



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสมบัติเชิงกลของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง โดยใช้เทคนิคทางแสง

The investigation of mechanical properties of cultured cancer cells by using optical method

ประธาน บวรณศิริ

b. 12827502

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 145192
รับเดือน.ปี 31 ส.ค. 2560

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณรายได้คณะฯ ประจำปีงบประมาณ 2558

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การศึกษาสมบัติเชิงกลของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงโดยใช้เทคนิคทางแสง
แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้ ประเภท ส่งเสริมนักวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2557 ถึง กันยายน 2558
ชื่อ – สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. ประธาน บุรณศิริ
ภาควิชาฟิสิกส์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ในการวิจัยนี้ ภาพเฟสของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่จะถูกคำนวณและสร้างขึ้นจากเทคนิคของดิฟฟิราโทกราฟีซึ่งจะบันทึกข้อมูลทั้งความเข้มและเฟสของภาพไว้ รวมทั้งการใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์ที่เรียกว่า สมการการส่งผ่านความเข้ม (Transport of Intensity Equation: TIE) ซึ่งใช้การแปลงฟูเรียร์และการใช้เงื่อนไขขอบเขต สมการการส่งผ่านความเข้มแบบเดิมที่ระยะไมโฟกัสหลายๆ ค่าจะถูกใช้ในการหาค่าที่เหมาะสมของระยะก่อนและหลังโฟกัสเพื่อที่จะได้ภาพเฟสของเซลล์มะเร็งที่มีความแม่นยำ ระยะไมโฟกัสที่ 2 และ 3 ไมโครเมตรแสดงภาพเฟสที่ดีขณะที่ระยะไมโฟกัสอื่นๆ ให้ผลที่ไม่ดี สมการการส่งผ่านความเข้มแบบปรับปรุงซึ่งใช้ภาพไมโฟกัส 4 และ 6 ภาพถูกนำมาประยุกต์ใช้และแสดงภาพเฟสที่ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสมการการส่งผ่านความเข้มแบบเดิม ผลของสมการการส่งผ่านความเข้มแบบปรับปรุงแสดงรูปร่างของเซลล์ที่ชัดเจนแม่นยำและยังแยกชั้นของเซลล์ได้ดีด้วย

คำสำคัญ: ภาพเฟส, ดิฟฟิราโทกราฟี, สมการการส่งผ่านความเข้ม

Research Title : The investigation of mechanical properties of cultured cancer cells by using optical method

Researcher : Asst. Prof. Dr. Prathan Buranasiri

Department of Applied Physics, Faculty of Science,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

ABSTRACT

In this research, the phase images of the colorectal cancer cells are calculated and constructed from the digital holography technique, which record the intensity and phase information of the image, and the mathematical method called Transport of Intensity Equation (TIE), which uses Fourier transform and the boundary condition. The traditional TIE in vary range of defocus is used to optimize the over- and under focus distance in order to retrieve precisely phase images of the cells. The 2 and 3 micrometer of defocus distances show the good phase image while the others result in poor condition. The modify TIE with 4 and 6 images of defocus is applied and they present the improvement of the phase comparing with the traditional one. The results of modify TIE show the precisely shape of the cells and also the clearly plane separation of the cells.

Keywords: phase image, digital holography, transport of intensity equation

กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้เป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัยการศึกษาสมบัติเชิงกลของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงโดยใช้เทคนิคทางแสง ผู้ดำเนินโครงการวิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่เล็งเห็นความสำคัญของงานวิจัยและให้เงินทุนวิจัยจากแหล่งทุนงบประมาณเงินรายได้ ประเภทส่งเสริมนักวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2558

ผศ.ดร. ประธาน บุณศิริ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	1
1.4 ระเบียบวิธีวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 การแทรกสอด (interference)	3
2.2 การเลี้ยวเบน (Diffraction of Wave)	4
2.3 โฮโลแกรม (Hologram)	5
2.3.1 วิธีการทำงานของโฮโลกราฟีและโฮโลแกรม	6
2.3.2 หลักการสร้างภาพ (Reconstruction) ของโฮโลแกรม	6
2.3.3 ดิจิตอลโฮโลแกรม	7
2.3.4 หลักการอ่านภาพ (Reconstruction) ของโฮโลแกรม โดยวิธี Angular spectrum	7
2.4 สมการการส่งผ่านความเข้มแสง (Transport of intensity equation)	9
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	11
3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง	11
3.2 การจัดเครื่องมือโฮโลกราฟีแบบดิจิตอล	11
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	13
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	14
4.1 จำนวนภาพ 2 ภาพ (1 st order TIE)	14
4.1.1 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 1 ไมโครเมตร	14
4.1.2 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 2 ไมโครเมตร	16
4.1.3 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 3 ไมโครเมตร	18
4.1.4 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 4 ไมโครเมตร	20
4.1.5 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 5 ไมโครเมตร	22
4.1.6 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 6 ไมโครเมตร	24
4.1.7 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 7 ไมโครเมตร	26

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.1.8 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 8 ไมโครเมตร	28
4.1.9 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 9 ไมโครเมตร	30
4.1.10 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 10 ไมโครเมตร	32
4.2 จำนวนภาพ 4 ภาพ (2 nd order TIE)	34
4.2.1 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 2 ไมโครเมตร	34
4.2.2 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 3 ไมโครเมตร	35
4.3 จำนวนภาพ 6 ภาพ (3 rd order TIE)	36
4.3.1 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 2 ไมโครเมตร	36
4.3.2 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 3 ไมโครเมตร	37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	38
เอกสารอ้างอิง	40



สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	รูปแสดงการแทรกสอดของคลื่นแบบเสริม	3
2.2	รูปแสดงการแทรกสอดของคลื่นแบบหักล้าง	4
2.3	รูปแสดงการแทรกสอดของคลื่นแสง	4
2.4	รูปการเลี้ยวเบนของคลื่น	5
2.5	รูปแสดงการสร้างภาพโฮโลแกรม	6
2.6	รูปแสดงการอ่านของภาพโฮโลแกรม	7
3.1	การจัดเครื่องมือโฮโลกราฟีแบบดิจิทัล	11
3.2	แหล่งกำเนิดแสงจากไฟฉาย LED	12
3.3	เซลล์มะเร็ง HT-29	12
3.4	ฐานเลื่อนความละเอียด 1 ไมโครเมตร	12
3.5	เลนส์วัตถุกำลังขยาย 20x	13
3.6	กล้อง CCD	13
4.1	(ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 1 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 1 ไมโครเมตร	14
4.2	ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 1 ไมโครเมตร	14
4.3	(ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 1 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 1 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.1	15
4.4	ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 1 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.1	15
4.5	(ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 2 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 2 ไมโครเมตร	16
4.6	ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร	16
4.7	(ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 2 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 2 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.5	17
4.8	ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.5	17
4.9	(ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 3 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 3 ไมโครเมตร	18
4.10	ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร	18
4.11	(ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 3 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 3 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.9	19
4.12	ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.9	19
4.13	(ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 4 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 4 ไมโครเมตร	20
4.14	ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 4 ไมโครเมตร	20
4.15	(ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 4 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 4 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.13	21
4.16	ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 4 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.13	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.41	(ก) ภาพที่ระยะโฟกัส (ข) ความแตกต่างของภาพ ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร จำนวน 4 ภาพ	34
4.42	ภาพเฟสที่คำนวณได้จาก 2 nd order TIE ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร	34
4.43	(ก) ภาพที่ระยะโฟกัส (ข) ความแตกต่างของภาพ ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร จำนวน 4 ภาพ	35
4.44	ภาพเฟสที่คำนวณได้จาก 2 nd order TIE ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร	35
4.45	(ก) ภาพที่ระยะโฟกัส (ข) ความแตกต่างของภาพ ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร จำนวน 6 ภาพ	36
4.46	ภาพเฟสที่คำนวณได้จาก 3 rd order TIE ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร	36
4.47	(ก) ภาพที่ระยะโฟกัส (ข) ความแตกต่างของภาพ ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร จำนวน 6 ภาพ	37
4.48	ภาพเฟสที่คำนวณได้จาก 3 rd order TIE ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร	37



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

การศึกษาสมบัติเชิงกลของสิ่งมีชีวิตเป็นสิ่งสำคัญในการวิเคราะห์ลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็น ลักษณะโครงสร้าง การเคลื่อนที่ และความยืดหยุ่นของสิ่งมีชีวิตนั้น เพื่อนำมาแก้ปัญหาในด้านอุตสาหกรรม อาหาร การเกษตร รวมไปถึงทางการแพทย์ ตลอดหลายทศวรรษที่ผ่านมาการศึกษาสมบัติเชิงกลของเซลล์ สิ่งมีชีวิตมักจะใช้เทคนิคที่หลากหลายทางชีววิทยา ทางเคมี และทางฟิสิกส์ ซึ่งการศึกษาสมบัติของเซลล์เชิงฟิสิกส์นี้จะอยู่ในสาขาวิจัยที่เรียกว่า ชีวฟิสิกส์ (Biophysics) เริ่มมีความแพร่หลายอย่างมาก โดยสมบัติของเซลล์ในทางฟิสิกส์ที่นิยมศึกษากันคือ สมบัติเชิงกล (Mechanical properties) ของเซลล์ซึ่งได้แก่การศึกษา การเคลื่อนที่ ความยืดหยุ่น รวมไปถึงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ด้วย การศึกษาสมบัติเชิงกลของเซลล์นี้ทำได้หลายวิธี ซึ่งวิธีที่นิยมได้แก่ กล้องจุลทรรศน์แรงดันอะตอม (Atomic Force Microscope: AFM), คีมจับเชิงแม่เหล็ก (Magnetic tweezers), เครื่องตรวจแรงดันในเซลล์เมมเบรน (Bio-membrane force probe), ระบบคีมจับเชิงแสง (Optical tweezers) เป็นต้น แต่ระบบที่กล่าวมาในข้างต้นมีความยุ่งยาก ซับซ้อนในการจัดเครื่องมือและเครื่องมือบางชนิดมีราคาที่สูง ดังนั้นในการวิจัยนี้ จะใช้ระบบทางแสงอย่างง่าย คือ โฮโลกราฟีแบบดิจิทัล (Digital Holography: DH) ร่วมกับการวิเคราะห์ทางคณิตศาสตร์ คือ สมการ การส่งผ่านความเข้มแสง (Transport of Intensity Equation: TIE) มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทั้ง ภายในและภายนอกของเซลล์สิ่งมีชีวิต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาและปรับปรุงระบบโฮโลกราฟีแบบดิจิทัล (DH)
- 2) เพื่อศึกษาและพัฒนาสมการการส่งผ่านความเข้มของแสง (TIE)
- 3) เพื่อศึกษาลักษณะเบื้องต้นของเซลล์มะเร็งโดยใช้ระบบโฮโลกราฟีแบบดิจิทัลกับสมการการส่งผ่านความเข้มของแสง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้จะปรับปรุงระบบโฮโลกราฟีแบบดิจิทัลโดยใช้สมการการส่งผ่านความเข้มของแสงเพื่อดู ลักษณะเบื้องต้นของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยการแสดงเป็นภาพเฟสของเซลล์มะเร็งโดยใช้สมการการส่งผ่านความเข้มของแสงแบบต่างๆ

1.4 ระเบียบวิธีวิจัย

- 1) ศึกษาและปรับปรุงระบบโฮโลกราฟีแบบดิจิทัล
- 2) ศึกษาการใช้สมการการส่งผ่านความเข้มของแสงในการแสดงภาพเฟส
- 3) เขียนโปรแกรม
- 4) ดำเนินเรื่องการขอใช้เซลล์มะเร็งและศึกษาวิธีการทดลองอย่างปลอดภัย
- 5) ทำการทดลอง และสรุปผลการทดลอง
- 6) เขียนรายงานวิจัย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถแสดงลักษณะภายในและภายนอกของเซลล์สิ่งมีชีวิตได้โดยใช้เครื่องมือที่ไม่ซับซ้อน ซึ่งสามารถต่อยอดพัฒนาในการวิเคราะห์ลักษณะของเซลล์มะเร็งเพื่อใช้ในการรักษาหรือใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 การแทรกสอด (Interference)

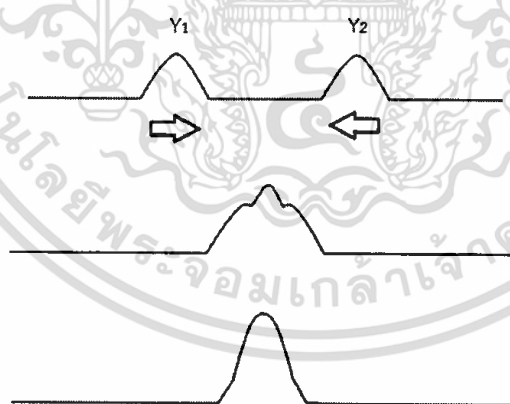
การแทรกสอด คือ การที่คลื่นสองคลื่นหรือมากกว่าที่อยู่ในตัวกลางเดียวกัน เมื่อมารวมกันแบบหักล้างหรือแบบเสริมกันที่ตำแหน่งใดๆ ก็จะเป็นไปตามหลักการทับซ้อน (Principle of superposition) ซึ่งกล่าวว่า “ถ้าคลื่นสองคลื่นใดๆ หรือมากกว่าเคลื่อนที่มาพร้อมกันในตัวกลางเดียวกัน ผลรวมของคลื่นทั้งสอง ณ จุดใดๆ จะมีค่าเท่ากับผลบวกของแอมพลิจูดของฟังก์ชันคลื่นทั้งสอง ณ จุดนั้น” โดยสมการการแทรกสอดคือ

$$Y_1 + Y_2 + \dots \quad (2.1)$$

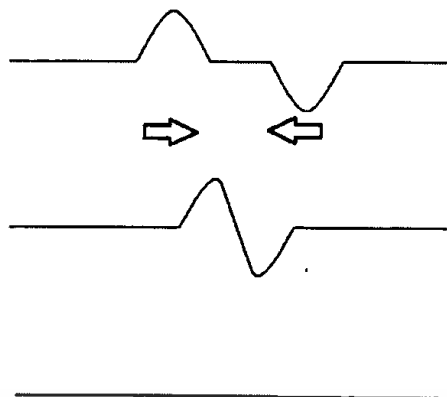
เมื่อ Y_1 และ Y_2 เป็นแอมพลิจูดของคลื่น Y_2 มีทิศทางเหมือนดังรูปที่ 2.1 ก็จะเป็นบวก แต่ถ้าทิศทางจะเป็นลบ

$$Y_1 - Y_2 - \dots \quad (2.2)$$

เมื่อพิจารณาผลต่างเฟส ถ้าคลื่นทั้งสองมีเฟสตรงข้ามกัน (Out of phase) จะเกิดการแทรกสอดแบบหักล้าง (Destructive interference) และถ้าคลื่นทั้งสองมีเฟสตรงกัน (in phase) จะเกิดการแทรกสอดแบบเสริม (constructive interference)

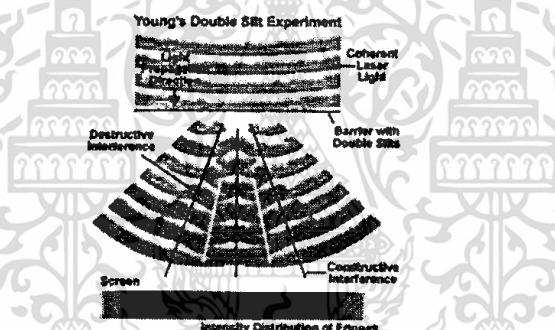


รูปที่ 2.1 แสดงการแทรกสอดของคลื่นแบบเสริม



รูปที่ 2.2 แสดงการแทรกสอดของคลื่นแบบหักล้าง

ถ้าแหล่งกำเนิดเป็นคลื่นแสงทั้งสองแหล่งกำเนิดหรือมากกว่า กำเนิดคลื่นแสงที่มีเฟสสัมพันธ์กันคงที่ตลอดเวลาซึ่งเรียกว่า แสงโคฮีเรนต์ (Coherent light) โดยความสว่างของแสงรวมจะไม่สม่ำเสมอ กล่าวคือเกิดกับแถบที่มีความสว่างน้อยและความสว่างมากหรือแถบมืดและแถบสว่าง ที่เรียกว่า ริ้วการแทรกสอด (Interference fringes)



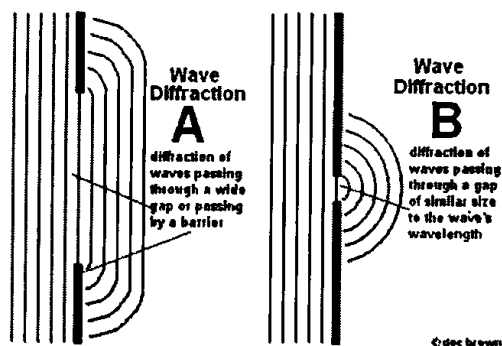
รูปที่ 2.3 แสดงการแทรกสอดของคลื่นแสง

การแทรกสอดของคลื่นจะเกิดขึ้นได้นั้น คลื่นที่รวมกันจะต้องมีความยาวคลื่นเท่ากัน และการแทรกสอดจะดำรงอยู่ได้อย่างเท่ากันนั้น คลื่นที่รวมกันจะต้องมีความสัมพันธ์กันทางเฟสคงที่ คลื่นที่มีความสัมพันธ์กันทางเฟสคงที่นี้ เรียกว่า โคฮีเรนต์ (Coherence) ถ้าคลื่นจากสองแหล่งไม่มีเฟสที่สัมพันธ์กัน เรียกว่า อินโคฮีเรนต์ (Incoherence)

2.2 การเลี้ยวเบน (Diffraction)

การที่คลื่นเคลื่อนที่ผ่านขอบหรือช่องเล็กๆ ก็จะทำให้เกิดการเลี้ยวเบนของคลื่นผ่านขอบหรือช่องนั้นได้ โดยใช้หลักของฮอยเกนส์ ซึ่งกล่าวไว้ว่า “ทุก ๆ จุดบนหน้าคลื่นอาจถือได้ว่าเป็นจุดกำเนิดคลื่นใหม่ที่ให้คลื่นความยาวคลื่นเดิมและเฟสเดียวกัน” หากคลื่นผ่านช่องที่มีขนาดมากกว่าความยาวคลื่นจะทำให้เกิดการแทรกสอดของคลื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงการเลี้ยวเบนของคลื่น

2.3 โฮโลกราฟี (Holography)

โฮโลกราฟี คือ กระบวนการสร้างภาพโฮโลแกรม ซึ่งเป็นภาพที่บันทึกลงบนฟิล์มหรือแผ่นเคลือบด้วยสารสำหรับบันทึกแสง ซึ่งผ่านเทคนิคการบันทึกด้วยการใช้แสงที่มีหน้าคลื่นสอดคล้องกัน (Coherence) เช่น แสงเลเซอร์ โฮโลกราฟีเป็นเทคนิคที่ช่วยให้แสงกระจายจากวัตถุที่จะบันทึกและได้ถูกสร้างขึ้นใหม่ต่อมา เพื่อให้ปรากฏเป็นวัตถุอยู่ในตำแหน่งเดิมเมื่อเทียบกับการบันทึก การเปลี่ยนแปลงรูปแบบตำแหน่งและทิศทางของระบบการมองเห็นช่วยให้แสงกระจายจากวัตถุที่จะบันทึกและได้ถูกสร้างขึ้นใหม่ เพื่อให้ปรากฏเป็นวัตถุอยู่ในตำแหน่งเดิมเมื่อเทียบกับการบันทึก “โฮโลแกรม ก็คือ บันทึกของรูปแบบการแทรกสอดของลำแสง ที่มีหน้าคลื่นสอดคล้องกัน 2 ลำ” ภาพที่ถูกสร้างขึ้นมาจากแสงเลเซอร์ โดยบันทึกริ้วรอยของการแทรกสอด (Interference pattern) ของแสงเลเซอร์ ทำให้เราสามารถมองเห็นภาพที่แตกต่างจากภาพทั่วไป ซึ่งไม่มีความลึกทางมิติของภาพ โดยภาพที่ได้จะเป็นภาพแบนๆ เรียบๆ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกันจะพบว่าภาพที่มาจากการบันทึกโดยเทคนิคโฮโลแกรมนั้นจะดูสวยงามมากขึ้นและยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆ อีกด้วย

โฮโลแกรมนี้นักค้นพบโดยเดนนิส กาเบอร์ (Dennis Gabor, 1900-1979) วิศวกรไฟฟ้าชาวฮังการี ในวันที่อีสเตอร์ ปี ค.ศ. 1947 โดยกาเบอร์ได้ค้นพบหลักการของโฮโลกราฟีโดยบังเอิญ ในระหว่างที่พัฒนาปรับปรุงคุณภาพของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่บริษัท British Thomson-Houston ที่เมือง Rugby ประเทศอังกฤษ จากการค้นพบนี้กาเบอร์ได้รับรางวัลโนเบลสาขาฟิสิกส์ในปี ค.ศ. 1971 เทคนิคที่คิดค้นเดิมยังใช้อยู่ในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่เป็นที่รู้จักกันในชื่อภาพสามมิติอิเล็กตรอน แต่ภาพสามมิติเป็นเทคนิคแสงซึ่งไม่ได้มีการพัฒนาอย่างจริงจัง จนกระทั่งมีการพัฒนาของเลเซอร์ในปี 1960

โฮโลแกรมแสงที่ใช้ได้จริงชิ้นแรกนั้นบันทึกอยู่ในรูปของวัตถุ 3D ซึ่งถูกสร้างขึ้นในปี 1962 โดย Yuri Denisyuk ในสหภาพโซเวียตและโดย Emmett Leith และ Juris Upatnieks ที่ University of Michigan ประเทศสหรัฐอเมริกา ความก้าวหน้าในเทคนิคการประมวลผลโฟโตเคมีคัลในการผลิตเพื่อแสดงภาพโฮโลแกรมที่มีคุณภาพสูง ซึ่งทำได้สำเร็จโดย Nicholas J. Phillips

โฮโลแกรมแบ่งได้เป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ 2 ประเภท คือ White-light hologram ซึ่งภาพโฮโลแกรมที่บันทึกนั้น สามารถมองเห็นได้ด้วยการส่องสว่างด้วยแสงสว่างจากธรรมชาติ และอีกประเภทหนึ่งคือ ภาพโฮโลแกรมที่ต้องถูกส่องสว่างด้วยแสงเลเซอร์หรือแสงที่มีสภาพหน้าคลื่นสอดคล้องกันในระดับหนึ่งถึงจะมองเห็นภาพ 3 มิติได้นอกจากนี้ยังอาจแบ่งโฮโลแกรมออกได้เป็น Transmission hologram, Reflection hologram, Image-plane hologram เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่โฮโลแกรมมีหลายชนิดนั้นสามารถทำได้ การส่งผ่านของโฮโลแกรมเช่นการผลิตโดย Leith และ Upatnieks ซึ่งถูกทำให้มองเห็นได้โดยส่องแสงเลเซอร์ผ่านวัตถุและมองภาพที่ถูกสร้างขึ้นใหม่จากโฮโลแกรม ด้านตรงข้ามของแหล่งที่มา การปรับแต่งภายหลังการหรือการส่งผ่านแถบสีโฮโลแกรมช่วยให้แสงสว่างโดยแสงสีขาวมากกว่าโดยเลเซอร์ แถบสีโฮโลแกรมเห็นได้ทั่วไปในปัจจุบันบนบัตรเครดิต ซึ่งเป็นคุณลักษณะด้านความปลอดภัยและในการบรรจุสินค้ารุ่นใหม่ของการส่งผ่านแถบสีโฮโลแกรมเกิดขึ้นโดยทั่วไป เป็นรูปแบบผิวในฟิล์มพลาสติกและวัตถุรวมเคลือบอะลูมิเนียมสะท้อนแสงที่ให้แสงสว่างจาก "ด้านหลัง" เพื่อสร้างภาพของวัตถุ

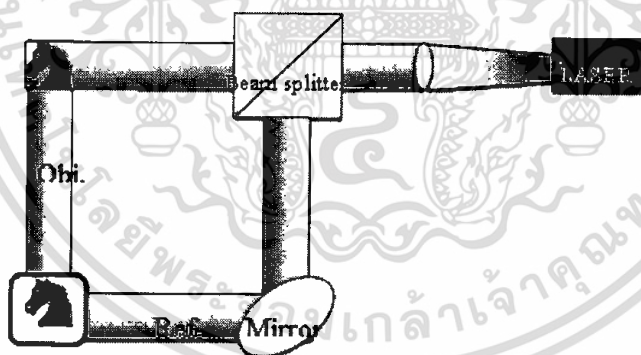
2.3.1 วิธีการทำงานของโฮโลกราฟีและโฮโลแกรม

ภาพโฮโลแกรมจะใช้หลักการสร้างภาพให้มีการแทรกสอดของแสงที่มากกระทบรูปภาพโดยการฉายแสงเลเซอร์จากแหล่งเดียวกัน แยกเป็น 2 ลำแสง ลำแสงหนึ่งเป็นลำแสงอ้างอิงเล็งตรงไปที่แผ่นฟิล์ม อีกหนึ่งลำแสงเล็งไปที่วัตถุและสะท้อนไปยังฟิล์ม แสงจากทั้งสองแหล่งจะถูกบันทึกไว้บนฟิล์มในรูปแบบของการแทรกสอด (Interference pattern) ซึ่งมองไม่คล้ายกับรูปของวัตถุต้นแบบ ก่อให้เกิดภาพเสมือน (Virtual image) ขึ้นมาตามมุมของแสงที่มากกระทบ ทำให้ตาของเรารับแสงอีกด้านหนึ่งของแผ่นโฮโลแกรมเกิดเห็นภาพ 3 มิติขึ้น

การสร้างโฮโลแกรมแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

1) การบันทึกภาพ (Recording of image) เป็นการบันทึกแถบการสอดแทรกเชิงซ้อน (Complex interference patterns) ซึ่งเกิดจากที่แต่ละแสงเลเซอร์ 2 ลำแสงซ้อนทับกันอยู่ (Superposition) แถบการสอดแทรกเชิงซ้อนนี้จะถูกบันทึกไว้บนฟิล์มถ่ายรูป (Photographic film)

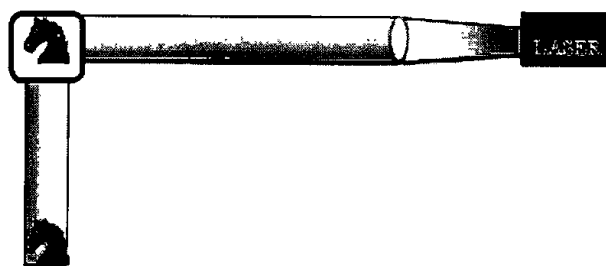
2) การสร้างภาพ (Reconstruction of image) เป็นการสร้างภาพ 3 มิติ ขึ้นจากฟิล์มถ่ายรูป



รูปที่ 2.5 การสร้างภาพโฮโลแกรม

2.3.2 หลักการสร้างภาพ (Reconstruction) โฮโลแกรม

การสร้างภาพโฮโลแกรมโดยใช้หลักการเดียวกันกับการบันทึกภาพโฮโลแกรม โดยจะต้องใช้แสงที่มีความยาวคลื่นค่าเดียวกับที่บันทึกและมุมเดียวกับมุมที่ถูกบันทึกเพื่อสร้างภาพที่ถูกบันทึกมา



รูปที่ 2.6 การสร้างภาพโฮโลแกรม

2.3.3 ดิจิตอลโฮโลแกรม

หลักการจะเหมือนกับโฮโลแกรมแต่จะต่างกันโดยที่เราจะบันทึกโดยใช้กล้องเป็นฉากรับภาพแทนแผ่นฟิล์มเราจึงเรียกว่าดิจิตอลโฮโลแกรม

2.3.4 หลักการสร้างภาพโฮโลแกรมโดยวิธี Angular spectrum

เป็นวิธีการที่ใช้การคำนวณทางคณิตศาสตร์เข้ามาอธิบายสนามทางแสงของระนาบการแพร่ของแสงรวมทั้งยังใช้ในการสร้างภาพขึ้นใหม่ในดิจิตอลโฮโลแกรม วิธีการนี้จะใช้ Fourier transform และ inverse Fourier transformation เพื่อสร้างดิจิตอลโฮโลแกรมเช่นเดียวกับวิธี Huygens convolution แต่จะมีข้อที่ด้อยกว่าคือระยะทางของการสร้างภาพใหม่ วิธีการ Angular Spectrum สามารถสร้างภาพขึ้นใหม่ได้อย่างถูกต้องในระยะทางที่วัตถุอยู่ใกล้ๆ เมื่อเทียบกับวิธีการของ Huygens convolution

สมมติว่าที่ระนาบ $z = 0$ คือที่ระนาบวัตถุ (ξ, η) และระนาบของสนามวัตถุคือ $O(\xi, \eta)$ และใช้ Fourier transform แบบ 2 มิติ จะได้ว่า

$$O'(f_\xi, f_\eta; 0) = F\{O(\xi, \eta, 0)\} \quad (2.3)$$

$$= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} O(\xi, \eta, 0) \exp[-j2\pi(f_\xi \xi + f_\eta \eta)] d\xi d\eta \quad (2.4)$$

และสามารถเขียน inverse Fourier transform ของ angular spectrum ได้ว่า

$$O(f_\xi, f_\eta; 0) = F^{-1}\{O'(f_\xi, f_\eta, 0)\} \quad (2.5)$$

$$= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} O'(f_\xi, f_\eta, 0) \exp[-j2\pi(f_\xi \xi + f_\eta \eta)] df_\xi df_\eta \quad (2.6)$$

โดยที่ f_ξ และ f_η เป็นส่วนประกอบของความถี่เชิงพื้นที่ (spatial frequency) โดยพิจารณาเป็นระนาบที่คลื่นแพร่ไปด้วยทิศแบบโคไซน์ (cosines) ส่วนประกอบของความถี่เชิงพื้นที่นั้นคือ

$$\alpha = \lambda f_\xi \beta = \lambda f_\eta \gamma = \sqrt{1 - (\lambda f_\xi)^2 - (\lambda f_\eta)^2} \quad (2.7)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขียน (2.6) ได้เป็น

$$O'(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}; 0) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} O(\xi, \eta, 0) \exp[-j2\pi(\frac{\alpha}{\lambda}\xi + \frac{\beta}{\lambda}\eta)] d\xi d\eta \quad (2.8)$$

หลังจากที่แพร่ไประยะทาง z เขียน (2.8) ได้เป็น

$$O'(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}; z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} O(\xi, \eta, 0) \exp[-j2\pi(\frac{\alpha}{\lambda}\xi + \frac{\beta}{\lambda}\eta)] \exp(-j\frac{2\pi}{\lambda}\gamma z) d\xi d\eta \quad (2.9)$$

$$= F\{O(\xi, \eta, 0) \exp(-j\frac{2\pi}{\lambda}\gamma z)\} \quad (2.10)$$

นำสมการที่ได้นั้นมาทำการหา inverse ของ Fourier transform

$$O'(x, y, z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} O(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, 0) \exp[-j2\pi(\frac{\alpha}{\lambda}\xi + \frac{\beta}{\lambda}\eta)] \exp(-j\frac{2\pi}{\lambda}\gamma z) d\frac{\alpha}{\lambda} d\frac{\beta}{\lambda} \quad (2.11)$$

$$= F^{-1}\{O'(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}; 0) \exp(-j\frac{2\pi}{\lambda}\gamma z)\} \quad (2.12)$$

เนื่องจากการแพร่ของคลื่นจากระนาบของวัตถุไปยังระนาบโฮโลแกรมด้วยระยะ z ดังนั้นสนามทางแสงบนระนาบโฮโลแกรมจะได้ว่า

$$\begin{aligned} h(x, y, z) &= O(x, y, z) \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} O'(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, 0) \exp[-j2\pi(\frac{\alpha}{\lambda}\xi + \frac{\beta}{\lambda}\eta)] \exp(-j\frac{2\pi}{\lambda}\gamma z) d\frac{\alpha}{\lambda} d\frac{\beta}{\lambda} \end{aligned} \quad (2.13)$$

$$= F^{-1}\{O'(\frac{\alpha}{\lambda}, \frac{\beta}{\lambda}, 0) \exp(-j\frac{2\pi}{\lambda}\gamma z)\} \quad (2.14)$$

$$= F^{-1}\{F\{O'(x, y, 0)\} \exp(-j\frac{2\pi}{\lambda}\gamma z)\} \quad (2.15)$$

ในทำนองเดียวกันสนามของแสงบนระนาบของการสร้างภาพขึ้นใหม่ $R(\xi', \eta')$ สามารถเขียนได้ในรูป inverse Fourier transform จากสนามโฮโลแกรม

$$R(\xi', \eta', z) = F^{-1}\{F\{h(x, y, 0)\} \exp(-j\frac{2\pi}{\lambda}\gamma z)\} \quad (2.16)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 สมการการส่งผ่านความเข้มแสง (Transport of intensity equation)

ความเข้มแสงและเฟสเป็นส่วนที่สำคัญในงานทางแสงด้านต่างๆ เช่น โทโมกราฟี (Tomography), ไมโครสโคปี (Microscopy) และ โฮโลกราฟี (Holography) ในส่วนของเฟสสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานได้หลายแบบ อาทิเช่น ลักษณะพื้นผิว ความหนา และขนาดของวัตถุที่นำมาวัด โดยทั่วไปการวัดค่าเฟสจะต้องมีเครื่องมือเฉพาะอย่างเช่น กล้องจุลทรรศน์บางชนิด หรือเซนเซอร์หน้าคลื่นแบบฮาร์แมน-แชค (Hartmann-Shack wave-front sensor) ในทางกลับกัน การวัดความเข้มแสงทำได้ง่ายๆ โดยใช้เพียงกล้องซีซีดี (CCD) หรือแม้แต่ตาของมนุษย์ก็ยังสามารถเห็นได้ ดังนั้นการหาค่าเฟสจากความเข้มแสงจึงเป็นวิธีการที่ง่ายโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อนเพียงแต่ใช้การแก้สมการทางคณิตศาสตร์ โดยสมการที่เป็นที่นิยมใช้คือ สมการการส่งผ่านความเข้มแสง นั่นเอง ซึ่งสมการนี้จะเริ่มต้นจากสมการคลื่นแสงสี่เหลี่ยม ความถี่ ω_0 ที่เคลื่อนไปในทิศ $+z$ ซึ่งเขียนได้เป็น

$$U(\vec{r}, z) = \tilde{U}(\vec{r}, z)e^{i(k_0 z - \omega_0 t)} \quad (2.17)$$

เมื่อ U คือ แอมพลิจูดเชิงซ้อน, \vec{r} คือ ระบายของการเคลื่อนที่ (x, y) และ $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ โดยที่ λ คือ ความยาวคลื่นที่ใช้ หากใช้การประมาณแบบพาราเซียล (Paraxial approximation), จะเขียนแอมพลิจูดเชิงซ้อน U ได้เป็น

$$\tilde{U}(\vec{r}, z) = \sqrt{I(\vec{r}, z)}e^{-i\varphi(\vec{r}, z)} \quad (2.18)$$

เมื่อ I และ φ คือความเข้มแสงและเฟส ตามลำดับ เมื่อแก้สมการ (2.17) และ (2.18) ร่วมกับสมการคลื่นจะเขียนสมการการส่งผ่านความเข้มแสง ได้เป็น

$$-k_0 \frac{\partial}{\partial z} I(\vec{r}, z) = \nabla_{\perp}^2 (I(\vec{r}, z)\varphi(\vec{r}, z)) \quad (2.19)$$

เมื่อ $\nabla_{\perp} = \frac{\partial}{\partial x} \hat{x} + \frac{\partial}{\partial y} \hat{y}$ และ \cdot คือ ผลคูณแบบดอท

ซึ่งพจน์ของการหาอนุพันธ์เทียบกับ z ในสมการ (2.19) เขียนได้เป็น

$$\frac{\partial}{\partial z} I(\vec{r}, z) \approx \frac{I(\vec{r}, z_0 + \Delta z) - I(\vec{r}, z_0 - \Delta z)}{\Delta z} \quad (2.20)$$

เมื่อ z_0 คือ ระยะโฟกัส และ Δz คือ ระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสที่สนใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อจำกัดของสมการการส่งผ่านความเข้มแสง คือ ความไม่เชิงเส้นของสมการ (2.20) กล่าวคือการได้ค่าสมการ (2.20) จะได้จากการประมาณระยะระหว่างโฟกัสซึ่งสมมติว่าความเข้มแสงเป็นแบบเชิงเส้น แต่ในความเป็นจริงจะเกิดการเลี้ยวเบนของแสงที่ระยะโฟกัสและระยะไม่โฟกัสทำให้เกิดความไม่เป็นเชิงเส้นขึ้น ส่งผลให้ภาพเฟสที่สร้างขึ้นมาไม่มีความคมชัด คุณภาพของภาพไม่ดีเท่าที่ควร

การแก้ไขปัญหานี้มีหลายวิธี ทั้งการใช้อนุกรมเทย์เลอร์, การใช้ polynomial fitting ทั้งในส่วนของเวลาและความถี่ และยังมีอีกวิธีซึ่งจะใช้ในงานวิจัยนี้คือการใช้น้ำหนักของภาพ (Image weight) โดยสมการคือ

$$\frac{\partial I(z)}{\partial z} \approx \frac{\sum_{i=1}^m (-1)^{i-1} a_i I_i(z_+) - \sum_{i=1}^n (-1)^{i-1} b_i I_i(z_-)}{\Delta z} \quad (2.21)$$

เมื่อ a_i และ b_i คือ ค่าน้ำหนักของภาพ, m คือ จำนวนภาพก่อนโฟกัส, n คือ จำนวนภาพหลังโฟกัส, z_+ และ z_- คือ ระยะก่อนและหลังโฟกัส ตามลำดับ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

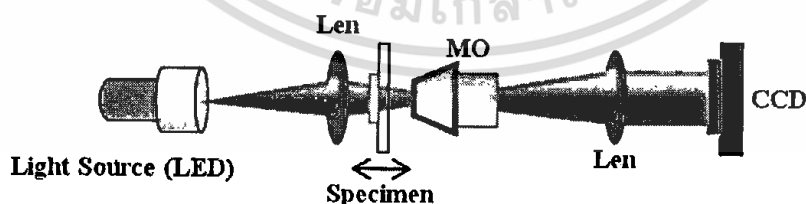
บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

- 1) ใช้ปิเปตดูดเซลล์มะเร็งออกจากขวดแก้วผสมเข้ากับอาหารของเซลล์ (DMEM: Debelco's modified eagle media, ซีรัมรกวัว 10% และเฟนิซิลิน 1 % ที่ผสมมาพร้อมกับสเตรปโตไมซิน) จำนวน 3 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง
- 2) ใช้เครื่องมือเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ให้ตกตะกอนออกจากสารละลาย
- 3) ดูดอาหารออกจากหลอดทดลอง และการทำความสะอาดเซลล์โดยจะใช้ PBS (Phosphate buffer saline) ความเข้มข้น 1% 5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปเหวี่ยงแยกสารอีกครั้ง
- 4) ดูด PBS ออกแล้วใส่อาหารเซลล์เข้าไปในบ่อเพาะเซลล์ซึ่งถูกเคลือบด้วยเจลาติน 2% จำนวน 800 มิลลิลิตร
- 5) ใช้กล้องจุลทรรศน์กับเลนส์กำลังขยาย 10 เท่า เพื่อสังเกตจำนวนการแบ่งตัวของเซลล์ โดยถ้าเซลล์มีการแบ่งตัวมากกว่า 70% แล้ว ก็สามารถที่จะนำไปใช้ในการทดลองได้ทันที และให้สังเกตสีของอาหารเซลล์ หากมีการเปลี่ยนไปให้รีบเปลี่ยนทันที
- 6) นำเซลล์ที่พร้อมใช้งานไปเพาะในตู้บ่อเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงใช้ปิเปตดูดเซลล์ขึ้นมาจากบ่อเพาะเซลล์ แล้วใส่เข้าไปในหลอดทดลองที่มีอาหารเซลล์ปริมาณ 3 มิลลิลิตร อยู่แล้ว
- 7) นำหลอดทดลองดังกล่าวไปเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการดูดอาหารเซลล์ออกอีกครั้ง จากนั้นจึงล้างเซลล์อีกรอบโดยใช้ PBS โดยครั้งนี้จะดูดขึ้น-ลง 2-3 ครั้ง แล้วก็เหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 8 นาที แล้วดูดอาหารเซลล์ออก
- 8) เตรียมอาหารเซลล์ปริมาณ 400 ไมโครลิตรเข้าไปในเซลล์ และดูดเซลล์จำนวน 4 ไมโครลิตรกับ PBS 36 ไมโครลิตรลงไปหลอดทดลองขนาดเล็ก

3.2 การจัดเครื่องมือโฮโลกราฟีแบบดิจิทัล



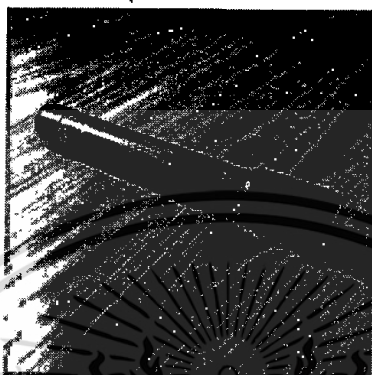
รูปที่ 3.1 การจัดเครื่องมือ

จากรูปที่ 3.1 แสงจากแหล่งกำเนิด LED จะถูกฉายผ่านไปยังเซลล์มะเร็งแล้วเข้าไปที่ MO (Microscope Objective) ในการวิจัยนี้จะทำการเลื่อนตำแหน่งของเซลล์มะเร็งโดยใช้ฐานเลื่อนความละเอียด 1 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อหาระยะโฟกัส และระยะก่อน-หลังโฟกัส จากนั้นจะนำมาคำนวณในสมการการส่งผ่านความเข้มแสงที่เขียนในโปรแกรมประมวลผล ซึ่งจะแสดงผลลัพธ์ออกมาเป็นภาพเฟส

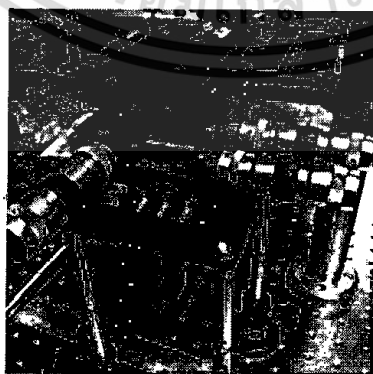
ในการวิจัยนี้ แสงจากไฟฉาย LED เป็นแสงขาวที่มีความยาวคลื่นประมาณ 550 นาโนเมตร เซลล์มะเร็งที่ใช้เป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (HT-29) ซึ่งบรรจุในแผ่นสไลด์แบบหลุม เลนส์วัตถุมีกำลังขยาย 100x



รูปที่ 3.2 แหล่งกำเนิดแสงจากไฟฉาย LED

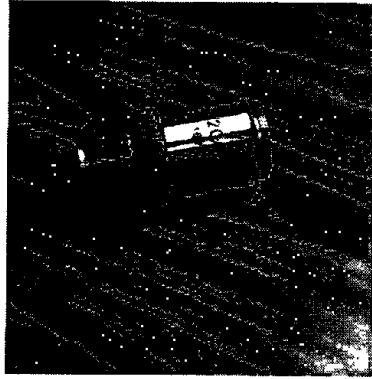


รูปที่ 3.3 เซลล์มะเร็ง HT-29

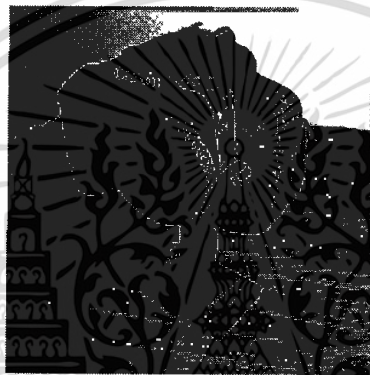


รูปที่ 3.4 ฐานเลื่อนความละเอียด 1 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.5 เลนส์วัตถุกำลังขยาย 20x



รูปที่ 3.6 กล้อง CCD

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย



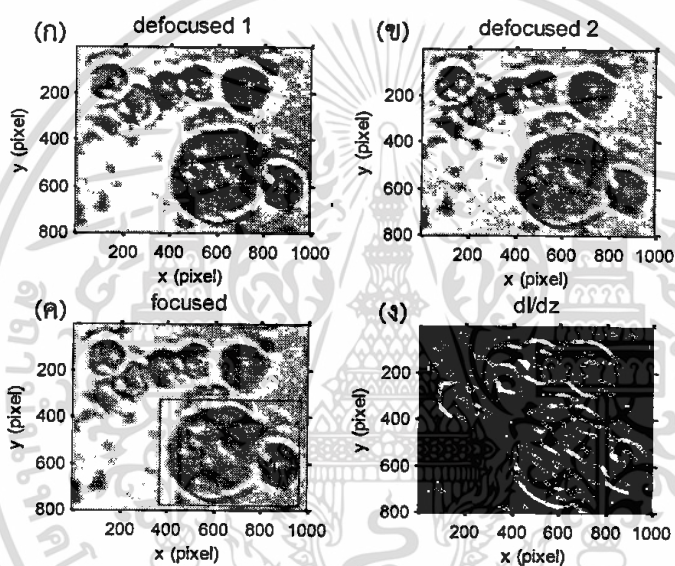
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย

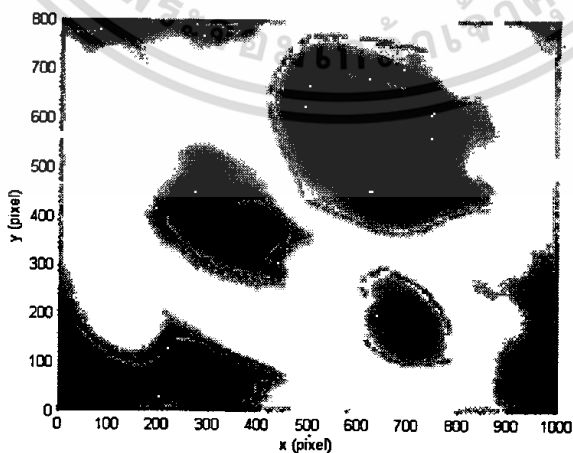
ในงานวิจัยนี้จะเปรียบเทียบภาพเฟสที่ได้จากระบบโฮโลกราฟีแบบดิจิทัลรวมกับสมการการส่งผ่านความเข้มแสง (สมการ 2.21) โดยจะกำหนดน้ำหนักของภาพและจำนวนภาพที่ต่างกันเพื่อหาภาพเฟสที่ดีที่สุดออกมา

4.1 จำนวนภาพ 2 ภาพ (1st order TIE)

4.1.1 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 1 ไมโครเมตร



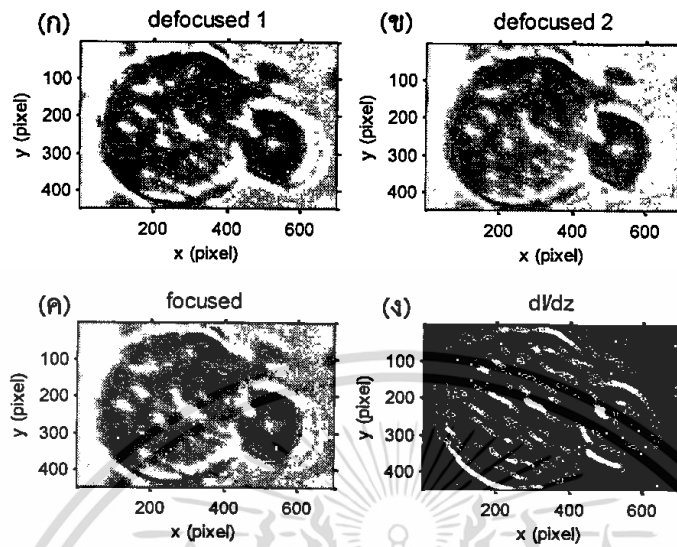
รูปที่ 4.1 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 1 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 1 ไมโครเมตร



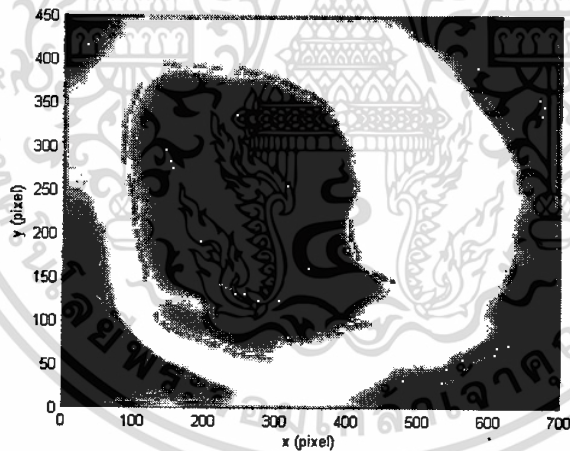
รูปที่ 4.2 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 1 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อขยายภาพในกรอบสีแดงของรูปที่ 4.1 จะได้ผลลัพธ์ดังนี้



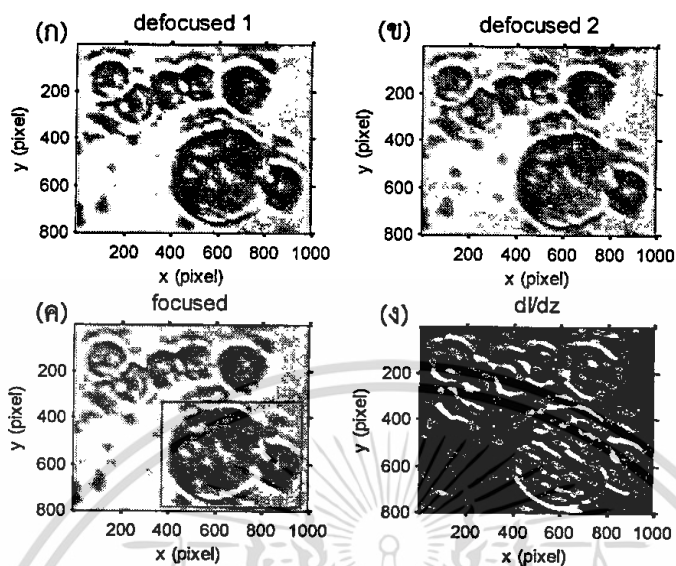
รูปที่ 4.3 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 1 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 1 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.1



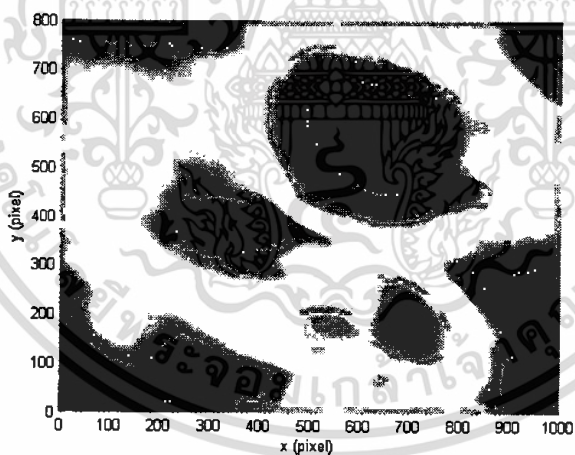
รูปที่ 4.4 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 1 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 2 ไมโครเมตร



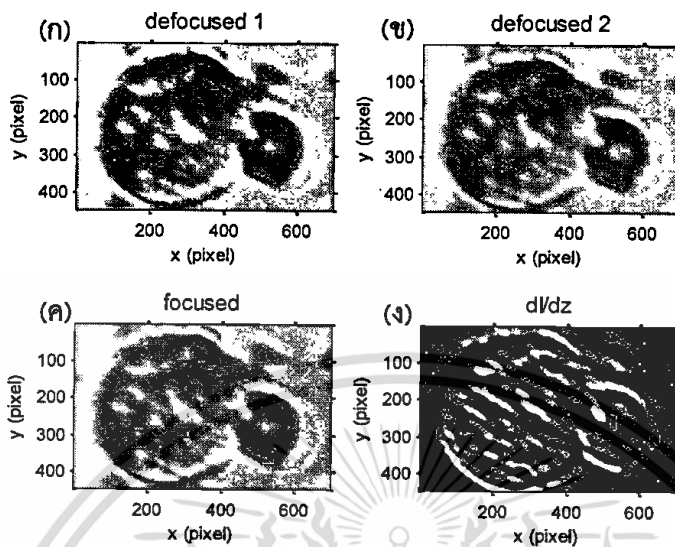
รูปที่ 4.5 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 2 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 2 ไมโครเมตร



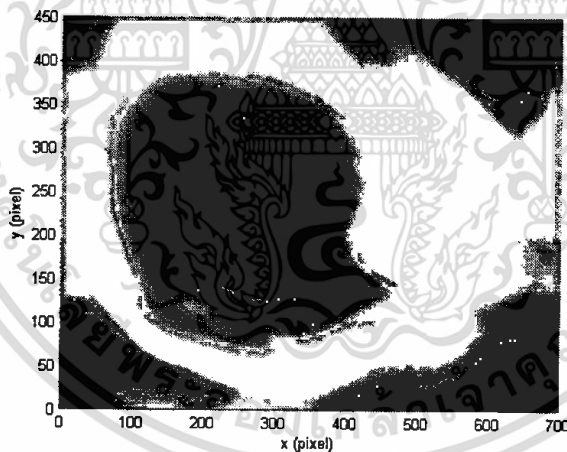
รูปที่ 4.6 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อขยายภาพในกรอบสีแดงของรูปที่ 4.5 จะได้ผลลัพธ์ดังนี้



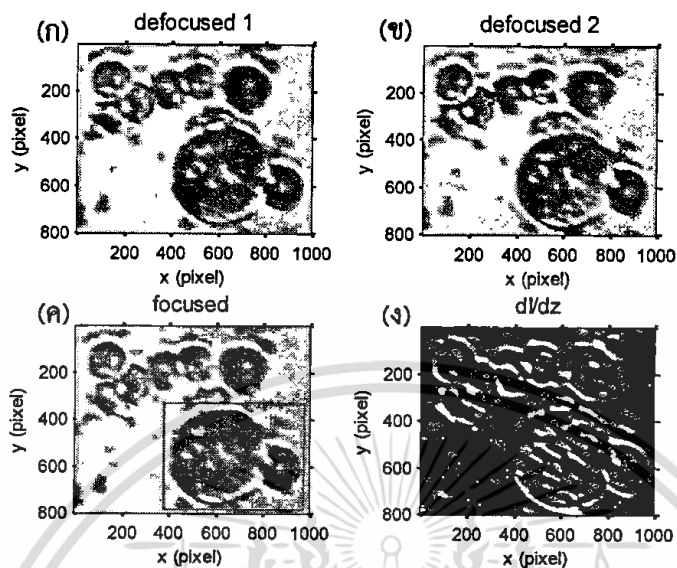
รูปที่ 4.7 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 2 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 2 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.5



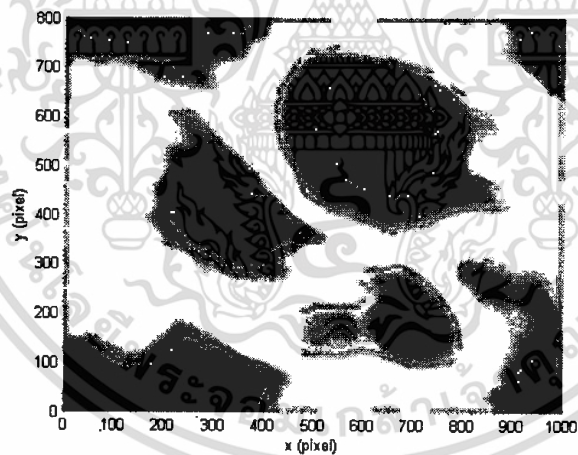
รูปที่ 4.8 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 3 ไมโครเมตร



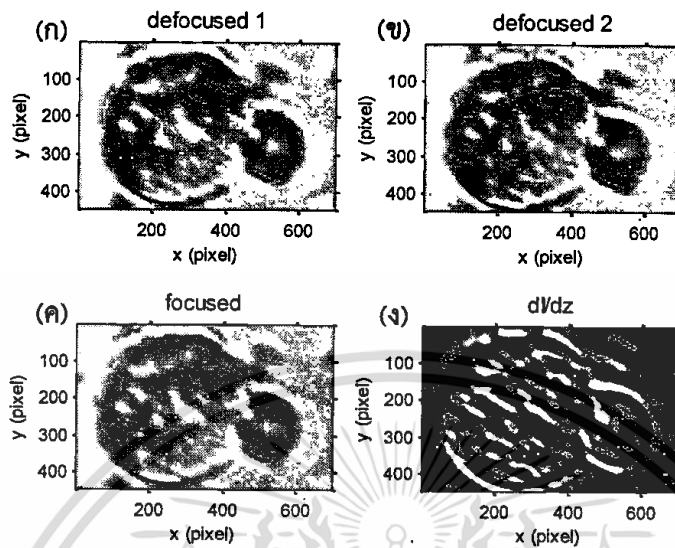
รูปที่ 4.9 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 3 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 3 ไมโครเมตร



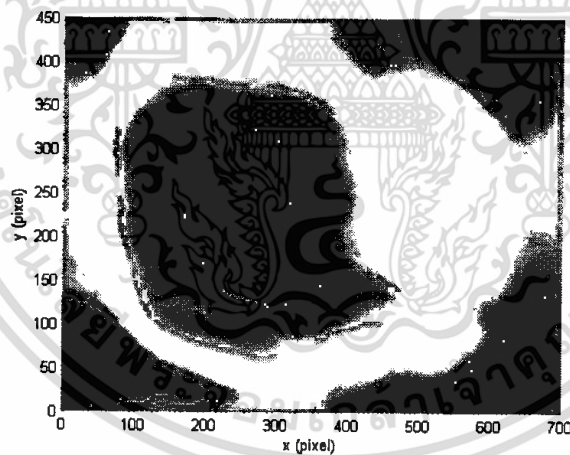
รูปที่ 4.10 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อขยายภาพในกรอบสีแดงของรูปที่ 4.9 จะได้ผลลัพธ์ดังนี้



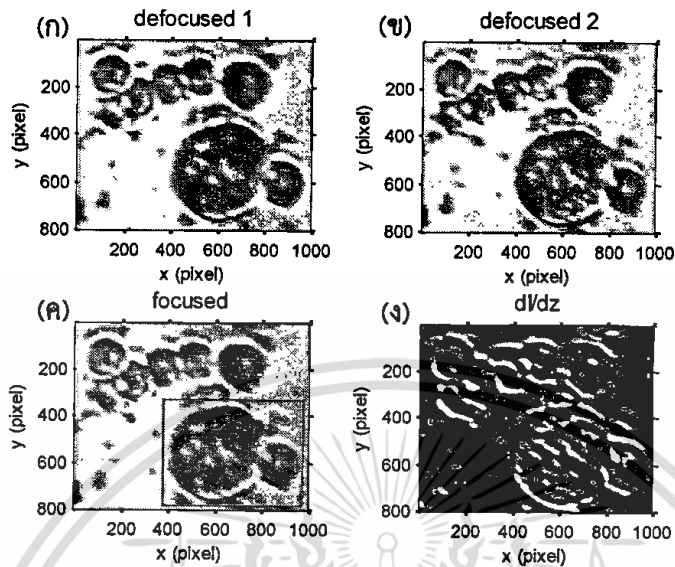
รูปที่ 4.11 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 3 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 3 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.9



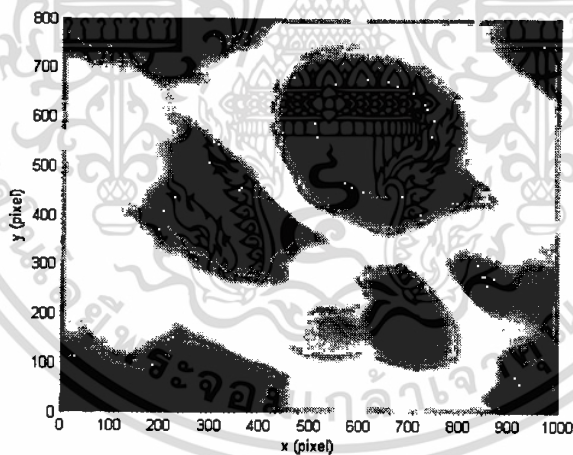
รูปที่ 4.12 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 4 ไมโครเมตร



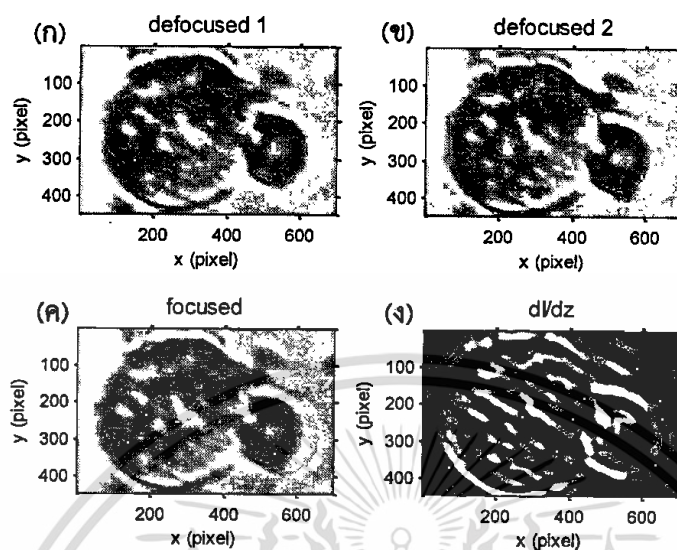
รูปที่ 4.13 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 4 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 4 ไมโครเมตร



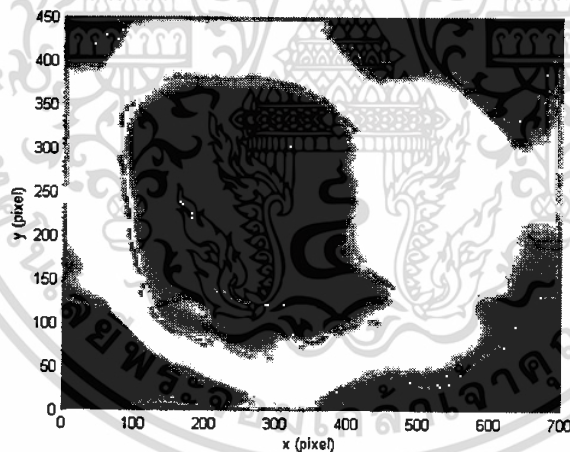
รูปที่ 4.14 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 4 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อขยายภาพในกรอบสีแดงของรูปที่ 4.13 จะได้ผลลัพธ์ดังนี้



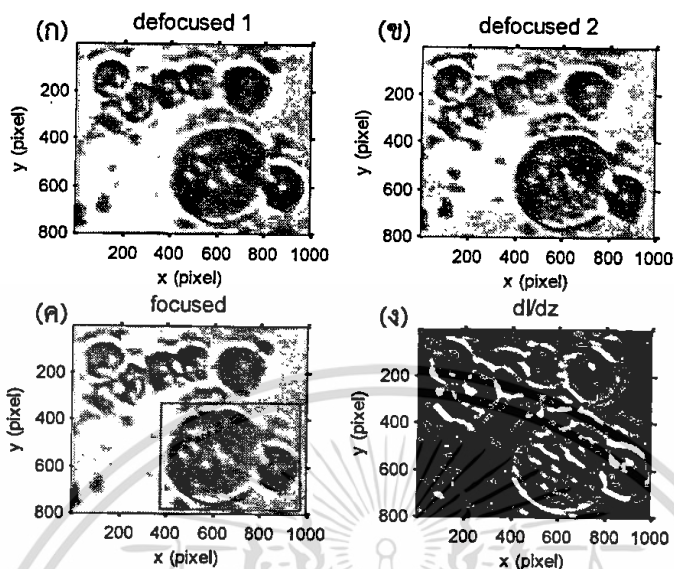
รูปที่ 4.15 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 4 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 4 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.13



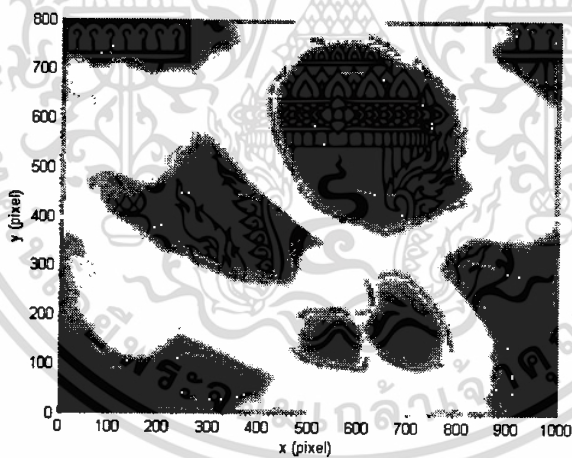
รูปที่ 4.16 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 4 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 5 ไมโครเมตร



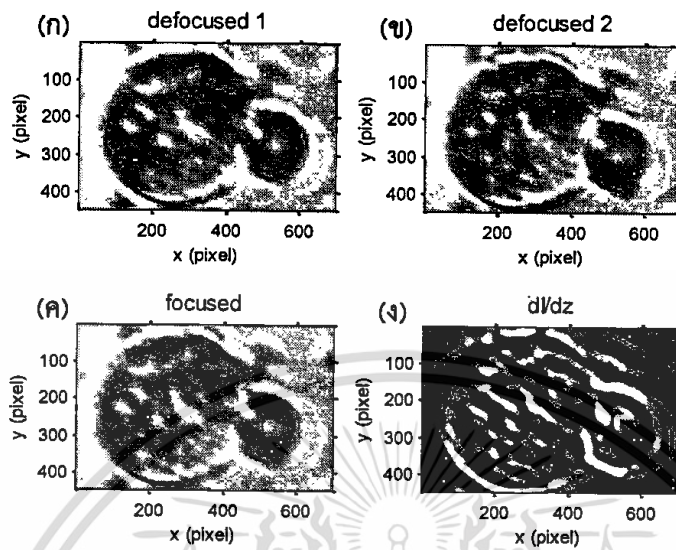
รูปที่ 4.17 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 5 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 5 ไมโครเมตร



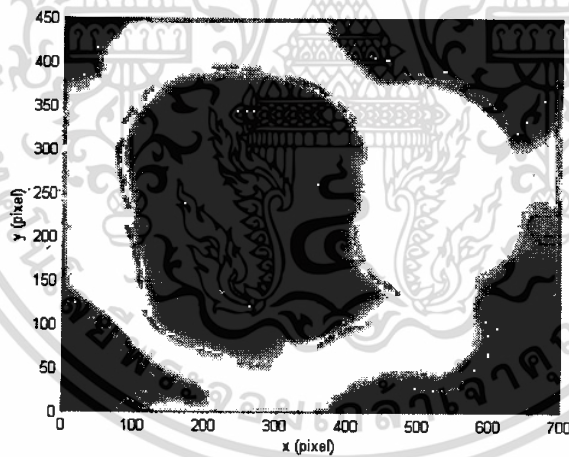
รูปที่ 4.18 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 5 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อขยายภาพในกรอบสีแดงของรูปที่ 4.17 จะได้ผลลัพธ์ดังนี้



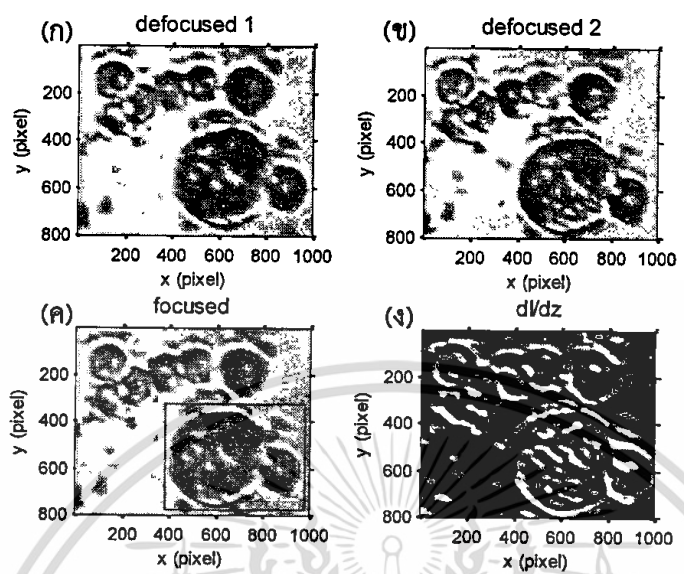
รูปที่ 4.19 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 5 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 5 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.17



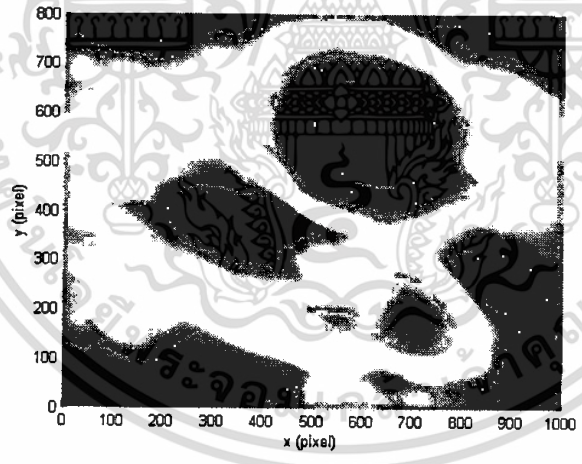
รูปที่ 4.20 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 5 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.6 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 6 ไมโครเมตร



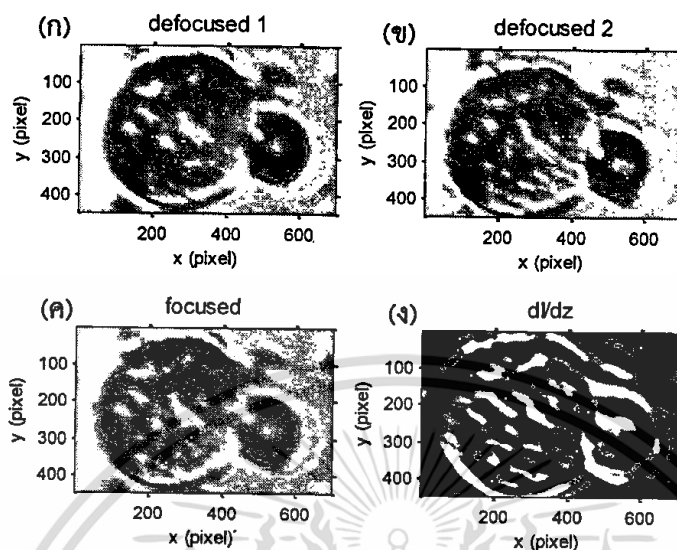
รูปที่ 4.21 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 6 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 6 ไมโครเมตร



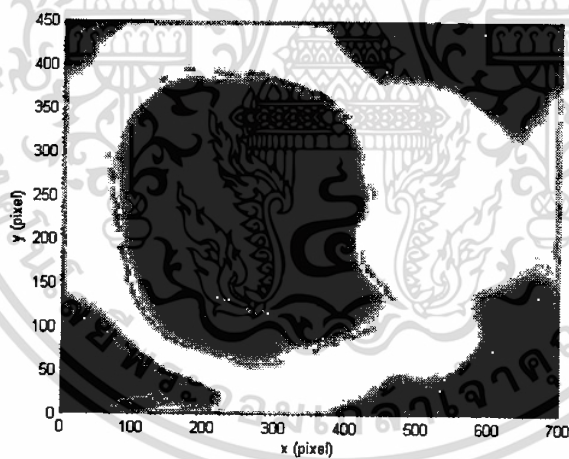
รูปที่ 4.22 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 6 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อขยายภาพในกรอบสีแดงของรูปที่ 4.21 จะได้ผลลัพธ์ดังนี้



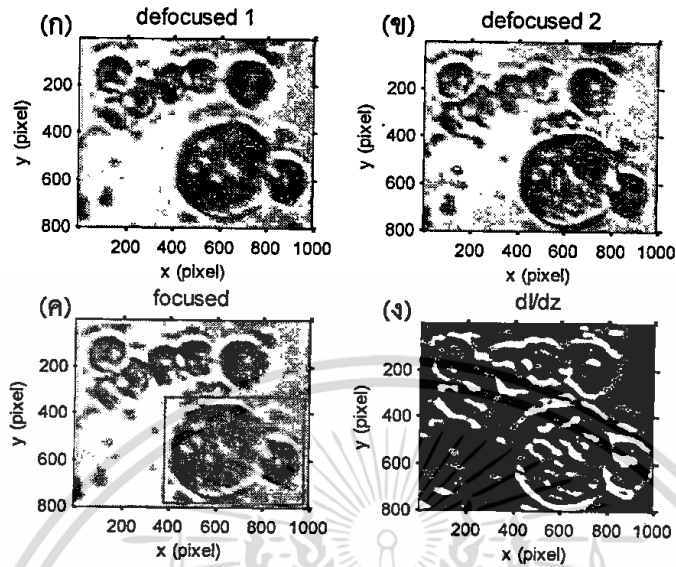
รูปที่ 4.23 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 6 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 6 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.21



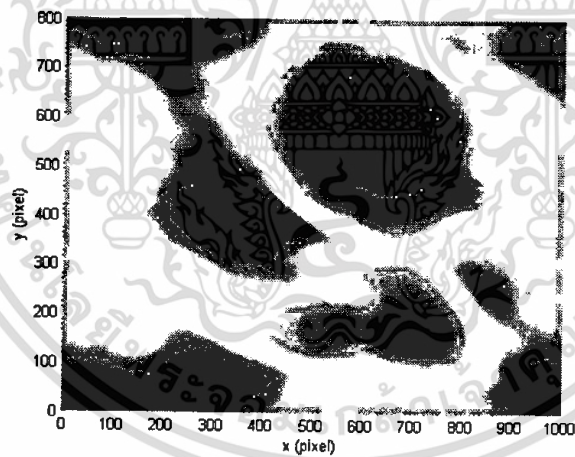
รูปที่ 4.24 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 6 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.7 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 7 ไมโครเมตร



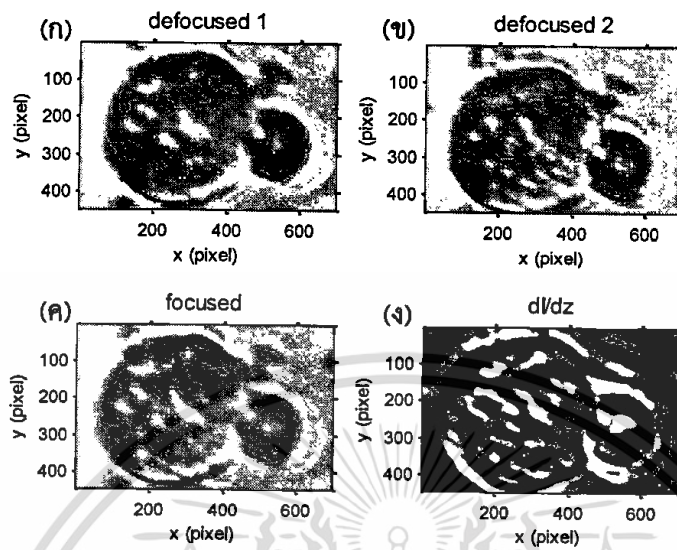
รูปที่ 4.25 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 7 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 7 ไมโครเมตร



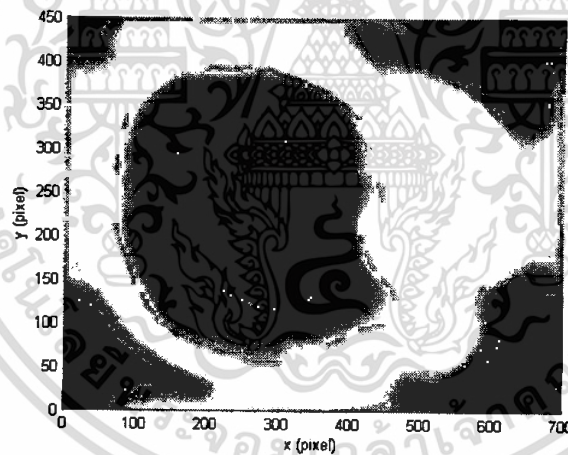
รูปที่ 4.26 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 7 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อขยายภาพในกรอบสีแดงของรูปที่ 4.25 จะได้ผลลัพธ์ดังนี้



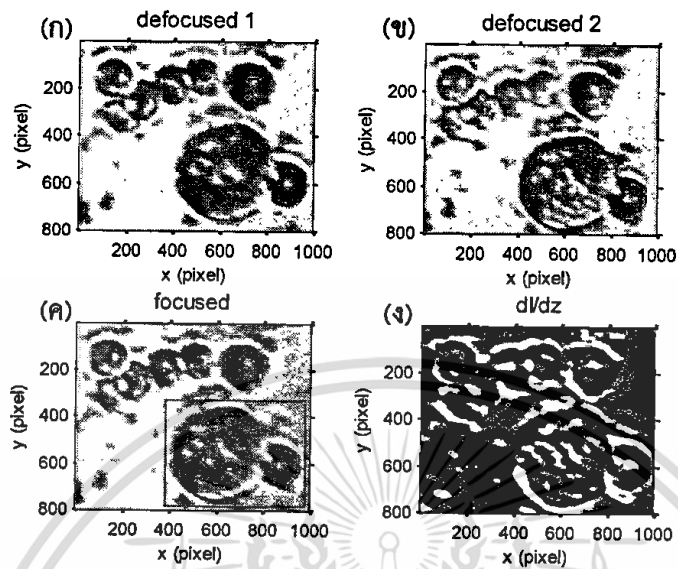
รูปที่ 4.27 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 7 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 7 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.25



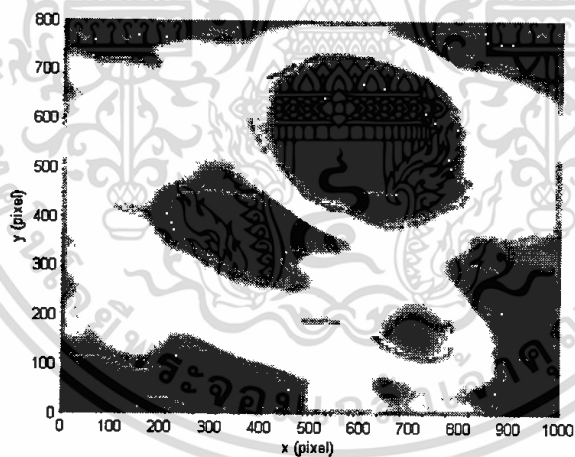
รูปที่ 4.28 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 7 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.8 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 8 ไมโครเมตร



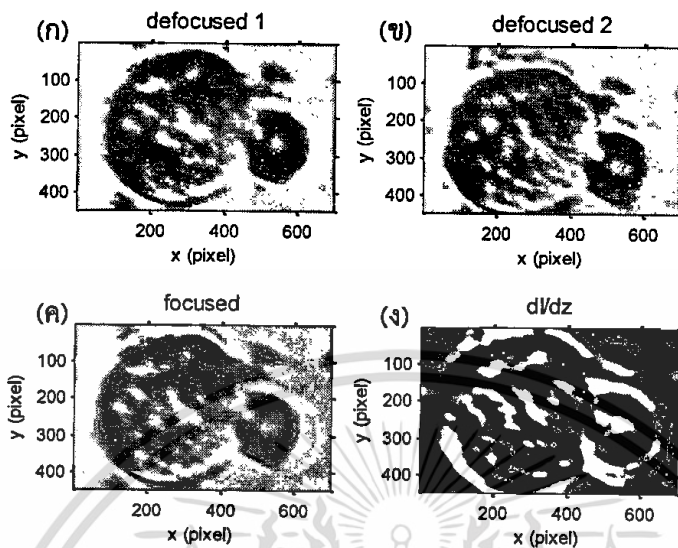
รูปที่ 4.29 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 8 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส
(ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 8 ไมโครเมตร



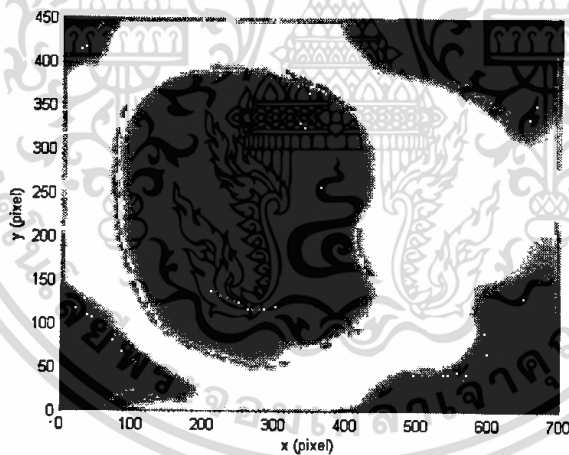
รูปที่ 4.30 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 8 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อขยายภาพในกรอบสีแดงของรูปที่ 4.29 จะได้ผลลัพธ์ดังนี้



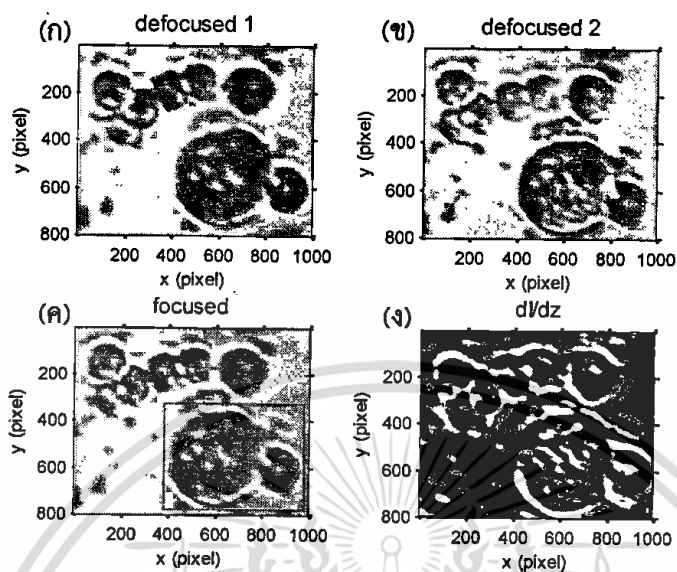
รูปที่ 4.31 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 8 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 8 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.29



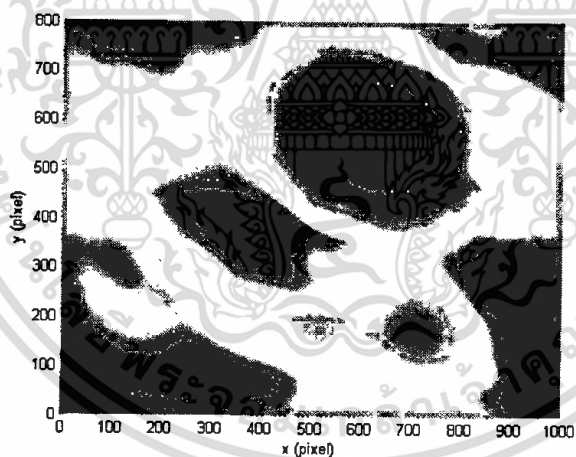
รูปที่ 4.32 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 8 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.9 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 9 ไมโครเมตร



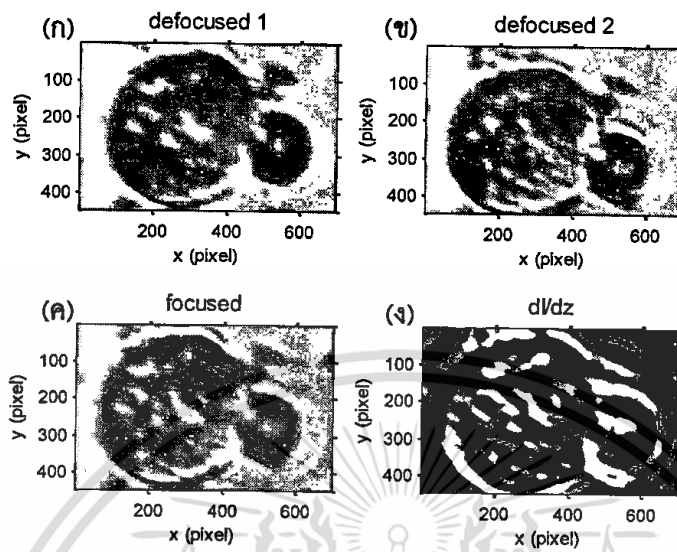
รูปที่ 4.33 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 9 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 9 ไมโครเมตร



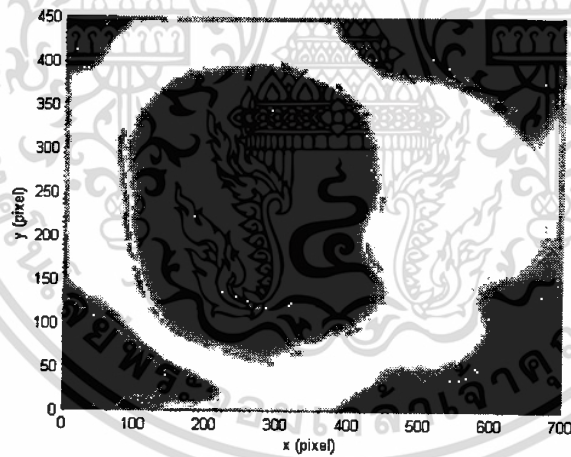
รูปที่ 4.34 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 9 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อขยายภาพในกรอบสีแดงของรูปที่ 4.33 จะได้ผลลัพธ์ดังนี้



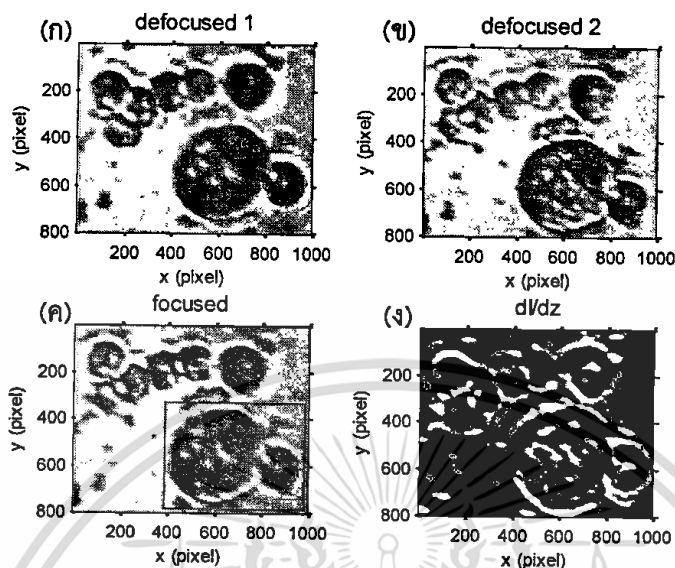
รูปที่ 4.35 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 9 ไมโครเมตร. (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 9 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.33



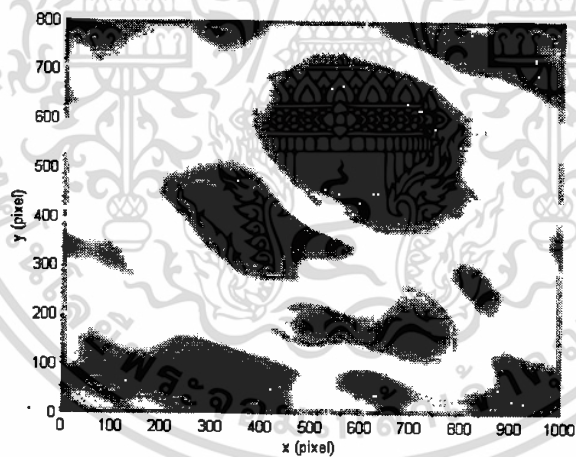
รูปที่ 4.36 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 9 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.10 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 10 ไมโครเมตร



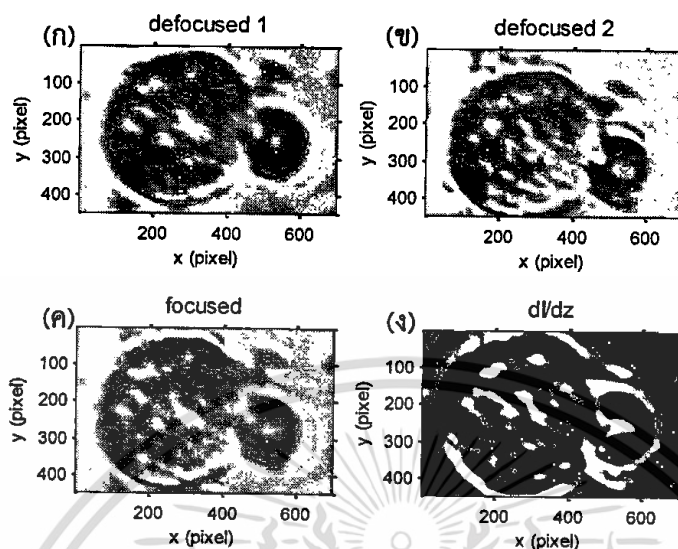
รูปที่ 4.37 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 10 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 10 ไมโครเมตร



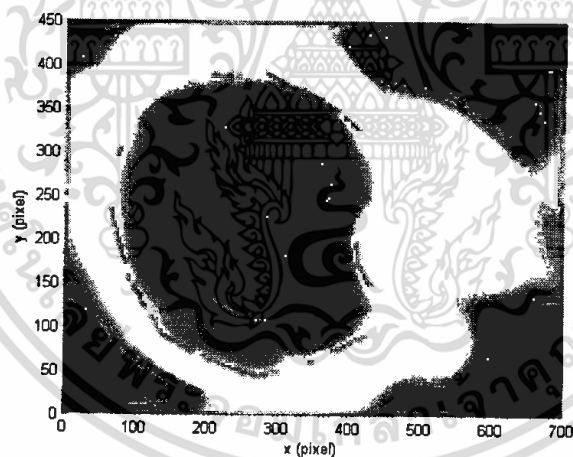
รูปที่ 4.38 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 10 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อขยายภาพในกรอบสีแดงของรูปที่ 4.37 จะได้ผลลัพธ์ดังนี้



รูปที่ 4.39 (ก) และ (ข) ภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 10 ไมโครเมตร (ค) ภาพที่ระยะโฟกัส (ง) ความแตกต่างของภาพก่อนโฟกัสและหลังโฟกัส ระยะ 10 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.37



รูปที่ 4.40 ภาพเฟสที่คำนวณได้ที่ระยะห่าง 10 ไมโครเมตร กรอบสีแดงรูปที่ 4.37

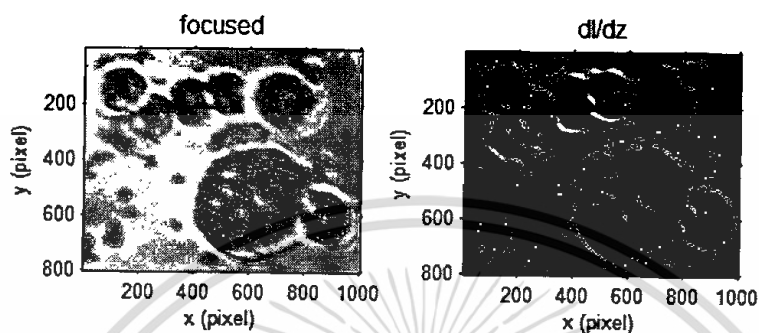
เมื่อพิจารณาภาพเซลล์มะเร็งที่ถ่ายจากกล้องจะสังเกตได้ว่าเซลล์บางบริเวณมีการซ้อนทับกันอยู่ บางบริเวณไม่มีการซ้อนทับกัน ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้จากการสร้างจากภาพเฟสด้วยสมการการส่งผ่านความเข้มแสง จะพบว่า เมื่อให้ระยะระหว่างก่อนและหลังโฟกัสมีค่าน้อย ภาพเฟสที่สร้างได้จะแสดงลักษณะของเซลล์ได้อย่างชัดเจน แต่เมื่อเพิ่มระยะระหว่างก่อนและหลังโฟกัสให้มากขึ้น ลักษณะของเซลล์จะมีความชัดเจนน้อยลง แต่สามารถแสดงลักษณะของเซลล์ที่อยู่ถัดลงไปได้ โดยเมื่อขยายในบริเวณที่สนใจพบว่า ระยะที่เหมาะสมที่สามารถแสดงภาพเฟสที่ดีที่สุดในงานวิจัยนี้ คือ ระยะห่าง 2 และ 3 ไมโครเมตร ซึ่งจะนำระยะนี้มาใช้ในการสร้างภาพเฟสในสมการ 2.21 ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

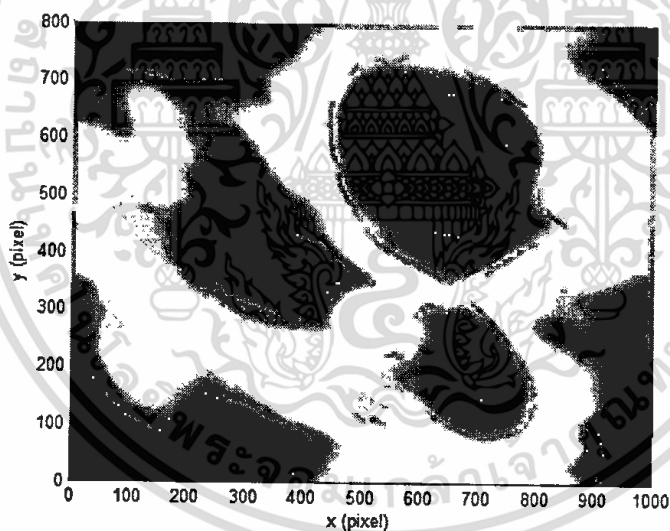
4.2 จำนวนภาพ 4 ภาพ (2^{nd} order TIE)

4.2.1 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 2 ไมโครเมตร

การสร้างภาพเฟสในส่วนนี้จะใช้ระยะห่างระหว่างภาพเป็น 2 ไมโครเมตร และใช้ภาพความเข้มที่ระยะต่างๆ กัน มาประมวลผลทั้งหมด 4 ภาพ



รูปที่ 4.41 (ก) ภาพที่ระยะโฟกัส (ข) ความแตกต่างของภาพ ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร จำนวน 4 ภาพ

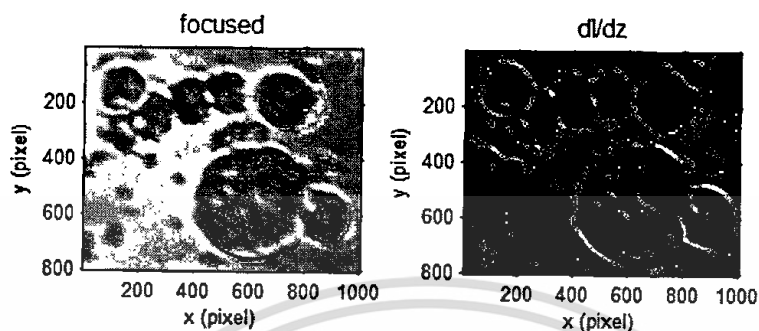


รูปที่ 4.42 ภาพเฟสที่คำนวณได้จาก 2^{nd} order TIE ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร

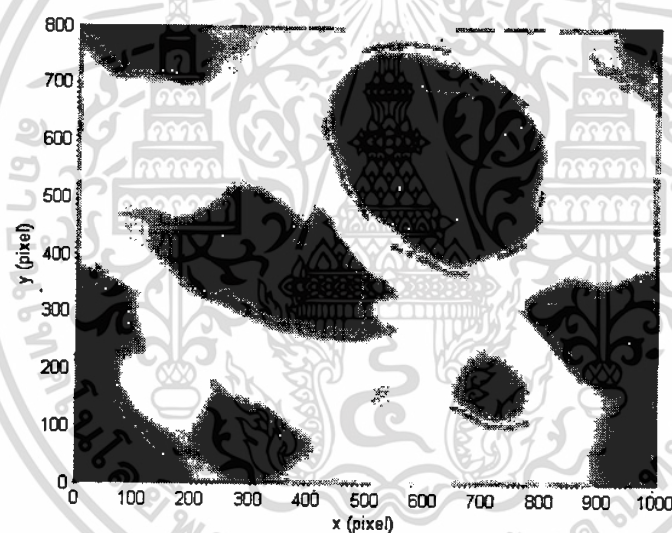
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 3 ไมโครเมตร

การสร้างภาพเฟสในส่วนนี้จะใช้ระยะห่างระหว่างภาพเป็น 3 ไมโครเมตร และใช้ภาพความเข้มที่ระยะต่างๆ กัน มาประมวลผลทั้งหมด 4 ภาพ



รูปที่ 4.43 (ก) ภาพที่ระยะโฟกัส (ข) ความแตกต่างของภาพ ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร จำนวน 4 ภาพ



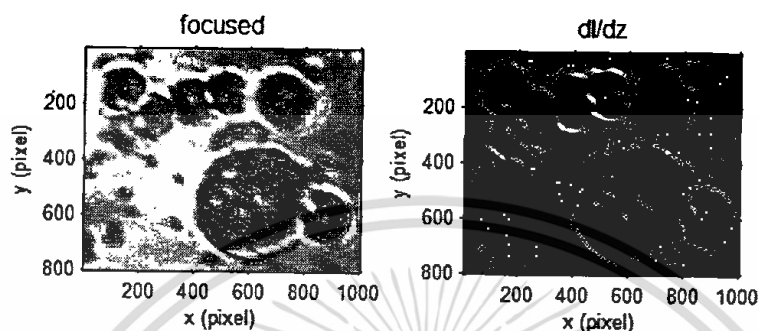
รูปที่ 4.44 ภาพเฟสที่คำนวณได้จาก 2nd order TIE ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร

จากรูปที่ 4.42 และ 4.44 แสดงให้เห็นว่าภาพเฟสที่ได้จะแสดงลักษณะของเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น โดยเฉพาะที่ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร ภาพเฟสจะแสดงรูปร่างของเซลล์มะเร็งที่ซ้อนทับกันอยู่ได้ดีขึ้นและยังแยกบริเวณของเซลล์ได้ดีกว่าที่ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร

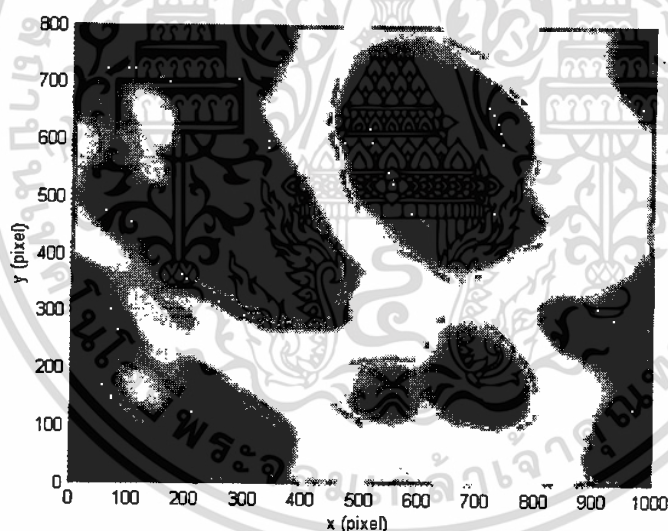
4.3 จำนวนภาพ 6 ภาพ (3^{rd} order TIE)

4.3.1 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 2 ไมโครเมตร

การสร้างภาพเฟสในส่วนนี้จะใช้ระยะห่างระหว่างภาพเป็น 2 ไมโครเมตร และใช้ภาพความเข้มที่ระยะต่างๆ กัน มาประมวลผลทั้งหมด 6 ภาพ



รูปที่ 4.45 (ก) ภาพที่ระยะโฟกัส (ข) ความแตกต่างของภาพ ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร จำนวน 6 ภาพ

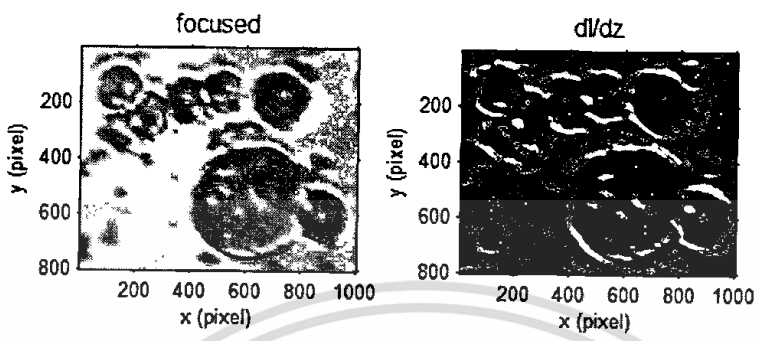


รูปที่ 4.46 ภาพเฟสที่คำนวณได้จาก 3^{rd} order TIE ระยะห่าง 2 ไมโครเมตร

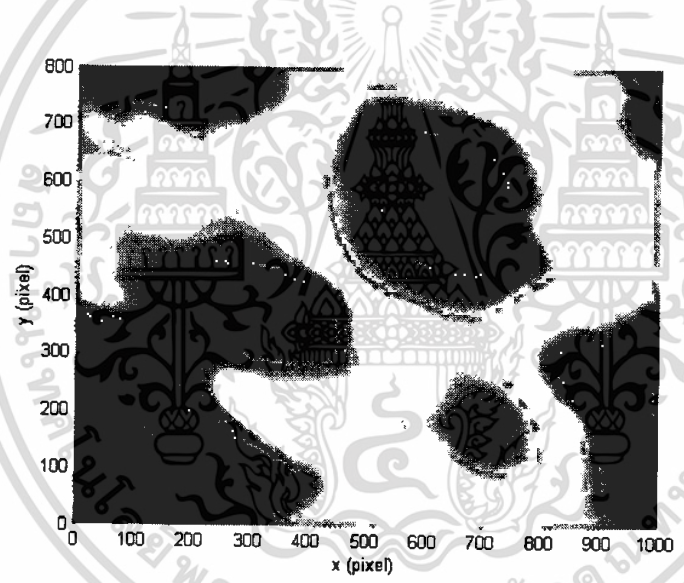
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 กำหนดระยะห่างระหว่างก่อนและหลังโฟกัสเท่ากับ 3 ไมโครเมตร

การสร้างภาพเฟสในส่วนนี้จะใช้ระยะห่างระหว่างภาพเป็น 3 ไมโครเมตร และใช้ภาพความเข้มที่ระยะต่างๆ กัน มาประมวลผลทั้งหมด 6 ภาพ



รูปที่ 4.47 (ก) ภาพที่ระยะโฟกัส (ข) ความแตกต่างของภาพ ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร จำนวน 6 ภาพ



รูปที่ 4.48 ภาพเฟสที่คำนวณได้จาก 3rd order TIE ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร

จากรูปที่ 4.46 และ 4.48 แสดงให้เห็นว่าภาพเฟสที่ได้จะแสดงลักษณะรูปร่างของเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น โดยเฉพาะที่ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร จะสามารถแยกบริเวณของเซลล์แต่ละเซลล์ได้ดี และยังสามารถรายละเอียดให้เห็นบริเวณที่เซลล์อยู่ติดกันได้เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

ในการวิจัยนี้จะศึกษาลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งจะสามารถนำไปพัฒนาหาสมบัติเชิงกลของเซลล์ได้ โดยเทคนิคหลักที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือโฮโลกราฟีแบบดิจิทัลซึ่งเป็นเครื่องมือที่ไม่ซับซ้อน สามารถจัดทำโดยใช้อุปกรณ์ทางแสงที่ใช้ได้โดยทั่วไปในห้องวิจัยทางด้านแสง ไม่ว่าจะเป็นไฟฉายแบบ LED เลนส์วัตถุของกล้องจุลทรรศน์ซึ่งใช้กำลังขยายไม่สูงมากประมาณ 20X รวมไปถึงกล้องบันทึกภาพที่หาซื้อได้ทั่วไปในห้องทดลอง ภาพที่ถ่ายได้จากกล้อง CCD จะเป็นภาพของความเข้มแสงซึ่งจะประกอบด้วยเฟสของภาพอยู่ด้วย ซึ่งข้อมูลเฟสนั้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลายอย่างไม่ว่าจะเป็นการหาโครงสร้างภายนอก การหาขอบของเซลล์ ซึ่งการที่จะได้ภาพเฟสออกมาในการวิจัยนี้จะใช้สมการการส่งผ่านความเข้มของแสงซึ่งเป็นสมการทางคณิตศาสตร์ในการแยกเฟสออกมาจากความเข้มแสงโดยใช้การแปลงฟูเรียร์และการถ่ายภาพที่ระยะก่อนและหลังโฟกัสเพื่อที่จะได้พจน์ของเฟสออกมา ซึ่งผู้วิจัยได้เพิ่มจำนวนภาพของระยะก่อนและหลังโฟกัสเพื่อทำให้การประมาณค่าของเฟสจากการแปลงฟูเรียร์มีความแม่นยำมากขึ้น

โดยผลจากการใช้สมการการส่งผ่านแบบเดิมได้แสดงไว้ในหัวข้อ 4.1 โดยจากผลการทดลองสรุปได้ว่าระยะที่สามารถแสดงลักษณะของเซลล์ได้ดีคือระยะ 2 และ 3 ไมโครเมตร ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นระยะที่ใกล้เคียงกับความหนาของเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง ส่วนที่ระยะมากกว่านี้การแสดงลักษณะของเซลล์จะเพี้ยนไปอันเนื่องมาจากผลของอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งลอยอยู่ในบริเวณที่ติดกับเซลล์ ซึ่งทำให้ค่าความเข้มแสงของภาพที่นำมาหาภาพเฟสมีความผิดเพี้ยนไป ดังนั้นการใช้สมการการส่งผ่านความเข้มแสงจะต้องใช้ระยะก่อนและหลังโฟกัสให้เหมาะสมกับความหนาของเซลล์ที่ต้องการนำมาวิเคราะห์

เมื่อหาระยะที่เหมาะสมในการหาระยะก่อนและหลังโฟกัสได้แล้ว ในหัวข้อ 4.2 และ 4.3 จะแสดงผลจากการใช้สมการการส่งผ่านความเข้มแสงที่ปรับปรุงขึ้นมา โดยผลของการปรับปรุงสมการการส่งผ่านความเข้มแสงโดยใช้ภาพที่นำมาคำนวณทั้งหมด 4 ภาพ แสดงไว้ในหัวข้อ 4.2 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มจำนวนภาพขึ้นจะทำให้การแสดงลักษณะของเซลล์มะเร็งมีความแม่นยำขึ้น และจะสามารถแสดงให้เห็นเซลล์มะเร็งอื่นที่ไม่ได้อยู่ในระนาบเดียวกับเซลล์ที่สนใจ โดยพบว่าที่ระยะห่าง 3 ไมโครเมตร จะแสดงลักษณะของเซลล์ได้ดีกว่าระยะห่าง 2 ไมโครเมตร รวมถึงยังแสดงภาพเซลล์ที่อยู่ในระนาบอื่นได้ชัดเจนอีกด้วย ส่วนในหัวข้อ 4.3 จะเป็นผลการปรับปรุงสมการการส่งผ่านความเข้มแสงโดยใช้ภาพจำนวน 6 ภาพ มาประมวลผล ซึ่งภาพเฟสที่ได้จะดีกว่าการใช้ภาพ 4 ภาพ ไม่ว่าจะเป็นการแสดงผลลักษณะของเซลล์ การแยกขอบเขต และการแสดงภาพของเซลล์ที่ขึ้นอื่นๆ

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าภาพเฟสสามารถแสดงลักษณะของเซลล์ได้ อีกทั้งยังสามารถบอกถึงการซ้อนกันหรือการที่เซลล์อยู่คนละระนาบได้ดีกว่าการใช้ภาพความเข้มของแสง แต่ข้อควรระวังในการใช้ภาพเฟสที่ได้จากสมการการส่งผ่านความเข้มของแสงคือจะต้องเลือกระยะก่อนและหลังโฟกัสให้เหมาะสมกับเซลล์ที่ต้องการนำมาวิเคราะห์ และความแม่นยำของการเลือนก็เป็นตัวแปรหนึ่งที่ทำให้ภาพเฟสที่ออกมามีความชัดเจนมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการวิจัยนี้ อาจมีความผิดพลาดซึ่งเกิดขึ้นได้จากปัจจัย ดังนี้

- 1) ผู้วิจัยใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็นหลอด LED จากไฟฉายที่งานใช้ทั่วไป จึงอาจทำให้แสงมีความเข้มไม่คงที่ตลอดการทดลองซึ่งทำให้ภาพเฟรมมีความผิดเพี้ยน
- 2) เนื่องจากอุปกรณ์ที่ทำการวิจัยเป็นอุปกรณ์ที่สร้างเองโดยใช้ตัวจับที่อาจจะไม่คงที่ เมื่อเวลาเลื่อนหาระยะโฟกัส รวมถึงระยะก่อนและหลังโฟกัส ทำให้ตัวเซลล์มีการขยับในระนาบที่ตั้งฉากกับการหาระยะต่างๆ ทำให้ภาพที่ถ่ายจากที่ระยะต่างๆ ไม่ตรงกัน ซึ่งเมื่อนำมาหาเฟสจากการใช้ความเข้มแสงในแต่ละบริเวณจึงอาจเกิดข้อผิดพลาดขึ้นมาได้

ดังนั้นเพื่อลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้จากปัจจัยที่กล่าวมา การใช้อุปกรณ์ที่มีความมั่นคงแข็งแรงเป็นสิ่งที่ไม่ได้ อาทิเช่น การใช้กล้องจุลทรรศน์แทนการใช้ระบบที่สร้างขึ้นเองซึ่งจะทำให้ความเข้มแสงคงที่มากขึ้นและหาระยะโฟกัสได้ดีขึ้นเนื่องจากมีเลนส์ตาช่วยขยายอีกระดับหนึ่ง การปรับปรุงฐานเลื่อนระยะให้มั่นคงซึ่งอาจรวมไปถึงการใช้การปรับระยะด้วยระบบคอมพิวเตอร์แทนการใช้มือหมุน และการปรับปรุงกล้องให้เป็นกล้องที่ใช้ในงานวิทยาศาสตร์โดยตรง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- [1] Zernike, F. 1942. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica*, 9(7), 686-698.
- [2] Zernike, F. 1942. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II. *Physica*, 9(10), 974-986.
- [3] Streibl, N. 1984. Phase imaging by the transport equation of intensity. *Optics Communications*, 49(1), 6-10.
- [4] Paganin, D. Mayo, S.C. Gureyev, T.E. Miller, P.R. Wilkins, S.W. 2002. Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object. *Journal of Microscopy*, 206(1), 33-40.
- [5] Paganin, D. Nugent, K.A. 1998. Noninterferometric Phase Imaging with Partially Coherent Light. *Physical Review Letters*, 80(12), 2586-2589
- [6] Waller, L. Tian, L. Barbastathis, G. 2010. Transport of Intensity phase-amplitude imaging with higher order intensity derivatives. *Optics Express*, 18(12), 12552-12561.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้