

การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อจำลองระบบลำไส้ในระบบของไหลจุลภาค

CELL CULTURE FOR GUT-ON-A-CHIP BASED ON MICROFLUIDICS SYSTEM



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมวัสดุนาโน

วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CELL CULTURE FOR GUT-ON-A-CHIP BASED ON
MICROFLUIDICS SYSTEM

NATTHAKARN NAKVATTANAROT

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF ENGINEERING
IN NANOMATERIAL ENGINEERING
COLLEGE OF NANOTECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2018

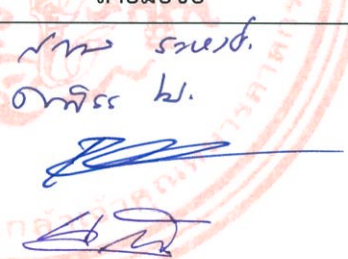
COLLEGE OF NANOTECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาควิชาภาคนาโนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
โครงการพิเศษ

หัวข้อโครงการพิเศษ การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อจำลองระบบลำไส้ในระบบของไหลจุลภาค
Special Project Title Cell culture for gut-on-a-chip based on microfluidics system
นักศึกษา นางสาว ณัฐกานต์ นาควัฒนโรจน์
รหัสประจำตัว 58110020
ปริญญา วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา นาโนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สาขาวิชา วิศวกรรมวัสดุภาคนาโน
ปีการศึกษา 2561
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. สากล ระหงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ภญ.ดร. ศศิธร เอื้อวิริยะวิทย์

คณะกรรมการสอบโครงการพิเศษ	ลายมือชื่อ
ดร. สากล ระหงษ์	
ภญ.ดร. ศศิธร เอื้อวิริยะวิทย์	
ผศ.ดร. ดารินี พรหมโยธิน	
ดร. นงลักษณ์ หวงกำแหง	

ภาควิชาภาคนาโนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบังอนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมวัสดุภาคนาโน
KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดารินี พรหมโยธิน)
หัวหน้าภาควิชาภาคนาโนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
วันที่..... เดือน.....พ.ศ. 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อจำลองระบบลำไส้ในระบบของไหลจุลภาค
นักศึกษา	นางสาว ญัฐกานต์ นาควัฒนโรจน์
รหัสประจำตัว	58110020
ปริญญา	วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา	นาโนวิทยาและนาโนเทคโนโลยี
สาขาวิชา	วิศวกรรมวัสดุนาโน
พ.ศ.	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. สากล ระหงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. ศศิธร เอื้อวิริยะวิทย์

บทคัดย่อ

ปัจจุบันได้มีการนำเอาวัสดุนาโนมาใช้อย่างแพร่หลายแต่ยังต้องมีการประเมินความปลอดภัยในการใช้งาน ซึ่งการประเมินจากการใช้สัตว์ทดลอง อาจให้ผลที่คลาดเคลื่อน ใช้เวลาและงบประมาณที่สูง และยังต้องคำนึงถึงจริยธรรมการทดลอง ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะจำลองระบบอวัยวะในร่างกายเพื่อใช้การศึกษา เกสัชจลนศาสตร์ และประเมินความปลอดภัยของวัสดุนาโน โดยในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาเงื่อนไขและ สภาวะที่เหมาะสมในการปลูกถ่ายและเลี้ยงเซลล์ของลำไส้ในระบบของไหลจุลภาค (Microfluidic system) โดยจะเริ่มจากการศึกษา และหาโปรตีนที่เหมาะสมกับสภาวะพื้นผิวของ Polydimethylsiloxane (PDMS) ซึ่งเป็นวัสดุที่ใช้ในการสร้างระบบของไหลจุลภาค PDMS จะถูกหยดลงบนหลุมเพาะเซลล์ และทำการถ่ายเซลล์ 2 ชนิด คือ Caco-2 และ CCD-18Co ลงในหลุมเพาะเซลล์ เมื่อเซลล์เจริญเติบโต จึงทำการวัดกิจกรรม การเผาผลาญ (Metabolic Activity) เพื่อดูการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธี MTS assay จากนั้นจึงทำการตรวจสอบพื้นผิวของโปรตีนที่เคลือบบน PDMS โดยจะทำการประเมินและวิเคราะห์ด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (Atomic Force Microscope; AFM) เพื่อตรวจสอบลักษณะการกระจายตัว ของโปรตีนที่เคลือบบน PDMS พบว่าพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านกระบวนการพลาสมาของออกซิเจนและ เคลือบโปรตีน Matrigel มีการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิว PDMS และส่งผลให้มีการยึดเกาะและ การเจริญเติบโตของเซลล์ CCD-18Co และ Caco-2 ที่ดีที่สุด เมื่อทราบเงื่อนไขที่ดีที่สุดในการเลี้ยงเซลล์แล้ว จึงทำการออกแบบ และสร้างระบบของไหลจุลภาคด้วยกระบวนการซอฟต์แวร์โฟโตลิโธกราฟี ซึ่งระบบของไหลจุลภาค ขึ้นรูปจากวัสดุ PDMS ที่สร้างขึ้นมีความกว้าง 497.43 ± 3.95 ไมครอน ความสูง 143.82 ± 3.29 ไมครอน จากที่ออกแบบไว้ 500 ไมครอนและ 150 ไมครอนตามลำดับ จากนั้นจึงทำการเคลือบ Matrigel ในระบบของไหลจุลภาค และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบของไหลจุลภาค โดยจะศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ลำไส้ในสภาวะที่มีอัตราการไหล $100 \mu\text{L/h}$ และสภาวะที่ไม่มีการไหลด้วยกล้องจุลทรรศน์ การปรับปรุงพื้นผิว PDMS ด้วย Matrigel เพื่อต่อการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ลำไส้ แต่ยังคง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องมีการศึกษาระยะเวลาที่ให้เซลล์มีการยึดเกาะก่อนเริ่มสภาวะการไหลและอัตราการไหลที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ รวมทั้งยืนยันคุณลักษณะของเซลล์ลำไส้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ลำไส้ในระบบของไหลจุลภาคต่อไป



Special Project Title	Cell culture for gut-on-a-chip based on microfluidics system
Student	Natthakarn Nakvattanarot
Student ID	58110020
Degree	Bachelor of Engineering
Program	Nanomaterial Engineering
Year	2018
Special Project Advisor	Dr. Sakon Rahong
Special Project Co-advisor	Dr. Sasitorn Aueviriyavit

ABSTRACT

Nowadays, nanomaterials have been widely studied and used for industrial applications; therefore, the nanosafety assessments and toxicology are necessary. Normally, in the pre-clinical period, in vivo animal model has been employed for the assessments. However, animal models are high-cost and time-consuming, fail to predict human responses because species differences and cause ethical problems. Organ-on-chips incorporating with culture of biomimetic tissues and microfluidic technologies are very attractive to study pharmacokinetic and toxicology of nanomaterials. Here, we report the design and fabrication of gut on a chip, made of intestinal cell transplant and culture into polydimethylsiloxane (PDMS) microfluidic system. PDMS was dropped into microplates and various proteins were applied on PDMS surface, then Caco-2 and CCD-18Co were added into the microplate. Metabolic activity assay was used to evaluate the adhesion and viability of cells via MTS assay. Then, the surface of protein on PDMS was then examined and analyzing by atomic force microscope (AFM) to investigate the arrangement characteristic of proteins, which coated on PDMS. Matrigel has a good adhesion and distribution with PDMS surface; therefore, the intestinal cells have a high adhesion and viability. The microfluidic systems were designed and fabricated by soft lithography technique. It was made from PDMS with $497.43 \pm 3.95 \mu\text{m}$ in width and $143.82 \pm 3.29 \mu\text{m}$ in height from the model designed of $500 \mu\text{m}$ and $150 \mu\text{m}$, respectively. Matrigel was introduced into microfluidic channel by syringe pump. Then the intestinal cells were introduced into microchannels

at flow rate 100 $\mu\text{L/h}$ and without flow condition. The adhesion and viability of cells in microchannel were investigated by the optical microscope. For the further optimization of the cell culture in the microfluidic system, the characteristics of intestinal cells in the microchannel need to confirm.



กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความเมตตากรุณาของ ดร. สากล ระหงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษจากวิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและ ญญ.ดร. ศศิธร เอื้อวิริยะวิทย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม นักวิจัยจากศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ แก่ข้าพเจ้าจึงทำให้มีความเข้าใจในด้านที่ทำการศึกษามากขึ้น รวมทั้งได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับหัวข้อโครงการพิเศษและแนวทางที่ดีในการเขียนโครงการพิเศษ ตลอดจนเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ ญญ.ดร. รัตน์จิรา วงศ์วานกุล คุณ ชนิกันต์ กุลยะณี และพี่ ๆ จากทีมวิจัยความปลอดภัยระดับนาโนด้านสุขภาพและสิ่งแวดล้อม (Nano Environmental and Health Safety, EHS) ที่ช่วยดูแล สั่งสอนและคอยให้คำแนะนำต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งข้อคิดและกำลังใจ ขอขอบคุณศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติและศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ที่สนับสนุนงานวิจัยทั้งในด้านอุปกรณ์การทำวิจัยและการตรวจวัดวิเคราะห์

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. นวพันธ์ ขยันกิจ วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบังสำหรับการตรวจวัดชิ้นงานด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมรวมถึงให้คำแนะนำและคำปรึกษาต่าง ๆ ที่มีส่วนทำให้งานวิจัยนี้เป็นไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณ นายอลงกต ตรีทอง ผู้ช่วยนักวิจัยศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติสำหรับการขอความอนุเคราะห์ในการใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม รวมทั้งยังสอนใช้เครื่องมือในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอบคุณเพื่อน ๆ และพี่ ๆ ทุกคนในวิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง แห่งนี้ที่ให้ความปรารถนาดี และความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ สำหรับการทำงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณมารดาและพี่ชายของผู้เขียนที่ให้การสนับสนุนด้านการเรียนและคอยให้กำลังใจในยามที่ท้อถอยจนเรียนผ่านพ้นมาได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านและสถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้เขียนตลอดมา

ณัฐกานต์ นาควัฒน์โรจน์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ii
กิตติกรรมประกาศ.....	iii
สารบัญ.....	iv
สารบัญตาราง.....	vi
สารบัญรูป.....	vii
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
1.4 กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	4
1.5 ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
1.6 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ความเป็นพิษของวัสดุนาโน.....	6
2.2 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	6
2.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์.....	6
2.2.2 การส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์เกาะผิว.....	7
2.2.3 ข้อดีและข้อจำกัดของการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	8
2.3 การวิเคราะห์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย MTS assay.....	10
2.4 เทคโนโลยีไมโครฟลูอิดิก.....	10
2.4.1 ระบบปฏิบัติการยอส์ส่วน (Lab on a chip).....	10
2.4.2 กระบวนการซอฟต์แวร์ลิโธกราฟี (Soft lithography).....	11
12	
2.4.3 น้ำยาไวแสง (Photoresist).....	13
2.5 การวิเคราะห์พื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม.....	14
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	15
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	16
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	19
3.3 เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดลอง.....	20

3.4	การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิจัย.....	22
3.4.1	การเตรียม 1X Dulbecco's Phosphate Buffered Salts (DPBS).....	22
3.4.2	การเตรียม sterile-filtered DMEM.....	22
3.4.3	การเตรียม Complete DMEM medium	23
3.4.4	การเตรียมโปรตีนที่ใช้ในการศึกษาการยึดเกาะของเซลล์.....	23
3.5	ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	24
3.5.1	การศึกษากายการยึดเกาะของเซลล์ลำไส้บนพื้นผิว PDMS.....	24
3.5.2	การสร้างไมโครฟลูอิดิก ชิพ.....	25
3.5.3	การเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ Caco-2 ในระบบไมโครฟลูอิดิก.....	28
3.6	การตรวจวัดวิเคราะห์.....	30
3.6.1	การตรวจสอบการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว PDMS.....	30
3.6.2	การตรวจสอบการดูดซับโปรตีนบนพื้นผิว PDMS.....	30
3.6.3	การตรวจสอบขนาดของไมโครฟลูอิดิก ชิพที่สร้างขึ้นจากกระบวนการ ซอฟต์แวร์โฟโตลิโกราฟี.....	30
3.6.4	การตรวจวิเคราะห์ลักษณะสัญญาณของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระบบไมโคร ฟลูอิดิก 30	
บทที่ 4	ผลและการอภิปรายผลการวิจัย	31
4.1	การศึกษากายการยึดเกาะของเซลล์ลำไส้บนพื้นผิว PDMS.....	31
4.1.1	ผลการตรวจสอบสัญญาณของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	31
4.1.2	ผลการประเมินอัตราจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย MTS assay.....	39
4.2	ผลการตรวจสอบการดูดซับโปรตีนบนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วย ออกซิเจนและไม่ผ่านการ พลาสมาด้วยออกซิเจน	41
4.2.1	การดูดซับโปรตีนบนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจน ก่อนเคลือบโปรตีน.....	41
4.2.2	การดูดซับโปรตีนบนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนก่อน เคลือบโปรตีน.....	44
4.3	ผลการตรวจสอบขนาดของไมโครฟลูอิดิก ชิพที่สร้างจากกระบวนการซอฟต์แวร์ โฟโตลิโกราฟี.....	47
4.4	ผลการตรวจสอบลักษณะสัญญาณของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระบบไมโครฟลูอิดิก....	50
บทที่ 5	สรุปผลวิจัยและแนวทางในการพัฒนา	53
5.1	สรุปผลการวิจัย.....	53
5.2	แนวทางในการพัฒนา	54

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ตารางแผนการดำเนินงาน.....	5
4.1 แสดงค่าเฉลี่ยกำลังสองของค่าความขรุขระ (RMS roughness) พื้นผิว PDMS	43
4.2 แสดงค่าเฉลี่ยกำลังสองของค่าความขรุขระ (RMS roughness) พื้นผิว PDMS ที่ผ่านการ พลาสมาด้วยออกซิเจน.....	46
4.3 แสดงค่าความกว้างของ Microchannel ระยะห่างระหว่าง Microchannel กับ Vacuum chamber และความสูงของ Microchannel	49



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 แสดงกลไกการนำส่งยากำจัดเซลล์มะเร็งด้วยอนุภาคนาโน	1
1.2 แสดงลำดับการพัฒนาของแบบจำลองที่ใช้ศึกษาความเป็นพิษและเภสัชจลนศาสตร์ของสาร.....	3
2.1 แสดงการจับกันระหว่างโปรตีน ECM กับโปรตีนที่แทรกในเยื่อหุ้มเซลล์	8
2.2 แสดงลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold).....	9
2.3 แสดงลักษณะของโดเมนทริกซเจลที่ใช้เลี้ยงเซลล์	9
2.4 แสดงหลักการของ MTS Assay.....	10
2.5 แสดงวิธีการสร้างชั้น PDMS	12
2.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วรอบในการหมุนเคลือบกับความหนาของชั้นฟิล์ม น้ำยาไวแสง	13
3.1 แสดงแผนผังขั้นตอนการวิจัย	15
3.2 แสดงเครื่อง Biological safety cabinet	16
3.3 แสดงตู้บ่มเซลล์.....	16
3.4 แสดงเครื่อง Inverted microscope	17
3.5 แสดงเครื่อง Plasma Cleaner.....	17
3.6 แสดงกล่องจุลทรรศน์แรงอะตอม	18
3.7 แสดงเครื่อง Microplate reader[20].....	18
3.8 แสดง Syringe pump.....	19
3.9 แสดงโครงสร้างวิลโล.....	20
3.10 แสดงลักษณะของเซลล์ Caco-2.....	21
3.11 แสดงลักษณะของเซลล์ CCD-18Co.....	21
3.12 แสดงการทดลองการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว PDMS ใน 24 wells plate	24
3.13 แสดงแบบจำลองไมโครฟลูอิดิก ชิพ	25
3.14 แสดงขั้นตอนการสร้างแม่พิมพ์จากน้ำยาไวแสง SU-8 2035	26
3.15 แสดงขั้นตอนการสร้างไมโครฟลูอิดิก ชิพ	27
3.16 แสดงระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ในไมโครฟลูอิดิก ชิพ.....	28
3.17 แสดงระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ในไมโครฟลูอิดิก ชิพ.....	29
3.18 แสดงไมโครฟลูอิดิก ชิพที่มีการบ่มเซลล์ไว้ใน 5% CO ₂ incubator.....	29
4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 24 ชั่วโมงของเซลล์ CCD-18Co.....	31
4.2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 48 ชั่วโมงของเซลล์ CCD-18Co.....	32
4.3 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 24 ชั่วโมงของเซลล์ CCD-18Co.....	33
4.4 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 48 ชั่วโมงของเซลล์ CCD-18Co.....	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

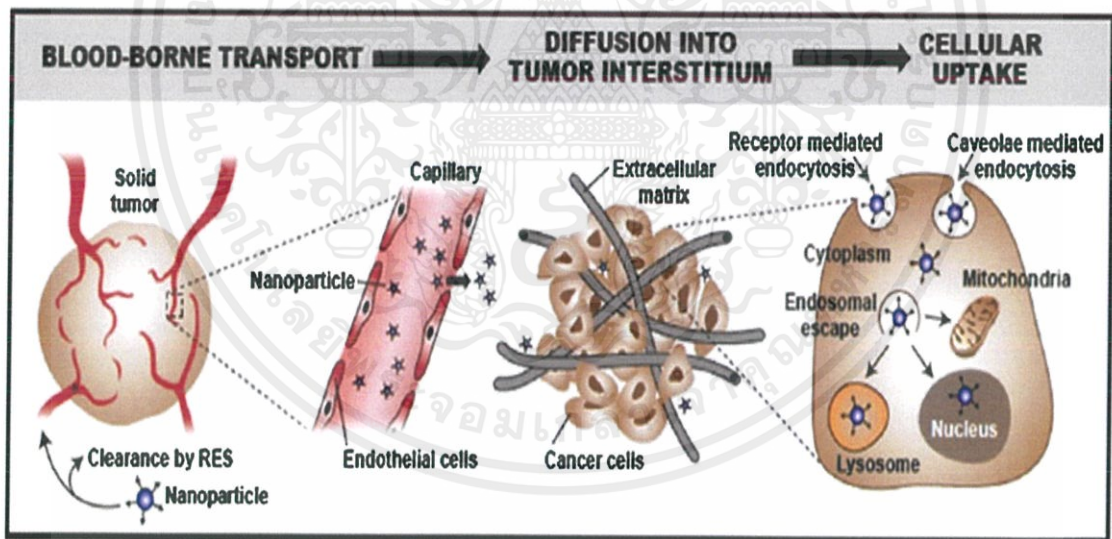
4.5 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 24 ชั่วโมงของเซลล์ Caco-2	35
4.6 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 48 ชั่วโมงของเซลล์ Caco-2	36
4.7 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 24 ชั่วโมงของเซลล์ Caco-2	37
4.8 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 48 ชั่วโมงของเซลล์ Caco-2	38
4.9 ผลการประเมินอัตราเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ CCD-18Co.....	39
4.10 แสดงผลการประเมินอัตราเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ Caco-2	40
4.11 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS.....	41
4.12 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน BSA	41
4.13 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน Poly-L lysine	42
4.14 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน Collagen.....	42
4.15 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน Matrigel	43
4.16 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจน.....	44
4.17 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA โดยที่ a คือภาพ phase, b คือภาพ topology และ c คือภาพ 3D.....	44
4.18 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนและเคลือบโปรตีน Poly-L lysine	45
4.19 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนและเคลือบด้วยโปรตีน Collagen.....	45
4.20 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนและเคลือบด้วยโปรตีน Matrigel.....	46
4.21 แสดงแบบจำลองไมโครฟลูอิดิก ชิพ	47
4.22 แสดงภาพตัดขวางของไมโครฟลูอิดิก ชิพ	48
4.23 แสดงภาพถ่ายไมโครแคนแนลด้วยกล้องจุลทรรศน์.....	48
4.24 แสดงภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4x ของเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงภายในไมโครแคนแนล.....	50
4.25 แสดงภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x ของเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงในไมโครแคนแนลเป็นระยะเวลา 4 วัน	51
4.26 แสดงภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4x ของเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงภายในไมโครแคนแนล.....	51
4.27 แสดงภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x ของเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงในไมโครแคนแนลเป็นระยะเวลา 4 วัน	52

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ในปัจจุบันได้มีการนำนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้งานด้านชีวการแพทย์ โดยการนำอนุภาคนาโนมาใช้ในการวินิจฉัยและรักษาโรคยกตัวอย่างเช่น การใช้อนุภาคนาโนเคลือบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งนำส่งยาไปยังเนื้องอก การใช้อนุภาคนาโนนำส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมายโดยอาศัยการตอบสนองต่อความเป็นกรด-ด่าง, อุณหภูมิ, การเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ที่เกิดขึ้นบริเวณอวัยวะเป้าหมาย การใช้อนุภาคนาโนเคลือบสารเรืองแสงและเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งค้นหาตำแหน่งของเซลล์มะเร็ง การใช้อนุภาคนาโนเคลือบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งขยายสัญญาณของรังสี (radiotherapy) ทำลายเซลล์มะเร็ง[1]



ภาพที่ 1.1 แสดงกลไกการนำส่งยากำจัดเซลล์มะเร็งด้วยอนุภาคนาโน[1]

แม้ว่าการนำอนุภาคนาโนมาประยุกต์ใช้งานด้านชีวการแพทย์จะช่วยพัฒนาการรักษาโรค แต่การจะนำมาใช้ประโยชน์กับมนุษย์นั้นจำเป็นจะต้องผ่านการทดสอบความเป็นพิษหรือความปลอดภัยและการทดสอบทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) ซึ่งก็คือการเป็นไปของสารเมื่อเข้าสู่ร่างกาย ได้แก่ การดูดซึมของสารเข้าสู่ร่างกาย (absorption), การกระจายตัวของสาร (distribution), การเปลี่ยนแปลง (metabolism) และการขับถ่ายออกจากร่างกาย (excretion)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งในการทดสอบทางเภสัชกรรมโดยทั่วไปแล้วจะมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ทดสอบกับเซลล์มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (*In vitro*)

ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบในสัตว์ทดลอง หลังจากที่ได้ผลการทดลองจากการทดสอบกับเซลล์มีชีวิตในหลอดทดลองจะเลือกนำสารที่ให้ผลดีมาทดลองกับสัตว์ทดลอง เช่น หนู กระต่าย เป็นต้น (*In vivo*)

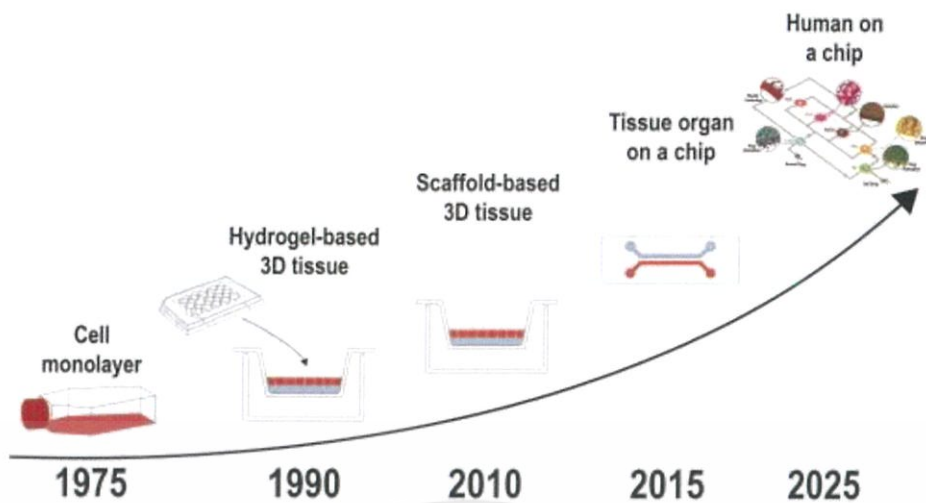
ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบในมนุษย์ โดยจะเริ่มทดลองจากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวนน้อย ๆ ก่อน เพื่อให้ทราบพิษที่เกิดขึ้นในมนุษย์ จากนั้นจึงเริ่มทำการทดลองในผู้ป่วยต่อไป[2]

การทดสอบกับเซลล์มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (*In vitro*) เซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองข้อดีคือ สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมที่จะให้เซลล์อยู่ได้ เซลล์จะมีความเหมือนและมีลักษณะเฉพาะตัว ประหยัด สังเกตเซลล์และตรวจวัดผลการทดลองได้ง่าย สามารถคาดเดาผลที่จะเกิดกับสัตว์ทดลองได้เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารต่าง ๆ ดังนั้นในการทดสอบสิ่งต่าง ๆ จะทดสอบในเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงขึ้นในหลอดทดลองเป็นขั้นแรกเพื่อทดแทนการทดสอบในสัตว์โดยตรง ซึ่งมีความยุ่งยากในการควบคุมปัจจัยต่างในการดำเนินชีวิตของสัตว์ มีค่าใช้จ่ายสูง ใช้ระยะเวลาในการศึกษานาน และยังคงคำนึงถึงจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง[2] แต่การเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง เซลล์จะมีพฤติกรรม ลักษณะรูปร่าง อัตราการเจริญเติบโต และการดำรงชีวิต แตกต่างไปจากสภาวะจริงในร่างกายที่มีการบีบกดตัวหรือการเคลื่อนไหวต่าง ๆ ของอวัยวะ และการไหลของของไหลในร่างกายได้แก่การไหลของเลือด, ออกซิเจน, สารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ ที่จะส่งผลต่อพฤติกรรมของเซลล์ และแม้ว่าการทดลองในสัตว์จะทำให้ทราบผลเบื้องต้นในสภาวะจริงแต่ความแตกต่างในการตอบสนองทางสรีรวิทยาระหว่างแบบจำลองสัตว์กับมนุษย์อาจส่งผลให้เกิดความเข้าใจผิดต่อประสิทธิภาพและความเป็นพิษของสาร[3] ดังนั้นการจำลองสภาพของอวัยวะภายในร่างกายมนุษย์ จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการพัฒนาในการนำอนุภาคนาโนมาประยุกต์ใช้งานด้านชีวการแพทย์

ไมโครฟลูอิดิก เทคโนโลยี (Microfluidic technology) คือ การจัดการ ควบคุม ของไหลที่มีปริมาณในระดับไมโครลิตรถึงนาโนลิตรเพื่อศึกษาและวินิจฉัยของไหลนั้น ๆ ในรูปของอุปกรณ์ขนาดเล็กที่เรียกว่า ไมโครฟลูอิดิก ชิพ (Microfluidics chip) มีช่องทางการไหลในระดับไมโครเมตร (Microchannel) จัดการของไหลโดยไมโครฟลูอิดิก ชิพสามารถสร้างได้โดยการหล่อพอลิเมอร์จากแม่แบบ[4]

งานวิจัยนี้จะนำเทคโนโลยีไมโครฟลูอิดิกเข้ามาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้เพื่อจำลองสภาวะการไหลให้คล้ายกับเซลล์ในร่างกาย โดยงานวิจัยนี้จะศึกษาลักษณะสัญญาณและเอนไซม์ของเซลล์ลำไส้ที่เพาะเลี้ยงใน Microchannel ที่มีขนาดความกว้าง 500 ไมครอน และความสูง 150 ไมครอนที่อัตราการไหลของสาร 100 ไมโครลิตรต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1.2 แสดงลำดับการพัฒนาของแบบจำลองที่ใช้ศึกษาความเป็นพิษและเภสัชจลนศาสตร์ของสาร[5]

จากภาพที่ 1.2 การทดสอบสารกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในช่วงแรก เซลล์ที่ใช้ในการทดลองมีลักษณะการเจริญเป็นแผ่นและมีอาหารปกคลุมอยู่ด้านบน ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาเซลล์ที่ใช้ในการทดลองให้มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ในสภาวะจริงตามธรรมชาติคือมีการเจริญในลักษณะสามมิติหรือเป็นชิ้นเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีโครงสร้างสามมิตียังขาดลักษณะการไหลของของไหลในร่างกาย และการบีบหดตัวของกล้ามเนื้อซึ่งเป็นสภาวะที่เกิดกับเซลล์ในสภาวะจริงตามธรรมชาติ จึงได้มีการนำเทคโนโลยีไมโครฟลูอิดิกเข้ามาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อจำลองสภาวะการไหลในร่างกายและการบีบหดตัวของกล้ามเนื้อ

1.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาพื้นผิวที่เคลือบโปรตีนเพื่อช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ลำไส้
- 1.2.2 สร้างระบบไมโครฟลูอิดิกเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้
- 1.2.3 ศึกษาาระบบไมโครฟลูอิดิกที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้
- 1.2.4 ศึกษาลักษณะของเซลล์ลำไส้ที่เพาะเลี้ยงในระบบไมโครฟลูอิดิก

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

งานวิจัยนี้จะศึกษาลักษณะของเซลล์ลำไส้ที่เพาะเลี้ยงในไมโครฟลูอิดิก ชิปซึ่งเป็นการจำลองสภาวะของเซลล์ให้มีความใกล้เคียงกับเซลล์ในร่างกายโดยจะทำการสร้างไมโครฟลูอิดิกชิปจาก พอลิไดเมทิลซิลอกเซน (Polydimethylsiloxane, PDMS) ดังนั้นในเบื้องต้นจะศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว PDMS เทียบกับพื้นผิว PDMS ที่เคลือบโปรตีนโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA), โพลีแอลไลซีน (Poly-L lysine), คอลลาเจน (Collagen) และ เมทริกซ์เจล (Matrigel) ทั้งนี้โปรตีนที่ใช้เคลือบเป็นสารละลาย ดังนั้นจะปรับปรุงสภาพพื้นผิว PDMS ให้มีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) ด้วย ออกซิเจน พลาสมา (Oxygen plasma) แล้วเคลือบโปรตีนทันที เทียบกับ PDMS ที่ปราศจากการปรับปรุงสภาพ

พื้นผิวก่อนเคลือบ สังเกตการยึดเกาะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงและทำการประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

1.4 กรอบแนวคิดในการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบไมโครฟลูอิดิก โดยจะเพาะเลี้ยงเซลล์ชั้นนอกสุดของผนังลำไส้มนุษย์ (Human epithelial colorectal adenocarcinoma, Caco-2) ในไมโครฟลูอิดิก ชิพ เพื่อจำลองลำไส้มนุษย์ในสภาวะจริงโดยที่เทคโนโลยีไมโครฟลูอิดิกจะช่วยสร้างสภาวะการไหลของสารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ เหมือนการเคลื่อนที่ของสารในร่างกายที่เกิดจากการไหล ประกอบกับคุณสมบัติยืดหยุ่นของ PDMS ที่เป็นวัสดุหลักในการสร้างไมโครฟลูอิดิก ชิพ ส่งผลให้ระบบไมโครฟลูอิดิก สามารถบีบอัดตัวได้ เหมือนการบีบอัดตัวของลำไส้ในร่างกายมนุษย์

1.5 ขอบเขตของงานวิจัย

1.5.1 เปรียบเทียบการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วย BSA, Poly-L lysine, Collagen และ Matrigel

1.5.2 สร้างไมโครฟลูอิดิก ชิพ โดยกระบวนการซอฟต์แวร์โฟโตกราฟี

1.5.3 ศึกษาลักษณะของเซลล์ลำไส้ที่เพาะเลี้ยงขึ้นในระบบไมโครฟลูอิดิกและเซลล์ลำไส้ที่เลี้ยงในระบบที่ปราศจากการไหลของสาร

1.5.4 วิเคราะห์การยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว PDMS ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

1.6 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

ระยะที่ 1 ศึกษาการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว PDMS ที่จะนำมาใช้สร้างไมโครฟลูอิดิก ชิพ โดยจะทำการเคลือบพื้นผิว PDMS ด้วย BSA, Poly-L lysine, Laminin, Collagen, Matrigel เพื่อหาสภาพพื้นผิวของระบบไมโครฟลูอิดิก ที่เซลล์สามารถยึดเกาะได้ดี

ระยะที่ 2 ศึกษาสภาพพื้นผิวของ PDMS ที่ทำการปรับปรุงด้วยออกซิเจน พลาสมา ก่อนเคลือบโปรตีน และพื้นผิวของ PDMS ที่ไม่ผ่านการปรับปรุงด้วยออกซิเจน พลาสมา ก่อนเคลือบโปรตีน โดยมีโปรตีนที่ใช้ในการศึกษาดังนี้ BSA, Poly-L lysine, Laminin, Collagen และ Matrigel

ระยะที่ 3 ทำการออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิกและสร้างไมโครฟลูอิดิก ชิพ โดยกระบวนการซอฟต์แวร์โฟโตกราฟี

ระยะที่ 4 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ในระบบไมโครฟลูอิดิกและวิเคราะห์ลักษณะสัญญาณและเอนไซม์สำคัญของเซลล์ลำไส้ที่เพาะเลี้ยงในระบบไมโครฟลูอิดิก โดยจะเปรียบเทียบกับเซลล์ลำไส้ที่เพาะเลี้ยงขึ้นในระบบที่ปราศจากการไหล

ตารางที่ 1.1 ตารางแผนการดำเนินงาน

กิจกรรม	เดือนที่				
	ส.ค. - ก.ย.	ต.ค. - พ.ย.	ธ.ค. - ม.ค.	ก.พ. - มี.ค.	เม.ย.- พ.ค.
ศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ลำไส้บน พื้นผิว PDMS					
ศึกษาผลของการปรับปรุงสภาพพื้นผิว PDMS ก่อนเคลือบโปรตีนและศึกษา การดูดซับของโปรตีนแต่ละชนิดบน พื้นผิว PDMS					
ออกแบบและสร้างระบบไมโครฟลูอิดิก					
ศึกษาลักษณะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงขึ้น ในระบบไมโครฟลูอิดิก					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความเป็นพิษของวัสดุนาโน

ปัจจุบันวัสดุนาโนได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้งานในด้านอุตสาหกรรม เครื่องสำอาง การแพทย์ มากขึ้นแต่การศึกษาถึงอันตรายและผลกระทบยังมีข้อจำกัด อย่างไรก็ตามวัสดุนาโนสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 3 ช่องทางคือ การหายใจ, ซึมผ่านผิวหนังและการกิน โดยทางการหายใจเป็นทางเข้าสู่ร่างกายหลักและมีความเสี่ยงสูงที่สุดโดยที่ความเป็นพิษของวัสดุนาโนที่มีขนาดเล็กจะสูงกว่าวัสดุนาโนที่มีขนาดใหญ่กว่าในสารชนิดเดียวกัน เนื่องจาก วัสดุนาโนที่มีขนาดเล็ก สามารถเข้าสู่อวัยวะหรือเซลล์ต่าง ๆ ได้มากและลึกกว่า ส่งผลให้เกิดการอันตรายที่มากกว่าตามมา

ทางเข้าสู่ร่างกายของวัสดุนาโนมีความสัมพันธ์กับการก่อโรคในร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น อนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์สามารถก่อโรคกับผู้ที่ได้รับสัมผัสทางการหายใจ อย่างมะเร็งปอดได้ ทั้งนี้ความเป็นพิษและอันตรายของวัสดุนาโนขึ้นอยู่กับปัจจัยต่อไปนี้ คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี องค์ประกอบทางเคมี คุณสมบัติของกานจับตัวกัน รูปร่าง ขนาด ความเข้มข้นของวัสดุนาโนที่ได้รับ ระยะเวลาการสัมผัส การกระจายของวัสดุนาโน

2.2 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นวิธีการใช้เซลล์ไปทดสอบกับสารแล้ววัดความมีชีวิต เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ ซึ่งมักนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดกรองสารที่เป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ในขั้นตอนการพัฒนา ยา หรือ ประเมินความปลอดภัยของสารที่เป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ในยา เครื่องสำอาง สารปรุงแต่งอาหาร สารเคมีทางอุตสาหกรรม สารเคมีปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมทั้งที่เป็นและไม่ได้เป็นวัสดุนาโน

ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) มีความซับซ้อนและมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง การวิเคราะห์ความเป็นพิษด้วยเซลล์สัตว์จะต้องทราบข้อมูลพื้นฐาน เช่น คุณสมบัติของสารขณะสัมผัสกับเซลล์ ชนิดและปริมาณของเซลล์ที่เป็นเซลล์เป้าหมาย ความเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่สัมผัสจริงในธรรมชาติ ดังนั้นการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงต้องเลือกเซลล์อวัยวะที่เหมาะสมและควรเป็นเซลล์เป้าหมายที่แท้จริง เนื่องจากเซลล์ต่างชนิดกันอาจตอบสนองหรือแสดงความเป็นพิษได้ไม่เหมือนกัน อีกทั้งระดับความเป็นความพิษอาจแตกต่างกัน

2.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ด้านการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเซลล์สัตว์เป็นแบบจำลองที่นิยมใช้ประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์แทนสัตว์ทดลอง เพราะการประเมินเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นพิษต่อเซลล์ทำได้รวดเร็ว ควบคุมสภาพแวดล้อมที่ทำการวิเคราะห์ได้ สูญเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่า และ ไม่มีปัญหาในเรื่องของศีลธรรม[3]

เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง แบ่งออกได้เป็นสามกลุ่มใหญ่ๆ คือ เซลล์ปกติ เซลล์ไลน์ที่ไม่ได้เกิดจากเซลล์มะเร็ง และเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ไลน์จากเซลล์มะเร็ง

2.2.1.1 กลุ่มเซลล์ปกติ (Normal human primary cells and tissues)

กลุ่มเซลล์ปกติหรือเซลล์ปฐมภูมิ (Primary cell) คือเซลล์ที่มาจากมนุษย์หรือสัตว์โดยตรง เซลล์ได้จากการย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์ หรือการปั่นแยกด้วยวิธีเชิงกลแล้วนำมาเพาะเลี้ยงโดยเริ่มนับเซลล์เป็นแพสเสจ (Passage) ที่ 0 ข้อดีของการใช้เซลล์กลุ่มนี้ คือ เซลล์แสดงลักษณะเหมือนกับเซลล์ของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะเดิม แต่ข้อเสียคือ มีการผสมของเซลล์หลายชนิด ต้องใช้ความพยายามแยกเซลล์หลากหลายซึ่งมักจะปนกันมาจากการตัดเนื้อเยื่อ[7]

2.2.1.2 กลุ่มเซลล์ไลน์ที่ไม่ได้เกิดจากเซลล์มะเร็ง (Human non-cancer cell lines)

กลุ่มเซลล์ไลน์ที่มีช่วงชีวิตจำกัดเป็นเซลล์ที่มีการซัพคัลเจอร์ (Subculture) หรือ ถ่ายโอนมาจากเซลล์ปฐมภูมิเริ่มนับเซลล์เป็นแพสเสจที่ 1 เมื่อเลี้ยงไปจนถึงแพสเสจที่ 3 เซลล์จะเริ่มมีลักษณะคงตัวสามารถเลี้ยงต่อเนื่องได้ระยะหนึ่ง เซลล์จะตายตามอายุของเซลล์ สาเหตุเกิดจาก เทโลเมียร์ (Telomere) ที่อยู่ปลายสุดโครโมโซมหดสั้นลงในแต่ละครั้งที่มีการแบ่งเซลล์จนหมด[7]

2.2.1.3 กลุ่มเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ไลน์จากเซลล์มะเร็ง (human cancer cells และ cell lines)

กลุ่มเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ไลน์จากเซลล์มะเร็ง คือเซลล์ไลน์ที่เจริญต่อเนื่อง (Continuous cell line) เซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน p53 ส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์เทโลเมอเรสที่ทำหน้าที่สร้างเทโลเมียร์ เซลล์จึงสามารถแบ่งตัวได้ต่อเนื่อง หรืออาจเป็นเซลล์ไลน์ที่ถูกกระตุ้นให้เป็นเซลล์มะเร็งโดยใช้สารก่อมะเร็งหรือไวรัส ข้อดีของเซลล์กลุ่มนี้คือ สามารถเลี้ยงได้นาน แต่ข้อเสียคือ เซลล์สูญเสียการแสดงออกของยีนบางชนิด[7]

การเพาะเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะอยู่ในสารละลายที่เป็นอาหารของเซลล์ (Cell suspension) ซึ่งจะถูกนำไปเลี้ยงในภาชนะที่เป็นพลาสติกในสภาวะที่เหมาะสม การเจริญเติบโตของเซลล์มี 2 ลักษณะ คือ เซลล์เจริญแผ่เต็มพื้นผิวภาชนะ (Adherent monolayer) เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติและเซลล์ที่มีการเจริญแบบแขวนลอย เซลล์สามารถเคลื่อนตัวได้อย่างอิสระในอาหาร (Suspended cell) เป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์เม็ดเลือด

2.2.2 การส่งเสริมการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์เกาะผิว

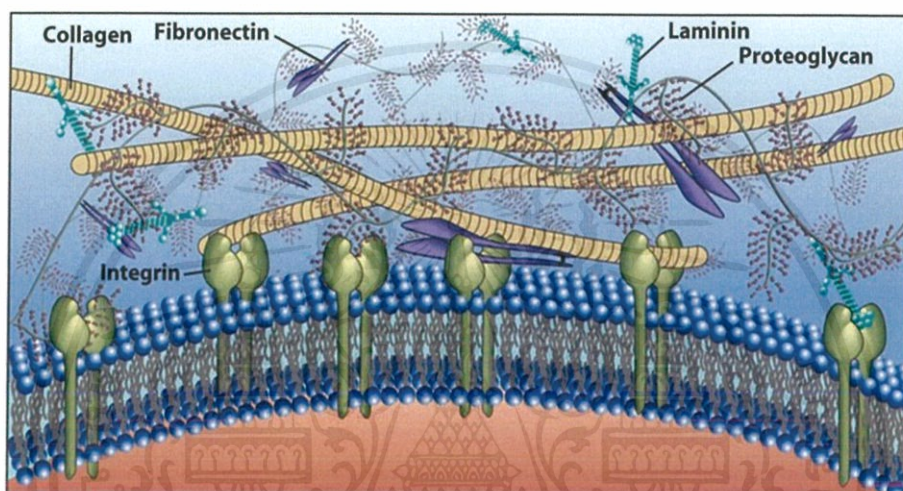
โดยทั่วไปเซลล์สามารถปรับสภาพแวดล้อมที่เซลล์อยู่โดยการหลั่งสาร เช่น ECM และ Growth factor สู่อำนาจเพื่อส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ เซลล์บางชนิดสามารถปรับตัวได้รวดเร็วจึงเจริญได้ดีกว่า ดังนั้นหากนำอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ให้เจริญแล้วมาเลี้ยงเซลล์ (Conditioned medium) จะช่วยให้เซลล์เจริญได้ดี อย่างไรก็ตามอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์มาแล้วจะมีของเสียที่เซลล์ปลดปล่อยออกมา รวมทั้งเซลล์ที่ไม่มีชีวิตปะปนอยู่ในอาหาร[8] ดังนั้นการใช้สารที่ช่วยให้เซลล์เกาะติดกับพื้นผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ (Attachment factor) มาปรับปรุงสภาพพื้นผิวให้เหมาะสมต่อการเกาะเจริญของเซลล์จึงมักใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเซลล์เกาะผิว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Attachment factor สามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกจะเป็นกลุ่มของสารชีวภาพ ทำหน้าที่เพิ่มประจุบนพื้นผิว ประจุที่พื้นผิวจะไปดึงดูดกับประจุที่เยื่อหุ้มเซลล์จึงช่วยให้เซลล์ยึดเกาะ พื้นผิวได้ดีขึ้น เช่น Poly-L lysine กลุ่มที่สองกลุ่มของโปรตีนที่อยู่นอกเยื่อหุ้มเซลล์ (Extracellular matrix, ECM) โปรตีนในกลุ่มนี้จะจับกับโปรตีนที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (Integrins) [9] ดังรูปภาพที่ 2.1

ดังนั้นเมื่อเคลือบโปรตีนในกลุ่มนี้ลงบนพื้นผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์จึงส่งผลให้เซลล์ยึดเกาะพื้นผิวได้ดีขึ้น โดยโปรตีนในกลุ่มนี้ที่รู้จักโดยมากได้แก่ Collagen, Laminin, Fibronectin เป็นต้น



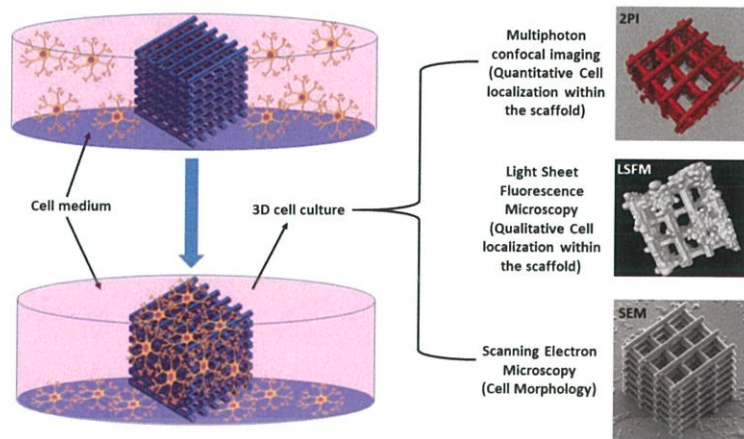
ภาพที่ 2.1 แสดงการจับกันระหว่างโปรตีน ECM กับโปรตีนที่แทรกในเยื่อหุ้มเซลล์[10]

2.2.3 ข้อดีและข้อจำกัดของการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

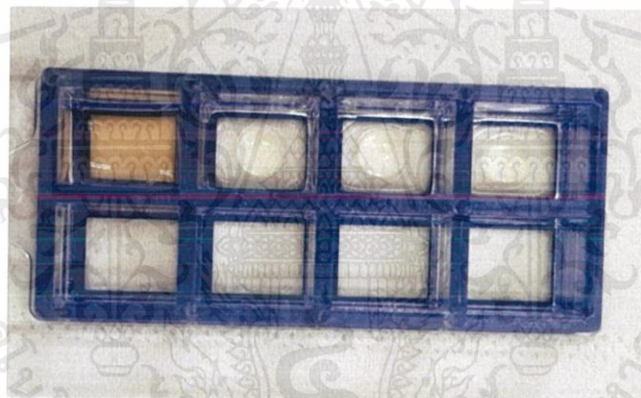
การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง มีข้อดีคือ สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมที่ทำการวิเคราะห์อย่างเช่น ความเข้มข้นของสารที่ทดสอบและระยะเวลาที่สัมผัสกับสาร ได้แม่นยำกว่าในสัตว์ทดลอง ทั้งนี้เป็นเพราะว่า ในสัตว์ทดลอง มีระบบหมุนเวียน ระบบขับถ่าย กลไกกำจัดสิ่งแปลกปลอม ส่งผลให้ควบคุมปัจจัยที่จะศึกษาได้ยาก นอกจากนี้การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงยังเอื้อต่อการเก็บตัวอย่างได้สม่ำเสมอ การเก็บตัวอย่างในสัตว์ทดลองอาจมีปัญหามาจาก สภาพทางกายภาพของสัตว์ทดลองไม่เหมาะสมต่อการเก็บตัวอย่าง[9] แต่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงขึ้นแบบ 2 มิติ (Monolayer) มีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ข้างเคียงต่างจากเซลล์สภาวะตามธรรมชาติที่มีการจัดเรียงตัวแบบ 3 มิติ ซึ่งอาจทำให้ผลการศึกษาดังนั้น การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จึงควรใช้เซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ในร่างกายให้ได้มากที่สุด

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติ เซลล์จะมีการเจริญเกาะกลุ่มกันเป็นโครงสร้าง 3 มิติคล้ายขึ้นเนื้อเยื่อ สามารถเพาะเลี้ยงได้โดยการตรึงบนโครงเลี้ยงเซลล์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Scaffold) หรือ เลี้ยงในโดเมนที่เป็นโปรตีน Extracellular matrix[10]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะของโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold) เพื่อให้เซลล์เจริญเป็น
โครงสร้าง 3 มิติ[11]



ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะของโดมเมทริกซ์เจลที่ใช้เลี้ยงเซลล์

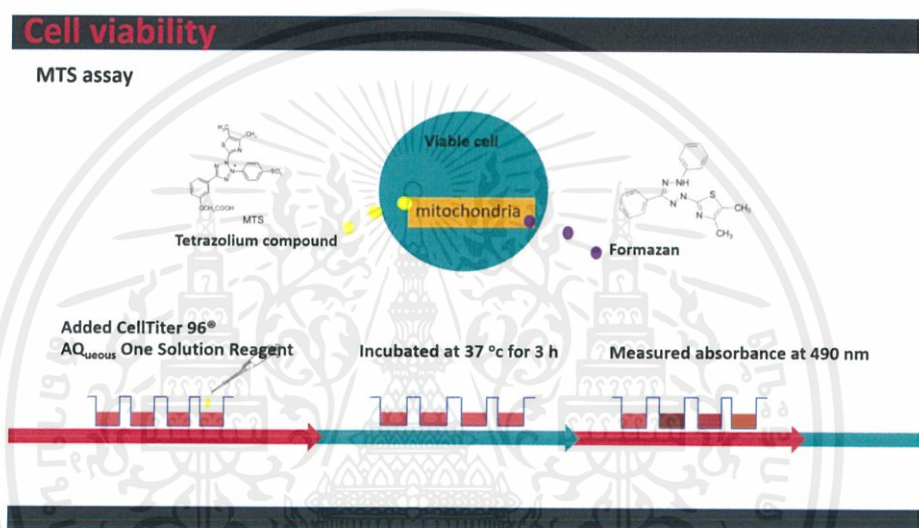
อย่างไรก็ตามเซลล์เพาะเลี้ยงแบบ 2 มิติและ 3 มิติ ไม่สามารถศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) ตั้งแต่การรับยา ระยะเวลาและความเข้มข้นของยาที่ออกฤทธิ์ การเปลี่ยนแปลง ความเข้มข้นของยา เมตาบอลิซึม การแทรกซึมหรือแพร่ผ่านเนื้อเยื่อ และการขับยาออกจากร่างกาย ได้ ซึ่งการที่สารไม่เป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยง อาจก่อความเป็นพิษหลังจากเกิดเมตาบอลิซึมในร่างกาย ได้ ดังนั้นจึงยังต้องมีการตรวจสอบความเป็นพิษหรือศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลองแต่การทดลองใน สัตว์ทดลองมีข้อจำกัดอันเนื่องมาจาก เมตาบอลิซึมในคนและสัตว์ทดลองมีความแตกต่างกัน และใน สัตว์แต่ละสายพันธุ์ก็มีความแตกต่างกันมาก ข้อมูลที่ได้จึงยังไม่ใช่ว่าข้อมูลที่ดีอีกทั้งปัญหาศีลธรรมและ จรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลองก็ยังคงเป็นข้อจำกัดในการใช้สัตว์ทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การวิเคราะห์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย MTS assay

ในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์หลังจากให้เซลล์สัมผัสกับสารทดสอบสามารถวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีการ MTS Assay ซึ่งเป็นวิธีการประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจากการวัดกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเซลล์

MTS คือ สารละลายเตตระโซเลียม (Tetrazolium) มีสีเหลือง สารชนิดนี้จะถูกเอนไซม์ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เปลี่ยนให้อยู่ในรูปของฟอร์มazan (Formazan) ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 490 นาโนเมตร ดังนั้นปริมาณของฟอร์มazanที่เพิ่มขึ้นจะบ่งบอกถึงปริมาณของเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้น[12]



ภาพที่ 2.4 แสดงหลักการของ MTS Assay

จากภาพที่ 2.4 หลังจากที่ยืดสารละลาย MTS ให้กับเซลล์ที่ต้องการวิเคราะห์แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในระหว่างนี้สารละลาย MTS จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของฟอร์มazanเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ค่าการดูดกลืนแสงจะแตกต่างกันไปตามปริมาณของฟอร์มazanที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ดังนั้นปริมาณของฟอร์มazanจึงบ่งชี้ถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

2.4 เทคโนโลยีไมโครฟลูอิดิก

2.4.1 ระบบปฏิบัติการย่อส่วน (Lab on a chip)

Lab on a chip หรือ Microfluidics chip คือ อุปกรณ์ที่รวบรวมกระบวนการในห้องปฏิบัติการ อย่างเช่น การแยกสาร การผสมสาร การตรวจวัดสาร ไว้ในรูปของชิพที่มีขนาดเล็กตัวหนึ่ง ส่งผลให้เกิดข้อดีในการทำการทดลอง หรือ ตรวจวิเคราะห์สาร คือ ประหยัดปริมาณสาร ประหยัดพื้นที่ที่ใช้การทำการทดลอง ประหยัดทรัพยากรบุคคล ไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้ทำการทดลองหลายคน พกพาได้ง่าย ให้ผลที่รวดเร็ว[13]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งในปัจจุบันจะพบว่ามีกรนำ Microfluidics chip มาประยุกต์ใช้งานทางด้านการแพทย์ และชีววิทยาอยู่มาก ยกตัวอย่างเช่น ชุดตรวจวินิจฉัยโรคแบบสำเร็จรูป การจำลองการทำงานของอวัยวะภายในร่างกายมนุษย์ (Organs On Chips) การวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล เช่น สารพันธุกรรม (DNA) เป็นต้น ทั้งนี้การตรวจวิเคราะห์ต่าง ๆ จะอาศัยเทคโนโลยีระบบของไหลจุลภาค ซึ่งโครงสร้างสำคัญของเทคโนโลยีระบบของไหลจุลภาคก็คือช่องทางการไหลขนาดเล็กในระดับไมโครเมตร (microchannel) ซึ่งจะเป็นช่องทางในการไหลของสารที่ต้องการทำการตรวจวิเคราะห์ โดยการสร้างช่องทางการไหลสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค Micro fabrication ซึ่งในช่วงเริ่มต้นของการพัฒนา Microfluidics chip ถูกสร้างขึ้นจากวัสดุฐานรองเช่น ซิลิกอนและแก้ว ด้วยเทคนิค Photolithography และ Etching ซึ่งดัดแปลงมาจากอุตสาหกรรมการออกแบบและพัฒนาวงจรไฟฟ้าขนาดเล็ก (Microelectronic industry) แต่กระบวนการ Etching มีราคาสูงและไม่ยืดหยุ่นจึงเป็นแรงผลักดันให้ปัจจุบันนักวิจัยส่วนใหญ่หันมาสนใจสร้างและพัฒนา Microfluidics chip โดยใช้พอลิเมอร์แทนเนื่องจาก ใช้เวลาในการผลิตน้อย มีคุณสมบัติ เข้ากันได้กับชีวโมเลกุลได้ (Biocompatibility) และมีราคาถูกจึงสามารถใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้งได้ โดยจะประยุกต์ใช้พอลิเมอร์กับเทคนิค Soft lithography ที่อยู่บนรากฐานของการพิมพ์แบบ (Printing) และหล่อแบบ (Mold) จากแม่แบบต่าง ๆ โดยที่แม่แบบสามารถสร้างได้จากเทคนิคต่าง ๆ นอกเหนือจากเทคนิค photolithography เช่น electron beam lithography, x-ray lithography หรือ ion beam lithography เป็นต้น[14]

2.4.2 กระบวนการซอฟต์แวร์ลิโธกราฟี (Soft lithography)

Soft lithography คือ กระบวนการถ่ายโอนหรือสร้างลวดลายด้วยการใช้วัสดุที่มีลักษณะอ่อนนิ่มอย่าง พอลิเมอร์หล่อลงแม่พิมพ์ที่สามารถสร้างได้จากเทคนิค photolithography[15]

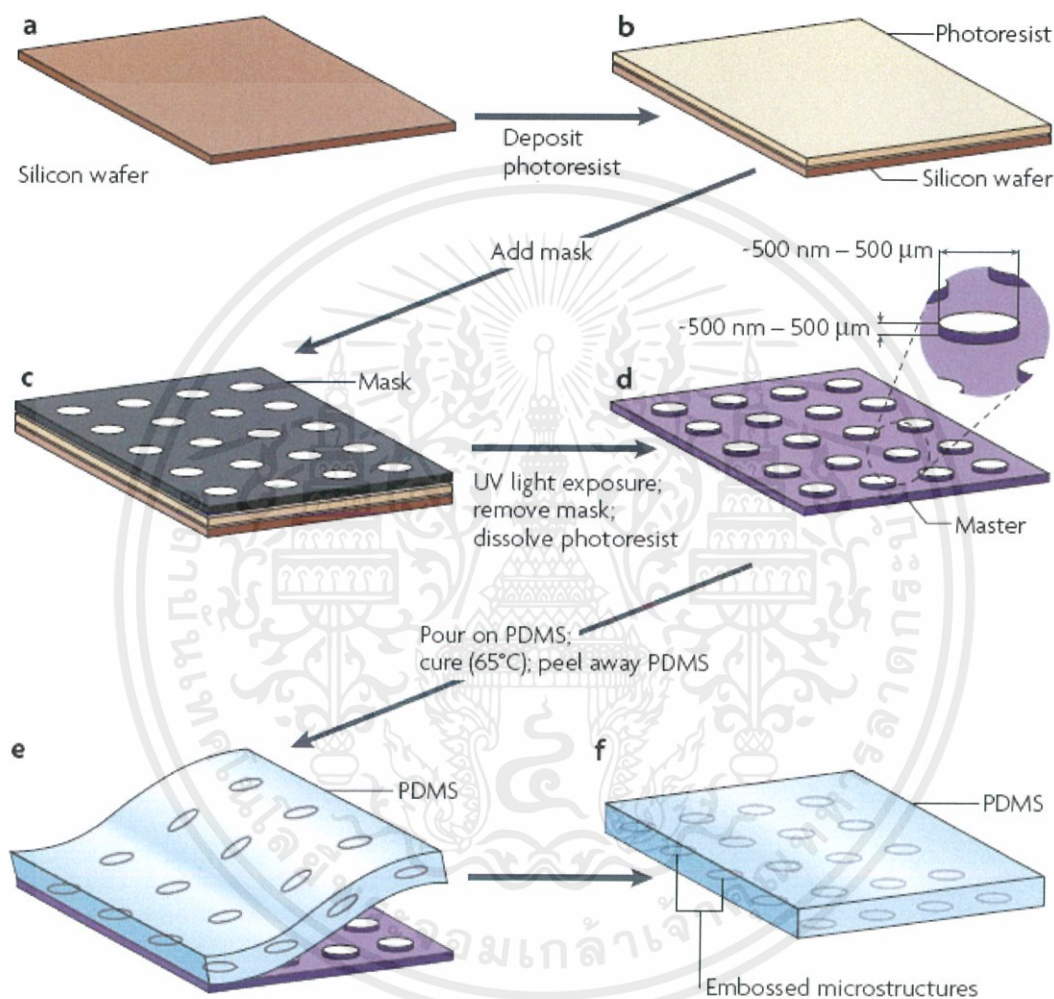
Photolithography คือ กระบวนการถ่ายโอนลวดลายด้วยการฉายแสง UV โดยจะทำการฉายแสง UV จากเครื่องกำเนิดแสงผ่านหน้ากากกันแสง (Photomask) ลงบนแผ่นฐานรองรับ (Substrate) ที่ เคลือบด้วยน้ำยาไวแสง (Photoresist) เกิดเป็น ลวดลายตามหน้ากากกันแสงบนชั้นของน้ำยาไวแสง โดยที่ลวดลายที่เกิดขึ้นจะสอดคล้องกับชนิดของน้ำยาไวแสงที่มีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด ดังนี้

1. น้ำยาไวแสงชนิดบวก เมื่อโดนแสงจะเกิดความอ่อนตัว และหลุดออกไปเมื่อทำการล้างลายด้วยน้ำยาล้างลาย (Developer) ดังนั้นส่วนที่เกินเป็นลวดลายจะส่วนที่ไม่โดนแสง
 2. น้ำยาไวแสงชนิดลบ เมื่อโดนแสงจะเกิดการแข็งตัว ดังนั้นส่วนที่ไม่โดนแสงจะหลุดออกไปเมื่อทำการล้างลายด้วยน้ำยาล้างลาย (Developer) ดังนั้นส่วนที่เกิดเป็นลวดลายจะเป็นส่วนที่โดนแสง[16]
- ซึ่งขนาดของลวดลายที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากระยะเวลาในการฉายแสงคือ ถ้าให้มีการฉายแสงด้วยระยะเวลาที่นานเกินไปจะส่งผลให้ขนาดของลวดลายเล็กกว่าลวดลายบนหน้ากากกันแสง และถ้ามีการให้แสงด้วยระยะที่น้อยเกินไปจะส่งผลให้ขนาดของลวดลายใหญ่กว่าลวดลายบนหน้ากากกันแสง ดังนั้นจะต้องมีการฉายแสงด้วยระยะเวลาที่เหมาะสมโดยคำนวณได้จากสมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$E = Pt$$

เมื่อ E คือ พลังงานของแสง มิลลิจูล / ตารางเซนติเมตร
 P คือ กำลังของแสง มิลลิวัตต์ / ตารางเซนติเมตร
 t คือ เวลาที่ใช้ในการฉายแสง / วินาที

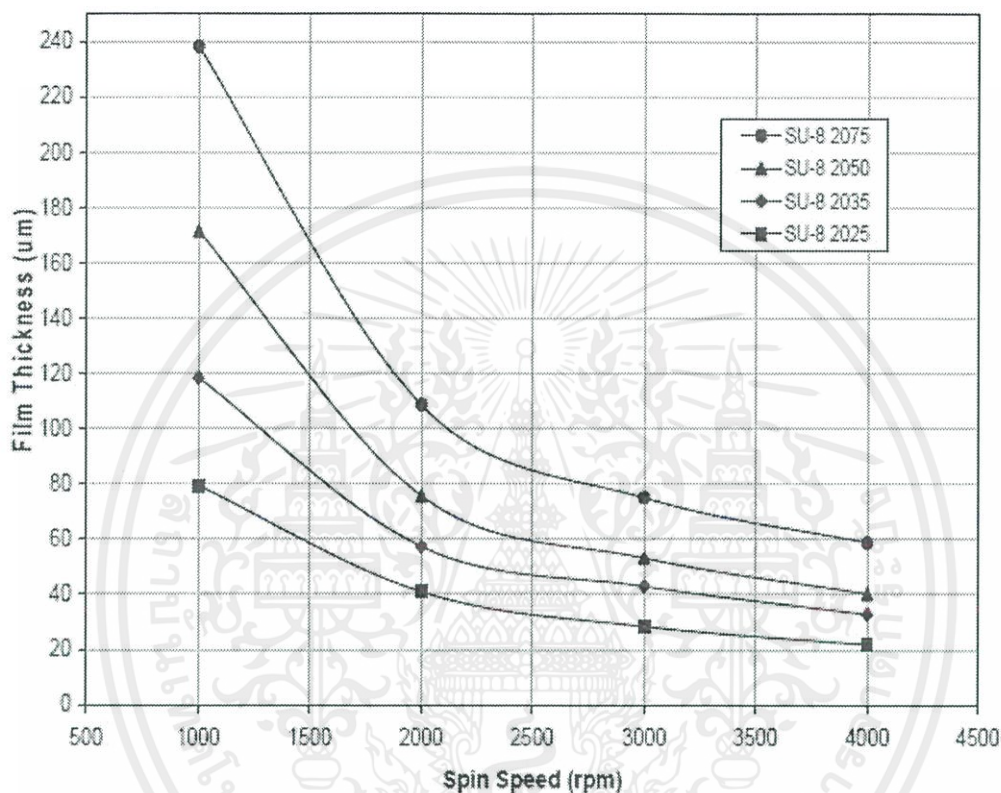


ภาพที่ 2.5 แสดงวิธีการสร้างชั้น PDMS โดยที่รูป a-d แสดงการสร้างแม่พิมพ์ด้วยวิธี Photolithography, รูป e-f แสดงการสร้างชั้น PDMS ด้วยวิธีการ soft lithography[17]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 น้ำยาไวแสง (Photoresist)

SU-8 2035 เป็นน้ำยาไวแสงชนิดลบ มีค่าความหนืดแตกต่างกันตามหมายเลข ซึ่งค่าความหนืดของน้ำยาไวแสง (Photoresist) จะสอดคล้องกับความเร็วในการหมุนเคลือบ (Spin coat) และส่งผลต่อความหนาของชั้นฟิล์มน้ำยาไวแสงหรือก็คือความสูงของแม่พิมพ์[18]



ภาพที่ 2.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วรอบในการหมุนเคลือบกับความหนาของชั้นฟิล์มน้ำยาไวแสง[18]

2.5 การวิเคราะห์พื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม

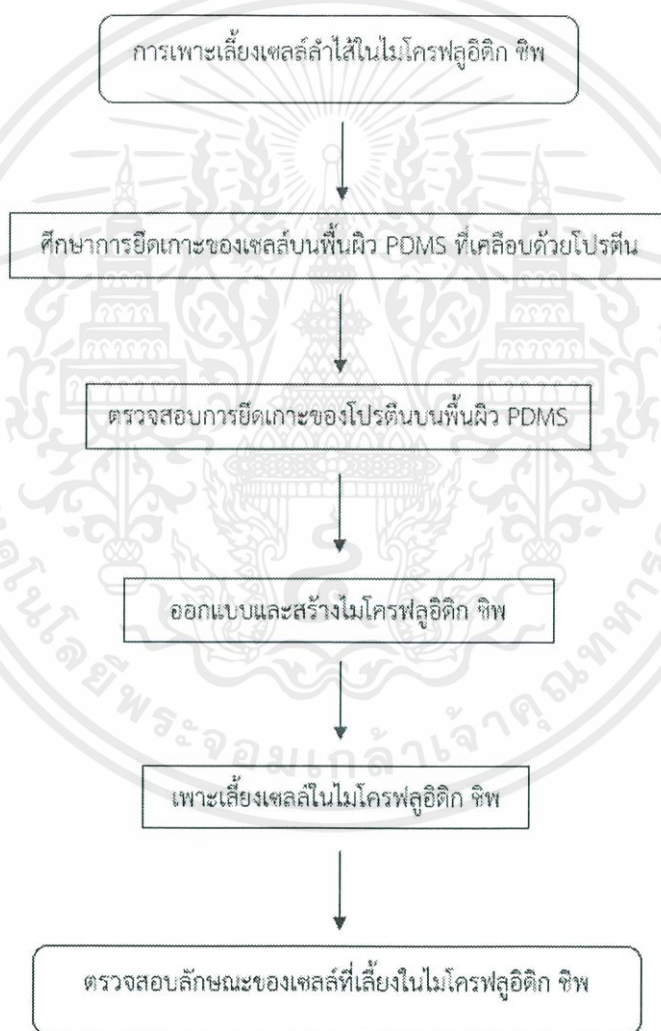
กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscope, AFM) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาสภาพพื้นผิวของวัสดุต่าง ๆ ในระดับนาโนเมตร โดยอาศัยส่วนแขน (Cantilever) ที่มีเข็ม (Tip) ขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร เคลื่อนที่ไปตามพื้นผิวของวัสดุ ในขณะที่มีการยิงแสงเลเซอร์ให้ตกกระทบบนปลายของแขนและสะท้อนเข้าสู่เครื่องตรวจวัดความเข้มแสง เมื่อเข็มเคลื่อนที่ไปตามพื้นผิวจะเกิดแรงอันตรกิริยาระหว่างอะตอมของเข็มกับพื้นผิวส่งผลให้ส่วนแขนเกิดการขยับขึ้น ลง ความเข้มแสงจึงเกิดการเปลี่ยนแปลง ข้อมูลความเข้มแสงที่เปลี่ยนแปลงนี้จะถูกประมวลผลโดยคอมพิวเตอร์เพื่อแสดงผลเป็นภาพของพื้นผิว ในทางเทคนิค AFM สามารถเก็บข้อมูลได้ 4 ลักษณะ (mode) ที่สำคัญคือ

1. Contact mode เป็นการศึกษาสภาพพื้นผิวโดยให้เข็มอยู่ใกล้กับพื้นผิวประมาณ 1 ถึง 2 อังสตรอมและลากเข็มไปตามพื้นผิวที่ต้องการศึกษาส่งผลให้เกิดแรงผลักรวม โดยสภาพพื้นผิวที่แตกต่างกันก็จะส่งผลให้แรงผลักรวมแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเทคนิคของ Contact mode มีข้อเสียคือ การลากเข็มไปบนพื้นผิวของวัสดุอาจทำให้เกิดความเสียหายที่พื้นผิว
2. Non-contact mode ในเทคนิคนี้ตัวเข็มจะถูกยกให้ห่างจากพื้นผิวประมาณ 10 – 100 อังสตรอมเพื่อหลีกเลี่ยงการทำลายพื้นผิวที่ศึกษา แรงที่กระทำระหว่างปลายเข็มและพื้นผิวจะเป็นลักษณะแรงดึงดูดซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพพื้นผิวของชิ้นงาน อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือ แรงดึงดูดที่เกิดขึ้นจะอ่อนกว่าแรงผลักรวมใน contact mode ดังนั้นการตรวจสอบพื้นผิวจะไวต่อสิ่งแปลกปลอมที่อยู่บนพื้นผิว ความละเอียดของภาพจึงน้อยกว่า
3. Tapping mode เป็นเทคนิคที่ผสมระหว่าง Contact mode กับ Non-contact mode เข้าด้วยกันกล่าวคือให้ปลายเข็มอยู่ใกล้กับพื้นผิวเช่นเดียวกับ Contact mode เพื่อให้เกิดภาพที่ชัดเจนในขณะเดียวกันก็จะให้มีการสั่นของแขนหรือทำให้เข็มเกิดการเคลื่อนที่ขึ้นลงขณะตรวจสอบ เพื่อหลีกเลี่ยงการลากเข็มไปบนพื้นผิวของวัสดุซึ่งจะทำให้พื้นผิวเสียหายได้
4. Force Modulation Mode มีหลักการที่คล้ายกับ Tapping mode คือจะให้แขนมีการสั่นขณะตรวจสอบพื้นผิวแต่แอมพลิจูดในการสั่นของเทคนิค Force Modulation Mode จะน้อยกว่า Tapping mode ในขณะที่ความเร็วในการสั่นสูงกว่าความเร็วในการเคลื่อนที่ของเข็ม[19]

บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

ภายในบทนี้จะกล่าวถึงสารเคมี อุปกรณ์ และวัสดุต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง วิธีการเตรียมและขั้นตอนการทดลองต่าง ๆ ในงานวิจัยซึ่งมีลำดับขั้นตอนในการศึกษาดังที่แสดงในภาพที่ 3.1 นี้



ภาพที่ 3.1 แสดงแผนผังขั้นตอนการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. Biological safety cabinet (Safety class 2, Thermo Scientific)



ภาพที่ 3.2 แสดงเครื่อง Biological safety cabinet

2. ตู้บ่มเซลล์ (5%CO₂ incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Forma Series II water jacket, Thermo Scientific)



ภาพที่ 3.3 แสดงตู้บ่มเซลล์

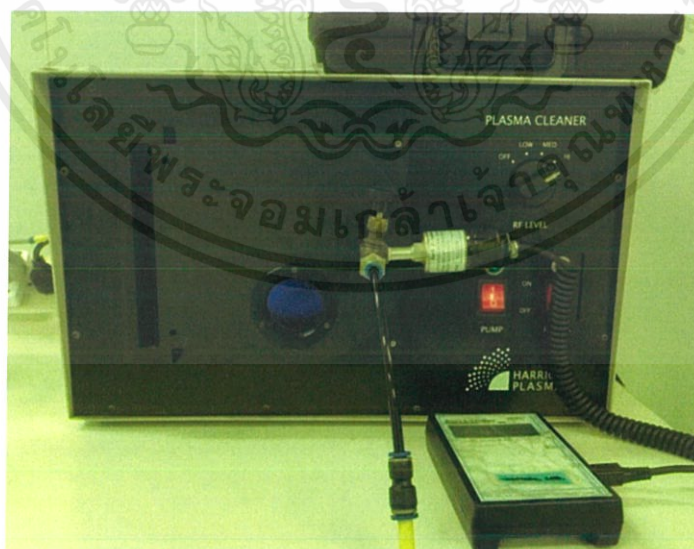
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Inverted microscope (CKX41, Olympus)



ภาพที่ 3.4 แสดงเครื่อง Inverted microscope

4. Plasma Cleaner (PDC-001/002 (115/230V), Harrick Plasma)



ภาพที่ 3.5 แสดงเครื่อง Plasma Cleaner

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (SPA-400, SII)



ภาพที่ 3.6 แสดงกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม

6. Microplate reader (SpectraMax M5, RI Technologies)



ภาพที่ 3.7 แสดงเครื่อง Microplate reader[20]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. Syringe pump (NE-1000, NEW ERA)



ภาพที่ 3.8 แสดง Syringe pump

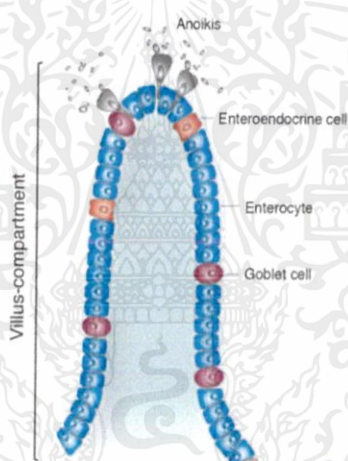
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose powder (Cat.no. 12800-085, Gibco)
2. Fetal bovine serum (Cat.no. 16000-036, Gibco)
3. Non-essential amino acid
4. Glutamax (Cat.no. 35050-061, Gibco)
5. Penicillin-Streptomycin (Cat no. 1IVG7-15140-122, Gibco)
6. Trypsin-EDTA 0.25% (Cat no. 1IVG7-25200-072, Gibco)
7. Dulbecco's Phosphate Buffered Salts (DPBS), (Cat no. 1IVG4-14200-075, Gibco)
8. Trypan blue solution 0.4% (Cat no. T8154, Sigma-Aldrich)
9. Matrigel (Cat no. 356231, Corning)
10. Collagen (Cat no. 354236, Corning)
11. BSA (Cat no. 9048-46-8, Sigma-Aldrich)
12. Poly-L lysine (Cat no. 25988-63-0, Sigma-Aldrich)

3.3 เซลล์ที่ใช้สำหรับการทดลอง

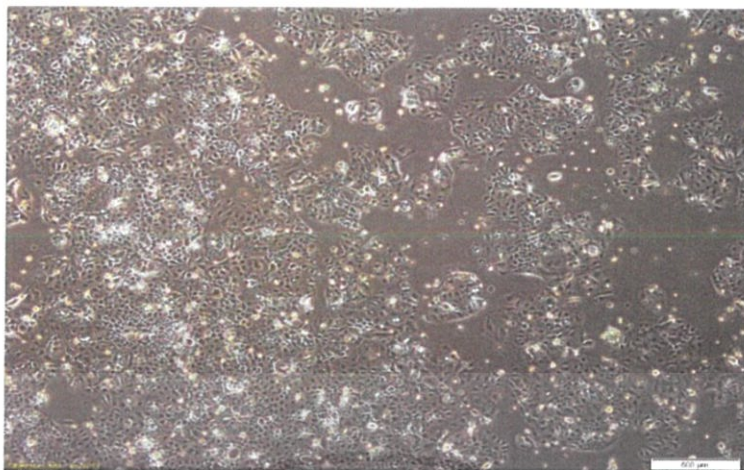
ในงานวิจัยนี้จะนำเซลล์ลำไส้มาใช้ในการศึกษาการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน เพื่อให้ได้สภาพพื้นผิวภายในไมโครแชนแนลที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ เมื่อทราบถึงสภาพพื้นผิวที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ จึงจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ขึ้นในระบบไมโครฟลูอิดิกเพื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ในสภาวะที่ใกล้เคียงกับเซลล์ในร่างกายมนุษย์ ดังนั้นจึงเลือกเซลล์ลำไส้ที่มาจากมนุษย์มาใช้ในการวิจัยนี้ 2 ชนิดคือ

1. เซลล์ชั้นนอกสุดของผนังลำไส้มนุษย์ (Human epithelial colorectal adenocarcinoma) มีชื่อเรียกว่า Caco-2 โดยที่ชั้นนอกสุดของลำไส้มนุษย์จะมีลักษณะเฉพาะของลำไส้คือมีโครงสร้างยื่นออกมาจากผนังลำไส้คล้ายนิ้วมือขนาดเล็กเรียกว่า วิลโล (villi) มีหน้าที่ในการเพิ่มพื้นที่ผิวในลำไส้โครงสร้างของวิลโลจะประกอบไปด้วยเซลล์หลายชนิดมาเรียงต่อกันดังที่แสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.9 แสดงโครงสร้างวิลโล

โดยเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของวิลโลจะเป็นเซลล์ enterocyte มีหน้าที่ในการดูดซึมสารอาหารเป็นหลัก เซลล์ Caco-2 เป็นเซลล์ enterocyte ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์ ข้อดีคือสามารถเลี้ยงได้เป็นระยะเวลานานและนิยมนำมาใช้เป็นตัวแทนลำไส้ในการทดสอบสาร



ภาพที่ 3.10 แสดงลักษณะของเซลล์ Caco-2 โดยมี scale bar คือ 500 ไมครอน

2. เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในลำไส้มนุษย์ (Human fibroblast colorectal adenocarcinoma) มีชื่อเรียกว่า CCD-18Co เซลล์ชนิดนี้จะพบเป็นจำนวนมากในชั้น Lamina propria ซึ่งอยู่ถัดมาจากชั้นแรกของผนังลำไส้มนุษย์ ลักษณะเด่นของเซลล์ชนิดนี้คือ สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวได้ง่ายจึงนำเซลล์ชนิดนี้มาศึกษาการยึดเกาะบนพื้นผิว PDMS เพื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ Caco-2 ที่จะทำการเพาะเลี้ยงในระบบไมโครฟลูอิดิก



ภาพที่ 3.11 แสดงลักษณะของเซลล์ CCD-18Co โดยมี scale bar คือ 500 ไมครอน

3.4 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิจัย

3.4.1 การเตรียม 1X Dulbecco's Phosphate Buffered Salts (DPBS)

ภายในงานวิจัยนี้ 1X Dulbecco's Phosphate Buffered Salts หรือ DPBS จะถูกใช้ล้างผิวเซลล์ และเป็นสารละลายที่ใช้ในการเจือจางโปรตีน BSA ในการศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ โดยการเตรียม DPBS จะมีขั้นตอนดังนี้

1. เจือจาง DPBS ปริมาตร 100 mL ในน้ำกลั่น type1 ปริมาตร 880 mL
2. ปรับค่า pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้ได้ pH เท่ากับ 7.25
3. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น type1 ให้ได้ปริมาตร 1,000 mL
4. นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะเวลาหนึ่ง 15 นาที
5. เก็บ DPBS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
6. นำ DPBS มาอุ่นด้วย incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเมื่อต้องการใช้ทำการทดลอง

3.4.2 การเตรียม sterile-filtered DMEM

sterile-filtered DMEM หรือ DMEM คืออาหารสำหรับใช้เลี้ยงเซลล์ซึ่งจะใช้เลี้ยงเซลล์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้และยังใช้เจือจางโปรตีน Collagen และ Matrigel ในการศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ ซึ่งการเตรียม DMEM ในแต่ละครั้งจะเตรียม 2 ลิตรซึ่งเป็นปริมาตรสูงสุดที่ตัวกรอง PES 0.22 μm จะกรองได้

1. ละลาย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose powder 2 ของลงในน้ำกลั่น type1 ปริมาตร 1.95 ลิตร ด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง
2. กลั่นน้ำกลั่น type1 ภายในช่องเพื่อป้องกันไม่ให้ผง DMEM ติดค้างภายในช่องบรรจุ
3. เติม NaHCO_3 7.4 กรัม (การเติม NaHCO_3 โดยจะเติม 3.7 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตรในที่นี้เตรียม DMEM 2 ลิตรจึงเติม NaHCO_3 7.4 กรัม)
4. ปรับค่า pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 7.25 โดยที่ค่า pH ที่ต่ำกว่า 7.25 จะเติม HCl แต่ถ้าค่า pH มากกว่า 7.25 จะเติม NaOH
5. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น type1 ให้ได้ปริมาตร 2 ลิตร
6. นำไปกรองให้ปราศจากเชื้อด้วย 0.22 μm PES ภายในเครื่อง Biological safety cabinet (Safety class 2, Thermo Scientific)
7. เก็บ sterile-filtered DMEM ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.3 การเตรียม Complete DMEM medium

Complete DMEM medium คือ sterile-filtered DMEM ที่นำมาเติมสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2 ก่อนที่จะนำไปใช้เพาะเลี้ยงเซลล์โดยขั้นจะทำการเตรียม ภายในเครื่อง Biological safety cabinet ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

- (1) เติมสารอาหารเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ดังนี้ Fetal bovine serum (10%), Non-essential amino acid (1%), Glutamax (1%)
- (2) เติมนยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลชีพในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยจะเติม 1% Pen strep

3.4.4 การเตรียมโปรตีนที่ใช้ในการศึกษาการยึดเกาะของเซลล์

โปรตีนที่ใช้ในการศึกษาในงานวิจัยนี้จะประกอบไปด้วย BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel และ Matrigel ผสมกับ Collagen โดย BSA เป็นโปรตีนที่ถูกนำมาใช้ศึกษาเทียบกับโปรตีน Poly-L lysine, Collagen, Matrigel ที่มีการนำมาใช้เพิ่มความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์กับพื้นผิวซึ่งวิธีการเตรียมโปรตีนดังกล่าวมีดังนี้

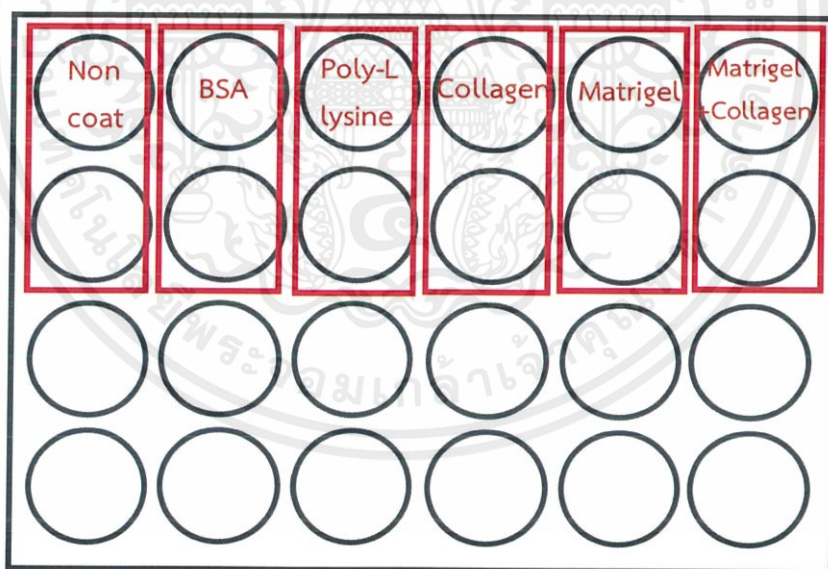
- (1) การเตรียม BSA จะทำโดยการชั่ง BSA ให้ได้ 5 มิลลิกรัมแล้วเติมสารละลาย DPBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วกรองด้วยฟیلเตอร์ขนาด 0.22 ไมครอนภายในเครื่อง Biological safety cabinet แล้วปรับความเข้มข้นให้เหลือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยการเจือจางในสารละลาย DPBS
- (2) การเตรียม Poly-L lysine จะนำ Poly-L lysine มาเจือจางในน้ำกลั่น type 1 เพื่อให้ความเข้มข้นลดเหลือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วกรองด้วยฟیلเตอร์ขนาด 0.22 ไมครอนภายในเครื่อง Biological safety cabinet
- (3) การเตรียม Collagen และ Matrigel จะนำ Collagen และ Matrigel มาเจือจางในสารละลาย DMEM เพื่อให้ความเข้มข้นลดลงเหลือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ
- (4) การเตรียม Matrigel ผสม Collagen จะนำ Collagen 50 ไมโครกรัมใน DMEM 1 มิลลิลิตร มาผสมกับ Matrigel 300 ไมโครกรัมใน DMEM 1 มิลลิลิตร

3.5 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ลำไส้บนพื้นผิว PDMS

การศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ลำไส้บนพื้นผิว PDMS จะเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 และ เซลล์ CCD-18Co บนพื้นผิว PDMS 2 สภาวะได้แก่ พื้นผิว PDMS ที่ได้รับพลาสมาของออกซิเจน แรงดันไฟฟ้าสูงเป็นเวลา 2 นาที 30 วินาทีและพื้นผิวที่ไม่ได้รับพลาสมาของออกซิเจนก่อนทำการเคลือบโปรตีนซึ่งหลังจากเตรียมสภาวะพื้นผิว PDMS ที่หล่อใน 24 wells plate จะมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. แช่ 70% ethanol หลุมละ 500 ไมโครลิตรเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูด 70% ethanol ในแต่ละหลุมทิ้ง
2. นำ 24 wells plate ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
3. ฉายแสง UV ให้กับ 24 wells plate ภายในเครื่อง Biological safety cabinet เป็นเวลา 30 นาทีโดยจะเปิดฝา 24 wells plate ไว้เพื่อให้พื้นผิวของ PDMS ได้รับแสง UV โดยตรง
4. แช่โปรตีนที่เตรียมขึ้นในหลุม หลุมละ 500 ไมโครลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเมื่อครบ 1 ชั่วโมงจะดูดโปรตีนในแต่ละหลุมทิ้งแล้วล้างด้วยสารละลาย DPBS 1 รอบ
5. เพาะเลี้ยงเซลล์ความหนาแน่น 8,000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรใน 24 wells plate

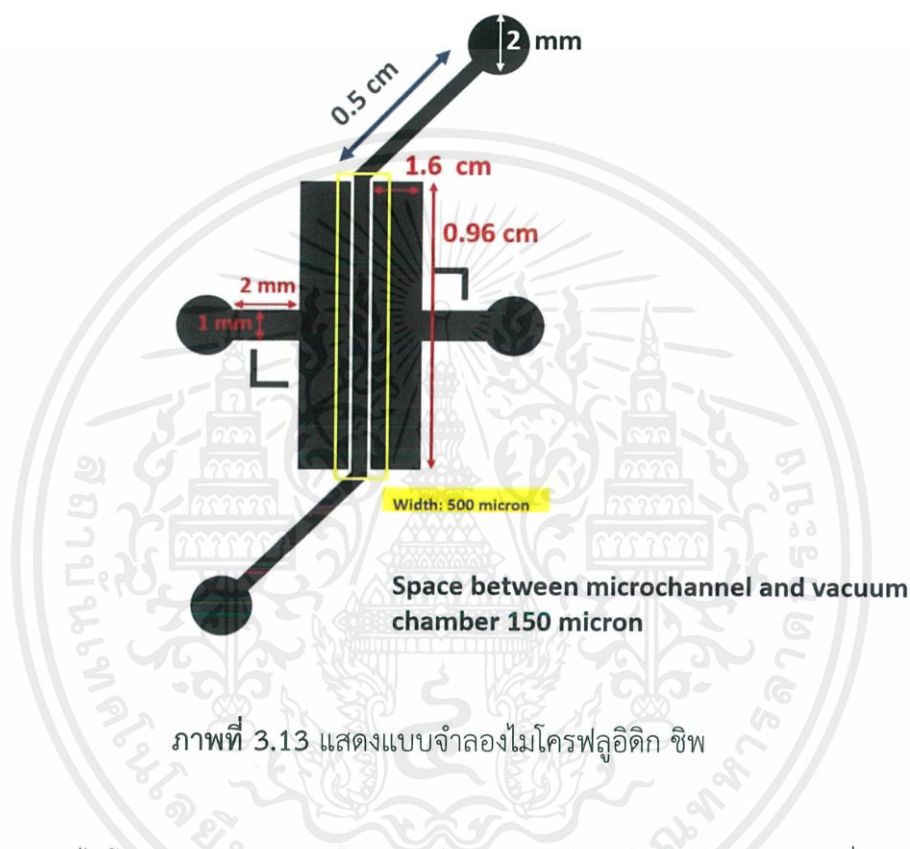


ภาพที่ 3.12 แสดงการทดลองการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว PDMS ใน 24 wells plate

3.5.2 การสร้างไมโครฟลูอิดิก ชิพ

3.5.2.1 ออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิก ชิพ

ออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิก ชิพด้วยโปรแกรม Computer Aided Design (CAD) โดยระบบไมโครฟลูอิดิก ชิพนี้จะมีลักษณะดังภาพที่ 3.13

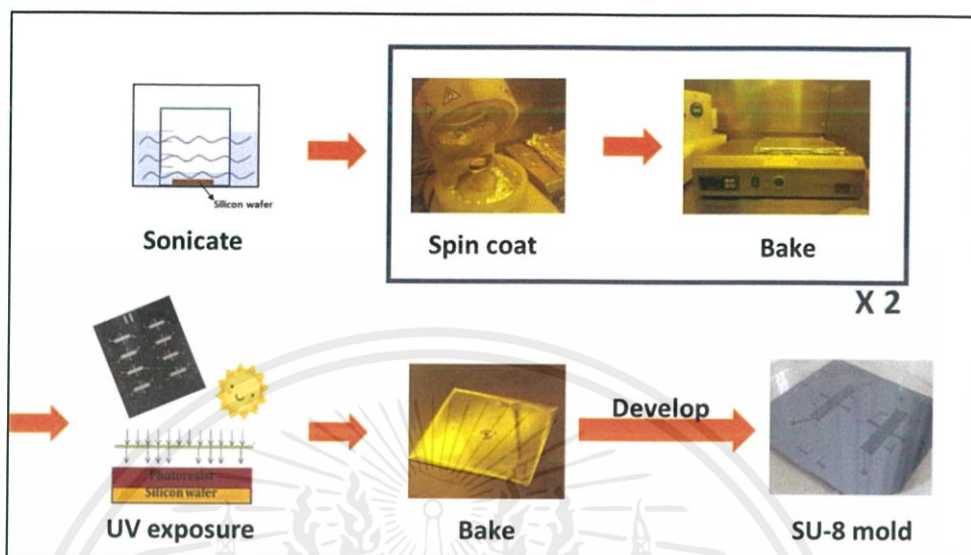


ภาพที่ 3.13 แสดงแบบจำลองไมโครฟลูอิดิก ชิพ

จากภาพไมโครแซนแนลความกว้าง 500 ไมครอนอยู่ระหว่างไมโครแซนแนลที่มีความกว้าง 1,600 ไมครอน คือ ไมโครแซนแนลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ ในขณะที่ไมโครแซนแนลที่อยู่ถัดออกมา 150 ไมครอนทั้งฝั่งซ้ายและขวาเรียกว่า Vacuum chamber จะใช้สร้างสภาวะการบีบอัดตัวของลำไส้ด้วยการดูดอากาศในไมโครแซนแนลออกและให้อากาศหรือแรงดันสลับไป สลับมา ส่งผลให้ไมโครแซนแนลที่อยู่ตรงกลางถูกยืดออกและบีบเข้า

หลังจากออกแบบระบบไมโครฟลูอิดิก ชิพด้วยโปรแกรมเสร็จจะนำไปสั่งทำฟิล์มสำหรับใช้เป็นหน้ากากกันแสง (Photomask) ในกระบวนการสร้างแม่พิมพ์จากน้ำยาไวแสง SU-8 2035

3.5.2.2 สร้างแม่พิมพ์จากกระบวนการ Photolithography ด้วยน้ำยาไวแสง (Photoresist) SU-8 2035

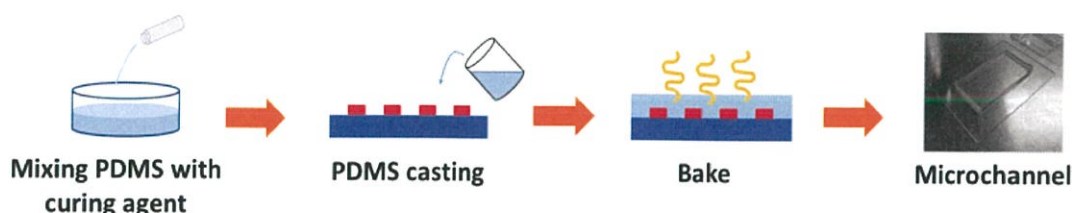


ภาพที่ 3.14 แสดงขั้นตอนการสร้างแม่พิมพ์จากน้ำยาไวแสง SU-8 2035

1. ทำความสะอาดแผ่นซิลิกอนด้วยน้ำยาล้างจานและสั่นด้วยคลื่นเสียง (sonication) กับ อะซิโตน (Acetone), ไอโซโพรพานอล (Isopropanol, IPA) และน้ำกลั่น (Deionized water, DI) เป็นเวลาอย่างละ 10 นาทีตามลำดับหลังจากนั้นจะพลาสมาพื้นผิวแผ่นซิลิกอนด้วยออกซิเจนเป็นเวลา 5 นาที ที่แรงดันไฟฟ้าสูง
2. สร้างชั้นฟิล์มน้ำยาไวแสง SU-8 2035 ลงบนแผ่นซิลิกอนด้วยวิธีการหมุนเคลือบ (spin coat) โดยจะทำการหมุนเกลียวที่ความเร็วรอบ 500 rpm เป็นเวลา 10 วินาทีก่อนจะหมุนเคลือบที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
3. ให้ความร้อนกับแผ่นซิลิกอนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาทีตามลำดับแล้วจึงปล่อยให้ชิ้นงานมีอุณหภูมิลดลงจนเท่ากับอุณหภูมิห้อง
4. ทำซ้ำข้อ (2) และ (3) 1 ครั้ง
5. ฉายแสง UV ผ่านหน้ากากกันแสง (Photo mask) เป็นเวลา 10 วินาทีเมื่อฉายแสง UV เสร็จให้นำชิ้นงานไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีและ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 นาที
6. เมื่อชิ้นงานมีอุณหภูมิลดลงจนเท่ากับอุณหภูมิห้องจะนำชิ้นงานมาแช่ในน้ำยาล้าง SU-8 2035 (SU-8 Developer) เป็นเวลา 11 นาทีเพื่อให้น้ำยาไวแสง SU-8 ส่วนที่ไม่ถูกแสง UV หลุดออก
7. ทำความสะอาดแม่พิมพ์ด้วยไอโซโพรพานอล (Isopropanol, IPA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.3 สร้างไมโครฟลูอิดิก ชิพจากแม่พิมพ์ SU-8 ด้วยวิธีการ Soft lithography



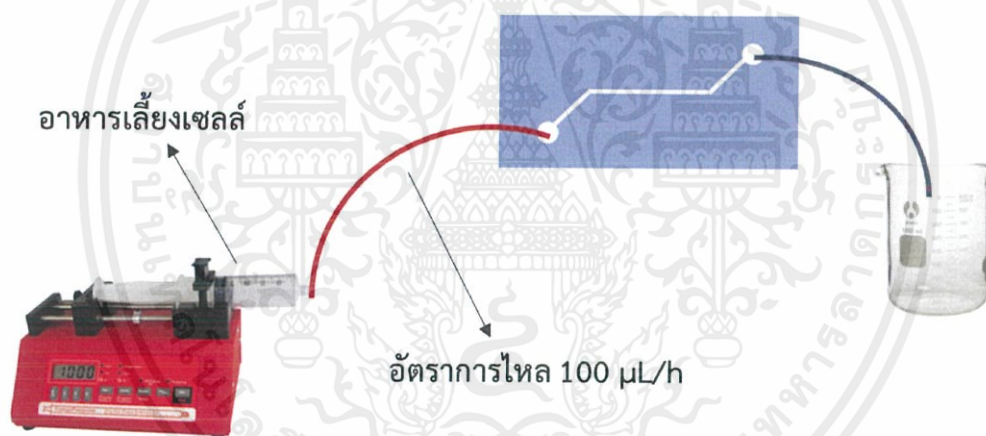
ภาพที่ 3.15 แสดงขั้นตอนการสร้างไมโครฟลูอิดิก ชิพ

1. ละลายเคลือบแม่พิมพ์ SU-8 ด้วย triethoxysilane จำนวน 20 ไมโครลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนทำการหล่อ PDMS ที่ผสมให้เข้ากันกับ curing agent ในอัตราส่วน 15: 1 เพื่อให้ PDMS สามารถลอกออกจากแม่พิมพ์ได้ง่าย
2. กำจัดฟองอากาศใน PDMS ด้วยการวางในระบบทำสุญญากาศเมื่อ PDMS ปราศจาก ฟองอากาศจึงนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้ PDMS แข็งตัว
3. หลังจากปล่อยให้ PDMS อุณหภูมิลดลงเท่ากันกับอุณหภูมิห้องจะสามารถลอกออกจากแม่พิมพ์ ได้เลย เมื่อลอก PDMS ออกจากแม่พิมพ์ให้เก็บไว้ในกล่องที่สะอาดปราศจากฝุ่นเพื่อป้องกัน ฝุ่นอุดตันไมโครแชนแนล
4. นำ PDMS ที่ลอกออกมาจากแม่พิมพ์ มาเจาะรูทางเข้า ทางออกของสารก่อนวางลงบนฟิล์ม บาง PDMS ที่เตรียมขึ้นจากการหมุนเคลือบด้วยความเร็วรอบ 2,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ลงบนแผ่นกระจกบาง (Cover slip) แล้วจึงนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.5.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ Caco-2 ในระบบไมโครฟลูอิดิก

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในไมโครแชนแนลจะใช้เซลล์แขวนลอย (cell suspension) 12,000 cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 μL ซึ่งก่อนการเพาะเลี้ยงเซลล์ในไมโครแชนแนลจะนำไมโครฟลูอิดิก ชิพที่เตรียมขึ้นไปฆ่าเชื้อภายในไมโครแชนแนลด้วย 70% แอลกอฮอล์เป็นเวลา 30 นาที นำไปอบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียสและฉายแสง UV เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจะเคลือบโปรตีน Matrigel ความเข้มข้น 300 $\mu\text{g/mL}$ ลงบนพื้นผิวในไมโครแชนแนลด้วยการแช่โปรตีนในไมโครแชนแนลเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในไมโครแชนแนลจะศึกษาที่ 2 สภาวะคือระบบของไหลหยุดนิ่งและระบบที่มีการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 100 $\mu\text{L/h}$ อย่างต่อเนื่องโดยจะกำหนดให้ระบบมีการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ 1 ชั่วโมง 30 นาที

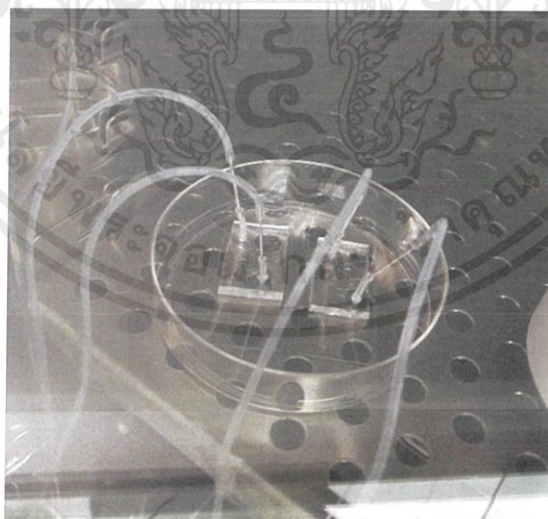


ภาพที่ 3.16 แสดงระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ในไมโครฟลูอิดิก ชิพ

จากภาพที่ 3.9 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกบรรจุในกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ทำการต่อท่อซิลิโคนจากปลายเข็มเข้าสู่ไมโครฟลูอิดิก ชิพและต่อท่อซิลิโคนจากไมโครฟลูอิดิก ชิพออกไปยังปั๊มเกอร์โดยมีปั๊มควบคุมกระบอกฉีดยาให้ฉีดอาหารเลี้ยงเซลล์เข้าสู่ไมโครฟลูอิดิก ชิพให้มีอัตราการไหล 100 $\mu\text{L/h}$



ภาพที่ 3.17 แสดงระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ในไมโครฟลูอิดิก ชิพ



ภาพที่ 3.18 แสดงไมโครฟลูอิดิก ชิพที่มีการบ่มเซลล์ไว้ใน 5% CO₂ incubator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การตรวจวัดวิเคราะห์

3.6.1 การตรวจสอบการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิว PDMS

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 24 wells plate ครบ 24 ชั่วโมงจะตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดเลนส์ใกล้วัตถุอยู่ด้านล่างและตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเดิมอีกครั้งเมื่อครบ 48 ชั่วโมงหลังจากตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เสร็จจะประเมินอัตราจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Cell viability) ด้วยวิธีการ MTS assays ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมทิ้งและล้างผิวเซลล์ด้วยสารละลาย DPBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 1 ครั้ง
2. ใส่สารละลาย MTS ที่เจือจางใน DMEM 1 ใน 10 หลุมละ 300 ไมโครลิตรแล้วจึงนำไปบ่มในตู้ 5% CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อบ่มสารละลาย MTS กับเซลล์ครบ 3 ชั่วโมงจึงนำสารละลายในแต่ละหลุมมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader
3. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเทียบอัตราส่วนโดยจะกำหนดให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากหลุมที่ PDMS ปราศจากการเคลือบโปรตีนและไม่ได้รับพลาสมาของออกซิเจนเป็น 100 เปอร์เซ็นต์และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากหลุมอื่นเทียบอัตราส่วนกับหลุมที่ PDMS ปราศจากการเคลือบโปรตีนและไม่ได้รับพลาสมาของออกซิเจน ค่าอัตราส่วนที่มากจะแสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมาก

3.6.2 การตรวจสอบการดูดซับโปรตีนบนพื้นผิว PDMS

การตรวจสอบการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิว PDMS เพื่อให้ทราบถึงสภาพพื้นผิวแท้จริงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยจะทำการตรวจสอบตัวอย่างขนาด 1 ตารางเซนติเมตรที่เคลือบโปรตีนความเข้มข้นเดียวกันกับที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์คือ BSA 50 µg/mL, Poly-L lysine 100 µg/mL, Collagen 50 µg/mL, Matrigel 300 µg/mL และ Collagen 50 µg/mL ผสม Matrigel 300 µg/mL ด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม

3.6.3 การตรวจสอบขนาดของไมโครฟลูอิดิก ชิพที่สร้างขึ้นจากกระบวนการซอฟต์แวร์โฟโตลิโกราฟี

ตรวจสอบขนาดของไมโครฟลูอิดิก ชิพที่สร้างขึ้นเพื่อยืนยันว่าเป็นไปตามที่ออกแบบไว้จะทำการตรวจสอบด้วยการนำไมโครแคนแนลที่หล่อด้วย PDMS ตัดตามขวางแล้วพลิกด้านข้างขึ้นก่อนจะนำไปถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและนำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดของไมโครแคนแนลด้วยโปรแกรม ImageJ

3.6.4 การตรวจวิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระบบไมโครฟลูอิดิก

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในไมโครฟลูอิดิก ชิพจะตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดเลนส์ใกล้วัตถุอยู่ด้านล่างในแต่ละวันเป็นเวลา 4 วัน

บทที่ 4

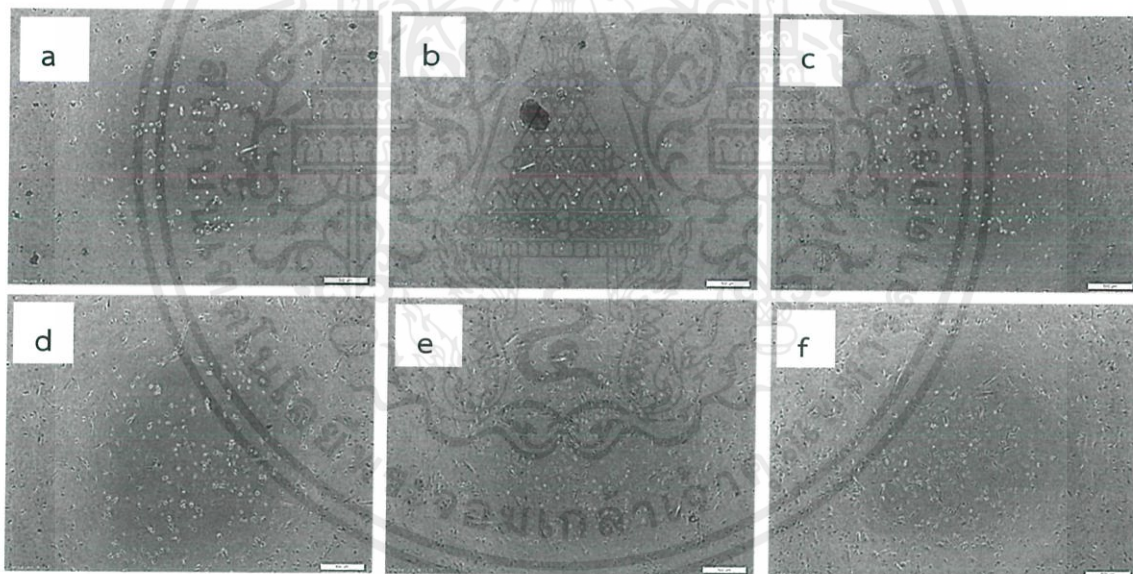
ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ลำไส้บนพื้นผิว PDMS

4.1.1 ผลการตรวจสอบสัณฐานของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

4.1.1.1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ CCD-18Co บนพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสมกับ Matrigel

1. ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ CCD-18Co บนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนและเคลือบโปรตีน

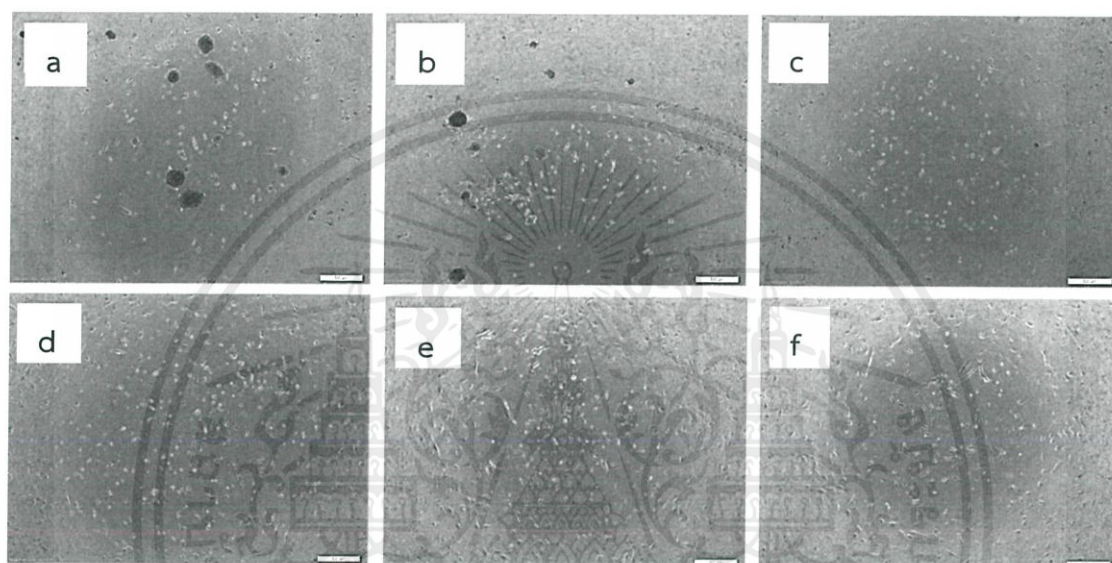


ภาพที่ 4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 24 ชั่วโมงของเซลล์ CCD-18Co โดยที่ภาพ a คือภาพเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS โดยปราศจากการเคลือบโปรตีนและภาพ b - f คือภาพเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านพลาสมาของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสมกับ Matrigel ตามลำดับโดยมี scale bar คือ 500 ไมครอน

จากภาพที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ CCD-18Co ครบ 24 ชั่วโมงเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านพลาสมาของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA และ Poly-L

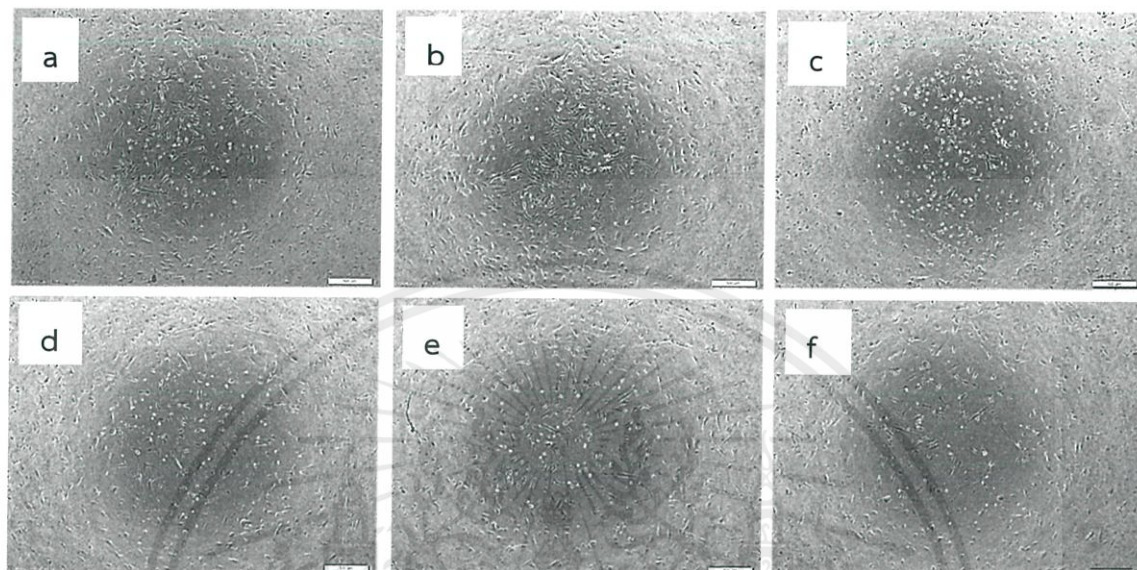
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lysine มีการยึดเกาะของเซลล์ CCD-18Co ที่ไม่ดีเทียบเท่าพื้นผิว PDMS ที่เคลือบโปรตีน Collagen, Matrigel และ Collagen ผสม Matrigel นอกจากนี้เซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีนทั้งสามดังกล่าวยังมีลักษณะสีฐานของเซลล์ที่ดีคือมีลักษณะเรียวยาว เมื่อครบ 48 ชั่วโมงพบว่าเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน Collagen, Matrigel และ Collagen ผสม Matrigel มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เซลล์มีความเรียวยาวเพิ่มขึ้นในขณะที่เซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน BSA และ Poly-L lysine ไม่ได้แสดงออกถึงลักษณะการเจริญเติบโตที่ดี แสดงด้วยภาพที่ 4.2



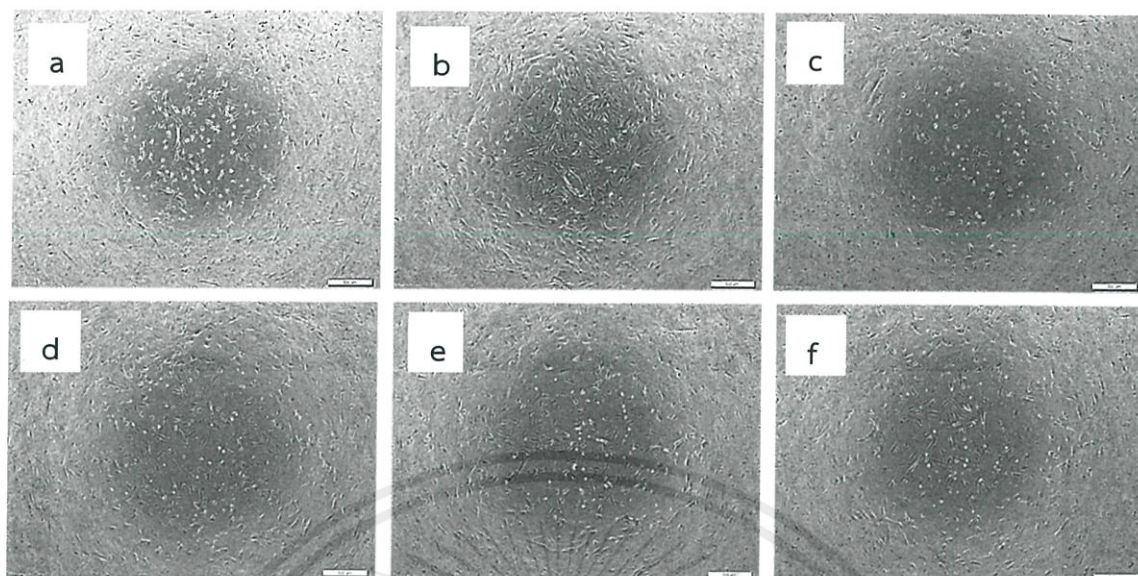
ภาพที่ 4.2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 48 ชั่วโมงของเซลล์ CCD-18Co โดยที่ภาพ a คือภาพเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS โดยปราศจากการเคลือบโปรตีนและภาพ b – f คือภาพเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านพลาสมาของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสมกับ Matrigel ตามลำดับโดยมี scale bar คือ 500 ไมครอน

2. ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ CCD-18Co บนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนและเคลือบโปรตีน



ภาพที่ 4.3 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 24 ชั่วโมงของเซลล์ CCD-18Co โดยที่ภาพ a คือภาพเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ปราศจากการเคลือบโปรตีนและภาพ b – f คือภาพเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านพลาสมาของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสมกับ Matrigel ตามลำดับโดยมี scale bar คือ 500 ไมครอน

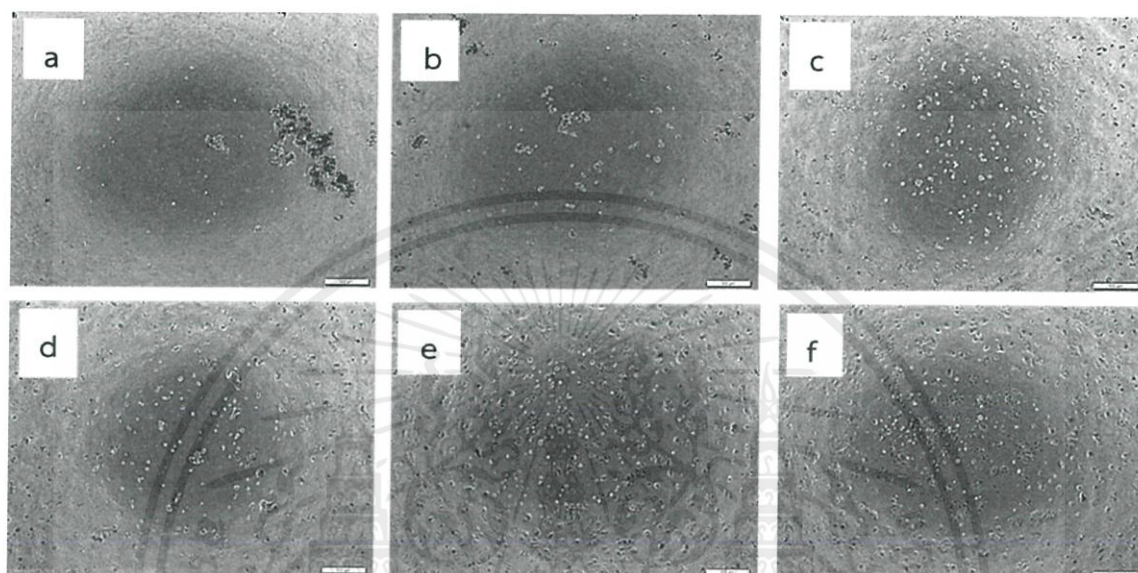
จากภาพที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ CCD-18Co ครบ 24 ชั่วโมงเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านพลาสมาของออกซิเจนมีการยึดเกาะและการเจริญของเซลล์ CCD-18Co ที่ดี เซลล์มีลักษณะพื้นฐานที่สมบูรณ์คือมีลักษณะรูปร่างยาวเรียวยาวแม้ว่าพื้นผิว PDMS จะไม่ได้เคลือบโปรตีนแต่พบว่าเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านพลาสมาของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน Poly-L lysine มีการยึดเกาะน้อย เซลล์มีลักษณะพื้นฐานที่ด้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิวที่ไม่ได้เคลือบโปรตีนหรือเคลือบโปรตีน BSA, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสม Matrigel เมื่อครบ 48 ชั่วโมงยังคงพบว่าเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านพลาสมาของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน Poly-L lysine มีการยึดเกาะน้อย ไม่มีการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิวที่ไม่ได้เคลือบโปรตีนหรือเคลือบโปรตีน BSA, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสม Matrigel มีการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้น เซลล์มีลักษณะยาวมากขึ้นดังที่แสดงในภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 48 ชั่วโมงของเซลล์ CCD-18Co โดยที่ภาพ a คือภาพเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS โดยปราศจากการเคลือบโปรตีนและภาพ b - f คือภาพเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านพลาสติกของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสมกับ Matrigel ตามลำดับโดยมี scale bar คือ 500 ไมครอน

4.1.1.2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 บนพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสมกับ Matrigel

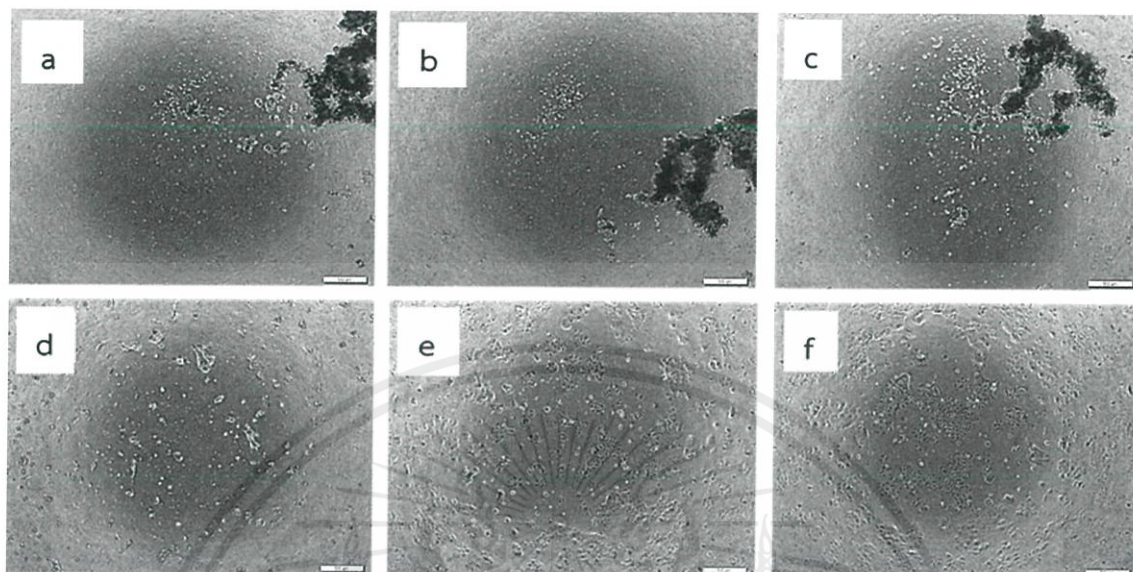
1. ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 บนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนและเคลือบโปรตีน



ภาพที่ 4.5 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 24 ชั่วโมงของเซลล์ Caco-2 โดยที่ภาพ a คือภาพเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ปราศจากการเคลือบโปรตีนและภาพ b - f คือภาพเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านพลาสมาของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสมกับ Matrigel ตามลำดับโดยมี scale bar คือ 500 ไมครอน

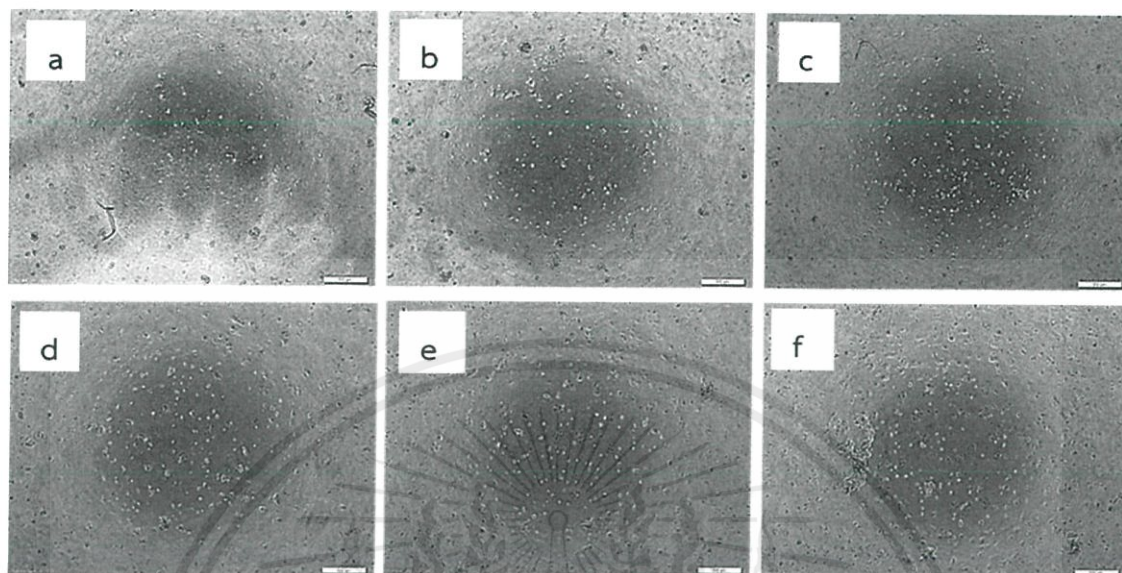
จากภาพที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ครบ 24 ชั่วโมงเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านการพลาสมาของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA กับ Poly-L lysine ลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์หนาแน่นกว่าในพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน Collagen, Matrigel และ Collagen ผสม Matrigel ที่สภาพพื้นผิวทั้ง 3 ดังกล่าวพบว่ามียึดเกาะของเซลล์ Caco-2 บนพื้นผิวที่เคลือบด้วย Collagen เพียงเล็กน้อยในขณะที่พื้นผิวที่เคลือบด้วย Matrigel และพื้นผิวที่เคลือบด้วย Collagen ผสม Matrigel มีการยึดเกาะของเซลล์ Caco-2 มากกว่านอกจากนี้เซลล์ยังมีการยึดเกาะระหว่างเซลล์ด้วยกันเป็นกลุ่มเซลล์แสดงออกถึงลักษณะการเจริญเติบโตที่ดีและเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ครบ 48 ชั่วโมงพบว่าพื้นผิวที่เคลือบด้วย Matrigel และ Collagen ผสม Matrigel เซลล์ Caco-2 มีลักษณะสัณฐานที่สมบูรณ์ กลุ่มเซลล์มีการแผ่ขยายออกเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นแสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มจำนวนประชากรเซลล์ Caco-2 ในขณะที่พื้นผิวที่เคลือบด้วย

Collagen พบลักษณะของกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กและพื้นผิวที่เคลือบด้วย BSA กับ Poly-L lysine ไม่พบการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2 ดังที่แสดงในภาพที่ 4.6



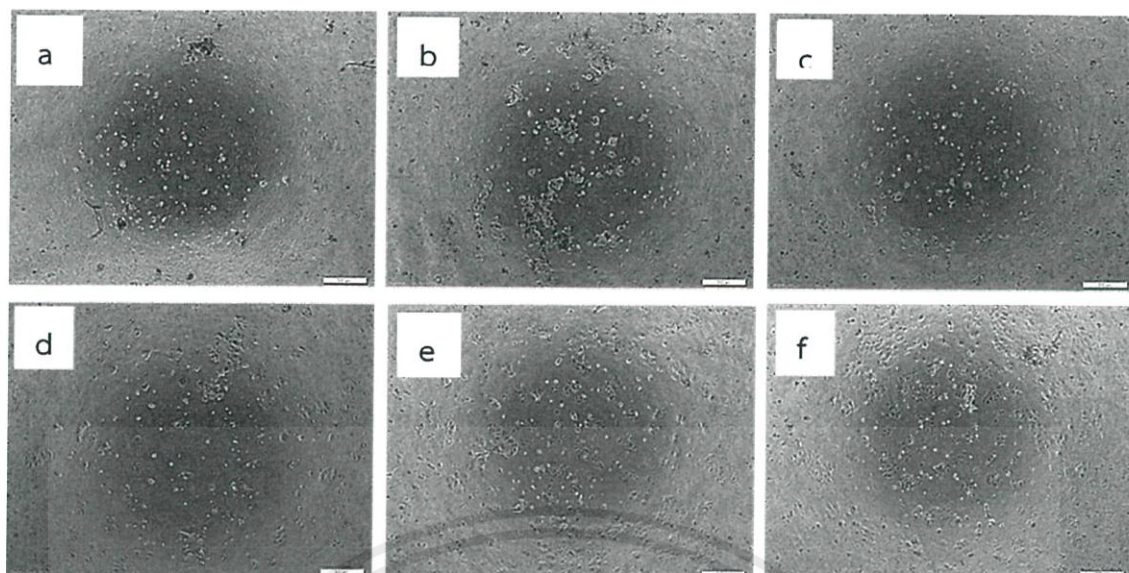
ภาพที่ 4.6 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 48 ชั่วโมงของเซลล์ Caco-2 โดยที่ภาพ a คือภาพเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ปราศจากการเคลือบโปรตีนและภาพ b - f คือภาพเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านพลาสติกของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสมกับ Matrigel ตามลำดับโดยมี scale bar คือ 500 ไมครอน

2. ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 บนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนและเคลือบโปรตีน



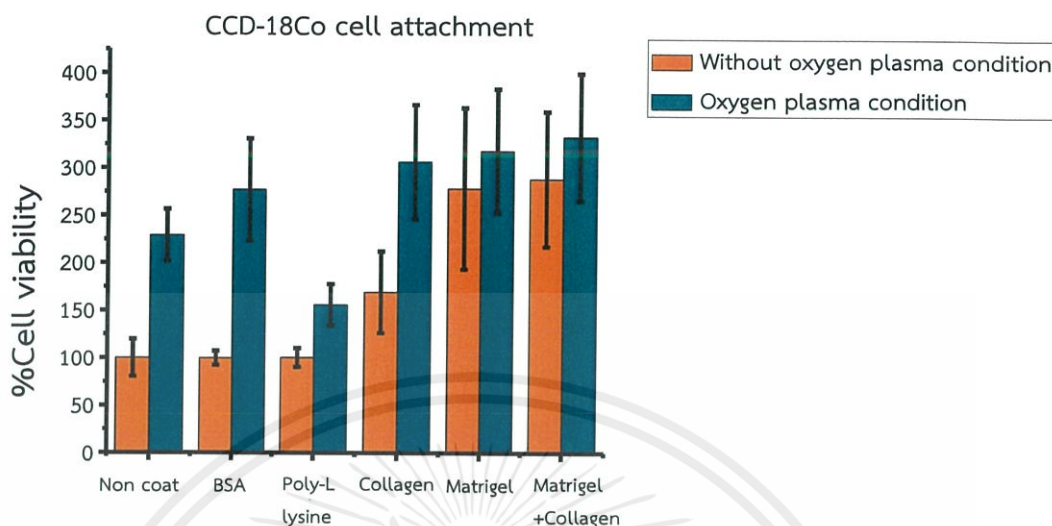
ภาพที่ 4.7 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 24 ชั่วโมงของเซลล์ Caco-2 โดยที่ภาพ a คือภาพเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ปราศจากการเคลือบโปรตีนและภาพ b - f คือภาพเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านพลาสมาของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสมกับ Matrigel ตามลำดับโดยมี scale bar คือ 500 ไมครอน

จากภาพที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ครบ 24 ชั่วโมงเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ได้รับพลาสมาของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA กับ Poly-L lysine ลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์หนาแน่นกว่าในพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน Collagen, Matrigel และ Collagen ผสม Matrigel ที่สภาพพื้นผิวทั้ง 3 ดังกล่าวพบการยึดเกาะของเซลล์ โดยพื้นผิวที่เคลือบด้วย Collagen ผสม Matrigel จะเห็นการยึดของเซลล์ Caco-2 กระจายอยู่บนพื้นผิวได้มากกว่าพื้นผิวอื่นและเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ครบ 48 ชั่วโมงพบว่าพื้นผิวที่เคลือบด้วย Matrigel และ Collagen ผสม Matrigel เซลล์ Caco-2 มีลักษณะสัญญาณที่สมบูรณ์ กลุ่มเซลล์มีการแผ่ขยายเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นแสดงถึงการเพิ่มจำนวนประชากรเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2 ที่ดี ในขณะที่พื้นผิวที่เคลือบด้วย Collagen พบการยึดเกาะของกลุ่มเซลล์เพียงเล็กน้อยและพื้นผิวที่ปราศจากการเคลือบโปรตีนและพื้นผิวที่เคลือบด้วยโปรตีน BSA กับ Poly-L lysine ไม่พบการยึดเกาะของเซลล์ดังที่แสดงในภาพที่ 4.8



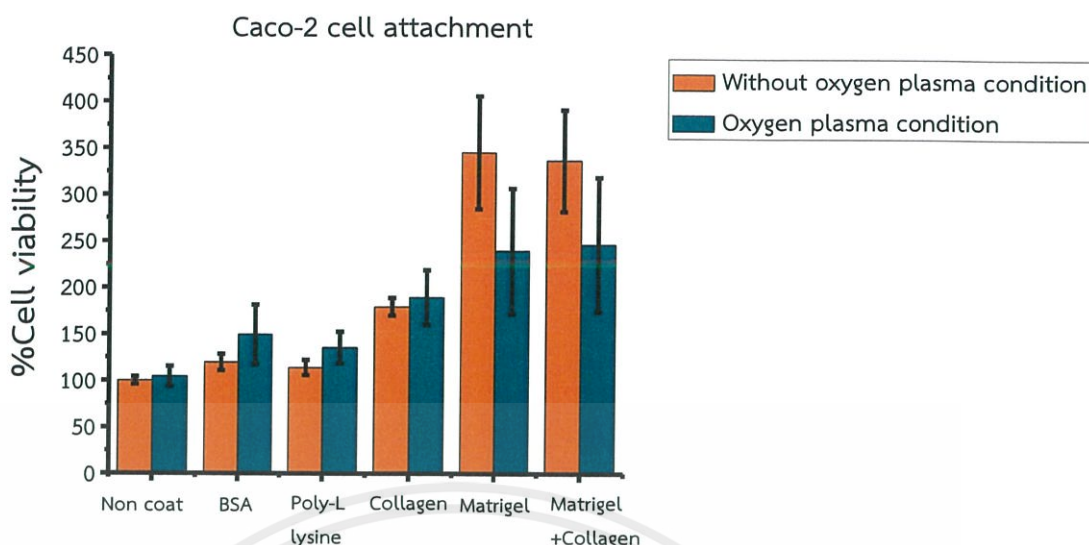
ภาพที่ 4.8 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 48 ชั่วโมงของเซลล์ Caco-2 โดยที่ภาพ a คือภาพเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ปราศจากการเคลือบโปรตีนและภาพ b - f คือภาพเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านพลาสมาของออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสมกับ Matrigel ตามลำดับโดยมี scale bar คือ 500 ไมครอน

4.1.2 ผลการประเมินอัตราจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย MTS assay



ภาพที่ 4.9 ผลการประเมินอัตราเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ CCD-18Co ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านพลาสติกของออกซิเจนก่อนเคลือบโปรตีนเทียบกับพื้นผิว PDMS ที่ผ่านพลาสติกของออกซิเจนก่อนเคลือบโปรตีน

จากภาพที่ 4.9 พื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านพลาสติกของออกซิเจนจะมีอัตราเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ CCD-18Co สูงขึ้นเมื่อเคลือบพื้นผิว PDMS ด้วยโปรตีน Matrigel หรือ Collagen ผสมกับ Matrigel แต่เมื่อทำการปรับปรุงสภาพพื้นผิว PDMS ด้วยพลาสติกของออกซิเจนจะส่งผลให้อัตราเซลล์ที่มีชีวิตสูงขึ้นแม้ว่าจะไม่ได้เคลือบโปรตีนลงบนพื้นผิวแต่ในกรณีที่พื้นผิว PDMS ผ่านการพลาสติกด้วยออกซิเจนแล้วเคลือบด้วยโปรตีน Poly-L lysine พบว่าโปรตีนชนิดนี้ไม่ได้ส่งผลให้อัตราเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มสูงขึ้นกว่าสภาพพื้นผิว PDMS ที่ปราศจากการเคลือบโปรตีนหลังพลาสติกด้วยออกซิเจนแสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนพื้นผิว PDMS ได้เมื่อทำการปรับปรุงสภาพพื้นผิวด้วยพลาสติกของออกซิเจนหรือเคลือบด้วยโปรตีน Matrigel ทั้งนี้การพลาสติกด้วยออกซิเจนก่อนเคลือบโปรตีน Matrigel หรือ Collagen ผสม Matrigel ไม่ได้ส่งผลต่ออัตราเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ CCD-18Co อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับอัตราเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ CCD-18Co บนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านการพลาสติกด้วยออกซิเจนก่อนเคลือบโปรตีน Matrigel

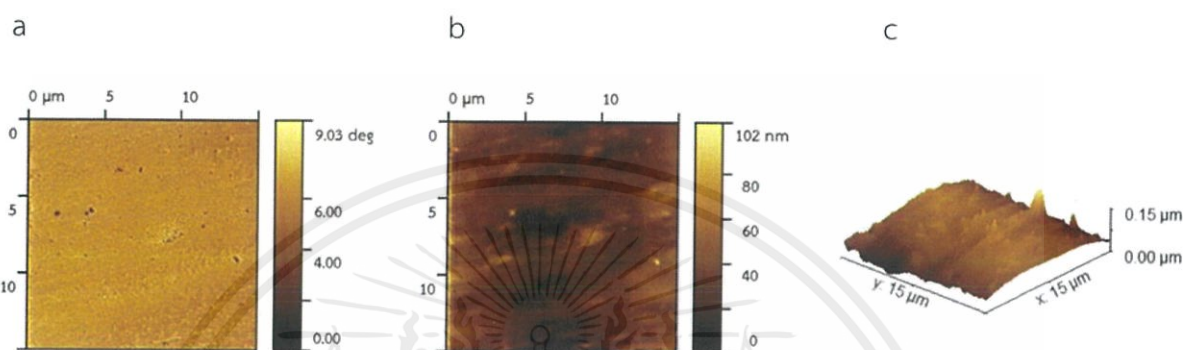


ภาพที่ 4.10 แสดงผลการประเมินอัตราเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านพลาสมาของออกซิเจนและเคลือบโปรตีนเทียบกับพื้นผิว PDMS ที่ผ่านพลาสมาของออกซิเจนก่อนเคลือบโปรตีน

จากภาพที่ 4.10 พื้นผิว PDMS ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 จะมีอัตราเซลล์ที่มีชีวิตสูงเมื่อทำการปรับสภาพพื้นผิวด้วยการเคลือบโปรตีน Matrigel หรือ Collagen ผสม Matrigel ทั้งนี้การปรับสภาพพื้นผิวด้วยพลาสมาของออกซิเจนไม่ได้ส่งผลให้อัตราเซลล์ที่มีชีวิตของ Caco-2 เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาผลการประเมินอัตราเซลล์ที่มีชีวิตและผลการตรวจสอบสัญญาณของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงของเซลล์ทั้งสองชนิดจะเห็นได้ว่าการปรับสภาพพื้นผิวด้วยพลาสมาของออกซิเจนจะช่วยเพิ่มอัตราเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ CCD-18Co เท่านั้นแต่การปรับสภาพพื้นผิวด้วยการเคลือบโปรตีน Matrigel หรือ Collagen ผสม Matrigel แม้ว่าจะไม่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนก่อนเคลือบโปรตีนเซลล์ทั้งสองชนิดก็มีลักษณะสัญญาณและการเจริญของเซลล์ที่ดีสอดคล้องกับอัตราเซลล์ที่มีชีวิตสูง ทั้งนี้ Matrigel มีส่วนประกอบหลัก ๆ คือ ลามินิน (Laminin), คอลลาเจน (Collagen) และเอนแทกติน (Entactin) ซึ่งทั้งสามชนิดนี้เป็นโปรตีนที่สามารถพบได้บริเวณรอบ ๆ เซลล์ (Extracellular matrix proteins) สามารถจับกับโปรตีนที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (integrin) ได้ และเนื่องจากอัตราเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงบนพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วย Matrigel ไม่แตกต่างจากพื้นผิวที่เคลือบด้วย Collagen ผสม Matrigel อย่างมีนัยสำคัญดังนั้นการสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบไมโครฟลูอิดิกจะใช้โปรตีน Matrigel มาปรับสภาพพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจน

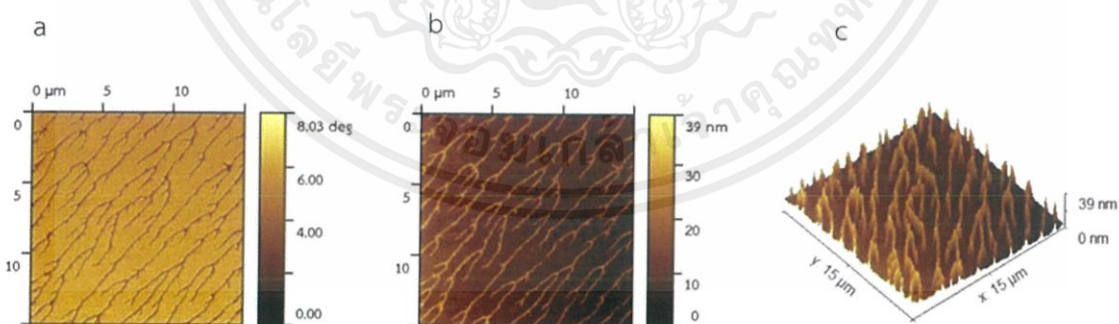
4.2 ผลการตรวจสอบการดูดซับโปรตีนบนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วย ออกซิเจนและไม่ผ่านการ พลาสมาด้วยออกซิเจน

4.2.1 การดูดซับโปรตีนบนพื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนก่อนเคลือบโปรตีน



ภาพที่ 4.11 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS โดยที่ a คือภาพ phase, b คือภาพ topology และ c คือภาพ 3D

จากภาพที่ 4.11 จะเห็นได้ว่าพื้นผิวที่ทำการตรวจสอบมีความเรียบและมีเฟสเพียงเฟสเดียว โดยจะมีค่าความขรุขระเฉลี่ย 15.79 ± 2.62 นาโนเมตร

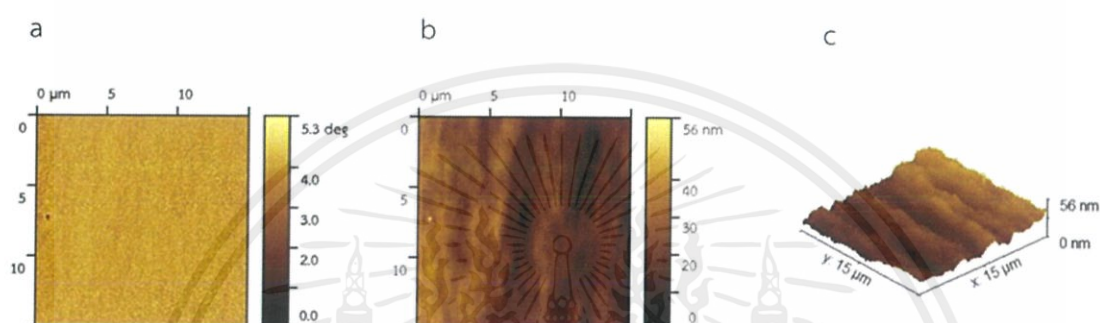


ภาพที่ 4.12 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน BSA โดยที่ a คือภาพ phase, b คือภาพ topology และ c คือภาพ 3D

จากภาพที่ 4.12 จะเห็นได้ว่าพื้นผิวที่ทำการตรวจสอบสามารถสังเกตเห็นความขรุขระได้โดยจะมีค่าความขรุขระเฉลี่ยที่ 8.28 ± 2.74 นาโนเมตรซึ่งถึงแม้ว่าค่าความขรุขระของ PDMS ที่เคลือบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

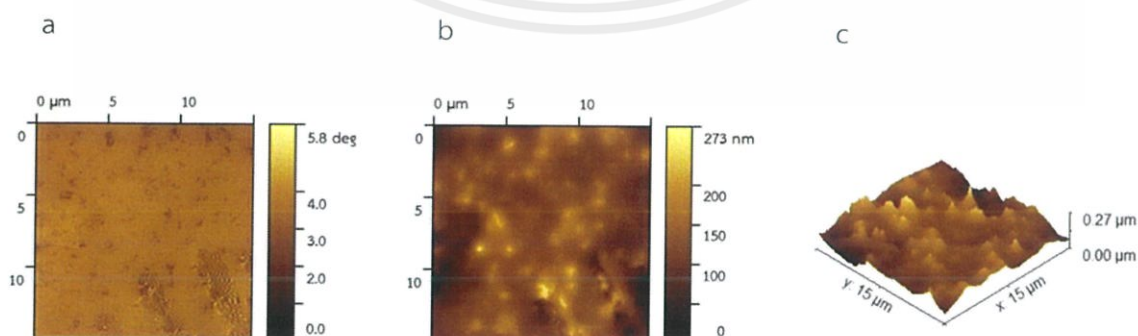
ด้วย BSA จะมีค่าน้อยกว่าพื้นผิว PDMS แต่ผลการตรวจสอบพื้นผิวสามารถสังเกตได้ว่าพื้นผิวประกอบไปด้วยเฟส 2 เฟสคือ เฟสของวัสดุที่เป็นฐานรองรับซึ่งก็คือ PDMS และเฟสที่คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนโดยเฟสที่ 2 มีค่าความสูงจากพื้นผิวถึง 39 นาโนเมตร

(หมายเหตุ ลักษณะของเฟสที่ปรากฏในภาพที่ 4.13 นี้มีรูปแบบที่ผิดไปจากลักษณะของโปรตีน ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเก็บรักษาตัวอย่างที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ ระยะเวลาที่ใช้เก็บรักษาตัวอย่างก่อนนำไปตรวจสอบ และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา ส่งผลให้เกิดข้อบกพร่องขึ้น)



ภาพที่ 4.13 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน Poly-L lysine โดยที่ a คือภาพ phase, b คือภาพ topology และ c คือภาพ 3D

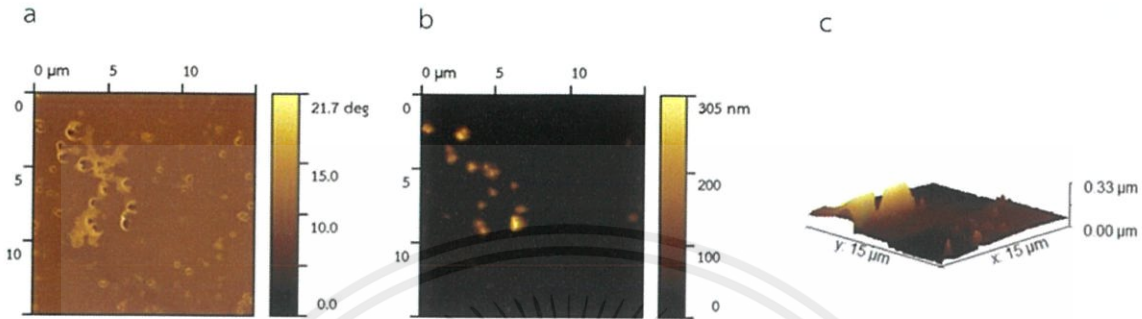
จากภาพที่ 4.13 จะเห็นได้ว่าพื้นผิวที่ทำการตรวจสอบมีความเรียบและมีเฟสเพียงเฟสเดียว ค่าความขรุขระเฉลี่ยที่ 26.82 ± 33.85 นาโนเมตรและค่าระยะห่างระหว่างจุดที่สูงที่สุดบนพื้นผิวกับจุดที่ต่ำที่สุดคือ 56 นาโนเมตร



ภาพที่ 4.14 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน Collagen โดยที่ a คือภาพ phase, b คือภาพ topology และ c คือภาพ 3D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.14 จะเห็นได้ว่าพื้นผิวที่ทำการตรวจสอบมีเฟสเพียงแค่เฟสเดียวแต่จะสังเกตเห็นความขรุขระได้จากภาพ b โดยที่ค่าระยะห่างระหว่างจุดที่สูงที่สุดบนพื้นผิวกับจุดที่ต่ำที่สุดคือ 273 นาโนเมตรและมีค่าความขรุขระเฉลี่ยที่ 35.67 ± 29.80 นาโนเมตร



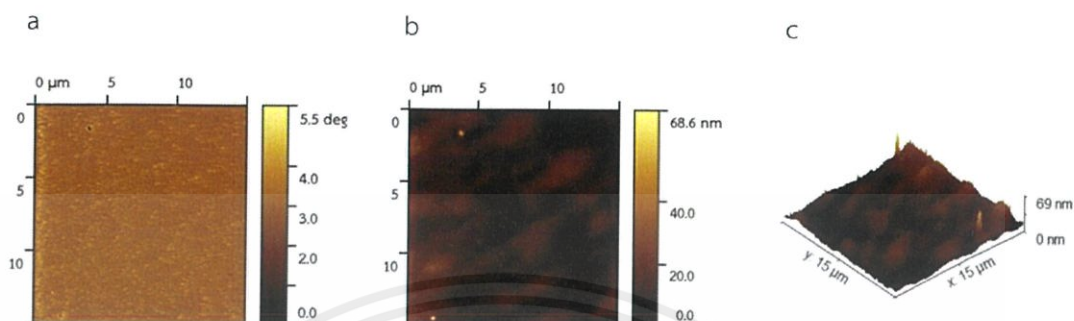
ภาพที่ 4.15 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน Matrigel โดยที่ a คือภาพ phase, b คือภาพ topography และ c คือภาพ 3D

จากภาพที่ 4.15 จะเห็นได้ว่าพื้นผิวที่ทำการตรวจสอบสามารถสังเกตเห็นความขรุขระได้โดยจะมีค่าความขรุขระเฉลี่ยที่ 20.22 ± 10.20 นาโนเมตร พื้นผิวที่ทำการตรวจสอบประกอบไปด้วยเฟส 2 เฟสคือ เฟสของวัสดุที่เป็นฐานรองรับซึ่งก็คือ PDMS และเฟสที่คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนโดยเฟสที่ 2 มีค่าความสูงจากพื้นผิวถึง 305 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยกำลังสองของค่าความขรุขระ (RMS roughness) พื้นผิว PDMS ที่ไม่ผ่านการ พลาสมาด้วยออกซิเจนก่อนเคลือบโปรตีน โดยค่าที่แสดงในตารางที่ 4.1 นี้ได้จากการนำค่าเฉลี่ยกำลังสองของค่าความขรุขระ 5 บริเวณมาเฉลี่ย

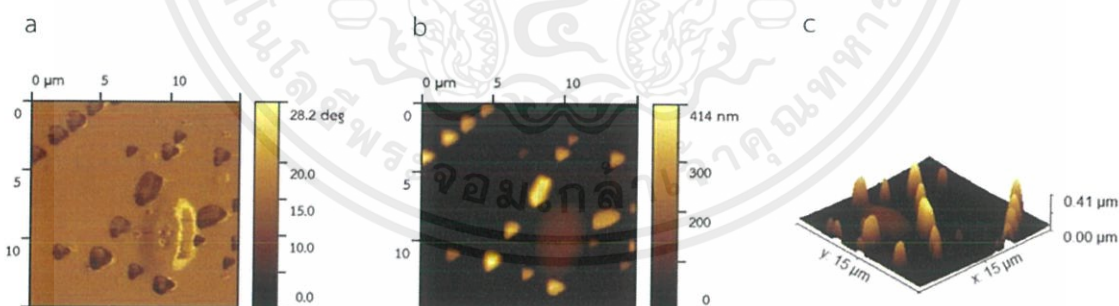
Sample	RMS roughness (nm)	Maximum height (nm)
PDMS/Non coat	15.79 ± 2.62	102
PDMS/BSA	8.28 ± 2.74	39
PDMS/Poly-L lysine	26.82 ± 33.85	56
PDMS/Collagen	35.67 ± 29.80	273
PDMS/Matrigel	20.22 ± 10.20	305

4.2.2 การดูดซับโปรตีนบนพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนก่อนเคลือบโปรตีน



ภาพที่ 4.16 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจน โดยที่ a คือภาพ phase, b คือภาพ topology และ c คือภาพ 3D

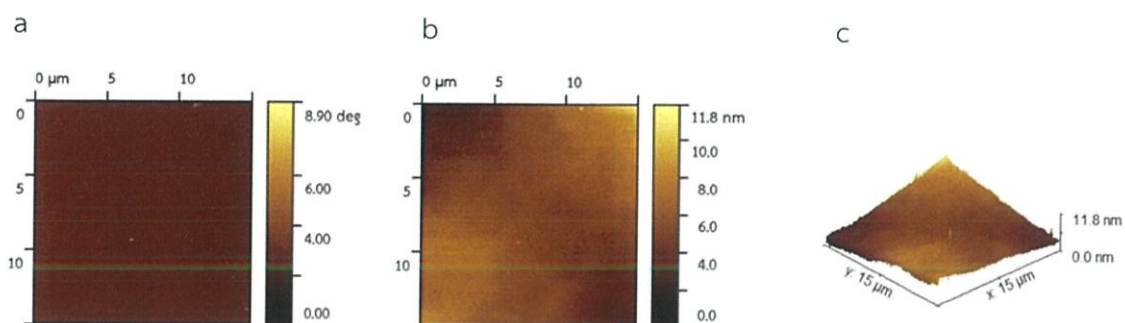
จากภาพที่ 4.16 จะเห็นได้ว่าพื้นผิวที่ทำการตรวจสอบมีความเรียบและมีเฟสเพียงเฟสเดียว ค่าระยะห่างระหว่างจุดที่สูงที่สุดบนพื้นผิวกับจุดที่ต่ำที่สุดคือ 69 นาโนเมตร มีค่าความขรุขระเฉลี่ย 19.24 ± 17.10 นาโนเมตร



ภาพที่ 4.17 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนและเคลือบโปรตีน BSA โดยที่ a คือภาพ phase, b คือภาพ topology และ c คือภาพ 3D

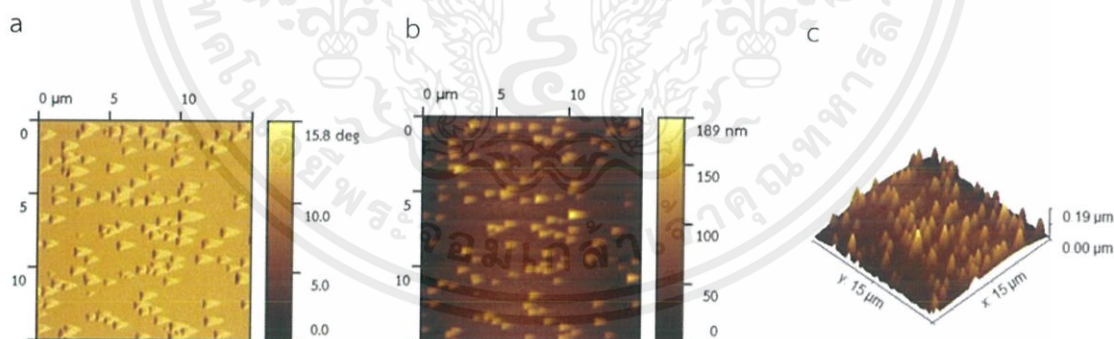
จากภาพที่ 4.17 จะเห็นได้ว่าพื้นผิวที่ทำการตรวจสอบสามารถสังเกตเห็นความขรุขระได้โดยจะมีค่าความขรุขระเฉลี่ยที่ 33.11 ± 18.49 นาโนเมตร พื้นผิวที่ทำการตรวจสอบประกอบไปด้วยเฟส 2 เฟสคือเฟสของวัสดุที่เป็นฐานรองรับซึ่งก็คือ PDMS และเฟสที่คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนโดยเฟสที่ 2 มีค่าความสูงจากพื้นผิวถึง 414 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนและเคลือบโปรตีน Poly-L lysine โดยที่ a คือภาพ phase, b คือภาพ topography และ c คือภาพ 3D

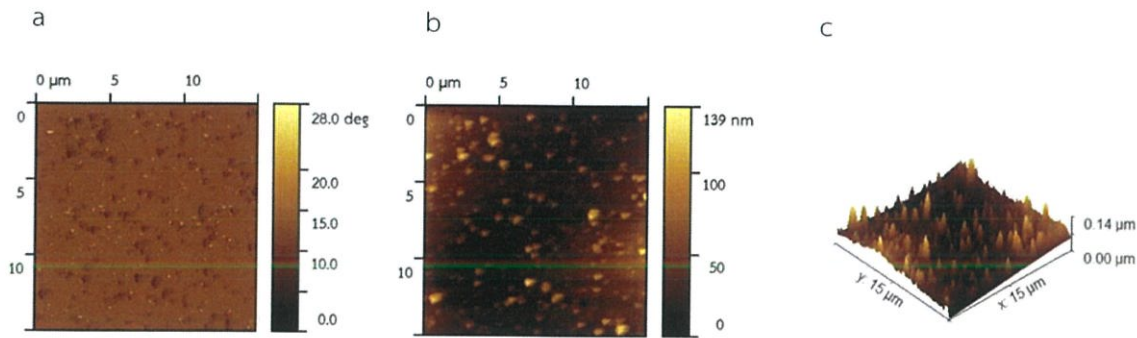
จากภาพที่ 4.18 จะเห็นได้ว่าพื้นผิวที่ทำการตรวจสอบมีความเรียบและมีเฟสเพียงเฟสเดียว ค่าความขรุขระเฉลี่ยที่ 5.92 ± 3.79 นาโนเมตรและค่าระยะห่างระหว่างจุดที่สูงที่สุดบนพื้นผิวกับจุดที่ต่ำที่สุดคือ 11.8 นาโนเมตร



ภาพที่ 4.19 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนและเคลือบด้วยโปรตีน Collagen โดยที่ a คือภาพ phase, b คือภาพ topography และ c คือภาพ 3D

จากภาพที่ 4.19 จะเห็นได้ว่าพื้นผิวที่ทำการตรวจสอบสามารถสังเกตเห็นความขรุขระได้โดยจะมีค่าความขรุขระเฉลี่ยที่ 55.40 ± 27.71 นาโนเมตร พื้นผิวที่ทำการตรวจสอบประกอบไปด้วยเฟส 2 เฟสคือ เฟสของวัสดุที่เป็นฐานรองรับซึ่งก็คือ PDMS และเฟสที่คาดว่าจะโปรตีนโดยเฟสที่ 2 มีความสูงจากพื้นผิวถึง 189 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



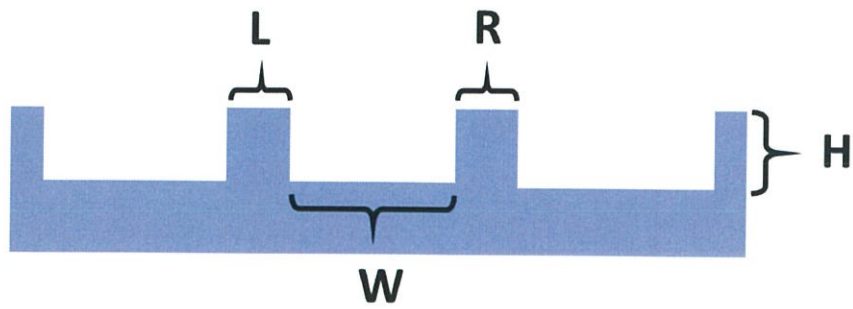
ภาพที่ 4.20 แสดงผลการตรวจสอบพื้นผิว PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนและเคลือบด้วยโปรตีน Matrigel โดยที่ a คือภาพ phase, b คือภาพ topology และ c คือภาพ 3D

จากภาพที่ 4.20 จะเห็นได้ว่าพื้นผิวที่ทำการตรวจสอบสามารถสังเกตเห็นความขรุขระได้โดยจะมีค่าความขรุขระเฉลี่ยที่ 128.98 ± 173.35 นาโนเมตร พื้นผิวที่ทำการตรวจสอบประกอบไปด้วยเฟส 2 เฟสคือ เฟสของวัสดุที่เป็นฐานรองรับซึ่งก็คือ PDMS และเฟสที่คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนโดยเฟสที่ 2 มีค่าความสูงจากพื้นผิวถึง 139 นาโนเมตร

(หมายเหตุ ลักษณะของเฟสที่ปรากฏในภาพที่ 4.19 และ 4.20 นี้มีการแสดงให้เห็นถึงเฟสที่มีแนวโน้มว่าเป็น โปรตีนอยู่บนพื้นผิวซึ่งเฟสดังกล่าวมีรูปร่างสามเหลี่ยม ซึ่งการที่เฟสมีรูปร่างสามเหลี่ยมนี้เป็นข้อบ่งชี้มาจากเข็ม AFM ที่ใช้ในการตรวจสอบมีสิ่งสกปรกติดอยู่ลักษณะของภาพที่ได้จึงไม่สมบูรณ์)

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยกำลังสองของค่าความขรุขระ (RMS roughness) พื้นผิว PDMS ที่ผ่านการ พลาสมาด้วยออกซิเจนก่อนเคลือบโปรตีนโดยค่าที่แสดงในตารางที่ 4.2 นี้ได้จากการนำค่าเฉลี่ยกำลังสองของค่าความขรุขระ 5 บริเวณมาเฉลี่ย

Sample	RMS roughness (nm)	Maximum height (nm)
PDMS/Non coat	19.24 ± 17.10	68.6
PDMS/BSA	33.11 ± 18.49	414
PDMS/Poly-L lysine	5.92 ± 3.79	11.8
PDMS/Collagen	55.40 ± 27.71	189
PDMS/Matrigel	128.98 ± 173.35	139



ภาพที่ 4.22 แสดงภาพตัดขวางของไมโครฟลูอิดิก ชิพ โดยที่ W คือความกว้างของ Microchannel L กับ R คือระยะห่างระหว่าง Microchannel กับ Vacuum chamber และ H คือความสูงของ Microchannel



ภาพที่ 4.23 แสดงภาพถ่ายไมโครแคนแนลด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x โดยมี scale bar คือ 200 ไมครอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

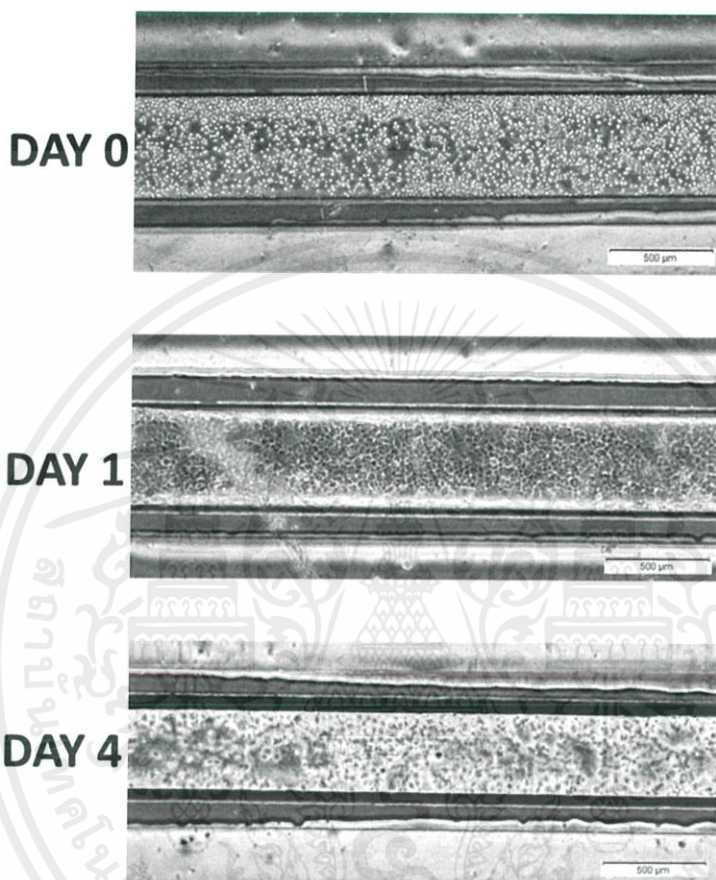
ตารางที่ 4.3 แสดงค่าความกว้างของ Microchannel ระยะห่างระหว่าง Microchannel กับ Vacuum chamber และความสูงของ Microchannel ที่ได้จากการสั้ววัดไมโครเซนแนล 6 ชิ้น

Width	Dimension (µm)
W	497.43 ± 3.95
L	141.89 ± 3.17
R	140.78 ± 2.63
H	143.82 ± 3.29

จากภาพที่ 4.21 แสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนการทำวิจัยนี้ได้ออกแบบไมโครฟลูอิดิก ชิพให้มีขนาด Microchannel 500 ไมครอน Vacuum chamber 1,600 ไมครอน ระยะห่างระหว่าง Microchannel กับ Vacuum chamber คือ 150 ไมครอน ความสูง 150 ไมครอน ซึ่งเมื่อนำ Microchannel ไปตรวจสอบพบว่า Microchannel (W) มีขนาด 497.43 ± 3.95 ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับแบบ 99.49 เปอร์เซ็นต์ ระยะห่างระหว่างระหว่าง Microchannel กับ Vacuum chamber (L) มีขนาด 141.89 ± 3.17 ใกล้เคียงกับแบบ 94.59 เปอร์เซ็นต์ ระยะห่างระหว่าง Microchannel กับ Vacuum chamber (R) มีขนาด 140.78 ± 2.63 ใกล้เคียงกับแบบ 93.85 เปอร์เซ็นต์และความสูงของ Microchannel 143.82 ± 3.29 ใกล้เคียงกับแบบ 95.88 เปอร์เซ็นต์

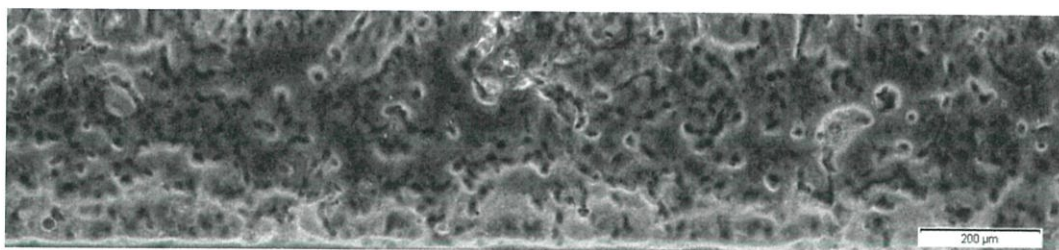
4.4 ผลการตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระบบไมโครฟลูอิดิก

- (1) ผลการตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระบบไมโครฟลูอิดิกที่ไม่มีการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์



ภาพที่ 4.24 แสดงภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4x ของเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงภายในไมโครแชนแนล โดยมี scale bar คือ 500 ไมครอน

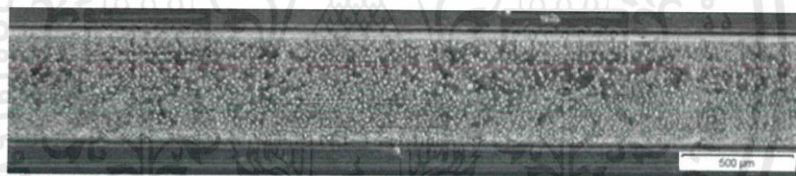
จากภาพที่ 4.24 ในวันที่เริ่มทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Day 0) จะเห็นได้ว่าเซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลมลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์หรือก็คืออยู่ในรูปของสารแขวนลอยภายในไมโครแชนแนลอย่างหนาแน่นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ 1 วันเซลล์ Caco-2 มีการยึดเกาะและเจริญเติบโตทั่วทั้งพื้นผิวของไมโครแชนแนลและเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 4 วันพบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตซ้อนทับกันดังที่แสดงในภาพที่ 4.25



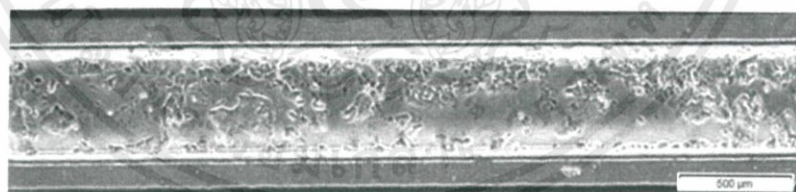
ภาพที่ 4.25 แสดงภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x ของเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงในไมโครแคนแนลเป็นระยะเวลา 4 วัน โดยมี scale bar คือ 200 ไมครอน

(2) ผลการตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระบบไมโครฟลูอิดิกที่มีการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตรา 100 $\mu\text{L}/\text{h}$

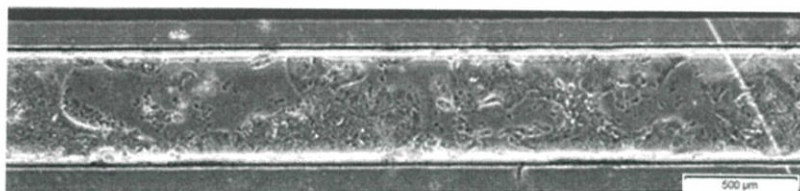
Day 0



Day 1



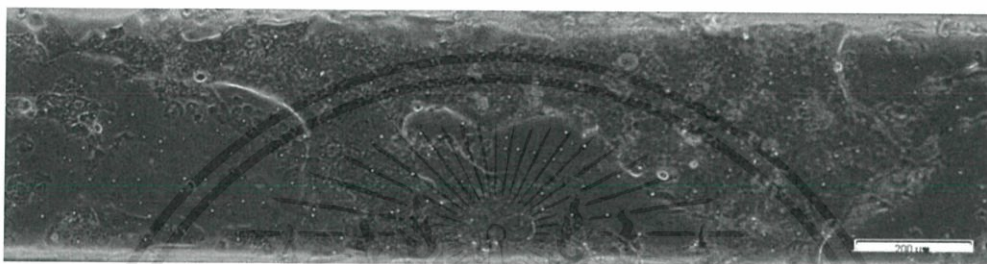
Day 4



ภาพที่ 4.26 แสดงภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4x ของเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงภายในไมโครแคนแนล โดยมี scale bar คือ 500 ไมครอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.26 ในวันที่เริ่มทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Day 0) จะเห็นได้ว่าเซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลมลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์หรือก็คืออยู่ในรูปของสารแขวนลอยภายในไมโครแชนแนลอย่างหนาแน่นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ 1 วันเซลล์ Caco-2 มีการยึดเกาะและเจริญเติบโตบนพื้นผิวของไมโครแชนแนลบางส่วนและเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 4 วันพบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตและแผ่ขยายออกเป็นบริเวณกว้างมากขึ้น



ภาพที่ 4.27 แสดงภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x ของเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงในไมโครแชนแนลเป็นระยะเวลา 4 วัน โดยมี scale bar คือ 200 ไมครอน

จะเห็นได้ว่าเซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงในระบบไมโครฟลูอิดิกที่ไม่มีการไหลอย่างต่อเนื่อง เซลล์มีการยึดเกาะและการเจริญเติบโตทั่วทั้งพื้นผิวไมโครแชนแนลตั้งแต่วันที่ 1 ในขณะที่เซลล์ Caco-2 ที่เพาะเลี้ยงในระบบไมโครฟลูอิดิกที่มีการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่องที่ $100 \mu\text{L/h}$ หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาทีพบว่าเซลล์จะมีการยึดเกาะแค่บางบริเวณของพื้นผิวไมโครแชนแนล แสดงให้เห็นว่าที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาทีเซลล์ยังยึดเกาะกับพื้นผิวได้ไม่ดีเมื่อให้ระบบมีการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์จึงไหลออกจากไมโครแชนแนลพร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ส่งผลให้จำนวนเซลล์ในไมโครแชนแนลลดน้อยลงและเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 4 วันจะเห็นได้ว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นแต่ยังไม่ครอบคลุมทั่วทั้งพื้นผิวไมโครแชนแนลซึ่งแสดงให้เห็นแนวโน้มที่เซลล์หลุดออกจากพื้นผิว

สรุปผลวิจัยและแนวทางในการพัฒนา

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาพื้นผิว PDMS ที่เคลือบด้วยโปรตีน BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel และ Collagen ผสม Matrigel เพื่อหาสภาพพื้นผิวที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดย PDMS ที่นำมาศึกษาจะแบ่งออกเป็น 2 เงื่อนไขคือ PDMS ที่ไม่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนก่อนเคลือบโปรตีนและ PDMS ที่ผ่านการพลาสมาด้วยออกซิเจนก่อนเคลือบโปรตีน ซึ่งพบว่าพื้นผิวของ PDMS ทั้ง 2 เงื่อนไขมีการดูดซับโปรตีน BSA, Poly-L lysine, Collagen, Matrigel แต่พื้นผิวที่เคลือบด้วย Matrigel มีการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ดี ดังนั้นในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์จะใช้โปรตีน Matrigel เคลือบพื้นผิวภายในไมโครแชนแนล

การเตรียมไมโครฟลูอิดิก ชิพด้วยวิธีการซอฟต์แวร์ลิโธกราฟีพบว่าไมโครฟลูอิดิก ชิพมีขนาดใกล้เคียงกับที่ออกแบบไว้โดยที่ Microchannel มีขนาด 497.43 ± 3.95 ไมครอน ความสูง 99.49 ไมครอน ระยะห่างระหว่าง Microchannel กับ Vacuum chamber (L) มีขนาด 141.89 ± 3.17 ไมครอน ความสูง 94.59 ไมครอน ระยะห่างระหว่าง Microchannel กับ Vacuum chamber (R) มีขนาด 140.78 ± 2.63 ไมครอน ความสูง 93.85 ไมครอน และความสูงของ Microchannel 143.82 ± 3.29 ไมครอน ความสูง 95.88 ไมครอน

ในส่วนของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในไมโครฟลูอิดิก ชิพจะแบ่งออกเป็น 2 สถานะคือ สถานะที่ไม่มีการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์และสถานะที่ทำให้มีการไหลของอาหารเลี้ยง 100 $\mu\text{L}/\text{h}$ หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ 1 ชั่วโมง 30 นาที ซึ่งพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในไมโครแชนแนลที่ไม่มีการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์มีการยึดเกาะบนพื้นผิวภายในไมโครแชนแนลหนาแน่นกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในไมโครแชนแนลที่มีการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์เนื่องจากในสถานะที่มีการไหลของอาหารเลี้ยงเซลล์ในไมโครแชนแนลที่อัตราการไหล 100 $\mu\text{L}/\text{h}$ อาจส่งผลให้เซลล์บางจำนวนไหลออกจากไมโครแชนแนล ทั้งนี้การที่เซลล์บางจำนวนไหลออกจากไมโครแชนแนลอาจเกิดได้จาก 2 สาเหตุดังนี้ ระยะเวลาที่ให้เซลล์อยู่ในสถานะนิ่งก่อนมีการไหลไม่เพียงพอให้เซลล์มีการยึดเกาะอย่างเหมาะสมและอัตราการไหลภายในไมโครแชนแนลมีค่าสูง

5.2 แนวทางในการพัฒนา

สำหรับในงานวิจัยนี้ควรมีการนำไปพัฒนาต่อ โดยมีแนวทางในการศึกษาและพัฒนาดังต่อไปนี้ คือ

1. การศึกษาการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิว PDMS ควรมีเทคนิคอื่นในการตรวจสอบเพื่อยืนยันว่ามีการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิว PDMS อาทิเช่น เทคนิครามานสเปกโตรสโคปี
2. ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบไมโครฟลูอิดิกควรศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ภายในไมโครแชนแนลที่อัตราการไหลต่าง ๆ จาก 100 $\mu\text{L}/\text{h}$ อาจปรับลดลงมาเป็น 50 $\mu\text{L}/\text{h}$ หรือ 30 $\mu\text{L}/\text{h}$ เป็นต้น ซึ่งในการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์สามารถทำได้โดยการตรวจสอบ ความสูงของเซลล์, เอนไซม์อะมิโนเปปติเดส (Aminopeptidase), โปรตีนที่แทรกอยู่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ (Tight junction) และโปรตีนที่แสดงออกถึงการดื้อยา (Multi-drug resistance protein) เป็นต้น
3. ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระบบไมโครฟลูอิดิก ควรมีการเพิ่มระยะเวลาที่ให้เซลล์อยู่ในสภาวะนิ่งก่อนเริ่มสภาวะการไหล ซึ่งอาจเพิ่มระยะเวลาเป็น 3 ชั่วโมงหรือ 6 ชั่วโมง เป็นต้น
4. สร้างไมโครฟลูอิดิก ชิฟโดยใช้เมมเบรนที่มีรูพรุนนาโนมาคั่นกลางภายในไมโครแชนแนลให้แบ่งออกเป็นสองส่วนคือบนกับล่างและเพาะเลี้ยงเซลล์บนเมมเบรนรูพรุนนาโนที่คั่นภายในไมโครแชนแนลเพื่อศึกษาการแพร่ผ่านของสารระหว่างเซลล์
5. ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์อาจมีการจำลองสภาวะการบีบ หดตัวของลำไส้ด้วยการควบคุมความดันภายใน Vacuum chamber เพื่อให้ไมโครแชนแนลเกิดการยืดเข้า ออก

บรรณานุกรม

- [1] Choi, J.-H., et al., "*Priming nanoparticle-guided diagnostics and therapeutics towards human organs-on-chips microphysiological system*", Nano Convergence, vol. 3, no. 1, pp. 24, 2016.
- [2] "กว่าจะมาเป็นยา", เกสักร จีรต์ เหลืองมั่นคง, 2012. [Online]. Available from: <https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/105/%E0%B8%81%E0%B8%A7%E0%B9%88%E0%B8%B2%E0%B8%88%E0%B8%B0%E0%B8%A1%E0%B8%B2%E0%B9%80%E0%B8%9B%E0%B9%87%E0%B8%99%E0%B8%A2%E0%B8%B2/>. [Accessed: 8-Jul-2019].
- [3] สุวรรณ เียรธกร, การทดสอบด้านพิษวิทยาด้วยวิธีทางเลือก. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, June 17, 2015.
- [4] Kim, H.J., et al., "*Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow*", Lab Chip, vol. 12, no. 12, pp. 2165-74, 2012.
- [5] "ระบบของไหลจุลภาค (Micro-fluidics)", สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน, [Online]. Available from: <https://www.slri.or.th/th/applications--research-highlight/-micro-fluidics.html>. [Accessed: 14-Mar-2019].
- [6] "From an organ on a chip to a body on a chip", Gaudriault, P., 2018. [Online]. Available from: <https://www.cherrybiotech.com/scientific-note/organs-on-chip/from-an-organ-on-a-chip-to-a-body-on-chip>. [Accessed: 1-October-2018].
- [7] "อันตรายและการประเมิน" Thailand, N.I.C.o., 2018. [Online]. Available from: <http://nict.sc.chula.ac.th/site/index.php/technology/hazard?showall=1&limitstart=>. [Accessed: 21-Jul-2019].
- [8] "ความรู้พื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์: *Basic knowledge in animal cell culture*", กัลยาณี จิตรีพงค์พันธ์, นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ, 2550, นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร. 197.
- [9] "Extra Cellular Matrix Is Critical to Neuroplasticity", Lieff, J., 2013, [Online]. Available from: <http://jonlieffmd.com/blog/extra-cellular-matrix-is-critical-to-neuroplasticity>. [Accessed: 17-Sep-2018].
- [10] SIGMA-ALDRICH, 2D vs. 3D Cell Model Systems.
- [11] Haigh, J. "3D Cell Culture for Biological-Relevant", *Neuroscientific, In Vitro Environments*, 2017. [Online]. Available from: <https://www.advancedsciencenews.com/3d-cell-culture-towards-realistic-biological-environments-cell-culture/>. [Accessed: 6-June-2018]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [12] Kuete, V., O. Karaosmanoğlu, and H. Sivas, *Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables*, in *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, V. Kuete, Editor. 2017, Academic Press. p. 271-297.
- [13] Bragheri, F., R. Martinez Vazquez, and R. Osellame, *Chapter 12.3 - Microfluidics*, in *Three-Dimensional Microfabrication Using Two-photon Polymerization*, T. Baldacchini, Editor. 2016, William Andrew Publishing: Oxford. p. 310-334.
- [14] "Microfluidics คือ อะไรและมีประโยชน์อย่างไร? ", ศูนย์ความเป็นเลิศด้านฟิสิกส์ (ThEP), 2017. [Online]. Available from: http://thepcenter.org/src/qa_read.php?question_id=1. [Accessed: 3-May-2019].
- [15] Moreira, F.T.C., et al., 1 - *Synthesis of molecular biomimetics*, in *Biomimetic Technologies*, T.D. Ngo, Editor. 2015, Woodhead Publishing. p. 3-31.
- [16] Li, C.W. and G.J. Wang, 8 - *MEMS manufacturing techniques for tissue scaffolding devices*, in *MEMS for Biomedical Applications*, S. Bhansali and A. Vasudev, Editors. 2012, Woodhead Publishing. p. 192-217.
- [17] Weibel, D.B., W.R. Diluzio, and G.M. Whitesides, "Microfabrication meets microbiology", *Nat Rev Microbiol*, vol. 5, no. 3, pp. 209-18., 2007.
- [18] MICROCHEM, *PROCESSING GUIDELINES FOR: SU-8 2025, SU-8 2035, SU-8 2050 and SU-8 2075*.
- [19] "Genomics & Cell Characterization Core Facility (GC3F)", OREGON, U.O., [Online]. Available from: <https://gc3f.uoregon.edu/quantification-instruments>. [Accessed: 10-June-2019].
- [20] "การวิเคราะห์พื้นผิวโพลิเมอร์ด้วยเทคนิค Atomic Force Microscopy", รศ.ดร.จตุพร วุฒิกนกกาญจน์,

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) : นางสาว ณัฐกานต์ นาควัฒน์โรจน์
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) : Miss Natthakarn Nakvattanarot
วัน เดือน ปีเกิด : 30 เมษายน 2540
ที่อยู่ : 34/52 หมู่ที่ 5 ต.หนองปรือ อ.บางละมุง จ.ชลบุรี 20160
ช่องทางติดต่อสื่อสาร : 58110006@kmitl.ac.th
: โทร. 0650997450
ประวัติการศึกษา : มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนโพธิสัมพันธ์ พินยาคาร
: ชั้นปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
สาขาวิศวกรรมวัสดุนาโน
วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร
ผลงาน : นำเสนอผลงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้บนพื้นผิว
PDMS ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ PACCON
2019