

การพัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาษที่มีการดัดแปรพื้นผิวและต้นแบบ
ไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของจุลชีพก่อโรค

นายปณณวิชญ์ ธิรบรรกิจพิธาน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

Development of surface-modified paper-based human intestinal cell model and
prototype of wireless biosensor for detection of pathogenic microorganisms

Mr. Pannawich Thirabowonkitphithan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University



3166961032

CU Thesais 5976680537 thesis / recv: 02082562 05:10:56 / seq: 13

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาษที่
มีการดัดแปรพื้นผิวและต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สาย
สำหรับตรวจวัดการเจริญของจุลชีพก่อโรค

โดย

นายปัทมณวิชญ์ ธิรบวรกิจพิธาน

สาขาวิชา

ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

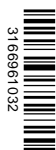
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิริพร จิตแก้ว)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัลยา ประไพเนพ)



ปริญญานิพนธ์ ศึกษาระดับปริญญาโท : การพัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาษที่มีการดัดแปรพื้นผิวและต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของจุลชีพก่อโรค. (

Development of surface-modified paper-based human intestinal cell model and prototype of wireless biosensor for detection of pathogenic microorganisms) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นการนำเสนอผลงานวิจัย การพัฒนาวิธีการใหม่เพื่อควบคุมและเฝ้าระวังโรคติดเชื้อ โดยประกอบด้วยเนื้อหาสำคัญสองส่วน ได้แก่ (i) การพัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษที่มีการดัดแปรพื้นผิว เพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษากลไกการบุกรุกของเชื้อจุลชีพก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และ (ii) การพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์แบบไร้สายเพื่อการตรวจติดตามการเจริญของเชื้อจุลชีพก่อโรค โดยในครั้งแรก เซลล์ลำไส้ของมนุษย์ HT-29 จำนวน 200,000 เซลล์ ถูกเพาะเลี้ยงในบริเวณขอบน้ำของกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยกระดาษถูกดัดแปรพื้นผิวด้วยสารเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix: ECM) ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Matrigel, Collagen-1 และ Laminin พื้นที่เพาะเลี้ยงเซลล์มีขนาด 12.56 ตารางมิลลิเมตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เซลล์ HT-29 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษ มีชีวิตรอดได้ถึง 28 วัน และแสดงลักษณะของเซลล์ที่เจริญเต็มที่ โดยมีการแสดงออกของวิลไล (villi) ที่ผิวเซลล์ด้านบน (apical) และมีการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 ซึ่งแสดงถึงเซลล์มีการสร้างไทด์จังก์ชันเกิดขึ้น จากการใช้สารเชื่อมพันธะสำหรับเชื่อมพันธะ ECM แต่ละชนิดพบว่าเมื่อใช้สารเจนิฟินในการเชื่อมพันธะ เซลล์มีชีวิตรอดทั้งหมด (100 - 112.8%) ในขณะที่มีเพียง 1.1 - 67.3 % ของเซลล์รอดชีวิต หากใช้สารกลูตาไรลดีไฮด์ในการเชื่อมพันธะ แต่การใช้สารเชื่อมพันธะทั้งสองชนิด ทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวมีรูปร่างแบบสามมิติได้ เมื่อสังเกตด้วย SEM เซลล์มีลักษณะแบน การดัดแปรพื้นผิวกระดาษด้วยสาร ECM ชนิด Matrigel ส่งผลให้เซลล์มีชีวิตรอดมากที่สุดและสาร ECM ชนิด Laminin ทำให้เซลล์เกิดการแปรสภาพ (cell differentiation) ได้ดีที่สุด งานวิจัยส่วนที่ 2 เป็นการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับติดตามการเจริญของเชื้อจุลชีพก่อโรค ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus gordonii* และ *Candida albicans* พบว่า เชื้อดังกล่าวสามารถสร้างไบโอฟิล์มบนผิวของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐาน (glassy carbon electrode) และสามารถให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เป็นลบได้ ด้วยการวัดศักย์ไฟฟ้าเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง Ag/AgCl และอาศัยหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอนออกภายนอกเซลล์ของเชื้อจุลชีพก่อโรค (extracellular electron transfer) ในการรีดิวซ์ซิลเวอร์คลอไรด์ทำให้ความต้านทานของเสารับสัญญาณของ RFID tag ลดลง จึงสามารถตรวจติดตามการเจริญของเชื้อจุลชีพแบบไร้สายได้ โดยสรุปงานทั้งสองส่วนในวิทยานิพนธ์นี้ มีบทบาทในการเป็นส่วนหนึ่งของการเฝ้าระวังการเกิดโรคติดเชื้อแบบองค์รวม โดยไบโอเซนเซอร์ไร้สายสามารถใช้เฝ้าระวังการเกิดไบโอฟิล์มของจุลชีพก่อโรค การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบใหม่บนกระดาษสามารถใช้ในการศึกษากลไกการเกิดโรคติดเชื้อและใช้เป็นโมเดลในการพัฒนายาชนิดใหม่สำหรับโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารได้ในอนาคต

สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอนุทาง การแพทย์	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2561	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5976680537 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE


KEYWORD: PAPER-BASED 3D CELL CULTURE / EXTRACELLULAR MATRIX / HT-29 / INTESTINAL
MODEL / BACTERIAL INFECTION / WIRELESS BIOSENSOR / RFID

Pannawich Thirabowonkitphithan : Development of surface-modified paper-based human intestinal cell model and prototype of wireless biosensor for detection of pathogenic microorganisms. Advisor: Asst. Prof. Wanida Laiwattanapaisal, Ph.D.

This thesis represents the new development methods for control and surveillance of infectious diseases. There are two main parts including (i) the development of surface-modified paper-based human intestinal cell model for gastrointestinal pathogen invasion study and (ii) the development of a prototype of wireless biosensor for detection of pathogenic microorganisms. For the first part, 200,000 cells of human colon cancer cell line, HT-29, were seeded on the hydrophilic area of Whatman No. 1 paper. The paper had been modified with various types of extracellular matrices (ECM), including Matrigel, collagen-1 and laminin. The area for cell seeding is approximately 12.56 mm². Under the optimized condition, the cells could survive up to 28 days and showed the mature cell characteristics by formation of apical villi and ZO-1 tight junction protein. Using of cross-linking agents, genipin showed good biocompatible property that the cells could survive 100-112.8%. In contrast, using glutaraldehyde as a cross-linking agent, cell viability showed approximately 1.1-67.3%. Nevertheless, using of both cross-linking agents, the cells could not be differentiated into 3D structure, as tumorigenic phenotype was observed under SEM. The ECM modified paper with Matrigel provided highest numbers of cell viability, whereas laminin-modified paper can influence most cellular differentiation. The second part of this thesis was the development of wireless biosensors for monitoring of pathogenic microorganisms, including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus gordonii* and *Candida albicans*. Interestingly, all these microorganisms can form biofilm on immersed glassy carbon electrode and generated the currents that can be measured vs Ag/AgCl reference electrode. Based on the principle of extracellular electron transfer, electron generated by the pathogens was used to reduce the AgCl sensing layer to metallic Ag which in turn changed the impedance of the RFID antenna. The change of impedance of RFID tag antenna can be wirelessly monitored. In conclusion, both parts of this thesis can be fulfill a holistic system for surveillance of infectious diseases. Wireless biosensors can be used for early detection of biofilm formation of pathogenic microorganisms. The new cell culture platform on paper can be useful for investigation of infection mechanism and also serve as a model for novel drug development in gastrointestinal diseases in the near future.

Field of Study: Clinical Biochemistry and Molecular Medicine Student's Signature

Academic Year: 2018 Advisor's Signature


 CT :Thesis 5976680537 thesis / recv: 02082562 05:10:56 / seq: 13
 316991032

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วย ความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒน์ไพศาล ซึ่งรับหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ซึ่งได้ให้คำปรึกษาช่วยชี้แนะแนวทาง ในการแก้ปัญหา แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนในทุกๆ ด้าน ทั้งในด้านการเรียนและการใช้ชีวิต จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ ประธานกรรมการในการสอบป้องกัน วิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร.ศิริพร จิตแก้ว กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัลยา ประไพเทพ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบ วิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีคลินิกที่คอยสั่งสอน ให้ความรู้ และให้คำแนะนำในการทำงาน วิจัย

ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกใน ด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่ พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ทุน สนับสนุนนิติตระดับปริญญาเอกและโทไปทำวิจัยในต่างประเทศ ทุนสนับสนุนนิติตระดับปริญญาเอกและโทเสนอ ผลงานวิชาการในประเทศ จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง สาขาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ที่คอยให้กำลังใจมิตรภาพ และให้ ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ความรักและกำลังใจ ส่งผลิให้งานวิจัยนี้ สำเร็จไปได้ด้วยดี

I would like to express my sincere gratitude to Prof. Tautgirdas Ruzgas for the continuous support of my study and research in Sweden, for his patience, motivation, enthusiasm, and immense knowledge. His guidance helped me in all the time of research and writing of the manuscript.

บัณฑิตวิษณุ ธิรบรรณกิจพิธาน

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ	ฏ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	6
ขอบเขตของการวิจัย.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
ลำดับขั้นในการเสนอผลการวิจัย	7
บทที่ 2.....	8
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
2.1 ลำไส้	8
2.1.1 ส่วนประกอบและหน้าที่ของลำไส้.....	8
2.2 โรคติดเชื้อ.....	9
2.2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างไบโอฟิล์มและการติดเชื้อ	10

2.2.2 การวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์ทางการแพทย์ 13

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ (Three-dimensional cell culture) 14

2.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยไม่มีอาศัยโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold-free system).... 15

2.3.2 การเลี้ยงเซลล์โดยใช้ระบบการหมุนวน (rotating culture) 15

2.3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยอาศัยแรงลอยตัวของแม่เหล็ก (magnetic levitation) 16

2.3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold system) 17

2.3.5 พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ 18

2.3.5.1 พอลิแลคติกแอซิด (Poly-lactic acid (PLA)) 18

2.3.5.2 พอลิไกลโคลิกแอซิด (Poly-glycolic acid (PGA)) 19

2.3.6 พอลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ 20

2.4 ไบโอฟิล์มที่มีคุณสมบัติในการสร้างกระแสไฟฟ้า (electroactive biofilms) 25

2.4.1 กลไกการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังขั้วโดยตรง (direct electron transfer: DET) 26

2.4.2 การขนส่งอิเล็กตรอนไปยังขั้วโดยอาศัยสารสื่อกลาง (mediated electron transfer: MET)..... 27

2.5 การพัฒนาไบโอเซนเซอร์แบบไร้สาย 29

บทที่ 3..... 31

วิธีดำเนินการวิจัย..... 31

3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย..... 31

3.1.1 เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยและวิธีการเพาะเลี้ยง..... 31

3.1.1.1 เซลล์ HT-29 human colon cancer cell line 31

3.1.1.2 แบคทีเรีย 32

3.1.1.3 ยีสต์..... 33

3.2 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	33
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	37
ส่วนที่ 1 การพัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาศที่มีการดัดแปรพื้นผิว ..	37
1. การออกแบบลวดลายบนกระดาศเพื่อใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์	37
2. การทดสอบชนิดของกระดาศกรองที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์	38
3. การทดสอบหาความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาศ.....	38
4. การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ต่อการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold)	39
5. การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ของสารเชื่อมพันธะ (cross linking agents) ต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์.....	40
6. การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT	42
7. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนไทต์จังก์ชัน ชนิด ZO-1 ในเซลล์ HT-29 โดยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (Immunofluorescence)	43
8. การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาศด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) .	43
ส่วนที่ 2 การพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของจุลชีพก่อโรค	44
1. การออกแบบและสร้างอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ	44
2. การศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิด (Open circuit potential: OCP)	45
3. การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน (silver nanoparticles) สำหรับการดัดแปรพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน (screen-printed electrode)	46
4. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโน (gold nanoparticles) สำหรับการดัดแปรพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน (screen-printed electrode) .	47
5. การดัดแปรพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน	47



6.	การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าของอนุภาคเงินนาโนด้วยวิธีการทางไฟฟ้าเคมี.....	48
7.	การศึกษาความสามารถในการใช้อิเล็กตรอนจากไบโอฟิล์มเพื่อรีดิวซ์ (reduce) อนุภาคเงินนาโนที่มีคุณสมบัติการนำไฟฟ้าลดลง.....	49
8.	การตรวจติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยการตรวจวัดแบบไร้สาย.....	50
บทที่ 4.....		52
ผลการวิจัย		52
ส่วนที่ 1 การพัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาศที่มีการดัดแปรพื้นผิว.....		52
1.1	ผลการทดสอบประสิทธิภาพชนิดของกระดาศกรองที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์	52
1.2	ผลการทดสอบความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาศ.....	53
1.3	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ต่อการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold).....	55
1.4	ผลการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ของสารเชื่อมพันธะ (cross linking agents) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ HT-29.....	57
1.5	ผลการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาศกรองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) .	59
1.6	ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาศกรองเป็นระยะเวลา 28 วัน	61
1.7	ผลการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนไทด์จังก์ชัน ชนิด ZO-1 ในเซลล์ HT-29 โดยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (Immunofluorescence)	63
ส่วนที่ 2 การพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค.....		67
2.1	ผลการตรวจวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ (Characterization of synthesized nanoparticles).....	67

2.2 ผลการศึกษาลักษณะเฉพาะของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิว . 69

2.3 ผลการศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิด (Open circuit potential: OCP) 71

2.4 ผลการศึกษาความสามารถในการใช้อิเล็กตรอนจากไบโอฟิล์มเพื่อรีดิวซ์ อนุภาค
เงินนาโนที่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าลดลง 72

2.5 ผลการทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยการตรวจวัดแบบไร้สาย 74

บทที่ 5..... 76

 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 76

 สรุปผลการวิจัย 76

 อภิปรายผลการวิจัย..... 80

บรรณานุกรม 88

ประวัติผู้เขียน..... 95

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 เครื่องที่ใช้ในงานวิจัย.....	33
ตารางที่ 2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	34
ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	35
ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ HT-29 โดยการใช้สารเชื่อมพันธะต่อสารแมทริกซ์ นอกเซลล์ชนิดที่ต่างกัน.....	58

3166961032

CD IThesis 5976680537 thesis / rev: 02082562 05:10:56 / seq: 13

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงอวัยวะลำไส้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์.....	8
ภาพที่ 2 แสดงสาเหตุหลักในการเสียชีวิตของประชากรในประเทศกำลังพัฒนา	10
ภาพที่ 3 แสดงวงจรของการเกิดไบโอฟิล์มตั้งแต่การเริ่มยึดเกาะบนพื้นผิวจนถึงการปลดปล่อย เซลล์	12
ภาพที่ 4 แสดงวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแสวงกิ่งครอบ	15
ภาพที่ 5 แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยใช้ rotating wall vessel (RWV).....	16
ภาพที่ 6 แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยอาศัยแรงลอยตัวของแม่เหล็ก (magnetic levitation)	17
ภาพที่ 7 แสดงโครงร่างสามมิติสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จากพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิด พอลิแลค ติคแอซิด	19
ภาพที่ 8 แสดงภาพเส้นใยพอลิไกลโคไลคแอซิดที่มีเซลล์ Fibroblast ยึดเกาะ	20
ภาพที่ 9 แสดงการใช้พอลิเมอร์ธรรมชาติในการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์	21
ภาพที่ 10 แสดงการติดตามการบุกรุกของเซลล์มะเร็งเต้านมโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษ	22
ภาพที่ 11 แสดงความเข้มข้นของสีเมลานินที่เพิ่มขึ้นเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของสาร α -MSH..	23
ภาพที่ 12 แสดงการติดตามการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษโดยใช้การ ติดตามด้วยสี	24
ภาพที่ 13 เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนแอนติเจนที่ผิวเซลล์ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ระหว่างเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนเพลทเลี้ยงเซลล์และเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษ	25
ภาพที่ 14 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ขั้วแอนโนด และขั้วแคโทด	26
ภาพที่ 15 แสดงกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนโดยใช้โมเลกุล C-type cytochrome ในการ ถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ขั้วแอนโนด	26

ภาพที่ 16 แสดง nanowire ของเชื้อแบคทีเรีย..... 27

ภาพที่ 17 แสดงปฏิกิริยาการขนส่งอิเล็กตรอนออกภายนอกเซลล์..... 28

ภาพที่ 18 แสดงการตรวจวัดกลูโคสในน้ำตาจากคอนแทคเลนส์แบบไร้สาย..... 30

ภาพที่ 19 แสดงลักษณะของเซลล์ HT-29 จาก (ATCC HTB-38) 32

ภาพที่ 20 แสดงลดลายบนกระดาษที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม Adobe Photoshop CC 2015 37

ภาพที่ 21 แสดงตำแหน่งในการนับเซลล์บน hemocytometer 39

ภาพที่ 22 แสดงปฏิกิริยาการเชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนของโปรตีน..... 41

ภาพที่ 23 แสดงปฏิกิริยาการเชื่อมหมู่อะมิโนของโปรตีนด้วยสารเงินฟีน 41

ภาพที่ 24 แสดงปฏิกิริยาการเกิดรีดักชันภายในเซลล์ โดยเอนไซม์ไมโทคอนเดรียรีดักเทส 42

ภาพที่ 25 แสดงภาพด้านบนของฝาหลอด centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร 45

ภาพที่ 26 แสดงระบบการวัดค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิด (OCP)..... 46

ภาพที่ 27 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน 47

ภาพที่ 28 แสดงขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิวด้วยอนุภาคนาโน 48

ภาพที่ 29 แสดงระบบการทดสอบความสามารถในการใช้อิเล็กตรอนจากไบโอฟิล์ม 50

ภาพที่ 30 แสดงระบบการติดตามการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแบบไร้สาย 51

ภาพที่ 31 แสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาษกรอง 53

ภาพที่ 32 แสดงผลการเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์..... 55

ภาพที่ 33 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ 56

ภาพที่ 34 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เซลล์ HT-29 ที่มีชีวิตและความเข้มข้นของสารเชื่อมพันธะ 58

ภาพที่ 35 แสดงภาพถ่ายจาก SEM ของเซลล์ HT-29 60

ภาพที่ 36 แสดงภาพถ่ายจาก SEM ของเซลล์ HT-29 ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนกระดาษที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ 61

ภาพที่ 37 แสดงผลการมีชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษเมื่อถูกตัดแปรพื้นผิวด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ชนิดต่าง ๆ.....	63
ภาพที่ 38 ภาพแสดงการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 ในเซลล์ HT-29	66
ภาพที่ 39 แสดงการกระจายตัวของขนาดของอนุภาคเงินนาโน.....	68
ภาพที่ 40 แสดงภาพถ่ายจาก Transmission electron microscope (TEM)	69
ภาพที่ 41 แสดงภาพถ่ายจาก Scanning electron microscope (SEM)	70
ภาพที่ 42 แสดงภาพถ่ายจาก Scanning electron microscope (SEM)	70
ภาพที่ 43 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อและค่าศักย์ไฟฟ้า.....	72
ภาพที่ 44 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น จากการใช้อิเล็กตรอนจากไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงร่วมกัน (Polymicrobial) ในการวัดอัตราการไหลไปเป็นซิลเวอร์	74
ภาพที่ 45 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความถี่ (Frequency) และ ค่าการลดทอนสัญญาณ (attenuation unit).....	75

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคติดเชื้อ (Infectious diseases) คือความผิดปกติที่มีสาเหตุมาจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย ไวรัส โปรโตซัว หรือ เชื้อรา (1) โดยเมื่อก่อโรคขึ้นแล้ว โรคที่เกิดขึ้นสามารถแพร่กระจายไปยังบุคคลอื่นทั้งทางตรง หรือทางอ้อม โดยการแพร่กระจายเชื้อโรคผ่านทางพาหะ เช่น แมลงหรือสัตว์ หรือการสัมผัสและรับประทานอาหาร น้ำ ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (2)

พยาธิกำเนิด (pathogenesis) ของการติดเชื้อ อาศัยขั้นตอนต่าง ๆ ในการก่อโรคติดเชื้อ โดยเริ่มจาก การยึดเกาะ (adherence) โดยเมื่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเข้าสู่ร่างกายแล้ว ขั้นตอนการยึดเกาะถือเป็นกระบวนการเริ่มต้นที่สำคัญในการก่อให้เกิดการติดเชื้อ โดยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจะยึดเกาะกับเซลล์เยื่อ (epithelial cells) แล้วแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (multiplication) และสะสม (deposition) ในบริเวณเนื้อเยื่อ (3) โดยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้โดยผ่านทางช่องทางต่าง ๆ เช่น การติดเชื้อที่ผิวหนัง (skin infection) ผ่านทางรอยเปิดบนผิวหนังจากการถูกของมีคมบาด การถูกแมลงกัด หรือแผลจากการผ่าตัด การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (respiratory tract infection) การติดเชื้อของระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) และการติดเชื้อที่ระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract infection) (4) เป็นต้น ซึ่งอาการของการติดเชื้อมีอาการที่แตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และบริเวณของการก่อโรค แต่การติดเชื้อมีอาการที่สามารถสังเกตได้ร่วมกัน เช่น อาการไข้ เกิดจากการที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายพยายามต่อต้านการติดเชื้อ (5) การอักเสบ เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายพยายามต่อสู้และกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (6)

เพื่อหาแนวทางป้องกันการเกิดโรคหรือเพื่อประโยชน์ในการรักษา นักวิจัยให้ความสนใจในการศึกษากลไกการก่อโรค โดยในปัจจุบันวิธีการศึกษากลไกการก่อโรคอาศัยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง (*in vitro* cell culture models) ที่มีความจำเพาะกับระบบต่าง ๆ ของร่างกายที่ต้องการศึกษาร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนภาชนะเลี้ยงเซลล์ (cell culture flask) ที่มีลักษณะแบน เซลล์สามารถเจริญได้ในรูปแบบสองมิติ ทำให้การแสดงออกของ



เซลล์ เช่น รูปร่างของเซลล์ อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและพร้อมเพรียงกัน การได้รับสารอาหารและแก๊ส การจำกัดของเสีย (7) การขาดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และเซลล์ (cell-cell interaction) การขาดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และสารเมทริกซ์นอกเซลล์ (cell-extracellular matrix interaction) ทำให้เซลล์มีความแตกต่างไปจากเซลล์ที่เกิดขึ้นในร่างกาย (8, 9) จึงทำให้การศึกษากลไกการก่อโรคอาจมีความคลาดเคลื่อนไปจากสิ่งที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย เนื่องจากเซลล์มีลักษณะการแสดงออกที่แตกต่างไปจากสภาพแวดล้อมดั้งเดิม นอกจากนี้ ยังมี การทดลองศึกษากลไกการเกิดโรคโดยใช้สัตว์ทดลอง เช่น หนู กระต่าย เป็นต้น แต่การทดลองในสัตว์มีต้นทุนการศึกษาทดลองที่สูง และผลที่ได้จากการทดลองในสัตว์ทดลองไม่สามารถสะท้อนผลที่อาจเกิดขึ้นจริงในมนุษย์ได้ อีกทั้งการใช้สัตว์ทดลองต้องคำนึงถึงจรรยาบรรณในการใช้สัตว์ทดลอง โดยคำนึงถึงหลัก 3Rs ได้แก่ **Replacement** โดยการใช้วิธีการอื่นทดแทนการใช้สัตว์ทดลอง เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (cell culture) **Reduction** การใช้สัตว์ทดลองในจำนวนที่เหมาะสม และ **Refinement** การใช้วิธีการและเทคนิคในการวิจัยที่เหมาะสมต่อสัตว์ทดลอง (10) ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกับผลที่เกิดขึ้นในร่างกายและเพื่อเป็นการลดการใช้สัตว์ทดลอง ทำให้มีนักวิจัยคิดค้นวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ เพื่อให้ได้ผลการแสดงออกของเซลล์ที่ใกล้เคียงกับเซลล์ที่เกิดขึ้นในร่างกายมากยิ่งขึ้น โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ มีวิธีต่าง ๆ เช่น แสงกิ่ง ดรอป (hanging drop method) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะเป็นหยดน้ำที่เกาะอยู่กับพื้นผิวของภาชนะ เพื่อให้เซลล์เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์แล้วเกิดรูปร่างแบบสามมิติ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ได้มากกว่า 50 ไมโครลิตร ได้ เนื่องจากแรงตึงผิวไม่เพียงพอต่อการต้านแรงโน้มถ่วง จึงทำให้หยดน้ำไม่สามารถเกาะที่พื้นผิวของภาชนะได้ (11) และการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทำได้ยากต้องอาศัยความชำนาญ นอกจากนี้ ยังมีวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยใช้เพลทที่เซลล์ไม่สามารถยึดเกาะได้ (non-adherent surface methods) เช่น ทำการเคลือบพื้นผิวของเพลทด้วยสาร Poly-HEMA (Poly 2-hydroxyethyl methacrylate) เซลล์ที่ไม่สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวจะเกิดการรวมกลุ่มเป็นรูปร่างสามมิติ (spheroid) แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือเพลทที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีราคาสูง (12, 13) หรือวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold-based methods) โครงเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท ได้แก่ พอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer) เช่น polyethylene glycol (PEG) มีขั้นตอนในการสังเคราะห์ที่ค่อนข้างซับซ้อนและเทคนิคที่ซับซ้อนทำให้มีต้นทุนสูง และเส้นใยจากธรรมชาติ (natural polymer) เช่น คอลลาเจน (collagen) ต้องใช้ในปริมาณมากและไม่เหมาะสำหรับการทดสอบพร้อมกันใน

ปริมาณมาก (high throughput screening: HTS) (14) จากข้อจำกัดดังกล่าวทำให้มีกลุ่มนักวิจัยหันมาใช้กระดาษในการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์เนื่องจากกระดาษมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและมีราคาถูก สามารถจัดหามาได้ง่าย อีกทั้งกระดาษยังไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมและประหยัดพื้นที่ในการจัดเก็บ การใช้กระดาษเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สามารถลดการใช้ปริมาณสารเคมีหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ให้ลดต้นทุนในการทดลอง (15) ตัวอย่างการนำกระดาษมาเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (16), เซลล์ผิวหนังชนิดเมลาโนมา (17), เซลล์ตับ (18) และเซลล์ปอด (19) เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้มนุษย์บนกระดาษยังไม่มีกรรายนามมาก่อน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เสนอแนวคิดการพัฒนาโมเดลใหม่เพื่อใช้เป็นแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ที่มีลักษณะการแสดงออกทางด้านชีววิทยาและสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่คล้ายคลึงกับเซลล์ลำไส้ในร่างกาย โดยเลือกศึกษาเซลล์ HT-29 human colon adenocarcinoma cell line เนื่องจาก เซลล์สามารถเกิดการแปรสภาพของเซลล์ (cell differentiation) และมีการสื่อสารระหว่างเซลล์โดยการสร้างไทต์จังก์ชัน (tight junction) เชื่อมเป็นรอยต่อระหว่างเซลล์ และเซลล์ยังแสดงลักษณะที่เหมือนกับเซลล์ enterocytes ที่พบในลำไส้เล็ก คือเซลล์สามารถพัฒนาและแสดงออกโครงสร้างวิลไล (villi) ทางด้านบน (apical) ของเซลล์ได้ และนอกจากนี้ เซลล์ HT-29 ยังถูกนำมาใช้ในการศึกษาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ลำไส้ต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย และยังถูกใช้ในการศึกษาการยึดเกาะ (adhesion) การบุกรุก (invasion) หรือการมีชีวิตรอดของเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ เนื่องจากเซลล์สามารถแสดงลักษณะของเซลล์ลำไส้ที่เจริญเต็มที่และสามารถหลั่งสารเมือกได้อีกทั้งการเพาะเลี้ยงแบบสามมิติบนกระดาษ สามารถใช้ประโยชน์ในการศึกษากลไกการเกิดโรคและพยาธิสภาพของโรคที่มีการอักเสบของระบบทางเดินอาหาร (inflammatory bowel diseases (IBD)) ต่อไป เช่น Crohn's disease หรือ Ulcerative Colitis ที่อาจเกิดขึ้น และยังเป็นทางเลือกหนึ่งของงานวิจัยที่สามารถลดการใช้สัตว์ทดลองได้ ในงานวิจัยนี้ นำเสนอวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษที่มีการตัดแปรรูปผิวด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ชนิดต่าง ๆ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษ เส้นใยของกระดาษที่สานกันเป็นร่างแหสามมิติจะทำหน้าที่ในการเป็นโครงร่างสนับสนุนให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวได้แบบสามมิติในรูพรุนของกระดาษ และกระดาษมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพต่อเซลล์และมีความเป็นพิษต่ำ จึงทำให้กระดาษเป็นวัสดุชีวภาพ (biomaterial) (20, 21) ที่สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้เป็นแบบจำลองของเซลล์ที่มีการแสดงออกที่ใกล้เคียงกับเซลล์ในร่างกาย และลดปริมาณการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ (cell culture media) รวมไปถึงสารแมทริกซ์นอกเซลล์

(extracellular matrix) ที่ใช้ในการดัดแปรพื้นผิวของกระดาษ ซึ่งคาดว่าจะสามารถลดต้นทุนและค่าใช้จ่ายในการศึกษาวิจัย และเนื่องจากการเลี้ยงเซลล์บนกระดาษสามารถทำการทดสอบได้พร้อมกันครั้งละปริมาณมาก ๆ จึงสามารถประยุกต์ใช้การเลี้ยงเซลล์บนกระดาษสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของยาในระบบอุตสาหกรรมที่ต้องการผลการทดสอบพร้อมกันในปริมาณมาก (high throughput screening: HTS) และด้วยคุณสมบัติความยืดหยุ่นของกระดาษ สามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดทางไบโอเซนเซอร์อื่น ๆ เช่น screen-printed electrode บนผิวกระดาษโดยตรง ทำให้มีความเป็นไปได้สูง ที่จะต่อยอดนำโมเดลเซลล์ลำไส้ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษร่วมกับเทคนิคไบโอเซนเซอร์ เพื่อติดตามแบบสภาวะจริง (real time monitoring) หรือติดตามแบบไร้สาย (wireless biosensor) ซึ่งจะมีประโยชน์ในการติดตามการเจริญของเซลล์ (cell proliferation) หรือการตายของเซลล์ (cell death) หรือกรณีเซลล์ลำไส้หากมีการถูกทำลายไต่ตึงจังก์ชัน จากการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เชื้อ Salmonella ก็สามารถศึกษาติดตามได้อย่างรวดเร็วและทันที่

ในการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ในงานประจำทั่วไปใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย การย้อมสีแกรม (Gram stain) การตรวจทางชีวเคมี (Biochemical test) การตรวจด้วยวิธีทางซีโรโลยี (Serological test) รวมถึงการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular technique) เพื่อหาสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคโดยตรง ซึ่งหลักการดังกล่าวต้องอาศัยบุคลากรทางการแพทย์ที่มีความรู้ ความสามารถ และเป็นผู้เชี่ยวชาญในการปฏิบัติงาน อีกทั้งบางการทดสอบต้องอาศัยระยะเวลาที่นานกว่าจะทราบผลและมีต้นทุนการทดสอบที่สูง ทำให้ในขั้นตอนการรักษาเบื้องต้น แพทย์อาจต้องรักษาโดยใช้ยาที่ไม่ตรงกับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค หรือมีการใช้ยาที่มากเกินไปจนกว่าความจำเป็น ยิ่งไปกว่านั้นในมุมมองของผู้ป่วยเพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาล ผู้ป่วยมักมีการซื้อยารับประทานเอง เนื่องจากการใช้ยาโดยขาดความระมัดระวัง อาจนำไปสู่การเกิดปัญหาเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะขึ้นได้ ในสถานพยาบาล ก็มีความจำเป็นต้องเฝ้าระวังการติดเชื้อโรคดังกล่าวด้วย เพราะเป็นแหล่งที่มีการสะสมของเชื้อโรคและเชื้อโรคมักกลไกการสร้างไบโอฟิล์ม ทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะได้และเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก โดยเชื้อจะสร้างไบโอฟิล์มเพื่อป้องกันตัวเองจากสภาวะแวดล้อม ซึ่งเชื้อที่อยู่ในไบโอฟิล์มสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะได้สูงขึ้นประมาณ 10 ถึง 1000 เท่า (22) โดยเชื้อจุลินทรีย์อาศัยไบโอฟิล์มในการป้องกันการทำลายจากยา หรือระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (23, 24) ดังนั้นเพื่อเป็นการเฝ้าระวังการติดเชื้อและอันตรายที่เพิ่มขึ้นจากการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ การพัฒนาไบโอเซนเซอร์สำหรับตรวจติดตามการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์สามารถช่วยในการ

เฝ้าระวังและป้องกันปัญหาการติดเชื้อที่อาจเกิดขึ้นได้ และหากมีการนำเทคโนโลยีตัวรับทางชีวภาพไร้สาย (wireless biosensors) มาร่วมในการใช้งานจะทำให้สามารถติดตามการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างทันทั่วทั้งที่ และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เพื่อป้องกันปัญหาการเกิดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะที่เพิ่มขึ้นในอนาคต ผู้วิจัยได้นำเสนอต้นแบบไบโอเซนเซอร์แบบไร้สาย สำหรับการตรวจวัดการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยอาศัยความสามารถในการขนส่งอิเล็กตรอนออกนอกเซลล์ (extracellular electron transfer) ของเชื้อจุลินทรีย์ (25) ร่วมกับการใช้ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันของอนุภาคเงินนาโน (silver nanoparticles) ที่ใช้เป็นส่วนในการติดตามการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาวิจัยสามารถตรวจติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถป้องกันการติดเชื้อและลดการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคในสิ่งมีชีวิตได้ อีกทั้งไบโอเซนเซอร์แบบไร้สายสำหรับการตรวจวัดการเจริญของไบโอฟิล์มที่พัฒนาขึ้นมีต้นทุนในการทดลองที่ไม่สูงเมื่อเทียบกับการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

ซึ่งงานวิจัยทั้งสองส่วน ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้บนกระดาษ และการพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค สามารถนำมาประยุกต์ใช้ศึกษากลไกการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคมะเร็งลำไส้ (Colorectal cancer) กลุ่มโรคที่มีการอักเสบของระบบทางเดินอาหาร (Inflammatory Bowel Disease) และ แผลในระบบทางเดินอาหาร (Gut wound) ที่เกิดจากการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เซลล์ลำไส้ได้ จะทำให้เข้าใจกลไกการก่อโรคมายิ่งขึ้น จนถึงการเฝ้าระวังการติดเชื้อโดยใช้อุปกรณ์ไบโอเซนเซอร์แบบไร้สาย การศึกษาวิจัยนี้นับเป็นระบบการศึกษาและจัดการโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศได้ทางหนึ่ง และลดความสูญเสียที่จะเกิดขึ้นทั้งทางด้านสาธารณสุข และยังให้เกิดผลเสียทางด้านเศรษฐกิจของประเทศ เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการรักษาและดูแลผู้ป่วยมีมูลค่าสูง รวมถึงสามารถใช้เป็นโมเดลศึกษาพัฒนายาชนิดใหม่ในการรักษาโรคติดเชื้อมากกว่าได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติบนกระดาษ
2. เพื่อพัฒนาโมเดลเซลล์ลำไส้ของมนุษย์ที่มีการแสดงออกทางชีววิทยาและสัญญาณวิทยาที่คล้ายคลึงกับเซลล์ในร่างกายของมนุษย์
3. เพื่อพัฒนาต้นแบบของไบโอเซนเซอร์แบบไร้สายสำหรับการตรวจวัดการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้มุ่งศึกษาเพื่อพัฒนาระบบการจัดการและการพัฒนาวิธีการควบคุมโรคติดเชื้ออย่างองค์รวมตั้งแต่การพัฒนาโมเดลการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติบนกระดาษเพื่อให้เซลล์เกิดการแสดงออกทางชีวภาพที่ใกล้เคียงกับเซลล์ในร่างกาย โดยใช้ HT-29 cells เพาะเลี้ยงบนกระดาษที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วย Matrigel, Collagen-1 และ Laminin และศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์และการมีชีวิตของเซลล์บนกระดาษด้วยวิธี MTT และศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 โดยใช้เทคนิค immunofluorescent รวมถึงศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์โดยใช้ Scanning electron microscope อีกทั้งยังพัฒนาต้นแบบของไบโอเซนเซอร์แบบไร้สาย (wireless biosensor) เพื่อการติดตามการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยใช้ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันของอนุภาคเงินนาโน (Silver nanoparticles) ร่วมกับคุณสมบัติการถ่ายทอดอิเล็กตรอนนอกเซลล์ (Extracellular electron transfer) ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาโมเดลโดยใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงแบบสามมิติบนกระดาษ เป็นโมเดลศึกษาโรคติดเชื้อ เพื่อการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเชื้อก่อโรคและเจ้าบ้าน (host-pathogen interaction) ในอนาคต
2. ลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ โดยใช้กระดาษเป็นโครงร่างสำหรับการเลี้ยงเซลล์ (scaffold)
3. สามารถศึกษาและเข้าใจกระบวนการทางชีวภาพที่ใกล้เคียงกับเซลล์ที่เกิดขึ้นในร่างกายได้มากยิ่งขึ้น

4. สามารถพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์ที่สามารถตรวจวัดการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแบบไร้สาย
5. สามารถนำต้นแบบไบโอเซนเซอร์แบบไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่พัฒนาขึ้นไปพัฒนาต่อยอดเป็นอุปกรณ์ไบโอเซนเซอร์แบบสวมใส่ (wearable sensor) เพื่อติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้
6. เป็นการผลิตนวัตกรรมทางการแพทย์ เพื่อประโยชน์ในการศึกษาและป้องกันโรคติดเชื้อ
7. เป็นการบูรณาการองค์ความรู้ทั้งทางด้านชีวเคมี จุลชีววิทยา และการพัฒนาไบโอเซนเซอร์ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานวิจัยในอนาคตและเป็นประโยชน์ต่อประชาชน

ลำดับขั้นในการเสนอผลการวิจัย

1. นำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ
2. ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการระดับชาติและนานาชาติ



3166981032

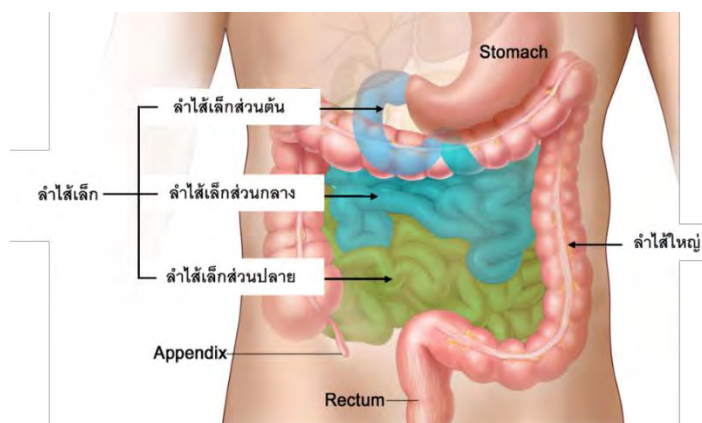
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลำไส้

2.1.1 ส่วนประกอบและหน้าที่ของลำไส้

ลำไส้ของมนุษย์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนหลัก ๆ ได้แก่ ลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ โดยลำไส้เล็กสามารถแบ่งออกได้เป็น ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) และ ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) โดยลำไส้เล็กในแต่ละส่วนจะมีหน้าที่และความสามารถในการดูดซึมสารอาหารที่แตกต่างกันออกไป ลำไส้เล็กส่วนต้นทำหน้าที่ดูดซึมวิตามินที่ละลายน้ำได้ และกรดไขมัน และทำหน้าที่บดอาหารให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อส่งต่อไปยังลำไส้เล็กส่วนกลางและลำไส้เล็กส่วนปลายต่อไป กลูโคสและโซเดียมไอออนถูกดูดซึมที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนกลาง สำหรับลำไส้เล็กส่วนปลายทำหน้าที่ดูดซึมวิตามินบี 12 และ เหล็กน้ำดี เพื่อใช้ในการย่อยและดูดซึมไขมัน และน้ำมัน (26) โดยภาพที่ 1 แสดงกายวิภาคของลำไส้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์



ที่มา ดัดแปลงจาก Ref. (27)

ภาพที่ 1 แสดงอวัยวะลำไส้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

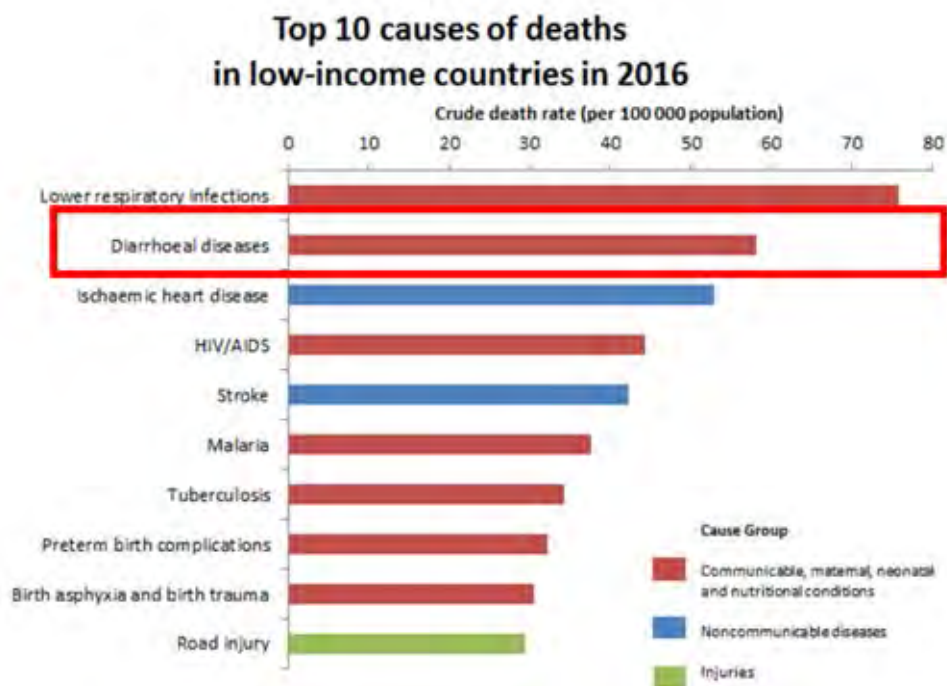
ซึ่งผิวของลำไส้เล็กจะถูกปกคลุมด้วยไมโครวิลไล (microvilli) เพื่อช่วยเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมสารอาหาร โดยไมโครวิลไลจะมีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร โดยการเรียงตัวกันของไมโครวิลไลสามารถเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมสารอาหารได้เพิ่มขึ้นถึง 500 เท่า สำหรับลำไส้ใหญ่ (colon) ทำ

หน้าที่ดูดน้ำ วิตามิน และแร่ธาตุกลับเข้าสู่ร่างกาย และเป็นบริเวณที่มีเชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่อย่างหนาแน่น โดยเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่อาศัยบริเวณลำไส้ใหญ่เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobes) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณลำไส้ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการผลิตเซลล์เยื่อบุลำไส้ ลักษณะรูปร่างของเซลล์ลำไส้และการทำหน้าที่ในการเป็นชั้นของเนื้อเยื่อในการป้องกันการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและยังทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันในระบบลำไส้ (intestinal immune response) โดยลำไส้มีตัวรับรู้การบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วย pathogen-recognition receptors (PRRs) โดย PRRs ที่พบในลำไส้คือ Toll-like receptors (TLR) โดยสามารถรับรู้ผ่าน pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ที่อยู่บนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (28) โดยเมื่อมีการรับรู้ถึงการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแล้ว เซลล์ลำไส้จะทำการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (cell proliferation) (29, 30) สร้างภูมิคุ้มกันชนิด IgA (31) เพื่อต่อต้านการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค การพยายามรักษารอยต่อระหว่างเซลล์ (tight junction) (32) และการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ทั้งนี้ระบบภูมิคุ้มกันที่ลำไส้ทำหน้าที่ดังกล่าวเพื่อการรักษาคุณสมบัติของการเป็นชั้นเนื้อเยื่อ (epithelial barrier) ที่สำคัญ (33) ในการป้องกันการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกร่างกาย

2.2 โรคติดเชื้อ

โรคติดเชื้อจัดว่าเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนา โดยประชากรช่วงวัยเด็กและวัยผู้สูงอายุมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูงสุด เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันในเด็กยังทำงานไม่ได้เต็มประสิทธิภาพและความเสื่อมถอยของระบบภูมิคุ้มกันในผู้สูงอายุทำให้มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ง่าย โดยข้อมูลองค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ปี ค.ศ. 2000-2016 ระบุสาเหตุการเสียชีวิต 10 อันดับ ซึ่งโรคติดเชื้อเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตถึง 3 ใน 10 สาเหตุ ได้แก่ การติดเชื้อทางเดินหายใจส่วนล่าง โรคอุจจาระร่วง และโรคติดเชื้อฉวยโอกาส โดยสาเหตุของโรคติดเชื้อเกิดได้จากหลากหลายปัจจัย เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส หรือพยาธิ ซึ่งเมื่อเกิดการติดเชื้อขึ้นแล้วจะมีการแพร่กระจายเชื้อไปยังสิ่งมีชีวิตอื่นทั้งมนุษย์และสัตว์ โดยช่องทางการติดเชื้ออาจเกิดจากการสัมผัสสัมผัสจากแหล่งเชื้อโรคโดยตรง เช่น การรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อน การสัมผัสสิ่งคัดหลั่งจากสัตว์หรือบุคคลที่ติดเชื้ออยู่ก่อน โดยช่องทางการระบาดที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อได้แก่ การแพร่เชื้อทางอากาศ (34) และเมื่อพิจารณาจากข้อมูลสาเหตุการเสียชีวิต 10 อันดับ

จะพบว่าในประเทศกำลังพัฒนา โรคอุจจาระร่วงถือเป็นสาเหตุที่สำคัญอันดับที่ 2 รองจากการติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ดังแสดงในภาพที่ 2



ที่มา Ref. (34)

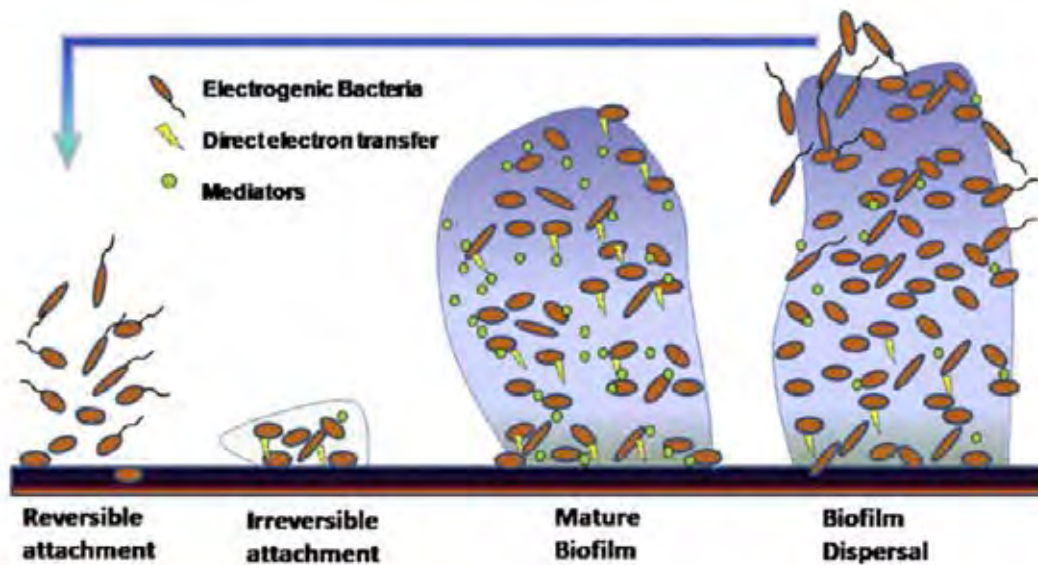
ภาพที่ 2 แสดงสาเหตุหลักในการเสียชีวิตของประชากรในประเทศกำลังพัฒนา

2.2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างไบโอฟิล์มและการติดเชื้อ

พยาธิกำเนิด (Pathogenesis) ของโรคติดเชื้อ อาศัยปัจจัยหลัก 3 ปัจจัย ในการเกิดโรคติดเชื้อ ได้แก่ เจ้าบ้าน (host) เชื้อจุลชีพที่ก่อโรค (infectious agents) และ สิ่งแวดล้อมภายนอก (external environment) โดยอาจเป็นเชื้อจุลชีพที่อยู่ภายในร่างกาย (endogenous infectious agent) ที่เวลาปกติไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อแต่อาจทำให้เกิดการติดเชื้อเมื่อภูมิคุ้มกันลดต่ำลง และ เชื้อจุลชีพที่ก่อโรคนอกในร่างกาย (exogenous infectious agent) จากสิ่งแวดล้อม เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วทำให้เกิดการติดเชื้อ ทั้งนี้ความสามารถในการเกิดการติดเชื้อขึ้นกับความอ่อนไหว (susceptibility) ของเจ้าบ้าน (host) เป็นสำคัญ และสิ่งแวดล้อมอีกปัจจัยที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ โดยสิ่งแวดล้อมรวมถึง พาหะนำเชื้อ (vector) รวมไปถึงแมลงหรือสัตว์ที่แพร่กระจายเชื้อโรค

และแหล่งเชื้อโรค (reservoir) หรือสัตว์ที่เป็นแหล่งโรค (zoonotic hosts) ที่เป็นแหล่งในการสะสมเชื้อโรคและพร้อมที่จะแพร่กระจายเชื้อเมื่อมีพาหะมาสัมผัสหรือนำเชื้อไปยังสิ่งมีชีวิตอื่น

ไบโอฟิล์ม (biofilm) ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Antoine Von Leeuwenhoek ในศตวรรษที่ 17 โดยการเกิดไบโอฟิล์มเริ่มจากเชื้อที่เป็นเซลล์ลอยเดี่ยว (planktonic cell) เกิดการยึดเกาะพื้นผิว ซึ่งการเปลี่ยนจากเซลล์ที่ลอยมาสู่การสร้างไบโอฟิล์มเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมซึ่งกระตุ้นให้เซลล์เกิดการปรับตัวและเปลี่ยนการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวเซลล์เพื่อใช้ในการยึดเกาะ และ เซลล์ยังเปลี่ยนแปลงการใช้อาหาร หรือมีการสร้างสารอันตราย (virulence factors) เพื่อตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น การเปลี่ยนแปลง pH การตอบสนองต่อรังสี การตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ หรือในสภาวะที่มีอาหารหรือออกซิเจนปริมาณจำกัด (35) โดยการเกิดไบโอฟิล์มสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ โดย ระยะแรกเซลล์จะทำการยึดเกาะพื้นผิวโดยในระยะนี้เป็นการยึดเกาะแบบผันกลับได้โดยยังคงมีการแสดงออกของแฟลกเจลลา (flagella) และพิไล (pili) ระยะที่สอง เป็นระยะที่เซลล์เกิดการยึดเกาะแบบไม่สามารถผันกลับได้ และมีการส่งสัญญาณเพื่อสื่อสารไปยังเชื้อตัวอื่น โดยใช้ Quorum sensing (QS) และผลิตสารเมทริกซ์พอลิเมอร์ออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน พอลิแซ็กคาไรด์ และกรดนิวคลีอิก ระยะที่สาม มีการสร้างไบโอฟิล์มที่มีโครงสร้างสมบูรณ์ (mature biofilm) โดยภายในไบโอฟิล์มมีโครงสร้างที่เป็นช่องว่างสำหรับการใช้ลำเลียงน้ำ สารอาหารและเพื่อกำจัดของเสีย และขั้นตอนสุดท้ายเป็นขั้นตอนการปลดปล่อยเซลล์ ให้กลายเป็นเซลล์ที่สามารถล่องลอยเป็นอิสระได้ และพร้อมที่จะสร้างไบโอฟิล์มใหม่อีกครั้ง (36) โดยภาพที่ 3 แสดงวงจรชีวิตของไบโอฟิล์ม



ที่มา Ref. (37)

ภาพที่ 3 แสดงวงจรของการเกิดไบโอฟิล์มตั้งแต่การเริ่มยึดเกาะบนพื้นผิวจนถึงการปลดปล่อยเซลล์

การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อทำให้เชื้อติดต่อยาปฏิชีวนะมากยิ่งขึ้น โดยเชื้อมีกลไกในการติดต่อยา เช่น การสร้างแคปซูลหรือไกลโคคาลิกซ์ (glycocalyx) ซึ่งเป็นสารเมือกใช้ในการห่อหุ้มตัว ทำให้ยาสามารถเข้าถึงเชื้อได้ลดลง โดยสารเมือกนี้จะทำหน้าที่ในการสะสมตัวยาไว้ได้มากถึง 25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวของเชื้อ (38) หรือการใช้เอนไซม์ในการเปลี่ยนสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ให้มีความเป็นพิษลดลงโดยการทำงานของยีนดื้อยาที่มีอยู่ (39) การปรับเปลี่ยนสารพันธุกรรมเมื่ออยู่ในไบโอฟิล์มที่มีอาหารและอากาศจำกัด เพื่อการมีชีวิตรอด เช่น เชื้อ *Escherichia coli* มีการสร้าง เอนไซม์ superoxide dismutases และ เอนไซม์สำหรับการซ่อมแซมสารพันธุกรรม (40) เป็นต้น ซึ่งสถาบันสุขภาพแห่งชาติประเทศสหรัฐอเมริกา (National Institute of Health) รายงานว่าการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและการติดเชื้อแบบเรื้อรังมักเกี่ยวข้องกับ เชื้อสร้างไบโอฟิล์ม สูงถึง 65 เปอร์เซ็นต์และ 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยในผู้ป่วยที่มีการใส่อวัยวะเทียม เช่น สายสวนหลอดเลือดดำส่วนกลาง (central venous catheters) ลิ้นหัวใจเทียม (mechanical heart valves) สายสวนปัสสาวะ (urinary catheters) มักมีความเสี่ยงต่อการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*,

Enterococcus faecalis หรือเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น ๆ สำหรับผู้ที่ไม่ได้มีการใส่ถ้วยวะเทียมก็มีความเสี่ยงในการติดเชื้อ *Pseudomonas aerobicus* และ *Fusobacterium nucleatum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคปริทันต์อักเสบเนื่องจากการมีสุขอนามัยที่ไม่ดี (41)

2.2.2 การวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์ทางการแพทย์

วิธีการวินิจฉัยการติดเชื้อในปัจจุบันอาศัยการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เป็นหลัก โดยมีวิธีการทดสอบดังต่อไปนี้ (42, 43)

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial culture)

โดยการนำตัวอย่างสิ่งส่งตรวจมาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยชนิดของสิ่งส่งตรวจขึ้นกับบริเวณที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อ เช่น เลือด ปัสสาวะ หนอง เสมหะ อุจจาระ หรือ ชิ้นเนื้อที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อ ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย อาศัยความแตกต่างของลักษณะโคโลนีของเชื้อ เช่น ขนาด รูปร่าง การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือการย่อยทำลายเม็ดเลือดแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษที่มีการผสมเม็ดเลือดแดง

2. การย้อมสีแกรม (Gram stain)

เป็นการย้อมสีเพื่อดูลักษณะการติดสีย้อมของเซลล์ โดยสามารถย้อมจากสิ่งส่งตรวจได้โดยตรง เพื่อประเมินชนิดของเชื้อก่อโรคคร่าว ๆ เพื่อการให้ยารักษาโรคในกรณีเร่งด่วน แต่การย้อมจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงอาจมีการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่นจากบริเวณที่จัดเก็บสิ่งส่งตรวจ ซึ่งอาจไม่ใช่เชื้อก่อโรคที่แท้จริง หรือย้อมสีของเซลล์จากโคโลนีหลังจากมีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะสามารถทำนายลักษณะการติดสี และรูปร่างของเชื้อก่อโรคได้ง่ายขึ้น เนื่องจากไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ โดยการรายงานผลจะรายงานแยกตาม การติดสี รูปร่าง และลักษณะการเรียงตัวของเชื้อ โดยแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงของ Crystal violet และ แบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของ Safranin

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical test)

ในการยืนยันความถูกต้องในการวินิจฉัยเชื้อก่อโรค การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีสามารถช่วยจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ถึงระดับจิ้นส์และสปีชีส์ โดยอาศัยการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ เช่น catalase, oxidase หรือ urease หรืออาศัยความสามารถในการหมัก (fermentation) หรือ การสร้าง H_2S ของเชื้อ เป็นต้น

4. การจำแนกแบคทีเรียโดยอาศัยวิธีทางซีโรโลยี (Serological test)

เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีลักษณะของแอนติเจนที่แตกต่างกัน ดังนั้น สามารถใช้แอนติบอดีที่จำเพาะใช้ในการตรวจหาแอนติเจน หรือ ในทางกลับกันหากมีการติดเชื้อเชื้อก่อโรคจะกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีซึ่งสามารถใช้ตรวจวัดการติดเชื้อได้ โดยวิธีที่ใช้ในการตรวจ เช่น latex agglutination (LA), enzyme immunoassay (EIA) และ immunofluorescence (IF)

5. เทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular technique)

เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคได้จากสิ่งส่งตรวจได้โดยตรง ซึ่งมีประโยชน์สำหรับเชื้อก่อโรคที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้หรือมีการเจริญเติบโตช้า ซึ่งเทคนิคนี้มีความไว และความจำเพาะสูง สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคได้แม้มีเชื้อในปริมาณน้อย

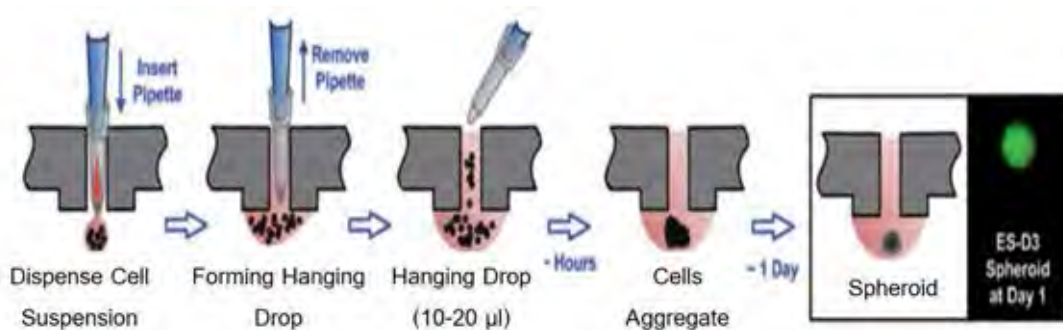
2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ (Three-dimensional cell culture)

ในปัจจุบันการศึกษากลไกการเกิดโรคหรือการศึกษาพยาธิยาศาสตร์ใหม่ต้องอาศัยการเลียนแบบการติดเชื้อที่เกิดขึ้นกับมนุษย์หรือผลการตอบสนองต่อยาที่เกิดขึ้น โดยเริ่มแรกนักวิจัยทำการศึกษากลไกการเกิดโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนภาชนะที่มีฐานทรงแบนทำจากพลาสติก polystyrene หรือ แก้ว ทำให้เซลล์เจริญเติบโตแบบสองมิติ เซลล์แสดงลักษณะทางกายวิภาค (anatomy) และ สรีรวิทยา (physiology) ที่แตกต่างไปจากเซลล์ที่อยู่ในร่างกาย (*in vivo*) โดยเซลล์จะเจริญเติบโตบนระนาบแบน และขาดการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์ (cell-cell interaction) และขาดการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับสารแมทริกซ์นอกเซลล์ (cell-extracellular matrix interaction) ทำให้เซลล์มีการแสดงออกทางลักษณะรูปร่าง (morphology) ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation) รวมไปถึงกระบวนการแสดงออกทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ส่งผลให้การแสดงออกของยีน และการผลิตโปรตีนที่ต่างไปจากเซลล์ในร่างกาย (44-46) จึงทำให้นักวิจัยมีการคิดค้นวิธีในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ (3D cell culture) เพื่อให้เซลล์มีการแสดงออกทางชีวภาพใกล้เคียงกับเซลล์ที่เกิดขึ้นในร่างกาย โดยพัฒนาวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระบบ คือ 1. การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยไม่อาศัยโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold-free system) และ 2. การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold system)

2.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยไม่อาศัยโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold-free system)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวงกิ่งดรอปล (Hanging drop method)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะเป็นหยดน้ำและอาศัยแรงโน้มถ่วงในการทำให้เซลล์ตกตะกอนลงมาอยู่รวมกันและเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน (cell-cell interaction) และในที่สุดเกิดการเจริญเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างทรงกลม (spheroid) โดยไม่ต้องอาศัยโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) โดยเซลล์จะเกิดรูปร่างทรงกลมเมื่อทำการเพาะเลี้ยง 2-4 วัน หลังจากการหว่านเซลล์ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ คือ อุปกรณ์พิเศษที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีราคาแพง และการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทำได้ยาก และอาจรบกวน spheroid (47, 48) โดยภาพที่ 4 แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวงกิ่งดรอปล



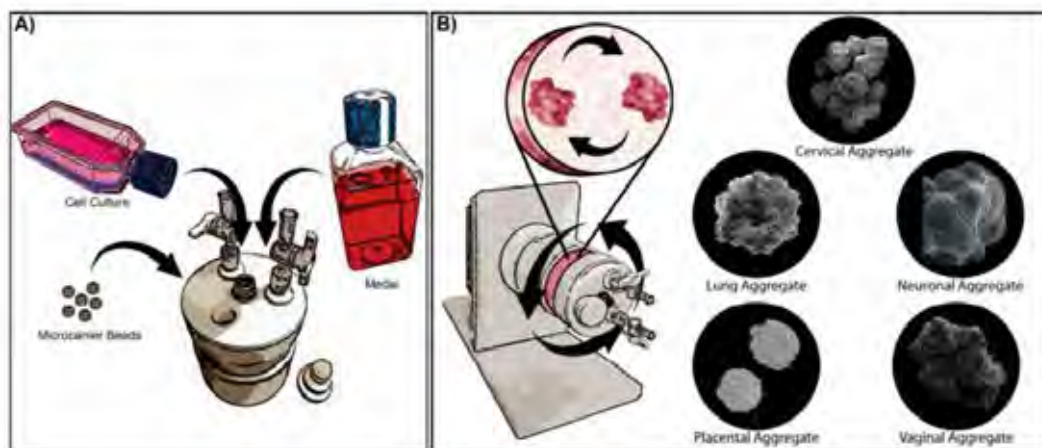
ที่มา Ref. (49)

ภาพที่ 4 แสดงวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวงกิ่งดรอปล

2.3.2 การเลี้ยงเซลล์โดยการใช้ระบบการหมุนวน (rotating culture)

ระบบท่อหมุนวน (rotating wall vessel (RWV)) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบ rotating ได้รับการคิดค้นและพัฒนาจากองค์การบริหารการบินและอวกาศแห่งชาติ National Aeronautics and Space Administration (NASA) เพื่อทำให้เกิดสภาวะที่มีแรงโน้มถ่วงน้อย เพื่อให้เซลล์เกิดการรวมตัวกันและมีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อได้ (tissue-like) (50, 51) โดยเซลล์ที่เคยถูกเพาะเลี้ยงด้วยระบบหมุนวนจะเกาะบนเม็ด microcarrier beads และเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อนเซลล์ที่มีลักษณะทรงกลม (spheroid) โดยตัวอย่าง

เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้ได้แก่ เซลล์ปอด (52) เซลล์ตับ (53) เซลล์ลำไส้ (54) และเซลล์ประสาท (55) เป็นต้น เพื่อใช้ในการศึกษาการตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยภาพที่ 5 แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติในระบบการเพาะเลี้ยงแบบหมุนวน



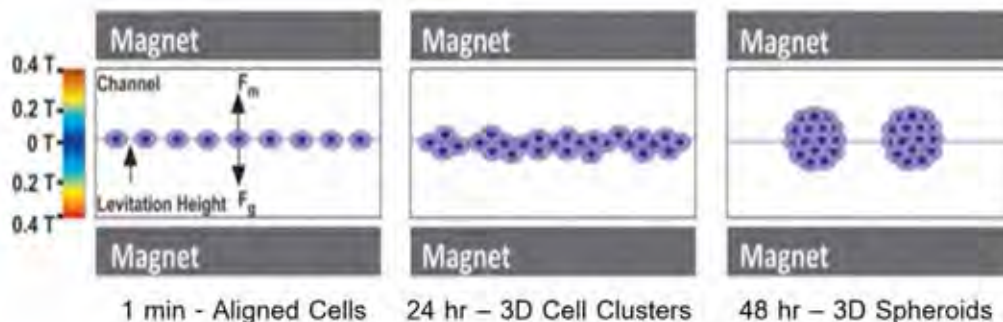
ที่มา Ref. (56)

ภาพที่ 5 แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยใช้ rotating wall vessel (RWV)

(A) แสดงระบบการเพาะเลี้ยง (B) แสดงตัวอย่างเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วย RWV

2.3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยอาศัยแรงลอยตัวของแม่เหล็ก (magnetic levitation)

การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยแรงลอยตัวของแม่เหล็กในการประคองเซลล์เพื่อไม่ให้สัมผัสกับพื้นผิวของภาชนะในการเพาะเลี้ยง โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับไฮโดรเจลที่ผสมสารที่มีคุณสมบัติทางแม่เหล็ก เช่น สารอนุภาคทองคำนาโน (gold nanoparticles) หรือ อนุภาคนาโนระดับนาโนของเหล็กออกไซด์ (iron oxide magnetic nanoparticles) เพื่อใช้ในการทำให้เซลล์ลอยตัวขณะอยู่ในสนามแม่เหล็ก (57) ดังแสดงในภาพที่ 6



ที่มา Ref. (57)

ภาพที่ 6 แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยอาศัยแรงลอยตัวของแม่เหล็ก (magnetic levitation)

2.3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold system)

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยอาศัยโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) สามารถจำแนกออกเป็น การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์ชนิดพอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer) (58-60) การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้พอลิเมอร์ธรรมชาติ (natural polymer) (61-63) หรือการผสมผสานระหว่างพอลิเมอร์สังเคราะห์และพอลิเมอร์ธรรมชาติเข้าด้วยกัน (synthetic/natural polymer hybrids) (64-66)

โดยโครงเลี้ยงเซลล์ควรมีลักษณะดังต่อไปนี้ (67-69)

1. ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility)

วัสดุที่ใช้ในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและสามารถให้เซลล์ยึดเกาะบนพื้นผิวและมีการแสดงออกของเซลล์ที่ปกติได้

2. สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradability)

โดยวัตถุประสงค์นี้เพื่อใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อทำการใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ สำหรับการปลูกถ่ายทดแทน โดยผลลัพท์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของโครงเลี้ยงเซลล์ต้องไม่เป็นพิษต่อร่างกายและสามารถกำจัดออกจากร่างกายโดยไม่สะสมในอวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง

3. คุณสมบัติเชิงกล (Mechanical properties)

โครงเลี้ยงเซลล์ที่จะปลูกถ่ายเข้าในร่างกายต้องมีคุณสมบัติเชิงกลที่เหมาะสมต่อการใช้งาน เช่น ความแข็ง (hardness) ความแข็งแรง (strength) และ ความเหนียว (ductility) ที่จะทนต่อแรงกดภายนอกได้ตั้งแต่เริ่มกระบวนการปลูกถ่ายจนเสร็จสิ้นการปรับเปลี่ยนเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่ โดยเฉพาะการนำใช้งานที่เกี่ยวกับกระดูกและข้อต่อ

4. การออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffold design)

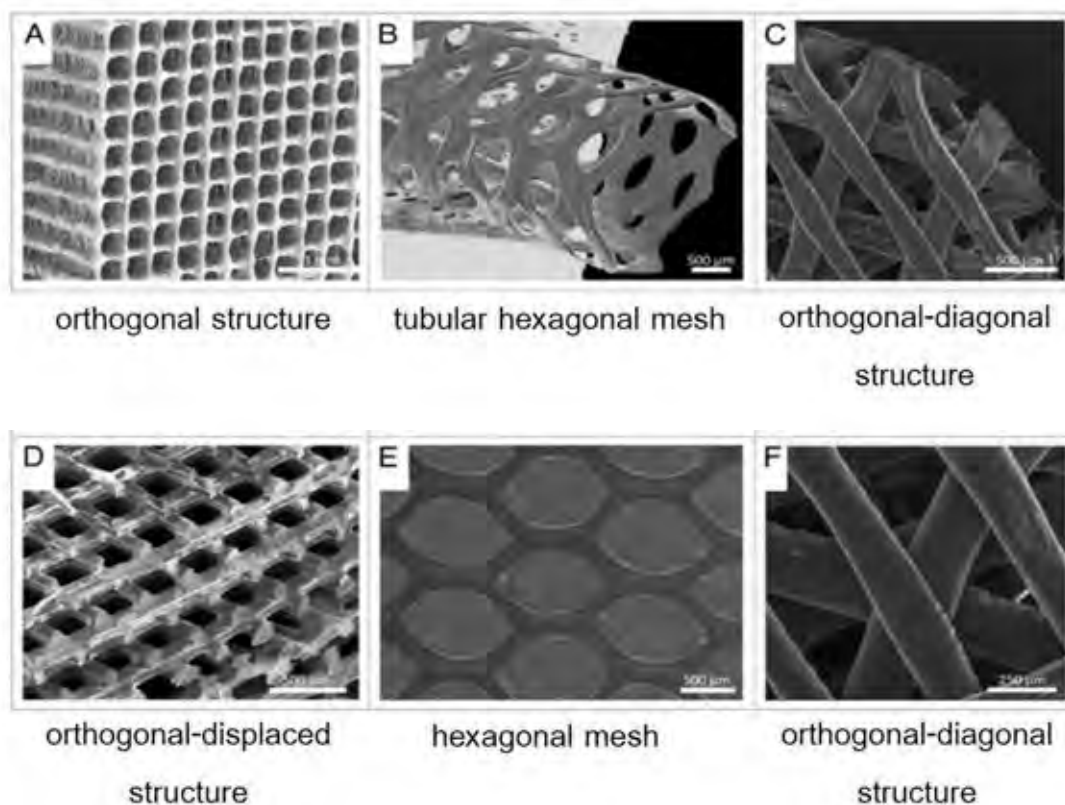
การออกแบบโครงเลี้ยงเซลล์ถือเป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์ควรมีช่องที่สามารถเชื่อมต่อกันได้ เพื่อให้เซลล์สามารถแทรกสอดเข้าไปในช่องได้ หรือเพื่อการขนส่งอาหารและการกำจัดของเสีย

2.3.5 พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ

ในปัจจุบันนิยมใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ เนื่องจาก พอลิเมอร์สังเคราะห์สามารถถูกกำหนดคุณลักษณะได้ เช่น ระยะเวลาเกิดการย่อยสลาย หรือการกำหนดให้มีคุณสมบัติความยืดหยุ่น ความแข็งแรง หรืออัตราการย่อยสลายตัวทางชีวภาพ ซึ่งทำให้พอลิเมอร์สังเคราะห์มีราคาที่ถูกกว่าการใช้พอลิเมอร์จากธรรมชาติ (70)

2.3.5.1 พอลิแลคติกแอซิด (Poly-lactic acid (PLA))

เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่สามารถย่อยสลายได้ เกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ของกรดแลคติก โดยพอลิเมอร์ชนิดนี้ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) สำหรับในการใช้งานในมนุษย์ เช่น สำหรับการปลูกถ่ายเซลล์กระดูก การขนส่งยา เป็นต้น โดยเทคนิคที่ใช้ในการสร้างโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยพอลิแลคติกแอซิด คือ การใช้เครื่องพิมพ์สามมิติในการขึ้นรูปให้มีรูปทรงตามที่ต้องการ (71, 72) ดังแสดงในภาพที่ 7



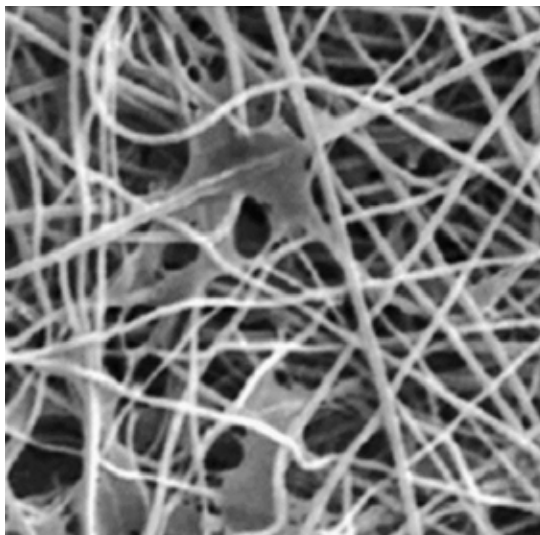
ที่มา ดัดแปลงจาก Ref. (73)

ภาพที่ 7 แสดงโครงร่างสามมิติสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จากพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิด พอลิแลคติกแอซิด โดยขึ้นรูปเป็นรูปทรงต่าง ๆ

2.3.5.2 พอลิไกลโคลิกแอซิด (Poly-glycolic acid (PGA))

พอลิไกลโคลิกแอซิดเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยได้ทางชีวภาพชนิดแรกที่มีการนำมาใช้งาน และได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ว่าปลอดภัยสำหรับการใช้งานในมนุษย์ และความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่ำ ด้วยคุณสมบัติเฉพาะตัวที่สามารถเปลี่ยนรูปได้ (thermoplastic) จึงทำให้พอลิไกลโคลิกแอซิดได้รับการใช้งานอย่างแพร่หลายในการทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ภายใน 2 ถึง 4 สัปดาห์ (74) และ ไม่ก่อให้เกิดสารพิษในร่างกาย อีกทั้งในการกำจัดสารที่ย่อยสลายแล้ว ร่างกายสามารถ

กำจัดออกได้รูปแบบของคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยปราศจากการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลาย (75) โดยภาพที่ 8 แสดงเส้นใยพอลิไกลโคลิคแอซิดพอลิเมอร์

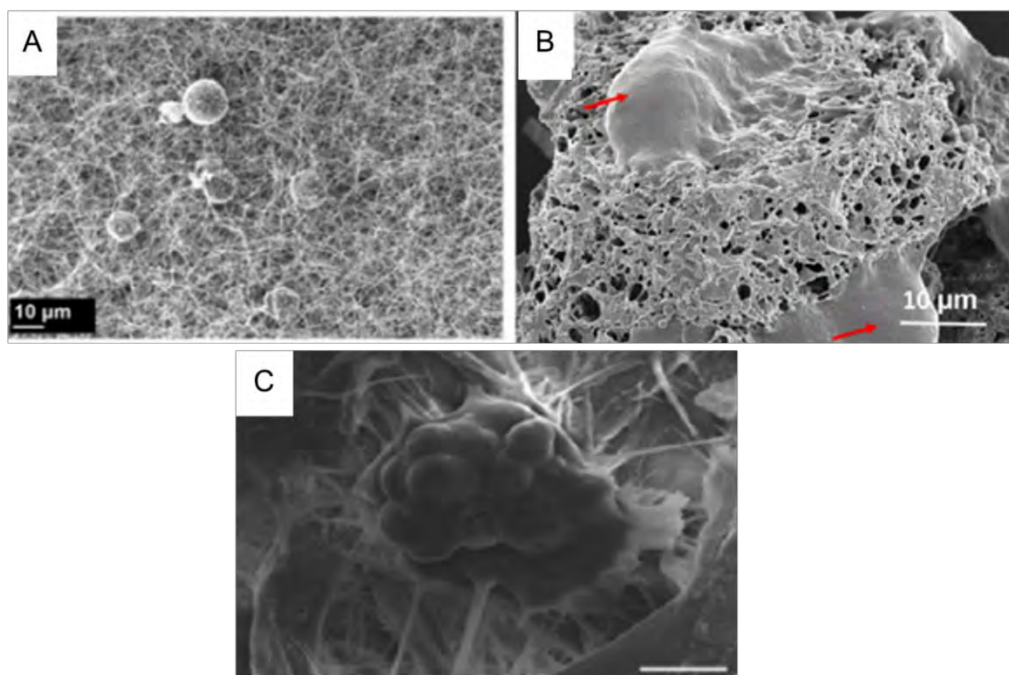


ที่มา Ref. (76)

ภาพที่ 8 แสดงภาพเส้นใยพอลิไกลโคลิคแอซิดที่มีเซลล์ Fibroblast ยึดเกาะ

2.3.6 พอลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ

พอลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติได้มาจากทั้งพืชหรือสัตว์ โดยต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ ตัวอย่างของพอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น ไคโตซาน (chitosan) คอลลาเจน (collagen) เจลาติน (gelatin) ลามินิน (laminin) และเส้นใยเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งพอลิเมอร์ธรรมชาติมีความอ่อนตัวและมีความยืดหยุ่นสูงกว่าพอลิเมอร์สังเคราะห์ จึงทำให้สามารถนำไปใช้งานในรูปแบบที่ต้องการได้ ยิ่งไปกว่านั้นพอลิเมอร์ธรรมชาติยังมีส่วนสำคัญในการมีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ซึ่งช่วยส่งเสริมให้เซลล์มีการแสดงออกทางชีววิทยาที่ดียิ่งขึ้น (61, 62, 77) ตัวอย่างของการใช้พอลิเมอร์ธรรมชาติในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 9



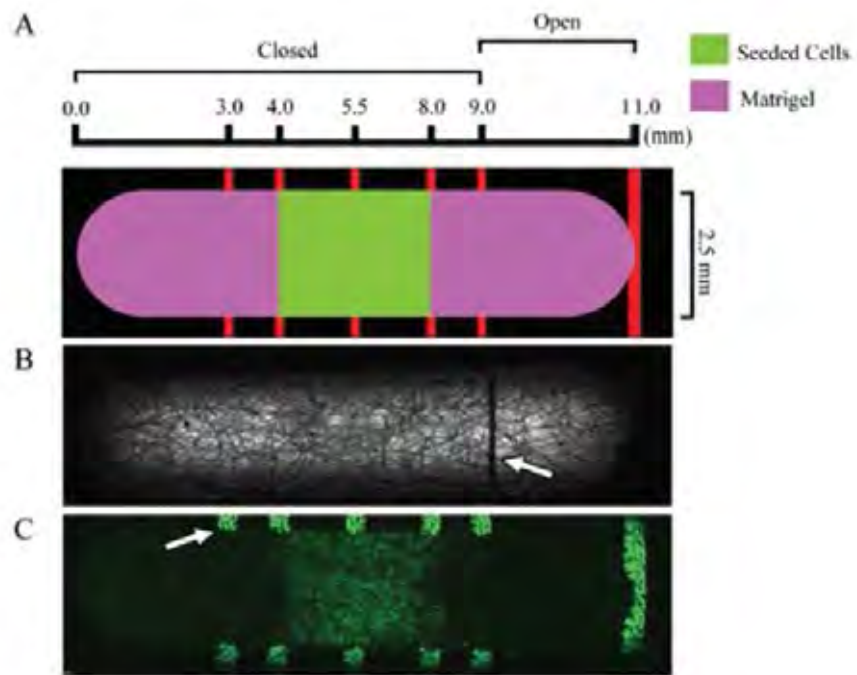
ที่มา ดัดแปลงจาก Ref. (78-80)

ภาพที่ 9 แสดงการใช้พอลิเมอร์ธรรมชาติในการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์

โดยใช้สารพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิด (A) คอลลาเจน (B) ไคโตซาน และ (C) เซลลูโลส

ในปัจจุบันกระดาษได้รับความสนใจอย่างมากในการใช้งานในวงการชีวการแพทย์ เนื่องจากกระดาษมีโครงสร้างที่เกิดจากการสานกันเป็นร่างแหของเส้นใยเซลลูโลส ทำให้กระดาษมีคุณสมบัติในการดูดซับของเหลว มีราคาถูก น้ำหนักเบา สามารถจัดหาได้ง่าย และยิ่งไปกว่านั้นกระดาษมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูงจึงทำให้นักวิจัยเล็งเห็นการนำกระดาษมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (21, 81) เนื่องด้วยคุณสมบัติที่กล่าวข้างต้นทำให้กระดาษสามารถใช้เป็นโครงร่างเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติได้ โดยกระดาษสามารถเลียนแบบโครงสร้างให้เซลล์สามารถมีการเจริญเติบโต (cell proliferation) การแปรสภาพของเซลล์ (cell differentiation) และมีรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) ที่คล้ายกับเซลล์ที่เกิดขึ้นในร่างกายได้ และการเลี้ยงเซลล์บนกระดาษยังสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคอื่นได้ เช่น การวัดการเกิดสี (colorimetric detection) การวัดทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical detection) และการวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

(fluorescent detections) ซึ่งสามารถทำให้ติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเซลล์ได้อย่างทันที่ โดยตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้กระดาษในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น กลุ่มของ Rachael M. Kenney และคณะ ทำการศึกษาความสามารถในการรุกรานของเซลล์มะเร็งเต้านมเมื่อมีการกระตุ้นด้วยสารเคโมไคน์ (chemokine) แสดงให้เห็นว่าเซลล์เกิดการรุกรานไปยังบริเวณที่มีสารเคโมไคน์อยู่ ซึ่งสามารถทำการติดตามการรุกรานของเซลล์ได้ด้วยการถ่ายภาพด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ ดังแสดงในภาพที่ 10 โดยภาพ A องค์ประกอบของอุปกรณ์ ภาพ B แสดงเส้นใยของกระดาษและลูกศรแสดงรอยต่อระหว่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารเคโมไคน์กับบริเวณที่ปลูกเซลล์ ภาพ C แสดงภาพการติดตามการบุกรุกของเซลล์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ (82)

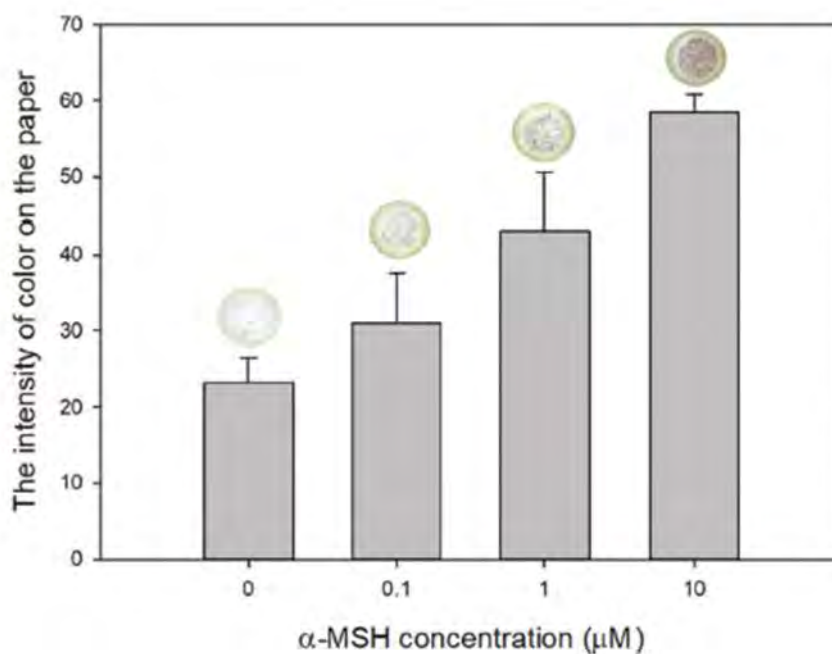


ที่มา Ref. (83)

ภาพที่ 10 แสดงการติดตามการบุกรุกของเซลล์มะเร็งเต้านมโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษ และใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ในการติดตาม

จากการศึกษาคุณสมบัติในการลดเม็ดสีในเซลล์เมลานินของสารโคจิกแอซิด (Kojic acid) และ อาร์บูติน (Arbutin) ของ Naricha Pupinyo และคณะ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษและติดตามผลการลดลงของการผลิตเม็ดสีเมลานินด้วยวิธีการติดตามด้วยสี (colorimetric

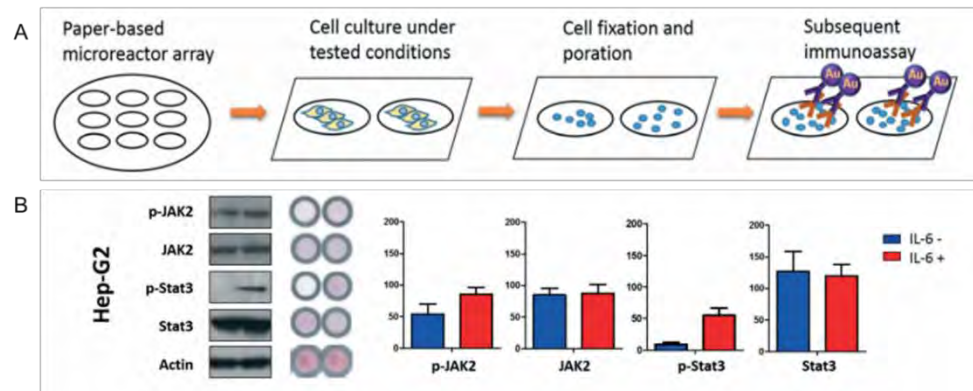
detection) โดยเมื่อใช้สารกระตุ้นการผลิตเม็ดสี ชนิด แอลฟา-เมลาโนไซตส์ติมิวเลติงฮอโมน (melanocyte-stimulating hormone: α -MSH) พบว่าสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีด้าที่เพิ่มขึ้นได้บนกระดาษตามปริมาณความเข้มข้นของสาร α -MSH ดังแสดงในภาพที่ 11



ที่มา Ref. (17)

ภาพที่ 11 แสดงความเข้มของสีเมลานินที่เพิ่มขึ้นเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของสาร α -MSH

หรือการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling) ที่ศึกษาวิจัยโดย Chia-Hao Huang และคณะ โดยการใช้หลักการทางอิมมูโน (immunoassay) โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนเป้าหมายในการเกิดการถ่ายทอดสัญญาณและทำการติดแอนติบอดีนั้นด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโน (gold nanoparticles) เพื่อใช้ติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยสี ซึ่งหากเซลล์มีการแสดงออกของโปรตีนชนิดใดมาก สีที่เกิดขึ้นจะเข้มไปในทิศทางเดียวกัน (84) ดังแสดงในภาพที่ 12

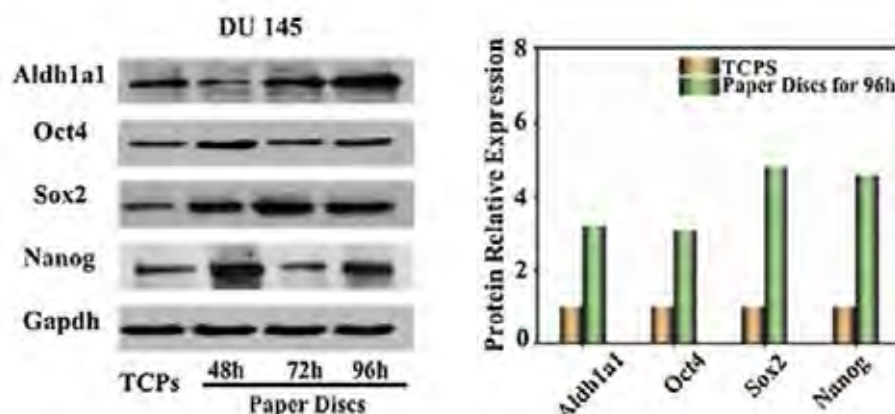


ที่มา Ref. (84)

ภาพที่ 12 แสดงการติดตามการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษโดยใช้การติดตามด้วยสี

(A) แสดงขั้นตอนการตรวจวัด (B) แสดงผลการเปลี่ยนแปลงจากการส่งสัญญาณในเซลล์ที่เกิดขึ้นด้วยสีและ ระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot

อีกทั้งการเพาะเลี้ยงเซลล์ในกระดาษยังสามารถใช้เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดเพื่อนำไปใช้ในการผลิตยาในการรักษามะเร็งได้ โดย Jing Jing Fu และคณะพบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากบนกระดาษสามารถทำให้เกิดลักษณะการแสดงออกของเซลล์มะเร็งต้นกำเนิด (cancer stem cell) ได้มากยิ่งขึ้น โดยทำการศึกษาโดยการย้อมแอนติเจนที่จำเพาะบนผิวเซลล์ (biomarker) ที่จำเพาะ เช่น Oct4, Sox2 และ Nanog จากการศึกษาวิจัยพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนกระดาษมีการแสดงออกของแอนติเจนบนผิวเซลล์ต่อการเป็นเซลล์มะเร็งต้นกำเนิดมากยิ่งขึ้น (79) ดังแสดงในภาพที่ 13

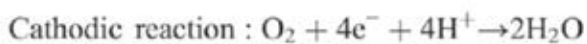
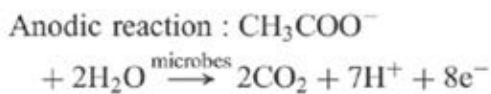


ที่มา Ref. (79)

ภาพที่ 13 เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนแอนติเจนที่ผิวเซลล์ของเซลล์มะเร็งต่อมลพิษระหว่างเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนเพลทเลี้ยงเซลล์และเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษ โดย (A) แสดงผล Western blot และ (B) แสดงการเปรียบเทียบสัมพัทธ์ของโปรตีนแอนติเจนที่ผิวเซลล์จากเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนเพลทและเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษ

2.4 ไบโอฟิล์มที่มีคุณสมบัติในการสร้างกระแสไฟฟ้า (electroactive biofilms)

มนุษย์ได้ใช้ประโยชน์จากการขนส่งอิเล็กตรอนออกนอกเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ (microbial fuel cell: MFC) โดยหลักการทำงานคือการเปลี่ยนพลังงานเคมีจากสารประกอบอินทรีย์ไปเป็นพลังงานไฟฟ้าโดยอาศัยจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีการใช้ประโยชน์จากหลักการนี้ในการใช้บำบัดน้ำเสีย และการผลิตกระแสไฟฟ้า (85, 86) หลักในการทำงานของ MFC คือ เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในภาชนะที่มีขั้วแอโนด (anodic chamber) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จะทำการออกซิไดส์ซับสเตรท เช่น คาร์บอน โปรตีน แล้วเกิดการสร้างอิเล็กตรอนขึ้น อิเล็กตรอนที่สร้างขึ้นจะถูกถ่ายโอนไปยังขั้วแอโนด แล้วไหลไปยังขั้วแคโทด ซึ่งมีออกซิเจนอยู่ทำให้ออกซิเจนมารับอิเล็กตรอนและเกิดเป็นน้ำเกิดขึ้นดังภาพที่ 14 แสดงสมการปฏิกิริยาที่ขั้วแอโนดและแคโทด โดยกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเป็นผลพลอยได้จากปฏิกิริยาดังกล่าว

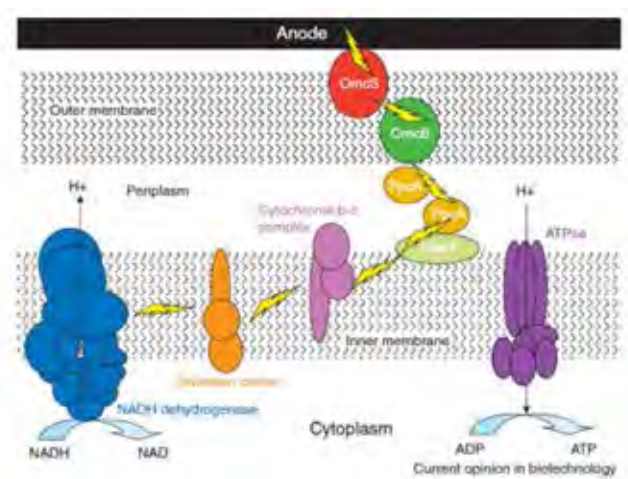


ภาพที่ 14 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่ขั้วแอโนด และขั้วแคโทด

ซึ่งกลไกในการขนส่งอิเล็กตรอนนอกเซลล์เกิดขึ้นได้หลัก ๆ แบ่งออกเป็นสองกลไก ได้แก่ การขนส่งอิเล็กตรอนไปยังขั้วโดยตรง (direct electron transfer: DET) และการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังขั้วโดยอาศัยสารสื่อกลาง (mediated electron transfer: MET)

2.4.1 กลไกการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังขั้วโดยตรง (direct electron transfer: DET)

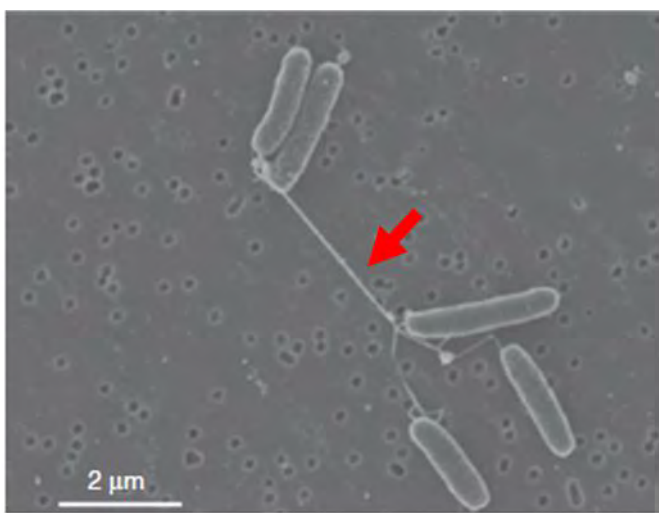
เชื้อจุลินทรีย์สามารถออกซิไดส์สารประกอบอินทรีย์และสามารถโอนถ่ายอิเล็กตรอนไปยังขั้วโดยตรงโดยอาศัย C-type cytochromes (87) ที่อยู่บนผิวชั้นนอกของเซลล์ โดยโมเลกุลที่เกี่ยวข้องได้แก่ OmcB, OmcS และ OmcE โดยกลไกเกิดเลียนแบบกระบวนการหายใจระดับเซลล์แต่ใช้ขั้วแอโนดเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทน ดังแสดงในภาพที่ 15



ที่มา Ref. (88)

ภาพที่ 15 แสดงกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนโดยใช้โมเลกุล C-type cytochrome ในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ขั้วแอโนด

นอกจากนี้การขนส่งอิเล็กตรอนไปยังขั้วโดยตรงยังมีอีกกลไกหนึ่งสำหรับไบโอฟิล์มที่มีความหนา คือ การสร้างพิลที่นำไฟฟ้าได้ (conductive pili) หรือที่รู้จักกันในนาม ลวดนาโน (nanowire) ซึ่งมีความยาวได้มากถึง 20 ไมโครเมตร ดังแสดงในภาพที่ 16 โดยมีการค้นพบครั้งแรกในเชื้อ *Geobacter* และ *Shewanella* (89, 90)



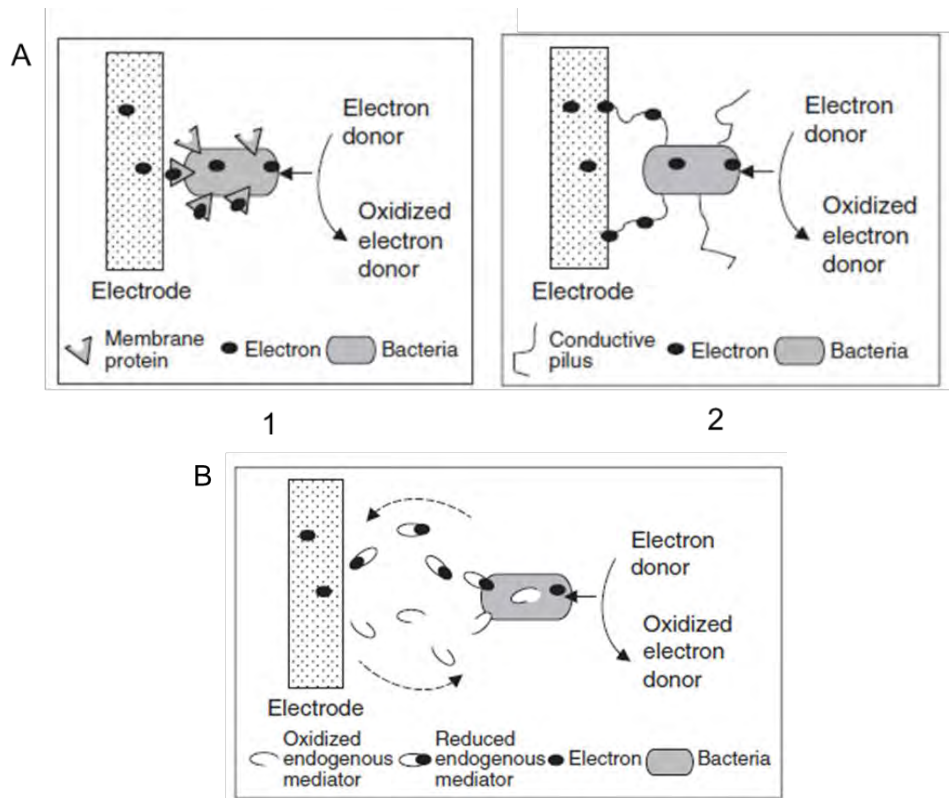
ที่มา Ref. (90)

ภาพที่ 16 แสดง nanowire ของเชื้อแบคทีเรีย

2.4.2 การขนส่งอิเล็กตรอนไปยังขั้วโดยอาศัยสารสื่อกลาง (mediated electron transfer: MET)

การขนส่งอิเล็กตรอนไปยังขั้วแอโนดโดยอาศัยสื่อกลางเชื้อจุลินทรีย์สามารถอาศัยสารสื่อกลางได้สองชนิด คือ สารสื่อกลางภายนอก (exogenous mediators) เช่น การใช้ Thionine ในการขนส่งอิเล็กตรอนของเชื้อ *E. coli* และ *Proteus vulgaris* และ การใช้ Phenazine เป็นสารสื่อกลางภายนอกของเชื้อ *Pseudomonas spp.* และ *Bacillus spp.* (91, 92) สำหรับสารสื่อกลางภายใน (endogenous mediators) เช่น การผลิตสาร pyocyanin ในเชื้อ *P. aeruginosa* (93) และการหลั่งสาร riboflavin ของเชื้อ *S. oneidensis* (94)

กล่าวโดยสรุป คือ เชื้อจุลินทรีย์สามารถขนส่งอิเล็กตรอนไปยังขั้วได้ผ่านสองกลไกหลัก โดยการขนส่งแบบ DET เชื้อสามารถใช้โปรตีนที่ผิวเซลล์หรือการใช้พิไลที่มีคุณสมบัตินำไฟฟ้าได้ และการขนส่งแบบ MET เชื้อจำเป็นต้องมีการหลั่งสารสื่อกลางหรือมีการใช้สารสื่อกลางจากภายนอกเพื่อเป็นตัวกลางในการขนส่งอิเล็กตรอน ดังแสดงในภาพที่ 17



ที่มา ดัดแปลงจาก Ref. (95)

ภาพที่ 17 แสดงปฏิกิริยาการขนส่งอิเล็กตรอนออกภายนอกเซลล์

โดย (A) แสดงการขนส่งอิเล็กตรอนโดยตรง โดยอาศัยโปรตีนที่ผิวเซลล์ (1) หรือ ใช้ลวดนาโน (2)

(B) แสดงการขนส่งอิเล็กตรอนโดยใช้สารสื่อกลาง

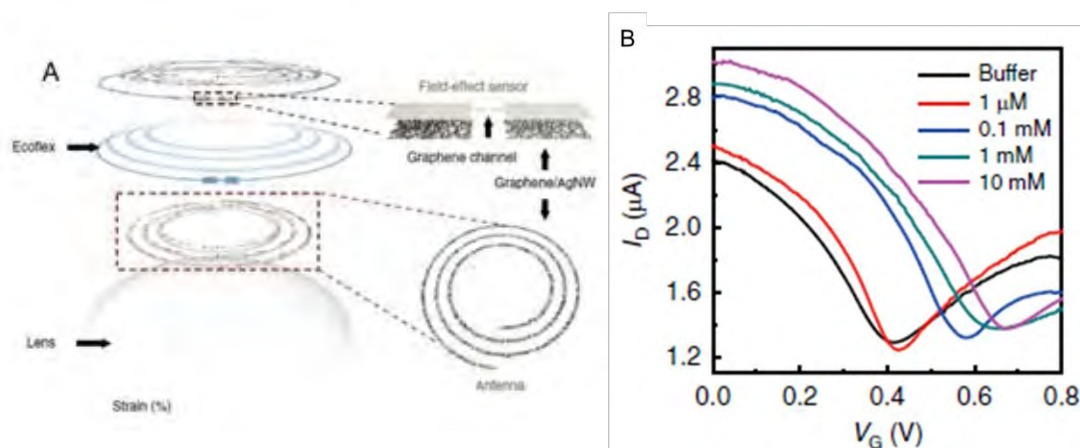
2.5 การพัฒนาไบโอเซนเซอร์แบบไร้สาย

ในยุคปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการสื่อสารแบบไร้สายเข้ากับระบบสุขภาพ เพื่อให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องและทันท่วงที ยกตัวอย่างเช่น การตรวจติดตามสารชีวโมเลกุลในโรคเบาหวาน โรคหัวใจ หรือ โรคอัลไซเมอร์ การตรวจการติดเชื้อแบคทีเรีย หรือใช้ในการติดตามการนำส่งยา เป็นต้น ซึ่งการนำเทคโนโลยีการสื่อสารแบบไร้สายเข้ามาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ทำให้ลดขั้นตอนและความยุ่งยากในการปฏิบัติต่อผู้ป่วย เช่น การพัฒนาระบบการติดตามความผิดปกติของระบบทางเดินอาหารโดยการพัฒนาแคปซูลที่สามารถวัด pH ความดัน และ อุณหภูมิได้ในคราวเดียว ทำให้สามารถติดตามความเปลี่ยนแปลงได้อย่างทันทีและต่อเนื่อง (96)

นักวิจัยประยุกต์การใช้งานเทคโนโลยีไร้สายโดยการเก็บข้อมูลของสารชีวเคมีหรือสารเคมีจากแหล่งกำเนิด และประมวลผล พร้อมทั้งส่งข้อมูลนั้นไปยังอุปกรณ์ที่อยู่ห่างไกลออกไปแบบไร้สาย โดยเทคโนโลยีไร้สายที่นิยมใช้งานส่วนใหญ่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามประเภทของตัวรับส่งสัญญาณ ได้แก่ active radio และ passive radio ซึ่งอุปกรณ์รับส่งสัญญาณแบบ active radio พบได้ในเทคโนโลยีไร้สายของ Bluetooth Zigbee และ ISM/SRD860 อุปกรณ์ประเภทนี้สามารถรับส่งข้อมูลได้ในระยะทางที่ไกลเนื่องจาก อาศัยพลังงานจากแบตเตอรี่ที่ฝังอยู่ในส่วนรับส่งสัญญาณ ซึ่งเทคโนโลยี Bluetooth (97, 98) และ Zigbee (99, 100) สามารถรับส่งสัญญาณได้ไกล 10 ถึง 100 เมตร และ ISM/SRD860 (101) สามารถรับส่งสัญญาณได้ในระยะทางตั้งแต่ 50 เมตร ถึง 2 กิโลเมตร สำหรับอุปกรณ์รับส่งสัญญาณแบบ passive radio ตัวรับส่งสัญญาณไม่อาศัยพลังงานจากแบตเตอรี่ ยกตัวอย่างเช่น เทคโนโลยี Radio frequency identification (RFID) (102, 103) และ เทคโนโลยี Near Field Communication (NFC) (104) ซึ่งทำให้เป็นเทคโนโลยีที่ได้รับความนิยมในการนำไปศึกษาพัฒนาอุปกรณ์ไบโอเซนเซอร์ต่าง ๆ แต่ข้อจำกัดของเทคโนโลยีแบบ passive radio คือ ระยะทางในการรับส่งข้อมูลสั้นกว่าการรับส่งข้อมูลโดยใช้เทคโนโลยีแบบ active radio กล่าวคือ NFC สามารถรับส่งข้อมูลได้ในระยะทาง 15 เซนติเมตร และ RFID สามารถรับส่งข้อมูลได้ในระยะทาง 15 เมตร

สำหรับการนำเทคโนโลยีไร้สายใช้งานร่วมกับไบโอเซนเซอร์ วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical detection) ถูกนำมาพัฒนาเพื่อใช้งานร่วมกับเทคโนโลยีการสื่อสารแบบไร้สาย โดยอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นนี้ควรมีราคาถูกและใช้งานได้ง่าย เช่น การพัฒนา

อุปกรณ์ให้สามารถสวมใส่ได้ (wearable) สามารถฝังในร่างกาย (implantable) หรือ สามารถเคลื่อนย้าย พกพาได้สะดวกต่อการใช้งาน (handheld) (105) ยกตัวอย่างเช่น การพัฒนาคอนแทคเลนส์ เพื่อการตรวจติดตามความดันภายในลูกตาและระดับน้ำตาลกลูโคสในน้ำตา โดยใช้เทคนิคทางไฟฟ้าเคมีร่วมกับการใช้วัสดุนาโนในการพัฒนาไบโอเซนเซอร์แบบไร้สาย โดยอาศัยคุณสมบัติของวัสดุนาโนในการนำไฟฟ้า และอาศัยการเปลี่ยนแปลงความต้านทาน ในการติดตามแบบไร้สาย โดยใช้กราฟีนและลวดนาโนซิลเวอร์เพื่อการตรวจติดตามความดันภายในลูกตาและระดับน้ำตาลในน้ำตาด้วย โดยอาศัยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) เมื่อเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสที่อยู่ในน้ำตาจะเปลี่ยนเป็นสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อใช้ทำให้เกิดอิเล็กตรอน โดยปริมาณอิเล็กตรอนที่เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสในน้ำตา (106) ดังแสดงในภาพที่ 18



ที่มา ดัดแปลงจาก Ref. (106)

ภาพที่ 18 แสดงการตรวจวัดกลูโคสในน้ำตาจากคอนแทคเลนส์แบบไร้สาย โดยใช้ (A) คอนแทคเลนส์ (B) แสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณตามความเข้มข้นของปริมาณกลูโคส

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

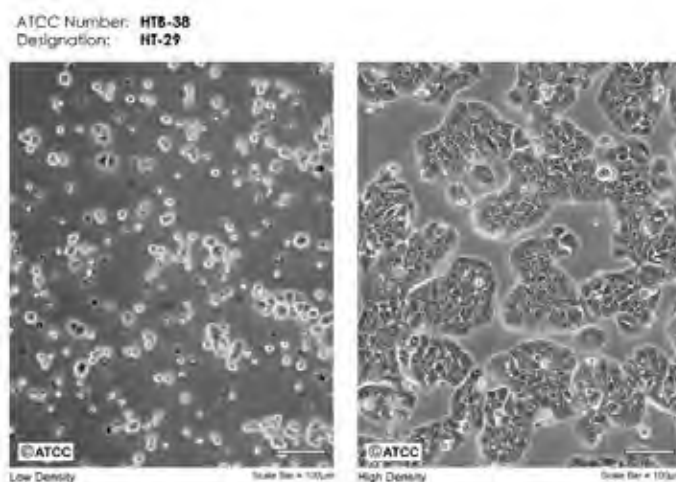
วิทยานิพนธ์นี้ประกอบด้วยเนื้อหาสองส่วน ส่วนแรกคือ การพัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาษที่มีการดัดแปรพื้นผิว การทดลองส่วนนี้ทำวิจัยที่ ภาควิชาเคมีคัลิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ การพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของจุลชีพก่อโรค ซึ่งการทดลองส่วนนี้ทำวิจัยที่ Biofilms-Research Center for Biointerfaces, Department of Biomedical Science, Faculty of Health and Society และ Department of Oral Biology, Faculty of Odontology *Malmö University ประเทศสวีเดน*

3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยและวิธีการเพาะเลี้ยง

3.1.1.1 เซลล์ HT-29 human colon cancer cell line

เป็นเซลล์สายพันธุ์ (cell line) ที่แยกมาจากผู้ป่วยที่เป็นโรค colorectal adenocarcinoma โดยในการเพาะเลี้ยง เซลล์ HT-29 ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ของบริษัท HyClone ที่มีส่วนประกอบของ กลูโคส 4500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีส่วนประกอบของ Fetal Bovine Serum (FBS) อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และมีความเข้มข้นของ L-Glutamine อยู่ 4 มิลลิโมลาร์ (mM) ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (cell culture flask) และนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของเซลล์ HT-29 เป็นเซลล์ยึดเกาะ (adherent cell) มีขนาดประมาณ 10 ไมโครเมตร และมีการเจริญเติบโตแบบรวมกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 19



ที่มา Ref. (107)

ภาพที่ 19 แสดงลักษณะของเซลล์ HT-29 จาก (ATCC HTB-38)

โดยภาพด้านซ้ายแสดงเซลล์ HT-29 ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่ำ (low density) และ ภาพด้านขวาแสดงความหนาแน่นของเซลล์สูง (high density)

3.1.1.2 แบคทีเรีย

Escherichia coli (DH5- α) ATCC® 68233™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™, *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) ATCC® 15692™ ได้มาจาก The American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา และ *Streptococcus gordonii* แยกได้จากผู้ป่วยโรคปริทันต์ และทำการทดสอบยืนยันเชื้อโดยใช้ลักษณะทางโคโคไนด์ การใช้สารชีวเคมีและวิธีทางอณูชีววิทยา

แบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* (DH5- α), *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LB (Luria-Bertani) ของบริษัท Acumedia ประเทศสหรัฐอเมริกา มีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 7.3 ± 0.2 บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

แบคทีเรียชนิด *Streptococcus gordonii* ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion broth ของบริษัท Acumedia ประเทศสหรัฐอเมริกา บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.1.1.3 ยีสต์

Candida albicans ATCC® 10231™ ได้มาจาก The American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา

ยีสต์ชนิด *Candida albicans* ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารชนิด yeast extract peptone dextrose โดยมีส่วนประกอบ ดังนี้ สารสกัดยีสต์ (yeast extract) บริษัท Acumedia ประเทศสหรัฐอเมริกา Bacto-Peptone บริษัท DIFCO ประเทศสหรัฐอเมริกา D(+)-Glucose anhydrous บริษัท BDH Prolabo chemicals ประเทศเบลเยียม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 6.5 ± 0.2 บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.2 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1	Autoclave	Tomy, USA
2	Biological safety cabinet	Airtech, China
3	CO ₂ incubator	Thermo Scientific, USA
4	Confocal microscope รุ่น LSM700	Carl Zeiss, Germany
5	Centrifuge	Kendro, Germany
6	pH meter	Thermo Scientific, USA
7	Light microscope	Olympus, Japan
8	Scanning Electron Microscope (SEM)	JEOL, USA
9	UV-VIS spectrophotometer	SHIMADZU, Japan
10	Vortex mixer	FINEPCR, Korea
11	เครื่องผลิตน้ำ MilliQ	Millipore, USA
12	Network analyzer	SDR-Kits, UK

ลำดับ	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
13	Potentiostat	Ivium, Netherlands
14	Digital multimeter	Brandford,
15	4°C refrigerator	Sharp, Japan
16	-20°C freezer	Sanyo Electric, Japan
17	-80°C deep freezer	Ilshin Lab, Netherlands
18	Analytical balance	Mettler Toledo, Switzerland
19	Heat block	Sea Gull Way, USA
20	ELISA plate reader	BioTek, USA
21	Gel Electrophoresis Apparatus	Bio-Rad Laboratories, USA
22	Hot air oven	Memmert, Germany
23	Pipette Controller	Sartorius, Germany
24	Wax printer (Fuji xerox 8870)	Xerox, USA
25	Hotplate stirrer	Cole-Parmer Canada Inc., Canada

ตารางที่ 2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1	24 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, Denmark
2	96 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, Denmark
3	Cell culture flask (25, 75 cm ³)	Nest Biotechnology, China
4	Serological pipette (5, 10, 25 ml)	Corning Inc., USA
5	Transfer pipette (3 ml)	JETBiofil, China

ลำดับ	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
6	Microcentrifuge tube (1.5 ml)	Costar, USA
7	Hemocytometer	Precicolor HBG, Germany
8	Autopipette	Gilson, France
9	Pipette tip (10, 20, 200, 1000 μ l)	Gilson Inc., USA
10	Glassware	Pyrex, USA
11	Duran bottles	SCHOTT, Germany
12	Centrifuge tube (15, 50 ml)	SARSTEDT, Germany
13	Whatman filter paper	GE healthcare, USA

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
1	DMEM	HyClone, USA
2	EDTA-Trypsin 0.25% (1X)	HyClone, USA
3	Fetal bovine serum (FBS)	HyClone, USA
4	Penicillin Streptomycin	HyClone, USA
5	Phosphate Buffered Saline (PBS) 10X	HyClone, USA
6	Trypan Blue	Gibco, USA
7	Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Merck Millipore, USA
8	Thiazoyl blue tetrazolium bromide (MTT)	BioBasic, Canada
9	Matrigel	Corning Life Sciences, USA
10	Collagen-1 rat tail	Corning Life Sciences,

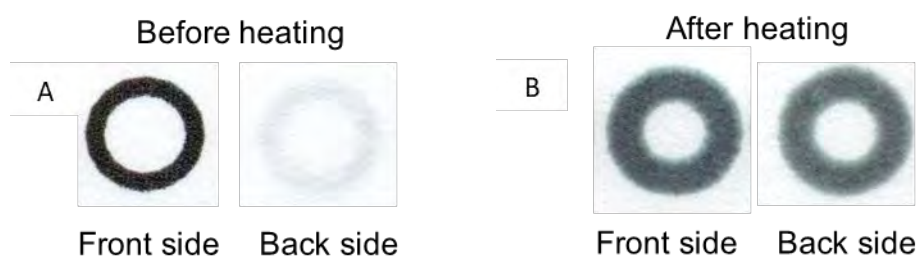
ลำดับ	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	บริษัทและประเทศที่ผลิต
		USA
11	Laminin	Corning Life Sciences, USA
12	Genipin	Challenge bioproducts, Taiwan
13	Anti-rabbit IgG, HRP linked Ab	Cell signaling Technology, USA
14	RIPA lysis buffer	Merck Millipore, USA
15	Bovine serum albumin (BSA)	Sigma Aldrich, USA
16	Precision Plus Protein Standards ladders	Bio-Rad, USA
17	Proteinase inhibitor cocktail	Roche, Mannheim, Germany
18	ZO-1 antibody	Cell signaling Technology, USA
19	ECL Western Blotting Substrate	GE healthcare, USA
20	L-ascorbic acid	Sigma Aldrich, China
21	Sodium citrate dehydrate	Sigma Aldrich, Austria
22	Silver nitrate	Sigma Aldrich, USA
23	Potassium chloride	Sigma Aldrich, Spain
24	Tetrachloroauric (III) acid trihydrate	Sigma Aldrich, USA
25	Trisodium citrate dihydrate	Sigma Aldrich, USA

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การพัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาษที่มีการดัดแปรพื้นผิว

1. การออกแบบลวดลายบนกระดาษเพื่อใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

ในงานวิจัยนี้ใช้โปรแกรม Adobe Photoshop CC2015 ออกแบบลวดลายบนกระดาษ เพื่อใช้สำหรับสร้างขอบเขตในการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยออกแบบเป็นวงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4 มิลลิเมตร จากนั้นเมื่อได้แบบแล้วนำแบบที่ได้พิมพ์ลงบนกระดาษกรอง หากไม่กล่าวเป็นอย่างอื่น ในงานวิจัยนี้จะหมายถึงกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยใช้เครื่องพิมพ์ชนิดหมึกแว็กซ์ (wax printer) ซึ่งหลังพิมพ์แว็กซ์ก่อนการนำไปให้ความร้อน เนื้อแว็กซ์จะติดเพียงด้านเดียว ด้านหลังยังไม่มีเนื้อแว็กซ์ซึมผ่านถึง (ภาพที่ 20 A) หลังจากนั้นนำกระดาษไปสัมผัสด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส โดยวางกระดาษที่พิมพ์หมึกแว็กซ์บนเครื่อง hot plate เป็นเวลานาน 2 นาที เพื่อให้แว็กซ์ที่เคลือบอยู่บนผิวหน้าของกระดาษละลายแล้วซึมลงไปยังเนื้อกระดาษด้านล่าง ซึ่งมองเห็นสีดำของแว็กซ์ทะลุผ่านกระดาษอย่างชัดเจน (ภาพที่ 20 B) ทำให้เกิดขอบเขตระหว่างบริเวณที่ชอบน้ำและบริเวณไม่ชอบน้ำ (บริเวณที่มีแว็กซ์) โดยบริเวณชอบน้ำใช้เป็นพื้นที่สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 20



ภาพที่ 20 แสดงลวดลายบนกระดาษที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม Adobe Photoshop CC 2015 (A) แสดงลวดลายที่ถูกพิมพ์บนกระดาษโดยใช้เครื่องพิมพ์ชนิดหมึกแว็กซ์ก่อนให้ความร้อน โดยแสดงด้านหน้าของกระดาษ และ ภาพด้านหลังของกระดาษ (B) แสดงลวดลายบนกระดาษหลังจากนำไปให้ความร้อน

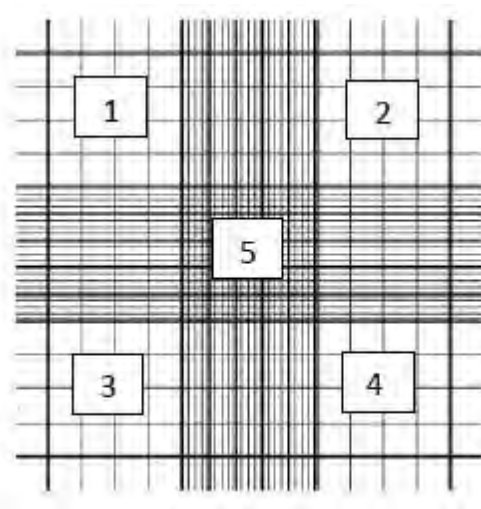
2. การทดสอบชนิดของกระดาษกรองที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

กระดาษกรองแต่ละชนิดมีขนาดรูพรุนที่แตกต่างกัน ซึ่งขนาดรูพรุนมีผลต่อการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้ได้ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาษกรอง 3 ชนิด ที่มีขนาดรูพรุนที่แตกต่างกัน ได้แก่ Whatman No.1 ที่มีขนาดรูพรุน 11 ไมโครเมตร กระดาษ Whatman No.2 ที่มีขนาดรูพรุน 8 ไมโครเมตร และ กระดาษ Whatman No.4 ที่มีขนาดรูพรุน 20-25 ไมโครเมตร โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-29 บนกระดาษกรองแต่ละชนิด โดยตัดกระดาษกรองด้วยเครื่องตัดกระดาษให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และวางกระดาษใน 96 well plate ที่ปราศจากเชื้อแบบมีฝาปิด และนำไปฉายรังสียูวีเพื่อให้ปราศจากเชื้อก่อนการทดลอง ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-29 บนกระดาษ โดยหยอดอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ที่มีส่วนประกอบของ FBS อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และมีความเข้มข้นของ L-Glutamine อยู่ 4 มิลลิโมลาร์ (mM) ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำเซลล์บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบเวลา ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) บนกระดาษแต่ละชนิด จากนั้นเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาษที่ให้ผลการมีชีวิตของเซลล์สูงที่สุดนำไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3. การทดสอบหาความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษ

สำหรับการทดสอบหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษ ทำการศึกษาโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-29 ที่มีปริมาณเซลล์ที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 50,000 เซลล์ 100,000 เซลล์ 150,000 เซลล์ และ 200,000 เซลล์ ลงบนพื้นที่ส่วนที่ขอบน้ำบนกระดาษ ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษกรอง Whatman No.1 ซึ่งเป็นชนิดของกระดาษที่ให้ผลการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงที่สุดจากผลการทดสอบเบื้องต้น โดยวางกระดาษใน 96 well plate ที่ปราศจากเชื้อแบบมีฝาปิด ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ที่มีส่วนประกอบของ FBS อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และมีความเข้มข้นของ L-Glutamine อยู่ 4 มิลลิโมลาร์ (mM) ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำเซลล์บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลล์เซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) เปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ที่ใช้ในการทดลองที่ให้ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ที่มากที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ในการทดสอบความหนาแน่นของเซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงทำได้โดยการนับปริมาณเซลล์โดยใช้ hemocytometer แล้วทำการย้อมสีเซลล์ด้วย Trypan blue แล้วนับเซลล์ตามตำแหน่งในภาพที่ 21



ที่มา Ref. (108)

ภาพที่ 21 แสดงตำแหน่งในการนับเซลล์บน hemocytometer

จากนั้นคำนวณปริมาณเซลล์จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ต่อหนึ่งมิลลิลิตร} = \text{ปริมาณเซลล์ที่นับได้} / \text{จำนวนช่องที่นับเซลล์} \times \text{Dilution factor} \times 10^4$$

$$\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} = \text{จำนวนเซลล์ต่อหนึ่งมิลลิลิตร} \times \text{ปริมาณทั้งหมด}$$

4. การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ต่อการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold)

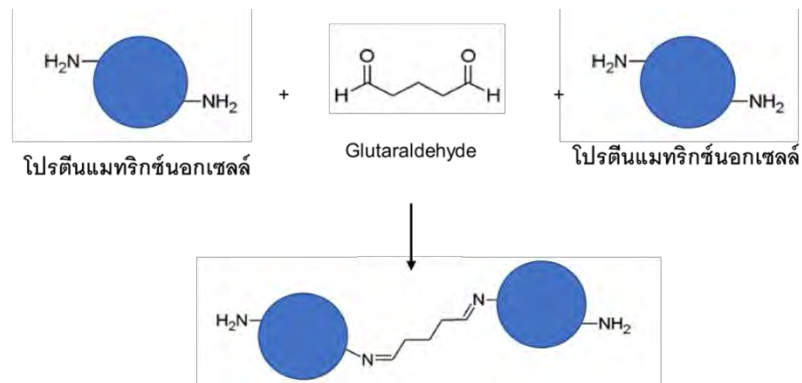
ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ตัดแปรรูปพื้นผิวของกระดาษด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ เพื่อช่วยสนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์บนกระดาษและเพื่อช่วยให้เซลล์แสดงลักษณะทางชีวภาพของเซลล์ที่คล้ายคลึงกับเซลล์ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย โดยได้ศึกษาเปรียบเทียบสารแมทริกซ์นอกเซลล์

3 ชนิด ได้แก่ Matrigel, Collagen-1 rat tail และ Laminin โดย Collagen-1 ถูกเจือจางด้วยสารละลายกรดอะซิติก (acetic acid) ความเข้มข้น 0.02 N เพื่อให้ได้สาร Collagen-1 ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Laminin ถูกเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ให้ได้ความเข้มข้น เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ Matrigel สามารถนำไปใช้งานได้โดยไม่ต้องเจือจาง จากนั้นนำสารแมทริกซ์นอกเซลล์ Matrigel, Collagen-1 และ Laminin ไปทำการตัดแปรพื้นผิวของกระดาศ โดยหยดสารแมทริกซ์นอกเซลล์แต่ละชนิด ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ลงบนบริเวณขอบน้ำของกระดาศ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อทำให้เกิดเจล (gelation) เคลือบบนกระดาศ แล้วนำไปใช้ทำการศึกษาดทดลองต่อไป

5. การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ของสารเชื่อมพันธะ (cross linking agents) ต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์

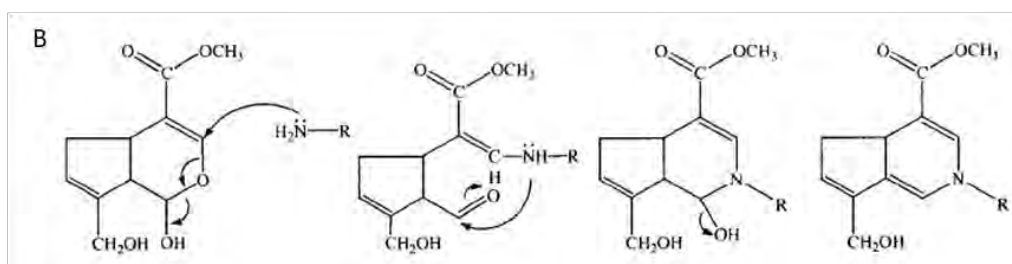
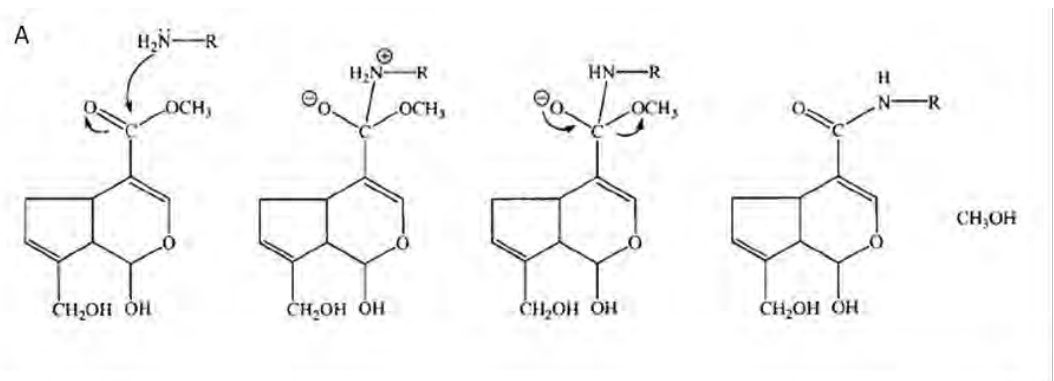
เพื่อเพิ่มความเสถียรให้แก่สารแมทริกซ์นอกเซลล์ในการยึดติดกับพื้นผิวของกระดาศ สารเชื่อมพันธะ (cross linking agents) จึงถูกนำมาใช้ในการเชื่อมระหว่างโมเลกุลหรือภายในโมเลกุลเดียวกันของโปรตีนสารแมทริกซ์นอกเซลล์ โดยการเชื่อมระหว่างพันธะเอมีนของโปรตีน (ภาพที่ 22 และ ภาพที่ 23) โดยในการศึกษาวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของการใช้สารเชื่อมพันธะ 2 ชนิด ได้แก่ สารกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และ สารเจนิพิน (genipin) ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ โดยเตรียมความเข้มข้นของสารเจนิพินในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 0.6% (w/v), 0.3% (w/v) และ 0.1% (w/v) และเตรียมความเข้มข้นของสารกลูตารัลดีไฮด์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ 0.6% (v/v), 0.3% (v/v) และ 0.1% (v/v) ขั้นตอนในการ crosslink ทำโดยหยดสารแมทริกซ์นอกเซลล์ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงบนพื้นที่สำหรับการเลี้ยงเซลล์แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อทำให้เกิดเจล (gelation) เคลือบบนกระดาศ จากนั้นนำกระดาศที่ถูกตัดแปรพื้นผิวด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์มาแช่ในสารละลายของสารเชื่อมพันธะที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาแล้ว ทำการล้างกระดาศด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์โดยใช้ปริมาณมาก จำนวน 3 ครั้ง เพื่อกำจัดสารละลายเชื่อมพันธะส่วนเกินออกให้หมด ก่อนนำกระดาศไปใช้ในการทดลองต่อไป โดยปฏิบัติการเชื่อมพันธะด้วย

สารเจนิพินสามารถเกิดได้ 2 แบบ ได้แก่ เกิดการแทนที่ monosubstituted amide ดังแสดงในภาพ 23A และ เกิด tertiary amine ดังแสดงในภาพ 23B



ที่มา ดัดแปลงจาก Ref. (109)

ภาพที่ 22 แสดงปฏิกิริยาการเชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนของโปรตีน
สองโมเลกุลด้วยสารเชื่อมพันธะชนิด glutaraldehyde

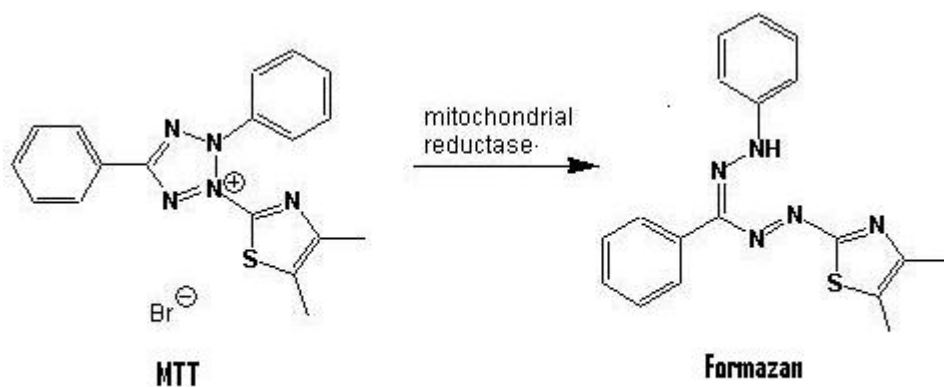


ที่มา ดัดแปลงจาก Ref. (110)

ภาพที่ 23 แสดงปฏิกิริยาการเชื่อมหมู่อะมิโนของโปรตีนด้วยสารเจนิพิน

6. การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT

วิธี MTT เป็นการตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยสามารถใช้ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation) และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) โดยในเซลล์ที่มีชีวิตมีการเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ โดยหลักการของวิธี MTT คือ การวัดเมตาบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย โดยเอนไซม์ mitochondrial reductase ในไมโทคอนเดรีย จะเปลี่ยนสีของสาร Thiazoyl blue tetrazolium bromide (MTT) ซึ่งมีสีเหลืองเป็นตะกอนของสาร formazan ซึ่งมีสีม่วงภายในเซลล์ ปฏิกิริยาการเกิดรีดักชันภายในเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 24 โดยปริมาณตะกอนสีม่วงของ formazan ที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต ทำการทดลองโดยเตรียมสาร Thiazoyl blue tetrazolium bromide ให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร แล้วทำการบ่มกับเซลล์ HT-29 ที่เลี้ยงบนกระดาษ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร



ที่มา Ref. (111)

ภาพที่ 24 แสดงปฏิกิริยาการเกิดรีดักชันภายในเซลล์ โดยเอนไซม์ไมโทคอนเดรียรีดักเทส (mitochondrial reductase)

7. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนไทด์จังก์ชัน ชนิด ZO-1 ในเซลล์ HT-29 โดยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (Immunofluorescence)

เซลล์ HT-29 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาศที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิวด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์เป็นเวลา 14 วัน มาทำให้คงสภาพด้วยสาร พาราฟอร์มัลดีไฮด์ 4 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง จากนั้น permeabilized เซลล์ด้วยสาร Triton X-100 ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ อีกจำนวน 3 ครั้ง แล้วใช้ blocking solution ซึ่งในงานวิจัยนี้คือสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 1% ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เพื่อปกคลุมพื้นผิวที่ยังว่าง ป้องกันการจับกันแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดีที่อาจทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) แล้วทำการย้อมโปรตีน ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะ Zonula occludens-1 (ZO-1) rabbit monoclonal antibody โดยใช้อัตราส่วน 1:1000 และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงย้อมด้วย secondary antibody anti-rabbit IgG (H+L) ที่ติดฉลากด้วยสาร Alexa 488 โดยใช้อัตราส่วน 1:1000 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง แล้วย้อมนิวเคลียส ด้วยสี Hoechst 33258 ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ บ่มในที่มืดเป็นเวลานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนไทด์จังก์ชัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน (Confocal laser scanning microscopy) ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดยเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 488 นาโนเมตร สำหรับการถ่ายภาพโปรตีน ZO-1 ด้วยสาร Alex 488 และ ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร สำหรับการถ่ายนิวเคลียสด้วยสี Hoechst 33258

8. การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาศด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)

เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัตถุ การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเนื่องจากเทคนิคนี้จะให้ภาพที่เป็นลักษณะสามมิติ โดยภาพที่เกิดขึ้นเกิดจากการสะท้อนกลับของอิเล็กตรอนจากพื้นผิวของวัตถุที่ทำการศึกษา วิธีการทดลอง นำเซลล์เพาะเลี้ยงบนกระดาศ มาทำให้เซลล์คงสภาพด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ที่มีความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่

ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งก่อนการวิเคราะห์ด้วยกล้อง SEM มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยทำให้ตัวอย่างเซลล์แห้งด้วยการใช้ชุดแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน ตั้งแต่ 35%, 50%, 75%, 95% และ 100% ตามลำดับ แล้วเคลือบผิวตัวอย่างด้วยโลหะทองคำโดยใช้เครื่อง sputter coater เพื่อให้พื้นผิวสามารถนำไฟฟ้าได้ แล้วจึงนำไปศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษต่อไป

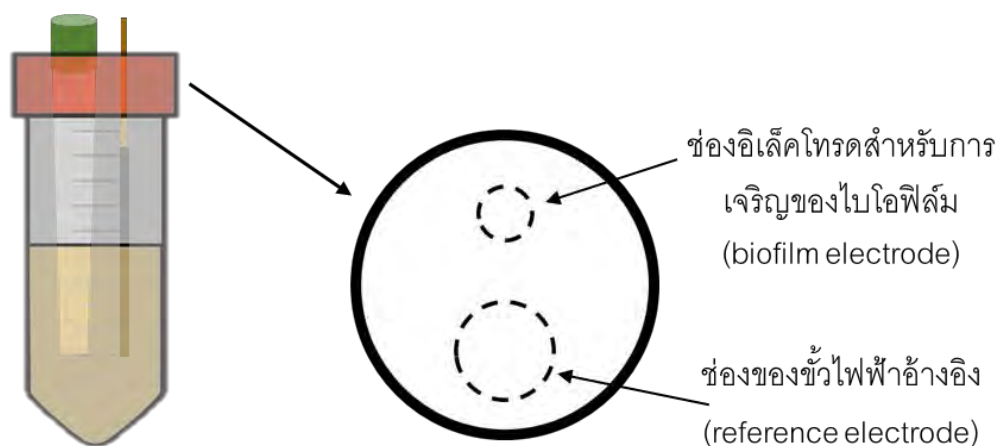
ส่วนที่ 2 การพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของจุลชีพก่อโรค

1. การออกแบบและสร้างอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ในงานวิจัยนี้ ได้ออกแบบอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้หลอด centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เป็นอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยง โดยเจาะรูที่ฝาจำนวน 2 รู ให้มีขนาดแตกต่างกัน โดยรูขนาด 4.5 มิลลิเมตร ใช้เพื่อเป็นช่องของอิเล็กโทรดสำหรับติดตามการเจริญของไบโอฟิล์ม โดยเชื้อจะเจริญเติบโตและสร้างไบโอฟิล์มบนอิเล็กโทรดนี้ (biofilm hosting electrode) และรูขนาด 14 มิลลิเมตร ใช้สำหรับเป็นช่องของขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode) อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอิเล็กโทรดรวมด้วย แสดงในภาพที่ 25

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิดโดย เชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด LB สำหรับเชื้อ *S. gordonii* ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BHI และ *C. albicans* ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว YPD ก่อนการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับอิเล็กโทรดสำหรับติดตามการเจริญของไบโอฟิล์ม เชื้อ *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *S. gordonii* ถูกนำมาปรับปริมาณเชื้อโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีความขุ่นของเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 0.8 , ความขุ่นของเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 0.16, ความขุ่นของเชื้อ *P. aeruginosa* เท่ากับ 0.066 และความขุ่นของเชื้อ *S. gordonii* เท่ากับ 0.02 สำหรับเชื้อ *C. albicans* ใช้ความยาวคลื่นที่ 530 นาโนเมตร ปรับให้มีความขุ่นของเชื้อเท่ากับ 0.38 เพื่อปรับให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เท่ากันที่ 10^7 CFU/mL จากนั้นนำเชื้อที่ปรับปริมาณเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงร่วมกับอิเล็กโทรดสำหรับติดตามการเจริญของไบโอฟิล์มในหลอด centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยง

เชื้อปริมาณ 30 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณของเชื้อสุทธิขณะเริ่มต้นการทดลองเท่ากับ 10^6 CFU/mL

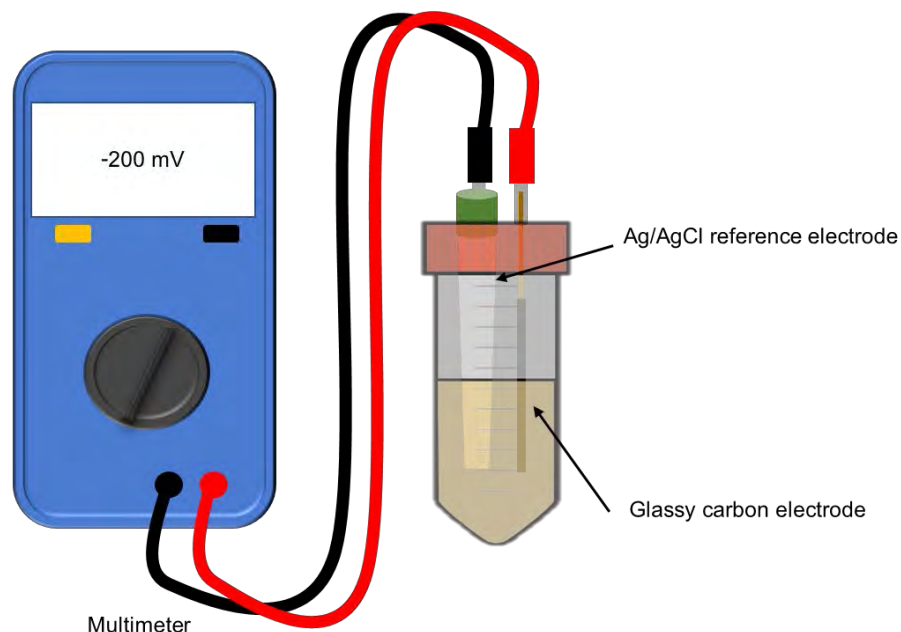


ภาพที่ 25 แสดงภาพด้านบนของฝาหลอด centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร และแสดงตำแหน่งสำหรับเจาะรูเพื่อใช้เป็นช่องว่างสำหรับอิเล็กโทรด

2. การศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิด (Open circuit potential: OCP)

ในการศึกษาวิจัยนี้อาศัยกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนออกภายนอกเซลล์ (extracellular electron transfer) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ เชื้อ *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. gordonii* และ *C. albicans* และใช้วัสดุนำไฟฟ้าเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron sink) แทนการใช้ออกซิเจน เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเกิดกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนออกภายนอกเซลล์และความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการใช้วัสดุนำไฟฟ้าเป็นตัวรับอิเล็กตรอน เชื้อจุลินทรีย์ถูกนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐาน (glassy carbon electrode) โดยบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้าโดยการวัดค่าความต่างของศักย์ไฟฟ้าระหว่างขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode) และขั้วไฟฟ้าสำหรับการเจริญของไบโอฟิล์ม (biofilm hosting electrode) ซึ่งก็คือ glassy carbon electrode โดยใช้มัลติมิเตอร์แบบดิจิทัล

(digital multimeter) บันทึกค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าจนครบ 24 ชั่วโมง โดยเริ่มจาก 0 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง 8 ชั่วโมง 18 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ระบบการวัดค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิด (OCP) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์พร้อมกับอิเล็กโทรด แสดงดังภาพที่ 26



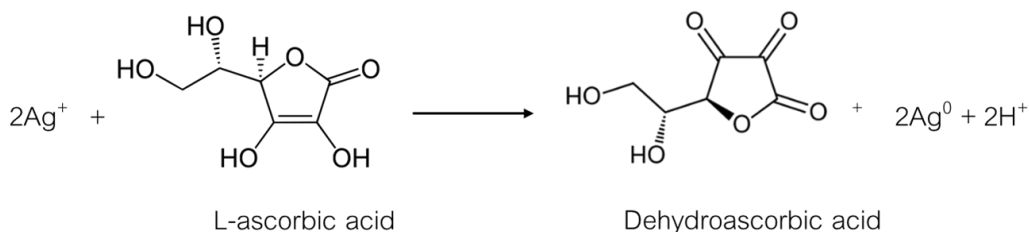
ภาพที่ 26 แสดงระบบการวัดค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิด (OCP)

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์พร้อมกับอิเล็กโทรด โดยในระบบประกอบด้วย multimeter, ขั้วไฟฟ้าอ้างอิง, ขั้วคาร์บอนอสัณฐาน และเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในหลอด

3. การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน (silver nanoparticles) สำหรับการดัดแปรพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน (screen-printed electrode)

ในงานวิจัยนี้อาศัยหลักการการเกิดรีดอกซ์ (ปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอน) ของอนุภาคเงินนาโน (Ag^0) ในการติดตามการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนทำโดยต้มน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาณ 95 มิลลิลิตร ให้มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ จากนั้นใส่ สารละลาย L-ascorbic acid ที่มีความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ (M) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วต้มต่อไปเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นใส่สารละลายที่มีส่วนผสมของ 1% w/v sodium citrate dehydrate ปริมาณ 2 มิลลิลิตร 1% w/v silver nitrate ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร และ 8 มิลลิ

โมลาร์ potassium chloride ปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วต้มต่อไปอีกประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป โดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน แสดงดังสมการภาพที่ 27



ภาพที่ 27 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน

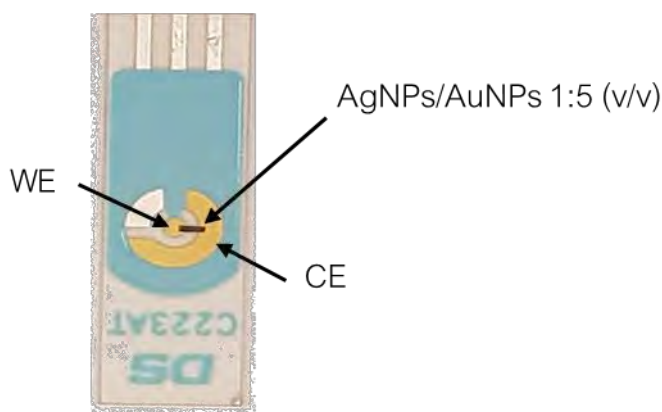
4. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโน (gold nanoparticles) สำหรับการดัดแปรพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน (screen-printed electrode)

อนุภาคทองคำระดับนาโนถูกนำมาใช้ร่วมกับอนุภาคเงินนาโนในการดัดแปรพื้นผิวของอิเล็กโทรด โดยการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนทำได้โดยละลายผง tetrachloroauric (III) acid trihydrate จำนวน 19.7 มิลลิกรัม ในน้ำปราศจากไอออน ปริมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลาย trisodium citrate dihydrate ที่ความเข้มข้น 38.8 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นสีของสารละลายจะเริ่มเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีฟ้าเทา แล้วเปลี่ยนไปเป็นสีไวน์แดง ทำการต้มสารละลายต่อไปอีกประมาณ 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

5. การดัดแปรพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน

ในงานวิจัยนี้ใช้ขั้วไฟฟ้าทองคำพิมพ์สกรีน (gold screen-printed electrode) สำหรับเป็นส่วนในการตรวจวัดการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยใช้อนุภาคนาโนผสมในการเชื่อมระหว่างขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode) และขั้วไฟฟ้าช่วย (counter electrode) วิธีในการดัดแปรพื้นผิวทำได้โดยกำหนดพื้นที่ลงบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนโดยใช้เทปกาวติดเพื่อให้เกิดช่องว่างระยะห่างประมาณ 1.5 มิลลิเมตรจากนั้นหยดสารละลายผสมระหว่างอนุภาคเงินนาโนและอนุภาคทองคำระดับนาโนในอัตราส่วน 1:5 (v/v) ซึ่งสัดส่วนความเข้มข้นที่ใช้ นี้ มาจากการทดลองเบื้องต้นของ Larpant และคณะ โดยหยดสารละลายลงในบริเวณช่องว่าง

ระหว่างเทปกาว ซึ่งเป็นการเชื่อมขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode: WE) และขั้วไฟฟ้าช่วย (counter electrode: CE) จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยวางบน hot plate ที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส จนสารละลายระเหยเกิดเป็นเส้นตรงบาง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 28 จากนั้นทำการเคลือบทับชั้นอนุภาคนาโนผสม (AgNPs/AuNPs) ด้วยสารละลาย Nafion ที่มีความเข้มข้น 5% เพื่อให้อนุภาคเงินนาโนที่อยู่บนขั้วไฟฟ้ามีเสถียรภาพมากขึ้น เพื่อป้องกันการหลุดของอนุภาคเงินนาโน เมื่อใช้ในการทดลองที่ต้องจุ่มขั้วไฟฟ้ามีสกรีนที่ดัดแปรพื้นผิว ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานานและเพื่อเพิ่มความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุภาคเงินนาโนและเชื้อจุลินทรีย์

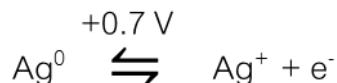


ภาพที่ 28 แสดงขั้วไฟฟ้ามีสกรีนที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิวด้วยอนุภาคนาโน

6. การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าของอนุภาคเงินนาโนด้วยวิธีการทางไฟฟ้าเคมี

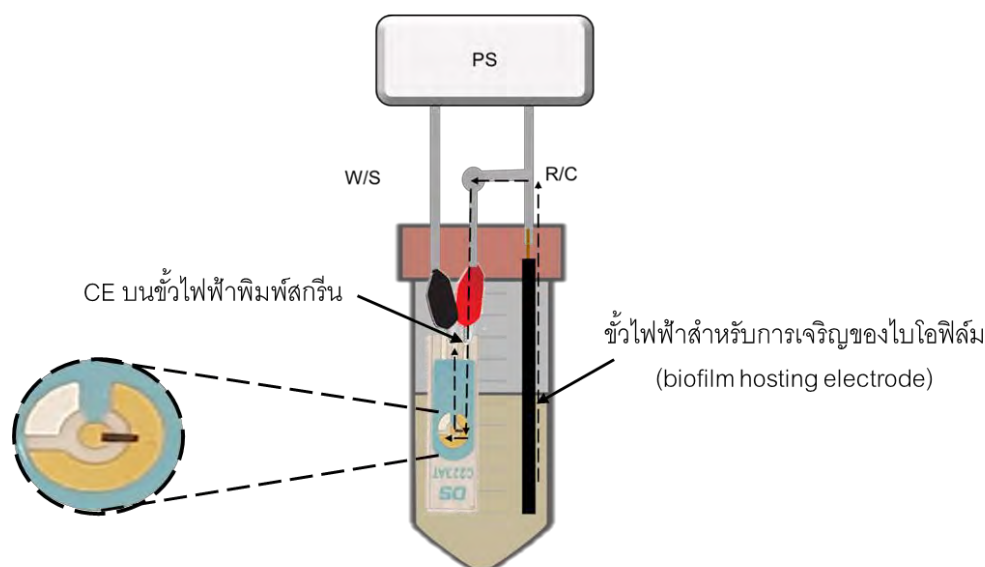
ขั้วไฟฟ้ามีสกรีนที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิวจะถูกนำมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ด้วยเซลล์ไฟฟ้าเคมี (electrochemical cell) เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยใช้กระบวนการทางไฟฟ้าเคมีด้วยเทคนิค chronoamperometry ตั้งค่าความต่างศักย์คงที่ +0.70 V และใช้เวลาในการเกิดออกซิเดชัน 12 วินาที เพื่อให้อนุภาคเงินนาโนเปลี่ยนจากอนุภาคที่สามารถนำไฟฟ้าได้ Ag^0 เป็นอนุภาคซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) อย่างไม่สมบูรณ์ ดังแสดงในปฏิกิริยา จากนั้นนำขั้วไฟฟ้ามีสกรีนไปใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

ปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของซิลเวอร์ไปเป็นซิลเวอร์ไอออน



7. การศึกษาความสามารถในการใช้อิเล็กตรอนจากไบโอฟิล์มเพื่อรีดิวซ์ (reduce) อนุภาคเงินนาโนที่มีคุณสมบัติการนำไฟฟ้าลดลง

งานวิจัยนี้อาศัยหลักการเกิดออกซิเดชัน และรีดักชันของอนุภาคเงินนาโน โดยใช้ อิเล็กตรอนที่ได้รับการถ่ายทอดจากไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ทำการทดลองโดยใช้ เทคนิค chronoamperometry โดยให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่แก่ขั้วทำงาน +0.005 V แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเทียบกับเวลา โดยใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐาน (glassy carbon electrode) เป็นขั้วสำหรับการเจริญของไบโอฟิล์ม โดยในการทดลองทำการเชื่อมต่อ ขั้วไฟฟ้าสำหรับการเจริญของไบโอฟิล์มเข้ากับขั้วไฟฟ้าช่วยบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน แล้วต่อเข้ากับ สายเคเบิล reference/counter ของเครื่อง Potentiostat และทำการเชื่อมต่อขั้วไฟฟ้าทำงานบน ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนเข้ากับเครื่อง Potentiostat แล้ววัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น ระบบการทดสอบ ความสามารถในการใช้อิเล็กตรอนจากไบโอฟิล์ม ดังแสดงในภาพที่ 29 โดยอิเล็กตรอนไหลจาก ขั้วไฟฟ้าสำหรับการเจริญของไบโอฟิล์มไปยังสายเคเบิล reference/counter แล้วไหลผ่านขั้วไฟฟ้า ช่วยบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน จากนั้นไหลผ่านซิลเวอร์คลอไรด์ที่พาดระหว่างขั้วไฟฟ้าช่วยและ ขั้วไฟฟ้าทำงาน แล้วจึงไหลไปยังเครื่อง Potentiostat

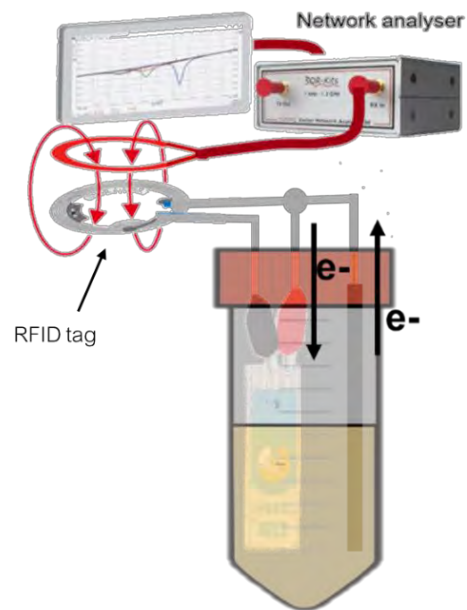


ภาพที่ 29 แสดงระบบการทดสอบความสามารถในการใช้อิเล็กตรอนจากไบโอฟิล์ม เพื่อรีดิวซ์ (reduce) อนุภาคเงินนาโน ให้เกิดการนำกระแสไฟฟ้า (เส้นปะ แสดงทิศทางการไหลของอิเล็กตรอน) (R/C: reference/counter cables, W/S: working/sensing cables, PS: Potentiostat)

8. การตรวจติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยการตรวจวัดแบบไร้สาย

เทคโนโลยีที่ใช้ในการตรวจวัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แบบไร้สายที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ อาร์เอฟไอดี (RFID-radio frequency identification) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่อาศัยคลื่นวิทยุในการทำงานรับส่งข้อมูล โดยในระบบการตรวจวัดแบบไร้สายด้วยเทคโนโลยีอาร์เอฟไอดีประกอบด้วย เครื่องอ่านอาร์เอฟไอดี (RFID reader) และ แท็กอาร์เอฟไอดี (RFID tag) การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอาร์เอฟไอดีในงานวิจัยนี้ ทำได้โดยเชื่อมเสาอากาศของ RFID tag เข้ากับสายเคเบิลเพื่อในการเชื่อมต่อกับขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ใช้เป็นส่วนในการติดตามการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อ การติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แบบไร้สายทำได้โดย เชื่อมต่อขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วยอนุภาคนาโนผสมเข้ากับเสาอากาศของ RFID tag แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของควมถี่ที่เปลี่ยนไป ระบบการติดตามการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแบบไร้สาย ในงานวิจัยนี้ ใช้เครื่อง Network analyser ดังแสดงในภาพที่ 30 โดยที่ก่อนการ

เจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อ RFID tag มีความต้านทานสูงเนื่องจากซิลเวอร์คลอไรด์ที่อยู่บน
 หัวไฟฟ้าพิมพ์สกรีน จึงทำให้มีค่าความถี่สูง แต่เมื่อมีการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคจะเกิด
 การถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปยังหัวไฟฟ้าสำหรับการเจริญของไบโอฟิล์มและอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะ
 ไปรีดิวซ์ซิลเวอร์คลอไรด์ทำให้ค่าความต้านทานของ RFID tag ลดลง จึงส่งผลให้ความถี่เปลี่ยนไป
 ยิ่งที่ความถี่ต่ำ



ภาพที่ 30 แสดงระบบการติดตามการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแบบไร้สาย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

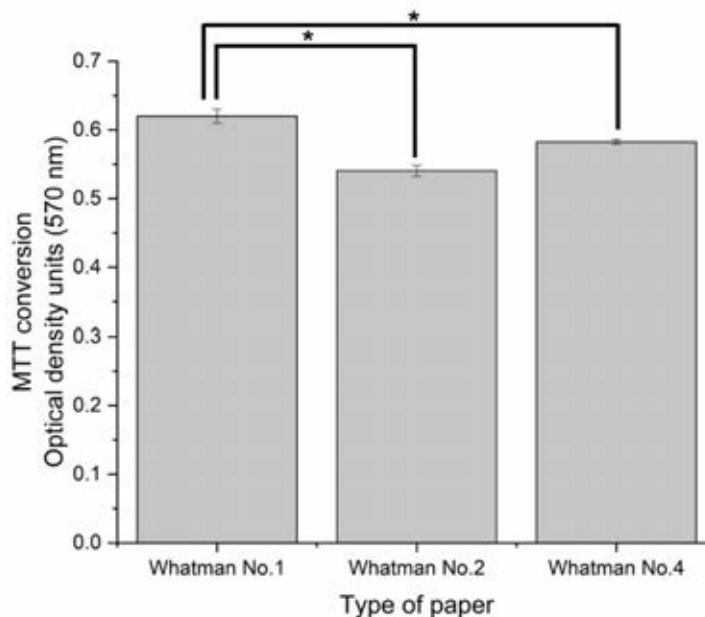
ส่วนที่ 1 การพัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาษที่มีการตัดแปรรูปผิว

1.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพชนิดของกระดาษกรองที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

เนื่องจากกระดาษกรองแต่ละชนิดมีขนาดรูพรุนที่แตกต่างกัน โดยขนาดของรูพรุนส่งผลต่อการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) ที่สามารถสนับสนุนการยึดเกาะและการกักเก็บเซลล์ได้ต่างกัน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของกระดาษกรองจำนวน 3 ชนิด ที่มีขนาดรูพรุนที่แตกต่างกัน ได้แก่ กระดาษกรอง Whatman No.1 ที่มีขนาดรูพรุน 11 ไมโครเมตร กระดาษกรอง Whatman No.2 ที่มีขนาดรูพรุน 8 ไมโครเมตร และ กระดาษกรอง Whatman No.4 ที่มีขนาดรูพรุน 20-25 ไมโครเมตร โดยนำกระดาษกรองทั้ง 3 ชนิดมาใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ โดยทำการพิมพ์ลวดลายบนกระดาษกรองแล้วนำไปให้ความร้อนเพื่อให้หมึกแว็กซ์ละลายและซึมลงในเนื้อกระดาษกรองด้านล่างเพื่อให้เกิดขอบเขตบริเวณชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ บริเวณชอบน้ำใช้เป็นพื้นที่สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำกระดาษกรองดังกล่าวไปฆ่าเชื้อโรคโดยใช้รังสียูวี (UV) เป็นเวลานาน 15 นาที ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยทดสอบด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-29 จำนวน 150,000 เซลล์ ลงในบริเวณสำหรับการเพาะเลี้ยง แต่ละการทดลอง ทดสอบประสิทธิภาพกระดาษกรองแต่ละชนิดจำนวน 3 ครั้ง โดยเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 2 วัน เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะกับเส้นใยของกระดาษ ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 31 จากผลการวิจัยพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 ให้ค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบด้วยวิธี MTT สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 2 และ กระดาษกรอง Whatman No.4 โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ * ($p < 0.05$) ด้วยการวิเคราะห์ด้วยความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Turkey ดังนั้นกระดาษกรอง Whatman No.1 จึงมีประสิทธิภาพในการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์และสามารถสนับสนุนให้เซลล์ยึดเกาะได้ดีกว่ากระดาษกรอง Whatman No.2 และ กระดาษกรอง Whatman No.4 เนื่องจากขนาดของรูพรุนมีขนาดที่เหมาะสมกับขนาดของเซลล์ HT-29 ที่มีขนาดโดยประมาณ 10 ไมโครเมตร โดยหากกระดาษมีขนาดรูพรุนที่ใหญ่เกินไปทำให้ไม่สามารถกักเก็บเซลล์ไว้ในเนื้อ



กระดาษได้ เซลล์จึงเล็ดลอดลงไปด้านล่างของกระดาษ แต่สำหรับกระดาษที่มีขนาดรูพรุนเล็ก ทำ ให้เซลล์เกาะบนเส้นใยของกระดาษด้านบนอย่างเดียวและเจริญเติบโตแบบยึดไปตามแนวเส้นใย ด้านข้างจึงไม่สามารถแบ่งตัวได้ในแบบสามมิติ



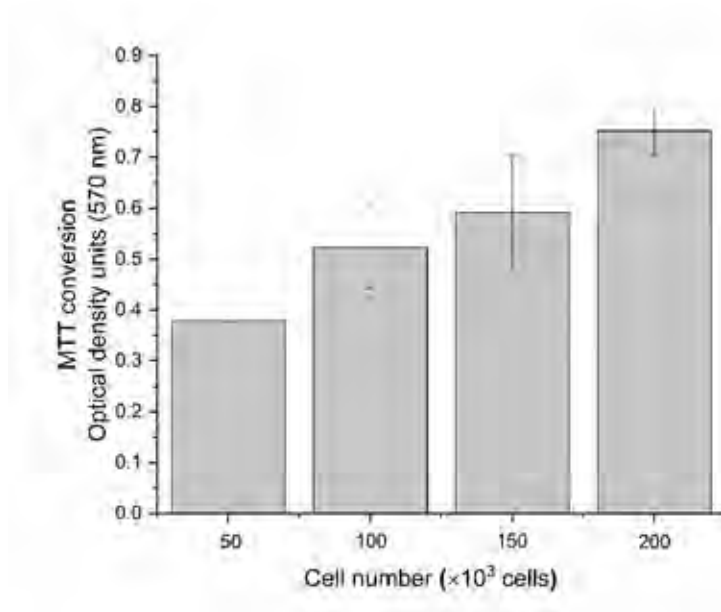
ภาพที่ 31 แสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาษกรอง

Whatman No.1 กระดาษกรอง Whatman No.2 และ กระดาษกรอง Whatman No.4 ในการเป็น โครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) (n=3)

1.2 ผลการทดสอบความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง เซลล์บนกระดาษ

เมื่อกระดาษเกิดจากการประสานกันของร่างแหเส้นใยเซลลูโลสเป็นสามมิติทำให้มีพื้นที่ ผิวมาก ดังนั้นเพื่อให้เห็นความเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนและเพื่อให้มีปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมแก่พื้นที่ เพาะเลี้ยง เซลล์ HT-29 ถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยทดสอบใน ปริมาณความหนาแน่นเซลล์ที่ต่างกันโดยเริ่มต้นที่ 50,000 เซลล์ 100,000 เซลล์ 150,000 เซลล์ และ 200,000 เซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 2 วัน และทดสอบโดยเพาะเลี้ยง เซลล์แต่ละความหนาแน่นจำนวน 3 การทดสอบ โดยจากผลการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 32

พบว่า การใช้ปริมาณความหนาแน่นเซลล์ที่ 200,000 เซลล์ให้ค่าการดูดกลืนแสงด้วยการทดสอบด้วยวิธี MTT สูงที่สุด ซึ่งแสดงถึงที่ปริมาณความหนาแน่นเซลล์นี้ เซลล์สามารถมีชีวิตรอดได้ โดยที่การใช้ปริมาณความหนาแน่นเซลล์ที่ 200,000 เซลล์ให้ค่าการดูดกลืนที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้เซลล์ที่ปริมาณความหนาแน่นเซลล์ที่ 50,000 เซลล์ ถึง 1.98 เท่า และ สูงกว่า 1.44 เท่า ของการเพาะเลี้ยงโดยใช้เซลล์ปริมาณความหนาแน่นเซลล์ที่ 100,000 เซลล์ และ 1.27 เท่า ของการเพาะเลี้ยงโดยใช้เซลล์ปริมาณความหนาแน่นเซลล์ที่ 150,000 เซลล์ ดังนั้นเซลล์ที่ปริมาณความหนาแน่นที่ 200,000 เซลล์ ยังเจริญเติบโตและมีชีวิตรอด แสดงถึงความหนาแน่นไม่มากเกินไปจนทำให้เกิดการตายของเซลล์ภายในพื้นที่เลี้ยงเซลล์ที่จำกัดบนกระดาศ ในระยะเวลา 2 วัน ซึ่งในการทดลองนี้คือบริเวณขอบน้ำ 12.56 ตารางมิลลิเมตร จึงใช้ความหนาแน่นของเซลล์ดังกล่าวนำมาใช้ในการทดลองต่อไป อย่างไรก็ตามที่ความหนาแน่นของเซลล์มากกว่า 200,000 เซลล์ ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากที่ปริมาณความหนาแน่นเซลล์ที่สูงอาจทำให้เซลล์เกิดความเครียดและเหนียวนำไปเกิดการตายได้ ซึ่งควรทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายโดยการย้อมด้วย Calcein AM และ Propidium iodide (PI) โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้เอนไซม์เอสเทอเรสภายในเซลล์ (intracellular esterase) เพื่อเปลี่ยน Calcein AM ซึ่งไม่เรืองแสงให้กลายเป็น Calcein ที่สามารถเรืองแสงได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงที่มีความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร สำหรับเซลล์ตาย ผนังเซลล์จะสูญเสียความสามารถในการกั้นสารต่าง ๆ (membrane permeability) ทำให้สาร PI สามารถผ่านเข้าไปจับกับ DNA ได้ โดย PI ถูกกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร และเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่น 617 นาโนเมตร ดังนั้นในเซลล์ที่มีชีวิตจะย้อมติดสีเขียวของ Calcein และเซลล์ตายจะติดสีแดงจาก PI และการใช้ปริมาณเซลล์ที่สูงขณะเริ่มต้นอาจทำให้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลายาวนานได้ในพื้นที่ที่จำกัด



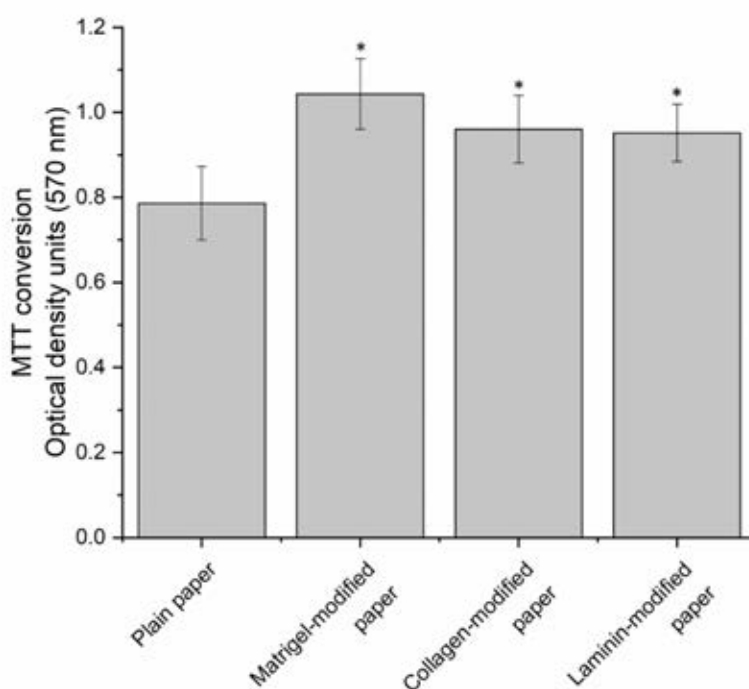
ภาพที่ 32 แสดงผลการเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษต่อการมีชีวิตของเซลล์ ภายในเวลา 2 วัน

1.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ต่อการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold)

สารแมทริกซ์นอกเซลล์นอกจากทำหน้าที่ช่วยสนับสนุนเซลล์ในการยึดเกาะแล้ว ยังสามารถทำหน้าที่เกี่ยวกับการส่งสัญญาณเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ เช่น ลักษณะรูปร่างของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์และการร่าางคูลภายในเซลล์ให้เป็นปกติ ดังนั้นเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ที่มีความเหมาะสม ช่วยการยึดเกาะ การมีชีวิตรอด และการพัฒนาของเซลล์ ให้มีการแสดงออกของเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนเซลล์ลำไส้ที่อยู่ในร่างกาย เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ด้วยการทดสอบโดยใช้สารแมทริกซ์นอกเซลล์ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ Matrigel, Collagen-1 และ Laminin ดัดแปรพื้นผิวของกระดาษกรองบริเวณส่วนที่ขอบน้ำสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-29 บนกระดาษกรองที่ดัดแปรด้วย Matrigel, Collagen-1 และ Laminin และเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษกรองที่ดัดแปรพื้นผิวเป็นเวลา 21 วัน จากนั้นนำเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองแต่ละชนิดมาทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT จากผลการทดลองพบว่า การดัดแปรพื้นผิวของกระดาษกรองด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ช่วยให้เซลล์ยึดเกาะกับกระดาษกรองได้ดียิ่งขึ้น และเซลล์มีชีวิตรอดมากกว่าการใช้



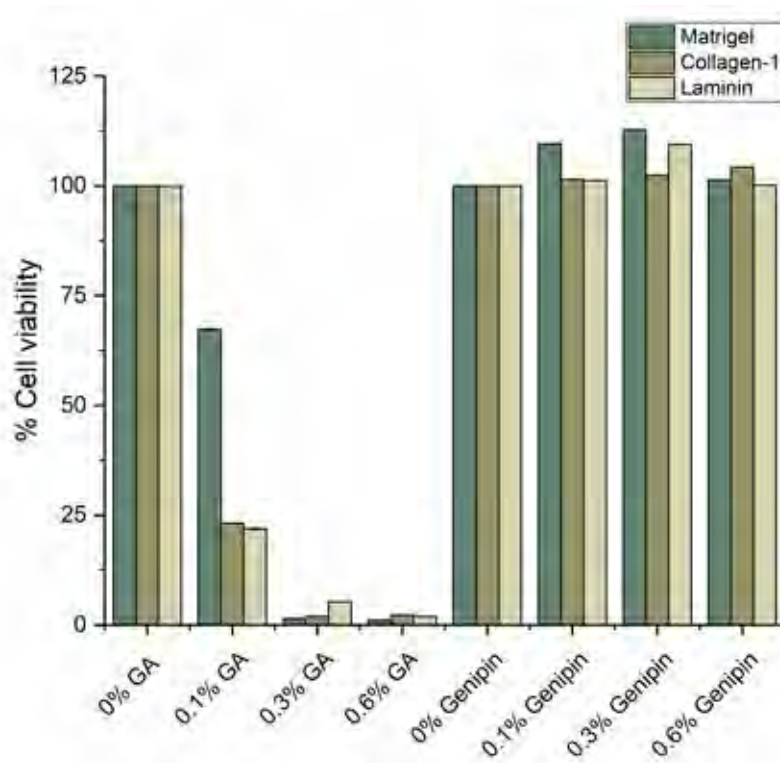
กระดาษกรองที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูปผิว ดังแสดงในภาพที่ 33 เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองที่ถูกตัดแปรรูปด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ทั้ง Matrigel, Collagen-1 และ Laminin ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm สูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยกระดาษกรองที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูปผิวโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ * ($p < 0.05$) ด้วยการวิเคราะห์ด้วยความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Turkey ดังนั้น สารแมทริกซ์นอกเซลล์มีประสิทธิภาพในการช่วยสนับสนุนให้เซลล์ยึดเกาะบนเส้นใยของกระดาษกรองและส่งผลให้เซลล์มีชีวิตรอดได้ดียิ่งขึ้น โดยการใช้ Matrigel ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด แสดงถึงเซลล์รอดชีวิตได้ดีที่สุดในสภาวะที่มี Matrigel เป็นสารแมทริกซ์นอกเซลล์ เนื่องจาก Matrigel ประกอบด้วยโปรตีนแมทริกซ์และ growth factors หลายชนิด เช่น epidermal growth factor และ insulin like growth factor ส่งผลกระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโต ส่วนการใช้ Collagen-1 และ Laminin ให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 33 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ที่ใช้ในโครงเลี้ยงเซลล์ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์* $p < 0.05$ (n=3)

1.4 ผลการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ของสาร เชื่อมพันธะ (cross linking agents) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ HT-29

ในการศึกษาวิจัยนี้ ได้ศึกษาโดยใช้สารเชื่อมพันธะ 2 ชนิด ได้แก่ สารเจนิพิน (genipin) และ สารกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ในการเชื่อมพันธะของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ที่ใช้ในการตัดแปรรูปผิวของกระดาศสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-29 ซึ่งสารเจนิพินเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่ได้จาก *Gardenia jasminoides* หรือ ดอกพุดซ้อน โดยสารเจนิพินถูกนำมาใช้ประโยชน์ในงานวิจัยทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) เพื่อใช้เป็นสารเชื่อมพันธะสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ สารเชื่อมพันธะมีความสามารถในการเชื่อมพันธะเอมีนของโปรตีนทำให้เกิดการประสานกันเป็นร่างแหของโปรตีนแมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่ใช้ในการตัดแปรรูปผิวของกระดาศกรอง ส่งผลให้โปรตีนมีความเสถียรและยึดติดกับกระดาศกรองได้ดีขึ้น จากผลการวิจัยโดยการใช้สารเชื่อมพันธะที่ความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้ 0.6%, 0.3% และ 0.1% พบว่าสารเจนิพินทุกความเข้มข้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำหรือมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ จึงทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในกระดาศกรองที่มีการตัดแปรรูปผิวที่เชื่อมพันธะสารแมทริกซ์นอกเซลล์ด้วยสารเจนิพิน เห็นได้จากผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี MTT โดยการใช้สารแมทริกซ์นอกเซลล์ที่ไม่ได้เชื่อมพันธะเป็นตัวควบคุม ในขณะที่เมื่อใช้สารกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมพันธะ พบว่าสารกลูตารัลดีไฮด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้หากใช้ในความเข้มข้นสูง แต่ที่ความเข้มข้นของสารกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นต่ำที่ 0.1% พบว่า เซลล์ยังสามารถมีชีวิตรอดได้ ดังแสดงในภาพที่ 34 แต่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่าสภาวะที่ใช้สารเจนิพินเชื่อมพันธะ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ HT-29 ที่เลี้ยงบนกระดาศที่ตัดแปรรูปผิวด้วยการใช้สารเชื่อมพันธะและสารแมทริกซ์นอกเซลล์ชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสารเชื่อมพันธะที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่เหมาะสมในการนำมาใช้เชื่อมพันธะสำหรับสารแมทริกซ์นอกเซลล์เพื่อใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาศกรอง ได้แก่ สารเจนิพิน โดยแต่ละความเข้มข้นของสารเจนิพินที่ใช้ในการเชื่อมพันธะ ส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ HT-29 ไม่แตกต่างกันดังนั้น สารเจนิพินที่ความเข้มข้น 0.1% จึงเหมาะสมที่สุดในการใช้งานเนื่องจากมีความเข้มข้นของสารในระดับต่ำที่สุดแต่ให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 34 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เซลล์ HT-29 ที่มีชีวิตและความเข้มข้นของสารเชื่อมพันธะ

ที่ใช้กับแต่ละชนิดของสารเมทริกซ์นอกเซลล์

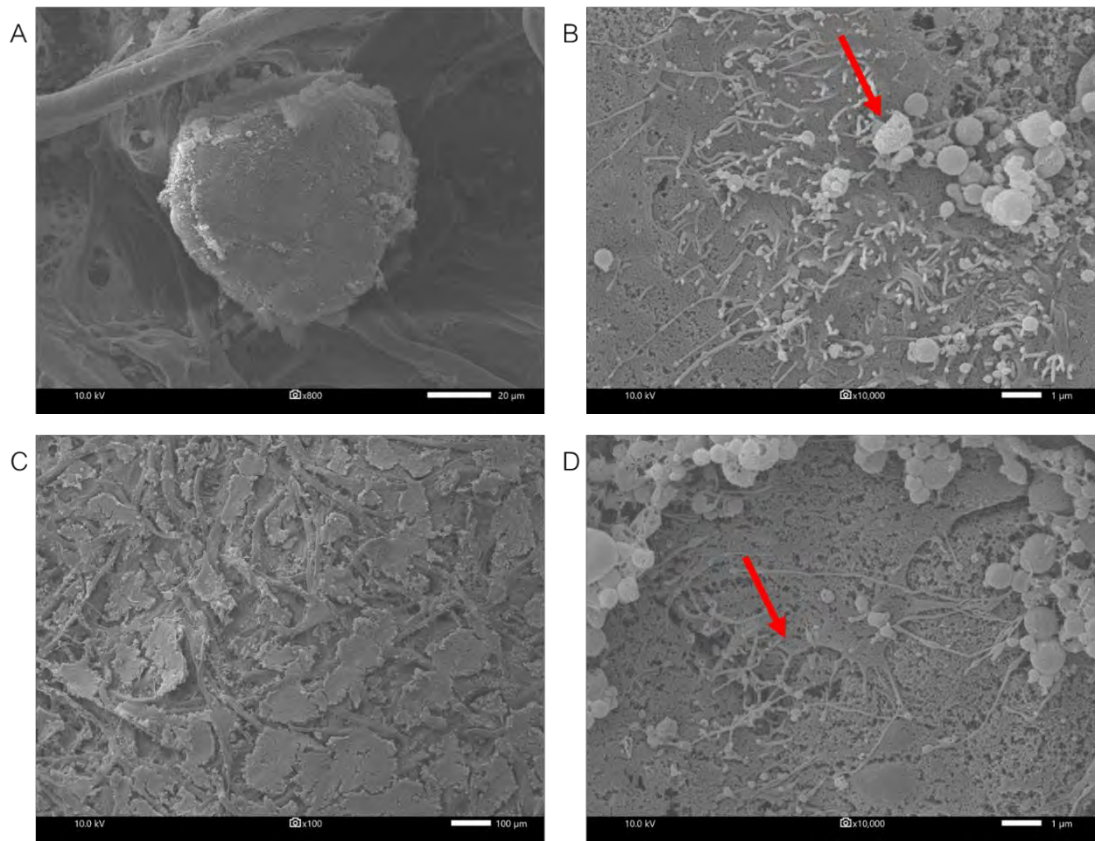
ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ HT-29 โดยการใช้สารเชื่อมพันธะต่อสารเมทริกซ์นอกเซลล์ชนิดที่แตกต่างกัน

Concentration of cross-linking agent	Extracellular matrix		
	Matrigel	Collagen-1	Laminin
0% Glutaraldehyde	100.0	100.0	100.0
0.1% Glutaraldehyde	67.3	23.2	21.9
0.3% Glutaraldehyde	1.4	2.0	5.3
0.6% Glutaraldehyde	1.1	2.3	1.9
0% Genipin	100.0	100.0	100.0

Concentration of cross-linking agent	Extracellular matrix		
	Matrigel	Collagen-1	Laminin
0.1% Genipin	109.6	101.5	101.3
0.3% Genipin	112.8	102.5	109.5
0.6% Genipin	101.3	104.3	100.2

1.5 ผลการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)

เพื่อศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ รูปร่างของเซลล์ (cell morphology) และการแปรสภาพของเซลล์ (cell differentiation) ซึ่งลักษณะการแสดงออกของเซลล์มีความสำคัญในการทำหน้าที่และป้องกันการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอม โดยเซลล์ลำไส้จะมีการแสดงออกของขั้วของเซลล์ (polarity) โดยทางด้าน apical จะมีเส้นขนขนาดเล็กเรียกว่า วิลไล (villi) ทำหน้าที่เพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมและการเคลื่อนไหวเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมภายนอกที่เข้าสู่บริเวณลำไส้ และ goblet cells ที่ทำหน้าที่ในการสร้างเมือก (mucus) โดยจากผลการทดลองด้วยกล้อง SEM พบว่า เซลล์ HT-29 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองที่มีการตัดแปรรูปผิวด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ทั้งสามชนิด สามารถเจริญเติบโตแบบสามมิติบนกระดาษกรองและมีการแสดงออกของวิลไลที่บริเวณผิวเซลล์ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าเซลล์สามารถหลั่งสารเมือกออกมาที่ผิวเซลล์ได้อีกด้วย สำหรับเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษที่มีการตัดแปรรูปผิวด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ที่ใช้สารเจนิพินในการเชื่อมพันธะ พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโต แต่ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนกระดาษมีลักษณะเป็นแผ่นแบน ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองที่ถูกตัดแปรรูปผิวเพียงเฉพาะสารแมทริกซ์นอกเซลล์ ที่ไม่ใช้สารเชื่อมพันธะ เซลล์มีลักษณะเป็นสามมิติ (spheroid) ดังแสดงในภาพที่ 35

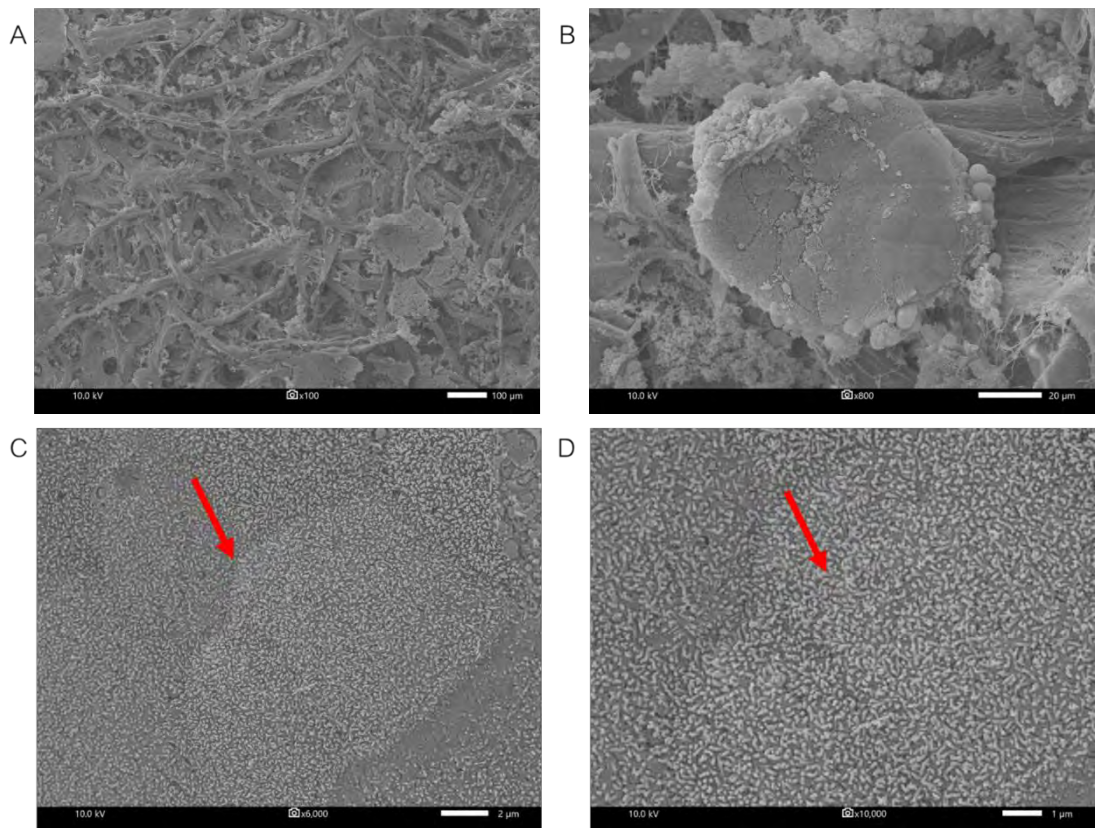


ภาพที่ 35 แสดงภาพถ่ายจาก SEM ของเซลล์ HT-29

(A) เซลล์เจริญแบบสามมิติ (spheroid) (B) สารเมือกบริเวณผิวเซลล์ (C) เซลล์เจริญเป็นแผ่นแบนจากการใช้สารเชื่อมพันระหว่างสารเมทริกซ์นอกเซลล์ (D) แสดงการยึดกันระหว่างเซลล์

จะเห็นได้ว่าเซลล์ HT-29 ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนกระดาษที่ตัดแปรรูปผิวด้วยสารเมทริกซ์นอกเซลล์เป็นเวลา 14 วัน เซลล์มีลักษณะรูปร่างแบบสามมิติ (spheroid) (กำลังขยาย 800 เท่า) (ภาพ 35A) และมีการแปรสภาพของเซลล์โดยการแสดงออกของวิลโลและมีการเชื่อมกันของเซลล์ที่ผิวเซลล์ดังลูกศร (กำลังขยาย 10,000 เท่า) (ภาพ 35B) ภาพ (35C) แสดงลักษณะรูปร่างของเซลล์ HT-29 ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนกระดาษที่ตัดแปรรูปผิวด้วยสารเมทริกซ์นอกเซลล์และผ่านการเชื่อมพันด้วยสารเจนิทิน เป็นเวลา 14 วัน (กำลังขยาย 100 เท่า) และภาพ (35D) แสดงการยึดเกาะระหว่างเซลล์ (กำลังขยาย 10,000 เท่า)

ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้นเป็นเวลา 21 วัน พบว่าเซลล์มีการแปรสภาพของเซลล์อย่างสมบูรณ์และมีการแสดงออกของวิลโลและแสดงรอยต่อของเซลล์ (junction) อย่างเห็นได้ชัดเจนเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษกรองที่ตัดแปรรูปผิวด้วย Laminin ดังแสดงในภาพที่ 36



ภาพที่ 36 แสดงภาพถ่ายจาก SEM ของเซลล์ HT-29 ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนกระดาษที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ ชนิด Laminin (A) แสดงภาพของกระดาษกรองที่ถูกตัดแปรพื้นผิวและผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 21 วัน (B) ลักษณะรูปร่างเซลล์ HT-29 แบบสามมิติ (C) แสดงรอยเชื่อมต่อของเซลล์ดังกล่าว และ (D) แสดงวิลไล (villi) บนผิวเซลล์

1.6 ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองเป็นระยะเวลา 28 วัน

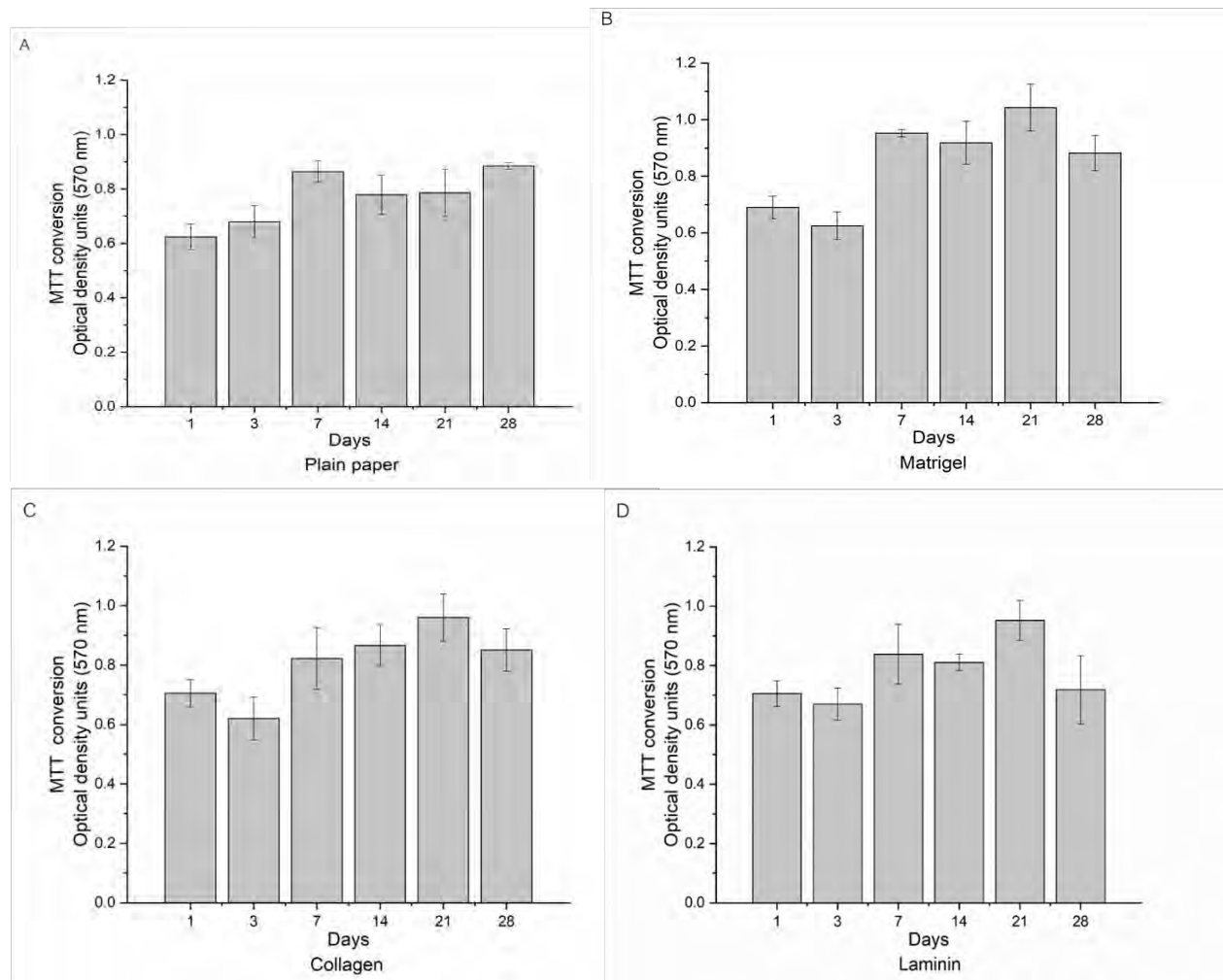
เพื่อศึกษาความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองและความสามารถของกระดาษกรองในการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ในระยะเวลาที่ยาวนาน รวมถึงเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ (cell differentiation) ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรอง เซลล์ HT-29 ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองโดยใช้ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่ 200,000 เซลล์ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 1 วัน 3 วัน 7 วัน 14 วัน 21 วัน และ 28 วัน

จากนั้นนำเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองแต่ละช่วงเวลา มาทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT จากผลการทดลองพบว่ากระดาษกรองที่ไม่ผ่านการตัดแปรรพื้นผิวสามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ โดยมีการชีวิตรอดของเซลล์ในช่วงวันที่ 1-3 และช่วง 7-28 วัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ * ($p < 0.05$) ด้วยการวิเคราะห์ด้วยความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Turkey

สำหรับกระดาษที่ตัดแปรรพื้นผิวให้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันคือ กระดาษที่ตัดแปรรพื้นผิวด้วย Matrigel เซลล์ HT-29 มีการรอดชีวิตในช่วง วันที่ 1-3 และช่วง 7-28 วัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ * ($p < 0.05$) ด้วยการวิเคราะห์ด้วยความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Turkey

กระดาษที่ตัดแปรรพื้นผิวด้วย Collagen-1 ในช่วง 1-3 วัน และช่วง 7-28 วัน เซลล์ HT-29 มีชีวิตรอดในแต่ละช่วงเวลาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ * ($p < 0.05$) ด้วยการวิเคราะห์ด้วยความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Turkey ในระหว่างช่วงเวลานั้น

สำหรับเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองที่ถูกตัดแปรรพื้นผิวด้วย Laminin ในช่วงเวลา 1-3 วัน และช่วง 7-21 วัน เซลล์มีชีวิตรอดไม่แตกต่างกัน แต่ในช่วงระยะเวลา 21 และ 28 วัน ในวันที่ 28 เซลล์มีการรอดชีวิตน้อยลงโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ * ($p < 0.05$) ด้วยการวิเคราะห์ด้วยความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Turkey แต่เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 37 B ถึง D จะเห็นได้ว่า ในวันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษกรองที่ตัดแปรรพื้นผิว ค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธี MTT ที่วัดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าลดต่ำลง ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าเริ่มมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น ทั้งนี้ควรทำการทดสอบการตายของเซลล์ด้วยวิธีที่จำเพาะเช่น การย้อมด้วย propidium iodide เพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ว่าการตายของเซลล์เกิดขึ้นจริง

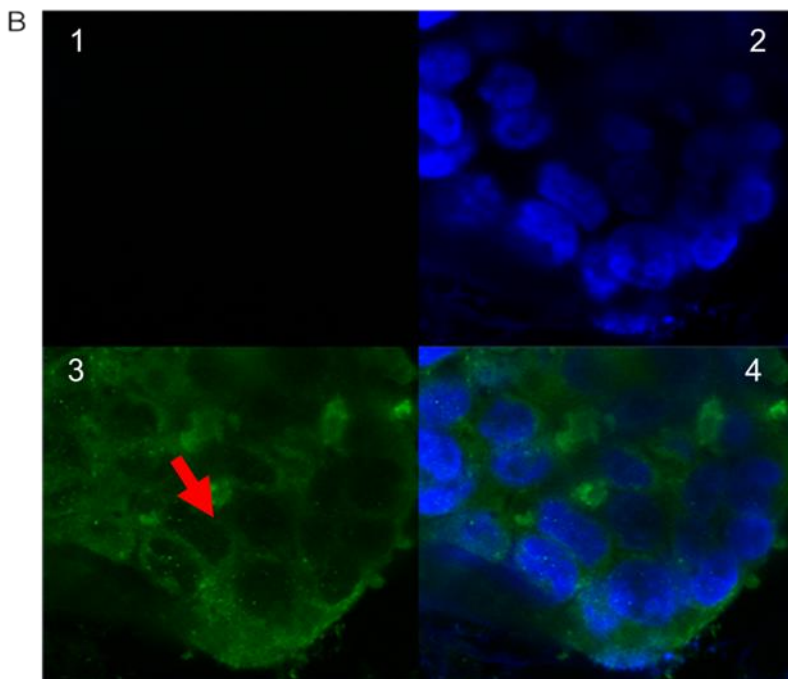
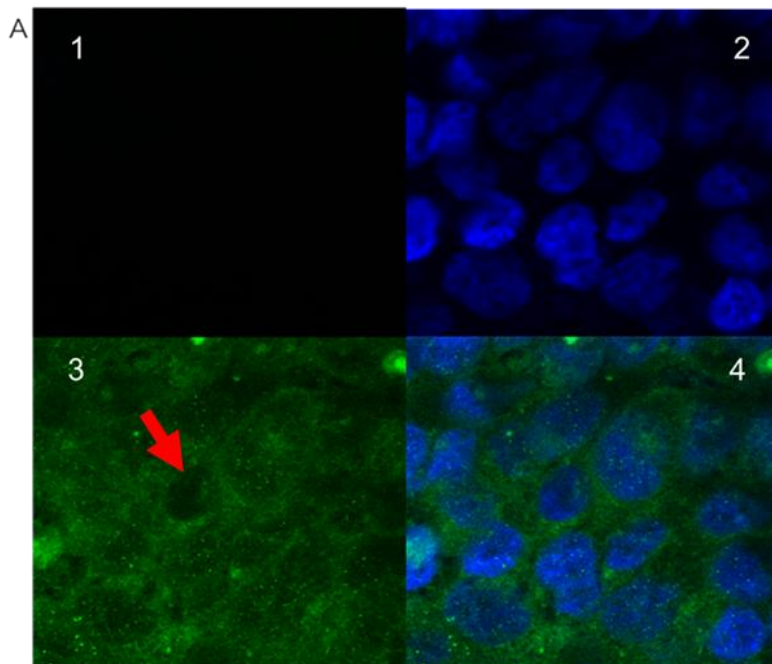


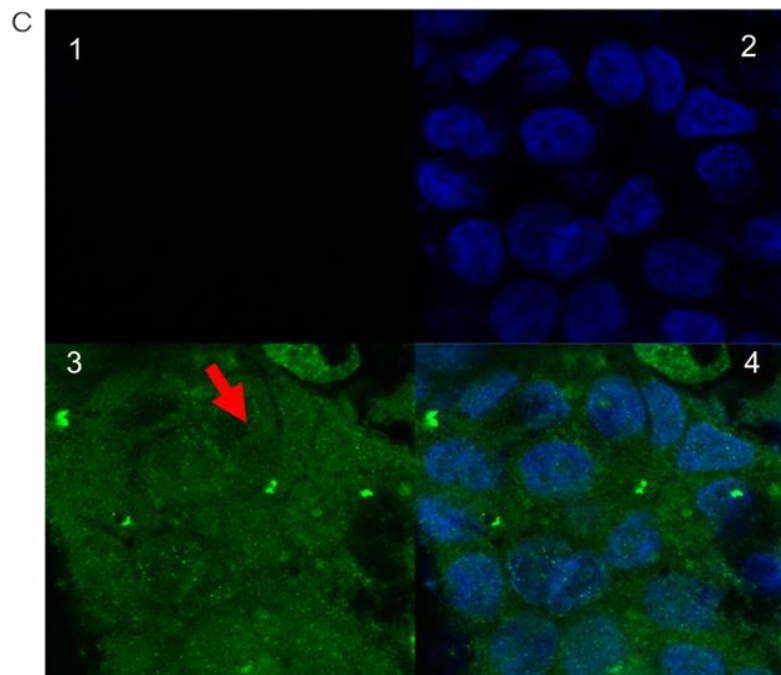
ภาพที่ 37 แสดงผลการมีชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษเมื่อถูกตัดแปรรูปด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ชนิดต่าง ๆ

1.7 ผลการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนไทต์จังก์ชัน ชนิด ZO-1 ในเซลล์ HT-29 โดยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (Immunofluorescence)

เนื่องด้วยโปรตีน zonula occludens-1 (ZO-1) เป็นโปรตีนโครงร่างที่สำคัญต่อโปรตีนไทต์จังก์ชัน ที่ทำให้เซลล์สามารถยึดเชื่อมต่อกันได้เพื่อป้องกันการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอมภายนอก หรือเพื่อป้องกันการสูญเสียของร่างกาย ดังนั้นโปรตีน ZO-1 จึงถือเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการดำรงสภาวะที่ปกติของลำไส้ ในการศึกษาวิจัยนี้เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 ของเซลล์ลำไส้ที่ถูกเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบใหม่บนกระดาษ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์

HT-29 บนกระดาษกรองที่มีการดัดแปรพื้นผิวด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ชนิด Matrigel, Collagen-1 และ Laminin เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำมาข้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ZO-1 แล้วทำการถ่ายภาพด้วยกล้อง confocal ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-29 เป็นเวลา 14 วัน บนกระดาษกรองที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ทั้งสามชนิดมีผลให้เซลล์แสดงออกโปรตีน ZO-1 ได้ โดยเซลล์ที่ถูกเลี้ยงบนกระดาษที่ถูกข้อมด้วยแอนติบอดีชนิดที่ 2 (secondary antibody) เพียงอย่างเดียวถูกใช้เป็นตัวควบคุม (control) ดังแสดงในภาพที่ 38 A1, B1 และ C1 และสีน้ำเงินแสดงถึงนิวเคลียสของเซลล์ที่ถูกข้อมด้วยสี Hoechst 33258 ดังแสดงในภาพที่ 38 A2, B2 และ C2 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 โดยสังเกตได้จากขอบเซลล์ที่ติดสีเขียวซึ่งเกิดจากแอนติบอดีชนิดแรก (primary antibody) จับกับโปรตีน ZO-1 แล้วข้อมด้วยแอนติบอดีชนิดที่ 2 (secondary antibody) ที่ติดสี Alexa 488 ดังแสดงในภาพ ที่ 38 A3, B3 และ C3 โดยภาพที่ 38 A4, B4 และ C4 เกิดจากการรวมภาพที่ 2 และ 3 ในแต่ละภาพเข้าด้วยกัน ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ HT-29 บนกระดาษสามารถทำให้เซลล์มีพัฒนาการทางชีววิทยาของเซลล์ที่เหมือนกับในร่างกาย โดยทำให้เซลล์สามารถแบ่งตัวได้แบบสามมิติและมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์ (cell-cell interaction) และ ระหว่างเซลล์กับแมทริกซ์นอกเซลล์ (cell-matrix interaction) ซึ่งโปรตีน ชนิด ZO-1 จะมีการแสดงออกบริเวณทางด้านบน (apical) ของเซลล์เพื่อเชื่อมยึดเซลล์เข้าด้วยกัน ดังนั้นจึงควรเห็นการติดสีบริเวณรอบ ๆ เซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้ จากภาพที่ 38 A3, B3 และ C3 พบการติดสีในไซโทพลาสซึมร่วมด้วยซึ่งอาจเกิดจากการติดสีแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดี หรือเกิดจากการใช้สารคงสภาพเซลล์ (fixatives) ที่อาจจะยังไม่เหมาะสมทำให้โปรตีนถูกทำลาย จึงไม่สามารถข้อมเห็นโปรตีน ZO-1 บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เป็นขอบเขตที่ชัดเจนได้





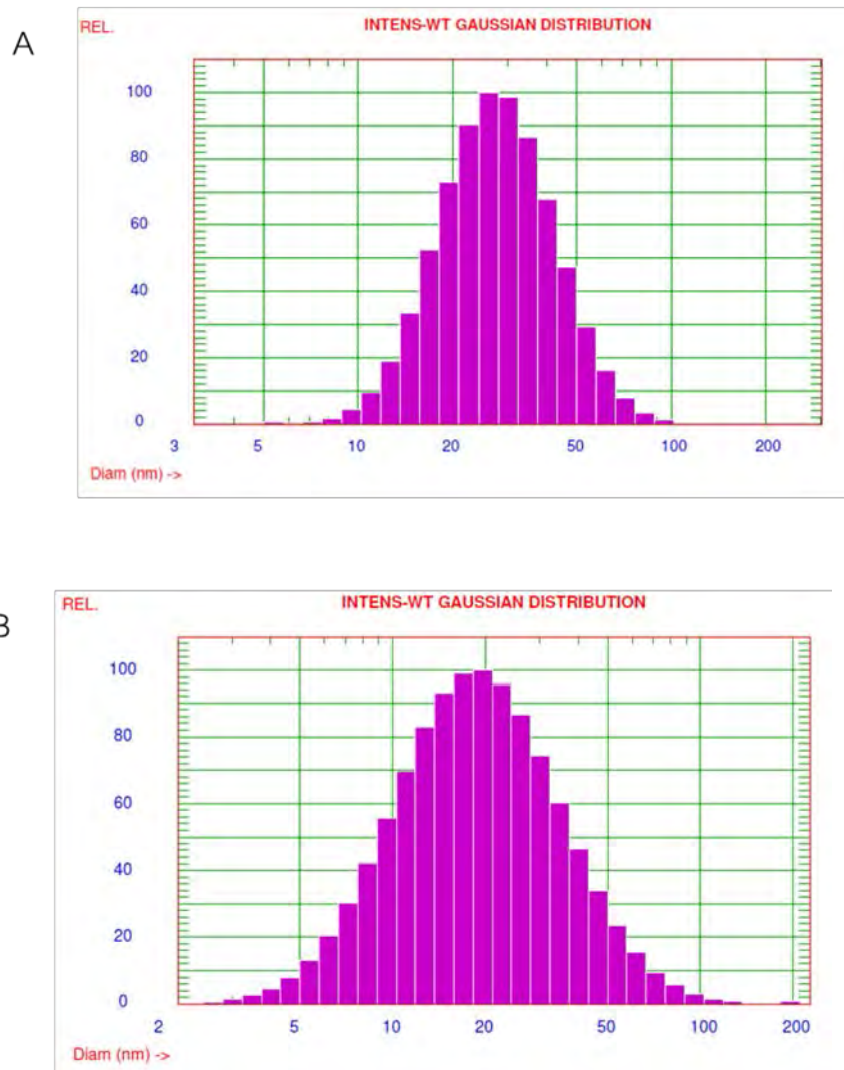
ภาพที่ 38 ภาพแสดงการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 ในเซลล์ HT-29
จากการย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ แสดงภาพเซลล์ที่ถูกเลี้ยงบนกระดาษที่ถูกดัดแปร
ด้วย

(A) Matrigel ; (B) Collagen-1 และ (C) Laminin

ส่วนที่ 2 การพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของจุลชีพก่อโรค

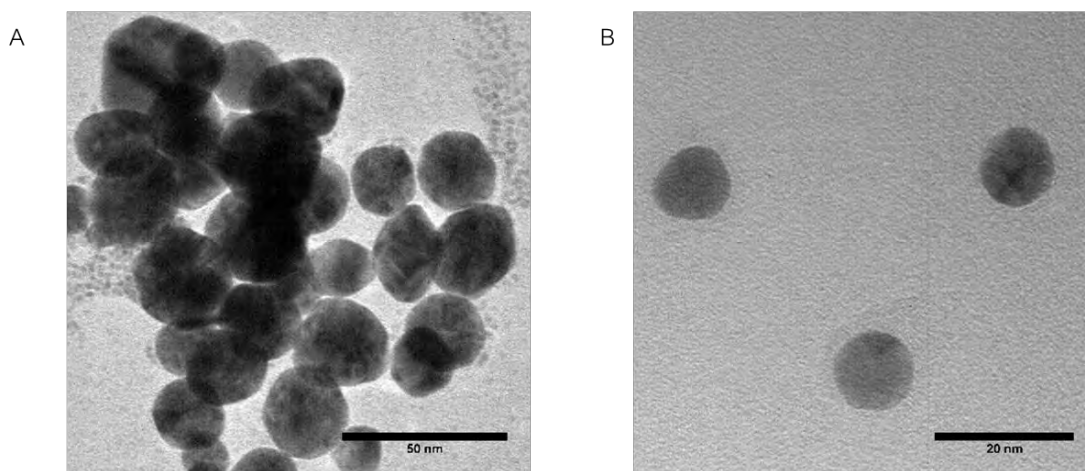
2.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ (Characterization of synthesized nanoparticles)

เพื่อสร้างจุดเชื่อมต่อระหว่างขั้วไฟฟ้าช่วยและขั้วไฟฟ้าทำงานบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนอนุภาคเงินนาโนและอนุภาคทองคำระดับนาโนถูกสังเคราะห์ดังแสดงในบทที่ 3 หัวข้อ 3.3.2.3 และ 3.3.2.4 หลังจากสังเคราะห์เรียบร้อยแล้ว ได้ศึกษาลักษณะของอนุภาคนาโนร่วมด้วย เพื่อประเมินประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ โดยตรวจวิเคราะห์ลักษณะของอนุภาคเงินนาโนด้วย เครื่อง Dynamic light scattering (DLS) โดยวัดการกระเพื่อมของแสง ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้วัดขนาดของสารในตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 2-500 นาโนเมตร ได้ โดยอนุภาคที่มีขนาดใหญ่จะทำให้เกิดการกระเพื่อมของแสงต่ำกว่าอนุภาคที่มีขนาดเล็กเนื่องจากเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า โดยผลการตรวจวิเคราะห์พบว่า อนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์ได้ มีขนาดเฉลี่ย 30.1 นาโนเมตร โดยมีค่าความเบี่ยงเบนของขนาดของอนุภาค 12.8 นาโนเมตร โดยตรวจวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 632.8 นาโนเมตร อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมินี้มีค่าความหนืดของของเหลว เท่ากับ 0.978 เซนติพอยส์ โดยการกระจายตัวของขนาดของอนุภาคเงินนาโน แสดงในภาพที่ 39 A ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคเงินนาโนพบว่า มีขนาด ประมาณ 30 นาโนเมตร ซึ่งเป็นขนาดของอนุภาคที่เหมาะสม ไม่ส่งผลต่อการตายของเชื้อจุลชีพ หากอนุภาคเงินนาโนมีขนาดเล็กเกินไป เช่น 10 นาโนเมตร จะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งไม่เหมาะสมแก่การนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ และอนุภาคทองคำระดับนาโน มีขนาดเฉลี่ย 22.6 นาโนเมตร โดยมีค่าความเบี่ยงเบนของขนาดของอนุภาค 14 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 632.8 นาโนเมตร อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส และมีค่าความหนืดของของเหลว เท่ากับ 0.93 เซนติพอยส์ โดยการกระจายตัวของขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโน แสดงในภาพที่ 39 B



ภาพที่ 39 แสดงการกระจายตัวของขนาดของอนุภาคเงินนาโน (A) และ อนุภาคทองคำระดับนาโน (B) ที่สังเคราะห์ได้

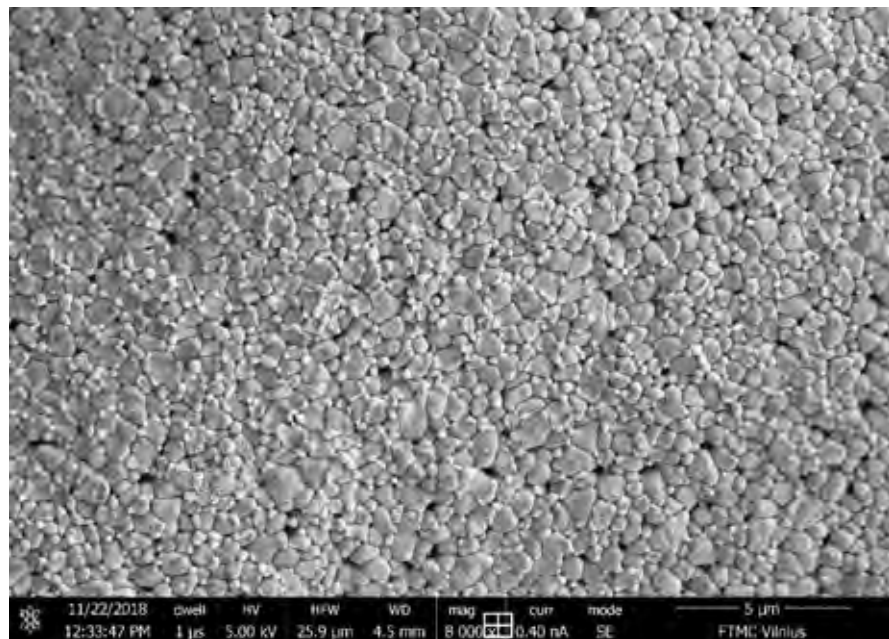
นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาลักษณะของอนุภาคเพิ่มเติมโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope) เพื่อศึกษาขนาดของอนุภาคเงินนาโนและอนุภาคทองคำระดับนาโนที่สังเคราะห์ได้ โดยจากผลการศึกษาพบว่าอนุภาคเงินระดับนาโนมีขนาดโดยประมาณ 30 นาโนเมตร และอนุภาคทองคำระดับนาโนมีขนาดโดยประมาณ 18 นาโนเมตร ซึ่งขนาดของอนุภาคเงินนาโนและอนุภาคทองคำระดับนาโนที่ได้จากการศึกษาลักษณะของอนุภาคด้วยวิธี DLS และ วิธี TEM ให้ผลของขนาดที่สอดคล้องกัน ดังแสดงในภาพที่ 40



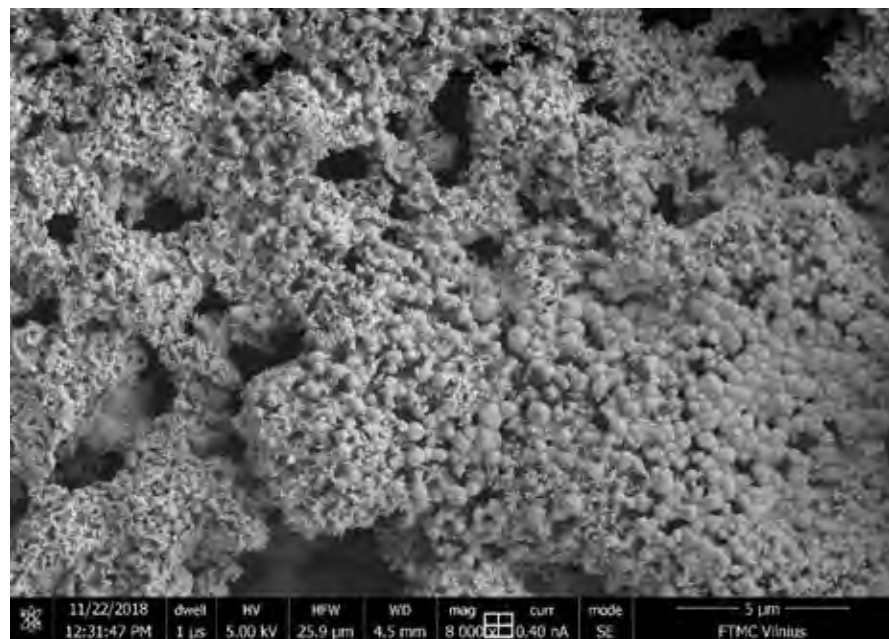
ภาพที่ 40 แสดงภาพถ่ายจาก Transmission electron microscope (TEM) ของ (A) อนุภาคเงินนาโน (silver nanoparticles) และ (B) อนุภาคทองคำระดับนาโน (gold nanoparticles)

2.2 ผลการศึกษาลักษณะเฉพาะของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิว

หลังจากทำการสร้างจุดเชื่อมต่อระหว่างขั้วไฟฟ้าช่วยและขั้วไฟฟ้าทำงานบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนแล้วนั้น ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนถูกนำมาศึกษาลักษณะของพื้นผิวบริเวณที่มีการเชื่อมต่อเพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพที่อาจส่งผลกระทบต่อการนำไฟฟ้า โดยทำการศึกษาด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) ที่กำลังขยาย 8,000 เท่า เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าพบว่า หลังจากการระเหยน้ำออกจากอนุภาคนาโนผสมแล้ว อนุภาคผสมมีการจัดเรียงตัวชิดติดกันบนผิวของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน ดังแสดงในภาพที่ 41 แต่เมื่อนำไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าด้วยวิธีทางไฟฟ้าเคมีพบว่า มีการรวมกลุ่มของอนุภาคนาโนเกิดขึ้นและทำให้เกิดเป็นโพรงช่องว่างขึ้นภายใน ดังแสดงในภาพที่ 42



ภาพที่ 41 แสดงภาพถ่ายจาก Scanning electron microscope (SEM)
ของอนุภาคนาโนที่อยู่บนขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิว

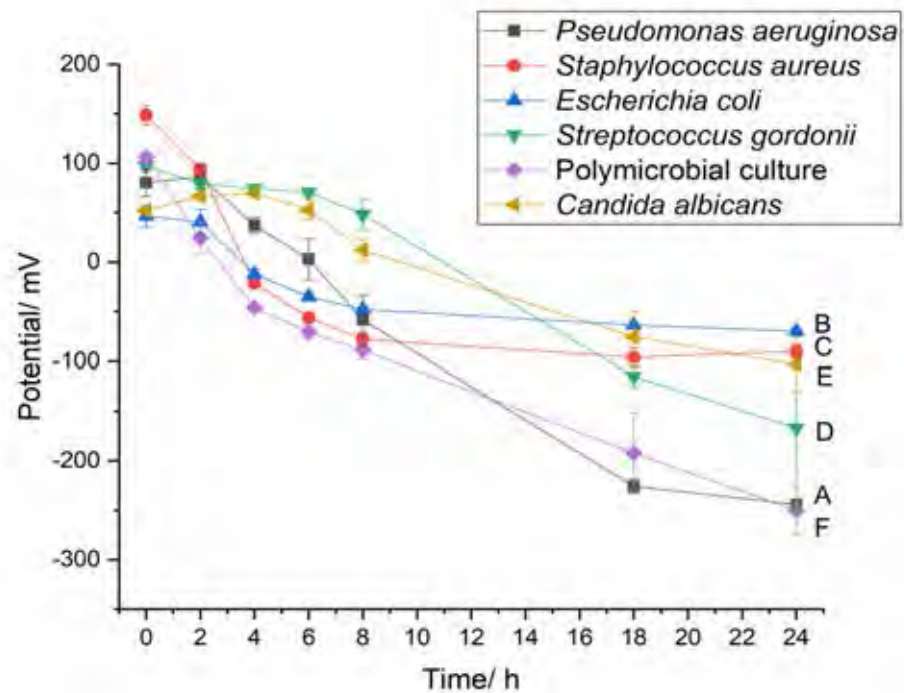


ภาพที่ 42 แสดงภาพถ่ายจาก Scanning electron microscope (SEM)
ของอนุภาคนาโนที่อยู่บนขั้วไฟฟ้าที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิวหลังการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าเคมี

2.3 ผลการศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิด (Open circuit potential: OCP)

ค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิดเกิดจากความต่างศักย์ไฟฟ้าของขั้วไฟฟ้าทำงานและขั้วไฟฟ้าอ้างอิง โดยปราศจากการจ่ายกระแสไฟฟ้าหรือความต่างศักย์จากภายนอก (load) เพื่อศึกษาว่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคสามารถเกิดกระบวนการการถ่ายทอดอิเล็กตรอนออกภายนอกเซลล์และสามารถใช้ขั้วไฟฟ้าเป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ถูกนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐาน (glassy carbon electrode) โดยบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus gordonii*, *Candida albicans* และ การเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (polymicrobial culture) ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* สามารถทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้าในวงจรเปิดได้ โดยขณะเริ่มการเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่าค่าศักย์ไฟฟ้ามีค่าเป็นบวก และเมื่อทำการบ่มเพาะเชื้อร่วมกับขั้วไฟฟ้า ค่าศักย์ไฟฟ้ามีความเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางลบ และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อกับขั้วไฟฟ้าเป็นเวลานานขึ้น ค่าศักย์ไฟฟ้าจะมีความเป็นลบมากยิ่งขึ้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถใช้ขั้วไฟฟ้าเป็นตัวรับอิเล็กตรอนที่เกิดจากการใช้สารอาหารได้ ซึ่งจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่นำมาทดสอบ สามารถเกิดกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนออกภายนอกเซลล์และสามารถใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐานเป็นตัวรับอิเล็กตรอน จึงทำให้อิเล็กตรอนถ่ายเทไปบนขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐานและเมื่อทำการวัดค่าเปรียบเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิงแล้วจึงพบว่าขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐานมีค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นลบ โดยค่าศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นมีค่าที่แตกต่างกันตามลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนออกภายนอกเซลล์ หรือคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ในการสร้างสารสื่อกลางรีดอกซ์ (redox mediator) ที่มีคุณสมบัติในการช่วยขนส่งอิเล็กตรอนออกภายนอกเซลล์ และสามารถกลับเข้าสู่เซลล์แล้วเกิดการขนส่งอิเล็กตรอนใหม่ออกนอกเซลล์ได้ ยกตัวอย่างเช่น สาร pyocyanin ที่ผลิตโดยเชื้อ *P. aeruginosa* จึงทำให้เชื้อ *P. aeruginosa* มีค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิดเป็นลบมากที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อชนิดอื่น โดยค่าศักย์ไฟฟ้าของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ 24 ชั่วโมงหลังการเพาะเลี้ยงมีค่าโดยประมาณ -244 มิลลิโวลต์ ในขณะที่เชื้อ *E. coli* มีค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิดประมาณ -70 มิลลิโวลต์ ค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิดของเชื้อ *S. aureus* ประมาณ -90 มิลลิโวลต์ และ ประมาณ -170 มิลลิโวลต์ สำหรับเชื้อ *S. gordonii* และ สำหรับเชื้อ *C. albicans* มีค่า

ศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิดโดยประมาณ -103 มิลลิโวลต์ โดยภาพที่ 43 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิดที่วัดได้จากเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

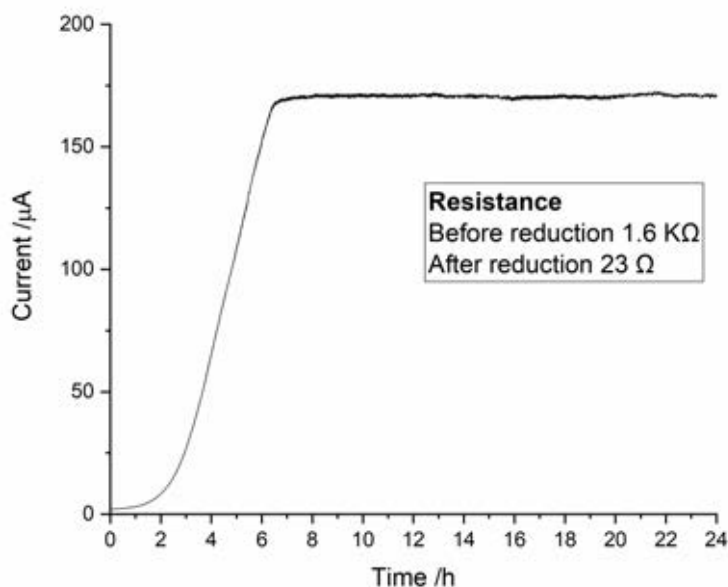


ภาพที่ 43 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อและค่าศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้น เมื่อทำการวัดค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิดของขั้วสำหรับไบโอฟิล์มและขั้วไฟฟ้าอ้างอิง โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B), *S. aureus* (C), *S. gordonii* (D), *C. albicans* (E) และการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกันของเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* (F)

2.4 ผลการศึกษาความสามารถในการใช้อิเล็กตรอนจากไบโอฟิล์มเพื่อรีดิวซ์อนุภาคเงินนาโนที่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าลดลง

อนุภาคเงินนาโนสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันได้เมื่อมีการรับหรือจ่ายอิเล็กตรอน ซึ่งทำให้ความสามารถในการนำไฟฟ้าของอนุภาคเงินนาโนเปลี่ยนแปลงไป โดยเมื่ออนุภาคเงินนาโนเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนเกิดเป็นซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) ซึ่ง Ag^+ สามารถจับกับคลอไรด์ไอออน (Cl^-) ที่อยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เกิดเป็นเกลือเงิน ($AgCl$) ซึ่งชั้นของเกลือเงินที่เกิดขึ้นสามารถขัดขวางการขนส่งอิเล็กตรอน ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้ประยุกต์ใช้ประโยชน์จากปฏิกิริยารีดอกซ์ของอนุภาคเงินนาโนสำหรับใช้เป็นส่วนในการติดตามการเจริญ

ของไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรค โดยทำการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนเพื่อนำมาใช้ในการตัดแปรพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน โดยใช้อนุภาคเงินนาโนเชื่อมระหว่างขั้วไฟฟ้าทำงานและขั้วไฟฟ้าช่วย แล้วทำการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการนำไฟฟ้าของอนุภาคเงินนาโนโดยการใช้กระบวนการทางเคมีไฟฟ้าด้วยเทคนิค Chronoamperometry เปลี่ยนจาก Ag^0 ที่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าได้ดีไปเป็นซิลเวอร์ไอออน Ag^+ ที่จะเข้าจับกับคลอไรด์ไอออน (Cl^-) ซึ่งจะเกิดเป็นเกลือเงินที่ไม่นำไฟฟ้าทำให้ค่าความต้านทานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนมีค่าสูงขึ้นมา จากนั้นใช้กระแสที่เกิดจากขั้วไฟฟ้าที่มีไบโอฟิล์มของจุลชีพก่อโรคไหลผ่านชั้นของเกลือเงินแล้วเกิดปฏิกิริยารีดักชัน จากนั้นอิเล็กตรอนจะไหลข้ามไปยังขั้วไฟฟ้าทำงานแล้วเข้าสู่เครื่อง Potentiostat แล้ววิเคราะห์ปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ไหลผ่าน โดยจากผลการวิจัยพบว่า ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่มีชั้นของเกลือเงินเป็นส่วนตรวจวัด กระแสไฟฟ้าจะถูกวัดอยู่ที่ค่าประมาณ 0 ไมโครแอมแปร์ (μA) เนื่องจากขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนมีค่าความต้านทานสูง แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลชีพและระยะผ่านไปจนเข้าสู่ช่วงระยะการแบ่งตัว (log phase of growth) จะพบว่ากระแสไฟฟ้าที่ถูกวัดจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากมีการผลิตอิเล็กตรอนออกมามากขึ้นแล้วอิเล็กตรอนถูกนำไปใช้ในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของเกลือเงินกลับกลายเป็นอนุภาคเงินนาโนที่นำไฟฟ้าได้ จึงทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ดังกล่าว และเมื่อวัดค่าความต้านทานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนหลังเสร็จสิ้นการทดลองพบว่า ค่าความต้านทานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนลดลงจากระดับกิโลโอห์ม ($K\Omega$) เหลือเพียงหน่วยโอห์ม (Ω) ดังแสดงในภาพที่ 44 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอิเล็กตรอนที่เกิดจากไบโอฟิล์มของเชื้อจุลชีพก่อโรคสามารถนำมาใช้ในการรีดิวซ์เกลือเงินที่เป็นส่วนสำหรับตรวจวัดปฏิกิริยาให้กลับเป็นอนุภาคเงินที่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าได้



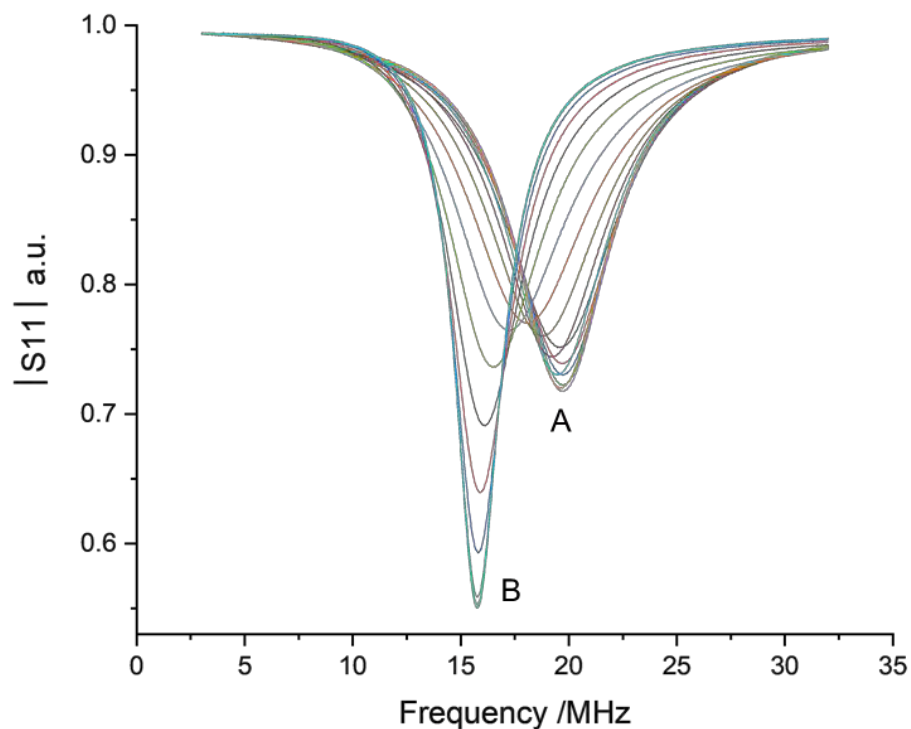
ภาพที่ 44 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น

จากการใช้อิเล็กทรอนิกส์จากไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงร่วมกัน (Polymicrobial) ในการรีดิวซ์ซิลเวอร์คลอไรด์ไปเป็นซิลเวอร์

2.5 ผลการทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยการตรวจวัดแบบไร้สาย

ในปัจจุบันโครงข่ายของสรรพสิ่ง หรือ Internet of Things (IoT) เป็นเรื่องที่กำลังได้รับความสนใจ เนื่องจาก IoT สามารถใช้เชื่อมต่อกับอุปกรณ์ได้หลากหลายชนิด เช่น คอมพิวเตอร์ โทรศัพท์มือถือ อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ และเซ็นเซอร์ ทำให้สามารถติดต่อสื่อสารหรือทำงานร่วมกันได้อย่างสะดวกรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้ผู้วิจัยได้สังเกตเห็นประโยชน์ของเทคโนโลยีการสื่อสารแบบไร้สาย เช่น การใช้งานเทคโนโลยีไร้สายอาร์เอฟไอดี (Radio frequency identification: RFID) ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยทำการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอาร์เอฟไอดีด้วยการเชื่อมเสาอากาศของ RFID tag เข้ากับขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิว และทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อให้เกิดเป็นซิลเวอร์คลอไรด์ที่มีคุณสมบัติความนำไฟฟ้าได้ไม่ดี ทำให้ค่าความต้านทาน (Impedance) ของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนมีค่าสูง และเมื่อทำการสื่อสารกับเครื่องอ่านอาร์เอฟไอดี (RFID reader) จะพบว่ามีค่าการตอบสนองที่ค่าความถี่สูง และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *P. aeruginosa* และ *S. aureus* เชื้อจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตและใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐานเป็นตัวรับ

อิเล็กตรอน แล้วอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะไหลผ่านชั้นของซิลเวอร์คลอไรด์แล้วเกิดการรีดิวซ์ซิลเวอร์คลอไรด์ให้กลายเป็นซิลเวอร์ ซึ่งมีความสามารถในการนำไฟฟ้าสูงขึ้น และปฏิกิริยารีดักชันที่เกิดขึ้นส่งผลให้ค่าความต้านทานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนลดต่ำลง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าความถี่ ดังแสดงในภาพที่ 45 ซึ่งสามารถตรวจวัดได้แบบไร้สายด้วยเครื่องอ่านอาร์เอฟไอดี ดังนั้นจึงสามารถนำเทคโนโลยีอาร์เอฟไอดีเพื่อใช้ในการตรวจติดตามการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแบบไร้สายได้ โดย จุด A แสดงความถี่ ณ จุดเริ่มต้นของการทดลองที่มีความต้านทานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนสูง และ จุด B แสดงความถี่หลังเกิดการรีดิวซ์ซิลเวอร์คลอไรด์ ทำให้ความต้านทานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนลดลง แต่ละเส้นแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงความถี่ของเสาอากาศ RFID เมื่อเวลาผ่านไป อันเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงความต้านทานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ส่งผลให้เกิดความเปลี่ยนแปลงความต้านทานของเสาอากาศ RFID ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้แบบทันทีและต่อเนื่อง



ภาพที่ 45 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความถี่ (Frequency) และ ค่าการลดทอนสัญญาณ (attenuation unit)

ของการติดตามการเจริญของไบโอฟิล์มเชื้อร่วมกันของเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ด้วยอาร์เอฟไอดี

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาษที่มีการตัดแปรรูปผิว และพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของจุลชีพก่อโรค โดยการพัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาษที่มีการตัดแปรรูปผิว กระดาษถูกนำมาใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (scaffold) และใช้เทคนิคการพิมพ์ด้วยหมึกแว็กซ์เพื่อสร้างขอบเขตและกำหนดพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ รวมถึงได้ทำการตัดแปรรูปผิวของกระดาษกรองด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ เพื่อช่วยสนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์บนเส้นใยของกระดาษกรองและเพื่อช่วยในด้านการพัฒนาทางชีววิทยาของเซลล์ ทั้งในด้านรูปร่างของเซลล์ (cell morphology) การเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation) และการแปรสภาพของเซลล์ (cell differentiation) นอกจากนี้ยังศึกษาคุณสมบัติของสารเจนิปิน (genipin) และ กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ในการเชื่อมพันธะของโปรตีนแมทริกซ์นอกเซลล์และความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยในการทดลอง ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ HT-29 บนกระดาษกรองแล้ววัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT และศึกษาการแสดงออกของเซลล์ รวมถึงการแปรสภาพของเซลล์ด้วยเทคนิค cell imaging โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน zonula occludens-1 (ZO-1) เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว และใช้เทคนิคการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy: SEM) เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์และการแปรสภาพของเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษ

สำหรับการพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของจุลชีพก่อโรค อาศัยหลักการการขนส่งอิเล็กตรอนออกนอกเซลล์ (extracellular electron transfer) ของเชื้อจุลชีพ ร่วมกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันของอนุภาคเงินนาโน โดยเมื่อมีการเจริญของเชื้อจุลชีพก่อโรค เชื้อจุลชีพก่อโรคจะใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐาน (glassy carbon electrode) เพื่อการยึดเกาะและสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐาน และใช้ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐานเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ เนื่องจากสภาวะในไบโอฟิล์มมีปริมาณของออกซิเจนต่ำ ดังนั้นจึงสามารถใช้ประโยชน์จากการขนส่งอิเล็กตรอนออกนอก

เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเพื่อใช้ในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของอนุภาคเงินนาโนที่อยู่ในรูปของซิลเวอร์คลอไรด์ (AgCl) ซึ่งมีความสามารถในการนำไฟฟ้าต่ำ ให้กลายเป็นอนุภาคเงินนาโน (Ag^0) ที่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าได้ดี และด้วยการเกิดรีดักชันของซิลเวอร์คลอไรด์ไปเป็นซิลเวอร์นี้เองสามารถใช้ประโยชน์โดยการนำขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน (screen-printed electrode) มาดัดแปรพื้นผิวด้วยอนุภาคนาโนผสมระหว่างอนุภาคเงินนาโน (AgNPs) และ อนุภาคทองคำระดับนาโน (AuNPs) โดยทำให้เกิดการเชื่อมต่อระหว่างขั้วไฟฟ้าช่วย (counter electrode) และขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode) เพื่อใช้อิเล็กตรอนที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในการรีดิวซ์อนุภาคเงินนาโนในรูป AgCl ให้เปลี่ยนแปลงเป็น Ag^0 ซึ่งขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนนี้ได้เชื่อมต่อกับเสาอากาศของ RFID tag เมื่อเกิดความเปลี่ยนแปลงความต้านทาน (impedance) ของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความต้านทานของเสาอากาศของ RFID tag ซึ่งสามารถอ่านค่าความถี่ที่เปลี่ยนแปลงไปโดยใช้เครื่องวิเคราะห์สัญญาณ (network analyzer) โดยเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความถี่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นถึงการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ที่สามารถติดตามได้แบบไร้สายจากการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีอาร์เอฟไอดี (Radio frequency identification: RFID)

จากผลการทดลองการพัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาษที่มีการดัดแปรพื้นผิวพบว่า กระดาษกรอง Whatman No.1 ที่มีขนาดรูพรุน 11 ไมโครเมตร เป็นชนิดของกระดาษกรองที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ HT-29 เนื่องจากขนาดของรูพรุนมีความเหมาะสมในการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์ HT-29 ที่มีขนาดโดยประมาณ 10 ไมโครเมตร และความหนาแน่นของเซลล์ที่ใช้ในการทดลองคือ 200,000 เซลล์ ทั้งนี้ควรทำการเพาะเซลล์ที่มีความหนาแน่นเซลล์อื่นด้วย เช่น 50,000 100,000 และ 150,000 เซลล์ เนื่องจากในการทดลองทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 28 วัน ดังนั้นการศึกษาจำนวนเซลล์ที่มีความหนาแน่นอื่น ๆ ควบคู่ไปด้วย อาจทำให้ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น เพราะการเริ่มต้นเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์จำนวนมากอาจทำให้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงไม่เพียงพอต่อจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น จึงทำให้การเจริญของเซลล์เป็นไปได้อย่างจำกัด

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารเมทริกซ์นอกเซลล์ในการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์พบว่า เมื่อทำการดัดแปรพื้นผิวของกระดาษด้วยสารเมทริกซ์นอกเซลล์ที่แตกต่างกันสามชนิด ได้แก่ Matrigel Collagen-1 และ Laminin จากผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยสารเมทริกซ์นอกเซลล์ชนิด Matrigel ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตได้มากที่สุดเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบ

กับกระดาษที่ไม่ได้ผ่านการตัดแปรพื้นผิว และกระดาษที่ตัดแปรพื้นผิวด้วย Collagen-1 และ Laminin

จากการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของสารเชื่อมพันธะต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์พบว่า สารเจนิพิน ซึ่งเป็นสารสกัดจาก *Gardenia jasminoides* หรือดอกพุด มีการใช้งานอย่างแพร่หลายในการใช้งานเพื่อเชื่อมพันธะของโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ (112-114) จากผลการทดลองพบว่า สารเจนิพินมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงกว่าสารกลูตาไรลดีไฮด์ โดยเซลล์ HT-29 ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองที่ตัดแปรพื้นผิวและใช้สารเจนิพินในการเชื่อมพันธะของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ พบว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการใช้สารกลูตาไรลดีไฮด์ในการเชื่อมพันธะของสารแมทริกซ์นอกเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษกรองที่ตัดแปรพื้นผิวและใช้สารเจนิพินในการเชื่อมพันธะของสารแมทริกซ์นอกเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 100 – 112.8 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษและใช้สารกลูตาไรลดีไฮด์ในการเชื่อมพันธะสารแมทริกซ์นอกเซลล์อยู่ที่ 1.1 – 67.3 เปอร์เซ็นต์ โดยความเข้มข้นของสารเจนิพินที่ 0.1% เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้งาน แต่เมื่อทำการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษที่ตัดแปรพื้นผิวและใช้สารเชื่อมพันธะในการเชื่อมพันธะสารแมทริกซ์นอกเซลล์พบว่า เซลล์มีรูปร่างแบน ไม่สามารถแบ่งตัวได้แบบสามมิติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ryan และคณะ

ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษกรองที่ตัดแปรพื้นผิวเป็นเวลา 28 วัน พบว่า เซลล์สามารถมีชีวิตรอดได้บนกระดาษ จากผลการทดสอบ MTT แสดงให้เห็นว่า ในวันที่ 1 – 3 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์มีการเจริญเติบโตได้ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 21 วัน พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และ เซลล์มีการรอดชีวิตสูงสุดเมื่อทำการทดลองด้วยวิธี MTT ในวันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง ค่าการดูดกลืนแสงด้วยการทดสอบด้วยวิธี MTT เริ่มลดลง แสดงให้เห็นว่าเริ่มมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น เพื่อพิสูจน์ว่ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้นจริง ควรทำการทดสอบเพิ่มเติมด้วยการย้อม Propidium iodide (PI) และ Calcein-AM เพื่อยืนยันเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตาย เนื่องจากเซลล์ที่ตายแล้ว ผนังเซลล์จะเสียคุณสมบัติในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน ทำให้สาร PI สามารถผ่านเข้าไปจับกับ DNA ได้ ดังนั้นเซลล์ที่มีชีวิตจะย้อมติดสีเขียวจากการทำงานของเอนไซม์เอสเทอเรสภายในเซลล์ (intracellular esterase) เพื่อเปลี่ยน

Calcein AM ซึ่งไม่เรืองแสงให้กลายเป็น Calcein ที่สามารถเรืองแสงได้ เซลล์ตายจะย้อมติดสีแดงจากการย้อมด้วย PI

นอกจากนี้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation) และการแปรสภาพของเซลล์ (cell differentiation) ด้วยเทคนิคการถ่ายภาพเซลล์ (cell imaging) พบว่า เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษที่มีการตัดแปรรูปผิว โดยการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 อาศัยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ (immunofluorescence) โดยบ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษที่ตัดแปรรูปผิวกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ZO-1 แล้วใช้แอนติบอดีชนิดที่สอง (secondary antibody) ที่ติดกับสารเรืองแสงชนิด Alexa 488 จากนั้นศึกษาการแสดงออกด้วยกล้อง confocal จากผลการศึกษาพบว่า เซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงบนกระดาษที่ตัดแปรรูปผิวเป็นเวลา 14 วัน เซลล์มีการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อโครงสร้างของไทต์จังก์ชัน ทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะติดกันได้ เพื่อป้องกันการบุกรุกของจุลชีพก่อโรคและสิ่งแปลกปลอมภายนอก ร่างกาย และจากการศึกษาการแปรสภาพของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) พบว่า เซลล์มีรูปร่าง (morphology) แบบสามมิติ และมีการแปรสภาพของเซลล์ (cell differentiation) โดยสังเกตจากการแสดงออกของวิลไล (villi) บนผิวเซลล์ และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษที่ตัดแปรรูปผิวด้วยสารเมทริกซ์นอกเซลล์ชนิด Laminin ส่งผลให้เซลล์มีการแสดงออกของวิลไลบนพื้นผิวมากที่สุด แสดงให้เห็นว่าเซลล์เกิดการแปรสภาพของเซลล์ขึ้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบสามมิติในกระดาษ ซึ่งลักษณะการแสดงออกของเซลล์มีความคล้ายคลึงกับเซลล์ enterocytes ของลำไส้เล็กที่เกิดขึ้นในร่างกาย

สำหรับผลศึกษาการพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของจุลชีพก่อโรค พบว่าเชื้อจุลชีพก่อโรคที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus gordonii*, *Candida albicans* และ การเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (polymicrobial culture) ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* สามารถทำให้เกิดค่าศักย์ไฟฟ้าที่เป็นลบได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับขั้วไฟฟ้าสำหรับการเกิดไบโอฟิล์ม (biofilm hosting electrode) และวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Ag/AgCl reference electrode) แสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลชีพก่อโรคสามารถใช้ขั้วไฟฟ้าเป็นตัวรับอิเล็กตรอนและพัฒนาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เป็นลบได้ โดยเชื้อ *P. aeruginosa* ให้ค่าศักย์ไฟฟ้า -244 mV เชื้อ *S. aureus* ให้ค่าศักย์ไฟฟ้า -90 mV เชื้อ *E. coli*

ให้ค่าศักย์ไฟฟ้า -69.7 mV เชื้อ *S. gordonii* ให้ค่าศักย์ไฟฟ้า -166.8 mV เชื้อ *C. albicans* ให้ค่าศักย์ไฟฟ้า -103.1 mV และ การเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกันของเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าประมาณ -250 mV และเมื่อทำการศึกษาการใช้อิเล็กตรอนที่เกิดจากจุลชีพในการรีดิวซ์ซิลเวอร์คลอไรด์ซึ่งมีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าไม่ดี ด้วยเทคนิค Chronoamperometry พบว่าอิเล็กตรอนจากเชื้อจุลชีพสามารถใช้ในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของซิลเวอร์คลอไรด์ให้กลับไปเป็นซิลเวอร์ที่ความสามารถนำไฟฟ้าได้ดี ซึ่งติดตามได้จากค่ากระแสไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลชีพพร้อมกับขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่ดัดแปรพื้นผิว

สำหรับการตรวจติดตามการของเชื้อจุลชีพก่อโรค โดยใช้เทคโนโลยีอาร์เอฟไอดี (RFID) ร่วมกับความสามารถในการขนส่งอิเล็กตรอนออกนอกเซลล์ของเชื้อจุลชีพ และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันของอนุภาคเงินนาโน โดยเมื่ออนุภาคเงินนาโนถูกออกซิไดส์ (oxidized) ไปเป็นซิลเวอร์คลอไรด์ ส่งผลให้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนมีความต้านทาน (impedance) ที่สูงขึ้น แต่เมื่อมีการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลชีพก่อโรค เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปยังขั้วไฟฟ้าและอิเล็กตรอนนี้ถูกใช้ในการรีดิวซ์ซิลเวอร์คลอไรด์ให้เปลี่ยนเป็นซิลเวอร์ที่มีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดีจึงทำให้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนมีค่าความต้านทานลดต่ำลง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความต้านทานที่เกิดขึ้นสามารถทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงความถี่ของเสาอากาศของ RFID tag ที่สามารถติดตามได้แบบไร้สายด้วยการอ่านด้วยเครื่องวิเคราะห์สัญญาณ ดังนั้นเมื่อมีการเจริญของเชื้อจุลชีพก่อโรค ทำให้ความถี่เปลี่ยนแปลงจากความถี่สูงไปยังความถี่ต่ำโดยแปรผันตามความต้านทานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน ซึ่งส่งผลให้ความต้านทานของเสาอากาศ RFID tag ลดต่ำลงไปด้วย จึงทำให้สามารถตรวจติดตามการเจริญของเชื้อจุลชีพก่อโรคได้แบบไร้สาย

อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษาการพัฒนาแบบจำลองเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาศที่มีการดัดแปรพื้นผิวและพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของจุลชีพก่อโรค เป็นการพัฒนาแบบองค์รวมสำหรับการศึกษากลไกการเกิดโรคติดเชื้อ รวมถึงการติดตามการเจริญของเชื้อจุลชีพก่อโรค เพื่อพัฒนาการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติสำหรับใช้ในการศึกษากลไกการเกิดโรคและการพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์แบบไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของเชื้อจุลชีพเพื่อประโยชน์ในการเฝ้าระวังการติดเชื้อและการแพร่ระบาดของเชื้อโรค รวมถึงป้องกันการเสียชีวิตเนื่องด้วยการติดเชื้อ โดยโรคอุจจาระร่วง (diarrhea) จัดเป็นโรคติดเชื้ออันดับต้น ๆ ที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิต

ของประชากรทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนา (115) อีกทั้งการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติบนกระดาษสามารถนำไปใช้ในการพัฒนายาชนิดใหม่เพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อได้ในอนาคต โดยในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาษที่มีการดัดแปรพื้นผิว โดยใช้กระดาษกรองเป็นโครงร่างในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (scaffold) เนื่องด้วยคุณสมบัติเฉพาะตัวของกระดาษกรอง ประกอบด้วย เส้นใยที่สานกันเป็นร่างแหสามมิติ ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของกระดาษที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ คุณสมบัติในการดูดซับของเหลว กระดาษสามารถซ้อนกันเป็นชั้น ๆ เพื่อจำกัดปริมาณอาหารและการซึมผ่านของแก๊ส ทำให้สามารถใช้กระดาษในการจำลองสภาวะการเกิดโรคได้ เช่น สภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (16) อีกทั้งกระดาษยังมีราคาถูก และการใช้กระดาษในการเพาะเลี้ยงเซลล์ยังสามารถช่วยลดปริมาณการใช้สารแมทริกซ์นอกเซลล์ลงได้ถึง 25 ถึง 50 เท่า คือใช้สารแมทริกซ์นอกเซลล์เพียง 2 ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติโดยการเคลือบสารแมทริกซ์นอกเซลล์บนภาชนะเลี้ยงเซลล์ (ECM coating) และใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์เพียง 200 ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 6 well plate จึงลดปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ถึง 15 ถึง 25 เท่า ซึ่งช่วยลดต้นทุนในการศึกษาวิจัยได้อย่างมาก อีกทั้งกระดาษยังประหยัดพื้นที่ในการจัดเก็บและสามารถเผ่ากำจัดทำลายโดยไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และข้อดีของการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษคือ เซลล์สามารถเจริญได้แบบสามมิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบดั้งเดิม โดยเซลล์มีลักษณะการเจริญในรูปแบบสามมิติ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Jing Jing Fu และคณะ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากบนกระดาษและเซลล์สามารถแสดงลักษณะรูปร่างเซลล์แบบสามมิติหลังจากการเพาะเลี้ยง 5-10 วัน (79) ในการวิจัยนี้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 200,000 เซลล์ลงบนกระดาษกรองที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิวด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์ ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Matrigel Collagen-1 และ Laminin โดยพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงเซลล์มีขนาด 12.56 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นการเริ่มต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยปริมาณเซลล์จำนวนมากอาจส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์เป็นไปได้อย่างจำกัดเนื่องด้วยขนาดของพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงเซลล์มีจำกัด จึงควรทำการศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยเพิ่มปัจจัยในเรื่องของเวลาที่เกี่ยวข้อง โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นเซลล์ต่าง ๆ เช่น ที่จำนวนเซลล์ 50,000 เซลล์ 100,000 เซลล์ และ 150,000 เซลล์ ร่วมด้วย และ

ติดตามการเจริญของเซลล์ รวมถึงการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้น

เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ต่อการเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ การเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษที่ดัดแปรพื้นผิวใช้สารแมทริกซ์นอกเซลล์ปริมาณ 2 ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติด้วยวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน เช่น การเคลือบสารแมทริกซ์นอกเซลล์บน 96 well plate ใช้สารแมทริกซ์นอกเซลล์ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และ การเคลือบสารแมทริกซ์นอกเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงหรือภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture flask) ยิ่งต้องใช้ปริมาณของสารแมทริกซ์นอกเซลล์มากขึ้นตามขนาดพื้นที่ผิวของภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยใช้ปริมาณสารแมทริกซ์นอกเซลล์ตั้งแต่ 1 มิลลิลิตร จนถึง 22 มิลลิลิตร (116) ซึ่งสารแมทริกซ์นอกเซลล์มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์ (adhesion) และการแสดงออกทางรูปร่าง (cell morphology) การสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell communication) การเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation) และ การตายของเซลล์ (cell death) จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษที่นำเสนอในงานวิจัยนี้มีการใช้สารแมทริกซ์นอกเซลล์ปริมาณน้อย ทำให้ประหยัดต้นทุนในการศึกษาวิจัยได้เป็นอย่างมาก โดยที่เซลล์ยังสามารถมีพัฒนาการทางชีวภาพของเซลล์และสามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวได้แบบสามมิติ ไม่แตกต่างจากการเจริญเติบโตในภาชนะเลี้ยงเซลล์สามมิติแบบดั้งเดิม

อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษที่ดัดแปรพื้นผิวและใช้สารเชื่อมพันธะในการเชื่อมพันธะของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ ผลการทดลองพบว่าการใช้สารเจนิพินเชื่อมพันธะของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ พบว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าการใช้สารกลูตารัลดีไฮด์ในการเชื่อมพันธะ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำโดย Gang Yang และคณะ (117) โดยทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเชื่อมพันธะ 4 ชนิด ได้แก่ glutaraldehyde, genipin, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide (EDC) และ microbial transglutaminase (mTG) โดยจากการเปรียบเทียบผลการรอดชีวิตของเซลล์ระหว่าง สารเจนิพินและ กลูตารัลดีไฮด์ พบว่า เซลล์ Adipose tissue-derived stem cells มีการเจริญเติบโตได้ดีในโครงเลี้ยงเซลล์ที่เชื่อมพันธะด้วยสารเจนิพิน โดยสารเจนิพินมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่าสารอัลดีไฮด์ (aldehyde) และ อีพ็อกซี (epoxy) กว่า 1000 เท่า (118) เนื่องจากเจนิพินพบได้ตามธรรมชาติจากดอกไม้ นอกจากนี้ยังมีความเป็นพิษต่ำกว่า กลูตารัลดีไฮด์ มีค่า LD50 ประมาณ 382 mg/kg เมื่อทดสอบในหนูทดลอง

แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษที่ใช้สารเชื่อมพันธะดังกล่าวพบว่า เซลล์มีลักษณะแบนและมีการแปรสภาพของเซลล์ (cell differentiation) ได้ไม่ดีนัก เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษที่ตัดแปรรูปผิวอย่างเดียวกันไม่ได้ใช้สารเชื่อมพันธะในการเชื่อมพันธะสารแมทริกซ์นอกเซลล์ ซึ่งอาจอธิบายได้จาก เมื่อมีการเชื่อมพันธะระหว่างสารแมทริกซ์นอกเซลล์แล้วอาจทำให้เกิดการอุดตันจากสารแมทริกซ์นอกเซลล์ในรูพรุนของกระดาษจึงทำให้เซลล์ไม่สามารถแทรกตัวเข้าไปแล้วเกิดการแบ่งตัวแบบสามมิติได้ และการเชื่อมพันธะของสารแมทริกซ์นอกเซลล์ทำให้สารแมทริกซ์นอกเซลล์มีความแข็งมากขึ้น (matrix stiffness) จึงส่งผลให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครมาทินและเกิดการปรับเปลี่ยนระบบเส้นใยภายในเซลล์ (cytoskeleton) ดังการศึกษาของ Ryan และคณะ (119) ดังนั้นการเชื่อมพันธะระหว่างสารแมทริกซ์นอกเซลล์ในงานวิจัยนี้ จึงไม่เหมาะสม จากผลการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานาน 28 วัน เพื่อศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนกระดาษที่ตัดแปรรูปผิวเป็นเวลา 21 วัน (ไม่ได้เชื่อมพันธะระหว่างสารแมทริกซ์นอกเซลล์) มีการแสดงลักษณะของเซลล์ที่มีเหมือน enterocytes ที่พบในลำไส้เล็ก โดยพบการเจริญของวิลโลสทางด้านบนของเซลล์ และมีรอยต่อของเซลล์ (tight junction) ที่ชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำโดย Esther Cohen และคณะ (120) แต่เมื่อพิจารณาการมีชีวิตรอดของเซลล์ในช่วงวันที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่าการเพิ่มขึ้นของเซลล์ไม่ได้แตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากการใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นปริมาณมากในการเพาะเลี้ยง ในพื้นที่จำกัด จึงทำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวเมื่อสัมผัสเซลล์ด้านข้าง (contact inhibition) (121) ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไปโดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่างกัน และติดตามไปจนครบ 28 วัน จากผลการศึกษาวิจัยการพัฒนากการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาษที่มีการตัดแปรรูปผิว สามารถสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์บนกระดาษที่มีการตัดแปรรูปผิว สามารถส่งเสริมให้เซลล์มีการแบ่งตัวแบบสามมิติและการแสดงออกของเซลล์ทั้งด้านรูปร่าง (cell morphology) การเจริญเติบโต (cell proliferation) และการแปรสภาพของเซลล์ (cell differentiation) ได้เซลล์ที่มีลักษณะเหมือนเซลล์ลำไส้ที่อยู่ในร่างกายมนุษย์ จึงสามารถนำไปใช้เพื่อการศึกษากลไกการเกิดโรคและเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยยาชนิดใหม่ได้ในอนาคต

ทั้งนี้การศึกษากการแสดงออกของโปรตีนไทด์จังก์ชันมีความสำคัญ เนื่องจากโปรตีนไทด์จังก์ชันเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการยึดเซลล์เข้าด้วยกันเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ หรือสิ่ง

แลกเปลี่ยนและรวมกันเพื่อป้องกันการสูญเสีย และใช้ในการสื่อสารระหว่างเซลล์ โปรตีนไทด์จังก์ชันชนิด ZO-1 เป็นโปรตีนภายนอก (peripheral membrane protein) ชนิดแรกที่ถูกศึกษาและระบุเป็นชนิดของโปรตีนไทด์จังก์ชัน (122) ซึ่งโปรตีน ZO-1 ทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงร่างที่สำคัญและมีโดเมนที่สำคัญในการเชื่อมต่อกับโปรตีนรอยต่อชนิดอื่น ๆ (123) จากผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ของมนุษย์บนกระดาดที่มีการตัดแปรพื้นผิวด้วยสารแมทริกซ์นอกเซลล์พบว่า เซลล์ HT-29 สามารถแสดงออกการสร้างโปรตีน ZO-1 ได้เมื่อทำการศึกษาโดยใช้แอนติบอดีชนิดที่หนึ่ง (primary antibody) ที่จำเพาะต่อโปรตีน ZO-1 และใช้แอนติบอดีชนิดที่สอง (secondary antibody) ที่ติดสารเรืองแสง Alexa 488 เพื่อติดตามตำแหน่งของการแสดงออกของโปรตีน โดยพบว่าโปรตีน ZO-1 เป็นโปรตีนที่แสดงออกบริเวณด้านบน (apical) ของเซลล์บริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์ แต่จากการทดลองพบว่าการติดสีในบริเวณไซโตพลาสซึมร่วมด้วย ซึ่งอาจเกิดจากการจับกันแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดีชนิดที่หนึ่ง หรือ โปรตีน ZO-1 ถูกทำลายจากการใช้สารคงสภาพเซลล์ (fixatives) ที่ไม่เหมาะสม โดยจากการศึกษาของ Alysia และคณะ พบว่า การใช้เมทานอล (methanol) หรือ เมทานอลผสมกับแอซีโตน (methanol-acetone) ในอัตราส่วน 1:1 เป็นสารคงสภาพเซลล์ต่อโปรตีน ZO-1 สามารถคงสภาพโปรตีนและถ่ายภาพการแสดงออกของโปรตีน ZO-1 ได้ชัดเจนมากกว่าการใช้สาร พาราฟอร์มัลดีไฮด์ 4 เปอร์เซ็นต์ (124) ซึ่งเป็นสารคงสภาพเซลล์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ในส่วนของการพัฒนาต้นแบบไบโอเซนเซอร์ไร้สายสำหรับตรวจวัดการเจริญของไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยหลักการในการศึกษาวิจัยนี้เกิดจากการดัดแปลงหลักการของเซลล์เชื้อเพลิงจุลินทรีย์ (microbial fuel cell) เพื่อใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนพลังงานจากสารอินทรีย์ไปเป็นกระแสไฟฟ้า (125) โดยในการศึกษาวิจัยอาศัยคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ในการขนส่งอิเล็กตรอนออกภายนอกเซลล์ (extracellular electron transfer) แล้วใช้วัสดุที่สามารถนำไฟฟ้าได้ เช่น ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐาน (glassy carbon electrode) ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอน (electron sink) แล้วใช้อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นนี้ในการเปลี่ยนแปลงซิลเวอร์คลอไรด์ที่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าต่ำให้กลับเป็นซิลเวอร์ที่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าที่ดีขึ้นได้ จากการศึกษาทำการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนและอนุภาคทองคำระดับนาโน แล้วผสมอนุภาคนาโนทั้งสองชนิดในอัตราส่วน 1:5 ซึ่งวิธีในการทดลองอ้างอิงจากการทดลองของ Larpan และคณะ (126) เพื่อใช้ในการดัดแปรพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน โดยใช้อนุภาคนาโนผสมเชื่อมระหว่างขั้วไฟฟ้าช่วย (counter

electrode) และขั้วไฟฟ้าทำงาน (working electrode) และทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน อัตราส่วนของอนุภาคเงินนาโนที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากอนุภาคเงินนาโนเพื่อเพิ่มความต้านทานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีน ซึ่งหากใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนที่มากขึ้นอาจทำให้ไม่สามารถเพิ่มความต้านทานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนได้ด้วย ปฏิกิริยาออกซิเดชัน เนื่องจากอนุภาคทองคำระดับนาโนจะเชื่อมต่อกับขั้วไฟฟ้าทั้งสองยังคงทำให้ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนมีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าได้

จากการศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าวงจรเปิด พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ในการศึกษาวิจัยทุกชนิดในงานวิจัยนี้ สามารถพัฒนาศักย์ไฟฟ้าที่มีค่าลบได้ ซึ่งเกิดขึ้นจากการถ่ายโอนอิเล็กตรอนที่เกิดจากการใช้สารอาหารไปยังขั้วไฟฟ้า และอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นทำให้เกิดค่าศักย์ไฟฟ้าที่ต่างกันเมื่อวัดเปรียบเทียบกับขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (Ag/AgCl reference electrode) แต่ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นขึ้นอยู่กับลักษณะการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด เช่น เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถสร้างศักย์ไฟฟ้าที่มีค่าลบมาก เนื่องจาก เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถให้อิเล็กตรอนแก่ขั้วไฟฟ้าคาร์บอนอสัณฐานได้โดยตรงแล้ว ยังสามารถสร้างสารสื่อกลาง (mediator) ได้แก่สาร phenazines ที่ทำหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนจากภายในเซลล์ไปยังขั้วไฟฟ้าร่วมด้วย (127, 128)

จากนั้นเมื่อทราบว่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ในการทดลองสามารถสร้างศักย์ไฟฟ้าที่เป็นลบได้ ผลการศึกษาศามารถในการใช้อิเล็กตรอนเพื่อนำไปใช้ในการเปลี่ยนซิลเวอร์คอลลอยด์ที่มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าต่ำ ให้กลับเป็นซิลเวอร์ที่มีคุณสมบัติที่ดีในการนำไฟฟ้าได้ดี พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ polymicrobial สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของซิลเวอร์คอลลอยด์เปลี่ยนไปเป็นซิลเวอร์ และมีการเพิ่มขึ้นของกระแสไฟฟ้าเกิดขึ้น แต่กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น มีปริมาณกระแสที่วัดได้ไม่เท่ากันในการทดลองแต่ละครั้ง เนื่องด้วย การดัดแปรพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าแบบพิมพ์สกรีน ในงานวิจัยนี้ ใช้เทคนิค drop casting ที่ไม่สามารถควบคุมขนาดของแถบของอนุภาคนาโนและการเรียงตัวของอนุภาคนาโนได้ จึงทำให้เกิดความไม่แม่นยำในการดัดแปรพื้นผิวบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนแต่ละชิ้น และการทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธีทางไฟฟ้าเคมี ทำให้ค่าความต้านทานของแต่ละขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนแตกต่างกัน ดังนั้นจึงถือเป็นข้อจำกัดของงานวิจัยนี้ และควรศึกษาเพิ่มเติมวิธีการดัดแปรพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าให้แม่นยำมากยิ่งขึ้น

เมื่อนำเทคโนโลยีการสื่อสารแบบไร้สายชนิด RFID มาใช้ร่วมในการติดตามการเจริญของ เชื้อจุลินทรีย์ ทำให้สามารถติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างต่อเนื่อง และทันท่วงที โดย ใงานวิจัยอาศัยปฏิกิริยาการจ่ายอิเล็กตรอน (oxidation) และปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอน (reduction) ของอนุภาคเงินนาโน เพื่อติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรสดังกล่าวข้างต้น และ อาศัยการเปลี่ยนแปลงความต้านทานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนที่เชื่อมต่อกับสายอากาศของ RFID tag ซึ่งเคยมีรายงานใช้การเปลี่ยนแปลงความต้านทานในการตรวจวัดปริมาณไอระเหยของ แอลกอฮอล์โดย Steinberg และคณะ (129) และ การตรวจวัดความเข้มข้นของแก๊สไนโตรเจนได ออกไซด์ในอากาศ โดย Clément และคณะ โดยเมื่อมีความเข้มข้นของแก๊สไนโตรเจนไดออกไซด์ เพิ่มขึ้น ความต้านทานจะเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (103) ซึ่งการทดลองนี้ประยุกต์ใช้การ เปลี่ยนแปลงความต้านทานของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนโดย เมื่อมีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ส่งผลให้ เกิดอิเล็กตรอนและอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นถูกใช้ในการรีดิวซ์ซิลเวอร์คลอไรด์ ทำให้ค่าความต้านทาน ของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนลดลงและทำให้ค่าความต้านทานของเสาอากาศของ RFID tag ลดลงตาม ไปด้วย ด้วยเหตุนี้ เครื่องวิเคราะห์สัญญาณ (network analyzer) สามารถตรวจจับได้ด้วยการ เปลี่ยนแปลงในควมถี่ซึ่งสามารถทำให้ติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แบบไร้สายได้ อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ไม่จำเพาะ ยังไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทำให้เกิด การถ่ายทอดอิเล็กตรอนได้

โดยจากผลการวิจัยทั้งสองส่วนสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษากลไกการเกิดโรคใน ระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคมะเร็งลำไส้ (Colorectal cancer) กลุ่มโรคที่มีการอักเสบของระบบ ทางเดินอาหาร (Inflammatory Bowel Disease) และ แผลในระบบทางเดินอาหาร (Gut wound) ที่เกิดจากการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เซลล์ลำไส้ โดยการประยุกต์ใช้เทคนิคการพิมพ์ สกรีนขั้วไฟฟ้าลงบนพื้นผิวของกระดาษ และเป็นไปได้ที่จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงกระดาษที่มี ขั้วไฟฟ้าโดยตรงและใช้เทคนิคการติดตามแบบไร้สาย (wireless biosensor) ในการติดตามการ เปลี่ยนแปลงของเซลล์ เช่น การเจริญของเซลล์ (cell proliferation) หรือการตายของเซลล์ (cell death) หรือกรณีเซลล์ลำไส้หากโตตั้งกั้น ถูกทำลายจากการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งจะ สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้อย่างทันท่วงที ซึ่งอาจทำให้นักวิจัย เข้าใจกลไกการ ก่อโรคได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้โมเดลนี้ ยังสามารถใช้ศึกษาการตอบสนองของเซลล์ลำไส้ต่อยารักษา โรคชนิดใหม่ได้อีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งเพื่อการศึกษากลไกการเกิดโรคและ

การแผ้วถางการติดเชื่อจุลชีพ ที่จะเป็นประโยชน์ต่อประชาชนและประเทศไทยในการเข้าสู่สังคม
ผู้สูงอายุในอนาคตอันใกล้



3156981032

CU Thesais 5976680537 thesais / recv: 02082562 05:10:56 / seq: 13

บรรณานุกรม

1. World Health Organization. Infectious diseases [cited 2019 June 15]. Available from: https://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/.
2. Mayo Clinic. Infectious diseases [cited 2019 June 15]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/infectious-diseases/symptoms-causes/syc-20351173>.
3. Z. A. McGee, E.N.Robinson. Molecular Mechanisms by Which Pathogenic Bacteria Interact with Host Mucosal Cells. The Pathogenesis of Bacterial Infections. BAYER-SYMP, volume 8:8-16.
4. Custovic A, Smajlovic J, Hadzic S, Ahmetagic S, Tihic N, Hadzagic H. Epidemiological surveillance of bacterial nosocomial infections in the surgical intensive care unit. Mater Sociomed. 2014;26(1):7-11.
5. Tournier JN, Hellmann AQ, Lesca G, Jouan A, Drouet E, Mathieu J. Fever-like thermal conditions regulate the activation of maturing dendritic cells. J Leukoc Biol. 2003;73(4):493-501.
6. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. Cell. 2010;140(6):771-6.
7. Gurski LA, Petrelli NJ, Jia X, Farach-Carson MC. 3D Matrices for Anti-Cancer Drug Testing and Development. Oncology Issues. 2017;25(1):20-5.
8. Huang H, Ding Y, Sun XS, Nguyen TA. Peptide Hydrogelation and Cell Encapsulation for 3D Culture of MCF-7 Breast Cancer Cells. PLOS ONE. 2013;8(3):e59482.
9. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. Biotechnology and bioengineering. 2009;103(4):655-63.
10. Barré-Sinoussi F, Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. Future Sci OA. 2015;1(4):FSO63-FSO.
11. Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. Journal of bioscience and bioengineering. 2007;103(5):389-98.
12. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. Biotechnology and bioengineering. 2003;83(2):173-80.
13. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. Cancer research. 1977;37(10):3639-43.
14. Fang Y, Eglén RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. SLAS Discov. 2017;22(5):456-72.
15. Chen Y-H, Kuo Z-K, Cheng C-M. Paper – a potential platform in pharmaceutical development. Trends in Biotechnology. 2015;33(1):4-9.
16. Mosadegh B, Dabiri BE, Lockett MR, Derda R, Campbell P, Parker KK, et al. Three-dimensional paper-based model for cardiac ischemia. Advanced healthcare materials. 2014;3(7):1036-43.
17. Pupinyo N, Chatatikun M, Chiabchalard A, Laiwattanapaisal W. In situ paper-based 3D cell culture for rapid screening of the anti-melanogenic activity. Analyst. 2019;144(1):290-8.
18. Wang Y, Su W, Wang L, Jiang L, Liu Y, Hui L, et al. Paper supported long-term 3D liver co-culture model for the assessment of hepatotoxic drugs. Toxicol Res (Camb). 2018;7(1):13-21.
19. Simon KA, Mosadegh B, Minn KT, Lockett MR, Mohammady MR, Boucher DM, et al. Metabolic response of lung cancer cells to radiation in a paper-based 3D cell culture system.

Biomaterials. 2016;95:47-59.

20. Yetisen AK, Akram MS, Lowe CR. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*. 2013;13(12):2210-51.
21. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry*. 2010;82(1):3-10.
22. von Eiff C, Jansen B, Kohnen W, Becker K. Infections Associated with Medical Devices. *Drugs*. 2005;65(2):179-214.
23. Tytgat HLP, Nobrega FL, van der Oost J, de Vos WM. Bowel Biofilms: Tipping Points between a Healthy and Compromised Gut? *Trends in microbiology*. 2019;27(1):17-25.
24. von Rosenvinge EC, O'May GA, Macfarlane S, Macfarlane GT, Shirliff ME. Microbial biofilms and gastrointestinal diseases. *Pathogens and disease*. 2013;67(1):25-38.
25. Yang Y, Xu M, Guo J, Sun G. Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *Process Biochemistry*. 2012;47(12):1707-14.
26. Turner HL, Turner JR. Good fences make good neighbors: Gastrointestinal mucosal structure. *Gut Microbes*. 2010;1(1):22-9.
27. Center UoCM. Specific bacteria in the small intestine are crucial for fat absorption 2018 [updated April 11, 2018; cited 2019 June 15]. Available from: <https://medicalxpress.com/news/2018-04-specific-bacteria-small-intestine-crucial.html>.
28. Santaolalla R, Fukata M, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol*. 2011;27(2):125-31.
29. Fukata M, Chen A, Klepper A, Krishnareddy S, Vamadevan AS, Thomas LS, et al. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*. 2006;131(3):862-77.
30. Fukata M, Hernandez Y, Conduah D, Cohen J, Chen A, Breglio K, et al. Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflammatory bowel diseases*. 2009;15(7):997-1006.
31. Shang L, Fukata M, Thirunarayanan N, Martin AP, Arnaboldi P, Maussang D, et al. Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology*. 2008;135(2):529-38.
32. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*. 2004;127(1):224-38.
33. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(3):159-69.
34. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. . Geneva: World Health Organization; 2018.
35. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology*. 2002;56:187-209.
36. Annous BA, Fratamico PM, Smith JL. Scientific Status Summary. *Journal of Food Science*. 2009;74(1):R24-R37.
37. Arunasri K, Mohan SV. Chapter 2.3 - Biofilms: Microbial Life on the Electrode Surface. In: Mohan SV, Varjani S, Pandey A, editors. *Microbial Electrochemical Technology*: Elsevier; 2019. p. 295-313.
38. Sugano M, Morisaki H, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Kuwata H, Miyazaki T, et al. Potential effect of cationic liposomes on interactions with oral bacterial cells and biofilms. *Journal of liposome research*. 2016;26(2):156-62.
39. Kummerle N, Feucht HH, Kaulfers PM. Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996;40(10):2276-9.

40. Suntharalingam P, Cvitkovitch DG. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends in microbiology*. 2005;13(1):3-6.
41. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*. 2018;81(1):7-11.
42. อิศยา จันทน์วิทยานุชิต. การวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2548.
43. ภัทรชัย กิรติสิน. ตำราวิทยาแบคทีเรียทางการแพทย์ *Textbook of Medical Bacteriology*. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล; 2549.
44. Bhadriraju K, Chen CS. Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug discovery today*. 2002;7(11):612-20.
45. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in cancer biology*. 2005;15(5):405-12.
46. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*. 2014;12(4):207-18.
47. Hsiao AY, Tung YC, Qu X, Patel LR, Pienta KJ, Takayama S. 384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids. *Biotechnology and bioengineering*. 2012;109(5):1293-304.
48. Hsiao AY, Tung Y-C, Kuo C-H, Mosadegh B, Bedenis R, Pienta KJ, et al. Micro-ring structures stabilize microdroplets to enable long term spheroid culture in 384 hanging drop array plates. *Biomed Microdevices*. 2012;14(2):313-23.
49. Tung Y-C, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa Y-s, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst*. 2011;136(3):473-8.
50. Goodwin TJ, Schroeder WF, Wolf DA, Moyer MP. Rotating-wall vessel coculture of small intestine as a prelude to tissue modeling: aspects of simulated microgravity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1993;202(2):181-92.
51. Schwarz RP, Goodwin TJ, Wolf DA. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: An application of simulated microgravity. *Journal of tissue culture methods*. 1992;14(2):51-7.
52. Brinley AA, Theriot CA, Nelman-Gonzalez M, Crucian B, Stowe RP, Barrett AD, et al. Characterization of Epstein-Barr virus reactivation in a modeled spaceflight system. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(3):616-24.
53. Sainz B, Jr., TenCate V, Uprichard SL. Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection. *Virology*. 2009;6:103-.
54. Papafragkou E, Hewitt J, Park GW, Greening G, Vinjé J. Challenges of Culturing Human Norovirus in Three-Dimensional Organoid Intestinal Cell Culture Models. *PLOS ONE*. 2013;8(6):e63485.
55. Goodwin TJ, McCarthy M, Osterrieder N, Cohrs RJ, Kaufer BB. Three-Dimensional Normal Human Neural Progenitor Tissue-Like Assemblies: A Model of Persistent Varicella-Zoster Virus Infection. *PLOS Pathogens*. 2013;9(8):e1003512.
56. Gardner JK, Herbst-Kralovetz MM. Three-Dimensional Rotating Wall Vessel-Derived Cell Culture Models for Studying Virus-Host Interactions. *Viruses*. 2016;8(11).
57. Türker E, Demirçak N, Arslan-Yildiz A. Scaffold-free three-dimensional cell culturing using magnetic levitation. *Biomaterials Science*. 2018;6(7):1745-53.
58. Fong EL, Lamhamedi-Cherradi SE, Burdett E, Ramamoorthy V, Lazar AJ, Kasper FK, et al.

Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(16):6500-5.

59. Hoque ME, Meng TTH, Chuan YL, Chowdhury M, Prasad RGSV. Fabrication and characterization of hybrid PCL/PEG 3D scaffolds for potential tissue engineering applications. *Materials Letters*. 2014;131:255-8.
60. Sharma Y, Tiwari A, Hattori S, Terada D, Sharma AK, Ramalingam M, et al. Fabrication of conducting electrospun nanofibers scaffold for three-dimensional cells culture. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012;51(4):627-31.
61. Younesi M, Goldberg VM, Akkus O. A micro-architecturally biomimetic collagen template for mesenchymal condensation based cartilage regeneration. *Acta biomaterialia*. 2016;30:212-21.
62. Arulmoli J, Wright HJ, Phan DTT, Sheth U, Que RA, Botten GA, et al. Combination scaffolds of salmon fibrin, hyaluronic acid, and laminin for human neural stem cell and vascular tissue engineering. *Acta biomaterialia*. 2016;43:122-38.
63. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(4-5):207-33.
64. Hutson CB, Nichol JW, Aubin H, Bae H, Yamanlar S, Al-Haque S, et al. Synthesis and characterization of tunable poly(ethylene glycol): gelatin methacrylate composite hydrogels. *Tissue engineering Part A*. 2011;17(13-14):1713-23.
65. Merkle VM, Tran PL, Hutchinson M, Ammann KR, DeCook K, Wu X, et al. Core-shell PVA/gelatin electrospun nanofibers promote human umbilical vein endothelial cell and smooth muscle cell proliferation and migration. *Acta biomaterialia*. 2015;27:77-87.
66. Choi DJ, Choi SM, Kang HY, Min HJ, Lee R, Ikram M, et al. Bioactive fish collagen/polycaprolactone composite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for 3D cell culture. *Journal of biotechnology*. 2015;205:47-58.
67. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011;14(3):88-95.
68. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(24):2529-43.
69. Sultana N. 1 - Mechanical and biological properties of scaffold materials. In: Deng Y, Kuiper J, editors. *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds*: Woodhead Publishing; 2018. p. 1-21.
70. Mano JF, Sousa RA, Boesel LF, Neves NM, Reis RL. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Composites Science and Technology*. 2004;64(6):789-817.
71. Wardyn JD, Sanderson C, Swan LE, Stagi M. Low cost production of 3D-printed devices and electrostimulation chambers for the culture of primary neurons. *Journal of Neuroscience Methods*. 2015;251:17-23.
72. Lopes MS, Jardini AL, Filho RM. Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering Applications. *Procedia Engineering*. 2012;42:1402-13.
73. Serra T, Mateos-Timoneda MA, Planell JA, Navarro M. 3D printed PLA-based scaffolds: a versatile tool in regenerative medicine. *Organogenesis*. 2013;9(4):239-44.
74. Boland ED, Wnek GE, Simpson DG, Pawlowski KJ, Bowlin GL. Tailoring Tissue Engineering Scaffolds Using Electrostatic Processing Techniques: A Study Of Poly(Glycolic Acid) Electrospinning. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 2001;38(12):1231-43.
75. Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ, Atala A. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nature Biotechnology*. 1999;17(2):149-55.
76. Park K, Ju YM, Son JS, Ahn KD, Han DK. Surface modification of biodegradable

electrospun nanofiber scaffolds and their interaction with fibroblasts. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2007;18(4):369-82.

77. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(4):207-33.
78. Huang L, Xiao L, Jung Poudel A, Li J, Zhou P, Gauthier M, et al. Porous chitosan microspheres as microcarriers for 3D cell culture. *Carbohydrate Polymers*. 2018;202:611-20.
79. Fu JJ, Zhou Y, Shi XX, Kang YJ, Lu ZS, Li Y, et al. Spontaneous formation of tumor spheroid on a hydrophilic filter paper for cancer stem cell enrichment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;174:426-34.
80. Reyhani V, Seddigh P, Guss B, Gustafsson R, Rask L, Rubin K. Fibrin binds to collagen and provides a bridge for $\alpha V\beta 3$ integrin-dependent contraction of collagen gels. *Biochemical Journal*. 2014;462(1):113-23.
81. Ballerini DR, Li X, Shen W. Patterned paper and alternative materials as substrates for low-cost microfluidic diagnostics. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2012;13(5):769-87.
82. Kenney RM, Boyce MW, Truong AS, Bagnell CR, Lockett MR. Real-time imaging of cancer cell chemotaxis in paper-based scaffolds. *Analyst*. 2016;141(2):661-8.
83. Kenney RM, Boyce MW, Truong AS, Bagnell CR, Lockett MR. Real-time imaging of cancer cell chemotaxis in paper-based scaffolds. *Analyst*. 2016;141(2):661-8.
84. Huang C-H, Lei KF, Tsang N-M. Paper-based microreactor array for rapid screening of cell signaling cascades. *Lab on a Chip*. 2016;16(15):2911-20.
85. Park DH, Zeikus JG. Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(4):1292-7.
86. Oh S, Logan BE. Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Research*. 2005;39(19):4673-82.
87. Holmes DE, Chaudhuri SK, Nevin KP, Mehta T, Methe BA, Liu A, et al. Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environmental microbiology*. 2006;8(10):1805-15.
88. Lovley DR. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008;19(6):564-71.
89. Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, Lovley DR. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*. 2005;435(7045):1098-101.
90. Gorby YA, Yanina S, McLean JS, Rosso KM, Moyles D, Dohnalkova A, et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(30):11358-63.
91. Reitz W. *Handbook of Fuel Cells: Fundamentals, Technology, and Applications*, (Volume 1) W. Vielstich, A. Lamm, and H. A. Gasteiger (editors). *Materials and Manufacturing Processes*. 2007;22(6):788-.
92. Shukla AK, Suresh P, Berchmans S, Rajendran A. Biological fuel cells and their applications. *Current Science*. 2004;87:455 – 68.
93. Rabaey K, Boon N, Höfte M, Verstraete W. Microbial Phenazine Production Enhances Electron Transfer in Biofuel Cells. *Environmental Science & Technology*. 2005;39(9):3401-8.
94. Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, Coursolle D, Gralnick JA, Bond DR. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(10):3968-73.
95. Basséguy R, Délia ML, Erable B, Bergel A. Electroactive biofilms. 2014:107-43.
96. Arshak K, Jafer E, Lyons G, Morris D, Korostynska O. A review of low-power wireless sensor microsystems for biomedical capsule diagnosis. *Microelectronics International*.

2004;21:8-19.

97. Chen C, Tsow F, Campbell KD, Iglesias R, Forzani E, Tao NJ. A wireless hybrid chemical sensor for detection of environmental volatile organic compounds. *IEEE sensors journal*. 2013;13(5):1748-55.
98. Kim J, Imani S, de Araujo WR, Warchall J, Valdes-Ramirez G, Paixao TR, et al. Wearable salivary uric acid mouthguard biosensor with integrated wireless electronics. *Biosensors & bioelectronics*. 2015;74:1061-8.
99. Lorwongtragool P, Sowade E, Watthanawisuth N, Baumann RR, Kerdcharoen T. A novel wearable electronic nose for healthcare based on flexible printed chemical sensor array. *Sensors (Basel)*. 2014;14(10):19700-12.
100. Llorente-Alonso A, Peña-Poza J, de Arcas G, García-Heras M, López JM, Villegas MA. Interface electronic system for measuring air acidity with optical sensors. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2013;194:67-74.
101. Gumus A, Lee S, Karlsson K, Gabrielson R, Winkler DW, Erickson D. Real-time in vivo uric acid biosensor system for biophysical monitoring of birds. *Analyst*. 2014;139(4):742-8.
102. Kassal P, Kim J, Kumar R, de Araujo WR, Steinberg IM, Steinberg MD, et al. Smart bandage with wireless connectivity for uric acid biosensing as an indicator of wound status. *Electrochemistry Communications*. 2015;56:6-10.
103. Clément P, Ramos A, Lazaro A, Molina-Luna L, Bittencourt C, Girbau D, et al. Oxygen plasma treated carbon nanotubes for the wireless monitoring of nitrogen dioxide levels. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015;208:444-9.
104. Abrar MA, Dong Y, Lee PK, Kim WS. Bendable Electro-chemical Lactate Sensor Printed with Silver Nano-particles. *Scientific Reports*. 2016;6:30565.
105. Ghafar-Zadeh E. Wireless integrated biosensors for point-of-care diagnostic applications. *Sensors (Basel)*. 2015;15(2):3236-61.
106. Kim J, Kim M, Lee M-S, Kim K, Ji S, Kim Y-T, et al. Wearable smart sensor systems integrated on soft contact lenses for wireless ocular diagnostics. *Nature Communications*. 2017;8:14997.
107. The American Type Culture Collection (ATCC). [cited 2019 June 1]. Available from: <https://atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/HTB-38.ashx>.
108. Nexcelom Bioscience. Cell Counting Methods [cited 2019 June 15]. Available from: <http://www.nexcelom.com/Products/Disposable-Hemocytometer.html>.
109. Thongnuanchan B, Ninjan R, Kalkornsurapranee E, Lopattananon N, Nakason C. Glutaraldehyde as Ambient Temperature Crosslinking Agent of Latex Films from Natural Rubber Grafted with Poly(diacetone acrylamide). *Journal of Polymers and the Environment*. 2018;26(7):3069-85.
110. Butler MF, Ng Y-F, Pudney PDA. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2003;41(24):3941-53.
111. Brescia P, Banks P. Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer 2009 [cited 2019 June 15]. Available from: <https://www.biotek.com/resources/application-notes/quantifying-cytotoxicity-of-thiostrepton-on-mesothelioma-cells-using-mtt-assay-and-the-epoch-microplate-spectrophotometer>.
112. Cheng NC, Estes BT, Young TH, Guilak F. Genipin-crosslinked cartilage-derived matrix as a scaffold for human adipose-derived stem cell chondrogenesis. *Tissue engineering Part A*. 2013;19(3-4):484-96.
113. Robinson M, Douglas S, Michelle Willerth S. Mechanically stable fibrin scaffolds promote viability and induce neurite outgrowth in neural aggregates derived from human

induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports*. 2017;7(1):6250.

114. Siddiqui N, Pramanik K. Improvement of cellular responses of genipin cross-linked chitosan/nano β -TCP composite scaffolds by surface modification with fibrin. *Biomedical Physics & Engineering Express*. 2018;4(4):045034.

115. World Health Organization. The top 10 causes of death 2018 [cited 2019 June 15]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

116. Kollodis Biosciences. Standard Coating Protocol.

117. Yang G, Xiao Z, Long H, Ma K, Zhang J, Ren X, et al. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1616.

118. De Clercq K, Schelfhout C, Bracke M, De Wever O, Van Bockstal M, Ceelen W, et al. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a strategy to prevent postsurgical peritoneal adhesions: In vitro and in vivo characterization. *Biomaterials*. 2016;96:33-46.

119. Stowers RS, Shcherbina A, Israeli J, Gruber JJ, Chang J, Nam S, et al. Matrix stiffness induces a tumorigenic phenotype in mammary epithelium through changes in chromatin accessibility. *Nature Biomedical Engineering*. 2019.

120. Cohen E, Ophir I, Shaul YB. Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *Journal of cell science*. 1999;112 (Pt 16):2657-66.

121. Todaro GJ, Lazar GK, Green H. The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 1965;66(3):325-33.

122. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *The Journal of Cell Biology*. 1986;103(3):755-66.

123. McNeil E, Capaldo CT, Macara IG. Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 2006;17(4):1922-32.

124. Buckley AG, Looi K, Iosifidis T, Ling KM, Sutanto EN, Martinovich KM, et al. Visualisation of Multiple Tight Junctional Complexes in Human Airway Epithelial Cells. *Biological procedures online*. 2018;20:3.

125. Li S, Cheng C, Thomas A. Carbon-Based Microbial-Fuel-Cell Electrodes: From Conductive Supports to Active Catalysts. *Advanced Materials*. 2017;29(8):1602547.

126. Larpant N, Pham AD, Shafaat A, Gonzalez JF, Sotres J, Sjöholm J, et al. Sensing by wireless reading Ag/AgCl redox conversion on RFID tag: universal, battery-less biosensor design. manuscript submission. 2019.

127. Bosire EM, Rosenbaum MA. Electrochemical Potential Influences Phenazine Production, Electron Transfer and Consequently Electric Current Generation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8(892).

128. Schiessl KT, Hu F, Jo J, Nazia SZ, Wang B, Price-Whelan A, et al. Phenazine production promotes antibiotic tolerance and metabolic heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature Communications*. 2019;10(1):762.

129. Steinberg MD, Žura I, Murkovic Steinberg I. Wireless smart tag with on-board conductometric chemical sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014;196:208-14.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายบัณฑิตวิชญ์ ภิรวรภกิจพิธาน
วัน เดือน ปี เกิด	07 กุมภาพันธ์ 2534
สถานที่เกิด	นครปฐม
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยม อันดับ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2558 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2559 โดยได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาทุนอุดหนุน การศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่ พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ทุนสนับสนุน นิสิตระดับปริญญาเอกและโทไปทำวิจัยในต่างประเทศ และ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย



316991032

CD :Thesis 5976680537 thesis / recv: 02082562 05:10:56 / seq: 13