รายงานวิจัย

เรื่อง

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน
Embryonic Stem Cell

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๑
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์นายแพทย์กำธร พฤกษานานนท์
ดร.รัฐจักร รังสิวิวัฒน์
นางสาวปราณี นำชัยศรีค้า
นางวิชชุดา อานนท์กิจพานิช
ศาสตราจารย์กิตติคุณนายแพทย์ประมวล วีรุตมเสน

หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัย เรื่อง "เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Embryonic Stem Cell)" ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๑ เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งจะนำไปสู่การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดต่อไป

การวิจัยนี้จะไม่สามารถสำเร็จลงได้ หากไม่ได้รับความสนับสนุนจากหน่วยงานและบุคลากรจำนวนมากให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ รวมทั้งได้ให้ข้อคิดเห็น และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ยิ่งต่อการวิจัย ซึ่งผู้วิจัยรู้สึกขอบคุณอย่างสูง ได้แก่ คุณพารณ อิศรเสนา บริษัท ปูนซิเมนต์ไทย, รองศาตราจารย์นายแพทย์ยาใจ ณ สงขลา อดีตคณบดีคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล อธิการบดี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ศาสตราจารย์นายแพทย์สุทธิพร จิตต์มิตรภาพ อดีตรองอธิการบดี ฝ่ายวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ศาสตราจารย์นายแพทย์สมภพ ลิ้มพงศานุรักษ์ หัวหน้าภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.มงคล เตชะกำพุ รองคณบดี ฝ่ายวางแผนและพัฒนา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยติดตามดูแลสนับสนุนงานวิจัยอย่างใกล้ชิดและเป็นกำลังใจให้แก่ทีมงานเป็นอย่างดี

ผู้เชี่ยวชาญชาวต่างประเทศอีกหลายท่านยังมีส่วนช่วยให้ผู้วิจัยมีองค์ความรู้ เป็นที่ปรึกษาให้ทีมเข้าใจประเด็นต่างๆใน รายงานฉบับนี้ ได้ดีขึ้น ท่านเหล่านี้ รวมถึง Professor Outi Hovatta, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital Huddinge, Fertility Unit, Sweden, Professor Andras Dinnyes, Genetic Reprogramming Group, Agricultural Biotechnology Center, Godollo, Hungary และ Professor Clive. N. Svenden, Director of Stem Cell Research Program, University of Wisconsin. U.S.A.

ขอขอบคุณอาจารย์นายแพทย์นิพัญจน์ อิศรเสนา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงมนตกานต์ ตันสถิตย์ รองหัวหน้าภาควิชาฝ่ายบริหาร หัวหน้าหน่วย embryology ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรหน่วยชีววิทยาวิทยาเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ช่วยสนับสนุนทางเทคนิค ท้ายที่สุดนี้งานวิจัยคงไม่สามารถสำเร็จลงได้หากปราศจากความช่วยเหลือของ คุณเสาวรัตน์ โพธิ์ประดิษฐ์ ซึ่งช่วยบริหารจัดการงบประมาณวิจัย และจัดเตรียม ต้นฉบับรายงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม ๒๕๕๑

บทคัดย่อ

เนื่องจากการใช้เซลล์พี่เลี้ยงที่แยกได้จากตัวอ่อนของหนู เพื่อเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่มาจากหนู ดังนั้น การศึกษาวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์โดยใช้เซลล์พี่เลี้ยงที่แยกได้จากคน เซลล์พี่เลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสแยกได้จากผิวหนังบริเวณหน้าท้องของผู้หญิงที่เข้ารับการผ่าตัดทำคลอด ใช้ตัวอ่อนที่เกิดการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และผ่านการแช่แข็งจำนวนสิบตัวอ่อน เพื่อสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ กลุ่ม อินเนอร์เซลล์แมส (inner cell mass; ICM) ของตัวอ่อน แปด ตัวอ่อนถูกแยกออกจากเซลล์โทรเฟคโตเดิร์ม (trophectoderm; TE) โดยการใช้แท่งแก้วไปเปตขนาดเล็ก พบว่ามี หนึ่ง ICM outgrowth เจริญขึ้นมา และ สองตัวอ่อนถูกเลี้ยงรวมกับเซลล์พี่เลี้ยงหลังจากที่ย่อยเอาเปลือกหุ้มตัวอ่อนออก พบว่ามี หนึ่ง ICM outgrowth เจริญขึ้นมา ผลการศึกษาสามารถสร้างเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (human embryonic stem – like cells; hES-like cells) ได้หนึ่ง สายพันธุ์ เซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่สร้างได้นี้ มีลักษณะทางกายภาพที่เหมือนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ให้ผลบวกต่อการทดสอบการย้อมสีทางอิมมูโนวิทยาต่อ Oct-4 และ alkaline phosphatase (AP) นอกจากนั้นยังสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็น embryoid body (EB) และเซลล์ประสาท อย่างไรก็ตาม จะได้ทำการทดสอบคุณลักษณะอื่นๆ และ การเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ ของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างได้นี้ ในขั้นตอนต่อไป

จากผลการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกได้จากผิวหนังของคน สามารถนำมาใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ทดแทนเซลล์ที่แยกได้จากตัวอ่อนของหนู

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

Using mouse embryonic fibroblasts (MEFs) as feeder cells to support the growth of human embryonic stem cells (hESCs) *in vitro*, facing the risk of cross-contamination with animal or unknown pathogens. In this study, human adult fibroblasts (HAFs) were used as feeder cells to support the derivation of hESCs. HAFs were isolated from female abdominal skin underwent caesarean section. Ten frozen-thawed blastocysts were subjected to hESCs derivation. Inner cell mass (ICM) of eight blastocysts were mechanically removed from trophectoderm (TE) by fine-drawn glass pipette and one ICM outgrowth or primary hES-like cell line grew up. Two blastocysts were plated directly onto the feeder cells after zona pellucida removal and one ICM outgrowth grew up. Later, one hES-like cell line was derived from ICM that have been isolated mechanically. This hES-like cells basically exhibited common feature of hESCs and positively immunostained to Oct-4 and alkaline phosphatase (AP). Furthermore, hES-like cells were able to form embryoid body (EB) and differentiate into neuron cells. Additional characterization and differentiation of these hES-like cells are ongoing. This study suggested that, to derive hESCs for therapeutic purposes, HAFs can be an effective substitution for MEFs.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ๑

บทคัดย่อภาษาไทย ๒

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ๓

สารบัญเรื่อง ๔

สารบัญตาราง ๕

สารบัญภาพ ๖

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ๗

บทที่

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของ ๗

วัตถุประสงค์ของการวิจัยและขอบเขตการวิจัย ๙

วิธีดำเนินการวิจัย ๙

ประโยชน์ ๑๐

เนื้อเรื่อง (Main Body)

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method) ๑๐

ผลการวิจัย ๑๓

อภิปรายผลการวิจัย ๑๙

สรุป ๒๑

บรรณานุกรม(Bibliography) ๒๑

ภาคผนวก(Appendix) ๒๓

ประวัตินักวิจัยและคณะ ๒๕

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ ๑ ผลการแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยใช้เซลล์พี่เลี้ยงที่แยกจากผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ ๑๗

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ ๑ เซลล์ชนิดแรกที่เจริญออกจากชิ้นเนื้อผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ ๑๓
รูปที่ ๒ ลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสที่เจริญออกจากชิ้นเนื้อผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ ๑๓
รูปที่ ๓ เซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ ที่ผ่านการยับยั้งการเจริญเติบโต ๑๔
รูปที่ ๔ กลุ่มเซลล์ที่เกิดการตาย (degenerated cells) หลังจากที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง ๑๔
รูปที่ ๕ ลักษณะของเซลล์ที่เจริญออกมาจาก trophectoderm (TE) ๑๕
รูปที่ ๖ primary hES-like cells เจริญออกมาจากตัวอ่อนที่ แยก ICM ด้วยวิธี mechanical isolation ๑๕
รูปที่ ๗ primary hES-like cells เจริญออกมาจากตัวอ่อนที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง ๑๕
รูปที่ ๘ ลักษณะ colony ของ hES-like cells ๑๕
รูปที่ ๙ ลักษณะของ individual cells ใน colony ของ hES-like cells ๑๖
รูปที่ ๑๐ hES like colonies ที่ถูกละลายหลังจากผ่านการแช่แข็ง ๑๖
รูปที่ ๑๑ hES-like cells ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ Oct-4 immunostaining ๑๗
รูปที่ ๑๒ hES-like cells ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ alkaline phosphatase ๑๘
รูปที่ ๑๓ embryoid body (EB) formation หลังการเหนี่ยวนำ ๑๘
รูปที่ ๑๔ เซลล์ในกลุ่ม neuron cells เจริญจาก hES-like cells ๑๘
รูปที่ ๑๕ เซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เพื่อตรวจหา β-tubulin ๑๙
รูปที่ ๑๖ เซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เพื่อตรวจหา nestin ๑๙

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
DMSO	dimethyl sulphoxide
EB	embryoid body
FBS	fetal bovine serum
hESCs	human embryonic stem cells
ICM	inner cell mass
PBS	phosphase buffer saline
PFA	paraformaldehyde
PMEFs	primary mouse embryonic fibroblasts
SSEA-1	stage specific embryonic antigen-1
SSEA-3	stage specific embryonic antigen-3
SSEA-4	stage specific embryonic antigen-4
TRA-1-60	tumor recognition antigen-1-60
TRA-1-81	tumor recognition antigen-1-81

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๑. บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปีแรกของการดำเนินงานวิจัย (๒๕๔๙-๒๕๕๐) คณะผู้วิจัยได้วางแผนงานวิจัย โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาเทคนิคและวิธีการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ โดยระยะแรกเริ่มจากการเลือกใช้ตัวอ่อนที่เกิดจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย แต่มีการเจริญหลังการปฏิสนธิที่ผิดปกติ ทั้งชนิดที่ผ่านและไม่ผ่านการรักษาสภาพด้วยการแช่แข็ง โดยมีขอบเขตของการวิจัยคือ ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกกลุ่มเซลล์ในตัวอ่อนที่เรียกว่า inner cell mass (ICM) ซึ่งเซลล์กลุ่มนี้จะเจริญไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ตัวอ่อน วิธีการแยกกลุ่มเซลล์ ICM นี้ ทางคณะผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีต่างๆ ประกอบด้วย immunosurgery ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน, การตัดแยกด้วยไปเปตแก้วขนาดเล็ก, การแยกด้วยเลเซอร์และการเลี้ยงทั้งตัวอ่อนลงบนเซลล์พี่เลี้ยง นอกจากนั้นทางคณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาเกี่ยวกับชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง (feeder cells) ต่อความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ระยะที่สองของงานวิจัยในปีแรก คณะผู้วิจัยได้เปลี่ยนมาใช้ตัวอ่อนที่เกิดจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย มีการเจริญเป็นปกติหลังการปฏิสนธิและผ่านการแช่แข็ง โดยขอบเขตของงานวิจัย จะยังเหมือนในระยะแรก คือ ศึกษาวิธีการแยกเซลล์ ICM และชนิดของเซลล์พี่เลี้ยงที่มีผลต่อการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ซึ่งผลการดำเนินงานวิจัยในช่วงปีแรกนี้ ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ และทางคณะผู้วิจัยได้ส่งผลงานการวิจัยเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารจดหมายเหตุทางแพทย์

ในปีที่สองของโครงการวิจัย (๒๕๕๐-๒๕๕๑) คณะผู้วิจัยได้วางแผนการวิจัยโดยมีจุดมุ่งหมายในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ปราศจากการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์จากสัตว์หรือปนเปื้อนน้อยที่สุด เพื่อที่จะสามารถใช้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างได้ในการศึกษาวิจัยในทางคลินิคต่อไป

เป็นที่ทราบกันดีว่า นอกจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จะสามารถสร้างได้จากเซลล์ ICM ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส (Thomson และคณะ ๑๙๙๘; Reubinoff และคณะ ๒๐๐๐) ยังมีรายงานความสำเร็จของการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จากเซลล์เพียงหนึ่งเซลล์ (single blastomere) ของตัวอ่อนระยะ ๘ เซลล์ (Klimanskaya และคณะ ๒๐๐๖) หรือตัวอ่อนที่หยุดการแบ่งตัวก่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีส (Zhang และคณะ ๒๐๐๖) ลักษณะพื้นฐานสำคัญที่บ่งชี้คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนคือ ภายในเซลล์มีสัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมสูง ต่างจากเซลล์ชนิดอื่นๆ มีการทำงานของเอนไซม์ telomerase ที่สูง แสดง marker ต่างๆที่บ่งชี้ถึงความเป็น pluripotency เช่น stage specific embryonic antigen (SSEA)-4, tumer rejective antigen (TRA)-1-60 และ TRA-1-81 รวมถึงการแสดงออกของ transcriptional factor Oct-4 และ Nanog (Reubinoff และคณะ ๒๐๐๐; Chamber และคณะ ๒๐๐๓; Mitsui และคณะ ๒๐๐๓) เมื่อเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในสภาวะที่เหมาะสม เซลล์จะสามารถเจริญและแบ่งตัวได้อย่างไม่มีขีดจำกัด และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะเมื่อถูกเหนี่ยวนำ (Thomson และคณะ ๑๙๙๘) ด้วยคุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมีความเหมาะสมที่จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาทางด้านพิษวิทยา การทดสอบหรือค้นหายาตัวใหม่ หรือการนำไปใช้เพื่อรักษาทางเซลล์ (cell therapy)

ในระยะแรกของการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน นักวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่ สร้างและเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสที่แยกได้จากตัวอ่อนของหนู เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงที่มีส่วนประกอบของซีรั่มที่ได้จากโค (fetal bovine serum) ซึ่งสภาพการเลี้ยงดังกล่าวทำให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อโรค หรือโปรตีนที่มาจากสัตว์ และอาจก่อให้เกิดปัญหาการต่อต้านทางภูมิคุ้มกัน หรือแพร่เชื้อจากสัตว์สู่คนเมื่อนำมาใช้ในทางคลินิก ถึงแม้ว่า Amit และคณะ (๒๐๐๕) จะทำการศึกษาและรายงานว่าไม่มีหลักฐานแสดงถึงการปนเปื้อนของไวรัสจากหนูมากับ

เซลล์พี่เลี้ยงที่ใช้เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ อย่างไรก็ตาม ในอนาคตหากจำเป็นต้องมีการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์มาใช้ในทางคลินิก เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนนั้น จำเป็นต้องแยก เพาะเลี้ยง และเก็บรักษาในสภาพที่ไม่มีการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ที่มาจากสัตว์

เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนต้องถูกสร้างและเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง เพื่อป้องกันความผิดปกติของโครโมโซม ที่อาจจะเกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการต่อเนื่องเป็นเวลานาน ดังนั้นเซลล์พี่เลี้ยงที่แยกได้ จากคนจึงถูกนำมาใช้แทนเซลล์พี่เลี้ยงที่แยกได้จากหนู Hovatta และคณะ (๒๐๐๓) ประสบความสำเร็จในการสร้างและเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยการใช้เซลล์พี่เลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสที่แยกได้จาก foreskin ของทารกแรกเกิด หลังจากนั้นจึงมีรายงานความสำเร็จในการสร้างและ หรือ เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์โดยใช้เซลล์พี่เลี้ยงชนิดต่างๆ ที่แยกได้จากมนุษย์ เช่น กล้ามเนื้อของเด็ก, ผิวหนังของเด็กและผู้ใหญ่ (Richard และคณะ ๒๐๐๒; Richards และคณะ ๒๐๐๓), fallopian tube, human marrow stromal cells (hMSCs) (Cheng และคณะ ๒๐๐๓) หรือแม้แต่เซลล์ไฟโบรบลาสที่เกิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ก็สามารถใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงได้ (Stojkovic และคณะ ๒๐๐๕)

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เจริญมาจากกลุ่มเซลล์ inner cell mass (ICM) ที่อยู่ในตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส วิธีการแยก ICM เพื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงมีส่วนสัมพันธ์โดยตรงกับการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ปราศจากการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์จากสัตว์ วิธีดั้งเดิมในการแยก ICM ทำได้โดยการใช้ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันระหว่าง แอนติเจน และแอนติบอดี้ ที่เรียกว่า immunosurgery (Evan และ Kaufman, ๑๙๘๑; Martin ๑๙๘๑) แอนติบอดี้ และแอนติเจนที่ใช้ได้มาจากซีรัมของสัตว์ จึงทำให้วิธี immunosurgery ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เพื่อสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่จะใช้ทางคลินิก ปัจจุบันวิธีที่เป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้แยก ICM แทนวิธี immunosurgery และสามารถสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดที่ปราศจากการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ได้แก่ การตัดแยก ICM ออกจาก เซลล์ trophectoderm (TE) ด้วยไปเปตแก้วที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กมาก (Kim และคณะ ๒๐๐๕) การใช้แท่งเหล็กทังสเตนขนาดเล็ก (Strom และคณะ ๒๐๐๗) การย่อยสลาย TE ด้วยสารละลายกรด Acidified Tyrode's solution (Ellerstrom และคณะ ๒๐๐๖) การใช้เลเซอร์ร่วมกับเครื่อง micromanipulator (Turetsky และคณะ ๒๐๐๘) หรือ การเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัวอ่อน ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง (Fletcher และคณะ ๒๐๐๖) วิธีการต่างๆเหล่านี้เป็นทางเลือกที่ดีในการที่จะแยก ICM โดยไม่ต้องให้ ICM สัมผัสกับซีรัมที่มาจากสัตว์ ซึ่งมีโอกาสเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนกับเชื้อโรคหรือโปรตีนจากสัตว์ อันจะทำให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างได้ไม่เหมาะสมจะนำมาใช้ทางคลินิก

วัตถุประสงค์ของการวิจัยและขอบเขตการวิจัย

ในปีที่สองของการดำเนินการวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ปราศจากการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์จากสัตว์ หรือปนเปื้อนน้อยที่สุด โดยเลือกใช้วิธีการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยการเลี้ยงรวมกับเซลล์พี่เลี้ยงที่แยกได้จากคน และเลือกใช้วิธีการแยก ICM โดยไปเปตแก้ว หรือเลี้ยงตัวอ่อนทั้งใบ

วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย เป็นแบบเชิงทดลองในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จากตัวอ่อนที่มีการเจริญปกติหลังผ่านการปฏิสนธินอกร่างกายและได้รับการแช่แข็งไว้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในประเทศไทย ลดการนำเข้าสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดและเทคโนโลยีจากต่างประเทศ และลดการเสียเปรียบทางเศรษฐกิจและเพิ่มความสามารถในการแข่งขัน

๒. ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

๒.๑. การแยกเซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนัง

เก็บชิ้นเนื้อผิวหนังจากหน้าท้อง บริเวณที่เป็นแผลเป็น (scar) จากหญิงตั้งครรภ์ ที่เข้ารับการผ่าตัดทำคลอด แช่ใน phosphase buffer saline (PBS) ที่เติมยาปฏิชีวนะ (penicillin ขนาด 100 IU/ml และ streptomycin ขนาด 100 µg/ml) แล้วส่งไปยังห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ล้างชิ้นเนื้อ ๕ ครั้ง ด้วย PBS ที่เติมยาปฏิชีวนะ ตัดชั้นไขมันและแยกชั้น dermis ออกจากเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ ภายใต้กล้องสเตอริโอ (steriomicroscope) ตัดชั้น dermis ให้ได้ขนาด ๑-๒ ตร.ซม. แล้ววางชิ้นเนื้อลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ขนาด ๖๐ มม. ปล่อยชิ้นเนื้ออยู่ภายในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ประมาณ ๕-๑๐ นาทีใน biosafety carbinet เติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส (DMEM high glucose, FBS ร้อยละ ๑๐, Glutamax ร้อยละ ๑, non-essential amino acid ร้อยละ ๑, antibiotic ร้อยละ ๑และ 0.055 mM mercaptoethanol) จำนวน ๑ มล. ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีชิ้นเนื้อติดอยู่ เลี้ยงในตู้เพาะบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C CO_2 ร้อยละ ๕ นาน ๒๔ ชม. หลังจากครบ ๒๔ ชม. เติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสปริมาณ ๔ มล. ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีชิ้นเนื้อ และเลี้ยงในตู้เพาะบ่มเซลล์ต่อเนื่องอีกประมาณ ๗-๑๐ วัน เซลล์ไฟโบรบลาสจะเจริญออกมาจากชิ้นเนื้อ ทำการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาส โดยวิธีมาตรฐาน ใช้ trypsin-EDTA ร้อยละ ๐.๐๕ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ ๑,๒๐๐ รอบต่อนาที นาน ๕ นาที

เซลล์ไฟโบรบลาสที่ถูกเพิ่มจำนวนและผ่านการรักษาสภาพด้วยการแช่แข็งโดยใช้น้ำยาแช่แข็งที่มีส่วนประกอบของ dimethylsulfoxide (DMSO)ร้อยละ ๑๐ และ น้ำยาเลี้ยงไฟโบรบลาส ร้อยละ ๙๐ เซลล์ไฟโบรบลาสจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ลบ ๑๙๖ °C ในไนโตรเจนเหลว

๒.๒ การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง

เซลล์ไฟโบรบลาสจะถูกยับยั้งการแบ่งตัวด้วยการเติม mitomycin C ความเข้มข้น ๑๐ ไมโครกรัม / มล. ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส และ เลี้ยงในตู้ปรับอุณหภูมิที่ 37°C นาน ๒-๓ ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยการใช้ trypsin-EDTA ร้อยละ ๐.๐๕ และ seed เซลล์พี่เลี้ยงลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย gelatin ร้อยละ ๐.๑ โดยจำนวนของเซลล์พี่เลี้ยงประมาณ ๑๕๐,๐๐๐ เซลล์ ต่อจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ ๒.๘๔ ตร.ซม.

น้ำยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์พี่เลี้ยงประกอบด้วย (DMEM high glucose, FBS ร้อยละ ๑๐, Glutamaxร้อยละ๑, non-essential amino acid ร้อยละ ๑, antibiotic ร้อยละ๑และ mM mercaptoethanol ๐.๐๕๕) เซลล์พี่เลี้ยงจะถูกใช้ภายใน ๑-๓ วัน หลังจากวันที่เตรียม ก่อนใช้เซลล์พี่เลี้ยงเพื่อเลี้ยงร่วมกับ ICM, ตัวอ่อน หรือ hES-like cells น้ำยาเลี้ยงเซลล์พี่เลี้ยงจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำยาที่ใช้สำหรับการแยกและการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน อย่างน้อย ๓-๕ ชั่วโมง

๒.๓ ตัวอ่อน

ในการดำเนินงานวิจัยในช่วงปีที่สองนี้ ทางคณะผู้วิจัย ได้เลือกใช้ตัวอ่อนที่ปฏิสนธิภายนอกร่างกาย มีการเจริญปกติหลังจากผ่านการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และได้รับการแช่แข็งไว้เพื่อทำการศึกษาวิจัย

๒.๔ การแยกเซลล์ inner cell masses (ICM) **และเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน** (human embryonic stem (hES) cells

๒.๔.๑ การแยก ICM

ทำการย่อยสลายเปลือกหุ้มตัวอ่อน (zona pellucida) โดยใช้เอนไซม์ pronase ความเข้มข้นร้อยละ ๐.๕ ใช้เวลาประมาณ ๒-๕ นาที จนเปลือกหุ้มตัวอ่อนละลายหมด หรือ Acidified Tyrode's solution ร้อยละ ๐.๑ นาน ๕-๑๐ วินาที จากนั้นแยกส่วนของ trophectoderm (TE) ออกจาก ICM ด้วยด้วยวิธีการตัดโดยใช้ glass pipette หรือ เข็มภายใต้กล้องสเตอริโอ (stereo-microscope)

๒.๔.๑.๑ วิธีการตัด หลังจากย่อยเปลือกหุ้มตัวอ่อนออกแล้วจะทำการตัดส่วนของตัวอ่อนที่มี ICM โดยใช้ glass pipette หรือเข็มขนาด 30 G 1/2 การตัดจะทำภายในหยดของน้ำเลี้ยงตัวอ่อนขนาด ๒๐-๔๐ ไมโครลิตร ที่ถูกคลุมด้วย mineral oil เพื่อป้องกันการระเหยและเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน

๒.๔.๑.๒ การเลี้ยงตัวอ่อนทั้งใบ (whole blastocyst culture) ในกรณีตัวอ่อนที่ส่วนของ ICM มีขนาดเล็กมาก หรือไม่สามารถสังเกตเห็นได้เมื่อใช้กล้องสเตอริโอ จะใช้วิธีเลี้ยงตัวอ่อนทั้งใบ บนเซลล์พี่เลี้ยงหลังจากที่ทำการย่อยเปลือกหุ้มตัวอ่อนออกแล้ว

๒.๕ การเลี้ยงและการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Culture and Propagation of hES cells)

ในระยะแรกของการสร้าง และเลี้ยง hES cells จะทำการ passage เซลล์ด้วยวิธี mechanical เพราะป้องกันการเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมอันเนื่องมาจากการ passage เซลล์ด้วยเอนไซม์ เมื่อโคโลนีของ hES cells มีขนาดประมาณ ๒,๐๐๐-๓,๐๐๐ ไมครอน โคโลนีจะถูกตัดแบ่งด้วย glass pipette ออกเป็นชิ้นเล็กประมาณ ๕-๘ ชิ้นขึ้นอยู่กับขนาดของโคโลนี จากนั้นโคโลนีที่ถูกตัดจะถูกนำไปเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมไว้ล่วงหน้าประมาณ ๒๔-๗๒ ชั่วโมง น้ำยาที่ใช้เลี้ยง hES cells ประกอบด้วย knockout Dulbecco's modified Eagles medium และเติมด้วย knockout serum replacement ร้อยละ ๒๐, Glutamax® ร้อยละ๑, non-essential amino acid ร้อยละ ๑, mercaptoethanol 0.055 mM, penicillin-streptomycin ร้อยละ ๑, insulin-selenium-transferrin ร้อยละ ๑ และ basic fibroblast growth factor (bFGF) 4 ng/ml. การ passage hES cells จะทำทุกๆ ๕-๗ วัน หรือขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของโคโลนี และขนาดของโคโลนี

๒.๖ การแช่แข็งเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Cryopreservation of hES cells)

ทำการแช่แข็ง hES cells ด้วยวิธี open pull straw vitrification ตามรายงานของ Reubinoff และคณะ (๒๐๐๑) โดยใช้สารเคมีที่ป้องกันการเป็นน้ำแข็งคือ ethylene glycol และ dimethyl sulphoxide (DMSO) และ sucrose เป็นสารที่ช่วยดึงน้ำออกจากเซลล์ และวิธีแช่แข็งแบบดั้งเดิม (conventional slow freezing) ตามรายงานของ Ha และคณะ (๒๐๐๕)

๒.๖.๑ วิธี open pulled straw vitrification ทำได้โดย ตัดแบ่งโคโลนีของ hES cells ด้วย glass pipette ออกเป็นชิ้นเล็กๆ โดยแต่ละชิ้นมีเซลล์ประมาณ ๕๐๐-๕,๐๐๐ เซลล์ แช่กลุ่มของเซลล์ในน้ำยา vitrification ๑ ที่มีส่วนประกอบของ DMSO ร้อยละ ๑๐ และ ethylene glycol ร้อยละ ๑๐ ใน holding medium นาน ๑ นาที จากนั้นแช่กลุ่มเซลล์ในน้ำยา

vitrification ๒ ที่มี DMSO ร้อยละ ๑๐, ethylene glycol ร้อยละ ๑๐, 0.1 M sucrose ใน holding medium นาน ๒๕ นาที ก่อนที่จะดูดกลุ่มเซลล์เข้าใน straw ด้วย capillary action และแช่ straw ในไนโตรเจนเหลวทันทีและเก็บ straw ไว้ใน cryotube ภายในถังไนโตรเจนเหลว

๒.๖.๒ วิธีดั้งเดิม (conventional method) ทำได้โดย หลังจากที่ตัดแบ่งโคโลนีออกเป็นกลุ่มเซลล์ประมาณ ๕๐๐-๕,๐๐๐ เซลล์ แล้วใส่กลุ่มเซลล์ในน้ำยาแช่งที่มี DMSO ร้อยละ ๕ และ ethylene glycol ร้อยละ ๑๐ ในน้ำยาเลี้ยง hES cells ที่อยู่ใน cryotube ใส่ cryotube ในกล่องสำหรับแช่แข็ง (freezing container; Mr Frosty; Nalgene, USA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ ลบ ๗๐ องศาเซลเซียส นาน ๑๒-๒๔ ชั่วโมง แล้วเก็บ cryotube ไว้ในไนโตรเจนเหลว

๒.๗ การพิสูจน์คุณลักษณะ(Characterization) ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน

Cell lines ที่สร้างได้จะต้องผ่านการพิสูจน์คุณลักษณะว่าแสดงคุณสมบัติเป็น hES cells หรือไม่โดยจะทำการทดสอบดังต่อไปนี้

๒.๗.๑ Alkaline phosphatase staining และ immunocytochemistry

Undifferentiated colonies จะถูกย้อมสีเพื่อทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ alkaline phophataseโดยใช้ชุดสอบสำเร็จรูป (Sigma-Aldish; St Louise, USA)

สำหรับการทดสอบวิธี immunocytochemistry, colonies จะถูก fix ด้วย paraformaldehyde (PFA) ร้อยละ ๔ ที่อุณหภูมิห้อง นาน ๑๐-๑๕ นาที จากนั้นจะทำการ block colonies ด้วย blocking buffer ซึ่งประกอบด้วย phosphase buffer saline (PBS), bovine serum albumin (BSA) ร้อยละ ๐.๕ และ Triton-X ร้อยละ ๐.๑ ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส ข้ามคืน (overnight) แล้ว incubate colonies ด้วย primary antibodies ที่ถูกเจือจางด้วย PBS ที่เติมด้วย BSA ร้อยละ ๐.๕ ที่อุณหภูมิห้องนาน ๒ ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ๓ ครั้ง แล้ว incubate ด้วย secondary antibodies ที่เจือจางด้วย PBS ที่เติมด้วย BSA ร้อยละ ๐.๕ นาน ๒ ชั่วโมง และล้างด้วย PBS อีก ๒ ครั้ง จากนั้นทำการ conterstaining ด้วย Hoechst 33342 ความเข้มข้น ๑ มก./มล. ปิดทับด้วย coverslip และดูผลการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบรังสี UV

Primary antibodies ที่ใช้จะมีความจำเพาะต่อ Oct-4, TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

Secondary antibody ที่ใช้ Rabbit anti-mouse IgG FITC หรือ Cy 3-conjugated (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA)

๒.๗.๒ การสร้าง embryoid bodie (EBs) และ teratoma

สร้าง EB โดยตัดแบ่ง colonies ของ hES cells ออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ ๐.๕ x ๐.๕ มม. แล้วเลี้ยงชิ้นส่วนของ hES cells ที่ถูกตัด ในน้ำยาเลี้ยง hES cells แต่ไม่เติม bFGF นานประมาณ ๕-๑๐ วัน แล้วสังเกตความสามารถของเซลล์ในการสร้าง EB

การสร้าง teratoma จะทำโดยการฉีด undifferentiated cells เข้าไปใน kidney capsule หรือบริเวณผิวหนังของอัณฑะของ nude mouse จากนั้นประมาณ ๖-๘ สัปดาห์ จะเกิดการสร้างก้อนเนื้อ tumors ขึ้น ทำการตัดก้อนเนื้อดังกล่าว fix ใน paraformaldehyde ตัดชิ้นเนื้อ ย้อมด้วยสี H&E และทำการตรวจทางพยาธิวิทยา

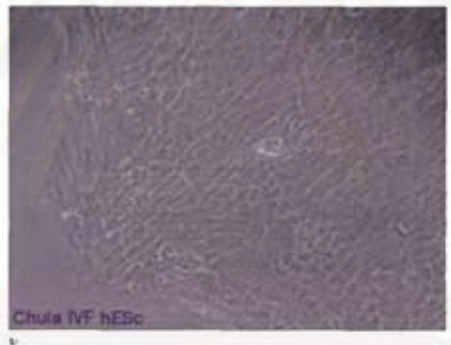
๒.๗.๓ การตรวจโครโมโซมด้วยวิธี Karyotyping

Incubate undifferentiated colonies ด้วย colcemid ความเข้มข้น ๒๐-๒๕ นก./มล. และ BrdU ความเข้มเข้น ๓๗.๕ มก./มล. นาน ๑๗-๑๙ ชั่วโมง (Fisher และคณะ ๑๙๙๖) ล้างออกด้วย PBS และทำให้เป็น single cell suspension ด้วยการใช้ cell dissociation buffer fix และย้อมสี cells ด้วยวิธี standard G-banding และตรวจสอบ metaphase spread ทำการตรวจสอบโครโมโซมครั้งแรกที่ passage ที่ ๕ และ ๑๐ จากนั้นตรวจสอบทุกๆ ๑๐-๑๕ passage เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมของ hES cell lines

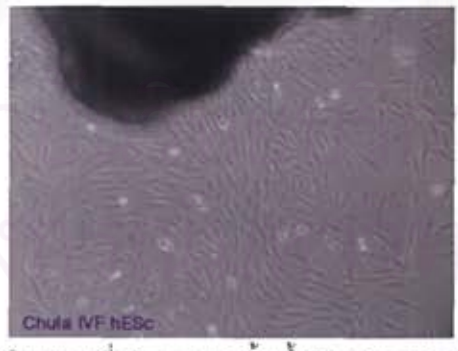
๓. ผลการวิจัย

๓.๑ การแยก และการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ (human adult skin fibroblasts)

ในการศึกษานี้ ทางคณะผู้วิจัยสามารถสร้างเซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังของคนได้ทั้งหมด ๓ เซลล์ไลน์ จากชิ้นเนื้อ ๔ ชิ้นเนื้อ หลังจากเลี้ยงชิ้นเนื้อนานประมาณ ๗-๑๐ วัน จบพบเซล์กลุ่มแรกที่เจริญออกมาจากชิ้นเนื้อ ซึ่งมีลักษณะกลม แต่ละเซลล์แผ่แบนและยึดติดกันแน่น (รูปที่ ๑) เซลล์กลุ่มดังกล่าวมีลักษณะคล้าย keratinocyte อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยไม่ทำการพิสูจน์ว่าเซลล์กลุ่มดังกล่าวเป็นเซลล์ชนิดใด หลังจากทำการย่อยเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย keratinocyte ออกด้วย trypsin-EDTA ร้อยละ ๐.๕ และเลี้ยงชิ้นเนื้อต่ออีก ๓-๕ วัน จะพบกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกระสวย เรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ (รูปที่ ๒) เจริญออกมาจากบริเวณที่เคยมี keratinocyte อยู่



รูปที่ ๑ เซลล์ชนิดแรกที่เจริญออกจากชิ้นเนื้อผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ ลักษณะค่อยข้างกลม รี แผ่ยึดติดกันแน่น (กำลังขยาย ๔๐ เท่า)

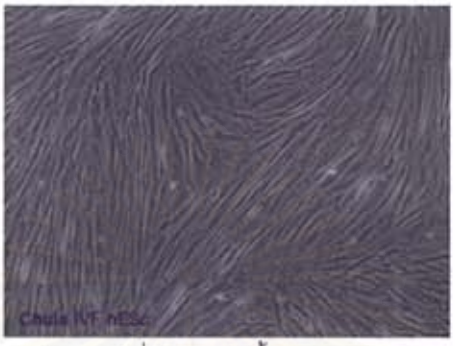


รูปที่ ๒ ลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสที่เจริญออกจากชิ้นเนื้อผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ (กำลังขยาย ๔๐ เท่า)

เซลล์ไฟโบรบลาสที่สร้างได้ถูกเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและเก็บรักษาสภาพโดยการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ที่ความเย็น ลบ ๑๙๖ องศาเซลเซียส หลังจากละลายเซลล์ไฟโบรบลาสเพื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิต หลังจากการแช่แข็ง พบว่ากว่าร้อยละ ๙๐ ของเซลล์ยังรอดชีวิต เซลล์ไฟโบรบลาสทั้ง ๓ เซลล์ไลน์ ถูก passage อย่างต่อเนื่อง โดยทำการ split ที่อัตราส่วน

๑:๓-๑:๔ ทุกๆ ๔-๕ วัน ในระหว่างการเลี้ยงพบว่าอัตราการตายของเซลล์ ต่ำมากเมื่อเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกได้จากตัวอ่อนของหนูไมซ์ (mouse embryonic fibroblasts; MEFs) เมื่อเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เหมือนกัน

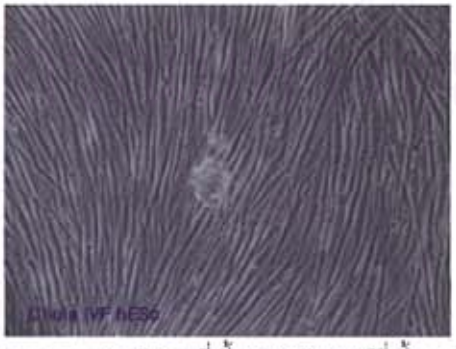
หลังจากที่ทำการหยุดการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสด้วยการเลี้ยงในน้ำยาที่มี mitomycin C ขนาด ๑๐ µg/ml นาน ๒.๕ ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยง พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสทั้งสามเซลล์ไลน์ มีมากกว่าร้อยละ ๙๐ (รูป ๓)



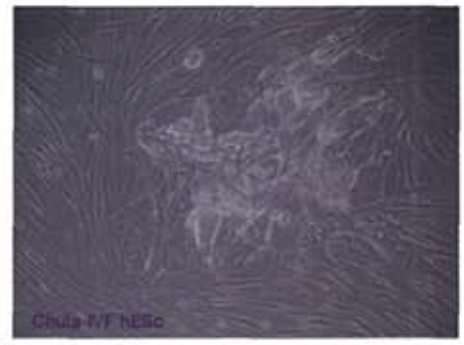
รูปที่ ๓ เซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ ที่ผ่านการยับยั้งการเจริญเติบโตด้วย mitomycin C และเตรียมไว้สำหรับเลี้ยง ICM, ตัวอ่อน หรือ hES like cells(กำลังขยาย ๔๐ เท่า)

๓.๒ การสร้างและการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน

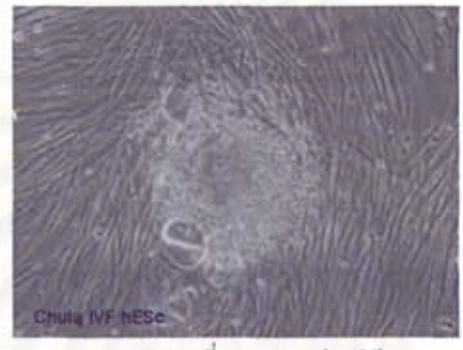
ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ ตัวอ่อนที่มีการพัฒนาเป็นปกติหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และผ่านการแช่แข็ง ทั้งหมด ๑๐ ตัวอ่อน เลือกใช้วิธีการแยกเซลล์ ICM ด้วยการตัดด้วยไปเปตแก้วขนาดเล็ก กับตัวอ่อนทั้งสิ้น ๘ ตัวอ่อน เนื่องจาก ICM ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส มีขนาดใหญ่ และมองเห็นชัดเจน ส่วนอีก ๒ ตัวอ่อน ที่ตำแหน่งและขนาดของ ICM เล็กมาก ไม่เหมาะที่จะแยก ICM ด้วยการตัดโดยไปเปต จึงเลือกใช้การเลี้ยงทั้งตัวอ่อนบนเซลล์พี่เลี้ยง หลังจากเลี้ยง ICM หรือตัวอ่อนร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงนานประมาณ ๗-๑๐ วัน คณะผู้วิจัยพบว่า ICM หรือตัวอ่อนมีการเจริญแตกต่างกัน สามลักษณะ คือ ICM หรือ ตัวอ่อน เกิดการตาย (degenerate) และเซลล์ไม่มีการเจริญเติบโต (รูปที่ ๔), มีเซลล์บางกลุ่มเจริญออกมาจาก ICM หรือ ตัวอ่อน ซึ่งเซลล์กลุ่มดังกล่าวเป็นเซลล์ที่เจริญมาจาก trophectoderm (TE) หรือเรียกว่า TE outgrowth (รูปที่ ๕) และการเจริญในลักษณะสุดท้ายคือ มีกลุ่มเซลล์เจริญออกมาจาก ICM และมีลักษณะเป็น primary human embryonic stem cells (รูปที่ ๖, ๗) เมื่อทำการตัดแบ่งโคโลนีของ primary human embryonic stem cells และเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมใหม่ ต่อเนื่องอีกประมาณ ๕-๗ วัน จะพบการเจริญของ hES like cells (รูปที่ ๘, ๙)



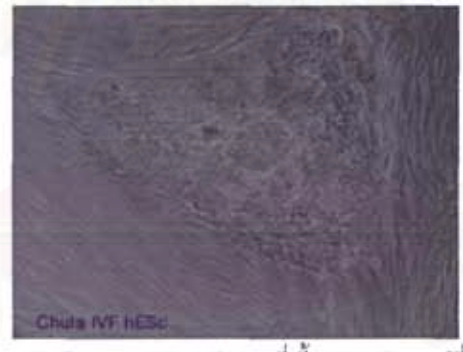
รูปที่ ๔ กลุ่มเซลล์ที่เกิดการตาย (degenerated) หลังจากที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง นาน ๑ สัปดาห์ (กำลังขยาย ๔๐ เท่า)



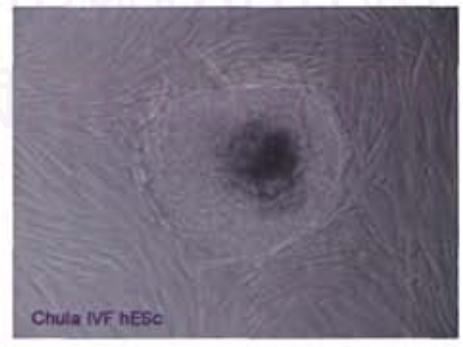
รูปที่ ๕ ลักษณะของเซลล์ที่เจริญออกมาจาก trophectoderm (TE) หรือ เรียกว่า trophectoderm outgrowth การเจริญของ TE จะยับยั้งการเจริญของ hES like cells (กำลังขยาย ๔๐ เท่า)



รูปที่ ๖ primary hES-like cells เจริญออกมาจากตัวอ่อนที่ แยก ICM ด้วยวิธี mechanical isolation (กำลังขยาย ๔๐ เท่า)



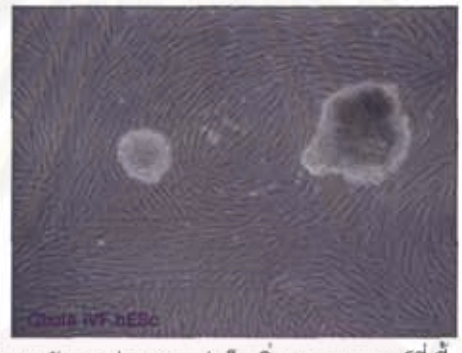
รูปที่ ๗ primary hES-like cells เจริญออกมาจากตัวอ่อนที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงแบบ whole blastocyst culture (กำลังขยาย ๔๐ เท่า)



รูปที่ ๘ ลักษณะ colony ของ hES-like cells (กำลังขยาย ๔๐ เท่า)

รูปที่ ๙ ลักษณะของ individual cells ใน colony ของ hES-like cells (กำลังขยาย ๒๐๐ เท่า)

การเพิ่มจำนวน (passage) ของ hES-like cells คณะผู้วิจัยเลือกใช้การตัดโคโลนีให้เป็นกลุ่มเซลล์ (clumps) เล็กๆ ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ประมาณ ๒๐๐ เซลล์ โดยการใช้เข็ม ขนาด 30 G ½ ที่ติดกับไซริงค์ขนาด ๑ มล. จากนั้นเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง การเพิ่มจำนวนของ hES-like cells จะทำทุกๆ ๕-๗ วัน hES-like cells จะถูกแช่แข็งเพื่อรักษาสภาพ โดยใช้วิธี slow freezing และใช้น้ำยาแช่แข็งที่มีความเข้มข้นของ dimethylsulfoxide (DMSO) ที่ร้อยละ ๑๐ และใช้วิธี vitrification จากผลการศึกษาพบว่าหลังผ่านการแช่แข็ง hES-like cells มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ร้อยละ ๘๐-๙๐ (รูป ๑๐)



รูปที่ ๑๐ hES like colonies ที่ถูกละลายหลังจากผ่านการแช่แข็ง เริ่มเกาะบนเซลล์พี่เลี้ยงภายใน ๒๔ ชั่วโมงหลังจากถูกละลาย (กำลังขยาย ๔๐ เท่า)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์โดยใช้เซลล์พี่เลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสที่แยกจากผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่แสดงในตารางที่ ๑

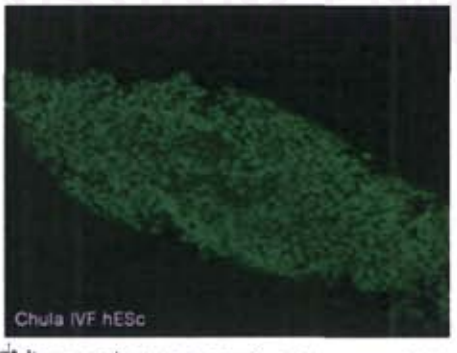
ตารางที่ ๑ ผลการแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยใช้เซลล์พี่เลี้ยงที่แยกจากผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่

Experiment	blastocyst number	Stage of blastocyst	Method for ICM isolation	Outgrowth formation	hES cells
I	no.1	expanded	mechanical	degenerated	-
	no.2	expanded	mechanical	degenerated	-
	no.3	expanded	mechanical	TE outgrowth	differentiated cells
	no.4	expanded	mechanical	primary hES-like cells	hES-like cells
II	no.1	expanded	whole blastocyst culture	primary hES-like cells	differentiated cells
III	no.1	expanded	mechanical	degenerated	-
	no.2	expanded	mechanical	TE outgrowth	differentiated cells
	no.3	hatching	whole blastocyst culture	TE outgrowth	differentiated cells
IV	no.1	expanded	mechanical	degenerated	-
	no.2	hatching	mechanical	not attached on feeder	-

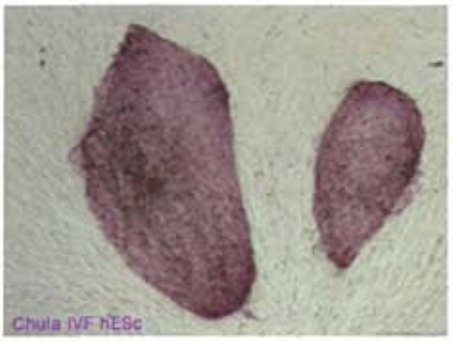
๓.๓ การพิสูจน์คุณลักษณะ และการเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะของ hES-like cells

hES-like cells ที่สร้างได้ ๑ สายพันธุ์ ถูกทดสอบเพื่อพิสูจน์คุณลักษณะของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยในระยะนี้ทางผู้วิจัยได้ทำการทดสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ alkaline phosphatase (AP) และการแสดงออกของ transcription factor Oct-4 โดยวิธีการย้อมสีทางอิมมูโน (immunostaining) พบว่า hES-like cells ให้ผลบวกต่อการทดสอบดังกล่าว (รูป ๑๑, ๑๒)

ส่วนการทดสอบอื่นๆ ได้แก่ การย้อมสีทางอิมมูโนเพื่อตรวจหาการแสดงออกของ surface antigen ต่อ SSEA-4, SSEA-3, TRA-1-60 และ TRA-1-81 รวมถึงการทดสอบทางโมเลกุลเพื่อตรวจหาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน คณะผู้วิจัยจะได้ดำเนินการในช่วงต่อไป

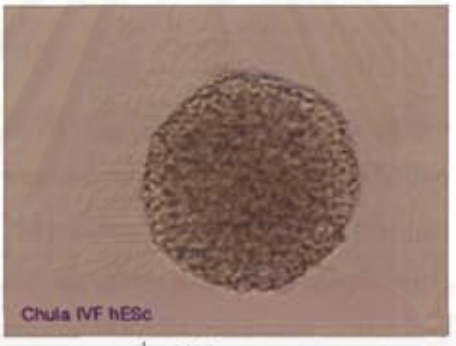


รูปที่ ๑๑ hES-like cells ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ Oct-4 immunostaining (กำลังขยาย ๑๐๐ เท่า)

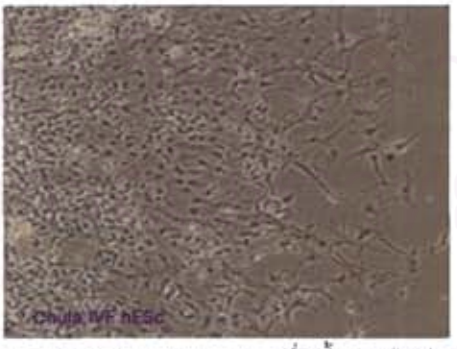


รูปที่ ๑๒ hES-like cells ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ alkaline phosphatase (AP) (กำลังขยาย ๔๐ เท่า)

การเหนี่ยวนำ hES-like cells ให้เปลี่ยนเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ พบว่า hES-like cells ที่สร้างได้สามารถเปลี่ยนไปเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีโครงสร้างเป็นสามมิติที่เรียกว่า embryoid body (EB) ในการเลี้ยงแบบแขวนลอย (suspension culture) (รูป ๑๓) ซึ่งโครงสร้างนี้สามารถเปรียบได้กับโครงสร้างของตัวอ่อนในระยะแรก เมื่อเลี้ยง EB ลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยเจลาติน ร้อยละ ๐.๑ และเหนี่ยวนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท พบว่าเซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ประสาท (รูปที่ ๑๔) หลังจากที่ทำการพิสูจน์คุณลักษณะของเซลล์ประสาทเหล่านั้นด้วยการย้อมสีทางอิมมูโน พบว่าเซลล์ประสาทที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้ผลบวกต่อ ß-tubulin และ nestin (รูป ๑๕, ๑๖)

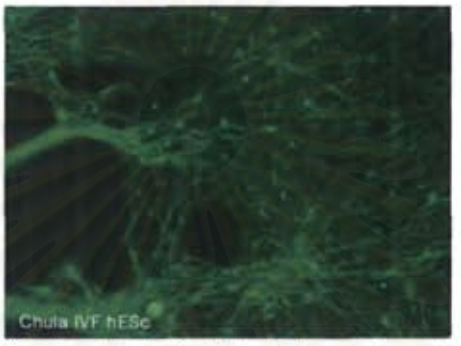


รูปที่ ๑๓ embryoid body (EB) formation หลังการเหนี่ยวนำให้ hES-like cells เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ (กำลังขยาย ๑๐๐ เท่า)



รูปที่ ๑๔ เซลล์ในกลุ่ม neuron cells เจริญจาก hES-like cells เมื่อเลี้ยงโดยไม่มีเซลล์พี่เลี้ยง(กำลังขยาย ๑๐๐ เท่า)

รูปที่ ๑๕ เซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ให้ผลบวกต่อการย้อมสีทางอิมมูโนเพื่อตรวจหา β-tubulin



รูปที่ ๑๖ เซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ให้ผลบวกต่อการย้อมสีทางอิมมูโนเพื่อตรวจหา nestin

๔. อภิปรายผลการวิจัย

เนื่องจากคุณลักษณะที่สำคัญของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ทำให้มีความคาดหวังในการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมาใช้ในทางคลินิก ไม่ว่าจะเป็นการใช้สำหรับรักษาผู้ป่วยด้วยวิธีเซลล์บำบัด (cell therapy) หรือการค้นหายาตัวใหม่ และการทดสอบทางยา (drug screening test) อย่างไรก็ตามเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างและเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงที่แยกจากหนู ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในทางการแพทย์ เพราะมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อโรค หรือโปรตีนที่มาจากสัตว์ต่อเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน และถึงแม้ว่าจะมีรายงานความสำเร็จในการแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์โดยไม่มีเซลล์พี่เลี้ยง (Klimanskaya และคณะ ๒๐๐๕) แต่ในการศึกษานี้ยังคงใช้น้ำยาที่ผ่านการ conditioned โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสของหนู Ludwig และคณะ (๒๐๐๖) ได้ทำการวิจัยถึงความเป็นไปได้ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนบน extracellular matrix และใช้น้ำยาที่ไม่มีส่วนผสมของผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ซึ่งในทางทฤษฎีนี้วิธีการนี้ถือว่าเป็นวิธีการเหมาะสมที่สุด ในการสร้าง และเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่จะใช้ในทางคลินิก แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดในสภาพการเลี้ยงแบบนี้พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีความผิดปกติทางพันธุกรรม เมื่อเลี้ยงต่อกันเป็นเวลานาน ทั้งนี้อาจจะเป็นไปได้ว่า การเติมสารต่างๆ โดยเฉพาะ growth factor ในระดับที่มีความเข้มข้นสูงมาก ลงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เซลล์ยังคงอยู่ในสภาวะ pluripotency เหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม

มีหลายรายงานการวิจัยที่ได้มีการใช้เซลล์พี่เลี้ยงที่แยกได้จากคน มาใช้ในการสร้าง และ หรือ เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ และพบว่าเซลล์พี่เลี้ยงที่แยกได้จากมนุษย์สามารถช่วยในการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน และการรักษาสภาพ undifferentiated ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (อ้างอิงถึง Mallon และคณะ ๒๐๐๖) ดังนั้นการใช้เซลล์พี่เลี้ยงที่แยกได้จากมนุษย์จึงทำให้มีความเหมาะสมที่จะนำเซลล์มาใช้ในทางการแพทย์

การศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัย เลือกใช้เซลล์พี่เลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสที่แยกได้จากผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ เซลล์ไฟโบรบลาส สามารถเจริญและแบ่งตัวได้มากกว่า 20 passage วิธีที่คณะผู้วิจัยใช้ในการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังไม่มีความซับซ้อนในกระบวนการเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่นๆ ที่แยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส จาก foreskin (Meng และคณะ ๒๐๐๘; Zhou และคณะ ๒๐๐๘) อย่างไรก็ตาม เซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกและเพาะเลี้ยงในการศึกษาครั้งนี้จะไม่ปราศจากผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เนื่องจากในน้ำยาเลี้ยงเซลล์มีส่วนผสมของซีรัมของโค แต่อย่างน้อยที่สุดการศึกษานี้เป็นอีกหนึ่งขั้นเพื่อที่จะพัฒนาไปสู่การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกจากคน เป็นเซลล์พี่เลี้ยง ซึ่งปัจจุบันมีรายงานการวิจัยที่สามารถสร้างเซลล์ไฟโบรบลาสที่ปราศจากการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และสามารถใช้เลี้ยงร่วมกับ hES cell line ได้ (Meng และคณะ ๒๐๐๘) ในขั้นต่อไป คณะผู้วิจัย จะได้ทำการแยกและสร้างเซลล์ ไฟโบรบลาสจากผิวหนังของคนที่ปราศจากการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์จากสัตว์และนำมาใช้ในการสร้างและเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

รายงานความสำเร็จในการสร้างและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ส่วนใหญ่ใช้เซลล์พี่เลี้ยงที่แยกได้จาก foreskin ของทารกแรกเกิด (Hovatta และคณะ ๒๐๐๓; Inzunza และคณะ ๒๐๐๕; Strom และคณะ ๒๐๐๗) จากผิวหนังของทารกที่แท้งก่อนครบกำหนดคลอด (Zhou และคณะ ๒๐๐๘) จากเยื่อบุผนังมดลูก (Lee และคณะ ๒๐๐๕) แต่ยังไม่มีรายงานความสำเร็จในการใช้เซลล์พี่เลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสที่แยกมาจากผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ผลการวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกได้จากผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ สามารถที่จะช่วยในการเจริญของ pluripotent เซลล์ใน ICM และช่วยในการแบ่งตัวขยายจำนวนของ hES-like cells ได้ ดังนั้นการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสที่แยกได้จากผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ปราศจากการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ที่มาจากสัตว์

จากผลการแยกและสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน พบว่าการเจริญของ primary hES-like cells สามารถพบได้ทั้งจากตัวอ่อนที่แยก ICM ด้วยการตัดด้วยไปเปตแก้วและจากตัวอ่อนที่เลี้ยงทั้งตัวอ่อนร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง การแยกเอาเซลล์ trophectoderm (TE) ออกจาก ICM ก่อนเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงนั้น มีผลต่อความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ทั้งนี้เนื่องจากการปนเปื้อนของ TE ในขั้นตอนการแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนนั้น TE จะเหนี่ยวนำให้ pluripotent cells เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ และ hES-like cells จะไม่สามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวได้ (Kim และคณะ ๒๐๐๕) เห็นได้จากผลการวิจัยครั้งนี้ (ตารางที่ ๑) แม้จะมี primary hES-like cells เจริญจากตัวอ่อนที่เลี้ยงทั้งตัวอ่อนร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง แต่หลังจากการ splitting ครั้งที่หนึ่ง จะพบเฉพาะ differentiated เซลล์ เจริญขึ้นมา และไม่พบ hES-like cells เจริญขึ้นมาเลย ต่างจาก primary hES-like cells ที่เจริญออกมาจาก ICM ที่ผ่านการตัดแยกเอา TE ออกด้วยไปเปตแก้ว หลังจากการ splitting ครั้งที่หนึ่ง กลุ่มของ hES-like cells เจริญขึ้นมาภายใน ๒๔ ชั่วโมง ดังนั้น การแยกเอา TE ออกให้มากที่สุดจาก ICM หรือจาก pluripotent เซลล์ มีผลต่อความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน

hES-like cells ที่สร้างได้จากการวิจัยครั้งนี้ แสดงคุณลักษณะเบื้องต้นของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยการให้ผลบวกต่อการย้อมสีทางอิมมูโน ต่อ transcriptional factor Oct-4 และการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase นอกจากนั้นเมื่อทำการเหนี่ยวนำให้ hES-like cells เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ พบว่าเซลล์สามารถเปลี่ยนเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายกับตัวอ่อนในระยะแรก (embryoid body) และสามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์ประสาทได้ อย่างไรก็ตาม การพิสูจน์คุณลักษณะอื่นๆ ของ hES-like cells เช่น การย้อมสีทางอิมมูโนเพื่อตรวจหา surface markers SSEA-3, TRA-1-60, TRA-1-81 รวมถึงการตรวจการแสดงออกของยีน ลักษณะทางโครโมโซมและความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิด teratoma เมื่อฉีด hES-like cells นี้เข้าสู่หนู จำเป็นต้องดำเนินการเพิ่มเติม เพื่อให้แน่ใจว่า hES-like cells ที่สร้างขึ้นจากการวิจัยครั้งนี้ มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน อย่างสมบูรณ์

อนึ่งในการวิจัยช่วงต่อไป คณะผู้วิจัยจะได้ดำเนินการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ปราศจากการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เพื่อจะได้นำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนดังกล่าวใช้ในการศึกษาวิจัยทางคลินิกต่อไป

๕. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาวิจัยของคณะผู้วิจัยพบว่า เซลล์พี่เลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสที่แยกได้จากผิวหนังของคนวัยผู้ใหญ่ สามารถที่จะใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากตัวอ่อนที่ถูกแยก ICM โดยการตัดด้วยไปเปตแก้ว (mechanical isolation of ICM) ผลจากการศึกษาวิจัยนี้ จะได้นำไปประยุกต์ใช้ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ปราศจากการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์จากสัตว์ในขั้นต่อไป

บรรณานุกรรม

๑. Amit M, Winkler ME, Menke S, Bruning E, Buscher K, Denner J, et al. No evidence for infection og human embryonic stem cells by feeder cell-derived murine leukemia viruses. Stem Cells 2005;23:761-71.

๒. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Funtional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell 2003;113:643-55.

๓. Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. Stem Cells 2003;21:131-42.

๔. Ellerstrom C, Strehl R, Moya K, Andersson K, Bergh C, Lundin K, et al. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. Stem Cells 2006;24:2170-6.

๕. Evan MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292:151-6.

๖. Fisher AM, Cockwell AE, Moore KJ, Gregson NM, Campbell PL, Campbell CM, et al. Rapid in situ harvesting and cytogenetic analysis of perinatal tissue samples. Prenat Diagn 1996;16(7):615–21.

๗. Fletcher JM, Ferrier PM, Gardner JO, Harkness L, Dhanjal S, Serhal P, et al. Variations in humanized and defined culture conditions supporting derivation of new human embryonic stem cell lines. Cloning and Stem Cells 2006;8(4):319-35.

๘. Ha SY, Jee BC, Suh CS, Kim HS, Oh SK, Kim SH, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. Hum Reprod 2005;20(7):1779-85.

๙. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg A, Inzunza J, Hreisson J, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. Hum Reprod 2003;18: 1404-9.

๑๐. Inzunza J, Gertow K, Stromberg AM, Matilainen E, Blennow E, Skottman H, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblast as feeder cells. Stem Cells. 2005;23:544-9.

๑๑. Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, Johnson J, West MD, Lanza R. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. Lancet 2005;365:1636–41.

๑๒. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. Nature 2006; 444(7118):481-5.

๑๓. Kim HS, Oh SK, Park YB, Ahn HJ, Sung KC, Kang MJ, et al. Methods for derivation of human embryonic stem cells. Stem Cells 2005;23:1228-33.

๑๔. Lee JB, Lee JE, Park JH, Kim SJ, Kim MK, Roh SI, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum free condition. Biol Reprod 2005;72:42-9

๑๕. Ludwig T, Levenstein M, Jones J, Berggren W, Mitchen E, Frane J, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. Nat Biotechnol 2006;24:185-7.

๑๖. Mallon BS, Park KY, Chen KG, Hamilton RS, McKay RDG. Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. Intl J Biotech Cell Biol 2006;38:1063-75.

๑๗. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryo cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:7634-8.

๑๘. Meng G, Liu S, Krawetz R, Chan M, Chernos J, Rancourt DE. A novel method for generating xeno-free human feeder cells for human embryonic stem cell culture. Stem Cells and Development 2008;17:413-22.

๑๙. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakamin M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell 2003;113:631-42.

๒๐. Strom S, Inzunza J, Grinnemo KH, Holmberg K, Matilainen E, Stromberg AM, et al. Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines. Hum Reprod 2007; 22(12):3051-8.

๒๑. Stojkovic P, Lako M, Stewart R, Prysborski S, Amstrong L, Evan J, et al. An autogenic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Stem Cells 2005;23:306-14.

๒๒. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998;282:1145–7.

๒๓. Turetsky T, Aizenman E, Gil Y, Weinberg N, Shufaro Y, Revel A, et al. Laser-assisted derivation human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. Hum Reprod 2008; 23(1): 46-53.

๒๔. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol 2000;18:399–404.

๒๕. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. Hum Reprod 2001;16:2187–94.

๒๖. Richards M, Tan S, Fong CY, Biswas A, Chan WK, Bongso A. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. Stem Cells 2003;21: 546-56

๒๗. Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2002;20:933–6.

๒๘. Zhang X, Stojkovic P, Przyborski S, Cooke M, Armstrong L, Lako M, et al. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. Stem Cells 2006;24:2669-76.

๒๙. Zhou J, Yang QO, Li J, Zhou XY, Lin G, Lu GX. Human feeder cells support establishment and definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells. Stem Cells and Development; 2008;17:737-50.

ภาคผนวก

เอกสารแนบท้าย ฉบับที่ ๕
หนังสือชี้แจงและหนังสือแสดงความยินยอมบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด
สถาบันพยาบาล/สถาบัน

คำอธิบาย

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เป็นเซลล์ตั้งต้นระยะแรกของชีวิต มีคุณสมบัติพิเศษ สามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัดจำนวน และสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆในร่างกายได้ทุกชนิด ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมีศักยภาพสูงที่จะนำมาศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อใช้ทดแทนและรักษาโรคเรื้อรังหลายชนิดให้หายได้ จึงมีประโยชน์อย่างมากในเบื้องต้นต่อการศึกษาวิจัยจะเป็นการพัฒนาความรู้ความเข้าใจทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และนำมาประยุกต์ใช้ทางเวชปฏิบัติ

ปัจจุบัน เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนสร้างและพัฒนาขึ้นจากตัวอ่อนและ/หรือเซลล์ไข่ที่ได้รับการบริจาคภายหลังสิ้นสุดกระบวนการรักษาภาวะมีบุตรยาก หรืออาจได้รับการบริจาคระหว่างขั้นตอนการรักษาหากมีปริมาณเซลล์ไข่มากเกินพอสำหรับการรักษาภาวะมีบุตรยาก

ข้าพเจ้าและสามีทราบดีว่า คณะแพทย์ผู้รักษาและทีมงานคำนึงถึงเป้าหมายและประโยชน์สูงสุดในการรักษาภาวะมีบุตรยากเป็นหลักสำคัญ อันดับแรก การขอรับบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือ ตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด จะพิจารณาเมื่อสิ้นสุดการรักษาภาวะมีบุตรยากแล้ว หรือต่อเมื่อเซลล์ไข่ที่ได้มีปริมาณมากเกินพอสำหรับการใช้เพื่อการรักษาทางคลินิก โดยจะต้องมีการแจ้งให้ข้าพเจ้าทราบและขอความยินยอมจากข้าพเจ้าอีกครั้ง ทั้งนี้การบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือ ตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด จะไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงหรืออันตรายต่อข้าพเจ้าเพิ่มขึ้น จากการรักษาภาวะมีบุตรยากตามปกติ

ข้าพเจ้าทราบดีว่า การบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือ ตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด จะดำเนินการโดยรักษาความลับของผู้ป่วยอย่างเคร่งครัด ทั้งนี้ข้าพเจ้าสามารถตัดสินใจขอยกเลิกการบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดได้ในภายหลังได้ โดยการตัดสินใจบริจาคหรือขอยกเลิกการบริจาคนี้จะไม่มีผลกระทบต่อการรักษาภาวะมีบุตรยากของข้าพเจ้า ทั้งนี้ข้าพเจ้ายินดีที่จะทำการบริจาคเพื่อประโยชน์ของการรักษาโรค และการศึกษาวิจัย โดยไม่มุ่งหวังสิ่งตอบแทนใดๆและจะไม่เรียกร้องความเป็นเจ้าของชีวผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นจากเซลล์ไข่ และ/หรือ ตัวอ่อน ของข้าพเจ้า ในภายภาคหน้า

ข้าพเจ้ามีโอกาสได้ซักถามและได้รับคำอธิบายจนกระทั่งเกิดความเข้าใจถึงขั้นตอนกระบวนการบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือ ตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด และมีความประสงค์ที่จะบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือ ตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด ภายใต้การดำเนินงานของ.....และคณะ จึงขอยืนยันการบริจาคตามนี้

☐ บริจาคเซลล์ไข่ ☐ บริจาคตัวอ่อน ☐ บริจาคทั้งเซลล์ไข่และตัวอ่อน

ลงนาม .....

(.....) (ภรรยา)

ลงนาม .....

(.....) (สามี)

ลงนาม .....

(.....) (พยาน)

ลงนาม .....

(.....) (แพทย์ผู้รักษาและให้คำอธิบาย)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COA No. 068/2008
IRB No. 096/50

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4455 ext 14, 15

Certificate of Approval

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has approved the following study which is to be carried out in compliance with the International guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

Study Title : Embryonic Stem Cell (Maintainance and Development for human Embryonic Stem Cell Lines (hESC)).

Study Code : -

Study Center : Chulalongkorn University

Principal Investigator : Associate Professor Kamthorn Pruksananonda, M.D.

Document Reviewed :

1. Protocol date: 11 Jan 08
2. Consent form

Signature: .....
(Emeritus Professor Anek Aribarg, M.D.)
Chairman of
The Institutional Review Board

Signature: .....
(Professor Areerat Suputtitada,M.D.)
Committee and Secretary of
The Institutional Review Board

Date of Approval : January 24, 2008

Approval Expire Date : January 24, 2009

Approval is granted subject to the following conditions: (see back of this Certificate)

ประวัตินักวิจัยและคณะ

๑. หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)

รองศาสตราจารย์นายแพทย์กำธร พฤกษานานนท์

Kamthorn PRUKSANANONDA, M.D.

Associate Professor of Obstetrics and Gynecology

Director of Chula IVF Program

ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๒. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

■ ๓ ๑๐๐๘ ๐๐๒๕๑ ๕๗๕

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

■ รองศาสตราจารย์ ระดับ ๙

■ หัวหน้าหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

■ หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๑๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐

โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๙, ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙

E-mail: pkamthorn@yahoo.com

๕. ประวัติการศึกษา

■ พ.ศ.๒๕๒๓ วิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

■ พ.ศ. ๒๕๒๕ แพทยศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยม) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

■ พ.ศ. ๒๕๓๑ วุฒิบัตร สูติ-นรีเวช จุฬาลงกรณ์/แพทยสภา

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

■ วุฒิบัตรเวชศาสตร์การเจริญพันธุ์

■ Certificate in Reproductive Biology and Infertility, University of Pennsylvania, Philadelphia, U.S.A.

<u>เกียรติประวัติในอดีต</u>

■ แพทย์ฝึกหัดดีเด่น และแพทย์ประจำบ้านดีเด่น โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

■ Best Research Paper - ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย

■ Young Genecologist Award – Asia Oceania Federation of Obstetrics and Gynaeclogy

■ Rockefeller Fellowship Award

■ เป็น Co author ใน chapter หนึ่งของหนังสือ Uterine and Embryonic Factors in Early pregnancy : Editor, JF Strauss, Plenum Press, U.S.A.

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย คนที่ ๑

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) ดร.รัฐจักร รังสิวิวัฒน์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Ruttachuk Rungsisiwut

๒. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

- ๓ ๓๐๑๒ ๐๐๗๘๗ ๔๑ ๕

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

- นักวิจัย

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

- หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
  คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐
  โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๙, ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙
- Email : ruttachule.r@chula.ac.th

๕. ประวัติการศึกษา

- ๒๕๔๒ - สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ๒๕๕๑ – วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- mouse and human embryonic stem cell derivation and culture
- somatic nuclear transfer in laboratory animal
- embryo manipulation

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ ๒

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวปราณี นำชัยศรีค้า

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms. Pranee Numchaisrika

๒. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

- ๓ ๑๐๐๑ ๐๐๒๙๘ ๘๓ ๘

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

- นักวิทยาศาสตร์ ๖

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

- หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
  คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐
  โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๘, ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙
- Email : pnumchaisrika@yahoo.com

๕. ประวัติการศึกษา

- พ.ศ.๒๕๒๙ วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Cell Culture, Collect and Culture Embryo in Animal Model

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ ๓

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางวิชชุดา อานนท์กิจพานิช

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Vichuda Ahnonkitpanit

๒. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

- ๓ ๑๐๑๔ ๐๐๙๒๘ ๕๕ ๒

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

- นักวิทยาศาสตร์การแพทย์(ชำนาญการ) ๘

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

- หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
  คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐
  โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๘, ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙
- Email : avichuda@yahoo.com

๕. ประวัติการศึกษา

- พ.ศ.๒๕๒๖ วิทยาศาสตร์บัณฑิต(ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- พ.ศ.๒๕๓๐ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต(สัตววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการปฏิสนธินอกร่างกาย(In vitro fertilization) เป็นเวลา ๑๖ ปี เช่น การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน การเตรียมอสุจิ การเลี้ยงตัวอ่อนในระยะต่างๆ การแช่แข็งและละลายตัวอ่อน การใส่ตัวอ่อน การช่วยการปฏิสนธิ(ICSI) การช่วยการฝังตัวของตัวอ่อน(Assisted hatching) การดึงเซลล์ตัวอ่อน(Embryo biopsy) การควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการให้ได้มาตรฐาน การวิเคราะห์ข้อมูล การฝึกอบรมบุคลากรจากสถาบันอื่นทั้งในและต่างประเทศ เป็นที่ปรึกษาในการจัดตั้งห้องปฏิบัติการด้านการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนให้กับสถาบันภายในประเทศ

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ ๔

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายแพทย์ประมวล วีรุตมเสน

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr.Pramuan Virutamasen

๒. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

- ๓ ๑๐๑๔ ๐๑๑๓๕ ๒๓ ๘

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

- ศาสตราจารย์กิตติคุณ ๑๑

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

- หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
  คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐
  โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๘, ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙
- Email : pvirutamasen@yahoo.com

๕. ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. ๒๕๐๑ อนุปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พ.ศ. ๒๕๐๕ แพทยศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยแพทยศาสตร์ กรุงเทพฯ
- พ.ศ. ๒๕๑๖ Master of Science , University of Pennsylvania , USA
- พ.ศ. ๒๕๑๖ อนุมัติบัตรสูตินรีเวชวิทยา แพทยสภา

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Physiology, Reproductive Biology, Specialty in Reproductive Endocrinology