| | |
|---|---|
| **ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** | การเลี้ยงและการแช่แข็งเซลล์ต้นกำเนิดลิมบัสและเนื้อเยื่อบุผิวช่องปากของกระต่าย |
| **ผู้เขียน** | นางสาวดารณี พรหมประสิทธิ์ |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์) |
| **คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** | ผศ.ดร. กนกกาญจน์ บำรุงกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก |
| | รศ.พญ. นภาพร ตนานุวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| | รศ.ดร. อำนาจ มีเวที อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| | ผศ.ดร. ชัยณรงค์ โตจรัส อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |

## บทคัดย่อ

การรักษาสภาวะการพร่องเซลล์ต้นกำเนิดลิมบัส (Limbal Stem Cell Deficiency; LSCD) ประสบความสำเร็จโดยการใช้เทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดลิมบัสเพาะเลี้ยงรวมทั้งเนื้อเยื่อบุผิวช่องปากเพาะเลี้ยงในผู้ป่วยที่มีอาการพร่องเซลล์ต้นกำเนิดลิมบัสโดยนักวิจัยหลายกลุ่มและด้วยหลายเทคนิค การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดลิมบัสและเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากของกระต่ายบนเยื่อหุ้มรกของมนุษย์ เลี้ยงร่วมกับ 3T3 fibroblast เพื่อนำไปปลูกถ่ายในกระต่ายก่อนที่จะนำมาใช้ในการรักษามนุษย์ และทำการศึกษาการสร้างผิวดวงตาใหม่หลังการปลูกถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังทำการศึกษาหาสารแช่แข็งที่เหมาะสมสำหรับแช่แข็งเซลล์และเนื้อเยื่อ การศึกษานี้ใช้กระต่ายพันธุ์ New Zealand white จำนวน 6 ตัว แบ่งออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัวเพื่อทำ limbal และ oral mucosal biopsies ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงทำโดยใช้เทคนิค explants culture ใช้เยื่อหุ้มรกของมนุษย์เป็นพื้นผิวยึดเกาะ เลี้ยงร่วมกับ 3T3 fibroblast

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และใช้เทคนิค air-lifting เนื้อเยื่อบุผิวที่เพาะเลี้ยงได้จากเนื้อเยื่อสดมีการเรียงตัวเป็นชั้นประมาณ 2-5 ชั้น เซลล์ในชั้นฐานมีรูปทรงเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์และรูปร่างแบนลงในชั้นผิว และพบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้จากเนื้อเยื่อลิมบัสและเนื้อเยื่อบุผิวช่องปาก พบการแสดงออกของ p63 ในเซลล์ชั้นฐานและชั้นกลาง การแสดงออกของ K3 พบในเซลล์ชั้นผิวและชั้นกลาง และการแสดงออกของ Cx43 พบกระจายอยู่ในทุกชั้น เนื้อเยื่อบุผิวเพาะเลี้ยงมีการแสดงออกของ p63, K3 และ Cx43 ยกเว้นเนื้อเยื่อบุผิวช่องปาก 1 ตัวอย่างที่ไม่พบการแสดงออกของ p63 ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นว่าเซลล์ในเนื้อเยื่อบุผิวเพาะเลี้ยงประกอบด้วยทั้งเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเพื่อทำหน้าที่เฉพาะ สำหรับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการแสดงออกของโปรตีนในผิวดวงตาที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์ต้นกำเนิดลิมบัสและเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากเพาะเลี้ยง มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับดวงตาปกติ แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อบุผิวเพาะเลี้ยงสามารถนำไปใช้ในการปลูกถ่ายเพื่อรักษา LSCD ได้ ในส่วนการแช่แข็งเนื้อเยื่อสดและเซลล์จากการเพาะเลี้ยงด้วย 25% DMSO ผสมกับ 25% propylene glycol เป็นเวลา 2 เดือนในไนโตรเจนเหลว ซึ่งเมื่อนำมาละลายแล้วเพาะเลี้ยงและย้อมแบบเดียวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อสด พบว่าเนื้อเยื่อบุผิวเพาะเลี้ยงสามารถเลี้ยงได้จากเนื้อเยื่อสดแช่แข็งทั้งหมด และจาก 1 ใน 6 ตัวอย่างของเซลล์เพาะเลี้ยงแช่แข็ง ลักษณะของเซลล์ที่เลี้ยงได้นั้นมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการแสดงออกของโปรตีนในรูปแบบที่คล้ายคลึงกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสด นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า 25% DMSO ผสมกับ 25% propylene glycol เป็นหนึ่งในสารแช่แข็งที่มีประสิทธิภาพในการนำไปแช่แข็งเนื้อเยื่อลิมบัสและเนื้อเยื่อบุผิวช่องปากซึ่งเป็นข้อดีต่อการนำไปใช้ในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**Thesis Title** Cultivation and Cryopreservation of Rabbit Limbal Stem Cell and Oral Mucosal Epithelial Cell

**Author** Miss Daranee Promprasit

**Degree** Master of Science (Anatomy)

**Thesis Advisory Committee**

| | | |
|---|---|---|
| | Asst. Prof. Dr. Kanokkan Bumroongkit | Advisor |
| | Assoc. Prof. Napaporn Tananuvat, M.D. | Co-advisor |
| | Assoc. Prof. Dr. Umnat Mevatee | Co-advisor |
| | Asst. Prof. Dr. Chainarong Tocharus | Co-advisor |

**Abstract**

Limbal stem cells deficiency (LSCD) has been successfully treated using cultivated limbal stem cells transplantation as well as cultivated oral mucosal epithelial transplantation in LSCD patients by many groups of researcher with various techniques. This study aimed to cultivate rabbit limbal stem cells and oral mucosal epithelial cells on HAM with 3T3 fibroblast for transplantation in rabbit model prior to use in human therapy. Reconstructed ocular surface by fresh cultured sheet transplantation was examined. Moreover, this study also verified the suitable cryoprotective solution for cryopreserved cells and tissues. Six New Zealand white rabbits were divided into two groups of three rabbits each which limbal and oral mucosal tissue biopsies were taken respectively. The cultivation was performed using

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

explants culture technique with denuded human amniotic membrane as a culture substrate, co-culture with 3T3 fibroblast and using air-lifting method. Cultured epithelial sheets from fresh tissue cultures showed stratification with two to five cell layers. Cuboidal cells and flatted cells were seen in basal layer and superficial layer respectively. There were no differences in epithelial morphology between cultured sheets from limbal and oral mucosal tissues. Immunostaining showed p63 positive cells were seen in basal and intermediated layer. K3 was stained cells in superficial and intermediate layer while expression of Cx43 were scattered in all layer throughout the epithelium. All cultured sheets expressed p63, K3 and Cx43 excepted one sheet from the oral mucosal culture that showed p63 negative. It is showed that all cultivated epithelial sheets contained heterogeneous population including stem cells and differentiated cells. The histology and marker expression of transplanted ocular surface with cultivated limbal and oral mucosal epithelial sheets were similar to normal eye indicated that cultivated epithelial sheets were able to use in transplantation for LSCD treatment. For cryopreservation, biopsy tissues and cultured cells were preserved for 2 months in liquid nitrogen using 25% DMSO combined with 25% propylene glycol. After 2 months, the tissues and cells were thawed, cultured and stained using same processes as fresh tissue cultures. Cultured epithelial sheets were able to generate from all cryopreserved tissues and one-sixth of cryopreserved cells. However, cultured cells morphology and marker expression showed similar pattern to fresh tissue culture. Moreover, the result showed that 25% DMSO combined with 25% propylene glycol was introduced as one of the effective CPA formulas to vitrify limbal and oral mucosal biopsies for advantages in future use.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved