พทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อพัฒนาวิธีการสร้างเชื้อสายเซลล์สัตว์จากตัวอ่อนของหนูทดลอง ให้เกิดขึ้นในคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เพื่อพัฒนาวิธีการเลี้ยงเซลล์สัตว์ในหลอดทดลอง ให้ลดความซับซ้อน และสามารถนำไปใช้ในการเรียนการสอนทุกระดับได้อย่างมีประสิทธิภาพ และได้ผลคุ้มค่า

เพื่อทดลองเลี้ยงเชื้อสายเซลล์สัตว์ในหลอดทดลอง โดยใช้วุ้นเป็นสิ่งยึดเกาะ

ความสำคัญของเรื่องที่ทำการวิจัย

การนำเซลล์ที่ได้จากตัวอ่อนสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ในขั้น blastocyst หรือที่เรียกว่า Embryonic Stem Cells (ES cells) มาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในห้องทดลอง เป็นพื้นฐานของการทำวิจัยด้านการเลี้ยงเซลล์สัตว์เพื่อใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ โดยการปลูกถ่ายสารพันธุกรรมให้กับตัวอ่อนของสัตว์เศรษฐกิจ โดยอาศัยเทคนิคชั้นสูงเช่น การแลกเปลี่ยนนิวเคลียส และการถ่ายทอดกรดนิวคลีอิค (nuclear replacement technology and nucleic acid transfer technology) นอกจากนี้ยังมีการใช้ ES cells ปกติ หรือที่ได้รับการดัดแปลงสารพันธุกรรมแล้ว มาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของยา (แทนการใช้สัตว์ทดลอง) อีกด้วย ผลลัพธ์อีกประการหนึ่งของการใช้เทคโนโลยีเหล่านี้ ได้แก่ การใช้หนูทดลอง ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมกลุ่มหนึ่งเป็นต้นแบบของการศึกษาทางด้านคัพภะวิทยา (embryology) การเจริญ และการเกิดโรคต่างๆขึ้นในขณะที่มีการเจริญในขั้นต่างๆ ของช่วงชีวิต

ในต่างประเทศการนำเอา ES cells ของสัตว์หลายชนิดมาทำเป็นเชื้อสายของเซลล์เพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆดังกล่าวข้างต้น มีมาอย่างกว้างขวาง ในการเลี้ยงเชื้อสาย ES cells เหล่านี้โดยทั่วไปแม้ว่าจะต้องมีเซลล์พี่เลี้ยง (fibroblast feeder) หรือวัสดุสังเคราะห์ชนิดต่างๆ เพื่อเป็นที่ยึดเกาะของเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ แต่ได้มีการพัฒนาเทคนิคและวิธีการเลี้ยง ES cells ที่ได้ผลดีมากโดยใช้วุ้นเจลาติน เพื่อให้เป็นพื้นผิวยึดเกาะของเซลล์แทนวัสดุสังเคราะห์ หรือเซลล์พี่เลี้ยง (Nagy *et al.*, 1993) วิธีการดังกล่าวนี้ นอกจากจะเป็นการลดขั้นตอนการเตรียมเซลล์พี่เลี้ยงแล้ว ยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการใช้วัสดุสังเคราะห์อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคนี้ ก็มีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงคือ ความเจาะจงของเชื้อสายเซลล์บางเชื้อสาย ที่ยังไม่สามารถพัฒนาให้เจริญได้โดยการใช้เทคนิคดังกล่าว

ในประเทศไทย การศึกษาทางด้านการเลี้ยง ES cells ยังไม่เป็นที่แพร่หลายนัก ทั้งนี้สาเหตุสำคัญอาจจะเป็นเพราะ นักวิจัยส่วนใหญ่เข้าใจว่า เทคนิคต่างๆที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวมีความซับซ้อน และใช้ต้นทุนสูงมาก ไม่คุ้มค่ากับการดำเนินการ และการคาดหวังผลลัพธ์ในด้านต่างๆ แต่ในสภาวะปัจจุบัน ความก้าวหน้าในการพัฒนาเทคนิค และวิธีการเลี้ยงเซลล์สัตว์มีมากขึ้น และมีผลการวิจัยจำนวนมากที่บ่งชี้ถึงความสำเร็จในการประยุกต์ใช้เทคนิคการเลี้ยงเซลล์สัตว์นี้ในด้านต่างๆ ซึ่งทำให้สามารถมองเห็นภาพความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้มากขึ้น (Hasty, *et al.* 1993; Nagy, *et al.*, 1993; Hogan, *et al.*, 1994; Rossant & Nagy, 1995)

ในการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นทั้งการสร้างเชื้อสาย ES cells จากตัวอ่อนของหนูทดลอง ซึ่งจะเป็นเชื้อสายเซลล์สัตว์เชื้อสายแรกที่จะถูกสร้างขึ้นใน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และวิธีการที่จะสามารถรักษาเชื้อสายเซลล์ดังกล่าว ให้สามารถคงอยู่ และสามารถใช้ประโยชน์ได้ในการเรียนการสอน และการวิจัยระดับต่างๆแล้ว ยังคำนึงถึงความเป็นไปได้ที่จะทำให้เกิดความประหยัดในการประยุกต์ใช้เทคนิควิธีการต่างๆในการเลี้ยงอีกด้วย

. ผลการวิจัย

การเตรียมตัวอ่อนขั้น blastocyst จากหนูทดลอง

ในจำนวนหนูเพศเมียที่ใช้ทั้งหมด 28 ตัว มีช่วงน้ำหนักตัวระหว่าง 20-35 กรัม พบว่ามีบางส่วนป่วยและตายก่อนการทดลองจะสิ้นสุด (ภาพที่ 1) และเมื่อทำการผสมแล้วได้ตัวอ่อนก่อนการฝังตัวขั้นต่างๆรวมทั้งสิ้น 71 ตัว โดยมีตัวอ่อนที่ฝังตัวกับผนังมดลูกแล้วบางส่วนได้ถูกนำไปใช้ในการทดลองอื่น จึงไม่สามารถนับจำนวนได้แน่นอน (ภาพที่ 2) และในจำนวนตัวอ่อนก่อนการฝังตัวนั้น มีเพียง 3 ตัวเท่านั้น ที่เป็นขั้น hatched blastocyst ที่สามารถนำไปเลี้ยงเพื่อให้ได้ ES cells

ในการนำตัวอ่อนขั้น hatched blastocyst ทั้ง 3 ตัวไปเลี้ยงใน อาหารเลี้ยงเซลล์ ES-medium พบว่าเริ่มมีการอพยพเคลื่อนตัว (migrate) ของเซลล์ออกมาจากตัวอ่อน ภายใน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 3) แต่เนื่องจากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในจานเลี้ยงที่ทำการทดลองทั้งหมดทำให้ตัวอ่อนหยุดการเจริญและตายในที่สุด จึงไม่สามารถดำเนินการเลี้ยงและแยก ES Cells ได้ต่อไป

ในระยะเวลาต่อมาได้ทำการเลี้ยงหนูเพศเมียอีก 5 ตัว ช่วงน้ำหนักเดียวกับหนูรุ่นแรก และทำการผสมปรากฏว่ามีแม่หนูเพียง 1 ตัวเท่านั้นที่ให้ตัวอ่อน และสามารถเก็บตัวอ่อนก่อนการฝังตัวขั้น hatched blastocyst ได้อีก 4 ตัวและได้นำมาทำการทดลองเลี้ยงทั้งหมด ตามขั้นตอนในแบบแผนวิธีการที่ 2 เสร็จแล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (ES medium) และตัวอ่อนลงไป แยกกันตัวละ 1 หลุม และนำจานเลี้ยงเซลล์เข้าฟักในตู้อบความชื้นที่ 37°C และ CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาตรวจดูพบว่า ตัวอ่อนทั้ง 4 ตัวมีการลงเกาะพื้นจาน และแบนตัวลงและมีการอพยพเคลื่อนที่ของเซลล์ออกมาโดยรอบตัวอ่อน และไม่มีการปนเปื้อนติดเชื้อจุลินทรีย์แต่อย่างใด จึงนับว่าเป็นความสำเร็จของการพัฒนาเทคนิคการทำให้ปลอดเชื้อขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการ