รายงานวิจัย

เรื่อง

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน
Embryonic Stem Cell

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๐
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์นายแพทย์กำธร พฤกษานานนท์
น.สพ.รัฐจักร รังสิวิวัฒน์
นางสาวปราณี นำชัยศรีค้า
นางวิชชุดา อานนท์กิจพานิช
ศาสตราจารย์กิตติคุณนายแพทย์ประมวล วีรุตมเสน

หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ เป็นเซลล์ที่แยกได้จากเซลล์ของตัวอ่อนในระยะก่อนฝังตัว เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนแสดงคุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถแบ่งตัวได้โดยไม่มีขีดจำกัด และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ทุกชนิดที่พบในร่างกาย ปัจจุบันเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนถูกสร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการในหลายๆประเทศ ประเทศไทยมีศักยภาพเพียงพอที่จะสร้างเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์เพื่อใช้ในการวิจัยทางด้านชีววิทยาโมเลกุล, การพัฒนาของตัวอ่อน หรือเพื่อการรักษาโดยใช้เซลล์ การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมนุษย์โดยแบ่งการศึกษาออกเป็นสองระยะ ระยะแรกศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่คาดว่าน่าจะสามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้ โดยเลือกใช้ตัวอ่อนกลุ่มที่มีการเจริญผิดปกติ หลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ทดสอบวิธีการแยกและเลี้ยงเซลล์ inner cell mass บนเซลล์พี่เลี้ยงชนิดต่างๆกัน นำผลที่ได้ประยุกต์ใช้กับการวิจัยในระยะที่สองซึ่งระยะนี้ใช้ตัวอ่อนกลุ่มที่มีการเจริญเป็นปกติหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกายและได้รับการแช่แข็งมาก่อน

ผลการวิจัยในระยะแรกใช้ตัวอ่อนที่เจริญผิดปกติจำนวนสิบตัวอ่อน พบว่าตัวอ่อนที่เซลล์ inner cell mass ถูกแยกด้วยวิธี immunosurgery ไม่สามารถเกาะบนเซลล์พี่เลี้ยง ตัวอ่อนที่ไม่สามารถแยกเซลล์ inner cell mass และเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงทั้งใบสามารถเกาะบนเซลล์พี่เลี้ยงจำนวนแปดในเก้าใบ และหนึ่งใบสามารถสร้างกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดระยะแรก แต่เกิดการ differentiation หลังจาก passage ที่หนึ่ง

การวิจัยระยะที่สองใช้ตัวอ่อนที่เจริญปกติและผ่านการแช่แข็งทั้งหมดยี่สิบหกตัวอ่อน พบว่าตัวอ่อนยี่สิบสามตัวอ่อนสามารถเกาะบนเซลล์พี่เลี้ยง ตัวอ่อนสามารถสร้างกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในระยะแรกจำนวนสามกลุ่มเซลล์ และในจำนวนสามกลุ่มเซลล์นี้สามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้หนึ่งเซลล์ไลน์ ซึ่งเซลล์ไลน์ดังกล่าวนี้ได้ทดสอบคุณลักษณะบางประการพบว่าให้ผลบวกต่อ alkaline phosphatase และ Oct-4 นอกจากนั้นยังสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า embryoid body ซึ่งเป็นความสามารถในการแปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ

ขณะนี้เซลล์ไลน์ดังกล่าวกำลังถูกเพิ่มจำนวนและทดสอบคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนเพิ่มเติม เพื่อใช้ในกระบวนการวิจัยในขั้นตอนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

Human embryonic stem cells (hESCs) can be derived from the pluripotent cells of pre-implantation embryos. These hESCs can be renew themselves indefinitely and differentiated into variety of cell types in human body. To date, hESC lines have been derived in many laboratories around the world. Thailand has the potential to derived hESCs and those hESCs can be used for studying biomedical, embryo development or cell therapy. This study was aimed to find the most suitable conditions for derivation of hESCs. The study was divided into two experiments, experiment I, culturing the abnormal development of fertilized embryos on different type of feeder cells and investigatation the effect of inner cell mass (ICM) isolation method on the derivation of hESCs. Experiment II, isolation of hESCs from frozen-thawed normal development of fertilized embryos. The results in experiment I showed that the ICM which isolated by immunosurgery method cannot attached on the feeder, while eight out of nine which the whole blastocyst have been cultured can attached on the feeder. One blastocyst can form outgrowth but differentiated after first passaging. Experiment II, twenty-three out of twenty-six frozen thawed normal development of fertilized embryos attached on the feeder layer. Three outgrowths were formed after initial plating and one hESC line was established. This newly established hESC line was characterized and showed positive results for alkaline phosphatase and Oct-4 staining. Furthermore, this hESC line was able to form embryoid body which confirms their differentiation potential and this new hESC line is undergoing for characterization.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัย เรื่อง "เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Embryonic Stem Cell)" ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๐ เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งจะนำไปสู่การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดต่อไป

การวิจัยนี้จะไม่สามารถสำเร็จลงได้ หากไม่ได้รับความสนับสนุนจากหน่วยงานและบุคลากรจำนวนมากให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ รวมทั้งได้ให้ข้อคิดเห็น และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ยิ่งต่อการวิจัย ซึ่งผู้วิจัยรู้สึกขอบคุณอย่างสูง ได้แก่ คุณพารณ อิศรเสนา บริษัท ปูนซิเมนต์ไทย, รองศาตราจารย์นายแพทย์ยาใจ ณ สงขลา อดีตคณบดีคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล อดีตคณบดีคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ศาสตราจารย์นายแพทย์สุทธิพร จิตต์มิตรภาพ รองอธิการบดี 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, Karolinsksa 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.

ขอขอบคุณอาจารย์นายแพทย์นิพัญจน์ อิศรเสนา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงมนตกานต์ ตันสถิตย์ รองหัวหน้าภาควิชาฝ่ายบริหาร หัวหน้าหน่วย embryology ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรหน่วยชีววิทยาวิทยาเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน และขอขอบคุณ สพ.ญ.ศศิธร รุ่งอรุณเลิศ, สพ.ญ.อัมพิกา ทองภักดี ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยสนับสนุนทางเทคนิค ท้ายที่สุดนี้งานวิจัยคงไม่สามารถสำเร็จลงได้หากปราศจากความช่วยเหลือของ คุณเสาวรัตน์ โพธิ์ประดิษฐ์ ซึ่งช่วยบริหารจัดการงบประมาณวิจัย และจัดเตรียม ต้นฉบับรายงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัย

มีนาคม ๒๕๕๑

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ๑
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ๒
กิตติกรรมประกาศ ๓
บทที่
๑. บทนำ
ความสำคัญและที่มาของปัญหา ๗
วัตถุประสงค์ของการวิจัยและขอบเขตการวิจัย ๙
วิธีดำเนินการวิจัย ๙
ประโยชน์ ๙
๒. ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน
เซลล์พี่เลี้ยง (feeder cells) สำหรับเลี้ยง ICM และ human embryonic stem cell ๙
ตัวอ่อน ๑๐
การแยกเซลล์ inner cell masses และเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (human embryonic stem (hES cells)) ๑๐
การเลี้ยงและการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์(Culture and Propagation of hES cells) ๑๐
การแช่แข็งเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Cryopreservation of hES cells) ๑๑
การพิสูจน์คุณลักษณะ (characterization) ของ human embryonic stem cell lines ๑๑
การวางแผนการทดลอง (Experimental design) ๑๒
ผลการดำเนินงาน
การสร้างเซลล์ไฟโบรบลาส(fibroblast) ๑๓
การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ๑๔
การทดลองที่ ๑ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากตัวอ่อนที่มีการเจริญที่ผิดปกติหลังปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ๑๕
การทดลองที่ ๒ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากตัวอ่อนที่มีการเจริญปกติ หลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกายและผ่านการแช่แข็ง ๑๗
๓. อภิปรายผลการดำเนินงาน ๒๐
๔. สรุป ๒๒
๕. บรรณานุกรม ๒๓
๖. ภาคผนวก ๒๕
๗. ประวัตินักวิจัยและคณะ ๒๘

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ ๑ ผลการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนที่เจริญผิดปกติ และผ่านการแช่แข็ง..... ๑๕

ตารางที่ ๒ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยใช้ตัวอ่อนที่มีการปฏิสนธิผิดปกติ และ ไม่ผ่านการแช่แข็ง..... ๑๖

ตารางที่ ๓ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยใช้ตัวอ่อนที่มีการปฏิสนธิเป็นปกติ และผ่านการแช่แข็ง..... ๑๗

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ ๑ ลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสชนิดต่างๆที่ใช้ในงานวิจัย ๑๔

รูปที่ ๒ ลักษณะของตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็ง การละลาย และเลี้ยงจนเจริญถึงระยะบลาสโตซิส ๑๔

รูปที่ ๓ การแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน จากตัวอ่อนที่มีการเจริญผิดปกติหลังการปฏิสนธินอกร่างกาย ๑๖

รูปที่ ๔ การแยกเซลล์ inner cell mass ด้วยเลเซอร์ และสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ๑๘

รูปที่ ๕ การเจริญของเซลล์ inner cell mass จากตัวอ่อนที่เจริญปกติ หลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง ๑๘

รูปที่ ๖ ลักษณะโคโลนีของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิด ๑๙

รูปที่ ๗ ลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ ๑๙

รูปที่ ๘ การพิสูจน์คุณลักษณะของเซลล์ที่คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ๒๐

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๑. บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา นักวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างจากตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส มีคุณสมบัติพิเศษและศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ทุกชนิดของร่างกายมนุษย์ได้ เกิดเป็นความหวังใหม่ที่จะนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมาประยุกต์ใช้รักษาโรคเรื้อรังหลายชนิดให้หายขาดหรือทุเลาลงได้ เช่น โรคเบาหวานชนิดที่หนึ่ง โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด โรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท ภาวะบาดเจ็บของไขสันหลัง เนื่องจากโรคเรื้อรังเหล่านี้ทำให้เกิดภาวะทุพพลภาพ และต้องการการรักษาต่อเนื่อง ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้โดยวิทยาการทางการแพทย์ในปัจจุบัน อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของชาติและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยและครอบครัว นอกจากนี้ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน จะสามารถช่วยให้เข้าใจถึงกลไกการเกิดพยาธิสภาพในระดับเซลล์ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของชีวิต และศึกษาถึงการพัฒนาการทั้งที่ปกติและผิดปกติ รวมทั้งใช้สร้างแบบจำลองของโรคเพื่อใช้ในการทดลอง โดยจะสามารถทดสอบยาและวิธีการรักษาในเซลล์และเนื้อเยื่อของมนุษย์ที่สร้างขึ้น ก่อนจะนำไปทดลองวิจัยในผู้ป่วยเป็นการลดความเสี่ยงในการทดลองวิจัยทางคลินิกในมนุษย์ลง

ลักษณะสำคัญที่ทำให้นักวิทยาศาสตร์ต่างให้ความสำคัญกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ คือ ความสามารถในการแบ่งตัวได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด (self-renewal) และในขณะเดียวกันเซลล์ยังคงมีศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่างๆที่ทำหน้าที่อย่างจำเพาะ (differentiation potential) ปัจจุบันวิธีที่จะได้มาซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์เพื่อใช้ในงานวิจัยสามารถทำได้โดย

๑. ติดต่อยังห้องปฏิบัติการซึ่งสร้าง และพิสูจน์คุณลักษณะเซลล์ไลน์ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เพื่อขอรับเซลล์ไลน์โดยตรง ซึ่งจำเป็นต้องเสียค่าใช้จ่ายในการซื้อเซลล์ไลน์ หรือเสียเฉพาะค่าขนส่งเท่านั้น
๒. สั่งซื้อเซลล์ไลน์จากบริษัทที่ขายเซลล์ไลน์
๓. สร้างเซลล์ไลน์ขึ้นเองภายในห้องปฏิบัติการ

การนำเข้าเซลล์ไลน์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากต่างประเทศไม่ว่าจะได้จากสถาบันวิจัยที่สร้างเซลล์ต้นกำเนิดโดยตรงหรือซื้อจากบริษัทที่ขายเซลล์ไลน์ ปัญหาสำคัญที่อาจจะเกิดขึ้นได้ก็คือ การสูญเสียเซลล์ไลน์ในระหว่างการขนส่ง หรือขั้นตอนพิธีการศุลกากร แม้ว่าระบบการขนส่งเซลล์ไลน์จะขนส่งโดยใช้ระบบความเย็นจากห้องควบคุมความเย็นหรือน้ำแข็งแห้ง แต่โดยทั่วไประดับความเย็นจะอยู่ที่ไม่ต่ำกว่า ลบ ๒๐ องศาเซลเซียส หากใช้เวลาในการขนส่งนาน โอกาสที่เซลล์จะเกิดการเสื่อมสภาพเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิย่อมเป็นไปได้สูง

การสร้างเซลล์ไลน์นอกจากจะเป็นการลดความเสี่ยงต่อปัญหาการเสื่อมสภาพของเซลล์ไลน์จากการขนส่งแล้ว ยังเป็นการพัฒนาประสบการณ์และองค์ความรู้ของนักวิจัยอันจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในประเทศไทยในอนาคต ถึงแม้การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จะมีการรายงานความสำเร็จครั้งแรกตั้งแต่ปี ๑๙๙๘ (Thomson และคณะ ๑๙๙๘) แต่วิธีการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนยังมีความหลากหลาย ส่งผลต่อความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ไม่ว่าจะเป็น ชนิดของเซลล์พี่เลี้ยง (feeder cells) วิธีการเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง รวมถึงจำนวนของเซลล์พี่เลี้ยงที่ใช้, วิธีในการแยกกลุ่ม inner cell mass (ICM) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะที่เรียกว่า pluripotent cells และจะเจริญไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน รวมไปถึงวิธีการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด เป็นต้น ปัจจัยต่างๆดังกล่าวขึ้นอยู่กับจุดมุ่งหมายของการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปใช้ หากเป็นการสร้างเพื่อศึกษาวิจัยความเป็นไปได้ในการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

ไปใช้ในทางคลินิก จำเป็นต้องสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในสภาพที่ปลอดจากผลิตภัณฑ์ที่มาจากสัตว์ และเป็นระดับ Good Manufacturing Practice (GMP)

ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่ากลไกใดที่ทำให้เซลล์ ICM ซึ่งปกติแล้วจะเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆเป็นส่วนประกอบของร่างกาย กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน นอกจากนั้นเซลล์ไลน์แต่ละเซลล์ไลน์ถึงแม้สร้างขึ้นมาจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ก็ยังแสดงคุณลักษณะทางกายภาพและระดับโมเลกุล โดยเฉพาะในระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน (Mikkola และคณะ ๒๐๐๖) ดังนั้น การมีเซลล์ไลน์ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจำนวนมาก จะทำให้มีความหลากหลายทางด้านพันธุกรรม และเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยต่อไป ภายในเซลล์ ICM ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสจะประกอบไปด้วยกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า epiblast ซึ่งเซลล์ epiblast นี้มีศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ร่างกายและเซลล์สืบพันธุ์ (Hiens และคณะ ๒๐๐๔) เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์สามารถสร้างได้จากการเลี้ยงกลุ่มเซลล์ดังกล่าวในห้องทดลอง และทำการพิสูจน์ได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนยังคงรักษาศักยภาพดังกล่าวได้หลังจากที่ผ่านการเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องเป็นเวลานาน (Thomson และคณะ ๑๙๙๘; Reubinoff และคณะ ๒๐๐๐) อย่างไรก็ดีองค์ความรู้เกี่ยวกับ การสร้าง, การพิสูจน์คุณลักษณะ และการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนยังคงอาศัยข้อมูลที่มีจากรายงานความสำเร็จของงานวิจัยหลายๆงานวิจัย ซึ่งมีความแตกต่างกันบ้างในรายละเอียด เป็นที่ยอมรับว่าความแตกต่างของความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนคนจากหนูเมาซ์นั้น อาจจะเนื่องมาจากความแตกต่างทางด้านชีววิทยาของเซลล์ หรือ จากเทคนิกที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างและเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด (Bongso และคณะ ๑๙๙๔; Piedrahita และคณะ ๑๙๙๐)

การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจะสร้างจากตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสซึ่งภายในจะมีกลุ่มเซลล์ inner cell mass (ICM) และกลุ่มเซลล์ ICM นี้จะถูกแยกออกโดยวิธี mechanical (Strom และคณะ ๒๐๐๗) หรือ immunosurgery (Thomson และคณะ ๑๙๙๘; Reubinoft และคณะ ๒๐๐๐) หลังจากที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง และเลี้ยงในน้ำยาสำหรับใช้แยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ICM จะเจริญและสร้างกลุ่มเซลล์ที่มีขอบเขตชัดเจน ซึ่งภายในกลุ่มเซลล์นั้นจะประกอบด้วยเซลล์เล็กๆที่มีขนาดของนิวเคลียสใหญ่ มองเห็นได้ชัดเจนจากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และมีอัตราส่วนระหว่างนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมสูง (Reubinoff และคณะ ๒๐๐๐) อย่างไรก็ตามมีรายงานความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จากตัวอ่อนระยะอื่นที่ไม่ใช่บลาสโตซิส เช่น ตัวอ่อนที่หยุดการเจริญก่อนถึงระยะบลาสโตซิส (Zhang และคณะ ๒๐๐๖) หรือ จากเซลล์บลาสโตเมียหนึ่งเซลล์ซึ่งเป็นวิธีการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยไม่มีการทำลายตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส (Klimanskaya และคณะ ๒๐๐๗)

ในระยะแรกของงานวิจัยเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ส่วนใหญ่เลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงที่แยกได้จากเซลล์ไฟโบรบลาสของหนู (mouse embryonic fibroblast) ต่อมานักวิจัยเกรงว่าอาจจะเกิดการปนเปื้อนของเชื้อโรค โดยเฉพาะไวรัส หรือโปรตีนบางชนิดจากหนูซึ่งอาจจะทำให้เซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรค ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะสร้าง และเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์โดยหลีกเลี่ยง เซลล์พี่เลี้ยง หรือสารต่างๆที่ได้มาจากสัตว์ ซึ่งจะเห็นได้จากรายงานการวิจัยบางงานวิจัยเลือกใช้เซลล์พี่เลี้ยงที่สร้างมาจากคน ไม่ว่า เซลล์ไฟโบรบลาสจากเด็ก, เยื่อบุท่อนำไข่ (Richard และคณะ ๒๐๐๒), เซลล์สโตรมาจากไขกระดูก (bone marrow stroma cell) (Cheng และคณะ ๒๐๐๓), เซลล์ไฟโบรบลาสจาก foreskin (Amit และคณะ ๒๐๐๓), เซลล์ไฟโบรบลาสจากผู้ใหญ่ (Richard และคณะ ๒๐๐๓) หรือ แม้แต่เซลล์เยื่อบุรก (Miyamoto และคณะ ๒๐๐๔) นอกจากนั้นยังได้มีความพยายามในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์โดยไม่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง โดยใช้น้ำยาชนิดพิเศษที่มีการเติมสาร growth factor ต่างๆร่วมกับ conditioned medium จากเซลล์พี่เลี้ยงไฟโบรบลาสจากหนู และเลี้ยงบน Matrigel (Xu และคณะ ๒๐๐๒), เลี้ยงบน

fibronectin โดยเติม TGF β1 และ bFGF (Amit และคณะ ๒๐๐๔) หรือ Matrigel ร่วมกับ สารที่กระตุ้น pathway ของ WNT (Sato และคณะ ๒๐๐๔).

วัตถุประสงค์ของการวิจัยและขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จากตัวอ่อนที่ได้รับการบริจาคจากคู่สมรสที่เข้ารับการแก้ไขภาวะการมีบุตรยาก ซึ่งตัวอ่อนที่ได้รับการบริจาค ได้ผ่านการแช่แข็งมาก่อน ขอบเขตของการวิจัยคือการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถสร้างและเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย เป็นแบบเชิงทดลองและวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จากตัวอ่อนที่เจริญผิดปกติและตัวอ่อนที่มีการเจริญปกติหลังผ่านการปฏิสนธินอกร่างกายและได้รับการแช่แข็งไว้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในประเทศไทย สร้างเครือข่ายและความร่วมมือระดับนานาชาติด้านการวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ลดการนำเข้าสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดและเทคโนโลยีจากต่างประเทศ และลดการเสียเปรียบทางเศรษฐกิจและเพิ่มความสามารถในการแข่งขัน

๒. ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน

๒.๑. เซลล์พี่เลี้ยง (feeder cells) สำหรับเลี้ยง ICM และ human embryonic stem cells

๒.๑.๑ แหล่งที่มาของเซลล์พี่เลี้ยง

๒.๑.๑.๑ เซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังคน (Human skin fibroblast)

๒.๑.๑.๒ Commercial cell lines

เลือกใช้เซลล์ที่ผลิต และจัดจำหน่ายโดยบริษัทผู้ผลิต และเซลล์ดังกล่าวได้ถูกอ้างอิงจากห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนถึงประสิทธิภาพในการใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยง เซลล์ที่เลือกใช้คือ human foreskin fibroblast (catalog number; CRL-1635, ATCC, Manasas, VA, USA) และ STO mouse embryonic fibroblast (catalog number; CRL-1503, ATCC, Manasas, VA, USA)

๒.๑.๒ การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง

ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสด้วยการเติม mitomycin C (Sigma) ความเข้มข้น ๑๐ มก. / มล. ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส และ เลี้ยงในตู้ปรับอุณหภูมิที่ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๒-๓ ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยการใช้ร้อยละ ๐.๐๕ trypsin-EDTA (Invitrogen) และ seed เซลล์พี่เลี้ยงลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยร้อยละ ๐.๑ gelatin โดยจำนวนของเซลล์พี่เลี้ยงต่อพื้นที่ของจานเพาะเลี้ยง สำหรับการสร้าง human embryonic stem cell กรณีใช้ human foreskin fibroblast จำนวนเซลล์ประมาณ ๑๕๐,๐๐๐ เซลล์ และกรณีใช้ MEF หรือ STO cells จำนวนเซลล์ประมาณ ๓๕๐,๐๐๐ เซลล์ ต่อจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ ๒.๘๔ ตร.ซม.

น้ำยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสและเซลล์พี่เลี้ยงประกอบด้วย DMEM high glucose, ๒ mM glutamine, ๕๐ U/ml penicillin, ๕๐ mg/ml streptomycin, ร้อยละ ๑๐ fetal bovine serum (FBS) น้ำยาเลี้ยงเซลล์และสารที่ใช้ ซื้อจาก Invitrogen ซึ่งเซลล์พี่เลี้ยงจะถูกใช้ภายใน ๑-๒ วัน หลังจากวันที่เตรียม

๒.๒ ตัวอ่อน

ตัวอ่อนกลุ่มที่ ๑ เป็นตัวอ่อนที่มีการเจริญที่ผิดปกติหลังจากผ่านการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ซึ่งตัวอ่อนชนิดนี้อาจจะไม่มีการสร้าง pronuclei (NOPN embryos) หรือ สร้าง 3 pronuclei (3 PN embryos) และได้รับการแช่แข็งไว้เพื่อทำการศึกษาวิจัย

ตัวอ่อนกลุ่มที่ ๒ เป็นตัวอ่อนที่มีการเจริญที่ผิดปกติหลังจากผ่านการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และไม่ผ่านการแช่แข็ง

ตัวอ่อนกลุ่มที่ ๓ เป็นตัวอ่อนที่มีการเจริญปกติหลังจากผ่านการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และได้รับการแช่แข็งไว้เพื่อทำการศึกษาวิจัย

๒.๓ การแยกเซลล์ inner cell masses **และเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์** (human embryonic stem (hES) cells)

๒.๓.๑ การแยก inner cell masses

ทำการย่อยสลายเปลือกหุ้มตัวอ่อน (zona pellucida) โดยใช้เอนไซม์ pronase (Sigma, St, Louise) ความเข้มข้นร้อยละ ๐.๕ ใช้เวลาประมาณ ๒-๕ นาทีจนเปลือกหุ้มตัวอ่อนละลายหมด หรือร้อยละ ๐.๑ acid tyrode solution (Specialty media) นาน ๕-๑๐ วินาที จากนั้นแยกส่วนของ trophectoderm ออกจาก inner cell masses ด้วยวิธีปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน (immunosurgery) หรือด้วยวิธีการตัดโดยใช้ glass pipette หรือ เข็มภายใต้กล้องสเตอริโอ (stereo-microscope)

๒.๓.๑.๑วิธี immunosurgery ทำได้โดยแช่ตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือกหุ้มใน anti-human whole serum antibody (Sigma, St, Louise) ประมาณ ๓๐ นาทีในตู้เลี้ยงตัวอ่อนอุณหภูมิ ๓๗ °C ร้อยละ ๕ CO_2 จากนั้นล้างตัวอ่อนในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ และแช่ตัวอ่อนใน guinea pig complement (Sigma, St, Louise) ที่เจือจางใน gelatin veronal buffer ในอัตราส่วน ๑ ต่อ ๔ นาน ๑๕-๒๐ นาที ในตู้เลี้ยงตัวอ่อนอุณหภูมิ ๓๗ °C, ร้อยละ ๕ CO_2 จากนั้นล้างตัวอ่อนในน้ำยาเลี้ยงเซลล์สามถึงห้าครั้ง ใช้ glass pipette ดูดเป่าตัวอ่อนเบาๆเพื่อให้เซลล์ throphectoderm ที่ตายหลังจากผ่านขั้นตอน immunosurgery หลุดออกจาก inner cell mass นำ inner cell mass ลงเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยง ในน้ำยาเลี้ยง hES cells

๒.๓.๑.๒ วิธีการตัดโดยใช้ glass pipette หลังจากย่อยเปลือกหุ้มตัวอ่อนออกแล้วจะทำการตัดส่วนของตัวอ่อนที่มี inner cell mass โดยใช้ glass pipette หรือเข็มขนาด 30G การตัดจะทำภายในหยดของน้ำเลี้ยงตัวอ่อนขนาด ๒๐-๔๐ ไมโครลิตร ที่ถูกคลุมด้วย mineral oil เพื่อป้องกันการระเหยและเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน

๒.๓.๑.๓ การเลี้ยงตัวอ่อนทั้งใบ (whole blastocyst culture) ในกรณีตัวอ่อนที่ส่วนของ inner cell mass มีขนาดเล็กมาก หรือไม่สามารถสังเกตเห็นได้เมื่อใช้กล้องสเตอริโอ จะใช้วิธีเลี้ยงตัวอ่อนทั้งใบ บนเซลล์พี่เลี้ยงหลังจากที่ทำการย่อยเปลือกหุ้มตัวอ่อนออกแล้ว

๒.๔ การเลี้ยงและการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (Culture and Propagation of hES cells)

ในระยะแรกของการสร้าง และเลี้ยง hES cells จะทำการ passage เซลล์ด้วยวิธี mechanical เพราะป้องกันการเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมอันเนื่องมาจากการ passage เซลล์ด้วยเอนไซม์ เมื่อโคโลนีของ hES cells มีขนาดประมาณ ๒๐๐๐-๓๐๐๐ ไมครอน โคโลนีจะถูกตัดแบ่งด้วย glass pipette ออกเป็นชิ้นเล็กประมาณ ๕-๘ ชิ้นขึ้นอยู่กับขนาดของโคโลนี จากนั้นโคโลนีที่ถูกตัดจะถูกนำไปเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมไว้ล่วงหน้าประมาณ ๒๔-๔๘ ชั่วโมง น้ำยาที่ใช้เลี้ยง

hES cells ประกอบด้วย knockout Dulbecco's modified Eagles medium (Gibco Invitrogen) และเติมด้วย knockout serum replacement (knockout SR, Gibco Invitrogen), ร้อยละ ๑ Glutamax®, ร้อยละ ๑ nonessential aminoacid, ๐.๕ mM 2-mercaptoethanol, ร้อยละ ๑ penicillin-streptomycin, ร้อยละ ๑ insulin-selenium-transferrin (Gibco Invitrogen) และ ๔ ng/ml bFGF(Invitrogen) การ passage hES cells จะทำทุกๆ ๕-๗ วัน หรือขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของโคโลนี และขนาดของโคโลนี

๒.๕ 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)

๒.๕.๑ วิธี open pulled straw vitrification ทำได้โดย ตัดแบ่งโคโลนีของ hES cells ด้วย glass pipette ออกเป็นชิ้นเล็กๆ โดยแต่ละชิ้นมีเซลล์ประมาณ ๕๐๐-๕,๐๐๐ เซลล์ แช่กลุ่มของเซลล์ในน้ำยา vitrification ๑ ที่มีส่วนประกอบของDMSO ร้อยละ ๑๐ และ ethylene glycol ร้อยละ ๑๐ ใน holding medium นาน ๑ นาที จากนั้นแช่กลุ่มเซลล์ในน้ำยา vitrification ๒ ที่มี DMSO ร้อยละ ๑๐, ethylene glycol ร้อยละ ๑๐, ๐.๑ M sucrose ใน holding medium นาน ๒๕ วินาที ก่อนที่จะดูดกลุ่มเซลล์เข้าใน straw ด้วย capillary action และแช่ straw ในไนโตรเจนเหลวทันทีและเก็บ straw ไว้ใน cryotube ภายในถังไนโตรเจนเหลว

๒.๕.๒ วิธีดั้งเดิม (conventional method) ทำได้โดย หลังจากที่ตัดแบ่งโคโลนีออกเป็นกลุ่มเซลล์ประมาณ ๕๐๐-๕,๐๐๐ เซลล์ แล้วใส่กลุ่มเซลล์ในน้ำยาแช่แข็งที่มี DMSO ร้อยละ ๕ และ ethylene glycol ร้อยละ ๑๐ ในน้ำยาเลี้ยง hES cells ที่อยู่ใน cryotube ใส่ cryotube ในกล่องสำหรับแช่แข็ง (freezing container; Mr Frosty; Nalgene, USA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิลบ ๗๐ องศาเซลเซียสนาน ๑๒-๒๔ ชั่วโมง แล้วเก็บ cryotube ไว้ในไนโตรเจนเหลว

๒.๖ การพิสูจน์คุณลักษณะ (characterisation) **ของ** human embryonic stem cell lines

Cell lines ที่สร้างได้จะต้องผ่านการพิสูจน์คุณลักษณะว่าแสดงคุณสมบัติเป็น human embryonic stem cell lines หรือไม่ โดยจะทำการทดสอบดังต่อไปนี้

๒.๖.๑ Alkaline phosphatase staining **และ** immunocytochemistry

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

สำหรับการทดสอบวิธี immunocytochemistry, colonies จะถูก fix ด้วย ร้อยละ๔ paraformaldehyde ที่อุณหภูมิห้อง นาน ๑๐-๑๕ น าที จากนั้นจะทำการ block colonies ด้วย blocking buffer ซึ่งประกอบด้วย phosphase buffer saline (PBS), ร้อยละ ๐.๕ bovine serum albumin (BSA) และ ร้อยละ ๐.๑ Triton-X ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียสข้ามคืน (overnight) แล้ว incubate colonies ด้วย primary antibodies ที่ถูกเจือจางด้วย PBS+ ร้อยละ๐.๕ BSA ที่อุณหภูมิห้องนาน ๒ ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ๓ ครั้ง แล้ว incubate ด้วย secondary antibodies ที่เจือจางด้วย PBS+ ร้อยละ

๐.๕ BSA นาน ๒ ชั่วโมง และล้างด้วย PBS อีก ๒ ครั้ง จากนั้นทำการ counterstaining ด้วย Hoechst 33342 (Sigma) 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 Cy3-conjugated (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA)

๒.๖.๒ การสร้าง embryoid bodies และ teratoma

ใช้วิธีการสร้าง embryoid bodies 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 embryoid bodies

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

๒.๖.๓ การตรวจโครโมโซมด้วยวิธี Karyotyping

Incubate undifferentiated colonies ด้วย colcemid ความเข้มข้น ๒๐-๒๕ นก./มล. และ BrdU ความเข้มเข้น ๓๗.๕ มก./มล. นาน ๑๗-๑๙ ชั่วโมง (Fisher et al., 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

๒.๗ การวางแผนการทดลอง (Experimental design)

เนื่องจากวัตถุประสงค์หลักของการวิจัยคือ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง และเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ดังนั้นแผนการทดลอง และวิธีการแยกเซลล์ inner cell mass จึงขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอ่อนเป็นหลัก และดำเนินการเป็นขั้นตอนดังนี้คือ

๒.๗.๑ การทดลองที่ ๑

คณะผู้วิจัยเลือกตัวอ่อนที่มีปฏิสนธิปกติ แต่มีการเจริญหลังปฏิสนธิที่ผิดปกติ มาใช้ในการศึกษา และทดสอบเพื่อหาระบบการแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดภายใต้สภาพแวดล้อม และห้องปฏิบัติการของภาควิชาฯ โดยดัชนีชี้วัดความสำเร็จคือ

๑. ตัวอ่อนสามารถเกาะบนเซลล์พี่เลี้ยงภายใน ๔๘ ชั่วโมงหลังจากเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง
๒. ตัวอ่อนที่เลี้ยงสามารถสร้างกลุ่มเซลล์ที่คล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิด หรือ inner cell mass outgrowth
๓. ตัวอ่อนสามารถเจริญอยู่บนเซลล์พี่เลี้ยงได้นาน ๗-๑๔ วัน หรือจนกว่าจะต้องทำการตัดแบ่งกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนระยะต้น

๒.๗.๒ การทดลองที่ ๒

ใช้ตัวอ่อนที่มีการปฏิสนธิปกติและผ่านการแช่แข็ง ซึ่งถือว่าตัวอ่อนกลุ่มนี้เป็นตัวอ่อนที่มีศักยภาพสูงในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เนื่องจากเกือบทุกเซลล์ไลน์ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่มีรายงานในปัจจุบัน สร้างได้จากตัว

อ่อนที่มีการปฏิสนธิปกติ โดยใช้ดัชนีชี้วัดความสำเร็จเช่นเดียวกับการแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน จากตัวอ่อนที่มีการปฏิสนธิผิดปกติ

๒.๘ ผลการดำเนินงาน

๒.๘.๑. การสร้างเซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast)

เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนหนูเมาซ์ (mouse embryonic fibroblasts; MEFs)

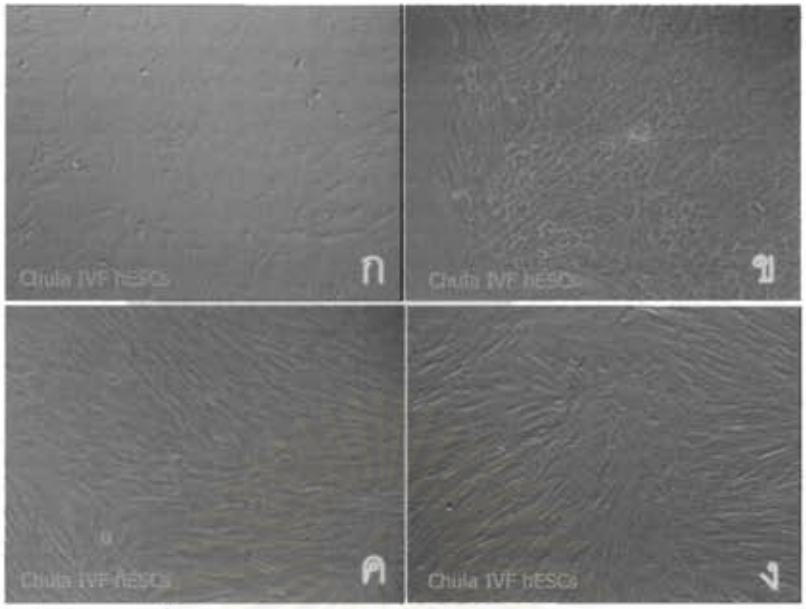
ทำการแยกเซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนหนูเมาซ์อายุ ๑๓-๑๔ วัน เซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกได้มีลักษณะคล้ายกระสวย (รูปที่ ๑ก) เซลล์มีอัตราการเจริญที่สม่ำเสมอ กล่าวคือ primary เซลล์ จะเจริญจนเต็มจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๑๐ เซ็นติเมตร ภายใน ๗๒-๙๖ ชั่วโมง จากนั้น primary เซลล์จะถูกแช่แข็งเก็บไว้เพื่อใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงต่อไป เมื่อทำการละลาย primary เซลล์ พบว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตประมาณร้อยละ ๙๐ และเมื่อเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีสารยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ คือ mitomycin C ความเข้มข้น ๑๐ ไมโครกรัม ต่อ มล. นาน ๒-๓ ชั่วโมง เพื่อทดสอบความสามารถในการเป็นเซลล์พี่เลี้ยง นำเซลล์พี่ผ่านการยับยั้งการเจริญด้วย mitomycin C ไปใช้ในการสร้างและเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของหนูไมซ์ พบว่าสามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูไมซ์และเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูไมซ์สามารถเจริญ แบ่งตัวและรักษาคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนหนูไมซ์ ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของคน

เซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังของคน (human skin fibroblast)

เลี้ยงและแยกเซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนัง โดยเลี้ยงชิ้นของผิวหนังในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไฟโบรบลาส ภายหลังจากเลี้ยงนาน ๑ สัปดาห์ กลุ่มเซลล์ชนิดแรกที่เจริญออกมาจากชิ้นผิวหนังจะเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย keratinocyte (รูปที่ ๑ข) ทำการย่อยเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย keratinocyte ด้วยเอนไซม์ trypsin และเลี้ยงชิ้นผิวหนังต่อไปด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส อีก ๓-๗ วัน จะเห็นเซลล์ไฟโบรบลาสเจริญขึ้นมา (รูปที่ ๑ค) ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาส แช่แข็งและทดสอบความสามารถในการเป็นเซลล์พี่เลี้ยงด้วยการหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย mitomycin C และเลี้ยงในสภาวะเช่นเดียวกับการแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน พบว่าเซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน ๑๐-๒๐ วัน โดยมีอัตราการเสื่อมหรือตายอยู่ในระดับต่ำ

นอกจากเซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนหนูไมซ์และผิวหนังของคน ยังใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจาก foreskin ของคน (รูปที่ ๑ง) ซึ่งมีรายงานถึงความสำเร็จในการใช้เพื่อสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ เซลล์ไฟโบรบลาสจาก foreskin นี้ซื้อจากบริษัท ATCC ประเทศสหรัฐอเมริกา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

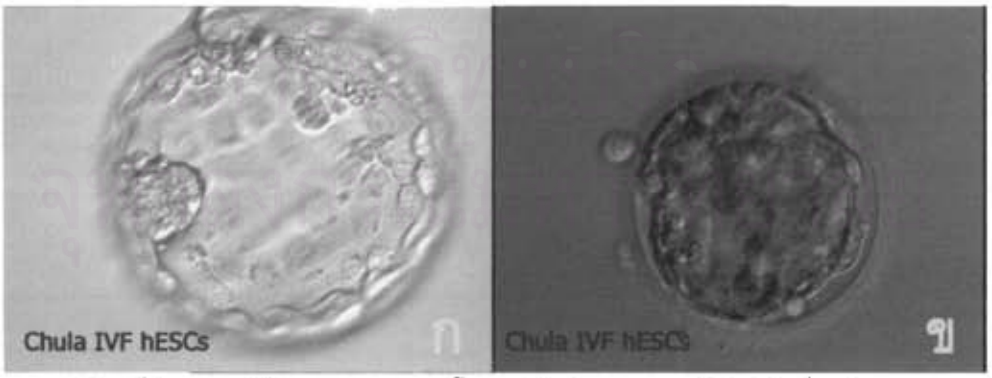


รูปที่ ๑ ลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกจากหนูเมาซ์ (primary mouse embryonic fibroblast; PMEFs) (ก); เซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ keratinocyte ที่เจริญมากจากชิ้นผิวหนังของคน (ข); เซลล์ไฟโบรบลาสที่ได้จากผิวหนังของคน (ค); และเซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกจาก foreskin ของคน (human foreskin fibroblast) (ง); เซลล์จากหนูเมาซ์จะมีลักษณะ spiky และมีขอบเขตที่ไม่แน่นอน เซลล์จากคนจะมีลักษณะเป็นกระสวย (กำลังขยาย ๑๐๐ เท่า)

๒.๘.๒ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน

ตัวอ่อนแช่แข็ง ที่ถูกละลาย เลี้ยงภายในห้องทดลอง เจริญจนถึงระยะบลาสโตซิส ก่อนเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง เปลือกหุ้มตัวอ่อน (zona pellucida) จะถูกย่อยสลายโดยใช้เอ็นไซม์ pronase ความเข้มข้นร้อยละ ๐.๒๕ หรือ acid tyrode solution

ตัวอ่อนที่มีกลุ่มเซลล์ inner cell mass ใหญ่มองเห็นได้ชัด (รูปที่ ๒ก) จะถูกนำมาใช้ในการแยกเซลล์ inner cell mass ด้วยวิธี immunosurgery, ตัดแยกเซลล์ trophoblast ด้วยไปเปตแก้ว หรือ แยกด้วยเลเซอร์ และเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง อย่างไรก็ตามบางครั้งคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ไม่ดี เนื่องจากไม่สามารถสังเกตเห็นกลุ่มของ inner cell mass ได้ (รูปที่ ๒ข) จำเป็นต้องเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัวอ่อนโดยไม่ทำการแยก inner cell mass



รูปที่ ๒ ลักษณะของตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็ง การละลาย และเลี้ยงจนเจริญถึงระยะบลาสโตซิส ก่อนที่จะนำมาแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ตัวอ่อนที่มี inner cell mass ขนาดใหญ่ (ก; กำลังขยาย ๔๐๐ เท่า) inner cell mass จะถูกแยกออกจากเซลล์ trophoblast ด้วยวิธี immuno surgery, เลเซอร์ หรือตัดแยกด้วยไปเปต ส่วนตัวอ่อนที่ inner cell mass มีขนาดเล็ก หรือมองไม่เห็น (ข; กำลังขยาย ๒๐๐ เท่า)) จะเลี้ยงทั้งตัวอ่อนเพื่อป้องกันการสูญเสีย inner cell mass ในขั้นตอนการแยกออกจากเซลล์ trophoblast

การทดลองที่ ๑

การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากตัวอ่อนที่มีการเจริญที่ผิดปกติหลังปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

เมื่อผ่านการละลายตัวอ่อนที่มีการเจริญผิดปกติหลังจากปฏิสนธิภายนอกร่างกายบางตัวอ่อนสามารถเจริญจนถึงระยะบลาสโตซิส (รูปที่ ๓ก) ตัวอ่อนที่ผ่านการย่อยสลายเปลือกหุ้ม (รูปที่ ๓ข) จะถูกเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง ทั้งนี้หลังจากเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงนาน ๔๘ ชั่วโมง ตัวอ่อน จะเกาะติดกับเซลล์พี่เลี้ยง (รูปที่ ๓ค) แสดงว่าเซลล์ภายในตัวอ่อนยังมีความสามารถในการเจริญ และไม่ถูกทำลายโดยกระบวนการย่อยสลายเปลือกหุ้มตัวอ่อน หลังจากเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงประมาณ ๗-๑๐ วัน พบว่า ตัวอ่อนบางตัวอ่อนมีกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในระยะแรกเจริญขึ้นมา (รูปที่ ๓ง) ทำการแยกกลุ่มเซลล์ดังกล่าว ออกมาเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงใหม่ที่เตรียมไว้ล่วงหน้า ๑-๒ วัน ทำการเลี้ยงต่อไปอีก ๑๐-๒๐ วัน พบว่าเซลล์ทั้งหมดที่เจริญขึ้นมาไม่ใช่เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน แต่เป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า differentiated cells (รูปที่ ๓จ)

ผลการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากตัวอ่อนที่เจริญผิดปกติหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ดังแสดงในตารางที่ ๑ และ ๒

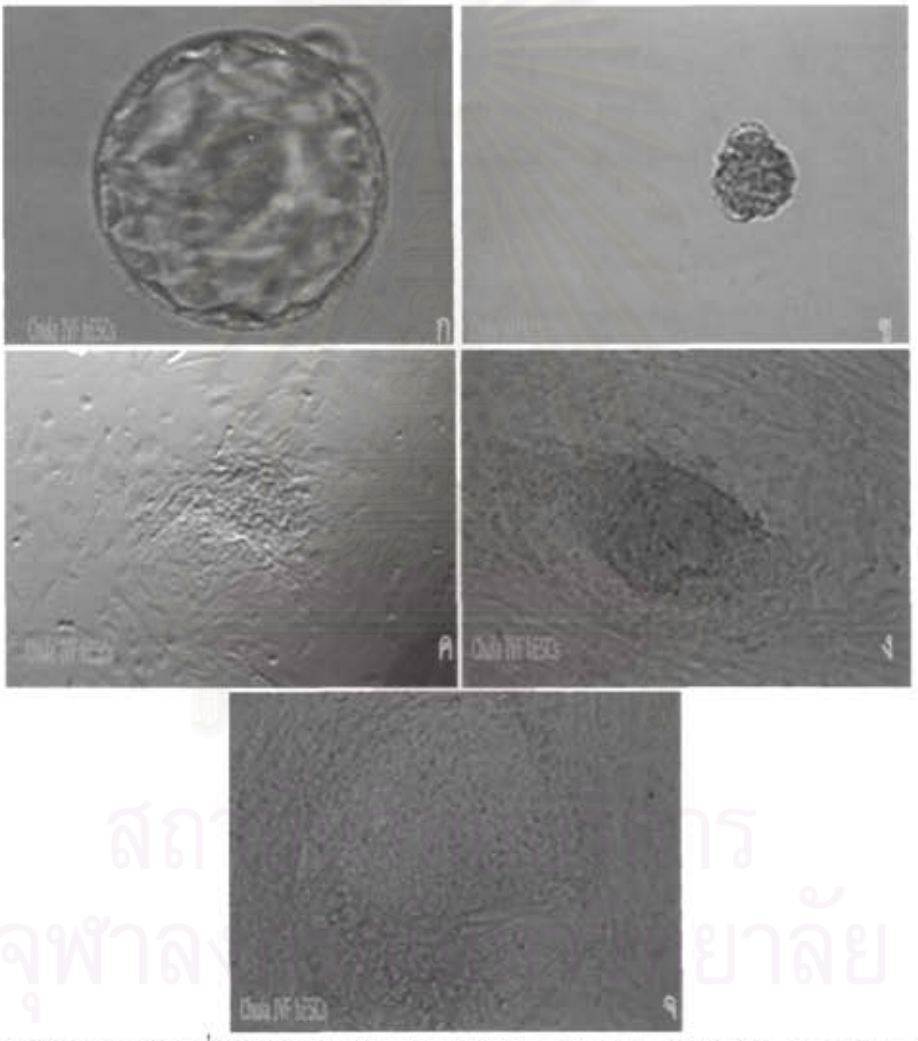
ตารางที่ ๑ ผลการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนที่เจริญผิดปกติ และผ่านการแช่แข็ง

Experiment	No. blastocyst	Day after thawing	Inner Cell Mass isolation		Type of feeder	Result
			Immuno-surgery	Whole blastocyst culture		
1	1	day 6		√	PMEF	differentiated after 1st passage
2	1	day 5	√		Human foreskin fibroblast	not attached on feeder
3	1	day 5		√	human foreskin fibroblast	differentiated after blastocyst culture
4	1	day 5		√	human foreskin fibroblast	differentiated after 1st passage
5	1	day 5		√	human foreskin fibroblast	differentiated after blastocyst culture
6	1	day 5		√	human foreskin fibroblast	not attached on feeder

PMEF : primary mouse embryonic fibroblast

ตารางที่ ๒ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยใช้ตัวอ่อนที่มีการปฏิสนธิผิดปกติ และ ไม่ผ่านการแช่แข็ง

Experiment	Stage of blastocyst	No. of embryo	Plated	Feeder cells	Attached on feeder cells	Outgrowth formation
1	NOPN Day 5	1	whole	foreskin	√	-
2	NOPN Day 6	1	whole	MEFs	√	√
3	3 PN Day 6	1	whole	foreskin	√	-
4	NOPN Day 6	1	whole	MEFs	√	-



รูปที่ ๓ ลักษณะการเจริญของตัวอ่อนที่เจริญผิดปกติหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย หลังจากผ่านการละลาย และเลี้ยงจนเจริญถึงระยะบลาสโตซิส (ก), ตัวอ่อนที่ถูกย่อยเอา zona pellucida ออกและพร้อมที่จะนำไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง (ข), เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงนาน ๔๘ ชั่วโมง (ค), กลุ่มของเซลล์ต้นกำเนิดระยะแรก (primary ES like cells) หลังจากเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงนาน ๗ วัน (ง), หลังจากทำการตัดแบ่งกลุ่มเซลล์ที่คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดระยะแรก เซลล์เกิดการ differentiation และไม่มีเซลล์ต้นกำเนิดเจริญจากตัวอ่อน (จ)

การทดลองที่ ๒

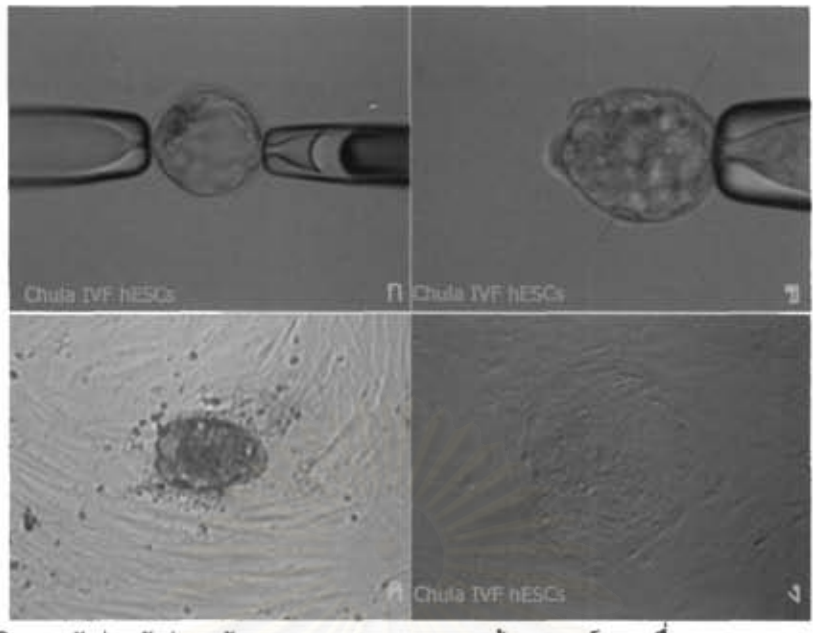
การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากตัวอ่อนที่มีการเจริญปกติหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกายและผ่านการแช่แข็ง

ผลการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากตัวอ่อนที่เจริญปกติหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย แสดงในตารางที่ ๓

ตารางที่ ๓ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยใช้ตัวอ่อนที่มีการปฏิสนธิเป็นปกติ และผ่านการแช่แข็ง

Experiment	Stage of blastocyst	No. of embryo	Plated	Feeder cells	Attached on feeder cells	Outgrowth formation
1	Day 6	1	whole	foreskin	√	-
2	Day 7	1	immunosurgery	MEFs	√	-
3	Day 5	1	whole	foreskin	√	-
4	Day 5	1	immunosurgery	foreskin	√	√
5	Day 5	1	laser	foreskin	√	-
6	Day 5	1	laser	foreskin	√	-
7	Day 6	3	whole	foreskin	√√√	- - -
8	Day 5	1	Whole	foreskin	√	-
9	Day 5	2	whole	foreskin	√√	- -
10	Day 6	1	mechanical	foreskin	√	-
11	Day 5	3	whole	STO	√√	- - -
12	Day 5	2	whole	STO	√√	- -
13	Day 6	3	whole	foreskin	√√√	√ - -
14	Day 5	1	immunosurgery	skin	√	-
15	Day 6	1	mechanical	skin	√	√
16	Day 6	3	mechanical	skin	-	-

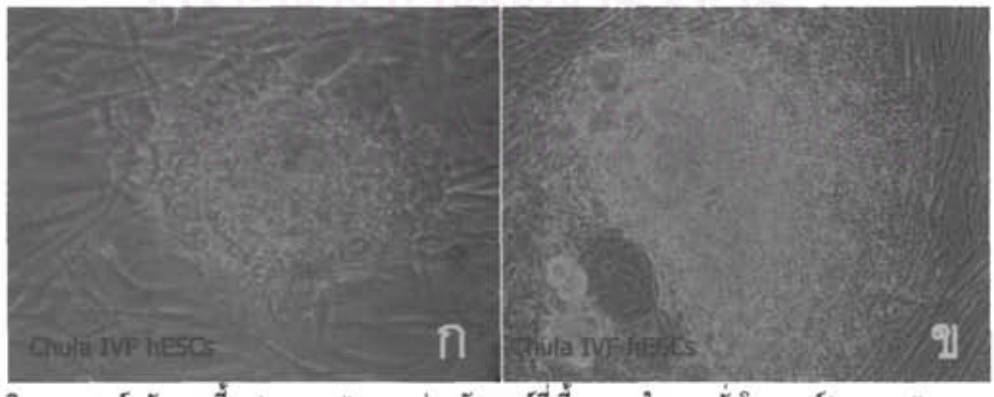
การแยก ICM เพื่อสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากตัวอ่อนที่เจริญปกติหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย เลือกใช้สามวิธีคือ เลเซอร์, immunosurgery และตัดแยกด้วยไปเปตแก้ว ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสบางตัวอ่อนถูกแยกเซลล์ ICM ด้วยเลเซอร์สามารถแยก ICM ออกมาได้ แต่ไม่สามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้ (รูปที่ ๔)



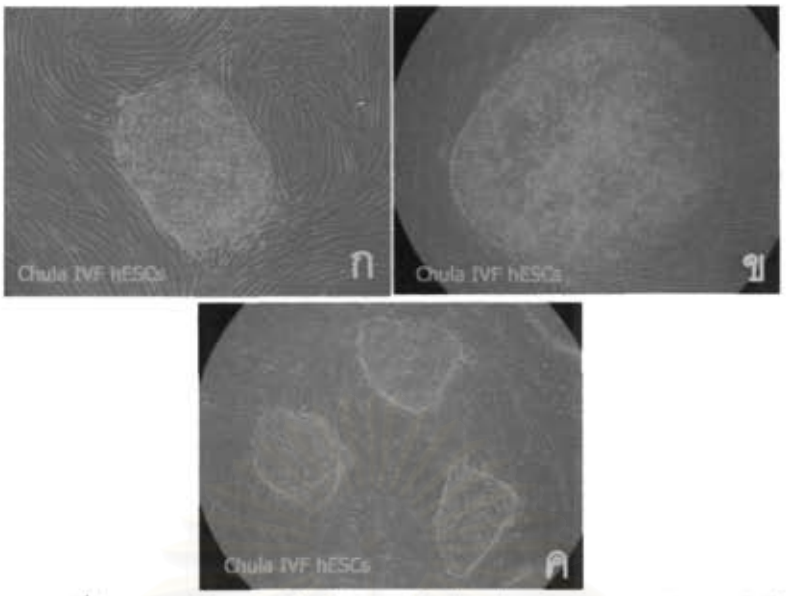
รูปที่ ๔ ลักษณะการเจริญของตัวอ่อนตัวอ่อนหลังจากแยก inner cell mass ด้วยเลเซอร์และเครื่อง micromanipulation

เปลือกของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส ถูกย่อยสลายด้วยเลเซอร์ และตัวอ่อนถูกดึงออกจากเปลือกหุ้มด้วย pipette (รูปที่ ๔ก), ตัวอ่อนที่ถูกแยกออก zona pellucida แล้ว กลุ่มของ inner cell mass ถูกแยกออกจาก trophectodermal cell ด้วยเลเซอร์ตามแนวเส้นประ (รูปที่ ๔ข), เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงนาน ๔๘ ชั่วโมง (รูปที่ ๔ค),กลุ่มของเซลล์ที่เจริญขึ้นไม่มีลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดระยะแรก (primary ES like cells) แต่เป็น differentiated cells (รูปที่ ๔ง)

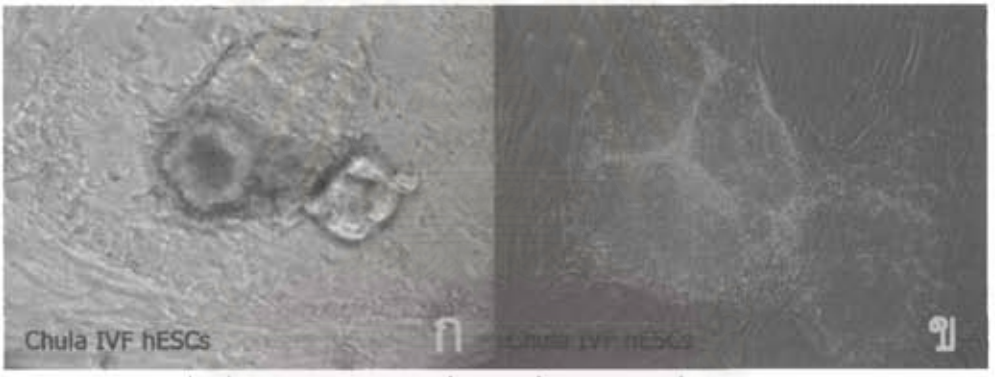
กรณีที่ตัวอ่อนที่ inner cell mass ถูกแยกด้วยวิธี immunosurgery หรือตัดแยกเซลล์ trophectoderm ด้วยไปเปต หลังจากเลี้ยงตัวอ่อน หรือ ICM ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงนาน ๔๘ ชั่วโมง ตัวอ่อน จะเกาะติดกับเซลล์พี่เลี้ยง (รูปที่ ๕ก) แสดงว่าเซลล์ภายในตัวอ่อนยังมีความสามารถในการเจริญ และไม่ถูกทำลายโดยกระบวน การย่อยสลายเปลือกหุ้มตัวอ่อน หลังจากเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงประมาณ ๗-๑๐ วัน พบว่า ตัวอ่อนบางตัวอ่อนมีกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในระยะแรกเจริญขึ้นมา (รูปที่ ๕ข) ทำการแยกกลุ่มเซลล์ดังกล่าว ออกมาเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงใหม่ที่เตรียมไว้ล่วงหน้า ๑-๒ วัน ทำการเลี้ยงต่อไปอีก ๕-๗ วัน พบว่ามีเซลล์สองกลุ่มที่เจริญขึ้นมาคือ เซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระยะแรก (primary human embryonic stem cells) (รูปที่ ๖ ก-ค) และเซลล์ไม่ใช่เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน แต่เป็นกลุ่มเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ เรียกว่า differentiated cells (รูปที่ ๗ก และ ๗ข)



รูปที่ ๕ การเจริญของเซลล์หลังจากเลี้ยง inner cell mass ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง ภายใน ๔๘ ชั่วโมงเซลล์ inner cell mass จะเกาะติดกับเซลล์พี่เลี้ยง (ก) และหลังจากเลี้ยงติดต่อกันเป็นเวลา ๕ วันจะพบกลุ่มเซลล์เจริญออกมาจาก inner cell mass (ข) (กำลังขยาย ๒๐๐ เท่า)



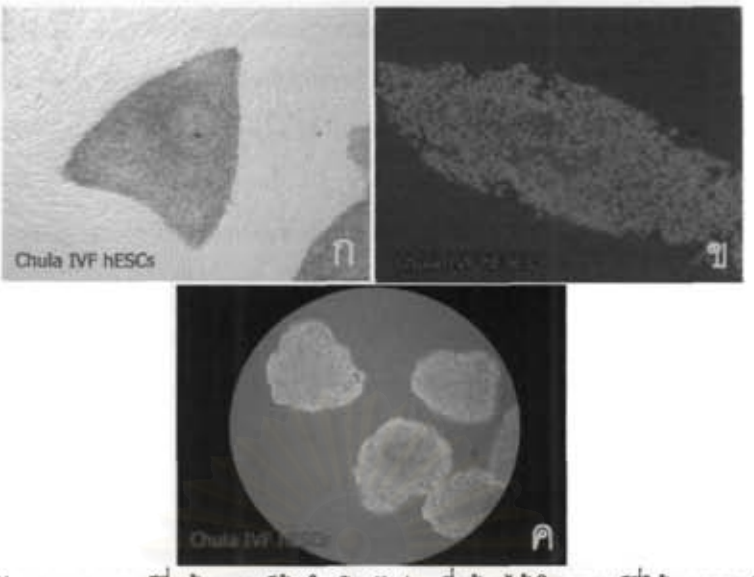
รูปที่ ๖ ลักษณะโคโลนีของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิด โคโลนีจะมีขอบเขตชัดเจน ประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็ก มีนิวเคลียสใหญ่และเห็นได้ชัด จากภาพแสดงลักษณะเซลล์และโคโลนีใน passage ที่ ๑ (ก); passage ที่ ๒ (ข) และ passage ที่ ๓ (ค) (ภาพ ก และ ข กำลังขยาย ๒๐๐ เท่า, ภาพ ค กำลังขยาย ๑๐๐ เท่า)



รูปที่ ๗ ลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ หรือที่เรียกว่าเซลล์เกิด differentiation ซึ่งการเกิด differentiation สามารถเกิดขึ้นได้หลังจากที่เลี้ยงกลุ่ม inner cell mass ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง (ก) (กำลังขยาย ๒๐๐ เท่า) หรือหลังจากทำการ passage เซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดในรูปที่ ๖ (ค) และเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา ๗ วัน (ข) (กำลังขยาย ๑๐๐ เท่า)

ผลการแยกเซลล์ต้นจากกำเนิดตัวอ่อน สามารถแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ซึ่งในระยะแรกนี้จำเป็นต้องระบุว่า เซลล์กลุ่มนี้เป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (human embryonic stem-like cells) เพราะยังต้องทำการพิสูจน์ในระดับเซลล์วิทยา และชีวโมเลกุลของเซลล์ต่อไป

อย่างไรก็ตาม ในเบื้องต้นผลการพิสูจน์คุณลักษณะของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้นี้ โดยวิธีการทางอิมมูโนวิทยาพบว่า เซลล์ดังกล่าวให้ผลบวกต่อการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase (รูปที่ ๘ก) และต่อ Oct-4 (รูปที่ ๘ข) ซึ่งถือเป็นยีนสำคัญที่แสดงลักษณะสำคัญของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน จากนั้นเซลล์ดังกล่าวยังสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า embryoid body (EB) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีสามมิติ และเป็นลักษณะสำคัญที่แสดงถึงความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ(differentiation)(รูปที่ ๘ค)



รูปที่ ๔ ผลการพิสูจน์คุณลักษณะของเซลล์ที่คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างได้ โดยเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase จะย้อมติดสีแดง (ก); เซลล์ที่แสดงออกของการทำงานของยีน Oct-4 ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน จะย้อมติดสีเขียว (ข) และเซลล์ที่สร้างได้นี้ ยังสามารถที่จะสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า embryoid body (ค) ซึ่งเป็นความสามารถที่ใช้พิสูจน์การแสดงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (กำลังขยาย ๑๐๐ เท่า)

๓. อภิปรายผลการดำเนินงาน

แม้คณะผู้วิจัยจะมีประสบการณ์ในการสร้าง และเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของหนูเมาส์ (บทความอยู่ในขั้นตอนการส่งตีพิมพ์) แต่เนื่องจากการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของคนมีความแตกต่างจากหนูเมาซ์ เช่น เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูเมาซ์สามารถสร้างได้จากทั้งตัวอ่อนที่เจริญภายในร่างกายและภายนอกร่างกาย (Tielens และคณะ ๒๐๐๔) แต่เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของคนสร้างได้จากตัวอ่อนที่เจริญถึงระยะบลาสโตซิสภายนอกร่างกาย (Bongso และคณะ ๑๙๙๔; Thomson และคณะ ๑๙๙๘; Reubinoft และคณะ ๒๐๐๐) หรือเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของหนูเมาส์ต้องอาศัย leukemia inhibitory factor (LIF) ช่วยในกระบวนการ self-renewal ในขณะที่เซลล์ต้นกำเนิดของคนไม่ต้องอาศัย LIF (Humphrey และคณะ ๒๐๐๔) ดังนั้นการใช้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส จากตัวอ่อนที่มีการเจริญผิดปกติหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย เพื่อทดสอบสภาวะต่างๆที่ใช้ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจึงค่อนข้างมีประโยชน์ต่อการเริ่มต้นการทดลอง เพราะในปัจจุบันมารายงานความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสที่เจริญมาจาก mononuclei zygote (Sus-Toby และคณะ ๒๐๐๔)

โดยทั่วไปเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (human embryonic stem cells; hESCs) สามารถแยกได้จากกลุ่มเซลล์ inner cell mass จากตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็ง (Lee และคณะ๒๐๐๕, Chen และคณะ ๒๐๐๗) และไม่ผ่านการแช่แข็ง (Peng และ Chen ๒๐๐๖, Heinz และคณะ ๒๐๐๔) แต่เป็นที่น่าสนใจว่าเซลล์ต้นกำเนิดสามารถสร้างจากตัวอ่อนที่หยุดการเจริญ (arrested embryos) ก่อนที่จะเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซิส (Zhang และคณะ ๒๐๐๖) หรือตัวอ่อนที่มี ๑ pronuclei (Sus-Toby และคณะ ๒๐๐๔) ได้เช่นกัน วิธีการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนขึ้นอยู่กับลักษณะของกลุ่มเซลล์ภายในตัวอ่อนที่เรียกว่า inner cell mass (ICM)กรณีที่ ICM มีขนาดใหญ่สามารถใช้วิธี immunosurgery (Chen และคณะ ๒๐๐๕, Lee และคณะ ๒๐๐๕, Inzunza และคณะ ๒๐๐๕) เพื่อทำลายส่วนที่เป็น trophectoderm และแยกเอาส่วน ICM ออกมาเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยง อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดที่ ความเข้มข้นของ antibody และ complement ที่ใช้อาจทำให้ เซลล์โดยเฉพาะ ICM อาจถูกทำลายไปด้วยหากใช้ความเข้มข้นของ antibody และ complement ในสัดส่วนที่สูง และเสี่ยงต่อการสูญเสียเซลล์ต้น

กำเนิด (Mandal และคณะ ๒๐๐๖) จากการผลการดำเนินงานคณะผู้วิจัยได้ทดลองใช้วิธีการแยกเซลล์ ICM ด้วยวิธี immuno surgery มีตัวอ่อน ๕ ตัวอ่อนที่ผ่านขั้นตอนการแยก ICM ด้วยวิธีนี้ สามารถแยก ICM ได้จากตัวอ่อนเพียงสามตัวอ่อน อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงพบว่ามีกลุ่ม ICM จากตัวอ่อนสองตัวอ่อนสามารถเกาะบนเซลล์พี่เลี้ยง เมื่อใช้ความเข้มข้นของ complement ที่ ๑ต่อ๔

กรณีที่ตัวอ่อนมีกลุ่มของเซลล์ ICM ชัดเจน แต่มีขนาดเล็ก การทำ immunosurgery อาจจะทำให้สูญเสียกลุ่มเซลล์ดังกล่าวได้ง่าย และการเลี้ยงตัวอ่อนทั้งใบที่มีเซลล์ trophectoderm อยู่ด้วยอาจส่งผลทำให้ trophectoderm เหนี่ยวนำให้ ICM เกิดการ differentiation (Kim และคณะ ๒๐๐๕) ดังนั้นการแยก ICM ด้วยวิธีการตัดส่วนของ ICM ออกจาก trophectoderm จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือก และวิธีนี้มีข้อดีเนื่องจากตัวอ่อนไม่ได้สัมผัสกับ antibody หรือ complement ที่ได้มาจากสัตว์ทดลอง จึงไม่มีการปนเปื้อน และเหมาะสำหรับการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่แยกด้วยวิธีนี้มาใช้ในทางคลินิก (Strom และคณะ ๒๐๐๗) จากผลการดำเนินงานคณะผู้วิจัยพยายามใช้เข็มขนาด 30G หรือ ไปเปตแก้วที่ถูกตัดให้มีขนาดใกล้เคียงกับตัวอ่อน ตัดตัวอ่อนบริเวณที่มี ICM พบว่าในระยะแรกวิธีนี้ใช้เวลาค่อนข้างนาน และผลที่ได้ไม่เป็นที่น่าพอใจ แต่หลังจากเริ่มมีความชำนาญพบว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ได้ ซึ่งคณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์เซลล์ไลน์แรกด้วยวิธีการแยก ICM ด้วยไปเปตแก้ว นอกจากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทดลองใช้ **"เลเซอร์"** ตัด ICM ภายใต้กล้อง inverted microscope (รูปที่ ๔) ซึ่งวิธีนี้ Turetsky และคณะ (๒๐๐๗) ประสบความสำเร็จในการสร้างแยก ICM ด้วยเลเซอร์ และสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ได้ จากการใช้เลเซอร์ คณะผู้วิจัยพบว่า สามารถแยกส่วนของ ICM ออกจาก trophectoderm ได้จากตัวอ่อนทั้งสองตัวอ่อนที่ใช้ **"เลเซอร์"** ตัด และหลังจากเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง กลุ่มของ inner cell mass จากตัวอ่อนทั้งสอง สามารถเกาะบนเซลล์พี่เลี้ยงได้ (รูปที่ ๔)

อย่างไรก็ตามตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ ส่วนใหญ่เป็นตัวอ่อนที่คุณภาพของ ICM ไม่ดี ไม่สามารถสังเกตเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นจำเป็นต้องเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัวอ่อน (whole blastocyst culture) ถึงแม้ว่าวิธีนี้ trophectoderm อาจจะยับยั้งการเจริญ หรือ เหนี่ยวนำให้เกิดการ differentiation ของ inner cell mass ก็ตาม แต่ก็เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดและยังมีรายงานความสำเร็จของการแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนด้วยวิธีนี้ (Mandal และคณะ ๒๐๐๖, Kim และคณะ ๒๐๐๕, Zhang และคณะ ๒๐๐๖) จากการดำเนินงานพบว่า ตัวอ่อนทุกใบที่เลี้ยงด้วยวิธีนี้สามารถเกาะบนเซลล์พี่เลี้ยงได้ภายใน ๔๘ ชั่วโมง ทั้งนี้ส่วนของ trophectoderm ที่ยังคงอยู่น่าจะช่วยให้ตัวอ่อนเกาะบนเซลล์พี่เลี้ยงได้ดีขึ้น

โดยทั่วไปแล้วกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดในระยะแรก (primary hESC) จะปรากฏหลังจากที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงประมาณ ๗-๑๔ วัน (Inzunza และคณะ ๒๐๐๕, Kim และคณะ ๒๐๐๕) จากนั้นจึงทำการตัดแบ่งกลุ่มเซลล์ดังกล่าวเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมใหม่ เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน จากผลการดำเนินการ ทางผู้วิจัยพบว่าหลังจากที่เลี้ยง inner cell mass หรือ ตัวอ่อน ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง ประมาณ ๗ -๑๔ วัน (ในบางกรณีนานถึง ๒๐ วัน) พบกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดในระยะแรกเพียง ๔ กลุ่มเซลล์จาก ๑๔ ตัวอ่อนที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง คิดเป็นร้อยละ ๒๘.๖ เมื่อทำการตัดแบ่งกลุ่มเซลล์ดังกล่าว และเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงต่อไปอีกประมาณ ๗-๑๐ วันพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่ที่เจริญขึ้นมา ไม่ใช่เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนแต่เป็นกลุ่ม differentiated cells ซึ่งคณะผู้วิจัยไม่ได้ดำเนินการวิเคราะห์ว่ากลุ่มเซลล์ดังกล่าวเป็นกลุ่มเซลล์ชนิดใด การ differentiation ของกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดในระยะแรกหลังจากที่ผ่านการตัดแบ่งนั้น เกิดจากเซลล์ไม่สามารถรักษาสภาพ pluripotency ของเซลล์ไว้ได้ ทั้งนี้ไม่ว่าปัจจัยใดๆก็ตาม เช่นสภาพการเลี้ยง หรือ น้ำยาเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม สามารถกระตุ้นให้มีการลดระดับของยีนที่ชื่อ Oct-4 ภายในเซลล์

ส่งผลให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนสภาพจากเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิด ไปเป็น differentiated cells (Brook และ Garder, ๑๙๙๗)

เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการเจริญของกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดในระยะแรก จากตัวอ่อนทั้งหมดที่เลี้ยง พบว่า ใน ๑๐ ตัวอ่อนที่เกาะบนเซลล์พี่เลี้ยงไม่มีการเจริญของกลุ่มเซลล์ดังกล่าวเลย เซลล์ภายในตัวอ่อนเหล่านี้ถึงแม้จะไม่ถูกทำลายในขั้นตอนการสลายเปลือกหุ้มตัวอ่อน การทำ immunosurgery หรือ ตัดส่วน ICM ด้วย laser แต่เซลล์กลับไม่มีการเจริญหลังจากที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตัวอ่อน ส่วนใหญ่ที่ใช้เป็นตัวอ่อนที่มีการเจริญผิดปกติคือ มีการสร้าง pronuclei มากกว่า หรือน้อยกว่า สอง pronuclei ถึงแม้ Suz-Toby และคณะ (๒๐๐๔) จะรายงานว่าสามารถแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจาก mononuclei zygote ได้ ตัวอ่อนกลุ่มนี้น่าจะไม่ใช่ตัวอ่อนกลุ่มที่เหมาะจะนำมาแยกเซลล์ต้นกำเนิด

อย่างไรก็ตาม หลังจากที่คณะผู้วิจัยได้พยายามหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเซลล์ ICM และเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง คณะผู้วิจัยสามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้หนึ่งเซลล์ไลน์ โดยเซลล์ไลน์ดังกล่าวนี้สร้างได้จากตัวอ่อนที่มีเจริญเป็นปกติหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และผ่านการแช่แข็ง ที่น่าสนใจก็คือ เซลล์ไลน์ดังกล่าวแยกได้จากการเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสจากเซลล์ผิวหนังของคนที่สร้างได้โดยคณะผู้วิจัย และสร้างจากห้องปฏิบัติการ ผลดังกล่าวทำให้ลดอัตราการปนเปื้อนของเชื้อโรค หรือโปรตีน ที่จะมาจากเซลล์พี่เลี้ยงไฟโบรบลาสของหนู และที่สำคัญในอนาคตทางผู้วิจัยอาจจะไม่จำเป็นต้องสั่งซื้อเซลล์ไฟโบรบลาสที่นำมาใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงจากต่างประเทศ

ขณะที่รายงานผลการดำเนินงานวิจัย เซลล์ไลน์ดังกล่าวกำลังได้รับการเพิ่มจำนวน และทดสอบคุณลักษณะเพิ่มเติม ทางผู้วิจัยคาดว่าน่าจะสามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยภายในปีที่สองของการดำเนินงานวิจัย

๔. สรุป

แหล่งของตัวอ่อนที่จะนำมาใช้แยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ซึ่งได้มาจากตัวอ่อนที่ได้รับการบริจาคจากคู่สมรสที่เหลือจากการใช้รักษาภาวะการมีบุตรยาก และได้รับการแช่แข็งไว้ มีอยู่อย่างจำกัด การเริ่มการดำเนินงานวิจัยด้วยการใช้ตัวอ่อนที่เจริญผิดปกติหลังจากผ่านการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ทั้งที่ผ่าน และไม่ผ่านการแช่แข็ง แล้วจึงใช้ตัวอ่อนที่ปฏิสนธิปกติ และผ่านการแช่แข็ง ในการแยกเซลล์ต้นกำเนิด การได้ศึกษาถึงวิธีการแยก ICM รวมถึงรูปแบบการเจริญของกลุ่มเซลล์ภายในตัวอ่อน หลังจากเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง ทำให้คณะผู้วิจัยสามารถพัฒนา และปรับปรุงกระบวนการวิจัย จนสามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ได้เป็นผลสำเร็จ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บรรณานุกรม

1. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. PNAS 1997; 94:5709-5712.
2. Chen H, Qian K, Hu J et al. The derivation of two additional human embryonic stem cell lines from day 3 embryos with low morphological scores. Human Reproduction. 2005;20(8): 2201-2206.
3. Chen HF, Kuo HC, Chien CL et al. Derivation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells: comparing serum-containing versus serum-free media and evidence of germ cell differentiation. Human Reproduction. 2007;22(2):567-577.
4. 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.
5. Heins N, Englund MCO, Sjoblom C et al. Derivation, Characterization and Differentiation of human embryonic stem cells. Stem Cells. 2004;22:367-376.
6. Humphrey RK, Beattie GM, Lopez AD et al., Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. Stem cells 2004; 22: 522-530.
7. Inzunza J, Gertow K, Stromberg M et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblast as feeder cells. Stem Cells.2005;23:544-549.
8. Kim HS, Oh SK, Park YB et al. Methods for derivation of human embryonic stem cells. Stem Cells. 2005;23:1228-1233.
9. Lee JB, Lee JE, Park JH 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;72:42-49
10. Mandal A, Tipnis S, Pal R et al. Characterization and in vitro differentiation potential of a new human embryonic stem cell line, ReliCell® hES1. Differentiation. 2006;74:81-90.
11. Mikkola M, Olsson C, Palgi J, Ustinov J, Palomaki T, Horelli-Kuitunen N, Knuutila S, Lundin K, Otonkoski T and Tuuri T. Distinct differentiation characteristics of individual human embryonic stem cell lines. BMC Developmental Biology 2006; 6:40
12. Park JH, Kim SJ, Oh EJ et al. Establishment and maintenance f human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. Biol Reprod 2003;69:2007–2014.
13. Peng HM and Chen GA. Serum-free medium cultivation to improve efficacy in establishment of human embryonic stem cell lines. Hum Reprod. 2006; 21(1) 217-222.
14. Sus-Toby E, Gerecht-Nir S, Amit M et al. Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote. Human Reproduction. 2004;19:670-675.
15. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998;282:1145–1147.

16. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol 2000;18:399–404.
17. Zhang X, Stojkoviz P, Przyborski S et al. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. Stem Cells. 2006;24:2669-2676.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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)

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ

bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
DMSO	dimethyl sulphoxide
EBs	embryoid bodies
FBS	fetal bovine serum
GMP	Good Manufacturing Practice
hESCs	human embryonic stem cells
ICM	inner cell mass
PMEFs	primary mouse embryonic fibroblasts
PFA	paraformaldehyde
PN	pronuclei
SSEA-1	stage specific embryonic antigen-1
SSEA-3	stage specific embryonic antigen-3
SSEA-4	stage specific embryonic antigen-4
TGF	transforming growth factor
TRA-1-60	tumor recognition antigen-1-60
TRA-1-81	tumor recognition antigen-1-81

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัตินักวิจัยและคณะ

1. 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

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

■ 3 1008 00251 575

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

■ รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

■ หัวหน้าหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

■ หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์ 0 2256-4829, 0 2256-4826 โทรสาร 0 2 256-4829

E-mail: pkamthorn@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

■ พ.ศ.2523 วิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

■ พ.ศ. 2525 แพทยศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยม) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

■ พ.ศ. 2531 วุฒิบัตร สูติ-นรีเวช จุฬาลงกรณ์/แพทยสภา

6. 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

■ Rockyfeller 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 1

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นาย รัฐจักร รังสิวิวัฒน์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Ruttachuk Rungsisiwut

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

- 3 3012 00787 41 4

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

- นิสิตปริญญาเอกโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

- หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
  คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม. 10330 โทรศัพท์ 0 2256-4829, 0 2256-4826 โทรสาร 0 2 256-4829
- Email : ruttachuk.r@student.chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

- 2542 - สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- 2545 - ปัจจุบันดุษฎีบัณฑิต ภาควิชา สูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์
  คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

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

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ 2

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวปราณี นำชัยศรีค้า

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms. Pranee Numchaisrika

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

- 3 1001 00298 83 8

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

- นักวิทยาศาสตร์ 6

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

- หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
  คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม. 10330 โทรศัพท์ 0 2256-4828, 0 2256-4826 โทรสาร 0 2 256-4829
- Email : pnumchaisrika@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

- พ.ศ.2529 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Cell Culture, Collect and Culture Embryo in Animal Model

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ 3

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางวิชุดา อานนท์กิจพานิช

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Vichuda Ahnonkitpanit

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

- 3 1014 00928 55 2

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

- นักวิทยาศาสตร์การแพทย์(ชำนาญการ) 8

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

- หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
  คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม. 10330 โทรศัพท์ 0 2256-4828, 0 2256-4826 โทรสาร 0 2 256-4829
- Email : avichuda@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

- พ.ศ.2526 วิทยาศาสตร์บัณฑิต(ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- พ.ศ.2530 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต(สัตววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการปฏิสนธินอกร่างกาย(In vitro fertilization) เป็นเวลา 16 ปี เช่น การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน การเตรียมอสุจิ การเลี้ยงตัวอ่อนในระยะต่างๆ การแช่แข็งและละลายตัวอ่อน การใส่ตัวอ่อน การช่วยการปฏิสนธิ(ICSI) การช่วยการฝังตัวของตัวอ่อน(Assisted hatching) การดึงเซลล์ตัวอ่อน(Embryo biopsy) การควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการให้ได้มาตรฐาน การวิเคราะห์ข้อมูล การฝึกอบรมบุคลากรจากสถาบันอื่นทั้งในและต่างประเทศ เป็นที่ปรึกษาในการจัดตั้งห้องปฏิบัติการด้านการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนให้กับสถาบันภายในประเทศ

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ 4

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายแพทย์ประมวล วีรุตมเสน

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr.Pramuan Virutamasen

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

- 3 1014 01135 23 8

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

- ศาสตราจารย์กิตติคุณ 11

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

- หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
  คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กทม. 10330 โทรศัพท์ 0 2256-4828, 0 2256-4826 โทรสาร 0 2 256-4829
- Email : pvirutamasen@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2501 อนุปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พ.ศ. 2505 แพทยศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยแพทยศาสตร์ กรุงเทพฯ
- พ.ศ. 2516 Master of Science , University of Pennsylvania , USA
- พ.ศ. 2516 อนุมัติบัตรสูตินรีเวชวิทยา แพทยสภา

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Physiology, Reproductive Biology, Specialty in Reproductive Endocrinology