สัญญาเลขที่ R2557B026

สำนักหอสมุด

อภินันทนาการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างหนังกำพร้าในหลอดทดลอง

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.นพ.ประทีป วรรณิสสร ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
2. ผศ.ดร.เนตรนภิส วรรณิสสร ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 23 มี.ค. 2565
เลขทะเบียน 1049872
เลขเรียกหนังสือ ว QP 88.5 ป7ว15 2567

สนับสนุนโดย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน (แบบปกติ) มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ชื่อเรื่อง	**การสร้างหนังกำพร้าในหลอดทดลอง**
หัวหน้าโครงการวิจัย	**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ประทีป วรรณิสสร**
คำสำคัญ	**หนังกำพร้าในหลอดทดลอง**

บทคัดย่อ

ผู้ป่วยที่มีผิวหนังถูกไฟไหม้เป็นบริเวณกว้างมีความเสี่ยงที่จะเสียชีวิตมาก หนึ่งในแนวทางรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้คือการนำผิวหนังปกติส่วนหนึ่งมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ในหลอดทดลองเพื่อสร้างแผ่นคล้ายหนังกำพร้าและนำไปปลูกถ่ายให้ตัวผู้ป่วยเอง วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือสร้างชั้นเซลล์สร้างเคอราทินในหลอดทดลอง โดยนำเซลล์สร้างเคอราทินที่แยกได้จากหนังกำพร้าของมนุษย์มาเริ่มเลี้ยงจากสารละลายเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ใช้เซรุ่ม แล้วนำมาเลี้ยงร่วมกับ feeder cells ที่ใช้เซรุ่มเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์จนขยายเต็มพื้นที่ภาชนะ และให้เจริญต่ออีก 2-5 วัน เพื่อให้เซลล์ซ้อนกันคล้ายหนังกำพร้า แล้วลอกแผ่นหนังกำพร้าด้วยเอนไซม์ dispase จนได้แผ่น membrane บาง ๆ เมื่อส่งไปดำเนินการทางพยาธิวิทยาจะเห็นเป็นแผ่นชั้นของเซลล์สร้างเคอราทินคล้ายหนังกำพร้าประมาณ 3-5 ชั้นเซลล์ ชั้นล่างมีรูปร่างเป็นทรงกลมถึงรี เซลล์ชั้นบนมีรูปร่างแบนว่าชั้นล่างคล้ายกระสวยที่อาจไปประยุกต์ใช้ในการเตรียมแผ่นผิวหนังกำพร้าในผู้ป่วยที่มีแผลไฟไหม้เป็นบริเวณกว้างได้

Abstract

Patient with large burn area has increase mortality risk. One of the treatment options is to cultivate a part of healthy skin in vitro to create an epidermal-like sheet and transplant it back to the patient. This research aims to create a keratinocyte sheet in vitro—first, dissociated keratinocytes from epidermis and culture by a serum-free medium. Next, harvested and plated keratinocytes with feeder cells using a serum-supplemented medium and allowed the cells to proliferate until confluence. Then, let the cells to pile up for 2-5 days, mimicking epidermis. Lastly, detached the membrane by dispase enzyme and sent for histopathology. The observed membrane consisted of a few layers of cells similar to the epidermis. This membrane may be used as an epidermal sheet to cover a large burn area

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	จุดมุ่งหมายของการวิจัย	1
	ขอบเขตของการวิจัย	1
	สมมุติฐานของการวิจัย	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
3	วิธีดำเนินการวิจัย	3
4	ผลการวิจัย	5
5	บทสรุป	11
	อภิปรายผลการวิจัย	11
	สรุปผลการวิจัย	12
บรรณานุกรม		13

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	จำนวนวันที่ใช้ในการแผ่เต็มพื้นที่ของเซลล์สร้างเคอราทิน 5×10^2 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และเซลล์สร้างเคอราทินในจำนวนทวีคูณ 10 20 30 และ 40 เท่า ในสารละลายที่มี และไม่มี Fetal calf serum	8

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	เซลล์สร้างเคอราทินที่เพิ่มจำนวนเป็นกลุ่มแทรกระหว่าง feeder cells เซลล์ 3T3 NIH	5
2	แผ่นหนังกำพร้าในหลอดทดลองที่สร้างจากเซลล์สร้างเคอราทินและ feeder cells แยกออกจากภาชนะด้วยเอนไซม์ dispase	6
3	แผ่นหนังกำพร้าจากภาพ 2 นำมาวางบนแผ่นกระดาษทิชชู	6
4	แผ่นหนังกำพร้าที่สร้างใน หลอดทดลองด้วยเซลล์สร้างเคอราทินที่เจริญซ้อนกันประมาณ 3-5 ชั้น เมื่อนำไปเตรียมด้วยวิธีทางจุลพยาธิและย้อมด้วย hematoxylin & eosin	7
5	แผ่นหนังกำพร้าที่สร้างโดยไม่ใช้ feeder cells โดยเริ่มจากเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินด้วยสารละลายเลี้ยงเซลล์ K-SFM ให้เซลล์แผ่จนเกือบเต็มพื้นที่	7
6	เซลล์สร้างเคอราทิน 2×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ในวันที่ 1 ด้วย K-serum และ K-SFM	8
7	เซลล์สร้างเคอราทิน 2×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ในวันที่ 3 ด้วย K-serum (ก) และ K-SFM (ข)	9
8	เซลล์สร้างเคอราทิน 5×10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ในวันที่ 7 ด้วย K-serum (ก) และ K-SFM (ข)	9
9	เซลล์สร้างเคอราทินที่เป็นเซลล์ยึดเกาะกระจายเซลล์หรือแพร่ไปสู่บริเวณอื่นด้วยการปล่อยเซลล์ให้ลอยไปในสารละลายและไปยึดเกาะบริเวณอื่น	10

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ผู้ที่มีผิวหนังถูกไฟไหม้เป็นบริเวณกว้างมีความเสี่ยงที่จะเสียชีวิตมากตามลำดับเนื่องจากสูญเสียผิวหนังที่ทำหน้าที่ควบคุมการสูญเสียน้ำและป้องกันการติดเชื้อ

การรักษาแผลผู้ป่วยไฟไหม้ที่ชั้นผิวหนังถูกทำลายไปทั้งหมดคือนำผิวหนังปกติของผู้ป่วยเองมาปลูกหรือปิดแผล แต่จะเกิดข้อจำกัดในผู้ที่เหลือผิวหนังปกตินิ้อย แนวทางที่จะรักษาชีวิตของผู้ป่วยกลุ่มนี้คือการนำผิวหนังปกติส่วนหนึ่งมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ในหลอดทดลอง สร้างแผ่นชั้นคล้ายหนังกำพร้าในหลอดทดลอง นำไปปลูกถ่ายให้ตัวผู้ป่วยเอง

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. สร้างแผ่นหนังกำพร้าในหลอดทดลอง
2. ศึกษาสักษณะของแผ่นหนังกำพร้าที่สร้างขึ้นด้วยวิธี hematoxylin eosin และย้อมหาเซลล์ต้นกำเนิดด้วยวิธี flow cytometry หรือ immunohistochemistry

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้จะใช้หนังหุ้มปลายอวัยวะเพศเด็กชายอายุต่ำกว่า 10 ปี ที่ขลิบเนื่องจากเหตุผลทางการแพทย์ เพื่อสร้างหนังกำพร้าในหลอดทดลอง

สมมุติฐานของการวิจัย

วิธีสร้างหนังกำพร้าในหลอดทดลองเพื่อใช้ปลูกถ่ายให้ตนเองที่เป็นที่ยอมรับเป็นการใช้สารละลายเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ร่วมกับ feeder layer [1] ปัจจุบันประเทศสหรัฐอเมริกา เกาหลี และญี่ปุ่น ได้ยอมรับการสร้างหนังกำพร้าในหลอดทดลองนี้ [2] นอกจากนี้มีรายงานถึงเทคนิคการสร้างหนังกำพร้าในหลอดทดลองจากประเทศสโลวาเกีย ที่มีประสบการณ์ด้านนี้กว่า 14 ปี มาเสนอเทคนิคและข้อควรระวังในการสร้างหนังกำพร้านี้ โดยมีความละเอียด พอที่จะการสร้างหนังกำพร้าในหลอดทดลองเบื้องต้นได้ [3]

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 1979 Green H เป็นนักวิจัยกลุ่มแรกที่รายงานการเลี้ยงเซลล์ผิวหนังให้เป็นแผ่นคล้ายหนังกำพร้า [4] เพื่อใช้ปลูกถ่ายเนื้อเยื่อบนแผลเปิดของผู้ป่วยเนื่องจากในขณะนั้นสารละลายเลี้ยงเซลล์ไม่มีประสิทธิภาพดีจึงต้องใช้ feeder layer คือเซลล์สร้างเส้นใยหนู 3T3 clone J2 ที่หยุดการเพิ่มจำนวนด้วยการฉายรังสีมาช่วยให้เซลล์สร้างเคอราทินยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ดีขึ้น เมื่อเซลล์สร้างเคอราทินเพิ่มจำนวนจะไปทดแทนเซลล์สร้างเส้นใยของหนูจะลอกแผ่นกำพร้าด้วยเอนไซม์ dispase และนำไปปลูกถ่าย Feeder layer อื่นที่ใช้ทดแทนกัน ได้แก่ 3T3 NIH และใช้ mitomycin C แทนการฉายรังสี [5]

ในปี ค.ศ. 2011 มีรายงานจากประเทศสโลเวเกียถึงประสบการณ์ 14 ปี ในการสร้างหนังกำพร้าในหลอดทดลองนี้ และมีข้อแนะนำเพื่อหลีกเลี่ยงข้อผิดพลาดในการสร้างหนังกำพร้า [5] ความสำเร็จของการใช้หนังกำพร้าที่สร้างในหลอดทดลองกับผู้ป่วยแผลไฟไหม้มีตั้งแต่ร้อยละ 15-85 โดยเกิดจากหลายปัจจัย [6] หลายประเทศได้ยอมรับวิธีนี้ให้ใช้รักษาผู้ป่วยได้ เช่น สหรัฐอเมริกา เกาหลี และญี่ปุ่น [2] รวมถึงประเทศอื่นที่มีรายงานวิจัยการใช้วิธีนี้ เช่น ฝรั่งเศส สโลวาเกีย และออสเตรเลีย เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

หลังจากได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จึงนำหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศมาตัดชั้นไขมันหรือหนังแท้ส่วนเกิน แบ่งเป็นชิ้นเล็ก แช่ในเอนไซม์ dispase ค้างคืน หรือประมาณ 12 ถึง 16 ชั่วโมง นำมาแยกหนังกำพร้าและหนังแท้ในภาชนะที่มีสารละลาย saline นำหนังกำพร้าที่แยกได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin ให้เป็นเซลล์เดี่ยว neutralize ด้วยเซรุ่ม นำไปเลี้ยงบนเซลล์สร้างเส้นใยหนู 3T3 strain NIH

Feeder cells ใช้เซลล์สร้างเส้นใยหนู 3T3 strain NIH จาก ECCACC collection มาเลี้ยงด้วย DMEM ที่มี fetal calf serum (FCS) ร้อยละ 10 (semi-confluent ~50%) treat ด้วย mitomycin C 5 microgram/ml นาน 3 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ต่อมาล้าง mitomycin C ออกเพื่อใช้เลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทิน

การเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินด้วยสารละลายเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ใช้ซีรัมในที่นี้ขอเรียกว่า K-SFM ประกอบด้วย Keratinocyte Serum-Free Medium (Ker SFM, Invitrogen) ที่มี 25 µg/ml bovine pituitary extract, 0.2 ng/ml epidermal growth factor และ 0.4 mM $CaCl_2$ [7]

การเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินด้วยสารละลายเลี้ยงที่ใช้ซีรัมในที่นี้ขอเรียกว่า K-serum ประกอบด้วย DMEM:Ham F12 ในสัดส่วน 3:1 และร้อยละ 10 FCS, 10 ng/ml epidermal growth factor, 0.1 nM cholreatoxine, 0.8 microgram/ml, 0.18 mM adenine, 5 microgram/ml apo-transferrine, 2 nM 3,3,5 Triiodo-l-Thyronine และ 0.12 U/ml Insulin เปลี่ยนสารละลายทุก 2 วัน จนมีพื้นที่ร้อยละ 60-70 ของพื้นที่ทั้งภาชนะ subculture เซลล์สร้างเคอราทิน กำจัด feeder cells ด้วย EDTA (0.02%) 20 วินาที และ trypsin/EDTA ต่ออีก 10-15 วินาที ล้างด้วย PBS เซลล์สร้างเคอราทินจะคงอยู่ Trypsinisation of keratinocyte ใช้ trypsin/EDTA ใหม่ ปมที่ 37 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 15 นาที ยับยั้ง trypsin ด้วยเซรุ่ม เลี้ยงต่อในอัตรา 1 ต่อ 3 [3]

การเตรียมแผ่นหนังกำพร้า ปล่อยให้เซลล์เจริญเต็มภาชนะและเลี้ยงต่ออีก 2-5 วัน เพื่อให้สร้างเซลล์ซ้อนกันหลายชั้น เป็นการเพิ่มความสะดวกในการลอก 1 วันก่อนลอกใช้สารละลายปราศจาก choleratoxin ในวันลอกหนังกำพร้าล้างเซลล์และปมด้วย dispase 1 U/ml (final) อีก 20-40 นาที ล้างด้วย PBS และนำแผ่นหนังกำพร้าไปทดสอบด้านต่าง ๆ ดังนี้

1. Flow cytometry ย่อยเซลล์แผ่นหนังกำพร้าให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วย trypsin/EDTA นำไปย้อม stem cell marker ที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวน เช่น antibody ต่อ integrin alpha 6^{hi}, $CD71^{lo}$[8] , integrin beta-1, cytokeratin 15 และ cytokeratin 19 [9]

2. เตรียมด้วยวิธีทางจุลพยาธิและย้อมด้วย hematoxylin & eosin เพื่อดูโครงสร้าง หรือชั้นของหนังกำพร้า

ตัด frozen section แลย้อม immunohistochemistry ด้วย antibody ข้างต้น [9]

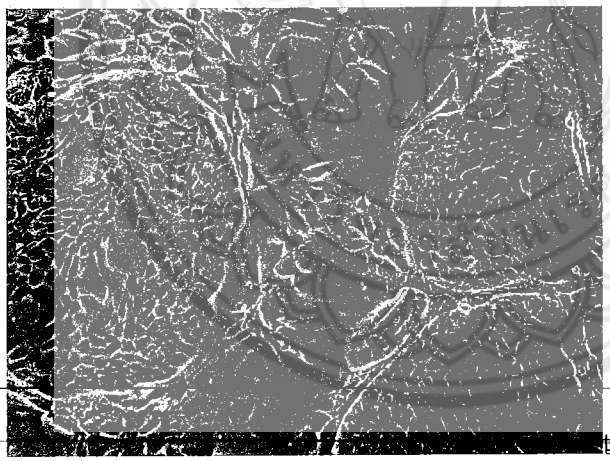
บทที่ 4

ผลการวิจัย

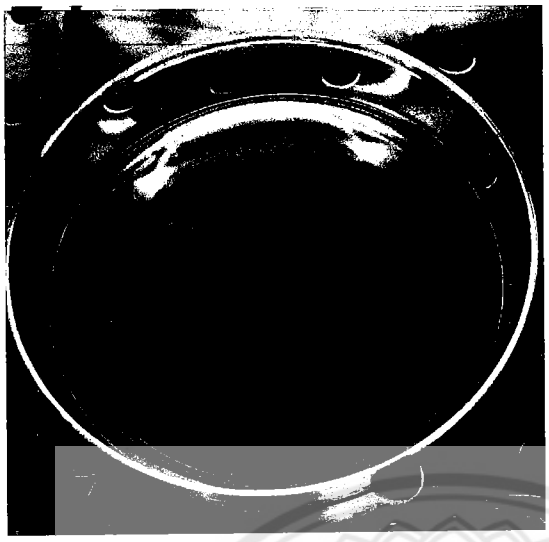
คณะผู้วิจัยเลือกที่จะใช้เซลล์สร้างเคอราทินที่ได้จากการเลี้ยงด้วยสารละลายเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ใช้ซีรัม (K-SFM) ตลอดการศึกษาเนื่องจากไม่มีการใช้ feeder cells จึงจะไม่มีการปนเปื้อนเซลล์อื่น

การสร้างแผ่นหนังกำพร้าในหลอดทดลอง โดยใช้เซลล์ 3T3 NIH เป็น feeder cells

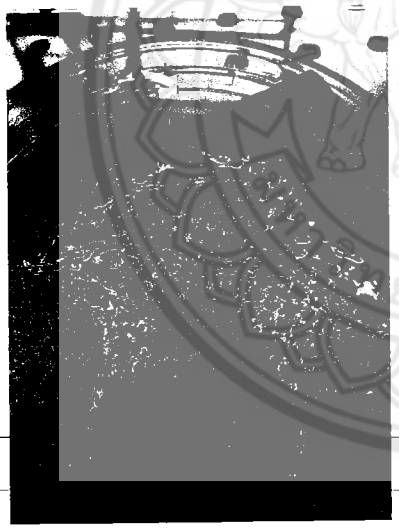
การเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินร่วมกับ feeder cells ในขั้นแรก นำ 3T3 NIH ที่ผ่านการปมด้วย mitomycin C และแช่แข็งไว้มาเลี้ยงในภาชนะไม่ต่ำกว่าครึ่งชั่วโมงเพื่อให้ 3T3 NIH ยึดเกาะก่อนนำเซลล์สร้างเคอราทินมาเลี้ยงโดยใช้ K-serum เมื่อเซลล์สร้างเคอราทินเพิ่มจำนวนจะรวมกันเป็นกลุ่ม ค่อย ๆ เปียด feeder cells (ภาพ 1) ที่ไม่ได้เพิ่มจำนวนออกไปจนหมดและสุดท้ายเหลือแต่เซลล์สร้างเคอราทิน เมื่อเซลล์สร้างเคอราทินแผ่เต็มพื้นที่ภาชนะแล้วจึงเลี้ยงต่ออีกประมาณ 2-5 วันให้เซลล์สร้างเคอราทินซ้อนกันเป็นชั้น หลังจากนั้นใช้เอนไซม์ dispase ลอกชั้นเซลล์ออกมาเป็นแผ่น (ภาพ 2) เมื่อนำแผ่นหนังกำพร้ามาวางบนแผ่นกระดาษทิชชู จะเห็นเป็นแผ่น membraneบางๆ (ภาพ 3) หลังจากนำไปดำเนินการด้วยวิธีทางจุลพยาธิและย้อมด้วย hematoxylin & eosin จะพบชั้นของเซลล์สร้างเคอราทินประมาณ 3-5 ชั้น (ภาพ 4)



ภาพ 1 เซลล์สร้างเคอราทินที่เพิ่มจำนวนเป็นกลุ่มแทรกระหว่าง feeder cells เซลล์ 3T3 NIH



ภาพ 2 แผ่นหนังกำพร้าในหลอดทดลองที่สร้างจากเซลล์สร้างเคอราทินและ feeder cells แล้วแยกออกจากภาชนะด้วยเอนไซม์ dispase



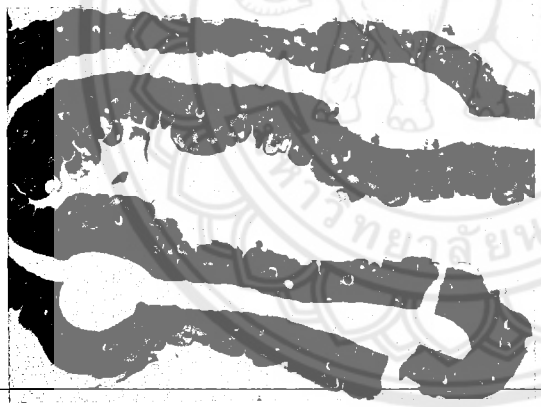
ภาพ 3 แผ่นหนังกำพร้าจากภาพที่ 2 นำมาวางบนแผ่นกระดาษทิชชู

104982
สำนักหอสมุด
23 มิ.ค. 2565

ภาพ 4 แผ่นหนังกำพร้าที่สร้างในหลอดทดลองด้วยเซลล์สร้างเคอราทินที่เจริญซ้อนกันประมาณ 3-5 ชั้น เมื่อนำไปเตรียมด้วยวิธีทางจุลพยาธิและย้อมด้วย hematoxylin & eosin

การสร้างแผ่นหนังกำพร้าในหลอดทดลอง โดยไม่ใช้เซลล์ 3T3 NIH

โดยเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินด้วยสารละลายเลี้ยงเซลล์ K-SFM ของบริษัท Thermo Fisher Scientific, Walthan, MA ประเทศสหรัฐอเมริกาให้เซลล์แผ่จนเกือบเต็มพื้นที่ ขั้นต่อมาเปลี่ยนไปใช้ K-serum เพื่อให้เซลล์สร้างเคอราทินเจริญซ้อนกันขึ้นไป ได้ผลการศึกษา ดังภาพ 5



ภาพ 5 แผ่นหนังกำพร้าที่สร้างโดยไม่ใช้ feeder cells โดยเริ่มจากเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินด้วยสารละลายเลี้ยงเซลล์ K-SFM ให้เซลล์แผ่จนเกือบเต็มพื้นที่ แล้วเปลี่ยนสารละลายเลี้ยงเซลล์เป็น K-serum และเลี้ยงต่อจนเต็มแผ่น และนำไปเตรียมด้วยวิธีทางจุลพยาธิและย้อมด้วย hematoxylin & eosin

เปรียบเทียบระยะเวลาในการแผ่เต็มพื้นที่ภาชนะของเซลล์สร้างเคอราทินเมื่อเลี้ยงด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม (K-serum) และน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม (K-SFM)

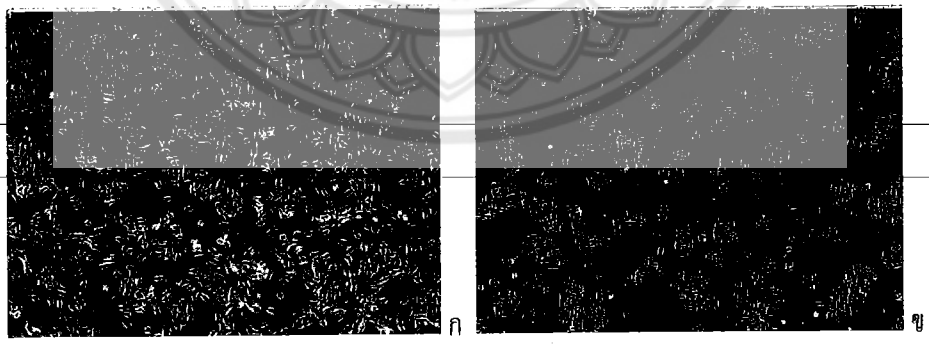
ในระยะแรกจะเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ K-serum หรือ K-SFM เมื่อเซลล์แผ่ใกล้เต็มพื้นกลุ่มที่ใช้น้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่เซลล์ K-SFM จะเปลี่ยนไปใช้ K-serum ส่วนกลุ่มที่ใช้ K-serum อยู่แล้วก็ใช้ต่อไป กลุ่ม

ที่ใช้ K-serum ตั้งแต่แรกจะใช้ feeder cells คือ 3T3 NIH โดยนำ 3T3 NIH ที่ผ่านการบ่มด้วย mitomycin C และแช่แข็งไว้มาเลี้ยงในภาชนะไม่ต่ำกว่าครึ่งชั่วโมงเพื่อให้ 3T3 NIH ยึดเกาะก่อนนำเซลล์สร้างเคอราทินมาเลี้ยงและใช้ K-serum เลี้ยงต่อ ส่วนกลุ่มที่ไม่ใช้ 3T3 NIH จะเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินด้วยสารละลายเลี้ยงเซลล์ K-SFM

ผลการติดตามจำนวนวันที่เซลล์แผ่จนเต็มภาชนะพบว่าหากใช้เซลล์สร้างเคอราทินตั้งแต่ $5x10^3$ เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรขึ้นไป จะใช้เวลาใกล้เคียงกันทั้ง K-serum และ K-SFM หากใช้เซลล์ $5x10^2$ ต่อตารางเซนติเมตร K-SFM จะแผ่เต็มภาชนะได้เร็วกว่า K-serum (ตาราง 1 และ ภาพ ๖-๘) และสารประกอบใน K-serum อาจเสื่อมสภาพ ดังผลการศึกษา หลังจากที่เซลล์แผ่เต็มก็สามารถเพิ่มชั้นเซลล์กลายเป็นแผ่นคล้ายภาพที่ 4 และ 5 โดยชั้นผิวหนังที่สร้างได้นั้นมีเซลล์ซ้อนกัน 3-5 ชั้น

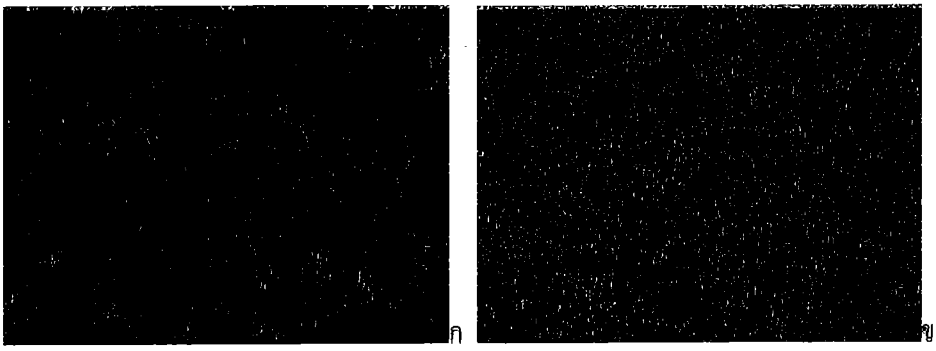
ตาราง 1 จำนวนวันที่ใช้ในการแผ่เต็มพื้นที่ของเซลล์สร้างเคอราทิน 5×10^2 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และเซลล์สร้างเคอราทินในจำนวนทวีคูณ 10 20 30 และ 40 เท่า (5×10^3, 1×10^4, 1.5×10^4 และ 2×10^4 ตามลำดับ) ในสารละลายเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินที่มีส่วนประกอบของ fetal calf serum (K-serum) เทียบกับสารละลายเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี serum (K-SFM) ใน K-serum จะใช้ feeder cell (3T3 NIH)

Keratinocyte plated cells/cm^2	Day at 100% confluence	
	K-serum	K-SFM
2×10^4	5	4
1.5×10^4	6	6
1×10^4	6	6
5×10^3	7	6
5×10^2	11 (95%)	8



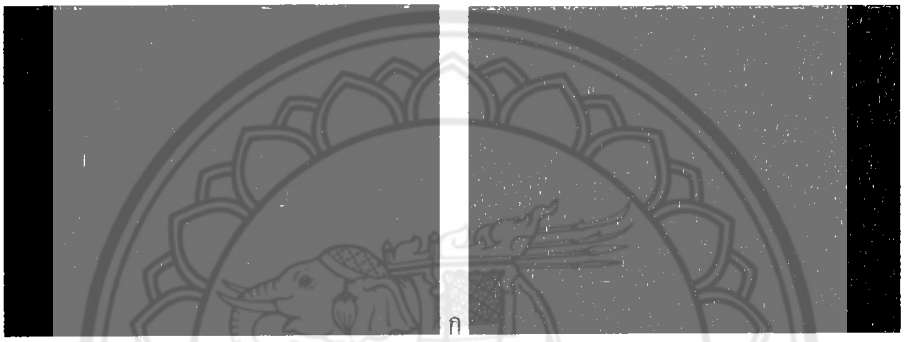
ก ข

ภาพ ๖ เซลล์สร้างเคอราทิน 2×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ในวันที่ 1 ด้วย K-serum (ก) และ K-SFM (ข)



ก ข

ภาพ 7 เซลล์สร้างเคอราทิน 2×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ในวันที่ 3 ด้วย K-serum (ก) และ K-SFM (ข)



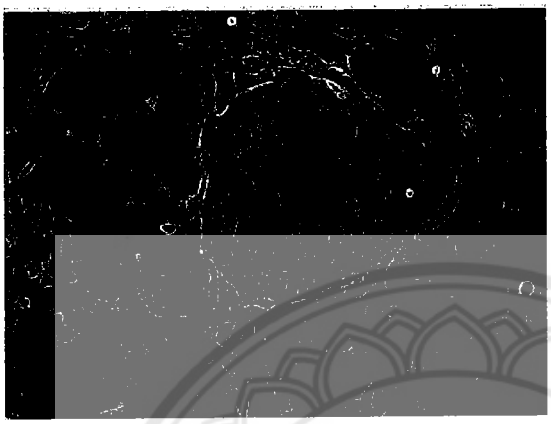
ก ข

ภาพ 8 เซลล์สร้างเคอราทิน 5×10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ในวันที่ 7 ด้วย K-serum (ก) และ K-SFM (ข)

ในขั้นตอนนี้คณะผู้วิจัยสามารถสร้างหนังกำพร้าในหลอดทดลองที่มีเซลล์สร้างเคอราทินซ้อนเป็นชั้นได้ทั้งการเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินในหลอดทดลองที่ใช้ feeder cells และ ไม่ใช้ feeder cells ส่วนการเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ของสารละลายเลี้ยงเซลล์ K-serum และ K-SFM นั้นเมื่อใช้เซลล์สร้างเคอราทินตั้งต้นตั้งแต่ 5×10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรขึ้นไปจะไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเริ่มใช้น้อยลงที่เซลล์ 5×10^2 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรจะพบว่ากลุ่ม K-SFM จะแผ่เต็มพื้นที่ได้เร็วกว่า K-serum (ตาราง 1)

คณะผู้วิจัยสังเกตว่าเซลล์สร้างเคอราทินที่เป็นเซลล์ยึดเกาะสามารถขยายการเจริญด้วยเซลล์แขวนลอยไปแผ่เพิ่มจำนวนในพื้นที่ว่าง ในการศึกษาการสร้างแผ่นหนังกำพร้าในหลอดทดลองครั้งหนึ่งที่ใช้สารละลายเลี้ยงเซลล์มากกว่าเดิมสองเท่าโดยคาดหวังว่าจะทำให้มีการเจริญที่ดีกว่าเดิมโดยยังเปลี่ยนสารละลายเลี้ยงเซลล์ K-serum ทุก 2-3 วัน ตามหลักการเลี้ยงเซลล์ทั่วไป เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงโดยลอกแผ่นหนังกำพร้าออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์พบว่าแผ่นหนังกำพร้าหลุดออกจากพื้นภาชนะฯ แต่ขอบของแผ่นหนังกำพร้ายังไม่หลุดออกจากด้านข้างของภาชนะ คณะผู้วิจัยคาดว่าแผ่นหนังกำพร้าได้เจริญสูงจากขอบพื้นภาชนะขึ้นไปด้านข้างภาชนะและไม่ได้สัมผัสกับเอนไซม์ที่ใช้ลอกแผ่นหนังกำพร้าจึงทำให้แผ่นหนังกำพร้ายังไม่หลุดออกจากด้านข้างภาชนะ จากเหตุดังกล่าวคณะผู้วิจัยมีข้อสมมุติฐานว่านอกเหนือจากการเจริญที่แผ่ออกด้านข้างแล้วอาจมีบางส่วนของเซลล์หลุดลอยไปในสารละลายเลี้ยงเซลล์และไปเจริญในพื้นที่ว่างได้หรือไม่

เพื่อพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าวคณะผู้วิจัยนำสารละลายเลี้ยงเซลล์ของ K-serum ที่ดูดทิ้งทุก 2-3 วัน นำไปปมในภาชนะใหม่ร่วมกับสารละลายเลี้ยงเซลล์ใหม่ ต่อมาพบกลุ่มก้อนของเซลล์สร้างเคอราทิน (ภาพ 9) นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้นำสารละลายเลี้ยงเซลล์ของ K-SFM ที่ดูดทิ้งมาปมในภาชนะใหม่ก็พบเซลล์สร้างเคอราทินเจริญเพิ่มจำนวน (ไม่มีรูปแสดง)



ภาพ 9 เซลล์สร้างเคอราทินที่เป็นเซลล์ยึดเกาะกระจายเซลล์หรือแพร่ไปสู่บริเวณอื่นด้วยการปล่อยเซลล์ให้ลอยไปในสารละลายและไปยึดเกาะบริเวณอื่น เมื่อนำสารละลายเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินที่ผ่านการเลี้ยงกับเซลล์สร้างเคอราทินมา 2-3 วัน ที่มักดูดทิ้งมาเลี้ยงรวมกับสารละลายเลี้ยงเซลล์ใหม่ในภาชนะใหม่ พบว่า 1 วันถัดมาพบกลุ่มเซลล์คล้ายเซลล์สร้างเคอราทิน (คล้ายภาพ 1) โดยอยู่ระหว่างเซลล์ 3T3

จากหลักฐานข้างต้นพบว่าเซลล์สร้างเคอราทินที่เป็นเซลล์ยึดเกาะขณะที่ขยายจำนวนและแผ่เพิ่มพื้นที่จะมีเซลล์ส่วนหนึ่งกลายเป็นเซลล์แขวนลอยชั่วขณะไปสู่พื้นที่ว่างและยึดเกาะ ต่อจากนั้นจะแผ่เพิ่มพื้นที่

คณะผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าขั้นตอนการสมานแผลของเซลล์สร้างเคอราทินนั้น นอกจากการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเคอราทินด้วยการแผ่ตามแนวราบแล้ว การกลายเป็นเซลล์แขวนลอยชั่วขณะเพื่อไปแผ่ปิดแผลส่วนอื่นจะช่วยให้การสมานแผลหายได้เร็วยิ่งขึ้น ดังนั้นการดูแลแผลจึงควรเอื้อให้การกลายเป็นเซลล์แขวนลอยชั่วขณะของเซลล์สร้างเคอราทินมีประสิทธิภาพมากที่สุดเพื่อช่วยสมานแผลได้เร็วขึ้น

บทที่ 5

บทสรุป

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการวิจัยสามารถสร้างชั้นเซลล์สร้างเคอราทินจากหนังหุ้มปลายอวัยวะเพศโดยใช้เซลล์สร้างเคอราทินที่ระยะแรกเลี้ยงในสารละลายเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ใช้ซีรัม (K-SFM) แล้วนำมาเลี้ยงต่อกับ feeder cells ด้วย 3T3 NIH โดยใช้สารละลายเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ซีรัม (K-serum) หรือไม่ใช้ feeder cells โดยใช้ K-SFM เมื่อเซลล์สร้างเคอราทินเพิ่มจำนวนแผ่นใกล้เต็มภาชนะส่วนที่ใช้ K-serum ยังคงใช้ต่อไป ส่วนที่ใช้ K-SFM นั้นเปลี่ยนมาใช้ K-serum และเลี้ยงต่อจนแผ่นเต็มภาชนะและซ้อนขึ้นไป 3-5 ชั้น (ภาพ 1-5) ต่อมาได้เปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนและแผ่นเต็มภาชนะของ K-serum และ K-SFM ด้วยเซลล์สร้างเคอราทินเริ่มต้นตั้งแต่ 5×10^2 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และในจำนวนทวีคูณ 10 20 30 และ 40 เท่า เป็น 5×10^3, 1×10^4, 1.5×10^4 และ 2×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรตามลำดับ ผลพบว่าเมื่อใช้เซลล์ 5×10^2 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร สารละลาย K-serum ใช้เวลากว่า 11 วัน ส่วน K-SFM ใช้เวลา 8 วัน ในส่วนของเซลล์ตั้งแต่ 5×10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรขึ้นไปนั้นได้ผลใกล้เคียงกัน การใช้เซลล์จำนวนมาก 2×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรจะแผ่เต็มภาชนะในวันที่ 4 ทั้ง K-serum และ K-SFM (ตาราง 1) และยังพบว่าเซลล์สร้างเคอราทินที่เลี้ยงด้วย K-serum และ K-SFM จะสามารถขยายพื้นที่ด้วยการสร้างเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายและไปเกาะในส่วนอื่นของภาชนะ ในการศึกษานี้สามารถเกาะและเพิ่มจำนวนในภาชนะใหม่ (ภาพ 9)

การศึกษานี้ต่างจากวิธีของ Dragunova และคณะ คือการเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินระยะแรกเริ่มด้วย K-SFM ที่เป็นสารละลายเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซรัมแล้วจึงนำเซลล์มาเลี้ยงร่วมกับ feeder cells และสร้างเป็นชั้นเซลล์สร้างเคอราทินได้ นอกจากนี้สามารถเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินและสร้างเป็นชั้นได้โดยไม่ใช้ feeder cells เพียงแต่ปรับใช้น้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เซรัมเมื่อเซลล์แผ่ใกล้เต็มภาชนะ ข้อดีของสารละลายที่ไม่มีเซรัมคือในระยะแรกคือเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างเคอราทินได้อย่างรวดเร็ว ทำให้แผ่เต็มพื้นที่ได้เร็วกว่าการใช้สารละลายที่ใช้เซรัม แต่สารละลายที่ไม่ใช้เซรัมไม่สามารถทำให้เซลล์ซ้อนเป็นชั้นได้ อาจเป็นเพราะสารอาหารไม่เหมาะกับการซ้อนเป็นชั้น ชั้นเซลล์สร้างเคอราทินที่สร้างได้นี้ไม่มีลักษณะของชั้นสตราตัม คอร์เนียม (stratum corneum) อาจเป็นเพราะไม่ได้ยกให้ส่วนบนสัมผัสอากาศ ในรายงานของ Hanada สามารถสร้างชั้นสตราตัม คอร์เนียมจากการยกให้ส่วนบนของชั้นเซลล์สัมผัสอากาศโดยที่ส่วนล่างยังมีสารละลาย [10] แม้ว่าจะมีการใช้ culture epithelia autograft ในการรักษาแผลหลังจากทำลาย giant congenital melanocytic nevus [11] หรือใช้รักษาผู้ป่วยแผลไฟไหม้บริเวณกว้างกว่าร้อยละ 30 ที่ไม่สามารถใช้ผิวหนังที่เหลือของตนเองมาปลูกถ่ายให้แผลไฟไหม้ได้หมดในประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศญี่ปุ่นที่ [10] แต่อัตราความสำเร็จที่ จะใช้ได้กับผู้ป่วยยังไม่แน่นอนเนื่องจากมีรายงานการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ พบว่าอัตราความสำเร็จที่ culture epithelia autograft จะใช้กับผู้ป่วยอยู่ระหว่างร้อยละ 0-100 และหากใช้ร่วมกับการปลูกถ่ายผิวหนังของผู้ป่วยเอง (autologous skin graft) จะมีอัตราความสำเร็จที่ร้อยละ 73-96 [12] ผลการศึกษานี้ที่จะใช้ประยุกต์ทางคลินิกคือการใช้สารละลายเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ใช้เซรัมสามารถเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว และการใช้เซลล์ตั้งต้นจำนวนมากสามารถลดเวลาการเลี้ยงเซลล์ลงได้ แต่ต้องแลกด้วยการใช้เซลล์จำนวน

มาก ข้อจำกัดที่สำคัญของการศึกษานี้คือยังไม่ได้ทดสอบกับผู้ป่วยจริงเนื่องจากไม่มีห้องปฏิบัติการเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะจะนำไปใช้กับผู้ป่วย

สรุปผลการวิจัย

การใช้สารละลายเลี้ยงเซลล์สร้างเคอราทินที่ไม่ใช้เซรั่มร่วมกับสารละลายที่ใช้เซรัมสามารสสร้างชั้นเซลล์สร้างเคอราทินซ้อนกัน 3-5 ชั้น ได้รวดเร็วและอาจนำไปใช้ประยุกต์ใช้ในการปิดแผลของผู้ป่วยเองที่มีแผลไฟไหม้เป็นบริเวณกว้างได้

บรรณานุกรม

1. Pomahac, B., et al., *Tissue Engineering of Skin.* Critical Reviews In Oral Biology & Medicine, 1998. **9**(3): p. 333-344.
2. Green, H., *The birth of therapy with cultured cells.* BioEssays, 2008. **30**(9): p. 897-903.
3. Dragunova, J., et al., *Experience gained during the long term cultivation of keratinocytes for treatment of burns patients.* Cell Tissue Bank, 2012. **13**(3): p. 471-8.
4. Green, H., O. Kehinde, and J. Thomas, *Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979. **76**(11): p. 5665-5668.
5. Dragúňová, J., et al., *Experience gained during the long term cultivation of keratinocytes for treatment of burns patients.* Cell and Tissue Banking. DOI: 10.1007/s**10561-011-9275**-z (ahead of print): p. 1-8.
6. Atiyeh, B.S. and M. Costagliola, *Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: Three decades later.* Burns, 2007. **33**(4): p. 405-413.
7. Pongcharoen, S., et al., *Protective effect of silk lutein on ultraviolet B-irradiated human keratinocytes.* Biological Research, 2013. **46**(1): p. 39-45.
8. Ghadially, R., *25 Years of Epidermal Stem Cell Research.* J Invest Dermatol, 2012. **132**(3): p. 797-810.
9. Draheim, K.M. and S. Lyle, *Epithelial stem cells.* Methods Mol Biol, 2011. **750**: p. 261-74.
10. Hanada, T., et al., *Keratinization induced by air exposure in the reconstructed human epidermal model: An in vitro model of a cultured epithelial autograft.* Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014. **118**(3): p. 323-326.
11. Morimoto, N., et al., *A case report of the first application of culture epithelial autograft (JACE(®)) for giant congenital melanocytic nevus after its approval in Japan.* J Artif Organs, 2018. **21**(2): p. 261-264.
12. Lo, C.H., et al., *Wound healing after cultured epithelial autografting in patients with massive burn injury: A cohort study.* J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2019. **72**(3): p. 427-437.