รหัสโครงการ SUT 1-104-49-36-29

รายงานการวิจัย

การสร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินจากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์และการปลูกถ่ายเซลล์เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคเบาหวาน

(Establishment of Insulin-Producing Cells from Human Embryonic Stem Cell Line and Transplantation for Potential Treatment of Diabetes Mellitus)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT 1-104-49-36-29

รายงานการวิจัย

การสร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินจากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์และการปลูกถ่ายเซลล์เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคเบาหวาน

(Establishment of Insulin-Producing Cells from Human Embryonic Stem Cell Line and Transplantation for Potential Treatment of Diabetes Mellitus)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ผู้ร่วมวิจัย

อาจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม

นางสาวปิยะภรณ์ รัตนนิลสรวง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2556

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2549 ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานทั้งสองแห่งเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จได้จากความร่วมมือเป็นอย่างดีของผู้ร่วมวิจัยสองท่านคือ อาจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม และ นางสาว ปิยะภรณ์ รัตนนิลสรวง ซึ่งขอขอบคุณท่านทั้งสองไว้ ณ โอกาสนี้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังใคร่ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีโดยส่วนรวม และ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ รวมทั้งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวกต่างๆทั้ง น้ำ ไฟ สถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะ กรรมการประเมินงานวิจัยและบุคคลอื่นๆซึ่งไม่อาจกล่าวได้หมดในโอกาสนี้ สำหรับการสนับสนุนและความช่วยเหลือต่างๆซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ลี้อนันต์ศักดิ์ศิริ
หัวหน้าโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

เบาหวานเป็นโรคที่มีระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดสูงผิดปกติ ซึ่งการมีภาวะเบาหวานเป็นเวลานานจะส่งผลให้เกิดอาการแทรกซ้อนที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย การรักษาโรคเบาหวานสามารถทำได้ด้วยการควบคุมอาหาร การออกกำลังกายและการใช้ยาที่เหมาะสม ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการรักษาโรคเบาหวานโดยการปลูกถ่ายเซลล์ตับอ่อน แต่การรักษาด้วยวิธีนี้ยังมีปัญหาการขาดแคลนตับอ่อนจากผู้บริจาคอวัยวะซึ่งเป็นแหล่งที่มาของเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการรักษาโรคด้วยเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด ด้วยเหตุนี้เซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จึงได้รับความสนใจศึกษาเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีศักยภาพในการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในร่างกายมนุษย์ได้ทุกชนิด การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสร้างเซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิตอินซูลินด้วยวิธีการที่ควบคุมการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มเซลล์ของตับอ่อนที่สร้างได้นี้ประกอบด้วยเซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิตอินซูลินเป็นส่วนมาก ซึ่งให้ผลบวกทั้งต่อการย้อมโปรตีน C-peptide การย้อมเซลล์ด้วย Dithizone และมีการหลั่งอินซูลินสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้กลุ่มเซลล์เซลล์ดังกล่าวยังมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ตับอ่อนและเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน

จากการตรวจสอบหน้าที่ของเซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้มในร่างกายหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย Streptozotocin พบว่า กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการฉีดรักษาด้วยเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถรักษาระดับน้ำตาลในเลือดได้ และสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดอาการแทรกซ้อนเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ ในขณะที่หนูที่ไม่ได้รับการฉีดเซลล์จะมีระดับน้ำตาลเพิ่มขึ้นหลังอดอาหาร ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิตอินซูลินที่สร้างจากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์มีความสามารถในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและป้องกันภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อการรักษาโรคเบาหวานในมนุษย์ต่อไปในอนาคต

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Diabetes is a group of chronic diseases in which a person has abnormally high levels of blood glucose. People with diabetes have an increased risk of developing serious complications. People with diabetes can control their blood glucose by following a healthy meal plan and exercise program, and taking oral medication. In developing a potential therapy for diabetic patients, islet cells transplantation has drawn great attention. Nevertheless, insufficient islets supply mainly a critical issue for the success of islet transplantation. Therefore, new cell based therapy need to be developed. In this regard, human embryonic stem cells (hESCs) may serve as good candidates for this since they are capable of differentiating into all cell types in the body. In this study, we designed a differentiation protocol that can generate hESC-derived insulin-producing cells (hES-DIPCs). The results revealed that the hES-DIPCs exhibited the characteristic of pancreatic β-cells including C-peptide and dithizone (DTZ)-positive cellular clusters. In addition, these cells demonstrated the ability to release insulin in response to glucose in a glucose dependent manner. Moreover, these cells also contained gene expression patterns of insulin producing cells and islet cell cluster similar to the pancreatic development.

In order to determine whether these cells could functions *in vivo*, non-encapsulated and encapsulated hES-DIPCs were used to transplant into streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice. Our results demonstrated that the transplantation of both non-encapsulated and encapsulated hES-DIPCs could control fasting blood glucose levels and prevent atherosclerosis in diabetic animals while the untransplanted control group showed an increase in blood glucose level. These results indicated that the hES-DIPCs have the ability to regulate hyperglycemic conditions as well as prevention of diabetic progression *in vivo*. The application of this work is therapeutic value in human diabetic treatment in the future.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญภาพ ..... ช

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 2

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

การเลี้ยงและขยายจำนวนเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ 3

การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

ไปเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน 3

วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ 4

วิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ 4

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การย้อมเซลล์ด้วย Dithizone ……..…….. 7

ทดสอบการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่เหนี่ยวนำให้

เกิดการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน …… 7

การสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ที่ผลิตอินซูลินโดยใช้สารละลายแอลจิเนท (Alginate) …… 7

ทดสอบการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้ม …… 8

ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ที่ผลิตอินซูลินในการรักษาโรคเบาหวาน …… 8

ตรวจสอบหนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีและ

ไม่มีเยื่อหุ้ม …… 9

ทดสอบหาระดับของสารชักนำให้เกิดการอักเสบในหนูทดลอง …….. 9

สถิติวิเคราะห์ ……..…….. 9

บทที่ 3 ผลการวิจัยและผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ให้เป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน … 10

การตรวจสอบเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่เปลี่ยนสภาพไปเป็น

เซลล์ที่ผลิตอินซูลิน ……..…….. 12

การสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน ……..…… 21

การตรวจวัดน้ำหนักตัวและระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหาร

ของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน …… 22

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การตรวจวัดระดับ blood urea nitrogen (BUN) และ creatinine ในเลือด
ของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน ……. 25
การตรวจวัดค่าไขมันในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่าย
เซลล์ที่ผลิตอินซูลิน ……..…….. 26
การตรวจวัดระดับสารชักนำให้เกิดการอักเสบในหนูทดลอง ……... 31
บทที่ 4 ข้อวิจารณ์ ……..... 32
บทที่ 5 บทสรุป
สรุปผลการวิจัย ……..…… 36
ข้อเสนอแนะ ……..…… 36
บรรณานุกรม …….. 37
ประวัติผู้วิจัย …… 40

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

		หน้า
1	ลำดับเบสของไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์…….	5

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์เป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน ……	11
2	การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของเซลล์ตับอ่อน ……..	14
3	การแสดงออกของยีนในระหว่างการสร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินจาก เซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ……..……..	15
4	ภาพจากกล้องอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ของการย้อมโปรตีน Nestin จาก เซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่เปลี่ยนสภาพเป็นเวลา 46 วัน ……	16
5	ภาพจากกล้องอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ของการย้อมโปรตีน somatostatin และ glucagon จากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่เปลี่ยนสภาพเป็นเวลา 46 วัน …..	17
6	ภาพจากกล้องอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ของการย้อมโปรตีน C-peptide และ glucagon จากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่เปลี่ยนสภาพเป็นเวลา 46 วัน …..	18
7	การย้อมเซลล์ด้วย Dithizone …….....	19
8	การหลั่งอินซูลินตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส …….....	20
9	เซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้ม ……....	21
10	น้ำหนักตัวของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิต อินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม …….……....	23
11	ระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหารของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการ ปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม ……...	24

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ระดับ BUN ในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม ……..……...	25
13	ระดับ creatinine ในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม ……..……..	26
14	ระดับ cholesterol ในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม ……..…….	27
15	ระดับ triglyceride ในเลือดของกลุ่มหนูทดลองหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม ……..……	28
16	ระดับ HDL ในเลือดของกลุ่มหนูทดลองหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม ……..……	29
17	ระดับ LDL ในเลือดของกลุ่มหนูทดลองหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม ……..…….	29

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	Atherogenic index (AI) ของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม ……..……	30
19	อัตราส่วนของ HDL/cholesterol ของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม ……	30
20	ระดับ IL-1β ในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์แบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม ……..……	31

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคเบาหวานนับเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั้งในระดับประเทศและระดับโลก เนื่องจากเป็นโรคที่มีความรุนแรงและยากต่อการรักษา คาดว่าประชากรโลกจะมีความชุกของโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นจาก 221 ล้านคน ในปี พ.ศ. 2553 เป็น 300 ล้านคนในปี พ.ศ. 2568 (Zimmet et al., 2003) สำหรับประชากรไทยพบว่ามีความชุกของโรคเบาหวานเท่ากับร้อยละ 9.6 (ประมาณ 2.4 ล้านคน) (Aekplakorn et al., 2003)

โรคเบาหวานเป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากความผิดปกติในการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินจากตับอ่อนหรือความผิดปกติในการออกฤทธิ์ของอินซูลิน หรือทั้งสองปัจจัยร่วมกัน จากสาเหตุดังกล่าวจะนำไปสู่ภาวะผิดปกติในการเผาผลาญพลังงานในร่างกาย โดยจะแสดงออกให้เห็นจากการมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง เมื่อเวลาผ่านไปจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตา ไต เส้นประสาท หลอดเลือดและหัวใจ ซึ่งถือเป็นภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญของโรคเบาหวาน ทำให้สิ้นเปลืองงบประมาณเป็นจำนวนมากสำหรับการรักษาโรคเบาหวาน การรักษาโรคเบาหวานจะมุ่งเน้นการรักษาเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดให้ใกล้เคียงปกติและป้องกันโรคแทรกซ้อนในระยะยาว ในการรักษาโรคเบาหวานนั้นมีหลักสำคัญคือการควบคุมอาหาร การออกกำลังกาย และการใช้ยา ซึ่งการใช้ยาจะแบ่งเป็นชนิดรับประทานและชนิดฉีด โดยการฉีดอินซูลินถือเป็นวิธีการรักษาหลักในผู้ป่วยเบาหวาน แต่พบว่าการใช้ยารักษาโรคเบาหวานนั้นมีผลข้างเคียงที่ต้องพึงระวังสำหรับรักษาผู้ป่วย

วิธีการรักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์ตับอ่อนจึงได้พัฒนาขึ้นมาเพื่อช่วยแก้ปัญหาของการรักษาโดยการฉีดอินซูลิน วิธีนี้ถือว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดในปัจจุบันสำหรับใช้รักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ตับอ่อนจะสามารถควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดได้ดีขึ้นโดยไม่ต้องพึ่งการฉีดอินซูลินเข้าทดแทนในร่างกาย แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือจำนวนเซลล์ตับอ่อนที่มีไม่มากเพียงพอสำหรับการปลูกถ่ายและผู้ป่วยมีความจำเป็นที่จะต้องใช้ยากดภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่องเพื่อป้องกันการต่อต้านของร่างกาย ทีมนักวิจัยในปัจจุบันให้ความสนใจที่จะพัฒนาการสร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินจากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ได้ด้วยวิธีการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (Cellular differentiation) เนื่องจากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อน

มนุษย์มีศักยภาพสูงโดยแสดงคุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถแบ่งตัวได้โดยไม่มีขีดจำกัด และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ทุกชนิดที่พบในร่างกาย ทั้งนี้นักวิจัยกลุ่มต่างๆได้รายงานการค้นพบวิธีการพัฒนาให้เซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ที่สามารถผลิตอินซูลินได้ โดยเซลล์ที่สร้างขึ้นมานี้จะมีการแสดงออกของสัญลักษณ์หรือเครื่องหมายต่างๆที่เกี่ยวข้องกับระยะการพัฒนาของเซลล์ตับอ่อน และเซลล์เหล่านี้ยังสามารถสร้างและหลั่งอินซูลินในการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (Assady et al., 2001; Baharvand et al., 2006b; Segev et al., 2004) แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการเปลี่ยนสภาพของเซลล์จากกลุ่มนักวิจัยเหล่านี้มีการใช้อินซูลินเป็นส่วนประกอบของน้ำเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นเซลล์ที่สร้างขึ้นมาจากวิธีเหล่านี้อาจดูดซับอินซูลินจากน้ำเลี้ยงเซลล์เข้าไปในเซลล์ (Rajagopal et al., 2003) นอกจากนี้พบว่าเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่นำมาใช้ในการทดลองจะมีการเพาะเลี้ยงให้เพิ่มจำนวนโดยใช้เซลล์พี่เลี้ยงที่เป็นเซลล์มาจากหนู ทำให้มีโอกาสการปนเปื้อนกับสารประกอบต่างๆจากสัตว์ได้ (Mallon et al., 2006) จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้คือพัฒนาวิธีการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ให้เป็นเซลล์ที่สามารถผลิตอินซูลินเพื่อนำไปปลูกถ่ายรักษาโรคเบาหวานในหนูเมาส์ที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน โดยหลีกเลี่ยงการใช้อินซูลินเป็นส่วนประกอบของน้ำเลี้ยงเซลล์และลดโอกาสการปนเปื้อนของเซลล์ที่สร้างขึ้นจากสารประกอบต่างๆจากสัตว์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินจากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ด้วยวิธีการเปลี่ยนสภาพของเซลล์
2. ทดสอบความสามารถของเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้มในการรักษาโรคเบาหวานโดยทดสอบในหนูเมาส์ที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ประสบผลสำเร็จในการพัฒนาวิธีการสร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินโดยการเปลี่ยนสภาพเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ให้เป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน

2. เซลล์ที่สร้างขึ้นสามารถนำไปใช้เป็นแบบจำลองเพื่อศึกษาหาแนวทางควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและป้องกันไม่ให้โรคเบาหวานมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การเลี้ยงและขยายจำนวนเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

นำเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (H9) ซึ่งได้มาจาก WiCell Research Institute, USA มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากคน (HFF-1 cell line, ATCC, USA) โดยมี mitomycin-c เป็นสารยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย 79 % KO-DMEM, 20 % KO-SR, 1 % non-essential amino acid , 1 mM L-glutamine, 0.1 mM β-mercaptoethanol, และ 5 ng/ml bFGF ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 4.5 %คาร์บอนไดออกไซด์ และ 5 %ออกซิเจน จากนั้นทำการย้ายเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงอันใหม่ (subculture) ทุกๆ 5 ถึง 7 วัน

การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน

โคโลนีของเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จะถูกตัดออกเป็นชิ้นๆ ให้ได้ขนาดประมาณ 300 ไมโครมิลลิเมตร จากนั้นนำเซลล์แต่ละชิ้นมาสร้างเป็น embryoid bodies (EBs) โดยวิธี hanging drop (1 ชิ้นต่อขนาดหยด 20 ไมโครมิลลิลิตร) นาน 2 วันในอาหารเลี้ยงเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ไม่ได้เติม bFGF ตามด้วยการทำการย้าย EBs ไปเลี้ยงต่อในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด ultra low attachment ที่มีการเติม Activin A (100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ไม่ได้เติม bFGF เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำ EBs ประมาณ 30 ชิ้น ไปเลี้ยงต่อในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 30 มิลลิเมตรที่เคลือบผิวด้วย 0.1 % gelatine ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย KO-DMEM, 2 % B27 supplement, 2 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF, 100 ng/ml Noggin และ 10 ng/ml Betacellulin เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เหมือนกับขั้นตอนที่ 3 แต่ไม่มีการเติม bFGF เป็นเวลา 7 วัน ก่อนเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย KO-DMEM, Nicotinamide, IGFII, Betacellulin, HGF เป็นเวลา 9 วัน โดยทำการ เซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 4.5 % คาร์บอนไดออกไซด์ และ 5 % ออกซิเจน และมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน นำเซลล์ที่สร้างขึ้นไปทดสอบเพื่อพิสูจน์ว่าเป็นเซลล์ที่สามารถผลิตอินซูลินได้ โดยการย้อมเซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์, ตรวจหา

การแสดงออกของยีนด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์, การย้อมเซลล์ด้วย Dithizone และทดสอบการหลั่งอินซูลินตอบสนองต่อความเข้มข้นของระดับน้ำตาลกลูโคส

วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

ตรึงสภาพเซลล์ด้วยพาราฟอร์มัลดีไฮด์ (4 เปอร์เซ็นต์ใน PBS) บล็อกเซลล์ด้วย 3 % PBS ที่มี และ 0.2 % Triton X-100 จากนั้นนำเซลล์ไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี้ตัวที่ 1 โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS และนำเซลล์ไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี้ติดฉลากสารเรืองแสงตัวที่ 2 โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง นำเซลล์มาย้อมนิวเคลียสโดยใช้ 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 นาที จากนั้นใช้ mounting media (VECTASHIELD, Vector Labs, Burlingame, CA) หยดลงบนเซลล์และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์ที่ได้ไปตรวจสอบการย้อมโดยดูจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (Olympus American Inc. Melville, NY) แอนติบอดี้ตัวที่ 1 มีดังนี้ mouse anti-hNestin 1:100 (R&D Systems, MAB1259); guinea pig anti-insulin, 1:100 (Dako, A0564); rabbit anti-glucagon, 1:100 (Dako, A0565); mouse anti-human pro-insulin c-peptide 1:100 (Chemicon, CBL94); mouse anti-somatostatin (Santa Cruz Biotechnology, SC-25262) แอนติบอดี้ตัวที่ 2 มีดังนี้ FITC-conjugated goat anti-mouse 1:100 (BD Pharmingen), FITC-conjugated swine anti-rabbit (Dako) and Cy3-conjugated goat anti-mouse 1:100 (Jackson Immuno Research Labs)

วิธีเรียลไทม์พีซีอาร์

นำเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์และเซลล์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลินในขั้นตอนต่างๆ มาสกัดให้ได้อาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด RT100 Total RNA Mini kit (Geneaid) อาร์เอ็นเอที่ได้จะนำไปวัดหาความเข้มข้นโดยใช้ NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc.) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ความเข้มข้นขนาด 50 ถึง 100 นาโนกรัม มาเข้าสู่ขั้นตอน reverse transcription เพื่อให้ได้คอมพลีเมนต์ทารี่ดีเอ็นเอ (cDNA) โดยใช้ cDNA Synthesis kit (Fermentas) ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบไปด้วย cDNA, SYBR Green master mix (Applied Biosystems), forward primer และ reverse primer (ตารางที่ 1) นำหลอดที่มีส่วนผสม จากข้อ 4 ไปทดสอบด้วยเครื่อง ABI 7900HT real time PCR system (Applied Biosystems) จากนั้นวัดระดับการแสดงออกของยีนโดยคำนวณจากยีนควบคุมภายใน คือ GAPDH

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์

ยีน	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' ----> 3')	อุณหภูมิของ Annealing (°C)	ขนาดชิ้นส่วนของยีนเป้าหมาย (bp)	แหล่งอ้างอิง
GAPDH	F: AGC CAC ATC GCT CAG ACA CC R: GTA CTC AGC GGC CAG CAT CG	60	302	Yao et al., 2006
OCT4	F: GAGCAAAACCCGGAGGAGT R: TTCTCTTTCGGGCCTGCAC	60	310	Yao et al., 2006
Nestin	F: CAGCTGGCGCACCTCAAGATG R: AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG	55	208	Shim et al., 2007
Pdx1	F: CCC ATG GAT GAA GTC TAC C R: GTC CTC CTC CTT TTT CCA C	58	262	Seeberger et al., 2006
Hnf3β	F: CCA CCA CCA ACC CCA CAA AAT G R: TGC AAC ACC GTC TCC CCA AAG T	60	294	Baharvand et al., 2006a

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ยีน	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' ----> 3')	อุณหภูมิของ Annealing (°C)	ขนาดชิ้นส่วนของยีนป้าหมาย (bp)	แหล่งอ้างอิง
Ngn3	F: GGT AGA AAG GAT GAC GCC TC R: CCG AGT TGA GGT CGT GCA T	58	313	Seeberger et al., 2006
NeuroD1	F: GCC CCA GGG TTA TGA GAC TAT CAC T R: CCG ACA GAG CCC AGA TGT AGT TCT T	61	523	Khoo et al., 2005
Pax6	F: CCG AGA GTA GCG ACT CCA G R: CTT CCG GTC TGC CCG TTC	64	239	Segev et al., 2004
Nkx6.1	F: GTT CCT CCT CCT CCT CTT CCT C R: AAG ATC TGC TGT CCG GAA AAA G	53	381	Segev et al., 2004
GLUT2	F: AGGACTTCTGTGGACCTTATGTG R: GTTCATGTCAAAAAGCAGGG	55	231	Segev et al., 2004

การย้อมเซลล์ด้วย Dithizone

ทำการเตรียมสารตั้งต้น Dithizone โดยละลาย Dithizone 50 มิลลิกรัม ใน dimethylsulfoxide (DMSO) 50 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส ก่อนทำการย้อมเซลล์ด้วย Dithizone ให้นำสารตั้งต้น 20 ไมโครมิลลิลิตร มาละลายกับอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร นำเซลล์มาย้อมกับสารละลาย Dithizone ดังข้อที่ 2 โดยบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วย Hank's balanced salt solution (HBSS) นำไปตรวจสอบการย้อมโดยดูจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (phase contrast)

ทดสอบการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน

นำเซลล์ที่ได้จากขั้นตอนสุดท้ายของการเหนี่ยวนำเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ให้เปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน มาล้าง 2 ครั้งด้วย Krebs-Ringer bicarbonate HEPES (KRBH) buffer จากนั้นนำเซลล์มาทดสอบกับ KRBH buffer ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 5, 20 หรือ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อนำมาทดสอบการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ วัดระดับความเข้มข้นของอินซูลินด้วย insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Dako)

การสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ที่ผลิตอินซูลินโดยใช้สารละลายแอลจิเนท (Alginate)

นำเซลล์ที่ผลิตอินซูลินมาผสมกับ 1.5 % สารละลายแอลจิเนท ที่มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 40,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้กระบอกฉีดยาดูดสารละลายเซลล์และปล่อยให้เป็นหยดๆผ่านเข็มฉีดยาลงไปใน สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (100 mM) ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์ (145 mM) และ MOPS (10 mM) นำเซลล์ที่มีเยื่อหุ้มไปล้างด้วย buffer หลังจากที่มีการสร้างรูปร่างของเยื่อหุ้มเซลล์ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จากนั้นนำเซลล์ที่มีเยื่อหุ้มไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ (4.5 %) และ ออกซิเจน (5 %)

ทดสอบการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้ม

นำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้ม มาวัดระดับความเข้มข้นของอินซูลิน โดยทำการเก็บส่วนใสในวันที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 ตามลำดับ วัดระดับความเข้มข้นของอินซูลินด้วย insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Dako)

ทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ที่ผลิตอินซูลินในการรักษาโรคเบาหวาน

หนูเมาส์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีการควบคุมตามข้อกำหนดของคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานการใช้สัตว์ทดลอง สภาวิจัยแห่งชาติ และปฏิบัติการทดลองตามข้อแนะนำของคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นำหนูเมาส์เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักตัวประมาณ 20 ถึง 30 กรัม มาเลี้ยงในห้องเลี้ยงที่มีสภาพแวดล้อมดังนี้ อุณหภูมิในห้องเลี้ยงควบคุมอยู่ที่ 23 ถึง 25 องศาเซลเซียส แสงมีการควบคุม อัตราส่วนชั่วโมงแสงสว่างกับความมืด เป็น 12 ชั่วโมงต่อ 12 ชั่วโมง ให้อาหารและน้ำอย่างเพียงพอต่อความต้องการของสัตว์ในแต่ละวัน

เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานในหนูเมาส์ โดยการฉีด Streptozotocin (STZ; ขนาด 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) เข้าช่องท้องในหนูเมาส์ที่อดอาหารนาน 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดเพื่อยืนยันภาวะการเป็นเบาหวานในหนูทดลอง หลังจากฉีด STZ เป็นเวลา 7 วัน โดยกำหนดให้หนูมีภาวะเบาหวานเมื่อมีระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหารสูงกว่า 250 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

ทำการแบ่งหนูเบาหวานออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1: หนูเบาหวานกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน จำนวน 5 ตัว

กลุ่มที่ 2: หนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีเยื่อหุ้ม จำนวน 5 ตัว

กลุ่มที่ 3: หนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้ม จำนวน 5 ตัว

โดยหนูทดลองจะไม่ได้รับการฉีดยากดภูมิคุ้มกันและมีการปลูกถ่ายเซลล์เป็นจำนวน 50,000 เซลล์ต่อตัว ในวันที่ 0, 14, 28 และ 42 การทดลองนี้ จะชั่งน้ำหนักตัวของหนูทดลองก่อนทำการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองทุกๆสัปดาห์

ตรวจสอบหนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีและไม่มีเยื่อหุ้ม

หลังจากทำการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้มให้แก่หนูทดลอง จะทำการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหาร ในหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ทุกๆ 14 วัน จนกระทั่งวันที่ 70 ของการทดลอง ด้วยเครื่องวัด Accu-Chek Advantage II (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany)

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง จะทำวิธีการุณยฆาตหนูทดลองด้วยวิธี Cervical dislocation นำตัวอย่างเลือดของหนูทดลองมาปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 1,500 g นาน 10 นาที นำซีรั่มที่แยกได้มาตรวจวัดระดับ blood urea nitrogen (BUN), creatinine, cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein (LDL) ในเลือด คำนวณหาค่า Atherogenic index (AI) จากสูตร (cholesterol-HDL)/HDL และคำนวณหาอัตราส่วนของ HDL/cholesterol

ทดสอบหาระดับของสารชักนำให้เกิดการอักเสบในหนูทดลอง

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำซีรั่มของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ที่แยกได้มาทดสอบหาระดับของสารชักนำให้เกิดการอักเสบ ชนิดอินเตอร์ลิวคินวันเบต้า (IL-1β) โดยใช้วิธี enzyme immunoassay (Mouse IL-1β/IL-1F2: Quantikine, R&D systems) ระดับของไซโตไคน์ที่วัดได้จะมีหน่วยเป็นพิโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สถิติวิเคราะห์

ข้อมูลของการทดลองในแต่ละกลุ่ม จะแสดงค่าเป็น Mean ± S.E.M และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ SPSS software package Version 11.5

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง 1 กลุ่ม ใช้ Paired-Samples T test

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่ม ใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan

กำหนดให้มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

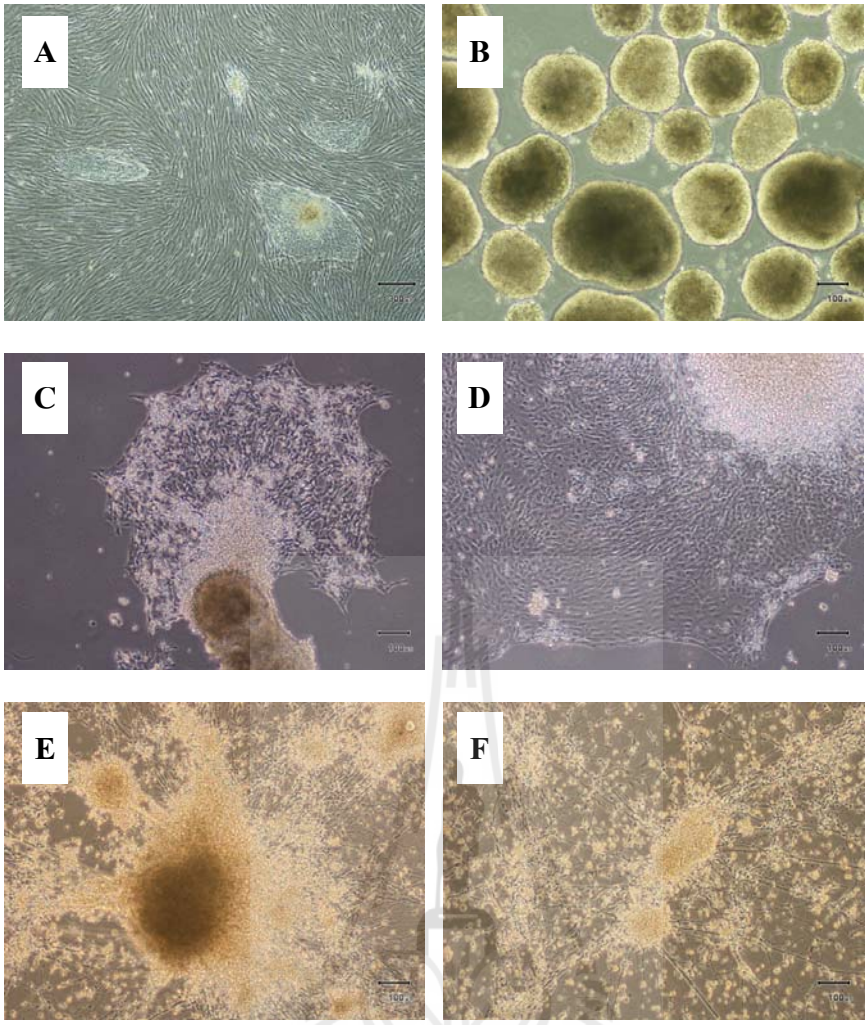
บทที่ 3

ผลการวิจัยและผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ให้เป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน

การเปลี่ยนสภาพจากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (ภาพที่ 1A) เพื่อให้ได้เซลล์ที่ผลิตอินซูลิน จะเริ่มต้นจากขั้นตอนการสร้าง embryoid bodies (EBs) เป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 1B) จากนั้นจะเหนี่ยวนำให้ EBs พัฒนาไปเป็นเซลล์ในระยะต่างๆของการสร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินโดยขั้นตอนแรกจะเหนี่ยวนำเซลล์ให้พัฒนาไปเป็น pancreatic endoderm เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งจะพบว่า EBs เกาะลงบนพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงเซลล์และมีเซลล์เจริญออกมาจาก EBs (ภาพที่ 1C) จากนั้นจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์พัฒนาไปเป็น pancreatic endocrine เป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 1D) ในขั้นตอนสุดท้ายจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์พัฒนาไปเป็นเซลล์ที่สามารถผลิตอินซูลินได้ โดยใช้เวลา 18 วัน จะพบว่ามีกลุ่มเซลล์ขนาดต่างๆเกิดขึ้นบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 1E และ 1F)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 1 การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์เป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน

(A) ลักษณะของโคโลนีเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

(B) Embryoid bodies (EBs)

(C) เซลล์ที่มีการเปลี่ยนสภาพเซลล์ในวันที่ 21, วันที่ 28 (D) และ วันที่ 46 (E และ F)

ความยาวเส้นสเกลบาร์ = 300 ไมโครเมตร (A); 100 ไมโครเมตร (B ถึง F)

การตรวจสอบเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน

เป็นขั้นตอนตรวจสอบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมาสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์เปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลินได้ นำเซลล์ที่ถูกเปลี่ยนสภาพในวันที่ 7, 21, 28 และ 46 มาทดสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ (ภาพที่ 2 และ 3) จากผลการทดสอบพบว่า *pancreatic duodenal homeobox 1* (*Pdx1*) จะแสดงออกเพิ่มขึ้นในวันที่ 28 และลดการแสดงออกในวันที่ 46 เซลล์ที่เปลี่ยนสภาพในวันที่ 21 จะมีการแสดงออกของ *glucagon* และ *Neurogenine 3* (*Ngn3*) หลังจากนั้นยีนทั้ง 2 ชนิดจะมีการแสดงออกลดลงไปตามขั้นตอนของการเปลี่ยนสภาพเซลล์, การแสดงออกของ *Nestin*, *Hnf3β*, *Nkx6.1*, *Pax6* จะเริ่มแสดงออกตั้งแต่วันที่ 7 และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นตามขั้นตอนของการเปลี่ยนสภาพเซลล์, *somatostatin* จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 21 จนกระทั่งวันที่ 46 ของขั้นตอนการเปลี่ยนสภาพเซลล์, *neurogenic differentiation factor 1* (*NeuroD1*) จะมีการแสดงออกเฉพาะวันที่ 28 ในขณะที่ *insulin* จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในวันที่ 46 ของการเปลี่ยนสภาพเซลล์ ส่วน *glucose transporter GLUT2* จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในระหว่างวันที่ 21 ถึง 46 โดยจะมีการแสดงออกสูงที่สุดในวันที่ 46

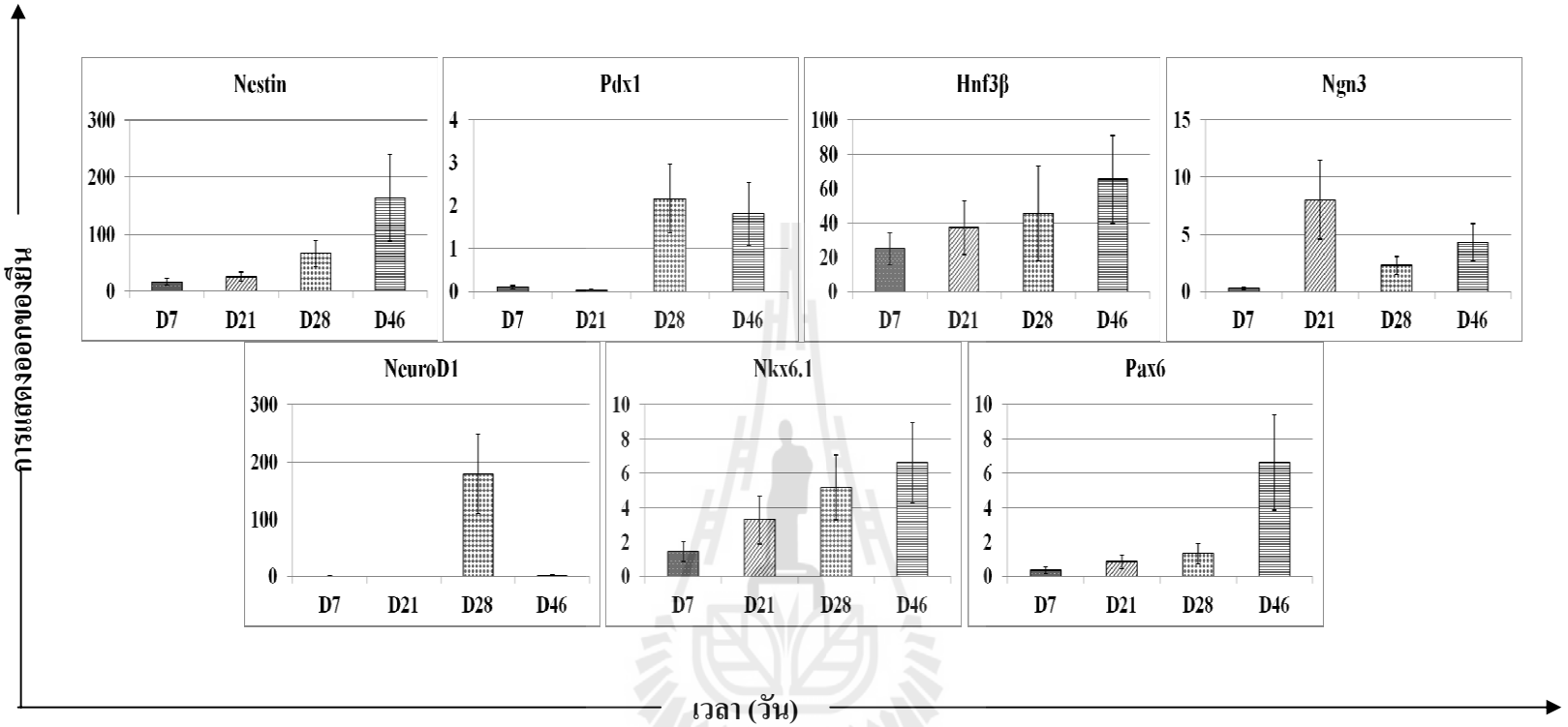
เพื่อยืนยันว่าเซลล์ที่สร้างขึ้นเป็นเซลล์ที่สามารถผลิตอินซูลินได้ จึงนำเซลล์ที่ถูกเปลี่ยนสภาพในวันที่ 46 ไปทดสอบการย้อมโปรตีนด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (ภาพที่ 4 ถึง 6) ผลการทดสอบพบว่าเซลล์จะมีการแสดงออกของโปรตีน C-peptide ซึ่งเป็นเครื่องหมายของการสร้างอินซูลินได้ภายในเซลล์ (ภาพที่ 6A) เซลล์ในขั้นตอนนี้จะมีการแสดงออกของโปรตีน glucagon (ภาพที่ 5B และ 6B) และโปรตีน somatostatin (ภาพที่ 5A) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ในขั้นตอนนี้จะมีการแสดงออกของโปรตีน Nestin (ภาพที่ 4A)

จากนั้นนำเซลล์ในขั้นตอนสุดท้ายของการเปลี่ยนสภาพเซลล์มาทดสอบการย้อมด้วย Dithizone ซึ่ง Dithizone นี้เป็น zinc-chelating agent ที่สามารถเลือกย้อมติดเฉพาะเซลล์ตับอ่อนชนิดเบต้า ผลการทดสอบพบว่าเซลล์ในขั้นตอนนี้จะให้ผลบวกต่อการย้อมด้วย Dithizone จึงยืนยันได้ว่าเซลล์ที่สร้างขึ้นมานี้เป็นเซลล์ที่สามารถผลิตอินซูลินได้ (ภาพที่ 7)

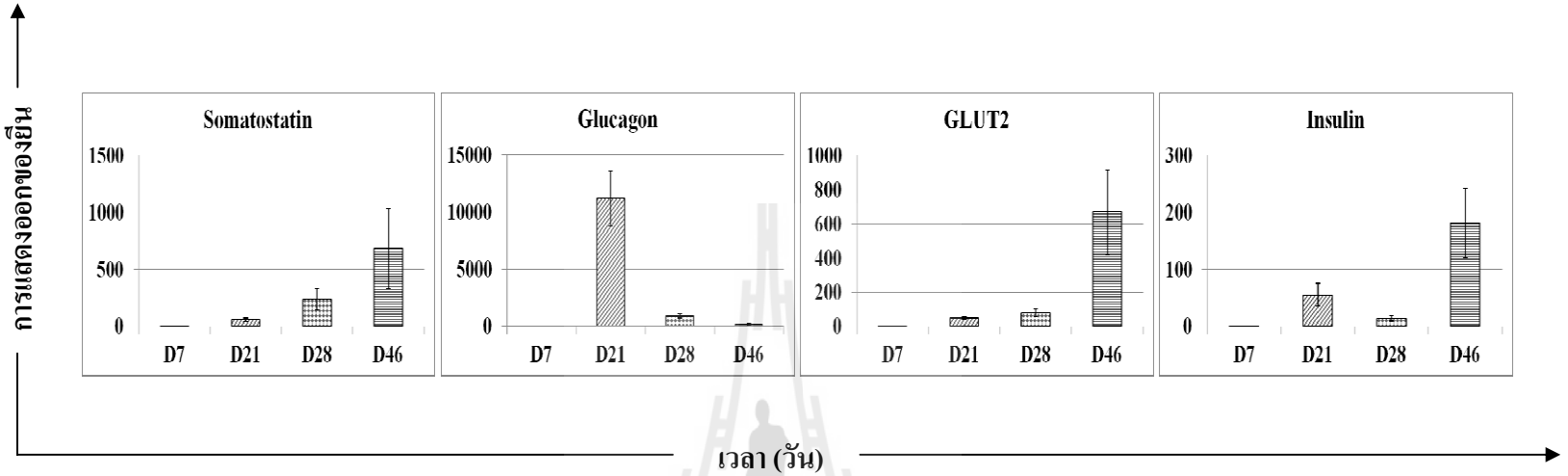
จากนั้นนำเซลล์ในขั้นตอนสุดท้ายมาทดสอบการหลั่งอินซูลินจากการกระตุ้นด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 5, 20 และ 50 มิลลิโมลาร์ ผลการทดสอบพบว่ามีการหลั่งของอินซูลินออกมาจากเซลล์ที่ระดับ 25.73 ± 2.41, 30.33 ± 1.14 และ 63.47 ± 0.52 พิโครโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าการหลั่งของอินซูลินจากเซลล์หลังกระตุ้นด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์มีความแตกต่าง

อย่างนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 8)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



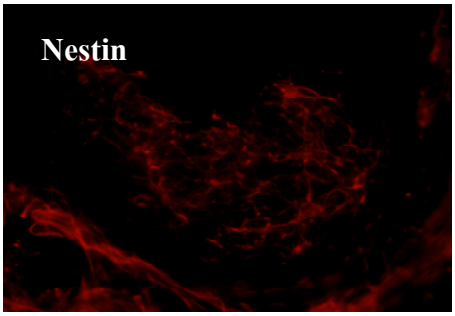
ภาพที่ 2 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของเซลล์ตับอ่อน
ทดสอบด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์จากตัวอย่างในวันที่ 7, 21, 28 และ 46 ของการเปลี่ยนสภาพเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ วัดระดับการแสดงออกของ *Nestin*, *Pdx1*, *Hnf3β*, *Ngn3*, *NeuroD1*, *Nkx6.1* และ *Pax6* โดยเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนกับเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนสภาพ



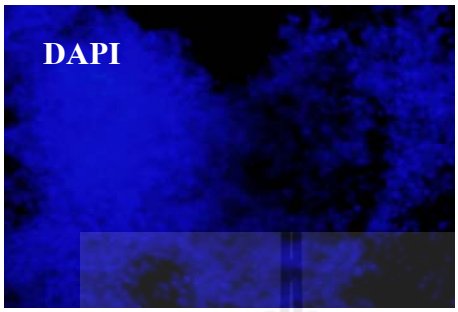
ภาพที่ 3 การแสดงออกของยีนในระหว่างการสร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินจากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ทดสอบด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์จากตัวอย่างในวันที่ 7, 21, 28 และ 46 ของการเปลี่ยนสภาพเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ วัดระดับการแสดงออกของ *somatostatin*, *glucagon*, *GLUT2* และ *insulin* โดยเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนกับเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนสภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

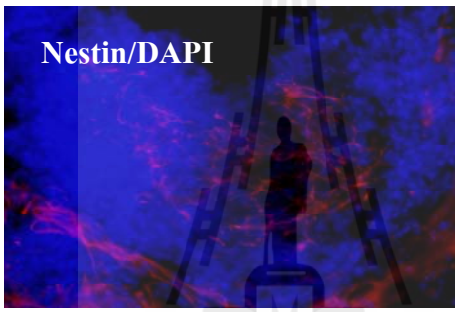
A



B



C



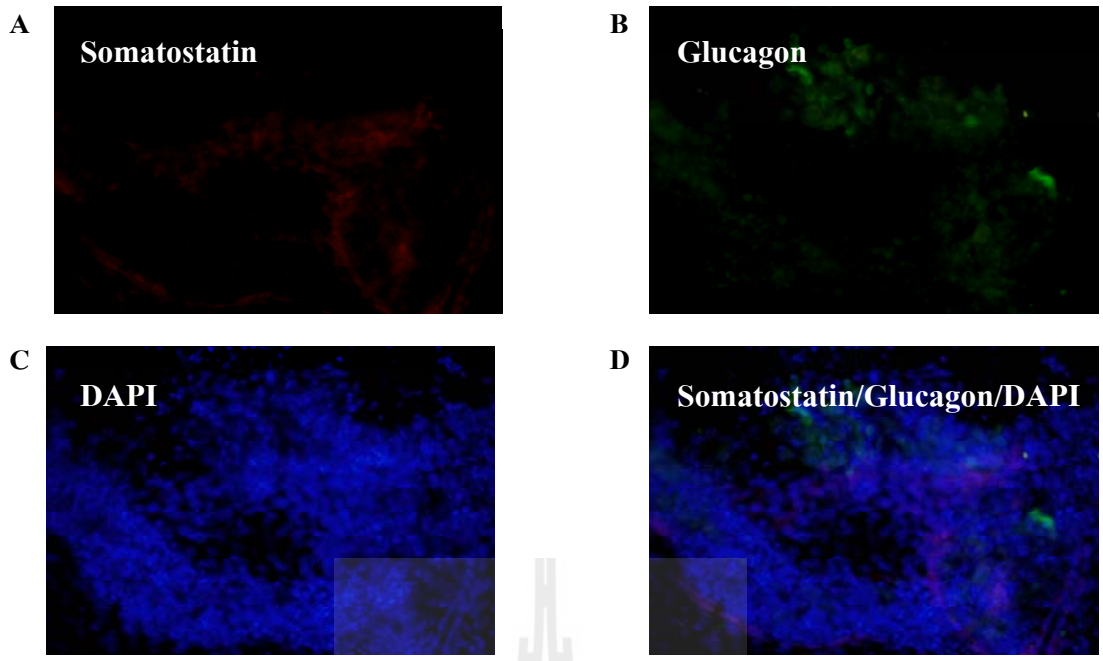
ภาพที่ 4 ภาพจากกล้องอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ของการย้อมโปรตีน Nestin จากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่เปลี่ยนสภาพเป็นเวลา 46 วัน

(A) ย้อมด้วยแอนติบอดี้ต่อ Nestin (สีแดง)

(B) ย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI (สีน้ำเงิน)

(C) ภาพรวมของการย้อมเซลล์ด้วย Nestin และ DAPI

ความยาวของสเกลบาร์ = 50 ไมโครเมตร



ภาพที่ 5 ภาพจากกล้องอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ของการย้อมโปรตีน somatostatin และ glucagon จากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่เปลี่ยนสภาพเป็นเวลา 46 วัน

(A) ย้อมด้วยแอนติบอดี้ต่อ somatostatin (สีแดง)

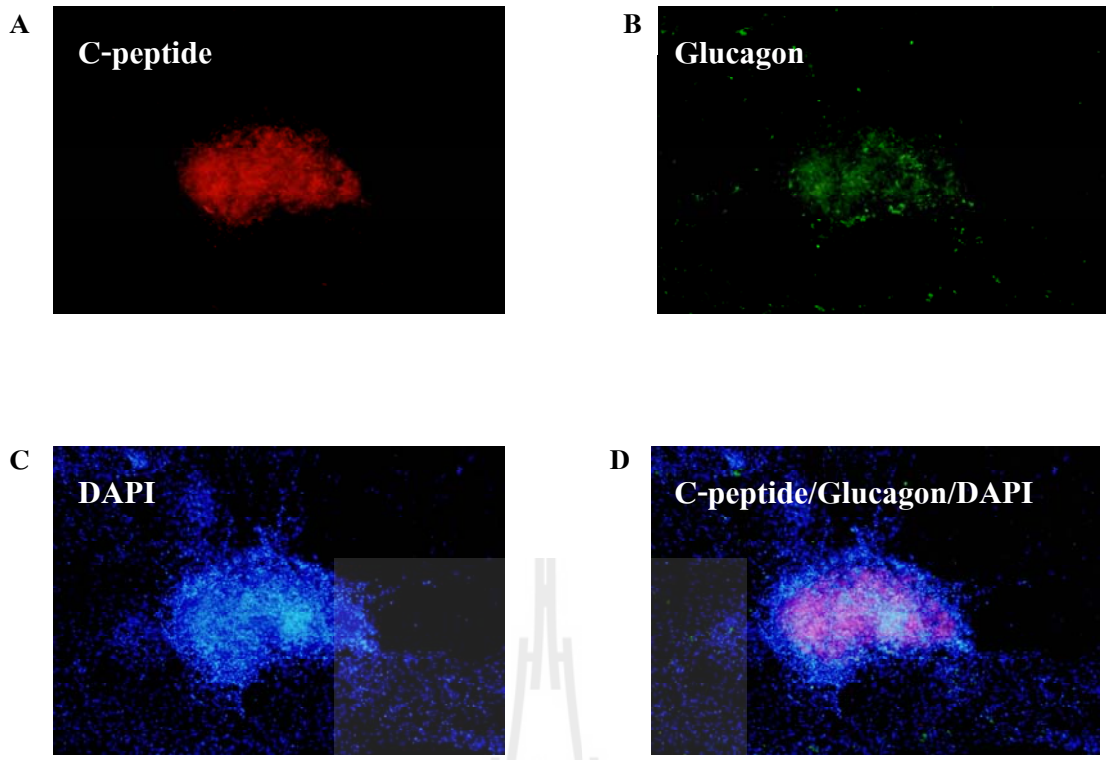
(B) ย้อมด้วยแอนติบอดี้ต่อ glucagon (สีเขียว)

(C) ย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI (สีน้ำเงิน)

(D) ภาพรวมของการย้อมเซลล์ด้วย somatostatin, glucagon และ DAP

ความยาวของสเกลบาร์ = 50 ไมโครเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 6 ภาพจากกล้องอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ของการย้อมโปรตีน C-peptide และ glucagon จากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่เปลี่ยนสภาพเป็นเวลา 46 วัน

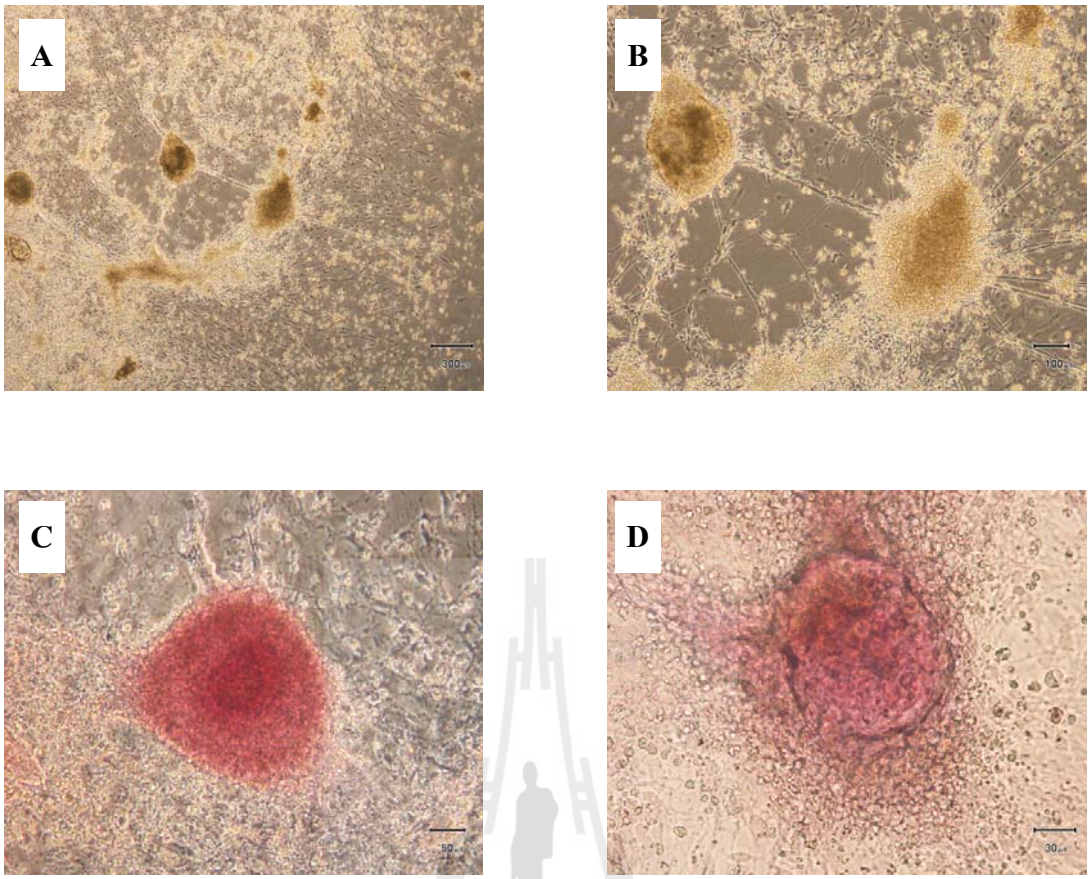
(A) ย้อมด้วยแอนติบอดี้ต่อ C-peptide (สีแดง)

(B) ย้อมด้วยแอนติบอดี้ต่อ glucagon (สีเขียว)

(C) ย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI (สีน้ำเงิน)

(D) ภาพรวมของการย้อมเซลล์ด้วย C-peptide, glucagon และ DAPI

ความยาวของสเกลบาร์ = 100 ไมโครเมตร



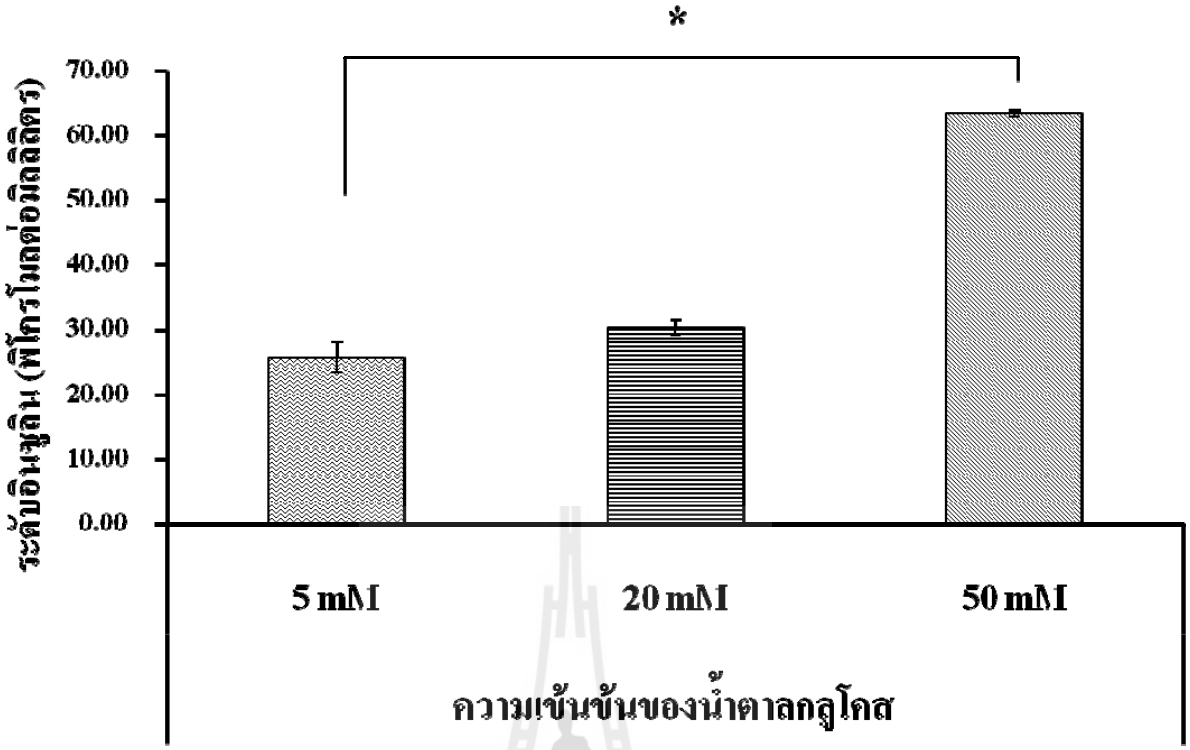
ภาพที่ 7 การย้อมเซลล์ด้วย Dithizone

(A และ B) ภาพเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์เปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน หลังจากเหนี่ยวนำเป็นเวลา 46 วัน

(C และ D) กลุ่มของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมด้วย Dithizone

ความยาวของสเกลบาร์ = 300 ไมโครเมตร (A), 100 ไมโครเมตร (B), 50 ไมโครเมตร (C) และ 30 ไมโครเมตร (D)

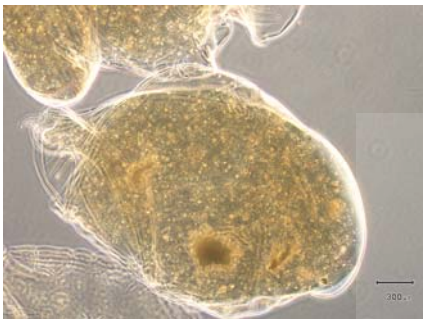
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

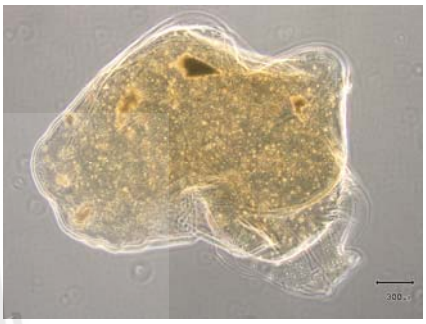


ภาพที่ 8 การหลั่งอินซูลินตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส
วัดการหลั่งของอินซูลินจากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลินหลังจากเหนี่ยวนำเป็นเวลา 46 วัน โดยทดสอบการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 5, 20 และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะมีการหลั่งอินซูลินเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากทดสอบกับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 50 มิลลิ-โมลาร์
*มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 5 มิลลิโมลาร์ ($P < 0.05$)

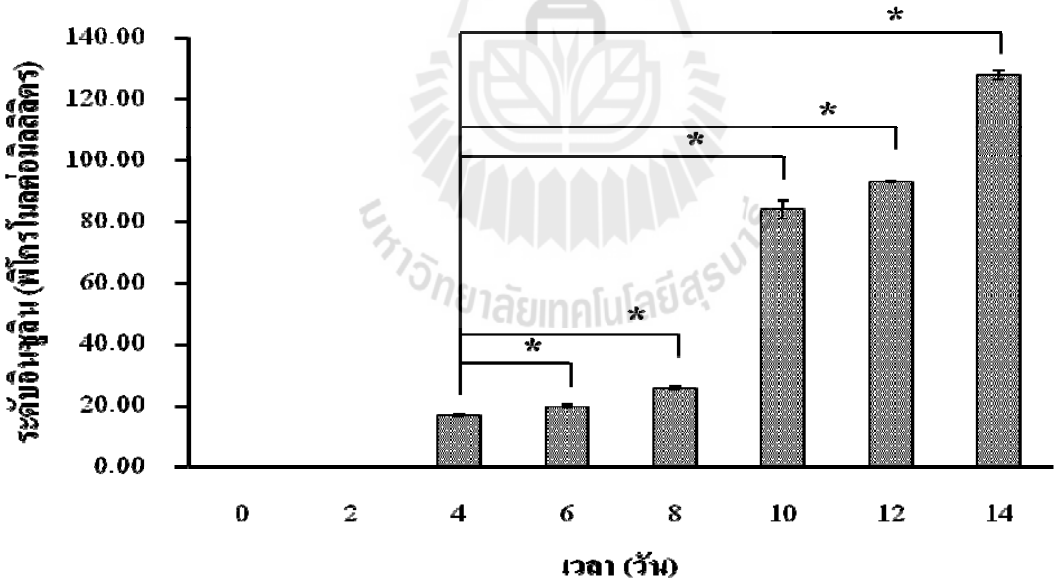
การสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน

หลังจากสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ที่ผลิตอินซูลินที่มีขนาดรูปร่างประมาณ 2,000 ไมโครเมตร (ภาพที่ 9A และ 9B) จะทำการทดสอบการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้มโดยวิธี ELISA ผลการทดสอบพบว่า จะมีการหลั่งอินซูลินเพิ่มขึ้นจากวันที่ 4 (16.90 ± 0.40 พิโครโมลต่อมิลลิลิตร) จนถึงวันที่ 14 (127.92 ± 1.58 พิโครโมลต่อมิลลิลิตร) ดังภาพที่ 9C

A 

B 

C



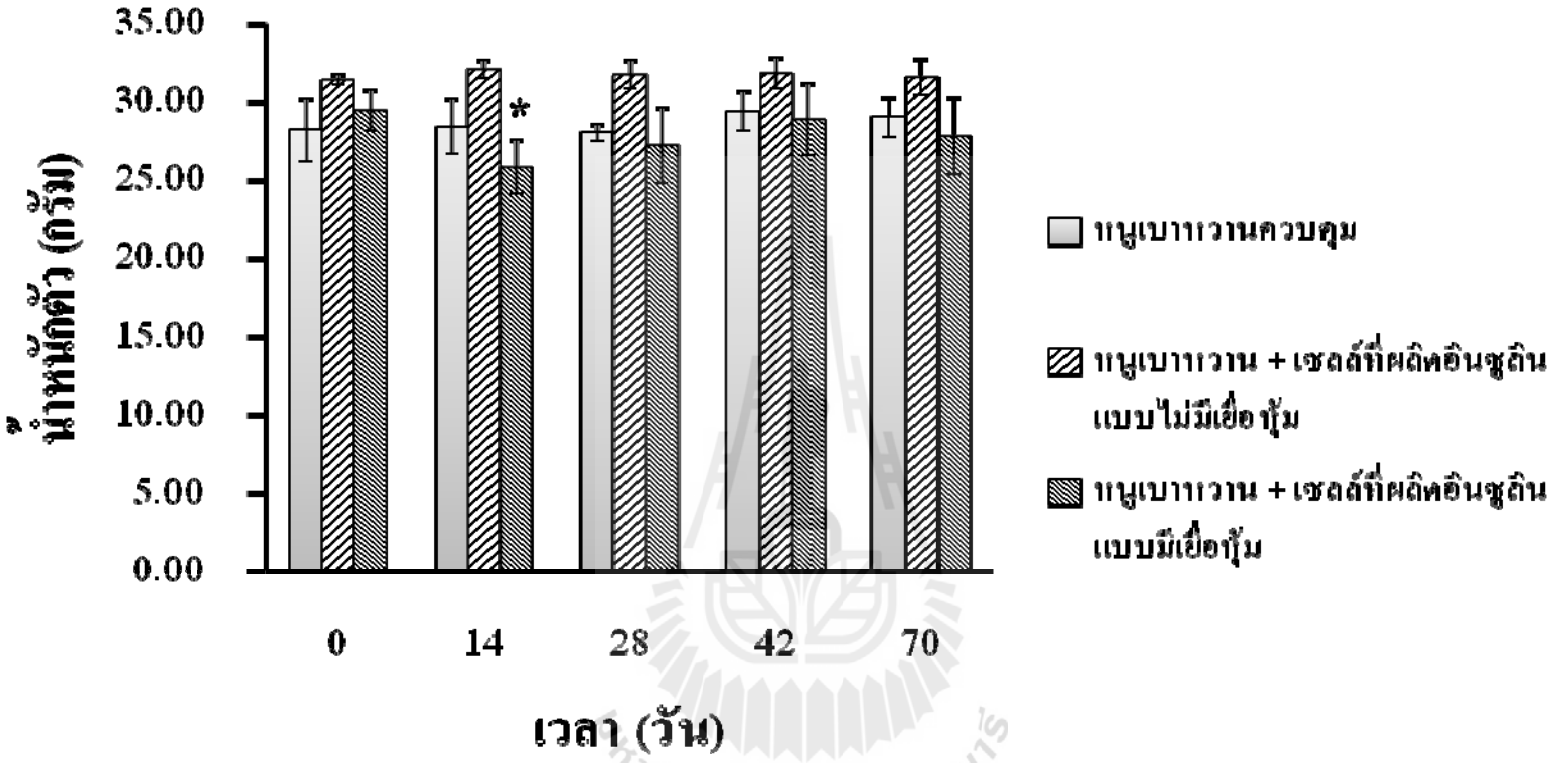
ภาพที่ 9 เซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้ม (A และ B) ลักษณะของเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้ม (C) ทดสอบการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้ม โดยวิธี ELISA จากตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ของขั้นตอนสุดท้ายในการเปลี่ยนสภาพเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ วันที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 ตามลำดับ

*มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 4 ($P < 0.05$)

การตรวจวัดน้ำหนักตัวและระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหารของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน

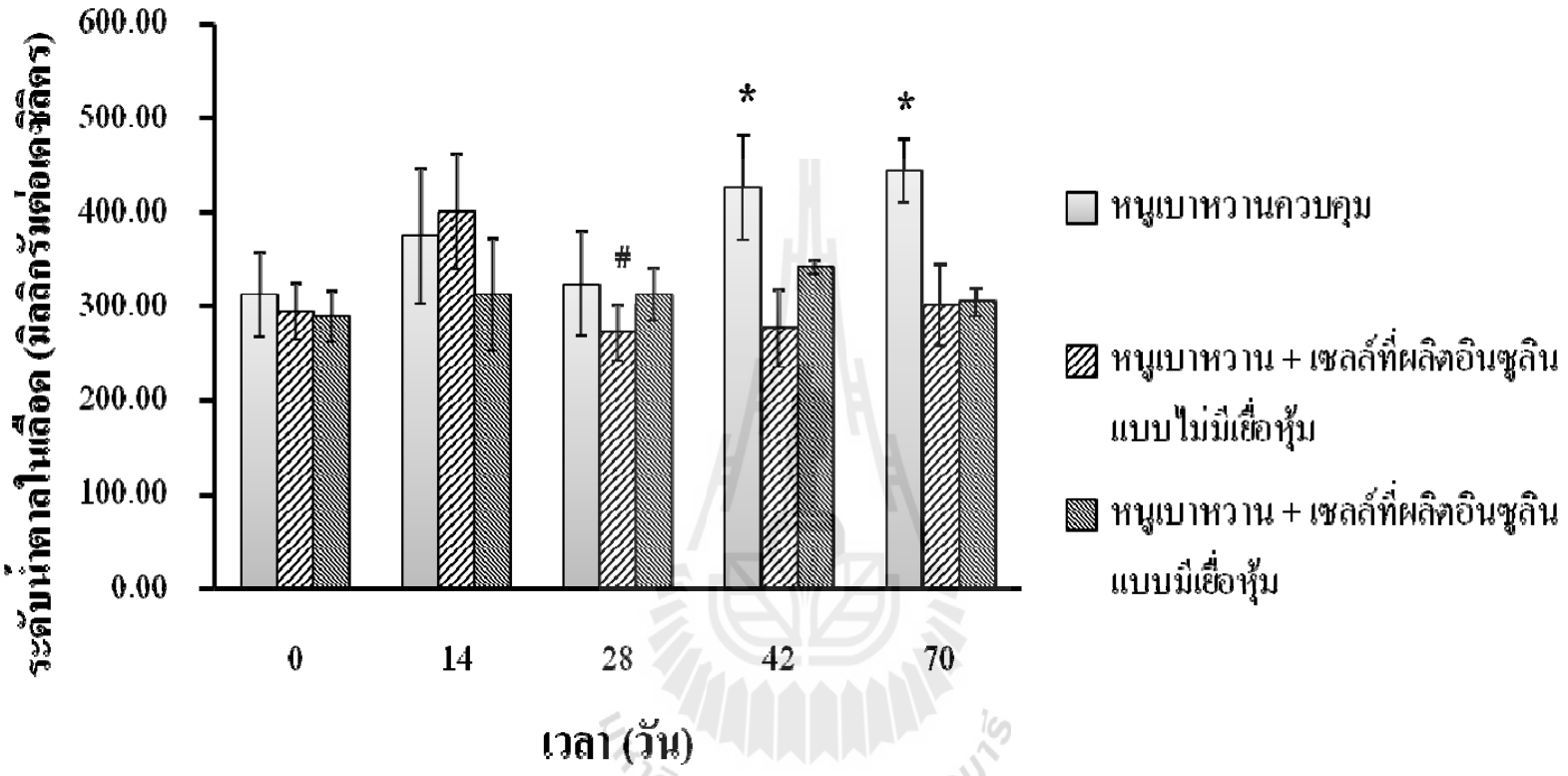
ผลการตรวจวัดน้ำหนักตัวและระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหารของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ แสดงดังภาพที่ 10 และ 11 ตามลำดับ โดยมีกลุ่มหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม ผลการทดสอบพบว่าน้ำหนักตัวของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้มเป็นเวลา 70 วัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นในกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้มเป็นเวลา 14 วัน (ภาพที่ 10) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานควบคุมจะมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แต่อย่างไรก็ตาม กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์แบบไม่มีเยื่อหุ้มจะมีการลดลงของระดับน้ำตาลในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 28 เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 14 หลังการปลูกถ่ายเซลล์ (ภาพที่ 11)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 10 น้ำหนักตัวของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม

*มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวเริ่มต้น ($P < 0.05$)



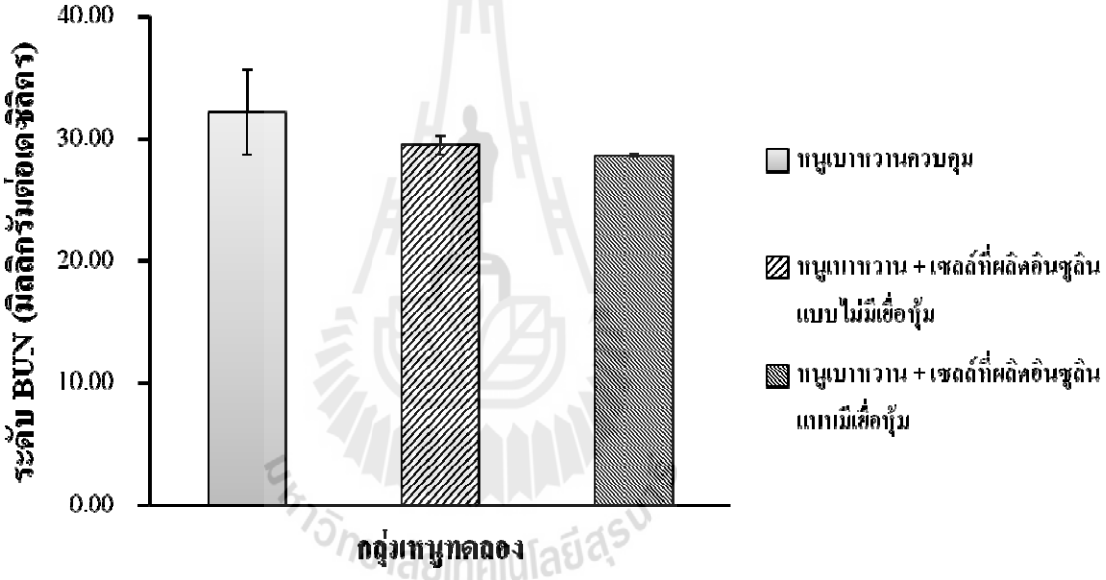
ภาพที่ 11 ระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหารของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม

*มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหารเริ่มต้น

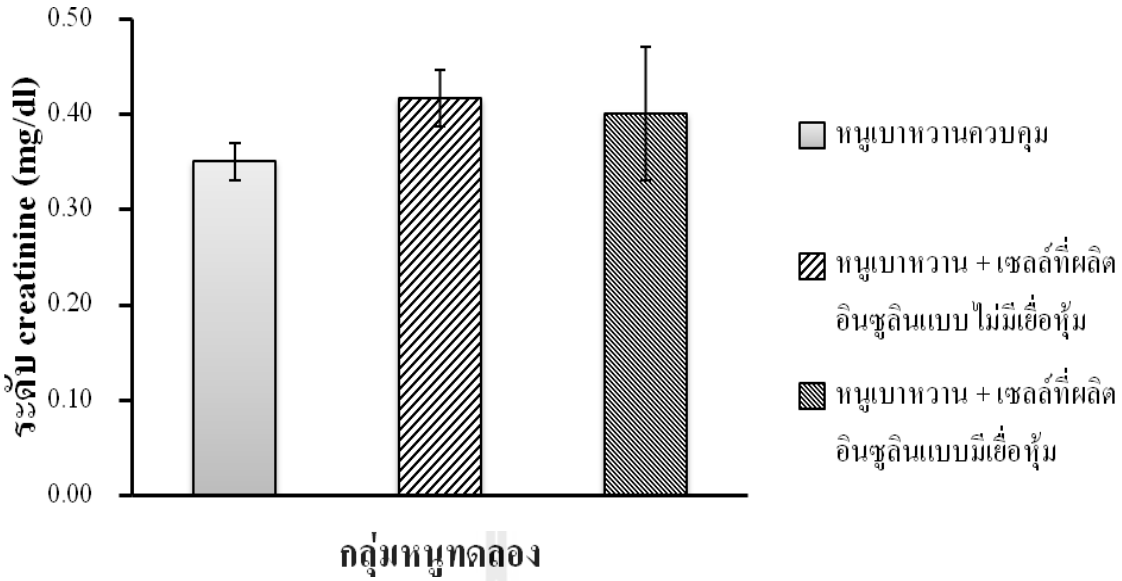
มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหารวันที่ 14

การตรวจวัดระดับ blood urea nitrogen (BUN) และ creatinine ในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน

ทำการตรวจระดับของ BUN และ creatinine ในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้มเป็นเวลา 70 วัน โดยมีกลุ่มควบคุมเป็นหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ ผลการทดสอบพบว่าหนูเบาหวานทั้ง 3 กลุ่มจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 12 และ 13 ตามลำดับ



ภาพที่ 12 ระดับ BUN ในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม



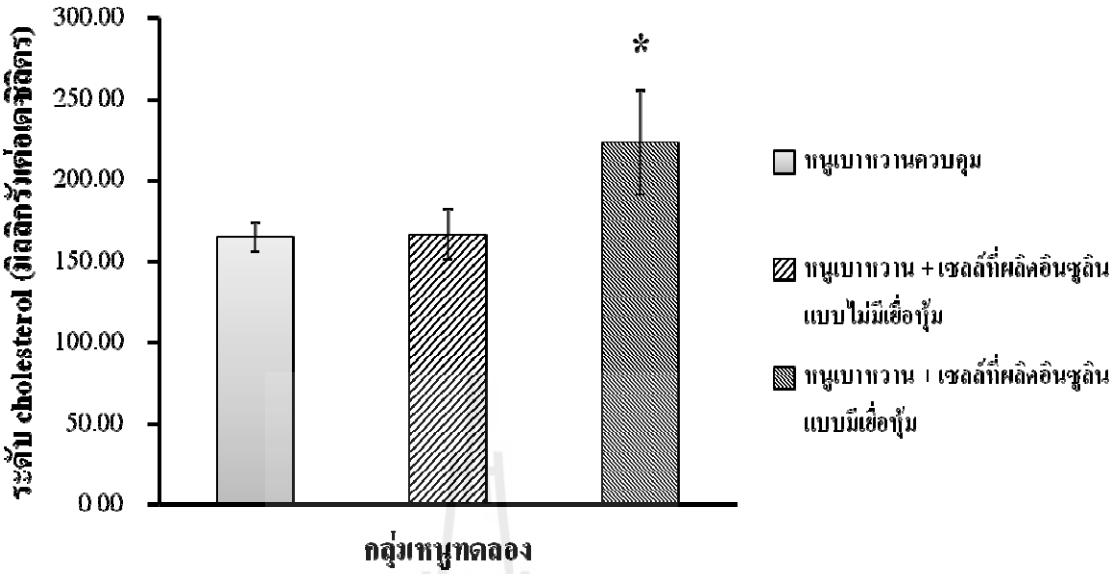
ภาพที่ 13 ระดับ creatinine `ในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม

การตรวจวัดค่าไขมันในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน

ระดับของ cholesterol, triglyceride, HDL, LDL, AI และ HDL/cholesterol ratio ของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม แสดงดังภาพที่ 14 ถึง 19 ตามลำดับ โดยมีกลุ่มหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินเป็นกลุ่มควบคุม ผลการทดสอบพบว่าระดับของ cholesterol, triglyceride, HDL และ LDL ของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีเยื่อหุ้มจะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่จะพบว่ากลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีเยื่อหุ้มจะมีค่า AI ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ มีค่า HDL/cholesterol ratio เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ขณะที่กลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้มจะมีระดับ cholesterol, triglyceride และ HDL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูควบคุม แต่อย่างไรก็ตาม ระดับ LDL, AI และ HDL/cholesterol ratio ของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิต

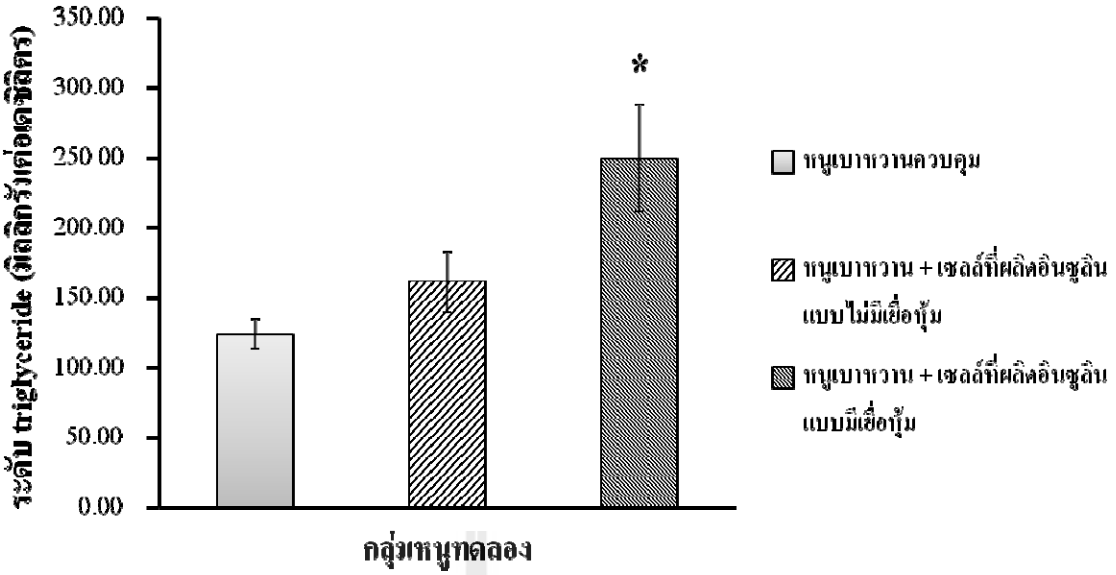
อินซูลินแบบมีเยื่อหุ้ม จะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูควบคุม แสดงดังภาพที่ 14, 17 ถึง 19 ตามลำดับ



ภาพที่ 14 ระดับ cholesterol ในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม

*มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม ($P < 0.05$)

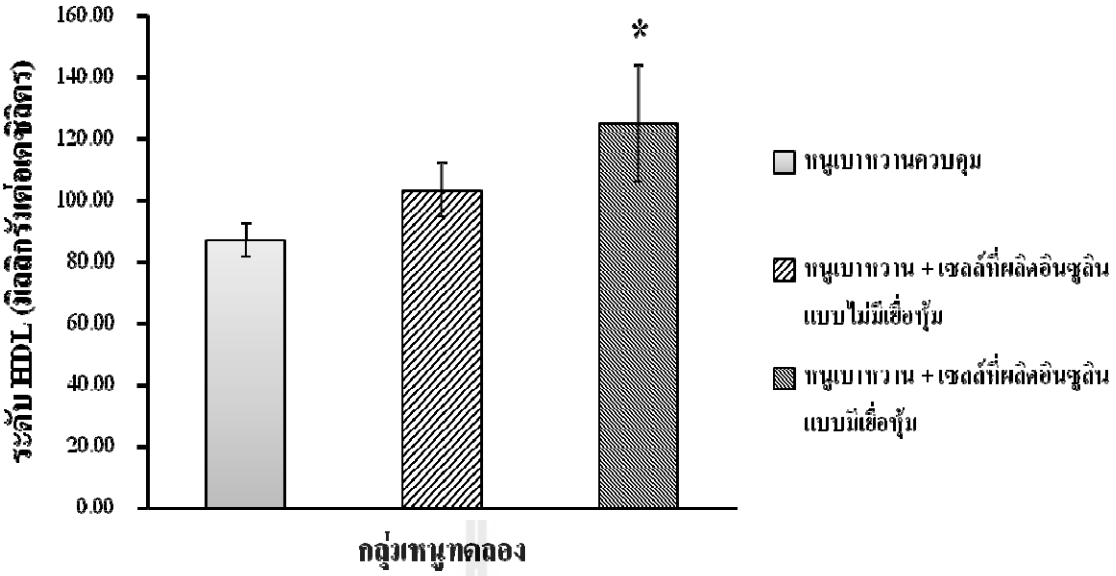
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 15 ระดับ triglyceride ในเลือดของกลุ่มหนูทดลองหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม

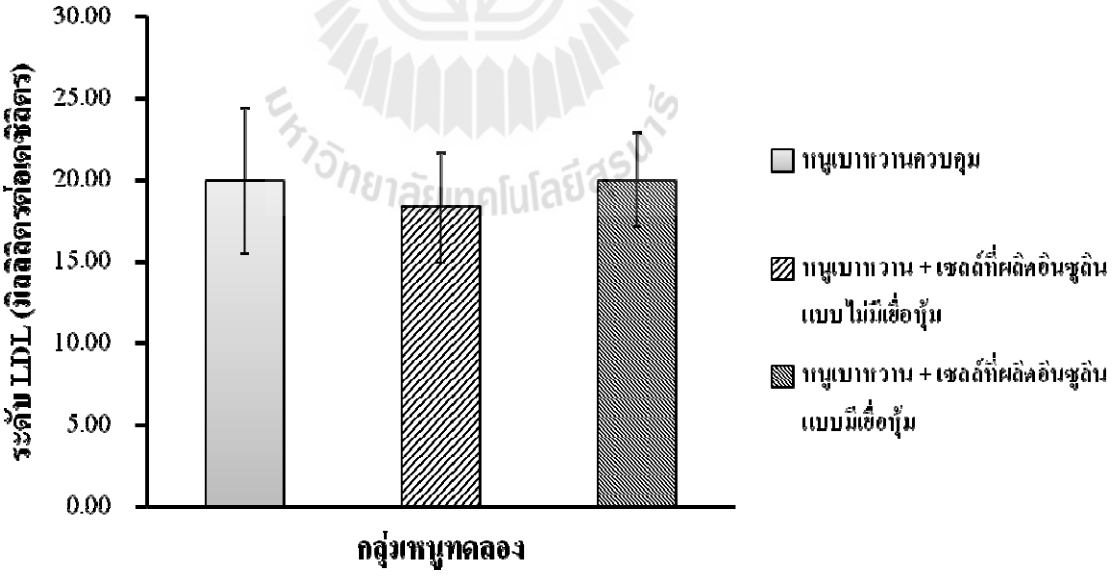
*มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม ($P < 0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

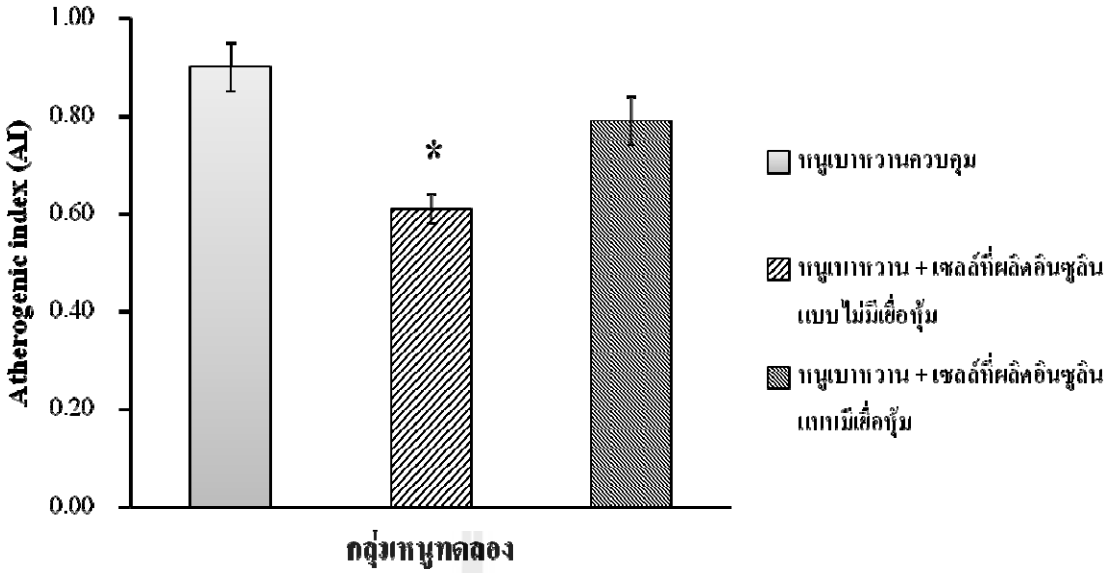


ภาพที่ 16 ระดับ HDL ในเลือดของกลุ่มหนูทดลองหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม

*มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม ($P < 0.05$)

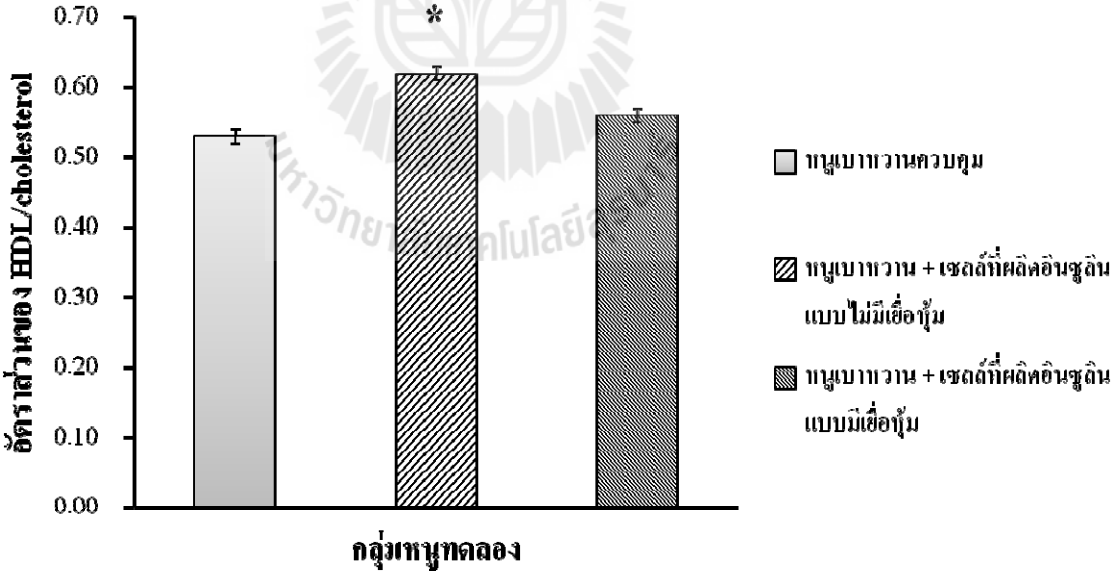


ภาพที่ 17 ระดับ LDL ในเลือดของกลุ่มหนูทดลองหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม



ภาพที่ 18 Atherogenic index (AI) ของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม

*มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม ($P < 0.05$)

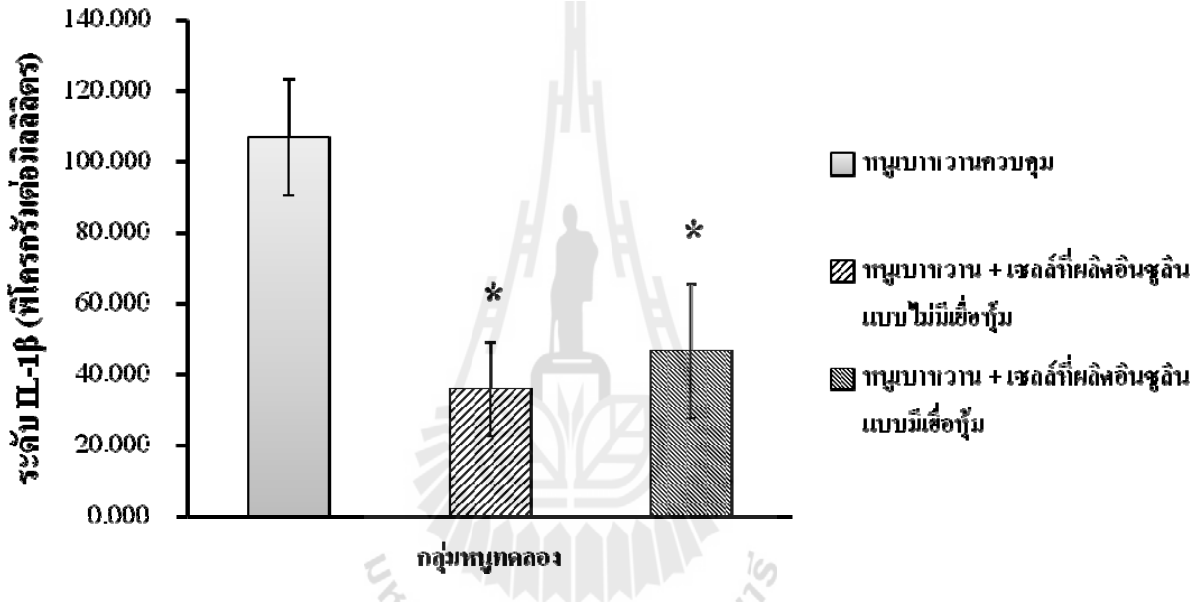


ภาพที่ 19 อัตราส่วนของ HDL/cholesterol ของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม

*มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม ($P < 0.05$)

การตรวจวัดระดับสารชักนำให้เกิดการอักเสบในหนูทดลอง

ทำการตรวจวัดระดับของสารชักนำให้เกิดการอักเสบชนิดอินเตอร์ลิวคินวันเบต้า ในกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม เมื่อสิ้นสุดการทดลองผลการทดสอบพบว่า ระดับของอินเตอร์ลิวคินวันเบต้าในกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ทั้ง 2 กลุ่ม จะมีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 ระดับ IL-1β ในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์แบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม

*มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม ($P < 0.05$)

บทที่ 4
ข้อวิจารณ์

ในการสร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินโดยวิธีเปลี่ยนสภาพเซลล์ของเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์นั้น จะมีขั้นตอนการเหนี่ยวนำเริ่มต้นจากระยะการสร้าง definitive endoderm (DE), pancreatic endoderm, pancreatic endocrine และระยะการเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์ตับอ่อน เพื่อให้เซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์เปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลินคล้ายคลึงกับขั้นตอนพัฒนาของเซลล์ตับอ่อน ในการสร้าง DE เป็น embryonic germ layer ที่จะพัฒนาต่อไปเป็นตับอ่อน (Docherty et al., 2007) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้สร้าง EBs โดยวิธี hanging drop ซึ่งเซลล์ในขั้นตอนนี้จะมีการแสดงออกของ *Hnf3β* ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่สำคัญต่อการพัฒนาของ endodermal cell lineage โดยในความเป็นจริงแล้ว *Hnf3β* จะเป็น transcriptional regulator ของ *Pdx1* ซึ่ง *Pdx1* นี้จะเป็นตัวสำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *insulin* และมีความจำเป็นต่อการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ไปเป็นเซลล์ตับอ่อน (Soria, 2001) มีรายงานว่าในการ depletion ของ *Pdx1* จะทำให้ไม่มีการเจริญของเซลล์ acinar และกลุ่มเซลล์ตับอ่อน (Hale et al., 2005) มีบางการศึกษารายงานว่า recombinant adenovirus ที่มี active mutant ของ *Pdx1* สามารถทำให้ hepatocytes ผลิตอินซูลินได้และทำให้โมเดลโรคเบาหวานมีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง โดยที่ hepatocytes ที่เปลี่ยนแปลงไปเซลล์ที่ผลิตอินซูลินเหล่านี้ยังคงมีการทำงานที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ตับด้วยการแสดงออกของ albumin และ transferrin (Imai et al., 2005) ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า การแสดงออกของ *Pdx1* จะเป็นตัวควบคุมการทำหน้าที่ของเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์ที่สร้างขึ้นจะมีการแสดงออกของยีน *Pdx1* ตั้งแต่ระยะ DE โดยมีการแสดงออกสูงสุดในระยะ pancreatic endocrine และลดการแสดงออกในระยะการเจริญของกลุ่มเซลล์ตับอ่อน

ในขั้นตอนการสร้าง EBs จากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีการแสดงออกของ *Nestin* ซึ่งเป็นเครื่องหมายของ pancreatic endocrine progenitor และเป็นเซลล์ตั้งต้นของเซลล์ประสาท การแสดงออกของ *Nestin* โดยเซลล์เหล่านี้จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพัฒนาของเซลล์ pancreatic endocrine (Hunziker and Stein, 2000) ข้อมูลเหล่านี้ได้รับการสนับสนุนจากการศึกษาที่พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากมนุษย์และหนูสามารถสร้างเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลินได้โดยการคัดเลือกจากเซลล์ที่มีการแสดงออกของ *Nestin* (Lumelsky et al., 2001; Mao et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่สร้างขึ้นในการศึกษาครั้งนี้มีการแสดงออกของ *Nkx6.1* ตั้งแต่ระยะการสร้าง definitive endoderm และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจนถึงระยะสุดท้ายของการสร้างเซลล์ พบว่า *Nkx6.1* จะมีความเกี่ยวข้องกับเบต้าเซลล์และ

เซลล์ประสาทบางชนิด (Docherty et al., 2007) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ประสาทและเซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิตอินซูลินมีเซลล์ตั้งต้นร่วมกันในระหว่างที่เหนี่ยวนำให้มีการสร้างเซลล์ในหลอดทดลอง (Soria, 2001)

ในระยะการสร้าง pancreatic endoderm จะมีการแสดงออกของยีน *Ngn3* เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก การแสดงออกของ *Ngn3* นั้นจะเป็นตัวกำหนดลักษณะเฉพาะของเซลล์ตั้งต้นของเซลล์ pancreatic endocrine ทั้ง 4 ชนิด (Gradwohl et al., 2000) มีการศึกษาพบว่า *Ngn3* และ *NeuroD1/BETA2* สามารถทำให้เกิดการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในกลุ่มเซลล์ตับอ่อน (Schwitzgebel et al., 2000) โดยมีการค้นพบว่า *Ngn3* จะเป็นตัวชักนำให้มีการแสดงออกของ *BETA2* (*NeuroD*) ซึ่งเป็น transcription factor สำหรับการแสดงออกของยีน *insulin* และการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในกลุ่มเซลล์ตับอ่อน (Soria, 2001) ซึ่งมีการตั้งสมมุติฐานว่า *Ngn3* นี้จะเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ *BETA2* ในระยะตั้งต้นของการเจริญเปลี่ยนแปลงของกลุ่มเซลล์ตับอ่อนผ่านทาง E boxes ใน *BETA2* promotor (Huang et al., 2000) ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *Ngn3* จะลดการแสดงออกในระหว่างการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระยะเซลล์ endocrine ไปเป็นเซลล์ของกลุ่มเซลล์ตับอ่อน ซึ่งจะมีการแสดงออกของ *Nkx6.1* เพิ่มขึ้น โดยมีรายงานว่าการแสดงออกของ *Nkx6.1* นี้จะถูกกระตุ้นในเซลล์ endoderm ที่ให้ผลบวกต่อ *Foxa2* (*Hnf3β*) ที่มีการแสดงออกของ *Pdx1* ภายในเซลล์ (Pedersen et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการแสดงออกของ *NeuroD1* และ *Pdx1* นี้มีความสำคัญในการคงคุณสมบัติของเซลล์ที่ผลิตอินซูลินที่สร้างมาจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของหนู (Saitoh et al., 2007) ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของ *Nkx6.1*, *NeuroD1* และ *Pdx1* จะเป็นตัวที่ทำให้เกิดการสร้างเบต้าเซลล์

ในการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตของเบต้าเซลล์นั้น เซลล์ที่สร้างขึ้นจะต้องมีการแสดงออกของ transcription factor ต่างๆเกิดขึ้นในหลอดทดลอง นอกจากนั้นมีความจำเป็นที่จะต้องเติมสารกระตุ้นต่างๆ เพื่อให้เซลล์ตั้งต้นสามารถเจริญเติบโต โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่าหลังจากเติม nicotinamide และ IGFII เป็นตัวกระตุ้นให้กับเซลล์ pancreatic endocrine จะมีการแสดงออกของ transcription factor ต่างๆเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตไปเป็นเซลล์ของกลุ่มเซลล์ตับอ่อน ซึ่งเซลล์ระยะสุดท้ายของการเปลี่ยนสภาพเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์ในครั้งนี้จะมีการแสดงออกของยีนประกอบด้วย *GLUT2*, *insulin*, *somatostatin* และ *glucagon* แต่เซลล์ในระยะนี้ยังคงพบว่ามีการแสดงออกของ *Nestin* และ *Hnf3β* ผลการย้อมเซลล์ที่ผลิตอินซูลินด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าเซลล์จะมีการแสดงออกของโปรตีน C-peptide ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์เหล่านี้สามารถสร้างอินซูลินได้ เซลล์เหล่านี้ยังมีการแสดงออกของโปรตีน somatostatin และ โปรตีน glucagon แต่พบว่าเซลล์ยังคงมีการแสดงออกของโปรตีน nestin ข้อมูลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ในในการศึกษาครั้งนี้สามารถสร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินขึ้นมาได้โดยยังคงมีเซลล์ตั้งต้นของการสร้าง

เซลล์ปะปนอยู่ จึงจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาปรับปรุงวิธีการเปลี่ยนสภาพเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ให้เป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลินต่อไปในอนาคต

เพื่อทดสอบว่าเซลล์ที่สร้างขึ้นมาในการศึกษาครั้งนี้สามารถทำหน้าที่ได้จริง จึงนำเซลล์ที่สร้างขึ้นหลังจากเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนสภาพเซลล์เป็นเวลา 46 วัน มาทำการทดสอบว่าเป็นเซลล์ชนิดเบต้าเซลล์จริงและสามารถหลั่งอินซูลินตอบสนองต่อระดับน้ำตาลกลูโคส ผลการทดสอบพบว่าเซลล์ที่สร้างขึ้นมาให้ผลบวกต่อการย้อม Dithizone ซึ่ง Dithizone นี้เป็น zinc-chelating agent ที่จะเลือกย้อมติดเฉพาะเบต้าเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ zinc อยู่มาก (Shiroi et al., 2005; Baharvand et al., 2006b) ข้อมูลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าการศึกษานี้สามารถสร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินขึ้นมาได้ และพบว่าเซลล์ในขั้นตอนนี้มีการหลั่งอินซูลินตอบสนองต่อระดับน้ำตาลกลูโคส โดยจะมีการหลั่งอินซูลินออกมาในระดับสูงหลังจากทดสอบกับน้ำตาลกลูโคสที่ระดับ 50 มิลลิโมลาร์เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบกับน้ำตาลกลูโคสที่ระดับ 5 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 4.8) นอกจากนี้เซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้มก็สามารถที่จะหลั่งอินซูลินออกมาได้ (ภาพที่ 4.9C) จึงแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้มที่สร้างขึ้นมาในการศึกษานี้สามารถทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลินได้

การสร้างเยื่อหุ้มให้กับเซลล์ที่ผลิตอินซูลินจะสามารถป้องกันไม่ให้เซลล์ที่ปลูกถ่ายเข้าไปในร่างกายของผู้รับเซลล์ถูกทำลายโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและแอนติบอดี้ โดยมีรายงานว่าเยื่อหุ้มชนิดแอลจิเนท (alginate) สามารถที่จะทำการปลูกถ่ายเซลล์ให้กับผู้รับได้โดยไม่ต้องฉีดยากดภูมิคุ้มกัน (de Vos et al., 2006) นอกจากนี้เยื่อหุ้มชนิดแอลจิเนทสามารถนำไปใช้ศึกษาการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของหนูเป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลิน (Wang et al., 2009) จากนั้นทำการทดสอบต่อไปว่าเซลล์ที่ผลิตอินซูลินที่สร้างขึ้นสามารถทำหน้าที่ได้จริงในร่างกาย โดยนำเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้มไปปลูกถ่ายให้กับหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีด Streptozotocin (STZ) ผลการทดสอบพบว่าหนูเบาหวานที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ทั้ง 2 ชนิด เป็นเวลา 70 วัน สามารถที่จะควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดหลังอดอาหารตลอดการทดลอง ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินจะมีการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดหลังอดอาหารตลอดการทดลอง ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าเซลล์ที่ผลิตอินซูลินที่สร้างขึ้นมานี้มีความสามารถที่จะลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของหนูเบาหวานเพื่อให้มีระดับคงที่และสามารถป้องกันความรุนแรงของโรคเบาหวานในหนูทดลองได้ ผลการรักษาที่ได้จากหนูทดลองในครั้งนี้อาจเป็นผลมาจากคุณภาพของเซลล์ที่ผลิตอินซูลินที่สร้างขึ้นมา ซึ่ง Migliavacca และคณะ ได้รายงานว่าลักษณะของกลุ่มเซลล์ตับอ่อนและระดับของอินซูลินในเซลล์จะเป็นสิ่งยืนยันการทำหน้าที่ของเซลล์ในร่างกายของสัตว์ทดลองหลังจากที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ (Migliavacca

et al., 2004) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์ที่สร้างขึ้นมานี้ยังมีเซลล์อื่นปะปนอยู่ในกลุ่มของเซลล์ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการสร้างเซลล์ต่อไป เพื่อให้ได้เซลล์ที่ผลิตอินซูลินมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นและไม่มีการปะปนของเซลล์ชนิดอื่นเพื่อให้ได้ผลการรักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์มีประสิทธิภาพมากขึ้น

จากการทดสอบหาระดับสารชักนำให้เกิดการอักเสบชนิดอินเตอร์ลิวคินวันเบต้า พบว่าหนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีและมีเยื่อหุ้ม จะมีระดับของอินเตอร์ลิวคินวันเบต้าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูควบคุม ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าเซลล์ที่ปลูกถ่ายให้กับหนูทดลองนั้นสามารถที่จะยับยั้งการสร้างอินเตอร์ลิวคินวันเบต้าและป้องกันไม่ให้โรคเบาหวานในหนูทดลองมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกของเซลล์เหล่านี้ในการลดการสร้างอินเตอร์ลิวคินวันเบต้า

การตรวจสอบทางเคมีคลินิกในหนูทดลองหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าหนูทดลองเหล่านี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับ BUN และ creatinine อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูควบคุม โดยการที่มีระดับของ BUN และ creatinie เพิ่มขึ้นนั้นจะเป็นเครื่องหมายที่แสดงว่าไตมีการทำหน้าที่ผิดปกติในภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง (Gatua et al., 2011) ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าเซลล์ที่สร้างขึ้นมานี้จะไม่มีผลต่อการทำหน้าที่ของไต การตรวจวัดระดับไขมันในเลือดเพื่อประเมินความผิดปกติของไขมันในเลือดของหนูทดลองประกอบด้วย cholesterol, triglyceride, HDL, LDL, AI และอัตราส่วนของ HDL/cholesterol ผลการทดสอบพบว่า หนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบมีเยื่อหุ้มจะมีระดับของ cholesterol, triglyceride และ HDL สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูควบคุม ขณะที่หนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ที่ผลิตอินซูลินแบบไม่มีเยื่อหุ้มจะมีระดับของ AI ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีอัตราส่วนของ HDL/cholesterol เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูควบคุม ซึ่งโรคเบาหวานนั้นจะมีความเกี่ยวข้องกับโรคในระบบหลอดเลือด (Wagner et al., 2002) การที่มีระดับของ HDL เพิ่มสูงขึ้นนั้นจะเป็นตัวช่วยลดระดับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดได้ (Assmann and Gotto, 2002) ดังนั้นผลที่ได้จึงชี้ให้เห็นว่าเซลล์ที่ผลิตอินซูลินที่สร้างขึ้นมาในการศึกษานี้อาจจะเป็นตัวช่วยลดระดับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดได้ อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษากลไกที่ทำให้เซลล์ที่ผลิตอินซูลินมีคุณสมบัติเหล่านี้ต่อไป

บทที่ 5
บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ประสบผลสำเร็จในการเปลี่ยนสภาพเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ให้เป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลินได้ โดยมีการสร้างเซลล์ตั้งแต่ระยะการสร้าง definitive endoderm (DE), pancreatic endoderm, pancreatic endocrine และระยะการเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์ตับอ่อน โดยเซลล์ที่สร้างขึ้นมานี้จะมีรูปแบบการแสดงออกของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ตับอ่อนคล้ายคลึงกับระยะการพัฒนาการของการสร้างตับอ่อนในร่างกายมนุษย์ และเซลล์เหล่านี้ยังคงมีลักษณะของเซลล์ตับอ่อนชนิดเบต้า ซึ่งประกอบด้วยการให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธีการย้อม Dithizone และมีการแสดงออกของโปรตีน C-peptide เกิดขึ้นภายในเซลล์ การทดสอบในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานพบว่า เซลล์ที่ผลิตอินซูลินสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและป้องกันไม่ให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัวในหนูทดลองได้

จึงสามารถสรุปได้ว่าการศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการสร้างเซลล์ที่ผลิตอินซูลินจากเซลล์ลายต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ โดยที่เซลล์จะแสดงลักษณะของเซลล์ที่สามารถผลิตอินซูลินได้ทั้งในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล โดยที่เซลล์เหล่านี้มีความสามารถในการรักษาโรคเบาหวานได้โดยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและป้องกันไม่ให้โรคเบาหวานมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ควรมีการต่อยอดในการพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ลายต้นกำเนิดมนุษย์ให้เป็นเซลล์ที่ผลิตอินซูลินได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อพัฒนาต่อสู่การรักษาโรคเบาหวานในมนุษย์ต่อไป

บรรณานุกรม

Aekplakorn, W., Stolk, R. P., Neal, B., Suriyawongpaisal, P., Chongsuvivatwong, V., Cheepudomwit, S. and Woodward, M. (2003). The prevalence and management of diabetes in Thai adults: the international collaborative study of cardiovascular disease in Asia. **Diabetes Care.** 26(10): 2758-2763.

Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K.L. and Tzukerman, M. (2001). Insulin production by human embryonic stem cells. **Diabetes.** 50(8): 1691-1697.

Assmann, G. and Gotto, A. M., Jr. (2004). HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. **Circulation.** 109(23 Suppl 1): III8-14.

Baharvand, H., Hashemi, S. M., Ashtiani, S. K. and Farrokhi, A. (2006a). Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems *in vitro*. **The International Journal of Developmental Biology.** 50(7): 645-652.

Baharvand, H., Jafary, H., Massumi, M. and Ashtiani, S. K. (2006b). Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells. **Development Growth & Differentiation.** 48(5):323-332.

de Vos, P., Faas, M. M., Strand, B. and Calafiore, R. (2006). Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. **Biomaterials.** 27(32): 5603-5617.

Docherty, K., Bernardo, A. S. and Vallier, L. (2007). Embryonic stem cell therapy for diabetes mellitus. **Seminars in Cell & Developmental Biology.** 18(6): 827-838.

Gatua, W. K., Makumi, J. N., Njagi, E. M., Kigondu, C. S., Mcligeyo, S. O. and Waithaka, S. K. (2011). Evaluation of urinary tubular enzymes as screening markers of renal dysfunction in patients suffering from diabetes mellitus. **Asian Journal of Medical Sciences.** 3(3): 84-90.

Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. and Guillemot, F. (2000). *Neurogenin3* is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 97(4): 1607-1611.

Hale, M. A., Kagami, H., Shi, L., Holland, A. M., Elsasser, H. P., Hammer, R. E. and MacDonald, R. J. (2005). The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas. **Developmental Biology.** 286(1): 225-237.

Huang, H. P., Liu, M., El-Hodiri, H. M., Chu, K., Jamrich, M. and Tsai, M. J. (2000). Regulation of the pancreatic islet-specific gene *BETA2* (*neuroD*) by neurogenin 3. **Molecular and Cellular Biology.** 20(9): 3292-3307.

Hunziker, E. and Stein, M. (2000). Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. **Biochemical and Biophysical Research Community.** 271(1): 116-119.

Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Sasano, H., Mizuguchi, H., Asano, T. and Oka, Y. (2005). Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver. **Biochemical and Biophysical Research Community.** 326(2): 402-409.

Khoo, M. L., McQuade, L. R., Smith, M. S., Lees, J. G., Sidhu, K. S. and Tuch, B. E. (2005). Growth and differentiation of embryoid bodies derived from human embryonic stem cells: effect of glucose and basic fibroblast growth factor. **Biology of Reproduction.** 73(6): 1147-1156.

Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R. and McKay, R. (2001). Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. **Science.** 292(5520): 1389-1394.

Mallon, B. S., Park, K. Y., Chen, K. G., Hamilton, R. S. and McKay, R. D. (2006). Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. **The International Journal of Biochemical & Cell Biology.** 38(7): 1063-1075.

Mao, G. H., Chen, G. A., Bai, H. Y., Song, T. R. and Wang, Y. X. (2009). The reversal of hyperglycaemia in diabetic mice using PLGA scaffolds seeded with islet-like cells derived from human embryonic stem cells. **Biomaterials.** 30(9): 1706-1714.

Migliavacca, B., Nano, R., Antonioli, B., Marzorati, S., Davalli, A. M., Di Carlo, V. and Bertuzzi, F. (2004). Identification of *in vitro* parameters predictive of graft function: a study in an animal model of islet transplantation. **Transplantation Proceedings.** 36(3): 612-613.

Pedersen, J. K., Nelson, S. B., Jorgensen, M. C., Henseleit, K. D., Fujitani, Y., Wright, C. V., Sander, M. and Serup, P. (2005). Endodermal expression of Nkx6 genes depends differentially on Pdx1. **Developmental Biology.** 288(2): 487-501.

Rajagopal, J., Anderson, W. J., Kume, S., Martinez, O. I. and Melton, D. A. (2003). Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. **Science.** 299(5605): 363.

Saitoh, K., Yamato, E., Miyazaki, S. and Miyazaki, J. (2007). Both Pdx-1 and NeuroD1 genes are requisite for the maintenance of insulin gene expression in ES-derived differentiated cells. **Diabetes Research and Clinical Practice.** 77 Suppl 1: S138-142.

Schwitzgebel, V. M., Scheel, D. W., Conners, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D. J., Sussel, L., Johnson, J. D. and German, M. S. (2000). Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. **Development.** 127(16): 3533-3542.

Seeberger, K. L., Dufour, J. M., Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Rajotte, R. V. and Korbutt, G. S. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. **Laboratory Investigation.** 86(2): 141-153.

Segev, H., Fishman, B., Ziskind, A., Shulman, M. and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. **Stem Cells**. 22(3): 265-274.

Segev, H., Fishman, B., Ziskind, A., Shulman, M. and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. **Stem Cells**. 22(3): 265-274.

Shim, J. H., Kim, S. E., Woo, D. H., Kim, S. K., Oh, C. H., McKay, R. and Kim, J. H. (2007). Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. **Diabetologia.** 50(6): 1228-1238.

Shiroi, A., Ueda, S., Ouji, Y., Saito, K., Moriya, K., Sugie, Y., Fukui, H., Ishizaka, S. and Yoshikawa, M. (2005). Differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells promoted by Nkx2.2 gene transfer. **World Journal of Gastroenterology.** 11(27): 4161-4166.

Soria, B. (2001). In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. **Differentiation.** 68(4-5): 205-219.

Wagner, A. M., Martijnez-Rubio, A., Ordonez-Llanos, J. and Perez-Perez, A (2002). Diabetes mellitus and cardiovascular disease. **European Journal of Internal Medicine.** 13(1): 15-30.

Wang, N., Adams, G., Buttery, L., Falcone, F. H. and Stolnik, S. (2009). Alginate encapsulation technology supports embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells. **Journal of Biotechnology.** 144(4): 304-312.

Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A. and Ding, S. (2006). Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 103(18): 6907-6912.

Zimmet, P., Shaw, J. and Alberti, K. G. (2003). Preventing type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view. **Diabetic Medicine.** 20(9): 693-702.

ประวัติผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร. วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ เกิดเมื่อวันที่ 31 มีนาคม 2513 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. เทคนิคการแพทย์ (พ.ศ. 2535) และ ปริญญาโท วท.ม. ชีวเคมีทางการแพทย์ (พ.ศ. 2539) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับ ปริญญาเอก สาขา Microbiology and Immunology โดยเน้นทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาทางการแพทย์และ เซลล์ต้นกำเนิด ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา จนจบการศึกษาในปี พ.ศ. 2544 ก่อนที่จะศึกษาต่อทางด้าน stem cell transplantation and stem cell regulation ในระดับ Post-Doctoral Fellow ณ National Institute of Health ประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2545-2546) ปัจจุบัน ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ทำงานในตำแน่งอาจารย์ประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา ประเทศไทย อาจารย์วิไลรัตน์ ได้รับรางวัลทางด้านวิชาการหลายรางวัล อาทิเช่น รางวัล Excellent Research Award (Stem cell), USA, Key Stone Symposium (พ.ศ. 2550), American Society of Hematology Traveling Award, USA (พ.ศ. 2546), Traveling Award, International Society for Stem Cell Research, Australia (พ.ศ.2547) / USA (พ.ศ. 2551), รางวัลส่งเสริมบัณฑิตบัณฑิต มูลนิธิอานันทมหิดล พ.ศ. 2551-2554 และ รางวัลศิษย์เก่าดีเด่นด้านวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่นในปี พ.ศ. 2554 ปัจจุบันอาจารย์วิไลรัตน์ มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ 30 ผลงาน สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนน มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 e-mail : wilairat@g.sut.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

อาจารย์ นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม เกิดเมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2509 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. แพทยศาสตร์ (พ.ศ. 2533) จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ Diploma Thai Board สาขา Anatomical Pathology จาก ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับ ปริญญาเอก สาขา Pathology ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา จนจบการศึกษาในปี พ.ศ. 2543 ก่อนที่จะศึกษาต่อทางด้าน Molecular Pathology ในระดับ Post-Doctoral Fellow ณ Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University ประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2544) ปัจจุบัน อาจารย์ นายแพทย์. ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม ทำงานในตำแหน่งหัวหน้าสาขาวิชาพยาธิวิทยา และเป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชา พยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา ประเทศไทยอาจารย์ นพ. ดร. ชวบูลย์ ได้รับรางวัลทางด้านวิชาการหลายรางวัล อาทิเช่น รางวัล King Scholarship award, Stem Cell Travelling award, International Society for Stem Cell Research (พ.ศ. 2551) และ รางวัลส่งเสริมบัณฑิตบัณฑิต มูลนิธิอานันทมหิดล ปัจจุบันอาจารย์ นพ. ดร. ชวบูลย์ มีผลงานตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ 15 ผลงาน และผลงานจดสิทธิบัตร 1 เรื่อง “A nucleic acid marker of cancer” Serial No.09/434,620, filed Nov.5, 1999 Joy L Ware, ChavaboonDechsukhum, Carleton T Garrett (Detection of novel WT1 transcript in human malignancy, including prostate, breast cancer and acute leukemia) สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาพยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนน มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

e-mail : chavaboon@sut.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

นางสาว ปิยะภรณ์ รัตนนิลสรวง สำเร็จวุฒิการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. สาขาเทคนิคการแพทย์ จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2541 และสำเร็จวุฒิการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยา จาก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลในปี พ.ศ. 2547 นางสาว ปิยะภรณ์ มีประสบการณ์ทำงานในตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร จ. ปราจีนบุรี และ นักเทคนิคการแพทย์ งานภูมิคุ้มกันและไวรัสวิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันบำราศนราดูร จ. นนทบุรี สถานที่ติดต่อปัจจุบัน 23/6 ถ. อินจันทร์ณรงค์ ต. ในเมือง อ. เมือง จ. บุรีรัมย์ 31000 e-mail: fonnaka1@hotmail.com

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี