



## รายงานการวิจัย

การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ให้เป็น  
เซลล์ตั้งต้นประสาทโดยใช้ 8 bromocyclicGMP  
(Conversion of mesenchymal stem cells derived human  
adipose tissue into neural stem cells using 8  
bromocyclicGMP)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ให้เป็น  
เซลล์ตั้งต้นประสาทโดยใช้ 8 bromocyclicGMP  
(Conversion of mesenchymal stem cells derived human  
adipose tissue into neural stem cells using 8  
bromocyclicGMP)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2557

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2561

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2557-2559 ผู้วิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัย ดำเนินการไปได้เป็นอย่างดีและสำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการวิจัย

กันยายน 2561



## บทคัดย่อ

การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเป็นหนึ่งในวิธีการที่น่าจะมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของระบบประสาท แต่เนื่องจากข้อจำกัดของการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์และเซลล์ตั้งต้นระบบประสาทมาใช้ในการรักษา เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ โดยเฉพาะจากเนื้อเยื่อไขมันจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพ การเก็บเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันเป็นวิธีการที่ง่าย มีเป็นจำนวนมากในร่างกาย และยังสามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้เป็นระยะเวลาหลายเดือนอีกด้วย นอกจากนี้แล้วเซลล์เหล่านี้ยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในระบบประสาทได้เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะการเหนี่ยวนำที่เหมาะสม ดังนั้นการหาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำเซลล์เหล่านี้ให้กลายเป็นเซลล์ระบบประสาทจึงเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยทางการแพทย์และอาจนำไปสู่การนำไปใช้ในทางคลินิกในอนาคต

วัตถุประสงค์การศึกษานี้คือ เพื่อหาผลของ 8 BromocyclicGMP (8Br-cGMP) ต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ไปเป็นเซลล์ระบบประสาท ผลการทดลองพบว่าหลังจากทำการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ เซลล์เหล่านั้นถูกนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน และนำไปตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ ด้วยวิธีการย้อมโปรตีนที่จับบนผิวเซลล์และการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่คัดแยกได้ มีการแสดงออกของโปรตีน CD73, CD90, และ CD105 แต่ไม่แสดงออกโปรตีน CD34 และ CD45 นอกจากนี้เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่คัดแยกมาในการวิจัยครั้งนี้มีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบฟิโนไทป์และการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่เหนี่ยวนำด้วย 8Br-cGMP ที่ความเข้มข้น 0 uM, 10 uM และ 100 uM เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท ผลการศึกษาพบว่า หนึ่งในสัปดาห์หลังทำการเหนี่ยวนำ ประชากรเซลล์ส่วนใหญ่ที่เติม 8Br-cGMP ความเข้มข้น 10 uM มีรูปร่าง เรียว ยาว มีขนาดเล็ก และพบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ประสาทที่มี bipolar และ multipolar ซึ่งมีแขนคล้ายแอกซอนยื่นออกมาจากตัวเซลล์อีกด้วย จำนวนสัดส่วนเซลล์ที่แสดงออกต่อ Nestin, Sox2, TUJ1 และ NF-L หลังการเหนี่ยวนำด้วย 10 uM 8Br-cGMP สูงกว่าความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์หลังการเหนี่ยวนำด้วย 10 uM 8Br-cGMP มีระดับของยีนที่จำเพาะต่อเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์นิวรอน (*MASH1*, *GAP43*, *TUJ1*, *NF-L*, และ *MAP2*) สูงกว่ากลุ่มความเข้มข้นอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์จากการเหนี่ยวนำด้วย 10 uM 8Br-cGMP ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอน

และเซลล์ค้ำจุนเต็มวัย พบว่าเซลล์เหล่านั้นสามารถกลายเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุนเต็มวัยได้ ซึ่งยืนยันด้วยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย RT-qPCR และการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Immunocytochemistry จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 10  $\mu$ M 8Br-cGMP สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตั้งต้นเซลล์ประสาทนิวรอน และยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุนเต็มวัยภายใต้ภาวะที่เหมาะสมได้อีกด้วย



## Abstract

Stem cell transplantation is a promising tool in neurodegenerative diseases treatment. Many features of human adipose stem cells (hASCs) among other types of stem cells demonstrate a glimpse of possibilities in clinical applications. Thus, researchers have been developing neural transdifferentiation of hASCs methods over the last decades. Various types of inducing agent, small molecule, chemical genetics that cause cell reprogramming in a nuclei, and specific signaling pathway inhibitors were applied to generate an efficient protocol. NO-cGMP signaling pathway is well known to play a vital role in regulation of cell growth, survival, differentiation, proliferation, migration, axon guidance and many other processes through a variety of downstream signaling cascades depending on cell type specific regulation. cGMP, as the mediator, help support NO regulate cell survival, differentiation and neuroprotective regulation. Previous research demonstrated that applying NO donor agents in neural differentiation medium could convert hESCs into neural-like cells. However, neural differentiation through this specific signaling pathway on hASCs has not been yet investigated. In this study, 8-Bromo-cyclic GMP (8Br-cGMP) was added to neural induction cocktails to improve the neural transdifferentiation efficiency of hASCs. Results demonstrated that hASCs under this condition exhibited higher expression of neural genes and could further differentiate into mature neuronal and glial cells. Our findings highlight that differentiated hASCs displayed neuronal progenitor profile, yet remained their plasticity as they can differentiate toward glial cells. Future studies employing *in vivo* transplantation models and their underlying mechanisms are warranted.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ.	ข
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	2
1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 สถานที่ทำการทดลองเก็บข้อมูล	5
3.2 การทดลองที่ 1 การคัดแยกและการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์	5
3.3 การทดลองที่ 2 การตรวจสอบความสามารถการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก กระดูกอ่อน และไขมัน	5
3.4 การทดลองที่ 3 การตรวจสอบโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมัน	6
3.5 การทดลองที่ 4 การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นระบบประสาท	7
3.6 การทดลองที่ 5 การเหนี่ยวนำเซลล์ตั้งต้นระบบประสาทไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุน	8
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	9

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 ผลการทดลอง	10
4.1.1 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ จากเนื้อเยื่อไขมัน	10
4.1.2 การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นระบบประสาท	11
4.1.3 การเหนี่ยวนำเซลล์ตั้งต้นระบบประสาทไปเป็นเซลล์ประสาท นิวรอนและเซลล์ค้ำจุน	13
4.2 วิจัยผลการทดลอง	15
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุป	17
5.2 ข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	18
ประวัตินักวิจัย	22





## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 คุณสมบัติของโปรแกรมที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน	7



## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ และการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์	10
ภาพที่ 2 การตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน	11
ภาพที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ หลังการเหนี่ยวนำด้วย 0, 10 และ 100 $\mu\text{M}$ 8Br-cGMP	11
ภาพที่ 4 การแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ตั้งต้นระบบประสาท	12
ภาพที่ 5 การแสดงออกของยีนหลังการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ด้วย 0, 10 และ 100 $\mu\text{M}$ 8Br-cGMP	13
ภาพที่ 6 การแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาทนิวรอน และเซลล์ค้ำจุน	14
ภาพที่ 7 การแสดงออกของยีนที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุน	15

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคการเสื่อมของระบบประสาทนั้นเกิดมาจากการเสื่อมสภาพและการทำงานบกพร่องของเซลล์ประสาทภายในสมอง ตัวอย่างของโรคการเสื่อมของระบบประสาทที่พบบ่อยนั้น ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ และ โรคพาร์คินสัน การระบาดของโรคเหล่านี้ซึ่งพบเห็นได้อย่างแพร่หลายทั่วโลกตามการรายงานการพบเห็นในแต่ละปีนั้น ทำให้วงการแพทย์มีการตื่นตัวที่จะคิดหาวิธีการฟื้นฟูการเสื่อมสภาพของเซลล์ และการซ่อมแซมการทำงานของเซลล์ให้กลับมาใช้ได้เหมือนเดิมได้ (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2004) เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells) จึงได้รับความสนใจในการศึกษาจากนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดมีคุณสมบัติพิเศษคือ สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองได้อย่างไม่จำกัด (self-renewal) และสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ได้ (differentiation) ทำให้เซลล์ชนิดนี้กลายเป็นความหวังทางการแพทย์สำหรับการรักษาโรคที่เกิดจากสภาวะเสื่อมของร่างกายในระบบต่างๆ ซึ่งปัจจุบันยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดหรือยังไม่มีผลการรักษาที่ดีเท่าที่ควร

โครงการวิจัยนี้จะมุ่งศึกษาศักยภาพของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ เพราะเป็นแหล่งเนื้อเยื่อที่หาได้ทุกเพศทุกวัย และเก็บได้ง่ายกว่าไขกระดูก มีงานวิจัยหลายงานที่รายงานถึงคุณลักษณะของยีนในเซลล์นี้ที่เหมาะสมในการนำไปใช้เหนี่ยวนำเป็นเซลล์ตั้งต้นประสาทโดยใช้ growth factor, small molecule หรือยาที่เข้าไปเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม แต่พบว่า ระยะเวลาที่ได้เซลล์เป้าหมายนานถึง 3 สัปดาห์และใช้สารเคมีหลายชนิดซึ่งมีราคาแพงในการเหนี่ยวนำเซลล์แต่ละครั้ง 8 bromocyclic GMP (8Br-cGMP) จึงเป็นสารอีกตัวหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจใช้ในการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ตั้งต้นประสาทได้ผ่าน NO-cGMP pathway เพราะ 8Br-cGMP เป็นตัวให้ nitric oxide (nitric oxide donor) ซึ่งเป็น secondary messenger ที่สำคัญภายในสมอง และจำเป็นต่อการสร้างซินแนปส์ รวมไปถึงการเจริญเติบโตของแอกซอนในเซลล์ประสาท อีกทั้งราคาของ 8Br-cGMP เมื่อเทียบสารชนิดอื่นที่นำมาใช้ในการเหนี่ยวนำนั้นมีราคาถูกกว่าถึงประมาณ 3 เท่า แม้ว่ากลไกของ 8Br-cGMP ยังไม่สามารถระบุได้ แต่การใช้ 8Br-cGMP ในการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นประสาทนั้นน่าจะมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการอื่นๆ

### 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อทำการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์
- 1.2.2 เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมและผลของ 8Br-cGMP ในการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ไปเป็นเซลล์ประสาท
- 1.2.3 เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ตั้งต้นประสาทในเซลล์ที่ได้หลังทำการเหนี่ยวนำ
- 1.2.4 เพื่อทดสอบความสามารถของเซลล์ตั้งต้นประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำในการกลายเป็นเซลล์

## ประสาท (Neurons) และเซลล์ค้ำจุน (Glia cells)

### 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1.3.1 ทำการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ในห้องทดลองเท่านั้น
- 1.3.2 ทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมและผลของ 8Br-cGMP ต่อการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นประสาท
- 1.3.3 ทำการทดสอบการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ตั้งต้นประสาทในเซลล์ที่ได้หลังทำการเหนี่ยวนำ
- 1.3.4 ทำการทดสอบความสามารถของเซลล์ตั้งต้นประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำในการกลายเป็นเซลล์ประสาท (Neurons) และเซลล์ค้ำจุน (Glia cells)

### 1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย(ถ้ามี)

8Br-cGMP สามารถเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นประสาทได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเซลล์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำมีลักษณะรูปร่างเหมือนเซลล์ตั้งต้นประสาท มีการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ตั้งต้นประสาท และสามารถกลายเป็นเซลล์ประสาท และเซลล์ค้ำจุนได้เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการอีกด้วย

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตรฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 1.5.1 สามารถสร้างเซลล์ประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่คัดแยกจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์
- 1.5.2 สามารถหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 8Br-cGMP ในการผลิตเซลล์ตั้งต้นประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์
- 1.5.3 เซลล์ที่ได้หลังจากการเหนี่ยวนำมีการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ตั้งต้นประสาท
- 1.5.4 เซลล์ที่ได้หลังจากการเหนี่ยวนำสามารถกลายเป็นเซลล์ประสาทเต็มวัย และเซลล์ค้ำจุนได้ในสภาวะที่เหมาะสม
- 1.5.5 เป็นการพัฒนาศักยภาพของชาติโดยคาดว่าจะสามารถผลิตบัณฑิตปริญญาโทได้ 1 คน

### 1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

นำเสนอผลงานวิจัยและจัดการประชุมเพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัย โดยจัดที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อีกทั้งร่วมกับคณะแพทยศาสตร์และโรงพยาบาลที่สนใจเพื่อนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้ในการผลิตเซลล์ประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่คัดแยกจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทดสอบยา และนวัตกรรมการรักษาต่างๆ ในอนาคต

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เซลล์ต้นกำเนิดนั้นเป็นเซลล์ตั้งต้นที่มีความสามารถในการแบ่งตัวเองได้ไม่จำกัด โดยเซลล์ลูกที่เกิดจากเซลล์แม่นั้นมีคุณสมบัติและรูปร่างเหมือนเซลล์แม่ทุกประการ นอกจากนี้ ยังมีคุณสมบัติในการกลายไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆได้อีกด้วย ในทศวรรษที่ผ่านมา มีการศึกษาการใช้เซลล์ต้นกำเนิดในการรักษาโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาทอย่างแพร่หลาย (McKay และคณะ, 1997; Gage และคณะ, 2000; Isacson และคณะ, 2003; Dietrich และ Kampermann, 2006) เซลล์ต้นกำเนิดที่มีคุณสมบัติเด่นในการรักษาโรคเหล่านี้ คือ เซลล์ตั้งต้นของระบบประสาท หรือ neural stem cells (NSCs) ซึ่งพบได้ในสมองบริเวณ ฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) และบริเวณ subventricular zone (SVZ) เซลล์ตั้งต้นของระบบประสาทที่บริเวณนี้สามารถที่จะกลายไปเป็นเซลล์ประสาทที่อยู่ในสมองได้ทุกชนิด (Bain และคณะ, 1995; Lee และคณะ, 2000) อย่างไรก็ตาม การแยกเซลล์ตั้งต้นของระบบประสาทจากสมองของมนุษย์นั้น มีขั้นตอนการทำที่ซับซ้อนและยังสร้างการบาดเจ็บให้แก่ผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอีกด้วย เนื่องจากต้องมีการตัดเนื้อเยื่อจากสมองออกไปทำการแยกเซลล์ตั้งต้นของระบบประสาท ดังนั้น นักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มมองหาแหล่งเซลล์ทดแทนที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคเหล่านี้ได้

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cells; MSCs) นั้นสามารถพบได้หลายแหล่ง อาทิเช่น ในไขกระดูก, ในกล้ามเนื้อลาย, ที่ผิวหนัง, ในเลือด, และ ในโพรงฟัน เป็นต้น (Hermann และคณะ, 2006) นอกจากนี้ ยังพบเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เป็นจำนวนมากที่เนื้อเยื่อไขมันอีกด้วย (Zuk และคณะ, 2002) นิยามของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ ทาง Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT) ได้ให้คำจำกัดความไว้ว่า เป็นเซลล์ที่สามารถแพร่และขยายจำนวนได้เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม และเซลล์เหล่านี้จะต้องแสดงออกต่อโปรตีนบนพื้นผิวของเซลล์ CD73, CD90 และ CD105 และไม่แสดงออกต่อโปรตีนบนพื้นผิวของเซลล์ CD34 และ CD45 เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ยังมีคุณสมบัติที่สามารถกลายไปเป็นเซลล์กระดูก, เซลล์ไขมัน, และเซลล์กระดูกอ่อนเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยสภาวะที่เหมาะสมอีกด้วย (Zuk และคณะ, 2002)

เนื่องจากเนื้อเยื่อไขมันนั้น เป็นเนื้อเยื่อที่มีอยู่ภายในร่างกายในทุกเพศ และทุกวัย และขั้นตอนการเก็บนั้นก็ไม่มี ความซับซ้อน และก่อให้เกิดการบาดเจ็บน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการเก็บเนื้อเยื่อสมอง หรือไขกระดูก การคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จึงได้รับความสนใจในการพัฒนาให้เป็นวิธีมาตรฐานในทางการแพทย์ และเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันยังให้ปริมาณเซลล์ที่มากกว่าแหล่งอื่นๆอีกด้วย (Zuk และคณะ, 2002) เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่ได้จากเนื้อเยื่อไขมันนั้น มีศักยภาพที่จะกลายไปเป็นเซลล์ตั้งต้นประสาทและเซลล์คล้ายเซลล์ประสาท (Mitchell และคณะ, 2003; Safford และคณะ, 2004; Lee และ Yoon, 2008; Jang และคณะ, 2010) อย่างไรก็ตาม แม้ว่ารูปร่างของเซลล์หลังการเหนี่ยวนำจะมีความคล้ายกับเซลล์ประสาท แต่การแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อระบบประสาทนั้นมีเพียงแค่ประมาณ 60-80% ภายในช่วงเวลาหนึ่งเท่านั้น (Wang และคณะ, 2004) แม้ว่าเซลล์ตั้งต้นประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำ จะมีการแสดงออกของยีน Nestin สูงถึง 90% (Hermann และคณะ, 2004; Hermann และคณะ, 2006) แต่ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำนั้นมีระยะเวลานาน และขั้นตอน

ในการเหนี่ยวนำมีหลายขั้นตอนที่จะทำให้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์สามารถรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนลักษณะคล้ายนิวโรสเฟียร์ได้ (Neurosphere) เมื่อนำมาเลี้ยงในงานเลี้ยงเซลล์ที่มีความสามารถในการเกาะของเซลล์ต่ำ (Ultralow attach dish) (Lee และคณะ, 2003) ด้วยเหตุนี้ ทำให้นักวิจัยพยายามที่จะพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อลดระยะเวลา และลดค่าใช้จ่ายในการเหนี่ยวนำเซลล์เหล่านั้น

NO-cGMP pathway มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในเซลล์ประสาทภายในสมอง (Arnold และคณะ, 1977) ไนตริก ออกไซด์ (Nitric oxide; NO) หรือ nitric oxide donor เป็นอนุมูลอิสระที่มีวงจรชีวิตสั้นๆ ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยเอนไซม์ไนตริก ออกไซด์ ซินเทส (Nitric oxide synthases; NOS) หลังจากที่ NO ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา NO จะทำหน้าที่เป็น secondary messenger เพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์ และระบบต่างๆทางสรีรวิทยา เช่น การคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ควบคุมความดันโลหิต และปริมาณเลือด รวมไปถึงการควบคุมการหลั่งสารสื่อประสาท ซึ่งการทำงานของเซลล์ และระบบต่างๆเหล่านี้ ขึ้นอยู่กับปริมาณของ NO ภายในเซลล์ และการจับกับตัวรับของ NO ตัวรับหลักของ NO คือ soluble guanylyl cyclase (sGC) (Arnold และคณะ, 1977) เมื่อ NO เข้ามาจับกับตัวรับนี้ จะทำให้ปริมาณของ cyclic GMP ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น และจะไปกระตุ้นการส่งสัญญาณของเซลล์ผ่าน pathway ต่างๆ จากการศึกษานี้ NO และ cGMP ในระดับเซลล์ พบว่า NO และ cGMP ควบคุมการแผ่อกของแอกซอน (axon outgrowth) การเจริญเติบโตของเซลล์ และการกลายเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ (proliferation and differentiation) (Traister และคณะ, 2004)

เนื่องด้วย บทบาทในการเป็นโมเลกุลส่งสาร (messenger molecule) ของ NO ภายในสมองที่ควบคุมการสร้างซินแนปส์ (synaptic formation) และกำหนดเซลล์ปลายทางของเซลล์ตั้งต้นระบบประสาท (neural plasticity) นักวิจัยจึงเริ่มให้ความสนใจศึกษาการใช้ NO donor หลากหลายชนิด ในการเหนี่ยวนำเซลล์ตัวอ่อนจาก Cnidarian (Esthephane และ Anctil, 2010) และเซลล์ตั้งต้นประสาทจากสมองของหนู (Sulz และคณะ, 2009; Muller และคณะ, 2010) ให้กลายเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ประสาท ผลจากการศึกษานี้พบว่ามีเซลล์หลังการเหนี่ยวนำมีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ประสาท และสามารถทำหน้าที่ได้เหมือนเซลล์ประสาทอีกด้วย

รายงานในงานวิจัยเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดให้กลายเป็นเซลล์ตั้งต้นประสาท โดยใช้ 8Br-cGMP ซึ่งเป็น NO donor นั้น พบในเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมนุษย์เท่านั้น โดยเซลล์ประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อเซลล์ตั้งต้นประสาท (Li และคณะ, 2010) แต่ยังไม่มียางานใช้ 8Br-cGMP ในการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ปรากฏ โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาผลของ 8Br-cGMP ต่อการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ตั้งต้นประสาท ซึ่งอาจจะนำมาซึ่งวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเทียบกับวิธีการเดิม และอาจจะนำไปสู่การศึกษาในการประยุกต์ใช้ในทางคลินิกเพื่อการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของระบบประสาทได้

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สถานที่ทำการทดลองเก็บข้อมูล

ทำการทดลองนี้ ณ ห้องทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich (Missouri, USA) ถ้าใช้จากบริษัทอื่นจะแจ้งไว้

#### 3.2 การทดลองที่ 1 การคัดแยกและการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์

เนื้อเยื่อไขมันที่ติดมากับผิวหนังที่เหลือทิ้งจากการผ่าตัดจะถูกเก็บจากคนไข้ที่มารับการผ่าตัดเพื่อทำคลอด (Caesarean section) ภายหลังจากการได้รับความยินยอมในการบริจาคเนื้อเยื่อไขมันจากผู้ที่เข้ารับการผ่าตัด โดยได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (Ethics Committee for Researches Involving Human Subjects, Suranaree University of Technology) ตามเอกสารรับรองโครงการวิจัยในมนุษย์เลขที่ EC-56-22 เนื้อเยื่อไขมันจำนวน 1 ตัวอย่าง ที่หนักประมาณ 10 – 30 กรัม นั้นจะถูกนำมาเข้าสู่กระบวนการแยกเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ตามวิธีการของ Zuk และคณะ, (2002) ดังนี้ นำเนื้อเยื่อไขมันล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) และ 75% เอทานอล (ethanol) เพื่อทำความสะอาดเนื้อเยื่อไขมัน หลังจากนั้น ตัดเนื้อเยื่อไขมันออกเป็นชิ้นขนาดเล็กด้วยมีดและกรรไกรในงานแก้วซึ่งมีเอนไซม์คอลลาจีเนส 1 (0.075% collagenase type I) อยู่เพื่อทำการย่อยเนื้อเยื่อไขมันเป็นระยะเวลาประมาณ 1 ชั่วโมงที่ 37°C หลังจากนั้น นำเนื้อเยื่อไขมันที่ทำการย่อยด้วยเอนไซม์นั้นมาปั่นเหวี่ยงที่ 400 xg เป็นเวลา 5 นาที และนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในน้ำยา  $\alpha$ -MEM (Alpha – Minimum Essential Medium) ที่เติมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin และ 100  $\mu$ g/ml streptomycin แล้วเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 5-10 วัน หรือจนกว่าจะพบโคโลนีของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ ทำให้ได้เซลล์ต้นกำเนิดจำนวน 1 เซลล์ไลน์ หลังจากนั้นย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตรโดยให้ความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่  $5 \times 10^3$  เซลล์/ตารางเซนติเมตร แล้วทำการเลี้ยงจนได้ passage ที่ 3 (P3) และหลังจากนั้นจะทำการตรวจสอบว่าเซลล์ที่ได้นั้นว่าเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ โดยดูศักยภาพในการเจริญเป็นเซลล์กระดูก, กระดูกอ่อน และไขมัน และใช้การวิเคราะห์การแสดงออกโปรตีนด้วยเทคนิค Immunocytochemistry และทำการแช่แข็งเซลล์ในไนโตรเจนเหลว

#### 3.3 การทดลองที่ 2 การตรวจสอบความสามารถการกลายไปเป็นเซลล์กระดูก, กระดูกอ่อน และไขมัน

- การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ให้พัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก

ทำการเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่น  $1 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จนกระทั่งได้ความหนาแน่นประมาณ 80% จากนั้นเลี้ยงต่อด้วยน้ำยาเหนี่ยวนำเป็นเซลล์กระดูกที่ปราศจาก FBS น้ำยาเหนี่ยวนำเป็นเซลล์กระดูกประกอบด้วย 100 nM dexamethasone, 0.2 mM L-ascorbate-2-phosphate, 2 mM L-glutamine, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 100 units/ml penicillin

และ 100 µg/ml streptomycin เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 2-3 วัน หลังจากนั้นตรึงเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde (PFA) และทำการย้อมสีด้วย Alizarin Red S

- การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ให้พัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน

ทำการเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่น  $1 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จนกระทั่งได้ความหนาแน่นประมาณ 80% จากนั้นเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำยาเหนี่ยวนำเป็นเซลล์กระดูกอ่อนซึ่งประกอบด้วย 2% FBS 0.05 mM ascorbate 2-phosphate, 40 µg/ml L-proline, 1 mM sodium pyruvate, 100 nM dexamethasone, 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, 10 ng/ml TGF-β3 (R&D Systems, Minnesota, USA) และ 1% ITS-X (Gibco®, Invitrogen) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 2-3 วัน หลังจากนั้นตรึงเซลล์ด้วย 4% PFA ทำการย้อมสีด้วย Alcian blue

- การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ให้พัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมัน

ทำการเลี้ยงเซลล์ที่ความหนาแน่น  $1 \times 10^3$  เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จนกระทั่งได้ความหนาแน่นประมาณ 80% จากนั้นเลี้ยงต่อด้วยน้ำยาเหนี่ยวนำเป็นเซลล์ไขมันที่ปราศจาก FBS น้ำยาเหนี่ยวนำเป็นเซลล์ไขมันซึ่งมี 10 µg/ml insulin, 100 µM indomethacin, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM isobutyl methylxanthine (IBMX), 100 units/ml penicillin และ 100 µg/ml streptomycin. เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 2-3 วัน หลังจากนั้นตรึงเซลล์ด้วย 4% PFA และทำการย้อมสีด้วย Oil-Red-O

### 3.4 การทดลองที่ 3 การตรวจสอบโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมัน

สำหรับการแสดงออกของโปรตีน จะใช้วิธี Immunocytochemistry เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ที่ passage 4 ถูกล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 3 ครั้ง สำหรับการตรวจสอบโปรตีนในนิวเคลียส ทำการตรึงเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde (PFA) เป็นเวลา 15 นาที และลดผลจากการจับกับโปรตีนอย่างไม่จำเพาะด้วย 10 % normal goat serum ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะถูกนำไปบ่มกับแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ต่อโปรตีนที่ผิวเซลล์ซึ่งจำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ ได้แก่ CD73, CD90 และ CD105 โดยใช้ CD34 และ CD45 (1:200; all from Santa Cruz Biotechnology, California, USA) เป็นตัวควบคุมซึ่งจะไม่มีแสดงออกของสองตัวนี้ในเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์มนุษย์ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน มาทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จากนั้นบ่มกับแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) Alexa fluor® 488 goat anti rabbit IgG (1:1000; Invitrogen) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีเพื่อดูนิวเคลียสด้วย 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 40, 6-diamino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) เป็นเวลา 10 นาที และทำการสังเกตผลแล้วถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus, model BH2-RFL-T3, Tokyo, Japan) แล้วนับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีและไม่ติดสีแล้วคิดเป็นร้อยละเทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมด



### 3.5 การทดลองที่ 4 การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นระบบประสาท

กลุ่มการทดลองมี 4 กลุ่ม คือ

1) น้ำยาเหนี่ยวนำมาตรฐาน ประกอบด้วย น้ำยา DMEM/F12 ที่เติมด้วย 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF, 10  $\mu$ M retinoic acid, 1%N2, 2%B27 ตามวิธีการมาตรฐานในการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปเป็นเซลล์ประสาท (Erceg และคณะ, 2008)

2) น้ำยาเหนี่ยวนำมาตรฐานในกลุ่ม 1 ที่เติม 10  $\mu$ M 8 bromocyclic GMP

3) น้ำยาเหนี่ยวนำมาตรฐานในกลุ่ม 1 ที่เติม 100  $\mu$ M 8 bromocyclic GMP

4) น้ำยาเหนี่ยวนำมาตรฐานในกลุ่ม 1 แต่เติม DMSO แทน retinoic acid ในปริมาณที่เท่ากัน เพื่อศึกษาผลของ DMSO ที่เป็นตัวทำละลาย retinoic acid ต่อการเหนี่ยวนำเซลล์

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของมนุษย์ประมาณ  $1.5 \times 10^5$  เซลล์ จะถูกนำมาเลี้ยงในงานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มม. ที่ถูกเคลือบด้วย 10 $\mu$ g/ml Poly-L-Lysine (Cultrex, UK) และ 5 $\mu$ g/ml mouse laminin (Cultrex, UK) หลังจากความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 60-70% confluence เซลล์ทุกกลุ่มการทดลองจะถูกเลี้ยงในน้ำยาเหนี่ยวนำตามกลุ่มการทดลองที่มี 10  $\mu$ M SB431542 และ 10 ng/ml noggin เป็นเวลา 7 วัน เพื่อบังคับให้เซลล์กลายเป็นเซลล์ภายใต้ ectodermal germs layer หลังจากวันที่ 7 เซลล์จะถูกเหนี่ยวนำต่อในน้ำยาตามกลุ่มการทดลองที่ไม่มี 10  $\mu$ M SB431542 และ 10 ng/ml noggin เป็นระยะเวลาอีก 7 วัน

ที่ระยะ 7, 14 วัน จะทำการตรึงเซลล์ด้วย 4% PFA และนำไปบ่มกับแอนติบอดีปฐมภูมิต่อโปรตีนซึ่งจำเพาะต่อเซลล์ประสาทตั้งต้น ได้แก่ Nestin, Sox2, TUJ1 และ NF-L จากนั้นบ่มกับแอนติบอดีทุติยภูมิและการสังเกตผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ และทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ตั้งต้นระบบประสาทโดยใช้ไพรเมอร์ของ *Nestin*, *Sox2*, *GAP43*, *MASH1*, *Tuj1*, *MAP2* และ *NF-L* (คุณสมบัติของไพรเมอร์แสดงใน ตารางที่ 1) โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ โดยการสกัด total RNA ด้วยชุด kit (RBC Real Genomics, RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) จากนั้น RNA จะถูก reverse transcribe เป็น cDNA ด้วย oligo- dT primer โดยใช้ iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT- qPCR (BioRad, Hercules, CA, USA) การแสดงออกของยีนต่างๆจะถูกประเมินโดยใช้ Light Cycler1 480 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) และ KAPA SYBR-Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) จากนั้นทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง real time PCR (QuantStudio™ 5, Applied Biosystems) โดยทำการวิเคราะห์ melting curve เพื่อช่วยในการระบุความจำเพาะของ primer นอกจากนี้ การแสดงออกของยีนจะถูกทำให้เป็นมาตรฐานด้วยยีน GAPDH ซึ่งถูกนำมาใช้เป็น reference และคำนวณหาค่าการแสดงออกของยีนต่อการแสดงออกของ GAPDH เพื่อหาปริมาณการแสดงออกแบบ fold exchange เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม โดยมี NPC-EC (Neural progenitor cells derived from human embryonic carcinoma) เป็น positive control

### 3.6 การทดลองที่ 5 การเหนี่ยวนำเซลล์ตั้งต้นระบบประสาทไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุน

เซลล์ประสาทที่จะทำการเหนี่ยวนำมี 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ประสาท (Neurons) และ เซลล์ค้ำจุน (Glial cells) ในการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอน จะใช้น้ำยา neurobasal (NB) medium ที่เติมด้วย 0.5  $\mu$ M RA, 1% FBS, 100 ng/mL forskolin, 10 ng/mL Nerve growth factor (NGF), 1% N2, 100 U/ml penicillin, และ 100  $\mu$ g/ml streptomycin เป็นระยะเวลาประมาณ 14 วัน หลังจากนั้น ตีเซลล์ด้วย 4% PFA และนำไปบ่มกับแอนติบอดีปฐมภูมิต่อโปรตีนซึ่งจำเพาะต่อเซลล์นิวรอน ได้แก่ Tuj1 และ ChAT จากนั้นบ่มกับแอนติบอดีทุติยภูมิและทำการสังเกตผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ และทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ประสาทโดยใช้ปฏิกิริยาถูกลงแบบย้อนกลับ โดยใช้ไพรเมอร์ของ *Nestin*, *Sox2*, *GAP43*, *MASH1*, *Tuj1*, *MAP2*, *NF-L*, *CNPase*, *S100B* และ *GFAP* (คุณสมบัติของไพรเมอร์แสดงใน ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

Gene	Accession number	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด (bp)	Ta (°C)
<i>Nestin</i>	NM006617.1	F-CTGTTGGCAGCCTCCAGGCC	381	60
		R-GCGGCATTTCCTTGCCCCACT		
<i>SOX2</i>	BC013923.2	F-CCCCCGCGGCAATAGCA	448	60
		R-TCGGCGCCGGGAGATACAT		
<i>GAP43</i>	NM002045.3	F-TCCTGAGCCCTGTCTCTCCCT	175	60
		R-GCCACACTGTTTGACTTGGG		
<i>MASH1</i>	NM004316	F-TCGCACAACCTGCATCTTTA	278	60
		R-CTTTTGACACAAGCTGCAT		
<i>TUJ1</i>	NM006086.3	F- GGGCCAAGTTCTGGGAAGTC	91	60
		R- ATCCGCTCCAGCTGCAAGT		
<i>MAP2</i>	XM006712533.1	F-TCAGAGGCAATGACCTTACC	320	55
		R-GTGGTAGGCTCTTGGTCTTT		
<i>NF-L</i>	BC013923.2	F-CCCCCGCGGCAATAGCA	280	60
		R-TCGGCGCCGGGAGATACAT		
<i>CNPase</i>	NM033133.4	F-GGTGCCTTTGGAGAGCATGG	302	60
		R-GGAACTCCATCTTCGAGGCT		
<i>S100B</i>	BC001766	F-GGAAATCAACGAGCAGGAGGT	408	60
		R-ATTAGCTACAACACGGCTGGA		
<i>GFAP</i>	NM002055	F-GTCCATGTGGAGCTTGACG	406	58
		R-CATTGAGCAGGTCCTGGTAC		

สำหรับการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ก้ำจุน จะใช้น้ำยา NeuroCult™ NS-A Proliferation Kit (Stem Cell Technologies, Canada) เทียบกับ neurobasal (NB) medium ที่เติมด้วย 10 ng/ml Platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA), 10 ng/ml bFGF, และ 100 ng/ml sonic hedgehog, 100 U/ml penicillin, และ 100 µg/ml streptomycin เป็นระยะเวลาประมาณ 10 วัน และจะเปลี่ยนไปใช้น้ำยา DMEM/F12 ที่เติมด้วย 3% FBS และ 15 nM F3 เป็นระยะเวลาอีก 3 วัน หลังจากนั้น ตรึงเซลล์ด้วย 4% PFA และนำไปบ่มกับแอนติบอดีปฐมภูมิต่อโปรตีนซึ่งจำเพาะต่อเซลล์ก้ำจุน ได้แก่ Olig2 และ GFAP จากนั้นบ่มกับแอนติบอดีทุติยภูมิ และทำการสังเกตผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ และทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ประสาทโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ โดยมี NPC-EC (Neural progenitor cells derived from human embryonic carcinoma) เป็น positive control

### 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทุกการทดลองมีตัวอย่างทดลองจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 17.0 (SPSS, Inc., USA) ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากทุกตัวอย่าง (Mean) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation: SD) ผลการทดลองจะถูกนำมาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ 2 ปัจจัย (Two-way ANOVA) และทำการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (Post hoc test) โดยวิธี Tukey-Kramer Honest Significant Difference (HSD) ความแตกต่างของผลการทดลองที่มีค่า P-value น้อยกว่า 0.05 ( $P < 0.05$ ), 0.01 ( $P < 0.01$ ) และ 0.001 ( $P < 0.001$ ) สรุปว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

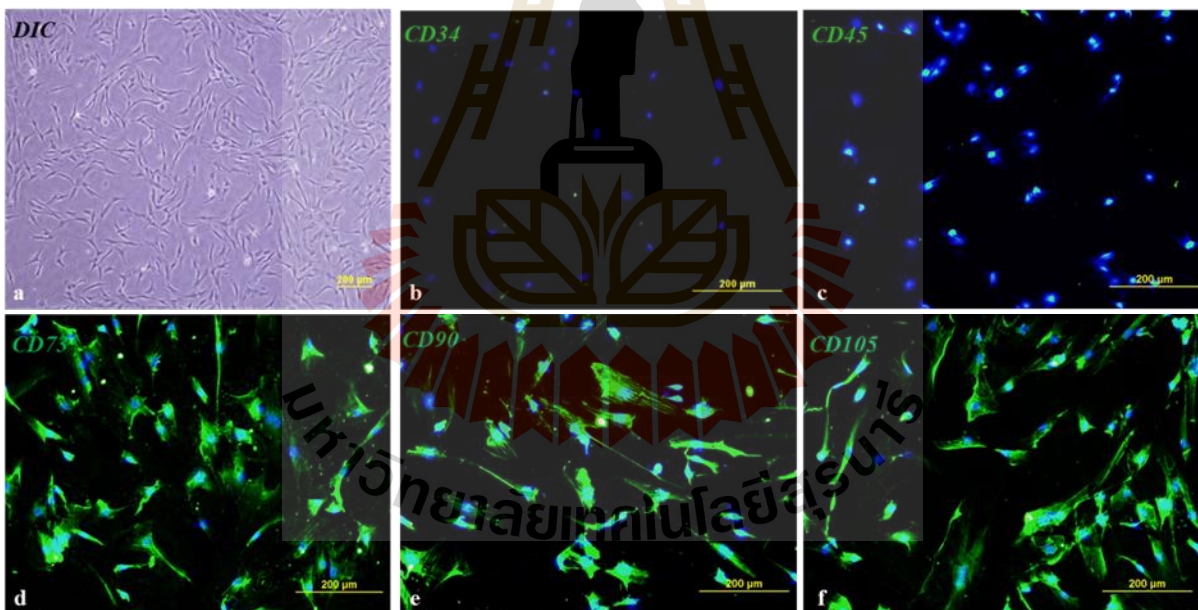
## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ผลการทดลอง

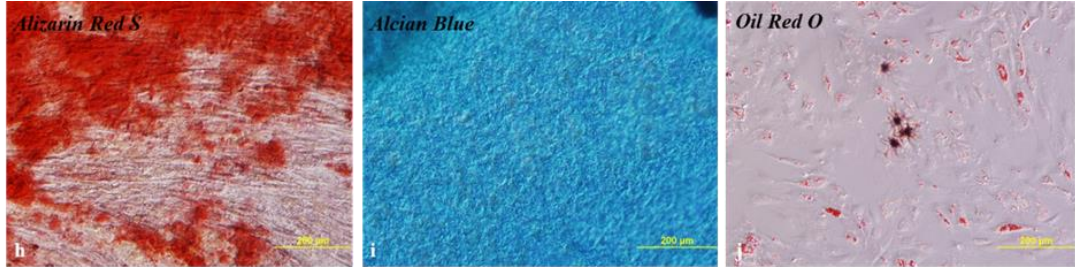
##### 4.1.1 ผลการทดลองการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมัน

หลังจากทำการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ เซลล์เหล่านั้นจะถูกนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน ซึ่งพบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์คล้ายไฟโบบลาส (fibroblast-like) ดังภาพที่ 1a โดยเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ในระยะ P3 จะถูกเก็บเพื่อทำการวิเคราะห์ตรวจสอบว่าเซลล์นั้นมีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ โดยดูการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Immunocytochemistry จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์มีการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ ได้แก่ CD73, CD90, และ CD105 แต่อย่างไรก็ตาม ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ CD34 และ CD45 (ภาพที่ 1b-1f)



ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ (a) และการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ ได้แก่ Nanog (d), Oct4 (e), SOX-2 (f) และการไม่แสดงออกของ CD 34 (b) และ CD45 (c) ซึ่งเป็นโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็น hematopoietic และ angiogenic lineages ด้วยวิธี immunocytochemistry ในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์

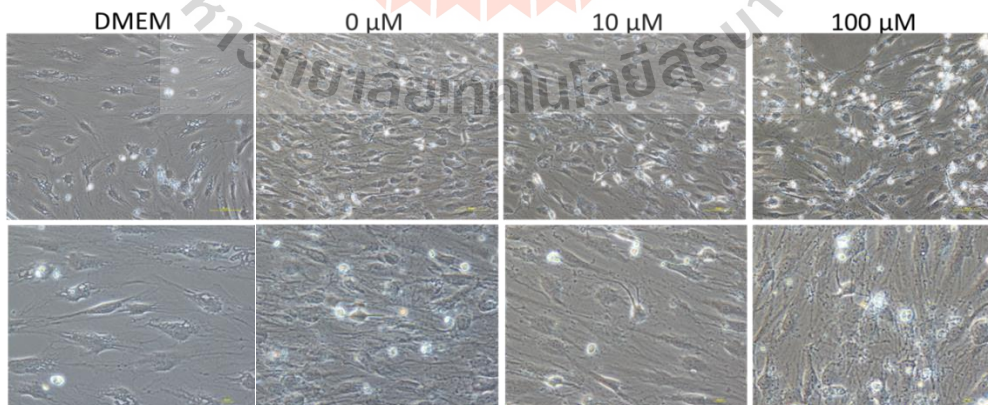
นอกจากนี้ยังทำการตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน ซึ่งพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ทั้งสามชนิดได้ ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่คัดแยกมานี้มีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (h) เซลล์กระดูกอ่อน (i) และเซลล์ไขมัน (j) ซึ่งจะทำการตรวจสอบการสะสมของแคลเซียมในเซลล์กระดูก, การสะสมของโปรติโอไกลแคนในเซลล์กระดูกอ่อน และการสร้างเม็ดไขมันของเซลล์ไขมัน โดยทำการย้อมสีด้วย Alizarin Red S, Alcian Blue และ Oil Red O ตามลำดับ

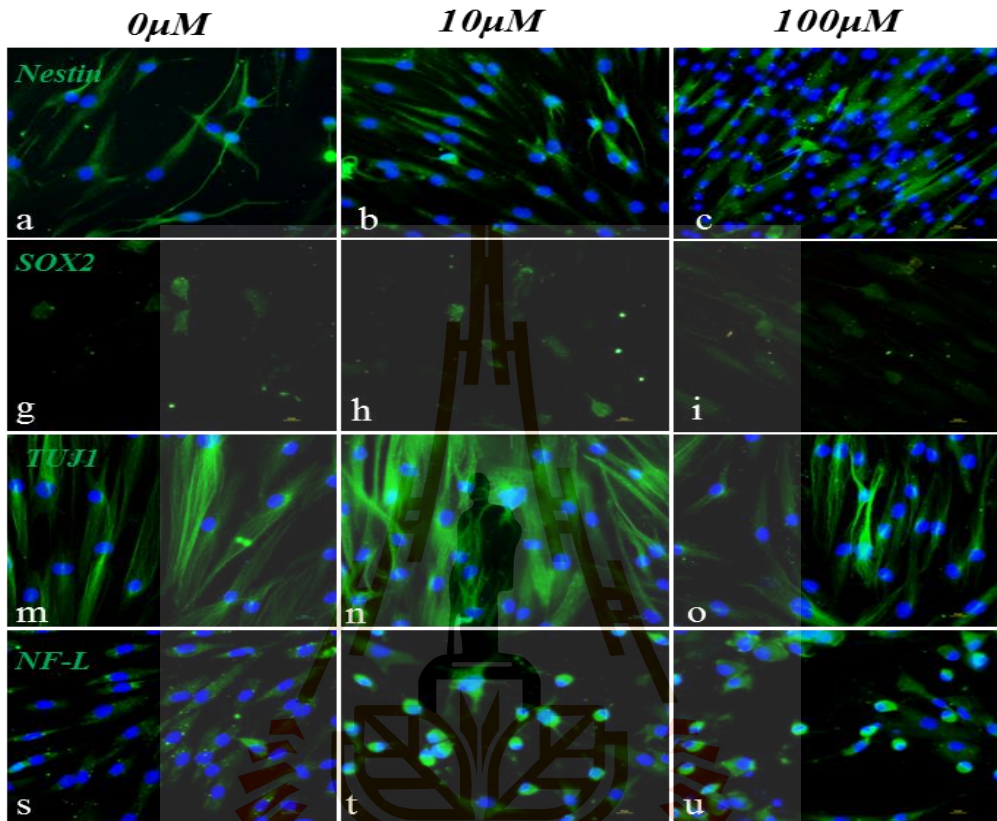
#### 4.1.2 ผลการทดลองการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นระบบประสาท

การศึกษาความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ โดยจะศึกษาการพัฒนาไปเป็นเซลล์ตั้งต้นระบบประสาท โดยจะทำการตรวจสอบพีโนไทป์และการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่เหนี่ยวนำด้วย 8Br-cGMP ที่ความเข้มข้น 0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  และ 100  $\mu\text{M}$  เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท ผลการศึกษาพบว่า หลังสัปดาห์หลังทำการเหนี่ยวนำ ประชากรเซลล์ส่วนใหญ่ที่เติม 8Br-cGMP ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  มีรูปร่าง เรียว ยาว มีขนาดเล็กกลวง และพบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ประสาทที่มี bipolar และ multipolar ซึ่งมีแขนงคล้ายแอกซอนยื่นออกมาจากตัวเซลล์ (ภาพที่ 3)



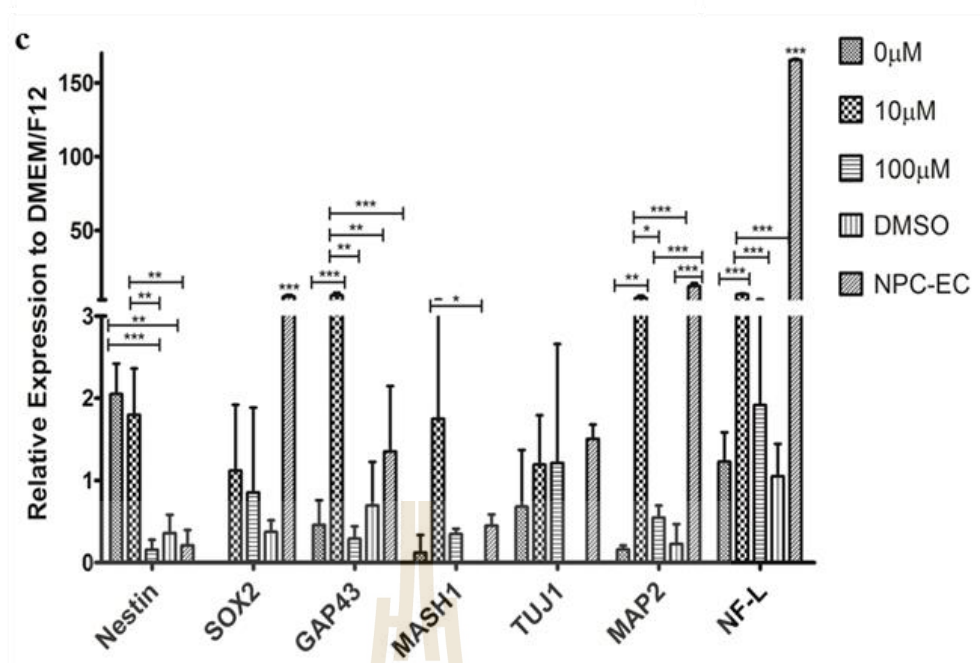
ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ หลังการเหนี่ยวนำด้วย 0, 10 และ 100  $\mu\text{M}$  8Br-cGMP โดยใช้การเหนี่ยวนำใน DMEM เป็น negative control

การแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ตั้งต้นระบบประสาท ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี immunocytochemistry จากผลการทดลอง พบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาท Nestin, Sox2, TUJ1 และ NF-L หลังการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ด้วย 10  $\mu$ M 8Br-cGMP สูงกว่าความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) (ภาพที่ 4)



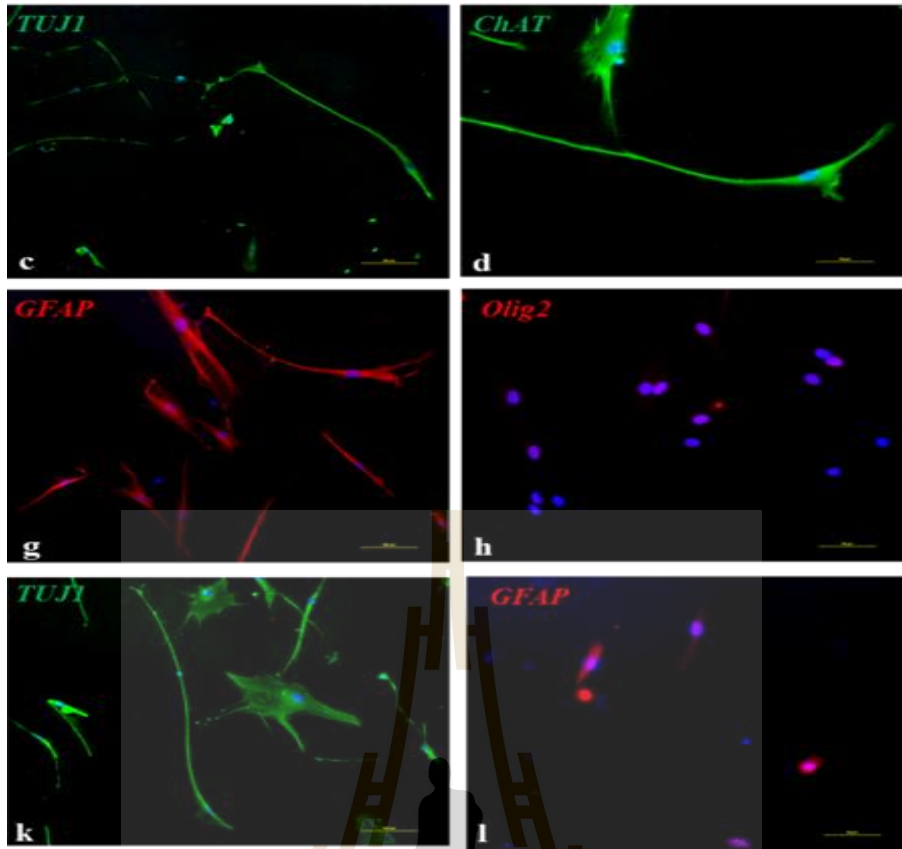
ภาพที่ 4 การแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ตั้งต้นระบบประสาท ได้แก่ Nestin, Sox2, TUJ1, และ NF-L. ด้วยวิธี immunocytochemistry หลังการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ด้วย 0, 10 และ 100  $\mu$ M 8Br-cGMP

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์หลังการเหนี่ยวนำด้วย 10  $\mu$ M 8Br-cGMP มีระดับของยีนที่จำเพาะต่อเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์นิวรอน *MASH1*, *GAP43*, *TUJ1*, *NF-L*, และ *MAP2* สูงกว่ากลุ่มความเข้มข้นอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การแสดงออกของยีนหลังการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ด้วย 0, 10 และ 100  $\mu\text{M}$  8Br-cGMP โดยมี NPC-EC (Neural progenitor cells derived from human embryonic carcinoma) เป็น positive control วิเคราะห์ทางสถิติโดย two-way ANOVA และ post hoc comparisons (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

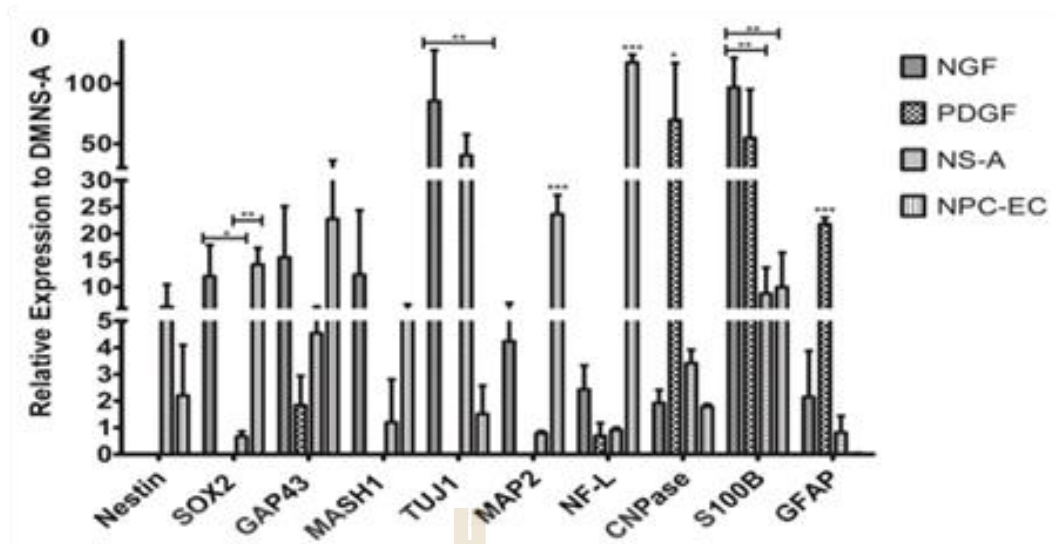
4.1.3 ผลการทดลองการเหนี่ยวนำเซลล์ตั้งต้นระบบประสาทไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุน การศึกษาความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่เหนี่ยวนำด้วย 10  $\mu\text{M}$  8Br-cGMP ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย RT-qPCR และการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Immunocytochemistry ผลการทดลองพบว่าเซลล์เหล่านั้นสามารถกลายไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุนเต็มวัยได้ ( ภาพที่ 6 ) โดยพบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาทนิวรอน TUJ1 และ ChAT ส่วนการเหนี่ยวนำด้วย PDGF เพื่อให้เป็นเซลล์ค้ำจุน พบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ค้ำจุนเต็มวัย ได้แก่ GFAP และ Oligo2 เมื่อเปรียบเทียบกับการเหนี่ยวนำภายใต้ภาวะ NS-A ซึ่งคือภาวะที่เหนี่ยวนำเซลล์ไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอน พบการแสดงออกของ TUJ1 (ภาพที่ 6k) แต่ไม่พบการแสดงออกของ GFAP (ภาพที่ 6l)



ภาพที่ 6 การแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาทนิวรอน ได้แก่ TUJ1 (c) และ ChAT (d) และเซลล์ค้ำจุน ได้แก่ GFAP (g) และ Oligo2 (h) . ด้วยวิธี immunocytochemistry

ความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุนของเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่เหนี่ยวนำด้วย 10 uM 8Br-cGMP ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย RT-qPCR ผลการทดลองพบว่าเซลล์เหล่านั้นสามารถกลายเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุนเต็มวัยได้ ภายใต้ภาวะที่เหนี่ยวนำด้วย NGF พบการแสดงออกของยีน *TUJ1* และ *S100B* ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนสูงกว่าในภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ *GAP43*, *MASH1*, *MAP2*, และ *NF-L* อีกด้วย ภายใต้ภาวะที่เหนี่ยวนำด้วย PDGF พบการแสดงออกของยีน *GFAP* และ *CNPase* ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ค้ำจุนสูงกว่าในภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่พบการแสดงออกของ *MAP2*, และ *TUJ1* (ภาพที่ 7)





ภาพที่ 7 การแสดงออกของยีนที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุน หลังการเหนี่ยวนำเซลล์ตั้งต้นระบบประสาท วิเคราะห์ทางสถิติโดย two-way ANOVA และ post hoc comparisons (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

NGF คือ น้ำยา neurobasal medium ที่เติม NGF

PDGF คือ น้ำยา neurobasal medium ที่เติม PDGF

NS-A คือ น้ำยา NeuroCult™ NS-A

NPC-EC คือ NPC-EC (Neural progenitor cells derived from human embryonic carcinoma) เป็น positive control

#### 4.2 วิจารณ์ผลการทดลอง

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ เป็นแหล่งเนื้อเยื่อที่หาได้ทุกเพศทุกวัย และเก็บได้ง่าย ซึ่งพบเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เป็นจำนวนมากที่เนื้อเยื่อไขมัน (Mizuno 2010; Zuk 2010; Ra และคณะ, 2011) เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เป็นเซลล์ที่สามารถขยายจำนวนได้เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม และเซลล์เหล่านี้จะต้องแสดงออกต่อโปรตีนบนพื้นผิวของเซลล์ CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 และ STRO-1 และไม่แสดงออกต่อโปรตีนบนพื้นผิวของ hematopoietic lineage CD11b, CD14, CD19, CD34 และ CD45 (Zuk และคณะ, 2002; Strem และคณะ, 2005; Wagner และคณะ, 2005; Krampner และคณะ, 2007; Schaffler และ Buchler, 2007; de Villiers และคณะ, 2009) เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ยังมีคุณสมบัติที่สามารถกลายไปเป็นเซลล์กระดูก, เซลล์ไขมัน, และเซลล์กระดูกอ่อนเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยสภาวะที่เหมาะสมอีกด้วย (Zuk และคณะ, 2002) เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ในการศึกษานี้ มีการแสดงออกต่อโปรตีนบนพื้นผิวของเซลล์ CD73, CD90 และ CD105 และไม่แสดงออกต่อโปรตีนบนพื้นผิวของเซลล์ CD34 และ CD45 (Vogel และคณะ, 2003) และยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก, เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมัน

มนุษย์ในการศึกษานี้มีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (Zuk และคณะ, 2002; Casteilla และ Dani, 2006)

มีงานวิจัยหลายชิ้น พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่ได้จากเนื้อเยื่อไขมันนั้น มีศักยภาพที่จะกลายเป็นเซลล์ตั้งต้นประสาทและเซลล์คล้ายเซลล์ประสาท (Mitchelle และคณะ, 2003; Safford และคณะ, 2004; Lee และ Yoon, 2008; Jang และคณะ, 2010; Zuk และคณะ, 2002; Ashjian และคณะ, 2003; Kompisch และคณะ, 2010; Zavan และคณะ, 2013) โดยพบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงความเป็นเซลล์ตั้งต้นประสาทและเซลล์คล้ายเซลล์ประสาท ได้แก่ Nestin, Sox2 และ TUJ1 (Ashjian และคณะ, 2003; Mareschi และคณะ, 2006; Jang และคณะ, 2010; Zavan และคณะ, 2010) และการแสดงออกของยีน ได้แก่ *Sox2*, *GAP43*, *MASH1*, *Tuj1*, *MAP2*, *NF-L* และ *NeuroD1* (Thomson และคณะ, 2011; Wang และคณะ, 2012; Skene, 1989; Lalli และคณะ, 2005; Mruthyunjaya และคณะ, 2011)

การศึกษาครั้งนี้มุ่งศึกษาถึงการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ด้วย 8 Br-cGMP ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นประสาท และเหนี่ยวนำเซลล์เหล่านั้นไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุน เมื่อนำมาตรวจสอบพบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาท Nestin, Sox2, TUJ1 และ NF-L และมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์นิวรอน *MASH1*, *GAP43*, *TUJ1*, *NF-L*, และ *MAP2* ส่วนการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ด้วย 8 Br-cGMP ไปเป็นเซลล์ตั้งต้นประสาทสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุนได้ ซึ่งพบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงความเป็นเซลล์ประสาทนิวรอน ได้แก่ TUJ1 และ ChAT และโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ค้ำจุนเต็มวัย ได้แก่ GFAP และ Oligo2 นอกจากนี้พบการแสดงออกของยีน TUJ1 และ S100B ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนสูงกว่าในภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบการแสดงออกของ *GAP43*, *MASH1*, *MAP2*, และ *NF-L* อีกด้วย และพบการแสดงออกของยีน GFAP และ CNPase ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ค้ำจุน

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผล

การศึกษาคั้งนี้มุ่งศึกษาถึงผลของ 8 bromocyclic GMP ต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ไปเป็นเซลล์ระบบประสาท โดยมีการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ ด้วยวิธีการย้อมโปรตีนที่จับบนผิวเซลล์และการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ซึ่งพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่คัดแยกได้ มีการแสดงออกของโปรตีน CD73, CD90, และ CD105 แต่ไม่แสดงออกโปรตีน CD34 และ CD45 นอกจากนี้เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบฟีโนไทป์และการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่เหนี่ยวนำด้วย 8Br-cGMP ที่ความเข้มข้น 0 uM, 10 uM และ 100 uM พบว่าการแสดงออกของโปรตีน Nestin, Sox2, TUJ1 และ NF-L หลังการเหนี่ยวนำด้วย 10 uM 8Br-cGMP สูงกว่าความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์หลังการเหนี่ยวนำด้วย 10 uM 8Br-cGMP มีระดับของยีนที่จำเพาะต่อเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์นิวรอน (*MASH1*, *GAP43*, *TUJ1*, *NF-L*, และ *MAP2*) สูงกว่ากลุ่มความเข้มข้นอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์คำจุนเต็มวัย จากเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่เหนี่ยวนำด้วย 10 uM 8Br-cGMP พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 10 uM 8Br-cGMP สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตั้งต้นเซลล์ประสาทนิวรอน และยังสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์คำจุนเต็มวัยได้ ซึ่งพบการแสดงออกของโปรตีนมาร์กเกอร์ที่เป็นตัวบ่งถึงความเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนได้แก่ TUJ1 และ ChAT และเซลล์คำจุน ได้แก่ GFAP2 และ Oligo2 และพบการแสดงออกของยีน *TUJ1* และ *S100B* ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์ประสาทนิวรอน และพบการแสดงออกของยีน *GFAP* และ *CNPase* ที่เป็นตัวบ่งถึงการเป็นเซลล์คำจุน

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการทำการทดลองต่อโดยตรวจสอบคุณสมบัติและความปลอดภัยในการปลูกถ่ายให้สัตว์ทดลอง ก่อนที่จะประยุกต์ใช้ในเวชศาสตร์ฟื้นฟูในอนาคต

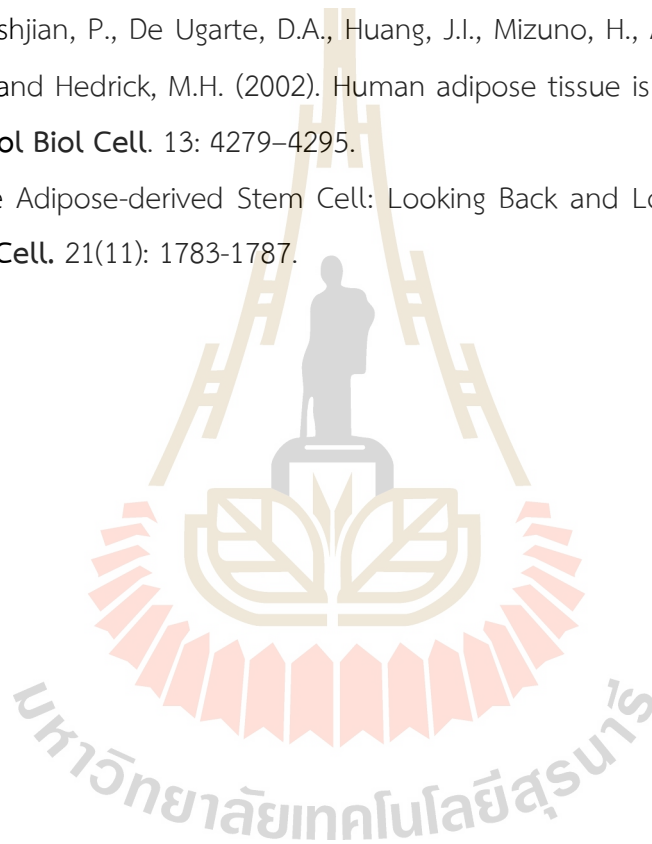
## บรรณานุกรม

- Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., and Murad, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc Natl Acad Sci.** 74: 3203–3207.
- Ashjian, P.H., Elbarbary, A.S., Edmonds, B., DeUgarte, D., Zhu, M., Zuk, P.A., Lorenz, H.P., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2003). *In vitro* differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. **Plast Reconstr Surg.** 111: 1922-1931.
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., and Gottlieb, D.I. (1995). Embryonic Stem Cells Express Neuronal Properties in Vitro. **Dev Biol.** 168:342-357.
- Casteilla, L., and Dani, C. (2006). Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. **Diabetes Metab.** 32(5): 393-401.
- De Villiers, J.A., Houreld, N., and Abrahamse, H. (2009). Adipose derived stem cells and smooth muscle cells: implications for regenerative medicine. **Stem Cell Rev.** 5(3): 256-265.
- Dietrich, J., and Kempermann, G. (2006). Role of Endogenous Neural Stem Cells in Neurological Disease and Brain Repair, in: M. Bähr (Ed.), **Brain Repair**, Springer US. pp. 191-220.
- Gage, F.H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. **Science.** 287: 1433-1438. DOI: 10.1126/science.287.5457.1433.
- Gimble, J.M., and Guilak, F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy.** 5: 362-369.
- Hermann, A., Maisel, M., and Storch, A. (2006). Epigenetic conversion of human adult bone mesodermal stromal cells into neuroectodermal cell types for replacement therapy of neurodegenerative disorders. **Expert Opinion on Biological Therapy.** 6: 653-670. DOI: 10.1517/14712598.6.7.653.
- Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Poppa, M.O., Fiedler, J., Boehm, B.O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R., and Storch, A. (2004). Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. **J Cell Sci.** jcs.01307.
- Isacson, O., Bjorklund, L.M., and Schumacher, J.M. (2003). Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease by stem cells. **Ann Neurol.** 53: S135-S148. DOI: 10.1002/ana.10482.

- Jang, S., Cho, H.-H., Cho, Y.-B., Park, J.-S., and Jeong, H.-S. (2010). Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. **BMC Cell Biology**. 11: 25.
- Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., and McKay, R.D. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. **Genes Dev**. 10: 3129 –3140.
- Krampera, M., Marconi, S., Pasini, A., Galie, M., Rigotti, G., Mosna, F., Tinelli, M., Lovato, L., Anghileri, E., Andreini, A., Pizzolo, G., Sbarbati, A., and Bonetti, B. (2007). Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. **Bone**. 40(2): 382-390.
- Kompisch, K.M., Lange, C., Steinemann, D., Skawran, B., Schlegelberger, B., Müller, R., and Schumacher, U. (2010). Neurogenic transdifferentiation of human adipose-derived stem cells? A critical protocol reevaluation with special emphasis on cell proliferation and cell cycle alterations. **Histochem Cell Biol**. 134: 453-468.
- Lee, J., Elkhouloun, A.G., Messina, S.A., Ferrari, N., Xi, D., Smith, C.L., Cooper, R., Albert, P.S., and Fine, H.A. (2003). Cellular and Genetic Characterization of Human Adult Bone Marrow-Derived Neural Stem-Like Cells. **Cancer Res**. 63: 8877-8889.
- Lee, S.-H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., and McKay, R.D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. **Nat Biotech**. 18: 675-679.
- Lee, T.-H., and Yoon, J.-G. (2008). Intracerebral transplantation of human adipose tissue stromal cells after middle cerebral artery occlusion in rats. **J Clin Neurosci**. 15: 907-912.
- Li, J.T., Somasundaram, C., Bian, K., Xiong, W., Mahmooduddin, F., Nath, R.K., and Murad, F. (2011). Nitric oxide signaling and neural stem cell differentiation in peripheral nerve regeneration. **J Plast Surg**. 10: 343-353.
- Mareschi, K., Novara, M., Rustichelli, D., Ferrero, I., Guido, D., and Carbone, E. (2006). Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural markers and eag K<sup>+</sup> channel types. **Exp Hematol**. 34: 1563–1572.
- McKay, R. (1997). Stem Cells in the Central Nervous System. **Science**. 276: 66-71. DOI: 10.1126/science.276.5309.66.
- Mitchell, K.E., Weiss, M.L., Mitchell, B.M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B., Beerenstrauch, M., Abou-Easa, K., Hildreth, T., and Troyer, D. (2003). Matrix Cells from

- Wharton's Jelly Form Neurons and Glia. **Stem Cells**. 21: 50-60. DOI: 10.1634/stemcells.21-1-50.
- Mizuno, H, and Hyakusoku, H. (2010). Fat Grafting to the Breast and Adipose-Derived Stem Cells: Recent Scientific Consensus and Controversy. **Aesthet Surg J**. 30(3): 381-387.
- Mruthyunjaya, S., Rumma, M., Ravibhushan, G., Anjali, S., and Padma, S. (2011). c-Jun/AP-1 transcription factor regulates laminin-1-induced neurite outgrowth in human bone marrow mesenchymal stem cells: Role of multiple signaling pathways. **FEBS Lett**. 585: 1915-1922.
- Muller, D., Greenland, K.J., Speth, R.C., and Middendorff, R. (2010). Neuronal Differentiation of NG108-15 Cells Has Impact on Nitric Oxide and Membrane (Natriuretic Peptide Receptor-A) Cyclic GMP-Generating Proteins. **Mol Cell Endocrinol**. 320: 118-127.
- Ra, J.C., Shin, I.S., Kim, S.H., Kang, S.K., Kang, B.C., Lee, H.Y., Kim, Y.J., Jo, J.Y., Yoon, E.J., Choi, H.J., and Kwon, E. (2011). Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. **Stem Cells Dev**. 20(8): 1297-308.
- Ramm, P., Alexandrov, Y., Cholewinski, A., Cybuch, Y., Nadon, R., and Soltys, B.J. (2003). Automated screening of neurite outgrowth. **J Biomol Screen**. 1: 7-18.
- Safford, K.M., Hicok, K.C., Safford, S.D., Halvorsen, Y.-D.C., Wilkison, W.O., Gimble, J.M., and Rice, H.E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 294: 371-379.
- Schaffler, A., and Buchler, C. (2007). Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem Cells**. 25(4): 818-827.
- Strem, B.M., Hicok, K.C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R.E., Fraser, J.K., and Hedrick, M.H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio J Med**. 54: 132-141.
- Sulz, L., Astorga, G., Bellette, B., Iturriaga, R., Mackay-sim, A. and Bacigalupo, J. (2009). Nitric oxide regulates neurogenesis in adult olfactory epithelium in vitro. **Nitric Oxides**. 20: 238-253.
- Traister, A., Abashidez, S., Gold, V., Yairi, R., Plachta, M.N., McJinnell, I., Patel, K. and Wei, M. (2004). BMP controls nitric oxide-mediated regulation of cell numbers in the developing neural tube. **Cell Death Differentiation**. 11: 832-841.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., and Ho, A.D. (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Exp Hematol**. 33(11): 1402-1416.

- Wang, N., Du, C.Q., Wang, S.S., Xie, K., Zhang, S.L., and Miao, J.Y. (2004). D609 induces vascular endothelial cells and marrow stromal cells differentiation into neuron-like cells. **Acta Pharmacologica Sinica**. 25: 422-426.
- Zavan, B., Michelotto, L., Lancerotto, L., Della-Puppa, A., D'Avella, D., and Abatangelo, G. (2013). Neural potential of a stem cell population in the adipose and cutaneous tissues. **Neurol Res**. 32: 47-54.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**. 7: 211-228.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**. 13: 4279-4295.
- Zuk, P.A. (2010). The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead. Kellogg D, ed. **Mol Biol Cell**. 21(11): 1783-1787.



## ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย  
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. เกิดวันที่ 7 มีนาคม 2502

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

### 4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-224154

ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 โทร. 081-4706393

### 5. ประวัติการศึกษา

5.1 ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523

สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย

5.2 ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525

สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย

Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy in swamp buffalo.

5.3 ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541

สถาบัน Kyoto University ประเทศญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)

Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

5.4 ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.

ด้วยทุน British Council สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง ตุลาคม 2527 -

กุมภาพันธ์ 2528

5.5 สมาชิกสมาคมวิชาชีพ:

5.5.1 International Embryo Transfer Society (IETS) Since 1998

5.5.2 President International Buffalo Federation (2010-2013)

5.5.3 President Asian Buffalo Association (2010-2013)



## 6. ประวัติการทำงาน:

6.1 9 ธันวาคม 2525-31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

6.2 1 พฤศจิกายน 2543-ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

## 7. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

7.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

7.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

7.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

7.4 Embryonic and somatic stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

## 8. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ย้อนหลัง 5 ปี

### 2017

Pitchayapipatkul, J., Somfai, T., Matoba, S., Parnpai, R., Nagai, T., Geshi, M. and Vongpralub, T.\* 2017. Microtubule stabilisers docetaxel and paclitaxel reduce spindle damage and maintain the developmental competence of in vitro-mature bovine oocytes during vitrification. *Reprod Fertil Dev.* doi: 10.1071/RD16193. (IF=2.135)

Tanthaisong P, Imsoonthornruksa S, Ngernsoungnern A, Ngernsoungnern P, Ketudat-Cairns M, Parnpai R.\*. 2017. Enhanced Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells by GSK-3 Inhibitors. *PLoS One.* 12: e0168059. (IF=3.54; เป็น Correspondence)

Suttirojpatana, T., Somfai, T.\*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Geshi, M. 2017. Effect of medium additives during liquid storage on developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Anim. Sci. J.* 88, 231–240 .(IF=1.045)

### 2016

Kunkanjanawan, T., Carter, R.L., Prucha, M., Yang, J., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.\* 2016. miR-196a ameliorates cytotoxicity and cellular phenotype in transgenic Huntington's disease monkey neural cells. *PloS One* 11: e0162788. (IF=3.54)

Suttirojpatana, T., Somfai, T.\*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.\*** and Geshi, M. 2016. Pretreatment of bovine sperm with dithiobutylamine (DTBA) significantly improves

embryo development after ICSI. *J. Reprod. Dev.* doi: 10.1262/jrd.2016-084 (IF=1.515; เป็น Correspondence)

**Parnpai, R.\***, Liang, Y., Ketudat-Cairns, M., Somfai, T. and Nagai, T. 2016. Vitrification of buffalo oocytes and embryos. *Theriogenology*. 86: 214-220. (IF=1.798; เป็น Correspondence)

Ye, D., Li, T., Heraud, P. and **Parnpai, R.\*** 2016. Effect of chromatin-remodeling agents in hepatic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Intl.* 3038764. (IF=2.813; เป็น Correspondence)

Suttirojattana, T., Somfai, T.\*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.\*** and Geshi, M. 2016. The effect of temperature during liquid storage of in vitro-matured bovine oocytes on subsequent embryo development. *Theriogenology*. 85: 509-518. (IF=1.798; เป็น Correspondence)

## 2015

Imsoonthornruksa, S., Pruksananonda, K., **Parnpai, R.**, Rungsiwirut, R. and Ketudat-Cairns, M.\* 2015. Expression and purification of recombinant human basic fibroblast growth factor fusion proteins and their uses in human stem cell culture. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 25 : 372-380. (IF=2.104)

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.\* 2015. Pretreatment of *in vitro* matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: Effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. *Cryobiology*. 71: 216-223. (IF=1.587)

Khamlor, T., Pongpiachan, P., **Parnpai, R.**, Punyawai, K., Sangsritavong. and Chokesajjawatee, N.\* 2015. Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*. 83: 891-896. (IF=1.792)

Punyawai, K., Anakkul, N., Srirattana, K., Aikawa, Y., Sangsritavong, S., Nagai, T., Imai K. and **Parnpai R.\*** 2015. Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. *J. Reprod. Dev.* 61 : 431-437. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Yoisungnern, T., Choi, Y.J., Woong, H.J., Kang, M.H., Das, J., Gurunathan, S., Kwon D.N., Cho, S.G., Park, C., Kyung Chang, W., Chang, B.S., **Parnpai R.** and Kim, J.H.\* 2015. Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. *Sci. Rep.* doi: 10.1038/srep11170. (IF=5.578)

Yoisungnern, T., Das, J., Choi, Y.J., **Parnpai, R.** and Kim, J.H.\* 2015. Effect of hexavalent

chromium-treated sperm on in vitro fertilization and embryo development. *Toxicol. Ind. Health*. pii: 0748233715579805. (IF=1.859)

## 2014

Carter, R.L., Chen, Y., Kunkanjanawan, T., Xu, Y., Moran, S.P., Putkhao, K., Yang, J., Huang, A.H.C., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.\* 2014. Reversal of cellular phenotypes in neural cells derived from Huntington's disease monkey-induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 3: 1-9. (IF=5.365)

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.\* 2014. Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native heifer. *Anim. Sci. J.* 85: 15-24. (IF=0.96)

**Parnpai, R.\***, Liang, Y.Y., Paul, A.K., Ngermsoungnern, A., Ngermsoungnern, P. and Ketudat-Cairns, M. 2014. Cryopreservation of buffalo oocytes. *Thai J. Vet. Med* 44 (Supplement 1): 119-123. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.\*** 2014. Blastocysts hatchability following oocytes and blastocyst vitrification. *Thai J. Vet. Med* 44 (Supplement 1): 237-240. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.\*** 2014. In vitro development potentiality of expanded bovine blastocysts subsequent Cryotop vitrification. *Thai J. Vet. Med.* 44: 513-521. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Punyawai, K., Sangsritavong, S., Liang, Y.Y., Sripunya, N. and **Parnpai, R.\*** 2014. Effect of thawing solutions on survival of bovine blastocyst using in-straw vitrificationn method. *Thai J. Vet. Med* 44 (Supplement 1): 241-243. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Putkhao, K.\*, Chan, A.W.S.\*, Yuksel, A. and **Parnpai, R.\*** 2013. Cryopreservation of transgenic Huntington's disease rhesus macaque sperm: A case report. *Cloning and Transgenesis* 2: 1000116.

Sripunya, N., Liang, Y., Panyawai, K., Srirattana, K., Ngermsoungnern, A., Ngermsoungnern, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.\*** 2014. Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. *Cryobiology* 69: 496-499. (IF=1.587; เป็น Correspondence)

Srirattana, K., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T., Kaneda, M.\* and **Parnpai, R.\*** 2014. Effects of Trichostatin A on *in vitro* development and DNA methylation level of the satellite I region of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. *J. Reprod. Dev.* 60: 336-341. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

## 2013

- Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.\* 2013. Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, *in vitro* embryo production and repeated oocyte pick up in Thai native heifers undergoing superstimulation. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 26: 488-500. (IF=0.541)
- Chasombat, J., Sakhong, D., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T\*. 2012 Superstimulation of follicular growth in Thai native heifers by a single administration of follicle stimulating hormone dissolved in polyvinylpyrrolidone. *J. Reprod. Dev.* 59: 214-218. (IF=1.515)
- Kaewmungkun, K., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Liang, Y., Sangsritavong, S. and **Parnpai, R.\*** 2013. Influence of growth factors on survival and development of swamp buffalo early antral follicle cultured *in vitro*. *Buffalo Bulletin* 32: (Special Issue 2): 617-621. (IF=0.027; เป็น Correspondence)
- Liang, Y.Y., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.\*** 2013. Vitrification of buffalo oocytes: Current status and perspectives. *Buffalo Bulletin* 32 (Special Issue 1): 196-203. (IF=0.027; เป็น Correspondence)
- Phongnimitr, T. Liang, Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C. and **Parnpai, R.\*** 2013. Effects of L-carnitine supplemented in maturation medium on the maturation rate of swamp buffalo oocytes. *Buffalo Bulletin* 32: (Special Issue 2): 613-616. (IF=0.027; เป็น Correspondence)
- Phongnimitr, T., Liang, Y.Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C.\* and **Parnpai, R.\*** 2013. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. *Anim. Sci. J.* 84: 719-725. (IF=0.96; เป็น Correspondence)
- Srirattana, K., Sripunya, N., Sangmalee, A., Imsoonthornruksa, S., Liang, Y.Y., Ketudat-Cairns M.K. and **Parnpai, R.\*** 2013. Developmental potential of vitrified goat oocytes following somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. *Small Rum. Res.* 112: 141-146. (IF=1.125; เป็น Correspondence)

## 2012

- Imsoonthornruksa, S., Srirattana, K., Phewsoi, W., Tunwattana, W., **Parnpai, R.\*** and Ketudat-Cairns, M\*. 2012. Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring. *Mitochondrion* 12: 506-513. (IF=3.249; เป็น Correspondence)

- Imsoonthornruksa, S., Sangmalee, A., Srirattana, K., **Parnpai, R.\***, Ketudat-Cairns, M\*. 2012. Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring. *Cell. Rerogram.* 14: 79-87. (IF=1.788; เป็น Correspondence)
- Liang, Y.Y., Srirattana, K., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.\***. 2012. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Cryobiology* 65: 151-156. (IF=1.587; เป็น Correspondence)
- Liang, Y., Rakwongrit, D., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R.\*** 2012. Cryopreservation of immature buffalo oocytes: Effects of cytochalasin B pretreatment on the efficiency of cryotop and solid surface vitrification methods. *Anim. Sci. J.* 83: 630-638. (IF=0.96; เป็น Correspondence)
- Putkhao, K., Kocerha, J., Cho, I.K., Yang, J.J., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S\*. 2012. Pathogenic cellular phenotypes are germline transmissible in a transgenic primate model of Huntington's Disease. *Stem Cell Dev.* 22: 1198-1205. (IF=3.727)
- Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M\* and **Parnpai, R.\***. 2012. Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin a treatment. *Cell Rerogram.* 14: 248-257. (IF=1.788; เป็น Correspondence)
- Takeda, K\*, Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Kaneda, M., Tasai, M., Nirasawa, K., Pinkert, C.A., **Parnpai, R.** and Nagai, T. 2012. Influence of intergeneric/interspecies mitochondrial injection; parthenogenetic development of bovine oocytes after injection of mitochondria derived from somatic cells. *J. Reprod. Dev.* 58: 323-329. (IF=1.515)
- Ye, D.N., Tanthanuch, W., Thumanu, K., Sangmalee, A., **Parnpai, R.\*** and Heraud, P\*. 2012. Discrimination of functional hepatocytes derived from mesenchymal stem cells using FTIR microspectroscopy. *Analyst* 135: 4774-4784. (IF=4.107; เป็น Correspondence)

## 2011

- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T. and **Parnpai, R.\***. 2011. The effects of manipulation medium and recipient cytoplasm on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos. *J. Reprod. Dev.* 57: 385-392. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

- Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M\*. 2011. A simple method for production and purification of soluble and biological activity recombinant human leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 151: 295-302. (IF=2.871)
- Kunkanjanawan, T., Noisa, P\*. and **Parnpai, R\***. 2011. Modeling neurological disorders by human induced pluripotent stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 350131. (IF=3.169; เป็น Correspondence)
- Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and **Parnpai, R\***. 2011. *In vitro* development of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 75: 1652-1660. (IF=1.798; เป็น Correspondence)
- Liang Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R\***. 2011. Effects of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Domestic Anim.* 46: e67-e73. (IF=1.515; เป็น Correspondence)
- Lorthongpanich, C\*, Chuti Laowtammathron, C. and **Parnpai, R\***. 2011. From microsurgery to single blastomere culture: conventional and novel methods for ES cell establishment. *Thai J. Vet. Med.* 41: 11-22. (IF=0.123; เป็น Correspondence)
- Parnpai, R.**, Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S. and Ketudat-Cairns, M. 2011. Somatic cell cloning for livestock and endangered species. *Thai J. Vet. Med* Suppl. 41: 77-85. (IF=0.123; เป็น Correspondence)
- Rattanasuk, S., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M\*. 2011. Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. *J. Reprod. Dev.* 57: 539-542. (IF=1.515)
- Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Tasai, M., Tagami, T., Nirasawa, K., Nagai, T., Kanai, Y., **Parnpai, R.** and Takeda, K\*. 2011. Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. *Anim. Sci. J.* 82: 236-243. (IF=0.96)
- Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R\***. and Heraud, P\*. 2011. Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cells derived hepatocytes using Synchrotron FTIR microspectroscopy. *J. Biomed. Optics* 16: 057005-1. (IF = 2.859; เป็น Correspondence)