รักษินีย์ คำมานิตย์ 2550: ผลของการลดซีรั่ม การเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่และสารเคมีต่อวงจรชีวิตเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสผิวหนังสุนัข. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์) สาขากายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิงศิริรักษ์ จันทครุ, Ph.D. 79 หน้า

วงจรชีวิตเซลล์ของเซลล์ต้นแบบและวิธีการในการเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะเดียวกันเป็นปัจจัยสำคัญ และมีผลต่อความสำเร็จของการโคลนนิ่งสุนัข วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อการศึกษาผลของการเหนี่ยวนำให้เซลล์ dermal fibroblast ของสุนัขให้อยู่ในระยะเดียวกันของวงจรชีวิตเซลล์ โดยการเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงที่ลดซีรั่ม (serum starvation) เลี้ยงให้เซลล์เจริญจนเต็มพื้นที่ (culture to confluence) และการใช้สารเคมี (chemical inhibitor) ได้แก่ roscovitine, aphidicolin และ colcemid เก็บตัวอย่างผิวหนังบริเวณหน้าท้องจากสุนัขในระหว่างการทำหมัน แล้วแยก dermal fibroblast ออกจากผิวหนัง แล้วเลี้ยงเซลล์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและใช้ในการทดลองระหว่าง passages 2 ถึง 6 ผลการทดลองพบว่า การเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงที่ลดซีรั่ม (0.5% fetal bovine serum) เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 เท่ากับ 88.4 ± 1.3, 90.9 ± 1.4 และ 90.3 ± 2.2 ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (73.6 ± 3.5 เปอร์เซ็นต์) และใกล้เคียงกับการเลี้ยงให้เซลล์เจริญจนเต็มพื้นที่ (91.7 ± 3.5 เปอร์เซ็นต์) การเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงที่มี roscovitine พบว่าไม่สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในระยะ G0/G1 ได้ แต่กลับเพิ่มเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์เมื่อใช้ roscovitine ที่ความเข้มข้น 30 μM และ 45 μM (11.0 ± 11.0 และ 16.2 ± 12.4 ตามลำดับ) การใช้ aphidicolin สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G1/S ได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ aphidicolin เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่เข้าสู่ระยะ G1/S จะเพิ่มขึ้นโดยไม่เพิ่มเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ การใช้ colcemid ที่มีความเข้มข้น 0.1 μg/ml สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M เพิ่มขึ้นเป็น 38.5 ± 8.7 เปอร์เซ็นต์ ขณะเดียวกันเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในระยะ G0/G1 กลับลดลง (51.4 ± 8.2 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ colcemid มากกว่า 0.1 μg/ml กลับไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M เพิ่มขึ้น ผลการทดลองนี้ชี้ว่า สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ dermal fibroblast ของสุนัขให้อยู่ในระยะเดียวกันของวงจรชีวิตเซลล์ได้ ซึ่งจะมีประโยชน์มากในการทำการทดลองการโคลนนิ่งสุนัข

Ruksinee Khammanit 2007: Effects of Serum Starvation, Cell Confluency and Chemical Inhibitors on Cell Cycle of Canine Dermal Fibroblast. Master of Science (Veterinary Anatomy), Major Field: Veterinary Anatomy, Department of Anatomy. Thesis Advisor: Assistant Professor Sirirak Chantakru, Ph.D. 79 pages.

The cell cycle stage of donor cells and the method of cell cycle synchronization are important factors influencing the success of somatic cell nuclear transfer. The objective of this study was to examine the cell cycle characteristics of canine dermal fibroblasts cultured under various conditions: serum starvation, culture to confluence and treated with chemical inhibitors, roscovitine, aphidicolin and colchicine. Canine dermal fibroblasts were isolated from skin samples obtained from the abdominal region of bitches during routine ovariohysterectomy. Cells were cultured and used for this experiment between passages 2 and 6 of culture. By short periods of 24, 48 and 72 h of serum starvation significantly increased ($P<0.05$) the percentages of cells at the G0/G1 phase to 88.4 ± 1.3, 90.9 ± 1.4 and 90.3 ± 2.2, respectively, which was similar to culture to confluency ($91.7 \pm 3.5\%$). Treatment with different concentrations of roscovitine did not increase the proportion of G0/G1 cells, on the other hand, it significantly increased the percentage of cells that underwent apoptosis at concentrations of 30 (10.9 ± 10.9) and 45 μM (16.2 ± 12.4). Using aphidicolin led to increase percentages of cells at the G1/S transition in a dose-dependent manner without increasing of apoptosis. Colchicine at a concentration of 0.1 μg/ml significantly increased ($P < 0.05$) the proportion of cells at the G2/M phase (38.5%), on the other hand, it significantly decreased the proportions of G0/G1 cells (51.4%). However higher concentrations of colcemid above 0.1 μg/ml did not increase the percentage of G2/M phase cells. These results indicate that canine dermal fibroblasts can be effectively synchronized at various stages of the cell cycle, which could have benefits for somatic cell nuclear transfer in this species.