



วิทยานิพนธ์

ผลของการลดซีรั่ม การเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่และสารเคมี
ต่อวงจรชีวิตเซลล์ ของเซลล์ไฟโบรบลาสผิวหนังสุนัข

**EFFECTS OF SERUM STARVATION, CELL CONFLUENCY
AND CHEMICAL INHIBITORS ON CELL CYCLE OF CANINE
DERMAL FIBROBLAST**

นางสาวรัชกษิณีย์ คำมานิตย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. ๒๕๕๐



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์

กายวิภาคศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของการลดซีรัม การเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่และสารเคมี ต่อวงจรชีวิตเซลล์ ของ
เซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังสุนัข

Effects of Serum Starvation, Cell Confluency and Chemical Inhibitors on Cell Cycle of
Canine Dermal Fibroblast

นามผู้วิจัย นางสาวรัชชิณีย์ คำมานิตย์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิงศิริรักษ์ จันทกรู, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิงวรรณดา สุจริต, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จำเนียร สายขุน, ป.ร.ด.)

กรรมการ

(อาจารย์กนกทิมาณี พันธุ์วิเชียร, วท.ค.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ธีระศักดิ์ พรพวงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของการลดซีรัม การเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่และสารเคมี ต่อวงจรชีวิตเซลล์
ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังสุนัข

Effects of Serum Starvation, Cell Confluency and Chemical Inhibitors on Cell Cycle of
Canine Dermal Fibroblast

โดย

นางสาวรัชกษิณี คำมานิตย์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2550

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สพ.ญ. ศิริรักษ์ จันทกรู ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และให้กำลังใจ ให้ความรู้ในการศึกษา การวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สพ.ญ. วรณดา สุจริต กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก แห่งสาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.ดร. กันทิมาณี พันธุ์วิเชียร กรรมการวิชาการของสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาการความรู้อันเป็นพื้นฐานในการทำงานวิจัย รวมถึงให้คำแนะนำ แนวทางการคิดอันเป็นสิ่งบันดาลใจให้ข้าพเจ้าทำงานวิจัยจนสำเร็จ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. จำเนียร สายขุน กรรมการที่ปรึกษาพิเศษ แห่งสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนการทำงานวิจัย ให้คำปรึกษาแนะนำในการปฏิบัติงานวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูลแปลผลทางสถิติ รวมถึงตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา ที่ให้ความเอื้อเฟื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณ กองควบคุมโรคพิษสุนัขบ้า กรุงเทพมหานคร โรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และคลินิกโรคสัตว์คณะเทคนิคการสัตวแพทยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รวมถึงสัตวแพทย์และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องในการเก็บตัวอย่างผิวหนังเพื่อใช้ในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

รักษิณีย์ คำมานิตย์

กันยายน 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	28
วิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	34
ผล	34
วิจารณ์ผล	53
สรุปและข้อเสนอแนะ	58
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	59
ภาคผนวก	76
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	79

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะต่างๆ ของวงจรชีวิตเซลล์ และเปอร์เซ็นต์การตาย หลังการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์	40
2	แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในวงจรชีวิตเซลล์ระยะ G0/G1, S, G2/M และเปอร์เซ็นต์การตาย หลังจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 โดยวิธีการลดปริมาณซีรัม (ซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์) ในเวลาต่างๆ และการเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่	43
3	แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ G0/G1, S, G2/M และ เปอร์เซ็นต์การตาย โดยการใช้สาร roscovitine ที่ความเข้มข้นต่างๆ	46
4	แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ G0/G1, S, G2/M และ เปอร์เซ็นต์การตาย ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G1/S โดยการใช้สาร aphidicolin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	49
5	แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ G0/G1, S, G2/M และ เปอร์เซ็นต์การตาย ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ G2/M โดยการใช้สาร colcemid ที่ความเข้มข้นต่างๆ	52

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพวาดแสดงองค์ประกอบของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า	5
2	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงเซลล์ dermal fibroblast ที่พบในชั้นหนังแท้	8
3	แสดงการเจริญของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็นเซลล์ปกติ	9
4	แผนผังแสดงวงจรชีวิตเซลล์ซึ่งประกอบด้วยระยะ G0, G1(A), G1(B), S, G2 และ M	10
5	การควบคุมการเกิดวงจรชีวิตเซลล์ในระยะต่างๆ ในระยะ G1 ถูกควบคุมโดย cyclinD และ Cdk4, 5 ระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S ถูกควบคุมโดย cyclinE และ Cdk2 ระยะ S ถูกควบคุมโดย cyclinA และ Cdk2 จากนั้นระยะ S เข้าสู่ระยะ G2 และระยะ M ถูกควบคุมโดย cyclinB และ Cdk1	16
6	แผนผังแสดงปริมาณดีเอ็นเอในเซลล์ระยะต่างๆ เซลล์ระยะ G0/G1 ประกอบด้วยดีเอ็นเอเป็น 1 เซต (1X) เซลล์ระยะ S มีดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1 และ 2 เซต เซลล์ระยะ G2/M มีดีเอ็นเอเป็น 2 เซต (2X)	18
7	แสดงกราฟปริมาณดีเอ็นเอในเซลล์ระยะต่างๆ	19
8	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดง dermal fibroblast วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงแบบ primary explant	36
9	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงแบบ primary explant	36
10	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast ซึ่งเจริญจนเต็มพื้นที่ในวันที่ 4-5 ของการเพาะเลี้ยงแบบ primary explant	36
11	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast ในวันที่ 6-7 ของการเพาะเลี้ยงแบบ primary explant	36
12	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast ที่มีแขนงของเซลล์แผ่ออกและเกาะพื้นผิวของจานเลี้ยงในวันที่ 6-7 ของการเพาะเลี้ยงแบบ primary explant	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ใน passage ที่ 3 ลักษณะของเซลล์เป็นรูปกระสวย เซลล์มีขนาดใกล้เคียงกัน มีการยื่นแขนงเพื่อยึดเกาะพื้นผิวในการเจริญแบ่งตัว	38
14	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast อยู่ใน passage ที่ 7 ที่เซลล์บางเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ประชากรของเซลล์มีหลายขนาดปะปนกัน	38
15	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast ใน passage ที่ 8 เซลล์ dermal fibroblast ส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่และเล็กปนกัน และเซลล์ที่มีขนาดใหญ่จะไม่มีส่วนแขนงของเซลล์	38
16	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast ใน passage ที่ 9 เซลล์ที่มีขนาดใหญ่และเซลล์ที่มีขนาดเล็กจะไม่มีส่วนของแขนงที่ยื่นออกมายึดเกาะพื้นผิว ทำให้มองเห็นเป็นช่องว่างระหว่างเซลล์จำนวนมาก	38
17	กราฟแสดงปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอของเซลล์ dermal fibroblast ในระยะ G0/G1 (M1), S (M2), G2/M (M3) และเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ (M4) ในการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ (กลุ่มควบคุม)	39
18	กราฟแสดงปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอของเซลล์ dermal fibroblast ในระยะ G0/G1 (M1), S (M2), G2/M (M3) และเปอร์เซ็นต์การตาย (M4) ในการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์และการเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่	42
	A. การเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่ (confluent)	
	B. กลุ่มที่ได้รับปริมาณซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	
	C. กลุ่มที่ได้รับปริมาณซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	
	D. กลุ่มที่ได้รับปริมาณซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	กราฟแสดงปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอของเซลล์ dermal fibroblast ในระยะ G0/G1 (M1), S (M2), G2/M (M3) และเปอร์เซ็นต์การตาย (M4) ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 โดยการใช้สาร roscovitine A. กลุ่มที่ได้รับ roscovitine ที่ความเข้มข้น 5 μM B. กลุ่มที่ได้รับ roscovitine ที่ความเข้มข้น 15 μM C. กลุ่มที่ได้รับ roscovitine ที่ความเข้มข้น 30 μM D. กลุ่มที่ได้รับ roscovitine ที่ความเข้มข้น 45 μM	45
20	กราฟแสดงปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอของเซลล์ dermal fibroblast ในระยะ G0/G1 (M1), S (M2), G2/M (M3) และเปอร์เซ็นต์การตาย (M4) ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S โดยการใช้สาร aphidicolin A. กลุ่มที่ได้รับ aphidicolin ที่ความเข้มข้น 1 μM B. กลุ่มที่ได้รับ aphidicolin ที่ความเข้มข้น 2.5 μM C. กลุ่มที่ได้รับ aphidicolin ที่ความเข้มข้น 5.0 μM D. กลุ่มที่ได้รับ aphidicolin ที่ความเข้มข้น 10 μM	48
21	กราฟแสดงปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอของเซลล์ dermal fibroblast ในระยะ G0/G1 (M1), S (M2), G2/M (M3) และเปอร์เซ็นต์การตาย (M4) ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M โดยการใช้สาร colcemid A. กลุ่มที่ได้รับ colcemid ที่ความเข้มข้น 0.1 μg/ml B. กลุ่มที่ได้รับ colcemid ที่ความเข้มข้น 0.25 μg/ml C. กลุ่มที่ได้รับ colcemid ที่ความเข้มข้น 0.5 μg/ml D. กลุ่มที่ได้รับ colcemid ที่ความเข้มข้น 1.0 μg/ml	51

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

DMEM	=	Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS	=	Fetal bovine serum
PBS	=	Phosphate buffer saline
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
EDTA	=	Ethylene diamine tetraacetic acid
PI	=	Propidium iodide
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
RNA	=	Ribonucleic acid
HCl	=	Hydrochloric acid
NaOH	=	Sodium hydroxide
μM	=	Micromole
μm	=	Micrometer
μg	=	Microgram
CO_2	=	Carbon dioxide

ผลของการลดซีรั่ม การเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่และสารเคมี ต่อวงจรชีวิตเซลล์ ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังสุนัข

Effects of Serum Starvation, Cell Confluency and Chemical Inhibitors on Cell Cycle of Canine Dermal Fibroblast

คำนำ

Dermal fibroblast เป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อประสานที่ผลิตเส้นใยนอกเซลล์ (extracellular fiber) และสารพื้นฐาน (ground substance) (Hedman *et al.*, 1979) พบที่ผิวหนังชั้นหนังแท้ เมื่อถูกด้วยกล้องจุลทรรศน์เซลล์มีลักษณะเป็นเซลล์ยาว แบน (กรรณิกา, 2546) ในสภาวะที่เกิดบาดแผล dermal fibroblast สามารถแบ่งตัว ผลิตเส้นใยคอลลาเจน โดยทำงานร่วมกับเซลล์ keratinocyte ของชั้นหนังกำพร้าเพื่อจำลองตัวเองทำหน้าที่เป็น artificial skin แทนผิวหนังบริเวณที่เสียหาย (Booth *et al.*, 1980, Butler, 2004) เซลล์ dermal fibroblast จากการเพาะเลี้ยง ยังคงมีความสามารถในการเจริญไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ ได้ ด้วยคุณสมบัติการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วจึงมีการนำ dermal fibroblast มาผลิตเป็น cell line ใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาด้านต่างๆ อย่างแพร่หลาย (Watson *et al.*, 2004) ปัจจุบัน dermal fibroblast ของสุนัขที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ สามารถนำมาใช้ตรวจสอบผลกระทบของสารเคมี หรือสมุนไพรต่อเซลล์ผิวหนัง รวมถึงการทดลองเกี่ยวกับปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคในผิวหนังสุนัข เช่น การขาดสารอาหาร และปรสิต เป็นต้น (Fray *et al.*, 2004)

การทำให้เซลล์อยู่ในระยะเดียวกัน (cell synchronization) เป็นการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะใดระยะหนึ่งในวงจรชีวิตเซลล์ที่ต้องการ เช่น การเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 ด้วยการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรั่ม 0.5 เปอร์เซ็นต์ หรือใช้สาร roscovitine การเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G1/S ด้วยสาร aphidicolin และการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M ด้วยสาร colcemid เป็นต้น โดยทั่วไปการทำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 นิยมทำ 3 วิธีคือ วิธีที่หนึ่งคือการทำให้เซลล์อยู่ในระยะพักโดยการลดปริมาณซีรั่ม (serum starvation) วิธีที่สองคือการเลี้ยงเซลล์ให้เต็มพื้นที่ (cell confluent) วิธีที่สามคือการใช้สาร roscovitine การลดปริมาณซีรั่มเพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 ควรใช้เวลาไม่เกิน 48 ชั่วโมง ตามที่มีรายงานในหนูและคน (Rawson *et al.*, 1991, Lindenboim *et al.*, 1995, Mills *et al.*, 1997, Ruhl *et al.*, 1999) และในสุกร (Kues *et al.*,

2000) แต่เซลล์ fibroblast ของโค และสุกร หลังจากผ่านการลดปริมาณซีรัมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการอยู่รอดของเซลล์ต่ำและทำให้ดีเอ็นเอแตก (Gibbons *et al.*, 2002)

การเหนี่ยวนำเซลล์ให้เข้าสู่ระยะ G0/G1 ของวงจรชีวิตเซลล์ มีประโยชน์ด้านเทคโนโลยีการโคลนนิ่งและการย้ายฝากตัวอ่อน วงจรชีวิตเซลล์มีผลต่อการเจริญของตัวอ่อน (Wilmut *et al.*, 1997, Cibelli *et al.*, 1998, Vignon *et al.*, 1998) พบว่าเซลล์ในระยะ G0/G1 เป็นระยะที่ทำให้ตัวอ่อนของสัตว์มีอัตราการเจริญดี (Urakawa *et al.*, 2004, Hayes *et al.*, 2005)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำเซลล์ dermal fibroblast ให้เข้าสู่ระยะ G0/G1 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบการเหนี่ยวนำโดยวิธีการเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่ (cell confluent) และการใช้สาร roscovitine
2. เพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำเซลล์ dermal fibroblast ให้เข้าสู่ระยะ G1/S ด้วยสาร aphidicolin
3. เพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำเซลล์ dermal fibroblast ให้เข้าสู่ระยะ G2/M ด้วยสาร colcemid

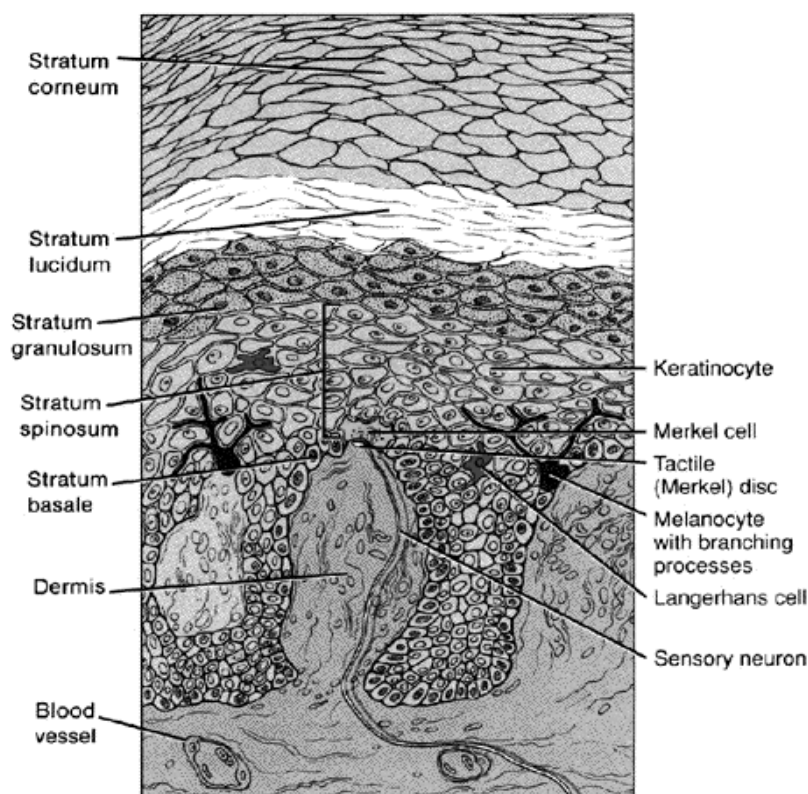
การตรวจเอกสาร

1. Dermal fibroblast

Dermal fibroblast เป็นเซลล์ที่พบในชั้นหนังแท้ของผิวหนัง (กนกธร, 2546, กรรณิกา, 2546) ผิวหนังมีลักษณะแตกต่างกันตามแต่ละส่วนของร่างกาย ผิวหนังประกอบด้วย 3 ชั้น คือ ชั้นหนังกำพร้า, ชั้นหนังแท้ และชั้นใต้ผิวหนัง

ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) เป็นชั้นที่ปกคลุมอยู่บนสุด มีต้นกำเนิดมาจาก surface ectoderm ชั้นนี้ประกอบไปด้วย เซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ เจริญเติบโตพัฒนาการ และตายลอกหลุดออกไปจากร่างกายตลอดเวลา และเป็นชั้นที่ให้กำเนิดโครงสร้างต่างๆ ได้แก่ ขน รูขุมขน ต่อมไขมัน ต่อมเหงื่อ เล็บ ชั้นหนังกำพร้า มีความหนาโดยเฉลี่ยประมาณ 0.4 ถึง 1.5 มิลลิเมตร แต่ความหนาของชั้นหนังกำพร้านี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณของร่างกาย ทำให้สามารถแบ่งผิวหนังตามความหนาของชั้นหนังกำพร้าได้เป็น 2 ชนิด คือ thick skin เป็นผิวหนังที่มีชั้นหนังกำพร้าหนา โดยเฉพาะชั้น stratum corneum พบบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้า ซึ่ง thick skin นี้ไม่มี ขน รูขุมขน และ ต่อมไขมัน arrector pili อยู่แต่มีต่อมเหงื่อเป็นจำนวนมาก ดังนั้นบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้าของร่างกาย จึงไม่พบเส้นขนหรือน้ำมันจากต่อมไขมัน (sebum) เหมือนบริเวณอื่นของร่างกาย ส่วน thin skin คือ ผิวหนังที่มีชั้นหนังกำพร้าบาง พบได้ทั่วร่างกายยกเว้น บริเวณฝ่ามือ ฝ่าเท้า ซึ่งผิวหนังชนิดนี้มี skin derivative ทุกชนิดเช่น รูขุมขน ต่อมไขมัน และต่อมเหงื่อ เป็นต้น

องค์ประกอบส่วนใหญ่ของชั้นหนังกำพร้า คือ เซลล์ keratinocyte มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ส่วนน้อยที่เรียกว่า dendritic cell เซลล์กลุ่มนี้มีไซโทพลาซึม ยื่นออกไปจากเซลล์เหมือนแขนขา (dendritic process) เป็นเซลล์ที่เดินทางมาจากตำแหน่งอื่นมาอาศัยอยู่ที่ผิวหนัง (immigrant cell) ประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิด คือ melanocyte, merkel cell และ langerhans cell (กนกธร, 2546, กรรณิกา, 2546) ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ภาพวาดแสดงองค์ประกอบของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า

ที่มา : Tortora and Gerard (1996)

ชั้นหนังกำพร้า แบ่งออกเป็นชั้นต่างๆ ดังนี้

1. Stratum germinativum หรือชั้น basal cell layer เป็นชั้นที่อยู่ล่างสุด มี basal lamina ขีดชั้นนี้ติดกับชั้นหนังแท้ ที่อยู่ด้านล่าง ชั้นนี้ประกอบไปด้วย basal cell ที่เรียงตัวกันชั้นเดียว รูปร่างเซลล์เป็น columnar มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ เซลล์มีไซโทพลาซึมค่อนข้างหนาแน่น เนื่องจากมีเส้นใย keratin นอกจากนี้ยังมี ribosome จำนวนมากแต่มี rough endoplasmic reticulum (RER) และ mitochondria น้อย ส่วน golgi apparatus มีขนาดเล็ก เป็นชั้นที่มีการเจริญเติบโตของหนังกำพร้า โดยมีการแบ่งเซลล์ขึ้นไปทดแทนเซลล์ชั้นบนๆ อย่างต่อเนื่อง การเปลี่ยนแปลงจาก basal cell กลายเป็น keratinocyte เริ่มจาก basal cell แบ่งตัวให้กำเนิด keratinocyte ที่มีลักษณะคล้ายหนามแหลมยื่นออกมาเรียงตัวกันหนาประมาณ 5-10 ชั้น เรียกผิวหนังชั้นนี้ว่า stratum spinosum จากนั้นเซลล์จะสร้าง keratin (keratinization) เก็บไว้ใน granule จึงเรียกเซลล์นี้ว่า granular cell ซึ่งกระบวนการตั้งแต่ basal cell แบ่งตัวผ่านกระบวนการ keratinization จนสมบูรณ์ก็กลายเป็น corneocyte ใช้เวลาประมาณ 14 วัน

2. Stratum spinosum (squamous cell layer) ประกอบด้วยเซลล์ keratinocyte เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ มีรูปร่างหลายเหลี่ยม ลักษณะคล้ายมีหนามยื่นออกมาจากผิวเซลล์ ชั้นนี้ประกอบด้วยเซลล์เรียงตัวกันหนาประมาณ 5-10 ชั้น โดยเซลล์ที่อยู่ติดกับชั้น basal cell มากที่สุด เป็นเซลล์ที่มีอายุน้อยกว่าเซลล์ที่อยู่ด้านบน มีรูปร่างหลายเหลี่ยม นิวเคลียสรูปร่างกลม ส่วนเซลล์ที่อยู่ด้านบน (upper spinous cell layer) มีขนาดใหญ่กว่าแบนราบมากกว่า และมีการสร้าง lamella granule พบมากบริเวณใกล้ golgi apparatus จากนั้นจะหลั่งออกนอกเซลล์ไปเป็นไขมันที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์

3. Stratum granulosum (granular cell layer) เป็นชั้นเซลล์ที่มีรูปร่างแบนเรียงตัวกัน 3-5 ชั้น ภายในไซโทพลาซึมมี basophilic granule บรรจุอยู่เป็นจำนวนมาก granule นี้มีชื่อเฉพาะว่า keratohyaline granule เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะเห็นเป็นจุดๆ สีน้ำเงินกระจายอยู่ในเซลล์ จนบดบังโครงสร้างอื่นๆ นอกจากนี้ granular cell ยังสร้างโปรตีนชนิดอื่นที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการ keratinization ได้แก่ profilaggrin, keratin, intermediate filament, loricrin

4. Stratum corneum ประกอบด้วยเซลล์ corneocyte หรือ cornified cell ซึ่งเปลี่ยนมาจาก granular cell เมื่อเปลี่ยนเป็น corneocyte เซลล์มีลักษณะคล้ายร่างแหเนื่องจากเซลล์เกิดการหดตัวภายในเซลล์ไม่มีออร์แกเนลล์ใดๆ มีแต่ keratin ที่สมบูรณ์แล้ว (mature keratin) เซลล์ในชั้นนี้มีขนาดใหญ่ที่สุดในชั้นหนังกำพร้า เมื่อ desmosome ถูกทำลาย เป็นการเริ่มกระบวนการลอกหลุดของเซลล์ออกไปเป็นขี้ไคล ความหนาบางของผิวหนังชั้นนี้แตกต่างกันในแต่ละบริเวณของร่างกาย thick skin มีชั้น corneum หนา พบที่บริเวณฝ่ามือฝ่าเท้า นอกจากนี้ยังมีชั้น stratum lucidum เพิ่มขึ้นอีก 1 ชั้น ส่วนผิวหนังที่เป็น thin skin มีชั้น corneum บาง และชั้น granular cell layer บางด้วย เซลล์ในชั้นนี้มีหน้าที่ปกป้องผิวจากอันตรายภายนอก (mechanical protection) ป้องกันการสูญเสียน้ำไปจากผิวหนัง และเป็นด่านผ่านทางของยาหรือสารจากภายนอก

5. Stratum lucidum เป็นชั้นบางๆ แทรกอยู่ระหว่างชั้น granular cell layer และ stratum corneum พบเฉพาะบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้าเท่านั้น เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเห็นเป็นแถบชั้นบางๆ มีสีชมพูจาง เนื่องจากสาร glycolipid ที่ปล่อยออกมาอยู่ระหว่างเซลล์ (กนกธร, 2546, กรรณิกา, 2546)

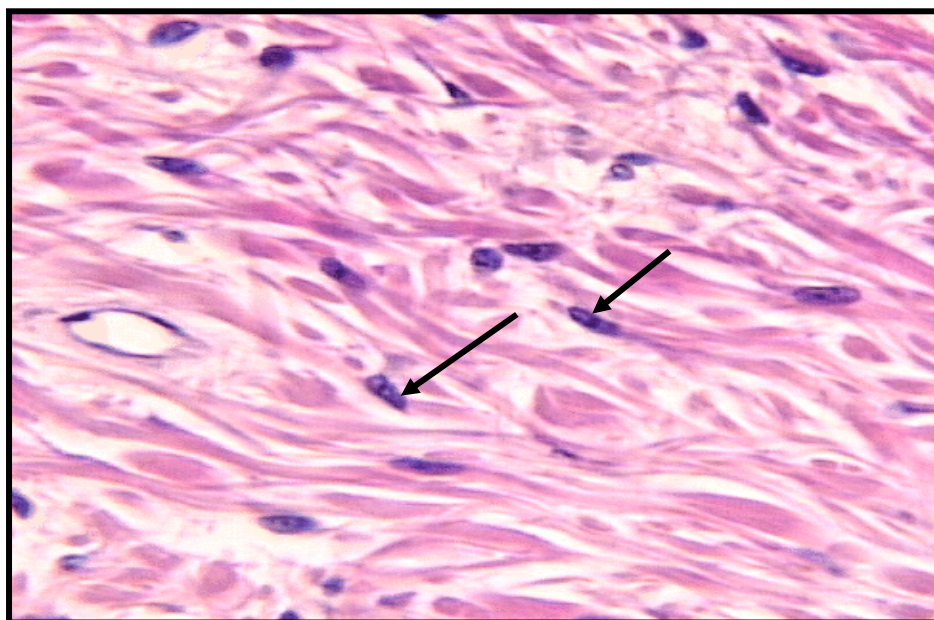
ชั้นหนังแท้ (dermis หรือ corium) เป็นชั้นที่อยู่ใต้ชั้นหนังกำพร้า หนังแท้มีความหนาแตกต่างกันในแต่ละบริเวณของร่างกาย ได้แก่ หนังกตา อกอวัยวะและหนังหุ้มปลายอวัยวะมีชั้นหนัง

เท้าบาง ส่วนฝ่ามือและฝ่าเท้ามีชั้นหนังเท้าหนา มีต้นกำเนิดจาก mesoderm ประกอบด้วยเนื้อเยื่อประสาณชนิดแน่นทึบ (dense connective tissue) หลอดเลือด และเส้นประสาท เป็นที่อยู่ของ fibroblast, macrophage, mast cell และเซลล์เม็ดเลือดเช่น lymphocyte และ plasma cell เป็นต้นหน้าที่ของชั้นหนังเท้าคือ ทำให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น ทนแรงยืดผิวหนังได้ ปกป้องร่างกายจากอันตราย อุ่นน้ำไว้เพื่อจุดประสงค์ในการควบคุมสมดุลความร้อนของร่างกาย และเป็นประสาทรับสัมผัสต่างๆ เนื้อเยื่อประสาณของหนังเท้ามีองค์ประกอบหลักคือเส้นใยคอลลาเจน ส่วนน้อยเป็นเส้นใยอีลาสติก และสาร amorphous ground substance ได้แก่ glycoprotein, proteoglycan, glycosaminoglycans ชั้นหนังเท้าแบ่งได้เป็น 2 ชั้น ตามความแตกต่างของเนื้อเยื่อประสาณ และองค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ papillary dermis เป็นชั้นที่อยู่ติดกับชั้นหนังกำพร้า ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจน ขนาดเล็ก เป็นคอลลาเจน type III และเส้นใยอีลาสติก เรียงตัวตั้งฉากกับชั้นหนังกำพร้า พบเซลล์ fibroblast จำนวนมาก เซลล์ชนิดนี้มีความสามารถในการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว และมีระดับเมแทบอลิซึมสูงมาก เพื่อประโยชน์ในการซ่อมแซมบาดแผล ส่วนชั้น reticular dermis เป็นชั้นที่อยู่ใต้ papillary dermis และต่อกับชั้นใต้ผิวหนัง (hypodermis) ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจน type I, type II และเส้นใยอีลาสติก ในชั้นหนังเท้าส่วนที่ต่อกับชั้น hypodermis มีหลอดเลือดน้อยกว่าชั้น papillary dermis ชั้น reticular dermis นี้สามารถแบ่งย่อยลงไปได้อีกเป็น 2 ชั้นคือ upper zone อยู่ชั้นบนใต้ papillary dermis ประกอบด้วยมัดของเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสติกเรียงตัวตามแนวอนก่ายกันไปมา ส่วน deeper zone อยู่ชั้นล่างสุดติดกับ hypodermis เป็นชั้นที่มีมัดเส้นใยคอลลาเจน และ เส้นใยอีลาสติกขนาดใหญ่ และมีเซลล์ fibroblast จำนวนมาก (กนกธร, 2546, กรรณิกา, 2546)

เนื้อเยื่อชั้นใต้ผิวหนัง (hypodermis หรือ subcutaneous layer) เป็นชั้นที่อยู่ต่อจากชั้นหนังเท้า ประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อประสาณชนิด loose connective tissue มีส่วนของต่อมเหงื่อ เส้นใยคอลลาเจน เส้นใยอีลาสติก ที่ต่อเนื่องลงมาจากชั้นหนังเท้าและเซลล์ไขมัน (fat หรือ adipose cell) และพบผมหรือขนที่กำลังงอก เซลล์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผิวหนังชั้นนี้คือเซลล์ไขมันซึ่งอยู่รวมกันเป็นพู แต่ละพูกั้นด้วย fibrous septa พบหลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง เส้นประสาท อยู่ใน septa นี้ด้วย ความหนาของชั้น hypodermis ขึ้นอยู่กับความหนาของชั้นไขมัน และขึ้นอยู่กับการกระจายตัวของร่างกาย เช่น บริเวณหน้าท้องจะหนามาก แต่บริเวณเปลือกตาหรือ penis จะบางมาก ผิวหนังชั้นนี้ทำหน้าที่รักษาความร้อนของร่างกายไว้ เป็นแหล่งสะสมพลังงานของร่างกาย ป้องกันการกระทบกระเทือน และทำให้ผิวหนังเคลื่อนไหวได้ไม่ติดแน่นกับโครงสร้างด้านใต้ผิวหนัง (กนกธร, 2546, กรรณิกา, 2546)

2. ลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast

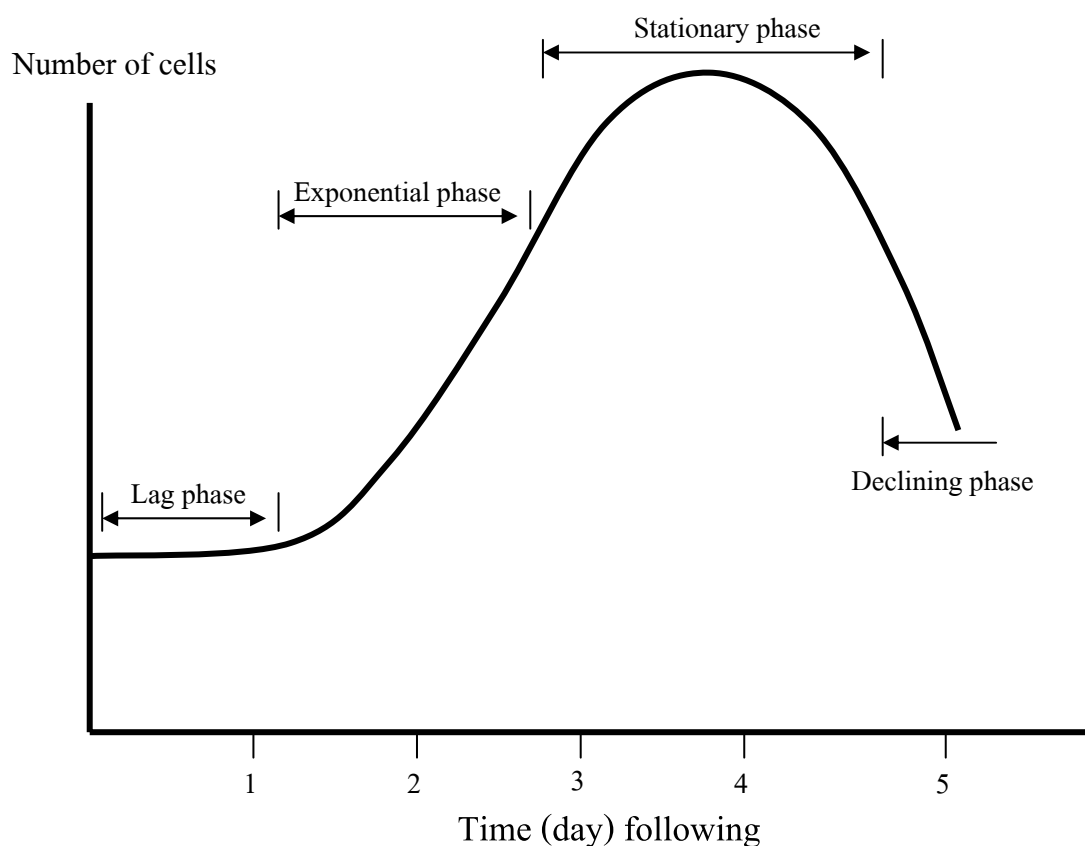
Dermal fibroblast เป็นเซลล์รูปกระสวย (ภาพที่ 2) อาจพบลักษณะที่เป็นแอ่งคล้ายดาวจึงเรียกว่า stellate shaped cell มีแขนงของเซลล์ยาว นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ รูปรีหรือกลม และเป็นชนิด vesicular type มีนิวคลีโอลัสเห็นเด่นชัด ไซโทพลาซึมติดสี basophilic หน้าที่ของ dermal fibroblast คือสร้าง tropocollagen ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเส้นใยคอลลาเจน และสารตั้งต้นของเส้นใย reticular เส้นใยอีลาสติก และ ground substance ได้แก่ glycoprotein, proteoglycan, glycosaminoglycans (กรรณิกา, 2546) dermal fibroblast ที่เจริญเต็มที่ และหยุดการแบ่งตัว กลายเป็นเซลล์ fibrocyte มีนิวเคลียสรี ลักษณะเป็น heterochromatin ไซโทพลาซึมติดสี acidophilic (Booth *et al.*, 1980) การทำงานของ dermal fibroblast เกิดขึ้นในสภาวะที่เกิดบาดแผล dermal fibroblast สามารถแบ่งตัว แล้วผลิตเส้นใยคอลลาเจนและอีลาสติกเพื่อซ่อมแซมผิวหนังส่วนที่เสียหาย (Cooper *et al.*, 1991) เมื่อนำเซลล์ dermal fibroblast มาเพาะเลี้ยง พบว่ายังคงมีความสามารถในการสร้างเส้นใยคอลลาเจน เส้นใยอีลาสติก และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้แก่ เซลล์ keratinocyte (Watson *et al.*, 2004)



ภาพที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงเซลล์ที่พบในชั้นหนังแท้ แสดงเซลล์ dermal fibroblast (ลูกศร)

ที่มา : King (2002)

เมื่อนำ dermal fibroblast มาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ต้องเกาะกับผิวของภาชนะจึงจะมีการแบ่งตัว (Freshney, 2000) การยึดเกาะพื้นผิวของเซลล์ fibroblast นั้นมีโปรตีนที่ช่วยในการยึดเกาะอยู่ในไซโทพลาซึมติดกับผิวเซลล์เรียกว่า stress fiber ประกอบด้วย actin filament, alpha-actinin, vinculin และ talin ที่ปลายของ stress fiber นี้จะจับกับส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณที่เรียกว่า focal adhesion ยึดอยู่กับโปรตีน integrin ซึ่งเป็น transmembrane protein ทำหน้าที่ยึดระหว่าง stress fiber ในไซโทพลาซึมและตัวรับใน extracellular matrix เช่น collagen, fibronectin, และ laminin เป็นต้น (ถัดมา, 2547) นอกจากนี้การเกาะของเซลล์กับพื้นผิวยังขึ้นอยู่กับประจุบวกบนผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ซึ่งจะจับกับประจุลบบนผิวเซลล์ และปริมาณโปรตีนช่วยเกาะที่อยู่ในซีรัมหรือเคลือบอยู่บนผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ เมื่อเกาะผิวแล้วเซลล์จะแบ่งตัวเจริญกลุ่มพื้นผิวภาชนะไปเรื่อยๆ จนกระทั่งอาหารหรือภาชนะถูกปกคลุมด้วยเซลล์ทั้งหมด (ถัดมา, 2547) การเจริญของ dermal fibroblast ที่อยู่ในสภาวะการเพาะเลี้ยงประกอบด้วยระยะ lag phase, log phase (exponential proliferation), stationary phase และ decline phase (ภาพที่ 3)



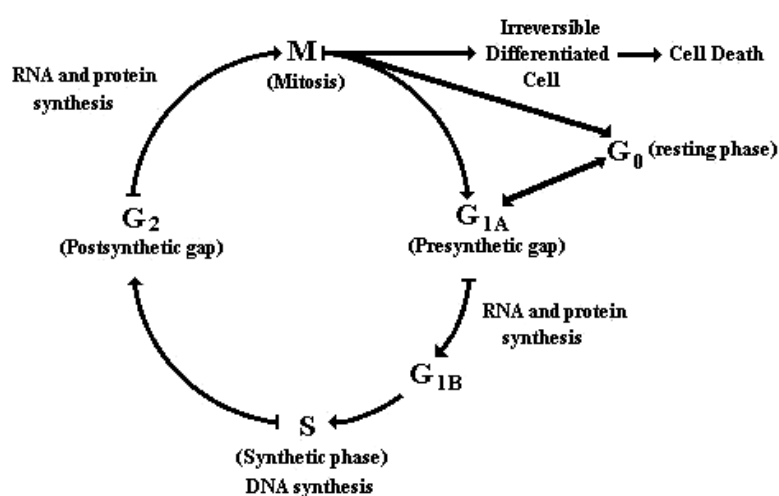
ภาพที่ 3 แสดงการเจริญของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็นเซลล์ปกติ

ที่มา : ดัดแปลงจาก Oswald *et al.* (1944)

เมื่อถ่ายเซลล์ไปเลี้ยงในภาชนะใหม่ เซลล์จะเข้าสู่ lag phase เนื่องจากเซลล์ยังไม่พร้อมที่จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ระยะนี้จึงเป็นระยะพักที่เซลล์เตรียมพร้อมในการเข้าสู่ระยะถัดไป หลังจากนั้นเมื่อเซลล์ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ เซลล์จะแบ่งตัวเพื่อเข้าสู่ exponential phase ซึ่งกินเวลานาน 2-10 วัน ขึ้นอยู่กับปริมาณพื้นที่ว่างบนผิวภาชนะที่เซลล์จะเจริญได้ และขึ้นกับปริมาณอาหารและคุณสมบัติเฉพาะของเซลล์ที่สามารถให้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด (saturation density) ช่วงที่เซลล์อยู่ใน exponential phase เป็นช่วงที่เซลล์แข็งแรงที่สุด และเหมาะต่อการใช้ศึกษาเซลล์ในแง่มุมต่างๆ เช่น ผลกระทบของสารต่อการเจริญของเซลล์ การทำงานของเซลล์ เป็นต้น เมื่อสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ลดลง เช่น ปริมาณพื้นที่ว่างหรือสารอาหารลดลง หรือมีการสะสมของของเสียที่เป็นพิษมากขึ้น เช่น กรดแลคติกและแอมโมเนีย จำนวนเซลล์โดยรวมจะไม่เพิ่มขึ้น เนื่องจากสัดส่วนของเซลล์ที่แบ่งตัวและสัดส่วนที่เซลล์ตายมีค่าใกล้เคียงกัน เรียกระยะของเซลล์ช่วงนี้ว่า stationary phase ในระยะนี้จะสามารถหาความหนาแน่นสูงสุดของเซลล์ได้ ต่อมาเมื่ออัตราการตายของเซลล์สูงกว่าอัตราการแบ่งตัวจะทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ decline phase และจำนวนเซลล์จะค่อยๆ ลดลง (กัลยาณี, 2547)

3. วงจรชีวิตเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian cell cycle)

เซลล์มีการสร้างขึ้นใหม่ผ่านกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ที่เรียกว่า วงจรชีวิตเซลล์ (cell cycle) ในแต่ละวงจรมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์จากหนึ่งเป็นสอง และมีระยะพัก คือ ไม่มีการแบ่งตัว เรียกว่า “quiescence stage” หรือ “resting stage” หรือ G₀ (G = Gap) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แผนผังแสดงวงจรชีวิตเซลล์ประกอบด้วยระยะ G₀, G₁(A), G₁(B), S, G₂ และ M
ที่มา : ปัญจะ (2549)

วงจรชีวิตเซลล์ ประกอบด้วย 3 ระยะ คือ ระยะก่อนแบ่งเซลล์ หรือ ระยะอินเตอร์เฟส (interphase) ระยะแบ่งเซลล์ (mitosis) ระยะแบ่งเซลล์สามารถแยกออกเป็นสองระยะคือ ช่วงแบ่งนิวเคลียส (mitosis หรือ karyokinesis) ซึ่งประกอบด้วยระยะ prophase, prometaphase, metaphase, anaphase และ telophase และ ช่วงแบ่งไซโทพลาซึม (cytokinesis) และระยะพัก (quiescence stage หรือ G0 phase)

1. ระยะก่อนแบ่งเซลล์ (interphase) เป็นช่วงที่ยาวที่สุดในวงจรชีวิตเซลล์ เป็นช่วงที่มีการเตรียมสะสมวัตถุดิบที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารต่างๆ รวมทั้งการสร้างออร์แกเนลล์ (organelle) มีการจำลองแบบดีเอ็นเอ และเพิ่มโครโมโซมจาก 1 เป็น 2 ช่วงเวลาที่อยู่ในระยะอินเตอร์เฟสแตกต่างกันตามชนิดของเซลล์ เซลล์ของสัตว์ที่กำลังเติบโตและต้องการการเพิ่มจำนวน เซลล์ระยะอินเตอร์เฟสจะมีการเตรียมพร้อมในการแบ่งเซลล์เสมอ ส่วนเซลล์ประสาทและเซลล์กล้ามเนื้อระยะอินเตอร์เฟสจะอยู่ในสภาพหยุดนิ่งจึงทำให้เซลล์ไม่มีการแบ่งตัว ระยะอินเตอร์เฟสประกอบด้วยระยะ G1, S และ G2 ดังนี้

ระยะ G1 (first gap หรือ presynthetic gap) พบหลังการแบ่งเซลล์สิ้นสุดลง เป็นระยะที่ช่วงก่อนที่จะมีการจำลองแบบโครโมโซมขึ้นมาใหม่ นิวเคลียสในระยะนี้มีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับเซลล์ร่างกายทั่วไป ระยะ G1 สามารถแบ่งออกเป็นระยะย่อยได้คือ G1A เป็นระยะที่เซลล์มีการเตรียมพร้อมสำหรับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีน (RNA and protein synthesis) ที่จำเป็นสำหรับการจำลองดีเอ็นเอ และ G1B เป็นระยะที่เกิดกระบวนการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีนที่จำเป็นสำหรับกิจกรรมในระยะ S เช่น histone ทั้งห้าชนิดคือ H1 H2A H2B H3 H4 แต่มี histone ที่สังเคราะห์ใน G1 เพียง 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งส่วนใหญ่สังเคราะห์ในระยะ S และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ เป็นต้น ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนมีขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน ได้แก่ การถอดรหัสดีเอ็นเอ (transcription) และการแปลรหัสดีเอ็นเอ (translation) ในกระบวนการ transcription ดีเอ็นเอที่เป็นข้อมูลทางพันธุกรรมจะถูกถอดแบบออกมาเป็นรหัสที่เรียกว่า pre-mRNA แล้วถูกเปลี่ยนเป็น mRNA ด้วยกระบวนการ RNA processing ก่อนที่จะออกจากนิวเคลียสไปอยู่ในไซโทพลาซึม จากนั้นในกระบวนการ translation รหัสในโมเลกุล mRNA จะถูกแปลความหมายออกมาเป็นโปรตีนโดย tRNA กระบวนการนี้เกิดขึ้นบนไรโบโซมในไซโทพลาซึม (ลัดดา, 2547, Alberts *et al.*, 1994)

ระยะ S (synthesis) เป็นระยะตั้งแต่เซลล์เริ่มมีการจำลองดีเอ็นเอจนเสร็จสิ้นเป็น 2 เท่า การจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA replication) เริ่มต้นด้วยเอนไซม์เฮลิเคส (helicase) ทำหน้าที่สลายพันธะไฮโดรเจน (H-bond) เพื่อให้เกลียวคู่ของดีเอ็นเอแยกออกจากกัน จากนั้นจะมีเฮลิคัสตีสเทบิลไลซิงโปรตีน (helix destabilizing protein) เข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวเพื่อป้องกันไม่ให้กลับคืนเป็นเกลียวคู่อีก และมีเอนไซม์ดีเอ็นเอไจเลส (DNA gyrase) ทำหน้าที่คลายปมเหนือจุดแยก (replication fork) โดยการตัดสายหนึ่งของดีเอ็นเอออก เพื่อทำให้เกิดการคลายเกลียวและคลายปม แล้วจึงทำหน้าที่ต่อจุดที่ตัดนั้นกลับเข้าไปดังเดิม บริเวณที่โป่งออกของสายดีเอ็นเอนั้นจะเป็นจุดเริ่มการจำลองโมเลกุล (initiation point) โดยมีเอนไซม์ไพรมาส (primase) สร้างสายอาร์เอ็นเอเริ่มต้น (RNA primer) จากนั้นดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 3 (DNA polymerase III) ทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลายด้าน 3'-OH ของสายอาร์เอ็นเอเริ่มต้นในทิศทาง 5' -> 3' ตามทิศทางของการคลายเกลียว โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดิมเป็นแม่แบบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ยาวตลอด เป็นสายลีดดิ้ง (leading strand) สำหรับโพลีนิวคลีโอไทด์สายใหม่อีกสายหนึ่งไม่สามารถสร้างต่อเนื่องกันเป็นสายยาวตลอดไปได้ เพราะทิศทางการสร้างสวนกับทิศทางการคลายเกลียวของโมเลกุลเดิมของดีเอ็นเอ จึงมีการสร้างโพลีนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ขึ้นมาก่อนแล้วจึงมาต่อกันเป็นสายยาว เพื่อให้ทิศทางการสร้างเป็นแบบ 5' -> 3' เช่นกัน เรียกสายนี้ว่าสายแลกกิง (lagging strand) โพลีนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ นี้ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1,000 ถึง 2,000 นิวคลีโอไทด์ เรียกโพลีนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ นี้ว่าโอคาซากิแฟรกเมนต์ (Okazaki fragment) หลังจากนั้นเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 1 (DNA polymerase I) ตัดสายอาร์เอ็นเอเริ่มต้นออก และเติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3'-OH ของสายโอคาซากิแฟรกเมนต์ จนกระทั่งเหลือช่องว่างเฉพาะปลาย 3'-OH และ 5'-PO₄ หรือที่เรียกว่า นิก (nick) เท่านั้น สุดท้ายเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) จะเชื่อมปลาย 3'-OH และ 5'-PO₄ เข้าด้วยกันด้วยพันธะเอสเตอร์ (ester bond) จะได้ดีเอ็นเอสายยาวตลอดสาย เมื่อการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอเสร็จสิ้น โครโมโซม 1 แท่งประกอบด้วย 2 sister chromatid ยึดติดกันด้วยเซนโทรเมียร์ (centromere) จึงมีจำนวนดีเอ็นเอเป็น 2 เท่าของปกติ (ประดิษฐ์, 2546) นอกจากนี้ในต้นระยะ S ยังมีการสังเคราะห์โปรตีนฮิสโตน และนอนฮิสโตน ซึ่งเพิ่มมากขึ้นในขณะที่มีการจำลองดีเอ็นเอ โปรตีนฮิสโตนจึงพบสูงมากตลอดช่วงระยะ S หลังจากนั้นฮิสโตนทั้งแปดโมเลกุลมารวมกับดีเอ็นเอได้เป็นนิวคลีโอโซม (ลัดดา, 2547, Alberts *et al.*, 1994)

ระยะ G2 (second gap) เป็นระยะก่อนที่จะเริ่มการแบ่งนิวเคลียส ในระยะนี้นิวเคลียสมีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เท่าของเซลล์ร่างกาย เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะสังเกตเห็นนิวเคลียสได้ชัดเจน ภายในนิวเคลียสมี 1 หรือ 2 nucleoli มีเส้นใยโครมาตินบางและยาวซึ่งในช่วงนี้ได้มีการ

จำลองตัวเองเรียบร้อยแล้ว ระยะนี้เซลล์มีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีนที่จำเป็นในการแบ่งเซลล์ มีการสังเคราะห์ฮิสโตนประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ มีการจำลองเซนโทรโซม (centrosome) เป็น 2 เท่า ภายในเซนโทรโซม มีเซนทริโอล (centriole) 1 คู่ และมีไมโครทิวบูล (microtubule) ยื่นออก การจำลองเซนทริโอลจะเกิดขึ้นที่ปลายระยะ G2 ไปจนถึงระยะ prophase เสร็จสิ้นระยะอินเตอร์เฟสจึงมีเซนทริโอล 4 อัน เมื่อเข้าสู่ระยะ prophase เซนทริโอลจะแยกออกจากกันไปอยู่ที่ขั้วเซลล์ทั้งสองข้าง (ลัคดา, 2547, Alberts *et al.*, 1994)

2. ระยะแบ่งเซลล์ ประกอบด้วย ช่วงแบ่งนิวเคลียส (mitosis) และช่วงแบ่งไซโทพลาซึม (cytokinesis) ช่วงแบ่งนิวเคลียสแบ่งออกเป็นระยะย่อยได้ 4 ระยะ ตามลำดับ คือ

Prophase ระยะนี้นิวคลีโอลัส และเยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มสลายไป โครโมโซมขดตัวสั้นเป็นคู่ชิดกันที่เซนโทรเมียร์ เซนทริโอลแยกไปคนละขั้ว ไมโครทิวบูลที่เป็นส่วนประกอบของสายใยสปินเดิลจะมาจากเซนโทรโซม ระยะนี้มีการเพิ่มโปรตีนทิวบูลิน (tubulin) ที่ปลายบวก ขณะที่ปลายลบยังติดอยู่กับเซนโทรโซม สายใยสปินเดิลที่ยื่นออกมาแผ่กระจายอยู่โดยรอบในแนวรัศมีเรียกว่า aster microtubule และ มีการสร้างเส้นใยสปินเดิล 2 ชนิดได้แก่ polar microtubule และ kinetochore microtubule ซึ่ง polar microtubule จะเป็นเส้นใยที่โยงไประหว่างขั้วของเซนโทรโซม เส้นใยจากทั้งสองขั้วนี้จะซ้อนกันตรงกลางเซลล์ ทำหน้าที่ดึงขั้วแยกออกจากกัน ส่วน kinetochore microtubule เป็นเส้นใยที่ยึดติดกับโปรตีน kinetochore ที่บริเวณเซนโทรเมียร์ ช่วยในการเคลื่อนที่ของโครโมโซม ในปลายระยะ prophase เยื่อหุ้มนิวเคลียสจะแยกตัวเป็นถุง (membrane vesicle) ทำให้เส้นใยสปินเดิลผ่านเข้าไปบริเวณนิวเคลียสของระหว่างขั้วได้ และนิวคลีโอลัสแตกตัวเป็นเม็ดเล็กๆ จนหายไป

Metaphase โครโมโซมเรียงตัวกลางเซลล์ เกิดจากเซนโทรโซมเคลื่อนไปอยู่ที่ขั้วของเซลล์ ตรงข้ามกับ kinetochore microtubule ดึงโครโมโซมให้มาเรียงอยู่ตรงกลาง โดยเซนโทรเมียร์ มาเรียงกันในแนว metaphase plate หรือ equatorial plate ตั้งฉากกับแนวของเส้นใยสปินเดิล

Anaphase โครมาทิดของแต่ละโครโมโซมถูกดึงแยกออกจากกันไปคนละขั้วของเซลล์ ซึ่งเกิดจากการหดตัวของเส้นใยสปินเดิล

Telophase โครมาทิดทำหน้าที่เป็นโครโมโซมของเซลล์ใหม่ เป็นระยะที่โครโมโซมใหม่แต่ละสายเคลื่อนที่เข้าสู่แต่ละขั้วของเซลล์ และเริ่มคลายตัวกลายเป็นโครมาติน ในขณะที่เดียวกันเกิดเยื่อหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบโครโมโซมทั้งสองชุด เกิดเป็น 2 นิวเคลียส ซึ่งต่างก็มีองค์ประกอบและคุณสมบัติเหมือนกัน (ลัดดา, 2547, Alberts *et al.*, 1994)

ช่วงแบ่งไซโทพลาซึม (cytokinesis) เป็นการแบ่งไซโทพลาซึมให้แก่เซลล์ที่แบ่งตัวใหม่ทั้งสองเซลล์ โดยการทำงานของ microfilament จากแรงหดตัวของ actin และ myosin ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แยกออกจากกัน หลังจากนั้นจะได้เซลล์สองเซลล์ที่เหมือนกันทุกประการ วงจรชีวิตเซลล์ที่มีการแบ่งตัวจะขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ และสภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น อาหาร อุณหภูมิ ระดับความเป็นกรด-ด่างและปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น โดยปกติเซลล์จะอยู่ในระยะ G1 ประมาณ 12 ชั่วโมง อยู่ในระยะ S ประมาณ 6 ถึง 8 ชั่วโมง อยู่ในระยะ G2 ประมาณ 3 ถึง 6 ชั่วโมง และอยู่ในระยะ mitosis ประมาณ 30 นาที (Pardee *et al.*, 1978, Baserga, 1984, Darzynkiewicz, 1992)

3. ระยะพัก (quiescence stage หรือ G0 phase) เซลล์อยู่ในระยะพักตัว ไม่มีการแบ่งตัว แต่พร้อมที่จะเข้าสู่ระยะ G1 เซลล์อาจจะอยู่ในระยะดังกล่าวได้นานเป็นวัน เป็นสัปดาห์ หรืออาจนานเป็นปีก็ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ เซลล์ที่อยู่ในระยะ G0 ได้แก่ เซลล์ไต ตับ ตับอ่อน ในภาวะปกติจะอยู่ในระยะ G0 เมื่อมีการเสื่อมสลายไปของของเซลล์เดิม จะมีการกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนทดแทนเซลล์เดิม ส่วนเซลล์ประสาท เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และเซลล์กล้ามเนื้อลาย อยู่ในระยะ G0 ไปตลอด เมื่อเซลล์ตายหรือถูกทำลายไปจึงไม่มีการงอกของเซลล์ใหม่ ปัจจัยที่ทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ G0 คือ การขาดสารอาหาร และ growth factor ที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ (Alberts *et al.*, 1994)

4. การควบคุมวงจรชีวิตเซลล์ (cell cycle regulation) เซลล์แต่ละชนิดมีแบบแผนของวงจรชีวิตเซลล์แตกต่างกัน เช่น เซลล์ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า keratinocyte เซลล์บุผิวหนัง ช่องปาก ช่องคลอด เซลล์บุผนังลำไส้ เซลล์ของต่อมไทรอยด์ เซลล์บุทางเดินปัสสาวะ แบ่งตัวได้อย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์เหล่านี้จะมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลาเพื่อทดแทนเซลล์ชนิดเดียวกันที่เสื่อมสลายไป เซลล์ดับแบ่งตัวเมื่อเกิดการเสียหายของเนื้อเยื่อ เซลล์ประสาทและเซลล์กล้ามเนื้อไม่แบ่งตัวเลย เป็นต้น กลไกการแบ่งตัวของเซลล์ควบคุมโดย growth factor ในซีรัมหรือเซลล์สร้างขึ้นเอง การทำงานของ growth factor ต่างๆ จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญเติบโต นอกจากนั้นแล้วยังมีปัจจัยอื่นที่มีส่วนควบคุมการแบ่งเซลล์ เช่น สารกระตุ้นการเจริญและฮอร์โมนที่เรียกว่า mitogen กระตุ้นเซลล์ให้เข้าสู่

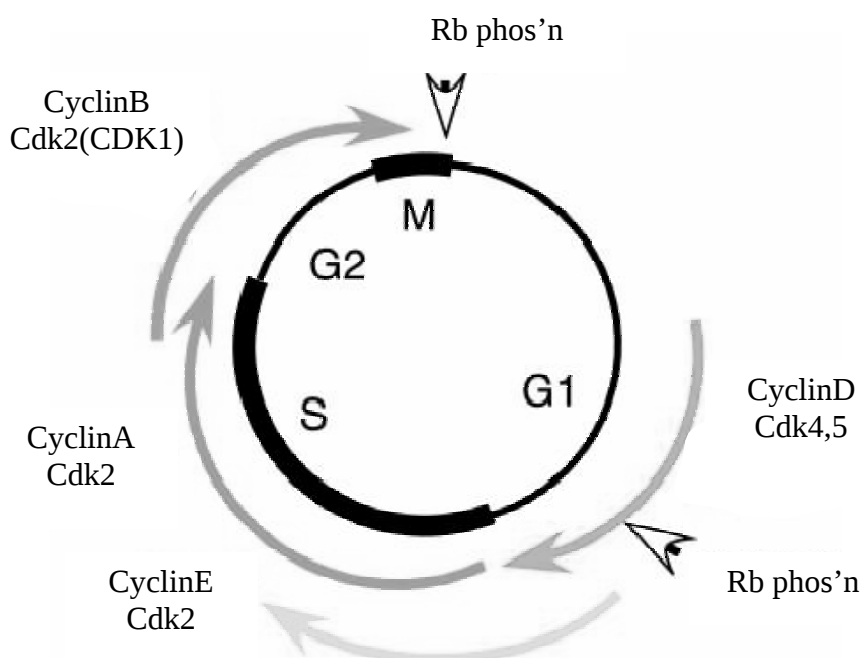
กระบวนการแบ่งเซลล์ได้ หรือขึ้นกับความต้องการยึดเกาะพื้นผิว และความหนาแน่นของเซลล์ซึ่งจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พบว่าเซลล์ต้องสัมผัสกับพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยง จากการสัมผัสจะส่งสัญญาณผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และโครงร่างของเซลล์ ทำให้เซลล์แบ่งตัวและเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นมากจะหยุดการแบ่งเซลล์ (ลัดดา, 2547, Alberts *et al.*, 1994)

5. กลไกการควบคุมวงจรชีวิตเซลล์ ขั้นตอนต่างๆ ของวงจรชีวิตเซลล์ถูกควบคุมโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์และโปรตีน เอนไซม์เหล่านี้เรียกว่า cyclin-dependent kinase (Cdk) เอนไซม์เหล่านี้จะทำงานได้เมื่อรวมอยู่กับ cyclin เท่านั้น cyclin เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในระยะอินเตอร์เฟส การเข้าคู่กันระหว่าง cyclin และ Cdk เรียกว่า Cdk-complex (CdkC) (Morgan, 1995)

ปัจจุบันเชื่อว่าวงจรชีวิตเซลล์ควบคุมด้วยการทำงานของโปรตีน cyclin ร่วมกับเอนไซม์ Cdk เรียกการควบคุมนี้ว่า checkpoint ซึ่งช่วยให้เซลล์สามารถตรวจหาและแก้ไขความผิดปกติในแต่ละกระบวนการก่อนที่จะผ่านเข้าสู่กระบวนการต่อไปได้ และหากแก้ไขไม่ได้ก็ทำลายตนเองไปโดยกระบวนการ apoptosis (Darzynkiewicz *et al.*, 1992, 2001) เอนไซม์ Cdk จะทำงานได้ต้องจับกับโปรตีน cyclin จากนั้นสารประกอบที่เกิดขึ้นระหว่าง cyclin และ Cdk จะร่วมกันทำหน้าที่ผลักดันกระบวนการควบคุมที่ถดถอยไปโดยการเติมฟอสเฟต (phosphorylation) ให้แก่โปรตีนเป้าหมาย การจับกันของ cyclin และ Cdk ผลักดันให้เซลล์ก้าวสู่ระยะต่างๆ ในวงจรชีวิตเซลล์ โดยเมื่อผ่านระยะหนึ่งแล้ว Cdk ของระยะนั้นๆ จะกลับสู่สภาพ inactive เนื่องจากโปรตีน cyclin ในแต่ละระยะจะถูกทำลายไปในกระบวนการ degradation โดยเอนไซม์ proteasome (Darzynkiewicz *et al.*, 1996)

จากการทดลองแสดงให้เห็นเกี่ยวกับ กลไกการควบคุมการเกิดวงจรชีวิตเซลล์ว่าขึ้นอยู่กับการทำงานของ growth factor ที่เรียกว่า maturation promoting factor (MPF) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ protein kinase ที่ทำงานโดยการเกิดปฏิกิริยาการเติมฟอสเฟตที่สารเป้าหมาย ปัจจุบันเชื่อว่าโปรตีน Cdk และ cyclin หมดความสามารถในการทำงานได้ ต้องมีการทำลายหรือสลายไปของโปรตีน cyclin (นวพรรณ, 2550) จึงมีผู้ศึกษาและพิสูจน์หาระดับโปรตีน cyclin ที่เกิดขึ้นในวงจรชีวิตเซลล์ และพบว่าระดับของ cyclin ต่างชนิดกันนั้นมีการเพิ่มขึ้นและลดลงในระยะต่างๆ ของวงจรชีวิตเซลล์ กล่าวคือพบว่า cyclinB มีระดับสูงมากในระยะ mitosis และ ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อออกจากระยะ mitosis ระดับ cyclinD สูงที่ระยะ G1 ตอนกลางจนถึงตอนปลายซึ่งเป็นจุดเริ่มต้น (start point) ของวงจรชีวิตเซลล์ ในขณะที่ cyclinE สูงขึ้นระหว่างระยะ G1/S และระดับ cyclinA เพิ่มขึ้นในระยะ S

และถึงระดับสูงสุดในระยะ G2/M ขณะที่ cyclinB นั้นสูงสุดในระยะ G2/M (Donjerkovic and Scott, 2000)



ภาพที่ 5 การควบคุมการเกิดวงจรชีวิตเซลล์ในระยะ G1 ถูกควบคุมโดย cyclinD และ Cdk4, 5 ระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S ถูกควบคุมโดย cyclinE และ Cdk2 ระยะ S ถูกควบคุมโดย cyclinA และ Cdk2 จากนั้นระยะ S เข้าสู่ระยะ G2 และระยะ M ถูกควบคุมโดย cyclinB และ Cdk1 ที่มา : Forsburg (2002)

การที่เซลล์เข้าสู่กระบวนการแบ่งตัวควบคุมโดยโปรตีนหลายชนิดซึ่งเปลี่ยนแปลงไปตามระยะต่างๆ ที่จุดเริ่มต้นระยะ G1 Wp transcription factor E2F จับกับ retinoblastoma (pRb) ซึ่งเป็นโปรตีนจาก tumor suppressor gene ทำให้การจำลองดีเอ็นเอไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เมื่อเซลล์สร้างโปรตีน cyclinD มากขึ้น โปรตีนนี้จะจับกับ Cdk4, 5 เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ ในช่วงระยะ G1 ตอนกลางและตอนปลาย (G1 mid-late) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้น (start point) ต่อมา cyclinE/Cdk2 ร่วมกับ cyclinD/Cdk4, 6 กระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ pRb ซึ่งทำให้ pRb ปลดปล่อย E2F ให้หลุดออกมาเพื่อไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ transcription ทำให้เซลล์สร้างโปรตีนต่างๆ ที่ใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ ในระยะ S cyclinE/Cdk2 ยังควบคุมการดำเนินไปของวงจรชีวิตเซลล์ โดยการสร้างโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ Cdk4 เช่น

โปรตีน p15, p16, p21 และ p57 เป็นต้น ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ควบคุมให้วงจรชีวิตเซลล์ดำเนินไปตามปกติ หากโปรตีนเหล่านี้ทำงานไม่สมบูรณ์ไม่สามารถควบคุมการแบ่งเซลล์ได้ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็ง การควบคุมการทำงานของ cyclinE/Cdk2 จะต่อเนื่องไปจนถึงระยะ S (Ford *et al.*, 2004)

ในระยะ S มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเกิดขึ้น cyclinA/Cdk2 จะควบคุมให้วงจรชีวิตเซลล์จะดำเนินต่อไปจนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเสร็จสิ้นและถูกต้อง หากเกิดความผิดพลาดในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอถูกทำลายจะกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน p53 ซึ่งจะไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนที่ทำให้กระบวนการต่างๆ หยุดชั่วคราว เพื่อให้เซลล์ได้ซ่อมแซมดีเอ็นเอหากมีความผิดพลาดมากหรือดีเอ็นเอถูกทำลายจนซ่อมไม่ได้ โปรตีน p53 จะชักนำให้เซลล์ตายโดยเข้าสู่กระบวนการ apoptosis (Stein and Pardee, 2004)

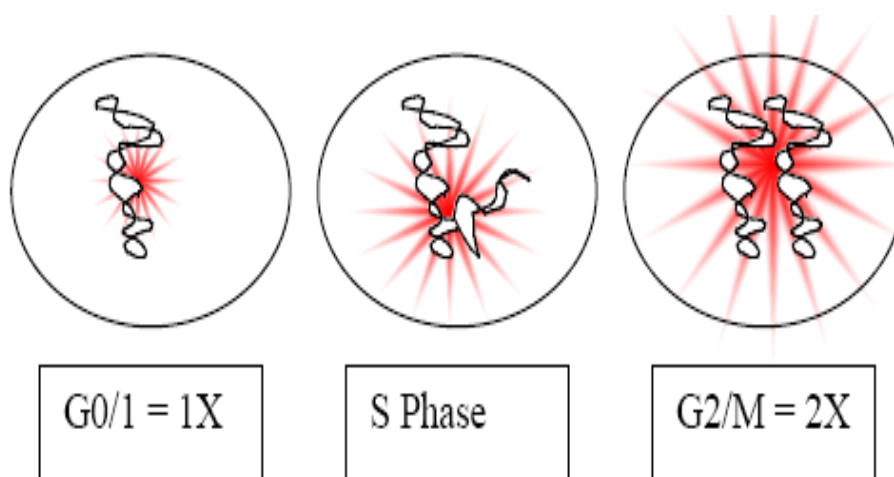
ในระยะ G2 เซลล์จะตรวจสอบความพร้อมก่อนเข้าสู่ระยะ mitosis ช่วงแรกโปรตีน cyclinA รวมกับโปรตีน Cell-division cycle (Cdc2) กระตุ้นให้วงจรชีวิตเซลล์ดำเนินต่อไป ซึ่งการทำงานของ complex นี้ถูกยับยั้งได้ด้วยโปรตีน p21, p27 และ p57 ในช่วงท้ายของระยะนี้ cyclinB และ Cdc2 รวมกันเป็น maturation promoting factor (MPF) และจะถูกดีฟอสเฟตออกด้วยเอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) มีผลกระตุ้นให้วงจรชีวิตเซลล์ดำเนินไปในระยะ mitosis ทำให้เกิดการขดตัวของโครโมโซม การสลายของเยื่อหุ้มนิวเคลียส รวมทั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล (Stein and Pardee, 2004)

6. การตรวจสอบวงจรชีวิตเซลล์ (cell cycle analysis)

1. การตรวจสอบหาระยะของวงจรชีวิตเซลล์ทำได้โดยการตรวจหาโปรตีนที่มีการผลิตจากเซลล์ในแต่ละระยะด้วยเทคนิค Immunohistochemistry : ได้แก่ การตรวจหาเซลล์ที่อยู่ในระยะแบ่งตัวโดยการตรวจหาโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นขณะที่เซลล์กำลังแบ่งตัวในระยะ G1 ได้แก่ proliferating cell nuclear antigen (PCNA) และ Ki-67 หรือการเติมสาร Bromodeoxyuridine (BrdU) ให้แก่เซลล์ ในช่วงระยะ G1 โดย cyclinD/Cdk4, 6 จะกระตุ้น PCNA ให้ทำงานเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ pRb มีผลทำให้ transcription factor กระตุ้นให้เกิดกระบวนการ transcription ในระยะ S (Darzynkiewicz *et al.*, 1996, Kasinathan *et al.*, 2001) วิธีนี้สามารถตรวจสอบองค์ประกอบที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ รวมถึงกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการ

ทำงานของเซลล์ได้อย่างเจาะจง เช่น กลไกการควบคุมการแบ่งเซลล์และ กระบวนการสร้างโปรตีน เป็นต้น (Memili *et al.*, 2004) ข้อด้อยของวิธีการนี้คือมีความซับซ้อนเนื่องจากกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์บางกระบวนการมีความเกี่ยวเนื่องกัน และแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละชนิด และระยะเวลาที่เกิดขึ้น

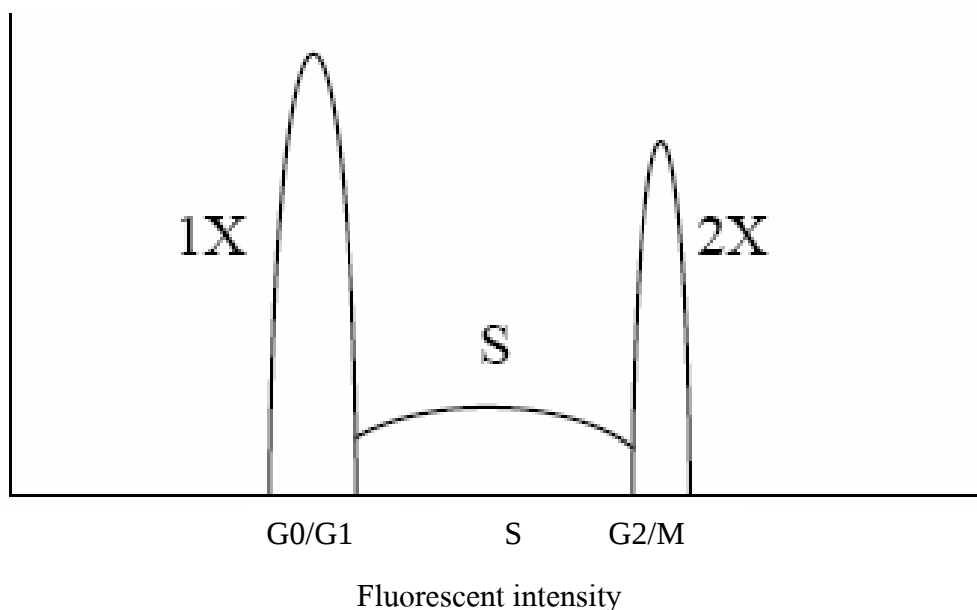
2. การตรวจหาสัดส่วนของเซลล์ในระยะของการแบ่งตัว โดยการหาปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี (flow cytometry) : วิธีการนี้เป็นการหาปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละเซลล์ เซลล์ที่ศึกษาจะถูกย้อมด้วยสียฟลูออเรสเซนซ์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอ ปริมาณการติดสียฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอในแต่ละเซลล์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อปริมาณดีเอ็นเอในเซลล์ ดีเอ็นเอมีปริมาณการติดสียฟลูออเรสเซนซ์เป็น 3 ลักษณะ คือ เซลล์ในระยะ G0/G1 ไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีลักษณะการติดสียฟลูออเรสเซนซ์เป็น 1 arbitrary unit (2C) เซลล์ในระยะ S เริ่มมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเกิดขึ้น มีลักษณะการติดสียฟลูออเรสเซนซ์เป็น intermediate คืออยู่ระหว่าง 1 arbitrary unit และ 2 arbitrary unit และเซลล์ในระยะ G2/M มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป็น 2 เท่า มีลักษณะการติดสียฟลูออเรสเซนซ์เป็น 2 arbitrary unit (4C) (Crissman and Steinkamp, 1973, Darzynkiewicz *et al.*, 1997, Krishan, 1975, Vielh *et al.*, 1991) ดังภาพที่ 6, 7



ภาพที่ 6 แผนผังแสดงปริมาณดีเอ็นเอในเซลล์ระยะต่างๆ เซลล์ระยะ G0/G1 มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 1 เซต (1X) เซลล์ระยะ S มีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1 และ 2 เซต เซลล์ระยะ G2/M มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เซต (2X)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Vielh *et al.* (1991)

Numbers of cells



ภาพที่ 7 แสดงกราฟปริมาณดีเอ็นเอในเซลล์ระยะต่างๆ

ที่มา: คัดแปลงจาก Vielh *et al.* (1991)

3. สียฟลูออเรสเซนซ์ที่นิยมใช้ได้แก่ Propidium iodide (PI) ทำงานโดยการเข้าจับกับ major groove ของ double-stranded DNA และ double-stranded RNA ให้สียฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นแสง 617 นาโนเมตร ซึ่งเป็นสีแดง (Crissman and Steinkamp, 1973, Krishan, 1975, Shankey *et al.*, 1993, Shackney and Shankey, 1999) Acridine Orange (AO) ใช้ในการย้อมดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอพร้อมกัน ให้แสงที่ความยาวคลื่นแสง 487 นาโนเมตรจะให้สีแดงและเขียว (Traganos *et al.*, 1977, Darzynkiewicz, 1990, 1992) Hoechst (Latt and Stetten, 1976, Shapiro, 1981) และ DAPI (4, 6-Diamidino-2-phenylindole) (Bigler, 1987, Latt, 1973) จะจับกับ AT-rich region ของดีเอ็นเอ สามารถให้สียฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นแสง 459 นาโนเมตร การนำวิธีการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอมาใช้ในการวิเคราะห์วงจรชีวิตเซลล์มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน แต่มีข้อด้อยคือ ไม่สามารถตรวจสอบกลไกการทำงานในวงจรชีวิตเซลล์ได้ (โกวิทย์, 2539, Gong *et al.*, 1993)

7. การแยกเก็บและการเลี้ยงเซลล์ dermal fibroblast

การเก็บตัวอย่างผิวหนัง : การเก็บตัวอย่างผิวหนังจากสัตว์ที่โตเต็มที่ เพื่อเพาะเลี้ยง dermal fibroblast สามารถเก็บได้จากผิวหนังบริเวณท้อง (Bratka-Robia *et al.*, 2002) หน้าแข้ง (Watson *et al.*, 2004) และบริเวณใบหู (Jang *et al.*, 2007) โดยวิธีการ biopsy ซึ่งเป็นวิธีการเก็บตัวอย่างที่มีข้อดีคือ ให้ยาระงับความรู้สึกเฉพาะบริเวณที่จะผ่าตัดได้ สัตว์รู้สึกตัวและฟื้นตัวเร็ว แผลหายภายใน 7-14 วันถ้าไม่มีการติดเชื้อแทรกซ้อน ในการเก็บผิวหนังบริเวณหน้าท้องชั้นของผิวหนังจะถูกแยกออกจากอวัยวะภายในช่องท้องด้วย superficial และ deep fascia รวมถึงชั้นกล้ามเนื้อที่เรียงตัวซ้อนทับกันในแต่ละด้าน ได้แก่ external abdominal oblique, internal abdominal oblique และ transversus abdominis (Evans, 2000) จึงสามารถแยกชั้นผิวหนังได้อย่างชัดเจน การเก็บตัวอย่างทำได้รวดเร็ว เช่น เก็บตัวอย่างพร้อมกับการผ่าตัดช่องท้องในการทำหมันเป็นต้น ส่วนผิวหนังบริเวณใบหูและหน้าแข้ง มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื่องจากประกอบด้วยชั้น epidermis และชั้น dermis ที่หนา แต่ชั้น hypodermis บาง เป็นบริเวณที่ไม่มีชั้นกล้ามเนื้อ และเป็นอวัยวะที่อยู่ในบริเวณที่สะดวกต่อการปฏิบัติ แต่มีข้อเสียคือ หากระหว่างการปฏิบัติงานไม่สะอาดเพียงพอ อาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อโรคขึ้นเนื้อที่จะนำไปเพาะเลี้ยงหรือส่งตัวสัตว์ได้ ขนาดของผิวหนังที่เหมาะสมคือ ยาว 6-8 มิลลิเมตร กว้าง 1-2 มิลลิเมตร (Freshney, 2000) การเก็บตัวอย่างผิวหนังอาจทำได้โดยการใช้เข็ม (fine needle aspiration biopsy หรือ FNAB) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน (Kurtycz *et al.*, 1998)

การแยกเซลล์ dermal fibroblast จากตัวอย่างผิวหนัง : ทำได้ 3 วิธี ดังนี้

1. การให้เซลล์เจริญเคลื่อนออกจากชิ้นเนื้อเยื่อผิวหนัง (primary explant) เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ที่มีการเจริญเคลื่อนที่ได้ดี ส่วนใหญ่ในการเลี้ยง dermal fibroblast มักนิยมใช้วิธีนี้ในการแยกเซลล์ โดยเริ่มจากนำเนื้อเยื่อมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แต่ละชิ้นมีขนาดกว้าง 1-2 มิลลิเมตร ล้างเซลล์ด้วย PBS ใส่ตัวอย่างใน flask สำหรับเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์และนำไปบ่มในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 สัปดาห์ หรือจนกว่าเซลล์จะเจริญแผ่กระจาย จนเต็มพื้นที่ การเลี้ยงเซลล์แบบนี้มีข้อดีคือ หากอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ มีอาหารและพื้นที่อุดมเกาะ เซลล์ที่เจริญส่วนใหญ่คือ fibroblast เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการเจริญแบ่งตัวแผ่กระจายไปตามพื้นผิวได้ดีกว่าเซลล์อื่นๆ จึงไม่เกิดการปนเปื้อนระหว่างเซลล์ที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อผิวหนัง เช่น keratinocyte และ adipose

cell เป็นต้น วิธีการดังกล่าวมีขั้นตอนไม่ซับซ้อน สะดวกต่อการปฏิบัติ แต่มีข้อด้อยคือ ใช้เวลานาน 2-3 สัปดาห์ ในการปล่อยให้เซลล์เจริญออกจากชั้นเนื้อเยื่อ และได้เซลล์ปริมาณน้อยเนื่องจากเซลล์จะค่อยๆ ออกจากชั้นเนื้อเยื่ออย่างช้าๆ เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย เนื่องจากผิวหนังเป็นอวัยวะที่อยู่ภายนอกและสัมผัสกับเชื้อต่างๆ ได้แก่ แบคทีเรีย รา อยู่ตลอดเวลา (Freshney, 2000)

2. การแยกโดยวิธีกล เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับเนื้อเยื่อที่โครงสร้างยึดระหว่างเซลล์ไม่ยึดติดกันแน่น นิยมใช้ตะแกรงโลหะ (sieve) ในการแยกเซลล์ โดยเริ่มจากนำเนื้อเยื่อมาบดบนตะแกรงบดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของช่องตะแกรง 100 ไมโครเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ หรือแยกองค์ประกอบต่างๆ ของเนื้อเยื่อออกจากเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาบดต่อในตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของช่องตะแกรง 20 ไมโครเมตร แล้วนำเซลล์ที่ได้มานับใน hemocytometer ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ วิธีนี้มีข้อดีคือสามารถแยกเซลล์ได้จำนวนมาก แต่มีข้อด้อยคือใช้ได้กับอวัยวะที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีโครงสร้างยึดติดกันแบบไม่หนาแน่น เช่น ตับและสมอง เป็นต้น วิธีนี้ไม่เหมาะกับการแยกเซลล์ dermal fibroblast ออกจากเนื้อเยื่อผิวหนัง เนื่องจากผิวหนังเป็นเนื้อเยื่อที่มีโครงสร้างระหว่างเซลล์ยึดติดกันอย่างหนาแน่น (Freshney, 2000)

3. การแยกโดยใช้เอนไซม์ เอนไซม์ที่นิยม ได้แก่ trypsin และ collagenase type III เป็นต้น เนื่องจากให้ผลดีกับเนื้อเยื่อทุกชนิด เอนไซม์ย่อยโปรตีนอื่นๆ อาจใช้ในการแยกเซลล์ ได้แก่ elastase, mucase และ papain เป็นต้น ส่วนเอนไซม์ที่นิยมใช้แยกเซลล์ dermal fibroblast คือ trypsin โดย การนำชิ้นเนื้อเยื่อมาหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก จากนั้นเติมเอนไซม์เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกัน โดยเอนไซม์จะทำลายโปรตีนที่ยึดระหว่างเซลล์ การทำงานของเอนไซม์อาจใช้เวลานานครึ่งชั่วโมงหรือข้ามคืนขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ จากนั้นนำมาปั่นให้เซลล์แยกออกจากกัน นำเซลล์ที่ได้เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำให้ได้ primary cell รวดเร็วภายใน 1-2 วัน และได้เซลล์ปริมาณมาก สามารถแยกเซลล์ที่ยึดเกาะกันอย่างแน่นหนาได้ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาอัตราการตาย และเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ได้ทันที แต่มีข้อด้อยคือ เอนไซม์เป็นอันตรายต่อเซลล์โดยทำลายโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ การแยกโดยใช้เอนไซม์จะได้ผลดีจึงจำเป็นต้องเลือกชนิดของเอนไซม์ และความเข้มข้น ให้เหมาะสมกับชนิดของเซลล์นั้นๆ (Freshney, 2000)

Dermal fibroblast ที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญแบ่งตัวแบบ mitosis ตามพื้นผิวของภาชนะเลี้ยงเซลล์ เซลล์ที่แบ่งตัวแล้วจะแผ่กระจายเป็นชั้นเดียว (monolayer) เซลล์จะไม่เจริญซ้อนแถวหรือก่ายกัน หากซ้อนทับกันจะเกิดการตายของเซลล์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยง dermal fibroblast อยู่

ระหว่าง 32 ถึง 40 องศาเซลเซียส ที่เหมาะสมที่สุดคือ 37 องศาเซลเซียส อาหารเลี้ยงเซลล์มี pH 7.2 ถึง 7.4 องค์ประกอบของอาหารมี กรดอะมิโน วิตามิน คาร์โบไฮเดรต growth factor, inorganic salt ไขมัน โปรตีน และจำเป็นต้องใช้ซีรัม เช่น fetal bovine serum เป็นต้น เพื่อเป็นแหล่งของ growth factor ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย (Butler, 2004)

8. การเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะเดียวกัน (cell synchronization)

การศึกษากลไกการควบคุมวงจรชีวิตเซลล์ จำเป็นต้องทำให้เซลล์อยู่ในระยะเดียวกัน ซึ่งการเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะเดียวกันมีประโยชน์ในการศึกษากลไกการทำงานของเซลล์ เช่น การแสดงออกของยีน (genes expression) และ protein phosphorylation เป็นต้น การทำให้เซลล์อยู่ในระยะเดียวกัน โดยทั่วไป นิยมทำ 3 วิธี วิธีที่หนึ่งคือการทำให้เซลล์อยู่ในระยะพักโดยการลดปริมาณซีรัม (serum starvation) วิธีที่สองคือการเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่ (cell confluent) วิธีที่สามคือการใช้สารเคมี (chemical treatment) ที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีนที่ใช้ในการแบ่งเซลล์

การลดปริมาณซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์ (serum starvation) : การลดปริมาณสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์จะทำให้เซลล์หยุดการแบ่งเซลล์ และผลักดันให้เซลล์เข้าสู่ระยะพักหรือระยะ G0 ดังนั้น ระยะเวลาการลดซีรัมจึงเป็นสิ่งสำคัญต่อการเจริญในระยะต่างๆ ของเซลล์ เซลล์อาจอยู่ในอาหารที่ไม่เติมซีรัม (serum free media) ได้นาน 12 ถึง 48 ชั่วโมง เซลล์จะออกจากระยะพักและมีการแบ่งตัวหากมีการเติมซีรัมหรือ growth factor ลงในอาหาร การลดซีรัมที่ยาวนานเกินไปทำให้เซลล์เสียหายและอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาภายในเซลล์รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น DNA fragmentation, caspase activation, chromatin condense และ cytoplasmic condensation เป็นต้น ส่งผลให้การเจริญของเซลล์หยุดชะงักซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ได้ (Hockenberry *et al.*, 1990, Hardy *et al.*, 2001, Ranger *et al.*, 2001, Stice *et al.*, 2000) มีรายงานการลดปริมาณซีรัมอย่างช้าๆ เพื่อให้เซลล์ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม โดยลดความเข้มข้นของ fetal bovine serum ในอาหารเลี้ยงเซลล์จาก 10 เปอร์เซ็นต์เป็น 5 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงลดปริมาณซีรัมเหลือ 1 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 24 ชั่วโมง จึงย้ายเซลล์ไปยังอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Korfiatis *et al.*, 2001) จากการทดลองในสุกรและโคพบว่าหลังจากการลดปริมาณซีรัมนานกว่า 48 ชั่วโมงทำให้เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอ (Kato *et al.*, 1998, 2000, Kues *et al.*, 2000) และในสุกรทำให้เกิดการตายของ

เซลล์เพิ่มขึ้นจาก 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็น 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ (Lee and Piedrahita, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในโคพบว่าหลังจากลดปริมาณซีรุ่มนานกว่า 48 ชั่วโมงทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์เพิ่มขึ้น 10.4 เปอร์เซ็นต์ (Cho *et al.*, 2005) จากการทดสอบการลดปริมาณซีรุ่มในเวลา 24 ชั่วโมงสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ fibroblast อยู่ในระยะ G0/G1 มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Kues *et al.*, 2000, Cho *et al.*, 2005, Gibbons *et al.*, 2002, Boquest *et al.*, 1999, Yu *et al.*, 2003, Cheong *et al.*, 2003, Saikhun *et al.*, 2004) สอดคล้องกับการทดลองของ Hayes *et al.*, 2005 ทดสอบเซลล์ fibroblast ของโคเปรียบเทียบกับระยะเวลาในการลดปริมาณซีรุ่มใน 1 วัน 3 วัน และ 5 วัน พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 เพิ่มขึ้นจาก 47.69 เปอร์เซ็นต์ เป็น 84.43 เปอร์เซ็นต์ 89.85 เปอร์เซ็นต์ และ 88.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณของเซลล์ในระยะ G0/G1 ไม่แตกต่างกันในแต่ละวัน แต่ในกระต่าย (Liu *et al.*, 2004) และในลูกโค พบว่าเซลล์ในระยะ G0/G1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจาก 48 ชั่วโมงของการลดปริมาณซีรุ่ม (Sun *et al.*, 2007)

การเหนี่ยวนำเซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 โดยเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่ (cell confluency) มีผลทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะพัก หรือหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ได้ เนื่องจากการขาดปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญเติบโต เช่น สารอาหาร คาร์บอนไดออกไซด์ และพื้นที่ในการยึดเกาะ เป็นต้น การศึกษาผลของการเหนี่ยวนำให้เซลล์ fibroblast ของโคเข้าสู่ระยะ G0/G1 โดยการทำให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่นั้น พบว่าวิธีนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด (Katska *et al.*, 2002) ในสุกร (Boquest *et al.*, 1999, Kues *et al.*, 2000) และในแมวป่าแอฟริกา (Gomez *et al.*, 2003) พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดลองในโค (Cho *et al.*, 2005) โดยเลี้ยงเซลล์ให้เต็มพื้นที่พบเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ 5.7 เปอร์เซ็นต์

การใช้สารเคมี : สารเคมีหลายชนิดถูกนำมาใช้กับเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว เพื่อหยุดการเจริญให้อยู่ในระยะที่ต้องการ ซึ่งสารเคมีแต่ละชนิดมีผลต่อเซลล์แต่ละระยะแตกต่างกันไป

1. สารเคมีที่ใช้ในการเหนี่ยวนำเซลล์ให้เข้าสู่ระยะ G0/G1 คือ Roscovitine [2-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurine] Roscovitine เป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ cyclin-dependent protein kinases (Gibbons *et al.*, 2002) มีการทดลองพบว่า roscovitine มีความสามารถในการยับยั้ง Cdk1 ที่ความเข้มข้น 0.65 μM , Cdk2 ที่ความเข้มข้น

0.7 μM และ Cdk5 ที่ความเข้มข้น 0.2 μM เมื่อใช้ที่ปริมาณ 16 μM roscovitine ยังมีสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ mammalian cell line และยับยั้งกิจกรรมของ M phase promoting factor (MPF) kinase ซึ่งจะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 ของวงจรชีวิตเซลล์ได้ (De Azevedo *et al.*, 1997, Meijer *et al.*, 1997, Alessi *et al.*, 1998, Schang *et al.*, 2000, Ljungman *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า roscovitine สามารถเหนี่ยวนำเซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 ในเซลล์ adult fibroblast และ fetal fibroblast ในโค (82.8 เปอร์เซ็นต์ 82.4 เปอร์เซ็นต์) (Gibbons *et al.*, 2002, Cho *et al.*, 2005) พบว่าการใช้ roscovitine ที่ความเข้มข้น 15 μM และ 30 μM สามารถเหนี่ยวนำเซลล์ให้อยู่ในระยะ G0/G1 ในระดับที่ไม่แตกต่างกัน แต่พบว่าการตายของเซลล์เกิดขึ้นประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 30 μM (Gibbons *et al.*, 2002, Cho *et al.*, 2005) ดังนั้นในการทดลองที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 16 μM สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 ได้ และพบว่า ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์เพิ่มขึ้น

2. สารเคมีที่ใช้ในการเหนี่ยวนำเซลล์ให้เข้าสู่ระยะ G1/S คือสาร aphidicolin (3- α ,4- α ,5- α ,17- α)-3,17-Dihydroxy-4-methyl-9,15-cyclo-C,18-dinor-14,15-secoandrosterane-4,17-dimethanol) สารเคมีนี้มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสอัลฟา (DNA polymerase alpha) และดีเอ็นเอโพลีเมอเรสเดลต้า (DNA polymerase delta) ในกระบวนการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอของ prokaryote (Fan and Price, 1997) และ eukaryotic cells (Huberman, 1981, Spadari *et al.*, 1982, 1985, Wang, 1991, Cheng and Kuchta, 1993, Pittman *et al.*, 1994, Yamada and Itoh, 1994, Poluha *et al.*, 1995, Kolman *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2004) ได้มีการนำ aphidicolin มาทดลองในเซลล์ประสาทและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนู mice พบว่า aphidicolin มีผลต่อ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสอัลฟา ในกระบวนการสร้างดีเอ็นเอภายในนิวเคลียส และมีผลต่อดีเอ็นเอโพลีเมอเรสเดลต้าในกระบวนการสร้างดีเอ็นเอภายใน mitochondria รวมถึงมีผลต่อดีเอ็นเอโพลีเมอเรสเบต้า (DNA polymerase beta) และดีเอ็นเอโพลีเมอเรสอัลฟา ในกระบวนการ DNA repair synthesis (Huberman, 1981, Spadari *et al.*, 1985) ในเซลล์ fibroblast ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม aphidicolin สามารถเหนี่ยวนำให้อยู่ในระยะ S (Chang *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 1993) มีรายงานพบว่า aphidicolin ที่ความเข้มข้น 6 μM สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ fibroblast ในสุกรอยู่ในระยะ S เพิ่มขึ้นจาก 15.2 เปอร์เซ็นต์ เป็น 23.8 เปอร์เซ็นต์ใน 5 ชั่วโมง และ 46.9 เปอร์เซ็นต์ใน 19 ชั่วโมง (Kues *et al.*, 2000) ผลการทดลองสอดคล้องกับการใช้ aphidicolin ในความเข้มข้น 5 μM ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ fibroblast ของคน และสัตว์ฟันแทะ (rodent) (Pedrail-Noy *et al.*, 1980, Levenson and Hamlin, 1993) ในประโยชน์ทางการแพทย์มีการทดลองพบว่า การทำให้เซลล์เข้าสู่

ระยะ S หลังจากการใช้สารหรือยาบางชนิดในการรักษาโรคมะเร็ง เป็นวิธีที่ใช้บ่งบอกผลหลังจากการใช้ยาในปริมาณต่างๆ ที่เซลล์มะเร็งกลับมาแบ่งตัวได้อีกครั้ง (Kuwakado *et al.*, 1993, Schimke *et al.*, 1994, Borner *et al.*, 1995, Urbani *et al.*, 1995)

3. สารเคมีที่ใช้ในการเหนี่ยวนำเซลล์ให้เข้าสู่ระยะแบ่งตัว คือ colchicine (N-Deacetyl-N-methyl colchicines) $C_{21}H_{25}NO_5$ colchicine เป็นสารที่ได้จากพืชในตระกูล colchicum มีฤทธิ์ในการทำลายไมโครทิวบูล ซึ่ง colchicine จะจับกับทิวบูลินซึ่งเป็นโปรตีนหลักของไมโครทิวบูลและทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ G2/M สารเคมีนี้ส่งเสริมการทำงานช่วง tubulin depolymerization มีผลยับยั้งกระบวนการเกิดระยะ mitosis ของเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ (Wilson *et al.*, 1976, Dustin, 1978, Mareel and DeMets, 1984, Sluder, 1991, Hartwell and Weinert, 1989, Murray and Kirschner, 1989, Nishiyama and Fujii, 1992) หลายการทดลองได้มีการทดสอบผลของสาร colcemid ซึ่งเป็นสารที่ให้ผลใกล้เคียงกับ colchicine (N-((7S)-5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo(a)heptalen-7-yl)-acetamide) $C_{22}H_{25}NO_6$ แต่มีความเป็นพิษกับเซลล์น้อยกว่า และยังพบว่ามิกดไกที่ชัดเจนในการยับยั้งไมโครทิวบูลมากกว่าสารเคมีชนิดอื่นๆ เช่น podophyllotoxin, steganacin, vinblastine, nocodazole (Deysson, 1968, Mareel and DeMets, 1984) ได้มีการทดลองผลของสารหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง mitotic spindle ของเซลล์ชนิดต่างๆ พบว่าเซลล์แต่ละชนิดสามารถสร้างไมโครทิวบูลได้อีกครั้งหลังจากหมดฤทธิ์ของสารดังกล่าว (Rieder and Palazzo, 1992) มีการทดลองใช้ colcemid, colchicine และสารอื่นที่มีผลในเช่นเดียวกันในเซลล์ของสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น หนูแฮมสเตอร์ (Stubblefield, 1964) newts, หนูแรท และ จิงโจ้ (Jensen *et al.*, 1987) กระต่าย (Phillips and Taylor, 1992) คน (Chamla *et al.*, 1980, Kuriyama *et al.*, 1981, Kanda *et al.*, 1994, Aoki *et al.*, 2007) พบว่าสารแต่ละชนิดให้ผลในการยับยั้ง mitosis แบบไม่ถาวร และสามารถเข้าสู่อินเตอร์เฟสในวงจรชีวิตเซลล์ต่อไปได้ นอกจากนี้แล้ว colcemid ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ผิดปกติเกิด apoptosis (Sherwood *et al.*, 1994, Tsuchida *et al.*, 1998, Gallaher *et al.*, 2000)

มีการทดลองพบว่าการใช้ colcemid ที่ความเข้มข้น 0.582 และ 1.455 μg ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ murine sarcoma เข้าสู่ระยะ G2/M ได้ ในขณะที่ความเข้มข้นสูง (5.82 μg) สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ เข้าสู่ระยะ G2/M ได้ 11 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมดในเวลา 14 ชั่วโมง และ 25 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมดในเวลา 20 ชั่วโมง (Nomura, 1980) ใน hamster embryo cell พบว่าความเข้มข้นของ colcemid ที่สูงมากกว่า 0.1 μg เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีผลยับยั้ง

ไมโทติคสปินเดิล แต่ไม่มีผลทำให้รูปร่างของเซลล์ และโครโมโซมเกิดการเปลี่ยนแปลง (Tsutsui *et al.*, 1984) และใน 24 ชั่วโมงสามารถเหนี่ยวนำให้ human lung epithelial-like (A549) cell ให้อยู่ในระยะ G2/M ได้ (Panayiotidis *et al.*, 2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่างผิวหนังสุนัข

1.1 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างผิวหนังสุนัข

1.1.1 ไขมีดผ่าตัด

1.1.2 Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร

1.1.3 กรรไกรผ่าตัด (scissors)

1.1.4 ปากคีบ (forceps)

1.1.5 Conical centrifuge tubes ขนาด 15 มิลลิลิตร

1.2 สารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่างผิวหนังสุนัข

1.2.1 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

1.2.2 Antibiotic (penicillin และ streptomycin) (Gibco®)

1.2.3 Ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์

2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเลี้ยงเซลล์ dermal fibroblast

2.1 อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงเซลล์ dermal fibroblast

2.1.1 ตู้ laminar flow

2.1.2 ตู้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ Incubator)

2.1.3 Water bath

2.1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง

2.1.5 Hemocytometer

2.1.6 จานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60x15 ตารางเซนติเมตร (Corning® Cell Culture Surfaces: Standard Tissue Culture Treated Polystyrene Surface)

2.1.7 Pipette

2.1.8 Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร

2.1.9 เครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติ ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

2.1.10 Cryogenic tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2 อุปกรณ์สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ dermal fibroblast

2.2.1 เครื่องกรองอาหารเลี้ยงเซลล์

2.2.2 ป้อนอากาศ

2.2.3 pH meter

2.3 สารเคมีสำหรับการเลี้ยงเซลล์ dermal fibroblast

2.3.1 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco®)

2.3.2 Fetal bovine serum (FBS)

2.3.3 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (sigma cat no. D2650)

2.3.4 Antibiotic (penicillin และ streptomycin) (Gibco®)

2.3.5 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4-7.4

2.3.6 Trypan blue 0.25 เปอร์เซ็นต์

2.3.7 Trypsin

2.3.8 Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

2.3.9 Hydrochloric acid (HCL)

2.3.10 Sodium hydroxide (NaOH)

3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทดสอบเซลล์ dermal fibroblast

3.1 อุปกรณ์สำหรับการทดสอบเซลล์

3.1.1 Flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA)

3.1.2 Nylon mesh 40 μ m (Spectrum, Los Angeles, CA)

3.1.3 เครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติ ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

3.1.4 Tips 100 ไมโครลิตร, 1000 ไมโครลิตร

3.1.5 Micro tube ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร

3.1.6 Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิเมตร

3.2 สารเคมีสำหรับการทดสอบเซลล์

3.2.1 Propidium iodide (Sigma cat no. 4170)

3.2.2 Fetal bovine serum (FBS) 0.5 เปอร์เซ็นต์ (Gibco®)

3.2.3 Aphidicolin (Sigma cat no. A0781)

3.2.4 Roscovitine (Sigma cat no. R7772)

3.2.5 Colcemid (Invitrogen, U.S.A.)

3.2.6 RNaseA (Invitrogen, U.S.A.)

3.2.7 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2-7.4

3.2.8 Ethyl alcohol หรือ Methyl alcohol

4. อุปกรณ์ทั่วไป

4.1 กล้องจุลทรรศน์ Inverted microscope

4.2 กล้องถ่ายภาพบันทึกข้อมูลแบบดิจิทัล

4.3 เครื่องชั่งสาร

4.4 ตู้เย็น 4, -20, -80 องศาเซลเซียส

วิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างผิวหนังจากสุนัขทำหมันอายุระหว่าง 1-3 ปี บริเวณหน้าท้องขนาดยาว 6-8 มิลลิเมตร กว้าง 1-2 มิลลิเมตร ด้วยวิธีปราศจากเชื้อ โดยวิธีการ biopsy จากนั้นนำตัวอย่างผิวหนังมาล้าง 2 ครั้ง ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2-7.4 ที่เติมด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ของ penicillin-streptomycin อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Freshney, 2000)

การแยก dermal fibroblast จากผิวหนัง

นำตัวอย่างผิวหนังมาแยกส่วนผิวหนังกำพร้าและชั้นเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังออก นำเนื้อเยื่อชั้นหนังแท้ที่ได้มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แต่ละชิ้นมีขนาดกว้าง 1-2 มิลลิเมตร ใส่ชิ้นเนื้อเยื่อลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture dish) ขนาด 60x15 มิลลิเมตร จำนวน 20-30 ชิ้นต่อ 1 จาน จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่เติมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ของ fetal bovine serum (FBS) และ 1 เปอร์เซ็นต์ของ penicillin-streptomycin ปริมาณ 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเซลล์เข้าบ่มในตู้บ่มที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 สัปดาห์ หรือจนกว่าเซลล์จะเจริญแผ่กระจายจนเต็มพื้นที่ (Freshney, 2000)

การเลี้ยงเซลล์

ทำการเก็บตัวอย่างผิวหนังออกจากงานเพาะเลี้ยงเซลล์เดิมแล้วนำไปเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์เดิมที่นำชิ้นเนื้อเยื่อออกแล้วนั้นปล่อยให้เซลล์เจริญแผ่กระจายแทนที่พื้นที่ว่างของชิ้นเนื้อเดิม 24 ชั่วโมง แล้วทำการ subculture ไปยังงานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ โดยกระบวนการที่เรียกว่า trypsinization เพื่อให้เซลล์หลุดจากภาชนะยึดเกาะ ซึ่งเริ่มจากการใช้ pipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมด จากนั้นเติม PBS เพื่อล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ทำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง เติม 0.25 เปอร์เซ็นต์ trypsin/EDTA ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 นาที เมื่อเซลล์หลุดจากผิวของงานเพาะเลี้ยงเซลล์ ใช้ pipette เก็บเซลล์พร้อมกับน้ำเลี้ยงเซลล์ลงใน conical centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นโดยเครื่องปั่นแยกที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาของเหลวที่อยู่ด้านบนออก เหลือไว้เพียงเซลล์ที่ตกตะกอน เติม stop medium ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์และ 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ trypsin จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์โดยการแบ่งเซลล์ในอัตราส่วน 1:10 นำเซลล์ 1 ส่วนมาย้อมด้วยสี trypan blue 0.25 เปอร์เซ็นต์ใน PBS (ปริมาณเซลล์/สีย้อมเท่ากับ 1:1) นำมานับด้วย Hemacytometer เซลล์ส่วนที่เหลือแบ่งเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก 2 วัน

การแช่แข็งเซลล์

เซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงใน passage ที่ 2-6 นำมาทำการ trypsinization โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมด จากนั้นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง เติม trypsin/EDTA ปริมาณ 10 เท่าของเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 นาที เมื่อเซลล์หลุดจากผิวของงานเพาะเลี้ยงเซลล์ แล้วนำไปปั่นโดยเครื่องปั่นแยกที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาของเหลวที่อยู่ด้านบนออก ได้เซลล์ที่ตกตะกอน (pellets) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตรครึ่งหนึ่งของ freezing medium ใช้ pipette ดูดขึ้นลงเพื่อให้ pellets ของเซลล์แยกออกจากกัน จากนั้นค่อยๆ หยด freezing medium ให้ความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย DMEM ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS, 1 เปอร์เซ็นต์ของ penicillin-streptomycin และ 10 เปอร์เซ็นต์ของ dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้เซลล์มีปริมาณ 2×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งลงใน cryogenic tube 1

มิลลิลิตร/tube นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หรือข้ามคืน จากนั้นย้ายลงในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)

การอุ่นละลายเซลล์

การละลายเซลล์จากเซลล์ที่รักษาสภาพไว้ ทำอย่างรวดเร็วโดยนำเซลล์ออกมาจากไนโตรเจนเหลวใส่ลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เจือจางเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้เซลล์ที่ตกตะกอน (pellets) หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ นำเซลล์มาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้น 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร

การจัดกลุ่มการทดลอง

การศึกษา dermal fibroblast ที่ได้จากผิวหนังสุนัขที่โตเต็มที่อายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป โดยการนำเซลล์ไปเลี้ยงด้วยความเข้มข้นเซลล์ 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาณ 5 มิลลิลิตรในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60x15 มิลลิเมตร ปล่อยให้เซลล์เจริญแบ่งตัว 24-48 ชั่วโมง ระหว่างนี้ตรวจดูปริมาณของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Inverted Microscope จากนั้นทำการทดลองกลุ่มต่างๆ ดังนี้

1. กลุ่มควบคุม

ใช้ dermal fibroblast เลี้ยงในระดับ 60-80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์ เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS เป็นเวลา 24, 48, 72 ชั่วโมง

2. กลุ่มทดลอง แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม

การทดลองที่ 1. ผลของการเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่ต่อวงจรชีวิตเซลล์: เลี้ยงเซลล์ dermal fibroblast ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS ให้เจริญในระดับ 90-100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เลี้ยง แล้วเลี้ยงต่อไปอีกด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดลองที่ 2. ผลของการลดปริมาณซีรัม (serum starvation) ต่อวงจรชีวิตเซลล์: เลี้ยงเซลล์ dermal fibroblast ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS จนได้เซลล์ในระดับ 60-80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์ของ FBS และเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

การทดลองที่ 3. ผลของสาร roscovitine ต่อวงจรชีวิตเซลล์: เลี้ยงเซลล์ dermal fibroblast ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS จนได้เซลล์ในระดับ 60-80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS และ roscovitine ที่ความเข้มข้น 1 μM , 15 μM , 30 μM , 45 μM และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Gibbons *et al.*, 2002)

การทดลองที่ 4. ผลของสาร aphidicolin ต่อวงจรชีวิตเซลล์: เลี้ยงเซลล์ dermal fibroblast ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS จนได้เซลล์ในระดับ 60-80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS และ aphidicolin ที่ความเข้มข้น 1 μM , 2.5 μM , 5 μM , 10 μM และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Kues *et al.*, 2000)

การทดลองที่ 5. ผลของสาร colcemid ต่อวงจรชีวิตเซลล์: เลี้ยงเซลล์ dermal fibroblast ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS จนได้เซลล์ในระดับ 60-80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS และ colcemid ที่ความเข้มข้น 0.1 μg , 0.25 μg , 0.5 μg , 1 μg และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Boquest *et al.*, 1999)

หลังจากสิ้นสุดระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ในภาวะต่างๆ ข้างต้นแล้ว นำเซลล์ที่ได้จากกลุ่มควบคุมและการทดลองแต่ละกลุ่มไปวิเคราะห์หาสัดส่วนของเซลล์ที่อยู่ระยะต่างๆ ของวงจรชีวิตเซลล์ด้วยเทคนิคฟลูออโรไซโตเมทรี โดยทำการทดลองซ้ำในแต่ละกลุ่มทดลองไม่ต่ำกว่า 3 ครั้ง

การเตรียมเซลล์สำหรับการวิเคราะห์หาสัดส่วนของเซลล์ที่อยู่ในระยะต่างๆ ของวงจรชีวิตเซลล์

1. การเก็บเซลล์จากจานเพาะเลี้ยง เริ่มจากการใช้ pipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจนหมดล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง เติม 0.25 เปอร์เซ็นต์ trypsin/EDTA ปริมาณ 1 มิลลิลิตร/จานเพาะเลี้ยงเซลล์ บ่มจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 นาที เมื่อเซลล์หลุดจากผิวของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ เก็บเซลล์พร้อมน้ำเลี้ยงเซลล์ลงใน conical centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร

แล้วนำไปปั่นโดยเครื่องปั่นแยกที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาของเหลวที่อยู่ด้านบนออก เหลือไว้เพียงเซลล์ที่ตกตะกอน (pellets)

2. การคงสภาพเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์ เติมน้ำ PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่เก็บเซลล์นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูด PBS ออกให้เหลือประมาณ 0.3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำ methanol หรือ ethanol 4 องศาเซลเซียส โดยการหยดอย่างช้าๆ ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร นำเซลล์คงสภาพที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืนหรือจนกว่าจะทำการย้อมสีดีเอ็นเอ

3. การย้อมสีดีเอ็นเอด้วย propidium iodide นำเซลล์ที่ได้มาล้างน้ำยาคงสภาพออกโดยการเติมน้ำ PBS 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างซ้ำ 1-2 ครั้ง ดูดเอาของเหลวที่อยู่ด้านบนออก เหลือไว้เพียงเซลล์ที่ตกตะกอน นำเซลล์ที่ได้มาย้อมสีโดยการเติมน้ำ 0.2 มิลลิลิตร ของของ RNaseA ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำ 0.2 มิลลิลิตรของ propidium iodide ที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำเซลล์มากรองผ่าน nylon mesh ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 ไมโครเมตร (Spectrum, Los Angeles, CA) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย flow cytometer

4. การวิเคราะห์ด้วย flow cytometer เซลล์จะถูกวิเคราะห์ด้วย FACS vantage flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) เครื่องจะวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ propidium iodide ขณะที่เซลล์ไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ อัตราเร็ว 500-1,000 เซลล์/วินาที เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ปรากฏในระยะ G0/G1, S และระยะ G2/M จะได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม WinMDI (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry) Version 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>)

5. การคำนวณทางสถิติ ข้อมูลนำมาคำนวณทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธีการ Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มโดย Duncan's New Multiple Range Test

ผลและวิจารณ์

ผล

การเจริญของ dermal fibroblast จากชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังสุนัข

ผลการแยกเก็บ dermal fibroblast โดยวิธีการให้เซลล์เจริญออกจากชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังของสุนัข หลังจากวางชั้นเนื้อในจานเพาะเลี้ยง 1-2 วัน พบเซลล์เคลื่อนออกมาจากตัวอย่างชั้นเนื้อ คือ เซลล์ dermal fibroblast ซึ่งมีรูปร่าง 2 แบบ แบบที่ 1 มีรูปร่างกระสวย ยื่นส่วนแขนง (process) ออกมาเพื่อยึดเกาะผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ และแบบที่ 2 เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลม ขนาดเล็ก กระจายออกมาโดยรอบของชั้นเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 8) และเซลล์จะมีการแบ่งตัวมากขึ้น ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 9) ในวันที่ 4-5 พบเซลล์เจริญจนเต็มพื้นที่รอบเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 10) ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการนำชั้นเนื้อเยื่อออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ต่อมาเซลล์จะเจริญแผ่ไปยังพื้นที่ว่างบริเวณรอบข้างจนเต็มภายใน 1-2 วัน (ภาพที่ 11) ระยะเวลาพบว่าเซลล์จะมีลักษณะเรียวยาว และสามารถยื่นแขนงของเซลล์ขยายออกไปในพื้นที่ว่างของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ได้อย่างเต็มที่ พบเซลล์ที่มีนิวเคลียส 2 นิวเคลียสซึ่งบ่งบอกถึงการที่เซลล์กำลังเจริญแบ่งตัว (ภาพที่ 12) ในวันที่ 6-7 ของการเลี้ยงเซลล์โดยวิธีการให้เซลล์เจริญออกจากชั้นเนื้อเยื่อเป็นระยะที่เหมาะสมต่อการ subculture เพื่อเก็บเซลล์จากจานเลี้ยงเซลล์เดิมไปเลี้ยงยังจานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ การเจริญของเซลล์ออกจากเนื้อเยื่อผิวหนังของสุนัข พบว่าอายุของสุนัขมีผลต่อการเจริญ โดยสุนัขที่มีอายุน้อยกว่า 4 ปีขึ้นไปเซลล์จะมีอัตราการแบ่งเซลล์ต่ำ เมื่อเทียบกับสุนัขที่มีอายุน้อยกว่า

การเจริญของ dermal fibroblast หลังจากการ subculture

เมื่อนำ dermal fibroblast ที่เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงและนำไป subculture เซลล์ dermal fibroblast จาก passage ที่ 1-6 (ภาพที่ 13) แบ่งตัวและมีรูปร่างเป็นรูปกระสวยตามปกติ เมื่อนำเซลล์จาก passage ที่ 7 ขึ้นไปจะพบว่าเซลล์ที่เจริญขึ้นใหม่มีขนาดใหญ่และเล็กปนกัน โดยสัดส่วนของเซลล์ขนาดใหญ่ที่พบใน passage ที่ 8 พบกระจายทั่วไปในพื้นที่เลี้ยงเซลล์และเพิ่มมากขึ้นใน passage ที่ 8 และ 9 ตามลำดับ (ภาพที่ 14-16)

ภาพที่ 8 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดง dermal fibroblast วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงแบบ primary explant พบเซลล์มีรูปร่างกระสวย ขึ้นส่วนแขนงออกมาเพื่อยึดเกาะผิว (ลูกศร) และเซลล์ที่มีรูปร่างกลม ขนาดเล็ก (หัวลูกศร)

ภาพที่ 9 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast (ลูกศร) วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงแบบ primary explant เซลล์มีลักษณะยาว เรียว

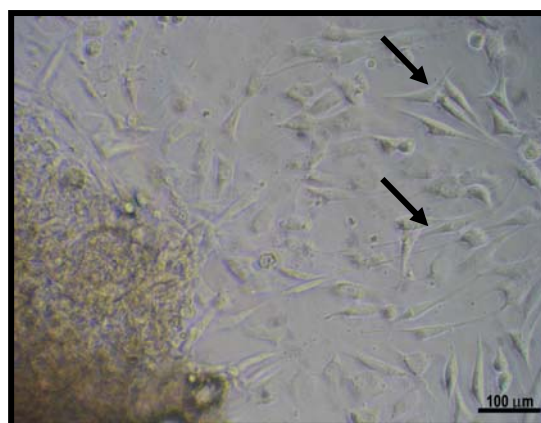
ภาพที่ 10 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast เจริญจนเต็มพื้นที่ในวันที่ 4-5 ของการเพาะเลี้ยงแบบ primary explant

ภาพที่ 11 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast ในวันที่ 6-7 ของการเพาะเลี้ยงแบบ primary explant เซลล์มีลักษณะเรียวยาว และสามารถยื่นแขนงของเซลล์ขยายออกไปในพื้นที่ว่างของจานเพาะเลี้ยงเซลล์

ภาพที่ 12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast ที่มีแขนงของเซลล์แผ่อกและเกาะพื้นผิวของจานเลี้ยง (ลูกศร) และพบเซลล์ที่มีนิวเคลียส 2 นิวเคลียส (หัวลูกศร) ในวันที่ 6-7 ของการเพาะเลี้ยงแบบ primary explant



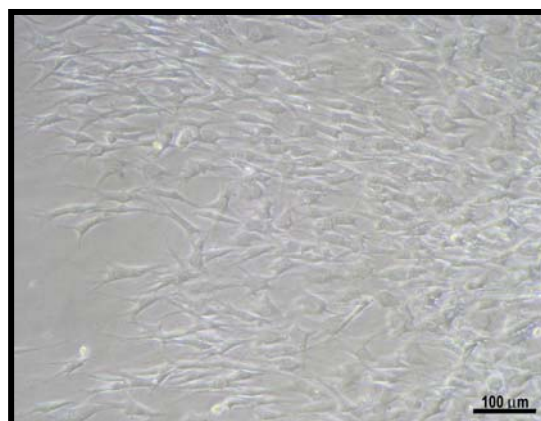
ภาพที่ 8



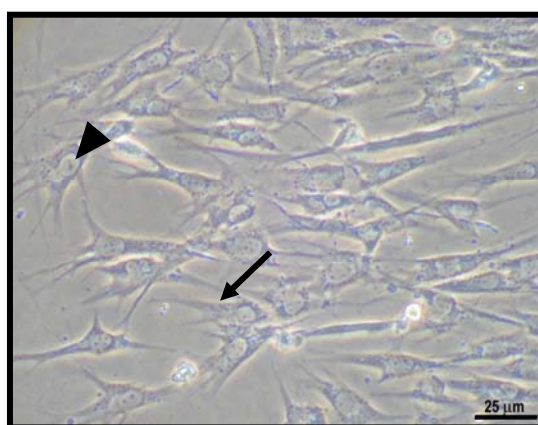
ภาพที่ 9



ภาพที่ 10



ภาพที่ 11



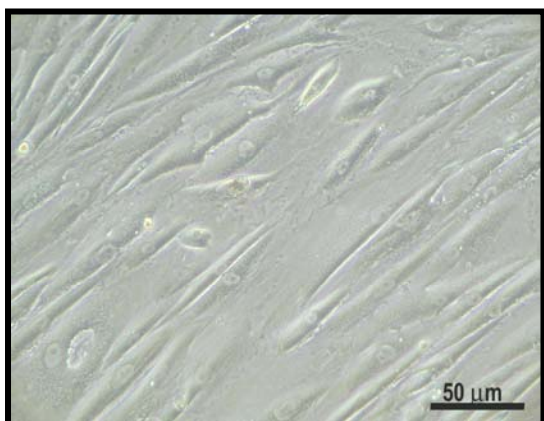
ภาพที่ 12

ภาพที่ 13 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ใน passage ที่ 3 ลักษณะของเซลล์เป็นรูปกระสวย เซลล์มีขนาดใกล้เคียงกัน มีการยื่นแขนงเพื่อยึดเกาะพื้นผิวในการเจริญแบ่งตัว

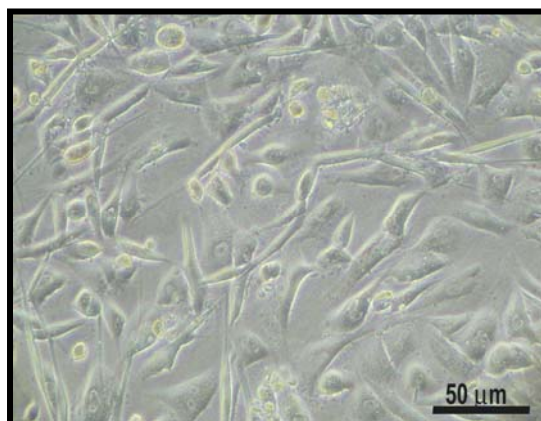
ภาพที่ 14 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast อยู่ใน passage ที่ 7 ที่เซลล์บางเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ประชากรของเซลล์มีหลายขนาดปะปนกัน

ภาพที่ 15 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast ใน passage ที่ 8 เซลล์ dermal fibroblast ส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่และเล็กปนกัน และเซลล์ที่มีขนาดใหญ่จะไม่มีส่วนแขนงของเซลล์ (ลูกศร)

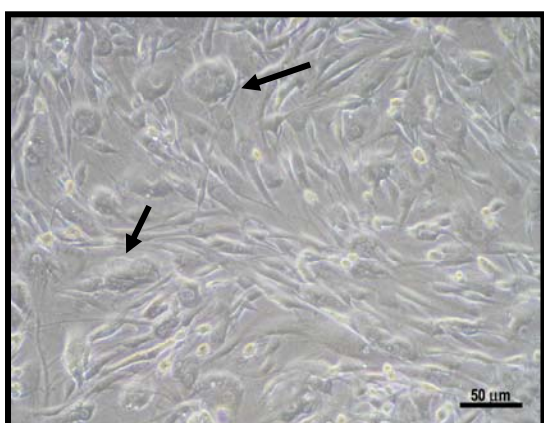
ภาพที่ 16 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ dermal fibroblast ใน passage ที่ 9 เซลล์ที่มีขนาดใหญ่ (ลูกศร) และเซลล์ที่มีขนาดเล็ก(หัวลูกศร) จะไม่มีส่วนของแขนงที่ยื่นออกมายึดเกาะพื้นผิว ทำให้มองเห็นเป็นช่องว่างระหว่างเซลล์จำนวนมาก



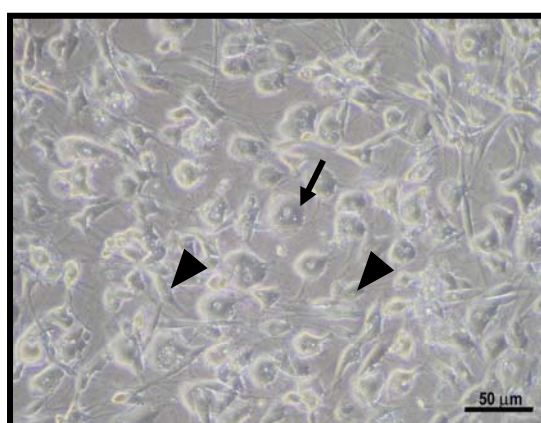
ภาพที่ 13



ภาพที่ 14



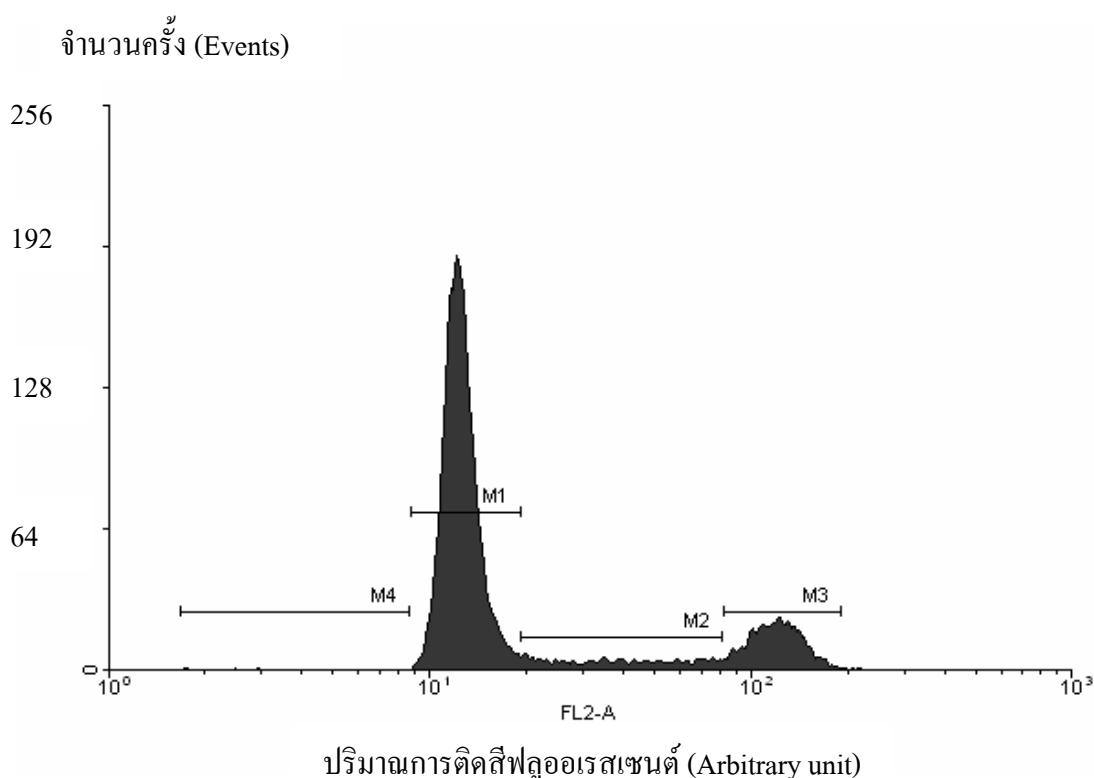
ภาพที่ 15



ภาพที่ 16

การตรวจสอบสัดส่วนของเซลล์ในระยะต่างๆ ของวงจรชีวิตเซลล์โดยการวัดปริมาณ ดีเอ็นเอในเซลล์ด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรี

เมื่อนำ dermal fibroblast ที่เลี้ยงใน DMEM + 10 เปอร์เซ็นต์ของ FBS มาแล้ว 2 วัน โดยมีปริมาณเซลล์ 60-80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่มาตรวจสอบสัดส่วนของเซลล์ในระยะ G0/G1, S และ G2/M จากปริมาณดีเอ็นเอ โดยการย้อมด้วย propidium iodide ที่ให้ความยาวคลื่นแสง 617 นาโนเมตร พบว่าเซลล์ในระยะ G0/G1 ในกราฟแสดงค่ายอดที่ 1 (M1) มีลักษณะการติดสีฟลูออเรสเซนซ์เป็น 1 arbitrary unit (2C) เซลล์ในระยะ S (M2) มีลักษณะการติดสีฟลูออเรสเซนซ์อยู่ระหว่าง 1 arbitrary unit และ 2 arbitrary unit และเซลล์ในระยะ G2/M ในกราฟแสดงค่ายอดที่ 2 (M3) มีลักษณะการติดสีฟลูออเรสเซนซ์เป็น 2 arbitrary unit (4C) แต่ยังไม่ปรากฏเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ (M4) ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 กราฟแสดงปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอของเซลล์ dermal fibroblast ในระยะ G0/G1 (M1), S (M2), G2/M (M3) และเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ (M4) ในการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ (กลุ่มควบคุม)

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะต่างๆ ของวงจรชีวิตเซลล์ และเปอร์เซ็นต์การตาย หลังการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ระยะต่างๆ $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 5)			
G0/G1	S	G2/M	Apoptosis
73.6 $\pm$ 3.5	10.5 $\pm$ 2.4	15.8 $\pm$ 2.3	0.4 $\pm$ 0.5

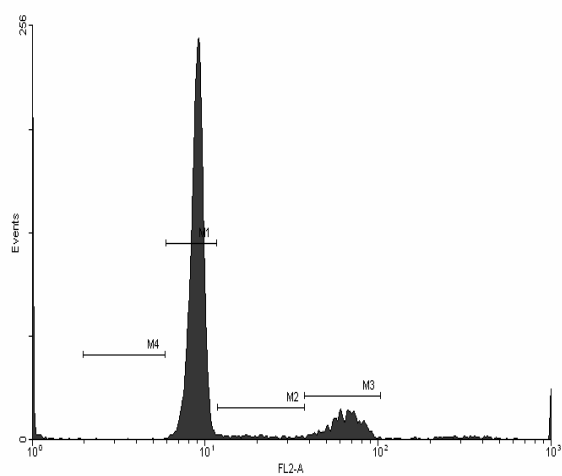
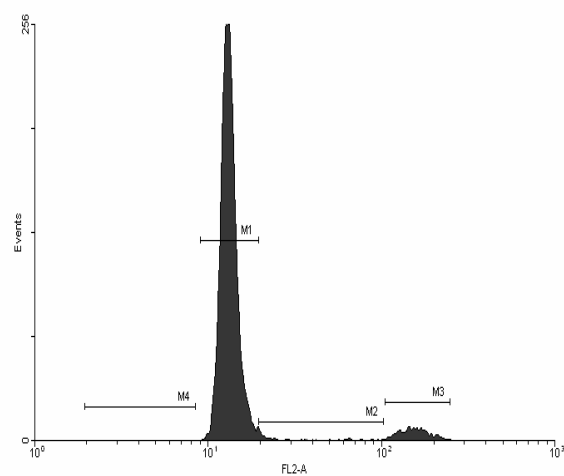
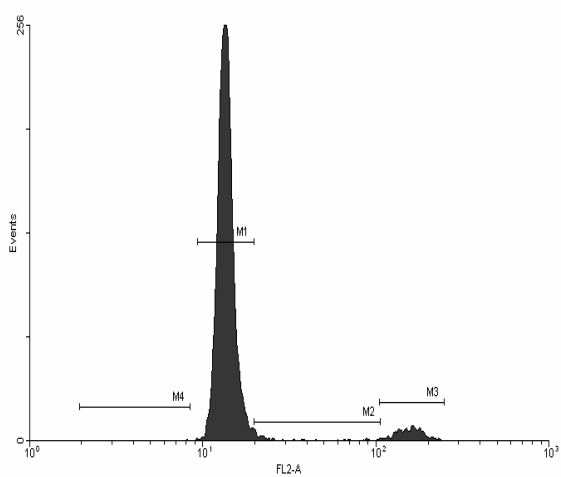
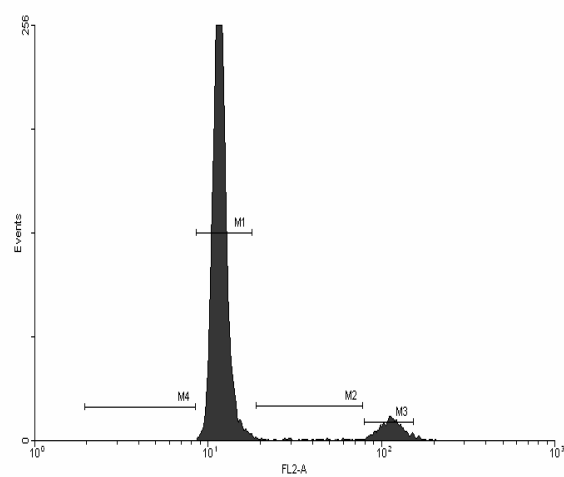
จากตาราง ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในแต่ละระยะในการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณเซลล์ที่อยู่ในระยะ G0/G1 เป็น 73.6 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ที่อยู่ในระยะ S เป็น 10.5 เซลล์ที่อยู่ในระยะ G2/M เป็น 15.8 และเปอร์เซ็นต์การตายเป็น 0.4

การทดลองที่ 1 และ 2 ผลการเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 ด้วยการลดปริมาณซีรัม (ซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์) และการเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่

เมื่อตรวจสอบระยะต่างๆ ของเซลล์หลังจากการทดลองลดซีรัมและการเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่ กราฟแสดงให้เห็นผลที่ได้จากเครื่องโฟลไซโทเมทรีแสดงจำนวนเซลล์ที่ติดสีฟลูออเรสเซนซ์ในระดับต่างๆ พบว่า จำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะ G0/G1 มีค่าฟลูออเรสเซนซ์ในช่วง M1 มีค่าสูงสุด ซึ่งทั้ง 4 กลุ่ม มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่สูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม จำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะ S และ G2/M มีค่าฟลูออเรสเซนซ์ในช่วง M2 และ M3 ตามลำดับ มีค่าน้อยมากและในทั้ง 4 กลุ่ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองพบว่ามีค่าลดลงอย่างชัดเจน ดังภาพที่ 18

ภาพที่ 18 กราฟแสดงปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอของเซลล์ dermal fibroblast ในระยะ G0/G1 (M1), S (M2), G2/M (M3) และเปอร์เซ็นต์การตาย (M4) ในการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์และการเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่

- A. การเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่ (confluent)
- B. กลุ่มที่ได้รับปริมาณซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- C. กลุ่มที่ได้รับปริมาณซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- D. กลุ่มที่ได้รับปริมาณซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

**A.****B.****C.****D.**

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในวงจรชีวิตเซลล์ระยะ G0/G1, S, G2/M และเปอร์เซ็นต์การตาย หลังจากการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 โดยการเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่และวิธีการลดปริมาณซีรัม (ซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์) ในเวลาต่างๆ

กลุ่มทดลอง	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในแต่ละระยะ $\pm$ S.D.			
	G0/G1	S	G2/M	Apoptosis
กลุ่มควบคุม (n=5)	73.6 $\pm$ 3.5 ^a	10.5 $\pm$ 2.4 ^a	15.8 $\pm$ 2.3 ^a	0.4 $\pm$ 0.5
Confluent 24 ชั่วโมง (n=3)	91.7 $\pm$ 3.5 ^b	1.2 $\pm$ 2.4 ^b	6.2 $\pm$ 2.3 ^b	0.8 $\pm$ 0.4
Serum starvation 24 ชั่วโมง (n=4)	88.4 $\pm$ 1.3 ^b	2.3 $\pm$ 0.7 ^b	9.2 $\pm$ 0.8 ^b	0.3 $\pm$ 0.2
Serum starvation 48 ชั่วโมง (n=3)	90.9 $\pm$ 1.4 ^b	1.9 $\pm$ 0.5 ^b	7.0 $\pm$ 0.9 ^b	0.3 $\pm$ 0.2
Serum starvation 72 ชั่วโมง (n=3)	90.3 $\pm$ 2.2 ^b	3.0 $\pm$ 1.6 ^b	7.1 $\pm$ 1.4 ^b	0.6 $\pm$ 0.7

a, b แสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เปรียบเทียบตามเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ระหว่างกลุ่มการทดลองที่อยู่ระยะเดียวกัน

$\pm$ S.D. แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

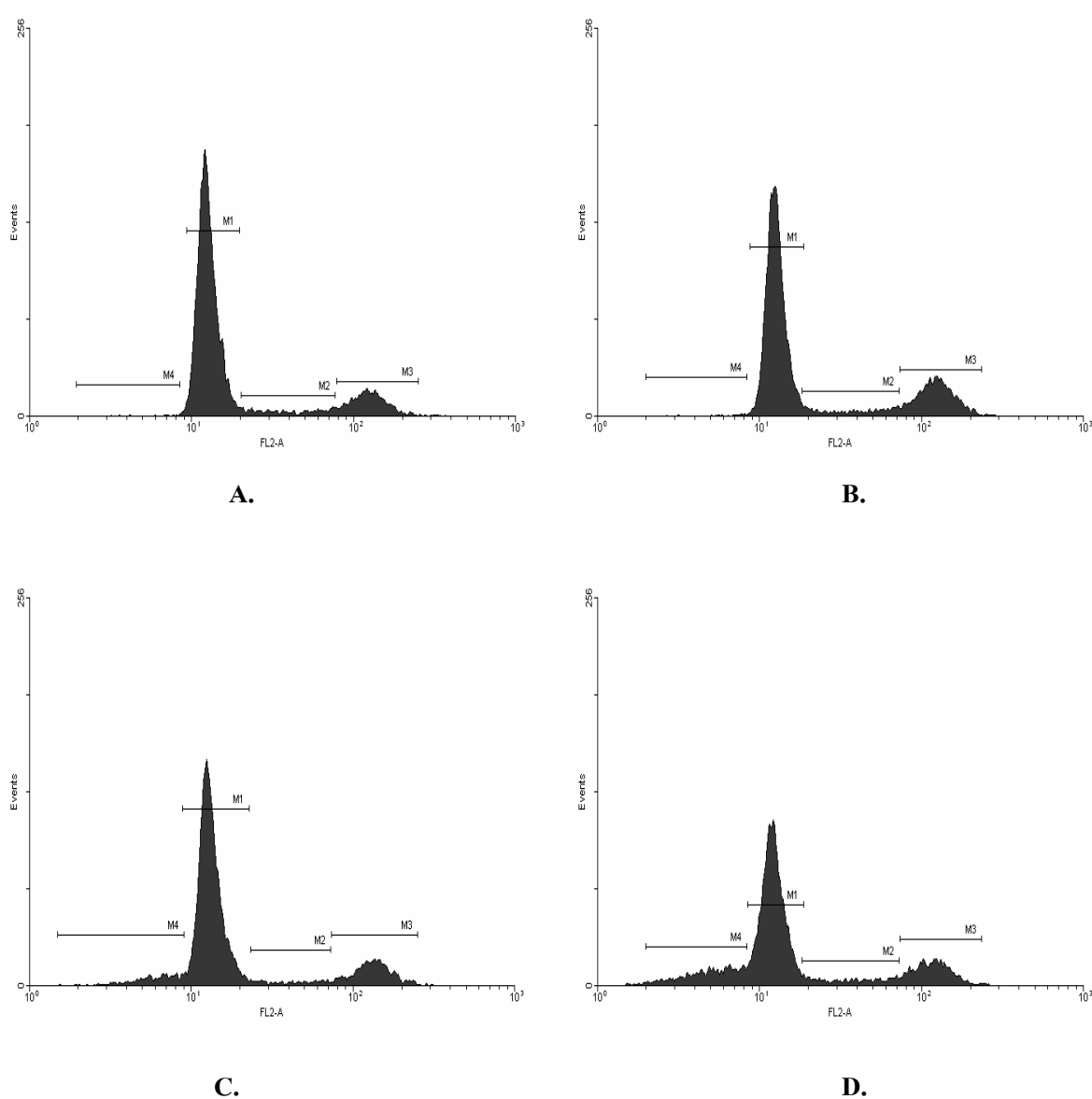
ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ G0/G1 หลังจากเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่ เท่ากับ 91.7 ± 3.5 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุม (73.6 ± 3.5) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เซลล์ในระยะ G0/G1 เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีซีรัม 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 88.4 ± 1.3 , 90.9 ± 1.4 และ 90.3 ± 2.2 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุม (73.6 ± 3.5) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ปริมาณของเซลล์ในระยะ S หลังจากการลดซีรัมเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 2.3 ± 0.7 , 1.9 ± 0.5 และ 3.0 ± 1.6 ตามลำดับ และพบว่าการเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่เท่ากับ 1.2 ± 2.4 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทดลอง แต่ต่ำกว่าค่าที่พบในกลุ่มควบคุม (10.5 ± 2.4) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ปริมาณของเซลล์ในระยะ G2/M หลังจากการลดซีรัมเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 9.2 ± 0.8 , 7.0 ± 0.9 และ 7.1 ± 1.4 ตามลำดับ และพบว่าการเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่เท่ากับ 6.2 ± 2.3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทดลอง แต่ต่ำกว่าค่าที่พบในกลุ่มควบคุม (15.8 ± 2.3) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อัตราการตายของเซลล์ (apoptosis) หลังจากการลดซีรัมเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 0.3 ± 0.2 , 0.3 ± 0.2 , 0.6 ± 0.7 และการเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่ เท่ากับ 0.8 ± 0.4 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (0.4 ± 0.5) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ภาพที่ 19 กราฟแสดงปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอของเซลล์ dermal fibroblast ในระยะ G0/G1 (M1), S (M2), G2/M (M3) และเปอร์เซ็นต์การตาย (M4) ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 โดยการใช้สาร roscovitine

- A. กลุ่มที่ได้รับ roscovitine ที่ความเข้มข้น 5 μM
- B. กลุ่มที่ได้รับ roscovitine ที่ความเข้มข้น 15 μM
- C. กลุ่มที่ได้รับ roscovitine ที่ความเข้มข้น 30 μM
- D. กลุ่มที่ได้รับ roscovitine ที่ความเข้มข้น 45 μM

การทดลองที่ 3 การเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 โดยใช้สาร roscovitine ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อตรวจสอบระยะต่างๆ ของเซลล์หลังการทดลองใช้สาร roscovitine ที่ความเข้มข้นต่างๆ กราฟแสดงให้เห็นปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ระยะ G0/G1 (M1), S (M2), G2/M (M3) ในกลุ่ม A และ B ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และพบว่าปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ (M4) ปรากฏชัดเจนในกลุ่ม C และเพิ่มมากขึ้นในกลุ่ม D ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ G0/G1, S, G2/M และ เปอร์เซ็นต์การตาย โดยการใช้สาร roscovitine ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Roscovitine (μM)	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในแต่ละระยะ $\pm$ SD			
	G0/G1	S	G2/M	Apoptosis
กลุ่มควบคุม (n=5)	$73.6 \pm 3.5^{a,b}$	10.5 ± 2.4^a	15.8 ± 2.3^{ab}	0.4 ± 0.5^a
5 (n=7)	78.6 ± 2.6^b	7.5 ± 2.1^b	13.5 ± 2.9^a	0.5 ± 0.4^a
15 (n=7)	$73.5 \pm 4.0^{a,b}$	7.5 ± 1.1^b	18.0 ± 3.5^b	1.3 ± 0.9^a
30 (n=7)	$70.4 \pm 6.7^{a,c}$	8.4 ± 2.5^{ab}	12.0 ± 3.1^a	11.0 ± 11.0^b
45 (n=7)	63.7 ± 10.4^c	8.4 ± 2.8^{ab}	12.3 ± 3.3^a	16.2 ± 12.4^b

a, b, c แสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เปรียบเทียบตามเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ระหว่างกลุ่มการทดลองที่อยู่ระยะเดียวกัน

$\pm$ S.D. แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

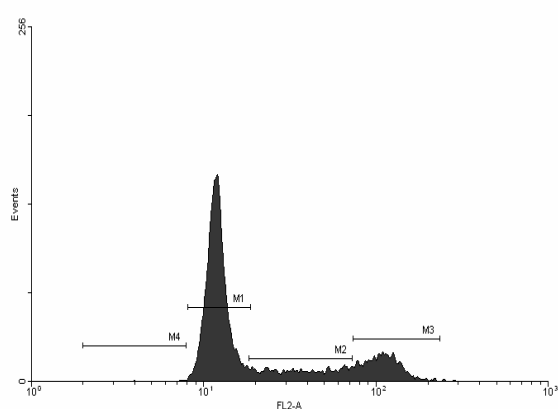
จากการเหนี่ยวนำเซลล์ dermal fibroblast ให้อยู่ในระยะ G0/G1 ด้วยการใช้สาร roscovitine พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่ในระยะ G0/G1 หลังจากการใช้ roscovitine ที่ความเข้มข้น 5 μM , 15 μM และ 30 μM เท่ากับ 78.6 ± 2.6 , 73.5 ± 4.0 และ 70.4 ± 6.7 ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเข้มข้น 15 μM และ 30 μM เท่ากับ 73.5 ± 4.0 และ ซึ่งไม่แตกต่างกัน ที่ความเข้มข้น 45 μM เท่ากับ 63.7 ± 10.4 ไม่แตกต่างกัน แต่ที่ความเข้มข้น 45 μM เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่ในระยะ G0/G1 (63.7 ± 10.4) ต่ำกว่าค่าที่พบในกลุ่มควบคุม (73.6 ± 3.5) อย่างมีนัยสำคัญ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่ในระยะ S หลังจากการใช้สาร roscovitine ที่ความเข้มข้น 5 μM และ 15 μM เท่ากับ 7.5 ± 2.1 และ 7.5 ± 1.1 ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และที่ความเข้มข้น 30 μM และ 45 μM เท่ากับ 8.4 ± 2.5 และ 8.4 ± 2.8 ซึ่งไม่แตกต่างจากที่ความเข้มข้น 5 μM และ 15 μM และไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (10.5 ± 2.4) ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ G2/M หลังจากการใช้สาร roscovitine ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้น 5 μM , 30 μM และ 45 μM เท่ากับ 13.5 ± 2.9 , 12.0 ± 3.1 และ 12.3 ± 3.3 ซึ่งไม่แตกต่างกัน แต่ต่ำกว่าค่าที่พบในความเข้มข้น 15 μM (18.0 ± 3.5) และกลุ่มควบคุม (15.8 ± 2.3) เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ความเข้มข้น 5 μM และ 15 μM (0.5 ± 0.4 , 1.3 ± 0.9) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ความเข้มข้น 30 μM และ 45 μM (11.0 ± 11.0 , 16.2 ± 12.4) สูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นที่ 5 μM และ 15 μM อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ภาพที่ 20 กราฟแสดงปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอของเซลล์ dermal fibroblast ในระยะ G0/G1 (M1), G1/S (M2), G2/M (M3) และเปอร์เซ็นต์การตาย (M4) ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S โดยการใช้สาร aphidicolin

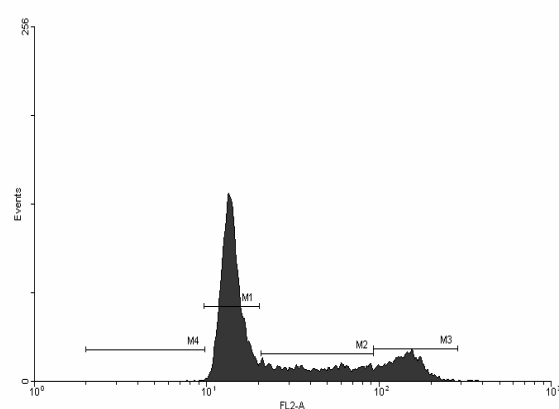
- A. กลุ่มที่ได้รับ aphidicolin ที่ความเข้มข้น 1.0 μM
- B. กลุ่มที่ได้รับ aphidicolin ที่ความเข้มข้น 2.5 μM
- C. กลุ่มที่ได้รับ aphidicolin ที่ความเข้มข้น 5.0 μM
- D. กลุ่มที่ได้รับ aphidicolin ที่ความเข้มข้น 10.0 μM

การทดลองที่ 4 การเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G1/S โดยใช้สาร aphidicolin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

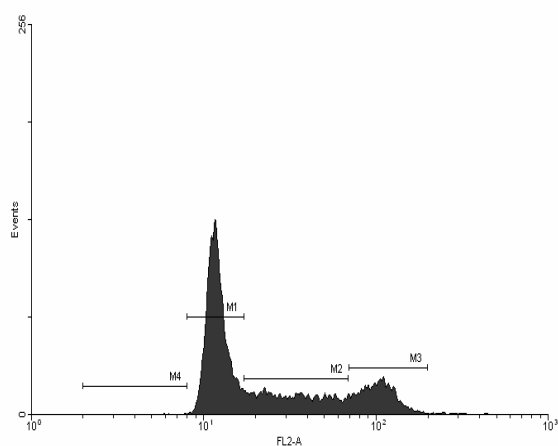
เมื่อตรวจสอบระยะต่างๆ ของเซลล์หลังจากการทดลองใช้สาร aphidicolin ที่ความเข้มข้นต่างๆ กราฟแสดงให้เห็นปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ระยะ G1/S (M2) ในทั้ง 4 กลุ่ม เพิ่มขึ้น แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน ดังภาพที่ 20



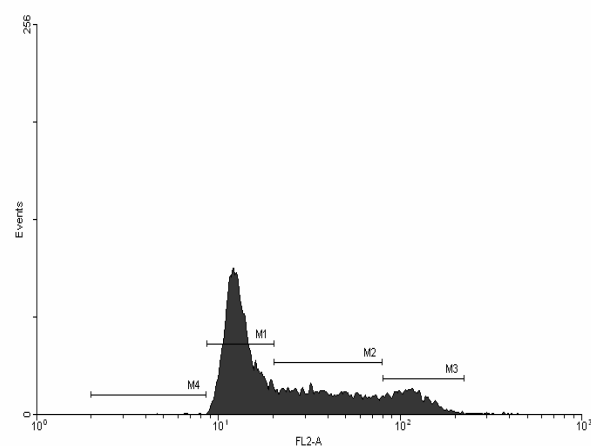
A.



B.



C.



D.

ภาพที่ 20

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ G0/G1, G1/S, G2/M และ เปอร์เซ็นต์การตาย ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S โดยการใช้สาร aphidicolin ที่ ความเข้มข้นต่างๆ

aphidicolin (μM)	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในแต่ละระยะ $\pm$ SD			
	G0/G1	G1/S	G2/M	Apoptosis
กลุ่มควบคุม (n=5)	73.6 ± 3.5^a	10.5 ± 2.4^a	15.8 ± 2.3^a	0.4 ± 0.5
1 (n=6)	63.5 ± 4.3^b	20.7 ± 4.2^b	15.3 ± 3.4^a	0.6 ± 1.0
2.5 (n=5)	60.4 ± 4.2^b	25.6 ± 5.3^{bc}	13.9 ± 2.2^{ab}	0.3 ± 0.2
5.0 (n=5)	59.9 ± 6.6^b	27.4 ± 2.9^c	13.2 ± 4.4^{ab}	1.4 ± 1.7
10 (n=6)	59.1 ± 8.9^b	29.6 ± 6.6^c	10.0 ± 4.2^b	1.3 ± 1.8

a, b, c แสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เปรียบเทียบตามเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ระหว่างกลุ่มการทดลองที่อยู่ระยะเดียวกัน

$\pm$ S.D. แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

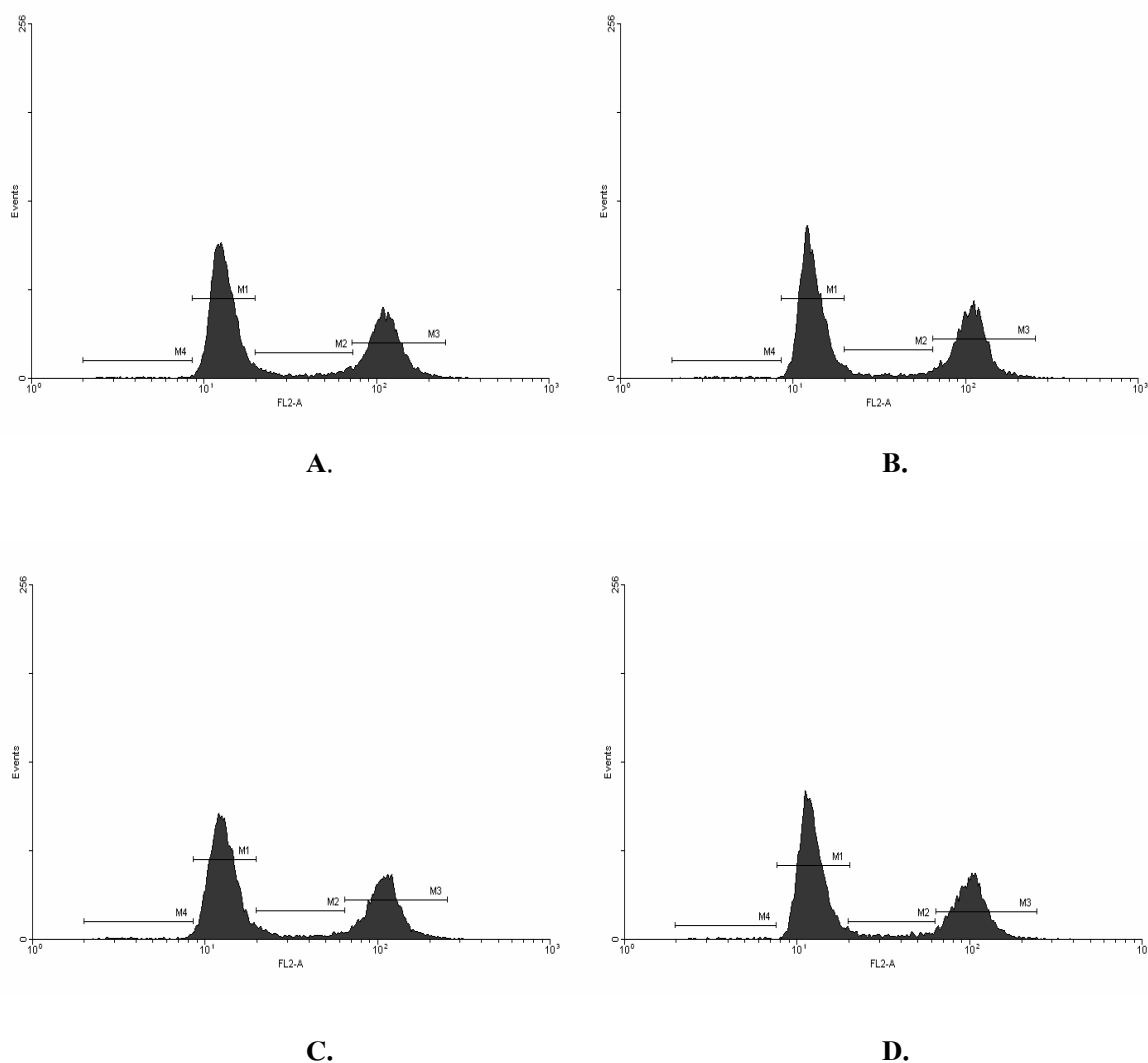
พบว่า ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ G0/G1 เท่ากับ 63.5 ± 4.3 , 60.4 ± 4.2 , 59.9 ± 6.6 และ 59.1 ± 8.9 หลังจากการใช้สาร aphidicolin ที่ความเข้มข้น 1 μM , 2.5 μM , 5.0 μM และ 10 μM ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (73.6 ± 3.5) ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ G1/S เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากการใช้สาร aphidicolin ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 μM ขึ้นไปเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเซลล์ที่อยู่ในระยะ G1/S เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสาร aphidicolin (ตารางที่ 4) เมื่อใช้สาร aphidicolin ที่ความเข้มข้น 2.5 μM , 5.0 μM และ 10 μM ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ในระยะ G1/S เท่ากับ 20.7 ± 4.2 , 25.6 ± 5.3 , 27.4 ± 2.9 และ 29.6 ± 6.6 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ในระยะ G2/M หลังจากการใช้สาร aphidicolin ที่ความเข้มข้น 10 μM (10.0 ± 4.2) มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (15.8 ± 2.3) และเมื่อใช้ aphidicolin ที่ความเข้มข้น 1 μM (15.3 ± 3.4) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ใช้ aphidicolin ที่ความเข้มข้น 2.5 μM และ 5.0 μM (13.9 ± 2.2 , 13.2 ± 4.4) ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มการทดลองที่ความเข้มข้นต่างๆ และไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ภาพที่ 21 กราฟแสดงปริมาณการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ของดีเอ็นเอของเซลล์ dermal fibroblast ในระยะ G0/G1 (M1), S (M2), G2/M (M3) และเปอร์เซ็นต์การตาย (M4) ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M โดยใช้สาร colcemid

- A. กลุ่มที่ได้รับ colcemid ที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/ml}$
- B. กลุ่มที่ได้รับ colcemid ที่ความเข้มข้น 0.25 $\mu\text{g/ml}$
- C. กลุ่มที่ได้รับ colcemid ที่ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/ml}$
- D. กลุ่มที่ได้รับ colcemid ที่ความเข้มข้น 1.0 $\mu\text{g/ml}$

การทดลองที่ 5 การเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G2/M โดยใช้สาร colcemid

เมื่อตรวจสอบระยะต่างๆ ของเซลล์หลังจากการใช้สาร colcemid กราฟแสดงให้เห็นปริมาณการดีฟลูออเรสเซนซ์ระยะ G2/M (M3) มีปริมาณสูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจนทั้ง 4 กลุ่ม และพบว่าปริมาณการดีฟลูออเรสเซนซ์ของระยะ G0/G1 (M4) และ S (M2) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ G0/G1, S, G2/M และ เปอร์เซ็นต์การตาย ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ G2/M โดยการใช้สาร colcemid ที่ ความเข้มข้นต่างๆ

colcemid ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในแต่ละระยะ $\pm$ SD			
	G0/G1	S	G2/M	Apoptosis
กลุ่มควบคุม (n=5)	73.6 ± 3.5^a	10.5 ± 2.4	15.8 ± 2.3^a	0.4 ± 0.5
0.10 (n=6)	51.4 ± 8.2^b	8.3 ± 2.6	38.5 ± 8.7^b	1.5 ± 0.4
0.25 (n=7)	52.5 ± 8.5^b	9.3 ± 3.4	36.2 ± 9.1^b	1.2 ± 0.6
0.50 (n=7)	52.3 ± 9.4^b	9.0 ± 2.9	36.5 ± 9.2^b	1.3 ± 0.9
1.0 (n=6)	54.0 ± 10.4^b	8.5 ± 3.1	35.1 ± 8.6^b	1.3 ± 0.8

a, b แสดงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เปรียบเทียบตามเปอร์เซ็นต์ของ เซลล์ระหว่างกลุ่มการทดลองที่อยู่ระยะเดียวกัน

$\pm$ S.D. แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ G0/G1 หลังจากการใช้สาร colcemid ที่ความเข้มข้น 0.1 μg , 0.25 μg , 0.5 μg และ 1.0 μg เท่ากับ 51.4 ± 8.2 , 52.5 ± 8.5 , 52.3 ± 9.4 และ 54.0 ± 10.4 ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (73.6 ± 3.5) ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ S หลังจากการใช้สาร colcemid ที่ความเข้มข้น 0.1 μg , 0.25 μg , 0.5 μg และ 1.0 μg เท่ากับ 8.3 ± 2.6 , 9.3 ± 3.4 , 9.0 ± 2.9 และ 8.5 ± 3.1 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (10.5 ± 2.4) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ dermal fibroblast ที่อยู่ในระยะ G2/M หลังจากการใช้สาร colcemid ที่ความเข้มข้น 0.1 μg , 0.25 μg , 0.5 μg และ 1.0 μg เท่ากับ 38.5 ± 8.7 , 36.2 ± 9.1 , 36.5 ± 9.2 และ 35.1 ± 8.6 ซึ่งสูงกว่าค่าที่พบในกลุ่มควบคุม (15.8 ± 2.3) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ความเข้มข้น 0.1 μg , 0.25 μg , 0.5 μg และ 1.0 μg (1.5 ± 0.4 , 1.2 ± 0.6 , 1.3 ± 0.9 , 1.3 ± 0.8) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (0.4 ± 0.5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วิจารณ์

การเลี้ยงเซลล์ dermal fibroblast ของสุนัขมีการรายงานในการทดลองของ Fray *et al.* (2004) เซลล์ dermal fibroblast สามารถเก็บจากชั้นเนื้อผิวหนังบริเวณหน้าท้องของสุนัข ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและสามารถประยุกต์ใช้ได้กับการเก็บผิวหนังบริเวณอื่นๆ ของร่างกาย dermal fibroblast ของสุนัขที่เพาะเลี้ยงจะถูกกระตุ้นในการเจริญแบ่งตัวด้วย growth factor ในซีรัม และมีการทดลองพบว่าโปรตีน fibronectin ที่ไฟโบรบลาสต์สร้างขึ้นเอง เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ (migration) ของไฟโบรบลาสต์ (Kohyama *et al.*, 2002, Leeb *et al.*, 2004) ในการแบ่งตัวและเจริญแผ่กระจายเป็นชั้นเดียวตามพื้นผิวของภาชนะเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะไม่เจริญซ้อนแถวหรือก่ายกัน การเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการให้เซลล์เจริญออกจากชิ้นเนื้อเยื่อผิวหนัง (primary explant) ใช้เวลา 1 สัปดาห์ เซลล์จะเจริญจนเต็มพื้นที่โดยรอบของชิ้นเนื้อเยื่อ และเป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการการ subculture เป็นครั้งแรก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bratka-Robia *et al.* (2002) ที่ทำการ subculture เป็นครั้งแรกในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ dermal fibroblast ของสุนัขแบบ primary explant และสามารถเลี้ยงไปจนถึง passage ที่ 16 แต่ยังไม่มียารายงานลักษณะโครงสร้างของเซลล์ dermal fibroblast ใน passage ที่สูงขึ้น ในการทดลองนี้พบว่าหลังจาก passage ที่ 7 เซลล์บางเซลล์จะเริ่มมีลักษณะโครงสร้างเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่และไม่มีส่วนแขนงของเซลล์ในการยึดเกาะ เนื่องจากบางเซลล์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเป็น transform cell เช่นมีการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมแต่ไม่มีการแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 เซลล์ ทำให้พบเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีแขนงของเซลล์สั้นลง (Adams *et al.*, 1968) โดยกระบวนการเกิดขึ้นเมื่อเซลล์มีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เซลล์จะพยายามปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมเพื่อดำรงชีวิตต่อไป ทำให้เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนไปจากปกติ และพบว่าบางเซลล์ตาย โดยเมื่อเซลล์เกิดความผิดปกติ จะถูกเหนี่ยวนำโดยให้เกิดกระบวนการ apoptosis ขึ้น เมื่อมองด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ตายจะหลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ (Alberts *et al.*, 1994)

วิธีการเลี้ยงเซลล์จากผิวหนังนอกจากการเลี้ยงแบบ primary explant แล้ว ยังสามารถทำได้โดยวิธีการใช้เอนไซม์ย่อยชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งเอนไซม์จะย่อยโปรตีนยึดเกาะระหว่างเซลล์กับเซลล์ หรือระหว่างเซลล์กับเนื้อเยื่อประสาน ทำให้เซลล์หลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยว ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำให้ได้เซลล์จากเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก และรวดเร็ว แต่วิธีการดังกล่าวมีข้อเสียคือเซลล์ที่ได้จะมีการเจือปนด้วยส่วนประกอบของเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น เส้นใยคอลลาเจน เส้นขน เซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของต่อมเหงื่อ ต่อมน้ำมัน เป็นต้น และต้องใช้ระยะเวลานานในการ subculture เพื่อให้ได้เซลล์ dermal

fibroblast ที่ไม่มีเซลล์อื่นๆ เจือปน และขั้นตอนในการใช้เอนไซม์เพื่อย่อยเซลล์ออกจากเนื้อเยื่อค่อนข้างมีความซับซ้อน เนื่องจากต้องเลือกชนิดของเอนไซม์ และระยะเวลา ในขั้นตอนต่างๆ ให้เหมาะสมกับเนื้อเยื่อนั้นๆ (Freshney, 2000)

การเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 โดยวิธีการลดปริมาณซีรัม 3 ช่วงเวลาคือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ให้ผลไม่แตกต่างกัน เซลล์ dermal fibroblast ของสุนัขเข้าสู่ระยะ G0/G1 ภายใน 24 ชั่วโมงเนื่องจากวงจรชีวิตเซลล์ปกติประมาณ 24 ชั่วโมง เมื่อมีการลดปริมาณซีรัมเซลล์จะเข้าสู่ระยะพักเพื่อพักตัว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 โดยใช้วิธีการลดปริมาณซีรัมในสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่นในสุกร (Boquest *et al.*, 1999, Kues *et al.*, 2000), โค (Cho *et al.*, 2005, Gibbons *et al.*, 2002, Cheong *et al.*, 2003) และแพะ (Yu *et al.*, 2003) มีการทดลองพบว่าเมื่อลดซีรัม เซลล์ของลูกโคเข้าสู่ระยะ G0/G1 เห็นได้ชัดเจนใน 48 และ 72 ชั่วโมง (Sun *et al.*, 2007) และในกระต่าย 96, 120 ชั่วโมง (Liu *et al.*, 2004) ในการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาการเข้าสู่ระยะ G0/G1 ของวงจรชีวิตเซลล์ขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมในการทดลอง เช่น การใช้เซลล์ใน passage แรกๆ จะทำให้อัตราการเจริญแบ่งเซลล์เป็นไปอย่างรวดเร็ว เซลล์จะเข้าสู่ระยะ G0/G1 เร็วกว่าการใช้เซลล์ใน passage ที่สูงขึ้น และสภาวะเฉพาะของเซลล์สัตว์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลอง (Kleinsmith and Kish, 1995) แม้ว่าการลดซีรัมที่ 48 และ 72 ชั่วโมงมีแนวโน้มที่จะทำให้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่ในระยะ G0/G1 มากกว่าแต่ทำให้เกิดการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการทดสอบในสัตว์ชนิดอื่นได้แก่ สุกร (Kues *et al.*, 2000, Lee and Piedrahita, 2002) โค (Cho *et al.*, 2005) และแพะ (Yu *et al.*, 2003) เนื่องจากการลดปริมาณซีรัมมีผลต่อการแสดงออกของยีนซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะพัก และเกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอในระยะต่อมา (Iyer *et al.*, 1999) และจะนำไปสู่กระบวนการตายของเซลล์ (Peng *et al.*, 1998) การลดปริมาณซีรัมทำให้เซลล์ขาดแคลนปัจจัยในการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอไม่สามารถจำลองตัวเองได้ (Gospodarowicz, 1974, Leof *et al.*, 1983, Brooks *et al.*, 1990, Lanza *et al.*, 2000) หรืออาจจะเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอหากระยะเวลาในการลดปริมาณซีรัมนานเกินไป นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆ เช่น สายพันธุ์ สภาวะการเพาะเลี้ยงที่จำเพาะกับเซลล์แต่ละชนิดอาจเป็นสาเหตุเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอได้

การเหนี่ยวนำเซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 สามารถทำได้โดยเลี้ยงให้เซลล์เจริญเต็มพื้นที่ (cell confluent) การทดลองในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ dermal fibroblast เข้าสู่ระยะ G0/G1 โดยเลี้ยงให้เซลล์เจริญจนเต็มพื้นที่ระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่าประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์

ที่เข้าสู่ระยะ G0/G1 มีค่าไม่แตกต่างกันในทั้ง 3 ช่วงเวลา (Sun *et al.*, 2007, Hayes *et al.*, 2005) ดังนั้นการเลี้ยงเซลล์จนเต็มพื้นที่ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 จึงทำการทดลองในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการลดระยะเวลาในการทดลองและลดปริมาณการใช้เซลล์รวมถึงอุปกรณ์และสารเคมี และผลการทดลองใน dermal fibroblast ของสุนัข พบว่า 91.7 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมดเข้าสู่ระยะ G0/G1 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานในโค (Katska *et al.*, 2002, Cho *et al.*, 2005) และในแมว (Gomez *et al.*, 2003) dermal fibroblast ของสุนัขเมื่อเลี้ยงเจริญจนเต็มพื้นที่ พบว่าปริมาณการตายของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

การใช้ roscovitine ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 ของวงจรชีวิตเซลล์ dermal fibroblast ของสุนัข พบว่าที่ความเข้มข้น 5 μM , 15 μM ทำให้เซลล์เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 (78.6 ± 2.6 , 73.5 ± 4.0) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (73.6 ± 3.5) และไม่เพิ่มปริมาณการตายของเซลล์ ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองในเซลล์ adult fibroblast และ fetal fibroblast ในโค ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 ของวงจรชีวิตเซลล์ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเซลล์ทั้งหมด โดยการใช้ roscovitine ที่ความเข้มข้น 15 μM และ 30 μM (Gibbons *et al.*, 2002, Cho *et al.*, 2005) ในการทดลองความเข้มข้นที่สูงขึ้น (30 μM และ 45 μM) ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 และปริมาณของเซลล์ในระยะ G0/G1 (70.4 ± 6.7 , 63.7 ± 10.4) จะต่ำกว่าที่ความเข้มข้น 5 μM , 15 μM และ กลุ่มควบคุม แต่จะพบการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) 11.0 ± 11.0 และ 16.2 ± 12.4 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.4 ± 0.5) ความเข้มข้นของ roscovitine ที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดอันตรรกกับเซลล์ได้เนื่องจากมีรายงานพบว่า roscovitine ที่ความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 10 μM มีผลสร้างความเสียหายให้แก่โปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการ transcription ซึ่งโปรตีน p53 จะตรวจสอบกระบวนการสร้างดีเอ็นเอและโปรตีนโดยเหนี่ยวนำให้เซลล์หยุดเพื่อซ่อมแซมสายดีเอ็นเอที่เสียหายโดยกระบวนการ DNA repair แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นที่ 25 μM เป็นความเข้มข้นที่สามารถทำลายโปรตีนต่างๆ ในกระบวนการสร้างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ได้แก่ เฮลิคัสดีสเตมิไลซิง โปรตีน ดีเอ็นเอไจเลส ดีเอ็นเอไพรมเอส ดีเอ็นเอไลเกส ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ซึ่งส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอได้ เซลล์จะเกิดการตายโดยวิธี apoptosis โดย p53 จะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง p21 จากนั้น p21 จะเป็นตัวกระตุ้นให้ mitochondria ปล่อย cytochrom C จะเปลี่ยน procaspase ให้เป็น caspase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีผลทำให้เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอ โครโมโซม รวมถึงออร์แกเนลล์ต่างๆ และเยื่อหุ้มเซลล์มีการแตกกระจาย (David-Pfeuty, 1999, Wesierska-Gadek *et al.*, 2005) ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของ Gibbons *et al.* (2002) และ Cho *et al.* (2005) พบว่าการใช้ roscovitine ที่ความเข้มข้น 30 μM จะทำให้การตายของเซลล์เพิ่มเป็น 6 เปอร์เซ็นต์

ของปริมาณเซลล์ทั้งหมด ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 ของวงจรชีวิตเซลล์ dermal fibroblast ของสุนัขคือ 5 μM เนื่องจากมีแนวโน้มเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 สูงกว่า และไม่พบการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น

การใช้ roscovitine เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการลดปริมาณซีรัม (serum starvation) และการเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่ (cell confluent) การทดลองพบว่าการใช้ roscovitine เหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G0/G1 ได้น้อยกว่าวิธีการลดปริมาณซีรัมและการเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่ ซึ่งใกล้เคียงกับการรายงานของ Gomez *et al.* (2003) ที่พบว่าปริมาณเซลล์ของแมวในระยะ G0/G1 ในการเหนี่ยวนำด้วยวิธีการใช้ roscovitine (56 เปอร์เซ็นต์) จะน้อยกว่าการเหนี่ยวนำโดยวิธีการลดปริมาณซีรัม (83 เปอร์เซ็นต์) และการเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่ (61 เปอร์เซ็นต์) การทดลองในสุนัขและแมวขัดแย้งกับการทดลองของ Gibbons *et al.* (2002) ในโคซึ่งพบว่า roscovitine สามารถเหนี่ยวนำให้มีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 (82.4 เปอร์เซ็นต์) ได้มากกว่าวิธีการลดปริมาณซีรัม (76.9 เปอร์เซ็นต์) และการทดลองของ Saikhun (2004) สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ G0/G1 มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ไม่แตกต่างกันทั้งวิธีการลดปริมาณซีรัมและการใช้ roscovitine ดังนั้นการใช้ roscovitine ต้องใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากการศึกษาที่ความเข้มข้นที่ 5 μM เป็นความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 ได้ แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้นพบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ในระยะ G0/G1 ไม่สูงขึ้น แต่กลับพบเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์มากขึ้น เนื่องจากมีรายงานสนับสนุนว่าที่ความเข้มข้นต่ำ 0.2 μM ถึง 0.7 μM มีผลในการยับยั้ง Cdk1, Cdk2 และ Cdk5 ใน fibroblasts ของคน (De Azevedo *et al.*, 1997, Meijer *et al.*, 1997, Alessi *et al.*, 1998, Schang *et al.*, 2000, Ljungman *et al.*, 2001)

ผลการเหนี่ยวนำให้เซลล์ dermal fibroblast ของสุนัขอยู่ในระยะ G0/G1 พบว่าการลดปริมาณซีรัม และการเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่ สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 ได้ 88-91 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด และพบเปอร์เซ็นต์การตายไม่เพิ่มขึ้น และพบว่าการลดปริมาณซีรัมและการเลี้ยงเซลล์ให้เจริญเต็มพื้นที่ 24 ชั่วโมง มีความเหมาะสมเนื่องจากเป็นระยะเวลาที่สั้น และมีแนวโน้มในการเกิดความเสียหายกับเซลล์น้อยกว่าการใช้ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ในขณะที่ roscovitine ที่ความเข้มข้น 5 μM เหมาะสมเนื่องจากสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 สูงกว่าการใช้ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น และไม่พบการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น

การใช้สาร aphidicolin พบว่า aphidicolin สามารถใช้ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ dermal fibroblast ของสุนัขอยู่ในระยะ G1/S (Wang *et al.*, 1993, Chang *et al.*, 2003) จากการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้น 1 μM , 2.5 μM , 5.0 μM และ 10 μM ปริมาณของเซลล์ในระยะ G1/S เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) จาก 10.5 ± 2.4 ในกลุ่มควบคุม เป็น 20.7 ± 4.2 , 25.6 ± 5.3 , 27.4 ± 2.9 , 29.6 ± 6.6 ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Kues *et al.* (2000) พบว่า aphidicolin ที่ความเข้มข้น 6 μM สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ fibroblast ในสุกรอยู่ในระยะ G1/S เพิ่มขึ้นจาก 15.2 เปอร์เซ็นต์ เป็น 23.8 เปอร์เซ็นต์ใน 5 ชั่วโมง และ 46.9 เปอร์เซ็นต์ใน 19 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 2.5 μM มีความเหมาะสมเนื่องจากสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G1/S ได้ดีกว่าการใช้ความเข้มข้น 1 μM แต่ให้ผลใกล้เคียงกับการใช้ความเข้มข้น 5.0 μM , 10 μM และไม่พบเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์เพิ่มขึ้น

การใช้ colcemid ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์สู่ระยะแบ่งตัวของวงจรชีวิตเซลล์ dermal fibroblast ของสุนัข จะทำให้เซลล์ G2/M เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) จาก 15.8 ± 2.3 ในกลุ่มควบคุม เป็น 38.5 ± 8.7 , 36.2 ± 9.1 , 36.5 ± 9.2 , 35.1 ± 8.6 ที่ความเข้มข้น 0.1 μg , 0.25 μg , 0.5 μg , และ 1.0 μg ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองในหนู hamster พบว่าใน 24 ชั่วโมงสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะ G2/M ได้ (Tsutsui *et al.*, 1984) และที่ 48 ชั่วโมงทำให้ tubulin dimers ไม่สามารถเข้ามารวมกันเป็นไมโครทิวบูลเพื่อทำหน้าที่ในกระบวนการแบ่งเซลล์ เซลล์จะถูกหยุดให้อยู่ในระยะ M ส่งผลให้ mitotic cyclin ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกิจกรรมในการแบ่งเซลล์มีระดับสูงขึ้น ทำให้เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอ ซึ่งนำไปสู่กระบวนการตายของเซลล์ได้ (Gallaher *et al.*, 2000, Panayiotidis *et al.*, 2006) ในการทดลองนี้ที่ความเข้มข้น 0.1 μg มีความเหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ dermal fibroblast สุนัข เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M ได้ ซึ่งไม่แตกต่างจากความเข้มข้นที่สูงขึ้น

จากการทดลอง สาร roscovitine และ aphidicolin เจือจางด้วย DMSO (dimethyl sulfoxide) ซึ่งในการทดลองใช้ความเข้มข้นสูงสุดที่ 0.34 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานพบว่าสาร DMSO มีผลในการเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในระยะต่างๆ ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ใน dermal fibroblast ของละมั่ง (Hashem *et al.*, 2006) และมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในสุกร และหนูแฮมสเตอร์ (Prather *et al.*, 1999, Fiore *et al.*, 2002)

สรุปและข้อเสนอแนะ

เมื่อใช้ roscovitine ที่ความเข้มข้น 5 μM สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เข้าสู่ระยะ G0/G1 ได้เพียงเล็กน้อยและเซลล์ไม่ตาย เมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นกลับทำให้เซลล์ตายเพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อใช้ roscovitine ที่ความเข้มข้นสูงควรลดเวลาการเลี้ยงลงเป็น 12-16 ชั่วโมง

aphidicolin ที่ความเข้มข้น 10 μM ให้ผลในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G1/S ได้สูงสุด แต่ควรเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงให้นานขึ้นหรือเพิ่มความเข้มข้นของ aphidicolin ให้มากกว่า 10 μM เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G1/S ให้มากขึ้น

การเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M ควรใช้ colcemid ที่ความเข้มข้น 0.1 μg แต่ควรเพิ่มเวลาในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G2/M นานขึ้นเป็น 36 หรือ 48 ชั่วโมง

ในการทดลองควรสังเกตลักษณะและรูปร่าง ของเซลล์ dermal fibroblast ที่เปลี่ยนแปลง ขณะที่เลี้ยงในอาหารที่ลดซีรั่ม หรือมีสารเคมีต่างๆ รวมทั้งการตรวจสอบจำนวนและลักษณะของโครโมโซมว่าผิดปกติหรือไม่

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กนกธร ปิยะธำรงรัตน์. 2546. เนื้อเยื่อวิทยา (histology). โอ.เอส. พรินติ้ง เฮ้าส์. กรุงเทพฯ.

กรรณิกา ชัชวาลวานิช. 2546. จุลกายวิภาคศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์. 2547. เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ **Basic technique in animal cell culture**. มหาวิทยาลัยศิลปากร, กรุงเทพฯ.

โกวิทย์ พัฒนาปัญญาสัตย์. 2539. โฟลไซโทเมทรี. วงตะวัน, กรุงเทพฯ.

นวพรรณ จารุรักษ์. 2549. **Cell cycle and cell cycle control**. แหล่งที่มา:
http://cai.md.chula.ac.th/lesson/lesson4511/html/cell_main.html, 01 พฤศจิกายน 2549.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2546. พันธุศาสตร์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปัญญา กุลพงษ์. 2549. **Basic principles of chemotherapy**. โรคมะเร็งในเด็ก. แหล่งที่มา:
http://www.med.cmu.ac.th/dept/pediatrics/04-divisions_home_thai/08-hema-onco-home/Panja-book/chapter3.htm, 01 มกราคม 2549.

ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547. ชีววิทยาของเซลล์ (Cell biology). โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

Adams, E.W., L. P. Carter and J. Walter. 1968. Growth and Maintenance of the Canine Venereal Tumor in Continuous Culture. **Cancer Res** 28: 753-757.

Alberts, B., D. Bray and J. Lewis. 1994. **Molecular Biology of the Cell**. 3rd ed, Garland Publishing Inc, New York.

- Alessi, F., S. Quarta and E. Prosperi. 1998. The cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine arrest human fibroblasts in G1 phase by specific inhibition of CDK2 kinase activity. **Exp Cell Res** 245: 8-18.
- Aoki, K., M. Aoki, M. Sugai, N. Harada, H. Miyoshi, T. Tsukamoto, T. Mizoshita, M. Tatematsu, H. Seno, T. Chiba, M. Oshima, C. L. Hsieh and M. M. Taketo. 2007. Chromosomal instability by beta-catenin/TCF transcription in APC or beta-catenin mutant cells. **Oncogene** 26: 3511-3520.
- Baserga, R. 1984. Growth in size and cell DNA replication. **Exp Cell Res** 151: 1-5.
- Bigler, R. D. 1987. A comparison of low-power helium-cadmium and argon ultraviolet lasers in commercial flow cytometers. **Cytometry** 8: 441.
- Booth, B. A., K. L. Polak and J. Uitto. 1980. Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. I. Optimization of the culture conditions for synthesis of type I and type III procollagens. **Biochim Biophys Acta** 607: 145-160.
- Boquest, A. C., B. N. Day and R. S. Prather. 1999. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. **Biol Reprod** 60: 1013-1019.
- Borner, M. M., C. E. Myers, O. Sartor, Y. Sei, T. Toko, J. B. Trepel and E. Schneider. 1995. Drug-induced apoptosis is not necessarily dependent on macromolecular synthesis or proliferation in the p53-negative human prostate cancer cell line PC-3. **Cancer Res** 55: 2122-2128.
- Bratka-Robia, C. B., G. Mitteregger, A. Aichinger, M. Egerbacher, M. Helmreich and E. Bamberg. 2002. Primary cell culture and morphological characterization of canine dermal papilla cells and dermal fibroblasts. **Veterinary Dermatology** 13: 1-6.

- Brooks, R. F., M. Howard, D. S. Leake and P. N. Riddle. 1990. Failure of platelet-derived growth factor plus insulin to stimulate sustained proliferation of Swiss 3T3 cells. Requirement for hydrocortisone, prostaglandin E1, lipoproteins, fibronectin and an unidentified component derived from serum. **J Cell Sci** 97: 71–78.
- Butler, M. 2004. **Animal Cell Culture and Technology**. 2nd ed, Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford.
- Chamla, Y., M. Roumy, M. Lassegues and J. Battin. 1980. Altered sensitivity to colchicine and PHA in human cultured cells. **Hum Genet** 53: 249-253.
- Chang, W. C., S. R. Rudiger, S. K. Walker, H. M., Hamilton, K. M. Hartwich and T. T. Peura. 2003. Effect of treatment of somatic cells with aphidicolin on the in vitro development of cloned sheep embryos. **Theriogenology** 59: 241
- Cheng, C. H. and R. D. Kuchta. 1993. DNA polymerase epsilon: aphidicolin inhibition and the relationship between polymerase and exonuclease activity. **Biochemistry** 32: 8568-8574.
- Cheong, H. T., T. M. Park, K. Ikeda and Y. Takahashi. 2003. Cell cycle analysis of bovine cultured somatic cells by flow cytometry. **Jpn J Vet Res** 51: 95-103.
- Cho, S. R., S. A. Ock, J. G. Yoo, B. Mohana kumar, S. Y. Choe and G. J. Rho. 2005. Effects of Confluent, Roscovitine Treatment and Serum Starvation on the Cell cycle Synchronization of Bovine Foetal Fibroblasts. **Reproduction in Domestic Animals** 40: 171–176.
- Cibelli, J. B., S. L. Stice, P. J. Golueke, J. J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell and F. A. Ponce de Leon. 1998. Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts. **Science** 280: 1256–1258.

Cooper, M. L., J. F. Hansbrough, R. L. Spielvogel, R. Cohen, R. L. Bartel and G. Naughton.

1991. In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. **Biomaterials** 12: 243-248.

Crissman, H. A. and J. A. Steinkamp. 1973. Rapid simultaneous measurement of DNA, protein and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. **J Cell Biol** 59: 766.

Darzynkiewicz, Z. 1990. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. **Methods in Cell Biology** 33: 285-298.

Darzynkiewicz, Z., S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M. A. Hotz, P. Lassota and F. Traganos. 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry** 13: 795-808.

Darzynkiewicz, Z. 1992. **Mammalian Cell Cycle Analysis. In: The Cell Cycle: A Practical Approach.** P. Fantes and R. Brooks (eds.), Oxford University Press, Oxford,

Darzynkiewicz, Z., J. Gong, G. Juan, B. Ardelt and F. Traganos. 1996. Cytometry of cyclin proteins. **Cytometry** 25: 1-13.

Darzynkiewicz, Z., P. Robinson, P. Dean, L. Dressler, P. Rabinovitch, C. Stewart, H. Tanke and L. Wheelless. 1997. **Nucleic Acid Analysis. Introduction. In: Current Protocols in Cytometry.** New York.

Darzynkiewicz, Z., E. Bedner and P. Smolewski. 2001. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. **Semin Hematol** 38: 179-193.

- David-Pfeuty, T. 1999. Potent inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 induce nuclear accumulation of wild-type p53 and nucleolar fragmentation in human untransformed and tumor-derived cells. **Oncogene** 18: 7409-7422.
- De Azevedo, W. F., S. Leclerc, L. Meijer, L. Havlicek, M. Strnad and S. H. Kim. 1997. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. **Eur J Biochem** 243: 518-526.
- Deysson, G. 1968. Antimitotic substances. **Int Rev Cytol** 24: 99-148.
- Donjerkovic, D. and D. W. Scott. 2000. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. **Cell Res** 10: 1-16.
- Dustin, P. 1978. **Microtubules**, Springer Verlag. New York.
- Evans, H. E. and A. Delahunta. 2000. **Guide to the Dissection of the Dog**. WB Saunders, 5th Ed. New York.
- Fan, X. and C. M. Price. 1997. Coordinate regulation of G- and C strand length during new telomere synthesis. **Mol Biol Cell** 8: 2145-2155.
- Fiore, M., R. Zanier and F. Degrassi. 2002. Reversible G(1) arrest by dimethyl sulfoxide as a new method to synchronize Chinese hamster cells. **Mutagenesis** 17: 419-24.
- Ford, H. L., R. A. Sclafani and J. Degregori. 2004. Cell cycle regulatory cascades. In: Stein GS, Pardee AB, editors. **Cell cycle and growth control: biomolecular regulation and cancer**. 2nd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Liss.

Forsburg, S. L. 2002. **The cell cycle**. Dr Forsburg's all-purpose Cell Cycle Lecture Notes.

แหล่งที่มา: <http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/cclecture.html>, 15 เมษายน 2007.

Fray, T. R., A. L. Watson, J. M. Croft, C. D. Baker, J. Bailey, N. Sirel, A. Tobias and P. J.

Markwell. 2004. A combination of aloe vera, curcumin, vitamin C, and taurine increases canine fibroblast migration and decreases tritiated water diffusion across canine keratinocytes in vitro. **J Nuture** 134: 2117S-2119S.

Freshney, R. I. 2000. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 4th ed. Wiley, New York.

Gallaher, B. W., A. Berthold, J. Klammt, M. Knüpfer, J. Kratzsch, M. Bartsch and W. Kiess.

2000. Expression of apoptosis and cell cycle related genes in proliferating and colcemid arrested cells of divergent lineage. **Cell Mol Biol** 46: 79-88.

Gibbons, J., S. Arat, J. Rzucidlo, K. Miyoshi, R. Waltenburg, D. Respass, A. Venable and S.

Stice. 2002. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. **Biol Reprod** 66: 895-900.

Gomez, M. C., J. A. Jenkins, A. Giraldo, R. F. Harris, A. King, B. L. Dresser and C. E. Pope.

2003. Nuclear transfer of synchronized african wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. **Biol Reprod** 69: 1032-1041.

Gong, J., F. Traganos and Z. Darzynkiewicz. 1993. Simultaneous analysis of cell cycle kinetics

at two different DNA ploidy levels based on DNA content and cyclin B measurements. **Cancer Res** 53: 5096-5099.

Gospodarowicz, D., 1974. Localisation of a fibroblast growth factor and its effects alone and

with hydrocortisone on 3T3 cell growth. **Nature** 249: 123-127.

- Hardy, K., S. Spanos, D. Becker, P. Iannelli, R. M. Winston and J. Stark. 2001. From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development. **Proc Natl Acad Sci USA** 98: 1655–1660.
- Hartwell, L. H. and T. A. Weinert. 1989. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. **Science** 246: 629-634.
- Hashem, M. A., D. P. Bhandari, S. K. Kang, B. C. Lee and H. W. Suk. 2006. Cell cycle analysis of in vitro cultured goral (*Naemorhedus caudatus*) adult skin fibroblasts. **Cell Biol Int** 30: 698-703.
- Hayes, O., B. Ramos, L. L. Rodriguez, A. Aguilar, T. Badia and F. O. Castro. 2005. Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle. **Anim Reprod Sci** 87: 181-192.
- Hedman, K., M. Kurkinen, K. Alitalo, A. Vaheri, S. Johansson and M. Hook. 1979. Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures. **J Cell Biology** 81: 83-91.
- Hockenberry, D., G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber and S. J. Korsmeyer. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature** 384: 334–336.
- Huberman, J. A. 1981. New views of the biochemistry of eucaryotic DNA replication revealed by aphidicolin, an unusual inhibitor of DNA polymerase alpha. **Cell** 23: 647-648.
- Iyer, V. R., M. B Eisen, D. T. Ross, G. Schuler, T. Moore, J. C. Lee, J. M. Trent, L. M. Staudt, J. Jr. Hudson, M. S. Boguski, D. Lashkari, D. Shalon, D. Botstein and P. O. Brown. 1999. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. **Science** 283: 83-87.

- Jang, G., M. K. Kim, H. J. Oh, M. S. Hossein, Y. H. Fibrianto, S. G. Hong, J. E. Park, J. J. Kim, H. J. Kim, S. K. Kang, D. Y. Kim and B. C. Lee. 2007. Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology** 67: 941-947.
- Jensen, C. G., E. A., Davison, S. S. Bowser and C. L. Rieder. 1987. Primary cilia cycle in PtK1 cells: Effects of colcemid and taxol on cilia formation and resorption. **Cell Modif Cyloskel** 7: 187-197.
- Kanda, R., T. Jiang, I. Hayata and S. Kobayashi. 1994. Effects of colcemid concentration on chromosome aberration analysis in human lymphocytes. **J Radiat Res (Tokyo)** 35: 41-47.
- Kasinathan, P., J. G. Knott, Z. Wang, D. J. Jerry and J. M. Robl. 2001. Production of calves from G1 fibroblasts. **Nat Biotechnol** 19: 1176–1178.
- Kato, Y., T. Tani, Y. Sotomaru, K. Kurokawa, J. Kato, H. Doguchi, H. Yasue and Y. Tsunoda. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of single adult. **Science** 282: 2095–2098.
- Kato, Y., T. Tani and Y. Tsunoda. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **J Reprod Fertil** 120: 231–237.
- Katska, L., M. Bochenek, G. Kania, B. Rynska and Z. Smorag. 2002. Flow cytometric cell cycle analysis of somatic cells primary cultures established for bovine cloning. **Theriogenology** 58: 1733-1744.
- King, D.G. 2006. **Introduction to Histology**. College of Science; Department of Anatomy, School of Medicine. แหล่งที่มา: <http://www.siumed.edu/~dking2/intro/IN008b1.htm>, 16 January 2006

- Kleinsmith, L. J. and V. M. Kish. 1995. **Principles of cell and molecular biology**. 2nd ed. Harper Collins College Publishers, New York.
- Kohyama, T., X. Liu, H. J. Kim, T. Kobayashi, R. F. Ertl, F. Q. Wen, H. Takizawa and S. I. Rennard. 2002. Prostacyclin analogs inhibit fibroblast migration. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 283: L428-432.
- Kolman, A., N. Kotova and J. Grawé. 2002. Aphidicolin induces 6-thioguanine resistant mutants in human diploid fibroblasts. **Mutat Res** 499: 227-233.
- Korfiatis, N., A. Trounson and O. Lacham Kaplan. 2001. Cell synchronization for the purposes of nuclear transfer in the bovine. **Cloning Stem Cells** 3: 125-138.
- Krishan, A. 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of cell cycle by propidium iodide staining. **J Cell Biol** 66:188.
- Kues, W. A., M. Anger, J. W. Carnwath, D. Paul, J. Motlik and H. Niemann. 2000. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. **Biol Reprod** 62: 412-419.
- Kuriyama, M., M. C. Wang, C. I. Lee, L. D. Papsidero, C. S. Killian, H. Inaji, N. H. Slack, T. Nishiura, G. P. Murphy and T. M. Chu. 1981. Use of human prostate-specific antigen in monitoring prostate cancer. **Cancer Res** 41: 3874-3876.
- Kurtycz, D. F., R. Logrono, C. Harris, S. Asplund and L. O'Donnell. 1998. Use of fine needle aspiration for fibroblast culture. **Pediatr Pathol Lab Med** 18: 35-39.
- Kuwakado, K., M. Kubota, H. Hirota, S. Adachi, K. Matsubara, Y. Kasai, Y. Akiyama and H. Mikawa. 1993. Aphidicolin potentiates apoptosis induced by arabinosyl nucleosides in human myeloid leukemia cell lines. **Biochem Pharmacol** 46: 1909-1916.

- Lanza, R. P., J. B. Cibelli, C. Blackwell, V. J. Cristofalo, M. K. Francis, G. M. Baerlocher, J. Mak, M. Schertzer, E. A. Chavez, N. Sawyer, P. M. Lansdrop and M. D. West. 2000. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. **Science** 288: 665-668.
- Latt, S. A. 1973. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. **Proc Natl Acad Sci USA** 70: 3395.
- Latt, S. A. and G. Stetten. 1976. Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. **J Histochem Cytochem** 24: 24.
- Lee, C. K. and J. A. Piedrahita. 2002. Inhibition of apoptosis in serum starved porcine embryonic fibroblasts. **Mol Reprod Devel** 62: 106-112.
- Leeb, S. N., D. Vogl, J. Grossmann, W. Falk, J. Schölmerich, G. Rogler and C. M. Gelbmann. 2004. Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts. **Am J Gastroenterol** 99: 335-340.
- Leof, E. B., J. J. Van Wyk, E. J. O'Keefe and W. J. Pledger. 1983. Epidermal growth factor (EGF) is required during the traverse of early G1 in PDGF stimulated density-arrested BalB/c-3T3 cells. **Exp Cell Res** 147: 202-208.
- Levenson, V. and J. Hamlin. 1993. A general protocol for evaluation the specific effects of DNA replication inhibitors. **Nucleic Acids Res** 21: 3997-4004.
- Lindenboim, L., R. Diamond, E. Rothenberg and R. Stein. 1995. Apoptosis induced by serum deprivation of PC12 cells is not preceded by growth arrest and can occur at each phase of the cell cycle. **Cancer Res** 55: 1242-1247.

- Liu, C. T., K. C. Yu and J. C. Ju. 2004. Cell cycle stage analysis of rabbit foetal fibroblasts and cumulus cells. **Reprod Domest Anim** 39: 385-390.
- Ljungman, M. and M. T. Paulsen. 2001. The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. **Mol Pharmacol** 60: 785-789.
- Mareel, M. M. and M. DeMets. 1984. Effect of microtubule inhibitors on invasion and on related activities of tumor cells. **Int Rev Cytol** 90: 125-168.
- Meijer, L., A. Borgne, O. Mulner, J. P. J. Chong, J. J. Blow, N. Inagaki, M. Inagaki, J. G. Delcros and J. P. Moulinoux. 1997. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. **Eur J Biochem** 243: 527-536.
- Memili, E, E. Behboodi, S. A. Overton, M. O'Coin, A. Zahedi, H. M. Meade and Y. Echelard. 2004. Synchronization of goat fibroblast cells at quiescent stage and determination of their transition from G0 to G1 by detection of cyclin D1 mRNA. **Cloning and Stem Cells** 6: 58-66.
- Mills, J. C., L. H. Kim and R. N. Pittman. 1997. Differentiation to an NGF-dependent state and apoptosis following NGF removal both occur asynchronously in cultures of PC12 cells. **Exp Cell Res** 23: 337-345.
- Morgan, D. O. 1995. Principles of CDK regulation. **Nature** 374: 131-134.
- Murray, A. W. and M. W. Kirschner. 1989. Dominoes and clocks: The union of two views of the cell cycle. **Science** 246: 614-621.

- Nishiyama, I. and T. Fujii. 1992. Laminin-induced process outgrowth from isolated fetal rat C-cells. **Exp Cell Res** 198-214.
- Nomura, T. 1980. In vivo cell cycle synchronization of the murine sarcoma 180 by continuous colcemid infusion (author's transl). **Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi**. 54: 1719-1732.
- Oswald, T. Avery, C. M. MacLeod and M. McCarty. 1944. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types; Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated From Pneumococcus Type III. **J Exp Med** 79: 137-158.
- Panayiotidis, M. I., R. C. Rancourt, A. Pappa and C. W. White. 2006. Effect of cell cycle growth arrest on global DNA methylation status in human lung epithelial-like (A549) cells. **In Vivo** 20: 861-865.
- Pardee, A. B., R. Dubrow, J. L. Hamlin and R. F. Kletzien. 1978. Animal cell cycle. **Annu Rev Biochem** 47: 715-750.
- Pedrail-Noy, G., S. Spadari, A. Miller-Faures, A. O. A. Miller, J. Kruppa and G. Koch. 1980. Synchronization of HeLa by inhibition of DNA polymerase α with aphidicolon. **Nucleic Acids Res** 8: 377-387.
- Peng, X., T. Maruo, H. Matsuo, S. Takekida and J. Deguchi. 1998. Serum deprivation-induced apoptosis in cultured porcine granulosa cells is characterized by increased expression of p53 protein, Fas antigen and Fas ligand and by decreased expression of PCNA. **Endocr J** 45: 247-253.
- Phillips, M. E. and A. Taylor. 1992. Effect of colcemid on the water permeability response to vasopressin in isolated perfused rabbit collecting tubules. **J Physiol** 456: 591.

- Pittman, S. M., D. Strickland and C. M. Ireland. 1994. Polymerization of tubulin in apoptotic cells is not cell cycle dependent. **Exp Cell Res** 215: 263-272.
- Poluha, W., D. K. Poluha and A. H. Ross. 1995. TrkA neurogenic receptor regulates differentiation of neuroblastoma cells. **Oncogene** 10: 185-189.
- Prather, R. S., A. C. Boquest and B. N. Day. 1999. Cell cycle analysis of cultured porcine mammary cells. **Cloning** 1: 17-24.
- Ranger, A. M., B. A. Malynn and S. J. Korsmeyer. 2001. Mouse models of cell death. **Nat Genet** 28: 113-118.
- Rawson, C. L., D. T. Loo, J. R. Duimstra, O. R. Hedstrom, E. E. Schmidt and D. W. Barnes. 1991. Death of serum-free mouse embryo cells caused by epidermal growth factor deprivation. **J Cell Biol** 113: 671-680.
- Rieder, C. L. and R. E. Palazzo. 1992. Colcemid and the mitotic cycle. **J Cell Sci** 102: 387.
- Ruhl, M., E. Sahin, M. Johannsen, R. Somasundaram, D. Manski, E. O. Riecken and D. Schuppan. 1999. Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax. **J Biol Chem** 274: 34361-34368.
- Saikhun, J. 2004. **Somatic cell cloning in swamp buffalo (Bubalus Bubalis)**. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy (anatomy) faculty of graduate studies, Mahidol University. Thailand.
- Saikhun, J., N. Kitiyanant, C. Songtaveesin, K. Pavasuthipaisit and Y. Kitiyanant. 2004. Development of swamp buffalo (Bubulus Bubalis) embryos after parthenogenetic

activation and nuclear transfer using serum fed or starved fetal fibroblasts. **Reprod Nutr Dev** 44: 65–78.

Schang, L. M., A. Rosenberg and P. A. Schaffer. 2000. Roscovitine, a specific inhibitor of cellular cyclin-dependent kinases, inhibits herpes simplex virus DNA synthesis in the presence of viral early proteins. **J Virol** 74: 2107-2120.

Schimke, R. T., A. Kung, S. S. Sherwood, J. Sheridan and R. Sharma. 1994. Life, death and genomic change in perturbed cell cycles. **Philos Trans R Soc London B Biol Sci** 345: 311-317.

Shackney, S. E. and T. V. Shankey. 1999. Cell Cycle Models for Molecular Biology and Molecular Oncology: **Exploring New Dimensions Cytometry** 35: 97-116.

Shankey, T. V., P. S. Rabinovitch, B. Bagwell, K. D. Bauer, R. E. Duque, D. W. Hedley, B. H. Mayall and L. Wheelless. 1993. Guidelines for Implementation of Clinical DNA Cytometry. **Cytometry** 14: 472-477.

Shapiro, H. M. 1981. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y. **Cytometry** 2: 143.

Sherwood, S. W., J. P. Sheridan, R. T. Schimke. 1994. Induction of apoptosis by the anti-tubulin drug colcemid: relationship of mitotic checkpoint control to the induction of apoptosis in HeLa S3 cells. **Exp Cell Res** 215: 373-379.

Sluder, G. 1991. **The practical use of colchicine and colcemid to reversibly block microtubule assembly in living cells.** In *Advanced Techniques in Chromosome Research* (ed. K.W. Adolph), Marcel Dekker, New York.

- Spadari, S., F. Sala and G. Pedrali-Noy. 1982. Aphidicolin, a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes. **Trends Biochem Sci** 7: 29–32.
- Spadari, S., F. Focher, F. Sala, G. Ciarrocchi, G. Koch, A. Falaschi and G. Pedrali-Noy. 1985. Control of cell division by aphidicolin without adverse effects upon resting cells. **Arzneimittelforschung** 35: 1108-1116.
- Stein, G. S. and A. B. Pardee. 2004. **Cell cycle and growth control**, 2nd ed. biomolecular regulation and cancer / edited by Hoboken, N. J., Wiley-Liss.
- Stice, S. L., J. Gibbons, J. R. Rzucidlo and C. A. Baile. 2000. Improvements in nuclear transfer procedures will increase commercial utilization of animal cloning. **Asian Aust J Anim Sci** 13: 856-860.
- Stubblefield, E. 1964. **DNA synthesis and chromosomal morphology of Chinese hamster cells cultured in media containing N-deacetyl-N-methylcolchicine (Colcemid)**. In Cytogenetics of Cells in Culture (ed. R.J. Harris), Academic Press. New York.
- Sun, X. Z., S. H. Wang, Y. H. Zhang, Y. P. Dai and N. Li. 2007. Cell cycle synchronization of Fibroblast derived from transgenic cloned Cattle ear skin: effect of serum starvation, Roscovitine, and contact inhibition. **Reproduction, Fertility and Development** 19: 161–162.
- Tortora, G. J. and S. R. Grabowski. 1996. **Principles of Anatomy and Physiology**. Harper Collins College Publisher, New York.
- Traganos, F., Z. Darzynkiewicz and T. Sharpless. 1977. Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. **J Histochem Cytochem** 25: 46.

- Tsuchida, T., K. Yoshimura, Y. Shirayama and K. Kawamoto. 1998. Colcemid-induced apoptosis of cultured human glioma: electron microscopic and confocal laser microscopic observation of cells sorted in different phases of cell cycle. **Cytometry** 31: 295-299.
- Tsutsui, T., H. Maizumi and J. C. Barrett. 1984. Colcemid-induced neoplastic transformation and aneuploidy in Syrian hamster embryo cells. **Carcinogenesis** 5: 89-93.
- Urakawa, M, A. Ideta, T. Sawada and Y. Aoyagi. 2004. Examination of modified cell synchronization method and bovine nuclear transfer using synchronized early G1 phase fibroblast cells. **Theriogenology** 62: 714–728.
- Urbani, L., S. W. Sherwood and R. T. Schimke. 1995. Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle progression by drugs employed in cell synchronization. **Exp Cell Res** 219: 159-168.
- Vielh, P., H. Magdelenat, Y. Remvikos and B. Dutrillaux. 1991. **Analysis of DNA content**. In: Vielh P., Guides to Clinical Aspiration Biopsy: Flow Cytometry. New York.
- Vignon, X., P. Chesne, D. Bourlue, J. Flechon and J. P. Renard. 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. **CR Acad Sci III** 121: 735–745.
- Wang, N. D., J. R. Testa and D. I. Smith. 1993. Determination of the specificity of aphidicolin-induced breakage of the human 3p14.2 fragile site. **Genomics** 17: 341-347.
- Wang, T. S. 1991. Eukaryotic DNA polymerases. **Annu Rev Biochem** 60: 513–520.
- Watson, A., C. Baker, J. Bailey, T. Fray and P. Markwell. 2004. A high yield method for growing primary canine keratinocytes. **Veterinary Journal** 168: 81-86.

- Wesierska-Gadek, J., M. Gueorguieva and M. Horky. 2005. Roscovitine-induced up-regulation of p53AIP1 protein precedes the onset of apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. **Mol Cancer Ther** 4: 503.
- Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature** 385: 810–813.
- Wilson, L., K. Anderson and D. Chin. 1976. **Nonstoichiometric poisoning of microtubule polymerization:** A model for the mechanism of action of the vinca alkaloids, podophylcotoxin and colchicine. In Cell Motility (ed. Goldman, R. Pollard, T. and Rosenbaum, J.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Yamada, K. and R. Itoh. 1994. Involvement of DNA polymerase delta and/or epsilon in joining UV-induced DNA single strand breaks in human fibroblasts. **Biochim Biophys Acta** 1219: 302-306.
- Yu, Y. S., X. S. Sun, H. N. Jiang, Y. Han, C. B. Zhao and J. H. Tan. 2003. Studies of the cell cycle of in vitro cultured skin fibroblasts in goats: work in progress. **Theriogenology** 59: 1277-1289.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเซลล์ canine dermal fibroblast (DMEM + 10% FBS)

1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Gibco)	13.4	กรัม
Fetal bovine serum (FBS)	100	มิลลิลิตร
NaHCO ₃	3.7	กรัม
Penicillin-streptomycin	10	มิลลิลิตร

เติมน้ำกรองจนครบ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 7.2-7.4 ด้วย HCL และ NaOH นำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปกรองด้วยเครื่องกรอง (Corning Bottle Top Filter, 0.22 µm) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส

การเตรียม Phosphate buffer saline (PBS)

1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

NaCL	8	กรัม
KCL	0.2	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม
NaH ₂ PO ₄	1.44	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 7.2-7.4 ด้วย HCL และ NaOH นำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลายในการแช่แข็งเซลล์

10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (20%)	2	มิลลิลิตร
อาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM+10% FBS+1% penicillin-streptomycin)	8	มิลลิลิตร

การเตรียม Propidium iodide

Stock solution 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

Propidium iodide (cat no. P4170 sigma)	25	มิลลิกรัม
PBS	25	มิลลิลิตร
เก็บให้พ้นแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส		

การเตรียม Roscovitine

Stock solution 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

Roscovitine (cat no. R7772 sigma)	5	มิลลิกรัม
DMSO	1	มิลลิลิตร
เก็บให้พ้นแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส		

การเตรียม Aphidicolin

Stock solution 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

Aphidicolin (cat no. 10797 sigma)	1	มิลลิกรัม
DMSO	100	ไมโครลิตร
เก็บให้พ้นแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส		

การเตรียม 70% alcohol สำหรับฆ่าเชื้อในห้องเลี้ยงเซลล์

1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Alcohol 95 %	750	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	รักษิณีย์ คำมานิตย์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	0๕ กันยายน ๒๕๒๔
สถานที่เกิด	อ. ภูเรือ จ. เลย
ประวัติการศึกษา	-ระดับประถมศึกษาโรงเรียนบ้านแก่งม่วง อ. ภูเรือ จ. เลย -ระดับมัธยมศึกษาโรงเรียนเลขอนุกูลวิทยา อ. เมือง จ. เลย -ระดับปริญญาตรี (วท.บ. สัตวศาสตร์) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลภาคตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี -ระดับปริญญาโท (วท.ม. กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปีการศึกษา ๒๕๔๕

