



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (คลินิกศึกษาทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

คลินิกศึกษาทางสัตวแพทย์

สัตวแพทยศาสตร์

สาขา

คณะ

เรื่อง ประสิทธิภาพของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมลูกสุนัขในการฟื้นฟูแผลที่กระจกตา
ในกระต่าย

Effects of Puppy Deciduous Teeth Stem Cells on Rabbit Corneal Regeneration

นามผู้วิจัย นายนักรบ พัฒนาผล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์สุนทรี เพ็ชรดี, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อารีย์ ทยานานุกัณฑ์, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นรินทร์ อุประกรินทร์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสีทงี่ มทววิทยาสัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมลูกสุนัขในการฟื้นฟูแผลที่กระจกตาในกระต่าย

Effects of Puppy Deciduous Teeth Stem Cells on Rabbit Corneal Regeneration

โดย

นายนักรบ พัฒนาผล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อขอความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (คลินิกศึกษาทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2558

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นักรบ พัฒนาผล 2558: ประสิทธิภาพของเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมลูกสุนัขในการฟื้นฟู
แผลที่กระจกตาในกระต่าย ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (คลินิกศึกษาทางสัตวแพทย์)
สาขาคีฬาทางสัตวแพทย์คณะสัตวแพทยศาสตร์อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
อาจารย์สุนทรี เพ็ชรดี, Ph.D. 68 หน้า

ภาวะแผลหลุมที่กระจกตาในสุนัขและแมวมีความรุนแรงหลายระดับและเป็นสาเหตุทำให้เกิดการอักเสบของลูกตาและอาจรุนแรงถึงขั้นทำให้สูญเสียการมองเห็นได้ การรักษาและการจัดการภาวะดังกล่าวมีด้วยกันหลากหลายวิธีซึ่งผลที่ได้จากการรักษาก็มีความแตกต่างกันไปตามความรุนแรงของแผล การทดลองนี้ศึกษาถึงประสิทธิภาพและผลของการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมลูกสุนัขผ่านทางเยื่อตาขาวในกระต่ายทดลองและสุนัขป่วยจริงที่มีภาวะแผลหลุมที่กระจกตา โดยชักนำให้เกิดแผลหลุมที่กระจกตากระต่ายทั้ง 2 ข้างแล้วปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมลูกสุนัขความเข้มข้น 5 แสนเซลล์ผ่านทางเยื่อตาขาวของตาขวาแล้วใช้น้ำเกลือปลอดเชื้อฉีดเข้าเยื่อตาขาวของตาซ้าย หลังจากนั้น 30 วัน พบว่ากระจกตาของกลุ่มทดลองมีความใสมากกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนผลทางพยาธิวิทยาพบว่าจำนวนชั้นของเยื่อ epithelium ของกระจกตาในกลุ่มทดลองมีมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และปริมาณการแสดงออกของตัวบ่งชี้ที่ผิวเซลล์ชนิด connexin 43 (Cx43) ในกลุ่มทดลองมีมากกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน นอกจากนี้ผลของการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมลูกสุนัขในสุนัขป่วยจริง พบว่าแผลหลุมที่กระจกตาใช้ระยะเวลาในการหายของแผลสั้นกว่าและเกิดแผลเป็นน้อยกว่า ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมลูกสุนัขสามารถสนับสนุนและฟื้นฟูการหายของแผลหลุมที่กระจกตาได้ดีและมีประสิทธิภาพสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์ป่วยในโรงพยาบาลได้

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Nakrob Pattanapon 2015: Effects of Puppy Deciduous Teeth Stem Cells on Rabbit Corneal Regeneration. Master of Science (Veterinary Clinical Studies), Major Field: Veterinary Clinical Studies, Faculty of Veterinary Medicine. Thesis Advisor: Miss Soontaree Petchdee, Ph.D. 68 pages.

Corneal ulcers in dogs and cats can cause inflammation of the eye and may cause a vision loss. There are a number of treatments available to manage this condition. However, the effective treatment depends on many factors, including the severity of a wound. In this present study, we describe a method for the stem cells from puppy deciduous teeth (pDSCs) transplantation for treatment severe corneal ulcer in rabbits and dogs. Ulcerative keratitis was induced in 8 rabbits and 5×10^5 cells of pDSCs were transplanted through the sub-conjunctiva of the right eye and sterile saline was used as control in the left eye. The clarity of cornea recovered within 30 days after pDSCs transplantation in the transplanted group. Moreover, the number of layers of the lining epithelium of the cornea and the amount of connexin 43 (Cx43) were significantly higher in the transplanted group. In clinical trial, pDSCs were transplanted through sub-conjunctiva to treat severe corneal ulcers in 4 dogs. pDSCs transplantation created the shorter healing times and less corneal scars. The results suggested that, pDSCs transplantation is the effective therapy for corneal repair and can be effectively applied to treat the ulceration of the cornea in patients.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อ .สพ.ญ.ดร.สุนทรี เพ็ชรดี แห่งภาควิชาเวชศาสตร์คลินิก สัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักของงานวิจัยที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ การวิเคราะห์ข้อมูลและการแปลผลทางสถิติ ให้กำลังใจ ให้ความรู้ในการศึกษา การวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ขอกราบขอบพระคุณ ผศ .ดร.สพ.ญ. อารีย์ ทยานานุกักร์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมของงานวิจัย แห่ง ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ รศ.ดร. เฉลิมพร องค์กรโสภณ แห่งสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้อันเป็นพื้นฐานในการทำงานวิจัย รวมถึงให้คำแนะนำ แนะนำแนวทางความคิดอันเป็นสิ่งบันดาลใจให้ข้าพเจ้าทำงานวิจัยจนสำเร็จ ขอกราบขอบพระคุณ คุณ วิไลรัตน์ น้าสิงห์ แห่งภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้กรุณาช่วยอำนวยความสะดวกในการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยเรื่องนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ โรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน ที่อำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานวิจัยและช่วยในการเก็บตัวอย่างสัตว์ป่วยเพื่อใช้ในการวิจัย ขอขอบพระคุณ ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะ สัตวแพทยศาสตร์ มหา วิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง และขอขอบพระคุณสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา ที่ให้ความเอื้อเฟื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนในการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาในครั้งนี้

นักรบ พัฒนาผล

ธันวาคม 2557

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	22
การตรวจเอกสาร	23
อุปกรณ์และวิธีการ	27
อุปกรณ์	27
วิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	36
ผล	36
วิจารณ์	43
สรุปและข้อเสนอแนะ	45
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	46
ภาคผนวก	52
ภาคผนวก ก รายงานสัตว์ป่วย	53
ภาคผนวก ข ผลการตรวจเลือดของสัตว์ทดลอง	63
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	68

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดง growth factor receptor cell adhesion molecules และ other cell-surface marker ที่แสดงออกโดย MSC	17
2	แสดงการแบ่งระดับความชุ่มชื้นของกระจกตาออกเป็น grade	35
3	แสดงลำดับเบส annealing temperature และความยาวของ primer ของยีนบนผิวเซลล์ชนิด connexin43 และ actin	35
4	แสดง grade ของความชุ่มชื้นของกระจกตาในกลุ่มควบคุม (Control) และกลุ่มทดลอง (pDSC) หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมลูกสุนัข 30 วัน	36
5	แสดงจำนวนชั้นของเยื่อ epithelium ระหว่างกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มทดลอง (pDSC) หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมลูกสุนัข 30 วัน	40
ตารางผนวกที่		
ข1	แสดงผลการตรวจเลือดของกระต่ายตัวที่ 1 และ 2	64
ข2	แสดงผลการตรวจเลือดของกระต่ายตัวที่ 3 และ 4	65
ข3	แสดงผลการตรวจเลือดของกระต่ายตัวที่ 5 และ 6	66
ข4	แสดงผลการตรวจเลือดของกระต่ายตัวที่ 7 และ 8	67

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงชั้นของกระจกตาซึ่งประกอบไปด้วยชั้น epithelium bowman's membrane stroma descemet's membrane และ endothelium ตามลำดับ	4
2	แสดงชั้นของเยื่อ epithelium ซึ่งประกอบไปด้วย superficial cells intermediate cells และ basal cells	4
3	แสดง junctions ที่อยู่บนผิวของเซลล์ epithelium ที่กระจกตาทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ tight junction Desmosome junction adherens junction และ gap junction	5
4	แสดงชั้นของ stroma	5
5	แสดงการแบ่ง grade ของแผลหุลุมที่กระจกตา ซึ่งมี 5 grade	7
6	แสดงการทำ debridement ที่กระจกตาเพื่อรักษาภาวะ indolent ulcer	9
7	แสดงการทำ grid keratotomy ที่กระจกตาเพื่อรักษาภาวะ indolent ulcer	9
8	แสดงหลักในการรักษาแผลหุลุม grade 4 คือลดกระบวนการอักเสบและสนับสนุนให้เกิดกระบวนการ epithelialization	10
9	แสดงการทำ conjunctival flap เพื่อรักษาแผลหุลุม grade 4 และ grade 5	11
10	แสดงเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (embryonic stem cell)	14
11	แสดงการจำแนกของเซลล์ต้นกำเนิดตามความสามารถในการพัฒนาได้อีก 3 ชนิด คือ totipotent stem cell pluripotent stem cell และ unipotent stem cell	15
12	แสดงการเปลี่ยนแปลงตัวเองของ MSC ซึ่งสามารถแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อไขมัน (adipocyte) เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (chondrocyte) และเนื้อเยื่อกระดูก (osteocyte) ได้ในห้องปฏิบัติการ โดยอาศัยการกระตุ้นจาก growth factors ชนิดต่างๆ	16
13	แสดงการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันโดย MSC เกิดขึ้นที่หลายระดับ เช่น กดการทำงานของ naive T-cell และ memory T-cell ยับยั้งการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงตัวเองของ B-cell ไปเป็น plasma cell ดังนั้นการสร้าง antibody จึงลดลง กดการแบ่งตัวของ NK cells กดการผลิต IFN-g และลดการทำงานของ NK cells ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงตัวเองของ monocyte เป็น immature dendritic cell (iDC) และการพัฒนาเป็น mature DC	20

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	แสดงตำแหน่งของ limbal stem cell ที่อยู่บริเวณระหว่างกระจกตาและเยื่อตาขาว และเป็นกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเซลล์เยื่อ epithelium เซลล์ใหม่เพื่อทดแทนส่วนที่สูญเสียไปทั้งในภาวะปกติและภาวะแผลหลุมที่กระจกตา	24
15	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของพื้มน้ำนมจากลูกสุนัข (A) แสดงเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่ติดกับเนื้อเยื่อ โพรงรากพื้ (B) แสดงการไหลมารวมกันของเซลล์จนมีความหนาแน่นเกือบเต็ม flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ภายใน 4-6 วัน	29
16	แสดงการเหนี่ยวนำการสลับกระต่ายด้วยยาชนิด xylazine และ ketamine เข้ากล้ามเนื้อ	30
17	แสดงการรักษาภาวะสลบของกระต่ายด้วยการดมยา isofurane	31
18	แสดงกระดวยกรองปลอดเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร (ซ้าย) และ สารด่าง NaOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ขวา)	31
19	แสดงการชักนำให้เกิดแผลที่กระจกตาโดยใช้แผ่นกระดวยกรองปลอดเชื้อที่จุ่มสารด่างนำไปวางกลางกระจกตากระต่าย	32
20	แสดงการล้างกระจกตาด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อแบบไหลผ่านเป็นเวลา 30 วินาที	32
21	แสดงแผลที่กระจกตาหลังถูกชักนำให้เกิดด้วยสารด่าง	33
22	การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากพื้มน้ำนมลูกสุนัขเข้าเยื่อตาขาวของตาขาว	33
23	แสดงความชุ่มชื้นของกระจกตาในกลุ่มควบคุมซึ่งอยู่ใน grade 3-4 หลังการฉีดน้ำเกลือเข้าเยื่อตาขาว 30 วัน	37
24	แสดงความชุ่มชื้นของกระจกตาในกลุ่มทดลองซึ่งอยู่ใน grade 1-2 หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากพื้มน้ำนมลูกสุนัข 30 วัน	37
25	แสดงจำนวนชั้นของเยื่อ epithelium ของกระจกตากระต่ายปกติ	38
26	แสดงภาพทางจุลพยาธิของกระจกตาหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดแผล จะเห็นได้ว่าไม่พบชั้นของเยื่อ epithelium	30

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
27	แสดงจำนวนชั้นของเยื่อ epithelium ของกระจกตาในกลุ่มควบคุมหลังการฉีดน้ำเกลือเข้าเยื่อตาขาว 30 วัน	39
28	แสดงจำนวนชั้นของเยื่อ epithelium ของกระจกตาในกลุ่มทดลองหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากพื้นน้ำนมลูกสุนัข 30 วัน	40
29	แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ของค่าเฉลี่ยของจำนวนชั้นเยื่อ epithelium ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง	41
30	แสดงภาพถ่ายผลผลิตของ RT-PCR ที่เคลื่อนผ่าน agarose gel electrophoresis โดยแถบบนแสดงถึงการแสดงออกของ mRNA ของยีน connexin 43 (Cx43) บนผิวเซลล์เยื่อ epithelium ของกระจกตา ส่วนแถบล่างคือยีน actin ระหว่างกลุ่มทดลอง (D) และกลุ่มควบคุม (C) DNA ladder ที่ใช้คือ 100 bp DNA ladder จากภาพจะมีจำนวนตัวอย่างการทดลองเพียง 5 ตัวอย่าง สืบเนื่องจากปริมาณของ mRNA จากตัวอย่างที่ 6 7 และ 8 มีน้อยมากจนไม่สามารถทำ RT-PCR ได้	42
31	แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของอัตราส่วนของการแสดงออกของ mRNA ของยีน connexin 43 บนผิวเซลล์เยื่อ epithelium ของกระจกตาต่อยีน actin เฉลี่ยในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง	42
ภาพผนวกที่		
ก1	แสดงภาวะแผลหลุมลึกถึงชั้น descemet's membrane ก่อนได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด	55
ก2	แสดงกระจกตาที่ไม่พบแผลหลุมแล้วหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด 20 วัน	55
ก3	แสดงภาพแผลหลุมที่กระจกตาก่อนได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด	57
ก4	แสดงภาพกระจกตาที่ไม่มีแผลหลุมหลังได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด 20 วัน	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก5 แสดงภาพหลังฉีดเซลล์ต้นกำเนิดเข้าเยื่อตาขาวในตาขวาที่เกิดแผลหลุมขนาดกว้าง จะพบลักษณะคล้ายเยื่อตาขาวบวมน้ำ	59
ก6 แสดงภาพกระจกตาที่ไม่มีแผลหลุมหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดแล้ว 28 วัน	59
ก7 แสดงภาพแผลหลุมลึกที่กลางกระจกตา ภาวะกระจกตาอักเสบ กระจกตาบวมน้ำ และเยื่อตาขาวอักเสบก่อนการรักษา	60
ก8 แสดงภาพหลังปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเข้าเยื่อตาขาวทันที ลักษณะคล้ายเยื่อตาขาวบวมน้ำ	61
ก9 แสดงภาพหลังจากปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดได้ 7 วัน พบแผลหลุมตื้นและแคบลงมากเมื่อเทียบกับภาพก่อนปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด	61

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ALT	=	Alanin aminotransferase
APC	=	Antigen presenting cell
α -SMA	=	Alpha-smooth muscle actin
BASO	=	Basophil
Bp	=	Base paired
CBC	=	Complete blood count
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleic acid
CO ₂	=	Carbon dioxide
°C	=	Degree of celsius
DMEM	=	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EOS	=	Eosinophil
FBS	=	Fetal bovine serum
fL	=	Femtoliter
G-CSF	=	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	=	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
g/dL	=	Grams per deciliter
HCl	=	Hydrochloric acid
HCT	=	Hematocrit
HGB	=	Hemoglobin
hIDPSC	=	Human immature dental pulp stem cell
IOP	=	Intra-ocular pressure
IL	=	Interleukin
LYMP	=	Lymphocyte
MCH	=	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	=	Mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	=	Mean corpuscular volume
M-CSF	=	Macrophage colony stimulating factor

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

mg/dL	=	Milligrams per deciliter
mmHg	=	Millimetres of mercury
MONO	=	Monocyte
μL	=	Microliter
mRNA	=	Messenger ribonucleic acid
MSC	=	Mesenchymal stem cell
NaOH	=	Sodium hydroxide
NEUT	=	Neutrophil
PCNA	=	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	=	Polymerase chain reaction
pDSC	=	Puppy deciduous teeth stem cell
Pg	=	Picogram
PLT	=	Platelet
RBC	=	Red blood cell
RT-PCR	=	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCr	=	Serum creatinine
STT	=	Schirmer's tear test
Th1	=	T-helper type 1
Th2	=	T-helper type 2
U/L	=	Unit per liter
VEGE	=	Vascular endothelial growth factor
WBC	=	White blood cell

ประสิทธิภาพของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมลูกสุนัขในการฟื้นฟูแผลที่กระจกตา ในกระต่าย

Effects of Puppy Deciduous Teeth Stem Cells on Rabbit Corneal Regeneration

คำนำ

ภาวะแผลหลุมที่กระจกตาในสัตว์เลี้ยงเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส สารเคมีกัดกร่อน การกระทบกระเทือนที่รุนแรง โดยทุกสาเหตุสร้างความเจ็บปวดและทุกข์ทรมานต่อสัตว์ โดยความรุนแรงของแผลหลุมที่กระจกตาแบ่งออกได้เป็นหลายระดับ ตั้งแต่แผลหลุมตื้น (superficial corneal ulcer) ไปจนถึงแผลหลุมลึก (deep corneal ulcer) ซึ่งการรักษาในกรณีแผลหลุมตื้นนั้นทำได้ง่ายและแผลหายค่อนข้างเร็ว (William, 2001) แต่แผลหลุมที่มีความลึกและกว้างจะมีการรักษาที่ค่อนข้างยากและการพยากรณ์โรคในสัตว์ที่เกิดภาวะนี้ถือว่าค่อนข้างแย่ และผลเสียที่มากที่สุดคือทำให้สัตว์สูญเสียการมองเห็นไปอย่างถาวรได้ (Lin *et al.*, 2013) โดยทั่วไปสารเคมีที่มีผลเสียต่อตาของสัตว์แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นด่างและสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นกรด ซึ่งสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นด่างจะทำให้เกิดการทำลายและสร้างผลเสียให้กับดวงตาสัตว์มากกว่าสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นกรด สืบเนื่องจากสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นด่างสามารถแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อลูกตาและทำลายส่วนที่เป็น protective barrier ได้ดีกว่าสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นกรด ด้วยเหตุนี้จึงใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นด่างในการศึกษาครั้งนี้ โดยหลักในการรักษาภาวะกระจกตาทึบทำลายจากสารเคมีประกอบไปด้วย

1. สนับสนุนให้เกิด ภาวะ re-epithelialization และมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เยื่อกระจกตา
2. ลดการเกิดแผลหลุมที่กระจกตาและสนับสนุนการหายของแผล
3. ควบคุมการอักเสบของดวงตา

การรักษากรณีแผลหลุมลึกแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ การรักษาทางอายุรกรรมและการรักษาทางศัลยกรรม (Michael, 1997) โดยในส่วนของการรักษาทางอายุรกรรมนั้นจะเป็นการให้ยาในกลุ่มพวก protease inhibitors ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) และ ยาดับการอักเสบ (anti-inflammatory drugs) ซึ่งให้ผลในการรักษาที่ไม่ดีและใช้ระยะเวลาที่ยาวนาน ส่วนการรักษาทางศัลยกรรมประกอบ

ไปด้วยวิธี conjunctival flap วิธี amniotic membrane transplantation และ/หรือวิธี limbal stem cell transplantation ซึ่งวิธีสุดท้ายถือเป็นวิธีการรักษาที่ใช้ได้ดีกับภาวะกระจกตาถูกทำลายจากสารต่าง (Gomes *et al.*, 2003) โดย amniotic membrane ที่นำมาใช้ในวิธี amniotic membrane transplantation ต้องได้รับจากตัวให้หรือผู้บริจาค (donor) ซึ่งมีวิธีการเตรียมที่ยุ่งยากและซับซ้อน ส่วนวิธี limbal stem cell transplantation นั้นได้เซลล์มาจากลูกตาดีกข้างของสัตว์ป่วย (autograft) หรือจากลูกตาของสัตว์ตัวอื่นที่เป็นชนิดเดียวกัน (allograft) ซึ่งส่วนใหญ่การรักษาด้วยเซลล์ต้นกำเนิดจะช่วยเรื่องการเกิดใหม่ของเซลล์และการหายของแผลในเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายได้ดี

โครงสร้างของกระจกตา

โดยทั่วไปความหนาของกระจกตาบริเวณตรงกลางจะบางกว่าบริเวณขอบรอบนอก และเนื่องจากกระจกตาเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่มีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยง ฉะนั้น การได้รับออกซิเจน กรดอะมิโน กลูโคสและสารอาหารอื่นๆจะมาจากน้ำตา (tear film) น้ำในลูกตา (aqueous humor) และ limbal vessels โครงสร้างของกระจกตา ในกระต่าย ประกอบด้วย 5 ชั้นเรียงลำดับจากด้าน หน้าไปสู่ด้านหลัง (ภาพที่ 1) คือ

1. ชั้นเยื่อ epithelium

ชั้นเยื่อ epithelium นั้นจะมีการเรียงตัวของเซลล์ประมาณ 5-7 ชั้น (Steele, 1999) โดย 2-3 ชั้นบนสุด (superficial cells) จะเป็นเซลล์ epithelium แบบ stratified squamous เป็นเซลล์รูปร่างแบนทำหน้าที่ในการรับสารอาหารต่างๆจากน้ำตา ส่วนเซลล์ epithelium 2-3 ชั้นถัดมา (intermediate cells) มีรูปร่างคล้ายปีก (wing cells) เป็นส่วนที่มีปลายประสาทมาหล่อเลี้ยง ฉะนั้นเวลาเกิดบาดแผลถึงบริเวณนี้จะสร้างความเจ็บปวดให้สัตว์เป็นอย่างมาก ส่วนเซลล์ epithelium ชั้นสุดท้ายเป็นเซลล์รูปแท่ง (columnar basal cells) เป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวสูง เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการหายของแผลเมื่อเกิดแผลที่กระจกตา (ภาพที่ 2) โดยเซลล์ epithelium แต่ละเซลล์นั้นจะมีการเชื่อมต่อกันด้วย junctions ที่อยู่บนผิวเซลล์ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ชนิดตามหน้าที่ คือ tight junctions adherens junctions desmosomes junctions และ gap junctions (ภาพที่ 3) โดยใน gap junctions นั้นมีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยโปรตีน connexin (Kumar and Gilula, 1996, Suzuki *et al.*, 2000, Kimura *et al.*, 2010) ซึ่งเป็นตัวที่ใช้ทดสอบในการศึกษา

2. ชั้น Bowman's membrane หรือ basement membrane

เป็นชั้นของเนื้อเยื่อบางๆ ทำหน้าที่ในการยึดเหนี่ยวเซลล์เยื่อ epithelium ให้เกาะกับชั้น stroma

3. ชั้น stroma

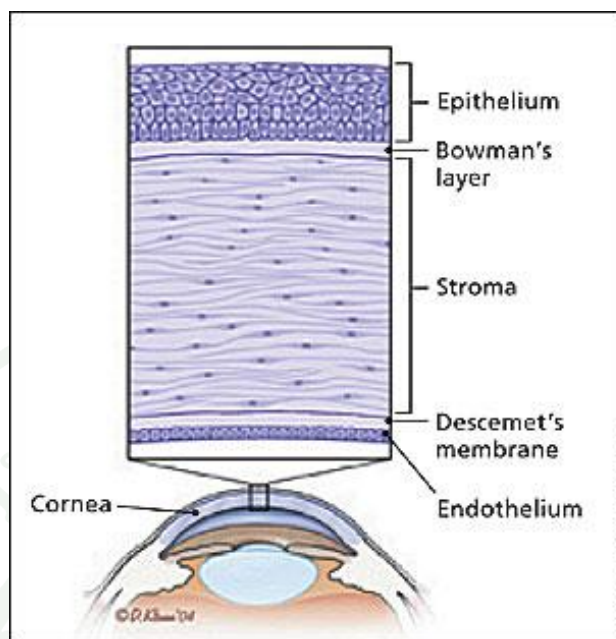
เป็นส่วนประกอบ 90 เปอร์เซ็นต์ของกระจกตา เกิดจากการเรียงตัวซ้อนทับกันหลายชั้นของมัดคอลลาเจน (collagen bundles) คอลลาเจนในชั้น stroma นี้ถูกผลิตและรักษาสภาพด้วยเซลล์ที่เรียกว่า keratocytes โดยคอลลาเจนแต่ละชั้นนั้นจะจับตัวกันแบบหลวมๆ องค์ประกอบของ stroma 75-80 เปอร์เซ็นต์คือน้ำ ส่วนที่เหลืออีก 20-25 เปอร์เซ็นต์เป็นคอลลาเจนและ glycosaminoglycans (ภาพที่ 4) ชั้น stroma มีคุณสมบัติเข้ากันได้ดีกับน้ำ ฉะนั้นเมื่อเกิดการทำลายของชั้นเยื่อ epithelium หรือชั้นเยื่อ endothelium จะเกิดการแทรกตัวของน้ำเข้าไปในระหว่างชั้นของคอลลาเจนทำให้เกิดภาวะกระจกตาบวมน้ำได้

4. ชั้น Descemet's membrane

เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้นบางๆที่มีความยืดหยุ่นสูงและทนทานต่อการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ดี ทำหน้าที่เป็นตัวยึดเกาะของเซลล์ endothelium กับชั้น stroma

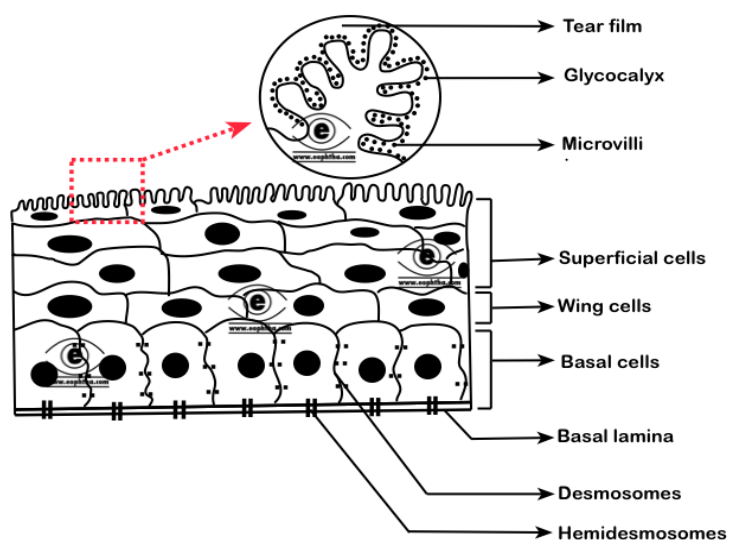
5. ชั้นเยื่อ endothelium

เป็นการเรียงตัวชั้นเดียวของเซลล์ endothelium ด้านในสุดของกระจกตา ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างแบบ hexagonal



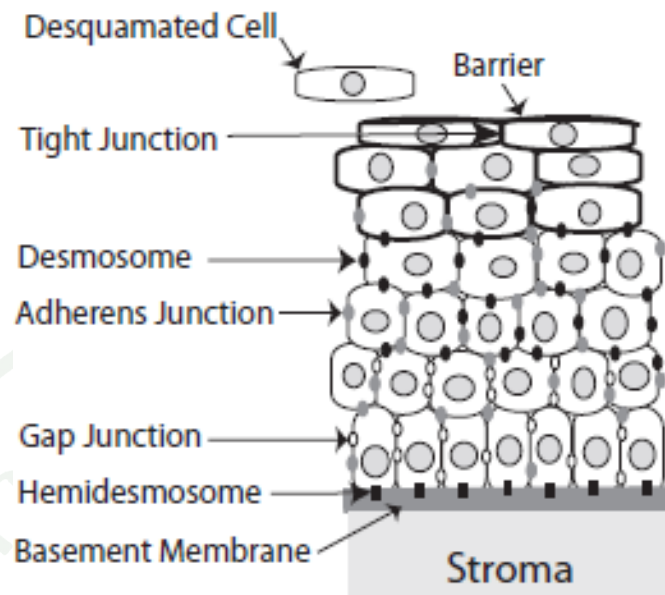
ภาพที่ 1 แสดงชั้นของกระจกตาซึ่งประกอบไปด้วยชั้น epithelium bowman's membrane stroma descemet's membrane และ endothelium ตามลำดับ

ที่มา: Wilson and Last (2004)



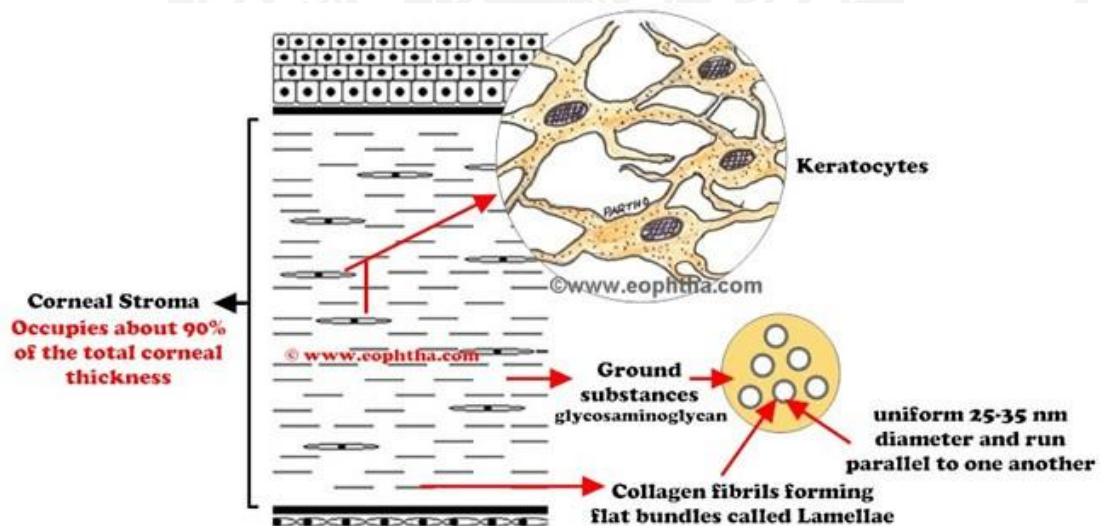
ภาพที่ 2 แสดงชั้นของเยื่อ epithelium ซึ่งประกอบไปด้วย superficial cells intermediate cells และ basal cells

ที่มา: Majumder (2008)



ภาพที่ 3 แสดง junctions ที่อยู่บนผิวของเซลล์ epithelium ที่กระจกตาทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ tight junction Desmosome junction adherens junction และ gap junction

ที่มา: คัดแปลงจาก Swamynathan *et al.* (2011)



ภาพที่ 4 แสดงชั้นของ stroma

ที่มา: Majumder (2008)

ชนิดของแผลหลุมที่กระจกตา

ทุกวันนี้มีการแบ่ง grade ของแผลหลุมที่กระจกตา (William, 2001) ตามความลึกของแผล ดังนี้ (ภาพที่ 5)

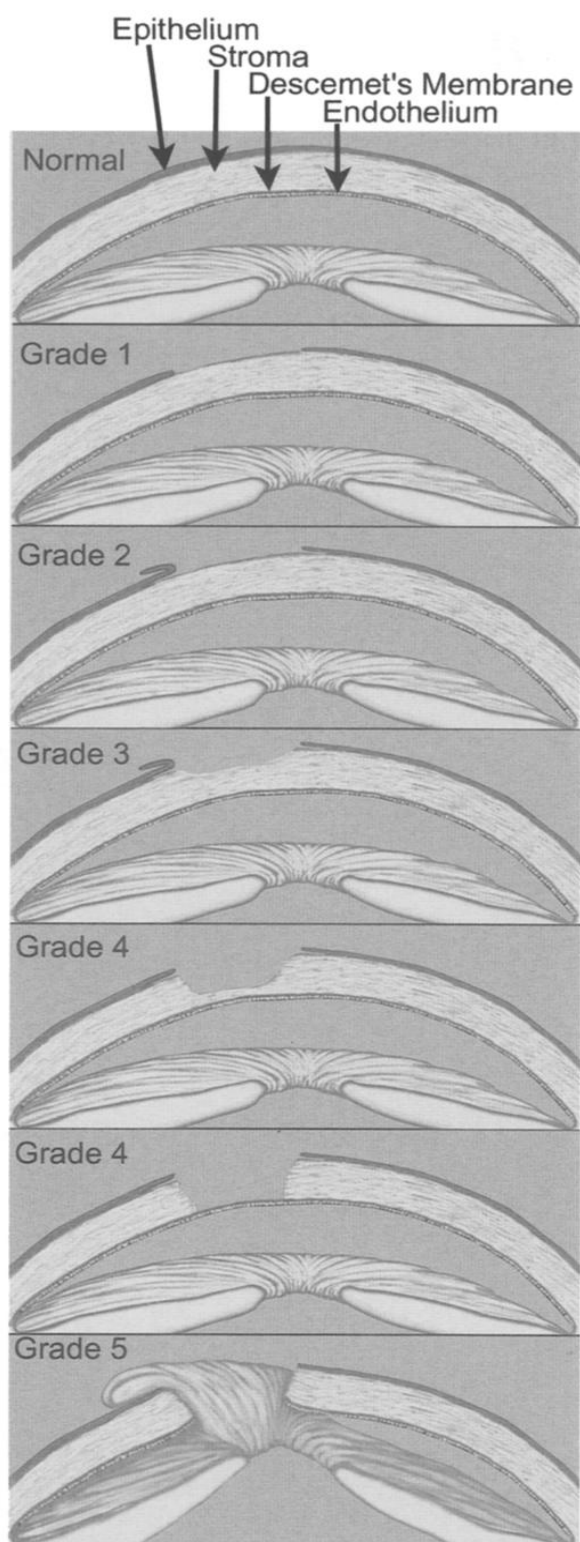
Grade 1

เป็นแผลหลุมชนิดตื้น (superficial corneal ulcers) พบได้บ่อยในสัตว์เลี้ยงเล ะมักไม่จำเป็นต้องได้รับการรักษา อาการโดยทั่วไปจะพบว่าสัตว์มีอาการหริต (blepharospasm) ไม่กล้าสู้แสง (photophobia) การวินิจฉัยทำโดยย้อมสีกระจกตาด้วยสารละลาย fluorescein ในกรณีที่ต้องได้รับการรักษา ยาที่ใช้จะเป็นยาปฏิชีวนะต่างๆ ไป วันละ 3-4 ครั้ง เพื่อป้องกันการติดเชื้อแทรกซ้อน ร่วมกับขยายม่านตา เช่น atropine 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้กล้ามเนื้อ ciliary body เป็นอัมพาตชั่วคราว ทำให้สัตว์รู้สึกสบายตามากขึ้น ในกรณีที่รักษาแล้วแผลไม่หายควรตรวจหาสาเหตุที่แท้จริง เช่น มีระดับน้ำตาที่เพียงพอ ไม่มีขนตาที่ขึ้นผิดตำแหน่งแล้วที่กระจกตา (distichiasis หรือ ectopic cilia) หรือสิ่งแปลกปลอมที่กระจกตา เป็นต้น

Grade 2

เป็นแผลหลุมชนิดตื้นที่หายช้าและหายค่อนข้างยากหรือที่เรียกว่า boxer ulcer หรือ indolent ulcer หรือ non-healing ulcer มักพบในสัตว์เลี้ยงโตเต็มวัยไปจนถึงแก่ จ การตรวจจะพบลักษณะของสี fluorescein แทรกเข้าไปตามขอบแผลได้ชั้น epithelium ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด แต่คาดว่าน่าจะเกิดมาจากการยึดเกาะของชั้น epithelium กับ basement membrane บกพร่อง ส่วนการรักษานั้นแบ่งออกเป็นการรักษาทางศัลยกรรมและการรักษาทางอายุรกรรม โดยการรักษาทางศัลยกรรมนั้นประกอบไปด้วยการทำ debridement และ grid keratotomy

การทำ debridement อาจไม่จำเป็นต้องวางยาสลบเพียงแคให้ยาเฉพาะที่หยอดตา จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ปลอดเชื้อปิดกระจกตาบริเวณขอบแผลรอบๆออกจนกว่าชั้น epithelium ที่ไม่ยึดกับ basement membrane จะหลุดออกหมด (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 แสดงการแบ่ง grade ของแผลหลุมที่กระจกตา ซึ่งมี 5 grade

ที่มา: William (2001)

ส่วนการทำ grid keratotomy อาจใช้ยาชาหยอดตาเพียงอย่างเดียวหรือให้ร่วมกับการวางยาซึมหรืออาจต้องให้ยาสลบแล้วแต่กรณี วิธีการทำ นำเข็มฉีดยาเบอร์ 23 ถึง 25 กรีดลงบนกระจกตาที่เป็นแผลให้ลึกหนึ่งในสามของความหนาของชั้น stroma กรีดเป็นรูปตารางโดยเว้นระยะห่างแต่ละเส้นที่กรีดประมาณ 1 ถึง 2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 7) หลังจากนั้นให้การรักษาทางยาเหมือนกรณีแผลหลุม grade 1

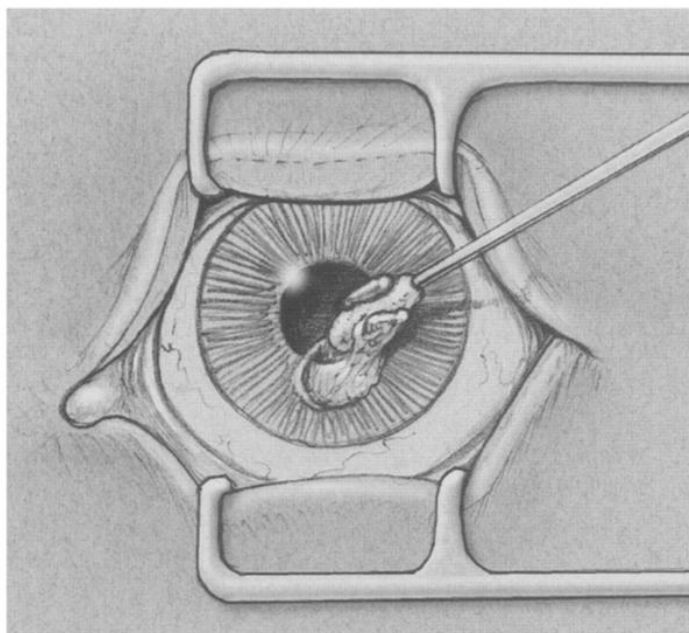
Stanley *et al.* (1998) ทำการศึกษาถึงผลของ การทำ debridement และ grid keratotomy ในสุนัขที่มีภาวะ indolent ulcer จำนวน 92 ตัว พบว่า การทำ debridement มีการหายของแผล 63 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาในการหายของแผลนาน 21.5 วัน ส่วนการทำ grid keratotomy มีการหายของแผล 85 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาในการหายของแผลนาน 11.5 วัน

Grade 3

เป็นแผลหลุมที่ลึกถึงชั้น stroma แต่ไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ของความหนาของชั้น stroma อาจเกิดการลุกลามต่อเนื่องหรือไม่เกิดการลุกลามก็ได้ ในกรณีที่ ไม่เกิดการลุกลามการรักษาจะคล้ายกับแผลหลุม grade 1 การใช้ยาขยายม่านตาหยอดตา ร่วมกับยาลดการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) ทางระบบและการใช้ปฏิชีวนะหยอดตาที่เหมาะสมจะทำให้แผลหายได้ ในกรณีที่ลุกลามก็จะเกิดเป็นแผลหลุม grade 4 ดังจะได้อธิบายต่อไป

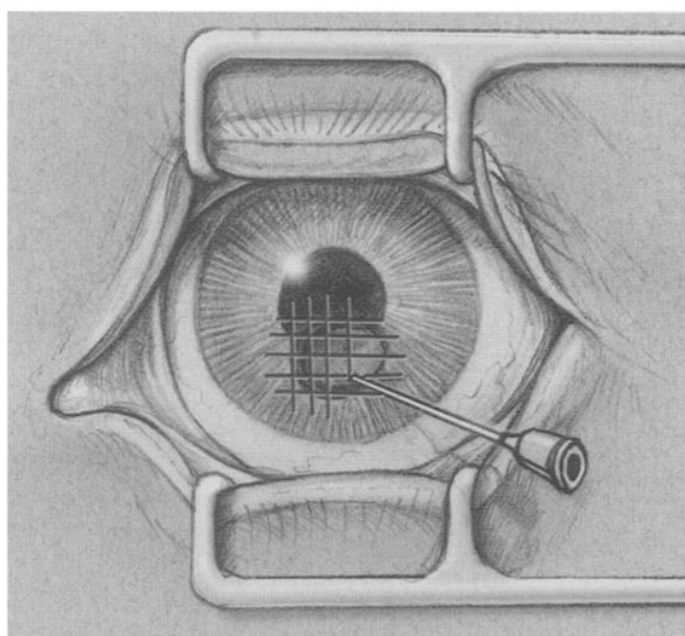
Grade 4

เป็นแผลหลุมลึกมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของชั้น stroma แบ่งออกเป็น 2 ระดับคือ แผลลึกมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์แต่ไม่ถึงชั้น descemet's membrane และแผลหลุมที่ส่วนของ stroma หายไปทั้งหมดจนถึงชั้น descemet's membrane สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการลุกลามมาจากแผลหลุม grade 3 ซึ่งควรทำการตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติมถึงปัจจัยอื่นที่ทำให้เกิดการลุกลามของแผลหลุมได้เช่น โครงสร้างหนังตาผิดปกติ การผลิตน้ำตาลลดลง สิ่งแปลกปลอมต่างๆ การขึ้นของขนตาที่ผิดปกติ การติดเชื้อแบคทีเรียเช่น *Pseudomonas sp.* และ *Streptococcus sp.* ทำให้ polymorphonuclear cells เคลื่อนตัวเข้ามายังบริเวณแผลและปล่อยพวก proteolytic enzymes ออกมาทำให้เกิดการลุกลามของแผลหลุมได้



ภาพที่ 6 แสดงการทำ debridement ที่กระจกตาเพื่อรักษาภาวะ indolent ulcer

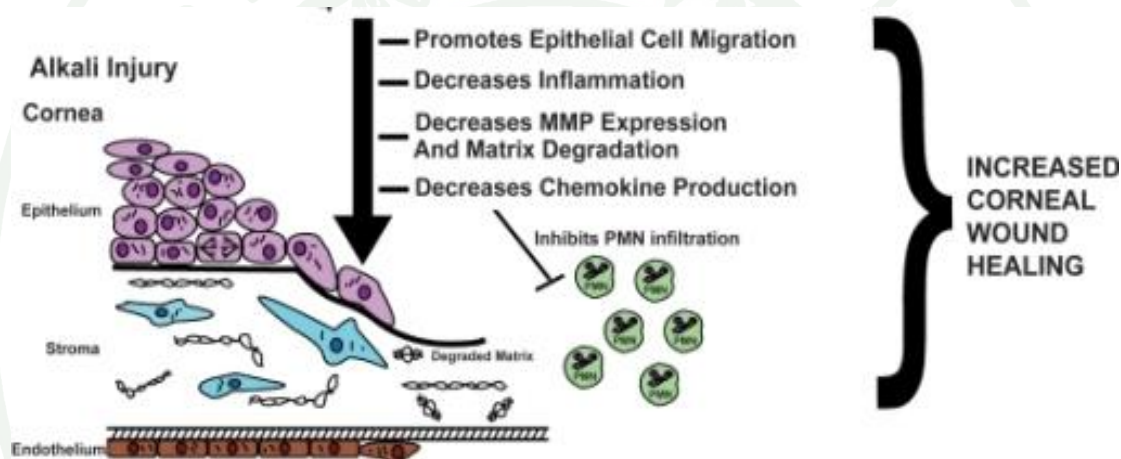
ที่มา: คัดแปลงจาก William (2001)



ภาพที่ 7 แสดงการทำ grid keratotomy ที่กระจกตาเพื่อรักษาภาวะ indolent ulcer

ที่มา: คัดแปลงจาก William (2001)

หลักในการรักษาแผลหลุม grade 4 คือพยายามลดการทำลายกระจกตาและสนับสนุนให้เกิดการหายของแผลให้เร็วขึ้น (ภาพที่ 8) การเลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมตามผลเพาะเชื้อและผลการทดสอบความไวของยาเป็นสิ่งที่ดีแต่ในความเป็นจริงแล้วผลจากการเพาะเชื้ออาศัยระยะเวลาอันเกินกว่าที่สามารถจะรอได้ จึงอาจใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย generation สูงๆ เช่น tobramycin วันละ 4 ครั้งหรือทุกๆ 2 ชั่วโมงร่วมกับยาขยายม่านตาได้โดยไม่ต้องรอผลเพาะเชื้อ แต่การรักษาที่ดีที่สุดสำหรับแผลหลุม grade 4 คือการผ่าตัดทำ conjunctival flaps (ภาพที่ 9) ซึ่ง flaps จะช่วยปกป้องแผล เป็นแหล่งนำพาสารอาหารที่จำเป็นมาสู่แผลและป้องกัน proteolytic enzymes ได้

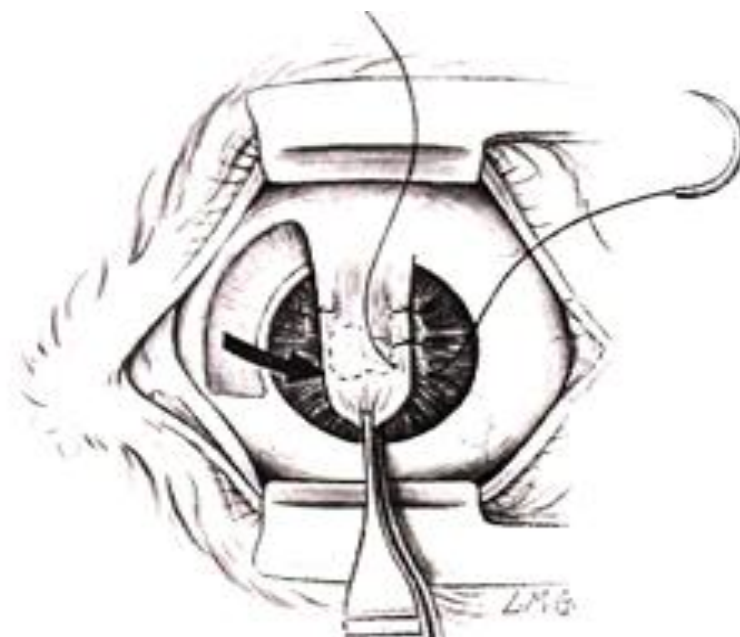


ภาพที่ 8 แสดงหลักในการรักษาแผลหลุม grade 4 คือลดกระบวนการอักเสบและสนับสนุนให้เกิดกระบวนการ epithelialization

ที่มา: คัดแปลงจาก Sosne (2007)

Grade 5

ส่วนใหญ่เป็นการลุกลามมาจากแผลหลุม grade 4 จนทำให้เกิดการทะลุของกระจกตา มีโอกาสทำให้เกิดการติดเชื้อเข้าสู่ลูกตาและเกิดการอักเสบทั่วลูกตาได้ง่าย โดยปกติเมื่อกระจกตาทะลุ ม่านตาจะเคลื่อนตัวออกมาบริเวณแผลทำให้ปิดรูแผลที่ทะลุกระจกตา การรักษาที่คล้ายคลึงกับแผลหลุม grade 4 คือการทำ conjunctival flaps ในกรณีที่แผลกระจกตามีขนาดกว้างมากอาจต้องใช้กระจกตาจากผู้บริจาค การรักษาทางศัลยกรรมจะต้องทำร่วมกับการให้ยาปฏิชีวนะหยอดตา ยาขยายม่านตาหยอดตา และควรให้ยาปฏิชีวนะและยาลดการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ทางระบบร่วมด้วย



ภาพที่ 9 แสดงการทำ conjunctival flap เพื่อรักษาแผลหลุม grade 4 และ grade 5

ที่มา: <http://www.hangangah.co.kr>

กระบวนการหายของแผลที่กระจกตา

โดยปกติเมื่อเกิดบาดแผลที่กระจกตา หลังจากเย็บ epithelium ที่กระจกตาถูกทำลายจะมีการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางเซลล์ ทางชีวเคมีและทางประสาท (cellular biochemical and neural responses) โดยแผลขนาดเล็กนั้นอาศัยการตอบสนองทางเซลล์จากเย็บ epithelium ซึ่งอาจทิ้งเนื้อเยื่อแผลเป็นไว้ที่กระจกตาเล็กน้อยหรือไม่มีเลยก็ได้ ส่วนแผลขนาดใหญ่และลึกจะอาศัยการตอบสนองทางเซลล์จากเย็บ epithelium และ keratocytes ที่อยู่ในชั้น stroma

หลังจากเกิดบาดแผลที่กระจกตาไม่นานจะมี fibrin และ fibronectin เคลื่อนตัวมายังบริเวณที่เกิดบาดแผลและมีการเรียงตัวกันเป็น fibrin and fibronectin mat กลุ่มบริเวณที่เกิดบาดแผลไว้เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวยึดเกาะเซลล์เย็บ epithelium ใหม่ที่จะเคลื่อนตัวเข้ามาในบริเวณที่เกิดบาดแผล (Abrams *et al.*, 2000) เมื่อเซลล์เย็บ epithelium เริ่มเคลื่อนตัวเข้ามาจะหลั่งสาร plasminogen activators ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน plasminogen ไปเป็น plasmin ทำหน้าที่เป็นตัวยึดเกาะระหว่างเซลล์เย็บ epithelium ใหม่กับเซลล์เย็บ epithelium เดิมและ fibrin and fibronectin mat จากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการตอบสนองทางเซลล์จากเย็บ epithelium ซึ่งประกอบไปด้วย การเคลื่อนตัวเข้ามาของเซลล์ (cell migration) การแบ่งตัวของเซลล์ (cell replication) และการยึดเกาะของเซลล์ (cell

adhesion) ซึ่งเซลล์เยื่อ epithelium ส่วนของ intermediate cells และ basal cells จะเพิ่มการสร้าง actin และ monofilaments จากนั้น basal cells ที่มีลักษณะเป็นเซลล์รูปแท่งจะเริ่มบีบตัวเองให้แบน และสร้างโครงร่างคล้ายนิ้วมือยื่นออกจากขอบเซลล์ (finger-like projections) เพื่อไปเกาะกับ actin filaments ทำให้เกิดการดึงตัวของเซลล์เยื่อ epithelium เข้ามาในบริเวณบาดแผลต่อเนื่องเข้ามาเรื่อยๆ จนปกคลุมบาดแผลทั้งหมด โดยในระหว่างกระบวนการนี้เซลล์ neutrophils และ macrophages จะเคลื่อนตัวเข้ามาบริเวณบาดแผลผ่านทางน้ำตา เมื่อบาดแผลถูกปกคลุมด้วยเซลล์เยื่อ epithelium ชั้นเดียวทั้งหมด การเคลื่อนตัวของ neutrophils และ macrophages เข้าสู่บาดแผลก็จะหยุดลงและเกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อ epithelium (cell proliferation) เพื่อเติมส่วนที่ขาดหายไปให้เต็ม (Dua *et al.*, 1994)

การหายของแผลจะเกิดขึ้นสมบูรณ์ไม่ได้จนกว่าจะมีการยึดเกาะ (adhesion) ของเซลล์เยื่อ epithelium กับ stroma อย่างสมบูรณ์ โดยถ้าชั้น basement membrane ไม่เกิดการเสียหายมาก การยึดเกาะจะเกิดขึ้น สมบูรณ์ภายในเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ แต่ถ้าชั้น basement membrane เสียหายมาก อาจใช้เวลาในการยึดเกาะอย่างสมบูรณ์ประมาณ 6 สัปดาห์ ส่วนกระบวนการหายของแผลในชั้น stroma นั้นเกิดจากการตอบสนองของเซลล์ keratocytes ที่เปลี่ยนแปลงตัวเองเป็น fibroblast ซึ่งจะผลิตคอลลาเจน เพื่อเติมส่วนที่ขาดหายไปแต่คอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่นั้นจะมีการเรียงตัวแบบสุ่ม (random) ทำให้เกิดเป็นเนื้อเยื่อแผลเป็น (scar) ขึ้นที่กระชกตา

เซลล์ต้นกำเนิด

ในปัจจุบัน การบำบัดด้วยเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) เป็นวิทยาการใหม่ในการรักษา บาดแผล และกลุ่มโรคเรื้อรัง เช่น โรคหัวใจ โรคเบาหวาน มะเร็ง โรคกระดูก โรคตา และ แผลเรื้อรัง แต่อย่างไรก็ตาม การใช้เซลล์ต้นกำเนิดในการรักษาโรคต่างๆ ยังอยู่ในขั้นตอนการพัฒนาการวิจัย เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่ไม่จำเพาะซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษในการแบ่งตัวให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดเหมือนเดิมที่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะได้และเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ในร่างกายได้ เช่น เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์เม็ดเลือดแดง keratinocyte เซลล์เนื้อเยื่อไขมัน เซลล์กระดูก และกระดูกอ่อนและเซลล์สมอง เป็นต้น ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดแบ่งตามแหล่งที่มาได้เป็น 3 ชนิดคือ

1. เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (embryonic stem cell)

เซลล์ต้นกำเนิดที่เก็บส่วนของ inner cell mass จากตัวอ่อนของที่ยังอยู่ในระยะ blastocyst เซลล์ต้นกำเนิดในระยะนี้จะมีอายุเพียง 5-7 วัน หลังการปฏิสนธิ แม้จะมีจำนวนเซลล์ไม่มาก

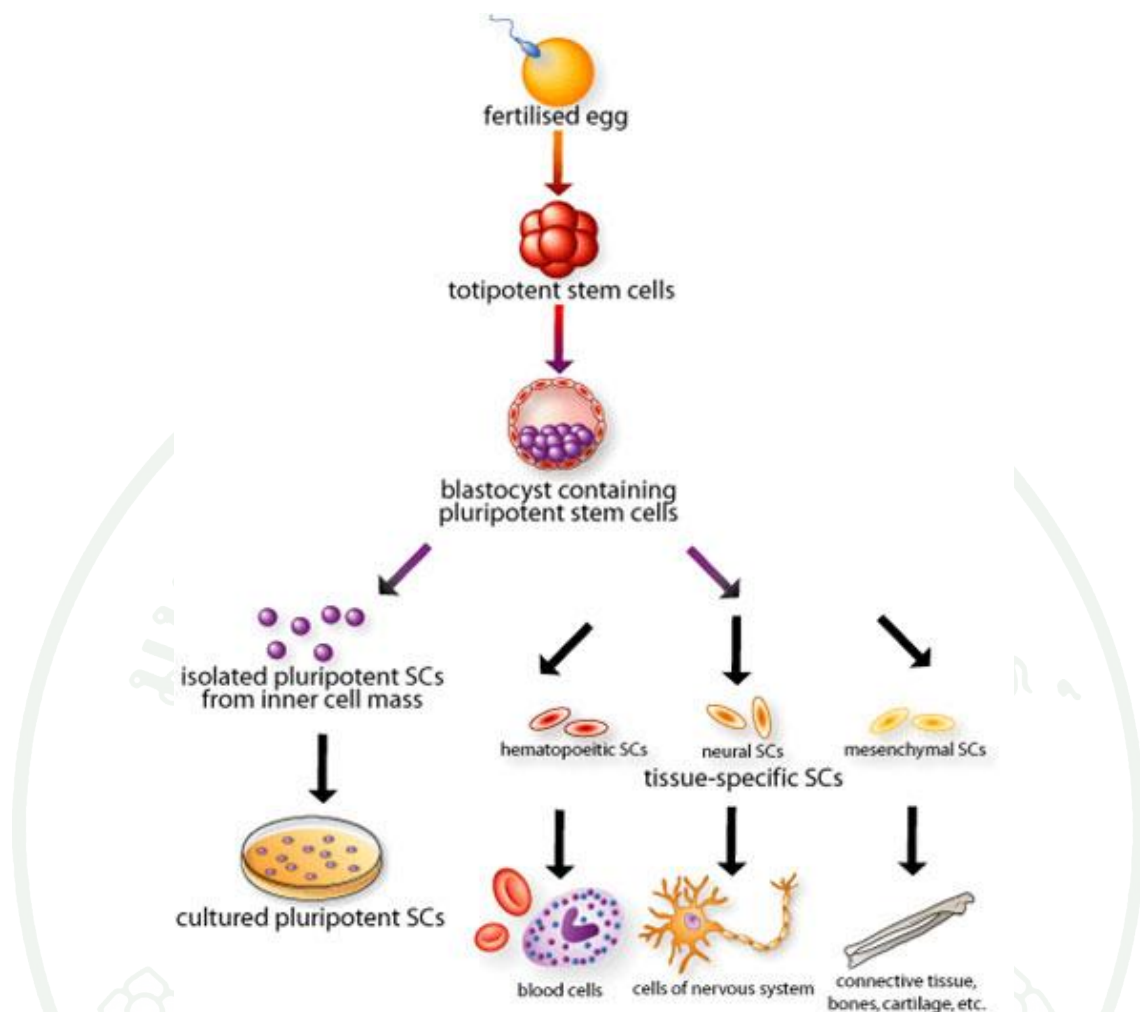
เมื่อเทียบกับ เซลล์ต้นกำเนิดที่ไค่ จากเนื้อเยื่อที่โตเต็มวัย แต่เนื่องจากมันมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์อื่นๆ ของร่างกายได้ จึงนับว่าเป็น เซลล์ต้นกำเนิดที่มีประสิทธิภาพในการรักษา และวิจัยอย่างสูงสุด (ภาพที่ 10)

2. เซลล์ต้นกำเนิดจากฟัตัส (fetal stem cell)

เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่พบในกระแสเลือดของลูกสัตว์ในครรภ์ที่อายุน้อยกว่า 12 สัปดาห์ มีความสามารถในการเจริญเป็นเนื้อเยื่อมากมาย ไม่ว่าจะเป็นกระดูก กระดูกอ่อน เซลล์ประสาท เซลล์กล้ามเนื้อ หรืออวัยวะภายใน รวมทั้งเม็ดเลือด

3. เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อที่โตเต็มวัย (adult stem cell/ mesenchymal stem cell)

เซลล์ต้นกำเนิดที่เก็บจากเนื้อเยื่อที่โตเต็มวัย เช่น เซลล์จากไขกระดูก เนื้อเยื่อไขมัน ผิวหนัง เลือด และ ฟันน้ำนม เป็นต้น

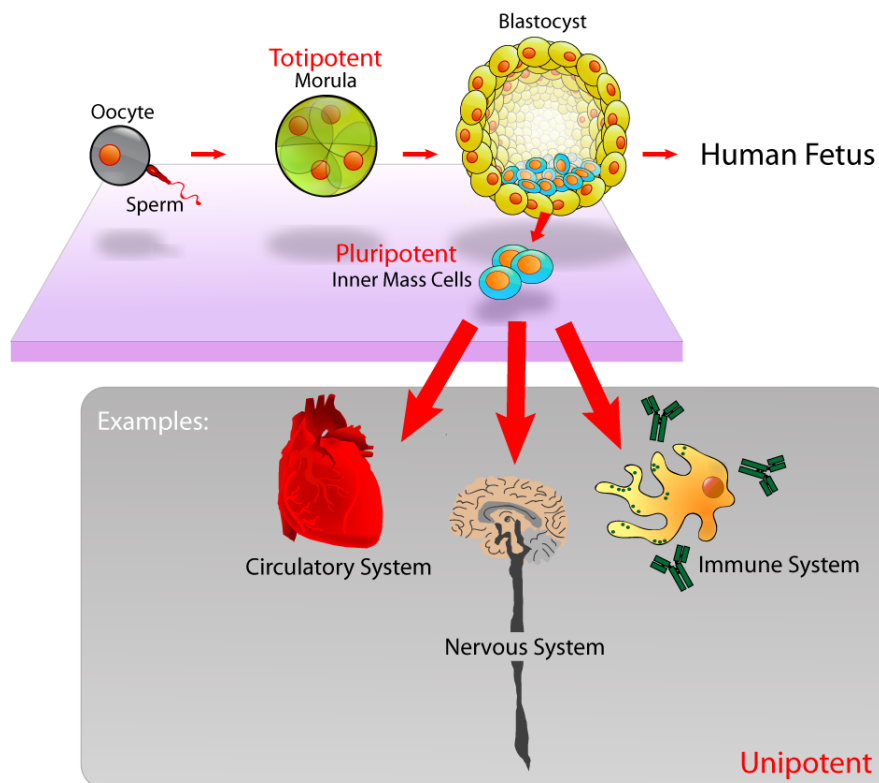


ภาพที่ 10 แสดงเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (embryonic stem cell)

ที่มา: <http://stemcellforautism.com/types-of-stem-cells>

นอกจากนี้ยังสามารถ จำแนกประเภทของเซลล์ต้นกำเนิดตามความสามารถในการนำไปพัฒนาได้อีก 3 ชนิด (ภาพที่ 11) คือ

1. Totipotent stem cell คือ เซลล์ที่พัฒนาไปได้แบบไม่จำกัด เช่น เซลล์ตัวอ่อนของสัตว์
2. Pluripotent stem cell คือ เซลล์ที่พัฒนาไปได้หลายแบบ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเนื้อเยื่อต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต
3. Unipotent stem cell คือ เซลล์ที่พัฒนาไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น

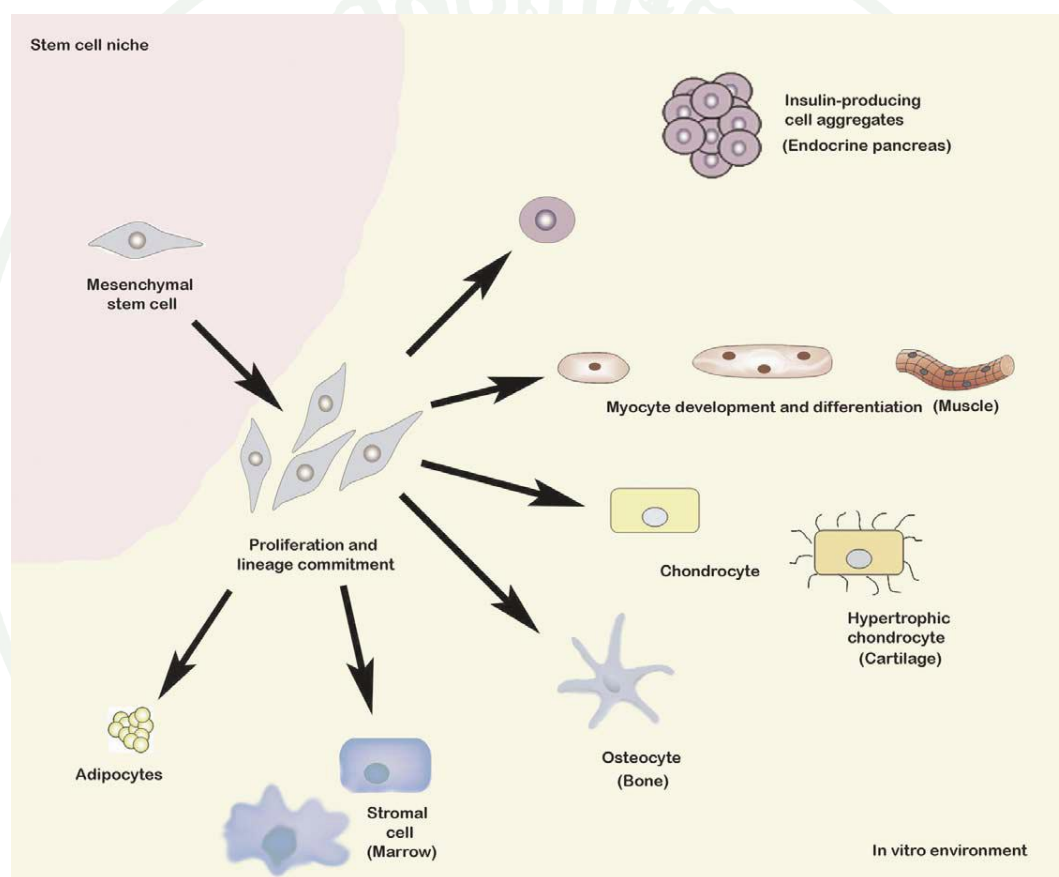


ภาพที่ 11 แสดงการจำแนกของเซลล์ต้นกำเนิดตามความสามารถในการพัฒนาได้อีก 3 ชนิด คือ totipotent stem cell pluripotent stem cell และ unipotent stem cell

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Embryonic_stem_cell

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า มีการ นำเซลล์ต้นกำเนิด ชนิด mesenchymal stem cell (MSC) มาใช้ ในทางสัตวแพทย์ เพื่อรักษาอาการบาดเจ็บ ของกล้ามเนื้อและกระดูก ในสุนัข และมีส่วนการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ MSC ในการรักษาภาวะแผลที่กระดูกตายในสัตว์เลี้ยง ซึ่ง MSC เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่เก็บได้จากอวัยวะต่างๆ เช่น เซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก เซลล์กล้ามเนื้อ และ เซลล์ประสาท เป็นต้น เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมัน นั้นมันนั้นถือเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด MSC เช่นเดียวกัน (Kawashima, 2012) มีรายงานว่า เซลล์ต้นกำเนิด ชนิด MSC มีความสามารถในการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลง ึ่งตัวเองสูง สามารถเปลี่ยนแปลงเป็น osteocyte myocyte chondrocyte และ adipocyte ได้ (ภาพที่ 12) และมีศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงตัวเองได้ ดีกว่า insulin-producing cell โดยกลไกในการทำงานดังกล่าวนี้ยังไม่ชัดเจน MSC สามารถแยกได้

จากเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น ไขกระดูก กระดูก ไขมัน wharton's jelly จากสายสะดือ เลือดจากสายสะดือ รก ฟันน้ำนม และตับอ่อน เป็นต้น ซึ่งการนำมาใช้ประโยชน์นั้นอาจได้จากการเพาะเลี้ยง การแช่แข็ง (cryopreserved) หรือการบริจาคจากผู้ให้ นอกจากนี้ MSC ในคนยังมีคุณสมบัติภูมิคุ้มกันอีกด้วย จึงมีการนำมาใช้ในการรักษาโรคด้วยเซลล์ (cellular therapy) เพื่อฟื้นฟูเนื้อเยื่อที่เกิดความผิดปกติในวงกว้างโดยการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันของตนเองให้แก่ตนเอง (autograft)



ภาพที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงตัวเองของ MSC ซึ่งสามารถแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อไขมัน (adipocyte) เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (chondrocyte) และเนื้อเยื่อกระดูก (osteocyte) ได้ในห้องปฏิบัติการ โดยอาศัยการกระตุ้นจาก growth factors ชนิดต่างๆ

ที่มา: Kode *et al.* (2009)

MSC ไม่มีการแสดงออกของ hematopoietic stem cell marker จึงสามารถแยกออกจาก hematopoietic stem cell ได้ซึ่ง MSC ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตัวเองเป็น hematopoietic cell แต่มีส่วน

ในการกระตุ้นการสร้างเซลล์ชนิดนี้โดยการสร้าง cytokine chemokine และ growth factor เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้าง hematopoietic cell ลักษณะของ MSC สามารถบ่งชี้ได้ด้วย specific Cell-surface protein ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง growth factor receptor cell adhesion molecules และ other cell-surface marker ที่แสดงออกโดย MSC

Marker type	Example
Surface markers	CD13 CD29 CD44 CD73 CD90 CD105 CD106 Stro-1 และ Sca-1
Cytokine receptors	IL-1R IL-3R IL-4R IL-6R และ IL-7R
Extracellular matrix receptors	integrins $\alpha 1$ $\alpha 2$ $\alpha 3$ αA αv $\beta 2$ $\beta 3$ $\beta 4$ ICAM-1 ICAM-2 VCAM-1 ALCAM-1 Endoglin และ Hyaluronate Receptor
Growth factor receptors	BFGF-R และ PDGF-R
Other receptors	Thy-1 IFN- γ R TGF- β R และ TNF-R

ที่มา: Kode et al. (2009)

MSC มีการแสดงออกของ adhesion-related antigen บนผิวเซลล์ เช่น integrins $\alpha v \beta 3$ integrins $\alpha v \beta 5$ integrin subunits $\alpha 4 \alpha 5$ และ $\beta 1$ intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) และ CD44H เป็นต้น ทำหน้าที่เพิ่มความสามารถในการยึดเกาะ antigen ภายนอกเซลล์ในการเคลื่อนตัวของเซลล์ไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมาย MSC ไม่แสดง co-stimulatory molecule บนผิวเซลล์ ทำให้ไม่มีการส่งสัญญาณกระตุ้น T-cell ให้ทำงาน นอกจากนี้ MSC ยังมีการแสดง MHC class I น้อยและไม่แสดง MHC class II บนผิวเซลล์อีกด้วย ทำให้เซลล์ไม่มี allogenic setting ไม่มีการนำเสนอ antigen บนผิวเซลล์เพื่อกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันให้ทำลายเซลล์ ด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้มีการใช้ MSC ในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ เนื่องจากไม่มีปฏิกิริยาต่อภูมิคุ้มกันของ host

MSC สร้าง cytokines chemokine และ growth factor มากมาย เช่น interleukin (IL)-6 IL-7 IL-8 IL-11 IL-12 IL-14 IL-15 leukemia inhibitory factor granulocyte colony-stimulatory factor (G-CSF) granulocyte macrophage colony-stimulatory factor (GM-CSF) stem cell factor macrophage colony-stimulatory factor (M-CSF) และ FMS-like tyrosine kinase-3 ligand (flk-3L)

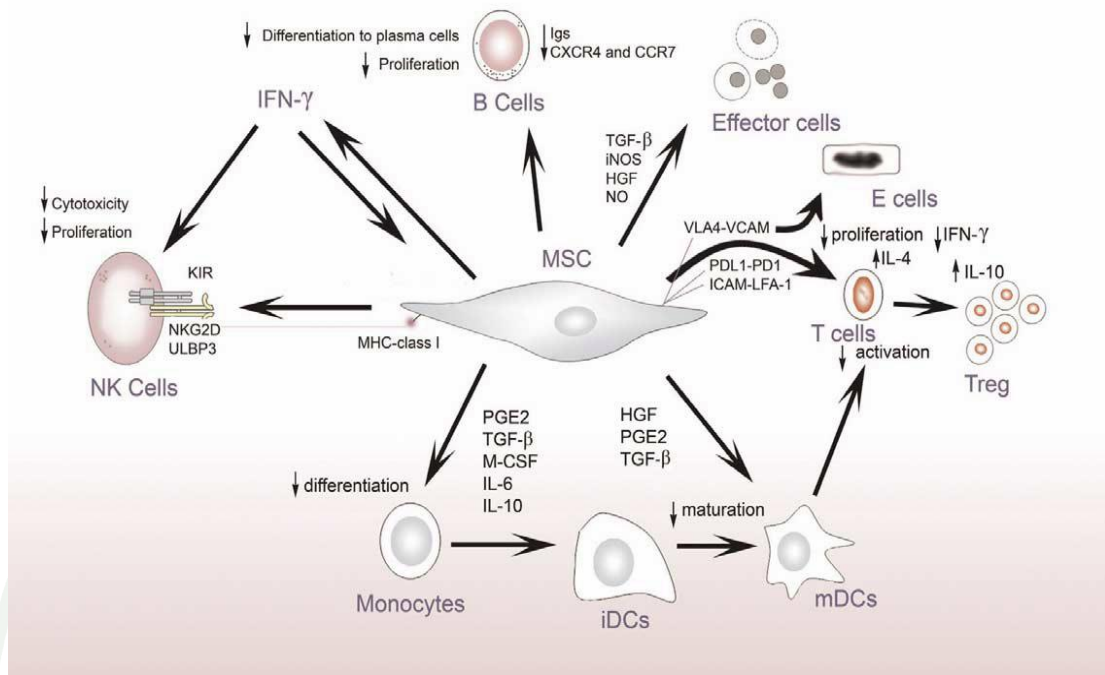
เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการ hematopoiesis นอกจากนี้ยังมีการค้นพบว่ายีนที่สร้าง cytokine และ chemokine ของ MSC ที่อยู่ในปอดแตกต่างจากยีนดังกล่าวของ MSC ที่อยู่ในไขกระดูก ซึ่งยีนที่เกี่ยวกับกระบวนการ angiogenesis และกระบวนการ hematopoiesis จะมีการแสดงออกจาก MSC ในไขกระดูกมากกว่ายีนจาก MSC ในปอดซึ่งหมายความว่า จะพบภาวะ osteogenesis และ hematopoiesis ในกระดูกแต่จะไม่พบ ในปอด แสดงให้เห็นว่าสภาวะแวดล้อมของเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันจะเป็นตัวกำหนดหน้าที่การทำงานของ MSC ที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ นอกจากนี้บนผิวเซลล์ของ MSC ก็มี cytokine receptor ด้วยเช่นกัน ได้แก่ IL-1R IL-3R IL-4R IL-6R และ IL-7R เมื่อมีการกระตุ้น receptor เหล่านี้จะทำให้ MSC สร้าง chemokine เพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก ส่วนใหญ่ได้แก่ CXCL9 CXCL10 และ CXCL11 และที่สำคัญคือมีการค้นพบ chemokine receptor บนผิวเซลล์เช่น CCR1 CCR4 CCR5 CCR7 และ CCR10 ซึ่ง receptor เหล่านี้คาดว่ามียับยั้งที่สำคัญในการเคลื่อนตัวของ MSC ไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมาย เพื่อทำกระตุ้นการซ่อมแซมพื้นฟูเซลล์ที่บาดเจ็บและเจริญเป็นเซลล์ใหม่ทดแทนเซลล์ที่ตายไป ลักษณะของ MSC คล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดทั่วไปคือถูกควบคุมการทำงานโดย microenvironment และ multiple factors ที่ความเข้มข้นต่างๆซึ่งอาจทำงานอย่างอิสระหรือทำงานร่วมกับ หลายๆปัจจัยก็ได้ ดังนั้นเมื่อ MSC อยู่ในสภาพแวดล้อมเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันจึงมีบทบาทหน้าที่ที่แตกต่างกันตาม สภาพแวดล้อมนั้นๆ เช่น MSC ในไขกระดูกเซลล์จะทำหน้าที่สร้างเซลล์กระดูกและสร้างเม็ดเลือด เป็นต้น การบาดเจ็บของเซลล์ การอักเสบ การติดเชื้อ และมะเร็งเป็นปัจจัยที่กระตุ้นให้ MSC เกิดการเคลื่อนตัวมาซ่อมแซมบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บ แต่ตามกลไกในการเดินทางมาทำงานของเซลล์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

MSC มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันมากมาย สามารถเบี่ยงเบนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทำให้ไม่เกิดกระบวนการอักเสบขึ้นได้ ด้วยการเปลี่ยนแปลง T-helper type 1 (Th1) เป็น T-helper type 2 (Th2) กดการสร้าง interferon (IFN)- γ จาก NK-cell และลดการผลิต antibody จาก B-cell เพื่อควบคุมกระบวนการ lymphopoiesis และกดภูมิคุ้มกันทั้ง innate และ adaptive immunity ผ่านทาง indirect soluble factors หรือทาง direct physical contact โดย MSC ที่มาจากไขกระดูกมีผลต่อการพัฒนาของทั้ง B-cell และ T-cell โดยผ่านการทำงานของ Cytokine Growth factor และ Adhesion molecule นอกจากนี้จากการที่ MSC ไม่มีการแสดง MHC class II บนผิวเซลล์ทำให้เซลล์สามารถหลีกเลี่ยงกระบวนการ allogenic setting ของระบบภูมิคุ้มกันได้ และด้วยคุณสมบัติของ MSC ในการเปลี่ยนแปลงตัวเองได้ง่ายและเป็นเซลล์สำรองของร่างกาย จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อและใช้ในการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บในทางการรักษา

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ของ MSC และ allogenic lymphocyte ร่วมกันพบว่า MSC ทำให้ lymphocyte ไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ แสดงให้เห็นว่า MSC ไม่ได้เป็นเซลล์ภูมิคุ้มกัน มาแต่กำเนิด นอกจากนี้ยังพบว่า MSC สามารถกดการแบ่งตัวของ lymphocyte antigen presenting cell (APC) และ NK cell ในปฏิกิริยา mixed-lymphocyte reaction (MLR) ซึ่งต่อต้านเนื้อเยื่อหรือไขกระดูกที่ได้รับการปลูกถ่ายได้อีกด้วย ในปัจจุบันการศึกษาส่วนใหญ่คาดว่าเนื่องจาก MSC ไม่มีการแสดงออกของ MHC class II และ co-stimulatory molecule บนผิวเซลล์ทำให้ไม่เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันขึ้นเมื่อทำการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพสูงในการรักษา graft VS. host disease (GvHD) ในการทดลองทางคลินิก

จากการศึกษาที่ผ่านมาไม่นานบ่งชี้ว่ามีการแสดงออกของ toll-like receptor (TLR) protein ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการเปลี่ยนแปลงภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าการยับยั้งการจับของ TLR4 (ให้จับกับ double-stranded RNA) และ TLR3 (ให้จับกับ lipopolysaccharide และ innate self-antigen) ทำให้ MSC ไม่สามารถกดการทำงานของ T-Cell ได้ และจากหลายๆรายงานพบว่า TLR3 เป็นตัวเริ่มต้นการกระตุ้นให้ MSC เกิดการตอบสนองและเคลื่อนตัวไปยังเป้าหมาย

MSC มีบทบาทในการกดการแบ่งตัวของ T-cell และการผลิต cytokine ที่เกี่ยวข้องเช่น IL-10 TGF- β indolemine 2,3-dioxygenase (IDO) และ prostaglandin E2 (PGE2) ความสามารถในการกดภูมิคุ้มกันของ MSC ไม่ได้มีมาแต่กำเนิดแต่เกิดจากการกระตุ้นของ pro-inflammatory cytokine ได้แก่ IFN- γ ซึ่งทำงานร่วมกับ TNF- α , IL-1 α หรือ IL-1 β คาดว่าการสร้าง cytokine เกิดขึ้นระหว่างการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้นโดย chemokine ที่สร้างโดย MSC กลไกการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันที่เป็นไปได้ของ MSC (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 แสดงการเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกัน โดย MSC เกิดขึ้นที่หลายระดับ เช่น กดการทำงานของ naive T-cell และ memory T-cell ชับยั้งการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงตัวเองของ B-cell ไปเป็น plasma cell ดังนั้นการสร้าง antibody จึงลดลง กดการแบ่งตัวของ NK cells กดการผลิต IFN-g และลดการทำงานของ NK cells ชับยั้งการเปลี่ยนแปลงตัวเองของ monocyte เป็น immature dendritic cell (iDC) และการพัฒนาเป็น mature DC

ที่มา: Kode *et al.* (2009)

เซลล์ต้นกำเนิด เป็นสิ่งหนึ่งที่ถูกนำมาพิจารณาในการแทนที่ ซ่อมแซม สร้างทดแทน และการฟื้นฟูเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีการเสื่อมสลาย เช่น โรค Parkinson's ที่มีการเสื่อมสลายของเซลล์หลายชนิด จึงมีการนำ stem cell มาใช้รักษาทดแทนตลอดชีวิต โดยได้ทำการแยก stem cell ซึ่งเชื่อว่าเซลล์หัวใจใหม่ที่ได้รับการปลูก ถ่ายสามารถนำมาซ่อมแซมความเสียหายจากหัวใจวาย ได้หรือเซลล์ต้นกำเนิดนำมาใช้ในการรักษาโรคตับแข็ง เป็นต้น จุดที่มีการปลูก stem cell จะง่ายต่อการสร้างเนื้อเยื่อข้างเคียงมาทดแทน โดยมีการหลั่งสารที่มีผลต่อการต่ออายุการทำงานทางชีววิทยา เช่น สารในระบบภูมิคุ้มกัน หรือ สารอาหารที่สำคัญเพื่อช่วยในการฟื้นฟูเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) การศึกษาในสัตว์ทดลองและ การศึกษาในห้องปฏิบัติการ ที่หลากหลายเป็นสิ่งที่ช่วยตัดสินใจถึงความเป็นไปได้ในการที่จะปลูกถ่าย MSC เพื่อการรักษาโรค นอกจากนี้ ความปลอดภัย และ

ประสิทธิภาพในการปลูกถ่าย MSC ก็เป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึง การทดลอง ในสิ่งมีชีวิตแสดงให้เห็นว่า MSC สามารถเข้าไปในอวัยวะได้หลายชนิด เช่น ตับ กระดูก และไตหลังจากที่ได้มีการฉีดเข้าหลอดเลือด ในสุนัขได้มีการปลูกถ่าย MSC ที่ได้จากตัวมันเองกับ bone matrix บางส่วนที่มีการสลายของแร่ธาตุ เพื่อช่วยฟื้นฟูกระดูกที่มีปัญหาและมีการเจริญของกระดูกใน non-weight-bearing gap โดยการสร้างใหม่ของกระดูกที่มีปัญหาจะต้องอาศัย การคัดสรรทดแทนข้อร่วมด้วย คุณสมบัติเหล่านี้จึงชี้ให้เห็นว่า MSC สามารถช่วยในการซ่อมแซมและสร้างทดแทนเนื้อเยื่อได้

การรักษาด้วยเซลล์ต้นกำเนิดให้ได้ผลนั้นต้องการองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ประการในการทำงานร่วมกัน คือ ปริมาณของเซลล์เป้าหมายและสถานะแวดล้อมของเซลล์เป้าหมายนั้น ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดที่ใช้ปลูกถ่ายนั้นแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

1. การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (tissue-restricted stem cell หรือ progenitors) ที่จำเพาะต่อเนื้อเยื่อเป้าหมาย
2. การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงแล้ว (differentiated stem cell) หลังจากระบวนการทางห้องปฏิบัติการ

การใช้ mesenchymal stem cell จาก blood-derived stem cell โดยเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็น multipotential stem cells สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์เต็มวัย (adult cell) ได้หลากหลายชนิด จากการทดลองพบว่าสามารถพัฒนาไปเป็นกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อกระดูก เนื้อเยื่อตับ และเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งสามารถตอบสนองต่อการเสียหายได้ทั้ง แบบเฉียบพลัน (acute) และแบบเรื้อรัง (chronic) โดยการใช้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้เหมาะสำหรับการพัฒนาไปเป็น non-hematopoietic tissue มีการนำมาใช้ศึกษา ทดลอง และนำมาใช้ในการรักษาจริงในทางคลินิก

อย่างไรก็ตาม จุดประสงค์ในการศึกษานี้ก็เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมสุนัขในการสนับสนุนและฟื้นฟูการหายของแผลหลุมที่กระดูกตายในกระต่ายทดลอง และในสัตว์ป่วยจริงเพื่อลดความยุ่งยากในการหาผู้บริจาคและนำมาประยุกต์ใช้เป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคแผลหลุมที่กระดูกตาย อีกทางหนึ่ง โดยใช้การประเมินความชุ่มชื้นของกระดูก การประเมินทางพยาธิวิทยา และการวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนบนผิวเซลล์เยื่อ epithelium เป็นตัวชี้วัด โดยคาดหวังว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมสุนัขจะสามารถสนับสนุนและฟื้นฟูการหายของแผลหลุมที่กระดูกตายได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมลูกสุนัขในการสนับสนุน ฟันฟู การหายของแผลที่กระจกตาในกระต่าย
2. เพื่อเป็นพื้นฐานและแนวทางในการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมลูกสุนัขในการรักษาแผลที่กระจกตาจากสาเหตุอื่นๆทั้งในกระต่าย สุนัข และแมว
3. เพื่อพัฒนาการทำงานวิจัยและพัฒนาเทคนิคใหม่ในการประยุกต์ใช้ของเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมลูกสุนัขในโรคของตาส่วนอื่นๆ
4. ผลิตงานวิจัยที่มีคุณภาพ สามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการที่มีชื่อเสียงได้

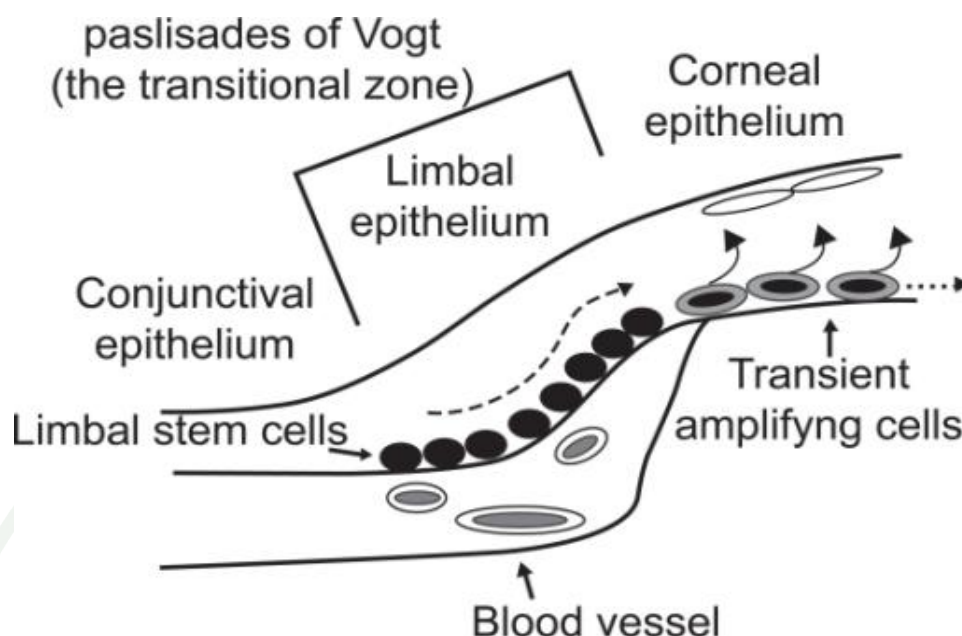
การตรวจเอกสาร

สารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นด่างสร้างความเสียหายให้กระจกตาของสัตว์รุนแรงมากและสามารถทำให้สัตว์ตาบอดได้ ฉะนั้นการจัดการที่รวดเร็วและเหมาะสมจะนำไปสู่การพยากรณ์โรคที่ดี

ในปี 1995 Kim และ Tseng เริ่มใช้การปลูกถ่าย amniotic membrane ในการรักษาแผลที่กระจกตาจากสารเคมีรวมถึงแผลของกระจกตาจากสาเหตุอื่น นอกจากนี้ Gomes *et.al.* (2003) ศึกษาถึงผลของการศัลยกรรมปลูกถ่าย amniotic membrane บนกระจกตาของมนุษย์ที่เกิดภาวะเป็นแผลจากสารเคมีโดยที่สูญเสียส่วนของ limbal stem cell ไปด้วย ซึ่ง limbal stem cell เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่วางตัวอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างเยื่อตาขาวและกระจกตา (ภาพที่ 14) ซึ่งในสภาวะปกติการขยายตัวและเพิ่มจำนวนของ limbal stem cell จะป้องกันการเจริญเติบโตของเซลล์เยื่อตาขาวและขัดขวางการแทรกตัวของเส้นเลือดไปสู่ชั้น stroma ฉะนั้นการสูญเสียส่วนของ limbal stem cell จะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคตาที่รุนแรงได้ (Dua *et al.*, 2009, Davangen and Evensen, 1971, Kruse *et al.*, 1990, Lavker *et al.*, 1991) โดยศึกษาในผู้ป่วยภาวะดังกล่าวจำนวน 20 ราย และแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1. กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่าย amniotic membrane ที่ปราศจากการปลูกถ่าย limbal stem cell ร่วมด้วย
2. กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการถ่าย amniotic membrane ร่วมกับการปลูกถ่าย limbal stem cell จากดวงตาอีกข้างของผู้ป่วยเอง
3. กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการถ่าย amniotic membrane ร่วมกับการปลูกถ่าย limbal stem cell จากผู้บริจาค

โดยพบว่าการปลูกถ่าย human amniotic membrane ในภาวะดวงตาถูกทำลายจากสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นด่างของมนุษย์ในกรณีที่มี limbal stem cell ถูกทำลายไปบางส่วนนั้นให้ผลในการรักษาที่ดีประสบความสำเร็จ 100% ส่วนในกรณีที่ limbal stem cell ถูกทำลายไปทั้งหมดนั้นควรต้องมีการปลูกถ่าย human amniotic membrane ร่วมกับ limbal stem cell ด้วยจึงจะประสบความสำเร็จในการรักษา



ภาพที่ 14 แสดงตำแหน่งของ limbal stem cell ที่อยู่บริเวณระหว่างกระจกตาและเยื่อตาขาวและเป็นกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเซลล์เยื่อ epithelium เซลล์ใหม่เพื่อทดแทนส่วนที่สูญเสียไปทั้งในภาวะปกติและภาวะแผลหลุมที่กระจกตา

ที่มา: Kayama (2007)

และในปี 2010 Gomes *et.al.* ยังศึกษาถึงผลของการใช้ tissue-engineered cell sheets ที่มี human immature dental pulp stem cells (hIDPSC) เป็นส่วนประกอบในการศัลยกรรมแก้ไข ภาวะแผลที่กระจกตาในกระต่ายกรณีที่มี limbal stem cell ถูกทำลายไปทั้งหมดจำนวน 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ชักนำให้สูญเสีย limbal stem cell โดยการใช้น้ำสารด่าง NaOH เป็นเวลา 25 วินาที (mild chemical burn) และ กลุ่มที่ชักนำให้สูญเสีย limbal stem cell โดยการใช้น้ำสารด่าง NaOH เป็นเวลา 45 วินาที (severe chemical burn) หลังจากนั้น 1 เดือน ทำ superficial keratectomy เพื่อลอกเอาส่วน fibrovascular pannus ที่ปกคลุมแผลอยู่ออกในกระต่ายทั้ง 2 กลุ่ม หลังจากนั้นในแต่ละกลุ่มนั้นจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือกลุ่มที่รับการปลูกถ่าย amniotic membrane เพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่าย amniotic membrane ร่วมกับ hIDPSC เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า กระจกตาของกระต่ายในกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่าย hIDPSC มีความใสมากขึ้นในขณะที่กระต่ายกลุ่มที่ไม่ได้รับการปลูกถ่าย hIDPSC จะมีกระจกตาที่เกิดภาวะ total conjunctivalization และ opacification นอกจากนี้ยังพบว่ากระต่ายกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่าย hIDPSC กรณี mild chemical burn มีความใสของกระจกตามากกว่าและเกิด neovascularization น้อยกว่ากรณี severe chemical burn ด้วย

Ye *et al.* (2006) ศึกษาถึงการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของกระดูกอ่อนของกระดูกชนิด mesenchymal stem cells (ที่เก็บจากไขกระดูกของกระดูกขาหลังก่อนบนของกระดูกตัวบริจาด) ทางระบบหมุนเวียนเลือดสามารถ home และ engraft มาที่กระจกตากระดูกอ่อนเพื่อสนับสนุนฟื้นฟูการหายของแผลจากสารเคมีต่าง โดยแบ่งกระดูกอ่อนที่ถูกชักนำให้เกิดแผลที่กระจกตาจากสารต่างออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้

1. กลุ่มที่มีการทำงานของไขกระดูกปกติ (normal bone marrow function) และไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด
2. กลุ่มที่มีการทำงานของไขกระดูกปกติ และได้รับการปลูกถ่ายด้วย mesenchymal stem cell ผ่านทางเส้นเลือดดำที่หู (ear vein)
3. กลุ่มที่ถูกกดการทำงานของไขกระดูกด้วย cyclophosphamide และไม่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์ต้นกำเนิด
4. กลุ่มที่ถูกกดการทำงานของไขกระดูกด้วย cyclophosphamide และได้รับการปลูกถ่ายด้วย mesenchymal stem cell ผ่านทางเส้นเลือดดำที่หู (ear vein)

จากนั้นติดตามผลการทดลองในวันที่ 3 วันที่ 14 และ 1 เดือนหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อประเมิน

1. Corneal re-epithelialization corneal opacity และ neovascularization
2. Cell engraftment ในไขกระดูก ในระบบหมุนเวียนโลหิตและ ในกระจกตา ด้วยการติดฉลากสารเรืองแสง DiI กับ mesenchymal stem cell ก่อนการใช้ปลูกถ่ายให้กับสัตว์ทดลอง
3. Cell proliferation และ cell differentiation โดยใช้ immunohistochemistry ในการตรวจหา proliferating cell nuclear antigen (PCNA) P63 vimentin และ α -smooth muscle actin (α -SMA) ที่กระจกตา

พบว่าหลังจากการใช้ mesenchymal stem cells จำนวน 1×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ผ่านทางหลอดเลือดดำที่หู 1 เดือน กระดูกอ่อนกลุ่มที่ 2 ให้ผลในการรักษาที่ดีมากเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นในทุก parameter ที่ประเมิน คือ กระจกตามีความใสมากที่สุด ตรวจพบ PCNA P63 และ vimentin มากที่สุด และพบการเรืองแสงของ DiI ที่ติดฉลากมากับ mesenchymal stem cell มากกว่าในกลุ่มที่ 4 ด้วยซึ่ง

แสดงให้เห็นว่า mesenchymal stem cell สามารถ เคลื่อนตัวไปยังบริเวณที่เกิดแผลและสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เยื่อกระจกตาได้ โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่วันที่ 14 หลังการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด

Zhang *et al.* (2012) ศึกษาถึงความสามารถของ mesenchymal stem cell จากไขกระดูกของหนูทดลองในการผลิตสารที่เป็นประโยชน์ (beneficial factors) ต่อการหายของแผลหลุมที่กระจกตา เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF) pigment epithelium-derived factor epidermal growth factor transforming growth factor-beta1 integrin $\alpha_5\beta_1$ integrin $\alpha_6\beta_1$ fibronectin และ laminin เปรียบเทียบกับความสามารถในการหลั่งสารดังกล่าวของ limbal stem cells จากดวงตาของหนูทดลอง โดยปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดทั้ง 2 ชนิดลงบน acellular corneal matrix ที่ได้มาจากกระจกตาสุนัข ในห้องปฏิบัติการ พบว่า การแสดงออกของ VEGF epidermal growth factor และ transforming growth factor-beta1 ของ mesenchymal stem cell มีสูงกว่า limbal stem cell อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า mesenchymal stem cell สามารถผลิตสารที่เป็นประโยชน์ต่อการหายของแผลที่กระจกตามากกว่า limbal stem cell

นอกจากนี้ Lin *et al.* (2013) ศึกษาถึงการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ (human adipose tissue-derived stem cells) ในกระจกตากระต่ายหลังจากเกิดภาวะแผลจากสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นด่างไม่นาน โดยแบ่งกระจกตากระต่ายออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่าย เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์จำนวน 1.3×10^5 เซลล์/0.2 มิลลิลิตร ผ่านทางเยื่อตาขาว (subconjunctival injection) และกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายน้ำเกลือปลอดเชื้อปริมาณเท่ากัน หลังจากนั้น 1 เดือน ติดตามผลการทดลอง พบว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ สามารถสนับสนุนให้เกิดการสร้างเซลล์เยื่อกระจกตาของกระต่ายในภาวะแผลดังกล่าวข้างต้นได้ โดยพบว่าความใสของกระจกตา จำนวนชั้นของเซลล์ของเยื่อกระจกตาในกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดมีมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเตรียมเซลล์ต้นกำเนิด

- 1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ
- 1.2 อุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์
- 1.3 ตู้บ่มเพาะเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
- 1.4 ห้องปลอดเชื้อ

2. อุปกรณ์ในการวางยาสลบสัตว์และเหนี่ยวนำแผลที่กระจกตา

- 2.1 Xylazine
- 2.2 Ketamine
- 2.3 Isofurane
- 2.4 Tetracaine HCl eye drop 0.5 เปอร์เซ็นต์
- 2.5 NaOH 10 เปอร์เซ็นต์
- 2.6 กระจกตากรองปลอดเชื้อเบอร์ 1
- 2.7 น้ำเกลือ Normal saline 0.9 เปอร์เซ็นต์
- 2.8 เซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมสุนัข
- 2.9 Gentamicin eye drop
- 2.10 อุปกรณ์ต่างหน้าต่างา
- 2.11 ปากคีบ

3. อุปกรณ์สำหรับการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

- 3.1 สี Hematoxyline และ Eosin
- 3.2 แผ่นสไลด์แก้ว
- 3.3 Biopsy punch
- 3.4 Formalin 10 เปอร์เซ็นต์
- 3.5 เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ

- 3.6 กล้องจุลทรรศน์
- 3.7 กล้องถ่ายภาพบันทึกข้อมูลแบบดิจิทัล
- 3.8 เครื่องตรวจนับเม็ดเลือด
- 3.9 เครื่องตรวจค่าเคมีในเลือด

4. อุปกรณ์สำหรับการตรวจ PCR

- 4.1 PCR machine
- 4.2 Pipette
- 4.3 Tips
- 4.4 Micro tube
- 4.5 TRI[®] reagent
- 4.6 Primer (Connexin43 และ Actin)
- 4.7 สารละลายในการทำ PCR
- 4.8 ตู้เย็น

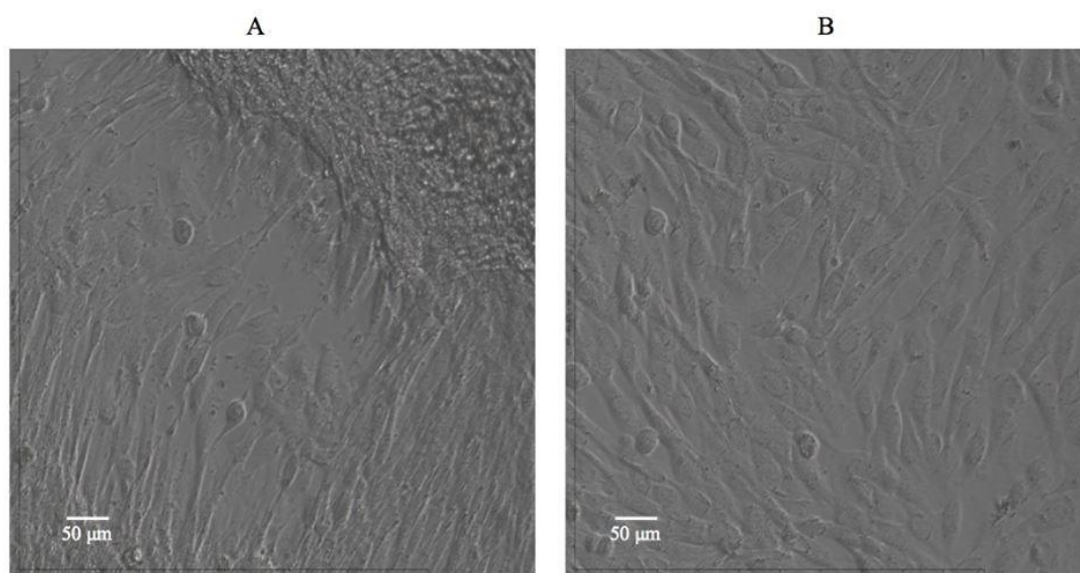
5. อุปกรณ์อื่นๆ

- 5.1 เครื่องชั่งน้ำหนัก
- 5.2 กระจกน็อคยา
- 5.3 เข็มฉีดยา
- 5.4 สำลี
- 5.5 แอลกอฮอล์
- 5.6 ห้องฆ่าตัดปลอดเชื้อ
- 5.7 เครื่องดมยาสลบ
- 5.8 เครื่องให้น้ำเกลืออัตโนมัติ
- 5.9 กรงกระต่าย

วิธีการ

1. การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนมสุนัข (puppy deciduous teeth stem cells, pDSC)

เก็บฟันน้ำนมสุนัขโดยวิธีปลอดเชื้อโดยใช้หมพาสเจอร์ไรส์เป็น transport medium นำมาล้างด้วย PBS จากนั้นเปิดรากฟันแล้วเก็บเนื้อเยื่อในโพรงฟันน้ำนมออกมา ล้างด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี penicillin และ streptomycin แล้วนำไปตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆที่สุดเท่าที่จะทำได้ เก็บชิ้นส่วนที่ได้จากการตัดทั้งหมดนำไปปั่นให้ตกตะกอน ทิ้งส่วนใสด้านบนแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปเลี้ยงในภาชนะแล้วนำไปใส่ใน incubator ที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ครบ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ 5-7 วันจนเซลล์เริ่มมีการแบ่งตัวเต็มพื้นผิว จึงทำการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านั้น (ภาพที่ 15) เพื่อนำไปใช้



ภาพที่ 15 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของฟันน้ำนมจากลูกสุนัข (A) แสดงเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่ติดกับเนื้อเยื่อโพรงรากฟัน (B) แสดงการไหลมารวมกันของเซลล์จนมีความหนาแน่นเกือบเต็ม flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ภายใน 4-6 วัน

2. สัตว์ทดลอง

กระต่ายที่นำมาทดลองทั้งหมดได้รับการเลี้ยงดูและจัดการตามมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยใช้กระต่ายสายพันธุ์ new zealand white เพศผู้

จำนวน 8 ตัวที่มีช่วงอายุ 1-2 ปีและมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 2.1-2.6 กิโลกรัม จะถูกวางยาสลบแบบหมดความรู้สึกทั่วร่างกายด้วย xylazine ในขนาด 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ ketamine 5 เปอร์เซ็นต์ในขนาด 5 มิลลิกรัม /กิโลกรัม ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (ภาพที่ 16) และคงสภาวะสลบด้วยยาดมสลบ isofurane (ภาพที่ 17) หยอดตาทั้งสองข้างด้วยยาชาเฉพาะที่ tetracaine HCl 0.5 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นใช้แผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร (ภาพที่ 18) จุ่มลงใน NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที นำมาวางลงตรงกลางกระจกตาเป็นเวลา 40 วินาที (ภาพที่ 19) นำกระดาษกรองออกจากตาแล้วล้างตาด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ (normal saline) แบบไหลผ่านเป็นเวลา 30 วินาที (ภาพที่ 20) หลังจากทำให้กระจกตาเกิดแผลแล้ว (ภาพที่ 21) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (pDSC) ที่เตรียมได้ดังกล่าวข้างต้นปริมาณความเข้มข้น 5×10^5 เซลล์/0.25 มิลลิลิตร เข้าเยื่อตาขาว (subconjunctival injection) ข้างขวาซึ่งถือเป็นกลุ่มทดลอง (ภาพที่ 22) ส่วนกลุ่มควบคุมใช้วิธีการทำให้เกิดแผลที่กระจกตาข้างซ้ายเหมือนข้างขวาและใช้น้ำเกลือปลอดเชื้อ ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเยื่อตาขาว ใช้น้ำยาปฏิชีวนะเฉพาะที่ (gentamicin eye drop) หยอดตาทั้งสองข้างวันละ 3 เวลาเพื่อป้องกันการติดเชื้อแทรกซ้อนเป็นเวลา 30 วัน



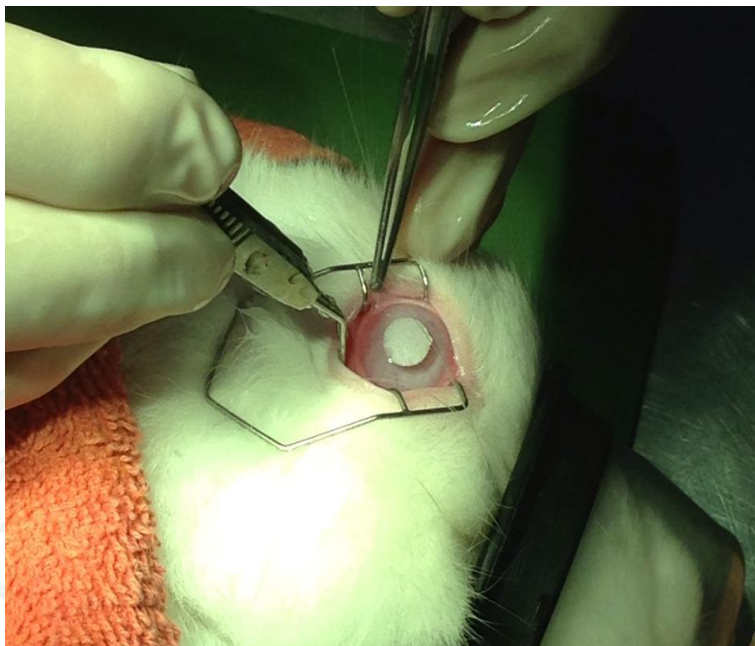
ภาพที่ 16 แสดงการเหนี่ยวนำการสลบกระต่ายด้วยยาฉีด xylazine และ ketamine เข้ากล้ามเนื้อ



ภาพที่ 17 แสดงการรักษาภาวะสลบของกระต่ายด้วยการดมยา isofurane



ภาพที่ 18 แสดงกระต่ายกรองปลอดเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร (ซ้าย) และ สารด่าง NaOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ขวา)



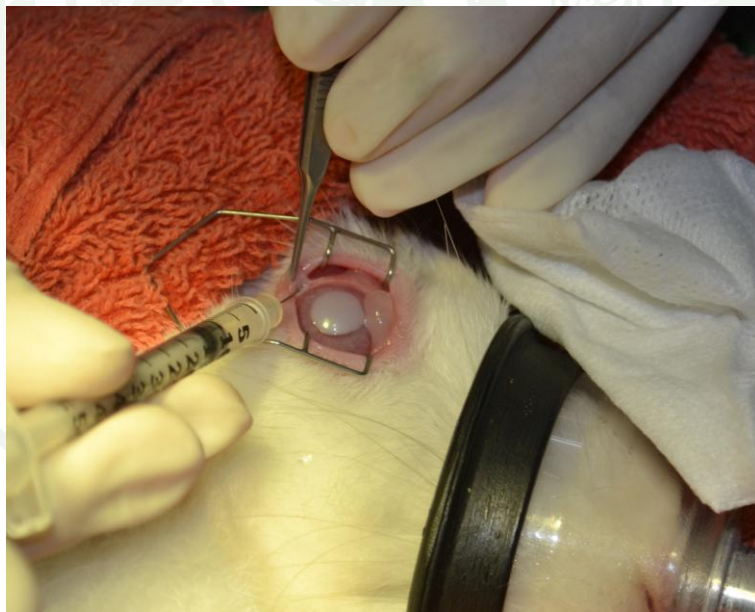
ภาพที่ 19 แสดงการชักนำให้เกิดแผลที่กระจกตาโดยใช้แผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อที่จุ่มสารต่าง
นำไปวางกลางกระจกตากระต่าย



ภาพที่ 20 แสดงการล้างกระจกตาด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อแบบไหลผ่านเป็นเวลา 30 วินาที



ภาพที่ 21 แสดงแผลที่กระจกตาหลังถูกชกน้ำให้เกิดด้วยสารต่าง



ภาพที่ 22 แสดงการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากพินันมลูกสุนัขเข้าเยื่อตาขาวของตาขวา

3. การประเมินความขุ่นใสของกระจกตา (corneal haziness grading)

เมื่อครบกำหนด 30 วันหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด วางยาสลบกระต่ายด้วยยานำสลบ ด้วยวิธีที่เคยกล่าวไว้แล้วข้างต้น จากนั้นทำการแบ่งระดับความขุ่นใสของกระจกตาโดยสัตวแพทย์ผู้ ซึ่งไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทดลองนี้โดยใช้หลักการของ Ye *et al.* (2006) (ตารางที่ 2) ดังนี้ grade 0 กระจกตาใส ไม่พบความขุ่นเลย grade 1 กระจกตาค่อนข้างใส grade 2 กระจกตาค่อนข้างใสจากการใช้ไฟส่องสว่าง grade 3 กระจกตาขุ่นปานกลาง บดบังโครงสร้างม่านตาบางส่วน grade 4 กระจกตาขุ่นมาก บดบังโครงสร้างภายในลูกตาทั้งหมด

4. การประเมินทางจุลพยาธิวิทยา

หลังจากประเมินความขุ่นใสของกระจกตาเรียบร้อยแล้ว ทำการ เมตตามาดกระต่ายทดลอง ทั้งหมดแล้ว เก็บตัวอย่างบริเวณกลางกระจกตา ด้วย biopsy punch ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วแบ่งตัวอย่างกระจกตาที่ได้ออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปทำการตรวจวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยาโดยการตัดชิ้นเนื้อไปย้อมสี hematoxyline and eosin แล้วนับจำนวนชั้นเยื่อ epithelium ส่วนที่สองนำไปตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณในขั้นตอนต่อไป

5. การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction

นำตัวอย่างส่วนที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยาไปบดให้ละเอียดใน TRI Reagent® (1 มิลลิลิตร/เนื้อเยื่อ 50-100 มิลลิกรัม) ซึ่งจะได้ total RNA จากกระจกตา จากนั้นเปลี่ยน mRNA ไปเป็น cDNA ด้วยเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อวิเคราะห์ proliferative effect ของกระบวนการหายของแผลหรือการแสดงออกของ mRNA ของยีนบนผิวเซลล์ชนิด connexin43 (Cx43) โดยใช้ยีน actin เป็นยีนควบคุมการแสดงออกของ mRNA ภายใน (internal control) โดย primer ที่ใช้ในการทำ PCR มีลำดับเบส annealing temperature และความยาว primer ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 แสดงการแบ่งระดับความขุ่นใสของกระจกตาออกเป็น grade

Grade 0	กระจกตาใส ไม่พบความขุ่น
Grade 1	กระจกตาค่อนข้างใส พบความขุ่นน้อยมาก ยังสามารถมองรายละเอียดและโครงสร้างภายในลูกตาดูด้วยตาเปล่าได้ชัดเจน
Grade 2	กระจกตาค่อนข้างใส พบความขุ่นได้บ้าง และต้องอาศัยไฟส่องสว่างเพื่อตรวจรายละเอียดและโครงสร้างภายในลูกตาได้อย่างชัดเจน
Grade 3	กระจกตาขุ่นปานกลาง บดบังรายละเอียดและโครงสร้างภายในลูกตาบางส่วน
Grade 4	กระจกตาขุ่นมัวมากไม่สามารถมองเห็นรายละเอียดและโครงสร้างภายในลูกตา

ตารางที่ 3 แสดงลำดับเบส annealing temperature และความยาวของ primer ของยีนบนพิวเซลล์ ชนิด connexin43 และ actin

Gene	Sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Length (bp)
Cx43	Forward: GCC TTC TTG CTG ATC CAA TGG	55	495
	Reverse: TGC ATG GGA GTT GGA GAT GG		
Actin	Forward: TGC TGT CCC TGT ACG CCT CT	55	340
	Reverse: TTG CCG ATG GTG ATG ACC TG		

ผลและวิจารณ์

ผล

การประเมินความชุ่มชื้นของกระจกตา

จากการประเมินตามตารางที่ 2 ในกระจกตาทั้ง 2 กลุ่ม โดยสัตวแพทย์ผู้ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทดลองนี้พบว่าในกลุ่มควบคุมมีความชุ่มชื้นของกระจกตาอยู่ใน grade 3-4 (ภาพที่ 23) ส่วนกลุ่มทดลองมีความชุ่มชื้นของกระจกตาอยู่ใน grade 1-2 (ภาพที่ 24) (ตารางที่ 4) โดยไม่พบการติดเชื้อแทรกซ้อนใดๆในกระจกตาทั้ง 2 กลุ่ม จากการประเมินความชุ่มชื้นของกระจกตาจะเห็นได้ว่ากระจกตาในกลุ่มทดลองมีความใส มากกว่ากลุ่มควบคุมค่อนข้างมาก หรืออีกนัยหนึ่งคือกระจกตาในกลุ่มทดลองเกิดเนื้อเยื่อแผลเป็นน้อยกว่ากระจกตากลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4 แสดง grade ของความชุ่มชื้นของกระจกตาในกลุ่มควบคุม (Control) และกลุ่มทดลอง (pDSC) หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมลูกสุนัข 30 วัน

กลุ่ม	กระต่ายตัวที่							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control	4	4	3	4	3	3	4	4
pDSC	2	1	1	1	2	1	2	1



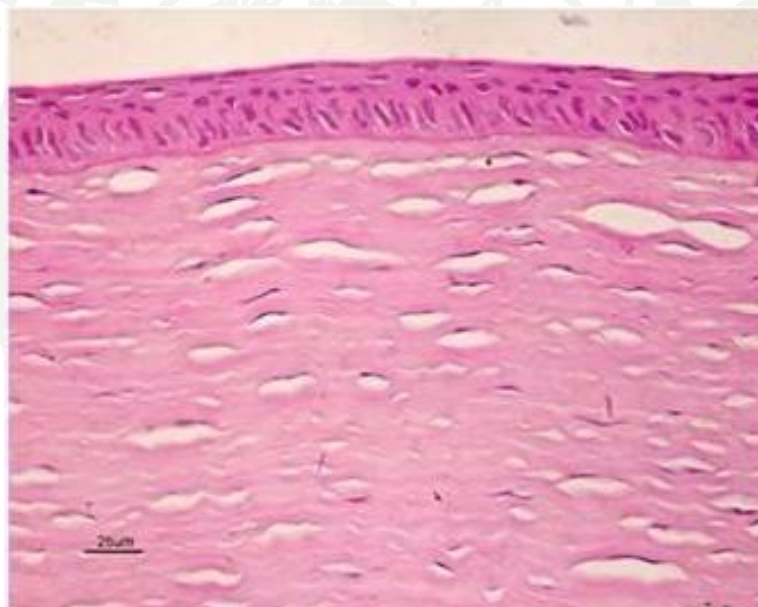
ภาพที่ 23 แสดงความขุ่นใสของกระจกตาในกลุ่มควบคุมซึ่งอยู่ใน grade 3-4 หลังการฉีดน้ำเกลือเข้าเยื่อตาขาว 30 วัน



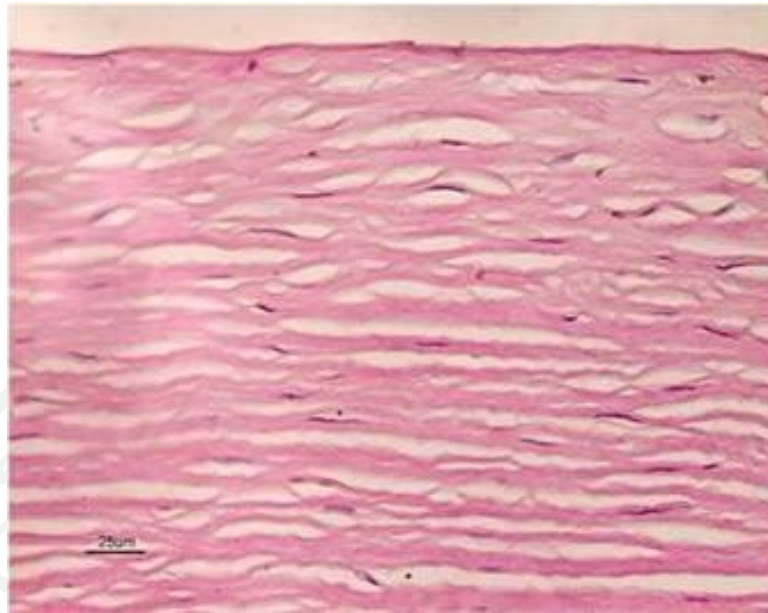
ภาพที่ 24 แสดงความขุ่นใสของกระจกตาในกลุ่มทดลองซึ่งอยู่ใน grade 1-2 หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมลูกสุนัข 30 วัน

การประเมินทางพยาธิวิทยา

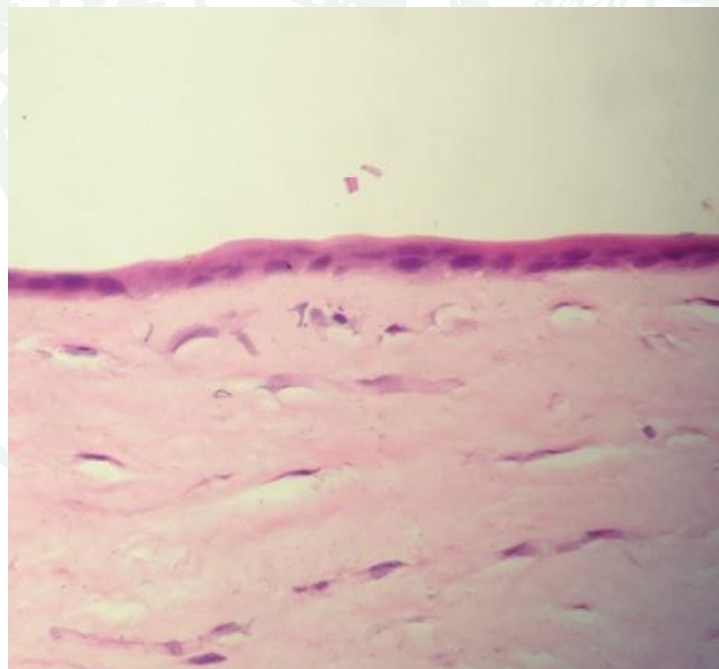
จำนวนชั้นของเยื่อ epithelium ของกระจกตากระต่ายปกติมีประมาณ 5 ถึง 7 ชั้น (ภาพที่ 25) แต่หลังจากทำการชักนำให้เกิดแผลด้วยสารต่างที่กระจกตาแล้วพบว่าเซลล์เยื่อ epithelium ถูกทำลายทั้งหมด (ภาพที่ 26) ส่วนผลทางจุลพยาธิวิทยา จากการทดลองนั้น พบว่าจำนวนชั้นของเยื่อ epithelium ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 27) มีประมาณ 1 ถึง 2 ชั้น ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (ภาพที่ 28) ที่มีประมาณ 3 ถึง 6 ชั้น (ตารางที่ 5) โดยผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Student's t-test พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนชั้นของเยื่อ epithelium ทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) (ภาพที่ 29) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มทดลองมีการฟื้นฟูการหายของแผลที่กระจกตามากกว่ากลุ่มควบคุม



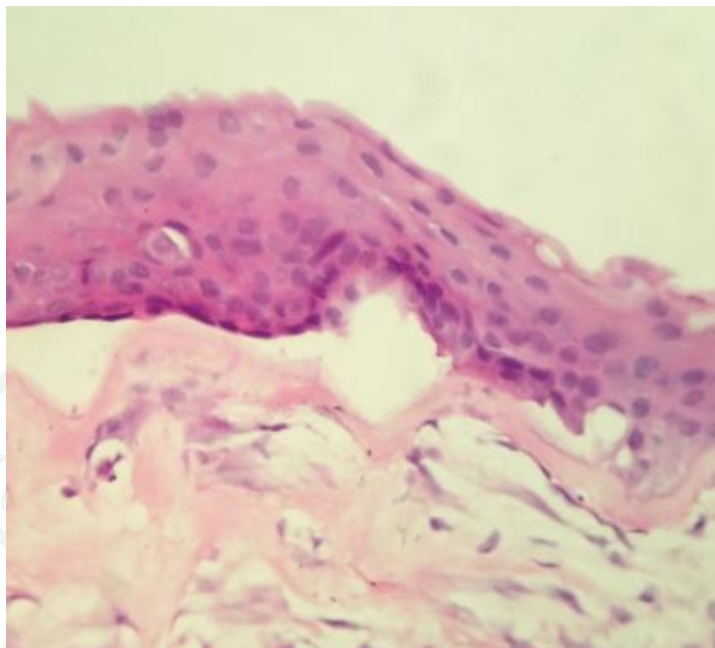
ภาพที่ 25 แสดงจำนวนชั้นของเยื่อ epithelium ของกระจกตากระต่ายปกติ



ภาพที่ 26 แสดงภาพทางจุลพยาธิของกระจกตาหลังจากเหนียวทำให้เกิดแผล จะเห็นได้ว่าไม่พบชั้นของเยื่อ epithelium



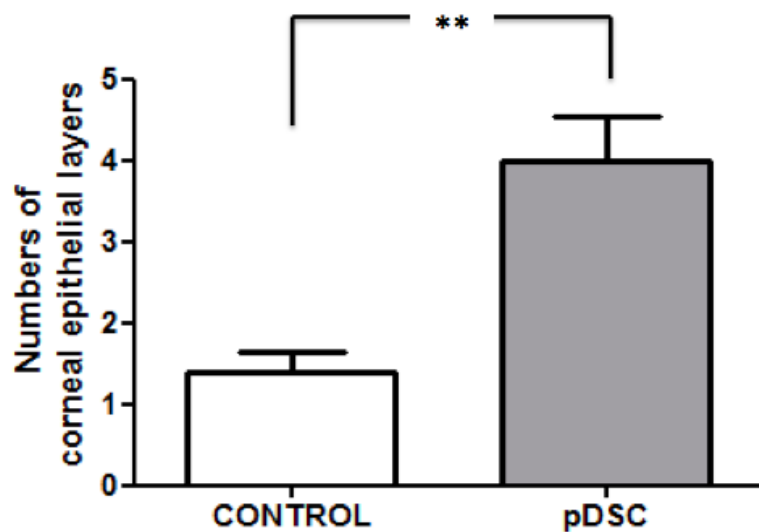
ภาพที่ 27 แสดงจำนวนชั้นของเยื่อ epithelium ของกระจกตาในกลุ่มควบคุมหลังการฉีดน้ำเกลือเข้าเยื่อตาขาว 30 วัน



ภาพที่ 28 แสดงจำนวนชั้นของเยื่อ epithelium ของกระจกตาในกลุ่มทดลองหลังการปลูกถ่าย เซลล์ต้นกำเนิดจากพื้มน้ำนมลูกสุนัข 30 วัน

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนชั้นของเยื่อ epithelium ระหว่างกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มทดลอง (pDSC) หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากพื้มน้ำนมลูกสุนัข 30 วัน

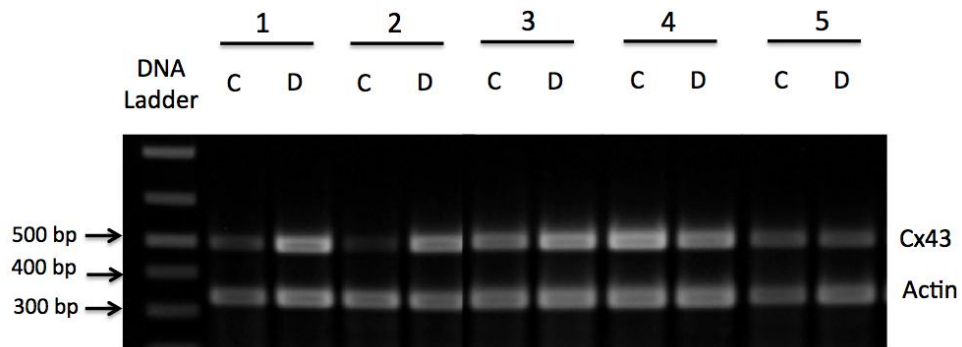
กลุ่ม	กระต่ายตัวที่							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Control	2	1	2	1	1	2	1	1
pDSC	4	4	3	4	3	5	6	4



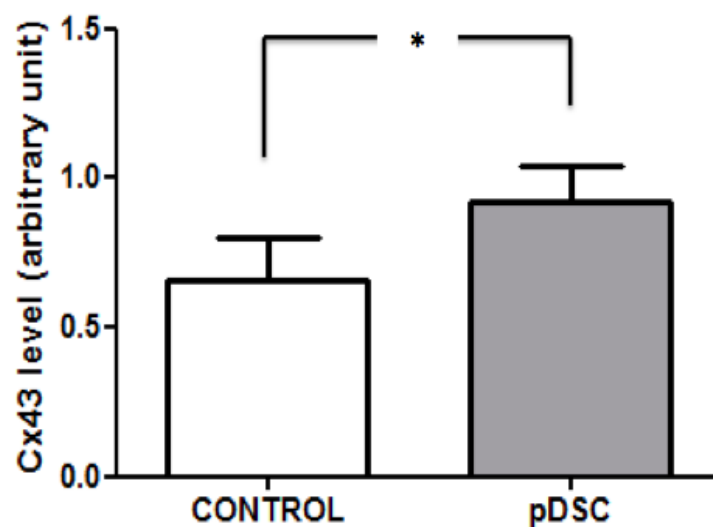
ภาพที่ 29 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ของค่าเฉลี่ยของจำนวนชั้นเยื่อ epithelium ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของการแสดงออกของ mRNA ของยีนบนผิวเซลล์

ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Student's t-test พบว่าอัตราส่วนของการแสดงออกของ mRNA ของยีน connexin 43 บนผิวเซลล์เยื่อ epithelium ของกระจกตาต่อยีน actin เฉลี่ยในกลุ่มทดลองมีมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 30 และ 31) แสดงให้เห็นว่ากระจกตาในกลุ่มทดลองมี proliferative effect หรือการสร้างเซลล์เยื่อ epithelium ขึ้นมาใหม่เพื่อมาเติมเต็มส่วนของแผลที่ขาดหายไปมีมากกว่ากระจกตาในกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจทางพยาธิวิทยา แต่ไม่อาจบ่งบอกได้ว่าเซลล์เยื่อ epithelium ที่เกิดขึ้นใหม่นั้นมีการเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ต้นกำเนิดจากพื้นน้ำนมลูกสุนัขที่ใช้เนื่องจากไม่มีการติดฉลากเซลล์ต้นกำเนิดที่ใช้ก่อนการทดลอง



ภาพที่ 30 แสดงภาพถ่ายผลผลิตของ RT-PCR ที่เคลื่อนผ่าน agarose gel electrophoresis โดยแถบบนแสดงถึงการแสดงออกของ mRNA ของยีน connexin 43 (Cx43) บนผิวเซลล์เยื่อ epithelium ของกระจกตา ส่วนแถบล่างคือยีน actin ระหว่างกลุ่มทดลอง (D) และกลุ่มควบคุม (C) DNA ladder ที่ใช้คือ 100 bp DNA ladder จากภาพจะมีจำนวนตัวอย่างการทดลองเพียง 5 ตัวอย่าง สืบเนื่องจากปริมาณของ mRNA จากตัวอย่างที่ 6 7 และ 8 มีน้อยมากจนไม่สามารถทำ RT-PCR ได้



ภาพที่ 31 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของอัตราส่วนของการแสดงออกของ mRNA ของยีน connexin 43 บนผิวเซลล์เยื่อ epithelium ของกระจกตาต่อยีน actin เฉลี่ยในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

วิจารณ์

ปัจจุบันมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของเซลล์ต้นกำเนิด จากหลายๆแหล่งต่อการรักษาแผล หลุมที่กระจกตา อาทิเช่น เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ Lin *et al.* (2013) พบว่าการ ใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ สามารถสนับสนุนให้เกิดการสร้างเซลล์เยื่อกระจกตา ของกระต่าย ในภาวะแผล หลุมจากสารเคมีต่าง โดยพบว่าความใสของกระจกตา จำนวนชั้นของ เซลล์ของเยื่อกระจกตาในก กลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดมีมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการ ปลูกถ่ายเซลล์ (Gomes *et al.*, 2010) ใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากพื้่นน้ำ นมมนุษย์ (hIDPSC) ในกระต่ายที่ มีภาวะแผลหลุมที่กระจกตาจากสารต่าง พบว่ากระจกตาของกระต่ายในกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่าย hIDPSC มีความใสมากขึ้น ในขณะที่กระต่ายกลุ่มที่ไม่ได้รับการปลูกถ่าย hIDPSC จะมีกระจกตาที่ เกิดภาวะ total conjunctivalization และ opacification นอกจากนี้ยังพบว่ากระต่ายกลุ่มที่ได้รับการ ปลูกถ่าย hIDPSC กรณี mild chemical burn มีความใสของกระจกตามากกว่าและเกิด neovascularization น้อยกว่ากรณี severe chemical burn

นอกจากนี้ Ye *et al.* (2006) ใช้ mesenchymal stem cell จากไขกระดูกกระต่ายจำนวน 1×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ปลูกถ่ายผ่านทางหลอดเลือดดำที่ใบหู กระต่ายที่เกิดแผลที่กระจกตา พบว่ากระต่าย กลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดให้ผลในการรักษาที่ดีมากเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นในทุก Parameter ที่ประเมิน คือ กระจกตามีความใสมากที่สุด ตรวจพบPCNA P63 และ vimentin มากที่สุด และพบการเรียงแสงของDiI ที่ติดฉลากมากับ mesenchymal stem cell ที่กระจกตาซึ่งแสดงให้เห็นว่า mesenchymal stem cell สามารถเคลื่อนตัวไปยังบริเวณที่เกิดแผลและสามารถ เปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์เยื่อ epithelium ของกระจกตาได้

จะเห็นได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell ไม่ว่าจะมาจากแหล่งใดหรือมา จากสิ่งมีชีวิตชนิดใดก็สามารถช่วยฟื้นฟูและสนับสนุนการหายของแผลที่กระจกตาได้ดี อีกทั้งยัง ก่อให้เกิดเนื้อเยื่อแผลเป็นหลังการรักษาน้อย ทำให้การรักษาแผลหลุมที่กระจกตาในสัตว์เลี้ยงหลาย ชนิดด้วยเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell โดยเฉพาะเซลล์ต้นกำเนิดจากพื้่นน้ำนมลูก สุนัขที่เราสามารถเพาะเลี้ยงเองได้ถือเป็นแนวทางใหม่ที่เหมาะจะนำมาใช้ในทางสัตวแพทยต่อไป ในอนาคต

การรักษาแผลหลุมที่กระจกตาอย่างมีประสิทธิภาพนั้นเป็นสิ่งที่สัตวแพทย์นั้นต้องการเพื่อ การพยากรณ์โรคที่ดีซึ่งหลักในการรักษาคือป้องกันการอักเสบและสนับสนุนให้เกิดภาวะ epithelialization ซึ่งการรักษาทางศัลยกรรม (เช่น amniotic membrane transplantation และ

conjunctival graft) นั้นช่วยลดการอักเสบและสนับสนุนให้เกิดภาวะ epithelialization ได้แต่ไม่ได้เพิ่มหน้าที่ของ limbal stem cell ที่เป็นกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่รักษาสภาพของเยื่อ epithelium ที่กระจกตาแต่การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดสามารถช่วยตรงนี้ได้ (Lin *et.al.*, 2013) นอกจากนี้ยังมีการนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell มาประยุกต์ใช้ในโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อหรือโรคที่เกิดจากเนื้อเยื่อเหล่านั้นถูกทำลาย

แม้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิด embryonic stem cell และ fetal stem cell จะมีประสิทธิภาพในการรักษาสูงมากแต่ก็มีข้อจำกัดเกี่ยวกับจรรยาบรรณในการนำเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านั้นมาใช้เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าว mesenchymal stem cell ถือเป็นทางเลือกที่ดีในการนำมาประยุกต์ใช้รักษาโรค ซึ่งการเก็บพื้่น้ำนมที่หลุดออกมาจากลูกสุนัขนั้นเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้มา โดยที่ไม่ได้สร้างความเจ็บปวดให้กับสุนัขเลย ฉะนั้นเซลล์ต้นกำเนิดจากพื้่น้ำนมลูกสุนัขจึงเป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถนำมาใช้โดยหลีกเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าวได้ดี

ปัจจุบันมีการศึกษาถึงการใช้ mesenchymal stem cell ในการทดลองทางการแพทย์และการทดลองในห้องปฏิบัติการมากมายเพื่อหวังจะใช้เป็นการรักษาทางเลือกใหม่ในการรักษาโรค ไม่ว่าจะเป็น โรคเลือด โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคกล้ามเนื้อและกระดูก โรคตาและโรคทางระบบประสาท ซึ่งผลของการทดลองจากรายงานเหล่านั้นพบว่าให้ผลที่ดี ฉะนั้นเซลล์ต้นกำเนิดจากพื้่น้ำนมลูกสุนัขก็ถือเป็นตัว เลือกหนึ่งที่พร้อมจะนำมาใช้ในการรักษาโรคเหล่านั้นได้แม้ว่ากลไกในการทำงานของเซลล์ต้นกำเนิดจะยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดก็ตาม

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมสุนัขมีประสิทธิภาพในการรักษาแผล หลุมที่กระจกตากระต่ายในกระต่ายได้ดี ทำให้เกิดเนื้อเยื่อแผลเป็นน้อยและความใสของกระจกตา หลังการรักษามีค่อนข้างมาก อีกทั้งยังสนับสนุนให้เกิดภาวะ epithelialization ได้ดีทำให้จำนวนชั้น ของเยื่อ epithelium ของกระจกตาและ proliferation effect เกิดขึ้นได้มาก

โดยความเข้มข้นของเซลล์ต้นกำเนิดที่ใช้นั้นขึ้นกับขนาดของบาดแผลและตำแหน่งที่จะทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด เช่น ขนาดของบาดแผลที่ใหญ่อาจต้องใช้เซลล์ต้นกำเนิดปริมาณ มากกว่าขนาดแผลที่เล็กกว่า และหากต้องการรักษาแผลที่กระจกตาแต่ตำแหน่งที่จะทำการปลูกถ่าย เซลล์ผ่านทางเส้นเลือดที่ขา ก็ควรใช้เซลล์ต้นกำเนิดปริมาณที่มากกว่าการปลูกถ่ายเซลล์เข้าเยื่อตาขาว (Kode *et al.*, 2009)

การใช้ยาดมสลบ isofurane ในสัตว์ทดลองเพียงอย่างเดียวน่าจะให้ผลในการฟื้นตัวของ สัตว์ทดลองหลังการสลบได้ดีกว่าการให้ยาคิดเพื่อนำสลบเนื่องจากผลข้างเคียงของยาดมสลบ isofurane นั้นมีน้อยกว่า xylazine และ ketamine มากทำให้สัตว์ทดลองฟื้นตัวได้เร็ว

ผลการตรวจ complete blood count serum creatinine และ serum alanine transferase ของกระต่ายทดลองทั้ง 8 ตัว ก่อนการทดลองและหลังการทดลองอยู่ในเกณฑ์ปกติ (ภาคผนวก ข) รวมไปถึงการตรวจวัดระดับน้ำตา (Schirmer's tear test) ความดันในลูกตา (intra-ocular pressure, mmHg) และการตอบสนองแบบ dazzle reflex ทั้งก่อนและหลังการทดลองก็อยู่ในเกณฑ์ปกติ เช่นกัน

ควรมีการติดตามลักษณะเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมสุนัขในการทดลองนี้ก่อนการปลูกถ่าย ให้กับสัตว์ทดลองเพื่อจะได้ทราบถึงความสามารถในการ homing และ engraftment รวมไปถึงการ differentiation ของเซลล์ต้นกำเนิดที่ทำการปลูกถ่ายไปเป็นเซลล์เยื่อ epithelium ของกระจกตาได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- Abrams, G.A., S.L. Goodman, P.F. Nealey, M. Franco and C.J. Murphy. 2000. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. **Cell and Tissue Research** 299: 39–46.
- Chamberlain, G., J. Fox, B. Ashton and J. Middleton. 2007. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, Differentiation capacity, Immunological features, and Potential for homing. **Stem Cells** 25: 2739-2749.
- Chandler, H.L., C.M.H. Colitz, P. Lu, W.J.A. Saville and D.F. Kusewitt. 2006. The role of the slug transcription factors in cell migration during corneal re-epithelialization in the dog. **Experimental Eye Research** 84: 400-411.
- Davanger, M. and A. Evensen. 1979. Role of the pericorneal papillary structure in the renewal of corneal epithelium. **Nature** 229: 560-561.
- Dua, H.S., J.A.P. Gomes and A. Singh. 1994. Corneal epithelial wound healing. **British Journal of Ophthalmology** 78: 401-408.
- Dua, H.S., A. Miri, T. Alomar, A.M. Yeung and D.G. Said. 2009. The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance. **Ophthalmology** 116: 856-863.
- Dua, H.S. and A. Azuara-Blanco. 2000. Limbal stem cells of the corneal epithelium. **Survey of Ophthalmology** 44: 415-425.
- Du, Y., J. Chen and L. James. 2003. Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. **Molecular Vision** 9: 635-643.
- Fortier, L.A. and A.J. Travis. 2011. Stem cells in veterinary medicine. **Stem Cell Research and Therapy** 2: 2-6.

- Gomes J.A., M.S. Santos, M.C. Cunha, V.L. Mascaro, J.N. Barros and L.B. Sousa. 2003. Amniotic membrane transplantation for partial and total limbal stem cell deficiency secondary to chemical burn. **American Academy of Ophthalmology** 110: 466-473.
- Gomes J.A., B.G. Monteiro, G.B. Melo, R.L. Smith, M.C. Silva, N.F. Lizier, A. Kerkis, H. Cerruti and I. Kerkis. 2010. Corneal Reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 51: 1408-1414.
- HANGANG Animal Hospital. 2007. Postoperative management. **Pedicle Conjunctival Graft on the ruptured Descemetocoele with Iris Prolapse in a Shihtzu**. Available Source: <http://www.hangangah.co.kr>, February 26, 2013.
- Horwitz, E.M. and W.R Prather. 2009. Cytokines as the major mechanism of MSC clinical activity: Expanding the spectrum of cell therapy. **Israel Medical Association World Federation Conference** 11: 132-134.
- Holland, E.J. and G.S. Schwatz. 1996. The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system. **Cornea** 15: 549-556.
- Jones, M. 2006. Embryonic stem cell. **Wikipedia The Free Encyclopedia**. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Embryonic_stem_cell, September 29, 2012.
- Kawashima, N. 2012. Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizontal for tissue regeneration. **Archives of Oral biology** 57: 1439-1458.
- Kimura, K., S. Teranishi and T. Nishida. 2010. Establishment of human corneal epithelial cells stably expressing human connexin 43. **Experimental Eye Research** 90: 4-9.
- Kim, W-S., B-S. Park and J-H. Sung. 2009. The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. **Expert Opinion Bio. Ther.** 9: 879-887.

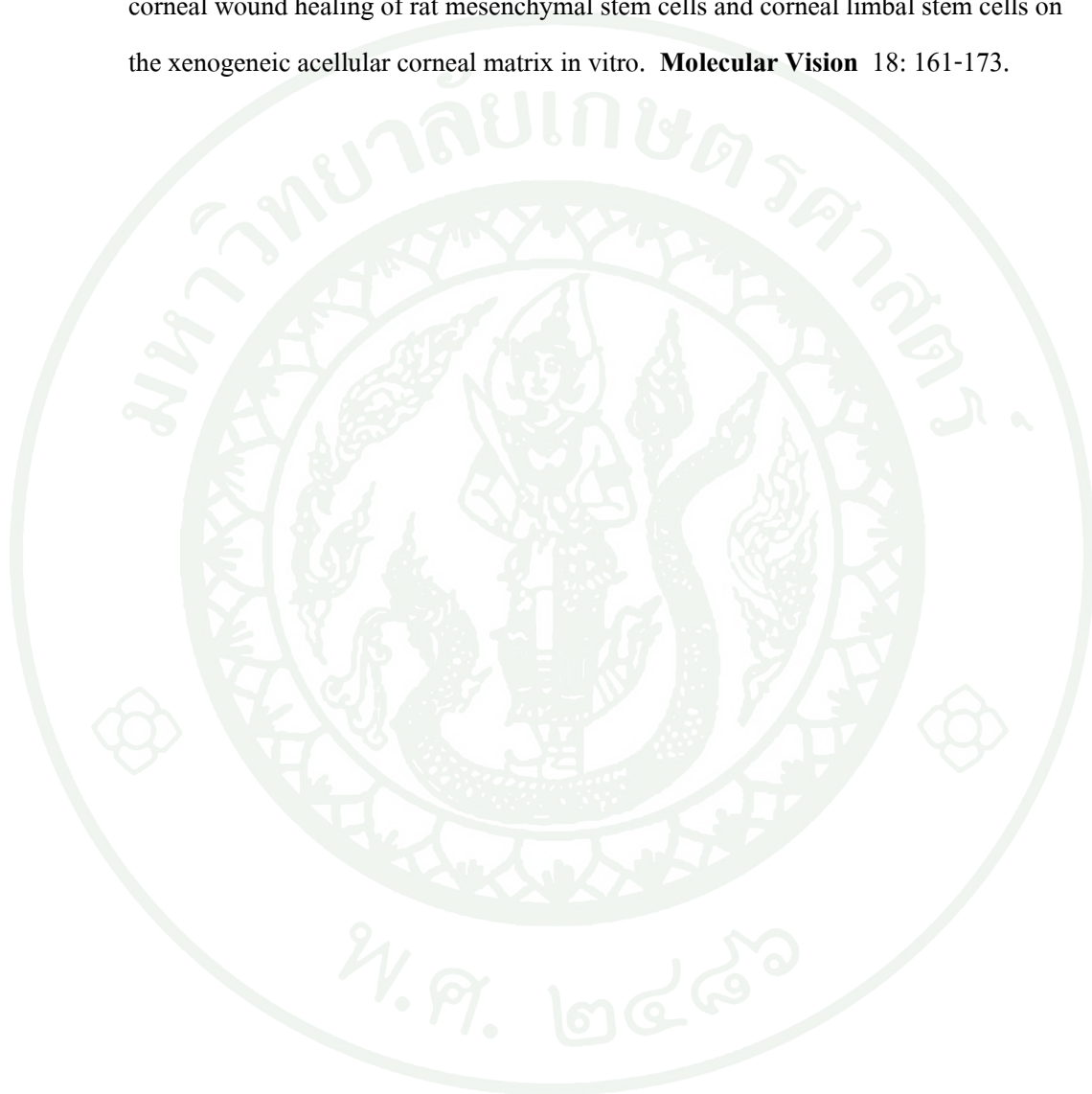
- Kode, J.A., S. Mukherjee, M.V. Joglekar and A.A. Hardikar. 2009. Review Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. **International Society for Cellular Therapy Cytotherapy**, 11: 377-391.
- Kruse, F.E., J.J. Chen, R.J. Tsai and S.C. Tseng. 1990. Conjunctival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 31: 1903-1913.
- Kumar, N.M. and N.B. Gilula. 1996. The gap junction Communication channel. **Cell** 84: 381-388.
- Lavker, R.M., G. Dong and S.Z. Cheng. 1991. Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelia migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 32: 1864-1875.
- Lin, H.F., Y.C. Lai, C.F. Tai, J.L. Tsai, H.C. Hsu, R.F. Hsu, S.N. Lu, N.H. Feng, C.Y. Chai and C.H. Lee. 2012. Effects of cultured human adipose-derived stem cells transplantation on rabbit cornea regeneration after alkali chemical burn. **Kaohsiung Journal of Medical Science** 29: 14-18.
- Majumder, P.D. 2008. Anatomy of cornea. **Illustrated Ocular Anatomy**. Available Source: [Http://www.eophtha.com/eophtha/Anatomy/anatomyofcornea1.html](http://www.eophtha.com/eophtha/Anatomy/anatomyofcornea1.html), March 10, 2013.
- Menzel-Severing, J., F.E. Kruse and U. Schlotzer-Schrehards. 2013. Stem cell-based therapy for corneal epithelial reconstruction: present and future. **Canada Journal of Ophthalmology** 48: 13-21.
- Michael, D.W. 1997. Major review: Chemical injuries of the eye: Current concepts in pathophysiology and therapy. **Survey of Ophthalmology** 41: 275-312.

- Miura, M., S. Gronthos, M. Zhao, B. Lu, L.W. Fisher, P.G. Robey and S. Shi. 2003. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceeding of The National Academy of Sciences** 100: 5807-5812.
- NeuroGen Brain and Spine Institute, StemAsia Hospital and Research Centre. n.d. Types of stem cell. **Stem Cell Therapy for Autism**. Available Source: [Http://stemcellforautism.com/types-of-stem-cells](http://stemcellforautism.com/types-of-stem-cells), February 12, 2013.
- Notara, M., A. Alatza, J. Gilfillan, A.R. Harris, H.J. Levis, S. Schrader, A. Vernon and J.T. Daniels. 2010. In sick and in health: Corneal epithelial stem cell biology, pathology and therapy. **Experimental Eye Research** 90: 188-195.
- Oh, J.Y., M.K. Kim, M.S. Shin, W.R. Wee and J.H. Lee. 2009. Cytokine secretion by human mesenchymal stem cells cocultured with damage corneal epithelial cells. **Cytokine** 46: 100-103.
- Qu, L., X. Yang, X. Wang, M. Zhao, S. Mi, Z. Dou and H. Wang. 2007. Reconstruction of corneal epithelium with cryopreserve corneal limbal stem cells in a rabbit model. **The Veterinary Journal** 179: 392-400.
- Shimazaki, J., H.Y. Yang and K. Tsubota. 1997. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. **Ophthalmology** 104: 2068-2076.
- Sosne, G., P. Qiu and M. Kurpakus-Wheater. 2007. Thymosin beta 4: A novel corneal wound healing and anti-inflammatory agent. **Clinical Ophthalmology** 1: 201-207.
- Stanley, R.G, C. Hardman and B.W. Johnson. 1998. Results of grid keratotomy, superficial keratectomy and debridement for the management of persistent corneal erosions in 92 dogs. **Veterinary Ophthalmology** 1: 233-238.
- Steele, C. 1999. Corneal wound healing: A review. **Optometry Today** Sep: 28-32.

- Suzuki, K., T. Tanaka, M. Enoki and T. Nishida. 2000. Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 41: 2495-2500.
- Swamynathan, S., D. Kenchegowda, J. Piatigorsky and S. Swamynathan. 2011. Regulation of corneal epithelial barrier function by kruppel-like transcription factor 4. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 52: 1762-1769.
- Swift, G.J., R.K. Aggarwal, G.J. Davis, D.J. Coster and K.A. Williams. 1996. Survival of rabbit limbal stem cell allografts. **Transplantation** 62: 568-574.
- Thoft, R.A., J. Friend and H.S. Murphy. 1979. Ocular surface epithelium and corneal vascularization in rabbits. I. The role of wounding. **Investigative Ophthalmology and Visual Science** 18: 85-92.
- Tseng, S.C.G., P. Prabhasawat, K. Barton, T. Gray and D. Meller. 1998. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. **Archives of Ophthalmology** 116: 431-441.
- Tsubota, K., Y. Satake, M. Kaido, N. Shinozaki, S. Shimmura, H. Bissen-Miyajima and J. Shimazaki. 1999. Treatment of severe ocular-surface disorder with corneal epithelial stem-cell transplantation. **The new England Journal of Medicine** 340: 1697-1730.
- William, W.M. 2001. Evaluation and management of corneal ulcerations: A systematic approach. **Clinical Techniques in Small Animal Practice** 16: 51-57.
- Wilson, S.A. and A. Last. 2004. Management of corneal abrasions. **American Family Physician** 70: 123-128.
- Ye, J., K. Yao and J.C. Kim. 2006. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing. **Eye (London)** 20: 482-490.

Yu, F-S.X., J. Yin, K. Xu and J. Huang. 2010. Growth factors and corneal epithelial wound healing. **Brain Research Bulletin** 81: 229-235.

Zhang, J., C. Huang, Y. Fenf, Y. Li and W. Wang. 2012. Comparison of beneficial factors for corneal wound healing of rat mesenchymal stem cells and corneal limbal stem cells on the xenogeneic acellular corneal matrix in vitro. **Molecular Vision** 18: 161-173.







ภาคผนวก ก
รายงานสัตว์ป่วย

รายงานสัตว์ป่วย

เคสที่ 1

สุนัขพันธุ์ชิทสุ เพศเมีย อายุ 4 ปี พบภาวะแผลหลุมลึกที่กระจกตาถึงชั้น descemet's membrane (descemetocoele) ของตาขวา กระจกตาบวมน้ำ (corneal edema) กระจกตาอักเสบ (keratitis) และเยื่อตาขาวอักเสบ (conjunctivitis) (ภาพผนวกที่ ก1) พบการตอบสนองแบบ menace reflex และ Dazzle reflex ระดับน้ำตา (Schirmer's tear test, STT) และความดันลูกตา (intra-ocular pressure, IOP) อยู่ในช่วงปกติ ได้รับเหนี่ยวนำการสลบด้วย xylazine ขนาด 2.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ atropine ขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ จากนั้นชักนำการสลบด้วย propofol ขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/ชั่วโมง เข้าทางเส้นเลือดดำ เมื่อสุนัขอยู่ในภาวะการสลบดีแล้ว ล้างตาที่เกิดแผลหลุมด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อจนสะอาด จากนั้นทำ การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจาก ฟันน้ำนมลูกสุนัข (pDSC) ความเข้มข้น 1.5×10^5 เซลล์/0.2 มิลลิลิตร เข้าเยื่อตาขาว หลังจากนั้น ควบคุมการติดเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะหยอดตา (0.5% moxifloxacin) วันละ 4 เวลา หยอดยาขยายม่านตา (1% atropine) เพื่อป้องกันการยึดติดของม่านตาวันละ 1 ครั้ง และให้พ่นยา caprofen ขนาด 2.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เพื่อลดการอักเสบของกระจกตาวันละ 2 ครั้ง

การติดตามผลการรักษาพบว่าแผลหลุมมีขนาดตื้นขึ้นและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เล็กลงประมาณครึ่งหนึ่งของอาการก่อนการรักษาในวันที่ 7 ส่วนในวันที่ 14 หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดพบแผลหลุมขนาดเล็กลงมากจนเกือบหายสนิท และจากการตรวจในวันที่ 20 ไม่พบแผลหลุมที่ กระจกตา (ย้อมไมติดีสี fluorescein) พบเนื้อเยื่อแผลเป็นขนาดไม่กว้างมาก และกระจกตาขุ่น เล็กน้อย (ภาพผนวกที่ ก2)



ภาพผนวกที่ ก1 แสดงภาวะแผลหุลุมถึงชั้น descemet's membrane ก่อนได้รับการปลูกถ่ายเซลล์
ต้นกำเนิด



ภาพผนวกที่ ก2 แสดงกระจกตาที่ไม่พบแผลหุลุมแล้วหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด
20 วัน

เคสที่ 2

สุนัขพันธุ์ชิสุเพศเมีย อายุ 7 ปี เกิดภาวะแผลหลุมลึกที่กระจกตาข้างขวา (deep corneal ulcer) ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด third eyelid flap ร่วมกับหยอดยาปฏิชีวนะ (tobramycin) และยาขยายม่านตา (1% atropine) หยอดตาเป็นเวลา 7 วัน พบว่าอาการไม่ดีขึ้นและแผลหลุมมีขนาดกว้างมากกว่าเดิม (ภาพผนวกที่ ก3) พบภาวะกระจกตาอักเสบ เยื่อตาขาวอักเสบและกระจกตาบวม น้ำ ตรวจพบระดับน้ำตาล ความดันลูกตา การตอบสนองแบบ menace reflex และ dazzle reflex ปกติ ทั้งหมด จากนั้นทำการเหนี่ยวนำการสลบด้วย diazepam ขนาด 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้าเส้นเลือดดำ แล้วชักนำการสลบด้วย propofol ขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/ชั่วโมง เข้าทางเส้นเลือดดำ เช่นกัน เมื่อสัตว์อยู่ในภาวะสลบดีแล้วล้างตาที่เกิดแผลหลุมด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อจนสะอาดแล้ว ทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (pDSC) ความเข้มข้นเท่ากับเคสที่ 1 จากนั้นหยอดตาด้วยยาปฏิชีวนะ (0.5% moxifloxacin) วันละ 4 เวลา หยอดยาขยายม่านตา (1% atropine) วันละ 1 ครั้ง และป้อนยาลดการอักเสบ caprofen ขนาด 2.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละ 2 ครั้งต่อเนื่อง

หลังจากการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดครบ 10 วัน พบว่าขนาดของแผลหลุมลดลงจนเกือบหายสนิท ภาวะกระจกตาบวม น้ำ กระจกตาอักเสบ และเยื่อตาขาวอักเสบลดลงมาก ตรวจวัด ระดับน้ำตาล ความดันลูกตา การตอบสนองแบบ menace และ dazzle reflex ยังคงเป็นปกติทั้งหมด

สุนัขได้เข้ารับการตรวจอีกครั้งหลังจากปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดครบ 20 วัน ไม่พบแผลหลุมที่กระจกตา ภาวะกระจกตาบวม น้ำ กระจกตาอักเสบ และเยื่อตาขาวอักเสบแล้ว พบภาวะ melanosis บริเวณแผลเป็นเล็กน้อย (ภาพผนวกที่ ก4)



ภาพผนวกที่ ก3 แสดงภาพแผลหลุมที่กระจกตาท่อน ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด

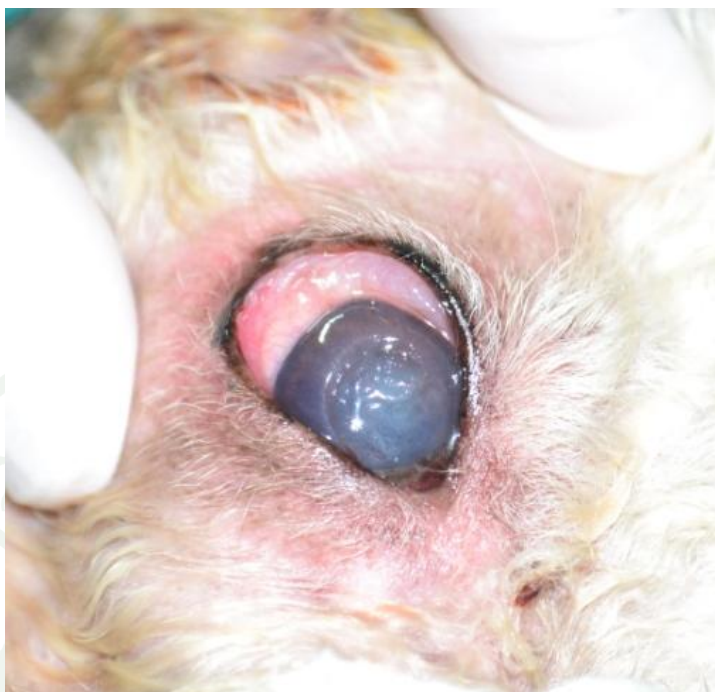


ภาพผนวกที่ ก4 แสดงภาพกระจกตาที่ไม่มีแผลหลุมหลังได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด 20 วัน

เคสที่ 3

สุนัขพันธุ์พูเคิล เพศเมีย อายุ 11 ปี รักษาอาการตาแห้ง (keratoconjunctivitis sicca, KCS) ด้วยยาหยอดตา cyclosporine วันละ 2 ครั้ง และ Lacryvisc[®] วันละ 3-4 ครั้ง มาเป็นเวลานาน พบเกิดภาวะแผลหลุม ขนาดกว้าง ที่กระจกตาแทรกซ้อนขึ้นที่ตาขวา กระจกตาอักเสบและเยื่อตาขาวอักเสบ ตรวจวัดความดันลูกตา การตอบสนองแบบ menace และ dazzle reflex เป็นปกติ ทำการเหนี่ยวนำการสลบด้วย diazepam ขนาด 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้าเส้นเลือดดำ แล้วชักนำการสลบด้วย propofol ขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/ชั่วโมง เข้าทางเส้นเลือดดำเช่นกัน คงภาวะการสลบด้วย isofurane เมื่อสัตว์อยู่ในภาวะสลบดีแล้วล้างตาที่เกิดแผลหลุมด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อจนสะอาด แล้วทำการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (pDSC) ขนาดความเข้มข้นเท่าเคส ที่ 1 เข้าเยื่อตาขวาทำให้มีลักษณะคล้ายเยื่อตาขาววมน้ำ (ภาพผนวกที่ ก 5) ร่วมกับหยอดตาด้วยยาปฏิชีวนะ (0.5% moxifloxacin) วันละ 4 ครั้ง หยอดยาขยายม่านตา (1% atropine) วันละ 1 ครั้ง หยอดยารักษาโรคตาแห้งที่ใช้อยู่แล้วและป้องกันอาการอักเสบ caprofen ขนาด 2.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละ 2 ครั้ง

ผลของการรักษา 7 วันหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด พบว่าแผลหลุม มีขนาดแคบลงกว่าก่อนการรักษาไม่มาก แต่ภาวะกระจกตาอักเสบ กระจกตาบวมน้ำ และเยื่อตาขาวอักเสบลดลงอย่างมาก เมื่อครบ 14 วันหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด พบว่าแผลหลุมมีขนาดเล็กลงและตื้นขึ้นมากเมื่อเทียบกับวันแรก ไม่พบภาวะกระจกตาอักเสบ กระจกตาบวมน้ำ และเยื่อตาขาวอักเสบแล้ว จนกระทั่งวันที่ 28 หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด ตรวจไม่พบแผลหลุมที่กระจกตา กระต่ายแล้ว (ภาพผนวกที่ ก6)



ภาพผนวกที่ ก5 แสดงภาพหลังฉีดเซลล์ต้นกำเนิดเข้าเยื่อตาขาวในตาขวาที่เกิดแผลหลุมขนาดกว้าง จะพบลักษณะคล้ายเยื่อตาขาวบวมน้ำ



ภาพผนวกที่ ก6 แสดงภาพกระจกตาที่ไม่มีแผลหลุมหลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดแล้ว 28 วัน

เคสที่ 4

สุนัขพันธุ์ชิหู่เพศผู้ อายุ 6 ปี ตรวจพบภาวะแผลหลุมลึกที่กระจกตา (deep corneal ulcer) ขนาดไม่กว้าง กระจกตาวมน้ำ เยื่อตาขาวอักเสบ (ภาพผนวกที่ ก7) ตรวจวัดระดับน้ำตาล และความดันลูกตาอยู่ในเกณฑ์ปกติ พบการตอบสนอง ทั้งแบบ menace reflex และ dazzle reflex จากนั้นทำการเหนี่ยวนำการสลบด้วย diazepam ขนาด 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้าเส้นเลือดดำ แล้วชักนำการสลบด้วย propofol ขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/ชั่วโมง เข้าทางเส้นเลือดดำเช่นกัน เมื่อสัตว์อยู่ในภาวะสลบดีแล้วล้างตาที่เกิดแผลหลุมด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อจนสะอาดแล้ว ทำการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (pDSC) ขนาดความเข้มข้น 5×10^7 เซลล์ / 0.2 มิลลิลิตรเข้าเยื่อตาขาว (ภาพผนวกที่ ก8) ร่วมกับหยอดตาด้วยยาปฏิชีวนะ (0.5% moxifloxacin) วันละ 4 ครั้ง ยาขยายม่านตา (1% atropine) วันละ 1 ครั้ง และป้อนยา carprofen ขนาด 2.2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละ 2 ครั้ง เพื่อลดการอักเสบที่กระจกตาหลังจากนั้น 7 วัน พบว่าแผลหลุมที่กระจกตามีขนาดแคบลงและตื้นขึ้น ภาวะกระจกตาวมน้ำ กระจกตาอักเสบและเยื่อตาขาวอักเสบลดลงมาก (ภาพผนวกที่ ก9)



ภาพผนวกที่ ก7 แสดงภาพแผลหลุมลึกที่กลางกระจกตา ภาวะกระจกตาอักเสบ กระจกตาวมน้ำ และเยื่อตาขาวอักเสบก่อนการรักษา



ภาพผนวกที่ ก8 แสดงภาพหลังปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเข้าเยื่อตาขาวทันที ลักษณะคล้ายเยื่อตาขาวบวมน้ำ



ภาพผนวกที่ ก9 แสดงภาพหลังจากปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดได้ 7 วัน พบแผลหลุมตื้นและแคบลงมากเมื่อเทียบกับภาพก่อนปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด

การทดลองนี้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมสุนัขที่ถูกปลูกถ่ายในกระต่าย 8 ตัวที่เกิดภาวะแผลหลุมที่กระจกตาจากสารต่างและปลูกถ่ายในสุนัขป่วย จริงที่เกิดภาวะแผลหลุมลึกที่รุนแรง พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมสุนัขมีประสิทธิภาพในการรักษาแผลหลุมที่กระจกตาของสัตว์ทั้ง 2 ชนิดได้ จากผลการทดลอง ทั้งการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด จากพืชน้ำนมสุนัขทั้งในกระต่ายทดลองและสุนัขป่วย จริงจะเห็นได้ว่าแผลที่กระจกตาทาย เร็วและเกิดเนื้อเยื่อแผลเป็นน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมสุนัขสามารถใช้เป็นทางเลือกที่ดีในการรักษาฟื้นฟูภาวะแผลหลุมที่กระจกตาในสัตว์เลี้ยง ไม่ว่าจะเป็นสัตว์เลี้ยงที่ต่างสายพันธุ์หรือ สัตว์เลี้ยงสายพันธุ์เดียวกับแหล่งที่มาของเซลล์ต้นกำเนิด

การติดตามผลการรักษาในสัตว์ป่วยจริงที่ดีควรทำการตรวจทุกวันเพื่อวัดขนาดความกว้างและความลึกของแผลหลุมที่กระจกตาอีกทั้งการย้อมสี fluorescein ทุกวันจะสามารถบอกได้ชัดเจนว่าแผลหลุมที่กระจกตาทายสนิทในวันที่เท่าไรหลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดแต่เนื่องจากข้อจำกัดหลายประการทั้งทางเจ้าของสัตว์ป่วยและทางโรงพยาบาลสัตว์เองทำให้ไม่สามารถทำการตรวจทุกวันได้ จึงใช้ความสะดวกของเจ้าของสัตว์ป่วยเป็นหลักในการติดตามผลการรักษา

นอกจากนี้การทดลองในสัตว์ป่วยจริงควรมีเอกสารที่มีรายละเอียดการเข้าร่วมโครงการอย่างชัดเจนให้เจ้าของสัตว์ป่วยเช่นบัตรชี้รับทราบและปฏิบัติตามเงื่อนไขที่วางเอาไว้อย่างเคร่งครัดเนื่องจากมีเจ้าของสัตว์ป่วยหลายรายที่ไม่มาติดตามผลการรักษาตามเวลาที่นัดหมายกันไว้ ทำให้เกิดการสูญเสียข้อมูลอันเป็นประโยชน์ต่อการทดลอง



ตารางผนวกที่ ข1 แสดงผลการตรวจเลือดของกระต่ายตัวที่ 1 และ 2

Parameters	กระต่ายตัวที่ 1		กระต่ายตัวที่ 2		ค่าปกติ*
	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	6.96	7.82	9.55	8.62	5-12
NEUT (%)	44.4	31.5	28.0	27.5	35-55
LYMP (%)	43.8	59.7	59.5	60.7	25-60
MONO (%)	10.7	7.4	10.1	9.9	2-10
EOS (%)	0.6	0.5	1.4	0.7	0-5
BASO (%)	0.5	0.9	1.0	1.2	2-8
RBC ($10^3/\mu\text{L}$)	5.55	5.81	4.98	5.39	4-8
HGB (g/dL)	12.4	12.5	10.7	11.2	8-17.5
HCT (%)	41.9	42.2	35.5	38.4	30-50
MCV (fL)	74.3	72.6	69.6	71.2	58-75
MCH (pg)	20.7	21.5	19.2	20.8	17.5-23.5
MCHC (g/dL)	28.6	29.6	35.0	29.2	29-37
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	400	417	359	400	290-650
SCr (mg/dL)	1.02	1.04	1.77	1.26	0.5-2.6
ALT (U/L)	102	122	68	51	14-80

*ที่มา: Carpenter (2013)

ตารางผนวกที่ ๒ แสดงผลการตรวจเลือดของกระต่ายตัวที่ 3 และ 4

Parameters	กระต่ายตัวที่ 3		กระต่ายตัวที่ 4		ค่าปกติ*
	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	6.78	10.55	8.98	7.90	5-12
NEUT (%)	50.5	21.5	34.1	36.5	35-55
LYMP (%)	38.5	66.9	53.9	53.9	25-60
MONO (%)	9.5	10.8	10.4	8.7	2-10
EOS (%)	1.0	0.5	0.5	0.5	0-5
BASO (%)	0.5	0.3	1.1	0.4	2-8
RBC ($10^3/\mu\text{L}$)	5.49	6.09	5.95	6.33	4-8
HGB (g/dL)	11.7	12.5	12.2	13.0	8-17.5
HCT (%)	40.9	43.6	43.2	42.2	30-50
MCV (fL)	69.8	71.6	69.4	66.7	58-75
MCH (pg)	19.9	20.5	21.1	20.5	17.5-23.5
MCHC (g/dL)	30.6	28.7	30.3	30.8	29-37
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	409	466	298	337	290-650
SCr (mg/dL)	1.05	1.39	1.18	1.07	0.5-2.6
ALT (U/L)	97	122.8	99.7	47.7	14-80

*ที่มา: Carpenter (2013)

ตารางผนวกที่ ๓ แสดงผลการตรวจเลือดของกระต่ายตัวที่ 5 และ 6

Parameters	กระต่ายตัวที่ 5		กระต่ายตัวที่ 6		ค่าปกติ*
	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	8.84	5.51	9.37	6.02	5-12
NEUT (%)	36.9	39.1	22.9	54.4	35-55
LYMP (%)	52.4	47.9	65.5	33.6	25-60
MONO (%)	9.7	11.4	10.5	9.5	2-10
EOS (%)	0.4	1.1	0.8	1.0	0-5
BASO (%)	0.5	0.5	0.3	0.5	2-8
RBC ($10^3/\mu\text{L}$)	6.19	7.03	6.56	5.85	4-8
HGB (g/dL)	13.7	14.1	11.1	12.9	8-17.5
HCT (%)	44.6	43.3	43.9	42.2	30-50
MCV (fL)	60.7	61.6	69.3	72.1	58-75
MCH (pg)	19.5	20.1	19.4	22.1	17.5-23.5
MCHC (g/dL)	31.8	32.6	34.4	30.6	29-37
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	294	319	442	328	290-650
SCr (mg/dL)	1.09	1.57	1.89	1.71	0.5-2.6
ALT (U/L)	78.3	50.7	94.8	47.2	14-80

*ที่มา: Carpenter (2013)

ตารางผนวกที่ ๔ แสดงผลการตรวจเลือดของกระต่ายตัวที่ 7 และ 8

Parameters	กระต่ายตัวที่ 7		กระต่ายตัวที่ 8		ค่าปกติ*
	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	ก่อนทดลอง	หลังทดลอง	
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	8.48	9.54	7.86	8.60	5-12
NEUT (%)	30.5	25.0	35.5	44.8	35-55
LYMP (%)	57.7	60.0	55.7	43.4	25-60
MONO (%)	9.4	12.6	7.2	10.7	2-10
EOS (%)	1.2	1.4	0.5	0.6	0-5
BASO (%)	1.2	1.0	1.1	0.5	2-8
RBC ($10^3/\mu\text{L}$)	5.45	6.08	4.87	5.34	4-8
HGB (g/dL)	12.9	13.0	14.8	11.1	8-17.5
HCT (%)	44.0	43.3	35.4	35.8	30-50
MCV (fL)	71.7	71.2	66.7	67.0	58-75
MCH (pg)	20.9	21.4	19.8	20.8	17.5-23.5
MCHC (g/dL)	31.3	30.0	30.4	31.0	29-37
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	220	240	309	352	290-650
SCr (mg/dL)	1.34	1.21	0.94	1.24	0.5-2.6
ALT (U/L)	68.3	71.1	76.9	72.6	14-80

*ที่มา: Carpenter (2013)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นายณักรบ พัฒนาผล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 10 มีนาคม พ.ศ. 2522
สถานที่เกิด	อ. ปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์
ประวัติการศึกษา	สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	สัตวแพทย์หน่วยสัตว์เล็ก
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน