

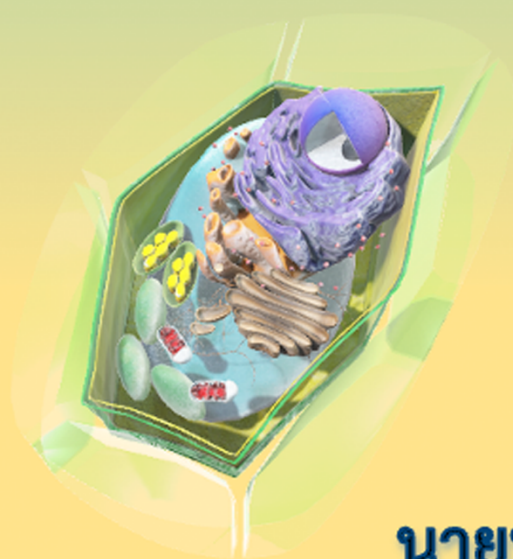


คู่มือปฏิบัติงาน

การแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมัน

และ

การเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์ที่แยกจากเนื้อเยื่อไขมัน



นายพูนสิน พวงไพโรจน์

สังกัดหน่วยงานกลุ่มวิจัยและเครือข่าย ฝ่ายวิจัย

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล



คู่มือปฏิบัติงาน

เรื่อง

การแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมัน
และการเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์ที่แยกจากเนื้อเยื่อไขมัน

โดย

นายพูนสิน พวงไพโรจน์

ตำแหน่งผู้ช่วยวิจัย

หน่วยบ่มเพาะวิจัยชีวการแพทย์ (ฝ่ายวิจัย)

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ. 2566

คำนำ

เซลล์ต้นกำเนิด หรือสเต็มเซลล์ (stem cells) คือ เซลล์ที่ยังเป็นตัวอ่อนและยังไม่ได้ทำหน้าที่แบบจำเพาะเจาะจงจะอยู่ในบริเวณเดียวกับเซลล์ที่ทำหน้าที่แบบจำเพาะเจาะจง ทั้งนี้เซลล์ต้นกำเนิดมีความสามารถแบ่งเซลล์ตัวเองขึ้นมาใหม่ได้หลายครั้ง โดยที่ยังคงคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนนั้นอยู่ (self-renewal) และยังสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่จำเพาะได้หลายรูปแบบตามแต่อวัยวะนั้น ๆ โดยที่แหล่งของสเต็มเซลล์สามารถพบได้หลายบริเวณ เช่น เลือด, ไขสันหลัง, สายสะดือ และเนื้อเยื่อไขมัน เป็นต้น

เนื้อเยื่อไขมันเป็นแหล่งที่สามารถพบสเต็มเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งเนื้อเยื่อไขมันนี้ส่วนใหญ่มักได้มาจากบริเวณใต้ผิวหนังช่องท้อง และต้นขา เป็นต้น ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาการนำสเต็มเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อไขมันไปใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์เพื่อการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคข้อเข่าเสื่อม โรคเบาหวาน โรคตับ เป็นต้น และด้านความสวยงามสำหรับฟื้นฟูหรือบรรเทาโรคผิวหนัง ทำให้สเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมันได้รับความสนใจในการศึกษาและพัฒนาสำหรับการใช้เป็นเซลล์บำบัดเป็นอย่างมาก ดังนั้นคู่มือปฏิบัติการเล่มนี้จึงกล่าวถึงขั้นตอนสำคัญในการแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมัน และการเพาะเลี้ยง สเต็มเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อไขมัน

พูนสิน พวงไพโรจน์

ผู้ช่วยวิจัย

30 กันยายน 2566

กิตติกรรมประกาศ

คู่มือการปฏิบัติงานการแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมันและการเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมันเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐวัฒน์ อ่อนลมูล และ รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.เปรมฤทัย ธิติเลิศเดชา ที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาให้คำแนะนำและชี้แนะในการจัดทำคู่มือเล่มนี้ รวมถึงขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย กลุ่มวิจัยด้านชีววิทยาภูมิคุ้มกันและวิทยาศาสตร์การบำบัด (Siriraj Research Group in Immunobiology and Therapeutic Sciences, SiRG-ITS) คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ทำให้เกิดขั้นตอนการแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมันและการเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมันเสร็จสมบูรณ์เป็นคู่มือการปฏิบัติงานเล่มนี้ขึ้น

พูนสิน พวงไพโรจน์

ผู้ช่วยวิจัย

30 กันยายน 2566

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
บทที่ 1 บทนำ.....	7
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	7
1.2 วัตถุประสงค์.....	9
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	9
1.4 ขอบเขตคู่มือปฏิบัติงาน.....	10
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ/คำจำกัดความ	10
บทที่ 2 บทบาทหน้าที่ ความรับผิดชอบ.....	11
2.1 บทบาทหน้าที่ ความรับผิดชอบของตำแหน่งผู้ช่วยวิจัย.....	11
2.2 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ.....	11
2.3 ภาระงานตาม PA	11
2.4 โครงสร้างการบริหารจัดการ.....	12
บทที่ 3 หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข	13
3.1 หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน	13
3.2 การเตรียมความพร้อมก่อนเริ่มปฏิบัติงาน	13
3.3 ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงในการเตรียมงานก่อนปฏิบัติงาน.....	16
3.4 ข้อควรปฏิบัติก่อนเริ่มปฏิบัติงาน.....	16
บทที่ 4 วิธีการปฏิบัติงาน	17
4.1 กิจกรรม/แผนปฏิบัติงาน	17
4.2 แผนผังภาพรวมขั้นตอนการปฏิบัติงานโดยสังเขป	17
4.3 ขั้นตอนการปฏิบัติงาน.....	18
บทที่ 5 ปัญหาอุปสรรค แนวทางในการแก้ไข และข้อเสนอแนะ	23
5.1 ปัญหาอุปสรรค และแนวทางในการแก้ไข	23
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	24
เอกสารอ้างอิง	26

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของสเต็มเซลล์ชนิดมีเซนไคมอลเป็นเซลล์เนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ	7
ภาพที่ 2 เซลล์ที่พบภายในเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue)	7
ภาพที่ 3 แสดงตัวอย่างการนำสเต็มเซลล์ไปใช้เลี้ยงต่อให้เซลล์มีหน้าที่ที่จำเพาะขึ้นเพื่อนำไปประโยชน์ทางการแพทย์.....	8
ภาพที่ 4 แสดงการแยกชั้นของเนื้อเยื่อไขมัน (WAT) ภายหลังจากวางตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง.....	17
ภาพที่ 5 แสดงส่วนของเนื้อเยื่อไขมัน (WAT) หลังปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm/min นาน 3 นาที	18
ภาพที่ 6 แสดงการแยกชั้นของเนื้อเยื่อไขมันหลังย่อยด้วยเอนไซม์ collagenase A type I ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง.....	19
ภาพที่ 7 แสดงการแบ่งช่องนับเซลล์ของ counting chamber ออกเป็น 4 ช่อง ได้แก่ ช่อง A, B, C และ D	20

ศูนย์บรรณสารและการเรียนรู้ สถาบันนวัตกรรมการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยพะเยา

บทที่ 1

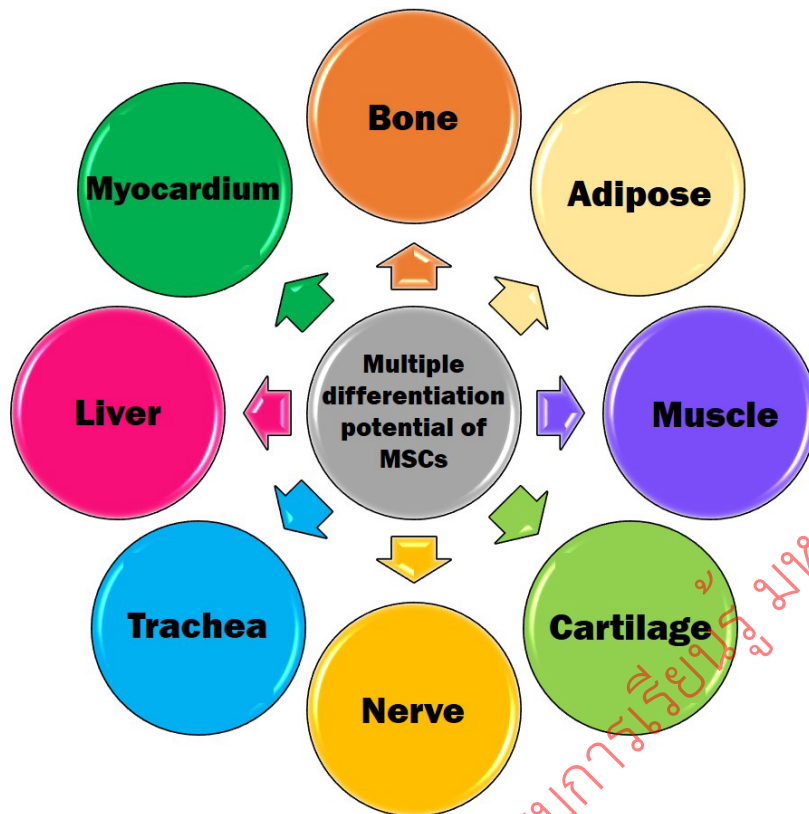
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) เป็นเนื้อเยื่อประสานชนิดพิเศษทำหน้าที่สะสมไขมันไว้เพื่อเป็นแหล่งผลิตพลังงานให้แก่ร่างกาย เป็นฉนวนช่วยป้องกันการสูญเสียความร้อนจากร่างกายและช่วยลดอันตรายเมื่อได้รับแรงกระแทกจากภายนอก เนื้อเยื่อไขมันแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ เนื้อเยื่อไขมันสีน้ำตาล (brown adipose tissue, BAT) ซึ่งเซลล์ในเนื้อเยื่อกลุ่มนี้จะมีลักษณะรูปร่างกลม มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์ ภายในไซโตพลาสซึมบรรจุหยดไขมัน (lipid oil droplets) ขนาดเล็กเป็นจำนวนมากและภายในเซลล์จะมีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เป็นจำนวนมากทำให้เนื้อเยื่อมีสีน้ำตาล ดังนั้นจึงมีบทบาทหน้าที่ในการผลิตความร้อนให้แก่ร่างกาย ส่วนเนื้อเยื่อไขมันชนิดที่สอง คือ เนื้อเยื่อไขมันสีขาว (white adipose tissue, WAT) ซึ่งพบได้ในชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous tissue) โดยเฉพาะบริเวณผนังหน้าท้อง ช่องท้อง และสะโพก ลักษณะรูปร่างเซลล์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ในเนื้อเยื่อไขมันสีน้ำตาล ภายในไซโตพลาสซึมบรรจุไขมันขนาดใหญ่เพียงหยดเดียว (single oil droplet) ทำให้นิวเคลียสถูกเบียดไปชิดขอบเซลล์ด้านใดด้านหนึ่ง เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) จะเห็นเป็นลักษณะคล้ายวงแหวน (signet ring) ทำให้มีบทบาทสำคัญทางด้านการป้องกันเชิงกล (mechanical cushion) เช่น ลดแรงกระแทกจากภายนอก

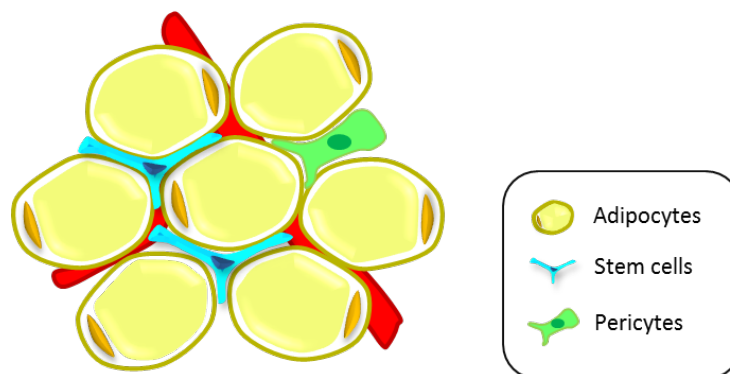
เซลล์ต้นกำเนิด หรือสเต็มเซลล์ (stem cells) คือ เซลล์ตัวอ่อนที่ยังมีการเจริญเติบโตไม่เต็มที่ มีคุณลักษณะพิเศษแตกต่างจากเซลล์อื่น ๆ ในร่างกาย คือ

1. เป็นเซลล์ที่ไม่ได้มีหน้าที่จำเพาะเจาะจง (undifferentiated cells) ซึ่งจะคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์นี้ไว้ แม้ว่าจะมีเซลล์อื่นอยู่บริเวณใกล้เคียงก็ตาม
2. เป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวและสร้างทดแทนขึ้นมาใหม่ (self-renewal) ได้หลายครั้ง โดยยังคงคุณลักษณะแบบเดิมอยู่
3. เป็นเซลล์ที่สามารถเจริญเติบโตเพื่อไปทำหน้าที่จำเพาะเจาะจง (differentiated cells) ได้ และสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่ออื่นที่จำเพาะเจาะจงได้ เช่น เซลล์ประสาท เซลล์สมอง เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์ตับ เป็นต้น⁽¹⁻⁴⁾ ปกติแล้วสเต็มเซลล์ที่เจริญเติบโตไปเพื่อทำหน้าที่เฉพาะเจาะจงแล้วนั้นจะไม่สามารถย้อนกลับมาเป็นสเต็มเซลล์ได้อีกครั้ง



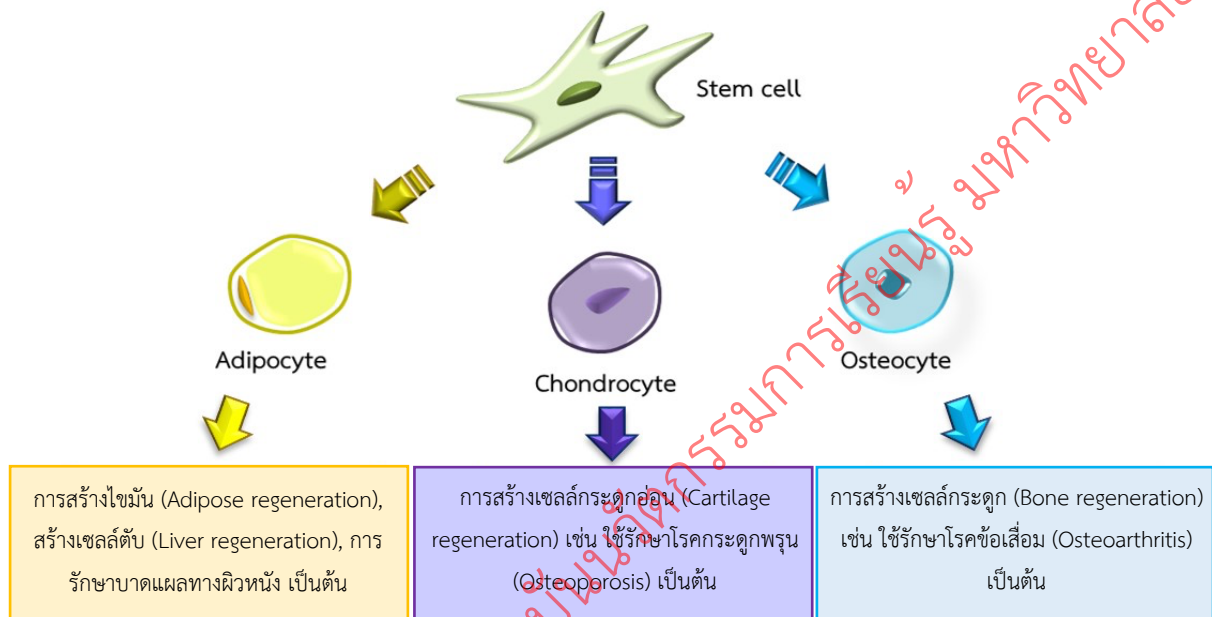
ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของสเต็มเซลล์ชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cells, MSC) เป็นเซลล์เนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ (ที่มา : วาดโดย นายพูนสิน พวงไพโรจน์)

ในเนื้อเยื่อไขมันนอกจากจะพบเซลล์ไขมัน (adipocyte) เป็นจำนวนมากแล้ว ยังพบว่ามีสเต็มเซลล์อยู่เป็นจำนวนมากด้วยเช่นกัน มีรายงานการศึกษาวิจัยเป็นจำนวนมากได้แยกสเต็มเซลล์ออกจากเนื้อไขมันด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ย่อย เช่น collagenase type I ซึ่งภายหลังจากผ่านกระบวนการคัดแยกเซลล์และเนื้อเยื่อออกจากเนื้อเยื่อไขมันแล้วจะเรียกเซลล์กลุ่มนี้ว่า “stromal vascular fraction (SVF)”⁽⁵⁻¹²⁾ โดยเซลล์ SVF นี้สามารถเจริญเติบโตไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด เช่น เซลล์ไขมัน (adipocyte) เซลล์กระดูก (osteocyte) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) เป็นต้น⁽¹³⁻¹⁸⁾



ภาพที่ 2 เซลล์ที่พบภายในเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) ได้แก่ adipocytes, stem cells และ pericytes (ที่มา : วาดโดย นายพูนสิน พวงไพโรจน์)

ปัจจุบันได้มีการนำสเต็มเซลล์มาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมากเพื่อใช้สำหรับการบรรเทา บำบัด รักษาโรค เสริมสร้าง และฟื้นฟู จึงทำให้เป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจในวงกว้าง ทั้งนี้ขั้นตอนการปฏิบัติงานในการคัดแยกและเพาะเลี้ยง เพิ่มจำนวนสเต็มเซลล์ยังไม่ถูกนำมาสรุปเป็นมาตรฐาน จึงทำให้เกิดคู่มือปฏิบัติงานนี้ขึ้นโดยจะกล่าวถึงเทคนิคการคัดแยกสเต็ม เซลล์ออกจากเนื้อเยื่อไขมันด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ collagenase type I รวมถึงปัญหาอุปสรรคและแนวทางในการแก้ไข ซึ่ง เซลล์ที่ได้จากการคัดแยกจะสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อยอดประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไปได้ เช่น การนำสเต็มเซลล์ ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์⁽¹⁹⁻²²⁾ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงตัวอย่างการนำสเต็มเซลล์ไปใช้เลี้ยงต่อให้เซลล์มีหน้าที่ที่จำเพาะขึ้น เพื่อนำไปประโยชน์ทางการแพทย์ (ที่มา : วาดโดย นายพูนสิน พวงไพโรจน์)

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อใช้เป็นคู่มือปฏิบัติงานมาตรฐานสำหรับแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมัน และการเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อไขมัน
2. เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานใช้เป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอนการปฏิบัติงาน
3. ใช้เป็นแนวทางต้นแบบสำหรับงานอื่นที่มีลักษณะงานคล้ายคลึงกัน

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ผู้ปฏิบัติงานสามารถใช้คู่มือนี้เป็นมาตรฐานในการทำงาน วางแผนการทำงานได้อย่างเป็นระบบ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการทำงานมากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างปฏิบัติงานได้

1.4 ขอบเขตคู่มือปฏิบัติงาน

คู่มือปฏิบัติงานเล่มนี้กล่าวถึงตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมความพร้อมก่อนเริ่มปฏิบัติงาน เช่น การเตรียมอุปกรณ์ น้ำยาหรือสารเคมีที่ใช้สำหรับการปฏิบัติงาน, วิธีการแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมันโดยใช้เอนไซม์ collagenase type I, วิธีการเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์ที่แยกจากเนื้อเยื่อไขมัน, การเก็บรักษาเซลล์ ตลอดจนแนวทางการแก้ไขปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นระหว่างการปฏิบัติงาน

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ/คำจำกัดความ

1.5.1 Lipoaspirate fluid (LAF) เป็นส่วนน้ำที่ประกอบด้วยเลือด และสารน้ำที่อยู่ด้านล่างสุดของกระบอกฉีดยา (syringe) หลังจากให้น้ำมันที่ดูดได้มาปั่นแยกเพื่อเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อไขมัน

1.5.2 Stromal vascular fraction (SVF) คือ กลุ่มเซลล์ที่ได้จากกระบวนการแยกเซลล์ไขมันที่ดูดได้ นำมาคัดแยก SVF ด้วยวิธีการใช้ collagenase type I

1.5.3 Processed lipoaspirate (PLA) cells เป็นกลุ่มเซลล์ที่เกาะกับภาชนะเลี้ยงเซลล์ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง SVF ผ่านไปแล้ว 24 ชั่วโมง

1.5.4 Trypan blue exclusion เป็นเทคนิคที่ใช้ในการย้อมเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (dead cells) ด้วยสี trypan blue สำหรับเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue ภายในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) เนื่องจากโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนเสื่อมสภาพหรือถูกทำลาย ทำให้ trypan blue สามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ สำหรับเซลล์ที่ยังมีชีวิต (live cells) จะย้อมไม่ติดสี trypan blue เนื่องจากโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนยังไม่เสื่อมสภาพหรือถูกทำลาย สี trypan blue จึงไม่สามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ได้

1.5.5 Complete medium คือ อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ครบส่วนที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอาหาร, ความเป็นกรด-ด่าง, ปราศจากสารพิษ และปลอดเชื้อเพื่อส่งเสริมให้เซลล์เพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตต่อไป

1.5.6 Freezing cryoprotectant solution คือ น้ำยาที่ใช้สำหรับการเก็บรักษาเซลล์แบบแช่แข็ง โดยมีส่วนผสมของสารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เสื่อมสภาพจากการแช่แข็ง เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นต้น

1.5.7 Confluence คือ ความหนาแน่นของเซลล์ที่แบ่งตัวและเจริญเติบโตครอบคลุมของพื้นที่ผิวบนภาชนะเลี้ยงเซลล์

1.5.8 Subculture คือ กระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อและเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสม เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนได้ confluence ถึงระดับที่เหมาะสมแล้วจึงใช้เอนไซม์ Trypsin-EDTA (กระบวนการนี้จะถูกเรียกว่า Trypsinization) เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากการยึดเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์และแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว (single cell) จากนั้นนำเซลล์บางส่วนไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อไปโดยใส่ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการแบ่งตัวและเจริญเติบโตของเซลล์ต่อไป

บทที่ 2

บทบาทหน้าที่ ความรับผิดชอบ

2.1 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง

ลักษณะงานที่ปฏิบัติโดยทั่วไป ตำแหน่งผู้ช่วยวิจัย

สายงานนี้ครอบคลุมถึงตำแหน่งต่าง ๆ ที่ปฏิบัติงานเกี่ยวกับ การวิเคราะห์ การวิจัย ซึ่งมีลักษณะงานที่ปฏิบัติเกี่ยวกับการศึกษา การทดสอบ การวิเคราะห์ การสังเคราะห์ เพื่อประโยชน์ในทางวิชาการ การเผยแพร่ความรู้ และการแก้ปัญหาต่าง ๆ ทางการศึกษา วิทยาศาสตร์ สังคม เศรษฐกิจ การเมือง เป็นต้น หรือเพื่อการอื่นใดตามที่ได้รับมอบหมาย และปฏิบัติหน้าที่อื่นที่เกี่ยวข้อง

2.2 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ

หน้าที่ความรับผิดชอบ และลักษณะงานที่ปฏิบัติ

ปฏิบัติงานเกี่ยวกับงานวิจัย และปฏิบัติหน้าที่อื่นที่เกี่ยวข้อง ลักษณะงานที่ปฏิบัติเป็นงานสนับสนุนการวิจัย ซึ่งต้องใช้ทักษะ ความชำนาญ และเทคนิคต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย เช่น การปฏิบัติงานด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อก่อโรค (sterile technique) ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียม อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับการปฏิบัติงาน ทักษะความชำนาญด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ใช้ทักษะความรู้ในการสังเกต ดูรูปร่างและความแตกต่างของเซลล์เพาะเลี้ยงในภาวะที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ หรือเซลล์เพาะเลี้ยงที่เกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ (contaminate) เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เป็นต้น งานด้านอื่น ๆ ที่ได้รับมอบหมาย คือ เป็นเจ้าหน้าที่ความปลอดภัยทางการวิจัย เพื่อทำหน้าที่ประสานงานให้ข้อมูลด้านห้องปฏิบัติการวิจัย ตรวจสอบ ดูแล ให้คำแนะนำการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการวิจัยระดับ 2 (biosafety level 2, BSL2) ให้มีมาตรฐานและความปลอดภัย เป็นต้น นอกจากนี้ด้านการพัฒนาตนเอง เพื่อให้รอบรู้ทันเทคนิคและวิทยาการใหม่ ๆ โดยการเข้าร่วมอบรม หรือเข้าร่วมงานประชุมวิชาการต่าง ๆ อย่างสม่ำเสมอโดยสามารถนำความรู้ เทคนิค และทักษะที่อบรม มาประยุกต์ใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อหน้าที่ในงานที่ปฏิบัติ หน่วยงานฯ และคณะฯ ต่อไป

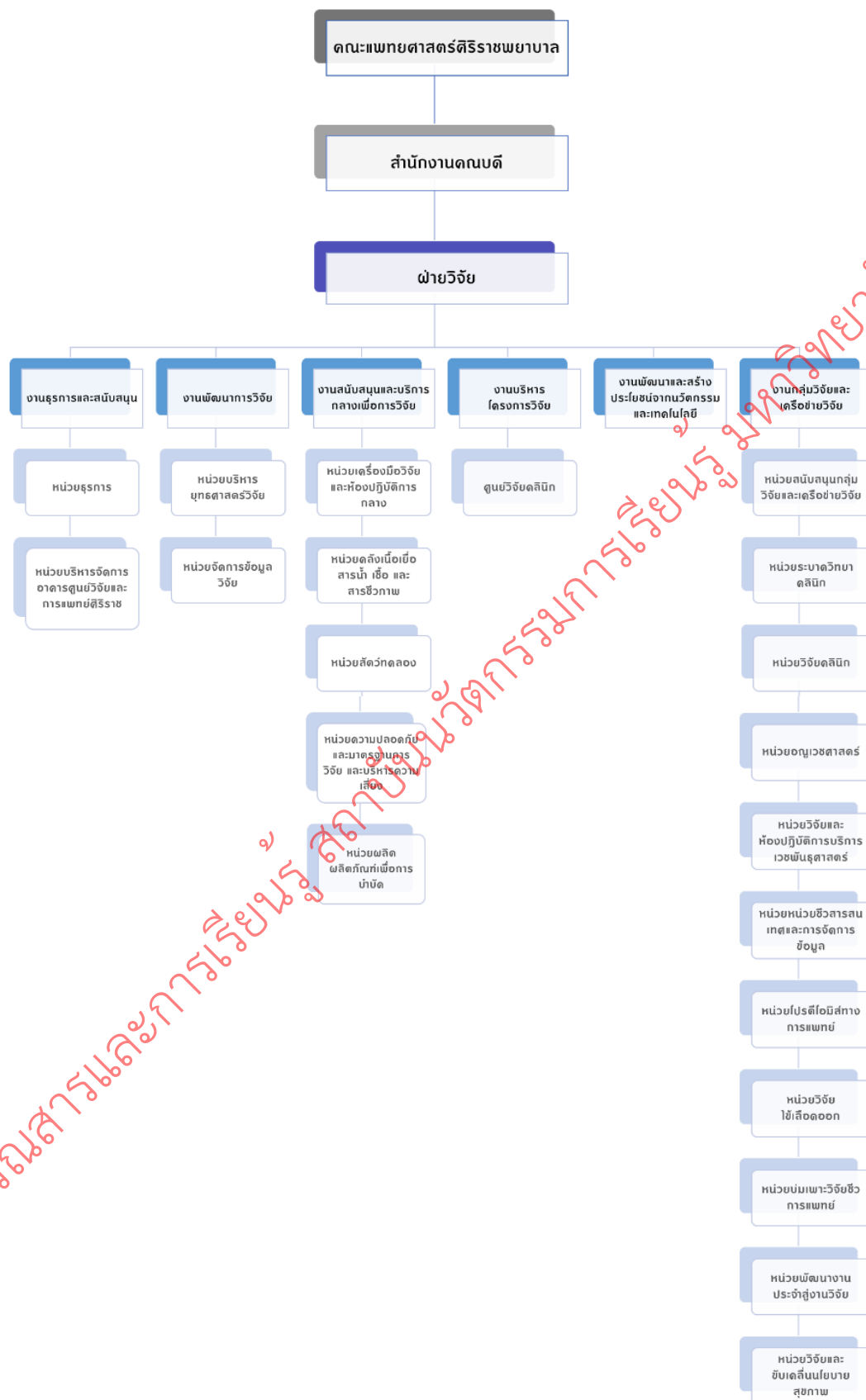
2.3 ภาระงานตาม PA

2.3.1 ปฏิบัติการวิจัยทางห้องปฏิบัติการตามโครงการที่ได้รับมอบหมาย โดยเริ่มตั้งแต่การรับส่งตัวอย่าง/ประสานงานระหว่างหน่วยงาน เพื่อนำตัวอย่างมาคัดแยกเซลล์ตามกระบวนการต่าง ๆ ได้แก่ การสกัดสเต็มเซลล์ออกจากเนื้อเยื่อไขมัน การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนสเต็มเซลล์ ที่ได้จากการคัดแยกออกจากเนื้อเยื่อไขมัน การเก็บรักษาสเต็มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ เป็นต้น จากนั้นสเต็มเซลล์ที่ได้บางส่วนจะถูกนำมาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาสเต็มเซลล์ให้เจริญไปเป็น เซลล์ไขมัน เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์กระดูกต่อไป

2.3.2 วิเคราะห์ สรุปผลการทดลอง และจัดทำรายงานการวิจัยภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ถูกกระตุ้น และไม่ถูกกระตุ้นให้พัฒนาเป็น เซลล์ไขมัน เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์กระดูก

2.3.3 ปฏิบัติงานอื่น ๆ ตามที่ได้รับมอบหมาย เช่น การตรวจสอบสภาพความพร้อมของเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับการวิจัยให้อยู่ในสภาพที่พร้อมใช้เสมอ การตรวจสอบอุปกรณ์และภาชนะที่ใช้ในการปฏิบัติงานให้มีปริมาณที่เพียงพอต่อการใช้งานเสมอ การตรวจสอบอุปกรณ์ น้ำยา และสารเคมีให้มีปริมาณที่เพียงพอต่อการใช้งานเสมอ

2.4 โครงสร้างการบริหารจัดการ



บทที่ 3

หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข

3.1 หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน

การแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมัน และการเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อไขมัน จะถูกปฏิบัติภายในห้องปฏิบัติการที่มีการกำหนดให้มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 2 (Biosafety level 2, BSL-2) โดยเครื่องมือและครุภัณฑ์ต่าง ๆ ต้องอยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานควรมีความรู้ความเข้าใจและผ่านการฝึกอบรมการปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการ BSL-2 เพื่อให้การปฏิบัติงานเป็นไปอย่างปลอดภัย และลดความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นในขณะปฏิบัติงาน สำหรับแนวทางการปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพมีการกำหนดให้ปฏิบัติตาม ศูนย์บริหารความปลอดภัย อาชีวอนามัย และสิ่งแวดล้อม (Center for Occupational Safety Health and Environment Management, COSHEM)

3.2 การเตรียมความพร้อมก่อนเริ่มปฏิบัติงาน

มีการเตรียมความพร้อมก่อนเริ่มปฏิบัติงาน เพื่อให้การปฏิบัติงานเป็นไปด้วยความเรียบร้อย และลดการเกิดอุบัติเหตุที่อาจเกิดขึ้นระหว่างปฏิบัติงาน กล่าวโดยสรุปได้ดังนี้

3.2.1 การเตรียมความพร้อมของผู้ปฏิบัติงาน

ผู้ปฏิบัติงานยึดหลักแนวปฏิบัติด้านความปลอดภัย อาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม และทำการสวมใส่อุปกรณ์คุ้มครองความปลอดภัยส่วนบุคคล (Personal protective equipment, PPE) เพื่อให้เกิดความปลอดภัยกับผู้ปฏิบัติงาน และสอดคล้องกับพันธกิจของมหาวิทยาลัยในการดำเนินงานเรื่องความปลอดภัย อาชีวอนามัย และสภาพแวดล้อมในการทำงาน

3.2.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับปฏิบัติงาน

วัสดุอุปกรณ์	ยี่ห้อ/ประเทศ
ตัวปิดปลายกระบอกฉีดยา (combi-Stopper)	B.BRAUN, Germany
กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 15 มิลลิลิตร	NIPRO, Japan
หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร	FALCON, Maxico
หลอดเก็บเซลล์ (cryogenic vials) ชนิด internal thread capacity	Corning, Maxico
Transfer pipette ขนาด 2 mL	Biologix
Serological pipette ขนาด 5, 10, 25 และ 50 mL	Corning, USA
ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (flask)	Corning, USA
เครื่องนับเซลล์ Hemocytometer	C-Chip disposable, Korea
Freezing container (Mr.Frosty™)	Nalgene™
Cell strainer แบบ nylon ขนาด 100 µm	Corning, USA
Syringe filter ขนาด 0.45 µm	Corning, Germany
Filter system (500 mL)	Corning, USA
Polystyrene round-bottom tube (5 mL)	FALCON, Maxico

3.2.3 เครื่องมือที่ใช้สำหรับปฏิบัติงาน

เครื่องมือ	ยี่ห้อ/ประเทศ	รุ่น
เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge)	Beckman Coulter, USA	Allegra X-15R
เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)	Sciencetific Industries, USA	SI-0246
เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (pipette aid)	Corning, Poland	-
เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (autopipette)	Gilson, France	Pipetman Neo
ชุดกรองน้ำพร้อมเครื่องปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)	Millipore, Brazil	xx1004720
ตู้เก็บสารเคมีพร้อมระบบดูดซับไอระเหยสารเคมีแบบไร้ท่อ (chemical storage cabinet)	Erlab	No.AVP804AS
ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส	Thermo Fisher Scientific, USA	906
ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO ₂ Incubator)	Thermo Fisher scientific, USA	371
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope)	OLYMPUS, Philippines	CKX41
กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา (light microscope)	Nikon, Japan	e2000
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (shaking water bath)	JULABO, Germany	SW23
ตู้ปฏิบัติการปราศจากเชื้อ (biosafety cabinet)	Labconco, USA	Logic Purifier class II
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ	Stuart, UK	SI500
ตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส	Sanyo, Japan	MPR-141D
ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)	Binder, USA	FED115
ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว	Taylor Wharton, USA	-
เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง	Sartorius, Germany	ED822-CW
เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง	Adventurer, USA	AR 2140
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)	Rexmed, Taiwan	RAU530-D
กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ชนิดหัวกลับ (inverted fluorescent microscope)	Nikon, Japan	Ti-S Intensilight Ri1 NIS-D

3.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับปฏิบัติงาน

สารเคมี	ยี่ห้อ/ประเทศ
Phosphate-buffered Saline (PBS) pH 7.4	Gibco Life Technologies, UK
Collagenase type I	Gibco Life Technologies, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (1X, DMEM)	Gibco Life Technologies, USA
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco Life Technologies, Germany
Penicillin-streptomycin (10,000 U/mL)	Gibco Life Technologies, USA
L-glutamine (200 mM)	Gibco Life Technologies, USA
Gentamicin (10 mg/mL)	Gibco Life Technologies, China
Ammonium-Chloride-Potassium (ACK) Lysing Buffer	Gibco Life Technologies, USA
0.25% Trypsin-EDTA (1X), phenol red	Gibco Life Technologies, Canada
0.4% Trypan Blue Stain	Gibco Life Technologies, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, US
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Trucount™ tubes	BD, USA
Liquid nitrogen	-

3.2.5 การเตรียมสารเคมีที่ใช้สำหรับการแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมัน และการเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อไขมัน

- การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 3.5% (w/v) BSA ที่ละลายอยู่ใน PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (mL) ทำได้โดยชั่ง BSA ปริมาณ 3.5 กรัม (g) ละลายใน PBS ปริมาตร 100 mL จากนั้นใช้แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) กวนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ได้เป็นสีเหลืองอ่อน ใส
- การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 2 mg/mL collagenase A type I ใน 3.5% BSA in PBS ปริมาตร 100 mL โดยชั่ง collagenase A type I ปริมาณ 0.2 g ละลายใน 3.5% BSA in PBS ปริมาตร 100 mL จากนั้นเขย่าผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 ไมครอน (μm) 1 ครั้ง
- การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 1% BSA in PBS ปริมาตร 100 mL โดยชั่ง BSA ปริมาณ 1 g ละลายใน PBS 100 mL จากนั้นใช้ magnetic bar กวนสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 μm 1 ครั้ง

- การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ครบส่วน (complete medium) ปริมาตร 500 mL

ขั้นตอนที่	ความเข้มข้นสารละลาย	ปริมาตร
1	1X DMEM	440 mL
2	FBS*	50 mL
3	L-glutamine (200 mM)	5 mL
4	Pen-strep (10,000 U/mL)	5 mL
5	Gentamicin (10 mg/mL)	50 µL
6	นำไปกรองผ่านด้วย filter system ขนาด 0.22 µm ก่อนนำไปใช้เลี้ยงเซลล์	

* นำ FBS ไปผ่านกระบวนการ heat inactivate ที่ 56 °C นาน 30 นาที

3.2.6 การเตรียมน้ำยาสำหรับเก็บรักษาเซลล์ (freezing cryoprotectant solution)

ขั้นตอนที่	ความเข้มข้นสารละลาย	ปริมาตร
1	FBS*	9 mL
2	DMSO	1 mL
3	ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย vortex	
4	นำไปกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.22 µm	

* นำ FBS ไปผ่านกระบวนการ heat inactivate ที่ 56 °C นาน 30 นาที

3.3 ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงในการเตรียมงานก่อนปฏิบัติงาน

ควรศึกษาความรู้พื้นฐานด้านความปลอดภัยและความมั่นคงทางชีวภาพสำหรับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ระดับ BSL-2 ก่อนเริ่มปฏิบัติงาน เพื่อป้องกันไม่ก่อให้เกิดอันตรายจากการปฏิบัติงาน ความเสียหายต่อเครื่องมือ ต่อตนเอง และต่อผู้อื่น

3.4 ข้อควรปฏิบัติก่อนเริ่มปฏิบัติงาน

3.4.1 ทำความสะอาดมือและสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล

3.4.2 ทำความสะอาดพื้นผิวบริเวณที่ปฏิบัติงานภายในตู้ BSL-2 และอุปกรณ์ต่าง ๆ ภายในตู้ BSL-2 ด้วย 70% แอลกอฮอล์ จากนั้นเปิด UV ทิ้งไว้ 15 นาที

3.4.3 ทำความสะอาดอุปกรณ์และพื้นผิวส่วนต่าง ๆ ภายนอกตู้ BSL-2 ด้วย 70% แอลกอฮอล์ เช่น กล้อง จุลทรรศน์ โต๊ะปฏิบัติงาน และเครื่องปั่นเหวี่ยง เป็นต้น

3.4.4 เปิดเครื่อง water bath อย่างน้อย 15 นาที และตรวจสอบให้อุณหภูมิของน้ำอยู่ที่ 37 °C

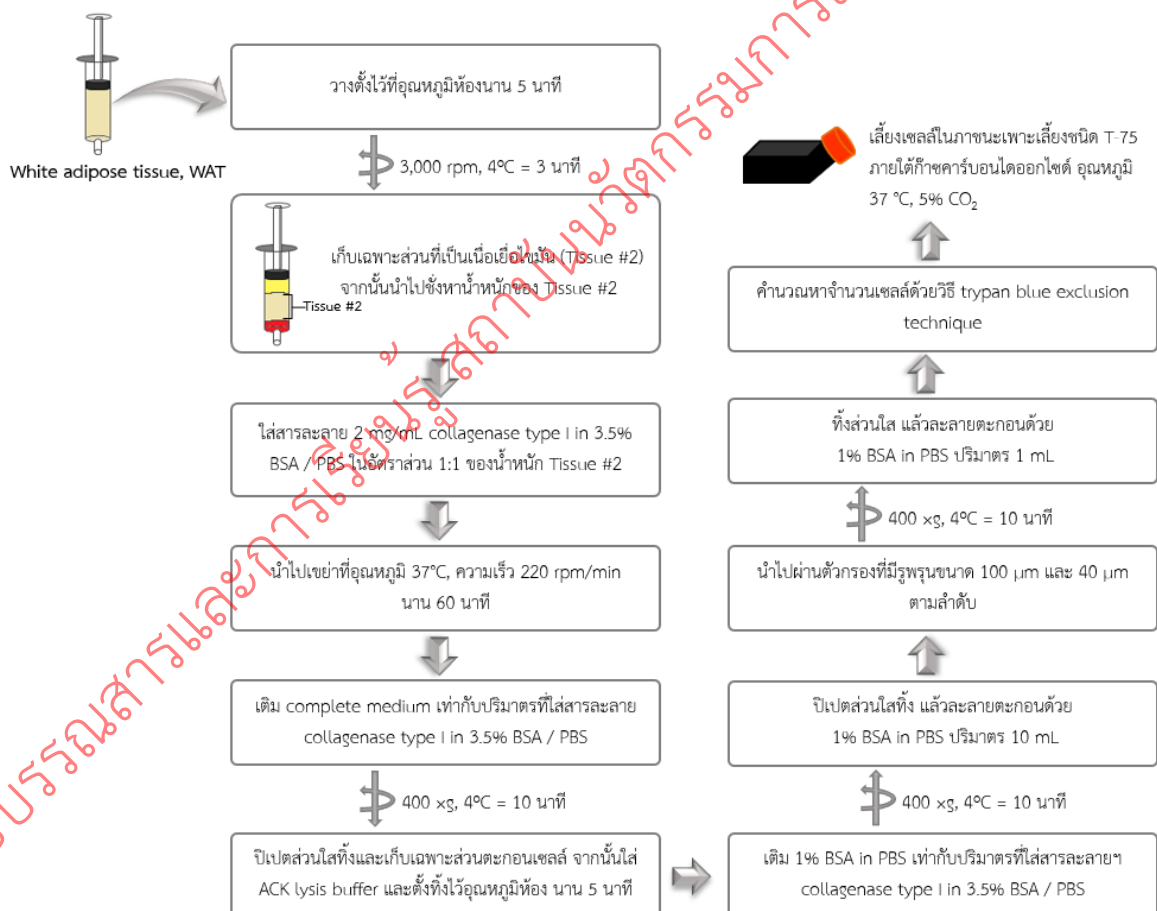
3.4.5 เตรียมสารละลาย หรือน้ำยาที่ต้องใช้สำหรับการปฏิบัติที่อุณหภูมิ 37 °C แช่ไว้ใน water bath อย่างน้อย 15 นาทีก่อนหยิบไปใช้

บทที่ 4 วิธีการปฏิบัติงาน

4.1 กิจกรรม/แผนปฏิบัติงาน

- 4.1.1 เตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับขั้นตอนการแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมัน และการเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อไขมัน
- 4.1.2 เตรียมสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับขั้นตอนการแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมัน และการเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อไขมัน
- 4.1.3 เตรียมสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับขั้นตอนการเก็บสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมันที่เพาะเลี้ยงได้ลงถึงไนโตรเจนเหลว

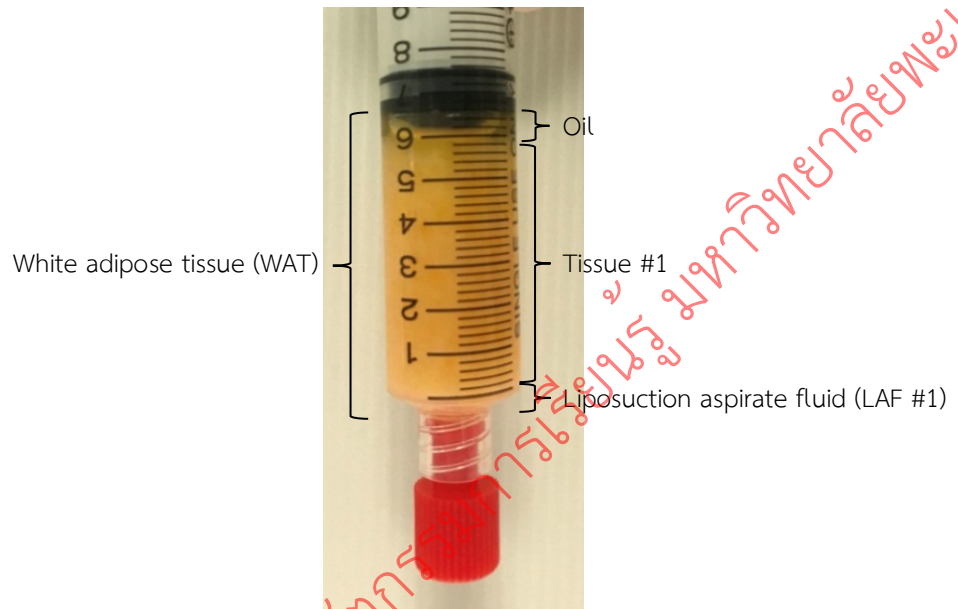
4.2 แผนผังภาพรวมขั้นตอนการปฏิบัติงานโดยสังเขป



4.3 ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

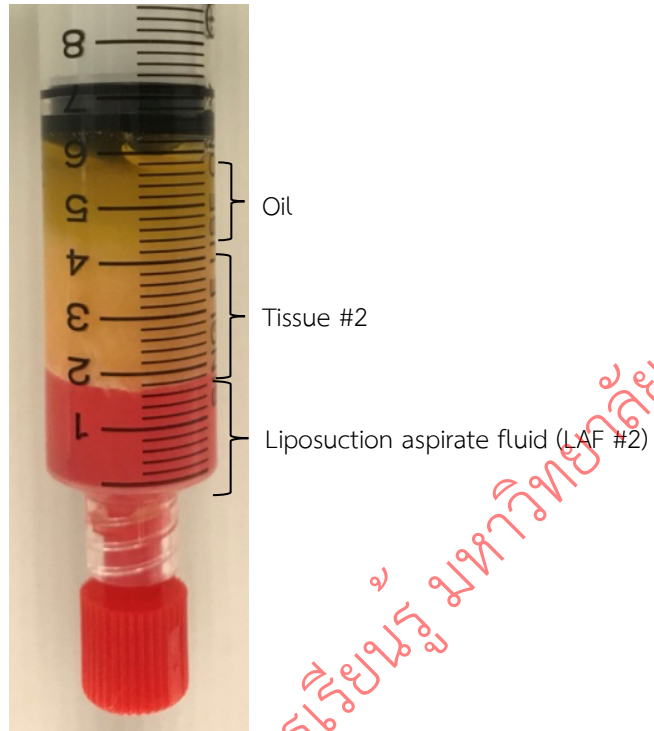
4.3.1 ขั้นตอนการแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมัน

- 4.3.1.1 นำกระบอกฉีดยาที่มีเนื้อเยื่อไขมันวางตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เนื้อเยื่อไขมัน (ชั้นกลาง; tissue #1) แยกออกจากน้ำมัน (ชั้นบน; oil) เลือดและสารน้ำอื่น ๆ (ชั้นล่าง; liposuction aspirate fluid, LAF #1) (ดังภาพที่ 1)



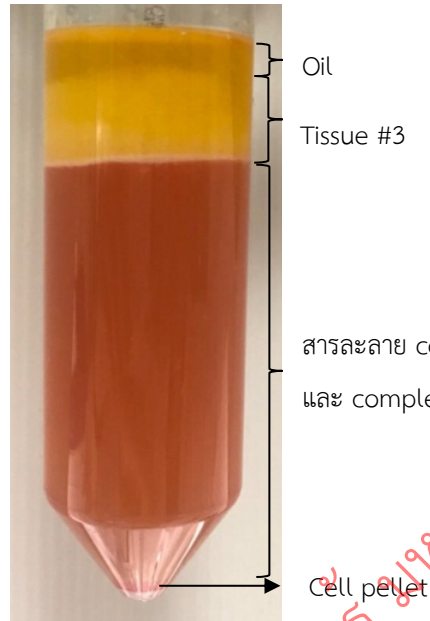
ภาพที่ 4 แสดงการแยกชั้นของเนื้อเยื่อไขมัน (WAT) ภายหลังจากวางตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ได้แก่ ไขมัน/น้ำมัน (oil), เนื้อเยื่อไขมัน (tissue #1) และ เลือดหรือสารน้ำอื่น ๆ (LAF #1) (ที่มา : ถ่ายภาพโดย นายพูนสิน พวงไพโรจน์)

- 4.3.1.2 นำกระบอกฉีดยาที่บรรจุ WAT ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที (rpm/min) นาน 3 นาที เพื่อแยกเนื้อเยื่อไขมันออกจากส่วนน้ำมัน และเลือดหรือสารน้ำอื่น ๆ ภายหลังจากการปั่นตก WAT จะแยกออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ไขมัน/น้ำมัน (oil) เนื้อเยื่อไขมัน (tissue #2) และเลือดหรือสารน้ำอื่น ๆ (LAF #2) (ดังภาพที่ 5) โดยจะเก็บส่วน tissue #2 ใส่ลงหลอดขนาด 50 mL ในขั้นตอนถัดไป



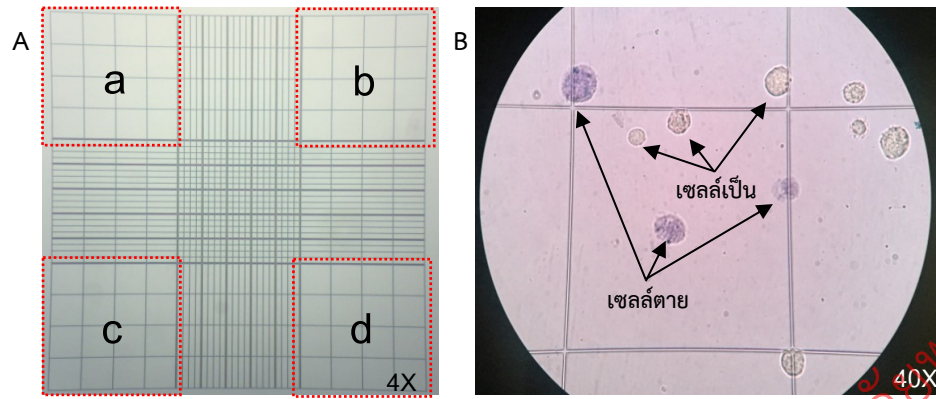
ภาพที่ 5 แสดงส่วนของเนื้อเยื่อไขมัน (WAF) ภายหลังปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm/min นาน 3 นาที ได้แก่ ชั้น ไขมัน/น้ำมัน (oil), เนื้อเยื่อไขมัน (tissue #2) และ เลือด หรือสารน้ำอื่น ๆ (LAF #2) (ที่มา : ถ่ายภาพโดย นายพูนสิน พวงไพโรจน์)

- 4.3.1.3 ชั่งน้ำหนักหลอดเปล่า (ขนาด 50 mL) ก่อนที่จะเก็บ tissue #2 โดยดันส่วนของ LAF #2 ทั้งหมด จากนั้นดันเฉพาะส่วนของ tissue #2 ใส่ลงในหลอดเปล่าที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้ว และทิ้งส่วนของ oil ไป จากนั้นนำหลอดไปชั่งน้ำหนักรวมอีกครั้งหนึ่งเพื่อนำไปคำนวณหาน้ำหนักของ tissue #2 โดยใช้ค่าน้ำหนักของหลอดที่มี tissue #2 (g) – น้ำหนักหลอดเปล่าก่อนใส่ tissue #2 (g)
- 4.3.1.4 จากนั้นจึงเติมสารละลายความเข้มข้น 2 mg/mL collagenase type I ใน 3.5% BSA อัตราส่วน 1:1 เช่น น้ำหนัก tissue #2 = 15 g : สารละลาย 3.5% BSA = 15 mL
- 4.3.1.5 นำไปเขย่าในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 220 rpm/min ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที
- 4.3.1.6 เมื่อครบเวลาให้เติม complete medium ปริมาตรเท่ากับที่ใส่สารละลาย collagenase type I ที่มี 3.5% BSA ในข้อ 4.2.1.4 และผสมสารละลายกับเนื้อเยื่อที่ถูกย่อยแล้วให้เข้ากันด้วยการเขย่าแบบกลับหลอด (invert mix)
- 4.3.1.7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 400×g อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เนื้อเยื่อจะถูกแยกออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ oil, tissue #3 สารละลาย collagenase ร่วมกับ complete medium และตะกอนเซลล์ (cell pellet) ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แสดงการแยกชั้นของเนื้อเยื่อไขมันหลังย่อยด้วยเอนไซม์ collagenase type I ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง โดยแยกออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ ไขมัน/น้ำมัน (oil), เนื้อเยื่อไขมัน (tissue #3), สารละลาย collagenase complete medium และ cell pellet (ที่มา : ถ่ายภาพโดย นายพูนสิน พวงไพโรจน์)

- 4.3.1.8 ปิดเตส่วนบนทิ้งไปทั้งหมด เก็บเฉพาะส่วน cell pellet จากนั้นเติม ACK lysis buffer เท่ากับปริมาตรของสารละลาย collagenase type I ที่ใส่ในข้อ 4.2.1.4 แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที
- 4.3.1.9 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 400×g อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งไป จากนั้นจึงละลาย (resuspend) cell pellet ด้วย 1% BSA in 1X PBS ปริมาตร 10 mL และเขย่าแบบ invert mix จากนั้นจึงนำไปผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 100 μm และ 40 μm ตามลำดับ เพื่อแยกเศษของเนื้อเยื่อไขมันที่ยังเหลือออก
- 4.3.1.10 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 400×g อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสออกแล้ว resuspend cell pellet ด้วย 1% BSA in 1XPBS และวัดปริมาตรทั้งหมดที่เหลือในหลอด (เพื่อสำหรับนำไปคำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด และร้อยละความอยู่รอดของเซลล์) โดยจะเรียกเซลล์ส่วนนี้ว่า stromal vascular fraction (SVF)
- 4.3.1.11 คำนวณหาจำนวนเซลล์เป็น (viable cell), จำนวนรวมของเซลล์ (total cells = viable cells + dead cells) และร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability) ของ SVF ด้วยวิธี trypan blue exclusion technique โดยการเปิด SVF มา 20 μL ผสมกับ 0.4% trypan blue 20 μL (dilution factor, DF = 2) แล้วนำมานับหาจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer ภายใต้อุปกรณ์กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40X จากการนับเซลล์ทั้งหมด 4 ช่อง (ดังภาพที่ 7) โดยเซลล์ตายจะติดสีน้ำเงิน เซลล์เป็นจะไม่ติดสีน้ำเงิน



ภาพที่ 7 A) แสดงการแบ่งช่องนับเซลล์ของ counting chamber ออกเป็น 4 ช่องใหญ่ ได้แก่ ช่อง a, b, c และ d และ B) แสดงลักษณะการติดสีของเซลล์โดยเซลล์ตายติดสีน้ำเงิน และเซลล์เป็นไม่ติดสี (ที่มา : ถ่ายภาพโดย นายพูนสิน พวงไพโรจน์)

จากนั้นคำนวณหา total cells, viable cells และ % cell viability ดังนี้

$$\text{Total cells} = \left(\frac{\text{จำนวนเซลล์}^a}{4} \times \text{dilution factor} \times 10^4 \right) \times \text{ปริมาตรของ cell suspend (mL)}$$

$$\text{Viable cells} = \left(\frac{\text{จำนวนเซลล์}^b}{4} \times \text{dilution factor} \times 10^4 \right) \times \text{ปริมาตรหลัง cell suspend (mL)}$$

$$\% \text{ Viability} = \left(\frac{\text{viable cells}}{\text{total cells}} \right) \times 100$$

หมายเหตุ a = จำนวนทั้งหมดของเซลล์เป็น และเซลล์ตายที่ได้จากการนับเซลล์ทั้ง 4 ช่อง

b = จำนวนเซลล์เป็นทั้งหมดที่ได้จากการนับเซลล์ทั้ง 4 ช่อง

4.3.1.12 เติมน้ำ complete medium ปริมาตร 22.5 mL ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีพื้นที่การเจริญเติบโต 75 cm² (flask T-75) และปิเปต SVF ทั้งหมดใส่ flask T-75 นำไปเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะบนพื้นผิว flask โดยเรียกเซลล์ที่เกาะในขั้นตอนนี้ว่า processed lipoaspirate cells (PLA cells)

4.3.2 การเพาะเลี้ยง PLA cells ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อไขมัน

4.3.2.1 หลังจากครบ 24 ชั่วโมง ปิเปต complete medium ทั้งหมด และเติม 1X PBS ปริมาตร 10 mL โดยเอียง flask ขึ้น-ลง ซ้าย-ขวา เพื่อล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะ flask ออกให้เหลือแต่ PLA cell ที่เกาะอยู่บนผิว flask T75 จากนั้นปิเปต 1X PBS ออกให้หมด เพื่อไม่ให้ไปเจือจางเอนไซม์ trypsin-EDTA ที่จะใส่ในขั้นตอนต่อไป

4.3.2.2 เติมน้ำเอนไซม์ trypsin-EDTA (0.25%) ปริมาตร 5 mL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ ประมาณ 5-7 นาที และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อ PLA cells หลุดออกจากพื้นผิวของ

flask T-75 ประมาณ 90% แล้วจึงเติม complete media ปริมาตร 5 mL เพื่อเจือจาง trypsin-EDTA จากนั้นล้างเซลล์ที่ยังเหลืออยู่ใน flask ด้วย complete media ปริมาตร 5 mL จำนวน 2 รอบ โดยย้ายเซลล์ที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 mL

4.3.2.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใสและละลายตะกอนเซลล์กลับด้วย complete media ปริมาตร 850 μ L แล้ววัดปริมาตรทั้งหมดหลังใสอีกครั้ง เพื่อนำไปคำนวณหาจำนวนเซลล์ จากนั้นทำเหมือนขั้นตอนที่ 4.3.1.11

4.3.2.4 คำนวณ viable cells เพื่อใส่ใน flask T-75 สำหรับนำไปเลี้ยงต่อที่ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2,000 cells/cm² โดยคำนวณได้จาก

$$\text{ปริมาตร viable cells สำหรับเพาะเลี้ยงต่อ} = \frac{\text{ความหนาแน่นของเซลล์ (cell/cm}^2\text{)} \times \text{ปริมาตรของ cell suspend (mL)}}{\text{จำนวน viable cells}}$$

จากนั้นเติม complete medium ปริมาตร 22.5 mL และเขย่า flask T-75 ในแนวระนาบ ขึ้น-ลง ซ้าย-ขวา เบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วภายใน flask T-75 กลุ่มเซลล์ในขั้นตอนนี้จะเรียกว่า adipose-derived stem cells (ADSCs) จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์จะทำการเปลี่ยน medium ทุก 3-4 วัน โดยปิเปต medium เก้าออก จากนั้นใส่ complete media ใหม่ปริมาตร 22.5 mL แล้วนำกลับไปเข้าตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂ จนกระทั่ง ADSCs ภายใน flask T-75 แบ่งตัวและเจริญเติบโตจนมีความหนาแน่น (confluence) ประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่ผิว flask จึงทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อในรุ่นถัดไป (subculture) โดยกระบวนการ trypsinization (ทำตามตั้งแต่ขั้นตอนที่ 4.3.2.2 เป็นต้นไป) และทุกการ subculture จะนับ passage ใหม่เสมอ

4.3.3 การเก็บรักษาเซลล์ ADSCs

การเก็บรักษาเซลล์จะเก็บรักษาในรูปของเซลล์แช่แข็ง (frozen cells) ซึ่งหลังจากเลี้ยงเซลล์จน confluence แล้วทำการ trypsinization เซลล์ที่ได้จะถูกนับและคำนวณเพื่อเก็บลงใน cryogenic vial หลอดละไม่เกิน 10 $\times$ 10⁶ cells ต่อ freezing cryoprotectant solution 1 mL แล้วแช่หลอดไว้ใน freezing container (Mr.Frosty™) นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ -80°C จากนั้นจึงนำเซลล์ไปเก็บรักษาบนไอระเหยของไนโตรเจนเหลวในถังสำหรับเก็บเซลล์ต่อไป

บทที่ 5

ปัญหาอุปสรรค แนวทางในการแก้ไข และข้อเสนอแนะ

5.1 ปัญหาอุปสรรคและแนวทางในการแก้ไข

- **ปัญหาอุปสรรค** : การปั่นเหวี่ยงกระบอกฉีดขนาด 10 mL ที่มีเนื้อเยื่อไขมันปริมาตรเกิน 7 mL จะทำให้ก้านของกระบอกฉีดขาดกับแกน rotor และแตกหักขณะปั่นเหวี่ยง

แนวทางการแก้ไขและข้อเสนอแนะ

แบ่งใส่กระบอกฉีดขนาด 10 mL อันใหม่ ให้ปริมาตรไม่เกิน 7 mL (ทำภายในตู้ BSL-2) และขณะที่ใส่กระบอกฉีดลงใน bucket หาดำแหน่งที่เมื่อขณะเครื่องปั่นเหวี่ยงทำงานแล้วก้านกระบอกฉีดจะไม่ชนกับแกนของ rotor

- **ปัญหาอุปสรรค** : ประสิทธิภาพการทำงานของ collagenase type I ลดลง หรือย่อยได้ไม่ดี

แนวทางการแก้ไขและข้อเสนอแนะ

- ควรเตรียมสารละลายใหม่ก่อนใช้เสมอ (fresh preparation) ไม่ควรเตรียมไว้ล่วงหน้าเพราะจะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง

- ก่อนนำหลอดที่มี tissue #2 ไปแช่ยา ควรเปิดอุณหภูมิของเครื่องแช่ไว้ล่วงหน้าให้ได้อุณหภูมิ 37 °C ก่อน ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

- ขั้นตอนที่ 4.3.1.3 ในขณะที่ดันส่วนของ tissue #2 ออกจาก syringe หากพบว่าขณะดัน tissue #2 มีลักษณะเป็นก้อน tissue ให้ดูดทั้งก้อนทิ้งไป เนื่องจากจะทำให้ย่อยได้ไม่ดีแล้วยังทำให้ตอนกรองผ่านตัวกรองที่ 100 µm ต้นส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถไหลผ่านตัวกรองไปได้

- **ปัญหาอุปสรรค** : ขั้นตอนที่ 4.3.1.7 ภายหลังปั่นพบว่าชั้นของ oil มีปริมาตรมากกว่า 3 mL (จากการประมาณที่อ่านค่าได้จากข้างหลอดทดลอง)

แนวทางการแก้ไขและข้อเสนอแนะ

การพบว่าปริมาณของ oil เยอะมากเกินไปตั้งแต่ขั้นตอนที่ 4.3.1.7 จะส่งผลในขั้นตอนนับเซลล์ SVF ทำให้นับเซลล์ยากเนื่องจากจะเห็น oil ภายใต้อ่างจุลทรรศน์ปะปนอยู่กับเซลล์ ดังนั้นในขั้นตอนนี้ควรดูดชั้นของ oil ออกให้ได้มากที่สุด หรือหากยังเห็นว่า มี oil ปนอยู่กับ cell pellet ภายหลังจากดูดชั้นของ oil, tissue #3, สารละลาย collagenase ร่วมกับ complete medium ออกหมดแล้ว ให้ดูดเฉพาะส่วน cell pellet ทั้งหมดย้ายไปใส่หลอดทดลองหลอดใหม่

- **ปัญหาอุปสรรค** : ในขั้นตอนกระบวนการ trypsinization เซลล์หลุดค่อนข้างยากหรือใช้เวลาในการ incubation นาน

แนวทางการแก้ไขและข้อเสนอแนะ

ปัญหาเซลล์หลุดยากหลังจากที่ใส่ 0.25% trypsin-EDTA ไปแล้ว อาจมาจากขั้นตอนการล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะด้วย 1X PBS ก่อนใส่ trypsin-EDTA แล้วเปิด 1X PBS ออกไม่หมดทำให้ความเข้มข้นของ trypsin-EDTA เจือจาง ดังนั้นจึงควรเปิด 1X PBS ออกให้ได้มากที่สุด หรืออาจมาจากการใส่ trypsin-EDTA ขณะที่ยังมีอุณหภูมิต่ำกว่า 25°C ทำให้ต้องใช้เวลาในการบ่มที่ 37°C นานขึ้น ดังนั้นก่อนนำ trypsin-EDTA มาใช้ควรตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิห้อง

- **ปัญหาอุปสรรค :** หลังจาก trypsinization พบว่าร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability) น้อยกว่า 80%

แนวทางการแก้ไขและข้อเสนอแนะ

ขั้นตอน trypsinization ไม่ควรใช้ระยะเวลาที่เซลล์อยู่ใน 0.25% trypsin-EDTA เกินกว่า 15-20 นาที

- **ปัญหาอุปสรรค :** เซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายในตู้ incubator พบว่าเจริญเติบโตช้าผิดปกติหรือ % confluence นานผิดปกติ

แนวทางการแก้ไขและข้อเสนอแนะ

ปัญหาที่เซลล์เจริญเติบโตช้าอาจมีได้จากหลายสาเหตุ ให้ลองทวนสอบตั้งแต่ความเข้มข้นของส่วนประกอบในขั้นตอนการเตรียม complete medium ว่าผิดหรือไม่, การคำนวณความหนาแน่นของเซลล์ตั้งต้นที่ใช้เพาะเลี้ยง passage ต่อไปผิดหรือไม่, สภาวะความพร้อมของตู้ที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์หรือไม่ โดยภายในตู้จะต้องมีอุณหภูมิอยู่ที่ 37°C ค่า % ความชื้นอยู่ที่ร้อยละ 70-80 และ 5% CO₂ เป็นต้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

การปฏิบัติงานการแยกสเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมันและการเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อไขมัน จำเป็นต้องมีการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับปฏิบัติงานผ่านการสอบเทียบ (calibration) และมีการตรวจสอบความพร้อมก่อนใช้งานทุกครั้ง รวมถึงมีการตรวจสอบคุณภาพ/ประสิทธิภาพในการทำงานเป็นประจำอย่างสม่ำเสมอ เพื่อความถูกต้องแม่นยำสำหรับการปฏิบัติงาน เช่น

- เครื่องชั่งน้ำหนัก มีการสอบเทียบประจำปี ก่อนใช้งานเครื่องชั่งให้ตรวจสอบลูกน้ำหนักที่ติดตั้งไว้สำหรับตรวจสอบความลาดเอียงของเครื่องชั่งว่าอยู่ตรงกึ่งกลางของวงกลมเสมอก่อนใช้งาน และใช้ชนิดของเครื่องชั่งน้ำหนักให้ตรงตามจุดประสงค์ที่ชั่ง เช่น ถ้าต้องการชั่งน้ำหนักที่หน่วยเป็นมิลลิกรัม (mg) ควรเลือกใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง เพื่อลดความคลาดเคลื่อนของน้ำหนักสารหรือตัวอย่างที่นำมาชั่ง
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายกึ่งอัตโนมัติ (autopipette) ผ่านการสอบเทียบ และมีใบรับรองผลการสอบเทียบ ออกมาอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับความคลาดเคลื่อนได้ นอกจากนี้การเลือกใช้ขนาดต่าง ๆ ของ autopipette ควรเลือกใช้ให้สอดคล้องกับลักษณะปริมาตรที่ต้องการดูดสารละลาย เช่น ถ้าต้องการดูดสารละลายปริมาตร 50 µL ควรเลือกใช้ autopipette ขนาด P100 ที่สามารถดูดสารละลายได้ตั้งแต่ 10-100 µL มากกว่าการเลือกใช้ขนาด P200 ที่สามารถดูดสารละลายได้ตั้งแต่ 20-200 µL เพื่อช่วยเพิ่มความถูกต้องแม่นยำและยังช่วยรักษาสปริงที่อยู่ภายในไม่ขัดแน่นจนเกินไป ทำให้ช่วยยืดอายุการใช้งานได้นานขึ้น
- ตู้ biosafety cabinet (BSC) ควรเลือกใช้ชนิดของตู้ให้ถูก สำหรับงานด้านเพาะเลี้ยงเซลล์ตู้ BSC ที่เหมาะสมต่อการปฏิบัติงาน คือ BSC Class II นอกจากนี้ตู้ BSC ต้องมีการสอบเทียบประจำปีและมีใบรับรองว่าผ่านทุกหัวข้อทดสอบตามเกณฑ์ที่กำหนด
- ตู้ incubator สำหรับใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ มีการสอบเทียบประจำปีและมีใบรับรองว่าผ่านเกณฑ์ทดสอบทุกหัวข้อ หมั่นตรวจสอบอุณหภูมิ %CO₂ และ % ค่าความชื้น (%RH) อยู่สม่ำเสมอ เพื่อให้ภายในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยสภาวะที่เหมาะสม คือที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂, และ 70-80 %RH

- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) ต้องผ่านการสอบเทียบ และมีใบรับรองผลผ่านการสอบเทียบออกมาอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และก่อนใช้งานทุกครั้งต้องทำการปรับสมดุลของสารตัวอย่างให้เท่ากัน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดอุบัติเหตุต่าง ๆ ที่จะทำให้อุปกรณ์เครื่องมือเสียหาย
- อ่างน้ำแบบควบคุมและเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิต้องผ่านการสอบเทียบ (calibration) และมีการตรวจสอบอุณหภูมิให้ตรงตามค่าที่กำหนดไว้ทุกครั้งก่อนใช้งาน

นอกจากนี้ผู้ที่ปฏิบัติงานตามคู่มือปฏิบัติงานเล่มนี้ ควรมีความรู้ ความเข้าใจเบื้องต้นด้านความปลอดภัย และความมั่นคงทางชีวภาพสำหรับห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ หรือผ่านหลักสูตรการเรียนรู้และทดสอบความปลอดภัยในการใช้ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ (MU LabPass) ก่อนเริ่มปฏิบัติงาน เพื่อช่วยป้องกันไม่ก่อให้เกิดอันตรายจากการปฏิบัติงาน และก่อให้เกิดความเสียหายทั้งต่อตนเองและผู้อื่น

ศูนย์บรรณสารและการเรียนรู้ สถาบันนวัตกรรมการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยพะเยา

เอกสารอ้างอิง

1. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960). 2004;139(1):93-9.
2. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. Cells. 2019;8(8).
3. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. Cell Transplantation. 2016;25(5):829-48.
4. Eom YW, Shim KY, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. The Korean journal of internal medicine. 2015;30(5):580-9.
5. Zhu M, Heydarkhan-Hagvall S, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P. Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. Journal of visualized experiments : JoVE. 2013(79):e50585.
6. Aronowitz JA, Lockhart RA, Hakakian CS. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. SpringerPlus. 2015;4:713.
7. Senesi L, De Francesco F, Farinelli L, Manzotti S, Gagliardi G, Papalia GF, et al. Mechanical and Enzymatic Procedures to Isolate the Stromal Vascular Fraction From Adipose Tissue: Preliminary Results. 2019;7(88).
8. Doornaert M, De Maere E, Colle J, Declercq H, Taminiau J, Lemeire K, et al. Xenogen-free isolation and culture of human adipose mesenchymal stem cells. Stem Cell Research. 2019;40:101532.
9. Winnier GE, Valenzuela N, Peters-Hall J, Kellner J, Alt C, Alt EU. Isolation of adipose tissue derived regenerative cells from human subcutaneous tissue with or without the use of an enzymatic reagent. PLOS ONE. 2019;14(9):e0221457.
10. Chang H, Do BR, Che JH, Kang BC, Kim JH, Kwon E, et al. Safety of adipose-derived stem cells and collagenase in fat tissue preparation. Aesthetic plastic surgery. 2013;37(4):802-8.
11. Lee SJ, Lee CR, Kim KI, Ryu YH, Kim E, Han YN, et al. Optimal Condition of Isolation from an Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction for the Development of Automated Systems. Tissue engineering and regenerative medicine. 2020;17(2):203-8.
12. Duan W, Lopez MJ. Effects of enzyme and cryoprotectant concentrations on yield of equine adipose-derived multipotent stromal cells. American journal of veterinary research. 2018;79(10):1100-12.
13. Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Orbay H, Fujimura J, Ono S, et al. Chapter 32 - Adipose-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. In: Legato MJ, editor. Principles of Gender-Specific Medicine (Third Edition). San Diego: Academic Press; 2017. p. 459-79.
14. Li N, Gao J, Mi L, Zhang G, Zhang L, Zhang N, et al. Synovial membrane mesenchymal stem cells: past life, current situation, and application in bone and joint diseases. Stem Cell Research & Therapy. 2020;11(1):381.
15. Shi Y, Wang Y, Li Q, Liu K, Hou J, Shao C, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. Nature Reviews Nephrology. 2018;14(8):493-507.

16. Xu L, Liu Y, Sun Y, Wang B, Xiong Y, Lin W, et al. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):275.
17. Li Y, Jin D, Xie W, Wen L, Chen W, Xu J, et al. PPAR- γ and Wnt Regulate the Differentiation of MSCs into Adipocytes and Osteoblasts Respectively. *Current stem cell research & therapy.* 2018;13(3):185-92.
18. Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell death and differentiation.* 2016;23(7):1128-39.
19. Mailey B, Hosseini A, Baker J, Young A, Alfonso Z, Hicok K, et al. Adipose-derived stem cells: methods for isolation and applications for clinical use. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ).* 2014;1210:161-81.
20. Mazini L, Ezzoubi M, Malka G. Overview of current adipose-derived stem cell (ADSCs) processing involved in therapeutic advancements: flow chart and regulation updates before and after COVID-19. *Stem Cell Research & Therapy.* 2021;12(1):1.
21. Zhang J, Liu Y, Chen Y, Yuan L, Liu H, Wang J, et al. Adipose-Derived Stem Cells: Current Applications and Future Directions in the Regeneration of Multiple Tissues. *Stem cells international.* 2020;2020:8810813.
22. Naderi N, Combelleck EJ, Griffin M, Sedaghati T, Javed M, Findlay MW, et al. The regenerative role of adipose-derived stem cells (ADSC) in plastic and reconstructive surgery. *International wound journal.* 2017;14(1):112-24.

ศูนย์บรรณสารและการเรียนรู้ สถาบันนวัตกรรมการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยพะเยา

ทรัพยากรเล่มนี้ ได้มอบให้ศูนย์บรรณสารและการเรียนรู้
สถาบันนวัตกรรมการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยพะเยา
เพื่อเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ

ห้ามผู้ใดทำซ้ำ คัดลอก ลอกเลียน ดัดแปลง ปลอมแปลง จัดเผยแพร่
จำหน่าย ให้เช่า เข้าครอบครอง เรียกถึงข้อมูล บันทึก ส่งผ่าน
หรือกระทำการใด ๆ เกี่ยวกับลิขสิทธิ์ของเล่ม โดยไม่ชอบด้วยกฎหมาย
หรือโดยไม่ได้รับอนุญาตอย่างเป็นทางการจากเจ้าของผลงาน

