Original Article/นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาของหมูในหลอดทดลองเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาการทำงานของเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาระดับโมเลกุล

อังคณา กระจ่าง[1]

วิโรจน์ ลิ่มตระการ[2], **สมพร รี้พลมหา**[3], **วัลยา อุทัยสาง-ธเนศพงศ์ธรรม**[1]

บทคัดย่อ

เซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการมองเห็น ผลกระทบใดๆ ที่ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงหรือการทำงานแย่ลงอาจทำให้สูญเสียการมองเห็นได้ ดังนั้นการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่อาจส่งผลกระทบดังกล่าวจึงเป็นสิ่งที่ควรศึกษาอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับจำนวนเซลล์หรือการทำงานของเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาอาจทำได้หลายวิธี โดยในวิธีต่างๆนั้น การเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองนับเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากมีความสะดวก และไม่ยุ่งยากในการทดสอบ อย่างไรก็ดี ประเทศไทยยังมีการพัฒนาในด้านนี้ไม่มากนัก คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาโดยใช้กระจกตาของหมูเป็นแม่แบบและได้รายงานรายละเอียดในขั้นตอนต่างๆ เพื่อให้ผู้ที่สนใจสามารถทำตามได้ รวมทั้งได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิธีการนับด้วย hemacytometer กับวิธีการ MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay ซึ่งพบว่าเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle(DMEM) ที่มี fetal bovine serum ในปริมาณร้อยละ 10 เซลล์ที่เพาะเลี้ยงสามารถทำการเพิ่มขยายจำนวนได้ตามต้องการ และพบว่าวิธีการติดตามการเจริญเติบโตสามารถใช้ได้ทั้ง 2 วิธีกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ แต่วิธี MTT assay จะมีค่าความผิดพลาดน้อยกว่า ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาได้จริง ด้วยวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก และใช้เวลาไม่นาน เซลล์ที่ได้ยังสามารถนำมาศึกษาอัตราการเจริญเติบโตได้ด้วยวิธีต่างๆ **จักษุเวชสาร 2551; กรกฎาคม-ธันวาคม 22(2): 118-126.**

คำสำคัญ: เซลล์เยื่อบุชั้นใน กระจกตา การเลี้ยงเซลล์

[1] **ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพ 10110**

[2] **ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120**

[3] **ภาควิชาจักษุ โสต ศอ นาสิก ราลิงซ์วิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ นครนายก 26120**

บทนำ

เซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตา (corneal endothelial cell) เป็นเซลล์ที่มีลักษณะเป็นชั้นเดียว มีรูปร่างเหลี่ยมแบบ hexagonal ตั้งแต่แรกเกิดจะมีความหนาแน่นของเซลล์มากกว่า 3,000 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร[1] และจะลดลงไปเรื่อยๆ อย่างช้าๆ ตามอายุ และไม่มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์อีก[2] ส่วนของเซลล์ชั้นนี้มีองค์ประกอบที่สำคัญของ Na^+/K^+-ATPase pump ที่ทำหน้าที่ควบให้ปริมาณน้ำในกระจกตา (corneal stroma) ให้อยู่ระดับต่ำ (relatively dehydrated state) จึงมีความใส (transparent) อยู่ตลอด ทำให้เราสามารถมองเห็นสิ่งต่างๆ ได้อย่างปกติ หากเมื่อไรที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่ำกว่า 500 เซลล์ต่อหนึ่งตารางมิลลิเมตร[3-4] กระจกตาจะบวมน้ำและสูญเสียความใส (translucent) ทำให้การมองเห็นลดลง (ถึงขั้นบอด) ได้อย่างถาวร ดังนั้นผลกระทบใดๆที่เกิดขึ้นต่อเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาจะทำให้เกิดผลกระทบต่อการมองเห็นได้ในที่สุด ซึ่งการศึกษาถึงผลกระทบต่างๆ ทั้งสารเคมีหรือสิ่งแวดล้อมในระหว่างการทำผ่าตัดต่อการอยู่รอดของเซลล์และการทำงานในระดับโมเลกุลของเซลล์ จากรายงานวิจัยที่มีในปัจจุบันพบว่ามีได้หลากหลายวิธี ทั้งการนับเซลล์โดยตรงจากภายในลูกตาภายหลังการผ่าตัดโดยใช้กล้อง specular microscope[5-9] การใช้ลูกตาของสัตว์เป็นแม่แบบในการทดสอบ[10-14] และการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อทดสอบผลโดยตรง ทั้งการเพาะเลี้ยงเซลล์จากคน[15-17] และการเพาะเลี้ยงเซลล์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม[18-22] นอกเหนือจากการใช้กล้อง specular microscope แล้ว วิธีการอื่นๆยังมีการศึกษาไม่มากนักในประเทศไทย ทำให้การศึกษาถึงผลกระทบในด้านต่างๆต่อเซลล์และรวมถึงในระดับโมเลกุลยังมีข้อจำกัดอยู่ ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาในหลอดทดลอง สำหรับใช้ในการศึกษาผลกระทบในระดับเซลล์เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตอบปัญหาทางการแพทย์ โดยได้เลือกการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุชั้นในจากกระจกตาหมู เนื่องจากเป็นสัตว์ที่มีความใกล้เคียงกับคนและหาตัวอย่างได้ง่าย นอกจากนั้นยังมีรายงานวิจัยที่นำเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาหมูมาใช้เป็นแม่แบบในการศึกษาด้วย[20] โดยได้แสดงขั้นตอนการทำอย่างละเอียดเพื่อให้ผู้ที่สนใจสามารถทำตามได้จริง รวมทั้งได้เปรียบเทียบวิธีการติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์โดยวิธีนับเซลล์ด้วย hemacytometer และวิธี MTT assay เพื่อให้เห็นถึงความเป็นไปได้ และความสะดวกในการศึกษาวิจัยด้วยวิธีดังกล่าวนี้ด้วย

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ลูกตาหมูที่ใช้ในการเตรียมเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตา (porcine corneal endothelial cells: PCEC) ได้จากโรงฆ่าสัตว์ในระยะเวลาไม่เกิน 8 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) สารละลายย่อยเซลล์ออกจากพื้นผิว trypsin-EDTA (ethylene-diamine-tetraacetic acid) ยาปฏิชีวนะ penicillin-streptomycin และ fetal bovine serum จากบริษัท Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา สาร MTT หรือ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide จากบริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการทดลอง

1. การแยกเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาจากตาหมู[20]

นำตาหมูที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ (รูปที่ 1A) นำมาล้างให้สะอาดในเบื้องต้นด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง (รูปที่ 1B) จากนั้นแช่ลูกตาหมูที่ได้ทั้งลูก (whole globe) ใน 70 % แอลกอฮอล์เป็นเวลา 2-3 นาที เพื่อลดการปนเปื้อนให้มากที่สุด (รูปที่ 1C) แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออีก 2-3 ครั้ง จึงเริ่มตัดแยกเฉพาะส่วนของกระจกตา (corneal button) โดยใช้ใบมีดผ่าตัดเจาะเข้าที่ด้านหน้าและค่อยๆ เลาะเป็นวงกลมไม่ให้มีส่วนของตาขาว (scleral ring) ติดมา (รูปที่ 1D) ชิ้นส่วนที่ได้ของกระจกตามีลักษณะเป็นเหมือนวุ้น สีขาวใส โค้งเล็กน้อย (รูปที่ 1E) ล้างกระจกตาที่ได้ในตู้ปลอดเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM ที่มี fetal bovine serum อยู่ร้อยละ 10 โดยมี penicillin จำนวน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ streptomycin จำนวน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)2-3 ครั้ง เพื่อช่วยลดการปนเปื้อน รวมทั้งรักษาสภาวะของเซลล์ด้วย จากนั้นนำชิ้นส่วนของกระจกตาวางลงในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สะอาดโดยให้มีลักษณะโค้งขึ้นให้ด้านที่มีเซลล์เยื่อบุชั้นในอยู่ด้านบน (รูปที่ 1F-G) จากนั้นหยดสารละลาย trypsin-EDTA ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงไปที่บนผิวด้านในของกระจกตา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสประมาณ 1-2 นาที (รูปที่ 1H) แล้วใช้ spatula เขี่ยเบาๆ บนผิวเยื่อเซลล์ชั้นใน (รูปที่ 1I) เซลล์ที่ได้ที่ติดที่ปลาย spatula นำไป

จุ่มลงในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม (uncoated 24 well-plate บริษัท Corning) ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (รูปที่ 1J) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลาอย่างน้อย 1 อาทิตย์ เพื่อให้เซลล์ได้เริ่มขยายเพิ่มปริมาณ

2. การเลี้ยงเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตา

เซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาที่มีจำนวนมากพอแล้ว ทำการ subculture โดยการดูดอาหารเก่าออก ล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS แล้วบ่มเซลล์ในสารละลาย trypsin - EDTA เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นเคาะเซลล์ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวของจานอาหารเลี้ยงเซลล์ ดูดเซลล์ที่ได้ออกแล้วทำการปั่นแยกเก็บเฉพาะส่วนตะกอนเซลล์ กระจายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ แล้วนำไปเลี้ยงต่อในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น จะทำให้ได้เซลล์ปริมาณเพิ่มมากขึ้น จากนั้นจะเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 2-3 วัน จนมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเต็มพื้นที่ แล้วจึงทำการ subculture ครั้งต่อไป

3. การนับเซลล์ด้วย hemacytometer

เลี้ยงเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม โดยให้มีจำนวนเริ่มต้นที่ 20,000 เซลล์ต่อหลุมต่อ 1 มิลลิลิตรของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อครบระยะเวลาที่ต้องการ ดูดอาหารเก่าทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS 1 ครั้ง แล้วบ่มเซลล์ในสารละลาย trypsin-EDTA ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นใช้ปิเปตดูดเบ่าขึ้นลง 2-3 ครั้ง เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวของจานอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 950 ไมโครลิตร และดูดสารละลายทั้งหมดบรรจุลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปนับด้วยเครื่อง hemacytometer โดยนำมาปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสี trypan blue อัตราส่วน 1:1 แล้วหยอดลงในช่องของ hemacytometer จากนั้นนับเซลล์ที่ได้ผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ แสดงผลที่ได้โดยคำนวณเป็นจำนวนเซลล์ทั้งหมดของแต่ละตัวอย่าง ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งทำซ้ำอย่างน้อย 3 รอบ

4. MTT assay[21]

เลี้ยงเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม โดยให้มีจำนวนเริ่มต้นที่ 20,000 เซลล์ต่อหลุมต่อ 1 มิลลิลิตรของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อครบตามเวลาที่ต้องการดูดอาหารเก่าทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS 1 ครั้ง เติมอาหารใหม่ที่มีส่วนผสมของสาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วดูดอาหารที่มีส่วนผสมของ MTT อยู่ทิ้ง เติมแทนที่ด้วยสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อละลายผลึกสีม่วงที่เกิดขึ้น วัดความเข้มของสีด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ผลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งทำซ้ำอย่างน้อย 3 รอบ

การเลี้ยงเซลล์ Porcine corneal endothelial cells (PCEC) ในหลอดทดลอง

เซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาที่แยกได้สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่กำหนดโดยในช่วงสัปดาห์แรกมีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า มีลักษณะเซลล์ค่อนข้างยาวรี เกาะกันเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ (รูปที่ 2A) ในเวลาสองสัปดาห์พบว่ากลุ่มเซลล์เล็กๆ มีขนาดกว้างขึ้นเนื่องจากมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น (รูปที่ 2B) เมื่อเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ จะมีเซลล์เกือบเต็มช่องของจานอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลมขึ้น บางเซลล์เป็นลักษณะเหลี่ยม (รูปที่ 2C) และเมื่อเลี้ยงไว้เป็นเวลานาน 3-4 สัปดาห์ เซลล์ที่ได้จะมีลักษณะรูปกลมหลายเหลี่ยมมากขึ้น (รูปที่ 2D) และมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นเบียดเกาะอยู่บนพื้นผิวของจานอาหารเลี้ยงเซลล์ทำให้แต่ละเซลล์ดูมีขนาดเล็กลง จึงได้ทำการเพิ่มขยายจำนวนเซลล์ให้มีมากขึ้นอีก โดยการย้ายเซลล์ทั้งหมดจาก 1 ช่องเซลล์ที่ได้ ย้ายลงสู่ขวดอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะเดิมคือ 37 องศาเซลเซียสและมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ซึ่งพบว่าเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นจนเกือบเต็มพื้นที่ของขวดอาหารเลี้ยงเซลล์ภายในระยะเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ และมีลักษณะของเซลล์เป็นรูปกลมหลายเหลี่ยมตรงกับรายงานจากงานวิจัยอื่นๆ[6] จากนั้นจึงได้ทำ subculture หรือ

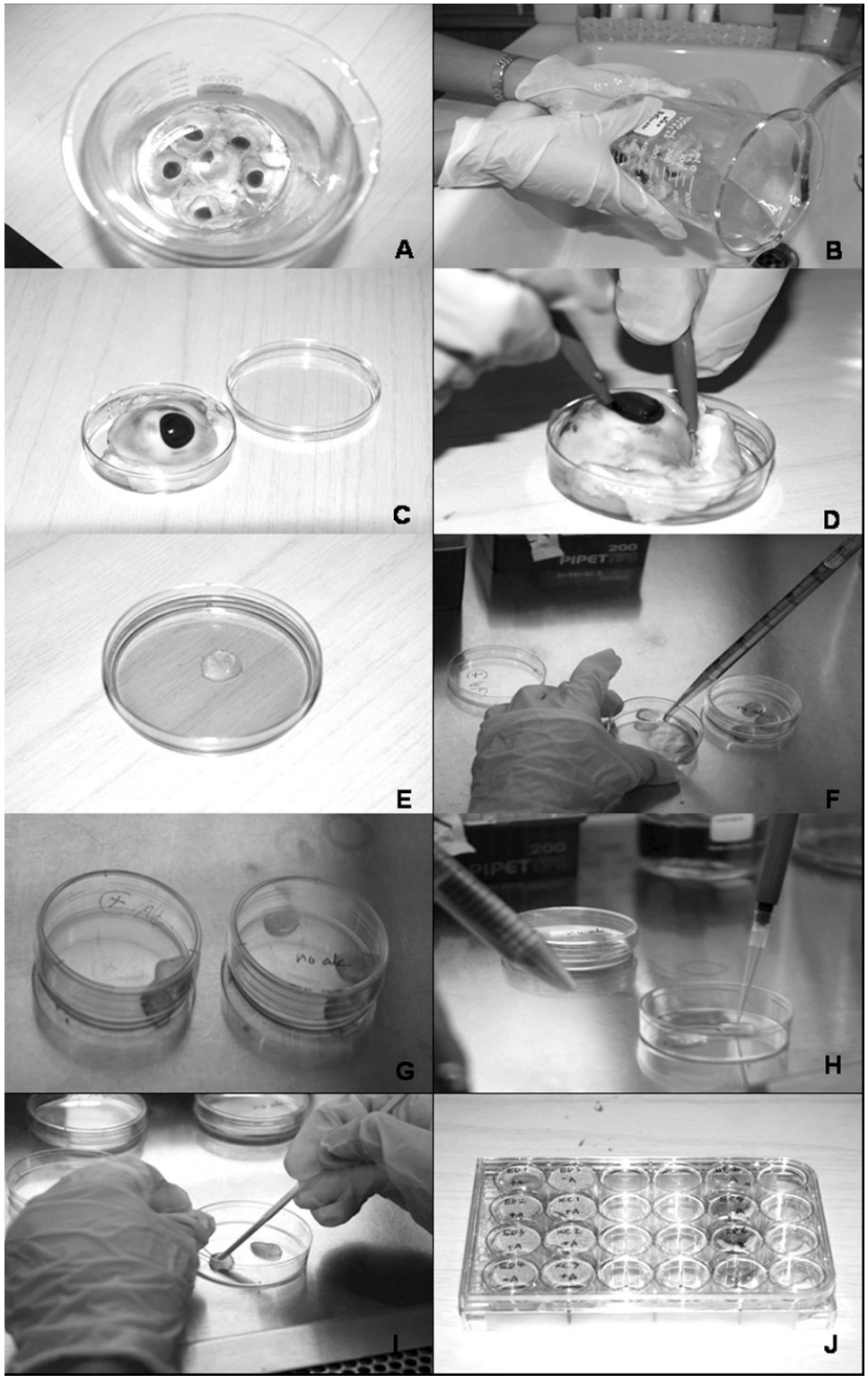

Figure 1 *Primary culture of porcine corneal endothelial cells. The porcine eyes from slaughterhouse (A) were washed several times in distilled water (B). Before removing the corneal part, the porcine eye ball was disinfected with 70% alcohol (C). Then the cornea was carefully excised excluding the scleral ring part (D). Next, the jelly-like cornea (E) was rinsed in fresh medium several times (F-G) before being digested with trypsin-EDTA solution (H). In the last step, the porcine corneal endothelial cells were detached from the corneal stroma using a sterile spatula (I) and cultivated in 24-well plate at 37°C, 5% CO_2 (J). (รูปสีท้ายเล่ม)*

การเพิ่มปริมาณเซลล์จำนวน 2 ครั้ง เพื่อให้มีปริมาณและมีความแข็งแรงมากพอต่อการทดสอบ MTT assay ต่อไป เซลล์ที่ไม่ได้ทดสอบสามารถเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสสำหรับใช้ในการทดสอบอื่นๆต่อไปได้ สำหรับเซลล์ที่ผ่านการ passage ไปเรื่อยๆ พบว่าในช่วงประมาณไม่เกิน passage ที่ 15 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ในขณะที่เมื่อทำการ subculture ไปมากกว่านี้มีเซลล์บางส่วนที่เริ่มเปลี่ยนแปลง คือ จะคงลักษณะของรูปรียาว ไม่เปลี่ยนเป็นรูปหลายเหลี่ยม รวมทั้งเซลล์เริ่มมีการตายได้ง่ายขึ้น การเจริญเติบโตเริ่มช้าลง และเมื่อเลี้ยงต่อไปเซลล์จะเริ่มตายมากขึ้น ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์ primary culture ของเซลล์ปกติจะมีอย่างจำกัด ไม่เหมือนกับเซลล์มะเร็งที่สามารถเลี้ยงในหลอดทดลองได้ไปตลอดเป็นเวลานาน

การติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์

เซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาจำนวนเริ่มต้นที่ 20,000 เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตรต่อหลุมของจานอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 10 วัน ในแต่ละวันแบ่งตัวอย่างทำการทดลอง 2 ชุดๆ ละ 3 ตัวอย่าง ชุดแรกทำการนับจำนวนเซลล์โดยใช้อุปกรณ์ hemacytometer และชุดที่สองทดสอบด้วยสาร MTT ซึ่งผลการทดสอบ (รูปที่ 3) พบว่าเซลล์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเป็นสัดส่วนกับระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในช่วง 6 วันแรก และเริ่มมีจำนวนคงที่เมื่อเข้าสู่วันที่ 7 โดยพบลักษณะของกราฟเช่นเดียวกันทั้ง 2 วิธี แต่จากการหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลองจำนวน 3 ครั้งของแต่ละวิธี พบว่าวิธี MTT assay จะมีค่าต่ำกว่าวิธีการนับด้วย hemacytometer ซึ่งแสดงถึงความน่าเชื่อถือของข้อมูลที่มีมากกว่า

วิจารณ์

กระจกตาเป็นส่วนหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการมองเห็น ประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิด ชั้นนอกสุดเป็นชั้นของ epithelial cells ชั้นกลางคือ stromal ที่มีความหนามากที่สุด ประกอบด้วย fibroblast cells หลายชั้นเรียงตัวกัน ชั้นใน

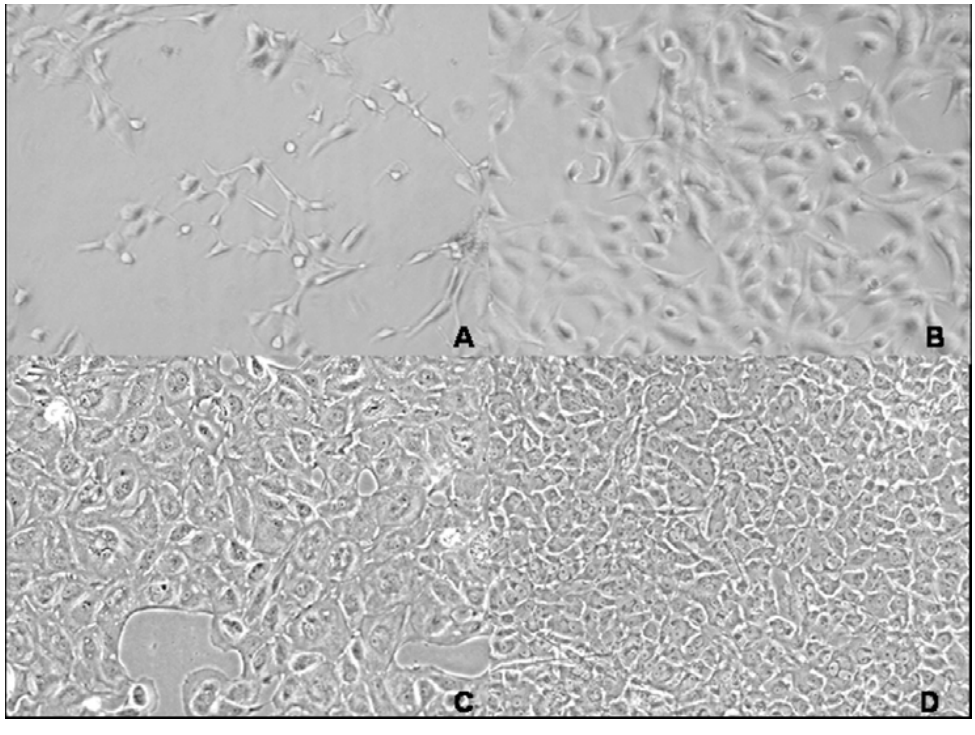

Figure 2 *Phase-contrast of isolated porcine corneal endothelial cells (x20). A) One week after isolation showing low amount of cells, B) The cell number is increased in two weeks, C) The rounded shape morphology of isolated cells, and D) At four weeks, cultivated PCECs present in a more uniform hexagonal shape.*

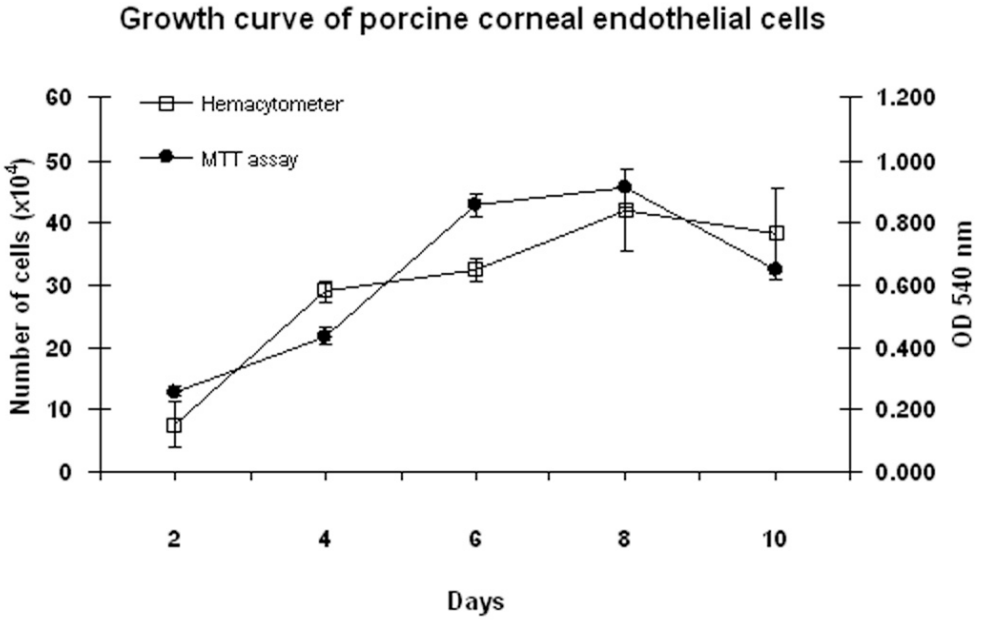

Figure 3 *Proliferation studies of porcine corneal endothelial cells using hemacytometer counting and MTT assay. Growth curves showed an increased in cell number in both methods whilst MTT assay demonstrated a better SD value. The experiments were performed in triplicate and repeated as three times in each experiment.*

สุดหรือ endothelial cells มีความหนาเพียงชั้นเดียวทำหน้าที่ให้กระจกตามีความใสอยู่ตลอด (transparent) โดยอาศัยการทำงานของ Na^+/K^+-ATPase pump ในชั้นนี้จะไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ (non-regeneration) หากได้รับความเสียหายจะทำให้จำนวนเซลล์ลดลงอย่างถาวร และจะชดเชยการทำงาน (compensation) โดยการแผ่ขยายตัวเซลล์ออกให้กว้างขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการควบคุมระดับปริมาณน้ำในกระจกตาลดลงตามอัตราส่วนเซลล์ที่ลดลง และอาจส่งผลกระทบต่อการมองเห็นได้ในที่สุด[3-4]

จากรายงานการวิจัยในปัจจุบันพบว่ามีปัจจัยต่างๆที่อาจส่งผลกระทบต่อปริมาณเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาได้ ได้แก่ ผลของความร้อนที่เกิดขึ้นจากการทำผ่าตัดสลายต้อกระจก phacoemulsification[5,9,11] ผลของสารละลายที่เป็น hypotonic[22] เป็นต้น โดยทำให้จำนวนเซลล์เยื่อบุชั้นในลดลง และเนื่องจากเซลล์เยื่อบุกระจกตาชั้นในไม่สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้อีก การหาสาเหตุของการตายของเซลล์และแนวทางป้องกันจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุด ปัจจุบันจึงมีนักวิจัยมากมายได้ให้ความสนใจและศึกษากลไกการทำงานระดับเซลล์ รวมถึงผลกระทบจากปัจจัยต่างๆที่มีต่อจำนวนเซลล์ โดยวิธีการที่ใช้ในการศึกษามีทั้งการทดสอบในสัตว์ทดลอง การเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง ทั้งจากของคนและจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุกระจกตาชั้นในของจากคนนั้นมีข้อจำกัดที่ตัวอย่างกระจกตาเพื่อนำมาแยกเซลล์นั้นหาได้ยากมาก กระจกตาที่ได้รับบริจาคเป็นสิ่งที่มีค่ามากสำหรับผู้ที่สูญเสียการมองเห็นมากกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง ดังนั้นจึงนิยมที่จะใช้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีความใกล้เคียงมากกว่า โดยเฉพาะหมูที่มีลักษณะทางชีววิทยาของลูกตาคล้ายกับของคน[23] มีรายงานการนำมาใช้เป็นแม่แบบในการศึกษากลไกการทำงานของเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตา ได้แก่ การศึกษาผลของ unoprostone ต่อระดับของแคลเซียม[24] ผลของ povidone iodine ต่อความหนาแน่นของเซลล์[25] ผลของการกำจัดแร่ธาตุเหล็กที่ช่วยทำให้ความเสียหายของเซลล์จากการเก็บในที่เย็นลดลงได้[26] เป็นต้น แสดงถึงความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นแม่แบบในการศึกษาผลกระทบต่างๆ ได้

เซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาหมูที่แยกได้มีลักษณะที่สอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา[27] โดยมีลักษณะของรูปเหลี่ยม hexagonal ไม่มีลักษณะเรียวยาว (spindle shape) ของเซลล์ fibroblast ที่อาจปนเปื้อนจากขั้นตอนการเตรียม ในขณะที่การปนเปื้อนของเซลล์เยื่อบุชั้นนอกนั้นถูกจำกัดใน

ขั้นตอนการแช่ลูกตาหมูใน 70% แอลกอฮอล์ที่ทำให้เซลล์เยื่อบุชั้นนอกส่วนใหญ่ได้รับความเสียหายและไม่สามารถเจริญเติบโตต่อได้ และนอกจากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทดสอบเชี่ยเซลล์เยื่อบุชั้นนอกมาเลี้ยงในสภาวะเดียวกันแต่พบว่าไม่มีเซลล์เจริญเติบโตขึ้นเลย (ไม่ได้แสดงในผลการทดลอง) จึงทำให้มั่นใจได้ว่าไม่มีการปนเปื้อนจากเซลล์ชนิดอื่น

สำหรับการติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์นั้นทำได้หลายวิธี การนับด้วย hemacytometer เป็นวิธีที่มีใช้มานานสะดวก ไม่ยุ่งยาก แต่มีข้อเสียคือมีความผิดพลาดเกิดขึ้นได้ง่ายเพราะเป็นการนับด้วยตาเปล่าผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ ในขณะที่วิธี MTT assay เป็นวิธีการทางชีวเคมีที่มีความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน มีรายงานวิจัยมากมายที่นำวิธีนี้มาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ หรืออาจศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้เซลล์ตายหรืออยู่รอดมากขึ้น[28-30] โดยวิธีนี้ที่อาศัยหลักการว่าเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะยังมีการทำงานของเอนไซม์ในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial dehydrogenase) เอนไซม์นี้จะสามารถเปลี่ยนสาร tetrazolium ที่มีในปฏิกิริยาให้เป็นผลึกสารสีม่วง formazan เซลล์ที่ตายแล้วจะไม่สามารถทำให้ผลึกสาร formazan เกิดขึ้นได้ สีที่เกิดขึ้นจึงสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต หากมีมากก็จะมีผลึกสีม่วงเกิดขึ้นมาก สีที่เกิดขึ้นก็จะเข้ม ค่าของการดูดกลืนแสงก็จะสูงด้วยเช่นกัน ซึ่งจากการติดตามการเจริญเติบโตด้วยวิธีนี้แม้ว่าจะมีหลายขั้นตอนมากกว่าการนับด้วย hemacytometer แต่พบว่ามีค่าความผิดพลาดที่น้อยกว่า การติดตามการเจริญเติบโตด้วยวิธี MTT assay จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมมากกว่าและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบถึงผลกระทบด้านต่างๆ ได้อย่างสะดวก

ดังนั้นจากผลการทดลองจึงกล่าวได้ว่าสามารถเตรียมเซลล์เยื่อบุชั้นในของกระจกตาหมูได้ และนำมาใช้เป็นแม่แบบในการศึกษาผลกระทบต่างๆได้ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ทำได้สะดวก การเตรียมเซลล์เพียงครั้งเดียวก็สามารถมีเซลล์ใช้ได้เป็นระยะเวลานานหลายๆ ครั้ง การทดสอบต่างๆ สามารถทำได้โดยตรงกับเซลล์ เห็นผลในระยะเวลาสั้น และที่สำคัญสามารถจะลดหรืองดการไม่ต้องใช้สัตว์ทดลองเป็นจำนวนมากได้

บทขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเงินสนับสนุนการทำวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2549 ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และหน่วยวิจัยกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในการเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelial: Normal and pathogenic structure and function. Opthalmology 1982;89:531-90.
2. Bourne WM. Chronic endothelial cell loss in transplanted corneas. Cornea 1983;2:289-94.
3. Fischbarg J, Lim JJ. Role of carbons, anions, and carbonic anhydrase in fluid transport across rabbit corneal endothelium. J Physiol 1974;241:647-75.
4. Geroski HH, Matsuda M, Yee RW, Egelhauser HF. Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. Opthalmology 1985;92:759-63.
5. Mencucci R, Ponchietti C, Vangili G, Giansanti F, Menchini U. Corneal endothelial damage after cataract surgery; microincision versus standard technique. J Cataract Refeact Surg 2006;32:1351-4.
6. Walkow T, Anders N, Klebe S. Endothelial cell loss after phacoemulsification: relation to preoperative and intraoperative parameters. J Cataract Refract Surg 2000;26:727-32.
7. van Dooren BT, Mulder PG, Nieuwendaal CP, Beekhuis WH, Melles GR. Endothelial cell density after deep anterior lamellar keratoplasty (Melles technique). Am J Ophthalmol 2004;137:397-400.
8. Suzuki H, Takahashi H, Hori J, Hiraoka M, Igarashi T, Shiwa T. Phacoemulsification associated corneal damage evaluated by corneal volume. Am J Ophthalmol 2006; 142(3):525-8.
9. Lundberg B, Jonsson M, Behndig A. Postoperative corneal swelling correlates strongly to corneal endothelial cell loss after phacoemulsification cataract surgery. Am J Ophthalmol 2005;139(6):1035-41.
10. Yang H, Zheng D, Zhang Z. Effect of intracameral lidocaine anesthesia on the anterior segment of rabbit eyes. Yan Ke Xue Bao 2002;18:54-8, 62.
11. Mencucci R, Ambrosini S, Ponchietti C, Marini M, Vanneli GB, Menchini U. Ultrasound thermal damage to rabbit corneas after simulated phacoemulsification. J Cataract Refeact Surg 2005;31:2180-6.
12. Schellini SA, Creppe MC, Gregório EA, Padovani CR. Lidocaine effects on corneal endothelial cell ultrastructure. Vet Ophthalmol 2007;10(4):239-44.
13. Nemet AY, Assia EI, Meyerstein D, Meyerstein N, Gedanken A, Topaz M. Protective effect of free-radical scavengers on

corneal endothelial damage in phacoemulsification. J Cataract Refract Surg 2007;33(2):310-5.

14. Chang YS, Tseng SY, Tseng SH, Wu CL, Chen MF. Triamcinolone acetonide suspension toxicity to corneal endothelial cells. J Cataract Refract Surg 2006;32(9): 1549-55.
15. Lambert RW, Anderson JA, Heitzmann J, Sutherland CJ, Moore MM, Binder PS. Excimer laser effects on human corneal endothelium. Modulation by serum factor(s). Arch Ophthalmol 1996 Dec;114(12):1499-505.
16. Suh LH, Zhang C, Chuck RS, et al. Cryopreservation and lentiviral-mediated genetic modification of human primary cultured corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007;48(7):3056-61.
17. Park CY, Zhu Z, Zhang C, Moon CS, Chuck RS. Cellular redox state predicts in vitro corneal endothelial cell proliferation capacity. Exp Eye Res 2006;83(4):903-10.
18. Chang CH, Lin CP, Wang HZ. Cytotoxicity of intracameral injection drugs to corneal endothelium as evaluated by corneal endothelial cell culture. Cornea 1995;14(1):71-6.
19. Serbecic N, Beutelspacher SC. Anti-oxidative vitamins prevent lipid-peroxidation and apoptosis in corneal endothelial cells. Cell Tissue Res 2005;320(3):465-75.
20. Wollensak G, Sporl E, Reber F, Piillunat L, Funk R. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. Ophthalmic Res 2003;35:324-8.
21. Uthaisang W, Reutrakul V, Krachangchaeng C, Wilairat P, Fadeel B. VR-3848, a novel peptide derived from Euphobiaceae, induces mitochondria-dependent apoptosis in human leukemia cells. Cancer Lett 2004;208(2):171-8.
22. Meltendorf C, Ohrloff C, Rieck P, Schroeter J. Endothelial cell density in porcine corneas after exposure to hypotonic solutions. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 2007; 245:143-7.
23. Proulx S, Bourget J-M, Gagnon N, et al. Optimization of cultured conditions for porcine corneal endothelial cells. Mol Vision 2007;13: 524-33.
24. Wu KY, Wang HZ, Hong SJ. Mechanism of unoprostone-induced cytosolic Ca^{2+} mobility in cultured porcine corneal endothelial cells. Exp Eye Res 2007;85(2):185-91.
25. Lerhaupt KE, Mauger TF. Corneal endothelial changes from exposure to povidone iodine solution. Cutan Ocul Toxicol 2006;25(2):63-5.
26. Rauen U, Kerkweq U, Wusteman MC, de Groot H. Cold-induced injury to porcine corneal endothelial cells and its mediation by chelatable iron: implications for corneal preservation. Cornea 2006;25(1):68-77.
27. Reichl S, Bednarz J, Muller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. Br J Ophthalmol 2004;88:560-5.
28. Rios JD, Shatos M, Urashima H, Tran H, Dartt DA. OPC-12759 increases proliferation of cultured rat conjunctival goblet cells. Cornea 2006;25(5):573-81.
29. Yoeruek E, Spitzer MS, Tatar O, Aisenbrey S, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Safety profile of bevacizumab on cultured human corneal cells. Cornea 2007;26(8):977-82.
30. Capo-Aponte JE, Wang Z, Bildin VN, Pokorny KS, Reinach PS. Fate of hypertonicity-stressed corneal epithelial cells depends on differential MAPK activation and p38MAPK/Na-K-2Cl cotransporter 1 interaction. Exp Eye Res 2007;84: 361-72.

Case Report/รายงานผู้ป่วย

Intracameral Gnathostomiasis

Pairoj Pipitsangjan, M.D.

Abstract

Gnathostoma spinigerum is the most common tissue parasite infection in Thailand and the second most common ocular parasite. Ocular examination is crucial to proper diagnosis and treatment. Eye is the only organ where parasite can be visualized directly. The rapidly removing parasite is the best treatment which prevent complication and death from systemic migration of parasite. The author reported one patient who presented with painful and blur vision of left eye. The larva of Gnathostoma was found in anterior chamber. Nd YAG laser was used for immobilized parasite before surgical removal. **Thai J Ophthalmol 2008; July-December 22(2): 127-131.**

Department of Ophthalmology Surin Hospital