การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทไตรเจมินาลแบบปฐมภูมิ เพื่อศึกษากลไกการนำความรู้สึกในระดับปลาย

*อันวยา แก้วพิทักษ์**

บทคัดย่อ

*การศึกษากลไกรับความรู้สึกในระดับปลาย ต้องการรูปแบบการทดลองที่สามารถวิเคราะห์ผลของความเปลี่ยนแปลงทั้งในระดับเซลล์และโมเลกุล โดยการศึกษาการรับความรู้สึกในบริเวณขากรรไกรและใบหน้าสามารถใช้เซลล์ประสาทจากปมประสาทไตรเจมินาลมาเป็นตัวแทนการรับความรู้สึกบริเวณนี้ได้ **วัตถุประสงค์**ของการทดลองนี้คือเพื่อพัฒนาวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อประสาทไตรเจนินาลในห้องปฏิบัติการ ให้สามารถเติบโตได้ดีและพร้อมนำไปใช้ในการทดลองต่อไปได้ **วัสดุและวิธีการ**จะเน้นไปที่วิธีและขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อและแสดงขั้นตอนของการเตรียมเซลล์ในห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นปมประสาทไตรเจมินาลที่ได้มาจากหนู **ผลการทดลอง**นี้แสดงถึงการเติบโตได้ดีของเซลล์ประสาทไตรเจมินาลเมื่อมีการเลี้ยงในความหนาแน่นที่สูงและเวลาที่เหมาะสมในการนำเซลล์ประสาทมาศึกษาคือไม่เกิน 2 วันในห้องปฏิบัติการ นับแต่การแยกเนื้อเยื่อออกจากหนู **สรุป**ได้ว่าการใช้ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อและขั้นตอนของการเตรียมเซลล์ดังบทความนี้สามารถเป็นแบบเครื่องมือพื้นฐานสำหรับการศึกษากลไกในระดับปลายของการรับความรู้สึกในบริเวณขากรรไกรและใบหน้าต่อไปได้*

***คำสำคัญ**: trigeminal; primary cell culture; neuron; orofacial pain; ICR mouse*

* *อาจารย์ประจำภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*

บทนำ

การศึกษากลไกการเจ็บปวดนั้นอาจมีทางเลือกได้หลายวิธี ทั้งการใช้การทดลองที่ศึกษาพฤติกรรมในสัตว์ทดลองเมื่อให้สิ่งกระตุ้นที่หลากหลาย หรือเป็นได้ทั้งการศึกษาในระดับเนื้อเยื่อและโมเลกุล [1-3] ซึ่งการมีเครื่องมือในการทดลองอย่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการที่ดี สามารถนำไปต่อยอดเพื่อการศึกษาอื่นๆได้ เช่นการศึกษากลไกการเกิดกระบวนการอักเสบหรือการศึกษาการแสดงออกของเซลล์ในภาวะต่างๆ และเนื่องจากการศึกษากลไกการนำความรู้สึกในระดับเนื้อเยื่อและโมเลกุลจำเป็นต้องลอกเลียนลักษณะทางคลินิกได้จริง [4] และด้วยเงื่อนไขทางจริยธรรม ทำให้การศึกษาทางประสาทวิทยาหรือการศึกษากลไกความเจ็บปวดในระดับที่ใช้ในสัตว์ทดลองเป็นไปได้อย่างจำกัด

ในระยะหลังจึงมีการพยายามพัฒนาการศึกษาในระดับเนื้อเยื่อและโมเลกุลมากขึ้น คุณค่าสำคัญอีกประการของการศึกษาเซลล์ประสาทในห้องปฏิบัติการคือการที่ผู้วิจัยสามารถแยกชนิดเซลล์ที่ต้องการศึกษาได้ โดยผลการศึกษาจะไม่ได้รับผลกระทบจากเซลล์ที่เป็นตัวแปรปรวนอื่นๆในการกระบวนการวิจัย โดยวัตถุประสงค์หลักของการทดลองนี้คือเพื่อการพัฒนาระบบการเลี้ยงเซลล์ประสาทไตรเจมินาล ให้เซลล์มีความสมบูรณ์และพร้อมสำหรับการทดลองในห้องปฏิบัติการต่อไป โดยเฉพาะเพื่อการศึกษาการนำความรู้สึกส่วนปลาย

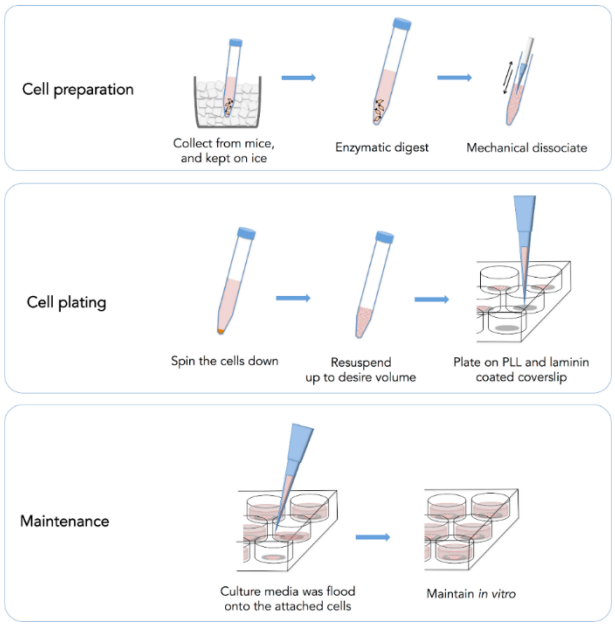
วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง: ปมประสาทไตรเจมินาลได้รับมาจากหนูสายพันธุ์ ICR เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 30-35 กรัม ซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 25±2°C ความชื้นสัมพัทธ์ 50% ให้แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง โดยสัตว์ทดลองได้รับอาหารมาตรฐานและน้ำดื่มตลอดเวลา ในการเตรียมสัตว์ทดลอง จะมีการทำให้หนูสลบด้วย isoflurane ที่เกินขนาด แล้วตามด้วยการทำ cervical dissociation ตามขั้นตอนของ Animal Surgical Procedure Act (ASAP) ของ UK Home Office และปมประสาทไตรเจมินาลจะได้รับการแยกออกมาทันทีในเวลาไม่เกิน 15 นาที เพื่อเพิ่มอัตราการรอดของเซลล์ประสาทก่อนที่เซลล์จากปมประสาทจะได้รับการแยกในห้องปฏิบัติการต่อไป ขั้นตอนการเตรียมสัตว์ทดลองอยู่ภายใต้การรับรองทางจริยธรรมของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เลขที่ 2560-01-011

ขั้นตอนการเตรียมปมประสาทไตรเจมินาล: นำซากหนูที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น ทำการแยกกะโหลกส่วนบนของหนูออกด้วยกรรไกรแยกกระดูก จากนั้นยกสมองออก จะพบตำแหน่งปมประสาทไตรเจมินาลของหนูได้อย่างชัดเจน จากนั้นให้ทำการแยกปมประสาทไตรเจมินาลทั้ง 2 ข้างออกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำใส่ในสารละลาย Hank's balance salt ที่บรรจุอยู่ในน้ำแข็ง ก่อนล้างด้วยสารละลาย Hank's balance salt ที่ มี 1 % Penicillin and streptomycin ทำการล้าง 2 รอบ ก่อนนำปมประสาทที่

ได้จากขั้นตอนนี้ไปห้องปฏิบัติการเนื้อเยื่อต่อไปภายในระยะเวลาไม่เกิน 15 นาที

ขั้นตอนในห้องปฏิบัติการเนื้อเยื่อ: วิธีการที่จะอธิบายต่อไปนี้ เป็นการปรับขั้นตอนการเพาะเลี้ยงมาจากการเพาะเลี้ยงปมประสาทรากหลัง (dorsal root ganglia) โดยปมประสาทไตรเจมินาลที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นจะถูกย่อยในสารละลาย 1.25% (w/v) collagenase type IV ใน DMEM/F12 ก่อน 2 รอบ รอบแรกเป็นเวลา 60 นาที และรอบหลังเป็นเวลา 45 นาที ใน 5% CO_2, 37°C จากนั้นจะทำการล้างเนื้อเยื่อจากขั้นตอนที่แล้วก่อนนำมาย่อยอีกรอบในสารละลาย 1.25% (w/v) trypsin ใน DMEM/F12 เป็นเวลา 15 นาที ใน 5% CO_2, 37°C หลังจากที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ประเภทแล้วทำการหยุดการทำงานของ trypsin ด้วย 50% fecal calf serum เป็นเวลา 3-5 นาที ก่อนที่เนื้อเยื่อจะถูกแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆด้วยการใช้การสูบขึ้นลงผ่านปลายพลาสติกไปเปตขนาด 1000 µL อย่างเบามือไม่เกิน 20 รอบ จนกว่าปมประสาทจะละลายเข้ากับสารละลาย 50% fecal calf serum จนมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันก่อนนำไปล้าง 2 รอบใน DMEM/F12 ด้วยการเหวี่ยงสารละลายใน centrifuge ที่ 900 RPM เป็นเวลา 10 นาที ขั้นตอนต่อไปสามารถกำหนดความหนาแน่นของเซลล์ได้ด้วยการกำหนดปริมาณสารเลี้ยงเซลล์ตามความต้องการ จากนั้นทำการวางเซลล์บนผิวจานเลี้ยงที่ได้รับการเคลือบผิวด้วย poly-l-lysine และลามินินตามขั้นตอนที่ผู้ผลิตแนะนำ รักษาเซลล์ที่ทำการวางบนจานเลี้ยงแล้วไว้ในตู้เลี้ยงที่ 5% CO_2, 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนที่จะให้อาหารแก่เซลล์ผ่านสารละลาย Bottenstein and Sato (DMEM/F12 ที่มี 1% PS 1% N_2 supplement 1% bovine serum albumin)[5] จากนั้นเซลล์จะถูกเลี้ยงต่อใน 5% CO_2, 37°C และควรมีการเปลี่ยนสารเลี้ยงหลัง 24 ชั่วโมงแรกปริมาณครึ่งหนึ่งของสารเลี้ยง และเปลี่ยนอีกครั้งทุก 48 ชั่วโมง ขั้นตอนทั้งหมดดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1. ขั้นตอนการปฏิบัติการในห้องทดลองเพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทไตรเจมินาล

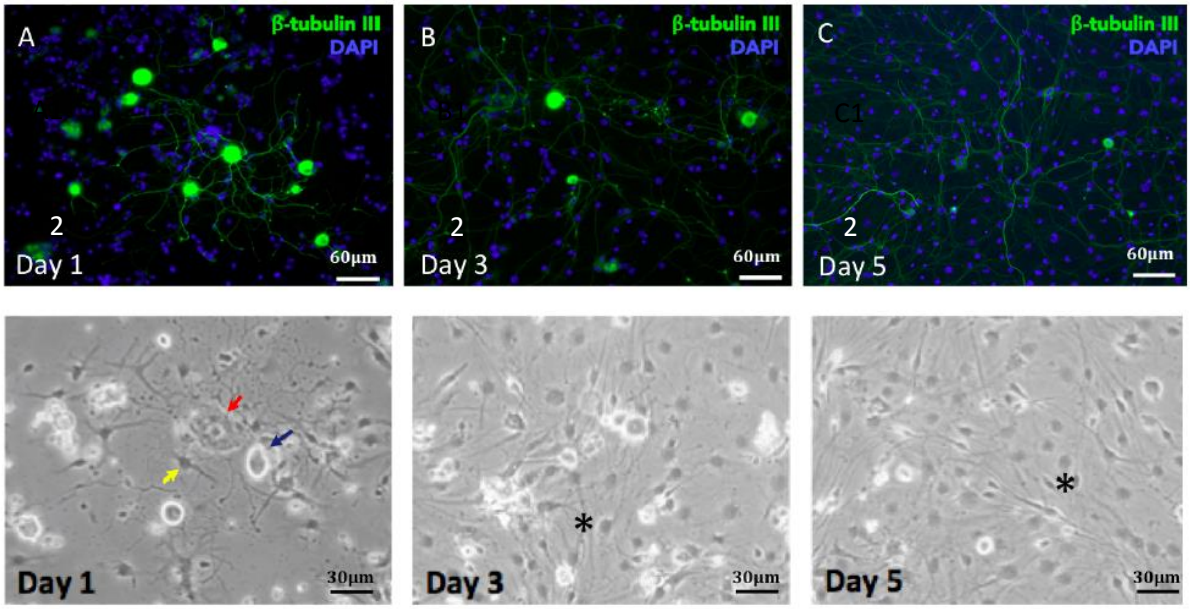
ปมประสาทถูกเก็บในสารละลาย HBSS ที่บรรจุในถังน้ำแข็ง ก่อนนำมาย่อยในสารละลาย collagenase และ trypsin ใน 5% CO2, 37°C ก่อนที่เนื้อเยื่อจะถูกแยกเป็นเซลล์เดี่ยว ด้วยการใช้การสูบขึ้นลงผ่านไปเปตอย่างเบามือ จนกว่าปมประสาทจะละลายเข้ากับสารละลายจนมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนทำการเหวี่ยงสารละลายใน centrifuge เพื่อล้างเอนไซม์ต่างๆในขั้นต้น จากนั้นทำการวางเซลล์บนผิวจานเลี้ยงที่ได้รับการเคลือบผิวด้วย poly-l-lysine และลามินิน แล้วทำการรักษาเซลล์ที่วางบนจานเลี้ยงแล้วไว้ในตู้เลี้ยงที่ 5% CO2, 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนที่จะให้อาหารแก่เซลล์ผ่านสารละลาย Bottenstein and Sato จากนั้นเซลล์จะถูกเลี้ยงต่อใน 5% CO2, 37°C และเปลี่ยนสารเลี้ยงหลัง 24 ชั่วโมงแรกปริมาณครึ่งหนึ่งของสารเลี้ยง และเปลี่ยนอีกครั้งทุก 48 ชั่วโมง

Immunofluorescence: หลังจากเซลล์ประสาทถูกเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงบนแผ่นแก้ว เซลล์จะถูกล้างด้วย 0.1 M PBS 2 ครั้งก่อนที่เซลล์จะถูกผนึกด้วย 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 45 นาที โมเลกุลไม่จำเพาะต่างๆจะถูกสกัดกั้นด้วย 10% normal donkey serum ใน 0.5% Triton X-100 ใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเซลล์ที่อยู่บนแผ่นแก้วจะถูกย้อมด้วยแอนติ้บอดี้ขั้นแรกเพื่อระบุลักษณะเฉพาะของเซลล์ประสาท คือ β-tubulin III (anti-mouse β-tubulin III) ใน 1% NDS และ 0.5% Triton X-100 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเซลล์จะถูกล้างใน 0.5% Triton X-100 ใน PBS เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจะถูกย้อมด้วยแอนติ้บอดี้ในขั้นที่สอง (donkey anti-mouse conjugate FITC) ใน 1% NDS และ 0.5% Triton X-100 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายเซลล์จะถูกล้างด้วย 0.5% Triton X-100 ใน PBS เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปยึดเข้ากับแผ่นแก้วด้วย Vectashield contained DAPI และนำไปศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูโอเรสเซนต์ต่อไป [6-7]

ผลการศึกษา

การใช้ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามขั้นตอนดั้งเดิมที่ปรับจากการเลี้ยงเซลล์ประสาทจากปมประสาทรากหลัง จะพบว่ามีการเติบโตของเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เซลล์ประสาท (non-neuronal cells) เกิดขึ้นจนทดแทนตำแหน่งของเซลล์ประสาทไปจนมีจำนวนของเซลล์ประสาทลดลงตั้งแต่การเพาะเลี้ยงในวันที่ 3 เป็นต้นไป ดังแสดงในรูปที่ 2 แสดงลักษณะของเซลล์จากปมประสาทไตรเจมินาลด้วยวิธีที่ใช้กับปมประสาทหลัง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast ที่เลี้ยงไว้ 1 วัน 3 วันและ 5 วัน โดยเซลล์ที่เลี้ยงไว้ 1 วัน แสดงลักษณะของเซลล์หลากหลายรูปร่าง ทั้งที่เป็นทรงกลม มีลักษณะขาวเป็นวงโดยรอบบ่ง

บอกถึงลักษณะของเซลล์ประสาท รูปกระสวยบ่งบอกถึงลักษณะของเซลล์แซทเทลไลท์เกลีย (Sattelite glia cells) และเซลล์สีเข้มขนาดใหญ่บ่งบอกถึงลักษณะของ fibroblast ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในวันที่ 3 - 5 แสดงลักษณะของเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ประสาทรวมตัวกันหนาแน่นขึ้น และยิ่งมีการรวมตัวกันหนาแน่นขึ้นของเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ประสาท จนแทรกทับเซลล์ประสาทในวันหลังๆ ของการเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 2. ลักษณะของเซลล์จากปมประสาทไตรเจมินาลในวันที่ 1 วันที่ 3 และวันที่ 5

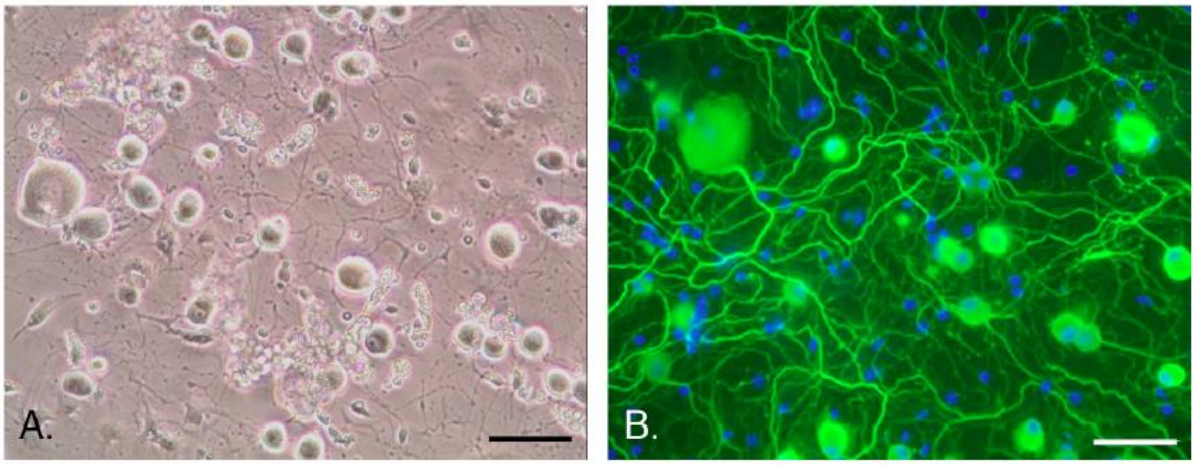
A1-C1 แสดงลักษณะของเซลล์จากปมประสาทไตรเจมินาลด้วยวิธีที่ใช้กับปมประสาทหลัง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast ที่เลี้ยงไว้ 1 วัน 3 วันและ 5 วัน โดย A1 คือเซลล์ที่เลี้ยงไว้ 1 วัน แสดงลักษณะของเซลล์หลากหลายรูปร่าง ทั้งที่เป็นทรงกลม มีลักษณะขาวเป็นวงโดยรอบบ่งบอกถึงลักษณะของเซลล์ประสาท (ลูกศรสีน้ำเงิน) รูปกระสวยบ่งบอกถึงลักษณะของเซลล์พี่เลี้ยง (ลูกศรเหลือง) และเซลล์สีเข้มขนาดใหญ่บ่งบอกถึงลักษณะของ fibroblast (ลูกศรแดง) B1 คือเซลล์ที่เลี้ยงไว้ 3 วัน แสดงลักษณะของเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ประสาทรวมตัวกันหนาแน่นขึ้น (ดอกจัน) C1 คือเซลล์ที่เลี้ยงไว้ 5 วัน แสดงลักษณะของการรวมตัวกันหนาแน่นขึ้นของเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ประสาท (ดอกจัน) ซึ่งแสดงถึงการเจริญของเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ประสาทที่แทรกทับเซลล์ประสาทในวันหลังๆของการเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ (มาตราส่วนรูปภาพคือ 30 μm)

A2-C2 แสดงลักษณะของเซลล์จากปมประสาทไตรเจมินาลด้วยวิธีที่ใช้กับปมประสาทหลัง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่เลี้ยงไว้ 1 วัน 3 วันและ 5 วัน โดย A2 คือเซลล์ที่เลี้ยงไว้ 1 วัน แสดงการย้อมฟลูออ

เรสเซนต์ด้วยตัวบ่งชี้เซลล์ประสาท (β-tubulin III) (สีเขียว) ร่วมกับตัวบ่งชี้นิวเคลียส (DAPI) (สีฟ้า) ซึ่งแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากปมประสาทไตรเจมินาลภายใน 5 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นการลดลงของเซลล์ประสาท ซึ่งถูกแทนที่ด้วยเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ประสาทซึ่งสามารถแพร่ขยายได้รวดเร็วภายใน 5 วัน (มาตราส่วนรูปภาพคือ 60 μm)

ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่เลี้ยงไว้ 1 วัน 3 วันและ 5 วัน ซึ่งแสดงไว้ด้วยตัวบ่งชี้เซลล์ประสาท (β-tubulin III) ร่วมกับตัวบ่งชี้นิวเคลียส (DAPI) ก็แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากปมประสาทไตรเจมินาลภายใน 5 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นการลดลงของเซลล์ประสาท และถูกแทนที่ด้วยเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ประสาทซึ่งสามารถแพร่ขยายได้รวดเร็วภายหลังการเพาะเลี้ยงในวันที่ 3

ในขณะที่การปรับวิธีการเลี้ยงโดยการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ต่อพื้นที่ และทำการเลือกใช้เซลล์ในวันที่ 2 จะทำให้มีสัดส่วนของเซลล์ประสาทเติบโตได้ดี ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 3 การเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 2 ซึ่งเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ในขั้นตอนการวางบนจานเลี้ยง จะซึ่งแสดงถึงการรวมตัวกันอย่างแน่นหนาและเชื่อมต่อกันของแขนงเซลล์ (neuronal network) และแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ประสาทนั้นก็มีความหนาแน่นน้อยลง ดังแสดงในรูปที่ 3 ภาพ A จากกล้องจุลทรรศน์ phase contrast และภาพ B ซึ่งแสดงการย้อมฟลูออเรสเซนต์ด้วยตัวบ่งชี้เซลล์ประสาท (β-tubulin III) ร่วมกับตัวบ่งชี้นิวเคลียส (DAPI)



รูปที่ 3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทไตรเจมินาลด้วยวิธีเดิม แต่เพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ต่อพื้นที่
การเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 2 แสดงลักษณะของเซลล์จากปมประสาทไตรเจมินาลด้วยวิธีที่ใช้กับปมประสาทหลังภายใต้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast ที่เลี้ยงไว้ 2 วัน ซึ่งแสดงถึงการรวมตัวกันอย่างแน่นหนาและเชื่อมต่อกันของแขนงเซลล์ (neuronal network) และแสดงให้เห็นว่าเซล์ที่ไม่ใช่เซลล์ประสาทนั้นก็มีความหนาแน่นน้อยลง ดังแสดงในภาพ A จากกล้องจุลทรรศน์ phase contrast และภาพ B ซึ่งแสดงการย้อมฟลูออเรสเซนต์ด้วยตัวบ่งชี้เซลล์ประสาท (β-tubulin III) (สีเขียว) ร่วมกับตัวบ่งชี้นิวเคลียส (DAPI) (สีฟ้า) (มาตราส่วนรูปภาพคือ 60 μm)

<u>วิจารณ์</u>

เป้าหมายสำคัญของการศึกษานี้คือเพื่อพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสาทรับความรู้สึกส่วนปลาย โดยเฉพาะเนื้อเยื่อประสาทไตรเจมินาลเพื่อใช้เป็นตัวแทนศึกษากลไกการรับความรู้สึกในบริเวณขากรรไกรและใบหน้า โดยวัตถุประสงค์เดิมของการศึกษานี้คือเพื่อแยกเฉพาะเซลล์ประสาทออกจากเซลล์อื่นๆ แต่เพราะเซลล์ประสาทในระดับปลายต้องการการทำงานที่สอดคล้องกันกับเซลล์พี่เลี้ยง (satellite glial cells) [1, 3, 8-9] ดังแสดงจากลักษณะของปมประสาทไตรเจมินาลที่เซลล์ประสาทจะถูกห่อหุ้มอย่างแนบชิดไปกับเซลล์พี่เลี้ยง และช่วยกันทำงานเป็นหน่วยเดียวกัน เพื่อทำหน้าที่ในการสนับสนุนและส่งเสริมสภาวะสมดุลของเซลล์ประสาท [1, 3, 9]

การนำเซลล์เนื้อเยื่อประสาทไตรเจมินาลไปใช้ในงานวิจัยอื่นๆสามารถทำได้หลากหลาย เช่นเพื่อการศึกษากลไกธรรมชาติของเซลล์ในการตอบสนองต่อสิ่งต่างๆทดแทนการใช้การทดลองในสัตว์ รวมถึงใช้เป็นการศึกษาเบื้องต้นสำหรับการทดลองทางเภสัชวิทยา [12] ก่อนจะมีการวิจัยในระดับคลินิก และประโยชน์เด่นที่สุดคือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสาทบนแผ่นแก้วคือสามารถใช้ได้ดีในการศึกษาและบันทึกการตอบสนองทางไฟฟ้าของเซลล์ประสาท [13]

แม้จะพบข้อจำกัดสำคัญของการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทในห้องปฏิบัติการ เช่น อาจจะมีลักษณะบางประการร่วมกับเซลล์ที่กำลังซ่อมแซมตัวเอง เนื่องจากกระบวนการในห้องปฏิบัติการที่ต้องมีการกระทบกระเทือนต่อเนื้อเยื่อบ้าง เช่นการใช้ trypsin หรือ collagenase แยกเนื้อเยื่อ ทำให้เซลล์ตอบสนองต่อการกระทบกระเทือนนั้นด้วยการซ่อมแซมตัวเอง [14] แต่อย่างไรก็ตามหลายการศึกษาก็สนับสนุนว่าการศึกษาด้วยเซลล์เนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการของเซลล์ประสาทยังเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพดี [10, 15] เพื่อการศึกษากลไกการตอบสนองทางประสาทวิทยา โดยเฉพาะการศึกษากลไกการรับ

ความรู้สึกในระดับปลาย และการพัฒนาการเลี้ยงเนื้อเยื้อด้วยวิธีนี้ แสดงให้เห็นว่าการใช้เวลาในห้องปฏิบัติการที่ลดลงจากวิธีมาตรฐานเดิมนั้นให้เซลล์ประสาทที่มีสภาพสมบูรณ์ พร้อมสำหรับเป็นเครื่องมือในการทดลองต่อไป

สรุป

ลักษณะที่แตกต่างระหว่างเซลล์ประสาทและเซลล์พี่เลี้ยง นอกจากจะเป็นเรื่องรูปร่างภายนอกของเซลล์แล้ว ลักษณะทางห้องปฏิบัติการที่มีผลต่อการศึกษานี้คือการที่เซลล์ประสาทรับความรู้สึกส่วนปลายนั้นไม่สามารถแบ่งตัวได้ในห้องปฏิบัติการ แต่ในขณะที่เซลล์พี่เลี้ยงหรือเซลล์ปนเปื้อนอื่นๆในระบบเพาะเลี้ยงสามารถเติบโตได้ดีและรวดเร็วในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเป็นต้นมา นี่ทำให้เป็นอุปสรรคหนึ่งในการรักษาสภาพของการเพาะเลี้ยงให้อยู่ได้นาน แม้การเติม mitotic inhibitor อาจจะช่วยยับยั้งการเติบโตของเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ประสาทได้ แต่อาจส่งผลรบกวนสภาพเพื่อการทดลองในการการทดลองต่อๆไป จากการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าการทดลองใดๆที่ใช้เซลล์นี้ ควรดำเนินการภายในวันที่ 2 เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่เซลล์มีสภาพที่สมบูรณ์พร้อมแล้ว และการเลี้ยงไว้นานเกินไปจะทำให้มีเซลล์ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นมากเกินไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่เอื้อเฟื้อเวลาและเงินทุนเบื้องต้นในการศึกษาครั้งนี้ รวมทั้งเงินทุนวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หมายเลข DEN600612S-0

เอกสารอ้างอิง

1. *Villa G, Fumagalli M, Verderio C, Abbracchio MP, Ceruti S. Expression and contribution of satellite glial cells purinoceptors to pain transmission in sensory ganglia: an update. Neuron Glia Biol. 2010; 6(1): 31-42.*
2. *Hanani M. Role of satellite glial cells in gastrointestinal pain. Front Cell Neurosci. 2015; 9(October): 1-10.*
3. *Costa FAL, Neto FLM. Satellite glial cells in sensory ganglia: its role in pain. Brazilian J Anesthesiol (English Ed). 2015; 65(1): 73-81.*
4. *Higginns D, Banker G. Primary dissociated cell cultures. In: Stevens CF, ed. Culturing Nerve Cells. 2nd ed. The MIT Press; 1998: 37-78.*
5. *Daly W., Yao L., Zeugolis D., Windebank A., APandit A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. J R Soc Interface. 2012; 9: 202-221*
6. *Rodd H D. and Boissonade F M. Comparative immunohistochemical analysis of the peptidergic innervation of human primary and permanent tooth pulp. Arch Oral Biol. 2002; 47: 375-85.*
7. *Rodd H D and Boissonade F M.* Immunocytochemical investigation of

neurovascular relationships in human tooth pulp. *J Anat. 2003; 202:195-203.*

8. *Kushnir R, Cherkas PS, Hanani M. Peripheral inflammation upregulates P2X receptor expression in satellite glial cells of mouse trigeminal ganglia: A calcium imaging study. Neuropharmacology. 2011; 61(4): 739-746.*
9. *Hanani M. Role of satellite glial cells in gastrointestinal pain. Front Cell Neurosci. 2015; 9(October): 1-10.*
10. *Poulsen JN, Larsen F, Duroux M, Gazerani P. Primary culture of trigeminal satellite glial cells: A cell-based platform to study morphology and function of peripheral glia. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2014; 6(1): 1-12.*
11. *Takeda M, Takahashi M, Matsumoto S. Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain. Neurosci Biobehav Rev. 2009; 33: 784-792.*
12. *He Y, Baas PW. Growing and working with peripheral neurons. Methods Cell Biol. 2003; 71:17-35.*
13. *Malin SA, Davis BM, Molliver DC. Production of dissociated sensory neuron cultures andconsiderations for their use in studying neuronal function and plasticity. Nat Protoc. 2007; 2(1): 152-160.*
14. *Ma W, Dumont Y, Vercauteren F, Quirion R. Lipopolysaccharide induces calcitonin generelated peptide in the RAW264.7 macrophage cell line. Immunology. 2010; 130(3): 399-409.*
15. *Passmore GM. Dorsal root ganglion neurones in culture: A model system for identifying novel analgesic targets? J Pharmacol Toxicol Methods. 2005; 51(3 SPEC.ISS.): 201-20*

ผู้รับผิดชอบบทความ

อันวยา แก้วพิทักษ์

ภาควิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

โทร. 074-287-601, 084-858-4488

โทรสาร. 074-429-875

E-mail: aunwaya.k@psu.ac.th

Trigeminal neuron primary cultures for peripheral sensitization studying

*Aunwaya Kaewpitak**

Abstract

There are various options for studying peripheral sensitization and pain, in both cellular and molecular levels. Orofacial pain study could be represented by using trigeminal ganglia culture. The aim of this study was to develop the tissue culture of trigeminal neurons to grow healthily in laboratory conditions. Material and methods were underlined the processes to prepare trigeminal ganglia dissected from the mice. From this study, it showed that cultured cells from trigeminal ganglia were well flourished with high density in the first 2 days in the cultures. Conclusion, the processes from this study could be used to prepare the trigeminal neurons and the supporting cells which are the foundation for molecular study of peripheral sensitization. This culture system could be the representative for orofacial peripheral sensitization study.

**Lecturer; Preventive Department, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University*