



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การศึกษาบทบาทของ HNK-1 ต่อการอพยพของนิวรัล
เครสเซลล์ในตัวอ่อนของหนู

โดย นางสาว สุกนธา เจริญวิทย์ และคณะ

30 มิถุนายน พ.ศ. 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาบทบาทของ HNK-1 ต่อการอพยพของนิวรัลเครส
เซลล์ในตัวของหนู

ผู้วิจัย

นางสาว สุคนธา เจริญวิทย์

สังกัด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความคิดเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ รศ. ทพญ. ดร. วันดี อภินหสมิต ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Professor Kazuhiro Eto, Department of Molecular Craniofacial Embryology, Graduate of Tokyo Medical and Dental University ประเทศญี่ปุ่น ที่ได้กรุณาสละเวลาเป็นนักวิจัยที่ปรึกษา

ขอขอบคุณ Dr. Michio Fujiwara, Medicinal Safety Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Company, Tokyo, Japan ที่กรุณามอบหนู mutant rat small eye จำนวน 12 ตัวเพื่อเป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ ในการสร้าง colony ของหนูชนิดนี้ในประเทศไทย และได้ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษา

ขอขอบคุณ Dr. Sachiko Iseki, Department of Molecular Craniofacial Embryology, Graduate of Tokyo Medical and Dental University ประเทศญี่ปุ่น ที่กรุณาสับสนุนวัสดุทางวิทยาศาสตร์บางส่วน

ขอขอบคุณ คุณอมร หงษา คุณสังคม พิมลี คุณวิไลพร ทองมอญ คุณพรทิพา จำปา ที่ให้ความช่วยเหลือในการเลี้ยงหนู ทำการปลอดเชื้ออาหาร น้ำ และดูแลทำความสะอาดห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG4580022

ชื่อโครงการ : การศึกษาบทบาทของHNK-1ต่อการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ในตัวของหนู

ชื่อนักวิจัย : สุคนธา เจริญวิทย์
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : suconta.c@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2545 – 30 มิถุนายน พ.ศ. 2547

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษารูปแบบการกระจายตัวของ HNK-1 ณ เวลาที่มีการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ในตัวอ่อนของหนูแรทสายพันธุ์ Sprague- Dawley เปรียบเทียบกับหนูกลายพันธุ์ในสายพันธุ์เดียวกัน คือ Rat small eye (*rSey*)

วิธีทดลอง : ศึกษาแบบการกระจายตัวของ HNK-1 ในตัวอ่อนระยะ Day-10 wild type และ homozygous *rSey* โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ โดยต้องทำการแยกว่าตัวอ่อนใดเป็น homozygous *rSey* โดยการตรวจหา Pax-6 protein โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้เช่นกัน

ผลการทดลอง: ผลการศึกษาการกระจายตัวของ HNK-1 ในตัวอ่อนปกติพบว่า ก่อนที่นิวรัลเครสเซลล์จะเริ่มอพยพจะพบ HNK-1 กระจายตัวอยู่ทั่วไปใน mesenchyme ตามเส้นทางการอพยพ และการกระจายตัวจะค่อยๆหายไปจาก mesenchyme บริเวณด้านข้างของตัวอ่อนซึ่งเป็นบริเวณที่มีนิวรัลเครสเซลล์เริ่มเคลื่อนตัวมาปะปนอยู่ นอกจากนี้ใน homozygous *rSey* พบว่า HNK-1 มีการกระจายตัวอยู่อย่างผิดปกติอยู่ตามเส้นทาง ณ เวลาของการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง : จากผลการทดลองพบว่า HNK-1 มีการกระจายตัวใน mesenchyme ตามเส้นทางการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ ณ เวลาที่สอดคล้องกับการอพยพ ร่วมกับการกระจายตัวที่ผิดปกติใน homozygous *rSey* ซึ่งพบว่ายังคงมีการกระจายตัวของ HNK-1 อยู่ใน mesenchyme ตามเส้นทางการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ ซึ่งจากรูปแบบการกระจายตัวนี้แสดงให้เห็นว่า HNK-1 น่าจะมีบทบาทในการยับยั้งการเคลื่อนตัวของนิวรัลเครสเซลล์ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของกลุ่มนักวิจัยชาวญี่ปุ่นที่ศึกษาบทบาทของ HNK-1 ในจานเพาะเลี้ยง และได้รายงานว่า HNK-1 มีบทบาทในการยับยั้งการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ในจานเพาะเลี้ยง

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต : การศึกษารูปแบบการกระจายตัวของ HNK-1 ในการศึกษาเป็นเพียงส่วนหนึ่งของการศึกษาบทบาทของ HNK-1 ต่อการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ในตัวอ่อนของหนู ยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการศึกษานี้ แต่เนื่องจากมีกลุ่มนักวิจัยชาวญี่ปุ่นได้ทำการศึกษาครอบคลุมส่วนที่เราควรจะศึกษาต่อไป คือ ส่วนของการศึกษาในจานเพาะเลี้ยง และยืนยันที่น่าจะเกี่ยวข้อง ตามที่ได้แจ้งปัญหาในรายงานความก้าวหน้าที่ผ่านมา อย่างไรก็ตามการที่เรามี colony ของ rat small eye ในประเทศไทย ทำให้เรามีตัวอย่างที่ดีในการศึกษาความผิดปกติอื่นๆ เช่น การสร้างฟัน

คำหลัก HNK-1, rat small eye, Pax-6, neural crest cell

Abstract

Project Code : TRG4580022

Project Title : Study on role of HNK-1 on migration of neural crest cell in rat embryos

Investigator : Suconta Chareonvit

Department of Anatomy, Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

E-mail Address : suconta.c@chula.ac.th

Project Period : 1 July 2002 – 30 June 2004

Abstract

Objective : The aim of this study is to compare the distribution patterns of HNK-1 between the SD (Sprague- Dawley) embryos and the homozygous rat small eye (*rSey*) at the onset of cranial crest cells migration.

Methodology: Distribution patterns of HNK-1 in Day-10 wild type and homozygous *rSey* were studied using immunohistochemical staining with HNK-1 antibody. According to the indistinguishable phenotype of the homozygous *rSey* at the stage we studied, the methods to separate the homozygotes from their littermates was also performed. The method was detecting the Pax-6 protein by immunohistochemical staining with anti-Pax-6.

Results : The results show that in wild type embryos, HNK-1 distributed generally in the mesenchyme along the pathway prior to the onset of cranial crest cell migration and gradually disappeared peripherally whereas the migration progressed. Moreover, the result from homozygous *rSey* shows that HNK-1 distributed ectopically in the mesenchyme along the migration pathway.

Discussion and Conclusions: The distribution pattern of HNK-1 in Day-10 wild type is spatiotemporally coincides with the migration of cranial crest cell. HNK-1 also distributes ectopically in the mesenchyme of the migration pathway in homozygous *rSey*. Taken these results together, it is likely that HNK-1 act as a barrier for migration of crest cells. This finding is supported by the *in vitro* study that HNK-1 has inhibitory effect on migration of neural crest cell.

Further study: The findings from this study that HNK-1 has inhibitory effects to neural crest cell migration should be confirmed and the gene related to the ectopically expression of HNK-1 in homozygous *rSey* should be investigated. Unfortunately, the works had already done and published as reported previously. However, the colony of the mutant rat small eye will be a source of valuable samples for studying other developmental abnormalities such as tooth development.

Keywords: HNK-1, rat small eye, Pax-6, neural crest cell

สารบัญ

บทที่	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iv
สารบัญ	vi
สารบัญภาพ	vii
สารบัญตาราง	viii

บทที่ 1 บทนำ	1
ปัญหาที่ทำการวิจัยและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	3

บทที่ 2 วิธีการทดลอง ผลการทดลอง และบทวิจารณ์	4
I. การสร้าง colony ของหนู rat small eye (rSey)	4
II. การแยก homozygous rSey ออกจาก littermate โดยแยกจาก genotype	8
III. การแยก homozygous rSey ออกจาก littermate โดยการตรวจหาโปรตีน Pax-6	12
IV. การศึกษาการกระจายตัวของ HNK-1 day 10 wild type	15
V. การศึกษาการกระจายตัวของ HNK-1 day 10 homozygous rSey	20

บทที่ 3 บทวิจารณ์สรุป	23
-----------------------------	----

บทที่ 4 หนังสืออ้างอิง	26
------------------------------	----

บทที่ 5 output	28
----------------------	----

ภาคผนวก ก. บทคัดย่อและ power point เรื่อง "The Study of Supernumerary Incisor Formation in rSey Rat" ที่นำเสนอแบบ oral presentation ในที่ประชุม The 82nd General Session & Exhibition of the International, American and Canadian Associations for Dental Research (IADR/AADR/CADR)

ภาคผนวก ข. บทคัดย่อ และ poster (ขนาดย่อ) เรื่อง "Contribution of Maxillary Process Epithelium in Rat Maxillary Incisor Formation" ที่นำเสนอในที่ประชุม The 19th International Association for Dental Research-Southeast Asia Division (IADR/SEA)

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1	ขั้นตอนการเตรียม Paraffin section และ Cryosection.....	13
---	--	----

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	ห้องและกรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง5
2	ลักษณะตาของ adult wild type เปรียบเทียบกับ heterozygous <i>rSey</i>6
3	ลักษณะของ newborn wild type เปรียบเทียบกับ homozygous <i>rSey</i>6
4	Electrophoresis ของ PCR product10
5	ผลการตรวจหา Pax-6 โปรตีนในตัวอ่อนระยะ Day 1214
6	เปรียบเทียบผลการศึกษา HNK-1 ใน paraffin section และ cryosection16
7	การกระจายตัวของ HNK-1 ในตัวอ่อน wild type ระยะต่างๆ17
8	การกระจายตัวของ HNK-1 ใน homozygous <i>rSey</i> ระยะ somite 7-8 21
9	การกระจายตัวของ HNK-1 และ Lewis-X ใน wild type ระยะ somite 5-6 25

บทนำ

ปัญหาที่ทำการวิจัย และ ความสำคัญของปัญหา

ความพิการของศีรษะและใบหน้าโดยกำเนิด เช่น ปากแหว่ง เพดานโหว่ เป็นปัญหาที่สำคัญปัญหาหนึ่งของประชากรไทย อุบัติการณ์ของการเกิดโรคนี้สูงถึงประมาณ 1 คนต่อเด็กที่เกิด 2,500 คน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เด็กที่เกิดจากมารดาที่เป็นชาวนาในช่วงประมาณเดือนธันวาคมถึงมกราคม มีอุบัติการณ์ของการเกิดความพิการของศีรษะและใบหน้าโดยกำเนิดสูงกว่าเด็กที่เกิดในช่วงเวลาอื่นในมารดากลุ่มเดียวกัน ได้มีการตั้งข้อสังเกตว่า ช่วงที่ตัวอ่อนในครรภ์กำลังสร้างศีรษะและใบหน้านั้นตรงกับช่วงเดือนเมษายนและพฤษภาคม ซึ่งเป็นฤดูกาลทำนาที่มารดาของเด็กเหล่านี้สัมผัสกับสารเคมี เช่น ยาฆ่าหญ้า ยาฆ่าแมลง มากกว่าปกติ จากหลากหลายสมมติฐานที่เชื่อกันว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปากแหว่ง เพดานโหว่นั้น สมมติฐานหนึ่งที่น่าสนใจ คือ การเกิดความผิดปกติของนิวรัลเครสเซลล์ (neural crest cell) เนื่องจากเซลล์นี้เป็นองค์ประกอบหลักในการสร้าง branchial arch ซึ่งต่อมากลายเป็น facial primordia จากนั้นแต่ละ facial primordia จะมาเชื่อมกันเป็นใบหน้าและเพดานปาก เมื่อการเชื่อมกันของ facial primordia เหล่านี้ไม่สมบูรณ์ก็ทำให้เกิดปากแหว่ง เพดานโหว่ขึ้น

นิวรัลเครสเซลล์ เป็นกลุ่มเซลล์ในตัวอ่อนซึ่งมีลักษณะเฉพาะ คือ มีคุณสมบัติสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น (differentiation) ได้หลายชนิด เช่น เซลล์ประสาทอัตโนมัติ เซลล์ประสาทรับความรู้สึก กระดูกและกระดูกอ่อนของใบหน้าและกะโหลกศีรษะบางชิ้น เป็นต้น และลักษณะเฉพาะอีกอย่าง คือ เซลล์เหล่านี้เมื่อเกิดขึ้นแล้วมันจะต้องอพยพ (migration) ไปยังจุดหมายก่อนที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น การเกิดความผิดปกติขึ้นกับการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์โดยเฉพาะกลุ่มที่จะเจริญไปเป็นส่วนของศีรษะและใบหน้านั้นมีรายงานว่า ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อการเจริญของใบหน้าและศีรษะ ทำให้เกิดรูปร่างลักษณะที่ผิดปกติไป ความผิดปกตินี้เกิดขึ้นได้ทั้งในกรณีที่เกิดร่วมกับความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น Treacher Collins syndrome และ Pierre Robin syndrome หรือเกิดจากการได้รับสารที่เป็นอันตรายต่อตัวอ่อนขณะที่อยู่ในครรภ์ เช่น retinoic acid, alcohol ซึ่งอาจจะรวมถึงการได้รับสารพิษ เช่น ยาฆ่าแมลงในกรณีของมารดาชาวนาที่กล่าวถึงในตอนต้นด้วย ดังนั้นการเข้าใจถึงกลไกการทำงานของการสร้างและการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ อาจจะนำเราไปสู่ความเข้าใจธรรมชาติของการเกิดความผิดปกติเหล่านั้น และอาจนำไปถึงการหาหนทางป้องกันการเกิดความผิดปกตินี้ได้

การศึกษานี้เป็นการศึกษาส่วนหนึ่งที่พยายามเข้าถึงกลไกการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ในสัตว์ทดลอง ซึ่งในการศึกษานี้เราใช้ หนู rat สายพันธุ์ Sprague- Dawley เนื่องจากหาได้ในประเทศไทย นอกจากนี้ที่สำคัญ คือ ในหนูสายพันธุ์นี้มีหนูกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneously mutation) ที่เรียกกันว่า rat small eye (rSey) Homozygous rSey มีลักษณะของ facial cleft ซึ่งเป็นความผิดปกติเหมือนปากแหว่ง และเพดานโหว่แต่มีความรุนแรงกว่า รวมทั้งความผิดปกติของใบหน้าอื่นๆ เช่น ไม่มีตา ไม่มีจมูก ทำให้ homozygote ตายทันทีเมื่อคลอด ขณะที่ heterozygote แสดงลักษณะตาเล็กอันเป็นที่มาของชื่อ rat small eye จากการศึกษาของกลุ่มของ

Professor Kazuhiro Eto พบว่า homozygotes มีความผิดปกติของการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ กลุ่มที่อพยพออกมาจากสมองส่วนกลาง และความผิดปกตินั้นมาจากสิ่งแวดล้อมไม่เอื้ออำนวยต่อการอพยพของเซลล์มากกว่าการผิดปกติที่ตัวเซลล์เอง ข้าพเจ้าได้ทำการศึกษาเบื้องต้น โดยการหาโมเลกุลที่น่าจะเป็นสาเหตุของการเกิดความผิดปกติของการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ โดยเริ่มจากการศึกษาการกระจายตัวของโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ fibronectin, laminin, chondroitin sulfate proteoglycan และ HNK-1 ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้เป็นที่ทราบกันว่ามีผลต่อการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ และได้ศึกษาเปรียบเทียบกับระหว่างหนูปกติและหนูกลายพันธุ์ พบว่า มีความแตกต่างของการกระจายตัวของ HNK-1 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดหนึ่ง อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ไม่อาจยืนยันได้ว่า HNK-1 มีความเกี่ยวข้องกับการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์เนื่องจากระยะเวลา หรือ stage ของตัวอย่างที่ศึกษานั้นเป็นระยะที่การอพยพของนิวรัลเครสได้สิ้นสุดลงแล้ว และยังไม่มีการศึกษาถึงการกระจายตัวของ HNK-1 บริเวณศีรษะและใบหน้าในระยะที่มีการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์กลุ่มที่อพยพมาจากสมอง

นอกจากนี้จากผลการทำการทดลองนำร่องโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ (neural crest cell culture) บนจานเพาะเลี้ยงที่เคลือบด้วย HNK-1 ซึ่งข้าพเจ้าได้ทำการศึกษาขณะศึกษาอยู่ที่ Tokyo Medical and Dental University พบว่า HNK-1 มีแนวโน้มในการยับยั้งการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์กลุ่มที่อพยพออกมาจากสมองส่วนกลาง (midbrain) แต่ไม่มีผลต่อนิวรัลเครสเซลล์กลุ่มที่อพยพออกมาจากสมองส่วนหน้า (forebrain) จากการประมวลผลทั้งหมดที่ได้นำมาสู่สมมติฐานว่า HNK-1 น่าจะมีบทบาทในการเคลื่อนตัวของนิวรัลเครสเซลล์โดยเฉพาะกลุ่มที่เคลื่อนมาจากสมองส่วนกลาง และความผิดปกติของการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ที่เกิดขึ้นกับหนู rat small eye นั้นอาจจะเกิดเนื่องจากการที่มีการกระจายของ HNK-1 ที่ผิดปกติไป

การศึกษานี้ต้องการที่จะสนับสนุนสมมติฐานที่ได้ คือ หาก HNK-1 เกี่ยวข้องกับการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์จริง ในระยะก่อนการอพยพ และระหว่างการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์จะต้องมีการกระจายตัวของ HNK-1 อยู่ใน pathway ของนิวรัลเครสเซลล์ และรูปแบบของการกระจายตัว (distribution pattern) นั้นจะต้องสัมพันธ์กับการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์กลุ่มที่อพยพออกมาจากสมองส่วนกลาง และการกระจายตัวใน homozygous *rSey* ซึ่งมีความผิดปกติของการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์นั้นควรจะต้องเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากระยะก่อนการอพยพ และระหว่างการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์นั้น คือ ระยะตั้งแต่ presomite ถึงระยะ 11-12 somite เป็นระยะซึ่ง homozygous *rSey* ยังไม่มีแสดงความผิดปกติทางรูปร่าง (morphology) เราจึงต้องหาวิธีแยก homozygote ออกจาก littermate ซึ่งเราจะได้ homozygote จะได้ประมาณ 1 ใน 4 จากการผสมระหว่าง heterozygotes ดังนั้นเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์หลักที่กล่าวมาจึงต้องมีการดำเนินการตามลำดับขั้นตอน ดังต่อไปนี้

วัตถุประสงค์ที่ 1

เพื่อสร้าง colony ของหนู rat small eye (rSey) เนื่องจาก rSey เป็น mutate rat ซึ่งค้นพบโดยห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของบริษัท Yamanouchi Pharmaceutical ประเทศญี่ปุ่น และไม่สามารถหาได้ในประเทศไทย และตัวอย่างที่ต้องการศึกษามีหลายระยะ และต้องใช้จำนวนมาก ขณะที่ homozygote จะตายทันทีภายหลังคลอด ดังนั้นการจะได้ homozygote มาศึกษานั้นมีวิธีเดียว คือ ต้องทำการผสมระหว่าง heterozygote และตามกฎพันธุกรรมเราจะได้ homozygote เพียงประมาณ 1 ใน 4 เท่านั้น ซึ่งทางนักวิจัยที่เลี้ยงร่วมกับบริษัท Yamanouchi Pharmaceutical ได้มอบพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ heterozygous rSey ให้มาสร้าง colony

วัตถุประสงค์ที่ 2

เพื่อหาวิธีการแยก homozygote ออกจาก littermate ตั้งแต่ระยะ presomite ที่มีความเที่ยงตรงสูง และสิ้นเปลืองน้อยที่สุด

วัตถุประสงค์ที่ 3

เพื่อศึกษารูปแบบการกระจาย (distribution pattern) ของ HNK-1 ใน pathway of migration ของนิวรัลเครสเซลล์กลุ่มที่อพยพออกมาจากสมองส่วนกลาง ในระยะตั้งแต่ก่อนและระหว่างการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ในหนู wild type เพื่อแสดงว่าในภาวะปกติ มีการกระจายตัวของ HNK-1 ในรูปแบบที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์

วัตถุประสงค์ที่ 4

เพื่อศึกษารูปแบบการกระจาย (distribution pattern) ของ HNK-1 ใน pathway of migration ของนิวรัลเครสเซลล์กลุ่มที่อพยพออกมาจากสมองส่วนกลาง ในระยะตั้งแต่ก่อนและระหว่างการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ในหนู homozygous rSey ว่ามีความแตกต่างจากหนูปกติอย่างไร

วิธีการทดลอง ผลการทดลอง และ บทวิจารณ์

I. การสร้าง colony ของหนู rat small eye (*rSey*)

วิธีการทดลอง

ใช้วิธีการขยายพันธุ์แบบ inbred colony โดยได้รับการอนุเคราะห์พ่อพันธุ์ และแม่พันธุ์ อายุ 6 สัปดาห์ จากบริษัท Yamanouchi Pharmaceutical ประเทศญี่ปุ่น จำนวน 12 ตัว เป็นเพศผู้ และเมียอย่างละ 6 ตัว โดยสัตว์ทุกตัวได้รับการตรวจสอบและได้รับหนังสือรับรองว่าเป็น pathogenic free ก่อนที่จะส่งมายังประเทศไทย เมื่อสัตว์ทดลองมาถึงประเทศไทยเราได้ดำเนินการผ่านศุลกากรภายในวันนั้น และได้นำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทันที โดยเลี้ยงแยกเพศ กรงละ 2 ตัว โดยกรงที่เลี้ยงมี 2 ชนิด คือ

- กรงสเตนเลสที่ขนาด 27.5 cm.x 43.5 cm.x16.5 cm. ด้านบนเป็นตะแกรงปิดมีที่ลีดด้านข้าง ภายในใส่วัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อยซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ (สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ) (รูปที่ 1)

- กรงที่เป็นตะแกรงเหล็กมีถาดรองอยู่ข้างใต้ ขนาด 35 cm.x 40 cm. x 25 cm. กรงชนิดนี้จะใช้เฉพาะเมื่อจะทำการ mating เท่านั้น โดยจะไม่ใช้วัสดุรองนอนเพื่อให้สามารถตรวจสอบ plug ได้

เราจะทำการเปลี่ยนกรงพร้อมวัสดุรองนอน และขวดน้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง อาหารที่ใช้เลี้ยงเป็นอาหารเม็ดสำหรับหนู (สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ) นำมาแบ่งเป็นห่อเล็กๆ ประมาณห่อละ 0.5 กิโลกรัมและใช้น้ำ distilled water ทั้งอาหารและน้ำจะถูกนำมาทำการ sterile ด้วยการ autoclave ก่อนจะให้แก่หนู ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ดูปัจจัยภายนอกจึงไม่มีการควบคุมปริมาณอาหารและน้ำที่ให้

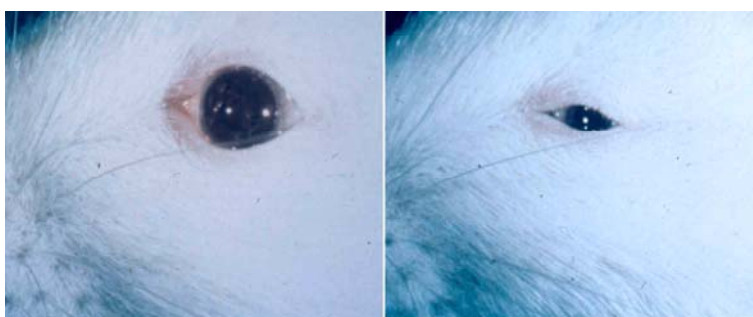
สำหรับพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่นำมาจากประเทศญี่ปุ่นนั้น หลังจากเลี้ยงไว้เป็นระยะเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ (อายุประมาณ 9 สัปดาห์) พ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ทั้งหมดมีขนาดและน้ำหนักตัวมากขึ้นโดยเฉลี่ยมีน้ำหนัก 218 กรัม เริ่มทำการ mating โดยเอาพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์อย่างละ 1 ตัวมาอยู่ในกรงเดียวกัน ตรวจสอบหา plug ในช่วงเช้าและบ่าย โดยถ้ามีการ mate เกิดขึ้นจะเห็น plug ตกลงมาที่ถาดรอง เมื่อพบ plug จะทำการแยกออกจากกัน และระหว่างที่ตั้งครรภ์จะแยกเลี้ยงแม่พันธุ์กรงละ 1 ตัว โดยปกติหนูจะตั้งครรภ์ 21-22 วัน หนูที่เกิดใหม่จะได้รับการเลี้ยงดูจากแม่เป็นเวลา 4-5 สัปดาห์ จากนั้นจะทำการหย่านม แยกเพศ และแยกลักษณะตามขนาดของตา หนูที่ได้พันธุ์กรรมเป็น heterozygote จะมีขนาดตาสีเล็กกว่าหนูที่มีพันธุ์กรรมเป็น wild type (รูปที่ 2) ลูกหนูเพศผู้ร้อยละ 90 ไม่ว่าจะมียีนลักษณะอย่างไรจะถูกกำจัด โดยใช้วิธีดมยาให้สลบแล้วตามด้วยการทำ cervical dislocation ที่เหลือร้อยละ 5 ที่มีตาสีเล็กจะเลี้ยงไว้เป็นพ่อพันธุ์ ส่วนเพศเมียที่มีลักษณะตาสีเล็กจะถูกเลี้ยงดูโดยประมาณร้อยละ 25 เป็นแม่พันธุ์ และร้อยละ 75 ใช้สำหรับเก็บตัวอย่าง



รูปที่ 1 บน: ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง และ ล่าง: ภายในกรง

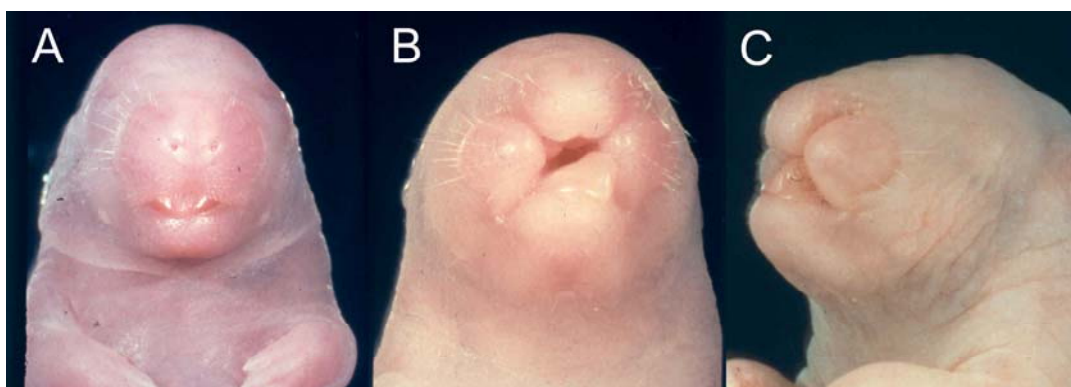
ผลการทดลอง

จากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ heterozygous *rSey* อย่างละ 6 ตัว สามารถสร้าง colony ของ rat small eye ในระยะเวลาตั้งแต่เริ่มทำการขยายพันธุ์หนู rat small eye (*rSey*) จนถึงปัจจุบันสามารถขยายพันธุ์ได้เป็นผลดี สามารถเก็บตัวอย่างได้ตามจำนวนที่ต้องการ โดย new born ที่ได้ยังคงลักษณะ phenotype ตามที่ได้มีรายงานมา กล่าวคือ ไม่มีตา ไม่มีจมูก และมี facial cleft (รูปที่ 3) ซึ่งเกิดจากการที่ส่วนของ maxillary process ไม่เชื่อมกับ frontonasal process โดยเชื่อว่ามีสาเหตุมาจากการที่ midbrain neural crest cell กลุ่มหนึ่งถูกขวางไม่ให้อพยพเข้าไปยัง frontonasal process



รูปที่ 2 ลักษณะตา ซ้าย : wild type adult

ขวา : heterozygous adult



รูปที่ 3 A: ลักษณะทางด้านหน้าของ wild type newborn B: ด้านหน้าของ homozygote และ C: ด้านข้างของ homozygous newborn ซึ่งไม่มีทั้งตา และ จมูก รวมทั้งมี bilateral facial cleft ซึ่งเกิดจากการไม่ fuse กันของ maxillary processes และ frontonasal prominence

บทวิจารณ์

เนื่องจากขณะนี้สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติได้จัดตั้งคณะกรรมการแห่งชาติเพื่อพัฒนางานเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานวิจัย งานทดสอบ งานผลิตชีววัตถุ และงานสอนขึ้น ซึ่งห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้รับการตรวจเยี่ยมรวมทั้งคำแนะนำจากคณะตรวจเยี่ยม ซึ่งเราได้ปรับปรุงตามคำแนะนำเท่าที่จะทำได้ เนื่องจากมีข้อจำกัดบางข้อที่ทำให้ไม่สามารถทำตามคำแนะนำได้ เช่น เรื่องสถานที่ และ งบประมาณ

การเลี้ยงสัตว์ทดลองที่เป็น colony พิเศษซึ่งเป็น consanguineous strain เช่น rat small eye นี้ มีข้อพิเศษที่ต้องคำนึงถึง คือ การ mating ซึ่ง consanguineous mating ที่ทำกันมีทั้งหมด 3 วิธี คือ

1. Parallel line system คือ mating กันระหว่างพี่น้อง ให้กำเนิด generation ต่อไปซึ่งจะทำการ mate ระหว่างพี่น้องอีก และให้กำเนิด generation ต่อไปเรื่อยๆ วิธีการนี้ควรมีพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์อย่างน้อย 5 คู่
2. Single-line system คือ mating กันระหว่างพี่น้อง ให้กำเนิด generation ต่อไป และเลือกลูกกลับมา mate กับพ่อ หรือ แม่ ให้กำเนิด generation ต่อไปเรื่อยๆ
3. Mixed system เป็นวิธีที่เราใช้ และเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ mating กันทั้งภายใน generation เดียวกัน และข้าม generation การเลือก male และ female ใช้วิธีการสุ่ม

เมื่อ maintain colony ไปได้ระยะหนึ่งควรมีการตรวจสอบสายพันธุ์ วิธีที่แน่นอนที่สุด คือ การตรวจสอบ sequence ของ mutate Pax-6 gene แต่เราไม่ได้ใช้วิธีนี้ เนื่องจากไม่มีงบประมาณ จึงใช้การตรวจสอบ phenotype ของ homozygous newborn และ แยกเอา heterozygote ซึ่งมีลักษณะ small eye เด่นชัดเท่านั้นเป็น พ่อพันธุ์ และ แม่พันธุ์

II. การแยก homozygous *rSey* ออกจาก littermate โดยแยกจาก genotype

วิธีการทดลอง

ระเบียบวิธีวิจัยที่เสนอคือ การสกัด genomic DNA ออกจากรก หรือส่วนของตัวอ่อนที่ไม่ใช้ในการทดลอง แล้วนำ genomic DNA นั้นมาตรวจสอบ Pax-6 gene mutation โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งขั้นตอนการดำเนินการมีต่อไปนี

1. ออกแบบ primer โดยได้ดำเนินการออกแบบ และสังเคราะห์ primer 2 ชุด เป็นชุดที่จำเพาะต่อส่วนที่มี mutation ของ Pax-6 gene ชุดหนึ่ง และ primer ที่จำเพาะต่อส่วนเดียวกันแต่ไม่มี mutation อีกชุดหนึ่ง โดย sequence ของ primer ที่ออกแบบ คือ

ชุดที่ 1

CCG GCA GAA GAT CGT AGA GCT

เป็น sense primer

TCC CTG TCC TTC CTG TTG CTG

เป็น antisense primer

ชุดที่ 2

CAT CTT TGC TTG GGA AAT CCG

เป็น sense primer

CTT GCG TGG GTT GCC CTG GTA

เป็น antisense primer

โดย primer ชุดแรก อยู่ในช่วง basepair ที่ 455 - 932 ของ Pax-6 gene เมื่อทำ PCR แล้วให้ PCR product 477 basepairs โดยส่วนของ mutation ของ rat small eye (*rSey*) เป็น single base insertion อยู่ที่ตำแหน่งที่ 480 ส่วน primer ชุดที่ 2 อยู่ที่ตำแหน่ง 668 - 903 ให้ PCR product 235 basepairs เป็นตำแหน่งที่ไม่มี mutation และมีความยาวพอเหมาะที่จะทำ sequencing เพื่อตรวจสอบ

2. หา optimal condition สำหรับ PCR โดยใช้ genomic DNA ที่ทำการสกัดจาก cell line โดยวิธีเดียวกับวิธีที่เราจะทำและได้ผลจากการทดลองอื่นแล้วว่าสามารถทำ PCR ได้ผลดีเป็นตัวอย่างในการหา condition ซึ่งได้ทำการ vary concentration ของ PCR buffer, MgCl₂ Solution และ genomic DNA ซึ่ง condition ที่เลือกใช้ คือ

PCR mixture (ต่อ 1 reaction 50 µl) ประกอบด้วย

10 x PCR buffer	5	µl
25 mM MgCl ₂ Solution	5	µl
10 mM dNTP	4	µl
Primer up stream (10 pM/µl)	2	µl
Primer down stream (10 pM/µl)	2	µl
Taq polymerase enzyme	0.25	µl
genomicDNA (10 µg/ml)	1	µl
H ₂ O to make 50 µl	30.75	µl

โดยผสมส่วนประกอบอื่นทั้งหมดยกเว้น genomic DNA ที่สกัดได้ก่อนเป็น master mixture แล้ว จึงแบ่งแต่ละหลอดและเติม genomic DNA ต่อไป สำหรับ primer ใช้ชุดที่ 1 ซึ่งจะได้ PCR product 477 basepairs จากนั้นเข้าเครื่อง thermocycler โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Pre-heat	95 ° c	10 min.	1 cycle
PCR-cycle	95 ° c	10 sec.	
	54.5 ° c	30 sec.	30 cycles
	72 ° c	1 min.	
Post-heat	72 ° c	10 min.	1 cycle
Stop	4 ° c		

จากนั้นนำ PCR product มาทำ electrophoresis บน 2% agarose gel จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide และดูด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต

3. สกัด genomic DNA จากรกและชิ้นส่วนของตัวอ่อนที่ทราบแน่ชัดว่า มี genotype เป็น wild type โดยใช้ ตัวอ่อนของหนู SD ในระยะเดียวกับที่เราต้องการทดสอบ คือ Day 10 และ ตัวอย่างที่มี genotype เป็น homozygotes ใช้ตัวอ่อนที่แสดงลักษณะผิดปกติแล้วคือ Day 15 ซึ่งเห็นความผิดปกติได้อย่างเด่นชัด นำเอาตัวอ่อนส่วนที่ไม่ใช้รวมทั้งส่วนที่เป็นรกมาสกัด DNA ด้วย DNAzol ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ขาย นำ DNA ที่สกัดได้มาละลายให้ได้ความเข้มข้น 10 µg/ml จากนั้นนำมาทำ Polymerase chain reaction เพื่อตรวจหา Pax-6 gene mutation โดยใช้ genomic DNA เป็น control สำหรับระบบและ GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) ซึ่งเป็น enzyme ที่มีระดับคงที่เป็น internal control หากขั้นตอนนี้ได้ผลดีจึงจะเริ่มสกัด DNA จากรก และตัวอ่อนที่ได้จากการผสมกันระหว่าง heterozygous rSey ในระยะที่เราต้องการศึกษา (Day 10) และทำ Polymerase chain reaction เพื่อตรวจหา genotype

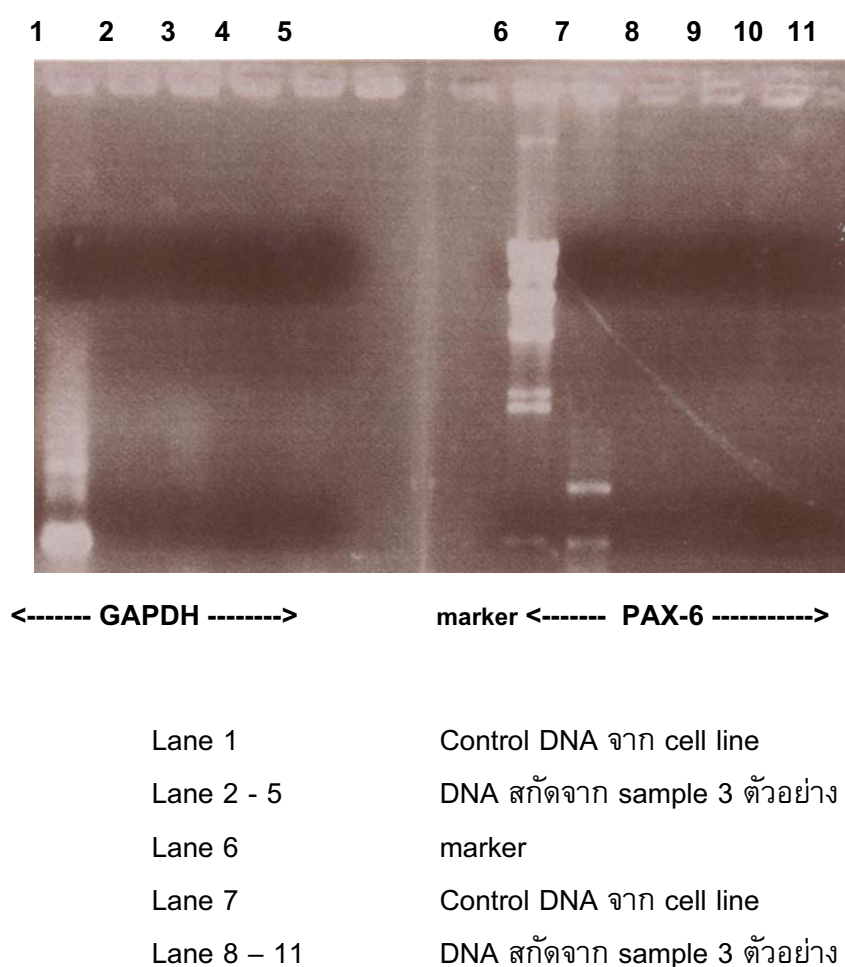
ผลการทดลอง

การหา optimal condition สำหรับการทำให้ PCR

การหา optimal condition สำหรับการทำให้ PCR เพื่อเป็นการตรวจสอบว่า primer ที่ออกแบบมานี้มีความเหมาะสมโดยเมื่อใช้ตัวอย่างที่เป็น genomic DNA ที่สกัดมาจาก cell line และได้ใช้ในการทำ PCR ได้ผลดีมาแล้ว พบว่าสามารถได้ PCR product ที่ต้องการได้โดยได้ทั้ง GAPDH และ Pax-6 (lane ที่ 1 และ 7 ในรูปที่ 4)

การตรวจสอบตัวอย่างโดยการสกัด DNA และ PCR

การสกัด DNA จากรกและชิ้นส่วนของตัวอ่อนที่ทราบแน่ชัดว่า มี genotype เป็น wild type หรือเป็น homozygotes โดยใช้ condition ที่หาได้ และใช้ไพรเมอร์ ต่อ GAPDH เป็นตัวควบคุมภายใน ปรากฏว่าได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4 (lane ที่ 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11) ยังไม่สามารถได้ผล PCR จากตัวอย่างที่เราทำการสกัด DNA ขณะที่ตัวอย่างที่เป็นตัวควบคุมระบบได้ผลทั้ง GAPDH และ Pax-6 ใน lane ที่ 1 และ 7 ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองนี้แสดงว่าขั้นตอนที่ต้องแก้ไข คือ ขั้นตอนของการสกัด DNA



รูปที่ 4 electrophoresis ของ PCR product

บทวิจารณ์

ในการศึกษานี้ไม่ประสบผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ คือ ไม่สามารถหาความแตกต่างของ genotype โดยวิธีการ PCR ได้ ซึ่งการศึกษานี้ได้พยายามวางแผนและทำการศึกษตามขั้นตอนดังที่ได้ออกแบบมา คือ หลังจากออกแบบ primer แล้ว ได้ทำการทดสอบว่า primer นี้ใช้ได้ผลจริงโดยใช้ตัวอย่าง DNA ที่สกัดโดยวิธีเดียวกันจาก cell line ที่เคยทำ PCR ได้ผลดีมาแล้วเป็นตัวทดสอบ พร้อมทั้งยังเป็นการหา optimal condition ด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อทำการสกัด DNA พบว่าสามารถวัดค่า Optical Density (O.D.) โดยความยาวคลื่นสำหรับวัด DNA ได้ แต่เมื่อนำมาทำ PCR แล้วกลับไม่ได้ผล โดยได้ทำการสกัดใหม่ 3 ครั้ง และ vary ความเข้มข้นของ DNA พบว่าก็ยังไม่ได้ผล โดยทุกครั้งได้ใช้ ตัวอย่าง DNA ที่สกัดจาก cell line เป็นตัวควบคุมสำหรับระบบเพื่อให้แน่ใจไม่มีความผิดพลาดขณะทำการทดลอง เช่น ผสม PCR mixture ไม่ถูกต้อง หรือเกิดความผิดพลาดในขั้นตอนของการเปลี่ยนอุณหภูมิของแต่ละรอบของ PCR cycle จากผลที่แสดงจึงสรุปว่า ความผิดพลาดน่าจะเกิดจากการสกัด DNA

การศึกษานี้ไม่ได้ทำการทดลองในส่วนนี้ต่อ เนื่องจากส่วนนี้ไม่ได้เป็นวัตถุประสงค์หลัก เป็นเพียงการศึกษาเพื่อให้ได้วิธีที่จะแยก homozygotes ออกจาก littermates ซึ่งนอกจากวิธีนี้แล้วยังได้เสนออีกวิธีหนึ่ง คือ การตรวจหา Pax-6 โปรตีนซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดในตอนต่อไป โดยพบว่าวิธีการหาโปรตีนนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และประหยัด จึงเลือกใช้วิธีการดังกล่าวในการแยก homozygote และพักการศึกษาในส่วนนี้เนื่องจากวัสดุมีราคาแพงมาก และมีงบประมาณไม่เพียงพอที่จะศึกษาต่อ

อย่างไรก็ตามหากมีงบประมาณยังคงตั้งใจที่จะทำการศึกษาต่อในส่วนนี้ เนื่องจากโดยความเป็นจริงแล้วค่อนข้างเป็นการยากในการที่จะ detect one-base insertion mutation ออกจาก gene ปกติได้โดยใช้วิธี PCR หากวิธีนี้สำเร็จ จะเป็นประโยชน์อย่างมาก เนื่องจาก mutation ใน *rSey* นั้นเกิดในระดับ translation ไม่ใช่ระดับ transcription ทำให้วิธีการ detect mutation ในระดับ mRNA เช่น in situ hybridization ไม่สามารถทำได้

แผนการศึกษาในส่วนนี้ต่อ เริ่มจากการเปลี่ยนวิธีการสกัด DNA โดยอาจใช้ DNA extraction kit และทำ PCR จนได้แถบของ GAPDH และ Pax-6 ในตัวอย่างที่เป็น wild type จากนั้นส่ง sequencing เพื่อยืนยันผลระดับหนึ่งก่อน จากนั้นจึงทำในตัวอย่างที่รู้แน่ชัดว่าเป็น homozygote และ heterozygote เมื่อได้ผลดีแล้วจึงค่อยใช้ในการทดสอบตัวอย่างที่ไม่รู้ genotype ต่อไป

III. การแยก homozygous *rSey* ออกจาก littermate โดยการตรวจหาโปรตีน Pax-6

ระเบียบวิธีที่เสนอ คือ ใช้วิธี Immunohistochemical technique และวิธีแสดงปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค Avidin-Biotin Complex และ DAB reaction (Sigma) โดยใช้ polyclonal antibody ต่อ Pax-6 โปรตีน (BAbCO) ซึ่งเป็น antibody ที่จำเพาะต่อ Pax-6 โปรตีน บริเวณ C terminus ซึ่ง mutation ของ rat small eye ทำให้โปรตีนบริเวณนี้ขาดหายไปเนื่องจาก mutation ทำให้เกิด abnormal stop codon และได้ Pax-6 โปรตีนที่ไม่มีส่วน C terminus ทำให้สามารถแยก homozygote ออกจาก littermate ได้

การดำเนินการที่ทำได้ดำเนินการหา optimal condition โดยใช้วิธีการตาม reference ดังนี้

1. ทำการเก็บตัวอย่าง ได้ทำการเก็บตัวอย่างหลายระยะทั้งใน SD wild type ซึ่งส่งจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ และ rat small eye เพื่อใช้เป็นตัวอย่างต่างวัตถุประสงค์ คือ Day 10 embryos ทั้งหมดจากการผสมระหว่าง *rSey* เป็นตัวอย่างที่ใช้ศึกษา Day 12 SD wild type ใช้เป็น positive control Day 12 Homozygous *rSey* เป็น control เนื่องจากเป็นระยะที่แยก homozygote ได้โดย morphology เป็นตัวอย่างที่ใช้ในการหา optimal condition และเป็นการยืนยัน specificity ของ antibody
 2. ดำเนินขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างสำหรับตัด section โดยได้ดำเนินการเตรียมตัวอย่างสำหรับทั้ง paraffin section และ cryo-section เนื่องจาก paraffin section ให้คุณภาพของ section ที่ดีกว่า ขณะที่ cryo-section จะ preserve โปรตีนได้ดีกว่าเนื่องจากไม่ต้องผ่านความร้อน
 3. ทำการตัด section
 4. ดำเนินขั้นตอนในการล้างเอาวัสดุที่ embeded section ออก
- ในขั้นตอนที่ 2-4 มีวิธีการที่แตกต่างกัน ดังได้แสดงในตารางที่ 1
5. กำจัด internal oxidation โดยการแช่ section ใน 0.3% H_2O_2 ใน Methanol
 6. Block non-specific reaction ด้วย 2% Horse serum in PBS
 7. Incubate primary antibody (anti Pax-6) 1:1,000 in 2% Horse serum in PBS ใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส overnight
 8. Incubate secondary antibody คือ biotinylated anti-rabbit IgG (1:200) 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
 9. DAB reaction และหยุดปฏิกิริยาใน PBS
 10. Counter stain ด้วย Methyl green
 11. Mount slide ด้วย cover glass

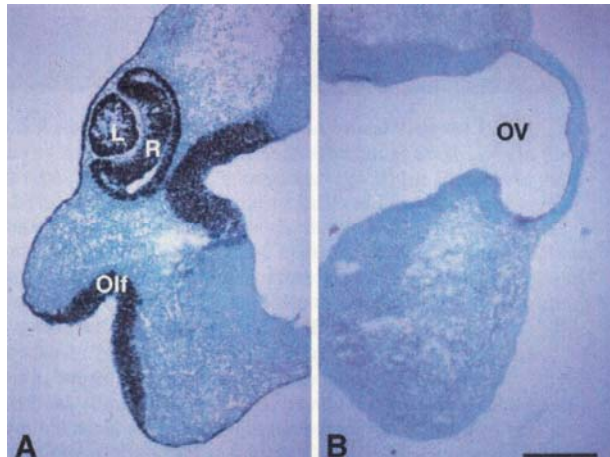
ตารางที่ 1 ขั้นตอนในการเตรียม Paraffin section และ Cryo-section ที่ทำในงานวิจัยนี้

ขั้นตอนการดำเนินการ	สำหรับ Paraffin section	สำหรับ Cryo-section
fixation	ต้องทำ	อาจทำหรือไม่ทำ
ชนิดของ fixative	4% paraformaldehyde	4% paraformaldehyde
ระยะเวลา fixation	2-6 ชั่วโมงแล้วแต่ขนาดของตัวอ่อน	2-6 ชั่วโมงแล้วแต่ขนาดของตัวอ่อน
Dehydration	ทำโดยใช้ series of Ethanol	ไม่ทำ ใช้การแช่ใน sucrose 10%, 20% และ 30% เพื่อลดการเกิด ice crystal
Clearing	ใช้ Xylene	Soak in OCT compound
Embedding materials	Paraplast	OCT compound
Sectioning	ตัดด้วย microtome ที่ความหนา 7 ไมครอน	ตัดด้วย cryostat ที่ความหนา 12-15 ไมครอน
การล้าง embedding materials	ใช้ Xylene ตามด้วย series of Ethanol และ PBS	PBS
Boiling	ทำในกรณีที่ใช้ Pax-6 antibody	ไม่ทำ

ผลการทดลอง

รูปร่างลักษณะ (morphology) ของตัวอ่อน wild type ระยะ Day 12 จะมีความแตกต่างอย่างเด่นชัดดังแสดงในรูปที่ 5 ตัวอ่อนในระยะนี้ เริ่มมีการสร้าง lens, retina และ olfactory epithelium โดยเริ่มจากการหนาตัวของ epithelium บริเวณที่จะเจริญไปเป็นตาและจมูก เรียกว่า lens และ nasal (olfactory) placode และมีการ invagination ของ neural tube เรียกว่า optic vesicle ต่อมา lens placode และ optic vesicle จะพัฒนาเป็น lens และ retina ส่วน nasal placode จะเริ่ม invaginate และหนาตัวขึ้นเป็น Olfactory epithelium (รูปที่ 5A) ขณะที่ homozygous *rSey* ไม่มีสร้างทั้ง lens, retina และ olfactory epithelium นอกจากนี้ส่วน neural tube ยังคงเป็น optic vesicle ซึ่งมีรูปร่างที่ผิดปกติ (รูปที่ 5B)

จากการตรวจหา Pax-6 โปรตีนใน SD wild type ระยะ Day-12 ตรวจพบ Pax-6 โปรตีนได้ที่ตำแหน่ง neural tube บริเวณที่ติดกับ retina, lens, retina และที่ olfactory epithelium (บริเวณที่ติดสีดำรูปที่ 5A) ขณะที่เราไม่สามารถพบ Pax-6 โปรตีนใน homozygous *rSey* เลย (รูปที่ 5B)



รูปที่ 5 ผลการตรวจหา Pax-6 โปรตีนในตัวอ่อนระยะ Day-12 **A:** wild type **B:** homozygous *rSey* (L= Lens; R = Retina; Olf = Olfactory epithelium; OV = Optic Vesicle)

ใน SD wild type ระยะ Day 10 พบว่า pax-6 โปรตีน ปรากฏอยู่ที่ neural tube ส่วนที่กำลังจะเจริญไปเป็น optic vesicle เช่นกัน ในส่วนของการทดลองตรวจหา โปรตีน Pax-6 เพื่อแยก homozygous *rSey* ออกจาก littermate นั้นจะกล่าวถึงรายละเอียดภายหลังในบทความการกระจายตัวของ HNK-1 ใน day 10 homozygous *rSey*

บทวิจารณ์

การศึกษาในส่วนนี้เป็นการศึกษาเพื่อจะแยก homozygous *rSey* ออกจาก littermate โดยการตรวจหา Pax-6 โปรตีนโดยใช้ antibody ซึ่งตรวจหา C-terminal domain ของ Pax-6 โปรตีน ซึ่ง mutation ที่เกิดขึ้นกับ *rSey* คือ มี one base insertion ใน Pax-6 gene ซึ่งสามารถ transcribe ได้ แต่ขณะที่เกิดการ translation เกิด abnormal stop codon ผลก็คือ ได้ pax-6 โปรตีนที่ขาดส่วน C-terminal ไป ซึ่งจากผลการทดลองในตัวอ่อนระยะ Day-12 แสดงให้เห็นว่าใช้ในการแยกระหว่าง wild type และ homozygote ได้ผลดี

อย่างไรก็ตาม การจะระบุ homozygous *rSey* ระยะ Day-10 ออกจาก littermate โดยดูผลการตรวจหา Pax-6 โปรตีนที่ negative นั้นเป็นเรื่องที่จะต้องระวังอย่างมากไม่ให้เกิดการเกิด false negative ขึ้น ดังนั้นการออกแบบการทดลองในการตรวจสอบตัวอ่อนที่เกิดจากการผสมกันระหว่าง heterozygous *rSey* ระยะ Day-10 แต่ละครั้งจึงต้องมีตัวควบคุมหลายๆตัวเพื่อไม่ให้เกิดการแปรผลที่ผิดพลาด

IV. การศึกษาการกระจายตัวของ HNK-1 ใน wild type

วิธีการทดลอง

ระเบียบวิธีที่เสนอ คือ ใช้วิธี Immunohistochemical technique และวิธีแสดงปฏิกิริยาโดยใช้ เทคนิค Avidin-Biotin Complex และ DAB reaction โดยใช้ CD57 (LeuTM-7 ของ Becton-Dickinson) ซึ่งเป็น monoclonal antibody ต่อ HNK-1 carbohydrate epitope เป็น primary antibody และ Biotinylated antimouse IgM เป็น secondary antibody

โดยวิธีการทำเป็นดังนี้

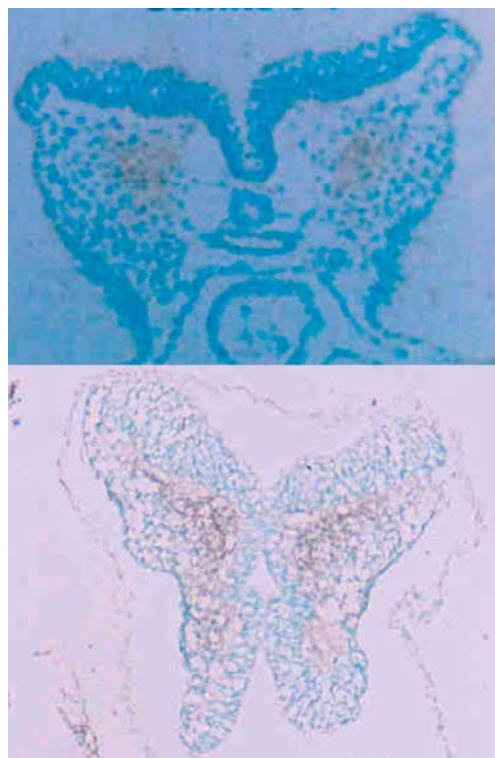
1. ทำการเก็บตัวอย่าง ได้ทำการเก็บตัวอย่างระยะต่างๆของ Day 10 wild type
2. ดำเนินขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างสำหรับตัดทั้งแบบ paraffin และ cryo-section โดยมากดำเนินการเตรียมตัวอย่างสำหรับ paraffin section เนื่องจาก paraffin section ให้คุณภาพของ section ที่ดีกว่า
3. ทำการตัด section
4. ดำเนินขั้นตอนในการล้างเอาวัสดุที่ embedded section ออก
5. กำจัด internal oxidation โดยการแช่ section ใน 0.3% H₂O₂ ใน Methanol
6. Block non-specific reaction ด้วย 2% Horse serum in PBS (Phosphate buffer saline)
7. Incubate HNK-1 antibody 1:50 in 2% Horse serum in PBS ใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส overnight ล้างด้วย PBS เป็นเวลา 5 นาที 3 ครั้ง
8. Incubate secondary antibody 1:200 in 2% Horse serum in PBS ใน moist chamber 1 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง
9. DAB reaction และหยุดปฏิกิริยาใน PBS
10. Counter stain ด้วย Methyl green
11. Mount slide ด้วย coverglass

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแสดงถึงรูปแบบการกระจายตัวของ HNK-1 ณ ช่วงเวลาที่มีการอพยพของ cranial neural crest cell โดยเฉพาะกลุ่ม midbrain จากการศึกษที่ผ่านมาพบว่า midbrain crest cell จะเริ่มอพยพในระยะที่ตัวอ่อนมี somite 5-6 และสิ้นสุดการอพยพในระยะที่มี somite 11-12 ซึ่งตัวอ่อนจะใช้เวลาประมาณ 1.5 ชั่วโมงในการพัฒนา 1 somite ดังนั้น จึงต้องเก็บตัวอย่างในระยะเวลาต่าง ๆ กันเพื่อให้ได้ตัวอย่างตั้งแต่ระยะก่อนการอพยพตัวเล็กน้อย คือระยะก่อนมี somite เล็กน้อย (presomite) จนถึง ระยะที่มี somite 4 somite (นิวรัลเครสเซลล์เริ่มอพยพเมื่อมี 5 somite) ซึ่งเราจะทำการศึกษารูปแบบการกระจายตัวของ HNK-1 โดยแบ่ง stage ของตัวอ่อนที่ศึกษาโดยรวมตัวอ่อนที่มีรูปร่างใกล้เคียงกันมากเข้าด้วยกัน และเรียกระยะต่างๆที่ศึกษาดังต่อไปนี้คือ

presomite	หมายถึง	ตัวอ่อนที่กำลังเริ่มสร้าง somite หรือ มี 1 - 2 somite
so: 3-4	หมายถึง	ตัวอ่อนที่มี 3 - 4 somite
so: 5-6	หมายถึง	ตัวอ่อนที่มี 5 - 6 somite
so: 7-8	หมายถึง	ตัวอ่อนที่มี 7 - 8 somite
so: 9-10	หมายถึง	ตัวอ่อนที่มี 9 - 10 somite
so: 11-12	หมายถึง	ตัวอ่อนที่มี 11 -12 somite

ผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่า เราสามารถตรวจพบ HNK-1 ได้ทั้งใน paraffin section และ cryo-section โดยรูปที่ 6 แสดงผลของการศึกษาการกระจายตัวของ HNK-1 ใน paraffin section (บน) และ cryo-section (ล่าง) ซึ่ง section ทั้ง 2 แบบให้ผล positive ที่บริเวณตรงกลางของ mesenchyme ของตัวอ่อน โดยที่ epithelium และ mesenchyme บริเวณด้านข้างเป็น negative เหมือนกัน cryo-section ได้ปฏิกิริยาที่เด่นชัดกว่า แต่คุณภาพของ section ของ cryo-section ในแง่การคง morphology ของตัวอ่อนนั้นน้อยกว่า paraffin section



รูปที่ 6 เปรียบเทียบผลการศึกษา HNK-1 ในตัวอ่อนระยะ somite 5-6 บน : paraffin section (coronal section) ล่าง : cryo-section (horizontal section)

รูปแบบการกระจายตัวของ HNK-1 ในตัวอ่อนระยะก่อนการอพยพของ midbrain crest cell

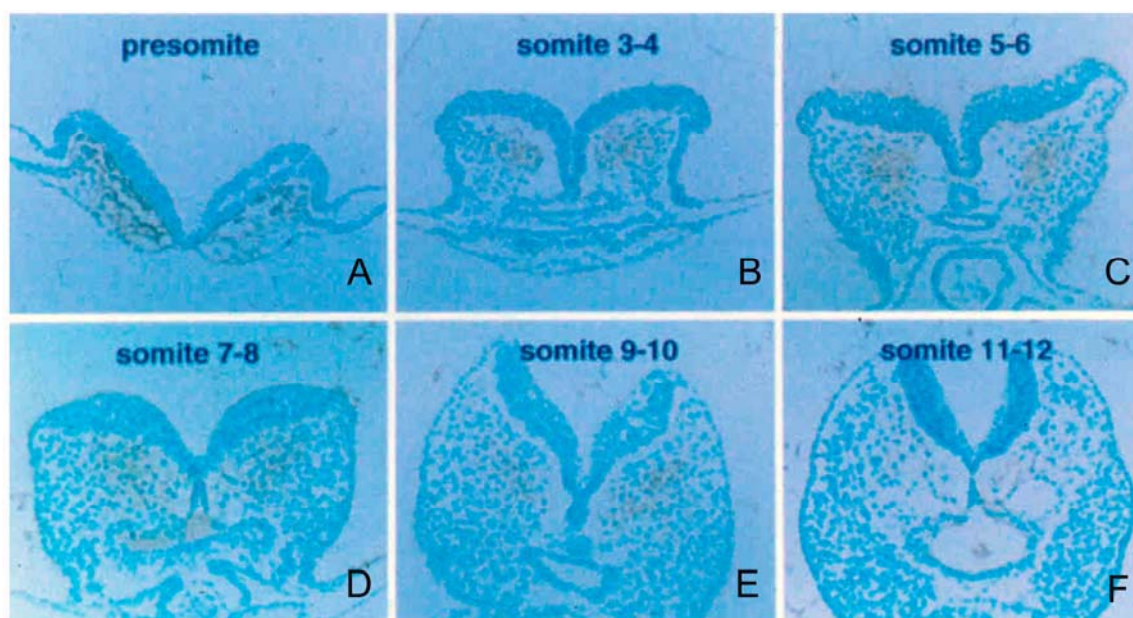
เราเริ่มศึกษาตั้งแต่ระยะที่ตัวอ่อนกำลังเริ่มสร้าง somite หรือมี somite 1-2 ซึ่งลักษณะของตัวอ่อนระยะนี้เป็น early headfold ส่วนของระบบประสาทยังมีลักษณะเป็น neural fold คือมีการหนาตัวของ epithelium ในแนวกกลาง ขนาดของตัวอ่อนในแนว antero-posterior ประมาณ 3-4 มิลลิเมตร จากการศึกษพบว่า HNK-1 กระจายอยู่ทั่วไปใน mesenchyme ของตัวอ่อนตั้งแต่ได้ต่อ epithelium จนถึงใจกลางซึ่งเราจะเรียกว่า mesenchymal core (รูปที่ 7A)

ระยะ somite 3-4 รูปร่างของตัวอ่อนยังคงเป็น head fold เหมือนในระยะ presomite แต่มี somite 3-4 คู่ และมีขนาดใหญ่ขึ้นเป็น 4-5 มิลลิเมตร พบว่าการกระจายตัวของ HNK-1 บริเวณ mesenchyme ที่อยู่บริเวณขอบๆ เริ่มหายไป คงเหลือที่ mesenchymal core (รูปที่ 7B)

รูปแบบการกระจายตัวของ HNK-1 ในตัวอ่อนระยะที่การอพยพของ midbrain crest cell

ช่วงนี้เราศึกษาโดยแยกตัวอ่อนเป็น 4 ระยะ คือ ตั้งแต่ระยะ somite 5-6 ถึงระยะ somite 11-12 ซึ่งรูปร่างของตัวอ่อนและรูปแบบการกระจายตัวของ HNK-1 เปลี่ยนแปลงไป ดังนี้

ระยะ somite 5-6 ระบบประสาทของตัวอ่อนมีการยกตัวสูงมากขึ้น ตัวอ่อนมี somite 5-6 คู่ และมีขนาดใหญ่ขึ้นเป็น 7-8 มิลลิเมตร พบว่าการกระจายตัวของ HNK-1 บริเวณ mesenchyme ที่อยู่บริเวณขอบๆ เริ่มหายไป คงเหลือที่ mesenchymal core (รูปที่ 7C)



รูปที่ 7 การกระจายตัวของ HNK-1 ในตัวอ่อน wild type ระยะต่างๆ **A:** presomite; **B:** somite 3-4; **C:** somite 5-6; **D:** somite 7-8; **E:** somite 9-10; **F:** somite 11-12

ระยะ somite 7-8 ตัวอ่อนจะมี neural plate ยกสูงขึ้น ปลายๆระยะเริ่มมีการปิดตัวพร้อมที่จะม้วนตัว พบว่าการกระจายตัวของ HNK-1 ที่ บริเวณ mesenchymal core มีขอบเขตแคบลงจากตัวอ่อนระยะก่อน (รูปที่ 7D)

ระยะ somite 9-10 ตัวอ่อนอยู่ในระยะม้วนตัว (จะเห็นตัวอ่อนม้วนตัวมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด) ส่วน neural tube เริ่มมีการหว่าตัวเพื่อพัฒนาเป็นส่วน optic vesicle พบว่าการกระจายตัวหายไป คงเหลือที่ mesenchymal core เล็กน้อย (รูปที่ 7E)

ระยะ somite 11-12 เริ่มเกิดการ fusion ของ neural tube เห็น invagination ของ neural tube อย่างเด่นชัด ในระยะนี้พบว่าการกระจายตัวของ HNK-1 หายไปหมด (รูปที่ 7F)

บทวิจารณ์

การศึกษานี้เป็นการศึกษารูปแบบการกระจายตัวของ HNK-1 ในตัวอ่อนระยะต่างๆซึ่งมีขนาดเล็กมาก และพัฒนาแตกต่างกันเพียงประมาณ 1.5 - 3 ชั่วโมง การนับจำนวน somite ให้ได้ถูกต้องแม่นยำนั้นค่อนข้างทำได้ยากแม้ว่าจะนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องดูรูปร่างของตัวอ่อนประกอบกับการนับ somite เพื่อให้การกำหนด stage ที่เที่ยงตรงขึ้น แม้ว่า cryo-section จะแสดงผลของปฏิกิริยาเด่นชัดกว่า paraffin section แต่คุณภาพของ section ในแง่การคง morphology ของตัวอ่อนซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการบอก stage ของตัวอ่อนนั้น cryo-section ด้อยกว่า paraffin section มาก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเตรียม section เป็น paraffin section เป็นส่วนใหญ่

ผลการทดลองแสดงว่า HNK-1 มีรูปแบบการกระจายใน mesenchyme ที่สอดคล้องกับการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ กล่าวคือ พบ HNK-1 ปรากฏอยู่ทั่วไปในระยะก่อนที่ neural crest cell จะเริ่มอพยพ และในระยะ somite 3-4 ก่อนที่นิวรัลเครสเซลล์เริ่มอพยพเล็กน้อย HNK-1 จะค่อยๆเริ่มหายไปจาก mesenchyme บริเวณติดต่อ epithelium แต่จะคงเหลือปรากฏอยู่ใน mesenchymal core และ เมื่อนิวรัลเครสเซลล์เริ่มอพยพมาปะปนอยู่ใน mesenchyme บริเวณขอบๆ พบว่า HNK-1 หายไปจาก mesenchyme มากขึ้น และหายไปมากขึ้นเรื่อยๆเมื่อตัวอ่อนพัฒนาขึ้น จนถึงระยะ somite 11-12 ไม่ปรากฏ HNK-1 ใน mesenchyme เลย

จากรูปแบบการกระจายตัวนี้ ทำให้สามารถพิสูจน์สมมติฐานที่ตั้งไว้ในบทนำได้ คือ HNK-1 มีการกระจายตัวของอยู่ใน pathway ของนิวรัลเครสเซลล์ และรูปแบบของการกระจายตัวนั้นสัมพันธ์กับการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์กลุ่มที่อพยพออกมาจากสมองส่วนกลาง จากรูปแบบการกระจายตัวนี้ทำให้สามารถตั้งสมมติฐานถึงบทบาทของ HNK-1 ต่อนิวรัลเครสเซลล์ได้ 2 ทาง คือ สมมติฐานแรก HNK-1 ปรากฏขึ้นเพื่อเหนี่ยวนำให้นิวรัลเครสเซลล์เกิดการอพยพ และ สมมติฐานที่สองคือ HNK-1 ทำหน้าที่เป็นตัวขัดขวางการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ ซึ่งจากผลการทดลองเพียงเท่านี้เราไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นไปตามสมมติฐานใด จึงทำให้เกิดการศึกษาในการกระจายตัวของ HNK-1 ใน homozygous *rSey* ขึ้น

จากการศึกษาของ Matsuo et al พบว่า anterior midbrain crest cell ของ homozygous *rSey* กลุ่มที่เริ่มอพยพก่อน (เริ่มอพยพตั้งแต่ somite 5) ไม่สามารถอพยพไปยังจุดหมายบริเวณ

frontonasal process ได้ และเมื่อได้ทดลองเอา midbrain crest cell จากตัวอ่อนปกติไปฉีดให้ homozygous *rSey* ก็ยังไม่สามารถไปถึงจุดหมายได้ ในขณะที่ตัวอ่อนปกติที่เป็น control เมื่อฉีด midbrain crest cell จากตัวอ่อนอื่นเข้าไป นิวรัลเครสเซลล์ที่ฉีดเข้าไปนั้นสามารถอพยพไปยังจุดหมายได้ปกติ จากการทดลองนี้ทำให้ได้ข้อสรุปว่า ใน homozygous *rSey* น่าจะมีปัจจัยบางอย่างที่ มาขัดขวางการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ และปัจจัยที่มาขัดขวางนั้นอาจจะเกี่ยวข้องกับ HNK-1 เราจึงได้ทำการศึกษารูปแบบการกระจายตัวของ HNK-1 ใน homozygous *rSey* ดังจะได้กล่าวถึงใน บทต่อไป

V. การศึกษาการกระจายตัวของ HNK-1 ใน day 10 homozygous *rSey*

วิธีการทดลอง

การศึกษาการกระจายตัวของ HNK-1 ใน homozygous *rSey* เหมือนกับใน wild type ทุกประการ ต่างกันตรงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างซึ่งต้องแบ่งบาง section มาทำการตรวจหา Pax-6 โปรตีน โดยใช้วิธี Immunohistochemical technique และวิธีแสดงปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค Avidin-Biotin Complex และ DAB reaction เช่นกัน

การเก็บตัวอย่าง Day 10 homozygous *rSey* ต้องทำโดยการเก็บตัวอย่าง embryos ที่เกิดจากการผสมระหว่าง heterozygote พร้อมทั้ง label embryos ทุกตัว ในส่วนนี้เราเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 66 samples จากแม่หนู 7 ตัว โดยแต่ละตัวอย่างจะถูก label ด้วยหมายเลข 3 หลัก คือ

หลักที่ 1 มีตั้งแต่ 1 ถึง 7 เป็นหมายเลขที่เรากำหนดให้แม่หนูที่นำมาเก็บตัวอย่าง

หลักที่ 2 และ 3 เป็นหมายเลขประจำตัวของตัวอ่อน เนื่องจากจำนวนลูกหนูในหนึ่งท้องมีได้ 12-16 ตัว จึงใช้เลข 2 หลัก

ดังนั้น #402 หมายถึง ตัวอย่างที่ 2 จากแม่ตัวที่ 4 หรือ #612 หมายถึง ตัวอย่างที่ 12 จากแม่ตัวที่ 6 จากนั้นเราจะทำการตัด sample ทุกตัวอย่างเป็น section หนาประมาณ 7 ไมครอนใน paraffin section และจะเลือกเก็บ section จากแต่ละตัวอย่างมา 3 sections จากตำแหน่งที่ห่างกันมาทำการย้อม Pax-6 โปรตีนในแผ่น glass slide เดียวกันเพื่อควบคุมภาวะการย้อมให้เป็นภาวะเดียวกัน

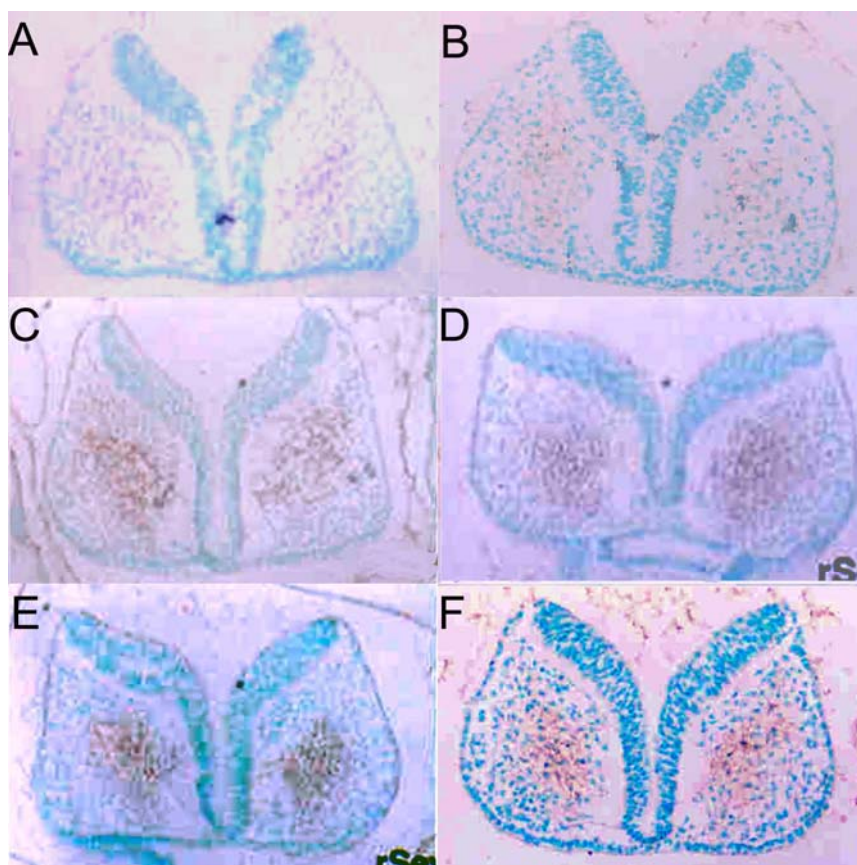
การตรวจหา Pax-6 โปรตีนในทุกตัวอย่างจะทำพร้อมกัน ตามที่ได้เสนอผลการศึกษามาแล้วว่า homozygote จะแสดงผล negative ต่อ pax-6 โปรตีน เนื่องจาก antibody ที่เราใช้ศึกษาเตรียมขึ้นจาก Pax-6 โปรตีนบริเวณ C terminus ซึ่งเป็นส่วนที่ขาดหายไป ใน homozygote ดังนั้นเพื่อให้แน่ใจว่าผล negative ที่ได้นั้นไม่ได้เกิดจากการผิดพลาดของการทดลอง จึงต้องใช้ตัวอย่างจาก wild type เป็นตัวควบคุม (positive control) นอกเหนือจาก negative control ซึ่งใช้ 2% Horse serum in PBS แทน primary antibody และเราจะสรุปว่าตัวอย่างใดเป็น homozygote เมื่อทั้ง 3 section จากตัวอย่างนั้นให้ผล negative ทั้งหมดและตัวควบคุมนั้นต้องได้ผล positive

จากนั้นจึงนำ section จากตัวอย่างที่ negative มาทำการศึกษาการกระจายตัวของ HNK-1 โดยใช้ wild type stage เดียวกัน และ ในบางการทดลองก็ทำการศึกษาการกระจายตัวของ HNK-1 ในตัวอย่างที่ตรวจพบ Pax-6 โปรตีนด้วย

ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า ตัวอย่างจาก Day10 ที่ได้จากการผสมกันระหว่าง heterozygote ทั้งหมด 66 อย่าง จากแม่หนู 7 ตัว มี 14 ตัวอย่างที่ให้ผล negative ทั้ง 3 section โดยมี stage ต่างกันตั้งแต่ somite 3-4 ถึง somite 9-10

ผลจากการนำตัวอย่างที่ negative มาทำการศึกษาการกระจายตัวของ HNK-1 พบผลที่น่าสนใจดังที่แสดงในรูปที่ 8 คือ ในระยะ somite 7-8 การกระจายตัวของ HNK-1 ในส่วน mesenchymal core ของ wild type embryo จะเริ่มหายไป (รูปที่ 8A) เช่นเดียวกับ #702 ซึ่งเป็นตัวอ่อนที่เราตรวจพบ Pax-6 โปรตีน (รูปที่ 8B) แต่ในตัวอย่างที่เราสรุปว่าเป็น homozygote 4 ตัวอย่าง คือ #402, #606, #612 และ #703 ยังคงมีการกระจายของ HNK-1 อยู่ที่ mesenchymal core ของตัวอ่อนอยู่มากกว่าทั้งปริมาณและพื้นที่เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ไม่ใช่ homozygote (รูปที่ 8C, D, E และ F)



รูปที่ 8 การกระจายตัวของ HNK-1 ใน homozygous *rSey* ระยะ somite 7-8 **A:** wild type; **B:** ตัวอ่อน #702 ซึ่งเป็นตัวอ่อนที่เราตรวจพบ Pax-6 โปรตีน **C:** ตัวอ่อน #402; **D:** ตัวอ่อน #606; **E:** ตัวอ่อน #612; และ **F:** ตัวอ่อน #703 C-Fเป็นตัวอ่อนที่เราตรวจไม่พบ Pax-6 โปรตีน และระบุว่าเป็น homozygous *rSey*

บทวิจารณ์

จากตัวอย่างที่ศึกษาจากการผสมกันระหว่าง heterozygous *rSey* เราสามารถเก็บตัวอย่างได้ตัวอ่อน 66 ตัวจากแม่พันธุ์ 7 ตัว โดยเมื่อตรวจสอบตัวอ่อนด้วยการตรวจสอบหา Pax-6 โปรตีนพบว่า เป็น homozygous *rSey* ทั้งหมด 14 ตัวอย่าง ซึ่งคิดได้เป็นสัดส่วน 1:4.7 ซึ่งอยู่ในสัดส่วนที่เป็นไปตามกฎพันธุกรรมที่ควรจะได้ homozygous *rSey* จำนวน 1:4 เป็น heterozygous *rSey* จำนวน 2:4 และเป็น wild type จำนวน 1:4

ผลการศึกษาการกระจายตัวของ HNK-1 พบว่า homozygous *rSey* มีการกระจายตัวของ HNK-1 แตกต่างจาก wild type ที่ระยะเดียวกัน โดยมีความเข้มข้นและขอบเขตการกระจายตัวกว้างกว่า wild type จากรูปแบบการกระจายตัวนี้รวมกับการศึกษาที่ผ่านมาทำให้สรุปได้ว่า HNK-1 น่าจะมีบทบาทในการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ โดยในหนู wild type HNK-1 จะหายไปเมื่อนิวรัลเครสเซลล์เคลื่อนตัวตั้งรูปแบบการกระจายตัวที่เสนอไปแล้วในบทที่แล้ว กล่าวคือ ในระยะ presomite ซึ่งนิวรัลเครสเซลล์ยังไม่เริ่มอพยพ HNK-1 จะกระจายตัวอยู่ทั่วไปใน mesenchyme เมื่อ HNK-1 หายไปจาก mesenchyme บริเวณติดต่อ epithelium เป็นเวลาเดียวกับที่นิวรัลเครสเซลล์เริ่มอพยพเข้าไปปะปนใน mesenchyme บริเวณนั้น จากนั้นเมื่อนิวรัลเครสเซลล์อพยพเข้าไปปะปนกับ mesenchyme มากขึ้น พบว่า การกระจายตัวของ HNK-1 จะมีขอบเขตน้อยลงจนไม่สามารถพบการกระจายตัวของ HNK-1 เลยในระยะ somite 11-12 ส่วนใน homozygous *rSey* นั้นพบว่า ในระยะที่นิวรัลเครสเซลล์กำลังเคลื่อนตัวอยู่นั้น (ดังเช่นระยะ somite 7-8 ในรูปที่ 8) พบว่ามี HNK-1 กระจายอยู่ในขอบเขตที่กว้างกว่าและปริมาณมากกว่า wild type และ littermate ซึ่งตรวจพบ Pax-6 โปรตีนจึงเป็นไปได้ว่า HNK-1 เป็นปัจจัยที่ขัดขวางต่อการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ใน homozygous *rSey* ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สนับสนุนผลการศึกษาที่ทำโดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นซึ่งทำในงานเพาะเลี้ยง

บทวิจารณ์สรุป

การศึกษาในโครงการนี้ต้องการศึกษาบทบาทของ HNK-1 ต่อการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ ซึ่งเพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์นี้ จำเป็นต้องทำการศึกษาตามขั้นตอนตามที่ได้เสนอในโครงการ คือ

วัตถุประสงค์ที่ 1

สร้าง colony ของหนู rat small eye (*rSey*) เพื่อเป็นแหล่งป้อนตัวอย่างในการศึกษา

วัตถุประสงค์ที่ 2

หาวิธีการแยก homozygote ออกจาก littermate ตั้งแต่ระยะ presomite ที่มีความเที่ยงตรงสูง และสิ้นเปลืองน้อยที่สุด โดยเสนอ 2 วิธี คือ การแยกจาก genotype โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และการแยกโดยการตรวจหา Pax-6 โปรตีนโดยวิธี immunohistochemical technique

วัตถุประสงค์ที่ 3

ศึกษารูปแบบการกระจาย (distribution pattern) ของ HNK-1 ใน pathway of migration ของนิวรัลเครสเซลล์กลุ่มที่อพยพออกมาจากสมองส่วนกลาง ในระยะตั้งแต่ก่อนและระหว่างการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ในหนู wild type

วัตถุประสงค์ที่ 4

ศึกษารูปแบบการกระจาย (distribution pattern) ของ HNK-1 ใน pathway of migration ของนิวรัลเครสเซลล์กลุ่มที่อพยพออกมาจากสมองส่วนกลาง ในระยะตั้งแต่ก่อนและระหว่างการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ในหนู homozygous *rSey*

ซึ่งตามที่ได้รายงานมาแต่ต้น เราได้ทำการศึกษาตามที่ได้เสนอไว้ทั้งหมดและได้ผลตามที่เราคาดหวังไว้เกือบทั้งหมด โดยมีเพียงการแยก homozygous *rSey* ออกจาก littermate โดยวิธี PCR เท่านั้นที่ไม่บรรลุวัตถุประสงค์ เนื่องจากประสบปัญหาในการสกัด DNA และเราไม่ได้มุ่งทำการศึกษาเพื่อแก้ปัญหาเหล่านั้น เพราะเราได้เสนอวิธีในการแยก homozygous *rSey* 2 วิธี และอีกวิธีที่เราเสนอ คือ การแยกโดยการตรวจหา Pax-6 โปรตีนนั้นใช้ได้ผลดี และเหตุผลสำคัญที่เราไม่ทำการศึกษานี้ต่อ คือ วัสดุในการทดลองมีราคาแพงมาก งบประมาณที่เราได้ไม่เพียงพอ

ส่วนผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้ เป็นไปตามสมมติฐานของการศึกษาที่ได้กล่าวไว้ในบทนำ คือ เราพบว่า HNK-1 มีการกระจายตัวอยู่ตามเส้นทางอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ของตัวอ่อน wild type ระยะตั้งแต่ presomite จนถึงระยะ somite 9-10 ซึ่งเป็นระยะก่อนที่นิวรัลเครสเซลล์โดยเฉพาะกลุ่ม midbrain เริ่มการอพยพเล็กน้อยจนถึงระยะเกือบจะสิ้นสุดการอพยพ ซึ่งถือว่าช่วงเวลาของการกระจายตัวของ HNK-1 สอดคล้องกับช่วงเวลาของการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์

นอกจากนี้รูปแบบการกระจายตัวของ HNK-1 ยังสอดคล้องกับการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ โดย HNK-1 จะปรากฏขึ้นก่อนการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ จากนั้นจะหายไปจากเส้นทางเมื่อนิวรัลเครสเซลล์เริ่มการอพยพ ซึ่งรูปแบบการกระจายตัวนี้ทำให้สามารถตั้งสมมติฐานถึงบทบาทของ HNK-1 ต่อนิวรัลเครสเซลล์ได้ 2 สมมติฐาน คือ สมมติฐานที่หนึ่ง HNK-1 เหนี่ยวนำให้เกิด

การอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ และ สมมติฐานที่สอง HNK-1 เป็นตัวขัดขวางการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์

ผลการทดลองในส่วนที่ศึกษาใน homozygous *rSey* ซึ่งมีความผิดปกติในการเคลื่อนตัวของนิวรัลเครสเซลล์กลุ่ม midbrain พบการกระจายตัวที่มากกว่าใน wild type เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนระยะเดียวกัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่า บทบาทของ HNK-1 ต่อนิวรัลเครสเซลล์น่าจะเป็นไปตามสมมติฐานที่สอง คือ HNK-1 ขัดขวางการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์อยู่ เมื่อการกระจายตัวของ HNK-1 หายไป นิวรัลเครสเซลล์จึงเริ่มอพยพ และการที่ HNK-1 ยังกระจายอยู่ในเส้นทางอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ของ homozygous *rSey* ทำให้นิวรัลเครสเซลล์โดยเฉพาะกลุ่ม midbrain ไม่สามารถเคลื่อนตัวผ่านไปยังจุดหมายได้

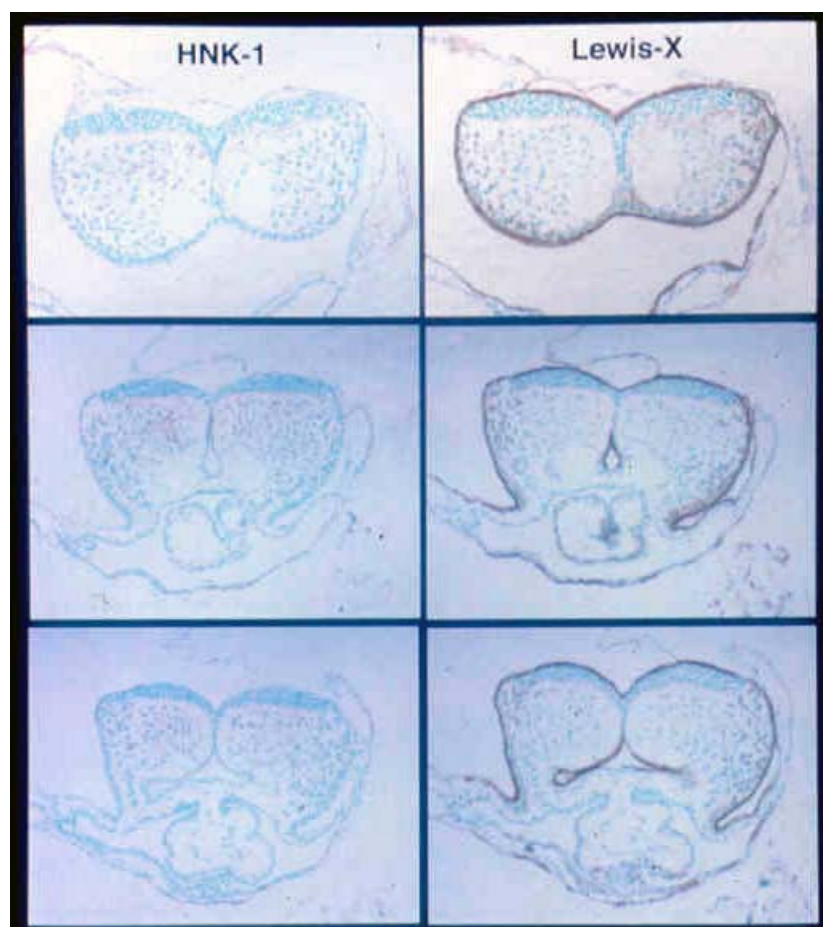
ผลการศึกษานี้สนับสนุนการศึกษาของนักวิจัยชาวญี่ปุ่นซึ่งตีพิมพ์ในปี ค.ศ. 2001 โดย Nagase et al. (เอกสารอ้างอิงที่ 17) ซึ่งเป็นงานวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ทำการศึกษาสำรองไว้ในส่วนของ neural crest cell culture (ผู้เขียนได้กล่าวถึงในส่วน acknowledgement) ซึ่งขณะที่ข้าพเจ้าเขียนโครงร่างเพื่อการศึกษาเรื่องนี้เสนอต่อ สกว. ขณะนั้นไม่สามารถตรวจพบการตีพิมพ์นี้ในฐานข้อมูล หลังจากได้รับทุนและทำการขยาย colony ของ rat small eye ไปแล้วระยะหนึ่งจึงพบการตีพิมพ์นี้ และได้รายงานถึงปัญหาที่อาจทำให้การศึกษานี้ไม่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติไปยัง สกว. โดยตลอด อย่างไรก็ตาม การตีพิมพ์ดังกล่าว รายงานถึงบทบาทของ HNK-1 ในการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์กลุ่ม midbrain ในหลอดทดลอง ส่วนการศึกษาในส่วนของการกระจายตัวของ HNK-1 ในระยะ Day-10 ซึ่งเป็นระยะที่มีการเคลื่อนตัวของนิวรัลเครสเซลล์ และการที่ homozygous *rSey* มีการกระจายตัวที่ผิดปกติไปนั้นยังไม่มีรายงานในการตีพิมพ์นี้

หลังจากที่ได้รายงานปัญหาที่เกิดขึ้นแก่ สกว. และได้รับคำแนะนำจากอาจารย์ที่ปรึกษาและผู้ทรงคุณวุฒิจาก สกว. ข้าพเจ้าได้รับอนุมัติให้ทำการศึกษาต่อในปีที่ 2 โดยที่ข้าพเจ้าได้เสนอว่า จะเพิ่มการทำ immunohistochemical staining ของ Pax-7 ซึ่งมีรายงานว่า เป็น marker สำหรับนิวรัลเครสเซลล์กลุ่มที่จะอพยพไปยัง lateral nasal process ซึ่งส่วนใหญ่คือ midbrain crest cell ซึ่งได้ทำการสั่งซื้อ antibody จากต่างประเทศแล้วแต่ยังไม่ได้ผลการทดลองในส่วนนี้

ข้าพเจ้าได้ทำการศึกษารูปแบบการกระจายของ Lewis-X ในตัวอ่อน wild type เพิ่มเติมจากที่เสนอไว้ สาเหตุที่เลือกศึกษา Lewis-X เนื่องจากเป็นอนุพันธ์น้ำตาลเช่นเดียวกับ HNK-1 และมีรายงานว่า Lewis-X หรือ SSEA-1 เป็น early marker ของนิวรัลเครสเซลล์บางกลุ่มในสัตว์ปีก ผลที่ได้ที่น่าสนใจคือ พบการกระจายของ Lewis-X ที่ epithelium ของตัวอ่อนทุกระยะ และ พบที่ผนังของเซลล์ใน mesenchyme บางเซลล์ ซึ่งน่าจะเป็นนิวรัลเครสเซลล์ เมื่อนำ serial section มาทำการย้อมสลับกันระหว่าง HNK-1 และ Lewis-X พบว่า ไม่มีการ overlap กันระหว่างอนุพันธ์น้ำตาลทั้งสอง จากรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่าบริเวณที่มีการกระจายของ HNK-1 ไม่มีเซลล์ที่น่าจะเป็นนิวรัลเครส (เซลล์ที่ย้อมติด Lewis-X) อยู่ อย่างไรก็ตามขณะนี้ยังไม่ได้ทำในส่วน of homozygous *rSey* เนื่องจาก Pax-6 antibody หมดและยังไม่มียงบประมาณที่จะซื้อใหม่ ซึ่งข้าพเจ้ามีความเห็นว่าการได้ผลใน homozygous *rSey* ร่วมกับ ผลส่วนที่ทำการศึกษา Pax-7 การศึกษานี้น่าจะมีน้ำ

หนักมากพอที่จะได้รับการตีพิมพ์ได้ ทั้งนี้ข้าพเจ้าตั้งใจว่า หากรายงานนี้ได้รับความเห็นชอบจากกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ และได้รับอนุมัติเงินค่าตอบแทนส่วนที่เหลือ ข้าพเจ้าจะนำเงินค่าตอบแทนมาทำซื้อ antibody และทำการศึกษาต่อ

นอกจากนี้ ผลที่ได้จากการศึกษานี้มีสิ่งที่ข้าพเจ้าเห็นว่าเป็นประโยชน์อย่างมากคือ การมี colony ของ rat small eye ในประเทศของเรา ซึ่งเราสามารถใช้ rat small eye ในการศึกษาเรื่อง tooth development โดยเป็นวิทยานิพนธ์ของนิสิตปริญญาเอก ผลงานในเรื่อง tooth development นี้ได้ไปเสนอที่งานประชุมระดับนานาชาติถึง 2 ครั้ง โดยใช้ชื่อแหล่งทุนนี้โดยตลอด และขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการเตรียม manuscript เพื่อเสนอต่อ Development ซึ่งเป็นวารสารระดับนานาชาติที่มี impact factor สูงและมีความเป็นไปได้ที่จะได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์



รูปที่ 9 การกระจายตัวของ ซ้าย HNK-1 และ ขวา Lewis-X ใน wild type ระยะ somite 5-6 ที่ plane ต่างๆ

หนังสืออ้างอิง

1. Bronner-Fraser M (1987) Perturbation of cranial neural crest migration by the HNK-1 antibody. *Devl Biol* **123**, 321-31.
2. Chalepakis G, Tremblay P and Gruss P (1992) Pax genes, mutant and molecular function. *J Cell Sci Suppl* **16**, 61-7.
3. Chareonvit S. (2002) Distribution of fibronectin, laminin, tenascin, chondroitin sulfate proteoglycan and HNK-1 epitope in the head region of the homozygous rat small eye (*rSey*) embryos. *ScienceAsia* **28**, 87-92.
4. Chisholm AD and Horvitz HR (1995) Patterning of the *Caenorhabditis elegans* head region by the *Pax-6* family member *vab-3*. *Nature* **377**, 52-5.
5. Fujiwara M, Uchida T, Osumi-Yamashita N and Eto K (1994) Uchida rat (*rSey*): a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse *Sey* mutant. *Differentiation* **57**, 31-8.
6. Glaser T, Walton DS and Maas RL (1992) Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nature Genet* **2**, 232-9.
7. Grindley JC, Davidson DR and Hill RE (1995) The role of *Pax-6* in eye and nasal development. *Development* **121**, 1433-42.
8. Hall H, Liu L, Schachner M and Schmitz B (1993) The L2/HNK-1 carbohydrate mediates adhesion of neural cells to laminin. *Eur J Neurosci* **5**, 34-42.
9. Hanson I and Van Heyningen V (1995) Pax -6: more than meets the eye. *Trends Genet* **11**, 268-78.
10. Hill RE, Favor J and Hogan BLM (1991) Mouse small eye results from mutation in paired-like homeobox-containing gene. *Nature* **354**, 522-8
11. Hoffmann S and Edelman GM (1987) A proteoglycan with HNK-1 antigenic determinants is a neuron associated ligand for cytotactin. *Proc natn Acad Sci USA* **84**, 2523-7.
12. Jordan T, Hanson I, Zaletayev D, Hodgson S, Prosser J, Seawright A, Hastie N and Van Heyningen V (1992) The human *PAX-6* gene is mutated in two patients with aniridia. *Nature Genet* **1**, 328-32.
13. Krauss S, Johanson T, Korzh V and Fjose A (1991) Expression pattern of zebrafish *pax* genes suggests a role in early brain regionalization. *Nature* **353**, 267-70.
14. Li HS, Yang JM, Jacobson RD, Pasko D and Sundin O (1994) *Pax-6* is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate: implications for stepwise

- determination of the lens. *Dev Biol* **162**, 181-94.
15. Mansouri A, Stoykova A, Torres M and Gruss P (1996) Dysgenesis of Cephalic neural crest derivatives in *Pax7*^{-/-} mutant rat. *Development* **122**, 831-838.
 16. Mutsuo T, Osumi-Yamashita N, Noji S, Ohuchi H, Koyama E, Myokai F, Mutsuo N, Taniguchi S, et al. (1993) A mutation in the *Pax-6* gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells. *Nature Genet* **3**, 299-304.
 17. Nagase T, Nakamura S, Harii K and Osumi N (2001) Ectopically localized HNK-1 epitope perturbs migration of the midbrain crest cells in *Pax-6* mutant rat. *Devel Growth Differ* **43**, 683 -692
 18. Osumi-Yamashita N, Kuratani S, Ninomiya Y, Aoki K, Iseki S, Chareonvit S, Doi H, Fujiwara M, et al. (1997) Cranial anomaly of homozygous *rSey* rat is associated with a defect in the migration pathway of midbrain crest cells. *Devel Growth Differ* **39**, 53-67.
 19. Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Doi H and Eto K (1994) The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Dev Biol* **164**, 409-19.
 20. Puelles A, Gruss P and Westerfield M (1992) Sequence and expression of *Pax-6* are highly conserved between zebrafish and mice. *Development* **114**, 643-51.
 21. Serbedzija GN, Bronner-Fraser M and Fraser SE (1992) Vital dye analysis of cranial crest cell migration in the mouse embryo. *Development* **116**, 297-307.
 22. Tan SS and Moriss-Kay G (1985) The development and distribution of the cranial neural crest in the rat embryo. *Cell Tissue Res* **240**, 403-16.
 23. Tan SS and Moriss-Kay G (1986) Analysis of cranial neural crest migration and early fates in postimplantation rat chimeras. *J Embryol Exp Morph* **98**, 21-58.
 24. Ton CCT, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, Van Heyningen V, Hastie ND, et al (1991) Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from aniridia region. *Cell* **67**, 1059-74.
 25. Walther C and Gruss P (1991) *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**, 1435-49.

Output

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

เนื่องจากมีปัญหาจากการที่มีกลุ่มนักวิจัยชาวญี่ปุ่นได้ทำการศึกษาบทบาทของ HNK-1 ต่อการอพยพของนิวรัลเครสเซลล์ และได้ตีพิมพ์ผลการศึกษาดังได้รายงานถึงปัญหานี้ต่อสกว.มาโดยตลอด อย่างไรก็ตามเนื่องจาก การศึกษารูปแบบการกระจายตัวของ HNK-1 ยังเป็นส่วนที่กลุ่มนักวิจัยดังกล่าวยังไม่ได้ทำการศึกษา ข้าพเจ้าจึงคิดว่าจะส่งผลการศึกษานี้เพื่อขอรับพิจารณาลงตีพิมพ์ต่อวารสาร ScienceAsia ในหัวข้อเรื่อง “ Distribution pattern of HNK-1 during the onset of cranial crest migration in wild type and *rSey* homozygous embryos” โดยขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการเตรียม manuscript พร้อมทั้งรออนุมัติงบประมาณเพื่อทำการทดลองส่วนที่เกี่ยวข้องกับ Pax-7 และ Lewis-X เพิ่มเติม

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ

โครงการวิจัยนี้ก่อให้เกิด colony ของ rat small eye

Rat small eye เป็นตัวอย่างความผิดปกติที่เกิดขึ้นทางธรรมชาติที่ดี เนื่องจาก Pax-6 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของหลายระบบ ทั้งระบบประสาท ความผิดปกติของใบหน้า (facial cleft) ได้แก่ ตา และ จมูก รวมทั้งระบบต่อมไร้ท่อ ได้แก่ ตับอ่อน ดังนั้น rat small eye จึงเป็นแหล่งตัวอย่างการศึกษาที่ดี

โครงการวิจัยนี้ก่อให้เกิดการสร้างนักวิจัยใหม่

เนื่องจากการที่มี colony ของ rat small eye จึงได้นำมาศึกษา และเป็นหัวข้อวิทยานิพนธ์ให้แก่บัณฑิตปริญาเอก สาขาชีววิทยาช่องปาก 1 คน คือ น.ส. รุ่งอรุณ เกรียงไกร ซึ่งได้ทำการศึกษเกี่ยวกับการสร้างฟัน maxillary incisor ซึ่งพบว่า ใน homozygous *rSey* นั้น นอกจากจะเกิด facial cleft แล้ว ยังมีปรากฏการณ์ supernumerary tooth development คือ มีการสร้างฟันที่เกินกว่าภาวะปกติ จึงทำให้เกิดสมมติฐานอันนำมาถึงหัวข้อวิทยานิพนธ์เรื่อง “Comparison of gene expression related to the maxillary incisor development between the wild type and the homozygous *rSey* with maxillary supernumerary incisors” และนอกเหนือจากนี้ เรายังได้ขยายการศึกษาไปถึงการศึกษารูปแบบของ maxillary process ต่อการสร้างฟัน maxillary incisor ซึ่งได้ไปเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 2 เรื่อง ได้แก่

R. Kraingkrai, S. Iseki, M. Fujiwara, K. Yahagi, K. Eto and S. Chareonvit. The Study of Supernumerary Incisor Formation in *rSey* Rat, March 10-13, 2004. The 82nd General Session & Exhibition of the International, American and Canadian Associations for Dental Research; Honolulu, Hawaii, USA.

R. Kraingkrai, **S. Chareonvit**, M. Fujiwara, K. Yahagi, K. Eto and S. Iseki.
Contribution of Maxillary Process Epithelium in Rat Maxillary Incisor Formation, September
3-6, 2004. The 19th International Association for Dental Research- Southeast Asia
Division; Koh Samui, Thailand.

ภาคผนวก

The Study of Supernumerary Incisor Formation in *rSey* Rat

R. Kriangkrai^{1,2}, S. Iseki², M. Fujiwara³, K.Yahagi³,
K.Eto² and S.Chareonvit¹

¹Chulalongkorn University, Faculty of Dentistry, Thailand

²Tokyo Medical and Dental University,
Graduate School of Dentistry, Japan

³Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd, Tokyo, Japan

A mutant rat with small eyes, *rSey*

rSey inherits a dominant mutation in *Pax-6* gene and this mutation leads to impaired migration of anterior midbrain neural crest cells resulting in lack of eyes, nose and facial cleft in the homozygote.

Facial morphology of new born rat

wild type

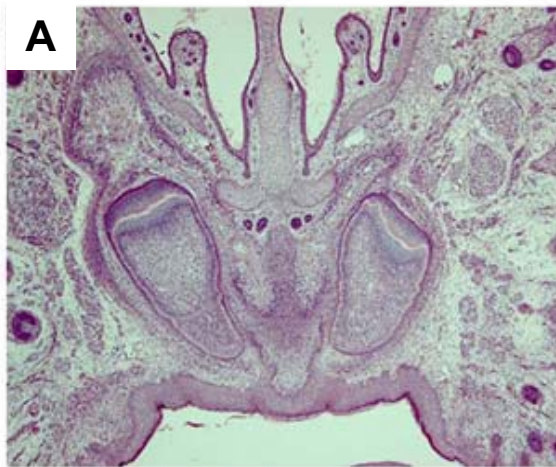


homozygote (*rSey/rSey*)



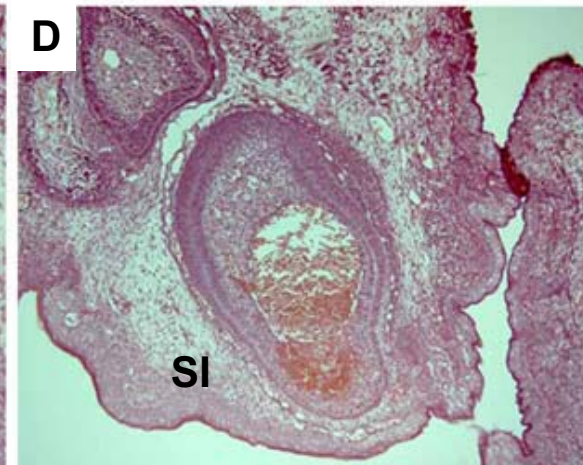
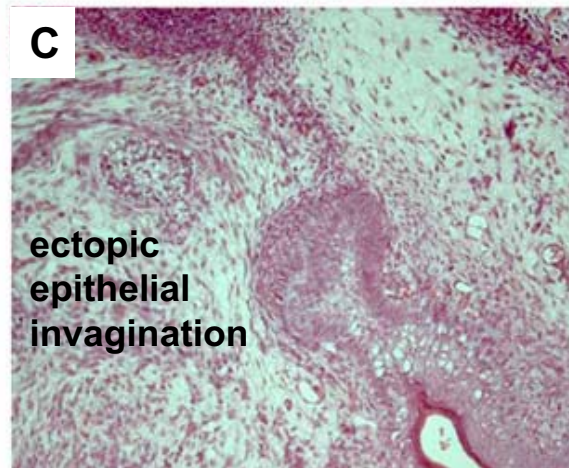
20% of homozygotes develop supernumerary incisor-like structures at E 20

wild type



A: wild type (WT)

homozygote (*rSey/rSey*)



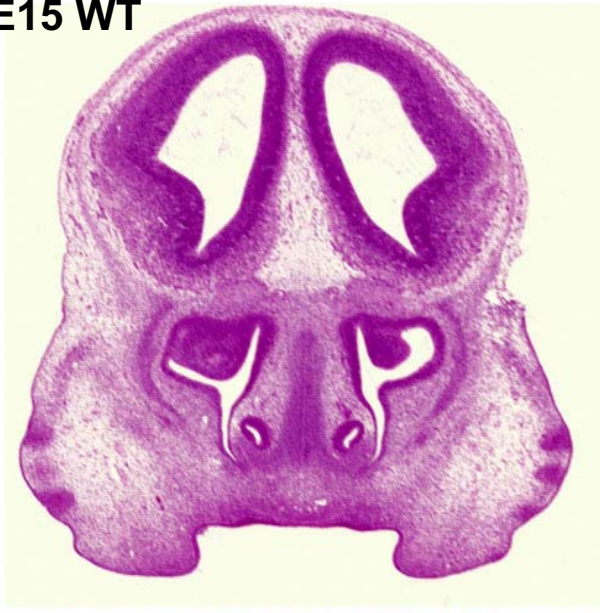
B-D: homozygote (*rSey/rSey*)

MI: maxillary incisor

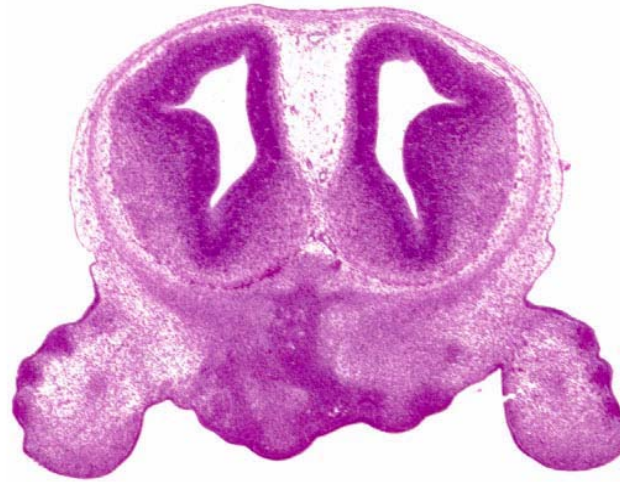
SI: supernumerary
incisor-like structure

Histology of wild type and homozygote

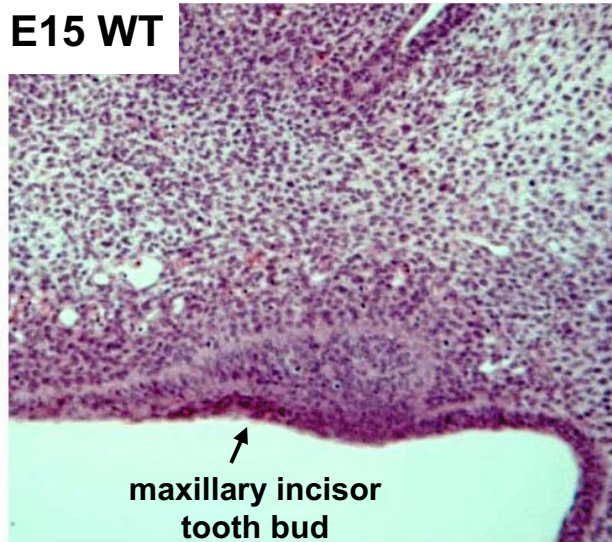
E15 WT



E15 *rSey/rSey*

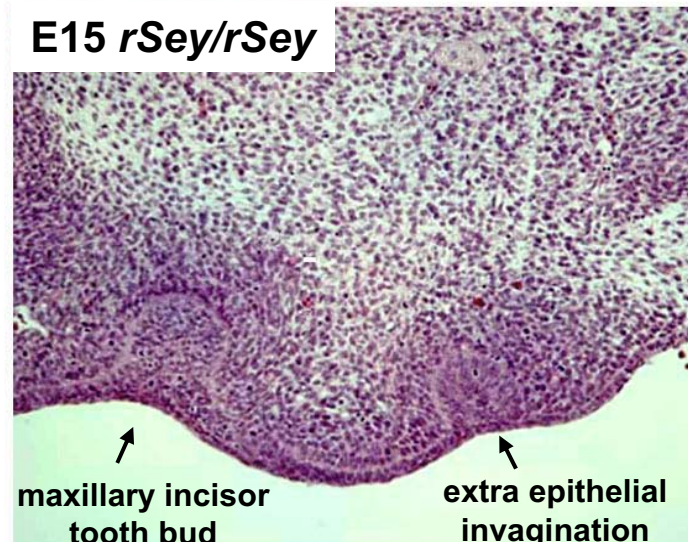


E15 WT



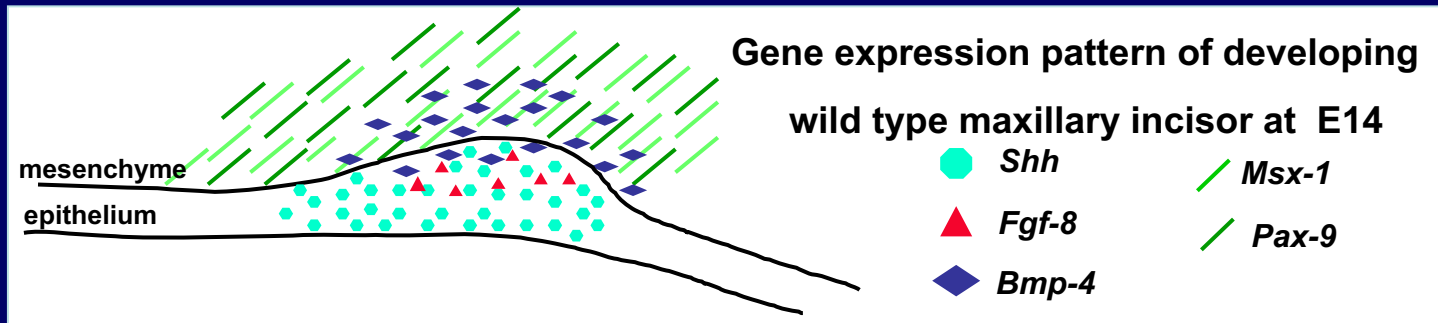
↑
maxillary incisor
tooth bud

E15 *rSey/rSey*

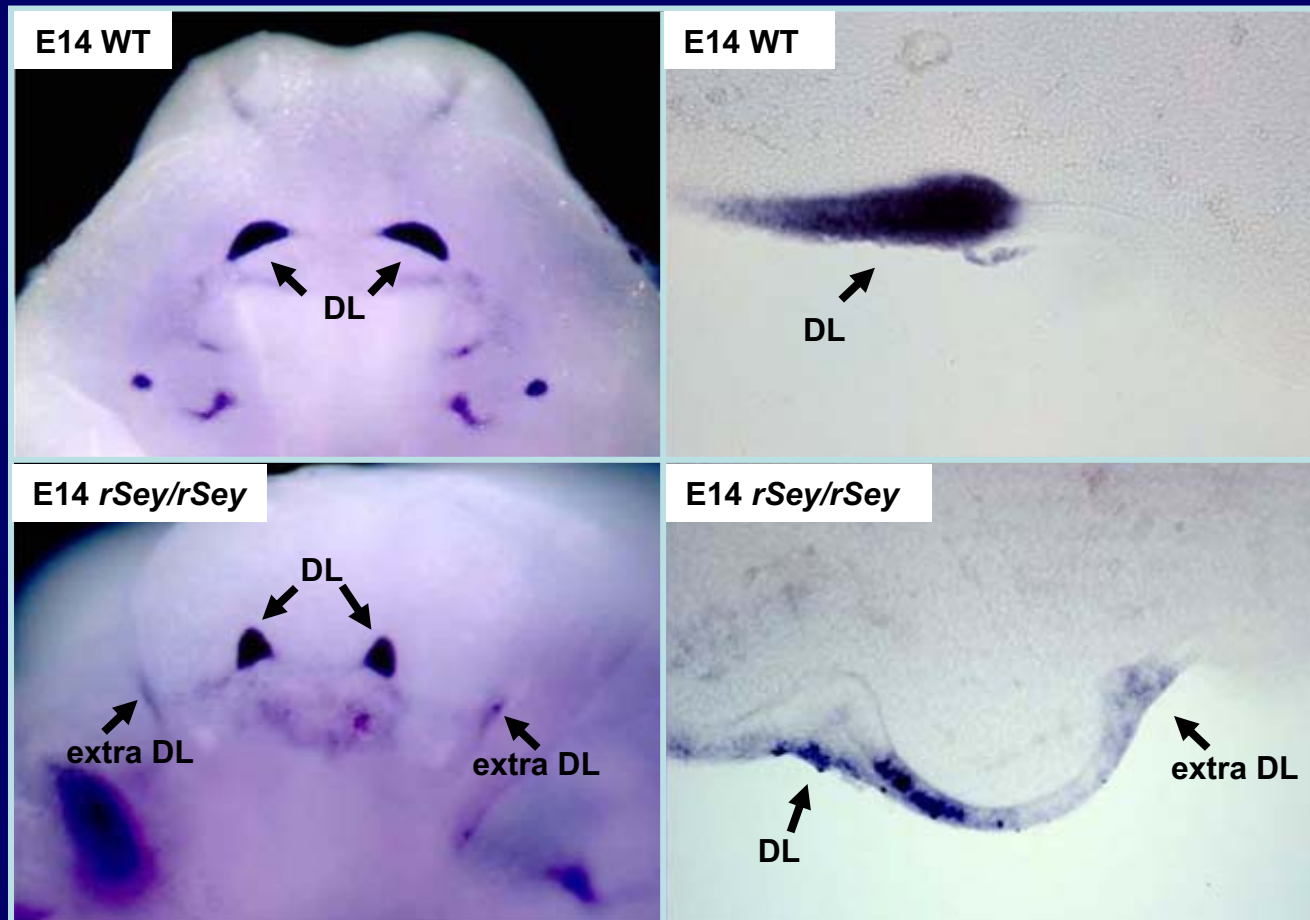


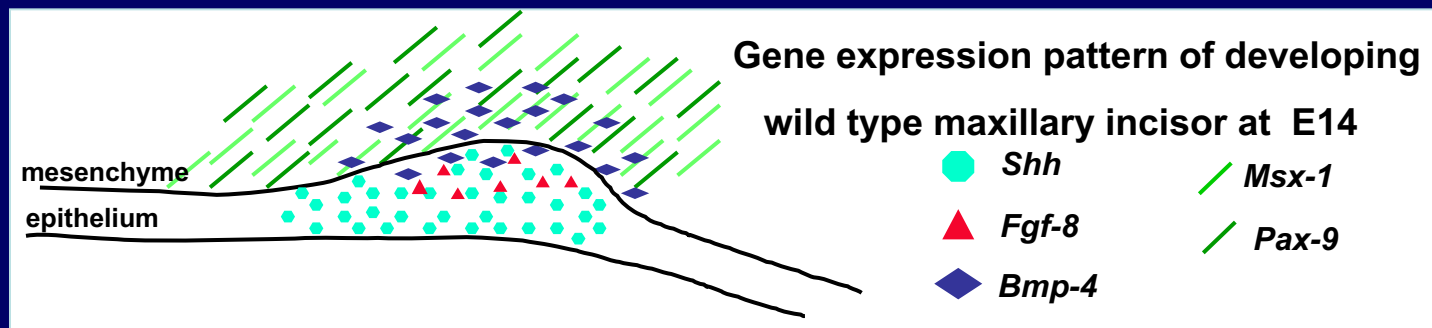
↑
maxillary incisor
tooth bud

↑
extra epithelial
invagination

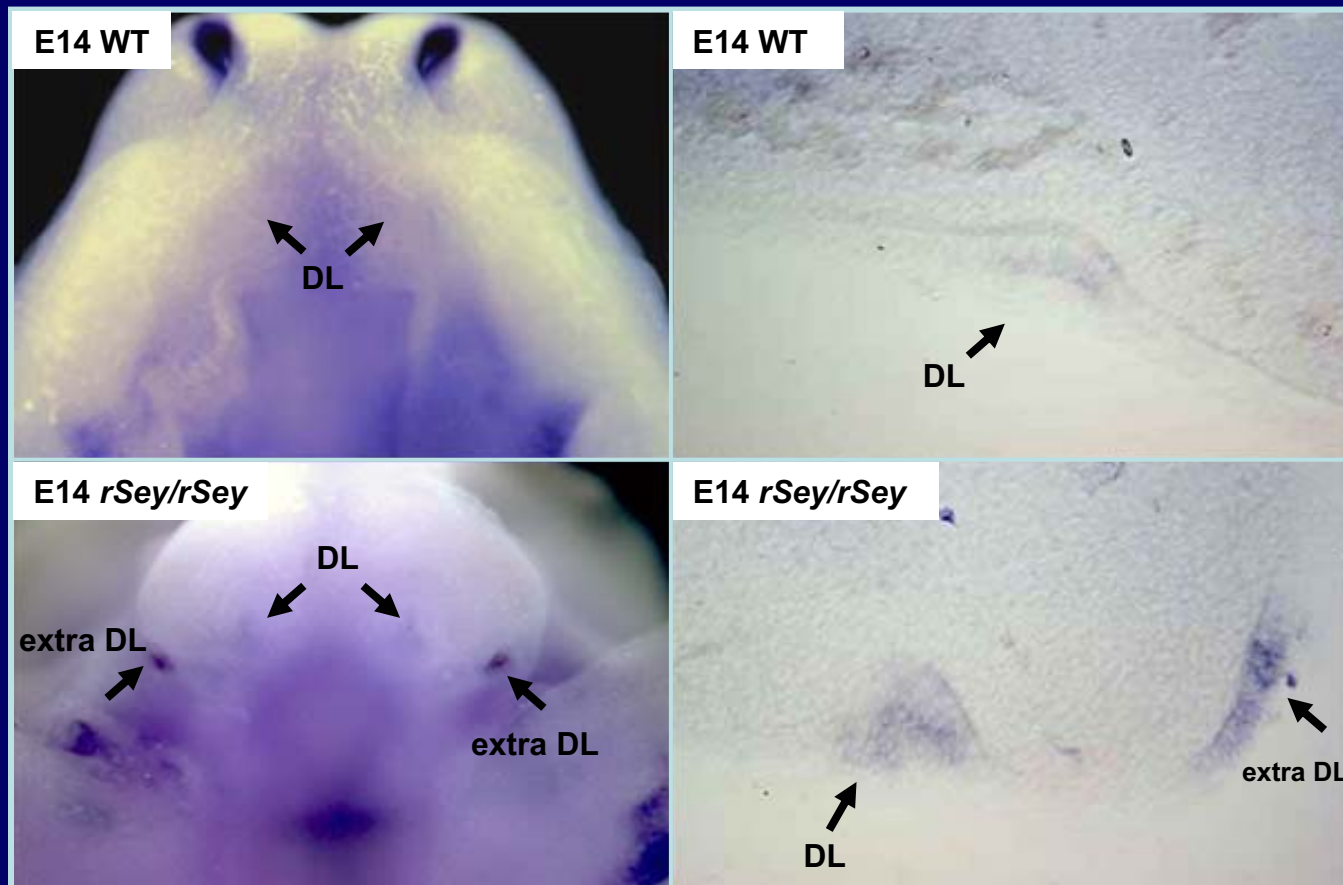


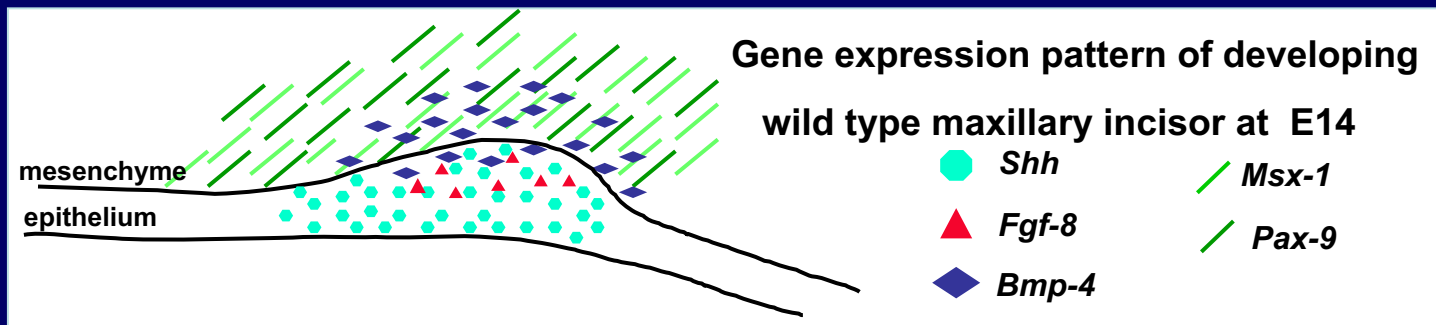
Whole mount *in situ* hybridization of *Shh*



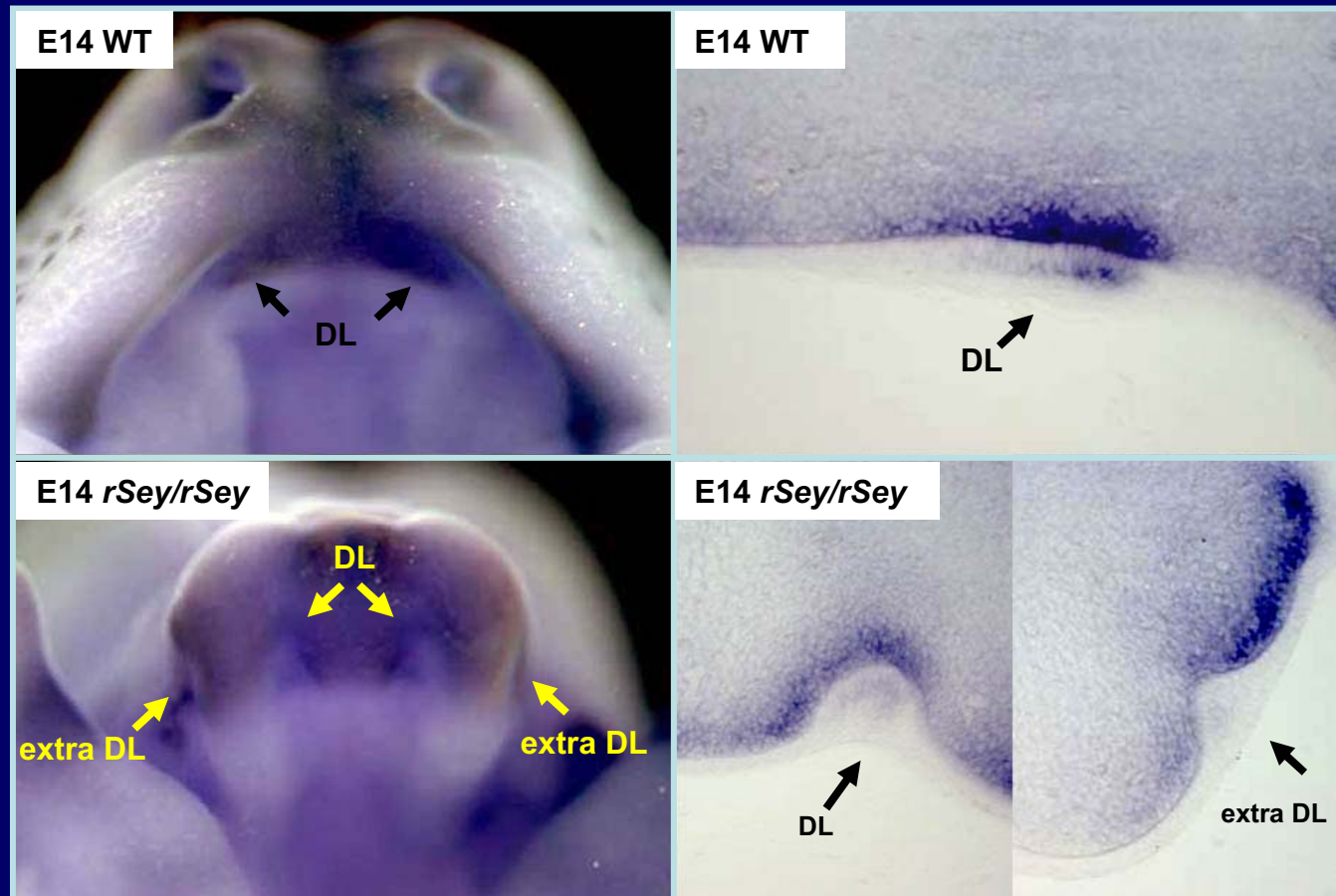


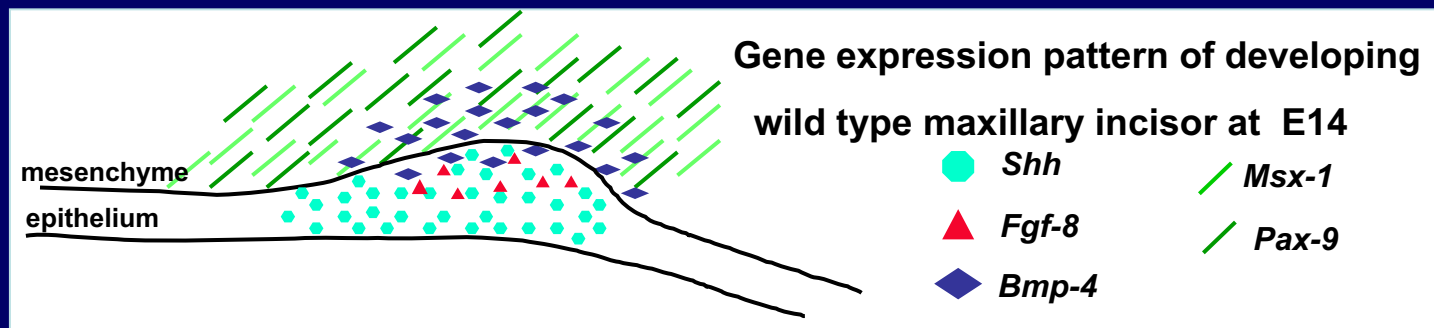
Whole mount *in situ* hybridization of *Fgf-8*



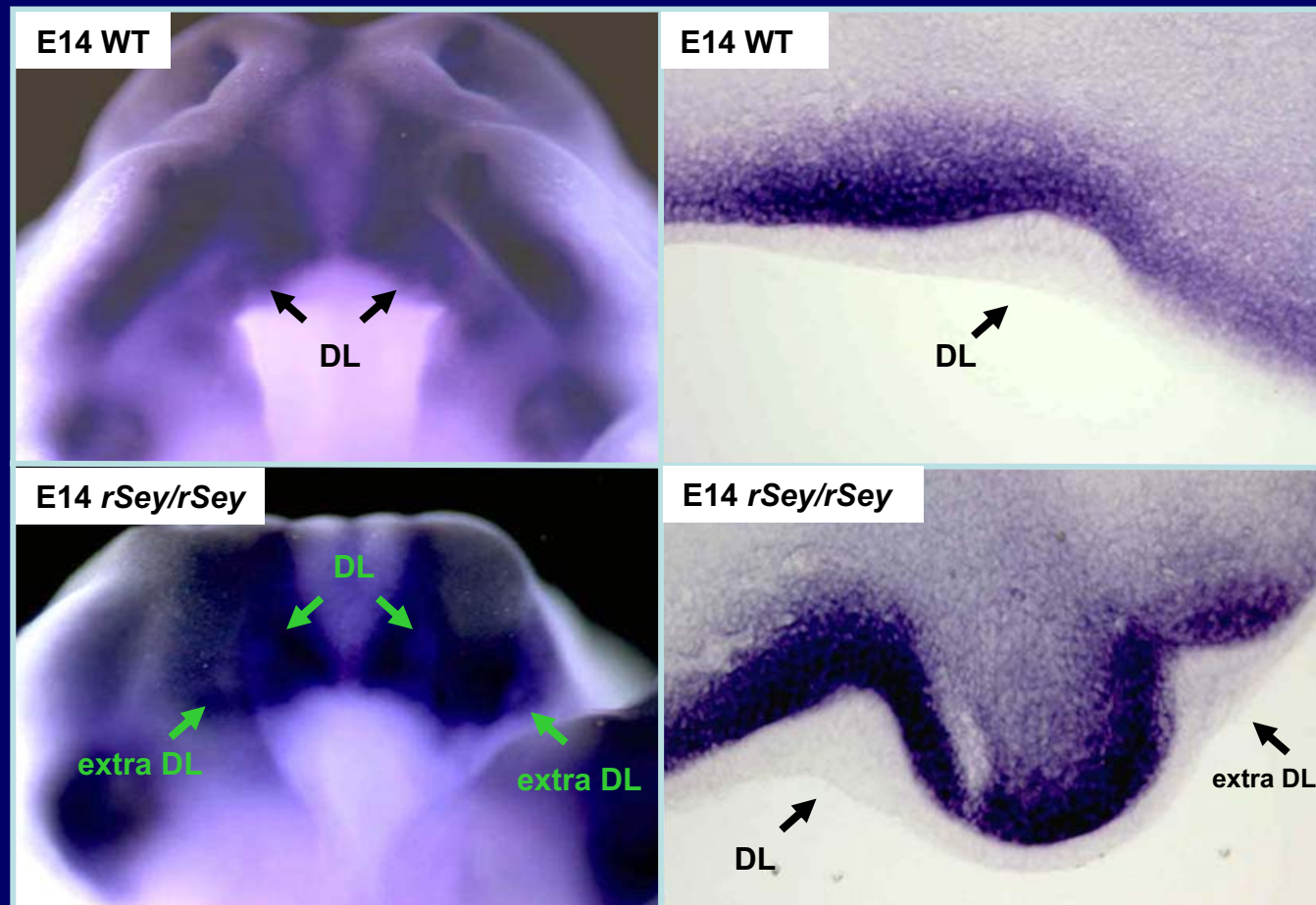


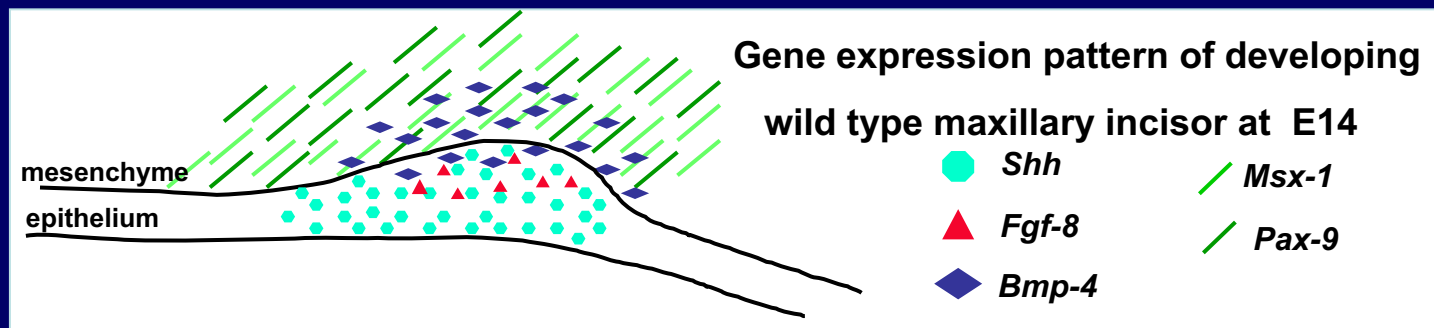
Whole mount *in situ* hybridization of *Bmp-4*



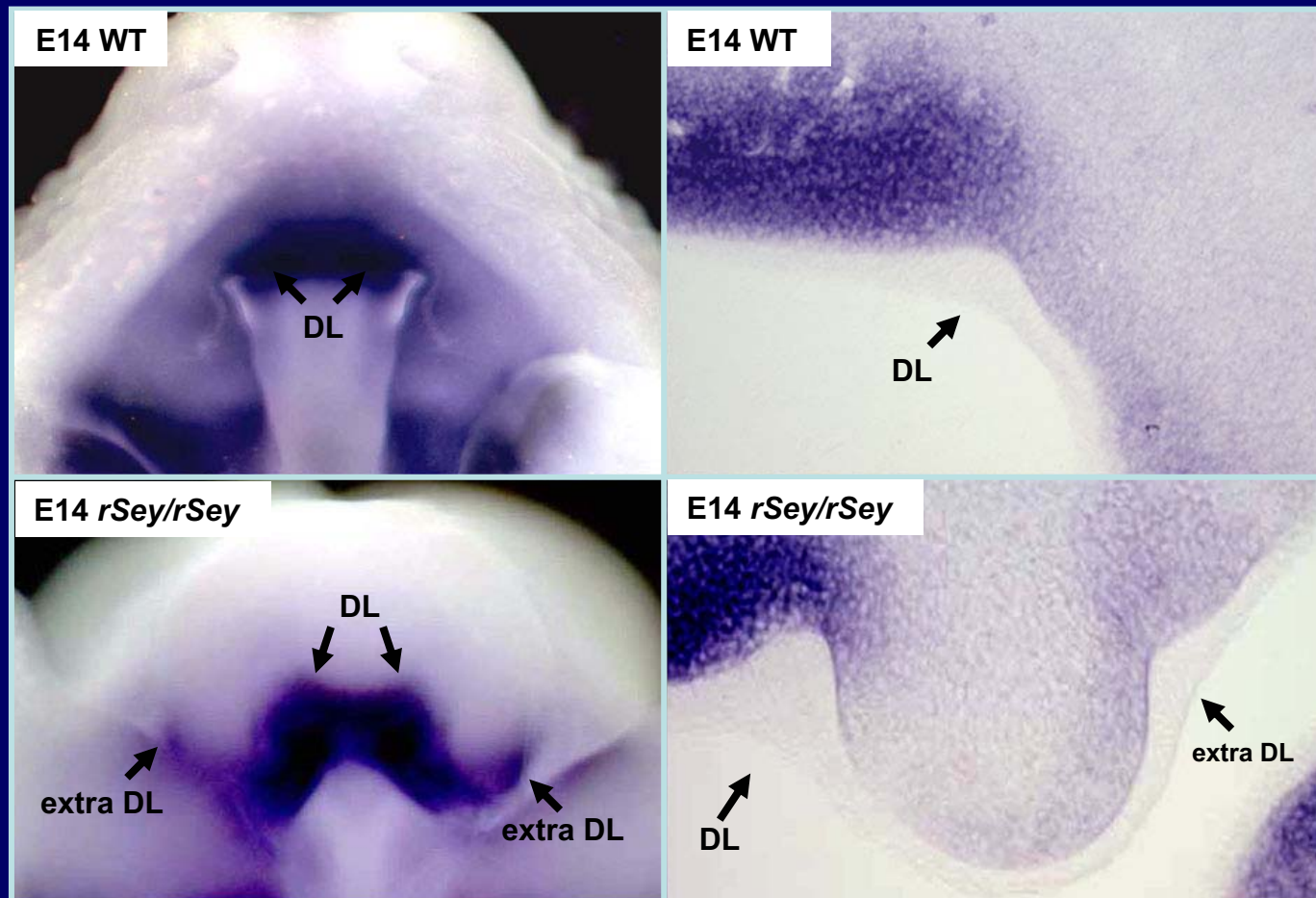


Whole mount in situ hybridization of *Msx-1*

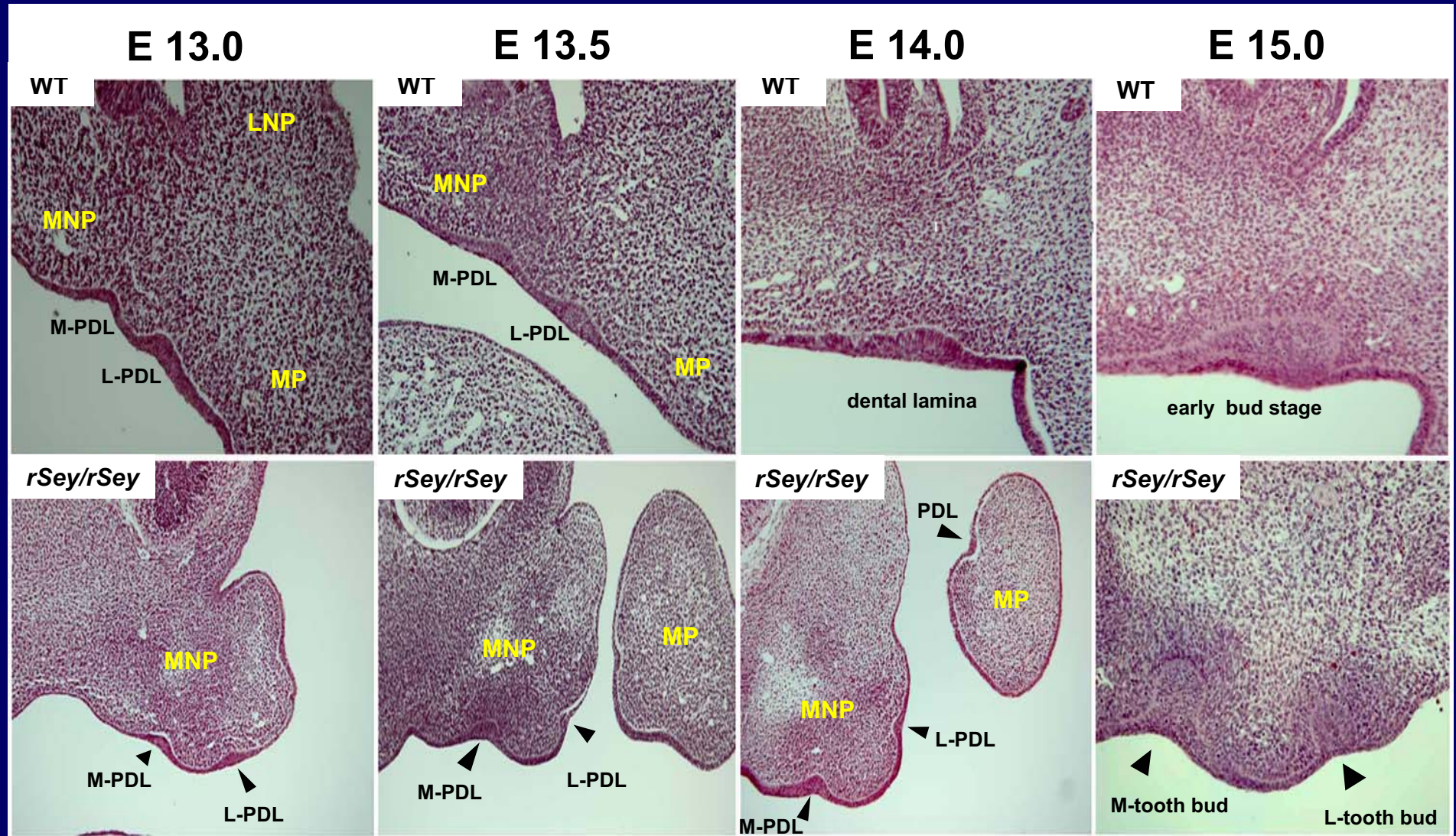




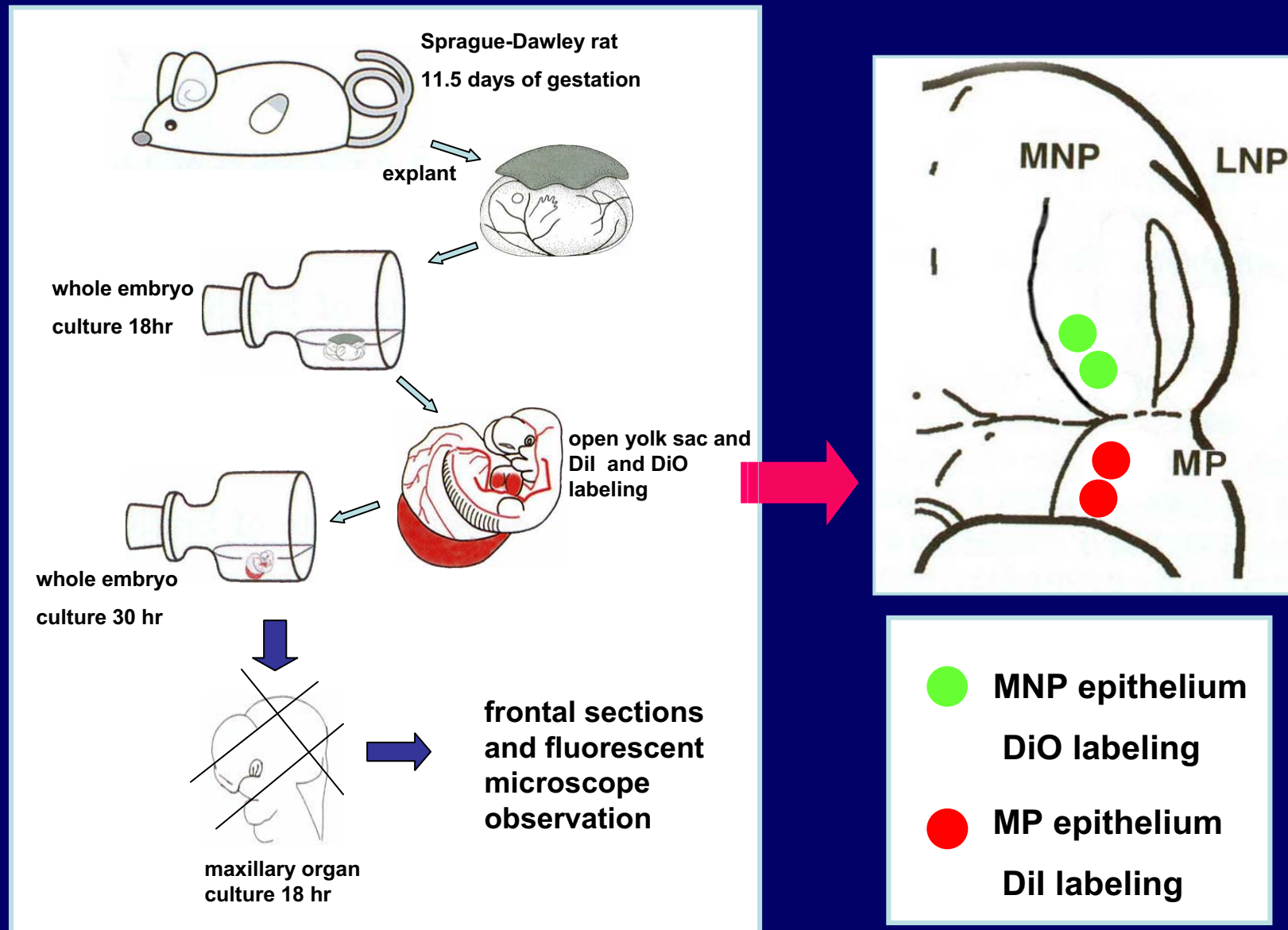
Whole mount in situ hybridization of *Pax-9*



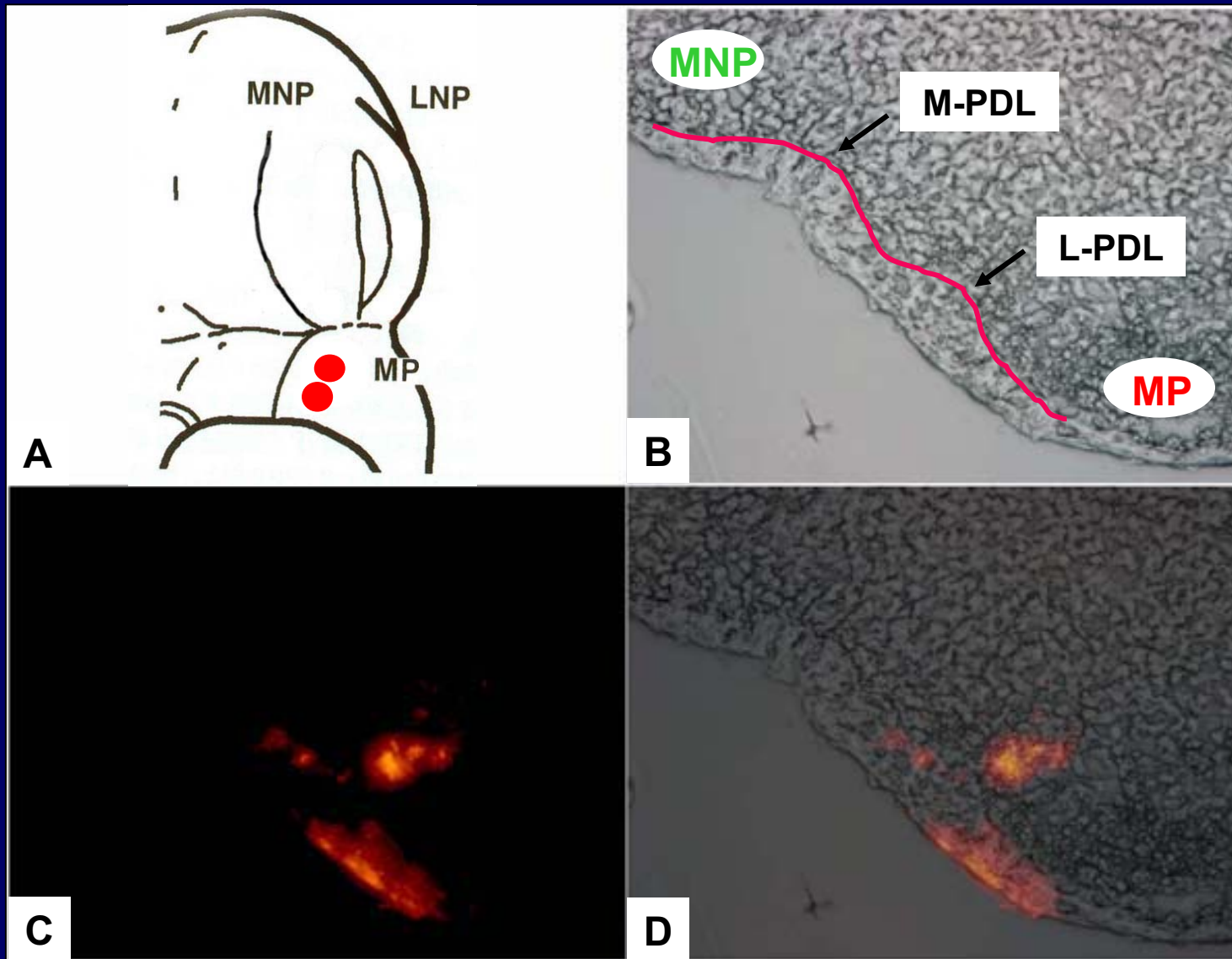
Histological observation of maxillary incisor development



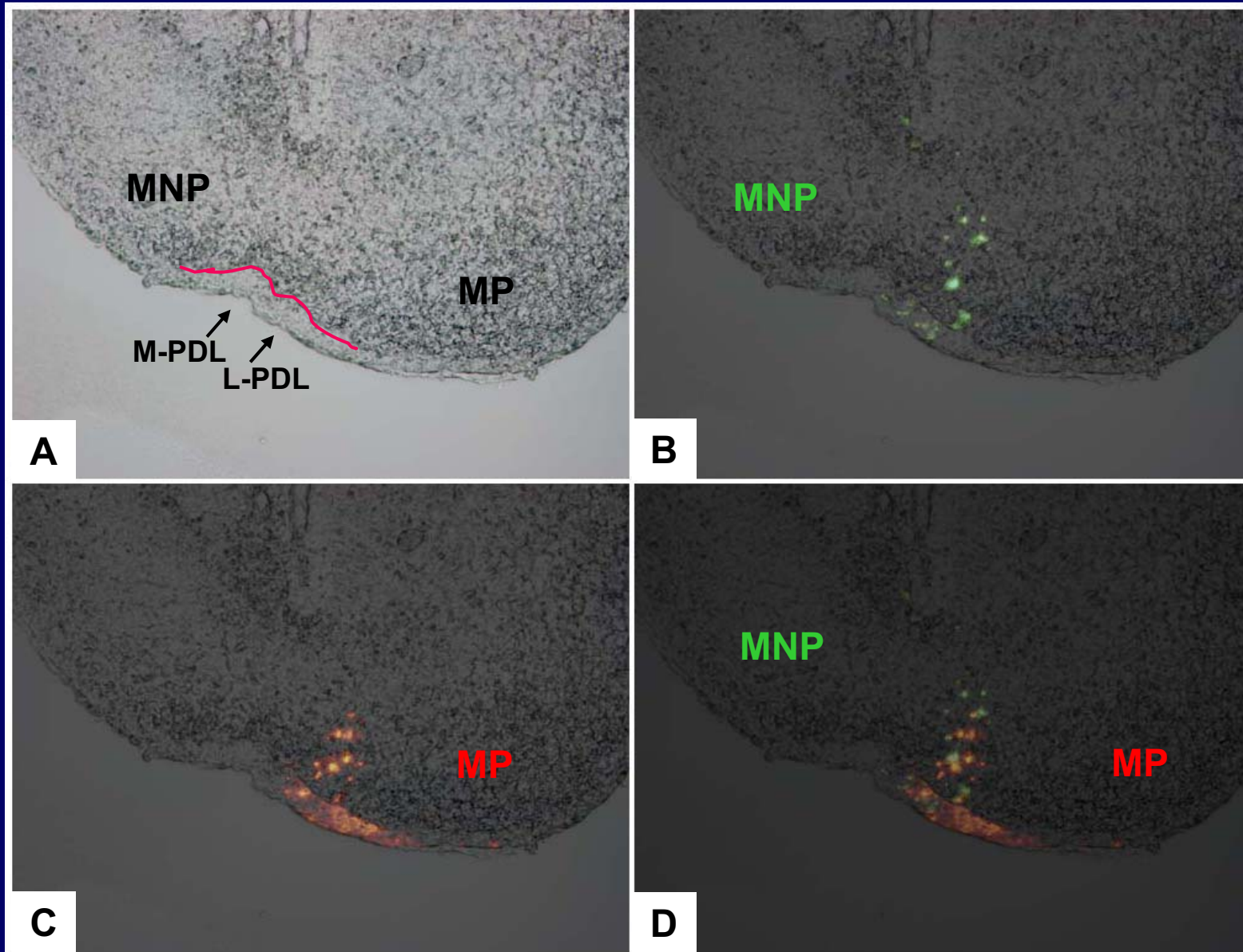
Labeling of MNP and MP epithelia to investigate their contribution to incisor formation



Dil labeling of maxillary process epithelium



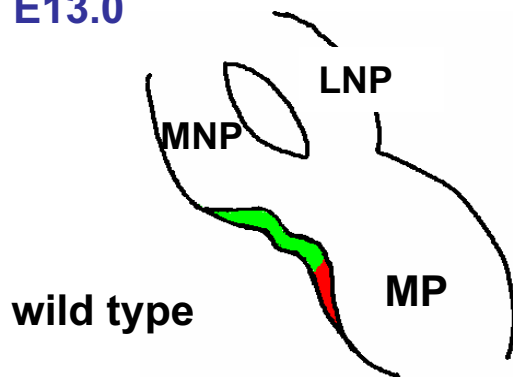
DiO and Dil labeling of medial nasal process and maxillary process



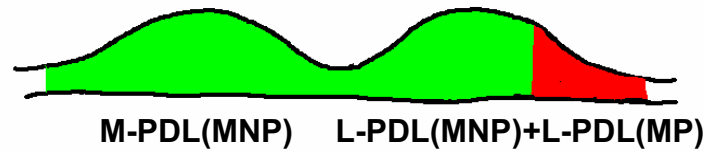
Conclusions

maxillary incisor development

E13.0



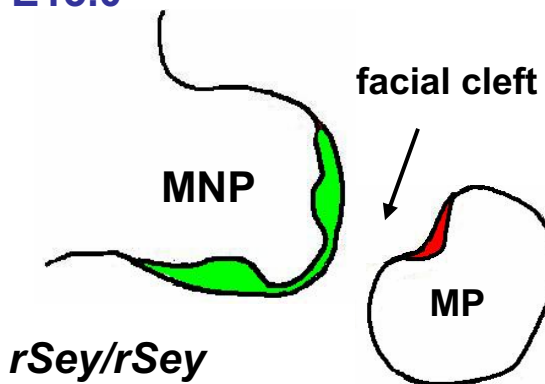
E13.5



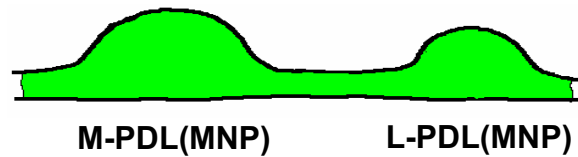
E14.0



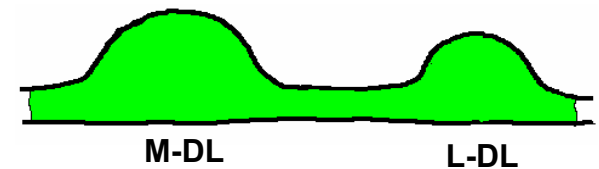
E13.0



E13.5



E14.0



**This research is supported by the
Thailand Research Fund and
Grants-in-Aid for Scientific Research
from MEXT Japan.**

Contribution of maxillary process epithelium in rat maxillary incisor formation

Rungarun Kriangkrai^{1,2}, Suconta Chareonvit², Michio Fujiwara³, Koichi Yahagi³, Kazuhiro Eto¹ and Sachiko Iseki¹

¹Tokyo Medical and Dental University, Graduate School of Dentistry, Tokyo, Japan, ²Chulalongkorn University, Faculty of Dentistry, Bangkok, Thailand, ³Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd, Tokyo, Japan

INTRODUCTION

Mammalian dental formula includes three incisors, one canine, four premolars, and three molars in each dental quadrant. Murid evolution leads to reduction in the number of teeth. It comprises only one incisor separated from three molars by a toothless gap diastema. Classical data suggests that the maxillary incisor corresponds to the middle incisor, while the other two have been lost during murid evolution.

During the early mouse maxillary incisor formation, the several embryonic maxillary incisor placode (epithelial thickening) are identified. Strassburg *et al.* interpreted that there are three maxillary incisor placodes, the middle one develops into functional maxillary incisor and the other two become regressed during early stage of development. However, Peterkova *et al.* described that maxillary incisor dental placode is formed by an assembly of five maxillary incisor dental placodes. Around this period, facial processes, maxillary process (MP), medial nasal process (MNP) and lateral nasal process (LNP) fuse to form the midface. Since maxillary incisor placodes develop in the area of facial process fusion it is suggested that the maxillary process epithelium might participate in the maxillary incisor formation.

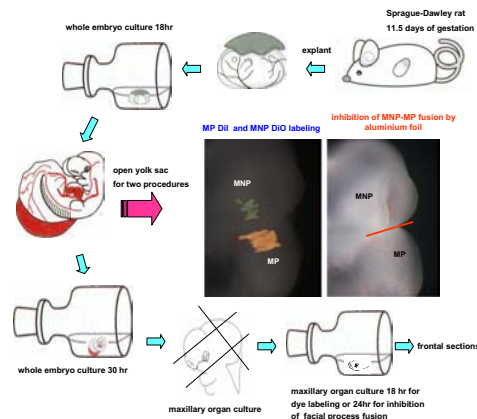
In order to get some insight into maxillary incisor formation and its epithelial origin, we carried out studies on fetuses of wild type SD rat and rat small eye mutant (*rSey*).

MATERIALS AND METHODS

Animals: Fetuses of Sprague-Dawley (SD) rat and *rSey* which was found in the course of breeding SD rats were used. The day on which the vaginal plug was found was designated as embryonic day 0 (=E 0).

Histological analysis: The samples were fixed in Bouin's fixative and embedded in paraffin for hematoxylin and eosin staining.

Epithelial labeling of MNP and MP and inhibition of MNP-MP fusion (see figure below): Whole rat fetuses of E11.5 were cultured followed by maxillary organ culture. During whole embryo culture, the fetus was taken out of the embryonic membrane and subjected to the operation, epithelial labeling with fluorescent dyes or inhibition of MNP-MP fusion aluminium foil insertion.



Epithelial labeling of MNP and MP and inhibition of MNP-MP fusion were carried out with whole embryo culture followed by maxillary organ culture.

RESULTS

MAXILLARY INCISOR DENTAL PLACODE IS COMPOSED OF PRIMARY DENTAL PLACODE (PDP) FUSION DURING THE PROCESS OF FACIAL PROCESS FUSION

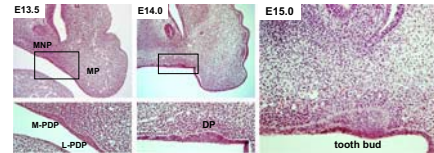
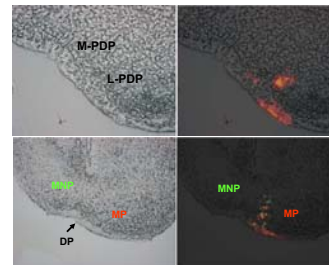


Fig. 1 Histological analysis of wild type maxillary incisor formation shows that at E13.5 MNP and MP have started fusion to make the midface. The thickened primary dental placodes appear aligned around the boundary of MNP and MP, medial and lateral primary dental placodes (M-PDP and L-PDP). They eventually approach each other and fuse to make a single dental placode at E14.0. The dental placode starts invagination at E15.0 indicating early bud stage.

MAXILLARY PROCESS EPITHELIUM CONTRIBUTES TO LATERAL PART OF MAXILLARY INCISOR DENTAL PLACODE



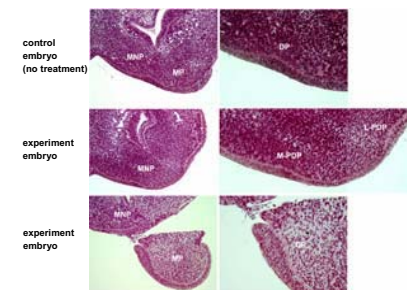
We performed the labeling experiment to investigate the contribution of MP epithelium to maxillary incisor dental placode formation (see Materials and Methods).

Fig. 2 At the end of maxillary culture following whole embryo culture from E11.5, the formation of M-PDP and L-PDP is observed.

Fluorescent dye labeling of MP (Dil, red) shows that MP epithelium contributes to the

lateral part of the L-PDP. Sometimes we find the formation of a fused single dental placode at the end of culture and double labeling of MNP (DIO, green) and MP (Dil, red) clearly shows that MNP and MP epithelia comprise the dental placode (DP) together.

INHIBITION OF MNP-MP FUSION RESULTS IN SEPARATION OF PDP FORMATION

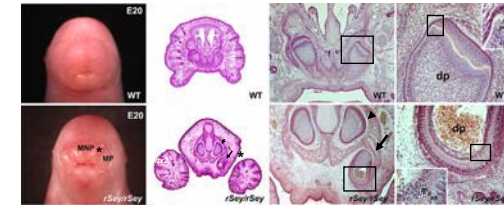


We inhibited the fusion of MNP and MP of the wild type fetus by aluminium foil insertion under the same culture system as Fig. 2, to evaluate the role of MP epithelium in maxillary dental placode formation.

Fig. 3 As shown above, a single dental placode is formed in the explant at the end of culture.

When we disturb the MNP-MP fusion by aluminium foil insertion we observe separated epithelial thickening in the MNP. We also find the appearance of the epithelial thickening in MP. We show that MP epithelium contributes to the lateral part of maxillary dental placode. Moreover, the defect in facial process fusion leads to develop separated PDP in MNP and MP. These observations suggest that the fusion of facial prominences is required to achieve a single maxillary incisor dental placode.

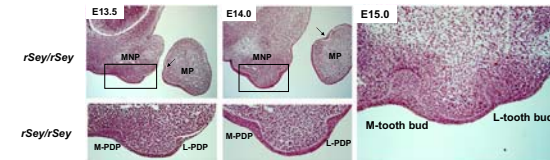
ECTOPIC MAXILLARY INCISOR-LIKE STRUCTURES DEVELOP IN HOMOZYGOUS *rSey*



We carried out histological observation on maxillary incisor formation in a mutant rat which shows impaired facial process fusion.

Fig.4 Homozygous *rSey* shows facial cleft between MNP and MP (asterisk) due to the lack of LNP. Histological observation on the E20 fetus demonstrates that the maxillary incisor of both wild type and *rSey* homozygotes develops to late bell stage and exhibits amelogenesis and odontogenesis. 25% of homozygous *rSey* shows incisor-like structures (arrow) in addition to its original incisors (arrowhead).

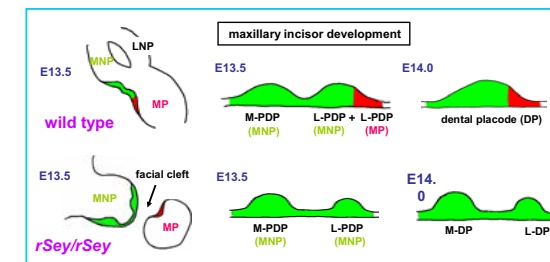
PDP ARE KEPT SEPARATED IN HOMOZYGOUS *rSey*



We investigated the maxillary incisor development in the *rSey* homozygotes.

Fig.5 Histological study shows that at E13.5 M-PDP and L-PDP develop in MNP. At E14.0 M-PDP and L-PDP are separated in a distance in MNP (compare to wild type in Fig. 1) and the epithelial thickening in MP is still present (arrow). At E15.0 dental placodes in MNP of homozygous *rSey* start invagination separately. The epithelial thickening in MP does not invaginate.

CONCLUSION



Rat maxillary incisor dental lamina contains the epithelial components, in MNP and MP, and they assemble to develop into one functional incisor. The dental placode assembly begins with the incorporation of MP epithelium to L-PDP in MNP at the beginning of MNP-MP fusion. Subsequently M-PDP and L-PDP approach to develop a single maxillary incisor during the process of MNP-MP fusion. Inhibition of facial process fusion resulting in separated PDP, which demonstrates the role of the fusion process in a single maxillary incisor tooth bud formation. These are supported by the study of the homozygous *rSey* which has a facial cleft between MNP and MP. In the mutant separated PDP are developed in each component, M-PDP is adequate to develop an incisor, where as improper L-PDP lacking MP component shows incomplete incisor development.