การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรเพื่องานทางวิทยาศาสตร์
Study of Swine White Blood Cells Culture for Scientific Purpose

วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์[1] ภัทรา มูลจิตร[1] ยลยง วุ้นวงษ์[1] อรวรรณ์ บุตรดี[1]
สุขสันต์ ฉ่ำสิงห์[1] สุธี รัตนภิรมย์[1] วรวิทย์ วัชชวัลคุ[1] ไพฑูรย์ มูลจิตร[2]
E-mail: fvetwich@ku.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการนำเสนอวิธีการทางเลือกในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกร เพื่อใช้งานทางห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรมีความสำคัญต่อการนำไปใช้เพื่อประโยชน์ในงานการศึกษาวิจัย ด้านวิทยาศาสตร์ ผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดสุกรโดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดเฮพาริน ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ มีการเตรียมเซลล์จาก 1) เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งได้จากวิธีการปั่นแยกด้วยไฟคอล (Ficoll-Hypaque) ได้เซลล์ชนิด Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) ทั้งชนิด แขวนลอย และชนิดเกาะพื้น 2)เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างน้ำเลือด (whole blood) โดยไม่ต้องปั่นแยก ได้เซลล์ชนิดเกาะพื้น ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดอาร์พีเอ็มไอ 1640 (RPMI 1640) ซึ่งมี ซีรั่มโค 10% สารปฏิชีวนะและสารป้องกันรา บ่มเพาะเซลล์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°c ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ผลการศึกษาพบว่าการเตรียมเซลล์จากวิธีการปั่นแยกด้วยไฟคอล ได้เซลล์ส่วนที่แขวนลอยพร้อมนำไปใช้งานได้ที่ 48-72 ชั่วโมง และมีกลุ่มเซลล์ที่เกาะพื้นผิวภาชนะ เซลล์ที่เตรียมจากตัวอย่างน้ำเลือด ไม่ต้องปั่นแยกก่อนการเลี้ยง เมื่อเลี้ยงจนครบ 72 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ได้เซลล์กลุ่มที่เกาะพื้น จากนั้นเลี้ยงเซลล์ที่เกาะพื้นจากการเตรียมทั้งสองวิธีไปจนครบเวลา 1 เดือน เซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิวภาชนะ แบ่งเลี้ยงและนำไปใช้งานต่อได้ รูปภาพของเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรถูกเก็บเป็นรูปไฟล์ดิจิทัลจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับที่เชื่อมต่อกับชุดโปรแกรมถ่ายภาพ NIS-Element BR 4.40®

คำสำคัญ: สุกร เม็ดเลือดขาว การเพาะเลี้ยงเซลล์ ไฟคอล

Abstract

This research aimed to provide alternative procedure for white blood cells culture from swine blood for laboratory purpose as white blood cells are important for scientific research. We collected blood with heparin anticoagulant, prepared by aseptic technique. The cells came from two sources: 1) swine white blood cells from Ficoll-Hypaque, cells obtained from buffy coat fraction were Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC); and 2) swine white blood cells from whole blood without centrifuging process. Both preparation, white blood cells sources were then cultured using Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium supplement with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) containing antibiotics and antifungal incubated at 37°c, 5% CO_2 supplied incubator. This study suggested that PBMC from culture medium in cells suspension were ready to use at 48-72 hour of culture, remained adherent cells on culture flask surface. Cells from whole blood culture without fractionating were adherent and cells were washed with Phosphate Buffer Saline at 72 hour. These cells from both sources were maintained for 1 month. Cells were confluented subcultured, ready used for further work. The cells images were kept as digital file using inverted microscope associated with NIS- Element BR 4.40® program.

Keywords: swine, white blood cells, cells culture, Fi-coll

ความเป็นมาของปัญหา

เซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของคน และสัตว์ ซึ่งได้มาจากการแยกเซลล์ออกมาจากตัวอย่างเลือด (whole blood) ซึ่งแบ่งเป็น เซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cell) ทำหน้าที่ลำเลียงออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ และเซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cell) สองชนิด คือ เม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูล (granule) และชนิดที่ไม่มีแกรนูล agranulocyte) เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่ไม่มีแกรนูลเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ตัวอย่างที่สำคัญคือเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ (Lymphocyte) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดแขวนลอย (cell suspension type) และโมโนซัยท์ (monocyte) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดเกาะพื้น

[1] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
[2] ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

(adherent cells type) การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวทั่วไป สำหรับการค้นคว้าวิจัย เช่นการศึกษาการใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่องานวิจัยในคน เช่นการศึกษาการตอบสนองต่อเชื้อโรคที่ก่อโรควัณโรคหรือเพื่อต้องการทดสอบสารกลุ่ม อินเทอเฟียรอน (interferon) ในสัตว์ เซลล์เพาะเลี้ยงจากเม็ดเลือดขาว มีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสที่ก่อโรคสำคัญ ในสุกร เช่นโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African swine fever: ASF) ซึ่งเป็นโรคที่ติดต่อร้ายแรงในสุกรที่แพร่ระบาด ในภูมิภาคต่างๆ ทั่วโลก ถึงแม้ว่าโรคนี้จะไม่ใช่โรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนแต่ก็ถือว่าเป็นโรคที่สามารถส่งผลกระทบ ต่อเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก (Karalyan et al.,2012) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวจากสุกรเพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการใช้งานในลำดับต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อนำเสนอวิธีการทางเลือก และเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรอย่างง่าย เพื่อการนำไปใช้ทางวิทยาศาสตร์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ประเภทของการวิจัย

เป็นการวิจัยแบบทดลองทางวิทยาศาสตร์ประยุกต์

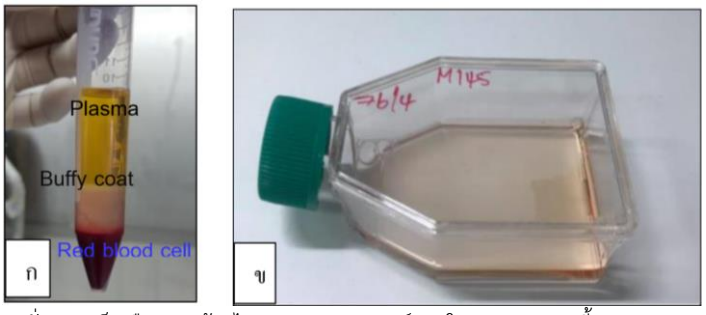
2. ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ได้มาจากการเจาะเลือดสุกรที่ใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ รายวิชาปฏิบัติการ ทางสัตว์เศรษฐกิจ 1 ของนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ชั้นปีที่ 5 (Clinical Laboratory in Farm Animal I) จากฟาร์มทดลองของหน่วยงาน

3. วิธีการวิจัย

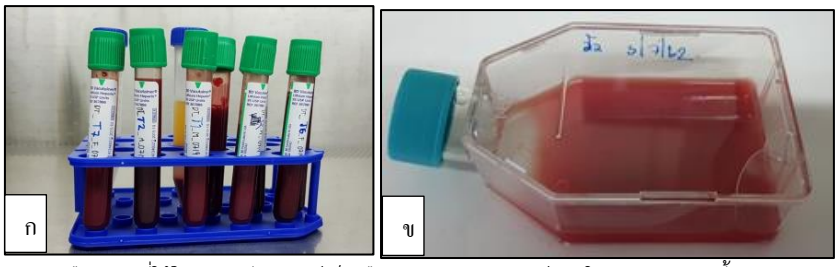
3.1 นำตัวอย่างเลือดสุกรที่เจาะจากหลอดเลือดดำสุกร ใส่ในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดเฮปาริน (heparin anticoagulant) จากนั้นนำไปเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยสองวิธี ดังนี้

3.1.1 ปั่นแยกเม็ดเลือดขาวด้วยไฟคอล หรือเทคนิค sediment gravity หรือ centrifugation technique เพื่อเก็บเม็ดเลือดขาวทั้งหมดจากส่วนชั้น buffy coat โดยใช้ความเร็วรอบ 2,500 รอบ/นาที (RPM) เป็นเวลา 25 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิด swing out roter ได้เซลล์ชนิด PBMC (ภาพประกอบที่ 1 ก) จากนั้น ทำการปั่นล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด อาร์พีเอ็มไอ1640 (RPMI 1640) ที่มีสารปฏิชีวนะ และสารป้องกันรา ใช้ความเร็วรอบ 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำ PBMCไปเลี้ยงในภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (ขนาดความจุปริมาตร 5 -7 มิลลิลิตร) ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด อาร์พีเอ็มไอ1640 (RPMI 1640) ที่ประกอบด้วยซีรั่มโค 10% สารปฏิชีวนะ สารป้องกันรา และสารกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยสารคอนคอนาวาลิน เอ (Con A) ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพประกอบที่ 1ข) เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้ควบคุมที่มีอุณหภูมิ 37°c และมีระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 -72 ชั่วโมง



ภาพประกอบที่ 1 ก) การปั่นแยกเม็ดเลือดขาวด้วยไฟคอล และ ข) เซลล์ภายในภาชนะเพาะเลี้ยง

3.1.2 ใช้ตัวอย่างจากเลือด (whole blood) โดยไม่มีการปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากส่วนประกอบอื่นๆ ในเลือด (ภาพประกอบที่ 2 ก) ใช้ตัวอย่างเลือดปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อภาชนะ และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด อาร์พีเอ็มไอ1640 (RPMI 1640) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:5) ซึ่งมี ซีรั่มโค 10% สารปฏิชีวนะ สารป้องกันรา และไม่ใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ (ภาพประกอบที่ 2 ข) บ่มเพาะเซลล์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (37°c และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%)



ภาพประกอบที่ 2 ก) เลือดสุกรที่ใช้ในการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาว และ ข) เซลล์ภายในภาชนะเพาะเลี้ยง

3.2 เมื่อครบเวลาเพาะเลี้ยงที่ 48 - 72 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำไปใช้งาน โดยตัวอย่างที่เตรียม PBMC ด้วยวิธีปั่นแยก ให้ทำให้ทำการเก็บเซลล์ส่วนของเซลล์ที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ออกมาใช้งาน และเติมอาหารใหม่ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อเลี้ยงเซลล์กลุ่มที่เกาะพื้นผิวภาชนะ ส่วนตัวอย่างเซลล์ที่เตรียมจากการเลี้ยงเซลล์ที่มาจากเลือด (whole blood) โดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มที่เกาะอยู่บนพื้นผิวภาชนะ เลี้ยงเซลล์ที่เกาะพื้นผิวภาชนะต่อไปจนครบเวลา 1 เดือน และสังเกตการเจริญเติบโตของเซลล์

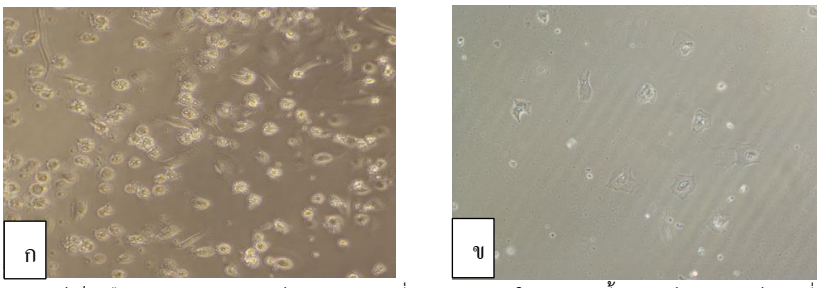
3.3 เก็บรูปภาพของเซลล์ที่เกาะพื้นที่ผิวภาชนะด้วย กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) ที่เชื่อมต่อกับโปรแกรมชุดถ่ายภาพดิจิทัล NIS- Element BR 4.40®

ผลการวิจัย

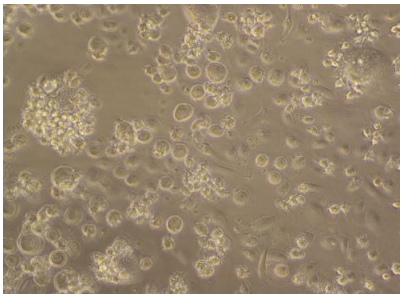
เมื่อครบเวลา 72 ชั่วโมงในการเลี้ยง ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่ได้มาจากการเตรียมตัวอย่าง 2 วิธี โดยแสดงผลดังนี้

1. จากวิธีการปั่นแยกเลือดสุกร และเอาส่วนของ buffy coat มาเลี้ยง สามารถพบเซลล์เม็ดเลือดขาว 2 กลุ่มคือ เซลล์กลุ่ม PBMC ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเซลล์กลุ่มที่เกาะเจริญบนพื้นผิวภาชนะ (ภาพประกอบที่ 3ก) และเมื่อเก็บเซลล์ที่แขวนลอยไปแล้ว เซลล์ที่เหลือหลังการล้าง จะเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มเกาะพื้น เซลล์ที่ได้มีการเพิ่มจำนวนและมีการเจริญเติบโต ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ แสดงลักษณะของเซลล์ ดังรูป ภาพประกอบที่ 3(ข) ปริมาณของเซลล์ชนิดที่เกาะพื้นผิวมีจำนวนน้อยลง แต่มีการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนได้ดี

2. จากวิธีการเลี้ยงเลือดสุกร โดยไม่มีการปั่นแยก และไม่เพิ่มสารกระตุ้นการเจริญเติบโต ทำให้มีส่วนของเม็ดเลือดแดง (red blood cells) ปะปนอยู่ด้วย อย่างไรก็ตามการเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ เซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่มแขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเซลล์ในกลุ่มที่เกาะเจริญบนพื้นผิวภาชนะ สามารถเจริญเติบโต และเจริญเพิ่มจำวนได้ดีเช่นเดียวกัน (ภาพประกอบที่ 4)

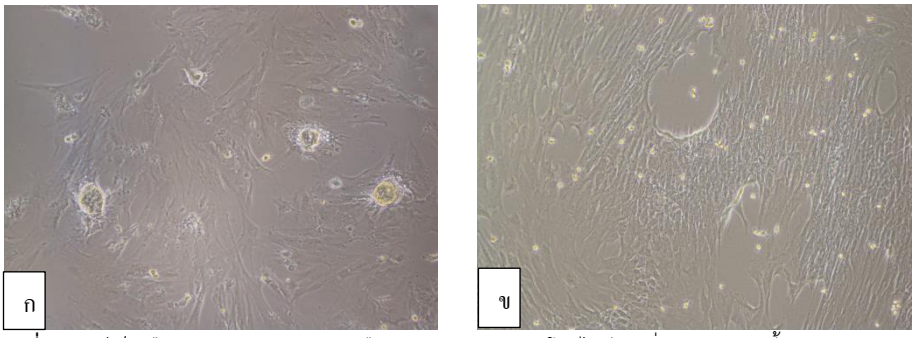


ภาพประกอบที่ 3 เซลล์เม็ดเลือดขาวสุกร ก) เซลล์กลุ่ม PBMC ที่แขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเซลล์กลุ่มที่เกาะเจริญบนพื้นผิวก่อนการแยกเก็บเซลล์ และ ข) เซลล์กลุ่มที่เกาะเจริญบนพื้นผิวภาชนะ ที่กำลังขยาย 200 เท่า

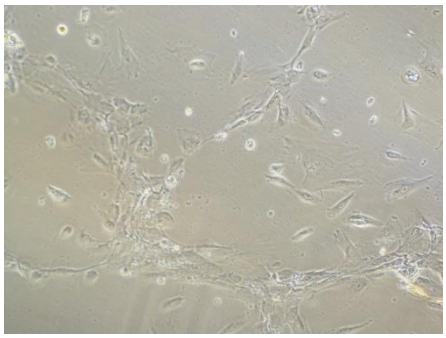


ภาพประกอบที่ 4 เซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรจากตัวอย่างเลือด (whole blood) โดยไม่มีการปั่นแยก ที่กำลังขยาย 200 เท่า

สำหรับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่เกาะพื้น ซึ่งเตรียมได้จากทั้งสองวิธีการ คือ ทั้งที่ได้จากการปั่นแยก และชนิดที่เตรียมจากเลือดสุกรโดยไม่มีการปั่นแยก เปรียบเทียบเซลล์กลุ่มเกาะพื้นจากวิธีการเตรียมทั้งสองแบบ เซลล์จากตัวอย่างเลือด (whole blood) โดยไม่มีการปั่นแยก มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่า เมื่อนำมาเพาะ เลี้ยงต่อ พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเลี้ยงครบ 1 สัปดาห์ (ภาพประกอบที่ 5 ก) และเซลล์เจริญเต็มที่เมื่อเลี้ยงจนครบ 1 เดือน โดยตัวเซลล์เติบโตในลักษณะยืดตัวยาว รี มีรูปร่างคล้ายกระสวย (ภาพประกอบที่ 5 ข) และเมื่อนำมาแบ่งแยกเลี้ยง (subculture) ในอัตราส่วน 1:3 พบว่า เซลล์สามารถ เจริญเติบโต และมีการแบ่งตัวที่ดี โดยมีลักษณะรูปร่างคล้ายกระสวย (ภาพประกอบที่ 6)



ภาพประกอบที่ 5 เซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรจากตัวอย่างเลือด (whole blood) โดยไม่มีการปั่นแยก เพาะเลี้ยงต่อจากกลุ่มเซลล์เกาะพื้น อายุ 2 สัปดาห์ (ก) และอายุ 1 เดือน (ข)



ภาพประกอบที่ 6 เซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรจากตัวอย่างเลือด (whole blood) โดยไม่มีการปั่นแยกหลังการแบ่งเลี้ยง อายุ 2 สัปดาห์

อภิปรายผล

วิธีการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน และสัตว์ มีขั้นตอนรูปแบบที่คล้ายคลึงกันโดยใช้วิธีการปั่นแยก ออกจากตัวอย่างเลือด (whole blood) โดยใช้อุปกรณ์เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิด swing out roter ที่เป็นอุปกรณ์ราคาแพง เทคนิคนี้ ใช้หลักการของการปั่นสารตกตะกอนตามขนาด และน้ำหนักโมเลกุล ที่เรียก sediment gravity (Ying et al.,2015) สำหรับการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรจากตัวอย่างเลือดที่เจาะเก็บมาแล้วนำไปเพาะเลี้ยงโดยตรง ไม่มีการปั่นแยกครั้งนี้นับเป็นวิธีง่าย สะดวก อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงวัตถุประสงค์ของการนำเอาเซลล์เม็ดเลือดขาวไปใช้หากต้องการใช้เซลล์ในส่วนที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงจำเป็นที่ต้องใช้รูปแบบที่ต้องใช้วิธีเตรียมแบบปั่นแยก การแยก PBMC จากตัวอย่างคน มีรายงานนำเสนอไว้ที่ใช้เทคนิคไฟคอล เป็นวิธีการที่ง่ายเพื่อนำเอาเซลล์กลุ่ม PBMC ไปเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวิธีการคล้ายคลึงกันกับงานวิจัยครั้งนี้ เพียงแต่จำนวนรอบในการปั่นเหวี่ยงแตกต่างกัน (ทิพย์วรรณ์ ชื่นจิตร และคณะ 2553.) Fany et al., 2020 ศึกษาการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรในช่วงอายุที่ต่างกัน ได้รายงานว่ามีผลทำให้ปริมาณหรือจำนวนของเม็ดเลือดขาวแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ ที่ใช้เลือดจากสุกรอายุ 12 สัปดาห์ ซึ่งอยู่ในกลุ่มอายุน้อย ที่ให้ปริมาณและคุณภาพของเซลล์ที่ดี

เมื่อพิจารณารูปแบบการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อประโยชน์สำหรับการศึกษาในคน เช่นการศึกษาเกี่ยวกับสารอินเทอร์เฟียรอน(interferon) และสารอินเทอลูคิน (interlukin) (Damsgaard et al.,2009) มีการนำเอาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดโดยไม่มีการปั่นแยกมาใช้ ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าใช้สภาพการเลี้ยง เตรียมตัวอย่าง ตลอดจนอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงชนิดเดียวกัน อัตราส่วนของปริมาณเลือดที่ใช้ในคนต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ที่ 1:5 -1: 10 (Deenadayalan et al.,2013) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้ที่ใช้เลือดสุกรต่อน้ำเลี้ยงเซลล์อยู่ที่ 1:5 สำหรับช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บผลผลิตเซลล์

หรือตรวจสอบเซลล์เม็ดเลือดสุกรคือ 72 ชั่วโมง มีความคล้ายคลึงกับคน โดยในคนมีการศึกษาโดยการเตรียมเซลล์จากตัวอย่างเลือดแบบไม่ปั่นแยกแต่ใช้สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ชนิด phytohemagglutinin (PHA) (Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research.1999) แต่สารที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ คอคอนนาวาลิน เอ (Conconavalin A)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้สามารถนำเสนอทางเลือกในการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาว และการเพาะเลี้ยง เพื่อนำไปใช้เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ได้ ซึ่งการใช้วิธีปั่นแยกเลือดด้วยไฟคอล หรือ sediment gravity ให้ผลผลิตที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด PBMC และเซลล์เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่เกาะพื้นผิวภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง ส่วนการเตรียมเซลล์จากตัวอย่างเลือดสุกรแบบไม่ต้องปั่นแยก และไม่กระตุ้นการเจริญเติบโตนับเป็นวิธีที่ง่าย เป็นทางเลือกหนึ่ง ให้ผลผลิตเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่เกาะพื้นผิวภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยเฉพาะชนิดโมโนซัยท์เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญกล่าวคือเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการเจริญ และพัฒนาเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้ควรที่จะได้ศึกษาเพิ่มเติมในการนำเอาเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงไปใช้ประโยชน์เพิ่มเติมในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์อื่นๆ เช่น นำไปใช้ในการศึกษาทดลองความเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ในการศึกษาการตอบสนองต่อเชื้อโรค (Dolores et al., 2013: Karalyan et al.,2012) และในการเพาะแยกเชื้อไวรัสที่จำเพาะเจาะจง ควรมีการศึกษาต่อถึงการเลี้ยงเซลล์ การใช้ประโยชน์จากเซลล์ และการเก็บรักษาเซลล์เม็ดเลือดขาวของสุกรไว้ในธนาคารเซลล์(cell bank) ของหน่วยงาน ซึ่งเป็นการเก็บรักษาพันธุกรรมของสุกรในรูปแบบหนึ่ง เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการค้นคว้าวิจัยในคราวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ทิพย์วรรณ ชื่นจิตร สุจิตรา สุขวิทย์ ฉัตรี คมกริช สุชชนา แทบประสิทธิ์ จุฑาภรณ์ จั่นวงค์แก้ว อวิรุทธ์ อุ่นรารมย์ ขวัญใจ วิพุทธิกุล กรองกาญจน์ สายพิณ ศิริพันธ์ กอนวงค์ ภานุวัฒน์ มิเถิง ดลนภัส กุวานนท์ และณรงค์ฤทธิ์ ศิริโสภณา. (2553). การแยกเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนซัยท์อย่างง่ายโดยวิธีการปั่นแยกด้วยเปอร์คอล. **Royal Thai Army Medical Journal**. Vol. 63 Vol. 1 January-March 2010

Damsgaard CT, Lauritzen L, Calder PC, Kjaer TM, Frøkiaer H. 2009. Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines - a comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes. **J Immunol Methods**. Jan 30; 340(2): 95-101.

Deenadayalan, A., Maddineni, P. & Raja, A.2013.Comparison of whole blood and PBMC assays for T-cell functional analysis. **BMC Res Notes** 6, 120. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-120. > (สืบค้นเมื่อวันที่ 5 มกราคม 2564).

Dolores Silva, Carlos G.G. Ponte, Mariana A. Hacker, Paulo R.Z. Antas,.2013. A whole blood assay as a simple, broad assessment of cytokines and chemokines to evaluate human immune responses to Mycobacterium tuberculosis antigens. **Acta Tropica**.Volume 127, Issue 2,2013,Pages 75-81.

Fany B, A. Prévost-Blondel, Guillaume P., Edwige B., Jean-Jacques L, Fabrice A, Giorgia E, Emmanuelle B, Nicolas B., and Silvia V-N.2020.The Composition of Circulating Leukocytes Varies With Age and Melanoma Onset in the MeLiM Pig Biomedical Model. **Front. Immunol**. Institut Cochin, Paris, France <https://doi.org /10.3389/fimmu.2020.00291>(สืบค้นเมื่อวันที่ 5 มกราคม 2564)

Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research.1999. 10, Application of Whole-Blood Cultures to Field Study Measurements of Cellular Immune Function In Vitro. **Military Strategies for Sustainment of Nutrition and Immune Function in the Field. Washington (DC)**: National Academies Press (US); Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK230958/> (สืบค้นเมื่อวันที่ 5 มกราคม 2564).

Karalyan, Z., Zakaryan, H., Arzumanyan, H. et al. Pathology of porcine peripheral white blood cells during infection with African swine fever virus. **BMC Vet Res** 8,18 (2012). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-18> (สืบค้นเมื่อวันที่ 5 มกราคม 2564).

Ying L., Sultan A., Florencia H., Marie V. 2015. Impact of Ficoll density gradient centrifugation on major and trace element concentrations in erythrocytes and blood plasma. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**.Volume 29, Pages 249-254,