Special Article

Conventional and Novel Methods for Embryonic Stem Cell Line Derivation

Sorapop Kiatpongsan MD*,**, Yuen Tannirandorn MD*,
Pranee Numchaisrikha BSc*,**, Ruttachuk Rungsiwiwut DVM*,**

** Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University*
*** Chulalongkorn Gene and Stem Cell Therapy Research Program*

Cell therapy is the promising therapeutic tool for the next decade. "Regenerative Medicine" based on cell and tissue replacement therapy is proposed as a revolutionary approach to various chronic and incurable conditions. The first key step for successful cell therapy is the establishment of clinical grade human Embryonic Stem Cell (hESC) lines. This article provides a concise summary on conventional and novel methods for hESC line derivation. There is also discussion on progression, future direction and problems in hESC line development. In Thailand, more advance knowledge, skill, and technology are required to develop the first human embryonic stem cell line and step forward to make cell therapy a reality.

Keywords: *Embryonic stem cell, Derivation, Nuclear transfer, Single blastomere*

J Med Assoc Thai 2006; 89 (6): 896-903
Full text. e-Journal: *http://www.medassocthai.org/journal*

In 1981, the first mouse embryonic stem cell line was isolated from mouse blastocyst by Martin G.R[1]. Evans MJ and Kaufman MH also reported the similar finding in the same year[2]. Thomson JA et al successfully established the first human embryonic stem cell lines from day 5-6 human embryo in 1998[3]. This discovery is a landmark step in stem cell research and consequentially embryonic stem cell has obtained great attention as the potential revolution for the treatment for many chronic and incurable diseases because of its exceptional properties.

Derivation methods for embryonic stem cell lines[4]

Establishing human Embryonic Stem Cell (hESC) lines is not only a crucial step but also basic principle and technique in stem cell research. hESC lines are invaluable biomaterials for therapeutic application. Currently, there are four methods to develop embryonic stem cell lines.

Correspondence to : Kiatpongsan S, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama 4 Rd, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand. Phone: 0-1694-5595, 0-2256-4241, E-mail: ksorapop@yahoo.com

1. Classical method[3]

This was the first method used for establishing hESC line. The inner cell mass was separated from a day 5-6 blastocyst by immunosurgery. Then, it was cultured on feeder cells. Normally, the blastocysts used in stem cell researches are donated from infertile couples or they may be specifically created for research purpose.

2. Single blastomere method[5]

This new approach was reported by Chung Y and his colleagues in 2005. This derivation method was based on blastomere biopsy procedure performed for Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD). The biopsied blastomere was co-cultured with an established embryonic stem cell. By this protocol, new embryonic stem cell line can be created from single blastomere. The main advantage of this technique is that it does not destroy embryo. The biopsied embryo still has a potential to implant and develop into new offspring. As a result, there are fewer problems from ethical viewpoint. However, this method has been tested only in mouse embryos. Therefore, further studies are needed before applying this procedure in human blastocysts.

3. Nuclear transfer method

Embryonic stem cell line derivation from nuclear transfer was widely and thoroughly studied in animals especially in mouse[6]. Hwang WS and colleagues have reported the development of the first hESC line by this method[7]. Adult somatic cell nucleus was transferred into an ennucleated oocyte. Then, an electrical stimulation was performed and cell was cultured to blastocyst stage. An embryonic stem cell line had been harvested from inner cell mass of created blastcyst with the classical method. The proposed advantage of this technique is that the genetic material of an established embryonic stem cell line and of an adult somatic cell are nearly identical. Therefore, it was presumed that this cell line would not produce immunological reaction when is used as cell therapy. With this technique, model of various diseases can be created using somatic cell nucleus of patients. Unfortunately, report from Hwang WS group was proved to be fraudulent[8]. As a result, the possibility and limitation of this technique in producing human cell line are being under further investigation.

4. Altered nuclear transfer method[9]

This method is based on transferring of an altered nucleus of somatic cell into enucleated oocyte. The nuclear modification is obtained by turning off the function of the cdx2 gene, a gene that plays an important role in blastocyst implantation. Therefore, a blastocyst established by this method lacks the potential to implant and to develop to be a fetus. Meisser A and Jaenisch R have proposed this method in order to avoid destruction of a blastocyst that has a potential to develop to be a human being. They would like to overcome the controversial issues on moral status of human embryos. Nevertheless, the concept and principle of this method has been argued for its ethical appropriateness and for the possible negative consequences of inhibiting cdx2 gene on the established cell line.

Efficacy and success rate in the development of human embryonic stem cell line[10]

The success rate in the development of hESC line from the classical method is 18.8 percent. This means that 18.8 embryonic stem cell lines can be created from 100 frozen good quality human embryos. The success rate of each step of cell line derivation is shown in table 1. However, other methods have lower success rate than the classical method. Key factors for success in embryonic stem cell line derivation are knowledge in reproductive biology, stem cell biology, embryonic growth and development, good embryonic culture techniques and efficient embryonic micromanipulation techniques.

Current situations in the development of human embryonic stem cell lines

According to report of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR) in June 2005, more than 100 embryonic stem cell lines have been developed worldwide[11-29]. However, most of them face the problem of animal product contamination. Therefore, nearly all of the established hESC lines cannot be used in the clinical level due to substandard quality and safety.

Conclusion

According to current situation and problems of embryonic stem cell line derivation, there are both the opportunity and the necessity for creating novel techniques or modifying traditional techniques for better quality of the cell lines. These are aiming at improving the safety from research grade to clinical grade hESC lines[30-31]. Finally, these would be invaluable resources for cell and tissue therapies. However,

Table 1. The success rate in each step for the derivation of hESC lines by the classical method[10]

Steps in hESC line derivation (classical method)	Percent of embryos
1. Frozen good quality day 2-3 embryos	100.0
2. Thaw survival	70.0
3. Blastocysts	42.0
4. Zona removal	42.0
5. Inner Cell Mass (ICM) isolation	29.4
6. Primary growth (10-14 days)	23.5
7. First colony	18.8
8. hESC line	18.8

appropriate solution for the ethical controversies should be also considered apart from the technical aspect.

In Thailand, there are several research groups interested in development of animal embryonic stem cell lines with different methods. To develop the first human embryonic stem cell line for clinical purposes, in-depth knowledge and profound understanding in stem cell biology and experienced and skillful research team are required because they are key elements for the success. Furthermore, these methods should be widely accepted from the ethical viewpoint of Thai society.

References

1. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1981; 78: 7634-8.
2. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-6.
3. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-7.
4. Weissman IL. Medicine: politic stem cells. Nature 2006; 439: 145-7.
5. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J, et al. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. Nature 2006; 439: 216-9.
6. Saito S, Liu B, Yokoyama K. Animal embryonic stem (ES) cells: self-renewal, pluripotency, transgenesis and nuclear transfer. Hum Cell 2004; 17: 107-15.
7. Hwang WS, Roh SI, Lee BC, Kang SK, Kwon DK, Kim S, et al. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. Science 2005; 308: 1777-83.
8. Kennedy D. Editorial Retraction of Hwang et al. Papers. Science 2006; 311: 335.
9. Meissner A, Jaenisch R. Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts. Nature 2006; 439: 212-5.
10. Bongso A, Lee EH. Stem cells from bench to bedside. Singapore: World Scientific Publishing, 2005: 18.
11. Findikli N, Kahraman S, Akcin O, Sertyel S, Candan Z. Establishment and characterization of new human embryonic stem cell lines. Reprod Biomed Online 2005; 10: 617-27.
12. Chen H, Qian K, Hu J, Liu D, Lu W, Yang Y, et al. The derivation of two additional human embryonic stem cell lines from day 3 embryos with low morphological scores. Hum Reprod 2005; 20: 2201-6.
13. Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, Brunette E, Powell S, Nath A, et al. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. Fertil Steril 2005; 83: 1517-29.
14. Pickering SJ, Minger SL, Patel M, Taylor H, Black C, Burns CJ, et al. Generation of a human embryonic stem cell line encoding the cystic fibrosis mutation deltaF508, using preimplantation genetic diagnosis. Reprod Biomed Online 2005;10:390-7.
15. Oh SK, Kim HS, Ahn HJ, Seol HW, Kim YY, Park YB, et al. Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. Stem Cells 2005; 23: 211-9.
16. Lee JB, Lee JE, Park JH, Kim SJ, Kim MK, Roh SI, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. Biol Reprod 2005; 72: 42-9.
17. Simon C, Escobedo C, Valbuena D, Genbacev O, Galan A, Krtolica A, et al. First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions. Fertil Steril 2005; 83: 246-9.
18. Verlinsky Y, Strelchenko N, Kukharenko V, Rechitsky S, Verlinsky O, Galat V, et al. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. Reprod Biomed Online 2005; 10: 105-10.
19. Strelchenko N, Verlinsky O, Kukharenko V, Verlinsky Y. Morula-derived human embryonic stem cells. Reprod Biomed Online 2004; 9: 623-9.
20. Stojkovic M, Lako M, Stojkovic P, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, et al. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. Stem Cells 2004; 22: 790-7.
21. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Taee A, Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. Differentiation 2004; 72: 224-9.
22. Heins N, Englund MC, Sjoblom C, Dahl U, Tonning A, Bergh C, et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. Stem Cells 2004; 22: 367-76.

23. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. N Engl J Med 2004 25; 350: 1353-6.
24. Park SP, Lee YJ, Lee KS, Ah Shin H, Cho HY, Chung KS, et al. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. Hum Reprod 2004; 19: 676-84.
25. Suss-Toby E, Gerecht-Nir S, Amit M, Manor D, Itskovitz-Eldor J. Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote. Hum Reprod 2004; 19: 670-5.
26. Park JH, Kim SJ, Oh EJ, Moon SY, Roh SI, Kim CG, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. Biol Reprod 2003; 69: 2007-14.
27. Pickering SJ, Braude PR, Patel M, Burns CJ, Trussler J, Bolton V, et al. Preimplantation genetic diagnosis as a novel source of embryos for stem cell research. Reprod Biomed Online 2003; 7: 353-64.
28. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. Hum Reprod 2003; 18: 1404-9.
29. Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2002; 20: 933-6.
30. Li Y, Powell S, Brunette E, Lebkowski J, Mandalam R. Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products. Biotechnol Bioeng 2005; 91: 688-98.
31. Cobo F, Stacey GN, Hunt C, Cabrera C, Nieto A, Montes R, et al. Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardisation. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68: 456-66.

การสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยวิธีการดั้งเดิมและวิธีการใหม่

สรภพ เกียรติพงษ์สาร, เยื้อน ตันนิรันดร, ปราณี นำชัยศรีค้า, รัฐจักร รังสิวิวัฒน์

เซลล์บำบัดเป็นความหวังสำคัญของการรักษาโรคในทศวรรษหน้า "เวชศาสตร์การซ่อมสร้าง" บนพื้นฐานของการรักษาด้วยเซลล์และเนื้อเยื่อทดแทน คาดว่าจะสามารถปฏิรูปแนวทางการรักษาโรคเรื้อรังและโรคที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้จำนวนหลายโรค ขั้นตอนเริ่มต้นสำคัญที่จะทำให้เซลล์บำบัดประสบผลสำเร็จคือการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ที่มีคุณภาพระดับดีพอสำหรับใช้เพื่อการรักษาในทางคลินิก บทความนี้สรุปหลักและวิธีการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนทั้งวิธีการมาตรฐานดั้งเดิมและวิธีการที่เสนอขึ้นใหม่ และอภิปรายถึงความก้าวหน้า ทิศทาง และปัญหาในการพัฒนาสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน สำหรับประเทศไทยความรู้ความเชี่ยวชาญและเทคโนโลยีขั้นสูงมีความจำเป็น สำหรับการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์สายพันธุ์แรกขึ้นในประเทศไทย และจะเป็นรากฐานสำหรับการพัฒนาเซลล์บำบัดให้ประสบผลสำเร็จ

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนถูกค้นพบครั้งแรกในหนู เมื่อปี ค.ศ. 1981 โดย Martin G.R. ที่สามารถเพาะแยกเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการเจริญไปเป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ ได้จากตัวอ่อนระยะแรกของหนู[1] รวมทั้ง Evans M.J. และ Kaufman M.H. ที่ได้รายงานการคัดแยกเซลล์ที่มีคุณสมบัติพิเศษจากตัวอ่อนของหนูในปีเดียวกัน[2] สำหรับในมนุษย์ Thomson J.A. และคณะประสบความสำเร็จในการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน จากตัวอ่อนของมนุษย์ในช่วงอายุ 5-6 วัน[3] ได้ในปี ค.ศ. 1998 ทำให้เกิดความตื่นตัวและความสนใจที่จะพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้เพื่อการรักษาโรคในมนุษย์ เนื่องจากศักยภาพและคุณสมบัติเฉพาะหลายประการของเซลล์ต้นกำเนิด

วิธีการพัฒนาสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในปัจจุบัน[4]

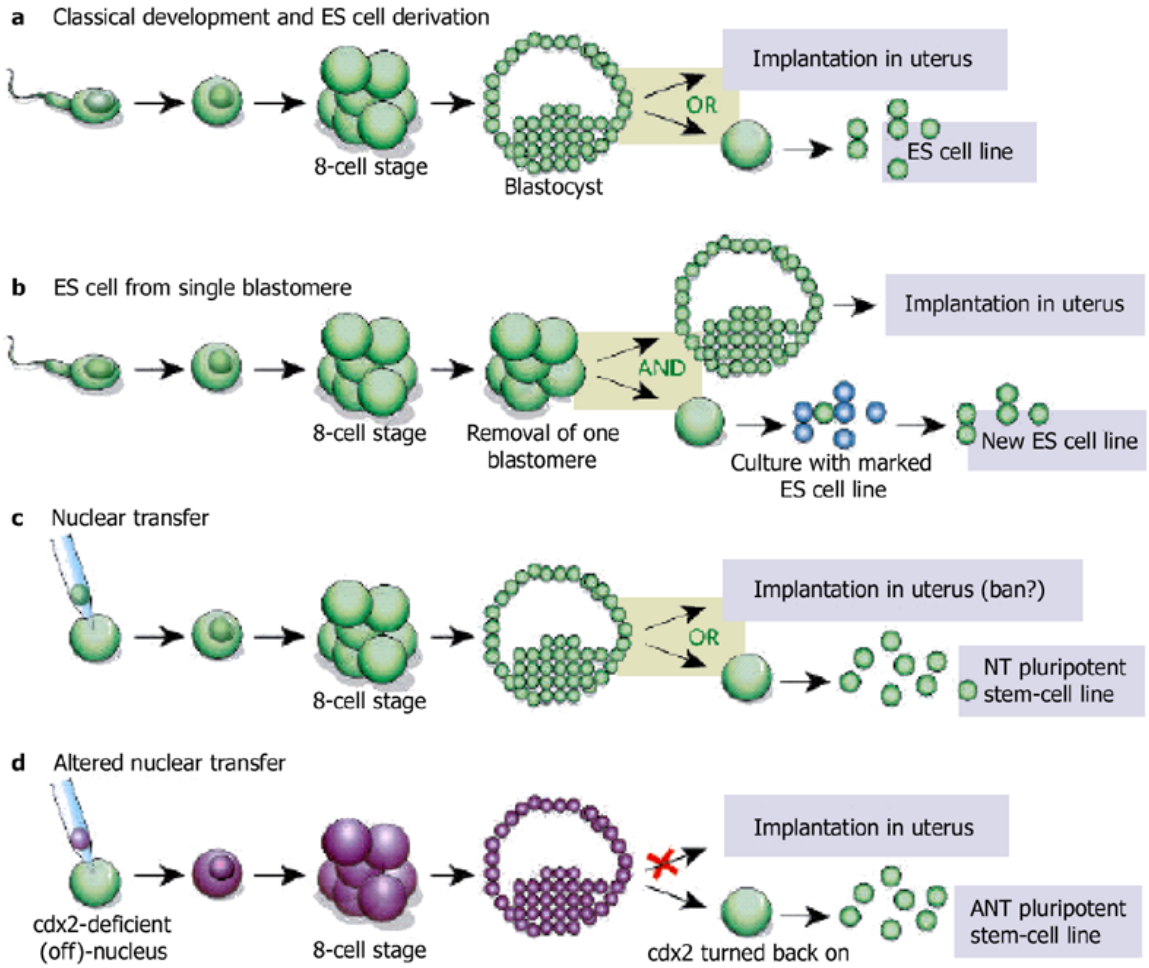
การพัฒนาสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในมนุษย์ เป็นความรู้และเทคนิคพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการศึกษาวิจัยด้านเซลล์ต้นกำเนิด และเป็นทรัพยากรหลักสำหรับนำไปพัฒนาใช้เพื่อการรักษาโรค เทคโนโลยีการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิด ในปัจจุบันมี 4 วิธีการ (ภาพที่ 1) ได้แก่

1. วิธีการมาตรฐานดั้งเดิม[3]

เป็นวิธีการแรกที่ใช้ในการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้สำเร็จ โดยการแยกส่วน inner cell mass ออกจากตัวอ่อนของมนุษย์ในระยะบลาสโตซิส ที่มีอายุระหว่าง 5-6 วัน ด้วยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง โดยบลาสโตซิสที่นำมาใช้มักได้รับการบริจาคภาคหลังจากสิ้นสุดการรักษาผู้ป่วยที่มีบุตรยาก หรืออาจเป็นบลาสโตซิสที่สร้างขึ้นโดยเฉพาะสำหรับการศึกษาวิจัย

2. วิธีการสร้างจาก blastomere จำนวน 1 เซลล์[5]

เป็นวิธีการใหม่ที่รายงานโดย Chung Y. และคณะ เมื่อ ค.ศ. 2005 มีพื้นฐานมาจากการตัดแยกเซลล์ของตัวอ่อนในระยะ 8 เซลล์ เพื่อการตรวจวินิจฉัยทางพันธุกรรมก่อนการฝังตัวในโพรงมดลูก (Preimplantation Genetic Diagnosis: PGD) นำเซลล์ blastomere ที่ตัดแยกออกจากตัวอ่อน ไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน



ภาพที่ 1. แสดงวิธีการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนด้วยวิธีการต่าง ๆ [4]

จะสามารถสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนใหม่ขึ้นได้จากเซลล์ blastomere จำนวน 1 เซลล์ มีข้อดีและจุดเด่นคือเป็นวิธีการที่ไม่ต้องทำลายตัวอ่อนเพื่อสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิด หลีกเลี่ยงและลดปัญหาทางจริยธรรมเกี่ยวกับการใช้ตัวอ่อนเพื่อการศึกษาวิจัย เนื่องจากตัวอ่อนที่ถูกตัดแยก blastomere ยังคงสามารถฝังตัวและเจริญต่อไปเป็นทารกได้ หากแต่วิธีการนี้ยังเป็นเพียงการศึกษาวิจัยในตัวอ่อนของหนู ต้องอาศัยหลักฐานและข้อมูลเพิ่มเติมก่อนนำมาประยุกต์ใช้ในตัวอ่อนของมนุษย์

3. วิธีการย้ายเปลี่ยนนิวเคลียสระหว่างเซลล์

เป็นวิธีการผลิตสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดที่มีการศึกษาวิจัยและทดลองอย่างลึกซึ้งในสัตว์ทดลอง โดยเฉพาะในหนู[6] สำหรับในมนุษย์มีรายงานการผลิตสายพันธุ์ด้วยวิธีการนี้โดย Hwang W.S. และคณะ[7] โดยการย้ายนิวเคลียสของเซลล์ร่างกายที่เจริญพัฒนาแล้ว เข้าสู่ภายในเซลล์ไข่ที่นำเอานิวเคลียสออกก่อนแล้ว จากนั้นจึงกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าในระดับที่เหมาะสมและเพาะเลี้ยงต่อไปจนเป็นตัวอ่อนในระยะ blastocyst จากนั้นจึงสร้าง

สายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยวิธีการมาตรฐานดั้งเดิม วิธีการนี้มีจุดเด่นที่สามารถสร้างสายพันธุ์ของเซลล์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับเซลล์ร่างกายที่นำนิวเคลียสมาใช้ จึงสันนิษฐานว่าจะไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้านทางภูมิคุ้มกันเมื่อนำมาใช้รักษาในผู้ป่วยที่เป็นเจ้าของนิวเคลียสของเซลล์ร่างกาย และจะเป็นการสร้างแบบจำลองในการศึกษาโรคที่ดี ในกรณีที่เซลล์ร่างกายที่นำนิวเคลียสมาใช้เป็นของผู้ป่วยที่เป็นโรค ปัจจุบันมีการตรวจสอบพบว่ารายงาน Hwang W.S. และคณะ เป็นเพียงการกล่าวอ้างโดยไม่มีหลักฐานสนับสนุน[8] จึงทำให้การสร้างสายพันธุ์โดยวิธีการนี้ ต้องการการศึกษาวิจัยถึงความเป็นไปได้และเทคนิควิธีการที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติม

4. วิธีการย้ายเปลี่ยนนิวเคลียสระหว่างเซลล์ที่ได้รับการดัดแปลง[9]

เป็นวิธีการผลิตสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดที่มีการดัดแปลงนิวเคลียสของเซลล์ร่างกายก่อนนำมาใช้ โดยระงับการทำงานของ ยีน cdx2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการฝังตัวของตัวอ่อน ทำให้ตัวอ่อนที่สร้างขึ้นขาดศักยภาพในการฝังตัวภายในโพรงมดลูกและเจริญเป็นทารกต่อไป รายงานโดย Meissner A. และ Jaenisch R. โดยมี วัตถุประสงค์เพื่อหลีกเลี่ยงการทำลายตัวอ่อนที่มีศักยภาพในการเจริญเป็นทารก หลักการและแนวคิดนี้ได้รับการโต้แย้งถึงประเด็นความถูกต้องทางจริยธรรม และวิจารณ์ถึงผลกระทบต่าง ๆ ที่อาจเกิดจากการระงับการทำงานของยีน cdx2 ต่อสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างขึ้น

ประสิทธิภาพและอัตราความสำเร็จในการพัฒนาสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์[10]

วิธีการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนแบบมาตรฐานดั้งเดิม มีอัตราความสำเร็จร้อยละ 18.8 (สามารถสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้ 18.8 สายพันธุ์ จากตัวอ่อนแช่แข็งของมนุษย์ที่มีคุณภาพดี จำนวน 100 ตัวอ่อน) โดยมีอัตราความสำเร็จในแต่ละลำดับขั้นตอน ดังแสดงในตารางที่ 1 และพบว่าอัตราความสำเร็จของวิธีการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในลักษณะอื่นๆ มีอัตราความสำเร็จต่ำกว่าวิธีการมาตรฐานดั้งเดิม ปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จในการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน คือความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับชีววิทยาการเจริญพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดการเจริญและพัฒนาการของตัวอ่อน เทคนิคการเพาะเลี้ยง และจุลเทคนิคการจัดการตัวอ่อนที่ดีและมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 1. แสดงอัตราความสำเร็จของแต่ละขั้นตอนในการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนแบบมาตรฐาน ดั้งเดิม[10]

ขั้นตอนการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน	ร้อยละของตัวอ่อน
1. ตัวอ่อนแช่แข็งอายุ 2-3 วัน	100.0
2. การอยู่รอดภายหลังการละลาย	70.0
3. ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส	42.0
4. การแยกส่วนโซนาออก	42.0
5. การคัดแยกส่วน inner cell mass	29.4
6. การเจริญเติบโตในระยะแรก (10-14 วัน)	23.5
7. การรวมเป็นกลุ่มเซลล์ครั้งแรก	18.8
8. สายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์	18.8

สถานการณ์ปัจจุบันด้านการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน: ปัญหาและอุปสรรค

ปัจจุบันมีสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ผลิตขึ้นได้ทั่วโลก จากการรวบรวมของ International Society for Stem Cell Research (ISSCR) เมื่อเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2548 มากกว่า 100 สายพันธุ์[11-29] แต่สายพันธุ์ส่วนใหญ่พบว่ามีปัญหาเรื่องการปนเปื้อนเซลล์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ทำให้สายพันธุ์ของเซลล์ที่ผลิตขึ้นส่วนมากมีคุณภาพและความปลอดภัยไม่ดีพอ สำหรับการนำไปใช้ในทางคลินิก

สรุป

จากข้อมูลข้างต้น แสดงให้เห็นถึงโอกาสและความจำเป็นในการพัฒนาสร้างเทคนิควิธีการใหม่ หรือ ปรับปรุงเทคนิควิธีการในปัจจุบันให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นในอนาคต[30,31] พัฒนาคุณภาพของเซลล์ต้นกำเนิดจากระดับที่สร้างขึ้นเพื่อการศึกษาวิจัย สู่ระดับที่มีคุณภาพดีพอสำหรับการนำไปใช้เพื่อการรักษาโรคในมนุษย์ได้ มีความปลอดภัยสูง หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของเซลล์และชิ้นส่วนของสัตว์ รวมทั้งสอดคล้องกับหลักจริยธรรม การศึกษาวิจัยในตัวอ่อนของมนุษย์

สำหรับในประเทศไทย มีกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มที่กำลังทำการศึกษาวิจัยเพื่อสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของสัตว์ทดลองโดยวิธีการต่าง ๆ กัน ส่วนการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ขึ้นเพื่อใช้ในการรักษานั้น ต้องการความรู้ความเข้าใจในระดับลึก และบุคลากรทีมงานวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญและประสบการณ์สูง เรียนรู้และพัฒนาเพื่อสร้างสายพันธุ์ที่มีคุณภาพสูง รวมทั้งควรเป็นวิธีการที่เป็นที่ยอมรับและสอดคล้องกับแนวคิดทางจริยธรรมของสังคมไทย