Review Article

# Techniques Used in Craniofacial Developmental Biology

**Philaiporn Vivatbutsiri**[1]

[1]Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

**Correspondence to:**

Philaiporn Vivatbutsiri. Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, 34 Henri-Dunant Rd., Wang-mai, Patumwan, Bangkok, 10330 Thailand Tel: 02-2188885, 02-2188875, 085-3839172 Email: vphilaiporn@yahoo.com

## Abstract

So does as the other parts of the body, craniofacial development involves various complex processes such as cell proliferation, cell migration, cell induction, cell differentiation and cell to cell interaction. Each of developmental process occurs in particular time. Thus, to achieve the aim of the developmental biological study, the techniques used in the study and the influence of surrounding factors on the developmental process should be considered. The technique used in developmental biology varies from simple technique *in vitro* to complicate technique *in utero* and *ex utero* surgery. Cell and tissue culture enables us to study in cell and tissue level, whereas organ culture can be used for studying the interaction of tissues in the organ level. Study in organ system level can be studied by whole embryo culture with limitation of time, therefore studying the fetus in the uterus by surgery through it called *in utero* and *ex utero* technique can use as a solution. This review literature is focusing on the techniques used in craniofacial developmental studies mainly done in mouse and rat. The example of the research using each technique is also given. The knowledge from this review can be a guideline for researcher to select the proper technique to study developmental in craniofacial region including tooth and supporting structures.

**Key words:** Craniofacial development; *Ex utero* surgery; Organ culture; Whole embryo culture

Received Date: Sept 19, 2014, Accepted Date: Nov 12, 2014

บทความปริทัศน์

# วิธีการที่ใช้ในการศึกษาชีววิทยาพัฒนาการในส่วนของกะโหลกศีรษะและใบหน้า

**พิไลพร วิวัฒน์บุตรสิริ**[1]

[1]ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

**ติดต่อเกี่ยวกับบทความ:**

พิไลพร วิวัฒน์บุตรสิริ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 34 ถ.อังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330 โทรศัพท์: 02-2188885, 02-2188875, 085-3839172 อีเมล: vphilaiporn@yahoo.com

บทคัดย่อ

กระบวนการพัฒนาการรวมถึงการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่าง ๆ ในส่วนของกะโหลกศีรษะและใบหน้า เป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนเช่นเดียวกับการเจริญพัฒนาของอวัยวะส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย เนื่องจากเกิดขึ้นจากหลายกระบวนการ ตั้งแต่การเพิ่มจำนวนเซลล์ไปจนถึงการเปลี่ยนสภาพเซลล์ รวมทั้งกระบวนการเหนี่ยวนำซึ่งกันของเซลล์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาจำเพาะระหว่างกระบวนการพัฒนาการ การศึกษาชีววิทยาพัฒนาการให้ได้ตามวัตถุประสงค์จึงต้องเลือกวิธีการที่เหมาะสม โดยคำนึงถึงปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะนั้น ๆ วิธีการที่ใช้ในการศึกษาชีววิทยาพัฒนาการมีตั้งแต่การเพาะเลี้ยงเซลล์ และเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นการนำเซลล์จากตัวอ่อนมาเพาะเลี้ยงภายในตู้อบ การเพาะเลี้ยงอวัยวะโดยการนำชิ้นส่วนอวัยวะออกมาศึกษาการเจริญพัฒนาภายนอก และยังสามารถทำการศึกษาในตัวอ่อนได้ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัว โดยนำตัวอ่อนมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ไปจนถึงการผ่าตัดอินยูเทอโร (*in utero)* และเอกซ์ยูเทอโร (*ex utero*) โดยทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องเข้าไปศึกษาตัวอ่อนที่ยังเจริญอยู่ภายในมดลูกโดยตรง บทความปริทัศน์นี้จะกล่าวถึงวิธีการศึกษาต่าง ๆ ในการศึกษาการเจริญพัฒนาของส่วนกะโหลกศีรษะ และใบหน้า รวมถึงงานวิจัยที่ใช้วิธีการศึกษาดังกล่าว โดยเป็นการศึกษาวิจัยในหนูทดลองซึ่งเป็นสัตว์ทดลองที่นิยมใช้ในการศึกษาชีววิทยาพัฒนาการเป็นหลักเพื่อเป็นแนวทางพื้นฐานในการเลือกใช้วิธีการศึกษาที่เหมาะสมในการศึกษาวิจัยด้านการเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อของกะโหลกศีรษะและใบหน้า รวมทั้งฟันและเนื้อเยื่อรองรับ

**คำสำคัญ:** พัฒนาการในส่วนของกะโหลกศีรษะและใบหน้า; การผ่าตัดเอกซ์ยูเทอโร; การเพาะเลี้ยงอวัยวะ; การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัว

## บทนำ

ชีววิทยาพัฒนาการ (developmental biology) คือ การศึกษากระบวนการพัฒนาการรวมถึงการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่าง ๆ ตั้งแต่หลังการปฏิสนธิในระยะตัวอ่อน (embryo) จนถึงระยะหลังคลอด อย่างไรก็ตาม บางอวัยวะอาจมีการพัฒนาการต่อเนื่องไปจนถึงวัยผู้ใหญ่ กระบวนการพัฒนาการของเนื้อเยื่อ และอวัยวะ ประกอบไปด้วยหลายกระบวนการ ดังนี้ 1) การเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) 2) การอพยพเคลื่อนย้ายของเซลล์ไปสู่ตำแหน่งที่จำเพาะ (cell migration) 3) การเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะ (cell induction) และ 4) การเปลี่ยนสภาพเซลล์ (cell differentiation) การสร้างเนื้อเยื่อและอวัยวะนั้นเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน ซึ่งกระบวนการดังกล่าว อาจเกิดขึ้นในช่วงเวลาเดียวกัน หรือมีการซ้อนทับกันในการพัฒนาของอวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง อาจจำเป็นต้องใช้เซลล์ที่มาจากเนื้อเยื่อต้นกำเนิดมากกว่าหนึ่งชนิด นอกจากนี้ กระบวนการสร้างเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ยังอาศัยกระบวนการเหนี่ยวนำซึ่งกันของเซลล์ (cell to cell interaction) เนื่องจาก กระบวนการของการพัฒนาเนื้อเยื่อ และอวัยวะเกิดขึ้นในช่วงเวลาใดช่วงเวลาหนึ่ง และผ่านไปสู่อีกกระบวนการหนึ่งอย่างรวดเร็ว ดังนั้น การศึกษาการพัฒนาของอวัยวะต่าง ๆ จึงต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องมากมาย ทั้งช่วงเวลาของการศึกษาที่ต้องมีความจำเพาะสูง และสารหลั่งที่มีผลต่อกระบวนการพัฒนา เช่น ไซโทไคน์ (cytokines) โปรตีน และ/หรือฮอร์โมน ที่หลั่งออกมาจากเนื้อเยื่อบริเวณนั้น หรือจากเซลล์ข้างเคียง ดังนั้น การศึกษาชีววิทยาพัฒนาการจึงจำเป็นต้องเลือกวิธีการที่เหมาะสมและเป็นวิธีการที่เอื้ออำนวยต่อกระบวนการเจริญของอวัยวะหรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่สนใจทำการศึกษา โดยวิธีการศึกษานั้นจะต้องเป็นวิธีการที่จำลองสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญของเนื้อเยื่อต่าง ๆ และสามารถดำเนินการได้

วิธีการศึกษาชีววิทยาพัฒนาการมีหลายวิธี ตั้งแต่การนำเซลล์ของเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยง จนถึงการศึกษาโดยตรงกับตัวอ่อนในครรภ์ด้วยวิธีการผ่าตัด วิธีการศึกษาเบื้องต้นที่ใช้ในการศึกษาคือ การนำเซลล์ หรือเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาออกมาจากตัวอ่อน และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของเซลล์ และทำการเลี้ยงภายในตู้อบที่มีอุณหภูมิ และก๊าซที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ การศึกษาโดยวิธีนี้เรียกว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ (cell and tissue culture)[1] วิธีการศึกษาอีกวิธีหนึ่งที่มีความคล้ายคลึงกัน แต่เปลี่ยนจากการเพาะเลี้ยงเซลล์มาเป็นการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอวัยวะที่มีขนาดไม่ใหญ่มากนัก เรียกการศึกษาด้วยวิธีนี้ว่า การเพาะเลี้ยงอวัยวะ (organ culture)[2] การศึกษาด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดในเรื่องการได้รับอาหาร และก๊าซ จึงเหมาะกับการใช้ศึกษาชิ้นส่วนอวัยวะที่มีขนาดไม่ใหญ่จนเกินไป นอกจากการศึกษาโดยการนำเซลล์เนื้อเยื่อ หรือชิ้นอวัยวะออกมาเพาะเลี้ยงภายนอกแล้ว ยังมีวิธีการศึกษา โดยการนำตัวอ่อนทั้งตัวออกมาเพาะเลี้ยงภายนอกครรภ์ในห้องปฏิบัติการ โดยระบบจำลองสภาวะที่จำเพาะต่อการเจริญของตัวอ่อนเลียนแบบในครรภ์มารดาเรียกว่า วิธีการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัว (whole embryo culture)[3,4] โดยนำตัวอ่อนออกมาจากมดลูก และนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนภายในตู้อบ การศึกษาด้วยวิธีนี้ ใช้ในการศึกษาตัวอ่อนในระยะแรกที่มีขนาดเล็ก และยังไม่มีการพัฒนาการของระบบต่าง ๆ เช่น ระบบผิวหนังซึ่งเป็นตัวขัดขวางการซึมผ่านของอาหาร และก๊าซเข้าสู่เซลล์ภายใน อย่างไรก็ตาม การศึกษาด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดเช่นเดียวกับการศึกษาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอวัยวะ กล่าวคือ เมื่อตัวอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น การแทรกซึมของอาหารเข้าสู่เซลล์ภายในก็จะทำได้ยาก ทำให้เซลล์ภายในไม่ได้รับสารอาหาร และไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ จากข้อจำกัดดังกล่าว ทำให้ไม่สามารถศึกษาการพัฒนาการของอวัยวะในตัวอ่อนที่มีขนาดใหญ่ได้ การศึกษาในตัวอ่อนที่ยังเจริญอยู่ภายในมดลูกจึงถูกพัฒนาขึ้น เรียกวิธีการศึกษานี้ว่า การผ่าตัดอินยูเทอโร และเอกซ์ยูเทอโร (*in utero* and *ex utero* surgery)[5] เป็นวิธีการศึกษาในตัวอ่อนที่ยังเจริญอยู่ภายในมดลูก โดยทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องเข้าสู่ตัวอ่อนภายในมดลูกโดยตรง และทำการปิดช่องท้อง เพื่อให้ตัวอ่อนเจริญต่อไปภายในมดลูก การศึกษาด้วยวิธีนี้ตัวอ่อนยังได้รับอาหารจากแม่ผ่านทางรกเหมือนในภาวะปกติ การเจริญเติบโตพัฒนาของอวัยวะต่าง ๆ ยังคงดำเนินไปตามปกติ จึงนับเป็นวิธีที่มีความใกล้เคียงกับสภาพจริงมากที่สุด ถึงอย่างไรก็ตาม การศึกษาด้วยวิธีนี้ก็มีข้อจำกัดคือ แม่ไม่สามารถคลอดตัวอ่อนออกมาได้เองตามธรรมชาติเนื่องจาก มดลูกได้ถูกเปิดออกแล้วภายในช่องท้อง ดังนั้น ในการเก็บตัวอ่อนไปศึกษาจะต้องทำก่อนกำหนดเวลาครบอายุครรภ์ของสัตว์ทดลองโดยทำการการุณยฆาต (euthanasia) แม่ เพื่อเก็บตัวอ่อน

การศึกษาชีววิทยาพัฒนาการมีวิธีการศึกษาหลายวิธีดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น การเลือกใช้วิธีการใดในการศึกษาต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายประการ ได้แก่ วัตถุประสงค์ของการศึกษา เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่ต้องการศึกษา รวมทั้งระยะของตัวอ่อนที่ต้องการศึกษา ดังนั้น จึงควรทราบถึงข้อได้เปรียบ และข้อจำกัดในวิธีการศึกษาแต่ละวิธี เพื่อจะได้เลือกวิธีการศึกษาที่เหมาะสม และสามารถทำให้การศึกษาบรรลุวัตถุประสงค์ได้มากที่สุด ในสาขาทันตแพทยศาสตร์ การศึกษากระบวนการเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อ จะมุ่งเน้นการศึกษาการพัฒนาการในส่วนของกะโหลกศีรษะและใบหน้า (craniofacial development) รวมไปถึงอวัยวะต่าง ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ ฟัน และเนื้อเยื่อรองรับฟัน เพื่อศึกษากระบวนการเจริญตามสภาวะปกติ และสาเหตุการเกิดโรค หรือความพิการต่าง ๆ

รวมทั้งการค้นหาวิธีการใหม่ ๆ ในกระบวนการซ่อมแซม และสร้างเนื้อเยื่อเพื่อการทดแทน (tissue repair and regeneration) ในการรักษาผู้ป่วย ดังนั้น บทความปริทัศน์นี้จะมุ่งเน้นวิธีการศึกษาการเจริญพัฒนาของส่วนกะโหลกศีรษะและใบหน้า โดยกล่าวถึงการศึกษาวิจัยในหนูทดลองซึ่งเป็นสัตว์ทดลองที่นิยมใช้ในการศึกษาชีววิทยาพัฒนาการ เพราะเป็นสัตว์ที่มียีนใกล้เคียงกับมนุษย์ เนื่องจากหนู และมนุษย์มาจากสายการวิวัฒนาการเดียวกัน เพื่อให้ทราบถึงวิธีการศึกษาแบบต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาการพัฒนาการของกะโหลกศีรษะ และใบหน้า และงานวิจัยที่รองรับวิธีการนั้น ๆ ในอดีต และปัจจุบัน เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานในการเลือกวิธีการศึกษาที่เหมาะสมในการศึกษาวิจัยด้านการเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อของกะโหลกศีรษะและใบหน้า รวมทั้งฟัน และเนื้อเยื่อรองรับ

## การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ (Cell and Tissue culture)

วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ซึ่งนำมาจากตัวอ่อน เป็นวิธีการศึกษาโดยการนำเซลล์ หรือชิ้นส่วนเนื้อเยื่อชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือมากกว่าหนึ่งชนิดจากตัวอ่อน เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการภายใต้สภาพแวดล้อมพื้นฐานที่ถูกจัดขึ้น เพื่อให้เซลล์ หรือเนื้อเยื่อที่นำออกมาเพาะเลี้ยงสามารถเจริญเติบโตได้ โดยนำเซลล์ หรือชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ มาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงภายในตู้อบที่มีการควบคุมอุณหภูมิให้ใกล้เคียงกับอุณหภูมิร่างกายของสิ่งมีชีวิตคือ 37 องศาเซลเซียส มีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และมีความชื้นที่เหมาะสม โดยทั่วไปเซลล์ และเนื้อเยื่อ จะถูกเลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ในการเจริญเติบโต ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน เกลือแร่ และวิตามิน นอกจากนี้ ยังมีการเติมซีรัม (serum) จากสัตว์ ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มสารบางชนิดซึ่งไม่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์แต่มีความจำเป็นในการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น โปรตีน ไขมัน และโกรว์ทแฟคเตอร์ (growth factor) รวมทั้งมีการใส่สารซึ่งมีคุณสมบัติในการบ่งชี้สภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) เนื่องจากเซลล์ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ระดับ 7.4

เซลล์จากตัวอ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงได้มาจากการย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอ็นไซม์ แล้วปั่นแยกเซลล์ เพื่อนำมาเพาะเลี้ยง หรือนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ซึ่งมีเซลล์ที่ต้องการศึกษามาวางในจานเพาะเลี้ยง ทำการเพาะเลี้ยงกระทั่งมีเซลล์เจริญ และคลานออกมาจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ เรียกวิธีนี้ว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิ (primary cell culture) เซลล์ที่ได้สามารถนำไปเพาะเลี้ยง และศึกษาต่อ สำหรับเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นของเหลว เช่น เลือดหรือไขกระดูก การนำเซลล์ออกมาเพาะเลี้ยงสามารถทำได้โดยการล้างเนื้อเยื่อนั้นด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ นำเซลล์ที่ได้ไปปั่นแยก ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง โดยบางเซลล์จะถูกคัดเลือกเพื่อเป็นเซลล์ไลน์ (cell line) สำหรับเก็บไว้ใช้ในการศึกษาในอนาคต

การศึกษาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อนิยมใช้ในการศึกษาพฤติกรรมของเซลล์หรือเนื้อเยื่อในด้านการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนสภาพเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และสามารถเพาะเลี้ยงร่วมกับสารที่ต้องการศึกษา เช่น โกรว์ทแฟคเตอร์ (growth factor) หรือโปรตีนต่าง ๆ สารดังกล่าวอาจใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยตรง หรือใช้ตัวนำพา เช่น เม็ดอะกาโรส (agarose bead) เป็นตัวพาสารนั้น ๆ (ตารางที่ 1) การศึกษาด้วยวิธีการนี้เป็นประโยชน์ และเหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ ความสามารถในการคงสภาวะความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ และความสามารถในการเปลี่ยนสภาพเซลล์ การศึกษาจากหลายคณะผู้วิจัย ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในการศึกษาความสามารถในการคงสภาวะความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์จากตัวอ่อนมนุษย์ โดยยังคงการแสดงออกของยีนซึ่งเป็นตัวชี้วัดความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (marker of embryonic/pluripotent stem cell) ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์[6-8] การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากฟัน เพื่อนำไปใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนเป็นไปอย่างกว้างขวางในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา การเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นวิธีการศึกษาที่นำมาใช้ศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากฟันในเบื้องต้น ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อในโพรงฟัน (Dental Pulp Stem Cells; DPSCs)[9-11] เซลล์ต้นกำเนิดจากฟันน้ำนม (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth; SHED)[12] เซลล์ต้นกำเนิดจากแอพพิคอลแพพิลา (Stem Cells of the Apical Papilla; SCAP)[13-15] และเซลล์จากถุงหุ้มหน่อฟัน (Dental Follicle Stem Cell; DFSC)[16,17] เซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้สามารถพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น เนื้อเยื่อของฟัน กระดูก กระดูกอ่อน และไขมันได้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยง ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเซลล์จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเซลล์ต้นกำเนิดในเบื้องต้นก่อนจะนำไปศึกษาในลำดับต่อไป

การเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อ สามารถใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์กันของเซลล์หรือเนื้อเยื่อมากกว่าหนึ่งชนิด โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่สนใจเข้าด้วยกัน หน่อฟันเกิดขึ้นจากเนื้อเยื่อมากกว่าหนึ่งชนิด โดยเกิดการเหนี่ยวนำซึ่งกันและกันในระหว่างกระบวนการพัฒนาของหน่อฟัน[18,19] วิธีการเพาะเซลล์หรือเลี้ยงเนื้อเยื่อมากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกัน จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการพัฒนาการของเนื้อเยื่อ การศึกษาโดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสองชนิดที่มีบทบาทสำคัญในการเริ่มกระบวนการพัฒนาของ

หน่อฟันเข้าด้วยกัน โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบุผิวฟัน (dental epithelium) ร่วมกับเนื้อเยื่อเด็นทัลมีเซนไคม์ (dental mesenchyme) ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำซึ่งกัน กระทั่งเกิดการพัฒนาของหน่อฟันขึ้นได้[20,21] วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสองชนิดร่วมกันถูกนำมาใช้ร่วมกับการกระตุ้นด้วยโปรตีนที่สนใจเพื่อใช้ศึกษาบทบาทของโปรตีนดังกล่าวต่อกระบวนการพัฒนาของหน่อฟัน[22-24] วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ นอกจากจะมีประโยชน์ในการศึกษาบทบาท และความสำคัญของเนื้อเยื่อบุผิวฟัน และเด็นทัลมีเซนไคม์ รวมทั้งโปรตีน หรือยีนต่าง ๆ ในระหว่างกระบวนการพัฒนาการของฟันแล้ว ในปัจจุบันการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาของหน่อฟันทดแทน (tooth germ bioengineering) เป็นที่สนใจอย่างมาก การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวกับมีเซนไคม์เข้าด้วยกันเป็นวิธีการที่นิยมมากที่สุดในการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของหน่อฟัน[25-28] นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อร่วมกัน ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการสร้างฟันทดแทนจากเนื้อเยื่อของผู้ใหญ่ โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากผู้ใหญ่ ร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดหรือเนื้อเยื่อจากตัวอ่อน ก่อนจะพัฒนาขึ้นมาเป็นฟันเมื่อนำไปฝังในเยื่อหุ้มไต[29,30] จึงสามารถกล่าวได้ว่า วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อ มีความสำคัญอย่างมากทั้งในการศึกษาบทบาทของเนื้อเยื่อ โปรตีนหรือยีน ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการพัฒนาของเนื้อเยื่อและอวัยวะ รวมทั้งยังมีความสำคัญอย่างมากในการใช้ศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด และการพัฒนาของหน่อฟันขึ้นใหม่

## การเพาะเลี้ยงอวัยวะ (Organ culture)

วิธีการเพาะเลี้ยงอวัยวะถูกคิดค้นขึ้นโดย Loeb ในปี ค.ศ. 1897 ในหลอดทดลอง[31] วิธีการนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาการพัฒนาการของอวัยวะ โดยการนำอวัยวะทั้งชิ้นหรือบางส่วนของอวัยวะที่ต้องการศึกษา มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ และทำการเพาะเลี้ยงในตู้อบ อวัยวะหรือชิ้นส่วนอวัยวะที่นำมาเพาะเลี้ยง ถูกตัดออกมาโดยไม่ผ่านการย่อยโดยเอ็นไซม์ จึงมีความใกล้เคียงกับอวัยวะที่ยังอยู่ในธรรมชาติอยู่มาก การหลั่งฮอร์โมนหรือโปรตีนต่าง ๆ ที่ถูกสร้าง และหลั่งออกมาจากอวัยวะนั้น ๆ ยังเกิดขึ้นเหมือนในสภาวะปกติ เนื่องจากชิ้นส่วนอวัยวะที่เพาะเลี้ยงมีมิติมากกว่าเซลล์ จึงต้องได้รับออกซิเจนในปริมาณมากกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อป้องกันการขาดออกซิเจนของเนื้อเยื่อตรงกลางของอวัยวะ และต้องได้รับอาหารอย่างทั่วถึง การเจริญเติบโตจึงต้องใช้วิธีการที่ทำให้ชิ้นส่วนอวัยวะสามารถสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ทั่วชิ้นอวัยวะ วิธีการต่าง ๆ ถูกพัฒนาขึ้น เริ่มต้นจากการเลี้ยงอวัยวะบนลิ่มพลาสมา (plasma clot)[32,33] และพัฒนามาเลี้ยงบนอะกาซับสเตรต (agar substrate)[34] ต่อมา Trowell[35,36] ได้ทำการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงอวัยวะ โดยวางชิ้นอวัยวะบนแผ่นฟิลเตอร์บาง ๆ ซึ่งรองรับด้วยกริดโลหะ (metal grid) ในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์บรรจุอยู่ถึงระดับที่ชิ้นอวัยวะวาง เรียกวิธีการนี้ว่า การเพาะเลี้ยงแบบโทรเวล (Trowell-type organ culture) เป็นวิธีการที่เป็นที่ยอมรับ และนิยมใช้กันมากในปัจจุบัน นอกจากนี้ ยังมีวิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะที่มีขนาดไม่ใหญ่มากนัก เรียกว่า วิธีการเพาะเลี้ยงแบบแฮงค์กิ้งดรอป (Hanging drop culture) โดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณน้อย ซึ่งหยดอยู่ที่ฝาของจานเลี้ยงเซลล์มีการป้องกันการระเหยของอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใส่น้ำ หรือสารละลายบัฟเฟอร์ ในจานเลี้ยง การศึกษาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะสามารถใช้ศึกษาการพัฒนาของอวัยวะต่าง ๆ ได้หลายชนิด ชิ้นส่วนอวัยวะที่นำมาเพาะเลี้ยงสามารถนำมาจากตัวอ่อนทุกระยะ ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงขึ้นกับขนาด และความซับซ้อนของอวัยวะนั้น ๆ

วิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางทันตแพทยศาสตร์อย่างกว้างขวางเพื่อวัตถุประสงค์ในการศึกษาที่แตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 1) ได้แก่ 1) การเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง เพื่อศึกษาการพัฒนาการของอวัยวะนั้น หรืออวัยวะที่ประกอบอยู่ภายในชิ้นอวัยวะที่นำมาเพาะเลี้ยง เช่น การเพาะเลี้ยงหน่อฟัน (tooth bud) เพื่อศึกษาการเจริญพัฒนาของหน่อฟัน[37] การเพาะเลี้ยงฟาริงเจียลอาร์ชที่หนึ่ง (first pharyngeal arch) เพื่อศึกษาการพัฒนาของขากรรไกรล่าง ลิ้น และหน่อฟันภายในขากรรไกร[38] 2) การเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะร่วมกับการกระตุ้นด้วยสาร หรือโปรตีนที่ต้องการศึกษา เพื่อใช้ในการศึกษาผลของการพัฒนาของเนื้อเยื่อ การแสดงออกของยีน หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งนิยมทำกันมากในการศึกษายีน หรือโปรตีน ที่มีบทบาทในการพัฒนาของหน่อฟัน[2,39,40] การใช้เม็ดอะกาโรสที่ชุบด้วยโปรตีนร่วมกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอวัยวะ ทำให้ค้นพบบทบาทของโปรตีนหลายชนิดที่มีความสำคัญในกระบวนการพัฒนาของหน่อฟัน เช่น Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4), Fibroblast Growth Factor 4 (FGF4) และ Noggin เป็นต้น[2,40] 3) การเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะสามารถใช้ศึกษาติดตามการเคลื่อนที่ของเซลล์จากตำแหน่งตั้งต้น ไปสู่ตำแหน่งที่เซลล์จะพัฒนาเป็นอวัยวะ เช่น การเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะร่วมกับการฉีดสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent dye) ไปยังเซลล์ที่ต้องการศึกษาเพื่อติดตามการเคลื่อนที่ และพัฒนาของเซลล์ดังกล่าว[41,42] นอกจากการใช้วิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะในการศึกษาพัฒนาการของหน่อฟันแล้ว ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาฟันที่ขึ้นแล้วอีกด้วย เช่น การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของฟันที่ขึ้นแล้วเพื่อศึกษาการละลายของรากฟันหลังจากได้รับแรง[43]

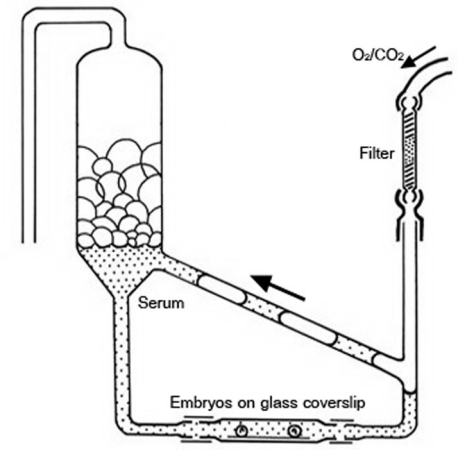
การศึกษาโดยวิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะเป็นวิธีที่

นิยมนำมาใช้ในการศึกษาการพัฒนาของเพดานปาก (palate) อย่างแพร่หลาย[44] โดยนำชิ้นส่วนเพดานปากในระยะที่ยังไม่เชื่อมต่อกันมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เพื่อวัตถุประสงค์ในการศึกษาต่าง ๆ กัน เช่น ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการพัฒนาของเพดานปาก[45,46] และการตายของเซลล์ หลังจากการเชื่อมต่อกันของเพดานปาก[47] นอกจากนี้ ยังเป็นวิธีที่เหมาะสมอย่างยิ่งในการใช้ศึกษาการเกิดภาวะเพดานโหว่ (cleft palate)[48,49] เนื่องจากสามารถควบคุมระยะห่างของชิ้นส่วนเพดานปากที่นำมาศึกษาในจานเพาะเลี้ยงได้

การเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะในจานเพาะเลี้ยงมีข้อจำกัดในด้านการได้รับอาหาร และก๊าซอย่างทั่วถึงทั้งหมดของชิ้นอวัยวะตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง หากชิ้นส่วนอวัยวะที่นำมาเพาะเลี้ยงมีขนาดใหญ่เกินไปจะเป็นอุปสรรคในการแพร่ของอาหาร และออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ด้านในชิ้นอวัยวะ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยง โดยนำชิ้นส่วนอวัยวะมาเพาะเลี้ยงในขวดแก้วที่ปิดด้วยจุกยาง และยึดเข้ากับเครื่องหมุนซึ่งทำการหมุนตลอดระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง เพื่อให้ชิ้นส่วนอวัยวะที่ทำการเพาะเลี้ยงได้รับอาหาร และออกซิเจนอย่างทั่วถึง วิธีการนี้ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงหน่อฟัน เพื่อศึกษาการพัฒนาของรากฟัน[50] จึงกล่าวได้ว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะเป็นวิธีการศึกษาที่เหมาะสมในการศึกษาการพัฒนาของอวัยวะภายนอกได้อย่างชัดเจน และใกล้ชิด อีกทั้งเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการใช้ศึกษาผลการพัฒนาของอวัยวะรวมทั้งการแสดงออกของโปรตีนหรือยีน ภายหลังการกระตุ้นโดยสาร หรือโปรตีนที่ต้องการศึกษา นอกจากนี้ ยังสามารถใช้ในการติดตามการเคลื่อนที่ของเซลล์ในระหว่างกระบวนการพัฒนาของอวัยวะได้อีกด้วย (ตารางที่ 1)

## การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัว (Whole embryo culture)

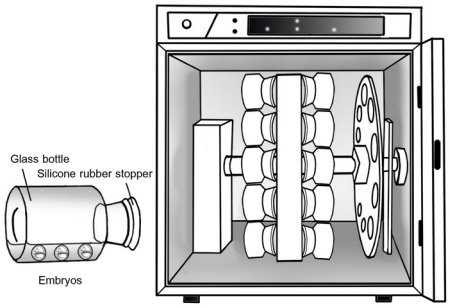
การศึกษาด้วยวิธีนี้คือ การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัวภายนอกครรภ์มารดาในห้องปฏิบัติการ ซึ่งพัฒนาขึ้นตั้งแต่ ค.ศ. 1966 โดย New[51] ได้ทำการเลี้ยงตัวอ่อนหนูทดลองในซีรัมแทนการเลี้ยงบนลิ่มพลาสมาซึ่งขัดขวางการพัฒนาของตัวอ่อน ซีรัมถูกบรรจุอยู่ภายในกระจกนาฬิกา (watch glass) ซึ่งวางในจานเพาะเลี้ยงโดยได้รับความชื้นจากสำลีชุบน้ำเกลือรอบ ๆ ตัวอ่อนที่เลี้ยงในซีรัมสามารถเพาะเลี้ยงได้เป็นเวลา 30 - 40 ชั่วโมง ไปจนถึงระยะไม่เกิน 30 ปล้อง (somites) โดยมีการเจริญเติบโตได้ดีเหมือนตัวอ่อนที่พัฒนาในครรภ์ สำหรับตัวอ่อนที่มีขนาดใหญ่กว่าระยะดังกล่าว จะไม่สามารถเจริญต่อไปได้ เนื่องจากตัวอ่อนหลังจากระยะนี้จะมีการเจริญเติบโตเร็วมาก อีกทั้งการได้รับอาหาร และก๊าซจะได้รับผ่านทางรก เมื่อนำตัวอ่อนมาเพาะเลี้ยงภายนอก จึงทำให้การได้รับสารอาหารในระยะนี้ไม่เพียงพอ รวมถึงการแลกเปลี่ยนก๊าซเป็นไปอย่างไม่ทั่วถึง เนื่องจากตัวอ่อนอยู่ในสภาวะนิ่งภายในกระจกนาฬิกา จึงมีการพัฒนาการเลี้ยงตัวอ่อนในสภาวะที่มีการไหลเวียนของอาหารเลี้ยงตัวอ่อนขึ้นในปี ค.ศ. 1967 โดย New[42] ได้พัฒนาเครื่องมือที่ทำให้เกิดระบบการไหลเวียนของอาหารเลี้ยงตัวอ่อน และอากาศตลอดเวลาที่ทำการเลี้ยงตัวอ่อน เรียกเครื่องมือนี้ว่า เซอร์คูเลเตอร์ (Circulator) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน และซีรัมสำหรับเลี้ยงตัวอ่อนจะมีการหมุนเวียนผ่านตัวอ่อนซึ่งถูกยึดอยู่บนผ้าเรยอนที่วางบนโคเวอร์สลิป (cover slip) ตลอดเวลา (รูปที่ 1)




***รูปที่ 1*** *เครื่องเซอร์คูเลเตอร์สำหรับการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัว ตัวอ่อนหนูทดลองถูกยึดบนผ้าเรยอนที่วางบนโคเวอร์สลิป ซีรัมมีการไหลเวียนอย่างต่อเนื่องภายในท่อแก้ว ออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านตัวกรองเข้าสู่ระบบการไหลเวียนภายใน (ดัดแปลงจาก New DA., 1967[51])*

***Figure 1*** *The circulator for whole embryo culture. Embryos pressed down into rayon fabric attached on a glass coverslip are in the detachable chamber. Serum flows continuously in the glass tube. A stream of $O_2/CO_2$ enters through the filter and circulates into the tube. (Modified from New DA., 1967[51])*

ตัวอ่อนที่ถูกเลี้ยงด้วยเครื่องเซอร์คูเลเตอร์ สามารถเจริญเติบโตจนถึงระยะ 40 - 45 ปล้อง แต่เนื่องจากเครื่องเซอร์คูเลเตอร์มีความยุ่งยากในการใช้งาน จึงมีการพัฒนาเครื่องมือที่เหมาะสม และใช้งานได้ง่ายในเวลาต่อมา การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนถูกพัฒนาต่อมา โดยนำมาเลี้ยงในหลอดทรงกระบอกปิดด้วยจุกยาง และยึดเข้ากับเครื่องที่ทำการหมุนหลอดทรงกระบอกตลอดเวลา เพื่อให้เกิดการหมุนเวียนของก๊าซ และอาหารเลี้ยงตัวอ่อน ซึ่งติดตั้งไว้ภายในตู้อบ เรียกการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนแบบนี้ว่า การเพาะเลี้ยงระบบโรเตติงบอทเทิล (Rotating-bottle culture system)[52] (รูปที่ 2)




A B

***รูปที่ 2*** *การเพาะเลี้ยงระบบโรเตติงบอทเทิล*
*A. ตัวอ่อนภายในขวดแก้วซึ่งบรรจุซีรัม และปิดด้วยจุกยาง*
*B. ขวดแก้วยึดกับเครื่องหมุนภายในตู้อบ*

***Figure 2*** *Rotating-bottle culture system*
*A. Embryos are in cylindrical glass bottle contained serum and sealed with the silicone rubber stopper*
*B. Culture glass bottles were placed in the rotator culture system in the incubator*

การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนมีการพัฒนาเทคนิคขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง เพื่อปรับให้เกิดความเหมาะสมในการใช้ศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อน โดยตัวอ่อนหนูทดลองที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัวได้อยู่ในช่วงตั้งแต่ตัวอ่อนมีอายุ 6.5 วัน (E6.5) จนถึงอายุ 12.5 วัน (E12.5) ในหนูเมาส์ (mouse) และตัวอ่อนที่มีอายุ 8.5 วัน (E8.5) ถึงอายุ 14.5 วัน (E14.5) ในหนูแรท (rat)[3] อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนคือ ซีรัมจากสัตว์ ได้แก่ ซีรัมจากหนูแรท (rat serum) ซึ่งให้สารอาหารที่เพียงพอแก่ตัวอ่อนในการเจริญเติบโต ตัวอ่อนถูกเลี้ยงในซีรัมภายในขวดแก้วซึ่งติดอยู่กับเครื่องหมุนซึ่งอยู่ภายในตู้อบ ขวดแก้วจะถูกหมุนตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน เพื่อให้เกิดการหมุนเวียนของซีรัม และก๊าซอย่างทั่วถึง[4] นอกจากวิธีการที่ได้กล่าวมาข้างต้น ได้มีผู้นำวิธีการเพาะเลี้ยงแบบโทรเวลมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน โดยอาศัยหลักการที่ว่า การทำให้เกิดการหมุนเวียนของอาหาร และก๊าซมีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัว โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบโทรเวลร่วมกับการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงตัวอ่อนทุก 2 ชั่วโมง และทำการเขย่าทุก 20 - 30 นาที เพื่อให้มีการหมุนเวียนของอาหารเลี้ยงตัวอ่อนและอากาศตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแทนการใช้เครื่องหมุน ในการศึกษานี้สามารถเลี้ยงตัวอ่อนที่มีอายุ 8 วัน (E8) ได้นานถึง 48 ชั่วโมง[38]

วิธีการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัว สามารถใช้ศึกษาตัวอ่อนที่อยู่ในระยะตั้งแต่เกิดการสร้างของระบบประสาท (neurulation) ซึ่งเกิดขึ้นก่อนการพัฒนาของฟาริงเจียลอาร์ช ไปจนถึงระยะที่มีการสร้างของใบหน้าและศีรษะเสร็จสมบูรณ์ ดังนั้น การศึกษาด้วยวิธีนี้ จึงเหมาะสมในการใช้ศึกษาการพัฒนาการของอวัยวะที่เกิดขึ้นระหว่างช่วงเวลาดังกล่าว (ตารางที่ 1) เช่น การติดตามการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวรัลเครสต์ (neural crest cell) จากจุดตั้งต้นไปสู่ตำแหน่งที่จะเจริญพัฒนาเป็นอวัยวะ การพัฒนาของส่วนยื่นใบหน้า (facial process) ต่าง ๆ ที่เจริญเป็นส่วนของใบหน้าและช่องปาก เป็นต้น การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวรัลเครสต์ไปยังตำแหน่งที่จะเจริญเป็นอวัยวะของใบหน้าและช่องปาก โดยทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนตั้งแต่ระยะที่ยังไม่มีการสร้างของใบหน้าและช่องปาก ร่วมกับการฉีดสีฟลูออเรสเซนต์ที่เซลล์[53,54] ทั้งนี้ ยังสามารถทำการศึกษาดังกล่าวร่วมกับการกระตุ้นด้วยสารบางชนิด เพื่อศึกษาผลกระทบต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้อีกด้วย เช่น การศึกษาผลของวิตามินเอ (retinoic acid) ต่อการเคลื่อนที่เซลล์[55] เนื่องจากวิธีการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัวไม่สามารถใช้ศึกษาตัวอ่อนภายหลังระยะที่มีการสร้างของศีรษะและใบหน้าเสร็จสมบูรณ์ การศึกษาการพัฒนาของเซลล์นิวรัลเครสต์ของใบหน้าและช่องปาก ในระยะหลังจากนี้ จึงต้องใช้วิธีการศึกษาอื่น ๆ ร่วมด้วย กล่าวคือ ในระยะแรกของการศึกษาใช้วิธีการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนจนกระทั่งการสร้างของใบหน้าสมบูรณ์ แล้วจึงทำการตัดชิ้นส่วนอวัยวะที่ต้องการศึกษามาทำการศึกษาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะ ตัวอย่างการศึกษาที่ใช้วิธีการดังกล่าวควบคู่กัน ได้แก่ การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวรัลเครสต์จากตำแหน่งต้นกำเนิดบริเวณสมองส่วนกลางด้านหลัง (posterior midbrain) เพื่อมาพัฒนาเป็นหน่อฟันกรามล่าง (mandibular molar)[56] และการศึกษากลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดของการเจริญของใบหน้าส่วนกลาง (midface) และหน่อฟันตัดบน (maxillary incisor) โดยทำการฉีดสีฟลูออเรสเซนต์ที่ผิวกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดของส่วนยื่นใบหน้าต่าง ๆ ก่อนที่จะเกิดการเจริญ และมีการเชื่อมกันของส่วนยื่นใบหน้าซึ่งจะเจริญไปเป็นใบหน้าส่วนกลางและฟันตัดบน เพื่อศึกษาติดตามการพัฒนาของกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดที่จะเจริญเซลล์ต้นกำเนิดใดที่จะเจริญไปเป็นใบหน้าส่วนกลางและหน่อฟันตัดบน[42]

ดังนั้น การศึกษาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัวจึงเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมในการใช้ศึกษาการเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อและอวัยวะ ในระยะเริ่มแรกของตัวอ่อนก่อนที่จะมีการสร้างของศีรษะและใบหน้าเสร็จสมบูรณ์ เนื่องจากวิธีการนี้สามารถนำตัวอ่อนออกมาเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตภายนอกได้ ทำให้สามารถศึกษาการพัฒนาของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆ ของตัวอ่อนได้อย่างชัดเจน วิธีการนี้นิยมในการใช้ศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่สนใจ โดยใช้ร่วมกับวิธีการฉีดสีฟลูออเรสเซนต์ที่เซลล์ที่ต้องการศึกษา และทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อติดตามการเคลื่อนที่ของเซลล์ไปยังตำแหน่งที่จะเจริญพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆ ในกรณีที่ต้องการศึกษาตัวอ่อนระยะหลังจากที่มีการสร้างของศีรษะและใบหน้าสมบูรณ์แล้ว สามารถทำการศึกษาได้ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นอวัยวะ ภายหลังจากทำการศึกษาด้วยวิธีการ

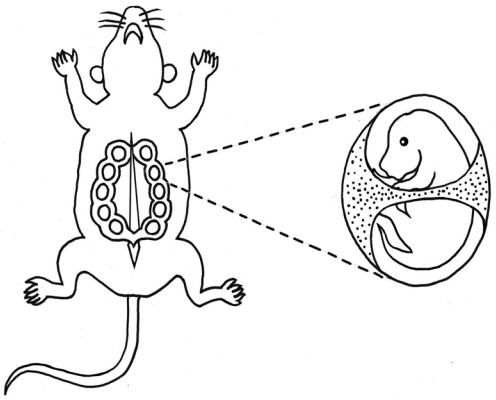
เพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัวแล้ว

### การผ่าตัดอินยูเทอโร และเอกซ์ยูเทอโร (*In Utero* and *Ex Utero* surgery)

วิธีการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัวเป็นวิธีที่สามารถนำตัวอ่อนออกมาศึกษาได้อย่างใกล้ชิดภายนอก แต่ก็มีข้อจำกัดในเรื่องการได้รับอาหาร และออกซิเจนของตัวอ่อน เมื่อตัวอ่อนมีขนาดใหญ่กว่าระยะที่มีการสร้างศีรษะและใบหน้าเสร็จสมบูรณ์ เนื่องจากเมื่อตัวอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้นจะมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วมากขึ้น อีกทั้งการได้รับอาหารการแลกเปลี่ยนก๊าซ และของเสียเกิดขึ้นผ่านทางรก ซึ่งไม่ได้ทำหน้าที่แล้วเมื่อนำตัวอ่อนออกมาเพาะเลี้ยงภายนอก ทำให้การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถทำได้ จึงมีการพัฒนาวิธีการศึกษาโดยตรงในตัวอ่อนหนูทดลองในครรภ์ โดยการผ่าตัดเข้าสู่ตัวอ่อนใต้เยื่อถุงน้ำคร่ำ (amnion) และถุงไข่แดง (yolk sac) ภายในมดลูกหนูทดลอง สามารถทำได้ 2 วิธีคือ อินยูเทอโร และเอกซ์ยูเทอโร[5] ทั้ง 2 วิธีมีความแตกต่างกันที่การเย็บปิดของมดลูกหลังการผ่าตัด กล่าวคือ มดลูก น้ำคร่ำ และถุงไข่แดงจะถูกเปิดออก และเย็บปิด เมื่อทำการผ่าตัดด้วยวิธีการผ่าตัดอินยูเทอโร ในขณะที่การผ่าตัดด้วยวิธีการผ่าตัดเอกซ์ยูเทอโรจะทำการเปิดมดลูกโดยไม่เย็บปิด โดยตัวอ่อนจะยังติดอยู่กับรกซึ่งเกาะอยู่บนมดลูก (รูปที่ 3)

เนื่องจากมีผลการศึกษาว่า ตัวอ่อนหนูทดลองที่รกยังคงยึดอยู่กับมดลูกสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ภายในช่องท้องจนครบกำหนดในมดลูกที่ถูกเปิดออก[57] วิธีการผ่าตัดเอกซ์ยูเทอโรจึงเป็นที่นิยมในการใช้ศึกษาโดยตรงในตัวอ่อนภายใต้การผ่าตัดทั้ง 2 วิธี หนูทดลองจะได้รับการทำให้สลบด้วยยาสลบทั่วไป (general anesthesia) ก่อนการผ่าตัดเปิดหน้าท้องเข้าสู่ท่อมดลูก และเย็บปิดหน้าท้อง หลังจากการผ่าตัดเสร็จสิ้น เพื่อให้ตัวอ่อนเจริญต่อไปในครรภ์ ถึงแม้ว่าการผ่าตัดดังกล่าวจะถือเป็นการผ่าตัดใหญ่ แต่หนูทดลองก็สามารถฟื้นตัวได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังการผ่าตัด ในการศึกษาด้วยวิธีการผ่าตัดโดยตรงเข้าสู่ตัวอ่อนมีการผ่าตัดเปิดเข้าสู่มดลูก ดังนั้น หนูทดลองจะไม่สามารถคลอดเองได้ การเก็บตัวอย่างตัวอ่อนจึงต้องทำด้วยวิธีการุณยฆาต และทำการเปิดผนังหน้าท้องเข้าไปเพื่อเก็บตัวอย่าง

การศึกษาด้วยวิธีนี้เป็นวิธีการศึกษาที่มีความใกล้เคียงกับสภาวะธรรมชาติมากที่สุด เนื่องจากตัวอ่อนยังคงเจริญเติบโตต่อไปในครรภ์ การได้รับอาหาร และการแลกเปลี่ยนก๊าซของตัวอ่อนยังคงดำเนินไปตามปกติผ่านทางรก การศึกษาตัวอ่อนด้วยวิธีนี้ สามารถใช้ในการศึกษาตัวอ่อนที่มีขนาดใหญ่ และเป็นวิธีที่เอื้ออำนวยให้ตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตจนครบอายุครรภ์ได้อีกด้วย วิธีการต่าง ๆ ถูกนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการศึกษาด้วยวิธีนี้ เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาที่แตกต่างกันไป ได้แก่ การฉีดสารต่าง ๆ เข้าสู่ตัวอ่อน เช่น การฉีดไวรัสเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน การปลูกถ่ายเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่สนใจเข้าสู่ตัวอ่อน การฉีดสีย้อมเพื่อทำการติดตามการเคลื่อนที่ และเจริญพัฒนาของเซลล์ การใช้เม็ดอะกาโรสเป็นตัวนำโปรตีนหรือโกรว์ทแฟคเตอร์ที่ต้องการศึกษาฝังเข้าไปในตัวอ่อนเพื่อศึกษาผลที่เกิดขึ้น[58-64]



***รูปที่ 3*** *การผ่าตัดอินยูเทอโร และเอกซ์ยูเทอโร มดลูกของหนูทดลองที่ตั้งครรภ์ถูกยกออกมาจากช่องท้องเพื่อใช้ในการศึกษา*

***Figure 3*** *In Utero and Ex Utero surgery. The abdomen of the pregnant mouse is opened and the whole uterus is lifted off the abdominal cavity. The uterus is opened to expose the embryo for study.*

การศึกษาด้วยวิธีการผ่าตัดโดยตรงเข้าสู่ตัวอ่อนถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาตัวอ่อนในระยะที่ไม่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงภายนอกได้ ซึ่งเป็นระยะที่ตัวอ่อนมีขนาดใหญ่ และมีการพัฒนาของอวัยวะต่าง ๆ แล้ว วิธีการนี้จึงนิยมใช้ในการศึกษาอวัยวะที่มีการเจริญพัฒนามาช่วงระยะเวลาหนึ่งแล้ว เช่น การพัฒนาของกระดูกกะโหลกศีรษะหลังจากระยะเริ่มสร้าง จนกระทั่งสร้างเสร็จสมบูรณ์ มีหลายการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาการของส่วนกะโหลกศีรษะและใบหน้า ที่นำวิธีการผ่าตัดเข้าสู่ตัวอ่อนโดยตรงมาใช้ร่วมกับวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การใช้เม็ดอะกาโรสนำโกรว์ทแฟคเตอร์ฝังเข้าไปบริเวณกะโหลกศีรษะของตัวอ่อนหนูทดลอง เพื่อศึกษาการสร้างกระดูกกะโหลกศีรษะ[58,59,65] การใช้วิธีการฉีดสีฟลูออเรสเซนต์ร่วมกับการผ่าตัดเข้าสู่ตัวอ่อนโดยตรง เพื่อติดตามการเคลื่อนที่ และพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิด ในการสร้างกระดูกกะโหลกศีรษะ[61,66] นอกจากนี้ ยังสามารถใช้วิธีนี้ในการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเนื้อเยื่อทดแทน โดยใช้ในการหาตำแหน่งที่เหมาะสมในการปลูกถ่ายหน่อฟันแทนบริเวณช่องโพรงของตาด้านหน้า (anterior eye chamber) และเยื่อหุ้ม

ไต ซึ่งเป็นตำแหน่งที่นิยมใช้เป็นที่ปลูกถ่ายหน่อฟัน เพื่อการศึกษาเรื่องการเกิดฟันใหม่ทดแทน (tooth regeneration)[62]

จะเห็นว่า การศึกษาด้วยวิธีการผ่าตัดเข้าสู่ตัวอ่อนโดยตรงเป็นประโยชน์อย่างมากในการใช้ศึกษาทางด้านชีววิทยาพัฒนาการในตัวอ่อนที่มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะใช้วิธีการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งตัวได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่เอื้ออำนวยให้ตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตได้อย่างเป็นธรรมชาติที่สุดจนถึงครบกำหนดอายุครรภ์ อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีการศึกษาต่าง ๆ ได้ด้วย ได้แก่ การติดตามการพัฒนาของเซลล์โดยการติดสารเรืองแสงที่เซลล์ การศึกษาพฤติกรรมการแสดงออกของเซลล์และเนื้อเยื่อ หลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยโปรตีนบางชนิด อีกทั้ง ยังสามารถใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการปลูกถ่ายเซลล์ หรืออวัยวะได้อีกด้วย (ตารางที่ 1)

## บทสรุป

การศึกษาทางด้านชีววิทยาพัฒนาการของกะโหลกศีรษะและใบหน้า ประกอบด้วยการศึกษาในหลายแง่มุม ตั้งแต่การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ต้นกำเนิดไปยังบริเวณที่จะพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ จนถึงการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเนื้อเยื่อหรืออวัยวะทดแทน การเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ประกอบไปด้วยกระบวนการหลายอย่าง ได้แก่ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การอพยพเคลื่อนย้ายของเซลล์ไปสู่ตำแหน่งที่จำเพาะ การเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะ และการเปลี่ยนสภาพเซลล์ เป็นต้น การเลือกวิธีที่เหมาะสมในการศึกษาเรื่องใด จึงต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง เนื่องจากกระบวนการต่าง ๆ ของการพัฒนามีความซับซ้อน และมีปัจจัยเกี่ยวข้องหลายประการ เช่น อายุของตัวอ่อนที่ทำการศึกษา ช่วงเวลาในการศึกษา เนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ทำการศึกษา และปัจจัยข้างเคียงที่มีผลต่อการศึกษา ทั้งนี้ ต้องคำนึงถึงความเหมาะสมของวิธีที่จะนำมาใช้ในการศึกษาว่า สามารถทำให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการศึกษาได้หรือไม่ โดยต้องตระหนักถึงข้อจำกัด ข้อเด่น และข้อด้อยของการศึกษาแต่ละวิธี เพื่อจะสามารถเลือกใช้วิธีการที่เหมาะสม และทำให้บรรลุวัตถุประสงค์ได้มากที่สุด ทั้งนี้ในการศึกษาบางเรื่องอาจต้องใช้วิธีการมากกว่าหนึ่งวิธีควบคู่กันไปเพื่อให้การศึกษาสามารถบรรลุวัตถุประสงค์ได้

***Table 1*** *Comparison of the techniques used in the craniofacial developmental biology*

***ตารางที่ 1*** *ตารางเปรียบเทียบวิธีการที่ใช้ในการศึกษาชีววิทยาพัฒนาการในส่วนของกะโหลกศีรษะและใบหน้า*

| Technique of study | Stage of embryo | Region of study | Duration of study | Objective of study | Supplemental technique |
|---|---|---|---|---|---|
| Tissue culture | All stages of the embryo | Cells or tissues from the embryo | Several weeks | Cell characteristic;<br>Proliferation<br>Differentiation<br>Cell-cell interaction | Protein induction<br>Co-culture of cell or tissue |
| Organ culture | All stages of the embryo | Part of the organ from the embryo | Depend on size and type of the organ | Organ development<br>Cell lineage tracking | Cell labeling technique<br>Bead implantation<br>Viral injection |
| Whole embryo culture | Embryo from neurulation stage until the end of craniofacial forming stage | Whole embryo | 12 - 60 hours | Embryo development<br>Organ development<br>Cell lineage tracking | Cell labeling technique<br>Bead implantation<br>Viral injection |
| *In utero* and *Ex utero* surgery | Embryo after the end of craniofacial forming stage | Whole embryo | Until full-term pregnancy | Organ development<br>Cell lineage tracking<br>Tissue transplantation | Cell labeling technique<br>Bead implantation<br>Viral injection<br>Cell or tissue injection/implantation |

## เอกสารอ้างอิง


1. Freshney RI. Basic Principles of Cell Culture. Culture of Cells for Tissue Engineering: 1st ed. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey: USA; 2006. p. 1-22.
2. Munne PM, Närhi K, Michon F. Analysis of tissue interactions in ectodermal organ culture. ***Methods Mol Biol*** 2013;945:401-16.
3. Martin P, Cockroft DL. Culture of postimplantation mouse embryos. ***Methods Mol Biol*** 2008;461:7-22.
4. Fujinaga M. *In vitro* culture of rodent embryos during the early postimplantation period. ***Methods Mol Biol*** 2000;135:53-76.
5. Ngô-Muller V, Muneoka K. *In utero* and *exo utero* surgery on rodent embryos. ***Methods Enzymol*** 2010;476:205-26.
6. 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.
7. Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 1998;95:13726-31.
8. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. ***Nat Biotechnol*** 2000;18:399-404.
9. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 2000;97:13625-30.
10. Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. ***Stem Cells*** 2006;24:2493-503.
11. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. ***Stem Cell Rev*** 2008;4:21-6.
12. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 2003;100:5807-12.
13. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. ***PLoS One*** 2006;1:e79.
14. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, *et al.* Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. ***J Endod*** 2008;34:166-71.
15. Ruparel NB, de Almeida JF, Henry MA, Diogenes A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. ***J Endod*** 2013;39:357-63.
16. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. ***Matrix Biol*** 2005;24:155-65.
17. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. ***J Dent Res*** 2008;87:767-71.
18. Miletich I, Sharpe PT. Normal and abnormal dental development. ***Hum Mol Genet*** 2003;12:R69-73.
19. Thesleff I. Developmental biology and building a tooth. ***Quintessence Int*** 2003;34:613-20.
20. Lumsden AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. ***Development*** 1988;103:155-69.
21. Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. ***Arch Oral Biol*** 1987;32:123-7.
22. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. ***Cell*** 1993;75:45-58.
23. Chen Y, Bei M, Woo I, Satokata I, Maas R. Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. ***Development*** 1996;122:3035-44.
24. Jiang N, Zhou J, Chen M, Schiff MD, Lee CH, Kong K, *et al.* Postnatal epithelium and mesenchyme stem/progenitor cells in bioengineered amelogenesis and dentinogenesis. ***Biomaterials*** 2014;35:2172-80.
25. Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. ***J Dent Res*** 2004;83:518-22.
26. Li ZY, Chen L, Liu L, Lin YF, Li SW, Tian WD. Odontogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells. ***J Oral Maxillofac Surg*** 2007;65:494-500.
27. Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, *et al.* Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. ***J Biol Chem*** 2012;287:10590-601.

28. Nakagawa E, Itoh T, Yoshie H, Satokata I. Odontogenic potential of post-natal oral mucosal epithelium. ***J Dent Res*** 2009;88:219-23.
29. Zheng L, Warotayanont R, Stahl J, Kunimatsu R, Klein O, DenBesten PK, *et al.* Inductive ability of human developing and differentiated dental mesenchyme. ***Cells Tissues Organs*** 2013;198:99-110.
30. Angelova Volponi A, Kawasaki M, Sharpe PT. Adult human gingival epithelial cells as a source for whole-tooth bioengineering. ***J Dent Res*** 2013;92:329-34.
31. Carrel A, Burrows MT. Cultivation of tissues *in vitro* and its technique. ***J Exp Med*** 1911;13:387-96.
32. Tansley K. The formation of rosettes in the rat retina. ***Br J Ophthalmol*** 1933;17:321-36.
33. Strangeways TSP, Fell HB. Experimental studies on the differentiation of embryonic tissues growing *in vivo* and *in vitro*. II. The development of the isolated early embryonic eye of the fowl when cultivated *in vitro*. ***Proc Roy Soc B*** 1926;100:273-83.
34. Harrison JR. *In vitro* analysis of differentiation of retinal pigment in the developing chick embryo. ***J Exp Zool*** 1951;118:209-41.
35. Trowell OA. A modified technique for organ culture *in vitro*. ***Exp Cell Res*** 1954;6:246-8.
36. Trowell OA. The culture of mature organs in a synthetic medium. ***Exp Cell Res*** 1959;16:118-47.
37. Yamada M, Bringas P Jr, Grodin M, MacDougall M, Cummings E, Grimmett J, *et al.* Chemically-defined organ culture of embryonic mouse tooth organs: morphogenesis, dentinogenesis and amelogenesis. ***J Biol Buccale*** 1980;8:127-39.
38. Chai Y, Bringas P Jr, Shuler C, Devaney E, Grosschedl R, Slavkin HC. A mouse mandibular culture model permits the study of neural crest cell migration and tooth development. ***Int J Dev Biol*** 1998;42:87-94.
39. James MJ, Järvinen E, Wang XP, Thesleff I. Different roles of Runx2 during early neural crest-derived bone and tooth development. ***J Bone Miner Res*** 2006;21:1034-44.
40. Hu X, Wang Y, He F, Li L, Zheng Y, Zhang Y, *et al.* Noggin is required for early development of murine upper incisors. ***J Dent Res*** 2012;91:394-400.
41. Fujiwara N, Tabata MJ, Endoh M, Ishizeki K, Nawa T. Insulin-like growth factor-I stimulates cell proliferation in the outer layer of Hertwig's epithelial root sheath and elongation of the tooth root in mouse molars *in vitro*. ***Cell Tissue Res*** 2005;320:69-75.
42. Kriangkrai R, Chareonvit S, Yahagi K, Fujiwara M, Eto K, Iseki S. Study of Pax6 mutant rat revealed the association between upper incisor formation and midface formation. ***Dev Dyn*** 2006;235:2134-43.
43. Wan Hassan WN, Stephenson PA, Waddington RJ, Sloan AJ. An *ex vivo* culture model for orthodontically induced root resorption. ***J Dent*** 2012;40:406-15.
44. Michele PM, Greene R. Palate Development; In: Tuan RS, Lo CW, editors. Developmental Biology Protocols. 1st ed. Totowa; New Jersey: 2000. p. 267-74.
45. Pungchanchaikul P, Gelbier M, Ferretti P, Bloch-Zupan A. Gene expression during palate fusion *in vivo* and *in vitro*. ***J Dent Res*** 2005;84:526-31.
46. Yu W, Kamara H, Svoboda KK. The role of twist during palate development. ***Dev Dyn*** 2008;237:2716-25.
47. Cuervo R, Covarrubias L. Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. ***Development*** 2004;131:15-24.
48. Taya Y, O'Kane S, Ferguson MW. Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. ***Development*** 1999;126:3869-79.
49. Erfani S, Maldonado TS, Crisera CA, Warren SM, Lee S, Longaker MT. An *in vitro* mouse model of cleft palate: defining a critical intershelf distance necessary for palatal clefting. ***Plast Reconstr Surg*** 2001;108:403-10.
50. Sohn WJ, Choi MA, Yamamoto H, Lee S, Lee Y, Jung JK, *et al.* Contribution of mesenchymal proliferation in tooth root morphogenesis. ***J Dent Res*** 2014;93:78-83.
51. New DA. Development of rat embryos cultured in blood sera. ***J Reprod Fertil*** 1966;12:509-24.
52. New DA, Coppola PT, Terry S. Culture of explanted rat embryos in rotating tubes. ***J Reprod Fertil*** 1973;35:135-8.
53. Matsuo T, Osumi-Yamashita N, Noji S, Ohuchi H, Koyama E, Myokai F, *et al.* A mutation in the Pax-6 gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells. ***Nat Genet*** 1993;3:299-304.
54. Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Doi H, Eto K. The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. ***Dev Biol*** 1994;164:409-19.
55. Lee YM, Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Moon CK, Eriksson U, Eto K. Retinoic acid stage-dependently alters the migration pattern and identity of hindbrain neural crest cells. ***Development*** 1995;121:825-37.

56. Imai H, Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Eto K. Contribution of early-emigrating midbrain crest cells to the dental mesenchyme of mandibular molar teeth in rat embryos. ***Dev Biol*** 1996;176:151-65.
57. Muneoka K, Wanek N, Bryant SV. Mouse embryos develop normally *exo utero*. ***J Exp Zool*** 1986;239:289-93.
58. Iseki S, Wilkie AO, Heath JK, Ishimaru T, Eto K, Morriss-Kay GM. Fgfr2 and osteopontin domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF2. ***Development*** 1997;124:3375-84.
59. Iseki S, Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. ***Development*** 1999;126:5611-20.
60. Ngo-Muller V, Muneoka K. Influence of FGF4 on digit morphogenesis during limb development in the mouse. ***Dev Biol*** 2000;219:224-36.
61. Yoshida T, Vivatbutsiri P, Morriss-Kay G, Saga Y, Iseki S. Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. ***Mech Dev*** 2008;125:797-808.
62. Song Y, Yan M, Muneoka K, Chen Y. Mouse embryonic diastema region is an ideal site for the development of ectopically transplanted tooth germ. ***Dev Dyn*** 2008;237:411-6.
63. Shikanai M, Asahina K, Iseki S, Teramoto K, Nishida T, Shimizu-Saito K, *et al*. A novel method of mouse *ex utero* transplantation of hepatic progenitor cells into the fetal liver. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2009;381:276-82.
64. Hatta T, Matsumoto A, Otani H. Application of the mouse *exo utero* development system in the study of developmental biology and teratology. ***Congenit Anom (Kyoto)*** 2004;44:2-8.
65. Mikura A, Okuhara S, Saito M, Ota M, Ueda K, Iseki S. Association of tenascin-W expression with mineralization in mouse calvarial development. ***Congenit Anom (Kyoto)*** 2009;49:77-84.
66. Machida A, Okuhara S, Harada K, Iseki S. Difference in apical and basal growth of the frontal bone primordium in Foxc1ch/ch mice. ***Congenit Anom (Kyoto)*** 2014;54:172-7.