บทคัดย่อ

การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเป็นหนึ่งในวิธีการที่น่าจะมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของระบบประสาท แต่เนื่องจากข้อจำกัดของการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์และเซลล์ตั้งต้นระบบประสาทมาใช้ในการรักษา เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ โดยเฉพาะจากเนื้อเยื่อไขมันจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพ การเก็บเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมันเป็นวิธีการที่ง่าย มีเป็นจำนวนมากในร่างกาย และยังสามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้เป็นระยะเวลาหลายเดือนอีกด้วย นอกจากนี้แล้วเซลล์เหล่านี้ยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในระบบประสาทได้เมื่ออยู่ภายใต้ภาวะการเหนี่ยวนำที่เหมาะสม ดังนั้นการหาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำเซลล์เหล่านี้ให้กลายไปเป็นเซลล์ระบบประสาทจึงเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยทางการแพทย์และอาจนำไปสู่การนำไปใช้ในทางคลินิกในอนาคต

วัตถุประสงค์การศึกษานี้คือ เพื่อหาผลของ 8 BromocyclicGMP (8Br-cGMP) ต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ไปเป็นเซลล์ระบบประสาท ผลการทดลองพบว่าหลังจากทำการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ เซลล์เหล่านั้นถูกนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน และนำไปตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ ด้วยวิธีการย้อมโปรตีนที่จับบนผิวเซลล์และการเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่คัดแยกได้ มีการแสดงออกของโปรตีน CD73, CD90, และ CD105 แต่ไม่แสดงออกโปรตีน CD34 และ CD45 นอกจากนั้นเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่คัดแยกมาในการวิจัยครั้งนี้มีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบฟีโนไทป์และการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่เหนี่ยวนำด้วย 8Br-cGMP ที่ความเข้มข้น 0 uM, 10 uM และ 100 uM เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท ผลการศึกษาพบว่า หนึ่งสัปดาห์หลังทำการเหนี่ยวนำ ประชากรเซลล์ส่วนใหญ่ที่เติม 8Br-cGMP ความเข้มข้น 10 uM มีรูปร่าง เรียว ยาว มีขนาดเล็กลง และพบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ประสาทที่มี bipolar และ multipolar ซึ่งมีแขนงคล้ายแอกซอนยื่นออกมาจากตัวเซลล์อีกด้วย จำนวนสัดส่วนเซลล์ที่แสดงออกต่อ Nestin, Sox2, TUJ1 และ NF-L หลังการเหนี่ยวนำด้วย 10 uM 8Br-cGMP สูงกว่าความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$) ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์หลังการเหนี่ยวนำด้วย 10 uM 8Br-cGMP มีระดับของยีนที่จำเพาะต่อเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์นิวรอน (*MASH1, GAP43, TUJ1, NF-L,* และ *MAP2*) สูงกว่ากลุ่มความเข้มข้นอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์จากการเหนี่ยวนำด้วย 10 uM 8Br-cGMP ให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอน

และเซลล์ค้ำจุนเต็มวัย พบว่าเซลล์เหล่านั้นสามารถกลายไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุนเต็มวัยได้ ซึ่งยืนยันด้วยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย RT-qPCR และการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Immunocytochemistry จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อไขมันมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 10 uM 8Br-cGMP สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ตั้งต้นเซลล์ประสาทนิวรอน และยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทนิวรอนและเซลล์ค้ำจุนเต็มวัยภายใต้ภาวะที่เหมาะสมได้อีกด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Stem cell transplantation is a promising tool in neurodegenerative diseases treatment. Many features of human adipose stem cells (hASCs) among other types of stem cells demonstrate a glimpse of possibilities in clinical applications. Thus, researchers have been developing neural transdifferentiation of hASCs methods over the last decades. Various types of inducing agent, small molecule, chemical genetics that cause cell reprogramming in a nuclei, and specific signaling pathway inhibitors were applied to generate an efficient protocol. NO-cGMP signaling pathway is well known to play a vital role in regulation of cell growth, survival, differentiation, proliferation, migration, axon guidance and many other processes through a variety of downstream signaling cascades depending on cell type specific regulation. cGMP, as the mediator, help support NO regulate cell survival, differentiation and neuroprotective regulation. Previous research demonstrated that applying NO donor agents in neural differentiation medium could convert hESCs into neural-like cells. However, neural differentiation through this specific signaling pathway on hASCs has not been yet investigated. In this study, 8 Bromo-cyclic GMP (8Br-cGMP) was added to neural induction cocktails to improve the neural transdifferentiation efficiency of hASCs. Results demonstrated that hASCs under this condition exhibited higher expression of neural genes and could further differentiate into mature neuronal and glial cells. Our findings highlight that differentiated hASCs displayed neuronal progenitor profile, yet remained their plasticity as they can differentiate toward glial cells. Future studies employing *in vivo* transplantation models and their underlying mechanisms are warrante.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี