เหงียน ถิ ฮง : การเหนี่ยวนำและการปลูกถ่ายเซลล์เยื่อบุผิวกระจกตาที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซ็นไคม์จากวาร์ตันเจลลี่มนุษย์ในกระต่ายโมเดลโรคพร่องเซลล์ต้นกำเนิดลิมบัส (INDUCTION AND TRANSPLANTATION OF CORNEAL EPITHELIAL CELLS DERIVED FROM HUMAN WHARTON'S JELLY MESENCHYMAL STEM CELLS INTO THE LIMBAL STEM CELL DEFICIENCY RABBIT MODEL) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 111 หน้า.

คำสำคัญ: เซลล์ต้นกำเนิดมีเซ็นไคม์/เซลล์เยื่อบุผิวกระจกตา/การเปลี่ยนแปลงเซล์/การปลูกถ่าย/กระต่าย

เยื่อบุผิวกระจกตาประกอบด้วยเซลล์เยื่อบุผิวกระจกตา (corneal epithelial cells: CECs) ซึ่งถูกสร้างใหม่อย่างต่อเนื่องโดย limbal epithelial stem cells (LESCs) เมื่อ LESCs สูญเสียไปหรือมีการทำงานที่ผิดปกติจะทำให้เกิดโรคพร่องเซลล์ต้นกำเนิดลิมบัส (limbal stem cell deficiency: LSCD) ซึ่งทำให้เสียเยื่อบุผิวกระจกตาและการมองเห็นบกพร่อง การสร้างเยื่อบุผิวกระจกตาขึ้นมาใหม่จำเป็นต้องได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เยื่อบุผิวกระจกตา การทดลองที่ 1 ของงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของสารทดสอบต่อ signaling pathway 3 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เยื่อบุผิวกระจกตา รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซ็นไคม์จากวาร์ตันเจลลี่ของมนุษย์ไปเป็นเซลล์เยื่อบุผิวกระจกตา พบว่า All-trans retinoic acid (RA) ยับยั้ง Wnt signaling pathway โดยยับยั้งการเคลื่อนย้าย β-catenin จากไซโทพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียส SB505124 ยับยั้ง TGF-β signaling pathway โดยลดการเกิด phosphorylation ที่ Smad2 ส่วน BMP4 ไม่ทำให้ phosphorylation ของ Smad1/5/8 ใน BMP signaling pathway เพิ่มขึ้น การใช้สารผสมของ RA, SB505124, BMP4 และ EGF ใน 3 วันแรกของการเหนี่ยวนำ แล้วเปลี่ยนมาใช้ supplemented hormonal epidermal medium ในการเหนี่ยวนำต่ออีก 6 วัน ทำให้เกิดเซลล์เยื่อบุผิวกระจกตาที่ปรากฏ CK12 ซึ่งเป็นโมเลกุลบ่งชี้ความเป็นเซลล์กระจกตา การทดลองที่ 2 ได้สร้าง cell sheet จากเซลล์เยื่อบุผิวกระจกตาที่ได้จากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซ็นไคม์จากวาร์ตันเจลลี่ของมนุษย์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำจากการทดลองที่ 1 และประเมินประสิทธิภาพของการปลูกถ่าย cell sheet ในการรักษาโรคพร่องเซลล์ต้นกำเนิดลิมบัสในกระต่าย เยื่อถุงน้ำคร่ำของมนุษย์ถูกนำมาลอกเยื่อบุผิวออกโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้ม 0.5 N เป็นเวลา 30 วินาที ทำให้ได้ de-epithelialized amniotic membrane (dAM) จากนั้นจึงสร้าง cell sheet โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวกระจกตาลงบน dAM ทำให้ได้ cell

sheet ที่ประกอบด้วยชั้นของเซลล์ 1 – 4 ชั้น ซึ่งเซลล์ยังคงปรากฏ CK12 อยู่ กระต่ายจำนวน 9 ตัว ถูกทำให้ตาข้างขวาเป็นโรคพร่องเซลล์ต้นกำเนิดลิมบัส โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้ม 1 N เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้น 28 วัน จึงแบ่งกระต่ายออกเป็น 3 กลุ่มเท่าๆกัน กลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับการรักษา กลุ่มที่ 2 ได้รับการปลูกถ่าย dAM และ กลุ่มที่ 3 ได้รับการปลูกถ่าย cell sheet ผลการทดลองพบว่าวิธี alkali burn treatment ในกลุ่มที่ 1 ไม่สามารถกำจัด LESCs ได้หมด ทำให้ LESCs ที่เหลืออยู่สร้างเซลล์เยื่อบุผิวกระจกตาขึ้นมาใหม่บริเวณขอบกระจกตาและยับยั้งการงอกของเนื้อเยื่อ conjunctiva และ หลอดเลือดเข้าสู่กลางกระจกตา กลุ่มที่ 2 วิธี alkali burn treatment และกระบวนการผ่าตัดสามารถกำจัด LESCs ออกได้ทั้งหมด ทำให้เนื้อเยื่อ conjunctiva และ หลอดเลือดงอกเข้ามาในกระจกตาอย่างรวดเร็วและไม่พบเซลล์เยื่อบุผิวกระจกตาเกิดขึ้น ในกลุ่มที่ 3 เซลล์เยื่อบุผิวกระจกตาที่ปลูกถ่ายยังคงมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตบนกระจกตาของกระต่าย ทำให้เกิดเยื่อบุผิวกระจกตาขึ้นมาใหม่และทำให้กระตาใสขึ้น สรุปได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีเซ็นไคม์จากวาร์ตันเจลลี่ของมนุษย์เป็นตัวเลือกที่ดีในการสร้างเซลล์เยื่อบุผิวกระจกตาซึ่งเมื่อนำไปปลูกถ่ายในกระต่ายที่เป็นโรคพร่องเซลล์ต้นกำเนิดลิมบัส สามารถทำให้เกิดเยื่อบุผิวกระจกตาขึ้นมาใหม่ได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

NGUYEN THI HONG : INDUCTION AND TRANSPLANTATION OF CORNEAL EPITHELIAL CELLS DERIVED FROM HUMAN WHARTON'S JELLY MESENCHYMAL STEM CELLS INTO THE LIMBAL STEM CELL DEFICIENCY RABBIT MODEL. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 111 PP.

Keywords: Mesenchymal stem cells/Corneal epithelial cells/Differentiation/ transplantation/Rabbit

Corneal epithelium comprises of corneal epithelial cells (CECs) that are continuously renewed by limbal epithelial stem cells (LESCs). Loss or dysfunction of LESCs causes limbal stem cell deficiency (LSCD) which results in loss of corneal epithelial integrity and visual impairment. To regenerate the ocular surface, transplantation of stem cells-derived CECs is necessary. The first experiment of this study aimed to test the effects of treatments on three signaling pathways involved in CEC differentiation as well as examined the optimal protocol for inducing CECs derived from human WJ-MSCs. All-trans retinoic acid (RA) inhibited Wnt signaling pathway via suppressing the translocation of β- catenin from the cytoplasm into the nucleus. SB505124 downregulated TGF-β signaling pathway via reducing the phosphorylation of Smad2. BMP4 did not increase the phosphorylation of Smad1/5/8 that involved in BMP signaling. The combination of RA, SB505124, BMP4, and EGF for the first 3 days of differentiation followed by the supplemented hormonal epidermal medium for additional 6 days could generate CECs that expressed CK12 which is a specific marker of CECs. The second experiment of this study aimed to generate cell sheet from the induced CECs derived from human WJ-MSCs and evaluate the efficiency of cell sheet transplantation on recovery of LSCD in rabbit model. CECs were induced from human WJ- MSCs following the optimal method of the first experiment. Human amniotic membrane (hAM) was de-epithelialized by 0.5N NaOH treatment for 30s then rubbing with cotton-tipped applicator. The cell sheet was generated by seeding induced CECs on human de-epithelialized AM (dhAM). The cell sheet consisted of 1- to 4-layers of

cells and these cells retained the expression of CK12. LSCD rabbit model was created by treatment with 1N NaOH for 30s in 9 right eyes of rabbits. After 28 days, rabbit right eyes were divided into 3 group: G1 (no transplantation), G2 (dhAM transplantation) and G3 (cell sheet transplantation). The results indicated that only alkali burn treatment (G1) could not destroy all LESCs so remained LESCs regenerated CECs (expressed CK12) in peripheral cornea and inhibited growing into central cornea of conjunctiva and blood vessels. In G2, alkali burn, and surgery process removed all LESCs that were functioned in both barrier and generation CECs, so conjunctiva and blood vessels grew faster, and CECs were not observed. In G3, induced CECs could survive, grow in rabbit cornea and they could support recovery of cornea epithelium, improving cornea opacity. Overall, human WJ-MSCs could be a good candidate for induced CECs that further supported reconstruction of corneal epithelium after transplantation into rabbit LSCD model.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology
Academic Year 2021

Student's Signature _____
Advisor's Signature _____
Co-advisor's Signature _____
Co-advisor's Signature _____