

กุลเรช นาตัม : การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อวาร์ตันเจल्लीของสายสะดือมนุษย์ไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน และการปลูกถ่ายให้หนูตะเภาที่มีภาวะข้อเข่าเสื่อม (INDUCTION OF HUMAN WHARTON'S JELLY OF UMBILICAL CORD DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS TO BE CHONDROCYTES AND TRANSPLANTATION IN GUINEA PIGS MODEL WITH SPONTANEOUS OSTEOARTHRITIS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 87 หน้า.

คำสำคัญ: สายสะดือมนุษย์/เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์/เซลล์กระดูกอ่อน/ภาวะข้อเข่าเสื่อม/  
การปลูกถ่าย

สายสะดือมนุษย์จำนวน 2 ตัวอย่าง จากผู้บริจาค ถูกนำมาแยกเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ได้สำเร็จ ได้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จำนวน 2 สายพันธุ์ ครอบคลุมที่กำหนด เซลล์ทั้งสองสายพันธุ์ถูกนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ ได้แก่ โปรตีนที่ผิวเซลล์ การสร้างโคโลนีกลุ่มเซลล์ ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น (เซลล์กระดูกเซลล์ไขมัน และ เซลล์กระดูกอ่อน) พบว่ามีเซลล์สายพันธุ์เดียวที่มีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่เหมาะสมซึ่งจะถูกใช้ในการทดลองต่อไป ในการวิเคราะห์โปรตีนที่ผิวเซลล์ได้เปลี่ยนวิธีการวิเคราะห์จากการย้อมเซลล์บนจานเลี้ยงเซลล์มาเป็นวิธีโพลีไซโทเมทรี ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีที่ดีกว่าเนื่องจากจะทำให้ได้ข้อมูลสัดส่วนจำนวนเซลล์ที่ติดสีย้อมต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดด้วย การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ให้เปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อนสามารถทำได้สำเร็จ โดยใช้เวลาในการเหนี่ยวนำเป็นเวลา 28 วัน แล้ววิเคราะห์ความเป็นเซลล์กระดูกอ่อนโดยการย้อม immunofluorescence การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี qPCR และตรวจสอบการสร้างโปรตีนด้วยวิธี immunoblot ในขั้นตอนการย้อม immunofluorescence และการตรวจสอบโปรตีนด้วย immunoblot ได้เสนอการตรวจสอบ Type II collagen เพียงอย่างเดียว แต่ได้ย้อม Sox9 Aggrecan และ Type X collagen และตรวจสอบโปรตีน Type X collagen ด้วยเพื่อยืนยันผลเพิ่มเติม นอกเหนือจากนี้ยังได้มีการนำกระดูกอ่อนมนุษย์มาใช้แยกเซลล์กระดูกอ่อนเพื่อเปรียบเทียบผลการแสดงออกของยีนกับเซลล์กระดูกอ่อนที่ได้จากการเหนี่ยวนำและใช้สกัดโปรตีนเพื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ได้จากกระดูกอ่อนของหนูตะเภาหลังการปลูกถ่ายเซลล์อีกด้วย การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ให้เปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อนใช้เวลาเวลา 14 วัน เพื่อให้ได้เซลล์กระดูกอ่อนระยะเริ่มต้นสำหรับฉีดเข้าข้อเข่าหนูตะเภาอายุ 7 เดือน ที่มีอาการข้อเข่าเสื่อมโดยธรรมชาติในระยะเริ่มต้น และเก็บข้อเข่ามาวิเคราะห์ผลหลังการปลูกถ่ายเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบผลกับการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำและการฉีด Hyaluronic acid พบว่าเซลล์ที่ฉีดเข้าไปเกาะที่ผิวกระดูกอ่อนช่วยซ่อมแซมกระดูกอ่อนที่เสียหายให้กลับมาดีขึ้นได้ โดย

ให้ผลดีกว่าการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดที่ไม่ได้เหนี่ยวนำและดีกว่าการฉีด Hyaluronic acid ทำให้เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสมบูรณ์ขึ้นใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของหนูตะเภาอายุ 3 เดือนที่ยังไม่มีภาวะข้อเข่าเสื่อม โดยมีคะแนนความเสียหายของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนโดยใช้เกณฑ์ของ Mankin ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยา



สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ปีการศึกษา 2567

ลายมือชื่อนักศึกษา G. Nadeem.  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา G. Nadeem.

GULREZ NADEEM : INDUCTION OF HUMAN WHARTON'S JELLY OF UMBILICAL CORD DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS TO BE CHONDROCYTES AND TRANSPLANTATION IN GUINEA PIG MODEL WITH SPONTANEOUS OSTEOARTHRITIS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 87 PP.

Keyword: UMBILICAL CORD/MESENCHYMAL STEM CELLS/CHONDROCYTES/  
OSTEOARTHRITIS/TRANSPLANTATION

Mesenchymal stem cells (MSCs) were successfully isolated from the umbilical cords of two donors. Two cell lines of the MSCs were obtained and characterized. The analyzed characteristics included cell surface markers, colony forming unit, population doubling time, surface protein expression, and differentiation potencies into three cell lineages (adipogenic, chondrogenic and osteogenic). The results revealed that only one cell line exhibited appropriate MSCs characteristics and it was recruited to do in the next experiments. In the determination of cell surface markers, flow cytometry was used instead of cell staining on culture dish because it can provide quantitative values of the positive cell proportion. MSCs were induced to be chondrocytes via the induction of chondrogenic differentiation for 28 days. The obtained chondrocytes were characterized by immunofluorescent staining, qPCR, and immunoblotting. In the project proposal, only type II collagen was proposed to be determined in the immunofluorescent staining and immunoblotting. However, Sox9, Aggrecan, and type X collagen were also detected in the immunofluorescent staining, and type X collagen was further determined in the immunoblotting to strongly confirm the results. Moreover, a human cartilage was included in the research for chondrocyte isolation and protein extraction. The human cartilage-derived chondrocytes were used to compare the gene expressions with the MSC-derived chondrocytes, whereas the human cartilage protein lysate was used to compare the proteins composition with guinea pig cartilage protein lysates. Early stage chondrocytes can be obtained by chondrogenic differentiation induction of MSCs for 14 days. For transplantation, MSCs-derived early stage chondrocytes were intra-articular injected into the knee joints of 7-month old guinea pigs which have symptom of early spontaneous

osteoarthritis. After transplantation for 5 weeks, the joints were collected. The results from the injection of MSCs-derived early stage chondrocytes were compared with those from the injection of undifferentiated MSCs and the injection of Hyaluronic acid. The results revealed that the transplanted cells were integrated into the guinea pig cartilage surfaces and restored the degenerated cartilages. The injection of MSCs-derived early stage chondrocytes recovered the degenerated cartilages better than the injection of undifferentiated MSCs and the injection of Hyaluronic acid. The tissues of the recovered cartilages after the injection of MSCs-derived early stage chondrocytes resemble the cartilages of 3-month old guinea pigs, which have no symptom of osteoarthritis, with no significant difference in the Mankin's scores from the histological assessment.



School of Biotechnology  
Academic Year 2024

Student's Signature G. Nadeem  
Advisor's Signature Prof. Dr. ...