

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

“แผ่นเซลล์กระดูกอ่อนสำหรับการรักษาโรคเข่าเสื่อม”

Chondrocyte Cell Sheets for the Treatment of Articular
Cartilage Defects

เสนอ สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข

ดำเนินการโดย

รศ. ดร. ขวัญชนก พสุวัต

ศ. นพ. สารเนตร์ ไวกุล

ดร. นพ. โพธิ์มงคล โชติญาณวงศ์

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ กลุ่มผู้วิจัยได้พัฒนาเทคโนโลยีการสร้างแผ่นเซลล์มาใช้กับเซลล์กระดูกอ่อนเพื่อเป็น วิธีใหม่ในการรักษาโรคข้อเสื่อมและอาการบาดเจ็บที่กระดูกอ่อน ซึ่งทางกลุ่มผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึงผล ของการใช้แอสแตมปีเจลลาติน ในการลอกแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนและคุณสมบัติของแผ่นเซลล์ที่ได้โดยวัดจาก ยืนที่สำคัญของกระดูกอ่อน และ stress fiber กระดูกอ่อนที่ใช้ในการทดลองนี้ได้มาจากผู้ป่วยที่เข้ารับ ผ่าตัดข้อเข่า เซลล์กระดูกอ่อนจะนำมาย่อยแล้วเลี้ยงเพิ่มจำนวน ก่อนที่จะนำมาเลี้ยงบนภาชนะเลี้ยงเซลล์ พิเศษที่ปรับสภาพตามอุณหภูมิ หลังจากนั้นจึงทำการลอกโดยใช้แอสแตมปีเจลลาติน หรือไม่ใช่แอสแตมปี ซึ่งผลที่ได้พบว่า หากใช้แอสแตมปีเจลลาตินแล้ว แผ่นเซลล์ที่ได้จะมีขนาดใหญ่กว่า ไม่หดตัว และพบ stress fiber ปริมาณมาก แต่ว่าปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ 2 ซึ่งเป็นยืนที่สำคัญของเซลล์กระดูกอ่อนนั้นน้อยกว่า แผ่นเซลล์ที่ไม่ใช่แอสแตมปีเจลลาติน เนื่องจากการที่ไม่ใช่แอสแตมปีเจลลาติน แผ่นเซลล์จะมีการหดตัวมากกว่า stress fiber จะมีปริมาณน้อยกว่ามาก ทำให้คอลลาเจนชนิดที่ 2 มีมากกว่า ดังนั้นเราจึงสรุปได้ว่าการ ผลิต stress fiber มีผลอย่างมากต่อการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 2 ดังนั้นเซลล์กระดูกอ่อนในแผ่นเซลล์ที่ ไม่ใช่แอสแตมปีเจลลาตินจะรวมตัวกันแน่นกว่าเกิดเป็นโครงสร้างแบบ 3D ซึ่งเหมาะสมกับการปลูกถ่ายเนื้อ เยื่อมากกว่าแผ่นเซลล์ที่ลอกโดยใช้แอสแตมปีเจลลาติน

นอกจากนั้นทางกลุ่มวิจัยยังสร้างพื้นผิวในการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนแบบใหม่ ที่สามารถจะทำให้เซลล์กระดูกอ่อนไม่เปลี่ยนสภาพ ในการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน เซลล์สามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์ fibroblast ได้เมื่อเลี้ยงไปเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาทางกลุ่มวิจัยจึงได้นำ the fifth generation dendrimer-immobilized surface (G5) มาใช้ในการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน ซึ่งเซลล์กระดูกอ่อนที่ เลี้ยงบนพื้นผิวนี้นี้จะมีลักษณะเป็นก้อน ซึ่งเป็นสภาวะแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ กระดูกอ่อน จากการศึกษาพบว่าเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงบนพื้นผิวใหม่นี้จะมีคุณสมบัติที่ดีกว่า คือมีคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ aggrecan เยอะกว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนภาชนะเลี้ยงเซลล์ทั่วไป นอกจากนั้น ยืนที่บ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็น fibroblast ซึ่งคือคอลลาเจนชนิดที่ 1 ก็น้อยลงด้วย ดังนั้นพื้นผิวใหม่นี้จึงเหมาะสมกับการนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์กระดูกอ่อน ก่อนที่จะนำมาสร้างเป็น แผ่นเซลล์กระดูกอ่อน สำหรับงานวิจัยทางด้านนี้ในอนาคต

Abstract

Cell sheet technology is applied to human articular chondrocytes to construct a tissue-like structure as an alternative treatment for cartilage defect. The effect of a gelatin manipulator, as a cell sheet transfer system, on the quality of the chondrocyte sheets was investigated. The changes of important chondrogenic markers and stress fibers, resulting from the cell sheet manipulation, were also studied. The chondrocyte cell sheets were constructed with patient-derived chondrocytes using a temperature-responsive polymer, and a gelatin manipulator as a transfer carrier. The properties of the cell sheets including sizes, expression levels of collagen type II and I, and the localization of the stress fibers were assessed and compared with those of the cell sheets harvested without the gelatin manipulator. Using the gelatin manipulator, the original size of the chondrocyte cell sheets was retained with abundant stress fibers and a decrease in the expression of collagen type II. Without the gelatin manipulator, although the cell shrinkage occurred, the cell sheet with suppressed stress fiber formation showed significantly high levels of collagen type II. These results supported that the changes of the stress fiber formation in the chondrocyte cell sheets affected the production of the chondrogenic markers. The densely packed tissue-like structure possessed a good chondrogenic activity, indicating its potential use in autologous chondrocyte implantation to treat cartilage defects.

One of the challenges in cartilage tissue engineering is the maintenance of the chondrogenic activities during long-term culture. To overcome this problem, we proposed a new culture surface using the fifth generation dendrimer-immobilized surface (G5). Chondrocytes cultured on this surface formed various aggregates, providing desirable three-dimensional structure that closely mimicked the native environment of chondrocytes. As a result, higher chondrogenic markers (collagen type II and aggrecan) with lower de-differentiation marker (collagen type I) were observed in the cells on G5 surfaces as compared to those cultured on traditional polystyrene surfaces. This new surface would be beneficial for chondrocyte cell sheet engineering in our future study.

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

ในงานวิจัยนี้ทางกลุ่มผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการสร้างแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนหลายชั้นที่มีคุณภาพดีเพื่อการรักษาโรคเข่าเสื่อมและกระดูกอ่อนบาดเจ็บ โดยที่เซลล์กระดูกอ่อนถูกแยกออกจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน แล้วทำการเพิ่มจำนวน จากนั้นจึงลอกออกมาเป็นแผ่น ทำแต่ละแผ่นเซลล์มาประกบกันให้เป็นแผ่นเซลล์ที่มีความหนามากขึ้น ในปัจจุบันทางกลุ่มผู้วิจัยได้แผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. ความหนา 3 ชั้นหรือ 1 มม. แผ่นเซลล์ที่ได้มีปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ aggrecan ที่สูงบ่งบอกถึงแผ่นเซลล์ที่มีคุณภาพดี

บทที่ 1: บทนำ

1.1. หลักการและเหตุผล

โรคข้อเสื่อมเป็นโรคที่พบบ่อยในผู้สูงอายุทั้งชายและหญิงเป็นโรคที่เกิดจากการสึกหรอของข้อต่างๆที่รับน้ำหนักและภาวะเสื่อมสภาพ โรคนี้เป็นโรคเรื้อรังทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยลดลงและอาจทำให้โรคอื่น ๆ กำเริบเช่นโรคเบาหวานและความดันโลหิตสูงเนื่องจากออกกำลังกายไม่ได้ กลไกการเกิดข้อเสื่อม เริ่มจากกระดูกอ่อน (chondrocytes) ของข้อมีการเสื่อมสภาพทำให้กระดูกอ่อนไม่สามารถเป็นเบาะรอง รับน้ำหนักหรือเกิดจากการเสียดสีทำให้เกิดการสึกหรอของกระดูกอ่อนซึ่งทำให้ชั้นของกระดูกอ่อนบางลง ดังนั้นการทำงานของกระดูกอ่อนจึงเสียไป กระดูกอ่อนนี้ไม่สามารถสร้างขึ้นมาทดแทนใหม่ได้หากเกิดการเสื่อมขึ้นแล้ว ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาที่สามารถทำให้โรคข้อเสื่อมกลับมาเป็นปกติได้ การรักษาส่วนใหญ่ จะเป็นในลักษณะชะลอการรุกรานของโรค, ลดอาการเจ็บปวด และทำให้ผู้ป่วยช่วยเหลือตนเองได้มากขึ้น หากผู้ป่วยมีอาการมากแพทย์จะแนะนำให้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อโดยใช้ข้อเทียม ข้อเสียของข้อเทียมคือ การเสียดสีกระดูกที่ติดของผู้ป่วยไปและข้ออาจมีการหลุดหรือหลวมได้ในอนาคต โดยทั่วไปข้อเทียมจะมี อายุการใช้งานประมาณ 15 – 20 ปี ซึ่งถ้าผู้ป่วยต้องเปลี่ยนข้อเทียมในอายุน้อยอาจทำให้ต้องเปลี่ยนข้อ เทียมเป็นครั้งที่ 2 หรือ 3 ทำให้เกิดความเสี่ยงในการผ่าตัดมากขึ้น นอกจากนั้นข้อเทียมต้องนำเข้าจาก ต่างประเทศ ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการผ่าตัดสูง

เนื่องด้วยปัญหาที่เกิดขึ้นกับข้อเทียม ทางวงการแพทย์เริ่มให้ความสนใจการปลูกถ่ายเซลล์กระดูก อ่อน ในบริเวณที่มีปัญหาเพื่อใช้เป็นการรักษาในเบื้องต้น ก่อนที่จะไปถึงการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข้า ซึ่งเซลล์ กระดูกอ่อนที่ใช้มีทั้งจากเซลล์กระดูกอ่อนของผู้ป่วยเองหรือจากสเต็มเซลล์โดยใช้เทคนิคทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ขั้นตอนการปลูกถ่ายเริ่มจากการนำเซลล์กระดูกอ่อนที่ได้จากคนไข้ไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนให้เพียงพอในการรักษา จากนั้นจึงทำการฉีดเซลล์กระดูกอ่อนไปยังข้อที่ต้องการรักษา ข้อดีของวิธีนี้คือร่างกาย ของผู้ป่วยไม่เกิดปฏิกิริยาปฏิเสธเนื่องจากเป็นเซลล์ของตัวเอง แต่วิธีนี้มีข้อด้อยที่ควรพิจารณา คือ เซลล์ที่ฉีดเข้าไปมักจะกระจายตัวไม่เกาะกับกระดูกอ่อน ทำให้จำนวนเซลล์ที่ใช้ในการรักษานั้นน้อย ลงไม่เพียงพอ เป็นผลทำให้การรักษาไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ดังนั้นการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อน ควรจะปลูกถ่ายในรูปแบบของเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ที่เกาะมากขึ้นและสามารถเจริญเติบโตได้ดี

เพื่อแก้ปัญหาที่กล่าวมาในข้างต้น ทางนักวิจัยได้คิดค้นวิธีการสร้างเนื้อเยื่อสามมิติจากแผ่นเซลล์หลายชั้นเรียกว่า cell sheet engineering โดยทำการเลี้ยงเซลล์บนโพลิเมอร์ที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิ (temperature-responsive polymer) ซึ่งโพลิเมอร์จะมีลักษณะไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ที่อุณหภูมิ 37°C ทำให้เซลล์สามารถเกาะกับโพลิเมอร์และเจริญเติบโตได้ จนกระทั่งเซลล์โตเต็มที่เรียงตัวเป็นชั้นเดียวแล้วจึงทำการลดอุณหภูมิลงให้อยู่ที่ 20°C ที่อุณหภูมิต่ำโพลิเมอร์จะกลายเป็นแบบชอบน้ำ (hydrophilic) สายโพลิเมอร์จะยึดตัวขึ้นผลึกแผ่นเซลล์ให้หลุดออกมาเป็นแผ่นเองโดยไม่ต้องใช้เอนไซม์ จากนั้นจึงนำแผ่นเซลล์หลายๆแผ่นมาประกบกันทำให้เกิดเป็นแผ่นเซลล์ที่มีความหนาสามารถนำไปปลูก ถ่ายได้

ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยจึงเสนองานวิจัยที่เน้นการสร้างแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนหลายชั้นที่มีคุณภาพดี โดยการศึกษาวิธีการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนและการลอกแผ่นเซลล์ที่เหมาะสมเพื่อสร้างแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน ที่มี ความหนามากกว่า 3 ชั้น ในขั้นตอนแรกการสร้างแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนจะทำโดยใช้วัสดุเลี้ยง เซลล์ที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิ คุณภาพของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนจะพิจารณาด้วยวิธีทาง molecular biology เพื่อดู ยีนและโปรตีนที่สำคัญสำหรับเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์ หลังจากได้แผ่นเซลล์กระดูกอ่อน มนุษย์ที่มีคุณภาพ

ดีแล้วจึงนำแผ่นเซลล์นั้นมาพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการปลูกถ่ายเบื้องต้นโดยใช้การทดลองแบบ ex vivo ผลสำเร็จของงานวิจัยนี้จะได้อะไรคือการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน และวิธีการสร้างแผ่น เซลล์กระดูกอ่อนที่มีความเป็นไปได้อีกในการปลูกถ่ายเพื่อใช้ในอีกหนึ่งทางเลือกในการรักษาโรคข้อเสื่อมใน อนาคต นอกจากการรักษาโรคข้อเสื่อมแล้ว วิธีนี้ยังสามารถใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีกระดูกอ่อนบาดเจ็บ (chondral injury) จากอุบัติเหตุเช่นนักกีฬา เป็นต้น เป็นการยกระดับเทคโนโลยีทางการแพทย์เพื่อ สนองนโยบายการจัดตั้งประเทศไทยเป็น Medical Hub ในแถบภูมิภาคและเพิ่มคุณภาพชีวิตของ ประชาชนเพื่อให้เข้าถึงการรักษาได้ง่ายขึ้น และมีค่าใช้จ่ายในการรักษาที่ลดลง นอกจากนั้นงานวิจัยนี้ยัง เป็นการเชื่อมโยงการวิจัยของทีมวิจัยหลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ มจร. ซึ่งทำงานทางด้าน pre-clinical studies กับทีมวิจัยแพทย์ออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้รับผิดชอบงานวิจัยด้านคลินิก ซึ่งทำให้เกิดเป็น เครือข่ายวิจัย ส่งผลให้เกิดงานวิจัยที่สามารถพัฒนา ต่อยอดไปใช้ได้จริง

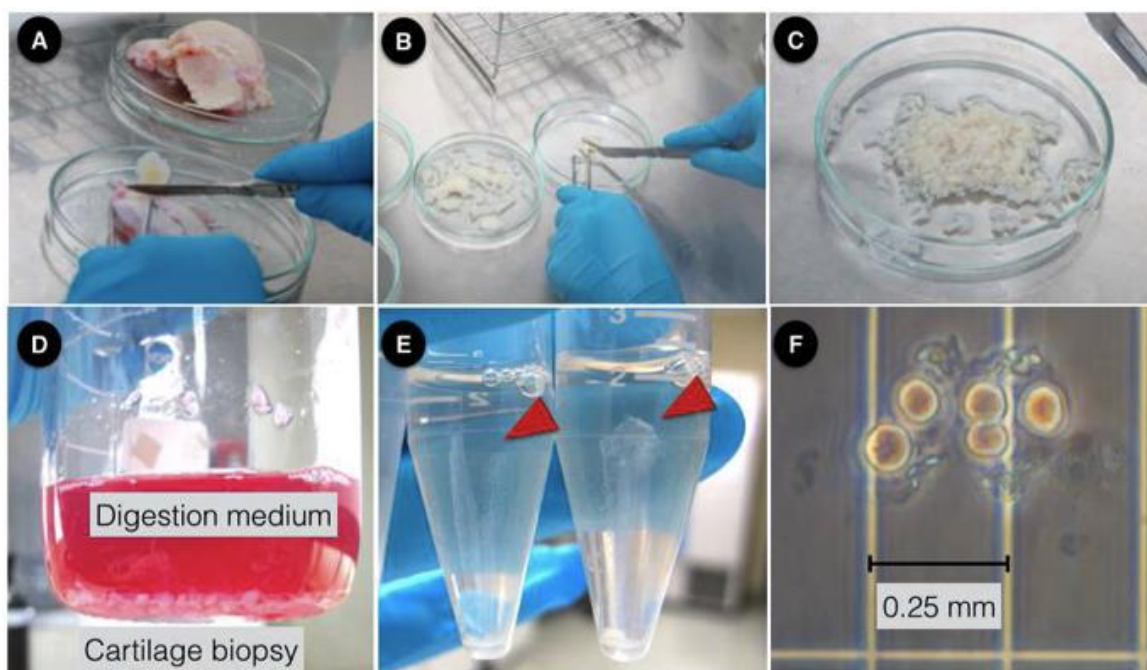
1.2. วัตถุประสงค์โครงการ

- ศึกษาวิธีการแยกและเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนเพื่อให้ได้เซลล์ที่มีปริมาณมากและมีคุณภาพสูง
- ศึกษาวิธีการทำแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนอย่างน้อย 3 ชั้น
- ทดสอบคุณภาพทางชีวภาพของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนและศึกษาวิธีการควบคุมคุณภาพของแผ่น เซลล์กระดูกอ่อนที่สร้างขึ้น
- ศึกษาความเป็นไปได้อีกในการปลูกถ่ายแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน

บทที่ 2: วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1. การแยกเซลล์กระดูกอ่อนของมนุษย์

ขั้นตอนการดำเนินงานเกี่ยวกับกระดูกอ่อนของคนได้รับการอนุญาตจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน (COA no. Si387/2015) งานวิจัยนี้ได้รับกระดูกอ่อนจากผู้ป่วยเปลี่ยนกระดูกผิวข้ออายุ ระหว่าง 60 – 80 ปี จากโรงพยาบาลศิริราช รูปที่ 2.1 แสดงขั้นตอนการแยกเซลล์กระดูกอ่อน โดยใช้เอนไซม์ กระดูกอ่อนจะถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆและย้ายไปสู่ภาชนะปลอดเชื้อ ชิ้นกระดูกอ่อนถูกล้างใน Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ที่ผสม 1% antibiotic-antimycotics เพื่อล้างเลือดและเศษกระดูก ที่ยังตกค้าง หลังจากนั้นชิ้นกระดูกอ่อนจะถูกย่อยใน digestion medium ที่มีส่วนผสมของ Dulbecco's Modified Eagle Medium, collagenase II และ antibiotic-antimycotics ในตู้บ่ม 37 °C ที่เขย่า 100 rpm หลังจากที่ย่อยเป็นเวลา 22 ชั่วโมงแล้ว นำไปตกตะกอนแยกเซลล์กระดูกอ่อน ออกจากสารละลายที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วย HBSS 10% FBS เมื่อนับจำนวนเซลล์ที่ได้แล้วจึงย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM medium 10% FBS 1% antibiotic-antimycotics จนกระทั่ง เซลล์เกาะแผ่และโต ที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้ CO₂ โดยมีการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 – 4 วัน

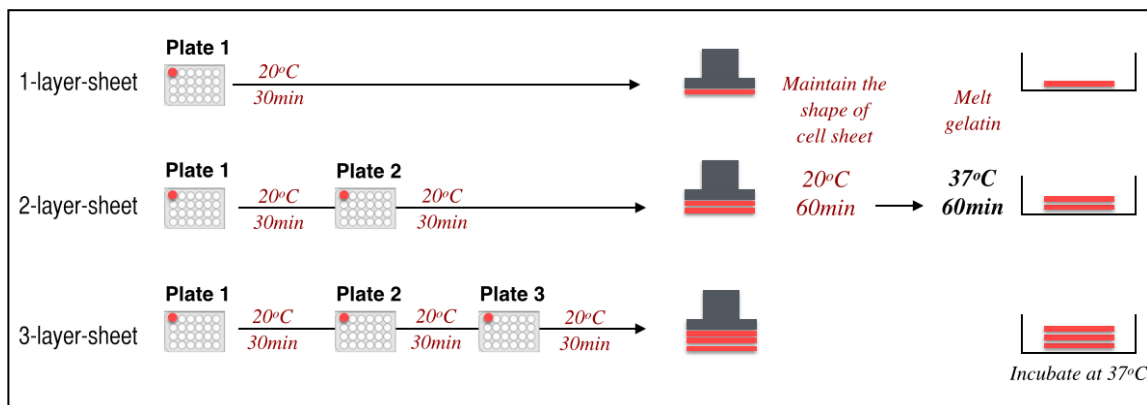


รูปที่ 2.1: ขั้นตอนการแยกเซลล์กระดูกอ่อน

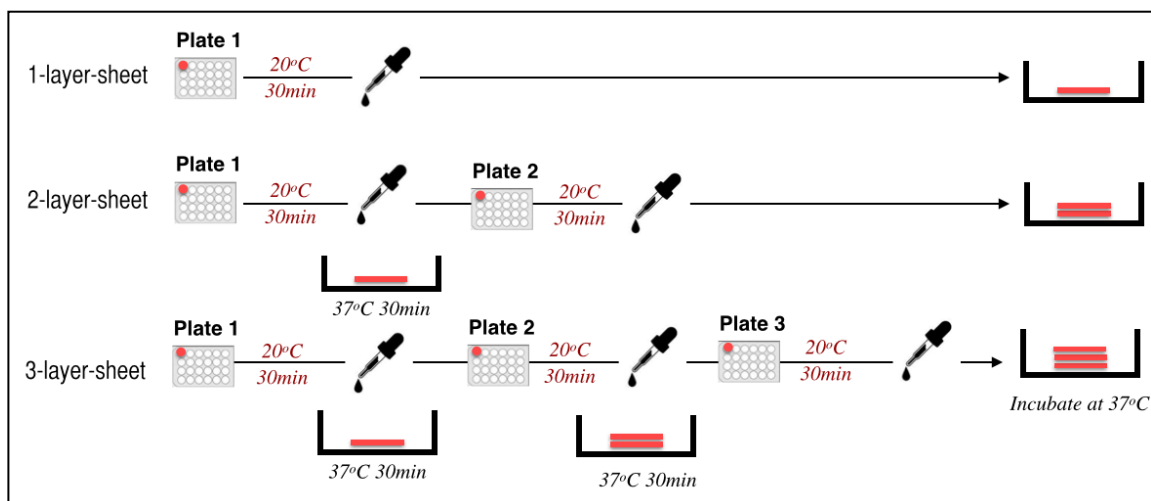
2.2. การเตรียมแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน

เซลล์กระดูกอ่อนที่ถูกนำมาสร้างแผ่นเซลล์อยู่ระหว่าง Passages 1 – 5 การเตรียมแผ่นเซลล์ กระดูกอ่อนใช้เซลล์กระดูกอ่อนจำนวน 6×10^5 cells/cm² ต่อแผ่นเซลล์ 1 ชิ้น ขั้นตอนการสร้าง เริ่มจากเลี้ยงเซลล์บนภาชนะชนิด 24-well UpCell[®] plates ที่ถูกเคลือบด้วยเซรัม เป็นเวลา 1 วัน ที่อุณหภูมิ 37°C ก่อนเลี้ยงเซลล์ได้มีการใส่ teflon rings เพื่อป้องกันการเกาะของเซลล์ที่ขอบภาชนะ หลังจากเซลล์เกาะพื้นผิวแล้วล้าง

ผิวเซลล์ แล้วนำเซลล์ที่ล่อยออกจากภาชนะด้วยสารละลาย DMEM เหลือไว้เพียงบางส่วนเพื่อป้องกันเซลล์แห้ง ขั้นตอนการสร้างแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนจะมีการเปรียบเทียบ วิธีการสร้างโดยใช้เทคนิคต่างกันคือ gelatin stamp (รูปที่ 2.2), pipetting (รูปที่ 2.3) และ PVDF membrane



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการเตรียมแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนโดยเทคนิค stamp method



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการเตรียมแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนโดยเทคนิค pipetting method

สำหรับวิธี pipetting เซลล์กระดูกอ่อนบนผิวภาชนะ UpCell ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงลอกแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนออกจากพื้นผิวภาชนะโดยการพ่นสารละลาย DMEM บนผิวเซลล์เบาๆ ซึ่งในขั้นตอนนี้แผ่นเซลล์จะยังไม่หลุดออกมา ดังนั้นในการลอกแผ่นเซลล์จะ 3 วิธีด้วยกัน วิธีที่ 1 คือวิธีการใช้ pipette โดยจะทำการพ่นสารละลาย DMEM ใต้แผ่นเซลล์เพื่อให้แผ่นเซลล์หลุด ออกมาทั้งชิ้น จากนั้นจึงวางแผ่นเซลล์ลงบนพื้นผิวภาชนะใหม่ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที วิธีที่ 2 คือการใช้ gelatin stamp ในการลอกเซลล์ โดยขั้นตอนการเตรียม gelatin stamp สำหรับงาน วิจัยนี้ปรับเปลี่ยนมาจากวิธีของ Kino-oka et al. [11] สารละลาย gelatin ถูกทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีการ กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.22 μ m. แล้วเซ็ทให้เป็น stamp ในแม่แบบที่อุณหภูมิ 4°C เป็น เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำ gelatin stamp ไปวางลงบนพื้นผิวเซลล์ที่ถูกเลี้ยงบนภาชนะ UpCell แล้วจึงนำไปบ่มที่ 20°C เป็นเวลา 30 นาที แผ่น

เซลล์จะถูกลอกออกเป็นแผ่นติดอยู่บน gelatin stamp แล้ววางแผ่นเซลล์ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่ จากนั้นจึงบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้แผ่นเซลล์ติดกับภาชนะใหม่และละลาย gelatin วิธีที่ 3 คือการใช้ PVDF หรือ poly(vinylidene difluoride) นำ membrane (PVDF) วางลงบนพื้นผิวเซลล์เบาๆ เซลล์แผ่นก็จะติดอยู่ กับ membrane แล้วจึงนำ membrane ไปวางลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่ จากนั้นจึงบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้แผ่นเซลล์ติดกับภาชนะใหม่ แล้วจึงทำการลอกแผ่นเซลล์ออกจาก PVDF membrane ด้วย tweezers สำหรับการสร้างแผ่นเซลล์หลายๆ ชั้นนั้นจะใช้วิธีเดียวกันกับการสร้างแผ่น เซลล์ชั้นเดียว ต่างกันที่จะนำแผ่นเซลล์ที่ลอกออกมาวางทับกับแผ่นเซลล์ที่ 1 จากนั้นจึงทำการบ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้แผ่นเซลล์เกาะกันเอง

2.3. ความมีชีวิตของเซลล์

แผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่ผ่านการถ่ายเลี้ยงบนภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่ถูกย้อมสีวัดความมีชีวิตรอด ของเซลล์ด้วย LIVE/DEAD® Viability / Cytotoxicity Kit เพื่อวิเคราะห์ศักยภาพการเจริญเติบโตของ เซลล์กระดูกอ่อนในโครงสร้างของเซลล์แบบแผ่นที่ถูกสร้างขึ้นโดยใช้วิธีที่ต่างกันโดยใช้กล้อง microscope (Olympus BX 60)

2.4. การแสดงออกของยีน

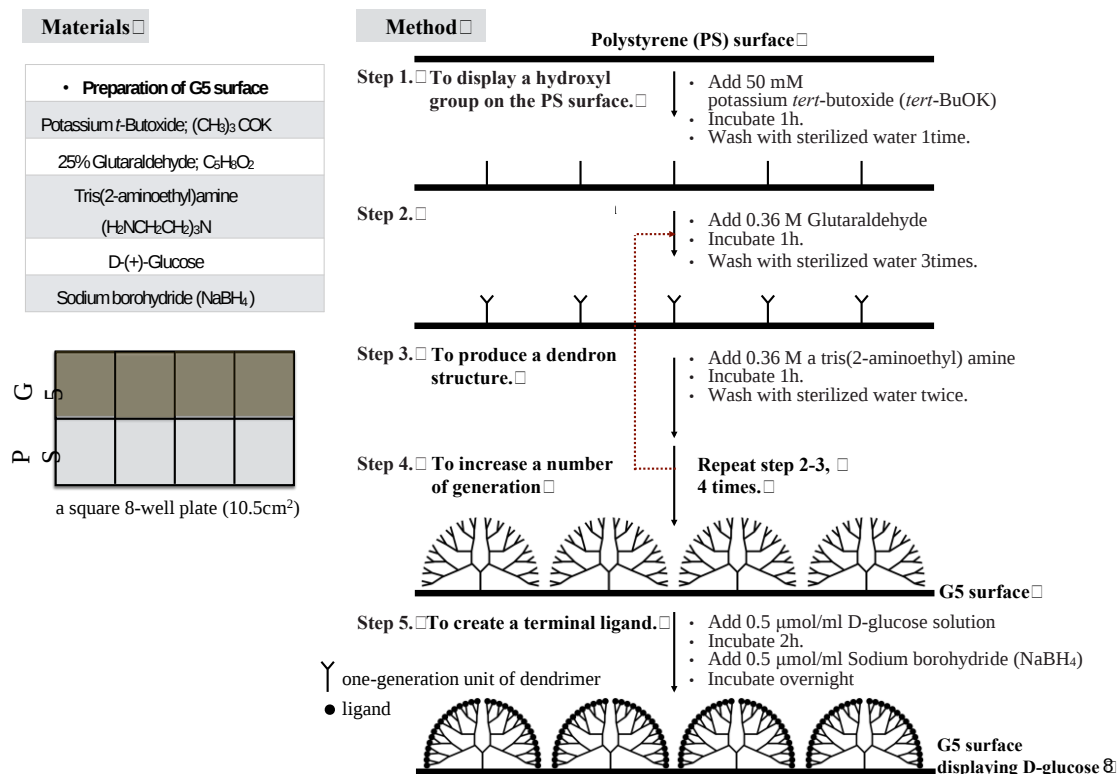
การแสดงออกของยีนในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนจะวิเคราะห์ (Gene Expression) ด้วยวิธี Real-Time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR) โดย total RNA ถูกแยกออกจากเซลล์โดยใช้ ชุดสกัด และถูกเปลี่ยนเป็น single stand cDNA โดยใช้ iScript™ Select cDNA Synthesis Kit ที่ประกอบด้วย total RNA, 5X iScript select reaction mix, oligo(dT)20 primer, iScript reverse transcriptase และ nuclease free water โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 60 นาที และ 85°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายในปฏิกิริยาในชุดทดสอบ SYBR® Green Real-time PCR Master Mix โดยใช้เครื่อง Stratagene Mx3005P ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาทีและ 60 °C เป็นเวลา 15 วินาทีจำนวน 45 รอบ ชุด Primers คือ glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH; NM_002046), sense: 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3', antisense: 5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GT-3'[14]; type II collagen (COL2A1; NM_033150), sense: 5'-AAG ATG GTC CCA AAG GTG CTC G-3', antisense: 5'-AGC TTC TCC TCT GTC TCC TTG C-3'[15]; type I collagen (COL1A1; NM_000088), sense: 5'- AGG GCT CCA ACG AGA TCG AGA-3', antisense: 5'-TAC AGG AAG CAG ACA GGG CCA-3'[16]. ผลการเพิ่มจำนวนของยีนเป้าหมายสามารถคำนวณได้ในรูปแบบของ relative mRNA expression โดย $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [17] และ normalized ด้วยวิธี trypsinization ปฏิกิริยาทั้งหมดจะถูกทำซ้ำสองครั้งโดยใช้ total RNA ที่แยกมาจากกระดูกอ่อนของผู้ป่วยต่างเคส

2.5. การแสดงออกของโปรตีน

โปรตีนภายในโครงสร้างของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนจะวิเคราะห์ด้วยวิธี chemistry-histoImmuno ซึ่ง Stainingเตรียมใน Tissue-Tek OCT compound แล้วตัดเป็น เนื้อเยื่อบางโดยใช้เครื่อง cryostat (Leica CM3050S) หลังจากนั้นจึงตรึงรูปร่างของเซลล์ไว้ใน 4% paraformaldehyde เมื่อผ่านกระบวนการเตรียม สไลด์แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin และ Eosin แล้วจึง decolorized ด้วย 95% ethanol ล้างพื้นผิวสไลด์ ด้วย xylene สองครั้งแล้ว mounted ด้วย mounting medium สำหรับขั้นตอนการทำ immunohistochemistry สไลด์จะถูกบ่มกับสารละลาย mouse monoclonal aggrecan antibody หรือ mouse monoclonal collagen type I antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงล้างออกด้วย tris buffer saline (TBS) และบ่มด้วย horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงส่องใต้กล้อง phase contrast microscope (Olympus BX 60).

.2.6การสร้างพื้นผิวเลี้ยงเซลล์แบบ dendrimer-immobilized surface

วิธีการสร้างพื้นผิวที่มี dendrimerเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากกลุ่มวิจัยของ Professor Masahiro oka-Kinoจาก Osaka Universityเพื่อสร้างพื้นผิวที่นำไปใช้เลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนที่มีสภาพดีได้ วิธีการเริ่มจากนำภาชนะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (PS surface) ที่มีลักษณะเป็นsquare 8-well plates, T75 flasks และ T225 flasks ถูกนำมาเปลี่ยนคุณสมบัติของพื้นผิวให้เป็น fifth generation of dendrimer (G5 surface) ซึ่งมีความไม่ชอบน้ำมากกว่า PS surface [18] โดยขั้นตอนการสังเคราะห์ G5 surface ดำเนินการภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เริ่มจากนำภาชนะแบบ PS surface บ่มกับสารละลาย potassium tert-butoxide 1 ชมเพื่อ . สร้าง hydroxyl groups หลังจากล้างด้วยน้ำเปล่าปลอดเชื้อ พื้นผิวภาชนะ ดังกล่าวถูกบ่มต่อด้วยสารละลาย glutaraldehyde 1 ชมและล้างออกด้วยน้ำเปล่าปลอดเชื้อ .เอ ปฏิกริยาการสร้าง dendrimer เกิดขึ้นเมื่อนำ พื้นผิว ภาชนะบ่มด้วยสารละลาย tris (2-aminoethyl) amine 1 ชมการทำซ้ำในขั้นตอนการบ่มพื้นผิวด้วย . สาร ละลายglutaraldehydeและสารละลาย tris (2-aminoethyl) amine เป็นจำนวน 5 ครั้ง จะได้พื้นผิว ภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบ G5 surface พื้นผิวนี้นี้ถูกติด ligands ด้วยการบ่มด้วยสารละลาย D-glucose 2 ชม . และแช่ด้วยสารละลาย sodium borohydride 24 ชม. โดยไม่ต้องเอาสารละลายเดิมออก หลังจากนั้นจึงล้าง พื้นผิวด้วยน้ำเปล่าปลอดเชื้อก่อนนำภาชนะเลี้ยง เซลล์ไปใช้เลี้ยงเซลล์ รูปที่ 2.4

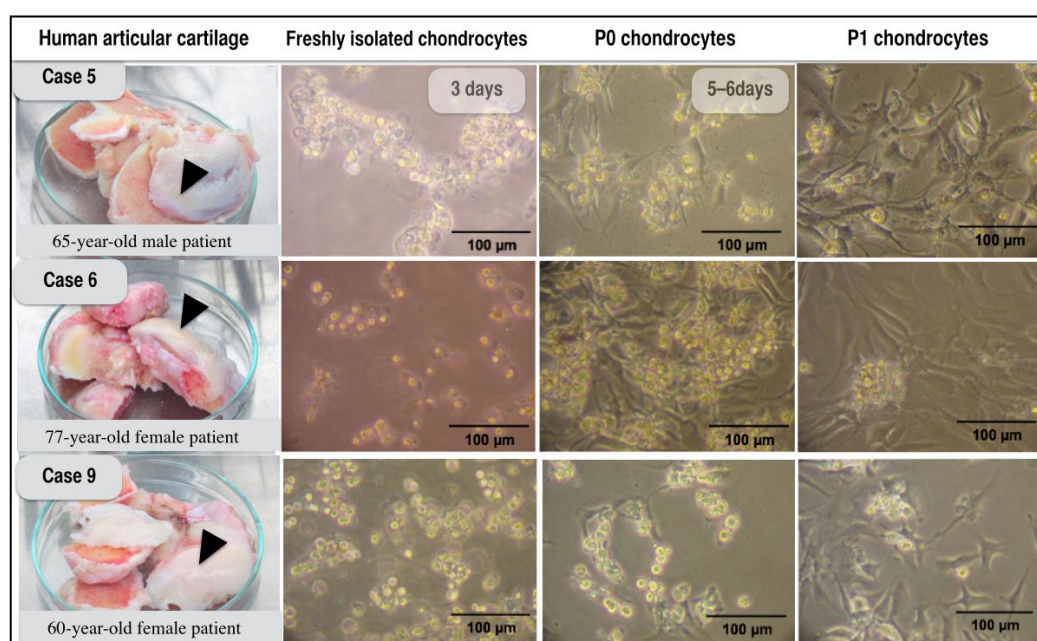


รูปที่ 2.4: ขั้นตอนการสร้างพื้นผิวแบบ Dendrimer-Immobilized Surface G5

บทที่ 3: ผลการทดลองและการวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 เซลล์กระดูกอ่อน

รูปที่ 3.1 แสดงรูปร่างเซลล์กระดูกอ่อนที่ถูกแยกโดยใช้วิธี enzymatic digestion การทดลองนี้ประสบความสำเร็จในการแยกเซลล์กระดูกอ่อนออกจากกระดูกอ่อนผิวข้อ โดยได้ปริมาณเซลล์ 1.36×10^6 เซลล์ต่อกระดูกอ่อน 1 กรัม รูปร่างเซลล์ที่ถูกแยกออกมาใหม่จะมีลักษณะกลมและเกาะกันเป็นกลุ่ม เซลล์เจริญเติบโตเกาะบนพื้นผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ หลังจากเลี้ยงมาได้เป็นเวลา 5 – 6 วัน รูปร่างของเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงจากลักษณะกลมเป็นแบบรูปกระสวย (fibroblast-like structure) เมื่อถ่ายเลี้ยงเป็น Passage 1 เซลล์เพิ่มจำนวน และรูปร่างเซลล์ส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็น fibroblast

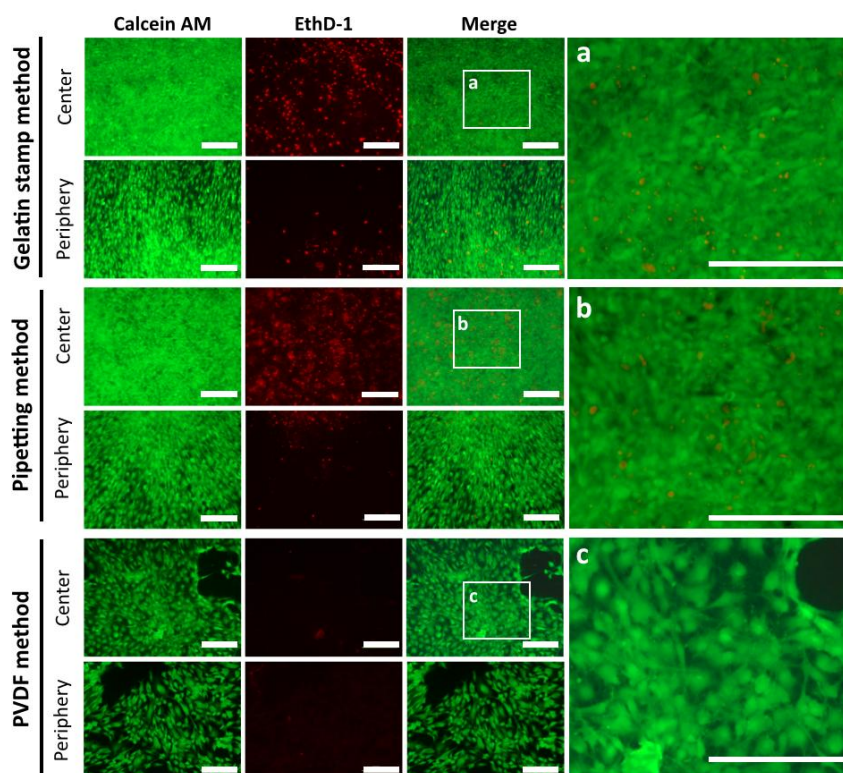


รูปที่ 3.1 กระดูกอ่อนผิวข้อจากผู้ป่วย และรูปร่างของเซลล์กระดูกอ่อน Scale bar = 100 μ m

3.2 เซลล์กระดูกอ่อนแบบแผ่นและควมมีชีวิตรอดของเซลล์

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้วิธีการลอกเซลล์ 3 วิธีคือเทคนิค gelatin stamp, pipette และ PVDF supporting membrane ซึ่งการใช้วิธี gelatin stamp และ pipette มีประสิทธิภาพ ในการสร้างแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน โดยเป็นที่น่าสนใจว่าการใช้วิธี pipette ในการลอกเซลล์จะทำให้เซลล์หลุดและติดกันแน่นภายในโครงสร้างเซลล์แบบแผ่น ส่วนการลอกเซลล์โดยใช้ gelatin stamp จะสามารถรักษารูปร่างของเซลล์แผ่นได้ แม้ว่าเซลล์มีการหลุดตัวบ้างเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ PVDF พบว่าเซลล์จะหลุดออกจากพื้นผิวที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิ แต่เซลล์แผ่นส่วนใหญ่ยังคงติดอยู่กับ PVDF membrane มีเพียงบางส่วนเท่านั้นที่สามารถเกาะติดกับพื้นผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่ รูปที่ 3.2 แสดงคุณภาพของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 1 ชั้น ที่ถูกตรวจสอบโดยใช้ live/dead staining เพื่อดูว่าแผ่น เซลล์ที่ลอกออกมานั้นประกอบด้วยเซลล์ที่มีชีวิต การทดลองครั้งนี้พบว่าแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่ลอก โดยใช้ gelatin stamp และ pipetting ส่วนใหญ่มีชีวิตรอด

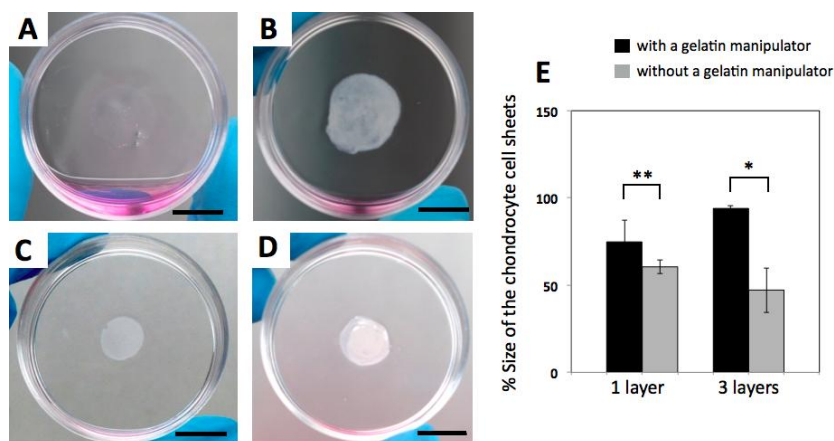
โดยแสดงจากรูปร่างกลมของเซลล์ที่ติดสีเขียว แม้จะมีเซลล์ตายบางส่วนบริเวณตรงกลางของเซลล์แผ่นที่ติดสีแดง เซลล์ส่วนใหญ่บริเวณขอบเซลล์แผ่น จะยังคงมีชีวิตรอดซึ่งติดสีเขียวและแสดงรูปร่างเป็นกระสวย สำหรับการสร้างแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนโดยใช้ PVDF membrane พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่ ยังมีชีวิตรอดและเกาะแผ่กว้างเต็มพื้นที่ แต่แผ่นเซลล์ที่ได้จะขาด เนื่องจากบางส่วนของแผ่นเซลล์ยังติดอยู่บน PVDF membrane ดังนั้นเราจึงเลือกที่จะไม่ใช้วิธีนี้ต่อไปในการ ศึกษาขั้นต่อไป



รูปที่ 3.2 เซลล์กระดูกอ่อนแบบแผ่นที่ถูกย้อมด้วย live/dead staining

3.3 แผ่นเซลล์กระดูกอ่อนแบบหลายชั้น

การศึกษารังนี้ แผ่นเซลล์กระดูกอ่อนถูกสร้างขึ้นด้วยวิธีการใช้และไม่ใช้ gelatin manipulator หรือ gelatin stamp ส่วนวิธี pipetting จะใช้เรียกว่าเป็นวิธีที่ไม่ใช้ gelatin stamp แทน รูปที่ 3.3 แสดงรูปร่างของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน ทั้งสองวิธีสามารถสร้างแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนได้ถึง 3 ชั้น ลักษณะ ของแผ่นเซลล์มีสีขาวมันวาวคล้ายกระดูกอ่อน เซลล์สามารถหลุดออกมาเป็นแผ่นเนื่องจากพื้นผิวภาชนะที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิถูกเปลี่ยนให้มีความชอบน้ำ โมเลกุลของน้ำจะแทรกเข้าไปในโครงสร้างของพอลิเมอร์ซึ่ง จะทำให้หลักเซลล์ออกมาพร้อมกับโปรตีนของเซลล์ (extracellular matrix) ที่อยู่รอบตัวเซลล์ [3] การหดตัว ของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนมองเห็นได้ชัด เมื่อลอกโดยไม่ใช้ ซึ่งแผ่น gelatin manipulator เซลล์มีการหดตัว ประมาณ 50% เมื่อเทียบกับขนาดเริ่มต้น ในขณะทำการสร้างแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน โดยใช้ ยังคง gelatin manipulator รูปร่างได้ดี มีความใกล้เคียงกับขนาดเริ่มต้น



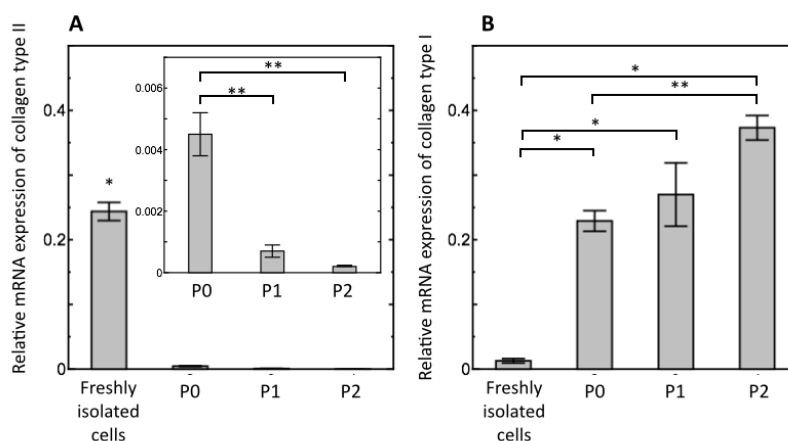
รูปที่ 3.3 แผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 1 ชั้นและ 3 ชั้น ที่สร้างโดยใช้ (D-C)gelatin manipulator และไม่ใช่ (B-A) ขนาดของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน (E)Scale bars=10 μ m

การหดตัวของเซลล์แบบแผ่นที่ถูกสร้างโดยไม่ใช่ มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยน gelatin manipulator แปลงโครงสร้างของ cytoskeleton ภายในตัวเซลล์ใหม่ [10] การสร้างแผ่นเซลล์ด้วยวิธีการใช้ gelatin จะทำให้เซลล์รักษารูปแบบการเรียงตัวของ manipulator cytoskeleton ซึ่งสามารถแก้ปัญหาการหดตัวของแผ่นเซลล์ได้[19]

3.4 การแสดงออกของยีนและโปรตีน

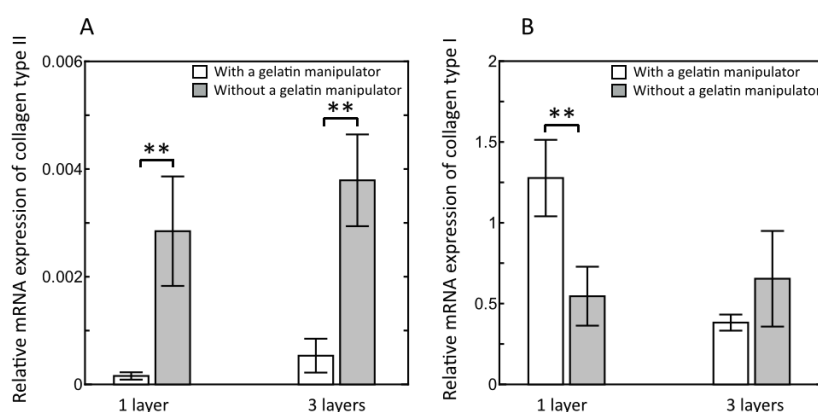
เซลล์กระดูกอ่อนที่ถูกแยกออกมาจากกระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ถูกนำมาทดสอบการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 ซึ่งเป็นยีนที่จำเพาะเจาะจงกับกระดูกอ่อน (cartilage-specific marker) และคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่บ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็น 1fibroblast [20] เพื่อประเมินคุณภาพของเซลล์ก่อนนำมาสร้างเป็นแผ่นเซลล์ จากการทดลองพบว่าเซลล์ที่ได้รับมาจากผู้ป่วยมีการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดดังแสดงใน รูป 3.4 เมื่อจำนวนครั้งในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ (passage number) เพิ่มขึ้น ปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ 2 มีแนวโน้มลดลง ในขณะที่ยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น

โดยทั่วไปคุณสมบัติของเซลล์กระดูกอ่อนของคนปกติ มีความแตกต่างจากเซลล์กระดูกอ่อนในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม [21] มีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าการผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 1 พบมากในเซลล์กระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งการแสดงออกดังกล่าวบ่งบอกถึงระดับความสามารถของเซลล์ในการสร้างโปรตีนเพื่อการซ่อมแซมตัวเองได้น้อย [22] ดังนั้นการแสดงออกของ collagen type I ในเซลล์กระดูกอ่อน การศึกษาครั้งนี้อาจเนื่องมาจาก 2สาเหตุคือการนำเซลล์มาจากกระดูกอ่อนผิวข้อของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และการเพิ่มปริมาณของเซลล์แบบ two-dimensional culture อย่างไรก็ตามเซลล์กระดูกอ่อนนี้ยังคงเป็นโมเดลที่ดี สามารถใช้ในการทดลองเพื่อการศึกษาผลของการใช้ ต่อคุณภาพของแผ่น gelatin manipulator เซลล์กระดูกอ่อนได้



รูปที่ 3.4 การแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 (A)และชนิดที่ 1 (B) ในเซลล์กระดูกอ่อน

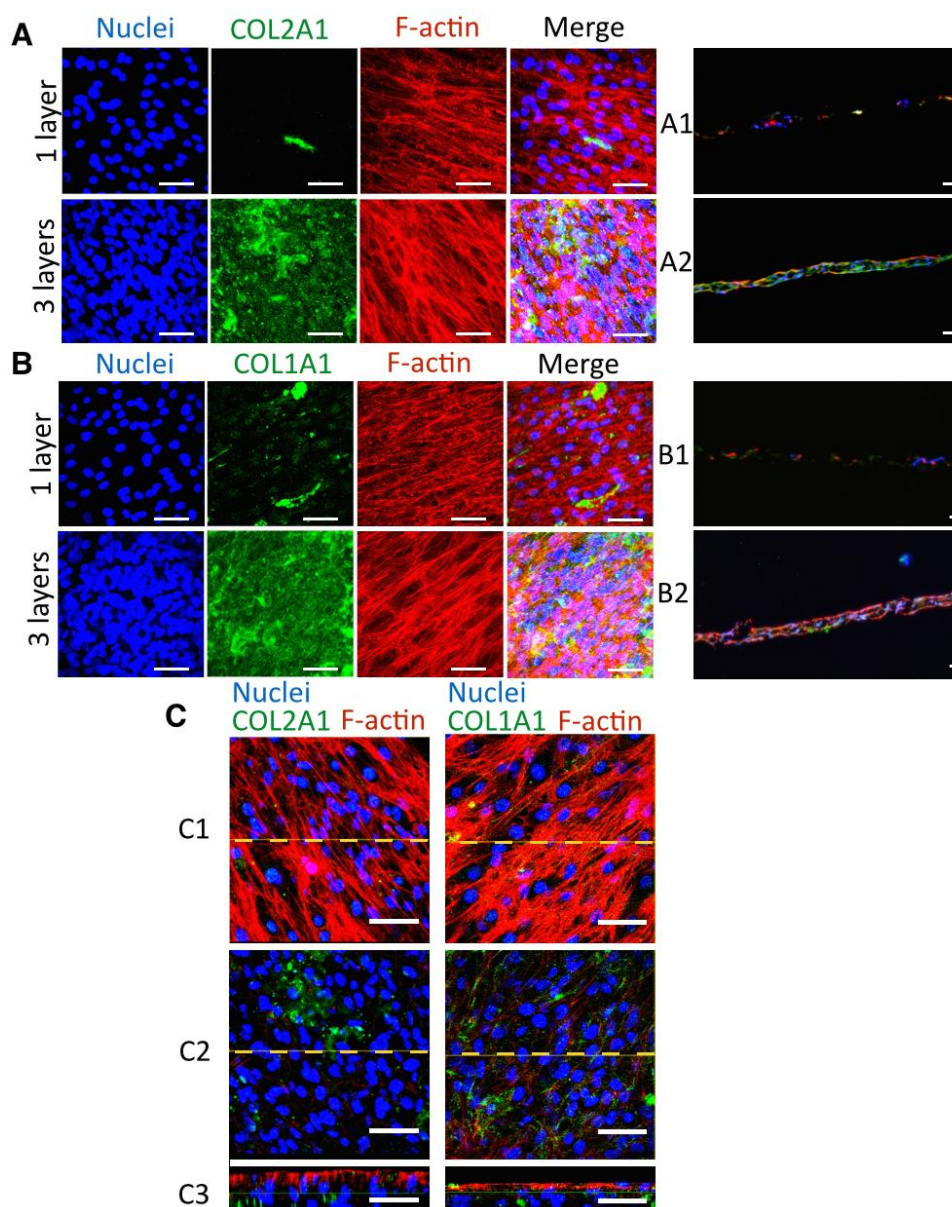
เซลล์กระดูกอ่อนที่ผ่านการถ่ายเลี้ยงบนภาชนะชนิดพอลิสไตรีนถูกนำไปสร้างเป็นแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน จากนั้นแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพด้วยกระบวนการ real-time PCR ในวันที่ 7 ผลการทดลองพบว่าเมื่อแผ่นเซลล์ถูกสร้างโดยใช้ gelatin manipulator ปริมาณ relative mRNA ของ คอลลาเจนชนิดที่ 2 มีมากกว่าเมื่อเทียบกับแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 1 ชั้น ดังแสดงในรูปที่ 3.5A นอกจากนี้ ปริมาณ relative mRNA ของคอลลาเจนชนิดที่ 2 ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนทั้ง 1 และ 3 ชั้น ที่ถูกสร้างโดยเทคนิคที่ไม่ใช้ gelatin manipulator มีมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับแผ่นเซลล์ที่ถูกสร้างโดยการใช้ gelatin ส่วนการแสดงออกของ manipulator คอลลาเจนชนิดที่ 1 ซึ่งเป็นยีนที่บ่งบอกถึงการ 1dedifferentiate ของเซลล์กระดูกอ่อนไปเป็น fibroblast-like cell พบว่าปริมาณ relative mRNA คอลลาเจนชนิดที่ 1 เพิ่มขึ้น 1 ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 1 ชั้น เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเซลล์ 3 ชั้นที่ถูกสร้าง ด้วยเทคนิคการใช้ gelatin เช่นเดียวกัน ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าโครงสร้าง manipulator ของแผ่นเซลล์ 3 ชั้นสามารถลดการผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 1 ถึงแม้จะไม่สามารถเพิ่มปริมาณ 1คอลลาเจนชนิดที่ 2 ได้ (รูปที่ 3.5B)



รูปที่ 3.5 การแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 (A)และชนิดที่ 1 (B) ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่ถูก สร้าง โดยการใช้และไม่ใช้ gelatin manipulator

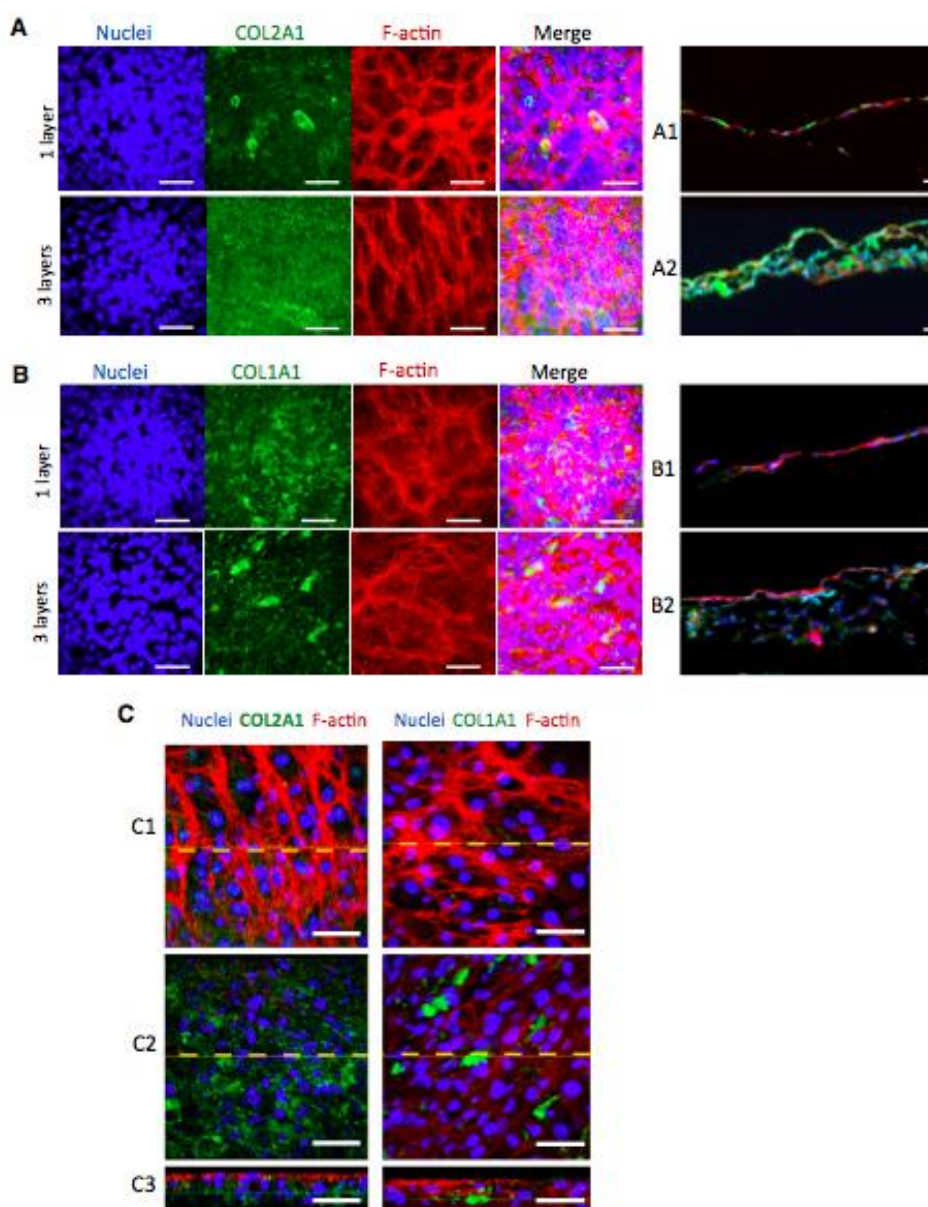
การศึกษาครั้งนี้ได้มีการตรวจสอบการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 ในเซลล์กระดูกอ่อน ระหว่างการเพิ่มจำนวน ซึ่งพบว่าปริมาณของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 ลดลง โดยอาจจะมีสาเหตุมาจากการถ่าย เลี้ยงหลายครั้ง แต่เมื่อนำเซลล์เหล่านั้นมาเป็นต้นแบบในการสร้างเซลล์แบบแผ่น การคงอยู่ของยีนคอลลาเจน ชนิดที่ 2 สามารถบ่งบอกได้ว่าเทคนิคการสร้างเซลล์กระดูกอ่อนแบบแผ่นในการศึกษาครั้งนี้ มีความเป็นไปได้ 2 ที่จะสร้างแผ่นเซลล์เพื่อการรักษาแผลกระดูกอ่อนผิวข้อ อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 ซึ่งหมายถึงการ 1de-differentiationของเซลล์ มีการตรวจพบในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนเช่นกัน การเกิด de-differentiation ของเซลล์กระดูกอ่อนสามารถพบได้ทั่วไปในเซลล์กระดูกอ่อนที่ผ่านกระบวนการแยกเซลล์ มาจากกระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม [23] การเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงของยีนและรูปร่างของ เซลล์เกิดขึ้นเมื่อเซลล์มีการเกาะและแบ่งตัวเพื่อการเจริญเติบโตซึ่งทำให้การผลิตโปรตีนนอกเซลล์ลดลงไป เพราะเซลล์สูญเสียคุณสมบัติความเป็นเซลล์กระดูกอ่อนดั้งเดิมที่มีรูปร่างกลม [24]

จากผลการตรวจสอบปริมาณยีน ทำให้ทราบว่าการสร้างแผ่นเซลล์โดยใช้เทคนิคที่ต่างกันส่งผลต่อ ลักษณะทางกายภาพและคุณภาพของแผ่นเซลล์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลง รูปร่างในส่วนของการหดของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน การพอร์มรูปร่างของ stress fiber และการแสดงออก ของคอลลาเจนทั้งสองชนิด โดยตำแหน่งของ และคอลลาเจน stress fiberถูกตรวจสอบในแผ่นเซลล์ที่ผ่าน การเลี้ยงบนพื้นผิว polystyrene มาแล้ว 7 วัน ด้วยกระบวนการ immunofluorescence staining จากผล การทดลองพบว่าแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 3 ชั้นที่ถูกสร้างโดยใช้เทคนิค gelatin manipulator มีความ หนา ประมาณ 50 μm มีการเรียงตัวของ stress fiber ขนานยาวไปกับรูปร่างของเซลล์กระดูกอ่อนใน โครงสร้าง แผ่นเซลล์ ผลการตรวจสอบการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 พบว่ามีคอลลาเจนชนิดที่ 2 ในแผ่นเซลล์ กระดูกอ่อน 3 ชั้น แต่ในแผ่นเซลล์ 1 ชั้นจะมีคอลลาเจนชนิดที่ 2 น้อยกว่า (รูปที่ 3.6) ส่วนการ แสดงออก ของคอลลาเจนชนิดที่ 1 จะพบได้ทั้งในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 1 และ 3 ชั้น จากผลการตรวจสอบ tomograms ส่วนใหญ่คอลลาเจนชนิดที่ 2 ถูกพบด้านในของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน ที่มีการติดสีย้อมของ F-actin น้อย ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 1 จะกระจายไปทั่วทั้งแผ่นเซลล์ กระดูกอ่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณการติดสีของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ส่วนใหญ่จะอยู่ตำแหน่งเดียวกับ F-actin ผล การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการติดสีที่ชัดเจนของ F-actin มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจนชนิด ที่ 1 การ ติดสีที่เบาบางของ F-actin นำไปสู่การสร้างคอลลาเจนชนิด ที่ 2



รูปที่ 3.6 การแสดงออกของโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 (A), คอลลาเจนชนิดที่ 1 (B) , ภาพตัดขวาง (A1, A2, B1, B2), ภาพด้านบนสุด (C1), ภาพบริเวณกึ่งกลาง (C2), และภาพรวม (C3) ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่ถูกสร้างโดยใช้ gelatin manipulator

ส่วนแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 3 ชั้น ที่ถูกสร้างโดยไม่ใช้ gelatin manipulator มีความหนาประมาณ $100\ \mu\text{m}$ ผลการย้อมสีพบว่า มีการติดสีของคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ ชนิดที่ 1 ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน ทั้งแบบ 1 และ 3 ชั้น โดยพบการติดสีของ F-actin น้อย การแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 ถูกพบ ทั้งโครงสร้างของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนแบบ 3 ชั้น ในขณะที่ คอลลาเจนชนิดที่ 1 ถูกพบเพียงบางส่วน (รูปที่ 3.7)



รูปที่ 3.7 การแสดงออกของโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 (A), คอลลาเจนชนิดที่ 1 (B), ภาพตัดขวาง (A1, A2, B1, B2), ภาพด้านบนสุด (C1), ภาพบริเวณกึ่งกลาง (C2), และภาพรวม (C3) ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน ที่ถูกสร้างโดยไม่ใช่ gelatin manipulator

การสร้าง stress fiber ที่น้อยมีผลในการหดตัวของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่สร้างโดยไม่ใช่ gelatin manipulator นอกจากนั้นแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนดังกล่าวมีการผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 2 มากกว่าแผ่นเซลล์ที่ลอกด้วย gelatin manipulator จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ stress fiber กับการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 2

จากหลักการของเทคโนโลยีการสร้างแผ่นเซลล์ (cell sheet technology) ช่วยให้แผ่นเซลล์ที่ถูกสร้างขึ้นยังคงหน้าที่ของเซลล์ไว้ได้ เพราะมีโปรตีนระหว่างเซลล์ (cell-cell junction) และโปรตีนนอกเซลล์ (extracellular matrix) นอกจากนั้นโปรตีนดังกล่าวยังทำให้คล้ายกับกาว ซึ่งทำการเชื่อมและ ยึด

เกาะของแผ่นเซลล์ในแต่ละชั้นได้ และแผ่นเซลล์กับพื้นผิวภาชนะ [3] การศึกษาครั้งนี้ ประสบความสำเร็จ ในการสร้างแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนหลายชั้น ทั้งด้วยเทคนิคการใช้และไม่ใช้ gelatin manipulator แม้ว่า จะทำการทดลองโดยใช้เซลล์กระดูกอ่อนที่มาจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก็ตาม การยึดเกาะของแผ่นเซลล์ใน แต่ละชั้น และการสร้างแผ่นเซลล์โดยไม่ใช้เอนไซม์ทำให้แผ่นเซลล์รักษา fibronectin และโปรตีนที่ช่วยใน การยึดเกาะต่างๆไว้ได้ [7] ซึ่งเมื่อนำมาใช้จริงแผ่นเซลล์นี้ก็จะสามารถ ยึดเกาะกับเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ เสียหาย (host tissue) ได้ ทำให้การปลูกถ่ายมีความเป็นไปได้มากกว่า การใช้สารละลายของเซลล์กระดูก อ่อน เนื่องจากเซลล์กระดูกอ่อนที่อยู่ในสารละลายจะไม่มีโปรตีน fibronectin หรือ extracellular matrix ที่สำคัญในการยึดเกาะเพราะโปรตีนเหล่านี้ได้ถูกทำลายไปตอน ที่เซลล์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ จึงทำ ให้การฉีดเซลล์ไม่ค่อยประสบความสำเร็จมากนัก

เมื่อพิจารณาถึงรูปร่างของแผ่นเซลล์หลังกระบวนการลอกแผ่นเซลล์ (detachment process) พบว่าขนาดของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 1 ชั้น และ 3 ชั้น ที่สร้างโดยการใช้ gelatin manipulator มีขนาด ใหญ่กว่าแผ่นเซลล์ที่สร้างแบบไม่ใช้ gelatin manipulator อย่างไรก็ตามความหนาของแผ่นเซลล์ ที่ถูก สร้างโดยการใช้ gelatin manipulator มีความบางกว่าเพราะโครงสร้างส่วนใหญ่ของ cytoskeleton ยังคงเดิมคล้ายกับตอนที่แผ่นเซลล์เกาะอยู่บนภาชนะเลี้ยงเซลล์ มีงานวิจัยรายงานว่าการสร้างแผ่นเซลล์ โดยไม่ใช้วัสดุที่ช่วยคงรูปร่างของแผ่นเซลล์ (supporting material) จะทำให้แผ่นเซลล์หดและม้วนตัว ระหว่างกระบวนการลอกเซลล์ เพราะ cytoskeleton มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง [25] โดยทั่วไปการ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ cytoskeleton ในระดับเซลล์มีความเกี่ยวข้องกับการสื่อสารของสัญญาณ ภายนอกและภายในเซลล์ ซึ่งเป็นตัวควบคุมหน้าที่ของเซลล์ เช่น proliferation, migration, และ differentiation [26, 27] หนึ่งในส่วนประกอบสำคัญของ cytoskeleton คือ stress fiber ซึ่งจะทำ หน้าที่เป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างเซลล์และโปรตีนนอกเซลล์ [28] ในงานนี้ การใช้ gelatin manipulator สามารถคงรูปร่างของแผ่นเซลล์ไว้ได้เพราะตัว gelatin manipulatorจำกัดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ของ cytoskeleton โดยตรวจสอบพบจากผลการย้อมสีของ stress fiber ที่มีโครงสร้างยึดตรงภายใน เซลล์ เหมือนกับเซลล์ที่เกาะกับภาชนะเลี้ยงเซลล์ธรรมดา (รูปที่ 3.5) เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเซลล์ที่ถูก สร้างโดยไม่มีการใช้ gelatin manipulator พบว่าเซลล์เกิดการหดตัวร่วมกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ของ stress fiber ทำให้ stress fiber มีลักษณะเป็นสายสั้นๆไม่แผ่กระจายเหมือนแผ่นเซลล์ที่ลอกด้วย gelatin manipulator การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของ stress fiber นอกจากจะมีความเกี่ยวข้องกับการ หดตัวของเซลล์แล้ว ยังมีผลต่อการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ 1 อีกด้วย จากผลการทดสอบ ระดับการแสดงออกของยีนในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนพบว่า (mRNA expression) ระดับของคอลลาเจน ชนิดที่ 2 ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่ถูกสร้างโดยไม่ใช้ gelatin manipulator มีระดับที่สูงกว่าแผ่นเซลล์ กระดูกอ่อนที่ถูกสร้างโดยการใช้ gelatin manipulator แม้ว่าคอลลาเจนชนิดที่ 1 จะถูกพบในทั้งแผ่น เซลล์ทั้งหมด ผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้ว่าการหดตัวของแผ่นเซลล์อันเนื่องมาจากการ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ cytoskeleton มีผลกระทบต่อการผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ ชนิดที่ 1 อย่างไรก็ตามปัจจุบันนี้กลไกการเกิดกระบวนการดังกล่าวยังไม่ชัดเจน ผลจากการศึกษานี้สามารถเสนอ ได้

ว่าบางสัญญาณจากเซลล์ซึ่งเป็นตัวควบคุมการสร้าง stress fiber และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ cytoskeleton อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการผลิตยีนและโปรตีนที่จำเพาะเจาะจงกับเซลล์กระดูกอ่อน

การสร้าง stress fiber ถูกควบคุมโดย RhoA signal ซึ่งเป็นหนึ่งในสมาชิกของ Rho GTPase family การเกิด RhoA signal ที่มากเกินไปจะทำให้เซลล์กระดูกอ่อนมีรูปร่างแบนยาวคล้าย fibroblast มากกว่าลักษณะกลมที่พบในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เซลล์ที่มีรูปร่างแบนยาวนี้จะมี stress fiber อยู่ภายในเป็นจำนวนมาก [29] งานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการสร้างโปรตีนนอกเซลล์เช่นคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ aggrecan จะมีปริมาณลดลงในเซลล์ที่ผลิต stress fiber เยอะ [30] เมื่อมีการยับยั้งสัญญาณ RhoA เซลล์ที่มีลักษณะแบนยาวซึ่งเป็น de-differentiated chondrocytes จะสามารถเปลี่ยนรูปร่างกลับไปเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลมได้ [31] เหมือนกับลักษณะทางกายภาพของเซลล์กระดูกอ่อนที่ฝังตัวอยู่ใน กระดูกอ่อน ดังนั้นโครงสร้างสามมิติจึงเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ช่วยทำให้เซลล์กระดูกอ่อนเปลี่ยนสภาพ กลับมาเป็นกระดูกอ่อนที่มีลักษณะใกล้เคียงเซลล์กระดูกอ่อนในร่างกาย [1] การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างสามมิติของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนสามารถเปลี่ยนแปลงสัญญาณ RhoA ซึ่งนำไปสู่การลด การสร้าง stress fiber และการเพิ่มการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 2

การแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 ถูกควบคุมโดยตรงจาก transcription factor Sox9 [15] ซึ่งมีงานวิจัยที่ผ่านมารายงานว่าเมื่อการสร้าง stress fiber ในเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ลดลง จะทำให้ปริมาณของ transcription factor Sox9 เพิ่มขึ้น [32] ซึ่งแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 3 ชั้นจะมีปริมาณ 9Sox ที่มากกว่าแผ่นเซลล์ 1 ชั้น และมากกว่าระดับของ 9Sox ในเซลล์กระดูกอ่อนที่ถูกเก็บโดยใช้เอนไซม์ [33] นอกจากนี้ยังพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์กระดูกอ่อนซึ่งคือคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ aggrecan มีระดับเพิ่มขึ้นอีกด้วย ในขณะที่ปริมาณการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ลดลง [14] ในการศึกษา ครั้งนี้พบว่าระดับการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 3 ชั้น ที่ถูกสร้างโดยไม่ ใช้ gelatin manipulator มีระดับที่สูงกว่าแผ่นเซลล์ที่ถูกสร้างโดยใช้ gelatin manipulator ดังนั้นความเป็นไปได้ที่สามารถอธิบายการเพิ่มขึ้นของคอลลาเจนชนิดที่ 2 คือการลด stress fiber ในเซลล์ที่มีรูปร่างกลม เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของ Sox9 [34] และในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน ซึ่งแสดงการลดลงของ RhoA อาจเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 ผ่านการกระตุ้น transcription factor Sox9

ผลการทดลองในการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า แผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่ถูกสร้างขึ้น มีศักยภาพในการนำไปใช้ทางคลินิก แม้ว่าเซลล์ดังกล่าวจะเป็นเซลล์กระดูกอ่อนของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งคุณภาพของเซลล์ค่อนข้างต่ำ แต่งานวิจัยนี้ก็แสดงให้เห็นว่าคุณลักษณะที่แสดงออกถึงความเป็นเซลล์กระดูกอ่อนสามารถเพิ่มขึ้นได้ถ้าเซลล์นั้นอยู่ในโครงสร้างสามมิติของแผ่นเซลล์ อย่างไรก็ตามหนึ่งในความท้าทายในงานนี้คือการลด de-differentiation ของเซลล์กระดูกอ่อน ซึ่งพบโดยทั่วไปเมื่อมีการเลี้ยงเซลล์ในระยะเวลายาวนานเพื่อเพิ่มจำนวน ทางออกที่มีความเป็นไปได้คือการเพิ่มจำนวนโดยกระตุ้นให้เซลล์ฟอร์มรูปร่างเป็นก้อน ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงเป็นก้อนจะมีการสร้าง คอลลาเจนชนิดที่ 2 เพิ่มขึ้นได้ [26] นอกเหนือจากการลด de-differentiation ของเซลล์กระดูกอ่อน อีกหนึ่ง

ข้อจำกัดของการศึกษาในครั้งนี้คือขนาดของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่ถูกจำกัดโดยการใช้ภาชนะ เลี้ยงเซลล์ แบบ 24-well temperature-responsive plate ทำให้ได้แผ่นเซลล์ที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก แผ่นเซลล์ที่ได้จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ที่ประมาณ 1.5 cm เพื่อสร้างแผ่นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ภาชนะ ของ temperature-responsive surface จำเป็นต้องมีขนาดใหญ่ขึ้น จึงจะสามารถนำมาใช้สร้างแผ่น เซลล์ขนาดใหญ่เพื่อรองรับการรักษากระดูกอ่อนผิวข้อที่เสียหายเป็นบริเวณกว้าง ในส่วนของความหนา ของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนนั้นขึ้นอยู่กับจำนวนชั้นของแผ่นเซลล์ หากต้องการรักษากระดูกอ่อนที่มีแผลลึก แผ่น เซลล์ที่จะใช้ปลูกถ่ายควรจะต้องประกอบด้วยแผ่นเซลล์มากกว่า 3 ชั้น ซึ่งขั้นตอนการสร้างแผ่นเซลล์ที่ พัฒนาขึ้นมาจากงานวิจัยนี้สามารถทำซ้ำได้เรื่อยๆเพื่อให้ได้แผ่นเซลล์ที่มีขนาดหนาขึ้นได้

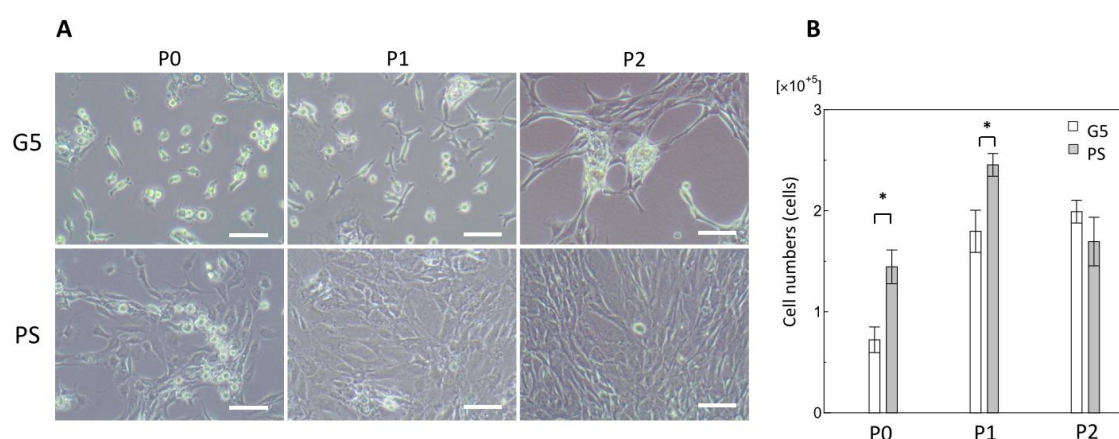
โดยสรุปจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนที่แยกออกมาจากกระดูกอ่อนของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม สามารถนำไป สร้างเป็นแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนด้วยเทคนิคการใช้และไม่ใช้ gelatin manipulator การศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าการสร้าง stress fiber ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนนั้นมีผลต่อการผลิตยีนที่จำเพาะต่อเซลล์ กระดูก อ่อน ถึงแม้ว่าสามารถคงขนาดของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนไว้ได้โดยการใช้ gelatin manipulator แต่วิธีการ ลอกเซลล์แบบนี้จะได้แผ่นเซลล์ที่มี stress fiber มากมายในแผ่นเซลล์ ซึ่งมีผลต่อปริมาณการ สร้าง คอลลาเจนชนิดที่ 2 นอกจากนี้คอลลาเจนชนิดที่ 1 ยังเพิ่มขึ้นอีกด้วย ดังนั้นแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน ที่ได้ อาจจะไม่ใช่แผ่นเซลล์ที่เหมาะสมในการศึกษาต่อในสัตว์ทดลองและการศึกษาทางคลินิก ส่วนแผ่น เซลล์ที่ สร้างโดยไม่ใช้ gelatin manipulator พบว่าแผ่นเซลล์มีการหดตัว แต่แผ่นเซลล์ลักษณะนี้จะมี stress fiber น้อยซึ่งส่งผลให้ปริมาณการผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 2 สูงกว่าแผ่นเซลล์ที่ลอกด้วย gelatin manipulator การทดลองเหล่านี้บ่งบอกได้ว่าแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่ฟอร์มโครงสร้างของเซลล์แน่น พร้อมกับการลดการสร้าง stress fiber อาจมีศักยภาพสูงในการถ่ายเลี้ยงเนื้อเยื่อเซลล์กระดูกอ่อนเพื่อ รักษาอาการเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อ

3.5 พฤติกรรมของเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์บน G5 surface

จากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าเซลล์กระดูกอ่อนเกิดกระบวนการ de-differentiation ใน ระหว่างการเพิ่มจำนวนเซลล์บนพื้นผิวแบบ PS surface หรือพื้นผิวของภาชนะเลี้ยงเซลล์ต่างๆไป ซึ่งทำให้ คุณสมบัติความเป็นเซลล์กระดูกอ่อนลดลง จากผลการทดลองที่ในช่วงแรกทำให้ทราบว่าสภาพที่ เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนเพื่อให้ผลิตคอลลาเจนแบบที่ 2 ได้เยอะคือสภาพแวดล้อมแบบ 3 มิติ ซึ่งในปัจจุบันในการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนต่างๆไปนั้นจะใช้วิธีเพิ่มจำนวนเซลล์ในแบบ monolayer cell culture หรือเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติก่อน จนกระทั่งได้จำนวนเซลล์ที่มากพอ แต่เซลล์ที่ได้จะเป็นเซลล์ ที่เปลี่ยนสภาพไปเป็น fibroblast ทำให้เกิดเป็น cartilage-fibro เพื่อเป็นการกระตุ้นคุณสมบัติของเซลล์ กระดูกอ่อนให้กลับมา like chondrocyte-fibroblast เซลล์ (differentiation-re) จะนำไปสร้างเป็นก้อน เหตุผลที่ต้องแยกเป็น 2 วิธีเพราะว่าเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงเป็น ก้อนจะเจริญเติบโตช้า ทำให้ได้เซลล์ จำนวนไม่เพียงพอต่อการรักษา ดังนั้นการเลี้ยงด้วยวิธีนี้จะใช้เวลา ในการเลี้ยงมากกว่า 5 สัปดาห์ ซึ่งไม่ เหมาะสมกับการไปใช้ในการปลูกถ่ายเซลล์หรือสร้างเป็นเนื้อเยื่อ กระดูกอ่อน

2 ดังนั้นในส่วนที่ของโครงการวิจัยนี้ กลุ่มนักวิจัยมีความประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการเพิ่ม จำนวนเซลล์กระดูกอ่อนในปริมาณที่มาก และได้เซลล์กระดูกอ่อนที่มีคุณภาพดีภายในขั้นตอนเดียว โดยพัฒนาวิธีการจากกลุ่มวิจัย oka-Professor Masahiro Kino จาก Osaka University ซึ่งใช้วิธีปรับ สภาพพื้นผิวเลี้ยงเซลล์ด้วยการเคลือบ dendrimer การเคลือบ (dendrimer immobilized surface) dendrimer นี้จะทำให้พื้นผิวมีความไม่ชอบน้ำมากขึ้น และพื้นผิวมีความโค้งนูนในระดับนาโนเมตร ทำให้เซลล์ไม่สามารถเกาะแล้วแผ่ตัวเองออกได้ จึงกระตุ้นให้เซลล์เกาะกันเองเป็นก้อนขนาดเล็กบนพื้นผิว โดยงานวิจัยนี้ได้เลือกพื้นผิวแบบ (5G)fifth generation dendrimer immobilized surface มาใช้ เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการใช้พื้นผิวแบบ G5 surface ทำให้เซลล์กระดูกอ่อนของกระต่าย สามารถรวมตัวเป็นก้อนเซลล์ได้ในระหว่างการเลี้ยง นอกจากนี้ก้อนเซลล์ดังกล่าวมีการสร้างคอลลาเจน ชนิดที่ 2 ได้ดี เมื่อเทียบกับเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงบนพื้นผิว PS surface [26]

การทดลองนี้ได้มีการศึกษาการรูปร่างและคุณสมบัติของเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ ที่ถูกถ่ายเลี้ยงบน ภาชนะ แบบ G5 surface และ PS surface เป็นจำนวน 2 ครั้ง รูปร่างและจำนวนของเซลล์ กระดูกอ่อนใหม่ (P0 chondrocyte) เซลล์กระดูกอ่อนที่ผ่านการถ่ายเลี้ยง 1 ครั้ง (P1) และ 2 ครั้ง (P2) ถูกตรวจสอบ เมื่อเซลล์เกาะพื้นผิวและโตเต็มที่ในวันที่ 7 ดังแสดงในรูป 3.8A เซลล์กระดูกอ่อน P0 แสดงรูปร่างกลมและมีการสร้างก้อนเซลล์ (cell aggregate) เล็กๆบนพื้นผิว G5 อย่างไรก็ตามมีบางเซลล์ ที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยม (polygonal shape) ตรงกันข้ามกับลักษณะรูปร่างของเซลล์กระดูกอ่อนบน PS surface รูปร่างของเซลล์กระดูกอ่อน P0 แสดงรูปร่างหลายเหลี่ยม มีบางเซลล์เท่านั้นที่มีรูปร่างกลม เมื่อเซลล์กระดูกอ่อนผ่านการถ่ายเลี้ยงบนพื้นผิว G5 พบว่าเซลล์กระดูกอ่อน P1 ไม่เพียงแต่แสดงรูปร่าง กลมและรูปร่างหลายเหลี่ยมแล้ว ยังพบก้อนเซลล์เล็กๆอีกด้วย ก้อนเซลล์ดังกล่าวฟอร์มรูปร่างแน่น อย่างเห็นได้ชัดเจน เมื่อถูกถ่ายเลี้ยงเป็น P2 อย่างไรก็ตาม ยังคงตรวจพบเซลล์กระดูกอ่อน P2 ที่มีรูปร่าง หลายเหลี่ยมแบบยาว ส่วนพื้นผิวแบบ PS surface ทั้งเซลล์กระดูกอ่อนแบบ P1 และ P2 มีรูปร่างยาว คล้ายโครงสร้างของเซลล์แบบ fibroblast และโตแน่นเต็ม พื้นที่เลี้ยงเซลล์แบบหนึ่งชั้นโดยไม่มีการฟอร์ม ก้อนเซลล์

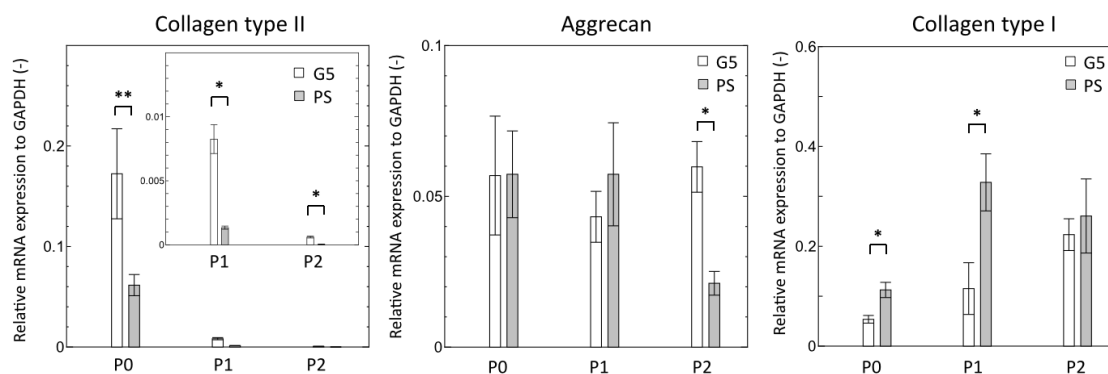


รูปที่ 3.8 รูปร่าง(A) และจำนวน ของเซลล์กระดูกอ่อน (B)P0 – P2 บนG5 surface และ PS surface ในวันที่ 7 (A)Scale bars = 100 μm ข้อมูลถูกวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธี student's t-testและพิจารณาความ มีนัยสำคัญที่ $*p < 0.01$

เนื่องจากการทดลองเลี้ยงเซลล์บน G5 surface มีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วนำไปสร้างเป็นแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนโดยที่เซลล์ดังกล่าวยังคงคุณสมบัติของเซลล์กระดูกอ่อนไว้ได้ ดังนั้นคุณสมบัติการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation)จึงเป็นคุณสมบัติที่สำคัญ cell proliferation บ่งบอกถึงความสมดุลระหว่างการแบ่งตัวและการสูญเสียเซลล์ สามารถดูได้จากอัตราการเพิ่มของเซลล์ที่ เวลาต่างๆ จากผลการทดลองในรูปที่ B3.8พบว่าในวันที่ 7จำนวนเซลล์กระดูกอ่อน (1P และ 0P) ที่เลี้ยงบน PS surfaceจะมีจำนวนมากกว่าจำนวนเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงบน surface 5Gอย่างไรก็ตามจำนวนของเซลล์กระดูกอ่อน P2 ที่ถูกถ่ายเลี้ยงบนทั้งสองพื้นผิวมีจำนวนใกล้เคียงกัน ลักษณะการเกาะแผ่ของเซลล์ค่อนข้างแตกต่างแต่จำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน อาจมีสาเหตุมาจากเซลล์ จำนวนมากฟอร์มตัวเป็นก้อนทำให้ดูจากรูปเหมือนว่าจำนวนเซลล์บน surface 5Gมีปริมาณน้อยกว่า

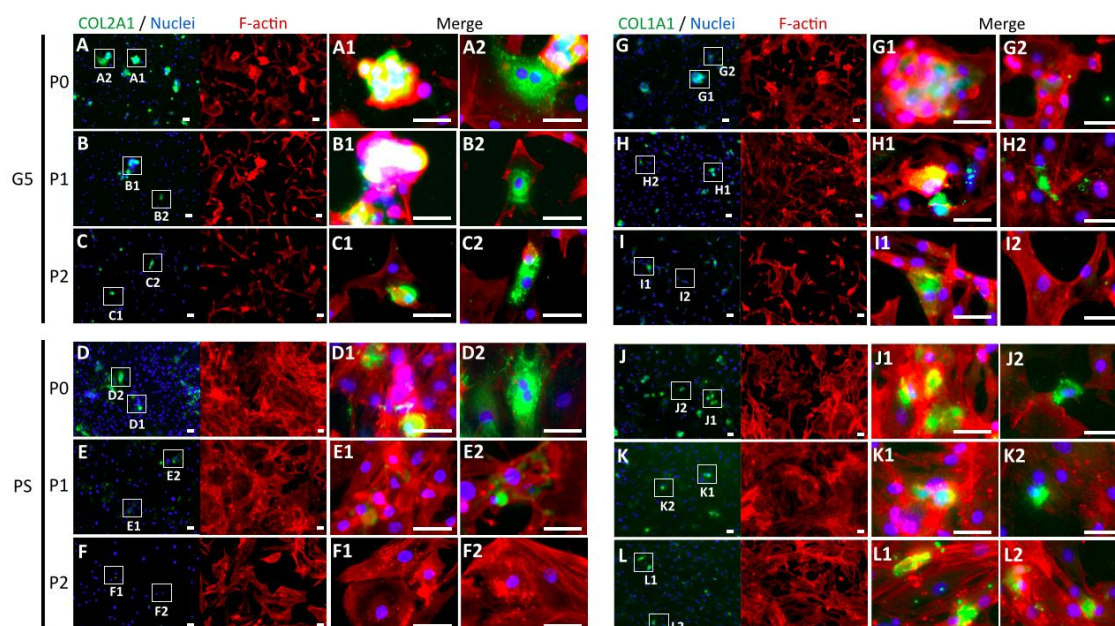
3.6 คุณสมบัติของเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์บน G5 surface

คุณสมบัติของเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงบนภาชนะทั้งสองชนิดจะวัดจากการแสดงออกของยีน chondrogenic (collagen type II และ aggrecan) และ dedifferentiation (collagen type I) โดยวัดจากเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงมาแล้วเป็นเวลา 7วัน ผลการทดลองพบว่าระดับการแสดงออกของ คอลลาเจนชนิดที่ 2 ในเซลล์กระดูกอ่อนที่ถูกถ่ายเลี้ยงบน ภาชนะทั้งสองแบบมีระดับที่ลดลงหลังจากถ่าย เลี้ยงไป 2 ครั้ง ดังแสดงในรูป 3.9 เป็นที่น่าสนใจว่าระดับการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 ใน เซลล์ที่ถ่ายเลี้ยงบน G5 surface มีปริมาณมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถ่ายเลี้ยงบน PS surface นอกจากนี้ ระดับของ aggrecan ยังคงอยู่ในระดับใกล้เคียงกันใน เซลล์กระดูกอ่อน P0 – P2 บน G5 surfaceในขณะที่ระดับของ aggrecan ลดลง ในเซลล์กระดูกอ่อน P2 บน PS surface นอกจากนี้ แนวโน้มการเพิ่มขึ้นของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ถูกพบในเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงบน ทั้งสองพื้นผิว แต่ระดับคอลลาเจนชนิดที่ 1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในเซลล์กระดูกอ่อน P0 และ P1 บน G5 surface เปรียบเทียบกับ PS surface ผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าพื้นผิว G5 surface สามารถนำมาใช้เพิ่ม จำนวนเซลล์กระดูกอ่อนโดยที่เซลล์ยังคงรักษาความเป็นเซลล์กระดูกอ่อนได้



รูปที่ 3.9 การแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 2, aggrecan และคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์ กระดูกอ่อน P0 - P2 บน G5 surface และ PS surface ข้อมูลถูกวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธี student's t-test และพิจารณา ความมีนัยสำคัญที่ $*p < 0.01$ และ $**p < 0.05$

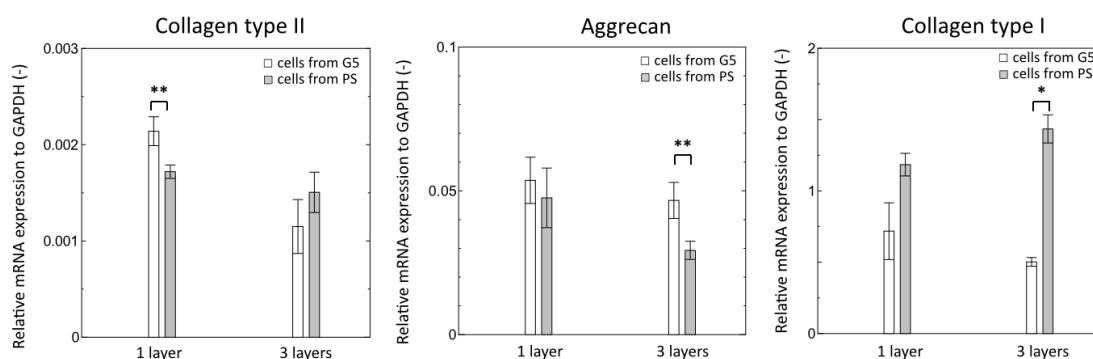
จากการตรวจพบการฟอร์มรูปร่างเป็นก้อนของเซลล์กระดูกอ่อนบน G5 surface ทำให้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างรูปร่างของเซลล์และการแสดงออกของยีนที่จำเพาะกับเซลล์กระดูกอ่อน โดยใช้เทคนิค immunostaining assay เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ F-actin คอลลาเจนชนิดที่ 2 และชนิดที่ 1 ดังแสดงในรูป 3.10 การแสดงออกของ F-actin จะพบมากในเซลล์กระดูกอ่อนที่ยึดตัว และมีหลายเหลี่ยม (polygonal structure) แต่ F-actin จะมีน้อยในเซลล์กระดูกอ่อน P0 - P2 ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลม บน G5 surface และ PS surface บนพื้นผิวแบบ G5 ส่วนใหญ่คอลลาเจนชนิดที่ 2 ถูกตรวจพบในเซลล์กระดูกอ่อน P0 - P2 ที่ฟอร์มรูปร่างเป็นก้อนเซลล์ และการติดสีของคอลลาเจนชนิดที่ 2 มองเห็นได้ชัดเจนในเซลล์ที่ไม่มีการติดสีของ F-actin ส่วนลักษณะการติดสีของเซลล์กระดูกอ่อน ที่ถูกเลี้ยงบน PS surface พบว่า การติดสีของคอลลาเจนชนิดที่ 2 มองเห็นได้เฉพาะในเซลล์กระดูกอ่อน P0 เท่านั้น อย่างไรก็ตามผลการย้อมสีของคอลลาเจนชนิดที่ 1 สามารถตรวจพบได้ในทุกเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ที่ถูกถ่ายเลี้ยงบน PS surface จากผลการทดสอบ immunostaining assay แสดงให้เห็นว่าเซลล์กระดูกอ่อนที่ฟอร์มรูปร่างเป็นก้อน และเซลล์กระดูกอ่อนที่ไม่ติดสีของ F-actin เป็น เซลล์ที่มีการผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 2



รูปที่ 3.10 การแสดงออกของโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 และคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในเซลล์กระดูกอ่อน ที่ถูกถ่ายเลี้ยงบน G5 surface และ PS surface

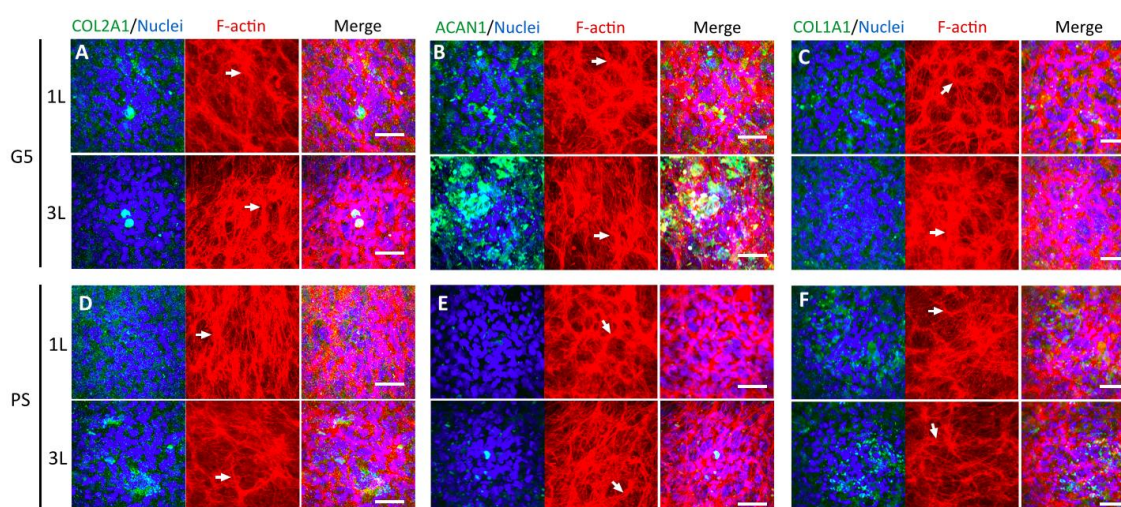
3.7 คุณสมบัติของแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์ที่สร้างมาจากเซลล์บน G5 surface

เซลล์กระดูกอ่อน P2 ที่ถูกถ่ายเลี้ยงบน G5 surface และ PS surface ถูกนำมาสร้างเป็นแผ่นเซลล์ 1 ชั้นและ 3 ชั้น การวิเคราะห์คุณสมบัติในการแสดงออกของยีนและโปรตีนทำเมื่อแผ่นเซลล์เกาะแผ่ และเจริญเติบโตได้ดีบนภาชนะใหม่ในวันที่ 7 โดยใช้เทคนิค real-time PCR และ immunostaining ผลการวิเคราะห์ทดลองพบว่ายีนที่จำเพาะต่อเซลล์กระดูกอ่อนถูกตรวจสอบพบได้ในแผ่นเซลล์ทั้งหมด ดังแสดงจากระดับการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ aggrecan ในรูป 3.11 ระดับการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 เพิ่มขึ้นในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 1 ชั้น ที่สร้างมาจากเซลล์ที่ผ่านการถ่าย เลี้ยงบน G5 surface เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเซลล์ที่ได้จากเซลล์ที่เลี้ยงบน PS surface ถึงแม้ว่า ระดับการออกของยีนนี้จะลดลงในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 3 ชั้นก็ตาม ส่วนระดับยีน aggrecan ยังคง ระดับเดิมในแผ่นเซลล์ทั้งหมดที่ถูกสร้างโดยเซลล์จาก G5 surface ซึ่งระดับการแสดงออกของ aggrecan นั้นลดลงอย่างมากในแผ่นเซลล์ 3 ชั้นที่สร้างมาจากเซลล์บน PS surface อย่างไรก็ตามการแสดงออกของ ยีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ซึ่งหมายถึงการเกิด de-differentiation ก็ยังคงมีอยู่ในทุกๆแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน ระดับของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในแผ่นเซลล์ที่สร้างจากเซลล์ที่เลี้ยงบน PS surface จะมีปริมาณมากกว่า ในแผ่นเซลล์ที่สร้างจากเซลล์กระดูกอ่อน G5 surface โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแสดงออกของ คอลลาเจนชนิดที่ 1 ในแผ่นเซลล์ 3 ชั้น มีระดับที่น้อยกว่าในแผ่นเซลล์ที่ถูกสร้างโดยเซลล์จาก PS surface



รูปที่ 3.11 การแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิดที่ 2, aggrecan และคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน P2 ที่ถ่ายเลี้ยงบน G5 surface และ PS surface ข้อมูลถูกวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธี student's t-test และพิจารณา ความมีนัยสำคัญที่ * $p < 0.01$ และ ** $p < 0.05$

ผลการตรวจสอบตำแหน่งการแสดงออก F-actin, คอลลาเจนชนิดที่ 2, aggrecan และ คอลลาเจนที่ 1 ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่สร้างจากเซลล์ที่ถูกเลี้ยงบน G5 surface และ PS surface พบว่ารูปร่างเซลล์โดยรวมในโครงสร้างของแผ่นเซลล์มีรูปร่างกลมดังแสดงในรูป 3.12 ในโครงสร้างของ แผ่นเซลล์พบว่า F-actin มีการฟอร์มรูปร่างคล้ายรังผึ้ง (honeycomb-like structure)



รูปที่ 3.12 การแสดงออกของโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 aggrecan และคอลลาเจนชนิดที่ 1 ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน ที่สร้างจากเซลล์กระดูกอ่อนที่ถูกถ่ายเลี้ยงบน G5 surface และ PS surface

การแสดงออกของโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ aggrecan ถพบได้ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของคอลลาเจนชนิดที่ 2 และ aggrecan ในแผ่นเซลล์ที่สร้างมาจากเซลล์บน G5 surface และ PS surface พบว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวพบได้ชัดเจนในเซลล์ที่มีรูปร่างกลมภายในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่สร้างจากเซลล์บน G5 surface ส่วนการแสดงออกของ คอลลาเจนชนิดที่ 1 ถูกพบได้ทั่วทั้งแผ่นเซลล์ อย่างไรก็ตามการที่คอลลาเจนชนิดที่ 1 สามารถมองเห็นได้ชัดเจน

ในแผ่นเซลล์กระดูกอ่อน 1 ชั้น เมื่อเทียบกับแผ่นเซลล์ 3 ชั้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์กระดูกอ่อนที่มีการפורมรูปร่างเป็นก้อนเซลล์เป็นปัจจัยที่บ่งชี้ถึงโครงสร้างที่สามารถทำให้เซลล์กระดูกอ่อนคงคุณสมบัติไว้ได้ในขณะที่มีการถ่ายเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน เมื่อนำเซลล์กระดูกอ่อนเหล่านี้ไป สร้างเป็นแผ่นเซลล์จะช่วยส่งเสริมให้แผ่นเซลล์กระดูกอ่อนคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์กระดูกอ่อนได้เมื่อเปรียบเทียบการแผ่นเซลล์ที่สร้างจากเซลล์กระดูกอ่อนบน PS surface

3.8 ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในสัตว์ทดลอง

เนื่องจากในปัจจุบัน ทางรัฐบาลได้ออกพระราชบัญญัติสัตว์เพื่อนงานทางวิทยาศาสตร์ ในปี พ.ศ. 2558 ซึ่งมีใจความสำคัญให้ผู้ที่เกี่ยวข้องในงานวิจัยที่ต้องใช้สัตว์ทดลอง ได้รับการอบรมและการสอบเพื่อขอใบอนุญาตการใช้สัตว์ทดลอง ดังนั้นทางผู้ร่วมวิจัยทุกคนในโครงการนี้จึงได้เข้าร่วมอบรมการใช้สัตว์ในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2559 ในเดือนมิถุนายน 2559 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน และได้รับใบอนุญาตใช้สัตว์ทดลองเป็นที่เรียบร้อย

จากนั้นทางกลุ่มผู้วิจัยได้ทำการติดต่อไปที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อขอรับการทดสอบผลของการรักษาแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนในสัตว์ทดลอง โดยสัตว์ทดลองที่เหมาะสมกับการวิจัยคือกระต่าย New Zealand (New Zealand Rabbits) เนื่องจากกระต่ายมีขนาดที่ใหญ่เพียงพอในการวิจัยนั้น ผู้ทำการทดสอบจะต้องทำการสร้างแผลบนกระดูกอ่อนของกระต่ายขึ้นมาก่อน โดยการเจาะข้อเข่าของกระต่ายให้เป็นหลุมทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 มม. และ ลึกประมาณ 3 มม. ขนาดของแผลไม่สามารถใหญ่กว่านี้ได้เนื่องจากจะทำให้กระต่ายเคลื่อนไหวไม่ได้เนื่องจากข้อเข่าของกระต่ายมีขนาดเล็ก โดยค่าใช้จ่ายที่จะต้องใช้จ่ายอยู่ที่ประมาณ 300,000 บาท หรือมากกว่า ซึ่งค่าใช้จ่ายนี้รวมถึง ค่ากระต่าย ค่าดูแลตลอดระยะเวลาการทำวิจัย และค่าวิเคราะห์ เนื้อเยื่อ ซึ่งทำให้งบประมาณที่ได้มานั้นไม่เพียงพอสำหรับการวิจัย

.4 ผลผลิต (output) และตัวชี้วัด

ผลผลิต		
	จำนวน) รวม 2ปี(	จำนวน)ในปีที่ (1
1. ต้นแบบกระบวนการ	1 ต้นแบบ	ต้นแบบกระบวนการสร้างแผ่นเซลล์กระดูกอ่อนที่มีประสิทธิภาพ
2. นวัตกรรมทางการรักษาโรคข้อเสื่อม	1 เรื่อง	-)คาดว่าจะได้ในปีที่ (2
3. สิทธิบัตรภายในประเทศ	1 เรื่อง	-)อยู่ในขั้นตอนการร่าง(
4. การผลิตบัณฑิต	1 คน	1 คน บัณฑิตระดับปริญญาเอก) คาดว่าจะจบในเดือนพฤษภาคม (2560
5. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ	2 เรื่อง	○ 1 เรื่อง ○ Effect of Cell Sheet Manipulation Techniques on the Expression of Collagen Type II and Stress Fiber Formation in Human Chondrocyte Sheets (submitted to Tissue Engineering)

เอกสารอ้างอิง

1. Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J., and Noel, D., 2009, "Cartilage Engineering: A Crucial Combination of Cells, Biomaterials and Biofactors", *Trends Biotechnol*, Vol. 27, No. 5, pp. 307-314.
2. Ebihara, G., Sato, M., Yamato, M., Mitani, G., Kutsuna, T., Nagai, T., Ito, S., Ukai, T., Kobayashi, M., Kokubo, M., Okano, T., and Mochida, J., 2012, "Cartilage Repair in Transplanted Scaffold-Free Chondrocyte Sheets Using a Minipig Model", *Biomaterials*, Vol. 33, No. 15, pp. 3846-3851.
3. Matsuda, N., Shimizu, T., Yamato, M., and Okano, T., 2007, "Tissue Engineering Based on Cell Sheet Technology", *Advanced Materials*, Vol. 19, No. 20, pp. 3089-3099.
4. Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M., Sakai, H., and Sakurai, Y., 1995, "Mechanism of Cell Detachment from Temperature-Modulated, Hydrophilic-Hydrophobic Polymer Surfaces", *Biomaterials*, Vol. 16, No. 4, pp. 297-303.
5. Yamato, M., Utsumi, M., Kushida, A., Konno, C., Kikuchi, A., and Okano, T., 2001, "Thermo-Responsive Culture Dishes Allow the Intact Harvest of Multilayered Keratinocyte Sheets without Disperse by Reducing Temperature", *Tissue Eng*, Vol. 7, No. 4, pp. 473-480.
6. Ito, S., Sato, M., Yamato, M., Mitani, G., Kutsuna, T., Nagai, T., Ukai, T., Kobayashi, M., Kokubo, M., Okano, T., and Mochida, J., 2012, "Repair of Articular Cartilage Defect with Layered Chondrocyte Sheets and Cultured Synovial Cells", *Biomaterials*, Vol. 33, No. 21, pp. 5278-5286.
7. Kaneshiro, N., Sato, M., Ishihara, M., Mitani, G., Sakai, H., and Mochida, J., 2006, "Bioengineered Chondrocyte Sheets May Be Potentially Useful for the Treatment of Partial Thickness Defects of Articular Cartilage", *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 349, No. 2, pp. 723-731.
8. Haraguchi, Y., Shimizu, T., Sasagawa, T., Sekine, H., Sakaguchi, K., Kikuchi, T., Sekine, W., Sekiya, S., Yamato, M., Umezaki, M., and Okano, T., 2012, "Fabrication of Functional Three-Dimensional Tissues by Stacking Cell Sheets in Vitro", *Nat Protoc*, Vol. 7, No. 5, pp. 850-858.

9. Viravaidya-Pasuwat, K., Wong-in, S., Sakulaue, P., and Siriawatwechakul, W., 2013, "Construction of a Chondrocyte Cell Sheet Using Temperature-Responsive Poly(N-Isopropylacrylamide)-Co-Acrylamide", Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, Vol. 2013, No., pp. 6969-6972.
10. Wong-In, S., KhanhThuyen, N.T., Siriawatwechakul, W., and Viravaidya-Pasuwat, K., 2013, "Multilayered Mouse Preosteoblast Mc3t3-E1 Sheets Harvested from Temperature-Responsive Poly(N-Isopropylacrylamide-Co-Acrylamide) Grafted Culture Surface for Cell Sheet Engineering", Journal of Applied Polymer Science, Vol. 129, No. 5, pp. 3061-3069.
11. Kino-oka, M., Ngo, T.X., Nagamori, E., Takezawa, Y., Miyake, Y., Sawa, Y., Saito, A., Shimizu, T., Okano, T., and Taya, M., 2012, "Evaluation of Vertical Cell Fluidity in a Multilayered Sheet of Skeletal Myoblasts", J Biosci Bioeng, Vol. 113, No. 1, pp. 128-131.
12. Tsuda, Y., Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A., Sasagawa, T., Sekiya, S., Kobayashi, J., Chen, G., and Okano, T., 2007, "Cellular Control of Tissue Architectures Using a Three-Dimensional Tissue Fabrication Technique", Biomaterials, Vol. 28, No. 33, pp. 4939-4946.
13. Williams, C., Tsuda, Y., Isenberg, B.C., Yamato, M., Shimizu, T., Okano, T., and Wong, J.Y., 2009, "Aligned Cell Sheets Grown on Thermo-Responsive Substrates with Microcontact Printed Protein Patterns", Advanced Materials, Vol. 21, No. 21, pp. 2161-2164.
14. Mitani, G., Sato, M., Lee, J.I.K., Kaneshiro, N., Ishihara, M., Ota, N., Kokubo, M., Sakai, H., Kikuchi, T., and Mochida, J., 2009, "The Properties of Bioengineered Chondrocyte Sheets for Cartilage Regeneration", BMC Biotechnol, Vol. 9, No., p. 17.
15. Stokes, D.G., Liu, G., Dharmavaram, R., Hawkins, D., Piera-Velazquez, S., and Jimenez, S.A., 2001, "Regulation of Type-I Collagen Gene Expression During Human Chondrocyte De-Differentiation and Recovery of Chondrocyte-Specific Phenotype in Culture Involves Sry-Type High-Mobility-Group Box (Sox) Transcription Factors", Biochem J, Vol. 360, No. Pt 2, pp. 461-470.

16. Hamid, A.A., Idrus, R.B.H., Saim, A.B., Sathappan, S., and Chua, K.H., 2012, "Characterization of Human Adipose-Derived Stem Cells and Expression of Chondrogenic Genes During Induction of Cartilage Differentiation", *Clinics (Sao Paulo)*, Vol. 67, No. 2, pp. 99-106.
17. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001, "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative Pcr and the 2(-Delta Delta C(T)) Method", *Methods*, Vol. 25, No. 4, pp. 402-408.
18. Kim, M.-H., Ogawa, Y., Yamada, K., Taya, M., and Kino-oka, M., 2014, "Directed Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells toward a Cardiomyogenic Fate Commitment through Formation of Cell Aggregates", *Biochem. Eng. J.*, Vol. 84, No., pp. 53-58.
19. Williams, C., Xie, A.W., Yamato, M., Okano, T., and Wong, J.Y., 2011, "Stacking of Aligned Cell Sheets for Layer-by-Layer Control of Complex Tissue Structure", *Biomaterials*, Vol. 32, No. 24, pp. 5625-5632.
20. Kino-Oka, M., Maeda, Y., Sato, Y., Maruyama, N., Takezawa, Y., Khoshfetrat, A.B., Sugawara, K., and Taya, M., 2009, "Morphological Evaluation of Chondrogenic Potency in Passaged Cell Populations", *J Biosci Bioeng*, Vol. 107, No. 5, pp. 544-551.
21. Buckwalter, J.A., Mankin, H.J., and Grodzinsky, A.J., 2005, "Articular Cartilage and Osteoarthritis", *Instr Course Lect*, Vol. 54, No., pp. 465-480.
22. Rosa, S.C., Rufino, A.T., Judas, F.M., Tenreiro, C.M., Lopes, M.C., and Mendes, A.F., 2011, "Role of Glucose as a Modulator of Anabolic and Catabolic Gene Expression in Normal and Osteoarthritic Human Chondrocytes", *J Cell Biochem*, Vol. 112, No. 10, pp. 2813-2824.
23. Tchetina, E.V., Squires, G., and Poole, A.R., 2005, "Increased Type Ii Collagen Degradation and Very Early Focal Cartilage Degeneration Is Associated with Upregulation of Chondrocyte Differentiation Related Genes in Early Human Articular Cartilage Lesions", *J Rheumatol*, Vol. 32, No. 5, pp. 876-886.
24. Tew, S.R., Murdoch, A.D., Rauchenberg, R.P., and Hardingham, T.E., 2008, "Cellular Methods in Cartilage Research: Primary Human Chondrocytes in Culture and

- Chondrogenesis in Human Bone Marrow Stem Cells", *Methods*, Vol. 45, No. 1, pp. 2-9.
25. Zhonglan Tang, Akiyama, Y., and Okano, T., 2012, "Temperature-Responsive Polymer Modified Surface for Cell Sheet Engineering", *Polymers*, Vol. 4, No., pp. 1478-1498.
 26. Kim, M.H., Kino-oka, M., Morinaga, Y., Sawada, Y., Kawase, M., Yagi, K., and Taya, M., 2009, "Morphological Regulation and Aggregate Formation of Rabbit Chondrocytes on Dendrimer-Immobilized Surfaces with D-Glucose Display", *J Biosci Bioeng*, Vol. 107, No. 2, pp. 196-205.
 27. Singh, P. and Schwarzbauer, J.E., 2012, "Fibronectin and Stem Cell Differentiation – Lessons from Chondrogenesis", *Journal of Cell Science*, Vol. 125, No. 16, pp. 3703-3712.
 28. Kassianidou, E. and Kumar, S., 2015, "A Biomechanical Perspective on Stress Fiber Structure and Function", *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1853, No. 11 Pt B, pp. 3065-3074.
 29. Kim, M.H., Kino-oka, M., and Taya, M., 2010, "Designing Culture Surfaces Based on Cell Anchoring Mechanisms to Regulate Cell Morphologies and Functions", *Biotechnol Adv*, Vol. 28, No. 1, pp. 7-16.
 30. Novakofski, K., Boehm, A., and Fortier, L., 2009, "The Small Gtpase Rho Mediates Articular Chondrocyte Phenotype and Morphology in Response to Interleukin-1alpha and Insulin-Like Growth Factor-I", *J Orthop Res*, Vol. 27, No. 1, pp. 58-64.
 31. Mahmood, T.A., de Jong, R., Riesle, J., Langer, R., and van Blitterswijk, C.A., 2004, "Adhesion-Mediated Signal Transduction in Human Articular Chondrocytes: The Influence of Biomaterial Chemistry and Tenascin-C", *Exp Cell Res*, Vol. 301, No. 2, pp. 179-188.
 32. Tew, S.R. and Hardingham, T.E., 2006, "Regulation of Sox9 Mrna in Human Articular Chondrocytes Involving P38 Mapk Activation and Mrna Stabilization", *J Biol Chem*, Vol. 281, No. 51, pp. 39471-39479.

33. Hamahashi, K., Sato, M., Yamato, M., Kokubo, M., Mitani, G., Ito, S., Nagai, T., Ebihara, G., Kutsuna, T., Okano, T., and Mochida, J., 2012, "Studies of the Humoral Factors Produced by Layered Chondrocyte Sheets", *J Tissue Eng Regen Med*, Vol. 9, No. 1, pp. 24-30.
34. Parreno, J., Raju, S., Niaki, M.N., Andrejevic, K., Jiang, A., Delve, E., and Kandel, R., 2014, "Expression of Type I Collagen and Tenascin C Is Regulated by Actin Polymerization through Mrtf in Dedifferentiated Chondrocytes", *FEBS Lett*, Vol. 588, No. 20, pp. 3677-3684.

เอกสารแนบ

จดหมายนำ

Dear Editor:

Enclosed, please find our manuscript entitled “Effect of Cell Sheet Manipulation Techniques on the Expression of Collagen Type II and Stress Fiber Formation in Human Chondrocyte Sheets”, which we are submitting for publication consideration as an original article in Tissue Engineering Part A. Authors are Sopita Wong-in, Saranatra Waikakul, Pojchong Chotiyarnwong, Wanwipa Siriwatwechakul and Kwanchanok Viravaidya-Pasuwat.

In this manuscript, we describe a process to construct multi-layered chondrocyte cell sheets using a temperature-responsive culture surface for the treatment of articular cartilage defects. To overcome a problem with cell sheet shrinkage, a gelatin manipulator was used as a cell sheet transfer system. Our result showed that the gelatin manipulator could help preserved the stretched morphology of the cells, similar to that of the attached cells, as indicated by the abundant the cellular stress fibers. As a result, the shrinkage of the cell sheets was not observed. As expected, without using a gelatin manipulator, the cells were allowed to spontaneously rearrange their cytoskeletons and a lower production of stress fibers was observed, leading to cell sheet shrinkage. Interestingly, the chondrocyte cell sheets constructed without the use of the gelatin stamp possessed a higher level of collagen type II, an important marker for articular chondrocytes, when compared with those constructed with the gelatin stamp. Therefore, we believed that there was a relationship between the stress fibers and collagen type II which was explained through the known pathway in this manuscript.

We believe that this manuscript is appropriate for the publication by Tissue Engineering Part A, as the journal provides a forum for researchers, scientists and physicians who are interested in tissue growth and regeneration to exchange ideas and report new findings. Although chondrocyte cell sheet engineering has been previously developed, this is the first time that the effect of the cell sheet manipulation techniques on the outcome of the chondrocyte cell sheets has been investigated.

This manuscript has not been published and is not under consideration for publication elsewhere. We have no conflict of interest to disclose.

Thank you for your consideration of this manuscript.

Sincerely,



Kwanchanok Viravaidya-Pasuwat
Associate Professor