กมลนารี โชตินันทกุล : การเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดและการประยุกต์ใช้ในการรักษาบาดแผล (EXPANSION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND ITS APPLICATION IN WOUND HEALING) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร.วิไลรัตน์ ลื้อนันต์ศักดิ์ศิริ, 217 หน้า.

งานนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด ($CD34^+$ cells) จากเลือดสายสะดือที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารอาหารไซโตไคน์ชนิดที่ประกอบด้วย 4 ไซโตไคน์ (4F; Flt3L SCF TPO และ IL-6) เทียบกับ 4 ไซโตไคน์ร่วมกับ Wnt1 (4FW) เปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงในอาหารที่มีซีรั่มและไม่ใช้ซีรั่มสัตว์เป็นส่วนผสม นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยส่วนผสมของไซโตไคน์ชนิดใหม่จำนวน 6 ชนิดเทียบกับไซโตไคน์ 4F ซึ่งไม่มีซีรั่ม และทำการทดลองศึกษาผลการรักษาบาดแผลในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานจากสารสเตรปโตโซโตซินด้วยเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดชนิด $CD34^+$ เปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดชนิด $CD34^+$ ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ 4FW ที่ไม่มีส่วนประกอบของซีรั่มเป็นเวลา 5 วัน จากการทดลองแรกพบว่า อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของซีรั่มประกอบด้วย 4F และ 4FW เพิ่มจำนวนเซลล์ $CD34^+CD38^-$ (~18.5 และ ~24.3 เท่า ตามลำดับ) ได้ดีกว่าอาหารที่มีส่วนผสมของซีรั่ม (~4.2 และ ~6.6 เท่า ตามลำดับ) เมื่อเลี้ยงไปได้ 7 วัน และเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของซีรั่มเพิ่มจำนวนเซลล์ $CD133^+CD38^-$ และยับยั้งการเพิ่มจำนวน $CD34^-CD38^+$ ได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีซีรั่ม การทดลองที่สองในการเปรียบเทียบทั้ง 7 ชนิดของส่วนผสมของไซโตไคน์ต่างๆในอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของซีรั่มพบว่า กลุ่มที่มีส่วนผสมของไซโตไคน์ 4FW และ P0 สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ $CD34^+CD38^-$ (~24.3 เท่า) และ $CD133^+CD38^-$ (~18.2 เท่า) ได้สูงสุดตามลำดับ เมื่อเลี้ยงได้ 7 วัน อาหารทุกกลุ่มของไซโตไคน์ร่วมชนิดต่างๆ ที่ทำการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดสามารถรักษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ได้ โดยทำการศึกษาจากระดับเซลล์ด้วยวิธีการดูการสร้างโคโลนีของเซลล์โปรเจนิเตอร์ต่างๆ และการเลี้ยงในสารน้ำชนิดต่างๆ เพื่อดูการพัฒนาไปเป็นเม็ดเลือดเต็มวัยสายต่างๆ และศึกษาในระดับโมเลกุลด้วยการดูการแสดงออกของยีน *Oct3/4* และ *Nanog* ที่เกี่ยวข้องในการรักษาความเป็นพลูริโพเทนท์ของเซลล์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ให้ผลที่ใกล้เคียงกับผลจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่สกัดใหม่ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม สำหรับการทดลองสุดท้ายในการรักษาบาดแผลในหนูที่เป็นเบาหวานพบว่า เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดและเซลล์ที่เพิ่มจำนวนในอาหาร 4FW ที่ไม่มีส่วนผสมของซีรั่มสามารถช่วยรักษาบาดแผลได้ดีขึ้น โดยไปเพิ่มการเดินทางและเพิ่มจำนวนของเซลล์แมคโครฟาจที่

แสดง CD68 โมเลกุล และเซลล์เอนโดทีเลียมที่แสดง CD31 โมเลกุลบนผิวเซลล์โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสทรี ผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าการใช้อาหารที่ไม่มีซีรั่มและมีส่วนผสมของไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ที่คิดขึ้นใหม่นี้ สามารถช่วยลดการปนเปื้อนส่วนผสมจากสัตว์ และเพิ่มจำนวนเซลล์ที่แสดงโมเลกุล CD34 บนผิวเซลล์ได้ภายนอกร่างกาย โดยเฉพาะการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าการเพิ่มไซโตไคน์ Wnt1 มีบทบาทในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และประโยชน์จากการใช้เซลล์ชนิด $CD34^{+}$ จากเลือดสายสะดือและเซลล์ที่เพิ่มจำนวนในอาหารที่มีส่วนประกอบของ Wnt1 เป็นเวลา 5 วันช่วยรักษาบาดแผลในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยสารสเตรปโตโซโตซินได้อีกอย่างมีนัยสำคัญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

KAMONNAREE CHOTINANTAKUL : EXPANSION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND ITS APPLICATION IN WOUND HEALING. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. WILAIRAT LEEANANSAKSIRI, Ph.D. 217 PP.

HEMATOPOIETIC STEM CELLS/CORD BLOOD/$CD34^+$ CELLS/ EXPANSION/ WOUND HEALING

The aims of this study were to compare the ability of *ex vivo* expansion of human cord blood (CB) $CD34^+$ cells cultured in cytokine factors; 4F (Flt3L, SCF, TPO, and IL-6) and 4F containing Wnt1 (4FW) in serum and serum-free medium and to compare newly six combinations of cytokine cocktails with 4F in serum-free medium in supporting proliferation. In the present study, the capacity of expanded $CD34^+$ cells in serum-free medium in wound healing was also investigated and compared with freshly isolated $CD34^+$ cells in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice. Firstly, the culture of CB-$CD34^+$ cells in serum-free medium with 4F and 4FW showed superior *ex vivo* expansion of $CD34^+CD38^-$ cells (~18.5- and ~24.3-folds, respectively) than those of serum containing medium (~4.2- and ~6.6-folds, respectively) significantly at day 7. Interestingly, in the serum-free medium exhibited the increase in $CD133^+CD38^-$ cells and preserved the expansion of $CD34^-CD38^+$ cells (more committed cells) than those of serum containing medium. Secondly, among the seven combinations of cytokine cocktails in serum-free medium investigated in this study, cultivation in 4FW and P0 medium showed the highest expansion of $CD34^+CD38^-$ cells (~24.3 fold) and $CD133^+CD38^-$ cells (~18.2 fold), respectively, at

day 7. All cocktails could maintain stemness of expanded cells in which the cellular level as determined by colony forming cell and liquid culture assay, and the molecular level as analyzed from the expression pluripotency genes (*Oct3/4* and *Nanog*) displayed the comparative results compared to freshly isolated $CD34^+$ cells. Finally, fresh and day 5-expanded $CD34^+$ cells obtained from 4FW in serum-free culture could accelerate wound healing in diabetic mice by improved proliferation and migration of $CD68^+$ macrophages and $CD31^+$ endothelial cells as identified by immunohistochemistry analysis. In conclusion, these data demonstrate the benefits of using serum-free medium with new cytokine cocktails as an effective choice to eliminate the contamination of animal product and enhance CB-$CD34^+$ cells expansion *ex vivo*. Particularly, this study is the first research that confirms the addition of Wnt1 plays an essential role in promoting the proliferation. In addition, our findings also indicate for the first time that significantly improvement of wound healing in STZ-induced diabetic mice can be succeeded by the use of freshly isolated and day 5-expanded CB-$CD34^+$ cells from 4FW medium.

School of Microbiology

Academic Year 2011

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____