หทัยวรรณ โชคชูวัฒนาเลิศ : การวินิจฉัยการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซ็นไคม์ที่คัดแยกได้จากเนื้อเยื่อวาร์ตันเจลลีของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงในระบบที่ปราศจากส่วนประกอบที่ได้จากสัตว์ด้วยวิธี FT-IR MICROSPECTROSCOPY (DISCRIMINATION OF BIOCHEMICAL CHANGES IN HUMAN WHARTON'S JELLY DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS CULTURED UNDER XENO-FREE SYSTEMS BY FT-IR MICROSPECTROSCOPY) อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 66 หน้า

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cells; MSCs) คือเซลล์ต้นกำเนิดที่เก็บได้จากจากเนื้อเยื่อโตเต็มวัยที่มีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในการนำไปใช้ในการรักษาด้วยวิธีสเต็มเซลล์บำบัด อย่างไรก็ตามการใช้ซีรัมที่ได้จากตัวอ่อนโค (fetal bovine serum; FBS) ในระบบเพาะเลี้ยงเซลล์แบบดั้งเดิมนั้นก่อให้เกิดความกังวลด้านความปลอดภัยในการรักษาเมื่อนำเซลล์ดังกล่าวไปใช้กับผู้ป่วย นอกจากนั้นพบว่าคุณลักษณะสำคัญของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ เช่น อัตราการเพิ่มจำนวน การแสดงออกของสารพันธุกรรมและศักยภาพในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลาง (mesoderm) มีการเปลี่ยนแปลงภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อส่งเสริมให้เกิดความปลอดภัยในการนำไปใช้ในการรักษาทางคลินิกการศึกษานี้จึงมีเป้าหมายในการสร้างระบบการเพาะเลี้ยงที่ปราศจากการใช้สารที่มาจากสัตว์โดยใช้ซีรัมที่ได้จากสายสะดือมนุษย์ (hCBS) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่ได้จากวาร์ตันเจลลีมนุษย์ (hWJ-MSCs) ผลของระบบการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ได้รับการศึกษาโดยใช้กระบวนการการตรวจสอบคุณลักษณะที่เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการศึกษาด้วยเทคนิค Fourier transform infrared (FT-IR) microspectroscopy ในการศึกษานี้สายสะดือแต่ละเส้นจะถูกแบ่งและเพาะเลี้ยงในระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบดั้งเดิมที่มีส่วนประกอบที่มาจากสัตว์โดยใช้ FBS และระบบการเพาะเลี้ยงที่ปราศจากส่วนประกอบที่มาจากสัตว์โดยใช้ hCBS โดย hWJ-MSCs ที่เพาะเลี้ยงด้วย hCBS (hWJ-MSCs-hCBS) แสดงการแบ่งตัวสะสมที่สูงกว่าและใช้เวลาในการแบ่งตัวน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ hWJ-MSCs ที่เพาะเลี้ยงด้วย FBS (hWJ-MSCs-FBS) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของรูปร่างของเซลล์และคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เมื่อทดสอบด้วยกระบวนการการตรวจสอบคุณลักษณะที่เป็นมาตรฐาน ในทางตรงกันข้ามจากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis; PCA) ของ FT-IR สเปกตรัมของ hWJ-MSCs ที่ได้จากระบบการเพาะเลี้ยงทั้งสองแสดงให้เห็นว่าสเปกตรัมของ hWJ-MSCs-FBS และ hWJ-MSCs-hCBS สามารถแบ่งแยกออกจากกันด้วยองค์ประกอบหลักที่ 1 โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนทั้งหมดในชุดข้อมูลได้ถึงร้อยละ 63 โดย hWJ-MSCs-FBS แสดงค่า

การดูดกลืนแสงสูงกว่าในช่วงไขมัน (สเปกตรัมการยืดหดของพันธะ C-H ในช่วง 3,000-2,800 เซ็นติเมตร$^{-1}$) ตำแหน่งสูงสุดของการยืดหดของพันธะลิปิดเอสเทอร์ C=O (1,743 เซ็นติเมตร$^{-1}$) และช่วงของกรดนิวคลีอิก (1,261-900 เซ็นติเมตร$^{-1}$) แต่ทว่า hWJ-MSCs-hCBS มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่มี β-sheet สูง (การเพิ่มการดูดกลืนแสงที่1,639 เซ็นติเมตร$^{-1}$)

โดยสรุปการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าชนิดของซีรัมที่ใช้ส่งผลกระทบโดยตรงต่อคุณลักษณะของ hWJ-MSCs ที่เพาะเลี้ยง การค้นพบนี้เป็นหลักฐานแสดงให้เห็นว่าระบบการเพาะเลี้ยงที่ปราศจากส่วนประกอบที่ได้จากสัตว์มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เพื่อวัตถุประสงค์ในการรักษาทางคลินิก นอกจากนี้การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นว่าเทคนิค FT-IR microspectroscopy ร่วมกับการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักสามารถแยกเซลล์ที่ได้จากกระบวนการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันได้ในขณะที่กระบวนการการตรวจสอบคุณลักษณะที่เป็นมาตรฐานไม่สามารถแยก เทคนิคนี้แสดงหมู่ฟังก์ชันของสารอินทรีย์ของ hWJ-MSCs ได้ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงอินฟราเรดเพียงครั้งเดียวโดยปราศจากกระบวนการการติดฉลากที่ซับซ้อน ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเทคนิค FT-IR microspectroscopy เป็นเทคนิคทางเลือกที่โดดเด่นในการตรวจสอบคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

HATAIWAN CHOKECHUWATTANALERT : DISCRIMINATION OF BIOCHEMICAL CHANGES IN HUMAN WHARTON'S JELLY DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS CULTURED UNDER XENO-FREE SYSTEMS BY FT-IR MICROSPECTROSCOPY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 66 PP.

XENO-FREE CULTURE SYSTEM/MESENCHYMAL STEM CELLS PROPERTIES/FT-IR MICROSPECTROSCOPY

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells of particularly interest for stem cell-based therapy. However, the uses of fetal bovine serum (FBS) in conventional culture systems have raised concerns about the therapeutic safety for use with patients. Moreover, key properties of MSCs such as proliferation rate, transcriptional profiles, and mesodermal differentiation potential have been shown to be altered under different culture systems. Therefore, in order to facilitate the safety of clinical applications, this study aimes to establish a xeno-free culture system using human cord blood serum (hCBS) for human Wharton's Jelly derived MSCs (hWJ-MSCs) derivation. The effects of different culture systems on hWJ-MSCs properties were studied by standard characterization methods compared with results obtained using Fourier transform infrared (FT-IR) microspectroscopy. In this study, individual umbilical cords were divided and cultured by conventional xeno- (fetal bovine serum: FBS) and xeno-free (human cord blood serum: hCBS) culture systems. hWJ-MSCs cultured in hCBS (hWJ-MSCs-hCBS) exhibited a significantly higher cumulative population doubling with shorter population doubling time when compared with hWJ-

MSCs cultured in FBS (hWJ-MSCs-FBS). However, there were no differences in cell morphology and MSCs properties detected by standard characterization methods. In contrast, Principal component analysis (PCA) of FT-IR spectra of hWJ-MSCs derived from both culture systems revealed that the spectra of hWJ-MSCs-FBS and hWJ-MSCs-hCBS could be discriminated in scores plots along PC1, which can be explain by the 63% of the total variance in the dataset. hWJ-MSCs-FBS revealed higher absorption in lipid bands (C-H stretching spectral region (3,000-2,800 cm^{-1})), lipid ester C=O stretching peak (1,743 cm^{-1}), and nucleic acids region (1,261-900 cm^{-1}) whereas hWJ-MSCs-hCBS have higher β-sheet rich proteins (increase in absorbance at 1,639 cm^{-1}).

In summary, this study demonstrated that the type of serum supplement directly influences the properties of the cultivated hWJ-MSCs. These findings provided the evidence that the xeno-free culture system is suitable for the *ex vivo* expansion of clinical grade MSCs. Moreover, this study was the first to demonstrate that FT-IR microspectroscopy coupled with PCA analysis, but the standard characterization methods could not, could discriminate the cells derived from different culture systems. This technique reveals the organic functional groups of hWJ-MSCs via a single measurement of an infrared absorption, without any requirement of complicated labeling process. Therefore, the data presented here shows that FT-IR microspectroscopy is an alternative outstanding technique for MSCs characterization.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2012 Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature _____