นิภา ชัยเจริญอุดมรุ่ง : การพัฒนากระบวนการสร้างระบบการเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติด้วยแคลเซียม-อัลจิเนต เพื่อเป็นแบบจำลองในการศึกษามะเร็งเนื้อเยื่อระบบประสาทและประเมินประสิทธิภาพยาต้านมะเร็ง (FABRICATION OF 3D CALCIUM-ALGINATE SCAFFOLD CELL CULTURE SYSTEM AS A NERVE-TISSUE CANCER MODEL FOR ANTICANCER DRUG STUDIES) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริญญา น้อยสา, 167 หน้า.

มะเร็งเนื้อเยื่อระบบประสาทโดยเฉพาะอย่างยิ่ง มะเร็งกลัยโอบลาสโตมา และมะเร็งนิวโรบลาสโตมา เป็นความท้าทายระดับโลกต่อสุขภาพของมนุษย์ ยิ่งไปกว่านั้นกลัยโอบลาสโตมาเป็นมะเร็งของเนื้อเยื่อระบบประสาทที่มีความรุนแรงมากที่สุดและดื้อต่อยาเคมีบำบัด โดยมีอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยเฉลี่ย 12-15 เดือน สำหรับผู้ป่วยมะเร็งกลัยโอบลาสโตมาที่ได้รับการวินิจฉัยใหม่ และ 5-7 เดือน สำหรับผู้ที่เกิดมะเร็งซ้ำ คอร์ไดเซปินเป็นสารสกัดจากถั่งเช่า จากรายงานการศึกษาภายใต้การทดสอบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในห้องทดลองด้วยระบบสองมิติ พบว่าคอร์ไดเซปินเป็นสารต้านมะเร็งที่มีกระบวนการทำงานผ่านหลากหลายกลไก อย่างไรก็ตามกลไกการต้านมะเร็งระบบประสาทของคอร์ไดเซปินยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบกลไกการทำงานของคอร์ไดเซปินต่อเซลล์มะเร็งเนื้อเยื่อระบบประสาทของมนุษย์ พบว่าคอร์ไดเซปินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมา (U-251) และมะเร็งนิวโรบลาสโตมา (SH-SY5Y) ผ่านวิถีจากภายในที่มีไมโตคอนเดรียเป็นตัวกลาง และการปรับเปลี่ยนของกระบวนการออโต้ฟาจี้ อย่างไรก็ตามมีมุมมองที่เกิดขึ้นใหม่ พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบดั้งเดิมในระบบสองมิติอาจไม่สามารถเลียนแบบสภาพแวดล้อมแบบสามมิติซึ่งเซลล์มะเร็งอาศัยอยู่จริงได้ รูปแบบการเพาะเลี้ยงเซลล์สามมิติจึงมีการใช้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้นเพื่อการศึกษาชีววิทยาของมะเร็ง และเพื่อคัดกรองสารต้านมะเร็ง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติมีการจำลองสภาวะแวดล้อมที่เซลล์มะเร็งอาศัยอยู่ได้ใกล้เคียงกับชิ้นเนื้อมะเร็งที่พบในร่างกายมนุษย์ ดังนั้นโครงสร้างสามมิติแคลเซียม-อัลจิเนต จึงถูกพัฒนาขึ้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมา และตรวจสอบการตอบสนองต่อสารต้านมะเร็งเทโมโซโลไมด์ ด็อกโซรูบิซิน และคอร์ไดเซปิน ผลการทดลอง พบว่าเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมาที่เลี้ยงในโครงสร้างสามมิติแคลเซียม-อัลจิเนตมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ลดลง ขณะเดียวกันมีการก่อตัวเป็นก้อนเนื้องอกเพิ่มมากขึ้น และเพิ่มการแสดงออกของยีนในกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง และยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นที่มีความจำเพาะ นอกจากนี้ศักยภาพในการเกิดหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมาแบบสามมิติมีเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากมีการแสดงออกของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่สูงกว่าในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระบบสองมิติ นอกจากนี้เซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมาแบบสามมิติได้รับการทดสอบด้วย

สารต้านมะเร็ง เทโมโซโลไมด์ ด็อกโซรูบิซิน และคอร์ไดเซปิน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมาแบบสามมิติมีความสามารถในการต้านทานต่อสารต้านมะเร็งมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระบบสองมิติ

เพื่อทำความเข้าใจชีววิทยาของมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา และเปิดเผยกลไกการดื้อต่อยาต้านมะเร็ง ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนแบบองค์รวมด้วยแบบแผนทางทรานสคริบโตมิกส์ และวิถีระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของมะเร็งกลัยโอบลาสโตมาแบบสามมิติที่สูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระบบสองมิติ โดยใช้เทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq ผลการวิจัยพบว่า ยีนเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมาแบบสามมิติจำนวน 7,411 และ 3,915 ยีน มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และลดลงตามลำดับ เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมาที่เพาะเลี้ยงในระบบสองมิติ นอกจากนี้การวิเคราะห์จากฐานข้อมูลวิถี KEGG แสดงให้เห็นว่ายีนในวิถีวัฏจักรของเซลล์ และการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอมีการแสดงออกลดลง ขณะที่ยีนในวิถี วิถีไมโทเจน-แอคทิเวเตดโปรตีนไคเนส, ออโต้ฟาจี้, การเมแทบอลิซึมยา-ไซโตโครมพี 450 และ ABC ทรานสปอร์ตเตอร์ มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนดังกล่าวนี้ทำให้เราเข้าใจกลไกที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของมะเร็งกลัยโอบลาสโตมาได้ดียิ่งขึ้น จากผลการทดลองข้างต้นอาจสรุปได้ว่า โครงสร้างสามมิติแคลเซียม-อัลจิเนตสามารถเป็นแบบจำลองที่มีความเป็นไปได้สำหรับการศึกษามะเร็งเนื้อเยื่อระบบประสาทของมนุษย์ การคัดกรองยาต้านมะเร็ง และการระบุเป้าหมายใหม่ระดับโมเลกุล พร้อมทั้งต้นทุนต่ำ และง่ายต่อการใช้งาน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา Nipha

ปีการศึกษา 2561 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

NIPHA CHAICHAROENAUDOMRUNG : FABRICATION OF 3D CALCIUM-ALGINATE SCAFFOLD CELL CULTURE SYSTEM AS A NERVE-TISSUE CANCER MODEL FOR ANTICANCER DRUG STUDIES.
THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PARINYA NOISA, Ph.D. 167 PP.

3D CALCIUM-ALGINATE SCAFFOLDS/ANTICANCER DRUGSCREENING/NERVE-TISSUE CANCER MODEL/CORDYCEPIN/TRANSCRIPTOMIC

Nerve-tissue cancer, in particular glioblastoma and neuroblastoma, is a global challenge to human health. Besides, glioblastoma is the most aggressive type of brain malignancy and highly resistant to chemotherapy, with a median survival rate of 12-15 months for a newly diagnosed glioblastoma, and 5-7 months for recurrent glioblastoma. Cordycepin, a bioactive compound of *Cordyceps* ssp., has been revealed as a strong anti-cancer agent through several pathways under the traditional two-dimension (2D) *in vitro* cell culture condition. However, the mechanisms, by which cordycepin counteracts nerve-tissue cancer, is still poorly understood. In this study, the underlying mechanisms of cordycepin against human nerve-tissue cancer cell line were explored. Here, it was found that cordycepin inhibited cell growth and induced apoptosis in both U-251 glioblastoma and SH-SY5Y neuroblastoma cell lines through the mitochondrial-mediated intrinsic pathway and the modulation of autophagy. However, an emerging view finds that the traditional 2D cell culture may not accurately mimic the three-dimensional environment, in which cancer cells reside. The three-dimensional (3D) cell culture model has been increasingly used to study cancer biology and screen for anticancer agents due to its close mimicry to the *in vivo* tumor biopsies. Therefore, the 3D calcium (Ca)-alginate scaffolds were developed for glioblastoma cell culture and an examination of the responses to the anticancer agents, including temozolomide, doxorubicin and cordycepin. Compared to the 2D culture, glioblastoma cells cultured on the 3D Ca-alginate scaffolds showed reduced cell

proliferation, increased tumor spheroid formation, enhanced expression of cancer stem cell genes, and improved the expression of differentiation potential-associated genes. Additionally, the vascularization potential of the 3D glioblastoma cells was increased, as indicated by a higher expression of tumor angiogenesis biomarker than that of the cells in the 2D culture. Then, the 3D glioblastoma cells were treated with the anticancer agents, including temozolomide, doxorubicin, and cordycepin. The results demonstrated that the 3D glioblastomas presented a greater resistance to the tested anticancer agents than that of the cells in the 2D culture. Additionally, to understand this glioblastoma biology and reveal the mechanism of anticancer drugs resistance, the transcriptomic profiles and molecular pathways were analyzed using Next Generation Sequencing Illumina HiSeq technology. The data demonstrated that glioblastoma cells in the 3D Ca-alginate scaffolds exhibited higher resistance to anti-cancer drugs than the 2D condition. The results revealed that 7,411 and 3,915 genes of 3D glioblastoma were upregulated and downregulated, respectively as compared with the 2D monolayer glioblastoma culture. Further, the KEGG pathway analysis showed that the downregulated genes were mainly enriched in cell cycle and DNA replication pathways, while the upregulated genes were mainly enriched with MAPK signaling, autophagy, drug metabolism-cytochrome P450, and ABC transporter pathways. Such alterations of gene expression gave us a clue to better understand the related-mechanisms to anticancer drug resistance of human glioblastoma. Taken together, the 3D calcium-alginate scaffolds developed in this research could be a feasible platform for human nerve-tissue cancer study, anti-cancer drug screening, and novel molecular target identification with a low-cost and easy-to-use approach.

School of Biotechnology

Academic Year 2018

Student's Signature Nipha

Advisor's Signature