Thesis Title Gelatin Scaffold in Cartilage Tissue Engineering

Author Miss Nuengruethai Khamwaen

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert Chairperson

Assist. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai Member

ABSTRACT

Adult cartilage tissue has limited self-repair capacity, especially in the case of severe damages caused by developmental abnormalities, trauma, or aging-related degeneration-like osteoarthritis. Recently, the search for alternative therapies that might influence the disease process has confirmed that tissue engineering is a viable technique. Tissue engineering has the potential to repair cartilage structures replaced to damage cartilage. In this study, we hypothesized that hyaluronan (HA) could provide superior biological effects on the human chondrocytes in a three-dimensional culture system for tissue engineering. To test this hypothesized, HA 0.07% (v/v) was coated onto gelatin scaffold (Spongostan standard, Johnson & Johnson), and gelatin scaffolds alone were taken as a control. Chondrocytes were isolated from human articular cartilage (HAC), seeded on the scaffolds and incubated 0, 7, 14, 21 days, by changing of the culture medium every three days. The effects of each gelatin scaffold on morphological changes, cell adhesion, proliferation, and extracellular matrix

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

synthesis were analyzed by scanning electron microscopy (SEM), cell attachment test, AlamarBlue assay, dye binding assay (DMMB), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for HA, and immunohistochemical analysis, respectively. Scanning electron microscopy (SEM) showed that large number of chondrocytes attached initially on the surface of the scaffold, the cells showed rounded morphology. Morphologically, cells found on the surface of the scaffold exhibited a flat appearance and slowly form confluent starting from 14 to 21 days of the growth. When chondrocytes were seeded with HA treated gelatin scaffold, a significantly enhanced cellular attachment was observed compared to HA untreated gelatin scaffold ($p<0.05$). AlamarBlue assay was used to examine the proliferation of chondrocytes. The chondroctyes on the HA treated gelatin scaffold had the higher proliferation rate (%) than the chondrocytes which grew on the non-HA treated scaffold (%). Both sulfated glycosaminoglycan (sGAG) and hyaluronic acid (HA) released were higher in gelatin treated with HA0.07% scaffold than in control scaffolds without HA0.07%. Extracellular matrix staining by Safranin O and immunohistochemistry for WF6 were elevated in gelatin treated with HA0.07% scaffolds.

These results suggest that hyaluronan (HA) was treated onto the surface of gelatin scaffold enhance the attachment, proliferation, and possible application as a matrix for three-dimensional growth of human chondrocytes for cartilage tissue engineering. Gelatin scaffold, which is biodegradable and non-toxic, also could be applied for clinical and investigated in animal model.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การใช้โครงร่างเจลาตินสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

ผู้เขียน นางสาว หนึ่งฤทัย คำแหวน

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ ประธานกรรมการ

ผศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย กรรมการ

บทคัดย่อ

เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่มีอายุมากมีข้อจำกัดในความสามารถของการซ่อมแซมตัวเอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ถูกทำลายอย่างรุนแรงไม่ว่าจะโดยสาเหตุจากการเจริญของกระดูกอ่อนอย่างผิดปกติ ได้รับบาดเจ็บหรือเกิดโรคกระดูกเสื่อมซึ่งสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มมากขึ้น เป็นต้น ปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการรักษาทางเลือกใหม่ซึ่งได้มีการนำเทคนิควิศวกรรมเนื้อเยื่อเข้ามามีบทบาทในการรักษาโรคให้ได้ผลดียิ่งขึ้น ซึ่งในการศึกษานี้ได้ตั้งสมมุติฐานเกี่ยวกับผลของไฮยาลูโรแนนต่อเซลล์คอนโดรซัยต์ของคนในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ ดังนั้นเพื่อทดสอบสมมุติฐานนี้จึงได้นำโครงร่างเจลาติน (Spongostan standard, Johnson & Johnson) มาเคลือบด้วยไฮยาลูโรแนนที่ความเข้มข้น 0.07% ปริมาตรต่อปริมาตร และมีโครงร่างเจลาตินเป็นตัวควบคุม จากนั้นแยกเซลล์กระดูกอ่อนจากกระดูกอ่อนของคนแล้วนำไปเติมลงในโครงร่างเจลาตินในแต่ละกลุ่ม และนำไปเพาะเลี้ยง จนครบ 0, 7, 14, และ 21 วัน โดยจะมีการเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน ซึ่งจะมีการวัดผลของการเปลี่ยนแปลงของโครงร่างเจลาตินแต่ละกลุ่ม และเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระดูกอ่อน โดยจะศึกษาลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนไปโดยใช้ scanning electron microscopy (SEM) ซึ่งพบลักษณะของเซลล์กระดูกอ่อนมีรูปร่างกลม และมีการเจริญของเซลล์บนผิวโครงร่างเจลาตินที่เคลือบด้วย HA0.07% เป็นจำนวนมากและมีลักษณะเป็นแผ่นมากขึ้น เนื่องจากมีการสร้าง เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ECM) เติมเต็มรูพรุนของโครงร่างเจลาตินนั่นเอง การวัดการเกาะติดของเซลล์กระดูกอ่อนพบว่าในกลุ่มที่เคลือบด้วยไฮยาลูโรแนน มีการเกาะติดของเซลล์มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เคลือบ เมื่อการวัดการแบ่งตัวของเซลล์กระดูกอ่อนโดยใช้วิธี AlamarBlue พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีกว่าในกลุ่มควบคุม ส่วนการหลั่งของ ECM ได้แก่ ซัลเฟตไกลโคซามิโนไกลแคน วัดโดยวิธี dye binding (DMMB) และไฮยาลูโลนิก แอซิด วัดโดยวิธี ELISA พบว่าทั้งสองการทดลองมีการหลั่งเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่มีการเคลือบด้วย HA เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์โดยวิธี immunohistochemistry ซึ่งนำโครงร่างเจลาตินแต่ละกลุ่มไปย้อมด้วย Safranin O พบว่าย้อมติดสีแดงในส่วนของ GAG และ แอนติบอดี WF6 ซึ่งมีความจำเพาะต่อส่วนประกอบของสายคอนดรอยติน ซัลเฟต พบว่ามีการติดสีมากกว่าในกลุ่มที่เคลือบด้วย HA เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เคลือบด้วย HA แสดงว่ามีการสร้างส่วนประกอบของ ECM มากขึ้น

จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า ไฮยาลูโลแนนที่เคลือบลงบนโครงร่างเจลาตินมีส่วนช่วยเพิ่มการเกาะติดและการแบ่งตัวของเซลล์กระดูกอ่อนอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ในการนำโครงร่างนี้ซึ่งสามารถย่อยสลายได้และไม่เป็นพิษ ไปประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนของคนในโครงร่างสามมิติไปใช้ในทางคลินิก และนำไปศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved