Thesis Title The Study of Optimal Cartilage Preserving Condition for Cartilage Tissue Engineering

Author Miss Wichaya Sriutta

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Dr. Peraphan Pothacharoen	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ongchai	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Dumnoensun Pruksakorn, M.D.	Co-advisor

ABSTRACT

Autologous chondrocyte implantation (ACI) is the promising method for cartilage defect treatment. The major concern is the viability and quality of the chondrocytes for implantation. The purpose of this study is to optimize the storage condition for maintaining biological properties of the preserved cartilage for tissue engineering application. The human cartilage explants were harvested from fresh mortise and tenon joint of 3 donors and were stored in different culture medium either 4 or -80^{o}C for 6 weeks. At 1, 2, 3 and 6 weeks after harvest, the chondrocytes were isolated and analyzed for cell viability and chondrogenic gene expression compare to chondrocytes which were isoloated form fresh cartilage by histological analysis and quantitative RT-PCR, respectively. For the shortest of preserved period, chondrocyte viability were 50-70% and 30-60% after stored for 1 week at 4 and -80 ◦C, respectively. The decreased of cell viability were observed when stored for over 1 week. The chondrocytes which isolated from the preserved cartilage in 10% DMSO chondrogenic medium for 1 week showed the highest retaining of the chondrogenic genes expression (*SOX9*, *ACAN* and *COL2A1)* when compared to the fresh isolated chondrocytes. The proliferation rate of isolated

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

chondrocytes were measured by Alamar blue assay. It was found that isolated chondrocyte from preserved cartilage in 10% DMSO chondrogenic medium for 1 week showed the best proliferation rate when compared to the other conditions. Furthermore, The examination of the expression of apoptosis genes (*BAX, BAK* and *CASP3)* and cell cycle genes (*CCND1, CDK4* and *CDK6*) found that the long term cryopreservation (-80˚ C) showed the higher expression of the apoptosis and cell cycle genes. The decreasing of proliferation rate of the isolated chondrocytes from cryopreservation was observed and less than the isolated chondrocytes from 4˚ C preservation. From the cell viability, proliferation rate and chondrogenic properties analysis, it could be concluded that the optimal storage condition for maintaining cartilage quality was 10% DMSO chondrogenic medium at 4℃ for 1 week. The isolated chondrocytes showed highest cell viability and chondrocyte properties remaining when compared to the fresh chondrocytes. Incidentally, this quality of the preserved cartilage in the chosen condition was further investigated in the rabbit ACI model *(in vivo).* The chondrocytes which used for implantation were isolated and expanded from the preserved cartilage. After implantation of 6 months, the macroscopic assessment of the ACI rabbit knees found that there was no difference between the fresh chondrocytes implantation (autologous transplantation) and the preserved chondrocytes implantation (allologous implantation). The releasing of the chondroitin sulfate (WF6 epitopes) to the serum, which reflects the degradation of the cartilage were not difference between the ACI rabbits and the full thickness defect with no treatment rabbit. However, the investigation of the macroscopic assessment and also histological evaluation of neocartilage from these groups should be further studied. Nevertheless, we suggested that the optimal condition (10% DMSO chondrogenic medium for 1 week) which be chosen have passed all criterias and rather maintained similarly quality as fresh cartilage. The preserved condition has the value in cartilage banking for clinical treatment which should be use for both *ex vivo* and *in vivo* manipulations for allograft chondrocytes implantation.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษากระดูกอ่อนเพื่อใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ผู้เขียน นางสาววิชายา ศรีอุทธา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ. ดร. พีรพรรณ โปธาเจริญ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ.ดร. นพ. ดำเนินสันต์ พฤกษากร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การผ่าตัดปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนเป็นวิธีการรักษารอยโรคบริเวณกระดูกอ่อนที่ใช้ในปัจจุบัน ซึ่งปัจจัยสำคัญในการปลูกถ่ายคือ อัตราการรอดชีวิตและคุณภาพของเซลล์กระดูกอ่อนสำหรับนำไปปลูกถ่าย ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงต้องการศึกษาวิธีการเก็บรักษากระดูกอ่อนในสภาวะต่างๆให้คงคุณภาพใกล้เคียงกับกระดูกอ่อนสด และสามารถประยุกต์ใช้ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้ ทำการเก็บตัวอย่างกระดูกอ่อนจากบริเวณกระดูกข้อเท้าของผู้บริจาคจำนวน 3 คน แบ่งกลุ่มการเก็บรักษา ในสภาวะที่แตกต่างกัน 8 กลุ่ม ซึ่งเห็บที่อุณหภูมิ 4 และ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ นำมาตรวจสอบคุณภาพของกระดูกอ่อนโดยการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่เป็นสารบ่งชี้ของกระดูกอ่อนด้วยวิธี Real-time PCR เมื่อครบเวลาการเก็บ 1, 3 และ 6 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสด การเก็บรักษาเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในอาหารชนิด Chondrogenic medium ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์กระดูกอ่อนใกล้เคียงกับเซลล์กระดูกอ่อนสดมากที่สุดถึงร้อยละ 50-70

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่สำคัญของกระดูกอ่อนได้แก่ SOX9, ACAN และ COL2A1 และผลจากการเจริญเติบโตของเซลล์โดยใช้วิธีการ Alamar Blue assay ใกล้เคียงกับการแสดงออกและการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกอ่อนสดมากที่สุด และหากเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จะพบว่าผลจากลักษณะทางจุลกายวิภาค การแสดงออกของยีนรวมถึงการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกอ่อนลดน้อย สอดคล้องกับการเก็บเป็นระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นด้วย ในส่วนของสัตว์ทดลองให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยมีการทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของการต่ายตามสภาวะที่ค้นพบในช่วงต้นและทำการปลูกถ่ายโดยใช้เซลล์กระดูกอ่อนที่ผ่านการเก็บรักษาเปรียบเทียบกับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์กระดูกอ่อนสด ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในปัจจุบัน ผลการตรวจสอบด้วยปริมาณของคอนดรอยตินซัลเฟตอิพิโทป (WF6) และลักษณะทางพยาธิวิทยาประกอบกับจุลพยาธิวิทยาและกายภาพของกระดูกอ่อนพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในเรื่องของการประเมินอาการทางคลินิกระหว่างกระต่ายทั้งสองกลุ่ม ระดับของสารบ่งชี้ทางชีวภาพไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการรักษาการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อโดยการใช้การปลูกถ่ายเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่ผ่านการเก็บรักษานับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาการบาดเจ็บของกระดูกอ่อนผิวข้อในผู้ป่วยได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved