การศึกษาเพื่อหาระดับของเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างหลอดเลือด จากเส้นเลือดแดงโคโรนารี ในคนไข้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด

นาย พงษ์ศักดิ์ อินทรเพชร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETERMINATION OF INTRACORONARY ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME

Mr. Phongsak Intharaphet

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medicine
Department of Medicine, Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาเพื่อหาระดับของเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างหลอดเลือดจากเส้นเลือดแดงโคโรนารี ในคนไข้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด
โดย	นาย พงษ์ศักดิ์ อินทรเพชร
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุพจน์ ศรีมหาโชตะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธานินทร์ อินทรกำธรชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุพจน์ ศรีมหาโชตะ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชุษณา สวนกระต่าย)

..... กรรมการ

(อาจารย์ วีนัส อุดมประเสริฐกุล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พงษ์ศักดิ์ อินทรเพชร : การศึกษาเพื่อหาระดับของเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างหลอดเลือดจากเส้นเลือดแดงโคโรนารี ในคนไข้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (DETERMINATION OF INTRACORONARY ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME) อ. ที่ปรึกษา : รศ. นพ. สุพจน์ ศรีมหาโชตะ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. นพ. เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์. 81 หน้า.

การซ่อมแซมกล้ามเนื้อหัวใจ หลังจากเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน ซึ่งส่งผลให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายนั้น สามารถแสดงให้เห็นโดยการตรวจพบเซลล์ต้นกำเนิด การสร้างหลอดเลือดในกระแสเลือด ซึ่งยังพบว่าระดับของเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างหลอดเลือดดังกล่าวนี้ ยังแปรผันตามกับปริมาณกล้ามเนื้อหัวใจที่ได้รับอันตราย แต่ยังไม่มีการศึกษาปริมาณ เซลล์ดังกล่าวนี้ในหลอดเลือดแดงโรโรนารี ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ได้รับอันตรายว่าระดับเซลล์จะเป็นอย่างไร

วิธีการศึกษา: คนไข้ 35 คนที่เข้ารับการรักษาต่อ ในโรงพยาบาลและมาด้วยโรคหัวใจขาดเลือด โดยแบ่งเป็นกลุ่มกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและคนไข้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเรื้อรัง ที่มาทำการตรวจสวนหัวใจหลังจากผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมการศึกษา จะได้รับการเก็บเลือดจากหลอดเลือดดำส่วนปลายและหลอดเลือดแดงโคโรนารี เพื่อนำไปหาระดับของเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างหลอดเลือด โดยวิธีโฟลไซโตเมตรี

ผลการศึกษา ระดับของเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างหลอดเลือดจาก หลอดเลือดดำส่วนปลายและหลอดเลือดแดงโคโรนารี ในคนไข้ทั้ง 2 กลุ่ม แสดงดังตาราง โดยระดับของเซลล์ดังกล่าวในหลอดเลือดแดงโคโรนารี จะพบว่ากลุ่มกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันจะมีมากกว่ากลุ่มกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเรื้อรัง และระดับเซลล์ในหลอดเลือดดำส่วนปลายก็พบว่าระดับเซลล์จะสูงกว่าในกลุ่มกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน แม้ว่าความแตกต่างจะยังไม่ชัดเจน (ระดับของ แสดงเป็น Median (IQR))

แหล่งของเซลล์	โรคหัวใจขาดเลือดเรื้อรัง จำนวน 15 คน	โรคหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันจำนวน 20 คน	p
หลอดเลือดแดงโคโรนารี	996 (606- 3,818)	11,591 (2,276-98,163)	0.0001
หลอดเลือดดำ	2,948 (441- 6,956)	8,455 (1,402-52,209)	0.011

สรุป ระดับของเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างหลอดเลือดจากหลอดเลือดแดงโคโรนารี พบว่ามีระดับสูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเรื้อรัง และในกลุ่มผู้ป่วยกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน ก็มีระดับของเซลล์ดังกล่าวในหลอดเลือดแดงโคโรนารี สูงกว่าในหลอดเลือดดำส่วนปลาย

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

487 47575 30 : MAJOR MEDICINE (CARDIOLOGY)
KEY WORDS : ENDOTHELIAL PROGENITOR CELL / ACUTE CORONARY SYNDROME / CHRONIC STALE ANGINA / FLOW CYTOMETRY

PHONGSAK INTHARAPHET : DETERMINATION OF INTRACORONARY ENDOTHELIAL CELLS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUPHOT SRIMAHACHOTA, M.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. KEARKIAT PRADITPORNSILPA, M.D. 81 pp.

Background Repair of infarcted myocardium after acute coronary syndrome was previously documented by determination of circulating endothelial progenitor cell in peripheral vein which show proportionated number compare with extent of myocardial injury. Exact number of EPC in coronary artery which are the site of injury was not been vigoriously defined.

Method Thirty five patients were enrolled with the diagnosis of acute coronary syndrome (ACS, n = 20) and stable coronary artery disease (CSA, n = 15). Blood samples were drawn simultaneously from coronary arteries and peripheral veins. The concentration of EPC positive for CD133 and VEGFR were determined with flow cytometry.

Result The concentrations of EPC (cell/ml) from coronary arteries and peripheral veins in the 2 groups were shown in the Table. The intracoronary levels were significantly different, being highest in the ACS group. The levels of venous EPC followed the same trend but did not reach statistical significance.

Site of cells	CSA ,n = 15 Median (IQR)	ACS, n = 20 Median (IQR)	p (ANOVA)
Coronary artery	996(606- 3,818)	11,591 (2,276-98,163)	0.0001
Vein	2,948 (441- 6,956)	8,455 (1,402-52,209)	0.011

Conclusion The concentration of intracoronary EPC in patient with ACS was higher than CSA. Level of intracoronary artery EPC was higher than venous EPC only in ACS group. These findings suggested the homing of such cells to the injury site.

Department Medicine Student's signature

Field of study Medicine Advisor's signature

Academic year 2006 Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์นายแพทย์สุพจน์ ศรีมหาโชตะอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ผู้ให้ความรู้ด้านการตรวจสวนหัวใจและหลอดเลือด การวางแผนงานการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ให้ความรู้ด้านการศึกษาเรื่องเซลล์ และการทำวิจัย รวมทั้งให้คำปรึกษาด้านการตรวจทางห้องปฏิบัติการ การวางแผนงานการทำวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ วสันต์ อุทัยเฉลิม ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัยและให้ความรู้ด้านการตรวจสวนหัวใจและหลอดเลือด

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ วศิน พุทธารี ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัยและให้ความรู้ด้านการตรวจสวนหัวใจและหลอดเลือด

ขอขอบคุณ อาจารย์ นายแพทย์ จักรพันธ์ ชัยพรมประสิทธิ์ ผู้ให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัยและให้ความรู้ด้านการตรวจสวนหัวใจและหลอดเลือด

ขอขอบคุณแพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาวิชาโรคหัวใจทุกท่านผู้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บเลือดตัวอย่างและร่วมดูแลรักษาผู้ป่วยหลังการตรวจสวนหัวใจและหลอดเลือดที่เข้าร่วมการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ หน่วยโรคไตและเจ้าหน้าที่ห้องตรวจสวนหัวใจและหลอดเลือดทุกท่านซึ่งมีจิตใจเอื้อเฟื้อและได้ให้กำลังสนับสนุนการวิจัยโดยมิได้คำนึงถึงสิ่งตอบแทนจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ผู้ป่วยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจ

ขอขอบคุณิดา มารดาที่คอยให้กำลังใจและอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้และอบรมด้วยดีตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย……	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..	จ
กิตติกรรมประกาศ……..	ช
สารบัญ……	ซ
สารบัญตาราง……	ฌ
สารบัญรูปภาพ……...	ญ
สารบัญคำย่อ ……	ฏ
1 บทนำ……..	1
ความสำคัญและที่มาของการวิจัย.....	1
คำถามของการวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	3
วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
ปัญหาทางจริยธรรม……	3
ข้อจำกัดของการวิจัย……	4
ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
Basic Knowledge of Stem Cells and Clinical Utilities…….....	5
Clinical Researches of Endothelial progenitor cells……	36
การตรวจหาระดับของ เซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือด (endothelial progenitor cell) ……..	42
ปัจจัยที่มีผลต่อระดับของ EPC ในกระแสเลือด (Physiclogial factor and EPC)…….....	42
3 วิธีการวิจัย ……..	46
ประชากร……	46
การสังเกตและการวัด……	47
การรวบรวมข้อมูล……	47
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	48
4 ผลการวิจัย.....	49

หน้า

ข้อมูลพื้นฐาน..... 49
จำนวน endothelial progenitor cell ในคนไข้ acute coronary syndrome ,chronic stable angina 50
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 57
สรุปผลการวิจัย..... 57
อภิปรายผล..... 57
ข้อเสนอแนะ..... 62
รายการอ้างอิง..... 62
ภาคผนวก..... 77
ประวัติผู้เขียนนิพนธ์ 79

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงเซลล์ที่จะใช้เป็นเซลล์ในการปลูกถ่าย.....	16
2.2	แสดงข้อมูลการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูก (Bone Marrow Cell Implantation)……..	23
2.3	เปรียบเทียบข้อมูลการตรวจการทำงานของหัวใจจากกลุ่มที่รักษาด้ายการปลูกถ่ายเซลล์และกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีมาตรฐานที่เวลา 3 เดือน.....	26
2.4	แสดงผลการตรวจการการทำงานของหัวใจ โดยการฉีดสารทึบแสง (LV Function Assessed by Analysis of LV Angiography) ในคนไข้กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์.....	27
2.5	แสดงผลการตรวจการการทำงานของหัวใจ โดยการฉีดสี (LV Function Assessed by Analysis of LV Angiography) ในคนไข้กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีมาตรฐาน (control group).....	27
2.6	แสดงข้อมูลของกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์และกลุ่มควบคุมที่เวลาก่อนและหลังการปลูกถ่าย 2 เดือน.....	32
2.7	แสดงปริมาตรและกล้ามเนื้อของหัวใจห้องล่างซ้าย (Left ventricular volume and mass indices) , การบีบตัว (global LVEF) , และปริมาณเลือดที่มาเลี้ยงกล้ามนื้อของหัวใจ จากการตรวจด้วย MRI ที่เวลาก่อนและหลังปลูกถ่ายเซลล์ 6 เดือน....	34
2.8	แสดงการบีบตัวของกล้ามเนื้อของหัวใจที่เวลาก่อนและหลังปลูกถ่ายเซลล์ 6 เดือน (ตรวจด้วย MRI)…….	35
4.1	แสดงข้อมูลพื้นฐานผู้ ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา.....	51
4.2	ผลการตรวจ Flow cytometry จากคนไข้ในกลุ่ม acute coronary syndrome จาก coronary (A) และ peripheral vein site (B)…….	52
4.3	จำนวน Endothelial progenitor cell จากเส้นเลือด peripheral vein ในคนไข้.....	53

สารรูปภาพ

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงเซลล์ที่จะใช้เป็นเซลล์ในการปลูกถ่าย.....	11
2.2	แสดงข้อมูลการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูก (Bone Marrow Cell Implantation)……..	12
2.3	เปรียบเทียบข้อมูลการตรวจการทำงานของหัวใจจากกลุ่มที่รักษาด้ายการปลูกถ่ายเซลล์และกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีมาตรฐานที่เวลา 3 เดือน.....	14
2.4	แสดงผลการตรวจการการทำงานของหัวใจ โดยการฉีดสารทึบแสง (LV Function Assessed by Analysis of LV Angiography) ในคนไข้กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์.....	24
2.5	แสดงผลการตรวจการการทำงานของหัวใจ โดยการฉีดสี (LV Function Assessed by Analysis of LV Angiography) ในคนไข้กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีมาตรฐาน (control group).....	28
2.6	แสดงข้อมูลของกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์และกลุ่มควบคุมที่เวลาก่อนและหลังการปลูกถ่าย 2 เดือน……..	30
2.7	แสดงปริมาตรและกล้ามเนื้อของหัวใจห้องล่างซ้าย (Left ventricular volume and mass indices) , การบีบตัว (global LVEF) , และปริมาณเลือดที่มาเลี้ยงกล้ามนื้อของหัวใจ จากการตรวจด้วย MRI ที่เวลาก่อนและหลังปลูกถ่ายเซลล์ 6 เดือน....	34
2.8	แสดงการบีบตัวของกล้ามเนื้อของหัวใจที่เวลาก่อนและหลังปลูกถ่ายเซลล์ 6 เดือน (ตรวจด้วย MRI).....	35
4.1	การตรวจ coronary angiography.....	51
4.2	แสดงจำนวน endothelial progenitor cell จากหลอดเลือด coronary ในคนไข้ acute coronary syndrome chronic stable angina……...	52
4.3	แสดงจำนวน endothelial progenitor cell จาก peripheral vein ในคนไข้ acute coronary syndrome chronic stable angina	52
4.4	ผลการตรวจ Flow cytometry จากคนไข้ในกลุ่ม stable CAD จาก coronary (A) และ peripheral vein site (B).....	53
4.5	กราฟแท่ง แสดงจำนวน endothelial progenitor cell จากหลอดเลือด coronary (A)จาก หลอดเลือด peripheral vein(B) ในคนไข้ acute coronary syndrome chronic stable angina และ normal…….	55

ตารางที่ หน้า

4.6 Endothelial progenitor cell จาหลอดเลือด peripheral vein และ จากหลอดเลือด แดง coronary ในคนไข้ acute coronary syndrome และ chronic stable angina..... 56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญคำย่อ

EPC	endothelial progenitor cells
AMI	acute myocardial infarction
CD	cluster of differentiation
VGFR	vascular endothelial groth factor receptor
ACS	acute coronary syndrome
CSA	chronic stable angina
IQR	interquartile range
LV	left ventricle
LVEF	left ventricular ejection fraction
ASTEMI	acute ST elevation myocardial infarction
NSTEMI	non ST elevation myocardial infarction
UA	unstable angina
CAD	coronary artery disease
DNA	deoxy riinucleic acid
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
SDF-1	stromal derieved factor 1
CABG	coronary artery bypass graft
LAD	left anterior descending artery
OM	obtuse marginal
D1	first diagonal
PL	posteriolateral srtery
PD	posterior descending artery
TOPCARE	Transplantation of Progenitor Cells and Regen- eration Enhancement
BOOST	The Bone Marrow Transfer to Enhance ST Elevation Infarct Regeneration
PET	positron emission tomography
SPECT	single photon emission computer tomography
SD	standard deviation
CFU	colomy forming unit

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CRP	C-reactive protein
ACEI	angiotensin converting enzyme inhibitor
ARB	angiotensin receptor blocker
CPK	creatine phosphokinase
PCI	percutaneous coronary intervention
WMSI	wall motion score index
LDL	low density lipoprotien
HDL	high density lipoprotien
NYHA	New York Heart assocciation
ACC	American college of cardiology
AHA	American heart association

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ภาวะหัวใจล้มเหลว (congestive heart failure) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดหลังจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือด (AMI: acute myocardial infarction) ยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญและการรักษาในปัจจุบันก็ยังมีข้อจำกัดในการยับยั้งการเกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้างใหม่ (ventricular remodeling) ของกล้ามเนื้อหัวใจและภาวะหัวใจล้มเหลว การรักษาภาวะหัวใจตายเฉียบพลันโดยใช้ stem cell จึงได้รับความสนใจในการที่จะนำมาเป็นวิธีการที่จะสร้างเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจทดแทนเซลล์ที่ตายไป แม้ตอนนี้จะมีข้อมูลมากมายจากสัตว์ทดลองที่เชื่อว่าการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวนี้อาจจะสามารถใช้ได้จริง แต่บทบาทในการที่นำมาใช้ในทางปฏิบัติเพื่อให้ได้ประโยชน์ในคนไข้กล้ามเนื้อหัวใจตายนั้นยังไม่แน่ชัด และผลในระยะยาวก็ยังไม่ทราบดี เนื่องจากการติดตามผลยังไม่ยาวพอและมีตัวอย่างคนไข้ค่อนข้างน้อยที่จะมาสรุปข้อมูล มีข้อมูลจากการศึกษาใน Phase I ที่แสดงถึงความเป็นไปได้และอาจจะเป็นผลดีในการที่จะนำมารักษาคนไข้หลังจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือด การศึกษาวิจัยการรักษาด้วย stem cell ในอนาคตคงจะให้คำตอบเกี่ยวกับการนำวิธีการรักษานี้มาใช้ต่อไป

ปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ทำให้เกิดภาวะ atherosclerosis โดยการเหนียว นำให้เกิดการเสียการทำงานเพื่อการทำลาย เซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) ซึ่งภาวะที่มีผลต่อเซลล์บุหลอดเลือดดังกล่าวนี้ จะทำให้ในที่สุดเกิดเป็นโรคทางหัวใจและหลอดเลือดขึ้นมา ไม่ว่าจะเป็นหัวใจขาดเลือด (myocardial infarction) หัวใจล้มเหลว (congestive heart failure), โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) เป็นต้น

หลังจากที่มีการทำลายของเซลล์บุหลอดเลือด ถ้าจะมีกระบวนการของการซ่อมแซมซึ่งจากหลักฐานเชื่อว่า มีเซลล์ซึ่งมีความสามารถในการพัฒนา เพื่อจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์บุผิวได้ซึ่งเซลล์ดังกล่าวเจริญมาจาก เซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูกเป็นหลักแต่อาจมาจากแหล่งอื่นได้ เช่น กล้ามเนื้อในอวัยวะ เช่น หัวใจเองแต่ประมาณน้อยกว่ามาก

เซลล์กลุ่มนี้จึงเรียกว่า endothelial progenitor cell ซึ่งเป็น subset ของ pluripolent stem cells ซึ่งจะแสดง CD34 , CD133 และ VGFR บนผิวเซลล์ การปล่อยเซลล์ดังกล่าวนี้ จากแหล่งต้นกำเนิดซึ่งส่วนใหญ่ คือไขกระดูกมาสู่กระแสเลือดเพื่อ จะถูกส่งไปบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บนั้น เป็นการตอบสนองจากการหลั่งของ cytokine บางอย่างที่ไปกระตุ้นให้ไขกระดูก ปลดปล่อยเซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือดเหล่านี้ออกมา และหลังจากที่ EPCs ออกมาในกระแสเลือดแล้ว ก็จะถูกนำไปสู่บริเวณที่

ได้รับอันตราย (homing process) ซึ่งจะทำให้มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ และซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับอันตราย

ข้อมูลจากสัตว์ทดลองและการศึกษาในมนุษย์ สนับสนุนบทบาทของการขาดเลือด (tissue ischemia) ว่าเป็นปัจจัยหนึ่งในการทำให้มีการปลดปล่อยของ EPCs จากแหล่งกำเนิดมาสู่กระแสเลือดโดย cytokine ที่มีความสำคัญ คือ vascular endothelial growth factor (VEGF)และ stroke cell derive factor -1 (SDF-1)

การปลดปล่อยของ endothelial progenitor cells ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ทั้งในกรณีของกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและกลุ่มที่เป็น chronic stable angina ได้รับการศึกษาและพบปริมาณเซลล์ดังกล่าวในกระแสเลือด (peripheral blood) แปรผันกับระดับของความรุนแรงซึ่งนั่นก็คือ พบ EPCs ปริมาณมากกว่าในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน

อย่างไรก็ตาม ตั้งแต่ขั้นตอนการปลดปล่อย endothelial progenitor cells (mobilization) และการนำ cell ดังกล่าวมาจนถึงแหล่งที่เกิดอันตราย ซึ่งหมายถึงหลอดเลือดแดง coronary (coronary artery) ยังมีข้อมูลอยู่น้อย และระดับของ endothelial progenitor cells ในหลอดเลือด coronary ในผู้ป่วยกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดก็ยังไม่มีการศึกษาชัดเจน ในการศึกษานี้จึงพยายามที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ endothelial progenitor cells ในหลอดเลือดแดง coronary กับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเพื่อดูว่ามีความสัมพันธ์ดังเช่นในหลอดเลือดดำส่วนปลาย (peripheral blood) หรือไม่ และ endothelial progenitor cells ในคนไข้รายเดียวกันนั้น ใน peripheral blood และในหลอดเลือดแดง coronary จะมีความสัมพันธ์กันหรือไม่

คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก มีความแตกต่างกันของระดับ endothelial progenitor cells (EPC) ในคนไข้กลุ่มกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (รวมถึง ASTEMI, NSTEM และ unstable angina) และกลุ่มที่เป็น chronic stable angina หรือไม่

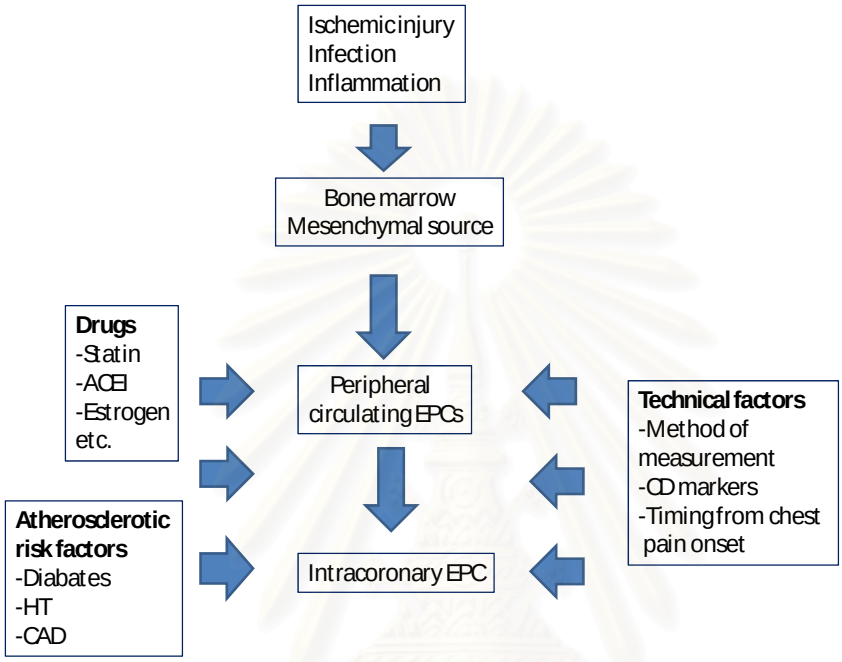
คำถามรอง มีความแตกต่างกันของระดับของ endothelial progenitor cells ในหลอดเลือด coronary และ peripheral blood ในคนไข้ทั้งสองกลุ่มหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1). เพื่อหาระดับของ endothelial progenitor cells ในหลอดเลือดแดง coronary ของผู้ป่วย acute coronary syndrome เปรียบเทียบกับกลุ่ม chronic stable Angina

2). เพื่อหาระดับของ endothelial progenitor cells ในหลอดเลือดแดง coronary เปรียบเทียบกับ ใน peripheral blood ในคนไข้ทั้งสองกลุ่ม

กรอบแนวความคิดในการวิจัย



วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษา cross-sectional study ที่มีกลุ่ม control โดยตรวจวัดระดับของ endothelial progenitor cell ในผู้ป่วย acute coronary syndrome และ chromic stable angina แล้วทำการวิเคราะห์เพื่อหาระดับ endothelial progenitor cells ในคนไข้ทั้งสองกลุ่ม ที่มารับการรักษาที่ รพ.จุฬาลงกรณ์

1.6 ปัญหาทางจริยธรรม

เนื่องจากผู้ป่วยที่เข้าร่วมวิจัย เป็นผู้ป่วยที่มารับการรักษาตามปกติ ในหน่วยหัวใจและหลอดเลือดและขั้นตอนการรักษา และหัตถการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ก็เป็นไปตามมาตรฐานการรักษา แต่สิ่งที่เพิ่มเติมคือ ผู้ป่วยจะได้รับการเก็บเลือดจากหลอดเลือดดำ และเลือดจากหลอดเลือดแดง coronary ขณะทำการตรวจสวนหัวใจ (cardiac catheterization) โดยปริมาณเลือดที่เจาะ คือ 20 ml ในแต่ละตำแหน่งรวมปริมาณ 40 ml ต่อคนไข้ 1 คน คือเป็นปริมาณที่น้อยและไม่มีผลต่อภาวะ hemodynamic ของผู้ป่วย รวมทั้งไม่ทำให้ขั้นตอนการรักษามีความล่าช้าแต่ประการใด ทั้งนี้

การศึกษานี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในงานวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อจำกัดของการวิจัย

1). เนื่องจากเป็นการศึกษา ทั้งในกลุ่มคนไข้ที่เป็นภาวะกล้ามเนื้อเฉียบพลันและ chronic stable angina ซึ่งต้องได้รับการทำ coronary angiography โดยคนไข้ทั้งสองกลุ่ม ที่จะพิจารณาทำการตรวจ angiography ดังกล่าว มีทั้งกรณีฉุกเฉิน และเป็นตามตารางที่ได้รับการวางแผนไว้ ทำให้เกิดความไม่แน่นอนในการที่จะเก็บตัวอย่างได้ต่อวัน

2). เนื่องจากไม่มีการเก็บเซลล์ เพื่อรอขั้นตอนตรวจหา EPC ที่ดี ดังนั้นจึงไม่สามารถเก็บเลือดตัวอย่าง ในกรณีที่ผู้ป่วยมานอกเวลาได้

3). การตรวจดังกล่าว ต้องใช้เวลานานและขั้นตอนซับซ้อน จึงทำให้การตรวจเป็นไปได้อย่างมาก 2 คน/วัน และจะต้องส่งเลือดตรวจก่อน 10.00 - 12.00 น. ทำให้บางวันอาจได้จำนวน case เพียง 1 case หรือไม่ได้เลย

4). ห้องปฏิบัติการต้องให้บริการกับงานวิจัยอื่น รวมทั้งการบริการผู้ป่วยอื่นด้วย จึงไม่สามารถทำได้ทุกวัน ส่วนใหญ่แล้วประมาณ 2-3 วัน/สัปดาห์

5). การตรวจทางห้องปฏิบัติการ นอกจากขั้นตอนซับซ้อนและใช้เวลานานแล้ว สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ เป็นสารเคมีที่ไม่มีจำหน่ายโดยตรง จึงทำให้มีบางช่วงที่น้ำยาดังกล่าวหมด และต้องรอการสั่งซื้อ

6). เจ้าหน้าที่ ที่สามารถตรวจทางห้องปฏิบัติการได้ มีเพียง 1 คน ทำให้บางช่วงที่เจ้าหน้าที่ลาหรือไม่สามารถปฏิบัติหน้าที่ได้ ทำให้การเก็บตัวอย่างล่าช้าออกไป

7). เนื่องจากเป็นการวิจัยระดับเซลล์ ซึ่งอยู่ในช่วงแรก ๆ ของการพัฒนา ทำให้ยังขาดความพร้อมในหลาย ๆ ด้าน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1). ทราบจำนวนของ endothelial progenitor cells ที่ถูกปลดปล่อยจากแหล่งกำเนิด ซึ่งส่วนใหญ่คือไขกระดูก ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน และกลุ่มที่เป็น stable CAD เพื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาเปรียบเทียบกันว่า ผลของ injury ที่มากกว่าในกลุ่มกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน จะแตกต่างกับกลุ่ม stable CAD อย่างไร

2). ได้ทราบความสัมพันธ์ของระดับ endothelial progenitor cells ในหลอดเลือดแดง coronary และใน peripheral blood ในคนไข้ ทั้ง 2 กลุ่ม เพื่อดูว่าระดับของ endothelial progenitor cells ที่มาจากทั้ง 2 ที่ จะสัมพันธ์กันหรือไม่

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Basic knowledge of stem cells and clinical utilities

ภาวะหัวใจล้มเหลว (congestive heart failure) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดหลังจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือด (myocardial infarction) ถ้าจะประมาณแล้วก็มีผลต่อผู้คนนับล้าน และเป็นสาเหตุอันดับต้น ๆ ของการเข้านอนโรงพยาบาลของคนไข้อายุ 65 ปีขึ้นไป [1] จุดมุ่งหมายสำคัญของแพทย์ที่ดูแลคนไข้ในช่วงภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันก็คือพยายามเปิดเส้นเลือดให้เร็วที่สุดและเก็บกล้ามเนื้อหัวใจที่มีชีวิตอยู่ให้มากที่สุด ถ้าไม่สามารถทำให้เลือดกลับไปเลี้ยงกล้าม เนื้อหัวใจได้ทันก็จะเกิดภาวะต่างๆตามมาเช่น การทำงานของหัวใจห้องล่างซ้ายผิดปกติ (left ventricular dysfunction) กล้ามเนื้อหัวใจมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างใหม่ (ventricular remodeling) และเกิดภาวะหัวใจวายตามมา ซึ่งส่งผลให้ความดันในห้องหัวใจสูงขึ้นในช่วงบีบตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจนอกจากนี้ยังมีการหลั่งสารต่างๆออกมาด้วยเช่น neurohormones และ mediators ต่าง ๆ

ปัจจุบันถึงแม้จะมีวิธีการในการรักษากล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ทั้งการใช้ยาและการผ่าตัด รวมถึงการเปิดเส้นเลือดหัวใจด้วยวิธีอื่นๆ แต่ก็ไม่มีวิธีใดจะสามารถเปลี่ยนแผลเป็น (myocardial scar) ที่เกิดจากการตายของกล้ามเนื้อหัวใจเป็นกล้ามเนื้อที่มีชีวิตและสามารถกลับมาทำงานเป็นปกติได้

อัตราการตายของภาวะหัวใจวายยังคงสูง พบว่าครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยหัวใจวายจะเสียชีวิตภายใน 5 ปี ได้มีการพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ๆที่มีประสิทธิภาพไม่ว่าจะเป็นยาต้าน neurohormones (betablocker, angiotensin converting enzyme inhibitors) รวมถึงอุปกรณ์ที่ช่วยการทำงานของหัวใจห้องล่างซ้าย (left ventricular assist devices) แต่มีข้อจำกัดในการที่ไม่สามารถทำให้กล้ามเนื้อหัวใจที่ตายไปในช่วงขาดเลือดเฉียบพลันกลับมามีชีวิตได้ [2] ถึงแม้ว่าเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของมนุษย์เคยมีรายงานว่าสามารถที่จะแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของกล้ามเนื้อหลังจากเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายก็ตามแต่ความสามารถในการแบ่งตัว ดังกล่าวรวมถึงการทำให้ผลเสียของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (ventricular remodeling) ดีขึ้น จนทำให้การทำงานของหัวใจกลับมาเป็นปกติมีข้อจำกัดค่อนข้างมาก

การสร้างเส้นเลือดใหม่ภายหลังจากเกิดกล้ามเนื้อหัวใจตาย (neovascularization) [3] มีบทบาทสำคัญในการเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกล้ามเนื้อหัวใจ พบว่าภายหลังจากเกิดกล้าม เนื้อหัวใจตายเกิดขึ้น โครงข่ายหลอดเลือดแดงฝอยที่เกิดขึ้นใหม่ไม่สามารถที่จะลำเลียงเลือดมาเลี้ยงกล้ามเนื้อบริเวณที่มีการปรับตัวหลังจากการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ (ventricular remodellings) ซึ่งความ

ไม่พอเพียงของการนำเลือดมาเลี้ยงดังกล่าวทำให้มีเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจตายเพิ่มขึ้นจากการขาดเลือด และเกิดพังผืดในกล้ามเนื้อหัวใจเพิ่มขึ้น [4] โดยการสร้างหลอดเลือดใหม่นี้เป็นขบวนการที่มีความสำคัญที่สามารถลดการขยายตัวของผนังกล้ามเนื้อหัวใจ (ventricular dilatation) ได้ รวมทั้งทำให้การบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจดีขึ้นโดยผลดังกล่าวยังเกิดจากการที่เลือดไปเลี้ยงหัวใจส่วนที่ปรับตัวทำงานน้อยลงในช่วงขาดเลือด (hibernating myocardium) ให้กลับมาทำงานได้และยังลดการตายของเซลล์ที่ปรับด้วยขยายขนาด (hypertrophied cardiomyocytes) เพื่อทำงานทดแทนเซลล์ที่ตายไป

อย่างไรก็ตามภาวะหัวใจล้มเหลวหลังจากการตายอย่างเฉียบพลันของกล้ามเนื้อหัวใจที่เป็นบริเวณกว้างก็เป็นภาวะที่เกิดขึ้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้เมื่อกลไกการปรับด้วยตามธรรมชาตินั้นไม่สา มารถทำงานทดแทนเซลล์ที่สูญเสียไปจำนวนมากดังกล่าวได้เพียงพอ

การซ่อมแซมหัวใจตามธรรมชาติ

เมื่อมีภาวะอะไรก็ตามที่ทำให้เกิดผลเสียต่อร่างกาย เช่น เมื่อมีเซลล์ตายไปร่างกายก็จะมีขบวนการในการซ่อมแซมอวัยวะส่วนนั้น [5, 6] ซึ่งจากหลักการนี้ทำให้ต้องกลับมาทบทวนถึงขบวนการดังกล่าวในกล้ามเนื้อหัวใจว่าสามารถที่จะมีการสร้างเซลล์ขึ้นมาทดแทนเซลล์หลังจากเกิดการตายได้หรือไม่

ก่อนหน้านี้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเชื่อว่าเป็นเซลล์เจริญพัฒนาจนถึงขั้นตอนสุดท้าย [7,8,] ดังนั้นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจก็จะมีปริมาณลดลงตามอายุที่มากขึ้นซึ่งความเชื่อดังกล่าวก็มีข้อมูลมาสนับสนุนยืนยันคือพบว่าการแบ่งตัวของเซลล์ในกล้ามเนื้อหัวใจน้อยมากเมื่อเทียบกับในตับ ซึ่งนั่นก็หมายถึงว่าเมื่อมีภาวะอะไรก็ตามเกิดขึ้นกับกล้ามเนื้อหัวใจที่ทำให้ต้องทำงานมากขึ้นมันก็จะปรับ ตัวโดยการขยายขนาดเซลล์แทนที่จะแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้น

ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือดยังเชื่อว่าเป็นขบวนการที่ไม่สามารถสร้างเซลล์ใหม่มาทดแทนได้และการที่การทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจจะกลับมาทำงานได้ดีขึ้นนั้นเชื่อว่าเกิดจากขบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (cardiac remodelling) ซึ่งประกอบด้วยการเพิ่มขยายขนาดของเซลล์และพังผืด อย่างไรก็ตามมีการนำเสนอข้อมูลที่พบว่ามีแบ่งตัวเพิ่มเป็นจำนวนมากในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมนุษย์ [9,10] และพบมีการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้น 10 – 60 เท่าในคนไข้ที่เสียชีวิตจากหัวใจวาย แต่อย่างไรก็ตามก็ยังถือว่าเป็นสัดส่วนที่น้อยถ้าเทียบกับการที่จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเพื่อซ่อมแซมกล้ามเนื้อหัวใจที่ตายไป

แหล่งของเซลล์ที่จะแบ่งตัวในกล้ามเนื้อหัวใจก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัด โดยเซลล์ดังกล่าวอาจจะกระจายอยู่ทั่วไปในกล้ามเนื้อหัวใจและมีมาตั้งแต่เกิด อย่างไรก็ตามความเป็นไปได้ที่เซลล์ที่แบ่ง ตัวได้จะมาจากนอกหัวใจก็มีรายงานจากผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายหัวใจที่ได้รับหัวใจจากเพศตรงข้าม โดย

ผู้ชายที่ได้รับการปลูกถ่ายหัวใจจากผู้หญิง ผลตรวจชิ้นเนื้อหัวใจที่ได้รับการปลูกถ่ายมา ซึ่งปกติจะมีโครโมโซมเป็น XX ก็พบว่าสามารถตรวจว่ามีโครโมโซม Y ปรากฏอยู่ด้วย [10-12] ถึงแม้ว่าสัดส่วนของเซลล์ที่มีโครโมโซม Y และจำนวนของการแบ่งตัวที่พบนั้นจะมีความหลาก หลายขึ้นอยู่กับผู้ป่วยแต่ละราย ข้อมูลนี้ก็แสดงให้เห็นว่าหัวใจมนุษย์สามารถสร้างเซลล์ใหม่โดย รับเซลล์ต้นกำเนิดจากนอกหัวใจได้ ซึ่งเชื่อว่าเซลล์ที่เข้าไปใหม่นี้จะสามารถที่จะแบ่งตัวและพัฒนาเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้ โดยแหล่งของเซลล์ที่เชื่อว่าอาจเป็นต้นกำเนิดของเซลล์ดังกล่าวอาจมาจาก 1. เซลล์ไขกระดูก [13-15] 2. เซลล์ที่อยู่ในหัวใจเองที่สามารถแบ่งตัวได้ (local resident cardiac stem cell populations) หลักฐานที่เชื่อว่าเซลล์อาจมาจากแหล่งที่ 2 (จากตัวหัวใจเอง) คือ การสามารถแยกเซลล์ที่แสดงความสามารถในการแบ่งตัวได้ (cell expressing a progenitor phenotype) คือตรวจพบ lin-, c-kit+, sca-1 + markers ซึ่งเซลล์ดังกล่าวเชื่อว่ามีความสามารถในการ ขยายเพิ่มจำนวน (selfrenewing) สร้างเซลล์ใหม่จากเซลล์เดิม (Clonogenic) และเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ได้หลากหลาย (multipotent) และเซลล์เหล่านี้เมื่อปลูกถ่ายเข้าไปในหัวใจของสัตว์ที่มีภาวะหัวใจขาดเลือดสามารถทำให้การทำงานของหัวใจดีขึ้นได้ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่เชื่อว่ามาจากหัวใจ (cardiac stem cell) จะไม่แสดง marker ของเซลล์ในระบบเลือด (hematopoietic cell) หรือเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial lineage) ก็ยังเชื่อว่าเซลล์ดังกล่าวอาจมาจากไขกระดูก [10,11,16-18]

แหล่งอื่นของเซลล์ต้นกำเนิดที่มาจากหัวใจเชื่อว่ามาจากเยื่อหุ้มหัวใจ (epicardium) โดยพบว่าเซลล์ที่เป็น progenitor cell จากเยื่อหุ้มหัวใจเมื่อเข้ามาอยู่ในกล้ามเนื้อหัวใจสามารถแบ่งตัวและพัฒนาเป็นเซลล์ของหัวใจได้ [19]

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิด

การวิจัยเกี่ยวกับ Stem cell เป็นความรู้ที่ก้าวหน้าเกี่ยวกับว่าสิ่งมีชีวิตสามารถพัฒนาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียวและมีการสร้างเซลล์ที่ปกติทดแทนเซลล์ที่สูญเสียการทำงานได้ ซึ่งสาขาของการวิจัยนี้ทำให้มีการค้นหาความเป็นไปได้ของการรักษาด้วยเซลล์ (cell-based therapy) ในการรักษาโรคต่าง ๆ ซึ่งถูกเรียกว่า regenerative หรือ reparative Medicine

Stem cells มีลักษณะเฉพาะที่แยกจากเซลล์ชนิดอื่นคือ

1. เซลล์มีลักษณะเป็น “unspecialized cell” ซึ่งมีการแบ่งตัวซ้ำ ๆ ได้หลายครั้ง
2. เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาหรือภาวะบางอย่างเซลล์เหล่านี้สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะได้ เช่น เซลล์หัวใจหรือเซลล์สร้างอินสุลิน

ในการศึกษาเกี่ยวกับ cell-based therapy จะศึกษาเกี่ยวกับ stem cell อยู่ 2 ชนิด คือ embryonic stem cell และ adult stem cell ซึ่งมีความแตกต่างทางหน้าที่และลักษณะพิเศษต่างๆ ความก้าวหน้าเกี่ยวกับการศึกษาทางด้าน stem cell เริ่มจากสามารถเก็บ stem cell จาก embryo ของหนู เมื่อ 20 ปีก่อน และพัฒนาจนสามารถแยกเก็บเซลล์ embryo ของมนุษย์และเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งเรียกว่า “human embryonic stem cell” โดยในตอนแรก จุดประสงค์หลักของการวิจัยเป็นไปเพื่อช่วยการผสมพันธุ์นอกร่างกาย (in vitro fertilization) สำหรับผู้ที่เป็นหมัน และเซลล์ embryo ที่ไม่ได้ใช้ก็นำมาศึกษาต่อโดยได้รับความยินยอมจากผู้บริจาค

เมื่อมีการปฏิสนธิประมาณ 3-5 วัน ของอายุ embryo เรียกว่า blastocyst ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ 2 กลุ่มด้วยกัน คือ เซลล์รอบนอกและเซลล์ที่อยู่ด้านใน (inner cell mass) ซึ่งกลุ่มเซลล์ที่อยู่ด้านในนี้เองก็จะพัฒนาไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ เช่น หัวใจ ปอด ผิวหนัง เป็นต้น เนื้อเยื่อของผู้ใหญ่บางอย่าง เช่น ไขกระดูก กล้ามเนื้อ สมอง พบมีกลุ่มของเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวทดแทนเซลล์ที่ตายไปจากเหตุต่าง ๆ ซึ่งอยู่ในขั้นตอนการศึกษาวิจัย

ลักษณะจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิด [19]

Stem cells มีความแตกต่างจากเซลล์อื่นๆ ของร่างกายแม้จะมีแหล่งที่มาต่างกัน โดย Stem cell มี ลักษณะจำเพาะดังนี้คือ

1. Stem cells สามารถแบ่งตัวและสร้างเซลล์ใหม่ได้เป็นระยะเวลานาน
2. Stem cells ไม่มีลักษณะจำเพาะ (unspecialized)
3. Stem cells สามารถที่จะเจริญและพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะได้

มีความพยายามที่จะเข้าใจคุณลักษณะพื้นฐานของ stem cells เกี่ยวกับความสามารถในการแบ่งตัวได้เป็นระยะเวลานาน ซึ่งมีคำถามว่า

1. ทำไม embryonic stem cell แบ่งตัวได้เป็นปีในการทดลองในห้องปฏิบัติการในขณะที่ adult stem cells ไม่สามารถทำได้
2. อะไรเป็นปัจจัยสำคัญในสิ่งมีชีวิตที่สามารถควบคุมการแบ่งตัวและการผลิตเซลล์ใหม่ของ stem cells

Stem cells ไม่มีลักษณะจำเพาะ โดยลักษณะพื้นฐานอันหนึ่งของ stem cells คือ ไม่มีโครงสร้างจำเพาะของอวัยวะใดที่จะทำให้สามารถทำหน้าที่ได้ [20-24] stem cell ไม่สามารถทำงานร่วมกับเซลล์ข้างเคียงในการลำเลียงเลือดได้ (เหมือนเซลล์หัวใจ) มันไม่สามารถลำเลียงออกซิเจนได้ (เหมือนเซลล์เม็ดเลือดแดง) อย่างไรก็ตาม unspecialized stem cell สามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติพิเศษ (specialized cell) ได้ เช่น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์เม็ดเลือด [25-28]

เซลล์ต้นกำเนิดสามารถแบ่งตัวและเจริญเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะได้

เมื่อ unspecialized stem cell พัฒนาเป็น specialized cell ขบวนดังกล่าวเรียกว่า differentiation โดยขณะนี้เริ่มมีความเข้าใจเกี่ยวกับขั้นตอนในการกระตุ้นการ differentiation ทั้งปัจจัยจากภายนอกเซลล์และปัจจัยภายในเซลล์

ปัจจัยหรือสัญญาณจากภายในเซลล์ถูกควบคุมโดยสายพันธุกรรม (DNA) ส่วนสัญญาณจากภายนอกเซลล์นั้นอาจเป็นสารเคมีที่ถูกหลั่งมาจากเซลล์ การสัมผัสกันของเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียง หรืออาจเป็นโมเลกุลบางอย่าง ส่วนความเชื่อที่ว่า stem cell ใดมักจะเจริญไปเป็นเซลล์ของอวัยวะหรือระบบนั้น เช่น stem cell จากไขกระดูก พัฒนากลายไปเป็น เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด อาจจะไม่ถูกต้องทีเดียว มีการทดลองเป็นจำนวนมากในช่วงหลายปีหลังที่พบว่า stem cell จากอวัยวะหนึ่งสามารถจะเจริญและพัฒนาเป็นเซลล์ต่างๆ ในหลายอวัยวะได้ซึ่งภาวะดังกล่าวเรียก ว่า plasticity

เซลล์ต้นกำเนิด embryonic คืออะไร [29-31]

Embryonic stem cell สามารถที่จะแยกมาจาก embryo ซึ่งเกิดจากการปฏิสนธินอกร่างกาย โดย embryo ดังกล่าวมีอายุประมาณ 4-5 วัน และอยู่ในระยะ blastocyst โดยที่ embryonic stem cell จะแยกมาจากส่วน Inner cell mass ของ blastocyst หลังจากที่แยกมาก็นำมาเพาะเลี้ยง (culture) ในอาหารเพาะเลี้ยง โดยมี embryonic stem cell ของหนูอยู่ล้อมรอบเพื่อทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่คอยให้อาหารและให้ human embryonic cell เกาะตัว อย่างไรก็ตามระยะหลังก็ได้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงโดยไม่ใช้เซลล์ของหนูเข้ามาช่วยเพื่อตัดปัญหาเรื่องการติดเชื้อไวรัสที่จะมีผลต่อ human embryonic stem cell

หลังจากที่ human embryonic stem cell แบ่งตัวได้จำนวนเซลล์มากพอก็จะถูกเปลี่ยนถ่ายไปยังจานเพาะอันใหม่ (subculturing) ซึ่งหลังจากผ่านไป 5-6 เดือน ก็จะได้เซลล์เป็นล้านเซลล์ โดยที่แต่ละเซลล์ก็ยังเป็นเซลล์ที่ไม่มีความจำเพาะ คือยังไม่มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ของอวัยวะใด

ในขั้นตอนการสร้าง embryonic stem cell จะมีขั้นตอนเพื่อตรวจสอบและวิเคราะห์ถึงความเป็น stem cell คือดูว่ามีคุณสมบัติพื้นฐานของความเป็น stem cell หรือไม่ โดยมีขั้นตอนและวิธีในการวิเคราะห์ คือ

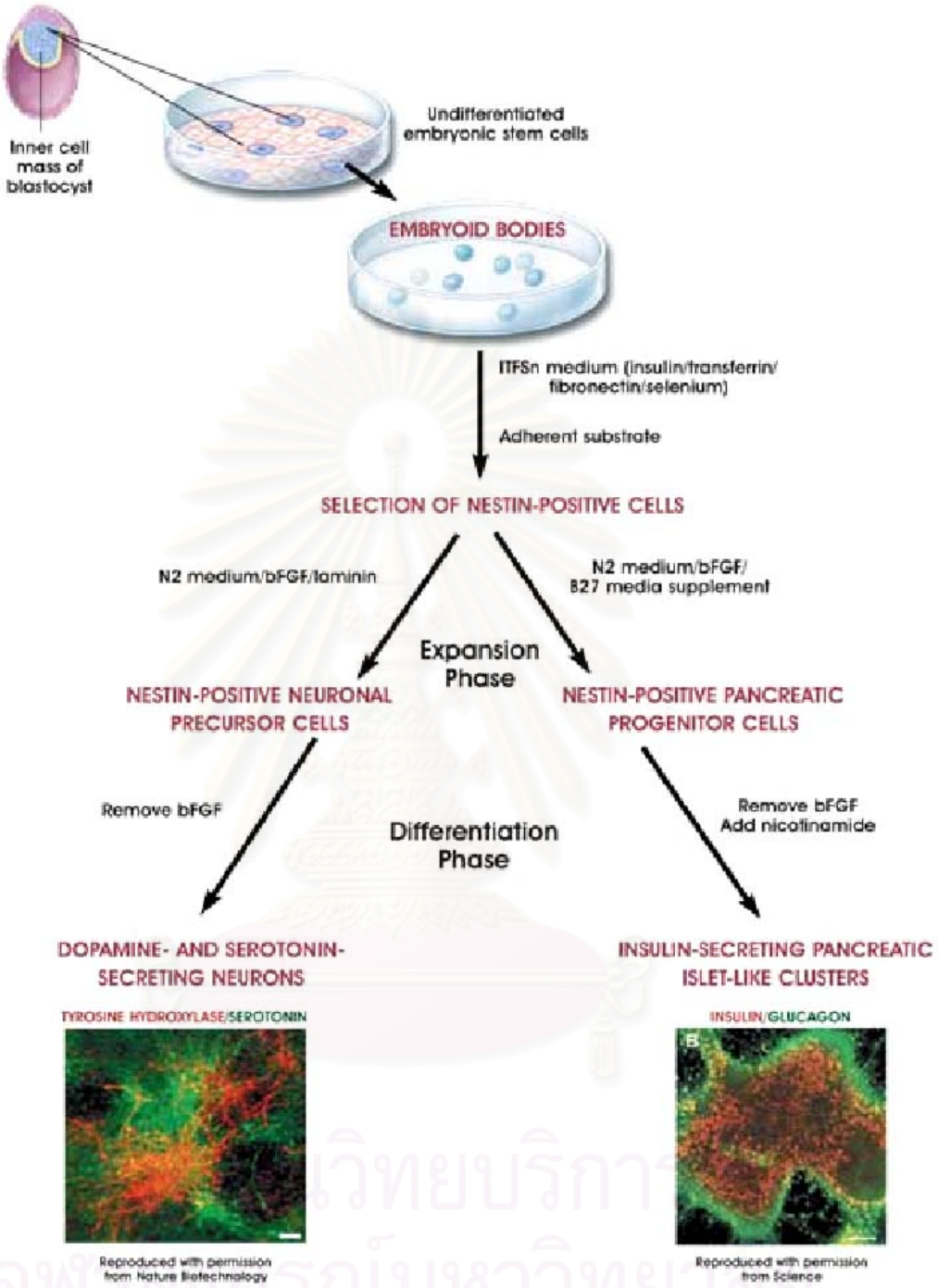
1. การให้เซลล์เจริญเติบโตและดูการแบ่งตัว จากการ subculture หลายครั้งว่าเซลล์ยังคงดูปกติ และยังไม่มี differentiation
2. ใช้วิธีการพิเศษเพื่อศึกษาถึงลักษณะจำเพาะ (specific marker) ที่พบเฉพาะบนเซลล์ที่ไม่มี differentiation เช่น ศึกษาว่ามีการปรากฏของ protein oct-4 ซึ่งเป็น transcription factor เพื่อทำหน้าที่ส่งสัญญาณให้ gene ทำงาน หรือไม่ทำงานตามเวลาที่เหมาะสม

3. ศึกษาโคโมโซมเพื่อดูลักษณะและจำนวน
4. ศึกษาดูความสามารถของเซลล์หลังจากที่ถูกนำไปแช่แข็งแล้วทำให้ละลายและเอามาทำการเพาะเลี้ยงใหม่
5. ทดสอบความสามารถในการแบ่งตัวและเจริญเป็นเซลล์หลาย ๆ ชนิด (pluripotent) โดยให้เจริญและพัฒนาเองในจานเพาะเลี้ยงหรือให้เจริญในสภาวะพิเศษเพื่อเจริญเป็นเซลล์ชนิดที่มีความจำเพาะหรืออาจฉีดเซลล์เข้าไปในหนูที่ถูกทำให้มีภูมิคุ้มกันบกพร่องดูว่า เซลล์สามารถแบ่งตัวเป็นก้อน tumor ที่เรียกว่า teratoma ได้หรือไม่ โดย teratoma จะประกอบไปด้วยเซลล์ที่เจริญไปเป็นเซลล์เฉพาะหลายชนิด

เซลล์ต้นกำเนิด embryonic ถูกกระตุ้นเพื่อเจริญพัฒนาต่อไปได้อย่างไร

ในขณะที่เพาะเลี้ยง embryonic stem cell ภายใต้ภาวะบางอย่างมันจะแบ่งตัวไปได้เรื่อย ๆ โดยที่ไม่มี differentiation แต่ถ้าทำให้ embryonic stem cell เกาะกลุ่มกันเป็น embryoid bodies มันจะเริ่มที่จะ differentiate ได้โดยสามารถที่จะเจริญเป็นเซลล์กล้ามเนื้อเซลล์หัวใจ เซลล์ประสาท เป็นต้น (รูปภาพที่ 2.1) โดยสามารถที่จะกำหนดปัจจัยต่าง ๆ เพื่อควบคุมให้ embryonic stem cell เจริญไปเป็นเซลล์เฉพาะกลุ่มได้

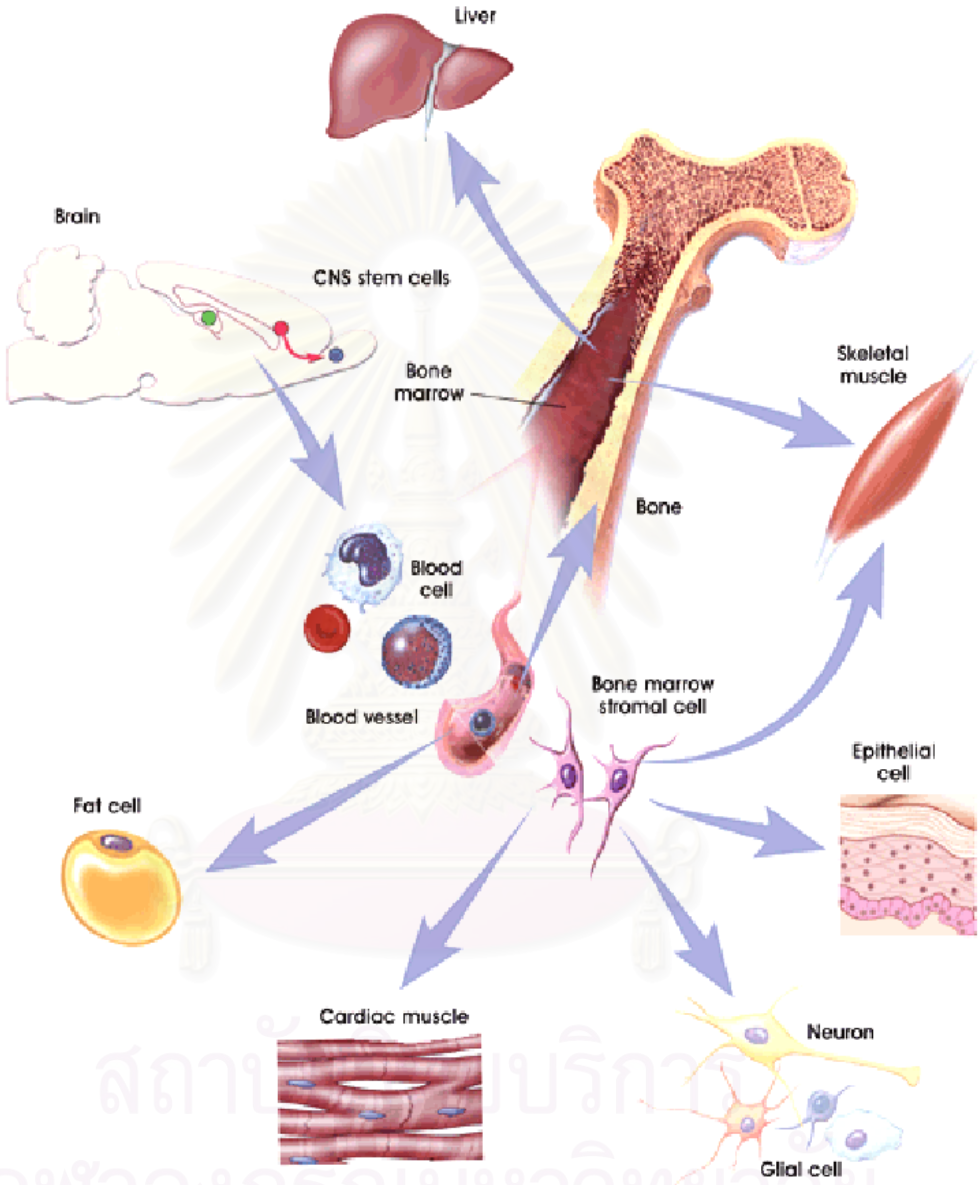
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปภาพที่ 2.1: การเจริญและแบ่งตัว (Directed differentiation) ของ เซลล์ตัวอ่อนของหนู (mouse embryonic stem cells)

เซลล์ตัวอ่อนต้นกำเนิดจากผู้ใหญ่ (Adult stem cell)

Adult stem cell เป็นเซลล์ที่ยังไม่มีการเจริญพัฒนา (differentiation) ซึ่งพบอยู่ท่ามกลาง



รูปภาพที่ 2.2 : ความสามารถในการแบ่งตัวเป็นเซลล์ต่างๆของ stem cell (Plasticity of adult stem cells)

เซลล์ที่ differentiation แล้ว โดยเซลล์ดังกล่าวสามารถที่จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะได้ (รูปภาพที่ 2.2) โดยบทบาทแรกของ adult stem cell คือเพื่อให้มีการซ่อมแซมและคงอยู่ของอวัยวะนั้น ๆ โดยมักจะเรียก adult stem cell ว่าเป็น somatic stem cell แทน

ตัวอย่างของ adult stem cell ที่รู้จักกันมานานมาจากไขกระดูกและใช้ในการปลูกถ่ายมากว่า 30 ปี adult stem cell บางชนิดมีความสามารถที่จะเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

การศึกษา adult stem cell มีมากว่า 40 ปี โดยพบว่าไขกระดูกประกอบด้วย stem cell อย่างน้อย 2 ชนิด คือ

1. hematopoietic stem cell ซึ่งจะเจริญไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ
2. bone marrow stromal cell ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่มีความหลากหลายและสามารถเจริญไปเป็นกระดูก กระดูกอ่อน ไขมัน และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้

ในปี 1990 ก็มีการค้นพบว่าสมองของผู้ใหญ่นั้นมี stem cell ที่สามารถเจริญไปเป็นเซลล์ต่าง ๆ ได้ คือ astrocytes, oligodendrocytes และ neurons หรือ neural cells

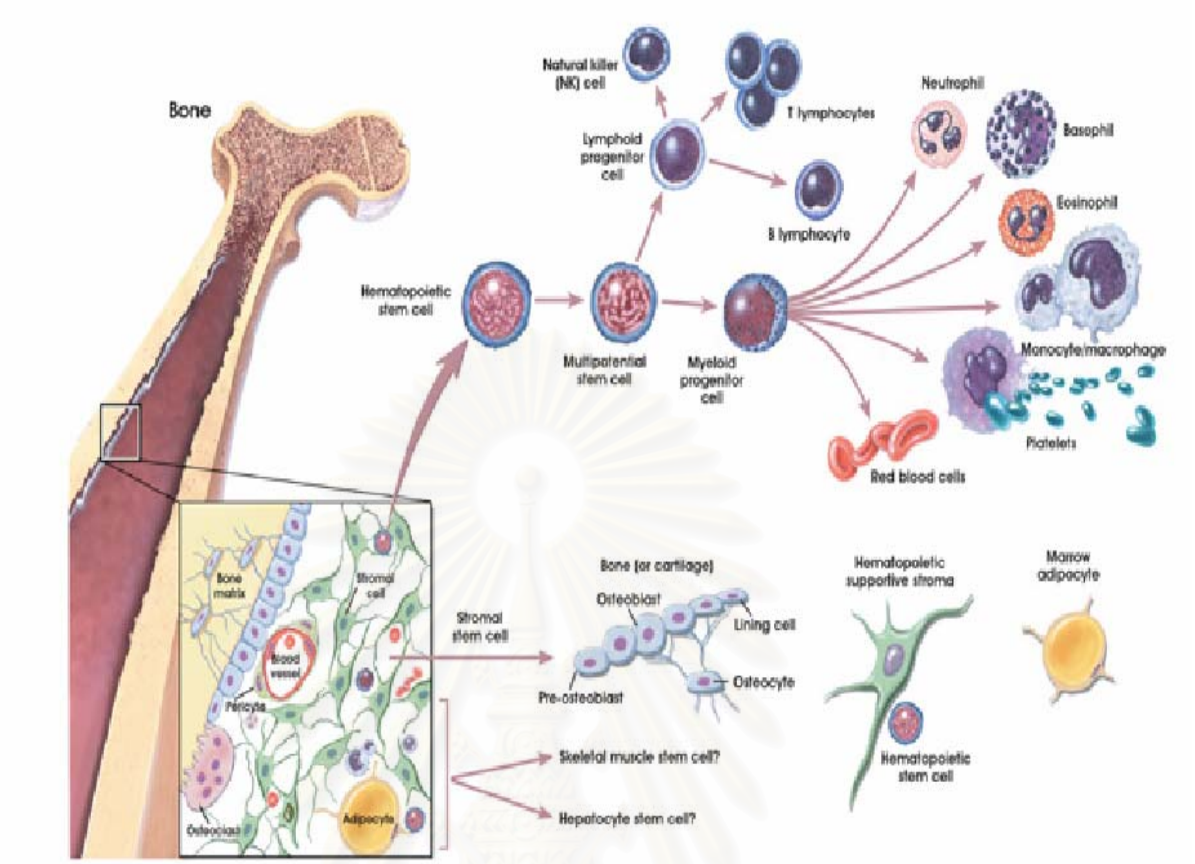
ปกติแล้ว adult stem cell ที่มีอยู่ตามอวัยวะต่าง ๆ จะมีจำนวนน้อยและจะอยู่ในบริเวณที่จำเพาะในอวัยวะนั้นๆ โดยที่จะยังไม่มีการแบ่งตัวจนกระทั่งจะถูกกระตุ้นจากโรคหรือภยันตรายใด ๆ จากภายนอก

เนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่พบว่ามี stem cell ที่มีรายงาน คือสมอง ไขกระดูก เลือด เส้นเลือด กล้ามเนื้อ ผิวหนังและตับ

ขั้นตอนในการศึกษาว่าเซลล์ใดเป็น stem cell มีขั้นตอนคือ

1. ดูโมเลกุลที่ปรากฏอยู่บนผนังเซลล์ (molecular markers) ใน เนื้อเยื่อที่มีชีวิต
2. เอาเซลล์ออกมาจากสัตว์ที่มีชีวิตแล้วติดสลากเซลล์ดังกล่าวขณะเพาะเลี้ยงและปลูกถ่ายกลับเข้าไปในสัตว์อีกตัวหนึ่ง แล้วดูว่าสามารถที่จะแบ่งตัวได้หรือไม่
3. แยกเซลล์ออกมาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงและปรับสภาวะต่างๆหรือใส่สารกระตุ้นการเจริญเติบโต (growth factors) แล้วดูว่าเซลล์สามารถจะเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีความ จำเพาะได้หรือไม่

Adult stem cell โดยสภาวะปกติสามารถจะแบ่งตัวได้เป็นระยะเวลานาน และสามารถที่จะเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีความจำเพาะได้ ตัวอย่างเช่น hematopoietic stem cell สามารถเจริญเป็นเซลล์เม็ดเลือดได้ทุกชนิด เช่น lymphocytes, natural killer cells, red blood cells เป็นต้น นอกจากนี้ adult stem cells บางชนิดยังสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์จำเพาะอีกหลายชนิด (plasticity หรือ trandifferentiation) เช่น สามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ในระบบประสาทกล้ามเนื้อและเซลล์ตับได้ เป็นต้น



รูปภาพที่ 2.3 : การเจริญและพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด และ เซลล์ต้นกำเนิดในผู้ใหญ่ (Hematopoietic and stromal stem cell)

ความเหมือนและความแตกต่างของ Embryonic และ Adult stem cell

Adult และ embryonic stem cell มีความแตกต่างกันในแง่ของจำนวนและชนิดของเซลล์ที่จะสามารถเจริญพัฒนาไปเป็น โดย embryonic stem cell สามารถที่จะเจริญไปเป็นเซลล์ทุกชนิดในร่างกายเพราะมีคุณสมบัติเป็น pluripotent ส่วน adult stem cell จะมีข้อจำกัดมากกว่า (รูปภาพที่ 2.3) แต่อาจเป็นเพราะการได้ adult stem cell มาศึกษามีปริมาณน้อย จึงอาจทำให้ข้อมูลนี้ยังต้องการการศึกษาอีกต่อไป แต่การนำ adult stem cell มาใช้ในการรักษาก็มีข้อได้ข้อเปรียบเพราะเป็นเซลล์ของผู้ป่วยเองซึ่งจะไม่ถูกต่อต้านด้วยระบบภูมิคุ้มกัน

ขั้นตอนวิธีการซ่อมแซมเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Cellular cardiomyoplasty approach)

หัวใจของผู้ใหญ่ ปกติจะมีเซลล์หัวใจบางกลุ่มที่ยังไม่เจริญพัฒนาเต็มที่และสามารถที่จะเข้าสู่วงจรการเจริญแบ่งตัวของเซลล์ (cell cycle) ได้ หลังจากเกิดกล้ามเนื้อหัวใจตาย แต่อย่างไรก็ตามขบวนการดังกล่าวก็ยังไม่เพียงพอที่จะทำให้หัวใจทำงานได้อย่างปกติ

cellular myoplasty ซึ่งเป็นขบวนการทดแทนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ตายไป โดยใช้วิธีการปลูกถ่ายเซลล์ (cell transplantation) ได้รับการศึกษาเพื่อนำมาเป็นแนวทางในการรักษา โดยวิธีการดังต่อไปนี้

1. ปลูกถ่าย stem cell ที่จะเจริญพัฒนาไปเป็น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ หรือกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่
2. เคลื่อนย้าย stem cell จากไขกระดูก ไปยังตำแหน่งของหัวใจที่ได้รับอันตรายโดยใช้สารบาง อย่างกระตุ้นเช่น G-CSF, stem cell factors, hepatocyte growth factors [32]
3. ใช้สารเคมีในกลุ่ม growth factors เช่น insulin like และ hepatocyte growth factors ที่จะกระตุ้นการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดหัวใจ (cardiac progenitor cells) ไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ [33-35]

ขั้นตอนของ stem cell ที่ได้รับการปลูกถ่ายและถูกลำเลียงไปสู่เนื้อเยื่อหัวใจส่วนที่ได้รับอันตราย (homing process) [36-37] ยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด แต่เชื่อว่าน่าจะสัมพันธ์กับสภาวะแวดล้อมในบริเวณดังกล่าว (microenviroment factors) ที่ทำให้ stem cell เจริญเติบโตและทำงานได้ นอกจากนี้ยังอาจมีสารหรือสภาวะบางอย่างที่เชื่อว่าอาจมีสารเกี่ยวข้องกับ homing process คือ integrin, homing receptors, ภาวะ ischemia, การที่มีการแสดงออกของ vascular endothelial growth factors เพิ่มขึ้น [38-43]

ในการปลูกถ่าย stem cell เข้าไปในบริเวณที่ได้รับอันตราย (infarct area) stem cell จะต้องแบ่งตัวอย่างรวดเร็วให้ได้เซลล์เพียงพอเพื่อที่จะทนต่อสภาวะทางกายภาพและทางไฟฟ้าของหัวใจ [44-45] โดยสภาวะของการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วนี้จะเกิดขึ้นขณะที่หัวใจสามารถที่จะทำหน้า ที่ได้เป็นปกติในการบีบตัวและนำเลือดไปเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ซึ่งหมายความว่าขบวนการทั้งหมดจะเกิดได้จะต้องมีการสร้างเส้นเลือดพร้อมกันไป

เซลล์ที่จะนำมาใช้ในการปลูกถ่าย (Donor cells)

เซลล์ที่จะนำมาใช้ในการปลูกถ่าย stem cell ที่หัวใจมาจากหลายแหล่ง (ตารางที่2.1) ซึ่งเซลล์ดังกล่าวจะมาทดแทนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ตายไปและทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหัวใจน้อยที่สุด

Donor Cell	Advantages	Disadvantages
Fetal cardiomyocytes	Cardiomyocyte phenotype	Immunosuppression required, ethical debate, short survival, and limited supply
Skeletal myoblasts	Lack of immunogenicity; autologous transplantation; high yield; and fatigue-resistant, slow-twitch fibers	Arrhythmogenic and lack of gap junction
Endothelial progenitor cells	Lack of immunogenicity and autologous transplantation	Need for expansion because of limited supply
Embryonic stem cells	Pluripotent and highly expandable	Immunosuppression required, ethical debate, lack of availability, and tumor potential
Adult mesenchymal stem cells	Lack of immunogenicity, autologous transplantation, pluripotent, and cryopreservable for future use	Unclear functional and electrophysiologic properties and difficult to isolate and propogate in culture

ตารางที่ 2.1: แสดงเซลล์ที่จะใช้เป็นเซลล์ในการปลูกถ่าย

เซลล์ตัวอ่อนหัวใจจากทารกก่อนคลอด (Fetal cardiomyocytes)

จากการทดลองของ Soonpaa และคณะ [46] แสดงให้เห็นถึง fetal cardiomyocytes ที่ปลูกถ่ายในหัวใจหนู โดยพบว่า fetal cardiomyocytes สามารถที่จะมีชีวิต แบ่งตัวและรวมเข้าไปกับกล้ามเนื้อหัวใจทีได้รับการปลูกถ่ายได้ เกิดเป็นเนื้อเยื่อหัวใจใหม่ที่ทำให้หัวใจทำงานดีขึ้น [47-49] อีกการทดลองจาก Elzion และคณะ [50] ได้รายงานผลการทดลองซึ่งพบว่าการขยายตัวของหัวใจห้องล่างบริเวณที่บางตัวจากกล้ามเนื้อตายและการบีบตัวที่ผิดปกติของหัวใจ เป็นไปในทางที่ดีขึ้นหลังจากการปลูกถ่าย embryonic cardiomycytes ในหัวใจหนูทดลองที่ทำให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตาย โดยเชื่อว่า Fetal cardiomyocytes ที่ปลูกถ่ายเข้าไปอาจจะทำให้มีการหลั่งสารที่สามารถปกป้องหัวใจ (cardioprotective factors) เช่น vascular endothelial growth factors ซึ่งออกฤทธิ์กับเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจใกล้เคียงโดยกระตุ้นให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ในบริเวณเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่และกล้าม เนื้อหัวใจเดิม [51-55] ซึ่งการที่มีหลอดเลือดแดงมากขึ้นบริเวณปลูกถ่ายเซลล์ไม่เพียงแต่ทำให้มีเลือดมาเลี้ยงมากขึ้นแต่ยังทำให้การกำจัดซากเซลล์ที่ตายแล้วออกจากบริเวณที่เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายได้ดียิ่งขึ้น

สำหรับการปลูกถ่าย Fetal cardiomyochtes ในมนุษย์มีข้อจำกัดมากทั้งในแง่ศีลธรรม และการไม่สามารถหาเซลล์ปริมาณเพียงพอเพื่อนำมาใช้ปลูกถ่ายให้แก่กล้ามเนื้อหัวใจที่ได้รับอันตรายได้ จึงทำให้การพัฒนา cell-bases therapy โดยใช้ fetal stem cell ยังไม่ก้าวหน้ามากนัก

เซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อน (Skelelal myoblast)

เซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อน (skeletal myoblast) โดยปกติจะทำหน้าที่เป็นเซลล์ตั้งต้นในการเจริญพัฒนาเป็นกล้ามเนื้อ [56] การปลูกถ่ายเซลล์ตัวอ่อนกล้ามเนื้อของตัวเอง (autologous skeletal myoblast transplantation) นั้นมีข้อได้เปรียบในหลายด้านทั้งในเรื่องศีลธรรม การต่อต้านทางภูมิคุ้มกันและปริมาณเซลล์ที่มีมาก นอกจากนี้เซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อนยังทนต่อการขาดเลือดได้ดี จึงทำให้โอกาสที่เซลล์จะยังมีชีวิตรอดในบริเวณที่การลำเลียงเลือดไปเลี้ยงน้อยได้มากขึ้นซึ่งเป็นภาวะ ที่มักจะเกิดในหัวใจของคนไข้ที่เป็นโรคเส้นเลือดหัวใจ [57] Jain และคณะ [58] ทดลองในหนูที่ทำให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตาย ได้แสดงให้เห็นถึงการปลูกถ่ายเซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อนที่ปลูกถ่ายเข้าไปสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าภาวะห้องหัวใจที่ขยายขนาดขึ้นจากกล้ามเนื้อหัวใจตาย (ventricular dilatation) ลดลง ทำให้การบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจดีขึ้นและทำให้ทนต่อการออกแรงได้ดีขึ้น

นอกจากนี้การทดลองในแกะ [59] ก็ให้ผลคล้ายกัน คือ ทำให้การบีบตัวของหัวใจห้องล่างดีขึ้น พบว่าเกิดจากการที่เซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อนไปเกาะกลุ่มกันที่เยื่อพังผืดในหัวใจหลังจากเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจตาย ซึ่งทำให้มีการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อขึ้นบริเวณดังกล่าวและพบมีการแสดงออกของ myosin heavy chain ในบริเวณดังกล่าว โดยผลการทดลองที่แสดงถึงการดีขึ้นของการทำงานของหัวใจนั้นจะขึ้นกับปริมาณเซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อนที่ปลูกถ่ายเข้าไปว่ามีมากน้อยเพียงใด [60]

เซลล์ต้นกำเนิดของผนังหลอดเลือด (Endothelial progenitor cell)

โดยปกติแล้วการสร้างเส้นเลือดใหม่ถือเป็นหัวใจสำคัญสำหรับการรอดชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ถูกสร้างขึ้นใหม่หลังจากปลูกถ่ายเซลล์เข้าไป โดยถ้าปริมาณเลือดที่ลำเลียงไปเลี้ยงไม่เพียงพอก็จะทำให้เซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่ไม่สามารถมีชีวิตได้ และจะส่งผลต่อการทำงานของหัวใจโดยรวมด้วย [61-65]

Endothelial progenitor cells ปกติจะอยู่ในไขกระดูกและจะถูกปลดปล่อยเข้ามาในกระแสเลือดหลังจากเกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลันและทำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ขึ้นมา [66-69] ซึ่งการปลูกถ่าย Endothelial progenitor cell นี้นับว่ามีข้อได้เปรียบเนื่องจากเป็นเซลล์ของตัวเอง ทำให้ไม่ต้องใช้ยากดภูมคุ้มกันภายหลังจากการปลูกถ่าย

จากการทดลองของ Kocher และคณะ [70] ได้ฉีด สารกระตุ้นเม็ดเลือด (G-CSF) ทางหลอดเลือดดำในหนูทดลองเพื่อกระตุ้นการเคลื่อนย้าย endothelial progenitor cells จากไขกระดูกไปยังบริเวณที่มีการตายของกล้ามเนื้อหัวใจภายใน 48 ชม. หลังจากเกิดหัวใจขาดเลือด พบว่ามีการเจริญเติบโตของเซลล์และพัฒนา (transdifferentiation) ไปเป็นเซลล์บุผนังหลอดเลือดและกระตุ้นให้มี

การสร้างเส้นเลือดใหม่เข้าไปในกล้ามเนื้อหัวใจในรอบบริเวณที่มีการตายและบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังหัวใจ (ventricular remodelling) ซึ่งทำให้มีการทำงานของหัวใจที่ดีขึ้น Endothelial progenitor cell นี้ อาจจะมีการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้ทำให้การซ่อมแซมกล้ามเนื้อหัวใจได้ดีขึ้น[71,72]

อุปสรรคหนึ่งในการใช้ endothelial progenitor cells ก็คือไม่สามารถที่จะหาเซลล์ได้จำนวนเพียงพอ โดยได้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยง progenitor cells ภายนอกร่างกาย ก่อนปลูกถ่ายแต่ก็มีปัญหาที่เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจะมีคุณสมบัติที่ต่างออกไปคือ ขบวนการเข้าสู่บริเวณของกล้ามเนื้อหัวใจ (homing process) [73] ลดลง รวมทั้งประสิทธิภาพของเซลล์ก็มีความด้อยกว่าเซลล์ที่เกิดในร่างกายด้วย

อย่างไรก็ตามโดยปกติแล้วการรักษาคนไข้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดด้วยยาต้านไขมันกลุ่ม statin ก็จะสามารถช่วยเพิ่มจำนวน endothelial progenitor cells ในกระแสเลือดได้[74]

มีการทดลองในหมูที่ได้รับการทำให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเรื้อรัง (chronic experimental myocardial ischemia) ซึ่งพบว่า endothelial progenitor cells จากไขกระดูกของหมูหลังจากที่ได้รับการฉีดเข้าไปในกล้ามเนื้อหัวใจบริเวณที่ขาดเลือดผ่านทางผนังด้านในของหัวใจ (transendocardial injection) สามารถหลั่งสารกระตุ้นหลอดเลือด เช่น vascular endothelial growth factors, macrophage chemoattractant protein-1 ซึ่งสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cell) และเพิ่มปริมาณเลือดที่ไปเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้[75-77]

เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (Embryonic stem cell)

เซลล์ตัวอ่อนของมนุษย์ (human embryonic stem cell) เป็นเซลล์ที่สามารถเจริญและพัฒนาเป็นเซลล์ได้ทุกชนิดในร่างกายซึ่งรวมทั้งเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ อย่างไรก็ตามความสามารถนี้ก็ยังถือว่าน้อยอยู่ถ้าเทียบกับผลการทดลองในหนู [78,79] โดยจากการทดลองในหนูด้วยการปลูกถ่าย embryonic stem cells เข้าไปในบริเวณที่เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายทำให้มีการสร้างเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและทำให้การทำงานโดยรวมของหัวใจดีขึ้น [80-81] ถ้าจะนำการทดลองนี้มาใช้ในคนโดยการปลูกถ่าย embryonic stem cell ของสัตว์เข้าไป ก็ทำให้มีปัญหาทางด้านภูมิคุ้มกันทำลายเซลล์ที่ปลูกถ่ายเข้าไป แม้จะสามารถใช้ยากดภูมิคุ้มกันเข้ามาใช้แต่ก็ยังมีการ ศึกษาไม่มากพอ

การปลูกถ่าย human embryonic stem cells น่าจะมีข้อได้เปรียบมากกว่าเพราะกระตุ้นภูมิคุ้มกันน้อยกว่า โดยเชื่อว่าเกิดจากมีการแสดงออกของโปรตีนบางอย่างบนผิวเซลล์น้อยกว่าอย่างไรก็ตามการนำ human embryonic stem cells มาใช้ในทางปฏิบัติก็มีข้อจำกัดเพราะการหาเซลล์ที่ได้ไม่มากพอและปัญหาทางด้านจริยธรรมและกฎหมายที่ยังไม่ชัดเจน

เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อผู้ใหญ่ (adult mesenchymal stem cell)

Mesenchymal stem cell ในคนสามารถที่จะนำมาใช้ในการศึกษาได้โดยเก็บจากไขกระดูกและในกระแสเลือดซึ่งสามารถนำไปปลูกถ่ายให้คนไข้เอง โดยเซลล์ดังกล่าวสามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ได้หลายชนิด [82-86] รวมทั้งเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งการใช้ mesenchymal stem cell ในการปลูกถ่ายนี้ทำให้ความจำเป็นในการใช้ยากดภูมิคุ้มกันหมดไป แม้ว่าจะใช้เซลล์ดังกล่าวมาจากคนอื่นก็ตาม

มีการทดลองปลูกถ่าย mesenchymal stem cell [87] ในหมูทั้งแบบใช้เซลล์ของตัวเอง (autologous) หรือใช้เซลล์ของคนอื่น (allogenic) โดยนำเซลล์ดังกล่าวมาปลูกถ่ายไปยังกล้ามเนื้อหัวใจหลังเกิดเซลล์ตายจากการขาดเลือด พบว่า mesenchymal stem cell สามารถที่จะรวมกับเซลล์ของหัวใจเดิมได้และแบ่งตัวเจริญไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้ ทำให้สามารถที่จะลดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังหัวใจหลังเกิดกล้ามเนื้อตาย (ventricular remodelling) และทำให้การทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจดีขึ้นได้อย่างมาก [88,89]

ในอีกการศึกษาหนึ่งโดย Min และคณะ [90] ได้รายงานการทดลองในหมูภายหลังปลูกถ่าย human mesenchymal stem cells เข้าไปในหมูที่ทำให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดโดยการฉีดเซลล์ดังกล่าวเข้าไปในกล้ามเนื้อหัวใจโดยตรงทำให้การทำงานของหัวใจดีขึ้น และพบว่าการทำงานของหัวใจดีเพิ่มขึ้นไปอีกมากถ้าปลูกถ่าย human mesenchymal stem cell ร่วมกับ human fetal cardiomyocytes

การทดลองโดยการฉีด mesenchymal stem cells ร่วมกับเซลล์ไขกระดูกเข้าไปในบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจตายในหมู [91] พบว่าทำให้มีการแสดงออกของ cardiac tenascin เป็นอย่างมากและมีการกระตุ้นกระแสประสาทsympatheticมากขึ้น โดยผลดังกล่าวทำให้มีประสาท Sympathetic มาเลี้ยงที่หัวใจมากขึ้น สำหรับยีนในกลุ่ม tenascin นั้นจะเกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ขึ้นมาทดแทนเซลล์ประสาทเดิม [92-94] และยังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกล้ามเนื้อหัวใจ [95] การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเส้นเลือดและการสร้างเซลล์บุหลอดเลือดใหม่ [96-99] โดยกลไกดังกล่าวอาจจะพออธิบายได้ว่าทำไมกล้ามเนื้อหัวใจจึงทำงานได้ดีขึ้นหลังจากได้รับการปลูกถ่าย mesenchymal stem cells อย่างไรก็ตามการกระตุ้นประสาทซิมพาเธติกมากเกินไปอาจจะทำให้เกิดหัวใจเต้นผิดจังหวะร้ายแรงจนเสียชีวิตได้ [100-105]

มีการทดลองกระตุ้น adult mesenchymal stem cells ซึ่งนำมาจากเซลล์ไขมันชั้นใต้ผิวหนังโดยใช้ 5-azacytidine ซึ่งเป็นสารที่ช่วยในการเติมหมู่ methyl ให้กับสายพันธุกรรม (DNA demethylating agent) พบว่าสามารถกระตุ้นเซลล์ทำให้เจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้ [106] และก็มีการทดลองในลักษณะคล้ายกันโดย Tomita และ คณะ [65] ซึ่งทำการ

เพาะเลี้ยงเซลล์ไขกระดูกพร้อมด้วยสาร 5-azacytidine พบว่าเซลล์สามารถเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่คล้ายกับเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และทำการปลูกถ่ายเข้าไปในกล้ามเนื้อหัวใจบริเวณที่ตายจากการขาดเลือดก็พบว่าทำให้การทำงานของหัวใจดีขึ้น ดังนั้นจึงพอจะสรุปได้ว่าการใส่สาร 5-azacytidine ใน mesenchymal stem cells ก่อนที่จะปลูกถ่ายเซลล์อาจจะทำให้โอกาสที่จะประสบความสำเร็จในการสร้างเซลล์ใหม่ในบริเวณที่เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายมากขึ้น

การนำเซลล์ต้นกำเนิดเข้าไปในกล้ามเนื้อหัวใจ (Mode of delivery of stem cell)

Intramyocardial injection เป็นการฉีด stem cell เข้าไปในกล้ามเนื้อหัวใจโดยตรง มีการทดลองโดย Orlic และ คณะ [107] ซึ่งแยก stem cell จากไขกระดูกและฉีดเข้าไปในกล้ามเนื้อหัวใจรอบบริเวณที่ตายจากการขาดเลือดในหนูทดลอง พบว่าเซลล์ที่ปลูกถ่ายเข้าไปนั้นสามารถที่จะเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและเซลล์บุหลอดเลือดได้ ทำให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจขึ้นมาใหม่และการสร้างเส้นเลือดใหม่ด้วย โดยรวมจะทำให้การทำงานของหัวใจดีขึ้น

การปลูกถ่าย stem cell เข้าไปในกล้ามเนื้อหัวใจโดยตรงจะต้องการปริมาณเซลล์ที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการปลูกถ่ายโดยการฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำหรือผ่านทางเส้นเลือดหัวใจ (intracoronary administration) แม้ว่าขั้นตอนการฉีดเซลล์เข้าไปจะดูค่อนข้างง่ายและสามารถทำได้โดยตรวจหาบริเวณที่จะทำการฉีดเซลล์เข้าไปได้โดยตรง แต่การปลูกถ่ายด้วยวิธีดังกล่าวอาจเป็น ไปได้ในกรณีที่ผู้ป่วยต้องกระทำการผ่าตัดเส้นเลือดหัวใจ (CABG) ซึ่งทำให้ต้องคำนึงถึงปัจจัยเสี่ยงทั้งก่อนผ่าตัดและหลังผ่าตัด และผลการทดลองในหนูก็ประสบความสำเร็จเพียงแค่ 40 % [107]

อีกวิธีหนึ่งคือการปลูกถ่าย stem cell โดยผ่านทางการสวนหัวใจ (catheter base myocardial injections) โดยบริเวณที่ฉีดจะใช้การตรวจทางไฟฟ้าช่วยค้นหา (electromechanic mapping) โดยที่ electromechanic mapping [108] นี้สามารถที่จะช่วยค้นหาตำแหน่งที่เป็นแผลเป็นจากเซลล์ที่ตายไปหรือบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่ยังมีชีวิต ทำให้สามารถประเมินกล้ามเนื้อหัวใจได้ทั้งหมดและสามารถปลูกถ่ายเซลล์ไปยังบริเวณที่ต้องการได้อย่างแม่นยำ [109,110]

การฉีดเซลล์เข้าไปในหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Intracoronary injection)

การปลูกถ่าย stem cell ด้วยการฉีดเซลล์เข้าไปในเส้นเลือดแดงโคโรนารีผ่านการสวนเส้นเลือดหัวใจ (coronary catheterization) สามารถใช้เป็นวิธีการหนึ่งในการปลูกถ่าย stem cell ไปยังกล้ามเนื้อหัวใจที่ตายจากการขาดเลือด [111] วิธีดังกล่าวนี้มีข้อได้เปรียบกว่าการปลูกถ่าย stem cell โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (intravenous injection) เพราะสามารถนำเซลล์จำนวนมากไปยังบริเวณที่มีเซลล์ตายหรือบริเวณรอบๆได้ นอกจากนี้ยังทำให้เซลล์ที่ต้องการปลูกถ่ายเข้าไปรวมกับกล้ามเนื้อ

หัวใจบริเวณที่ต้องการได้อย่างสม่ำเสมอ ซึ่งต่างจากการปลูกถ่ายเซลล์ด้วยการฉีดเซลล์เข้าไปโดยตรงที่กล้ามเนื้อหัวใจซึ่งทำให้เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มเล็ก ๆ และอาจเป็นจุดที่ทำให้มีความไม่เสถียรของกระแสไฟฟ้า (electrical instability) จนเกิดหัวใจเต้นผิดจังหวะได้ [112]

การฉีดเซลล์เข้าไปในเส้นเลือดแดงโคโรนารีซึ่งโดยปกติจะใช้ความดันสูงจะทำให้การเคลื่อน ที่ของ stem cell ผ่านช่องว่างของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดเพื่อไปยังบริเวณที่มีกล้ามเนื้อหัวใจตายได้ดียิ่งขึ้น แต่ด้วยวิธีการดังกล่าวอาจทำให้เกิดการไหลเวียนของเลือดในหลอดเลือดแดงโคโรนารีผิดปกติ และอาจเกิดเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจตายเพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นปริมาณของ stem cell และระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการปลูกถ่ายควรได้รับการศึกษาอย่างระมัดระวัง

การฉีดเซลล์เข้าทางหลอดเลือดดำ (Intravenons injection)

การปลูกถ่าย stem cell โดยการฉีดเซลล์เข้าทางเส้นเลือดดำเป็นวิธีที่น่าสนใจและเป็นไปได้มากในทางปฏิบัติเนื่องจากง่ายและไม่ต้องการการผ่าตัดหรือการสวนหัวใจ โดยถ้าเซลล์ที่ปลูกถ่ายเข้าไปมีกลไกในการเดินทางไปยังบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจตายได้จำเพาะ ขบวนการดังกล่าวก็อาจจะนำมาใช้ในทางปฏิบัติได้ เชื่อว่ามีหลายกลไกที่มีความสัมพันธ์กับขั้นตอนที่ stem cell จะเข้ามาสู่บริเวณกล้ามเนื้อหัวใจตาย (homing process) เช่น ปัจจัยแวดล้อมของบริเวณที่เกิดเซลล์กล้าม เนื้อหัวใจตาย (microenvironment factors) การแสดงออกของ matrix และ adhesion molecules ของเนื้อเยื่อที่จะได้รับอันตรายจากการขาดเลือดรวมถึง homing receptors และปัจจัยอื่น ๆ อีกที่อาจเกี่ยวข้อง อย่างไรก็ตาม stem cell สามารถเดินทางไปยังอวัยวะอื่นๆด้วยจึงทำให้จำนวนเซลล์ที่จะไปถึงบริเวณของหัวใจที่ต้องการมีจำนวนน้อยลง ทำให้มีเซลล์ไม่เพียงพอในการแบ่งตัวเพื่อสร้างกล้ามเนื้อหัวใจ

Mechanism of stem cell Migration [113-114]

หลังจากได้รับการปลูกถ่าย Stem cell จะถูกลำเลียงไปสู่บริเวณของกล้ามเนื้อหัวใจที่ได้รับอันตรายและสามารถเจริญเติบโตและทำหน้าที่ต่อไป สภาวะแวดล้อมในบริเวณของกล้ามเนื้อหัว ใจที่ได้รับอันตรายดังกล่าวจะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นในขั้นตอนที่ stem cell จะเข้ามาและเจริญเปลี่ยนแปลงโดยทำให้มีการเพิ่มความสามารถในการผ่านระหว่างเซลล์บุหลอดเลือด การแสดง ออกของ adhesion molecules อย่างเช่น integrin และ homing receptors ขบวนการทั้งหมดเกิดขึ้นโดยผ่านทางการสัมผัสกันของเซลล์และปลดปล่อยสารเคมี chemoattractants จากผนังกล้ามเนื้อหัวใจที่ได้รับอันตราย

ความสามารถในการเคลื่อนที่ของ stem cell ไปยังบริเวณที่ได้รับอันตรายอาจเกิดจากสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (growth factors) หลายตัว เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF) และ stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) โดยพบว่าการแสดงออกของสารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างมากในบริเวณเนื้อเยื่อที่ขาดเลือด เป็นข้อสนับสนุนอันหนึ่งว่าสารเหล่านี้อาจจะทำหน้าที่เป็น homing signals ที่ทำให้ stem cell ที่ปลูกถ่ายเข้าไปเดินทางมายังบริเวณของกล้ามเนื้อหัวใจที่ได้รับอันตรายได้ และเซลล์ที่ใช้ในการปลูกถ่ายจะต้องรวมตัวเข้ากับเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลาสั้นๆหลังจากเกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือดจึงจะได้ประโยชน์สูงสุด

หลังจากขั้นตอนการเข้าสู่บริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่ได้รับอันตราย และมีการแบ่งเซลล์เพิ่ม ขึ้นแล้วเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่สร้างขึ้นใหม่จะต้องมีการเชื่อมโยงกับเซลล์ข้างเคียงโดยทางไฟฟ้า (intercellularly electrical couplings) และมีการสร้าง connexin ซึ่งเป็นโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นส่วนประกอบของรอยต่อระหว่างเซลล์ (gap junctions) และการที่ stem cell ที่ปลูกถ่ายจะยังมีชีวิตอยู่ได้ต้องมีการสร้างเส้นเลือดใหม่เพื่อนำเลือดไปเลี้ยงเซลล์ได้เพียงพอเพื่อให้บีบตัวได้อย่างปกติ

การศึกษาใน Phase I

การศึกษาเกี่ยวกับการปลูกถ่าย stem cell ยังเป็นการศึกษาขนาดเล็กและไม่ใช่การศึกษาแบบสุ่ม (non-randomized trial) ซึ่งต่อไปนี้จะได้กล่าวถึงการศึกษาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการปลูกถ่าย stem cell ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายจากการขาดเลือด

การศึกษา Hamano และคณะ [115] (Local Implantation of Autologous Bone Marrow Cells for Therapeutic Angiogenesis in Patients With Ischemic Heart Disease) ได้ทำการฉีดเซลล์ไขกระดูกของผู้ป่วยเองเข้าไปในบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่ขาดเลือดในระหว่างที่ทำการผ่าตัดหลอดเลือดแดง coronary (coronary artery bypass grafting surgery) โดยมีคนไข้จำนวน 5 คน ซึ่งได้รับการรักษาวิธีใหม่นี้พร้อมไปกับการผ่าตัดเส้นเลือด คนไข้ทั้งหมดได้รับการตรวจและติดตามผลเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ปี พบว่าเซลล์ไขกระดูกของคนไข้สามารถฝังตัวเข้าไปในกล้ามเนื้อหัวใจโดยการตรวจหัวใจโดยวิธี scintigraphy (รูปภาพที่ 2.4) หลังผ่าตัดแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของเลือดที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจของคนไข้ 3 ใน 5 คน (ตารางที่ 2.2) และผลการตรวจเอกซ์เรย์หัวใจ ตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจและคลื่นสะท้อนความถี่สูง (echocardiography) รวมผลการตรวจเลือดก็ไม่พบผลที่ชี้บ่งไปในทางไม่ดี อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่และเพิ่มการนำเลือดมาเลี้ยงแต่จำนวนของเลือดที่มายังบริเวณดังกล่าวก็ยังน้อยเมื่อเทียบกับการ

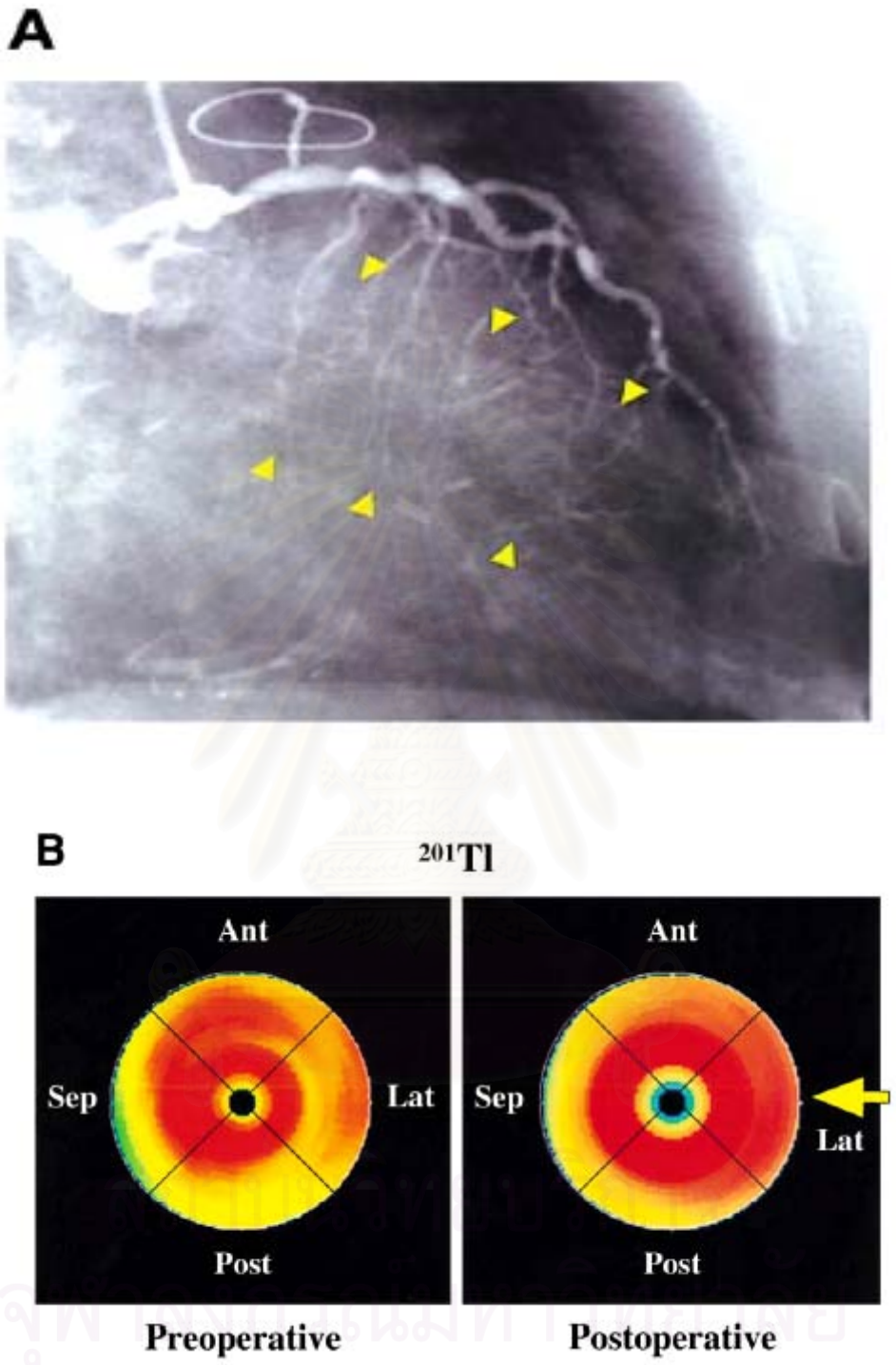
ผ่าตัดเส้นเลือดหัวใจ กล่าวโดยสรุปการรักษาวิธีใหม่นี้ค่อนข้างปลอดภัยและอาจเป็นทางเลือกในการรักษาสำหรับคนไข้โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดที่ไม่สามารถรักษาได้ด้วยวิธีอื่น

Patient no.	Sex	Age (years)	Sites of CABG / Area of BMCI	No. of cells/point (points)	Outcome
1	M	67	LAD, D1, 14PL 15PL	$5*10^7$ (6 points)	Improvement
2	F	68	LAD, OM1, OM2 14PL	$5.6*10^7$ (11 points)	Inestimable
3	M	59	LAD, 14PL, 4PD 15PL	$1*10^8$ (5 points)	Improvement
4	M	61	LAD, OM, 4PD, 4PL D1	$1*10^8$ (10 points)	Inestimable
5	F	73	LAD, D1, 4PD, 4PL Cx	$1*10^8$ (22 points)	Improvement

CABG, coronary artery bypass grafting; BMCI,bone marrow cell injection; LAD, left anterior descending artery; Cx, circumflex artery; D1, first diagonal branch; PL, posterolateral branch; PD, posterodescending branch; OM, obtuse marginal branch.

ตารางที่ 2.2 : แสดงข้อมูลการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูก (Bone Marrow Cell Implantation) ในคนไข้จำนวน 5 คน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปภาพที่ 2.4: แสดงผลการฉีดสีเพื่อดูหลอดเลือดแดง coronary (coronary angiogram) (A) และการตรวจทางนิเคลียร์ (201Tl scintigram) (B) ของคนไข้รายที่5 ซึ่งการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกไปยังบริเวณที่เลี้ยงด้วย circumflex artery และพบมีการดีขึ้นของเลือดที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจซึ่งตรวจโดย 201Tl scintigram 1 เดือนหลังจากผ่าตัดหลอดเลือดแดง coronary ลูกศรแสดงบริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์ (A) และบริเวณที่การลำเลียงเลือดไปเลี้ยงที่พบว่าดีขึ้น (B) .

การศึกษาของ Strauer และคณะ [111] ได้ทำการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกชนิด mononuclear ของคนไข้เอง ไปยังหลอดเลือดแดง coronary ที่เกี่ยวข้องกับการขาดเลือดในผู้ป่วยรายนั้น โดยการปลูกถ่ายจะกระทำในช่วงที่คนไข้ได้รับการตรวจสวนเส้นเลือดหัวใจและทำการขยายหลอดเลือดแดง coronary (percutoneous transluminal coronary angioplasty) 6 วัน หลังจากเกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน

ในการศึกษานี้มีคนไข้ 20 คน ที่เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายตลอดทุกชั้น (transmural infarction) ตามเกณฑ์วินิจฉัยขององค์การอนามัยโลก โดยมีเส้นเลือดที่เป็นเหตุดังต่อไปนี้ left anterior descending coronary artery (LAD) 4 คน , left circumflex coronary artery (LCX) 3 คน , right coronary artery (RCA) 13 คน (ตารางที่2.3) โดยระยะเวลาที่คนไข้เจ็บหน้าอกก่อนที่จะมาโรงพยาบาล 12 $\pm$ 10 ชม. โดยการศึกษาจะไม่รวมคนไข้ที่มีภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายมามากกว่า 72 ชม.มีภาวะช็อคจากหัวใจ (cardiogenic shock) มีโรคร้ายแรงอื่นร่วมด้วย ดื่มเหล้าหรือใช้ยาเสพติดอย่างอื่น

หลังจากที่ได้รับการรักษามาตรฐานสำหรับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน คนไข้ 10 คน ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกชนิด mononuclear cell ของตัวเอง ในขณะที่อีก 10 คน ได้รับเฉพาะการรักษามาตรฐานของภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายอย่างเดียว หลังจากติดตามการรักษา 3 เดือน (ตารางที่ 3) บริเวณที่มีเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจตาย ซึ่งแสดงให้เห็นโดยใช้วิธีการฉีดสีเข้าไปในหัวใจห้องล่าง (ventriculography) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ร่วมด้วย เมื่อเทียบกับก่อนรักษาและกับกลุ่มที่รักษาแบบมาตรฐานเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ ผนังกล้ามเนื้อหัวใจที่เคยมีเซลล์กล้ามเนื้อตายมีการเคลื่อนไหวมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มที่รักษาด้วยการปลูกเซลล์ได้รับการตรวจการทำงานของหัวใจโดยวิธี dobutamine stress echocardiography, radionuclide ventriculography และ catheterization of the right heart พบว่าคนไข้ในกลุ่มนี้มีการเพิ่มขึ้นของ stroke volume index, left ventricular end systolic volume และการบีบตัวรวมถึงการเพิ่มของเลือดที่มาเลี้ยงหัวใจ โดยสรุปแล้วการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกชนิด mononuclear ของคนไข้เองมีความปลอดภัยและน่าจะมีประสิทธิภาพดี โดยทั้งหมดเป็นผลจากมีการสร้างกล้ามเนื้อหัวใจและการสร้างเส้นเลือดขึ้นมาใหม่

	Before Cell Therapy	3 Months After Cell Therapy	*P*
No. of patients	10	10	...
Hemodynamic data			
LV ejection fraction, %	51±14	53±13	NS
Stroke volume index, mL/m²	49±7	56±7	0.010
Cardiac geometry			
LV end-diastolic volume, mL	158±20	143±30	NS
LV end-systolic volume, mL	82±26	67±21	0.011
Contractility indices			
Circumferential fiber shortening, mm/s	20.5±4.2	24.4±7.7	NS
P_{syst}/ESV, mm Hg/mL	1.81±1.44	2.27±1.72	0.005
Infarct region as perfusion defect			
^{201}Thallium scintigraphy, cm²	174±99	128±71	0.016

NS indicates not significant.

ตารางที่ 2.3 : เปรียบเทียบข้อมูลการตรวจการทำงานของหัวใจจากกลุ่มที่รักษาด้ายการปลูกถ่ายเซลล์และกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีมาตรฐานที่เวลา 3 เดือน

ในการศึกษา TOPCARE AMI (The Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction) โดย Assmus B และคณะ [112] มีคนไข้ 20 คนที่ได้รับการรักษาด้วยวิธี primary angiography และใส่ขดลวด โดยคนไข้ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์โดยทางเส้นเลือดแดงโคโรนารีด้วย โดยคนไข้ทั้งหมด 20 คน ที่เกิด reperfused acute myocardial infarction ถูกสุ่มให้ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูก 9 คน หรือ progenitor cell ที่มาจากกระแสเลือด 11 คน ในช่วงเวลา 4.3±1.5 วัน หลังเกิดกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด การศึกษาพบว่าหลังการปลูกถ่ายเซลล์ทั้งสองชนิดสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ global left ventricular ejection fraction (LVEF) (ตารางที่ 2.4) และการบีบตัวของบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่เคยมีการตายจากการขาดเลือด นอกจากนี้ยังพบการลดลงอย่างมากของ end systolic left ventricular volume ในช่วงเวลาติดตาม 4 เดือน และเมื่อเทียบผลการศึกษากับกลุ่มอ้างอิง (ตารางที่ 2.5 และรูปภาพที่ 2.5) พบว่าในกลุ่มหลังนี้มีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยของ LVEF และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ end systolic volume

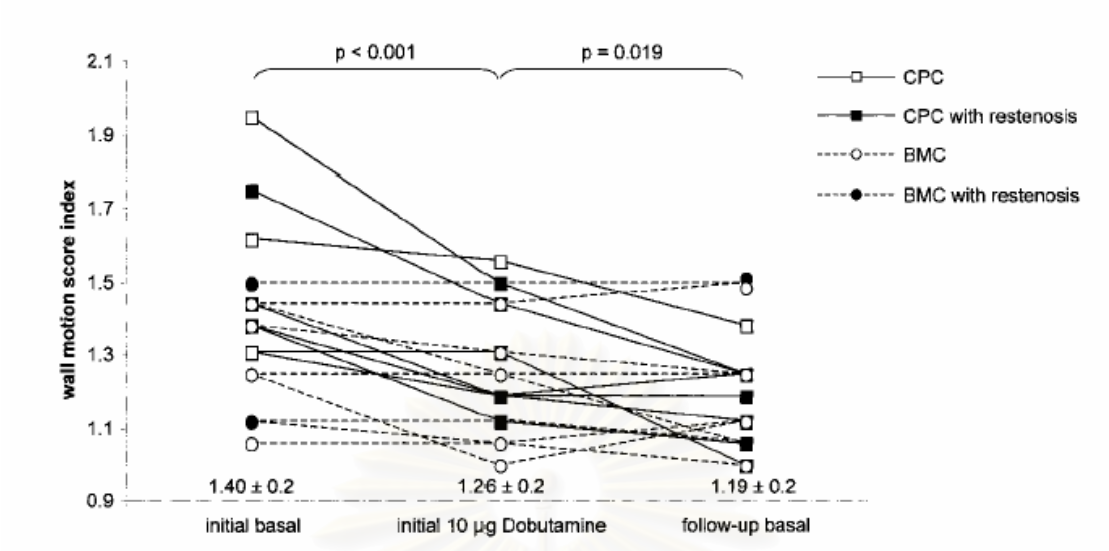
	Baseline (n=19)	Follow-Up (n=19)	*P*
Ejection fraction, %	51.6±9.6	60.1±8.6	0.003
End-diastolic volume, mL	117.2±35.1	105.2±29.9	0.199
End-systolic volume, mL	56.1±20.0	42.2±15.1	0.011
Regional wall motion, SD/chord			
Infarct	−1.5±0.2	−0.5±0.7	<0.001
Infarct center	−1.5±0.5	−0.8±0.5	<0.001
Infarct border	−1.3±0.4	−0.4±0.6	<0.001

ตารางที่ 2.4 : แสดงผลการตรวจการการทำงานของหัวใจ โดยการฉีดสารทึบแสง (LV Function Assessed by Analysis of LV Angiography) ในคนไข้กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์

	Baseline (n=11)	Follow-Up (n=11)	*P*
Ejection fraction, %	51±10	53.5±7.9	NS
End-diastolic volume, mL	102±23.6	123±50.3	NS
End-systolic volume, mL	50.4±17.5	58.2±32.2	NS

ตารางที่ 2.5 : แสดงผลการตรวจการการทำงานของหัวใจ โดยการฉีดสี (LV Function Assessed by Analysis of LV Angiography) ในคนไข้กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีมาตรฐาน (control group)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปภาพที่ 2.5 : การตรวจคลื่นสะท้อนหัวใจขณะพัก (Echocardiographic wall motion score index) ณ จุดเริ่มต้น ขณะกระตุ้นด้วย low-dose dobutamine ในช่วงก่อนและหลังการปลูกถ่ายเซลล์ที่เวลา 4 เดือน

ในการติดตามคนไข้ 4 เดือนก็พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของเลือดที่ไปเลี้ยงบริเวณที่ขาดเลือด การตรวจดูการมีชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (myocardial viability) ในบริเวณที่เคยมีเซลล์ตายจากการขาดเลือดด้วยวิธี positron emission tomography (PET scan) ก็พบว่าเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างในตัวแปรที่วัดข้างต้นระหว่างการปลูกถ่ายเซลล์ที่มาจากไขกระดูกหรือมาจากกระแสเลือด และในช่วงเฝ้าติดตามก็ไม่พบมีการตอบสนองด้วยการอักเสบหรือหัวใจเต้นผิดจังหวะชนิดร้ายแรง โดยสรุปในคนไข้ที่มีกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบ พลัน การปลูกถ่าย progenitor cell จากเลือดและ stem cell จากไขกระดูกของคนไข้เองมีโอกาสเป็นไปได้สูงในทางปฏิบัติและค่อนข้างปลอดภัยและยังส่งผลดีในแง่ของการเปลี่ยนแปลงโครง สร้างของกล้ามเนื้อหัวใจภายหลังจากเกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (post-infarction remodelling process)

ในการศึกษา Autologous skeletal myoblast transplantation for severe Post-infarction left ventricular dysfunction โดย Menashe P. และคณะ [116] ซึ่งรวบรวมคนไข้ 10 คน ที่มีการทำงานของหัวใจห้องล่างซ้ายลดลงอย่างมาก (LVEF<35%) และพบมีรอยแผลเป็นที่ไม่เคลื่อน ไหวด้วยการตรวจ dobutamine echocardiography และ PET Scan โดยคนไข้มีการวางแผนที่จะทำการผ่าตัดหลอดเลือดแดง coronary อยู่แล้ว

เซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อนได้ถูกเพาะเลี้ยงจากกล้ามเนื้อที่ตัดมาจากต้นขา โดยหลังจากนั้นประมาณ 16 วันจะได้เซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อน 871×10^6 เซลล์และทำการปลูกถ่ายไปยังบริเวณที่เป็น

แผลเป็นในขณะที่ทำการผ่าตัดหลอดเลือดแดง coronary ในช่วงการติดตาม 10.9 เดือนพบว่าระดับความสามารถในการทำงานซึ่งวัดโดย New York Heart Association Functional class ดีขึ้นจาก 2.7±0.2 ก่อนผ่าตัดเป็น 1.6±0.1 หลังผ่าตัด และตรวจพบการบีบตัวของหัวใจห้องล่างซ้ายดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการศึกษาสรุปได้ว่าการปลูกถ่ายเซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อนของตนไข้เองในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายที่มีการทำงานของหัวใจลดลงอย่างมากมีความเป็นไปได้และค่อนข้างปลอดภัย โดยการตรวจพบว่ามีการบีบตัวของบริเวณที่เคยเป็นแผลเป็นและไม่เคลื่อนไหวบ่งว่าการรักษาวิธีใหม่นี้น่าจะมีประ สิทธิภาพดี

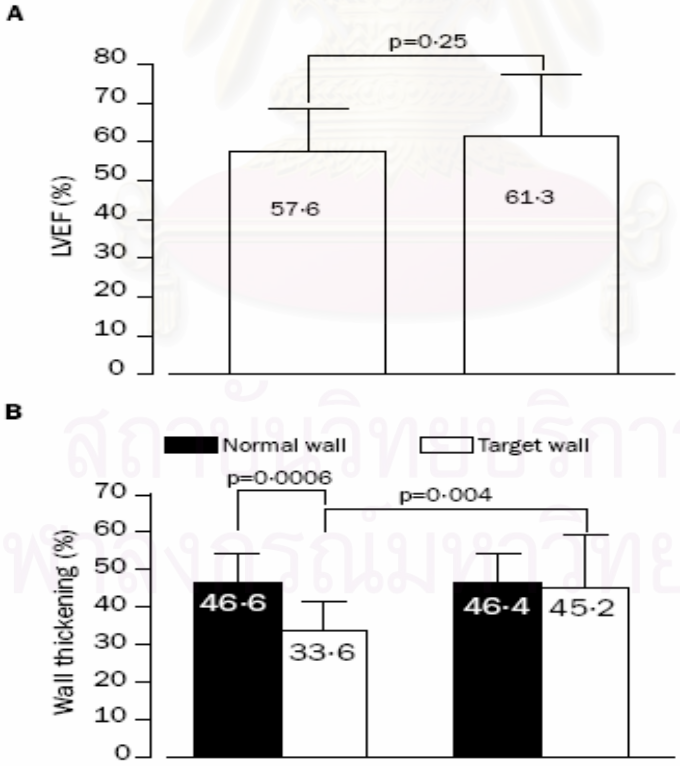
การศึกษาของ Stamm C. และคณะ [117] (Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration) โดยศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกของคนไข้เองขณะที่ได้รับการผ่าตัดเส้นเลือดหัวใจในคนไข้ 6 รายที่เกิดกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดในการตรวจติดตามเป็นระยะ เวลา 3-9 เดือน พบว่าการนำเลือดไปเลี้ยงบริเวณที่เคยมีกล้ามเนื้อหัวใจตายดีขึ้นจากการตรวจโดยใช้ SPECT (single photon emission computer tomography) myocardial perfusion scintigraphy ซึ่งพบว่า stem cell ที่ปลูกถ่ายให้หัวใจของคนไข้อาจจะมีบทบาทในการสร้างเส้นเลือดใหม่ในบริเวณที่เกิดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจแม้ว่าในแง่ของการบีบตัวของกล้าม เนื้อหัวใจบริเวณดัง กล่าวเมื่อเทียบกับก่อนรักษาจะไม่เพิ่มขึ้นให้เห็นชัดเจน ในจำนวนนี้คนไข้ 2 คนเกิดหัวใจเต้นเร็วชนิด supraventricular tachycardia แต่คนไข้ทุกคนก็มีชีวิตอยู่ตลอดการตรวจติดตาม

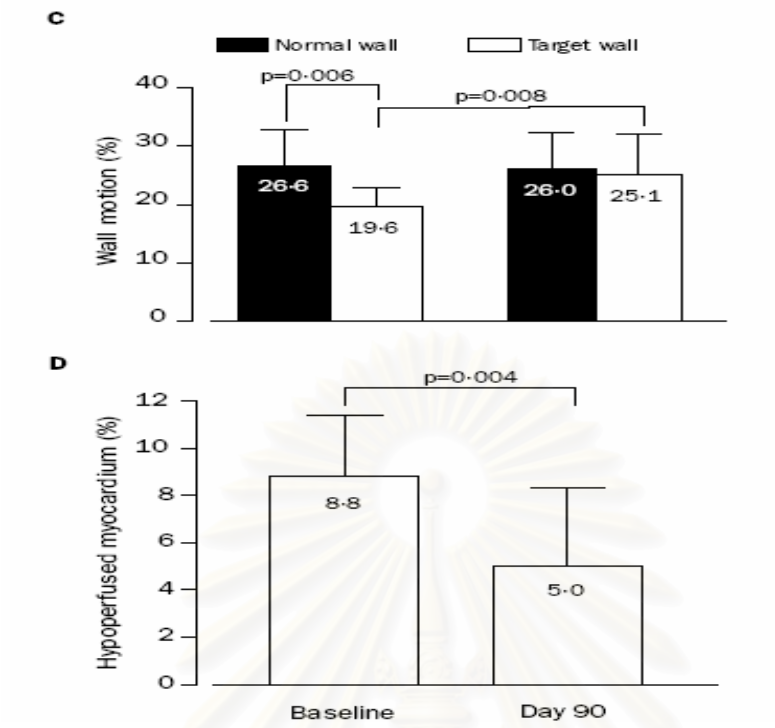
การศึกษาวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์และการเจริญเปลี่ยนแปลงจากการตรวจชิ้นเนื้อ (Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation) โดย Pagani FD และ คณะ [64] ซึ่งศึกษาในคนไข้ 5 คนที่มีกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดและเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาและรอคอยการทำผ่าตัดเปลี่ยนหัวใจ (heart transplantation) คนไข้ที่เข้าร่วมการศึกษาทั้ง หมดเคยได้รับการผ่าตัดเส้นเลือดหัวใจ (CABG) และการตรวจการทำงานของหัวใจโดยเฉลี่ยแล้ว LVEF ประมาณ 15% และ ยังต้องใช้ยากระตุ้นหัวใจ (inotrope dependent)

ในการศึกษานี้ทำการปลูกถ่ายเซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อนของคนไข้เองไปยังบริเวณที่เป็นแผลเป็นในกล้ามเนื้อหัวใจ โดยการปลูกถ่ายดังกล่าวทำพร้อมไปกับการใส่เครื่องช่วยการทำงานของหัว ใจห้องล่าง (left ventricular assist devices) โดยการตรวจชิ้นเนื้อพบว่าเซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อนที่ปลูกถ่ายเข้าไปยังมีชีวิตและสามารถที่จะเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อที่เจริญเต็มที่ (mature myofiber) ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ตัวอ่อนกล้ามเนื้อที่ปลูกถ่ายไปที่หัวใจนั้นไม่กระตุ้นให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันทำลายเซลล์ โดยสรุปจากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการรักษาโรค หัวใจ

โดยการปลูกถ่ายเซลล์กล้ามเนื้อตัวอ่อนและพบว่ารูปแบบของการมีชีวิตและการแบ่งเซลล์ในสัตว์ทดลองก็มีลักษณะที่คล้ายกับในคน

การศึกษาของ Tse และคณะ [108] เพื่อศึกษาการสร้างเส้นเลือดใหม่ในบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่ขาดเลือดโดยการปลูกถ่ายเซลล์เข้าไปยังผนังกล้ามเนื้อหัวใจโดยตรง (angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation) เซลล์ที่ใช้ปลูกถ่ายเป็นเซลล์ไขกระดูกชนิด mononuclear cell ซึ่งคนไข้ 8 คน ในการศึกษานี้เป็นกลุ่มที่มีโรคหัวใจขาดเลือดเป็นแบบ stable angina ที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา ในการปลูกถ่ายเซลล์ผู้ป่วยจะได้รับการตรวจสวนเส้นเลือดหัวใจและค้นหาตำแหน่งที่จะฉีดเซลล์เข้าในกล้ามเนื้อหัวใจโดยใช้วิธีทางไฟฟ้า (electromechanic mappings) หลังจากนั้นเซลล์ที่จะใช้ปลูกถ่ายถูกฉีดเข้าไปในกล้ามเนื้อหัวใจโดยผ่านทางผนังด้านในหัวใจ (transendothelial approach) เซลล์ไขกระดูกชนิด Mononuclear cell ที่ใช้ในการปลูกถ่ายเซลล์นี้นำมาจากไขกระดูกบริเวณ iliac crest





รูปภาพที่ : 2.6 แสดงการบีบตัวของหัวใจ (A), ความหนาของผนังกล้ามเนื้อที่ปลูกถ่าย (regional wall thickening) (B), การเคลื่อนไหวของผนังกล้ามเนื้อที่ปลูกถ่าย (C) เปอร์เซนของกล้ามเนื้อหัวใจที่ยังขาดเลือดของผนังกล้ามเนื้อที่ปลูกถ่ายและกล้ามเนื้อหัวใจปกติ (hypoperfused myocardium) (D) ในช่วงเวลาก่อนและหลังจากปลูกถ่ายเซลล์ 90 วัน (Data are mean (SD))

จากตรวจติดตามผู้ป่วยเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าผู้ป่วยมีอาการเจ็บหน้าอกน้อยลงและใช้ยาอมใต้ลิ้น (nitroglycerine) ลดลง นอกจากนี้พบว่าเลือดที่มาเลี้ยงหัวใจและการบีบตัวของหัวใจในส่วนที่ได้รับการปลูกถ่ายดีขึ้นอย่างชัดเจนจากการตรวจด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าดังแสดง (รูปภาพที่2.6) ในขั้นตอนของการปลูกถ่ายไม่พบภาวะแทรกซ้อนทั้งเฉียบพลันและตลอดช่วงการตรวจติดตาม

ในการทดลองของ Perin EC และคณะ [118] ศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกให้กับคนไข้หัวใจล้มเหลวที่เกิดจากหัวใจขาดเลือดเรื้อรัง (transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure) โดยการศึกษานี้เซลล์ไขกระดูกที่ใช้เป็นเซลล์ชนิด mononuclear cell โดยการปลูกถ่ายนี้จะใช้การตรวจสวนหลอดเลือดแดง coronary ช่วยในการนำเซลล์เข้าไป โดยเซลล์จะถูกฉีดผ่านทางผนังด้านในของหัวใจไปยังบริเวณของหัวใจขาดเลือดที่ทำงานน้อย (hibernating myocardium) โดยใช้การตรวจทางไฟฟ้า (electromechanic mappings)

	Treatment (n=14)	Control (n=7)	P*
NYHA class			
Before treatment	2.21±0.89	2.71±0.75	
After treatment	1.14±0.36	2.71±0.76	0.0001
P	0.0003	1.0	
CCSAS class			
Before treatment	2.64±0.84	2.57±0.97	
After treatment	1.28±0.61	2.14±0.89	
P	0.0001	0.06	0.001
Ramp treadmill			
METs			
Before treatment	5.09±2.5	5.07±1.96	
After treatment	6.68±2.35	5.16±2.45	0.078
P	0.0085	0.84	
$\dot{V}o_2$max			
Before treatment	17.96±8.78	17.75±6.85	
After treatment	23.38±8.31	18.08±8.58	0.08
P	0.01	0.84	
Echocardiogram			
ESV, cc			
Before treatment	146.78±53.46	89.42±26.23	
After treatment	123.21±47.88	98.85±20.52	0.041
P	0.026	0.36	
EDV, cc			
Before treatment	211.35±76.89	135.71±26.08	
After treatment	189.14±67.54	145±27.62	0.09
P	0.065	0.50	
EF, %			
Before treatment	30±5.56	36±11.73	
After treatment	35.5±7.85	31.85±7.55	0.029
P	0.027	0.31	
SPECT			
Total reversible defect, %			
Before treatment	15.15±14.99	10.71±16.60	
After treatment	4.53±10.61	32.28±37.25	0.022
P	0.016	0.23	
% Rest defect (50%)			
Before treatment	40.77±11.13	35.85±10.09	
After treatment	38.84±8.79	36.42±12.08	0.65
P	0.44	0.77	

*P values reflect comparison of the differences between treatment and control groups over time

ตารางที่ 2.6 : แสดงข้อมูลของกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์และกลุ่มควบคุมที่เวลาก่อนและหลังการปลูกถ่าย 2 เดือน

สำหรับในการศึกษานี้ มีคนไข้ 14 ราย ซึ่งมีภาวะเส้นเลือดหัวใจขาดเลือดรุนแรงและมีการทำงานของหัวใจลดลงอย่างมาก (LVEF < 40%) ซึ่งไม่สามารถจะทำผ่าตัดเปลี่ยนหลอดเลือดแดง coronary ได้ หลังจากที่เก็บเซลล์ไขกระดูกจาก iliac crest 4 ชม. เซลล์ไขกระดูกดังกล่าวจะถูกฉีดเข้าไปในกล้ามเนื้อหัวใจ ในการตรวจติดตามที่เวลา 2 เดือน (ตารางที่ 2.6) พบว่าคนไข้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มีอาการโดยรวมดีขึ้น โดยพิจารณาจาก New York Heart Association class และ Canadian cardiovascular society angina score นอกจากนี้ยังพบการลดลงอย่างมากของบริเวณที่ผิดปกติที่เปลี่ยนแปลงขณะที่ทำงานมากขึ้น (reversible stress defect) และการบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ (LVEF) ก็ดีขึ้นจากการตรวจด้วย SPECT ที่เวลา 4 เดือน ผลการตรวจติดตามพบว่ามีการเพิ่มขึ้น

ของ LVEF จาก 20% เป็น 29% และมีการลดลงของปริมาตรหัวใจหลังการบีบตัว (end systolic volume) และพบว่าบริเวณที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ก็มีการบีบตัวเพิ่มขึ้น โดยเชื่อว่าการที่กล้ามเนื้อหัวใจทำงานได้ดีขึ้นน่าจะเป็นผลจากการมีการสร้างเส้นเลือดใหม่เพราะพบว่ามีเลือดไปเลี้ยงบริเวณกล้าม เนื้อหัวใจที่ไม่ค่อยทำงาน (hibernating myocardium) มากขึ้น ในการทดลองนี้มีผู้ป่วยเสียชีวิต 1 คน โดยคิดว่าเกิดจาก sudden cardiac death แต่ในรายอื่นก็ไม่พบภาวะแทรกซ้อนในช่วงปลูกถ่ายเซลล์และไม่พบภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะรุนแรง

The Bone Marrow Transfer to Enhance ST Elevation Infarct Regeneration (BOOST) study [119] โดยการศึกษานี้ถือเป็น การศึกษาที่มีการสุ่มและควบคุม (randomized controlled study) ชิ้นแรกของการปลูกถ่าย stem cell ในคนไข้ที่มีกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน

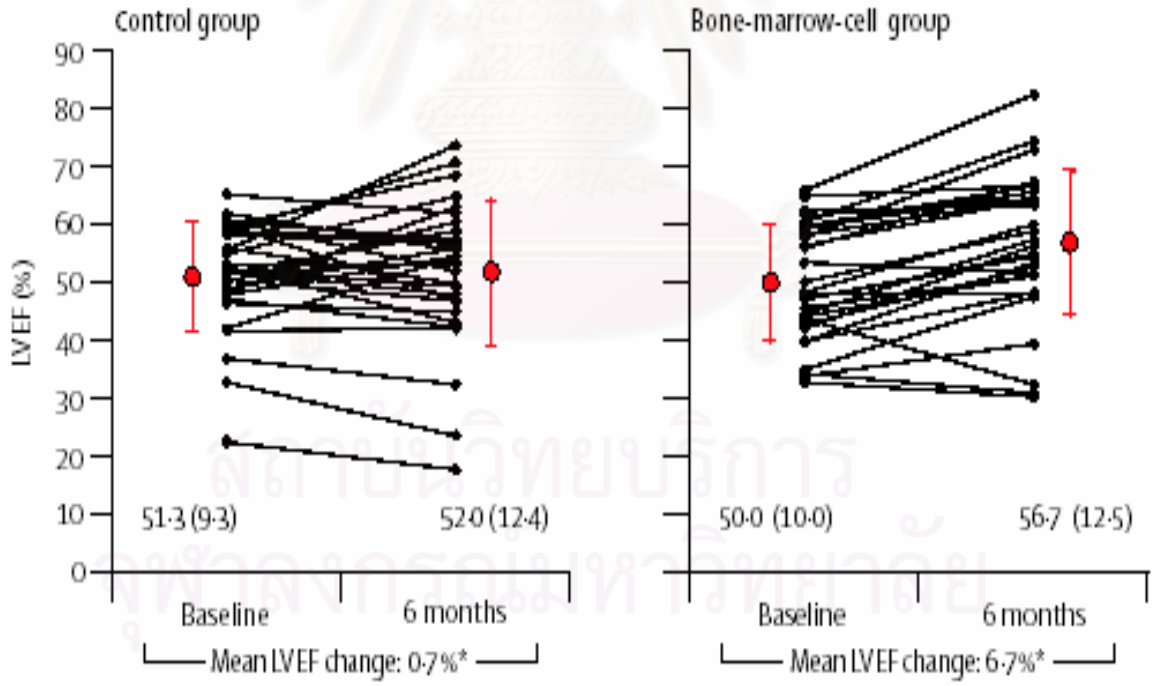
การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อที่จะประเมินว่าการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกของคนไข้เอง (autologous bone marrow cell) สามารถทำให้การบีบตัวของหัวใจ (LVEF) ที่การตรวจติดตาม 6 เดือนดีขึ้นได้หรือไม่ โดยหลังจากที่คนไข้กล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลันแบบ ST-Segment elevation จำนวน 60 ราย ได้รับการรักษาด้วยการสวนและขยายเส้นเลือดหัวใจ ในการศึกษาจะแบ่งคนไข้ออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 30 คน โดยกลุ่มแรกให้ได้รับการรักษาแบบมาตรฐานทั่วไปอีกกลุ่มหนึ่งได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกร่วมไปกับการรักษาแบบเดิม โดยการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกดังกล่าวทำโดยการฉีดเซลล์ผ่านทางเส้นเลือดแดงโคโรนารีในระยะเวลา 4.8 วัน หลังจากการตรวจสวนและขยายเส้นเลือดหัวใจ (percutaneous coronary intervention, PCI)

จุดประสงค์หลัก (Primary end point) คือ การเปลี่ยนแปลงของการบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ (LVEF) ที่ระยะเวลา 6 เดือน โดยการตรวจด้วยเอกซ์เรย์แม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) การวิเคราะห์ผล MRI จะทำโดยผู้ศึกษา 2 กลุ่ม ที่ไม่ทราบข้อมูลของผู้ป่วยแต่ละราย โดยสรุปแล้วผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึง ผลการปลูกถ่ายเซลล์ไขกระดูกให้คนไข้กล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลันแบบ ST-segment elevation ซึ่งพบว่าทำให้การบีบตัวของหัวใจ (LVEF) ดีขึ้น (ตารางที่ 2.7,2.8 : รูปภาพที่ 2.7) อย่างชัดเจนในการตรวจติดตามที่เวลา 6 เดือน และนอกจากนี้การวิเคราะห์การบีบตัว (global LVEF) ของกล้ามเนื้อของหัวใจในคนไข้แต่ละกลุ่มย่อยที่เวลาก่อนและหลังปลูกถ่ายเซลล์ 6 เดือนก็พบว่าข้อมูลสนับสนุนปลูกถ่ายเซลล์ (รูปภาพที่ 2.8)

	Baseline		6 months		Change	
	Controls	BMC group	Controls	BMC group	Controls	BMC group
LVEDV index (mL/m²)	81·4 (16·9)	84·2 (17·2)	84·9 (21·9)	91·7 (26·0)	3·4 (11·1)	7·6 (20·0)
LVESV index (mL/m²)	40·6 (16·9)	43·0 (14·7)	42·6 (23·5)	42·4 (23·9)	2·0 (11·1)	-0·6 (14·9)
Global LVEF (%)	51·3 (9·3)	50·0 (10·0)	52·0 (12·4)	56·7 (12·5)	0·7 (8·1)	6·7 (6·5)
LVM index (g/m²)	78·2 (18·3)	82·7 (18·7)	71·7 (14·2)	71·9 (14·6)	-6·5 (12·8)	-10·8 (10·6)
LE (mL)	30·3 (17·4)	33·0 (21·1)	19·8 (9·8)	18·9 (12·2)	-10·5 (10·6)	-14·1 (13·0)

BMC=bone-marrow cell. Data are mean (SD) unless otherwise stated. *Treatment effects expressed asdifferences in least-squares means (ANCOVA model) with 95% CI. LVM=left ventricular mass. LE=late contrast enhancement. There were no differences between groups at baseline.

ตารางที่ 2.7 : แสดงปริมาตรและกล้ามเนื้อของหัวใจห้องล่างซ้าย (Left ventricular volume and mass indices), การบีบตัว (global LVEF) , และปริมาณเลือดที่มาเลี้ยงกล้ามเนื้อของหัวใจ จากการตรวจด้วย MRI ที่เวลาก่อนและหลังปลูกถ่ายเซลล์ 6 เดือน

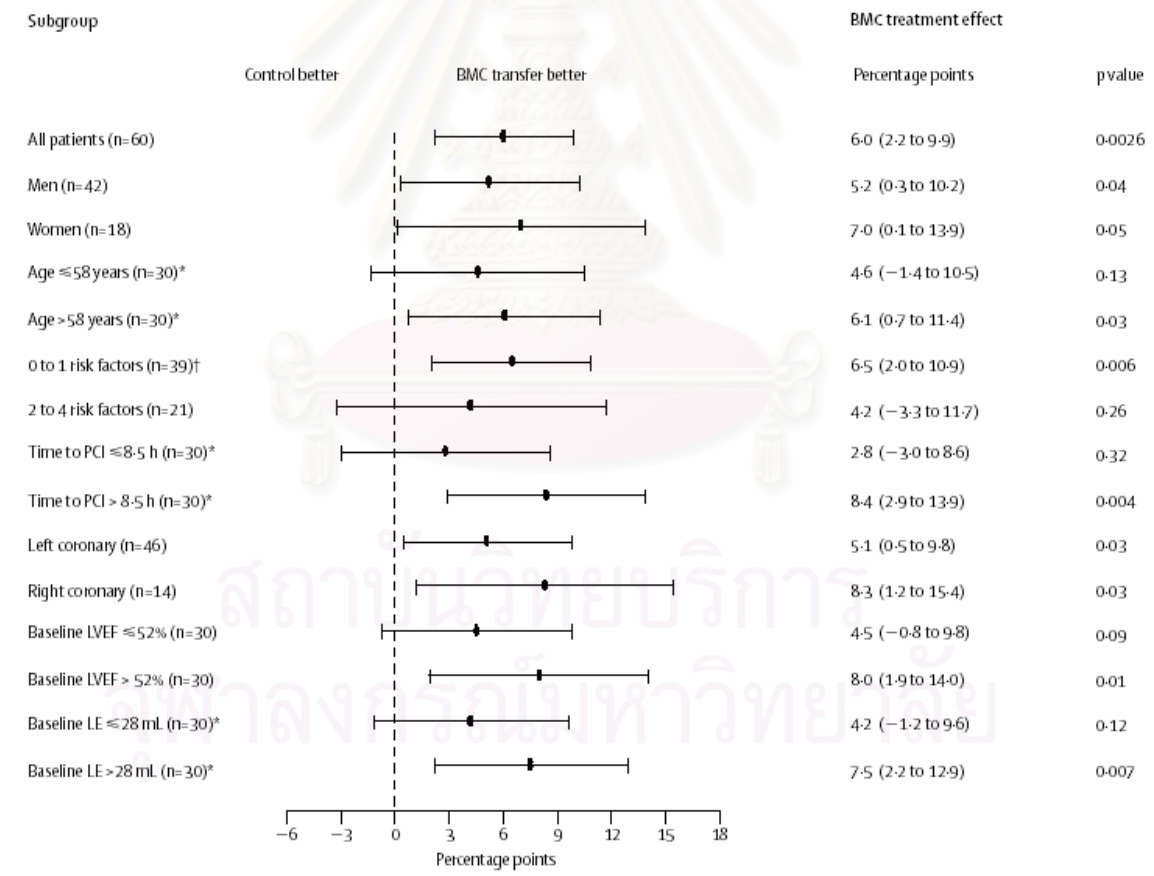


รูปภาพที่ 2.7 : การบีบตัว (global LVEF) ของกล้ามเนื้อของหัวใจ ที่เวลาก่อนและหลังปลูกถ่ายเซลล์ 6 เดือน (*p=0.0026 for difference between groups) จุดเล็ก (Small dots) แสดงข้อมูลของแต่ละราย; จุดใหญ่ (large dots) แสดงข้อมูลเฉลี่ย ; แท่งในแนวตั้งแสดง (Vertical bars) แสดงความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	Baseline		6 months		Change		BMC treatment effect†	p
	Controls	BMC group	Controls	BMC group	Controls	BMC group		
Regional LVEF (%)	47·8 (9·7)	46·3 (10·6)	48·9 (15·2)	53·0 (15·5)	1·1 (11·8)	6·7 (9·5)	5·7 (0·2 to 11·3)	0·04
Systolic wall motion (mm), infarct region	3·9 (1·8)	4·4 (1·9)	4·9 (2·9)	5·9 (2·5)	1·0 (2·5)	1·5 (2·1)	0·6 (-0·6 to 1·8)	0·32
Systolic wall motion (mm), border zone	6·8 (1·6)	7·0 (1·7)	6·8 (2·1)	8·0 (2·1)	-0·1 (2·2)	1·0 (1·9)	1·1 (0·1 to 2·1)	0·03

BMC=bone-marrow cell. Data are mean (SD). Treatment effects are expressed as differences in least-squares means (ANCOVA model) and 95% CI .There were no differences between groups at baseline

ตารางที่ 2.8 : การบีบตัวของกล้ามเนื้อของหัวใจที่เวลาก่อนและหลังปลูกถ่ายเซลล์ 6 เดือน (ตรวจด้วย MRI)



รูปภาพที่ 2.8: การวิเคราะห์ การบีบตัว (global LVEF) ของกล้ามเนื้อของหัวใจ ในคนไข้แต่ละกลุ่ม ที่เวลาก่อนและหลังปลูกถ่ายเซลล์ 6 เดือน LE=late contrast enhancement. BMC=bone-marrow cell.

Clinical researches of endothelial progenitor cells

การเปลี่ยนแปลงหลังจากที่มีภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเกิดขึ้น จะมีการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจโดยรวมค่อย ๆ แย่ลง และร่วมกับปัจจัยอื่น ๆ ที่ทำให้เกิดภาวะ atherosclerosis ก็จะทำให้เซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells) ได้รับอันตราย และทำงานเสียไปจนทั้งหมดทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจขึ้น

เซลล์ต้นกำเนิดของหลอดเลือด (endothelial progenitor cells) เป็นเซลล์ในกลุ่ม pluripotent stem cells ซึ่งจะให้ผลบวกต่อ CD34;CD31;CD133 และ VEGFR. การปล่อยเซลล์ดังกล่าวออกจากแหล่งกำเนิด โดยเฉพาะไขกระดูกนั้น จะเกิดโดยการตอบสนองต่อภาวะอันตรายต่าง ๆ เช่น กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ภาวะการอักเสบ ซึ่งจะปล่อย cytokines ออกมาและกระตุ้นการปล่อยเซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือด อีกทีหนึ่ง หลังจากที Endothelial progenitor cells ออกจากแหล่งกำเนิดและมาอยู่ในกระแสเลือดแล้ว ก็จะมีขั้นตอนที่นำเซลล์ดังกล่าว ไปสู่เนื้อเยื่อที่ได้รับอันตรายเรียกว่า homing process ซึ่งก็จะทำให้มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ และซ่อมแซมเนื้อเยื่อต่อไป

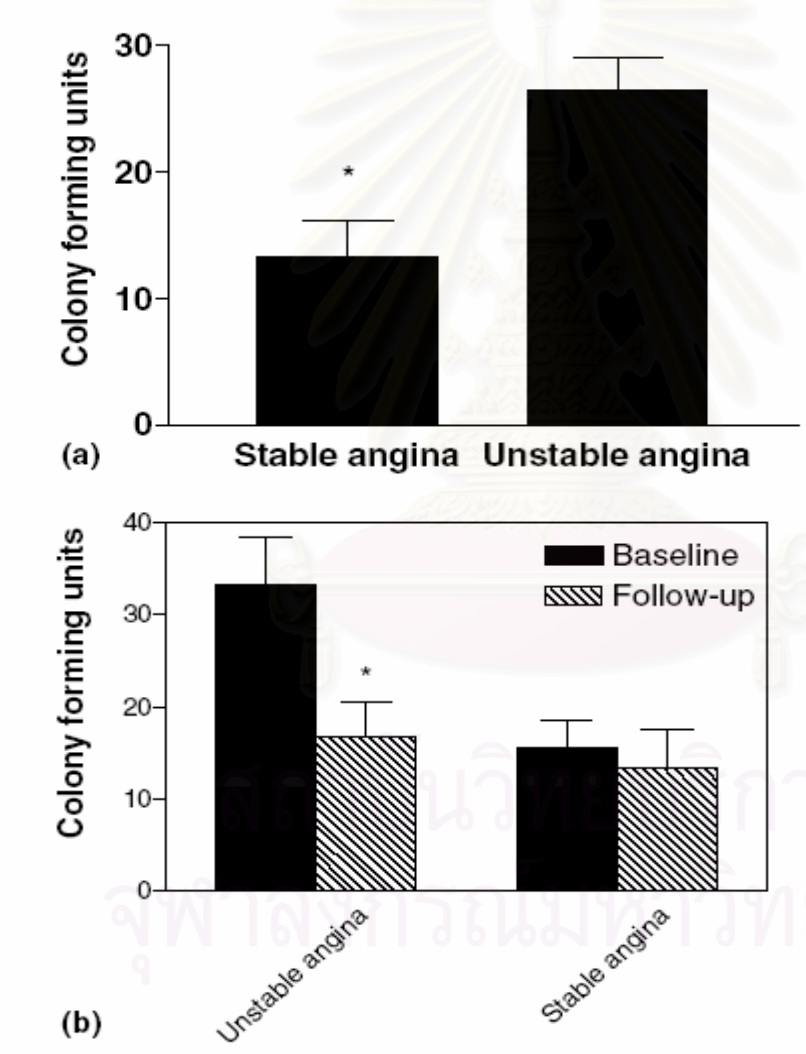
มีหลายปัจจัยที่ทำให้มีการปล่อย endothelial progenitor cells จากแหล่งกำเนิดเข้าสู่กระแสเลือดที่สำคัญ คือ ภาวะการขาดเลือด โดยมีหลักฐานพบว่า vascular endothelial growth factor (VEGF) และ Stroke cell derive factor-1 (SDF-1) เป็น cytokines หลักในการกระตุ้นการปล่อย endothelial progenitor cells ออกมา

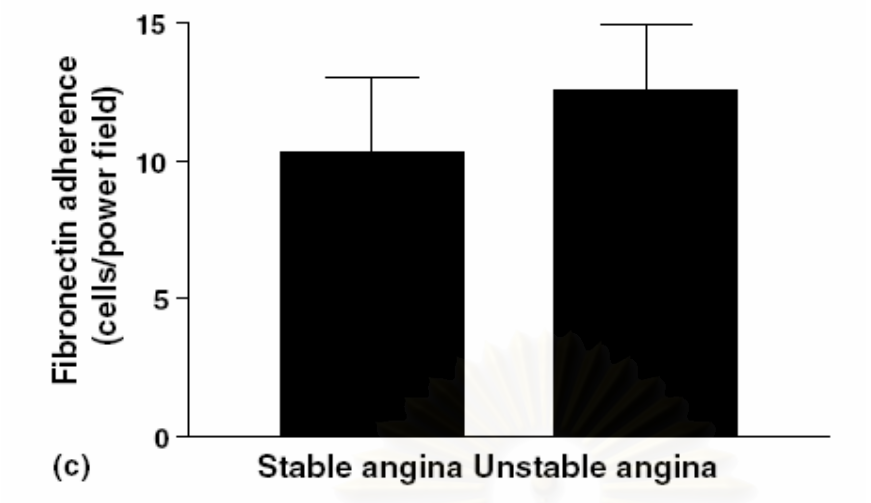
หลังจากที่มีภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และมีกล้ามเนื้อหัวใจบางส่วนตายไป ก็จะมีการปล่อย endothelial progenitor cells เข้ามาในกระแสเลือดและมาที่บริเวณที่ขาดเลือดในที่สุด เหตุผลหนึ่งคงเป็นจากในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเอง มีปริมาณ endothelial progenitor cells น้อยมากและไม่สามารถที่จะเพิ่มจำนวนและตอบสนองต่อการบาดเจ็บดังกล่าวได้เพียงพอ

ตามที่ได้กล่าวในตอนเริ่มต้นว่าการสร้างหลอดเลือด (vasculogenesis) ตั้งแต่ในช่วงแรกของชีวิตนั้นอาศัย pleuripotent embryonic stem cell เพื่อสร้างเป็นโครงข่ายหลอดเลือด อย่างไรก็ตามในการศึกษาในช่วงหลังนี้พบว่า ภาวะ vascular genesis สามารถเกิดขึ้นได้ในผู้ใหญ่ด้วยซึ่งอาศัย endothelial progenitor cells ซึ่งมีแหล่งกำเนิดมาจากอวัยวะต่างๆ เช่น ไขกระดูก, กล้ามเนื้อ, และในกระแสเลือดเอง

การศึกษาของ Jacob George et al [120] ซึ่งได้ศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือด endothelial perigenitor cell (EPC) ที่อยู่ในกระแสเลือด ในคนไข้ที่เป็นกล้ามเนื้อหัวใจแบบ unstable angina เทียบกับกลุ่มที่เป็น chronic stable angina โดยในการศึกษาดังกล่าวนี้เพื่อดูจำนวน endothelial progenitor cells ที่ตอบสนองจากภาวะการขาดเลือดดังกล่าว

ผู้ป่วยในกลุ่ม unstable Angina จำนวน 29 คน กับกลุ่มควบคุมที่เป็น chronic stable angina 12 คน โดยมีลักษณะพื้นฐานคล้ายกันและศึกษาจำนวน endothelial progenitor cells โดยดูจาก colony-forming unit assay และ adhesive properties ของเซลล์ดังกล่าวพบว่า endothelial progenitor cells ในกระแสเลือด ในกลุ่มคนไข้ unstable angina เมื่อเทียบกับคนไข้ chronic stable angina แล้ว มีการเพิ่มจำนวนขึ้นมากกว่า (24.5 $\pm$ 2.6 และ 13.3 $\pm$ 2.9 ตามลำดับ) และในคนไข้กลุ่ม unstable angina จำนวน 7 คน มีการตรวจ EPC ซ้ำในอีก 30 เดือน ต่อมาพบว่า endothelial progenitor cells ลดลงจากเดิมประมาณ 50% (รูปภาพที่ 2.8)

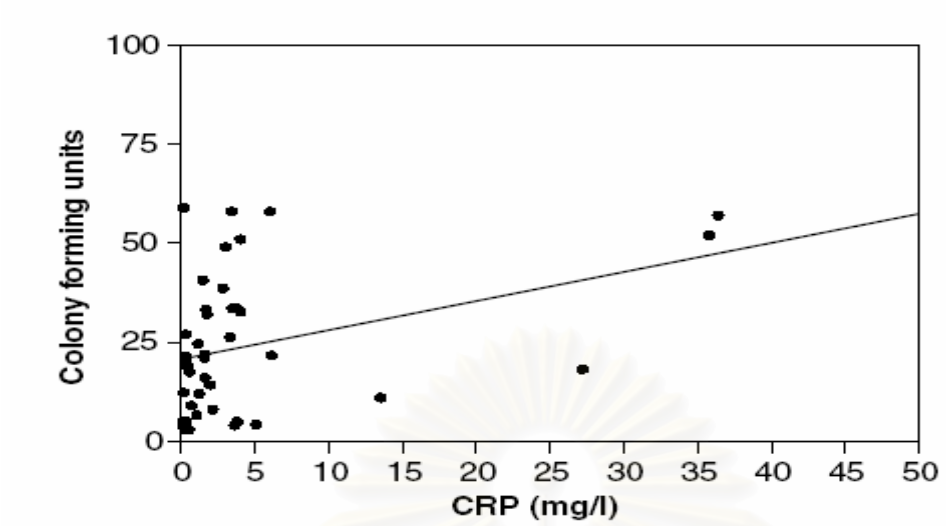




รูปภาพที่ 2.9: จำนวนของ EPC ในผู้ป่วย unstable angina pectoris และ stable angina. เปรียบเทียบจำนวนของ EPC โดยวิธี CFU method (a) เปรียบเทียบจำนวนของ EPC ในผู้ป่วย unstable 7 ราย และ stable angina 5 ราย ที่ baseline และ 3 เดือน (b) p < 0:05. (c) adherence to fibronectin ในผู้ป่วย unstable angina pectoris และ stable angina

ความสัมพันธ์ระหว่าง systemic inflammation และ EPC mobilization ในการศึกษานี้ใช้ hs-CRP ซึ่งเป็นสารที่เกิดในภาวะการอักเสบและศึกษาความสัมพันธ์กับ EPC พบว่า CRP สูงขึ้นมากในกลุ่ม unstable angina เมื่อเทียบกับ chronic stable Angina (5.6 ± 0.3 mg/l 1.9 ± 0.3 mg/dl , BL 0.001 และจำนวน endothelial progenitor cells ก็สัมพันธ์กับ CPR ที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปภาพที่ 2.9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปภาพที่ 3.0 : Correlation ระหว่าง CRP levels และ CFU counts ในผู้ป่วย Unstable angina pectoris และ stable angina

ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าว ก็สรุปได้ว่า ภาวะ unstable angina สามารถเพิ่ม endothelial per genitor cell ได้ และสารที่เป็น maker ภาวะการอักเสบ เช่น CRP ก็สัมพันธ์กับจำนวน endothelial progenitor cells ซึ่งเชื่อว่า ภาวะการอักเสบสามารถที่จะทำให้มีการปล่อย endothelial progenitor cells จากแหล่งกำเนิดได้เช่นเดียวกับ สารในกลุ่ม growth factor (VEGF) เป็นต้น

ในการศึกษาของ Antonio Maria Leone [121] และคณะเพื่อประเมินการ mobilization ของ endothelial progenitor cells จากไขกระดูก ในคนไข้ที่เป็นภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน เทียบกับกลุ่มที่เป็น chronic stable angina และกลุ่มคนไข้ ไม่มีโรคและแข็งแรงดี โดยการศึกษาดังกล่าว ตรวจเลือดจาก peripheral blood โดยใช้ CD34 เป็น maker วัดโดย flow cytokine ศึกษาคนไข้ทั้งหมด 123 คน โดยเป็น AMI 54 ราย , CSA 26 ราย และผู้ป่วยปกติอีก 43 ราย

ในผู้ป่วย AMI ผู้ป่วยได้รับการเจาะเลือด เพื่อตรวจหา cell ที่แสดง CD34/CD45 ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 หลังจากเริ่มมีอาการ และตรวจติดตามอีก 1 ปี สำหรับในกลุ่มที่เป็น CSA และ healthy controls จะเจาะเลือดครั้งเดียว การประเมินผลของ mobilization ในกลุ่ม AMI พบว่า จำนวนของ CD34 cell จะเหมือนกันในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 และมีปริมาณสูงสุดประมาณวันที่ 5 แต่ก็มีบางคนที่ปริมาณสูงสุดขึ้นได้ในวันแรก และวันที่ 3 หลังเกิดอาการ

การเปรียบเทียบจำนวน CD34+cell ในกลุ่ม AMI, กลุ่ม CSA และกลุ่ม healthy control พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยกลุ่ม AMI จะมากกว่า CSA และ healthy control ตามลำดับ (AMI 7040 $\pm$ 6270 cell/ml, CSA 3800 $\pm$ 2120 cell/ml, P=0.03 และ healthy control

1870 ± 1520 cell/ml, P<0.001) โดยพบว่า การใช้ satin , การทำ primary intervention ของหลอดเลือด , กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดในปริมาณ Anterior wall เป็น independent predictor ที่สำคัญ

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ซึ่งได้ประเมินการทำงานของหัวใจ (LV function) ในช่วงแรกของการขาดเลือดไม่พบว่า จำนวนของ CD34+จะสามารถพยากรณ์ LV function ได้ โดยพบว่าตัวแปรที่สำคัญ ที่พยากรณ์การทำงาน ของหัวใจ ได้แก่
CPK , กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดบริเวณ Anterior wall ความเข้มข้นของ fibrinogen , การทำ primary PCI และการสูบบุหรี่ แต่ในการติดตามผู้ป่วยที่เวลา หนึ่งปี กลับพบว่าจำนวนของ CD34+cell นั้นสัมพันธ์กับ LV function เป็นอย่างดี โดย CD34+ ที่มี ปริมาณมากจะสัมพันธ์กับ LV function ที่ดี โดยประเมินจาก LVEF,WMSI และ LVESV และการที่มีจำนวน CD34+cell สูงอยู่อย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่เกิดอาการนั้น จะทำให้ LV function ดีขึ้นเป็นอย่างมาก

โดยสรุปพบว่า จำนวน CD34+cell ที่พบใน acute myccardial Infarction นั้น จะสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของการทำงานหัวใจในทางที่ดีขึ้น ซึ่งเชื่อว่าอาจเป็นจาก CD34 cell เหล่านี้ทำหน้าที่ซ่อมแซม กล้ามเนื้อหัวใจเกิดจากการขาดเลือด นอกจากนี้เมื่อเทียบกับกลุ่ม CSA และ normal healthy control แล้ว กลุ่มคนไข้ AMI ก็จะมีปริมาณ CD34+cellมากกว่า

การศึกษาของ Massa M และคณะ [122] ซึ่งศึกษาจำนวนของ endothelial progenitor cells ในช่วงแรก (ในวันแรก) ของ AMI เทียบกับกลุ่ม control โดยใช้ CD34+ Flow cytokine ก็ได้ข้อมูลคล้าย ๆ กันคือ cell ที่มี CD34+ (endothelial progenitor cells ,EPC) จะพบมากกว่าในกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและนอกจากนี้ เนื่องจากการศึกษานี้ตรวจ endothelial progenitor cells ค่อนข้างเร็ว ทำให้พบว่าเซลล์ดังกล่าว สามารถที่จะ mobilize จากไขกระดูกมาอยู่ในกระแสเลือด ตั้งแต่ในช่วงแรก ๆ ไม่กี่ชั่วโมงหลังเกิด AMI แต่การศึกษานี้ไม่พบว่า มีความสัมพันธ์ของ CD34+cell และ cell subset กับการรักษาไม่ว่าจะเป็นการได้รับยาในกลุ่ม Satin, ACEI หรือการทำ mechanical intervention

ภาวะ endothelial dysfunction/injury เป็นตัวกระตุ้นให้มีการ mobilization ของ endothelial progenitor cells ซึ่งจะทำให้เกิดกระบวนการซ่อมแซมของหลอดเลือด รวมทั้งสร้าง cell กล้ามเนื้อใหม่ตามมา อย่างไรก็ตามมีข้อมูลจากหลายการศึกษา พบว่าปริมาณของ endothelial progenitor cell จะแปรผกผันกับจำนวน risk factor ที่ทำให้เกิด atherosclerosis และการศึกษาเพื่อวัดจำนวนของ EPC เอง ก็สามารถที่จะบอกถึงพยากรณ์โรค ในผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือดได้

การศึกษาของ Nikos Werner และคณะ [123] ศึกษา endothelial progenitor cells (CD34+ และ KDR+) ในคนไข้โรคหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งจะประเมินการศึกษาและติดตามอีก 12 เดือน เพื่อดูความเกี่ยวเนื่องกับการเสียชีวิตจาก cardiovascular cause, major cardiovascular event

(MI, revascularization , hospitalization) และการเสียชีวิตโดยรวม คนไข้ทั้งหมด 519 คน ในจำนวนนี้ 43 คน เสียชีวิต และ 23 คน จาก 43 คน เป็นจาก cardiovascular causes มี first major cardiovascular event เกิดขึ้นในคนไข้ 214 คน

โดยจากการศึกษา พบว่าหลังจากปรับในเรื่องของอายุ , เพศ vascular risk factors และปัจจัยอื่นๆ พบว่าการเพิ่มขึ้นของ endothelial progenitor cells สัมพันธ์กับการลดลงของโอกาสเสียชีวิตจาก cardiovascular causes , first major cardiovascular event, การนอนโรงพยาบาลจากสาเหตุของโรคหัวใจและหลอดเลือด แต่ระดับของ endothelial progenitor cells ไม่สามารถทำนายการเกิด AME และการตายจากทุกสาเหตุได้

นอกจากดูจำนวน CD34+ แล้ว การศึกษานี้ยังวัดจำนวน CD133+cell ซึ่งพบว่าสัมพันธ์กับการเกิด cardiovascular outcome เช่นกัน ซึ่งการศึกษานี้ก็สรุปว่า endothelial progenitor cells ในกระแสเลือดสามารถใช้เพื่อ Identify คนไข้ที่เป็นกลุ่มเสี่ยงสูงที่จะเกิด major adverse cardiovascular event และการวัดปริมาณ endothelial progenitor cells สามารถที่จะทำให้การประเมินความเสี่ยง (Risk stratification) ได้ดียิ่งขึ้น

มีการศึกษาที่คล้าย ๆ กัน โดย Jonathan M และคณะ [125] ซึ่งวัดจำนวนของ endothelial progenitor cells โดยวิธีนัย colony forming unit จาก peripheral blood ในผู้ป่วยชาย 45 คน อายุเฉลี่ย 50 $\pm$ 2 ปี โดยผู้เข้าร่วมศึกษาจะมีความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดหลายอย่าง แต่ยังไม่เคยเกิดโรคและจะศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนของ endothelial progenitor cells ในกระแสเลือดและ Framingham risk factor score รวมทั้งความสัมพันธ์ของ EPC กับ endothelial function ด้วย พบว่าระดับของ endothelial progenitor cells ในกระแสเลือดจะเป็น predictor ที่ดีในการประเมินการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ดีกว่า ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดโดยทั่วไป (Framingham risk factors)

นอกจากนี้การศึกษาระดับของ endothelial progenitor cells กับ endothelial function โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงของ brachial artery reactivity พบว่าระดับของ endothelial progenitor cells มีความสัมพันธ์และเป็น strong predictor ของ brachial artery reactivity ดีกว่าการที่มีหรือไม่มีปัจจัยเสี่ยงโดยทั่วไปอย่างอื่น

โดยสรุประดับของ endothelial progenitor cells ในกระแสเลือดเป็น marker ที่สำคัญในการบอกการทำงานของหลอดเลือดและโอกาสเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดและการที่ endothelium ได้รับบาดเจ็บและไม่มีการตอบสนองที่เพียงพอของ endothelial progenitor cells ก็จะส่งผลที่ไม่ดีกับการดำเนินโรคทางหัวใจและหลอดเลือด

การตรวจหาระดับของ เซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือด (endothelial progenitor cell)

ในการตรวจหาระดับเซลล์ต้นกำเนิดหลอดเลือด (endothelial program cell) มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายทั้งการตรวจนับจำนวนของ colony forming unit (CFU) จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีมาตราฐานและการตรวจหาเซลล์โดยวิธี flow cytometry

สำหรับการหาระดับของเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry นั้น จะใช้ marker เพื่อตรวจหาเซลล์ได้หลายวิธีด้วยกัน แต่ก็เป็นที่แพร่หลายและมีความ จำเพาะ กับ EPC มากคือ CD133 และ VEGFR-2 โดยพบว่าเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ marker ทั้งสอง จะสัมพันธ์กับระดับของเซลล์ที่ตรวจวัดโดยวิธีมาตราฐานคือการนับ colony forming unit [126]

ในการตรวจหาเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry นั้น เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แม้ว่าวิธีการตรวจที่เป็นมาตราฐานจะยังไม่ชัดเจนนัก แต่มีการศึกษาเพื่อที่จะประเมินวิธีการตรวจนี้กับการ ตรวจนับด้วยวิธี cell culture assay โดยในการศึกษานี้ตรวจหาระดับ EPC ในคนไข้อาสาสมัครเปรียบเทียบวิธี flow cytometry และการตรวจนับเซลล์ จาก colony forming unit โดยวิธี flow cytometry นั้น จะใช้ markers หลายตัวเพื่อ identification EPC คือ VEGFR2 , CD133 ,CD34 และ CD54 จากการศึกษาพบว่า ระดับ EPC ของทั้ง 2 วิธี นั้นมีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดี (correlation efficient (r)= 0.98) ซึ่งแสดงว่าการตรวจหาระดับเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry นี้ ใกล้เคียงกับวิธี cell culture assay ได้ [127]

EPC จะแสดงลักษณะเฉพาะคือ จะตรวจพบ CD34 , CD133 และ VEGFR-2 ซึ่งมีการศึกษาพบว่า mutipotent adult progenitor cell จะแสดง CD133 และ VEGFR-2 แต่จะให้ผลลบกับ CD34 โดยเชื่อว่า cell ดังกล่าวนี้ น่าจะเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของ EPC ในกระแสเลือด นอกจากนี้ยังพบว่า CD34 ไม่ได้พบเฉพาะใน progenitor cell เท่านั้น แต่ยังพบได้ใน mature endothelial cell และเซลล์อื่น ในขณะที่ CD133 จะหายไปในช่วง differentiation และตรวจไม่พบใน mature endothelial cell และ monocytic cell จึงเชื่อว่า CD133 น่าจะจำเพาะกับ stem cell มากกว่า CD34 [128]

ปัจจัยที่มีผลต่อระดับของ EPC ในกระแสเลือด (Physiclogial factor and EPC)

มีหลายปัจจัยที่มีผลต่อระดับของ EPC ในกระแสเลือด โดยปัจจัยดังกล่าวอาจมี ผลโดยตรงหรือโดยอ้อมต่อ ไขกระดูกซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของ EPC ในการที่จะปลดปล่อยเซลล์นี้ออกมาในกระแสเลือด ปัจจัยดังกล่าวได้แก่ [129]

1. อายุ (aging process)
2. ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular risk factor)
   - ไขมันในหลอดเลือด (lipid disorder)

- ความดันโลหิตสูง (hypertension)
- เบาหวาน
- risk อื่น ๆ

3. โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease)
   - ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเรื้อรัง
   - ภาวะ unstable angina
   - ภาวะหัวใจล้มเหลว
   - โรคอื่น ๆ
4. ผลของยาต่าง ๆ
   - ยากลุ่ม station (HMGCOA Reeducates inhibitor)
   - ยากลุ่ม rein Angiotonsin system
   - estrogen
   - ยากลุ่มอื่น ๆ

1. อายุ (aging process)

จากการศึกษาพบว่า อายุ มีผลต่อการหลั่ง EPC เข้ามาในกระแสเลือด และรวมถึงหน้าที่การทำงานของ EPC ที่ลดลงด้วย [130] การศึกษาของ Versa และ Stubble รายงานถึงระดับของ EPC ในคนไข้กลุ่มกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเรื้อรังที่ลดลง สัมพันธ์กับอายุที่มากขึ้น และยังพบว่าการ mobilization ของ EPC หลังจากการผ่าตัดเส้นเลือดหัวใจ (coronary artery bypass grafting) ก็มีปริมาณลดลงในคนไข้สูงอายุ [131-133] นอกจากปัจจัย จากเรื่องอายุเองยังเชื่อว่า ในกลุ่มคนไข้สูงอายุ มักจะมี ปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ เพิ่มขึ้น และมีโรคที่อาจมีผลต่อ ระดับ EPC มากขึ้นเช่นกัน

2. ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด

2.1 ภาวะไขมันในเลือด

จากหลายการศึกษาพบว่า Metabolism ของไขมันและลักษณะทางชีวิทยาของ EPC มีความเกี่ยวข้อง กัน พบว่าระดับของ colony forming unit จากการ culture เซลล์ EPC มีระดับที่ลดลงในคนไข้ที่มีระดับ cholesterol ที่สูงขึ้นและระดับของ LDL-cholesterol ก็มีความสัมพันธ์กับระดับของ EPC ที่ลดลง (10) โดยเชื่อว่า oxidized-LDL จะทำให้การกระตุ้นการหลั่ง EPC ที่เกิดจากการเหนียวนำโดย VEGF ลดลง [134]

2.2 ความดันโลหิตสูง

เมื่อเปรียบเทียบกับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจอย่างอื่น พบว่าความดันโลหิตสูง เป็นปัจจัยที่มีผลทำให้การ mobilization ของ EPC เสียไปมากที่สุด [135] จากการศึกษาพบว่า angiotonsin II ทำให้ระดับของ enzyme telomerase ใน EPC ลดลง และในระดับ in vivo ยังพบว่า angiotensin II ทำให้การเพิ่มจำนวนของ EPC ลดลง [136-137]

2.3 เบาหวาน

พบว่า EPC ลดลงในทั้งผู้ป่วยเบาหวาน ประเภทที่ 1 และ 2 นอกจากนี้ยังพบว่า การเสียหน้าที่การทำงานของ EPC ก็อาจ จะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนทางเส้นเลือด ในคนไข้เบาหวาน [138,139] จากหลักฐานต่าง ๆ พบว่า ภาวะเบาหวานจะทำให้ความสามารถ ในการสร้างหลอดเลือดของ EPC ลดลงได้ ส่วนหนึ่งอาจเป็นจากการที่ EPC ไม่สามารถที่จะรวมเข้าไปกับเซลล์บุหลอดเลือดในหลอดเลือดได้ดี โดยการสูญเสียหน้าที่ของ EPC ทั้งหมดที่กล่าวมาจะสัมพันธ์กับระดับของ Hemoglobin A1c ที่เพิ่มขึ้นด้วย

2.4 ปัจจัยอื่นๆ

ปัจจัยอื่นที่เชื่อว่า อาจมีผลทำให้ EPC ลดลง เช่นการสูบบุหรี่ โดยจากการศึกษาพบว่า EPC จากคนไข้ที่สูบบุหรี่จัด จะ ตายในช่วงแรก ๆ ที่เอามาเพาะเลี้ยง [140] และในคนไข้ที่หยุดบุหรี่ ระดับ EPC ก็จะมาปกติได้ เชื่อว่า nicotine อาจมีผลต่อระดับของ EPC แต่ถ้า Nicotine อยู่ในระดับความเข้มข้น 10.8 mcl/l อาจจะเพิ่มปริมาณ EPC ได้ รวมทั้งทำให้การแบ่งตัวและการสร้างหลอดเลือดเพิ่มขึ้นได้แต่ถ้าระดับสูงกว่านี้ก็จะทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ [141]

3. **โรคทางหัวใจและหลอดเลือด** (cardiovascular disease)

โรคทางหัวใจและหลอดเลือดมีผลต่อการเพิ่ม และลดระดับของ EPC ในกระแสเลือดที่แตกต่างกัน

3.1) ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด เรื้อรัง พบว่าระดับของ EPC ในกลุ่มคนนี้ เหล่านี้ที่มีความรุนแรงของอาการมาก จะไม่แตกต่างจากในกลุ่ม control มากนัก แต่พบว่าจะทำให้ความสามารถในการเพิ่มจำนวน EPC ของไขกระดูกผิดปกติไปได้ [142]

3.2) ภาวะ Unstable angina และกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน พบว่าภาวะ unstable angina จะทำให้ระดับของ EPC ในเลือดเพิ่มขึ้น แต่ไม่ได้ทำให้ความสามารถ ในการที่อาการคนไข้เริ่มกลับเข้าภาวะสู่ปกติแล้ว ระดับของ EPC ก็จะลดลง [143] เชื่อว่า inflammatory marker เช่น CRP อาจมีผลต่อการเพิ่มระดับของ EPC แต่อย่างไรก็ตาม CRP ก็อาจจะทำให้ การแบ่งตัว, การมีชีวิตรอด และหน้าที่ของ EPC ลดลงได้ [144] ในกลุ่มคนไข้กล้ามเนื้อของหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน ก็

เช่นเดียวกันคือ ทำให้ระดับของ EPC เพิ่มขึ้น โดยจะเพิ่มมากสุดปริมาณ วันที่ 7 หลังเกิดอาการ โดยเชื่อว่าปริมาณ VEGF ที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยสำคัญ ในการเพิ่มระดับของ EPC

3.3) ภาวะหัวใจล้มเหลว (Heart failure)

ระดับของ EPC ในคนไข้หัวใจล้มเหลว สัมพันธ์กับระดับของ TNF-alfa โดยระดับของ EPC จะขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของภาวะนี้ โดยพบว่าในระยะของโรคที่เป็นไม่มาก (NYHA class 1 และ 2) EPC จะมีปริมาณที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ เมื่อโรคมีความรุนแรงมากขึ้น ระดับของ EPC จะลดลง [145] โดยพบว่าระดับ BNP ที่มากขึ้นจะทำให้ระดับ EPC ลดลง

3.4) โรคอื่น ๆ ที่อาจมีผล เช่น Projectile dysfunction, in stunt stenosis ผู้ป่วยแล้วผ่าตัดปลูกถ่ายหัวใจและมีโรคของเส้นเลือด (vasculopathy) [146]

4. ผลของยาต่อระดับของ EPC

4.1) ยากลุ่ม Stain (HMGCOA reeducates inhibitor)

จากการศึกษายากลุ่มนี้กับโรคทางหัวใจและหลอดเลือดพบว่า ทำให้หน้าที่การทำงานของเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial) ดีขึ้น [63,64] นอกจากนี้ยังพบว่า ยากลุ่ม stain ยังมีผลทำให้การแบ่งตัวของ EPC เพิ่มขึ้น โดยผลของ stain จะคล้ายกับผลของ VEGF [147,148] การ differentiation และ ความสามารถในการรวมกับเซลล์บุผิวของ EPC ก็พบว่าเพิ่มขึ้น จากผลของ stain โดยเชื่อว่าผ่านทาง PI-3 Kinase/Ake pathway และ integrin ตามลำดับ

4.2) Rennin angiotensin – aldosterone system

จากการศึกษายาในกลุ่ม angiotensin II receptor antagonist, olmesartan และ irbesartan, พบว่าทำให้ระดับของ EPC เพิ่มใน [149] และยังพบว่า valsartan มีผลทำให้ tolemerase activity ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแปรตัวของ EPC เพิ่มขึ้นด้วย [150] สำหรับยากลุ่ม angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI) ก็ให้ผลคล้ายกับกลุ่ม angiotensin II receptor Antagonist [151]

4.3) Estrogen ไม่มีการศึกษาโดยตรงเกี่ยวกับผลของ estrogen ต่อระดับของ EPC แต่เชื่อว่า estrogen อาจทำให้มีผลกระตุ้น EPC จากไขกระดูกได้

4.4) ยาอื่น

ยาที่อาจทำให้ activity ของ EPC เพิ่มขึ้นได้ เช่น vardenafil, puerarin, ginkgo biloba extract ในขณะที่ rapamicin จะยับยั้งการแบ่งตัวและการ differentiation ของ EPC [152] ยาในกลุ่ม rosiglitazone ไม่เพียงแต่ทำให้ระดับของ EPC และความสามารถในการทำงานของ EPC เพิ่มขึ้นแต่ยากลุ่มนี้ยังมีผลยับยั้ง ผลของ CRP ที่มีต่อ EPC ได้

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

ประชากร

ประชากรเป้าหมาย

ผู้ป่วยคนไทยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน และกลุ่มที่เป็น chronic stable angina โดยมีข้อบ่งชี้ที่ต้องได้รับการทำ coronary angiography

ประชากรตัวอย่าง

ผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่ รพ.จุฬาลงกรณ์

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา

ผู้ป่วยที่เป็นกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน และ chronic stable angina หรือกลุ่มผู้ป่วยอื่นที่มีข้อ บ่งชี้ที่ต้องได้รับการทำ coronary angiogram โดยมีอายุระหว่าง 30 – 90 ปี ที่ยินยอมเข้าร่วมการศึกษาโดยในกลุ่มกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันรวมถึง Acute STEMI, Acute non STEM และ Unstable angina โดยคำจำกัดความตาม ACC/AHA definitions

เกณฑ์การตัดออกจากการศึกษา

- ผู้ป่วยที่เป็นภาวะดังกล่าวจาก Secondary causes
- ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนหัวใจมาก่อน(post-heart transplantation)
- ผู้ป่วย malignancy , autoimmune และ inflammatory disease อื่น
- ผู้ป่วยที่มี moderate to marked impaired renal function
- ผู้ป่วย severe และ critical ซึ่งทำให้มีความเร่งด่วนที่ต้องได้รับการรักษา
- ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมในการศึกษา

การคำนวณขนาดตัวอย่าง เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาระดับของ EPC มาก่อนในหลอดเลือดแดง coronary ดังนั้นการคำนวณ ตัวอย่างจึงอาศัยการศึกษาที่ใกล้เคียง คือ การศึกษาระดับของ EPC ในหลอดเลือดดำ

$$N = Z_{\alpha}^{2} \times Variance^{2} / E^{2}$$

Z_{α} = Z value from table at confidence 90% (1.75)

Variance = variance of continuous data (9.38)

E = acceptale error (3)

โดยการศึกษาระดับของ EPC ในหลอดเลือดดำ ศึกษาเปรียบเทียบในคนไข้ โรคหลอดเลือดหัวใจที่มีอาการเป็นกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและเรื้อรัง การคำนวณขนาดตัวอย่างอาศัยสูตรคำนวณและสมมติฐานว่าคนไข้ จากทั้ง 2 กลุ่มเป็นอิสระต่อกัน ซึ่งจากการคำนวณพบว่าจำนวนตัวอย่างที่เหมาะสม ในแต่ละกลุ่มทดลองคือ 30 คน รวมเป็น 60 คน

การสังเกตและการวัด

1. ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ , อายุ , ประวัติการเจ็บหน้าอก , จำนวนเส้นเลือดแดง coronary ที่มีรอยโรค , ประวัติการมีโรคร่วม คือ เบาหวาน , ความดันโลหิตสูง , โรคหัวใจขาดเลือดอยู่เดิม,ประวัติการรักษาด้วยยา คือ ยากลุ่ม FISA , Beta blocker , statin , Nitrate , Diuretic , ctopidogrel , ACEI/ARB

2. ข้อมูลที่ศึกษา

ระดับของ Endothelial progenitor cell จากหลอดเลือดแดง coronary และหลอดเลือดดำส่วนปลาย (peripheral vein)

3. เครื่องมือที่ใช้วัด

1). ระดับ EPC วัดโดย flow cytrometry ซึ่งจะตรวจนับ cell ที่ให้ผลบวกกับ VEGFR-2 และ CD133

2). ตรวจ complete blood count เพื่อดูสัดส่วนของ cell เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ โดยใช้ automated machine

3). การเก็บเลือดในคนไข้แต่ละราย จะเก็บเลือดจาก peripheral vein ในเวลาใกล้เคียงกับการทำ coronary angiography และดูดเลือดจากหลอดเลือดแดง coronary โดยห่างกันไม่เกิน 1 ชั่วโมง โดยเลือดดังกล่าวจะถูกส่ง เพื่อไปตรวจทางห้องปฏิบัติการ ภายใน 4 ชั่วโมง

4. การคำนวณ

ข้อมูล flow cytometry จะทำให้ทราบ fraction ของ cell ที่ ให้ผลบวกต่อ VEGFR CD133 แล้วนำมาคำนวณเป็นปริมาณ EPC ในหน่วย cell/ml

การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

1). ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย ประกอบกับผลการตรวจ coronary angiogram

2). ผล flow cytometry และ complete blood count

โดยข้อมูลทั้ง 2 ส่วน ผู้ทำการวิจัยเป็นผู้เก็บรวบรวมข้อมูล บันทึกและตรวจสอบความสมบูรณ์ของข้อมูล และนำมาวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

1). ทดสอบความแตกต่าง ในแง่ข้อมูลพื้นฐานในคนไข้แต่ละกลุ่ม ได้แก่ อายุ , เพศ , โรคประจำตัว , จำนวนหลอดเลือดแดง coronary ที่มีรอยโรค , ประวัติการรักษาด้วยยาซึ่งเป็น Categorial data โดยใช้ Chai square และ Man- Whitney U

2). แสดงข้อมูลระดับของ EPC ในเลือดเป็น mean +/- SD และเปรียบเทียบระดับ intracoronary EPC ในคนไข้กลุ่มกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน และ Chromic stable Angina และ peripheral blood ในคนไข้ทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้ student t test ในกรณีที่ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ แต่ถ้าข้อมูลไม่มีการแจกแจงแบบปกติจะแสดงข้อมูลระดับของ EPC ในเลือดเป็น median and interquartile range และแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป logarithm แล้วจึงเปรียบเทียบในคนไข้ทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้ student t test

3). การเปรียบเทียบข้อมูลในแต่ละส่วนของการศึกษา เพื่อให้เห็นค่านัยสำคัญทางสถิติ จะใช้ $P<0.05$

4). การคำนวณ ทางสถิติจะใช้ program สำเร็จรูป คือ STATA version 8.2 และ SPSS version 13 for window

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ข้อมูลพื้นฐาน

มีผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 56 ราย แต่ผู้ป่วยที่ผลการตรวจสามารถนำมาวิเคราะห์ได้มีทั้งหมด 40 ราย โดยแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (acute coronary syndrome) จำนวน 20 ราย (ซึ่งรวมถึงผู้ป่วย acute STEMI, non-STEMI และ unstable angina) กลุ่ม chronic stable จำนวน15 ราย angina และกลุ่มที่ได้รับการทำ coronary angiogram แล้วพบเลือดปกติเพื่อผิดปกติเพียงเล็กน้อย จำนวน5 ราย

ในกลุ่มคนไข้ที่เข้าร่วมการศึกษา แต่ไม่มีผลที่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ ประกอบด้วยกลุ่มที่เป็นกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน 7 ราย กลุ่มกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเรื้อรัง 6 ราย และกลุ่มที่หลอดเลือดแดง coronary ปกติ 2 ราย โดยสาเหตุที่ไม่มีผลการตรวจระดับเซลล์ เนื่องจากเหตุผลทางห้องปฏิบัติการและวิธีการตรวจที่ทำให้ไม่สามารถนับเซลล์ได้ถูกต้อง และส่วนหนึ่งเนื่องจากเลือดไม่ได้รับการผ่านขบวนการตรวจ เพราะเวลาไม่เหมาะสมรวมถึงรวมถึงความพร้อมของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ

ผู้ป่วยกลุ่ม acute coronary syndrome มีอายุระหว่าง 49-89 ปี (อายุเฉลี่ย 65 ± 20 ปี) เป็นผู้ป่วยเพศชาย 14 คน หญิง 6 คน ผู้ป่วยกลุ่ม chronic stable Angina มีอายุระหว่าง 46-77 ปี (อายุเฉลี่ย 64 ± 18 ปี)เป็นผู้ป่วยชาย 8 คน หญิง 7 คน

สำหรับข้อมูลพื้นฐานอื่น อันประกอบด้วย เพศ อายุ โรคประจำตัวก่อนที่จะเข้าร่วมการศึกษา ยาที่ได้รับและจำนวนหลอดเลือดแดง coronary ที่มีรอยโรคจากผลการทำ angiogram ในคนไข้ทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

ผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้เก็บรวบรวมคนไข้บางส่วนที่มี ผลการตรวจ coronary angiogram ให้ผล normal ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้ ส่วนใหญ่จะมาแสดงอาการด้วย อาการเจ็บหน้าอกและทำการตรวจ แล้วพบความผิดปกติ กับอีกส่วนหนึ่งเป็นผู้ป่วยที่ทำการฉีดสี เพื่อประเมินความพร้อมก่อนทำผ่าตัดระบบอื่น ที่ไม่เกี่ยวข้องกับหัวใจและหลอดเลือด ตามข้อบ่งชี้ทางคลีนิก

จำนวน EPC ในคนไข้กลุ่ม normal coronary artery ทั้งในหลอดเลือดแดง coronary และหลอดเลือดดำส่วนปลาย พบว่ามีปริมาณน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับคนไข้ อีก 2 กลุ่ม คือ กลุ่มกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลันและเรื้อรัง โดยพบว่ามีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบ

กลุ่มที่หลอดเลือดปกติกับกลุ่มคนไข้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเรื้อรัง (chronic stable angina) แล้วมีความแตกต่างกัน แต่ยังไม่เห็นผลชัดเจนนัก

ตารางที่ 4.1: ข้อมูลพื้นฐานผู้ ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา

variables	Acute coronary syndrome/UA, n=20 (%)	Chronic stable angina, n=15 (%)	p
Male	70	53	NS
Age (year)	65	64	NS
CAD extent (*n* x vessels)	2.25	2.13	NS
Hypertension	90	80	NS
Treated DM	45	60	NS
Known IHD	30	40	NS
Current smoke	15	10	NS
Past smoke	30	27	NS
Hyperlipidemia	85	67	NS
Betablocker	45	46	NS
ACEI/ARB	60	46	NS
Aspirin	60	60	NS
Statin	53	70	NS
Calcium blocker	20	20	NS
Nitrate	25	40	NS
Diuretics	25	27	NS
Clopidogrel	10	33	NS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวน Endothelial progenitor cell **ในคนไข้** acute coronary syndrome **และ** chronic stable angina

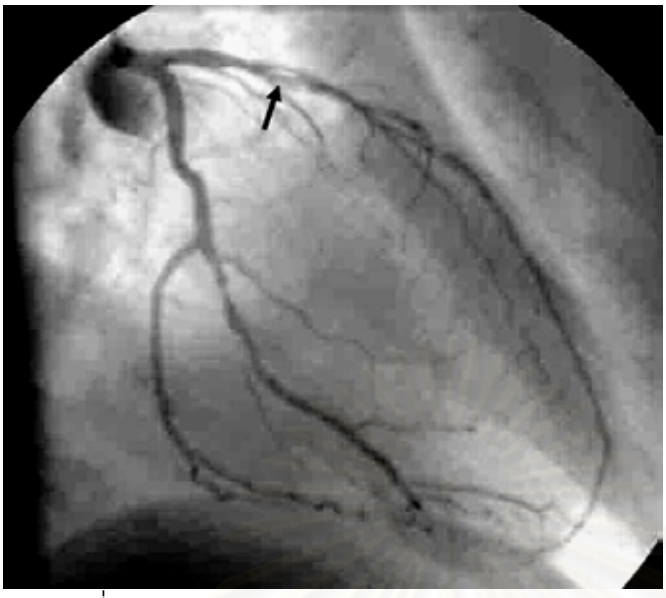
ผู้ป่วยจำนวน 35 คน โดยแบ่งเป็นกลุ่มคนไข้ acute coronary syndrome 20 คน และกลุ่ม Stable CAD 15 คน ได้รับการรวบรวมเพื่อเข้าร่วมการศึกษา ในช่วงสิงหาคม 2549 ถึงกุมภาพันธ์ 2550

ผู้ป่วยทุกรายที่เป็น acute MI มาแสดงอาการด้วยอาการเจ็บหน้าอก มีการเปลี่ยนแปลงของคลื่นไฟฟ้าหัวใจร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของระดับ cardiac markers ส่วนผู้ป่วยในกลุ่ม chronic stable angina เป็นผู้ป่วยที่มีอาการเจ็บหน้าอกและได้รับการตรวจ non-invasive test หรือ ประเมินจากสภาวะทางคลินิก ก่อนจะส่งตรวจ coronary angiogram ส่วนผู้ป่วยที่ตรวจพบ normal coronary จะเป็นกลุ่มที่สงสัย chronic stable angina หรือทำ coronary angiogram ด้วยเหตุผลอื่น เช่น pre-operative evaluation

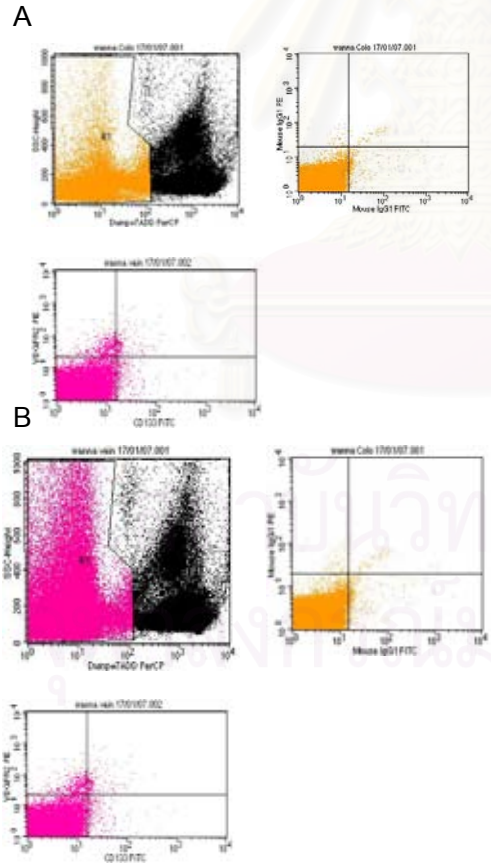
ผู้ป่วยกลุ่ม acute coronary syndrome ที่เป็น STEMI จะได้รับการทำ angiogram ในวันแรกที่มาโรงพยาบาล ขณะที่คนไข้กลุ่ม NSTEMI และ UA จะได้รับการทำ angiogram ภายใน 2-6 วัน ตั้งแต่เริ่มมีอาการ

คนไข้ที่เข้าร่วมการศึกษาจะได้รับการเจาะเลือดในวันที่ จะได้รับการตรวจ angiography (รูปภาพที่ 4.1) พร้อมกับเก็บเลือดจาก coronary ในระหว่างวันที่ปลาย catheter อยู่ใน coronary artery ที่มี lesion ที่คาดว่าจะเป็น culprit lesion หรือในกลุ่ม chronic stable angina ก็เลือกจาก coronary artery ที่มี lesion มากที่สุด เลือดจากคนไข้ทั้งจาก coronary และ peripheral vein จะถูกส่งไปยังห้องปฏิบัติการภายใน 4 ชม. หลังจากเก็บเพื่อตรวจวัด CD133 และ VEGFR โดยวิธี Flow cytometry ซึ่งจะรายงานผลดังตัวอย่าง รูปที่ 4.2 และ 4.3 โดยผู้ป่วยจะได้รับการตรวจหาเซลล์ที่แสดง CD133+และVEGFR+ เพียงครั้งเดียว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

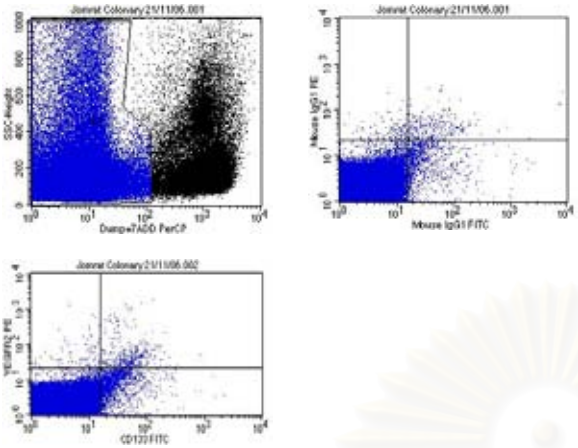


รูปภาพที่ 4.1 การตรวจ Coronary Angiography

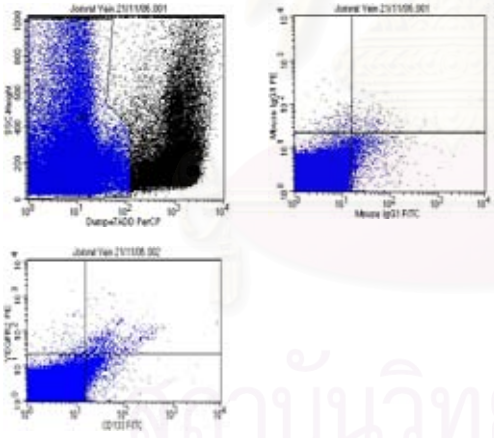


รูปภาพที่ 4.2 ผลการตรวจ Flow cytometry จากคนไข้ในกลุ่ม acute coronary syndrome รายหนึ่ง จาก coronary (A) และ peripheral vein site (B)

A

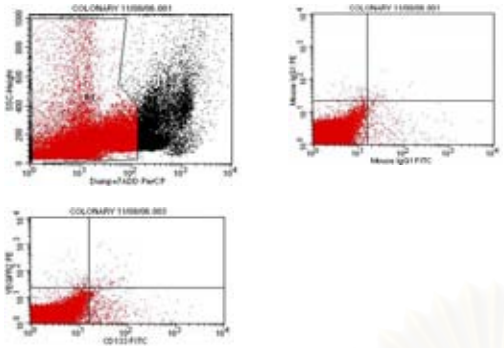


B

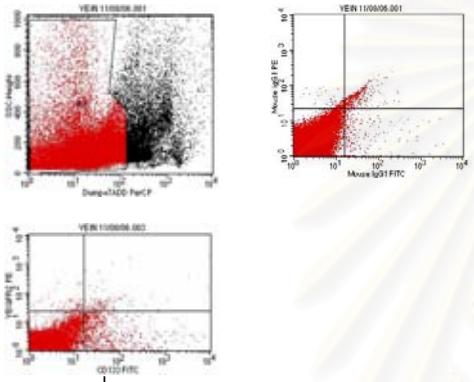


รูปภาพที่ 4.3 ผลการตรวจ Flow cytometry จากคนไข้ในกลุ่ม chronic stable angina รายหนึ่งจาก coronary (A) และ peripheral vein site (B)

A



B



รูปภาพที่ 4.4 ผลการตรวจ Flow cytometry จากคนไข้ในกลุ่ม ที่มี normal coronary รายหนึ่งจาก coronary (A) และ peripheral vein site (B)

เนื่องจาก risk factors ของ atherosclerosis และ การรักษาด้วยยาบางอย่าง โดยเฉพาะ statin อาจจะมีผลต่อการตอบสนองของไขกระดูกต่อการปลดปล่อย EPC ออกมาสู่กระแสเลือด ดังนั้นจากกลุ่มคนไข้จึงได้พยายามที่จะทำให้ ไม่มีความแตกต่างของคนไข้ ในกลุ่ม acute coronary syndrome และ chronic stable angina ในแง่ของ risk factors และ drug treatment นอกจากนี้ระดับความรุนแรงของ coronary lesion โดยดูจากจำนวนของเส้นเลือดที่มีรอยโรค เช่น 1,2 หรือ 3 เส้น ในทั้ง 2 กลุ่ม ก็ไม่มีความแตกต่างกัน

เมื่อมาดู EPC ในแต่ละกลุ่มคนไข้ พบว่า คนไข้ที่เป็น acute coronary syndrome จะมี EPC จำนวนมากกว่า ในกลุ่ม chronic stable angina จากเส้นเลือดแดง coronary คนไข้ที่เป็น acute coronary syndrome จะมี EPC จำนวนน้อยกว่า ในกลุ่ม chronic stable angina จากเส้นเลือด peripheral vein ดังตาราง 4.2 และ 4.3 รูปภาพที่ 4.5 และ 4.6

ตารางที่ 4.2 : จำนวน endothelial progenitor cell จากเส้นเลือดแดง coronary ในคนไข้ acute coronary syndrome and chronic stable angina

Studied group	Median EPC (cell/ ml) [IQR *]	P$^{\$}$
Acute coronary syndrome	11,591(2,276-98,163)	< 0.0001
Stable CAD	996(606- 3,818)	< 0.0001

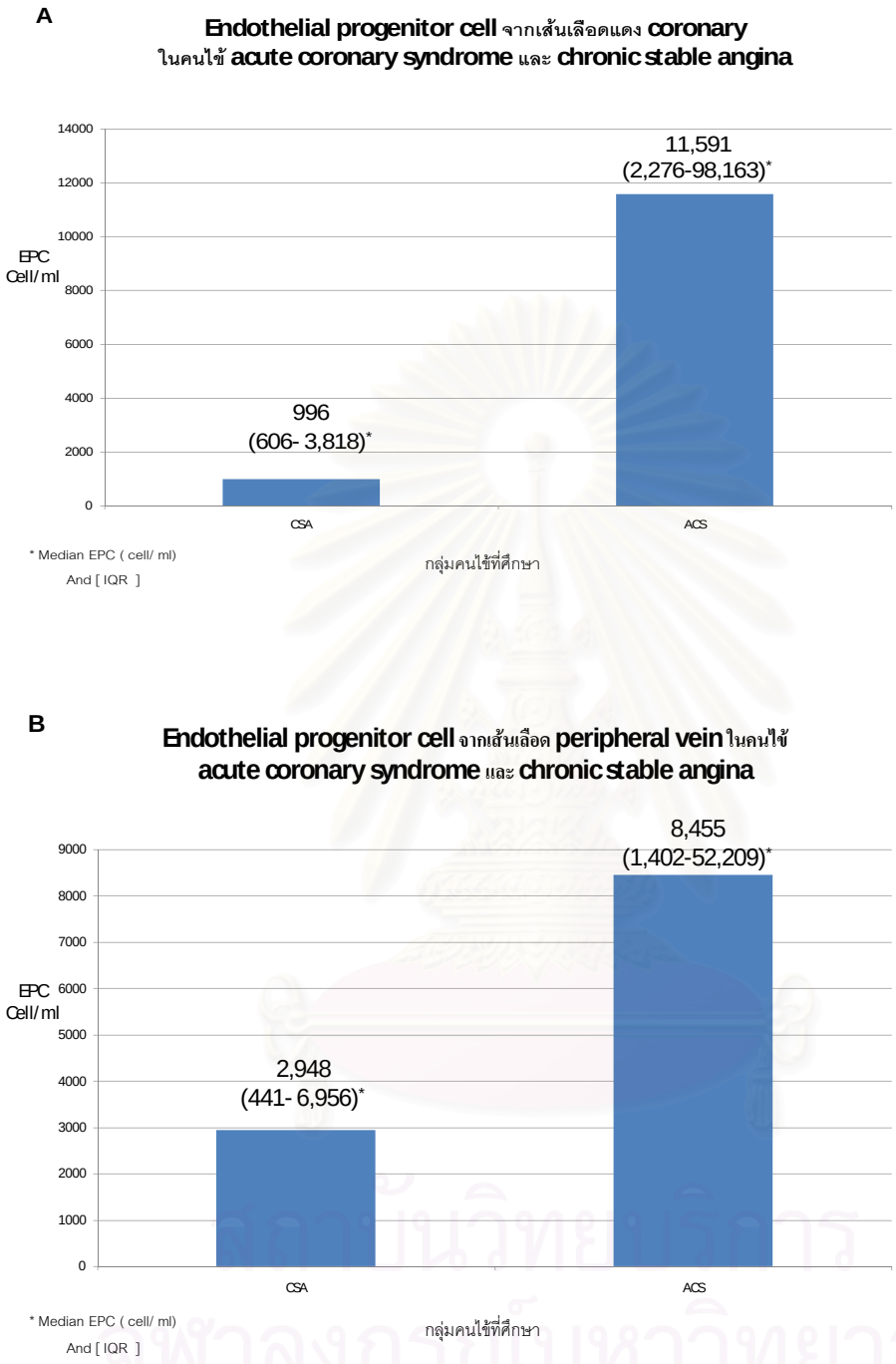
* IQR : interquqrtile range, $^{\$}$ p value of student t test between 2 groups

ตารางที่ 4.3 จำนวน endothelial progenitor cell จากเส้นเลือด peripheral vein ในคนไข้ acute coronary syndrome และ chronic stable angina

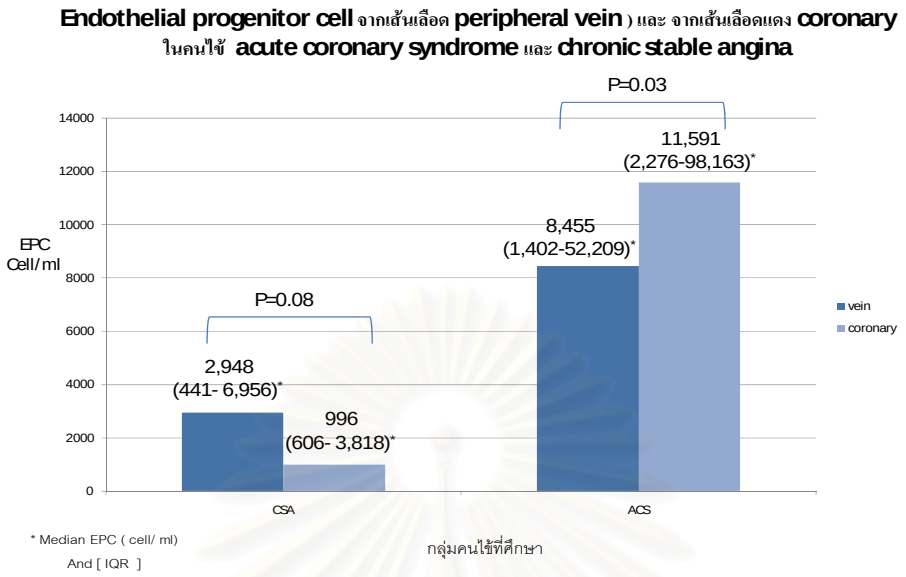
Studied group	Median EPC (cell/ ml) [IQR *]	P$^{\$}$
Acute coronary syndrome	8,455(1,402-52,209)	0.001
Stable CAD	2,948(441- 6,956)	0.001

* IQR : interquqrtile range, $^{\$}$ p value of student t test between 2 groups

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปภาพที่ 4.5 กราฟแท่งแสดงจำนวน Endothelial progenitor cell จากเส้นเลือด Coronary (A)จากเส้นเลือด peripheral vein(B) ในคนไข้ Acute coronary syndrome chronic stable angina และ norma



รูปภาพที่ 4.6 Endothelial progenitor cell จากหลอดเลือด peripheral vein และ จากหลอดเลือดแดง coronary ในคนไข้ acute coronary syndrome และ chronic stable angina

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบระดับของ endothelial progenitor cells (EPCs) โดยศึกษาได้เปรียบเทียบระดับของ EPCs ในกลุ่มคนไข้ acute coronary syndrome และกลุ่มที่เป็น chronic stable angina โดยเปรียบเทียบระดับเซลล์ดังกล่าว ทั้งใน coronary artery และ peripheral vein นอกจากนี้ จากข้อมูลดังกล่าวยังทำการเปรียบเทียบระดับของ EPCs ภายในกลุ่มคนไข้เดียวกันถึงความแตกต่างในเรื่องของระดับ EPCs ใน coronary artery และ peripheral vein ระดับของ EPCs ซึ่งในการศึกษานี้ ดูจาก double positive ต่อ CD133 และ VEGFR เพื่อความถูกต้องในการ Identified EPCs ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกันชัดเจน (มีนัยสำคัญทางสถิติ) ระหว่างระดับของ EPCs ในคนไข้กลุ่ม acute coronary syndrome เมื่อเทียบกับกลุ่ม Chronic stable angina โดยในกลุ่ม acute coronary syndrome มีระดับของ EPCs สูงกว่า ในกลุ่ม chronic stable angina

ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบระดับของ EPCs ในคนไข้แต่ละกลุ่ม เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่าง EPCs ใน coronary artery และ peripheral vein ในคนไข้รายเดียวกันพบว่า มีความแตกต่างระหว่างระดับของ EPCs จากทั้ง 2 แหล่ง

อภิปรายผล

ในการศึกษาระดับของ endothelial progenitor cell ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) โดยเชื่อว่าการสร้างหลอดเลือดขึ้นใหม่ (neovascularization) หลังจากเกิดภาวะอันตรายต่อเนื้อเยื่อ เช่น กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดนั้น สามารถเกิดขึ้นได้ จากการทำงานของเซลล์ดังกล่าวร่วมกับปัจจัยอย่างอื่น ๆ เพื่อให้การทำงานของอวัยวะกลับมาใกล้เคียงกับปกติ

การกระตุ้นให้มีการปลดปล่อย EPCs ออกมาสู่กระแสเลือดเกิดได้จากหลายปัจจัยดังกล่าวข้างต้น ปริมาณการปลดปล่อยเซลล์ดังกล่าว เชื่อว่าน่าจะเป็นสัดส่วนกับความรุนแรงของอันตรายที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อ ซึ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้เปรียบเทียบระดับ EPCs ใน acute coronary syndrome และ chronic stable angina ซึ่งจากผลการศึกษาวิจัย พบว่า ระดับ EPCs ในคนไข้กลุ่ม acute coronary syndrome ทั้งจาก coronary artery และ peripheral vein มากกว่าคนไข้ในกลุ่ม chronic stable angina อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Werner N. และคณะ [153] ศึกษาเรื่อง stem cell และการซ่อมแซมของหัวใจพบว่า mediator ที่สำคัญ ที่ทำให้มีการปลดปล่อย EPCs คือ VEGF และ SDF-1 ซึ่งปริมาณ cytokines ดังกล่าวนี้ ก็พบปริมาณที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของการขาดเลือดของเนื้อเยื่อ

หลังจากมีการปลดปล่อยเซลล์ออกมายังกระแสเลือด EPCs จะถูกนำไปสู่บริเวณที่ได้รับอันตราย เรียกว่า homing process ซึ่งต้องอาศัย cytokines อีกกลุ่มหนึ่ง โดยการศึกษานี้ เป็นการศึกษาโดยอ้อมว่าในบริเวณที่ขาดเลือด น่าจะมี signal บางอย่างเพื่อดึงดูดให้ EPC มาอยู่เป็นปริมาณมาก โดยการศึกษานี้เปรียบเทียบปริมาณ EPCs ใน coronary artery สูงกว่า peripheral vein อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากยังไม่มี study ที่เปรียบเทียบระดับ cell จากสองที่ในคนเดียวกัน จึงไม่สามารถจะเปรียบเทียบข้อมูลได้ แต่อย่างไรก็ตามคงต้องศึกษาต่อไปว่า cytokines ใด เป็นตัวการสำคัญในขั้นตอนของ homing process นี้

หลังจากที่มีการขาดเลือดจากภาวะ acute coronary syndrome จะทำให้มีการหลั่ง cytokines และ mediator ต่าง ๆ เช่น VEGF และ stromal derived facta-1 (SDF-1) ทำให้มีการกระตุ้นต่อไขกระดูก และมีการปลดปล่อย EPC ออกมาในกระแสเลือด หลังจากที่มี EPC ในกระแสเลือดแล้วก็มีขั้นตอนที่ทำให้ cell ดังกล่าวนี้ ไปทำหน้าที่ซ่อมแซมส่วนที่ได้รับความเสียหาย จากการขาดเลือด

ในการศึกษาก่อนหน้านี้มีการเปรียบเทียบ circulating EPC ในกลุ่มคนไข้ chronic stable angina และ unstable angina [120] ซึ่งพบว่าระดับของ circulating EPC จะสูงกว่าในกลุ่ม unstable Angina ซึ่งในการศึกษานี้ในคนไข้กลุ่ม unstable angina จะตรวจไม่พบความผิดปกติของ cardiac biomarker ซึ่งบ่งถึงว่ามีปริมาณความรุนแรงของการขาดเลือดไม่มาก แต่สามารถที่จะกระตุ้นให้ไขกระดูกปลดปล่อย EPC ออกมาในปริมาณมาก แต่อย่างไรก็ตามระดับของ EPC ก็จะกลับสู่ปกติหลังจากที่คนไข้กลับสู่ภาวะเสถียรแล้ว

นอกจากนี้มีการศึกษาที่เปรียบเทียบ EPC ในกระแสเลือดในคนไข้ทั้ง 3 กลุ่ม คือ acute myocardial infarction, chronic stable angina และกลุ่ม normal โดยการศึกษานี้เปรียบเทียบระดับของ EPC ในเส้นเลือดดำเช่นกันและผลก็คล้ายกับการศึกษาแรก คือ จำนวนของ EPC จะมากสุดในกลุ่ม acute myocardial infarction และรองลงมาคือกลุ่ม chronic stable angina โดยความแตกต่างในแต่ละกลุ่มมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งหมด

Massa M และคณะ [121] ศึกษาจำนวน EPC ในกลุ่ม acute myocardial infarction และ control โดยการตรวจหา CD34+ cells ก็ให้ข้อมูลที่คล้ายกันคือ จะพบว่า EPC ในกลุ่ม acute MI จะมากกว่า control อย่างมีนัยสำคัญ

จากตัวอย่าง การศึกษาวิจัยทั้ง 3 พบว่าจำนวน EPC ที่ตอบสนองต่อภาวะการขาดเลือด จะมีระดับสูงสุดในกลุ่มคนไข้ acute coronary syndrome ทั้ง unstable angina และ acute MI แต่การศึกษาทั้งหมดเป็นการเปรียบเทียบระดับ EPC จากแหล่งกำเนิด ซึ่งส่วนใหญ่ก็คือ ไขกระดูก

แม้ว่าระดับของ EPC จะสัมพันธ์ กับความรุนแรงของการขาดเลือดก็ตาม แต่ขั้นตอนที่จะนำเซลล์ดังกล่าวไปซ่อมแซมบริเวณที่ขาดเลือด ซึ่งเรียกว่า homing process นั้น ยังไม่มีการศึกษาแน่ชัด แต่เชื่อว่าเป็นผลจากการตอบสนองต่อ cytokines บางอย่าง ที่จะดึงดูด EPC ไปยังบริเวณที่ขาดเลือด

จากการศึกษานี้ จึงเป็นการตอบคำถามว่าหลังจาก EPC มีการ mobilization มาในกระแสเลือดแล้ว สัดส่วนของเซลล์ที่ homing ไปยังบริเวณที่ขาดเลือดจะสัมพันธ์กับภาวะความรุนแรงของการขาดเลือด เช่นใน peripheral rein หรือไม่

เนื่องจากไม่มีการศึกษา EPC ใน coronary artery ในคนไข้เส้นเลือดหัวใจมาก่อน จึงทำให้ไม่สามารถจะนำผลการศึกษานี้ ไปเปรียบเทียบได้ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบกับผลการศึกษาที่คล้ายกันของระดับ EPC ในหลอดเลือดดำ ก็พอจะสรุปได้ว่าผลการศึกษาเป็นไปในแนวทางเดียวกัน และระดับเซลล์ใน peripheral rein น่าจะเป็นตัว determine ระดับเซลล์ใน coronary artery ได้ในกลุ่มที่เป็น acute coronary syndrome

ส่วนผลการศึกษาเปรียบเทียบ EPC ในคนไข้ chronic stable angina ที่พบว่าระดับของ EPC ใน peripheral vein สูงกว่าใน coronary artery สาเหตุส่วนหนึ่งน่าจะเป็นจากภาวะการขาดเลือดเรื้อรัง แม้ว่าจะไม่ทำให้ cell ตาย แต่ก็ทำให้มีการกระตุ้น ให้มีการปลดปล่อย EPC ออกมาในกระแสเลือดได้ แต่กลไกที่จะนำเซลล์ดังกล่าวนี้ไปยัง ตำแหน่งของการขาดเลือดอาจจะยังไม่มีสัญญาณหรือ mediators ที่มากพอดังนั้น homing process จึงเกิดขึ้นได้ไม่ดี

แต่เนื่องจากว่า การศึกษานี้มีข้อจำกัดเรื่อง จำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา จึงทำให้การสรุปผลดังกล่าวนี้ อาจจะยังไม่ชัดเจนคงต้องรอผลการศึกษาที่มีจำนวน ผู้ป่วยมากกว่านี้ เพื่อเป็นการยืนยัน

อนึ่ง การศึกษานี้ได้เก็บรวบรวมคนไข้ที่ตรวจ coronary angiogrom และผลปกติมาด้วย เพื่อดูระดับของ EPC ว่าจะเป็นอย่างไร แม้จะมีข้อมูลเพียงแค่ 5 ตัวอย่างแต่พบว่า ระดับของ EPC ก็มีค่าน้อย เมื่อเทียบกับคนไข้อีก 2 กลุ่ม โดยระดับ EPC ที่ได้มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะกับกลุ่ม acute coronary syndrome ซึ่งก็สอดคล้องกับการศึกษาของ Aortonic M. Leone และคณะ ที่ทำการศึกษาระดับ EPC ในคนไข้ทั้ง 3 กลุ่ม แม้ว่าจะเป็นการศึกษาในเส้นเลือดดำก็ตาม ผลการศึกษานี้นอกจากจะบอกถึงว่าระดับ EPC มีความแตกต่างระหว่างในกลุ่มคนไข้ เส้นเลือดปกติกับเส้นเลือดที่มีโดยโรคแล้ว ยังพบว่า แม้ในกลุ่มที่มีเส้นเลือดปกติ ก็ยังมีการตรวจพบ EPC ได้ จึงทำให้มีความสงสัยว่า อาจมี injury ขนาดเล็กน้อย และมีการตอบสนองอยู่บ้าง และถ้ามีการศึกษาที่มี

ขนาดใหญ่กว่านี้ เพื่อดูระดับของ EPC ในคนไข้ที่ normal coronary อาจจะได้ข้อมูลที่แตกต่างคือ อาจจะมีทั้งต่ำมาก ๆ เช่น การศึกษานี้หรือมีค่าสูงได้ โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีรอยโรคขยายออกด้านนอก ไม่ทำให้มีการตีบตัน แต่ก็มีพยาธิสภาพของ endothelium แม้จะตรวจไม่พบจาก angiogram ก็ตาม

เนื่องจากการตรวจหา EPC ในการศึกษานี้ ใช้วิธี Flow cyternetry ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว เมื่อเทียบกับวิธีมาตราฐาน คือ cell culture assay และนับ colony forming unit แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่เปรียบเทียบการตรวจหาระดับ EPC โดย 2 วิธี พบว่ามีความสัมพันธ์กันดี โดยเฉพาะไว้ใช้ marker ในการ identification cell ที่เหมาะสม

จากความรู้เดิมที่เราพบว่า EPC จะให้ผลบวกต่อ marker บนยังเซลล์คือ CD34,CD133, และ VEGFR แต่จากข้อมูลในระยะหลังพบว่า CD133 และ VEGFR มีความแม่นยำมากกว่า การใช้ CD34 เนื่องจากระดับของเซลล์ดังกล่าวจาก culture assay มากกว่าและ CD34 ยังตรวจเจอได้ใน cell ชนิดอื่นนอกจาก progenitor cell ดังนั้น การศึกษานี้ จึงเลือกใช้ marker ทั้งสองตัวนี้แทน CD34 เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องมากขึ้น มีความขัดแย้งในเรื่องของระดับ EPC ในช่วงที่เกิด acute coronary syndrome โดยพบว่าจากการศึกษาของ Shintani และคณะ [154] ระดับ EPC จะสูงสุด ในวันที่ 7 หลังมีอาการ ในขณะที่การศึกษาของ Leone และคณะ [155] ไม่พบความแตกต่างของระดับ EPC ใน 7 วันแรก และในการศึกษานี้ ในการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อส่งตรวจนั้น ไม่สามารถจำเพาะวันได้ชัดเจน แต่ขึ้นกับคนไข้ จะได้รับการตรวจ angiogrom เมื่อไรตามความเหมาะสมและความเร่งด่วน ดังนั้นในเรื่องของเวลาที่อาจจะมีผลกับระดับเซลล์ อาจทำให้ควบคุมไม่ได้ แต่อย่างไรก็ตามคนไข้ acute coronary syndrome ส่วนใหญ่ในการศึกษานี้ จะได้รับการตรวจ Angiogram ในวันที่ 3-4 หลังมีอาการ

นอกจากปัจจัยทางด้านความรุนแรง ของอันตรายต่อเนื้อเยื่อที่มีผลต่อการตอบสนองของไขกระดูก ในการปลดปล่อย EPCs แล้วเชื่อว่ายังมีอีกหลายปัจจัย เช่น อายุ, โรคที่ผู้ป่วยเป็นร่วมกับภาวะ IHD ยาที่ผู้ป่วยได้รับ ในขณะนั้น เนื่องจากการศึกษานี้ เป็นการศึกษาขนาดเล็ก จึงไม่สามารถที่จะบอกได้ชัดเจนถึงปัจจัย ที่มีผลต่อการตอบสนองของไขกระดูกในการปล่อยเซลล์อย่างชัดเจนได้

โดยสรุปในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดแบบเฉียบพลัน จึงมีผลให้เซลล์กล้ามเนื้อบางส่วนตาย ทำให้มีการตอบสนองของไขกระดูกเพื่อปลดปล่อย EPCs ได้มากกว่าในกลุ่ม chronic stable angina และ เชื่อว่าบริเวณที่ขาดเลือด น่าจะมีกลไกบางอย่างในการดึงดูดเซลล์ EPCs เพื่อเข้าไปซ่อมแซมบริเวณที่ขาดเลือดดังกล่าวได้

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาเพื่อให้เห็นความแตกต่างของ EPC ชัดเจนในคนไข้ ทั้งสามกลุ่มคือ acute coronary syndrome , chronic stable angina และกลุ่ม normal อาจจะต้องใช้ตัวอย่างที่มากขึ้น
2. การศึกษานั้น เป็นเพียงศึกษาผลลัพธ์ที่เกิดจากมีการ homing ของ EPC มาที่บริเวณที่ขาดเลือดแต่เหตุหรือ cytokine ใดที่เป็นตัวจักรในการทำให้ เกิด process นี้ ยังไม่ทราบ ซึ่งน่าจะได้มีการศึกษาต่อไป เพื่อที่จะนำมาใช้ในทางคลีนิกได้
3. แม้การตรวจพบ EPC ใน coronary artery ก็ไม่ได้เป็นการยืนยันว่า เซลล์ดังกล่าวจะสามารถรวมเข้ากับเซลล์บุหลอดเลือดเดิมได้ ซึ่งขั้นตอนการ incorporation ของ EPC นี้ ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้การซ่อมแซมบริเวณที่ขาดเลือดนั้นเกิดขึ้นได้ คงต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อศึกษากลไกที่ EPC จะรวมเข้ากับ เซลล์บุผิวหลอดเลือกได้
4. การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของยากับระดับ EPC ที่พบว่า มียาบางกลุ่มเช่น statin, angiotonsin converting enzyme inhibtors เป็นต้น ทำให้ระดับของ EPC เพิ่มขึ้นได้ แต่การศึกษาใน coronary artery ก็ยังไม่มี และ dose ที่เหมาะสมที่จะทำให้มี EPC mobilize ออกมาจากไขกระดูก ก็ยังไม่มีการศึกษาชัดเจน ดังนั้น เพื่อให้เห็นผลของยาที่มีต่อระดับและการทำงานของ EPC ก็น่าจะมีการศึกษาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

[1] Cohn JN, Bristow MR, Chien KR. Report of the National Heart, Lung and Blood Institute special emphasis panel on heart failure research. **Circulation** 1997; 95:766-70.

[2] Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. **N Engl J Med** 2001; 344:1750-7.

[3] Olivetti G, Capasso JM, Megs LG. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. **Circ Res** 1991; 68:856-69.

[4] Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. **Circulation** 1990; 81:1161-72.

[5] Jackson KA, Majka SM, Wang H. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium byadult stem cells. **J Clin Invest** 2001; 107: 1395–402.

[6] Eisenberg LM, Eisenberg CA. Adult stem cells and their cardiac potential. **Anat Rec** 2004; 276: 103–12.

[7] MacLellan WR, Schneider MD. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. **Annu Rev Physiol** 2000; 62: 289–319.

[8] Chien KR, Olson EN. Converging pathways and principles in heart development and disease: **Cel**l 2002; 110: 153–62.

[9] Kajstura J, Leri A, Finato N. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95: 8801–05.

[10] Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP. Chimerism of the transplanted heart. **N Engl J Med** 2002; 346: 5–15.

[11] La.amme MA, Myerson D, Saftz JE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. **Circ Res** 2002; 90: 634–40.

[12] Muller P, Pfeiffer P, Koglin J. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. **Circulation** 2002; 106: 31–35.

[13] Deb A, Wang S, Skelding KA. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. **Circulation** 2003; 107: 1247–49.

[14] Jackson KA, Majka SM, Wang H. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. **J Clin Invest** 2001; 107: 1395–402.

[15] Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG. Megeney LA. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. **FEBS Lett** 2002; 530: 239–43.

[16] Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100: 12313–18.

[17] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell 2003; 114: 763–76.

[18] Hughes S. Cardiac stem cells. **J Pathol** 2002; 197: 468–78.

[19] Wessels A, Perez-Pomares JM. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. **Anat Rec** 2004; 276: 43–57.

[20] Grogan M, Redfield MM, Bailey KR. Long-term outcome of patients with biopsyproved myocarditis: comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy. **J Am Coll Cardiol** 1995; 26:80-84.

[21] Nelissen-Vrancken HJ, Debets JJ, Snoeckx LH. Time-related normalization of maximal coronary flow in isolated perfused hearts of rats with myocardial infarction. **Circulation** 1996; 93:349-55.

[22] American Heart Association. 2000 Heart and Stroke Statistical Update. Dallas, TX: **American Heart Association**; 2001.

[23] O'Connell JB, Bristow MR. Economic impact of heart failure in the United States: time for a different approach. **J Heart Lung Transplant** 1994: 13: S107-S112.

[24] Califf RM, Adams KF, McKenna WJ. Arandomized controlled trial of epoprostenol therapy for severe congestive heart failure: the Flolan International Randomized Trial (FIRST). **Am Heart J** 1997; 134:44-54.

[25] Ravichandran LV, Puvanakrishnan R. In vivo labeling studies on the biosynthesis and degradation of collagen in experimental myocardial infarction. **Biochem Int** 1991; 24:405-14.

[26] Braunwald E, Pfeffer MA. Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. **Am J Cardiol** 1991; 68: 1-6.

[27] Hochman JS, Choo H. Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage. **Circulation** 1987; 75:299-306.

[28] Nidorf SM, Siu SC, Galambos G. Benefit of late coronary reperfusion on ventricular morphology and function after myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol** 1992; 20:307-13.

[29] Kocher AA. Bone marrow-derived stem cells for ischemic hearts. **Wien Klin Wochenschr** 2003; 115:77-9.

[30] Bishop AE, Buttery L, Polak JM. Embryonic stem cells. **J Pathol** 2002; 197:424-429.

[31] Semsarian C. Stem cells in cardiovascular disease: from cell biology to clinical therapy. **Intern Med J**. 2002; 32:259-65.

[32] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:10344 -9.

[33] Welch S, Plank D, Witt S. Cardiac-specific IGF-1 expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice. **Circ Res** 2002; 90: 641-8.

[34] Semsarian C, Wu MJ, Ju YK. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca2+ dependent calcineurin signaling pathway. **Nature** 1999; 400:576-81.

[35] Rosenthal N. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. **N Engl J Med** 2003; 349:267-74.

[36] Hardy CL. The homing of hematopoietic stem cells to the bone marrow. **Am J Med Sci** 1995; 309:260-6.

[37] Perin EC, Geng YJ, Willerson JT. Adult stem cell therapy in perspective. **Circulation** 2003; 107:935-8.

[38] Caplice NM, Gersh BJ. Stem cells to repair the heart: a clinical perspective. **Circ Res** 2003; 92:6-8.

[39] Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. **Circulation** 2003; 108:2212-8.

[40] Banai S, Shweiki D, Pinson A. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. **Cardiovasc Res** 1994;28:1176-9.

[41] Brogi E, Schatterman G, Wu T. Hypoxiainduced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. **J Clin Invest** 1996; 97:469-76.

[42] Lee SH, Wolf PL, Escudero R. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. **N Engl J Med** 2000; 342:626-33.

[43] Pillarisetti K, Gupta SK. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. **Inflammation** 2001; 25:293-300.

[44] Dengler TJ, Katus HA. Stem cell therapy for the infarcted heart ("cellular cardiomyoplasty"). **Herz** 2002; 27:598-610.

[45] Musil LS, Le A-CN, Van Slyke JK. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. **J Biol Chem** 2000; 275: 25207-15.

[46] Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. **Science** 1994; 264:98-101.

[47] Leor J, Patterson M, Quinones MJ. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat: a potential method of repair for infarcted myocardium? **Circulation** 1996; 94 (suppl II) :II332-6.

[48] Scorsin M, Marotte F, Sabri A. Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial area? **Circulation** 1996;94 (suppl II) :II337-40.

[49] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD. Cardiomyocytetransplantation improves heart function. **Ann Thorac Surg** 1996; 62:654-61.

[50] Etzion S, Battler A, Barbash IM. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in rat model of extensive myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol** 2001; 33:1321-30.

[51] Li RK, Mickle DAG, Weisel RD. Human pediatric and adult ventricular cardiomyocytes in culture: assessment of phenotypic changes with passing. **Cardiovasc Res** 1996; 32:362-73.

[52] Van Meter CH, Claycomb WC, Delcarpio JB. Myoblast transplantation in the porcine model: a potential technique for myocardial repair. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1995; 110:1442-8.

[53] Li RK, Mickle DAG, Weisel RD.The natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue. **Circulation** 1997; 96 (suppl II) :II179-87.

[54] Koh GY, Klug MG, Soonpaa MH. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. **J Clin Invest** 1993; 92:1548-54.

[55] Chiu RC, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. **Ann Thorac Surg** 1995; 60:12-18.

[56] Allen RE, Rankin LL. Regulation of satellite cells during skeletal muscle growth and development. **Proc Soc Exp Biol Med** 1990; 194:81-6.

[57] Leor J, Prentice H, Sartorelli V. Gene transfer and cell transplant: an experimental approach to repair a “broken heart. **Cardiovasc Res** 1997; 35:431-41.

[58] Jain M, DerSimonian H, Brenner DA. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. **Circulation** 2001; 103: 1920-7.

[59] Ghostine S, Carrion C, Souza LCG. Longterm efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. **Circulation** 2002;106 (suppl I) :I131-6.

[60] Pouzet B, Vilquin JT, Hagége AA. Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: can tissue processing be optimized? **Circulation** 2000; 102 (suppl III) : III210-5.

[61] Robinson SW, Cho PW, Levitsky HI. Arterial delivery of genetically labeled skeletal myoblasts to the murine heart: long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts. **Cell Transplant** 1996; 5:77-91

[62] Taylor DA, Atkins BZ, Hungsreugs P. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. **Nature Med** 1998; 4:929-33.

[63] Menasché P, Hagége AA, Vilquin JT. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. **J Am Coll Cardiol** 2003; 41:1078-83.

[64] Pagani FP, DerSimonian H, Zawadzka A. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. **J Am Coll Cardiol** 2003; 41:879-88.

[65] Tomita S, Li RK, Weisel RD. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. **Circulation** 1999; 100 (suppl II):II247-56.

[66] Shintani S, Murohara T, Ikeda H. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. **Circulation** 2001; 103:2776-9.

[67] Asahara T, Masuda H, Takahashi T. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. **Circ Res** 1999; 85:221-8.

[68] Takahashi T, Kalka C, Masuda H. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. **Nat Med** 1999; 5:434-8.

[69] Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. **Circulation** 2001; 103:634-47.

[70] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocytes apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nat Med** 2001; 7:430-6.

[71] Condorelli G, Borello U, De Angelis L. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:10733-8.

[72] Badorff C, Brandes RP, Popp R. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionallyactive cardiomyocytes. **Circulation** 2003; 107:1024-32.

[73] Szilvassy SJ, Bass MJ, Van Zant G, Grimes B. Organ-selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by ex vivo expansion. **Blood** 1999; 93:1557-66.

[74] Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. **Circulation** 2001; 103:2885 -90.

[75] Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alpha v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of actions and clinical development. **J Clin Invest** 1999; 103:1227-30.

[76] Fuchs S, Baffour R, Zhou YF. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. **J Am Coll Cardiol** 2001; 37:1726-32.

[77] Orlic D, Hill J, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. **Circ Res** 2002; 91:1092 -1102.

[78] Hescheler J, Fleischman BK. Indispensable tools: embryonic stem cells yield insights into the human heart. **J Clin Invest** 2001; 108:363-4.

[79] Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. **J Clin Invest** 2001; 108:40714.

[80] Min JY, Yang Y, Converso KL. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. **J Appl Physiol** 2002; 92:288-96.

[81] Yang Y, Min JY, Rana JS. VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cells. **J Appl Physiol** 2002; 93:1140-51.

[82] Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta, M. Muscle regeneration by bone marrow–derived myogenic progenitors. **Science** 1998; 279:1528-30.

[83] Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. **J Thorac Cardiovasc Surg** 2002; 120:999-1005.

[84] Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. **Ann Thorac Surg** 2002; 73:1919-25..

[85] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. **J Clin Invest** 1999; 103:697-705.

[86] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. **Circulation** 2002; 105:93-8.

[87] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science** 1999; 284:143-7.

[88] Makkar RR, Price MJ, Lill M. Multilineage differentiation of transplanted allogenic mesenchymal stem cells injected in a porcine model of recent

myocardial infarction improves left ventricular function. **Circulation** 2002; 106: II 34-43.

[89] Qayyum MS, Takizawa K, Frantzen M. Mesenchymal stem cell therapy prevents deterioration of left ventricular function in a porcine myocardial infarction model [abstract]. **J Am Coll Cardiol** 2002; 39:169A.

[90] Min JY, Sullivan MF, Yang Y. Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. **Ann Thorac Surg 2002**; 74:1568-75.

[91] Martin BJ, Shake JG, Brawn J. Mesenchymal stem cell implantation improves regional function in infarcted swine myocardium. **Circulation** 2000; 102:II682.

[92] Lai AC, Wallner K, Cao JM. Colocalization of tenascin and sympathetic nerves in a canine model of nerve sprouting and sudden cardiac death. J **Cardiovasc Electrophysiol** 2000; 11:1345-51.

[93] Joester A, Faissner A, The structure and function function of tenascins in the nervous system. **Matrix Biol** 2001; 20:13-22.

[94] Probstmeier R, Nellen J, Gloor S. Tenascin-R is expressed by Schwann cells in the peripheral nervous system. **J Neurosci Res**. 2001; 64:70-78.

[95] Yamamoto K, Dang QN, Kennedy SP. Induction of tenascin-C in cardiac myocytes by mechanical deformation. Role of reactive oxygen species. **J Biol Chem** 1999; 274:21840- 6.

[96] Wallner K, Li C, Shah PK. Tenascin-C is expressed in macrophage-rich human coronary atherosclerotic plaque. **Circulation** 1999; 99:1284-9.

[97] Cowan KN, Jones P, Rabinovitch M. Regression of hypertrophied rat pulmonary arteries in organ culture is associated with suppression of proteolytic activity, inhibition of tenascin-C, and smooth muscle cell apoptosis. **Circ Res** 1999; 84:1223-33.

[98] Gassler N, Rastar F, Hentz MW. Angiogenesis and expression of tenascin after transmural laser revascularization. **Histol Histopathol** 1999; 14:81-87.

[99] Wallner K, Sharifi BG, Shah PK. Adventitial remodeling after angioplasty is associated with expression of tenascin mRNA by adventitial myofibroblasts. **J Am Coll Cardiol** 2001; 37:655-61.

[100] Pak HN, Qayyum M, Kim DT. Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a swine model of myocardial infarction. **J Cardiovasc Electrophysiol** 2003; 14:841-8.

[101] Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. **Circ Res** 2001;88: 1159-67.

[102] Martins JB, Zipes DB. Effects of sympathetic and vagal nerves on recovery properties of the endocardium and epicardium of the canine left ventricle. **Circ Res** 1980; 46:100-10.

[103] Opthof T, Ramdat Misier AR, Coronel R. Dispersion of refractoriness in canine ventricular myocardium. Effects of sympathetic stimulation.**Circ Res** 1991; 68:1204-15.

[104] Cao JM, Fishbein MC, Han JB. Relationship between regional cardiac hyperinnvervation and ventricular arrhythmia. **Circulation** 2000; 101:1960-9.

[105] Cao JM, Chen LS, KenKnight BH. Nerve sprouting and sudden cardiac death. **Circ Res** 2000; 86:816-21.

[106] Rangappa S, Fen C, Lee EH. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. **Ann Thorac Surg** 2003; 75:775-9.

[107] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature** 2001; 410:701-5.

[108] Tse HF, Kwong YL, Chan J. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. **Lancet** 2003; 361:47-49.

[109] Perin EC, Silva GV, Sarmento-Leite R. Assessing myocardial viability and infarct transmurality with left ventricular electromechanical mapping in patients with stable coronary artery disease: validation by delayed enhancement magnetic resonance imaging. **Circulation** 2002; 106:957-61.

[110] Wolf T, Gepstein L, Dror U. Detailed endocardial mapping accurately predicts the transmural extent of myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol** 2001; 37:1590-7.

[111] Strauer BE, Brehm M, Zeus T. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. **Circulation** 2002; 106:1913-18.

[112] Assmus B, Schachinger V, Teupe C. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). **Circulation 2**002; 106:3009-17.

[113] Link DC. Mechanisms of granulocyte colonystimulating factor-induced hematopoietic progenitor- cell mobilization. **Semin Hematol** 2000; 37:25-32.

[114] Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony stimulating factor. **Blood** 2001; 98:1289-97.

[115] Hamano K, Nishida M, Hirata K. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. **Jpn Circ J** 2001; 65:845-7

[116] Hagége AA, Carrion C, Menasché P. Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. **Lancet** 2003: 361:491-2.

[117] Stamm C, Westphal B, Hans-Dieter K. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. **Lancet** 2003; 361:45-6.

[118] Perin EC, Dohmann H, Borojevic R. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation** 2003; 107:2294-2302.

[119] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J. Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration (BOOST) trial. Late Breaking Clinical Trials. **American Heart Association**; 2003.

[120] Jacob George, Emil Goldstein and Soulico Abashidze. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. **Eur Heart J** 2004; 25: 1003 -8.

[121] Antonio Maria Leone, Sergio Rutella, Giuseppina Bonanno. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. **Eur Heart J** 2005; 26: 1196 -1204.

[122] Margherita Massa, Vittorio Rosti, Maurizio Ferrario. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction **Blood** 2005; 105: 199 -206.

[123] Werner N., Kosiol S., Schiegl T. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. **N Engl J Med** 2005; 353:999-1007.

[124] Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk

[125] Hill J. M., Zalos G.,Halcox J. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. **N Engl J Med** 2003; 348:593-600.

[126] Rustemeyer P, Wittkowski W, Greve B. Flow-cytometric identification, enumeration, purification, and expansion of CD133+ and VEGF-R2+ endothelial progenitor cells from peripheral blood. **J Immunoassay Immunochem**. 2007; 28 (1):13-23.

[127] Rustemeyer P, Wittkowski W, Jurk K. Optimized flow cytometric analysis of endothelial progenitor cells in peripheral blood. **J Immunoassay Immunochem**. 2006; 27(1):77-88.

[128] L. Gallacher, B. Murdoch, D.M. Wu.Isolation and characterization of human CD34(−)Lin(−) and CD34(+)Lin(−) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7, **Blood** 2000; 95: 2813–20.

[129] Werner N, Kosiol S, Schiegl T. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. **N Engl J Med** 2005; 353: 999-1007.

[130] F.M. Rauscher, P.J. Goldschmidt-Clermont, B.H. Davis. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. **Circulation** 2003; 108: 457–63.

[131] R.J. Scheubel, H. Zorn,S. Rolf-Edgar. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. **J Am Col Cardiol** 2003; 42: 2073–80

[132] J.M. Edelberg, L. Tang, K. Hattori, D. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. **Circ Res** 2002; 90: e89–e93.

[133] M. Vasa, S. Fichtlscherer, A. Aicher. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. **Circ Res** 2001; 89: E1–E7.

[134] T. Imanishi, T. Hano, Y. Matsuo. Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 2003; 30: 665–70.

[135] J.M. Hill, G. Zalos, J.P. Halcox. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. **N Engl J Med** 2003; 348: 593–600.

[136] J. Waltenberger. Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications. **Cardiovasc Res** 2001; 9: 554–60.

[137] T. Imanishi, T. Hano,I. Nishio. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells. **Hypertens Res** 2004; 27: 101–8.

[138] C.J.M. Loomans, E.J.P. deKoening, F.J.T. Staal. Endothelial progenitor cell dysfunction a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type I diabetes. **Diabetes** 2004; 53: 195-9.

[139] O.M. Tepper, R.D. Galiano, J.M. Capla. Human endothelial progenitor cells from type II diabetes exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. **Circulation** 2002; 106: 2781–6.

[140] T. Kondo, M. Hayashi,K. Takeshita. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2004; 24: 1442-7.

[141] X. Wang, J. Zhu, J. Chen. Effects of nicotine on the number and activity of circulating endothelial progenitor cells. **J Clin Pharmacol** 2004; 44: 881-9.

[142] C. Heeschen, R. Lehman, J. Honold. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. **Circulation** 2004; 109: 1615–22.

[143] J. George, E. Goldstein, S. Abashidze. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. **Eur Heart J** 2004; 25:1003–8.

[144] S. Verma, M.A. Kukiszewski, S.-H. Li. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function. **Circulation** 2004; 109: r91–r100.

[145] M. Valgimigli, G.M. Rigolin, A. Fucili. $CD34^{+}$ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. **Circulation** 2004; 110: 1209–12.

[146] D. Simper, S. Wang, A. Deb. Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with vasculopathy and endothelial cells of non cardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis. **Circulation** 2003; 107: 143–9.

[147] S.M. Grundy. Statin trials and goals of cholesterol-lowering therapy, **Circulation** 1998; 97: 1436–9.

[148] D.J. Maron, S. Fazio, M.F. Linton. Current perspectives on statins. **Circulation** 2000; 101: 207–13.

[149] F.H. Bahlmann, K.D. deGroot, O. Mueller, B. Stimulation of endothelial progenitor cells A new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. **Hypertension** 2005; 45: 526–9.

[150] T. Imanishi, T. Hano, I. Nishio. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. **J Hypertens** 2005; 23: 97–104.

[151] T.Q. Min, C.J. Zhu, W.X. Xiang, Z. Improvement in endothelial progenitor cells from peripheral blood by ramipril therapy in patients with stable coronary artery disease. **Cardiovasc Drugs Ther** 2004; 18: 203–9.

[152] J. Chen, X. Wang, J. Zhu. Effects of Ginkgo biloba extract on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. **J Cardiovasc Pharmacol** 2004; 43: 347–52.

[153] Werner N., Kosiol S., Schiegl T. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. **N Engl J Med** 2005; 353:999-1007.

[154] Jacob George, Emil Goldstein, Soulico Abashidze. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. **Eur Heart J** 2004; 25: 1003 -8.

[155] Antonio Maria Leone, Sergio Rutella, Giuseppina Bonanno. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. **Eur Heart J** 2005; 26: 1196 -204.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Data collection form

ID:

Group: 1) ACS

2) CSA

Name:

HN:

Age:

Sex:

Clinical presentation:

Underlying disease:

Current drug treatment

ECG:

Cadiac biomarkers:

1) CK

2) CKMB

3) Troponin

Other Lab: BUN/Cr:

CBC vein:

CBC coronary:

Electrolyte:

Other:

CXR:

CAG result:

1)SVD

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2)DVD

3)TVD

Date from onset:

MAP from cath lab:

EPC(cell/ml) :

1) Vein :
2) Coronary:

Note:

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ พงษ์ศักดิ์ อินทรเพชร
ที่อยู่ 104 อ. ศรีบุญเรือง จ. หนองบัวลำภู
ประเทศไทย 39180
เกิดวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2517

ประวัติการศึกษา

ระดับประถม	โรงเรียนบ้านศรีบุญเรือง	จ. อุดรธานี
ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียนศรีบุญเรืองวิทยาการ	จ. อุดรธานี
ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนอุดรพิทยานุกูล	จ. อุดรธานี
แพทยศาสตรบัณฑิต	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	กรุงเทพมหานคร
ผู้เชี่ยวชาญด้านอายุรศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	กรุงเทพมหานคร
ผู้เชี่ยวชาญสาขาหัวใจและหลอดเลือด	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	กรุงเทพมหานคร

ประวัติการทำงาน

แพทย์ฝึกหัด	รพ.อำนาจเจริญ	จ.อำนาจเจริญ
รักษาการผู้อำนวยการโรงพยาบาล	รพ.หัวตะพาน	จ.อำนาจเจริญ
แพทย์ประจำบ้านและแพทย์ประจำบ้านต่อยอด	รพ.จุฬาลงกรณ์	กรุงเทพมหานคร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย