

(ร่าง) รายงานฉบับสมบูรณ์

Collateral circulation development in rabbit heart after stem cells transplantation

รหัสโครงการ

SCH –NR2010-11-05

สุนทรี เพ็ชรดี และ ทวีศักดิ์ ส่งเสริม

15 กันยายน 2555

(ร่าง) รายงานฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาระบบไหลเวียนเสริมหลังจากการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดในหัวใจกระต่าย

Collateral circulation development in rabbit heart after stem cells transplantation

รหัสโครงการ

SCH –NR2010-11-05

รายนามคณะผู้วิจัย

1. สุนทรี เพ็ชรดี  
หน่วยงาน ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน
2. ทวีศักดิ์ ส่งเสริม  
หน่วยงาน หน่วยงาน ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน

วันเริ่มต้นโครงการ 1 กันยายน 2554

วันสิ้นสุดโครงการ 31 สิงหาคม 2555

ตรวจสอบเอกสารพิมพ์เสร็จ : ชื่อผู้ตรวจสอบ

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก  
ศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ  
และได้รับความอนุเคราะห์ เซลล์ต้นกำเนิด จาก ดร. เพชรวิรินทร์ ศรีวัฒนกุล

ปีงบประมาณที่ได้รับทุน 2553

ปีงบประมาณ 2553

## ABSTRACT

Coronary artery disease is a common precursor to sudden cardiac death worldwide. To regenerate lost myocardium and coronary vasculature, stem cell transplantation is a promising therapeutic approach for the treatment. In this study, we examined the therapeutic effects of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) on myocardial regeneration. Fifteen adult male New Zealand White rabbits were subjected to coronary artery occlusion. The marginal branch of the left circumflex coronary artery of rabbits was ligated over 8 weeks to produce an ischemic area of 25-30% of the left ventricle. After surgically induced myocardial ischemia, rabbits in a test group were injected by SHEDs. Heart rate variability was measured to reflect cardiac autonomic modulation. The infarcted size measurements were performed at the end of each experiment. Our results show significant reduction in infarcted size in the SHED-transplanted group. This finding suggests that SHED could be an alternative selection for cardiac repair.

**Keywords:** stem cells, myocardial infarction, heart rate variability

## บทคัดย่อ

โรคหลอดเลือดหัวใจมักเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายอย่างกะทันหันที่พบได้ทั่วโลก การรักษาโดยการใช้เซลล์ต้นกำเนิดเป็นการรักษาที่มีแนวโน้มให้ผลในการฟื้นฟูกล้ามเนื้อหัวใจ และ เส้นเลือดได้ ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาผลการฟื้นฟูกล้ามเนื้อหัวใจ โดยการใช้ เซลล์ต้นกำเนิดจากพลาสมาของมนุษย์ โดยทำการศึกษา ในกระต่ายพันธุ์ นิวซีแลนด์ ไวท์ ซึ่งถูกผ่าตัด และทำการมัดเส้นเลือดหัวใจ โคโรนารีด้านซ้าย เพื่อให้เกิด กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดแบบถาวร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยให้มีขนาดกล้ามเนื้อที่ขาดเลือด มีสัดส่วน ประมาณ 25-30% ของพื้นที่หัวใจห้องล่าง หลังการเกิดกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด กระต่ายในกลุ่มทดสอบจะได้รับเซลล์ต้นกำเนิดจากพลาสมาของมนุษย์ (SHED) และทำการวัด ความแปรปรวนของอัตราการเต้นของหัวใจ (HRV) เพื่อศึกษา การทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ และขนาดกล้ามเนื้อหัวใจตาย จะถูกวัด เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ซึ่ง ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดจากพลาสมาของมนุษย์ สามารถให้ผลในการซ่อมแซมกล้ามเนื้อหัวใจได้

คำสำคัญ เซลล์ต้นกำเนิด กล้ามเนื้อหัวใจตาย ความแปรปรวนของอัตราการเต้นของหัวใจ

## บทนำ

โรคหลอดเลือดหัวใจ (Coronary artery disease) เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายเฉียบพลันทั่วโลก (National center for health statistic, 2010) การอุดตันของหลอดเลือดหัวใจส่งผลให้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Myocardial ischemia) กล้ามเนื้อหัวใจที่ขาดเลือดเป็นระยะเวลาสั้นทำให้กล้ามเนื้อหัวใจตาย (Myocardial infarction) หัวใจมีการทำงานที่ผิดปกติไปและหัวใจหยุดทำงานในที่สุด (Kloner R.A., 2001) ก่อให้เกิดการสูญเสียภายในครอบครัวและส่งผลกระทบต่อทางเศรษฐกิจ

ในเบื้องต้น ผู้ป่วยที่มีภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายได้รับการประเมินอาการและให้การรักษา โดยมุ่งเน้นไม่ให้อาการรุนแรงขึ้น หรือรักษาตามอาการได้แก่ การให้ออกซิเจน การให้ยาลดปวด (Analgesia) การให้ยาปรับการเต้นของหัวใจให้มีความสม่ำเสมอ (Antiarrhythmic drug; Beta blocker) การให้ยาละลายลิ่มเลือด (Thrombolytic drugs) การให้ยาป้องกันการแข็งตัวของ (Anticoagulant; Aspirin heparin) มีการตรวจสอบภายในหัวใจ (Cardiac catheterization) และผ่าตัดบายพาสหลอดเลือดหัวใจ (Coronary artery bypass surgery) ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง (Antman, *et al.* 2004) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาในการรักษาภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายยังมีผลข้างเคียง คำเตือนและข้อห้ามใช้หลายประการ

การรักษาโรคโดยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells) ถือเป็นการรักษาทางเลือกที่มีผู้ให้ความสนใจและทำการวิจัยเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการรักษามากขึ้นในปัจจุบัน โดยมุ่งหวังว่าการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อม มีการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cells; MSCs) พบว่าเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ชนิดมีโซเดิร์ม (Mesoderm) หลายชนิดได้แก่ เซลล์ไขมัน (adipocyte) ออสติโอเบลาสต์ (osteoblast) และมีความสามารถในการรับลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Cardiomyocyte) เซลล์ตับ (Hepatocyte) และเซลล์ชนิดอื่นๆ ได้ อีกทั้งยังมีผลการศึกษายืนยันว่ามีประสิทธิภาพในการรักษากล้ามเนื้อหัวใจตายและโรคสมองขาดเลือด (stroke)

มีการศึกษาที่รายงานว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากฟันน้ำนมมนุษย์ (Stem cells from human exfoliated deciduous teeth; SHED) มีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เร็วกว่า MSCs ชนิดอื่นๆ และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด (Miura, M., 2003) รวมถึงการเก็บ SHED จากฟันน้ำนมทำได้ง่ายและสามารถเก็บได้หลายครั้ง

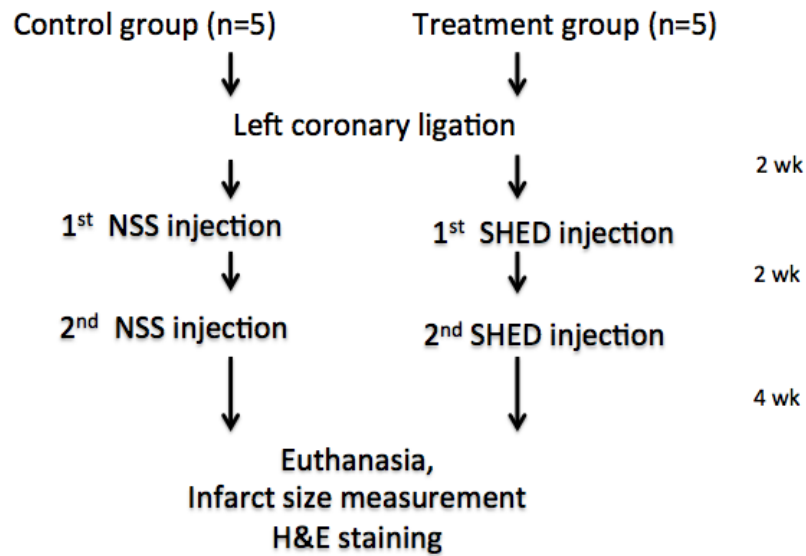
จุดประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการปลูกถ่าย SHED ในการรักษากล้ามเนื้อหัวใจตาย

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

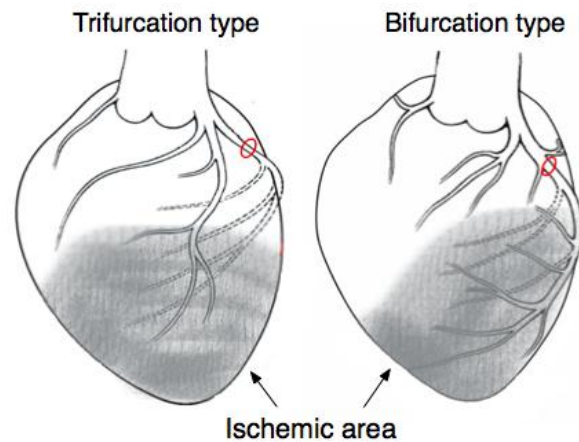
สัตว์ทดลองต้นแบบในการศึกษาครั้งนี้คือกระต่าย พันธุ์ไวท์ นิวซีแลนด์ (White New Zealand rabbits) เพศผู้ จำนวน 15 ตัว โดยกระต่ายทั้งหมดมีน้ำหนักตัวอยู่ในช่วง 2.7-3 กิโลกรัม โดยได้รับการตรวจสอบตามมาตรฐานการใช้สัตว์ทดลอง (The guide for the care and use of laboratory animals published by the US National Institutes of Health; NIH Publication No.85-23, revised 1996) และ ได้รับการยอมรับตามมาตรฐานหลักการใช้สัตว์ทดลองของ UK animals Scientific Procedures Act 1986 กระต่ายทั้งหมดถูกเลี้ยงโดยควบคุมปัจจัยทางด้านสภาวะแวดล้อม อาหารและการดูแลที่เหมือนกัน ที่อาคารเรียนและปฏิบัติการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

กระต่าย 15 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มควบคุม จำนวน 5 ตัว ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตาย แต่ไม่ได้รับการรักษา
2. กลุ่มทดลอง จำนวน 5 ตัว ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตาย และได้รับการรักษา ด้วยการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดจากเซลล์รากฟันน้ำนมมนุษย์หรือฟันคุดของมนุษย์ (Stem cells from human exfoliated deciduous teeth; SHED) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. เพชรินทร์ ศรีวัฒนกุล ผู้อำนวยการฝ่ายห้องปฏิบัติการ Bioeden Asia tooth cell bank
3. กลุ่มควบคุม (sham-operated) จำนวน 5 ตัว ทำการเปิดผ่าช่องอกและเย็บปิด โดยไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตาย เป็นกลุ่มควบคุมพื้นฐาน เพื่อยืนยัน ผลการทดลองที่ได้ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับยาสลบและขั้นตอนการผ่าตัด



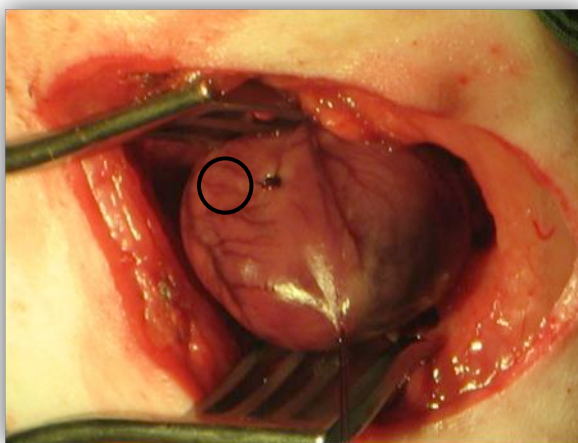
การเหนี่ยวนำให้เกิดกล้ามเนื้อตายทำได้โดยการสวนมัดส่วนปลายของแขนงเส้นเลือด left circumflex coronary แบบถาวร ซึ่งจะก่อให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายประมาณ 25-30% ที่บริเวณหัวใจห้องล่างซ้าย โดยเส้นเลือดโคโรนารีในกระต่ายแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ ดังรูปที่ 1 โดยทำตามต้นแบบ จาก University of Glasgow (Ng *et al.*, 1998; Burton *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2007)



รูปที่ 1: แขนงเส้นเลือดโคโรนารีในกระต่าย แบบ Bifurcation หรือ Trifurcation

กระต่ายถูกทำให้สลบด้วยการดมสลบด้วย 5% Isoflurane จากนั้นคงสภาวะการสลบด้วย 1-3% Isoflurane ตลอดการผ่าตัด จากนั้นทำการโกนขนบริเวณผนังช่องอกด้านซ้ายและเตรียมพื้นที่ผ่าตัดด้วยกรรมวิธีที่ปลอดเชื้อ ติด

อุปกรณ์ติดตามสัญญาณชีพได้แก่ เครื่องบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจ เครื่องวัดความดันและเครื่องวัดความเข้มข้นของออกซิเจนในกระแสเลือด เริ่มจากการระบุตำแหน่งของปลายลิ้นปี่ ทำการกรีดผิวหนัง กล้ามเนื้อที่ปกคลุมช่องอกและกล้ามเนื้อซี่โครงซี่โครงที่ตำแหน่งห่างจากปลายลิ้นปี่ไปทางด้านหน้า 1 เซนติเมตร โดยให้รอยกรีดเปิดขนานกับแนวกระดูกซี่โครงให้ความยาวของแผลประมาณ 7 เซนติเมตร แล้วถ่างผนังช่องอกให้มีพื้นที่เพียงพอในการทำงาน จากนั้นซ่อนตักหัวใจขึ้นมา แล้วตัดถุงหุ้มหัวใจ ระบุตำแหน่งแขนงของเส้นเลือด left circumflex coronary แล้วทำการผูกเส้นเลือด ดังรูปที่ 2 ติดตามการทำงานของหัวใจโดยคลื่นไฟฟ้าหัวใจ หลังจากผูกเส้นเลือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วค่อยทำการเย็บปิดผนังช่องอกด้วย กล้ามเนื้อและผิวหนังตามลำดับ หลังผ่าตัดฉีดสารละลายผสมของ Sodium bicarbonate Gelofusine และ Normal saline เข้าเส้นเลือดอย่างช้าๆ จากนั้นทำการดูแลหลังผ่าตัดโดย ให้ยาระงับอาการปวด ยาปฏิชีวนะ ทำแผลและตัดไหม 7 วันหลังจากการผ่าตัด แล้วทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดให้แก่กระต่ายกลุ่มทดลองในสองสัปดาห์ถัดไป

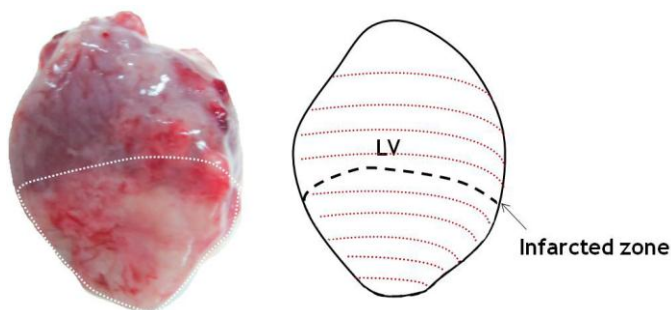


รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งการผูกแขนงเส้นเลือด left circumflex coronary ในวงกลมสีดำ

ทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้สารละลายที่มีจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากรากฟันมนุษย์จำนวนไม่ต่ำกว่า  $1 \times 10^6$  เซลล์ ในสารละลายน้ำเกลือปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ฉีดเข้าที่เส้นเลือดดำบริเวณหู (marginal ear vein) ดังรูปที่ 3 ให้แก่กระต่ายในกลุ่มทดลอง ขณะที่ฉีดสารละลายน้ำเกลือ (Normal saline) ให้แก่กระต่ายในกลุ่มควบคุม และหลังจากนั้น 2 สัปดาห์ทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดและฉีดสารละลายน้ำเกลือให้กระต่ายกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมตามลำดับอีกครั้ง ทำการเมตตามาตรกระต่ายทั้งหมดเมื่อ 4 สัปดาห์หลังจากการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเสร็จสิ้น เก็บตัวอย่างหัวใจเพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบขนาดพื้นที่กล้ามเนื้อหัวใจตาย (Infarcted size area) และการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา



รูปที่ 3 แสดงการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด โดยการฉีดผ่านเส้นเลือดดำบริเวณหู



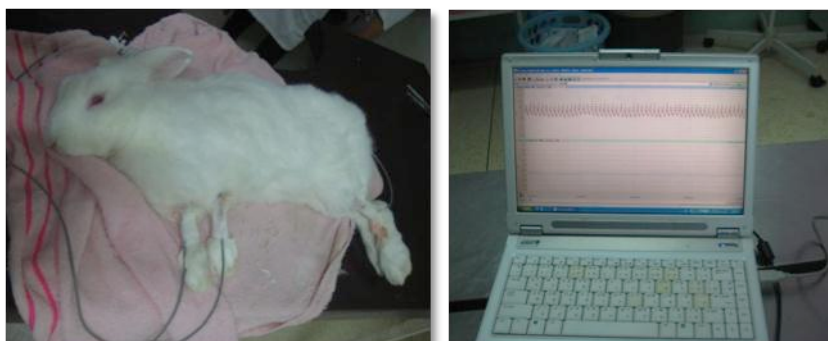
รูปที่ 4 แสดงการตัดกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างเป็นแผ่นบางจากปลายถึงฐานหัวใจ เส้นประแสดงขอบเขต ระหว่างกล้ามเนื้อหัวใจส่วนปกติและส่วนที่เกิดเนื้อตาย

### การวัดค่าความแปรปรวนของอัตราการเต้นของหัวใจ (Heart Rate Variability; HRV)

การวัดค่าความแปรปรวนของอัตราการเต้นของหัวใจ

เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นของหัวใจในช่วงเวลาหนึ่ง ในระหว่างทำการทดลอง ทำการบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (ECGs) และอัตราการเต้นของหัวใจของสัตว์ขณะสลบ โดยเหนี่ยวนำการสลบด้วยการดมยา โดยใช้ isoflurane 5 % ทำการบันทึก คลื่นไฟฟ้าหัวใจ ECGs ของสัตว์ทดลองในทุกกลุ่มการทดลอง จะถูกบันทึกในช่วงเวลา 15-20 นาทีสัปดาห์ละครั้งตลอดการทดลอง โดยบันทึก ECGs จากสายขั้วไฟฟ้าที่ต่อกับเครื่องแสดงคลื่นกระแสไฟฟ้า (Oscilloscope; Nicolet Instrument Corporation, Wisconsin, USA.) เพื่อสามารถติดตามคลื่นไฟฟ้าหัวใจได้จากจอภาพในขณะที่ทำการบันทึก ดังรูปที่ 5 โดยบันทึก ECG แบบต่อเนื่องติดต่อกัน

นาน 15 นาที ด้วยเครื่องบันทึกการทำงานของหัวใจ แล้วนำอัตราการเต้นของหัวใจที่บันทึก มาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นหัวใจ ความแปรปรวนของอัตราการเต้นหัวใจ (HRV) ถูกคำนวณโดยใช้ Fast Fourier transform (FFT) ตามขั้นตอนวิธีการ nonparametric วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นหัวใจ ทางสถิติโดยใช้ One way analysis of variance (ANOVA), โดยมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  ข้อมูลแสดงในรูปแบบ  $\text{mean} \pm \text{standard error of the mean (SEM)}$ .



รูปที่ 5 แสดงการบันทึกคลื่นไฟฟ้าหัวใจขณะสลบในกระต่ายทดลอง

การศึกษา Infarcted size area ทำโดยการย้อมสี เพื่อแยกบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่ตายออกจากกล้ามเนื้อหัวใจที่ยังมีชีวิต ใช้หัวเข็มปลายทู่สอดเข้าช่องเปิดของเส้นเลือด left coronary artery แล้วฉีด Phosphate buffer saline (PBS) เพื่อชะล้างเอาเลือดที่ค้างอยู่ในระบบ (Coronary system) ออกไป จากนั้นฉีดสี Evan blue เข้าสู่ระบบหลอดเลือดเลี้ยงหัวใจผ่านช่องเปิดเดิม สีจะเข้าไปย้อมพื้นที่กล้ามเนื้อหัวใจที่ยังมีชีวิตที่ถูกหล่อเลี้ยงด้วยเส้นเลือดของ Coronary system ยกเว้นบริเวณที่ไม่มีหลอดเลือดเข้าไปหล่อเลี้ยงหรือบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่ตาย หลังจากนั้นนำหัวใจที่ย้อมเสร็จเรียบร้อยแล้วไปแช่ที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น ตัดตามขวางจากฐานถึงยอดหัวใจ ให้แต่ละชิ้นมีความหนา 2 มิลลิเมตร แล้วนำทั้งหมดลงแช่ใน Triphenyltetrazolium chloride (TTC) เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที แล้วย้ายไปตรึงสีในสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ฟอร์มาลินข้ามคืน ขั้นตอนการย้อมสีทั้งหมดจะช่วยให้มองเห็นบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่ยังมีชีวิตเป็นสีแดงแยกจากบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่ตายซึ่งจะเป็นสีขาว จากนั้นถ่ายภาพหน้าตัดชิ้นกล้ามเนื้อหัวใจทุกชิ้น นำรูปภาพที่ได้ไปวัดขนาดกล้ามเนื้อหัวใจตายด้วยโปรแกรม Imagej และคำนวณเป็น % infarcted volume โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ infarcted volume} = \left[ \frac{\text{Total infarcted size area} \times \text{Thickness}}{\text{Total heart volume}} \right] \times 100$$

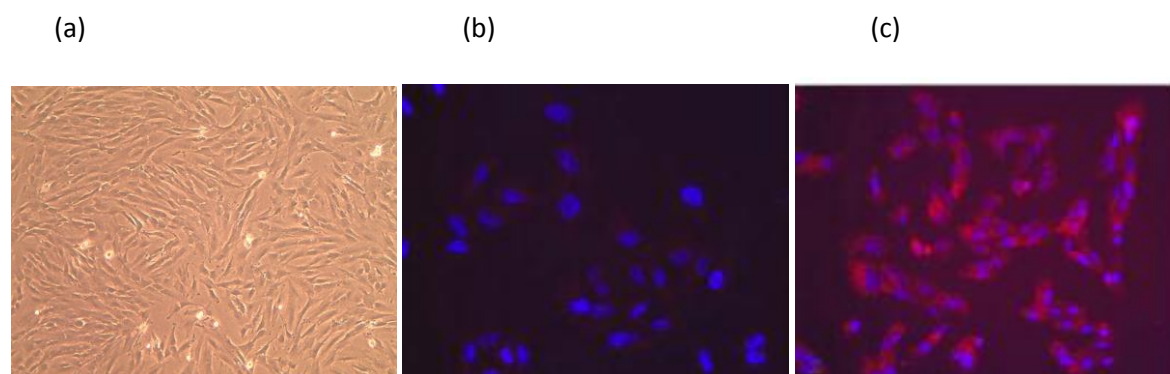
นำ % infarcted volume มาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่า % infarcted volume ของกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยใช้วิธีการทางสถิติ Student T-test

การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา เนื้อเยื่อตัวอย่างบริเวณที่ทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดขนาด ( $0.5 \text{ cm}^3$ ) ถูกเก็บรักษาในสารละลาย 10% ฟอर्मาลินจะใช้ในการศึกษาจุลพยาธิวิทยา โดยเนื้อเยื่อจะถูกตัดให้มีความหนาประมาณ 5-8 ไมโครเมตร โดยผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง tissue processing machine แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin แล้วนำไปศึกษาการเกิดหลอดเลือดใหม่รอบรอยต่อระหว่างบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจตายและบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่ยังมีชีวิต

### ผลการศึกษา

#### การศึกษาลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์

การแสดงออกในเชิงบวกของเครื่องหมายที่ติดบนพื้นผิว เป็น 100% สำหรับ Stro1 (รูปที่ 6) เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (MSCS) ยึดติดกับจานเลี้ยงพลาสติก และกระจายตัวดังแสดงในรูปที่ 6 (a)

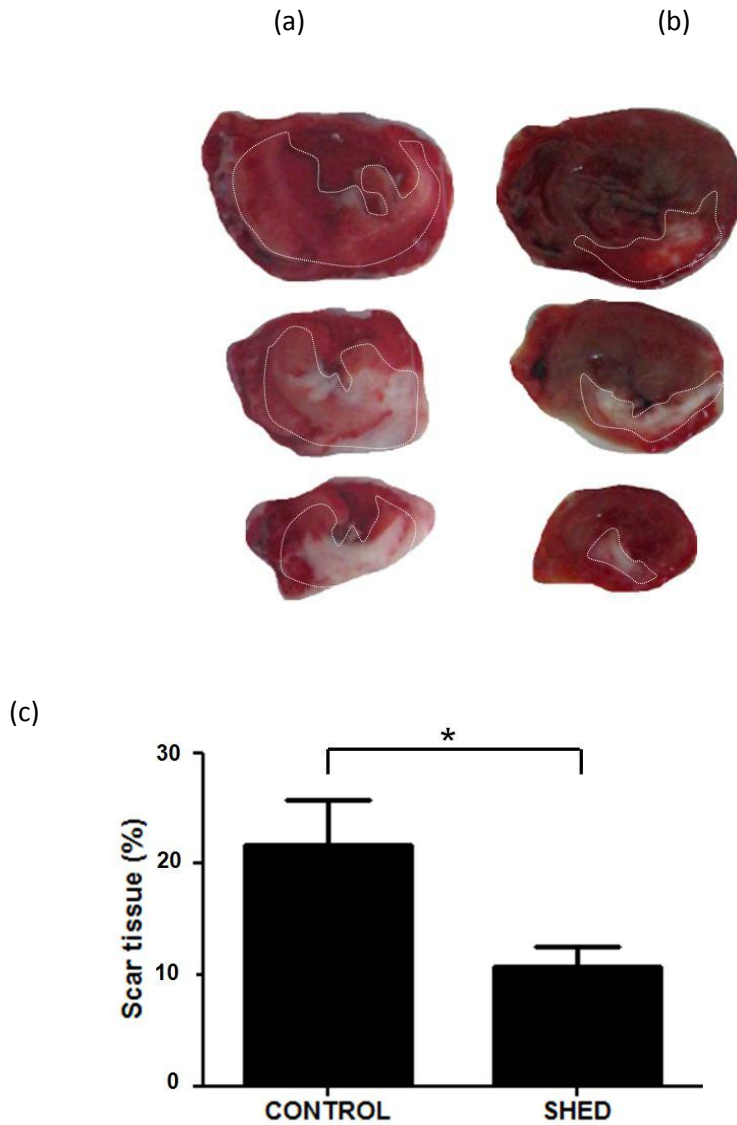


รูปที่ 6 แสดงการวิเคราะห์เซลล์ต้นกำเนิด SHED โดยวิธี immunocytochemistry ในรูป (b) แสดงให้เห็นผลบวก stro-1 เท่ากับ 100% เมื่อเทียบกับ เซลล์ HeLa (c) สีฟ้าแสดง DAPI ย้อมสีนิวเคลียส สีแดงคือ stro-1 โดยแอนติบอดีที่ติดฉลาก Cy3

#### การศึกษาผลของการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมมนุษย์ต่อขนาดเนื้อตายในกล้ามเนื้อหัวใจ

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (8 สัปดาห์หลังจากผ่าตัดผูกเส้นเลือดหัวใจ) เก็บกล้ามเนื้อหัวใจมาวัดขนาดเนื้อตาย พบว่าขนาดเนื้อตายของกระต่ายกลุ่มควบคุมเท่ากับ  $21.6 \pm 0.04$  % ในขณะที่กระต่ายกลุ่มทดลอง เท่ากับ

10.7±0.02 % เมื่อทดสอบทางสถิติโดยใช้ Student t-test พบว่าอัตราการเต้นของหัวใจในกระต่ายกลุ่มควบคุมแตกต่างจากกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า  $P\text{-value} < 0.05$



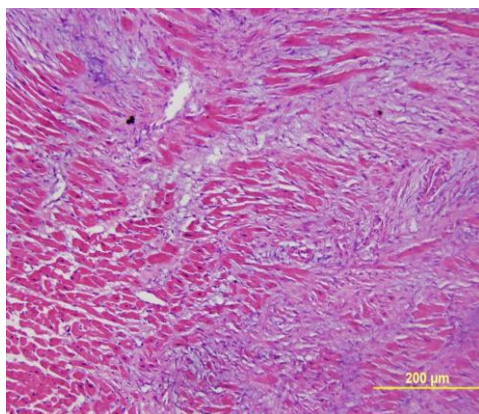
รูปที่ 7 แสดงขนาดเนื้อตายบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจของกระต่ายกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

#### การศึกษาผลของการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมมนุษย์ทางจุลพยาธิวิทยา

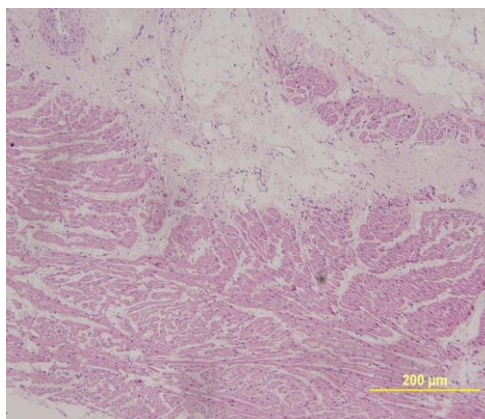
จากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 7) พบว่าเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจของกระต่ายกลุ่มควบคุม (ภาพด้านซ้าย) มีเนื้อตายและพังพืดเกิดขึ้น (Fibrosis) ในขณะที่กล้ามเนื้อหัวใจของ

กระต่ายกลุ่มทดลอง (ภาพด้านขวา) มีเนื้อตายเกิดขึ้นแต่ไม่พบพังพืด นอกจากนี้ยังพบการเกิดเส้นเลือดใหม่ขึ้นบริเวณรอบเนื้อตาย (Neo-vascularization)

(a)

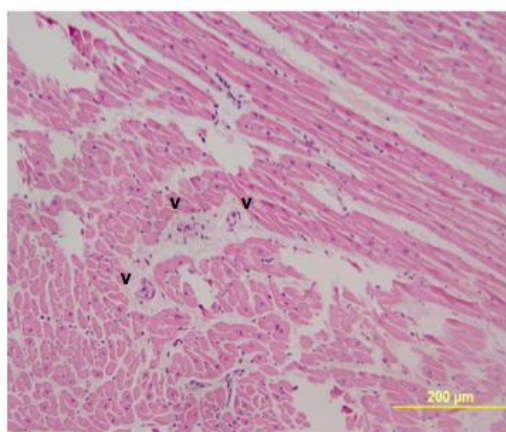


(b)

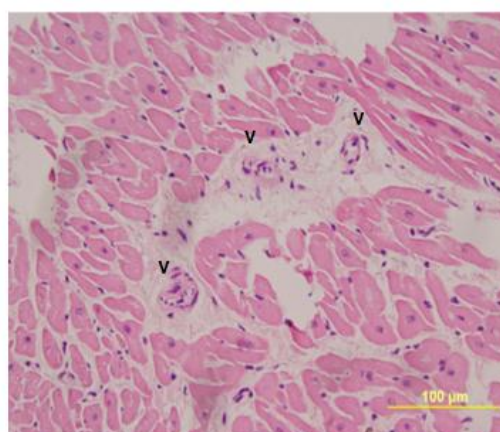


รูปที่ 8 ภาพแสดงเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจที่ย้อมสี hematoxyline-eosin ในกลุ่มควบคุม (ซ้าย) และกลุ่มทดลอง

(c)



(d)



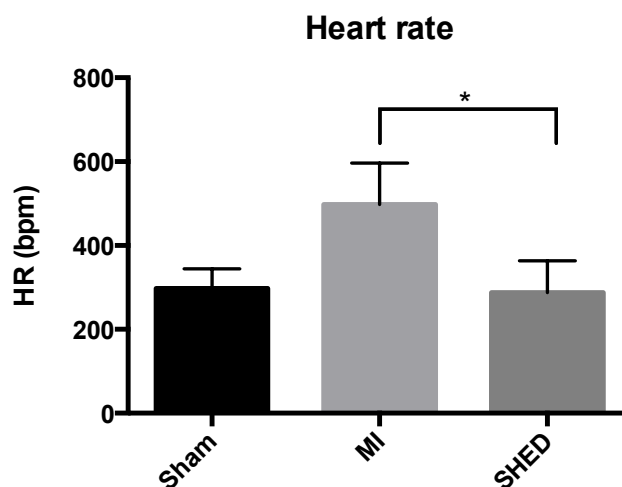
รูปที่ 9 แสดงภาพขยาย (ด้านขวา) ของ peri-infarcted zone ของกลุ่มทดลองที่มีการปลูกถ่าย SHED แสดงให้เห็นถึงการเกิดเส้นเลือดใหม่ (neovascularization; v) รอบกล้ามเนื้อหัวใจ

## การศึกษาผลของการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมมนุษย์ต่ออัตราการเต้นของหัวใจและการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ

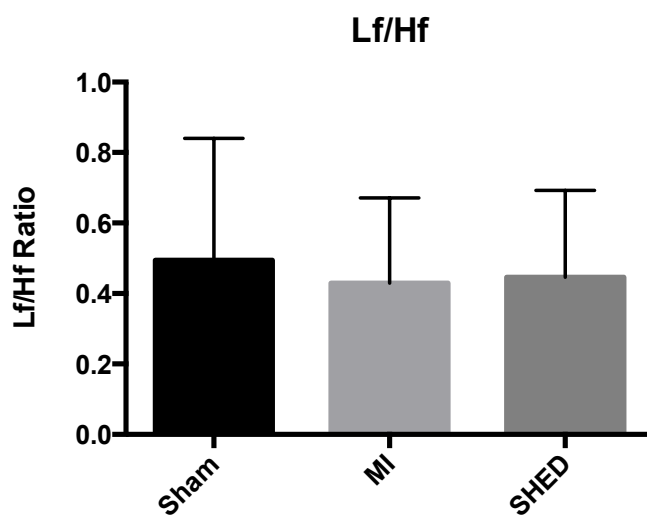
อัตราการเต้นหัวใจและความแปรปรวนของอัตราการเต้นหัวใจในการควบคุมและกลุ่มทดลอง แสดงในรูปที่ 10 (a) และ (b) ตามลำดับ เมื่อวัดอัตราการเต้นของหัวใจในกระต่ายทุกกลุ่มทดลอง พบว่าอัตราการเต้นของหัวใจเฉลี่ยในกระต่ายกลุ่ม Sham มีค่าเท่ากับ 297 ครั้งต่อนาที ในกระต่ายกลุ่ม MI มีค่าเท่ากับ 497 ครั้งต่อนาที และในกระต่ายกลุ่ม SHED มีค่าเท่ากับ 288 ครั้งต่อนาที และเมื่อทดสอบทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA พบว่าอัตราการเต้นของหัวใจในกระต่ายกลุ่ม MI แตกต่างจากกลุ่ม SHED อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า  $P\text{-value} < 0.05$  (รูปที่ 10a)

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในตัวแปรอัตราการเต้นของหัวใจที่พบในสัตว์ที่รักษาด้วย  $1 \times 10^6$  SHED เมื่อเทียบกับการควบคุม แม้ว่ากลุ่มที่ทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด มีแนวโน้มที่จะปรับปรุงสมดุลของระบบประสาทอัตโนมัติและยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญให้เห็นในพารามิเตอร์ electrocardiographic เช่นเดียวกับในโปรไฟล์เลือด (ข้อมูลไม่แสดง)

(a)



(b)



รูปที่ 10 แสดงอัตราการเต้นของหัวใจ ในกระต่ายกลุ่มเปิดผ่าแต่ไม่มีการผูกเส้นเลือดหัวใจ และไม่มีการฉีดเซลล์ต้นกำเนิด (Sham group) กลุ่มเปิดผ่าผูกเส้นเลือดหัวใจแต่ไม่มีการฉีดเซลล์ต้นกำเนิด (Myocardial infarction group: MI) กลุ่มเปิดผ่าผูกเส้นเลือดหัวใจและฉีดเซลล์ต้นกำเนิด (SHED group)

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษา ผลของการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมมนุษย์ หลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายในกระต่ายกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง คาดว่าผลจากพาราไครน์น่าจะมีบทบาทในการเพิ่มการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ในบริเวณที่เกิดเนื้อตาย เช่น การสร้างเส้นเลือดใหม่ (Neo-vascularization) การลดการอักเสบ การซ่อมแซมแทนที่บริเวณเนื้อตาย แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้าใจในบทบาทหน้าที่และผลของพาราไครน์ของเซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมของมนุษย์ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำมาสนับสนุนผลการศึกษาในครั้งนี้ และจากผลของอัตราการเต้นของหัวใจที่ลดลงในกระต่ายกลุ่มทดลองเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อพิจารณาจากสมการอัตราการส่งเลือดออกจากหัวใจในหนึ่งนาที (Cardiac Output) เท่ากับอัตราการเต้นของหัวใจ (Heart Rate) คูณกับปริมาตรเลือดที่ไหลออกจากหัวใจห้องล่างซ้าย (Stroke volume) ในกรณีการเกิดหัวใจล้มเหลว Stroke volume จะลดลงในขณะที่ Heart Rate จะเพิ่มขึ้นเพื่อผลในการคงที่ Cardiac Output ดังนั้นจากการศึกษาทดลองครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า การใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากพืชน้ำนมของมนุษย์มีผลช่วยในการซ่อมแซมภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายในกระต่าย

## Reference

1. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125(1):e2–e220.
2. Gepstein L. Derivation and Potential Applications of Human Embryonic Stem Cells. *Circulation Research*. 2002;91(10):866–876.
3. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. 1999;100(19 Suppl):II247–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567312>. Accessed September 3, 2012.
4. Brehm M, Zeus T, Strauer BE. Stem cells--clinical application and perspectives. *Herz*. 2002;27(7):611–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12439633>. Accessed September 3, 2012.
5. Caspi O, Gepstein L. Regenerating the heart using human embryonic stem cells--from cell to bedside. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2006;8(3):208–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16599061>. Accessed September 3, 2012.
6. Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, et al. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *The American journal of cardiology*. 2006;97(6):823–9.
7. Meirelles L da S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *British journal of haematology*. 2003;123(4):702–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14616976>. Accessed July 25, 2012.
8. Petersen T, Niklason L. Cellular lifespan and regenerative medicine. *Biomaterials*. 2007;28(26):3751–6.
9. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*. 2009;88(9):792–806.
10. Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2008;26(3):638–45.
11. Perez-Illarbe M, Agbulut O, Pelacho B, et al. Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium. *European journal of heart failure*. 2008;10(11):1065–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18805052>. Accessed August 28, 2012.
12. Hansson EM, Lindsay ME, Chien KR. Regeneration next: toward heart stem cell therapeutics. *Cell stem cell*. 2009;5(4):364–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19796617>. Accessed September 3, 2012.
13. Gneocchi M, Danieli P, Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascular pharmacology*. 2012;57(1):48–55. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2012.04.002>. Accessed July 23, 2012.
14. Huang G, Pashmforoush M, Chung B, Saxon LA. The role of cardiac electrophysiology in myocardial regenerative stem cell therapy. *Journal of cardiovascular translational research*. 2011;4(1):61–5.

15. Halbach M, Pfannkuche K, Pillekamp F, et al. Electrophysiological maturation and integration of murine fetal cardiomyocytes after transplantation. *Circulation research*. 2007;101(5):484–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641227>. Accessed August 14, 2012.
16. Roell W, Lewalter T, Sasse P, et al. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature*. 2007;450(7171):819–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18064002>. Accessed August 2, 2012.
17. Kishi T. Heart failure as an autonomic nervous system dysfunction. *Journal of cardiology*. 2012;59(2):117–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jjcc.2011.12.006>. Accessed August 30, 2012.
18. Kishi T, Hirooka Y. Central mechanisms of abnormal sympathoexcitation in chronic heart failure. *Cardiology research and practice*. 2012;2012:847172. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3420224&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed September 11, 2012.
19. Nolan J, Flapan AD, Capewell S, et al. Decreased cardiac parasympathetic activity in chronic heart failure and its relation to left ventricular function. *British heart journal*. 1992;67(6):482–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1024892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed September 10, 2012.

## Appendix

### 1. ผู้รับผิดชอบ ประกอบด้วย

#### 1.1 หัวหน้าโครงการ

(ชื่อ-สกุล ภาษาไทย) สุนทรี เพ็ชรดี

(ชื่อ-สกุล ภาษาอังกฤษ) SOONTAREE PETCHDEE

ตำแหน่ง อาจารย์

ระดับการศึกษาสูงสุด ปริญญาเอก

**หน่วยงานต้นสังกัด** ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน

**สถานที่ทำงาน** ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน จังหวัด นครปฐม รหัสไปรษณีย์ 73140

โทรศัพท์ 034-351901-3 ext 3450-1

โทรสาร 034-351405

e-mail [fvetstr@ku.ac.th](mailto:fvetstr@ku.ac.th)

รับผิดชอบในการประสานงานโครงการวิจัย ศึกษาการทำงานของหัวใจและหลอดเลือด

สัดส่วนของงาน 80%

#### 1.2 ผู้ร่วมงานวิจัย (ระบุชื่อผู้ร่วมวิจัย หน่วยงาน พร้อมทั้งสถานที่ติดต่อ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ

*E-mail และอธิบายถึงลักษณะและสัดส่วนของงานที่แต่ละคนรับผิดชอบ)*

1. (ชื่อ-สกุล ภาษาไทย) ทวีศักดิ์ ส่งเสริม

(ชื่อ-สกุล ภาษาอังกฤษ) THAWEESAK SONGSERM

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

ระดับการศึกษาสูงสุด ปริญญาเอก

**หน่วยงานต้นสังกัด** ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตกำแพงแสน

**สถานที่ทำงาน** ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

โทรศัพท์ 034 – 351901 – 3,089-8343536

โทรสาร 034 – 351405

อีเมล [fvetss@ku.ac.th](mailto:fvetss@ku.ac.th)

รับผิดชอบในส่วน การศึกษาทางพยาธิวิทยา

สัดส่วนของงาน 20%