

บทความพิเศษ

การเก็บและเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดเพื่อใช้รักษาโรคที่ไม่ใช่โรคทางระบบโลหิตวิทยา

มณีนพ ยิ้มยิ้ม, อรทัย พรหมสุวิชา และ จิรายุ เอื้อวรากุล

สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ในปัจจุบันการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells) มีบทบาทอย่างมากในทางการแพทย์ ความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดที่เพิ่มมากขึ้นในรอบ 10 ปีที่ผ่านมาทำให้แพทย์และนักวิจัยเล็งเห็นความสำคัญของการนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ประโยชน์ เพื่อรักษาโรคภัยไข้เจ็บที่ยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เช่น โรคกระดูกพรุน โรคเบาหวาน โรคเกี่ยวกับสมองและระบบประสาท โรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น โดยคาดหวังว่าเซลล์ต้นกำเนิดจะเข้าไปทดแทนหรือซ่อมแซมเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่เกิดพยาธิสภาพให้ทำงานเป็นปกติได้ดังเดิม

เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells)¹

เซลล์ต้นกำเนิดมีคุณสมบัติที่สำคัญ 4 ประการ ได้แก่

1. ความสามารถในการสร้างเซลล์ใหม่หรือเซลล์ลูกที่มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ต้นกำเนิดทุกประการ (self-renewal capacity)
2. ความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation capacity) ได้อย่างไม่สิ้นสุด โดยอัตราการสร้างเซลล์ใหม่อยู่ภายใต้กลไกการควบคุมของร่างกาย
3. ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดอื่นที่มีลักษณะและหน้าที่จำเพาะมากขึ้น (differentia-

tion capacity)

4. ความสามารถในการสร้างเซลล์ลูกได้หลากหลายประเภท (pluripotency) หรือได้ทุกประเภท (totipotency)

แหล่งที่มาของเซลล์ต้นกำเนิด²⁻¹⁰

แหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดมีทั้งในไขกระดูก กระแสเลือด เลือดสายสะดือทารก ในอวัยวะบางส่วนของร่างกาย ได้แก่ ผิวหนัง เยื่อบุทางเดินอาหาร สมอง หัวใจ หรือ กล้ามเนื้อ เป็นต้น และจากตัวอ่อนมนุษย์ โดยตัวอ่อนนี้อาจมาจากการทำเด็กหลอดแก้ว (in vitro fertilization) หรือจากการโคลนนิ่ง (therapeutic cloning) นอกจากนี้เซลล์ต้นกำเนิดยังได้จากการตกในครรภ์สตรีที่แท้งบุตรในช่วง 5-9 สัปดาห์ (fetal germ cells)

การวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดในปัจจุบันอาศัยเซลล์ต้นกำเนิดจาก 2 แหล่ง คือ

1. เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมนุษย์ (Human embryonic stem cell)¹⁰ เป็นเซลล์ที่ได้มาจากส่วน inner cell mass ของเซลล์ตัวอ่อนระยะ blastocyst หลังจากปฏิสนธิได้ 3-5 วัน ถือว่าเป็น pluripotent stem cell เนื่องจากสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้มากกว่า 200 ชนิด ซึ่งจะพัฒนาต่อไปเป็นเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆ ตามบริเวณที่เซลล์นี้เข้าไปอยู่ในร่างกาย ในปี 1998 Thomson และคณะ สามารถแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนของมนุษย์ และนำมาเพาะเลี้ยงในห้อง

ได้รับต้นฉบับ 28 มิถุนายน 2549 ให้ลงตีพิมพ์ 30 กรกฎาคม 2549
ต้องการสำเนาต้นฉบับกรุณาติดต่อ รศ.ดร.พญ. จิรายุ เอื้อวรากุล
สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ ตึกเฉลิมพระเกียรติชั้น
12 โรงพยาบาลศิริราช ถนนพหลโยธิน เขตบางกอกน้อย กทม. 10700

ปฏิบัติการได้สำเร็จเป็นครั้งแรก¹¹ แต่อย่างไรก็ดี การนำเซลล์จากตัวอ่อนของมนุษย์มาใช้ประโยชน์ จะมีปัญหาในเรื่องชีวจริยศาสตร์เข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้น เพื่อหลีกเลี่ยงประเด็นดังกล่าว การใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากผู้ใหญ่จึงมีบทบาทสำคัญอย่างมากในปัจจุบัน

2. เซลล์ต้นกำเนิดจากผู้ใหญ่ (Human adult stem cell)¹³⁻¹⁹ นักวิทยาศาสตร์บางคนใช้คำว่า somatic stem cell เนื่องจากไม่จำเป็นที่เซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้จะต้องมาจากผู้ใหญ่เท่านั้น แต่อาจมาจากเด็ก หรือ สายสะดือก็ได้ และยังมีคำว่า tissue stem cell และ post-natal stem cell ที่ใช้เรียกเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้มาจากเซลล์ผู้ใหญ่ด้วย นอกจากนี้ที่น่าสนใจคือ มีผู้เสนอคำว่า spore-like cell เพราะพบในทุกเนื้อเยื่อ และมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานานในภาวะที่ไม่อุดมสมบูรณ์¹² อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปแล้วยังคงนิยมใช้คำว่า adult stem cell เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้พบในเนื้อเยื่อและอวัยวะที่พัฒนาแล้วในร่างกายมนุษย์ ตัวอย่างของเซลล์ต้นกำเนิดจากผู้ใหญ่ที่รู้จักกันดีคือ เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (hematopoietic stem cell) ที่อยู่ภายในไขกระดูก ซึ่งปกติจะพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ในร่างกาย เช่น เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกร็ดเลือด ก่อนหน้านั้นเชื่อกันว่าเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อชนิดอื่นๆ ที่อยู่นอกกระบวนโลหิตวิทยาได้ แต่จากการทดลองในระยะต่อมาพบว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ตับ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์ไต เซลล์กระดูกอ่อน ได้¹³⁻¹⁷ ซึ่งคุณสมบัติที่เซลล์ต้นกำเนิดในเนื้อเยื่อชนิดหนึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่ออีกชนิดหนึ่งได้ เรียกว่า stem cell plasticity^{18,19}

เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดกับการประยุกต์ใช้²⁰⁻²⁷

นับเป็นเวลากว่า 30 ปี แล้วที่มีการนำเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจากไขกระดูกและเลือดของผู้บริจาคเข้าไปใช้ฟื้นฟูหน้าที่การสร้างเซลล์เม็ดเลือดประเภทต่างๆ ในผู้

รับ ไม่ว่าจะเป็นในภาวะที่ผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดขนาดสูงที่ทำให้ลายไขกระดูก (myeloablative chemotherapy) หรือตามหลังการฉายรังสีทั่วร่างกาย (total body irradiation) ผู้ป่วยโรคระบบโลหิตจำนวนมากจากทั่วโลก ไม่ว่าจะเป็นผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน และเรื้อรัง ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยโรคพันธุกรรม เช่น ธาลัสซีเมีย ฯลฯ ที่มีโอกาสได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก สามารถรอดพ้นจากโรคร้ายหรือโรคเรื้อรังต่างๆ และหายขาดได้ แสดงให้เห็นประจักษ์ถึงคุณสมบัติที่สำคัญของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด ทั้งในด้าน proliferation, differentiation และ pluripotency

ในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา ได้มีความพยายามที่จะใช้คุณสมบัติอีกข้อหนึ่งของเซลล์ต้นกำเนิด นั่นคือ stem cell plasticity ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยนักวิทยาศาสตร์คาดหวังที่จะใช้ประโยชน์จากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด โดยนำมาเซลล์จากไขกระดูกมาใช้บำบัดโรคที่ไม่ใช่โรคทางโลหิตวิทยา เช่น โรคที่เป็นผลมาจากการสูญเสีย หรือเสื่อมสภาพของเซลล์ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเบาหวาน โรคประสาทที่มีปฏิกิริยาการเคลื่อนไหวน้อยลงและอาการสั่น (Parkinson's disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) และอาการบาดเจ็บที่กระดูกสันหลัง เป็นต้น โดยคาดว่าเซลล์ต้นกำเนิดจะเข้าไปทดแทนเซลล์ หรืออวัยวะที่เสียไปได้

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองมีรายงานว่า เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดทำให้เกิดมี engraftment และฟื้นฟูการทำงานของเซลล์ตับในหนูที่มีภาวะตับวาย²⁰ และการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเข้าในหนูที่ทำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด พบว่าเซลล์เหล่านี้สามารถให้กำเนิดเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจใหม่ ซึ่งช่วยให้กล้ามเนื้อหัวใจทำงานได้ดีขึ้น^{21,22}

จากข้อมูลพื้นฐานในสัตว์ทดลอง ได้นำไปสู่การศึกษาทางคลินิก โดยมีรายงานจากหลายแห่งที่ได้ทดลองรักษาในผู้ป่วย โดยได้นำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้รักษาโรคต่างๆ

อาทิเช่น การใช้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจากไขกระดูกในการรักษาผู้ป่วยโรคหัวใจ เซลล์เหล่านี้จะถูกฉีดเข้าสู่หัวใจของผู้ป่วยในบริเวณที่มีการอุดตันของหลอดเลือดหัวใจ เพื่อสร้างหลอดเลือดใหม่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ หรือฉีดเข้าไปที่บริเวณกล้ามเนื้อหัวใจตาย ก็จะพบว่าเซลล์บางส่วนยังสามารถแปรสภาพเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้อีกด้วย^{23,24} นอกจากนี้ในกรณีผู้ป่วยที่เกิดภาวะเนื้อเยื่อภายในกระดูกตายเนื่องจากขาดเลือดไปหล่อเลี้ยง (avascular necrosis หรือ osteonecrosis) ได้มีการทดลองฉีดเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเข้าไปยังบริเวณที่เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อกระดูกร่วมกับการทำ core decompression ซึ่งจะให้ผลดีกับผู้ป่วยที่มีอาการในระยะเริ่มแรก พบว่าผู้ป่วยมีอาการเจ็บปวด และอาการที่ข้อต่อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งยังระงับการดำเนินของโรคเข้าสู่ระยะสุดท้ายช้าลงด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ทำ core decompression เพียงอย่างเดียว^{25,26} อย่างไรก็ตาม เมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานว่า ในบางโรค หรือบางความผิดปกติ ถึงแม้จะมีการศึกษาเป็นอย่างดีแล้วในสัตว์ทดลองว่า การใช้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดสามารถบรรเทาอาการของโรคลงได้ แต่ทว่าเมื่อนำมาใช้ในทางคลินิก พบว่ารายงานการศึกษาในผู้ป่วยไม่สนับสนุนผลการรักษาในสัตว์ทดลอง²⁷

ในปัจจุบันมีผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยเซลล์ต้นกำเนิดมากขึ้นเรื่อยๆ เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกเป็นแหล่งหนึ่งที่มีการศึกษากันมาก โดยเฉพาะเซลล์ที่ได้มาจากไขกระดูกของผู้ป่วยเอง (autologous bone marrow stem cell) เนื่องจากมีข้อดีคือ ไม่ต้องรอคอยผู้บริจาค เช่น กรณีผู้ป่วยที่มีภาวะหัวใจล้มเหลวที่ต้องได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนหัวใจ การใช้เซลล์ต้นกำเนิดอาจจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษา นอกจากนี้ยังไม่มีปัญหาเรื่องภูมิคุ้มกันต่อต้าน (immunogenic rejection) เนื่องจากเป็นเซลล์ของตัวเอง และไม่มีปัญหาข้อโต้แย้งเรื่องจริยธรรมเหมือนกับการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมนุษย์

อย่างไรก็ตาม สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง คือ วิธีการเก็บ (harvest) และขั้นตอนการแยก (isolation) เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก ต้องมีคุณภาพ ปลอดภัย และไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ต้นกำเนิด เพื่อให้ได้เซลล์ที่ยังคงประสิทธิภาพ เมื่อนำกลับเข้าไปให้ผู้ป่วยอีกครั้ง

การเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด

โดยทั่วไปการนำเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดไปใช้รักษาโรคในระบบอื่น มักไม่ต้องการเซลล์จำนวนมากเท่ากับการปลูกถ่ายไขกระดูก เนื่องจากมักจะถูกใช้เป็นเซลล์เสริมเพิ่มจากการรักษาด้วยวิธีปกติของโรคนั้นๆ การเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดสามารถเก็บได้ในห้องผ่าตัด โดยใช้วิธีวางยาสลบ หรือให้ยาชาเฉพาะที่ในบริเวณช่วงล่างของร่างกาย สำหรับการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดสามารถทำได้โดยวิธีฉีดยากระตุ้นไขกระดูก เช่น granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) เข้าผิวหนัง เพื่อกระตุ้นให้มีการเคลื่อนย้ายเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกสู่เลือด (mobilized stem cells) และทำการเก็บด้วยเครื่อง leukapheresis

จากประสบการณ์ของโรงพยาบาลศิริราชในการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้มาจากไขกระดูกของผู้ป่วยเอง (autologous bone marrow stem cell) จำนวน 10 ราย ในรอบ 2 ปีที่ผ่านมา เพื่อใช้รักษาโรคที่ไม่ใช่โรคระบบโลหิตนั้น คณะผู้เขียนได้ใช้วิธีเก็บเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจากไขกระดูก โดยทำการดูดไขกระดูกจากบริเวณด้านหลังของสะโพกจำนวน 100 มล. ซึ่งขั้นตอนการเก็บนี้จะใช้เวลาไม่เกิน 20 นาที ไขกระดูกที่ได้จะนำไปใส่ในสารเลี้ยงเซลล์ (cell culture medium) ที่มีสารกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำไขกระดูกที่เจาะได้มาดำเนินการต่อในห้องปฏิบัติการทันที

การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจากไขกระดูก^{24-26, 28, 29}

จากการทบทวนวารสารดังแสดงในตารางที่ 1 มีรายงานจากหลายแห่งที่ได้รายงานการเตรียมเซลล์ต้น

ตารางที่ 1 รายงานการศึกษการใช้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจากไขกระดูกในทางคลินิก

ผู้วิจัย / ประเทศ	จำนวน ไขกระดูก (มล.)	วิธีที่ใช้แยก เซลล์โมโน นิวเคลียร์	จำนวนเซลล์ โมโนนิวเคลียร์	จำนวนเซลล์ ต้นกำเนิด (CD34+cells)	โรคที่รักษา
Perin et al. ²⁴ / บราซิล	50	Ficoll-Hypaque	$2.6 \pm 0.6 \times 10^7$	$6.3 \pm 0.8 \times 10^5$	Ischemic heart failure
Hemigou et al. ²⁵ / ฝรั่งเศส	147 ± 12	Cell separator	$2.4 \pm 0.1 \times 10^9$	ไม่ระบุ	Osteonecrosis
Gangji et al. ²⁶ / เบลเยียม	400	Cell separator	$2.0 \pm 0.3 \times 10^9$	$2.0 \pm 0.1 \times 10^7$	Osteonecrosis
Akar et al. ²⁸ / ตุรกี	519 ± 45.5	Cell separator	$1.2 \pm 0.4 \times 10^9$	$4.8 \pm 4 \times 10^7$	Buerger 's disease
Higashi et al. ²⁹ / ญี่ปุ่น	500	Cell separator	$1.6 \pm 0.3 \times 10^9$	$3.8 \pm 1.6 \times 10^7$	Peripheral arterial disease

กำเนิดเม็ดเลือดจากไขกระดูก โดยนำไขกระดูกที่เจาะได้มาแยกเซลล์โมโนนิวเคลียร์ (mononuclear cells) ออกมา วิธีที่ใช้แยกมีด้วยกัน 2 วิธี คือ วิธีแรกใช้การปั่นผ่าน density gradient ที่ประกอบด้วยสาร Ficoll-Hypaque (Ficoll density separation) และวิธีที่สองจะแยกเซลล์โมโนนิวเคลียร์โดยการใช้เครื่องปั่นแยกเม็ดเลือด (blood cell separator) เช่น Fenwal CS-3000 Plus และ COBE Spectra เพื่อลดปริมาณไขกระดูกโดยการแยกเม็ดเลือดแดง และพลาสมาออกไป คงเหลือแต่ส่วนของชั้นเซลล์โมโนนิวเคลียร์ เพื่อนำกลับไปให้ผู้ป่วย ซึ่งวิธีนี้เซลล์ต้นกำเนิดอาจจะถูกรบกวนน้อยกว่า เนื่องจากไม่ต้องผ่านขั้นตอนการปั่นล้างเพื่อลดการปนเปื้อนของสาร Ficoll-Hypaque แต่จำนวนไขกระดูกต้องเจาะในปริมาณมากขึ้นประมาณ 150-500 มล. ส่วนการประเมินคุณภาพของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ที่แยกด้วยวิธี Ficoll-Hypaque โดยการตรวจนับเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (cell viability) ด้วย trypan blue exclusion dye พบเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ค่อนข้างดี โดยมีผู้รายงานว่าค่า viability เท่ากับร้อยละ 96.2 ± 4.9 ²⁴ แต่วิธีที่ใช้เครื่องปั่นแยกเม็ดเลือดไม่มีรายงานการศึกษาระบุไว้

Perin และคณะ รายงานการใช้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจากไขกระดูกในผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจขาดเลือดชนิดรุนแรง²⁴ โดยฉีดเซลล์เข้าไปบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจที่ขาดเลือดโดยตรง พบว่าช่วยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือด

ใหม่ (neovascularization) ในบริเวณรอบๆ เนื้อเยื่อหัวใจที่ขาดเลือดได้ ทำให้เพิ่มปริมาณเลือด ที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจให้ดีขึ้น ส่วนคณะของ Hemigou และคณะของ Gangji ได้ศึกษาผู้ป่วยที่มีความเจ็บปวดที่กระดูกโคนขา (femoral head) บริเวณสะโพก เนื่องจากเนื้อเยื่อภายในกระดูกตาย และไม่สามารถสร้างขึ้นมาใหม่ได้ (osteonecrosis) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มียาสำหรับป้องกัน หรือรักษาโรคดังกล่าว รายงานการรักษาผู้ป่วยด้วยการฉีดเซลล์ต้นกำเนิดของตัวผู้ป่วยเองเข้าไปในบริเวณที่มีการตายของเนื้อเยื่อ (necrotic lesion) พบว่าผลการรักษาเบื้องต้นอยู่ในเกณฑ์ที่มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพดีกับผู้ป่วยที่มีอาการในระยะเริ่มแรก แต่ยังคงต้องศึกษาต่อไปในระยะยาว เนื่องจากการศึกษาทำในผู้ป่วยกลุ่มเล็ก (n = 13) และการติดตามผลการรักษาอยู่ในระยะสั้น^{25,26} นอกจากนี้คณะของ Akar และคณะของ Higashi พบว่าในผู้ป่วยที่มีภาวะขาดเลือดไปเลี้ยงที่บริเวณขา (limb ischemia) จากโรค Buerger และ peripheral arterial disease เมื่อฉีดเซลล์ต้นกำเนิดเข้าไปใน ischemic tissue สามารถเพิ่ม endothelial cell function และ angiogenesis เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้สเต็มเซลล์เข้าไปแทน^{28,29} ส่วนจำนวนเซลล์ที่ใช้ในการรักษาจะแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา บางที่อาจขึ้นกับภาวะของโรค หรือความผิดปกติที่เกิดขึ้น

สำหรับประสบการณ์ที่โรงพยาบาลศิริราช โดยคณะผู้เขียนนั้น ใช้วิธีแยกเซลล์โมโนนิวเคลียร์จากไขกระดูกจำนวน 100 มล. ด้วยวิธี Ficoll-Hypaque density gradient cell separation โดยใช้สัดส่วนไขกระดูกต่อ Ficoll-Hypaque เท่ากับ 2 : 1 และปั่น 2,000 รอบ/นาทีนาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เมื่อได้เซลล์โมโนนิวเคลียร์แล้วจะล้าง 2 ครั้ง ด้วย normal saline ที่มี human serum albumin และ heparin เพื่อป้องกันเซลล์จับกันเป็นก้อน จากนั้นเจือจางเซลล์โมโนนิวเคลียร์ด้วย normal saline ที่มี 5% human serum albumin ในปริมาณ 10 มล. พร้อมนำไปให้ผู้ป่วยในห้องผ่าตัด โดยทั่วไปเซลล์เหล่านี้เมื่อแยกออกมาแล้วจะถูกฉีดกลับเข้าไปในผู้ป่วยภายในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง นอกจากนี้เซลล์โมโนนิวเคลียร์จะถูกแบ่งไว้ส่วนหนึ่งเพื่อนับจำนวน ตรวจนับเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (cell viability) และวิเคราะห์จำนวนเซลล์ต้นกำเนิด โดยตรวจหา CD34 บนผิวเซลล์ (CD34+ cells) ด้วย จากที่ได้ทดลองเก็บเซลล์ผู้ป่วย 10 รายที่มีการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดไปใช้รักษาโรคระบบอื่นนั้น ผลการวิเคราะห์พบว่า หลังจากรับขั้นตอนการแยก ได้ค่า recovery ของเซลล์โมโนนิวเคลียร์เท่ากับร้อยละ 72.4±15.7 โดยมีจำนวนเซลล์โมโนนิวเคลียร์ทั้งหมดเฉลี่ย 9.1±4.9x10⁸ เซลล์ โดยมีเซลล์ต้นกำเนิด (CD34⁺ cells) เฉลี่ย 1.3±0.8x10⁷ เซลล์ (1.5±0.5%) และเตรียมให้ปริมาณสุดท้ายเท่ากับ 10 มล. เพื่อใช้ในการฉีด โดยเซลล์เหล่านี้ยังมีชีวิตอยู่ทั้งหมด (100% viable cells)

โดยสรุป วิธีการเก็บ และการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดมีความสำคัญ ต้องมีคุณภาพ ปลอดภัย และทำอันตรายต่อตัวเซลล์น้อยที่สุด โดยเมื่อนำกลับเข้าไปให้ผู้ป่วยแล้วเซลล์ต้นกำเนิดจะคงมีประสิทธิภาพเหมือนเดิมอยู่หรือไม่ คงต้องติดตามผลการรักษาต่อไปในระยะยาว เป็นไปได้ว่า ในอนาคตการรักษาด้วยเซลล์ต้นกำเนิดอาจจะเป็นมาตรฐานการรักษาทางการแพทย์สำหรับโรคอีกหลายๆ ชนิด

เอกสารอ้างอิง

1. Lanza R, Gearhart J, Hogan B. *Handbook of Stem Cells*. Oxford : Elsevier Academic Press, 2004.
2. Pillow RP, Epstein RB, Buckner CD, et al. Treatment of bone-marrow failure by isogeneic marrow infusion. *N Engl J Med* 1966;275:94-7.
3. Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, et al. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1995;85:1655-4.
4. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1996;88:795-802.
5. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(Suppl):11830-35.
6. Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 2002;24:91-8.
7. Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:14720-5.
8. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;144:763-76.
9. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, et al. Myogenic specification of side population cells in skeleton muscle. *J Cell Biol* 2002;159:123-34.
10. Papaioannou V. Stem cells and differentiation. *Differentiation* 2001;68:153-4.
11. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
12. Vacanti MP, Roy A, Cortiella J, et al. Identification and initial characterization of spore-like cells in adult mammals. *J Cell Biochem* 2001;80:455-60.
13. Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257.
14. Korbling M, Katz RL, Khanna A, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral blood stem cells. *N Engl J Med* 2002;346:738-46.

15. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002;346: 5-15.
16. Poulosom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 2001;195:229-35.
17. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, et al. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4397-402.
18. Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther* 2002;9:754-8.
19. Wulf GG, Jackson KA, Goodell MA. Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts. *Exp Hematol* 2001;29:1361-70.
20. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1299-34.
21. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410:701-5.
22. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10344-9. 13
23. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913-8.
24. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Trans-endocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003;107:2294-302.
25. Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop* 2002;405:14-23.
26. Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, et al. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. *J Bone Joint Surg* 2004;79A:1153-60.
27. Haufe SM, Mork AR. Intradiscal injection of hematopoietic stem cells in an attempt to rejuvenate the intervertebral discs. *Stem cells and Dev* 2006;15: 136-7.
28. Akar R, Durdu S, Arat M, et al. Therapeutic angiogenesis by autologous transplantation of bone-marrow mononuclear cells for Buerger 's patients with retractable limb ischaemia: a preliminary report. *Turk J Haematol* 2004;21:13-21.
29. Higashi Y, Kimura M, Hara K, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 2004;109:1215-8.