ผลของสารประกอบแม่เหล็ก IronQ ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เอนโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ในระดับหลอดทดลอง

The effects of a magnetic IronQ complex on endothelial progenitor cells expansion *in vitro*

จิราภรณ์ กันทะพันธ์[1,2] ณฐปกรน์ เดชสุภา[1,2*]

Jiraporn Kantapan[1,2] Nathupakorn Dechsupa[1,2*]

[1]ภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

[1]Department of Radiologic Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai Province, Thailand

[2]ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศด้านการสร้างภาพระดับโมเลกุล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

[2]Center of Excellence for Molecular Imaging (CEMI), Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chaing Mai Province, Thailand

* ผู้รับผิดชอบบทความ (Email: Nathupakorn.d@cmu.ac.th)

* Corresponding author (Email: Nathupakorn.d@cmu.ac.th)

Received October 2015

Accepted as revised December 2015

Abstract

Introduction: *In vitro* proliferation and expansion of endothelial progenitor cells play important roles in the cell-based therapies for patient with acute myocardial infarction or ischemic heart disease.

Objective: To determine the effect of magnetic IronQ complex on the proliferation of endothelial progenitor cells *in vitro.*

Methods: Peripheral blood mononuclear cells from venous blood was isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation method. PBMCs ($1x10^6$ cell/4-mL) were cultured with various concentrations of IronQ at 0, 100, 200, 300, 400 and 500 µg/mL for 17 days. Cell morphology was observed and recorded under inverted microscope. Specific marker for endothelial progenitor cells was characterized by immunostaining with CD34-FITC and analyzed by flow cytometer.

Results: Under inverted microscope, after 7 days of incubation, PBMCs showed stem cell-typical morphology surrounded by spindle-shaped cells. Interestingly, in the presence of IronQ, those colony-forming cells were increased in dose and time dependent manner. It was observed that only the cell incubated with IronQ was promoted spindle-shaped cells to form tube-like structure similar to the process of vasculogenesis. Cell incubated with IronQ for 10 days was positive with CD34 in dose dependent manner. Cells in the presence of IronQ at 500 µg/mL was strongly positive compared to others concentrations with the value of 47.66±2.52%. This indicated the increasing of endothelial progenitor cell proliferation.

Conclusion: This is the first study demonstrated the using of IronQ to promote endothelial progenitor cell proliferation *in vitro* without addition of any growth factors or specific growth activator leading to the cost reduction and also able to increase efficiency for cell-based therapy.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2016; 49(1): 106-113. Doi: 10.14456/jams.2016.3

Keywords: IronQ, PBMCs, EPCs, cell therapy, *in vitro* cell expansion

บทคัดย่อ

บทนำ: การเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ในหลอดทดลองเป็นกระบวนการที่สำคัญอย่างยิ่งในการรักษาด้วยวิธีเซลล์บำบัดให้เกิดประสิทธิผลในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะหัวใจขาดเลือดหรือเส้นเลือดหัวใจตีบ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาผลของสารประกอบแม่เหล็ก IronQ ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ในหลอดทดลอง

วัสดุและวิธีการ: เตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยวด้วยวิธี Ficoll-Hypaque ปรับเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น $1x10^6$ cell/4 mL จากนั้นเพาะเลี้ยงร่วมกับสาร IronQ ที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 µg/mL ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 17 วัน ตรวจสอบและบันทึกสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ และยืนยันคุณลักษณะจำเพาะของเซลล์โดยย้อมด้วย CD34-FITC วิเคราะห์ด้วยวิธีโฟล ไซโตเมทรี

ผลการทดลอง: สังเกตพบลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดคือโคโลนีของเซลล์แวดล้อมด้วยเซลล์รูปกระสวยตั้งแต่วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และมีจำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร IronQ และตามเวลาของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ ยังพบการจัดเรียงตัวของเซลล์รูปกระสวยเป็นแนวเส้นคล้ายการสร้างท่อตรงตามคุณลักษณะจำเพาะของการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยพบในกลุ่มที่มีการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ IronQ เท่านั้น เซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 10 วัน ให้ผลบวกต่อ CD34 เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของ IronQ ที่ใช้ โดยความเข้มข้น 500 µg/mL ให้ผลบวกต่อ CD34 เพิ่มขึ้นแตกต่างจากความเข้มข้นอื่นอย่างชัดเจนโดยให้ค่าสูงถึง 47.66±2.52% ซึ่งสะท้อนถึงปริมาณของเอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ที่เพิ่มขึ้น

สรุปผลการทดลอง: การศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่ค้นพบและแสดงให้เห็นว่า IronQ สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ในหลอดทดลองโดยไม่มีการเติมสารเร่งการเจริญเติบโตหรือสร้างสภาวะที่จำเพาะแต่อย่างใด ทำให้ประหยัดต้นทุนและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาด้วยวิธีเซลล์บำบัดได้ดียิ่งขึ้น

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2559; 49(1): 106-113. Doi: 10.14456/jams.2016.3

คำหัส: IronQ, PBMCs, EPCs, cell therapy, *in vitro* cell expansion

บทนำ

หลักฐานการค้นพบของ Asahara และคณะ ระบุว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ผนังหลอดเลือด (endothelial cells) ได้นั้น เรียกว่า “เซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์หรือ endothelial progenitor cells (EPCs)” เซลล์เหล่านี้อยู่ในกระแสเลือด มีบทบาทในการรักษาสมดุลและซ่อมแซมการบาดเจ็บของหลอดเลือดในร่างกายมนุษย์[1] มีรายงานการศึกษาบ่งชี้ว่าโปรเจนิเตอร์ของเซลล์ผนังหลอดเลือดทำให้การทำงานของอวัยวะที่เกิดการตายชั่วคราวดีขึ้นโดยกระตุ้นและเหนี่ยวนำให้มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ เรียกกระบวนการนี้ว่า “vasculogenesis” ซึ่งแตกต่างจากการเกิด angiogenesis โดยเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์สามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่เกิดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจและเปลี่ยนแปลงตัวเองเพื่อทำหน้าที่เป็นเซลล์เอ็นโดธีเลียลและเกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ในบริเวณเนื้อเยื่อที่เสียหาย[2,3] การรักษาโดยใช้เซลล์บำบัดในกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจขาดเลือดหรือหลอดเลือดหัวใจตีบใช้ “เซลล์เอนโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์” ที่ได้จากร่างกายของผู้ป่วยในการเสริมสร้างการก่อตัวของหลอดเลือดใหม่ในบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการอุดตันของหลอดเลือดและบรรเทาอาการของโรคที่เกิดขึ้น ได้แก่ การเจ็บหน้าอกอย่างรุนแรง โดยเฉพาะในรายที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาที่มีอยู่ในปัจจุบัน ขั้นตอนการรักษาเริ่มจากนำเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ซึ่งแยกได้จากเลือดของผู้ป่วยเองมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง จากนั้นนำกลับไปปลูกถ่ายโดยการฉีดเข้าสู่หัวใจของผู้ป่วยในบริเวณที่มีการอุดตันของหลอดเลือดหัวใจ เพื่อการสร้างหลอดเลือดใหม่

และขนส่งสารอาหารและออกซิเจนไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ นอกจากนี้ เซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์บางส่วนยังสามารถแปรสภาพไปเป็นกล้ามเนื้อเรียบและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจซึ่งช่วยส่งเสริมการสร้างกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อหลอดเลือดที่สูญเสียไปขึ้นมาใหม่อีกครั้ง[4,5] อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่าจำนวนเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ในกระแสเลือดมีจำนวนลดลงเมื่ออายุมากขึ้น โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด (ความดันสูง/หัวใจล้มเหลว/ภาวะไขมันในเลือดสูง/ภาวะหลอดเลือดแข็งและสูญเสียความยืดหยุ่น) โรคเบาหวาน โรคระบบทางเดินหายใจชนิด chronic obstructive pulmonary disease (COPD) และโรคไขข้อรูมาตอยด์[6,7,8,9] ดังนั้น การประยุกต์ใช้เซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์เพื่อการรักษาผู้ป่วยด้วยวิธีเซลล์บำบัดจึงจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงและขยายจำนวนโปรเจนิเตอร์เซลล์ผนังหลอดเลือดให้มากเพียงพอและเซลล์มีประสิทธิภาพในระดับหลอดทดลอง ก่อนนำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปใช้ในการรักษาผู้ป่วย[10] หรือเพื่อการศึกษาทดลองในลำดับต่อไป[11] มีการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและมีการรายงาน เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีสารเร่งการเจริญเติบโต (growth factors) หลากหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ หรือ การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่จำเพาะกับการเจริญเติบโตของเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์[12,13] อย่างไรก็ตาม กระบวนการดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายสูง จึงมีความพยายามค้นหาสารที่มีคุณสมบัติเหมาะสมและราคาต่ำในการเพาะเลี้ยงเซลล์ขึ้นใช้แทนสารเร่งการเจริญเติบโต เพื่อใช้ประโยชน์ในการเตรียมเซลล์สำหรับใช้ในการรักษาด้วยวิธีเซลล์บำบัด IronQ เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นภายใต้ศูนย์วิจัยเพื่อความเป็นเลิศด้านการสร้างภาพระดับโมเลกุล (CEMI) ภาควิชารังสีเทคนิค มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีพื้นฐานจากโมเลกุลของเคอร์ซิตินร่วมกับไอออนของโลหะเหล็ก มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเป็นสารเทอราโนสติก (theranostic agents) ที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารเปรียบต่างสำหรับเอ็มอาร์ไอ (MRI-contrast agent) IronQ มีค่า T1 relaxivity (*r1*) เท่ากับ 0.25 และ 0.095 $mM^{-1}.s^{-1}$ ในตัวกลางที่เป็นน้ำและในเจลแฟนทอมตามลำดับ[14] และมีคุณสมบัติสำหรับการรักษาโรคในขณะเดียวกัน

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของ IronQ ในหลอดทดลอง ต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพของเอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์เซลล์ที่ได้จากการแยกโมโนนิวเคลียร์เซลล์จากเซลล์เม็ดเลือดในหลอดเลือดดำ

วิธีการศึกษา

1. การแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs)

ตัวอย่างเลือดที่เหลือใช้จากการบริจาคโลหิตปริมาตร 100 mL เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA นำมาใส่หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงโดยบรรจุหลอดละ 15 mL ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS, pH 7.4) ปริมาตร 15 mL ผสมให้เข้ากันดีแล้วเติมสาร Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™) ปริมาตร 15 mL ลงที่ก้นหลอดอย่างเบามือ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs) ปั่นล้างด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นแตกเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ปนเปื้อนด้วย RBC lysing solution และปั่นล้างด้วย PBS อีกครั้ง เก็บตะกอนเซลล์และนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ซึ่งมี 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin-streptomycin บ่มเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5%CO_2 และความชื้นสัมพัทธ์ 95% งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตามเอกสารเลขที่ AMSEC-58EM-005

2. การทดสอบประสิทธิภาพของ IronQ ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์โปรเจนิเตอร์ผนังหลอดเลือด (EPCs) และการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์

เตรียม PBMCs ความเข้มข้น $2.5x10^5$ cells/mL ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10%FCS RPMI 1640 (ซึ่งมี 1% penicillin-streptomycin) ปริมาตร 4 mL ใน 6-well plate เติมสารละลาย IronQ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 µg/mL ตามลำดับ จากนั้นเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO_2 และความชื้นสัมพัทธ์ 95% ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) และบันทึกภาพเซลล์ในทุกความเข้มข้นของ IronQ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆ

3. การจำแนกวิเคราะห์จำนวนเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ด้วยเทคนิคโฟล ไซโตเมทรี

เป็นการตรวจหา CD34 ซึ่งเป็นโมเลกุลเฉพาะของเอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์เซลล์ ด้วยการทำปฏิกิริยากับ FITC conjugated anti-CD34 โดยเตรียมเซลล์ความเข้มข้น $1×10^6$ cells/mL ปั่นล้างด้วย PBS (pH 7.4) ปริมาตร 1 mL ด้วยความเร็ว 7,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 ครั้ง ดูดบัฟเฟอร์ทิ้ง เติม PBS (pH 7.4) ปริมาตร 100 µL ตามด้วย FITC conjugated anti-CD34 (BD Biosciences) ปริมาตร 20 µL ผสมให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ บ่มที่อุณหภูมิ

ห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ครบเวลาเติม PBS (pH 7.4) ปริมาตร 400 µL ผสมให้เข้ากันอย่างเบามือและวิเคราะห์เซลล์ที่ทำปฏิกิริยากับ FITC conjugated anti-CD34 ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (Coulter Epics MCL-XL®)

ผลการศึกษา

1. คุณลักษณะจำเพาะของเซลล์ EPCs

PBMCs ที่แยกจากกระแสเลือดและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10%FCS RPMI 1640 เป็นเวลา 7 วัน โดยไม่มีการแยกเซลล์ที่ลอยออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ พบว่าเกิดกลุ่มโคโลนี (colony) ของเซลล์แสดงดังในรูปที่ 1 โดยมีเซลล์รูปกระสวย (spindle shaped) อยู่ล้อมรอบโคโลนี ซึ่งจัดเป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ (EPCs) ตามที่เคยมีรายงานมาก่อน[1] การศึกษาโปรตีน CD34 บนผิวเซลล์ พบว่า PBMCs ที่แยกได้มีเซลล์ EPCs ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมด้วย anti-CD34 คิดเป็น 1.4% ของ PBMCs ทั้งหมด

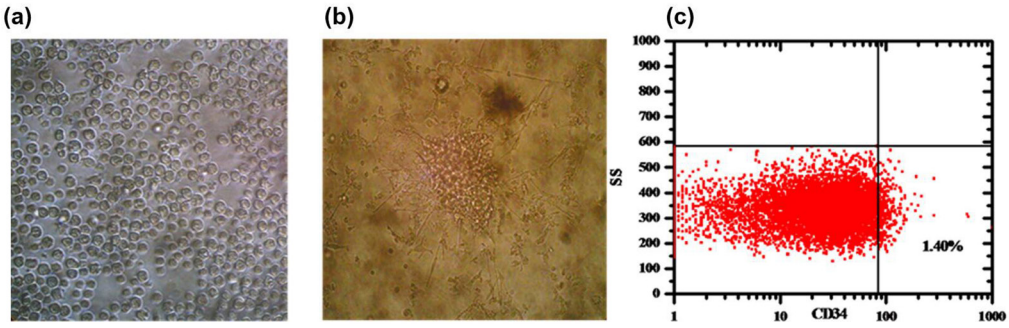

Figure 1: Characterization of human endothelial progenitor cells (EPCs). *Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were plated on culture flask after isolating from human peripheral blood (original magnification ×40) (a). After cultivation for 7 days, cells exhibited colony of spindle-shaped, endothelial cell-like morphology (original magnification ×40) (b). Flow cytometry analysis of CD34 on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after 10-day cultivation (c).*

2. ผลของ IronQ ต่อลักษณะสัณฐานและการเพิ่มจำนวนของ EPCs

จากการสังเกตการเจริญของเซลล์ PBMCs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าจำนวนโคโลนีที่แสดงถึงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด (PBSCs) และเซลล์ EPCs ที่อยู่ล้อมรอบโคโลนีมีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเลี้ยงเซลล์ PBMCs ร่วมกับ IronQ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม IronQ ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยสังเกตพบความแตกต่างของจำนวนโคโลนีได้ตั้งแต่วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทั้งนี้จำนวนโคโลนีและเซลล์รูปกระสวยมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเลี้ยงเซลล์ PBMCs ในหลอดทดลอง และเมื่อนับจำนวนเซลล์พบว่า เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ IronQ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ IronQ (dose dependent) และยังพบว่าเซลล์ PBMCs เมื่อได้รับ IronQ มีการเจริญเติบโตรวดเร็วกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย IronQ และอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ IronQ

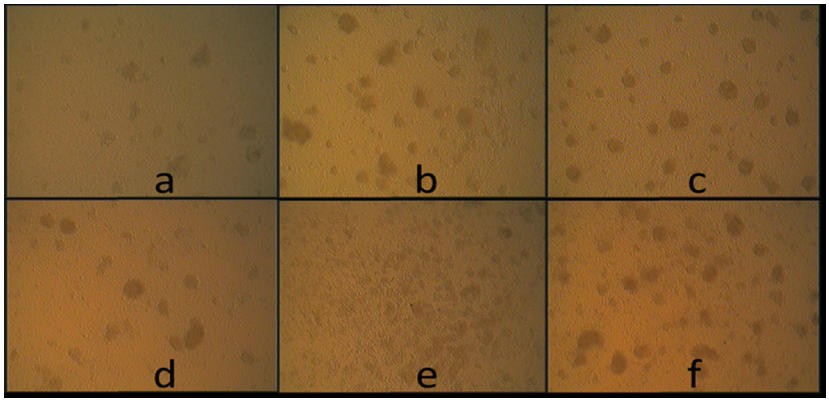

Figure 2 Effect of IronQ on proliferation. *Increasing of cell colonies of PBMCs cell cultured (at day 17) in the presence of IronQ: (a) 0; (b) 100; (c) 200; (d) 300; (e) 400; and (f) 500 µg/ml. (magnification x50)*

3. ผลของ IronQ ต่อจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกกับ anti-CD34

หลังจากการกระตุ้นเซลล์ PBMCs ด้วย IronQ เป็นเวลา 10 วัน เพื่อให้มั่นใจว่าจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นคือกลุ่มเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ คณะผู้วิจัยศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) ของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน CD34 ด้วยเทคนิค flow cytometry ทั้งนี้ CD34 ถูกนำมาใช้เพื่อยืนยันลักษณะจำเพาะของเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ การศึกษาก่อนหน้าพบว่ากลุ่มประชากรของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน CD34 ที่แยกได้จากเลือดและไขกระดูกมีความสามารถในการพัฒนาตัวเองไปเป็นเซลล์เอ็นโดธีเลียล[1,2,5] การศึกษาผลของ IronQ ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์โดยวิเคราะห์เซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ anti-CD34 พบว่าจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกมีจำนวนเพิ่มขึ้นแปรผันตามระดับความเข้มข้นของ IronQ เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3 ที่ความเข้มข้นของ IronQ ต่ำกว่า 500 µg/mL จำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ CD34 ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ IronQ ที่สูงขึ้น (13.23±2.04%) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อถึงความเข้มข้นสูงสุดของ IronQ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 500 µg/mL พบเซลล์ให้ผลบวกกับ anti-CD34 เพิ่มขึ้นแตกต่างจากความเข้มข้นก่อนหน้าอย่างชัดเจนโดยให้ค่าผลบวกกับ anti-CD34 สูงที่สุดถึง 47.66±2.52%

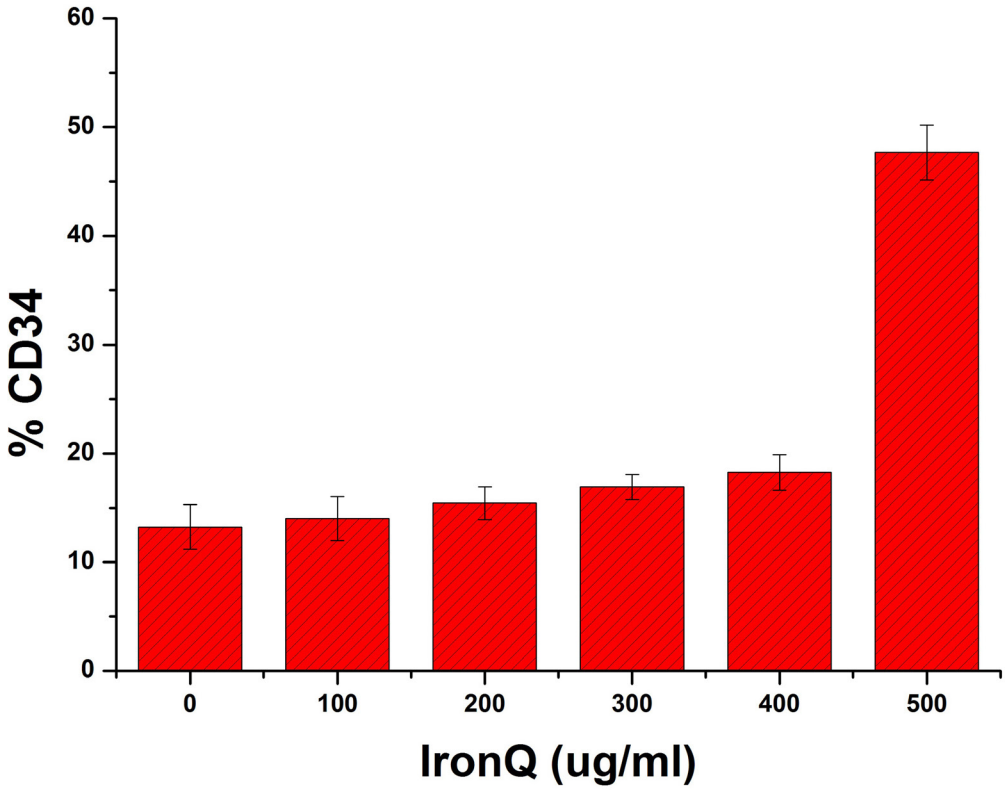

Figure 3 Effect of IronQ on the expression of surface CD34. *Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were cultured and treated with IronQ for 10 days. Flow cytometry analysis of surface CD34 was performed. IronQ increased number of CD34+ cells. Data are expressed as the mean±SEM (n=3).*

4. การสร้างท่อของเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์

ความสามารถในการสร้างท่อ (tube formation) ซึ่งเป็นระยะต้นของกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ถือเป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์เอนโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์อีกอย่างหนึ่งที่พบได้ในระดับห้องทดลอง จากการสังเกตสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 17 วัน พบว่า เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย IronQ สามารถตรวจพบลักษณะการสร้างท่อให้เห็นในทุกความเข้มข้นของ IronQ แต่ไม่พบในชุดควบคุม ลักษณะท่อที่พบเกิดจากการเรียงตัวต่อกันของเซลล์เป็นแนวเส้นดังแสดงในรูปที่ 4 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Risau และคณะ ที่พบการสร้างท่อในระยะเริ่มต้นของกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง[15]

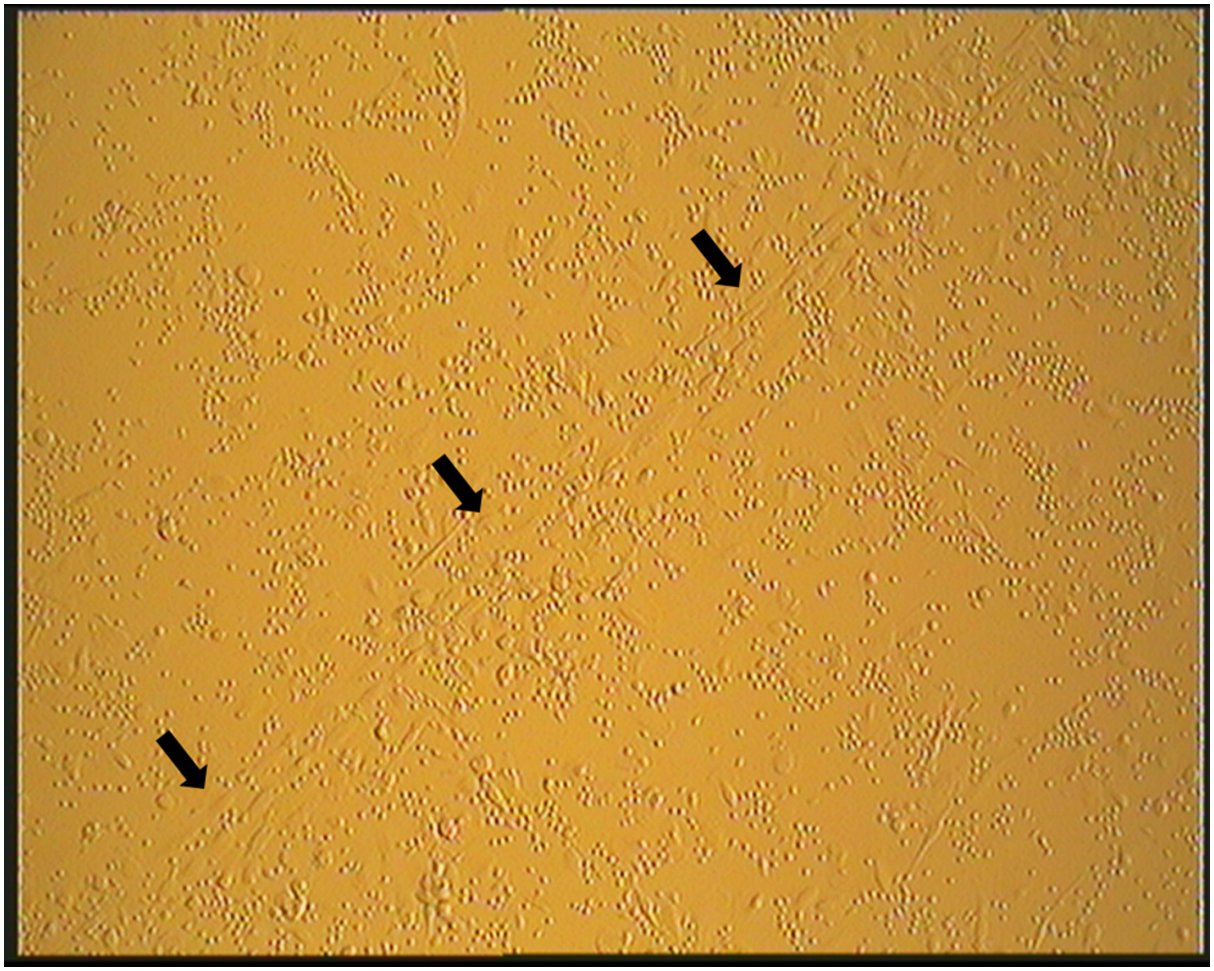

Figure 4 Tube-like structures. *Peripheral blood mononuclear cell culture with IronQ for 17 days showed line formation that similar to vasculogenesis. (unstained; original magnification x100).*

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะหัวใจขาดเลือดหรือเส้นเลือดหัวใจตีบโดยการใช้เซลล์บำบัดคือการใช้เซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์จากเลือดของผู้ป่วยเอง การรักษาจึงมีความปลอดภัยมากขึ้นเนื่องจากไม่เกิดการต่อต้านเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้รับและไม่ผิดหลักจริยธรรม อย่างไรก็ตาม การรักษาด้วยวิธีนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากจำนวนเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ที่แยกได้จากกระแสเลือดมีจำนวนน้อย โดยพบอยู่ระหว่าง 0.0001% ถึง 0.01% ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่แยกจากกระแสเลือดของคนปกติ[16] นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ในกระแสเลือดยังลดลงแปรผกผันอายุที่มากขึ้น รวมถึงพยาธิสภาพบางอย่าง เช่น โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด (ความดันสูง/หัวใจล้มเหลว) และเบาหวาน การเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ก่อนนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยจึงเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญอย่างยิ่ง การศึกษานี้นับเป็นรายงานแรกที่พบว่าสารประกอบแม่เหล็ก IronQ (สารสังเคราะห์จากณ ศูนย์วิจัย เพื่อความเป็นเลิศด้านการสร้างภาพระดับโมเลกุล มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ PBMCs (data not published) แต่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ โดยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ตามความเข้มข้นที่ใช้ (dose dependent) คณะผู้วิจัยยังวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่ให้ผลบวกเมื่อย้อมด้วย FITC-conjugated anti-CD34 เมื่อเลี้ยงเซลล์ไปแล้วเป็นเวลา 10 วัน เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า ณ วันที่ 10 จำนวนเซลล์ที่เป็นเซลล์ต้นกำเนิดหรือเซลล์โปรเจนิเตอร์เพิ่มจำนวนมากขึ้นในขณะที่เซลล์แก่มีจำนวนลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า IronQ สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างท่อของเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์และไม่พบกระบวนการนี้ในกลุ่มควบคุม

กลไกของ IronQ ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาพบว่า ในสภาวะที่มีน้ำตาลสูง (high glucose) เซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์มีจำนวนลดลง แต่เมื่อมีการให้ Quercetin พบว่าจำนวนเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์กลับเพิ่มจำนวนและเข้าสู่ภาวะปกติ Quercetin มีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ที่สัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน Sirt1 ซึ่งกระตุ้น

การทำงานของเอ็นไซม์ eNOS ส่งผลให้ระดับของไนตริกออกไซด์ (NO) เพิ่มขึ้น ไนตริกออกไซด์มีความสำคัญต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์เอ็นธีเลียลโปรเจนิเตอร์[17] นอกจากนี้ยังมีรายงานการว่า $CD34^+$ cells มีความไวต่อการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทสิส (apoptosis)[18] Quercetin ซึ่งเป็นสารโพลีฟีนอลชนิดหนึ่งที่อาจช่วยป้องกันการเกิดอะพอพโทสิสในเซลล์โปรเจนิเตอร์[19] นอกจาก Quercetin ส่วนประกอบหลักอีกชนิดหนึ่งของ IronQ คือเหล็กไอออนซึ่งมีรายงานการบ่งชี้ว่าช่วยกระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโต[20] นอกจากมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์แล้ว IronQ ยังมีคุณสมบัติเชิงแม่เหล็กซึ่งทำให้สามารถติดตามได้ด้วยเทคนิคการสร้างภาพเอ็มอาร์ไอ[14] สาร IronQ จึงมีคุณสมบัติที่พิเศษสองอย่างในเวลาเดียวกัน (dual function) ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการติดตามการเคลื่อนที่และการกระจายตัวของเซลล์ที่ฉีดเข้าไปในตัวผู้ป่วยว่าอยู่ในตำแหน่งที่ต้องการหรือไม่ ตลอดจนมีการเจริญเติบโตอย่างไร

กล่าวได้ว่า IronQ มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็นโดธีเลียลโปรเจนิเตอร์ได้สูงเกือบ 50% เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ PBMCs ในหลอดทดลองเป็น 10 วัน โดยไม่มีการเติมสารเร่งการเจริญเติบโตหรือปรับสภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างจำเพาะอื่นเพิ่มเติม IronQ มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำและสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ EPCs ได้สูง อีกทั้งยังสามารถติดตามได้ด้วยเทคนิคการสร้างภาพเอ็มอาร์ไอ จึงเป็นสารที่มีศักยภาพสูงในการนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคด้วยวิธีเซลล์บำบัด โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจขาดเลือดหรือหลอดเลือดหัวใจตีบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณส่วนงานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ สำหรับตัวอย่างเลือด และขอบคุณภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Takayuki A, Toyoaki M, Alison S, Marcy S, Rien van der Zee, Tong L, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275: 964-7.
2. Takayuki A, Haruchika M, Tomono T, Christoph K, Christopher P, Marcy S, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ Res 1999; 85: 221-8.
3. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, et al. Intracoronary injection of CD133-positive enrich bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. Circulation 2005; 112: 1178-83.
4. Ben-Shoshan J, George J. Endothelial progenitor cells as therapeutic vectors in cardiovascular disorders: From experimental models to human trials. Pharmacol Ther 2007; 115: 25-36.
5. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Korbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood $CD34^+$- enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. Circulation 2003; 108: 2070-3.
6. Rouhl RP, van Oostenbrugge RJ, Damoiseaux J, Cohen JW, Lodder J. Endothelial progenitor cell research in stroke: a potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts. Stroke 2008; 39: 2158-2165.
7. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. Circ Res 2001; 89: E1-E7.
8. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. Circulation 2002; 106: 2781-6.
9. Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, et al. Circulating $CD34^+$ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. Eur Heart J 2006; 27: 2247-55.

10. Ferrari N, Glod J, Lee J, Kobiler D, Fine HA. Bone marrow-derived, endothelial progenitor-like cells as angiogenesis-selective gene-targeting vectors. Gene Ther 2003; 10: 647–56.
11. Debatin KM, Wei J, Beltinger C. Endothelial progenitor cells for cancer gene therapy. Gene Ther 2008; 15: 780–6.
12. Carlos BB, Susana N, Macarena LF, Daniel PC, Magda H, Juan S, et al. An affordable method to obtain cultured endothelial cells from peripheral blood. J Cell Mol Med 2013; 17(11): 1475-83.
13. Jianguo W, Tianhang L, Hong Z, Zhengmao L, Jianwei B, Xuchao X, et al. Optimization of culture conditions for endothelial progenitor cells from porcine bone marrow *in vitro*. Cell Prolif 2010; 43: 418-26.
14. Narin Tuntamong. A study of the relaxivity of Iron-based complexes [Term paper]. Faculty of Associated Medical Sciences: Chiang Mai University; 2013 (in Thai).
15. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol 1995; 11: 73-91.
16. Barber CL, Iruela-Arispe ML. The ever-elusive endothelial progenitor cell: identities, functions and clinical implications. Pediatr Res 2006; 59: 26R–32R.
17. Zhao LR, Du YJ, Chen L, Liu ZG, Pan YH, Liu JF, et al. Quercetin protects against high glucose-induced damage in bone marrow-derived endothelial progenitor cells. Int J Mol Med 2014; 34(4):1025-1031.
18. Ito H, Rovira II, Bloom ML, Takeda K, Ferrans VJ, Quyyumi AA, et al. Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin. Cancer Res 1999; 59: 5875-5877.
19. Hamed S, Alshiek J, Aharon A, Brenner B, Roguin A. Red wine consumption improves in vitro migration of endothelial progenitor cells in young, healthy individuals. Am J Clin Nutr 2010; 92: 161-9.
20. Pourcelot E, Lenon M, Mobilia N, Cahn JY, Arnaud J, Fanchon E, et al. Iron for proliferation of cell lines and hematopoietic progenitors: Nailing down the intracellular function iron concentration. Biochim Biophys Acta 2015; 1853: 1596-605.