



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

ชื่อโครงการ : บทบาทเชิงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์บุหลอดเลือดที่หลุดลอย
ในกระแสเลือดกับกลไกการเกิดการอุดตันภายในหลอดเลือด
ของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย
Interactive role of circulating endothelial cells and
pathogenesis of vascular complications in thalassemic
patients.

ผศ. ดร. พรรณี บุตรเทพ และคณะ

30 มิถุนายน 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

ชื่อโครงการ : บทบาทเชิงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์บุหลอดเลือดที่หลุด
ลอยในกระแสเลือดกับกลไกการเกิดการอุดตันภายใน
หลอดเลือดของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย

**Interactive role of circulating endothelial cells
and pathogenesis of vascular complications in
thalassemic patients.**

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|------------------------------|---|
| 1. ผศ. ดร. พรรณี บุตรเทพ | ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี |
| 2. น.ส. สุมาลี จินดาดำรงเวช | ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี |
| 3. น.ส. เรวดี วิเศษพานิชกิจ | ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี |
| 4. ศ. ดร. อานนท์ บุญยะรัตเวช | ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) โครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก ปี 2541 เลขที่ PDF / 21 / 2541 พร้อมกันนี้ก็ขอขอบคุณ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย และมีส่วนทำให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ

บทคัดย่อ

Project Code : PDF / 21 / 2541

Project Title : บทบาทเชิงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์บุหลอดเลือดที่หลุดลอยในกระแสเลือดกับกลไกการเกิดการอุดตันภายในหลอดเลือด ของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

Investigators :

1. ผศ. ดร. พรรณี บุตรเทพ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี
2. น.ส. สุมาลี จินดาดำรงเวช ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี
3. น.ส. เรวดี วิเศษพานิชกิจ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี
4. ค. ดร. อานนท์ บุญยะรัตเวช ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี

E-mail Address : rapbt @ mahidol.ac.th

Project Period : 1 กรกฎาคม 2541 – 30 มิถุนายน 2543

Objective : เพื่อที่จะได้ความรู้ใหม่ว่าเซลล์บุหลอดเลือดในร่างกายผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียนั้นหลุดออกมาในกระแสเลือดจริงหรือไม่ และมีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติอย่างไร ซึ่งจะทำให้ทราบแนวทางการนำไปสู่กลไก ของการเกิดหลอดเลือดอุดตันในผู้ป่วย และการรักษาต่อไป

Methodology : ทำการศึกษาหาปริมาณและตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆของ circulating endothelial cells ใน peripheral blood ของคนไข้ thalassemia โดยเปรียบเทียบกับคนปกติ โดยการตรวจสอบ viability, numbers และ markers ของเซลล์ และตรวจสอบการมี activation ของ endothelial cells และทดลองนำเซลล์ที่แยกได้มาทำการ culture ในภาวะที่เหมาะสม สรุปผลการทดลองทั้งหมดและวิเคราะห์ข้อมูล

Results : จากการศึกษาเซลล์บุหลอดเลือดที่หลุดลอยอยู่ในกระแสเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และคนปกติ พบว่ามีเซลล์บุหลอดเลือดหลุดลอยออกมาในกระแสเลือดของผู้ป่วยดังกล่าวมากกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ก็พบว่าเซลล์ที่แยกได้ดังกล่าวนี้ จะแสดงภาวะของความผิดปกติต่าง ๆ โดยพบว่าการ express endothelial cells adhesion molecules หลายชนิดที่จัดว่าเป็น marker ของ endothelial cells activation และ injury

Discussion Conclusion : การศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าในร่างกายของผู้ป่วยธาลัสซีเมียนั้น มีภาวะความผิดปกติภายในหลอดเลือดจริง และการที่พบว่าการหลุดลอยของเซลล์บุหลอดเลือดออกมาในกระแสเลือดมากกว่าคนปกติ และเซลล์ดังกล่าวยังแสดงภาวะของการมี injury ซึ่งจะสนับสนุนผลงานเรื่อง การเพิ่มขึ้นของระดับ thrombomodulin ในผู้ป่วยเหล่านี้

Suggestions / Further Implication / Implementation : ผลจากการศึกษาครั้งนี้ ทำให้สามารถสรุปได้ว่าในหลอดเลือดของผู้ป่วย โรคธาลัสซีเมียนั้นมีความผิดปกติที่อาจนำไปสู่การเกิด thrombosis ได้ การหาแนวทางป้องกันจึงมีความสำคัญมากสำหรับผู้ป่วยเหล่านี้

Keywords : Circulating endothelial cell, thalassemia, vascular injury

Abstract

Project Code : PDF / 21 / 2541

Project Title : Interactive role of circulating endothelial cells and pathogenesis of vascular complications in thalassemic patients.

Investigators :

1. Asst. Prof. Dr. Punnee Butthep
2. Ms. Sumalee Jindadumrongwech
3. Ms. Raewadee Wisedpanichkij
3. Prof. Dr. Ahnond Bunyaratvej

Dept.of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University

E-mail Address : rapbt @ mahidol.ac.th

Project Period : 1 July 1998 – 30 June 2000

Objective : To determine whether the endothelial cells in thalassemic patients can detach from the vascular wall and studied for the number, origin, and surface markers for endothelial cells activation and injury.

Methodology : We examined the numbers of circulating endothelial cells in the peripheral blood of normal and thalassemia patients and evaluated the viability and markers of endothelial cell including the markers for activation and injury of endothelial cells. The cultured method was also studied in those isolated cells using medium-199.

Results : The numbers of circulating endothelial cells in thalassemic patients both alpha and beta thalassemia are significantly higher than normal subjects. These isolated cells also expressed the markers of endothelial cells activation including ICAM-1;CD54, VCAM-1;CD106 and E-selectin; CD62E.

Discussion Conclusion : This studies suggest that the vascular endothelium is activated in patients with thalassemia both alpha and beta types especially in the disease forms. The adhesion proteins on activated endothelial cells may have a role in the vascular pathology of thalassemic patients which related to the increased level of thrombomodulin in the patients as reported in our previous studied.

Suggestions / Further Implication / Implementation : The results from this studied may suggested to the defect of vascular in the thalassemic patients which leading to the vascular thrombosis in the small capillaries. The prevention and control of these phenomenons will be useful in the future.

Keywords : Circulating endothelial cell, thalassemia, vascular injury

สารบัญเรื่อง

(Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	8
Executive summary	9
บทนำ	12
วิธีการทดลอง	14
ผลการทดลอง	18
บทวิจารณ์	25
หนังสืออ้างอิง	27
Output / ภาคผนวก	29

สารบัญตาราง
(List of Tables)

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงจำนวน เพศและอายุของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย	18
ตารางที่ 2 ปริมาณของ circulating endothelial cells ในคนไข้ thalassemia ชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับคนปกติ	20
ตารางที่ 3. แสดงค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ป่วย thalassemia ชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับคนปกติ (mean + SD) จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง Technicon H*3 Hematology Analyzer	23

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

	หน้า
รูปที่ 1. Circulating endothelial cells ที่ย้อมด้วย Sheep anti human von Willebrand factor : FITC	19
รูปที่ 2. Circulating endothelial cells staining with Mouse anti human CD54 : RPE (A) and with Mouse anti human CD 106 : RPE (B)	21
รูปที่ 3. Circulating endothelial cells staining with Mouse anti human CD 62E : FITC (A) and with Mouse anti human CD 31 : FITC (B)	21
รูปที่ 4. Circulating endothelial cells staining with Mouse anti human CD 36 : FITC	22
รูปที่ 5. Circulating endothelial cells staining with Annexin V- FITC และ propidium iodide	22

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ
(List of Abbreviations)

M – 199	-----	Medium 199
mg	-----	milligram
μg	-----	microgram
ng	-----	nanogram
pg	-----	picogram
ml	-----	milliliter
μl	-----	microliter
β-thal /HbE	-----	Beta thalassemia/ Hemoglobin E
β-thal /HbE(NS)	-----	Beta thalassemia/ Hemoglobin E (non-splenectomized)
β-thal /HbE(S)	-----	Beta thalassemia/ Hemoglobin E (splenectomized)
α-thal	-----	Alpha thalassemia
HbH	-----	HbH disease
HbE (EE)	-----	Homozygous HbE
HbE (EA)	-----	HbE trait

Executive summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคธาลัสซีเมียมีสาเหตุจากความผิดปกติทางพันธุกรรมที่ระดับ gene ของการสร้างสายโกลบินของฮีโมโกลบิน นอกจากจะพบความผิดปกติที่เม็ดเลือดแดง ซึ่งมีผลให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลายง่ายกว่าปกติแล้ว ยังพบว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นในระบบต่างๆ ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคและมีผลต่อผู้ป่วยมากขึ้น ผลกระทบบางอย่างเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ผลกระทบที่สำคัญอย่างหนึ่งคือปัญหาแทรกซ้อนในระบบหลอดเลือด ซึ่งแสดงพยาธิสภาพและอาการทางคลินิกให้เห็นได้ในปอด คือภาวะการอุดตันของหลอดเลือดภายในปอด (Pulmonary thromboembolism) ทำให้เป็นสาเหตุของการขาดออกซิเจนในเลือด (hypoxia) ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยที่มีปัญหาเรื่องโลหิตจางอยู่แล้ว จากการรายงาน ในปี 1980 พบว่าในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียที่เสียชีวิตจำนวน 43 คนพบว่า 19 คน (44 %) มีพยาธิสภาพของปอดที่เด่นชัดคือมีการอุดตันของหลอดเลือดภายในปอด

ข้อบ่งชี้ทางคลินิกถึงปัญหาภาวะแทรกซ้อนในระบบหลอดเลือดอีกประการหนึ่งก็คือ ผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีปัญหาเรื่อง Leg ulcer ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือด และ blood supply ในบริเวณขา ทำให้เกิดบริเวณเนื้อตายเป็น ulcer ได้ โดยที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการมีพยาธิสภาพที่ผิดปกติ ของเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells)

ผู้เสนอโครงการได้รายงานถึงความเปลี่ยนแปลงของเซลล์บุหลอดเลือดโดยศึกษาจาก umbilical cord vein โดยทำการศึกษาภาวะที่อาจเกี่ยวข้องกับ ความผิดปกติของผู้ป่วยธาลัสซีเมียทำให้ได้ข้อสรุปเบื้องต้นว่าเม็ดเลือดแดงและซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียนั้น มีส่วนในการสร้างความผิดปกติให้กับเซลล์บุหลอดเลือดในหลอดทดลองซึ่งเป็นข้อมูลที่ชี้แนะว่าอาการทางคลินิกบางอย่างของผู้ป่วยธาลัสซีเมียน่าจะมีปัญหาที่มีส่วนสัมพันธ์กับเซลล์บุหลอดเลือดอย่างแน่นอน นอกจากนี้ยังได้รายงานการตรวจพบระดับ thrombomodulin สูงขึ้นในเลือดผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกที่เกี่ยวกับภาวะแทรกซ้อนของระบบหลอดเลือด ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวนำไปสู่การตั้งสมมุติฐานว่า เซลล์บุหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียอาจมีความแปรปรวนเมื่อสัมผัสกับเลือดผู้ป่วยตลอดเวลา และนอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาวาเซลล์บุหลอดเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีความแปรปรวนหรือผิดปกติหรือไม่ โดยทำการตรวจสอบปริมาณของสารหลังต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับเซลล์บุหลอดเลือดซึ่งพบว่าสารเหล่านี้มีปริมาณแตกต่างจากคนปกติอันแสดงถึงความแปรปรวนและความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

การที่เกิดความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือดในผู้ป่วยนี้ เซลล์เหล่านี้น่าจะมีการหลุดออกมาจากผนังหลอดเลือดและสร้างปัญหาแทรกซ้อนขึ้นมาได้ จึงเป็นที่น่าสนใจว่าเซลล์บุหลอดเลือดในกระแสเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีจริงหรือไม่ถ้ามีจะทำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบการแข็งตัวของเลือดอย่างไร

การตรวจสอบการหลุดลอกของเซลล์บุหลอดเลือดจากผู้ป่วยธาลัสซีเมียก็จะเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการมี endothelial cell injury หรือ dysfunction ซึ่งอาจจะมีผลเกี่ยวข้องต่อการเกิด thrombosis ในร่างกายของผู้ป่วย ดังนั้นการตรวจสอบหาปริมาณและคุณสมบัติของเซลล์บุหลอดเลือดในร่างกายของผู้ป่วยจะทำให้สามารถประเมินสถานภาพของผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้โดยตรง และเป็นองค์ความรู้ใหม่ในบทบาทใหม่ of เซลล์บุหลอดเลือดซึ่งยังไม่ทราบกันมาก่อน

2. วัตถุประสงค์

เพื่อที่จะได้ความรู้ใหม่ว่าเซลล์บุหลอดเลือดในร่างกายผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียนั้นหลุดออกมาในกระแสเลือดจริงหรือไม่ และมีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติอย่างไร ซึ่งจะทำให้ทราบแนวทางที่นำไปสู่กลไก ของการเกิดหลอดเลือดอุดตันในผู้ป่วย และการรักษาต่อไป

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 แยกเซลล์บุหลอดเลือดจาก peripheral blood ของผู้ป่วยธาลัสซีเมียทั้งชนิด อัลฟา และ เบต้า โดยเปรียบเทียบกับ คนปกติ

3.2 ตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกออกมาจากผู้ป่วย
คุณสมบัติของเซลล์บุหลอดเลือดจะตรวจสอบโดยการย้อมด้วย monoclonal antibody against von Willebrand factor (vWF) และตรวจสอบโดยใช้กล้อง Scanning confocal microscope และถ้าได้ปริมาณเซลล์มากพอก็จะตรวจสอบ marker ของเซลล์บุหลอดเลือด คือ Weibel palade bodies โดยใช้กล้อง transmission electron microscope

3.3 ตรวจสอบความผิดปกติของเซลล์ที่แยกออกมา โดยจะทำการศึกษาดังนี้

3.3.1 ศึกษารูปร่างลักษณะและคุณสมบัติของการมีชีวิตอยู่ (viability) ของเซลล์บุหลอดเลือดโดยการย้อมและตรวจสอบโดยใช้กล้อง Inverted phase contrast microscope

3.3.2 ตรวจสอบปริมาณ (quantitation) ของเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกออกมาได้ โดยเปรียบเทียบกับคนปกติและคนไข้ธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ

3.3.3 ศึกษาการ expression ของ adhesion molecules ซึ่งเป็น markers ของการถูก activation โดยการย้อมและตรวจสอบด้วยกล้อง Scanning confocal microscope

3.3.4 ตรวจสอบว่าแหล่งที่มาของเซลล์บุหลอดเลือดดังกล่าวว่ามาจากส่วน microvascular หรือไม่โดยการย้อมด้วย specific monoclonal antibody

3.3.5 กรณีที่เซลล์มีจำนวนมากพอจะทำการทดสอบ tissue factor expression

3.3.6 กรณีที่เซลล์บุหลอดเลือดตายเป็นจำนวนมาก ก็จะทำมาศึกษาว่าเกิดจาก apoptosis หรือไม่ โดยใช้วิธีการย้อมพิเศษ

3.4 กรณีที่เซลล์บุหลอดเลือดดังกล่าวยังมีชีวิตอยู่ จะทำการทดลอง culture เซลล์เหล่านั้นให้ได้ปริมาณเซลล์ที่มากพอแล้วนำมาศึกษาต่อไป

4. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ

4.1 ทดลองหาวิธีที่เหมาะสมในการแยก circulating endothelial cells

4.2 ตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ ของ endothelial cells ที่แยกออกมา ได้แก่ การตรวจสอบ viability ของเซลล์ numbers และ markers ของเซลล์

4.3 ตรวจสอบการมี activation ของ endothelial cells และตรวจสอบหาแหล่งที่มาโดยใช้ markers บางตัว และทดลองนำเซลล์ที่แยกได้มาทำการ culture ในภาวะที่เหมาะสม

4.4 ตรวจสอบความผิดปกติของเซลล์ที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดการอุดตันภายในหลอดเลือดเพิ่มเติมและสรุปผลการทดลองทั้งหมด

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียนอกจากพบความผิดปกติที่เม็ดเลือดแดง ซึ่งมีผลให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลายง่ายกว่าปกติแล้ว ยังพบว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นในระบบต่างๆทำให้เกิดความรุนแรงของโรคและมีผลต่อผู้ป่วยมากขึ้น ผลกระทบที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ ปัญหาแทรกซ้อนในระบบหลอดเลือดซึ่งแสดงพยาธิสภาพให้เห็นได้ในปอด คือภาวะการอุดตันของหลอดเลือดภายในปอด (Pulmonary thromboembolism) ทำให้เป็นสาเหตุของการขาดออกซิเจนในเลือด (hypoxia) ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยมากขึ้น มีรายงานในปี 1980 พบว่าผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียที่เสียชีวิตจำนวน 43 คนพบว่า 19 คน (44%) มีพยาธิสภาพของปอดที่เด่นชัดคือมีการอุดตันของหลอดเลือดภายในปอด นอกจากนี้ยังพบว่าปัญหาภาวะแทรกซ้อนในระบบหลอดเลือดอีกประการหนึ่งคือ ผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียมีปัญหาเรื่อง leg ulcer ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือด และ blood supply ในบริเวณขา ทำให้เกิดบริเวณเนื้อตายเป็น ulcer ได้โดยที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการมีพยาธิสภาพที่ผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells) ซึ่งในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับแล้วว่า เซลล์บุหลอดเลือดจะเกี่ยวข้องกับการ tissue reaction ที่สำคัญต่างๆ และเป็น targets สำหรับ injurious agents

จากการศึกษาที่ผ่านมาผู้เสนอโครงการและคณะได้รายงานถึงความเปลี่ยนแปลงของเซลล์บุหลอดเลือดจาก umbilical cord vein โดยได้ข้อสรุปเบื้องต้นว่า เม็ดเลือดแดงและซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียนั้นมีส่วนในการสร้างความผิดปกติให้กับเซลล์บุหลอดเลือดในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นข้อมูลที่ชี้แนะว่าอาการทางคลินิกบางอย่างของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียน่าจะมีปัญหาที่มีส่วนสัมพันธ์กับเซลล์บุหลอดเลือดอย่างแน่นอน นอกจากนี้ยังได้รายงานการตรวจพบระดับของ thrombomodulin ที่สูงขึ้นในเลือดผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกที่เกี่ยวกับภาวะแทรกซ้อนของระบบหลอดเลือด ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวนำไปสู่การตั้งสมมุติฐานว่า เซลล์บุหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียอาจมีความแปรปรวนเมื่อสัมผัสกับเลือดผู้ป่วยตลอดเวลา และนอกจากนั้นยังได้ทำการตรวจสอบปริมาณของสารหลังต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับเซลล์บุหลอดเลือด ซึ่งพบว่าสารเหล่านี้มีปริมาณแตกต่างจากคนปกติซึ่งแสดงถึงความแปรปรวน และความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย

ความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือดในผู้ป่วยนี้ จัดว่าเป็น major factor ที่เกี่ยวข้องกับการ pathogenesis ของ vascular system โดยที่เซลล์เหล่านี้น่าจะมีการหลุดลอกออกมาจากผนังหลอดเลือดและสร้างปัญหาแทรกซ้อนขึ้นมาได้ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่า เซลล์บุหลอดเลือดในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียมีจริงหรือไม่ ถ้ามีจะทำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบการแข็งตัวของเลือดหรือไม่อย่างไร

การตรวจสอบการหลุดลอกของเซลล์บุหลอดเลือดจากผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียโดยตรงก็น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการมี endothelial cell injury และการมี detachment ของเซลล์ในร่างกายของผู้ป่วย (in vivo) โดยที่ผ่านมาการศึกษาเซลล์บุหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย จะทำโดยการตรวจสอบหาปริมาณสารต่างๆที่หลั่งออกมาจากเซลล์บุหลอดเลือดที่เกิดจาก injurious agent แต่ก็จะไม่เฉพาะเจาะจงนักที่จะสรุปว่าเซลล์บุหลอดเลือดมี injury ดังนั้นการตรวจสอบหาปริมาณและคุณสมบัติของเซลล์บุหลอดเลือดในร่างกายของผู้ป่วยโดยตรงน่าจะจัดว่าเป็น direct indicator ของ vascular injury ใน in vivo ที่มีประโยชน์ในทางคลินิก ซึ่งจะทำให้สามารถประเมินสถานภาพของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียได้โดยตรงและเป็นองค์ความรู้ใหม่ในบทบาทใหม่ของเซลล์บุหลอดเลือดซึ่งยังไม่ทราบกันมาก่อน

วิธีการทดลอง (Material & Method)

1. ศึกษาหาวิธีในการแยกเซลล์บุหลอดเลือดจาก peripheral blood ของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย ทั้งชนิด อัลฟา และ เบต้า โดยเปรียบเทียบกับ คนปกติ

การศึกษาหาวิธีแยก circulating endothelial cells โดยวิธีต่างๆ จาก circulating blood ได้ทำการทดลองแยกในตัวอย่างเลือดจากคนปกติและผู้ป่วย thalassemia จำนวนทั้งสิ้น 13 ราย ดังต่อไปนี้คือ

- 1.1 Normal blood 4 ราย
- 1.2 β - thalassemia / HbE (nonsplenectomized) 3 ราย
- 1.3 β - thalassemia / HbE (splenectomized) 2 ราย
- 1.4 HbH 2 ราย
- 1.5 Homozygous HbE (EE) 2 ราย

การเก็บเลือดและวิธีทำ

ในการทดลองแยก circulating endothelial cells จาก whole blood นั้นได้ทดลองแยกทั้งจาก PRP (platelet rich plasma) โดยรวมกับการใช้ ADP เพื่อแยก platelet ออกไป และโดยใช้ Percoll density gradient โดยที่ Percoll จะเป็น referenced medium สำหรับแยกเซลล์โดยวิธี density gradient centrifugation โดย Percoll จะประกอบไปด้วย colloidal silica ที่ coat ด้วย polyvinylpyrrolidone (PVP) ซึ่งเหมาะสมสำหรับใช้กับ biological materials ซึ่งการใช้ Percoll density gradient ได้ทำการแยกเซลล์ที่ 25% , 40%, 50%, 60% และ 70% Percoll

ผลการทดลองแยกจาก PRP พบว่าจะได้จำนวนของเซลล์ค่อนข้างต่ำและเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงจะได้ผลไม่ชัดเจนเนื่องจากเซลล์มีจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับวิธี Percoll density gradient ซึ่งผลจากการแยกจะได้เซลล์จำนวนมากที่ 40% Percoll และ 60% Percoll

2. ตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกออกมาจากผู้ป่วย

การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกออกมาทำโดยนำมาตรวจสอบโดยการย้อมด้วย Sheep anti human von Willebrand factor : FITC ซึ่งเป็น purified IgG conjugated to Fluorescein Isothiocyanate Isomer I (FITC) – liquid (Serotec Product) ที่ละลายอยู่ใน Phosphate buffered saline pH 7.2 การย้อมจะใช้ dilution 1 : 50 .โดยใช้เวลา 30 นาที และการตรวจสอบทำโดยใช้กล้อง Scanning confocal microscope

3. ศึกษารูปร่างลักษณะและคุณสมบัติของการมีชีวิตอยู่ (viability) ของเซลล์บุหลอดเลือดโดยการย้อมและตรวจสอบโดยใช้กล้อง Inverted phase contrast microscope

จากการนำเซลล์ที่แยกได้โดยวิธีใช้ Percoll density gradient มาทำการตรวจสอบ viability โดยใช้ Trypan blue มาย้อม โดยการ incubate กับเซลล์และตรวจสอบโดยใช้กล้อง Inverted phase contrast microscope เพื่อดูว่าเซลล์ที่แยกออกมาได้นั้นมีชีวิตอยู่หรือเป็นเซลล์ที่ตายแล้วและนับจำนวนของ viable cells ซึ่งไม่ติดสี ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดแล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของ viable cells

4. ตรวจสอบปริมาณ (quantitation) ของเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกออกมาได้ โดยเปรียบเทียบกับคนปกติและคนไข้ธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ

การตรวจสอบปริมาณของเซลล์บุหลอดเลือดสามารถใช้ได้ทั้งวิธี Percoll density gradient และโดยใช้ Histopaque ซึ่งการนับจะนับเฉพาะเซลล์ที่ติดสี positive ต่อ anti human von Willebrand factor : FITC โดยจะนับจำนวน positive cells ที่แยกได้จากการใช้ sample 1 ml. โดยทำการศึกษาในคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ จำนวน 53 รายคือ

Normal blood	21	ราย
β - thalassemia / HbE (nonsplenectomized)	2	ราย
β - thalassemia / HbE (splenectomized)	7	ราย
HbH	5	ราย
Homozygous HbE (EE)	5	ราย
HbE trait	13	ราย

5. ศึกษาการ expression ของ adhesion molecules ซึ่งเป็น markers ของการถูก activation โดยการย้อมและตรวจสอบด้วยกล้อง Scanning confocal microscope

ในการศึกษาคุณสมบัติของ endothelial cells ที่หลุดลอยออกมาว่ามีการ express ของ adhesion molecules ต่าง ๆ ซึ่งเป็น markers ของการมี activation ของ endothelial cells นั้นได้ทดสอบโดยการย้อม โดยใช้ monoclonal antibodies ดังต่อไปนี้คือ

5.1 Mouse anti human CD54 : RPE ซึ่งเป็น Purified IgG conjugated to R. Phycoerythrin (RPE) – lyophilised ซึ่งจะมี specificity ต่อ human CD 54 surface antigen หรือ ICAM-1

5.2 Mouse anti human CD 106 : RPE ซึ่งเป็น Purified IgG conjugated to R. Phycoerythrin (RPE) – lyophilised ซึ่งจะมี specificity ต่อ human VCAM – 1 ซึ่งเป็น antigen ที่ expressed บน activated endothelial cells และเซลล์อื่นๆ บางชนิด

5.3 Mouse anti human CD 62E : FITC ซึ่งเป็น Purified IgG conjugated to Fluorescein isothiocyanate Isomer I (FITC) – liquid ซึ่งจะมี specificity ต่อ human E-Selectin (ELAM – 1) ซึ่งเป็น antigen ที่ expressed บน activated endothelial cells และเซลล์อื่นๆ บางชนิด

5.4 Mouse anti human CD 31 : FITC ซึ่งเป็น Purified IgG conjugated to Fluorescein isothiocyanate Isomer I (FITC) – liquid ซึ่งจะมี specificity ต่อ human CD31 (PECAM-1) ซึ่งเป็น glycoprotein ที่ expressed บน endothelial cells , platelets และเซลล์อื่นๆ บางชนิด

6. ตรวจสอบว่าแหล่งที่มาของเซลล์บุหลอดเลือดดังกล่าวว่ามาจากส่วน microvascular หรือไม่โดยการย้อมด้วย specific monoclonal antibody

ในการตรวจสอบว่าเซลล์ดังกล่าวหลุดลอยมาจากส่วน microvascular หรือไม่นั้น ได้ทำการทดสอบโดยใช้ specific monoclonal antibody คือใช้ Mouse anti human CD 36 : FITC ซึ่งเป็น Purified IgM conjugated to Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1 (FITC) – liquid ซึ่งมี specificity ต่อ human CD 36 antigen ซึ่งเป็น glycoprotein ที่ expressed อยู่บนเซลล์ต่างๆ รวมทั้ง endothelial cell โดยมีคุณสมบัติเป็น receptor ต่อ thrombospondin

7. การตรวจสอบคุณสมบัติของการมี apoptosis ในเซลล์บุหลอดเลือด

ในการทดสอบว่าเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกออกมาจาก peripheral blood มีลักษณะของการเกิด apoptosis หรือไม่นั้น ในการทดลองนี้ได้นำเซลล์ที่แยกได้มาทดสอบโดยการย้อมโดยใช้ Apoptosis Detection Kits (TACS Annexin V – FITC) ซึ่งประกอบไปด้วย Annexin V conjugated กับ FITC และ propidium iodide โดยส่วนผสมของ Annexin V – FITC และ propidium iodide จะทำให้สามารถแยกระหว่าง early apoptotic cells (Annexin V-FITC positive), late apoptotic และ/ หรือ necrotic cells (Annexin V- FITC และ propidium iodide positive) และ viable cells (unstained)

8. การทดลองนำเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกได้มาเพาะเลี้ยง (Culture)

จากเซลล์ที่แยกออกมาได้จาก peripheral blood ได้นำมาทดลองเพาะเลี้ยง (culture) ใน culture medium ที่เหมาะสมสำหรับ endothelial cells โดยใช้ Medium - 199 (M-199) โดยมี supplements ที่เหมาะสมสำหรับ endothelial cells คือ fetal bovine serum และ VEGF (vascular endothelial cell growth factor) จากนั้นก็ทำการตรวจสอบรูปร่างลักษณะและการเจริญเติบโตของเซลล์ที่แยกออกมาได้ โดยใช้กล้อง Inverted phase contrast microscope เป็นเวลา 1 – 2 สัปดาห์

9. ศึกษาวิเคราะห์ Blood cells parameters ต่าง ๆ ของผู้ป่วยในทางโลหิตวิทยา

ชนิดและปริมาณของส่วนประกอบต่างๆในเลือด ได้แก่ hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), เม็ดเลือดชนิดต่างๆ และ เกล็ดเลือด (platelet) ในผู้ป่วย thalassemia และคนปกติ ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ในทางโลหิตวิทยา โดยใช้เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติคือ Technicon H*3 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ค่าต่างๆออกมาได้ โดยใช้ EDTA blood

10. ศึกษาระดับสาร VEGF (Vascular endothelial cell growth factor) ใน Plasma ของผู้ป่วยธาลัสซีเมียและคนปกติ

การศึกษาปริมาณของสาร VEGF ที่อาจเกี่ยวข้องกับการหลุดลอกของเซลล์บุหลอดเลือด ทำโดยวิธี two – site enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้น้ำยา PREDICTA for quantification of human VEGF (Genzyme diagnostics) โดยทำการศึกษาใน plasma ของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับคนปกติ

11. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล ใช้การเปรียบเทียบทางสถิติ โดยเปรียบเทียบผลจากผู้ป่วยธาลัสซีเมียทุกชนิดที่ทำการศึกษากับคนปกติ เปรียบเทียบธาลัสซีเมียชนิด alpha กับชนิด beta และธาลัสซีเมียชนิดตัดม้าม (splenectomized) เทียบกับไม่ตัดม้าม (nonsplenectomized) โดยสถิติจะใช้ program computer คำนวณโดยใช้ ANOVA test

ผลการทดลอง (Results)

จากจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งคนปกติ และผู้ป่วย Thalassemia จำนวนทั้งหมด 66 ราย สามารถแยกออกเป็นชนิดต่างๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวน เพศและอายุของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

Group	N	Male	Female	Age Ranges
Normal	25	18	7	25 – 48
β -thal/E(NS)	5	4	1	16 – 42
β -thal/E (s)	9	6	3	15 – 38
HbH	7	4	3	30 – 45
HbE (EE)	7	6	1	25 – 40
HbE trait	13	5	8	18 – 26
Total	66	43	23	15 - 48

ผลการศึกษาหาวิธีในการแยกเซลล์บุหลอดเลือดจาก peripheral blood ของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย ทั้งชนิด อัลฟา และ เบต้า โดยเปรียบเทียบกับ คนปกติ

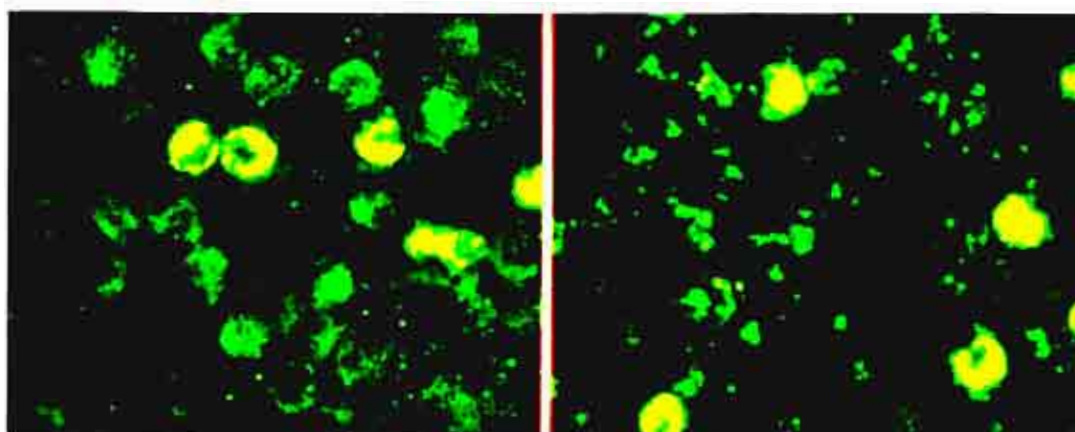
ผลจากการทดลองแยก circulating endothelial cells สามารถสรุปได้ว่าในเลือดของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียนั้นทั้งชนิด disease forms คือ β - thalassemia / Hb E ทั้งประเภทที่ติดม้ามและไม่ได้ติดม้าม รวมทั้ง HbH disease หรือชนิด nondisease form ได้แก่ homozygous HbE (EE) จะพบว่ามีเซลล์ที่มีรูปร่างลักษณะคล้าย endothelial cells อยู่ใน blood circulation ทำให้สามารถเชื่อถือได้ว่าใน blood circulation ของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียนั้นมีความเป็นไปได้ว่ามี endothelial cells หลุดลอยออกมาได้จริง

ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกออกมาจากผู้ป่วย

การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกออกมาทำโดยนำมาตรวจสอบโดยการย้อมด้วย Sheep anti human von Willebrand factor : FITC ซึ่งเป็น purified IgG conjugated to Fluorescein Isothiocyanate Isomer I (FITC) และการตรวจสอบทำโดยใช้กล้อง Scanning confocal microscope พบว่าเซลล์ที่แยกออกมานั้นให้ผล positive ต่อการย้อม

ซึ่งทำให้สามารถยืนยันได้ว่าเซลล์ดังกล่าวมีคุณสมบัติของเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells) (รูปที่ 1)

รูปที่ 1. Circulating endothelial cells ที่ย้อมด้วย Sheep anti human von Willebrand factor : FITC



ผลการศึกษารูปร่างลักษณะและคุณสมบัติของการมีชีวิตอยู่ (viability) ของเซลล์บุหลอดเลือดโดยการย้อมและตรวจสอบโดยใช้กล้อง Inverted phase contrast microscope

จากการนำเซลล์ที่แยกได้โดยวิธีใช้ Percoll density gradient มาทำการตรวจสอบ viability โดยใช้ Trypan blue มาย้อม โดยการ incubate กับเซลล์และตรวจสอบโดยใช้กล้อง Inverted phase contrast microscope เพื่อดูว่าเซลล์ที่แยกออกมาได้นั้นมีชีวิตอยู่หรือเป็นเซลล์ที่ตายแล้วโดยการนับจำนวนของ viable cells ซึ่งไม่ติดสี ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดแล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของ viable cells พบว่าเซลล์เหล่านี้ยังมี viability ค่อนข้างสูง โดยจะอยู่ในระดับ 70 – 80 % ทั้งในกลุ่มคนปกติซึ่งมีจำนวนไม่มาก และในกลุ่มคนไข้ thalassemia ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์มากกว่าแต่ไม่พบความแตกต่างของค่า viability ซึ่งแสดงว่าเซลล์เหล่านี้ส่วนใหญ่ยังมีชีวิตอยู่ แต่ก็มีส่วนหนึ่งที่ติดสี trypan blue

ตรวจสอบปริมาณ (quantitation) ของเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกออกมาได้ โดยเปรียบเทียบกับคนปกติและคนไข้ธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ

การตรวจสอบปริมาณของเซลล์บุหลอดเลือดสามารถใช้ได้ทั้งวิธี Percoll density gradient และโดยใช้ Histopaque ซึ่งการนับจะนับเฉพาะเซลล์ที่ติดสี positive ต่อ anti human von Willebrand factor : FITC โดยจะนับจำนวน positive cells ที่ได้จากการใช้ sample 1 ml. โดยทำการศึกษาในคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ จำนวน 53 รายคือ Normal blood 21 ราย, β - thalassemia / HbE (nonsplenectomized; NS) 2 ราย, β - thalassemia / HbE (splenectomized; S) 7 ราย, HbH 5 ราย, Homozygous HbE (EE) 5 ราย และ HbE

trait 13 ราย ซึ่งผลจากการตรวจสอบปริมาณของ circulating endothelial cells พบว่าการหลุดลอกของเซลล์ดังกล่าวจะมีจำนวนที่แตกต่างจากคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มของ β -thal / HbE ทั้งกลุ่มที่ตัดม้ามและไม่ตัดม้ามและในกลุ่มของ HbH และ Homozygous HbE (EE) และนอกจากนี้ยังมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.001) ในกลุ่มของ α thal (HbH) และ β - thal (β -thal/E) ด้วย ดังแสดงอยู่ใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณของ circulating endothelial cells ในคนไข้ thalassemia ชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับคนปกติ

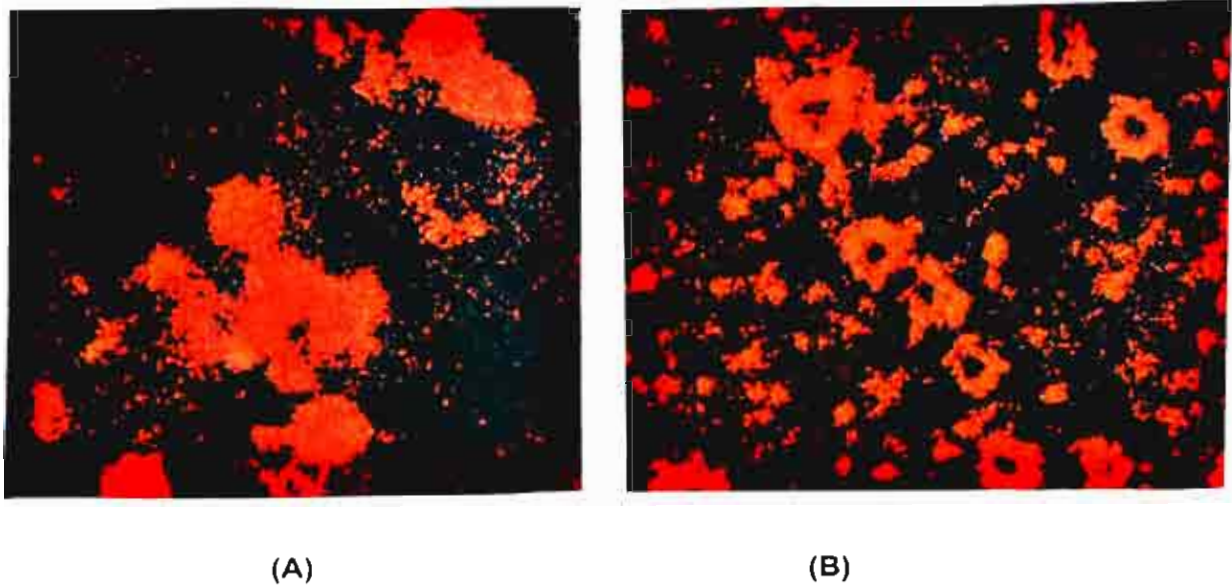
Type	N	CEC no. (mean $\pm$ SD)	P-value vs normal
Normal	21	3.53 $\pm$ 2.09	-
β - thal / HbE (NS)	2	34.15 $\pm$ 5.23	< 0.0001
β - thal / HbE (S)	7	53.10 $\pm$ 11.11	< 0.0001
HbH disease	5	12.85 $\pm$ 5.61	< 0.0001
HbE ;EE	5	16.67 $\pm$ 5.53	< 0.0001
HbE trait	13	6.78 $\pm$ 3.85	NS

NS = non significant difference

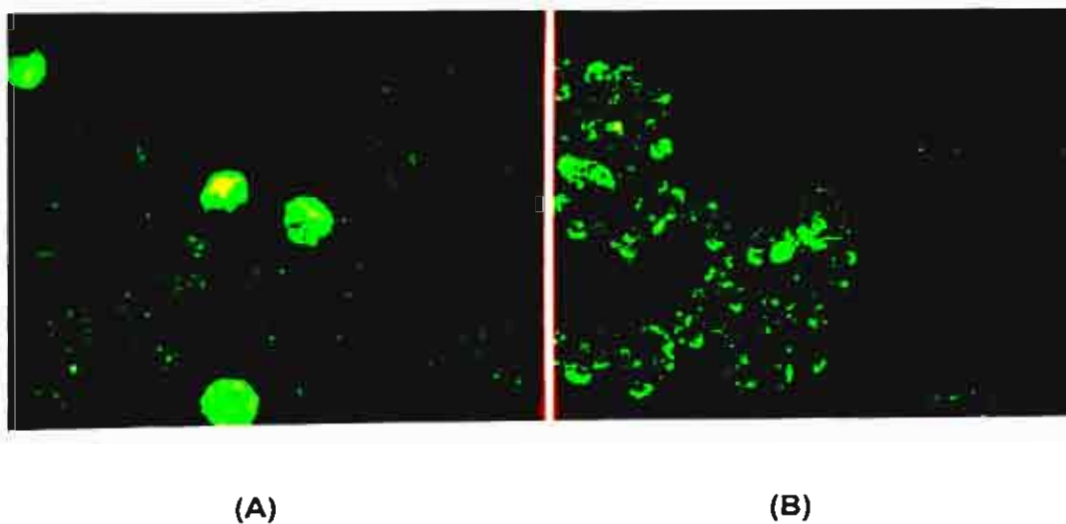
ศึกษาการ expression ของ adhesion molecules ซึ่งเป็น markers ของการถูก activation โดยการย้อมและตรวจสอบด้วยกล้อง Scanning confocal microscope

จากการศึกษาคุณสมบัติของ endothelial cells ที่หลุดลอยออกมาว่ามีการ express ของ adhesion molecules ต่างๆ ซึ่งเป็น markers ของการมี activation ของ endothelial cells โดยการย้อม โดยใช้ monoclonal antibodies ต่างๆ ได้แก่ Mouse anti human CD54 : RPE ซึ่งจะมี specificity ต่อ human CD 54 surface antigen หรือ ICAM-1 ; Mouse anti human CD 106 : RPE ซึ่งจะมี specificity ต่อ human VCAM – 1 ; Mouse anti human CD 62E : FITC ซึ่งจะมี specificity ต่อ human E-Selectin (ELAM – 1) และ Mouse anti human CD 31 : FITC ซึ่งจะมี specificity ต่อ human CD31 (PECAM-1) ซึ่งเป็น glycoprotein ที่ expressed บน endothelial cells , platelets และเซลล์อื่นๆ บางชนิด พบว่า เซลล์ที่แยกออกมาได้จะให้สี positive กับ monoclonal antibodies ดังกล่าวเกือบทุกชนิด แต่จะไม่ให้สี positive ในทุกเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 2 - 3

รูปที่ 2. Circulating endothelial cells staining with Mouse anti human CD54 : RPE (A) and with Mouse anti human CD 106 : RPE (B)



รูปที่ 3. Circulating endothelial cells staining with Mouse anti human CD 62E : FITC (A) and with Mouse anti human CD 31 : FITC (B)

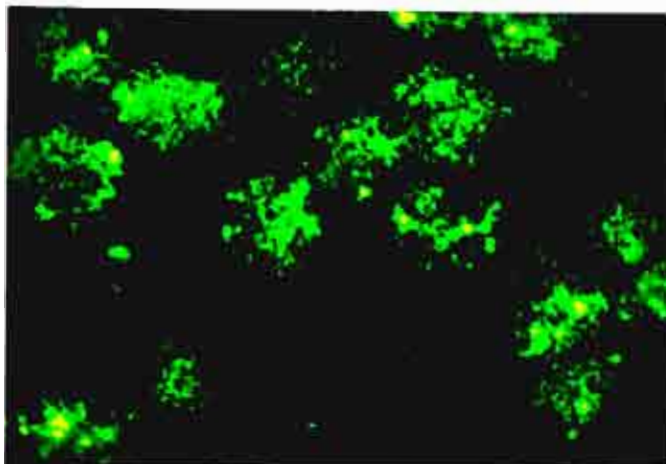


ผลการตรวจสอบว่าแหล่งที่มาของเซลล์บุหลอดเลือดดังกล่าวว่ามาจากส่วน microvascular หรือไม่โดยการย้อมด้วย specific monoclonal antibody

จากการตรวจสอบโดยใช้ specific monoclonal antibody คือ Purified IgM conjugated กับ Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1 (FITC) ซึ่งมี specificity ต่อ human CD 36

antigen ซึ่งเป็น glycoprotein ที่ expressed อยู่บนเซลล์ต่างๆ รวมทั้ง endothelial cell พบว่าเซลล์ดังกล่าวที่แยกออกมาได้นั้นให้สี positive กับ anti CD 36 ตามรูปที่ 4

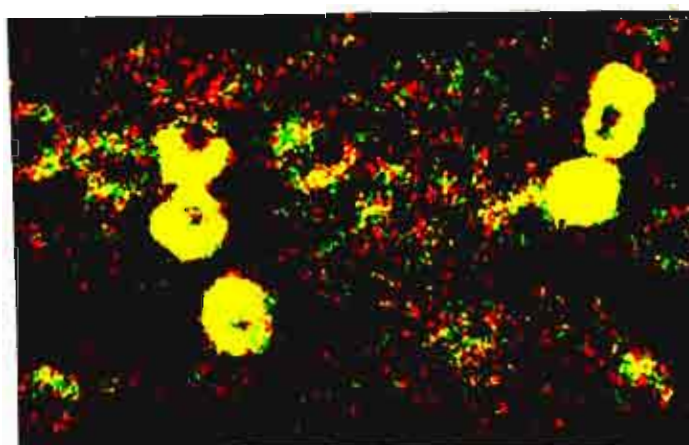
รูปที่ 4. Circulating endothelial cells staining with Mouse anti human CD 36 : FITC



ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของการมี apoptosis ในเซลล์บุหลอดเลือด

จากการทดสอบว่าเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกออกมาจาก peripheral blood มีลักษณะของการเกิด apoptosis หรือไม่ โดยการย้อมโดยใช้ Apoptosis Detection ซึ่งประกอบไปด้วย Annexin V conjugated กับ FITC และ propidium iodide โดยส่วนผสมของ Annexin V – FITC และ propidium iodide จะทำให้สามารถแยกระหว่าง early apoptotic cells (Annexin V-FITC positive), late apoptotic และ/ หรือ necrotic cells (Annexin V- FITC และ propidium iodide positive) และ viable cells (unstained) พบว่าผลจากการย้อมไม่พบ apoptotic cells โดยที่เซลล์ส่วนใหญ่จะไม่ติดสี Annexin V แต่อย่างไรก็ตามจะมีบางกลุ่มที่ติดสี positive ดังแสดงในรูปที่ 5

รูปที่ 5. Circulating endothelial cells staining with Annexin V- FITC และ propidium iodide



ผลการทดลองนำเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกได้มาเพาะเลี้ยง (culture) ในหลอดทดลอง

จากการนำเซลล์ที่แยกออกมาได้จาก peripheral blood มาทดลองเพาะเลี้ยง (culture) ใน culture medium ที่เหมาะสมสำหรับ endothelial cells คือ Medium - 199 (M-199) โดยมี supplements ที่เหมาะสมสำหรับ endothelial cells คือ fetal bovine serum และ VEGF (vascular endothelial cell growth factor) โดยทำการตรวจสอบรูปร่างลักษณะ และการเจริญเติบโตของเซลล์ที่แยกออกมาได้ โดยใช้กล้อง Inverted phase contrast microscope เป็นเวลา 1 – 2 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ที่แยกออกมาได้ จะมีรูปร่างลักษณะและคุณสมบัติคล้ายกับ endothelial cells คือจะเกาะติดกับภาชนะที่ทำการเพาะเลี้ยงและเมื่อมีจำนวนน้อยๆจะมีรูปร่างคล้ายกับ spindle shape แต่มีเส้นใย (thread like) ที่ต่อเนื่องกันระหว่างเซลล์ต่อเซลล์คล้ายกับคุณสมบัติของ endothelial cells ในการเกิด angiogenesis และไม่พบในเซลล์ชนิดอื่นๆ แต่จากการติดตามและตรวจสอบเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ดังกล่าวจะไม่ค่อยมีการ proliferate หรือเพิ่มจำนวนขึ้นเลย ถึงแม้จะใส่ growth factor ลงไปใน medium แล้วก็ตาม ซึ่งทำให้ไม่สามารถนำเซลล์ดังกล่าวไปศึกษาต่อได้

ผลการศึกษาวิเคราะห์ Blood cells parameters ต่าง ๆ ของผู้ป่วยในทางโลหิตวิทยา

การตรวจสอบชนิดและปริมาณของส่วนประกอบต่างๆในเลือด ได้แก่ hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), เม็ดเลือดชนิดต่างๆ และ เกล็ดเลือด (platelet) ในผู้ป่วย thalassemia และคนปกติที่นำมาศึกษา โดยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติคือ Technicon H*3 แสดงให้เห็นว่า จำนวนของ red blood cells count (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct) และ mean corpuscular volume (MCV) จะต่ำกว่าในคนปกติ ส่วน reticulocyte count (Retic) จะสูงกว่าในคนปกติในกลุ่มของ disease form ส่วน platelet count (PLT) จะไม่แตกต่างจากในกลุ่มคนปกติ ดังแสดงใน ตารางที่ 3

ตารางที่ 3. แสดงค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ป่วย thalassemia ชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับคนปกติ (mean $\pm$ SD) จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง Technicon H*3 Hematology Analyzer

Type	RBC	Hb	Hct	MCV	Retic	PLT
Normal	4.75 $\pm$ 0.79	14.31 $\pm$ 0.6	42.31 $\pm$ 3.4	90.31 $\pm$ 5.6	1.10 $\pm$ 0.46	240.0 $\pm$ 42.1
β -thal/E (NS)	3.96 $\pm$ 0.67	7.65 $\pm$ 1.1	24.72 $\pm$ 2.6	64.85 $\pm$ 5.9	3.68 $\pm$ 1.57	330.7 $\pm$ 75.8
β -thal / E (S)	3.11 $\pm$ 0.39	5.81 $\pm$ 0.8	21.40 $\pm$ 2.7	68.61 $\pm$ 7.4	20.5 $\pm$ 18.6	785.6 $\pm$ 438.7
HbH	4.45 $\pm$ 0.79	8.75 $\pm$ 1.2	34.28 $\pm$ 3.6	74.38 $\pm$ 4.6	4.36 $\pm$ 2.16	378.3 $\pm$ 82.1
HbE(EE)	4.03 $\pm$ 0.58	11.61 $\pm$ 1.3	35.33 $\pm$ 4.1	72.81 $\pm$ 3.9	1.98 $\pm$ 0.78	244.5 $\pm$ 38.4
HbE trait	4.55 $\pm$ 0.91	13.35 $\pm$ 1.6	39.38 $\pm$ 3.9	79.63 $\pm$ 4.7	1.03 $\pm$ 0.38	250.7 $\pm$ 38.8

ผลการศึกษาระดับสาร VEGF (Vascular endothelial cell growth factor) ใน Plasma ของผู้ป่วยธาลัสซีเมียและคนปกติ

การศึกษาปริมาณของสาร VEGF ที่อาจเกี่ยวข้องกับการหลุดลอกของเซลล์บุหลอดเลือด ทำโดยวิธี two – site enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้น้ำยา PREDICTA for quantification of human VEGF (Genzyme diagnostics) โดยทำการศึกษาใน plasma ของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับคนปกติ ผลการตรวจสอบพบว่าค่าของ VEGF สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วย β -thal / HbE ในกลุ่มที่ดัดม้าม (p-value < 0.0001) และในกลุ่มของ HbH (p-value = 0.0190) เมื่อเทียบกับคนปกติ และนอกจากนี้ยังพบว่าค่า VEGF ยังมี positive correlation กับค่า circulating endothelial cells ด้วย ($r = 0.793$; p-value = <0.0001)

บทวิจารณ์ (Discussion)

การศึกษาทั้งหมดดังกล่าว พบว่าใน peripheral blood ของผู้ป่วย thalassemia ทั้ง diseases และ non diseases form ซึ่งได้แก่ β -thalassemia / HbE ทั้งกลุ่มที่ดัดม้ามและไม่ได้ดัดม้าม กลุ่ม α -thalassemia ซึ่งได้แก่ HbH และกลุ่มที่ไม่แสดงอาการของโรคได้แก่ homozygous HbE (EE) และ heterozygous HbE (EA) ต่างก็มีการหลุดลอกของเซลล์บุหลอดเลือดออกมาในกระแสเลือดได้เช่นกันแต่มีจำนวนที่แตกต่างกัน โดยพบว่าในกลุ่มที่มีอาการรุนแรงได้แก่ β -thalassemia / HbE ที่ดัดม้ามจะพบว่าจำนวนของ circulating endothelial cells จะมีจำนวนสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ค่อยรุนแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.0001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะสูงกว่าในคนปกติอย่างชัดเจน ยกเว้นใน HbE trait ซึ่งจะสูงกว่าปกติเล็กน้อย และนอกจากนี้ยังพบอีกว่าเซลล์ที่หลุดออกมาดังกล่าวยังแสดงความผิดปกติที่สามารถตรวจสอบได้โดยการย้อมด้วย monoclonal antibodies ต่างๆ ซึ่งการ expression endothelial cell adhesion molecules เหล่านี้จะสามารถบ่งบอกถึงการที่ endothelial cells ถูก activation ภายในร่างกายหรือหลอดเลือดของผู้ป่วย และยังบ่งบอกถึงภาวะ dysfunction ของเซลล์เหล่านั้นด้วย จากรายงานการศึกษาโดยการทำ autopsy ผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่เสียชีวิต พบว่าจะมี microthrombi กระจายอยู่ทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ pulmonary artery (1) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือดด้วย (2) จากการตั้งสมมุติฐานจากการศึกษาเชื่อว่าการเกิด thrombus ในหลอดเลือดอาจเกี่ยวข้องกับการที่เซลล์บุหลอดเลือดถูกทำลาย ซึ่งโดยปกติแล้วหลอดเลือดจะมีคุณสมบัติในการช่วยป้องกันการเกิดลิ่มเลือด (3-4) จากรายงานในผู้ป่วยโรค sickle cell anemia ซึ่งเป็นโรคที่มีความผิดปกติของ hemoglobin พบพยาธิสภาพที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับเซลล์บุหลอดเลือดในภาวะที่มีความรุนแรงของโรค (crisis) โดยมีรายงานการพบเซลล์บุหลอดเลือดที่หลุดลอยในกระแสเลือดมากกว่าคนปกติ (5-6) และจากการศึกษาของ Solovey A และคณะ (7-8) ยังพบภาวะความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือดที่แยกได้เหล่านั้น ซึ่งจะสามารถบ่งบอกถึงความผิดปกติในร่างกายของผู้ป่วยโดยตรง โดยที่ได้มีหลักฐานยืนยันแล้วว่า เซลล์บุหลอดเลือดในกระแสเลือดสามารถใช้เป็น indicator ที่บ่งบอกถึงการมีภาวะ injury ของเซลล์บุหลอดเลือดในร่างกายของผู้ป่วยได้ (9) จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าในกระแสเลือดของผู้ป่วย thalassemia ทั้งชนิด alpha และ beta -thalassemia ที่มีความรุนแรงจะพบเซลล์บุหลอดเลือดหลุดลอยออกมาได้จริง แต่อย่างไรก็ตามในกลุ่มที่ไม่รุนแรงและไม่แสดงอาการ ได้แก่กลุ่มของ homozygous HbE และ HbE trait ก็จะมีพบเซลล์ดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน จากข้อมูลการศึกษาที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย ได้เคยศึกษาและรายงานถึงความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องโดยตรงระหว่างเซลล์บุหลอดเลือดและโรคธาลัสซีเมีย โดยได้ข้อสรุปเป็นขั้นตอนต่างๆคือ ในปี 1992 ศึกษาพบว่า เม็ดเลือดแดง และ ซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียมีส่วนเกี่ยวข้องกับ

เซลล์บุหลอดเลือดในหลอดทดลอง (10-12) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย น่าจะมีปัญหาที่มีส่วนสัมพันธ์กับเซลล์บุหลอดเลือดอย่างแน่นอน และต่อมาคณะผู้วิจัยก็ได้ ดำเนินการศึกษาต่อ ว่าเซลล์บุหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียจะมีความผิดปกติหรือไม่ เมื่อ สัมผัสกับเลือดผู้ป่วยอยู่ตลอดเวลา โดยได้ทำการตรวจสอบปริมาณของสารหลังต่างๆ (cytokines และ plasma proteins) ที่เกี่ยวข้องกับเซลล์บุหลอดเลือด ได้แก่ plasma thrombomodulin ซึ่งพบว่ามีปริมาณแตกต่างจากคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (13) และ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาระดับของ soluble endothelial cell adhesion molecules ในซีรัมของผู้ป่วย thalassemia ก็พบว่ามีค่าแตกต่างจากคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน (14) จากผลดังกล่าวและผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้สามารถสรุปได้ว่าภายใน หลอดเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมียจะต้องมีความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือดอย่างแน่นอน และ เซลล์เหล่านี้จะมีพยาธิสภาพที่ไม่ปกติจึงทำให้หลุดลอกออกมาในกระแสเลือดมากกว่าคนปกติ และจากการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์เหล่านี้ก็พบว่ามีค่าผิดปกติจริง แต่ไม่ถึงระดับ apoptosis เนื่องจากว่ายังมี viability ค่อนข้างสูงหลังจากแยกออกมาใหม่ๆ แต่เมื่อทดลองเพาะ เลี้ยงดูแล้วก็พบว่าจะไม่สามารถเจริญเติบโตหรือแบ่งตัวได้เหมือนเซลล์อื่นๆ

นอกจากการพบว่าการหลุดลอกออกมาของเซลล์บุหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียแล้ว การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าในผู้ป่วยดังกล่าวยังมีความผิดปกติของการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องโดยตรง กับเซลล์บุหลอดเลือด ได้แก่ vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งพบว่า cytokines ดังกล่าวมีระดับสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรค โดยที่ VEGF จะมีความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับ activity ต่างๆของ endothelial cells ซึ่งรวมถึง การเกิด angiogenesis in vivo ด้วย (15 - 17) และการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าระดับของ VEGF มีความสัมพันธ์กับจำนวน circulating endothelial cells อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า spearman correlation = 0.793 (p-value = < 0.0001)

หนังสืออ้างอิง

1. Sonakul D, Pacharee P, Laohapand T, Fucharoen S, Wasi P. Pulmonary artery obstruction in Thalassemia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1980; 11 : 516-523.
2. Sumiyoshi A, Thakerngpol K, Sonakul D. Pulmonary microthromboemboli in thalassemic cases. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992; 23 Suppl 2 : 29-31.
3. Esmon CT. The regulation of natural anticoagulant pathway. Science 1987; 235 : 1348-1352.
4. Rodgers GM. Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. FASEB J 1988; 2 : 116-123.
5. Sowemmimo – Coker SO, Meiselman HJ, Francis RB Jr. Increased circulating endothelial cells in sickle cell crisis. Am J Hematol 1989; 31 : 263-265.
6. George F, Toulon P, Sampol J, Sultan Y. Detection of high levels of circulating endothelial cells in patients with sickle cell crisis. Blood 1992; 80 : Suppl : 12a. Abstract.
7. Solovey A, Lin Y, Browne PV, Wayner E, Choong S, Hebbel RP. Phenotypic analysis of circulating endothelial cells reveals an activated endothelium in sickle cell anemia patients. Blood 1996; 88 : Suppl 1: 648a. Abstract.
8. Solovey A, Lin Y, Browne PV, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. N Engl J Med 1997; 337: 1584 – 1590.
9. Bouvier CA, Gaynor E, Cintron JR, Bernhardt B, Spaet TH. Circulating endothelium as an indication of vascular injury. Thromb Diath Haemorrh Suppl 1970; 40 : 163-168.
10. Butthep P, Bunyaratvej A, Kitaguchi H, Funahara Y, Fucharoen S. Interaction between endothelial cells and thalassemic red cells *in vitro*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992; 23 Suppl 2 : 101-104.
11. Bunyaratvej A, Funahara Y, Butthep P, Kitaguchi H, Fucharoen S. Thalassemic serum impairs endothelial cell growth *in vitro*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992; 23 Suppl 2 : 105-109.

12. Butthep P, Khuapinant A, Bunyaratvej A, Funahara Y, Kitaguchi H, Fucharoen S. Thalassemic serum inhibit endothelial cell mitosis in vitro. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997; 28 Suppl 3 : 155-160.
13. Butthep P, Bunyaratvej A, Funahara Y, Kitaguchi H, Fucharoen S, Sato S, Bhamarapavati N. Alteration in vascular endothelial cell –related plasma proteins in thalassemic patients and their correlation with clinical symptoms. *Thromb Haemost* 1995; 74(4): 1045-1049.
14. Butthep P, Bunyaratvej A, Funahara Y, Kitaguchi H, Fucharoen S, Sato S, Bhamarapavati N. The possible evidence of endothelial cell activation and disturbance in thalassemia : An in vitro study. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997; 28 Suppl 3 : 141-148a.
15. Harold F. Dvorak, Lawrence F. Brown, Micheal Detmar, and Ann M. Dvorak. Vascular permeability factor, vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J of Pathology* 1995; 140 (5) : 20-27.
16. Breier G, Risau W : The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol* 1996; 6 : 454-463.
17. Hirashima M, Kataoka H, Nishikawa S. Matsuyoshi N, and Nishikawa Si. Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis. *Blood* 1999; 93(4) : 1-11.

Output ที่ได้ :

ขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างเขียนต้นฉบับ หรือ manuscript ซึ่งชื่อเรื่องก็กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาให้สอดคล้องกับเนื้อหาของ paper และ Journal ที่จะส่งไปตีพิมพ์คือ American Journal of Hematology

ภาคผนวก

หมายเหตุ : manuscript กำลังอยู่ในระหว่างการเตรียมต้นฉบับเพื่อส่งไปตีพิมพ์
