PDF/21/2541-ดร. พรรณี บุตรเทพ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

ชื่อโครงการ : บทบาทเชิงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์บุหลอดเลือดที่หลุดลอยในกระแสเลือดกับกลไกการเกิดการอุดตันภายในหลอดเลือดของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย

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

ผศ. ดร. พรรณี บุตรเทพ และคณะ

30 มิถุนายน 2543

สัญญาเลขที่ PDF / 21 / 2541

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

ชื่อโครงการ :บทบาทเชิงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์บุหลอดเลือดที่หลุดลอยในกระแสเลือดกับกลไกการเกิดการอุดตันภายในหลอดเลือดของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย

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

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ. ดร. พรรณี บุตรเทพ	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี
2. น.ส. สุมาลี จินดาดำรงเวช	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี
3. น.ส. เรวดี วิเศษพานิชกิจ	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี
4. ศ. ดร. อานนท์ บุณยะรัตเวช	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgement)

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

บทคัดย่อ

Project Code : PDF / 21 / 2541

Project Title : บทบาทเชิงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์บุหลอดเลือดที่หลุดลอยในกระแสเลือดกับกลไกการเกิดการอุดตันภายในหลอดเลือด ของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

Investigators :

1. ผศ. ดร. พรรณี บุดรเทพ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี
2. น.ส. สุมาลี จินดาดำรงเวช ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี
3. น.ส. เรวดี วิเศษพานิชกิจ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี
4. ศ. ดร. อานนท์ บุณยะรัตเวช ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี

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

Project Period : 1 กรกฎาคม 2541 – 30 มิถุนายน 2543

Objective : เพื่อที่จะได้ความรู้ใหม่ว่าเซลล์บุหลอดเลือดในร่างกายผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียนั้นหลุดออกมาในกระแสเลือดจริงหรือไม่ และมีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติอย่างไร ซึ่งจะทำให้ทราบแนวทางที่นำไปสู่กลไก 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 : จากการศึกษาเซลล์บุหลอดเลือดที่หลุดลอยอยู่ในกระแสเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมียและคนปกติ พบว่ามีเซลล์บุหลอดเลือดหลุดลอยออกมาในกระแสเลือดของผู้ป่วยดังกล่าวมากกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ก็พบว่าเซลล์ที่แยกได้ดังกล่าวนี้ จะแสดงภาวะของความผิดปกติต่าง ๆ โดยพบว่ามีการ express endothelial cells adhesion molecules หลายชนิดที่จัดว่าเป็น marker ของ endothelial cells activation และ injury

Discussion Conclusion : การศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าในร่างกายของผู้ป่วยธาลัสซีเมียนั้น มีภาวะความผิดปกติภายในหลอดเลือดจริง และการที่พบว่ามีการหลุดลอยของเซลล์บุหลอดเลือดออกมาในกระแสเลือดมากกว่าคนปกติ 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

กิติกรรมประกาศ 2

บทคัดย่อภาษาไทย 3

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ 4

สารบัญเรื่อง 5

สารบัญตาราง 6

สารบัญภาพ 7

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ 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) จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง 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

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ

(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 และนอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาว่าเซลล์บุหลอดเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีความแปรปรวนหรือผิดปกติหรือไม่ โดยทำการตรวจสอบปริมาณของสารหลั่งต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับเซลล์บุหลอดเลือดซึ่งพบว่าสารเหล่านี้มีปริมาณแตกต่างจากคนปกติอันแสดงถึงความแปรปรวนและความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

การที่เกิดความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือดในผู้ป่วยนี้ เซลล์เหล่านี้น่าจะมีการหลุดออกมาจากผนังหลอดเลือดและสร้างปัญหาแทรกซ้อนขึ้นมาได้ จึงเป็นที่น่าสนใจว่าเซลล์บุหลอดเลือดในกระแสเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีจริงหรือไม่ถ้ามีจะทำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบการแข็งตัวของเลือดอย่างไร

การตรวจสอบการหลุดลอกของเซลล์บุหลอดเลือดจากผู้ป่วยธาลัสซีเมียก็จะเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการมี endothelial cell injury หรือ dysfunction ซึ่งอาจจะมีผลเกี่ยวข้องต่อการเกิด thrombosis ในร่างกายของผู้ป่วย ดังนั้นการตรวจสอบหาปริมาณและคุณสมบัติของเซลล์บุหลอดเลือดในร่างกายของผู้ป่วยจะทำให้สามารถประเมินสถานภาพของผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้โดยตรง และเป็นองค์ความรู้ใหม่ในบทบาทใหม่ของเซลล์บุหลอดเลือดซึ่งยังไม่ทราบกันมาก่อน

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 Wiebel 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 ก็จะนำมาศึกษาว่าเกิดจาก 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 ตรวจสอบความผิดปกติของเซลล์ที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดการอุดตันภายในหลอดเลือด เพิ่มเติมและสรุปผลการทดลองทั้งหมด

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 เซลล์บุหลอดเลือดจะเกี่ยวข้องกับ tissue reaction ที่สำคัญต่างๆ และเป็น targets สำหรับ injurious agents

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

ความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือดในผู้ป่วยนี้ จัดว่าเป็น major factor ที่เกี่ยวข้องกับ 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) โดยร่วมกับการใช้ 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