นิพนธ์ต้นฉบับ

การวินิจฉัยโรค Polycythemia Vera (PV) โดยวิธี colony assay[@]

สุรีย์ พีรภูติ[1]
ธราธร ธรรมประสิทธิ์[2]

Abstract:

Diagnostic use of colony assay in Polycythemia Vera (PV)

Peeraputi S, Thamprasit T.

Division of Hematology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,

Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand

Chiangmairam Hospital, Muang, Chiangmai, 50200, Thailand

Songkla Med J 2005;23(1):29-36

Objective: *To determine the autonomous proliferation of erythroid stem cells in in vitro colony formation in the diagnosis of PV.*

Materials and methods: *Bone marrow (15 ml) was collected from thirty-five patients with suspected of PV (Hct > 50%) from the Hematology Clinic of Songklanagarind Hospital between January 2000 and December 2003. Mononuclear cells were isolated for colony assay, cultured at $4x10^6$ cell/ml with and without erythropoietin in alpha modification media and fetal calf serum incubated at 37°C in 5% CO_2. Erythroid colonies were stained with benzidine and scored on the 7^{th} day of culture for the CFU-E (colony forming unit-erythroid) and on the 14^{th} day of culture for the BFU-E (burst forming unit-erythroid).*

[@]นำเสนอในงานประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 18 ระหว่างวันที่ 14-16 สิงหาคม พ.ศ. 2545 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้รับรางวัลรองชนะเลิศอันดับ 1 ประเภทโปสเตอร์

[1]วท.ม., หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

[2]พ.บ., ว.ว. (โลหิตวิทยา), ผู้ช่วยศาสตราจารย์ โรงพยาบาลเชียงใหม่ราม อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

รับต้นฉบับวันที่ 21 พฤษภาคม 2547 รับลงตีพิมพ์วันที่ 21 ธันวาคม 2547

Results: *Thirty-one of the 35 patients with PV showed spontaneous in vitro colony formation (CFU-E, BFU-E) by erythroid stem cells, and colony growth without the addition of exogenous erythropoietin in the culture - a common finding in myeloproliferative disorder. The other four patients with secondary erythrocytosis had no autonomous growth of in vitro colony formation.*

Conclusion: *The results showed a diagnostic use for autonomous proliferation of erythroid stem cells in in vitro colony formation (CFU-E, BFU-E) in PV, even though patients were treated with phlebotomy, and other secondary erythrocytosis could be separated from PV.*

Key words: *Polycythemia Vera, colony assay, CFU-E, BFU-E*

บทคัดย่อ:

วัตถุประสงค์: *เพื่อตรวจหา autonomous proliferation ของเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งให้ colony forming units ของเม็ดเลือดแดงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์มาช่วยในการวินิจฉัยโรค Polycythemia Vera (PV)*

วัสดุและวิธีการ: *ศึกษาย้อนหลังในผู้ป่วยที่สงสัยโรค PV โดยมีฮีมาโตคริท (Hct) มากกว่าร้อยละ 50 จากคลินิกโรคเลือด โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2543 - ธันวาคม พ.ศ. 2546 จำนวน 35 ราย โดยนำไขกระดูกของผู้ป่วยมาปั่นแยก mononuclear cell และนำไปทำ colony assay ใน alpha modification media และ fetal calf serum โดยใส่และไม่ใส่ตัวกระตุ้น erythropoietin นำไปเพาะเลี้ยงในตู้ CO_2 incubator 37° C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 7 วัน สำหรับ CFU-E (colony forming unit-erythroid) และ 14 วัน สำหรับ BFU-E (burst forming unit-erythroid) ครบกำหนด harvest cell ย้อมด้วย benzidine แล้วนำไปนับจำนวนโคโลนีด้วยกล้องจุลทรรศน์*

ผลการศึกษา: *จำนวนผู้ป่วยที่นำไขกระดูกมาทำ colony assay ทั้งหมด 35 ราย พบว่า 31 ราย ให้การเจริญของ CFU-E และ BFU-E ของเม็ดเลือดแดงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น erythropoietin วินิจฉัยได้ว่าผู้ป่วย 31 ราย เป็นโรค PV ส่วนอีก 4 ราย ไม่มี autonomous growth ของ CFU-E และ BFU-E วินิจฉัยได้ว่าผู้ป่วยเป็น secondary erythrocytosis*

สรุป: *การตรวจหา autonomous proliferation ของเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งให้ colony forming units ของเม็ดเลือดแดงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สามารถช่วยวินิจฉัยโรค PV ได้ ซึ่งมีข้อดีคือใช้ทดแทน red cell mass ได้ สามารถทำในช่วงที่ฮีมาโตคริทลดลงหลังเอาเลือดออก (phlebotomy) ได้ และช่วยแยกโรค PV ออกจาก secondary erythrocytosis อื่น ๆ ได้*

คำสำคัญ: *Polycythemia Vera, colony assay, CFU-E, BFU-E*

บทนำ

Polycythemia Vera (PV) เป็นโรคหนึ่งในกลุ่ม myeloproliferative disorders ซึ่งมีการสร้างเม็ดเลือดแดงในไขกระดูกเพิ่มขึ้น ความผิดปกติที่พบในผู้ป่วยโรค PV มีความสำคัญเพราะเป็นกลไกที่นำไปสู่การเกิด thrombosis bleeding และการเปลี่ยนแปลงทาง metabolism อื่น ๆ[1] การวินิจฉัยโรค PV ต้องอาศัยเกณฑ์การวินิจฉัยต่าง ๆ คือ การมีม้ามโต จำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือดมากกว่า 12,000/มม.^{3} จำนวนเกล็ดเลือดมากกว่า 400,000/มม.^{3} leukocyte alkaline phosphatase (LAP) score มากกว่า 100 O_2 saturation มากกว่า ร้อยละ 95 ร่วมกับการมี red cell mass เพิ่มขึ้น ปัญหาในการวินิจฉัยโรค PV คือ การทำ red cell mass ต้องใช้สาร radioisotope[2] ทำให้ยุ่งยากไม่สะดวก และถ้าทำในช่วงที่ผู้ป่วยมีฮีมาโตคริทลดลงหลังจากเอาเลือดออก (phlebotomy) อาจให้ผลปกติได้ และผู้ป่วยบางรายเกณฑ์การวินิจฉัยต่าง ๆ ไม่ครบถ้วน ทำให้ไม่สามารถวินิจฉัยแยกโรค PV ออกจาก erythrocytosis อื่น ๆ การทำ colony assay เพื่อตรวจหา colony forming unit-erythroid (CFU-E) ของ hematopoietic stem cell ช่วยในการวินิจฉัยโรค PV[5-10, 12-16] และแยกโรค PV ออกจาก erythrocytosis อื่น ๆ เนื่องจากผู้ป่วยโรค PV จะมี autonomous proliferation ของเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งให้ CFU-E ของเม็ดเลือดแดงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งแตกต่างจาก erythrocytosis อื่น ๆ

การศึกษาเรื่องการเพาะเลี้ยงเซลล์ CFU-E ได้มีการพัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์[3] จนไปสู่เทคนิคการเพาะเลี้ยง hematopoietic stem cell ของมนุษย์[4] Zanjani และคณะ[5] ได้ทำการศึกษาโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ CFU-E จากไขกระดูกผู้ป่วยโรค PV และคนปกติโดยใช้เทคนิค plasma clot culture system พบว่าจะเกิด endogenous erythroid colonies (EEC) ในผู้ป่วยโรค PV โดยไม่เติมตัวกระตุ้น erythropoietin แต่จะไม่เกิด EEC ในคนปกติ แต่ถ้าเติมตัวกระตุ้น erythropoietin ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของคนปกติ จะเกิด CFU-E Beckman และคณะ[6] ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ CFU-E จาก peripheral blood stem cell (PBSC) ของผู้ป่วยโรค PV และโรค Polycythemia อื่นๆ โดยใช้เทคนิค methylcellulose assay system พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยไม่เติมตัวกระตุ้น erythropoietin จะเกิด EEC ในผู้ป่วยโรค PV แต่ไม่เกิด EEC ในผู้ป่วยโรค Polycythemia อื่นๆ แม้ว่าจะเติมตัวกระตุ้น erythropoietin ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของผู้ป่วยโรค Polycythemia อื่นๆ ก็ไม่มีการเจริญของ CFU-E เช่นกัน ต่อมา Juvonen และคณะ[7] ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ CFU-E จากไขกระดูกผู้ป่วยโรค PV, secondary erythrocytosis และ erythrocytosis อื่นๆ โดยใช้ methylcellulose assay system พบว่าจะเกิด EEC ในผู้ป่วยโรค PV ทุกราย แต่ไม่มี autonomous growth ในผู้ป่วย โรค secondary erythrocytosis และ erythrocytosis อื่นๆ

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำวิธีการทำ colony assay[4, 5] เพื่อตรวจหา autonomous proliferation ของเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งให้ CFU-E และ BFU-E ของเม็ดเลือดแดงในถาดเพาะเชื้อมาช่วยในการวินิจฉัยโรค PV และแยกโรค PV ออกจาก erythrocytosis อื่นๆ

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างตรวจ: เลือกผู้ป่วยที่สงสัยโรค PV ที่มีฮีมาโตคริทมากกว่าร้อยละ 50 จากคลินิกโรคเลือด โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2543 - ธันวาคม พ.ศ. 2546 จำนวน 35 ราย โดยนำไขกระดูก (bone marrow aspiration) ของผู้ป่วยประมาณ 15 มล. ใส่สารกันเลือดแข็งเฮพาริน (500 ยูนิต/มล.) ต่อไขกระดูกในอัตราส่วน 1:20 โดยเทคนิคสะอาดปลอดเชื้อ

2. วิธีการศึกษา: ทุกขั้นตอนต้องใช้เทคนิคสะอาดปลอดเชื้อทำในตู้ larminar flow

2.1 การแยก mononuclear cell: (ดัดแปลงจาก Mac Donald C[11]) นำไขกระดูกผู้ป่วย 15 มล. มาปั่นแยก mononuclear cell โดยผสม RPMI with 2% FCS (heat inactivated fetal calf serum) ในอัตราส่วน ไขกระดูก : RPMI with 2% FCS เท่ากับ 1 : 3 แล้วใช้ไปเปตต์แก้วดูดปล่อยผสมให้เข้ากัน ดูดส่วนผสมจำนวน 20 มล. ค่อยๆ ปล่อยบนผิวหน้าของตัวกลาง Ficoll-Hypaque density gradient 10 มล. โดยเอียงหลอดที่มี Ficoll-Hypaque 10 มล. เอียงประมาณ 45 องศา ปล่อยส่วนผสมจนครบ 20 มล. ปิดฝาหลอดให้แน่น นำไปปั่นด้วยความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ดูด mononuclear cell ที่ได้ล้างด้วย RPMI with 2% FCS อีก 2 ครั้ง โดยปั่นที่ความเร็ว 1,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และ 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ นำ mononuclear cell ที่ได้ ทำให้เป็น cell solution จำนวน $4x10^6$ เซลล์/มม.^{3} ด้วย α- MEM (alpha modification media) แล้วนำไปทำ colony assay

2.2 การทำ colony assay: นำ cell solution ที่ได้ $4x10^6$ เซลล์/มล. ไปทำ colony assay ดังตารางที่ 1 โดยการศึกษามีการเปรียบเทียบการใส่และไม่ใส่ตัวกระตุ้น erythropoietin (EPO)

ตารางที่ 1 ขั้นตอนการทำ colony assay (ดัดแปลงจาก Tepperman และคณะ[4])

Colony forming unit / ml	CFU-E (-EPO)	CFU-E (+EPO)	BFU-E (-EPO)	BFU-E (+EPO)
Alpha modification media (α-MEM)	0.9	0.5	0.9	0.5
Heat inactivated fetal calf serum (FCS)	0.6	0.6	0.6	0.6
10% bovine serum albumin (BSA)	0.2	0.2	0.2	0.2
10 iu/ml erythropoietin (EPO)	-	0.4	-	0.4
Incubate 37°C				
3% agar	0.2	0.2	0.2	0.2
Cell solution ($4x10^6$ cell/ml)	0.1	0.1	0.1	0.1

(-EPO: ไม่ใส่ erythropoietin, +EPO: ใส่ erythropoietin, CFU-E: colony forming unit-erythroid, BFU-E: burst forming unit-erythroid)

นำส่วนผสมแต่ละหลอดการทดลองหยอดใส่ sterile petri dish เล็ก (ขนาด 35x10 มม.) จำนวน 0.5 มล. ต่อหนึ่ง petri dish โดยค่อยๆ ปล่อยส่วนผสมให้เป็นรูปวงกลมตรงกลาง petri dish ใช้ petri dish 3 อันต่อส่วนผสม 1 หลอด ตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วเติม 0.5 มล. α- MEM with 10% FCS ลงข้างๆ ส่วนผสมที่แข็งตัวแล้ว แล้วนำ petri dish เล็กใส่ใน petri dish ใหญ่ (ขนาด 90 มม.) นำ petri dish เล็กอีกอันใส่น้ำสะอาดวางใน petri dish ใหญ่ ปิดฝาแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้ CO_2 incubator 37°C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 7 วัน สำหรับ CFU- E และ 14 วันสำหรับ BFU-E

2.3 Drying, Fixing and Staining: ครบกำหนดเพาะเลี้ยงเซลล์ 7 วัน และ 14 วัน harvest cell ใส่บนแผ่นสไลด์แก้ว แล้วซับให้แห้งด้วยแผ่น cellulose acetate และกระดาษกรองเบอร์ 5 แล้วนำไปทำ fixing ด้วย 5% glutaraldehyde แล้วย้อมด้วย 3% benzidine และ counter stain ด้วย hematoxylin นำไปอ่านผลโดยนับจำนวนโคโลนีด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลการศึกษา

ผู้ป่วยที่สงสัยโรค PV ที่นำไขกระดูกมาทำ colony assay จำนวน 35 ราย พบว่าผู้ป่วย 31 ราย (ลำดับที่ 1-31 ในตารางที่ 2) ผล colony assay ให้การเจริญของ CFU-E และ BFU-E ของเม็ดเลือดแดงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น erythropoietin คือเกิด endogenous erythroid colonies (EEC) ซึ่งแยกเป็นเพศชาย 12 ราย เพศหญิง 19 ราย (ดังตารางที่ 3, 4) อายุเฉลี่ยที่ 63 ปี (41-86 ปี) และ 60 ปี (41-80 ปี) ตามลำดับ และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ ดังนี้ ในเพศชายมีค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบิน 18.9 กรัม/ดล. (15.9-22.4 กรัม/ดล.), ฮีมาโตคริท ร้อยละ 59.3 (ร้อยละ 51-72), จำนวนเม็ดเลือดขาว 24.8x10^3/มม.^{3} (9.2x10^3-50.4x10^3/ มม.^{3}), จำนวนเกล็ดเลือด 706x10^3/มม.^{3} (207x10^3-1,235x10^3/ มม.^{3}) และเพศหญิงมีค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบิน 18.2 กรัม/ดล. (15.6-22 กรัม/ดล.), ฮีมาโตคริท ร้อยละ 58.7 (ร้อยละ 52-68), จำนวนเม็ดเลือดขาว 21.2 x10^3/มม.^{3} (6.9x10^3-56.6 x10^3/ มม.^{3}), จำนวนเกล็ดเลือด 716x10^3/มม.^{3} (329x10^3-1,564x 10^3/มม.^{3}) ซึ่งผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยทั้ง 31 ราย ดังตารางที่ 3 พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่มีเกณฑ์การวินิจฉัยในการวินิจฉัยโรค Polycythemia Vera ตามที่กำหนดของ PVSG (Polycythemia Vera Study Group) ครบหลายข้อ ยกเว้นผู้ป่วยรายที่ 1, 12, 15, 16, 25, 29 และ 30 ที่ยังมีข้อมูลในการวินิจฉัยไม่ครบ แต่ผลการทำ colony assay ของผู้ป่วยทั้ง 31ราย ให้ EEC เป็นผลบวก ซึ่งสามารถนำมาช่วยวินิจฉัยโรคให้กับผู้ป่วยที่มีเกณฑ์การวินิจฉัยไม่ครบตามที่กำหนดของ PVSG ดังนั้น จึงวินิจฉัยได้ว่าผู้ป่วยทั้ง 31 รายนี้เป็นโรค Polycythemia Vera

ตารางที่ 2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย

ลำดับผู้ป่วย	จำนวนโคโลนี/1x10^5 เซลล์ (Mean ± SD;n = 3)			
	CFU-E (-EPO)	CFU-E (+EPO)	BFU-E (-EPO)	BFU-E (+EPO)
1	333 ± 20	959 ± 24	158 ± 50	894 ± 57
2	16 ± 1	146 ± 5	4 ± 4	108 ±7
3	42 ± 34	125 ± 12	8 ± 3	30 ± 6
4	5 ± 1	21 ± 5	38 ± 2	271 ± 8
5	236 ± 8	342 ± 25	213 ± 17	402 ± 29
6	143 ± 6	291 ± 26	162 ± 7	248 ± 17
7	193 ± 12	535 ± 27	262 ± 20	385 ± 5
8	109 ± 6	365 ± 15	124 ± 13	483 ± 10
9	62 ± 8	289 ± 8	130 ± 10	215 ± 19
10	130 ± 10	310 ± 10	155 ± 5	377 ± 15
11	102 ± 8	150 ± 10	93 ± 8	353 ± 15
12	194 ± 14	448 ± 33	184 ± 12	430 ± 20
13	214 ± 31	243 ± 16	27 ± 4	33 ± 6
14	380 ± 11	430 ± 20	176 ± 17	173 ± 6
15	108 ± 5	226 ± 12	41 ± 2	51 ± 2
16	13 ± 2	50 ± 4	11 ± 2	16 ± 2
17	85 ± 9	186 ± 15	86 ± 6	174 ± 14
18	55 ± 4	181 ± 8	21 ± 7	67 ± 16
19	19 ± 2	169 ± 9	7 ± 2	43 ± 4
20	164 ± 7	211 ± 18	73 ± 8	178 ± 9
21	18 ± 2	52 ± 7	17 ± 2	38 ± 10
22	82 ± 6	161 ± 6	21 ± 1	131 ± 13
23	69 ± 8	76 ± 7	29 ± 7	23 ± 1
24	10 ± 1	37 ± 4	34 ± 7	60 ± 4
25	12 ± 2	34 ± 12	9 ± 1	16 ± 3
26	13 ± 2	15 ± 2	10 ± 1	24 ± 6
27	39 ± 8	261 ± 28	10 ± 6	68 ± 3
28	7 ± 2	24 ± 4	8 ± 3	17 ± 2
29	17 ± 2	16 ± 4	19 ± 3	19 ± 1
30	112 ± 9	158 ± 7	26 ± 1	39 ± 5
31	103 ± 7	138 ± 5	56 ± 7	111 ± 10
32	0	86 ± 10	0	39 ± 10
33	0	127 ± 4	0	10 ± 3
34	0	239 ± 21	0	210 ± 5
35	0	257 ± 15	0	233 ± 13

ส่วนผู้ป่วยอีก 4 ราย (ลำดับที่ 32-35 ในตารางที่ 2 และ 4) ผลการทำ colony assay ไม่มี autonomous growth ของ CFU-E และ BFU-E คือไม่เกิด EEC ผู้ป่วยทั้ง 4 ราย เป็นเพศชาย มีอายุเฉลี่ย 68 ปี (44-69 ปี) ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ ดังนี้ ค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบิน 17.5 กรัม/ดล. (15.5-18.3 กรัม/ดล.), ฮีมาโตคริท ร้อยละ 53.2 (ร้อยละ 50-56), จำนวนเม็ดเลือดขาว $6.5x10^3$/มม.^{3} ($4.7x10^3$-$7.8x10^3$/มม.^{3}), จำนวนเกล็ดเลือด $247x10^3$/มม.^{3} ($169x10^3$-$335x10^3$/มม.^{3}) ซึ่งผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ดังตารางที่ 3 ผู้ป่วยทั้ง 4 ราย คือ ลำดับที่ 32, 33, 34, 35 มีเกณฑ์การวินิจฉัยไม่ครบตามที่กำหนดของ PVSG และผลการทำ colony assay พบว่า ไม่เกิด autonomous growth ของ erythroid colony คือให้ EEC เป็นผลลบ จึงวินิจฉัยได้ว่าผู้ป่วยทั้ง 4 ราย เป็น secondary erythrocytosis แต่ถ้าใส่ตัวกระตุ้น erythropoietin พบว่า ผู้ป่วยทั้ง 35 ราย มีการเจริญของ CFU-E และ BFU-E ดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 3 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดแดงและข้อมูลทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วย

ลำดับผู้ป่วย	อายุ (ปี)	เพศ	Hb (g/dl)	Hct (%)	WBC ($x10^3$)	Platelets ($x10^3$)	O_2 Sat (%)	LAP Score	Splenomegaly	EEC
1	63	M	20	65	20.3	885	ND	99	-	+
2	55	M	16.7	53	21.5	991	97	324	-	+
3	50	F	18.4	58	9.4	489	96	220	+	+
4	49	F	15.6	54	26.2	1,564	ND	ND	+	+
5	44	F	17.1	53	19.7	896	96.1	ND	+	+
6	60	F	16.5	52	24.1	678	96	301	-	+
7	56	F	22	67	13.0	486	94	251	+	+
8	60	M	18	57	50.4	886	95	ND	+	+
9	72	M	21	67	27.9	487	95	216	-	+
10	41	F	19	60	28.4	785	ND	ND	-	+
11	58	F	15.6	55	30.6	1,157	ND	289	+	+
12	54	F	20	67	9.0	329	ND	ND	+	+
13	53	M	18	57	21.0	756	ND	ND	+	+
14	72	M	20	61	40.0	664	97	ND	-	+
15	54	F	18.6	57	9.7	461	ND	243	-	+
16	68	M	16.9	53	9.2	207	97	ND	-	+
17	69	F	16.3	54	29.0	401	ND	ND	+	+
18	70	F	18.8	56	24.5	704	ND	234	-	+
19	79	F	19.2	61	13.6	432	97	155	-	+
20	62	F	19.3	68	32.4	478	ND	255	+	+
21	64	M	15.9	51	16.4	1,235	98	210	+	+
22	71	M	18.5	55	20.5	696	ND	306	+	+
23	53	M	22.4	72	24	608	ND	267	+	+
24	63	F	16.8	52	14	841	ND	235	-	+
25	67	F	18.8	61	6.9	381	96	ND	-	+
26	69	F	16.9	54	22.3	1,398	ND	205	-	+
27	67	F	20.4	65	12.5	341	96.9	217	+	+
28	60	F	20	65	22.3	715	94	218	-	+
29	41	M	20.7	62	10	233	95.7	ND	-	+
30	86	M	19.2	59	36.5	824	ND	ND	-	+

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับผู้ป่วย	อายุ (ปี)	เพศ	Hb (g/dl)	Hct (%)	WBC ($x10^3$)	Platelets ($x10^3$)	O_2 Sat (%)	LAP Score	Splenomegaly	EEC
31	80	F	16.7	57	56.6	1,070	ND	301	-	+
32	57	M	17.9	54	7.8	225	97.2	ND	-	-
33	44	M	18.3	53	6.6	335	97.7	ND	-	-
34	62	M	15.6	50	6.7	257	ND	23	-	-
35	69	M	18.3	56	4.7	169	ND	98	-	-

(ND: not done, EEC: endogenous erythroid colonies)

ตารางที่ 4 สรุปผลการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดแดง และข้อมูลทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วย

Colony Culture	เพศ	อายุ (ปี)	Hb (g/dl)	Hct (%)	WBC ($x10^3$)	Platelet ($x10^3$)	Raised O_2 sat	Raised LAP	Splenomegaly
EEC (+ Ve)	M (n=12)	63 (41-86)	18.9 (15.9-22.4)	59.3 (51-72)	24.8 (9.2-50.4)	706 (207-1,235)	7/12	5/12	5/12
EEC (+ Ve)	F (n=19)	60 (41-80)	18.2 (15.6-22)	58.7 (52-68)	21.2 (6.9-56.6)	716 (329-1,564)	7/19	13/19	9/19
EEC (- Ve)	M (n=4)	68 (44-69)	17.5 (15.6-18.3)	53.2 (50-56)	6.5 (4.7-7.8)	247 (169-335)	2/4	0	0

วิจารณ์

จากการทำ colony assay จากไขกระดูกผู้ป่วยที่สงสัยโรค PV ที่มีฮีมาโตคริทมากกว่าร้อยละ 50 จำนวน 35 ราย พบว่าจะเกิด autonomous proliferation ของเซลล์ต้นกำเนิด (EEC) จำนวน 31 ราย โดยไม่เติมตัวกระตุ้น erythropoietin ส่วนอีก 4 ราย ไม่เกิด autonomous growth ของ CFU-E และ BFU-E แต่เมื่อเติมตัวกระตุ้น erythropoietin จะมีการเจริญของ CFU-E และ BFU-E ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของคณะต่าง ๆ[7-9] ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์จากไขกระดูกผู้ป่วยโรค PV จะเกิด EEC ส่วนผู้ป่วยโรค secondary erythrocytosis จะไม่เกิด EEC ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และผู้ป่วย 31 ราย ที่เกิด EEC นั้น มีผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ คือ มีฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริทสูง และมีเม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดสูงเกินค่าปกติ ซึ่งเข้าได้กับเกณฑ์การวินิจฉัยของโรค PV จึงวินิจฉัยได้ว่าผู้ป่วย 31 รายนี้เป็นโรค PV ส่วนผู้ป่วยอีก 4 รายที่ไม่เกิด EEC และมีผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ คือ มีค่าฮีโมโกลบิน และฮีมาโตคริทสูง แต่เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด อยู่ในค่าปกติ จึงวินิจฉัยได้ว่าผู้ป่วยทั้ง 4 รายนี้เป็น secondary erythrocytosis

การศึกษาครั้งนี้ใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์จากไขกระดูกผู้ป่วย เนื่องจากว่าในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ไขกระดูกผู้ป่วยจะเกิด EEC ในผู้ป่วยโรค PV ทุกราย แต่ถ้าใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์จาก peripheral blood stem cell (PBSC) ของผู้ป่วยอาจจะไม่เกิด EEC ในผู้ป่วยโรค PV บางราย ทำให้การวินิจฉัยโรค PV ผิดพลาดได้ดังการทดลองของ Weinberg และคณะ[10] ที่ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ CFU-E จากไขกระดูกและ PBSC ของผู้ป่วยโรค PV 14 ราย พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ไขกระดูกจะเกิด EEC ในผู้ป่วยโรค PV ทั้ง 14 ราย แต่การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ PBSC พบว่าจะเกิด endogenous colonies ของ BFU-E แค่ 8 ราย จากผู้ป่วยโรค PV 14 ราย ส่วนผู้ป่วยโรค erythrocytosis อื่น ๆ และคนปกติไม่มี autonomous growth ของ CFU-E ดังนั้น การทำ colony assay เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรค PV และแยกโรค PV ออกจาก erythro-

cytosis อื่น ๆ จึงจำเป็นต้องใช้ไขกระดูกจากผู้ป่วยมาเพาะเลี้ยงเซลล์ CFU-E ซึ่งช่วยให้การวินิจฉัยโรค PV ได้ถูกต้องแม่นยำ

การทำ colony assay เพื่อตรวจหา autonomous proliferation ของเซลล์ต้นกำเนิด (การเกิด EEC) ช่วยในการวินิจฉัยโรค PV ได้ ซึ่งมีข้อดีคือใช้ทดแทน red cell mass ได้ เนื่องจากปัญหาของการทำ red cell mass ถ้าทำในช่วงที่ผู้ป่วยมีฮีมาโตคริทลดลง (ต่ำกว่าร้อยละ 60) หลังจากเอาเลือดออก (Phlebotomy) อาจให้ผลปกติได้[22, 23] แต่การทำ colony assay สามารถทำในช่วงที่ผู้ป่วยมีฮีมาโตริทลดลงหลังจากเอาเลือดออกได้ดังการศึกษาของคณะต่าง ๆ[5-7, 24] ซึ่งศึกษาการทำ colony assay จากผู้ป่วยโรค PV ที่ได้รับการรักษาโดยการเอาเลือดออก พบว่าให้ผลบวกของ EEC และวิธีการตรวจนี้ยังช่วยแยกโรค PV ออกจาก secondary erythrocytosis อื่น ๆ[7-9, 17-21] การนำ colony assay ที่ให้ผลบวกของ EEC มาช่วยวินิจฉัยโรค PV มีประโยชน์มาก โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีเกณฑ์การวินิจฉัยต่าง ๆ ไม่ครบถ้วนตามที่กำหนดของ PVSG จากการทดลองนี้มีผู้ป่วย 7 ราย ที่มีเกณฑ์การวินิจฉัยต่าง ๆ ไม่ครบถ้วนตามที่กำหนดของ PVSG แต่ให้ผลบวกของ EEC จึงวินิจฉัยได้ว่าเป็นโรค PV อย่างไรก็ตาม การตรวจวิธีนี้ยังมีข้อจำกัด คือ ข้อมูลในปัจจุบันก็ยังพบว่าการตรวจวิธีนี้มิใช่วิธีที่เหมาะสมที่สุดในการวินิจฉัยโรค PV เนื่องจากแม้เป็นผลลบ (negative result) ก็ไม่สามารถแยกโรค PV (exclude PV) ออกไปได้[21, 22] ดังการศึกษาของ Zwicky และคณะ[21] ซึ่งศึกษาจาก PBSC พบว่าผู้ป่วยโรค PV 38 รายให้ผลบวกของ EEC 29 ราย และให้ผลลบ (negative result) ของ EEC 9 ราย จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมจาก PBSC เปรียบเทียบกับการใช้ไขกระดูกเพื่อให้ข้อมูลสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

การทำ colony assay เป็นวิธีที่ต้องใช้ทักษะและความชำนาญเฉพาะ ข้อที่ควรระมัดระวังคือ ทุกขั้นตอนต้องใช้เทคนิคสะอาดปลอดเชื้อ การแยก mononuclear cell ต้องระวังมากในการปล่อยส่วนผสมลงบนผิวหน้าของ Ficoll-Hypaque ถ้าปล่อยเร็วไปจะทำให้ส่วนผสมไปรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกับ Ficoll-Hypaque ทำให้แยก mononuclear cell ไม่ได้ agar ต้องทำให้ปลอดเชื้อ (autoclaved) และต้มให้เดือดก่อนใส่ในหลอดทดลองที่มี media ถ้าร้อนเกินไปทำให้เซลล์ตาย และถ้าเย็นเกินไปจะทำให้ agar จับตัวกันเป็นเม็ดเจล และหลอดที่ใส่ media ต้องแช่ใน water bath 37°C ตลอดเวลา ไปเปตต์แก้วจะต้องตัดปลายออกเพื่อให้ส่วนผสมที่มี agar ไหลผ่านได้ ส่วนผสมที่หยอดลงบน petri dish ต้องเป็นรูปวงกลมอยู่ตรงกลาง ถ้าติดขอบจะทำให้เซลล์เจริญไม่ดี ภายในตู้ CO_2 incubator ต้องใส่ถาดน้ำสะอาดไว้ส่วนล่างและไม่ให้แห้ง ดูแลตู้ CO_2 incubator ให้สะอาดไม่ให้ขึ้นเชื้อรา

สรุป

การทำ colony assay จากไขกระดูกผู้ป่วยเพื่อตรวจหา autonomous proliferation ของเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งให้ colony forming units ของเม็ดเลือดแดงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ สามารถช่วยวินิจฉัยโรค PV ได้ ซึ่งมีข้อดีคือใช้ทดแทน red cell mass ได้ สามารถทำในช่วงที่ผู้ป่วยมีฮีมาโตคริทลดลงหลังจากเอาเลือดออกได้ (phlebotomy) และยังช่วยแยกโรค PV ออกจาก secondary erythrocytosis อื่น ๆ ได้ ดังนั้นการใช้ colony assay มาช่วยในการวินิจฉัยโรค PV จึงมีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรค PV มาก โดยเฉพาะในกรณีที่ผู้ป่วยมีเกณฑ์การวินิจฉัยต่าง ๆ ไม่ครบถ้วน แต่การตรวจวิธีนี้ก็มีข้อจำกัดคือการเกิดผลลบของ EEC ก็ไม่สามารถแยกโรค PV ออกไปได้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป โดยใช้ PBSC เปรียบเทียบกับการใช้ไขกระดูกเพื่อให้ข้อมูลสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. อภิชัย ลีละสิริ, ถนอมศรี ศรีชัยกุล. Polycythemia Vera and primary erythrocytosis. ใน: ถนอมศรี ศรีชัยกุล, แสงสุรีย์ จูฑา, บรรณาธิการ. ตำราโลหิตวิทยาการวินิจฉัยและการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ ที.พี.พริ้นท์; 2537:346-65.
2. Balga I, Solenthaler M, Furlan M. Should whole body red cell mass be measured or calculated. Blood Cells Mol Dis 2000;26:25-31; discussion 32-36.
3. Mcleod DL, Shreeve MM, Axelrad AA. Improved plasma culture system for production of erythrocytic colonies *in vitro*: quantitative assay method for CFU-E. Blood 1974;44:517-34.
4. Tepperman AD, Curtis JE, McCulloch EA. Erythropoietic colonies in cultures of human marrow. Blood 1974;44:659-69.
5. Zanjani ED, Lutton JD, Hoffman R, Wasserman LR. Erythroid colony formation by polycythemia vera bone marrow *in vitro*. J Clin Invest 1977;59:841-8.
6. Beckman BS, Anderson WF, Beltran GS, Beckman EN, Fisher JW. Diagnostic use of CFU-E formation from peripheral blood in polycythemia vera. Am J Clin Pathol 1983;79:496-9.

7. Juvonen E, Partanen S, Ikkala E, Ruutu T. Megakaryocytic colony formation in polycythemia vera and secondary erythrocytosis. Br J Haematol 1988;69: 441-4.
8. Lemoine F, Najman A, Baillou C, Stachowiak J, Boffa G, Aegerter P, et al. A prospective study of the value of bone marrow erythroid progenitor cultures in polycythemia. Blood 1986;68:996-1002.
9. Partanen S, Juvonen E, Ikkala E, Ruutu T. Spontaneous erythroid colony formation in the differential diagnosis of erythrocytosis. Eur J Haematol 1989;42: 327-30.
10. Weinberg RS, Worsley A, Gilbert HS, Cuttner J, Berk PD, Alter BP. Comparison of erythroid progenitor cell growth in vitro in polycythemia vera and chronic myelogenous leukemia: only polycythemia vera has endogenous colonies. Leuk Res 1989;13:331-8.
11. MacDonald C. Primary culture and the establishment of cell lines. In: Davis JM, editor. Basic cell culture: a practical approach. New York: Oxford University Press, 1994;151-2.
12. Horland A, Ludman S, Murphy MJ, Moore MAS. Proliferation of erythroid colonies in semi-solid agar. Br J Haematol 1977;36:495-9.
13. Shih LY, Lee CT. Identification of masked polycythemia vera from patients with idiopathic marked thrombocytosis by endogenous erythroid colony assay. Blood 1994;83:744-8.
14. Westwood NB, Pearson TC. Diagnostic applications of haemopoietic progenitor culture techniques in polycythaemias and thrombocythaemias. Leukaemia and Lymphoma 1996;22:95-103.
15. Ciaudo M, Hadjez JM, Teyssandier I, Coly E, Zittoun R, Marie JP. Prognostic and diagnostic value of endogenous erythroid colony formation in essential thrombocythemia. Hematol Cell Ther 1998;40:171-4.
16. Shih LY, Lee CT, See LC, Ou YC, Dunn P, Wang PN, et al. *In vitro* culture growth of erythroid progenitors and serum erythropoietin assay in the differential diagnosis of polycythaemia. Eur J of Clin Invest 1998; 28:569-76 .
17. Lacombe C, Casadevall N, Varet B. Polycythemia vera: *in vitro* studies of circulating erythroid progenitors. Br J Haematol 1980;44:189-99.
18. Partanen S. Spontaneous erythroid colony formation in erythrocytosis. Acta Med Scand 1983;214:159-63.
19. Eridani S, Sawyer B, Pearson TC. Patterns of *in vitro* BFU-E proliferation in different forms of polycythaemia and in thrombocythaemia. Eur J Haematol 1987;38: 363-9.
20. Casadevall N, Lacombe C, Varet B. Erythroid cultures and erythropoietin assay. Clinical and diagnostic value. Nouv Rev Fr Hematol 1990;32:77-81.
21. Zwicky C, Theiler I, Zharen K, Ischi E, Tobler A. The predictive value of clonogenic stem cell assays for the diagnosis of polycythemia vera. Br J Haematol 2002;117:598-604.
22. Tefferi A. Polycythemia Vera: a complehensive review and clinical recommendations. Mayo Clin Proc 2003; 78:174-94.
23. Berlin N. Diagnosis and classification of polycythemia. Semin Haematol 1976;12:351-99.
24. Andreasson B, Swolin B, Kutti J. Patients with idiopathic myelofibrosis show increased CD 34^{+} cell concentrations in peripheral blood compared to patients with polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. Eur J Haematol 2002;68:189-93.