

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเลือดต่อการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดที่วิเคราะห์โดย flow cytometry

อัญชลี เทศสวัสดิ์, อรทัย ทะก่า, รจิตา กันยาบุญ และ วันชัย วนะชีวนาวิน

สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ : การวิจัยนี้ศึกษาถึงผลของระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเลือดต่อการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดงและแกรนูโลไซต์ (granulocyte) โดยใช้ flow cytometry เพื่อตรวจหาเม็ดเลือดที่ขาด CD59 (PNH cell) โดยการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดงที่ใช้ EDTA และ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง และการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนแกรนูโลไซต์ที่ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง ตัวอย่างเลือดที่นำมาศึกษาได้มาจากคนปกติ, ผู้ป่วย aplastic anemia (AA), ผู้ป่วย myelodysplastic syndrome (MDS), ผู้ป่วย lymphoma กลุ่มละ 10 ราย และผู้ป่วย paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) 13 ราย ทำการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดที่มีการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดงและแกรนูโลไซต์ (%CD59 positive erythrocyte และ %CD59 positive granulocyte) ไม่พบความแตกต่างกันของเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวในแต่ละช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (paired t-test, $p > 0.05$) แต่พบว่า %CD59 positive granulocyte บางตัวอย่างเลือดที่เก็บไว้นาน 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ต่างไปจากตัวอย่างเลือดที่ตรวจ ภายใน 24 ชั่วโมง ($>1\%$) เมื่อวิเคราะห์ %CD59 positive erythrocyte โดยใช้สารกันเลือดแข็ง EDTA เปรียบเทียบกับ heparin พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (t-test, $p > 0.05$) ดังนั้นสรุปได้ว่าตัวอย่างเลือดที่ใช้ EDTA หรือ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งเหมาะสมสำหรับส่งวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดงยังห้องปฏิบัติการต่างสถานที่ โดยระยะเวลาของการเก็บเลือดจนถึงเวลาวิเคราะห์ไม่เกิน 48 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนแกรนูโลไซต์นั้น สารกันเลือดแข็งที่เหมาะสมคือ heparin และควรทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง หลังการเก็บตัวอย่างเลือด ทั้งนี้ปริมาณเลือดที่ต่ำที่สุดที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 2 มิลลิลิตร

Key Words : ● Blood storage ● CD59 expression ● Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2548;15:233-46.

ได้รับต้นฉบับ 8 มิถุนายน 2548 ให้ลงตีพิมพ์ 10 กรกฎาคม 2548

ต้องการสำเนาต้นฉบับกรุณาติดต่อ ศ.นพ.วันชัย วนะชีวนาวิน สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) เป็น acquired chronic hemolytic anemia ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของผนังเม็ดเลือดแดง^{1,2} ที่มีผลมาจากความบกพร่องในการแสดงออกของ GPI-anchored proteins ได้แก่ CD55 (decay accelerating factor หรือ DAF), CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis หรือ MIRL) DAF และ MIRL ทำหน้าที่ควบคุมปฏิกิริยาการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ (complement)^{1,3,6} ดังนั้นการหายไปของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ทำให้เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย PNH มีความไวต่อ complement^{3,7} ทำให้เกิดภาวะ intravascular hemolysis การขาดหายไปของ GPI-anchored proteins ที่ผนังเม็ดเลือด ในคนไข้ PNH เป็นผลมาจากความบกพร่องในการสังเคราะห์ GPI-anchor ของเม็ดเลือด¹ โดยความบกพร่องดังกล่าวเป็นผลมาจาก somatic mutation ของ PIG-A ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บน X-chromosome มีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยาแรกของการสังเคราะห์ GPI-anchor^{4,8} นอกจากนี้การพบภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ เกร็ดเลือดต่ำในผู้ป่วย PNH ตลอดจนความสัมพันธ์ของโรคนี้กับโรคหรือความผิดปกติทาง stem cell ได้แก่ aplastic anemia, myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia และ myeloproliferative syndrome แสดงว่า PNH เป็นโรคของ stem cell ที่มีผลต่อเม็ดเลือดทุกชนิด (clonal hematologic disorder)^{9,10}

ลักษณะและอาการทางคลินิกที่สำคัญของ PNH ได้แก่ intravascular hemolysis, bone marrow failure และ thrombosis¹¹ การวินิจฉัยโรค PNH ต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่แม่นยำและเชื่อถือได้ การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ช่วยในการวินิจฉัย PNH มีหลายการทดสอบ โดยการตรวจส่วนใหญ่จะเป็นการทดสอบความไวของเม็ดเลือดแดงต่อคอมพลีเมนต์ เช่น Ham's test (acidified serum lysis test) และ sugar

water test (sucrose hemolysis test)^{3,7} อย่างไรก็ตามการตรวจดังกล่าว มีข้อจำกัด คือ สามารถตรวจได้บนเม็ดเลือดแดงเท่านั้น นอกจากนี้การทดสอบนี้ไม่จำเพาะต่อ PNH และขั้นตอนการทำให้ไม่สามารถประยุกต์ใช้ได้หลังจากผู้ป่วยได้รับเลือด³ ต่อมาได้มีการพัฒนาการตรวจกรองอื่นสำหรับ PNH ได้แก่ monoclonal antibody gel technique (PNH gel test)^{1,12} เพื่อตรวจหาเม็ดเลือดแดง PNH ที่มีการขาดหายไปของ GPI-anchor อย่างสมบูรณ์ โดยวิธี PNH gel test นี้สามารถใช้ตรวจดูความบกพร่องของ CD55 และ CD59 บนเม็ดเลือดแดงได้ในผู้ป่วย PNH แต่วิธีนี้ก็ยังมีความไวไม่มากนักและไม่สามารถตรวจหา GPI-deficient clone ที่พบในปริมาณน้อยๆ ได้

ในปัจจุบันได้มีการนำ flow cytometry ร่วมกับ monoclonal antibodies มาใช้ในการทดสอบดูการขาดหายไปของ GPI-anchored proteins เช่น CD59, CD48 และ CD55 ในเม็ดเลือดของผู้ป่วย PNH (PNH cell)^{2,5} เนื่องจากมีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ดีกว่าวิธีที่กล่าวมาข้างต้น และเนื่องจากสามารถตรวจวิเคราะห์หาขนาดของ PNH clone ภายใน hematopoietic cell lineages ได้ดีกว่าและน่าเชื่อถือกว่า Ham's test² จึงถูกนำมาใช้แทนที่ Ham's test ซึ่งเคยเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์ PNH¹³ ในประเทศไทยยังมีห้องปฏิบัติการไม่กี่แห่งที่สามารถตรวจวิเคราะห์โรค PNH โดยการใช้ flow cytometry เนื่องจากโรงพยาบาลศิริราช สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ เป็นแห่งหนึ่งให้บริการในการตรวจวิเคราะห์โรค PNH หากสถานพยาบาลอื่นมีความต้องการจะส่งเลือดมาตรวจวิเคราะห์อาจต้องใช้เวลาในการขนส่งซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะบอกให้ทราบถึงผลกระทบของการเก็บตัวอย่างเลือดในเวลาต่างๆ กัน โดยใช้ heparin และ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการขนส่งเลือดว่าควรส่งมาถึงภายในระยะ

เวลาเท่าใดจึงจะมีผลกระทบต่อผลการตรวจน้อยที่สุด รวมทั้งปริมาณของเลือดที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ สามารถเก็บได้ปริมาณน้อยที่สุดเท่าใดที่ยังสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งเม็ดเลือดแดงและแกรนูโลไซต์ (granulocyte) เพื่อลดปริมาณในการเก็บเลือดจากคนไข้

กลุ่มศึกษาและวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเลือด

ภายหลังจากได้รับความยินยอม (informed consent) กลุ่มศึกษาจะได้รับการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ (venous blood) ใส่หลอดสารกันเลือดแข็ง EDTA (EDTA blood) และ heparin (heparinized blood) โดยอัตราส่วนเลือด:สารกันเลือดแข็ง คือ 3 mL:5.4 mg EDTA และ 6 ml :40 μ L heparin ตามลำดับ เฉพาะ heparinized blood แบ่งทดสอบครั้งละ 2 mL ที่ 3 เวลาเพื่อแยกแกรนูโลไซต์ คือ ที่เวลา 0 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ระหว่างรอทดสอบในแต่ละเวลา เก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้อง การแยกเม็ดเลือดแดงออกจากเม็ดเลือดขาวทำโดยใช้ 6% dextran in NSS ตามวิธีที่เคยมีรายงานมาก่อน¹⁴

กลุ่มศึกษา

ประกอบด้วย ผู้ป่วย aplastic anemia (AA), ผู้ป่วย myelodysplastic syndrome (MDS), ผู้ป่วย lymphoma อย่างละ 10 ราย และผู้ป่วย paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) 13 ราย โดยในกลุ่มผู้ป่วย PNH แยกได้เป็นผู้ป่วย classical PNH 8 ราย, ผู้ป่วย AA ที่พัฒนาเป็น PNH 3 ราย และ ผู้ป่วย PNH ที่หายจากการเป็นโรคแล้ว 2 ราย การเจาะเลือดผู้ป่วยเป็นส่วนหนึ่งของการตรวจที่กระทำเมื่อผู้ป่วยมาติดตามการรักษาที่สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ศิริราช กลุ่มคอนโทรล (control) ประกอบด้วย คนปกติที่ไม่มีประวัติประจำตัวใดๆ และยินยอมให้ดำเนินการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ เพื่อทำการวิเคราะห์ในการศึกษา

วิธีการศึกษา

วิเคราะห์หา GPI-linked protein (CD59) บนเม็ดเลือดแดง (Erythrocyte immunophenotyping)

นำ EDTA blood หรือ heparinized blood 5 μ L ใส่ในหลอดทดลอง 2 หลอด หลังจากนั้นเติม 50 μ L ของ biotin mouse IgG2a (1:20) และ 50 μ L ของ biotin anti-human CD59 (1:20) ในหลอดใดหลอดหนึ่ง หลังจากนั้นทิ้งไว้ที่ 4 °C ในที่มืด 15-30 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้ง ด้วย 1x PBS 1,000 μ L นำไปปั่นที่ 2,000 rpm 5 นาที จากนั้นเติม Streptavidin-PE (1:10) 10 μ L ลงไปทุกหลอดทดลอง incubate 15-30 นาที ที่ 4 °C ในที่มืด ล้างเซลล์ 1 ครั้ง ด้วย 1xPBS 1,000 μ L นำไปปั่นที่ 2,000 rpm 5 นาที จากนั้นนำ rbc pellet มาเจือจางกับ 1% paraformaldehyde 500 μ L และนำมาวิเคราะห์ด้วย flow cytometry โดยใช้ CellQuest software

วิเคราะห์หา GPI-linked protein (CD59) บน

แกรนูโลไซต์ (Granulocyte immunophenotyping)

นำ heparinized blood 2 mL ผสมกับ 800 μ L ของ 6% dextran in NSS ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากเซลล์แยกชั้นนำส่วน supernate ใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 15 mL และเติม 1xPBS ลงไป 1 เท่า นำไปปั่นเซลล์ และไปปั่นที่ 2,000 rpm 5 นาที จากนั้นนำ cell pellet มา suspend ด้วย 1xPBS 1 mL เก็บเซลล์ 1x 10⁶/mL ต่อ หลอดทดลอง (เตรียมหลอดทดลอง 2 หลอด) หลังจากนั้นเติม 50 μ L ของ biotin mouse IgG2a (1:20) และ 50 μ L ของ biotin anti-human CD59 (1:20) ในหลอดใดหลอดหนึ่ง ทิ้งไว้ที่ 4 °C ในที่มืด 15-30 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้ง ด้วย 1x PBS 1,000 μ L ปั่นที่ 2,000 rpm 5 นาที จากนั้นเติม Streptavidin-PE (1:10) 10 μ L ลงไปทุกหลอดทดลอง incubate 15-30 นาที ที่ 4 °C ในที่มืด จากนั้นเติม 1 mL FACS lysing reagent และ incubate 10 นาที ที่ 4 °C ในที่มืด นำมาปั่นที่ 2,000 rpm 5 นาที ล้างเซลล์ด้วย 1xPBS

2 mL 1 ครั้ง ปั่นที่ 2,000 rpm 5 นาที จากนั้นนำ granulocyte pellet มาเจือจางกับ 1% paraformaldehyde 500 μ L และนำมาวิเคราะห์ด้วย flow cytometry โดยใช้ CellQuest software

สถิติทดสอบ

เปรียบเทียบความแตกต่างเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดที่มีการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดงและแกรนูโลไซต์ ในคนปกติ, ผู้ป่วย aplastic anemia (AA), ผู้ป่วย myelodysplastic syndrome (MDS), ผู้ป่วย lymphoma และ ผู้ป่วย paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) ระหว่างเวลาที่ 0 ชั่วโมง เทียบกับ 24 ชั่วโมง, 0 ชั่วโมง เทียบกับ 48 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง เทียบกับ 48 ชั่วโมง โดยใช้การทดสอบ paired t-test (two-tail) จาก program statview โดยทดสอบสมมติฐานที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เปรียบเทียบความแตกต่างเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดที่มีการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดง ระหว่างสารกันเลือดแข็ง EDTA และ heparin ระหว่างเวลาที่ 0 ชั่วโมง EDTA

เทียบกับ 0 ชั่วโมง heparin, 24 ชั่วโมง EDTA เทียบกับ 24 ชั่วโมง heparin และ 48 ชั่วโมง EDTA เทียบกับ 48 ชั่วโมง heparin โดยใช้การทดสอบ t-test และทดสอบความแปรปรวนของประชากรสองกลุ่มต่างกันหรือไม่ โดยใช้ F-test 15 ซึ่งทดสอบสมมติฐานที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

การแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดง (CD59 expression on erythrocytes) และ แกรนูโลไซต์ (CD59 expression on granulocytes)

การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดที่มีการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดง (%CD59 positive erythrocyte) ภายหลังการเก็บตัวอย่างเลือดทันที (ที่ 0 ชั่วโมง) โดยใช้สารกันเลือดแข็ง EDTA และ heparin พบ %CD59 positive erythrocyte เป็นปกติ (normal expression) ในคนปกติ 99.97 ± 0.06 SD และ 99.92 ± 0.18 SD (ตารางที่ 1) ในผู้ป่วย AA 99.78 ± 0.44 SD และ

ตารางที่ 1 แสดงค่า %CD59 positive และ mean $\pm$ 2SD ในคนปกติบนแกรนูโลไซต์และเม็ดเลือดแดงจาก EDTA blood และ heparinized blood ที่เวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

ลำดับที่	Normal								
	%CD59 positive								
	WBC (heparin)			RBC (EDTA)			RBC (heparin)		
	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
1	99.83	99.86	98.13	99.94	99.91	99.88	99.96	99.98	99.97
2	99.74	99.85	99.82	99.98	99.99	99.96	99.99	100.00	99.97
3	99.98	99.71	99.28	99.98	99.98	99.94	99.95	99.99	99.97
4	99.98	99.94	99.50	99.98	99.98	99.96	99.99	99.96	99.96
5	99.64	99.55	98.04	100.00	99.90	99.25	99.99	99.82	99.90
6	99.70	99.69	99.63	99.98	99.86	99.87	99.74	100.00	99.98
7	99.66	99.51	99.87	99.97	99.97	99.99	99.95	99.82	99.96
8	99.87	99.52	94.14	99.90	99.99	99.74	99.98	99.99	99.97
9	99.92	99.81	99.52	99.99	99.98	99.87	99.81	98.59	99.40
10	99.88	99.78	99.81	99.93	100.00	99.92	99.87	99.83	99.97
mean $\pm$ 2SD	99.83 $\pm$ 0.24	99.73 $\pm$ 0.30	98.78 $\pm$ 3.52	99.97 $\pm$ 0.06	99.96 $\pm$ 0.10	99.83 $\pm$ 0.64	99.92 $\pm$ 0.18	99.80 $\pm$ 0.86	99.91 $\pm$ 0.36

ตารางที่ 2 แสดงค่า %CD59 positive และ mean $\pm$ 2SD ในผู้ป่วย aplastic anemia บนแกรนูโลไซด์และเม็ดเลือดแดง จาก EDTA blood และ heparinized blood ที่เวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

Aplastic anemia									
ลำดับที่	%CD59 positive								
	WBC (heparin)			RBC (EDTA)			RBC (heparin)		
	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
1	99.61	99.68	99.54	99.80	99.96	99.85	99.04	99.86	99.97
2	97.09	96.59	97.06	99.52	99.68	99.43	99.15	99.65	99.21
3	99.48	99.77	99.11	99.94	99.99	99.95	99.90	99.97	99.89
4	98.67	99.33	99.98	99.60	99.80	99.84	99.89	99.89	99.85
5	99.92	99.24	99.67	99.89	99.95	99.96	99.99	99.96	99.99
6	99.85	99.34	99.37	99.76	99.81	99.76	99.74	99.75	99.74
7	98.64	98.17	97.61	99.38	99.35	99.35	99.24	99.39	99.32
8	99.86	99.93	99.56	100.00	100.00	99.97	99.99	99.97	99.70
9	99.98	98.83	96.48	100.00	100.00	99.80	99.97	99.97	99.60
10	99.96	99.93	99.88	99.94	99.89	99.98	99.69	99.99	99.94
mean $\pm$ 2SD	99.21 $\pm$ 1.80	99.08 $\pm$ 2.06	98.73 $\pm$ 2.42	99.78 $\pm$ 0.44	99.84 $\pm$ 0.40	99.79 $\pm$ 0.44	99.66 $\pm$ 0.74	99.84 $\pm$ 0.38	99.72 $\pm$ 0.54

ตารางที่ 3 แสดงค่า %CD59 positive และ mean $\pm$ 2SD ในผู้ป่วย myelodysplastic syndrome บนแกรนูโลไซด์และเม็ดเลือดแดง จาก EDTA blood และ heparinized blood ที่เวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

Myelodysplastic syndrome									
ลำดับที่	%CD59 positive								
	WBC (heparin)			RBC (EDTA)			RBC (heparin)		
	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
1	99.71	99.86	99.26	98.17	99.96	99.92	99.99	99.99	99.91
2	99.84	99.95	89.45	99.74	99.57	99.93	99.57	99.86	99.92
3	99.71	99.81	99.82	99.97	99.89	99.99	99.97	99.98	99.95
4	99.91	99.53	99.89	98.81	99.72	99.70	99.64	99.14	99.62
5	99.35	98.83	99.16	99.73	99.74	99.77	99.91	99.90	99.93
6	99.57	99.23	99.91	99.96	99.82	99.98	99.92	99.91	99.67
7	99.95	99.63	99.94	99.97	99.71	99.87	99.97	99.97	99.99
8	99.55	98.89	98.62	99.78	99.82	99.21	99.77	99.92	99.62
9	99.46	99.42	99.65	98.40	99.95	99.89	99.46	99.91	99.46
10	99.40	99.29	87.63	99.23	99.94	99.90	99.50	99.78	99.23
mean $\pm$ 2SD	99.55 $\pm$ 0.80	99.41 $\pm$ 0.70	97.33 $\pm$ 9.34	99.38 $\pm$ 1.36	99.81 $\pm$ 0.26	99.82 $\pm$ 0.46	99.77 $\pm$ 0.42	99.84 $\pm$ 0.50	99.73 $\pm$ 0.50

99.66 $\pm$ 0.74SD (ตารางที่ 2) ในผู้ป่วย MDS 99.38 $\pm$ 1.36SD และ 99.77 $\pm$ 0.42SD (โดยพบผู้ป่วย MDS 3 รายมี %CD59 positive erythrocyte น้อยกว่า 99% เมื่อใช้ EDTA blood) (ตารางที่ 3) ในผู้ป่วย lymphoma 99.90 $\pm$ 0.26SD และ 99.64 $\pm$ 1.12SD (ตารางที่ 4) ในผู้ป่วย PNH 73.51 $\pm$ 55.10SD และ

ตารางที่ 4 แสดงค่า %CD59 positive และ mean $\pm$ 2SD ในผู้ป่วย lymphoma บนแกรนูโลไซต์ และเม็ดเลือดแดง จาก EDTA blood และ heparinized blood ที่เวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

Lymphoma									
ลำดับที่	%CD59 positive								
	WBC (heparin)			RBC (EDTA)			RBC (heparin)		
	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
1	99.89	99.85	99.85	99.96	99.97	99.99	99.70	99.97	99.89
2	99.74	99.70	99.13	99.99	99.84	99.92	99.95	99.86	99.92
3	99.88	99.60	99.84	99.78	99.69	98.54	99.79	99.74	99.73
4	98.81	97.92	99.73	99.98	99.99	99.90	99.98	99.82	99.76
5	99.99	99.86	99.46	99.97	99.97	99.97	99.87	99.91	99.96
6	99.94	99.94	99.70	99.77	99.92	99.89	99.91	99.92	99.96
7	99.19	97.73	95.83	99.93	99.95	99.91	99.75	99.99	99.98
8	99.78	99.62	99.56	99.99	99.81	99.78	99.99	99.82	99.93
9	99.52	99.92	96.22	99.97	99.98	99.96	98.13	98.83	99.96
10	99.80	99.96	99.55	99.62	99.96	99.85	99.35	99.98	99.95
mean $\pm$ 2SD	99.65 $\pm$ 0.76	99.41 $\pm$ 1.70	98.89 $\pm$ 3.06	99.90 $\pm$ 0.26	99.91 $\pm$ 0.20	99.77 $\pm$ 0.88	99.64 $\pm$ 1.12	99.78 $\pm$ 0.68	99.90 $\pm$ 0.18

ตารางที่ 5 แสดงค่า %CD59 positive และ mean $\pm$ 2SD ในผู้ป่วย paroxysmal nocturnal hemoglobinuria บนแกรนูโลไซต์ และเม็ดเลือดแดง จาก EDTA blood และ heparinized blood ที่เวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ซึ่งผู้ป่วยรายที่ 3 และ 4 ได้หายจากการเป็นโรค PNH แล้ว และผู้ป่วยรายที่ 11, 12 และ 13 เคยมีประวัติว่า เป็น aplastic anemia มาก่อนและได้พัฒนาเป็น PNH

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria									
ลำดับที่	%CD59 positive								
	WBC (heparin)			RBC (EDTA)			RBC (heparin)		
	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
1	15.84	18.77	19.21	84.88	84.84	82.90	89.96	84.05	83.25
2	3.94	2.50	4.64	72.02	68.98	74.68	71.42	69.70	76.04
3	99.00	98.99	99.00	99.82	99.84	99.52	99.60	99.86	99.44
4	99.52	99.01	94.18	99.93	99.96	99.97	99.89	99.92	99.96
5	8.26	8.23	10.47	97.70	67.59	65.88	66.54	65.49	65.31
6	64.38	60.15	76.61	93.45	94.68	93.68	93.44	94.58	93.65
7	2.71	4.13	3.28	10.04	10.16	8.96	8.85	9.97	8.58
8	55.70	58.33	63.76	78.65	80.69	79.50	80.48	81.54	78.12
9	3.85	4.53	4.63	28.51	37.79	30.23	26.12	36.22	33.98
10	27.88	26.80	23.82	76.85	75.37	83.75	81.45	75.95	87.51
11	64.51	62.85	71.26	89.99	93.25	90.20	91.62	93.05	88.88
12	39.64	36.74	36.07	96.53	91.69	95.46	96.19	96.67	96.52
13	5.18	5.44	5.38	57.25	57.20	60.25	52.34	57.03	58.54
mean $\pm$ 2SD	37.72 $\pm$ 71.52	37.42 $\pm$ 70.54	39.41 $\pm$ 72.86	73.51 $\pm$ 55.10	74.00 $\pm$ 52.76	74.23 $\pm$ 54.90	73.68 $\pm$ 57.52	74.16 $\pm$ 53.88	74.60 $\pm$ 54.52

ตารางที่ 6 แสดงค่า %CD59 negative และ mean $\pm$ 2SD ในผู้ป่วย paroxysmal nocturnal hemoglobinuria บนแกรนูโลไซต์ และเม็ดเลือดแดง จาก EDTA blood และ heparinized blood ที่เวลา 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ซึ่งผู้ป่วยรายที่ 3 และ 4 ได้หายจากการเป็นโรค PNH แล้ว และผู้ป่วยรายที่ 11, 12 และ 13 เคยมีประวัติว่าเป็น aplastic anemia มาก่อนและได้พัฒนาเป็น PNH

ลำดับที่	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria								
	%CD59 negative								
	WBC (heparin)			RBC (EDTA)			RBC (heparin)		
	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr	0 hr	24 hr	48 hr
1	84.19	81.36	83.49	15.13	15.17	17.10	10.05	15.96	16.75
2	3.94	2.5	4.64	27.99	31.02	25.34	28.59	30.30	23.96
3	1.00	1.11	1.00	0.18	0.16	0.49	0.40	0.14	0.56
4	0.48	0.99	5.85	0.07	0.04	0.03	0.12	0.08	0.04
5	91.76	91.81	89.55	32.32	32.43	34.13	33.47	34.52	34.70
6	35.63	39.86	23.46	6.56	5.33	6.32	6.56	5.43	6.35
7	97.32	95.90	96.73	90.14	90.01	91.21	91.29	90.20	91.58
8	44.31	41.68	36.24	21.35	19.31	20.50	19.53	18.47	21.89
9	96.17	95.49	95.37	71.57	62.32	69.85	73.96	63.90	66.11
10	72.14	73.21	76.19	23.15	24.63	16.25	18.56	24.05	12.49
11	35.51	37.15	28.74	10.01	6.75	9.80	8.39	6.95	11.12
12	60.38	63.28	63.97	3.47	8.33	4.55	3.81	3.34	3.49
13	94.96	94.67	94.80	42.84	42.87	34.72	47.74	43.05	41.61
mean $\pm$ 2SD	62.30 $\pm$ 71.56	62.62 $\pm$ 70.56	60.83 $\pm$ 73.14	26.52 $\pm$ 55.20	26.03 $\pm$ 52.86	25.41 $\pm$ 54.62	26.34 $\pm$ 57.60	25.88 $\pm$ 53.98	25.43 $\pm$ 54.62

73.68 $\pm$ 57.52SD (ตารางที่ 5) และพบเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดที่มีการขาดหายไปของ CD59 บนเม็ดเลือดแดง (%CD59 negative erythrocyte) ในผู้ป่วย PNH 26.52 $\pm$ 55.20SD และ 26.34 $\pm$ 57.60SD (ตารางที่ 6) ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดที่มีการแสดงออกของ CD59 บนแกรนูโลไซต์ (%CD59 positive granulocyte) โดยใช้สารกันเลือดแข็ง heparin พบ %CD59 positive granulocyte เป็นปกติ (normal expression) ในคนปกติ 99.83 $\pm$ 0.24SD ในผู้ป่วย MDS 99.45 $\pm$ 0.88SD (พบ 2 รายมี %CD59 positive granulocyte น้อยกว่า 99%) ในผู้ป่วย AA 99.21 $\pm$ 1.80SD (พบ 4 รายมี %CD59 positive granulocyte น้อยกว่า 99%) ในผู้ป่วย lymphoma 99.65 $\pm$ 0.76SD (พบ 1 รายมี %CD59 positive granulocyte น้อยกว่า 99%) ในผู้ป่วย PNH 37.72 $\pm$ 71.52SD

และพบเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดที่มีการขาดหายไปของ CD59 บนแกรนูโลไซต์ (%CD59 negative granulocyte) ในผู้ป่วย PNH 62.30 $\pm$ 71.56SD ซึ่งในกลุ่มผู้ป่วย PNH มี 3 ราย ที่พัฒนามาจากโรค AA (รายที่ 11, 12 และ 13) โดยตรวจพบได้ทั้งบนเม็ดเลือดแดงและแกรนูโลไซต์ และ 2 ราย (รายที่ 3 และ 4) ที่หายจากการเป็นโรคแล้ว

ผลของสารกันเลือดแข็ง (EDTA หรือ heparin) ต่อการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดง

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดง จากการใช้สารกันเลือดแข็งต่างกัน คือ สารกันเลือดแข็ง EDTA เปรียบเทียบกับ heparin พบว่าในแต่ละช่วงเวลา (0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง) %CD59 positive erythrocyte เป็นปกติ ในกลุ่มคนปกติ, ผู้ป่วย AA, ผู้ป่วย MDS และผู้ป่วย lymphoma

มีมากกว่า 99% และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสารกันเลือดแข็งทั้งสองชนิด ยกเว้นผู้ป่วย MDS 3 ราย (รายที่ 1, 4, 9) ที่มี %CD59 positive erythrocyte 98.17%, 98.81% และ 98.40% ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ที่ 0 ชั่วโมง ในตัวอย่างเลือดที่ใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง และผู้ป่วย lymphoma 1 ราย (รายที่ 9) ที่มี %CD59 positive erythrocyte 98.13% เมื่อวิเคราะห์ที่ 0 ชั่วโมง ในตัวอย่างเลือดที่ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง สำหรับผู้ป่วย PNH ทุกรายมี %CD59 positive erythrocyte น้อยกว่า 99% ยกเว้นผู้ป่วย 2 ราย (รายที่ 3, 4) ที่หายจากการเป็นโรค PNH แล้วมี %CD59 positive erythrocyte เป็นปกติมากกว่า 99% และเมื่อเปรียบเทียบค่าดังกล่าวของตัวอย่างเลือดระหว่างกลุ่มที่ใช้ EDTA และกลุ่มที่ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งในแต่ละช่วงเวลาพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ผลของระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเลือดต่อการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดง และ แกรนูโลไซต์

การตรวจและวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดที่ระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างเลือดที่แตกต่างกัน คือ 0 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง พบ %CD59 positive erythrocyte เป็นปกติมากกว่าร้อยละ 99 ในคนปกติและผู้ป่วยโรคต่างๆ ยกเว้นผู้ป่วย PNH ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 99 และเมื่อเปรียบเทียบ %CD59 positive erythrocyte ของแต่ละช่วงเวลาในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) สำหรับแกรนูโลไซต์ พบ %CD59 positive granulocyte เป็นปกติมากกว่าร้อยละ 99 ในคนปกติและผู้ป่วยโรคต่างๆ ยกเว้นผู้ป่วย PNH ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 99 และพบว่าไม่มีความแตกต่างกันที่เวลา 0 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ของการเก็บตัวอย่างเลือดก่อนทำการตรวจวิเคราะห์ในทุกกลุ่มตัวอย่าง แต่ที่เวลา 48 ชั่วโมง คนปกติ 1 ราย (รายที่ 8) (ตารางที่ 1), ผู้ป่วย MDS 2 ราย (รายที่ 2, 10) (ตารางที่ 3), ผู้ป่วย lym-

phoma 2 ราย (รายที่ 7, 9) (ตารางที่ 4) พบ %CD59 positive granulocyte ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับ 0 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบ %CD59 positive granulocyte ของแต่ละช่วงเวลาในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

วิจารณ์

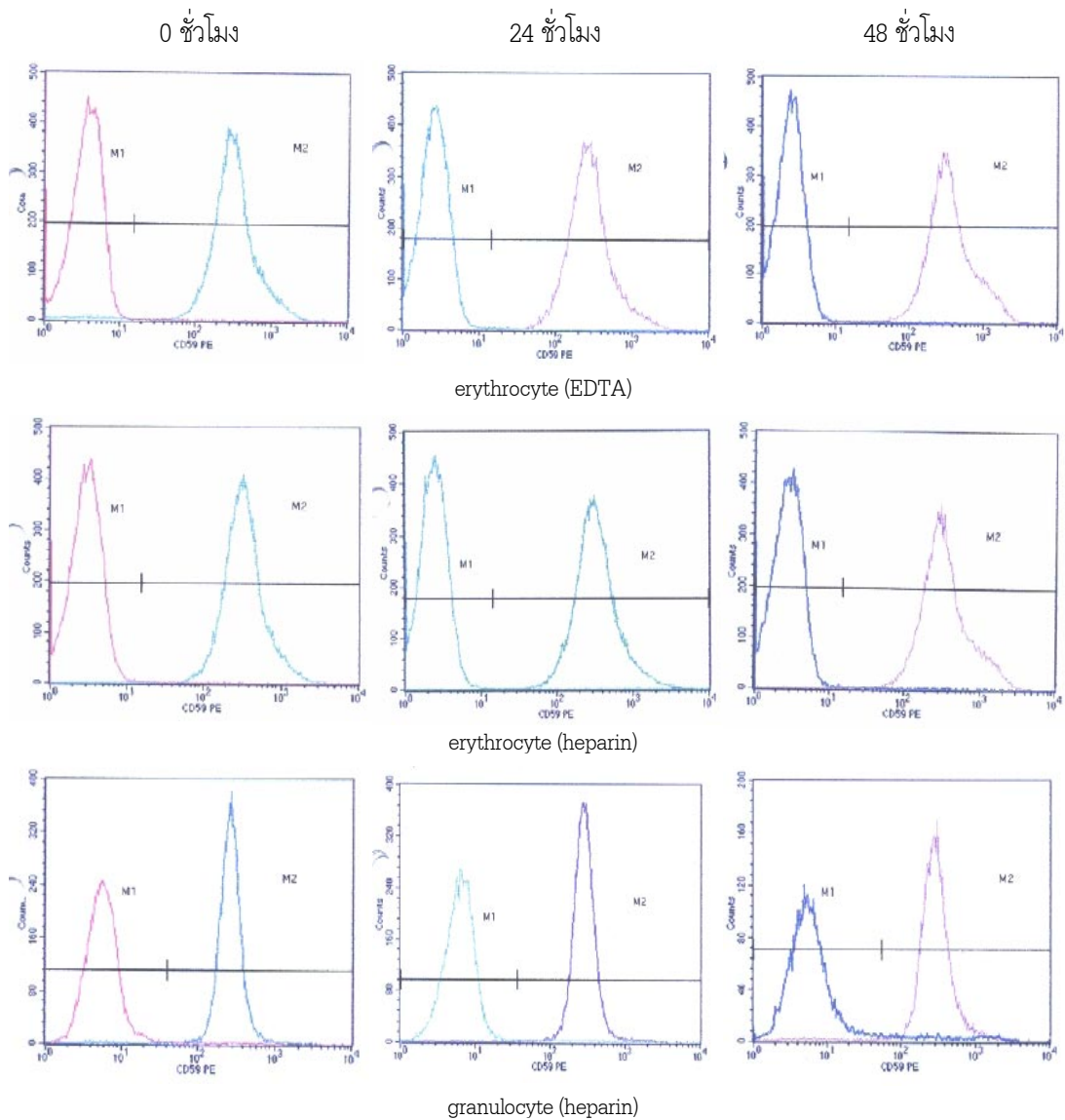
ลักษณะสำคัญที่พบในผู้ป่วย paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) คือ การขาดหายไปของ CD59 บนเม็ดเลือดแดงและแกรนูโลไซต์ ซึ่ง CD59 คือ membrane inhibitor of reactive lysis มีหน้าที่ป้องกันการทำลายเม็ดเลือดโดยชุดขวางการสะสมของ C9 บนผิวเซลล์ แม้ว่า Ham's test จะเคยเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยโรค PNH แต่ก็ถือได้ว่าเป็นวิธีที่ใช้ตรวจกรองเท่านั้น โดยอาจเกิดผลบวกปลอมกับโรคอื่นได้ ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการนำ flow cytometry ร่วมกับ monoclonal antibodies มาตรวจวิเคราะห์ CD59 บนเม็ดเลือด เนื่องจากเป็นวิธีที่ถูกต้องแม่นยำและมีความไวสูงทำให้สามารถตรวจพบ PNH clone ขนาดน้อยๆ ได้ และเป็นวิธีที่มีประโยชน์อย่างมากในการวิเคราะห์ในผู้ป่วย AA และผู้ป่วย MDS ที่พัฒนาเป็น PNH เมื่อเทียบกับ Ham's test การวิเคราะห์การขาดหายไปของแอนติเจน CD59 โดยใช้ flow cytometry สามารถจำแนกเม็ดเลือดที่มีการแสดงออกของ CD59 ออกเป็น PNH subpopulation ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของแอนติเจน ดังนั้น PNH I ไม่พบการขาดหายไปของแอนติเจน (normal cell), PNH II พบแอนติเจนขาดหายไปบางส่วน (intermediate expression), PNH III พบแอนติเจนขาดหายไปอย่างสมบูรณ์ (completely antigen deficiency)^{3,16,17} ในคนปกติสามารถพบการขาดหายไปของ CD59 บนเม็ดเลือดได้ถึง 1%^{3,18} ดังนั้นการตรวจพบเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดที่มีการขาดหายไปของ CD59 บนเม็ดเลือด (%CD59 negative) มากกว่า

1% หรือเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดที่มีการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือด (%CD59 positive) น้อยกว่าร้อยละ 99 เป็นตัวบ่งชี้ว่าผู้ป่วยมี PNH clone เกิดขึ้น และจากการศึกษาที่ผ่านมาโดยใช้ flow cytometry พบว่าการตรวจวัด PNH granulocytes จะแสดงถึงขนาดของ PNH clone ที่แท้จริงได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ PNH erythrocytes โดยเฉพาะในกรณีที่ PNH clone มีขนาดเล็ก เนื่องจากสัดส่วน (proportion) ของ PNH granulocytes จะสูงกว่าของ PNH erythrocytes เพราะช่วงชีวิต (life span) ของ PNH erythrocytes จะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดแดงปกติ หรือผลจากการให้เลือดอาจทำให้ PNH erythrocytes ลดลงจากการเจือจางด้วยเม็ดเลือดแดงที่ได้รับเข้าไป ในขณะที่ PNH granulocytes มีอายุเท่ากับแกรนูโลไซต์ปกติ ดังนั้นการวิเคราะห์ PNH granulocytes จะแสดงถึงการเกิด PNH clone ได้ดีกว่าการวิเคราะห์ PNH erythrocytes^{7,14,19}

จากการศึกษาผลของสารกันเลือดแข็งและระยะเวลาในการเก็บเม็ดเลือดต่อการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดงในเวลา 0 ชั่วโมง พบว่ามี %CD59 positive erythrocyte น้อยกว่าร้อยละ 99 ในผู้ป่วย MDS 3 ราย (รายที่ 1, รายที่ 4 และรายที่ 9) (ตารางที่ 3) (รูปที่ 1) เมื่อใช้สารกันเลือดแข็ง EDTA และผู้ป่วย lymphoma 1 ราย (รายที่ 9) เมื่อใช้สารกันเลือดแข็ง heparin (ตารางที่ 4) แต่เมื่อวิเคราะห์ในเวลาเพิ่มขึ้นกลับพบ %CD59 positive erythrocyte เป็นปกติมากกว่าร้อยละ 99 และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ %CD59 positive granulocyte ของผู้ป่วยเองก็พบมากกว่าร้อยละ 99 ในทุกช่วงเวลา ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจาก artefact ในการทดลอง และพบ %CD59 positive granulocyte ในผู้ป่วย AA 1 ราย (รายที่ 4) (ตารางที่ 2), ผู้ป่วย MDS 1 ราย (รายที่ 6) (ตารางที่ 3) และผู้ป่วย lymphoma 1 ราย (รายที่ 4) (ตารางที่ 4) น้อยกว่าร้อยละ 99 แต่เมื่อวิเคราะห์ในเวลาเพิ่มขึ้นรวมถึงการวิเคราะห์ %CD59 positive erythrocyte กลับพบมากกว่าร้อยละ 99

ดังนั้นการพบ %CD59 positive granulocyte น้อยกว่าร้อยละ 99 นั้นอาจเกิดจาก artefact มากกว่าการเกิด PNH clone ที่แท้จริงได้ อย่างไรก็ตามควรจะต้องติดตามศึกษาผู้ป่วย 3 รายนี้ต่อไป นอกจากนี้พบ %CD59 positive granulocyte น้อยกว่าร้อยละ 99 ในผู้ป่วย AA 3 ราย (รายที่ 2, รายที่ 7 และ รายที่ 9) (ตารางที่ 2) ในทุกช่วงเวลา แต่ %CD59 positive erythrocyte เป็นปกติมากกว่าร้อยละ 99 ในทุกช่วงเวลา แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วย AA ดังกล่าวเริ่มมี PNH clone เกิดขึ้น แต่พบการแสดงออกเฉพาะแกรนูโลไซต์เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการรายงานว่าสัดส่วนของ PNH granulocytes สามารถพบได้สูงกว่า PNH erythrocytes เพราะ PNH erythrocytes มีช่วงชีวิต (life span) ลดลง แต่ PNH granulocytes มีอายุเท่ากับแกรนูโลไซต์ปกติ¹⁴ ซึ่งในผู้ป่วยที่เริ่มมี PNH clone ขนาดเล็ก อาจตรวจพบความผิดปกติบนแกรนูโลไซต์ได้ก่อนเม็ดเลือดแดง

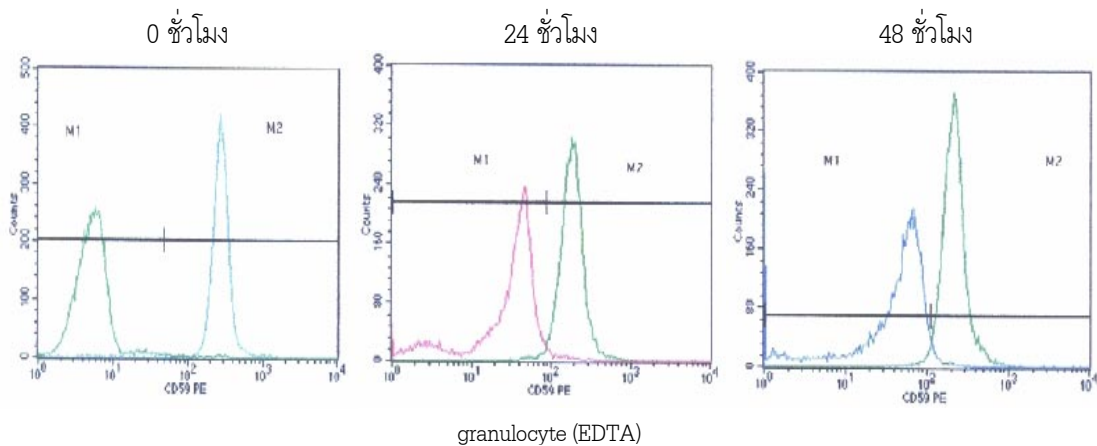
ในการศึกษาการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดงของคนปกติ ผู้ป่วย aplastic anemia (AA) ผู้ป่วย myelodysplastic syndrome (MDS) ผู้ป่วย lymphoma และผู้ป่วย paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) สามารถยอมรับ %CD59 positive erythrocyte ได้ เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดไว้นานที่สุด 48 ชั่วโมง จากการใช้ EDTA และ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง แต่การศึกษาในแกรนูโลไซต์สามารถยอมรับ %CD59 positive granulocyte ได้เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดไว้นานที่สุด 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง เนื่องจากแกรนูโลไซต์ที่เก็บไว้นานเกิน 24 ชั่วโมง จะพบ %CD59 positive granulocyte น้อยกว่าค่าที่ยอมรับได้ในคนปกติซึ่งอาจทำให้แปลผลผิดได้ โดยปกติแกรนูโลไซต์สามารถอยู่ภายนอกร่างกายได้นาน 6 ชั่วโมง ถ้าเกิน 6 ชั่วโมง จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงและมีปริมาณน้อยลง จากการศึกษาครั้งนี้ไม่ใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ในการวิเคราะห์ %CD59 positive granulocyte เพราะ EDTA สามารถเก็บรักษาสภาพเม็ดเลือดได้



รูปที่ 1 แสดงลักษณะการแสดงออกของ GPI-anchor protein (CD59) บนเม็ดเลือดแดง (จาก EDTA blood และ heparinized blood) โดยใช้ flow cytometry, M1 คือ ภาชนะของ negative control (Isotype control), M2 แสดง population เดียวของเม็ดเลือดแดง และแกรนูโลไซต์ที่แสดงออก CD59 ยกเว้นการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดง (จาก EDTA blood) ที่ 0 ชั่วโมง พบ population ของเม็ดเลือดแดงที่ไม่แสดงออก CD59 ในผู้ป่วย myelodysplastic syndrome รายที่ 1

นานไม่เกิน 30 ชั่วโมง แต่ heparin สามารถเก็บได้นานถึง 48 ชั่วโมง²⁰ และได้ทดลองศึกษาการแยกแกรนูโลไซต์ในคนปกติบางรายด้วยสารกันเลือดแข็ง EDTA พบว่าเมื่อทำหาค่าที่พบ %CD59 positive granulocyte เป็นปกติมากกว่าร้อยละ 99 แต่หลังจากวิเคราะห์ในเวลาเพิ่มขึ้นมักพบ isotype control เป็น 2 populations และ

พบ %CD59 positive granulocyte น้อยกว่า 99% (รูปที่ 2) ดังนั้น heparin จึงเป็นสารกันเลือดแข็งที่เหมาะสมในการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนแกรนูโลไซต์ มากกว่า EDTA และการพบ %CD59 positive erythrocyte น้อยกว่าร้อยละ 99 ที่เวลา 48 ชั่วโมง อาจเป็นเพราะมีส่วนของเม็ดเลือดแดงปนเข้ามา



รูปที่ 2 แสดงลักษณะการแสดงออกของ GPI-anchor protein (CD59) บนแกรนูโลไซต์ (จาก EDTA blood) โดยใช้ flow cytometry, M1 คือ อาณานิคมของ negative control (Isotype control), M2 แสดง population เดี่ยวของ แกรนูโลไซต์ที่แสดงออก CD59 ในคนปกติ

มาก ถึงแม้ว่าจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยน้ำยา FACS lysing แล้วก็ตาม แต่เนื่องจากการรายงานสามารถพบ CD59 บนเม็ดเลือดแดงได้มากกว่าแกรนูโลไซต์ จึงอาจทำให้แย่งจับกับ biotin anti-human CD59 ได้ดีกว่า ทำให้พบ %CD59 negative granulocyte มากกว่าร้อยละ 1 ซึ่งถือว่าเป็น artefactual abnormal result³ ฉะนั้นในการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนแกรนูโลไซต์ จึงควรทำให้เม็ดเลือดแดงปนมาน้อยที่สุด เพื่อลดปัญหาการเกิดผลผิดปกติลง (artefactual abnormal result) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดงและแกรนูโลไซต์ควบคู่กันไปจะให้ความน่าเชื่อถือสำหรับการตรวจ PNH ในผู้ป่วยทั้งหมดซึ่งจะแสดงถึงการขาดหายไปของแอนติเจนบนเม็ดเลือดทั้ง 2 ชนิด³

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการกล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่าง AA และ PNH โดยพบว่าผู้ป่วย AA บางส่วนสามารถพัฒนาเป็น PNH ได้ ซึ่งอาจเกิดจากความพยายามของไขกระดูกที่จะฟื้นตัวจากสภาวะ aplastic anemia ทำให้เกิด somatic mutation²¹ และให้กำเนิดเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติเกิดเป็น PNH ขึ้น และจากการศึกษาพบว่าในกลุ่มผู้ป่วย PNH มี 3 ราย (รายที่ 11, 12 และ 13) ที่มีการพัฒนามาจาก AA ซึ่งตรวจพบ PNH clone ได้ทั้งจากเม็ดเลือดแดงและแกรนูโลไซต์

และในกลุ่มผู้ป่วย AA 3 ราย (รายที่ 2, 7 และ 9) จาก 10 ราย ตรวจพบ PNH clone ได้จากแกรนูโลไซต์ สำหรับการพบ PNH clone ในผู้ป่วย MDS Dunn และคณะ²² ได้รายงานที่สามารถพบได้สูงถึงร้อยละ 23 และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการใช้ flow cytometry ในการตรวจวิเคราะห์โดย Nakao และคณะ²³ ซึ่งรายงานว่ามีประมาณร้อยละ 80 ของผู้ป่วย AA และประมาณร้อยละ 14 ของผู้ป่วย MDS มี PNH clone ซึ่ง PNH clone ในผู้ป่วย MDS อาจจะพบได้น้อยกว่าผู้ป่วย AA และดูเหมือนจะมีการขยายตัวน้อยกว่าใน classical PNH และ AA/ PNH บางราย ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบผู้ป่วย MDS ที่มีการพัฒนาเป็นโรค PNH อาจเนื่องจากการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยจำนวนน้อย จึงต้องการศึกษาในประชากรที่มากพอประกอบกับการศึกษานี้เป็นการย้อมเซลล์โดยใช้ monoclonal antibodies ติดฉลากด้วยสีชนิดเดียว (one color flow cytometry) ซึ่งมีความไวน้อยกว่าการศึกษาของ Nakao และคณะ

สรุป

จากการศึกษาผู้วิจัยได้นำเสนอการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือด โดยเม็ดเลือดแดงใช้ EDTA และ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง และแกรนูโลไซต์ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง ในเวลา 0 ชั่วโมง

24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง การศึกษาเม็ดเลือดของคนปกติ, ผู้ป่วย AA, ผู้ป่วย MDS, ผู้ป่วย lymphoma และ ผู้ป่วย PNH ภายหลังจากเก็บตัวอย่างเลือดและนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดงพบว่าสามารถยอมรับความผันแปร %CD59 positive erythrocyte ได้ เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดไว้นานที่สุด 48 ชั่วโมง โดยใช้ EDTA หรือ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทั้ง 3 ช่วงเวลา สำหรับการวิเคราะห์บนแกรนูโลไซต์ สามารถยอมรับความผันแปร %CD59 positive granulocyte ได้ เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดไว้นานที่สุด 24 ชั่วโมง หากเกิน 24 ชั่วโมงไม่แนะนำให้ส่งวิเคราะห์ ดังนั้นถ้าต้องการส่งวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดงสามารถใช้ EDTA หรือ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งก็ได้ แต่ถ้าต้องการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD59 บนแกรนูโลไซต์ ควรใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งและระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างเลือดจนถึงเวลาวิเคราะห์ต้องไม่เกิน 24 ชั่วโมง โดยปริมาณเลือดที่ต่ำที่สุดที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 2 มิลลิลิตร แต่หากระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างเลือดจนถึงเวลาวิเคราะห์เกิน 24 ชั่วโมง แนะนำให้ส่งวิเคราะห์เฉพาะการแสดงออกของ CD59 บนเม็ดเลือดแดงซึ่งจะให้ผลดีกว่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้บริจาคตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทำการทดสอบครั้งนี้ทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

- Hall C, Richards SJ, Hillman P. The Glycosylphosphatidylinositol Anchor and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria/Aplasia Model. *Acta Haematol* 2002;108:219-30.
- Luzzatto L. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *International Society of Haematology* 1996:120-7.
- Oelschlaegel U, Besson I, Arnoulet C, et al. A standardized flow cytometric method for screening paroxysmal nocturnal hemoglobinuria(PNH) measuring CD55 and CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. *Clin Lab Haem* 2001;23:81-90.
- Kinoshita T. Overview of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Molecular Genetics. In : Omine M, Kinoshita T, eds. *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Related Disorders*. Springer, 2001:3-7.
- Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996;87:5332-40.
- Meletis J, Terpos E, Samarkos M, et al. Detection of CD55 and/or CD59 Deficient Red Cell Populations in Patients with Aplastic Anemia and Myelodysplastic Syndrome. *Leukemia and Lymphoma* 1999.
- Luzzatto L, Hillmen P. Laboratory methods used in the investigation of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). In : Dacie JV, Lewis SM, eds. *Practical Haematology*. 8th ed. Churchill Livingstone 1995.
- Nishimura J, Hirota T, Kanakura Y, et al. Long-term support of hematopoiesis by a single stem cell clone in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2002;99:2748-51.
- Terpos E, Michali E, Meletis Chr, et al. "PNH-LIKE" Red Cell Populations in Patients with Anemia of Different Etiology. *Oslo* 1998.
- วันชัย วะชีวนาวิน, เกียรติศักดิ์ ภักดีสุวรรณ. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต* 1995;5:54-62.
- Meletis J, Terpos E. Recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Med Sci Monit*, 2003;9:RA161-72.
- Nathalang O, Chuansumrit A, Prayoonwivat W. Rapid screening of PNH red cell populations using the gel test. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003;34:887-90.
- Richards SJ, Rawstron AC and Hillmen P. Application of flow cytometry to the Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Cytometry* 2000;42:223-33.
- Pakdeesuwan K, Wanachiwanawin W, Siripanyapinyo U, Pattanapanyasat K, Wilairat P, Issaragrisil S. Immunophenotypic discrepancies between granulocyte and erythroid lineages in peripheral blood of

- patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *European Journal of Haematology* 2000;65:8-16.
15. จารุวรรณ โชคคณาพิทักษ์. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของประชากร 2 กลุ่ม. ใน: อรุณ จิรวรรณกุล, บรรณาธิการ. ชีวสถิติ. ภาควิชาชีวสถิติและประชากรศาสตร์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2542:144-59.
 16. Vittorio R. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2000;85: 82-7.
 17. Parker CJ. Molecular Basis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Stem cell* 1996;14:396-411.
 18. Wanachiwanawin W, Piyawattanasakul N, Visuthisakchai S, Issaragrisil S. Nature of PNH Clones in Aplastic Anemia. In : Omine M, Kinoshita T, eds. *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Related Disorders*. Springer 2001:229-33.
 19. Borowitz MJ. Flow Cytometry Testing in PNH. How Much is Enough? *Cytometry* 2000;42:221-2.
 20. สุรพล เกษะเรียนอุดม, กิตติพงศ์ รุ่งเรืองธนะกิจ, วัชรระ กลินอักษร, ชัยยศ คุณมานุสนธิ์, โกวิทย์ พัฒนปัญญาสัตย์. การบริหารคุณภาพโพลีไซโทเมตรี: การวิเคราะห์หาประชากรย่อยของเซลล์ลิมโฟไซต์. กรุงเทพฯ: ชมรมโพลีไซโทเมตรีแห่งประเทศไทย, 2541:68-9.
 21. Pakdeesuwan K, Wilairat P, Wanachiwanawin W. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) : From Basic Research to Clinical Points of View. *Mahidol Journal* 1997;4:29-34.
 22. Dunn DE, Tanawattanacharoen P, Boccuni P, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Annal Int Med* 1999;131:401-8.
 23. Nakao S, Wang H, Chuhjo T. Clinical Significance of Increase PNH-Type Cells in the Peripheral Blood of Patients with Aplastic Anemia and Refractory Anemia. In : Omine M, Kinoshita T, eds. *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Related Disorders*. Springer, 2001:129-37.

Study of the Effect of Blood Storage on CD59 Expression of Blood Cells

Anchalee Thatsawad, Oratai Taka, Rajita Kunyaboon and Wanchai Wanachiwanawin

Division of Hematology, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

Abstract : The objective of this study was to explore the effect of blood storage and different anticoagulants on flow-cytometric analysis of CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. Heparinized blood samples were used for analysis of CD59 expression on both erythrocytes and granulocytes, while EDTA blood was only appropriate for analysis of erythrocytes. Blood samples were collected from 10 healthy persons, 10 patients with aplastic anemia (AA), 10 patients with myelodysplastic syndrome (MDS), 10 patients with lymphoma and 13 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). Analyses of CD59 expression were performed at 0, 24, 48 hours after blood samples were collected and kept at room temperature. The CD59 expression as indicated by the proportions (%) of CD59 positive cells were not significantly different ($p>0.05$) at different time interval of analyses. However, at 48 hours of storage, the proportions of CD59 positive granulocytes from a few blood samples were unacceptably deviated ($>1\%$) from these analysed within 24 hours. The CD59 expressions on erythrocytes from EDTA and heparinized blood were not significantly different ($p>0.05$). In conclusion, for analyses of CD59 expression on erythrocytes, both EDTA and heparin can be used as anticoagulants and blood samples should be sent to operating laboratories within 48 hours. For CD59 expression on granulocytes, heparinized blood should be used and analysed within 24 hours of collection.

Key Words : ● Blood storage ● CD59 expression ● Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

Thai J Hematol Transf Med 2005;15:233-46.