บทคัดย่อ

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) เป็นโรคของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (hematopoietic stem cell disorder) ชนิด clonal มีลักษณะทางคลินิกที่สำคัญ คือ ภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในหลอดเลือดชนิดเรื้อรัง (chronic intravascular hemolytic anemia) ภาวะสร้างเม็ดเลือดได้น้อย (deficient hematopoiesis) และภาวะการเกิดลิ่มเลือด (thrombosis) ได้ง่าย โรคนี้เกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ชนิด somatic ของยีนที่อยู่บนโครโมโซม X ได้แก่ยีน PIG-A (phosphatidylinositol glycan class A) ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด ทำให้เม็ดเลือดทั้งหลายขาดความสามารถในการสังเคราะห์ glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor ซึ่งส่งผลให้โปรตีนบางชนิด (GPI-linked proteins) ไม่สามารถแสดงออกที่ผนังเซลล์ได้ ในบรรดาโปรตีนเหล่านี้รวมถึงโปรตีนที่คอยควบคุมการกระตุ้นระบบคอมพลีเม้นต์ (complement) ได้แก่ CD59 และ CD55 ทำให้เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย PNH มีความไวต่อคอมพลีเม้นต์ และแตกสลายได้ง่ายในกระแสเลือด พบ PNH ในประเทศไทยมากกว่าประเทศตะวันตก ซึ่งเชื่อว่าเป็นผลจากการที่โรคนี้มีความสัมพันธ์กับโรคไขกระดูกฝ่อ (aplastic anemia) โครงการนี้ได้ศึกษาพยาธิกำเนิดของโรค PNH ใน 2 ประเด็น คือ 1) ศึกษาต้นกำเนิดและความสำคัญของเม็ดเลือด PNH (ความสัมพันธ์ระหว่าง genotype กับ phenotype) และ 2) กลไกการขยายตัวของ PNH clone ในประเด็นแรกทำโดยการตรวจหา PNH cell โดย flow cytometry และการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน PIG-A โดยการวิเคราะห์ heteroduplex และการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing) พบว่าในผู้ป่วย PNH สัดส่วนของเม็ดเลือดแดง PNH (GPI-AP negative granulocytes) มีมากกว่าเม็ดเลือดแดง PNH (GPI-AP negative erythrocytes) และเป็นดัชนีแสดงขนาดของ PNH clone ได้ดีกว่า ชนิดของกลายพันธุ์ของยีน PIG-A ที่พบบ่อยคือ การขาดหายหรือเพิ่มขึ้นของ nucleotide จำนวนน้อยๆ (small deletion/insertion) และการแทนที่ nucleotide (base substitution) ทำให้ยีนนี้ไม่สามารถทำงานได้ เกิดเม็ดเลือดชนิด PNH III พบว่าความรุนแรงของโรค (โลหิตจาง) แสดงโดยขนาดของสัดส่วนของ GPI-AP negative granulocytes แต่มิใช่โดยชนิดของการกลายพันธุ์ของยีน GPI-A สำหรับการศึกษากลไกการขยายตัวของ PNH clone ทำโดยการตรวจสภาวะของการสร้างเม็ดเลือดในผู้ป่วย PNH (โดยการนับ CD34+ และการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด) และการติดตามการเกิด PNH cells (clone) ในผู้ป่วยไขกระดูกฝ่อ (32 ราย) พบว่าผู้ป่วย PNH มีการสร้างเม็ดเลือดลดลง ซึ่งแสดงโดยจำนวน CD34+, BFU-E, และ CFU-GM ลดลง และพบว่า CD8+ ของผู้ป่วยเองทำให้ CFU-GM ลดลงไปอีก นอกจากนี้พบว่า CD59+ granulocytes ของผู้ป่วยมีการตายแบบ apoptosis มากกว่า CD59- granulocytes ประมาณ 70% ของผู้ป่วยไขกระดูกฝ่อมีการเกิดของ PNH clone ในระหว่างการศึกษา แต่การเกิด PNH clone ส่วนใหญ่มักจะเป็นอยู่ชั่วคราว และขณะที่เกิดนั้นผู้ป่วยมักจะมีจำนวนเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือดต่ำกว่าขณะที่ไม่พบ PNH clone จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า PNH clone ถูกเลือกโดยสภาวะหรือกลไกเดียวกับที่ทำให้เกิดภาวะไขกระดูกฝ่อหรือไขกระดูกทำงานล้มเหลว ซึ่งน่าจะเป็นกลไกออโตอิมมูน (autoimmune mechanism) หรือโดยขบวนการ immunoselection

คำหลัก: **paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), PIG-A, PNH clone**

Abstract

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired clonal hematopoietic stem cell disorder characterized clinically by chronic intravascular hemolytic anemia, deficient hematopoiesis and thrombotic tendency. It is originated from a somatic mutation of the X-linked phosphatidylinositol glycan class A (PIG-A) gene in a hematopoietic stem cell resulting in the inability to biosynthesize glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor with subsequent failure of GPI-anchored proteins (GPI-APs) to be expressed on blood cells. Deficiency of the GPI-linked complement regulatory proteins, CD59 and CD55, is responsible for the hypersusceptibility of erythrocytes to the lytic action of complements. It is believed the PNH is more common in East Asia including Thailand than in the western countries, possibly due to the geographical difference in the prevalence of aplastic which is closely related to PNH. Our proposed studies were conducted to elucidate two aspects of pathogenesis of the disorder; 1) the origin and significances of PNH-phenotype blood cells (genotype-phenotype study), and 2) mechanism of PNH clonal expansion. The first issue was explored by immunophenotypic study of blood cells by flow cytometry and detection of PIG-A mutations by heteroduplex analysis and nucleotide sequencing. We found that GPI-AP (CD59) negative granulocytes were more prominent than erythrocytes and could actually reflect the size of PNH clone. Somatic mutations of the PIG-A were found in all 37 patients studied, and were mostly small deletions/insertions and base substitutions causing frameshift or nonsense, leading to the common PNH III phenotype. Severity of the disease (anemia) was found to be determined by the proportion of GPI-negative granulocytes but not by the types of PIG-A mutations. The mechanism of PNH clonal expansion was explored by studying the condition of hematopoiesis in PNH patients (CD34+ enumeration and hematopoietic stem cell culture) and looking at nature of PNH clones in a cohort of 32 aplastic anemia patients. Approximately 70% of the aplastic anemia patients showed PNH clones (CD59- granulocytes) during the follow-up period. Most of the emerging clones were usually transient and appeared during the status of significant bone marrow failure as represented by more the prominent leucopenia and thrombocytopenia. By hematopoietic stem cell culture, we found that PNH is usually associated with a condition of deficient hematopoiesis as shown by the low CD34+ cells and also BFU-E and CFU-GM. In addition autologous CD8+ cells seemed to depress the CFU-GM. Moreover the CD59+ granulocytes were more apoptotic than the CD59- counterpart. Our findings suggested that PNH is selected in the condition which is also responsible for bone marrow failure in aplastic anemia, i.e., the autoimmune mechanism or the immunoselection.

Key words: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), PIG-A, PNH clone