



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาสัญญาณภายในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดง
ของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

โดย

อ. ดร. ดลิตา ตันหยง และคณะ

กันยายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาสัญญาณภายในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดง
ของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

คณะผู้วิจัย

1. อ. ดร. ดลิตา ตันหยง

ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยมหิดล

2. ศ. นพ. สุทัศน์ ฟูเจริญ

โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุน
สนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการสังเคราะห์สายโกลบิน โดยปัญหาของผู้ป่วยเกิดจากภาวะซีดซึ่งมีสาเหตุที่สำคัญสาเหตุหนึ่งมาจาก ineffective erythropoiesis หรือภาวะที่เม็ดเลือดแดงตายไปก่อนที่จะเจริญไปเป็นตัวแก่ การวิจัยนี้ทำการศึกษาขบวนการ ineffective erythropoiesis โดยการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีอายุอยู่หรือ cell viability ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิด β -thalassemia/Hb E ตัดม้าม, ผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิด β -thalassemia/Hb E ไม่ตัดม้ามและคนปกติที่มีสุขภาพดี รวมทั้งทำการศึกษาผลของสาร interleukin-3 และสัญญาณภายในเซลล์ที่ควบคุมขบวนการดังกล่าวนี้อีกด้วย โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงและวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่และเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จากผลการวิจัยพบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงต้นกำเนิดหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 และ 7 วันจากกลุ่มผู้มีสุขภาพดีมีเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตอยู่มากที่สุด ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ชนิด β -thalassemia/Hb E ตัดม้ามมีค่าต่ำที่สุด โดยกลุ่มเซลล์ที่เติมสาร interleukin-3 ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ที่มีชีวิตอยู่สูงกว่ากลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้เติมสาร interleukin-3 ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ การศึกษาสัญญาณภายในเซลล์ที่ควบคุมขบวนการ ineffective erythropoiesis โดยการใช้สารยับยั้งที่จำเพาะกับสัญญาณภายในเซลล์ที่ต้องการศึกษาคือ สารยับยั้ง protein kinase C (Ro-318220), สารยับยั้ง phospholipase C (U-73122) และสารยับยั้ง JAK2 (AG-490) ใส่ลงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดง จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์เซลล์ตายแบบ apoptosis โดยวิธี flow cytometry ผลของการทดลองพบว่าเซลล์ที่ใส่สาร U-73122 มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายแบบ apoptosis สูงสุดทั้งในกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงต้นกำเนิดของคนปกติที่มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E นอกจากนี้เมื่อใส่สาร RO-318220 ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดแดงต้นกำเนิดของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E ตัดม้ามพบว่ามีเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายแบบ apoptosis สูงกว่าเซลล์จากคนปกติที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสัญญาณภายในเซลล์ชนิด phospholipase C น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อขบวนการ ineffective erythropoiesis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E ทั้งชนิดตัดม้ามและไม่ตัดม้าม นอกจากนี้ protein kinase C อาจจะมีส่วนควบคุมขบวนการดังกล่าวนี้ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E ตัดม้ามอีกด้วย

Abstract

Thalassemia is a genetic disorder caused by abnormal globin chain synthesis. One of the major causes of anemia in thalassemic patients is ineffective erythropoiesis. To study this process, we compared the percentage of cell viability of erythroid progenitor cells between thalassemic patients; splenectomized β -thalassemia/Hb E, nonsplenectomized β -thalassemia/Hb E and healthy subjects. In addition, study the effect of interleukin-3 (IL-3) and signaling pathways in ineffective erythropoiesis by using erythroid progenitor cell culture technique and analysis of cell viability and apoptotic cells. The results of this study showed that the highest percentage of cell viability was found in healthy subject, while splenectomized β -thalassemia/Hb E showed the lowest percentage of cell viability after culturing erythroid progenitor cells for 3 and 7 days. The IL-3 added erythroid progenitor cells showed higher cell viability than IL-3 depleted cells. To study the involvement of specific signaling pathways in ineffective erythropoiesis, the protein kinase C inhibitor (Ro-318220), phospholipase C inhibitor (U-73122) and JAK2 inhibitor (AG-490) were used in culture system and analyzed apoptotic cells by flow cytometry. The results showed that progenitor cells treated with U-73122 had the highest percentage of apoptotic cells in both healthy subjects and β -thalassemia/Hb E patients. In addition, the cells treated with Ro-318220 had significantly different of percent apoptotic cells between splenectomized β -thalassemia/Hb E and healthy subjects. It could suggest that phospholipase C might play a key role in the process of ineffective erythropoiesis in both splenectomized and nonsplenectomized β -thalassemia/Hb E. Moreover, protein kinase C might be involved in this process of splenectomized β -thalassemia/Hb E.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานของอาจารย์รุ่นใหม่

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคธาลัสซีเมีย เป็นโรคพันธุกรรมและเป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบอุบัติการณ์สูงในประเทศไทย ประมาณร้อยละ 20-30 ของประชากรมียืนอัลฟาธาลัสซีเมีย ประมาณร้อยละ 3-9 ของประชากรมียืนบีตาธาลัสซีเมีย ผู้ที่เป็นพาหะของโรคพบร้อยละประมาณ 40 และร้อยละ 1 ของประชากรป่วยเป็นโรค โดยเฉลี่ยคู่แต่งงานที่เสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียจะสูงประมาณทุก 1 ใน 5 ของคู่แต่งงาน เนื่องจากมียืนธาลัสซีเมียเป็นยีนด้อย (autosomal recessive) ผู้ที่เป็นพาหะจะไม่มีอาการผิดปกติ แต่ถ้าเป็นโรคชนิดรุนแรงและจะต้องได้รับการรักษาตลอดอายุขัย สาเหตุที่สำคัญของการเกิดภาวะซีดในโรคธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติของกระบวนการสร้างเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยเรียกว่า ineffective erythropoiesis

การสร้างเม็ดเลือดแดง มีจุดกำเนิดเริ่มมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงชนิด pluripotent stem cells (PPSC) โดย PPSC มีคุณสมบัติในการแบ่งตัว (self renewal) และการเจริญแก่ตัวเป็นเม็ดเลือดแดงต่อไป เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจริญเติบโตจาก PPSC แยกเป็นตัวอ่อนของเม็ดเลือดแดงชนิด committed progenitor cells โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture technique) เซลล์เม็ดเลือดตัวแรกที่สามสามารถแสดงให้เห็นว่าเจริญไปเป็นตัวอ่อนของสายเม็ดเลือดแดงโดยการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เรียกว่า colony forming unit-erythrocyte (CFU-E) จากนั้นจะมีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวจากเซลล์ตัวอ่อน (pronormoblast) เป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวแก่ (erythrocyte) โดยอาศัยปัจจัยควบคุม เช่น growth factors ซึ่งเป็นสารไกลโคโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นฮอร์โมน รวมทั้งสารไซโตไคน์ซึ่งประกอบด้วย interferon, interleukin ชนิดต่างๆ, colony stimulating factor (CSF), erythropoietin (EPO) เป็นต้น Interleukin เป็นสาร cytokine ที่สร้างมาจากเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte สาร interleukin ที่ควบคุมกระบวนการสร้างเม็ดเลือดมีหลายชนิดได้แก่ IL-1 ถึง IL-12 สำหรับ interleukin-3 นั้นสร้างจาก activated T-cell ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดสายต่างๆ ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยความสัมพันธ์ของสาร interleukin กับกลไกการเกิดโรคต่างๆ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานการศึกษาความสำคัญของสารดังกล่าวในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย

Ineffective erythropoiesis พยาธิวิทยาของโรคธาลัสซีเมียเกิดจากการสะสมของโกลบินส่วนเกินอยู่ในเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกทำลายง่ายกว่าปกติ ไชกระดูกจึงต้องสร้างเม็ดเลือดแดงมากขึ้น แต่เม็ดเลือดแดงเหล่านี้จะถูกทำลายไปตั้งแต่ระยะที่เป็นเซลล์อ่อน ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดภาวะซีดในผู้ป่วย จากการรายงานลักษณะเม็ดเลือดแดงในไขกระดูกของผู้ป่วย homozygous β -thalassemia พบว่ามี early polychromatic erythroblast และ late polychromatic erythroblast และมีการตกตะกอนของสารอัลฟาโกลบินอยู่ในไซโตพลาสซึมซึ่งบ่งชี้ถึงภาวะ ineffective erythropoiesis นอกจากนี้พบว่าเมื่อการเกิดภาวะ ineffective erythropoiesis เพิ่มขึ้น ทำให้มีอัตราการเกิดภาวะเซลล์ตายหรือ apoptosis เพิ่มขึ้นด้วย

สัญญาณภายในเซลล์ (signal transduction) ในกระบวนการสร้างเม็ดเลือดแดง นอกจากอาศัยปัจจัยควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังพบว่าสัญญาณภายในเซลล์มีความสำคัญอีกด้วย สาร growth factors มีการส่งสัญญาณ (signal) ผ่านผนังเซลล์ไปยังนิวเคลียส โดย growth factors จะจับกับ receptor ที่จำเพาะบนผิวเซลล์ การจับนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ receptor ซึ่งส่งผลให้มีการปล่อยตัวกลาง (secondary messenger) ออกมากระตุ้นเอนไซม์ในกระบวนการส่งสัญญาณ (signal transduction) ให้ทำงาน ในที่สุดสัญญาณจะถูกส่งจนถึงนิวเคลียสแล้วไปกระตุ้น transcription factors ทำ

ให้มีการสร้างดีเอ็นเอและควบคุมการเจริญแบ่งตัวของเซลล์ต่างๆ สำหรับสัญญาณภายในเซลล์ที่เกิดจากการกระตุ้นของสารไซโตไคน์มีหลายชนิดขึ้นกับชนิดของไซโตไคน์ ตัวอย่างเช่น การจับของสารไซโตไคน์ชนิด interleukin-6 และ receptor ทำให้มีการปล่อยสาร adenylate cyclase ออกมากระตุ้นให้มีการสร้าง cyclic AMP เพิ่มขึ้นใน bladder cancer cell lines (MGH) อย่างไรก็ตามรายละเอียดของขบวนการต่างๆยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างชัดเจน จากการศึกษาพบว่าสัญญาณภายในเซลล์มีความสำคัญต่อการทำงานของขบวนการ metabolism ต่างๆในร่างกาย รวมทั้งขบวนการสร้างเม็ดเลือดและขบวนการเกิดภาวะเซลล์ตายแบบ apoptosis ในโรคหลายชนิด เช่น มะเร็ง เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับกลไกและสัญญาณภายในเซลล์ที่ควบคุมขบวนการสร้างเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาถึงความสำคัญของ interleukin-3 และการตรวจหาชนิดของสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะ ineffective erythropoiesis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งผลการทดลองที่ได้จากโครงการนี้ทำให้นักวิจัยและบุคลากรทางการแพทย์ทราบถึงกลไกของการควบคุมการสร้างเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติของผู้ป่วยธาลัสซีเมียและเป็นประโยชน์ในการรักษาต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 ศึกษาความสำคัญของสารไซโตไคน์ (cytokine) ชนิด interleukin-3 ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดง (erythroid progenitor cells) ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E

2.2 ศึกษาสัญญาณภายในเซลล์ (signal transduction pathways) ชนิด JAK2, phospholipase-C, protein kinase C ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E

3. ระเบียบวิธีวิจัย

ส่วนที่ 1 การเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยธาลัสซีเมียและการเพาะเลี้ยง erythroid precursor cells เพื่อใช้ในการศึกษา โดยเริ่มต้นจากการนำเลือดผู้ป่วยธาลัสซีเมียมาปั่นแยก mononuclear cells ด้วย Ficoll-Hypaque และทำการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงที่ต้องการด้วยวิธี positive selection โดยใช้ monoclonal antibodies ชนิด CD34 positive (CD34+) และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสารกระตุ้นการเจริญเติบโต เช่น erythropoietin (EPO), stem cell factor จนได้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงที่ต้องการ

ส่วนที่ 2 การศึกษาความสำคัญของสารไซโตไคน์ชนิด interleukin-3 ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงจากคนไขธาลัสซีเมีย โดยการศึกษา viability ของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงทั้งก่อนและหลังให้สาร interleukin-3 โดยวิธี trypan blue staining

ส่วนที่ 3 การตรวจสอบสัญญาณภายในเซลล์ชนิด Jak2, phospholipase C, protein kinase C ต่อการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดง โดยใช้สารยับยั้ง (inhibitor) ซึ่งมีความจำเพาะต่อสัญญาณภายในเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น AG-490 ซึ่งเป็นสารยับยั้งของ Jak2, U-73122 ซึ่งเป็นสารยับยั้งของ Phospholipase C และ Ro-318220 ซึ่งเป็นสารยับยั้งของ Protein Kinase C โดยนำสารยับยั้งมาทดสอบเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หลังจากได้รับสารดังกล่าว จากนั้นทำการศึกษาโดยวิธี Flow cytometry

ส่วนที่ 4 การวิเคราะห์และรายงานผล ถ้าสารยับยั้งที่จำเพาะต่อสัญญาณภายในเซลล์ชนิดใดมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงแสดงให้เห็นว่าสัญญาณภายในเซลล์นั้นๆจะมีความสำคัญต่อขบวนการสร้างเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติไปในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

4. แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

ระยะเวลาโครงการ 1 ปี

ตั้งแต่ กรกฎาคม 2547 ถึง กรกฎาคม 2548

การดำเนินงาน	เดือนที่
1. การเก็บเลือดผู้ป่วยธาลัสซีเมียและวิเคราะห์หาค่าตรรกษณ์ต่างๆของเม็ดเลือดแดงและชนิดฮีโมโกลบิน	1-2
2. การเพาะเลี้ยง erythroid precursor cells โดยวิธี positive selection (antibody CD 34 +)	3-4
3. ศึกษาความสำคัญของสาร interleukin-3	5-7
4. การตรวจสอบหาชนิดของสัญญาณภายในเซลล์	8-10
5. การวิเคราะห์ข้อมูลและรายงานผล	11-12

5. งบประมาณโครงการ

	ปีที่ 1
1. หมวดค่าตอบแทน - ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000
2. หมวดค่าวัสดุ - สารเคมีและอุปกรณ์	110,000
3. หมวดค่าใช้สอย - ค่าถ่ายเอกสารและอื่นๆ	7,000
รวมงบประมาณโครงการ	237,000

เนื้อหาทบทวน

1. บทนำ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติในการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน ทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้น แดงง่าย และผู้ป่วยมีปัญหาซีดเรื้อรัง การสร้างฮีโมโกลบินถูกกำหนดโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 และ 16 ฮีโมโกลบินของคนปกติจะประกอบด้วยสายแอลฟาโกลบินและสายเบต้าโกลบินรวมตัวกันเป็นโมเลกุลของฮีโมโกลบิน (Hb A) ซึ่งการสร้างสายโกลบินทั้ง 2 เส้นนี้ในเม็ดเลือดแดงของคนปกติจะเท่าๆกัน แต่ในโรคธาลัสซีเมียจะมีความผิดปกติ คือ เม็ดเลือดแดงไม่สามารถสร้างสายโกลบินสายใดสายหนึ่งได้ หรือสร้างได้ในปริมาณที่น้อยกว่าอีกสายหนึ่ง เนื่องจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการสร้างฮีโมโกลบินทำให้สร้างฮีโมโกลบินได้น้อยลง ดังนั้นปริมาณของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงมีปริมาณน้อยลง หากมีโกลบินชนิดใดชนิดหนึ่งน้อยกว่าปกติจะทำให้การสร้างสายโกลบินเสียสมดุล (imbalance)

อุบัติการณ์ของธาลัสซีเมีย

ธาลัสซีเมียเป็นกลุ่มโรคเลือดที่มีรายงานพบผู้ป่วยใหม่ประมาณ 100,000 รายต่อปี พบมากในแถบประเทศอิตาลี, กรีก, ตะวันออกกลาง, เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแอฟริกา โดยเบต้าธาลัสซีเมีย (β -thalassemia) พบได้มากในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ในขณะที่อัลฟาธาลัสซีเมีย (α -thalassemia) พบได้มากในทวีปเอเชีย ในประเทศไทยพบว่าโรคธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยที่สุดในคนไทยซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. อัลฟาธาลัสซีเมีย (α -thalassemia)

- | | |
|---|-------------------------|
| 1.1 พาหะของ α -thalassemia 1 | พบประมาณ 5% ของประชากร |
| 1.2 พาหะของ α -thalassemia 2 | พบประมาณ 16% ของประชากร |
| 1.3 พาหะของฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริง (Hb CS) | พบประมาณ 4% ของประชากร |

2. เบต้าธาลัสซีเมีย (β -thalassemia)

- | | |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| 2.1 พาหะของ β -thalassemia 1 | พบประมาณ 5% ของประชากร |
| 2.2 พาหะของฮีโมโกลบินอี (Hb E) | พบประมาณ 13% ของประชากร ² |

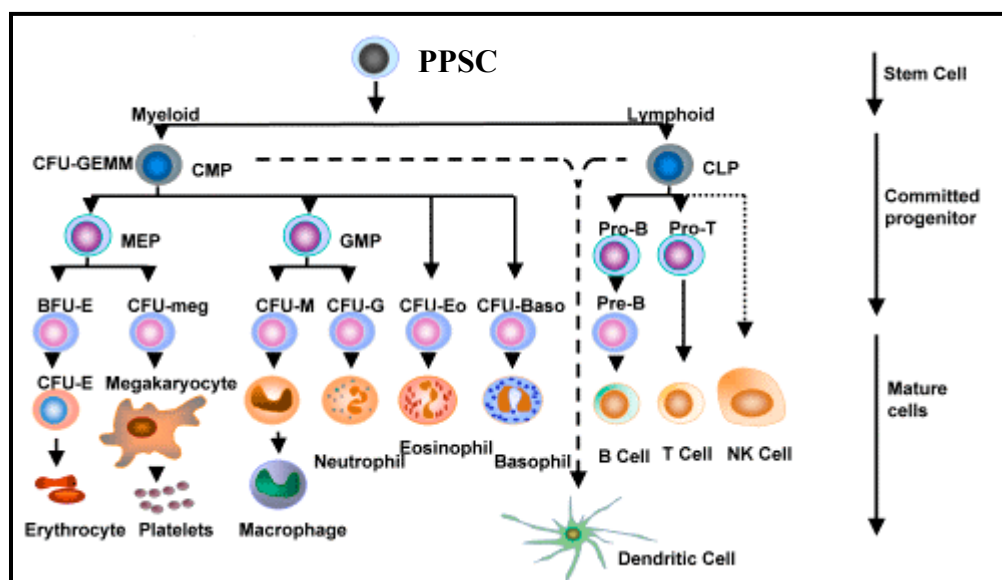
โดยเฉลี่ยแล้วพบ α -thalassemia 20-30%, β -thalassemia 3-9%, HbE สูงถึง 10-53% และ Hb CS 1-8% กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ เนื่องจากมียีนผิดปกติสูงและหลากหลายชนิดในประชากรทำให้เกิดโรค ธาลัสซีเมียที่มีความรุนแรงแตกต่างกันได้มากกว่า 60 ชนิด แต่มีโรคธาลัสซีเมียที่สำคัญ 4 โรคคือ Homozygous β -thalassemia, β -thalassemia/Hb E, Hb Bart's hydrops fetalis และ Hb H disease

โดยในจำนวนนี้ 3 โรคแรกเป็นโรคธาลัสซีเมียที่กระทรวงสาธารณสุขและมูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทยให้ความสำคัญในแง่ของการหาทางควบคุมป้องกัน

การสร้างเม็ดเลือด

เซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดทุกสายคือ pluripotent stem cell (PPSC) ซึ่งมีความสามารถในการแบ่งตัว (long-term repopulation) ในคนปกติสามารถพบเซลล์นี้ในไขกระดูกและพบปริมาณเล็กน้อยหมุนเวียนอยู่ในกระแสโลหิตด้วย PPSC มีความสามารถที่จะแบ่งตัวแบบอนูรักษ์ (self renewal) ได้เป็น PPSC ใหม่ 2 เซลล์ หรือจะแบ่งตัวแล้วมีพัฒนาการ (differentiation) ไปเป็นต้นกำเนิดของเม็ดเลือดสายใดสายหนึ่ง โดยในการสร้างเม็ดเลือดแต่ละชนิดต้องการสาร hematopoietic growth factor หรือ cytokine ต่างๆ ได้แก่ Colony

stimulating factor เช่น stem cell factor, erythropoietin, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin ชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 1.1 แสดงวิวัฒนาการของเม็ดเลือดต่าง ๆ

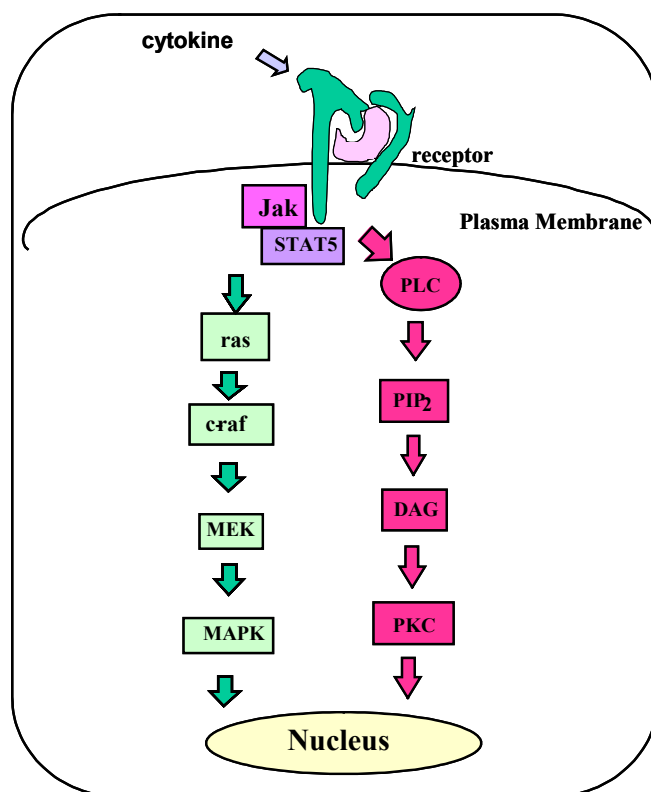
ภาวะ Ineffective erythropoiesis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

พยาธิสภาพในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเป็นผลสืบเนื่องมาจากภาวะชดเชยที่เริ่มมาตั้งแต่แรกคลอด อาการชดเชยดังกล่าวเกิดจากความผิดปกติภายในเม็ดเลือดแดง กล่าวคือเมื่อมีการสร้าง α -globin หรือ β -globin ลดลงทำให้เกิด α - หรือ β -thalassemia ซึ่งมีผลทำให้มี globin chain อีกชนิดหนึ่งเกินมาและตกตะกอนอยู่ในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนหรือถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง ผลของการย่อยสลาย globin chain ส่วนเกินดังกล่าวร่วมกับการตกตะกอนบางส่วน ทำให้เกิดพยาธิสภาพกับผนังของเม็ดเลือดแดงทั้งในส่วนที่เป็นโปรตีนและไขมัน โดยส่วนหนึ่งจะเป็นไปตามกระบวนการ oxidation ด้วย free oxygen radical สุดท้ายจะทำให้ผนังเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียแข็งตัว (rigidity) ทำให้เสียความยืดหยุ่น (loss of deformability) สูญเสียคุณภาพทางฟิสิกส์คือ ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (red cell deformability) ภาวะไม่สมดุลของน้ำภายในเซลล์ (hydration and dehydration) เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียจะถูกทำลายโดย reticuloendothelial system ได้ง่ายกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ อายุเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียจะสั้นกว่าของคนปกติมาก การตายของเม็ดเลือดแดงก่อนที่จะเจริญไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวแก่ที่ปล่อยออกมาสู่กระแสเลือดเรียกว่า **Ineffective erythropoiesis** การทำลายเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเกิดขึ้นตั้งแต่มีการสร้างเม็ดเลือดแดงในระยะตัวอ่อน (erythroid cells) ในไขกระดูก เพราะมีการสร้างฮีโมโกลบินตั้งแต่ระยะ pronormoblast ซึ่งเป็นระยะแรกของเซลล์สายเม็ดเลือดแดงที่สามารถระบุได้จากสัณฐานวิทยา (morphology) และยังคงอาจเป็นได้ในระยะ Colony forming unit-E (CFU-E) และ Burst forming unit-E (BFU-E) โดยระยะนี้ยังตรวจแยกชนิดไม่ได้ทางสัณฐานวิทยา (morphology) ต้องใช้คุณสมบัติพิเศษ คือ ความสามารถในการสร้างกลุ่มเซลล์ (colony) ในการสร้างเซลล์นอกร่างกาย และมีการตรวจพบพยาธิสภาพของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนภายในไขกระดูกของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ได้แก่ การตรวจพบตะกอน (precipitating mass) ภายใน cytoplasm, การตรวจพบเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) ผิดปกติจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนซึ่งบ่งชี้ถึงภาวะ

ineffective erythropoiesis ซึ่งแสดงถึงว่าไขกระดูกพยายามสร้างเม็ดเลือดแดงให้มากขึ้นเพื่อทดแทนเม็ดเลือดแดงที่ถูกทำลายไป แต่การแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงในไขกระดูกไปเป็นเม็ดเลือดแดงตัวแก่ (mature red cell) ไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร ซึ่งทำให้เกิดผลกระทบต่อการแสดงออกของโรค โดยทำให้ผู้ป่วยมีอาการซีดเรื้อรังและอาการอื่นๆตามมา เช่น ม้ามโต, ภาวะเหล็กเกิน เป็นต้น

สัญญาณภายในเซลล์ (Signal transduction, signaling pathway)

การเจริญเติบโตของเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนไปเป็นเม็ดเลือดแดงตัวแก่และถูกปล่อยออกสู่กระแสเลือดนั้น นอกจากจะถูกควบคุมโดย hemopoietic growth factors หลายชนิดแล้ว ยังพบว่าสัญญาณภายในเซลล์ (signaling pathways) มีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมอีกด้วย โดยพบว่าสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นของสาร cytokine คือ ชนิด Janus Kinase (Jak) ซึ่งเป็นสาร tyrosine kinase มีความสำคัญ โดย Jak จะไปกระตุ้นการทำงานของโปรตีนอีกตัวหนึ่งชื่อ Stat (signal transducers and activator of transcription) จากนั้น Jak/Stat จะทำงานร่วมกันเพื่อส่งสัญญาณต่อไป (downstream signaling) และมีผลต่อ transcription factor ในนิวเคลียสในที่สุด ต่อมาในปี 2000 โดยการวิจัยของ Sui X. และคณะพบว่าสัญญาณภายในเซลล์ชนิด PI-3K เกี่ยวข้องกับกลไกการยับยั้งการเกิดภาวะ apoptosis หลังการใช้สาร Erythropoietin (EPO) และ Stem cell factor (SCF) ในขบวนการสร้างเม็ดเลือดแดง จากการศึกษาต่างๆจะเห็นได้ว่าสัญญาณภายในเซลล์มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในขบวนการสร้างเม็ดเลือดแดงและการบกพร่องของสัญญาณภายในเซลล์มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่างๆอีกด้วย



รูปที่ 1.2 แสดงสัญญาณภายในเซลล์ที่ควบคุมโดยสาร ไซโตไคน์

(Jak=Janus kinase, PLC= Phospholipase C, PKC= Protein kinase C, MAPK= mitogen activated protein kinase)

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 ศึกษาความสำคัญของสารไซโตไคน์ (cytokine) ชนิด interleukin-3 ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดง (erythroid precursor cells) ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E

2.2 ศึกษาสัญญาณภายในเซลล์ (signal transduction pathways) ชนิด Jak2, phospholipase C, protein kinase C ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E

3. วิธีวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่าง

งานวิจัยครั้งนี้ใช้ peripheral blood จำนวน 20 ml ซึ่งมี sodium heparin เป็น anticoagulant มาเป็นตัวอย่างในการวิจัย การคัดเลือกและแบ่งกลุ่มตัวอย่างกระทำโดยใช้ประวัติเป็นตัวบ่งชี้ ซึ่งสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มผู้มีสุขภาพดี จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี และมีค่าทางโลหิตวิทยาปกติ จำนวน 5 ราย
2. กลุ่มผู้ป่วย จากโรงพยาบาลศิริราชและโรงพยาบาลศูนย์นครปฐม โดยแยกเป็นชนิดของธาลัสซีเมียดังนี้
 - 2.1 β -thalassemia/Hb E ไม่ตัดม้าม จำนวน 7 ราย
 - 2.2 β -thalassemia/Hb E ตัดม้าม จำนวน 6 ราย

3.2 วัสดุอุปกรณ์ (Materials)

3.2.1 เครื่องมือ

1. Laminar flow class II cabinet (NUAIR)
2. Refrigerated centrifuge (HERMLE Labnet 2 323 K, GIBTHAI)
3. Light microscope (Olympus)
4. Inverted microscope (Olympus)
5. Refrigerated centrifuge (RIS)
6. Waterbath (memmert)
7. CO₂ incubator (SHER LAB)
8. Hemocytometer (E-C Apparatus)
9. Separating column (MACS/LS)
10. Polystyrene centrifuge tube (CORNING Incorporated)
11. Tissue culture flask (TPP)
12. Slides (Sail brand)
13. Plastic syring 20 ml (Terumo, Nipro)
14. Needle No.21 G×1½" (Terumo)
15. Eppendoff tube
16. Filter tips (ART molecular bioproducts)
17. Automatic pipette (Gilson Medical Electronics, Villier-le-bel France)
18. Pipetteman

3.2.2 น้ำยา (Chemical and reagent)

1. phosphate buffer saline/2 mM EDTA
2. 0.5% human serum albumin in PBS
3. red cell lysis buffer

4. IMDM (GIBCO Invitrogen)
5. Histopaque (Sigma Diagnostics)
6. Fetal Calf Serum (FCS) (GIBCO, GIBTHAI)
7. Human AB serum (HAB)
8. Erythropoitin (EPO)(1000 U/ml)
9. Stem cell factor (SCF) (1 μ g/ml)
10. IL-3 (10 μ g/ml)
11. 0.4% trypan blue in PBS (Sigma)
12. CD34⁺ isolation kit (Macs)

3.3 วิธีทดลอง

3.3.1 การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาและชนิดของฮีโมโกลบินโดยเครื่อง automated HPLC

3.3.2 การคัดเลือก erythroid precursor cell จากเลือดตัวอย่างโดยวิธี CD 34 positive selection

1. นำ peripheral blood ซึ่งใช้ sodium heparin เป็น anticoagulant จำนวน 20 ml มาปั่นด้วยแรง 600 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 20°C
2. ดูด plasma ที่กั้นจากนั้นเจือจางเลือดด้วย PBS/2mM EDTA ประมาณ 2 เท่า ของจำนวน packed red cell
3. ค่อยๆ layer เลือดที่ dilute แล้วบนน้ำยา Ficoll hypaque อัตราส่วนเลือด:น้ำยา ประมาณ 10:4 จากนั้นปั่นด้วยแรง 400 g นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 20°C
4. ดูดชั้น PBS ที่กั้นจากนั้นดูดชั้น interface ซึ่งเป็นชั้น mononuclear cell นำมาล้างโดยเติม PBS 5 ml แล้วปั่นด้วยแรง 300 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20°C
5. ดูด supernatant ที่กั้นจากนั้น resuspend ตะกอนด้วย red cell lysis buffer 3 ml (สำหรับเลือดคนปกติ) หรือ 5 ml (สำหรับเลือดผู้ป่วย) จากนั้น incubate ใน waterbath 37°C นาน 5 นาที
6. เติม PBS 10 ml จากนั้นปั่นด้วยแรง 400 g นาน 7 นาที ที่อุณหภูมิ 20°C จนได้ตะกอน (pellet)
7. ดูด supernatant ที่กั้นจากนั้น resuspend pellet ด้วย PBS 10 ml แล้วนำไปปั่นด้วยแรง 200 g นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 20°C จนได้ pellet
8. ดูด supernatant ที่กั้นจากนั้น resuspend pellet ด้วย 0.5% human serum albumin in PBS 10 ml แล้วนำไปปั่นด้วยแรง 200 g นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 20°C ที่อุณหภูมิ 4°C
9. ใช้ suspension 40 μ l ผสมกับสี trypan blue 40 μ l จากนั้นนำไป count โดย counting chamber
10. นำ suspension ไปปั่นด้วยแรง 400 g นาน 7 นาที จะได้ตะกอนสีขาวขุ่น
11. ดูด supernatant ออก ให้มี final volume $\leq$ 300 μ l จากนั้นเติม FCR blocking และ CD 34+ ในปริมาณที่คำนวณได้จาก cell count (100 μ l : 10⁸ total cell) แล้ว incubate ในน้ำแข็งนาน 30 นาที
12. เตรียม LS separating column โดยผ่าน 0.5% human serum albumin in PBS ลงไป 3 ml จากนั้นเติม cell suspension แล้วจึงล้างด้วย buffer 3 ml 2 ครั้ง
13. นำ 0.5% human serum albumin in PBS จำนวน 5 ml มาทำการ flush out สารละลายใน LS column ลง conical tube 2 ครั้ง จากนั้นปั่นตกด้วยแรง 400 g นาน 7 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
14. ดูด supernatant ออก เหลือ pellet ไว้ทำการ culture ต่อไป

3.3.3 การทำ erythroid progenitor cell culture

1. นำ pellet ที่ได้จากการคัดเลือกว่าด้วย CD34+ มาเติม culture media ที่มีส่วนผสมดังนี้คือ IMDM 7 ml, FCS 900 μ l, HAB 1.5 ml, EPO (1000U/ml) 20 μ l, SCF (1 μ g/ml) 200 μ l จากนั้นแบ่ง cell suspension เป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน นำแต่ละส่วนใส่ลงใน flask ขนาด 50 ml จากนั้นเติม IL-3 (1 μ g/ml) 50 μ l ลงใน flask ที่ labeled + IL3 และไม่เติม IL3 ลงใน flask ที่ labeled - IL3
2. นำ flask ไป incubate ที่ 37°C ในตู้ CO₂ incubator โดยจะนับวันแรกเป็นวันที่ศูนย์ โดยจะทำการ culture จนถึงวันที่ 7 โดยจะทำการเปลี่ยน medium ในวันที่ 3

3.3.4 ขั้นตอนการเปลี่ยน medium

1. นำ cell suspension จาก flask ไปใส่ centrifuge tube นำไปปั่นด้วยแรง 400 g นาน 7 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
2. นำ pellet ไปเติม medium เหมือนขั้นตอนการ culture ในวันที่ศูนย์ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น
3. incubate ที่อุณหภูมิ 37°C ใน CO₂ incubator

3.3.5 ขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (viability cell) โดยวิธี trypan blue staining

1. ดูด suspension มา 40 μ l ผสมกับสี trypan blue 40 μ l จากนั้น ดูดส่วนผสมมา 20 μ l ใส่ counting chamber (hemocytometer)
2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที
3. ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วคำนวณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยเซลล์ตายจะติดสีน้ำเงิน ส่วนเซลล์มีชีวิตจะไม่ติดสี
4. การคำนวณ % cell viability

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตที่นับได้} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้}}$$

3.3.6 การศึกษาสัญญาณภายในเซลล์โดยการใช้ Flow cytometer

1. นำ erythroid precursor cells ที่ได้จากการ culture ในวันที่ 7 มา นับจำนวนเซลล์
2. เตรียมสารละลายยับยั้ง (inhibitor) ที่จำเพาะต่อสัญญาณภายในเซลล์ 3 ชนิดคือ AG-490 (สารยับยั้ง Jak2), U-73122 (สารยับยั้ง phospholipase-C), Ro-318220 (สารยับยั้ง Protein kinase C) โดยละลายสารยับยั้งใน 1% DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 μ M
3. นำสารละลาย inhibitor มา incubate กับ erythroid progenitor cells ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. นำเซลล์หลังการ incubate มาปั่นที่ 12000 rpm 5 นาที และล้างด้วย 1x D-PBS จำนวน 1 ml
5. ปั่นที่ 12000 rpm 5 นาที และนำ pellet มาเติมสารย้อมประกอบด้วย 1x binding buffer ผสมกับ Annexin V-labelled FITC และ Propidium iodide (PI) จำนวน 100 μ l, incubate ในที่มืด 15 นาที
6. นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometry

3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (statistical package for social science) version 10.0 (Microsoft Corp., USA) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย apoptosis ระหว่างกลุ่มตัวอย่างใช้ Wilcoxon Mann Whitney test ถ้าค่า p value < 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. ผลการวิจัย

จากการศึกษาความสำคัญของสาร interleukin-3 และสัญญาณภายในเซลล์ที่ควบคุมกระบวนการ ineffective erythropoiesis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ซึ่งมีความรุนแรงของโรคต่างกัน ข้อมูลต่างๆทางโลหิตวิทยาของคนปกติที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ชนิดไม่ตัดม้ามและตัดม้ามแสดงดังตารางที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงต้นกำเนิดที่มีชีวิตอยู่หรือ cell viability ในวันแรกของการเพาะเลี้ยงทั้งที่ได้จากก่อนและหลังการคัดเลือกด้วยวิธี CD34 positive (CD34 เป็น marker ที่จำเพาะกับเซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อนในระยะแรก) โดยการย้อมสี trypan blue พบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่มีชีวิตอยู่ที่ได้ก่อนการคัดเลือกด้วย CD34 สูงกว่าเซลล์ที่ได้หลังการคัดเลือกด้วย CD34 ทั้งในกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (ตารางที่ 4.4), ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ไม่ตัดม้าม (ตารางที่ 4.5) และผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ตัดม้าม (ตารางที่ 4.6) หลังจากได้เซลล์ของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ผ่านการคัดเลือกด้วย CD34 positive selection แล้วนำเซลล์ส่วนนี้ไปเพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสาร interleukin-3 เป็นเวลา 7 วันโดยทำการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ พบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีมีค่าสูงสุด ในขณะที่เซลล์จากกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ตัดม้ามมีค่าต่ำสุด และพบว่ากลุ่มเซลล์ที่มีการเติมสาร interleukin-3 ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์จะมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตอยู่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เติมสารดังตารางที่ 4.7 จากการย้อมสีเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่เป็น basophilic normoblast โดยไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่มาจากกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีลักษณะเหี่ยว นิวเคลียสผิดปกติคล้ายเซลล์ตายแบบ apoptosis ดังรูปที่ 4.2 วัดปริมาณจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงต้นกำเนิดที่ตายแบบ apoptosis ในกลุ่มคนต่างๆสามารถทำได้โดยการย้อมเซลล์ด้วย annexin-V labeled FITC และ propidium iodide (PI) และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometry ผลจากรูปที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของเซลล์ตายแบบ apoptosis จากกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีที่ใส่และไม่ใส่สาร interleukin-3 ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์คือ 18.1 และ 21.8 % ส่วนกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ตัดม้ามที่ใส่และไม่ใส่สาร interleukin-3 ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์มีค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของเซลล์ตายแบบ apoptosis เท่ากับ 21.7 และ 28 % ตามลำดับ จากผลพบว่าเซลล์ผู้ป่วยธาลัสซีเมียและเซลล์ที่ไม่ได้เติมสาร interleukin-3 ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายแบบ apoptosis สูงกว่าเซลล์จากคนปกติและเซลล์ที่เติมสาร interleukin-3 ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยการย้อม trypan blue โดยการตายแบบ apoptosis นี้แสดงถึงการเกิด ineffective erythropoiesis ซึ่งพบมากในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE โดยเฉพาะผู้ป่วยชนิดนี้หลังตัดม้าม นอกจากนี้การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาสัญญาณภายในเซลล์ที่ควบคุมกระบวนการ ineffective erythropoiesis นี้โดยการใช้สารยับยั้งสัญญาณที่สงสัย (inhibitor) คือ RO-318220 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง Protein Kinase C (PKC), AG-490 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง JAK2 และ U-73122 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง Phospholipase C โดยใส่สารดังกล่าวลงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงที่เพาะเลี้ยงมานาน 7 วันและวิเคราะห์จำนวนเซลล์ตายแบบ apoptosis ด้วยเครื่อง flow cytometry ทั้งในกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี (รูปที่ 4.4), ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ไม่ตัดม้าม (รูปที่ 4.5) และผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ตัดม้าม (รูปที่ 4.6) ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ใส่สาร U-73122 มีเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของ apoptosis สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ใส่สารยับยั้งชนิดอื่นและเซลล์ที่ไม่ใส่สารยับยั้งใดๆเลย (control) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ apoptosis หลังการใส่สารยับยั้งแต่ละชนิดระหว่างกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ทั้งชนิดตัดม้ามและไม่ตัดม้ามแสดงในรูปที่ 4.7, 4.8, 4.9

และ 4.10 พบว่าจำนวนเซลล์ตายแบบ apoptosis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ตัดม้ามที่ใส่สาร RO-318220 ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์มีค่าสูงกว่าเซลล์จากคนปกติที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.1 ค่าตรวจฮีตต่าง ๆ ทางโลหิตวิทยาของคนปกติที่มีสุขภาพดี

ample No.	เพศ	อายุ	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV/MCH/MCHC	Wbc Differential					
						N	L	M	E	B	NRC
1	M	22	13.4	39.5	88.6/30.7/34.2	51	45	4	-	-	-
2	F	22	13.1	37.4	87.7/30.6/34.9	67	25	5	2	1	-
3	F	22	13.3	39.0	88.8/30.3/34.1	34	56	3	3	1	-
4	F	22	13.1	37.4	87.7/30.6/34.9	67	25	5	2	1	-
5	F	22	13.3	39.0	88.8/30.3/34.1	34	56	3	3	1	-

ตารางที่ 4.2 ค่าตรวจฮีตต่าง ๆ ทางโลหิตวิทยาของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ไม่ตัดม้าม

Sample No.	เพศ	อายุ	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV/MCH/MCHC	Wbc Differential					
						N	L	M	E	B	NRC
1	F	38	9.9	28.7	58.3/20.1/34.5	50	50	-	-	-	-
2	M	16	10.2	30.3	58.8/19.8/33.7	59	38	5	2	1	5
3	F	29	6.0	21.4	60.5/16.9/28.0	30	60	5	3	2	208
4	F	18	7.6	24.7	56.4/17.4/30.8	65	29	3	3	-	4
5	M	17	8.8	31.7	70.2/23.4/33.3	59	31	8	2	-	-
6	M	41	5.1	15.4	58.9/19.8/33.1	51	25	7	17	-	57
7	F	23	5.5	18.6	63.7/18.8/29.6	61	35	4	-	-	55

ตารางที่ 4.3 ค่าตรวจฮีตต่าง ๆ ทางโลหิตวิทยาของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia / HbE ตัดม้าม

Sample No.	เพศ	อายุ	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV/MCH/MCHC	Wbc Differential					
						N	L	M	E	B	NRC
1	F	27	5.1	18.6	67.9/18.6/27.4	33	65	2	-	-	390
2	F	18	5	17.7	65.1/18.4/28.2	49	47	1	2	1	305
3	M	33	5.7	18.7	74.5/22.7/30.5	44	48	4	4	-	272
4	F	27	5.5	18.5	70.9/20.2/28.2	54	24	21	1	-	385
5	F	31	5.6	22	87.6/22.3/25.5	23	71	1	2	3	729
6	F	18	7.1	24.2	85.2/25.0/29.3	46	45	4	5	-	578

ตารางที่ 4.4 แสดง % cell viability ทั้งก่อนและหลังการคัดเลือกด้วย CD 34+ จากคนปกติที่มีสุขภาพดี

Sample	% cell viability ก่อน selection ด้วย CD34+	% cell viability หลัง selection ด้วย CD34+
1	93.9	93.2
2	98.1	87.9
3	96.0	91.9
4	96.3	89.8
5	97.5	90.6
mean	96.3	90.7
SD	1.62	2.02

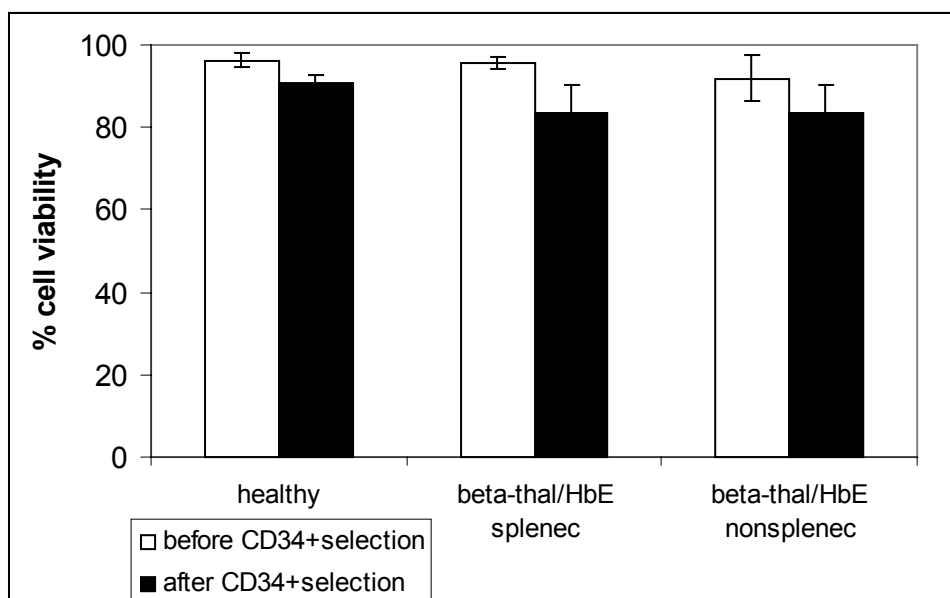
ตารางที่ 4.5 แสดง % cell viability ทั้งก่อนและหลังการคัดเลือกด้วย CD 34+ ของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia / HbE ไม่ตัดม้าม

Sample	% cell viability ก่อน selection ด้วย CD34+	% cell viability หลัง selection ด้วย CD34+
1	80.5	79.9
2	95.6	90.2
3	90.5	81.5
4	90.0	75.0
5	97.2	91.3
6	93.8	78.3
7	96.0	89.8
mean	91.9	83.7
SD	5.72	6.61

ตารางที่ 4.6 แสดง % cell viability ทั้งก่อนและหลังการคัดเลือกด้วย CD 34+ ของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia / HbE ตัดม้าม

Sample	% cell viability ก่อน selection ด้วย CD34+	% cell viability หลัง selection ด้วย CD34+
1	98.1	75.5
2	93.5	90.6
3	94.4	75.8
4	96.5	86.3
5	96.4	92.2
6	94.5	81.5
mean	95.6	83.7
SD	1.33	6.73

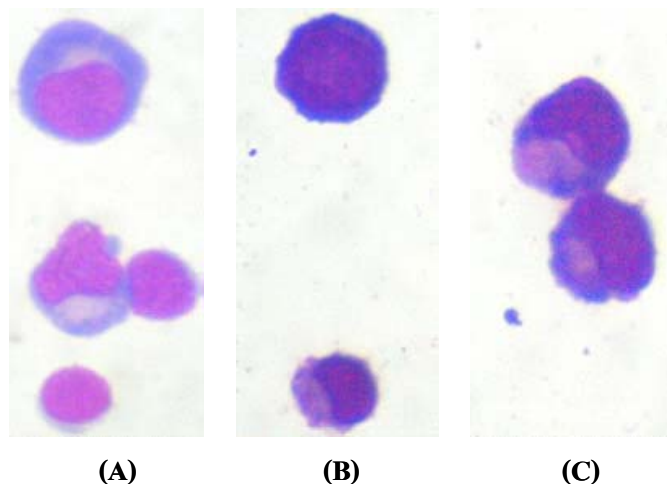
รูปที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยของ % viability cell ทั้งก่อนและหลังการคัดเลือกด้วย CD34 positive ในคนปกติที่มีสุขภาพดีเปรียบเทียบกับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/E ตัดม้ามและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/E ไม่ตัดม้าม



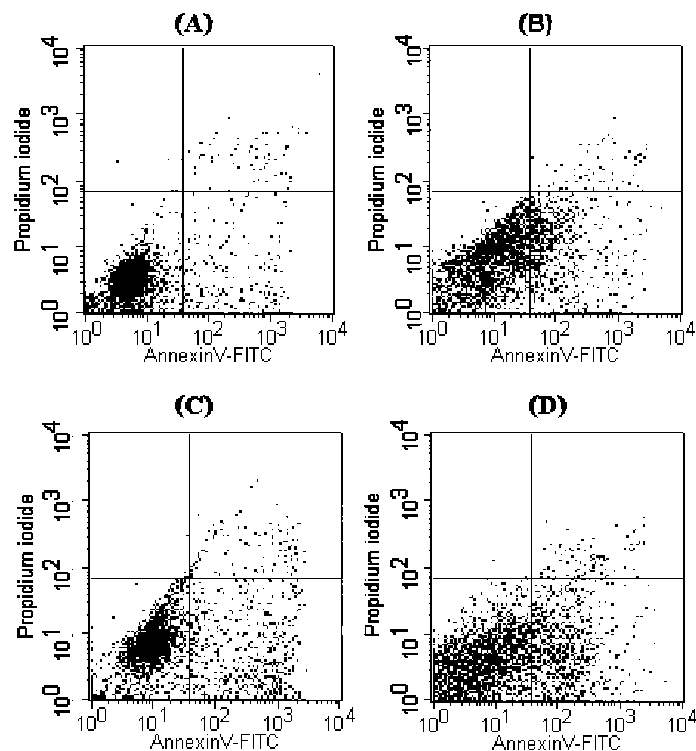
ตารางที่ 4.7 แสดงค่า mean $\pm$ standard deviation (SD) ของค่า % cell viability หลังการเพาะเลี้ยง erythroid progenitor cell จากตัวอย่างกลุ่มต่าง ๆ เป็นเวลา 3 และ 7 วัน

Subjects	Day 3		Day 7	
	IL3	noIL3	IL3	noIL3
Healthy subject	91.4 $\pm$ 4.0	88.2 $\pm$ 2.2	89.4 $\pm$ 5.5	86.8 $\pm$ 1.0
Splenectomized β -thal/E	80.3 $\pm$ 5.3	74.4 $\pm$ 2.2	79.9 $\pm$ 1.0	77.0 $\pm$ 3.5
Nonsplenectomized β -thal/E	85.3 $\pm$ 2.8	78.2 $\pm$ 5.5	84.7 $\pm$ 2.8	75.4 $\pm$ 3.4

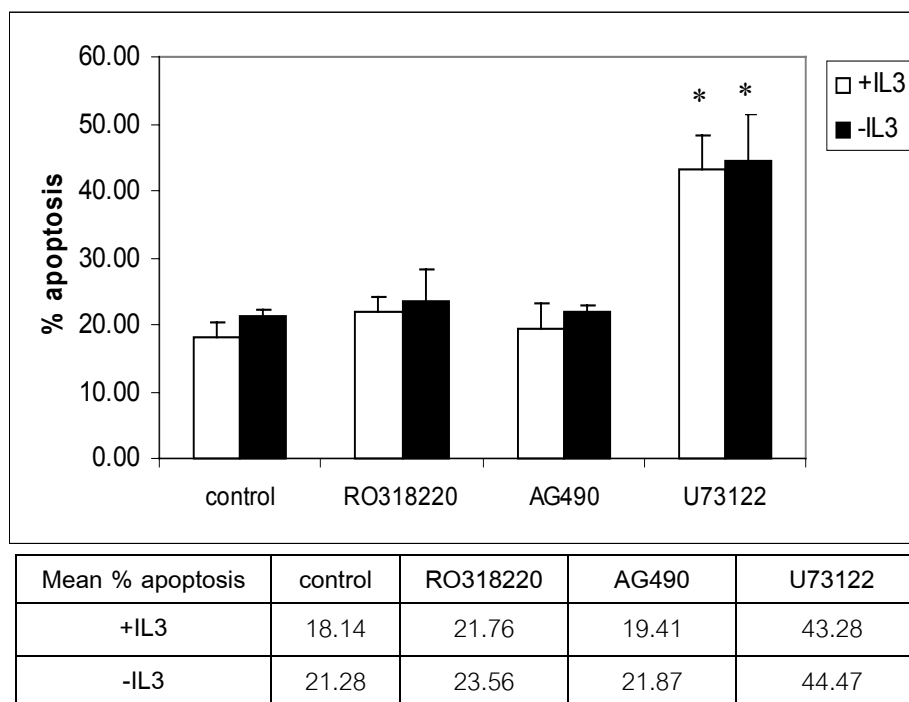
รูปที่ 4.2 แสดงรูปร่างเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันและทำการย้อมด้วยสี Wright
 (A) เซลล์จากกลุ่มผู้มีสุขภาพดี (B) เซลล์จากกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/E ไม่ตัดม้ามและ
 (C) เซลล์จากกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/E ตัดม้าม



รูปที่ 4.3 แสดงค่า % apoptosis ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง erythroid progenitor cells ของคนปกติ (A,B) และผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E ตัดม้าม (C,D) เป็นเวลา 7 วันโดยแบ่งเซลล์เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ใส่สาร IL-3 (A,C) และกลุ่มที่ไม่ใส่สาร IL-3 (B,D)

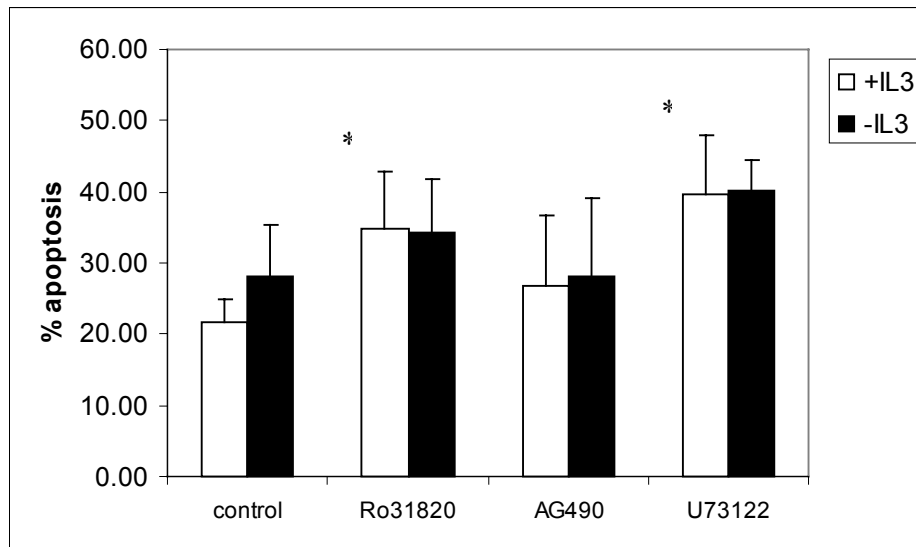


รูปที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ย % apoptosis ในคนปกติที่มีสุขภาพดีกลุ่มต่างๆ คือกลุ่มไม่ใส่สารยับยั้ง (control), กลุ่มใส่สาร RO-318220 (PKC inhibitor), กลุ่มใส่สาร AG-490 (JAK2 inhibitor), กลุ่มใส่สาร U-73122 (PLC inhibitor) ตามลำดับ



* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

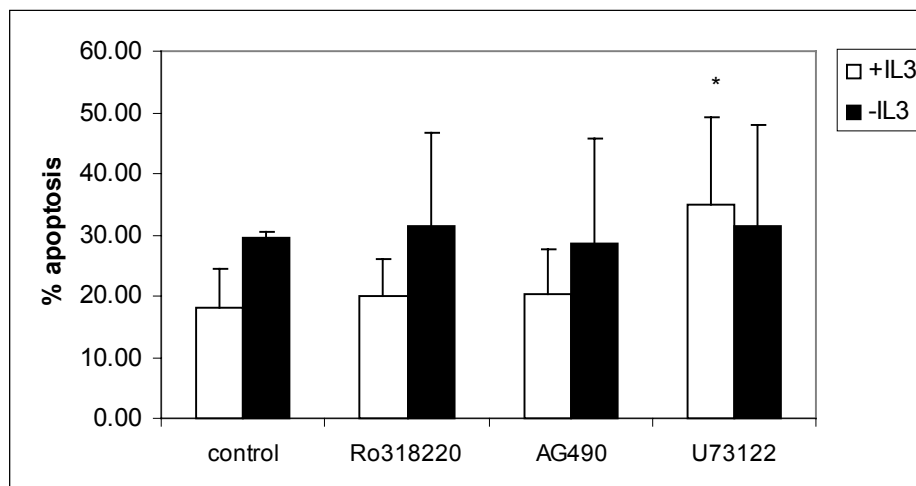
รูปที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ย % apoptosis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E ตัดม้ามกลุ่มต่าง ๆ คือกลุ่มไม่ใส่สารยับยั้ง (control), กลุ่มใส่สาร RO-318220 (PKC inhibitor), กลุ่มใส่สาร AG-490 (JAK2 inhibitor), กลุ่มใส่สาร U-73122 (PLC inhibitor) ตามลำดับ



Mean % apoptosis	control	RO318220	AG490	U73122
+IL3	21.74	34.85	26.77	39.77
-IL3	28.01	34.34	28.20	40.12

* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

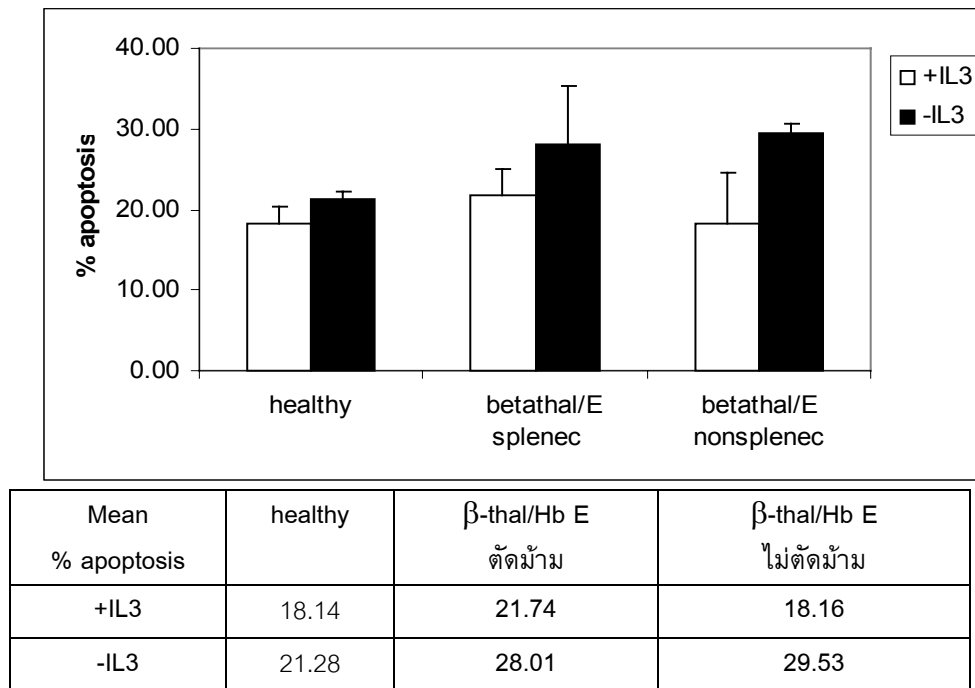
รูปที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ย % apoptosis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E ไม่ตัดม้ามกลุ่มต่าง ๆ คือกลุ่มไม่ใส่สารยับยั้ง (control), กลุ่มใส่สาร RO-318220 (PKC inhibitor), กลุ่มใส่สาร AG-490 (JAK2 inhibitor), กลุ่มใส่สาร U-73122 (PLC inhibitor) ตามลำดับ



Mean % apoptosis	control	RO318220	AG490	U73122
+IL3	18.16	20.09	20.28	234.99
-IL3	29.53	31.45	28.64	31.42

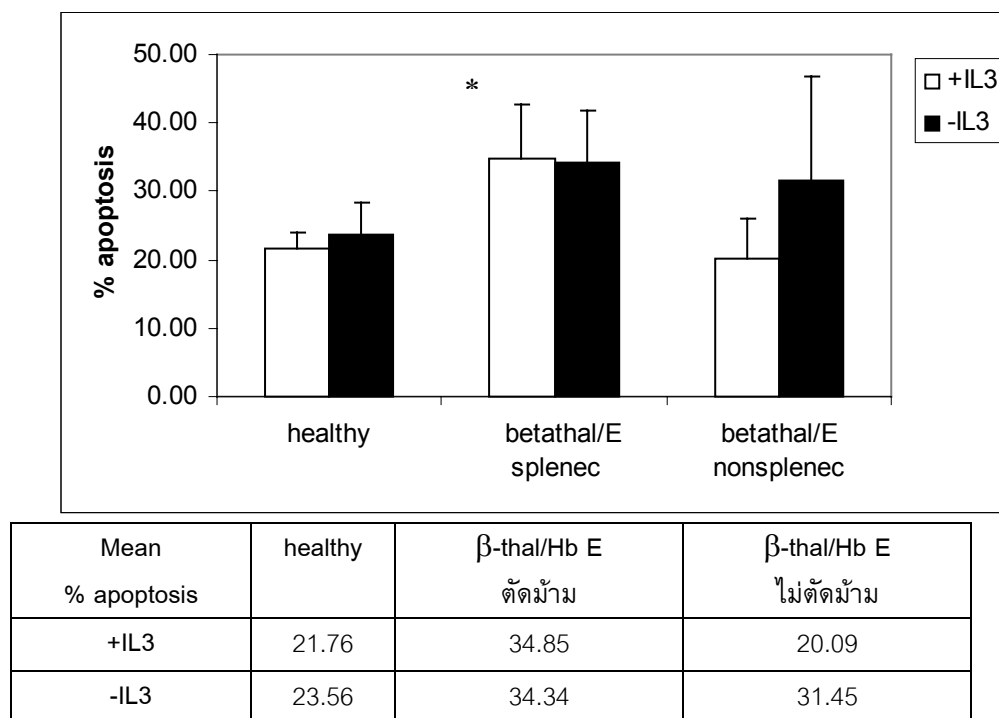
* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

รูปที่ 4.7 แสดงค่าเฉลี่ย % apoptosis จากกลุ่มที่ไม่ใส่สารยับยั้ง (control) จากคนปกติที่มีสุขภาพดี, ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E ตัดม้ามและไม่ตัดม้ามตามลำดับ



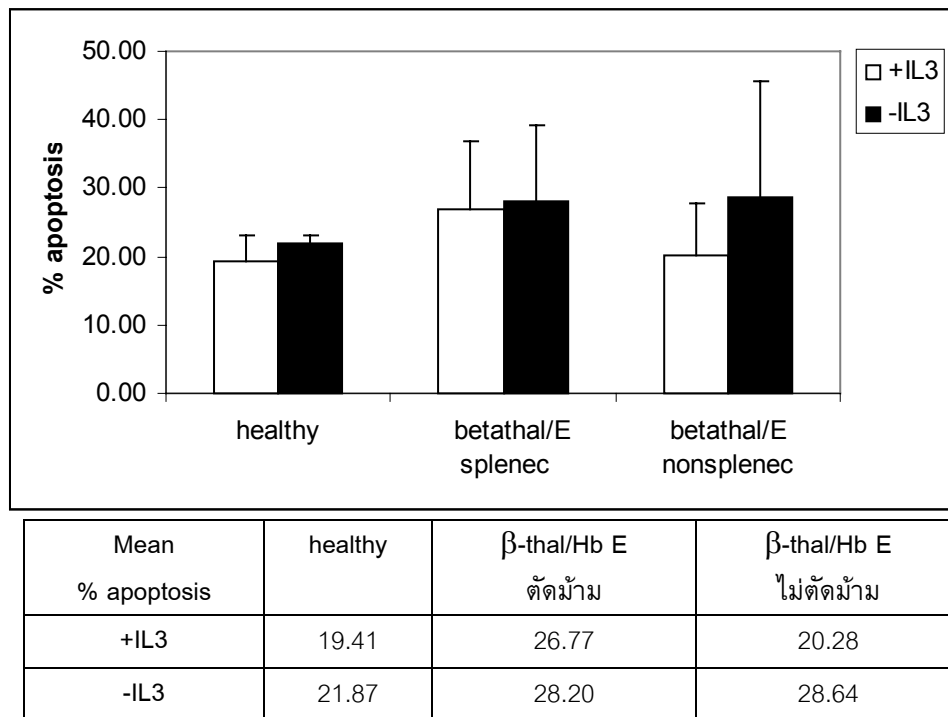
* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี

รูปที่ 4.8 แสดงค่าเฉลี่ย % apoptosis จากกลุ่มที่ใส่สาร RO-318220 (PKC inhibitor) จากคนปกติที่มีสุขภาพดี, ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E ตัดม้ามและไม่ตัดม้ามตามลำดับ



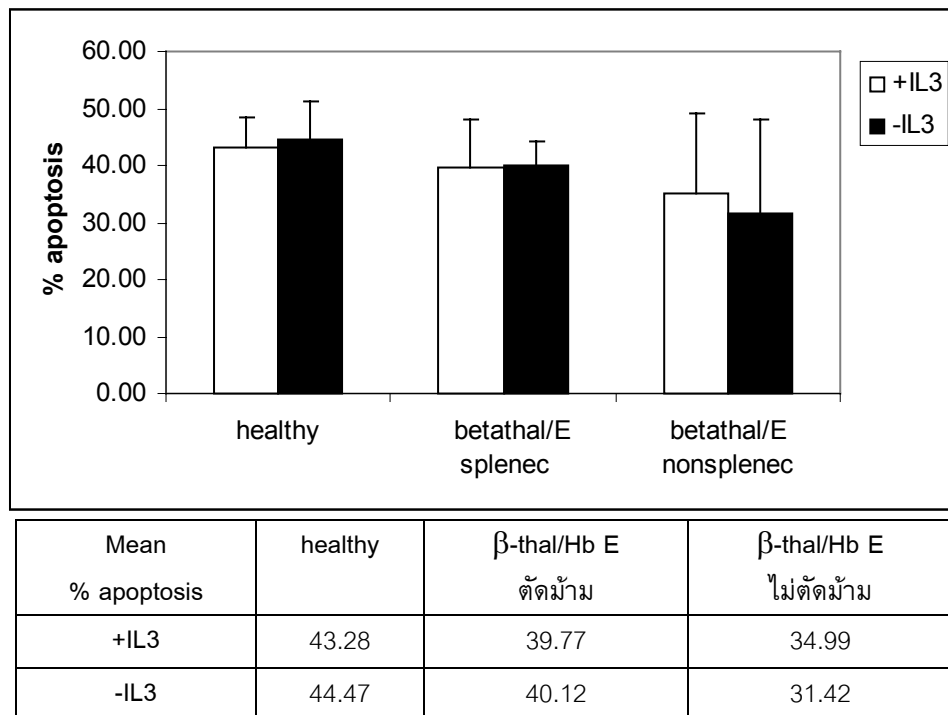
* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี

รูปที่ 4.9 แสดงค่าเฉลี่ย % apoptosis จากกลุ่มที่ใส่สาร AG-490 (JAK2 inhibitor) จากคนปกติที่มีสุขภาพดี, ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E ตัดม้ามและไม่ตัดม้ามตามลำดับ



* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี

รูปที่ 4.10 แสดงค่าเฉลี่ย % apoptosis จากกลุ่มที่ใส่สาร U-73122 (PLC inhibitor) จากคนปกติที่มีสุขภาพดี, ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E ตัดม้ามและไม่ตัดม้ามตามลำดับ



* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี

5. วิจัยและสรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยนี้ หลังจากทำการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี CD34 positive selection และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วันพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่หรือ cell viability ที่ได้จากกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ทั้งชนิดตัดม้ามและไม่ตัดม้ามมีค่าต่ำกว่าคนปกติที่มีสุขภาพดี แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีจำนวนเซลล์ตายมากกว่าคนปกติ ซึ่งเกิดจากขบวนการ Ineffective erythropoiesis เมื่อทำการศึกษาความสำคัญของสาร interleukin-3 และสัญญาณภายในเซลล์ที่ควบคุมขบวนการสร้างเม็ดเลือดแดงในคนปกติและขบวนการ Ineffective erythropoiesis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย พบว่าสาร interleukin-3 มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดแดงต้นกำเนิดในระยะแรก ดังผลการศึกษาข้างต้นพบว่ามีจำนวนเซลล์ตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นเมื่อไม่เติมสาร interleukin-3 ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นสาร interleukin-3 น่าจะมีบทบาทในการยับยั้งการตายแบบ apoptosis ในขบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งในคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จากการศึกษาความสำคัญของสัญญาณภายในเซลล์บางชนิดคือ Protein Kinase C (PKC), Phospholipase C (PLC) และ Janus Kinase 2 (JAK 2) ต่อการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยถ้าสัญญาณดังกล่าวถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งที่จำเพาะหรือ inhibitor โดยทำให้มีเซลล์ตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นจากภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่าสัญญาณดังกล่าวนี้จะมีสำคัญและการบกพร่องของสัญญาณนี้อาจนำไปสู่ขบวนการ Ineffective erythropoiesis ในเม็ดเลือดแดงต้นกำเนิดของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จากผลการทดลองพบว่าสาร U-73122 ซึ่งเป็นสารยับยั้งสัญญาณของ Phospholipase C ทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในคนปกติที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ส่วนสาร AG-490 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง Janus Kinase 2 นั้นถึงแม้ว่าจะทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE มากกว่ากลุ่ม control แต่พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis หลังการใส่สารยับยั้งแต่ละชนิดระหว่างกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ทั้งชนิดตัดม้ามและไม่ตัดม้าม พบว่าสาร RO-318220 ซึ่งเป็นสารยับยั้ง Protein Kinase C นั้นทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ชนิดตัดม้ามมากกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเติมสาร U-73122 ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ทั้งชนิดตัดม้ามและไม่ตัดม้ามพบว่ามีจำนวนเซลล์ตายแบบ apoptosis น้อยกว่าคนปกติ จากผลดังกล่าวนี้พบว่าสัญญาณภายในเซลล์ชนิด phospholipase C น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อขบวนการสร้างเม็ดเลือดแดงทั้งในคนปกติที่มีสุขภาพดีและขบวนการ Ineffective erythropoiesis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE นอกจากนี้ protein kinase C น่าจะมีบทบาทที่สำคัญต่อขบวนการนี้ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE ชนิดหลังตัดม้ามอีกด้วย จากผลการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสาร interleukin-3 รวมทั้งสัญญาณภายในเซลล์ชนิด phospholipase C และ protein kinase C มีความสำคัญต่อขบวนการ Ineffective erythropoiesis ในเม็ดเลือดแดงต้นกำเนิดของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE

6. เอกสารอ้างอิง

1. ทศนีย์ เลิบนาถ, สุทัศน์ ฟูเจริญ, ปราณี ฟูเจริญ, นพดล ศิริหารัตนกุล และวรวรรณ ต้นไพจิตร.: Thalassaemia: from molecular biology to clinical medicine. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย. 2544.
2. Haen J.P. Principles of hematology. Wm C. Brown Publishers. USA. 1995.
3. Hoffbrand A.V., Pettit J.E. and Moss P.A. H. Essential haematology. 4th ed. Blackwell Scientific publication. Oxford. 2001.

4. Zhang Y, Mahendran R., Yap L.L., Dsuvaranathan K., Khoo H.E. The signaling pathway for BCG-induced interleukin-6 production in human bladder cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2002 Jan, 15: 273-282
5. Schrier S.L. Pathophysiology of thalassemia. *Curr Opin Hamatol.* 2002. Mar; 9(2): 23-126.
6. Okada T., Kawano Y., Sakakibara T., Hazeki O. and Ui M. Essential role of phosphatidylinositol-3 kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocyte. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J. Biol. Chem.* 1994. 269: 3568-3573.
7. Lizcano J.M. and Alessi D.R. The insulin signaling pathway. *Curr. Biol.* 2002. 12. R236-R238.
8. Shelton J.G., Moye P.W., Steelman L. S., Blalock W.L., Le J.T., Franklin R.A., McMahon M, Mccubrey J.A. Differential effects of kinase cascade inhibitors on neoplastic and cytokine-mediated cell proliferation. *Leukemia.* 2003. 17 (9): 1765-1782.
9. Ma J., Liu Q., Zeng Y.X. Inhibition of phosphotidylinositol-3-kinase causes apoptosis in retinoic acid differentiated HL-60 leukemic cells. *Cell Cycle.* 2004. Jan-Feb; 3(1): 67-70.
10. Heldin C.H. and Purton M. *Signal transduction.* 1st ed. Chapman & Hall Ltd. London. 1996.
11. Darnell J. E., Kerr I.M, Stark G R. Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 1994. 264: 1415-1421.
12. Muta K and Krantz S.B. Apoptosis of human erythroid colony-forming cells is decreased stem cell factor and insulin-like growth factor I as well as Erythropoietin. *J Cell Physiol.* 1993. 156:264-271.
13. Sui X., Krantz S.B. Zhao A.J. Stem cell factor and erythropoietin inhibit apoptosis of human erythroid progenitor cells though different signaling pathways. *Br J of Haematol.* 2000. 110: 63-70.

Out put ที่ได้จากโครงการ

1. แสดงผลงานทางวิชาการแบบ poster presentation ในงานประชุมวิชาการประจำปี สมาคมเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 29 ระหว่างวันที่ 27-29 เมษายน 2548 โรงแรมไดมอนด์พลาซ่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี
ชื่อเรื่อง 'Study of cell viability in thalassemic erythroid progenitor cells'

2. **Dalina Tanyong**, Pranee Fucharoen, Thidarat Netikul, Thanmas Raungwittayawut, Noppadol Siritanaratkul, Suthat Fucharoen. Study of cell viability in thalassemic erythroid progenitor cells. Journal of the Medical Technologist Association of Thailand. (Accepted, July 2005, papers in press)

3. **Dalina Tanyong**, Pranee Fucharoen, Suthat Fucharoen. Study of signaling pathways in thalassemic erythroid progenitor cells. (Papers in preparation)