

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

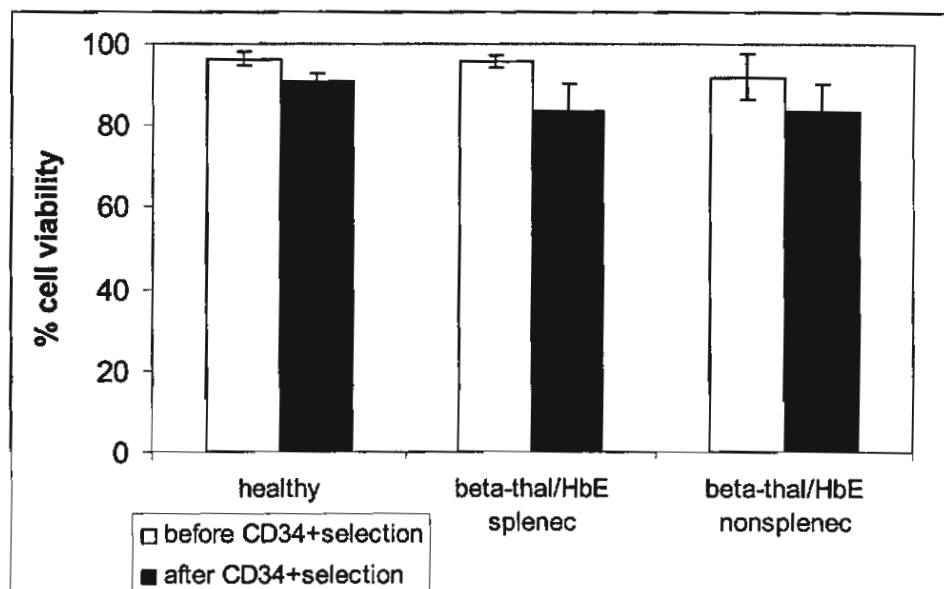
ตารางที่ 4.5 แสดง % cell viability ทั้งก่อนและหลังการคัดเลือกด้วย CD 34+ ของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia / HbE ไม่ตัดม้าม

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

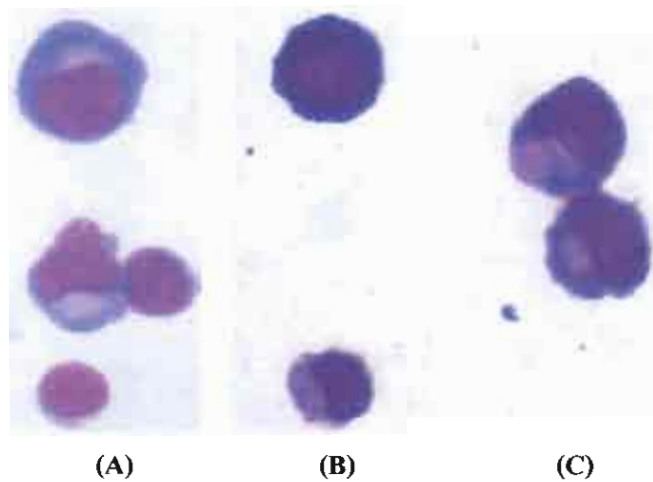
รูปที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยของ % viability cell ทั้งก่อนและหลังการคัดเลือกด้วย CD34 positive ในคนปกติที่มีสุขภาพดีเปรียบเทียบกับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/E ตัดม้ามและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/E ไม่ตัดม้าม



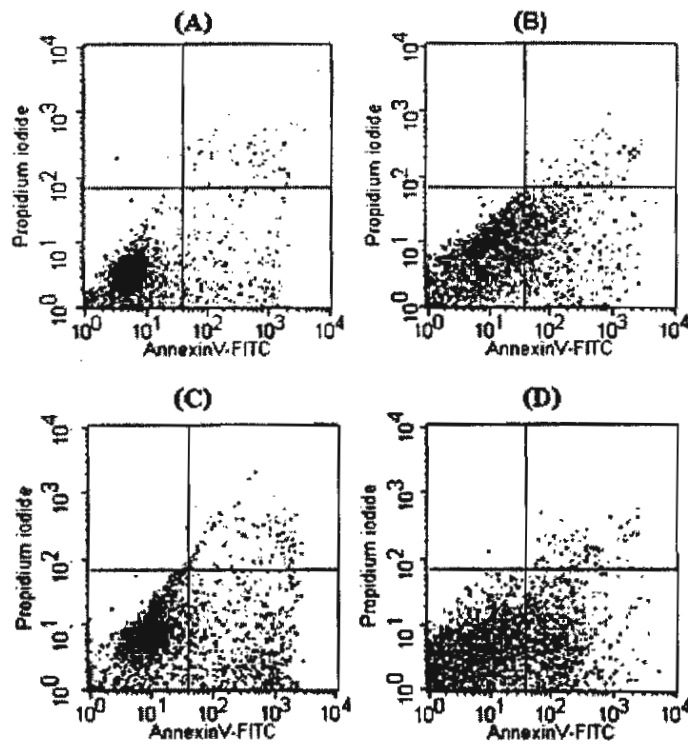
ตารางที่ 4.7 แสดงค่า mean $\pm$ standard deviation (SD) ของค่า % cell viability หลังการเพาะเลี้ยง erythroid progenitor cell จากตัวอย่างกลุ่มต่าง ๆ เป็นเวลา 3 และ 7 วัน

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

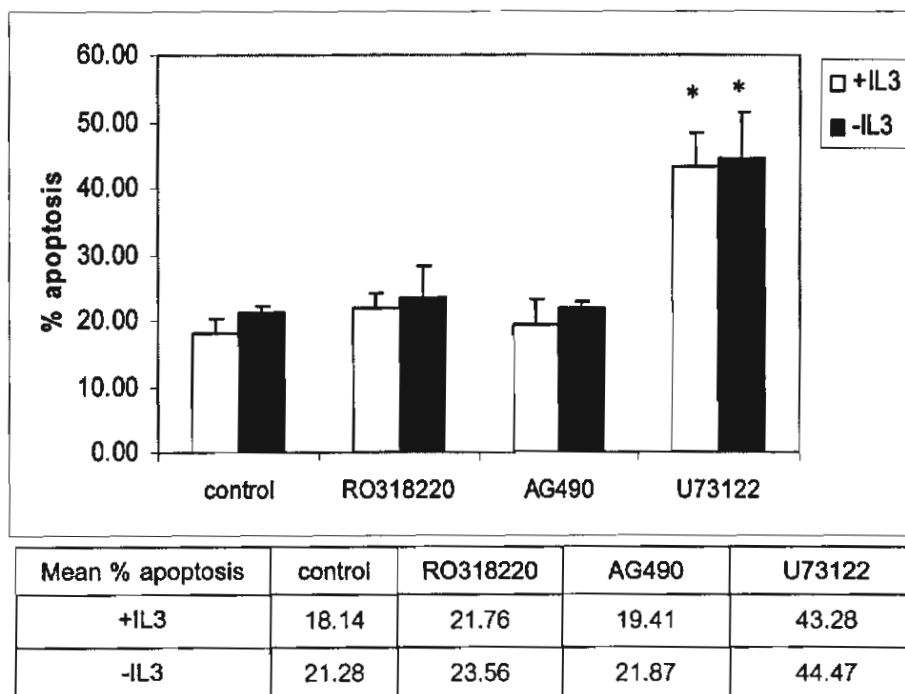
รูปที่ 4.2 แสดงรูปร่างเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันและทำการย้อมด้วยสี Wright
 (A) เซลล์จากกลุ่มผู้มีสุขภาพดี (B) เซลล์จากกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/E ไม่ตัดม้ามและ
 (C) เซลล์จากกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/E ตัดม้าม



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)

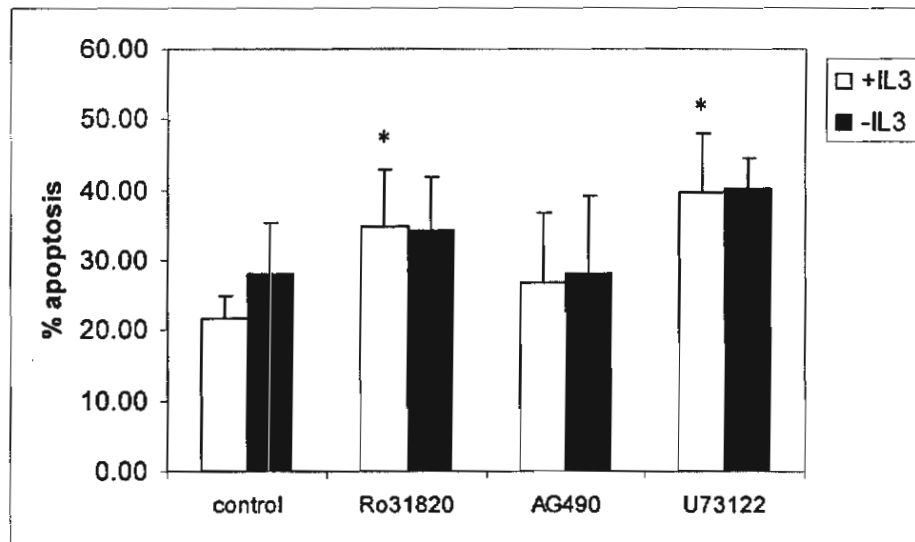


รูปที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ย % apoptosis ในคนปกติที่มีสุขภาพดีกลุ่มต่างๆ คือกลุ่มไม่ใส่สารยับยั้ง (control), กลุ่มใส่สาร RO-318220 (PKC inhibitor), กลุ่มใส่สาร AG-490 (JAK2 inhibitor), กลุ่มใส่สาร U-73122 (PLC inhibitor) ตามลำดับ



* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

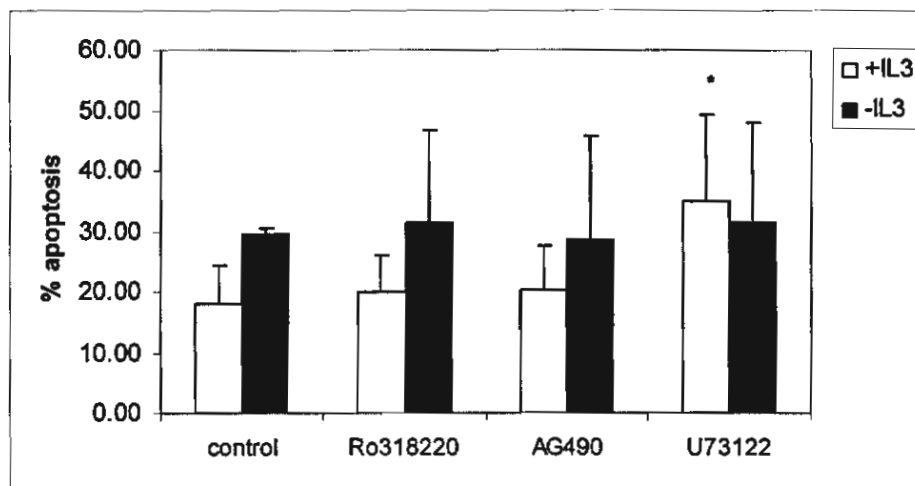
รูปที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ย % apoptosis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E ตัดม้ามกลุ่มต่างๆ คือกลุ่มไม่ใส่สารยับยั้ง (control), กลุ่มใส่สาร RO-318220 (PKC inhibitor), กลุ่มใส่สาร AG-490 (JAK2 inhibitor), กลุ่มใส่สาร U-73122 (PLC inhibitor) ตามลำดับ



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

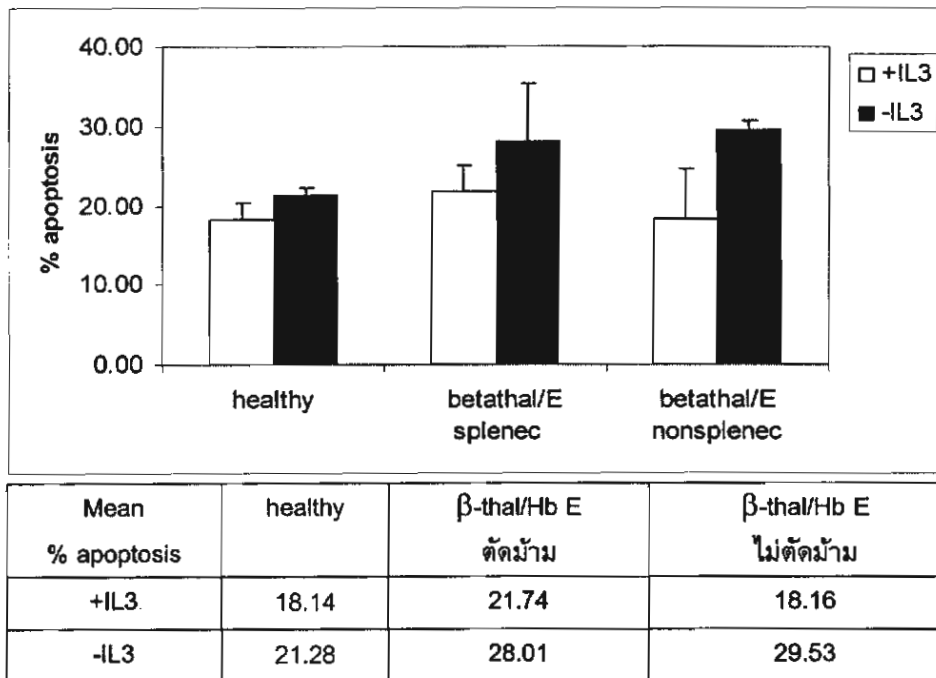
รูปที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ย % apoptosis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E ไม่ตัดม้ามกลุ่มต่างๆ คือกลุ่มไม่ใส่สารยับยั้ง (control), กลุ่มใส่สาร RO-318220 (PKC inhibitor), กลุ่มใส่สาร AG-490 (JAK2 inhibitor), กลุ่มใส่สาร U-73122 (PLC inhibitor) ตามลำดับ



Mean % apoptosis	control	RO318220	AG490	U73122
+IL3	18.16	20.09	20.28	34.99
-IL3	29.53	31.45	28.64	31.42

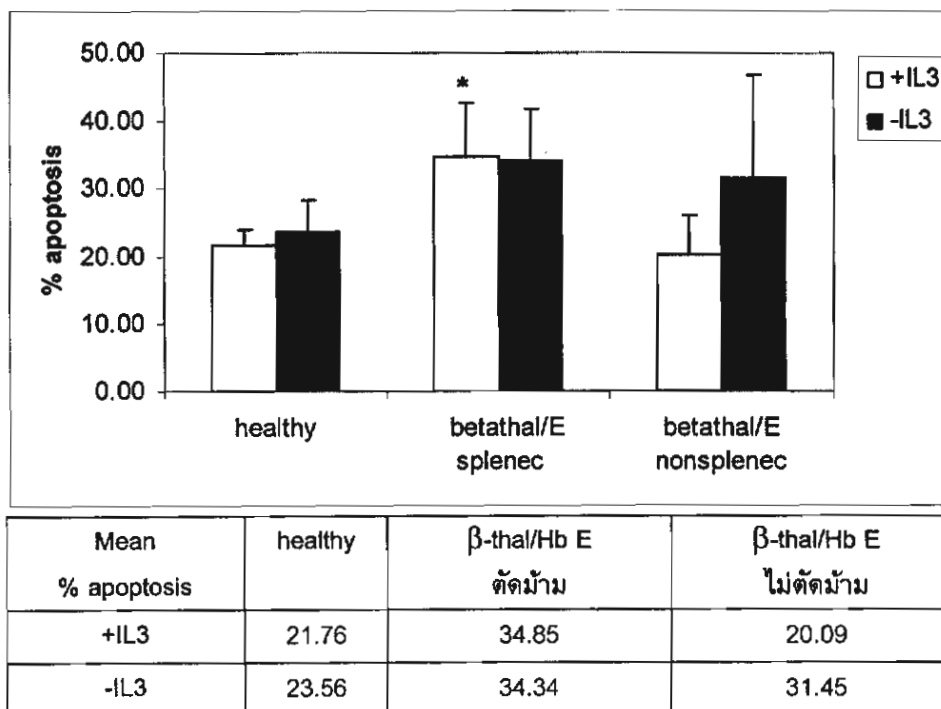
* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

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



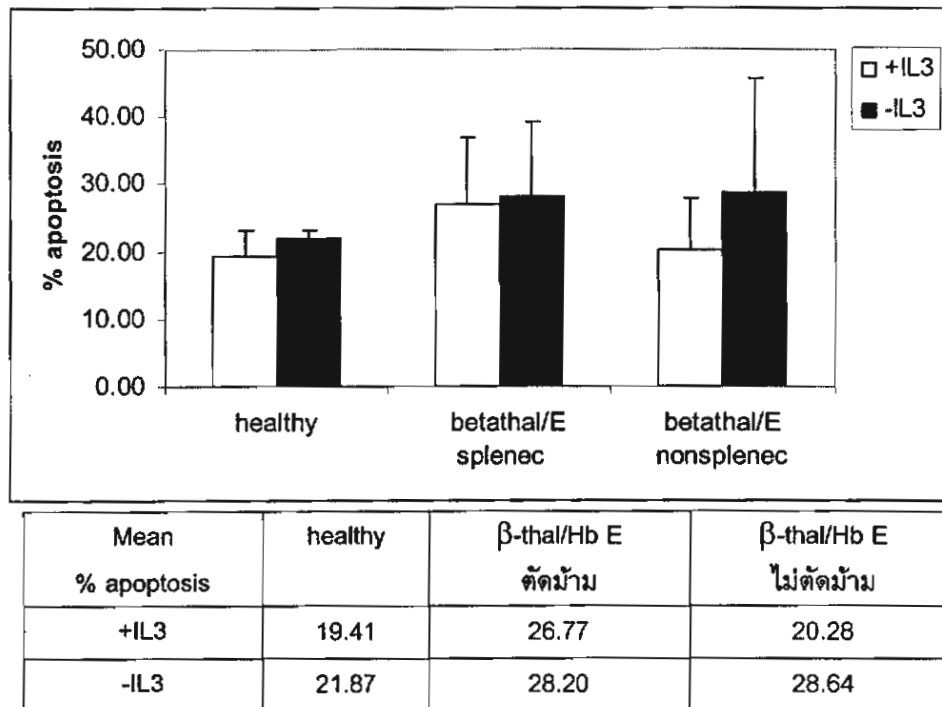
* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี

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



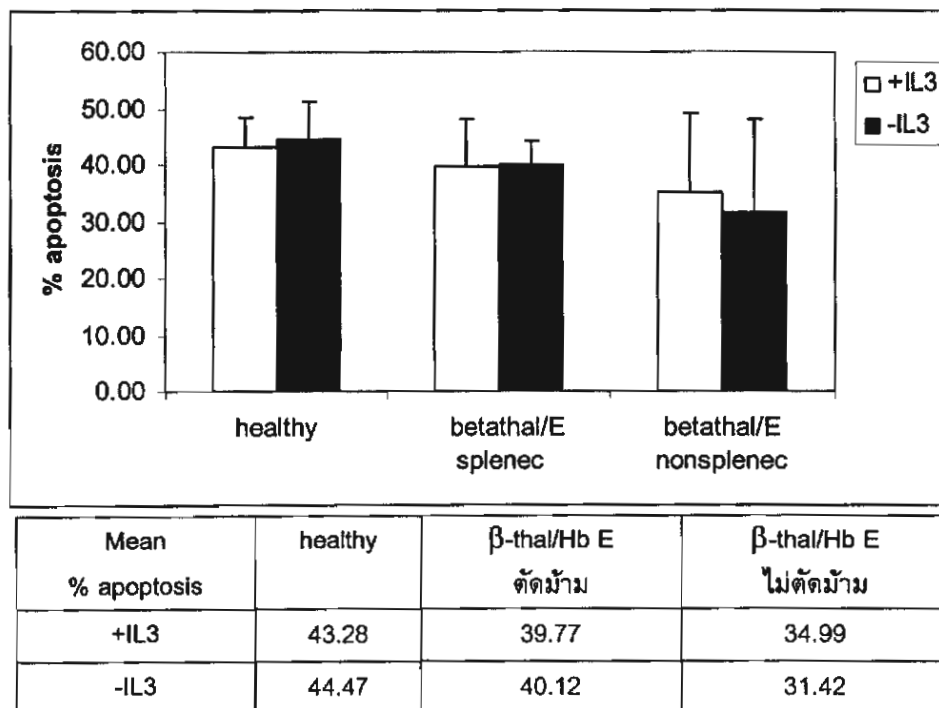
* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี

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. วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

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 แสดงให้เห็นว่าสัญญาณดังกล่าวนี้ น่าจะมีสำคัญและการบกพร่องของสัญญาณนี้อาจนำไปสู่ขบวนการ Ineffective erythropoiesis ในเม็ดเลือดแดงต้นกำเนิดของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จากผลการทดลองพบว่าสาร U-73122 ซึ่งเป็นสารยับยั้งสัญญาณของ Phospholipase C ทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในคนปกติที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE เมื่อเทียบกับกลุ่ม 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/Hb E ชนิดหลังตัดม้ามอีกด้วย จากผลการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสาร interleukin-3 รวมทั้งสัญญาณภายในเซลล์ชนิด phospholipase C และ protein kinase C มีความสำคัญต่อขบวนการ Ineffective erythropoiesis ในเม็ดเลือดแดงต้นกำเนิดของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/Hb E

6. เอกสารอ้างอิง

1. ทศนีย์ เลื่อนาค, สุทัศน์ ฟูเจริญ, ปราณี ฟูเจริญ, นพดล ศิริชนารัตนกุล และวรวรรณ ดันไพจิตร.: *Thalassemia: from molecular biology to clinical medicine*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร.โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์แห่งประเทศไทย. 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 โรงแรมโดมอนด์พลาซ่า 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)