

บทคัดย่อ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการสังเคราะห์สายโกลบิน โดยผู้ป่วยมีปัญหาจากภาวะซีดซึ่งมีสาเหตุที่สำคัญมาจากภาวะที่เม็ดเลือดแดงตายในไขกระดูกก่อนที่จะเจริญไปเป็นตัวแก่และปล่อยออกสู่กระแสเลือดหรือ ineffective erythropoiesis โดยปกติแล้วกระบวนการสร้างเม็ดเลือดแดงเกี่ยวข้องกับสาร Erythropoietin (EPO) ซึ่งเมื่อสารนี้จับกับตัวรับสัญญาณ (Erythropoietin receptor : EPOR) ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องและเกิดการสร้างเม็ดเลือดแดง ดังนั้น erythropoietin จึงเป็นสารที่สำคัญในกระบวนการดังกล่าวนี้และระดับการแสดงออกของตัวรับสัญญาณนี้อาจมีผลต่อกระบวนการสร้างเม็ดเลือดแดงทั้งในคนปกติและผู้ป่วยที่มีภาวะซีดด้วย วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาบทบาทของ erythropoietin ต่อจำนวนเซลล์ที่มีอายุอยู่ การเกิดการตายแบบ apoptosis ในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิด β -thalassemia/Hb E เปรียบเทียบกับคนปกติที่มีสุขภาพดี รวมทั้งทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ erythropoietin receptor และสัญญาณภายในเซลล์ที่ควบคุมกระบวนการดังกล่าวนี้อีกด้วย โดยทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่มี CD 34 จากเลือดตัวอย่าง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนเม็ดเลือดแดงในสารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่มีความเข้มข้นต่างๆของ erythropoietin เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่และเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis โดยวิธี trypan blue และ flow cytometry ตามลำดับ สำหรับการแสดงออกของ EPOR ในระดับ mRNA ใช้วิธี RT-PCR ส่วนการวัดปริมาณโปรตีนของ EPOR ใช้วิธี flow cytometry ผลการวิจัยพบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตอยู่มีค่าต่ำสุดและค่าการตายแบบ apoptosis มีค่าสูงสุดในกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ชนิด β -thalassemia/Hb E ที่ไม่ได้เติม EPO ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ โดย EPO สามารถช่วยลดหรือยับยั้งอัตราการตายแบบ apoptosis มากขึ้นตามความเข้มข้นของ EPO ที่ใช้ นอกจากนี้การแสดงออกของ EPO ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีนพบว่าการแสดงออกของ EPOR ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียน้อยกว่าคนปกติ และพบว่า Akt น่าจะเป็นสัญญาณภายในเซลล์ชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเกิด apoptosis โดย EPO ผลการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นข้อมูลสำหรับบทบาทของ EPO ในการควบคุมการสร้างเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยธาลัสซีเมียและอาจนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วยดังกล่าวได้ดียิ่งขึ้น

Abstract

Thalassemia is a genetic disorder which caused by abnormal globin chain synthesis. Anemia of these patients could cause by apoptosis and ineffective erythropoiesis. In normal erythropoiesis, erythropoietin (EPO) binds to erythropoietin receptor (EPOR), lead to activate the signaling pathways and control the process of red cell production. Therefore EPO is a key growth factor and it is possible that the level of EPOR expression might be involved in the ability of normal erythropoiesis. The objective of this study is to investigate the effect of EPO on cell viability, apoptosis on erythroid progenitor cells of β -thalassemia/Hb E patients and healthy subjects. In addition, study the expression level and signaling pathways in erythroid progenitor cells of both groups. CD34 progenitor cells were isolated from heparinized blood. Then erythroid progenitor cells were cultured in suitable culture medium in various concentration of EPO for 14 days. The percent cell viability and apoptosis were analyzed by trypan blue staining and flow cytometry, respectively. For EPOR expression, RNA was extracted from erythroid progenitor cell culture and then mRNA was converted to complementary DNA by using Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), while level of EPOR protein was examined by using flow cytometry. The results showed that the lowest cell viability and the highest percent cell apoptosis were found in erythroid progenitor cells from thalassemia untreated with EPO. EPO could reduce percent cell apoptosis with dose dependent manner. In addition, the mRNA and protein of EPOR in thalassemic patients was lower than healthy subjects. Moreover, Akt could be involved in signaling pathways of EPO in inhibiting apoptosis. From results of this study, it could be used as information of role of EPO in regulation of red cell production of thalassemic patients and lead to improvement of the patient treatment.

Key words: Erythropoietin, Erythropoietin receptor, β -thalassemia/Hb E