



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การกระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบินเอฟ : ศึกษาการนำไปใช้ในผู้ป่วย
เบต้า-ธาลัสซีเมีย และพัฒนาระบบตรวจสอบการกระตุ้นการสร้าง
สายโกลบินแกมมา

โดย

รศ.ดร.ยุวดี วัฒนโกศาสิน และคณะ

30 มีนาคม 2546

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ข
สารบัญรูป	ค
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	ฉ
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ญ
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	จ
โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย)	1
โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาอังกฤษ)	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ (โดยสรุป)	1
เหตุผลที่จำเป็นในการวิจัย	2
ระเบียบวิธีการวิจัย	4
ผลงานวิจัย	5
สรุปผลงานวิจัย	30
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	39

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1 Hematologic data ของผู้ป่วย β -thalassemia/HbE

27

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 BFU-E at day 0	5
2 BFU-E at day 1	6
3 BFU-E at day 2	6
4 BFU-E at day 3	7
5 BFU-E at day 4	7
6 BFU-E at day 5	7
7 CFU-E at day 6	8
8 CFU-E at day 7	8
9 Pronormoblast at day 7	8
10 Pronormoblast at day 8	9
11 Pronormoblast and Basophilic normoblast at day 9	9
12 Basophilic normoblast at day 10	9
13 Orthochromatic normoblast at day 10	10
14 Polychromatophilic and Orthochromatic normoblast at day 11	10
15 Orthochromatic normoblast and Polychromasia at day 12	10
16 Orthochromatic normoblast, Polychromasia and mRBC at day 13	11
17 Effect of varying concentrations of hydroxyurea in normal adult erythroid cultures.	12
18 Effect of hydroxyurea on primary normal adult erythroid cell proliferation	13
19 Effect of varying time of 30 μ M hydroxyurea treatment in normal adult erythroid cultures	15
20 Effect of varying time of 30 μ M hydroxyurea treatment in normal adult erythroid cultures on primary adult erythroid cell proliferation in beta-thalassemia patients	15

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
21 Effect of varying concentrations of hydroxyurea in β -thal/HbE erythroid cultures	17
22 Effect of hydroxyurea on primary adult erythroid cell proliferation in β -thal/HbE patients. Each bar represents the number of benzidine-positive cells present 96 hours after addition of hydroxyurea	18
23 Effect of varying time of 30 μ M hydroxyurea treatment in β -thal/HbE erythroid cultures	20
24 Effect of varying time of 30 μ M hydroxyurea treatment on primary adult erythroid cell proliferation in β -thal/HbE patients	20
25 Hydroxyurea effects on fractional HbF content in 30 μ M hydroxyurea treatment of primary erythroid cultures in β -thal/HbE patients	21
26 Hydroxyurea effects on globin mRNA levels in primary human adult erythroid cultures of β -thal/HbE. The level of transcription of the globin gene in the control was set to 1	24
27 Fold induction in $^G\gamma/^\Lambda\gamma$ globin chain in primary erythroid cell culture from different β -thal/HbE patients treated with 30 μ M hydroxyurea for 96 hours	25
28 Comparison of fractional HbF in vivo after 2 year hydroxyurea treatment and fractional HbF in vitro of primary erythroid progenitor cell cultures from β -thal/HbE treated with 30 μ M HU for 96 hours as compared to untreated control	28

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
29	Comparison of fold induction of $G\gamma/A\gamma$ globin chain in vivo after 2 year hydroxyurea treatment and $G\gamma/A\gamma$ globin chain in vitro of primary erythroid progenitor cell cultures from β -thal /HbE treated with 30 μ M HU for 96 hours as compared to untreated control	29
30	Comparison of fold induction of $G\gamma/A\gamma$ globin mRNA in vivo after 2 year hydroxyurea treatment and $G\gamma/A\gamma$ globin mRNA in vitro of primary erythroid progenitor cell cultures from β -thal /HbE treated with 30 μ M HU for 96 hours as compared to untreated control	30

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)
ทุนอุดหนุนการวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
ฝ่ายสวัสดิภาพสาธารณะ

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย): การกระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบินเอฟ: ศึกษาการนำไปใช้ในผู้ป่วยเบต้า-ธาลัสซีเมียและพัฒนาระบบตรวจสอบการกระตุ้นการสร้างสายโกลบินแกมมา

(ภาษาอังกฤษ): Hemoglobin F switching in *vitro*: the development of rapid screening of γ -globin synthesis and clinical correlates

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ. ดร.ยุวดี วัฒนโกศลสิน
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
กรุงเทพ 10110 เลขโทรศัพท์ 2602233-4 ต่อ 4604
E-mail : yuwatana@yahoo.com or yuwadee@swu.ac.th

3. สาขาที่ทำการวิจัย อนุชีววิทยาทางการแพทย์

4. ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี

5. ได้เสนอโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วนเพื่อขอทุนต่อแหล่งทุนอื่นที่ใดบ้าง
ไม่ได้เสนอต่อแหล่งทุนอื่น

6. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

β -thalassemia เกิดจากการที่ร่างกายสร้างสายโกลบิน β น้อยลง หรือสร้างไม่ได้เลย ทำให้สายโกลบิน α มีปริมาณเกินดุล ทำให้สายโกลบิน α ที่เกินมานี้ไม่สามารถรวมตัวเป็น homotetramers ได้ ดังนั้นจึงไปตกตะกอนบนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงทำให้เกิด oxidative damage ต่อส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนและไขมัน จากการที่เกิด oxidation ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จะมีผลทำให้มีการปล่อยอนุมูลอิสระ (free radical) จากเหล็กฮีม (heme) หรือ เฮมิโครม (hemichrome) แล้วส่งผลให้เม็ดเลือดแดงมีความผิดปกติและถูกทำลายได้ง่าย เกิดเป็น hemolytic anemia ทำให้ผู้ป่วยมีอาการซีดเหลือง ตับ ม้ามโต เจริญเติบโตช้า มีการสร้างเม็ดเลือดแดงมากกว่าปกติเพื่อทดแทนเม็ดเลือดแดงที่ถูกทำลายไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระดูก และมีความผิดปกติอื่นๆ ของร่างกาย อีกหลายประการมีงานวิจัยจากหลายกลุ่มทำต่อเนื่องมาหลายปี แสดงให้เห็นว่าในผู้ป่วย β -hemoglobinopathies คือ sickle cell anemia และ β -thalassemia ที่มีปริมาณ HbF สูงกว่าคนปกติจะทำให้อาการของโรคลดลง และได้มีการศึกษาโดยใช้ยาหรือสารเคมีที่มีผลกระตุ้นการสร้าง HbF เช่น hydroxyurea (HU), butyrate และยาอื่นๆ ที่มีผลต่อการ switching ในการแสดงออกของยีนโกลบิน เนื่องจากได้มีการค้นหายาหรือสารเคมี (therapeutic compounds) สำหรับ β -

thalassemia ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 เช่น 5-azacytidine ในการกระตุ้น γ -gene expression ใน adult baboons นอกจากนั้นยังมีการใช้สารอื่นๆ ใน in vitro และในสัตว์ทดลอง และใน clinical trials เช่นใช้ erythropoietin, butyric acid และ hydroxyurea ในคนไข้ β -thalassemia และ sickle cell anemia เป็นต้น แต่ก็พบว่าผลที่ได้จะแตกต่างกันไปขึ้นกับคนไข้แต่ละราย กล่าวคือ บางรายก็แสดงการตอบสนอง (responder) แต่บางรายก็ไม่ตอบสนอง (non-responder) ดังนั้นเพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นก่อนทำการรักษาผู้ป่วย β -thalassemia จึงจำเป็นต้องพัฒนาระบบตรวจสอบการกระตุ้นการสร้างสายโกลบินแกมมา โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดแดง (primary erythroid progenitor cell culture) จากเลือดของผู้ป่วยแต่ละรายซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่ยุ่งยากและผู้ป่วยไม่ได้รับความเจ็บปวดเหมือนการเตรียม erythroid progenitor cells จากการเจาะไขกระดูกของผู้ป่วย มาศึกษาการกระตุ้นการสร้าง HbF โดยการใช้ hydroxyurea เพื่อหาว่าผู้ป่วยรายใดมีการตอบสนองต่อ hydroxyurea หรือไม่ การศึกษาผลของการกระตุ้นการสร้าง HbF โดย hydroxyurea จะช่วยให้แพทย์ที่รักษาผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียได้ทราบถึงผลการ screening เบื้องต้นว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียคนไหนเป็น responder หรือ non-responder ได้สะดวกและรวดเร็ว และสามารถวางแผนการรักษาที่ถูกต้องต่อไปได้ จึงเป็นการ screening ที่มีประสิทธิภาพและประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายต่าง ๆ นอกจากนั้นผู้ป่วยธาลัสซีเมียก็ได้รับประโยชน์เช่น ถ้าผลการตรวจสอบพบว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียนั้นเป็น responder ก็จะได้รับการรักษาที่ถูกต้องรวดเร็ว หายจากอาการซีดและมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นได้ ส่วนคนไข้ที่เป็น non-responder ก็จะได้รับการรักษาโดยวิธีอื่น ดังนั้นการทำวิจัยนี้จะมีผลดีต่อทั้งแพทย์ผู้รักษาและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ให้มีการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายอื่นๆ

7. วัตถุประสงค์ (Objectives)

7.1 เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นในการตอบสนองของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (primary screening of responders) ต่อยาหรือสารเคมีที่กระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบิน เอฟ (HbF)

7.1.1 เพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นก่อนทำการรักษาผู้ป่วย β -thalassemia โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงจากเลือดของผู้ป่วยแต่ละราย (erythroid cell culture from patient's peripheral blood stem cell) มาศึกษาการกระตุ้นการสร้าง HbF โดยการใช้ hydroxyurea เพื่อหาว่าผู้ป่วยรายใดมีการตอบสนองต่อ hydroxyurea หรือไม่ (screening for responder and non-responder) ก่อนแพทย์จะทำการให้ยา ถ้าผู้ป่วยเป็น responder ก็ จะให้การรักษาโดยใช้ยาหรือสารเคมีดังกล่าว

7.1.2 ศึกษาขนาดหรือปริมาณ และระยะเวลาการใช้สาร hydroxyurea ที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นการสร้าง HbF ใน erythroid cell culture จาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thalassemia

- 7.1.3 ศึกษากลไกควบคุมการแสดงออกของ γ -globin gene โดยหาปริมาณ γ -globin mRNA ใน erythroid cell culture จาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thalassemia ที่ได้รับ hydroxyurea

8. วิธีการดำเนินการวิจัย

ศึกษาผลของการกระตุ้นการสร้าง Hb F โดย hydroxyurea

- 8.1 เตรียม erythroid cell culture จาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thalassemia แต่ละราย
- 8.2 ทดสอบการให้ hydroxyurea ใน erythroid cell culture ที่ได้ จากข้อ 8.1
- 8.3 หาขนาดของ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง Hb F และระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้สารดังกล่าว
- 8.4 หาปริมาณ γ -globin mRNA ใน erythroid cell culture จากผู้ป่วยแต่ละรายที่ได้รับ hydroxyurea จากข้อ 8.3 โดย reverse transcription real-time PCR detection technique (Perkin Elmer)
- 8.5 วิเคราะห์ hematologic data, hemoglobin analysis and reticulocyte count, % hemoglobin E และ hemoglobin F ของผู้ป่วยที่เป็น responder โดย conventional method
- 8.6 นำข้อมูลจากข้อ 8.4 (*in vitro* data) มาหาความสัมพันธ์กับข้อมูลที่ได้จากข้อ 8.5 (clinical data, hematological parameters) ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่การศึกษา molecular mechanism (genetic background, linkage analysis, polymorphism, etc.)
- 8.7 ให้ hydroxyurea แก่ผู้ป่วย β -thalassemia เช่น ผู้ป่วย β -thalassemia/hemoglobin E (β -thal/HbE) ที่เป็น responder เพื่อให้การรักษา
- 8.8 สรุป และแปลผล

9. ผลการทดลอง

ในการเตรียม primary erythroid cells จาก peripheral blood stem cells พบว่าวันที่ 0 เซลล์ส่วนใหญ่จะเป็น early erythroid-committed progenitors (burst-forming units, BFU-E) ณ วันที่ 3 เซลล์จะ proliferate และ differentiate ไปเป็น late BFU-E หลังจากนั้นเซลล์จะ proliferate และ differentiate ไปเป็นเซลล์ที่แก่มากขึ้น (more mature colony-forming unit like progenitors (CFU-E)) ในวันที่ 6 หลังจากนั้นเซลล์จะ proliferate และ differentiate ไปเป็นเซลล์ที่แก่มากขึ้น (more mature orthochromatic normoblasts after) หลังจากวันที่ 6 ณ วันที่ 10 เป็น erythroblast และ วันที่ 14 เป็น red blood cell จากนั้นทำการศึกษาค้นหาขนาดของ hydroxyurea (0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 and 100 μ M) และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF ในคนปกติพบว่า เติม hydroxyurea ที่ 30 μ M ในวันที่ 6 ของการเจริญ erythroid cell

culture แล้วทำการเก็บเซลล์มาวิเคราะห์หลังจากการเจริญ erythroid cell culture มาแล้ว 4 วัน (96 ชั่วโมง) เป็นภาวะที่เหมาะสมที่ยังให้จำนวนเซลล์สูง (benzidine positive cells) และ ยังสร้าง HbF สูง ส่วนค่า HbF content per cell จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ hydroxyurea เพิ่มขึ้น ส่วนจำนวนเซลล์จะลดลงแบบ dose dependent manner จากนั้นทำการศึกษาหาขนาดของ hydroxyurea (0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 and 100 μ M) และช่วงเวลา ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF ในผู้ป่วย β -thal/HbE พบว่า เติม hydroxyurea ที่ 30 μ M ในวันที่ 6 ของการเจริญ erythroid cell culture แล้วทำการเก็บเซลล์มาวิเคราะห์ในวันที่ 10 (96 ชั่วโมง) เป็นภาวะที่เหมาะสมที่ยังให้จำนวนเซลล์สูง (benzidine positive cells) และ ยังสร้าง HbF สูง พบว่า ขนาดของ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF คือ 30 μ M ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ยังให้จำนวนเซลล์สูง (benzidine positive cells) และ ยังสร้าง HbF สูง นอกจากนั้นการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้ยา (hydroxyurea) ในผู้ป่วย β -thal/HbE พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้ยา (hydroxyurea) คือ ให้ hydroxyurea เมื่อวันที่ 6 แล้วทำการเก็บเซลล์มาวิเคราะห์ในวันที่ 10 เป็นภาวะที่เหมาะสมที่ยังให้จำนวนเซลล์สูง (benzidine positive cells) และ ยังสร้าง HbF สูง จากการ optimized conditions ที่ได้ นำมาศึกษาการตอบสนองของผู้ป่วยต่อ hydroxyurea โดยศึกษาผลของ hydroxyurea ต่อการสร้าง HbF ซึ่งนำมาจาก peripheral blood ของผู้ป่วย β -thal/HbE ชนิดที่มีความรุนแรงระดับปานกลาง (thalassemia intermedia) จำนวน 22 ราย โดยการใช้ hydroxyurea ที่ความเข้มข้น เท่ากับ 30 μ M เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาหาค่า fractional HbF โดย HPLC technique ค่า fold increased $\gamma/\alpha\gamma$ globin chain โดย tritonX-100 acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis technique และค่า fold induction $\gamma/\alpha\gamma$ globin mRNA โดย real-time PCR detection technique เพื่อศึกษาหาว่าผู้ป่วยรายใดเป็น responder หรือ non-responder พบว่า $\gamma/\alpha\gamma$ globin mRNA, มีค่า 0.01 ± 0.01 and 9.39 ± 6.12 fractional HbF = 0.50-5.07 และ fold increased $\gamma/\alpha\gamma$ globin chain = 0.58 - 1.43 พบว่าไม่มีความเกี่ยวข้องในด้านเพศชาย และหญิงจากการหาค่า โดยทำ T-test ผู้ป่วยทั้ง 22 ราย มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่แตกต่างกัน โดยมีผู้ป่วย 20 รายที่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea และ 2 รายอาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea เนื่องจากมี fractional HbF content และ fold induction $\gamma/\alpha\gamma$ globin mRNA น้อยกว่า 1 หลังจากการศึกษาใน in vitro study แล้วได้ทำการศึกษาใน in vivo ของผู้ป่วย β -thal/HbE โดย in vivo ผู้ป่วย β -thal/HbE ได้รับ hydroxyurea เป็นเวลา 2 ปี ณ. โรงพยาบาลรามารักษ์โดย รศ. นพ. สุพร จันทร์จารุณี แล้วเจาะเลือดมาตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังแสดงในผลการทดลอง (in vivo) หลังจากผู้ป่วย หยุดการรับยา hydroxyurea แล้ว 7 เดือน- 1 ปี จึงเจาะเลือด ผู้ป่วย β -thal/HbE รายเดิมมาศึกษาโดย primary erythroid cell culture technique และตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังแสดงในผลการทดลอง (in vitro study) และเปรียบเทียบผลการทดลองจากการศึกษา in vivo และ in vitro ผลการเปรียบเทียบ in vivo และ in vitro ในผู้ป่วย β -thal/HbE พบว่า ค่าความสัมพันธ์ระหว่าง fractional HbF ใน in vivo และ in vitro มีค่า linear

correlation coefficients, $r^2 = 0.54$ ในขณะที่ ค่า fold increased γ^G/γ^A globin chain ใน in vivo และ in vitro มีค่า $r^2 = 0.62$ ส่วนค่า fold induction γ^G/γ^A globin mRNA ใน in vivo และ in vitro มีค่า $r^2 = 0.52$ สรุปได้ว่าการทดลองดังกล่าวโดยใช้ primary erythroid cell culture system จากเลือดผู้ป่วย β -thal/HbE ชนิดที่มีความรุนแรงระดับปานกลาง (thalassemia intermedia) จำนวน 13 รายที่ศึกษามี 11 รายที่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea และ 2 รายที่อาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea เนื่องจากมี fractional HbF content และ fold induction γ^G/γ^A globin mRNA ใน in vivo และ in vitro มีค่าต่ำกว่า 1 ซึ่งความแตกต่างในการตอบสนองของ erythroid precursor cell ในผู้ป่วยแต่ละรายดังกล่าวจะมากหรือน้อยขึ้นกับปัจจัยอื่นๆอีกหลายอย่าง เช่น ความสามารถในการสร้าง HbF ของผู้ป่วยที่มีอยู่ก่อนให้ hydroxyurea หรือปัจจัยพื้นฐานของ β -globin mutation และ/หรือชนิดของ Chromosome อาทิ XmnI site polymorphism บริเวณ promoter ของ γ -globin gene ดังนั้นในการทำวิจัยโครงการนี้โดยการทดลองใช้ primary erythroid cell culture system สามารถใช้ในการบ่งชี้ว่า ผู้ป่วย β -thal/HbE รายใดเป็น responder หรือ non-responder ก่อนที่จะเข้ารับการรักษาโดยการให้ยา hydroxyurea จากแพทย์

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RDG3/09/2543

ชื่อโครงการ: การกระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบินเอฟ: ศึกษาการนำไปใช้ในผู้ป่วยเบต้า-ธาลัสซีเมีย และ พัฒนาระบบตรวจสอบการกระตุ้นการสร้างสายโกลบินแกมมา

ชื่อนักวิจัย: ยวดี วัฒนโกศาติน
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

e-mail address: yuwadee@swu.ac.th or ywwatana@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: เดือน เมษายน พ.ศ. 2543 ถึง มีนาคม พ.ศ. 2546

การศึกษาการกระตุ้นการสังเคราะห์ฮีโมโกลบินเอฟ (HbF) ในผู้ป่วย β -thalassemia/HbE (β -thal/HbE) ต้องมีการศึกษาในห้องทดลอง (in vitro study) เพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นว่าผู้ป่วยรายใดมีการตอบสนองหรือไม่ตอบสนองต่อ hydroxyurea (responders or non-responders) ก่อนเข้ารับการรักษาจากแพทย์โดยการรับยา hydroxyurea (in vivo study) ซึ่งมีประโยชน์ในการลดการเจ็บปวดของผู้ป่วยทำให้มีอาการดีขึ้น ลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการรักษา ซึ่งการศึกษาในห้องทดลองทำโดยการเตรียมเซลล์ตัวอ่อนสำหรับการสร้างเม็ดเลือดแดง (primary erythroid progenitor cell culture) จากเลือดซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และผู้ป่วยไม่เจ็บปวดเหมือนการเจาะไขกระดูก ซึ่งก่อนทำการทดลองได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับความเข้มข้นของ hydroxyurea และช่วงเวลาที่ให้ hydroxyurea พบว่า hydroxyurea ที่ $30 \mu\text{M}$ ในวันที่ 6 และเก็บเซลล์ในวันที่ 10 มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์น้อยที่สุด แต่มีการกระตุ้นการสร้าง HbF สูงทั้งในผู้ป่วย β -thal/HbE และคนปกติ ได้เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย β -thal/HbE จำนวน 22 ราย ซึ่งมีอาการในระดับปานกลาง และเตรียม erythroid cell culture จาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thalassemia แต่ละราย จากนั้นหาปริมาณ HbF, Hb A₂, and Hb A ในผู้ป่วยแต่ละรายที่ได้รับ hydroxyurea โดย automated high-performance liquid chromatography ปริมาณ γ -globin mRNA โดย real time PCR detection technique และ γ -globin chains (γ^G/γ^A globin chain) โดย Triton X-100 acid urea polyacrylamide gel electrophoresis ผลการศึกษาพบว่าการกระตุ้นการสร้าง γ^G - และ / หรือ γ^A - globin mRNA, γ^G - globin mRNA = $0.05 \pm 0.01 - 50.86 \pm 8.68$, γ^A - globin mRNA = $0.19 \pm 0.001 - 26.23 \pm 3.01$, $\gamma^G/\gamma^A = 0.01 \pm 0.001 - 9.39 \pm 6.12$ ค่า relative levels of γ -mRNA ($100 \times \gamma/(\gamma+\beta)$ fold induction = 66.62 – 99.72 % ปริมาณ fractional HbF = 1.10 – 5.07 สรุปว่าในผู้ป่วยทั้ง 22 รายพบ

ว่า มีผู้ป่วย 20 รายที่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea และ 2 รายอาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea เนื่องจากมี fractional HbF content และ fold induction γ/α globin mRNA น้อยกว่า 1 ส่วนการศึกษา in vivo ผู้ป่วยได้รับยา hydroxyurea อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ปี แล้วเจาะเลือดมาวิเคราะห์หาค่า HbF γ/α globin mRNA และ γ/α globin chain แล้วนำไปเปรียบเทียบกับการศึกษา in vitro ซึ่งใช้ผู้ป่วยกลุ่มเดิมซึ่งหยุดการรับ hydroxyurea มาแล้ว 7 เดือน – 1 ปี แล้วเจาะเลือดมาเตรียมเซลล์ และ treat ด้วย 30 μ M hydroxyurea ในวันที่ 6 และเก็บเซลล์ในวันที่ 10 (96 ชั่วโมง) จากผลการทดลองพบว่า ค่า fractional HbF content มีค่า linear coefficient correlation $r^2 = 0.54$, (P value = 0.204) in vitro มีค่า 0.29 – 11.73, in vivo มีค่า 0.50-13.97, γ/α globin mRNA fold induction, $r^2 = 0.52$, (P value = 0.164) in vitro มีค่า 0.34 – 8.18, in vivo มีค่า 0.28 – 6.10 และ γ/α globin chain fold increase, $r^2 = 0.62$, (P value = 0.134) in vitro มีค่า 0.80 – 1.43, in vivo มีค่า 0.98 – 1.23 ผู้ป่วย β -thalassemia/HbE ชนิดที่มีความรุนแรงระดับปานกลาง (thalassemia intermedia) 13 รายที่ศึกษามี 11 รายที่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea และ 2 รายที่อาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea เนื่องจากมีค่า fractional HbF และ fold induction γ/α globin mRNA ใน in vivo และ in vitro มีค่าต่ำกว่า 1 ซึ่งการตอบสนองของ erythroid precursor cell ในผู้ป่วยแต่ละรายต่อ hydroxyurea มีความแตกต่างกันอาจเนื่องจากปัจจัยอื่นๆ อีกหลายอย่าง เช่น ความสามารถในการสร้าง HbF ของผู้ป่วยที่มีอยู่ก่อนให้ hydroxyurea หรือปัจจัยพื้นฐานของ β -globin mutation และ/หรือชนิดของChromosome อาทิ XmnI site polymorphism บริเวณ promoter ของ γ -globin gene เป็นต้น ดังนั้นวิธีการศึกษา in vitro นี้เป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะในการศึกษากลไกการควบคุมการกระตุ้นการสร้าง HbF โดยยาหรือสารเคมีตัวใหม่อื่นๆ

คำหลัก: hemoglobin F, hydroxyurea, γ - globin mRNA, erythroid, progenitor cell

ABSTRACT

Project Code: RDG3/09/2543

Project Title: Hemoglobin F switching in *vitro*: the development of rapid screening of γ -globin synthesis and clinical correlates

Investigators: Watanapokasin Y.
Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

e-mail address: yuwadee@swu.ac.th or ywwatana@yahoo.com

Project Duration: April 2000 - March 2003

The responses to hydroxyurea, that elevates fetal hemoglobin synthesis in β -thalassemia/HbE (β -thal/HbE) patients, need to be effectively elucidated in vitro in order to screen primarily of responders and non-responders before the in vivo treatment (eg orally administered hydroxyurea). This will help reducing the pain, cost and time of random treatment enabling the improved life quality of the patients. Primary erythroid progenitor cell culture from patient's peripheral blood is the convenient and rapid technique that is employed in this study. At concentration of agents chosen for minimal effect on cell division, hydroxyurea at 30 μ mol/L significantly increase fractional HbF contents in β -thal/HbE patients and normal adult. The effective duration of hydroxyurea treatment is from day 6 to day 10 (96 hours). This technique is rapid, convenient and less pain as compared to primary erythroid progenitor cells obtained from bone marrow. The availability of reliable cell assays such as real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) analyses of globin messenger RNA was used. The effect of 30 μ M hydroxyurea on 22 β -thal/HbE patients (thalassemia intermedia) are also studied. Addition of hydroxyurea to human erythroid cell cultures preferentially enhanced β -globin mRNA synthesis, either $^G\gamma$ - and/or $^A\gamma$ -globin mRNA in all patients. $^G\gamma$ -globin mRNA fold induction = $0.05 \pm 0.01 - 50.86 \pm 8.68$, $^A\gamma$ -mRNA fold induction = $0.19 \pm 0.001 - 26.23 \pm 3.01$, $^G\gamma/^A\gamma$ globin mRNA fold induction = $0.01 \pm 0.001 - 9.39 \pm 6.12$. The relative levels of γ -mRNA ($100 * \gamma / (\gamma + \beta)$) fold induction ranges from 66.62 – 99.72 %, $^G\gamma$ - and/or $^A\gamma$ -globin mRNA ($\% ^G\gamma / (^G\gamma + ^A\gamma)$) = $0.02 \pm 0.001 - 9.86 \pm 5.84$. Fractional HbF levels varied from 0.50 – 5.07. The results indicated that 20 patients are responders and 2 patients may be classified as non-responder as they showed fractional HbF levels and $^G\gamma/^A\gamma$ globin mRNA fold induction less than 1. For in vivo study, β -thal/HbE

patients were treated with hydroxyurea orally at a starting dose of 5 mg/kg/day for 5 days/week with escalation to maximum of 10 mg/kg/d for two years then all the assays were performed, whereas the in vitro study, primary culture system from adult erythroid cells obtained from the same group of patients who had seven to one year-off hydroxyurea treatment were studied. The results showed that γ^G/γ^A globin mRNA fold induction in vitro ranges from 0.34 – 8.18 and in vivo from 0.28 – 6.10, the linear correlation coefficient $r^2 = 0.52$ (P value = 0.164) as determined by paired T-test, fractional HbF content in vitro ranges from 0.50 – 13.97 and in vivo from 0.29 – 11.73, $r^2 = 0.54$ (P value = 0.204) and γ^G/γ^A globin chain fold increase in vitro ranges from 0.80 – 1.43 and in vivo from 0.98 – 1.23, $r^2 = 0.62$ (P value = 0.134). The results showed that 2 out of 13 patients may be classified as non-responders as they show low level of γ^G/γ^A globin mRNA fold induction and fractional HbF both in vivo and in vitro (<1). Hydroxyurea responses of patients are different, this may be due to many possible factors including ability to produce HbF in some patients before hydroxyurea treatment, β -globin mutation and/or inheritance of β -thalassemia Chromosome with the XmnI cleavage polymorphism at promoter of γ -globin gene etc. These methods may enable us to use the primary culture system of adult erythroid for preliminary screening of responders and non-responders as well as studying the mechanism (s) of new known γ -globin inducers and identifying new drug candidates.

Keywords: hemoglobin F, hydroxyurea, γ - globin mRNA, erythroid, progenitor cell

รายงานฉบับสมบูรณ์ของการวิจัย
ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
ฝ่ายสวัสดิภาพสาธารณะ

โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย)	การกระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบินเอฟ: ศึกษาการนำไปใช้ในผู้ป่วย เบต้า-ธาลัสซีเมียและพัฒนาระบบตรวจสอบการกระตุ้นการสร้าง สายโกลบินแกมมา
(ภาษาอังกฤษ)	Hemoglobin F switching in <i>vitro</i> : the development of rapid screening of γ -globin synthesis and clinical correlates
รายงานฉบับสมบูรณ์ของการวิจัย	ระหว่าง เดือน เมษายน พ.ศ. 2543 ถึง มีนาคม พ.ศ. 2546
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ หมายเลขโทรศัพท์ 2-602233-4 ต่อ 4604
รายนามหัวหน้าโครงการ	รศ. ดร.ยุวดี วัฒนโกคาสิน
และผู้ดำเนินการวิจัย	
<u>หัวข้อรายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย ดังนี้</u>	

วัตถุประสงค์ของโครงการ (โดยสรุป) :

1. เพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นก่อนทำการรักษาผู้ป่วย β -thalassemia โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงจากเลือดของผู้ป่วยแต่ละรายมาศึกษาการกระตุ้นการสร้าง HbF โดยการใช้ hydroxyurea เพื่อหาว่าผู้ป่วยรายใดมีการตอบสนองต่อ hydroxyurea หรือไม่
2. ศึกษาขนาดหรือปริมาณ และระยะเวลาการใช้สาร hydroxyurea ที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นการสร้าง HbF ใน erythroid cell culture จาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thalassemia
3. ศึกษากลไกควบคุมการแสดงออกของ γ -globin gene โดยหาปริมาณ γ -globin mRNA ใน erythroid cell culture จาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thalassemia ที่ได้รับ hydroxyurea

เหตุผลที่จำเป็นในการวิจัย

โรคที่เกิดจากความผิดปกติในการสร้างฮีโมโกลบิน (hemoglobinopathies) เช่น thalassemia และ sickle cell anemia เป็น genetic disorders ที่พบได้ทั่วไป โดยประมาณว่า ใน ค.ศ. 2000 ประมาณ 7% ของประชากรทั่วโลกจะมี globin chain mutation

ธาลัสซีเมีย (thalassemia) เป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุดในคนไทย และเป็นปัญหาที่สำคัญในประเทศไทยโรคหนึ่ง โดยเฉลี่ย 13-20 % ของคนที่อาศัยอยู่ในกรุงเทพฯ จะเป็นพาหะของ HbE (เกิดจาก mutation ของ codon ที่ตำแหน่ง 26 ของ β -globin gene, GAG $\rightarrow$ AGA) จะพบ HbE ก่อนข้างบ่อยในคนอีสาน ส่วน β -thalassemia พบประมาณ 3-9% (1) และพบได้ทั่วประเทศ

β -thalassemia เกิดจากการที่ร่างกายสร้างสายโกลบิน β น้อยลง หรือสร้างไม่ได้เลย ทำให้สายโกลบิน α มีปริมาณเกินดุล ทำให้สายโกลบิน α ที่เกินมานี้ไม่สามารถรวมตัวเป็น homotetramers ได้ ดังนั้นจึงไปตกตะกอนบนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงทำให้เกิด oxidative damage ต่อส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนและไขมัน จากการที่เกิด oxidation ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จะมีผลทำให้มีการปล่อยอนุมูลอิสระ (free radical) จากเหล็กฮีม (heme) หรือ เฮมิโครม (hemichrome) แล้วส่งผลให้เม็ดเลือดแดงมีความผิดปกติ และถูกทำลายได้ง่าย (2) เกิดเป็น hemolytic anemia ทำให้ผู้ป่วยมีอาการซีดเหลือง ตับ ม้ามโต เจริญเติบโตช้า มีการสร้างเม็ดเลือดแดงมากกว่าปกติเพื่อทดแทนเม็ดเลือดแดงที่ถูกทำลายไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระดูก ทำให้กระดูกใบหน้าเปลี่ยนแปลงไป มีลักษณะที่เรียกว่า “ใบหน้าธาลัสซีเมีย” และมีความผิดปกติอื่นๆ ของร่างกาย อีกหลายประการ (3)

β -thalassemia เกิดจากการผ่าเหล่า (mutation) ของยีนโกลบิน (4) ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของ mutation ที่เกิดว่ายังสร้าง mRNA หรือ สายโกลบิน β ได้หรือไม่ mutation ที่พบคือ point mutation, frameshift mutation, premature termination (nonsense mutation) และ splice junction mutation เป็นต้น (5-9)

การสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน (hemoglobin, Hb) ในมนุษย์พบว่าการแสดงออกของยีนโกลบิน บนโครโมโซม (α - and α -like globin gene บนโครโมโซมคู่ที่ 16, β - and β -like globin gene บนโครโมโซมคู่ที่ 11) จากระยะตัวอ่อน-ทารก-โตเต็มวัย (embryo-fetus-adult) โดยมี 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ (major switch) คือ มีการสร้าง embryonic Hb ในระยะตัวอ่อนในครรภ์ จนอายุได้ประมาณ 10 สัปดาห์ จึงมีการสร้าง fetal Hb (HbF) ในทารก และ switch ไปสร้าง adult Hb (Hb A₁ และ Hb A₂) ในระยะเต็มวัยก่อนคลอด

มีงานวิจัยจากหลายกลุ่มทำต่อเนื่องมาหลายปี (10-14) แสดงให้เห็นว่าในผู้ป่วย β -hemoglobinopathies คือ sickle cell anemia และ β -thalassemia ที่มีปริมาณ HbF สูงกว่าคนปกติจะทำให้

อาการของโรคลดลง และได้มีการศึกษาโดยใช้ยาหรือสารเคมีที่มีผลกระตุ้นการสร้าง HbF เช่น hydroxyurea (HU), butyrate และยาอื่นๆ ที่มีผลต่อการ switching ในการแสดงออกของยีน โกลบิน

เนื่องจากได้มีการค้นหายาหรือสารเคมี (therapeutic compounds) สำหรับ β -thalassemia ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 เช่น Desimone J. *et al.* (15) ใช้ 5-azacytidine ในการกระตุ้น γ -gene expression ใน adult baboons แต่เนื่องจากยาดังนี้เป็น cytotoxic drug ดังนั้น จึงนิยมใช้ใน end stage disease เพราะเหตุว่ามีคุณสมบัติในการเป็น carcinogenic agent ได้ ซึ่งยาดังนี้ทำงานโดย reverse DNA methylation ทำให้เกิด gene activation นอกจากนั้นยังมีการใช้สารอื่นๆ ใน in vitro และในสัตว์ทดลอง และใน clinical trials (16, 17) เช่น ใช้ erythropoietin, butyric acid และ hydroxyurea ในคนไข้ β -thalassemia และ sickle cell anemia เป็นต้น (18-22) แต่ก็พบว่าผลที่ได้จะแตกต่างกันไปขึ้นกับคนไข้แต่ละราย กล่าวคือ บางรายก็แสดงการตอบสนอง (responder) แต่บางรายก็ไม่ตอบสนอง (non-responder) และยังมีการศึกษาถึงผลของการเกิด histone acetylation โดย butyrate ทำให้มีการสร้าง γ -globin สูงขึ้น (23-24)

ดังนั้น ในการรักษาผู้ป่วย β -thalassemia โดยการใช้ยาหรือสารเคมีเพื่อกระตุ้นให้มีการสร้าง HbF ได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้น ในประเทศไทยมีการใช้ hydroxyurea ในการรักษาผู้ป่วย β -thalassemia/HbE (22) เนื่องจาก HbF มีคุณสมบัติในการนำพาออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ใกล้เคียงกับ HbA และมีการศึกษาผู้ที่มี HbF 100% เช่นใน homozygous hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) ซึ่งเกิดจาก gene deletion ของยีน โกลบินตัวอื่นๆ แล้วไปกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ γ -globin gene นั้นพบว่า ผู้ป่วย HPFH มีการเจริญเติบโตเหมือนคนปกติทุกอย่าง ไม่ชด ดับม้ามไม่โต ดังนั้นถ้าสามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง HbF โดยยาหรือสารเคมีก็จะเป็นวิธีการรักษาที่ดียิ่งหนึ่ง ที่จะทำให้ผู้ป่วยหายจากอาการซีด และมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นได้

อย่างไรก็ตาม ก่อนที่จะให้ยาหรือสารเคมีแก่ผู้ป่วย ต้องมีการศึกษาถึงผลของยาหรือสารเคมี เช่น ขนาด (ความเข้มข้นหรือปริมาณ) ผลข้างเคียงอื่นๆ รวมทั้งระยะเวลาในการใช้ยาหรือสารเคมี ฯลฯ นอกจากนั้นควรจะมีการศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของ HbF ในผู้ป่วยที่ถูกกระตุ้นด้วยยาหรือสารเคมีดังกล่าวด้วย เช่น การหาปริมาณ mRNA ในผู้ป่วยที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อยาดังกล่าว ในการศึกษานี้จะใช้ erythroid culture จาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thalassemia ชนิดต่างๆ

นอกจากการศึกษาผลของ butyrate และ hydroxyurea ในการกระตุ้นการสร้าง HbF ดังกล่าวข้างต้น ในขณะเดียวกันควรมีการศึกษาผลของยาหรือสารเคมีตัวอื่นๆ ที่สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง HbF สูงขึ้น เช่น butyrate derivatives หรือ สารที่มี functional groups ใกล้เคียงกับ butyrate หรือ hydroxyurea หรือ สารอื่นๆ ที่มีกลไกการออกฤทธิ์และทำงานคล้ายกับ butyrate เช่น สารที่ทำหน้าที่เป็น histone deacetylase

inhibitors จำพวก tetrapeptide trapoxin, antifungal antibiotic trichostatinA เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้ได้ยาหรือสารเคมีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ในการใช้ป้องกันและรักษาผู้ป่วย β -thalassemia ในการศึกษาผลของยาหรือสารเคมีตัวอื่นๆ นี้จะใช้ cell culture เช่น human leukemic cell line K562 และอาจพัฒนานำผลที่ได้ไปใช้ทดสอบใน transgenic thalassemic animal ต่อไปได้

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. เตรียม erythroid cell culture จาก peripheral blood stem cell ของคนปกติ (normal adults) แต่ละราย จำนวน 3 ราย โดยประยุกต์จากวิธีของ Swada et al., 1990 (25-26) และ Choi et al., 2000 (27)
2. ทดสอบการให้ hydroxyurea ใน erythroid cell culture ที่ได้
3. หาขนาดของ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF และระยะเวลาในการให้สาร hydroxyurea
4. เตรียม erythroid cell culture จาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thalassemia แต่ละราย จำนวน 3 ราย
5. ทดสอบการให้ hydroxyurea ใน erythroid cell culture ที่ได้
6. หาขนาดของ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF และระยะเวลาในการให้สาร hydroxyurea
7. จากข้อ 4.-6. เมื่อทราบขนาดของ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF และ ระยะเวลาในการให้สารแล้วจึงเริ่มทำการทดลองโดยเก็บเลือดและเตรียม erythroid cell culture จาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thalassemia แต่ละราย หาปริมาณ HbF, Hb A₂, and Hb A by automated high-performance liquid chromatography (VARIANT; BioRad, Hercules, CA, U.S.A.) γ -globin mRNA โดย real time PCR detection technique (Perkin Elmer) (28) และ γ -globin chains (γ^G/γ^A globin chain) ใน erythroid cell culture จากผู้ป่วยแต่ละรายที่ได้รับ hydroxyurea โดย Triton X-100 acid urea polyacrylamide gel electrophoresis
8. วิเคราะห์ hematologic data, hemoglobin analysis and reticulocyte count, serum transferrin receptor, % hemoglobin E และ hemoglobin F ของผู้ป่วย โดย conventional method
9. นำข้อมูลจากข้อ 7. (*in vitro* data) มาหาความสัมพันธ์กับข้อมูลที่ได้จากข้อ 8. (clinical data, hematological parameters) ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่การศึกษา molecular mechanism (genetic background, linkage analysis, polymorphism, etc.)

10. ศึกษาและเปรียบเทียบผลการทดลอง in vivo และ in vitro ในผู้ป่วย β -thalassemia/HbE (β -thal/HbE) โดย in vivo study ผู้ป่วย (β -thal/HbE) ได้รับ hydroxyurea เป็นเวลา 2 ปี และ เจาะเลือด มาตรวจวิเคราะห์ค่า ส่วนการศึกษาใน in vitro หลังจากผู้ป่วย รายเดิมหยุดยา hydroxyurea แล้ว 7 เดือน- 1 ปี จึงเจาะเลือด ผู้ป่วย β -thal/HbE รายเดิมมาศึกษาโดย erythroid cell culture technique และตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ และเปรียบเทียบผลการทดลองจาก in vivo และ in vitro
11. ให้ hydroxyurea แก่ผู้ป่วย β -thalassemia เช่น ผู้ป่วย β -thal/HbE ที่เป็น responder เพื่อให้การรักษา

ผลงานวิจัย

1. จากการศึกษาศึกษาและ small scale purification ของ erythroid progenitor cells จาก peripheral blood โดยกระบวนการดังต่อไปนี้ (ก) Mononuclear separation โดยใช้ Ficoll-Hypaque (ข) red blood cells lysis (ค) platelet depletion (ง) adherent cells depletion และ purification of BFU-E by magnetic cell sorting (negative selection)

Day 0;	BFU-E
Day 3;	Late BFU-E
Day 6;	CFU-E
Day 10;	Erythroblast
Day 14;	Red blood cell

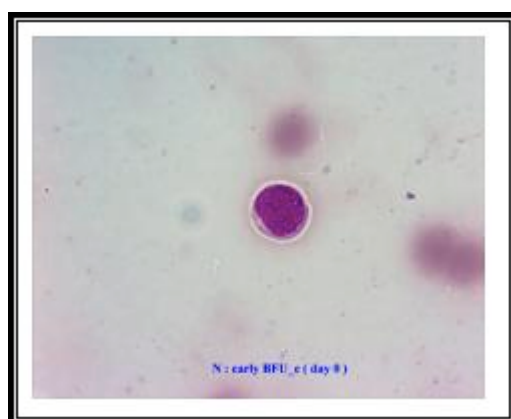


Figure 1 BFU-E at day 0

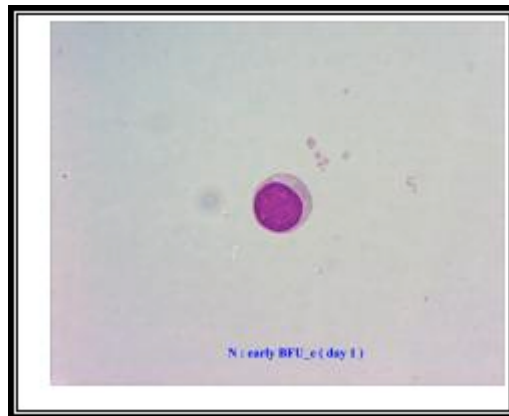


Figure 2 BFU-E at day 1

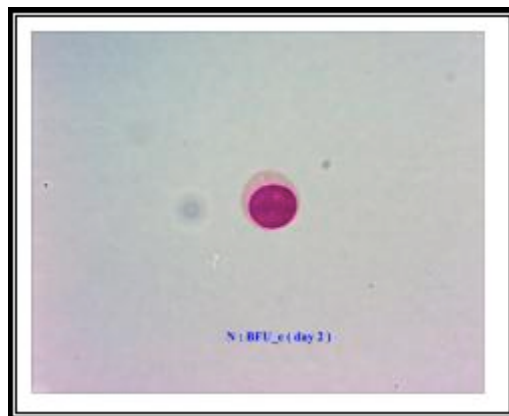


Figure 3 BFU-E at day 2

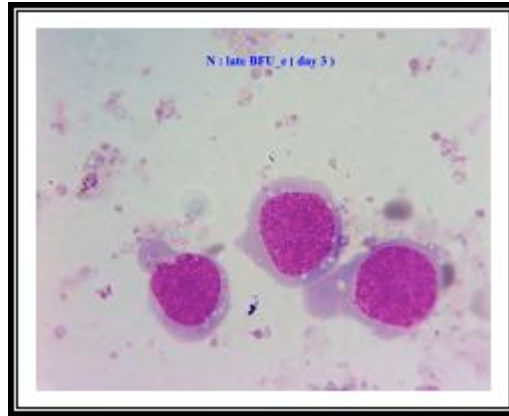


Figure 4 BFU-E at day 3

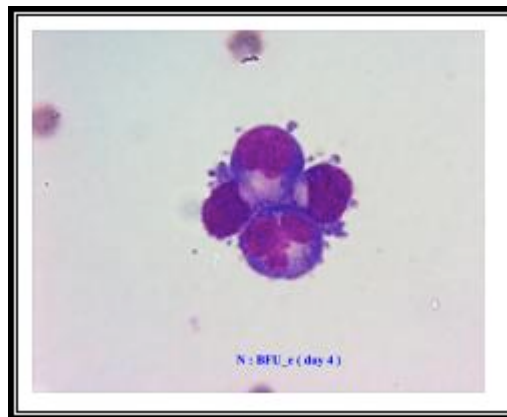


Figure 5 BFU-E at day 4

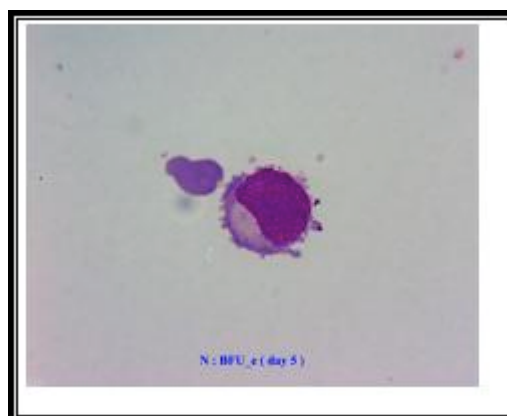


Figure 6 BFU-E at day 5

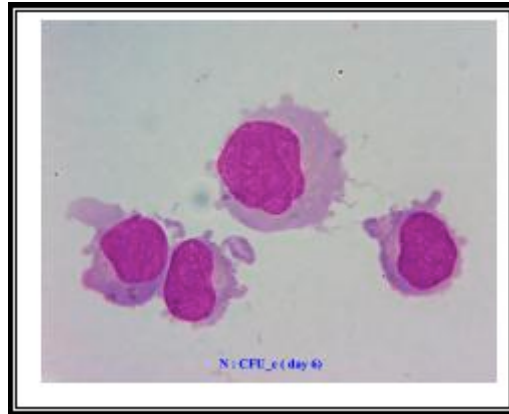


Figure 7 CFU-E at day 6

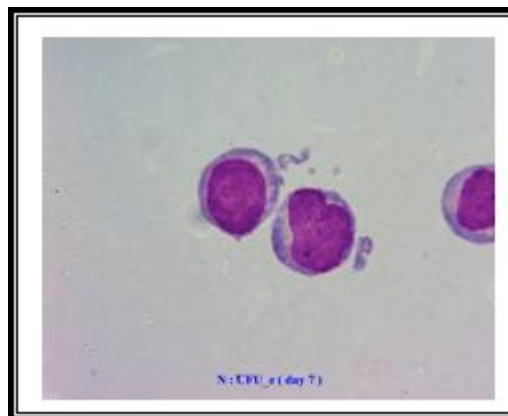


Figure 8 CFU-E at day 7



Figure 9 Pronormoblast at day 7

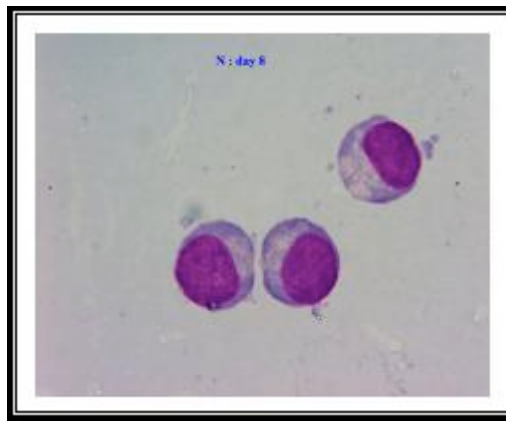


Figure 10 Pronormoblast at day 8

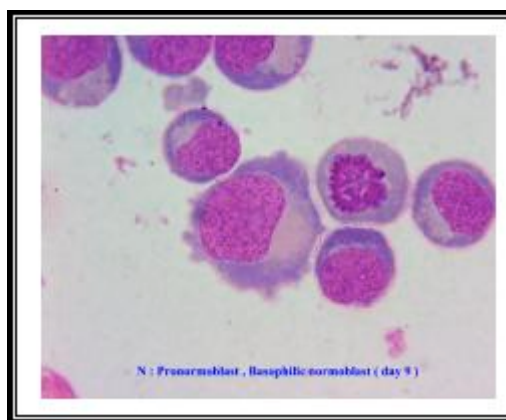


Figure 11 Pronormoblast and Basophilic normoblast at day 9

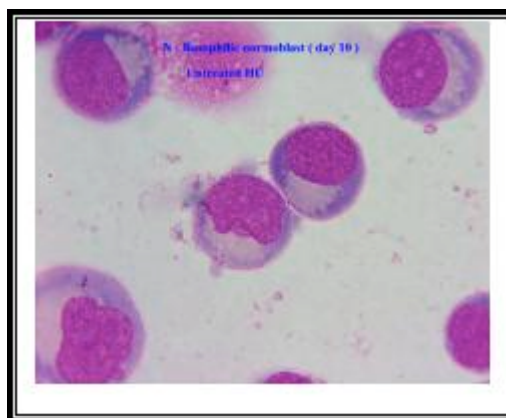


Figure 12 Basophilic normoblast at day 10

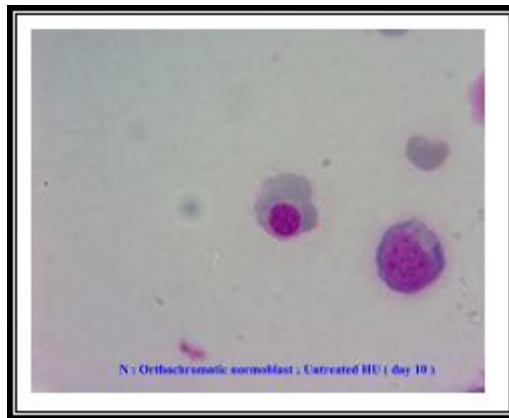


Figure 13 Orthochromatic normoblast at day 10

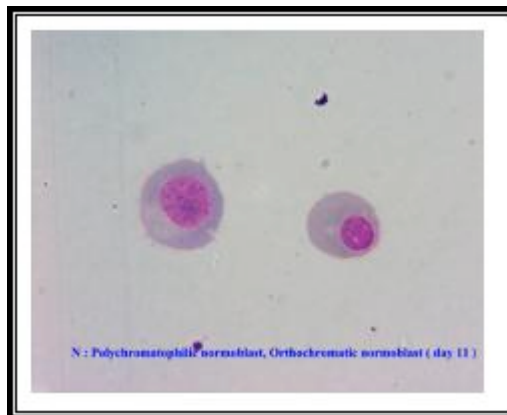


Figure 14 Polychromatophilic and Orthochromatic normoblast at day 11

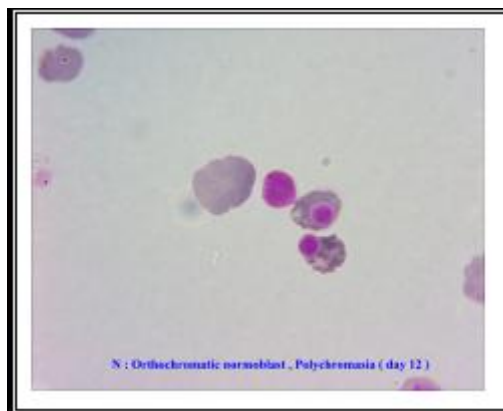


Figure 15 Orthochromatic normoblast and Polychromasia at day 12

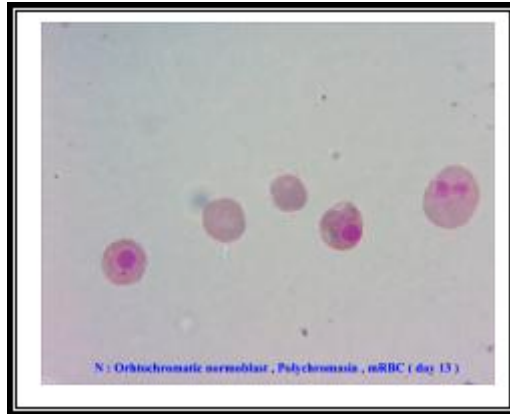


Figure 16 Orthochromatic normoblast, Polychromasia and mRBC at day 13

พบว่า สามารถแยก BFU-E และทำให้บริสุทธิ์ได้ (รูปที่ 1 - รูปที่ 16) erythroid precursor cells มีการ differentiate และ proliferate เริ่มจาก day 1 ไปจนถึง mature red cells ใน day 13 .

2. จากการศึกษาขนาดของ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF และ ระยะเวลาในการให้สาร hydroxyurea ที่เหมาะสมจาก peripheral blood stem cell ของคนปกติ (normal adults) จำนวน 3 ราย โดยใช้ Hydroxyurea ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 5 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ 100 μM) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บ Cell มาวิเคราะห์หาปริมาณฮีโมโกลบิน

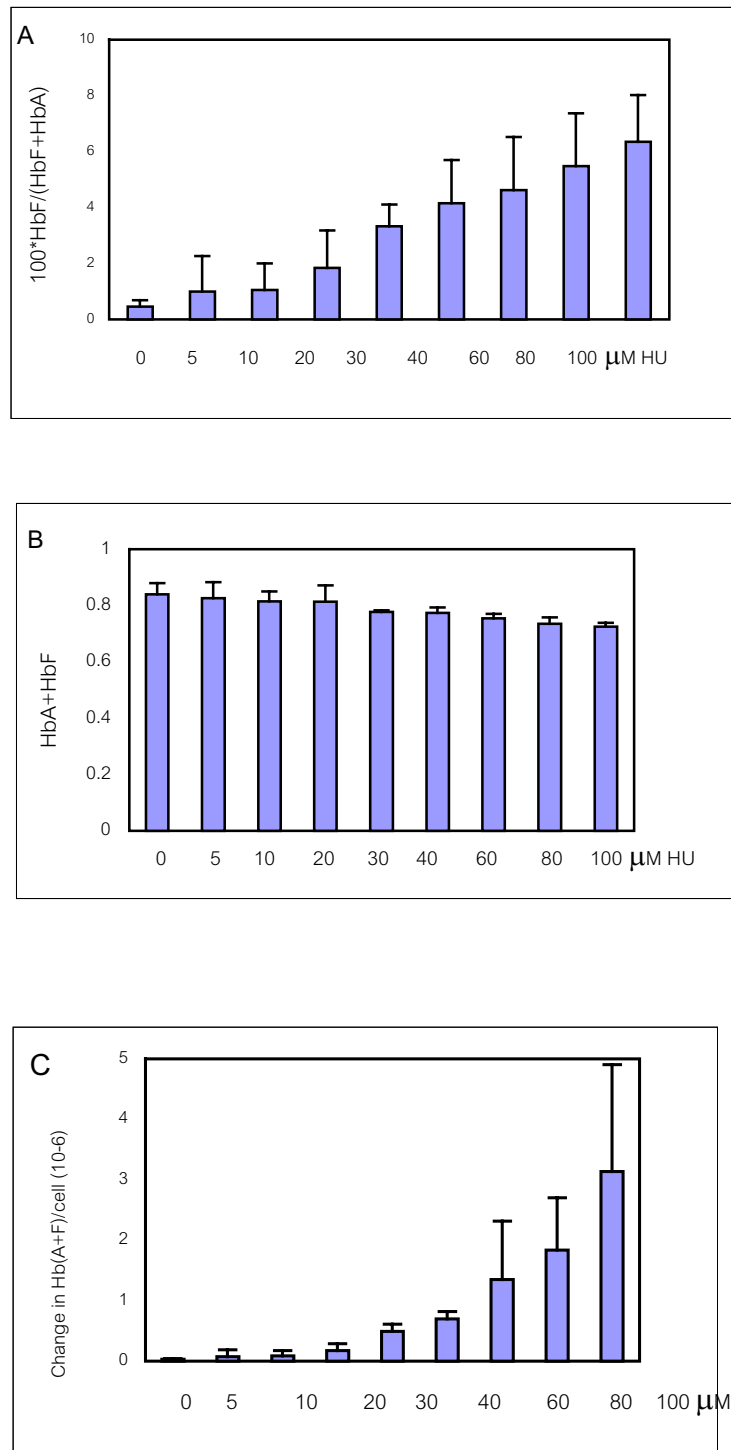


Figure 17 Effect of varying concentrations of hydroxyurea in normal adult erythroid cultures.

(A) Effect on fractional HbF content in erythroid cultures

(B) Effect on total Hb

(C) Effect on the amount of HbF per cell

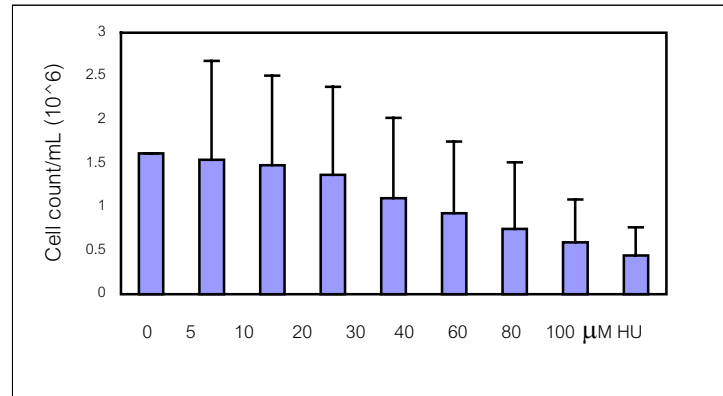


Figure 18 Effect of hydroxyurea on primary normal adult erythroid cell proliferation. Each bar represents the number of benzidine-positive cells present 96 hours after addition hydroxyurea.

พบว่า ที่ความเข้มข้น 30 μM ของ hydroxyurea จะสามารถกระตุ้นการสร้าง HbF ในคนปกติ ได้สูงสุด โดยศึกษาในผู้ป่วย β -thal/HbE จำนวน 3 ราย ค่าเฉลี่ยดังแสดงในรูปที่ 17(A-C) และ 18 จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า hydroxyurea ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อการสร้าง HbF เพิ่มขึ้นในลักษณะ dose dependent manner (Figure 17) ในขณะที่มีผลต่อการลดลงของจำนวนเซลล์ (Figure 18) เมื่อความเข้มข้นของ hydroxyurea เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของ hydroxyurea ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง HbF ได้สูง และยังมีจำนวนเซลล์สูงคือ 30 μM

3. ทำการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการสร้าง HbF ของคนปกติ (normal adults) จำนวน 3 ราย ในช่วงเวลาต่างๆ แสดงในรูปที่ 19 (A-C) และ 20

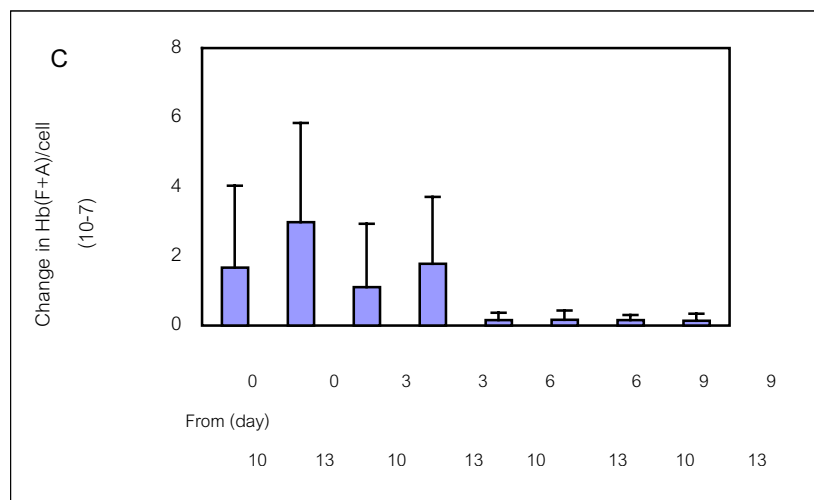
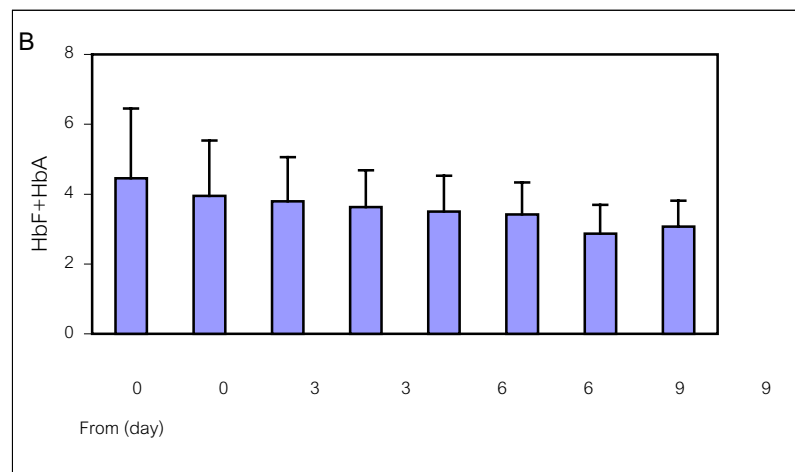
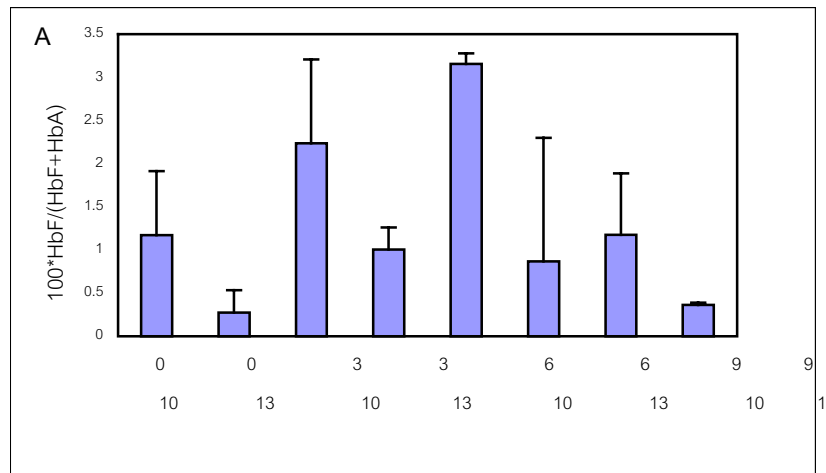


Figure 19 Effect of varying time of 30 μM hydroxyurea treatment in normal adult erythroid cultures.

- (A) Effect on fractional HbF content in normal adult erythroid cultures
- (B) Effect on total Hb
- (C) Effect on the amount of HbF per cell

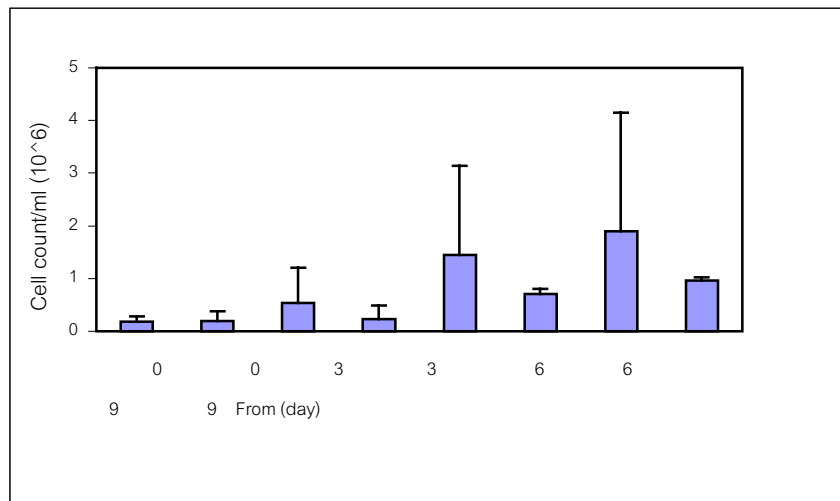
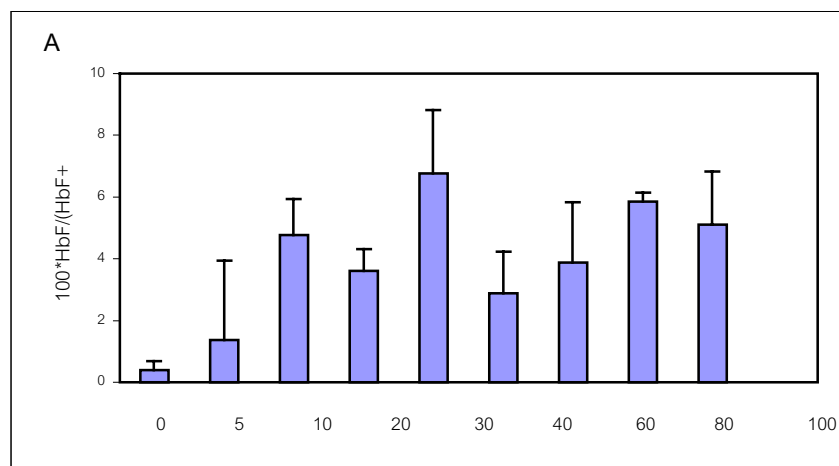


Figure 20 Effect of varying time of 30 μM hydroxyurea treatment in normal adult erythroid cultures on primary adult erythroid cell proliferation in beta-thalassemia patients.

จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าช่วงเวลาที่เหมาะสม ในการให้ hydroxyurea แล้วมีมีผลต่อการสร้าง HbF เพิ่มขึ้นคือ ให้ hydroxyurea ในวันที่ 6 และเก็บเซลล์ในวันที่ 10 (Figure 19) ในขณะที่ มีผลต่อจำนวน เซลล์ (Figure 20) ดังนั้น ช่วงเวลาที่เหมาะสม ในการให้ hydroxyurea ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง HbF ได้สูง และยังมีจำนวนเซลล์สูงคือ hydroxyurea ในวันที่ 6 และเก็บเซลล์ในวันที่ 10

4. ศึกษาหาขนาดของ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF และ ระยะเวลาในการให้ สาร hydroxyurea ที่เหมาะสมจาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thal/HbE จำนวน 3 ราย โดยใช้ Hydroxyurea ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ 100 μ M) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บ cell มาวิเคราะห์หาปริมาณฮีโมโกลบิน พบว่า ที่ความเข้มข้น 30 μ M ของ hydroxyurea จะสามารถกระตุ้นการสร้าง HbF ในผู้ป่วย β -thal/HbE ได้สูงสุด โดยศึกษาในผู้ป่วย β -thal/HbE จำนวน 3 ราย ค่าเฉลี่ยดังแสดงในรูปที่ 21 (A-C) และ 22



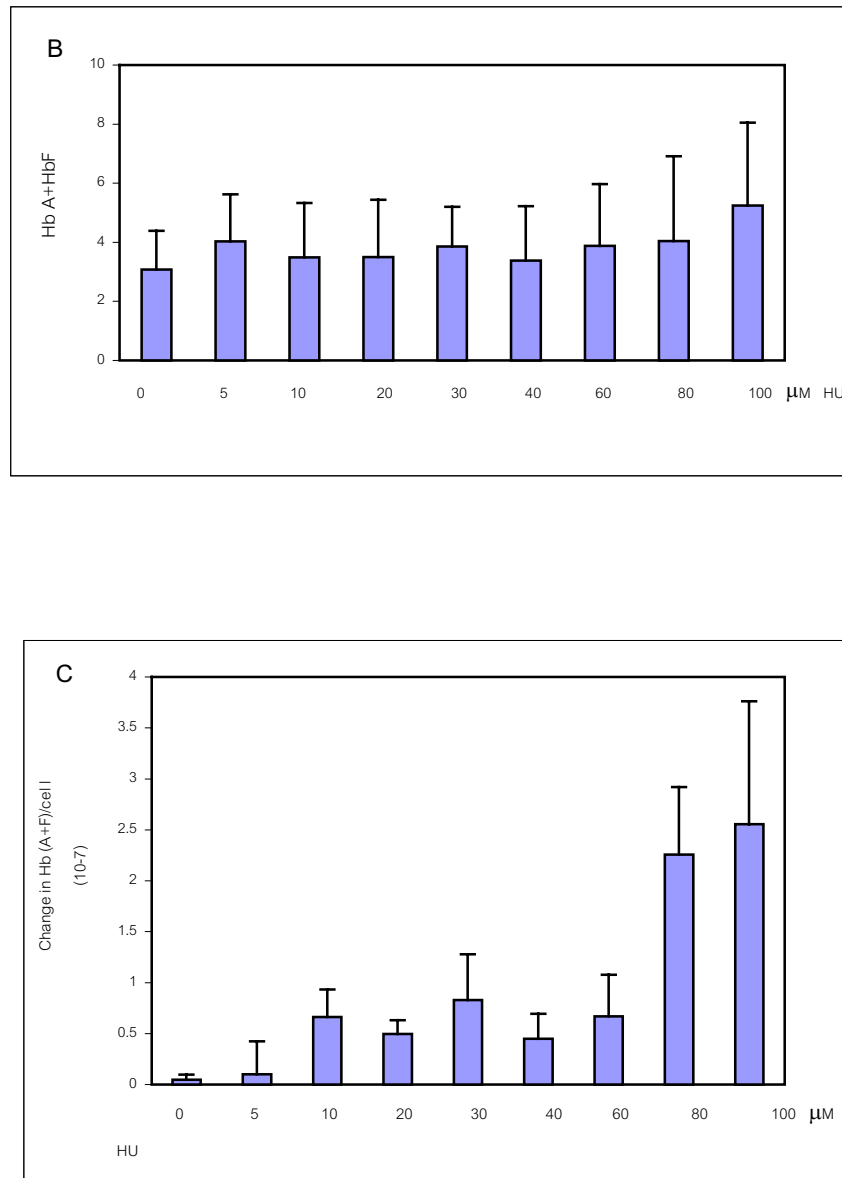


Figure 21 Effect of varying concentrations of hydroxyurea in β -thal/HbE erythroid cultures.

- (A) Effect on fractional HbF content in erythroid cultures
- (B) Effect on total Hb
- (C) Effect on the amount of HbF per cell

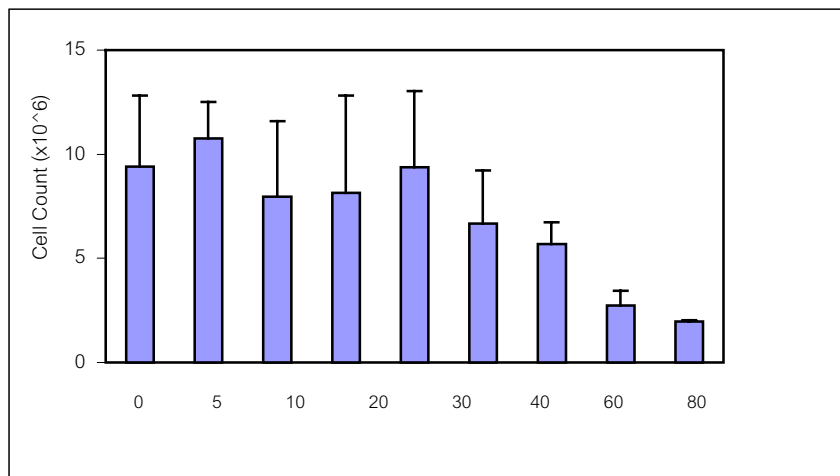
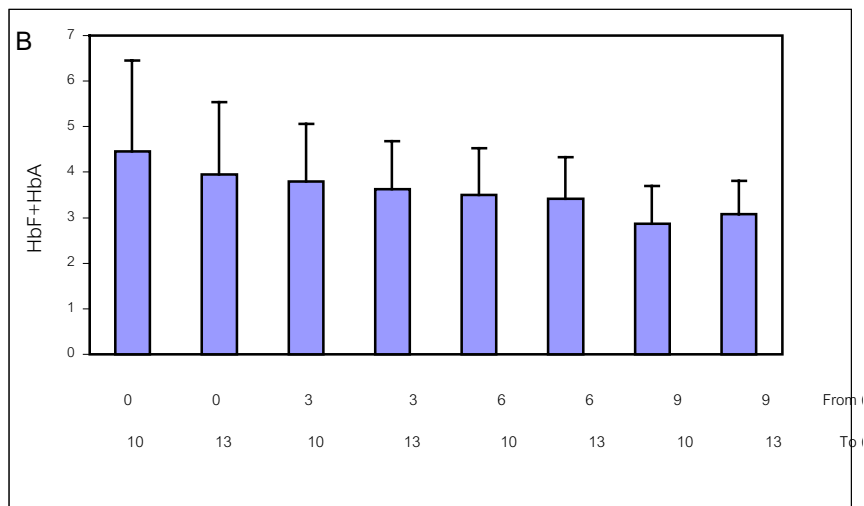
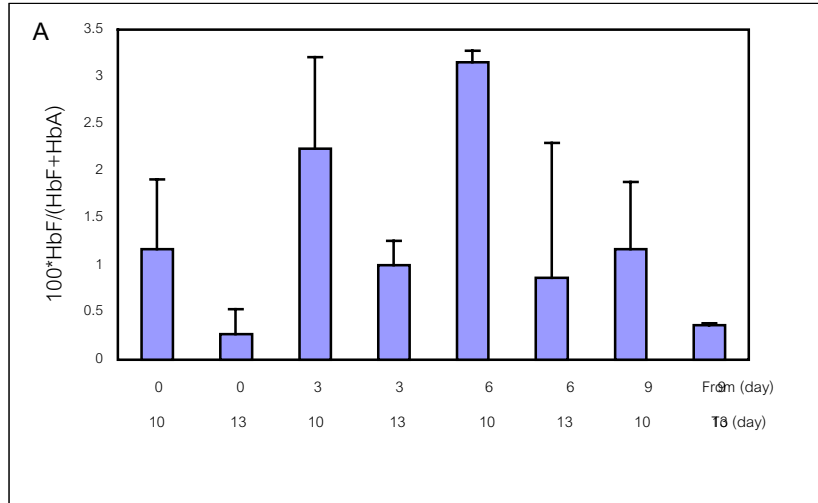


Figure 22 Effect of hydroxyurea on primary adult erythroid cell proliferation in β -thal/HbE patients. Each bar represents the number of benzidine-positive cells present 96 hours after addition of hydroxyurea.

จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า hydroxyurea ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อการสร้าง HbF เพิ่มขึ้นในลักษณะ dose independent manner (Figure 21) ในขณะที่ มีผลต่อการลดลงของจำนวนเซลล์ (Figure 22) เมื่อความเข้มข้นของ hydroxyurea เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของ hydroxyurea ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง HbF ได้สูง และยังมีจำนวนเซลล์สูงคือ 30 μ M

5. ทำการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการสร้าง HbF ของผู้ป่วย β -thal/HbE จำนวน 3 ราย ในช่วงเวลาต่างๆ แสดงในรูปที่ 23 (A-C) และ 24



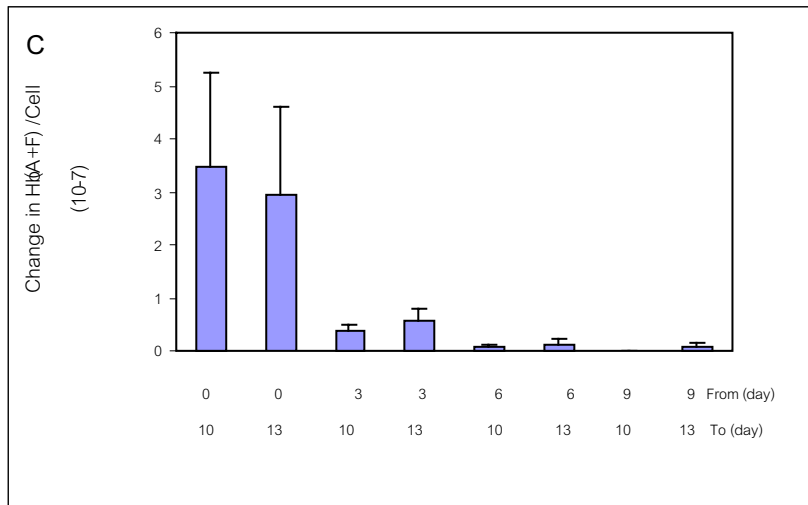


Figure 23 Effect of varying time of 30 μ M hydroxyurea treatment in β -thal/HbE erythroid cultures.

- (A) Effect on fractional HbF content in normal adult erythroid cultures
- (B) Effect on total Hb
- (C) Effect on the amount of HbF per cell

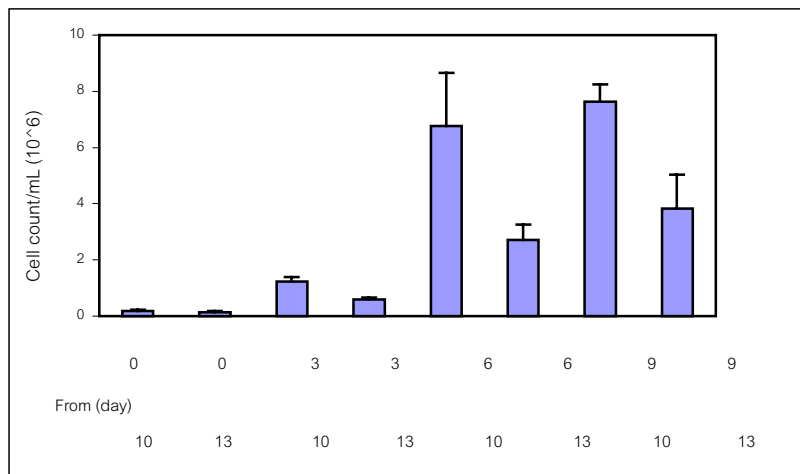


Figure 24 Effect of varying time of 30 μ M hydroxyurea treatment on primary adult erythroid cell proliferation in β -thal/HbE patients. Each bar represents the number of benzidine-positive cells present 96 hours after addition of hydroxyurea.

จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าช่วงเวลาที่เหมาะสม ในการให้ hydroxyurea แล้วมีมีผลต่อการสร้าง HbF เพิ่มขึ้นคือ ให้ hydroxyurea ในวันที่ 6 และเก็บเซลล์ในวันที่ 10 (Figure 23) ในขณะที่มีผลต่อจำนวน เซลล์ (Figure 24) ดังนั้น ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้ hydroxyurea ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง HbF ได้สูง และยังมีจำนวนเซลล์สูงคือ hydroxyurea ในวันที่ 6 และเก็บเซลล์ในวันที่ 10

6. ทำการทดลองกับผู้ป่วย β -thal/HbE จำนวน 22 ราย โดยการใช้ hydroxyurea ที่ความเข้มข้นเท่ากับ $30\ \mu\text{M}$ เพื่อศึกษาความเป็น responder ที่ช่วงของเวลาดังนี้ treated at day 6 : collected at day 10

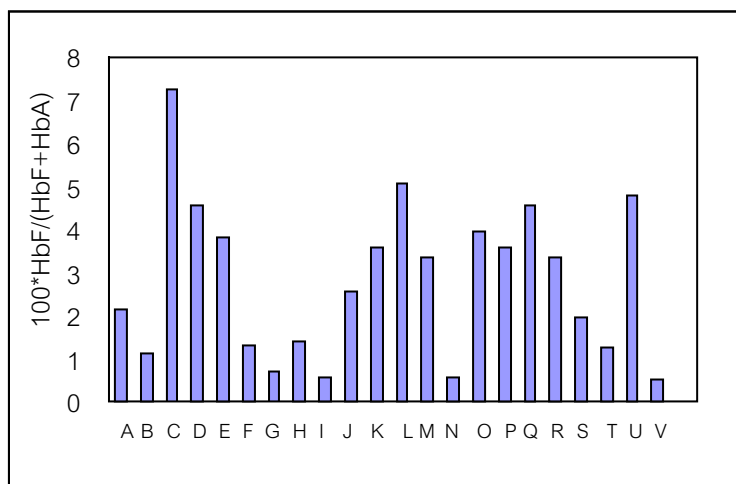
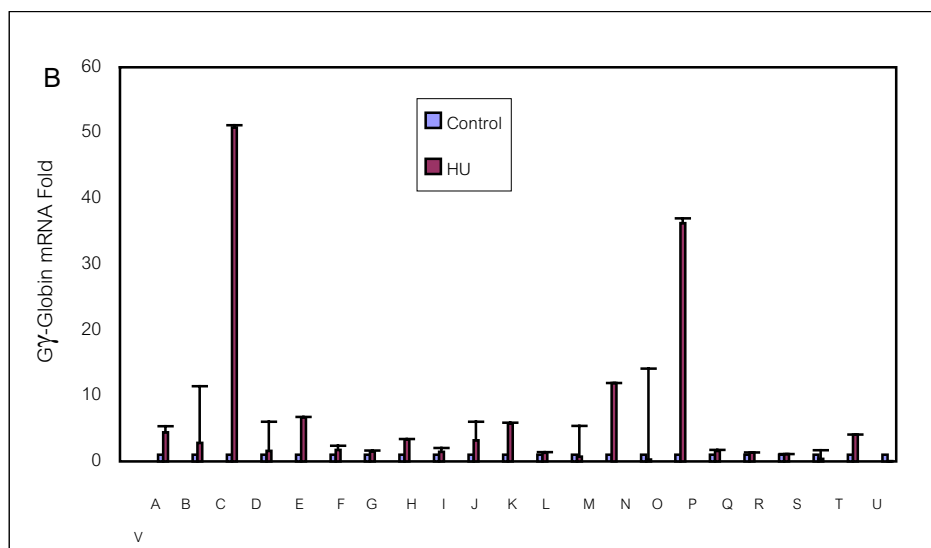
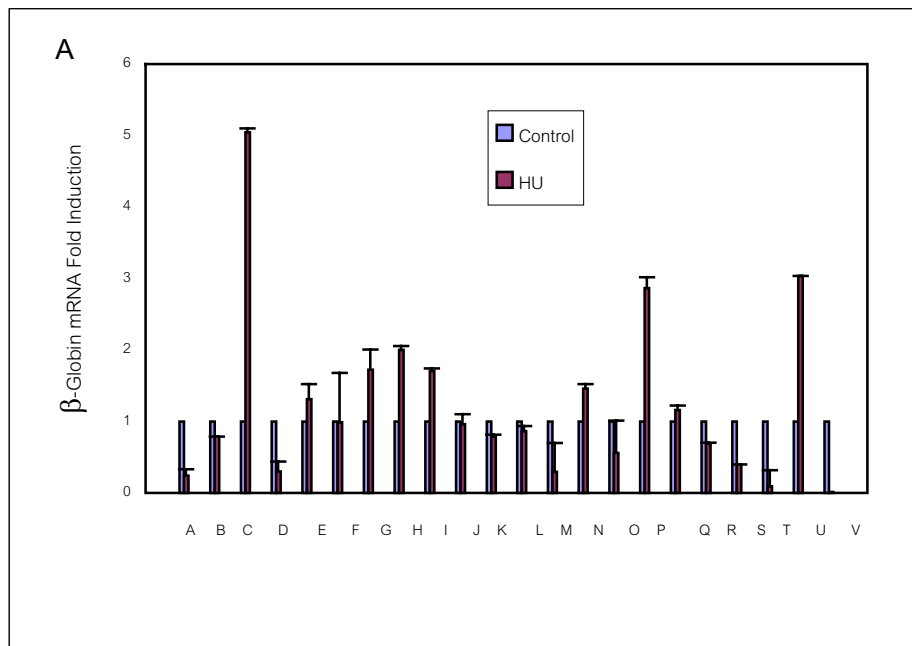
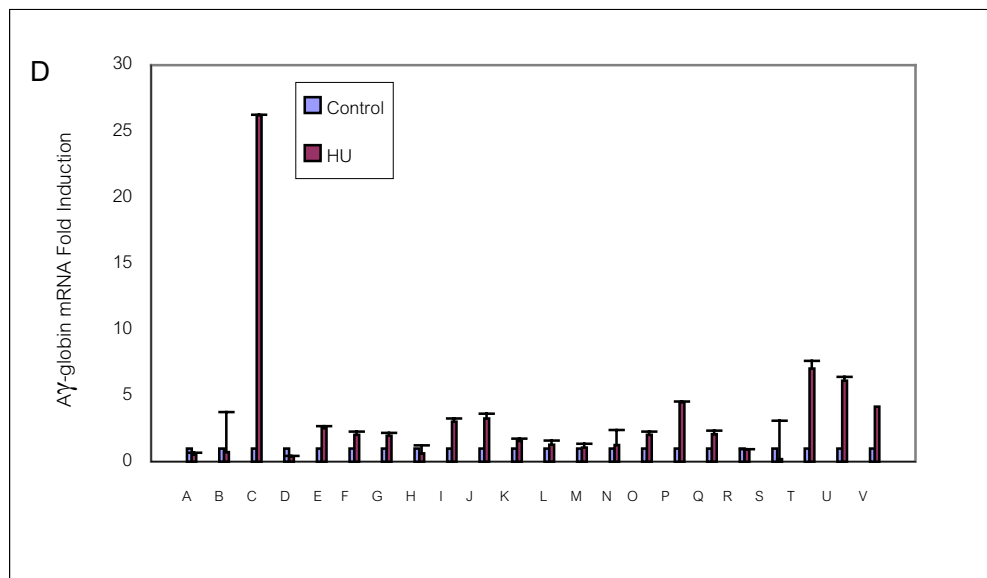
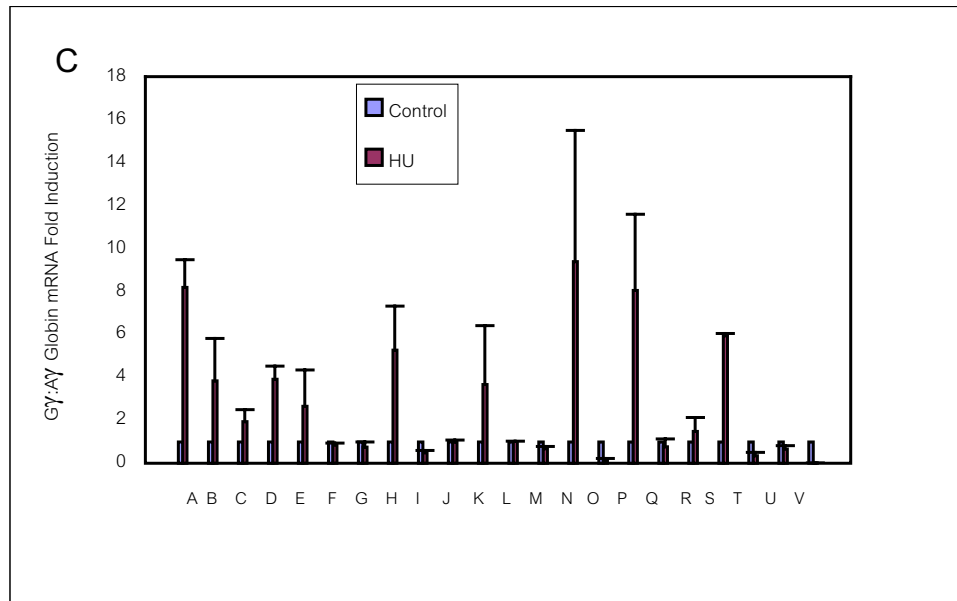


Figure 25 Hydroxyurea effects on fractional HbF content in $30\ \mu\text{M}$ hydroxyurea treatment of primary erythroid cultures in β -thal/HbE patients.

พบว่า ผู้ป่วยทั้ง 22 ราย มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่แตกต่างกันโดยมีผู้ป่วย 20 รายที่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea และ 2 รายอาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea เนื่องจากมี fractional HbF content น้อยกว่า 1 ดังแสดงในรูปที่ 25

7. จากการหาปริมาณ β -globin mRNA γ^G -globin mRNA γ^A -globin mRNA และ γ^G/γ^A globin mRNA ใน erythroid cell culture จากผู้ป่วยแต่ละรายที่ได้รับ hydroxyurea จำนวนทั้งสิ้น 22 ราย โดย real-time PCR detection technique





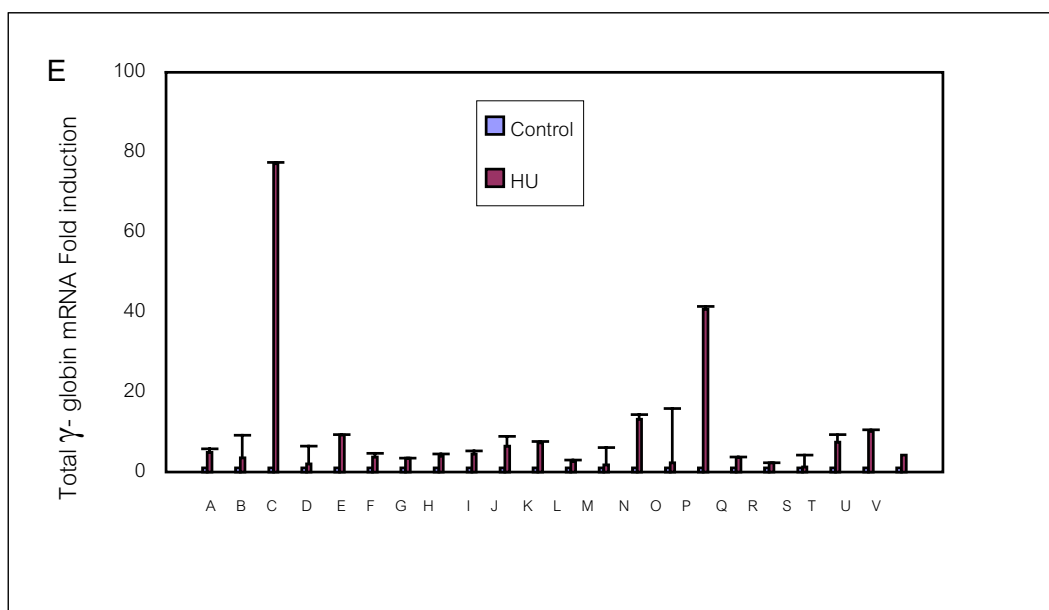


Figure 26 Hydroxyurea effects on globin mRNA levels in primary human adult erythroid cultures of β -thal/HbE. The level of transcription of the globin gene in the control was set to 1. The effect of hydroxyurea on

- (A) the level of β -globin message,
- (B) the levels of $^G\gamma$ -globin message
- (C) the levels of $^G\gamma/^\wedge\gamma$ globin message
- (D) the levels of $^\wedge\gamma$ -globin message
- (E) the levels of total γ -globin message and Untreated controls are shown as blue bars while hydroxyurea-treated samples are shown as green bars.

พบว่า ในผู้ป่วยที่ได้รับ hydroxyurea ความเข้มข้น 30 μM เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ให้ hydroxyurea ในวันที่ 6 ของการเจริญของเซลล์ แล้วเก็บเซลล์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในวันที่ 10 ของการเจริญ) มีปริมาณ $\gamma^G/\gamma^\wedge$ globin mRNA สูงกว่าปริมาณ $\gamma^G/\gamma^\wedge$ globin mRNA ที่พบในกรณีที่ไม่ได้รับการให้ hydroxyurea ดังแสดงในรูปที่ 26

8. จากการหาปริมาณ γ -globin chain ($G \gamma / A \gamma$ globin chain) ใน erythroid cell culture จากผู้ป่วยแต่ละรายที่ได้รับ hydroxyurea จำนวนทั้งสิ้น 9 รายโดย acid urea polyacrylamide gel electrophoresis technique พบว่า ในผู้ป่วยที่ได้รับ hydroxyurea ความเข้มข้น $30 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ให้ Hydroxyurea ในวันที่ 6 ของการเจริญของเซลล์ แล้วเก็บเซลล์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในวันที่ 10 ของการเจริญ) มีปริมาณ $G \gamma / A \gamma$ globin chain ต่อปริมาณ $G \gamma / A \gamma$ globin chain ที่พบในกรณีที่ไม่ได้รับการให้ hydroxyurea ดังแสดงในรูปที่

27

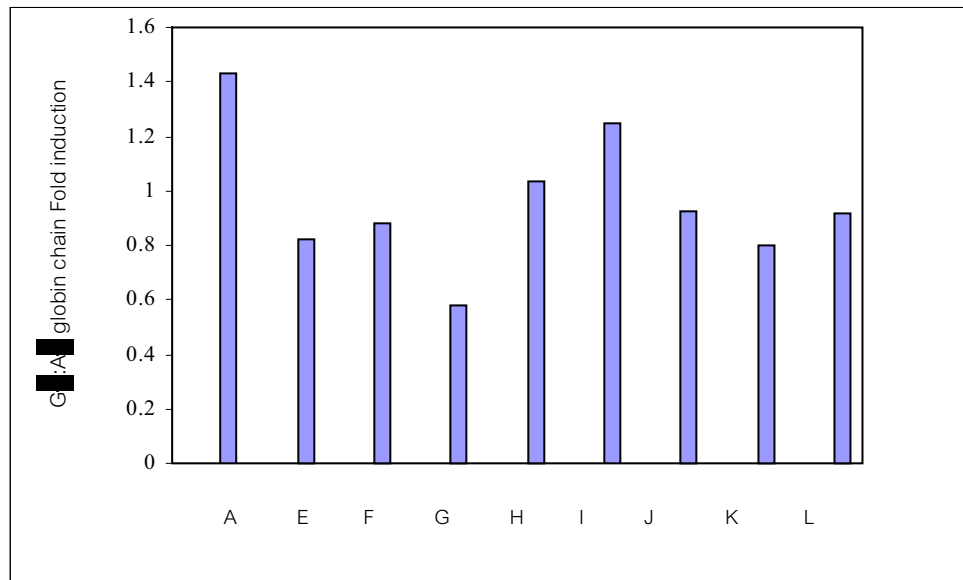


Figure 27 Fold induction in $G \gamma / A \gamma$ globin chain in primary erythroid cell culture from different β -thal/HbE patients treated with $30 \mu\text{M}$ hydroxyurea for 96 hours.

9. วิเคราะห์ hematologic data, hemoglobin analysis and reticulocyte count, % hemoglobin E และ hemoglobin F ของผู้ป่วย β -thal/HbE สำหรับ in vitro study โดยทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ hemoglobin E และ hemoglobin F โดย automated HPLC (Variant, BioRad) โดยได้ผลการวิจัยในส่วนของผู้ป่วย β -thal/HbE ใน in vivo study ทั้งก่อนและหลังการให้ hydroxyurea แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. Hematologic data ของผู้ป่วย β -thalassemia/HbE

Name	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	%RDW	Platelet	Hb E	%F	%A	Hb Type
AM baseline	5.6	20.7	63	17	27	27	744000	74.1	22.1	1.9	EF
AM 2 y-HU treatment	5.6	21	75	20	27	24	676000	61.6	36.5	1.9	
AS baseline	6	21.7	74	21	28	31	827000	60.5	35.7	4.8	EF
AS 2 y-HU treatment	6	22.4	70	19	27	27.7	783000	61.1	36.7	2.2	
CK baseline	4.5	17.1	70	19	27	32	75300	71.7	25.3	2.5	EF
CK 2 y-HU treatment	5.3	20.2	74.8	19.7	26.3	27.4	843000	59.4	38.1	2.5	
KS baseline	5.7	20.4	70	20	28	32	533000	66.4	29.4	6.4	EF
KS 2 y-HU treatment	5.9	23.4	71	18	25	25.5	820000	65.9	28.3	5.8	
LJ baseline	5.1	18.1	60	17	28	27	1066000	77.4	18.7	1.6	EF
LJ 2 y-HU treatment	5.5	20	73.4	20.2	27.5	24.5	881000	62.5	35.5	1.6	
ML baseline	5	18.1	63	18	28		1197000	71.4	25.6	2.1	EF
ML 2 y-HU treatment	5.5	20.1	72.5	19.9	27.4	24.6	1022000	55.4	44.5	2.1	
NS baseline	5.4	22.4	68	16	24	31	660000	76.1	20	2.2	EF
NS 2 y-HU treatment	5.5	21.8	73	18	25		481000	70.7	27.3	2	
PB baseline	7.1	25.1	67	18	28		623000	63.7	27.3	1.9	EFA
PB 2 y-HU treatment	6.7	24.4	70	19.3	27.6	24.9	674000	58.1	40	1.9	
PG baseline	6.6	23.2	53	15	29		733000	95.3	2.9	2.4	EF
PG 2 y-HU treatment	7	24.6	54	15	28	21	987000	94.4	3.2	2.4	
PM baseline	6.1	21.2	66	19	29		614000	56.5	26.4	13.7	EF
PM 2 y-HU treatment	6.8	23.4	66	19	29		950000	53.3	45.3	1.4	
SK baseline	6.2	22.2	71	20	28	33	406000	70.4	19.2	7.8	EFA
SK 2 y-HU treatment	4.5	18.5	82	20	24	29.5	464000	56.3	36.2	7.5	
SO baseline	5.3	19.75	13	27	27		361000	76.2	18.4	2.5	EF
SO 2 y-HU treatment	6.1	21.9	53	15	28		440000	77.3	20.1	2.6	
SP baseline	6.8	22	44	13	31		286000	88.3	5.6	3.1	EF
SP 2 y-HU treatment	7.3	25.8	49	14	28	20.5	350000	90.6	6.3	3.1	
SR baseline	6.3	22.3	54	15	28	23	478000	89	4.2	2.7	EF
SR 2 y-HU treatment	5.2	19.9	64	17	26	25	570000	88.6	9.3	3.1	
ST baseline	8.1	28.9	65	18	28		252000	47.3	465	1.3	EF
ST 2 y-HU treatment	8.9	27.6	65.7	21.1	32.2	22.8	226000	53	61.9	1.3	
WO baseline	6.2	22	60	16	27		948000	74.3	24.7	1.8	EF
WO 2 y-HU treatment	5.9	22	69	19	27		974000	57.3	40.9	1.8	
WT baseline	5.5	21.1	54	14	26	30	397000	66.3	29.2	1.6	EF
WT 2 y-HU treatment	5.4	19.3	58.1	16.3	28	26.7	374000	58.8	39.2	2	

10. ศึกษาและเปรียบเทียบผลการทดลอง in vivo และ in vitro ในผู้ป่วย β -thal/HbE โดยใน in vivo ผู้ป่วย β -thal/HbE ได้รับ hydroxyurea เป็นเวลา 2 ปี และ เจาะเลือดมาตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังแสดงในผลการทดลอง (in vivo) หลังจากหยุดยา hydroxyurea แล้ว 7 เดือน- 1 ปี จึงเจาะเลือด ผู้ป่วย β -thal/HbE รายเดิมมาศึกษาโดย erythroid cell culture technique และตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังแสดงในผลการทดลอง (in vitro) และเปรียบเทียบผลการทดลองใน in vivo และ in vitro

ผลการเปรียบเทียบ in vivo และ in vitro ในผู้ป่วย β -thal/HbE พบว่า ค่าความสัมพันธ์ ระหว่าง fractional HbF ใน in vivo และ in vitro ดังแสดงในรูป ที่ 28 มีค่า linear correlation coefficients, 0.50-19.08 และ in vivo = 0.29-11.73, $r^2 = 0.54$ (P value = 0.204), ในขณะที่ ค่า $G\gamma/A\gamma$ globin chain fold increase ใน in vivo และ in vitro study ดังแสดงในรูป ที่ 29 มีค่า = 0.80-1.43 และ in vivo = 0.98-1.23, $r^2 = 0.62$ (P value = 0.134) ส่วนค่า fold induction $G\gamma/A\gamma$ globin mRNA ใน in vivo และ in vitro ดังแสดงในรูป ที่ 30 มีค่า $G\gamma/A\gamma$ globin mRNA fold induction = 0.34-8.18 และ in vivo = 0.28-6.10, the linear correlation coefficient $r^2 = 0.52$ (P value = 0.164).

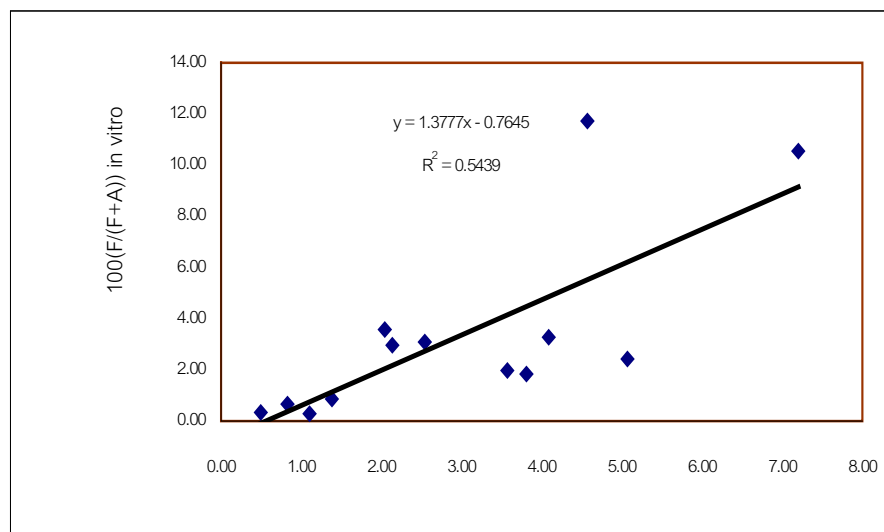


Figure 28 Comparison of fractional HbF in vivo after 2 year hydroxyurea treatment and fractional HbF in vitro of primary erythroid progenitor cell cultures from β -thal/HbE treated with 30 μ M HU for 96 hours as compared to untreated control.

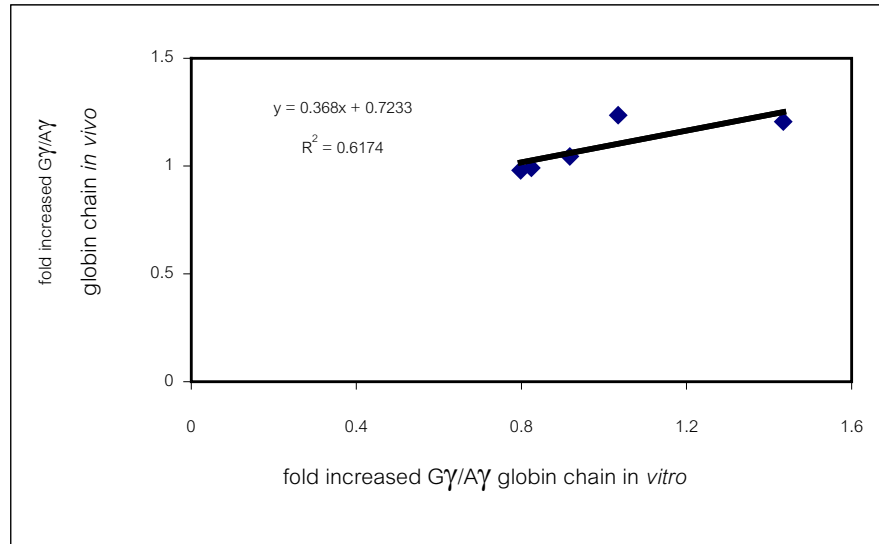


Figure 29 Comparison of fold induction of $G\gamma/A\gamma$ globin chain *in vivo* after 2 year hydroxyurea treatment and $G\gamma/A\gamma$ globin chain *in vitro* of primary erythroid progenitor cell cultures from β -thal /HbE treated with 30 μ M HU for 96 hours as compared to untreated control.

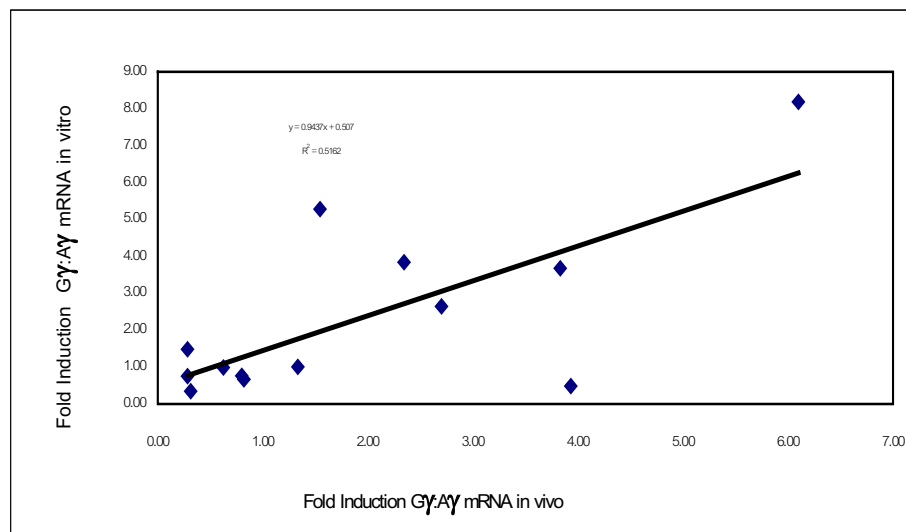


Figure 30 Comparison of fold induction of $G\gamma A\gamma$ globin mRNA in vivo after 2 year hydroxyurea treatment and $G\gamma A\gamma$ globin mRNA in vitro of primary erythroid progenitor cell cultures from β -thal /HbE treated with 30 μ M HU for 96 hours as compared to untreated control.

สรุปผลงานวิจัย

ในการเตรียม primary erythroid cells จาก peripheral blood stem cells โดยใช้เทคนิค cell culture ซึ่งประยุกต์มาจากวิธีของ Swada et al., 1990 (25-26) และ Choi et al., 2000 (27) พบว่าวันแรก (วันที่ 0) เซลล์ส่วนใหญ่จะเป็น early erythroid-committed progenitors (burst-forming units, BFU-E). ณ วันที่ 3 เซลล์จะ proliferate และ differentiate ไปเป็น late- BFU-E หลังจากนั้น เซลล์ จะ proliferate และ differentiate ไปเป็นเซลล์ที่แก่มากขึ้น (more mature colony-forming unit-like progenitors (CFU-E)) ใน วันที่ 6 หลังจากนั้น เซลล์จะ proliferate และ differentiate ไปเป็นเซลล์ที่แก่มากขึ้น (more mature orthochromatic normoblasts) หลังจาก วันที่ 6 ณ วันที่ 10 เป็น erythroblast และวันที่ 14 เป็น red blood cell ดังแสดงในรูปที่ 1-16 โดยใน 3 วันแรกของการ culture เซลล์จะอยู่ในระยะเซลล์ตัวอ่อนซึ่งต้องการ growth factors และ cytokines เช่น erythropoietin stem cell factor และ interleukin-3 แต่หลังจากนั้น interleukin-3 ซึ่งเป็น lineage specific cytokine ก็ไม่มีความจำเป็นต้องเติมลงไป ใน medium อีก จากนั้นทำการศึกษาหาขนาดของ hydroxyurea (0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 and 100 μ M) ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF ในคนปกติ พบว่า ขนาดที่เหมาะสม คือ 30 μ M ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ยังให้จำนวนเซลล์สูง (benzidine positive cells)

และ ยังสร้าง HbF สูงซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Smith et al., 2000 (29) ปริมาณของ total HbF ลดลงเล็กน้อยเมื่อความเข้มข้นของ hydroxyurea เพิ่มขึ้น ส่วนค่า HbF content per cell จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ hydroxyurea เพิ่มขึ้น ส่วนจำนวนเซลล์จะลดลงแบบ dose dependent manner นอกจากนั้นการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้ยา (hydroxyurea) พบว่าการ ให้ hydroxyurea เมื่อวันที่ 6 ของการเจริญ erythroid cell culture ซึ่งนำมาจาก Peripheral blood ของคนปกติแล้วทำการเก็บเซลล์มาวิเคราะห์หลังจากการเจริญ erythroid cell culture มาแล้ว 10 วัน เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ยังให้จำนวนเซลล์สูง (benzidine positive cells) และ ยังสร้าง HbF สูง จากนั้นทำการศึกษาค้นหาขนาดของ hydroxyurea (0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 and 100 μ M) ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF ในผู้ป่วย β -thal/HbE พบว่า ขนาดของ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF คือ 30 μ M ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ยังให้จำนวนเซลล์สูง (benzidine positive cells) และ ยังสร้าง HbF สูง ส่วนค่า HbF content per cell จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ hydroxyurea เพิ่มขึ้น ส่วนจำนวนเซลล์จะลดลงแบบ dose dependent manner นอกจากนั้นการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้ยา (hydroxyurea) ในผู้ป่วย β -thalassemia/hemoglobin E พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้ยา (hydroxyurea) คือ ให้ hydroxyurea เมื่อวันที่ 6 ของการเจริญ Erythroid cell culture ซึ่งนำมาจาก Peripheral blood ของผู้ป่วย β -thal/HbE แล้วทำการเก็บเซลล์มาวิเคราะห์หลังจากการเจริญ erythroid cell culture มาแล้ว 10 วัน เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ยังให้จำนวนเซลล์สูง (benzidine positive cells) และ ยังสร้าง HbF สูง ซึ่งการศึกษา optimized conditions ในผู้ป่วย β -thal/HbE ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จาก optimized conditions ที่ได้นำมาศึกษาการตอบสนองของผู้ป่วยต่อ hydroxyurea โดยศึกษาผลของ hydroxyurea ต่อการสร้าง HbF ซึ่งนำมาจาก Peripheral blood ของผู้ป่วย β -thal/HbE จำนวน 22 ราย โดยการใช้ hydroxyurea ที่ความเข้มข้น เท่ากับ 30 μ M เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (Treated at Day 6 : Collected at Day 10) เพื่อศึกษาหาว่าผู้ป่วยรายใดเป็น responder หรือ non-responder พบว่า ผู้ป่วยทั้ง 22 ราย มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่แตกต่างกัน (รูปที่ 25) มีผู้ป่วย 20 รายที่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea และ 2 รายอาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea เนื่องมาจากมี fractional HbF content และ fold induction γ/α globin mRNA น้อยกว่า 1 นอกจากนั้นจากการหาปริมาณ γ -globin mRNA (γ^G/γ^A mRNA) ใน Erythroid cell culture จากผู้ป่วยแต่ละรายที่ได้รับ hydroxyurea จำนวนทั้งสิ้น 22 รายโดย real time PCR detection technique พบว่า ในผู้ป่วยที่ได้รับ hydroxyurea ความเข้มข้น 30 μ M เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ให้ hydroxyurea ในวันที่ 6 ของการเจริญของเซลล์ แล้วเก็บเซลล์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในวันที่ 10 ของการเจริญ) มีปริมาณ γ^G/γ^A globin mRNA สูงกว่าปริมาณ γ^G/γ^A globin mRNA ที่พบในกรณีที่ไม่ได้รับการให้ hydroxyurea โดยสูงสุดถึงประมาณ 8 เท่า (รูปที่ 26) โดยมีผลต่อการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ γ^G -และ/หรือ γ^A -globin mRNA (รูปที่ 26) ใน Erythroid cell culture ของผู้ป่วยแต่ละรายแสดงว่าการกระตุ้นการสร้าง HbF มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ γ^G -และ/หรือ γ^A -globin message ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน

ของ Kollia et al., 1998 (30) ดังนั้นการหาปริมาณ γ -globin mRNA ในคนปกติเทียบกับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จะนำมาซึ่งความเข้าใจในการควบคุมการแสดงออกของ γ -globin gene นอกจากนั้นยังทำให้นักวิทยาศาสตร์และแพทย์ได้เข้าใจถึงขบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ควบคุม HbF ได้อย่างถูกต้อง อันจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีการป้องกันและรักษาโรคธาลัสซีเมียต่อไปในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

หลังจากการศึกษาใน in vitro แล้วได้นำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับการศึกษาใน in vivo ของผู้ป่วย β -thal/HbE โดย in vivo study ผู้ป่วย β -thal/HbE ได้รับ hydroxyurea เป็นเวลา 2 ปี ณ. โรงพยาบาลรามารชิ บดีโดย รศ.นพ. สุพร จันทร์จารุณี และ เจาะเลือดมาตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังแสดงในผลการทดลอง (in vivo study) หลังจากผู้ป่วย β -thal/HbE หยุดการรับยา hydroxyurea แล้ว 7 เดือน- 1 ปี จึงเจาะเลือด ผู้ป่วย รายเดิมมาศึกษาโดย primary erythroid cell culture technique และตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังแสดงในผลการทดลอง (in vitro study) และเปรียบเทียบผลการทดลอง in vivo และ in vitro ผลการเปรียบเทียบ in vivo และ in vitro study ในผู้ป่วย β -thal/HbE พบว่า ค่าความสัมพันธ์ระหว่าง fractional HbF ใน in vivo และ in vitro study ดังแสดงในรูปที่ 28 มีค่า Linear correlation coefficients, $r^2 = 0.54$ ในขณะที่ค่า fold increase in γ/α globin chain ใน in vivo และ in vitro study ดังแสดงในรูปที่ 29 มีค่า $r^2 = 0.62$ ส่วนค่า fold induction γ/α globin mRNA ใน in vivo และ in vitro study ดังแสดงในรูปที่ 30 มีค่า $r^2 = 0.52$ จากความสัมพันธ์ที่ได้ค่า correlation ระหว่าง in vitro และ in vivo study อยู่ในช่วงที่ค่อนข้างดี เพราะเหตุว่าเป็นการเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างผู้ป่วย β -thal/HbE ที่ได้รับ hydroxyurea เป็นเวลา 2 ปีกับ primary erythroid cell culture ที่ได้จากเลือดผู้ป่วย β -thal/HbE ที่ได้รับการ treat ด้วย $30 \mu\text{M}$ hydroxyurea เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ถึงแม้ว่าจะเป็นผู้ป่วยรายเดียวกันแต่ ณ. เวลาต่างกัน physiological conditions อาจมีความแตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างในการตอบสนองของ erythroid precursor cell ในผู้ป่วยแต่ละรายมีความแตกต่างกันดังกล่าวจะมากหรือน้อยขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ อีกหลายอย่าง เช่น ความสามารถในการสร้าง HbF ของผู้ป่วยที่มีอยู่ก่อนให้ hydroxyurea หรือปัจจัยพื้นฐานของ β -globin mutation และ/หรือชนิดของ Chromosome อาทิ XmnI site polymorphism บริเวณ promoter ของ γ -globin gene (31, 32) สิ่งแวดล้อม ความเครียด อาหารก็อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง physiological conditions ของร่างกายผู้ป่วย เป็นที่น่าสังเกตว่าจาก hematological data เช่น ค่าของ hemoglobin พบว่าผู้ป่วย β -thal/HbE ที่เข้ารับการรักษาดด้วย hydroxyurea (in vivo study) และผู้ป่วย β -thalassemia/HbE ในการศึกษาครั้งนี้จะเป็น β -thal/HbE ชนิดที่มีความรุนแรงระดับปานกลาง (thalassemia intermedia) สรุปได้ว่า จากการทดลองดังกล่าวโดยใช้ primary erythroid cell culture system ผู้ป่วย β -thal/HbE ชนิดที่มีความรุนแรงระดับปานกลาง β -thal/HbE 13 รายที่ศึกษามี 11 รายที่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea และ 2 รายที่อาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea เนื่องมาจากมีค่า fractional HbF และ fold induction γ/α globin mRNA ใน in vivo และ in vitro study มีค่าต่ำกว่า 1 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fibach et al, 1993 (10) ซึ่งพบว่า ผู้ป่วย β -thal/HbE bE ชนิดที่มีความ

รุนแรงระดับปานกลาง (thalassemia intermedia) มีระดับ HbF เพิ่มขึ้นหลังการให้ hydroxyurea ใน in vivo study ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเพิ่มการแบ่งตัวของ HbF containing erythroid และรายงานของ Fucharoen et al., 1996 (21) และ Hiajjar and Pearson, 1994 (33) พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของระดับ HbF อย่างมีนัยสำคัญ และมี clinical status ดีขึ้นด้วย อาจเนื่องมาจากการลดลงของ ineffective erythropoiesis และ severe hemolysis อันเป็นผลเนื่องมาจาก HbE แต่อย่างไรก็ตาม Zeng et al., 1995 (34) ศึกษาการตอบสนองต่อ hydroxyurea ในผู้ป่วย β -thal/HbE ชนิดที่มีความรุนแรงระดับปานกลาง (thalassemia intermedia) พบว่ามีระดับ β/α globin chain synthesis เพิ่มขึ้นในขณะที่ ไม่มีการเพิ่มของ HbF หลังการให้ hydroxyurea เลย ซึ่งยังไม่สามารถหาคำอธิบายได้

ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า hydroxyurea มีผลต่อผู้ป่วย β -thal/HbE ในแง่ของการเหนี่ยวนำให้เกิดการแทนที่ของ poorly hemoglobinized and short-lived erythroid cell population ด้วย precursors ตัวใหม่สำหรับการสร้าง HbF ขึ้น และมีผลต่อการแสดงออกของ γ^G -และ/หรือ γ^A -globin message ดังนั้นในการทำวิจัยโครงการนี้โดยการทดลองใช้ primary erythroid cell culture system สามารถจะใช้ในการบ่งชี้ว่า ผู้ป่วย β -thal/HbE รายใดเป็น responder or non-responder ก่อนที่จะเข้ารับการรักษาโดยการให้ยา hydroxyure จากแพทย์ กล่าวคือการศึกษาผลของการกระตุ้นการสร้าง HbF โดย hydroxyurea จะช่วยให้แพทย์ที่รักษาผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียได้ทราบถึงผลการ screening เบื้องต้นว่าผู้ป่วยรายใดที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นการสร้าง HbF ด้วย hydroxyurea ซึ่งถ้าหากพบว่าใน stem หรือ erythroid cell culture ของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีการตอบสนอง คือ มีการสร้าง HbF เพิ่มขึ้น ก็สามารถทำการรักษาผู้ป่วยธาลัสซีเมียนั้นได้โดยใช้ hydroxyurea แต่ถ้า erythroid cell culture ของ ผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ไม่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย hydroxyurea ดังกล่าว แพทย์ก็จะไม่รักษาผู้ป่วยด้วยวิธีนี้ เป็นการช่วยให้แพทย์ผู้รักษาได้ทราบนั้นผู้ป่วยธาลัสซีเมียคนไหนเป็น responder หรือ non-responder และสามารถวางแผนการรักษาที่ถูกรวบรวมไว้ได้ จึงเป็นการ screening ที่มีประสิทธิภาพและประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายต่าง ๆ นอกจากนั้นผู้ป่วยธาลัสซีเมียก็ได้รับประโยชน์เช่น ถ้าผลการตรวจสอบพบว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียนั้นเป็น responder ก็จะได้รับการรักษาที่ถูกต้องรวดเร็ว หายจากอาการซิดและมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นได้ ส่วนคนไข้ที่เป็น non-responder ก็จะได้รับการรักษาโดยวิธีอื่น ดังนั้นการทำวิจัยนี้จะมีผลดีต่อทั้งแพทย์ผู้รักษาและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ให้มีการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายอื่นๆ ดังนั้น วิธี culture โดยใช้ peripheral blood erythroid cells (in vitro) และ detection systems รวมทั้ง real-time quantitative PCR techniques เป็นการรวมเทคนิคที่มีประโยชน์ต่อการศึกษาหา responders ก่อนการเข้ารับการรักษาจากแพทย์ แล้วยังมีประโยชน์ในการศึกษาด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวกับ erythroid cell development หรือ modulation of Hb production โดย pharmacological agents รวมทั้งการตรวจกรองหายาหรือสารเคมี (screening for potential drug candidates) ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน (gene expression) รวมทั้งการศึกษา molecular mechanisms ของการใช้ยาหรือสารเคมี เหล่านั้น

นอกจากนี้งานที่ควรมีการศึกษาต่อไปคือ การศึกษาผลของยาหรือสารเคมีตัวอื่นๆ ที่สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง HbF สูงขึ้น เช่น butyrate derivatives หรือ สารที่มี functional groups ใกล้เคียงกับ butyrate หรือ hydroxyurea หรือสารอื่นๆ ที่มีกลไกการออกฤทธิ์และทำงานคล้ายกับ butyrate โดยใช้ primary erythroid cell culture system หรือ human leukemic cell line K562 และอาจพัฒนานำผลที่ได้ไปใช้ทดสอบใน transgenic thalassemic animal ต่อไปได้ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบหาหรือสารเคมีตัวใหม่อื่นๆ เพื่อกระตุ้นการสร้าง HbF ให้มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว (high throughput screening) หากสำเร็จก็จะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันและรักษาโรคธาลัสซีเมียได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น อีกทั้งเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายต่างๆ ของผู้ป่วยและแพทย์ผู้ทำการรักษา รวมทั้งอาจจะสามารถพัฒนาไปสู่การผลิตยาในระดับอุตสาหกรรมขึ้นใช้เองภายในประเทศได้

เอกสารอ้างอิง

1. Fucharoen, S. and Winichagoon, F. (1987). Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin 11: 65-88.
2. Wilairat, P and Watanapokasin, Y. (1998). Red cell membrane. Workshop in: thalassemia; from molecular biology to clinical medicine. 9-20 March. Mahidol University, Salaya, Nakorn Pathom, Thailand. 3-1 to 3-6.
3. Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. (1981). The thalassemia syndromes 3rd Ed, Blackwell, Oxford.
4. Thein, S.L. (1993). β -thalassemia. In: clinical hematology. The hemoglobinopathies. DR Higgs & DJ Weatherall (Ed)., Bailliere Tindall, London 6: 151-175.
5. Laig, M., Sangvansermisri, S., Wigangnon, J., Hundrieser, M., Pepe, M. and Flats, G. (1989). The spectrum of β -thalassemia mutations in northern and northeastern Thailand. Hum. Genet. 84: 47-50.
6. Winichagoon, P., Fucharoen, S., Thonglairoam, V., Tanapotiwirut, V. Wasi, P. (1990). β -thalassemia in Thailand. Ann. N.Y. Acad. Sci. 612: 31-42.
7. Fucharoen, G., Fucharoen, Sp., Jetsrisuparb, A. and Fukumaki, Y. (1990). Molecular basis of Hb E/ β -thalassemia and the origin of HbE in northeast Thailand: identification of one novel mutation using amplified DNA from buffy coat. Biochem. Biophys. Res. Commun. 170: 698-704.
8. Thein, S.L., Winichagoon, P., Hodketh, C., Best, S., Fucharoen, S., Wasi., P. and Weatherall, D. J. (1990). The molecular basis of β -thalassemia in Thailand amplification to prenatal diagnosis. Am. J. Hum. Genet. 47: 369-375.
9. Takeshita, K., forget, B.G., Scarpa, A. and Benz, E.J. (1984). Intracellular defect in β -globin mRNA accumulation due to a premature translation termination codon. Blood. 64: 13-22.
10. Fibach, E., Burke, L.P., Schechter, A.N., Noguchi, C.T. and Rodgers, G.P. (1993). Hydroxyurea increases fetal hemoglobin in cultured erythroid cells derived from normal individuals and patients with sickle cell anemia or β -Thalassemia. Blood 81: 1630-1635.
11. Steinberg, M.H., Lu, Z., Barton, F.B. Terrin, M.L., Charache, S., Dover, G.J. and the multicenter study of hydroxyurea. (1997). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. Blood. 89: 1078-1088.

12. Perrine, S. P. Ginder, G.D., Faller, D. V., Dover, G.H., Ikuta, T., Witkowska, H.E., Cai, S., Vichinsky, E.P. and Olivieri, N. F. (1993). A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in the β -globin disorders. *N. Engl. J. Med.* 328: 81-86.
13. Charache, S., Terrin, M.L., Moore, R.D., Dover, G.T., Barton, F.B., Eckert, S.V., Mcmahon, R.P., Bonds, D.R. and the investigators of the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell anemia. (1995). Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.* 33: 1317-1322.
14. Kaufman, R.E. (1992). Hydroxyurea : Specific therapy for sickle cell anemia. *J. Am. Soc. Hematol.* 79: 25033-25036.
15. Desimone, J., Heller, P., Hall, L., Zwiers, D. (1982). 5-Azacytidine stimulates fetal hemoglobin synthesis in anemic baboons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4428-4431.
16. Clouston, D.R. and Jane, M.S. (1998). Thalassemia: Sea of blood. *Today life science.* 10: 12-19.
17. Rodgers, G.P., Dover, G.J. Noguchi, C.T., Schechter, A.N., Nienhuis, A.W. (1990). Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. *N. Engl. J. Med.* 332: 1037.
18. Dover, G.J., Humphries, R.K., moore, J.G., Ley, T.J., Young N.S. Charache, S and nienhuis, A.W. (1986). Hydroxurea induction of hemoglobin F production in sickle cell disease relationship between cytotoxicity and F cell production *Blood* 67: 735-738.
19. Charache, S., Dover, G.J., moore, R.D., Eckert, S., Ballas, S.K., Koshy, M., Mliner, P.F.A., Qrringer, E.P., Phillips Jr, G., Platt, O.S. and Thomas, G.H. (1992), Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood* 97: 2555-2565.
20. Collins, A.F., Feason, H.A., Giardina, P., Mc. Donagh, K.T., Brusilow, S.W. and Dover , G.J. (1995). Oral sodium phenylbutyrate therapy in homozygous β -Thalassemia a clinical trial. *Blood* 85: 43-49.
21. Fucharoen, S., Siritanaratkul, N., Wincihagoon, P., Chowthawon, J., Siribon, W. Mucangsup, W., Chicharoen, S., Poolsub, N., Chindavijak, B., Pootrakul, P., Piankijagum, A., schechter, A. N. and Roders, G. P. (1996). Hydroxyurea increases hemoglobin F levels and improve the effectiveness of erythropoiesis in β -thalassemia of hemoglobin E disease. *Blood.* 87: 887-892.
22. Mc. Caffrey, P.G., Newsome, D.A., Fibach, E., Yoshida, M. and Su, M. S.-S. (1997). Induction of γ -globin by histone deacetylase inhibitors. *Blood.* 90: 2075-2083.

23. Constantoulakis, P., Knitter, G. and Stamatoyanopoulos, G. (1989). On The induction of fetal hemoglobin by butyrates: in vivo and in vitro studies with sodium butyrate and comparison of combination treatments with 5-AzaC and AraC. *Blood*, 74:1963-1971.
24. Fibach, E., Manor, D., Oppenheim, A. and Rehmsmeyer, E. A. (1989). Proliferation and maturation of human erythroid progenitors in liquid culture. *Blood* 73: 100-103.
25. Sawada K, Krantz SB, Kans JS, et al. (1987). Purification of human erythroid colony-forming units and demonstration of specific binding of erythropoietin. *J Clin Invest.* 80:357.
26. Sawada K, Krantz SB, Dai CH, et al. (1990). Purification of human burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution on erythropoietin receptors. *J cell Physiol.* 142:219.
27. Choi I, Muta K, Wickrema A, et al. (2000). Interferon gamma delays apoptosis of mature erythroid progenitor cells in the absence of erythropoietin. *Blood.* 95:3742-3749.
28. Watanapokasin, Y., Winichagoon, P., Fucharoen, S. and Wilairat, P. (2000). Relative quantitation of mRNA in β -Thalassemia/Hb E using real-time polymerase chain reaction. *Hemoglobin.* 24(2), 105-116.
29. Smith, R.D., Constance, J.L., Noguchi, T. and Schechter, N. (2002). Quantitative PCR analysis of HbF inducers in primary human adult erythroid cells. *Blood.* 95:863-869.
30. Kolia, p., Politou, M. and Loukopoulos, D. (1998). Hydroxyurea and hemin affect both the transcriptional and post-transcriptional mechanisms of some globin genes in human adult erythroid cells. *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 850, 5639-5698..
31. Fucharoen, S and Winichagoon, P. (2000). Clinical and hematologic aspects of hemoglobin E β -thalassemia. *Curr. Opin. Hematol.* 7:106-112.
32. Winichagoon, P., Thonglairoam, V, Fucharoen, S., Wilairat, P., Fukumaki, Y and Wasi, P. (1993). Severity differences in β -thalassemia/hemoglobin E syndromes: implication of genetic factor. *Br. J. Haematol.* 83:633-639.
33. Hajjar, F.M. and Pearson, H.A. (1994). Pharmacologic treatment of thalassemia intermedia with hydroxyurea. *J. Pediatrics.* 125:490-492.

34. Zeng, Y-T., Huang, S-Z., Ren, A-R., Lu, Z-H., Zeng , F-Y., Schechter, A. N. And Rodgers, G.P. (1995). Hydroxyurea therapy in β -thalassemia intermedia: improvement in hematological parameters due to enhanced β -globin synthesis. Brit. J. Haematol. 90:557-563.

ภาคผนวก

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการตามแผนงานโดยสรุป (พอสังเขป)

กิจกรรม (ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน	หมายเหตุ
1. เตรียม erythroid cell culture จาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thal/HbE และ ในคนปกติ	1. ศึกษาวิธีการ และเตรียม erythroid cell culture จาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thal/HbE และ ในคนปกติ	1. จากการศึกษาและทำ small scale purification ของ erythroid progenitor cells จาก peripheral blood cell ของผู้ป่วย β -thal/HbE และ ในคนปกติ โดยกระบวนการดังต่อไปนี้ (ก) mononuclear separation โดยใช้ Ficoll-Hypaque (ข) red blood cells lysis (ค) platelet depletion (ง) adherent cells depletion และ purification of BFU-E by magnetic cell sorting (negative selection) พบว่า สามารถแยก BFU-E และทำให้บริสุทธิ์ได้ Day 0; BFU-E Day 3; Late BFU-E Day 6; CFU-E Day 10; Erythroblast Day 13; Red blood cell	
2 ทดสอบการให้ hydroxyurea ใน erythroid cell culture ที่ได้จากข้อ 1 โดย - เตรียมสารละลาย	2. ทดสอบการให้ hydroxyurea ใน erythroid cell culture ที่ได้จากข้อ 1 - ทราบปริมาณหรือความ	2. Treat cell ด้วย hydroxyurea ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ 100 μ M) ในวันที่ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO ₂ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บ Cell มาวิเคราะห์หา	

hydroxyurea -เตรียม erythroid cell culture ประมาณ 2×10^5 cells/ml และ treat ด้วย hydroxyurea -หาปริมาณของ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF โดยไม่เป็นอันตรายต่อ erythroid cell culture -หาระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้ hydroxyurea ที่สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง HbF โดยไม่เป็นอันตรายต่อ erythroid cell culture	เข้มข้นของ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF -ทราบระยะเวลาในการให้ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF	ปริมาณฮีโมโกลบิน พบว่า hydroxyurea ที่ความเข้มข้น $30 \mu\text{M}$ กระตุ้นการสร้าง HbF ได้ดีในผู้ป่วย β-thal/HbE และ ในคนปกติ -Treat cell ด้วย $30 \mu\text{M}$ hydroxyurea ใน erythroid cell culture ที่ได้จากผู้ป่วย β-thal/HbE และ ในคนปกติบ่มที่อุณหภูมิ 37°C, $5\% \text{CO}_2$ โดย -Treat cell วันที่ 0 เก็บ Cell ณ.วันที่ 13 -Treat cell วันที่ 3 เก็บ Cell ณ.วันที่ 10 -Treat cell วันที่ 3 เก็บ Cell ณ.วันที่ 13 -Treat cell วันที่ 6 เก็บ Cell ณ.วันที่ 10 -Treat cell วันที่ 6 เก็บ Cell ณ.วันที่ 13 -Treat cell วันที่ 9 เก็บ Cell ณ.วันที่ 10 -Treat cell วันที่ 9 เก็บ Cell ณ.วันที่ 13 -บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, $5\% \text{CO}_2$ เก็บ Cell ณ.วันที่ มาวิเคราะห์หาปริมาณฮีโมโกลบิน (HbF, HbA) พบว่า treat cell วันที่ 6 เก็บ cell ณ.วันที่ 10 สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง HbF โดยไม่เป็นอันตรายต่อ erythroid cell culture 3. ทำการทดลองกับผู้ป่วย β-thal/HbE จำนวน 22 ราย โดยการใช้ hydroxyurea ที่ความเข้มข้น เท่ากับ $30 \mu\text{M}$ เพื่อศึกษาความเป็น responder ที่ช่วงของเวลาดังนี้ Treat at Day 6 : Collected at Day 10
--	--	--

3 . ทดสอบการให้ hydroxyurea แก่ primary erythroid cell culture จากเลือดของผู้ป่วย β-thal/HbE จำนวน 22 ราย และผู้ป่วย β-thal/HbE ที่ได้รับการรักษาด้วย hydroxyurea ที่โรงพยาบาลรามฯ 2 ปี และหยุดการรับ hydroxyurea เป็นเวลา 1 ปี จำนวน 13 ราย	3. ทำการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย β-thal/HbE เตรียม primary erythroid cell culture จำนวน 22 ราย และผู้ป่วย β-thal/HbE ที่ได้รับการรักษาด้วย hydroxyurea ที่โรงพยาบาลรามฯ 2 ปี และหยุดการรับ hydroxyurea เป็นเวลา 1 ปี จำนวน 13 ราย แล้ว treat เซลล์ด้วย hydroxyurea	
4. หาปริมาณ γ-globin mRNA ใน erythroid cell culture จากผู้ป่วยแต่ละรายที่ได้รับการให้ hydroxyurea โดย real-time PCR detection technique	4. หาราปริมาณ γ-globin mRNA ใน erythroid cell culture จากผู้ป่วยแต่ละรายที่ได้รับการให้ hydroxyurea โดย real-time PCR detection technique	4. ทำการหาปริมาณ γ-globin mRNA (γ^G/γ^A globin mRNA) ใน erythroid cell culture จากผู้ป่วยแต่ละรายที่ได้รับการให้ hydroxyurea โดย real-time PCR detection technique พบว่า ในผู้ป่วยที่ได้รับการให้ hydroxyurea ความเข้มข้น $30 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ให้ hydroxyurea ในวันที่ 6 ของการเจริญของเซลล์ แล้วเก็บเซลล์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในวันที่ 10 ของการเจริญ) มีปริมาณ γ^G/γ^A globin mRNA สูงกว่าปริมาณ γ^G/γ^A globin mRNA ที่พบในกรณีที่ไม่ได้มีการให้ hydroxyurea โดยสูงสุดถึง 6.4 เท่า และแบ่งเซลล์ที่ได้ไปหาปริมาณ HbF พบว่าทุกรายมีปริมาณ HbF เพิ่มขึ้น พบว่าค่า γ^G/γ^A globin chain ของผู้ที่ได้รับ hydroxyurea ความเข้มข้น $30 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ให้ hydroxyurea ในวันที่ 6 ของการเจริญของเซลล์ แล้วเก็บเซลล์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในวันที่ 10

หา γ^G/γ^A globin chain โดยวิธี triton X-100 acid urea polyacrylamide gel electrophoresis ตามวิธีของ Alter, B.P., <i>et al.</i>	ทราบปริมาณ γ^G/γ^A globin chain HbF, Hb A₂, และ HbA by automated high-performance liquid chromatography (VARIANT; BioRad, Hercules, CA, U.S.A.) ทราบปริมาณ γ^G/γ^A globin ratio ทราบปริมาณ γ^G/γ^A globin ratio โดยวิธี triton X-100 acid urea polyacrylamide gel electrophoresis	ของการเจริญ) จะมีค่าประมาณ 1.6:1.0 สรุปผู้ป่วยทั้ง 22 ราย มีประสิทธิภาพในการตอบสนองที่แตกต่างกัน (รูปที่ 25) พบว่า มีผู้ป่วย 20 รายที่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea และ 2 รายที่อาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea เนื่องจากมี fractional HbF content และ fold induction γ^G/γ^A globin mRNA มีค่าต่ำกว่า 1
5. วิเคราะห์ hematologic data, hemoglobin analysis and reticulocyte count, serum transferin receptor, % hemoglobin E และ hemoglobin F ของผู้ป่วยที่เป็น responder โดย conventional method	5. ทราบ hematologic data, hemoglobin analysis and reticulocyte count, serum transferin receptor, % hemoglobin E และ hemoglobin F ของผู้ป่วยที่เป็น responder โดย conventional method	5. ทราบ hematological data เช่น เปอร์เซนต์ hemoglobin E และ hemoglobin F โดย automated HPLC (Variant, Bio-Rad) ดังแสดงในผลการทดลอง 6. เปรียบเทียบผลการทดลอง in vivo และ in vitro ในผู้ป่วย β-thal/HbE โดย in vivo study ผู้ป่วย β-thal/HbE ได้รับ hydroxyurea เป็นเวลา 2 ปี และเจาะเลือดมาตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ (in vivo) หลังจากหยุดยา hydroxyurea แล้ว 7 เดือน- 1 ปี จึงเจาะเลือด ผู้ป่วย β-thal/HbE รายเดิมมาศึกษาโดย erythroid cell culture technique และตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังแสดงในผลการทดลอง (in vitro)

6. นำข้อมูลจากข้อ <i>in vitro</i> data มาหาความสัมพันธ์กับข้อมูลที่ได้จาก <i>in vivo</i> data	6. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างการทดลอง <i>in vivo</i> และ <i>in vitro</i>	study) และเปรียบเทียบผลการทดลอง <i>in vivo</i> และ <i>in vitro</i> ผลการเปรียบเทียบ <i>in vivo</i> และ <i>in vitro</i> study ในผู้ป่วย β-thal/HbE พบว่าค่าความสัมพันธ์ ระหว่าง fractional HbF ใน <i>in vivo</i> และ <i>in vitro</i> มีค่า Linear correlation coefficients, $r^2 = 0.54$ ในขณะที่ ค่า fold increase in $\gamma/\alpha\gamma$ globin chain ใน <i>in vivo</i> และ <i>in vitro</i> มีค่า $r^2 = 0.62$ ส่วนค่า fold induction $\gamma/\alpha\gamma$ globin mRNA ใน <i>in vivo</i> และ <i>in vitro</i> มีค่า $r^2 = 0.52$ จากการทดลองดังกล่าวโดยใช้ primary erythroid cell culture system ผู้ป่วย β-thal/HbE ชนิดที่มีความรุนแรงระดับปานกลาง (thalassemia intermedia) 13 รายที่ศึกษามี 11 รายที่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea และ 2 รายที่อาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea เนื่องจากมี fractional HbF content และ fold induction $\gamma/\alpha\gamma$ globin mRNA ใน <i>in vivo</i> และ <i>in vitro</i> มีค่าต่ำกว่า 1	
--	--	--	--

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆ ต่อ สกว. : -