



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

ตารางที่	สารบัญตาราง	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 วัฒนโกศาติน
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) และ เปรียบเทียบผลการทดลองจากการศึกษา 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 $r^2 = 0.52$ สรุปได้ว่าจากการทดลองดังกล่าวโดยใช้ 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 ในผู้ป่วยแต่ละรายดังกล่าวจะมากหรือน้อยขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายอย่าง 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 วัฒนโกศลสิน
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 ไม่ซีด ตับม้ามไม่โต ดังนั้นถ้าสามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง HbF โดยยาหรือสารเคมีก็จะเป็นวิธีการรักษาที่ค่อนข้างหนึ่ง 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 เจาะเลือดมาตรวจวิเคราะห์ค่าส่วนการศึกษาใน 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. จากการศึกษาและ 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

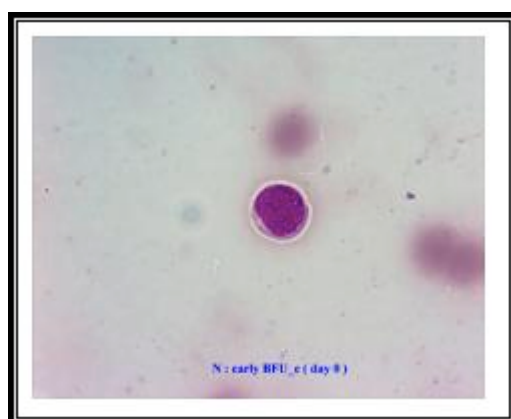


Figure 1 BFU-E at day 0

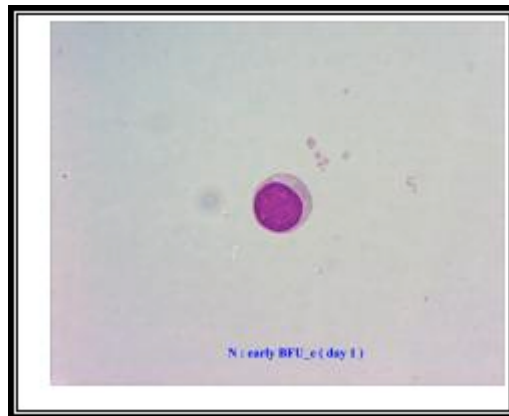


Figure 2 BFU-E at day 1

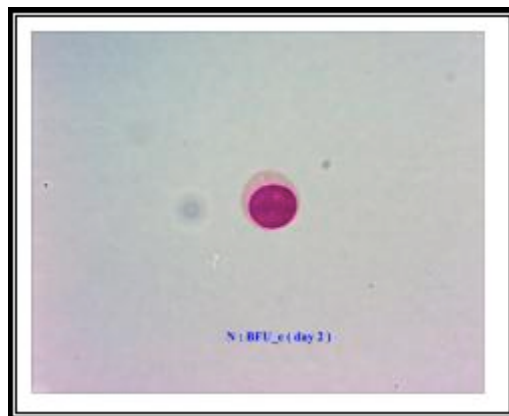


Figure 3 BFU-E at day 2

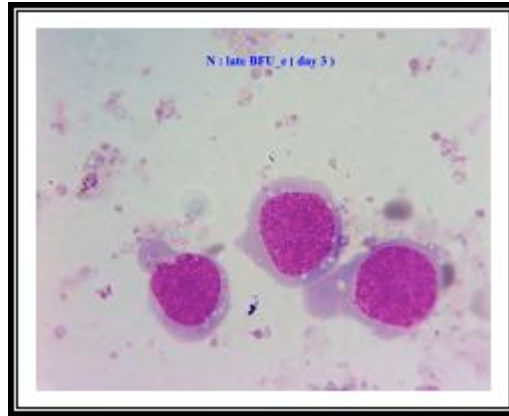


Figure 4 BFU-E at day 3

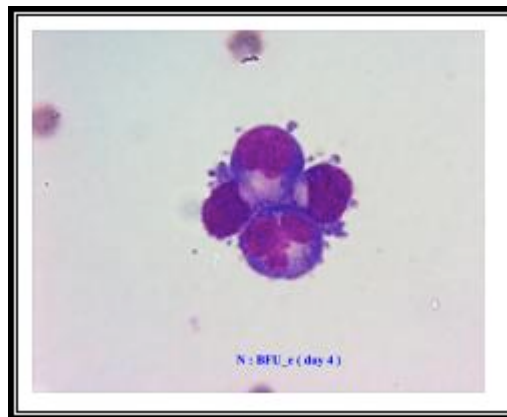


Figure 5 BFU-E at day 4

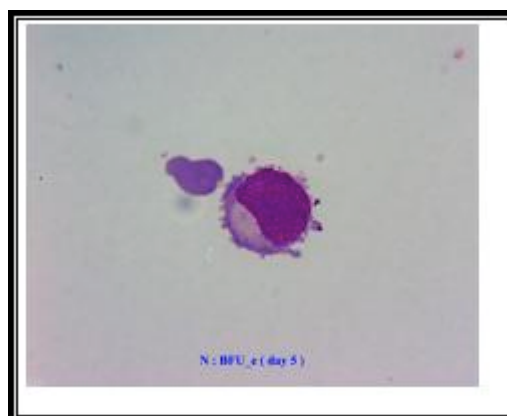


Figure 6 BFU-E at day 5

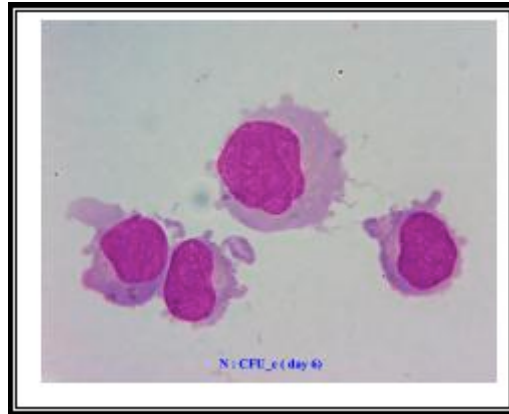


Figure 7 CFU-E at day 6

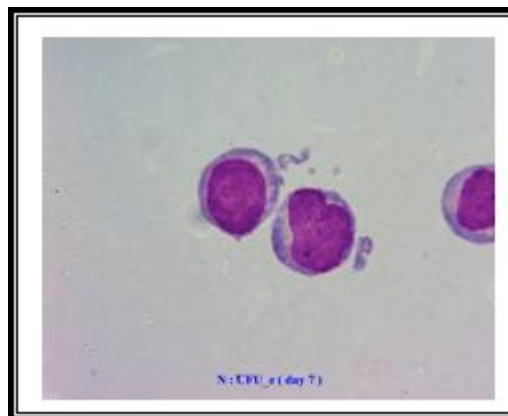


Figure 8 CFU-E at day 7



Figure 9 Pronormoblast at day 7