

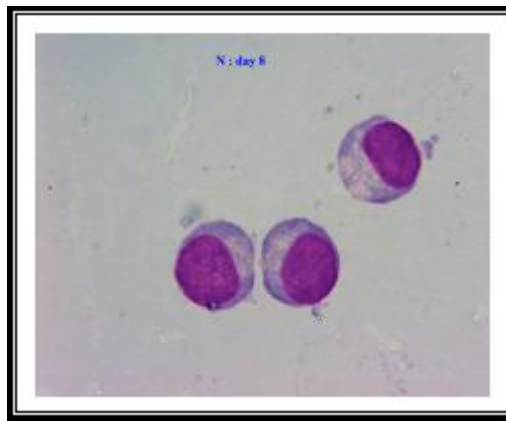


Figure 10 Pronormoblast at day 8

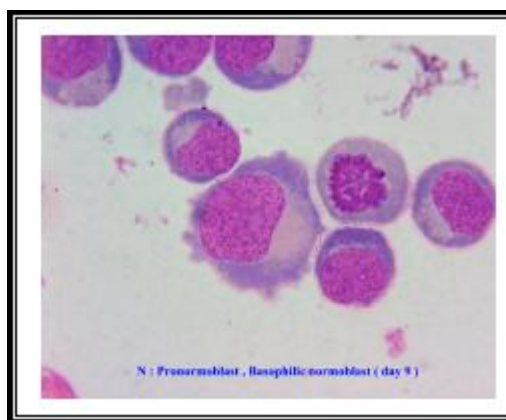


Figure 11 Pronormoblast and Basophilic normoblast at day 9

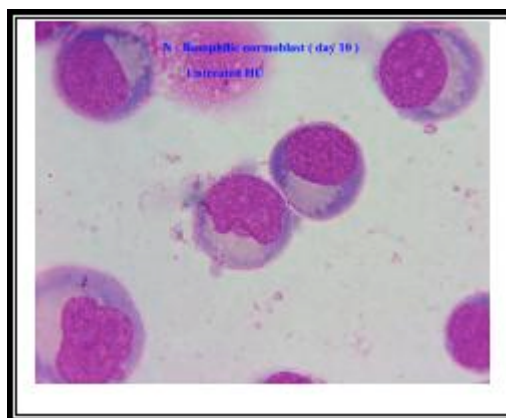


Figure 12 Basophilic normoblast at day 10

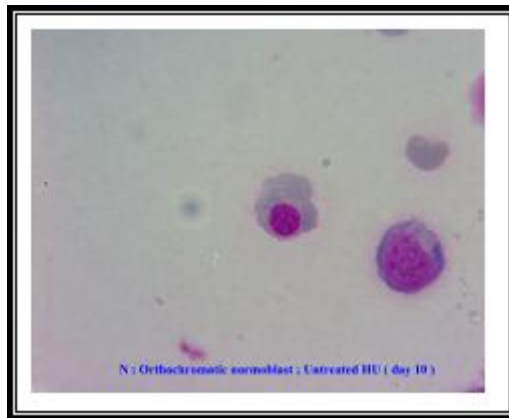


Figure 13 Orthochromatic normoblast at day 10

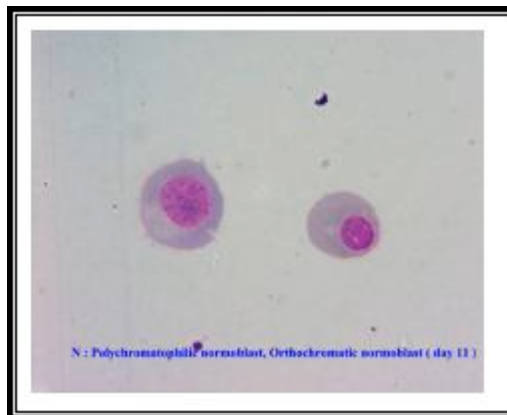


Figure 14 Polychromatophilic and Orthochromatic normoblast at day 11

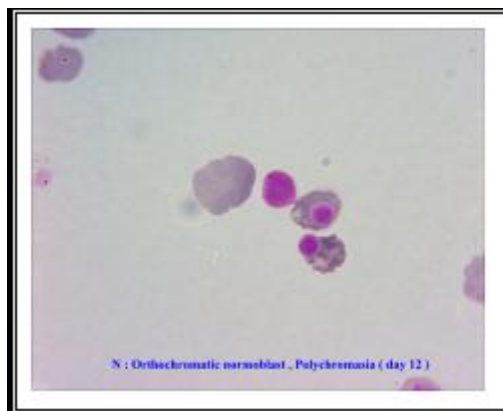


Figure 15 Orthochromatic normoblast and Polychromasia at day 12

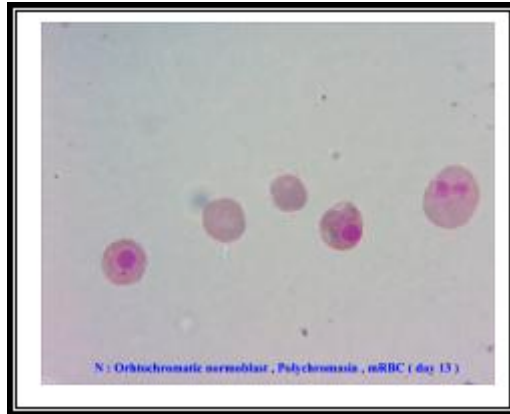


Figure 16 Orthochromatic normoblast, Polychromasia and mRBC at day 13

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 μ M) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บ Cell มาวิเคราะห์หาปริมาณฮีโมโกลบิน

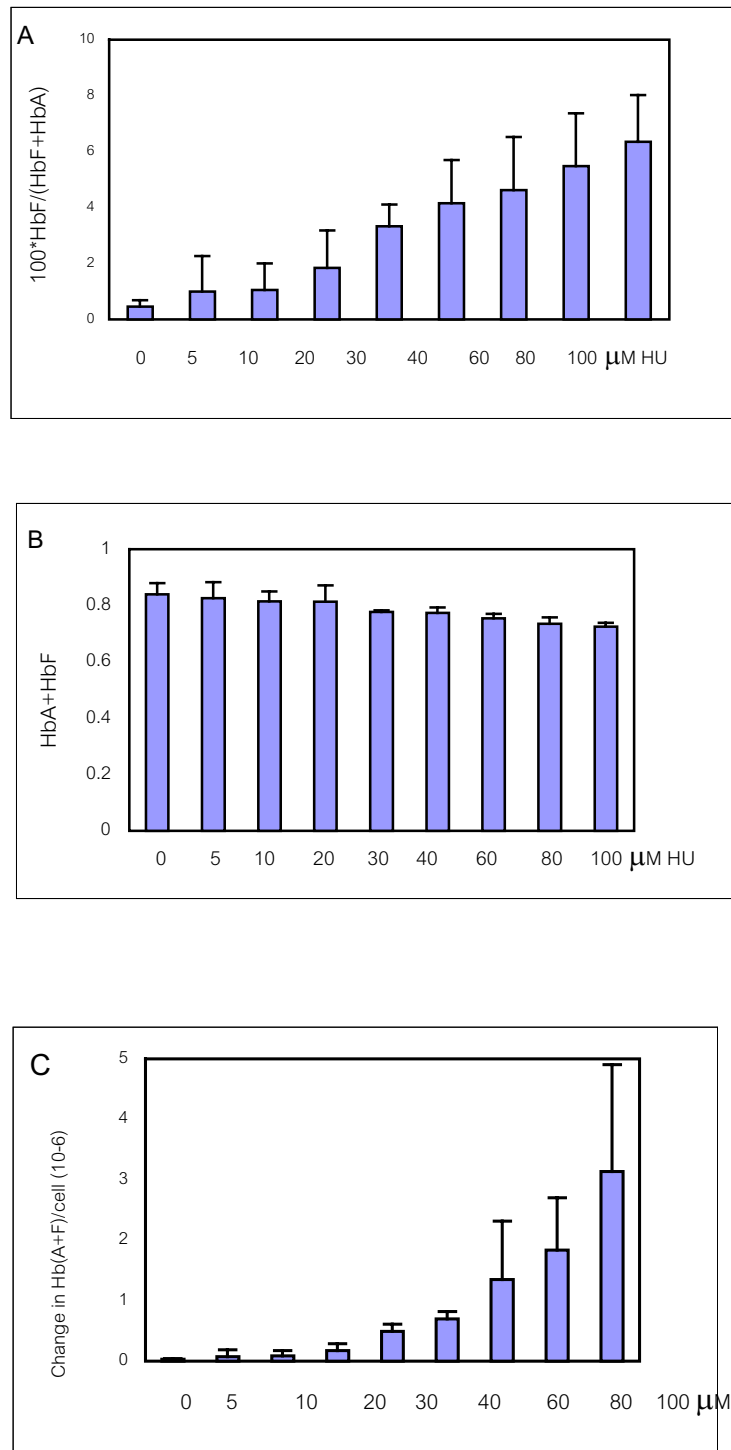


Figure 17 Effect of varying concentrations of hydroxyurea in normal adult erythroid cultures.

(A) Effect on fractional HbF content in erythroid cultures

(B) Effect on total Hb

(C) Effect on the amount of HbF per cell

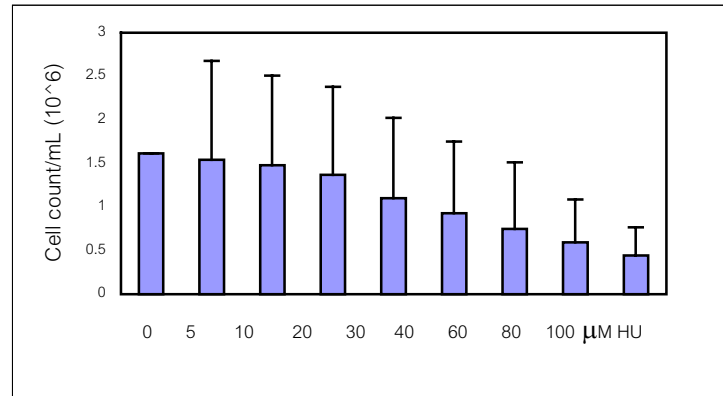


Figure 18 Effect of hydroxyurea on primary normal adult erythroid cell proliferation. Each bar represents the number of benzidine-positive cells present 96 hours after addition hydroxyurea.

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

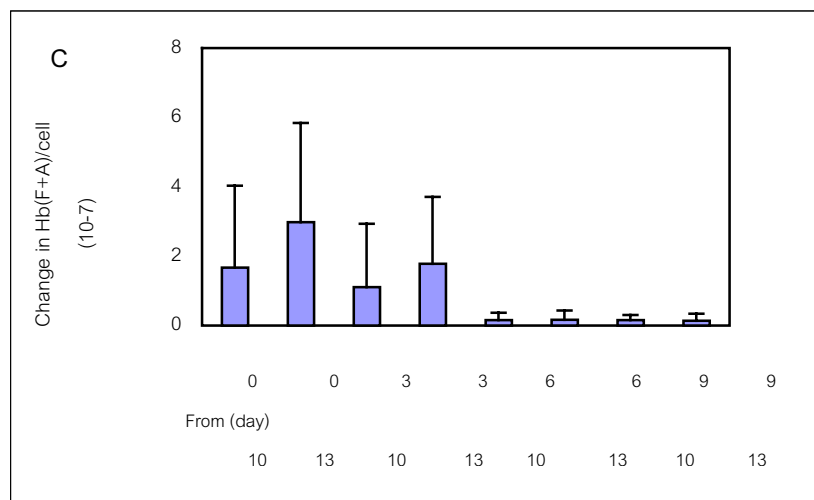
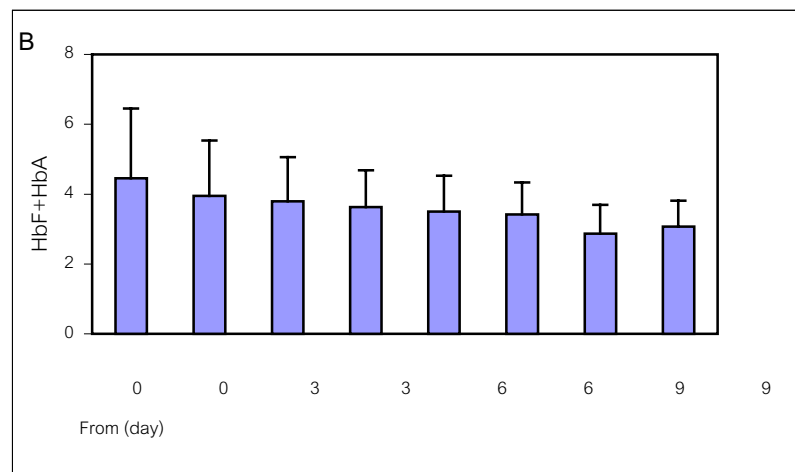
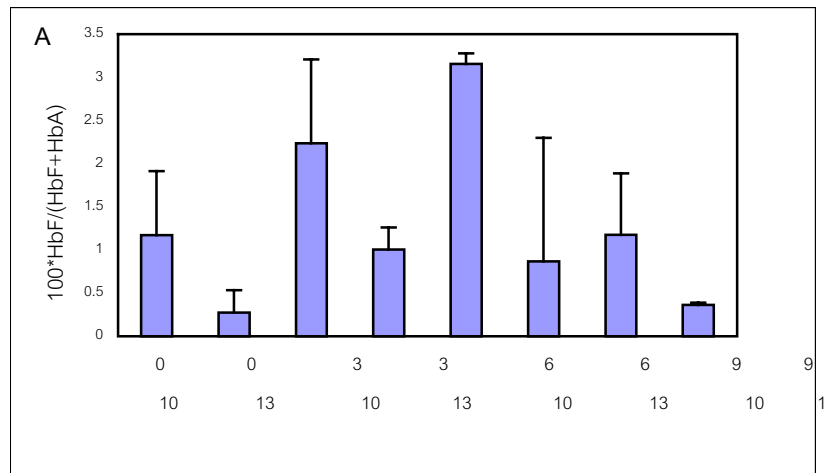


Figure 19 Effect of varying time of 30 μM hydroxyurea treatment in normal adult erythroid cultures.

(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

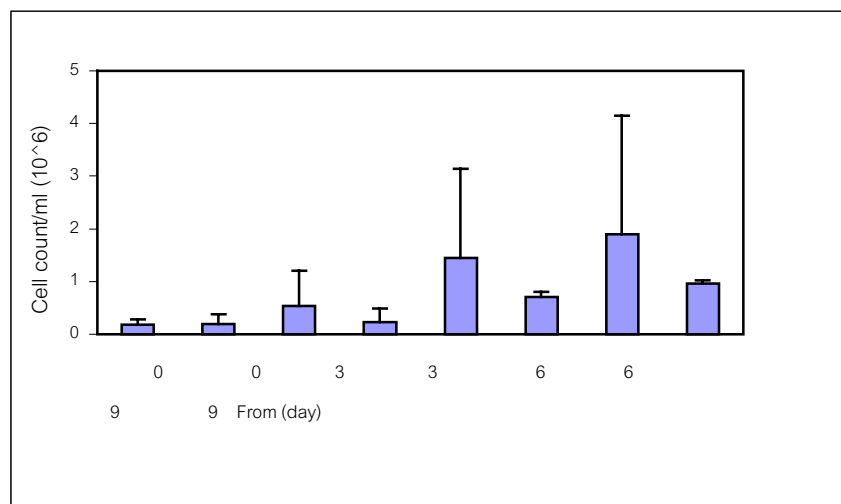
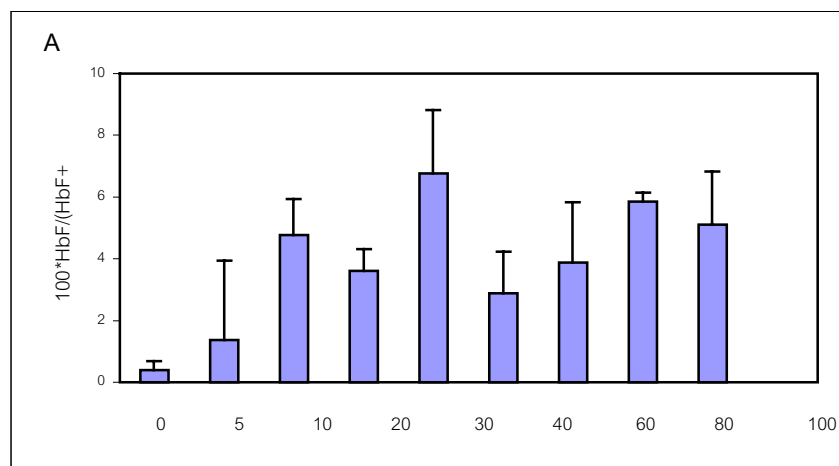


Figure 20 Effect of varying time of 30 μM hydroxyurea treatment in normal adult erythroid cultures on primary adult erythroid cell proliferation in beta-thalassemia patients.

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

4. ศึกษาหาขนาดของ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF และ ระยะเวลาในการให้สาร 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



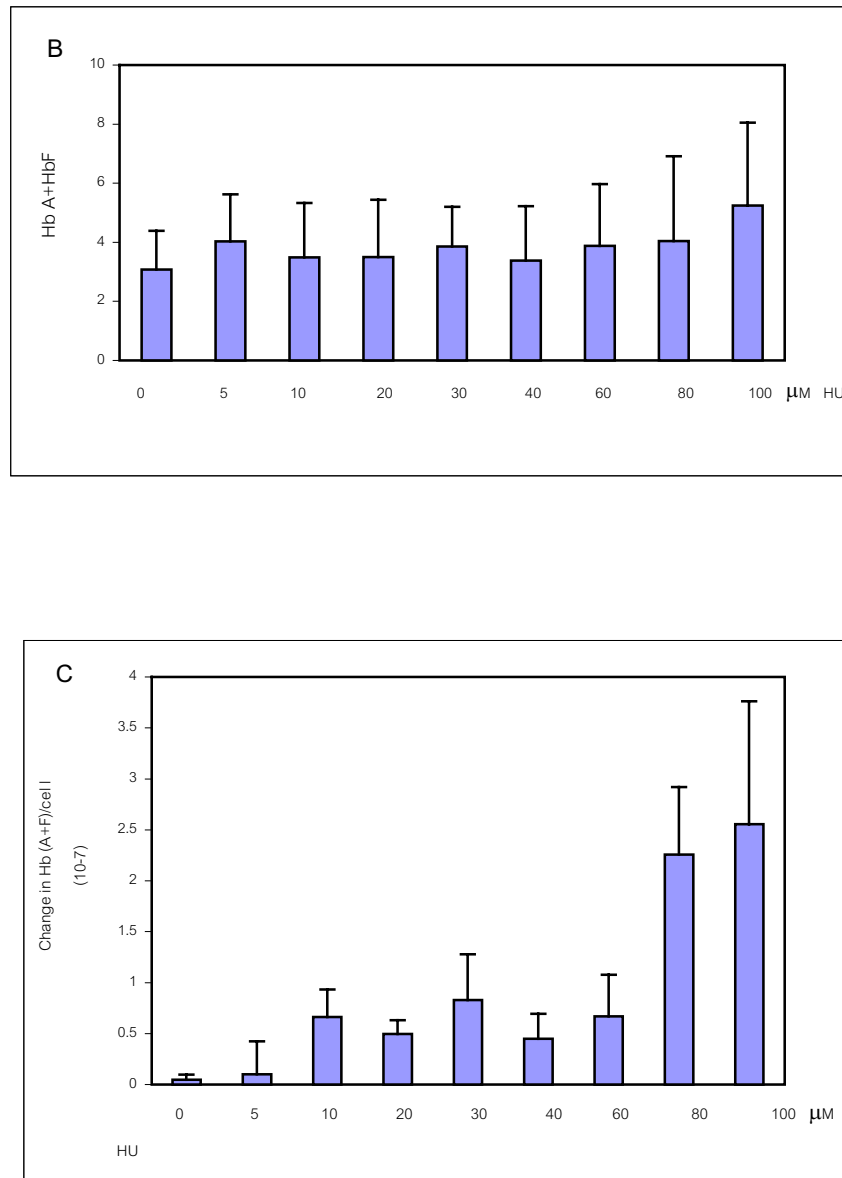


Figure 21 Effect of varying concentrations of hydroxyurea in β -thal/HbE erythroid cultures.

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

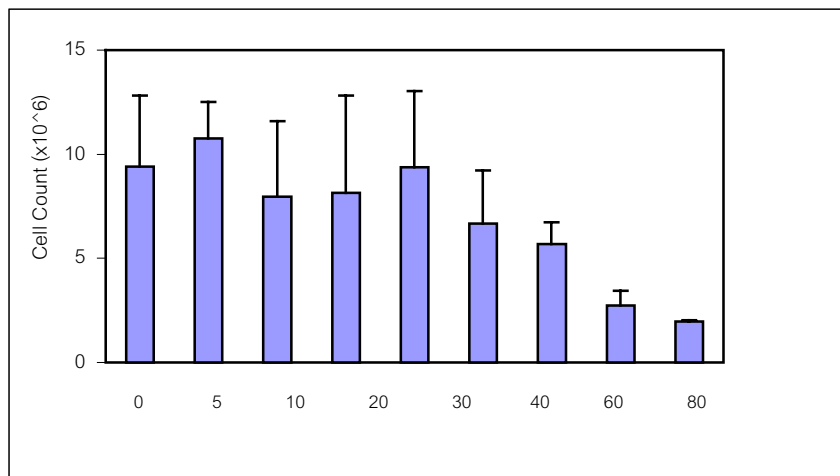
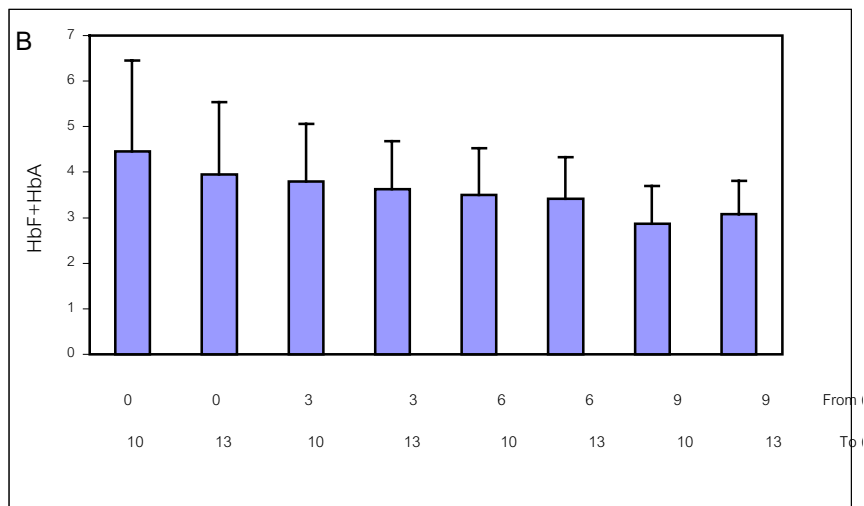
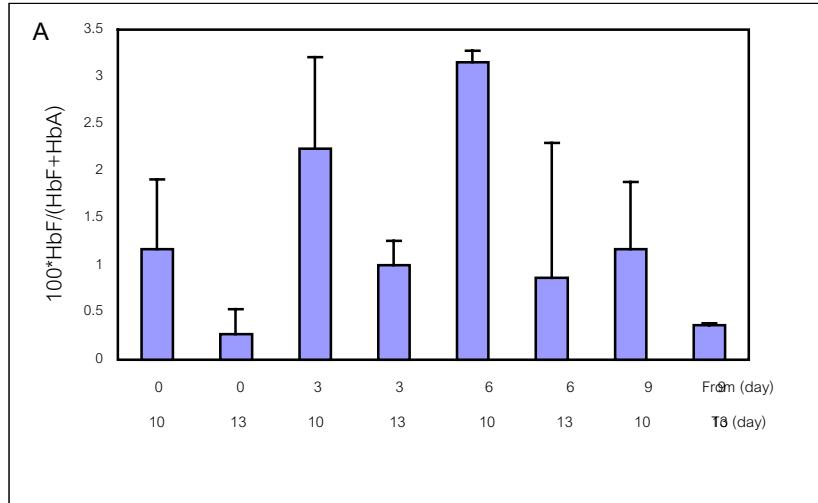


Figure 22 Effect of hydroxyurea on primary adult erythroid cell proliferation in β -thal/HbE patients. Each bar represents the number of benzidine-positive cells present 96 hours after addition of hydroxyurea.

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



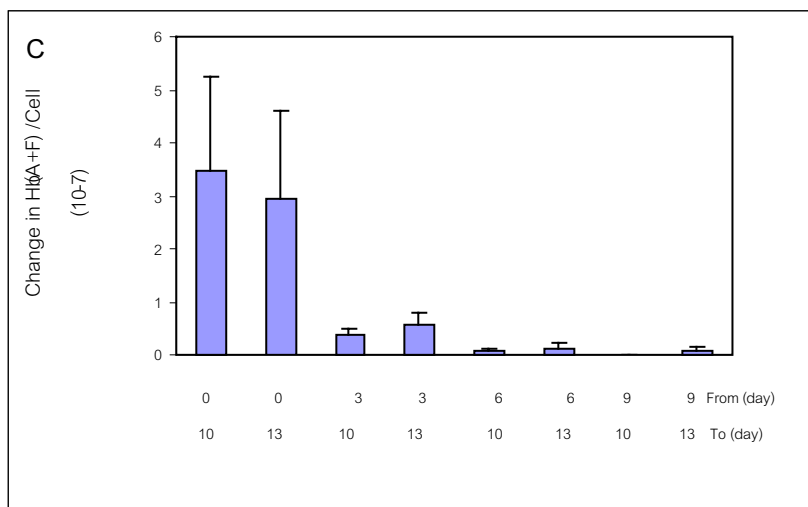


Figure 23 Effect of varying time of 30 μ M hydroxyurea treatment in β -thal/HbE erythroid cultures.

- (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

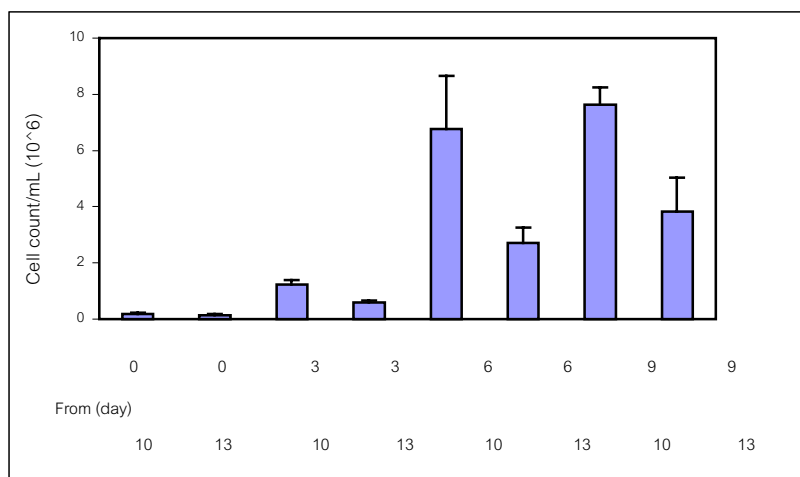


Figure 24 Effect of varying time of 30 μ M hydroxyurea treatment on primary adult erythroid cell proliferation in β -thal/HbE patients. Each bar represents the number of benzidine-positive cells present 96 hours after addition of hydroxyurea.

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 $30\text{ }\mu\text{M}$ เพื่อศึกษาความเป็น responder ที่ช่วงของเวลาดังนี้ treated at day 6 : collected at day 10

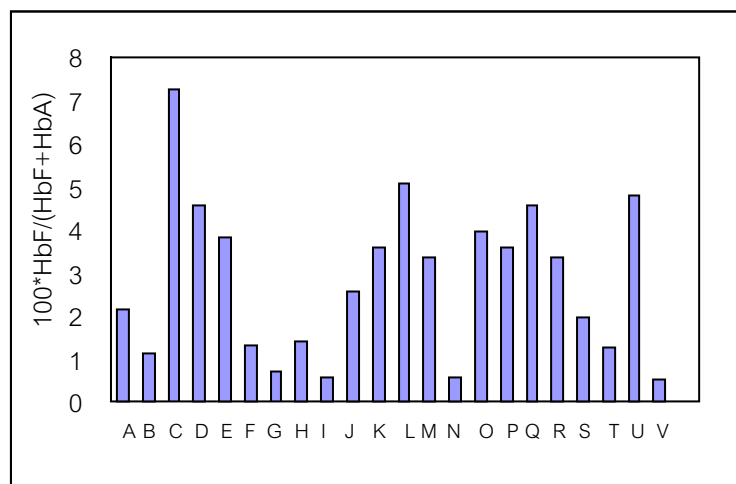
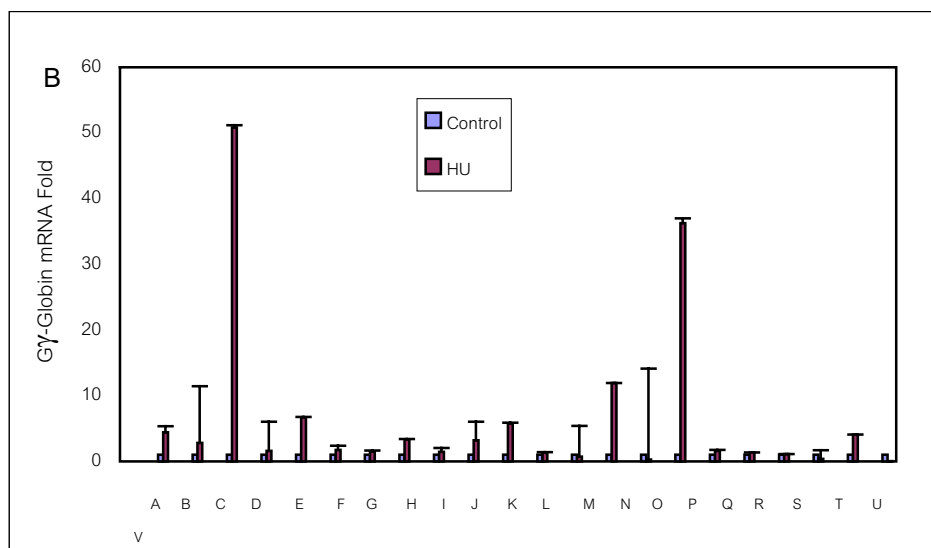
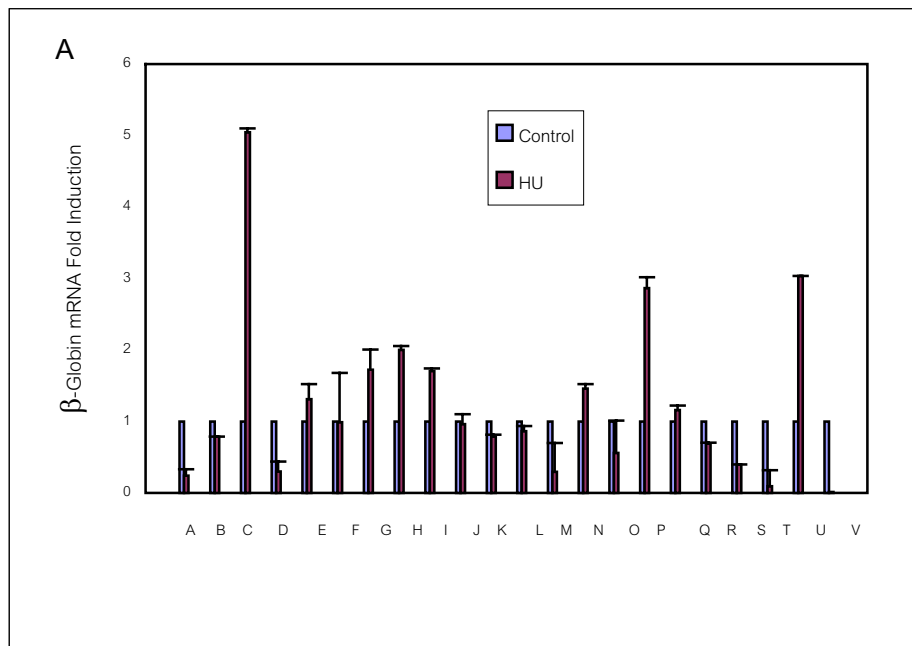
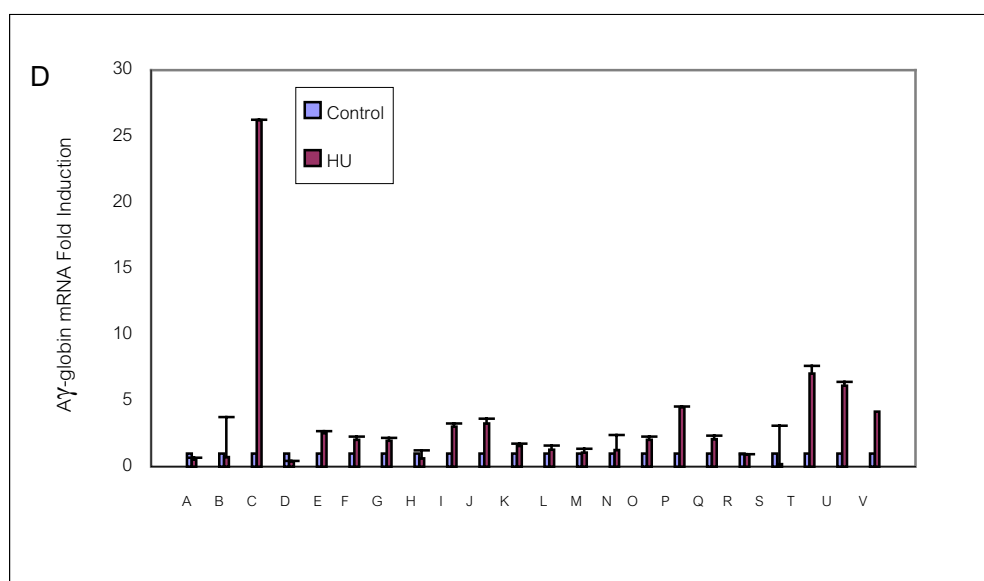
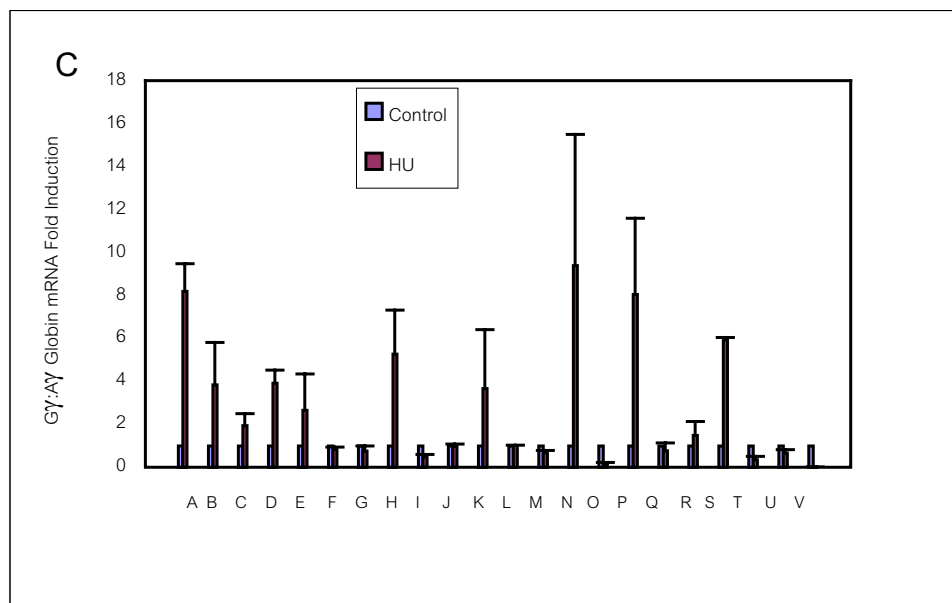


Figure 25 Hydroxyurea effects on fractional HbF content in $30\text{ }\mu\text{M}$ hydroxyurea treatment of primary erythroid cultures in β -thal/HbE patients.

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





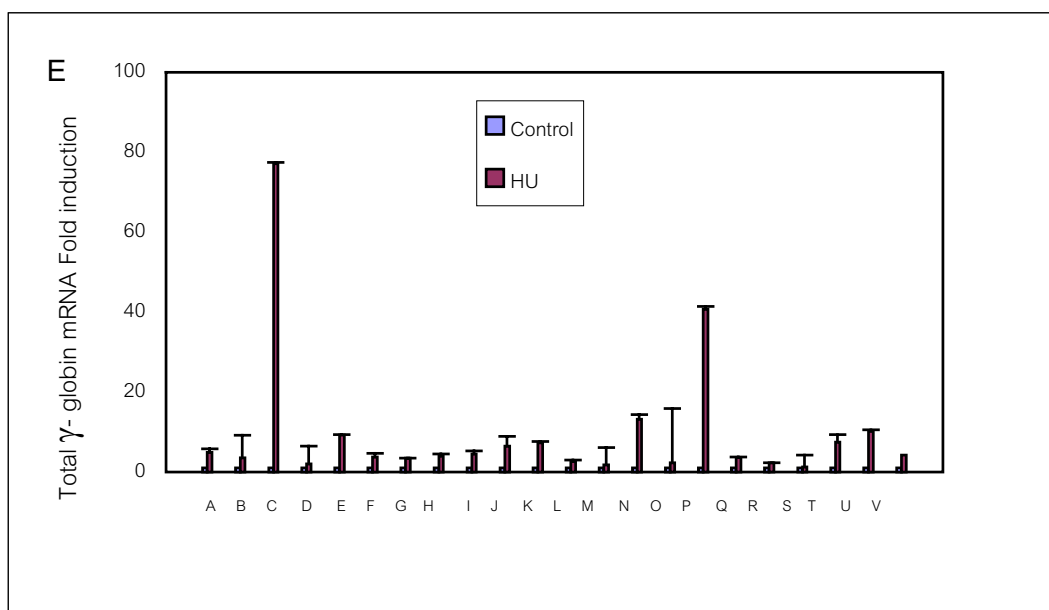


Figure 26 Hydroxyurea effects on globin mRNA levels in primary human adult erythroid cultures of β -thal/HbE. The level of transcription of the globin gene in the control was set to 1. The effect of hydroxyurea on

- (A) the level of β -globin message,
- (B) the levels of $^G\gamma$ -globin message
- (C) the levels of $^G\gamma/^\Delta\gamma$ globin message
- (D) the levels of $^\Delta\gamma$ -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 $^G\gamma/^\Delta\gamma$ globin mRNA สูงกว่าปริมาณ $^G\gamma/^\Delta\gamma$ 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

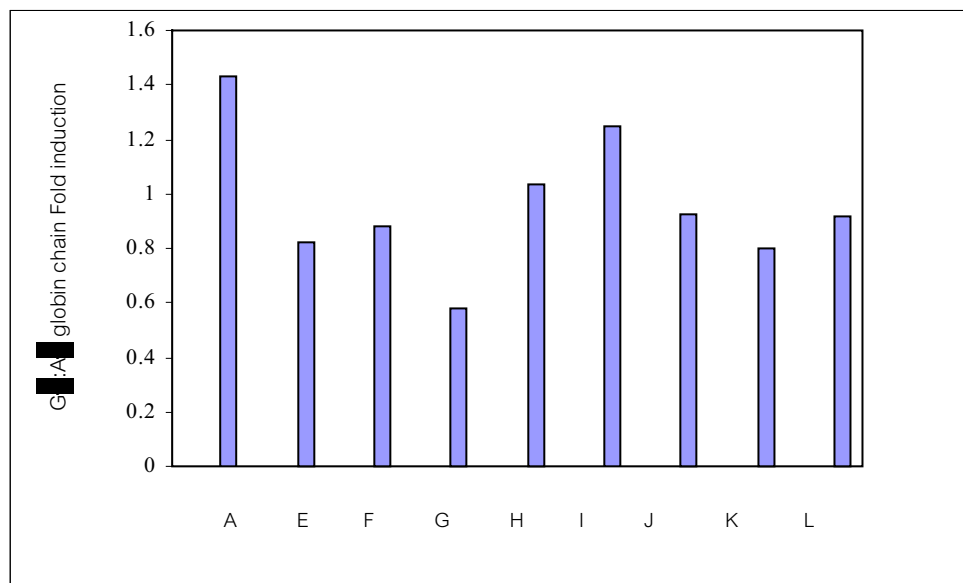


Figure 27 Fold induction in $G \gamma / A \gamma$ globin chain in primary erythroid cell culture from different β -thal/HbE patients treated with $30 \mu\text{M}$ hydroxyurea for 96 hours.

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).

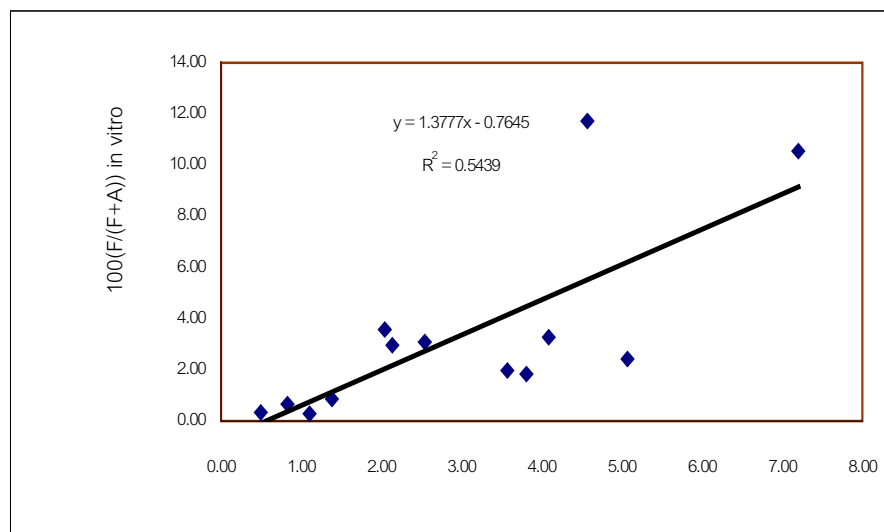


Figure 28 Comparison of fractional HbF in vivo after 2 year hydroxyurea treatment and fractional HbF in vitro of primary erythroid progenitor cell cultures from β -thal/HbE treated with 30 μ M HU for 96 hours as compared to untreated control.

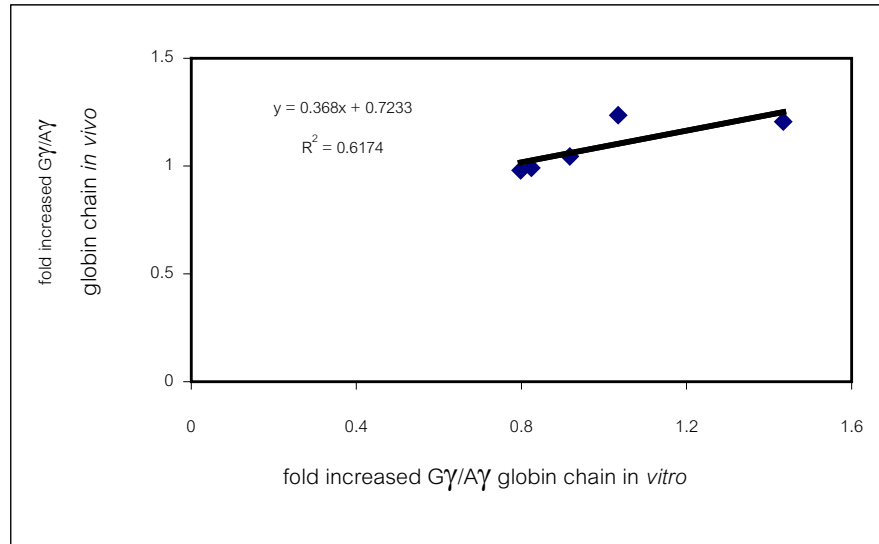


Figure 29 Comparison of fold induction of $G\gamma/A\gamma$ globin chain in vivo after 2 year hydroxyurea treatment and $G\gamma/A\gamma$ globin chain in vitro of primary erythroid progenitor cell cultures from β -thal /HbE treated with 30 μ M HU for 96 hours as compared to untreated control.

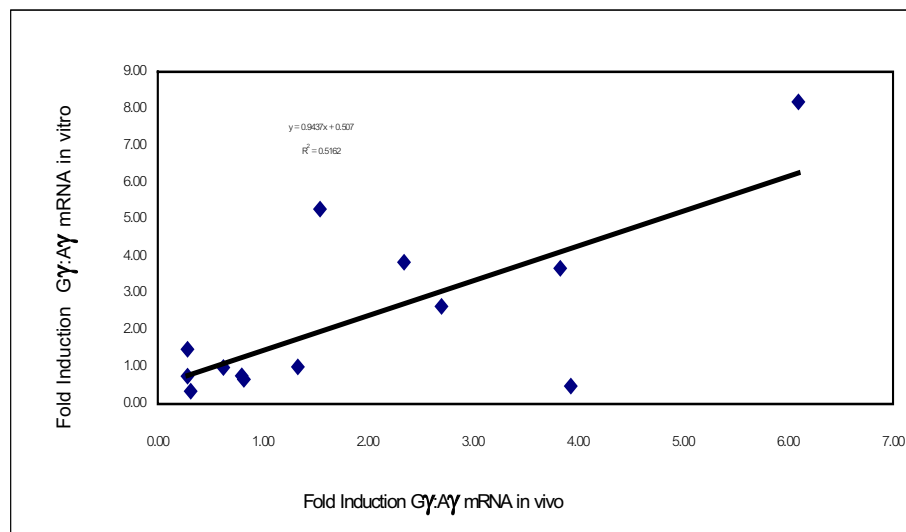


Figure 30 Comparison of fold induction of $G\gamma/A\gamma$ globin mRNA in vivo after 2 year hydroxyurea treatment and $G\gamma/A\gamma$ globin mRNA in vitro of primary erythroid progenitor cell cultures from β -thal /HbE treated with 30 μ M HU for 96 hours as compared to untreated control.

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 μM) ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF ในผู้ป่วย β -thal/HbE พบว่า ขนาดของ hydroxyurea ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง HbF คือ 30 μM 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 μM 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 μM 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 และสามารถวางแผนการรักษาที่ถูกริธีต่อไปได้ 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 ที่โรงพยาบาลรามมาศ 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 ที่โรงพยาบาลรามมาศ 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. : -