

ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว. (ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย)

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาเกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมียตั้งแต่ระดับโมเลกุลจนถึงระดับคลินิก
(ภาษาอังกฤษ) Thalassemia: from molecular biology to clinical medicine

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

หัวหน้าโครงการ:

ศ.นพ.สุทัศน์ ฟูเจริญ

โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

25/25 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา

อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

โทรศัพท์ (02) 8892557-8 โทรสาร (02) 8892559

e-mail: grsfc@mahidol.ac.th

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย (30%) : 18 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

คณะผู้ร่วมโครงการ:

1. ดร. ปราณี ฟูเจริญ

คุณวุฒิ : Ph.D.

ตำแหน่ง : นักเทคนิคการแพทย์ (เชี่ยวชาญพิเศษ) 10

สถานที่ทำงาน : โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย

สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

25/25 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา

อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

โทรศัพท์ (02) 8892557-8 โทรสาร (02) 8892559

e-mail: stsfc@mahidol.ac.th

หน้าที่ความรับผิดชอบในโครงการ: การศึกษาความผิดปกติในระดับโมเลกุลในกลุ่ม

ผู้ป่วยที่มีฮีโมโกลบิน เอ็ฟสูงผิดปกติ

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย (10%) : 6 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

2. ดร.โกวิท พัฒนาปัญญาสัจย์

คุณวุฒิ : Ph.D.
 ตำแหน่ง : ศาสตราจารย์
 สถานที่ทำงาน : สถานส่งเสริมการวิจัย
 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
 บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
 โทรศัพท์ (02) 4198940-86 ต่อ 6644 โทรสาร (02) 4110155
 e-mail: grkpy@mahidol.ac.th

หน้าที่ความรับผิดชอบในโครงการ : การศึกษาคุณสมบัติของ red cell vesicles

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย (10%) : 6 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

3. นพ.สุกร จันทจักรุณี

คุณวุฒิ : M.D.
 ตำแหน่ง : รองศาสตราจารย์
 สถานที่ทำงาน : สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์
 คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี
 มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 พญาไท กรุงเทพฯ 10400
 โทรศัพท์ (02) 2011392 โทรสาร (02) 2462123
 e-mail: rasjn@mahidol.ac.th

หน้าที่ความรับผิดชอบในโครงการ: การใช้ยากระตุ้นให้มีการสร้างฮีโมโกลบินเอ็ฟเพิ่มขึ้น

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย (10%) : 6 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

4. ดร.ยวดี วัฒนโกศลสิน

คุณวุฒิ : Ph.D.
 ตำแหน่ง : รองศาสตราจารย์
 สถานที่ทำงาน : ภาควิชาชีวเคมี
 คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
 สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110
 โทรศัพท์ (02) 2602235-5 ต่อ 4601
 โทรสาร (02) 2602122-4 ต่อ 4602
 e-mail: yuwadee@phm.sw.ac.th

หน้าที่ความรับผิดชอบในโครงการ: การทดสอบการกระตุ้นอีโมโกลบิน เอ็ฟ ด้วยไฮดรอกซียูเรีย โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดแดงต้นกำเนิด

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย (10%) : 6 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

5. ดร.รัชนิกร กัลล์ประวิทย์

คุณวุฒิ : Ph.D.

ตำแหน่ง : รองศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
โทรศัพท์ (02) 4197581 โทรสาร (02) 4111428

e-mail: sirkp@mahidol.ac.th

หน้าที่ความรับผิดชอบในโครงการ: Oxidative stress และผลของการใช้ antioxidants

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย (10%) : 6 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

6. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล

คุณวุฒิ : PhD

ตำแหน่ง : ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสวนดอก
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200
โทรศัพท์ (053)-945-322 ต่อ 221 หรือ 235
โทรสาร (053)-894-031

e-mail: ssrichai@mail.med.cmu.ac.th, mdbci@yahoo.com

หน้าที่ความรับผิดชอบในโครงการ: การศึกษาภาวะเหล็กเกินและการขับเหล็ก

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย (20 %) : 12 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

7. ดร.มล.เสาวรส สวัสดิวัฒน์

คุณวุฒิ : Ph.D.

ตำแหน่ง : นักวิจัย

สถานที่ทำงาน : โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย
สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา
25/25 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ตำบลศาลายา

อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

โทรศัพท์ (02) 8892557-8 โทรสาร (02) 8892559

e-mail : stssv@yahoo.com

หน้าที่ความรับผิดชอบในโครงการ : การศึกษา antisense DNA therapy

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย (10%) : 6 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

8. ดร.ปณทิพย์ วัฒนวิบูลย์

คุณวุฒิ : Ph.D.

ตำแหน่ง : รองศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน : ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยมหิดล บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

โทรศัพท์ (02) 4414370 ต่อ 2200

e-mail: mtpvt@mahidol.ac.th

หน้าที่ความรับผิดชอบในโครงการ : การศึกษา siRNA

เวลาที่ใช้ในโครงการวิจัย (10%) : 6 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

สาขาวิชาที่ทำการวิจัย วิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

(ภาษาไทย)

ในช่วงระยะเวลา 3 ปี (พ.ศ. 2545-2548) คณะผู้วิจัยจาก 3 มหาวิทยาลัย (7 คณะฯ) ได้ร่วมกันทำการศึกษาเกี่ยวกับธาลัสซีเมีย เพื่อทำให้เกิดความเข้าใจถึงสาเหตุความผิดปกติในระดับโมเลกุล ไปจนถึงความผิดปกติทางคลินิกและพยายามหาแนวทางใหม่ในการรักษาพยาบาลผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ซึ่งเป็นโรคทางกรรมพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดในคนไทย

ผลงานวิจัยที่สำคัญ สรุปได้เป็นหัวข้อใหญ่ ๆ ดังนี้

1. การเข้าใจกลไกในการควบคุมการแสดงออกของ γ -globin gene ซึ่งจะสร้างสายแกลมมาโกลบินที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของ Hb F โดยเฉพาะบทบาทของ DNA sequence ส่วนที่เป็น 3'enhancer และ 3' HS 1 ซึ่งพบว่าทำหน้าที่เป็น insulator ของยีนที่อยู่ทาง upstream

2. การตรวจพบและนับจำนวนของ microvesicles และ microparticles ซึ่งหลุดออกมาจากผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ตัดม้ามแล้ว microparticle/microvesicles ดังกล่าว มี

โมเลกุลของ phosphatidylserine อยู่ที่ผิวด้านนอกและสามารถไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์และโปรตีนอื่นหลายชนิด โดยเฉพาะโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด จึงอาจเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดการอุดตันในหลอดเลือดแดงผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

3. การศึกษาเกี่ยวกับภาวะ oxidative stress ซึ่งสาเหตุน่าจะมาจากภาวะเหล็กเกิน โดยเฉพาะเหล็กที่อยู่ในรูปของ non transferrin bound iron (NTBI) คณะผู้วิจัยเป็นคณะแรก ๆ ที่ได้ทำการศึกษาการหา/สารต้านอนุมูลอิสระ อาทิ ขมิ้นชัน ชาเขียว มาช่วยบรรเทาภาวะ oxidation ดังกล่าว โดยทำการทดลองทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในหนูทดลอง

4. ศึกษาแนวทางใหม่ในการรักษาผู้ป่วย เช่น ยา hydroxyurea มีคุณสมบัติที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดแดงสร้าง Hb F เพิ่มขึ้น แต่ผู้ป่วยบางรายอาจจะไม่ตอบสนองต่อยา คณะผู้วิจัยจึงได้หาวิธีตรวจสอบการตอบสนองต่อยา hydroxyurea ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ก่อนที่จะนำมาให้ผู้ป่วยรับประทาน นอกจากนี้ ยังได้ทำการทดสอบวิธีการรักษาใหม่ ๆ เช่น การใช้ antisense DNA เพื่อไปแก้ไขกระบวนการ abnormal splicing ที่เป็นสาเหตุสำคัญของ β -thalassemia ในคนไทยและได้เริ่มทดลองใช้ siRNA เพื่อลดปริมาณของ excess α -globin chain ในเซลล์เม็ดเลือดแดงต้นกำเนิดจากผู้ป่วย β -thalassemia เป็นต้น

5. ได้สร้างหนูธาลัสซีเมียเพื่อให้เป็นโมเดลในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของเม็ดเลือดแดงและการศึกษาพยาธิสภาพที่เปลี่ยนไปในโรค β -thalassemia/Hb E

6. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (single nucleotide polymorphism) ของ human genome โดยเฉพาะยีน UGT1A1 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ glucuronidation ของ drug metabolism เช่น ยาพาราเซตามอล

7. สร้าง antibody ต่อสายโกลบินและฮีโมโกลบิน โดย Ig Y technology เพื่อใช้ในการ screen หาผู้ที่ป่วยหรือเป็นโรคธาลัสซีเมีย ซึ่งจะมีประโยชน์ต่องานวิจัยและการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย

งานวิจัยทั้งหมด ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติและเผยแพร่ในรูปของบทความรวม 24 เรื่อง และนำเสนอในที่ประชุมระดับชาติ/นานาชาติ รวม 35 ครั้ง ตลอดจนผลิตนักศึกษาระดับปริญญาโทจำนวน 4 คนและระดับปริญญาเอกจำนวน 8 คน

(ภาษาอังกฤษ)

During these last three years (2002-2005) our thalassemia net work from 3 universities (7 faculties) has been conducted research in thalassemia from molecular level to clinical medicine. The aim of this project is to get better understanding and treatment of thalassemia, which is the most common genetic disorder among the Thais.

Major outcome may be divided as follows:

1. Get better understanding of the regulation of γ -globin gene expression, especially the role of 3'enhancer and 3'HS1 insulator. This may lead to the finding of Hb F enhancer.
2. An increasing number of microvesicles and microparticles in thalassemia has been demonstrated. Most of these minute particles originate from platelets and red cells. We also found that there was an increasing number of the active molecule, phosphatidylserine, at the outer surfaces of these particles. Phosphatidylserine may activate many cells and proteins in the circulation and may serve as the major cause of thrombosis in thalassemia.
3. We have studied in depth about oxidative stress that results from iron overload, especially from the non-transferrin bound iron (NTBI). To overcome this problem various antioxidants have been tried in cultured cells and experimental animals. We are the first group in the trial of curcumin and green tea, the common natural products, which were found to be very potent antioxidants.
4. The novel therapeutic approaches to improve the quality of life of the patients have also been explored. A good result from the long-term use of hydroxyurea in enhancing Hb F production was observed. We also try to correct the abnormal splicing process that leads to β -thalassemia, by using antisense DNA to restore the normal hemoglobins. Our preliminary result also showed that excess amount of α -globin chains, in β -thalassemia, may also be diminished by the use of siRNA.
5. We have developed a thalassemic/transgenic mice model for β -thalassemia/Hb E. These thalassemic transgenic mice are now being used as a model organism for different interventions.
6. The genetic polymorphism of the genes, such as UGT1A1, and its contribution in the glucuronidation of bilirubin and some drugs have been explored.
7. We also try to produce the antibodies against human hemoglobins and globin chains. These antibodies may be useful for future research and diagnoses of thalassemia.

We have published 24 papers in the peer review international journals and presented 35 pieces of works in the international and local scientific meetings. All together there are 4 master and 8 Ph.D. students graduated during these last 3 years under the support of Thailand Research Fund.

Executive summary

ธาลัสซีเมียเป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุดในคนไทย เมื่อคำนวณจากอุบัติการณ์ของผู้ที่เป็นพาหะทั้งหมดประมาณร้อยละ 30-40 ของประชากร พบว่าจะมีผู้ป่วยธาลัสซีเมียเกิดใหม่มากกว่า 10,000 คนทุก ๆ ปี การรักษาผู้ป่วยให้หายขาดด้วยการปลูกถ่ายไขกระดูกใหม่นั้น ยังเป็นเรื่องยากและมีค่าใช้จ่ายสูง ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีปัญหาของโรคเรื้อรังตั้งแต่เกิด ได้แก่ ปัญหาซิด ภาวะแทรกซ้อนจากการที่มีธาตุเหล็กสะสมมากเกินไปและภาวะแทรกซ้อนอื่น ๆ เช่น การเป็นโรคติดเชื้อ โรคกระดูกพรุน โรคตับและการทำงานของไตผิดปกติของต่อมไร้ท่อ

โครงการวิจัยที่ได้ทำการศึกษาในรายงานนี้ แบ่งออกได้เป็น 7 หัวข้อใหญ่ ๆ ดังนี้

1. Molecular biology

การศึกษาค้นคว้าความผิดปกติในระดับโมเลกุลที่ทำให้ฮีโมโกลบิน เอ็ฟ (Hb F, $\alpha_2\gamma_2$) สูงมีความสำคัญ เนื่องจากผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียที่มีระดับ Hb F สูง จะมีอาการของโรคน้อย งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาค้นคว้าความผิดปกติในระดับโมเลกุลที่ทำให้ Hb F สูงในผู้ป่วยสองราย ซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค β -thalassemia/Hb E เนื่องจากมี Hb typing เป็น E+F แต่ผู้ป่วยมีอาการซิดไม่มาก การเจริญเติบโตปกติและไม่พบตับม้ามโต ผลการวิเคราะห์ DNA ในผู้ป่วยรายแรกโดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization กับ nonradioactive labeled PCR probes พบว่าผู้ป่วยมีภาวะ hereditary persistence of fetal hemoglobin ชนิด SEA-HPFH ร่วมกับ Hb E โดยโครโมโซมข้างที่เป็น HPFH มีการขาดหายไปของ DNA บริเวณขึ้น β -globin ร่วมกับการขาดหายไปของ 3'HS-1 ซึ่งเป็น insulator ที่กั้นไม่ให้มี interaction ระหว่างการผลิต β -globin กับ enhancer sequence หลัง 3'HS-1 เมื่อมีการขาดหายไปของ DNA รวม 27 kb และทำให้ DNA บริเวณ 3'-enhancer ถูกนำเข้ามาใกล้กับ γ -globin จึงช่วยให้มีการแสดงออกของ γ globin gene และสร้าง Hb F มากขึ้น ผู้วิจัยได้พิสูจน์สมมติฐานนี้โดยเปรียบเทียบการแสดงออกของ EGFP ที่เชื่อมต่อกับ γ globin gene หลังจากทำ transient transfection ของ BAC constructs ชนิดต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นเข้าไปในเซลล์ K562

ส่วนผู้ป่วยอีกรายหนึ่ง ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค β -thalassemia/Hb E เช่นเดียวกัน เนื่องจากมี Hb typing เป็น E+F แต่ผู้ป่วยมีอาการซิดไม่มาก ผู้วิจัยได้ใช้วิธีใหม่ในการตรวจหาตำแหน่งของการแหงหายของ DNA โดยอาศัยข้อดีของเอ็นไซม์ DNA polymerase ชนิดใหม่ที่สามารถเพิ่มจำนวนขึ้น DNA ที่มีขนาดยาว ๆ ที่ครอบคลุมบริเวณที่แหงหายของ DNA ได้ พบว่าการแหงหายของ DNA ที่ทำให้เกิด $(\delta\beta)^0$ -thalassemia ในครอบครัวนี้ยังไม่เคยมีรายงานการค้นพบมาก่อน และการที่ DNA ขาดหายไปถึง 11.3 kb ทำให้ส่วนของ DNA ที่เป็น enhancer ในบริเวณนี้ถูกนำเข้ามาใกล้กับขึ้น γ -globin ประกอบกับ DNA ส่วนที่เป็น silencer ก็ขาดหายไปด้วย จึงน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการสร้าง Hb F เพิ่มขึ้น ซึ่งผู้วิจัยกำลังศึกษาเพื่อยืนยันสมมติฐานดังกล่าวอยู่

2. การศึกษาคุณสมบัติของ red cell vesicles และ microparticles

เม็ดเลือดแดงที่ไหลอยู่ในกระแสเลือด อาจมีเศษเล็ก ๆ ของผนังเม็ดเลือดแดง (red cell vesicles) หลุดออกมาโดยกระบวนการ vesiculation และ ยังมีอนุภาคขนาดเล็กที่หลุดมาจากผนังเซลล์ที่ถูกกระตุ้นหรือจากเซลล์ที่กำลังจะเกิด apoptosis แต่มีขนาดเล็กกว่า vesicles เรียกว่า microparticle เซลล์ผิดปกติทั้งสองชนิดอาจเกิดจาก activation ของเซลล์ชนิดต่าง ๆ หรือการที่มีการเพิ่มขึ้นของ calcium ภายในเซลล์ บนผิวของ red cell vesicles และ microparticles จะมีโมเลกุลของ phosphatidylserine (PS) ปรากฏอยู่และ PS นี้สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบอื่น ๆ ในร่างกาย เช่น ระบบการแข็งตัวของเลือดและ complement system ทำให้เกิดพยาธิสรีรวิทยาที่ผิดปกติ

เนื่องจาก red cell vesicles และ microparticles เหล่านี้มีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงปกติและอาจมีขนาดเล็กเท่าเกร็ดเลือด (platelet) ทำให้เกิดปัญหาในการวัดจำนวน คณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิคเพื่อแยกเซลล์เหล่านี้ออกจากเกร็ดเลือด โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะที่ติดฉลากกับสารเรืองแสงเข้าไปจับยึดกับเซลล์และตรวจสอบด้วยเทคนิค two-color flow cytometric immunostaining เมื่อผสมแอนติบอดีทั้งสองชนิดใส่ในหลอดที่มี fluorescent TrueCount bead ที่รู้ขนาดและจำนวน จะนำมาใช้เพื่อคำนวณ absolute numbers ของเซลล์ผิดปกติทั้งสองชนิดได้ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามี vesicle ของเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยธาลัสซีเมียและในเลือดของคนปกติ แต่อัตราร้อยละและจำนวนสัมบูรณ์ในผู้ป่วยมีสูงกว่าในคนปกติ โดยเฉพาะในเลือดของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียที่ตัดม้ามแล้ว และพบสูงในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียมากกว่าในผู้ป่วยอัลฟา ธาลัสซีเมีย

สำหรับการศึกษานิตเซลล์ต้นกำเนิดของ microparticles ทำได้โดยการย้อมเซลล์ด้วย แอนติบอดีจำเพาะ พบว่า ผู้ป่วยธาลัสซีเมียและคนปกติมีปริมาณเปอร์เซ็นต์ CD41 (เกร็ดเลือด) รวมถึง adhesion molecule CD62P และ CD36 ค่อนข้างสูง ส่วนเซลล์ที่มี glycophorin A ซึ่งได้แก่เม็ดเลือดแดงพบในระดับปานกลาง แต่ในผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E ที่ไม่ได้ตัดม้ามและผู้ป่วย Hb H พบเซลล์ที่เป็นเม็ดเลือดแดง (glycophorin A) สูงขึ้น ส่วนเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ต้นกำเนิดและ adhesion molecules อื่น ๆ พบว่ามีเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อย้อมเกร็ดเลือดด้วย annexinV ซึ่งจะจับกับโมเลกุลของ PS บนผิวเซลล์ พบว่ามีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากเม็ดเลือดแดงทั้งในผู้ป่วยธาลัสซีเมียและคนปกติ แสดงว่าเกร็ดเลือดอาจเป็นแหล่งเซลล์ต้นกำเนิดหลักของ microparticles ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียและคนปกติ

3. การศึกษาการเกิด thromboembolism และ thrombosis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดง expose ให้ phospholipids โดยเฉพาะ PS ออกมาด้านนอกได้ จึงมีคุณสมบัติคล้าย PF3 ทำให้เกิด thrombin activation อย่างต่อเนื่องและมีผลทำให้เกร็ดเลือดของผู้ป่วยทำงานมากกว่าปกติ ผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตัดม้ามแล้ว จะมีจำนวนของเกร็ดเลือดสูงกว่าปกติและมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการทำงาน (hyperactivity) เกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นจะมีรูปร่างเปลี่ยนไปและปล่อยสารออกจาก

แกรนูโล เช่น β -thromboglobulin (BTG) และ platelet factor 4 (PF4) ทำให้โปรตีน CD63 หรือ glycoprotein 53 ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ lysosomal membrane ของเกร็ดเลือดไหลออกมาด้านนอก ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดทั้งแบบ hypo- และ hyper-aggregation และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด thrombosis

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาเม็ดเลือดแดงที่มี PS อยู่บนผิวด้านนอกกับเกร็ดเลือดที่ผิดปกติ พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า PS exposing Rbc กับ CD63 positive ที่ออกมาอยู่บนผิวนอกของเกร็ดเลือด ค่าปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (platelet factor 3 like activity) ของผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E ทั้งที่ตัดม้ามและไม่ตัดม้าม ผู้ป่วยฮีโมโกลบินเอช (HbH) และฮีโมโกลบินเอช/คอนสแตนต์สปริง (HbH/CS) มีความแตกต่างจากคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E ที่ตัดม้าม และพบความสัมพันธ์ระหว่างค่าปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (platelet factor 3 like activity) กับปริมาณ annexin V positive microparticles

4. Therapeutic intervention

4.1 การใช้ยากระตุ้นให้มีการสร้างฮีโมโกลบิน เอ็ฟ เพิ่มขึ้น

ผู้ป่วยที่ได้รับยา hydroxyurea (HU) มีฮีโมโกลบิน เอ็ฟ เพิ่มขึ้นและไม่ต้องรับเลือดเลยระหว่างที่กินยา แต่การตอบสนองต่อยา HU ในผู้ป่วยแต่ละรายแตกต่างกันได้มาก ผู้ป่วยบางรายตอบสนองต่อการรักษาดี ในขณะที่ผู้ป่วยบางรายตอบสนองต่อยาน้อยมาก จึงได้ศึกษาเรื่องการกระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบิน เอ็ฟ ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับผลที่พบเมื่อให้ยา hydroxyurea ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ผลการศึกษาแสดงว่าการให้ยา HU ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงที่เพาะเลี้ยง (*in vitro* culture) สามารถพยากรณ์การตอบสนองต่อการให้ยา HU ในผู้ป่วยโรค β -thalassemia/Hb E การศึกษา *in vitro* จึงมีประโยชน์ในการเลือกให้ยา HU เฉพาะผู้ป่วยที่ให้การตอบสนองที่ดีต่อยาและช่วยลดผลอันไม่พึงประสงค์ในผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อยาได้ วิธีการนี้ยังอาจนำไปใช้ทดสอบสารหรือยาชนิดอื่น ๆ ได้ด้วย

4.2 Oxidative stress และผลของการใช้ antioxidant

ผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีปัญหา oxidative stress ซึ่งส่วนหนึ่งเกิดจาก Fenton reaction ที่มีธาตุเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้ระดับของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวผู้ป่วยต่ำกว่าปกติ ผู้ป่วยยังมีระดับ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตของ lipid peroxidation สูงกว่าคนปกติ ส่วนค่าของ antioxidant enzyme activity เช่น superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GSH-Px) ก็มีการเปลี่ยนแปลงไปด้วย การวิจัยครั้งนี้ ได้ศึกษาคุณสมบัติการเป็น strong antioxidant ของขมิ้นชันในผู้ป่วย (*in vivo*) โดยได้รับความร่วมมือจากองค์การเภสัชกรรม ในการผลิต curcumin capsule ขนาด 250 mg ให้กับผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า curcumin สามารถลดปริมาณของ nonheme iron และ PF3 like activity ลงได้และมีการเปลี่ยนแปลงของสภาวะ oxidative stress โดยพบว่า parameters ต่าง ๆ ที่กล่าวมาเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้น

4.3 การศึกษา non-transferrin bound iron และผลของขมิ้นชันและชาเขียวในการจับธาตุเหล็ก

ปกติธาตุเหล็กในพลาสมาจะจับอยู่กับโปรตีน transferrin ในผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E มีการสะสมของธาตุเหล็กมาก ทำให้ปริมาณธาตุเหล็กรวมและทรานส์เฟอร์ริน (transferrin) ในพลาสมา มีความอิ่มตัว (TIBC) เพิ่มขึ้น จนอิ่มตัวร้อยละ (transferrin saturation) และเกิดมีธาตุเหล็กที่ไม่จับกับทรานส์เฟอร์ริน เรียกว่า non-transferrin bound iron (NTBI) ปรากฏในพลาสมาของผู้ป่วยและไปกระตุ้นให้มีการสร้างอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่ไปทำลาย lipids, nucleic acids, proteins และ carbohydrates ทำให้การทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ผิดปกติไป

curcumin และสารสกัดชาเขียว (catechin) นอกจากจะมีคุณสมบัติเป็น antioxidant แล้ว ยังมีโครงสร้างที่อาจจะจับธาตุเหล็ก (iron-chelating activity) โดยเฉพาะธาตุเหล็ก NTBI เพราะมี β -diketo moiety ซึ่งสามารถจับเหล็ก ferric ion (Fe^{+3}) ได้ ในรายงานนี้ได้ทำการศึกษาคูสมบัติของ curcumin ในการจับธาตุเหล็กในพลาสมาทั้งที่อยู่ในรูปของ ferric nitrate (chemical form) และ NTBI (biological form) พบว่าการจับเหล็กในรูปของ NTBI ด้วย curcumin ขึ้นอยู่กับเวลาและความเข้มข้นของธาตุเหล็ก ส่วนสารสกัดชาเขียว พบว่ามีคุณสมบัติลดระดับธาตุเหล็ก NTBI ในซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณ (concentration-dependent manner) และเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา (time-dependent manner) นอกจากนี้ พบว่าผลิตภัณฑ์ชาเขียวที่เตรียมจากการอบแห้งในตู้ไมโครเวฟ (กำลังไฟฟ้า 800 วัตต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 3 นาทีสามารถลดปริมาณธาตุเหล็ก NTBI ได้ดีกว่าชาเขียวที่เตรียมขึ้นโดยวิธีเชิงพาณิชย์ ส่วนสาร catechin, EGCG และ epicatechin 3-gallate (ECG) ที่แยกได้จากชาเขียวมีความสามารถในการจับกับธาตุเหล็ก NTBI ได้ ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นและเวลาเช่นกัน

4.4 Antisense therapy และการใช้ siRNA

เนื่องจากมีวเตชั่น (mutation) ที่เกิดขึ้นบนยีนเบต้าโกลบินบางชนิด เช่น IVS1-5, G->C; IVSII-654, C->T รวมทั้ง β^E ส่งผลให้เกิดมี abnormal splicing ขึ้นในกระบวนการ mRNA processing โดยมีวเตชั่นเหล่านี้จะไปกระตุ้น cryptic splice site ที่อยู่ใกล้เคียง ทำให้มีการสร้าง mRNA ที่ผิดปกติและมีการสร้างสายเบต้าโกลบินลดลง การรักษาผู้ป่วยที่มีวเตชั่นดังกล่าว อาจทำได้โดยการเข้าไปสกัดกั้น (block) abnormal splicing ด้วยชิ้นส่วนของ DNA ขนาดเล็ก (antisense DNA) ที่สังเคราะห์ขึ้นในหลอดทดลอง

การศึกษานี้ได้เปรียบเทียบวิธีการนำ antisense DNA เข้าสู่เซลล์โดยวิธี syringe loading และวิธี free uptake และเปรียบเทียบผลการรักษาด้วย antisense DNA 3 ชนิด คือ morpholino, 2'-O-MOE phosphorothioate (MOE) และ peptide nucleic acid (PNA) ที่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโน lysine และ arginine เมื่อนำเซลล์จากไขกระดูกหนูธาลัสซีเมียที่มียีนผิดปกติของผู้ป่วยชนิด β IVS II-654 มาผสมกับ antisense DNA พบว่าจำนวน β -globin mRNA ที่มี splicing ผิดปกติเพิ่มขึ้น โดยขึ้นอยู่กับการขนาด (dose) ของ antisense DNA ที่

เติมลงไปและ antisense DNA ชนิด morpholino ให้ผลดีกว่า PNA และ MOE โดยทำให้เกิดการสะสมของ mRNA ปกติมากกว่า 50%

นอกจากนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองผลของ PNA ที่ conjugate กับ lysine 8 ตัว และ arginine 4, 6 และ 8 ตัว (8K, 4R, 6R, 8R) โดยการนำเข้าสู่เซลล์ไขกระดูกด้วยวิธี free uptake เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีการสร้าง mRNA ปกติเพิ่มมากขึ้นจากการใช้ PNA-8R (arginine) ความเข้มข้น 45 μ M และมากกว่าการใช้ PNA-8K (lysine) อย่างเห็นได้ชัด สรุปได้ว่า PNA ที่ conjugate กับ arginine ให้ผลดีกว่า PNA ที่ conjugate กับ lysine และจำนวนกรดอะมิโนที่ conjugate กับ PNA ที่มากขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์และสร้าง mRNA ปกติเพิ่มมากขึ้นด้วย

สำหรับ siRNA (small interference RNA) เป็นเทคนิคในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับ RNA (posttranscription) โดยการสังเคราะห์ RNA สายคู่สั้น ๆ ประมาณ 20 bp ที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary) กับเบสใน mRNA ซึ่งจะส่งผลให้ mRNA เส้นนั้นถูกทำลายไปและไม่สามารถสร้างโปรตีน การนำเทคนิค siRNA มาใช้ยับยั้งการสร้างอัลฟาโกลบินในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้เกิดสมดุลระหว่างสายอัลฟาและเบต้าโกลบินในเม็ดเลือดแดงมากขึ้น

ในการศึกษานี้ได้ทดลองใช้ siRNA ต่อ α -globin ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนอัลฟาโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของคนปกติระยะ pronormoblast ในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยนำ siRNA เข้าเซลล์ ECFC ด้วยวิธี transfection ด้วย lipofectamine ผลการทดลองพบว่า siRNA ที่ใช้สามารถเข้าสู่เซลล์ โดยไม่ทำให้เซลล์เกิด apoptosis เพิ่มขึ้นและ α -globin siRNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนอัลฟาโกลบิน ภายหลังจาก 48 ชั่วโมง โดยไม่ลดระดับ β -globin mRNA และพบว่าปริมาณโปรตีนอัลฟาโกลบินลดลงที่ 96 ชั่วโมง การตรวจปริมาณฮีโมโกลบินภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนระยะต่าง ๆ โดยการย้อมด้วย benzidine พบว่ามีการติดสีลดลงอย่างชัดเจน

5. การสร้าง transgenic mice

โครงการวิจัยนี้ เป็นความพยายามที่จะสร้างหนูที่ได้มีการสอດໂສຍเบต้าธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในคนไทยและยีนเบต้าโกลบิน อี เข้าไป เมื่อนำไปผสมพันธุ์กับหนูที่มีการ knockout เอยีนที่ควบคุมการสร้างเบต้าโกลบินของหนูออกไปแล้ว ก็อาจจะได้หนูที่เป็น β -thalassemia/Hb E transgenic/knockout mice ที่มีความผิดปกติต่าง ๆ คล้ายคลึงกับที่พบในคน โดยคาดหวังว่าหนูที่สร้างขึ้นมานำไปใช้ศึกษาทางด้านพยาธิสรีรวิทยา ตลอดจนอาจนำมาใช้ศึกษาเกี่ยวกับภาวะเหล็กเกิน (iron overload) และใช้เป็นโมเดลในการทดสอบยาขับเหล็กหรือยาที่กระตุ้นให้มีการสร้าง Hb F หรือการทดสอบ antisense therapy หรืออื่น ๆ เพื่อการรักษาด้วย gene therapy ต่อไป

ผลการศึกษาพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาและพยาธิวิทยาหลายอย่างขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนชุด (copy) ของยีนที่ถูก transfer เข้าไป หนู transgenic ชนิด HbE-DH หรือ HbE- $\beta^{IVSII-654}$ -DH ซึ่งมียีน β ของหนูบนโครโมโซมข้างเดียวแต่มี β^E ของมนุษย์อยู่ด้วย หนูกลุ่มนี้มีลักษณะของเม็ดเลือดแดงและค่าทางโลหิตวิทยาเช่นเดียวกับหนู wild type แสดงว่า β^E -gene ของมนุษย์ที่ integrate เข้าไปในโครโมโซมของหนูสามารถแสดงออก (expression) และสร้างฮีโมโกลบิน ($\alpha_2\beta_2^E$) ได้ ส่วนหนู rescued mice ซึ่งยีนหนูขาดหายไปจากโครโมโซมทั้งสองข้าง จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเม็ดเลือดแดงและค่าทางโลหิตวิทยาขึ้นอยู่กับจำนวนชุดของ β^E -gene ของคนที่หนูได้รับเช่นเดียวกัน ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า rescued mice ที่มี β^E -gene 4 ชุด ยังคงมีลักษณะของโรคธาลัสซีเมียเช่นเดียวกับ β knockout heterozygote แต่หนูที่มี β^E -gene ตั้งแต่ 8 ชุดขึ้นไปจะกลับมีลักษณะเหมือนหนู wild type แม้ว่าค่า MCV และค่า RDW จะยังผิดปกติ

6. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A) และเภสัชจลนศาสตร์ของยา พาราเซตามอล ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ในประเทศไทย ยังไม่มีการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาที่ใช้บ่อยในผู้ป่วยธาลัสซีเมียอย่างมีระบบ แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ ใช้แบบแผนการให้ยาในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเช่นเดียวกับคนไขอื่น ๆ ซึ่งอาจทำให้การรักษาไม่เกิดประสิทธิภาพเท่าที่ควร คณะผู้วิจัยจึงได้เริ่มทำการศึกษาค้นคว้าหาข้อมูลเบื้องต้นทางเภสัชจลนศาสตร์ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยใช้ยาสามัญประจำบ้าน พาราเซตามอล เป็นยาต้นแบบควบคุมไปกับการติดตามระดับบิลิรูบินในเลือด ข้อมูลเบื้องต้นชี้ให้เห็นว่าปริมาณยาพาราเซตามอลในพลาสมาในผู้ป่วย มีปริมาณต่ำกว่าในอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่เมตาโบไลต์ที่ผ่านทางปฏิกิริยา glucuronidation ในผู้ป่วยมีปริมาณต่ำกว่าในอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ซึ่งดูเหมือนว่าระดับยาที่ต่ำในผู้ป่วย น่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงยาได้เร็วขึ้นผ่านทางปฏิกิริยา glucuronidation เมื่อตรวจหา genetic polymorphisms ของยีน UGT1A1 และยีน UGT1A6 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ glucuronidation ของยา พบว่า ความหลากหลายของยีนที่ควบคุมการสร้าง UGTs ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณยาพาราเซตามอลในพลาสมาและเมตาโบไลต์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงยาผ่านทางปฏิกิริยา glucuronidation ทั้งในผู้ป่วยและอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ

7. การผลิตแอนติบอดีเพื่องานวิจัยและวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย

การตรวจหาปริมาณฮีโมโกลบินบาร์ท (Hb Bart's) สามารถใช้เป็นข้อบ่งชี้ของอัลฟาธาลัสซีเมียได้คร่าว ๆ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะผลิตแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบินบาร์ทและฮีโมโกลบินชนิดอื่น เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียโดย IgY technology ซึ่งเป็นการวิจัยเป็นครั้งแรกในโลก ทำให้สามารถเก็บแอนติบอดีจากไข่ไก่ โดยการแยก IgY ออกจาก egg yolk แล้วทำปฏิกิริยากับ hemoglobin และ globin chain ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นแอนติเจน โดยใช้เทคนิค ELISA

เนื้อหางานวิจัย

1. ปัญหาที่ทำการวิจัยและความสำคัญของปัญหา

ธาลัสซีเมียเป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุดในคนไทย เมื่อคำนวณจากอุบัติการณ์ของผู้ที่เป็นพาหะทั้งหมดประมาณร้อยละ 30-40 ของประชากร พบว่าจะมีผู้ป่วยธาลัสซีเมียเกิดใหม่มากกว่า 10,000 คนทุก ๆ ปี การรักษาผู้ป่วยให้หายขาดด้วยการปลูกถ่ายไขกระดูกใหม่นั้น ยังเป็นเรื่องยากและมีค่าใช้จ่ายสูง ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีปัญหาของโรคเรื้อรังตั้งแต่เกิด ได้แก่ ปัญหาซีด ไม่มีแรง มีภาวะแทรกซ้อนจากการที่มีธาตุเหล็กสะสมมากเกินไปและมีภาวะแทรกซ้อนอื่น ๆ เช่น การเป็นโรคติดเชื้อ โรคกระดูกพรุน โรคตับและการทำงานของไตผิดปกติของต่อมไร้ท่อ

ผลงานวิจัยที่ผ่านมา ทำให้ทราบถึงความคิดปกติในระดับโมเลกุลที่เป็นสาเหตุของ อัลฟาและเบต้าธาลัสซีเมีย และมีการนำความรู้ดังกล่าวไปใช้ในการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์และการตรวจเพื่อวินิจฉัยทารกในครรภ์ นอกจากนี้ ยังมีการวิจัยเพื่อจะให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างความผิดปกติของยีนและความรุนแรงของโรค (genotype-phenotype interaction) จนทำให้ทราบถึงปัจจัยทางพันธุกรรมบางอย่างที่อาจมีผลต่อการเป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมีย อย่างไรก็ดี ยังมีอื่นที่เรายังไม่ทราบเกี่ยวข้องอยู่อีก โดยเฉพาะยีนที่อาจเกี่ยวข้องหรือควบคุมการสร้าง ฮีโมโกลบิน เอ็ฟ (Hb F, $\alpha_2\gamma_2$) ที่อาจส่งผลทำให้ผู้ป่วยมีอาการน้อยลง

ส่วนงานวิจัยทางคลินิก ได้ค้นพบปัญหาที่สำคัญบางอย่าง เช่น ภาวะออกซิเจนในเลือดต่ำ (hypoxemia) ความผิดปกติของระบบการแข็งตัวของเลือด โดยเฉพาะเกร็ดเลือด ทำให้ทราบว่าผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียที่คัดค้านแล้ว มีโอกาสสูงที่จะเกิดภาวะเลือดแข็งตัวง่าย (hypercoagulable stage) และอาจนำไปสู่ภาวะการอุดตันของหลอดเลือด (thrombosis)

โครงการวิจัยที่ได้ทำการศึกษาในรายงานนี้ แบ่งออกได้เป็น 7 หัวข้อใหญ่ ๆ ดังนี้

1. Molecular biology

การศึกษาความผิดปกติในระดับโมเลกุลที่ทำให้เกิด อัลฟาและเบต้าธาลัสซีเมีย โดยเฉพาะกลุ่มที่มีระดับของฮีโมโกลบิน เอ็ฟ (Hb F, $\alpha_2\gamma_2$) สูงผิดปกติมีความสำคัญ ผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียแรกคลอดจนกระทั่งอายุ 8-10 เดือน มักจะยังไม่แสดงอาการซีด เพราะร่างกายยังคงสร้างฮีโมโกลบิน เอ็ฟ ได้ ภายหลังจากนั้นจะมี switch off ของการสร้างสายแกมมาโกลบินตามธรรมชาติและจะมีการสร้างสายเบต้า โกลบินขึ้นแทนที่ แต่ผู้ป่วยมียีนเบต้าโกลบินผิดปกติ ทำให้สร้างฮีโมโกลบิน เอ (Hb A, $\alpha_2\beta_2$) ไม่ได้ จึงเริ่มมีอาการซีดและความผิดปกติอื่น ๆ ตามมา นอกจากนั้นพบว่าผู้ป่วยที่มีระดับฮีโมโกลบิน เอ็ฟ สูง (สร้างสายแกมมาโกลบินได้มาก) จะมีอาการของโรคน้อยลง เนื่องจากฮีโมโกลบิน เอ็ฟ พาออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ใกล้เคียงกับฮีโมโกลบิน เอ นอกจากนั้นสายแกมมาโกลบิน (γ -globin) ที่เพิ่มขึ้น ยังจะช่วยลดปริมาณของสายอัลฟาโกลบิน (unbound α -globin) ด้วย การวิจัยนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐาน โดยมี ดร.ปราณี พูเจริญ เป็น

ผู้รับผิดชอบ จะทำการศึกษากลไกเกี่ยวกับการควบคุมการสร้างฮีโมโกลบิน เอ็ฟ ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นหายาหรือสารเคมีที่อาจนำมาใช้กระตุ้นให้มีการสร้างฮีโมโกลบิน เอ็ฟ เพิ่มขึ้นและไปช่วยลดความรุนแรงของโรคเบต้าธาลัสซีเมีย

2. การศึกษาคุณสมบัติของ red cell vesicles และ microparticles

งานวิจัยในระยะประมาณ 10 ปีที่ผ่านมา พบว่า ในขณะที่เม็ดเลือดแดงไหลอยู่ในกระแสเลือด อาจมีเศษเล็ก ๆ ของผนังเม็ดเลือดแดง (red cell vesicles) ที่หลุดออกมาโดยกระบวนการ vesiculation vesicles นี้มีส่วนประกอบทางเคมี โดยเฉพาะฟิวส์ด้านนอกประกอบไปด้วยโมเลกุลที่สำคัญหลายชนิด เช่น immunoglobulin และ phosphatidylserine (PS) ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้จะไปกระตุ้นการทำงานของระบบอื่น ๆ ในร่างกาย เช่น ระบบการแข็งตัวของเลือดและ complement system อันจะส่งผลให้เกิดพยาธิสรีรวิทยาที่ผิดปกติ การวิจัยในส่วนนี้มี ศ. ดร. โกวิท พัฒนาปัญญาสัจย์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เป็นหัวหน้าโครงการ โดยจะตรวจหาจำนวนของ red cell vesicles ซึ่งแต่เดิมเราตรวจพบ vesicles ดังกล่าวได้ แต่วัดออกมาเป็นจำนวน (quantitative) ไม่ได้ นอกจากนี้จะศึกษาคุณสมบัติและส่วนประกอบ โดยเฉพาะโปรตีนที่ผิวของ vesicle ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียหลาย ๆ ชนิด (genotype) ทั้งที่ตัดม้ามแล้วและยังไม่ได้ตัดม้าม

3. การศึกษาการเกิด thromboembolism และ thrombosis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตัดม้ามแล้ว มักจะมีจำนวนของเกร็ดเลือดสูงกว่าปกติและมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการทำงาน (hyperactivity) เกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นจะมีรูปร่างเปลี่ยนไปและปล่อยสารออกจากแกรนูล เช่น β -thromboglobulin (BTG) และ Platelet factor 4 (PF4) ทำให้โปรตีน CD63 หรือ glycoprotein 53 ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ lysosomal membrane ของเกร็ดเลือดไหลออกมาด้านนอก เกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นการทำงานมากผิดปกติ จะนำไปสู่การเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดทั้งแบบ hypo- และ hyper-aggregation และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด thrombosis ซึ่งเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย

4. Therapeutic intervention

การวิจัยเพื่อหาวิธีการรักษาผู้ป่วยธาลัสซีเมียให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นหรือหายจากโรคเป็นความพยายามที่ได้กระทำต่อเนื่องกันมาโดยตลอด วิธีการรักษาที่น่าจะมีศักยภาพและได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในรายงานนี้ได้แก่

4.1 การใช้ยากระตุ้นให้มีการสร้างฮีโมโกลบิน เอ็ฟ เพิ่มขึ้น

ผลการศึกษาที่ผ่านมา ทั้งจากต่างประเทศและของผู้วิจัยเอง แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยเบต้า ธาลัสซีเมีย ที่มีระดับฮีโมโกลบิน เอ็ฟ สูง (สร้างสายเกมม่าโกลบิน ได้มาก) จะมีอาการของโรคน้อยลง ผู้วิจัยเคยทดลองให้ยาไฮดรอกซียูเรีย (hydroxyurea, HU) เพื่อกระตุ้นการสร้าง ฮีโมโกลบิน เอ็ฟ ในผู้ป่วยโรค β -

thalassemia/Hb E พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับยาฮีโมโกลบิน เอ็ฟ เพิ่มขึ้นและไม่ต้องรับเลือดเลาะหว่างที่กินยา แต่การตอบสนองต่อยา HU ในผู้ป่วยแต่ละรายแตกต่างกันได้มาก ผู้ป่วยบางรายตอบสนองต่อการรักษาดี ในขณะที่ผู้ป่วยบางรายตอบสนองต่อยาน้อยมาก จึงได้ร่วมกับ ดร.ยุวดี วัฒนโกศลสิน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และ รศ.นพ.สุกร จันทจารุณี คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ศึกษาวิจัยเรื่องการกระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบิน เอ็ฟ ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับผลที่พบเมื่อให้ยา hydroxyurea ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

4.2 Oxidative stress และผลของการใช้ antioxidant

เป็นที่ทราบกันดีว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีปัญหา oxidative stress ซึ่งส่วนหนึ่งเกิดจาก Fenton reaction ที่มีธาตุเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากภาวะ oxidative stress ดังกล่าวจึงทำให้ระดับของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวผู้ป่วย เช่น วิตามินซี วิตามินอีและโคเอนไซม์ Q 10 ลดต่ำกว่าระดับในคนปกติ การศึกษาที่ผ่านมาได้มีความพยายามที่จะใช้ antioxidant ชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น วิตามิน อี มารักษาผู้ป่วย แต่ผลการศึกษาก็ไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน การศึกษาเบื้องต้นพบว่าผู้ป่วยมีระดับ malonyldialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตของ lipid peroxidation สูงกว่าคนปกติและระดับของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่น reduced glutathione (GSH) ต่ำกว่าปกติ ส่วนค่าของ antioxidant enzyme activity ต่าง ๆ เช่น superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GSH-Px) เปลี่ยนแปลงไป ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของขมิ้นชันที่มีสารสกัด curcumin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น strong antioxidant ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

Curcumin (turmeric) เป็นสมุนไพรไทยที่มีส่วนประกอบ เรียกว่า curcuminoids ประกอบด้วย curcumin I (diferuloylmethane), curcumin II (demethoxycurcumin) และ curcumin III (bisdemethoxy-curcumin) ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความร่วมมือจากองค์การเภสัชกรรม ในการผลิต curcumin capsule ขนาด 250 mg ให้แก่ผู้ป่วย โดยมี รศ. ดร.รัชนิกร กัลล์ประวิทย์ เป็นหัวหน้าโครงการ ในส่วนเกี่ยวกับการศึกษาผลของ antioxidant ในห้องปฏิบัติการ

4.3 การศึกษา non-transferrin bound iron และผลของขมิ้นชันและชาเขียวในการขับธาตุเหล็ก

ผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ได้รับเลือดเป็นประจำหรือผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงปานกลาง เมื่อมีอายุมากขึ้น จะมีธาตุเหล็กสะสมอยู่ในตัวมากและทำให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ตามมา เช่น ดับแข็ง เบาหวาน และภาวะหัวใจล้มเหลว จึงมีการวิจัยเพื่อหาวิธีขับธาตุเหล็กใหม่ ๆ โดยเฉพาะชนิดรับประทาน เพื่อนำมาใช้แทนยาขับเหล็กที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน คือ ยา desferrioxamine ซึ่งมีราคาแพงและต้องฉีดเข้าเส้นหรือได้ผิวหนังทุกวัน ๆ ละ 8-12 ชั่วโมง เพราะยาถูกขับออกเร็วมาก

ปกติธาตุเหล็กในพลาสมาจะถูกจับอยู่กับโปรตีน transferrin หรือ ligands อื่น ๆ เช่น albumin ผู้ป่วย β -thalassemia/HbE มีการสะสมของธาตุเหล็กมาก ปริมาณธาตุเหล็กรวม และทรานส์เฟอร์ริน

(transferrin) ในพลาสมาที่มีความอิ่มตัว (TIBC) เพิ่มขึ้น จนอิ่มตัวร้อยละ 100 (transferrin saturation) และเกิดมีธาตุเหล็กที่ไม่จับกับทรานส์เฟอร์ริน เรียกว่า non-transferrin bound iron (NTBI) ปรากฏในพลาสมาของผู้ป่วย β -thalassemia มีหลักฐานว่าธาตุเหล็กที่เรียกว่า NTBI นี้เป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่ไปทำลาย lipids, nucleic acids, proteins และ carbohydrates ทำให้การทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ผิดปกติไป ธาตุเหล็ก NTBI ในพลาสมาอาจมีส่วนทำให้ผู้ป่วยติดเชื้อได้ง่าย และทำให้การทำหน้าที่ของเซลล์เอนโดทิลเลียมบริเวณหลอดเลือดคอบกพร่อง นอกจากนี้ยังส่งผลให้ปริมาณสาร antioxidant จำพวกวิตามินอีและ glutathione ในร่างกายมีปริมาณลดลง ปัจจุบันธาตุเหล็ก NTBI ได้รับความสนใจในแง่ที่เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ที่สัมพันธ์กับภาวะธาตุเหล็กเกินและใช้เป็นตัวติดตามสัมฤทธิ์ผลของการรักษาภาวะเหล็กเกินในผู้ป่วยที่ได้รับยาขับเหล็ก

curcumin นอกจากจะมีคุณสมบัติเป็น antioxidant แล้ว ยังมีโครงสร้างที่อาจจะจับธาตุเหล็ก (iron-chelating activity) เพราะมี β -diketo moiety ซึ่งสามารถจับเหล็ก ferric ion (Fe^{+3}) ได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาวิจัยคุณสมบัติของ curcumin ในการจับธาตุเหล็กจากพลาสมามาก่อน ในรายงานนี้จึงได้ร่วมกับ ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทำการวิจัยเพื่อศึกษาคุณสมบัติของ curcumin ในการจับธาตุเหล็กและทำการวิจัยเพื่อตรวจวัดคุณสมบัติของสารสกัดชาเขียว (catechin) ในการดึงและลดปริมาณธาตุเหล็ก NTBI ในซีรัมของผู้ป่วยและตรวจวัดความสามารถของสารสกัดชาเขียวในการลดปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดงของคนปกติที่ถูกกระตุ้นด้วยซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียชนิด β -thalassemia

4.4 Antisense therapy และการใช้ siRNA

เนื่องจากมีวเตชัน (mutation) ที่เกิดขึ้นบนยีนเบต้าโกลบินบางชนิด เช่น IVSI-5, G->C; IVSII-654, C->T รวมทั้ง β^E ส่งผลให้เกิดมี abnormal splicing ขึ้นในกระบวนการ mRNA processing โดยวเตชันเหล่านี้จะไปกระตุ้น cryptic splice site ที่อยู่ใกล้เคียง ทำให้มีการสร้าง mRNA ที่ผิดปกติและมีการสร้างสายเบต้าโกลบินลดลง การรักษาผู้ป่วยที่มีวเตชันดังกล่าวที่มีความเป็นไปได้และมีการศึกษาวิจัยอยู่ในขณะนี้คือการเข้าไปสกัดกั้น (block) abnormal splicing ด้วยชิ้นส่วนของ DNA ขนาดเล็ก (antisense DNA) ที่สังเคราะห์ขึ้นในหลอดทดลอง เนื่องจากมีวเตชันเหล่านี้พบได้บ่อยในคนไทย จึงได้ริเริ่มงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง โดยมี ดร.มล.เสาวรส สวัสดิวัฒน์ เป็นหัวหน้ารับผิดชอบ และจะทำการวิจัยร่วมกับ Professor Ryszard Kole ที่มหาวิทยาลัย North Carolina ประเทศสหรัฐอเมริกา

สำหรับ siRNA (small interference RNA) เป็นเทคนิคในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับ RNA (posttranscription) ถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยในหลากหลายสาขา โดยการสังเคราะห์ RNA สายคู่สั้น ๆ ประมาณ 20 bp ที่มีลำดับเบสคู่สมกับเบส (complementary) ใน mRNA ซึ่งจะส่งผลให้ mRNA เส้น

นั้นถูกทำลายไปและไม่สามารถสร้างโปรตีนได้ การนำเทคนิค siRNA มาใช้ยับยั้งการสร้างอัลฟาโกลบินในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้เกิดสมดุลระหว่างสายอัลฟาและเบต้าโกลบินในเม็ดเลือดแดงมากขึ้น ซึ่งจะช่วยลดพยาธิสภาพที่เกิดกับเม็ดเลือดแดงอันเนื่องมาจากสายอัลฟาโกลบินที่ไม่มีคู่ ทำให้ความรุนแรงของการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลง งานวิจัยเบื้องต้นในส่วนนี้ทำโดย รศ.ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยได้รับความอนุเคราะห์ siRNA จาก Dr. Koichiro Muta จาก Kyushu University เมือง Fukuoka ประเทศญี่ปุ่น

5. การสร้าง transgenic mice

โครงการวิจัยนี้ เป็นความพยายามที่จะสร้างหนู ที่ได้มีการสอดใส่ยีนเบต้าธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในคนไทยและจีนโกลบิน อี เข้าไป โดยคาดหวังว่าหนู β -thalassemia/Hb E ที่สร้างขึ้นมา จะใช้เป็นโมเดลในการทดสอบยาที่ใช้ในการกระตุ้นให้มีการสร้างฮีโมโกลบิน เอ็ฟ หรือการทดสอบ antisense therapy และถ้าเราสามารถเอาหนูที่มียีน β -thalassemia/Hb E สอดใส่อยู่ไปผสมพันธุ์กับหนูที่มีการ knockout เอายีนที่ควบคุมการสร้างเบต้าโกลบินของหนูออกไปแล้ว ก็อาจจะได้หนูที่มีความผิดปกติต่าง ๆ คล้ายคลึงกับที่พบในคน (คือ หนูที่เป็น β -thalassemia/Hb E transgenic/knockout mice) เพื่อนำไปใช้ศึกษาทางด้านพยาธิสรีรวิทยา ตลอดจนอาจนำมาใช้ศึกษาเกี่ยวกับภาวะเหล็กเกิน (iron overload) และการรักษาด้วย gene therapy ต่อไป งานวิจัยนี้ทำร่วมกับ Associate Professor Dr. Panos Ioannou, Murdoch Institute, Melbourne University ประเทศออสเตรเลีย

6. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A) และเภสัชจลนศาสตร์ของยา พาราเซตามอล ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

เนื่องจากผู้ป่วย β -thalassemia/HbE จำเป็นต้องใช้ยาหลายชนิดในการรักษาและบรรเทาอาการต่าง ๆ เช่น ยาขับเหล็กส่วนเกิน ยาทางระบบหัวใจและหลอดเลือด ยาปฏิชีวนะ ยาแก้ปวด เป็นต้น ยาดังกล่าวจะถูกดูดซึม ย่อยสลายและกำจัดยาให้หมดฤทธิ์และขับออกจากร่างกายต่อไป ด้วยกระบวนการต่าง ๆ อาทิ กระบวนการ glucuronidation โดยเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase (UGTs) แต่ธรรมชาติของเอนไซม์ชุดนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphisms) ค่อนข้างสูง ผู้ป่วยที่มีภาวะบิลิรูบินในเลือดสูง (hyperbilirubinemia) เช่น ผู้ป่วย Gilbert's syndrome เอนไซม์ที่กำจัดบิลิรูบินคือ UDP-glucuronosyl-transferase (UGT1A1) ทำหน้าที่ลดลง เนื่องจากยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์มีจำนวนซ้ำของนิวคลีโอไทด์ TA (TA repeats) ที่ promoter ของ UGT1A1 gene แตกต่างกัน การศึกษาต่อมาพบว่าความหลากหลายของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ UGT1A1 มีความเกี่ยวข้องกับความหลากหลายของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ UGT1A ในรูปอื่น (isoform) ด้วย เช่น UGT1A6 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญใน

การเปลี่ยนแปลงสารและยาหลายชนิด เช่น ยาพาราเซตามอลและยาที่มีโครงสร้างแบบฟีนอล เป็นต้น และความผิดปกติดังกล่าวมักพบบริเวณ coding region ของ UGT1A6 (T181A, R184S)

ในประเทศไทย ยังไม่มีการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาที่ใช้บ่อยในผู้ป่วยธาลัสซีเมียอย่างมีระบบ แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ ใช้แบบแผนการให้ยาในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเช่นเดียวกับคนไขอื่น ๆ ซึ่งอาจทำให้การรักษาไม่เกิดประสิทธิภาพเท่าที่ควร คณะผู้วิจัยร่วมกับ ดร.อุดม จันทารักษ์ศรี ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จึงได้เริ่มทำการศึกษา เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นทางเภสัชจลนศาสตร์ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยใช้ยาสามัญประจำบ้าน เช่น พาราเซตามอล เป็นยาดันแบบควบคู่ไปกับการติดตามระดับบิลิรูบินในเลือด (endogenous substrate)

7. การผลิตแอนติบอดีเพื่องานวิจัยและวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย

ในปัจจุบันการตรวจหาพาหะของ อัลฟาธาลัสซีเมีย ทำได้ค่อนข้างแม่นยำ โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) แต่วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูงและอาจจะไม่เหมาะในการ screen หาผู้ป่วยหรือพาหะจำนวนมาก เมื่อแรกคลอดการตรวจหาปริมาณฮีโมโกลบินบาร์ท (Hb Bart's) สามารถใช้เป็นข้อบ่งชี้ของอัลฟาธาลัสซีเมียได้คร่าว ๆ แต่เมื่อการแสดงออกของยีนแกมมาโกลบินหยุดลง จะไม่สามารถตรวจพบ Hb Bart's ได้ ทั้งโดยวิธี electrophoresis และ column chromatography เดิมมีรายงานการใช้แอนติบอดีต่อ Hb Bart's มาตรวจหาพาหะของอัลฟาธาลัสซีเมีย โดยเทคนิค capillary tube precipitin test แต่ก็พบว่าวิธีดังกล่าวไม่ sensitive และ specific เพียงพอ การวิจัยครั้งนี้ จึงร่วมกับ ศ.มรว. ชัยณัฐร สวัสดิวัฒน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลและศ.ดร.วัชร กสิณฤกษ์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการสกัดแยก Hb Bart's จากเลือดของทารกที่เสียชีวิตเมื่อแรกคลอด แล้วนำไปสร้างแอนติบอดีในแม่ไก่ โดย IgY technology ซึ่งเป็นการวิจัยเป็นครั้งแรกในโลก เราสามารถเก็บไข่ไก่เพื่อศึกษาการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ Hb Bart's ได้ โดยการแยก IgY ออกจาก egg yolk แล้วทำปฏิกิริยากับ hemoglobin และ globin chain ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นแอนติเจน โดยใช้เทคนิค indirect ELISA

2. วัตถุประสงค์

- ก. การศึกษาเพื่อให้เข้าใจความผิดปกติที่เป็นสาเหตุของอัลฟาและเบต้าธาลัสซีเมียชนิดใหม่ ๆ
- ข. การศึกษาคุณสมบัติของเม็ดเลือดแดงและพลาสิรัรวิทยา
- ค. การศึกษาที่จะหาแนวทางในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น
- ง. การสร้างหนูที่มียีนธาลัสซีเมียของคนสอดใส่อยู่และสร้างหนู β -thalassemia/Hb E เพื่อนำมาใช้เป็นสัตว์ตัวอย่างในการศึกษาที่ไม่สามารถจะทำในผู้ป่วยได้ เช่น การทดสอบทางด้าน gene therapy

3. กิจกรรมที่ได้ดำเนินการ

3.1 การศึกษาความผิดปกติในระดับโมเลกุลในกลุ่มผู้ป่วยที่มีฮีโมโกลบิน เอ็ฟ สูงผิดปกติ

การสร้างฮีโมโกลบินเอ็ฟ (hemoglobin F, Hb F) โดยทั่วไปจะเกิดขึ้นเมื่อทารกอยู่ในครรภ์ โดย Hb F มีโครงสร้างทางโมเลกุลเป็น $\alpha_2\gamma_2$ เมื่อใกล้คลอดการสังเคราะห์ γ -globin chain เริ่มลดลงและมี β -globin chain ขึ้นมาแทนที่ จนภายหลังคลอดเมื่อทารกอายุประมาณ 1 ปี จะพบ Hb F ประมาณร้อยละ 1 เท่านั้น แต่ถ้ามีความผิดปกติของฮีโมโกลบินที่อยู่ในกลุ่ม β -globin gene cluster โดยเฉพาะการแห้วหายไของ β , δ และ γ -globin หรือมีวเตชั่นที่เกิดขึ้นในบริเวณ promoter ของ γ -globin gene จะทำให้ยังคงมีการสร้าง γ -globin chain และ Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) เช่นเดียวกับในระยะที่เป็นทารก โดยจะพบมี Hb F ประมาณร้อยละ 10-30 ภาวะที่มีการสร้าง Hb F ในผู้ใหญ่เรียกว่า Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) ผู้ที่เป็น HPFH ไม่มีอาการผิดปกติทางคลินิก แม้แต่ผู้ที่เป็น homozygote หรือผู้ที่มีปฏิกัมพันธ์กับยีน β -thalassemia หรือ Hb E ก็ไม่มีอาการผิดปกติ แต่อาจพบความไม่สมดุลของการสร้าง α - และ non α -globin

3.1.1 การศึกษาอนุชีววิทยาของ SEA-HPFH

ในประเทศไทยมีรายงานการพบ HPFH ไม่กี่รายงาน งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยครอบครัวที่ถูกส่งมาปรึกษา เพราะตรวจพบมีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงและมีระดับของ Hb F สูงกว่าคนปกติ 6 ครอบครัว เมื่อตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ Hb A₂ และ Hb F ดูการกระจายของเม็ดเลือดแดงที่มี Hb F ด้วยการย้อมสี (ตารางที่ 1) พบว่า

1) $G\gamma/A\gamma$ globin ratio ตรวจโดยใช้เทคนิคการแยกสายโกลบินด้วย polyacrylamide gel electrophoresis พบว่า subject ทุกรายมีค่า $G\gamma$ มากกว่า $A\gamma$ -globin chain

2) F-cell distribution คนปกติพบเม็ดเลือดแดงที่มี Hb F (F-cell) น้อย ประมาณร้อยละ 1-8 เท่านั้น แต่ในผู้ป่วยที่ศึกษาพบมี F-cell มากขึ้นและบางรายพบว่าเม็ดเลือดแดงทุกเม็ดเป็น F-cell (pancellular)

เมื่อสกัด DNA และทำการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ PCR technique เพื่อตรวจหาไมวเตชั่นชนิดที่เคยพบแล้วในคนไทย แต่ตรวจไม่พบความผิดปกติเหล่านี้ ได้แก่

- β -thalassemia ใช้เทคนิค reverse dot blot hybridization
- HPFH ชนิดต่างๆ เช่น HPFH-6 Thai type, Vietnamese type
- Chinese $G\gamma(A\gamma\delta\beta)^0$ -thalassemia
- Hb Lepore

จึงได้ทำการศึกษาต่อ ดังนี้

1. Haplotype analysis เป็นการศึกษารูปแบบของ single nucleotide polymorphism ที่เกิดขึ้นบน β -globin gene cluster ในตำแหน่งต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค PCR และ restriction enzyme จำเพาะได้แก่

- บริเวณ -158 nt จาก γ -globin gene ตัดด้วยเอนไซม์ *XmnI*
- ϵ -globin gene ตัดด้วยเอนไซม์ *HincII*
- γ -globin gene ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII*
- γ^A -globin gene ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII*
- $\psi\beta$ -globin gene ตัดด้วยเอนไซม์ *HincII*
- 3' $\psi\beta$ -globin gene ตัดด้วยเอนไซม์ *HincII*
- β -globin gene ตัดด้วยเอนไซม์ *AvaII*
- 3' β -globin gene ตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI*

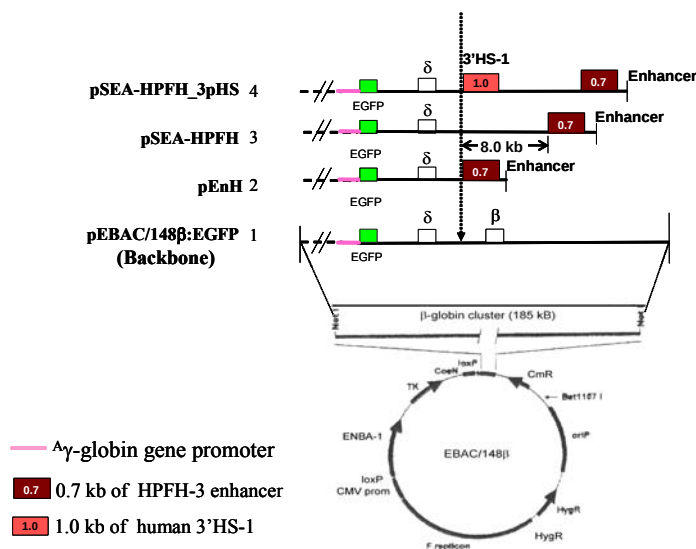
ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ค่าฮีโมโกลบิน ชนิดการผ่าเหล่าของ β -globin gene และ haplotype analysis ในผู้ป่วย 2 ครอบครัวที่ตรวจพบว่ามีฮีโมโกลบินเอ็ฟ สูงผิดปกติ

Analysis	Sex/Age (year)	Hb (g/dL)	MCV (fL)	Hb Typing	HbF (%)	HbA ₂ (%)	β -globin genotype	Haplotype *
Family A								
Son	M/14	12.1	59	EF	47.5	(E)45.4	- /E	+,--++,oo** -,+--+,,++
Father	M/37	11.7	65	EFA	2.6	(E)93.0	E/E	Not done
<u>Mother</u>	F/37	9.2	83	A ₂ FA	30.4	3.4	- /N	+,--++,oo** -,+----,++
Family B								
<u>Son</u>	M/25	12.8	76	A ₂ F	96.4	3.6	- / 35	+,--++,oo** -,+----,++
Father	M/48	11.5	66	A ₂ FA	2.1	5.6	N / 35	-,+----,++ -,+----,++
Mother	F/45	14.4	83	A ₂ FA	15.1	3.0	- / N	+,--++,oo** -,+----,++

หมายเหตุ: *แสดงแบบแผนของ DNA polymorphism บน β -globin gene cluster, +, ถูกตัดได้ด้วย restriction enzyme; -, ไม่ถูกตัดด้วย restriction enzyme **oo, แสดงว่า DNA บริเวณ β -globin gene อาจจะแห้วหายไปหรือมี polymorphism เป็น ++ เช่นเดียวกับ allele บนโครโมโซมอีกข้างหนึ่ง

2. Southern blot hybridization เพื่อตรวจหาการเกิด deletion โดยใช้ restriction enzyme ตัดจำเพาะเข้าไปย่อย DNA ของตัวอย่างและตรวจสอบด้วย DNA probe เพื่อเปรียบเทียบขนาดของ DNA fragment ที่ได้กับผลในคนปกติ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ พัฒนาการสร้าง DNA probe ซึ่งแต่เดิมมักจะเตรียมโดยการสร้าง recombinant DNA ที่เกิดจากการสอดใส่ยีนที่ต้องการศึกษาเข้าไปใน พลาสมิดของแบคทีเรีย เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียก็จะได้ recombinant DNA เพิ่มมากขึ้นทำให้สกัดเฉพาะส่วน DNA ที่ต้องการศึกษาและนำมาใช้เป็น DNA probe ได้ จะเห็นว่าเทคนิคดังกล่าวค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลานานในการเตรียม DNA probe ในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการเตรียม DNA probe โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มจำนวน DNA ที่มีลำดับของเบสปกติในบริเวณที่ต้องการใช้เป็นตัวตรวจสอบ (เช่น บางส่วนของ β -globin gene หรือ γ -globin gene) และในปฏิกิริยา PCR นั้นได้ incorporate DIG-11-dUTP เข้าไปด้วย ทำให้สามารถตรวจสอบ hybridization ที่เกิดขึ้นโดยใช้ DIG-alkaline phosphatase ซึ่งเป็นสารปลอดรังสี เทคนิคนี้มีประโยชน์มากเพราะไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี (^{32}P) ทำให้เกิดความปลอดภัยกับผู้วิจัยและเพื่อนร่วมงาน ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะและเสียค่าใช้จ่ายน้อยลง เพราะไม่ต้องรอส่ง ^{32}P มาใช้ในแต่ละครั้งที่ทำการทดลอง

3. การศึกษา γ -globin gene expression โดยการทำให้ transient transfection BAC constructs เข้าไปใน erythroleukemia cell line (K562) การสร้าง construct ใช้ plasmid EBAC/148 β ซึ่งเป็น BAC shuttle vector ที่มี β -globin gene cluster (70 kb) แล้วแทนที่ γ -globin gene coding region ด้วย EGFP/kanamycin cassette จะได้ pEBAC/148 β :EGFP ทำให้สามารถตรวจวัดการแสดงออกของ γ -globin gene โดยการตรวจวัดการแสดงออกของ EGFP ซึ่งตรวจสอบได้โดยใช้ flow cytometer นอกจากนั้น ยังใช้ plasmid นี้เป็น backbone ในการสร้าง constructs อีก 3 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย (1) 0.7 kb HPFH-3 core enhancer ที่ 5' breakpoint ของ SEA-HPFH (pEnH) (2) ~8.7 kb downstream 3' breakpoint ของ SEA-HPFH ซึ่งต่อด้วย 0.7 kb HPFH-3 core enhancer (pSEA-HPFH) และ (3) pSEA-HPFH ที่มี 1.0 kb human 3' HS-1 sequence คั่นก่อนตำแหน่ง 3' breakpoint sequence ของ SEA-HPFH (pSEA-HPFH_3pHS) ดังแสดงในรูปที่ 1 เมื่อได้ construct ทั้ง 4 ชนิด จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออก EGFP หลังจาก transient transfection เข้าไปใน K562 ที่เวลา 2 วัน และ 40 วันตามลำดับ



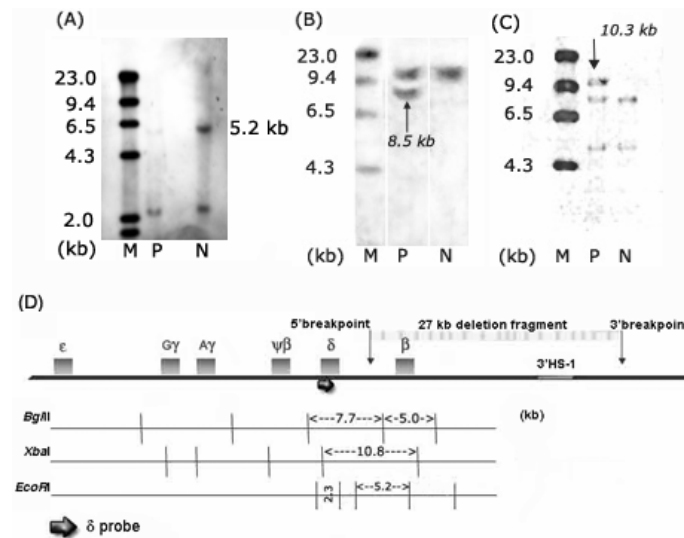
รูปที่ 1 EGFP modified EBAC constructs ที่มีส่วนของ 3' end แตกต่างกัน

ผลการศึกษา

Southern blot hybridization แสดงให้เห็นความผิดปกติที่มีสาเหตุจากยีนแหว่งในผู้ป่วยครอบครัวที่ 1 (Family A) เมื่อย่อย DNA ผู้ป่วยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* II และ *Xba* I และทำ hybridization กับ δ -globin gene probe (รูปที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบ DNA mapping ที่ได้กับรายงานที่เคยมีมาก่อนในต่างประเทศ พบว่า DNA fragment ที่ผิดปกตินั้นน่าจะเกิดจากการแหว่งของเนื้อ DNA ขนาด 27 kb ซึ่งเรียกว่า **SEA-HPFH type** จึงได้ใช้เทคนิค Gap-PCR เพื่อเป็น diagnostic method ไปตรวจสอบมิวเตชันใน ผู้ป่วยอีก 5 ครอบครัว พบว่าผู้ป่วย Family B เกิดจากมิวเตชันที่มียีนแหว่งหายไป 27 kb เช่นเดียวกัน

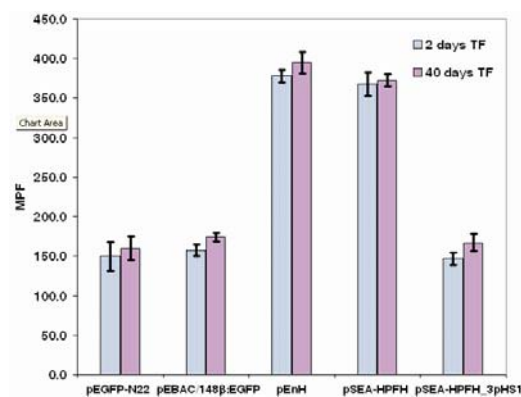
DNA sequencing บริเวณ breakpoint พบว่า 5' breakpoint อยู่ระหว่างนิวคลีโอไทด์ 986 และ 987 ทางด้าน upstream ของ β -globin gene และ 3' breakpoint อยู่ห่างจากตำแหน่ง 3' HS 1 ไปทาง downstream อีก 2.3 kb

ปัจจัยที่ทำให้มีการสร้าง HbF สูง อาจเกิดจากยีนส่วน 3'-enhancer ซึ่งพบอยู่ห่างจาก breakpoint ด้าน 3' ประมาณ 3-4 kb เมื่อเกิด deletion ของยีน β -globin ทำให้บริเวณ 3'-enhancer เข้ามาใกล้ยีน γ -globin จึงช่วยให้มีการผลิต γ globin chain มากขึ้น อีกปัจจัยหนึ่งซึ่งอาจเกิดร่วมกับปัจจัยแรก ได้แก่ การขาดหายไปของ 3'HS-1 ซึ่งพบว่าเป็น insulator คั่นประมาณ 20 kb ด้าน 3' จาก β -globin gene เพื่อกันไม่ให้มี interaction ระหว่างการผลิต β -globin กับ ยีนส่วนของยีนหลัง 3'HS-1



รูปที่ 2 Southern blot hybridization แสดงให้เห็นความผิดปกติที่มีสาเหตุจากยีนแหว่ง เมื่อย่อย DNA ผู้ป่วย ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* II (C) และ *Xba* I (B) และทำ hybridization กับ δ -globin gene probe

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออก EGFP หลังจากทำ transient transfection ของ BAC constructs ชนิดต่าง ๆ ที่สร้างขึ้น เข้าไปใน K562 แล้ววัด EGFP ในวันที่ 2 และ 40 ตามลำดับ พบว่าค่า Median peak fluorescence (MPF) ที่ได้จาก พลาสมิด ที่มีเฉพาะส่วนของ 0.7 kb HPFH-3 core enhancer (pEnH) และ พลาสมิด ที่เลียนแบบ SEA-HPFH ซึ่งมี 0.7 kb HPFH-3 core enhancer อยู่ข้างท้าย (pSEA-HPFH) มีค่าสูงกว่า พลาสมิด ที่มี 3' HS-1 sequence คั่นก่อนตำแหน่ง 3' breakpoint sequence ของ SEA-HPFH (pSEA-HPFH_3pHS) ประมาณ 2-3 เท่า (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงค่า median peak fluorescence (MPF) ของ EGFP expression หลังจากทำ transient transfection ของ BAC constructs ชนิดต่าง ๆ เข้าไปใน K562

ผลการศึกษาสนับสนุนสมมติฐานว่า การสร้าง HbF ที่สูงขึ้นในผู้ใหญ่ที่เป็น HPFH เกิดจากการ deletion ของยีน β -globin ร่วมกับการขาดหายไปของ 3'HS-1 ซึ่งเป็น insulator กันไม่ให้มี interaction ระหว่างการผลิต β -globin กับ enhancer sequence หลัง 3'HS-1 เมื่อมี deletion เกิดขึ้น DNA บริเวณ 3'-enhancer ถูกนำเข้ามาใกล้ยีน γ -globin จึงช่วยให้มีการแสดงออก γ globin gene และสร้าง Hb F มากขึ้น

3.1.2 การตรวจพบ $(\delta\beta)^0$ -thalassemia ชนิดใหม่ในคนไทยโดยการศึกษาในระดับโมเลกุล

ในงานวิจัยเพื่อหาปัจจัยทางพันธุกรรมที่ทำให้ผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E มีอาการรุนแรงแตกต่างกัน พบผู้ป่วยรายหนึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค β -thalassemia/Hb E เนื่องจากมี Hb typing เป็น E+F มีอาการซีดเล็กน้อย การเจริญเติบโตปกติและไม่พบตับม้ามโต เมื่อทำการศึกษาเลือดของบิดาไม่พบลักษณะของพาหะ β -thalassemia โดยพบว่าบิดามีปริมาณ Hb A₂ ปกติ แต่มีปริมาณ Hb F 23.2% เซลล์เม็ดเลือดแดงมีลักษณะ microcyte และ hypochromia มีค่า $^G\gamma$ -globin chain ต่ำกว่าปกติเล็กน้อยคือ 34.7% (ตารางที่ 2) ดังนั้น ความผิดปกติที่พบในครอบครัวนี้น่าจะเป็น $(\delta\beta)^0$ -thalassemia จึงได้ทำการศึกษาเพื่อหาชนิดของมิวเตชันต่อไป

ตารางที่ 2 ค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ป่วย $(\delta\beta)^0$ -thalassemia และครอบครัว

	Father	Mother	Propositus	Sister
Sex and Age	M	F	F/13	F/18
RBC ($10^{12}/L$)	5.35	4.17	6.03	5.58
Hb (g/dl)	13.4	11.9	12.2	12.1
Hct (%)	39.9	35.8	34.7	34.8
MCV (fl)	74.6	85.9	57.6	62.4
MCH (pg)	25.1	28.4	20.2	21.6
MCHC (g/dl)	33.7	33.1	35.2	34.6
RDW (%)	18.9	13.7	18.2	18.4
Hb A ₂ (E) (%)	2.7	31.1	49.9	53.0
Hb F (%)	23.2	0.9	45.6	42.3
$^G\gamma/^{G\gamma}+^A\gamma$ (%)	34.7	N.D.	46.4	46.1
-158 $^G\gamma$ XmnI	-/-	N.D.	+/-	N.D.

วิธีการศึกษา

ขั้นแรกทำการศึกษา haplotype บน β -globin gene cluster โดยใช้เทคนิค PCR แล้วตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตรวจหาว่า DNA ของผู้ป่วยบริเวณใดที่เป็น heterozygote พบว่า DNA ของผู้ป่วยตำแหน่ง γ /HindIII, $\phi\beta$ /HincII, 3' β /HinfI และ 3' β /BamHI เป็น heterozygous (รูปที่ 4A) แสดงว่าความผิดปกติของยีนน่าจะเกิดจาก gene deletion และตำแหน่งที่เกิดการขาดหายไปของ DNA ควรอยู่ระหว่าง $\phi\beta$ -globin gene และ 3' β -globin gene

ในการศึกษานี้ ได้ใช้วิธีใหม่ในการตรวจหาตำแหน่งของ breakpoint ของการแห้วหายของ DNA จากเดิมที่ใช้วิธี Southern blot hybridization ซึ่งทำได้ลำบากและใช้เวลานาน วิธีใหม่นี้อาศัยข้อดีของเอ็นไซม์ DNA polymerase ชนิดใหม่ คือ Phusion™ DNA polymerase (Finnzyme, Finland) ที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ที่มีขนาดยาว ๆ ที่ล้อมรอบบริเวณที่แห้วหายไปของ DNA ได้

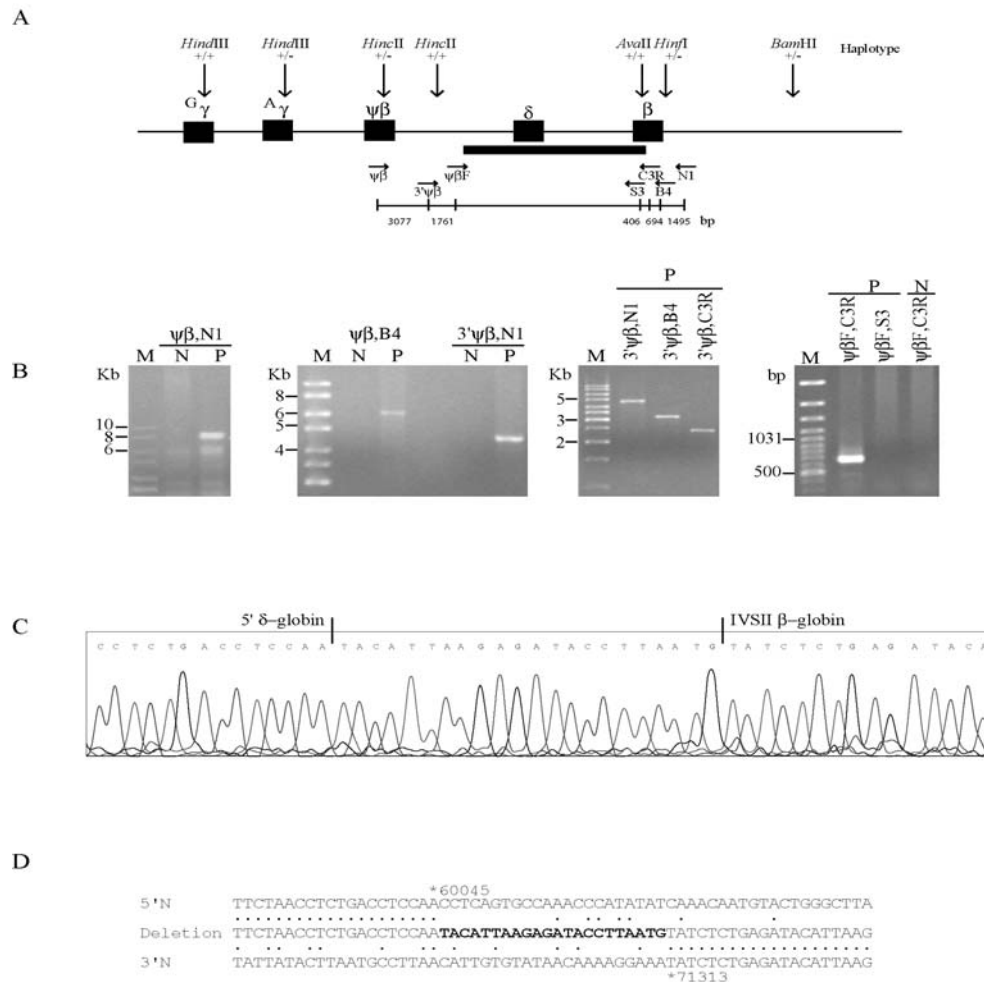
ผลการศึกษา

เริ่มต้นใช้ primer $\phi\beta$ และ N1 ซึ่งอยู่ upstream และ downstream ของตำแหน่ง heterozygote ที่ $\phi\beta$ /HincII และ 3' β /HinfI ตามลำดับ ซึ่งในคนปกติตำแหน่งของ primer ทั้งสองอยู่ห่างกัน 18.9 kb พบว่าชิ้น PCR ที่ได้จาก DNA ของผู้ป่วยมีขนาด 7.6 kb ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าปกติ 11.3 kb เพื่อยืนยันขนาดของ DNA ที่แห้วหายไป จึงทำ PCR โดยใช้ sense strand primer 3' $\phi\beta$, $\phi\beta$ F ที่อยู่ downstream ของ primer $\phi\beta$ และ antisense strand primer B4, C3R, S3 ซึ่งอยู่ upstream ของ primer N1 พบว่าชิ้นของ PCR product ที่ได้มีขนาดเล็กลงจากขนาดที่คาดว่าจะได้จากคนปกติ 11.3 kb (รูปที่ 4B) แสดงว่าการแห้วหายไปของ DNA มีขนาดประมาณ 11.3 kb และเมื่อทำ PCR ด้วย primer S3 ไม่มี PCR product เกิดขึ้น แสดงว่าตำแหน่งของ primer S3 อยู่ในบริเวณที่ DNA ขาดหายไป

เพื่อหาตำแหน่ง breakpoint จึงทำการศึกษาโดยทำ DNA sequencing พบว่าคนไข้มี DNA ขาดหายไป 11,269 kb โดยตำแหน่ง 5' breakpoint อยู่ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 60045 (NG_000007) ประมาณ 3.1 kb 5' ของยีน δ -globin และตำแหน่ง 3' breakpoint อยู่ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 71313 ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่ 274 ใน intron 2 ของยีน β -globin และมี 22 orphan nucleotide แทรกเข้ามา (รูปที่ 4C, 4D)

การแห้วหายไปของ DNA ที่ทำให้เกิด ($\delta\beta$)^o-thalassemia ในครอบครัวนี้ ยังไม่เคยมีรายงานการค้นพบมาก่อน แต่มีรายงานว่า DNA บริเวณประมาณ 2.3-4 kb upstream ของยีน δ -globin ซึ่งเป็น DNA ส่วนที่ขาดหายไปทางด้าน 5' ในผู้ป่วยรายนี้มี negative regulatory effect คือเป็น silencer ของทั้ง γ และ β -globin promoter และบริเวณ 3' β -globin มี DNA ที่เป็น enhancer อยู่ 2 แห่ง คือ DNA ส่วนที่อยู่ภายใน intron 2 ของยีน β -globin และอีกแห่งหนึ่งอยู่ทางด้าน 3' β -globin บริเวณที่เลยจาก poly A site การที่ผู้ป่วยมี DNA ขาดหายไปถึง 11.3 kb ทำให้ส่วนของ DNA ที่เป็น enhancer ในบริเวณนี้ ถูกนำเข้ามาใกล้กับยีน γ -

globin ประกอบกับ DNA ส่วนที่เป็น silencer ที่ขาดหายไปด้วย จึงน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการสร้าง Hb F เพิ่มขึ้น ซึ่งผู้วิจัยกำลังศึกษาเพื่อยืนยันสมมติฐานดังกล่าวอยู่



รูปที่ 4 (A) β -globin cluster แสดงตำแหน่งของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะและ haplotype ของผู้ป่วย ตำแหน่งของ primer และระยะห่างของ primer ตำแหน่งของ DNA ที่ขาดหายไปแสดงด้วยแท่งสีดำ (B) PCR product ที่ได้จาก primer ต่าง ๆ ที่ครอบคลุมบริเวณที่มีการแห้วหายไปของ DNA; N และ P คือ PCR product จาก DNA คนปกติและผู้ป่วยตามลำดับ (C) DNA sequencing ของบริเวณ breakpoint ของ $(\delta\beta)^0$ -thalassemia deletion (D) ลำดับเบสของ DNA ของผู้ป่วยบริเวณ breakpoint (deletion) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของคนปกติบริเวณ 5' breakpoint (5' N) และ 3' breakpoint (3' N) ตัวอักษรเข้มแสดง orphan nucleotide ที่แทรกเข้ามา

3.2 การศึกษาคุณสมบัติของ red cell vesicles และ microparticles

ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยเฉพาะรายที่ตัดม้ามแล้ว ขณะที่เม็ดเลือดแดงไหลอยู่ในกระแสเลือด อาจมีเศษเล็ก ๆ ของเม็ดเลือดแดง (red cell vesicles) หลุดออกมาโดยกระบวนการ vesiculation อยู่ในกระแสเลือด (peripheral blood) ผิวนอกของ vesicle มีส่วนประกอบทางเคมีที่ประกอบไปด้วยโมเลกุลที่สำคัญหลายชนิด เช่น immunoglobulin และ phosphatidylserine (PS) ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้จะไปกระตุ้นการทำงานของระบบอื่น ๆ ในร่างกาย เช่น ระบบการแข็งตัวของเลือดและ complement system ทำให้เกิดพยาธิสรีรวิทยาและความผิดปกติอื่นตามมา เนื่องจาก red cell vesicles เหล่านี้มีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงปกติและอาจมีขนาดเล็กเท่าเกร็ดเลือด (platelet) ทำให้เกิดปัญหาในการวัดจำนวน คณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิคเพื่อแยก red cell vesicles ออกจากเกร็ดเลือด โดยใช้เทคนิค two-color flow cytometric immunostaining method โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะที่ติดฉลากกับสารเรืองแสงเข้าไปจับยึดกับเซลล์ คือ

- Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-glycophorin A (Dako, Denmark) จะจับกับเม็ดเลือดแดงและ red cell vesicles
- fluorescent isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD41 antibody (Becton Dickinson Biosciences, CA) จะจับกับเกร็ดเลือด

วิธีนี้ทำให้สามารถวัด (quantitation) absolute number ของ red cell vesicles ได้เป็นครั้งแรก โดยการเปรียบเทียบกับจำนวนของ fluorescent TrueCount bead (Becton Dickinson Biosciences, CA)

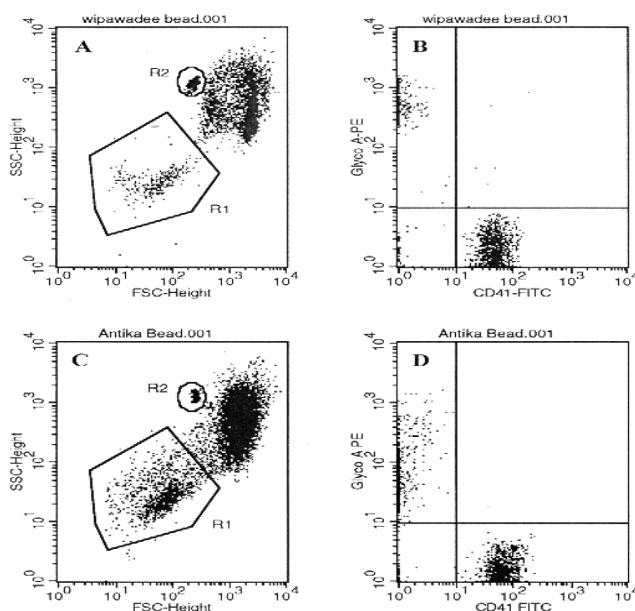
ความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จะนำไปสู่ปัญหาชนิดเรื้อรังและภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ เช่น การอุดตันในเส้นเลือดที่ปอด ภาวะติดเชื้อง่ายและการมีเหล็กเกิน เม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติมีผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง โมเลกุลของ phosphatidylserine (PS) ซึ่งปกติอยู่ที่ด้านในของผนังเม็ดเลือดแดง จะเปลี่ยนตำแหน่งจากด้านในเยื่อหุ้มเซลล์ไปอยู่บนผิวด้านนอกและจะไปกระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือดได้ นอกจากนั้นยังพบ PS ได้บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ red blood cell vesicle ด้วย ปัจจุบันมีการศึกษาถึงความสำคัญของ PS ในหลาย ๆ โรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางด้านการแข็งตัวของเลือด ซึ่งแหล่งของ PS ที่สำคัญคือ ไมโครพาร์ติเคิล (microparticles)

ไมโครพาร์ติเคิล คือ อนุภาคขนาดเล็กที่หลุดมาจากผนังเซลล์ที่ถูกกระตุ้นหรือจากเซลล์ที่กำลังจะเกิด apoptosis แต่มีขนาดเล็กกว่า vesicles การเกิดไมโครพาร์ติเคิลนั้นเหมือนกับการเกิด vesicles กล่าวคือ อาจเกิดจาก activation ของเซลล์ชนิดต่าง ๆ หรือเกิดจาก apoptosis หรือการที่มีการเพิ่ม calcium ภายในเซลล์ บนผิวของไมโครพาร์ติเคิลจะมี PS ปรากฏอยู่และ PS นี้สามารถกระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือดได้ มีรายงานว่าผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงของการอุดตันของเส้นเลือดจากภาวะ thrombosis มีปริมาณของไมโครพาร์ติเคิลสูง แต่ยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ซึ่งมีรายงานภาวะ thrombosis รวมถึง

activation ของเซลล์ต่าง ๆ ในเลือด ซึ่งอาจก่อให้เกิดไมโครพาร์ติเคิลได้ การศึกษาครั้งนี้ นอกจากจะวัดปริมาณของไมโครพาร์ติเคิลแล้วยังได้ตรวจวิเคราะห์ เพื่อหาชนิดเซลล์ต้นกำเนิดของไมโครพาร์ติเคิลด้วย ผลการศึกษา

3.2.1 การวัดปริมาณ (quantitation) ของ absolute number ของ red cell vesicles

phycoerythrin (PE)-conjugated anti-glycophorin A มีคุณสมบัติจับกับเม็ดเลือดแดงและ red cell vesicles ส่วน fluorescent isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD41 จะจับกับเกร็ดเลือด เมื่อผสมแอนติบอดีทั้งสองชนิดใส่ในหลอดที่มี fluorescent TrueCount bead ที่รู้จำนวนและนำไปวัดด้วยเครื่อง FACSsort โดยการ excite เซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยแสงที่มีความยาวคลื่น 488 nm จาก argon ion laser 15 mW เซลล์เม็ดเลือดแดง, red cell vesicles และ TrueCount beads จะถูกแยกออกจากกันตามขนาด โดยดูจากสัญญาณใน forward light scatter (FSC) และ side light scatter (SSC) (รูปที่ 5A, 5C) red cell vesicles จะอยู่ในบริเวณกลุ่ม R1 เช่นเดียวกับเกร็ดเลือดเพราะมีขนาดใกล้เคียงกัน ส่วน TrueCount beads (R2) จะมีขนาดใหญ่กว่าและแยก red cell vesicles จากเกร็ดเลือดได้จากการติดสี fluorescent คือ red cell vesicles จะจับกับ anti-glycophorin A ทำให้เห็นเป็นสีแดง ส่วนเกร็ดเลือดจับกับ anti-CD41 ทำให้เห็นเป็นสีเขียวของ FITC (รูปที่ 5B, 5D) จำนวนของ TrueCount beads ในช่อง R2 จะนำมาใช้เพื่อคำนวณ absolute numbers ของ red cell



รูปที่ 5 flow cytometric dot plot ของ red cell vesicles ในเลือดคนปกติ (5A, 5B) และผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E (5C, 5D) R1 แสดง FSC/SSC light scatter gate ของ red cell vesicles และเกร็ดเลือด (5A, 5C) แต่เฉพาะ red cell vesicles เท่านั้นที่จะจับกับ glycophorin A ส่วนเกร็ดเลือดจะจับกับ CD 41 (5B, 5D)

vesicles ตามสูตร ซึ่งพบว่า red cell vesicles ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียทุกชนิดสูงกว่าคนปกติ (ตารางที่ 3) และสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E ที่ตัดม้ามแล้ว

$$\text{Absolute Rbc vesicles}/\mu\text{L} = \frac{\text{No. of glycophorin A positive (R1)}}{\text{No. of bead collected (R2)}} \times \frac{\text{bead count/test} \times \text{dilution factor}}{\text{sample volume } (\mu\text{L})}$$

ตารางที่ 3 อัตราร้อยละและจำนวนสัมบูรณ์ (mean $\pm$ SD) ของ vesicle ของเม็ดเลือดแดงในคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ

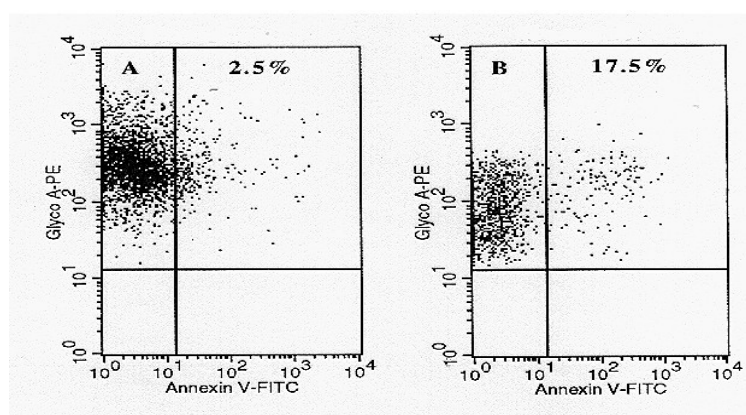
No. subject	Normal 25	β thal/HbE (S)*140	β thal/HbE (NS)**36	HbH 44	HbH/CS 18
% Vesicles	0.6 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 1.6	2.7 $\pm$ 1.7	2.1 $\pm$ 1.2	2.3 $\pm$ 1.4
Absolute Vesicles/ul	30,199 $\pm$ 19,686	261,648 $\pm$ 268,690	172,067 $\pm$ 220,813	126,489 $\pm$ 61,343	114,262 $\pm$ 70,340

S*= Splenectomized patients, NS** = Nonsplenectomized patients

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามี vesicle ของเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยธาลัสซีเมียและในเลือดของคนปกติ แต่อัตราร้อยละและจำนวนสัมบูรณ์ในผู้ป่วยมีสูงกว่าในคนปกติ โดยเฉพาะในเลือดของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียที่ตัดม้ามแล้ว และพบสูงในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียมากกว่าในผู้ป่วยอัลฟาธาลัสซีเมีย การที่เป็นเช่นนี้อาจจะเป็นเพราะว่าความรุนแรงที่เกิดกับโปรตีนในผนังเซลล์ ในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย มีมากกว่าในผู้ป่วยอัลฟาธาลัสซีเมีย โดยผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียไม่เสถียรเกิดแตกสลายง่ายกว่าเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยอัลฟาธาลัสซีเมีย ซึ่งสายเบต้าโกลบินส่วนเกินจะจับรวมกันเป็น homo-tetramer ได้ จึงมีความเสถียรมากกว่าสายอัลฟาโกลบินส่วนเกินที่พบในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย ซึ่งจะจับกับผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงและทำความเสียหาย หรือออกซิไดซ์ผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงได้ ความเสียหายของผนังเซลล์เหล่านี้ ทำให้อาการของโรคในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียมีมากกว่าในผู้ป่วยอัลฟาธาลัสซีเมีย จำนวน vesicle ของเม็ดเลือดแดงที่พบสูงในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียนี มีความสัมพันธ์ด้านลบกับความรุนแรงของโรค ซึ่งดูได้จากค่าฮีโมโกลบิน ค่าฮีมาโตคริตและจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ลดลงที่สัมพันธ์กับจำนวน vesicle ของเม็ดเลือดแดงที่เพิ่มขึ้น

การที่พบจำนวน vesicle ของเม็ดเลือดแดงที่สูงมากในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียที่ตัดม้าม แสดงให้เห็นว่าม้ามมีส่วนเกี่ยวข้องกับจำนวน vesicle ม้ามได้ชื่อว่าเป็นอวัยวะที่มีระบบ reticuloendothelial ที่สำคัญ มีหน้าที่กำจัดเซลล์ที่หมดอายุ เช่น เม็ดเลือดแดงที่แก่ตัว เซลล์ที่มี apoptosis เซลล์เหล่านี้มักพบว่ามี

phosphatidylserine (PS) บนผิวเซลล์ vesicle ของเม็ดเลือดแดงก็มีส่วนที่พบว่าเป็น PS เมื่อย้อมเซลล์ด้วย annexin V ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะกับ PS (รูปที่ 6) ใน vesicle ของเม็ดเลือดแดงพบว่ามี PS บนผิวเซลล์ถึงอัตราร้อยละ 10-50 ซึ่งสูงกว่าที่พบในเซลล์เม็ดเลือดแดงเองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$) ฉะนั้น vesicle ของเม็ดเลือดแดงก็ต้องถูกกำจัดทำลายโดยม้าม เมื่อผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียตัดม้าม จึงไม่สามารถกำจัด vesicle ได้เต็มที่ ทำให้พบ vesicle รวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติ เช่น เซลล์ anisocytosis และ poikilocytosis ของเม็ดเลือดแดงสูงในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผิดปกตินี้สามารถเกิดเป็น vesicle ได้มากมายในกระแสเลือด



รูปที่ 6 แสดงค่า two-parameter dot plot ของเม็ดเลือดแดง (A) และ red cell vesicle (B) ย้อมด้วย FITC-conjugated annexin V และ PE-conjugated anti-glycophorin A ตัวเลขที่มุมขวาแสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ย้อมติด annexin V

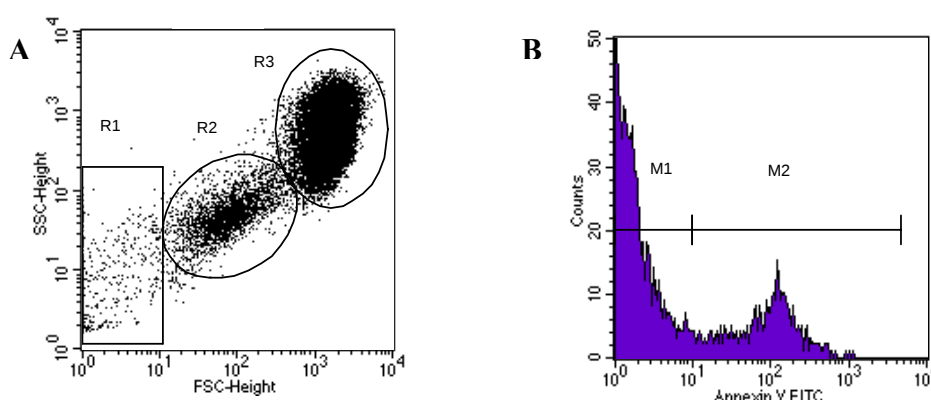
แม้ว่าจะยังไม่สามารถเชื่อมโยงจำนวน vesicle ของเม็ดเลือดแดงที่พบกับสาเหตุการเกิด thrombosis ที่มักพบบ่อยในผู้ป่วยธาลัสซีเมียก็ตาม แต่มีรายงานการเกิด thromboembolism ในผู้ป่วยโรคโลหิตจางต่าง ๆ เช่น ผู้ป่วยโรค sickle cell และโรคธาลัสซีเมีย ซึ่งมีการเชื่อมโยงกับความผิดปกติของ asymmetry ของ phospholipid ของเม็ดเลือดแดงและภาวะการกระตุ้นในเซลล์อื่น ๆ เช่น ในเกร็ดเลือด เซลล์โมโนไซต์ (monocyte) เซลล์แกรนูโลไซต์ (granulocyte) และเซลล์ endothelial การกระตุ้นเซลล์เหล่านี้ ทำให้ PS ออกมายังด้านนอกของผิวเซลล์และเกิด vesicle ขึ้น ซึ่งอาจจะไปทำให้เกิดการก่อตัวของส่วนประกอบของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ procoagulant ต่าง ๆ ฉะนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่การพบ vesicle หรือ microparticle ที่มาจากเม็ดเลือดแดงหรือเซลล์ชนิดอื่น ๆ ที่มี PS และ มีจำนวนมาก น่าจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพการอุดตันในเส้นเลือดและอวัยวะต่าง ๆ ของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

3.2.2 การศึกษาชนิดเซลล์ต้นกำเนิดและการวัดจำนวนและ absolute number ของ microparticle

การศึกษาหาจำนวนไมโครพาร์ติเคิล (MPs) ที่พบ annexin V positive และชนิดเซลล์ต้นกำเนิดของไมโครพาร์ติเคิลในเลือดของผู้ป่วยโรคสตีเมีย ทำได้โดยการย้อมผิวไมโครพาร์ติเคิลด้วย annexin V ซึ่งจำเพาะต่อ PS และ โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชนิดของเซลล์ ได้แก่ เม็ดเลือดแดง (glycophorin A) เม็ดเลือดขาว (CD45) เกร็ดเลือด (CD41) เอนโดทีเรียลเซลล์ (CD105) แกรนูโลไซต์ (CD66) โมโนไซต์ (CD14) รวมถึง adhesion molecule ที่สำคัญของเกร็ดเลือดและเอนโดทีเรียลเซลล์ชนิด P-selectin (CD62P) E-selectin (CD62E) CD 36 CD 61 และ tissue factor โดยทำการย้อมแบบ 3 สี

3.2.2.1 การหาค่าอัตราร้อยละ annexinV-positive ของ microparticles

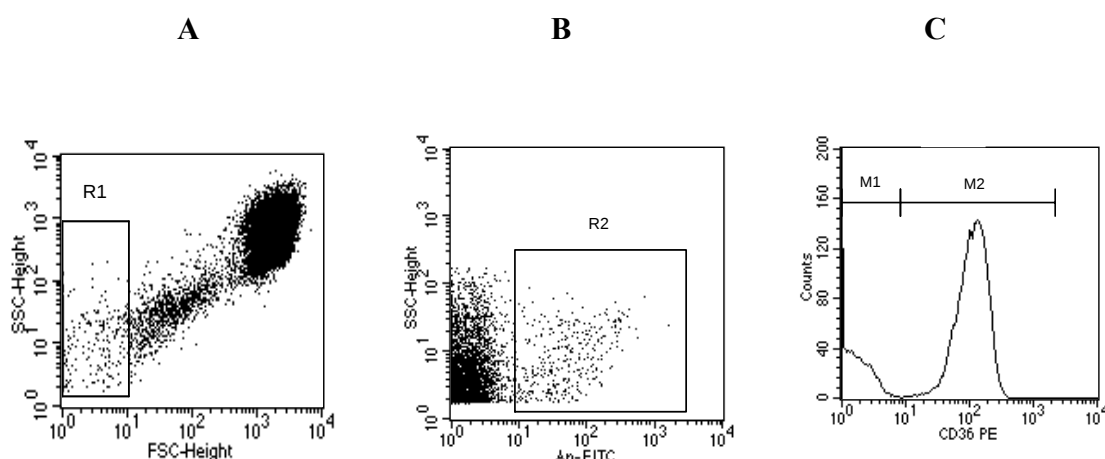
annexin V ที่ติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์สีเขียว (FITC) สามารถจับกับโมเลกุลของ phosphatidylserine (PS) บนผิวของ MPs ทั้งนี้ตัวอย่างเลือดจะต้องถูกย้อมทันทีหลังจากทำการเจาะ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSsort flow cytometer (Becton Dickinson) โดยใช้โปรแกรม CellQuest Software ในการบันทึกและวิเคราะห์ผลที่ได้ รูปที่ 7A แสดงคุณสมบัติของขนาด (FSC, แกนนอน) และความหนาแน่น (SSC, แกนตั้ง) ทำให้สามารถแยกกลุ่ม MPs ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีขนาดเล็กกว่าเกร็ดเลือดและเม็ดเลือดแดง แล้วกำหนดไว้ให้เป็นกลุ่มที่ 1 (region R1) ส่วนกลุ่มของเกร็ดเลือดและเม็ดเลือดแดงจะถูกกำหนดให้เป็นกลุ่มที่ 2 (region R2) และ 3 (region R3) ตามลำดับ เราสามารถนำกลุ่มประชากรของ MPs (R1) มาวิเคราะห์หาปริมาณการติด annexinV โดยการวิเคราะห์กราฟฮิสโตแกรม (histogram plot) (รูปที่ 7B) และเรียกค่าจำนวนทางสถิติ (histogram statistics) ที่แสดงเปอร์เซ็นต์ของกลุ่ม MPs ที่ติด annexin V (M2) ซึ่งในรูปที่ 7B พบว่ามีอยู่ 5.83% ของ microparticles ทั้งหมด



รูปที่ 7 แสดงขนาดและความหนาแน่นของ microparticles ในบริเวณ R1 (A) และการวิเคราะห์หาปริมาณ annexin V บนผิวของ MPs โดย histogram (B)

3.2.2.2 การหาชนิดของเซลล์ต้นกำเนิดของกลุ่มประชากร MPs ที่ติด Annexin V

เมื่อข้อมตัวอย่างเลือด (heparinized blood) ด้วย annexinV ที่ติดฉลากด้วยสี FITC และข้อมตามด้วย monoclonal antibody ที่ติดฉลากด้วยสีที่แตกต่างออกไป เช่น สี PE หรือสี Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) ที่จำเพาะต่อเซลล์ต่าง ๆ เช่น เม็ดเลือดแดง/anti-glycophorin A-PE, endothelial cells/CD105-PE (endoglin), granulocytes/CD66e-PE, monocytes/CD14-PE, เม็ดเลือดขาว/CD45-PerCP, CD62P-PE (P-selectin), CD61-PE (Integrin), CD36-PE, เกร็ดเลือด/CD41-FITC และ anti-tissue factor-FITC แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSsort flow cytometer โดยใช้โปรแกรม CellQuest Software ในการบันทึกและวิเคราะห์ผลที่ได้ (รูปที่ 8) กลุ่ม MPs ใน region R1 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีขนาดเล็กกว่าเกร็ดเลือดและเม็ดเลือดแดง จะสามารถแยกมาตรวจวิเคราะห์การติดสี annexinV ได้ เป็นกลุ่ม region R2 ของรูปที่ 8B และจากกลุ่ม region R2 นำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อเซลล์ต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นได้ โดยการวิเคราะห์ด้วยกราฟฮิสโตแกรม (histogram plot) และเรียกค่าคำนวณทางสถิติ (histogram statistics) กลุ่มที่ติด monoclonal antibody คือกลุ่ม M2 ตามรูปที่ 8C



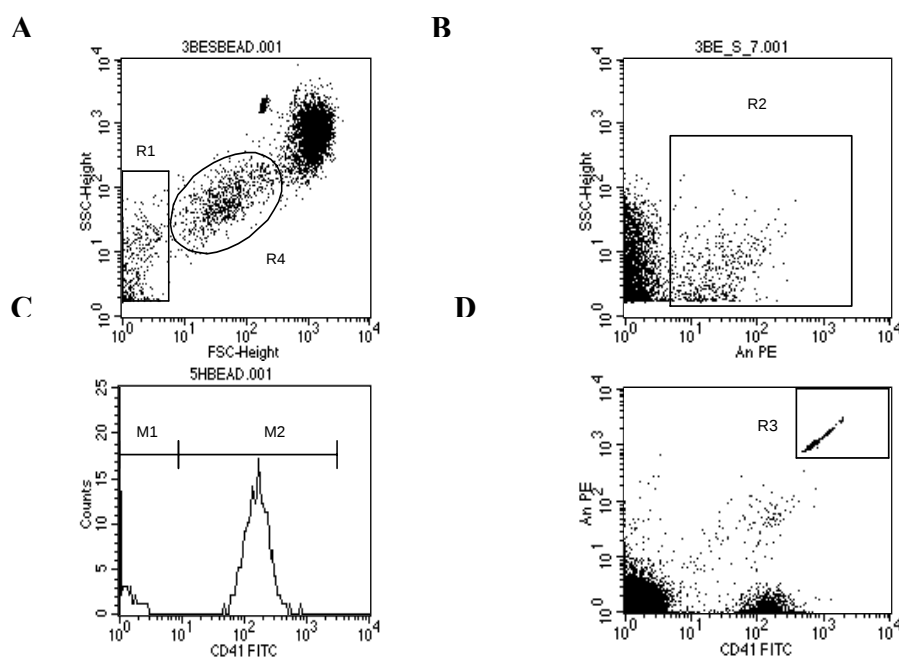
รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของ microparticles ใน R1 (A) ซึ่งสามารถแยกกลุ่มเซลล์ที่มี PS-positive ออกมาโดยการข้อมด้วย annexin V (B) และวิเคราะห์หาปริมาณของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดต่าง ๆ โดยการข้อมด้วย monoclonal antibody ที่จำเพาะ เช่น CD 36 (C)

การศึกษานี้เซลล์ต้นกำเนิดของไมโครพาร์ติเคิลที่พบ annexin V และ adhesion molecule พบว่า ผู้ป่วยธาลัสซีเมียและคนปกติมีปริมาณเปอร์เซ็นต์ CD41 (เกร็ดเลือด) รวมถึง adhesion molecule CD62P และ CD36 ก่อนข้างสูง รองลงมา คือ เซลล์ที่มี glycophorin A ซึ่งได้แก่เม็ดเลือดแดง ที่พบในระดับ

ปานกลาง แต่ในผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E ที่ไม่ได้ตัดม้ามและผู้ป่วย Hb H พบเซลล์ที่เป็น เม็ดเลือดแดง (glycophorin A) สูงขึ้น ส่วนเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ต้นกำเนิดและ adhesion molecules อื่น ๆ พบว่ามีเล็กน้อย

3.2.2.3 การหาจำนวนสัมบูรณ์ของ MPs ที่ย้อมติด annexin V

จำนวนสัมบูรณ์ของ MPs สามารถตรวจนับได้โดยการย้อมตัวอย่างเลือด (heparinized blood) ด้วย annexin V ที่ติดฉลากด้วยสี PE แล้วจึงย้อมด้วย monoclonal antibody ที่จำเพาะกับเกร็ดเลือด คือ anti-CD41a ที่ติดฉลากด้วยสี FITC ใน TrueCount tube (Lot No. 57004, Bead Count 51440, Becton Dickinson) ซึ่งภายในบรรจุ lyophilized pellet ขนาด 4.2 ไมโครเมตร ที่ติดฉลากไว้ด้วยสี FITC และสี PE เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACSsort flow cytometer ในรูปที่ 8 เซลล์ในกลุ่ม R1 คือ MPs ส่วน R4 คือเซลล์เกร็ดเลือด (รูปที่ 9A) MPs ที่ย้อมติดสี annexin V แยกออกมาวิเคราะห์ได้ใน region R2 (รูปที่ 9B)



รูปที่ 9 ตัวอย่างการหาจำนวนสัมบูรณ์ MPs ในเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมียรายหนึ่ง R1 คือเซลล์ในกลุ่ม MPs ส่วน R4 คือเซลล์เกร็ดเลือด (A) ซึ่งสามารถแยกเซลล์ที่ติด annexin V ออกมาได้เป็น R2 (B) และนำไปย้อมกับ marker เช่น CD41 ซึ่งจำเพาะต่อเกร็ดเลือดและคำนวณหาจำนวน โดยการเปรียบเทียบกับ lyophilized bead, R3 (D) และคำนวณจำนวน MPs ที่มาจากเกร็ดเลือด (CD41 positive) ได้ (C)

กลุ่มของ lyophilized pellet คือ กลุ่มใน region R3 (รูปที่ 9 D) ซึ่งได้จากภาพที่กำหนดให้แกนนตั้งเป็น FL1 (ในรูปคือ annexinV-PE) และแกนนอนเป็น FL2 (ในรูปคือ CD41-FITC) เก็บตัวอย่างให้ได้จำนวนของ lyophilized pellet (R3) อย่างน้อย 1,500 อนุภาคและคำนวณหาจำนวน MPs ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เกร็ดเลือดที่ติด annexinV ในตัวอย่างได้ตามสูตร

$$\text{Absolute annexinV-positive microparticles} = \frac{\text{Events in annexinV-positive microparticles population (R2)}}{\text{Events in absolute count bead region (R3)}} \times \frac{\text{Total bead per test}}{\text{Test volume}} \times \text{Dilution factor}$$

การศึกษาจำนวนไมโครพาร์ติเคิลที่พบ annexin V ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยเฉพาะใน β -thalassemia/Hb E ที่ตัดม้ามแล้ว (S) พบว่าค่าเฉลี่ยทั้งค่าเปอร์เซ็นต์ (percent positive) และค่าจำนวน (absolute number) ของ annexin V สูงกว่าคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงใน ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ (percent positive) และค่าจำนวน (absolute number) ของ annexin V positive microparticles (MPs) ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียและคนปกติ (S=splenectomy, NS=non-splenectomy)

	Patient's type				
	β -thalassemia/ Hb E (NS)	β -thalassemia/ Hb E (S)	HbH	HbH-CS	Normal
	N=28	N=25	N=24	N=18	N=22
	Mean $\pm$ S.D.	Mean $\pm$ S.D.	Mean $\pm$ S.D.	Mean $\pm$ S.D.	Mean $\pm$ S.D.
Percent annexin V positive MPs	13.55 $\pm$ 9.53	16.30 $\pm$ 9.09	12.42 $\pm$ 9.75	12.91 $\pm$ 7.23	10.47 $\pm$ 6.87
Absolute number of annexin V positive MPs	24314 $\pm$ 16918	52960 $\pm$ 31302	23940 $\pm$ 16807	23869 $\pm$ 16957	16934 $\pm$ 10139

ผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมีย มีค่าเฉลี่ยทั้งค่าเปอร์เซ็นต์ (percent positive) และค่าจำนวน (absolute number) ของไมโครพาร์ติเคิลที่มี annexin V สูงกว่าคนปกติและพบค่าสูงที่สุดในผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E ที่ตัดม้ามแล้ว แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียน่าจะมีพยาธิสภาพที่อาจก่อให้เกิดไมโครพาร์ติเคิลได้ง่าย ไมโครพาร์ติเคิลที่มี annexinV อาจเกิดขึ้นมาจากหลาย ๆ ปัจจัย ผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีการสร้างสายโกลบินที่ผิดปกติลดลงและสายโกลบินปกติที่เหลืออาจจะรบกวนการควบคุม phospholipid บนผนังเซลล์ ทำให้ PS ออกมาอยู่ด้านนอกและก่อให้เกิดการหลุดของผนังเซลล์ (shedding) เป็นไมโครพาร์ติเคิลในกระแสเลือดได้ นอกจากนี้เม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติสูญเสียความยืดหยุ่นของผนังเซลล์ (deformability) เมื่อต้องแทรกตัวผ่านไปตามผนังเส้นเลือดฝอยเพื่อทำหน้าที่หรือขณะแทรกตัวผ่าน sinusoid ในม้าม อาจทำให้เกิด

การหลุดของผนังเซลล์ได้เช่นกัน นอกจากเม็ดเลือดแดงแล้ว การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดของไมโครพาร์ติเคิลในผู้ป่วยและคนปกติยังพบว่า เกร็ดเลือด (CD41) และ adhesion molecule (CD36, CD62P) มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ annexin V สูงกว่าค่าเปอร์เซ็นต์ที่ได้จากเม็ดเลือดแดง (glycophorin A) ทั้งในผู้ป่วยธาลัสซีเมียและคนปกติ แสดงว่า เกร็ดเลือดอาจเป็นแหล่งเซลล์ต้นกำเนิดหลักของไมโครพาร์ติเคิล ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียและคนปกติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดของไมโครพาร์ติเคิลในคนปกติจากรายงานอื่น ที่พบว่า cellular marker ของเกร็ดเลือดมีค่าสูงสุด นอกจากนี้ยังมีรายงานที่สนับสนุนเกี่ยวกับการมี chronic platelet activation ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยเฉพาะผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E ที่ตัดม้ามแล้ว และยังมีรายงานเกี่ยวกับการมี persistent platelet activation ในโรค sickle cell disease (SCD) และพบไมโครพาร์ติเคิลจากเกร็ดเลือดด้วย

การเกิดการกระตุ้นเกร็ดเลือดนี้ อาจเกิดขึ้นมาจากหลายสาเหตุ แต่ยังไม่เป็นที่แน่ชัดและยังไม่มีรายงานเฉพาะเกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมีย สาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากการที่มี PS บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีผลไปกระตุ้นเซลล์อื่น ๆ รวมถึงเกร็ดเลือด ซึ่งมีคุณสมบัติถูกกระตุ้นได้ง่าย ประกอบกับผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีปริมาณเกร็ดเลือดที่สูงกว่าคนปกติด้วย จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้พบไมโครพาร์ติเคิลจากเกร็ดเลือดในสัดส่วนที่สูงกว่าเซลล์อื่น ๆ การที่มีเกร็ดเลือดและไมโครพาร์ติเคิลจากเกร็ดเลือดในระดับที่สูงในผู้ป่วยธาลัสซีเมียนี้ อาจก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือดได้

นอกเหนือจาก cellular marker จากเกร็ดเลือดและเม็ดเลือดแดงแล้ว ยังพบ cellular marker จากเอนโดทีเลียลเซลล์ (endothelial cell, EC) ซึ่ง cellular marker ที่ใช้คือ CD105 และพบ EC-microparticles ที่เกิดจากการ apoptosis ปริมาณของ cellular marker ทั้งสองชนิดพบสูงในระดับหนึ่ง ซึ่งไม่แตกต่างจากระดับของคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าปัญหาที่เกิดจากการถูกกระตุ้นของ EC ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย อาจแตกต่างจากคนปกติ โดย EC ที่พบสูงในคนปกติอาจถูกกำจัดได้และไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพ ส่วน cellular marker จากเซลล์อื่น ๆ พบว่ามีปริมาณที่ต่ำและไม่มีความแตกต่างจากระดับของคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ

3.3 การศึกษาการเกิด thromboembolism และ thrombosis ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตัดม้ามแล้ว มักจะมีจำนวนของเกร็ดเลือดสูงกว่าปกติและมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการทำงาน (hyperactivity) ทำให้เกิดภาวะ thromboembolism ซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย ผนังเซลล์เกร็ดเลือดประกอบไปด้วย phospholipids (PL) ซึ่งมีอยู่หลายชนิดเมื่อเกร็ดเลือดถูกกระตุ้น PL ส่วนที่เรียกว่า phosphatidylserine (PS) จะ expose ออกสู่ภายนอก เดิมเรียกสารกลุ่มนี้ว่า platelet factor 3 (PF3) เมื่อออกมาอยู่ด้านนอกจะเกิดการกระตุ้นเอ็นไซม์และการทำงานของเกร็ดเลือด โดยมี calcium เป็นตัวเชื่อม ทำให้เกิดพื้นผิวที่ coagulation factor มาจับ PL ส่วนที่ให้ FIXa และ FVIIIa มาจับ คือ phosphatidyl ethanolamine (PE) และ phosphatidylcholine (PC) ซึ่งจะไปย่อย FX ให้เป็น FXa จากนั้น FXa และ FVa จึงจับบน PL ส่วนที่เรียกว่า phosphatidylinositol (PI) และ

phosphatidylserine (PS) โดยมี calcium เป็นตัวเชื่อมเช่นกัน เรียกกลุ่ม complex นี้ว่า prothrombinase ซึ่งจะย่อย FII ให้เป็น FIIA คือ thrombin นั้นเอง และเป็นที่ทราบกันดีว่า thrombin เป็น key enzyme ที่สำคัญในการกระตุ้น fibrinogen ให้เป็น fibrin และยังกระตุ้นการทำงานของเกร็ดเลือดอีกด้วย เกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นจะมีรูปร่างเปลี่ยนไปและปล่อยสารออกจากแกรนูลเช่น β -thromboglobulin (BTG) และ Platelet factor 4 (PF4) ทำให้โปรตีน CD63 หรือ glycoprotein 53 ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ lysosomal membrane ของเกร็ดเลือดไหลออกมาด้านนอก เกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นการทำงานมากผิดปกติ จะนำไปสู่การเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดทั้งแบบ hypo- และ hyper-aggregation และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด thrombosis

3.3.1 การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มี PS อยู่บนผิวด้านนอกกับการเกิดการกระตุ้นการทำงานของเกร็ดเลือด

เนื่องจากเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียมีรูปร่างแตกต่างจากเม็ดเลือดแดงปกติ ผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดง expose ให้ phospholipids โดยเฉพาะ PS ออกมาด้านนอกได้ จึงมีคุณสมบัติคล้าย PF3 ทำให้เกิด thrombin activation อย่างต่อเนื่องและมีผลทำให้เกร็ดเลือดของผู้ป่วยทำงานมากกว่าปกติ คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มี PS อยู่บนผิวด้านนอกกับเกร็ดเลือดที่ผิดปกติ ซึ่งตรวจพบได้โดยการตรวจหาโปรตีน CD63 หรือ glycoprotein 53 ในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียจำนวน 50 ราย โดยเป็นผู้ป่วยที่ตัดม้าม 16 ราย และไม่ได้ตัดม้าม 34 ราย

~ การวัด PS บนผิวด้านนอกของเม็ดเลือดแดงใช้วิธี annexin V binding assay

~ วัดระดับ plasma BTG และ PF 4 โดยใช้ plasma ผสมกับ anti-platelet ได้แก่ 8.3 mM aspirin,

3.2 mM caffeine, 1.7 mM theophylline และ 1.5 mM sodium azide ใน 0.106 M sodium citrate

~ วัด CD63 บนผิวของเกร็ดเลือดโดยวิธี immunostaining และ flow cytometer

~ วัดการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด (platelet rich plasma aggregation test) โดยเครื่อง Aggreco II เมื่อกระตุ้นเกร็ดเลือดด้วยสาร agonists ได้แก่ 1 mg/ml epinephrine, 0.2 mM ADP, 2 mg/ml collagen และ 30 mg/ml ristocetin

ผลการศึกษา

พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า %PS exposing Rbc กับ %CD63 positive ที่ออกมาอยู่บนผิวด้านนอกของเกร็ดเลือด ($r = 0.85$), %CD63 positive กับระดับของ plasma BTG ($r = 0.7$) และระดับของ plasma PF 4 ($r = 0.83$) และ % activated platelet ($r = 0.785$) (ตารางที่ 5) ผลการศึกษายังแสดงว่าผู้ป่วยทุกรายมีค่าต่าง ๆ ดังกล่าวแตกต่างจากคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียที่ตัดม้ามแล้วมีค่าสูงกว่าผู้ป่วยที่ยังไม่ได้ตัดม้าม ยกเว้นค่าระดับ plasma PF 4 และ % activated platelet ซึ่งไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงที่ผิวเม็ดเลือดแดงและเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย

	Control	Total patients	Splenect. β -thalassemia	Non-splenect. β -thalassemia
Platelet count, $\times 10^3/\text{cumm}$	242	383	552	303
Annexin V positive, %	2.0	5.3	5.8	5.1
Plasma BTG, IU/ml	192	263	280	255
Plasma PF4, IU/ml	61	88	93	86
CD63 exposing platelet, %	1.4	4.3	4.7	4.1
Activated platelet (under SEM), %	17.0	36.7	38.6	34.7

ส่วนการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด พบว่าอัตราส่วนการเกาะกลุ่มในผู้ป่วย homozygous β -thalassemia (β -thalassemia major) และ β -thalassemia/Hb E ดังนี้

	<u>Hypoaggregability</u>	<u>Normoaggregability</u>	<u>Hyperaggregability</u>
β -thalassemia major	40	30	30
β -thalassemia/Hb E	70	17	13

3.3.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า *annexin V positive microparticles* กับค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาและค่าปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (*platelet factor 3 like activity*)

การที่มี *annexin V positive microparticles* ในปริมาณที่สูงนั้นหมายถึงการมี phosphatidyl serine (PS) ปรากฏอยู่ในกระแสเลือดในปริมาณมากและ PS นี้สามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพที่สำคัญ คือ การไปกระตุ้นระบบการแข็งตัวของเลือด รวมถึงการไปกระตุ้นเซลล์อื่น ๆ ให้อยู่ในสภาวะถูกกระตุ้น (activated cell) ได้ จึงได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า *annexin V positive microparticles* กับค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาและค่าปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (*platelet factor 3 like activity*)

ผลการศึกษา

ค่าปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (*platelet factor 3 like activity*) ของผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E ทั้งที่ตัดม้ามและไม่ตัดม้าม ผู้ป่วยฮีโมโกลบินเอช (HbH) และฮีโมโกลบินเอช/คอนสแตนต์สปริง (HbH/CS) มีความแตกต่างจากคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E ที่ตัดม้าม (ตาราง

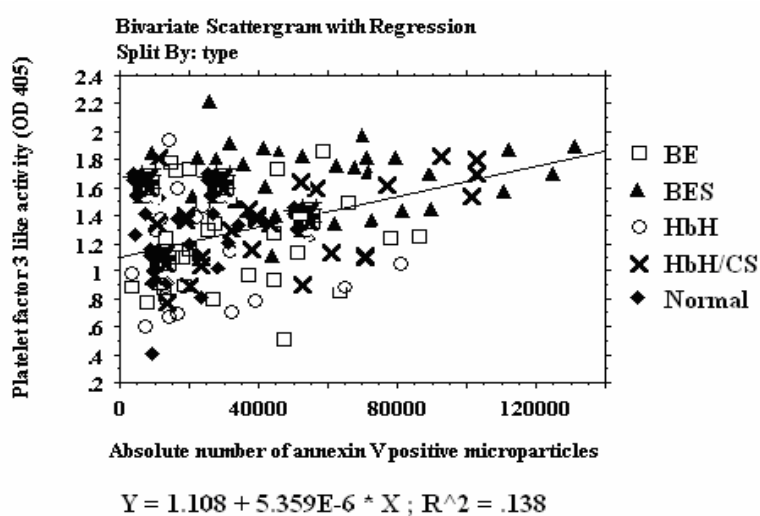
ที่ 6) และพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (platelet factor 3 like activity) กับปริมาณ annexin V positive microparticles ที่ $r^2 = 0.138$ (รูปที่ 10)

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.D.) ของค่าปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (platelet factor 3 like activity) ในเลือดผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ และคนปกติ

	Healthy subjects (n=11)	Patient's genotype			
		β -thalassemia/ Hb E (n=18)	β -thalassemia/ Hb E (ตัดม้าม) (n=16)	HbH (n=12)	HbH/CS (n=11)
Platelet factor 3 like activity (OD 405)	1.13 $\pm$ 0.16	1.22 $\pm$ 0.49 ^a	2.21 $\pm$ 0.76 ^b	1.48 $\pm$ 0.90 ^a	1.55 $\pm$ 0.44 ^a

a = significantly difference from healthy subjects ($p < 0.05$)

b = significantly difference from healthy subjects ($p < 0.01$)



รูปที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (platelet factor 3 like activity) กับจำนวน annexin V positive microparticles ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ และคนปกติ

เนื่องจากเกร็ดเลือดเป็นแหล่งกำเนิดของ annexin V positive microparticles ที่สำคัญ จึงได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของค่าปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (platelet factor 3 like activity) กับปริมาณ annexin V positive microparticles ที่มี specific marker และ adhesion molecule ของเกร็ดเลือด คือ CD41, CD36 และ CD

62P พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญที่ $r^2=0.209$, 0.177 และ 0.14 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระดับต่ำ ระหว่างปริมาณ annexin V positive microparticles กับค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาบางตัว คือ ค่าฮีโมโกลบิน ค่า mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) และค่าปริมาณเกร็ดเลือด โดยมีค่า $r^2=0.049$, 0.055 และ 0.109 ตามลำดับ

ผลการทดลองที่พบค่าปัจจัยการแข็งตัวของเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียสูงกว่าคนปกตินี้ สอดคล้องกับรายงานต่าง ๆ ที่พบความผิดปกติ ภาวะเสี่ยงและปัญหาเกี่ยวกับการอุดตันของเส้นเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ซึ่งยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนถึงสาเหตุของปัญหานี้ แต่มีรายงานที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติของผู้ป่วยธาลัสซีเมียซึ่งมี PS อยู่บนผิวเซลล์และการมี chronic activation ของเกร็ดเลือด ไมโครพาร์ติเคิล เป็นอนุภาคที่มี PS อยู่บนผิวอนุภาคและพบมีปริมาณสูงในหลาย ๆ โรคที่มีภาวะเสี่ยงต่อการเกิดการอุดตันของเส้นเลือด ผลการทดลองที่พบนี้ ชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของปริมาณ ไมโครพาร์ติเคิลกับค่าปัจจัยการแข็งตัวของเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย แสดงให้เห็นว่า ไมโครพาร์ติเคิลนี้น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดการแข็งตัวของเลือด ซึ่งอาจจะเกิดมากผิดปกติ จนก่อให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียบางรายได้

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าความผิดปกติของผนังเม็ดเลือดแดงซึ่งมี PS อยู่ด้านนอกอาจจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกร็ดเลือดมีรูปร่างและทำงานผิดปกติ จึงเกิดการเกาะกลุ่มเป็น aggregated platelet ขึ้นและอาจนำไปสู่การเกิด thrombosis ได้ง่าย

3.4 Therapeutic intervention

3.4.1 การใช้ยากระตุ้นให้มีการสร้างฮีโมโกลบิน เอ็ฟ ($Hb F, \alpha_2\gamma_2$) เพิ่มขึ้น

การศึกษาลักษณะอาการในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย พบว่าผู้ป่วยที่มีระดับฮีโมโกลบิน เอ็ฟ สูง (สร้าง $Hb F$ ได้มาก) จะมีความรุนแรงของโรคน้อย เนื่องจากฮีโมโกลบิน เอ็ฟ สามารถพาออกซิเจนไปให้เนื้อเยื่อได้ใกล้เคียงกับฮีโมโกลบิน เอ (Hb A, $\alpha_2\beta_2$) และการที่มีสาย γ -globin chain เพิ่มขึ้นยังช่วยลดปริมาณของสาย unbound α -globin chain ซึ่งเป็นส่วนเกินอยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงและส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพของเม็ดเลือดแดง ผู้วิจัยเคยทดลองให้ยาไฮดรอกซียูเรีย (hydroxyurea, HU) เพื่อกระตุ้นการสร้าง $Hb F$ พบว่าผู้ป่วยโรค β -thalassemia/Hb E ที่ได้รับยา $Hb F$ เพิ่มขึ้นและไม่ต้องรับเลือดเลเยระหว่างที่กินยา แต่การตอบสนองต่อยา HU ในผู้ป่วยแต่ละรายแตกต่างกันได้มาก ผู้ป่วยบางรายตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา HU ดี ในขณะที่ผู้ป่วยบางรายตอบสนองต่อยาน้อยมาก จึงได้ศึกษาวิจัยเรื่องการกระตุ้นการสร้าง ฮีโมโกลบิน เอ็ฟ ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง (*in vitro*) เพื่อเปรียบเทียบกับผลที่พบเมื่อให้ผู้ป่วยธาลัสซีเมียรับประทานยา hydroxyurea (*in vivo*)

วิธีการศึกษา

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นของ HU และช่วงเวลาการให้ยาจนถึงการวิเคราะห์ผลที่เหมาะสม โดยการเจาะเลือดผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E นำมาแยกชั้น mononuclear cell ด้วย Ficoll-Hypaque gradient และนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดง (erythroid progenitor cells) ในจานเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 3-6 วัน แล้วจึงนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้มาเติม HU ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 10, 20, 30, 60, 80, 100 mol/L เพื่อหาความเข้มข้นที่ให้ผลในการกระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบิน เอ็ฟ ที่ดีและมีจำนวนเซลล์ตายน้อยที่สุด แล้วจึงวิเคราะห์ผลของ HU ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

หลังจากนั้นจึงทำการศึกษาโดยเลือกผู้ป่วยโรค β -thalassemia/Hb E จำนวน 10 ราย ที่เคยได้รับการศึกษา *in vivo* โดย รศ.นพ.สุกร จันทจักรูณิ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี โดยได้รับประทานยา HU ขนาด 5 มก./กก./วัน เป็นเวลา 5 วันต่อสัปดาห์ นาน 2 ปี และได้หยุดยาไปแล้ว 1 ปี ทำการเจาะเลือดผู้ป่วยและนำ mononuclear cell ไปเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงในวันที่ 6 แล้วจึงเติม HU ความเข้มข้น 30 mol/L และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนครบ 10 วัน ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทดสอบแบบ *in vitro* หลังจากนั้นจึงเปรียบเทียบกับผลการรักษาแบบ *in vivo* โดยวัดการเพิ่มขึ้นของ Hb F ด้วยเครื่อง automated HPLC และวัดการเปลี่ยนแปลงของ $\text{G}\gamma/\text{A}\gamma$ globin chain โดยการทำให้ polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อแยกสายโกลบินชนิดต่าง ๆ ออกจากกันและวิเคราะห์ปริมาณด้วย densitometer ส่วน $\text{G}\gamma/\text{A}\gamma$ mRNA ratio ทำโดยใช้เทคนิค real-time PCR

ผลการทดลอง

การเติม HU ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 10, 20, 30, 60, 80, 100 mol/L ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงวันต่าง ๆ พบว่าความเข้มข้น 30 mol/L ให้ผลในการกระตุ้นการสร้าง ฮีโมโกลบิน เอ็ฟ ที่ดีและมีจำนวนเซลล์ตายน้อยที่สุด และเมื่อวิเคราะห์ผลของ HU ในระยะเวลาเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงต่าง ๆ กัน พบว่าการเติม HU ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงที่เลี้ยงในวันที่ 6 และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนครบ 10 วัน เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทดสอบ *in vitro* (ตารางที่ 7) การให้ HU ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงเมื่อเพาะเลี้ยงก่อน 6 วัน พบว่าเซลล์มี differentiation และเจริญเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวแก่ได้น้อย (Patient 6, ตารางที่ 7)

ตารางที่ 8 แสดงผลการตอบสนองต่อยา HU ในผู้ป่วย (*in vivo*) และในเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro* culture) โดยการวัดค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของ Hb F การเปลี่ยนแปลงของ $\text{G}\gamma/\text{A}\gamma$ globin chain และ $\text{G}\gamma/\text{A}\gamma$ mRNA ratio

ตารางที่ 7 การเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงที่เพาะเลี้ยงในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ก่อนและหลังการเติม HU ความเข้มข้น 30 mol/L และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนครบ 10 วัน

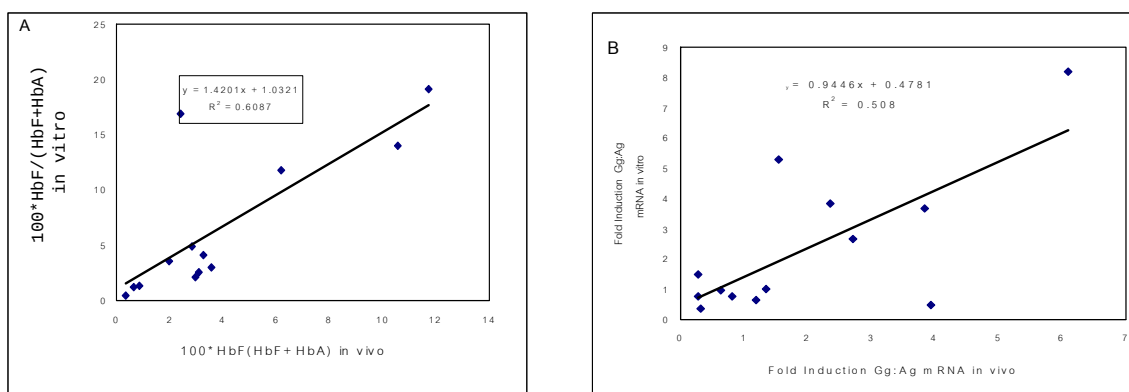
Treatment		% Pronormoblast	%Basophilic normoblast	%Polychromatic normoblast	%Orthochromatic normoblast	%Reticulocyte
Normal						
1	Untreated day 0-d10	3.0	17.0	67.0	11.0	2.0
	30μM HU d6-d10	3.0	20.0	64.0	11.0	2.0
2	Untreated day 0-d10	1.0	22.0	67.0	9.0	1.0
	30μM HU d6-d10	3.0	24.0	66.0	6.0	1.0
Patients						
1	Untreated day 0-d10	4.0	43.0	49.5	1.0	2.5
	30μM HU d6-d10	3.4	43.3	50.6	22.0	0.6
2	Untreated day 0-d10	1.0	29.0	62.0	3.3	5.2
	30μM HU d6-d10	2.0	37.0	53.0	8.0	1.0
3	Untreated day 0-d10	2.5	46.5	48.5	1.5	1.0
	30μM HU d6-d10	7.5	38.5	52.0	2.0	1.0
4	Untreated day 0-d10	3.0	20.5	75.0	1.0	0.5
	30μM HU d6-d10	4.0	21.5	73.5	2.5	0.5
5	Untreated day 0-d10	4.0	46.0	50.0	0.0	0.0
	30μM HU d6-d10	5.0	48.0	45.0	2.0	1.0
6	30μM HU d0-d10	7.0	68.0	25.0	0.0	1.0
	30μM HU d3-d10	2.0	35.0	60.0	3.0	0.0
	30μM HU d6-d10	2.0	23.0	55.5	19.5	0.0
	30μM HU d0-d13	1.0	36.0	56.5	3.0	0.5
	30μM HU d3-d13	0.0	46.4	46.0	4.6	3.0
	30μM HU d6-d13	0.0	1.5	32.5	58.5	7.5

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงค่า γ -mRNA, γ -globin chain และปริมาณ Hb F ภายหลังการให้ยาไฮดรอกซียูเรีย

	<i>in vitro</i> study	<i>in vivo</i> study	P value
increased $\gamma/\alpha\gamma$ m RNA (real-time PCR technique)	0.34-8.18	0.28-6.10	0.164
increased $\gamma/\alpha\gamma$ globin chain (Triton-acid urea gel electrophoresis)	0.80-1.43	0.98-1.23	0.134
increased Hb F (automated HPLC)	0.50-19.08	0.29-11.73	0.204

เมื่อเปรียบเทียบผลของไฮดรอกซียูเรียในเซลล์เพาะเลี้ยงแบบ *in vitro* โดยเติม HU ความเข้มข้น 30 mol/L ในเซลล์เพาะเลี้ยงวันที่ 6 และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนครบ 10 วันกับผลการรักษาแบบ *in vivo* พบว่ามีความสัมพันธ์กัน (รูปที่ 11) และพบผู้ป่วย 3 รายที่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าต่าง ๆ ดังกล่าวไม่ชัดเจน ทั้งการทดสอบแบบ *in vitro* และการให้ยา *in vivo*

ผลการศึกษาแสดงว่าการทดลองให้ยา HU ในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงที่เพาะเลี้ยง (*in vitro* culture) สามารถพยากรณ์การตอบสนองต่อการให้ยา HU ในผู้ป่วยโรค β -thalassemia/Hb E เนื่องจากยา HU มี cytotoxic effect การศึกษา *in vitro* จึงมีประโยชน์ในการเลือกให้ยา HU เฉพาะผู้ป่วยที่ให้การตอบสนองที่ดีต่อยาและช่วยลดผลอันไม่พึงประสงค์ในผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อยาได้ วิธีการนี้ยังอาจนำไปใช้ทดสอบสารหรือยาชนิดอื่น ๆ ได้ด้วย



รูปที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ของผลของไฮดรอกซียูเรีย ในการเพิ่มขึ้นของ Hb F และการเปลี่ยนแปลงของ $\gamma/\alpha\gamma$ globin mRNA ratio ในเซลล์เพาะเลี้ยงแบบ *in vitro* กับผลการรักษาแบบ *in vivo*

3.4.2 การศึกษา oxidative stress และผลของการใช้ antioxidant ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย β -thalassemia/HbE มีภาวะ oxidative stress สูงกว่าคนปกติ เนื่องจากมีความผิดปกติในการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน คือ มีการสังเคราะห์สาย เบต้าโกลบิน ลดลงหรือไม่มีการสังเคราะห์เลย ทำให้สาย อัลฟาโกลบิน เหลือมากเกินไปและไม่เสถียร เมื่อเลือดแดงอายุสั้นและแตกง่าย ฮีโมโกลบินเกิดเป็น methemoglobin และ hemichrome ซึ่งสามารถสลายต่อไปได้สายโกลบิน ฮีม (heme) และเหล็ก ส่วนของฮีมที่มีธาตุเหล็กอิสระหลุดออก จึงเกิดปฏิกิริยา oxidation ได้ง่าย อนุมูลของธาตุเหล็กจะเข้าไปร่วมในปฏิกิริยา Fenton ทำให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะ oxidative stress ได้จากการศึกษาเบื้องต้นโดยการตรวจภาวะ lipid peroxidation พบว่าผู้ป่วยมีระดับ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลผลิตของ lipid peroxidation สูงกว่าคนปกติและระดับของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่น reduced glutathione (GSH) ต่ำกว่าปกติ ส่วนค่าของ antioxidant enzyme activity ต่าง ๆ เช่น superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GSH-Px) เปลี่ยนแปลงไป (ตารางที่ 9) และเลือดของผู้ป่วยมีภาวะ oxidative stress สูงกว่าเลือดของคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

นอกจากนั้น ระดับของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ในผู้ป่วย เช่น วิตามินซี วิตามินอี และโคเอนไซม์ Q10 ยังลดต่ำกว่าค่าที่ตรวจพบในคนปกติ แต่การให้วิตามินอีแก่ผู้ป่วยเพียงชนิดเดียวไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจนว่าผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นหรือไม่ จึงได้มีความพยายามที่จะศึกษาผลของสารอื่น ๆ ที่เคยมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์เป็น antioxidants เช่น curcumin ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากขมิ้นชัน

ตารางที่ 9 แสดง oxidative stress และ antioxidants (units/g Hb) ในคนปกติและผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E

Biochemical parameters	Normal	β-thalassemia/Hb E patients		
		Total n=20	Splenectomized N=6	Non-splenectomized N=14
Antioxidant enzymes				
- SOD (u/g Hb)	2774.87±389.02	4157.66±557.39 ^a	4383.46±572.17 ^a	4082.54±536.98 ^a
- GSH-Px (u/g Hb)	32.94±3.84	61.00±10.00 ^a	54.7±7.28 ^a	64.44±9.83 ^a
Antioxidant				
- GSH (mg/g Hb)	1.78±0.22	1.76±0.25	1.92±0.20	1.70±0.24
Lipid peroxidation				
- MDA (nmol/g Hb)	548.03±124.56	1136.71±344.67 ^a	1496.78±341.36 ^a	1004.56±238.14 ^a

^a significantly different from normal group, $p<0.001$

ขมิ้นชัน (curcumin หรือ *curcuma longa* linn) เป็นสมุนไพรไทยที่มีส่วนประกอบเรียกว่า curcuminoids ประกอบด้วย curcumin I (diferuloylmethane) curcumin II (demethoxycurcumin) และ curcumin III (bisdemethoxy-curcumin) ละลายได้ใน ethanol, alkali, ketone, acetic acid และ chloroform แต่ไม่ละลายในน้ำ curcumin มี functional group ที่สำคัญคือ methoxylated phenols และ β -diketone ซึ่งเป็นลิแกนด์ (ligand) สำหรับโลหะ เช่น ธาตุเหล็ก จึงสามารถจับธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปของ ferric nitrate และ non-transferrin bound iron (NTBI) หรือ nonheme iron ได้ด้วย ส่วนของขมิ้นชันที่มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย คือ rhizome ซึ่งนำมาแปรรูปเป็นผงขมิ้น (turmeric) เพื่อใช้ประกอบอาหาร จะให้กลิ่นของขมิ้นและให้สารสีเหลือง (diferuloyl methane) ซึ่งเป็น polyphenolic pigment ของ curcumin

ในทางเภสัชศาสตร์ curcumin เป็นสารที่มีความปลอดภัยสูง การทดสอบในคนโดยให้รับประทาน curcumin วันละ 8 กรัม นาน 3 เดือน ไม่พบพิษจาก curcumin จึงมีการศึกษาวิจัยคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์ของขมิ้นชัน พบว่ามีคุณสมบัติที่สำคัญคือ antioxidant, prooxidant, anti-inflammatory และ anticancer การที่ curcumin ให้ผลทางเภสัชศาสตร์แตกต่างกันมากนี้ ทำให้เกิดการศึกษาวิจัยเพื่อหาขนาดยาที่เหมาะสมในการรักษาโรคต่าง ๆ

มีรายงานการวิจัยพบว่า derivatives ของ curcumin คือ demethoxy curcumin และ bisdemethoxy curcumin ในความเข้มข้นเพียง 80 μ M สามารถป้องกันการเกิด oxidation ของฮีโมโกลบิน การทดลองในหนูพบว่า curcumin ป้องกันการเกิด lipid peroxidation ของ microsomes ในเซลล์ตับ ในผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงและ brain homogenates โดยการกำจัด oxygen free radicals เช่น superoxide anions และ hydroxyl radicals นอกจากนี้ผงขมิ้น (turmeric) ยังช่วยลด lipid peroxidation โดยการรักษาระดับของ antioxidant enzyme เช่น superoxide dismutase (SOD) catalase และ glutathione peroxidase (GSH-Px)

3.4.2.1 การศึกษาคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของขมิ้นชัน ในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *in vitro*

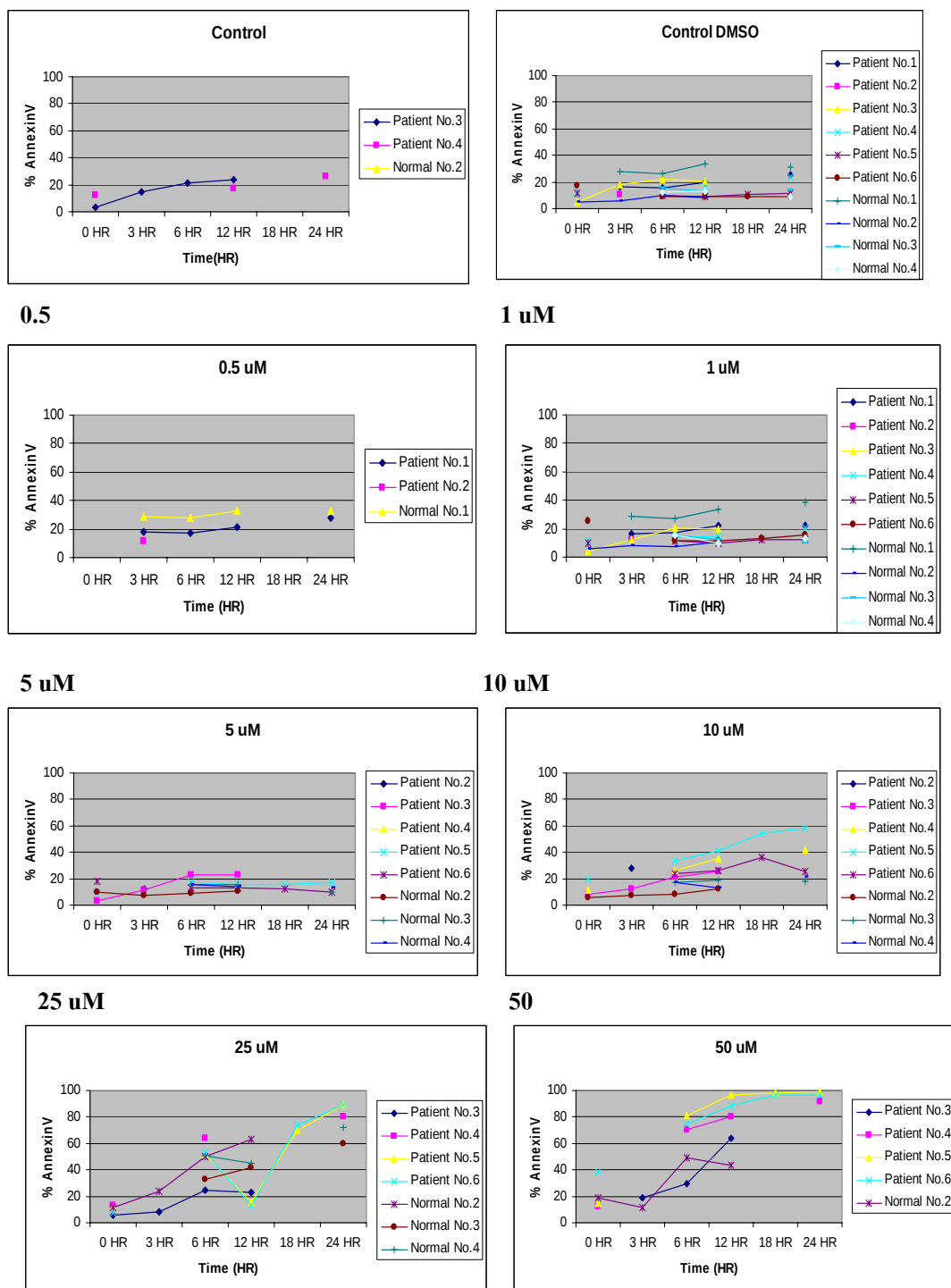
ผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E มี oxidative stress สูง โดยตรวจพบระดับของ malondi-aldehyde ซึ่งเป็นผลผลิตของ lipid peroxidation สูงกว่าคนปกติ มีระดับของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น reduced glutathione (GSH) ต่ำและมีค่าของ antioxidant enzyme ต่าง ๆ เช่น superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GSH-Px) เปลี่ยนแปลงไป แต่ในขณะเดียวกันก็มีรายงานการเกิด enhanced apoptosis ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนในไขกระดูกของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดภาวะซีด (anemia) ในผู้ป่วย ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่จะต้องศึกษาผลของ curcumin ในขนาดต่าง ๆ ที่จะต้องให้ และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย โดยการวัดจำนวน phosphatidylserine (PS) ที่ผิวด้านนอกของเซลล์ และวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของ reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์

1. การวัดจำนวน phosphatidylserine (PS) ที่ผิวด้านนอกของเซลล์ ทำโดยเจาะเลือด peripheral blood จากคนปกติ 4 รายและผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E 6 ราย ปั่นแยกเซลล์ต้นกำเนิด (CD 34) และนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยการเติม cytokines ต่าง ๆ และ erythropoietin (EPO) ให้เจริญเป็น เซลล์เม็ดเลือดแดงต้นกำเนิด (ECFC, erythroid colony forming cells) ในวันที่ 7 แล้วจึงเติม active ingredient ของ curcumin ($C_{21}H_{20}O_6$; 1,7-bis [4-hydroxy-3-methoxyphenyl]-1,6-heptadiene-3,5-dione, Sigma, USA) ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 และ 50 μM โดยการละลาย curcumin ใน 0.2% DMSO ภายหลังจากการ เติมน้ำละลาย curcumin นาน 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง จึงเติมสาร annexin V ที่ติดฉลากกับสารฟลูออเรสเซนต์ FITC ลงไปจับกับ PS บนผิวเซลล์ ทำให้สามารถตรวจหาปริมาณ PS บนผิวเซลล์ได้ด้วยเครื่อง flow cytometer

2. ตรวจหาปริมาณ reactive oxygen species (ROS) นำเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้สาร curcumin ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มาเติมสาร dichlorofluoresceine diacetate (DCFH-DA) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 mm แล้วอุ่นนาน 15 นาที ที่ $37^{\circ}C$ สาร DCFH-DA ที่ซึมผ่านผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงเข้าไป จะถูกตัดเอาหมู่ diacetate ที่ปลายออกด้วยเอนไซม์ esterase ในเซลล์เกิดเป็นสาร DCFH ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ ROS ภายในเซลล์ โดยมี H_2O_2 ที่เติมลงไปเป็นตัวกระตุ้น จะเปลี่ยนเป็นสาร DCF ซึ่งจะให้สารเรืองแสงสีเขียว ผลการศึกษา

เมื่อเติม curcumin ความเข้มข้น 0-5 μM เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ PS บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง (รูปที่ 12) แต่ความเข้มข้นของ curcumin ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 10 μM หรือการ incubate นานกว่า 6 ชั่วโมงขึ้นไป จะพบค่า annexin V เพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งชี้ถึงการที่มีปริมาณ PS บนผิวเซลล์ สูงขึ้น แสดงว่าเซลล์ของผู้ป่วยบางรายเริ่มมีการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้น ปริมาณ PS จะยิ่งสูงขึ้นเมื่อเติม curcumin ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นถึง 50 μM โดยพบค่า annexin V เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 65-95 เมื่อ incubate นาน 6-12 ชั่วโมง ซึ่งเม็ดเลือดแดงของคนปกติจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย

ผลการทดลองจึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของ bisdemethoxy curcumin มีผลต่อคุณสมบัติการ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อให้ curcumin ความเข้มข้นเพียง 5 μM หรือน้อยกว่า ถ้า curcumin มีความเข้มข้นสูงกว่านี้อาจจะทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis



รูปที่ 12 แสดงค่า annexin V positive red blood cells เมื่อเติม curcumin ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน ในคนปกติ 4 รายและผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E 6 ราย

3.4.2.2 การศึกษา pharmacokinetics ของ curcuminoids ในอาสาสมัครปกติ

ผู้วิจัยได้ทดลองศึกษา pharmacokinetics ของ curcuminoids ที่ผลิตจากองค์การเภสัชกรรม ขนาดแคปซูลละ 250 มก. ในอาสาสมัครปกติจำนวน 20 คน ที่ลงชื่อยินยอมเข้าร่วมโครงการและได้รับการคัดกรองจากแพทย์ให้เป็นไปตามเกณฑ์คัดเลือก โดยอาสาสมัครจะรับประทาน curcuminoids ครั้งเดียว จำนวน 6 กรัม (24 แคปซูล) เพื่อศึกษา pharmacokinetics หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ อาสาสมัครจะมารับ folic acid เพื่อรับประทานวันละครั้ง เป็นเวลา 14 วันและในวันที่ 14 อาสาสมัครจะต้องมาโรงพยาบาล เพื่อรับประทาน curcuminoids อีกครั้ง 6 กรัม พร้อมกับ dose สุดท้ายของ folic acid เพื่อศึกษาผลของ folic acid ต่อ pharmacokinetics ของ curcuminoids

อาสาสมัครจะได้รับการเจาะเลือด หลังจากอดอาหารประมาณ 10 ชั่วโมง จำนวน 20 มล. เป็น baseline ก่อนจะได้รับ curcuminoids จำนวน 6 กรัม พร้อมกับน้ำ 250 มล. หลังจากนั้นจะถูกเจาะเลือดที่ เวลา 15, 30, 60, 75 นาที 1.5, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง อาสาสมัครรับประทานอาหารและน้ำดื่มได้หลังรับ curcuminoids 2 ชั่วโมง เลือดที่ได้จะถูกนำไปแยกเม็ดเลือดและพลาสมา หลังจากนั้นเก็บพลาสมาที่ -80°C จนกระทั่งวิเคราะห์หาระดับ curcuminoids ส่วนเม็ดเลือดแดงนำไปวิเคราะห์ค่าสารต้านอนุมูลอิสระ

การวัดระดับ plasma curcuminoids และ active metabolites ทำโดยใช้ liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) และบันทึกผล plasma concentration time curve คำนวณค่า pharmacokinetics parameters ที่อธิบายระดับยาที่ดีที่สุด (ตารางที่ 10) นอกจากนั้นได้ทำการ validate วิธีก่อนทำการวิเคราะห์ตาม bioanalytical method validation (US FDA) ดังนี้

1. specificity การวิเคราะห์ plasma 6 ตัวอย่าง ของอาสาสมัครไม่มี endogenous peak ที่ retention time ของ curcuminoids และ internal standard
2. recovery ของ curcuminoids ใน plasma ในช่วง 0.01-1 $\mu\text{g/ml}$ หลังจาก liquid-liquid extraction พบว่า recovery ของ curcumin = 84.4-92.3% demethoxycurcumin = 84.6-91.5% และ bis-demethoxycurcumin 88-94.6%
3. lower limit of quantitation (LLOQ) โดยดูจาก signals to noise ratio พบว่า LLOQ ของวิธีนี้ = 0.005 $\mu\text{g/ml}$
4. linearity และ calibration range พบว่า curcuminoids ทั้ง 3 ตัว จะอยู่ใน linear ที่ช่วงความเข้มข้น 0.005 ถึง 1 $\mu\text{g/ml}$ และมีค่า $r^2 \geq 0.99$
5. accuracy และ precision พบว่า intra-day, inter-day accuracy และ precision อยู่ในช่วงยอมรับได้

6. ทดสอบ stability ที่ -80°C นาน 3 เดือน, freeze-thaw 3 cycles และ stability ของ processed samples (26 h ที่ 5°C) จำนวน $n = 3$, และ 2 ความเข้มข้น (0.0075 และ $0.75 \mu\text{g/ml}$) พบว่า อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ 10 pharmacokinetic ของ curcumin ในอาสาสมัครปกติ ที่ได้รับขมิ้นชัน 6 กรัม ($\text{mean} \pm \text{SEM}$)

Parameters	Male (n = 13)	Female (n = 7)	Total (n = 20)
$T_{1/2}$ (h)	5.072 ± 0.94	11.001 ± 5.532	7.147 ± 2.041
MRT (h)	7.072 ± 1.491	17.127 ± 8.068	10.591 ± 3.052
$\text{AUC}_{0-\infty}$ (ng.h/ml)	3.191 ± 0.675	10.382 ± 5.547	5.708 ± 2.051
Vd/F/kg (L/h/kg)	359296 ± 340335	322118 ± 135904	346284 ± 75602
C_{max} (ng/ml)	0.646 ± 0.125	0.658 ± 0.142	0.650 ± 0.093
T_{max} (h)	1.19 ± 0.04	1.32 ± 0.04	1.24 ± 0.03

3.4.2.3 การศึกษา oxidative stress และผลของการใช้ curcumin ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

การศึกษานี้ได้รับความร่วมมือจากองค์การเภสัชกรรม ในการผลิต curcumin capsule ขนาด 250 mg ให้กับผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E โดยมีผู้ป่วยที่ให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการจำนวน 24 ราย (11 ราย ได้รับการตัดม้ามแล้ว) ผู้ป่วยมีอายุระหว่าง 16-48 ปี และมีระดับฮีโมโกลบิน $4.7-9.5 \text{ g/dl}$ ผู้ป่วยจะได้รับ curcumin ขนาด 250 mg/แคปซูล วันละ 2 แคปซูลทุกวัน เป็นเวลา 6 เดือน

เนื่องจาก curcumin มีโครงสร้างที่สามารถจับธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปของ ferric nitrate และ non-transferrin bound iron (NTBI) หรือ nonheme iron ด้วย ในรายงานครั้งนี้ นอกจากจะศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสภาวะ oxidative stress จึงได้ศึกษาปริมาณ nonheme iron และ PF3-like activity ในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยด้วย เมื่อผู้ป่วยรับประทาน curcumin ครบ 6 เดือน จึงเจาะเลือดตรวจวัดสภาวะ oxidative stress รวมทั้ง nonheme iron และ PF3-like activity ในเลือดผู้ป่วยอีกครั้ง หลังจากนั้นให้ผู้ป่วยหยุดยาเป็นเวลา 3 เดือน แล้ววัด parameters ต่าง ๆ อีกครั้ง

ผลการศึกษา

การให้ขมิ้นชันกับผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบิน อี เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าตัวชี้วัดต่าง ๆ ที่กล่าวมาเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้นและสามารถลดปริมาณของ nonheme iron และ PF3 like activity ของ

เม็ดเลือดแดงลงได้ (ตารางที่ 11) เมื่อหยุดยาพบว่าค่า oxidative stress, antioxidants, nonheme iron และ PF3 like activity กลับมาอยู่ในระดับใกล้เคียงกับระดับก่อนที่จะได้รับขมิ้นชัน ผลการศึกษานี้แสดงถึงข้อดีอีกประการหนึ่งของการใช้ curcumin ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ที่มีทั้งปัญหา oxidative stress และ iron overload

ตารางที่ 11 ผลของ curcumin ต่อ oxidative stress, antioxidant, nonheme iron และ PF3 like activity (PS) ในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย β -thalassemia/HbE ก่อนให้ยา (0 month), หลังให้ยาเป็นเวลา 6 เดือน (6 months) และหลังจากหยุดยาเป็นเวลา 3 เดือน (withdrawal 3 months)

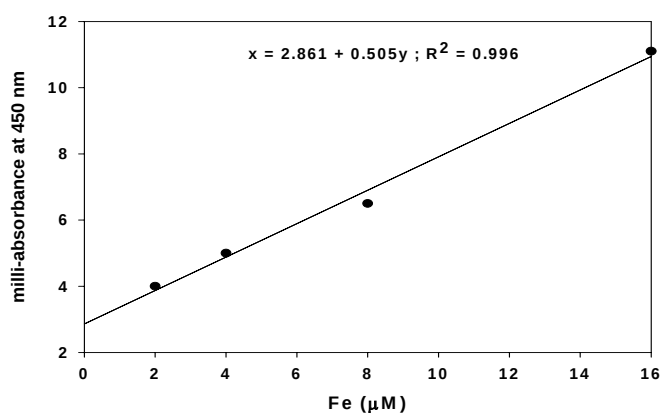
Subjects Biochemical parameters	Curcumin treatment (months)	Normal n=27	β -thalassemia/Hb E patient		
			splenectomized n=11	non-splenect. N=13	total n=24
MDA (nmols/g Hb)	0	565.9 $\pm$ 110.9	1625.4 $\pm$ 160.4	1571.2 $\pm$ 251.3	1596.1 $\pm$ 207.4
	6		1220.6 $\pm$ 137.7	1000.5 $\pm$ 225.9	1101.4 $\pm$ 213.2
	withdrawal 3		1661.4 $\pm$ 198.5	1505.3 $\pm$ 325.5	1583.4 $\pm$ 274.9
SOD (units/g Hb)	0	2867.9 $\pm$ 234.3	4986.2 $\pm$ 772.8	4614.4 $\pm$ 610.7	4784.8 $\pm$ 700.0
	6		4127.1 $\pm$ 790.2	3940.2 $\pm$ 303.3	4028.6 $\pm$ 572.7
	withdrawal 3		5288.1 $\pm$ 798.8	5040.5 $\pm$ 461.1	5164.3 $\pm$ 648.9
GSH-Px (units/g Hb)	0	28.3 $\pm$ 2.15	50.7 $\pm$ 6.7	44.0 $\pm$ 4.7	47.0 $\pm$ 6.5
	6		38.8 $\pm$ 5.3	37.0 $\pm$ 3.7	37.8 $\pm$ 4.5
	withdrawal 3		48.2 $\pm$ 7.2	46.2 $\pm$ 6.7	47.2 $\pm$ 5.9
GSH (mg/dl)	0	53.9 $\pm$ 9.0	48.2 $\pm$ 7.2	53.1 $\pm$ 10.5	50.8 $\pm$ 9.3
	6		58.0 $\pm$ 7.4	61.1 $\pm$ 7.5	59.7 $\pm$ 7.6
	withdrawal 3		40.1 $\pm$ 7.3	48.9 $\pm$ 7.5	44.5 $\pm$ 8.5
Nonheme iron (nmol Fe/mg protein)	0	0.8 $\pm$ 1.5	108.7 $\pm$ 27.4	4.5 $\pm$ 4.0	52.3 $\pm$ 56.1
	6		75.0 $\pm$ 28.1	0.8 $\pm$ 1.9	34.8 $\pm$ 42.1
	withdrawal 3		97.9 $\pm$ 24.5	9.3 $\pm$ 3.8	53.6 $\pm$ 48.8
PF3 like activity (OD 405)	0	0.25 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.4
	6		0.6 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.3
	withdrawal 3		1.1 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.4

3.4.3 การศึกษาเรื่อง non-transferrin bound iron (NTBI) และผลของไขมันชั้นและหาเขียว ในการจับธาตุเหล็ก

ปกติธาตุเหล็กในพลาสมาจะถูกจับอยู่กับโปรตีน transferrin หรือ ligands อื่น ๆ เช่น albumin ร่างกายผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E มีธาตุเหล็กสะสมมาก ปริมาณธาตุเหล็กรวมและทรานส์เฟอร์ริน (transferrin) ในพลาสมามีความอิ่มตัวเพิ่มมากขึ้น จนอิ่มตัวร้อยละ 100 (transferrin saturation) ทำให้มีธาตุเหล็กที่ไม่จับกับทรานส์เฟอร์ริน เรียกว่า non-transferrin bound iron (NTBI) ปรากฏในพลาสมาของผู้ป่วย β -thalassemia ขณะนี้ยังไม่ทราบโครงสร้างทางเคมีที่แน่ชัดของ NTBI แต่ถูกตรวจพบเป็นครั้งแรกใน serum ของผู้ป่วยในปริมาณ 1-10 μ M มีหลักฐานว่าธาตุเหล็กที่เรียกว่า NTBI นี้เป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่ไปทำลาย lipids, nucleic acids, proteins และ carbohydrates ทำให้การทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ผิดปกติไป ทำให้เกิดอาการตับแข็ง กล้ามเนื้อหัวใจทำงานผิดปกติ ต่อมไร้ท่อต่าง ๆ โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับการผลิต sex hormone และ insulin จะทำงานได้น้อยกว่าปกติ เป็นต้น ธาตุเหล็ก NTBI ในพลาสมามีส่วนทำให้ผู้ป่วยติดเชื้อมากขึ้นได้ง่ายและทำให้การทำหน้าที่ของเซลล์เอนโดทิลีียมบริเวณหลอดเลือดคอกพรวง ปัจจุบันธาตุเหล็ก NTBI ได้รับความสนใจในแง่ที่เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ที่สัมพันธ์กับภาวะธาตุเหล็กเกินและใช้เป็นตัวติดตามสัมฤทธิ์ผลของการรักษาภาวะเหล็กเกินในผู้ป่วยที่ได้รับยาขับเหล็ก

3.4.3.1 การวัดระดับ Non-transferrin bound iron (NTBI) ในซีรัมของหนูธาลัสซีเมีย

ความสำเร็จในการใช้เทคนิค GET recombination system ร่วมกับเทคนิคการสอดใส่ยีน β^E และยีน $\beta^{4\text{-bp deletion}}$ เข้าไปในพลาสมิด pEBAC/148 β ทำให้สามารถสร้างหนูทดลองที่มีมิวเตชันใน codon 41/42 (4-bp deletion) และใน codon 26 (HbE) ของ β -globin gene ซึ่งเป็นยีนธาลัสซีเมียที่พบบ่อยที่สุดในคนไทย หนูธาลัสซีเมีย (double heterozygote) ที่มี transgene ชนิดต่าง ๆ มีอาการของโรคธาลัสซีเมียคล้ายคลึงกับที่เกิดในคนที่เป็นโรคธาลัสซีเมีย พยาธิสภาพที่น่าสนใจอย่างหนึ่ง คือ อาการซีด อันเนื่องมาจากการมีฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียรอยู่ในเม็ดเลือดแดงของหนู transgenic ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลายง่ายกว่าปกติ และเกิดภาวะโลหิตจางขึ้น ทำให้มีปริมาณธาตุเหล็กเกิน จนเกิดการสะสมของธาตุเหล็กที่บริเวณเนื้อเยื่อต่าง ๆ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาและตรวจวัดปริมาณของธาตุเหล็ก NTBI ในพลาสมาหรือซีรัมของหนูธาลัสซีเมียที่สร้างขึ้น โดยการนำตัวอย่างซีรัมที่ได้มาจากการเจาะเลือดจากหัวใจ (cardiac puncture) ของหนูทดลอง 3 ตัว (รหัสเป็น 1S, 2S และ 3S ซึ่งมีหนูธาลัสซีเมียรวมอยู่ด้วย) มาทำการวัดปริมาณ NTBI ด้วยวิธี NTA chelation/HPLC และอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานที่แสดงปริมาณธาตุเหล็กความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ตรวจวัดได้ด้วยวิธี HPLC (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของปริมาณธาตุเหล็กความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ตรวจวัดได้ด้วยวิธี HPLC

ผลการศึกษา

ในซีรัมของหนูทดลอง 2 ใน 3 ตัวคือ 2S และ 3S มีธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ปรากฏขึ้นเหมือนกับที่ตรวจพบได้ในซีรัมของคนที่เป็นโรค homozygous β -thalassemia (ตารางที่ 12) หนูทดลอง 2S และ 3S ที่เป็น transgenic mice และเป็นโรคธาลัสซีเมีย จึงเหมาะที่จะนำมาเป็นแบบอย่างของหนูทดลอง เพื่อศึกษาภาวะเหล็กเกินที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ร่วมกับการที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการฉีดสารละลายธาตุเหล็กเข้าไปในปริมาณสูง เพื่อใช้ศึกษาผลสัมฤทธิ์ของยาขับเหล็กในการลดภาวะเหล็กเกิน ก่อนที่จะนำไปใช้ศึกษาทดลองในคนที่เป็นผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 12 ปริมาณ NTBI ที่ตรวจวัดได้ในซีรัมของหนูทดลอง 3 ตัว (1S, 2S และ 3S) และผู้ป่วยโรค homozygous β -thalassemia 1 ราย และคนปกติ 1 ราย

ตัวอย่างซีรัม	ปริมาณ NTBI (ไมโครโมลาร์)
หนูทดลอง 1S	0.28
หนูทดลอง 2S	7.21
หนูทดลอง 3S	6.22
ผู้ป่วยโรค homozygous β -thalassemia	6.22
คนปกติ	0.27

3.4.3.2 การศึกษาเรื่อง Non-transferrin-bound iron และปฏิสัมพันธ์กับขมิ้นชัน (curcumin)

การบำบัดด้วยยาขับเหล็ก เช่น เดสเฟอร์ร็อกซามีน (desferioxamine) หรือดีเฟอร์ริโพรน (deferiprone) หรือทั้งสองชนิดรวมกัน เป็นวิธีที่กำจัดธาตุเหล็กที่มากเกินไปออกจากร่างกายได้ เป็นการช่วยป้องกันอันตรายจากการเกิดสารอนุมูลอิสระที่มีธาตุเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและส่งผลให้ผู้ป่วยมีอายุยืนยาวขึ้น มีคุณภาพชีวิต (quality of life) ที่ดีขึ้น แต่มีค่าใช้จ่ายที่สูง ต้องทำการรักษาอย่างต่อเนื่องและมีฤทธิ์ข้างเคียงที่เป็นอันตราย

แม้ว่า curcumin จะมีโครงสร้างที่อาจจะจับธาตุเหล็ก (iron-chelating activity) เพราะมี β -diketo moiety ซึ่งสามารถจับเหล็ก ferric ion (Fe^{+3}) ได้ แต่ยังไม่มีการศึกษาวิจัยการจับธาตุเหล็กจากพลาสมาด้วย curcumin มาก่อน ในรายงานนี้จึงได้ทำการวิจัยเพื่อศึกษาคุณสมบัติของ curcumin ในการจับธาตุเหล็กทั้งที่อยู่ในรูปของ ferric nitrate (chemical form) และ NTBI (biological form) ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

1. การศึกษาการจับธาตุเหล็กในรูป ferric nitrate ของ curcumin

Incubate ferric nitrate 0-100 μM กับ curcumin ที่มีความเข้มข้น 100 μM ใน MOPS buffer, pH 7 ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบมีสีของ iron-curcumin ที่ได้โดยใช้ความยาวช่วงคลื่น 400-800 nm พบว่าความยาวช่วงคลื่น 500 nm สามารถวัดการจับเป็นสารประกอบระหว่างธาตุเหล็กกับ curcumin ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของธาตุเหล็ก คือ

- ๑ Fe^{+3} ที่มีความเข้มข้น 20 μM curcumin จะอิ่มตัว (saturate) ในเวลา 10 นาที
- ๑ Fe^{+3} ที่มีความเข้มข้น 40 μM curcumin จะอิ่มตัว (saturate) ในเวลา 15 นาที
- ๑ Fe^{+3} ที่มีความเข้มข้น 100 μM curcumin จะอิ่มตัว (saturate) ในเวลา 25 นาที

2. การศึกษาการจับธาตุเหล็กในรูปของ NTBI ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

นำ pooled serum ของผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ไม่ได้รับยาขับธาตุเหล็กมาทำปฏิกิริยากับ curcumin หรือ desferrioxamin (DFO) ความเข้มข้น 12.5–100 μM แล้ววัดความเข้มข้นของ NTBI ที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC ซึ่งทำได้ 2 แบบ คือ อาจเติม aluminium 100 μM ลงไปก่อนที่จะเติม NTA เพื่อป้องกัน iron-shuttling effect ระหว่างปฏิกิริยา (blocking step) หรือไม่มีการเติม aluminium

ผลการศึกษา

- ถ้าไม่เติม aluminium blocking เมื่อมี curcumin หรือ DFO ระดับของ NTBI จะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงระดับ maximum ในเวลา 1 ชั่วโมง (Δ NTBI = -5.6 μM เมื่อเติม curcumin และ Δ NTBI = -5.8 μM เมื่อเติม DFO) การลดลงของ NTBI นี้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมี ascorbic acid ความเข้มข้น 100 μM การจับธาตุเหล็กในรูปของ NTBI ออกอย่างรวดเร็ว เมื่อไม่มี aluminium blocking อาจเกิดจาก iron shuttling effect เนื่องจากสารตัวอย่าง NTBI มี excess unbound iron chelator

- ถ้าเติม aluminium blocking การจับธาตุเหล็กในรูป NTBI จะลดลงค่อนข้างช้าและเป็น biphasic คือ ระยะแรกจะเร็วแล้วจะช้าลง ผลการจับธาตุเหล็กใน 30 นาทีแรกพบว่า

๑ NTBI ลดลง 1.1 μM เมื่อมี curcumin 12.5 μM

๑ NTBI ลดลง 1.9 μM เมื่อมี curcumin 25 μM

๑ NTBI ลดลง 1.2 μM เมื่อมี DFO 12.5 μM

๑ NTBI ลดลง 2.8 μM เมื่อมี DFO 25 μM

- เมื่อเติม ascorbic acid 100 μM ภายในชั่วโมงแรก

๑ NTBI ลดลงจาก 7.0 เป็น 6.1 μM เมื่อมี curcumin 100 μM

๑ NTBI ลดลงจาก 7.0 เป็น 2.9 μM เมื่อมี DFO 100 μM

การจับเหล็กในรูปของ NTBI ด้วย curcumin นอกจากจะมีลักษณะเป็น biphasic แล้วยังขึ้นอยู่กับเวลาและความเข้มข้นของธาตุเหล็กด้วย จะต้องทำการศึกษาต่อไปเพื่อศึกษาว่าส่วนประกอบใดใน curcumin ที่มีบทบาทในการจับธาตุเหล็กและ NTBI ชนิดใดที่ถูกจับออกได้ด้วย curcumin เพื่อที่จะนำไปใช้ในการประเมินผลการใช้ curcumin ในแง่ของการเป็น oral iron chelator ต่อไป

3.4.3.3 ผลของสารสกัดชาเขียวในการดึงธาตุเหล็กในรูป non-transferrin bound iron (NTBI) และการลดปริมาณอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นด้วยซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ชาเป็นพืชที่ได้รับความนิยมในการบริโภคมากที่สุดชนิดหนึ่งของโลก การดื่มชาเขียวหนึ่งแก้ว (ปริมาณ 1.2 กรัม) ทำให้มีสารแคเทชินอยู่ในพลาสมาในปริมาณ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำใบชามาทำให้แห้งและผ่านกระบวนการหมัก จะได้เป็นชาหลายชนิด การผลิตชาเขียว (unfermented หรือ green tea) ไม่ต้องการผ่านกระบวนการหมัก ชาจีนอู่หลง (semi-fermented หรือ Oolong tea) ได้จากการนำใบชามาหมักช่วงระยะสั้น ๆ ส่วนชาดำ (fully-fermented หรือ black tea) ได้จากการนำใบชามาหมักเป็นเวลานานประมาณ 1 เดือน ในระหว่างที่ทำการหมักใบชาชนิดนั้นเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) ที่มีอยู่ในใบชาจะทำลายสารประกอบโพลีฟีนอลจำพวกสารแคเทชิน (catechins, C) อีพิกะเตชิน (epicatechin, EC) อีพิกะเตชินแกลเลต (epicatechin 3-gallate, ECG) อีพิกัลโลเคเตชิน (epigallocatechin, EGC) แกลโลเคเตชิน (gallocatechin gallate, GCG) และอีพิกัลโลเคเตชินแกลเลต (epigallocatechin 3-gallate, EGCG) ให้มีปริมาณน้อยลง การนำใบชาอ่อนที่ไม่ผ่านการหมักมาทำการอบ คั่วหรือหนึ่ง ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิสูงในเวลาสั้น ๆ จะช่วยหยุดยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว สารแคเทชินจะมีฤทธิ์ต้านและป้องกันการเกิดโรคเมเร็ง รวมทั้งโรคระบบหลอดเลือดและหัวใจ ช่วยป้องกันเม็ดเลือดแดงถูกทำลายโดยภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไป สาร ECG จากชาเขียวช่วยป้องกันลิโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ ไม่ให้ถูกออกซิไดซ์ด้วยสารอนุมูลอิสระ

สารประกอบโพลีฟีนอลในชาเขียวที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ (2-20 ไมโครโมลาร์) ยังมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ ลดภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไปและจับธาตุเหล็ก (bifunctional activities) ได้อีกด้วย

สาร catechin ในใบชาเขียวเป็นกลุ่มสารฟลาโวนอล (flavanols) ที่มีฤทธิ์ด้านการออกซิเดชันดีเยี่ยม พบว่ามีสาร catechin อยู่ประมาณ 20% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งน่าจะเป็นปริมาณที่มีความสำคัญมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG และ catechins ที่พบได้ในปริมาณสูงที่สุด ตามด้วยสาร ECG, EGC และ EC ตามลำดับ คุณสมบัติด้านการออกซิเดชันเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ $ECG > EGCG > EGC > GA > EC > C$ สาร catechin เหล่านี้มีความไวต่อการถูกออกซิไดส์ได้ง่าย สาร EGCG มีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันแรงที่สุดในกลุ่มสาร catechin โดยอาจจะจับกับอะตอมธาตุเหล็กในโมเลกุลของเอนไซม์ ribonucleotide reductase ซึ่งจำเป็นในการเจริญเติบโตของ ผลการศึกษาวิจัยร่วมกับมูลนิธิโครงการหลวงเมื่อเร็ว ๆ นี้ พบว่าผลิตภัณฑ์ชาเขียวแห้งที่เตรียมจากการอบแห้งในตู้ไมโครเวฟ (กำลังไฟฟ้า 800 วัตต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) นาน 3 นาที ยังคงมีปริมาณสาร catechin รวม สาร catechin ชนิด EGCG รวมทั้งฤทธิ์ด้านการออกซิเดชันเปรียบเทียบกับได้หรือดีกว่า ผลิตภัณฑ์ชาเขียวที่ผลิตขึ้นด้วยวิธีเชิงพาณิชย์อีกด้วย

งานวิจัยส่วนนี้เป็นการตรวจวัดคุณสมบัติของสารสกัดชาเขียว ในการดึงและลดปริมาณ ธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ในซีรัมของผู้ป่วยและตรวจวัดความสามารถของสารสกัดชาเขียว ในการลดปริมาณ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดงของคนปกติ ที่ถูกกระตุ้นด้วยซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียชนิด β -thalassemia major

1. การศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวในการลดปริมาณ NTBI ในซีรัม

ก. ผลความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียว

นำซีรัมผู้ป่วยโรค β -thalassemia major จำนวน 0.9 มล. มา incubate กับ สารสกัดชาเขียว (ความเข้มข้นสุดท้าย 0-0.5 กรัมเปอร์เซ็นต์) และสารละลาย desferioxamine (ความเข้มข้นสุดท้าย 0-100 ไมโครโมลาร์) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง แล้วแบ่งซีรัม เป็นสองส่วน ๆ ละ 0.45 มล. ส่วนหนึ่งไม่เติมและอีกส่วนหนึ่งเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์) ลงไป เพื่อป้องกันการเกิด iron-shuttling effect ซึ่งจะทำให้ ปริมาณ NTBI ที่ตรวจวัดได้ต่ำกว่าที่เป็นจริง แล้ว incubate ต่อไปอีก 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงเติมสารละลาย NTA (ความเข้มข้นสุดท้าย 80 มิลลิโมลาร์) ลงไปในซีรัมทั้งสองส่วนและ incubate ต่อไปอีก 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงปั่นผ่าน membrane filter (30-kD cut off) เพื่อแยกโปรตีนต่าง ๆ ที่มีอยู่ในซีรัมออกไป นำส่วนใส ultra-filtrate ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี NTA chelation/HPLC (Singh et al., *Anal. Biochem.* 1990)

ข. ผลของเวลา

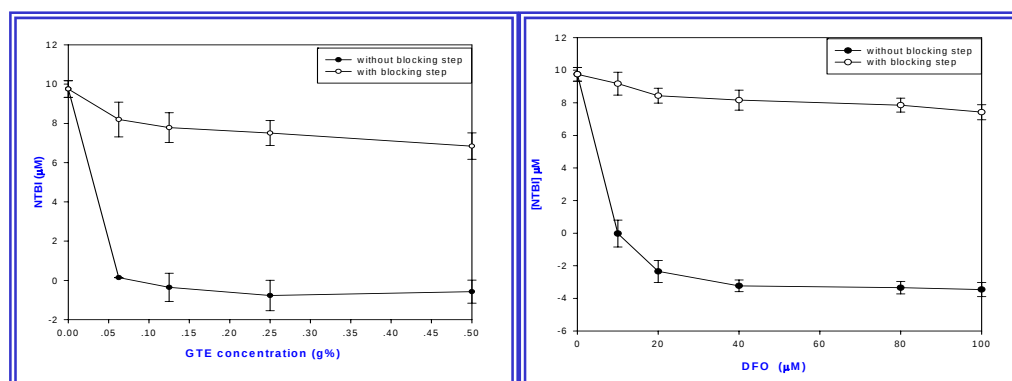
นำซีรัมผู้ป่วยโรค β -thalassemia major จำนวน 0.9 มล. มา incubate กับสารสกัดชาเขียว (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 กรัมเปอร์เซ็นต์) และสารละลาย desferioxamine (ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครโมลาร์) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลานาน 0, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งซีรัมเป็นสองส่วน ๆ ละ 0.45 มล. ส่วนหนึ่งไม่เติมและอีกส่วนหนึ่งเติมสารละลาย อะลูมิเนียมคลอไรด์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์) ลงไป แล้ว incubate ต่อไปอีก 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นจึงเติมสารละลาย NTA (ความเข้มข้นสุดท้าย 80 มิลลิโมลาร์) ลงไปในซีรัมทั้งสองส่วนและ incubate ต่อไปอีก 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นผ่าน membrane filter และนำส่วนใส ultra-filtrate ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี NTA chelation/HPLC

2. ผลของสารสกัดชาเขียวต่อปริมาณอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้น

แบ่ง red blood cell suspension ของคนปกติ (40% hematocrit) ออกเป็นสองส่วน โดยส่วนหนึ่ง (pre-treatment) นำมา incubate กับสารสกัดชาเขียว (ความเข้มข้นสุดท้าย 2 กรัมเปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง และอีกส่วนหนึ่ง (simultaneous treatment) นำมา incubate กับสารสกัดชาเขียว (ความเข้มข้นสุดท้าย 2 กรัมเปอร์เซ็นต์) ร่วมกับสารละลาย Fe^{2+} -EDTA (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์), Fe^{3+} -NTA (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์) และซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิด β -thalassemia major (ปริมาณ NTBI 9.8 ไมโครโมลาร์) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลานาน 1 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นนำมา incubate กับสารเรืองแสง 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ร่วมกับสารละลาย 3% H_2O_2 และตรวจวัดการเรืองแสงสีเขียว (fluorescent intensity, FI) ที่เกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่อง flow cytometer

ผลการทดลอง

เมื่อไม่ได้เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ลงไปในซีรัม พบว่าสารสกัดชาเขียวสามารถกำจัด NTBI ที่มีอยู่ในซีรัมได้เกือบทั้งหมด (NTBI = -9.61 ไมโครโมลาร์) ซึ่งคล้ายกับการทำงานของ desferioxamine (NTBI = -9.77 ไมโครโมลาร์) ภายในเวลา 1 ชั่วโมง (รูปที่ 14, วงกลมทึบ) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจาก iron-shuttling effect ที่เกิดขึ้นในสถานะที่มีสารจับเหล็กในสารสกัดชาเขียวและ desferioxamine อิสระคงเหลืออยู่ในซีรัมที่ศึกษา แต่เมื่อเติมสารละลายอะลูมิเนียมลงไปยับยั้งผลดังกล่าว พบว่า สารสกัดชาเขียวและ desferioxamine ลดปริมาณ NTBI ลงอย่างช้า ๆ ในช่วง 1 ชั่วโมงแรก ต่อจากนั้นก็ลดลงอย่างช้ามาก (รูปที่ 14 วงกลมโปร่ง) ดังนั้นชนิดหรือรูปแบบของ NTBI ในซีรัม น่าจะมีผลต่ออัตราเร็วในการทำงานของสารสกัดชาเขียวและ desferioxamine นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณ 43.7 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ NTBI ถูกกำจัดออกไปโดยสารสกัดชาเขียว (ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์) และประมาณ 51.1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ NTBI ถูกกำจัดออกไปโดยสารละลาย desferioxamine (ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์) ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง



รูปที่ 14 ผลของสารสกัดชาเขียว (GTE) ที่ความเข้มข้น 0-0.5 กรัมเปอร์เซ็นต์ (รูปซ้าย) และยา desferioxamine (DFO) ที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลาร์ (รูปขวา) ในการลดปริมาณ NTBI (mean±SEM) ในซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียชนิด β -thalassemia major 3 ราย

การนำ red cell suspension มา incubate กับสารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงล่วงหน้า ก่อนที่จะกระตุ้นด้วยสารละลาย Fe^{3+} -NTA หรือซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย หรือการนำ red cell suspension มา incubate กับสารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์ร่วมกับการกระตุ้นด้วยสารละลาย Fe^{3+} -NTA หรือซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย พบว่าสารสกัดชาเขียวลดปริมาณอนุมูลอิสระได้ดี

ตารางที่ 13 ผล oxidative stress ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยธาตุเหล็กวิธีการต่าง ๆ

Induction	Time (Hour)	2% GTE treatment			
		Without treatment	Pre-treatment	Immediate treatment	Post-treatment
Fe-EDTA	1	242±128	447±336	411±230	484±269
	8	137±23	180±54	151	254±92
Fe-NTA	1	252±	89±21	83±21	86±36
	8	280±64	187±130	227±102	257±72
Serum	1	346±3	242±42	258	304±16
	8	438±229	126±58	133	290±139

ในเวลา 1 และ 8 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถยับยั้งหรือลดปริมาณอนุมูลอิสระใน red cell suspension ที่นำมา incubate กับสารละลาย Fe^{3+} -EDTA (ตารางที่ 13) แสดงว่าชาเขียวมีองค์ประกอบของสารบางอย่างที่สามารถจับและดึงธาตุเหล็กได้คล้ายกับ desferrioxamine แม้ว่าจะมีศักยภาพที่ต่ำกว่าเล็กน้อย ความสามารถของสารสกัดชาเขียวในการกำจัดธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ในซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมียเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ มีลักษณะที่ขึ้นกับเวลาและความเข้มข้นที่ใช้ และยังช่วยลดภาวะอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงปกติที่ถูกกระตุ้นด้วยซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI อยู่

3. ความสามารถในการดึงธาตุเหล็กกลุ่มที่ไม่จับกับทรานส์เฟอร์รินในซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยสารอิพิเกลโลเคเตชินและอิพิเคเตชินแกลเลตในสารสกัดชา

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบสัมฤทธิ์ผล (efficacy) ของสารสกัดหยาบ (crude extract) และส่วนต่างๆ (fractions) ของสารเคเตชินที่แยกได้จากชาเขียวในหลอดทดลองในการดึงธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ในซีรัมของผู้ป่วยโรค β -thalassemia และเปรียบเทียบความสามารถในการจับธาตุเหล็กของผลิตภัณฑ์ชาเขียวที่ผลิตด้วยวิธีเชิงพาณิชย์กับวิธีอบแห้งในตู้ไมโครเวฟ

การเตรียมสารละลายชาเขียวต่าง ๆ การวิเคราะห์และแยกชนิดสารเคเตชิน

การเตรียมผลิตภัณฑ์ชาเขียวแห้ง

นำใบชาสดมาแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำมาผ่านความร้อนในเตาไมโครเวฟด้วยกำลังไฟฟ้า 800 วัตต์เป็นเวลา 3 นาที (เรียกว่า microwave processed green tea) อีกส่วนหนึ่งนำส่งโรงงานชาเพื่อเตรียมเป็นใบชาเขียวแห้งด้วยวิธีเชิงพาณิชย์ (เรียกว่า commercial green tea) เก็บบรรจุผลิตภัณฑ์ชาเขียวแห้งทั้งสองไว้ใช้ในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

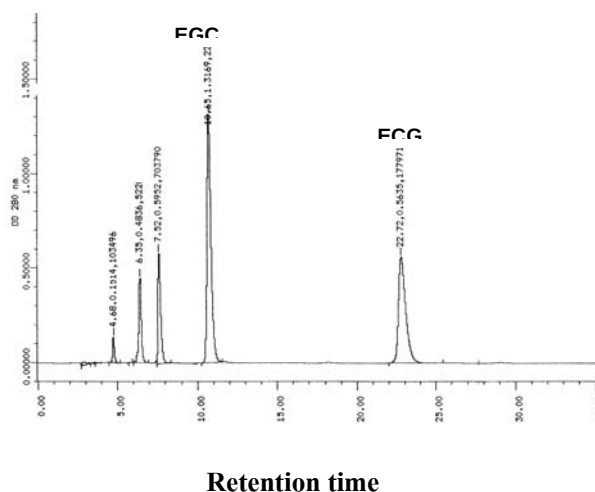
การเตรียมสารสกัดหยาบชาเขียว

นำใบชาเขียวแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยครกที่ทำด้วยกระเบื้องเคลือบ เติมน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสจำนวน 100 มิลลิลิตร ทำการสกัดเป็นเวลานาน 10 นาที กรองน้ำชาที่สกัดได้ลงบนกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร ก็จะได้สารสกัดหยาบชาเขียว (Green tea crude extract)

ก. การแยกสารเคเตชินต่างๆในชาเขียวด้วยวิธี HPLC

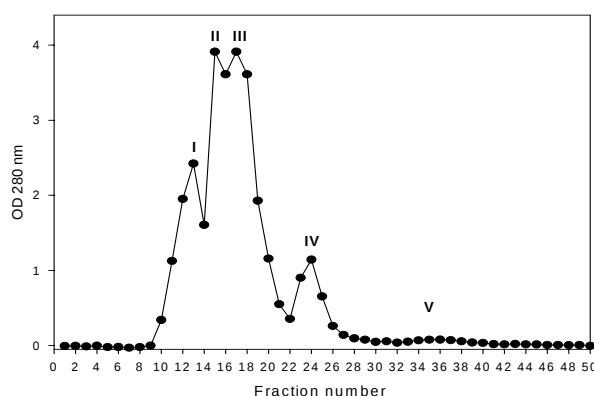
นำสารละลายชาเขียวที่เตรียมได้ไปแยกสารเคเตชินชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี Semi-preparative HPLC และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ นำผงสารเคเตชินต่างๆไปละลายใน MOPS buffer, pH 7.0 ก่อนนำไปใช้ศึกษาต่อไป

การวิเคราะห์สารสกัดชา (ความเข้มข้น 2 กรัมเปอร์เซ็นต์) ด้วยวิธี HPLC พบมีสาร catechin ต่าง ๆ ถูกชะออกมาตามลำดับเวลา (retention time, RT) ดังนี้ EGC (5.5 นาที), EC (RT 6.8 นาที), C (RT 9.8 นาที), EGCG (RT 11.5 นาที) และ ECG (RT 22.5 นาที) ซึ่งความเข้มข้นของสาร catechin ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในใบชาจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความสูงและพื้นที่ใต้กราฟ (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 สาร catechin ต่าง ๆ ในสารสกัดชาเขียวที่วิเคราะห์ได้โดยวิธี Analytical HPLC

การแยกสาร catechin ต่าง ๆ จากสารสกัดชาเขียวด้วยวิธี semi-preparative HPLC ได้สาร catechin ต่าง ๆ ทั้งหมด 5 ส่วน คือ Fraction I, II, III, IV และ V (รูปที่ 16) และพบว่าใน fraction I มีสาร Gallic acid และ EGC ใน fraction II มีสาร C และ EGCG ใน fraction III มีสาร C และ EC ใน fraction IV มีสาร ECG ส่วนใน fraction V ไม่พบสาร catechin ที่สนใจ



รูปที่ 16 สาร catechin ต่าง ๆ (fraction I, II, III, IV และ V) ที่แยกได้โดยวิธี semi-preparative HPLC

ข. การศึกษาจลศาสตร์ของสาร catechin ต่าง ๆ ในการจับกับธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ในซีรัม

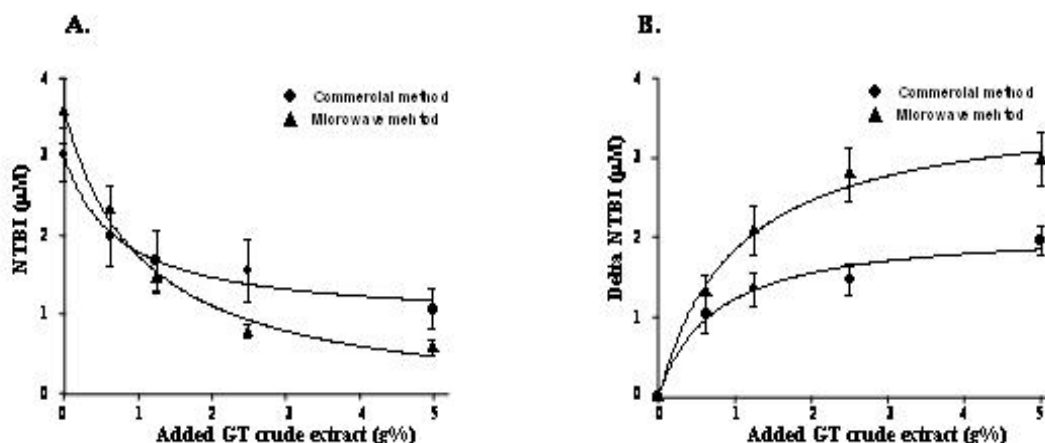
นำสารสกัดหยาบ (crude extract) และสาร catechin ต่างๆ (catechin fractions; EGCG และ ECG) จากชาเขียวมาทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียที่มีธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 0.5, 1, 2, 4 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมสารละลาย NTA ความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ เพื่อดึงธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ที่มีอยู่หรือเหลืออยู่ในพลาสมา ให้กลายเป็น Fe(NTA)_2 นำไปปั่นผ่าน ultrafiltration membrane (30-kD molecular weight cut-off) เพื่อกำจัดโปรตีนต่างๆ ในพลาสมาออกไป นำสารละลายที่ปั่นได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ด้วยวิธี RP-HPLC โดยอาศัยหลักการคือ สาร 1-methyl-2-propyl--3-hydroxypyridin-4-one (หรือ CP22) ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายชะที่ประกอบด้วย 19% acetonitrile ใน 5 mM MOPS, pH 7.0 จะแย่งจับธาตุเหล็กจากสารประกอบ $\text{Fe}^{3+}\text{-(NTA)}_2$ แทนที่ แล้วเปลี่ยนเป็นสารประกอบ $\text{Fe}^{3+}\text{-(CP22)}_3$ ซึ่งมีสีแดงและสามารถตรวจวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

ก..การดึงธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI โดยสารสกัดหยาบชาเขียว

ผลของความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียว

นำซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวน 10 รายมาทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาเขียว (microwave-processed และ commercial green tea) ความเข้มข้นสุดท้าย 0–0.5 g% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง และนำไปวัดปริมาณ NTBI ที่เหลืออยู่

ผลที่ได้ในรูปที่ 17A แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบชาเขียวทั้งสองชนิดมีความสามารถในการลดปริมาณ NTBI ลงได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ (concentration-dependent manner) ที่น่าสนใจคือชาเขียวที่เตรียมได้จากการอบแห้งในตู้อบไมโครเวฟ มีความสามารถในการลดปริมาณ NTBI ได้ดีกว่าชาเขียวที่เตรียมด้วยวิธีเชิงพาณิชย์ทั่วไป (รูปที่ 17B) ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่าการนำใบชาสดที่เก็บได้มาอบแห้งทันทีที่อุณหภูมิสูง (100 องศาเซลเซียส) สามารถยับยั้งการทำงานหรือทำลายเอนไซม์ โพลีเฟนิลออกซิเดสที่จะไปสลายสาร catechin ที่มีอยู่ในใบชา จึงทำให้มีปริมาณสาร catechin ต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG และ ECG ที่มีคุณสมบัติในการดึงธาตุเหล็กคงเหลืออยู่มากกว่าชาเขียวที่เตรียมด้วยวิธีเชิงพาณิชย์

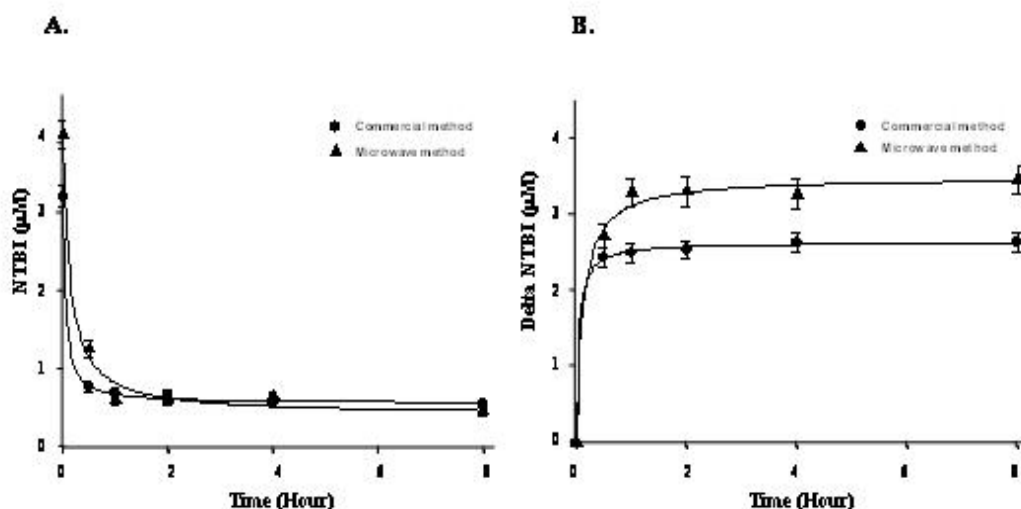


รูปที่ 17 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียว (microwave-processed และ commercial green tea) ในการลดปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI (mean $\pm$ SEM, n=10) ในซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (A) แสดงปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ที่ลดลง ตามความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียวที่เติมลงไป (B) แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ที่เป็นผลจากความเข้มข้นของสารสกัดชาเขียว

ผลของเวลา

เมื่อนำซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวน 10 ราย (5 รายยังไม่ได้รับการตัดม้ามและอีก 5 รายได้รับการตัดม้ามแล้ว) มาทำปฏิกิริยากับสารสกัดชาเขียว (microwave-processed และ commercial green tea) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 g% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 0-8 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดปริมาณ NTBI ด้วยวิธี NTA chelation/HPLC

ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดชาเขียวทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 g% มีความสามารถในการลดปริมาณ NTBI ได้ดี โดยจะพบว่าสารสกัดชาเขียวทั้งสองชนิดนี้สามารถลดปริมาณ NTBI ได้อย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลา 1-2 ชั่วโมงแรก (รูปที่ 18A) ต่อจากนั้นปริมาณ NTBI จะไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงมากนัก ในปริมาณความเข้มข้นเท่า ๆ กันสารสกัดชาเขียวที่เตรียมได้จากการอบแห้งในตู้อบไมโครเวฟมีความสามารถในการลดปริมาณ NTBI ได้ดีกว่าชาเขียวที่เตรียมด้วยวิธีเชิงพาณิชย์ทั่วไป (รูปที่ 18B) ซึ่งอาจเป็นเพราะว่ายังคงมีปริมาณสารเคเตชินต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG และ ECG ที่มีคุณสมบัติในการดึงธาตุเหล็กกลุ่มเหล็ออกมากกว่า



รูปที่ 18 ผลของเวลาในการลดปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI โดยสารสกัดหยาบชาเขียว (microwave-processed และ commercial green tea) (mean $\pm$ SEM, n=10) ในซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย A.) แสดงปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI ที่ลดลงตามเวลา B) แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของธาตุเหล็ก NTBI จากสารสกัดชาเขียวสองชนิด

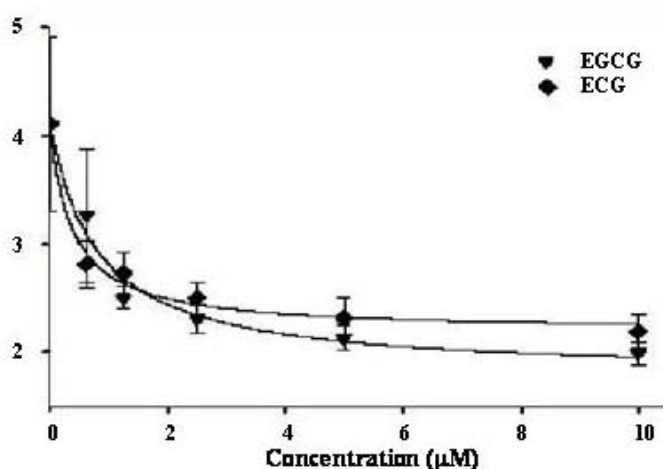
อย่างไรก็ตามจะสังเกตเห็นว่าแม้ว่าปริมาณ NTBI ในซีรัมจะถูกกำจัดให้หมดไปเป็นจำนวนมากโดยสารสกัดหยาบชาเขียวทั้งสองชนิด แต่ไม่สามารถถูกกำจัดไปได้ทั้งหมด ซึ่งอธิบายได้ว่า ในซีรัมผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่นำมาศึกษานี้มีปริมาณ NTBI อยู่ในระดับหนึ่งแต่มีอยู่ 2 รูปคือ รูปหนึ่งเป็น NTBI ขนาดโมเลกุลเล็ก (low-molecular weigh NTBI) ที่มีอะตอมของธาตุเหล็กจับตัวอยู่กับสารลิแกนด์ขนาดเล็ก (เช่น ซิเตรท ฟอสเฟตหรือ กรดอะมิโน กลูตามेट) ในพลาสมาและสามารถจับกับยาขับเหล็กที่ดึงเหล็กได้ดีกว่าได้ ส่วนอีกรูปหนึ่งเป็น NTBI ขนาดโมเลกุลใหญ่ (high-molecular weigh NTBI) ที่มีอะตอมของธาตุเหล็กจับตัวอยู่กับโปรตีนในพลาสมา (เช่น อัลบูมินและเซรูโลพลาสมิน) หรือจับตัวต่อกันเป็นสายโพลิเมอร์ยาว ดังนั้นโมเลกุลของยาขับเหล็กจึงไม่สามารถเข้าไปจับได้เนื่องจากผลของ steric hindrance ระหว่างโมเลกุลทั้งสอง

ง. การดึงธาตุเหล็กรูป NTBI โดยสารเคเตชิน EGCG และ ECG จากชาเขียว

ผลของความเข้มข้น

นำซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวน 10 รายมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย EGCG และ ECG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง และนำไปวัดปริมาณ NTBI ที่เหลืออยู่ ผลการทดลองในรูปที่ 19 แสดงให้เห็นว่าสาร EGCG ใน fraction II และสาร ECG ใน fraction IV สามารถลดปริมาณ NTBI ในซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ โดยพบว่าภายใน

1 ชั่วโมงสาร EGCG (ความเข้มข้น 10 μM) สามารถลดปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI จาก $4.11 \pm 0.81 \mu\text{M}$ เหลือ $2.01 \pm 0.21 \mu\text{M}$ ($\Delta\text{NTBI} = 2.10 \mu\text{M}$) ในขณะที่สาร ECG (ความเข้มข้น 10 μM) สามารถลดปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI จาก $4.11 \pm 0.81 \mu\text{M}$ เหลือ $2.15 \pm 0.30 \mu\text{M}$ ($\Delta\text{NTBI} = 1.96 \mu\text{M}$) แสดงว่าสารทั้งสองชนิดนี้ลดธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ได้ โดยที่สาร EGCG มีประสิทธิภาพดีกว่าสาร ECG เมื่อใช้ปริมาณเท่ากัน นอกจากนี้หุ้มแกลโกลิดในโมเลกุล EGCG และ ECG น่าจะมีบทบาทในการเข้าจับและดึงอะตอมธาตุเหล็กจากโมเลกุล NTBI ได้ดี

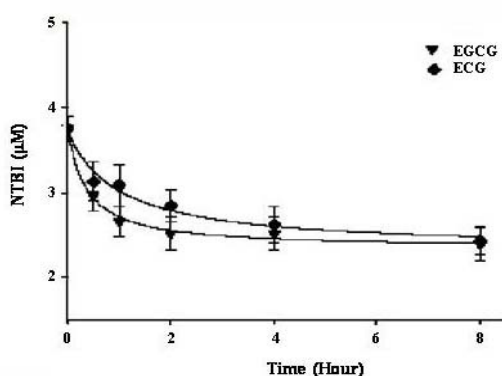


รูปที่ 19 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย EGCG และ ECG (0-10 μM) ในการลดปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI (mean $\pm$ SEM, n=10) ในซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ผลของเวลา

นำซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียจำนวน 10 ราย มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย EGCG และ ECG ความเข้มข้นสุดท้าย 10 μM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 0-8 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดปริมาณ NTBI ที่เหลืออยู่ ผลการทดลองในรูปที่ 20 แสดงให้เห็นว่าสาร EGCG ใน fraction II และสาร ECG ใน fraction IV สามารถลดปริมาณ NTBI ในซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้อย่างช้า ๆ ในลักษณะที่ขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา โดยพบว่าภายใน 1 ชั่วโมงสาร EGCG (ความเข้มข้น 2.5 μM) สามารถลดปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI จาก $3.75 \pm 0.13 \mu\text{M}$ เหลือ $2.66 \pm 0.18 \mu\text{M}$ ($\Delta\text{NTBI} = 1.09 \mu\text{M}$) ในขณะที่สาร ECG (ความเข้มข้น 2.5 μM) สามารถลดปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI จาก $3.75 \pm 0.13 \mu\text{M}$ เหลือ $3.08 \pm 0.24 \mu\text{M}$ ($\Delta\text{NTBI} = 0.67 \mu\text{M}$)

ส่วนภายในเวลา 8 ชั่วโมงจะพบว่าสาร EGCG (ความเข้มข้น 2.5 μM) สามารถลดปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI จาก 3.75 ± 0.13 μM เหลือ 2.39 ± 0.30 μM ($\Delta\text{NTBI} = 1.36$ μM) ในขณะที่สาร ECG (ความเข้มข้น 2.5 μM) สามารถลดปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI จาก 3.75 ± 0.13 μM เหลือ 2.43 ± 0.17 μM ($\Delta\text{NTBI} = 1.32$ μM) แสดงว่าสารทั้งสองชนิดนี้สามารถลดธาตุเหล็กรูป NTBI ได้ โดยที่สาร EGCG มีประสิทธิภาพดีกว่าสาร ECG เช่นกันเมื่อใช้ปริมาณเท่ากัน



รูปที่ 20 ผลของเวลาในการลดปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI (mean $\pm$ SEM, n=10) โดยสาร EGCG และ ECG (ความเข้มข้น 0-10 μM) ในซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งชั่งยาชีวภาพมีความสามารถลดระดับธาตุเหล็กรูป NTBI ในซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณ (concentration-dependent manner) และเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา (time-dependent manner) ผลิตภัณฑ์ชาเขียวที่เตรียมจากการอบแห้งในตู้อบไมโครเวฟ (กำลังไฟฟ้า 800 วัตต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 3 นาทีสามารถลดปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI ได้ดีกว่าชาเขียวที่เตรียมขึ้นโดยวิธีเชิงพาณิชย์ ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นและเวลาเช่นกัน สารเคเตชิน EGCG และ ECG ที่แยกได้จากชาเขียวมีความสามารถในการจับกับธาตุเหล็กรูป NTBI ได้ ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นและเวลา ซึ่งสาร EGCG มีความสามารถดีกว่าสาร ECG ใดๆก็ตาม แม้ว่าสารสกัดชาเขียว สาร EGCG และ ECG ที่แยกได้จากชาเขียวสามารถลดปริมาณ NTBI ได้จำนวนหนึ่ง แต่ก็ไม่สามารถกำจัด NTBI ทั้งหมดที่มีอยู่ให้หมดไปได้ อาจจะเป็นเพราะว่าในซีรัมมี NTBI ทั้งรูปที่ถูกกำจัดได้ง่ายและรูปที่กำจัดออกไปได้ยาก แม้ว่าจะเพิ่มปริมาณสารและเวลาในการทำปฏิกิริยาให้มากขึ้นพอแล้ว จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไปถึงธรรมชาติที่แท้จริงของธาตุเหล็กที่เกิดขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย

3.4.4 Antisense therapy

การศึกษาความผิดปกติของยีนในระดับโมเลกุล ทำให้ทราบว่ามิวเตชันของ β -globin gene ที่ทำให้เกิด β -thalassemia ที่พบบ่อยในคนไทยบางชนิดส่งผลให้เกิด abnormal RNA-splicing เช่น มิวเตชันใน IVS 1 ตำแหน่งที่ 5, G $\rightarrow$ C; IVS 2 ตำแหน่งที่ 654, C $\rightarrow$ T รวมทั้งการเกิด β^E จากการแทนที่ของเบส G $\rightarrow$ A มิวเตชันเหล่านี้ไปกระตุ้น cryptic splice site ที่อยู่ใกล้เคียงทำให้เกิด mRNA ผิดปกติและ frameshift mutation ยีนผิดปกติเหล่านี้จะสร้าง β -globin chain ปกติลดลงหรือสร้างไม่ได้ คณะผู้วิจัยมีสมมติฐานว่า ถ้าสามารถสกัดกั้น (block) abnormal splicing ที่เกิดขึ้น โดยให้ oligonucleotide ที่สังเคราะห์ขึ้นในหลอดทดลองเข้าไปจับกับ RNA บริเวณที่เป็น abnormal splice site จะทำให้กระบวนการ RNA processing ปกติเกิดขึ้นและสร้าง β -globin chain ได้ดังเดิม

งานวิจัยที่ผ่านมาได้ร่วมมือกับ Professor Ryszard Kole มหาวิทยาลัย North Carolina และโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (กป.) ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทำการศึกษาเพื่อทดลองใช้ antisense DNA ในรูปของ morpholino oligonucleotide ที่มีเบสคู่สมกับ RNA บริเวณที่เกิด abnormal splicing ใน β^E -globin pre-mRNA ใน HeLa cell line ที่มียีนธาลัสซีเมียชนิด β^{IVS1-6}/β^E พบว่า HeLa cell สามารถสร้าง β^E -globin mRNA และ β^E -globin chain จาก normal splicing เพิ่มขึ้นและปริมาณของ β^E -globin chain ขึ้นอยู่กับขนาด (dose) ของ antisense DNA ที่ให้กับเซลล์

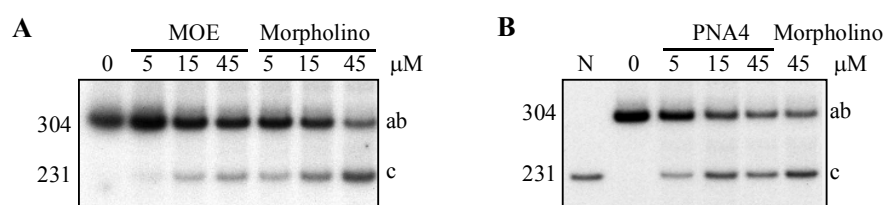
นอกจากนี้ยังได้ทดลองให้ morpholino oligonucleotide ที่มีเบสคู่สมกับบริเวณที่เป็น abnormal splice ใน intron 2 (IVS2) ตำแหน่งที่ 654 ของ β -globin gene ใน erythroid progenitor cells ที่ได้จากผู้ป่วย $\beta^{IVS2-654}$ thal/Hb E พบว่าเซลล์สามารถสร้าง β -globin mRNA ที่ถูกต้องและเกิดเป็น β -globin chain ที่รวมกับ α -globin เป็น Hb A ได้ และในทำนองเดียวกันเมื่อทดสอบกับ β^E -globin gene ก็พบว่าเกิด normal splicing ได้ β^E -globin mRNA และ Hb E ได้เช่นเดียวกัน และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดแดงต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนู transgenic ที่มียีนเบต้าธาลัสซีเมียชนิด IVS 2-654 ของมนุษย์ (C $\rightarrow$ T) และทดลองให้ morpholino oligonucleotide ที่มีเบสคู่สมกับบริเวณที่เป็น abnormal splice site ใน intron 2 ตำแหน่ง 654 ของ β -globin gene มนุษย์ พบว่าได้ผลเช่นเดียวกัน แม้ว่าผลที่ได้จะไม่ดีเท่ากับการทดลองที่ทำในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงจากผู้ป่วย แสดงว่าอาจจะใช้ transgenic mice เป็นต้นแบบการทดลองให้ antisense DNA แบบ *in vivo* ได้ต่อไป

การศึกษานี้ได้เปรียบเทียบวิธีการนำ antisense DNA เข้าสู่เซลล์โดยวิธี syringe loading และวิธี free uptake และเปรียบเทียบผลการรักษาด้วย antisense DNA 3 ชนิด คือ morpholino, 2'-O-MOE phosphorothioate (MOE) และ peptide nucleic acid (PNA) ที่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโน lysine และ arginine

ผลการศึกษา

3.4.4.1 การแก้ไข abnormal RNA splicing ด้วย antisense DNA ชนิด morpholino, MOE หรือ PNA ที่ปลายด้าน C-terminus มี lysine เกะอยู่ 4 ตัว (PNA-4K) และนำเข้าสู่เซลล์โดยวิธี syringe loading

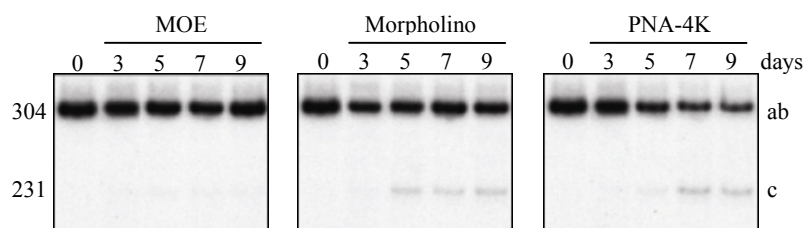
เมื่อนำเซลล์จากไขกระดูกหนูธาลัสซีเมียที่มียีนผิดปกติของผู้ป่วยชนิด β IVS II-654 มาผสมกับ antisense DNA แต่ละชนิดและใช้ syringe คูด cell suspension ผ่านเข็มฉีดยาขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง วิธีนี้จะทำให้เกิดรูรั่วที่ผนังเซลล์ oligonucleotide จึงแทรกซึมเข้าไปภายในเซลล์และไปพันเกลียว (hybridize) กับ DNA template ที่มีเบสคู่สมกันได้ ผลการทดลองพบว่าจำนวน β -globin mRNA ที่มี splicing ปกติเพิ่มขึ้นนั้น ขึ้นอยู่กับขนาด (dose) ของ antisense DNA ที่เติมลงไปใน cell suspension และ antisense DNA ชนิด morpholino ให้ผลดีกว่า PNA และ MOE โดย morpholino และ PNA-4K ความเข้มข้น 45 μ M ทำให้เกิดการสะสมของ mRNA ปกติมากกว่า 50% (รูปที่ 21) แสดงว่า antisense DNA ถูกนำเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงที่แยกจากไขกระดูกของหนูธาลัสซีเมียได้ด้วยวิธี syringe loading



รูปที่ 21 RT-PCR products ที่ได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์จากไขกระดูกหนูธาลัสซีเมีย ($\beta^{IVSII-645}$ knockin transgene) เป็นเวลา 18 ชั่วโมงและนำ antisense DNA ชนิด morpholino, MOE หรือ PNA-4K เข้าสู่เซลล์โดยวิธี syringe loading และเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง RT-PCR product ที่เกิดจาก splicing ปกติมีขนาด 231 bp (c) และจาก abnormal splicing ของยีนผิดปกติมีขนาด 304 bp

3.4.4.2 การนำ antisense DNA เข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี free uptake

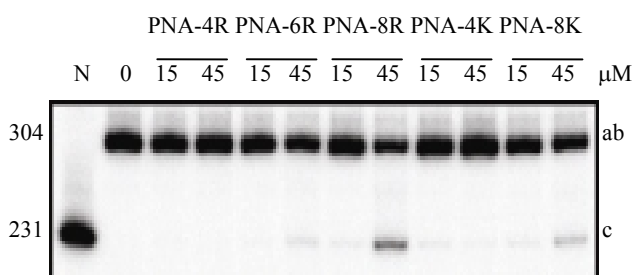
ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ไขกระดูกหนูธาลัสซีเมียที่มียีน $\beta^{IVSII-645}$ ของผู้ป่วยสอดแทรกอยู่ในส่วนผสมที่มี antisense DNA ความเข้มข้น 45 μ M และติดตามการสร้าง RNA เป็นเวลานาน 3-9 วัน การทดลองนี้มีความสำคัญเพื่อที่จะประเมินความสามารถของ antisense DNA แต่ละชนิดในการซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ ผล RT-PCR product แสดงให้เห็นว่าปริมาณการสร้าง mRNA ที่มี splicing ปกติโดย morpholino และ PNA-4K ซึ่งมีประจุเป็นบวกขึ้นอยู่กับเวลา แสดงว่า antisense DNA ทั้งสองชนิดนี้ สามารถแทรกซึมเข้าสู่เซลล์และทำให้เกิดการสร้าง mRNA ปกติได้ (รูปที่ 22) ส่วน MOE ซึ่งเป็น antisense DNA ที่มีประจุลบสร้าง mRNA ปกติน้อยมาก ซึ่งอาจจะเกิดเพราะไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดี



รูปที่ 22 RT-PCR products ที่ได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ไขกระดูกหนูธาลัสซีเมีย (β IVS II-654 knockin transgene) ในส่วนผสมที่มี antisense DNA ชนิดต่างๆ นาน 3-9 วัน RT-PCR products ที่เกิดจาก splicing ปกติ (c) และผิดปกติ (ab) มีขนาด 231 และ 304 bp ตามลำดับ

3.4.4.3 ผลการนำ PNA ที่ conjugate กับ lysine 8 ตัว และ arginine 4, 6 และ 8 ตัว (8K, 4R, 6R, 8R) เข้าสู่เซลล์ไขกระดูกด้วยวิธี free uptake

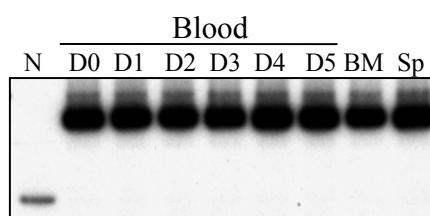
เนื่องจากมีรายงานว่า PNA oligonucleotide ที่มีกรดอะมิโน lysine 1, 2 และ 4 ตัวทางด้าน 3' end สามารถแทรกเข้าสู่เซลล์ได้ดีและสามารถแก้ไข splicing ที่ผิดปกติได้เพิ่มมากขึ้นใน HeLa cells และใน transgenic mouse ที่มียีน EGFP- β IVS II-654 สอดแทรกอยู่ ประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้นนี้อาจจะเกิดจากประจุบวกของกรดอะมิโน lysine คณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองผลของ PNA ที่ conjugate กับ lysine 8 ตัว และ arginine 4, 6 และ 8 ตัว (8K, 4R, 6R, 8R) โดยการนำเข้าสู่เซลล์ไขกระดูกด้วยวิธี free uptake เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงสกัด RNA มาวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR ผลการทดลองพบว่าการสร้าง mRNA ปกติเพิ่มมากขึ้นจากการใช้ PNA-8R (arginine) ความเข้มข้น 45 μ M และมากกว่าการใช้ PNA-8K (lysine) อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 23) สรุปได้ว่า PNA ที่ conjugate กับ arginine ให้ผลดีกว่า PNA ที่ conjugate กับ lysine และจำนวนกรดอะมิโนที่ conjugate กับ PNA ที่มากขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์และสร้าง mRNA ปกติเพิ่มมากขึ้นด้วย



รูปที่ 23 RT-PCR products ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไขกระดูกจากหนูธาลัสซีเมีย β IVS II-654 knockin transgene ในส่วนผสมที่มี PNA-peptide conjugate ชนิดต่าง ๆ และสกัด RNA ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเซลล์

3.4.4.4 การทดสอบแบบ *in vivo* โดยการฉีด antisense DNA ในหนูธาลัสซีเมียชนิด $\beta^{\text{IVS II-654}}$

ฉีด antisense DNA ในรูปของ PNA 4K (lysine) ความเข้มข้น 50 mg/kg/day เข้าไปบริเวณ tail vein ของหนูธาลัสซีเมียชนิด $\beta^{\text{IVS II-654}}$ เป็นเวลา 5 วัน แล้วเจาะเลือดจากปลายหางหนูในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 และจากไขกระดูกในวันที่ 5 นำมาสกัด RNA เพื่อศึกษา β -globin mRNA ที่มี splicing ปกติ ผลการทดลองในรูปที่ 24 แสดงว่าไม่มีการสร้าง correct β -globin mRNA เลย ทั้งจากไขกระดูก (BM) เซลล์ในกระแสเลือด (D 0-5) และม้าม (sp) แสดงว่าแม้ antisense DNA ได้รูปแบบต่าง ๆ จะสามารถเข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและสร้าง correct spliced β -globin แต่ยังไม่มีประสิทธิภาพในการรักษา เมื่อทดสอบโดยการฉีด antisense DNA เข้าไปในหนูธาลัสซีเมีย (*in vivo*)

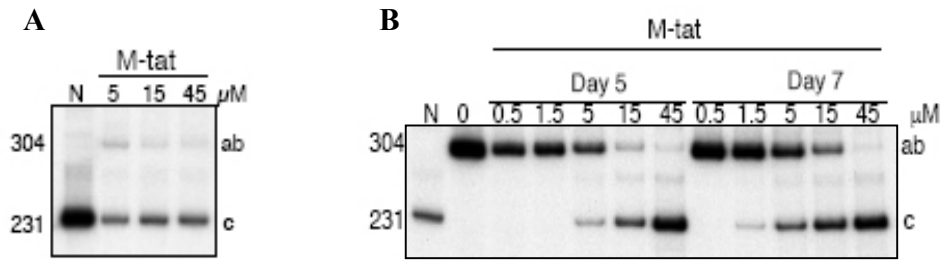


รูปที่ 24 การตรวจสอบ β -globin mRNA ที่มี splicing ปกติ ภายหลังจากการฉีด PNA 4K (IV) ความเข้มข้น 50 mg/kg/day เข้าไปในหนูธาลัสซีเมีย ชนิดที่มีการผ่าเหล่าใน intron 2 ตำแหน่ง 654 ($\beta^{\text{IVS II-654}}$) เป็นเวลา 5 วัน

3.4.4.5 การเพิ่มประสิทธิภาพของ antisense oligonucleotide โดยการนำ morpholino oligonucleotide มา conjugate กับ tat like peptide (M-tat)

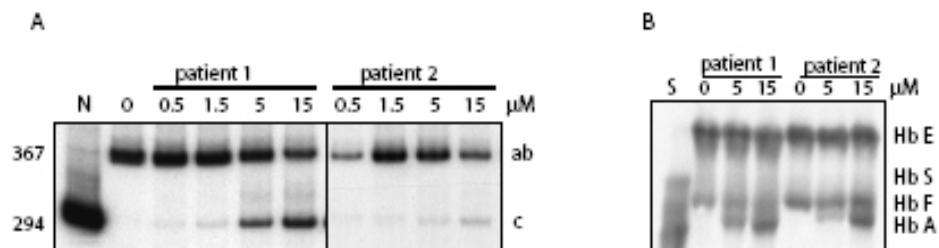
เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของ antisense oligonucleotide ได้มีการนำ morpholino oligonucleotide มา conjugate กับ tat like peptide (M-tat) เนื่องจากเคยมีการศึกษาว่า amino acid ลำดับที่-49-57 ของ Tat โปรตีนของไวรัส HIV สามารถนำ bimolecule ต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ได้

เมื่อนำ M-tat oligonucleotide มาทดลองให้เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน จากไขกระดูก หนูธาลัสซีเมีย $\beta^{\text{IVS II-654}}$ โดยวิธี syringe load พบว่ามีความเข้มข้น 5 μM สามารถทำให้เกิด correct β -globin mRNA ได้ประมาณ 90 % (รูปที่ 25) และเมื่อให้ M-tat ต่อเซลล์โดยวิธี free uptake พบว่ามีความเข้มข้น 45 μM มี correct β -globin mRNA ประมาณ 95 % (รูปที่ 25B) เมื่อเปรียบเทียบกับ morpholino oligonucleotide ที่ไม่ได้ conjugate กับ tat peptide ที่สามารถทำให้เกิด correct mRNA น้อยกว่า 5 % แสดงให้เห็นว่าการนำ Tat peptide มา conjugate กับ morpholino oligonucleotide ทำให้ประสิทธิภาพของ antisense oligonucleotide สูงขึ้น



รูปที่ 25 แสดง correct (c)β-globin mRNA ที่ได้จากการให้ M-tat oligonucleotide ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวอ่อนจากไขกระดูกหนูธาลัสซีเมียชนิด $\beta^{\text{IVS II-654}}$

นอกจากนี้ยังได้ทดลองให้ M-tat ต่อเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดง จากผู้ป่วย $\beta^{\text{IVS II-654}}$ /HbE โดยวิธี free uptake พบว่าเซลล์สามารถสร้าง β-globin mRNA ที่ถูกต้อง (รูปที่ 26A) และเป็น β-globin chain ที่สามารถรวมกับ β-globin เกิดเป็น Hb A ได้ (รูปที่ 26B) โดยปริมาณ Hb A ที่สังเคราะห์ขึ้นได้นั้น ขึ้นอยู่กับปริมาณของ M-tat oligonucleotide ที่เซลล์ได้รับ



รูปที่ 26 แสดง correct β-globin mRNA ที่ได้จากการให้ M-tat oligonucleotide ความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าไปในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงจากผู้ป่วย $\beta^{\text{IVS II-654}}$ /HbE 2 ราย โดยวิธี free uptake (A) และปริมาณ Hb A ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากการที่มี correct β-globin mRNA เพิ่มขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดง

ขณะนี้ผู้วิจัยกำลังเตรียมการทดสอบ *in vivo* ให้ M-tat oligonucleotide ในหนูธาลัสซีเมียชนิด $\beta^{\text{IVS II-654}}$ /HbE

3.4.5 การยับยั้งการแสดงออกของอัลฟาโกลบินด้วย siRNA

เทคนิคอาร์ เอ็น เอ ไอ เป็นเทคนิคในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์ เอ็น เอ (posttranscription) ถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยในหลากหลายสาขา โดยการสังเคราะห์อาร์ เอ็น เอ สายคู่ สั้น ๆ ประมาณ 20 bp (เรียกว่า small interference RNA หรือ siRNA) ที่มีลำดับเบสคู่กับเบส (complementary) ใน mRNA ส่งผลให้ mRNA เส้นนั้นถูกทำลายไปไม่สามารถสร้างโปรตีนได้ การนำเทคนิคอาร์ เอ็น เอ ไอ มาใช้ ยับยั้งการสร้างอัลฟาโกลบินในเม็ดเลือดแดงเบต้าธาลัสซีเมียเป็นอีกแนวทางหนึ่ง ที่ช่วยให้เกิดสมดุลระหว่าง สายอัลฟาและเบต้าโกลบินในเม็ดเลือดแดงมากขึ้น ซึ่งจะช่วยลดพยาธิสภาพที่เกิดกับเม็ดเลือดแดงอันเนื่องมาจากสายอัลฟาโกลบินที่ไม่มีคู่ ทำให้ความรุนแรงของการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลง

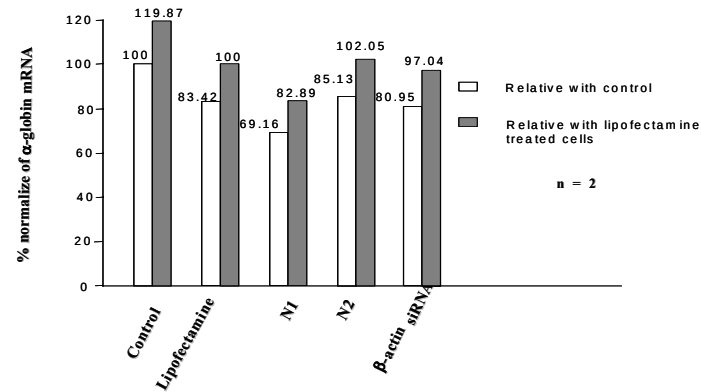
ในการศึกษานี้ได้ทดลองใช้ siRNA ต่อ α -globin ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. K Muta จาก Kyushu University, Fukuoka, ประเทศญี่ปุ่น ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนอัลฟาโกลบินในระดับอาร์ เอ็น เอ ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของคนปกติระยะ pronormoblast ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงวันที่ 6 (erythroid colony forming cells) α -globin siRNA ถูกนำเข้าเซลล์ ECFC โดยวิธี transfection ด้วย lipofectamine และศึกษาความเข้มข้นของ α -globin siRNA และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของ siRNA ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน โดยใช้ α -actin siRNA เป็น control ตรวจสอบการทำงานของ α -actin siRNA โดยนับจำนวน apoptotic cells ด้วย flow cytometry, วัดระดับ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR และวัดปริมาณโกลบินที่ลดลงด้วยวิธี globin-chain analysis และ benzidine staining

ผลการทดลอง

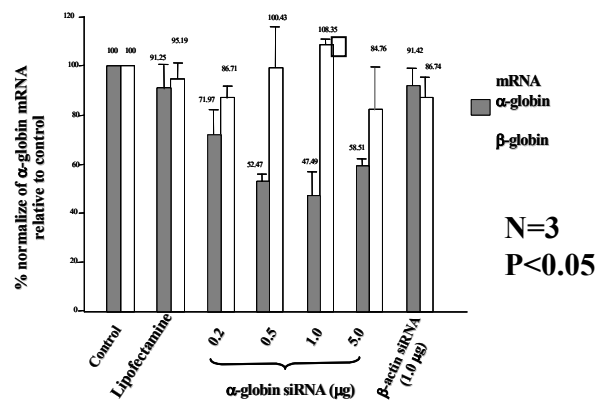
หลังจาก transfected siRNA เข้าในเซลล์ ECFC พบว่า siRNA ที่ใช้สามารถเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง lipofectamine โดยไม่ทำให้เซลล์เกิด apoptosis เพิ่มขึ้นและ α -globin siRNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัมสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนอัลฟาโกลบิน การตรวจวัดระดับ mRNA หลังจาก 48 ชั่วโมง พบระดับ α -globin mRNA ลดลง โดยไม่ลดระดับ β -globin mRNA (รูปที่ 27A) แต่ α -globin siRNA บางชนิดไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนอัลฟาโกลบินได้ (รูปที่ 27B) ส่วนการวัดปริมาณโปรตีนอัลฟาโกลบินที่ 96 ชั่วโมง พบว่าปริมาณโปรตีนโกลบินลดลง แม้ว่าในบางการทดลองลดลงไม่ชัดเจน (รูปที่ 28) อย่างไรก็ตาม การตรวจปริมาณฮีโมโกลบินภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนระยะต่าง ๆ โดยการย้อมด้วย benzidine พบว่ามีเซลล์ที่ติดสีลดลงอย่างชัดเจน

ผลจากการศึกษานี้อาจใช้เป็นรูปแบบตัวอย่าง เพื่อศึกษาเซลล์พยาธิสภาพในเม็ดเลือดแดงของอัลฟาธาลัสซีเมีย และนำไปประยุกต์ใช้เพื่อลดการสร้างสายอัลฟาโกลบินในเบต้าธาลัสซีเมีย เพื่อลดความรุนแรงของโรคที่มีสาเหตุจากสายอัลฟาโกลบินที่ไม่มีคู่ได้ต่อไป

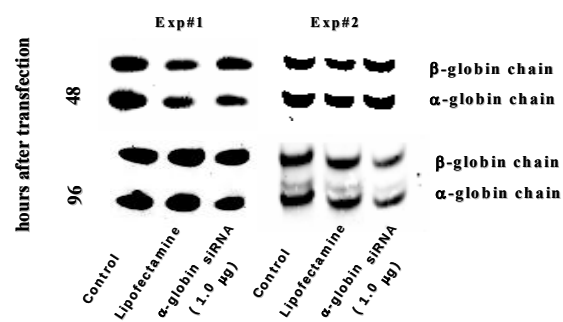
A



B.



รูปที่ 27 แสดงผลของ α -globin siRNA ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนอัลฟาโกลบิน (A) การตรวจวัดระดับ mRNA พบว่า α -globin siRNA บางชนิด (N2) ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนอัลฟาโกลบินได้ (B) ระดับ α -globin mRNA ลดลง โดยไม่ลดระดับ β -globin mRNA



รูปที่ 28 แสดงปริมาณของสายอัลฟาโกลบินที่ลดลงเมื่อเติม siRNA ยับยั้งการสร้างสายอัลฟาโกลบิน ในเซลล์เม็ดเลือดแดงผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียที่เพาะเลี้ยงวันที่ 6

3.5 การสร้าง Transgenic mice

ถึงแม้ว่าโรคธาลัสซีเมียจะพบบ่อยในประเทศไทยและมีผู้ป่วยจำนวนมาก การศึกษาธรรมชาติของโรค (natural history) ทำได้ยาก เพราะจะต้องใช้เวลาติดตามอาการและพยาธิวิทยาของผู้ป่วยต่อเนื่องเป็นเวลานาน ผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีหลายชนิดและจะมีอาการมากน้อยแตกต่างกัน นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีอาการชดมากอาจจะต้องได้รับเลือดบ่อย ทำให้การศึกษาพยาธิสภาพทำไม่ได้หรือทำได้ยาก ในต่างประเทศนักวิจัยได้พยายามที่จะหาโมเดล (model) สำหรับการศึกษาวิจัย โมเดลที่นักวิจัยกำลังใช้กันมากในปัจจุบันคือการสร้าง transgenic mice ที่เป็นธาลัสซีเมีย โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะนำหนูลธาลัสซีเมียนี้นามศึกษาวิจัยการรักษาโดยการเปลี่ยนยีน (gene therapy) หรือการใช้ยาและสารเคมีต่าง ๆ เพื่อรักษาอาการที่ผิดปกติ

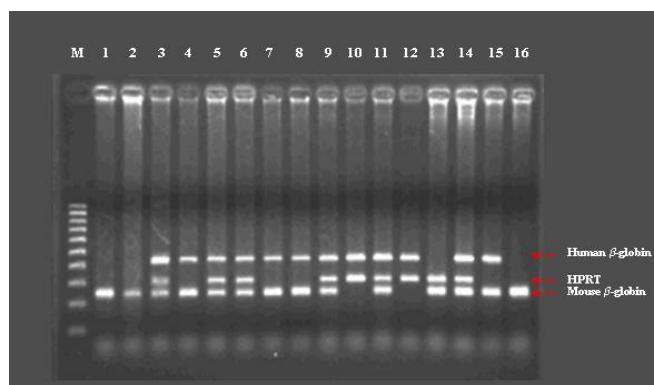
โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ร่วมมือกับ Dr. Panos Ioanou และ Prof. Robert Williamson จาก Murdoch Institute University of Melbourne เมืองเมลเบิร์น ประเทศออสเตรเลีย สร้างหนูลธาลัสซีเมียที่มีการสอเคลื่อนยีนทั้งกลุ่มบน β -globin gene cluster ของคนเข้าไป โดยยีน β -globin จะเป็นยีน β -thalassemia ที่มีการผ่าเหล่าชนิดที่พบบ่อยในคนไทย เช่น β^E และ $\beta^{4bp\ deletion}$ ขณะนี้ทางโครงการมีหนูลธาลัสซีเมียหลายชนิด เช่น หนูที่มียีนของหนูครบทั้ง b1 และ b2 ($\beta^{m+/+}$) แต่มียีน β -thalassemia ของคนร่วมด้วย (HbE transgenic หรือ β^{4bp} transgenic) ซึ่งจะไม่มิลักษณะผิดปกติเพราะมี endogenous gene ของหนูอยู่ครบ หรือหนูที่ยีน b1 และ b2 แห้วหายไป (β knockout, $\beta^{m+/-}$) บนโครโมโซมข้างหนึ่ง เรียกว่า heterozygous β knockout mice หรือมียีน β^E , $\beta^{4bp\ deletion}$ ร่วมกับ β knockout แบบ double heterozygote (HbE-DH, $\beta^{m+/-}\beta^E$ และ 4 bp-DH, $\beta^{m+/-}\beta^{4bp}$) ซึ่งจะมีลักษณะผิดปกติต่าง ๆ คล้ายธาลัสซีเมีย ขึ้นอยู่กับจำนวนชุด (copy) ของ β^E -gene ว่าเป็น 2, 4, 6 หรือ 8 ชุด

3.5.1 การดูแลและเพาะเลี้ยงหนูเพื่อรักษาสายพันธุ์ (genotype)

ชนิดของหนูลธาลัสซีเมียที่ต้องการสร้างขึ้นเพื่อการวิจัย ทำโดยให้มีการผสมพันธุ์ระหว่างหนูล transgenic ที่มีการสร้างขึ้นอยู่ก่อนแล้ว เช่น

- β knockout x HbE-transgene จะได้หนูชนิด A. HbE- β knockout (HbE-DH, $\beta^{m+/-}\beta^E$)
- β knockout x 4bp transgene จะได้หนูชนิด B. 4bp deletion- β knockout
(4bp deletion-DH, $\beta^{m+/-}\beta^{4bp}$)
- 4bp-DH x HbE-DH จะได้หนูชนิด A. HbE-DH
B. 4bp deletion-DH
C. 4bp deletion/HbE-DH ($\beta^{m+/-}\beta^{4bp}\beta^E$)
D. rescued 4bp deletion/HbE- β knockout
homozygote ($\beta^{m+/-}\beta^{4bp}\beta^E$)

การตรวจสอบชนิดของหนู transgenic ที่เกิดใหม่ทำได้โดยการตัดหางหนู ขนาดประมาณ 1 ซม. นำมาสกัด DNA และทำ multiplex PCR โดยใช้ primer 3 คู่ คู่แรกจำเพาะต่อยีน β -globin ของหนูให้ PCR product 260 bp คู่ที่สองจำเพาะต่อยีน β^E -globin ของมนุษย์ให้ PCR product 447 bp และ primer คู่สุดท้ายจำเพาะกับโครโมโซมหนูที่ถูกแทนที่ด้วยยีน HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) ซึ่งจะให้ PCR product ขนาด 315 bp ผลของ PCR fragment จะบ่งบอกถึง genotype ของหนู (รูปที่ 29)



รูปที่ 29 แสดงผลของ multiplex PCR ที่ใช้แยกชนิดของหนู genotype ต่าง ๆ amplified β -globin จากมนุษย์มีขนาด 447 bp และ amplified DNA จากหนูปกติมีขนาด 260 bp (แถว 1, 2, 16); amplified DNA จากหนู transgenic ($\beta^{m+/+}\beta^E$) มีขนาด 260 และ 447 bp (แถว 4, 7, 8, 15); amplified DNA จากหนู β knockout heterozygote ($\beta^{m+/-}$) มีขนาด 260 และ 315 bp (แถว 13); amplified DNA จากหนู double heterozygote ($\beta^{m+/-}\beta^E$) มีขนาด 260, 315 และ 447 bp (แถว 3, 5, 6, 9, 11 และ 14) และ amplified DNA จากหนู rescued β knockout homozygote ($\beta^{m-/-}\beta^E$) มีขนาด 315 และ 447 bp (แถว 10 และ 12)

หนูชนิด B, C, D จะมีลักษณะอาการผิดปกติและหนูชนิด D มีลักษณะเหมือนคนที่เป็นโรค β -thalassemia/HbE มากที่สุด เพราะไม่มี endogenous β -globin gene ของหนูเหลืออยู่ อย่างไรก็ตามหนูชนิด A, B, และ C สามารถนำมาใช้ศึกษาวิจัยได้ด้วย นอกจากนี้โครงการวิจัยธาลัสซีเมียยังได้รับ transgenic mice ซึ่งยีน β ของหนูข้างหนึ่งถูกแทนที่ (knock-in) ด้วยยีนธาลัสซีเมีย $\beta^{IVS-II-654, C \rightarrow T}$ ของมนุษย์ ($\beta^{m+/hIVS-II-654}$) จาก Professor Ryszard Kole ที่ Lineberger Comprehensive Cancer Center and Department of Pharmacology, University of North Carolina, Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อการศึกษาวิธีการรักษาผู้ป่วยด้วย antisense DNA ขณะนี้ได้ทำการผสมพันธุ์กับหนู β^E -transgenic เพื่อผลิตหนูที่มียีนของมนุษย์ทั้ง $\beta^{IVSII-654, C \rightarrow T}$ และ HbE gene ($\beta^{m+/hIVS-II-654}\beta^E$) และได้นำหนูที่มี genotype นี้ไปผสมพันธุ์กับหนู HbE-DH ($\beta^{m+/-}\beta^E$) เพื่อ

สร้างหนู rescued mice ที่มีแต่ยีนมนุษย์ $\beta^{IVSII-654,C \rightarrow T}/\beta^E$ โดยไม่มี endogenous gene ของหนูเหลืออยู่ ($\beta^{m-}/hIVSII-654 \beta^E$)

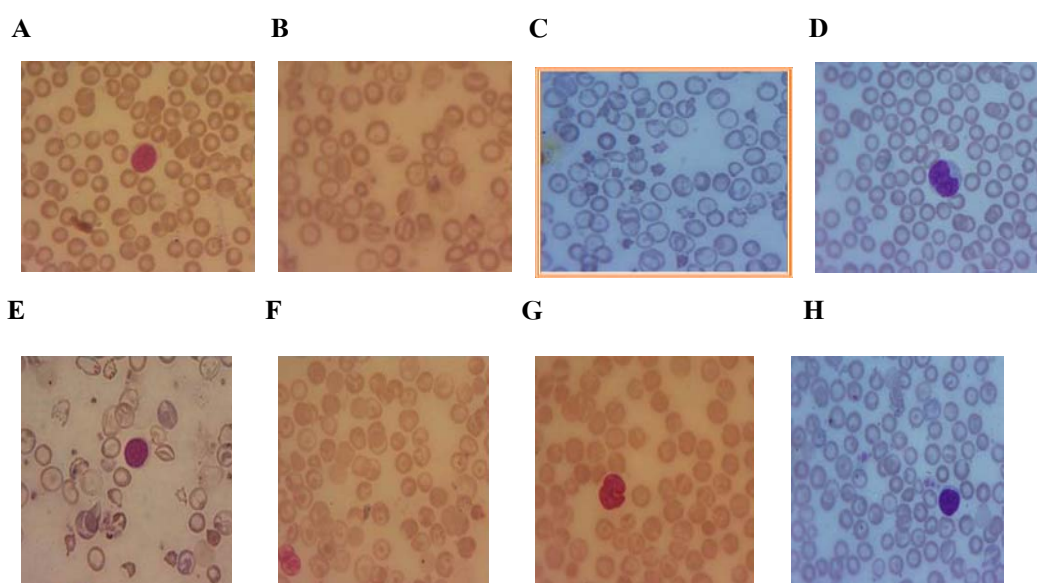
3.5.2 การศึกษาวิจัยโดยใช้หนูธาลัสซีเมีย

คณะผู้วิจัยได้แบ่งเลี้ยง transgenic mice ที่มี genotype ต่าง ๆ แยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกสำหรับผลิตหนู genotype ต่าง ๆ รวมทั้ง rescued mice และอีกส่วนหนึ่งนำไปทดลองศึกษาในหัวข้อต่อไปนี้

3.5.2.1 การศึกษาวิจัยธรรมชาติของ transgenic mice ชนิดต่าง ๆ (natural history) โดยการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา: Hb, MCV, MCH, MCHC, %Hb F โดยใช้ automatic blood cell counter และการวิเคราะห์ชนิดของฮีโมโกลบินโดยวิธี hemoglobin electrophoresis และ high performance liquid chromatography (HPLC)

ผลการศึกษา

เนื่องจากหนู strain ที่ใช้ในการวิจัยคือ C57BL/6 และ หนู β -knockout เกิดจากการที่ยีน b1 และ b2 ของหนูถูกทำให้แห้วหายไปจากโครโมโซมข้างหนึ่ง (β knockout heterozygote) ด้วยการแทนที่ด้วยยีน HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene)



รูปที่ 30 ลักษณะเม็ดเลือดแดงในหนูปกติและหนูที่มีลักษณะของธาลัสซีเมีย (A) หนูปกติ (B) หนู β -knockout heterozygote (C) หนู knock-in $\beta^{IVSII-654}$ -heterozygote (D) หนู HbE- $\beta^{IVSII-654}$ -DH และ (E-H) หนู rescued mice ชนิด β^{m-}/β^E ที่มี β^E -gene จำนวน 4, 6, และ 8 ชุดและหนู rescued mice ชนิด $\beta^{m-}/hIVSII-654 \beta^E$ ตามลำดับ

แม้ว่าหนูจะยังคงมียืน b1 และ b2 ครอบบนโครโมโซมข้างที่เหลือ หนูจะมีลักษณะของโรคธาลัสซีเมีย คือ มีอาการซีด ตับม้ามโต พบเหล็กสะสมอยู่ในตับและม้าม จึงเป็นโมเดลที่เหมาะสมในการศึกษาวิจัย นอกจากนี้ พบว่าหนูที่เป็น homozygote จะตายหมดตั้งแต่ในท้องเพราะหนูไม่มียืน γ ที่จะสร้าง HbF ($\alpha_2\gamma_2$) ได้เหมือนคน การสอดใส่ยืน β -globin ของมนุษย์เข้าไปในยืนหนู ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาและพยาธิวิทยาหลายอย่างขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนชุด (copy) ของยืนที่ถูก transfer เข้าไป หนู transgenic ชนิด HbE-DH หรือ HbE- $\beta^{\text{IVSII-654}}$ -DH ซึ่งมียืน β ของหนูบนโครโมโซมข้างเดียว แต่มี β^E ของมนุษย์อยู่ด้วย จะมีลักษณะของเม็ดเลือดแดง (รูปที่ 30) และค่าทางโลหิตวิทยาเช่นเดียวกับหนู wild type (ตารางที่ 14) แสดงว่า β^E -gene ของมนุษย์ที่ integrate เข้าไปในโครโมโซมของหนูสามารถแสดงออก (expression) และสร้างฮีโมโกลบิน ($\alpha_2\beta^E$) ได้

หนู transgenic ชนิด 4bp deletion-DH หรือหนู $\beta^{\text{m+/h IVSII-654}}$ heterozygote จะมีลักษณะเช่นเดียวกับหนู β knockout heterozygote เพราะถึงแม้จะมียืน β^{4bp} deletion ของคนหรือมียืน $\beta^{\text{IVSII-654}}$ ของคนอยู่ แต่ยืนนี้ไม่สามารถสร้าง β -globin chain ได้ หนูจึงมีอาการซีดและมีการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดแดงเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 แสดงค่าทางโลหิตวิทยาของหนู transgenic แบบต่างๆ

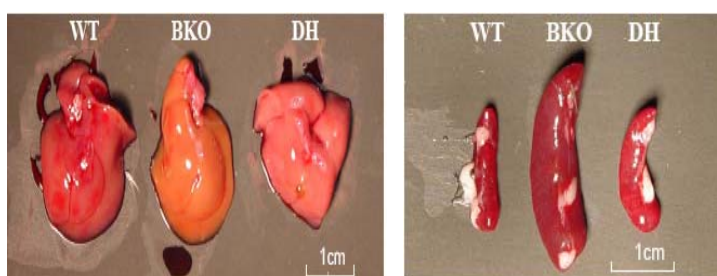
Group	n	Hb g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	RDW %	Rbc $10^9/\text{ml}$
C57/BL6 Wild type	20	15.3 ± 1.1	49.4 ± 3.0	51.7 ± 1.2	15.2 ± 1.2	13.6 ± 1.3	10.9 ± 0.7
Hb E transgene ($\beta^{\text{m+/h}}\beta^E$)	2	15.5 ± 0.9	50.9 ± 0.9	53.3 ± 1.4	16.3 ± 1.1	16.1 ± 1.1	ND
β knockout heterozygote ($\beta^{\text{m+/h}}$)	12	8.4 ± 0.5	28.5 ± 1.1	45.8 ± 2.7	13.8 ± 0.6	36.6 ± 1.3	5.1 ± 0.5
4bp deletion-DH ($\beta^{\text{m+/h}}\beta^{4bp}$)		8.3 ± 0.8	ND	42.6	12.4 ± 0.7	32.5 ± 1.7	ND
Heterozygous $\beta^{\text{m+/h IVS II-654}}$	5	8.3 ± 0.3	27.6 ± 1.0	42.2 ± 0.4	12.7 ± 0.2	ND	6.5 ± 0.3
HbE-DH ($\beta^{\text{m+/h}}\beta^E$, E 2 copies)	12	14.7 ± 0.7	51.4 ± 2.2	50.8 ± 0.6	14.8 ± 0.3	16.0 ± 2.7	10.1 ± 0.4
HbE-DH ($\beta^{\text{m+/h}}\beta^E$, E 4 copies)	12	15.0 ± 1.0	50.2 ± 0.7	50.3 ± 1.1	14.3 ± 0.7	17.1 ± 0.5	10.0 ± 0.3
HbE $\beta^{\text{IVSII-654}}$ -DH ($\beta^{\text{m+/h IVSII-654}}\beta^E$)	5	13.7 ± 1.0	40.7 ± 0.7	45.9 ± 1.1	15.2 ± 0.7	ND	8.9 ± 1.2
Rescued mice							
● $\beta^{\text{m-/h}}\beta^E$ (E 4 copies)	2	7.8, 6.2	20.4, 22.5	48, 49	18.4, 13.5	38.9, 26	4.25, 4.57
● $\beta^{\text{m-/h}}\beta^E$ (E 6 copies)	2	14.2, 11.6	45, 38	47, 43	15, 13	20, 20	9.5, 8.9
● $\beta^{\text{m-/h}}\beta^E$ (E 8 copies)	3	17.7 ± 1.4	51.8 ± 2.1	45.6 ± 3.2	14.4 ± 1.2	21.0 ± 2.3	12.4 ± 2.0
● $\beta^{\text{m-/h IVS II-654}}\beta^E$ (E 6 copies)	3	13.8 ± 0.6	43.9 ± 1.9	42.2 ± 1.4	13.3 ± 0.4	ND	10.4 ± 0.7

ส่วนหนู rescued mice ซึ่งยีนหนูขาดหายไปจากโครโมโซมทั้งสองข้างจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเม็ดเลือดแดงและค่าทางโลหิตวิทยา ขึ้นอยู่กับจำนวนชุดของ β^E -gene ของคนที่หนูได้รับ ในการศึกษาครั้งนี้พบ rescued mice ที่มี β^E -gene 4 ชุด จะยังคงมีลักษณะของโรคธาลัสซีเมียเช่นเดียวกับ β knockout heterozygote แต่หนูที่มี β^E -gene ตั้งแต่ 8 ชุดขึ้นไปจะกลับมีลักษณะเหมือนหนู wild type แม้ว่าค่า MCV และค่า RDW จะยังผิดปกติเล็กน้อย ส่วนหนูที่มี β^E 6 ชุด จะยังคงมีอาการซีดเล็กน้อยและมีผลทำให้ค่าโลหิตวิทยาผิดปกติ (ตารางที่ 14, รูปที่ 30)

3.5.2.2 การศึกษาเกี่ยวกับพยาธิสภาพของหนูธาลัสซีเมีย โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ หัวใจ ตับ ม้าม เพื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยใช้ light microscope และ electron microscope ร่วมกับ gross anatomy ตัวอย่างตับ ม้ามและไตได้จากการผ่าตัดหนูที่ถูกวางยาสลบ แล้ว fixed ในน้ำยา 10% buffered formalin เมื่อเตรียม tissue section แล้วจึงย้อมด้วยสี hematoxylin & eosin เพื่อศึกษาลักษณะทาง histology ร่วมกับการย้อมด้วยสี Prussian blue เพื่อศึกษาการสะสมของธาตุเหล็กในเนื้อเยื่อเหล่านี้ ปริมาณของธาตุเหล็กในตับวัดโดยวิธีของ Torrance และ Bothwell (Torrance J.D. & Bothwell T.H. A simple technique for measuring iron concentrations in formalinised liver samples. S. African. J. Med. Sci. 33:9-11, 1968.)

ผลการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงของอวัยวะ ได้แก่ ตับ ม้ามและไต เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยใช้ light microscope และ electron microscope ร่วมกับ gross anatomy พบว่าหนูชนิด β knockout heterozygote และหนู rescued mice มีตับขนาดปกติแต่ซีด (pale) และมีม้ามโต (splenomegaly) (ตารางที่ 15, รูปที่ 31)



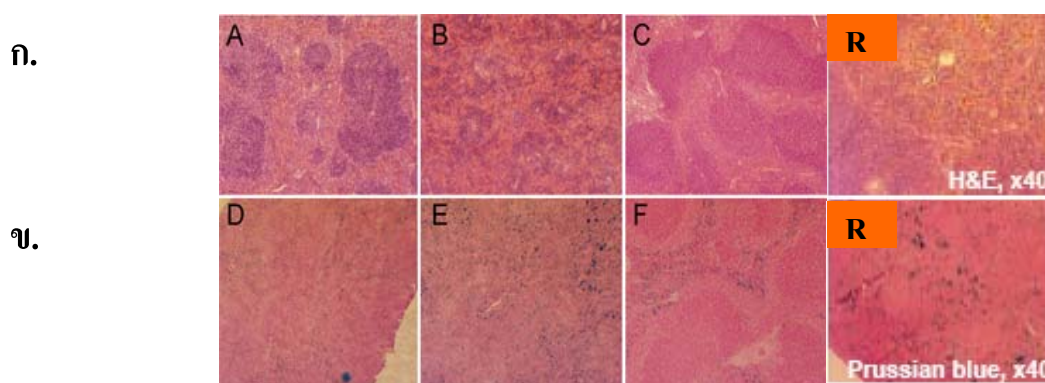
รูปที่ 31 ลักษณะทางกายภาพของอวัยวะตับและขนาดของม้ามที่เก็บจากหนูปกติ (WT), หนู β knockout heterozygote (BKO) และหนู double heterozygote (DH)

ตารางที่ 15 แสดงค่าน้ำหนักตัว, น้ำหนักอวัยวะต่าง ๆ และปริมาณเหล็กที่สะสมในตับของหนูปกติ, หนู Hb E transgene heterozygote, หนู β -knockout heterozygote, หนู double heterozygote และ หนู rescued

	No	Age range (day)	Body wt.* (g)	Weight index (%)			Liver Iron*
				Liver wt.	Spleen wt.	Heart wt.	
Wild type	4	60-108	21.7 $\pm$ 2.2	4.9 $\pm$ 0.14	0.16 $\pm$ 0.12	0.54 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.13
Hb E transgene	16	69-190	22.5 $\pm$ 3.4	4.7 $\pm$ 0.63	0.46 $\pm$ 0.08	0.58 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.10
β -Knockout	16	60-365	23.8 $\pm$ 2.9	4.8 $\pm$ 0.75	2.07 $\pm$ 0.53	0.76 $\pm$ 0.09	1.57 $\pm$ 0.43
Double heterozy	9	62-210	21.5 $\pm$ 2.3	5.5 $\pm$ 0.58	0.32 $\pm$ 0.11	0.56 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.05
Rescued	5	154-378	25.7 $\pm$ 3.5	5.5 $\pm$ 0.51	2.19 $\pm$ 0.56	0.88 $\pm$ 0.19	2.69 $\pm$ 0.73
Rescued 1		323	23.7	ND	2.5	0.93	3.48
Rescued 2		365	31.3	6.0	1.2	0.86	2.88
Rescued 3		378	25.9	4.8	2.6	0.62	1.73
Rescued 4		154	22.2	5.8	2.4	0.86	2.65
Rescued 5		165	25.3	5.5	2.2	1.15	ND

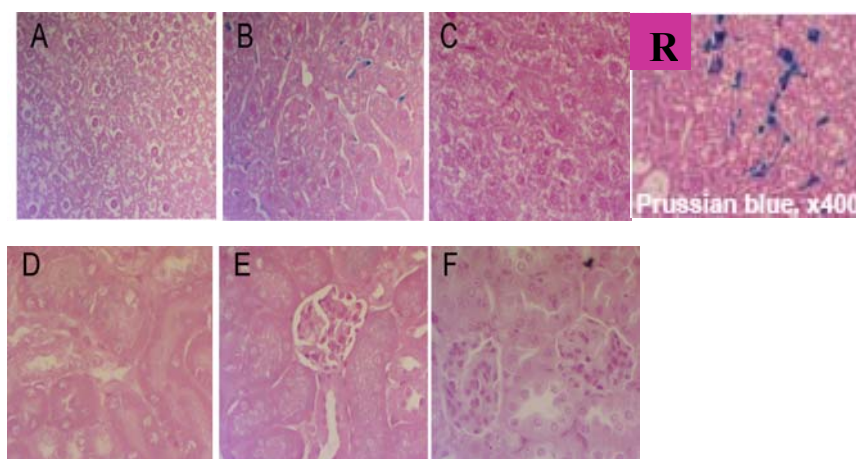
Body weight (g) and liver iron content (mg Fe/g dry wt) are shown as mean $\pm$ SD

Weight index is calculated from actual organ weight/body weight x 100



รูปที่ 32 ภาพถ่ายสไลด์ชิ้นเนื้อตับของหนู (ก) ย้อมด้วยสี H&E: A, หนูปกติ; B, หนู β knockout heterozygote; C, หนู double heterozygote และ R, หนู rescued mice (ข) ย้อมด้วยสี Prussian blue staining: D, หนูปกติ; E, หนู β knockout heterozygote; F, หนู double heterozygote และ R, หนู rescued mice. (กำลังขยาย 40 เท่า)

หนู β knockout heterozygote มี splenic red pulp ในม้ามขยายกว้างทำให้พบ splenic white pulp ยาก (รูปที่ 32B) พบธาตุเหล็กสะสมเพิ่มขึ้นในตับ ทั้ง hepatocyte (รูปที่ 33B) และ apical part ของ proximal tubular cell ของไต (รูปที่ 33E) ธาตุเหล็กสะสมจะพบมากยิ่งขึ้นในม้ามของ rescued mice (รูปที่ 32R) เมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี H&E และ Prussian blue staining และจะสังเกตเห็นได้ธาตุเหล็กที่สะสมมากยิ่งขึ้นในตับของ rescued mice เมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี Prussian blue staining (รูปที่ 33R)



รูปที่ 33 ภาพถ่ายสไลด์ชิ้นเนื้อตับ (A, B, C, R) และไต (D, E, F) ของหนู transgenic ชนิดต่าง ๆ: A และ D, หนูปกติ; B และ E, หนู β knockout heterozygote; C และ F, หนู double heterozygote และ R, หนู rescued mice (Prussian blue staining, กำลังขยาย 400 เท่า)

3.5.2.3 การศึกษาคุณสมบัติของเม็ดเลือดแดง

3.5.2.3.1 การวัดอายุขัยของเม็ดเลือดแดง (red cell life span) ด้วยเทคนิค flow cytometry ทำโดยการย้อมเม็ดเลือดแดงด้วยการฉีดยาไบโอติน (sulfo-NHS biotin) ประมาณ 100-200 ไมโครลิตร ผ่านทางเส้นเลือดดำบริเวณปลายหางเข้าไป (รูปที่ 34) เม็ดเลือดแดงที่อยู่ในหลอดเลือดของหนูทุกเซลล์จะถูกติดฉลากด้วยไบโอติน (biotin) หลังจากนั้นจึงติดตามเก็บเลือดจากปลายหางของหนูครั้งละประมาณ 2-5 ไมโครลิตร เป็นประจำสัปดาห์ละครั้ง ด้วยวิธี tail-vein puncture ซึ่งปริมาณของเลือดที่เก็บมาน้อยมาก จนไม่มีผลต่อปริมาตรเลือดและจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดฉลากในตัวหนูตัวนั้น เลือดของหนูที่เก็บได้นี้นำมาผสมกับ heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด เมื่อเติม streptavidin ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ที่เรียกว่า phycoerythrin (PE) streptavidin-PE จะจับกับไบโอติน บนผิวเม็ดเลือดแดงได้อย่างจำเพาะเจาะจง แล้วจึงนำเม็ดเลือดแดงเหล่านี้ไปวัดสารเรืองแสงด้วยเครื่อง Fluorescence Activator Cell Sort (FACS) flow cytometer และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม CellQuest เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดงที่มีไบโอตินและติดฉลากด้วย

streptavidin-PE โดยให้จำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีไบโอตินอยู่บนผิวเซลล์ในขณะที่นัดสารเป็น 100% ถ้าเปอร์เซ็นต์นี้จะลดลงไปเรื่อย ๆ ตามเวลาที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก่าจะค่อย ๆ ถูกกำจัดออกไปจากระบบไหลเวียนของเลือด ขณะที่เซลล์ใหม่ซึ่งไม่มีไบโอตินบนผิวเซลล์ก็ถูกสร้างขึ้น การวัดอายุขัยของเม็ดเลือดแดงจะสิ้นสุด เมื่อพบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีไบโอตินเท่ากับใน negative control (เมื่อไม่ได้ฉีดไบโอติน) หรือเท่ากับศูนย์



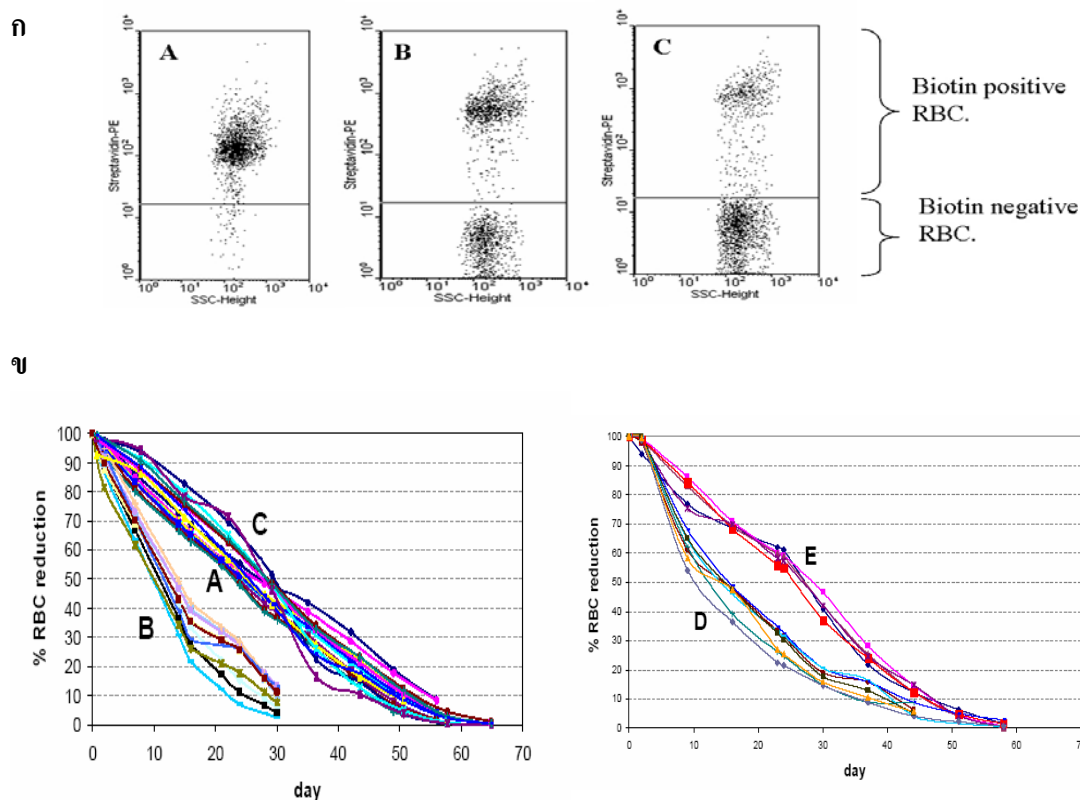
รูปที่ 34 การฉีดสารไบโอติน (sulfo-NHS biotin) ผ่านทางเส้นเลือดดำบริเวณปลายหางของหนู

ผลการศึกษา

จะเห็นว่าการสร้าง chimeric hemoglobin ในหนู rescued มีผลต่อลักษณะทางพยาธิวิทยา ทำให้อาการซึมของหนูลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนู heterozygous β knockout และแสดงว่า β^E -transgene ของคนสามารถแสดงออกได้ในหนู เพื่อที่จะศึกษาคุณสมบัติของเม็ดเลือดแดงที่มี chimeric hemoglobin ในเซลล์ จึงได้ทำการศึกษาอายุขัยของเม็ดเลือดแดง (RBC life span) ซึ่งจะบ่งบอกถึงความบกพร่องในการทำหน้าที่ของเม็ดเลือดแดง

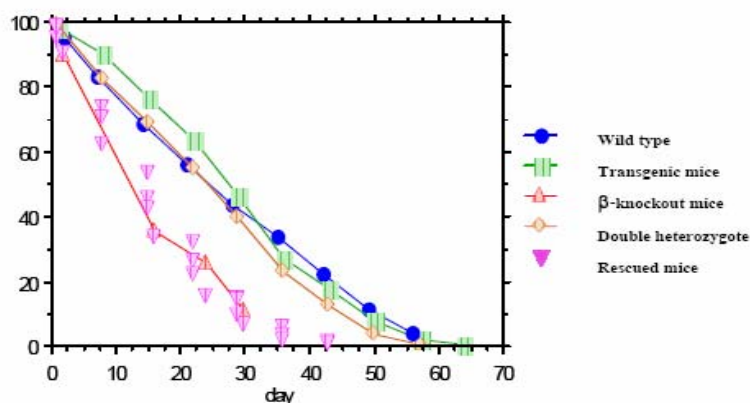
จากการทดลองในหนู 6 ชนิด คือ หนูปกติ (wild-type) หนูธาลัสซีเมียที่มีการแห่วงของยีนเบต้าโกลบินหนึ่งข้าง (heterozygous β knockout mice, $\beta^{m/-}$) หนูที่มียีน $\beta^{IVSII-654}$ knockin อยู่ในโครโมโซมข้างหนึ่ง ($\beta^{m+/IVSII-654}$ heterozygote) หรือมี Hb E ด้วย ($\beta^{m+/IVSII-654}/\beta^E$ -DH) และหนูธาลัสซีเมียที่มีการขาดหายไปของยีนเบต้าโกลบินทั้งสองข้าง แต่มี β^E -gene (rescued mice, $\beta^{m-/-}\beta^E$ และ $\beta^{m-/IVSII-654}\beta^E$) อยู่ด้วย เนื่องจากหนูทั้งหมดมีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ต่างกัน โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง ทำให้คุณสมบัติบางประการของเม็ดเลือดแดงเปลี่ยนไป ซึ่งมีผลต่ออายุขัยของเม็ดเลือด (รูปที่ 35) ในหนูปกติอายุขัยของเม็ดเลือดแดงประมาณ 58 วัน หรือครึ่งชีวิตของอายุขัย(T1/2) เท่ากับ 25 วัน หนู transgenic ซึ่งมียีน β^E -globin ของคนเข้าไปแทรกในพันธุกรรมของหนู มีอายุขัยของเม็ดเลือดแดงประมาณ 56 วัน หรือครึ่งชีวิตของอายุขัย (T1/2) เท่ากับ 28 วัน หนูธาลัสซีเมียที่มีการแห่วงของยีนเบต้าโกลบินหนึ่งข้าง

(β knockout heterozygote) หรือมียีน $\beta^{IVSII-654}$ เข้าไปแทนที่ยีน β ของหนูข้างหนึ่ง (heterozygous $\beta^{m+/IVSII-654}$) พบว่าอายุขัยของเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 36 วัน หรือครึ่งชีวิตของอายุขัย ($T_{1/2}$) เท่ากับ 13 วัน ซึ่งลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ



รูปที่ 35 ก. พังการกระจายของเม็ดเลือดแดงจากการวิเคราะห์ด้วย flow cytometry และ ข. กราฟแสดงอายุขัยของเม็ดเลือดแดงในหนู transgenic ชนิดต่างๆ หนูปกติ (A, E) , หนู β knockout heterozygote (B), หนู transgenic, $\beta^{m+/+}/\beta^E$ (C) และ heterozygote type $\beta^{m+/IVSII-654}$ (D)

ส่วนหนู double heterozygote ซึ่งมียีน β^E ร่วมกับ β knockout ($HbE-DH$, $\beta^{m+/+}/\beta^E$) มีอายุขัยของเม็ดเลือดแดงประมาณ 60 วันหรือครึ่งชีวิตของอายุขัย ($T_{1/2}$) เท่ากับ 25 วันเช่นเดียวกับหนูปกติ (รูปที่ 36) แต่หนู rescued type ซึ่งไม่มียีน b1 และ b2 ของหนูอยู่ในโครโมโซม แม้จะมี human β^E -globin gene เข้าไปทำงานแทนที่ได้ อายุขัยของเม็ดเลือดแดงยังคงลดลงเช่นเดียวกับหนูธาลัสซีเมีย β knockout heterozygote คือ ประมาณ 34 วัน หรือ ครึ่งชีวิตของอายุขัย ($T_{1/2}$) เท่ากับ 11 วัน



รูปที่ 36 กราฟแสดงอายุขัยและอายุครึ่งชีวิต ($T_{1/2}$) ของเม็ดเลือดแดง ในหนูปกติ (wild type), หนู heterozygous β knockout ($\beta^{m/+}$), หนู transgenic ($\beta^{m/+}/\beta^E$), หนู double heterozygote (HbE-DH, $\beta^{m/+}\beta^E$) และ หนู rescued type ($\beta^{m/+}/\beta^E$)

3.5.2.3.2 การวัด red cell vesicles ในหนูธาลัสซีเมียแบบต่าง ๆ ผู้ป่วยธาลัสซีเมียโดยเฉพาะรายที่ตัดม้ามแล้วมีเศษเล็กๆของเม็ดเลือดแดง (vesicles) หลุดออกมาในกระแสเลือด (peripheral blood) ผิวนอกของ vesicle ประกอบไปด้วยโมเลกุลที่สำคัญ เช่น immunoglobulin และ phosphatidylserine (PS) ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้จะไปกระตุ้นระบบอื่น ๆ ในร่างกาย เช่น complement system และระบบการแข็งตัวของเลือด ทำให้เกิดความผิดปกติอื่นตามมา

เนื่องจาก red cell vesicles เหล่านี้มีขนาดเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงปกติและอาจมีขนาดเล็กเท่ากับเกร็ดเลือด (platelet) จึงใช้แอนติบอดีจำเพาะที่ติดฉลากกับสารเรืองแสงเข้าไปจับยึด (binding) กับเซลล์คือ

- Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-glycophorin A จะจับกับเม็ดเลือดแดงและ red cell vesicles
- fluorescent isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD41 antibody จะจับกับเซลล์เกร็ดเลือด

แล้วตรวจโดยดูจากขนาดและแอนติเจนของเม็ดเลือดแดงที่ติดบน vesicle ซึ่งวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง flow cytometer โดยที่ขนาดของ vesicle จะมี forward light scatter (FSC) และ side light scatter (SSC) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของเกร็ดเลือด แต่ vesicle ของเม็ดเลือดแดงและเกร็ดเลือด ซึ่งอยู่เป็นกลุ่มในขนาดเดียวกันสามารถแยกออกจากกันได้ด้วย glycophorin A ซึ่งเป็นแอนติเจนที่จำเพาะต่อเม็ดเลือดแดงและแอนติเจน CD41a ซึ่งจำเพาะต่อเกร็ดเลือด อัตราร้อยละของ vesicle ของเม็ดเลือดแดงสามารถคำนวณได้จากอัตราร้อยละของ

glycophorin A เมื่อได้อัตราร้อยละก็สามารถคำนวณหาจำนวนสมบูรณ์ vesicle ของเม็ดเลือดแดง โดยเทียบกับจำนวน fluorescent TrueCount bead (Becton Dickinson Biosciences, CA) ซึ่งใส่ลงไปพร้อมกับเลือดตัวอย่างโดยที่จำนวน bead ที่ใส่ลงไปจะทราบจำนวนที่แน่นอน เมื่อทราบทั้งอัตราร้อยละ vesicle ของเม็ดเลือดแดงและอัตราส่วนของ bead ในช่อง R2 ต่อ bead ที่ใส่ลงไปทั้งหมดก็จะสามารถคำนวณหาจำนวนสมบูรณ์ vesicle ของเม็ดเลือดแดงได้ ตารางที่ 16 แสดงค่า reactive oxygen species (ROS) และจำนวน vesicle ของเม็ดเลือดแดงในหนูธาลัสซีเมียแบบต่าง ๆ พบว่าหนู rescued type มีเม็ดเลือดแดงผิดปกติซึ่งสอดคล้องกับค่า red cell life span ที่สั้นลง แม้ว่าระดับฮีโมโกลบินจะใกล้เคียงกับหนูปกติ

ตารางที่ 16 ค่า reactive oxygen species (ROS) และจำนวน vesicle ของเม็ดเลือดแดงในหนูธาลัสซีเมียแบบต่าง ๆ

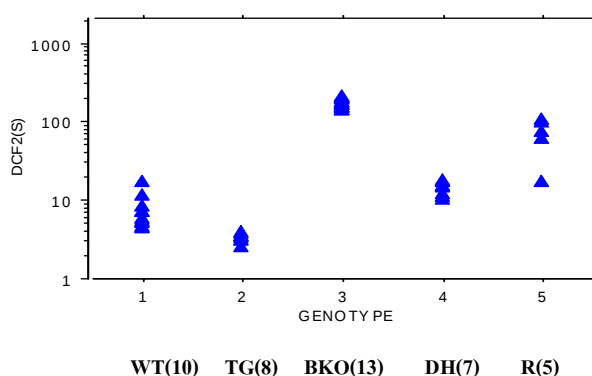
	Age (days) mean $\pm$ SD.	ROS level (Y Geomean)	RBC vesicle (%)	PS cell (%)
Wild type	83.88 $\pm$ 24.84	7.51 $\pm$ 3.85 (10)	2.94 $\pm$ 1.28 (13)	1.06 $\pm$ 0.56 (6)
HbE-Tg heterozygote	107.44 $\pm$ 32.59	3.28 $\pm$ 0.43 (8)	2.62 $\pm$ 1.55 (23)	0.87 $\pm$ 0.29 (7)
β -Knockout	153.63 $\pm$ 65.05	170.06 $\pm$ 24.57 (13)	22.43 $\pm$ 4.65 (24)	3.35 $\pm$ 0.75 (7)
Double heterozygote	95.16 $\pm$ 52.93	13.86 $\pm$ 2.98 (7)	1.48 $\pm$ 1.12 (11)	1.07 $\pm$ 0.35 (7)
Rescued	297.00 $\pm$ 109.30	117.44 $\pm$ 67.20 (6)	8.87 $\pm$ 3.29 (6)	1.24 $\pm$ 0.72 (5)
Rescued 1	323	117.45	4.11	1.00
Rescued 2	365	197.89	7.69	2.25
Rescued 3	397	38.99	9.84	0.52
Rescued 4	378	64.31	11.56	ND
Rescued 5	154	168.58	6.91	0.75
Rescued 6	165	ND	13.13	1.70

ROS - reactive oxygen species, RBC - red blood cell, PS - phosphatidylserine
Data expressed as mean $\pm$ S.D., ND - not determined

3.5.2.3.3 การวัดอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) ในหนูธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค flow cytometry-based DCF assay ผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีภาวะ oxidative stress สูงกว่าคนปกติ เนื่องจากมีความผิดปกติในการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน คือ มีการสังเคราะห์สายเบต้าโกลบินลดลงหรือไม่มีการสังเคราะห์เลย ทำให้มีสายอัลฟาโกลบินมากเกินไปและไม่เสถียร เม็ดเลือดแดงอายุสั้นแตกง่ายและมีภาวะที่มีเหล็กเกินจึงเกิดอนุมูลอิสระ โดยผ่านทางปฏิกิริยา Fenton ได้ง่าย การตรวจวัดอนุมูลอิสระทำได้โดยนำเซลล์เม็ดเลือดแดงมาเติมสาร dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 mM แล้วอุ่นนาน 15 นาทีที่ 37°C สาร DCFH-DA ที่ซึมผ่านผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงเข้าไป จะถูกตัดเอาหมู่ diacetate ที่ปลายออกด้วยเอนไซม์ esterase ในเซลล์เกิดเป็นสาร DCFH ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ ROS ภายในเซลล์ โดยมี H_2O_2 ที่เติมลงไปเป็นตัวกระตุ้น จะเปลี่ยนเป็นสาร DCF ซึ่งจะให้สารเรืองแสงสีเขียว จึงตรวจวัดปริมาณได้ด้วยเครื่อง flow cytometer

ผลการทดลอง

พบว่าเม็ดเลือดแดงหนูธาลัสซีเมียทั้งชนิด β knockout heterozygote และหนู rescued type มีภาวะ oxidative stress สูงกว่าหนูปกติ ซึ่งอาจจะอธิบายผลที่พบว่าหนู rescued type มีค่า red cell life span สั้นลง (รูป 37)



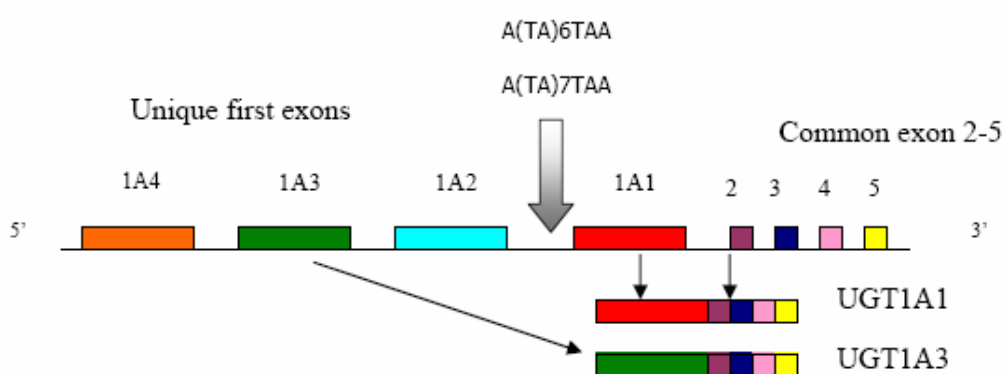
รูปที่ 37 แสดงผลการวัด reactive oxygen species (ROS) ในเม็ดเลือดแดงโดยวิธี 2', 7'-dichloro-fluorescein (DCF) assay ในหนูปกติ (WT), หนู transgenic (TG, $\beta^{m+/+}/\beta^E$), หนู heterozygous β knockout (BKO, $\beta^{m+/-}$), หนู double heterozygote (HbE-DH, $\beta^{m+/-}\beta^E$) และหนู rescued type (R, $\beta^{m-/-}/\beta^E$)

3.6 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A) และเภสัชจลนศาสตร์ของยา พาราเซตามอล ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ผลจากความผิดปกติในการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน ทำให้เม็ดเลือดแดงขาดความยืดหยุ่นและมีความแข็งตัวเพิ่มขึ้น เม็ดเลือดเหล่านี้จะถูกทำลายโดย reticuloendothelium system โดยเฉพาะที่ม้าม จึงมักพบว่าผู้ป่วยมีม้ามโต ในรายที่มีอาการซีดเรื้อรังเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติจะถูกย่อยสลายไป บิลิรูบินและธาตุเหล็กจะถูกเก็บสะสมไว้ ทำให้พบภาวะเหล็กเกินและดีซ่านในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ธาตุเหล็กบางส่วนจะถูกสะสมที่อวัยวะต่าง ๆ เช่น ตับ การที่ผู้ป่วยต้องได้รับเลือดบ่อย ๆ ทำให้มีภาวะเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ส่งผลกระทบต่อการทำงานของตับที่เป็นอวัยวะสำคัญ ในการกำจัดการออกฤทธิ์ของยาหรือสารอื่นที่เข้าสู่ร่างกาย การสะสมของธาตุเหล็กและอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก จะกระทบต่อการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ เช่น หลอดเลือดมีการแข็งตัว (atherosclerosis) ทำให้เลือดไปเลี้ยงหัวใจได้น้อย การบีบตัวของหัวใจลดลงส่งผลให้ปริมาณเลือดที่ถูกบีบออกจากหัวใจลดลง (cardiac output) เลือดไปเลี้ยงตับลดลง (hepatic blood flow) ไตลดการกรองและการขับของเสียออกจากร่างกาย ซึ่งพยาธิสภาพทั้งหมดนี้ล้วนแต่มีผลกระทบต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา (pharmacokinetics) ซึ่งรวมถึงการที่ยาถูกดูดซึม การกระจาย การเปลี่ยนแปลงและการถูกกำจัดออกจากร่างกาย

บิลิรูบินที่เกิดจากการสลายตัวของเม็ดเลือดแดง จะจับกับโปรตีนในพลาสมาและถูกนำไปที่ตับเพื่อทำปฏิกิริยากับ uridine diphosphate (UDP) ผ่านกระบวนการ glucuronidation โดยเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase (UGTs) ได้สารประกอบที่ละลายน้ำดีขึ้น จากนั้นจึงถูกขับออกทางปัสสาวะและน้ำดี บิลิรูบินในเลือดในระดับที่เหมาะสมมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ แต่ถ้ามีระดับสูงเกินไปในเลือดผู้ป่วยจะมีอาการตัวเหลือง ตาเหลืองและส่งผลให้เกิดอันตรายต่อสมองได้ (encephalopathy) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยมักมีแนวโน้มเป็นโรคน้ำในถุงน้ำดีและท่อน้ำดีร่วมด้วย

เนื่องจากผู้ป่วย β -thalassemia/HbE จำเป็นต้องใช้ยาหลายชนิดในการรักษาและบรรเทาอาการต่าง ๆ เช่น ยาขับเหล็กส่วนเกิน ยาทางระบบหัวใจและหลอดเลือด ยาปฏิชีวนะ ยาแก้ปวด เป็นต้น ยาดังกล่าวนี้นักถูกเปลี่ยนแปลงเพื่อกำจัดยาให้หมดฤทธิ์และขับออกจากร่างกายต่อไป ด้วยกระบวนการ glucuronidation โดยเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase (UGTs) เช่นเดียวกัน แต่ธรรมชาติของเอนไซม์ชุดนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphisms) ค่อนข้างสูง ในผู้ป่วยที่มีภาวะบิลิรูบินในเลือดสูง (hyperbilirubinemia) เช่น ผู้ป่วย Gilbert's syndrome เอนไซม์ที่กำจัดบิลิรูบินคือ UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) ทำหน้าที่ลดลง เนื่องจากยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำของ TA (TA repeats) ที่ promoter ของยีน UGT1A1 (รูปที่ 38) การศึกษาต่อมาพบว่าความหลากหลายของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ UGT1A1 มีความเกี่ยวข้องกับความหลากหลายของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ UGT1A ในรูปแบบอื่น (isoform) ด้วย เช่น UGT1A6 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารและยาหลายชนิด เช่น ยาพาราเซตามอลและยาที่มีโครงสร้างแบบฟินอล เป็นต้น และความผิดปกติดังกล่าวมักพบบริเวณ coding region ของ UGT1A6 (T181A, R184S)



รูปที่ 38 แผนที่ของยีน UGT1A1 แสดงจำนวนซ้ำของ TA (TA repeats) ที่ promoter ของยีน UGT1A1

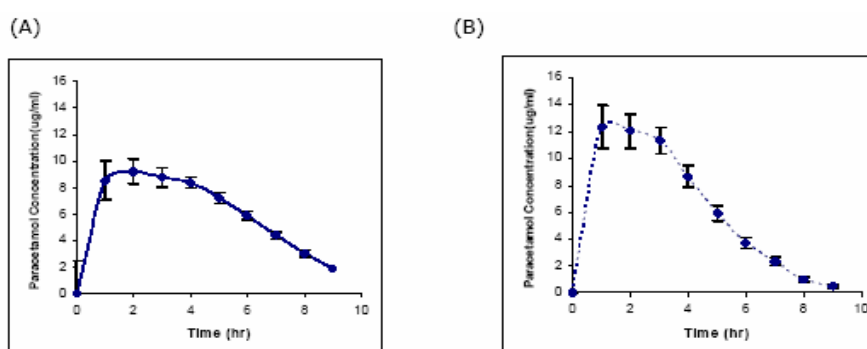
ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาที่ใช้บ่อย ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียอย่างมีระบบ แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ ใช้แบบแผนการให้ยาในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเช่นเดียวกับคนไขอื่น ๆ ซึ่งอาจทำให้การรักษาไม่เกิดประสิทธิผลเท่าที่ควร คณะผู้วิจัยร่วมกับ ดร.อุดม จันทารักษ์ศรี ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จึงได้เริ่มทำการศึกษา เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นทางเภสัชจลนศาสตร์ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยใช้ยาสามัญประจำบ้าน เช่น พาราเซตามอล เป็นยาต้นแบบควบคุมไปกับการติดตามระดับบิลิรูบินในเลือด (endogenous substrate)

วิธีการศึกษา

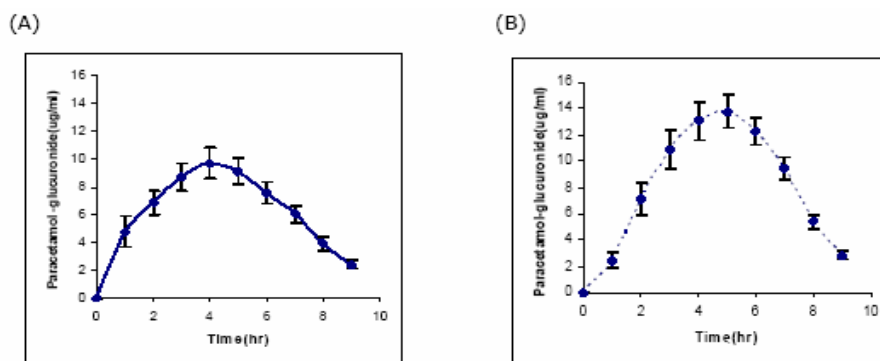
โดยการเลือกผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคใกล้เคียงกัน อายุ 18-45 ปี และต้องไม่มีประวัติได้รับเลือดหรือได้รับมาแล้วมากกว่า 3 เดือน ไม่เป็นโรคหัวใจ เบาหวาน แผลในกระเพาะอาหาร เป็นต้น จากนั้นให้ผู้ป่วยธาลัสซีเมียและอาสาสมัครสุขภาพดี 10 ราย รับประทานยาพาราเซตามอลขนาด 1 กรัม และเจาะเลือดตามเวลาต่าง ๆ กัน เป็นระยะเวลา 4-5 เท่าของค่าครึ่งชีวิตของยา และนำตัวอย่างเลือดมาตรวจวัดระดับยาและเมตาโบไลต์ของยา

ผลการศึกษา

ข้อมูลเบื้องต้นชี้ให้เห็นว่าปริมาณ ยาพาราเซตามอล ในพลาสมา (area under concentration time curve; AUC) ในผู้ป่วยมีปริมาณต่ำกว่าในอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่เมตาโบไลต์ที่ผ่านทางปฏิกิริยา glucuronidation ในผู้ป่วยมีปริมาณต่ำกว่าในอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (รูปที่ 39) ระดับยาที่ต่ำในผู้ป่วยน่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงยาได้เร็วขึ้นผ่านทางปฏิกิริยา glucuronidation (รูปที่ 40)

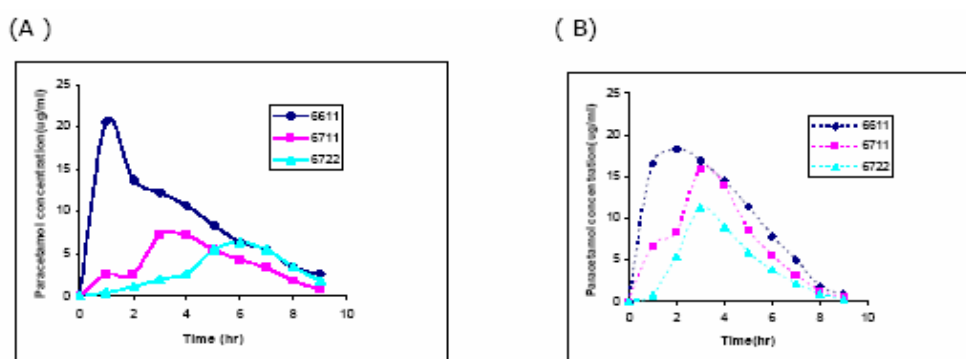


รูปที่ 39 curve แสดงค่าความเข้มข้นของยา พาราเซตามอล (mean±SEM) ในอาสาสมัครปกติ (A) และผู้ป่วยธาลัสซีเมีย 10 ราย (B)



รูปที่ 40 curve แสดงความเข้มข้นของ paracetamol-glucuronide (mean±SEM) ในอาสาสมัครปกติ (A) และผู้ป่วยโรคตับ 10 ราย (B)

คณะผู้วิจัยจึงได้พยายามสืบหาปัจจัยที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลง AUC ของยาและเมตาโบไลต์ของยาพาราเซตามอลในผู้ป่วย รวมถึงปัจจัยด้านพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ UGTs เมื่อตรวจหา genetic polymorphisms ของ UGT1A1 และ UGT 1A6 และนำมาวิเคราะห์อิทธิพลของ genetic polymorphisms ของเอ็นไซม์ UGT1A1 และ UGT 1A6 ที่ส่งผลกระทบต่อเภสัชจลนศาสตร์ ผลการทดลอง พบว่า



รูปที่ 40 curve แสดงค่าความเข้มข้นของยา พาราเซตามอล (mean±SEM) แยกตาม genetic polymorphisms ของ UGT1A1 และ UGT 1A6 ในอาสาสมัครปกติ (A) และผู้ป่วยโรคตับ (B)

**หมายเหตุ

66= homozygous for the common allele at the promoter of UGT1A1

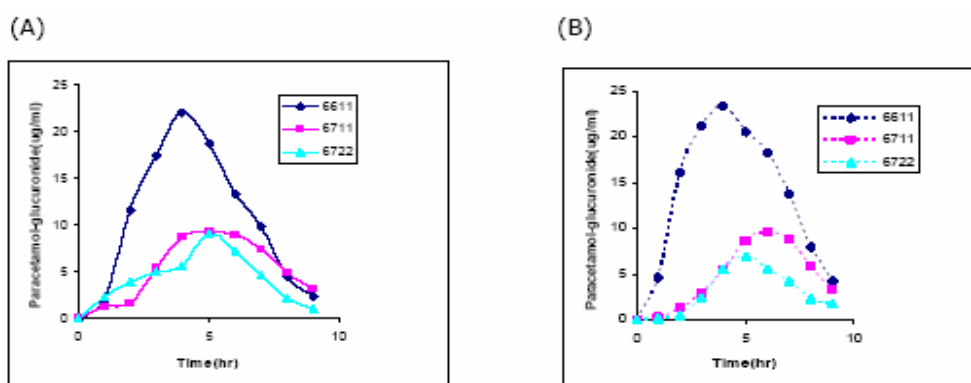
67= heterozygous at the promoter of UGT1A1

1= homozygous for the common allele at codon 181 and 184 of UGT 1A6

2= heterozygous at codon 181 and 184 of UGT 1A6

3= homozygous for variant allele at codon 181 and 184 of UGT 1A6

ความหลากหลายของยีนที่ควบคุมการสร้าง UGTs ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณยาพาราเซตามอลในพลาสมาและเมตาโบไลต์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงยาผ่านทางปฏิกิริยา glucuronidation ทั้งในผู้ป่วยและอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 41, 42) และ genetic polymorphism ของ UGT1A1 และ UGT1A6 มีแนวโน้มของการส่งผลกระทบต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงยาในระดับที่แตกต่างกัน



รูปที่ 41 curve แสดงความเข้มข้นของ paracetamol-glucuronide (mean±SEM) แยกตาม genetic polymorphisms ของ UGT1A1 และ UGT 1A6 ในอาสาสมัครปกติ (A) และผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (B)

3.7. การผลิตแอนติบอดีเพื่องานวิจัยและวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย

การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะผลิตแอนติบอดีต่อฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ และพัฒนาเป็นชุดตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย จึงได้ร่วมกับ ศ.มร.ว.ชัยยุทธ สวัสดิ์วัฒน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ ศ.วัชร กสินฤกษ์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการศึกษาวิจัย ผลการศึกษาวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว มีดังนี้

3.7.1 การเตรียม hemoglobin และ globin chain ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Hb A, Hb A₂, α-globin chain และ β-globin chain (จากเลือดของคนปกติ), Hb F และ γ-globin chain (จากเลือดของผู้ป่วยเบต้า-ธาลัสซีเมีย) และ Hb Bart's (จากเลือดของผู้ป่วยโรค Hb Bart's hydrops fetalis) ได้สำเร็จ และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการทางชีวเคมี ได้แก่ isoelectric focusing, cellulose acetate electrophoresis, high pressure liquid chromatography (HPLC) และ ion exchange chromatography ซึ่งตรวจสอบความบริสุทธิ์ได้ด้วยวิธี amino acid sequencing และ mass spectrophotometry หลังจากนั้น hemoglobin และ globin chain ที่ได้ถูกนำไปฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลอง เพื่อใช้เป็นแอนติเจนกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง hemoglobin และ globin chain ที่เหลือสามารถเก็บไว้ใช้ตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อไป

3.7.2 การใช้ IgY technology ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ Hb Bart's, Hb F, α -globin และ ξ -globin โดยการฉีด Hb Bart's, Hb F, α -globin และ ξ -globin เข้าไปในกล้ามเนื้อหน้าอกของแม่ไก่ เก็บซีรัมและไข่ไก่ เพื่อศึกษาการสร้างแอนติบอดี โดยการแยก IgY ออกจาก egg yolk ด้วยวิธี water dilution และ sodium phosphate precipitation และศึกษาการตรวจสอบแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA โดยใช้ hemoglobin และ globin chain ชนิดต่าง ๆ เป็นแอนติเจน ผลการทดลองพบว่า IgY technology สามารถผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี ต่อ Hb Bart's และ Hb F ได้จากไข่ไก่ของแม่ไก่ที่ฉีดกระตุ้นด้วย Hb Bart's และ Hb F แต่พบ cross-reactivity เนื่องจากทั้ง Hb Bart's และ Hb F มีส่วนประกอบของ γ -globin chain (ตารางที่ 17) สำหรับแม่ไก่ที่ฉีดด้วย α -globin และ ξ -globin พบแอนติบอดีในระดับต่ำและแอนติบอดีเกิดขึ้นได้ช้า เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีการฉีด Hb Bart's และ Hb F ซึ่งอาจเกิดจากการขาดคุณสมบัติของ immunogen ที่ดี

ผู้วิจัยได้นำเอา IgY แอนติบอดีที่ผลิตได้ มาพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียโดยวิธี direct ELISA ผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจแยกผู้ป่วย α -thalassemia บางชนิด ได้แก่ ผู้ป่วยที่เป็น Hb H disease, Hb H/CS ที่มีระดับของ Hb Bart's สูงกว่าปกติและผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียที่มีระดับของ Hb F สูงกว่าปกติ ได้แก่ ผู้ป่วยที่เป็น β -thalassemia/HbE และ β thalassemia major ออกจากคนปกติได้

สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ξ -globin เพื่อวินิจฉัย α -thalassemia 1 ทำได้โดยการฉีดหนูด้วย ξ -globin ใน route ต่าง ๆ และศึกษาการตอบสนองการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี ELISA จากนั้นนำ spleen cells ของหนูที่มีการสร้างแอนติบอดีมาเชื่อมต่อกับ myeloma cells โดยวิธี hybridoma technique ผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ได้จำนวน 8 clones โดยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดไม่จำเพาะต่อ ξ -globin เท่านั้น แต่ทำปฏิกิริยาได้กับ Hb A, Hb A₂, Hb F, Hb Bart's, α -globin, β -globin, γ -globin, adult lysate, normal cord lysate และ Hb Bart's hydrops fetalis lysate ด้วยเช่นกัน จึงจะต้องทำการแยกโปรตีนอื่น ๆ ออกไปเพื่อจะได้แอนติบอดีต่อ ξ -globin ที่บริสุทธิ์และจำเพาะกับ α -thalassemia 1

ตารางที่ 17 indirect ELISA แสดงผลบวกของ anti-Hb Bart's IgY antibodies ซึ่งจำเพาะต่อ γ globin chain ในคนปกติ พาหะธาลัสซีเมียและผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ

Subjects	Total cases	Positive cases (n) (%)
<i>Normal subjects</i>		
Normal hemoglobin	98	4 (4.1 %)
<i>α-thalassemia cases</i>		
:Disease		
Hb H-CS	16	16 (100 %)
Hb H disease	31	19 (61.3 %)
EA Bart's	4	4 (100 %)
CS EA Bart's	5	5 (100 %)
CS EF Bart's	1	1 (100 %)
Homozygous Hb CS	4	1 (25 %)
Bart's hydrops fetalis	3	3 (100 %)
:Non-disease		
Homozygous α -thal 2	5	1 (20 %)
Heterozygous α -thal 2	4	0 (0 %)
Heterozygous α -thal-1	57	5 (8.8 %)
Heterozygous Hb CS	8	0 (0%)
<i>β-thalassemia</i>		
:Disease		
β -thalassemia/Hb E	27	27 (100 %)
Homozygous β -thal	1	1 (100 %)
:non-disease		
Heterozygous β -thal	39	15 (38.5 %)
Homozygous Hb E	18	15 (83 %)
Heterozygous Hb E	25	3 (12 %)

4. ผลผลิตจากกลุ่มวิจัย

4.1 ผลงานตีพิมพ์ ในช่วงระยะเวลา 3 ปี (พ.ศ. 2545-2548) กลุ่มวิจัยชาลส์ซีเมียมี่มีผลงานตีพิมพ์ในวารสาร ซึ่งส่วนใหญ่เป็นวารสารต่างประเทศ ดังนี้

1. Jamsai D, Nefedov M, Narayanan K, Orford M, Fucharoen S, Williamson R, Ioannou P. Insertion of common mutations into the human β -globin locus using *GET recombination* and an EcoRI endonuclease counterselection cassette. *J Biotechnology* 2003; 101: 1-9. (Impact factor 2.543)
2. Chui D.H.K., Fucharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *Blood* 2003; 101: 791-800. (Impact factor 10.12)
3. Unchern S, Laoharuangpanya N, Phumala N, Sipankapracha P, Pootrakul P, Fucharoen S, Wanachivanawin W, Chantharaksri U. The effects of vitamin E on platelet activity in β -thalassemia patients. *Br J Haematol* 2003; 123: 738-744. (Impact factor 3.267)
4. Jamsai D, Orford M, Fucharoen S, Williamson R, Ioannou P. Insertion of modifications in the β -globin locus using *GET recombination* with single-stranded oligonucleotides and denatured PCR fragments. *Molecular Biotechnology* 2003; 23: 29-36. (Impact factor 2.743)
5. Ngiwsara L, Srisomsap C, Winichagoon P, Fucharoen S, Svasti J. Hb Kodaira II [β 146(HC3)His>Gln] detected in Thailand. *Hemoglobin* 2003; 27: 37-39. (Impact factor 0.505)
6. Jamsai D, Orford M, Nefedov M, Fucharoen S, Williamson R, Ioannou P. Targeted modification of a human β -globin locus BAC clone using *GET recombination* and an I-SceI counterselection cassette. *Genomics* 2003; 82: 68-77. (Impact factor 3.488)
7. Pootrakul P, Sirankapracha P, Sangote J, Kachintorn U, Maungsub W, Sriphen K, Thakernpol K, Atisuk K, Fucharoen S, Chantraluksri U, Shalev O, Hoffbrand V. Clinical trial of deferiprone iron chelation therapy in β -thalassemia/haemoglobin E patients in Thailand. *Br J Haematol* 2003; 122: 305-310. (Impact factor 3.267)
8. Paiboonsukwong K, Choi I, Matsushima T, Abe Y, Nishimura J, Winichagoon P, Fucharoen S, Nawata H, and Muta K. The signaling pathways of erythropoietin and interferon- γ differ in preventing the apoptosis of mature erythroid progenitor cells. *Int J Hematol* 2003; 78: 421-428. (Impact factor 1.119)

9. Wanachiwanawin W, Luengrojanakul P, sirangkapracha P, Leowattana W, Fucharoen S. Prevalence and clinical significance of hepatitis C virus infection in Thai patients with thalassemia. *Int J Hematol* 2003; 78: 374-378. (Impact factor 1.119)
10. Pattanapanyasat K, Noulisri E, Fucharoen S, Lerwana S, Lamchiagdhase P, Siritanarakul N, and H. Kyle Webster. Flow cytometric quantitation of red blood cell vesicles in thalassemia. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2004; 57B: 23-31. (Impact factor 2.095)
11. Ngiwsara L, Srisomsap C, Winichagoon P, Fucharoen S, and Svasti J. Two cases of compound heterozygosity for Hb Hekinan [α 27(B8) Glu->Asp (α 1)] and α -thalassemia in Thailand. *Hemoglobin* 2004; 28: 145-150. (Impact factor 0.505)
12. Jamsai D, Zaibak F, Khongnium W, Vadolas J, Voullaire L, Fowler JK, Gazeas S, Fucharoen S, Williamson R, Ioannou PA. A humanized mouse model for a common β^0 -thalassemia mutation. *Genomics* 2005; 85:453-361. (Impact factor 3.488)
13. Ngiwsara L, Srisomsap C, Winichagoon P, Fucharoen S, Sae-Ngow B, and Svasti J. Hb kurosaki [α 7(A5)Lys->Glu (AAG->GAG)]: an α 2-globin gene mutation found in Thailand. *Hemoglobin* 2005; 29 (2): 155-159. (Impact factor 0.505)
14. Wannasuphaphol B, Kalpravidh R, Patanapanyasat K, Ioannou P, Kuypers F A, Fucharoen S, and Winichagoon P. Rescued mice with Hb E transgenic developed red cell changes similar to human β -thalassemia/Hb E disease. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1054: in press.
15. Sripichai O, Whitacre J, Munkongdee T, Kumkhaek C, Makarasara W, Winichagoon P, Abel K, Braun A, and Fucharoen S. Genetic analysis of candidate modifier polymorphisms in β -thalassemia/Hb E patients. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1054; in press.
16. Watanapokasin Y, Chuncharunee S, Sanmund D, Kongnium W, Winichagoon, Fucharoen S. *In vivo* and *in vitro* studies of fetal hemoglobin induction by hydroxyurea in β -thalassemia/Hb E patients. *Experimental Hematol* 2005, accepted.
17. Changsri K, Akkarapathumwong V, Winichagoon P, Fucharoen S. Molecular mechanism of high Hb F production in Southeast Asian type HPFH. *Int J Hematol* 2005, accepted.
18. Jamsai D, Zaibak F, Vadolas J, Voullaire L, Wantana Khongnium, Kerry Forler, Sophie Gazeas, Heidi Peters, Prenee Winichagoon, Robert Williamson, Suthat Fucharoen, Panayiotis A. Ioannou. Humanized mouse models for HbE/ β -thalassemia. 2005, submitted to *Blood*.

19. Watanapokasin Y, Sanmund D, Kongnium W, Winichagoon, Koichiro M, Fucharoen S. Induction of g-globin expression by Hydroxyurea in liquid culture erythroid cells of Thai β -thalassemia/Hb E patients. 2005, submitted to Annal Hematology.
20. Jintaridith P, Kalpravidh RW, Srisomsap C, Fucharoen S, Svasti J, Kasinrerker W. Production of anti-hemoglobin Bart's antibody for thalassemia diagnosis from chicken egg. 2005, submitted to Int J Hematol.
21. Svasti S, Paksua S, Nuchprayoon I, Winichagoon P, Fucharoen S. New strategy to characterize a novel deletion causing $(\delta\beta)^0$ -thalassaemia in a mild β -thalassaemia/Hb E patient. 2005, submitted to Br J Haematol.

นอกจากนั้น ได้รับเชิญให้เขียนบทความในตำรา 3 เรื่อง

1. การรักษาผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ในตำรา Human Hemoglobin ของประเทศจีน โดยมีการแปลจากต้นฉบับภาษาอังกฤษให้เป็นภาษาจีน
2. บทความเรื่อง Hemoglobin E Disorders ในตำรา Clinical Aspects and Therapy of Thalassemia (Maggio A and Hoffbrand AV, eds.) จัดพิมพ์โดย SEE-FIRENZE ประเทศอิตาลี ปี ค.ศ.2004
3. ร่วมกับศาสตราจารย์เกียรติคุณ พญ. วรพรรณ ตันไพจิตร เขียนเรื่อง โรคธาลัสซีเมีย สำหรับเยาวชน ในหนังสือสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน (เล่มที่ 29) พ.ศ. 2548

4.2 การนำเสนอผลงานในที่ประชุมนานาชาติ

1. การประชุม: 9th International Conference on Thalassemia and Hemoglobinopathies. Palermo, Italy, October 15-19, 2003.

ชื่อเรื่อง: Hemoglobin E disorder: Pathophysiology and clinical finding.

ชื่อนักวิจัย: Suthat Fucharoen¹, Pranee Winichagoon¹, Orapan Sripichai¹, Thongperm Munkongdee¹, Kanjana Vichittumaros¹, Pornpan Sirankapracha¹, Noppadol Siritanaratkul², Tanyachai Sura³, Ampaiwan Chuansumrit³, Issarang Nuchprayoon⁴, Saranya Suwansings⁵, Somchai Intarasiripong⁶, Ken Abel⁷, Andreas Braun⁷

สังกัด ¹Thalassemia Research Centre, Institute of Science and Technology for Research and Development, ²Faculty of Medicine Siriraj Hospital, ³ Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, ⁴Faculty of Medicine

- Chulalongkorn University, ⁵ Chiangrai Pachanukraw Hospital, ⁶ Maharaj Nakornrajchasma Hospital, Thailand ⁷ SRQUENOM, Inc., San Diego, CA.
2. การประชุม: 9th International Conference on Thalassemia and Hemoglobinopathies. Palermo, Italy, October 15-19, 2003.
- ชื่อเรื่อง: Expression of β^E - and γ -globin genes in infants heterozygous for hemoglobin E
- ชื่อนักวิจัย: Pranee Winichagoon-Fucharoen¹, Kanjana Vichittumaros¹, Pattanee Winichagoon², Chureporn Chitchumroonchokechai², Suthat Fucharoen¹
- สังกัด: ¹Thalassemia Research Centre, Institute of Science and Technology for Research and Development ²Institute of Nutrition, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom 73170, Thailand.
3. การประชุม: 9th International Conference on Thalassemia and Hemoglobinopathies. Palermo, Italy, October 15-19, 2003.
- ชื่อเรื่อง: Humanised mouse models for β -thalassemia /HBE disease
- ชื่อนักวิจัย: Duangporn Jamsai^{1,2}, Faten Zaibak¹, Jim Vadolas¹, Suthat Fucharoen², Robert Williamson² and Panos Loannou^{1,*}
- สังกัด: ¹Murdoch Childrens Research Institute, Royal Children's Hospital, Parkeville, Victoria 3052, Australia ²Thalassemia Research Centre, Institute of Science and Technology and Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Nakornpathom 73170, Thailand
4. การประชุม: 9th International Conference on Thalassemia and Hemoglobinopathies. Palermo, Italy, October 15-19, 2003.
- ชื่อเรื่อง: Efficacy of curcumin in the in vitro removal of non transferrin-bound iron (NTBI) in thalassemic serum.
- ชื่อนักวิจัย: Somdet Srichairatanakool¹, Cholthida Thephinlap¹, Chada Phisalaphong² and Suthat Fucharoen³
- สังกัด: ¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, ²Thai Government Pharmaceutical Organization and ³Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Nakornpathom, Thailand

5. การประชุม: Genetics and Population Health. Western Australia, August 8-10, 2004;
 ชื่อเรื่อง: Thalassemia genotype-phenotype correlations
 ชื่อนักวิจัย: *Fucharoen S, Winichagoon P, Sripichai O, Kumkhaek C, Munkongdee T, Vichittumaros K, Sirankapracha P.
 สังกัด: Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Thailand
6. การประชุม: 5th Human Genetics Organization (HUGO) Pacific Meeting & 6th Asia-Pacific Conference on Human Genetics. Biopolis, Singapore, November 17-20, 2004.
 ชื่อเรื่อง: Disease modifier genes in thalassemia.
 ชื่อนักวิจัย: Fucharoen S¹, Winichagoon P¹, Sripichai O¹, Kumkhaek C¹, Whitacre J², Abel K², Braun A²
 สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
²SEQUENOM, Inc., San Diego, USA.
7. การประชุม: 5th Human Genetics Organization (HUGO) Pacific Meeting & 6th Asia-Pacific Conference on Human Genetics. Biopolis, Singapore, November 17-20, 2004.
 ชื่อเรื่อง: In vivo repair of incorrectly spliced β -globin mRNA restores hemoglobin synthesis in IVSII-654 β -thalassemic mouse.
 ชื่อนักวิจัย: Svasti S¹, Fucharoen S¹, Fucharoen P¹, Kole R²
 สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
²Lineberger Comprehensive Cancer Center, University
8. การประชุม: 5th Human Genetics Organization (HUGO) Pacific Meeting & 6th Asia-Pacific Conference on Human Genetics. Biopolis, Singapore, November 17-20, 2004.
 ชื่อเรื่อง: Development of an HPFH-specific assay for HbF inducers
 ชื่อนักวิจัย: Louthai P^{1,2}, Vadolas J², Warden H², Winichagoon P¹, Svasti J³, Ioannou P², Fucharoen S¹.
 สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand

- ²CAGT Research Group, Murdoch Children's Research Institute, Royal Children's Hospital, Flemington Road, Melbourne, VIC 3052, Australia
- ³Departments of Biochemistry, Mahidol University, Bangkok, Thailand
9. การประชุม: 5th Human Genetics Organization (HUGO) Pacific Meeting & 6th Asia-Pacific Conference on Human Genetics. Biopolis, Singapore, November 17-20, 2004.
- ชื่อเรื่อง: Molecular mechanism of HbF enhancing in Southeast Asian HPFH
- ชื่อนักวิจัย: Changsri Kh¹, Winichagoon P¹, Fucharoen S¹.
- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
10. การประชุม: 5th Human Genetics Organization (HUGO) Pacific Meeting & 6th Asia-Pacific Conference on Human Genetics. Biopolis, Singapore, November 17-20, 2004.
- ชื่อเรื่อง: Genetic factors affecting clinical severity in β -thalassemia/HbE disease
- ชื่อนักวิจัย: Kumkhaek C¹, Sripichai O¹, Munkongdee T¹, Vichittumaros K¹, Sirankapracha P¹, Winichagoon P¹, Fucharoen S¹.
- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
11. การประชุม: 5th Human Genetics Organization (HUGO) Pacific Meeting & 6th Asia-Pacific Conference on Human Genetics. Biopolis, Singapore, November 17-20, 2004.
- ชื่อเรื่อง: Frequent co-occurrence of UDP-glucuronosyl-transferase 1A1 and 1A6 polymorphisms in Thai beta-thalassemia/HbE and African-American sickle cell anemia patients
- ชื่อนักวิจัย: Jeeranut Sawattep², Thad Howard³, Noppawan Phumala Morales², Yupin Sanvarinde², Pranee Fucharoen¹, Suthat Fucharoen¹, Udom Chantharaksri², Russell E Ware³
- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
- ²Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University,
- ³Division of Hematology, St.Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, United States, 38105.

12. การประชุม: 5th Human Genetics Organization (HUGO) Pacific Meeting & 6th Asia-Pacific Conference on Human Genetics. Biopolis, Singapore, November 17-20, 2004.
- ชื่อเรื่อง: Pathophysiologic changes in a murine model of beta-thalassemia: human hemoglobin E transgene integration
- ผู้วิจัย: Bundit Wannasuphaphol^{1,2}, Wantana Khongnium¹, Worakawee Chumworathayee¹, Malee Warnnisson⁴, Ruchaneekorn Kalpravidh², Kovit Pattanapunyasat⁴, Duangporn Jamsai^{1,5}, Panos A. Ioannou⁵, Frans A. Kuypers⁶, Yvonne A. Van Gessel⁷, Pranee Winichagoon¹, Suthat Fucharoen¹.
- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
²Biochemistry Department, ³Development of Pathology and ⁴Development of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital Mahidol University, Interdisciplinary Graduate Program in Genetic Engineering, Kasetsart University,
⁵CAGT Research Group, The Murdoch Children's Research Institute, Royal Children's Hospital, Victoria, Australia
⁶Children's Hospital Oakland Research Institute CA USA.
⁷United States Army Medical Component. Armed Forces Research Institute of Medical Sciences Thailand
13. การประชุม: 46th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. San Diego USA, December 4-7, 2004.
- ชื่อเรื่อง: Disease modifier genes in thalassemia.
- ผู้วิจัย: Suthat Fucharoen¹, Pranee Winichagoon¹, Orapan Sripichai¹, Chutima Kumkhaek¹, Thongperm Munkongdee¹, Kanjana Vichittumaros¹, Pornpan Sirankapracha¹, Johanna Whitacre², Ken Abel, Andreas Braun²
- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
²SEQUENOM, Inc., San Diego, USA.
14. การประชุม: 46th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. San Diego USA, December 4-7, 2004.

- ชื่อเรื่อง: Genome-wide SNP association study for genetic modifiers of β^0 -thalassemia/Hb E.
 ชื่อนักวิจัย: Kenneth Abel¹, Johanna Whitacre¹, Qianli Ma¹, Vach Angkachatchai¹,
 Orapan Sripichai², Pranee Fucharoen², Lindsay Farrer³, Suthat Fucharoen²,
 Andreas Braun¹
 สังกัด: ¹SEQUENOM, Inc., San Diego, USA.
²Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research
 and Development, Mahidol University, Thailand
³Department of Medicine and Genetics and Genomics, School of Medicine,
 Boston University, Boston, MA,
15. การประชุม: Fourth World Conference of the International Coenzyme Q₁₀ Association, January
 26, 2005; The Beverly Hilton.
 ชื่อเรื่อง: Oxidative stress and the antioxidant activity of coenzyme Q₁₀ in β -thalassemia/Hb
 E patients.
 ชื่อนักวิจัย: Ruchaneekorn W. Kalpravidh¹, Angkana Wichit¹, Siritanaratkul N², Fucharoen S³
 สังกัด: ¹Department of Biochemistry, Mahidol University.
²Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital.
³Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research
 and Development, Mahidol University, Thailand
16. การประชุม: Eighth Cooley's anemia Symposium, March 17-19, 2005; USA.
 ชื่อเรื่อง: Genetic analysis of candidate modifier polymorphisms in beta-thalassemia/Hb E
 patients.
 ชื่อนักวิจัย: Orapan Sripichai¹, Johanna Whitacre², Thongperm Munkongdee¹, Chutima
 Khumkhaek¹, Ken Abel², Andreas Braun², Winichagoon P², Fucharoen S¹
 สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research
 and Development, Mahidol University, Thailand.
²SEQUENOM, Inc., San Diego, CA, USA.
17. การประชุม: Eighth Cooley's anemia Symposium, March 17-19, 2005; USA.
 ชื่อเรื่อง: Rescued mice with Hb E transgene developed pathologic changes similar to
 human β -thalassemia disease.
 ชื่อนักวิจัย: Bundit Wannasuphaphol¹, Kovit Pattanapunyasat², Panos A. Ioannou³,

Pranee Winichagoon-Fucharoen¹, Suthat Fucharoen¹

สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University

²Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University,

³CAGT Research Group, The Murdoch Childrens Research Institute, Victoria, Australia.

18. การประชุม: 15th International Conference on Oral Chelation in the Treatment of Thalassemia and other Diseases. April 22-26, 2005. Taiwan.

ชื่อเรื่อง: Iron-chelating and free-radical scavenging activities of curcumin and green tea catechins in iron-loaded conditions.

ชื่อนักวิจัย: Somdet Srichairatanakool¹, Sakaewan Ounjiaean¹, Chonthida Tephinlap¹, Wachiraporn Tipsuwan¹, Udompun Khansuwan¹, Chada Phisalpong², Suthat Fucharoen³.

สังกัด: ¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University,

²Government Pharmaceutical Organization, Bangkok,

³Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Nakhornpathom, Thailand

4.3 การนำเสนอผลงานในที่ประชุมภายในประเทศ

1. การประชุม: การประชุมสัมมนาวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติครั้งที่ 9 กรุงเทพมหานคร 18-19 มิถุนายน 2546

ชื่อเรื่อง: β - and α -thalassemia mutations in β -thalassemia/Hb E patients in Chiang Rai and Koraj

ชื่อนักวิจัย Orapan Sripichai^{1,2}, Thongperm Munkongdee², Kanjana Vichittumaros², Pranee Winichagoon², Saranya Suwansings³, Somchai Intarasiripong⁴, Nittaya Visanuyothin⁴, Suthat Fucharoen²,

สังกัด: ¹Department of Biochemistry, Faculty of Science and

²Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University,

³Chiangrai Prachanukraw Hospital and ⁴Maharaj Nakornrajchasma Hospital

2. การประชุม: การประชุมสัมมนาวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติครั้งที่ 9 กรุงเทพมหานคร
18-19 มิถุนายน 2546
ชื่อเรื่อง: Nonheme iron, platelet factor 3 like activity, and red blood cell vesicles in
 β -thalassemia/Hb E patients treated with curcumin
ชื่อนักวิจัย Ruchaneekorn W. Kalpravidh, Orn-uma Srojijit, Noppadol Siritanaratkul,
Nisarat Opartkiattikul, Kovit Pattanapanyasat, Chada Phisalaphong, Suthat
Fucharoen.
สังกัด: Department of Biochemistry, Department of Medicine, Department of
Clinical pathology, Office for research and Development, Faculty of
Medicine Siriraj Hospital, The Government Pharmaceutical Organization,
Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for
Research and Development, Mahidol University, Thailand
3. การประชุม: การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 29
มหาวิทยาลัยขอนแก่น 20-22 ตุลาคม 2546
ชื่อเรื่อง: Production of anti-hemoglobin Bart's antibody for thalassemia diagnosis from
chicken egg.
ชื่อนักวิจัย Jintaridith P, Kalpravidh RW, Srisomsap C, Fucharoen S, Svasti J, Kasinrerw W.
สังกัด: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol
University, Laboratory of Biochemistry, Chulabhorn Research Institute,
Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research
and Development, Mahidol University.
4. การประชุม: 10th ASEAN Conference in Medical Laboratory Technology. Chiang Mai
April 26-30, 2004
ชื่อเรื่อง: Prevention and control of thalassemia in the post-genomic era.
ชื่อนักวิจัย Suthat Fucharoen, Pranee Fucharoen
สังกัด: Thalassemia Research Centre, Institute of Science and Technology for Research
And Development, Mahidol University
5. การประชุม: 10th ASEAN Conference in Medical Laboratory Technology. Chiang Mai
April 26-30, 2004

- ชื่อเรื่อง: In vivo repair of incorrectly spliced β -globin mRNA restores hemoglobin synthesis in IVSII-654 β -thalassemic mouse.
- ชื่อนักวิจัย: Svasti S¹, Fucharoen S¹, Kole R²
- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
²Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina, Chaple Hill, NC, USA
6. การประชุม: 10th ASEAN Conference in Medical Laboratory Technology. Chiang Mai April 26-30, 2004
- ชื่อเรื่อง: Non-radioactive southern blot hybridization for detection of southeast Asian (SEA) HPFH in Thai families
- ชื่อนักวิจัย: Changsri Kh^{1,2}, Winichagoon P², Akkarapatumwong V¹, Fucharoen S²,
- สังกัด: ¹Institute of Molecular Biology and Genetics
²Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
7. การประชุม: การประชุมสัมมนาวิชาการชาลัสซีเมียแห่งชาติครั้งที่ 10 กรุงเทพมหานคร 29-30 กรกฎาคม 2547
- ชื่อเรื่อง: In vivo repair of incorrectly spliced β -globin mRNA restores hemoglobin synthesis in IVSII-654 β -thalassemic mouse.
- ชื่อนักวิจัย: Svasti S¹, Fucharoen S¹, Kole R²
- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
²Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina, Chaple Hill, NC, USA
8. การประชุม: การประชุมสัมมนาวิชาการชาลัสซีเมียแห่งชาติครั้งที่ 10 กรุงเทพมหานคร 29-30 กรกฎาคม 2547
- ชื่อเรื่อง: Non-radioactive southern blot hybridization for detection of southeast Asian (SEA) HPFH in Thai families
- ชื่อนักวิจัย: Changsri Kh^{1,2}, Winichagoon P², Akkarapatumwong V¹, Fucharoen S²,

- สังกัด: ¹Institute of Molecular Biology and Genetics
²Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
9. การประชุม: The Fifth Princess Chulabhorn International Science Congress. Evolving Genetics and Its Global Impact. กรุงเทพมหานคร, 16-20 สิงหาคม 2547
- ชื่อเรื่อง: Pathophysiologic changes in a murine model of beta-thalassemia: human hemoglobin E transgene integration
- ผู้วิจัย: Bundit Wannasuphaphol^{1,2}, Wantana Khongnium¹, Worakawee Chumworathayee¹, Malee Warnnisson⁴, Ruchaneekorn Kalpravidh², Kovit Pattanapunyasat⁴, Duangporn Jamsai^{1,5}, Panos A. Ioannou⁵, Frans A. Kuypers⁶, Yvonne A. Van Gessel⁷, Pranee Winichagoon¹, Suthat Fucharoen¹.
- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
²Biochemistry Department, ³Development of Pathology and ⁴Development of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital Mahidol University, Interdisciplinary Graduate Program in Genetic Engineering, Kasetsart University, Thailand.
10. การประชุม: The Fifth Princess Chulabhorn International Science Congress. Evolving Genetics and Its Global Impact. กรุงเทพมหานคร, 16-20 สิงหาคม 2547
- ชื่อเรื่อง: Frequent co-occurrence of polymorphisms in UDP-glucuronosyl-transferase 1A1 and 1A6 in Thai β -thalassemia/HbE and African-American sickle cell anemia patients
- ผู้วิจัย: Jeeranut Sawattep^{1,2}, Thad Howard⁴, Pranee Fucharoen³, Suthat Fucharoen³, Udom Chantharaksri¹, Russell E Ware⁴
- สังกัด: ¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, ³Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand, ²Department of Pharmacology, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand.
⁴Department of Pediatrics/Hematology/Oncology, Duke University, USA

11. การประชุม: 17th FAOBMB Symposium/2nd IUBMB Special Meeting /7th A-IMBN Conference Genomics and Health in the 21st Century. กรุงเทพมหานคร, 22-26 พฤศจิกายน 2547
- ชื่อเรื่อง: Determination for different severity of thalassemia: genotype phenotype interaction.
- ผู้วิจัย: Suthat Fucharoen¹, Pranee Winichagoon¹, Orapan Sripichai¹, Chutima Kumkhaek¹, Thongperm Munkongdee¹, Kanjana Vichittumaros¹, Pornpan Sirankapracha¹, Johanna Whitacre², Ken Abel², Andreas Braun²
- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Nakornpathom,
²SEQUENOM, Inc., San Diego, CA
12. การประชุม: 17th FAOBMB Symposium/2nd IUBMB Special Meeting /7th A-IMBN Conference Genomics and Health in the 21st Century กรุงเทพมหานคร, 22-26 พฤศจิกายน 2547
- ชื่อเรื่อง: Chicken egg yolk anti-Hb Bart's antibodies for thalassemia.
- ผู้วิจัย: Pornrutsami Jintaridith¹, Ruchaneeekorn W. Kalpravidh¹, Chantragan Srisomsap², Suthat Fucharoen³, M.R. Jisunuson Svasti^{2,4}, Watchara Kasinrer⁵
- สังกัด: ¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine Siriraj Hospital,
²Laboratory of Biochemistry, Chulabhorn Research Institute,
³Thalassemia Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University
⁴Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University,
⁵Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
13. การประชุม: การประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ครั้งที่ 29 วันที่ 27-29 เมษายน 2548
โรงแรมไคมอนด์ พลาซ่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี
- ชื่อเรื่อง: Triplicated A-globin genes $\alpha\alpha\alpha$ in clinical severity of $-A$ thalassemia/Hb E disease.
- ผู้วิจัย: Kumkhaek C¹, Sripichai O¹, Munkongdee T¹, Winichagoon P¹, Fucharoen S¹

- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand
14. การประชุม: การประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ครั้งที่ 29 วันที่ 27-29 เมษายน 2548
โรงแรมไคมอนด์ พลาซ่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี
- ชื่อเรื่อง: Genetic analysis of candidate modifier polymorphisms in beta-thalassemia/Hb E patients.
- ชื่อนักวิจัย: Orapan Sripichai¹, Johanna Whitacre², Thongperm Munkongdee¹, Chutima Khumkhaek¹, Ken Abel², Andreas Braun², Pranee Winichagoon¹, Suthat Fucharoen¹
- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand,
²SEQUENOM, Inc., San Diego, CA, USA
15. การประชุม: การประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ครั้งที่ 29 วันที่ 27-29 เมษายน 2548
โรงแรมไคมอนด์ พลาซ่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี
- ชื่อเรื่อง: In vivo repair of incorrectly spliced β -globin mRNA in β -thalassemic mouse by antisense oligonucleotide.
- ชื่อนักวิจัย: Saovaros Svasti^{1,2}, Pranee Winichagoon¹, Suthat Fucharoen¹ and Ryszard Kole²
- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand and
²Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA
16. การประชุม: การประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ครั้งที่ 29 วันที่ 27-29 เมษายน 2548
โรงแรมไคมอนด์ พลาซ่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี
- ชื่อเรื่อง: Pathophysiologic changes in a murine model of beta-thalassemia human hemoglobin E transgene integration.
- ชื่อนักวิจัย: Bundit Wannasuphaphol^{1,2}, Wantana Khongnium¹, Malee Warnnissorn³, Ruchaneekorn Kalpravidh², Kovit Pattanapunya⁴, Duangporn Jamsai^{1,5}, Panos A. Ioannou⁵, Frans A. Kuypers⁶, Yvonne A. Van Gessel⁷, Pranee Winichagoon¹, Suthat Fucharoen¹

- สังกัด: ¹Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand,
²Biochemistry Department, Mahidol University, Thailand,
³Department of Pathology, Mahidol University, Thailand,
⁴Department of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand
⁵CAGT Research Group, the Murdoch Children's Research Institute, Royal Children's Hospital, Victoria, Australia
⁶Children's Hospital Oakland Research Institute, CA, USA, ⁷United States Army Medical Component, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences.
17. การประชุม: การประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ครั้งที่ 29 วันที่ 27-29 เมษายน 2548
 โรงแรมไคมอนด์ พลาซ่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี
- ชื่อเรื่อง: Study of cell viability in thalassemic erythroid progenitor cells.
- ชื่อนักวิจัย: Dalina Tanyong¹, Pranee Fucharoen³, Thidarat Netikul¹, Thanmas Raungwittayawut¹, Noppadol Siritanaratkul², Suthat Fucharoen³
- สังกัด: ¹Department of Clinical Microscopy, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Thailand
²Department of medicine, Faculty of Medicine Siriraj hospital, Thailand,
³Thalassemia research center, Institute of Science and Technology for research and development, Mahidol University, Salaya campus, Thailand

นอกจากนั้นได้จัดประชุมเมธีวิจัยอาวุโส ทั้งหมด 3 ครั้ง ดังนี้

- ครั้งที่ 1 ชื่อเรื่องการประชุม “Protein Structure and Molecular Enzymology and Thalassemia Research”
 จัดร่วมกับ ศาสตราจารย์ ดร. มรว. ชัยอนุสรณ์ สวัสดิวัฒน์
 ระหว่างวันที่ 22-23 สิงหาคม 2546 ที่โรงแรมรอยัลริเวอร์ กรุงเทพมหานคร
- ครั้งที่ 2 ชื่อเรื่องการประชุม “Integration of Biological Science, Protein Chemistry and Medicine”
 จัดร่วมกับ ศาสตราจารย์ ดร. มรว. ชัยอนุสรณ์ สวัสดิวัฒน์, ดร. ศิริวัฒน์ วงศ์ศิริ
 ระหว่างวันที่ 14-15 พฤศจิกายน 2547 ที่ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- ครั้งที่ 3 ชื่อเรื่องการประชุม “Thalassemia: from molecular biology to clinical medicine”
 ระหว่างวันที่ 11 สิงหาคม 2548 ที่ โรงแรมรอยัลซิตี้ กรุงเทพมหานคร

4.4 การผลิตนักศึกษาระดับปริญญาโทและปริญญาเอก

นักศึกษาปริญญาเอกที่จบการศึกษาหรือกำลังศึกษาอยู่

ชื่อ-นามสกุล	หลักสูตร	แหล่งทุน	ปีการศึกษา
ดร. ดวงพร แจ่มใส	หลักสูตรอนุชีววิทยาและ พันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 1	2541-2545
ดร. ทิพย์รัตน์ สุวรรณมณี	หลักสูตรอนุชีววิทยาและ พันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 1	2541-2545
ดร. กิตติพงษ์ ไพบูลย์สุขวงศ์	หลักสูตรอนุชีววิทยาและ พันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	Ph.D/M.D. Program รุ่นที่ 9	2542-2546
ดร. ญัฐยา แซ่อึ้ง	หลักสูตรเทคนิคการแพทย์ (นานาชาติ) มหาวิทยาลัยมหิดล	ทุนโครงการพัฒนาอาจารย์ สาขาขาดแคลน (ดร.ปรางค์ ฟูเจริญ)	2543-2547
ร.อ.หญิง จีรานุช สวัสดิ์เทพ	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์	- (ดร.อุดม จันทารักษ์ศรี)	2543-2547
น.ส. ไชยมุข ช่างศรี	หลักสูตรอนุชีววิทยาและ พันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	ทุนโครงการพัฒนาอาจารย์ สาขาขาดแคลน	2543-2547
น.ส. พรวิทย์ จินตฤทธิ์	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราช- พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล	-	2543-2547
น.ส. อรพรรณ ศรีพิชัย	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 4	2544-2548
นายบัณฑิต วรรณสุกผล	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราช- พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล	Ph.D/M.D.รุ่น 11	2545-2549
น.ส. วรพรรณ ชุมเปี้ย	ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล	-	2545-2549

น.ส. ดวงมณี แสนมัน	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล	Split mode Ph.D. Program 4/2004 (ดร.ปราณี ฟูเจริญ)	2545-2549
น.ส. วรธนันท์ มกรสาร	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล	Ph.D/M.D. รุ่น 12	2546-2549
น.ส. ปรีชญ์ชัย เหล่าไทย	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	Ph.D/M.D. รุ่นที่ 12	2546-2549
นายณที เจียรวิริยะไพศาล	หลักสูตรอนุชีววิทยาและ พันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 6	2546-2550
น.ส. มยุรา มีแสง	หลักสูตรเทคนิคการแพทย์ (นานาชาติ) มหาวิทยาลัยมหิดล	โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 6	2546-2550
น.ส.ศิริพร จิตแก้ว	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ศิริราช พยาบาล	โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 7 (พิเศษ)	2547-2551
น.ส. ขนิษฐา ศรีนวล	หลักสูตรเทคนิคการแพทย์ (นานาชาติ) มหาวิทยาลัยมหิดล	โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 6 (รศ.ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์)	2547-2551
นายเอกฤทธิ์ นวลศรี	ภาควิชาอิมมูโนโลยี คณะแพทยศาสตร์ศิริราช พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล	โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 6 (ศ.โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์)	2547-2551

นักศึกษาปริญญาโทที่จบการศึกษาหรือกำลังศึกษาอยู่

ชื่อ-นามสกุล	หลักสูตร	แหล่งทุน	ปีการศึกษา
น.ส. ประไพพิศ อินเสน	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราช- พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล	-	2543-2546
นายวิฑูรย์ อู่ยหา	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราช- พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล	-	2541-2545
นายเอกฤทธิ์ นวลศรี	ภาควิชาอิมมูโนโลยี คณะแพทยศาสตร์ศิริราช- พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล	-	2543-2546
น.ส. วชิราภรณ์ ทิพย์สุวรรณ	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	-	2544-2547
นายวรวุฒิ สมศักดิ์	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	-	2544-2547
น.ส. ชลธิดา เทพหินลับ	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	-	2544-2547
น.ส. อรพรรณ สาระกุล	สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล	ทุนโครงการพัฒนาอาจารย์ สาขาขาดแคลน	2544-2547
นายสุรเชษฐ์ พรรคเสื่อ	สาขาพันธุวิศวกรรม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	-	2545-2548
นายวรกวี ชุมวรรฐายี	สาขาพันธุวิศวกรรม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	-	2545-2548

5. ผลลัพธ์และการนำผลงานไปใช้ประโยชน์

5.1 การสร้างเครือข่ายวิจัยภายในประเทศ ปัจจุบันกลุ่มวิจัยธาลัสซีเมียมีเครือข่ายความร่วมมือทางวิชาการ รวม 5 คณะ/สถาบันฯ ภายในมหาวิทยาลัยมหิดล และอีก 2 คณะจาก 2 มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ยังมีการดำเนินงานร่วมกับเมธีวิจัยอาวุโสอีก 2 ท่านและอาจารย์ท่านอื่น ดังนี้

ก. ศาสตราจารย์ ดร.มรว. ชัยฉุณสร สวัสดิวัฒน์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในส่วนที่เกี่ยวกับการค้นหาโครงสร้างของฮีโมโกลบินผิดปกติ ตลอดจนโครงสร้างและหน้าที่ของ hybrid molecule ระหว่าง mouse α globin กับ human β^E -globin

ข. ศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ สุขสำราญ มหาวิทยาลัยรามคำแหง เกี่ยวกับการศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติที่อาจมีผลกระตุ้นให้มีการสร้าง Hb F เพิ่มสูงขึ้น และการค้นหาสารสกัดจากธรรมชาติที่อาจมีคุณสมบัติเป็น iron chelator และ anti-apoptosis

ค. มิงงานวิจัยทางด้าน pharmacogenomics ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ร่วมกับ ดร. อุดม จันทราภิรักษ์ศรี

ง. ร่วมกับ ศ.วัชร กสินฤกษ์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการใช้ IgY technology ผลิตโพลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ Hb Bart's เพื่อนำมาตรวจวินิจฉัย α -thalassemia

5.2 ความร่วมมือในการทำวิจัยกับนักวิจัยจากต่างประเทศ อาทิ

1. ประเทศญี่ปุ่น

- Dr. Koichiro Muta
Department of Medicine and Bioregulatory Science
Graduate School of Medical Science
Kyushu University
- Professor Kazunari Taira
Department of Chemistry and Biotechnology
School of Engineering
The University of Tokyo

2. ประเทศออสเตรเลีย

- Dr. Panos Ioannou
Murdoch Institute & Royal Children Hospital
University of Melbourne

3. ประเทศสหรัฐอเมริกา

- Dr. Andreas Braun / Professor Charles Cantor
Sequenom Inc.
San Diego
- Professor Ryszard Kole
Lineberger Comprehensive Cancer Center
University of North Carolina

- Professor Lindsay Farrer
Department of Medicine and Genetics and Genomics
School of Medicine
Boston University
- Dr. Russell E. Ware
Division of Hematology, St.Jude Children's Research Hospital,
Memphis, TN

4. ประเทศสวีเดน

- Dr. Bengt Fadeel
Institute of Environmental Medicine
Karolinska Institute

5. ประเทศเยอรมัน

- Professor Helmut Bartsch
German Cancer Research Center (DKFZ)
Heidelberg

5.3 การจัดอบรมและการประชุมวิชาการธาลัสซีเมีย

1. ได้รับเชิญให้ร่วมเป็นกรรมการในการจัดการประชุมวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติ ครั้งที่ 8 (8-9 สิงหาคม 2545) ครั้งที่ 9 (18-19 มิถุนายน 2546) และครั้งที่ 10 (29-30 กรกฎาคม 2547)
2. จัดอบรมเรื่อง Advanced Knowledge in Thalassemia ณ โรงแรมเรดิสัน กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 20-21 มิถุนายน 2546
3. ได้ร่วมอยู่ในกองบรรณาธิการจัดพิมพ์ Proceeding ของการประชุม 4th Colloquium of Asian Network for Clinical Laboratory Standardization and Harmonization รวมทั้งเป็นประธานในการจัดประชุม 5th Colloquium of Asian Network for Clinical Laboratory Standardization and Harmonization ณ โรงแรม Royal River ระหว่างวันที่ 17-19 ธันวาคม 2546

นอกจากนี้ยังมีการนำเอาความรู้ที่ได้จากการทำวิจัยไปทดสอบใช้หรือนำไปเป็นพื้นฐานในการตรวจรักษา ควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย ร่วมกับกระทรวงสาธารณสุขและมูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย

6. นักวิจัยในโครงการที่ได้รับรางวัล/ทุนวิจัย ระหว่างรับทุนสำนักงานสนับสนุนการวิจัย

ก. รางวัลและทุนที่หัวหน้าโครงการได้รับในระหว่างรับทุน สำนักงานสนับสนุนการวิจัย

1. รางวัลนักวิทยาศาสตร์ดีเด่น ประจำปี พ.ศ. 2545 จากมูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ในพระบรมราชูปถัมภ์ ร่วมกับ ศาสตราจารย์ ดร.มรว. ชัยณูสรร สวัสดิวัฒน์ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. ศิษย์เก่าดีเด่น สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี พ.ศ. 2545

3. ทุนวิจัยเรื่อง “Genomewide search for disease modifier genes จาก NIH/USA (2002-2005)

ข. รางวัลและทุนที่ผู้ร่วมโครงการได้รับในระหว่างรับทุน สำนักงานสนับสนุนการวิจัย

6.1 ชื่อนักวิจัย: ศาสตราจารย์ ดร. โกวิท พัฒนาปัญญาสัจย์

6.1.1 โครงการวิจัยเรื่อง การเปลี่ยนแปลงของ Activation Markers และ Chemokine Receptors บนผิวของ Lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นเมื่อมีการติดเชื้อเอชไอวี-1 ในหลอดทดลอง ได้รับทุนจาก สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ตั้งแต่ปี พ.ศ.2545 เป็นจำนวนเงิน 445,000

6.1.2 โครงการวิจัยเรื่อง การควบคุมคุณภาพและการประกันคุณภาพการตรวจวัด CD4 ที่ ลิ้มโฟไซต์ ด้วยวิธีโฟลไซโตมิเตอร์ในประเทศไทย ได้รับทุนจาก สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 เป็นจำนวนเงิน 240,000

6.1.3 โครงการวิจัยเรื่อง การประเมินคุณภาพของโมโนโคลนัล แอนติบอดี ที่เจือจางเพื่อใช้ในการตรวจวัด CD4 ที่ ลิ้มโฟไซต์ ด้วยวิธีโฟลไซโตมิเตอร์ ได้รับทุนจาก สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ตั้งแต่ปี พ.ศ 2545 เป็นจำนวนเงิน 425,000 บาท

6.1.4 โครงการวิจัยเรื่อง การประเมินน้ำยาป้องกันความเสื่อมของตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคติดเชื้อเอชไอวี 1-เพื่อการวัดวิเคราะห์ CD4 ที่ลิ้มโฟไซต์ ในประเทศไทย ได้รับทุนจาก สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กระทรวงสาธารณสุข ตั้งแต่ปี พ.ศ 2545 เป็นจำนวนเงิน 193,000 บาท

6.1.5 โครงการวิจัยเรื่อง การประเมินคุณภาพการใช้โมโนโคลนัล แอนติบอดีราคาถูกเพื่อใช้ในการตรวจวัด CD4+ ที่ ลิ้มโฟไซต์ ในผู้ป่วยโรคติดเชื้อเอชไอวี-1 ใน

ประเทศไทย ได้รับทุนจาก สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กระทรวงสาธารณสุข ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 เป็นจำนวนเงิน 275,000 บาท

- 6.1.6 โครงการวิจัยเรื่อง CD8 T-lymphocyte function in HIV infected patients following in vitro activation: A selective or global defect in cytokine production and memory T cell distribution ได้รับทุนจากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 เป็นจำนวนเงิน 498,000
- 6.1.7 โครงการวิจัยเรื่อง การทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสารสกัดสมุนไพร 4 ชนิด ได้รับทุนจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี พ.ศ.2547 เป็นจำนวนเงิน 880,000 บาท
- 6.1.8 ได้รับทุนสนับสนุนจาก Becton Dickinson Immunocytometry Systems ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 ถึง ปัจจุบัน โดยในปี พ.ศ. 2541 เป็นจำนวนเงิน 30,000 เหรียญสหรัฐ ปี พ.ศ. 2543 เป็นจำนวนเงิน 30,000 เหรียญสหรัฐ ปี พ.ศ.2544 เป็นจำนวนเงิน 40,000 เหรียญสหรัฐ ปี พ.ศ. 2545 เป็นจำนวนเงิน 400,000 บาท และปี พ.ศ 2547 เป็น จำนวนเงิน 800,000 บาท
- 6.1.9 โครงการวิจัยเรื่อง Evaluation of CD4+ T-cell Enumeration Technologies ได้รับทุนจาก World Health Organization (WHO) ปี พ.ศ 2547 .เป็นจำนวนเงิน-.20,000 เหรียญสหรัฐ
- 6.1.10 โครงการวิจัยเรื่อง Evaluation of Flow Cytometer for determination of Absolute CD4+ T-Lymphocyte Counts in HIV-Infected Thai Patients, Global AIDS Program ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 เป็นจำนวนเงิน 524,510 บาท
- 6.1.11 โครงการวิจัยเรื่อง การประเมินคุณภาพการใช้โฟลไซโตมิเตอร์ในการวิเคราะห์หา CD4 ทีลิมโฟไซต์ ในผู้ป่วยโรคติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์ของประเทศไทย ได้รับทุนจาก US-CDC/GAP (Global AIDS Program) ตั้งแต่ปี พ.ศ-2545 .ปัจจุบัน เป็นจำนวนเงิน-.2,956,752 บาท
- 6.2 ชื่อนักวิจัย: ดร.ปราณี พูเจริญ
 - 6.2.1 การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และการควบคุมการสร้างเม็ดเลือดแดง จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2545-2548

- 6.2.2 ทุนวิจัยเรื่อง การศึกษาหนูธาลัสซีเมีย จากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ระหว่างปี พ.ศ. 2547-2549
- 6.3 ชื่อนักวิจัย: ดร. ม.ล. เสาวรส สวัสดิ์วัฒน์
- 6.3.1 ทุน Post-doctoral Research Follow จาก Cooley's Anemia Foundation
ปี พ.ศ. 2002 ทำวิจัยเรื่อง antisense therapy กับ Professor Ryszard Kole,
University of North Carolina
- 6.3.2 ทุนวิจัย “การซ่อมการตัดต่อ อาร์เอ็นเอ ผิดปกติในหนูธาลัสซีเมีย”
จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ระหว่างปี พ.ศ. 2547-2549
- 6.4 ชื่อนักวิจัย: ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล
- 6.4.1 ศึกษาคุณสมบัติด้านออกซิเดชั่นและจับธาตุเหล็กของสาร catechin ในใบชา
จากมูลนิธิโครงการหลวง ประจำปี พ.ศ. 2546
- 6.4.2 ศึกษาการลดภาวะธาตุเหล็กและอนุมูลอิสระมากเกินไปโดยสาร epicatechin
3-gallate (ECG) และ epigallocatechin 3-gallate (EGCG) ในใบชา
จากมูลนิธิ โครงการหลวง ประจำปี พ.ศ. 2547-2548
- 6.5 ชื่อนักวิจัย: ดร. คลินา ต้นหยง
- 6.5.1 ศึกษาปัญหาสัญญาณภายในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย
จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 6.6 ชื่อนักวิจัย: ดร. ดวงพร แจ่มใส
- 6.6.1 รางวัลวิทยานิพนธ์ดีเยี่ยม ประจำปี พ.ศ. 2547 “การสร้างหนูฮีโมโกลบินอี
และเบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย” จากสภากิจแห่งชาติ
- 6.6.2 รางวัลชมเชย ระดับปริญญาเอก เรื่อง “การสร้างหนูฮีโมโกลบินอี
และเบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย” ประจำปี พ.ศ. 2547 จากมหาวิทยาลัยมหิดล
- 6.7 ชื่อนักวิจัย: นางสาวอรรพรรณ คันธมาพันธ์
- 6.6.1 รางวัลวิทยานิพนธ์ดีเด่น ระดับปริญญาโท “การคัดกรองสาร flavonoid ที่มี
คุณสมบัติยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ของมนุษย์ชนิด KB” สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ ประจำปี พ.ศ. 2546
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่