

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5780103

ชื่อโครงการ: บทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอในการควบคุมภาวะ oxidative stress ในกลุ่มโรค hemolytic anemia

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน ดร. ขนิษฐา ศรีนวล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อีเมล: kanitta.s@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

Hemolytic anemia (HA) เป็นภาวะที่เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงหรือการกำจัดเม็ดเลือดแดงจากกระแสเลือดก่อนอายุขัย HA ที่พบบ่อยในโลกได้แก่ hereditary spherocytosis (HS), glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, sickle cell anemia และโรคธาลัสซีเมียโดยเฉพาะโรคธาลัสซีเมียนั้นพบได้มากในประเทศไทย สาเหตุหนึ่งของการภาวะซีดในกลุ่มโรค hemolytic anemia คือเม็ดเลือดแดงถูกทำลายด้วยภาวะภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล ส่วนในโรคธาลัสซีเมียนั้นความไม่สมดุลกันระหว่างการสร้างสายโกลบินทำให้เกิดสายบีต่าจับกันเองในโรคอัลฟาธาลัสซีเมียหรือสายอัลฟาที่ไม่มีคู่ ส่งผลทำให้โมเลกุลของฮีโมโกลบินสายที่เหลืตกตะกอนที่ผนังของเม็ดเลือดแดงทั้งตัวอ่อนและตัวแก่ ทำให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลายจากภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลที่เกิดจากโมเลกุลของฮีม นอกจากนี้พบว่าระดับของสารต้านอนุมูลอิสระในผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีระดับที่ลดลงเช่นกัน อย่างไรก็ตามกลไกในระดับโมเลกุลของการควบคุมภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียมีการแสดงออกของ ไมโครอาร์เอ็นเอ-144 เพิ่มขึ้นซึ่งมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกที่ลดลงของยีนเป้าหมายคือ nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) และระดับของกลูตาไธโอน เมื่อทำการศึกษาลของการลดหรือเพิ่มไมโครอาร์เอ็นเอ-144 โดยการเติม miR-inhibitor และ mimic ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน พบว่าเมื่อลดการแสดงของไมโครอาร์เอ็นเอ-144 นั้นจะส่งผลให้การแสดงออกของยีน NRF2 และระดับของกลูตาไธโอนเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มการแสดงของไมโครอาร์เอ็นเอ-144 จะส่งผลให้ลดการแสดงออกของยีน NRF2 และระดับของกลูตาไธโอน นอกจากนี้พบว่า การเพิ่มขึ้นของไมโครอาร์เอ็นเอ-144 จะทำให้เซลล์ไวต่อภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลที่ทำถูกกระตุ้นด้วยความเข้มข้น H_2O_2 ที่เหมาะสมและเซลล์เม็ดเลือดแดงจะทนต่อภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลเมื่อเติม inhibitor ของไมโครอาร์เอ็นเอ-144 ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าถ้ามีความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากไมโครอาร์เอ็นเอ-144 อาจส่งผลทำให้ความสามารถในการจัดการของเซลล์ต่อภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลจะลดลง ส่งผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงได้ง่าย

คำหลัก : เม็ดเลือดแดงแตกง่าย, โรคธาลัสซีเมีย, ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล, ไมโครอาร์เอ็นเอ-144, ยีน NRF-2

Abstract

Project Code : TRG5780103

Project Title : Role of miRNA regulates oxidative stress in hemolytic anemia

Investigator : Kanitta Srinoun

E-mail Address : Kanitta.s@psu.ac.th

Project Period : 2 years

Abstract:

Hemolytic anemia (HA) results from red blood cells (RBCs) destruction or removal of RBCs from the circulation before a normal life span. The most common HA affected worldwide are hereditary spherocytosis, G-6-PD deficiency, sickle cell anemia and thalassemia. Especially, thalassemia had high prevalence in Thailand. Oxidative damage to their erythroid cells seems to be a major etiology of hemolytic anemia. In thalassemia, imbalanced globin chain synthesis results in excessive β_4 in α -thalassemia or unbound α -globin chains in β -thalassemia causing erythroid destruction by oxidative stress. Oxidative stress status of thalassemia is potentiated by the heme. Conversely, the reduction of antioxidant level of α -thalassemia and β -thalassemia was observed. However, the molecular basic mechanism for this phenotype remains unknown. Our study showed miR-144 expression is up-regulated in thalassemia and correlated with reduced nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*NRF2*) as target mRNA and decreased glutathione levels. To study effect of miR-144 expression, the gain-loss of miR-144 expression were performed by miR- inhibitor and mimic transfection in erythroblastic cell line. This study reveals that miR-144 expression was down-regulated, and *NRF2* expression and glutathione levels were increase in comparison with untreated condition after miR- inhibitor transfection. While increased of miR-144 expression contributed to the decreased *NRF2* expression and glutathione level compared to untreated condition after miR- mimic transfection. Moreover, miR-144 overexpression leads to significantly increased sensitivity to oxidative stress at indicated concentrations of H_2O_2 and rescued by miR-144 inhibitor. Therefore, our findings suggested that dysregulation of miR-144 may play a role in their reduced ability to deal with oxidative stress and susceptibility to RBC hemolysis.

Keywords : hemolytic anemia, thalassemia, oxidative stress, miR-144, NRF-2

เนื้อหางานวิจัยประกอบด้วย

1. บทคัดย่อภาษาไทย และภาษาอังกฤษ (ตามเอกสารแนบหมายเลข 2/1 และ 2/2)
2. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary) ประกอบด้วย:

- ที่มาและความสำคัญของปัญหา

Hemolytic anemia เป็นภาวะที่เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงหรือการกำจัดเม็ดเลือดแดงจากกระแสเลือดก่อนอายุขัย ซึ่งโดยทั่วไปเม็ดเลือดแดงจะมีอายุราว 120 วัน [1, 2] Hemolytic anemia ที่พบบ่อยในโลกได้แก่ hereditary spherocytosis (HS), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency, sickle cell anemia และ thalassemia [3-9] โดยเฉพาะโรค thalassemia นั้นพบได้มากในประเทศไทย อาการทางคลินิกแบ่งออกได้เป็นการซีดแบบฉับพลันและเรื้อรังและพบเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนมากขึ้น มีอาการดีซ่าน, นิ่ว และม้ามโต สาเหตุหนึ่งของการภาวะซีดในกลุ่มโรค hemolytic anemia คือเม็ดเลือดแดงถูกทำลายด้วยภาวะภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) ซึ่งการเกิด oxidative stress จะเกิดขึ้นทั้งในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนส่งผลทำให้เกิดการสร้างเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติ (ineffective erythropoiesis) หรือในเม็ดเลือดแดงทำให้เกิดการแตกและอายุขัยสั้น ในภาวะปกติการเกิด oxidation จะถูกควบคุมให้อยู่ในภาวะที่สมดุลกันระหว่างสิ่งที่ทำให้เกิด oxidation (pro-oxidants) และสิ่งที่ต่อต้านการเกิด oxidative (anti-oxidants) แต่พบว่าในกลุ่มโรค hemolytic anemia มีการสร้าง pro-oxidants หรือ reactive oxygen species และผลผลิตที่ทำให้เกิด oxidative เช่น จากโปรตีน, ไขมัน, และสารพันธุกรรมมีการสร้างที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มโรค hemolytic anemia [10] ซึ่งการควบคุมสภาวะของ oxidation ในระดับโมเลกุล นั้นจะถูกควบคุมด้วย transcription factor และ microRNAs [11]

microRNA (miRNAs, miR-) คือ non coding RNA สายสั้นประมาณ 21 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโดยการยับยั้งการแปลรหัสของ mRNA หรือการกระตุ้นให้ mRNA สลาย การควบคุมแบบ negative ของการแสดงออกของ mRNA นี้มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์, การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง, การตายของเซลล์และภาวะ oxidation ด้วย [11-13] โดยก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษา miRNA และกระบวนการ redox-sensitive ไว้ [11] miRNA ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการการส่งสัญญาณของ Nrf2/ARE ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญใน redox homeostasis นอกจากนี้ miRNA มีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการ redox ในไมโตรคอนเดรียซึ่งเป็นแหล่งสร้าง H_2O_2 ที่มากที่สุดอีกด้วย[14] มีการศึกษาบทบาทของ miRNA ต่อกระบวนการ oxidative stress ในเม็ดเลือดแดงในหนู miR-144/451 knockout พบว่าเม็ดเลือดแดงของหนูจะมี oxidative stress เพิ่มขึ้น โดยต่อมาพบว่า miR-451 จะทำหน้าที่ควบคุมยีนเป้าหมายคือ Ywhaz (the phospho-serine/threonine binding protein 14-3-3 ζ) ซึ่งการแสดงออกที่ลดลงของยีนนี้ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ transcription factor 3 (FoxO3) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ oxidative stress [15] ในโรค sickle cell anemia ซึ่งกลุ่มของ hemolytic anemia เช่นกัน พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ ROS [16] และการลดลงของระดับ antioxidant [17] จากการศึกษาพบว่า miR-144 จะทำหน้าที่ควบคุมภาวะ oxidative stress โดยการควบคุมผ่าน nuclear factor-erythroid 2-

related factor 2 (*NRF2*) [18] แสดงว่า miRNA มีบทบาทที่สำคัญในการควบคุม oxidative stress ในกลุ่มโรค hemolytic anemia อย่างไรก็ตามในโรค hemolytic anemia อื่นนั้น กระบวนการทำงานและป้องกันกันเกิด oxidative stress ของ miRNA ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษายหยาบและหน้าที่ของ miRNA ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมภาวะ oxidative stress ในกลุ่มโรคของ hemolytic anemia ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลุ่มโรค thalassemia ซึ่งเป็นโรคที่พบมากในประเทศไทย โดยได้ทำการศึกษากการแสดงออกของ miR-144 ในการควบคุมผ่านยีนเป้าหมาย *NRF2* ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย thalassemia และศึกษาหน้าที่และความสำคัญของ miRNA และยีนเป้าหมาย (gain and loss function) ซึ่งการศึกษารั้งนี้จะเป็นข้อมูลที่สำคัญของบทบาทของ miRNA ในการควบคุมป้องกันภาวะ oxidative stress ในกลุ่มโรค hemolytic anemia

- ทบทวนวรรณกรรม

โรค hemolytic anemia

Hemolytic anemia เป็นภาวะที่เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงหรือการกำจัดเม็ดเลือดแดงจากกระแสเลือดก่อนอายุขัย ซึ่งโดยทั่วไปเม็ดเลือดแดงจะมีอายุราว 120 วัน [1, 2] Hemolytic anemia ที่พบบ่อยในโลกได้แก่ hereditary spherocytosis (HS), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency, sickle cell anemia และ thalassemia [3-9] โดยเฉพาะโรค thalassemia นั้นพบได้มากในประเทศไทย โดยเฉพาะโรค thalassemia นั้นพบได้มากในประเทศไทย อาการทางคลินิกแบ่งออกได้เป็นการขีดแบบฉับพลันและเรื้อรังและพบเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนมากขึ้น มีอาการดีซ่าน, นั้ว และม้ามโต

โรคธาลัสซีเมีย (Thalassemia)

โรค thalassemia และ abnormal hemoglobin เป็นโรคที่มีถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุดในคนไทย โดยพบว่าประชากรไทยเป็นพาหะของธาลัสซีเมียชนิดใดชนิดหนึ่งเช่น อัลฟาธาลัสซีเมีย (α -thalassemia) หรือเบต้าธาลัสซีเมีย (β -thalassemia) หรือร่วมกับ abnormal hemoglobin เช่น Hb Constant Spring (HbCS) หรือ พาหะของ hemoglobin E (HbE) สูงถึงร้อยละ 30-40 ดังนั้นกลุ่มโรคดังกล่าวจึงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทยเป็นอย่างมาก[6] โรค thalassemia แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักๆคือ

โรค α -thalassemia เกิดจากความผิดปกติของยีน α ซึ่งส่วนใหญ่จากการขาดหายไปของยีนส่งผลให้มีการสร้างสาย α -globin ลดลงหรือสร้างไม่ได้เลย ในทารกการลดลงของสาย α -globin นำไปสู่การจับกันของสาย γ -globin เรียกว่า hemoglobin Bart's (Hb Bart's; γ_4) เช่นเดียวกับในผู้ใหญ่จะมีการจับกันเองของสาย β -globin เรียกว่า hemoglobin H (Hb H; β_4) ซึ่ง hemoglobin ทั้งสองชนิดนี้จะจับกับออกซิเจนแน่น ส่งผลให้การปล่อยออกซิเจนไปสู่เนื้อเยื่อเกิดได้น้อยกว่าปกติ การเกิดพยาธิสภาพของผู้ป่วยจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนการขาดหายไปของยีนอัลฟาได้แก่ α -thalassemia2 ($-\alpha/\alpha\alpha$), α -thalassemia1 ($-\alpha/-\alpha$), ($--/\alpha\alpha$), HbH disease ($--/-\alpha$) และ Hb Bart's hydrops fetalis ($--/--$) ตามลำดับ ซึ่งจากการจับกันเองของ γ -globin และ β -globin สามารถตกตะกอนในเม็ดเลือดแดงตัวแก่ ทำให้เม็ดเลือดแดงผิดปกติและจะถูกทำลายเมื่อผ่านม้ามส่งผลให้เม็ดเลือดแดงมีอายุขัยสั้นกว่าปกติตัวเอง [7, 19]

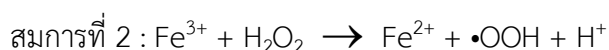
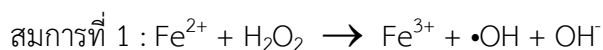
โรค β -thalassemia เกิดจากความผิดปกติของยีน β ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการมิวเตชันของยีนส่งผลให้มีการสร้างสาย β -globin ลดลงหรือสร้างไม่ได้เลย ส่งผลทำให้เกิดความไม่สมดุลกันระหว่างสาย α -globin และ β -hemoglobin α -hemoglobin ที่เหลืออยู่จะไม่เสถียรและจะตกตะกอนในผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนในไขกระดูกส่งผลให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนตั้งแต่ในไขกระดูก (ineffective erythropoiesis) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดภาวะซีดในผู้ป่วย β -thalassemia และ α -hemoglobin ที่เหลือตกตะกอนในเม็ดเลือดแดงตัวแก่จะส่งผลให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติดังกล่าวโดยจะถูกกำจัดโดยม้ามส่งผลให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่าปกติเช่นกัน [19-21]

จากการที่พยาธิสภาพของผู้ป่วย thalassemia จะเกิดจากการไม่สมดุลกันระหว่าง hemoglobin ทั้งสองสาย ซึ่งโมเลกุลของ hemoglobin สายที่เหลือนั้นจะตกตะกอนที่ผนังของเม็ดเลือดแดงทั้งตัวอ่อนและตัวแก่ ส่งผลให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติโดยม้าม ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่า 120 วัน (extravascular hemolysis) หรือถูกทำลายในหลอดเลือด (intravascular hemolysis) ทำให้มี heme หรือเหล็กที่เกิดจากการสลายของ hemoglobin สะสมอยู่มาก ทำให้ธาตุเหล็กซึ่งเป็นส่วนของประกอบ heme ที่จับอยู่ด้วยนั้นหลุดเป็นอิสระได้ง่ายส่งผลให้เกิดสารอนุมูลอิสระผ่านกระบวนการ Fenton reaction และสารอนุมูลอิสระมีโอกาสนำไปสัมผัสกับส่วนประกอบของเม็ดเลือดแดงเช่น โปรตีนหรือไขมันของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง [21-23] ให้เกิดผลผลิตของภาวะออกซิเดชันเพิ่มขึ้นอีก ส่งผลให้เกิดภาวะ oxidative stress ในผู้ป่วย thalassemia ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการภาวะซีดในผู้ป่วย thalassemia

ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (Oxidative stress) และการควบคุมภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลในเม็ดเลือดแดงระดับโมเลกุล

ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (Oxidative stress) เกิดจากการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องที่เป็นผลิตภัณฑ์หรืออาจเกิดจากความบกพร่องของการป้องกันอันตรายจากการเกิดออกซิเดชันซึ่งเกิดจากปริมาณเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้าน (anti-oxidants) การเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวลดลง อนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญต่อเซลล์ ได้แก่ อนุมูลอิสระออกซิเจน และอนุมูลอิสระไนโตรเจน ก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระอันมีความไวต่อชีวิตโมเลกุลภายในเซลล์ได้แก่ ไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ทำให้เซลล์ถูกทำลายและเกิดผลผลิตของอนุมูลอิสระส่งผลต่อพยาธิสภาพของร่างกายได้

ธาตุเหล็กซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในฮีโมโกลบิน เป็นหนึ่งตัวการสำคัญที่ทำให้ร่างกายสร้างสารโปรออกซิแดนท์ โดยผ่านกระบวนการ Fenton reaction ซึ่งสามารถทำให้เกิด oxidative stress ขึ้นภายในร่างกายได้ โดย Ferrous iron (Fe^{2+}) จะถูกออกซิไดซ์ด้วย H_2O_2 ทำให้ได้ hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) และ hydroxyl anion (OH^-) และสำหรับ ferric iron (Fe^{3+}) ที่เกิดขึ้นมาจะกลับมาทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได้เป็น peroxide radical ($\bullet\text{OOH}$) และ proton (H^+) ซึ่ง reactive oxygen species (ROS) ต่างๆที่เกิดขึ้นนั้นทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้น ดังสมการที่ 1 และ 2



การสะสมของสาร pro-oxidants จากกระบวนการดังกล่าวนี้ส่งผลทำให้เกิดกระบวนการการทำลายไขมันที่ผนังเซลล์ (lipid peroxidation), การทำลายสภาพโปรตีน (protein carbonylation) และการ

สลายตัวของฮีโมโกลบิน (Hb denaturation) ดังนั้นในร่างกายมนุษย์จึงมีกระบวนการควบคุมสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ ส่งผลให้ร่างกายอยู่ในสภาวะสมดุล ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สำคัญในร่างกาย เช่น SOD, GSH และ PRDX เป็นต้น [24, 25] โดยสารต้านอนุมูลอิสระข้างต้นนั้นล้วนถูกสร้างโดยการกระตุ้นด้วย transcription factor คือ NF-E2-related factor 2 NRF2 ซึ่ง NRF2 จะกระตุ้นยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระผ่าน antioxidant/ electrophile response element (ARE/EpRE) [26] ยีนเป้าหมายที่ถูกกระตุ้นเช่น Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (*Gclc*), glutamate-cysteine ligase, modifier subunit (*Gclm*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง Glutathione peroxidase (*GSHPx*), Thioredoxin reductase 1 (*Txnrd1*), Peroxiredoxin 1 (*Prdx1*) (เกี่ยวกับการกำจัด ROS), Glutathione S-transferase (*Gst*), NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (*Nqo1*) (ล้างพิษสารแปลกปลอม) [26-29] ในเซลล์เม็ดเลือดแดง NRF2 มีบทบาทที่สำคัญมาก โดยจากการศึกษาในหนูที่ขาดยีน NRF2 อย่างเดียวหรือขาดยีนอื่นที่ถูกควบคุมด้วย NRF2 เช่นยีน peroxiredoxin1 (PRDX1) พบว่าหนูจะมีภาวะ autoimmune hemolytic anemia และมีภาวะตอบสนองต่อออกซิเดชันได้ง่าย ร่วมกับพบระดับของ GSH ลดลง [30-32] จากการศึกษานี้ในหนูกระตุ้นให้เป็นโรค sickle cell disease (SCD) พบว่าเมื่อมีการเพิ่มการกระตุ้นยีน *NRF2* จะลดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล ลดการติดเชื้ ลดการทำลายอวัยวะและภาวะเม็ดเลือดแดงแตกง่ายในหนู SCD ได้ [33] นอกจาก NRF2 แล้ว พบว่า TF ที่สำคัญในการควบคุมภาวะออกซิเดชันคือ Forkhead box O3 (*Foxo3*) ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ SOD2, CAT [34] จากการศึกษานี้ในหนูที่ขาดยีนดังกล่าวพบว่ามียกระดับอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นและมีสารต้านอนุมูลอิสระลดลงส่งผลให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นลง [35] ยีน *Foxo3* ยังสามารถลดภาวะซีดในหนู β -thalassemia อีกด้วย [36] นอกจาก TF ที่กล่าวมาจะถูกควบคุมด้วยระดับของการภาวะออกซิเดชันแล้ว ปัจจุบันพบว่า TF เหล่านี้ยังถูกควบคุมในระดับของ post-translation ด้วย miRNA อีกด้วย

microRNA (miRNAs, miR-) คือ non-coding RNA สายสั้นประมาณ 21 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโดยการยับยั้งการแปลรหัสของ mRNA หรือการกระตุ้นให้ mRNA สลาย ซึ่งเป็นการควบคุมการแสดงออกของ miRNA แบบ negative ซึ่งพบว่า miRNA นี้มีความสำคัญในการควบคุมภาวะออกซิเดชันด้วย [37] โดยก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษา miRNA และกระบวนการ redox-sensitive ไว้ miRNA ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการการส่งสัญญาณของ Nrf2/ARE ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญใน redox homeostasis [38] นอกจากนี้ miRNA มีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการ redox ในไมโตรคอนเดรียซึ่งเป็นแหล่งสร้าง H_2O_2 ที่มากที่สุดอีกด้วย [14] มีการศึกษาบทบาทของ miRNA ต่อกระบวนการถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลในเม็ดเลือดแดงในหนู miR-144/451 knockout พบว่าเม็ดเลือดแดงของหนูจะมีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น โดยที่ miR-451 จะทำหน้าที่ควบคุมยีนเป้าหมายคือ Ywhaz (the phosphoserine/threonine binding protein 14-3-3 ζ) ซึ่งการแสดงออกที่ลดลงของยีนนี้ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ FoxO3 นั้นเอง [15] นอกจากนี้จากการศึกษาในโรค SCD ซึ่งมีระดับอนุมูลอิสระสูงและระดับสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ พบว่ามีการแสดงออกของ miR-144 เพิ่มขึ้นและ miR-144 จะทำหน้าที่ควบคุมภาวะออกซิเดชันโดยควบคุมผ่านยีน NRF2 [18] NRF2 ยังสามารถควบคุมภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลโดยผ่าน miR-214 ซึ่งจะยับยั้งยีน ATF4 (กระตุ้นการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ) [39] จึงเห็นได้ว่า miRNA มีบทบาทที่

สำคัญในการควบคุมภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลในเม็ดเลือดแดงผ่าน mRNA เป้าหมายที่สำคัญคือกลุ่มของ TF

โรคธาลัสซีเมีย (Thalassemia) และภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (Oxidative stress)

สาเหตุของพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในโรค thalassemia นั้นเกิดจากการไม่สมดุลกันระหว่าง hemoglobin ทั้งสองสายของผู้ป่วย thalassemia ทำให้โมเลกุลของ hemoglobin สายที่เหลืตกตะกอนที่ผนังของเม็ดเลือดแดงทั้งตัวอ่อนและตัวแก่ ส่งผลให้เกิดการทำลายของเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติดังกล่าว ทำให้มี heme หรือเหล็กที่เกิดจากการสลายของ hemoglobin กระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระผ่านกระบวนการ Fenton reaction และสารอนุมูลอิสระมีโอกาสร่วมสัมผัสกับส่วนประกอบของเม็ดเลือดแดงเช่น โปรตีนหรือไขมันของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ของสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น จากการศึกษาในผู้ป่วย พบการเพิ่มสูงขึ้นของระดับของ TBARS ซึ่งเป็นผลจากกระบวนการ lipid peroxidation ในกลุ่ม α -thalassemia trait และสูงขึ้นมากใน HbH disease และเมื่อทำการวัดระดับของสารต้านอนุมูลอิสระในพลาสมาพบว่าระดับของวิตามิน A, C และ E ลดลงในผู้ป่วยเช่นกัน เช่นเดียวกับเมื่อทำการตรวจวัดในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยพบว่าระดับของวิตามิน E, glutathione, catalase และ SOD ที่ลดลงเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยสามารถถูกกระตุ้นจาก hydrogen peroxide ได้ง่ายและมี deformability ของเม็ดเลือดแดงลดลงเช่นกัน [40] ส่วนในผู้ป่วย β -thalassemia นั้นพบว่ามีภาวะออกซิเดชันเกิดขึ้นใน band 4.1, band 3 ของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งนำไปสู่พยาธิสภาพของเม็ดเลือดแดง [22, 23, 41] และเมื่อทำการวัดระดับของ TBARS พบว่ามีระดับเพิ่มสูงขึ้น [42, 43] และมีการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระได้แก่ peroxyl radical trapping potential (TRAP) และวิตามิน E ในผู้ป่วย β -thalassemia [43]

แต่อย่างไรก็ตามกลไกทางโมเลกุลในการควบคุมกระบวนการทำงานและป้องกันกันเกิดภาวะ oxidative stress โดยเฉพาะอย่างยิ่ง miRNA และยีน TF เป้าหมายในกลุ่มโรคของ hemolytic anemia ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาบทบาทและหน้าที่ของ miRNA และ TF เป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมภาวะ oxidative stress ในกลุ่มโรค thalassemia ซึ่งเป็นโรคที่พบมากในประเทศไทย โดยทำได้ทำการศึกษากการแสดงออกของ miR-144 ในการควบคุมผ่านยีนเป้าหมาย *NRF2* ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย thalassemia และศึกษาหน้าที่และความสำคัญของ miRNA และยีนเป้าหมาย (gain and loss function) ซึ่งการศึกษารังนี้จะเป็นข้อมูลที่สำคัญของบทบาทของ miRNA ในการควบคุมป้องกันภาวะ oxidative stress ในกลุ่มโรค hemolytic anemia ต่อไป

- **วัตถุประสงค์**
- เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ในการควบคุมภาวะ oxidative stress ในกลุ่มโรค thalassemia
- เพื่อศึกษาการทำงานของ miRNA และ mRNA เป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมภาวะ oxidative stress ในกลุ่มโรค thalassemia

- วิธีทดลอง

1. ตัวอย่างผู้ป่วย

นำเลือดที่อยู่ในการเก็บเลือดแข็งจำนวน 6 ml จาก 25 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วยคนปกติจำนวน 6 ตัวอย่างจากอาสาสมัครและผู้ป่วยได้แก่ β thalassemia/HbE จำนวน 7 ตัวอย่าง, HbH diseases จำนวน 9 ตัวอย่าง และ HbH/CS-disease จำนวน 3 ตัวอย่าง จากคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลา นครินทร์ การศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลา นครินทร์ (Approval ID: 57-217-19-2) นำมาเตรียมสเมียร์เลือดและย้อมด้วยสี Wright Giemsa เพื่อดูรูปร่างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์ และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex

2. การคัดแยกเม็ดเลือดแดงระยะ reticulocyte ด้วยวิธีการปั่นแยก

นำตัวอย่างเลือดที่ได้มาปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศา เวลา 5 นาที เพื่อกำจัดพลาสมาและ buffy coat ที่ให้คงเหลือแต่ส่วนของเม็ดเลือดแดง (reticulocyte และเม็ดเลือดแดงตัวแก่) นำส่วนดังกล่าวมาล้างสองครั้งด้วย reticulocyte saline solution ที่เย็นและนำส่วนดังกล่าวมาปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศา เวลา 30 นาที แยกส่วนบนชั้นบนสุดที่ปั่นได้มาเติม reticulocyte saline solution และนำมาปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศา เวลา 30 นาทีอีกครั้งหนึ่ง นำเซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ reticulocyte ที่แยกได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของการแยกด้วยการวัดการแสดงออกของ CD71 ซึ่งจะจำเพาะกับเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (reticulocyte) ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometry นอกจากนี้เซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ reticulocyte ที่แยกได้จะถูกนำมาสกัด RNA เพื่อวัดการแสดงออกของ miRNA และ mRNA เป้าหมายต่อไป

3. การเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ K562 cell line ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ผสมกับ 10% Fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-Glutamine และ 1x Penicillin และ Streptomycin นำเอาเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ มาใส่ใน 24 well plate แต่ละหลุมมีเซลล์ประมาณ 1×10^5 เซลล์ เพื่อนำเซลล์ที่ได้ไปทำการศึกษาผลของการเพิ่มและลดการแสดงออกของ miR-144 ต่อไป

4. การเพิ่มการแสดงออกและยับยั้งการแสดงออกของ miR-144

เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 จำนวน 1×10^5 เซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ ใน 24-well plate ทำการ transfect โดยการนำ RNAiMAX Lipofectamine[®] reagent ผสมกับ Opti-MEM[®] medium เพื่อทำการเพิ่มการแสดงออกของ miR-144 นำ hsa-miR-144-3p miRNA mimic (mirVana[™]) ที่ความเข้มข้น 30 nM และ 40 nM ตามลำดับ และเพื่อทำการลดการแสดงออกของ miR-144 นำ anti-miR144 inhibitor ที่ความเข้มข้น 200 nM และ 300 nM ตามลำดับ ซึ่ง miR-144 mimic หรือ anti-miR144 inhibitor นั้นจะถูกเจือจางกับ Opti-MEM[®] medium จากนั้นเตรียมสารละลาย miR-144 mimic หรือ anti-miR144 inhibitor ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผสมกับสารละลาย RNAiMAX Lipofectamine[®] reagent ในอัตราส่วน 1:1 หลังจากผสมเข้ากันแล้วบ่ม ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำส่วนผสมที่ได้ใส่ลงในหลุมที่มีการใส่เซลล์ไว้แล้วข้างต้น จากนั้นนำเข้าไปเพาะเลี้ยงในตู้ CO₂ incubator ที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์ในวันที่ 3 หลังจากเติม miR-144 mimic หรือ anti-miR144 inhibitor นำเซลล์ที่ได้ไปตรวจการเพิ่ม

และลดการแสดงออกของ miR-144 โดยวิธี qRT-PCR และดูผลของเพิ่มและการลดการแสดงออกของ miR-144 ต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมาย, การมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability), รูปร่างของเซลล์ (Morphology) ด้วยวิธี cytospin, วัดระดับภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (Oxidative stress) ด้วยการวัดระดับของอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species: ROS) และสารต้านอนุมูลอิสระ Glutathione (GSH) ด้วยวิธี flow cytometry

5. การวัดการแสดงออกของ miRNA และ mRNA เป้าหมาย

- การวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ในเม็ดเลือดแดงด้วย qRT-PCR

เพื่อศึกษาการแสดงออกของ miRNA ที่เกี่ยวข้องกับ oxidative stress ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้คือ miR-144 นั้น เซลล์เม็ดเลือดแดงระยะ reticulocyte ของตัวอย่างคนปกติและผู้ป่วยที่แยกได้ หรือเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA mimic หรือ miRNA inhibitor จะถูกนำมาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัดของ Hybrid-R™ miRNA วิธีสกัดแบบ total RNA (large and small RNA) หลังจากนั้นนำมาวัดการแสดงออกของ miR-144 โดยใช้ TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems) เริ่มด้วยขั้นตอน Reverse transcribe RNA โดยมี primer ที่จำเพาะต่อ miR-144 นำผลผลิตที่ได้มาทำการวัดการแสดงออกของ miRNA ด้วย TaqMan probe (Applied Biosystems) ที่จำเพาะกับ miR-144 และใช้ RNU48 เป็น internal control คำนวณการแสดงออกโดยวิธี เปรียบเทียบค่า Ct ($2^{-\Delta Ct}$) ของการทดลองสามซ้ำ

- การวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA เป้าหมายในเม็ดเลือดแดงด้วย qRT-PCR

ทำการวัดการแสดงออกของยีน nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (NRF2) ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ายีน NRF2 เป็น mRNA เป้าหมายของ miR-144 การศึกษาทำโดยนำ total RNA ที่สกัดได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยน้ำยา High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) หลังจากผสมตัวอย่างที่ได้แล้ว นำไปเข้าเครื่อง Thermocycler ที่ อุณหภูมิ 37 °C นาน 60 นาที ต่อด้วย 95 °C นาน 5 นาทีและเก็บไว้ที่ 4 °C นำไปวัดการแสดงออกของ mRNA เป้าหมาย ด้วย qRT-PCR วิธี Sybergreen (SYBR® Premix Ex Taq™ II :Tli RNaseH Plus) โดยการใช้ forward primer 5'-GACGGTATGCAACAGGACATTGAG -3', reverse primer 5'-AACTTCTGTCTAGTTTGCTTCTGGA -3' (138 bp) และ GAPDH (endogenous gene) forward primer 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC, reverse primer 5'-GAAGATGGTGATGGGA TTTC-3' (226 bp) ที่ความเข้มข้นของ primer 0.2 μM ทำการเทียบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในตัวอย่าง mRNA ที่ได้จากเม็ดเลือดแดงระยะ reticulocyte คนปกติและผู้ป่วย thalassemia ทำการวัดการแสดงออกด้วย qRT-PCR คำนวณการแสดงออกโดยวิธี เปรียบเทียบค่า Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ของการทดลองสามซ้ำ

6. การมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability)

ทำการทดสอบผลการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA mimic หรือ miRNA inhibitor ด้วยการย้อมด้วยสี trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 นับจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี (เซลล์มีชีวิต) ด้วย counting chamber

7. รูปร่างของเซลล์ (Morphology) ด้วยวิธี cyto spin

ทำการทดสอบรูปร่างของเซลล์ Morphology ด้วยการปั่นตกตัวอย่าง ของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA mimic หรือ miRNA inhibitor ด้วยเครื่อง cyto spin ที่ความเร็ว 700 rpm นาน 5 นาที ทำการย้อมสีตัวอย่างเซลล์บนแผ่นสไลด์ด้วยสี Wright Giemsa เพื่อดูรูปร่างเซลล์ด้วย กล้องจุลทรรศน์

8. การวัดภาวะ oxidation และระดับ antioxidant

เพื่อตรวจภาวะ oxidation ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของตัวอย่างคนปกติและผู้ป่วย หรือเซลล์เม็ดเลือดแดง ตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA mimic หรือ miRNA inhibitor ด้วยการวัดระดับของ ROS โดย วิธี dichlorofluorescein (DCF) assay ซึ่งสาร 2', 7' dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) นั้น สามารถเข้าไปในเซลล์และจะถูก deacetylate ด้วย esterase ที่อยู่ในเซลล์ เปลี่ยนเป็น DCFH และถูก เปลี่ยนเป็นสารเรืองแสง 2', 7' dichlorofluorescein (DCF) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 นำตัวอย่างเม็ดเลือดแดง ประมาณ 1×10^6 cells/mL ละลายใน PBS มาย้อมด้วยสาร DCFH-DA ที่ถูกละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.4 mM หลังจากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ $37^\circ C$ เวลา 15 นาที ที่ 5% CO_2 หลังจากนั้น เม็ดเลือดแดงจะถูก ล้างด้วย PBS แล้ว เติม PBS ลงไปในตัวอย่างและกระตุ้นด้วย 2 mM ของ H_2O_2 นำเม็ดเลือดแดงมาตรวจ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometry โดยเริ่มจาก การวิเคราะห์แบบ dot-plot ระหว่าง side scatter (SSC) และ forward scatter (FSC) แล้ว เลือกบริเวณ (gate) ของเฉพาะเม็ดเลือดแดงอย่างเดียว หลังจากนั้นเม็ดเลือดแดง 10,000 เซลล์จะถูกวิเคราะห์ระดับของความเข้มแสง DCF (ROS ที่เกิดขึ้น) ในช่อง green fluorescent (FL-1) ทำวิเคราะห์ผลด้วย mean fluorescence intensity (MFI) ของระดับ ROS หลังจากการกระตุ้นที่ 30 นาทีในตัวอย่างคนปกติเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรค thalassemia หรือเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA mimic หรือ miRNA inhibitor เทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้ รับการ transfect

ส่วนการวัดระดับของ antioxidant นั้นจะทำการตรวจวัดระดับของ reduced thiol glutathione (GSH) ซึ่งเป็นสาร antioxidant ที่สำคัญในเม็ดเลือดแดง โดยนำตัวอย่างเม็ดเลือดแดงประมาณ 1×10^6 cells/mL ละลายใน PBS มาทำการกระตุ้นด้วยการเติม 1 mM ของ H_2O_2 หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ถูกกระตุ้น ไปปั่นที่อุณหภูมิ $37^\circ C$ 5% CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้มาปั่นล้างด้วย PBS นำตัวอย่าง ที่ได้มา ย้อมกับ mercury orange ละลายด้วย acetone ที่ความเข้มข้น 40 μM เวลา 3 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำเซลล์ที่ได้มาปั่นล้างด้วย PBS อีกครั้ง เติม PBS ลงไปในตัวอย่าง และนำเม็ดเลือดแดงมาตรวจวิเคราะห์ด้วย เครื่อง flow cytometry เซลล์จะถูกวิเคราะห์ระดับความเข้มแสง mercury orange (ระดับ GSH ที่เกิดขึ้น) ในช่อง FL-2 ทำวิเคราะห์ผลด้วย mean fluorescence intensity (MFI) เพื่อเปรียบเทียบระดับของสีที่เกิดขึ้น เทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรค thalassemia หรือเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA mimic หรือ miRNA inhibitor เทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับการ transfect ทำการวิเคราะห์ผลของ oxidative status จากเครื่อง flow cytometry ด้วยโปรแกรม Cell Quest Pro

9. การกระตุ้นภาวะ oxidative stress ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน

เพื่อศึกษาผลของการเพิ่มหรือลดการแสดงออกของ miR-144 ต่อภาวะ oxidative stress ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน โดยนำเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA mimic หรือ miRNA inhibitor มาจำนวน 2×10^4 cell มาเติม H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 10, 20, และ 30 μM เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์และทำการวัดการแสดงออกของ mRNA เป้าหมายต่อไป

10. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ (Statistical analysis) และความสัมพันธ์ของ miRNA และพยาธิสภาพของโรค

ข้อมูลค่าทางโลหิตวิทยา, การแสดงออกของ miRNA และการแสดงออกของ mRNA จะแสดงค่ากลางและค่าความคลาดเคลื่อน (mean $\pm$ SE) และใช้ค่า Student's t-test ในการคำนวณค่าความแตกต่าง (*p-value*) ค่าความสอดคล้องสัมพันธ์กันของ miRNA และพยาธิสภาพของกลุ่มโรค thalassemia โดยใช้ Spearman's rank correlation (SPSS version 13) ค่าความแตกต่างที่ $p < 0.05$.

- แผนการดำเนินงาน

แผนการวิจัย	เดือนที่						
	1-6	7-12	13-18	19-24	25-30	31-36	37-42
1. สั่งซื้อน้ำยาและสารเคมี/ ขอเอกสารจริยธรรมการวิจัย ในมนุษย์	←→						
2. เก็บตัวอย่างและศึกษา ภาวะ oxidation ในคนปกติ และกลุ่มโรค thalassemia		←→					
3. สกัดแยก total RNA จาก เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน reticulocyte/วิเคราะห์การ แสดงออกของ miRNA และ mRNA เป้าหมายด้วย qRT- PCR			←→				
4. เพาะเลี้ยงเม็ดเลือดแดงตัว อ่อน, เพิ่มการแสดงออกของ miRNA ด้วย miRNA mimic และยับยั้งการแสดงออกของ miRNA ด้วย Anti-miRNA inhibitor			←→				
5. ผลของภาวะ oxidation ในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนที่มี การเพิ่มการแสดงออกของ miRNA ด้วย miRNA mimic					←→		

แผนการวิจัย	เดือนที่						
และยับยั้งการแสดงออกของ miRNA ด้วย Anti-miRNA inhibitor							
7.ศึกษาความสัมพันธ์ของ miRNA และพยาธิสภาพของ กลุ่มโรค Thalassemia							
8. สรุป, รวบรวมผลการ ทดลอง ร่างผลงานวิจัย							
10. เขียนรายงานการวิจัย							
11. ตีพิมพ์ผลงานวิจัย							

3. ผลการทดลอง

3.1 ค่าทางโลหิตวิทยาและภาวะ oxidative stress ของผู้ป่วย thalassemia

เมื่อทำการตรวจวัดค่าทางโลหิตวิทยาของคนปกติและผู้ป่วย thalassemia ได้แก่ β thalassemia/HbE, HbH diseases และ HbH/CS-disease พบว่าค่า RBC count ของ β -thalassemia/HbE และ HbH/CS-disease มีค่าต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) นอกจากนี้พบว่าค่า Hb, Hct, MCV และ MCH มีค่าต่ำในกลุ่มโรค Thalassemia เมื่อเทียบกับคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ในส่วนของค่า MCHC มีค่าต่ำกว่าคนปกติเฉพาะกลุ่ม α -thalassemia และกลุ่มโรค Thalassemia มีค่า RDW สูงเมื่อเทียบกับคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) (แสดงดังตารางที่ 1) จากผลดังกล่าวแสดงว่ากลุ่มโรค Thalassemia มีภาวะซีดเมื่อเทียบกับคนปกติ

นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจวัดระดับของ ROS ด้วยเครื่อง flow cytometry พบว่าระดับของ ROS ในผู้ป่วยโรค thalassemia มีระดับที่สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) และมีระดับของ Glutathione ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เช่นกัน (แสดงดังตารางที่ 1)

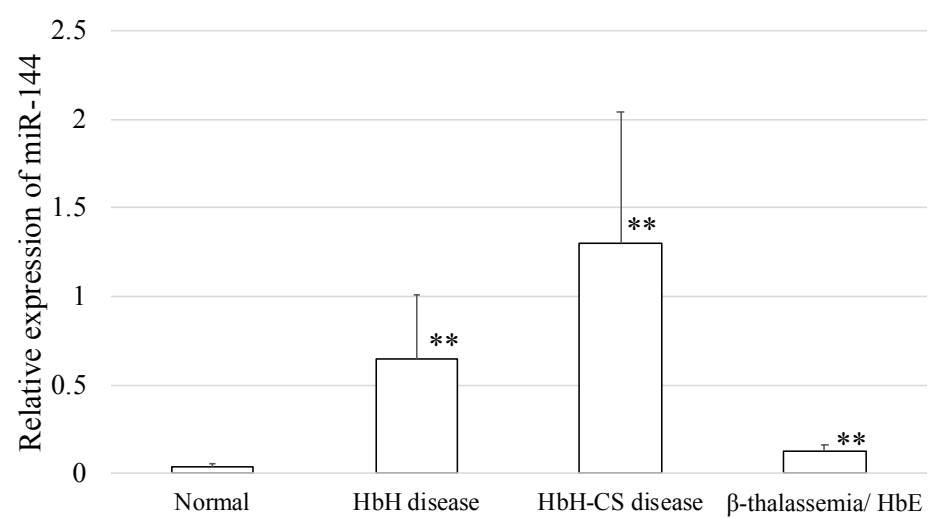
3.2 การแสดงออกของ miR-144 และ mRNA เป้าหมายในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน reticulocyte ของผู้ป่วย thalassemia

เมื่อทำการวัดการแสดงออกของ miR-144 ในกลุ่มผู้ป่วย thalassemia พบว่าในผู้ป่วย α -thalassemia ได้แก่ HbH disease และ HbH-CS disease มีการแสดงออกของ miR-144 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับคนปกติเป็น 15.7 เท่า และ 31.6 เท่าตามลำดับ ($p < 0.01$) เช่นเดียวกับผู้ป่วย β thalassemia/HbE ซึ่งมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเป็น 3.1 เท่า ($p < 0.01$) เช่นกัน (แสดงดังรูปที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงค่าทางโลหิตวิทยาและภาวะ oxidative stress ของคนปกติและผู้ป่วย thalassemia ได้แก่ β thalassemia/HbE, HbH diseases และ HbH/CS-disease

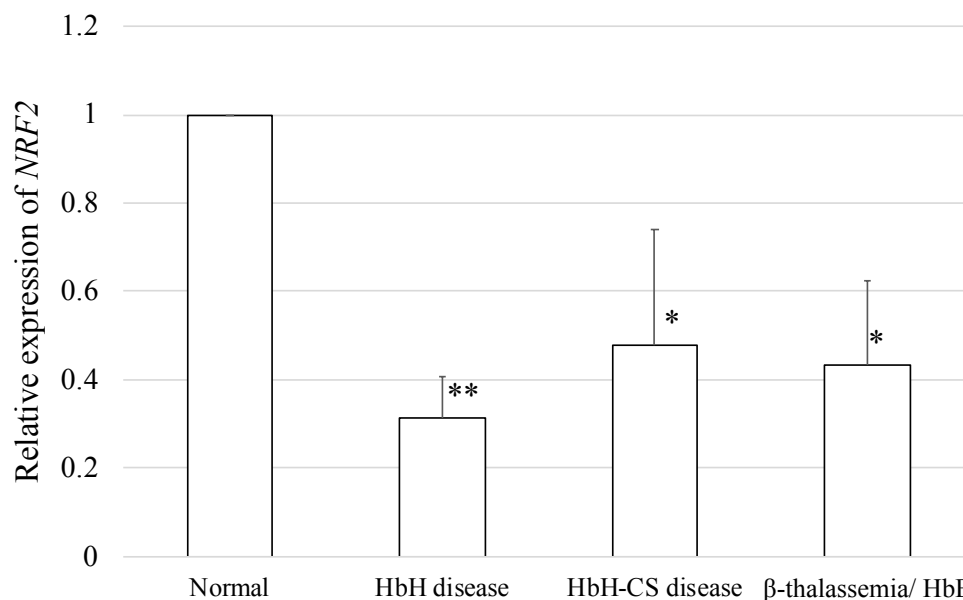
Red blood parameter	Normal (n=6)	Hb H disease (n=9)	HbH CS disease (n=3)	β -thalassemia/HbE (n=7)
RBC count (x10 ⁶ cell/L)	5.1 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.8	3.8 $\pm$ 0.1**	3.3 $\pm$ 0.6**
Hb (g/dL)	13.9 $\pm$ 1.1	8.5 $\pm$ 1.2**	7.8 $\pm$ 0.2**	7.9 $\pm$ 1.4**
Hct (%)	42.5 $\pm$ 3.3	29.8 $\pm$ 4.3**	29.6 $\pm$ 2.0**	24.1 $\pm$ 4.4 **
MCV (fL)	84.0 $\pm$ 2.1	67.3 $\pm$ 9.2**	78.8 $\pm$ 2.7*	72.8 $\pm$ 4.5 **
MCH (pg)	27.4 $\pm$ 1.0	19.1 $\pm$ 2.3**	20.9 $\pm$ 1.3**	23.9 $\pm$ 2.0**
MCHC (g/dL)	32.6 $\pm$ 0.4	28.54 $\pm$ 1.5**	26.6 $\pm$ 2.4**	32.8 $\pm$ 0.9
RDW (%)	13.6 $\pm$ 0.7	24.5 $\pm$ 2.3**	24.1 $\pm$ 3.9**	24.7 $\pm$ 4.7 **
ROS level (MFI)	30.8 $\pm$ 5.9	96.7 $\pm$ 42.9**	78.7 $\pm$ 30.3**	80.4 $\pm$ 12.5**
GSH (MFI)	430 $\pm$ 146.5	199.1 $\pm$ 95.3**	148.3 $\pm$ 46.6*	194.0 $\pm$ 57.1**

RBC, Red blood cells; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; Red cell distribution width; RDW, ROS; Reactive oxygen species GSH; Glutathione. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ โดยการใช้ independent Student’s t-test เปรียบเทียบกับคนปกติ

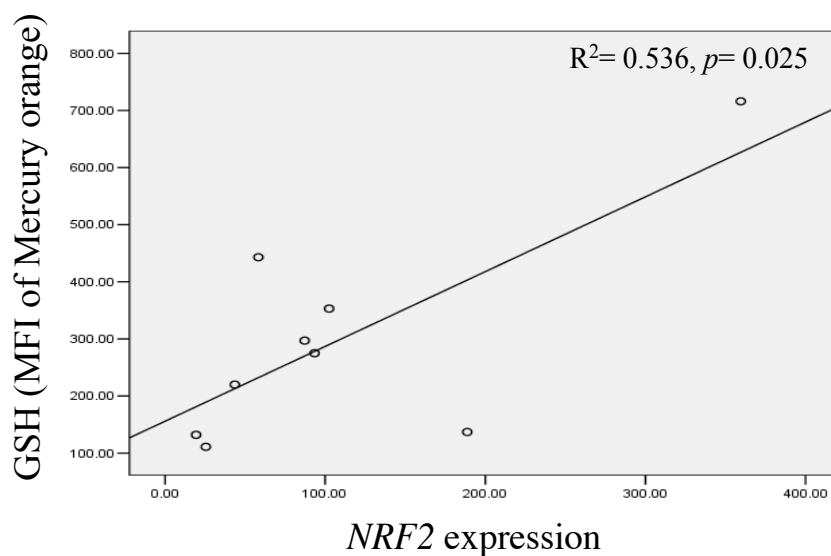


รูปที่ 1 แสดงการแสดงออกของ miR-144 ในกลุ่มผู้ป่วย thalassemia และคนปกติ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

และเมื่อทำการวัดการแสดงของ mRNA เป้าหมายของ miR-144 คือ *NRF2* พบว่าในผู้ป่วย α -thalassemia ได้แก่ HbH disease และ HbH-CS disease นั้นมีการแสดงออกของ *NRF2* ลดลงเมื่อเทียบกับคนปกติเป็น 0.3 เท่า ($p < 0.01$) และ 0.5 เท่าตามลำดับ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับผู้ป่วย β thalassemia/HbE ซึ่งมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเป็น 0.4 เท่า ($p < 0.05$) เช่นกัน (แสดงดังรูปที่ 2) นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ *NRF2* นั้น มีความสัมพันธ์กับระดับของ Glutathione ที่ตรวจวัดได้ (แสดงดังรูปที่ 3)



รูปที่ 2 แสดงการแสดงออกของ *NRF2* ในกลุ่มผู้ป่วย thalassemia และคนปกติ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)



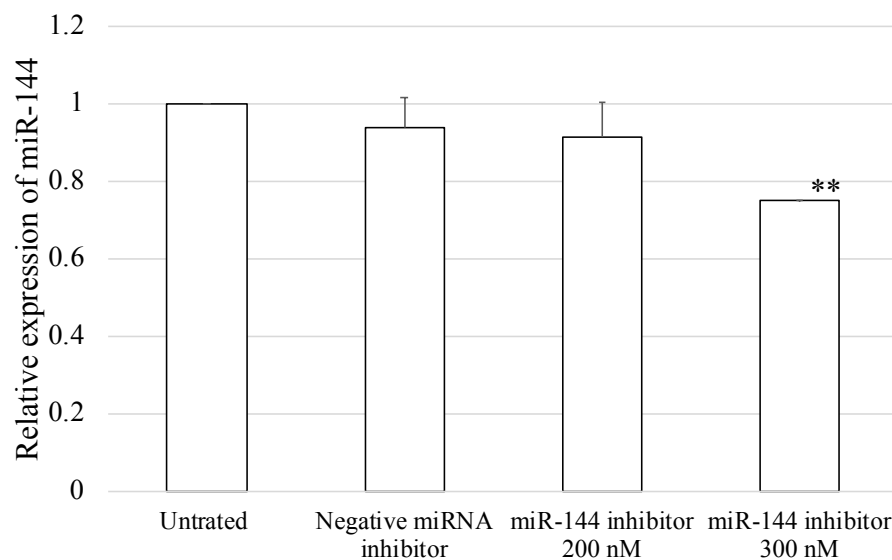
รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ *NRF2* และ ระดับของ Glutathione (MFI)

3.3 ผลของการลดการแสดงออกของ miR-144 ต่อ mRNA เป้าหมาย และภาวะ oxidative stress ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562

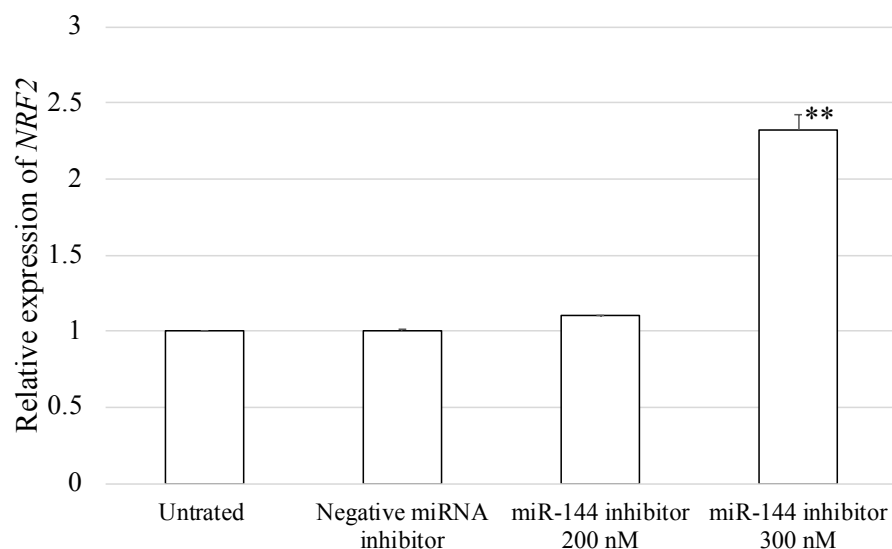
เมื่อทำการลดการแสดงออกของ miR-144 โดยใช้ anti-miR144 inhibitor ที่ความเข้มข้น 200 nM และ 300 nM ตามลำดับ พบว่าเมื่อทำการวัดการแสดงออกของ miR-144 ด้วย qRT-PCR มีการแสดงออกที่ลดลง

เป็น 0.7 เท่า ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่มีการ transfect anti-miR144 inhibitor ที่ความเข้มข้น 300 nM เปรียบเทียบกับ untreated cell อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (แสดงดังรูปที่ 4)

เมื่อทำการศึกษากลไกของการแสดงออกที่ลดลงของ miR-144 ต่อ mRNA เป้าหมาย พบว่าการแสดงออกที่ลดลงนั้นส่งผลทำให้ *NRF2* mRNA มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 หลังจากการเติม miR-144 inhibitor ที่ความเข้มข้น 300 nM เปรียบเทียบกับ untreated cell อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (แสดงดังรูปที่ 5)



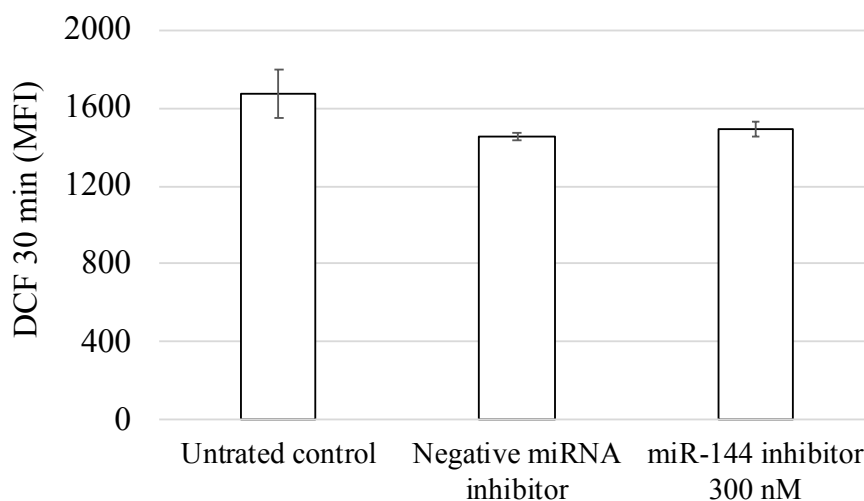
รูปที่ 4 แสดงการแสดงออกของ miR-144 ที่ลดลงในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 หลังจากการเติม miR-144 inhibitor (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)



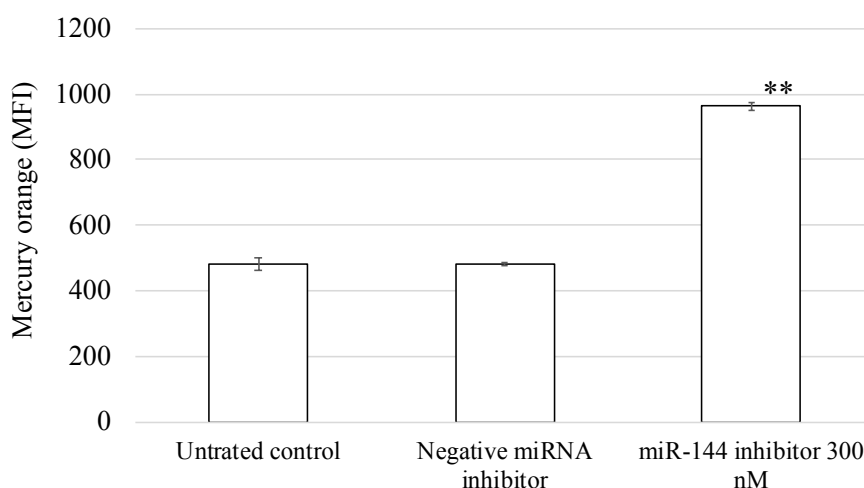
รูปที่ 5 แสดงการแสดงออกของ *NRF2* mRNA เป้าหมายที่เพิ่มขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 หลังจากการเติม miR-144 inhibitor (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

เมื่อทำการศึกษากลไกของการแสดงออกที่ลดลงของ miR-144 ต่อภาวะ oxidative stress ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 พบว่าเมื่อทำการวัดระดับของ oxidant ที่เกิดขึ้นหลังจากการเติม miR-144 inhibitor ที่ความเข้มข้น 300 nM เปรียบเทียบกับ untreated พบว่าไม่มีความแตกต่าง (แสดงดังรูปที่ 6) แต่

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวัดระดับของ Glutathione ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 หลังจากหลังจากการเติม miR-144 inhibitor ที่ความเข้มข้น 300 nM เปรียบเทียบกับ untreated พบว่ามีระดับของ Glutathione ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) (แสดงดังรูปที่ 7)



รูปที่ 6 แสดงระดับของ oxidant ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 หลังจากการเติม miR-144 inhibitor ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$)

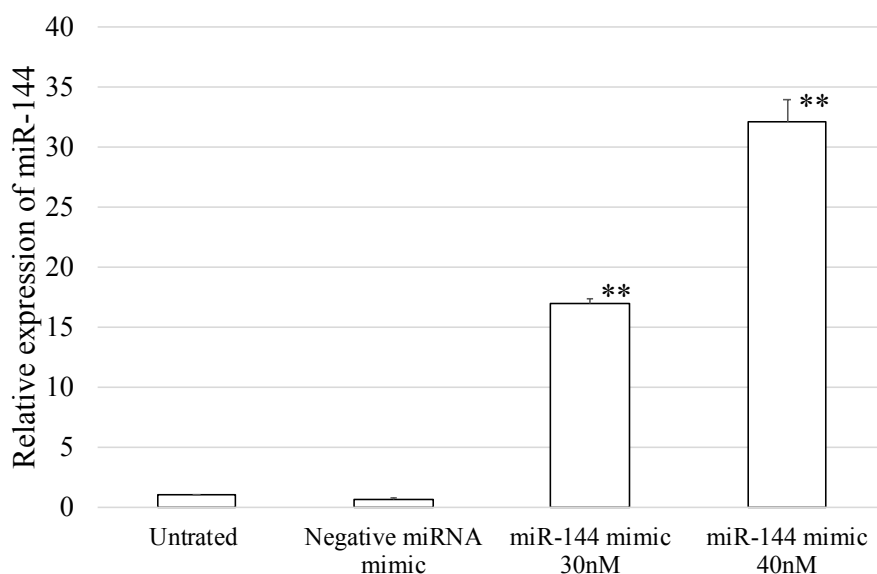


รูปที่ 7 แสดงระดับของ Glutathione ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 หลังจากการเติม miR-144 inhibitor ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$)

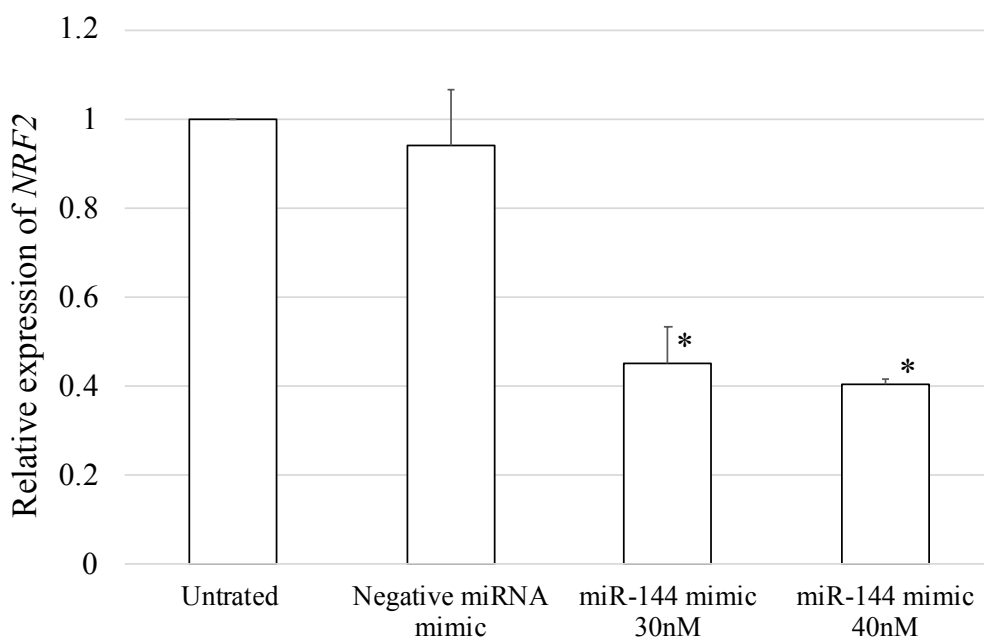
3.4 ผลของการเพิ่มการแสดงออกของ miR-144 ต่อ mRNA เป้าหมาย และภาวะ oxidative stress ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562

เมื่อทำการเพิ่มการแสดงออกของ miR-144 โดยใช้ miR144 mimic ที่ความเข้มข้น 30 nM และ 40 nM ตามลำดับ พบว่าเมื่อทำการวัดการแสดงออกของ miR-144 ด้วย qRT-PCR เช่นกัน มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเป็น 17 เท่า และ เป็น 32 เท่า ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่มีการ transfect ด้วย miR144 mimic ที่ความเข้มข้น 30 nM และ 40 nM ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ untreated cell อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) (แสดงดังรูปที่ 8)

เมื่อทำการศึกษาลงมือของการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ miR-144 ต่อ mRNA เป้าหมาย พบว่าการแสดงออกที่ลดลงนั้นส่งผลทำให้ *NRF2* mRNA มีการแสดงออกที่ลดลงในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 เป็น 0.4 เท่า ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่มีการ transfect ด้วย miR144 mimic ที่ความเข้มข้น 30 nM และ 40 nM เปรียบเทียบกับ untreated cell อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (แสดงดังรูปที่ 9)



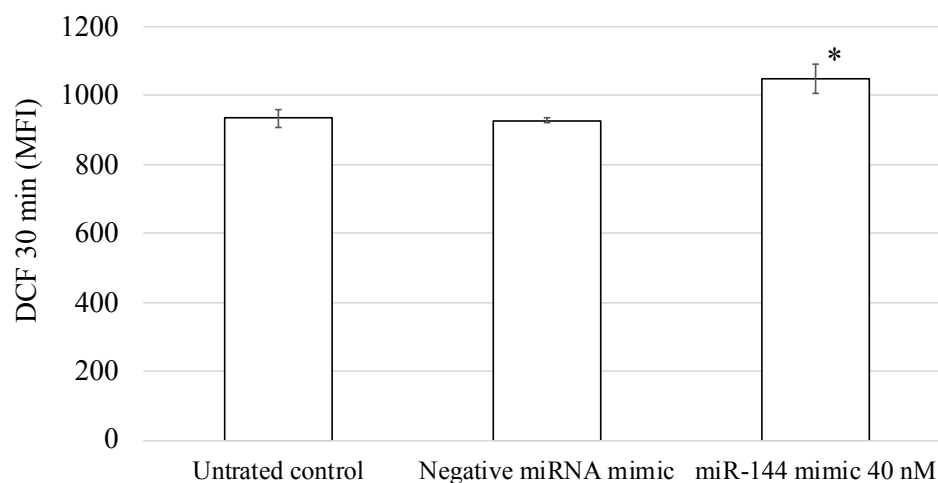
รูปที่ 8 แสดงการแสดงออกของ miR-144 ที่ลดลงในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 หลังจากการเติม miR-144 mimic (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)



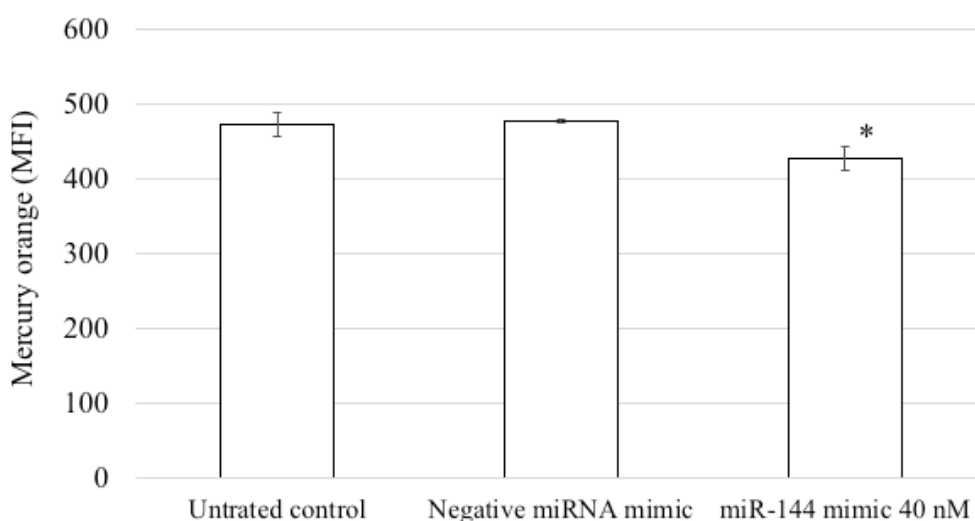
รูปที่ 9 แสดงการแสดงออกของ *NRF2* mRNA เป้าหมายที่ลดลงในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 หลังจากการเติม miR-144 mimic (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

เมื่อทำการศึกษาลงมือของการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ miR-144 ต่อภาวะ oxidative stress ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 พบว่าเมื่อทำการวัดระดับของ oxidant ที่เกิดขึ้นหลังจากการเติม miR-144 mimic ที่ความเข้มข้น 40 nM เปรียบเทียบกับ untreated พบว่าระดับของ oxidant เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (แสดงดังรูปที่ 10) และเมื่อทำการวัดระดับของ Glutathione ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562

หลังจากหลังจากการเติม miR-144 mimic ที่ความเข้มข้น 40 nM เปรียบเทียบกับ untreated พบว่ามีระดับของ Glutathione ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (แสดงดังรูปที่ 11)



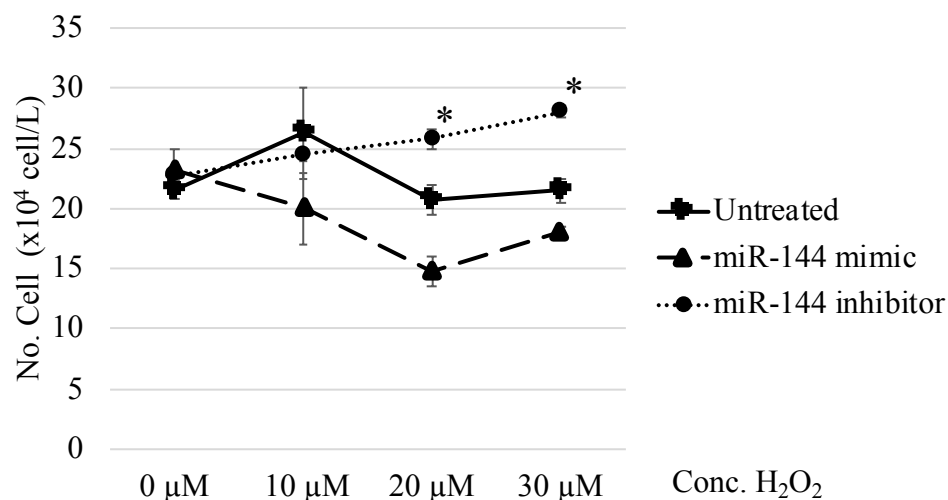
รูปที่ 10 แสดงระดับของ oxidant ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 หลังจากการเติม miR-144 mimic (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)



รูปที่ 11 แสดงระดับของ Glutathione ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 หลังจากการเติม miR-144 inhibitor (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

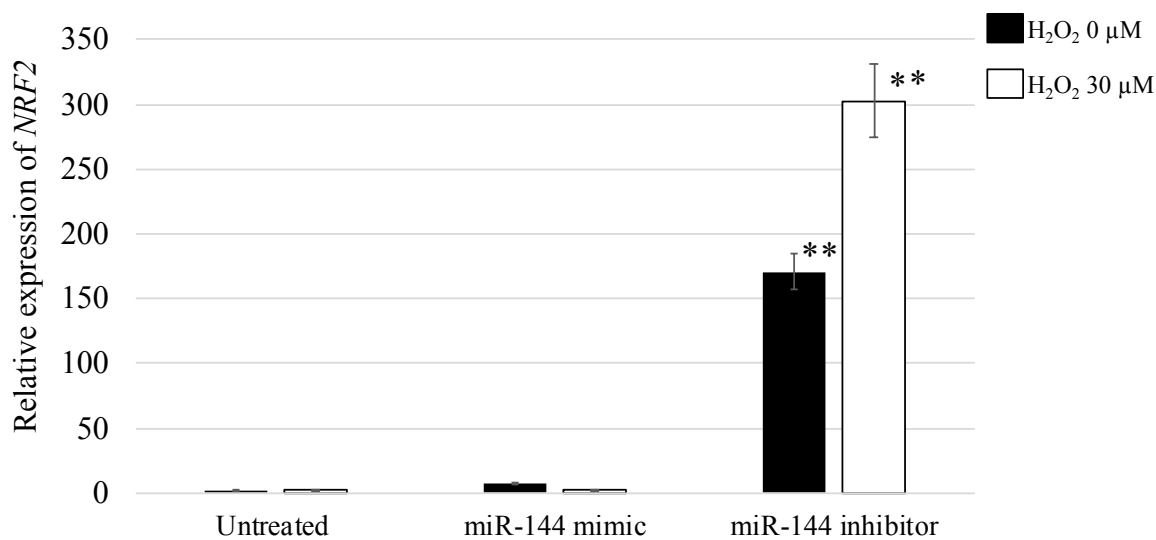
3.5 ผลจากการเพิ่มหรือลดการแสดงออกของ miR-144 ต่อกระตุ้นภาวะ oxidative stress ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน

จากการนำเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA mimic หรือ miRNA inhibitor มาเติม H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 10, 20, และ 30 μM เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยสี trypan blue นั้นพบว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA inhibitor จะพบการมีชีวิตเพิ่มขึ้นใน H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 μM อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ untreated นอกจากพบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA mimic จะพบการมีชีวิตลดลงใน H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 μM ตามลำดับ (แสดงดังรูปที่ 12)



รูปที่ 12 แสดงจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 หลังจากการเติม miR-144 inhibitor และ miRNA mimic ในภาวะที่เติม H₂O₂ ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 μM ตามลำดับ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

นอกจากนี้เมื่อทำการวัดการแสดงออกของ mRNA เป้าหมายคือ *NRF2* ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA mimic หรือ miRNA inhibitor ในสภาวะที่เติม H₂O₂ ความเข้มข้น 30 μM พบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA inhibitor ทั้งที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นภาวะ oxidative stress และในภาวะกระตุ้นด้วย H₂O₂ ความเข้มข้น 30 μM เมื่อเปรียบเทียบกับ untreated อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) แต่ไม่มีความแตกต่างการแสดงออกของ *NRF2* ใน เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 ที่ถูก transfect ด้วย miRNA mimic (แสดงดังรูปที่ 13)



รูปที่ 13 แสดงการแสดงออกของ *NRF2* mRNA เป้าหมายในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน K562 หลังจากการเติม miR-144 inhibitor และ miRNA mimic ในภาวะที่เติม H₂O₂ ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 μM ตามลำดับ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

โรค thalassemia เป็นโรคที่มีถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุดในคนไทย พยาธิสภาพของผู้ป่วย thalassemia จะเกิดจากการไม่สมดุลกันระหว่าง hemoglobin ทั้งสองสาย ซึ่งโมเลกุลของ hemoglobin สายที่เหลือนั้นจะตกตะกอนที่ผนังของเม็ดเลือดแดงทั้งตัวอ่อนและตัวแก่ส่งผลให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดง ที่ผิดปกติโดยม้าม ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่า 120 วัน (extravascular hemolysis) หรือถูกทำลายในหลอดเลือด (intravascular hemolysis) ทำให้มี heme หรือเหล็กที่เกิดจากการสลายของ hemoglobin สะสมอยู่มาก ทำให้ธาตุเหล็กซึ่งเป็นส่วนของประกอบ heme ที่จับอยู่ด้วยนั้นหลุดเป็นอิสระได้ง่ายส่งผลให้เกิดสารอนุมูลอิสระผ่านกระบวนการ Fenton reaction ให้เกิดผลผลิตของภาวะออกซิเดชันเพิ่มขึ้นอีก ส่งผลให้เกิดภาวะ oxidative stress ในผู้ป่วย thalassemia ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการภาวะซีดในผู้ป่วย thalassemia [21, 22] จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วย thalassemia ทั้ง α -thalassemia และ β -thalassemia จะมีระดับของอนุมูลอิสระ (ROS) เพิ่มขึ้นและระดับสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ต่ำลงเมื่อเทียบกับคนปกติซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้เช่นกัน [22, 23, 40, 41, 44]

เมื่อทำการศึกษาระบวนการควบคุมทางโมเลกุลของภาวะ oxidative stress ในผู้ป่วย thalassemia ผ่านการทำงานของ miRNA และยืนยันเป้าหมาย พบว่าในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนระยะ reticulocyte ในกลุ่มผู้ป่วย thalassemia พบว่าในผู้ป่วย α -thalassemia ได้แก่ HbH disease และ HbH-CS disease และผู้ป่วย β thalassemia/HbE พบว่ามีการแสดงของ miR-144 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับคนปกติ โดยผลการแสดงของ miR-144 ในกลุ่มผู้ป่วย thalassemia ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาการแสดงออกของ miR-144 ในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของผู้ป่วย sickle cell anemia ซึ่งเป็นกลุ่มโรค hemolytic anemia เช่นกัน [18] นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มผู้ป่วย α -thalassemia ได้แก่ HbH disease และ HbH-CS disease นั้นมีการระดับการแสดงออกของ miR-144 ที่เพิ่มมากกว่ากลุ่มผู้ป่วย β thalassemia/HbE อาจจะมีสาเหตุมาจากการเกิดพยาธิสภาพที่แตกต่างกันคือในกลุ่มผู้ป่วย α -thalassemia ภาวะซีดมักจะเกิดเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) ในกระแสเลือดมากกว่า β thalassemia/HbE ซึ่งมักจะมีการทำลายเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนตั้งแต่ไขกระดูก (ineffective erythropoiesis) [19, 20]

การทำงานของ miR-144 ในการควบคุมภาวะ oxidative stress ในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย thalassemia นั้นจะทำงานผ่านยีนเป้าหมายคือ *NRF2* ซึ่งพบว่าการแสดงออกที่ลดลงในเม็ดเลือดแดงระยะ reticulocyte เช่นกันสอดคล้องกับการศึกษาในผู้ป่วย sickle cell anemia เช่นกัน [18] การแสดงออกที่ลดลงของยีน *NRF2* นั้นมีความสอดคล้องกับระดับของ glutathione ซึ่งอาจจะทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย thalassemia ไวต่ออนุมูลอิสระมากขึ้นและในที่สุดนำไปสู่การแตกของเม็ดเลือดแดง โดยผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการศึกษาบทบาทของ *NRF2* ในหนูที่ขาดยีน *NRF2* พบว่าหนูจะมีภาวะ autoimmune hemolytic anemia และมีภาวะตอบสนองต่อออกซิเดชันได้ง่าย ร่วมกับพบระดับของ GSH ลดลง [30-32]

นอกจากการวัดระดับการแสดงออกของ miR-144 และยืนยันเป้าหมายในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของผู้ป่วย thalassemia แล้ว ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาลงและเพิ่มการแสดงออกของ miR-144 ต่อการควบคุม

ภาวะ oxidative stress โดยการเติม miR- inhibitor และ mimic ในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน โดยพบว่าพบว่าเมื่อลดการแสดงของไมโครอาร์เอ็นเอ-144 นั้นจะส่งผลให้การแสดงออกของยีน *NRF2* และระดับของกลูตาไธโอนเพิ่มขึ้นและยังสามารถยับยั้งการกระตุ้นจากอนุมูลอิสระ (H_2O_2) ได้จากการเพิ่มการแสดงออกของยีน *NRF2* นั้นเอง แต่เมื่อเพิ่มการแสดงของไมโครอาร์เอ็นเอ-144 จะส่งผลให้ลดการแสดงออกของยีน *NRF2* และระดับของกลูตาไธโอน อีกทั้งยังส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงนั้นไวต่อภาวะ oxidative stress ถูกกระตุ้นด้วยความเข้มข้น H_2O_2 อีกด้วย ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าถ้ามีความผิดปกติที่เกิดขึ้นจาก miR-144 อาจจะส่งผลทำให้ความสามารถในการจัดการของเซลล์ต่อภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลจะลดลง ส่งผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงได้ง่าย ซึ่งการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลที่สำคัญของบทบาทของ miRNA ในการควบคุมป้องกันภาวะ oxidative stress ในกลุ่มโรค hemolytic anemia เช่น hereditary spherocytosis (HS), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency ต่อไป

5. เอกสารอ้างอิง

1. ML T. Clinical hematology theory and procedures Lippincott Williams & Wilkins 2004.
2. Dhaliwal G, Cornett PA, Tierney LM, Jr. Hemolytic anemia. *American family physician* 2004; 69: 2599-606.
3. An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *British journal of haematology* 2008; 141: 367-75.
4. Ricard MP, Gilsanz F, Millan I. Erythroid membrane protein defects in hereditary spherocytosis. A study of 62 Spanish cases. *Haematologica* 2000; 85: 994-5.
5. Panich V, Wasi P, Na-Nakorn S. Hereditary spherocytosis in Thailand. Clinical, hematologic and genetic studies. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet* 1970; 53: 179-89.
6. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. *Hemoglobin* 1987; 11: 65-88.
7. Fucharoen S, Winichagoon P. Haemoglobinopathies in southeast Asia. *The Indian journal of medical research* 2011; 134: 498-506.
8. Jain SK, Palmer M. Effect of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on reduced and oxidized glutathione and lipid peroxide levels in the blood of African-Americans. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1996; 253: 181-3.
9. Prachukthum S, Nunnarumit P, Pienvichit P et al. Genetic polymorphisms in Thai neonates with hyperbilirubinemia. *Acta paediatrica* 2009; 98: 1106-10.
10. Fibach E, Rachmilewitz E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Current molecular medicine* 2008; 8: 609-19.

11. Siow RC, H JF. Redox regulation of microRNAs in health and disease. *Free radical biology & medicine* 2013; 64: 1-3.
12. Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010; 11: 252-63.
13. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM et al. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature immunology* 2008; 9: 839-45.
14. Nallamshetty S, Chan SY, Loscalzo J. Hypoxia: A master regulator of microRNA biogenesis and activity. *Free radical biology & medicine* 2013; 64: 20-30.
15. Yu D, dos Santos CO, Zhao G et al. miR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3zeta. *Genes & development* 2010; 24: 1620-33.
16. Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E et al. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *British journal of haematology* 2006; 132: 108-13.
17. Tatum VL, Chow CK. Antioxidant status and susceptibility of sickle erythrocytes to oxidative and osmotic stress. *Free radical research* 1996; 25: 133-9.
18. Sangokoya C, Telen MJ, Chi JT. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood* 2010; 116: 4338-48.
19. Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *The New England journal of medicine* 2005; 353: 1135-46.
20. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes. Malden, Massachusetts: Blackwell Science 2001.
21. Schrier SL. Pathophysiology of thalassemia. *Current opinion in hematology* 2002; 9: 123-6.
22. Advani R, Rubin E, Mohandas N, Schrier SL. Oxidative red blood cell membrane injury in the pathophysiology of severe mouse beta-thalassemia. *Blood* 1992; 79: 1064-7.
23. Yuan J, Kannan R, Shinar E et al. Isolation, characterization, and immunoprecipitation studies of immune complexes from membranes of beta-thalassemic erythrocytes. *Blood* 1992; 79: 3007-13.
24. Halliwell B. Free radicals in Biology and Medicine Avon, England: Oxford University Press. 1999.
25. Jones DP, Carlson JL, Mody VC et al. Redox state of glutathione in human plasma. *Free radical biology & medicine* 2000; 28: 625-35.
26. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 89-116.

27. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 443-53.
28. Li L, Dong H, Song E et al. Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling. *Chem Biol Interact* 2014; 209: 56-67.
29. Ishii T, Itoh K, Takahashi S et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem* 2000; 275: 16023-9.
30. Lee JM, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 9751-6.
31. Neumann CA, Krause DS, Carman CV et al. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 2003; 424: 561-5.
32. Kawatani Y, Suzuki T, Shimizu R et al. Nrf2 and selenoproteins are essential for maintaining oxidative homeostasis in erythrocytes and protecting against hemolytic anemia. *Blood* 2011; 117: 986-96.
33. Keleku-Lukwete N, Suzuki M, Otsuki A et al. Amelioration of inflammation and tissue damage in sickle cell model mice by Nrf2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: 12169-74.
34. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 2002; 419: 316-21.
35. Marinkovic D, Zhang X, Yalcin S et al. Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. *J Clin Invest* 2007; 117: 2133-44.
36. Franco SS, De Falco L, Ghaffari S et al. Resveratrol accelerates erythroid maturation by activation of FoxO3 and ameliorates anemia in beta-thalassemic mice. *Haematologica* 2014; 99: 267-75.
37. Winter J, Jung S, Keller S et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 2009; 11: 228-34.
38. Cheng X, Ku CH, Siow RC. Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis. *Free radical biology & medicine* 2013; 64: 4-11.
39. Gao M, Liu Y, Chen Y et al. miR-214 protects erythroid cells against oxidative stress by targeting ATF4 and EZH2. *Free Radic Biol Med* 2016; 92: 39-49.
40. Cheng ML, Ho HY, Tseng HC et al. Antioxidant deficit and enhanced susceptibility to oxidative damage in individuals with different forms of alpha-thalassaemia. *British journal of haematology* 2005; 128: 119-27.

41. Kattamis C, Kattamis AC. Oxidative stress disturbances in erythrocytes of beta-thalassemia. *Pediatric hematology and oncology* 2001; 18: 85-8.
42. Meral A, Tuncel P, Surmen-Gur E et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia. *Pediatric hematology and oncology* 2000; 17: 687-93.
43. Kassab-Chekir A, Laradi S, Ferchichi S et al. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2003; 338: 79-86.
44. Advani R, Sorenson S, Shinar E et al. Characterization and comparison of the red blood cell membrane damage in severe human alpha- and beta-thalassemia. *Blood* 1992; 79: 1058-63.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ เลขหน้า) หรือ ผลงานตามที่ได้คาดไว้ในสัญญาโครงการ

Kanitta Srinoun, Nuankanya Sathirapongsasuti, Kittiphong Paiboonsukwong, Malai

Wongchanchailert, Somporn Sretrirutchai, Suthat Fuchareon. MiR-144 controls oxidative stress tolerance of thalassemic erythroid cell via targeting NRF2 (submitted)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
 - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1. Oral presentation

- **Kanitta Muennu**, Kanokan Wongprad, Phoom Chairat, Ampika Kongkeaw, Somporn Sretrirutchai, Malai Wongchanchailert, Suthat Fuchareon. MiR-144 Modulates Oxidative Stress in Thalassemia via Targeting *NRF2*. The 1st ASEAN Congress on Medical Biotechnology and Molecular Biosciences, October 8-9 2015.

2. Poster presentation

- **Kanitta Srinoun**, Somporn Sretrirutchai, Malai Wongchanchailert, Suthat Fuchareon. Modulation of oxidative stress in thalassemia is contributed by miR-144 and its target NRF2. The 5th International biochemistry and molecular biology conference 2016. May 24-27, 2016.

การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ

1. Oral presentation

- **Kanitta Muennu**, Kanokwan Eadpeth, Kammarut Wongnavee, Nattanon Ruangsri, Warisara Sawas-urai, Somporn Sretrirutchai, Malai Wongchanchailert. MiR-144 controls oxidative stress and associates with anemia severity in thalassemia. The 31th Annual Meeting of Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, August 5-7, 2015. (2nd award)

- **Kanitta Srinoun**, Somporn Sretrirutchai, Malai Wongchanchailert, Suthat Fuchareon. miR-144 controls anti-oxidant production in K562 cell line. The 33th Annual Meeting of Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, August 5-7, 2017. (3th award)
- **Kanitta Srinoun**, Somporn Sretrirutchai, Malai Wongchanchailert, Suthat Fuchareon. miR-144 modulates oxidative stress tolerance in erythroblastic K562 cell line. The 1st National Conference on Health Sciences Research and Innovation. Mae Fah Luang University, December 7-8, 2017. (1st award)

2. Poster presentation

- **Kanitta Srinoun**, Somporn Sretrirutchai, Malai Wongchanchailert, Suthat Fuchareon. MiR-144 controls oxidative stress of thalassemia via its target NRF2. The 32th Annual Meeting of Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, August 3-5, 2016. (1st award)