อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของ CD95 ต่อการตายของเซลล์เม็ดเลือดแดงในพาหะธาลัสซีเมีย

CD 95 receptor-mediated apoptosis in thalassemia erythrocyte

อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย

Daniel Sagan

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 15 ส.ค. 2554
เลขทะเบียน 1578936
เลขเรียกหนังสือ 2 QP
ฉ
ต3245
2553

1 มิถุนายน 2553

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของ CD95 ต่อการตายของเซลล์เม็ดเลือดแดงในพาหะธาลัสซีเมีย

CD 95 receptor-mediated apoptosis in thalassemia erythrocyte

อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย

Daniel Sagan

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความร่วมมือของ นางสาวแน่งน้อย เจิมนิ่ม นิสิต ปริญญาโท สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ขอขอบคุณ Friederike Eckardt-Schupp, Institute for Radiation Biology, Helmholtz Center Munich ประเทศเยอรมัน ที่ให้ Jurkat cell lineเพื่อเป็นเซลล์ควบคุม และ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในโครงการนี้ อีกทั้งบุคคลอื่นที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย

Daneil Sagan

ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ: ผลของ CD95 ต่อการตายของเซลล์เม็ดเลือดแดงในพาหะธาลัสซีเมีย

CD 95 receptor-mediated apoptosis in thalassemia erythrocyte

ชื่อผู้วิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร. อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย

Dr. Daneil Sagan

หน่วยงานที่สังกัด: ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

หมายเลขโทรศัพท์: 0-5596-6257

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสาขา: เทคนิคการแพทย์

แหล่งทุนที่ได้รับและปีงบประมาณ: ทุนสนับสนุนงานวิจัยของคณะสหเวชศาสตร์

งบประมาณรายได้ ปี พ.ศ. 2551-2

จำนวนเงิน: 195,000 บาท

ระยะเวลาการทำวิจัย ตั้งแต่ 1 พฤศจิกายน 2551- 30 กันยายน 2553

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อภาษาไทย

การตายของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียมีผลต่อการรักษาสมดุลเม็ดเลือดแดงในร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียเกิดจากยีนผิดปกติที่ทำให้การสร้างโปรตีนโกลบินสายใดสายหนึ่ง ซึ่งเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงลดน้อยลงหรือสร้างไม่ได้ โกลบินที่จับคู่ไม่ได้และเหลือเป็นส่วนเกินจะสะสมอยู่ในเม็ดเลือดแดงทำให้เกิดพยาธิสภาพกับเซลล์ เม็ดเลือดแดงจึงแตกง่าย อายุสั้นและถูกทำลายง่ายในภาวะต่างๆเช่น ภาวะoxidative stress และ Osmotic shock ซึ่งภาวะเหล่านี้เหนี่ยวนำทำให้เกิดการแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียทำให้เกิดการตายแบบอีรพโตซีส จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีภาวะ oxidative stress สูง งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาบทบาทสำคัญของCD95บนผิวเม็ดเลือดแดง ที่มีผลต่อการตายของเม็ดเลือดแดง และอินซูลินในการป้องกันหรือยับยั้งการตายแบบอีรพโตซีสของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะoxidative stress เทียบกับภาวะปกติ โดยใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือด ด้วยเครื่อง Flowcytometry แสดงพบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะoxidative stress มีการแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดงลดลงถึง 38.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถูกเลี้ยงใน Ringer solution ที่มีอินซูลิน ซึ่งในภาวะปกติการแสดงออกของ phosphatidylserine ลดลงเพียง 3.4เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าอินซูลินสามารถป้องกันหรือยับยั้งการตายแบบอีรพโตซีสของ เซลล์

เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะoxidative stressได้ ข้อมูลที่ค้นพบดังกล่าวน่าจะมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย หรือโรคโลหิตจางชนิดอื่นในด้านการรักษาในอนาคต

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Suicidal death of Thalassemic red blood cell affects to balance of circulating erythrocytes in the body. Thalassemias result from the absent or reduced globin gene expression, which leads to imbalanced globin chains. The pathophysiology is predominantly determined by the amount of excess globin chains, which precipitate and cause oxidative damage in developing red cells (causing dyserythropoiesis) and in mature red cells (causing peripheral hemolysis). Eryptosis of Thalassemic red blood cells is triggered by erythrocyte injury after several stressors, including oxidative stress. Eryptosis is characterized by cell shrinkage, membrane blebbing, activation of proteases, and phosphatidylserine exposure at the outer membrane leaflet. Exposed phosphatidylserine is recognized by macrophages that engulf and degrade the affected cells. Enhanced eryptosis of thalassemic red blood cells thus leads to anemia. Accordingly, drugs interfering with eryptosis may prove useful in the treatment of anemia. The present study explored CD95 function and insulin inhibits with eryptosis. Erythrocyte phosphatidylserine exposure estimated from positive annexin V-binding cells by flowcytrometry. Under control conditions, thalassemic red blood cells non-oxidatives stress not significantly decreased percentage of erythrocyte phosphatidylserine exposure (3.4%) and thalassemic red blood cells oxidatives stress significantly decreased percentage of erythrocyte phosphatidylserine exposure (38.3%). In conclusion, insulin inhibited eryptosis of thalassemic red blood cells in oxidative stress.

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย	2
ขอบเขตของการศึกษาวิจัย	3
2 เนื้อเรื่อง	4
วิธีดำเนินการวิจัย	12
3 ผลการวิจัย	19
4 สรุปและข้อเสนอแนะ	25
บรรณานุกรม	27

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงชนิดและจำนวนของตัวอย่างในการวิจัย 12

ตารางที่ 2 แสดงความเข้มข้นของ lactate ต่อ ความเข้มข้นของอินซูลินที่เกิด การไกลโคไลซีส 15

ตารางที่ 3 แสดงความช่วงเข้มข้นของ tBOOH และ H_2O_2 ในการเหนี่ยวนำการตายแบบ อีริพโตซิส ของเซลล์ในภาวะ oxidative stress ของเซลล์เม็ดเลือดแดง 16

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์ของ apoptotic cell ของเม็ดเลือดแดง ที่ถูกการกระตุ้น ด้วย CH11 Fas-activating antibody ในความเข้มข้น และเวลาที่แตกต่างกัน 19

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต และเซลล์ตายของเม็ดเลือดแดงกลุ่มคนปกติ ต่อฤทธิ์ของอินซูลิน 20

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต และเซลล์ตายของเม็ดเลือดแดงกลุ่มของโรคธาลัสซีเมีย ต่อฤทธิ์ของ อินซูลิน 21

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบฤทธิ์ของ อินซูลิน ต่อการยับยั้งการตายแบบอีริพโตซิส ของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะ oxidative stress 22

ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การติดสีของ annexin v หรือ การแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย 23

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 โอกาสเสี่ยงของการมีลูกเป็นโรคเลือดจางธาลัสซีเมีย 6
รูปที่ 2 การกระตุ้น Apoptosis ผ่านทาง Death receptors 9
รูปที่ 3 การกระตุ้น Apoptosis ผ่านทาง Mitochondria pathway 10
รูปที่ 4 อินซูลินมีผลต่อกระบวนการต่างๆของเซลล์ที่ส่งผลให้เกิดการตายแบบอีริพโตซีส ของเซลล์ เม็ดเลือดแดง 11
รูปที่ 5 แสดงเครื่อง BD FACSCalibur Flow Cytometer;BDBiosciences,Heidel berg, Germany 18
รูปที่ 6 แสดงความแตกต่างของเฉลี่ยเปอร์เซนต์การติดสีของ annexin v หรือ การแสดงออกของ phosphatidylserineบนผิวเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะoxidative stress 23
รูปที่ 7 แสดงความแตกต่างของเฉลี่ยเปอร์เซนต์การติดสีของ annexin v หรือ การแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะปกติ 24

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

ธาลัสซีเมีย เป็นโรคโลหิตจางที่มีสาเหตุมาจากมีความผิดปกติทางพันธุกรรมของการสังเคราะห์เฮโมโกลบินที่เกิดจากความเปลี่ยนแปลงในอัตราการสร้างสายโปรตีนโกลบิน การที่มีอัตราการสร้างสายโกลบินชนิดหนึ่งๆ หรือหลายชนิดลดลงจะรบกวนการสร้างเฮโมโกลบินและ ทำให้โกลบินที่จับคู่ไม่ได้และ เหลือเป็นส่วนเกินจะสะสมอยู่ในเม็ดเลือดแดงทำให้เกิดพยาธิสภาพกับ เซลล์ เม็ดเลือดแดงจึงแตกง่าย ผู้ป่วยจะมีอาการซีด เหลือง ตับและม้ามโต เพราะเม็ดเลือดแดงอายุสั้นและถูกทำลายง่าย ส่งผลให้การทำงานของอวัยวะต่าง ๆ บกพร่องและเกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ตามมามากมาย ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้จึงมีภาวะโลหิตจาง โรคนี้ถ่ายทอดมาจากพ่อและแม่ทางพันธุกรรมพบได้ทั่วโลก และพบมากในประเทศไทยด้วยเช่นกัน[1-3].

ธาลัสซีเมีย เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญประการหนึ่งของประเทศไทย ขณะนี้พบประชากรไทยที่เป็นพาหะของธาลัสซีเมียชนิดใดชนิดหนึ่ง ถึงร้อยละ 30-40 หรือประมาณ 20 ล้านคน เมื่อพาหะแต่งงานกัน และเป็นชนิดที่เป็นพวกเดียวกัน อาจมีลูกเป็นโรคได้ พบว่าในประเทศไทยมีคนเป็นโรคธาลัสซีเมียมาก ถึงร้อยละ 1 หรือประมาณ 6 แสนคน และมีทารกเกิดใหม่เป็นโรคนี้ถึงปีละประมาณ 12,000 ราย ทำให้สูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลมากกว่า ปีละ 1,000 ล้าน บาทต่อปี[4-5].

ปัจจุบันยังมีเด็กเกิดใหม่ที่เป็นโรคนี้อีกมากซึ่งมีอากรซีดเหลือง(ดีซ่าน) ตัวเล็กไม่สมอายุ หน้าตาแปลก คือ หน้าผากใหญ่ โหนกแก้มสูง จมูกบาน ท้องโต เพราะตับม้ามโต ซึ่งอาจคลำได้ก้อนแข็ง ไม่มีแรงเพราะโลหิตจาง เป็นไข้บ่อยเพราะติดเชื้อง่าย ในรายที่ซีดมาก ต้องรักษาโดยการให้เลือดเป็นระยะๆ ให้มากพอตั้งแต่เด็กๆ เพื่อป้องกันความพิการต่างๆ แต่ต้องให้ยาขับเหล็กออกจากร่างกายตลอดชีวิตด้วย เพราะผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ทั้งที่ได้รับการถ่ายเลือดและไม่ได้รับการถ่ายเลือด จะสะสมเหล็กไว้ในร่างกายมากเกิน ก่อให้เกิดอันตรายกับอวัยวะต่างๆ เช่น ทำให้ตับแข็ง ทำให้เป็นพังผืดในหัวใจ ทำให้หัวใจวาย ทำให้เป็นเบาหวาน ฯลฯ ซึ่งทั้งการให้เลือดและการให้ยาขับเหล็ก เป็นเรื่องที่ราคาแพงมากและเสี่ยงต่อการได้รับเลือดที่ไม่ปลอดภัย โดยเฉพาะประเทศไทยซึ่งมีผู้ป่วยจำนวนมาก ยังเป็นไปไม่ได้ที่ผู้ป่วยธาลัสซีเมียทั้งประเทศที่สมควรจะได้รับการรักษาที่ดีที่สุด จึงจำเป็นที่จะต้องทำแผนควบคุมโรคธาลัสซีเมีย[4, 7-8]

ดังนั้นในการศึกษาการปรับการตายหรือการถูกทำลายของเม็ดเลือดแดงผู้ป่วยธาลัสซีเมียอาจเป็นส่วนสำคัญในการพัฒนาการทำแผนในการรักษาผู้ป่วยธาลัสซีเมียให้ได้รับการ

รักษาที่ดี มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นและไม่ทุกข์ทรมานต่อไปในอนาคต ซึ่งการตายของเซลล์เม็ดเลือดแดงแบบอะพอพโตซีส หรือที่เรียกว่า อีริพโตซีส (eryptosis) ในเม็ดเลือดแดงธาลัศซีเมียมักมีสาเหตุมาจากการเกิดภาวะออกซิเดทีพ การเกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโตซีสของเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้นมีลักษณะคล้ายกับการตายแบบอะพอพโตซีสของเซลล์ที่มีนิวเคลียสอื่นๆ โดยที่บนผิวม็ดเลือดแดงก็มี death receptor คือ death receptor CD95 หรือ Fas death receptor ที่เป็นตัวกลางในการเกิดการตายแบบอะพอพโตซีสของเซลล์ที่มีนิวเคลียสด้วยเหมือนกัน อย่างไรก็ตามหน้าที่ของ death receptor CD95 ในการเกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโตซีสของเซลล์เม็ดเลือดแดงยังไม่ได้รับการศึกษาวิเคราะห์ในเชิงลึกมากนัก อีกนัยหนึ่งมีกลุ่มนักวิจัยได้การศึกษากระบวนการตายแบบอะพอพโตซีสในการกระตุ้นผ่านทาง CD95 pathway โดยใช้ agonistic antibody (Berg et al., 2001) เพราะฉะนั้นถ้าการกระตุ้น death receptor CD95 โดยใช้ agonistic antibody สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซีสได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงต้องการศึกษาถึงบทบาท death receptor CD95 ของเซลล์เม็ดเลือดแดงว่าจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซีสของเซลล์เม็ดเลือดแดง ที่เรียกว่า อีริพโตซีส(eryptosis)และอาจ มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย ซึ่งเป็นเป้าหมายแรกของการศึกษาในครั้งนี้

เป้าหมาย ที่ สอง ของ การ ศึกษานี้คือการศึกษาการลดลงของการตายแบบอะพอพโตซีสของเซลล์เม็ดเลือดแดง ที่เรียกว่า อีริพโตซีส(eryptosis) ในเซลล์ เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย เนื่องจากมีงานวิจัยมากมาย แนะนำ ว่า อินซูลิน อาจ ป้องกัน เซลล์จาการตายแบบอะพอพโตซีสโดย การลดภาวะ oxidative stress ใน เซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ และอินซูลิน สามารถกระตุ้นการเกิดไกลคไลซีสของเซลล์ เม็ดเลือด [9]ความ รู้ นี้ จึงเป็นเหตุผลพื้นฐานในการศึกษาถึงบทบาทของอิน ซูลินที่สามารถลดหรือป้องกัน เซลล์เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย จาการตายแบบอะพอพโตซีสโดย การลดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือด แดง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซีสในเซลล์ เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย.

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาบทบาทและการทำงานของ death receptor CD95 ในการเกิดกระบวน การตายแบบอะพอพโตซีสในเซลล์ เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย.

2. เพื่อศึกษาบทบาทของอินซูลินที่มีผลต่อการลด หรือป้องกัน เซลล์เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย จาการตายแบบอะพอพโตซีสโดย การลดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือด แดง

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษากระบวนการตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์ เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย ถึงบทบาทและการทำงานของ death receptor CD95 ในการเป็นตัวกลางการเกิดกระบวน การตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์ เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย และบทบาทของอินซูลินที่มีผลต่อการลด หรือป้องกัน เซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย จากการตายแบบอีริพโตซีส โดย การลดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือดแดง ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่เป็นโรคธาลัสซีเมียจากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาถึงกระบวนการตายแบบอะพอพโตซีสในเซลล์ เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย นำไปปรับปรุง หรือพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วยธาลัสซีเมียต่อไป

บทที่ 2

เนื้อเรื่อง

1. โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia)

โรคธาลัสซีเมีย (thalassemia) เป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย คนไทยร้อยละ 1 หรือประมาณ 600,000 คน เป็นโรคธาลัสซีเมีย และร้อยละ 40 ของประชากรไทยเป็นพาหะของโรค แต่ก็ไม่ได้หมายความว่าผู้ป่วยทุกคนจะต้องมีอาการรุนแรงเสมอไป ผู้ป่วยส่วนใหญ่กว่า 5 แสนคนจะเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินเอช ซึ่งเกิดจากแอลฟ่า 1 ผนวกกับแอลฟ่า 2 หรือแอลฟ่า 1 ผนวกกับฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง โดยจะมีอาการซีดตั้งแต่เล็กน้อยจนถึงปานกลาง

ภาวะธาลัสซีเมียพบมากในประเทศไทย และพบได้ทั่วโลก ภาวะธาลัสซีเมียที่พบในบางประเทศเกือบทั้งหมด เป็นแบบเดียวกัน แต่ในประเทศไทยมีความหลากหลายมาก จากการสำรวจภาวะธาลัสซีเมียในประเทศไทยสามารถแบ่งเป็นพวกใหญ่ๆ ที่สำคัญ 2 พวกคือ

พวกที่ 1 - แอลฟ่า-ธาลัสซีเมีย พบมากได้แก่

พาหะของแอลฟ่า-ธาลัสซีเมีย 1 พบประมาณร้อยละ 5

พาหะของแอลฟ่า-ธาลัสซีเมีย 2 พบประมาณร้อยละ 16

พาหะของฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง พบประมาณร้อยละ 4

พวกที่ 2 - เบต้า-ธาลัสซีเมีย

พาหะของเบต้า-ธาลัสซีเมีย พบประมาณร้อยละ 5

พาหะของฮีโมโกลบินอี พบประมาณร้อยละ 13

ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินที่ผิดปกติ

ในเลือด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีเม็ดเลือดแดงประมาณ 5 ล้านเซลล์ ในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์มีสารสีแดงที่เรียกว่าฮีโมโกลบินประมาณ 300 ล้านโมเลกุล โครงสร้างของโมเลกุลของฮีโมโกลบีนควบคุมโดยยีนความผิดปกติที่ยีนแม้น้อยนิดก่อให้เกิดความผิดปกติในการสร้างฮีโมโกลบิน

ความผิดปกติในการสร้างฮีโมโกลบิน โดยเกิดเป็นฮีโมโกลบินชนิดผิดปกติ ที่พบแล้วกว่า 1000 ชนิด ในประเทศไทยก็พบหลายชนิด เช่น ฮีโมโกลบิน ศิริราช ฮีโมโกลบินอานันทราช ฮีโมโกลบินสยาม ฮีโมโกลบินธนบุรี ฮีโมโกลบินตาก ฯลฯ แต่ที่พบบ่อยในประเทศไทย คือ ฮีโมโกลบินอี (Hb E) และ ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์ สปริง (Hb Constant Spring)

ส่วนธาลัสซีเมีย หมายถึงความผิดปกติในการสร้างโปรตีนอันเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลของฮีโมโกลบิน โดยร่างกายสร้างได้น้อยไป ธาลัสซีเมียมีชนิดใหญ่ๆอยู่ 2 ชนิด สุดแล้วแต่เส้นโปรตีนใดที่น้อยไป คือแอลฟ่าธาลัสซีเมีย (α-thalassemia) และเบต้า ธาลัสซีเมีย (β-thalassemia) ทั้งแอลฟ่าและเบต้าธาลัสซีเมีย ยังมีชนิดแยกย่อยลงไปอีกมาก เมื่อกล่าวถึงธาลัสซีเมียจะหมายรวมถึงทั้งธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินที่ผิดปกติเพราะมีความสัมพันธ์กัน

อาการของโรคธาลัสซีเมียโรคธาลัสซีเมีย มีความรุนแรงต่างกันได้มาก อาจแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้ดังนี้

1. ฮีโมโกลบินบาร์ทไฮดรอพส์ฟิทัลลิส (Hb Bart's hydrops fetalis) เป็นชนิดที่รุนแรงที่สุด จะตายทั้งหมด อาจตายตั้งแต่ในครรภ์ ตายขณะคลอด หรือหลังคลอดเล็กน้อย ทารกมีลักษณะบวมและซีด รกมีขนาดใหญ่ ท้องป่องตับโตมาก ส่วนแม่ที่ตั้งครรภ์ลูกที่เป็นโรคนี้ จะมีปัญหาแทรกซ้อนระหว่างตั้งครรภ์คือ ครรภ์เป็นพิษ มีความดันเลือดสูง บวม มักมีการคลอดที่ผิดปกติ และมีการตกเลือดหลังคลอดด้วย

2. เบต้า-ธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี (β-thalassemia/Hb E) และ โฮโมซัยกัส เบต้า-ธาลัสซีเมีย (Homozygous β-thalassemia) ผู้ป่วยกลุ่มนี้แรกเกิดปกติ จะเริ่มมีอาการได้ตั้งแต่ภายในขวบปีแรก หรือหลังจากนั้น โดยผู้เป็นโรคชนิดหลัง มักมีอาการรุนแรงกว่าชนิดแรก อาการสำคัญคือ ซีดอ่อนเพลีย ท้องป่อง ม้ามและตับโต กระดูกใบหน้าเปลี่ยน จมูกแบน โหนกแก้มสูง คางและขากรรไกรกว้างใหญ่ ฟันบนยื่น กระดูกบางเปราะหักง่าย ร่างกายแคระแกร็น เจริญเติบโตไม่สมอายุ ในรายที่ซีดมากจำเป็นต้องได้รับเลือด แต่เนื่องจากในเลือดมีธาตุเหล็กมาก ฉะนั้นหากผู้ป่วยได้รับเลือดบ่อย ๆ จะเกิดภาวะแทรกซ้อน ที่สำคัญคือ มีธาตุเหล็กเกิน ไปสะสมในอวัยวะต่างๆ มีผลทำให้ผิวคล้ำ เป็นตับแข็ง เบาหวาน หัวใจล้มเหลว เป็นต้น นอกจากนี้ผลจากการสลายของเม็ดเลือดแดง ยังอาจพบนิ่วในถุงน้ำดีด้วย

3. โรคฮีโมโกลบินเอ็ช (Hb H disease) ส่วนใหญ่มีอาการน้อย ยกเว้นบางรายอาการรุนแรงคล้ายเบต้า-ธาลัสซีเมียได้ ผู้ป่วยซีดเล็กน้อย บางครั้งมีเหลืองเล็กน้อยร่วมด้วย ทำให้เข้าใจผิดคิดว่าเป็นโรคตับหรือโรคดีซ่าน หากมีไข้ติดเชื้อ ผู้ป่วยพวกนี้จะซีดลงได้มากและเร็ว จนทำให้หัวใจวายได้

ผู้มียีนแฝงอยู่หรือเป็นพาหะ

ผู้มียีนแฝงอยู่หรือเป็นพาหะ คือผู้ที่มียีนหรือสารพันธุกรรมผิดปกติ ที่ทำให้เป็นโรคธาลัสซีเมียแฝงอยู่ บุคคลเหล่านี้จะมีสุขภาพปกติเหมือนคนทั่วไป ไม่ถือว่าเป็นโรค จะมีชีวิตยืนยาวเหมือนบุคคลอื่นๆ แต่สามารถถ่ายทอดยีนธาลัสซีเมียต่อไปให้ลูกได้ ในประเทศไทยมีประชากรที่เป็นพาหะหรือมียีนธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ แฝงอยู่ประมาณร้อยละ 40 หรือประมาณ 24 ล้านคน

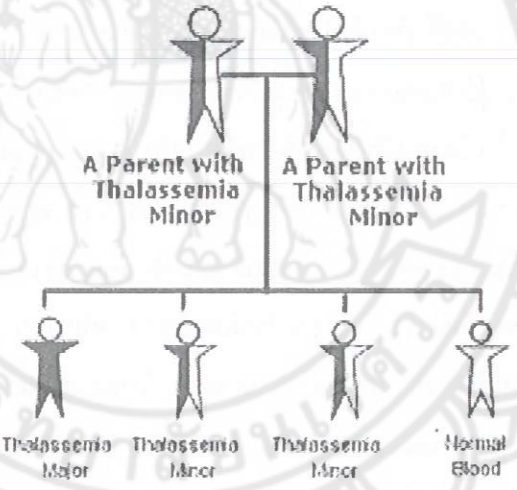
โอกาสเสี่ยงของการมีลูกเป็นโรคเลือดจางธาลัสซีเมีย (รูปที่1)

ถ้าทั้งพ่อและแม่มียีนแฝง (พาหะทั้งคู่) ในการตั้งครรภ์แต่ละครั้งโอกาสที่ลูกจะเป็นโรคเท่ากับร้อยละ 25 หรือ 1 ใน 4 โอกาสที่ลูกจะเป็นพาหะเท่ากับร้อยละ 50 หรือ 2 ใน 4 ในการตั้งครรภ์แต่ละครั้งโอกาสที่จะมีลูกไม่มียีนแฝงเท่ากับร้อยละ 25 หรือ 1 ใน 4

ถ้าพ่อหรือแม่เป็นยีนแฝง (พาหะ) เพียงคนเดียว โอกาสที่ลูกจะเป็นยีนแฝงเท่ากับร้อยละ 50 หรือ 2 ใน 4 โอกาสที่จะมีลูกปกติเท่ากับร้อยละ 50 หรือ 2 ใน 4

ถ้าพ่อหรือแม่เป็นโรคเลือดจางธาลัสซีเมียเพียงคนเดียว และอีกฝ่ายมียีนปกติ ในการตั้งครรภ์แต่ละครั้งลูกทุกคนจะมียีนแฝง หรือเท่ากับร้อยละ 100

ถ้าพ่อหรือแม่เป็นโรคธาลัสซีเมียเพียงคนเดียว และอีกฝ่ายมียีนแฝง ในการมีครรภ์แต่ละครั้งโอกาสที่ลูกจะเป็นโรคเท่ากับร้อยละ 50 หรือ 2 ใน 4 โอกาสที่ลูกจะมียีนแฝงเท่ากับร้อยละ 50 หรือ 2 ใน 4



รูปที่ 1 โอกาสเสี่ยงของการมีลูกเป็นโรคเลือดจางธาลัสซีเมีย

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย อาศัยลักษณะประวัติอาการเจ็บป่วย ประวัติญาติพี่น้องในครอบครัว ตรวจร่างกายพบว่าซีด ตับม้ามโต รวมทั้งการตรวจเลือดพบเม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะผิดปกติ หรือตรวจพบซนิดของฮีโมโกลบินที่ผิดปกติ

แนวทางการรักษา

การรักษาพื้นฐาน คือ การให้เลือด และการให้ยาขับเหล็ก

การให้เลือด เนื่องจากประเทศไทยมีผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวนมาก จึงมีปัญหาที่ไม่สามารถให้เลือดผู้ป่วยที่ควรได้รับเลือดทุกคนอย่างเต็มที่ ส่วนการให้ยาขับเหล็ก ผู้ป่วยควรได้รับยาขับเหล็กเพื่อขจัดภาวะเหล็กเกิน เพราะภาวะเหล็กเกินก่อให้เกิดพยาธิสภาพหลายแห่ง ปัญหาคือ ยาขับเหล็กมีราคาแพง และการให้ก็ยากลำบาก desferrioxamine เป็นยาขับเหล็กตัวเดียวที่ใช้กันมา 3 ทศวรรษ การบริหารยานี้ต้องใช้เครื่องฉีดติดตัวที่สามารถฉีดเข้าใต้ผิวหนังต่อเนื่องอัตโนมัติ ในระยะหลังมีการใช้ยา L1 ที่เพิ่งออกวางตลาด

การรักษาด้วยการกระตุ้มการสร้าง Hb F ทั้งนี้เนื่องจากผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีการสร้าง Hb F มาก เม็ดเลือดแดงจะมีอายุมากขึ้น ทำให้ระดับฮีโมโกลบินสูง ปัจจุบันมียา 3 ตัว ที่กระตุ้นการสร้าง Hb F ได้แก่ hydroxyurea, butyrate และ erythropoietin การใช้ยาเหล่านี้ตัวใดตัวหนึ่ง ทำให้ผู้ป่วยธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินสูงขึ้น ทำให้สบายขึ้น ลดหรือขจัดการต้องถ่ายเลือดให้

การรักษาให้หายจากโรคธาลัสซีเมีย ได้แก่ การปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) การรักษาด้วยสเต็มเซลล์ (stem cell) และการรักษาด้วยยีน (gene therapy)

ปัญหาของการปลูกถ่ายไขกระดูก

คือ ทำได้ยาก ราคาแพงประมาณ 1 ล้านบาทต่อราย และทำได้น้อยคน ส่วนการรักษาโดยใช้สเต็มเซลล์ ซึ่งใช้วิธีการแยกเซลล์ตัวอ่อนจากไขกระดูก เลี้ยงเพิ่มจำนวน แล้วฉีดเข้าไปในร่างกายใหม่ ได้เซลล์จำเพาะ เพื่อให้เซลล์สร้างเม็ดเลือดแดงได้ ขณะนี้มีการศึกษาวิจัยทางคลินิก ค่ารักษาจะถูกกว่าการเปลี่ยนไขกระดูกประมาณ 2 แสนบาทต่อราย

สำหรับการรักษาด้วยยีนนั้น ขณะนี้ทำได้แล้วในสัตว์ทดลอง จึงเป็นไปได้ว่าในอนาคตจะสามารถรักษาผู้ป่วยธาลัสซีเมียให้หายขาดได้ด้วยการใช้ยีน

แนวทางการป้องกัน

วิธีการป้องกัน คือ ต้องให้ประชาชนตระหนักถึงความสำคัญของการตรวจคัดกรอง โดยเฉพาะคู่สมรสที่จะมีลูก ต้องมีการตรวจเลือดก่อน เป็นหลักการ คือ ให้รู้ล่วงหน้าว่าจะเป็นอะไรแล้วขึ้นอยู่กับการตัดสินใจว่าดำเนินการอย่างไร ถ้าไม่สร้างความตระหนักและไม่ควบคุม โรคธาลัสซีเมียก็จะขยายเพิ่มมากขึ้นไปอีก ขณะนี้สัดส่วนของประชากรไทย ร้อยละ 40 เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมีย ซึ่งถือว่าสูงมากและเป็นอันดับหนึ่งของโลก

ปัจจุบันประเทศไทยต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย ตั้งแต่หลายร้อยล้านบาท จนถึงพันล้านบาทต่อปี สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ (สปสช.) ได้เข้ามาสนับสนุนงบประมาณ 50 ล้านบาท และในปี 2550 จะเพิ่มเป็น 90 ล้านบาท

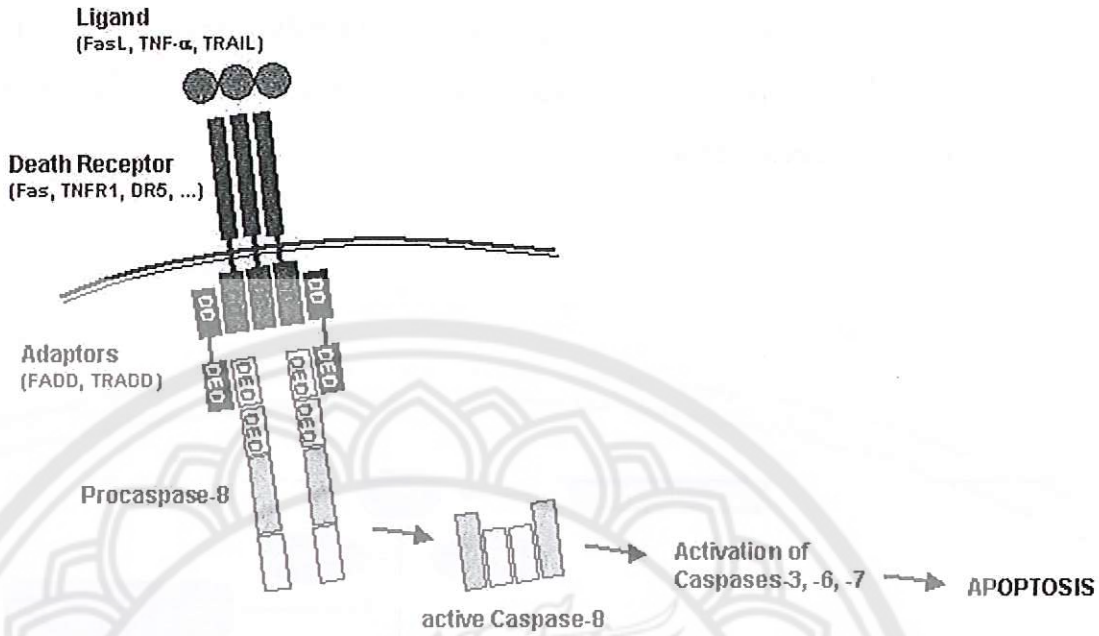
2.การตายแบบ Apoptosis

Apoptosis หรือ Programmed cell death เป็นการตายแบบจำเพาะของเซลล์ที่กำหนดไว้ใน genome โดยเกิดเหนี่ยวนำจากการส่งสัญญาณภายในเซลล์ หรือจากเซลล์อื่นๆ โดยทั่วไปแล้วการตายเซลล์ที่ตายแบบ Apoptosis จะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่สำคัญคือ เซลล์หดตัว (cell shrinks) ซึ่ง chromatin อัดกันแน่น (chromatin condenses) บริเวณ nuclear membrane และ plasma membrane มีลักษณะเป็นถุงเรียกว่า blebbing หรือ budding สุดท้ายเซลล์จะแตกและถูกห่อหุ้มด้วย membrane ที่เรียกว่า apoptotic bodies ซึ่งภายในจะมี condensed chromatin และ organelles ต่างๆ แล้วสุดท้าย apoptotic bodies จะถูกกินโดย macrophage ในร่างกายได้

การตายแบบ apoptosis จะเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยสัญญาณการชักนำให้เกิดการตาย ซึ่งมี 2 แบบ คือ สัญญาณที่มาจากภายนอกเซลล์ (Extrinsic apoptosis) และสัญญาณที่มาจากภายใน(Intrinsic apoptosis) ทั้งนี้การตายแบบ apoptosis มีกลไกการทำงานที่สัมพันธ์กันเป็น pathway network ดังนี้

1 .Death receptor pathway

Death receptor pathway (รูปที่ 2) เป็นการทำงานของตัวส่งสัญญาณเรียกว่า Death receptors ส่วนมากจะเป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ เช่น Fas receptor (Fas R, Fas/CD95), Tumor necrosis factor receptor (TNFR) และ DR5 เป็นต้น ตัวสัญญาณที่จะเหนี่ยวนำเรียกว่า Ligand เช่น Fas ligand (FasL), Tumor necrosis factor - α (TNF- α) และ TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) เป็นต้น การจับกันของ receptor และ ligand ทำให้เกิดลักษณะการเชื่อมต่อของ Death domain (DD) และ Death effector domain (DED) เกิดกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า Death –inducing signaling complexes (DISC) (Hennino and Berard, 2000) ซึ่ง DISC จะไปย่อย procaspase -8 ให้เป็น caspase -8 ซึ่งทำหน้าที่ไปกระตุ้นเอ็นไซม์ caspase ตัวอื่นต่อไป นอกจาก caspase - 8 ไปกระตุ้นเอ็นไซม์ caspase ตัว อื่นแล้ว caspase - 8 ยังไปตัดโปรตีน BH3 interacting domain death agonist (BID) ให้เป็น BID ทั้งนี้ BID ที่ได้จะไปจับกับ Bcl2 -associated X protein(BAX) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผิวของ mitochondria แล้วกระตุ้นการตายผ่าน Mitochondria pathway ต่อไป

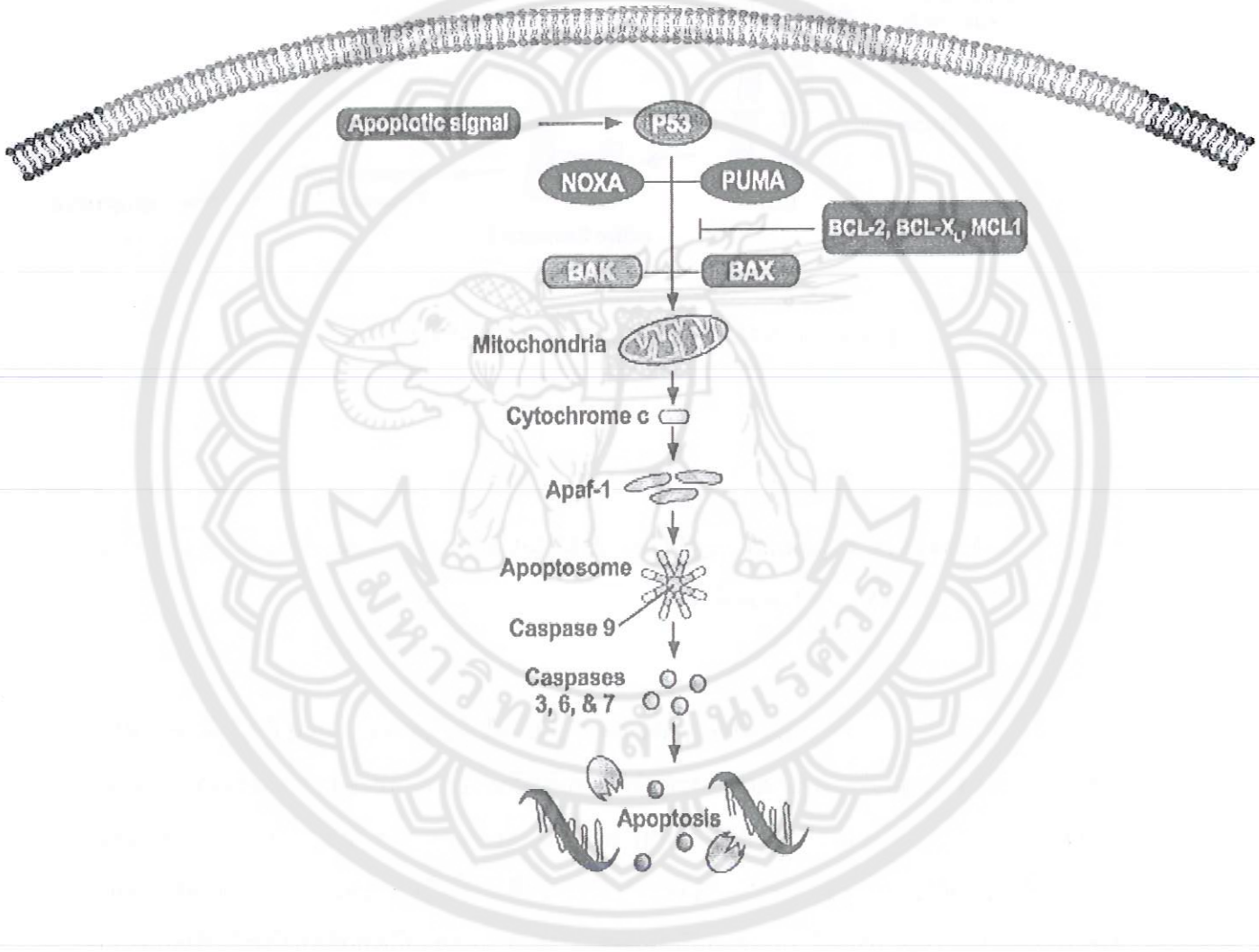


รูปที่ 2 การกระตุ้น Apoptosis ผ่านทาง Death receptors

2. Mitochondria pathway (รูปที่ 3) สามารถเกิดผ่าน caspase dependent pathway และ caspase independent pathway ดังนี้

Caspase-dependent pathway เป็นกลไกที่เกิดขึ้นจากความผิดปกติของ DNA และโปรตีน ภายในเซลล์ที่ก่อให้เกิดการกระตุ้นให้ระดับโปรตีน p53 เพิ่มขึ้น เนื่องจาก murine double minute 2 (mdm2) ไม่สามารถจับกับ p53 ได้เพราะถูกขัดขวางด้วย p19 protein และ Alternative reading frame (p19 ARF) จึงทำให้ p53 เป็นอิสระมีปริมาณเพิ่มขึ้น ความผิดปกติของโปรตีนมีผลทำให้ p53 มากคล้ายกับความผิดปกติของ DNA แต่ความผิดปกติของโปรตีนนั้นเกิดจากการ ทำงานที่ผิดปกติ ของ Transcription factor E2F (Lundberg and Weinberg,1999) ซึ่งจะกระตุ้นการทำงานของ p19 ARF ซึ่งจะขัดขวางการจับของ mdm2 กับ p53 แล้วทำให้ p53 เป็นอิสระมีปริมาณมาก จากนั้น p53 จะเป็น Transcription factor ในการสร้างโปรตีน p21WAF 1 และ BAX โปรตีนโดย p21WAF 1 จะทำหน้าที่หยุด cell cycle ส่วน BAX จะจับ ที่ผิวของไมโตคอนเดรีย ทำให้เกิด mitochondria transmembrane potential ซึ่งมีผลเกิดการปล่อย cytochrome C ในไมโตคอนเดรียออกมาจับกับ Apaf -1 (Apoptosis protease activating factor1) เกิดเป็นโครงสร้างใหม่ที่

เรียกว่า apoptosome โดย apoptosome จะไปกระตุ้น procaspase - 9 เป็น caspaes - 9 แล้วจึงไป กระตุ้น procaspase - 3 เป็น caspase - 3 และ caspase - 6 ใหม่ฤทธิ์ทำลายโปรตีนทั้งในเซลล์ และในนิวเคลียสได้

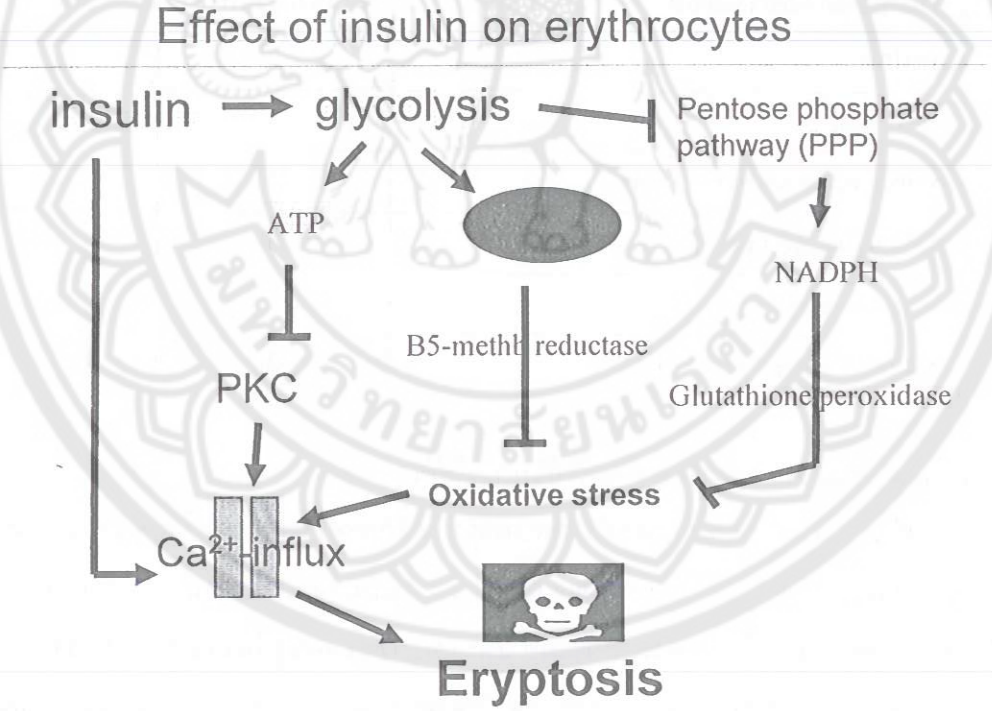


รูปที่ 3 การกระตุ้น Apoptosis ผ่านทาง Mitochondria pathway

3. **บทบาทของอินซูลินต่อการเกิดเกิดการตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์ เม็ดเลือดแดง**

อินซูลิน เป็นฮอร์โมนที่ไปกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์และลดความเข้มข้นของน้ำตาลในเลือด เร่งการเกิดกระบวนการ glycolysis (รูปที่ 4)

- glycolysis เป็นกระบวนการสลาย glucose ที่เกิดขึ้นต่อเนื่องหลายขั้นตอนให้เกิดเป็น pyruvate โดยจะได้พลังงานทั้งในรูป ATP และ NADH (ซึ่งเก็บพลังงานเคมีไว้ในตัว)
- ATP เป็นพลังงาน ทีมีผลไปยับยั้งการทำงานของ Protein kinase ซึ่งมีผลต่อการนำ Ca2+-influx เข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบอีริพโตซีส
- NADH เข้าสู่กระบวนการ Methemoglobin ช่วยลดการเกิด Oxidative stress จากการไม่สมดลของการสร้างฮีโมโกลบินของเซลล์เม็ดเลือดแดง



รูปที่ 4 อินซูลินมีผลต่อกระบวนการต่างๆของเซลล์ที่ส่งผลให้เกิดการตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์ เม็ดเลือดแดง

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ศึกษาเป็นตัวอย่างเลือดที่ใส่ EDTA (Ethylenediaminetetra-acetate) เป็นสารกันเลือดแข็งของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และคนปกติ จากห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 15 ราย ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่1 แสดงชนิดและจำนวนของตัวอย่างในการวิจัย

ชนิดของตัวอย่างเลือด	จำนวน (ราย)
คนปกติ	3
Hb E trait	3
Alpha thalassemia – 1 trait	3
Beta thalassemia trait	3
Hb H disease	3
Beta thalassemia / Hb E	3

2. สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษากระบวนการตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์ เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย ถึงบทบาทและการทำงานของ death receptor CD95 ในการเป็นตัวกลางการเกิดกระบวน การตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์ เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย และบทบาทของอินซูลินที่มีผลต่อการลด หรือป้องกันเซลล์เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย จากการตายแบบอีริพโตซีส โดย การลดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือด แดง โดยเทคนิคโฟลไซโตมิเตอร์ ซึ่งวิเคราะห์กระบวนการตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย โดยใช้ annexin V – FITC วัดการเกิด phosphatidrinylse บนผิวเม็ดเลือดแดง

3. วิธีการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดทั้งคนปกติ และผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จำนวน 15 ตัวอย่าง จากห้องปฏิบัติการ งานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร และเซลล์ Jurkat cells สำหรับเพาะเลี้ยง (Cell lines) เพื่อใช้เป็น controlในการวิจัย จาก Friederike Eckardt-Schupp, Institute for Radiation Biology, Helmholtz Center Munich.ประเทศเยอรมัน

3.2 การเตรียมตัวอย่างเม็ดเลือดแดง

การแยกเม็ดเลือดแดงให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสำหรับแยกเม็ดเลือดขาว Lymphoprep™(NYCOMED AS, Norway) เพื่อกำจัดเม็ดเลือดขาว ขั้นตอนการแยกปฏิบัติตามวิธีผู้ผลิต คือ นำตัวอย่างเลือดมาผสมกับน้ำเกลือในอัตราส่วน 1:1 พร้อมทั้งเตรียมน้ำยา Lymphoprep ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ในปริมาณ 3 ส่วน ต่อ ตัวอย่างเลือด 1 ส่วนทำการปั่นแยก (centrifuge) ด้วยความเร็ว 1,000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกชั้นต่างๆ ของเลือด หลังจากปั่นแยกครบ 10 นาทีแล้ว ดูดชั้นบนสุดเป็นของเหลวใสและถัดลงมาเป็นชั้นบางๆสีขาว (buffy coat layer) เป็นตำแหน่งของเม็ดเลือดขาว ทิ้งไปให้เหลือส่วนที่เป็นเม็ดเลือดแดงที่ตกลงมาอยู่บริเวณส่วนล่างของหลอดทดลอง แล้วปั่นล้างด้วย phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 ความเร็ว 1,000 g เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง

3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ Jurkat cells

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-cell(Jurkat) ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด RPMI 1640 with L-glutamine (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA) ที่มี 10%FBS, 100 U/ml ของ penicillin และ100 µg/ml ของ streptomycin ใน 5% Co_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.4 ขั้นตอนการวิจัย

3.4.1 การศึกษาบทบาท และหน้าที่ ของ death receptor CD95 ต่อการตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์เม็ดเลือดแดง

3.4.1.1 กระตุ้น death receptor CD95 บนผิวเม็ดเลือดแดงด้วย CH11 Fas-activating antibody

นำเซลล์เม็ดเลือดแดงมาปรับจำนวนเซลล์เป็น 1.0×10^6 เซลล์/มล. ด้วย Ringer solution (ประกอบด้วย (หน่วยมิลลิโมล): 125 NaCl, 5 KCl, 1 $MgSO_4$, 32 HEPES / NaOH(pH 7.4), 5 glucose, 1 $CaCl_2$) แล้วเติม 300ไมโครลิตร

ของเซลล์ลงใน หลอดทดลอง ที่มี agonistic antibody CH11(Millipore, Billerica, MA) โดยให้ความเข้มข้นเป็น 0, 100, 300 และ 500 ng / ml. นำเซลล์ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5%CO_2 นาน 24, 48, และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบแต่ละช่วงเวลาทำการเก็บเซลล์เพื่อมาดูการแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดง การทดลองนี้มี positive control คือ การเหนี่ยวนำเซลล์เม็ดเลือดแดงให้มีการแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดง ด้วย 1ไมโครโมลาร์ ของ ionomycin นำเซลล์ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

3.4.1.2 กระตุ้น death receptor CD95 บนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-cell(Jurkat) ด้วย CH11 Fas-activating antibody

นำ Jurkat cell lines ที่เลี้ยงไว้มาปรับจำนวนเซลล์เป็น1.0 x 10^6 เซลล์/มล. ด้วย completed RPMI-1640 แล้วเติม 1000 ไมโครลิตร ของเซลล์ลงใน 24-well flat-bottom culture plate ที่มี agonistic antibody CH11(Millipore, Billerica, MA) โดยให้ความเข้มข้น เป็น 0, 30, และ 50 ng / ml. นำเซลล์ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5%CO_2 นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์เพื่อมาดูการแสดงออกของ phosphatidylserine ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนการควบคุมคุณภาพของ agonistic antibody CH11

3.4.2 ทดสอบฤทธิ์ของอินซูลินต่อการยับยั้งการตายแบบอีริพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย จากภาวะ oxidative stress

3.4.2.1 ทดสอบการเกิดไกลโคไลซิสของอินซูลินของเซลล์เม็ดเลือดแดง

การตรวจสอบการเกิดไกลโคไลซีสทำได้โดยการวัดปริมาณ Lactate หลังจากใส่อินซูลินในหลอดทดลองของเซลล์เม็ดเลือดแดง ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติ (Hitachi 912, Roche)

นำเซลล์เม็ดเลือดแดงมาปรับจำนวนเซลล์เป็น 8-10% hematocrit ด้วย Ringer solution (ประกอบด้วย (หน่วยมิลลิโมล): 125 NaCl, 5 KCl, 1 $MgSO_4$,

1558526
สำนักหอสมุด
15 ส.ค. 2554

32 HEPES / NaOH(pH 7.4), 5 glucose, 1 $CaCl_2$) จำนวน 40 มิลลิลิตร แล้วแบ่งเป็น 4 หลอดทดลอง หลอดทดลองละ 10 มิลลิลิตร แล้วเติมอินซูลิน โดยให้ความเข้มข้นเป็น 0, 10, 100, และ1,000 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ นำเซลล์ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5%CO_2 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ของแต่ละหลอดทดลองที่ 1, 2, 3, และ 4 ชั่วโมง โดยเก็บครั้งละ 2 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนนำส่วนใสมา วัดปริมาณ Lactate ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารเคมีในเลือดอัตโนมัติ (Hitachi912, Roche)

ตารางที่ 2 แสดงความเข้มข้นของ lactate ต่อ ความเข้มข้นของอินซูลินที่เกิด การไกลโคไลซีส

ตัวอย่างการทดลอง	ความเข้มข้นของ Lactate (mg/dl)			
	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 4
1. RBC10 ml + 0 mM insulin	0.16	0.16	0.22	0.32
2. RBC 10 ml +10 mM insulin	0.22	0.25	0.41	0.47
3. RBC10 ml + 100 mM insulin	0.25	0.25	0.35	0.22
4. RBC10 ml+1000 mM insulin	0.25	0.22	0.35	0.25

ความเข้มข้นของอินซูลินที่ 10 mM เป็นความเข้มข้นที่ใช้สำหรับการทดสอบในงานวิจัยนี้โดยเกิดการไกลโคไลซีสภายใน 3 ชั่วโมง ดังตารางที่ 2

3.4.2.2 ทดสอบฤทธิ์ของ tBOOH และ H_2O_2 ต่อการเหนี่ยวนำการตายแบบอีริพโตซิสในภาวะ oxidative stress ของเซลล์เม็ดเลือดแดง

นำเซลล์เม็ดเลือดแดงมาปรับจำนวนเซลล์เป็น 8-10% hematocrit ด้วย Ringer solution (ประกอบด้วย (หน่วยมิลลิโมล): 125 NaCl, 5 KCl, 1 $MgSO_4$, 32 HEPES / NaOH(pH 7.4), 5 glucose, 1 $CaCl_2$) จำนวน 8 มิลลิลิตร แล้วแบ่งเป็น 8 หลอดทดลอง หลอดทดลองละ 1 มิลลิลิตร ใน

หลอดทดลองที่ 1 – 4 เติมสารละลาย tBOOH โดยให้ความเข้มข้นเป็น 0, 0.33, 0.66, และ 1.0 mM ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ปั่นแยกเอาส่วนใสออกแล้วเติม Ringer solution จำนวน 1 มิลลิลิตรลงไปใหม่ ส่วนหลอดทดลองที่ 5 – 8 เติมสารละลาย H_2O_2 ให้ความเข้มข้นเป็น 0, 1, 2, และ 4 mM หลังจากนั้น นำเซลล์ทั้ง 8 หลอดทดลองไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ของแต่ละหลอดทดลองมาดูการแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดง โดยใช้ positive control เป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูกเติมด้วย 1 µM ของ ionomycin ซึ่งมีคุณสมบัติเหนี่ยวนำทำให้เกิดการแสดงออกของ phosphatidylserine

ตารางที่ 3 แสดงความช่วงเข้มข้นของ tBOOH และ H_2O_2 ในการเหนี่ยวนำการตายแบบอีริพโตซิส ของเซลล์ในภาวะ oxidative stress ของเซลล์เม็ดเลือดแดง

Samples	Apoptotic cells number (%)
1.RBC 1 ml + 0 mM tBOOH	0.17
2.RBC 1 ml + 0.33 mM tBOOH	99.52
3.RBC 1 ml + 0.66 mM tBOOH	99.93
4.RBC 1 ml + 1 mM tBOOH	99.93
5.RBC 1 ml + 0 mM H_2O_2	0.39
6.RBC 1 ml + 1 mM H_2O_2	0.76
7.RBC 1 ml + 2 mM H_2O_2	0.86
8.RBC 1 ml + 4 mM H_2O_2	0.69
9. Positive control	99.5

จากตารางที่3 แสดงว่าความเข้มข้นของ tBOOH ที่ < 0.33 mM เป็นความเข้มข้นที่เพียงพอสำหรับการเหนี่ยวในการเหนี่ยวนำการตายแบบอีริพโตซิสของเซลล์ในภาวะ oxidative stress ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ส่วน H_2O_2ไม่สามารถเหนี่ยวนำได้

3.4.2.3 ทดสอบฤทธิ์ของ อินซูลิน ต่อการยับยั้งการตายแบบอีริพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะ oxidative stress จาก tBOOH

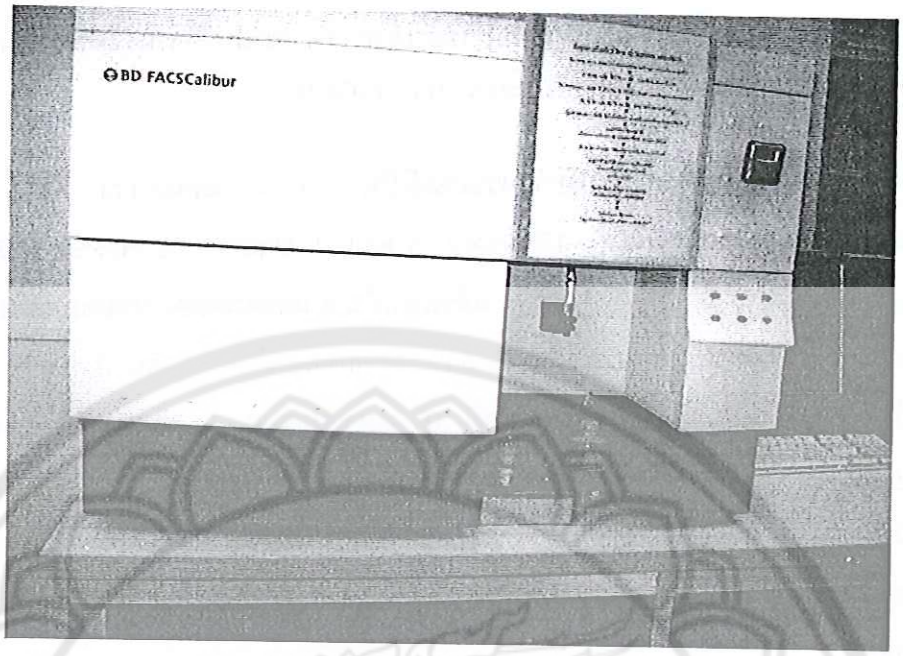
นำเซลล์เม็ดเลือดแดงมาปรับจำนวนเซลล์เป็น 8-10% hematocrit ด้วย Ringer solution (ประกอบด้วย (หน่วยมิลลิโมล): 125 NaCl, 5 KCl, 1 $MgSO_4$, 32 HEPES / NaOH(pH 7.4), 5 glucose, 1 $CaCl_2$) จำนวน 8 มิลลิลิตร แล้วแบ่งเป็น 8 หลอดทดลอง หลอดทดลองละ 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่ 1 – 4 ไม่ต้องเติมอินซูลิน ส่วนหลอดทดลองที่ 5 – 8 เติม10 mM ของ insulin แล้ว นำเซลล์ทั้ง 8 หลอดทดลองไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำเซลล์ทั้ง 8 หลอด มาเติมสารละลาย tBOOH โดยให้ความเข้มข้นเป็น 0, 0.02, และ 0.1 mM ลำดับ โดยเติมทั้งชุดที่มี และไม่มีอินซูลิน แล้วนำเซลล์ทั้ง 8 หลอดทดลองไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 17 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ของแต่ละหลอดทดลองมาดูการแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดง

3.4.2.4 การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดง

Phosphatidylserine โดยปกติจะอยู่ด้านในของ plasma membrane แต่เมื่อเซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโตซีส หรือ อีริพโตซีสของเซลล์เม็ดเลือดแดง จะถูกแสดงออกมาด้านนอกของ plasma membrane

3.4.2.4.1 การย้อมเซลล์ด้วย annexin v ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง

การย้อมเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย annexin v ที่ติดฉลากด้วยสารเรือง โดยใช้ชุด Annexin V-FITC apoptosis detection kit I (BD Biosciences) ขั้นตอนการย้อมปฏิบัติตามวิธีผู้ผลิต คือ นำเซลล์มาปั่นล้างด้วย phosphate-buffered saline (PBS) จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำมาปรับจำนวนเซลล์เป็น1.0 x 10^6 เซลล์/มล. ด้วย binding buffer (10 mM Hepes, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl2) แล้วแบ่งเซลล์มา 100 ไมโครลิตร แล้วเติม Annexin V-FITC จำนวน 5 ไมโครลิตร หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำมาเติมด้วย binding buffer อีก 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง Flowcytometry (รูปที่ 5) ภายใน 1 ชั่วโมง



รูปที่ 5 แสดงเครื่อง BD FACSCalibur Flow Cytometer;BDBiosciences,Heidel berg,Germany

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การศึกษาบทบาท และหน้าที่ ของ death receptor CD95 ต่อการตายแบบอีริพโตซีส ของเซลล์เม็ดเลือดแดง

วิเคราะห์หน้าที่ ของ death receptor CD95 ในการเป็นการตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยการกระตุ้น death receptor CD95 บนผิวเม็ดเลือดแดงด้วย CH11 Fas-activating antibody พบว่าเปอร์เซนต์ apoptotic cell ของเม็ดเลือดแดง ที่ถูกกระตุ้น ด้วย CH11 Fas-activating antibody ในความเข้มข้นที่ 0, 100, 300, และ 500 ng/ml และเวลาที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การตาย ของเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่แตกต่างกัน และเมื่อใช้เวลานานมากขึ้นที่ 72 ชั่วโมงเซลล์ก็จะตาย ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์ของ apoptotic cell ของเม็ดเลือดแดง ที่ถูกการกระตุ้น ด้วย CH11 Fas-activating antibody ในความเข้มข้น และเวลาที่แตกต่างกัน

ตัวอย่างการทดลอง	เปอร์เซนต์ apoptotic cell ของเม็ดเลือดแดง		
	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72
1. RBC + 0 ng/ml CH11antibody	3	4	24
2. RBC + 100 ng/ml CH11antibody	5	5	-
3. RBC + 300 ng/ml CH11antibody	4	5	-
4. RBC + 500 ng/ml CH11antibody	4	6	28

2. การทดสอบฤทธิ์ของ อินซูลิน ต่อการยับยั้งการตายแบบอีริพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะ oxidative stress จาก tBOOH

2.1 กลุ่มของคนปกติ

การทดสอบฤทธิ์ของ อินซูลิน ต่อการยับยั้งการตายแบบอีริพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงในของกลุ่มคนปกติในภาวะ oxidative stress จาก tBOOH พบว่า อินซูลิน มีผลยับยั้งการตายแบบอีริพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงของกลุ่มคนปกติในภาวะ oxidative stress ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต และเซลล์ตายของเม็ดเลือดแดงกลุ่มคนปกติต่อฤทธิ์ของอินซูลิน

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ tBOOH (mM)					
	0 mM		0.02 mM		0.1 mM	
	เซลล์รอดชีวิต (%)	เซลล์ตาย (%)	เซลล์รอดชีวิต (%)	เซลล์ตาย (%)	เซลล์รอดชีวิต (%)	เซลล์ตาย (%)
sample1 + 0 mM insilin	80	20	89	11	23	77
sample1 + 10 mM insilin	78	22	95	5	45	54
Sample 2 + 0 mM insilin	85	15	94	6	55	45
Sample 2 + 10 mM insilin	91	9	90	10	68	32
Sample 3 + 0 mM insilin	86	14	28	72	8	92
Sample 3 + 10 mM insilin	95	5	57	43	40	60

2.2 กลุ่มของโรคธาลัสซีเมีย

การทดสอบฤทธิ์ของ อินซูลิน ต่อการยับยั้งการตายแบบอีริพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะ oxidative stress จาก tBOOH พบว่า อินซูลิน มีผลยับยั้งการตายแบบอีริพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะ oxidative stress โดยฉพาะโรคธาลัสซีเมียชนิด Beta thalassemia / Hb E ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต และเซลล์ตายของเม็ดเลือดแดงกลุ่มของโรคธาลัสซีเมีย ต่อฤทธิ์ของ อินซูลิน

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ tBOOH (mM)					
	0 mM		0.02 mM		0.1 mM	
	เซลล์รอดชีวิต (%)	เซลล์ตาย (%)	เซลล์รอดชีวิต (%)	เซลล์ตาย (%)	เซลล์รอดชีวิต (%)	เซลล์ตาย (%)
sample1 + 0 mM insilin	82	12	95	5	9	81
sample1 +10 mM insilin	82	12	97	3	73	27
Sample 2 + 0 mM insilin	73	27	56	44	11	89
Sample 2 +10 mM insilin	83	17	49	51	41	59
Sample 3 + 0 mM insilin	68	22	22	78	3	97
Sample 3 +10 mM insilin	73	17	51	49	4	96

การทดสอบฤทธิ์ของ อินซูลิน ต่อการยับยั้งการตายแบบอีริพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะ oxidative stress พบว่าตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียทั้ง 3 ตัวอย่าง มีเปอร์เซนต์การติดสีของ annexin v ลดลง จาก 90% เป็น 25%, 78% เป็น 48% 70% เป็น 50% ตามลำดับ เมื่อมีอินซูลินเป็นส่วนประกอบใน Ringer solution ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดแดงส่วนในภาวะปกติทั้ง 3 ตัวอย่างมีเปอร์เซนต์การติดสีของ annexin vไม่แตกต่างทั้งมี และไม่มีอินซูลินใน Ringer solution (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบฤทธิ์ของ อินซูลิน ต่อการยับยั้งการตายแบบอีริพโตซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะ oxidative stress

Sample	Positive annexin v cells (%)			
	Non-oxidative stress		Oxidative stress	
	Untreated insulin	Treated insulin	Untreated insulin	Treated insulin
Sample 1	1	1	90	25
Sample 2	27	17	78	48
Sample 3	1	1	70	50

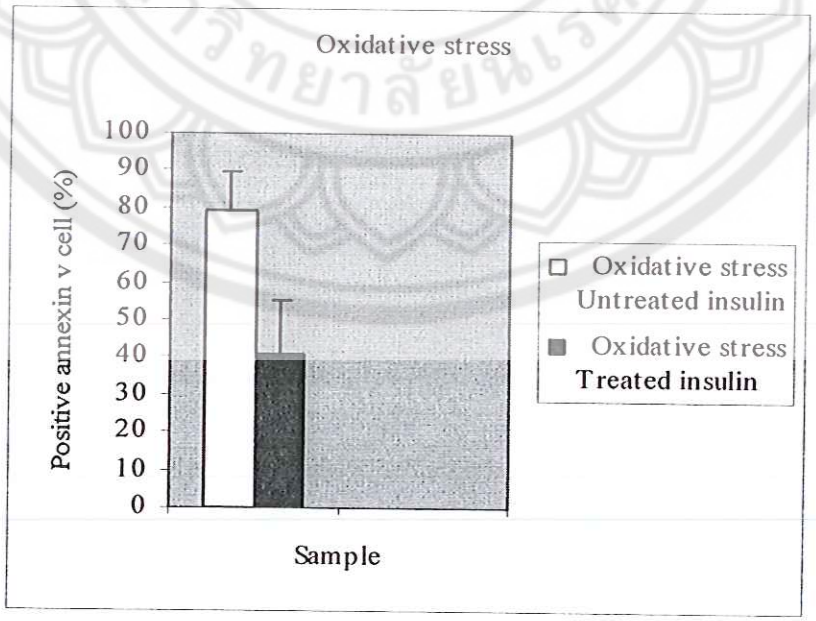
เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การติดสีของ annexin v หรือ การแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะ oxidative stress ระหว่างกลุ่มที่เลี้ยงใน Ringer solution ที่มีอินซูลิน และไม่มีอินซูลินจะพบว่ากลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียที่เลี้ยงใน Ringer solution ที่มีอินซูลินมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การติดสีของ annexin v หรือ การแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียลดลง จาก 79 ± 10.06 เป็น 41± 13.89 ซึ่งการลดลงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การติดสีของ annexin v นี้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Indipendent T – test, $p < 0.05$) กลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะปกติที่เลี้ยงในRinger solution ที่มีอินซูลินมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การติดสีของ annexin v หรือ การแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การติดสีของ annexin v หรือ การแสดงออกของphosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย

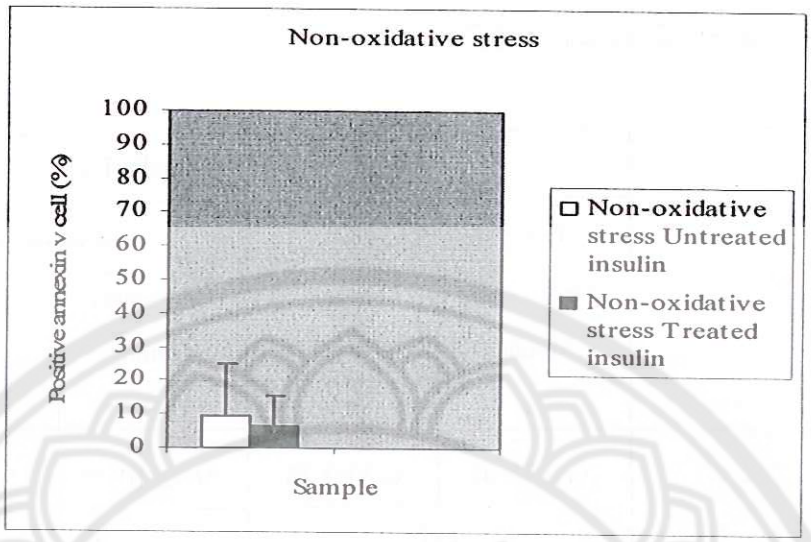
	Positive annexin v cells (%)			
	Non-oxidative stress		Oxidative stress	
	Untreated insulin	Treated insulin	Untreated insulin	Treated insulin
n	3	3	3	3
$\bar{x}\pm$SD	9.7±15.01	6.3±9.23	79.3±10.06	41.0±13.89
P- value	0.76		0.018*	

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความต่างของการลดลงของค่าเฉลี่ยการติดสีของ annexin vหรือการแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะ oxidative stress ระหว่างกลุ่มที่เลี้ยงใน Ringer solution ที่มีอินซูลิน และไม่มีจะพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความต่างของการลดลงเป็น 38.3% ในภาวะ ปกติกลุ่มที่เลี้ยงใน Ringer solution ที่มีอินซูลิน และไม่มีจะพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความต่างของการลดลงเพียง 3.4% (รูปที่ 6 และ 7)



รูปที่ 6 แสดงความแตกต่างของเฉลี่ยเปอร์เซนต์การติดสีของ annexin v หรือ การแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะ oxidative stress



รูปที่ 7 แสดงความแตกต่างของเฉลี่ยเปอร์เซนต์การติดสีของ annexin v หรือ การแสดงออกของ phosphatidylserine บนผิวเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียในภาวะปกติ

บทที่ 4

บทสรุป และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

การศึกษากระบวนการตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์ เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย ถึงบทบาทและการทำงานของ death receptor CD95 ในการเป็นตัวกลางการเกิดกระบวน การตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์ เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย และบทบาทของอินซูลินที่มีผลต่อการลด หรือป้องกัน เซลล์เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย จากการตายแบบอีริพโตซีส โดย การลดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือด แดง เมื่อทำการวิเคราะห์พิสูจน์สมมุติฐานของการวิจัยที่กล่าวว่า Death receptor CD95 มีบทบาท และเป็นตัวกลางในการเกิดกระบวน การตายแบบอีริพโตซีสในเซลล์ เม็ดเลือดแดง และอินซูลินมีผลต่อการลด หรือป้องกัน เซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย จากการตายแบบอะพอพโตซีสโดยการลดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือด แดง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าใน Death receptor CD95 ที่แสดงบนผิวเม็ดเลือดแดงไม่สามารถเป็นตัวกลางในการเกิดกระบวน การตายแบบอีริพโตซีสในเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยการกระตุ้นของ CH11 Fas-activating antibody ได้โดยตรง

จากการศึกษาบทบาทของอินซูลินที่มีผลต่อการลด หรือป้องกัน เซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย จากการตายแบบอีริพโตซีส โดย การลดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือดแดง พบว่าในกลุ่มคนปกติ และ กลุ่มคนที่เป็นพาหะธาลัสซีเมีย อินซูลินสามารถลด หรือป้องกัน เซลล์เม็ดเลือดแดงจากการตายแบบอะพอพโตซีสโดย การลดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือด แดง ส่วนกลุ่มคนที่เป็นโรคธาลัสซีเมียอินซูลินสามารถลด หรือป้องกัน เซลล์เม็ดเลือดแดง จากการตายแบบอะพอพโตซีสโดย การลดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือดแดง ในบางราย ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะความรุนแรงของโรค พยาธิสภาพของผู้ป่วย และลักษณะความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงที่แตกต่างกัน ทำให้การทนต่อภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือดแดง แตกต่างกัน ดังนั้นอินซูลินจึงไม่สามารถลด หรือป้องกัน เซลล์เม็ดเลือดแดง จากการตายแบบอะพอพโตซีสที่มีลักษณะความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงมาก และไวต่อการถูกทำลายด้วยภาวะ oxidative stress ได้สูง

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษากระบวนการตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์ เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย ถึงบทบาทและการทำงานของ death receptor CD95 ในการเป็นตัวกลางการเกิดกระบวน การตายแบบอีริพโตซีสของเซลล์ เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย และบทบาทของอินซูลินที่มีผลต่อการลด หรือป้องกัน เซลล์เม็ดเลือด แดงธาลัสซีเมีย จากการตายแบบอีริพโตซีส โดย การลดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือด แดง ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่า Death receptor CD95 ที่แสดงบนผิวเม็ดเลือดแดงไม่สามารถเป็นตัวกลางในการเกิดกระบวน การตายแบบอีริพโตซีสในเซลล์เม็ดเลือด แดง โดยการกระตุ้นของ CH11 Fas-activating antibody ได้โดยตรง และพบว่าอินซูลินสามารถลด หรือป้องกัน เซลล์เม็ดเลือด แดง จากการตายแบบอะพอพโตซีสโดย การลดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือด แดง ในบางราย ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะความรุนแรงของโรค พยาธิสภาพของผู้ป่วย และลักษณะความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อประยุกต์ใช้ในด้านของการคิดค้นการลด หรือป้องกัน เซลล์เม็ดเลือด แดงจากการตายแบบอะพอพโตซีสโดย การลดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ เม็ดเลือด แดง เพื่อป้องกันการเกิดภาวะโลหิตจางต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

1. Cohen AR, Galanello R, Pennell DJ, Cunningham MJ, Vichinsky E. Thalassemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program2004:14-34.

2. Sarnaik, S. A. (2005). Thalassemia and related hemoglobinopathies. Indian Journal of Pediatrics, 2(4), 319-324.

3. Schrier, S. L. (1997). Pathobiology of thalassemic erythrocytes. Current Opinion in Hematology, 4(2), 75-78.

4. Chareonkul, P., and Kraisin, J. (2004). Prevention and control of thalassemia at Saraburi Regional Hospital. Journal of The Medical Association of Thailand, 87(1), 8-15.

5. Pansatiankul, B., and Saisorn, S. (2003). A community-based thalassemia prevention and control model in northern Thailand. Journal of The Medical Association of Thailand, 86(3), S576-582.

6. Weatherall, D. J. (1993). The treatment of thalassemia--slow progress and new dilemmas. New England Journal of Medicine, 329(12), 877-879.

7. Borgna-Pignatti, C. (2007). Modern treatment of thalassaemia intermedia. British Journal of Haematology, 138(3), 291-304.

8. Borgna-Pignatti, C. (2006). Thalassemia. A few new tiles in a large mosaic. Haematologica, 91(9), 1159-1161.

9. Kang, S., Song, J., Kang, H., Kim, S., Lee, Y. and Park, D. (2003). Insulin can

block apoptosis by decreasing oxidative stresss via phosphatidylinositol3-kinase- and extracellular signal-regulated proteinkinase-dependent signaling pathwaysinHepG2cells. **European Journal of Endocrinology**, 148(1), 147–155.