

โรคโลหิตจาง ราลัสซีเมีย เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เมื่อคำนวณจากอุบัติการณ์ของผู้ที่เป็นพาหงั้งหมดประมาณร้อยละ 30-40 ของประชากร พบว่าจะมีผู้ป่วยราลัสซีเมียเกิดใหม่มากกว่า 10,000 คนทุก ๆ ปี ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีปัญหาของโรคเรื้อรังตั้งแต่เกิด ได้แก่ ปัญหาชีด ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงต้องได้รับการเดิมเลือดเป็นประจำเพื่อชดเชยอิโมโนโกลบินให้อยู่ในระดับคงที่ ถ้าไม่ได้รับยาขับเหล็กร่วมด้วยจะเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะเหล็กเกินและเกิดมีชาตุเหล็กที่ไม่ได้จับกับ transferrin เรียก non-transferrin bound iron นั้น ซึ่งคาดว่าเป็นตัวการสำคัญของปฏิกิริยาหาร์เบอร์ไวส์ (Haber Weiss) และ เฟนตอน (Fenton reactions) ในการสร้างสารประกอบออกซิเจนที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (reactive oxygen species, ROS) และนำไปสู่ภาวะอนุมูลอิสระมากเกิน ซึ่งสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสาร ชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ได้ ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น โรค เบ้าหวาน การเจริญเติบโตของร่างกายช้า การทำงานของดับและหัวใจผิดปกติ เป็นต้น ในช่วงระยะเวลา 3 ปี (พ.ศ. 2548-2551) คณะผู้วิจัยจาก 2 มหาวิทยาลัย (6 คณะฯ) ได้ร่วมกันศึกษาเกี่ยวกับราลัสซีเมีย เพื่อทำให้เกิดความเข้าใจถึงพยาธิสรีวิทยาและพยายามหาแนวทางใหม่ในการรักษาพยาบาลผู้ป่วยราลัสซีเมีย ผลงานวิจัยที่สำคัญ สรุปได้เป็นหัวข้อใหญ่ ๆ ดังนี้

1) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนโกลบินกับความรุนแรงของโรคราลัสซีเมีย โดยการวัดปริมาณ  $\alpha/\text{non } \alpha$ -globin mRNA ratio ด้วยเทคนิค multiplex reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) ใช้ TaqMan probe ที่จำเพาะกับ  $\alpha$ -,  $\beta^A$ - และ  $\gamma$ -globin mRNA ผลการศึกษาพบว่าในอัลฟ่า-ราลัสซีเมีย ค่า  $\alpha/\text{non } \alpha$ -globin mRNA ratio ลดลงตามความผิดปกติของยีนอัลฟ่า แต่ในผู้ป่วยโรคเบต้า-ราลัสซีเมีย/อิโมโนโกลบิน คือ ซึ่งมีระดับความรุนแรงของโรคหลากหลาย จะมีค่า  $\alpha/\text{non } \alpha$ -globin mRNA ratio อยู่ในช่วงกว้าง คือ 12.5-62.2 เมื่อศึกษาอัตราส่วนการแสดงออกของยีนโกลบินกับความรุนแรงของโรค ในผู้ป่วยที่มีอาการน้อย 100 คนและผู้ป่วยที่มีอาการมาก 147 คน พบว่าปริมาณ  $\beta$ -globin mRNA ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ปริมาณของ  $\gamma$ -globin mRNA ในผู้ป่วยที่มีอาการน้อยจะมีปริมาณสูงกว่าผู้ป่วยที่มีอาการมาก นอกจากนี้การศึกษาผลของการตัดต่อ  $\beta^E$ -globin mRNA ซึ่งจะเกิดทั้ง correctly spliced  $\beta^E$ -globin mRNA ที่สร้าง  $\beta^E$ -globin และ Hb E ได้กับ aberrantly spliced  $\beta$ -globin mRNA ซึ่งไม่สามารถสร้าง  $\beta^E$ -globin โดยการวัดปริมาณของ correctly และ aberrantly spliced  $\beta^E$ -globin mRNA ด้วยวิธี allele specific qRT-PCR พบว่าอัตราส่วนระหว่าง correctly/aberrantly spliced  $\beta^E$ -globin mRNA ในผู้ป่วยที่มีอาการน้อยบางคน มีค่าสูงมากเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มีอาการมาก แสดงให้เห็นว่ากระบวนการตัดต่อ  $\beta^E$ -globin pre-mRNA อาจจะ

เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันในผู้ป่วยเบต้า-ชาลสซีเมีย/ไฮโมโกลบิน คือ

2) การเปรียบเทียบและทำความสัมพันธ์ระหว่างตัวบ่งชี้การสร้างเม็ดเลือดแดงกับค่าทางโลหิตวิทยาและผลกระทบของการตัดม้ามต่อตัวบ่งชี้ ในผู้ป่วยเบต้า-ชาลสซีเมีย/ไฮโมโกลบิน คือ พบว่า ตัวบ่งชี้การสร้างเม็ดเลือดแดง erythropoietin (sEpo) มีระดับสูงขึ้นชัดเจน ปริมาณเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนเรติคูลอยซิต (reticulocyte) ก็เพิ่มขึ้นในแนวทางเดียวกัน แต่ไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคและไม่สามารถจำแนกกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรง ออกจากกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงได้ สาเหตุอาจมาจากการตัดม้ามที่สำคัญ คือ การตัดม้าม ซึ่งเป็นอวัยวะที่ช่วยคัดกรองเซลล์ต่าง ๆ กลุ่มผู้ป่วยที่ตัดม้ามแล้วมีปริมาณเม็ดเลือดแดงเรติคูลอยซิตสูงกว่า ซึ่งน่าจะเกิดจาก การกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงและการขาดอวัยวะเก็บกักเซลล์ การศึกษาในผู้ป่วยเบต้า-ชาลสซีเมีย/ไฮโมโกลบิน คือ กลุ่มนี้ยังพบว่าระดับ sEpo มีค่าแปรตามอายุ ซึ่งมีการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงมากในวัยเด็ก และลดลงตามช่วงอายุที่มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการแตกต่างกัน พบว่าระดับ sEpo ในกลุ่มผู้ป่วยอาการไม่รุนแรงมีค่าน้อยกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงอายุและลดลงเป็นลำดับเมื่อผู้ป่วยมีอายุมากขึ้น ส่วนระดับตัวบ่งชี้การสร้างเม็ดเลือดแดง transferrin receptor (sTfR) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่ตรวจวิเคราะห์จากซีรัมที่ไม่น่าจะได้รับผลกระทบจากการตัดม้าม กลับพบว่าไม่แปรตามระดับ sEpo แสดงว่าการตอบสนองการสร้างเม็ดเลือดแดงมีไม่มากเท่าที่ควร แม้เมื่อมีการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงที่สูงมาก ดังนั้น sTfR จึงไม่เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีของการสร้างเม็ดเลือดแดง

3) ศึกษาการสะสมไวตามินเอของเซลล์แมงมุม (arachnocytes) หรือเซลล์ hepatic stellate cells ในตับ ซึ่งจะช่วยบ่งชี้ถึงสภาวะของตับ เซลล์แมงมุมทำหน้าที่สะสมเรตินอลในรูปเม็ดไขมัน ในชัยโตพลาสซีม อาศัยอยู่ตามช่องว่างระหว่างเซลล์ตับและร่องหลอดเลือดฟ้อย ในภาวะที่มีการบาดเจ็บของเซลล์ตับ เซลล์แมงมุมจะสูญเสียเรตินอลและตั้งคระห์ extracellular matrix รวมถึงการสร้างเส้นใยและมีการเปลี่ยนรูปร่างจากเดิมที่คล้ายแมงมุมกล้ายเป็น myofibroblasts ซึ่งเป็นต้นเหตุของการเกิดแผลเป็นในตับและ hepatic fibrosis จนนำไปสู่โรคตับแข็ง (hepatitis cirrhosis) การศึกษาลักษณะการเรืองแสงไวตามินเอที่อยู่ในรูปเม็ดไขมัน ในตับของผู้ป่วยเบต้า-ชาลสซีเมีย/ไฮโมโกลบิน คือ พบมีการเรืองแสงนานาสีและขาดหายไปเป็นหย่อม ๆ เมื่อมีเม็ดเลือดแดงมีการแตกสลายจำนวนมากจะมีไฟโนรัสติกเกิลขึ้นในตับ โดยสัมพันธ์กับเหล็กที่สะสมอยู่ ผู้ป่วยที่ได้รับการตัดม้ามแล้วก็จะมีไฟโนรัสติกมากกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้ตัดม้าม เพราะมีเหล็กสะสมอยู่มากกว่า การสะสมของไวตามินเอในตับจึงแสดงถึงสภาวะของตับ ทำให้วินิจฉัยการบาดเจ็บของตับได้เร็วขึ้น

4) การศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนในไมโครพาติคิล (microparticles, MPs) พบว่า ร่างกายมี MPs หลากรายชนิด ซึ่งอยู่กับโปรตีนที่มาจากเซลล์ตันกำเนิดและสารกระตุ้น โดย MPs ที่ถูกสร้างเพิ่มขึ้นนั้น อาจเป็นผลมาจากการอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS)

ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้ป่วยเบต้า-ชาลส์ซีเมีย/ไฮโมโกลบิน อี ที่ตัดม้ามแล้ว พบร่วม มี MPs สูงมาก ผลการตรวจวัดระดับ ROS ในเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดงและเกร็ดเลือด พบร่วม มีค่าสูงกว่าคุณปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.01$ ) ในทางตรงกันข้าม ระดับของ reduced glutathione (GSH) ในกลุ่มเซลล์นี้ของผู้ป่วยที่ตัดม้าม มีค่าต่ำกว่าคุณปกติ ( $P < 0.05$ ) ยกเว้นระดับ ROS ในเม็ดเลือดแดงที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีของการรักษาสมดุลของ oxidative status เมื่อเซลล์มี ROS สูง จะทำให้ GSH มีปริมาณน้อยลง เมื่อศึกษาชนิด MPs จากเซลล์ตันกำเนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับคุณปกติ พบร่วมค่าเฉลี่ยของ MPs ที่มาจากการลีดเลือดมีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) และพบว่าระดับ ROS กับจำนวนของ MPs ในผู้ป่วยเบต้าชาลส์ซีเมีย/ไฮโมโกลบิน อี ที่ตัดม้าม มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก ดังนั้นการที่เซลล์มีภาวะ oxidative stress ที่สูงจะทำให้ผนังเซลล์เสียสภาพและปลดปล่อย MPs ซึ่งเป็นตัวส่งเสริมกระบวนการเกิดลิ่มเลือด ทำให้ผู้ป่วยมีความเสี่ยงที่จะเกิดภาวะหลอดเลือดอุดตัน (thromboembolic events) มากกว่าผู้ป่วยชาลส์ซีเมียชนิดอื่นและคุณปกติ

5) การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของมีนชันซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการทดลองในคนปกติจำนวน 20 คน ที่ได้รับมีนชันแคปซูล (250 mg.) ที่ผลิตจากองค์การเภสัชกรรม ครั้งเดียว 6 กรัม ผลการศึกษาในหลอดทดลอง พบร่วม เครอร์คิวมิโนย์ดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าวิตามินอีและวิตามินซีและยังมีฤทธิ์ป้องกันการแตกของเม็ดเลือดแดงอีกด้วย แต่การทดลองวัด parameters ต่าง ๆ เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของเครอร์คิวมิโนย์ดที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เวลาต่าง ๆ กัน กลับพบว่าไม่เห็นผลแตกต่างกันชัดเจน ระดับของเครอร์คิวมิโนย์ดจะขึ้นเพียงเล็กน้อย ในเวลาเดียวกันค่า ROS จะลดลงบ้าง โดยจะลดลงต่ำสุดเมื่อระดับของเครอร์คิวมิโนย์ดสูงสุด ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าอาสาสมัครปกติไม่ค่อยมีภาวะ oxidative stress โดยดูจากค่า ROS และ malondialdehyde (MDA) ที่เวลาเริ่มต้น ซึ่งอยู่ในระดับปกติ ส่วนค่า MDA และ GSH ไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะช่วงเวลาที่ให้อาสาสมัครรับชนิดนี้เข้าไปน้อยเกินกว่าที่จะเห็นการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากเครอร์คิวมิโนย์ดจะกระจายเข้าไปในเนื้อเยื่อและถูกปล่อยออกจากเนื้อเยื่อย่างช้า ๆ จึงมีระดับยาที่ available ในเลือดน้อย การทดลองต่อไปควรจะให้อาสาสมัครได้รับเครอร์คิวมิโนย์ดนานกว่านี้ เพื่ออาจจะเห็นผลที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้

6) การศึกษาคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (heart rate variability, HRV) ในชาลส์ซีเมีย พบร่วม หนูกลุ่ม โรคเบต้า-ชาลส์ซีเมียมีค่า HRV ทุก parameter ลดลงรวมทั้งค่า hemoglobin, serum iron และระดับ oxidative stress ก็แตกต่างจากหนูกลุ่ม wild type อย่างมีนัยสำคัญ การที่ค่า HRV ในหนูชาลส์ซีเมียลดลง อาจเป็นผลจากการซีดเรื้อรังร่วมกับการที่มีชาตุเหล็กเกิน ซึ่งนำไปสู่การเกิดภาวะอนุมูลอิสระมากเกินในเซลล์และเนื้อเยื่อ เช่นเดียวกับผลที่ตรวจพบในผู้ป่วยเด็กโรคเบต้า-ชาลส์ซีเมียมเจอร์ อายุมากกว่า 10 ปี จำนวน 14 ราย เปรียบเทียบกับเด็กปกติที่อยู่ในช่วงอายุเดียวกัน จำนวน 10 ราย พบร่วมผู้ป่วยมีค่า HRV ลดลงและอัตราการเต้นของหัวใจสูง

กว่าเด็กปกติ โดยผู้ป่วยบางคนไม่มีแม้แต่ sign of cardiac functional involvement ค่าของ HRV ที่ลดลงนี้แสดงว่าผู้ป่วยมี impaired sympathovagal activity และอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด cardiac arrhythmias ที่เป็นสาเหตุของ sudden cardiac death ได้ เมื่อติดตามศึกษาผู้ป่วยโดยได้รับการรักษาด้วยการให้เลือดสม่ำเสมอเป็นเวลา 6 เดือน พบร่วมกับผู้ป่วยมีระดับความเข้มของฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้น ค่า HRV จะดีขึ้น

7) การศึกษาการแสดงออกของช่องทางนำแคลเซียมแบบ แออล และการนำธาตุเหล็กผ่านเข้าเซลล์кар์ดิโไมโอซัยต์ (cardiomyocyte) ของหุนุชาลัสซีเมีย ธาตุเหล็กเข้าสู่кар์ดิโไมโอซัยต์โดย อาศัยการผ่านเข้าช่องทางต่าง ๆ เช่น Transferrin receptor 1 (TfR1), Divalent metal transporter 1 (DMT1) และ L-type calcium channel (LTCC) มีรายงานการศึกษาพบว่า การปรับและเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ TfR1 และ DMT1 mRNA ขึ้นกับปริมาณธาตุเหล็กในกล้ามเนื้อหัวใจ เมื่อมีปริมาณของธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นในกล้ามเนื้อหัวใจ จะพบการแสดงออกของ TfR1 และ DMT1 mRNA ที่ลดต่ำลง แต่กลับพบว่ากล้ามเนื้อหัวใจมีการแสดงออกของ TfR1 และ DMT1 น้อยมาก จึงมีการตั้งสมมุติฐานว่าช่องทางที่ขันส่งธาตุเหล็กเข้า-ออกในกล้ามเนื้อหัวใจ อาจจะอาศัยการส่งผ่านเข้าทาง LTCC งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาความแตกต่างการแสดงออกของ LTCC บนผิวเซลล์кар์ดิโไมโอซัยต์เพาะเลี้ยงของหุนุปกติ (wild type) เปรียบเทียบกับหุนุชาลัสซีเมียชนิด heterozygous BKO type (<sup>mu</sup>β<sub>th</sub>-3/+<sup>+</sup>) และ double heterozygous BKO with HbE (<sup>hu</sup>β<sub>E/+</sub>,<sup>mu</sup>β<sub>th</sub>-3/+<sup>+</sup>) และศึกษาปริมาณการนำธาตุเหล็กเข้าเซลล์кар์ดิโไมโอซัยต์ ผลการทดลองแสดงว่าเซลล์кар์ดิโไมโอซัยต์ในหุนุชาลัสซีเมีย BKO type (<sup>mu</sup>β<sub>th</sub>-3/+<sup>+</sup>) มี iron-uptake มากกว่าหุนุปกติ แต่คู่เหมือนว่าเหล็กที่เข้าเซลล์кар์ดิโไมโอซัยต์ไม่น่าจะผ่าน LTCC ทั้ง ๆ ที่มีโปรตีน LTCC ในเซลล์кар์ดิโไมโอซัยต์ของหุนุชาลัสซีเมียนากกว่าปกติ แสดงว่าเหล็กอาจเข้าสู่เซลล์кар์ดิโไมโอซัยต์โดยผ่านทางอื่น ๆ ซึ่งจะต้องดำเนินการศึกษาต่อไป

8) การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน UGT1A6 และปัจจัยทางพยาธิชีววิทยา ต่อการเปลี่ยนแปลงเภสัชจลนศาสตร์และความเป็นพิษของยาขับเหล็ก deferiprone (L1) ในผู้ป่วย ชาลัสซีเมีย ข้อมูลเบื้องต้นทางเภสัชจลนศาสตร์โดยใช้ยาสามัญประจำบ้านพาราเซตามอลเป็นยาต้นแบบ ชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงระดับของยาในผู้ป่วยชาลัสซีเมียเกิดได้เร็วขึ้น ผ่านทางปฏิกิริยา glucuronidation เมื่อตรวจหา genetic polymorphisms ของยีน UGT1A1 และยีน UGT1A6 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ glucuronidation ของยา พบร่วมกับความหลากหลายของยีนที่ควบคุมการสร้าง UGTs ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณยาพาราเซตามอล ในพลาสม่า และเมตาโนไซด์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงยา ทั้งในผู้ป่วยและอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ จึงได้ทำการศึกษาค่า เภสัชจลนศาสตร์ของยา deferiprone แบบให้ยาครั้งเดียว (single-dose) และติดตามการเปลี่ยนแปลงยาในร่างกายโดยการตรวจวัดการเกิดอนุพันธ์ glucuronidation รวมทั้งค่าเภสัชพลศาสตร์ คือ ปริมาณการขับเหล็กออกในปัสสาวะและการ

เปลี่ยนแปลงระดับ non transferrin bound iron (NTBI) ในชีรั่มของอาสาสมัครปกติ 20 รายและผู้ป่วยเบต้า-ชาลัสซีเมียเมีย/ชีโมโกลบิน อี 25 ราย ที่มีความแตกต่างของภาวะเหล็กสะสมในระดับต่าง ๆ ผลการศึกษาพบว่าปัจจัยทางพยาธิสภาพของผู้ป่วยมีอิทธิพลต่อเกสัชจลนศาสตร์ของยา deferiprone ในขณะที่ปัจจัยทางพันธุกรรมมีส่วนเพียงเล็กน้อย ค่าเกสัชจลนศาสตร์ปริมาณการขับเหล็กและการเกิดพิษของยา มีความสัมพันธ์กับค่าเหล็ก NTBI, ferritin และ serum iron การใช้ยาในผู้ป่วยอาจต้องปรับขนาดและให้ยาตามภาวะเหล็กเกิน

9) การศึกษาประสิทธิผลของสารสกัดขมิ้นชันและสาร catechin จากชาเขียว ต่อการยับยั้งภาวะเหล็กเกินและอนุมูลอิสระมากเกิน งานวิจัยก่อนหน้านี้กลุ่มผู้วิจัยพบว่าสาร catechin จากชาเขียวโดยเฉพาะ (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) และสารในกลุ่มเครอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) จากขมิ้นชันมีหมู่ฟังก์ชันอลที่สามารถจับกับธาตุเหล็กในหลอดทดลอง โดยสารสกัดเครอร์คูมินอยด์ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 515 นาโนเมตร และมีความสามารถในการจับอย่างรวดเร็วภายใน 15 นาทีและมากขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถจับเหล็กในรูป NTBI ในพลาสม่าของผู้ป่วยชาลัสซีเมียได้อีกด้วย การศึกษาในหนูทดลองทำโดยเห็นได้ชัดเจนว่าสาร catechin สามารถลดระดับ NTBI ในพลาสม่าได้ 2 เท่า เมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับอาหารที่มี ferrocene และเมื่อให้สารสกัดเครอร์คูมินอยด์ที่ความเข้มข้น 0.2% (W/W) เป็นเวลา 2 เดือน พบรูปที่ไม่ได้จับกับโปรตีนทรานส์เฟอร์รินในพลาสม่าและปริมาณเหล็กที่สะสมในเนื้อเยื่อของตับ หัวใจและม้ามที่มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับอาหารที่มี ferrocene และเมื่อให้สารสกัดเครอร์คูมินอยด์ที่ความเข้มข้น 200 mg/kg BW/day โดยยังคงให้อาหารที่มี ferrocene อย่างต่อเนื่อง พบรูปที่ไม่ได้จับกับ NTBI ในพลาสม่าได้ ส่วนการศึกษาประสิทธิผลของสาร catechin จากชาเขียวโดยเฉพาะ (-)-epigallo-catechin-3-gallate พบว่า เมื่อให้สารสกัดชาเขียวควบคู่กับการให้สารละลายน้ำเหล็กแก่หนูทดลองที่ได้เห็นได้ชัดเจนว่าเกิดภาวะเหล็กเกิน เป็นระยะเวลากว่า 6 เดือน สามารถลดระดับ NTBI และอนุมูลอิสระลงได้

10) การศึกษาเพื่อพัฒนาระบบวิธี เพื่อใช้ในการคัดกรองสารที่สามารถกระตุ้นชีโมโกลบิน เอ็ฟ และการคัดกรองหาสารที่สามารถกระตุ้นชีโมโกลบิน เอ็ฟ เนื่องจากการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา hydroxyurea ในผู้ป่วยให้ผลแตกต่างกัน จึงได้มีความพยายามที่จะค้นหาสารหรือยาตัวอื่น เพื่อจะนำมาใช้รักษาผู้ป่วยชาลัสซีเมีย โดยการสร้างเซลล์ที่บรรจุโครงสร้างดีเอ็นเอในกลุ่ม  $\beta$ -globin gene cluster ซึ่งมีการแทนที่ยีน  $\gamma$ -globin ด้วยยีนที่ให้สารเรืองแสงสีเขียว ( $\gamma$ EGFP) และสอดไส้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีการผ่าเหล่านี้ในตำแหน่ง -175 จาก  $^G\gamma$ -globin gene (-175 $^G\gamma$  HPFH) ลงในบริเวณ promoter ของยีน  $\gamma$  ซึ่งยีนที่ผิดปกติสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างชีโมโกลบิน เอ็ฟ สูงขึ้นได้ ผลการทดลองด้วยสารกระตุ้นชีโมโกลบิน เอ็ฟ ที่รู้จักกันมาก่อน เช่น hydroxyurea, butyrate, cisplatin และ hemin แสดงว่าเซลล์ EGFP สามารถนำมาใช้เป็นโมเดลในการคัดเลือกหาสารกระตุ้นชีโมโกลบิน เอ็ฟ จากการศึกษาสารตั้งเคราะห์

2000 ชนิดและสารสกัดจากธรรมชาติ 172 ชนิด ทั้งวิธี high throughput และ low throughput พบ มีสารที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 18 ชนิดที่สามารถเพิ่มชีโมโกลบิน เอฟ ได้ การศึกษาถึงกลไก ในการกระตุนชีโมโกลบิน เอฟ จะช่วยให้เข้าใจและช่วยเปิดทางสู่การค้นหาสารกระตุนตัวใหม่ ๆ ได้อีกด้วย

งานวิจัยทั้งหมด ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติและเผยแพร่ในรูปของ บทความรวม 24 เรื่องและยื่นขอสิทธิบัตร 1 เรื่อง มีการนำเสนอผลงานในที่ประชุมระดับชาติ/นานาชาติ รวม 29 ครั้ง ตลอดจนผลิตนักศึกษาระดับปริญญาโทจำนวน 4 คนและระดับปริญญาเอกจำนวน 10 คน

(ภาษาอังกฤษ)

Thalassemia and abnormal hemoglobins are the most common single gene disorder in Thailand. About 30-40% of the Thais carry certain type of abnormal genes. Severe thalassemia is anemia with associated symptoms. Untreated, the patients die early, at birth or before, in the case of Hb Bart's hydrops fetalis or in the first two decades of life. Several thalassemia syndromes have intermediate or moderate clinical symptoms. Their hemoglobin levels are usually above 7 g/dl associated with mild jaundice and hepatosplenomegaly with no defective physical development or thalassemic facies. Patients with thalassemia intermedia do not require regular blood transfusions except when they develop certain complication such as infections. Many pathophysiologic changes occur in severe and intermediate thalassemic diseases. Imbalance globin chain synthesis leads to red cell pathology and iron overload lead to free radical formation and oxidative damage to different tissues/organs. Better quality of lives may be achieved by the use of antioxidants and iron chelators. This year is the last year of the 3 years research network supports by The Thailand Research Fund through myself under the Senior Research Scholar Program (เมธีวิจัยอาวุโส). The overall achievement of our network during these last 3 years is summarized as follows.

1. Expression of globin genes in different thalassemia disorders was carried out from reticulocyte by multiplex quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The result demonstrated that the  $\alpha$ -/non- $\alpha$ -globin mRNA ratio is a good indicator of disease severity in different thalassemia disorders. In  $\alpha$ -thalassemia, the  $\alpha$ -/non- $\alpha$ -globin mRNA ratio is decreased due to the number of defective  $\alpha$ -globin gene. In  $\beta$ -thalassemia/HbE, the  $\alpha$ -/non- $\alpha$ -globin mRNA ratio is more variable ranging from 12.5 to 62.2. Expression of  $\beta$ - and  $\gamma$ -globin mRNA in  $\beta$ -thalassemia/HbE was further studied. The result showed that  $\gamma$ -globin mRNA in patients with the mild clinical symptom was higher than that of the severe patients. We also

studied expression of HbE, a G to A mutation in codon 26 of  $\beta$ -globin gene. This abnormal gene activates a cryptic 5' splice site in codon 25 leading to a reduction of correctly spliced  $\beta^E$ -globin mRNA, and consequently  $\beta^+$ -thalassemia. The level of correctly and aberrantly spliced  $\beta^E$ -globin mRNAs was measured by allele specific qRT-PCT. The result showed that the correctly spliced  $\beta^E$ -globin mRNA in erythroid cells culture from some clinically mild cases of  $\beta$ -thalassemia/HbE was higher than that of the severe patients. Therefore, this technique has a potential to designate the severity of  $\beta$ -thalassemia/HbE patients.

2. The correlation of biomarkers in active erythropoiesis and other hematologic parameters including splenectomy in  $\beta$ -thalassemia/HbE was studied. The two biomarkers used in this study are serum erythropoietin (sEpo) and serum transferrin receptor (sTfR). Preliminary data showed that sEpo and reticulocytes were markedly increased in  $\beta$ -thalassemia/HbE patients. However, there was no correlation of the two parameters with the disease severity. One major contributing factor is splenectomy. The number of reticulocytes in the splenectomized patients was higher than those in the non-splenectomized cases. Moreover, we found that the sEpo level varied accordingly to the patient's age. The level of sEpo was higher in young patients and gradually declined in the older age group. Although there was an increase in sTfR, there was no correlation with the sEpo and disease severity. This reflects that Epo response to erythropoiesis is not very efficient in  $\beta$ -thalassemia/HbE. Therefore, sTfR may not be a good indicator of active and effective erythropoiesis in thalassemia.

3. Study of liver fibrosis by autofluorescence of vitamin A in hepatic stellate cells (HSCs). In the normal liver, quiescent HSCs store vitamin A in the form of lipid droplets in their cytoplasmic processes. In chronic injury, activated HSCs that lack both lipid droplets and long processes display proliferation and transform into myofibroblast. Increased synthesis of extracellular matrix (ECM) component especially collagen leads to fibrosis and eventually cirrhosis. This is the first time that the livers of  $\beta$ -thalassemia/HbE patients were studied by fluorescence microscopy for HSCs. This technique allows us to detect vitamin A in HSCs that emits autofluorescence when it exposes to ultraviolet. Oil Red O is used to stain lipid and Masson trichrome stains for fibrous accumulation. The results showed that distribution of autofluorescence of vitamin A was heterogeneous and centrilobular focal attenuation. Some had fatty changes within part of the lobule and iron usually accumulates within Kupffer cells and sinusoid. It is possible that observation of heterogeneous pattern and focal attenuation in HSCs

represents the early liver injury and initiation of fibrous formation. Fibrosis is correlated with the degree of iron accumulation in the liver and is more pronounced in the splenectomized case of  $\beta$ -thalassemia/HbE disease.

4. An increasing numbers of microvesicles and microparticles in thalassemia, especially  $\beta$ -thalassemia/HbE, may have occurred from the increased reactive oxygen species (ROS) in thalassemia. Most of these minute particles originate from platelets and red blood cells. The results from this study, using flow cytometry to differentiate all cell types and to identify their proteins, showed that the levels of ROS in white blood cells, red blood cells and platelets were significantly higher than that of normal individuals ( $P < 0.01$ ). In contrast the level of reduced glutathione (GSH) in these cells, in splenectomized cases, was significantly lower than that of normal ( $P < 0.05$ ) except red blood cells. We also found that the origin of microparticles in  $\beta$ -thalassemia/HbE is mostly from platelets in comparison to those of normal ( $P < 0.05$ ). The level of ROS is also correlated with the numbers of microparticles in  $\beta$ -thalassemia/HbE. Therefore, defective cell membranes due to oxidative stress results in the formation of microparticles that may serve as the major cause of thromboembolic events in  $\beta$ -thalassemia/HbE.

5. Decreased or impaired  $\beta$ -globin biosynthesis results in the accumulation of unpaired  $\alpha$ -globin chains loading cell membranes with denatured globin chains, heme and iron, and causes the generation of reactive oxygen species. Excess of iron causes deleterious oxidative reaction in the red blood cell membrane and results in the loss of phospholipids asymmetry. The present study was designed to investigate pharmacokinetics of the natural antioxidant, curcumin, in reducing oxidative stress in 20 normal subjects taking a single dose of curcumin capsule (250 mg) produced by the Government Pharmaceutical Organization. Although the antioxidant activity of cucuminoids *in vitro* was better than that of vitamin E and vitamin C, the antioxidant efficiency in these subjects was not promising. Curcuminoids in serum was slightly increased while the level of ROS was slightly decreased, and the level of ROS was most decreasing when the level of curcuminoids was at its peak. This is probably because curcuminoids will be distributed to the tissues and slowly released, and the duration of curcumin administration was too short to assess its changes in the blood.

6. Selection of thalassemic patients who are at risk for having cardiomyopathy is essential as it is the fatal complication in thalassemic patients. Heart rate variability (HRV) is currently proposed as a strong predictor for mortality in patients with acute myocardial infarction and heart

failure. Its role in thalassemia, however, is still unclear. Therefore, in this study we investigated the characteristics of HRV in thalassemic mice as well as thalassemic patients.

In thalassemic mice, depressed HRV, an expression of cardiac autonomic modulation, was demonstrated in the  $^{mu}\beta^{+/+}$  and double heterozygous HbE/ $\beta$ -thalassemia mice. This is due to the effect of chronic anemia associated with a certain degree of iron overload that leads to oxidative damage, similar to that in thalassemic patients. However, the reduced hemoglobin with increased serum iron and ROS production was found only in the  $^{mu}\beta^{+/+}$  group. This finding raises the question about the causes of impaired autonomic modulation in double heterozygous HbE/ $\beta$ -thalassemia group. It is possible that depressed HRV may reflect an early physiologic change in this mouse model. Although the prognostic value of this depressed HRV still needs to be further investigated, these findings indicated that autonomic modulation in these thalassemic mice could well represent that in  $\beta$ -thalassemic patients.

In thalassemic pediatric patients, HRV was significantly depressed indicating cardiac autonomic disturbance in these patients. This sympatho-vagal imbalance was markedly improved after hemoglobin and hematocrit levels were increased, suggesting that an anemic condition greatly influences cardiac autonomic function in thalassemic patients. Blood transfusions not only maintain the level of hemoglobin, but also reduced HRV impairment. Similar to the findings in mice, HRV may reflect an early physiologic change in thalassemic patients. With a 6-month period of follow-up, both non-transferrin bound iron and echocardiogram (LVEF, FS, and E/E') were not altered, indicating that they may not be sensitive enough to detect early cardiac disturbance in these patients with preclinical stage of heart disease. With an early change of HRV parameters found in this study, HRV may be a good candidate for early detection of cardiac involvement in thalassemia major patients.

7. Expression of L-type calcium channel and iron uptake in cardiomyocytes were studied in thalassemic mice. Elevated cardiac iron causes iron-overload cardiomyopathy, a condition which provokes mortality due to heart failure in thalassemic patients. Previous studies have demonstrated that myocardial iron uptake may occur via L-type calcium channels (LTCC). However, direct evidence regarding iron uptake via the LTCC as well as its expression and response of iron overloaded conditions in thalassemic cardiomyocytes has not been investigated. In this study, cultured cardiomyocytes from genetic-altered  $\beta$ -thalassemic mice and wild-type mice were used to study expression of LTCC and iron uptake under iron overload condition.

Quantification of iron uptake in cardiomyocytes was performed by Calcein-AM fluorescence assay. The expression of LTCC was visualized and quantified by the immunohistochemical method. The result showed that expression of LTCC in cultured cardiomyocytes of thalassemic mice was significantly greater than those of wild type mice. Furthermore, under iron overloaded condition, iron uptake into the cultured ventricular myocytes of thalassemic mice were higher than those of wild type cells ( $p<0.01$ ). The iron uptake into cells could be prevented by administration of an iron chelator desferoxamine. However, the iron uptake into cultured cardiomyocytes from both types of mice could not be blocked by the LTCC blocker verapamil. These findings suggest that iron uptake mechanisms in thalassemic cardiomyocytes may be mediated by other pathways rather than via the LTCC.

8. Variations of drug response, efficacy and toxicity in  $\beta$ -thalassemia patients result from several factors including liver and renal functions, diseases severity, iron loading status and polymorphism of gene that encoding drug metabolizing enzymes. Deferiprone (1, 2-dimethyl-3-hydroxypyrid-one, L1) is an orally active iron chelator and is metabolized predominantly by glucuronidation to a conjugated product (L1-G) that lack of chelating properties. UGT1A6 has been recently identified as the isoform involving in the glucuronidation of deferiprone. Three coding single nucleotide polymorphism (cSNPs: S7A, T181A, R184S) have been identified in a single allele UGT1A\*2. Our research was thus aimed to evaluate the effects of genetic polymorphism, disease severity and iron loading status on pharmacokinetics of deferiprone. Three groups of healthy volunteers and  $\beta$ -thalassemia/Hb E who carry UGT1A6 genotypes \*1/1, \*1/\*2, \*2/\*2 were enrolled in this study. Serum and urine concentration-time curves of L1 and L1-G were constructed after 25 mg/kg deferiprone administration for pharmacokinetic analysis. The results showed that absorption of L1 was rapid with time for the maximum serum concentration ( $T_{max}$ ) of 50 min in both normal subjects and the patients. In healthy volunteers, the  $AUC_{0-\infty}$  of L1 and L1G as well as total 24 hr urinary L1G excretion in genotype \*1/\*2 were lower than \*1/1 and \*2/\*2. However, there was no statistically significant difference in any pharmacokinetic parameters of either L1 or L1-G among the genotypes. The results in the patients showed no difference between genotype groups.

By the disease severity, 11 and 14 patients were classified as mild-moderate and severe, respectively. The significant lower in maximum serum drug concentration ( $C_{max}$ ) and area under serum concentration time curve ( $AUC_{0-\infty}$ ) of L1 and L1G were observed in patients and depended

on disease severity. The significant longer elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) of L1 was also found in severe patients (mean  $\pm$  SD;  $127.1 \pm 17.7$ ,  $173.9 \pm 62.8$  and  $196.5 \pm 105.4$  min for normal, mild-moderate and severe, respectively). The changes in pharmacokinetic parameters showed good correlations with iron loading status of the patients. Concentration of L1-iron complex was increased simultaneously with the level of L1 in blood circulation. Interestingly, the molar concentration ratio of L1: iron less than 3 could be found in the patients with heavy iron overload after 300-480 min of drug administration. ESR spin trapping technique demonstrated enhanced free radical production in this group of patients.

It can be concluded that iron loading status of the patients was a major factor determining pharmacokinetics of L1. Thus, for the highest effectiveness with the lowest toxicity, dosage-regiment of L1 should be considered and monitored according to individual iron status of the patients.

9. Novel candidates of iron chelators for thalassemias. Desferrioxamine (DFO), deferiprone (DFP) and deferasirox (DFX) are nowadays promising iron chelators used for treatment of iron overloaded thalassemia patients. However, due to side effects and continuous treatment, development of cheap, safe and effective oral iron chelators is required. Antioxidative natural products are possible to relieve the oxidative stress persisting in the patients. This work was performed to study iron-chelating activity of curcuminoids, green tea extract (GTE) and epigallocatechin 3-gallate (EGCG) in thalassemic mice. Heterozygous  $\beta$ -knockout (BKO) and double heterozygous with HbE thalassemic mice (C57/BL6) were continuously fed with ferrene-supplemented diet (FSD) and intervened by oral administration of curcuminoids, GTE and epigallocatechin 3-gallate (EGCG) for 5-6 months. Levels of surrogate markers including blood hemoglobin, plasma NTBI and plasma MDA were measured. Iron content in their heart, spleen and liver was also examined using Pearl's staining and atomic absorption spectrometric techniques.

Curcuminoids lowered levels of plasma NTBI and MDA in the treated thalassemic mice. Interestingly, it decreased iron content and weight index considerably in liver and slightly in spleen. Similarly, GTE and EGCG effectively decreased plasma NTBI levels in the iron-loaded BKO mice. Although the BKO thalassemic mice were moderately anemia, treatment with CUR, GTE and EGCG did not enhance their hemoglobin synthesis.

Together with our previous reports HPO derivative, curcuminoids and green tea products would be candidates of oral iron chelators that can alleviate iron overload and oxidative stress efficiently in iron loaded-thalassemic mice. In perspectives, these compounds need to be evaluated for their iron-chelating capabilities in iron-loaded hepatocytes and cardiomyocytes, and thalassemia patients.

10. High-throughput screening of potential hemoglobin F enhancing agents. Reactivation of fetal hemoglobin (Hb F) synthesis should reduce the severity of  $\beta$ -thalassemia by pairing with the excess  $\alpha$ -globin chains. This approach is based on evidence that (1) newborns with b-thalassemia disease do not have thalassemia clinical symptom because of the presence of Hb F production during the first 6 to 8 months after birth, (2) increased production of Hb F has been shown to be one of the significant genetic factors modifying disease severity, and (3)  $\beta$ -thalassemia patients with hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) have milder thalassemia symptoms. Pharmacological stimulation of Hb F production is a potential approach to therapy for  $\beta$ -thalassemia. Despite a number of clinical trials investigating potential Hb F inducers, currently available inducers have low efficacy or high toxicity. Therefore, the identification of new pharmacological agents that can induce Hb F with greater efficacy and less toxicity is urgently needed. However, a major limitation is the lack of screening assays that can conveniently detect novel Hb F inducers with high specificity. We have developed stable genomic reporter assays (GRA) based on a bacterial artificial chromosome (EBAC) containing the human  $\beta$ -globin locus with the green fluorescence protein (EGFP) reporter cassette in-frame replacement at the  $^G\gamma$ - to  $^A\gamma$ - globin genes (pEBAC/148  $\Delta G\gamma A\gamma$  EGFP). Human erythroleukemia K562 cell lines carrying this construct in stably integrated have been shown to respond to a range of known Hb F inducers. The percent increase of EGFP from the basal level by hydroxyurea and butyrate (70-80%), cisplatin (442 $\pm$ 32%) and hemin (764 $\pm$ 145%) mirrored the induction levels of the endogenous globin genes. High-throughput screening of a 2000 biological active chemical library as well as 172 natural products have identified 18 compounds that were noted to up regulate  $\gamma$ -globin expression. These compounds were also shown to increase  $\gamma$ -globin mRNA expression. The lead compounds from this screening may serve as a very promising novel therapeutic compound for  $\beta$ -globin chain hemoglobinopathies. They will be further tested on  $\beta$ -thalassemia patients erythroid progenitor culture. The developed cellular assay is proved to be highly convenient and beneficial for HbF upregulation study in the future.



209741

We have published 24 papers in the peer review international journals and submitted 1 patent. We also presented 29 pieces of works in the international and ~~local~~ scientific meetings.

All together there are 4 master and 10 Ph.D. students graduated during these last 3 years under the support of Thailand Research Fund.