

รหัสโครงการ: RDG3/09/2543

ชื่อโครงการ: การกระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบินเอฟ: ศึกษาการนำไปใช้ในผู้ป่วยเบต้า-ทาลัสซีเมีย และ พัฒนาระบบตรวจสอบการกระตุ้นการสร้างสายโกลบินแกมมา

ชื่อนักวิจัย: ยวดี วัฒนโกศลสิน
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

e-mail address: yuwadee@swu.ac.th or ywwatana@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: เดือน เมษายน พ.ศ. 2543 ถึง มีนาคม พ.ศ. 2546

การศึกษาการกระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบินเอฟ (HbF) ในผู้ป่วย β -thalassemia/HbE (β -thal/HbE) ต้องมีการศึกษาในห้องทดลอง (in vitro study) เพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นว่าผู้ป่วยรายใดมีการตอบสนองหรือไม่ตอบสนองต่อ hydroxyurea (responders or non-responders) ก่อนเข้ารับการรักษาจากแพทย์โดยการรับยา hydroxyurea (in vivo study) ซึ่งมีประโยชน์ในการลดการเจ็บปวดของผู้ป่วยทำให้มีอาการดีขึ้น ลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการรักษา ซึ่งการศึกษาในห้องทดลองทำโดยการเตรียมเซลล์ตัวอ่อนสำหรับการสร้างเม็ดเลือดแดง (primary erythroid progenitor cell culture) จากเลือดซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และผู้ป่วยไม่เจ็บปวดเหมือนการเจาะไขกระดูก ซึ่งก่อนทำการทดลองได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับความเข้มข้นของ hydroxyurea และช่วงเวลาที่ให้ hydroxyurea พบว่า hydroxyurea ที่ $30 \mu\text{M}$ ในวันที่ 6 และเก็บเซลล์ในวันที่ 10 มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์น้อยที่สุด แต่มีการกระตุ้นการสร้าง HbF สูงทั้งในผู้ป่วย β -thal/HbE และคนปกติ ได้เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย β -thal/HbE จำนวน 22 ราย ซึ่งมีอาการในระดับปานกลาง และเตรียม erythroid cell culture จาก peripheral blood stem cell ของผู้ป่วย β -thalassemia แต่ละราย จากนั้นหาปริมาณ HbF, Hb A₂, and Hb A ในผู้ป่วยแต่ละรายที่ได้รับ hydroxyurea โดย automated high-performance liquid chromatography ปริมาณ γ -globin mRNA โดย real time PCR detection technique และ γ -globin chains (γ^G/γ^A globin chain) โดย Triton X-100 acid urea polyacrylamide gel electrophoresis ผลการศึกษาพบว่ามีกระตุ้นการสร้าง γ^G - และ / หรือ γ^A - globin mRNA, γ^G - globin mRNA = $0.05 \pm 0.01 - 50.86 \pm 8.68$, γ^A - globin mRNA = $0.19 \pm 0.001 - 26.23 \pm 3.01$, $\gamma^G/\gamma^A = 0.01 \pm 0.001 - 9.39 \pm 6.12$ ค่า relative levels of γ -mRNA ($100 \times \gamma/(\gamma+\beta)$) fold induction = $66.62 - 99.72 \%$ ปริมาณ fractional HbF = $1.10 - 5.07$ สรุปว่าในผู้ป่วยทั้ง 22 รายพบ

T.162361

ว่า มีผู้ป่วย 20 รายที่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea และ 2 รายอาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea เนื่องจากมี fractional HbF content และ fold induction γ/γ globin mRNA น้อยกว่า 1 ส่วนการศึกษา in vivo ผู้ป่วยได้รับยา hydroxyurea อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ปี แล้วเจาะเลือดมาวิเคราะห์หาค่า HbF γ/γ globin mRNA และ γ/γ globin chain แล้วนำไปเปรียบเทียบกับการศึกษา in vitro ซึ่งใช้ผู้ป่วยกลุ่มเดิมซึ่งหยุดการรับ hydroxyurea มาแล้ว 7 เดือน - 1 ปี แล้วเจาะเลือดมาเตรียมเซลล์ และ treat ด้วย 30 μ M hydroxyurea ในวันที่ 6 และเก็บเซลล์ในวันที่ 10 (96 ชั่วโมง) จากผลการทดลองพบว่า ค่า fractional HbF content มีค่า linear coefficient correlation $r^2 = 0.54$, (P value = 0.204) in vitro มีค่า 0.29 - 11.73, in vivo มีค่า 0.50-13.97, γ/γ globin mRNA fold induction, $r^2 = 0.52$, (P value = 0.164) in vitro มีค่า 0.34 - 8.18, in vivo มีค่า 0.28 - 6.10 และ γ/γ globin chain fold increase, $r^2 = 0.62$, (P value = 0.134) in vitro มีค่า 0.80 - 1.43, in vivo มีค่า 0.98 - 1.23 ผู้ป่วย β -thalassemia/HbE ชนิดที่มีความรุนแรงระดับปานกลาง (thalassemia intermedia) 13 รายที่ศึกษามี 11 รายที่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea และ 2 รายที่อาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการตอบสนองต่อ hydroxyurea เนื่องจากมีค่า fractional HbF และ fold induction γ/γ globin mRNA ใน in vivo และ in vitro มีค่าต่ำกว่า 1 ซึ่งการตอบสนองของ erythroid precursor cell ในผู้ป่วยแต่ละรายต่อ hydroxyurea มีความแตกต่างกันอาจเนื่องจากปัจจัยอื่นๆ อีกหลายอย่าง เช่น ความสามารถในการสร้าง HbF ของผู้ป่วยที่มีอยู่ก่อนให้ hydroxyurea หรือปัจจัยพื้นฐานของ β -globin mutation และ/หรือชนิดของ Chromosome อาทิ XmnI site polymorphism บริเวณ promoter ของ γ -globin gene เป็นต้น ดังนั้นวิธีการศึกษา in vitro นี้เป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสมในการศึกษากลไกการควบคุมการกระตุ้นการสร้าง HbF โดยยาหรือสารเคมีตัวใหม่อื่นๆ

คำหลัก: hemoglobin F, hydroxyurea, γ - globin mRNA, erythroid, progenitor cell

ABSTRACT

TE 162361

Project Code: RDG3/09/2543

Project Title: Hemoglobin F switching *in vitro*: the development of rapid screening of γ -globin synthesis and clinical correlates

Investigators: Watanapokasin Y.
Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

e-mail address: yuwadee@swu.ac.th or ywwatana@yahoo.com

Project Duration: April 2000 - March 2003

The responses to hydroxyurea, that elevates fetal hemoglobin synthesis in β -thalassemia/HbE (β -thal/HbE) patients, need to be effectively elucidated *in vitro* in order to screen primarily of responders and non-responders before the *in vivo* treatment (eg orally administered hydroxyurea). This will help reducing the pain, cost and time of random treatment enabling the improved life quality of the patients. Primary erythroid progenitor cell culture from patient's peripheral blood is the convenient and rapid technique that is employed in this study. At concentration of agents chosen for minimal effect on cell division, hydroxyurea at 30 $\mu\text{mol/L}$ significantly increase fractional HbF contents in β -thal/HbE patients and normal adult. The effective duration of hydroxyurea treatment is from day 6 to day 10 (96 hours). This technique is rapid, convenient and less pain as compared to primary erythroid progenitor cells obtained from bone marrow. The availability of reliable cell assays such as real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) analyses of globin messenger RNA was used. The effect of 30 μM hydroxyurea on 22 β -thal/HbE patients (thalassemia intermedia) are also studied. Addition of hydroxyurea to human erythroid cell cultures preferentially enhanced β -globin mRNA synthesis, either $^G\gamma$ - and/or $^A\gamma$ -globin mRNA in all patients. $^G\gamma$ -globin mRNA fold induction = $0.05 \pm 0.01 - 50.86 \pm 8.68$, $^A\gamma$ -mRNA fold induction = $0.19 \pm 0.001 - 26.23 \pm 3.01$, $^G\gamma/^A\gamma$ globin mRNA fold induction = $0.01 \pm 0.001 - 9.39 \pm 6.12$. The relative levels of γ -mRNA ($100 \times \gamma / (\gamma + \beta)$) fold induction ranges from 66.62 – 99.72 %, $^G\gamma$ - and/or $^A\gamma$ -globin mRNA ($\% \gamma / (^G\gamma + ^A\gamma)$) = $0.02 \pm 0.001 - 9.86 \pm 5.84$. Fractional HbF levels varied from 0.50 – 5.07. The results indicated that 20 patients are responders and 2 patients may be classified as non-responder as they showed fractional HbF levels and $^G\gamma/^A\gamma$ globin mRNA fold induction less than 1. For *in vivo* study, β -thal/HbE

patients were treated with hydroxyurea orally at a starting dose of 5 mg/kg/day for 5 days/week with escalation to maximum of 10 mg/kg/d for two years then all the assays were performed, whereas the in vitro study, primary culture system from adult erythroid cells obtained from the same group of patients who had seven to one year-off hydroxyurea treatment were studied. The results showed that γ^A/γ globin mRNA fold induction in vitro ranges from 0.34 – 8.18 and in vivo from 0.28 – 6.10, the linear correlation coefficient $r^2 = 0.52$ (P value = 0.164) as determined by paired T-test, fractional HbF content in vitro ranges from 0.50 – 13.97 and in vivo from 0.29 – 11.73, $r^2 = 0.54$ (P value = 0.204) and γ^A/γ globin chain fold increase in vitro ranges from 0.80 – 1.43 and in vivo from 0.98 – 1.23, $r^2 = 0.62$ (P value = 0.134). The results showed that 2 out of 13 patients may be classified as non-responders as they show low level of γ^A/γ globin mRNA fold induction and fractional HbF both in vivo and in vitro (<1). Hydroxyurea responses of patients are different, this may be due to many possible factors including ability to produce HbF in some patients before hydroxyurea treatment, β -globin mutation and/or inheritance of β -thalassemia Chromosome with the XmnI cleavage polymorphism at promoter of γ -globin gene etc. These methods may enable us to use the primary culture system of adult erythroid for preliminary screening of responders and non-responders as well as studying the mechanism (s) of new known γ -globin inducers and identifying new drug candidates.

Keywords: hemoglobin F, hydroxyurea, γ - globin mRNA, erythroid, progenitor cell