

**FLOW CYTOMETRIC ASSESSMENT OF NEUTROPHIL
FUNCTIONS FROM PERIPHERAL BLOOD OF
THALASSEMIA PATIENTS**

SAKORN KAEWMOON

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005**

ISBN 974-04-6583-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การประเมินประสิทธิภาพการทำงานของนิวโทรฟิลในเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ด้วยเครื่อง โฟล
ไซโตมิเตอร์ (FLOW CYTOMETRIC ASSESMENT OF NEUTROPHIL FUNCTIONS
IN WHOLE BLOOD OF THALASSEMIA PATIENTS)

สาคร แก้วมุล 4536749 SIIM/M

วท.ม. (วิทยาภูมิคุ้มกัน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์, Ph.D., ปัทมา เอกโพธิ์, Ph.D.,
สุทัศน์ ฟูเจริญ, พ.บ. M.D.

บทคัดย่อ

โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางที่มีความสำคัญที่สุดในประเทศไทย เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถสร้างฮีโมโกลบินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้เกิดภาวะซีดซึ่งมีความรุนแรงแตกต่างกันไป แม้ไม่พบว่าทำให้เกิดพยาธิสภาพกับระบบภูมิคุ้มกันโดยตรง แต่ก็เป็นที่ยอมรับว่าสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิตนั้นเกี่ยวข้องกับโดยตรงกับระบบภูมิคุ้มกันคือภาวะติดเชื้อ ทั้งนี้จากงานวิจัยต่างๆก็ยังไม่สามารถอธิบายถึงประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยที่พบอุบัติการณ์ของภาวะติดเชื้อได้สูงกว่าคนปกติทั้งชนิดที่ไม่รุนแรงและชนิดที่ทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ นิวโทรฟิลจัดว่าเป็นเซลล์ที่สำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันอย่างมากเพราะสามารถจับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกายตั้งแต่ระยะแรก เนื่องจากมีผลการศึกษาที่ขัดแย้งกันคือบางรายงานพบความผิดปกติของนิวโทรฟิลในโรคธาลัสซีเมียแต่บางรายงานก็ไม่พบความผิดปกติ ทั้งนี้ความแตกต่างอาจมีสาเหตุจากความน่าเชื่อถือของวิธีที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นการใช้วิธีการที่ยอมรับเป็นมาตรฐานเช่นโฟลไซโตเมทรีจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการประเมินประสิทธิภาพการทำงานของนิวโทรฟิลต่อไป

โดยการนำเทคนิคทางโฟลไซโตเมทรีมาประยุกต์ใช้ ทำให้สามารถใช้เลือดครบส่วนในการทดลองเพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลได้ โดยเลือกศึกษานิวโทรฟิลจากคุณสมบัติการยึดติดด้วยแอนติบอดีต่อต่อโปรตีนบนผิวเซลล์ที่ติดสลาด้วยสารเรืองแสงสีส้ม (CD13-PE) ขณะเดียวกันก็สามารถเลือกศึกษาชนิดที่ติดสลาด้วยสารเรืองแสงสีเขียว (BCECF) เมื่อเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาใหม่กับวิธีมาตรฐานที่ต้องแยกเซลล์ (dextran sedimentation) พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R^2 > 0.99$) เมื่อใช้ศึกษานิวโทรฟิลของผู้ป่วยเบต้า-ธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีกลุ่มที่ตัดม้ามและกลุ่มที่ไม่ได้ตัดม้าม และผู้ป่วยอัลฟา-ธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินเอชอย่างละ 20 รายเปรียบเทียบกับอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีจำนวน 20 รายพบว่าเมื่อทดลองให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10, 30, 60 นาที การจับกินและการฆ่าจุลชีพของนิวโทรฟิลมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R^2 > 0.99$) โดยไม่พบความผิดปกติของการจับกินและการฆ่าจุลชีพของนิวโทรฟิลในผู้ป่วยธาลัสซีเมียทุกกลุ่มและไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของนิวโทรฟิลกับภาวะการตัดม้าม ภาวะเหล็กเกิน และปัจจัยทางโลหิตวิทยาอื่นๆ

การประเมินประสิทธิภาพของนิวโทรฟิลด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรีโดยใช้เลือดครบส่วน เป็นวิธีที่รวดเร็ว และสามารถทำซ้ำได้ วิธีนี้นอกจากจะเป็นการจำลองสภาวะจริงในเลือดแล้วช่วยสามารถรักษาสภาพของเซลล์ให้คงเดิมอีกด้วย และเนื่องจากวิธีนี้ใช้เลือดเพียงปริมาณน้อยจึงเหมาะสำหรับทดสอบในผู้ป่วยเด็ก สัตว์ทดลองขนาดเล็กหรือนำไปประยุกต์ใช้กับโรคอื่นๆก็ได้

FLOW CYTOMETRIC ASSESMENT OF NEUTROPHIL FUNCTIONS FROM PERIPHERAL BLOOD OF THALASSEMIA PATIENTS.

SAKORN KAEWMOON 4536749 SIIM/M
M.Sc.(MMUNOLOGY)

THESIS ADVISORS : KOVIT PATTANAPANYASAT (Ph.D.), PATTAMA EKPO (Ph.D), SUTHAT FUCHAROEN (M.D.)

ABSTRACT

Thalassemia is the most important anemia disease in Thailand. It is an inherited hematological disease caused by defective production of adult hemoglobin (Hb A). This failure leads to an anemia with different degrees of severity. Even though the disease does not directly affect immune functions, infection, as a major cause of death in thalassemia, is strongly linked to immune response. However, there is not enough information to clearly explain immune functions in thalassemia, which is connected to more and more frequent episodes of both mild and severe infections. Neutrophils, professional phagocytes, play a crucial role as the first line defence against infectious pathogens in an innate immune response. For thalassemia, there are numerous reports of both defective and normal neutrophil functions from different techniques. Technical reliability has been discussed as a cause of controversial reports. Therefore, a “gold standard” technique for neutrophil function assessment, such as flow cytometry is required.

In this thesis, a dual color flow cytometry technique was developed for neutrophil function assessment by using whole blood (Wb) specimens. Neutrophils population was distinguished with CD13-PE labeling, while *Candida albicans* target particles were labeled by BCECF fluorochrome. This developed technique showed significant correlation when compared to standard dextran technique (Dx) ($R^2 > 0.99$). When applied for assessment of neutrophil opsonophagocytosis and killing functions of patients with splenectomized thalassemia/Hb E (n=20), nonsplenectomized thalassemia/Hb E (n=20), and Hb H disease (n=20) it was found that thalassemia neutrophil functions were normal at 10, 30, and 60 minutes of incubation periods when compared to healthy donors (n=20). Opsonophagocytosis and killing functions showed significant exponential correlation ($R^2 > 0.99$), while splenectomy, iron overload, and other hematological parameters showed no significant relation to neutrophil functions.

Flow cytometric assessment of neutrophils using whole blood specimens is rapid, simple, and reproducible. It not only mimics the physical properties of peripheral blood, but also reduces time consumption and preserves neutrophil functions. Moreover, only small amounts of whole blood are required, thus it is applicable for neutrophil function assessment in newborn or animal models with thalassemia and other diseases.

**KEY WORDS : THALASSEMIA / NEUTROPHIL FUNCTIONS /
PHAGOCYTOSIS / OXIDATIVE BURST/ FLOW CYTOMETRY**

128 p. ISBN 974-04-6583-8.