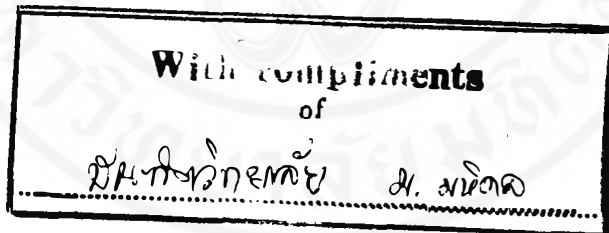


**BIOLOGY AND PATHOLOGICAL CHANGES OF
THALASSEMIC ERYTHROID PRECURSORS**

ARCHROB KHUHAPINANT
/



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(PATHOBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1997

ISBN 974-589-004-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

JH
A673g
1997

3636872 SCPA/D : MAJOR : PATHOBIOLOGY ; Ph.D. (PATHOBIOLOGY)

KEY WORD : THALASSEMIA / RETICULOCYTE / ERYTHROID
 PRECURSOR / PHOSPHATIDYLSERINE / PATHOL-
 OGY / FLOW CYTOMETRY / CELL CULTURE /
 ELECTRON MICROSCOPY

ARCHROB KHUHAPINANT : BIOLOGY AND PATHOLOGICAL
 CHANGES OF THALASSEMIC ERYTHROID PRECURSORS. THESIS
 ADVISOR : SOMPHONG SAHAPHONG, M.D., Ph.D., AHNOND
 BUNYARATVEJ, Ph.D., SUDA RIENGROJPITAK, Ph.D., KOVIT
 PATTANAPANYASAT, Ph.D. 220 p. ISBN 974-589-004-9

Thalassemia is a heterogeneous group of hereditary hematological disorders generally characterized by accumulation of either unmatched α - or β -globin chain in β - or α -thalassemia, respectively. By using the fluorescent flow cytometric technique, thalassemic peripheral blood reticulocytes have been investigated for their number, maturation state, *in vitro* maturation, volume, hemoglobin concentration and content. All symptomatic thalassemic patients show increased reticulocytes in both percentage and absolute number. These cells are also younger ones compared to those from normal persons as shown by their decrease in Low Fluorescence Ratio. These abnormalities are strikingly obvious in α -thalassemia with hemoglobin Constant Spring (CS), i.e. hemoglobin H with CS (H/CS) and homozygous CS (CS/CS). The splenectomized β -thalassemia/ hemoglobin E (β E-S) patients have much increased reticulocyte number and cells with high DNA content, probably nucleated red cells, designated as the upper particle count parameter. However, there is no difference for the degree of reticulocyte maturation in non-splenectomized (β E-NS) and splenectomized cases. Simultaneous measurement of reticulocytes and mature erythrocytes by flow cytometry revealed that discrepancy in erythrocytic hydration state of H/CS and CS/CS occurred as early as their reticulocyte state. The reticulocyte MCV/ mature erythrocyte MCV ratio in H/CS is significantly lower than that of H and such ratio in CS/CS reduces significantly compared to the normal one.

In vitro culture of β E erythroid precursors using the method of Two Phase Liquid Culture revealed increased proliferation of cells in β E-S more than β E-NS and normal control. Using the flow cytometric analysis of surface glycoprotein A (GA) and transferrin receptor (CD71), it was observed that the number of GA⁺ cells, CD71⁺ cells and both GA⁺, CD71⁺ cells was more in β E-S than that in β E-NS or normal ones in almost every week. Scanning electron microscopy of thalassemic erythroid precursors showed the dyserythropoietic features of proliferating erythroblasts in all types of thalassemia, rather striking in β E, H/CS and CS/CS. The increased loss of membrane lipid asymmetry by detection of phosphatidylserine exposure on external membrane leaflet using annexin V was found in erythroid precursors from all types of thalassemia ranging from the primitive stages to reticulocyte. Such abnormalities would partly explain the ineffective erythropoiesis in thalassemia.

3636872 SCPA/D : สาขาวิชา : พยาธิชีววิทยา ; ปร.ด. (พยาธิชีววิทยา)

อาจารย์ คุหาภินันท์ : การเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาและพยาธิวิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงในโรคธาลัสซีเมีย (Biology and pathological changes of thalassemic erythroid precursors)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สมพงษ์ สหพงศ์, M.D., Ph.D., อานนท์ บุญยะรัตเวช, Ph.D., สุดา เรียงโรจน์พิทักษ์, Ph.D., โกวิท พัฒนาปัญญาสัจด์ย์, Ph.D. 220 หน้า. ISBN 974-589-004-9

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม โดยสามารถแบ่งโดยทั่วไปได้เป็น 2 ชนิด จากความผิดปกติของการสังเคราะห์สายโกลบินที่ไม่สมดุล เป็นแอลฟาธาลัสซีเมียจากการลดลงของการสังเคราะห์สายแอลฟาโกลบิน และบีตาธาลัสซีเมียจากการลดลงของการสังเคราะห์สายบีตาโกลบิน งานวิจัยครั้งนี้ศึกษาเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนหรือเรติคูลอไซท์ในกระแสเลือดโดยใช้เทคนิคฟลูออโรสโคปรีเฟอเรนซ์ โดยศึกษาถึงจำนวน การพัฒนาในร่างกายและนอกร่างกาย ปริมาตร ปริมาณและความเข้มข้นของฮีโมโกลบินภายในเซลล์ พบว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียทุกชนิดที่มีอาการทางคลินิกมีเรติคูลอไซท์ที่เพิ่มมากขึ้นทั้งจำนวนและร้อยละเทียบกับเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ยังพบว่าเรติคูลอไซท์เหล่านี้มีอายุอ่อนกว่าเรติคูลอไซท์ของคนปกติ แสดงโดยค่า Low Fluorescence Ratio ที่ต่ำลง ความผิดปกติเช่นนี้พบได้อย่างชัดเจนในแอลฟาธาลัสซีเมียชนิดที่มีฮีโมโกลบินคอนสแตนต์สปริงร่วมกับด้วย คือ ฮีโมโกลบินเอช/คอนสแตนต์สปริง และฮีโมซัยกัสคอนสแตนต์สปริง สำหรับเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีที่ตัดม้ามแล้ว พบว่ามีจำนวนเรติคูลอไซท์ที่เพิ่มมากขึ้นและมีเซลล์ที่มีปริมาณสารพันธุกรรมสูงซึ่งอาจเป็นเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียส โดยพบจากการเพิ่มขึ้นของค่า upper particle count ไม่พบความแตกต่างในระดับของการพัฒนาระหว่างผู้ที่ไม่ได้ตัดม้ามและผู้ที่ตัดม้ามแล้ว จากการศึกษาเรติคูลอไซท์พร้อมกับเม็ดเลือดแดงในเวลาเดียวกันโดยเทคนิคฟลูออโรสโคปรีเฟอเรนซ์ พบว่าความผิดปกติของภาวบน้ำเกินในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยฮีโมโกลบินเอช/คอนสแตนต์สปริงและฮีโมซัยกัสคอนสแตนต์สปริงเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ระยะเรติคูลอไซท์ โดยค่าสัดส่วนปริมาตรเซลล์ระหว่างเรติคูลอไซท์ต่อเม็ดเลือดแดงในฮีโมโกลบินเอช/คอนสแตนต์สปริงจะต่ำกว่าในฮีโมโกลบินเอช และค่านี้ในฮีโมซัยกัสคอนสแตนต์สปริงจะต่ำกว่าคนปกติ

การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี โดยใช้เทคนิค Two-Phase Liquid Culture พบการเจริญเติบโตของเซลล์สูงมากในผู้ป่วยที่ตัดม้ามแล้วมากกว่าผู้ที่ยังไม่ได้ตัดม้ามและคนปกติ จากการศึกษาโดยเทคนิคฟลูออโรสโคปรีเฟอเรนซ์ต่อ glycophorin A (GA) และ transferrin receptor (CD71) บนผิวเซลล์ พบจำนวนของ GA⁺ cells, CD71⁺ cells และ GA⁺, CD71⁺ cells ในผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีที่ตัดม้ามแล้วมากกว่าผู้ที่ยังไม่ได้ตัดม้ามและคนปกติในเกือบทุกสัปดาห์ การศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดพบลักษณะความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงแบบ dyserythropoiesis โดยพบเด่นชัดในผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี ฮีโมโกลบินเอช/คอนสแตนต์สปริง และฮีโมซัยกัสคอนสแตนต์สปริง นอกจากนี้จากการศึกษาโดยใช้โปรตีน annexin V ร่วมกับเทคนิคฟลูออโรสโคปรีเฟอเรนซ์ยังพบการเพิ่มขึ้นของ phosphatidylserine บนผิวเซลล์ด้านนอกของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดงของธาลัสซีเมียทุกชนิดแม้ตั้งแต่ระยะอ่อนสุดจนถึงระยะเรติคูลอไซท์ ความผิดปกติที่พบทั้งหมดเหล่านี้จะช่วยในการอธิบายสภาวะการเกิด ineffective erythropoiesis ในธาลัสซีเมียได้ด้วย