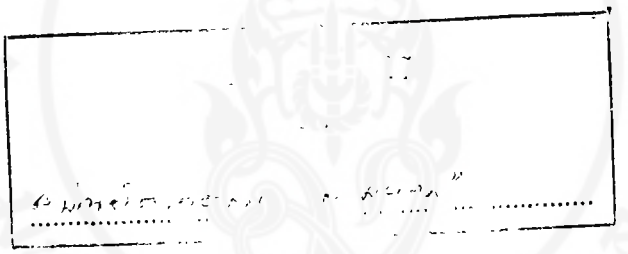
THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS ON THE PATHOPHYSIOLOGY OF BETA-THALASSEMIC RED CELL MEMBRANE.

SIRIPAKORN KASEMSANT



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1994

Copyright by Mahidol University

30557

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของภาวะออกซิเดชั่นต่อการเกิดพยาธิสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย
ผู้วิจัย	สิริภากร เกษมสันต์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	ประพนธ์ วิไลรัตน์ Ph. D.
	ประหยัด โกมารทัต Ph. D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	28 ตุลาคม พ.ศ. 2537

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษามากมายที่บ่งชี้ว่าพยาธิสภาพของเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีความเกี่ยวข้องกับการเกาะของสายโกลบินที่เหลือจากการจับคู่กัน ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งนำไปสู่การทำลายเม็ดเลือดแดงอย่างรวดเร็ว นับเป็นสาเหตุสำคัญที่นำไปสู่อาการโลหิตจางในที่สุด ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวที่เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีสาเหตุมาจากขบวนการออกซิเดชั่น และเพื่อเป็นการทดสอบสมมติฐาน ผู้วิจัยจึงทำการเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงปกติที่ผ่านการออกซิเดชั่นโดยใช้สารออกซิไดซิ่ง 3 ชนิด คือ t-butylhydroperoxide, phenazine methosulfate และ phenylhydrazine จากผลการศึกษาพบว่าทั้งเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียและเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงปกติที่ผ่านการออกซิเดชั่นมีการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายกัน กล่าวคือ ผลของการศึกษาโดยใช้ SDS-PAGE พบว่ามีโกลบินมาเกาะมากขึ้น มีการย่อยสลายของโปรตีน และในขณะเดียวกันก็มีการรวมตัวของโปรตีนโดยพันธะโควาเลนท์ทำให้เกิดโปรตีนขนาดใหญ่และซับซ้อนขึ้น จากการหาปริมาณกลุ่ม sulfhydryl อิสระของโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงพบว่ากลุ่มsulfhydrylอิสระของ spectrin+ankyrin และโปรตีน 4.1 มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเปลี่ยนแปลงภายนอกของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงพบว่าทั้งเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียและเม็ดเลือดแดงปกติที่ผ่านการออกซิ

Copyright by Mahidol University

เดชั่นมีการเปลี่ยนแปลงไปสามารถทำให้ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดมาเกาะเกิด prothrombinase complex ซึ่งสามารถเปลี่ยนโปรธรอมบินเป็นธรอมบิน (procoagulant cativity) นำไปสู่การเพิ่มการตอบสนองของเกร็ดเลือดและภาวะขาดออกซิเจนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้ ในเม็ดเลือดแดงปกติที่ผ่านการออกซิเดชั่นพบว่าความรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับความเข้มข้นของสารออกซิไดซิ่งที่ใช้ ส่วนในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียพบว่าเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีที่ตัดม้ามแล้วมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด รองลงมาคือเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีที่ยังไม่ตัดม้ามและผู้ป่วยอัลฟ่าธาลัสซีเมีย(ฮีโมโกลบินเอช) ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของวิตามินอีต่อการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีทั้งผู้ที่ตัดม้ามแล้วและยังไม่ตัดม้ามพบว่าการให้ผู้ป่วยรับประทานวิตามินอีวันละ 325 มิลลิกรัม เป็นเวลา 3 เดือน ไม่เพียงทำให้ระดับของวิตามินอีในพลาสม่าเพิ่มขึ้นเท่านั้นแต่ยังส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงภายนอกของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลงทำให้ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดมาเกาะน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า butylated hydroxytoluene (25-200 μM) และ วิตามินอี (d-α-tocopherol) (5-40 μM) ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดขบวนการออกซิเดชั่นสามารถลดการเกิด procoagulant cativity ได้บางส่วนแต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน

จากข้อมูลเหล่านี้สามารถสรุปได้ว่าเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีโดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีที่ตัดม้ามแล้วมีภาวะเครียดออกซิเดชั่นเพราะนอกจากจะมีการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่คล้ายกับการเปลี่ยนแปลงที่พบในเม็ดเลือดแดงปกติที่ผ่านการออกซิเดชั่นแล้ว ระดับของวิตามินอีในพลาสม่ายังมีระดับต่ำลงอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามการให้ผู้ป่วยรับประทานวิตามินอีมีผลช่วยยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดซึ่งอาจจะมีผลช่วยรักษาภาวะขาดออกซิเจนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title The Role of Oxidative Stress on the Pathophysiology of Beta-thalassemic Red Cell Membrane.

Name Siripakorn Kasemsant

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisor Committee

Prapon Wilairat, Ph. D.

Prayad Komaratat, Ph. D.

Date of Graduation 28 October B.E 2537 (1994)

ABSTRACT

Current studies indicate that the pathophysiology of thalassemic red blood cells is associated with binding of free globin chains to the cell membrane leading to oxidative stress which perturbs membrane organization and finally to rapid clearance of such cells by the reticuloendothelial system. However, problems in the study of oxidative damage in thalassemic red blood cells are complicated by individual variations. Having an *in vitro* model that mimics thalassemic red blood cells will be useful in determining the detailed effects of oxidative stress on membrane components.

In this study, normal red blood cells were oxidized with either phenazine methosulfate, phenylhydrazine or t-butylhydroperoxide. Following oxidation, electrophoretic pattern of membrane proteins were analyzed by SDS-PAGE, the thiol contents of individual membrane proteins were quantitated by radiolabeling with [3H] N-ethylmaleimide and procoagulant activity on the outer surface of red blood cells were measured by prothrombin converting activity assay. In oxidized red blood cells, there were evidences of protein damage as shown by increase in membrane-bound globin, protein degradation and formation of high molecular weight protein complex

Copyright by Mahidol University

which was partially reduced by β-mercaptoethanol. Sulfhydryl contents of spectrin and protein 4.1 were decreased in dose-dependent manner. All of these oxidizing agents could induce in a dose-dependent manner the presence of procoagulant activity on the outer surface of red blood cells. These alterations were also observed in thalassemic red blood cell membranes. The degree of changes was highest in splenectomized β-thalassemia/Hb E, followed by nonsplenectomized β-thalassemia/Hb E and α-thalassemia (Hb H disease). In addition, the reduction in the level of lipid antioxidant, vitamin E, also supported the important role of oxidative stress in the pathophysiology of thalassemic red blood cells. Antioxidants, butylated hydroxytoluene (25-200 μM) and d-α-tocopherol (5-40 μM), had partially protective effect on the presence of procoagulant activity on oxidized red cell outer surface but had no effect on the membrane protein damage.

To determine the effect of vitamin E status on red blood cell procoagulant activity, one group of β-thalassemia/Hb E patients was supplemented with vitamin E (325 mg daily) for three months and another group received placebo. The results indicated that vitamin E supplementation was not only able to raise the patients' plasma vitamin E status but also reduced their red cell procoagulant activity to near normal level.

It can be concluded from this study that thalassemic red blood cells were altered by oxidative stress. The degree of red cell membrane damage was highest in splenectomized β-thalassemia/Hb E followed by nonsplenectomized β-thalassemia/Hb E and Hb H disease respectively. Supplementation of vitamin E restored abnormal high procoagulant activity back towards the level of normal control. It is thus suggested that vitamin E may have therapeutic benefit in β-thalassemia/Hb E patients.

Copyright by Mahidol University