

STUDIES OF INOSINE
ON THE METABOLIC STATUS
OF THALASSEMIC RED BLOOD CELL
IN VITRO



ล 1 ส.ร. 2532

PATHAMA LEEWANICH

/

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(PHARMACOLOGY)

อกนันทนาการ

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย ห. สหกิจ

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1988

12086

Thesis Title STUDIES OF INOSINE ON THE METABOLIC STATUS
OF THALASSEMIC RED BLOOD CELL IN VITRO

Name Pathama Leewanich

Degree Master of Science (Pharmacology)

Thesis Supervisory Committee

1. Udom Chantharaksri, Ph.D.
2. Suthat Fucharoen, M.D.
3. Pipat Cherdrungsri, M.Sc.

Date of Graduation

May 12nd, 1988

ABSTRACT

Thalassemic red blood cells (RBCs) are known to have shorter survivals with accompanying numbers of metabolic defects and virtually all kinds of morphologic abnormalities are described. They are under continuous oxidative stress with exhausted antioxidative components. It is anticipated that the excessive uses or insufficient supplies of high energy phosphate (ATP) in thalassemic RBCs may be a presumptive factor that normally requires for maintaining the well being of RBCs. This study was designed to determine the metabolic status of thalassemic RBCs and assess in vitro if the effect of inosine, a known metabolic activator shows any pharmacologic benefit. Heparinized blood of normal volunteers,

non-splenectomized and splenectomized thalassemias (THAL) were subjected to various conditions in vitro. Levels of ATP and FDP (fructose 1,6-diphosphate, an intracellular glycolytic regulator) were respectively determined by HPLC and enzymatic methods.

It was found that the levels of ATP in thalassemic RBCs of both non-splenectomized (NS) and splenectomized (SP) were lower than those of volunteers (NORMAL). The elevated FDP levels in the thalassemic RBCs suggested that they were under continuous stress of having to compensate for the ATP-depleted RBCs. Inosine in the dose of 10 mM was found effectively in elevating both ATP and FDP in the RBCs, especially in ATP-depleted RBCs, of NORMAL and THAL. However, the restoring ability of inosine on the levels of intraerythrocytic ATP in THAL was not as marked as that in the NORMAL though the levels of FDP were higher elevated in THAL than that of NORMAL. These findings demonstrate that inosine is effective in maintaining the metabolic status of human RBCs of both NORMAL and THAL in vitro, and suggest that specific biochemical defect(s) may have occurred to the glycolytic regulatory pathway in the thalassemic RBCs.

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาผลของ Inosine ต่อ Metabolic Status
 ในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย Thalassemia ในหลอดทดลอง

ผู้วิจัย ปัทมา ล้วนิช

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ดร.อุดม จันทารักษ์ศรี

รศ.นพ.สุทัศน์ ฟูเจริญ

รศ.พิพัฒน์ เจิตรงษ์

วันที่สำเร็จการศึกษา 12 พฤษภาคม 2531

บทคัดย่อ

Thalassemia เป็นโรคโลหิตจางที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมในส่วนของ
 ความสามารถในการสร้างสายโกลบิน (globin chain) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในเม็ดเลือดแดง (RBC)
 ผลจากความผิดปกตินี้เป็นผลต่อเนื่องจนเกิดสภาวะทางพยาธิสภาพหลายอย่างด้วยกัน การศึกษาครั้งนี้
 ได้กระทำในผู้ป่วย Thalassemia ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Double heterozygous β -thal/HbE
 disease ซึ่งจัดเป็นกลุ่มโรคชนิดที่พบได้มากในประชากรไทย และอาการไม่รุนแรงมากนัก การศึกษา
 ครั้งนี้ใช้เม็ดเลือดแดงของคนปกติ (Normal RBC) เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยดูสภาวะทางด้าน
 พลังงาน (Energy metabolism) ด้วยการวัดระดับของสารเก็บพลังงาน (ATP) และสารที่มี
 บทบาทในการควบคุมขบวนการสร้างสารเก็บพลังงานของ RBC (FDP) ที่สภาวะต่าง ๆ ตั้งแต่ระดับ
 พลังงานพื้นฐาน (Basal level), เมื่อมีการกระตุ้นให้มีการสูญเสียพลังงาน และหลังจากให้สาร
 กระตุ้นการสร้างพลังงาน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้สาร Inosine เป็นตัวกระตุ้นดังกล่าว
 นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบผลของ Inosine กับผลของ Glucose ที่มีหน่วยความเข้มข้นเท่ากับ
 ความเข้มข้นของ Glucose ในเลือด (Blood glucose) ด้วย การทดลองทั้งหมดเพื่อต้องการ
 ศึกษาถึงผลการเปลี่ยนแปลงในหลอดทดลองในสภาวะที่ใกล้เคียงกับในร่างกายมากที่สุด จึงใช้
 อุณหภูมิ 37°C ในการเกิดปฏิกิริยา

ผลการศึกษาพบว่า RBC ของผู้ป่วย Thalassaemia กลุ่มนี้มีความผิดปกติในเรื่องของ Energy metabolism เมื่อเปรียบเทียบกับ RBC ของคนปกติ ซึ่งแสดงได้ด้วยค่าของระดับ ATP ที่ต่ำกว่าคนปกติ และระดับของ FDP ที่สูงกว่าของคนปกติ และในผู้ป่วยที่ได้รับการตัดม้ามมีแนวโน้มว่าจะมีความผิดปกติมากกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้ตัดม้าม เมื่อปล่อยให้ RBC อยู่ในสภาวะที่ขาดสารสำหรับใช้สร้าง ATP ระดับของ ATP ใน RBC ของคนปกติลดลงอย่างช้า ๆ ขณะที่ใน RBC ของผู้ป่วย Thalassaemia ระดับ ATP ลดลงเร็วกว่าและลดมากกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่า RBC ของผู้ป่วยน่าจะมีการใช้พลังงานมากกว่า RBC ของคนปกติ และเมื่อเติม Inosine ให้แก่ RBC เพื่อเพิ่มระดับ ATP พบว่า Inosine สามารถทำให้ระดับ ATP กลับสูงขึ้นมาได้ดีทั้งของ Normal และ Thalassaemia นอกจากนี้ระดับ FDP ก็เพิ่มได้ดีเช่นกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบระดับ ATP ที่เพิ่มขึ้น พบว่าผลการออกฤทธิ์ของ Inosine ใน RBC ของ Normal ดีกว่าของ Thalassaemia Glucose ก็สามารถเพิ่มระดับ ATP ได้ดี แต่ไม่สามารถเพิ่มระดับ FDP ได้ อย่างไรก็ตาม Inosine สามารถเพิ่มระดับ ATP ได้ดีกว่า Glucose ในกรณีที่เป็น RBC ของคนปกติแต่ถูกทำให้ขาดพลังงานระดับหนึ่ง (ATP-depleted RBC) และ RBC ของผู้ป่วย Thalassaemia ที่ไม่ถูกตัดม้าม และไม่ถูกทำให้พลังงานลดลงด้วย (Fresh RBC) ขณะที่ผลของ Inosine กับ Glucose ใน RBC สภาวะอื่น ๆ (Fresh normal, ATP-depleted RBC ของผู้ป่วยที่ไม่ถูกตัดม้าม และทั้ง Fresh และ ATP-depleted RBC ของผู้ป่วยที่ถูกตัดม้าม) ไม่แตกต่างกัน เมื่อศึกษา RBC ที่อยู่ในสภาพของเลือด (Whole blood) พบว่า Inosine สามารถรักษาระดับ ATP ได้ดีทั้งของ Normal และ Thalassaemia แสดงว่าส่วนประกอบอื่น ๆ ใน Whole blood อาจจะช่วยส่งเสริมผลของ Inosine

การศึกษาคั้งนี้สรุปได้ว่า RBC ของผู้ป่วย β -thal/HbE disease อาจมีความผิดปกติในเรื่องของการใช้พลังงานอย่างมาก และการสร้างพลังงานขึ้นมาทดแทนก็ไม่เพียงพอ จึงทำให้ RBC อยู่ในสภาวะของการขาดพลังงานตลอดเวลา และความผิดปกตินี้ Inosine น่าจะมีประโยชน์ในการช่วย RBC ให้สามารถสร้างพลังงานขึ้นมาทดแทนได้มากขึ้น