LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

28 MAR 1990

STUDY ON CYTOSOL AND MEMBRANE-BOUND PROTEASES IN β°- THALASSEMIA / Hb E RED CELL

YAOWALAK PIMAINOG

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

อภินันทนาการ
จาก
ขัณฑิตวิทยาลัย ม. มหิดล

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1989

Copyright by Mahidol University

13914

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาเอ็นซัยม์โปรตีเอสที่อยู่ในไซโตซอลและผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงในคนไข้เบต้าศูยน์-ธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบิน อี

ผู้วิจัย เยาวลักษณ์ พิมายนอก

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ สุทัศน์ พู่เจริญ , M.D.

ประพนธ์ วิไลรัตน์ , Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 23 มิถุนายน พ.ศ. 2532

บทคัดย่อ

คนไข้เบต้าศูยน์ธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบิน อี สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีระดับฮีโมโกลบินน้อยกว่า 7.7 กรัม/เดซิลิตร และกลุ่มที่มีระดับฮีโมโกลบินมากกว่า 7.7 กรัม/เดซิลิตร คนไข้กลุ่มที่มีระดับฮีโมโกลบินต่ำกว่าจะมีความรุนแรงของโรคมากกว่า อมรรัตน์ พรหมบุญ (Birth Defects 1988 ; 23(5A) : 249-56) และ กุลนภา มคธเพศ (Birth Defects 1988 ; 23(5A) : 257-61) ได้เคยศึกษาเอ็มซัยม์โปรตีเอสในไซโตซอลของเม็ดเลือดแดงของคนไข้เบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบิน อี มาก่อน การศึกษาครั้งนี้ได้เปลี่ยนแปลงสภาวะของระบบเพื่อให้สับสเตรทโกลบินละลายได้สมบูรณ์และเหมาะสมที่จะทำให้ไคเนติคเป็นเส้นตรงในระหว่างเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าแอคติวิตี้ของเอมซัยม์โปรตีเอสในคนไข้มีค่ามากกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) แต่แอคติวิตี้ของคนไข้ทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองครั้งนี้แตกต่างจากของอมรรัตน์ และ กุลนภาซึ่งพบว่าแอคติวิตี้ของคนไข้กลุ่มที่มีอาการน้อยมีค่ามากกว่าคนไข้กลุ่มที่มีอาการรุนแรงมาก อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองครั้งนี้ก็สอดคล้องกับการศึกษาของ Hamakubo (Contemporary Theme in Biochemistry 1986 ; 6 : 624-5) แอคติวิตี้ของเอนซัยม์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อในสารละลายที่ศึกษามีทั้งส่วนที่เป็นไซโตซอลและผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงรวมอยู่ด้วย

การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลของความเย็นต่อเอมซัยม์โปรตีเอสด้วย โดยการนำน้ำเลือด (lysate) ไปแช่แข็งในส่วนผสมของน้ำแข็งแห้งและอะซิโตน (อุณหภูมิประมาณ -78.5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปละลายจนสมบูรณ์ที่อ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปแช่บนถาดน้ำแข็งจนกว่าจะใช้ แอคติวิตี้ของเอนซัยม์ที่อยู่ในไซโตซอล หลังจากนำไปแช่แข็งแล้วไม่ต่างจากแอคติวิตี้ในไซโตซอลที่ไม่ได้แช่แข็ง อย่างไรก็ตามเมื่อนำไซโตซอลที่มีผนังเซลล์รวมอยู่ด้วยไปแช่แข็งพบว่ามีแอคติวิตี้

Copyright by Mahidol University

สูงขึ้นกว่าเดิม จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า ผลของการแช่แข็งทำให้เอนซัยม์โปรตีเอสที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงหลุดออกมาในไซโตซอล และเมื่อเอนซัยม์นี้อยู่ในรูปที่ละลายจะทำงานได้ดีขึ้น แอคติวิตี้ของเอนซัยม์โปรตีเอสในไซโตซอลที่มีผนังเซลล์รวมอยู่หลังจากนำไปแช่แข็งแล้วนี้ ไม่มีความแตกต่างระหว่างคนปกติกับคนไข้ที่มีอาการรุนแรงมากอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามในคนไข้ที่มีอาการรุนแรงน้อยกว่าสามารถแบ่งแอคติวิตี้ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีแอคติวิตี้เท่ากับคนปกติและกลุ่มที่มีแอคติวิตี้สูงกว่าคนปกติ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเอนซัยม์ที่เกาะที่ผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงอาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยลดความรุนแรงของภาวะซีดของคนไข้เบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบิน อี ได้บางคน

ได้ทำการศึกษารูปแบบของแถบโปรตีนจากผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงโดยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าหรืออิเลคโตรฟอรีซีส ผลการทดลองพบว่าแถบโปรตีนของผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงจากเลือดที่เจาะใหม่ๆ ไม่มีความแตกต่างระหว่างคนปกติและคนไข้ธาลัส-ซีเมีย ฮีโมโกลบิน อี อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อทิ้งเลือดนั้นไว้เป็นเวลา 3 ถึง 5 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพบว่า มีการหายไปของแถบโปรตีนบางส่วนโดยเฉพาะแถบโปรตีน 4.1 เอ อันเกิดเนื่องจากมีการถูกย่อยภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงนี้เห็นชัดเจนในคนไข้เบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย ฮีโมโกลบิน อี มากกว่าคนปกติโดยเฉพาะคนไข้ที่มีอาการรุนแรงมาก ความผิดปกติของแถบโปรตีน 4.1 เอ ในคนไข้เหล่านี้อาจจะเป็นปัจจัยที่ทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นเป็นผลทำให้เกิดสภาวะซีดตามมา

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Study on Cytosol and Membrane-bound Proteases in β°-Thalassemia / Hb E Red cell

Name Yaowalak Pimainog

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee Suthat Fucharoen, M.D.

Prapon Wilairat, Ph.D.

Date of Graduation 23 June B.E. 2532 (1989)

ABSTRACT

Patients with β°-thalassemia/Hb E disease have a wide range of anemia can be divided into two groups, one group with hemoglobin levels below 7.7 g/dl and the other above. Patients with low hemoglobin level have more severe anemia. Erythrocyte cytosol protease in patients with β°-thalassemia/Hb E disease had been previously studied by Promboon (Birth Defects 1988; 23(5A): 249-56)and Macotpet (Birth Defects 1988; 23(5A): 257-61). Assay condition were changed to make for complete dissolution of globin substrate and optimized for linear kinetics during 20 min at 30°C The results showed that erythrocyte cytosol protease activity of patients with β°-thalassemia/Hb E were significantly higher than control ($p<0.05$). The protease activities in the group with milder anemia were not different from severe group. This is in contrast to the results by Promboon and Macotpet, who found that protease activity in mild group was higher than severe group, but is consistent with the study of Hamakubo (Contemporary Theme in Biochemistry 1986 ; 6 : 624-5). Protease activity was not changed when red cell membrane was present in the assay solution.

The effects of freeze-thaw on erythrocyte lysate protease activity were also investigated. The lysate was frozen for 15 min in a mixture of dryice and acetone (-78.5°C) and was completely thawed in a water bath at 37°C , then immediately

Copyright by Mahidol University

stored on ice until used. The protease activities in cytosol fraction after freeze-thawing , were not different from untreated activity. However, following freeze-thawing of the cytosol plus membreane preparation, there was an enhancement of activity. There were no differences in protease activities of such preparations between control subjects and patients with severe anemia. However, activities in the patients with mild anemia could be devided into two groups : one group with the same activity as control and the other group with higher activity. These results suggested that membrene-bound protease may be a contributing factor in reducing the severity of anemia in some patients with β°-thalassemia/Hb E disease

Red cell membrane protein analysis by polyacrylamide gel electrophoresis in fresh blood of β°-thalassemia/Hb E and normal showed no significant difference. However, after storage at 4 °C for 3 to 5 days , there were many degradative changes in all samples, especially of band 4.1 a. The degradative changes were more abvious in severe cases than mild cases. Defect of band 4.1 a in thalassemic red cell may be a contributing factor in reducing red cell survival.

Copyright by Mahidol University