

การแสดงลักษณะของการสังเคราะห์ไมโทคอนไดรียในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1
ชนิดรุนแรง และชนิดอ่อนในประเทศไทย

นางสุรางค์ อิศวักนัง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ศูนย์วิทยทรัพยากร

แผนกวิชาชีวเคมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2517

HEMOGLOBIN BIOSYNTHETIC CHARACTERIZATION OF A CLASSICAL
AND A MILD β -THALASSEMIA IN THAILAND.



Mrs. Surang Assawamunkong

A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirement
for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1974

008593

i 180 69162

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

.....
.....
.....



คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย อาจารย์นายแพทย์ สง่า ภูตระกูล

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแสดงลักษณะของการสังเคราะห์ฮีโมโกลบินในผู้ป่วยโรค เบตา
ธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง และชนิดอ่อนในประเทศไทย

ชื่อ นางสาวรังค์ อิศวมันคง แผนกวิชาชีวเคมี

ปีการศึกษา 2517

บทคัดย่อ



เบตาธาลัสซีเมีย คือเป็นผิดปกติที่ทำให้อัตราการสังเคราะห์เพปไทด์ชนิดเบตาใน
เม็ดเลือดแดงลดน้อยลง เม็ดเลือดจะมีขนาดเล็กและคิดสีจางโดยไม่มีการขาดธาตุเหล็ก

ในประเทศไทยอุบัติการณ์ของโรคเบตาธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบิน อี (Hb E)
ประมาณ 5 % และ 13 % ของประชากรตามลำดับ เมื่อยีนทั้งสองชนิดนี้อยู่ร่วมกันจะทำให้เกิด
อาการของโรคโลหิตจางเรื้อรังที่เรียกว่า โรคเบตาธาลัสซีเมียฮีโมโกลบิน อี (β -thalasse-
mia/Hb E disease) ซึ่งทำให้เกิดปัญหาทั้งในทางแพทย์ เศรษฐกิจและสังคม จากการศึกษา
ของสาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มีหลักฐานบ่ง
ชี้ว่า เบตาธาลัสซีเมียในประเทศไทยแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ เบตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง
(Classical β -thalassemia = β -thal₁) และเบตาธาลัสซีเมียชนิดอ่อน (Mild β -
thalassemia = β -thal₂) ทั้งนี้โดยอาศัยหลักฐานจากการที่ยีนทั้งสองมีปฏิกริยากับยีนฮีโม-
โกลบิน อี (Hb E) โดยที่ β -thal₁ เมื่ออยู่ร่วมกับยีนฮีโมโกลบิน อี คนไข้จะมีชนิดของ
ฮีโมโกลบินเป็นฮีโมโกลบิน อี (Hb E) และฮีโมโกลบิน เอฟ (Hb F) ในขณะที่ β -thal₂
เมื่ออยู่ร่วมกับยีนฮีโมโกลบิน อี (Hb E) คนไข้จะมีชนิดของฮีโมโกลบินเป็นฮีโมโกลบิน อี (Hb E)
ฮีโมโกลบิน เอฟ (Hb F) และฮีโมโกลบิน เอ (Hb A) โดยที่คนไข้ไม่มีประวัติการรับ
เลือดมาก่อน

ในผู้ใหญ่เป็นการยาก หรืออาจทำไม่ได้เลยในการที่จะแยก β -thal₁ ออกจาก
 β -thal₂ เนื่องจากมีลักษณะของเม็ดเลือดที่คิดสีจาง, ขนาดเล็กและรวมทั้งมีการเพิ่มปริมาณ

ของฮีโมโกลบิน เอ สอง (Hb A₂) สูงเหมือน ๆ กัน

ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาลักษณะของการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน และวัดอัตราการสังเคราะห์ของโกลบินต่าง ๆ ในเม็ดเลือดแดงชนิดอ่อน โดยมี ³H leucine เป็นตัวติดตามผล โกลบินแต่ละชนิดแยกออกจากกันโดยใช้ CMC chromatography ใน sodium phosphate buffer pH 6.7 ซึ่งมี 8M urea และ 0.05M mercaptoethanol โดยเส้นเพปไทด์จะถูกแยกออกมาที่ละชนิดโดยอาศัย linear Na⁺ ions gradient ทำการวัด optical density และ radioactivity ของเพปไทด์แต่ละชนิด นำมาคำนวณหา β/α ratio of radioactivity และ specific activity

ในการทดลองนี้ได้ค่าเฉลี่ยของ radioactivity β/α ratio ในคนปกติ 6 คน เท่ากับ 0.92 ± 0.05 (หรือ $\alpha/\beta = 1.08 \pm 0.05$) ค่าเฉลี่ยของ radioactivity β/α ratio ในกลุ่ม β -thal₁ จำนวน 7 คน เท่ากับ 0.44 ± 0.014 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเป็นอย่างมากในทางสถิติเมื่อเทียบกับ radioactivity β/α ratio ในกลุ่ม β -thal₂ จำนวน 9 คนซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.50 ± 0.02 แสดงว่าการตรวจเบตาธาลัสซีเมียโดยการวัดอัตราการสังเคราะห์ของโกลบินนี้เป็นวิธีที่มีความไวสูงและสามารถใช้ในการแยก β -thal₁ ออกจาก β -thal₂ ได้เป็นอย่างดี ในการศึกษานี้ยังได้ทำในคนไข้ β -thal₁/Hb E disease และ β -thal₂/Hb E disease ค่าเฉลี่ยของ β^E/α ratio of radioactivity ของกลุ่ม β -thal₁/Hb E disease เท่ากับ 0.40 ± 0.08 (ไม่มี β^A) ส่วนค่าเฉลี่ยของ $\beta+\beta^E/\alpha$ ratio of radioactivity ของกลุ่ม β -thal₂/Hb E disease เท่ากับ 0.51 ± 0.07 เนื่องจาก β/α ratio ในกลุ่ม β -thal₂ แสดงถึงการกตการสร้าง β^A เพียงบางส่วน ซึ่งทำให้มีการสร้าง β^A ได้ในคนไข้ β -thal₂/Hb E disease. ใน Hb E trait ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณของฮีโมโกลบิน อี (Hb E) น้อยกว่าฮีโมโกลบิน เอ (Hb A) แต่ $\beta+\beta^E/\alpha$ ratio of radioactivity ก็อยู่ในระดับปกติคือ 0.97 ± 0.04

Thesis Title Hemoglobin Biosynthetic Characterization of a Classical and a Mild β -thalassemia in Thailand.

Name Mrs. Surang Assawamunkong Department Biochemistry

Academic Year 1974

ABSTRACT



Thalassemia is defined as a hereditary disorder with a decreased rate of a globin chain synthesis and presents as a hypochromic microcytic anemia without iron deficiency. β -thalassemia and hemoglobin E (Hb E) ($\alpha_2\beta_2^{26\text{Glu} \rightarrow \text{Lys}}$) are very prevalent in Thailand, with the incidence of 5 and 13 % respectively. Interaction of the two abnormal genes, known as β -thalassemia/Hb E disease, results in a clinical disorder of chronic hemolytic anemia, which poses not only in medical care but also in socio-economic problems. It is evident that the β -thalassemias can be classified into two types; Classical β -thalassemia (β -thal₁), and mild β -thalassemia (β -thal₂). Upon the interaction with Hb E, β -thal₁/Hb E disease reveals hemoglobin types of E+F, while the β -thal₂/Hb E disease has hemoglobin types of E+F+A without a history of blood transfusion. It is very difficult to designate the β -thal₁ and β -thal₂ trait in adult because the hematologic data of both are similar in terms of hypochromic microcytic red cells with elevated Hb A₂. This study attempts to characterize the heterozygotes by measuring the globin chain synthesis in reticulocytes in obligatory cases of β -thal₁ and β -thal₂ traits, and also to study the globin chain synthesis in Hb E traits.

The hemoglobin synthesis in reticulocytes by incubation at 37°C for 3 hours with ^3H -leucine were carried out. Globin prepared from washed red cells was fractionated by CMC chromatography, in sodium phosphate buffer at pH 6.7 containing 8M urea and 0.05M mercaptoethanol. The globin chains were eluted by a linear gradient of sodium ions. The optical density and radioactivity of each peak were determined. The total radioactivity and specific activity (cpm/min/OD) of β/α globin chain ratio were calculated.

A mean radioactivity β/α ratio of 6 cases of normal controls was 0.92 ± 0.05 (or α/β ratio = 1.08 ± 0.05). The hematologic data of 7 cases of obligatory β -thal₁ trait were similar to that of 9 cases of obligatory β -thal₂ trait, but the mean radioactivity ratio of the β -thal₁ being 0.44 ± 0.014 revealed significant difference from that of the β -thal₂ trait with 0.50 ± 0.02 . This indicated that the measurement of globin chain synthesis is a sensitive method for precise diagnosis of β -thal₁ and β -thal₂ trait. From the studies of incorporation in reticulocytes in β -thalassemia/Hb E disease, the mean radioactivity of β chain/ α chain ratio, β^E/α (no β^A) of 6 patients with β -thal₁/Hb E disease was 0.40 ± 0.08 , but the β chains/ α chain ratio, $\beta^A + \beta^E/\alpha$ of 5 cases of β -thal₂/Hb E disease was 0.51 ± 0.07 . Since the β/α ratio of the β -thal₂ trait indicated suppression of β chain synthesis less than the β -thal₁ trait, this was consistent with the presence of β^A chain, presumably due to partial suppression by β -thal₂ gene, in β -thal₂/Hb E disease. In Hb E trait, although the amount of Hb E is less than Hb A, the radioactivity of β chains/ α chain ratio; $\beta + \beta^E/\alpha$ was 0.97 ± 0.04 , which was in normal ranges.

ACKNOWLEDGEMENT



The author wishes to express her deep gratitude to Dr. Sa-nga Pootrakul, Division of Hematology, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, for his helpful supervision and encouragement throughout her study and preparation of this thesis.

This work was carried out with the permission of Professor Supa Na-Nakorn, Chief of Division of Hematology, Department of Medicine, Siriraj Hospital.

Thanks are also extended to all the staff of the Division of Hematology and Mr. Smai Leepipatpiboon for their various helps.

The author also wishes to thank Dr. Nikorn Dusitsin, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for his permission to use the Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer.

Special thanks are also due to Dr. Varapan Danutra for her constructive information.

This work was made possible by the support from the Graduate School of Chulalongkorn University and Mahitaladhibet research scholarships.

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	vi
ACKNOWLEDGEMENT	viii
TABLE OF CONTENTS	ix
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
ABBREVIATION	xiii
 CHAPTER	
1. INTRODUCTION	1
2. MATERIALS AND METHODS	11
3. RESULTS	22
4. DISCUSSION	43
5. CONCLUSION AND RECOMMENDATION	49
REFERENCES	53
VITA	58



LIST OF TABLES

Table	Page
1. Hematologic and globin synthesis data of seven subjects as a normal control.	23
2. Hematologic and globin synthesis data of seven subjects with heterozygous classical β -thalassemia and two subjects with double heterozygous β -thal ₁ and α -thalassemia.	26
3. Hematologic and globin synthesis data of nine subjects with heterozygous mild β -thalassemia.	28
4. Summary of t-test of hematologic globin synthesis mean values.	30
5. Hematologic and globin synthesis data of five subjects with heterozygous hemoglobin E, one subject with double heterozygous of hemoglobin E and α -thalassemia.	32
6. Hematologic and globin synthesis data of six subjects with β -thal ₁ /Hb E disease.	34
7. Hematologic and globin synthesis data of five subjects with β -thal ₂ /Hb E disease.	38
8. Summary of t-test of hematologic and globin synthesis mean values between β -thal ₁ /Hb E and β -thal ₂ /Hb E disease.	39

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. The genetic control of hemoglobin synthesis in normal adult.	3
2. Explanation of the finding of hemoglobin component in heterozygous for hemoglobin E variant.	4
3. Explanation of abnormal hemoglobin types found in double heterozygous β -thal ₁ and Hb E.	9
4. Explanation of hemoglobin types found in double heterozygous β -thal ₂ and Hb E.	9
5. Starch-gel electrophoresis in tris-EDTA-borate buffer pH 8.6 with orthodianisidine stain, demonstrating types in various genotype designations.	16
6. CMC chromatography of globin from classical β -thalassemia trait subject.	27
7. CMC chromatography of globin with mild β -thalassemia trait subject.	29
8. Typical CMC chromatograms of globins from β -thal ₁ /Hb E disease patient.	35
9. Typical CMC chromatogram of globin from β -thal ₂ /Hb E disease patient.	37
11. Histogram of globin synthesis studies in various genotypes.	41

Figure	Page
11. Tryptic peptide map of normal β chain.	42
12. Tryptic peptide map of β^E chain from both types of β -thal/Hb E disease.	42



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

Hb	=	Hemoglobin
β -thal ₁	=	Classical β -thalassemia
β -thal ₂	=	Mild β -thalassemia
α -thal ₁	=	Classical α -thalassemia
α -thal ₂	=	Mild β -thalassemia
β^A	=	Normal β -chain
β^E	=	Abnormal β -chain of Hb E
RBC	=	Red blood cell
PCV	=	Packed cell volume
MCV	=	Mean corpuscular volume
MCH	=	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	=	Mean corpuscular hemoglobin concentration
Alk. resist. Hb	=	Alkali resistant hemoglobin
Glu	=	Glutamic acid
Lys	=	Lysine