Thesis Title Apoptosis of Immature Red Blood Cells in β-thalassemic Patients

Author Mr. Sarun Kunwittaya

M.S. Medical Technology

Examining Committee

Lecturer Prasit Chanarat Chairman

Lecturer Dr.Yuttana Mundee Member

Assistant Professor Dr.Umnat Mevatee Member

ABSTRACT

Thalassemia is a genetic disease which one of clinical complications is chronic anemia due to ineffective erythropoiesis and sequestration by spleen. This paper aims to demonstrate apoptosis of nucleated red blood cells (NRBCs) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in β-thalassemic patients and to study an effect of thalassemia plasma on apoptosis. MATERIALS AND METHODS: Eleven males and 19 females patients with post-splenectomized and tranfustion dependent β-thalassemia major; age 4-15 years, 25 of FA and 5 of EF hemoglobin typing, were studied. Apoptosis was performed by the single cell gel electrophoresis, so called "comet assay". DNA damage were stained with ethidium bromide and analyzed as comet tail moment under fluorescence microscope. RESULTS: There are a lot of DNA strand break in β-thalassemic NRBCs demonstrated which comet tail moment (mean ± SD) was 515.17 ± 12.10 compares to 88 ± 2.50 pixels of NRBCs of normal cord blood, β-

thalassemia PBMCs were also significantly higher than normal (165.17 ± 2.10 vs 28.0 ± 2.50 pixels, $p< 0.05$). An increase of comet tail moment was also observed in normal PBMCs cord blood treated with 50% thalassemic plasma compared to untreated cells (535.00 ± 12.08 vs. 26.0 ± 2.89 pixels, $p< 0.05$). There is a negative correlation ($r = -0.15$) between hemoglobin and comet tail moment. Effect of oxidative stress to PBMC showed that iron ($FeSO_4$) and H_2O_2 at concentration 1.0 mM and 50 μM respectively induced DNA damage in both of PBMCs from normal cord blood and β-thalassemic patients. Activity of turmeric extract used to inhibit oxidative stress in this studied, a concentration at 20 μg/mL turmeric extract cotreated cells could inhibit oxidative stress, the result showed decreased DNA damage in PBMCs which treated with $FeSO_4$ and H_2O_2 at concentration 1.0 mM and 50 μM. A dose dependent manner of curcumin could inhibit oxidative stress. CONCLUSION: Apoptosis of NRBCs is one of mechanism that induced DNA damage of NRBCs that produced ineffective erythropoesis and chronic anemia which oxidative stress of oxygen free radicals and iron in plasma may be a major role of apoptosis pathway.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ อะพอพโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนในผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย
ชื่อผู้เขียน นายศรัล ขุนวิทยา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อาจารย์ประสิทธิ์ ชนะรัตน์ ประธานกรรมการ
อาจารย์ ดร.ยุทธนา หมั่นดี กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ มีเวที กรรมการ

บทคัดย่อ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมซึ่งมีภาวะโลหิตจางเรื้อรังเป็นอาการแทรกซ้อนอย่างหนึ่ง โดยมีสาเหตุมาจากการสร้างเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีประสิทธิภาพและถูกทำลายโดยม้าม วัตถุประสงค์ของรายงานนี้ศึกษาถึง apoptosis ของ nucleated red blood cell (NRBCs) และ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียและศึกษาผลของพลาสมาผู้ป่วยต่อการเกิด apoptosis วัสดุและวิธีการทดลอง: ผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียที่ได้รับการตัดม้ามแล้วเป็นชายจำนวน 11 คนและหญิงจำนวน 19 คนมีอายุระหว่าง 4-15 ปีโดยมีชนิดของฮีโมโกลบินคือ FA จำนวน 25 ราย และ EF จำนวน 5 ราย โดยทำการตรวจวัด apoptosis ในแต่ละเซลล์ ด้วยเทคนิค comet assay แล้วย้อมชิ้นส่วนของดีเอนเอด้วย ethidium bromide รายงานผลเป็นค่า comet tail moment (mt) ในหน่วยของ pixels ด้วยกล้อง fluorescence microscope จากผลการทดลองพบว่ามีชิ้นส่วนของดีเอนเอจำนวนมากใน NRBCs ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียและค่า comet tail moment (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) เท่ากับ 515.17 ± 12.10 pixels เปรียบเทียบกับ 88 ± 2.5 pixels ใน NRBCs ของเลือดจากสายสะดือเด็กปกติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ ส่วนค่า comet tail moment ของ PBMCs ในผู้ป่วยมีค่าที่สูงกว่า PBMCs จากเลือดสายสะดือเด็ก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (165.17 ± 2.10 ต่อ 28.0 ± 2.5 pixels ที่, $p<0.05$) ระดับของ comet tail

moment ของ PBMCs จากเลือดสายสะดือเด็ก มีค่าสูงขึ้นเมื่อทดสอบด้วย 50% พลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (untreated cells) เท่ากับ 535.0±12.08 ต่อ 26.0± 2.89 pixels ที่ $p<0.05$ เมื่อทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างฮีโมโกลบินและ comet tail moment พบว่ามีความสำพันธ์กันเชิงลบที่ r = -0.15 ผลของ oxidative stress ต่อเซลล์แสดงให้เห็นว่าเหล็กและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ และ 50 ไมโครโมลาร์ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายแก่ดีเอนเอนำไปสู่ apoptosis การศึกษาครั้งนี้ได้นำสารสะกัดจากผงขมิ้น (turmeric extract) มาใช้ในการศึกษา พบว่าที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งภาวะ oxidative stress ได้เป็นผลให้ดีเอนเอถูกทำลายลดลง จากการศึกษาสามารถสรุปผลได้ว่า apoptosis ของ NRBCs เป็นกลไกอย่างหนึ่งในการเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายดีเอนเอของ NRBCs ทำให้เกิดการสร้างเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีประสิทธิภาพและเกิดภาวะโลหิตจางเรื้อรัง ซึ่ง oxidative stress ของสารอนุมูลอิสระของออกซิเจนและเหล็กอิออนในพลาสมาอาจจะมีบทบาทสำคัญในการเกิด apoptosis.