การศึกษาหาระดับเอทีพีในเม็ดเลือดแดงปกติ และในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย

นางอารี สุขประเสริฐ

006583

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
แผนกวิชาเภสัชวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. ๒๕๑๘

i 1830607X

STUDIES ON ERYTHROCYTE ATP LEVELS IN NORMAL SUBJECTS AND SUBJECTS WITH MALARIAL INFECTION

Mrs. Aree Sookprasert

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmacology
Graduated School
Chulalongkorn University

1975

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science in Pharmacy.

B. Tamthai

Dean of the Graduate School

Thesis Committee:

Pisidhi Sadlier-Brosius Chairman

Plengvidhya, P.

Chamnong Visutaamnthorn

Suvit Areekul

Thesis Supervisor: Dr. Suvit Areekul

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาหาระดับเอทีพีในเม็ดเลือดแดงปกติและในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย

ชื่อ นางอารี สุขประเสริฐ แผนกวิชา เภสัชวิทยา

ปีการศึกษา ๒๕๑๗

บทคัดย่อ

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า เอทีพีมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับเมตาบอลิสมของเม็ดเลือดแดงและของเซลล์ของสิ่งที่มีชีวิตทั้งหลาย โดยปกติแล้วเม็ดเลือดแดงต้องใช้เอทีพีจำนวนหนึ่งในการมีชีวิตในระบบไหลเวียนของร่างกาย ได้มีการศึกษาถึงระดับของเอทีพีในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียกันอย่างกว้างขวางด้วยความสนใจ ๒ ประการ ความสนใจอันแรกเกิดจากการพบว่าระดับของเอทีพีในเม็ดเลือดแดงของ host อาจจะมีอิทธิพลต่ออัตราการเพิ่มของจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียได้ ความสนใจอีกอันหนึ่งเกิดจากสมมุติฐานที่ว่า การแข็งตัวของเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียซึ่งทำให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือดในอวัยวะต่าง ๆ ของhost นั้น อาจจะเกิดจากการขาดเอทีพีในเม็ดเลือดแดงเหล่านั้น

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าวนี้ โดยการศึกษาหาระดับของเอทีพีในเม็ดเลือดแดงปกติทั้งของคน ลิงและหนู และของคนไข้ที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด P. falciparum ของลิงที่ทำให้ติดเชื้อมาลาเรียชนิด P. knowlesi และของหนูที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด P. berghei

ผลการศึกษาหาปริมาณเอทีพีในเม็ดเลือดแดงของคนไข้ที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด P. falciparum จำนวน ๒๗ คน ได้ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนเท่ากับ 119.05 ± 30.75 μM/100 ml RBC (ค่าระหว่าง 58.8 - 189.7) ในผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรียตั้งแต่ ๑ ถึง ๑๐๕ ตัวต่อ ๑,๐๐๐ เม็ดเลือดแดง ค่าที่ได้นี้ไม่แตกต่างไปจากปริมาณเอทีพีในเม็ดเลือดแดงของคนปกติจำนวน ๑๕๑ คน ($P > 0.05$)

เมื่อนำเลือดที่ติดเชื้อมาแยกเป็นชั้นโดยใช้ 0.7 และ 0.8 M Sucrose solution พบว่าในคนไข้ที่ติดเชื้อมาลาเรีย ปริมาณเอทีพีในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียสูงกว่าในเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อมาลาเรียมาก และปริมาณเอทีพีในเม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อมาลาเรียนี้ต่ำกว่าปริมาณของเอทีพีในเม็ดเลือดแดงปกติ

ผลการศึกษาหาปริมาณเอทีพีในเม็ดเลือดแดงของลิงปกติ ๒๐ ตัว และในลิงที่ทำให้ติดเชื้อมาลาเรียชนิด P. knowlesi ๘ ตัว (จำนวน ๒๑ ตัวอย่าง) ซึ่งมีจำนวนการติดเชื้อแตกต่างกัน และในลิง ๔ ตัว ที่รักษาให้หายจากการติดเชื้อแล้ว พบว่าปริมาณเอทีพีในเม็ดเลือดแดงของลิงทั้ง ๓ พวกนี้ไม่แตกต่างกัน และค่าของเอทีพีไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนของเชื้อมาลาเรียตั้งแต่ ๑ ถึง ๑๐๓ ตัวต่อ ๑,๐๐๐ เม็ดเลือดแดง

ปริมาณของเอทีพีในเม็ดเลือดแดงของหนูที่ทำให้ติดเชื้อมาลาเรียชนิด P. berghei ในระยะของการติดเชื้อต่าง ๆ พบว่าค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนเท่ากับ 147.72 ± 74.3 µM/100 ml RBC ซึ่งสูงกว่าค่าเอทีพีในเม็ดเลือดแดงของหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ค่าเหล่านี้ไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนของเชื้อไข้จับสั่น ปริมาณของเอทีพีในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียเป็นปฏิภาคกลับกับจำนวนเชื้อมาลาเรียในขณะที่เม็ดเลือดแดงที่ไม่ติดเชื้อมีปริมาณเอทีพีเท่ากับเอทีพีในเม็ดเลือดแดงปกติ

Thesis title: Studies on erythrocyte ATP levels in normal subjects and subjects with malarial infection.

Name: Mrs. Aree Sookprasert Department of Pharmacology

Academic year: 1974

ABSTRACT

It has been well established that adenosine triphosphate (ATP) plays a vital role in erythrocyte metabolism of all living cells. A reasonably normal level of ATP is necessary for the survival of the erythrocyte during its in vivo life span. The role of ATP in red cells of subjects infected with malaria has been studied extensively for 2 interests. One principal finding was that the level of ATP in the erythrocyte of the host may influence the rate of increase of parasitaemia. Another development was the hypothesis that the rigidity of red cells in malaria infection which obstruct the blood vessels in various host organs might be due to ATP depletion in these erythrocytes. To test this hypothesis, the erythrocyte ATP content was estimated in the normal subjects, patients with P. falciparum malaria, monkeys with P. knowlesi malaria and mice with P. berghei malaria.

A mean value ± S.D. of erythrocyte ATP content of 119.05 ± 30.75 μM/100 ml RBC (range 58.8 - 189.7) in 27 patients with P. falciparum malaria with parasitaemia ranging from 1 to 105 parasites per 1,000 RBC was not significantly

different ($P > 0.05$) from the value of 101.86 ± 19.96 μM/100 ml RBC in 151 normal subjects. The infected blood samples were separated into different layers by using 0.7 and 0.8 M sucrose solutions. The calculated ATP content of parasitized red cells in these layers was found to be much higher than that of the non-parasitized red cells while the latter showed the same or lower content of ATP than that of the normal blood.

Erythrocyte ATP levels were also determined in 20 normal monkeys, 21 samples of 8 monkeys infected with P. knowlesi malaria at different stages of infection and in 9 monkeys at the convalescent stage. There was no significant difference ($P > 0.05$) between these values in the 3 groups of animals. The erythrocyte ATP levels also showed no relationship with the parasitaemia (ranged from 1 to 103 per 1,000 RBC).

A mean value ± S.D. of erythrocyte ATP content in P. berghei infected mice at various stages of infection (147.72 ± 74.3 μM/100 ml RBC) was found to be significantly higher than those in the normal mice ($P < 0.01$). These levels also showed no relationship with the parasitaemia. An inverse relationship between parasitaemia and the ATP content in parasitized red cells was obtained while the non-parasitized red cells showed the same content of ATP as in the normal erythrocytes.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my sincere gratitude and thanks to Dr. Suvit Areekul, Acting Head, Department of Tropical Radioisotopes, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, for his supervision, keen interest, guidance and encouragement during the course of this study.

I am indebted to Professor Chamlong Harinasuta, Dean of the Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, for his providing me the opportunity and means to carry out this work, and to Dr. Pricha Charoenlarp, Department of Clinical Tropical Medicine, for his support.

I also want to remember with my sincere thanks to the staffs of the Department of Tropical Radioisotopes for their cooperation, particularly to Miss Duangmarn Matrakul for her advice concerning the technique to ATP determination, to Mrs. Kanokwan Ukoskit for her helpful assistance on the experimental animals, to Miss Sanong Kitkornpan and Miss Yupa Chantachum for their general assistance.

My gratitude is extended to Professor Captain Pisidhi Sudhi-Aromna R.T.N., Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his support.

Finally, I would like to express my appreciation to the Thai Red Cross, for the supply of blood of the Thai blood donors.

LIST OF ABBREVIATIONS

AMP	Adenosine-5′-monophosphate
ADP	Adenosine-5′-diphosphate
ATP	Adenosine-5′-triphosphate
GAPD	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
Hb	Haemoglobin
Hct	Haematocrit
NADH + H^+	Reduced form of Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
PCA	Perchloric acid
P. berghei	*Plasmodium berghei*
P. falciparum	*Plasmodium f lciparum*
P. knowlesi	*Plasmodium knowlesi*
RBC	Red blood cells
S.D.	Standard deviation
S.E.	Standard error
TCA	Trichloroacetic acid

mM	Millimolar
µM	Micromolar
N	Normal
%	Per cent

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT vi

ACKNOWLEDGEMENTS viii

LIST OF ABBREVIATIONS ix

LIST OF TABLES xiii

LIST OF FIGURES xv

CHAPTER

1. INTRODUCTION

Adenosine-5′-triphosphate (ATP)..... 1

Function of ATP..... 2

The energy cycle in cells..... 3

ATP and red blood cells 6

Relationship between ATP levels and malaria 10

2. MATERIALS AND METHODS 15

Experimental subjects..... 17

Preparation of blood samples 18

Study on ATP concentration of red blood cells 19

Determination of the haematocrit levels... 22

Blood examination..... 23

Separation of parasitized red blood cells from non-parasitized red blood cells.. 25

CONTENTS (Cont.)

Page

3. RESULTS 27
Reproducibility 27
Recovery of added ATP 27
Studies on the effect of the temperature on erythrocytes ATP levels in stored blood 30
ATP content in red blood cells of Thai blood donors 34
ATP content in red blood cells of patients with P. falciparum malaria..... 41
Studies on erythrocytes ATP levels in monkeys 45
Studies on erythrocytes ATP levels in mice 51
4. DISCUSSION 59
5. CONCLUSION 67
REFERENCES 69
VITA 77

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Comparison of the similarities in the red cell alterations in malaria and in consequence to ATP depletion.....	14
2.	The reproducibility of ATP values in a same pooled blood sample.....	28
3.	Percentage recovery after adding the known amount of the standard ATP solution into the buffer solution and a blood sample.....	29
4.	The effect of time and temperature on ATP levels in red blood cell.....	31
5.	Red cell ATP levels obtained by various methods	35
6.	The effect of time on the red cell ATP levels of P. falciparum-infected blood stored in the refrigerator.....	39
7.	ATP content in red cells of patients with P. falciparum malaria.....	42
8.	The ATP content in the red blood cells of the normal monkeys.....	46

LIST OF TABLES (Cont.)

Table		Page
9.	The ATP content in the red blood cells of monkeys with P. knowlesi malaria.....	47
10.	ATP levels in the red blood cells of convalescent monkeys.....	48
11.	ATP levels in the red blood cells of the normal mice.....	52
12.	The ATP contents in the red blood cells of mice with P. berghei malaria.....	53
13.	The measured ATP content in red blood cells of mice infected with P. berghei and the calculated ATP content in the parasitized and non-parasitized red cells.....	57

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Calibration for the optimal amount of enzymes.....	32
2.	Effect of time and temperature on ATP levels.....	33
3.	The frequency distribution of red cell ATP levels in 151 Thai blood donors.....	36
4.	The frequency distribution of red cell ATP levels in 94 males.....	37
5.	The frequency distribution of red cell ATP levels in 57 females.....	38
6.	Effect of time and temperature on ATP levels in normal blood donors and blood infected with P. falciparum malaria.....	40
7.	Relationship between the parasitaemia and the measured red cell ATP content of 27 patients with P. falciparum malaria.....	43
8.	Relationship between the parasitaemia and the log ATP content of parasitized red cells with P. falciparum malaria.....	44

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
9.	The individual values of red cell ATP levels in normal, malaria infected and convalescent monkeys.....	49
10.	The erythrocyte ATP levels of infected monkeys with P. knowlesi malaria at different stage of infection.....	50
11.	ATP content in red cells of normal and the P. berghei-infected mice.....	54
12.	Relationship between the parasitaemia (%) and the measured red cell ATP content of P. berghei-infected mice.....	55
13.	Relationship between the parasitaemia (1000^{-1} RBC) and the ATP content in the parasitized red cells.....	58