



ABNORMAL RED CELL PERMEABILITY IN MALNUTRITION AND THALASSEMIA: PROLONGED ERYTHROCYTE GLYCEROL LYSIS TIME

by

Tawat Tositarat, B.Sc. (Med. Tech.)

Russamee Kawvishit, B.Sc. (Med. Tech.)

Panja Kulapongs, M.D., Dip. Am. Bd. of Ped.

ภายในเม็ดเลือดแดงประกอบด้วย สารหลายชนิด มีทั้งพวก impermeant molecules (ส่วนใหญ่เป็นพวกโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับ osmotic pressure เพราะมันผ่านผิวเม็ดเลือดออกไปไม่ได้) และ anions ต่าง ๆ ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก และสามารถซึมผ่านผิวเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็น semipermeable membrane เข้าออกได้อย่างรวดเร็วเพื่อบ่งกันมิให้ตัวมันเองเก็บ anions เหล่านั้นและน้ำไว้ใน

ตัวมากเกินไปจนแตกทำลายเม็ดเลือดแดง ต้องขับ cation (ที่สำคัญคือ โซเดียม) ออกจากตัวมัน โดยวิธีการที่เรียกกันว่า Sodium flux. ความผิดปกติของกลไกนี้ ทำให้เม็ดเลือดแดงมี osmotic fragility (NaCl) เพิ่มขึ้นดังเช่นที่พบในผู้ป่วยด้วยโรค congenital spherocytosis เป็นต้น โดยอาศัยหลักเกณฑ์เดียวกันนี้ เราสามารถจะศึกษาถึง permeability ของผิวของเม็ดเลือดแดง ด้วยวิธีการที่เรียกกัน

Hematology Division, the Anemia and Malnutrition Research Center,
Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

ว่า Erythrocyte glycerol lysis time โดยการใส่ glycerol แทน NaCl solution วิธีการนี้มีผู้ใช้ศึกษาในเลือดของสัตว์ต่าง ๆ กันมาเป็นเวลานานแล้ว (1-3) แต่เพิ่งจะมีการดัดแปลงให้สะดวกและเป็นประโยชน์ในด้านการตรวจความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นในโรคต่าง ๆ (4-5) วิธีนี้แม้ว่าจะไม่ specific แต่เป็นวิธีที่ง่ายทำได้รวดเร็วและใช้เลือดในปริมาณน้อยมากผลการศึกษาของเราพบว่าเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเด็กด้วยภาวะทุโภชนาการ (protein calorie malnutrition หรือ PCM) และ thalassemia มี glycerol lysis time นานผิดปกติอย่างชัดเจนเมื่อผู้ป่วยด้วย PCM ได้รับการรักษาจะมีระดับของ cholesterol, total phospholipid และ lecithin content ของ red cell membrane ลดต่ำลงจนกลับเป็นปกติ พร้อมกันนั้นก็จะมี glycerol lysis time เป็นปกติด้วย จุดประสงค์ของเราก็คือแนะนำวิธีการของ glycerol lysis ที่เราศึกษาอยู่ในขณะนี้เพื่อเป็นแนวทางที่จะได้มีผู้นำไปใช้ศึกษาเพิ่มเติมในโรคต่าง ๆ ที่พบได้บ่อยในบ้านเราต่อไป

วิธีการ

REAGENTS :

1. Isotonic phosphate-buffered saline (pH 7.4)
2. 0.3 M. Glycerol solution : เตรียมขึ้นโดยการผสม 3.07 gm. Glycerol, reagent grade (Fisher scientific Co., Pittsburgh, Pa.) กับ deionized distilled water จนได้น้ำยาครบ 100 ml. (น้ำยานี้ stable ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 6 เดือน)

วิธีทำ : เติม 20 ul. ของ whole blood (ใช้เลือดสดจากปลายนิ้วมือ, เลือดจาก heparinized capillary tube หรือเลือดที่ผสมกับ EDTA มาแล้วก็ได้) ลงไปในหลอดแก้วที่มี 5.0 ml. buffered saline ผสมให้เข้ากันดีแล้ว pipette 1.0 ml. ของน้ำยานี้ใส่ใน standard cuvette (10 mm. light path) ของเครื่อง spectrophotometer ที่มี linear/log หรือ linear potentiometric recorder (เช่น Beckman DU Monochromator หรือ Zeiss PMQ II spectrophotometer ร่วมกับ Gilford recorder เป็นต้น) วัด

optical density ที่ 625 nm. โดยมี completely hemolyzed blood sample เป็น blank เติม 2.0 ml. ของ 0.3 M Glycerol solution ลงใน cuvette โดยใช้ syringe pipette ผ่านเข็มขนาดใหญ่ (เบอร์ 16) หรือผ่านสาย polyethylene tube ก็ได้ ความขุ่นของ reaction mixture นี้จะลดลงอย่างรวดเร็ว median glycerol lysis time หรือ GLT₅₀ คือเวลาที่เข้าไปในการที่ O.D. ของ reaction mixture ลดลงเหลือ 50 % ของ initial value. (ดูตัวอย่างในรูป)

ข้อเสนอแนะ

1. ปริมาณของ Whole blood ที่ใช้ (20 lambda) ไม่สำคัญมากนักการที่ใช้ปริมาณขนาดนี้ก็เพราะในคนปกติจะทำให้ final reaction mixture ซึ่งเลือดถูกเจือจางเป็น 1:750 ส่วน ยังมี optical density เริ่มต้นอยู่ในระหว่าง 0.8-0.9 ซึ่งอ่านได้สะดวกและ dilution ขนาดนี้ทำให้ plasma และ anticoagulant ไม่มายุ่งกับผลการ lysis ถ้าผู้ป่วยซีดมากอาจจะใช้เลือดมากกว่านี้ แต่วิธีที่ดีที่สุด ก็คือเจาะเลือดทั้งไว้ระยะหนึ่ง และเอาน้ำเลือดออกเสียบ้างก็จะ

ได้เม็ดเลือดแดงมากเหมือนคนปกติ

2. Glycerol : Sodium chloride ratio ขนาดที่ใช้ข้างก้างดี ถ้าจะให้ lysis เร็วขึ้นก็เพิ่ม glycerol ถ้าเพิ่มปริมาณของ NaCl solution มักจะอ่านค่า GIT₅₀ ได้ยากเพราะ lysis เกิดน้อย

3. การเติม glycerol ต้องทำให้เสร็จภายในเวลา 5-10 วินาที เพราะ lysis เริ่มอย่างรวดเร็ว ดังนั้นวิธีที่แนะนำคือการใช้ automatic pipette หรือ plastic syringe ต่อกับ plastic tube ขนาดเล็ก (หรือ Pediatric gavage tube) สอดไว้ที่ปากของ cuvette และใช้ผ้าดำคลุมบริเวณนี้เป็นอย่างดี

4. Potentiometric recorder นั้นจะใช้ linear ธรรมดาาก็ได้ผลเหมือนกัน

5. วิธีนี้นอกจากจะใช้ตรวจเลือดในปริมาณน้อยแล้ว ในแต่ละวันเราสามารถจะตรวจผู้ป่วยได้เป็นจำนวนมากถ้าต้องการให้สะดวกยิ่งขึ้น ก็อาจจะดัดแปลงไปใช้ automated system หรือใช้ colorimeter ธรรมดา ก็ได้

ค่าของ GLT₅₀ ในผู้ใหญ่ปกติอยู่ระหว่าง 28-60 วินาที แต่มี skewed

distribution และมีค่าเฉลี่ยของ GLT₅₀ = 39.14 ± 11.67 วินาที เด็กปกติอายุระหว่าง 1-4 ขวบ มีค่าเฉลี่ยของ GLT₅₀ = 41.90 ± 7.97 วินาที ผล GLT₅₀ ใน triplicate sample ใกล้เคียงกันมากไม่ว่าจะใช้เลือดที่มี anticoagulant หรือไม่เมื่อเติมน้ำกลั่นแทน glycerol จะมี hemolysis อย่างรวดเร็วและมี GLT₅₀ เพียง 7-9 วินาทีเท่านั้นค่า GLT₅₀ ของเด็กที่ป่วยด้วยโรคทุโภชนาการสูงผิดปกติมาก (74.45 ± 18.18 วินาที) แต่เมื่อได้รับการรักษาเป็นเวลา 7-10 สัปดาห์ จนมีอาการเป็นปกติก็มีค่า GLT₅₀ เป็นปกติเช่นกัน (40.71 ± 6.36 วินาที) ส่วน GLT₅₀ ของ thalassemia มีค่าสูงผิดปกติมากระหว่าง 60.2 ถึง 120.7 วินาที (เฉลี่ย = 93.52 ± 25.30 วินาที)

วิจารณ์

การศึกษาเกี่ยวกับ hemolysis ของเม็ดเลือดแดงในน้ำยา non-electrolytes ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับ glycerol lysis พบว่ามีค่าแตกต่างกันในสัตว์ species ต่างๆ และมีความสัมพันธ์กับ red cell osmotic fragility ด้วย (5) อย่างไรก็ตาม osmotic fragility ของเม็ดเลือดแดงก็ไม่

ใช่สาเหตุสำคัญที่ทำให้เม็ดเลือดเหล่านีมี glycerol lysis time แตกต่างกันได้อย่างมากเช่นนี้การศึกษาในระยะต้นพบความสัมพันธ์ระหว่าง lipid composition ของผิวเม็ดเลือดแดงกับการซึมผ่านของ glycerol เข้าไปภายในเม็ดเลือด (3, 6-9) ต่อมา Gottfried and Robertson (4,5) พบว่าผู้ป่วยบางรายที่มี lipid pattern ของผิวเม็ดเลือดแดง (ที่สำคัญได้แก่ cholesterol, phospholipid และ lecithin) ผิดปกติมี GLT₅₀ นานมาก แต่ส่วนมากของผู้ป่วยที่มี GLT₅₀ ผิดปกติเช่นเดียวกันนี้มี lipid pattern เป็นปกติ Wessels and Veerkamp ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนประกอบของผิวเม็ดเลือดแดงในสัตว์หลายชนิด (10) พบว่า glycerol permeability coefficient กับ lipid composition ของผิวเม็ดเลือดแดงมีความสัมพันธ์กันบ้างแต่ไม่มาก และเม็ดเลือดแดงมักจะมี permeability น้อยลง (hemolysis ช้า) กว่าปกติถ้ามี cholesterol หรือ lecithin ที่ผิวของมัน เพิ่มขึ้นผลการศึกษานี้ตรงกับ Coward (11) และของเราเอง (12) ที่พบว่าผิวเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยด้วยภาวะทุโภชนาการมี

cholesterol, phospholipid, lecithin สูงผิดปกติ และมี osmotic fragility กับ permeability ลดลงในขณะเดียวกันผลการศึกษาของเราและของ Gottfried and Robertson (4.5) พบว่าผู้ป่วย thalassemia ทั้ง trait และ homozygous มี GLT 50 นานผิดปกติทั้ง ๆ ที่มี lipid composition ของผิวเม็ดเลือดแดงเป็นปกติก็แสดงว่า GLT 50 นานผิดปกติน่าจะเป็นเพราะผิวเม็ดเลือดแดงมี relative increase membrane surface area มากกว่าจะเป็นเพราะมีโครงสร้างผิดปกติทั้งนี้เพราะ Glycerol lysis time นั้นเป็นเพียงการวัด permeability ของผิวเม็ดเลือดแดงอย่างคร่าว ๆ เท่านั้น (1) อัตราของการเกิด hemolysis ในกรณีเช่นนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัย

อื่นๆ อีกหลายอย่างเช่น ความแตกต่างระหว่าง initial cell volume กับ critical hemolytic volume, การเปลี่ยนแปลงของ osmotic pressure ภายในเซลล์ในขณะที่มีน้ำพองตัวขึ้นเรื่อย ๆ เป็นต้น (1, 10) ทั้งนี้วิธี Glycerol lysis time นั้นจึงไม่ถือเป็นวิธีตรวจความผิดปกติเกี่ยวกับ lipid composition ของผิวเม็ดเลือดแดงแต่อาจใช้เป็น screening test ในผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะมีความผิดปกติในเซลล์ของเม็ดเลือดแดง หรือผิวเม็ดเลือดแดงอย่างอื่น ๆ ที่ทำให้มี surface membrane และ permeability เปลี่ยนแปลงไปและอาจจะช่วยแยกแยะระหว่างผู้ป่วย thalassemia minor กับ iron deficiency anemia ได้อย่างรวดเร็ว (5)

REFERENCES

1. Jacobs, M. H., Glassman, H. N., and Parpart, A. K. : Osmotic properties of the erythrocytes. VII. The temperature coefficients of certain hemolytic processes. J. Cell Comp. Physiol. 7:197, 1935.
2. Jacobs, M. H., Glassman, H. N., and Parpart, A. K. : Hemolysis and zoological relationship. Comparative studies with four penetrating nonelectrolytes. J.

- Exp. Zool. 113:277, 1950.
3. De Gier, J., Van Deenen, L.L.M., and Ven Sender, K.G.: Glycerol permeability of erythrocytes. *Experientia* 22:20, 1966.
 4. Gottfried, E.L., and Robertson, N.A.: RBC glycerol lysis time as a clinical tool. *Blood* 40:940, 1972.
 5. Gottfried, E.L., and Robertson, N.A.: Glycerol lysis time as a screening test for erythrocyte disorders. *J. Lab. Clin. Med.* 83:323, 1974.
 6. De Gier, J., Mandersloot, J. G., and Van Deenen, L.L.M.: Lipid composition and permeability of liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* 150:666, 1968.
 7. Moore, T.J.: Glycerol permeability of human fetal and adult erythrocytes and of a model membrane. *J. Lipid Res.* 9:642, 1968.
 8. Kroe, J., and Ostwald, R.: Erythrocyte membranes - effect of increased cholesterol content on permeability. *Biochem. Biophys. Acta* 249:647, 1971.
 9. Demel, R.A., Geurts Van Kessel, W.S.M., and Van Deenen, L.L.M.: The properties of polyunsaturated lecithins in monolayers and liposomes and the interactions of these lecithins with cholesterol. *Biochem. Biophys. Acta* 266:26, 1972.
 10. Wessels, J. M. C., and Veerkamp, J.H.: Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes. III Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *Biophys. Acta* 291:190, 1973.
 11. Coward, W.H.: The erythrocyte membrane in kwashiorkor. *Brit. J. Nutr.* 25:145, 1971.
 12. Brown, K., Suskind, R., Lubin B., Kulapongs, P., Leitzmann, C., and Olson, R.E.: The red cell membrane in protein-calorie malnutrition. (In Press).