Thesis Title Factors Influencing 2,3-Bisphosphoglycerate Level in Rat Erythrocytes During Exercise.

Author Miss Plernpit Yasin

M.S. Biochemistry

Examining Committee:

Lect. Dr. Udompun Khansuwan	Chairman
Asst. Prof. Anchalee Pongchaidecha	Member
Lect. Dr. Somdet Srichairatanakool	Member
Lect. Dr. Jatuporn Wongsathikun	Member

ABSTRACT

The compound 2,3-bisphosphoglycerate (2,3-BPG) is formed within red blood cells from the glycolytic intermediate 1,3-bisphosphoglycerate. The principal role of 2,3-BPG is to facilitate oxygen release from the oxyhemoglobin to active muscle tissues as red cells are passing through muscle tissue capillaries. Exercise requires an adequate supply of oxygen to maintain aerobic energy metabolism. We hypothesized that exercise causes an increase in erythrocyte 2,3-BPG level. The exercise programs and several factors such as a decrease in blood pH, an increase in temperature, a marked decrease in pO_2 and an excess Ca^{2+} that occur in red blood cell during exercise may affect the change in biochemical mechanisms that regulate erythrocyte 2,3-BPG level. In addition, anticoagulant and blood storage may be affecting the change in 2,3-BPG levels. The purpose of the present study was to investigate the effects of exercise programs and the factors that occur during exercise on the change in erythrocyte 2,3-BPG levels.

The first experiments were aimed to study the effects of anticoagulants on 2,3-BPG level in stored erythrocytes. Blood samples from each of five male Wistar rats were aliquoted into 2 sets of tubes containing heparin, potassium oxalate and sodium fluoride. The level of erythrocyte 2,3-BPG was immediately determined in the first set. The second set was stored at 4 $^{\circ}C$ for 5 days and the level of 2,3-BPG was determined. The second experiments were to study the effect of exercise programs on the response of erythrocyte 2,3-BPG level in normal male Wistar rats.

These programs included endurance training program, exhaust training program, acute exhaustion and endurance exhaust training. The levels of erythrocyte 2,3-BPG, lactate, triglycerides and glucose were determined after exercise. The third experiments were to study the effects of a decrease in pH, an elevated temperature, a marked decrease in pO_2 and an excess Ca^{2+} on erythrocyte 2,3-BPG levels, *in vitro*.

The results showed that the more powerful preservation of erythrocyte 2,3-BPG levels occurred in potassium oxalate than in sodium fluoride and heparin. The erythrocyte 2,3-BPG levels could be preserved in whole blood at 4 ^{o}C for 5 days of storage when anticoagulated with potassium oxalate. The effects of exercise programs on the change in erythrocyte 2,3-BPG level presented that the level was not changed in sedentary rats after limited to cage activity for 2, 5 and 8 weeks. The erythrocyte 2,3-BPG level was 15.43% increased within 2 weeks after endurance training exercise and the level was maintained up to 8 weeks later. The exhaust training exercise caused 19.61% increase of erythrocyte 2,3-BPG level after 2 weeks and gradually increased to 20.74% and 23.44% after 5 and 8 weeks, respectively. It is noteworthy to notice that 8 weeks of exercise by exhaust training program caused an increase of 2,3-BPG levels about 8.00% higher than endurance training program. The level of 2,3-BPG obtained after acute exhaust exercise was increased by 11.33% when compared to matched-sedentary control. In the same way, endurance exhaust exercise also caused the increase of 2,3-BPG level to 16.03% and 17.44% after 2 and 5 weeks of exercise, respectively. However, the difference of 2,3-BPG levels between 2 and 5 weeks of this program are not statistically significant ($p>0.05$). From these results, it can be implied that all programs of exercise causes an increase in erythrocyte 2,3-BPG levels by different magnitude. The rise in erythrocyte 2,3-BPG level after training exercise was higher than acute exercise. Furthermore, the lactate level was increased after exercise and the level was decreased after training. After training exercise, blood triglycerides level was decreased, whereas the level was not changed by acute exercise. However, different exercises according to this study did not caused change in blood glucose level. The effects of the factors that occur in red blood cells during exercise on erythrocyte 2,3-BPG level show that lower pH ranging from 6.8 to 7.2 caused an increase in erythrocyte 2,3-BPG levels as comparing to the

physiological pH (7.4). The erythrocyte 2,3-BPG levels were gradually increased as the incubation temperature was higher than 37°C. The optimal temperature was 43°C. Also, an excess of Ca^{2+} induced by calcium ionophore (A23187) caused an increase in erythrocyte 2,3-BPG levels. In addition, the level of erythrocyte 2,3-BPG was increased by a marked decrease in pO_2. Thus, factors including pH 7.2, temperature at 43°C, an excess of Ca^{2+} in erythrocyte induced by 10 nmole/L of A23187 and a marked decrease in pO_2 significantly increased erythrocyte 2,3-BPG level. The rise in erythrocyte 2,3-BPG induced by these factors was not related to the rise in deoxyhemoglobin.

In conclusion, exercise causes higher anaerobic energy metabolism at the beginning. Exercised muscle adapts in many ways from anaerobic to aerobic energy metabolism. These include an increase in erythrocyte 2,3-BPG level after exercise and more triglycerides are used as energy source after longer period of training. This suggests that exercise should be beneficial for the health when trained with an appropriate program. Moreover, the factors that occur in red blood cell during exercise affect the change in biochemical mechanisms that regulate erythrocyte 2,3-BPG level. Furthermore, the mechanisms of each factor that regulate the erythrocyte 2,3-BPG metabolism are significant for further study.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ปัจจัยที่มีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณ 2,3-Bisphosphoglycerate ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนูขณะออกกำลังกาย

ชื่อผู้เขียน นางสาวเพลินพิศ ยะสินธิ์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อ. ดร. อุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. อัญชลี พงษ์ชัยเดชา กรรมการ
อ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกูล กรรมการ
อ. ดร. จตุพร วงศ์สาธิตกุล กรรมการ

บทคัดย่อ

สารประกอบ 2,3-Bisphosphoglycerate (2,3-BPG) เกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดง จาก 1,3-Bisphosphoglycerate ซึ่งเป็นสารตัวกลางในขบวนการไกลโคไลซีส มีหน้าที่สำคัญช่วยให้ออกซิเจนหลุดออกจาก oxyhemoglobin ขณะที่เซลล์เม็ดเลือดแดงผ่านเข้าไปในเส้นเลือดฝอย เพื่อไปหล่อเลี้ยงกล้ามเนื้อ ในการออกกำลังกายนั้นต้องการออกซิเจนให้เพียงพอเพื่อคงไว้ซึ่งขบวนการเมตาบอลิสม์แบบ aerobic จึงคาดการณ์ว่าการออกกำลังกายน่าจะทำให้ระดับความเข้มข้นของ 2,3-BPG เพิ่มขึ้น ซึ่งระดับการเปลี่ยนแปลงนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับโปรแกรมการออกกำลังกาย และปัจจัยต่างๆ ที่เกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดงขณะออกกำลังกาย ได้แก่ pH ที่ลดลง อุณหภูมิที่สูงขึ้น ปริมาณ Ca^{2+} ที่มากเกินพอและความดันออกซิเจน (pO_2) ที่ลดลง น่าจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีต่อระดับความเข้มข้นของ 2,3-BPG นอกจากนี้ ยังมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดและระยะเวลาในการเก็บเลือดตัวอย่างก่อนทำการตรวจวัดระดับ 2,3-BPG ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ 2,3-BPG ได้ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาผลของการออกกำลังกายด้วยโปรแกรมต่างๆ กัน และปัจจัยต่างๆ ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการออกกำลังกาย ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของ 2,3-BPG ในเซลล์เม็ดเลือดแดง

การทดลองที่หนึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดต่อระดับ 2,3-BPG ในเลือดที่เก็บ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการแบ่งเลือดตัวอย่างจากหนูขาวเพศผู้ เป็น 2 ชุด แต่ละชุดประกอบไปด้วยหลอดทดลองซึ่งบรรจุ เฮพาริน โปแตสเซียมออกซาเลท และโซเดียมฟลูออไรด์ เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วทำการตรวจวัดระดับ 2,3-BPG

ทันทีในชุดแรก ส่วนชุดที่สอง นั้นเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จึงทำการตรวจวัดระดับ 2,3-BPG การทดลองที่สอง เพื่อศึกษาผลของการออกกำลังกายด้วยโปรแกรมที่แตกต่างกันต่อระดับ 2,3-BPG ในหนูขาวเพศผู้ โปรแกรมการออกกำลังกายในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย endurance training, exhaust training, acute exhaustion และ endurance exhaustion ทำการเก็บเลือดตัวอย่างหลังจากการออกกำลังเสร็จสิ้นลงเพื่อตรวจวัดระดับ 2,3-BPG แลคเตท ไตรกลีเซอไรด์ และกลูโคส การทดลองชุดที่สาม เพื่อศึกษาในหลอดทดลองถึงผลของ pH ที่ลดลง อุณหภูมิที่สูงขึ้น ปริมาณ Ca^{2+} ที่มากเกินพอและความดันออกซิเจน (pO_2) ที่ลดลง ต่อระดับของ 2,3-BPG ในเซลล์เม็ดเลือดแดง

จากผลการทดลองพบว่า โปแตสเซียม ออกซาเลท สามารถรักษาระดับ 2,3-BPG ได้มากกว่า โซเดียมฟลูออไรด์ และเฮพาริน และเมื่อใช้ โปแตสเซียม ออกซาเลทเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดสามารถรักษาระดับ 2,3-BPG ในเลือดได้ถึง 5 วัน เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ส่วนผลของการออกกำลังกายด้วยโปรแกรมต่างๆ กันต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ 2,3-BPG นั้นพบว่าระดับ 2,3-BPGไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อหนูถูกจำกัดอยู่ในกรงเป็นเวลา 2, 5 และ 8 สัปดาห์ การออกกำลังกายแบบ endurance training ทำให้ระดับ 2,3-BPG เพิ่มขึ้น 15.43% ภายใน 2 สัปดาห์ และคงที่ต่อไปอีกจนถึง 8 สัปดาห์ และการออกกำลังกายแบบ exhaust training ทำให้ระดับของ 2,3-BPG เพิ่มขึ้น 19.61% ภายใน 2 สัปดาห์ และเพิ่มขึ้นเป็น 20.74% และ 23.44% ใน 5 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการออกกำลังกายแบบ exhaust training ทำให้ระดับของ 2,3-BPG เพิ่มมากกว่า endurance training ประมาณ 8.00% ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ ส่วนระดับของ 2,3-BPG ภายหลังการออกกำลังกายแบบ acute exhaustion นั้น เพิ่มขึ้น 11.33% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกันภายหลังการออกกำลังกายแบบ endurance exhaust ระดับ 2,3-BPG เพิ่มขึ้น 16.03% และ 17.44% ภายใน 2 และ 5 สัปดาห์ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การออกกำลังกายด้วยโปรแกรมต่างๆ เหล่านี้ ทำให้ 2,3-BPG เพิ่มขึ้นได้แตกต่างกัน และการเพิ่มขึ้นของ 2,3-BPG ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ภายหลังการออกกำลังกายด้วยโปรแกรมที่มีการฝึกฝน (training) นั้นจะสูงกว่าการออกกำลังกายด้วยโปรแกรมที่ไม่มีการฝึกฝน (acute exhaust) นอกจากนี้ระดับความเข้มข้นของแลคเตทยังเพิ่มขึ้นภายหลังการออกกำลังกายและลดลงเมื่อมีการฝึกฝน การออกกำลังกายด้วยการฝึกฝนยังทำให้ระดับความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ลดลง ขณะที่การออกกำลังกายด้วยโปรแกรมที่ไม่มีการฝึกฝนนั้นไม่ได้ทำให้ไตรกลีเซอไรด์ลดลง อย่างไรก็ตามการออกกำลังกายด้วยโปรแกรมต่างๆ ตามการศึกษาในครั้งนี้ไม่ทำให้ระดับของกลูโคสเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด ส่วนผลของปัจจัยต่างๆ ที่เกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดง

ขณะออกกำลังกายต่อระดับ 2,3-BPG พบว่าที่ค่าพีเอชระหว่าง 6.8-7.2 นั้นทำให้ 2,3-BPG เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับที่ค่าพีเอช 7.4 และ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส นั้นก็ ทำให้ 2,3-BPG เพิ่มขึ้น และ เพิ่มมากขึ้นที่สุดที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ในทำนองเดียวกัน Ca^{2+} ที่มากเกินพอซึ่งเกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำของ Calcium ionophore (A 23187) ทำให้ 2,3-BPG เพิ่มขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้ 2,3-BPG ยังเพิ่มขึ้นเนื่องจากความดันออกซิเจนที่ลดลง (pO_2) ดังนั้นที่ค่าพีเอช 7.2, อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส และปริมาณ Ca^{2+} ที่มากเกินพอซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย A23187 เข้มข้น 10 นาโนโมล ต่อลิตร และความดันออกซิเจนที่ลดลง ล้วนเป็นปัจจัยที่ทำให้ 2,3-BPG เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และการเพิ่มขึ้นของ 2,3-BPG ในเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยการเหนี่ยวนำของปัจจัยเหล่านี้ ไม่มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ deoxyhemoglobin

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การออกกำลังกายนั้นทำให้กระบวนการเมตาบอลิสม์แบบ anaerobic สูงขึ้น กล้ามเนื้อจึงมีการปรับตัวในหลายๆ ด้าน เพื่อให้เกิดการปรับตัวจากขบวนการเมตาบอลิสม์ แบบ anaerobic เป็น acrobic ซึ่งการปรับตัวต่างๆ ดังกล่าวนี้ประกอบไปด้วย การเพิ่มขึ้นของ 2,3-BPG ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ภายหลังการออกกำลังกาย และไตรกลีเซอไรด์ถูกใช้มากขึ้น เพื่อเป็นแหล่งพลังงานเมื่อมีการฝึกฝน ดังนั้นการออกกำลังกายจะเกิดประโยชน์ต่อสุขภาพเมื่อมีการฝึกฝนด้วยโปรแกรมที่เหมาะสม ส่วนปัจจัยต่างๆ ซึ่งเกิดขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดแดงระหว่างออกกำลังกายส่งผลให้เกิดกลไกการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่ควบคุมระดับ 2,3-BPG ในเซลล์เม็ดเลือดแดง และนอกจากนี้ กลไกของแต่ละปัจจัยที่ควบคุมขบวนการเมตาบอลิสม์ของ 2,3-BPG นั้น มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งสำหรับการศึกษาต่อไป