

การทดลองส่วนที่ 1

การพัฒนาเทคนิค ESR spin labeling

และศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระดับโมเลกุลในไลโปโปรตีน

หลักการและเหตุผล

ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้ามักมีภาวะความผิดปกติของไขมันในเลือด ได้แก่ระดับคลอเรสเตอรอลต่ำ ปริมาณ HDL-Cholesterol ต่ำ แต่ระดับไตรกลีเซอไรด์สูง รวมทั้งปริมาณ cholesteryl esters ของ polyunsaturated fatty acid (PUFAs) ในไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein; LDL) และไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein; HDL) ก็ลดลงเมื่อเทียบกับคนปกติ (Luechapudiporn et al., 2006) กลไกของการเปลี่ยนแปลงนี้เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับภาวะ oxidative stress จากการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าไขมันบริเวณ hydrophobic core ของไลโปโปรตีนเป็นเป้าหมายสำคัญต่อการถูกทำลายโดยภาวะ oxidative stress และส่งผลให้การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันผิดปกติ (Morales et al., 2006) การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบไขมันและคุณสมบัติทางฟิสิกส์นี้อาจส่งผลให้การทำงานของไลโปโปรตีนและเมตาบอริซึมของไขมันในผู้ป่วยธาลัสซีเมียผิดปกติ นำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนแบบ atherosclerosis

เหลืกน่าจะเป็นเหตุสำคัญต่อการกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีนในเลือดของผู้ป่วย เหลืกที่กระตุ้นปฏิกิริยาอิสระได้แก่ non-transferrin bound iron (Anuwatanakulchai et al, 1984) และ hemin (Phumala et al, 2003) ซึ่งสามารถตรวจพบความเข้มข้นสูงในพลาสมาของผู้ป่วยและสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ แต่เหลืกทั้งสองรูปนี้มีคุณสมบัติในการละลายที่ต่างกันจึงคาดว่าเหลืกทั้งสองชนิดจะกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในตำแหน่งและมีความจำเพาะที่ต่างกันไป ดังนั้นการทำความเข้าใจในจลนศาสตร์และตำแหน่งของการกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระจึงมีความสำคัญต่อเข้าใจการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสารชีวโมเลกุลที่มีโครงสร้างซับซ้อนเช่นไลโปโปรตีนรวมไปถึงในระดับเซลล์ นอกจากนี้อาจมีประโยชน์ต่อการเลือกใช้สารต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพและที่มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่ตำแหน่งต่างๆได้

การศึกษานี้จะใช้เทคนิค spin labeling ซึ่งใช้ nitroxyl spin probe ได้แก่ 5-doxyl stearic acid (5-DS) และ 16-doxyl stearic acid (16-DS) (รูปที่ 1.1) ซึ่งติดอยู่บนผิวของไลโปโปรตีน และในตำแหน่ง carbon ที่ 16 ของ acyl chain ของ phospholipids ตามลำดับ (Morales et al., 2006) โดยในตำแหน่ง carbon ที่ 16 ของไลโปโปรตีนจะมีคุณสมบัติ hydrophobic เมื่อเทียบกับที่ผิวไลโปโปรตีน

Nitroxyl spin probe นี้จะมีค่าครึ่งชีวิตยาวแต่ในภาวะที่มีอนุมูลอิสระ nitroxyl spin probe สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ตามรูปที่ 1.2 ได้ผลผลิตเป็นสารซึ่งไม่มีสัญญาณ ESR (Kocherginsky et al, 2000) ดังนั้นการลดต่ำลงของสัญญาณ ESR นี้สามารถบ่งชี้ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ การติดตามการลดลงของ nitroxyl spin probe ทั้งสองชนิดในไลโปโปรตีนจะสะท้อนถึงจลนศาสตร์ของอนุมูลอิสระ.บริเวณที่ nitroxyl spin probe ติดอยู่ จึงคาดว่าน่าจะสามารถบ่งบอกตำแหน่งของปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกิดจากการกระตุ้นโดยเหล็กชนิดต่างๆได้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาคุณสมบัติการเคลื่อนไหวของไขมันในระดับโมเลกุลของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein ;LDL) ที่ติดด้วย nitroxyl spin probe ที่ติดที่ตำแหน่งต่างๆในไลโปโปรตีน
2. ศึกษาอัตราการลดลงของ ESR signal intensity ของ spin probe เมื่อกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระด้วยเหล็กและผลของยาขับเหล็ก deferiprone

วิธีดำเนินการศึกษา

สารเคมี

tert-Butylhydroperoxide (*t*-BuOOH; Sigma, St. Louis, MO)

5-doxyl stearic acid (5-DS; Aldrich, USA)

16-doxyl stearic acid (16-DS; Aldrich, USA)

Hemin (ferric-protoporphyrin IX);Sigma, St. Louis, MO)

Hydrogenperoxide (H₂O₂; Sigma, St. Louis, MO)

Iron standard solution (Merck, Damstat, Germany)

Nitrilotriacetic acid (NTA; igma, St. Louis, MO)

วิธีทดลอง

1. แยกไลโปโปรตีน (low density lipoprotein, LDL) ที่ density 1.019-1.063 จากซีรัมโดยวิธี sequential density gradient ultracentrifugation และแยกสารละลายเกลือออกด้วยโดยผ่าน PD-10 desalting column (GE Healthcare, Switzerland) และ LDL ที่เตรียมได้นำมาวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's Method คลอเรสเตอร์อล โดย enzymatic method (Ecoline ® S+, Holzheim, Germany) ก่อนทำการทดลองต่อไป

2. สาร spin probe ที่ใช้คือ 5- และ 16- doxyl stearic acid (5-DS และ 16-DS) เตรียม stock spin probe ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตรใน hexane นำ spin probe ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดแก้วสะอาด ทำให้แห้งเป็นชั้นบางๆเคลือบในหลอดแก้วโดยเป่าให้แห้งด้วย nitrogen หลอดแก้วที่มี spin probe เก็บในอุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

LDL จะ label ด้วย spin probe โดยการเติม LDL ลงในหลอดแก้วที่มี spin probe แล้วทิ้งไว้ประมาณ 3 นาทีเขย่าเบาๆ ความเข้มข้นของ LDL ต่อ spin probe ที่ใช้คือ 60 ไมโครกรัมโปรตีนของ LDL ต่อ 5 ไมโครกรัมของ spin probe

3. LDL ที่ติดด้วย spin probe นำไปศึกษาคุณสมบัติการเคลื่อนไหวของไขมันในระดับโมเลกุล และอัตราการลดลงของสัญญาณ ESR หลังจากกระตุ้นปฏิกิริยานุมูลอิสระด้วย hydrogenperoxide (H_2O_2) หรือ *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BuOOH) ในภาวะที่มีเหล็กในรูปของ hemin และ Fe-NTA

คุณสมบัติการเคลื่อนไหวของไขมันในระดับโมเลกุลจะใช้ค่า order parameter (S) สำหรับ 5-DS และค่า motion parameter (T) สำหรับ 16-DS (Morales et al., 2006)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

เมื่อนำ LDL ติดด้วย 5-DS และ 16-DS จะให้ ESR spectra ดังแสดงในรูปที่ 1.3a และ b ตามลำดับ สำหรับ 5-DS นั้น spin probe จะเข้าอยู่ในบริเวณชั้นไขมันด้านบนผิวของไลโปโปรตีน ส่วน 16-DS นั้น spin probe จะติดใกล้ส่วน hydrophobic core ของไลโปโปรตีน

ในภาวะที่มี hemin และกระตุ้นปฏิกิริยาดังสาร hydroperoxide (*t*-BuOOH และ H_2O_2) ความสูงของสัญญาณ ESR ของทั้ง 5-DS และ 16-DS จะค่อยๆลดลงตามรูปที่ 1.3 และอัตราการลดลงเป็นไปตามความเข้มข้นของ hemin แต่สำหรับ Fe-NTA พบว่าไม่มีผลต่อการลดลงของสัญญาณ ESR ไม่ว่าจะกระตุ้นปฏิกิริยาดัง H_2O_2 หรือ *t*-BuOOH (รูปที่ 1.4)

จากรูปการลดลงของสัญญาณ ESR จะสามารถคำนวณค่าต่างๆได้ดังนี้

- 1) Lag time คือระยะเวลาตั้งแต่เริ่มปฏิกิริยาจนถึง propagation phase
- 2) Rate of signal decay คืออัตราการลดลงของสัญญาณ คำนวณได้จาก slope ในช่วง propagation phase
- 3) Duration of 50% signal decay คือ เวลาที่สัญญาณลดลงครึ่งหนึ่ง

การลดลงของสัญญาณของ 5-DS และ 16-DS เมื่อมี hemin โดยการกระตุ้นด้วย *t*-BuOOH และ H_2O_2 แสดงในตารางที่ 1.1 และ 1.2 ตามลำดับ

จากตารางแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาอนุมูลอิสระเกิดมากขึ้นมีอัตราเร็วเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ hemin ซึ่งค่า lag time และ duration of 50% signal decay ลดลง ส่วน rate of signal decay เร็วขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบ spin probe ทั้งสองชนิดที่ภาวะการทดลองเดียวกันพบว่า lag time และ duration of 50% signal decay ของ 16-DS นั้นจะสั้นกว่า 5-DS อย่างมีนัยสำคัญ และ rate of signal decay ก็เร็วกว่าด้วยเช่นกัน สามารถสรุปได้ว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในบริเวณตำแหน่ง carbon ที่ 16 ของชั้น phospholipids เกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่าในบริเวณผิวและเมื่อเปรียบเทียบชนิดของ hydroperoxide เห็นว่า *t*-BuOOH ซึ่งมีความสามารถในการละลายในไขมันได้ดีนั้น สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้รวดเร็วกว่า H_2O_2

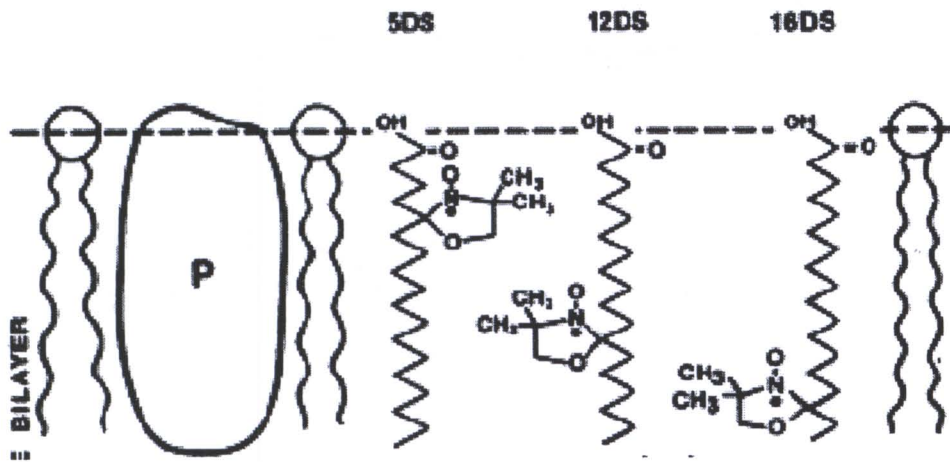
เมื่อพิจารณาการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไลโปโปรตีนโดยใช้ค่า order parameter (S) สำหรับ 5-DS พบว่าค่า S ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อกระตุ้นโดย hemin และ *t*-BuOOH หรือ H_2O_2 ตลอดเวลาการศึกษา แต่เมื่อติดตามค่า motion parameter (T) โดย 16-DS พบว่าค่า T มีการเปลี่ยนแปลงโดยมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อกระตุ้นโดย hemin และ *t*-BuOOH แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อกระตุ้นโดย H_2O_2 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะสอดคล้องกับปริมาณอนุมูลอิสระที่เพิ่มในบริเวณ hydrophobic region ของ LDL (รูปที่ 1.5 และ 1.6)

ยาขับเหล็ก deferiprone (L1) ซึ่งเป็นยาขับเหล็กชนิดรับประทาน ที่ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในภาวะที่มี hemin และมีกระตุ้นปฏิกิริยาด้วย *t*-BuOOH และ H_2O_2 ดังแสดงในตารางที่ 1.3 และ 1.4 ตามลำดับ

สรุปการศึกษาในส่วนที่ 1

1. อัตราการลดลงของสัญญาณ ESR ของสาร spin probe เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในไลโปโปรตีนนั้นจะเกิดในส่วน hydrophobic ได้เร็วกว่าทั้งนี้อาจสามารถอธิบายได้โดยในส่วนที่เป็น hydrophobic ของชั้น phospholipids นั้นมีความหนาแน่นของ unsaturated double bonds มากกว่าในส่วนที่ใกล้ผิว และจะเห็นได้ว่าสารประกอบเหล็กที่สามารถละลายในไขมันได้ดีกว่าเช่น hemin จะสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารประกอบเหล็กที่ละลายน้ำได้ดีเช่น Fe-NTA

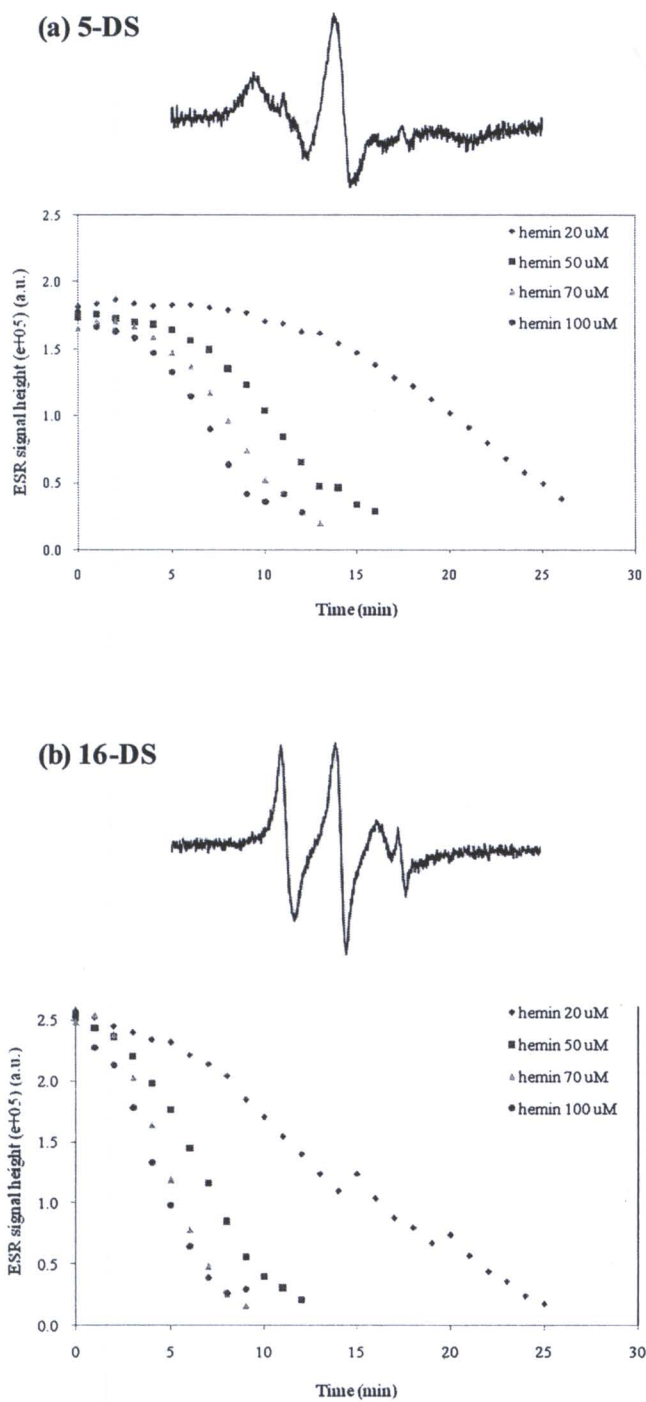
2. ยาขับเหล็ก deferiprone (L1) สามารถลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงเมื่อเทียบกับ hemin น่าจะอธิบายได้ว่าปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจาก hemin นั้น ไม่จำเป็นต้องมีกระบวนการแตกตัวของเหล็กจาก protoporphyrin ring ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Camejo et al., 1998 และผลของ deferiprone ในการลดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระน่าจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของ deferiprone ต่ออนุมูลอิสระโดยตรงนอกเหนือจากการเป็น iron chelator



รูปที่ 1.1 การจัดเรียงตัวของ doxyl stearic acid ใน phospholipid layer ของไลโปโปรตีน

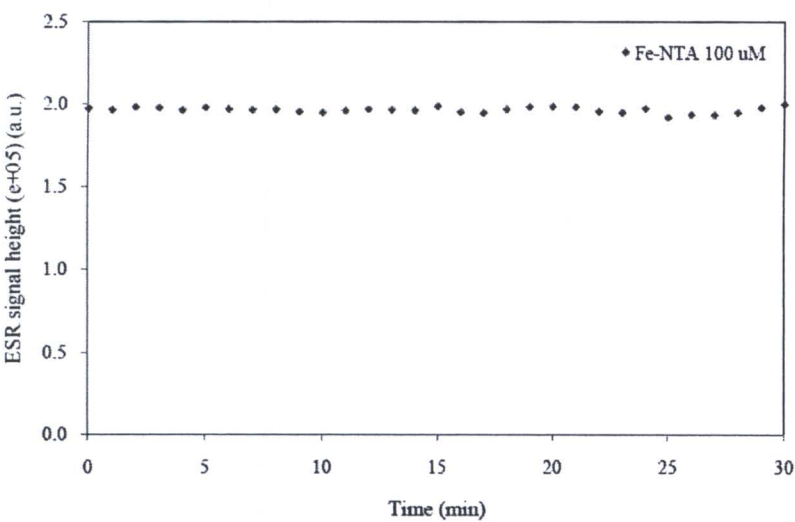


รูปที่ 1.2 ปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ (R) และ nitroxyl spin probe

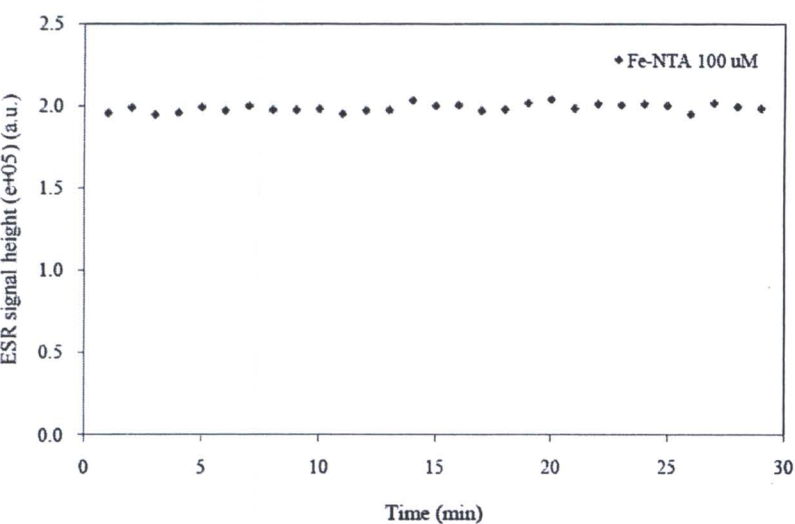


รูปที่ 1.3 สัญญาณ ESR และการลดลงของสัญญาณเมื่อเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ของ 5-DS (a) และ 16-DS (b) ในไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ เมื่อกระตุ้นด้วย hemin และ 1 mM *t*-BuOOH.

(a) 5-DS



(b) 16-DS



รูปที่ 1.4 ความสูงของสัญญาณ ESR ของ 5-DS (a) และ 16-DS (b) ในไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ เมื่อกระตุ้นด้วย Fe-NTA และ 1 mM *t*-BuOOH หรือ H₂O₂

ตารางที่ 1.1 Lag time, rate of ESR signal decay ($\times 10^4$ Au/min) และ duration for 50% ESR signal decay ของ 5-DS (a) และ 16-DS (b) ที่ hemin ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระด้วย 1 mM *t*-BuOOH

(a) 5-DS

Hemin (μ M)	Lag time (min)	Rate of signal decay ($\times 10^4$ Au/min)	50% signal decay (min)
20	12.597 ± 3.120	0.840 ± 0.304	21.075 ± 3.255
50	6.742 ± 1.794 *	1.660 ± 0.402	11.190 ± 1.254 *
70	4.893 ± 1.209 *	1.774 ± 0.441	9.175 ± 0.571 *
100	4.667 ± 0.764 *	1.937 ± 0.301 *	7.694 ± 1.203 *

Data are presented as mean $\pm$ SD of the duplicate in 3-independent experiments.

* $p < 0.05$ compared with 20 μ M hemin

(b) 16-DS

Hemin (μ M)	Lag time (min)	Rate of signal decay ($\times 10^4$ Au/min)	50% signal decay (min)
20	6.833 ± 1.341	1.486 ± 0.574	13.996 ± 2.709
50	3.016 ± 0.564 *	2.633 ± 1.199	7.198 ± 0.628 *
70	2.246 ± 0.327 *	4.136 ± 2.087	5.167 ± 0.441 *
100	1.897 ± 0.432 *	3.438 ± 1.536	4.583 ± 0.583 *

Data are presented as mean $\pm$ SD of the duplicate in 3-independent experiments.

* $p < 0.05$ compared with 20 μ M hemin

ตารางที่ 1.2 Lag time, rate of ESR signal decay ($\times 10^4$ Au/min) และ duration for 50% ESR signal decay ของ 5-DS (a) และ 16-DS (b) ที่ hemin ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระด้วย $1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$

(a) 5-DS

Hemin (μM)	Lag time (min)	Rate of signal decay ($\times 10^4$ Au/min)	50% signal decay (min)
20	> 15	0.070 ± 0.006	> 30
50	> 15	0.238 ± 0.045	> 30
70	> 15	0.274 ± 0.077	> 25-30
100	> 15	0.281 ± 0.067	> 25-30

Data are presented as mean $\pm$ SD of the duplicate in 2-independent experiments.

(b) 16-DS

Hemin (μM)	Lag time (min)	Rate of signal decay ($\times 10^4$ Au/min)	50% signal decay (min)
20	> 15	0.339 ± 0.208	> 30
50	> 15	0.473 ± 0.184	> 17 - 22
70	> 15	0.616 ± 0.243	> 17 - 22
100	> 15	0.666 ± 0.204	> 17 - 22

Data are presented as mean $\pm$ SD of the duplicate in 2-independent experiments.

ตารางที่ 1.3 ผลของยาขับเหล็ก deferiprone (L1) ต่อ lag time, rate of ESR signal decay และ duration for 50% ESR signal decay ของ 5-DS (a) และ 16-DS (b) เมื่อกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระด้วย 20 μ M hemin และ 1 mM *t*-BuOOH

(a) 5-DS

L1 (μ M)	Lag time (min)	Rate of signal decay ($\times 10^4$ Au/min)	50% signal decay (min)
0	10.173 $\pm$ 2.366	0.939 $\pm$ 0.009	18.654 $\pm$ 2.339
72	12.368 $\pm$ 2.743	0.716 $\pm$ 0.119	21.146 $\pm$ 1.317
432	> 30	0.750 $\pm$ 0.021	> 30

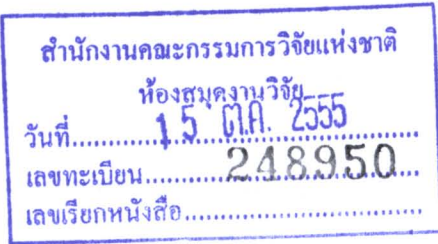
Data are presented as mean $\pm$ SD of the duplicate experiment.

(b) 16-DS

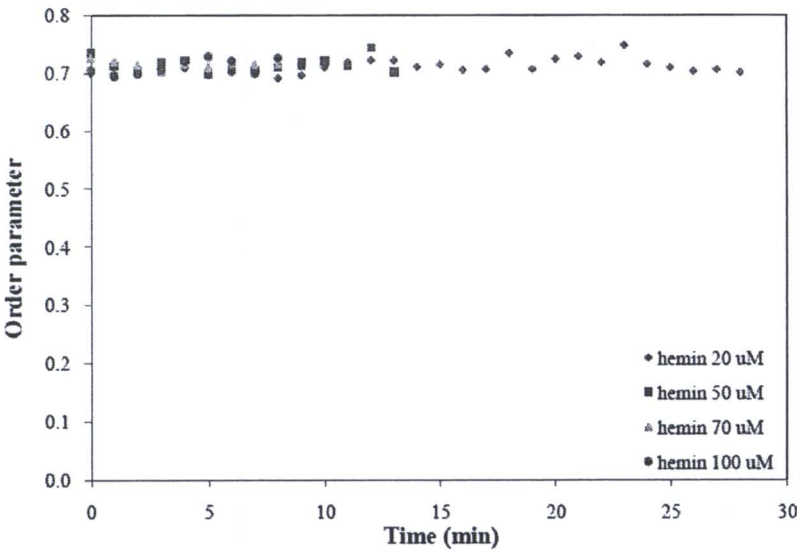
L1 (μ M)	Lag time (min)	Rate of signal decay ($\times 10^4$ Au/min)	50% signal decay (min)
0	6.000 $\pm$ 0.435	1.176 $\pm$ 0.005	10.733 $\pm$ 0.487
72	8.077 $\pm$ 0.326	0.859 $\pm$ 0.186	15.885 $\pm$ 1.142
432	> 30	0.162 $\pm$ 0.008 */**	> 30

Data are presented as mean $\pm$ SD of the duplicate experiment.

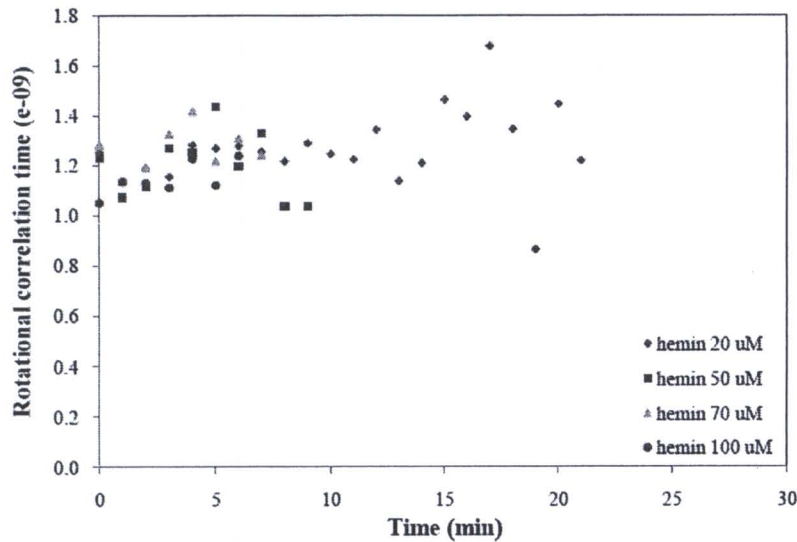
* $p < 0.05$ compared with without L1. ** $p < 0.05$ compared with added 72 μ M L1.



(a) 5-DS

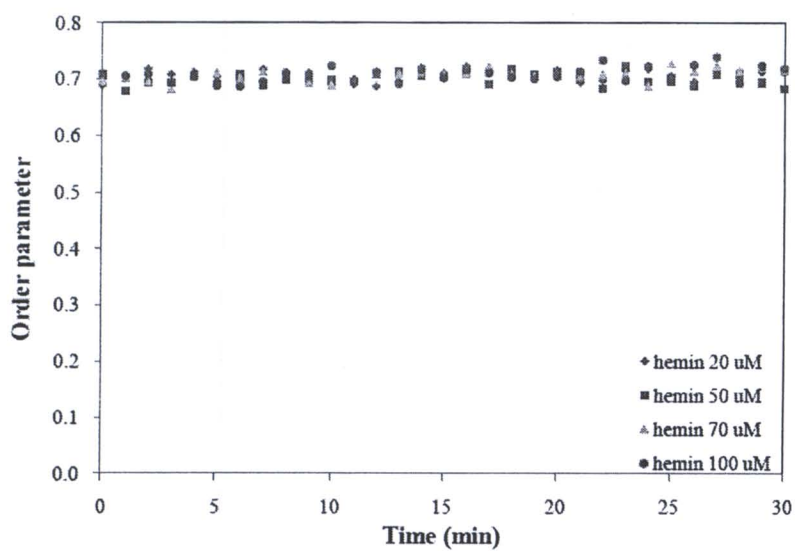


(b) 16-DS

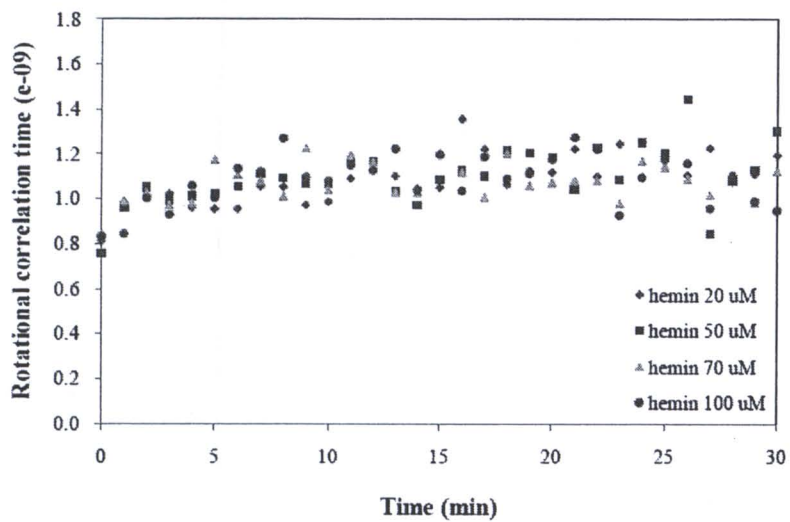


รูปที่ 1.5 ค่า order parameter จาก 5-DS (a) และ rotational correlation time จาก 16-DS (b) ในไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำเมื่อกระตุ้นเมื่อกระตุ้นด้วย hemin และ 1 mM *t*-BuOOH

(a) 5-DS



(b) 16-DS



รูปที่ 1.6 ค่า order parameter จาก 5-DS (a) และ rotational correlation time จาก 16-DS (b) ในไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำเมื่อกระตุ้นเมื่อกระตุ้นด้วย hemin และ 1 mM H_2O_2

ตารางที่ 1.4 ผลของยาขับเหล็ก deferiprone (L1) ต่อ lag time, rate of ESR signal decay และ duration for 50% ESR signal decay ของ 5-DS (a) และ 16-DS (b) เมื่อกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระด้วย 20 μ M hemin และ 1 mM H_2O_2

(a) 5-DS

L1 (μ M)	Lag time (min)	Rate of signal decay ($\times 10^4$ Au/min)	50% signal decay (min)
0	> 30	0.230 ± 0.068	> 30
72	> 30	0.370 ± 0.054	> 30
432	> 30	0.191 ± 0.002	> 30

Data are presented as mean $\pm$ SD of the duplicate experiment.

(b) 16-DS

L1 (μ M)	Lag time (min)	Rate of signal decay ($\times 10^4$ Au/min)	50% signal decay (min)
0	> 20	0.343 ± 0.033	> 25
72	> 30	0.331 ± 0.003	> 25
432	> 30	0.260 ± 0.079	> 25

Data are presented as mean $\pm$ SD of the duplicate experiment.