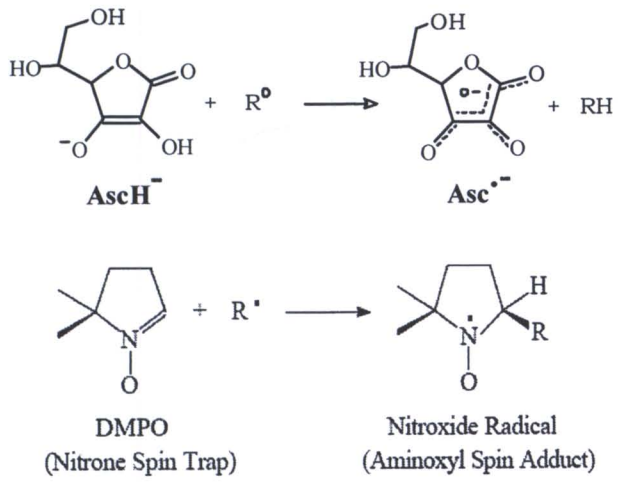
การทดลองส่วนที่ 2
การพัฒนาเทคนิค ESR spin trapping ในการประเมินภาวะ oxidative stress และการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในผู้ป่วยที่ได้รับยาขับเหล็ก

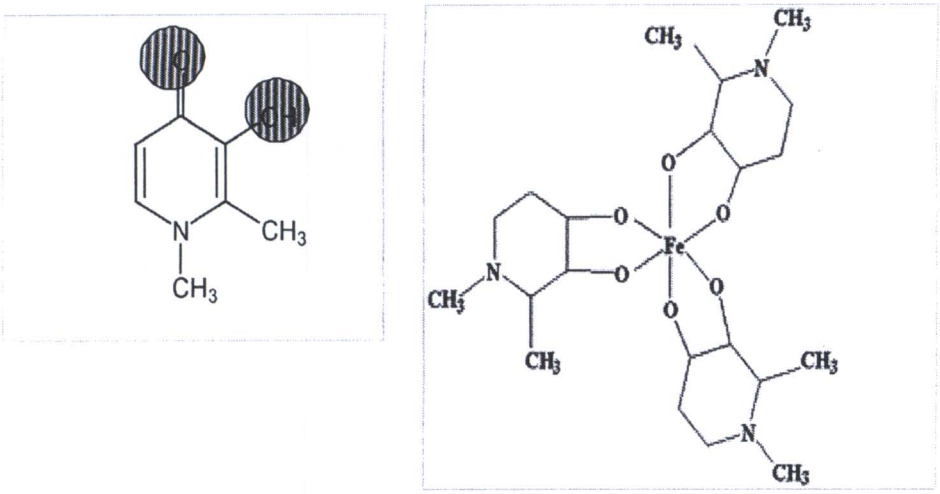
หลักการและเหตุผล

เทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาโดยใช้สมมติฐานว่า ในซีรั่มของผู้ป่วยที่มีภาวะเหล็กเกินมีสารประกอบเหล็กที่สามารถเร่งปฏิกิริยา Fenton เช่นเหล็กที่อยู่ในรูปของ non-transferrin bound iron (NTBI) ตามปกติปฏิกิริยาอนุมูลอิสระจะไม่สามารถตรวจวัดได้เนื่องจากในซีรั่มมี albumin และโปรตีนอื่นๆ รวมทั้งสารที่เป็น antioxidant มากพอ ดังนั้นจึงต้องขยายปฏิกิริยา Fenton โดยใช้ ascorbic acid ซึ่งส่งเสริมกระบวนการ redox cycling ทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มมากพอที่สามารถตรวจวัดด้วย spin trapping โดยมี 5,5-dimethyl-l-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) เป็น spin trapping agent ทั้ง ascorbic acid และ DMPO สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ดังรูปที่ 2.1 ได้เป็น ascorbyl radical และ DMPO adduct ตามลำดับ ดังนั้นความสูงของสัญญาณ ascorbyl radical และ DMPO adduct จึงสามารถนำมาใช้ประเมินการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ เทคนิคนี้จะนำไปใช้ในการประเมินภาวะ oxidative stress และติดตามผลของของยาขับเหล็กต่อการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (Jirasomprasert et al., 2009)

ยาขับเหล็ก deferiprone (1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one; L1, MW 139) เป็นยาขับเหล็กชนิดรับประทาน มีคุณสมบัติเป็น bidentate iron chelator กล่าวคือมีหมู่ที่จับกับเหล็กได้สองตำแหน่ง จึงต้องใช้ deferiprone 3 โมเลกุลต่อ Fe^{3+} 1 อะตอม เพื่อสร้างเป็นสารประกอบเชิงซ้อนอย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 2.2) ยาขับเหล็ก deferiprone นี้มีประสิทธิภาพสูง ราคาถูก เหมาะกับสถานะทางเศรษฐกิจของผู้ป่วยส่วนใหญ่จึงมีแนวโน้มที่จะใช้กับผู้ป่วยอย่างกว้างขวาง แต่อย่างไรก็ตาม deferiprone อาจก่ออาการไม่พึงประสงค์ได้ในผู้ป่วยบางรายเช่น transient agranulocytosis, neutropenia และ arthropathy คิดเป็น 0.6, 6 และ 15% ตามลำดับ (Kontoghiorghes et al ., 2003) ซึ่งเชื่อกันว่าอาการเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระอันเนื่องมาจาก deferiprone สร้างสารประกอบเชิงซ้อนไม่สมบูรณ์กับเหล็กคืออาจเป็น L1:Fe^{3+} 2:1 หรือ 1:1 แทนที่จะเป็น 3:1 (Devanur et al., 2008) ดังนั้นการพัฒนาเทคนิค ESR spin trapping นี้อาจมีประโยชน์ต่อการเฝ้าระวังอาการไม่พึงประสงค์ที่เกี่ยวเนื่องกับปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ และสามารถปรับขนาดยาให้เหมาะสมในผู้ป่วยที่มีความหลากหลายต่อไป



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับ ascorbic acid (AscH-) และ DMPO



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ deferiprone และสารประกอบเชิงซ้อนกับเหล็ก

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาเทคนิค ESR spin trapping เพื่อประเมินภาวะ oxidative stress ในซีรั่มของผู้ป่วย

2. ประยุกต์เทคนิคที่พัฒนาแล้วประเมินภาวะ oxidative stress และความสามารถในการปฏิกิริยาเกิดอนุมูลอิสระในผู้ป่วยที่ได้รับยาขับเหล็กในขนาดเดียว

3. ประยุกต์เทคนิคที่พัฒนาได้แล้วประเมินภาวะ oxidative stress และความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในผู้ป่วยที่ได้รับยาขับเหล็กต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 ปี

วิธีดำเนินการทดลอง

สารเคมี

Ascorbic acid (Merck, Darmstadt, Germany)

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

5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO; Sigma, St. Louis, MO)

Deferiprone (L1; Ferriprox™, Apotex Inc, Toronto, Ontario, Canada)

อาสาสมัคร

ผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้าอี แบ่งเป็น 2 ระดับความรุนแรงของโรคคือ ระดับ mild-moderate และระดับ severe โดยใช้ตัวกำหนดคือ ระดับฮีโมโกบิล อายุเมื่อเริ่มแสดงอาการ อายุเมื่อเริ่มการรับเลือด ความถี่ของการได้รับเลือด ระดับความรุนแรง hepato-splenomegaly และการแสดงออกถึงความผิกปกติในการเจริญเติบโต (Winichagoon et al, 2000) สำหรับอาสาสมัครปกติเป็นผู้ไม่สูบบุหรี่ ไม่ได้รับยาหรือแอลกอฮอล์ ก่อนการศึกษาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ อาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่มจะต้องงดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมงก่อนทำการเจาะเลือด การศึกษาในอาสาสมัครทุกการศึกษาได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทย์ศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

วิธีทดลอง

1. ทดสอบภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง

ซีรั่มจากอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร 1.12 M DMPO 10 ไมโครลิตร และ ascorbic acid 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ หลังจากเติม *t*-BuOOH ปริมาตร 10 ไมโครลิตรแล้ว ใส่สารผสมลงใน capillary tube ขนาด 75 ไมโครลิตร และใส่ลงใน ESR sample tube (type 5D 100mm/170 mm, Jeol Datum, Japan)

บันทึก ESR spectra ที่เวลาต่างๆหลังจากเติม *t*-BuOOH โดยX-band ESR spectrometer (E 500, Bruker, USA) ต่อด้วย ELEXSYS Super High Sensitivity Probehead cavity และตั้งค่าสำหรับการบันทึกที่ 350.0 ± 5.0 mT central field, 100 KHz modulation frequency, 0.1 modulation amplitude, 10.15 mW microwave power, 60 dB gain, 41.49 s scan time, 1.28 ms time constant.

การทดลองนี้จะปรับความเข้มข้นของสารต่างๆที่ใช้และเวลาในการบันทึก และความสัมพันธ์ของค่าที่ได้กับปริมาณเหล็กในซีรั่ม

2. การประเมินความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในผู้ป่วยที่ได้รับยาขับเหล็กในขนาดเดียว

ผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้าอี จำนวน 21 คน แบ่งเป็นตามระดับความรุนแรงของโรคเป็น 2 กลุ่มคือ ระดับ mild-moderate 11 คน และระดับ severe 10 คน ทั้งสองกลุ่มได้รับยาขับเหล็กชนิดรับประทาน deferiprone (Ferriprox™, Apotex Inc, Toronto, Ontario, Canada, Lot no. GY4120) ขนาด 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม หลังจากรับประทานยา เจาะเลือดที่เวลาต่างๆได้แก่ 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 และ 450 นาที ตัวอย่างเลือดนำไปปั่นแยกซีรั่ม เพื่อนำไปตรวจวัดระดับยาในเลือด โดยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) ระดับ non-transferrin bound iron และ deferiprone chelated iron โดยวิธี colourimetric method และ free radical generation โดย ESR spin trapping ตามวิธีที่ได้พัฒนา

3. การประเมินภาวะ oxidative stress และการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในผู้ป่วยที่ได้รับยาขับเหล็กต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 ปี

ผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้าอีที่มีความรุนแรงของโรคในระดับ severe จำนวน 14 คนทั้งหมดตัดม้ามแล้ว ได้รับยา deferiprone (GPO-L1®, องค์การเภสัชกรรม ประเทศไทย) ในขนาด 75 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมต่อวันทุกวัน มีการนัดหมายผู้ป่วยเป็นระยะคือก่อนเริ่มรับยาและที่ 1, 3, 6, 9, 12 เดือนหลังได้รับยาอย่างต่อเนื่อง ก่อนถึงวัดนัดหมายผู้ป่วยจะต้องงดอาหารเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง เมื่อถึงวันนัดหมายผู้ป่วยจะได้รับยามื้อเช้าในขนาด 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม และเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างซีรั่ม ที่เวลาก่อนได้รับยา (t=0 นาที) และที่เวลา t=60, 360 นาทีหลังได้รับยามื้อเช้า ซีรั่มที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C ในระยะเวลาไม่เกิน 2 เดือน และวิเคราะห์โดยวิธี ESR spin trapping ตามวิธีที่ได้พัฒนา

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. ผลการทดสอบภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง

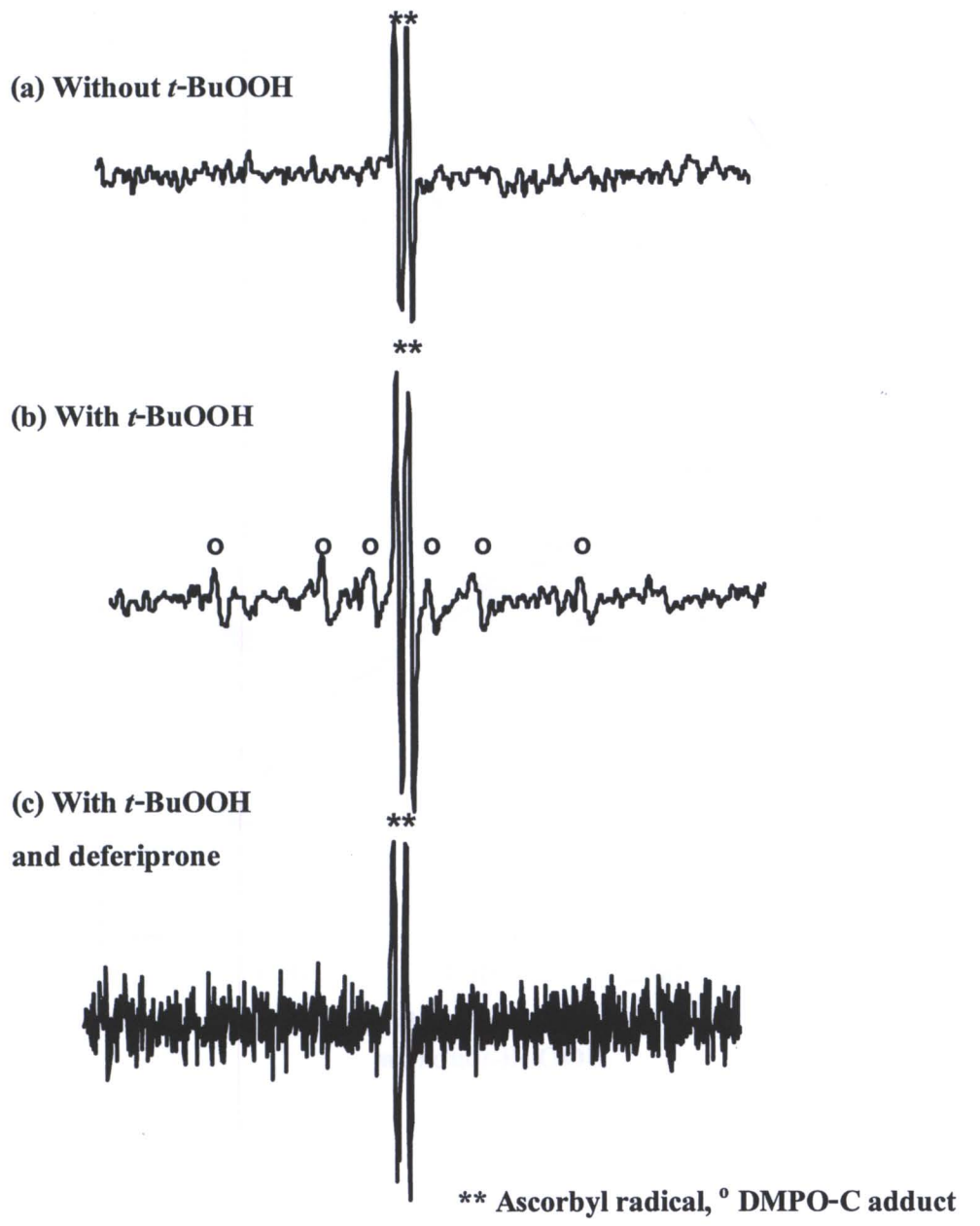
เมื่อเติม ascorbic acid ลงในซีรั่มของผู้ป่วยจะพบสัญญาณ ESR ของ ascorbyl radical (duplet, a_H = 0.18 mT) ความสูงของสัญญาณสูงสุดเมื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ascorbic acid ที่ระดับ 10^{-3} M (รูปที่ 2.3 a) เมื่อเติม 1 mM *t*-BuOOH แล้วจะพบสัญญาณ ESR อีกชนิดเพิ่มขึ้น (a_N = 2.37 mT, a_H= 1.65 mT) ซึ่งเป็นสัญญาณจาก adduct ระหว่าง DMPO และ carbon centered radicals (DMPO-C adduct) สัญญาณนี้จะหายไปเมื่อเติมสารละลายยาขับเหล็กลงในตัวอย่าง (รูปที่ 2.3 b,c) ความสูงของ ascorbyl radical ในซีรั่มของผู้ป่วยธาลัสซีเมียในภาวะที่เติมด้วย *t*-BuOOH นี้มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงดังแสดงในรูปที่ 2.4 ดังนั้นปฏิกิริยาที่เกิดจาก ascorbic acid อย่างเดียวในซีรั่มอาจใช้ประเมิน oxidative stress ได้ แต่ sensitivity ต่ำกว่า

ในภาวะการทดลองของ 50 µl ซีรั่มที่เติมด้วย 1 mM DMPO, 2.5 mM ascorbic acid และ 1 mM *t*-BuOOH (final concentrations) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างซีรั่มจากอาสาสมัครปรกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จะพบสัญญาณ DMPO-C adduct นั้นในซีรั่มจากผู้ป่วยเท่านั้น (รูปที่ 2.5) และความสูงของสัญญาณนี้จะมีความสัมพันธ์กับระดับ non-transferrin bound iron (NTBI) ในผู้ป่วย (รูปที่ 2.6)

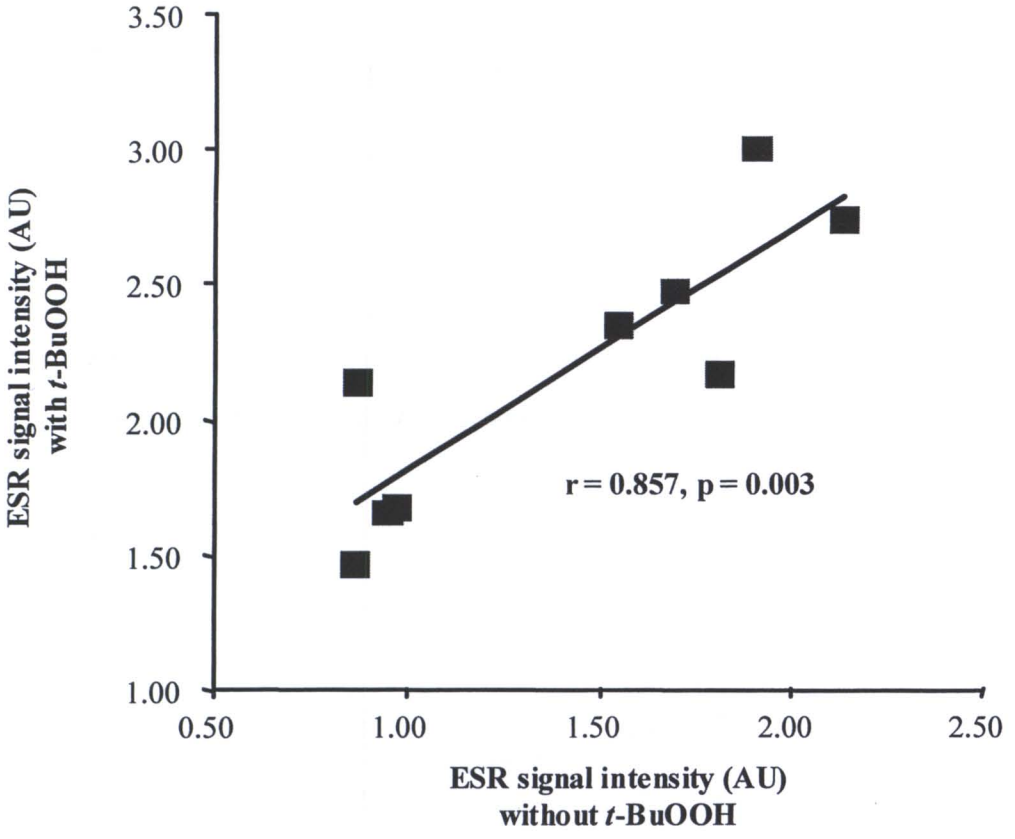
สัญญาณของ ascorbyl radical และ DMPO-C adduct มีความคงตัว ความสูงของสัญญาณไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาที่ศึกษา (รูปที่ 2.7)

จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าสัญญาณ ESR ที่ตรวจวัดได้ในซีรั่มนั้นเกี่ยวข้องกับระดับเหล็กที่มีความสามารถเหนี่ยวนำปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ จึงนำวิธีนี้มาประเมินความสามารถของการเหนี่ยวนำอนุมูลอิสระในผู้ป่วยที่ได้รับยาขับเหล็กต่อไป

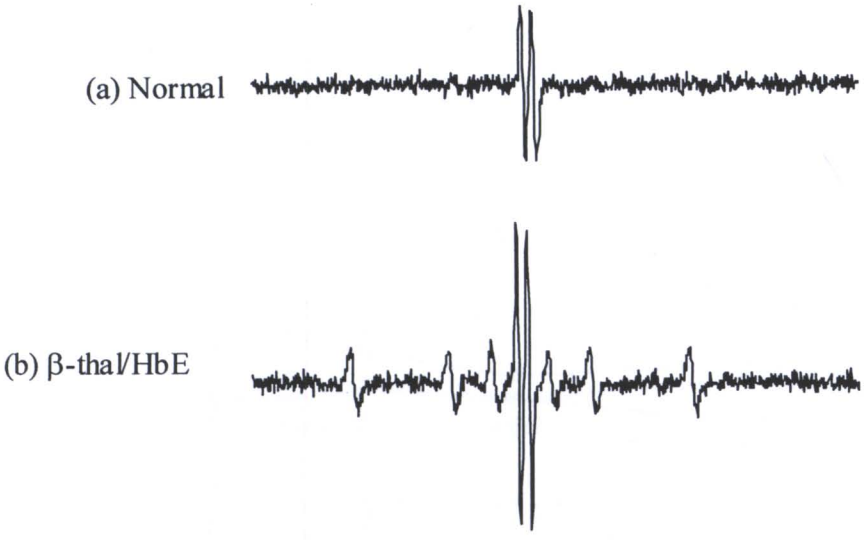
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



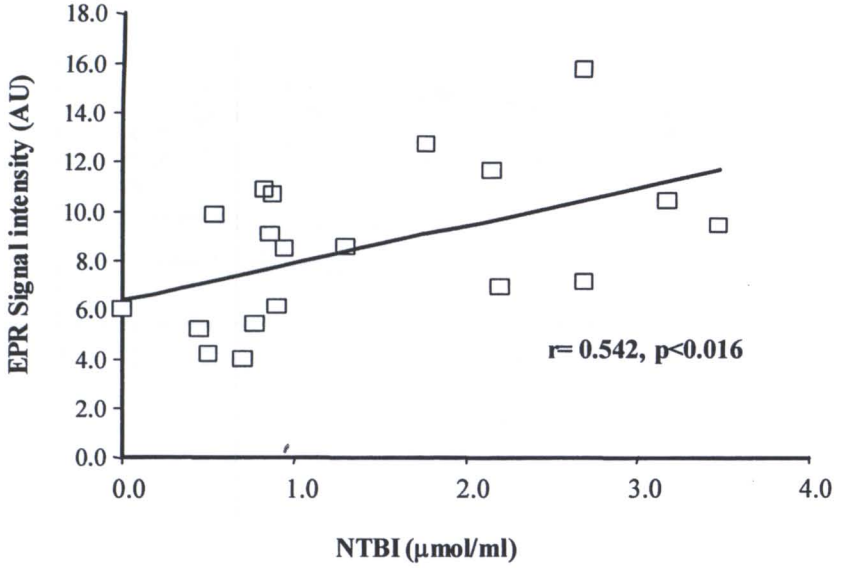
รูปที่ 2.3 สัญญาณ ESR ของ ascorbyl radical (*) และ DMPO-C adduct (0) ในซีรั่มของผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่เติม 2.5 mM ascorbic acid, ในภาวะที่ไม่เติม *t*-BuOOH (a) เติม 1 mM *t*-BuOOH (b) และเติม 1 mM *t*-BuOOH และ deferiprone



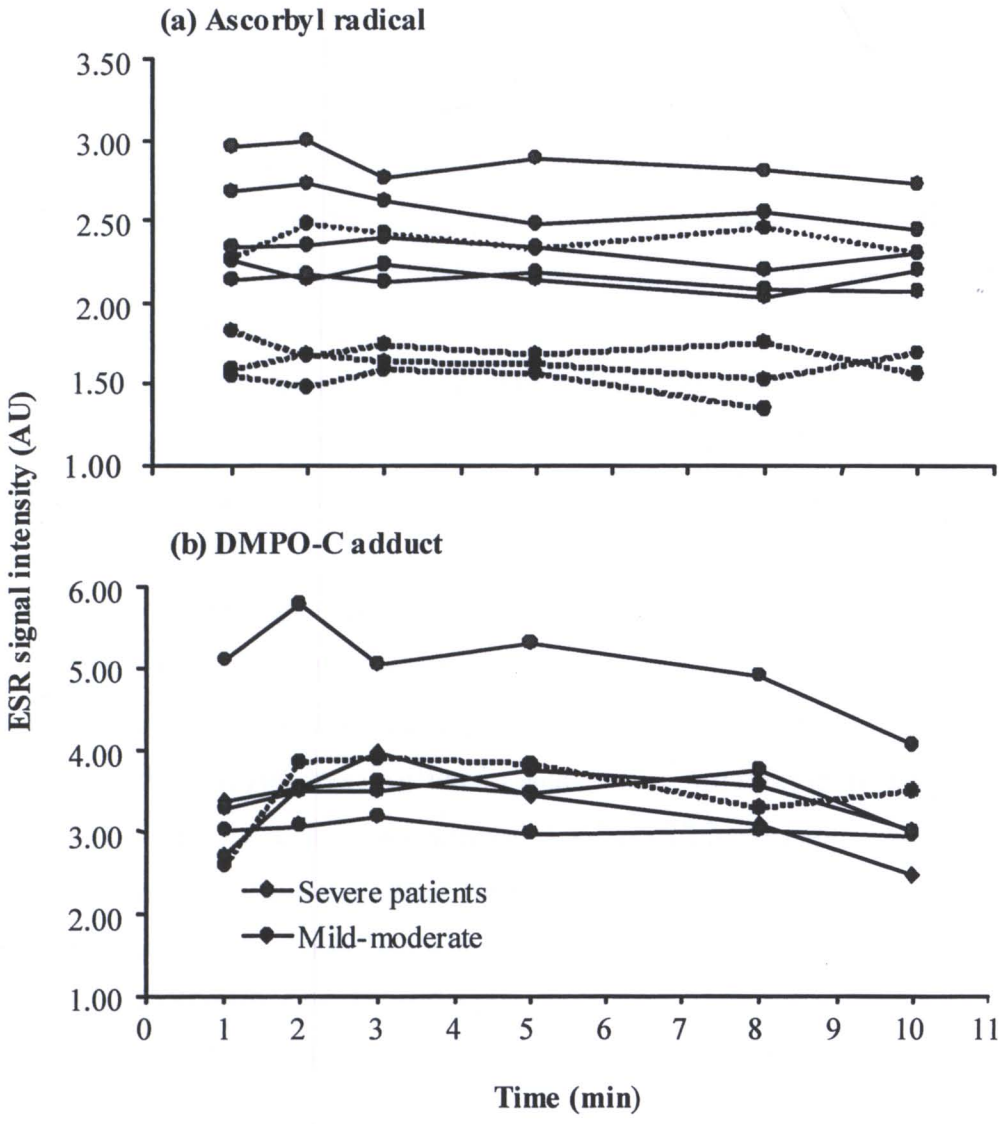
รูปที่ 2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของสัญญาณ ascorbyl radical ในตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยธาลัสซีเมียในภาวะที่เติมและไม่เติม 1 mM *t*-BuOOH



รูปที่ 2.5 เปรียบเทียบสัญญาณ ESR ในซีรั่มของคนปกติ (a) และผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (b) ในภาวะที่เติมด้วย 1 mM DMPO, 2.5 mM ascorbic acid และ 1 mM *t*-BuOOH



รูปที่ 2.6 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ DMPO-C adduct และ non transferrin bound iron (NTBI) ในซีรั่มของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย



รูปที่ 2.7 ความสูงของสัญญาณ ascorbyl radical (a) และ DMPO-C adduct (b) ในซีรั่มของผู้ป่วยที่เวลาต่างๆหลังจากการเติม *t*-BuOOH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา

2. ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาเกิดอนุมูลอิสระในผู้ป่วยที่ได้รับยาขับเหล็กในขนาดเดียว

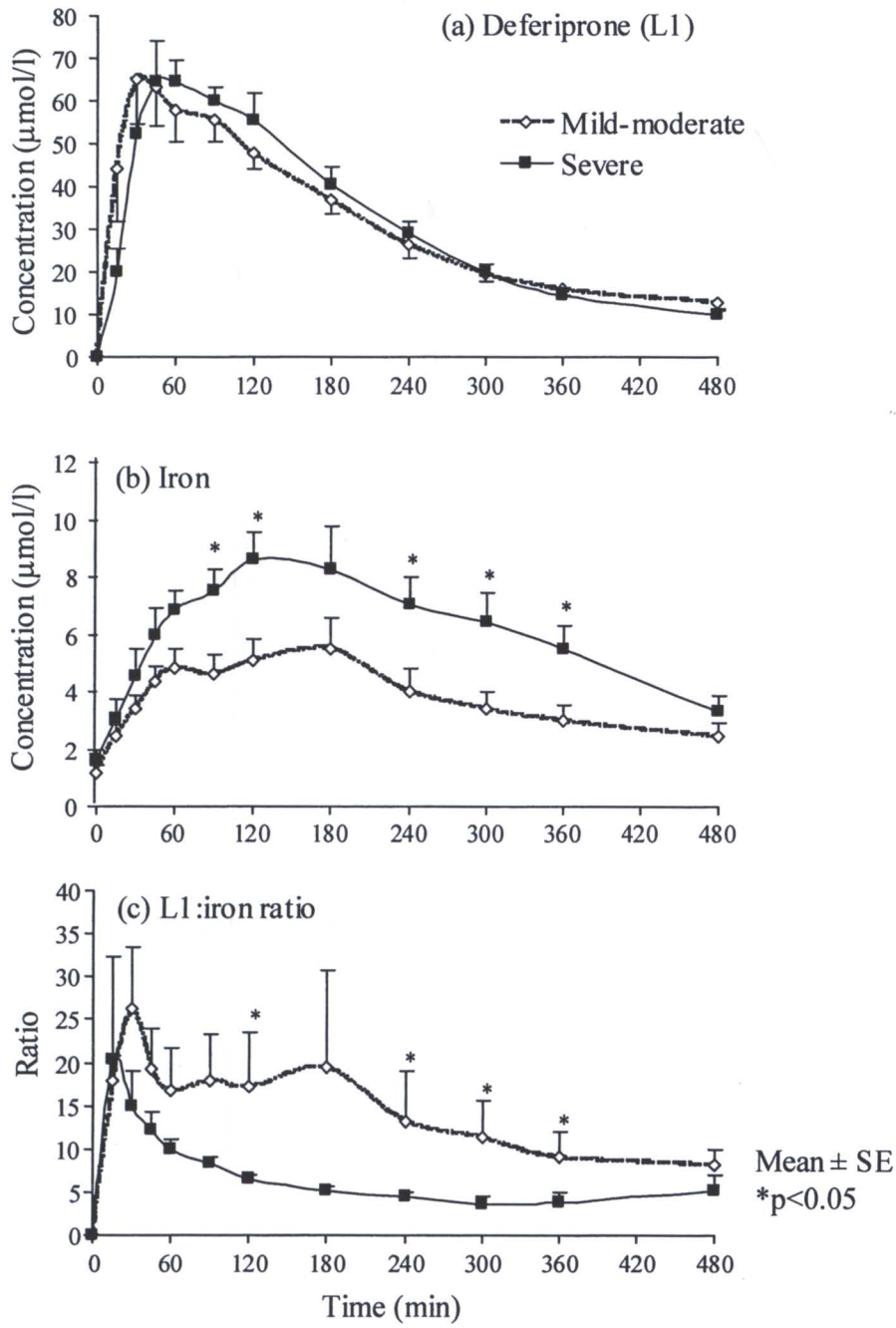
ระดับยา deferiprone (L1) และเหล็กที่จับกับยาขับเหล็ก (deferiprone-chelated iron) ในซีรั่มหลังได้รับยา deferiproneในขนาด 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมแสดงในรูป 2.8a และ b ตามลำดับ ระดับยาในซีรั่มขึ้นสูงสุดที่เวลาประมาณ 60 นาทีและระดับ deferiprone-chelated iron ขึ้นสูงสุดที่เวลา 120 นาที หลังจากนั้นยาและเหล็กจะถูกขับออกตามกฎเภสัชจลนศาสตร์

อัตราส่วนระหว่างยาและเหล็ก (L1:iron) ในซีรั่มแสดงในรูป 2.8c ในช่วงเวลาหลังจากได้รับยาจนถึง 300 นาที สัดส่วนระหว่างยาและเหล็กมากกว่า 3 แสดงว่ามียา deferiprone มากเกินพอที่จะจับกับเหล็กแบบสมบูรณ์ แต่หลังจากนั้นณ.เวลา 360 และ 480 นาที ระดับยาในเลือดลดต่ำลงในผู้ป่วยบางราย สัดส่วนระหว่างยาและเหล็กน้อยกว่า 3

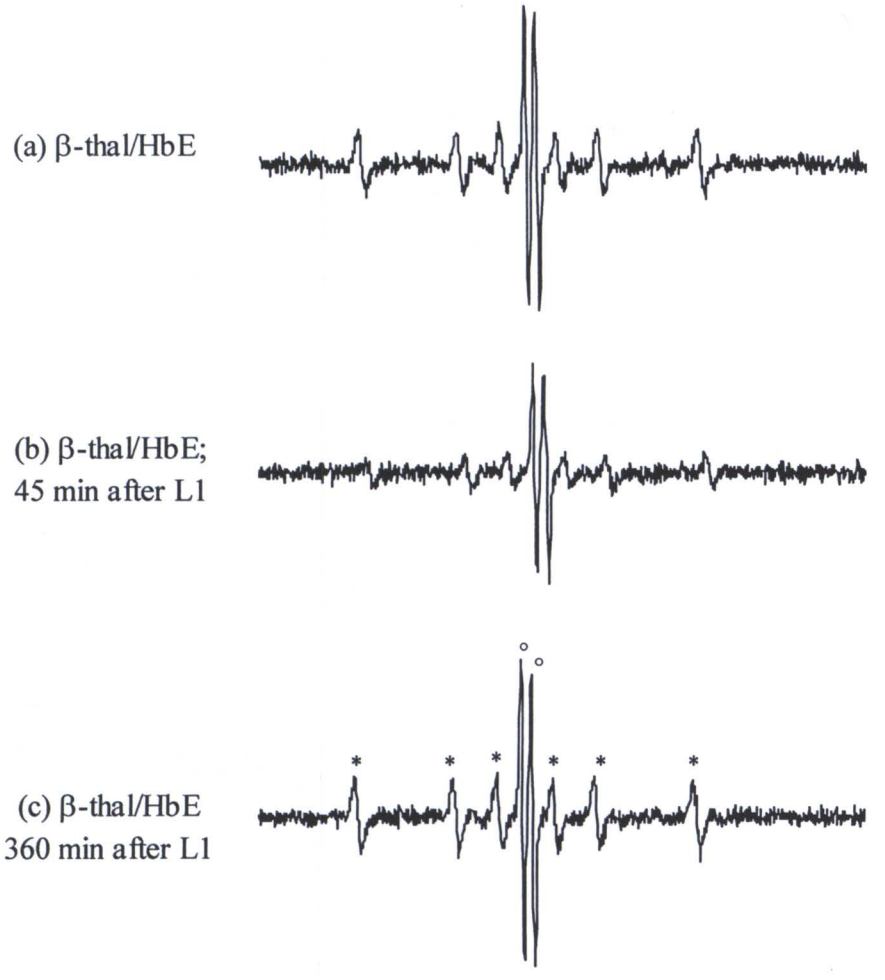
รูปที่ 2.9a แสดงความสูงของสัญญาณ ESR ในซีรั่มของผู้ป่วยก่อนได้รับยาขับเหล็ก ซึ่งสัญญาณของ ascorbyl radical และ DMPO-C adduct นี้จะลดลงตามความเข้มข้นของระดับยาในซีรั่ม (รูปที่ 2.10a และ b) และเมื่อยาถูกขับออกจากร่างกายสัญญาณ ESR นี้จะกลับสูงขึ้นจนใกล้ความสูงเมื่อก่อนได้รับยา จากผลการทดลองอธิบายได้ว่า deferiprone มีฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระซึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องจากความสามารถในการจับเหล็ก (reactive iron) ในซีรั่ม

ในผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคในระดับ severe พบว่าอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่างยาและเหล็กในซีรั่มที่เวลา 360 นาที (t=360) นั้น น้อยกว่า 3 และพบ enhanced ESR signal intensity แต่ในทางตรงกันข้าม ผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคในระดับ mild-moderate พบว่าอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่างยาและเหล็กในซีรั่มที่เวลา 360 นาที (t=360) นั้นมากกว่า 3 ในกรณีนี้สัญญาณ ESR ลดลงเมื่อเทียบกับก่อนได้รับยา ผลการทดลองสนับสนุนสมมติฐานว่าในกรณีที่การจับระหว่างยาขับเหล็กและเหล็กไม่สมบูรณ์เช่นในอัตราส่วนความเข้มข้นยาและเหล็ก 1:1 หรือ 2:1 ดังในกรณีของ bidentate iron chelator นั้นเหล็กก็ยังสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ (รูปที่ 2.11)

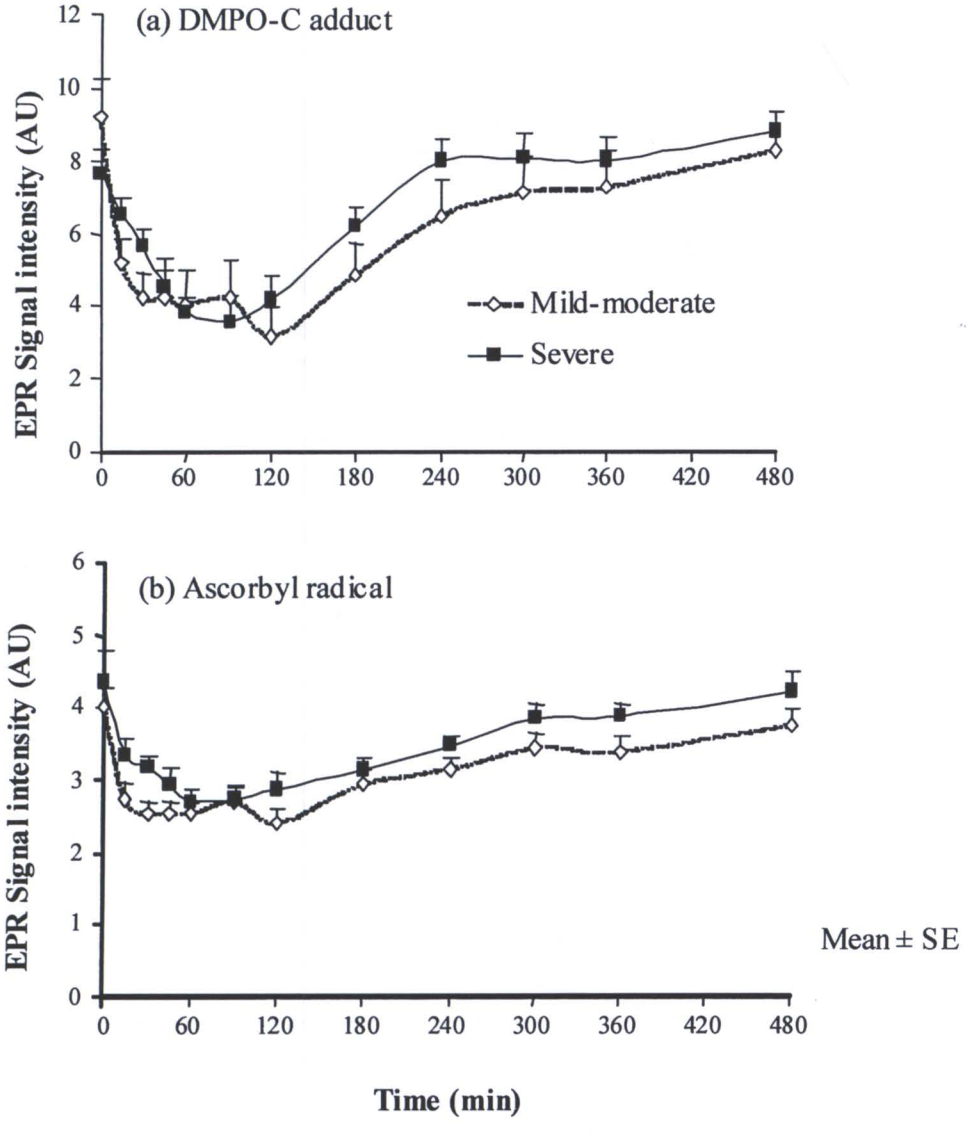
ดังนั้นการให้ยาในผู้ป่วยต้องคำนึงถึงภาวะเหล็กเกินของผู้ป่วยเพื่อปรับขนาดและช่วงเวลาการให้ยาเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดสารประกอบเหล็กของยาที่ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในซีรั่มผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้น และก่อให้เกิดอาการพิษของยามื่อให้ยาในระยะยาวได้



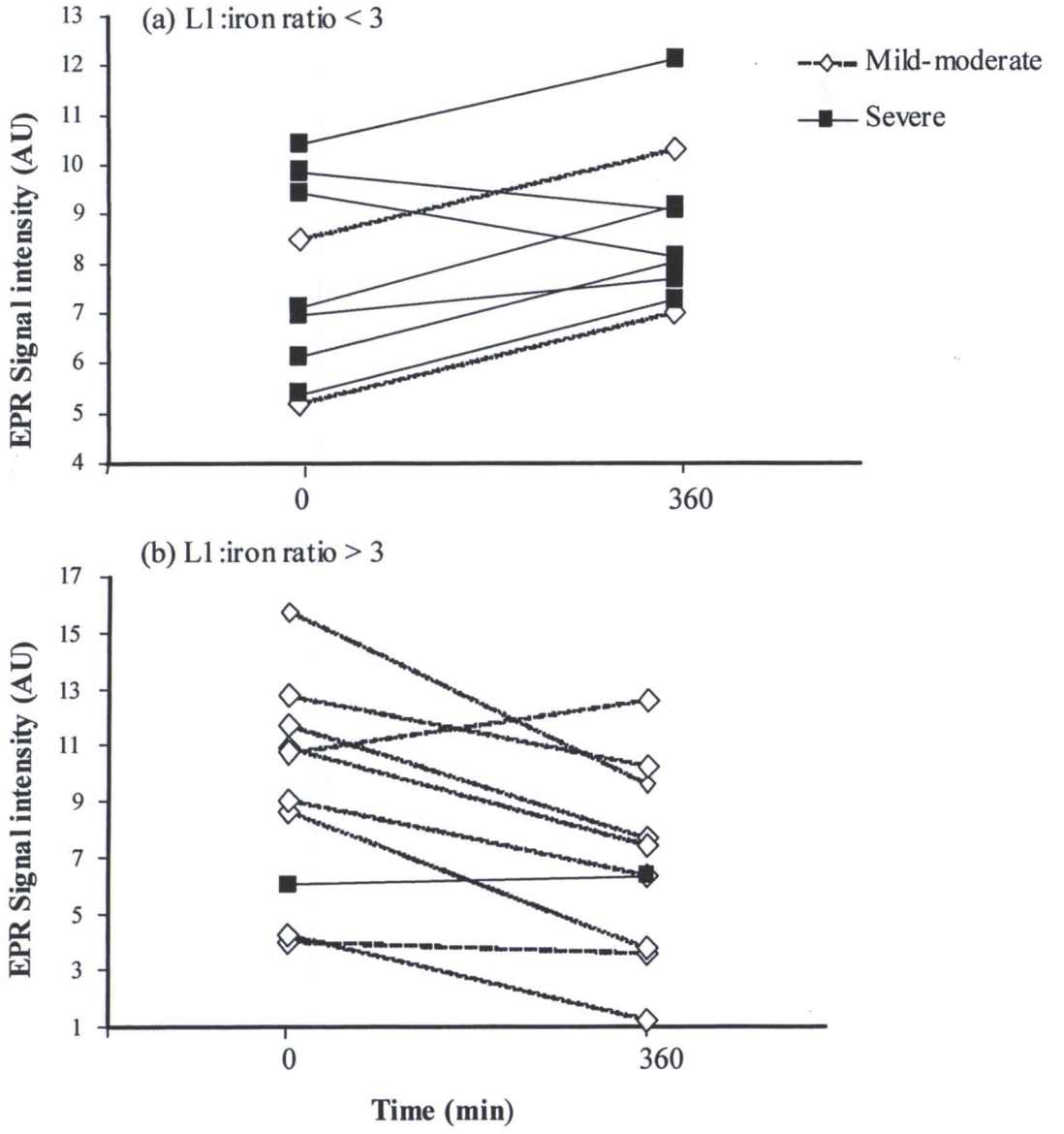
รูปที่ 2.8 ระดับยา deferiprone (a) deferiprone-chelated iron (b) และ อัตราส่วนระหว่างยาและเหล็ก (L1:iron) ในซีรั่มที่เวลาต่างๆหลังจากผู้ป่วยได้รับยา deferiprone (L1) ขนาด 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม



รูปที่ 2.9 สัญญาณ ESR ของ ascorbyl radical (o) และ DMPO-C adduct (*) ในซีรั่มของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ที่เวลาก่อนได้รับยา (a) 45 นาที (b) และ 360 นาทีหลังได้รับยา deferiprone (L1) ขนาด 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม



รูปที่ 2.10 ความสูงของสัญญาณ ESR ของ DMPO-C adduct (a) และ ascorbyl radical (b) ที่เวลาต่างๆหลังผู้ป่วยได้รับยา deferiprone (L1) ขนาด 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม



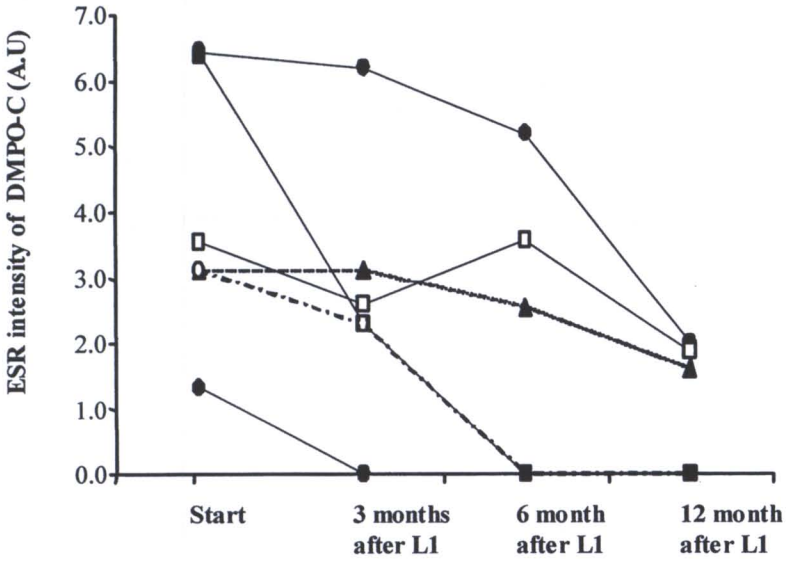
รูปที่ 2.11 การเปลี่ยนแปลงความสูงของสัญญาณ ESR ที่เวลา 360 นาทีหลังผู้ป่วยได้รับยา deferiprone (L1) ขนาด 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม ในกรณีที่อัตราส่วนความเข้มข้น L1:iron <3 (a) และ อัตราส่วนความเข้มข้น L1:iron >3 (b)

3. ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในผู้ป่วยที่ได้รับยาขับเหล็กต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 ปี

เมื่อตรวจวัดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในซีรั่มของผู้ป่วย 14 คน พบว่าซีรั่มของผู้ป่วย 9 คนสามารถตรวจพบ DMPO-C adduct ได้ที่เวลา t=0 ในจำนวนนี้ 6 คนเมื่อได้รับยาอย่างต่อเนื่องจนครบ 1 ปีพบว่า ความสูงของสัญญาณ DMPO-C adduct ลดลงอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 2.12) ส่วนผู้ป่วยอีก 3 คนนั้นค่าสัญญานของ DMPO-C adduct เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเป็นบางช่วงการนัดหมายโดยเฉพาะในช่วง 3 เดือนแรกของการได้รับยา

เมื่อตรวจสอบ enhanced EPR signal intensity ที่เวลา t=360 นาที พบว่าสัญญาณ DMPO-C adduct ไม่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตลอดช่วงการศึกษา ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ว่าไม่พบอาการไม่พึงประสงค์ในผู้ป่วยกลุ่มนี้

เนื่องจากการได้รับยาอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับ α-tocopherol (vitamin E) ในซีรั่มของผู้ป่วยด้วย ดังนั้นในบางกรณีแม้ว่าอัตราส่วนความเข้มข้นระหว่างยาและเหล็กน้อยกว่า 3 ก็ไม่พบการกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ



รูปที่ 2.12 การเปลี่ยนแปลงสัญญาณ ESR ของ DMPO-C adduct ในซีรั่มที่เวลาต่างๆหลังจากผู้ป่วยได้รับ deferiprone ต่อเนื่องในขนาด 75 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม

สรุปการศึกษาในส่วนที่ 2

จากการศึกษาสรุปได้ว่าเทคนิค ESR spin trapping ที่พัฒนาขึ้นมานั้นโดยอาศัยหลักการเพิ่มกระบวนการ redox cycling โดย ascorbic acid และกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดย *t*-BuOOH นั้น สามารถเพิ่มสัญญาณอนุมูลอิสระในซีรั่มของผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้ ความสูงของสัญญาณ ESR ที่วัดได้มีความสัมพันธ์กับเหล็กในรูปของ non-transferrin bound iron (NTBI) ซึ่งเป็นรูปที่เกี่ยวข้องกับการปฏิกิริยาเกิดอนุมูลอิสระ เทคนิคที่แสดงให้เห็นถึงการประยุกต์ใช้ประเมินความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในซีรั่มของผู้ป่วย

เมื่อผู้ป่วยได้รับยาในขนาดเดียวพบว่าถ้าผู้ป่วย มีภาวะเหล็กเกินในเลือดสูงโอกาสที่ผู้ป่วยจะมีสารประกอบเชิงซ้อนของยาและเหล็กแบบไม่สมบูรณ์และมีโอกาสเกิดการกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลในอิสระได้เมื่อระดับยาในเลือดลดต่ำลง ซึ่งน่าจะสอดคล้องกับการศึกษาที่ว่าอาการไม่พึงประสงค์มักจะเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่มีภาวะเหล็กเกินสูง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อให้ยาในระยะยาวแล้วความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในซีรั่มลดต่ำลงอย่างต่อเนื่องในผู้ป่วยส่วนใหญ่อาจเนื่องจากเหล็กในรูปของ NTBI ลดลงและระดับ α-tocopherol ในซีรั่มสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในระยะ 3 เดือนแรกของการได้รับยามีผู้ป่วยบางคนมีการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในซีรั่มเพิ่มขึ้นแต่อย่างไรก็ตามได้ปรับลดลงหรือไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าการได้รับยาขับเหล็กให้ประโยชน์กับผู้ป่วย และ deferiprone น่าจะมีความปลอดภัยในการใช้ ทั้งนี้ไม่พบอาการไม่พึงประสงค์กับผู้ป่วยในการศึกษานี้

ดังนั้นเทคนิคนี้จึงน่าจะมีความเป็นไปได้ในการใช้ตรวจสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับเหล็กในโรคหรือภาวะอื่นๆจากตัวอย่างซีรั่มของผู้ป่วยได้ วิธีนี้คงต้องมีการพิสูจน์และพัฒนาต่อไปเพื่อได้ข้อมูลชัดเจนเพิ่มขึ้นและเพื่อเข้าใจปัจจัยที่อาจจะมีผลต่อการศึกษาต่อไป