การทดลองส่วนที่ 3
การพัฒนาใช้เทคนิค in vivo ESR และ OMRI ในการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในหนูภาวะเหล็กเกิน

หลักการและเหตุผล

ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพต่างๆ ในปัจจุบันเชื่อว่ามากกว่า 80% ของโรคที่รู้จักนั้นเกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของการเกิดโรค อนุมูลอิสระมีหลายชนิดยกตัวอย่างเช่น hydroxyl radical, superoxide และ nitric oxide เป็นต้น อนุมูลอิสระแต่ละชนิดมีกระบวนการสร้าง การทำลาย การเกิดปฏิกิริยา จลนศาสตร์ ในแต่ละเนื้อเยื่อและอวัยวะแต่ละส่วนแตกต่างกัน เป็นเหตุผลว่าการศึกษาทดลองใช้สารต้านอนุมูลอิสระในเพื่อรักษาและป้องกันโรคในระบบที่ซับซ้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์จึงมักจะไม่ชัดเจน และอาจจะมีข้อขัดแย้งกันในผลการศึกษา ดังนั้นการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระต่างๆในระดับ in vivo จึงมีความสำคัญต่อความเข้าใจถึงปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในระบบที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากขึ้น

การพัฒนาเครื่อง L-band Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ในสัตว์ทดลองในขณะที่สัตว์ทดลองยังมีชีวิตอยู่ หลักการคือสาร spin probe ได้แก่สารในกลุ่ม piperidine nitroxides, pyrrolidine nitroxides ในร่างกายจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น วิธีนี้นำมาประยุกต์ใช้ในภาวะโรคต่างๆเช่น ภาวะเหล็กเกิน (Phumala et al., 1999) เป็นต้น ข้อดีของเทคนิคคือ real time สามารถติดตามปฏิกิริยาอนุมูลอิสระตามเวลาได้ และ non-invasive สัตว์ทดลองยังมีชีวิตอยู่และสามารถติดตามปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในระยะยาวได้ แต่ข้อจำกัดคือข้อมูลที่ได้เป็นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยรวมของแต่ละ compartment ที่ศึกษา และยังไม่สามารถจำแนกชนิดของอนุมูลอิสระได้

ในปัจจุบันการพัฒนาเครื่องมือที่เรียกว่า **O**verhauser **E**nhanced **M**agnetic **R**esonance **I**maging (OMRI) ซึ่งเป็น double resonance technique ระหว่าง MRI และ ESR โดยการทำให้เกิด overhauser effect (Krishna et al., 2002, Utsumi et al., 2006) รวมทั้งการพัฒนา spin probe ชนิดต่างๆให้มีคุณสมบัติทางการภาพและเคมีที่ต้องการ และการพัฒนาการประมวลผล ทำให้สามารถสร้างภาพอนุมูลอิสระในอวัยวะต่างๆ สามารถติดตามอนุมูลอิสระในหลายๆอวัยวะได้พร้อมกัน และสามารถบ่งถึงชนิดอนุมูลอิสระได้ในแต่ละส่วนของอวัยวะนั้นๆ

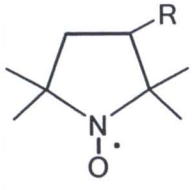
ผู้วิจัยเห็นว่าการพัฒนาการศึกษาอนุมูลอิสระโดยใช้เครื่องมือนี้น่าจะมีประโยชน์อย่างยิ่ง สามารถตอบคำถามวิจัยได้ชัดเจนในระบบสิ่งมีชีวิตได้จริง สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการศึกษากลไกการเกิดโรครวมทั้งกลไกและจลนศาสตร์สารต้านอนุมูลอิสระในโรคต่างๆได้ แต่อย่างไรก็ตามเครื่องมือนี้ยังอยู่ใน

ระหว่างการพัฒนาในเรื่องของการออกแบบตัวเครื่อง และ software รวมทั้งการพัฒนาสาร spin probe ชนิดต่างๆที่มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่เหมาะกับอวัยวะต่างๆ ดังนั้นการนำคำถามวิจัยและระบบการทดลองของเราไปใช้ในระหว่างการพัฒนานี้ ก็คงเป็นโอกาสดีที่ในการเรียนรู้ช่วยในการพัฒนาปรับปรุงและประยุกต์การให้ใช้งานได้อย่างเหมาะสมกับปัญหาวิจัยต่างๆ

ในที่นี้การทดลองต้นแบบจะเริ่มต้นจากการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในหนูภาวะเหล็กเกินโดยใช้ ferric nitrilotriacetic acid (Fe-NTA) ในกรณี chronic iron overloading โดย L-band ESR spectroscopy ซึ่งสามารถตรวจวัดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้เฉพาะส่วน และหนูภาวะเหล็กเกินโดย iron dextran ซึ่งเป็นกรณี acute iron overloading โดย OMRI เป็นการตรวจวัดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระทั้งร่างกาย สาร spin probe ที่ใช้คือ carbamoyl-PROXYL และ carboxy-PROXYL ซึ่งสารตัวแรกผ่านเข้าเซลล์ได้รวดเร็วกว่า ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดได้น่าจะอยู่ใน cellular compartment แต่ carboxy-PROXYL นั้นผ่านเข้าสู่เซลล์ได้น้อย ดังนั้นถ้าใช้สารนี้ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดได้น่าจะอยู่ใน blood compartment มากกว่า สาร spin probe ทั้ง 2 นี้มีโครงสร้างเป็นอนุมูลอิสระ (ตาราง 3.1) ให้สัญญาณ ESR และเมื่อเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระหรือสาร endogenous reducing agent ได้จะเปลี่ยนเป็น metabolite ซึ่งไม่มีสัญญาณ ESR ดังนั้นสารในกลุ่มนี้มีการประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวัดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระและ endogenous reducing agent ในการทดลองแบบ in vivo (Soule et al., 2007)

การศึกษานี้ได้รับความร่วมมือจาก Prof. Hideo Utsumi, Department of Bio-Functional Science, Faculty of Pharmaceutical Science and Innovation Center for Medical Redox Navigation Kyushu University, Fukuoka, Japan

ตาราง 3.1 สูตรโครงสร้างทางเคมี และ *n*-octanol/water partition coefficients (Po/w) ของ nitroxyl radicals

Probe	Basic structure	R	Po/w
Carboxy-PROXYL		$-COO^-$	0.0047
Carbamoyl-PROXYL		$-CONH_2$	0.68

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาและประยุกต์ใช้ L-band ESR และ OMRI ในการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำโดยเหล็กในหนูทดลองที่มีชีวิต

วิธีดำเนินการทดลอง

สารเคมี

Carbamoyl-PROXYL (Aldrich Chem. Co. WI)

Carboxy-PROXYL (Aldrich Chem. Co. WI)

Iron standard solution (Merck, Damstat, Germany)

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

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ คือ ddy mice เพศผู้อายุ 4 สัปดาห์ น้ำหนัก 20-24 กรัม จาก Seac Yoshitomi Co. (Fukuoka, Japan) สัตว์ทดลองจะเลี้ยงให้ปรับตัวอย่างน้อย 5 วันก่อนทำการศึกษาโดยให้น้ำและอาหารอย่างพอเพียงตามความต้องการ การศึกษาดำเนินการโดยผ่านการรับรองจาก the committee on the Ethics of Animal Experiment, Graduate School of Pharmaceutical Science, Kyushu University และดำเนินการภายใต้ the Guideline for Animal Experiments of the Graduate School of Pharmaceutical Science, Kyushu University

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การทดลองโดยใช้ L-band ESR spectroscopy

ภาวะเหล็กเกินในหนูจะสร้างโดย การฉีด ferric nitrilotriacetate ผ่านทางหน้าท้อง (i.p.) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยในช่วง 2 สัปดาห์แรกฉีดเหล็กเป็นปริมาณทั้งหมด 2.5 ไมโครโมลต่อหนึ่งตัวในเวลา 6 วัน และสัปดาห์สุดท้ายเหล็กเป็นปริมาณทั้งหมด 5 ไมโครโมลต่อหนึ่งตัวในเวลา 6 วัน และจะพักไว้ 4-5 วันก่อนนำไปตรวจวัดด้วย L-band ESR spectroscopy (JEOL, JES-PE-1X) หนูหลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่ไม่ได้รับการ treatment เลยและกลุ่มที่ให้เฉพาะ nitrilotriacetate (NTA) ใน procedure เช่นเดียวกับกลุ่ม ferric nitrilotriacetate สำหรับกลุ่มที่ได้รับยาขับเหล็ก deferrioxamine จะได้รับยาในขนาด 0.2 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกรัม ก่อนการฉีด ferric nitrilotriacetate เป็นเวลา 10 นาทีที่สัปดาห์สุดท้ายของการสร้างภาวะเหล็กเกิน

เมื่อจะตรวจวัดด้วย L-band ESR spectroscopy หนูจะทำให้สลบโดยใช้ Nembutal ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมทางกล้ามเนื้อ และวางบน Teflon holder และฉีดสาร spin probe คือ carbamoyl-PROXYL ขนาด 0.75 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกรัมทางทางเส้นเลือดดำที่หาง และตรวจวัดด้วย L-band ESR spectroscopy ที่บริเวณ upper abdomen ทันที สัญญาณ ESR จะถูกบันทึกและความสูงของสัญญาณจะลดลงตามเวลา หลังจากนั้นจึงสร้างกราฟระหว่าง In (signal intensity) กับเวลาหาค่าความชัน (slope) ซึ่งจะเป็นค่าคงที่อัตราการลดลงของสัญญาณ (k, rate constant of signal decay)

2. การทดลองโดยใช้ OMRI

1. Whole body image จากหนูภาวะเหล็กเกินโดยใช้ iron dextrane ทำการทดลองโดยใช้หนู ddy mice น้ำหนัก 23 – 30 g body weight ฉีด iron dextrane ขนาด 1 mg/g body weight ผ่านทางหน้าท้อง (i.p.) วันละครั้ง และเมื่อถึงเวลาทำการตรวจวัด หนูจะถูกฉีดด้วยสาร spin probe (carbamoyl-PROXYL หรือ carboxy-PROXYL) ในขนาด 2 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกรัมทางเส้นเลือดดำที่หาง และตรวจวัดด้วย OMRI ทั้นที whole body image จะถูกบันทึกไว้ทุกๆ 2 นาทีจนกว่าสัญญาณจะหมดลง

2. การทดลองโดยใช้ phantom เพื่อศึกษาผลกระทบของเหล็กต่อ intensity ของภาพ โดยใช้หลอดแก้วบรรจุ สาร spin probe และเติมด้วย iron dextrane ที่ความเข้มข้น 0 (control), 1, 2, 5, 10 µl/ml ตรวจวัดด้วย OMRI

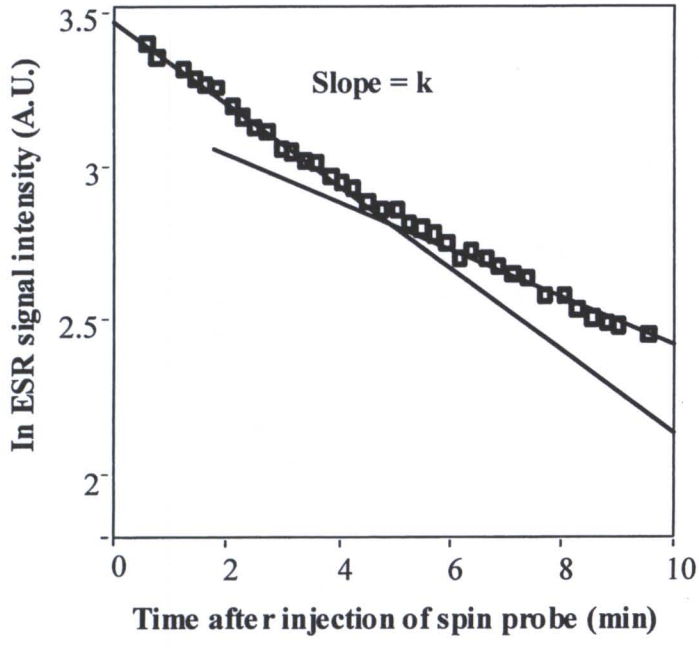
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การทดลองโดยใช้ L-band ESR spectroscopy

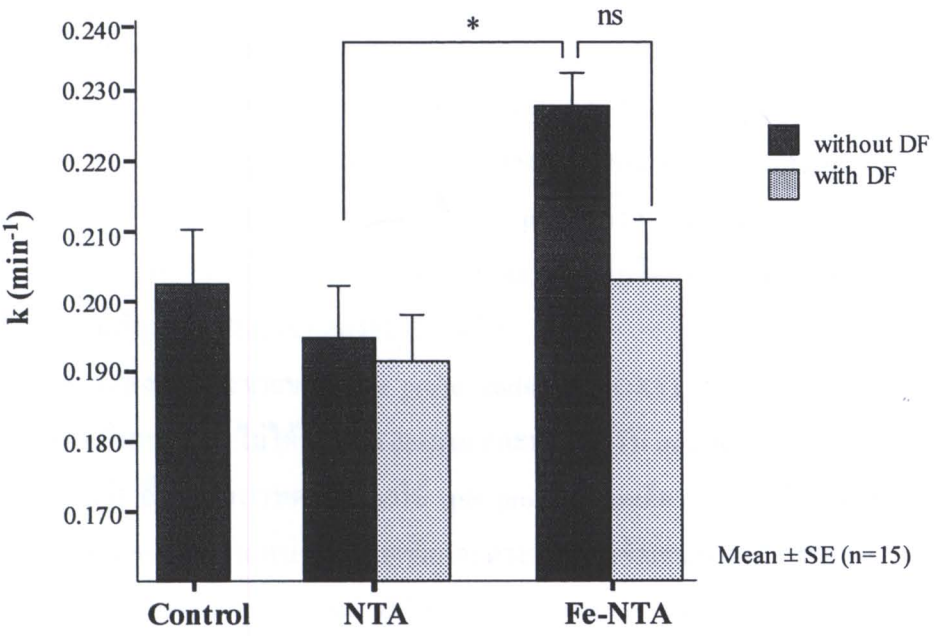
สัญญาณ ESR ที่ upper abdomen และการลดลงของสัญญาณแสดงดังรูปที่ 3.1 เมื่อหาค่าคงที่คงที่อัตราการลดลงของสัญญาณแสดงในรูปที่ 3.2 พบว่าการลดลงของสัญญาณ ESR ในหนูภาวะเหล็กเกินเร็วขึ้น (enhanced signal decay) และมีค่า k สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุม (control) หรือหนูที่ได้รับ NTA อย่างเดียว การให้ยาขับเหล็กช่วยลด enhanced signal decay นี้ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กระบวนการ enhanced signal decay นี้น่าจะเกียวข้องกับปฏิกิริยาอนุมูลอิสระและ oxidative stress เนื่องจากค่า k มีความสัมพันธ์กับระดับ hepatic glutathione (hepatic GSH; รูปที่ 3.3) คือเมื่อมีภาวะเหล็กเกินระดับ hepatic GSH ลดลง อนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำโดยเหล็กน่าจะสูงขึ้นและสามารถทำปฏิกิริยากับสาร spin probe ได้อย่างรวดเร็วจึงเห็นสัญญาณ ESR หายไป

(a) ESR spectra of carbamoyl-PROXYL

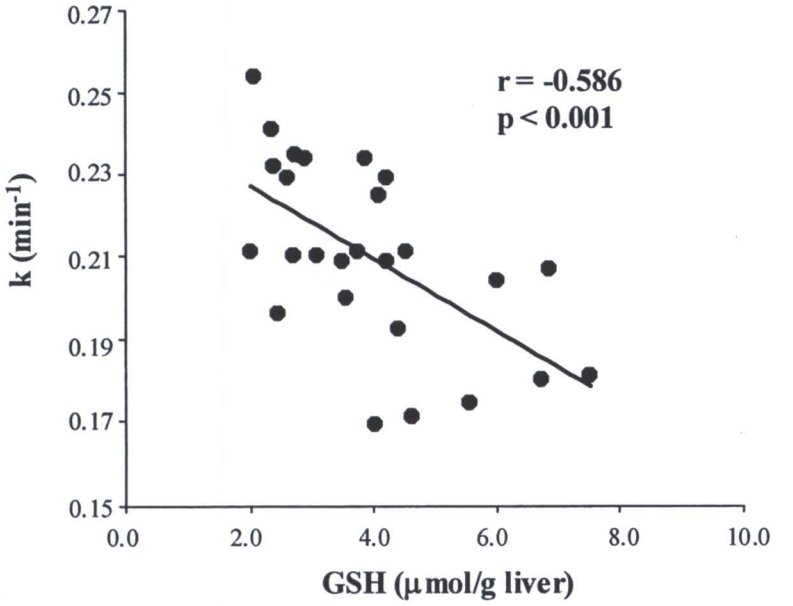
(b) ESR signal intensity and signal decay



รูปที่ 3.1 สัญญาณ ESR ของ carbamoyl-PROXYL ที่ upper abdomen ของหนู (a) และการลดลงของสัญญาณหลังฉีด carbamoyl-PROXYL ทางเส้นเลือดดำที่หาง (b)



รูปที่ 3.2 ค่าคงที่คงที่อัตราการลดลงของสัญญาณ ESR ของ carbamoyl-PROXYL ในหนูภาวะเหล็กเกิน



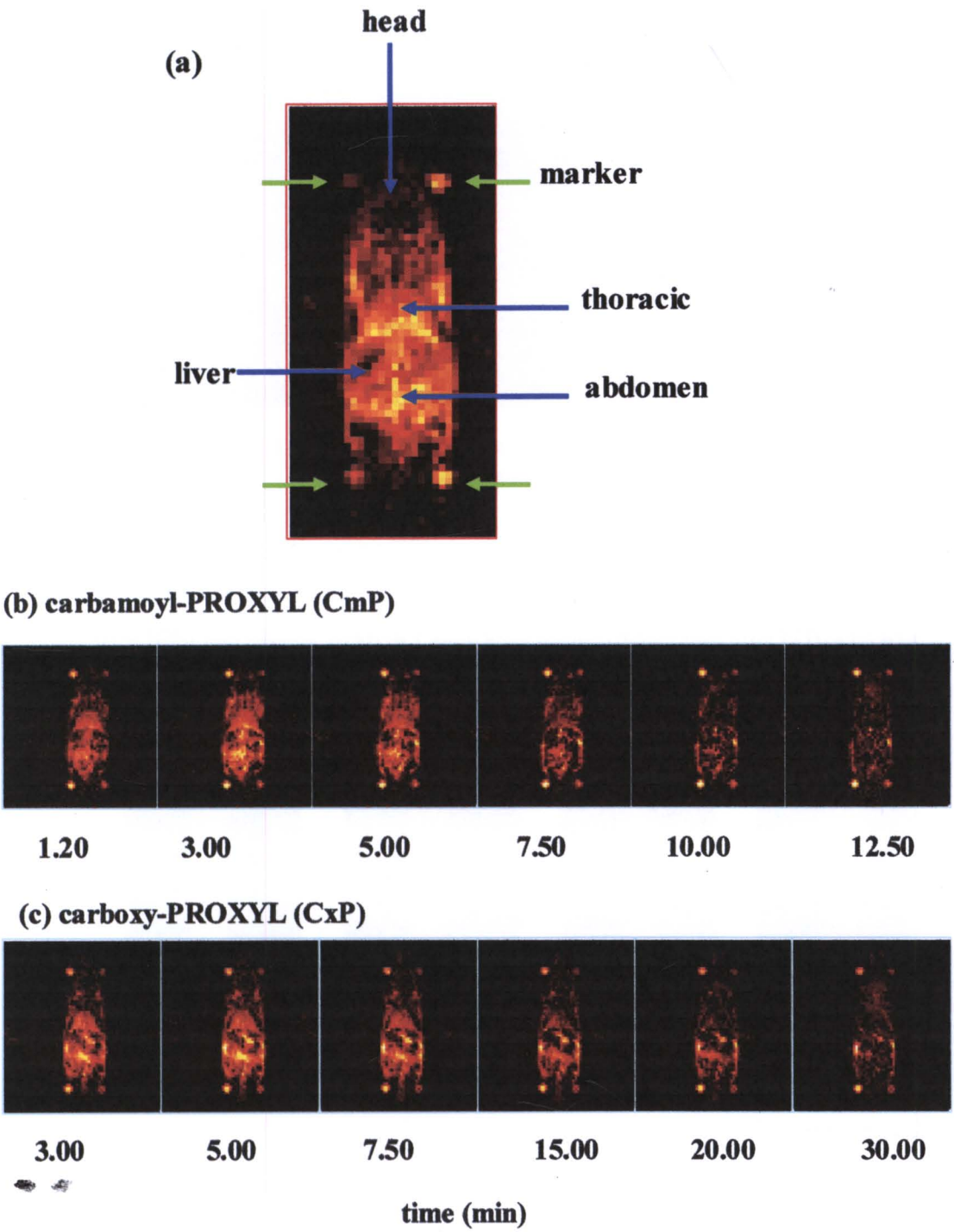
รูปที่ 3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ glutathione (GSH) และ ค่าคงที่คงที่อัตราการลดลงของสัญญาณ ESR ของ carbamoyl-PROXYL ในหนู

2. การทดลองโดยใช้ OMRI

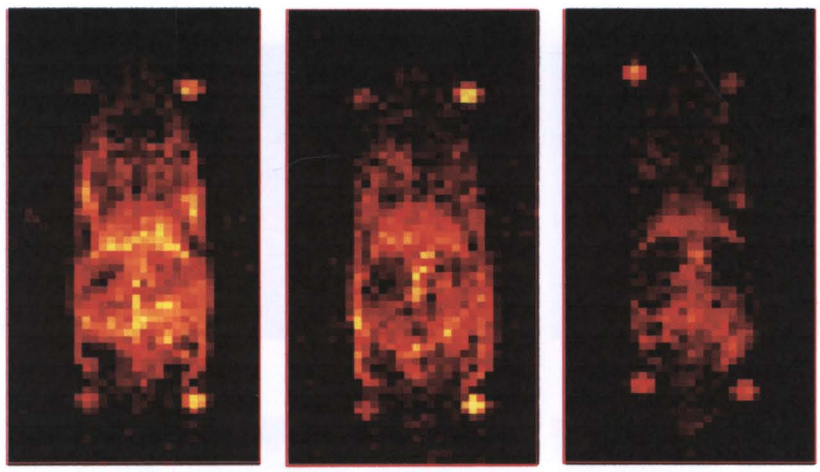
เมื่อฉีดสาร spin probe, carbamoyl-PROXYL หรือ carboxy-PROXYL ทางเส้นเลือดดำที่หางในหนูปรกติจะเห็นการกระจายของ spin probe ไปยังอวัยวะต่างๆดังแสดงในรูปที่ 3.4a สัญญาณ ESR ของ carbamoyl-PROXYL หรือ carboxy-PROXYL จะลดลงตามเวลาเนื่องจากกระบวนการเมตาบอริสมของร่างกายดังแสดงในรูปที่ 3.4b และ c ตามลำดับ spin probe ทั้งสองชนิดนี้ไม่ผ่าน blood brain barrier ดังนั้นจึงไม่พบการกระจายตัวของสารทั้งสองในส่วนศีรษะ และเห็นได้ว่า carbamoyl-PROXYL ซึ่งละลายในไขมันได้ดีกว่านั้นสัญญาณ ESR จะลดลงอย่างรวดเร็ว

รูปที่ 3.5 แสดงการกระจายของ spin probe, carboxy-PROXYL ที่เวลา 1 นาที หลังจากฉีด spin probe ใน ddy mice ในหนูปกติ ไม่ได้รับ iron dextran และหนูที่ได้รับ iron dextran ครั้งเดียวและฉีดซ้ำ จากภาพที่เห็นสังเกตได้ว่า ถึงแม้ว่าการทดลองโดยใช้ spin probe ขนาดเดียวกัน ความเข้มของภาพ (intensity) ซึ่งสังเกตได้จาก marker ทั้ง 4 ตำแหน่ง มีความเข้มแตกต่างกันอย่างชัดเจน จากการศึกษาพบว่าเหล็กมีผลต่อ relaxation time (T1, spin-spin interaction) ทำให้ความเข้มของสัญญาณที่ได้ลดลง พิสูจน์ได้จาก phantom experiment (รูปที่ 3.6) เห็นได้ว่าเมื่อความเข้นข้นของเหล็กเพิ่มขึ้น ความเข้มของสัญญาณ ESR จะลดลงตามลำดับ และเนื่องจากส่วนของตับมีสารประกอบเหล็กสูงอยู่ตามธรรมชาติค่า relaxation time สั้นลงเป็นผลให้มีข้อจำกัดในการสร้างภาพจาก spin probe นอกจากนี้จะเห็นว่าส่วนของตับดังแสดงในรูปที่ 3.4a เป็นพื้นที่ดำซึ่งเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งของการศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีภาวะเหล็กเกิน เนื่องจากเหล็กมีผลต่อสัญญาณ NMR ทั้งต่อค่า T1, spin-spin interaction และ T2, spin-environment interaction ทั้งนี้จากการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ X-band ESR ไม่พบว่าเหล็กมีปฏิกิริยากับ spin probe

ดังนั้นการศึกษาโดย OMRI ในสัตว์ที่มีภาวะเหล็กเกินจึงต้องปรับวิธีการคำนวณและการประมวลผลภาพใหม่ ซึ่งคำนวณ correcting factor ในการประมวลผลต่อไปดังนั้นภาพที่ได้หลังจากการปรับการประมวลผลแล้วเป็นไปดังรูปที่ 3.7 ซึ่งเห็นได้ว่าความเข้มของ marker ในทุกภาวะการทดลองไม่ว่าในหนูปกติ หนูได้รับเหล็กเกิน หรือ หนูได้รับเหล็กเกินและยาขับเหล็กมีค่าเท่ากัน ซึ่งความเข้มของภาพที่ได้ normalized แล้วในแต่ละ pixel สามารถนำไปแปลงเป็นค่าตัวเลขและคำนวณหาอัตราการลดลงของสัญญาณได้ดังในการทดลองใน L-band ESR spectroscopy ได้ต่อไป

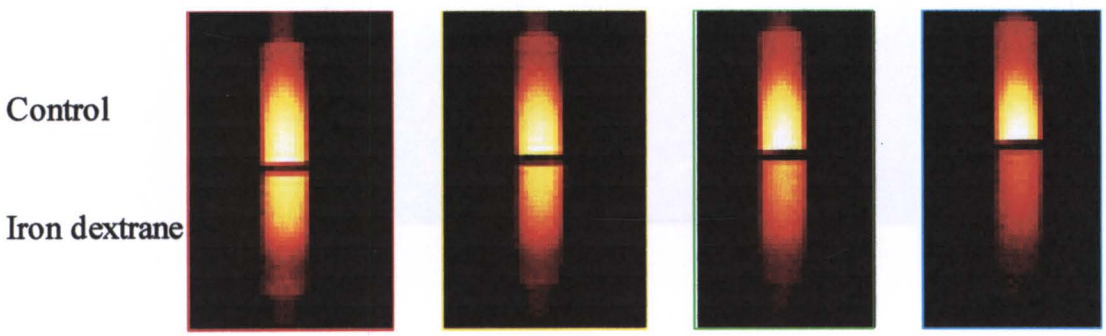


รูปที่ 3.4 แสดง whole body image (a) การลดลงของสัญญาณ ESR ของ carbamoyl-PROXYL (b) และ carboxy-PROXYL (c) ในหนูปกติ

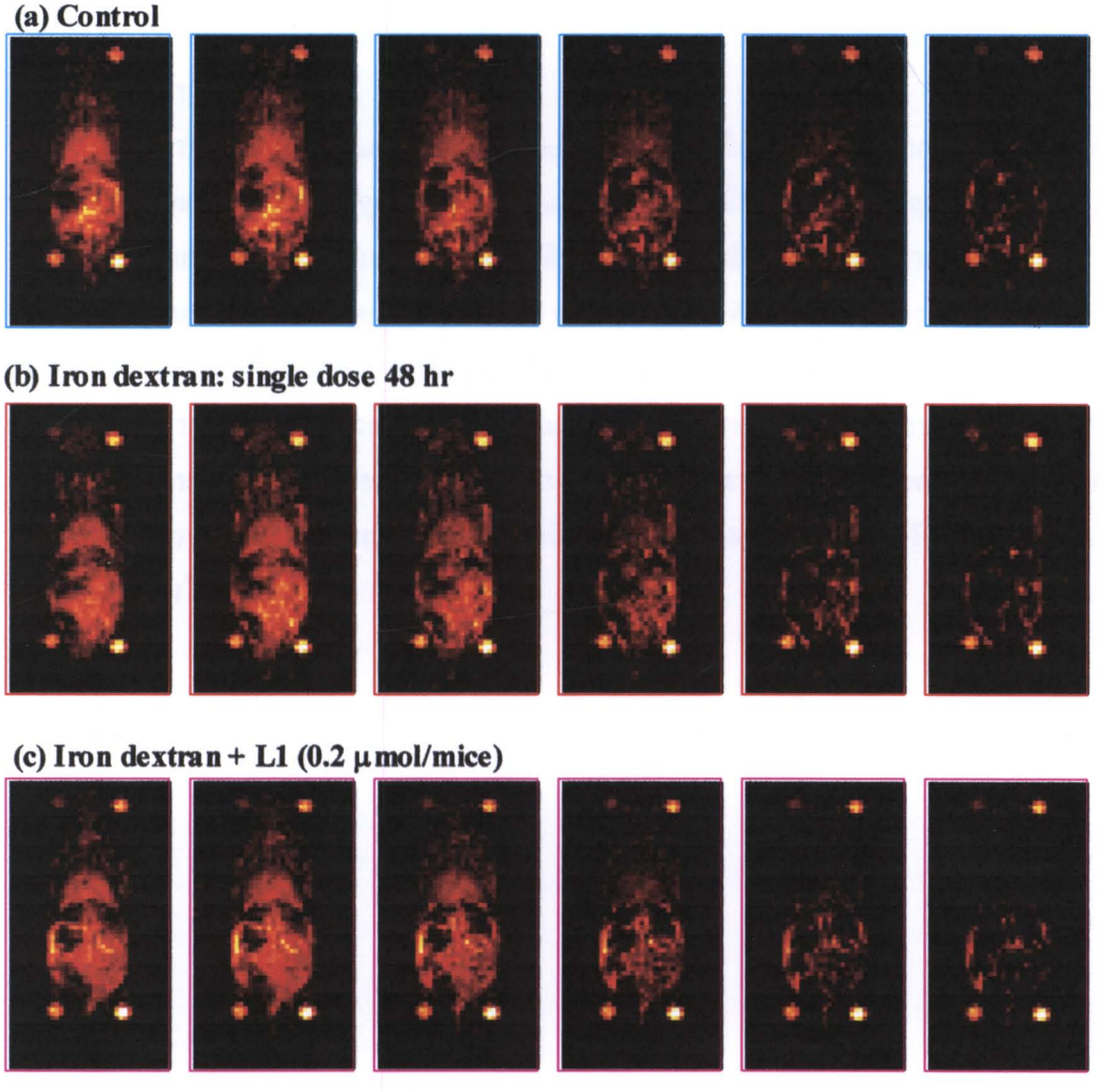


Control | 24 hr after single iron loading | 48 hr after repeated iron loading

รูปที่ 3.5 แสดงการกระจายของ spin probe, carboxy-PROXYL ที่เวลา 1 นาที หลังจากฉีด spin probe หนูที่ได้รับ iron dextran ในขนาด 1 mg/g body weight แบบครั้งเดียวและได้รับซ้ำ 5 ครั้ง



รูปที่ 3.6 ผลของความเข้มข้นของเหล็กต่อสัญญาณ ESR ของ carboxy-PROXYL (แถวบน) carboxy-PROXYL เติม iron dextran ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน (แถวล่าง)



รูปที่ 3.7 แสดง whole body image และ การลดลงของสัญญาณ ESR ของ carbamoyl-PROXYL ในหนูปกติ (a) หนูที่ได้รับ iron dextran ขนาดเดียวและพักไว้ 48 ชั่วโมงก่อนตรวจวัดด้วย OMRI (b) และ หนูที่ได้รับ iron dextran ขนาดเดียวและพักไว้ 48 ชั่วโมง ก่อนได้รับยาขับเหล็ก deferiprone (L1) ขนาด 0.2 ไมโครโมล และตรวจวัดด้วย OMRI

สรุปการทดลองในส่วนที่ 3

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาการตรวจวัดอนุมูลอิสระและจลนศาสตร์ของอนุมูลอิสระในสัตว์ทดลองที่มีชีวิต ผลการวิจัยพบว่าการลดลงของสัญญาณ ESR ของ nitroxyl spin probe เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในหนูมีภาวะเหล็กเกิน

การตรวจวัดโดยใช้ L-band ESR spectroscopy มีข้อจำกัดคือสัญญาณมากจากอวัยวะที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายเช่นในกรณีนี้ สัญญาณจะมาจาก upper abdomen ซึ่งในส่วนนี้มีสัญญาณของ nitroxyl spin probe ที่กระจายอยู่บริเวณตับเป็นส่วนใหญ่ อาจมีสัญญาณจากส่วนอื่นๆด้วย ซึ่งไม่จำเพาะเจาะจง

สำหรับการ ตรวจวัด nitroxyl spin probe ด้วย OMRI มีข้อดีคือสามารถสร้างภาพของ probe ได้ทั้งร่างกายการลดลงของสัญญาณสามารถคำนวณได้ในแต่ละ pixel นั้นหมายความว่าสามารถคำนวณอัตราการลดลงของสัญญาณในแต่ละอวัยวะได้พร้อมๆกัน และติดตามจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ซึ่งมีประโยชน์มากในการศึกษาการออกฤทธิ์ของยาต้านอนุมูลอิสระและยาขับเหล็ก แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังเป็นวิธีที่ยังอยู่ในการพัฒนาข้อมูลที่แสดงในที่นี้ แสดงถึงแน้วโน้มว่า OMRI น่าจะตรวจวัดอนุมูลอิสระในหนูที่มีภาวะเหล็กเกินได้เช่นกัน