ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248950

RMU5080058 ผศ.ดร. นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาและการประยุกต์ใช้ Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy ในการศึกษาผลของปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และยาขับเหล็กต่อพยาธิสรีระวิทยาของโรคธาลัสซีเมีย

โดย

นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส, Ph.D.และคณะ

กรกฎาคม พ.ศ. 2553

b00253936

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248950

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาและการประยุกต์ใช้ Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy ในการศึกษาผลของปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และยาขับเหล็กต่อพยาธิสรีระวิทยาของโรคธาลัสซีเมีย

โดย

นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส, Ph.D. และคณะ

กรกฎาคม พ. ศ. 2553

b00253936

สัญญาเลขที่ RMU5080058

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาและการประยุกต์ใช้ Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy ในการศึกษาผลของปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และยาขับเหล็กต่อพยาธิสรีระวิทยาของโรคธาลัสซีเมีย

คณะผู้วิจัย

1. ผศ. ดร. นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. นางปวีณา ยามานนท์	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. นายทศพล จิระสมประเสริฐ	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
4. นายสุพจน์ รอดรัตน์	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
5. นางสาวพัชราภรณ์ ชื่นพิศาล	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
6. นางสาวพรรณนารี ชัยวิชิต	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

248950

ชื่อโครงการ: การพัฒนาและการประยุกต์ใช้ Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy ในการศึกษาผลของปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และยาขับเหล็ก ต่อพยาธิสรีระวิทยาของโรคธาลัสซีเมีย

ชื่อหัวหน้าโครงการ: นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส, Ph.D.

Key words: ESR, iron chelator, iron overload, spin trapping, spin labeling, thalassemia

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธี electron spin resonance (ESR) spectroscopy โดยใช้เทคนิค spin labeling และ spin trapping เพื่อศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะแทรกซ้อนซึ่งเป็นผลจากภาวะเหล็กเกินในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย สำหรับการศึกษาตำแหน่งและจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำโดยเหล็กในไลโพโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำนั้นใช้สาร spin labeling สองชนิดได้แก่ 5- และ 16-doxyl stearic acid (5- และ 16 DS) ซึ่งเข้าไปแทรกอยู่ที่ส่วนผิวและส่วนชั้นในที่ไม่ชอบน้ำในชั้นของฟอสโฟไลปิด จากการศึกษาอัตราการลดลงของสัญญาณ ESR พบว่าปฏิกิริยาอนุมูลอิสระเกิดอย่างรวดเร็วในส่วนชั้นในที่ไม่ชอบน้ำ และสารประกอบเหล็ก hemin ซึ่งเป็นผลผลิตจากการเกิดออกซิเดชั่นของฮีโมโกลบินมีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ

สำหรับเทคนิค ESR spin trapping ได้พัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในซีรั่มของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดย ascorbic acid ช่วยส่งเสริมปฏิกิริยา redox cycling และ DMPO ใช้เป็นสาร spin trapping เมื่อเติม *t*-BuOOH ลงในซีรั่มของอาสาสมัครปกติ พบสัญญาณ ESR ของ ascorbyl radical เพียงชนิดเดียว แต่ในกรณีซีรั่มของผู้ป่วยพบสัญญาณของ carbon centered radical adduct of DMPO (DMPO-C adduct) อีกด้วย ความสูงของสัญญาณทั้งสองนี้สัมพันธ์กับระดับเหล็กในรูปของ non-transferrin bound iron (NTBI) และความสูงของสัญญาณเปลี่ยนแปลงตามระดับเหล็กที่สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ รวมทั้งระดับยาขับเหล็ก deferiprone ในซีรั่มด้วย เทคนิคนี้ใช้ติดตามการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่อาจเหนี่ยวนำโดยสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่สมบูรณ์ระหว่างเหล็กและยาขับเหล็ก deferiprone ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่รับประทานยาขับเหล็กนี้

ด้วยเครื่องมือระดับสูงขึ้นคือ in vivo ESR spectroscopy (L-band) และ Overhauser Enhanced Magnetic Resonance Imaging (OMRI) โดยใช้ nitroxyl spin probe สามารถศึกษาจลนศาสตร์และสร้างภาพของอนุมูลอิสระได้ในสัตว์ทดลองที่มีชีวิต การศึกษาแสดงให้เห็นว่าอัตราการลดลงของสัญญาณจาก nitroxyl spin probe นั้นสูงขึ้นในหนูขาวที่มีภาวะเหล็กเกิน เทคนิคนี้จะได้พัฒนาต่อไปเพื่อศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในสัตว์ทดลอง

สรุปได้ว่างานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคใหม่ในการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับภาวะเหล็กเกินในการทดลองระดับต่างๆ และจะนำมาประยุกต์เพื่อศึกษาผลของยาขับเหล็กและสารต้านอนุมูลอิสระในระดับคลินิคต่อไป

Abstract

248950

Title: Development and application of Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy to study effects of free radical reaction, antioxidant and iron chelator on pathophysiology of thalassemia

Principle investigator: Noppawan Phumala Morales, Ph.D.

Key words: ESR, iron chelator, iron overload, spin trapping, spin labeling, thalassemia

Abstract:

Electron spin resonance (ESR) spectroscopy with spin labeling and spin trapping techniques have been developed to study iron induced free radical reactions that are associated with complications in thalassemia. In order to localize the specific site and kinetics of iron induced free radical reactions in low density lipoprotein (LDL), paramagnetic fatty acid 5- and 16-doxyl stearic acid (5- and 16 DS) were used to label phospholipids layer near hydrophilic surface and the deeper hydrophobic region of LDL, respectively. By mean of the rate of ESR signal decay indicated that the deeper hydrophobic region of LDL was a primary site of LDL oxidation. Moreover hemin, a denaturative product of hemoglobin, was a potent iron complex that induced free radical reaction in lipoprotein.

An ESR spin trapping technique has been developed to demonstrate free radical activity in serum of thalassemia. Ascorbate was used to enhance redox cycling reaction and DMPO was used as a spin trapping agent. Addition of *t*-BuOOH, only ascorbyl radical, a doublet signal with a_H=1.81 G, was generated in normal serum. While serum of thalassemic patients showed an additional ESR signal, a sextet signal with a_N=16.5 and a_H=23.7 G. It was a typical ESR signal for carbon centered radical adduct of DMPO (DMPO-C adduct). The signal height of ascorbyl radical and DMPO-C adduct in serum were correlated with non-transferrin bound iron (NTBI) and were changed accordingly to the catalytic activity of iron as well as levels of an iron chelator, deferiprone. This technique is recently employed to monitor free radical activity that could produce by incomplete iron and deferiprone complexes in thalassemic patients. With the advanced L-band ESR spectroscopy and OMRI technique, kinetics and imaging of free radical generation were studied in living animals. Enhanced ESR signal decay of nitroxyl spin probe was observed in iron overloaded mice. The techniques need future development to demonstrated free radical reaction in vivo models.

In conclusion, we success to develop ESR technique to study iron induced free radical reaction both *in vitro* to *in vivo* models. The techniques will be applied to study the effect of iron chelatos and antioxidants in further clinical studies.

Executive Summary

ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำด้วยเหล็กถือว่าเป็นกระบวนการสำคัญที่นำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อและอวัยวะของผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกิน นำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนและสาเหตุการตายในที่สุด ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยนี้มีความซับซ้อนในแง่ของจลนศาสตร์เนื่องจากเหล็กอยู่หลากหลายรูปเช่น hemin, non-transfferin bound iron (NTBI) และ low molecular weight iron อื่นๆซึ่งสามารถเป็น active หรือ catalytic iron ได้ นอกจากนี้เหล็กแต่ละรูปยังกระจายในส่วนต่างๆทั้งนอกเซลล์ในเซลล์ และอวัยวะต่างๆที่แตกต่างกัน ดังนั้นการประเมินผลของอนุมูลอิสระหรือผลของการใช้สารต้านอนุมูลอิสระจึงมีข้อจำกัด

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาทคนิค Electron Spin Resonance (ESR) หรือ Electron Paramagentic Resonance (EPR) spectroscopy ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถติดตามอนุมูลอิสระได้โดยตรงและ real time ในแบบการทดลองต่างๆตั้งแต่การศึกษาใน macro molecule ได้แก่ ไลโพโปรตีน การศึกษาจากตัวอย่างซีรั่มของผู้ป่วย จนถึงการศึกษาในสัตว์ทดลอง และนำเทคนิคเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อทำความเข้าใจต่อพยาธิสรีระวิทยาของโรคธาลัสซีเมียซึ่งเกี่ยวข้องกับเหล็ก และผลของสารต้านอนุมูลอิสระและยาขับเหล็ก

งานวิจัยนี้แบ่งเป็นสามส่วนโดยมีวัตถุประสงค์จำเพาะดังนี้

1. พัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิค ESR spin labeling เพื่อศึกษาตำแหน่งของการเกิดอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็ก ตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยาขับเหล็กและสารต้านอนุมูลอิสระในระดับโมเลกุลโดยใช้ไลโพโปรตีนเป็นแบบจำลอง

2. พัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิค ESR spin trapping เพื่อศึกษาความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในผู้ป่วยและผลของยาขับเหล็กต่อการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ

3. พัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิค in vivo ESR และ nitroxyl spin probes เพื่อศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในอวัยวะต่างๆของหนูที่มีภาวะเหล็กเกิน และสร้างแบบจำลอง สำหรับศึกษาผลของยาขับเหล็กและสารต้านอนุมูลอิสระในสัตว์ทดลอง (in vivo model)

สำหรับการทดลองที่ 1 การศึกษาตำแหน่งของการเกิดอนุมูลอิสระในไลโพโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำโดยเทคนิค ESR spin labeling โดยใช้สาร spin probe สองชนิดได้แก่ 5-deoxyl stearic acid (5-DS) และ 16-deoxyl stearic acid (16-DS) ติดในชั้น phospholipids surface ที่ตำแหน่ง hydrocarbon ที่ 5 และ 16 ตามลำดับในไลโพโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoproteine, LDL) สาร spin probe นี้มีสัญญาณ ESR แต่สัญญาณจะลดลงเมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น ในที่นี้กระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโพโปรตีนด้วยสารประกอบเหล็ก คือ hemin และ Fe-NTA ซึ่งเป็นตัวแทนของ low molecular weight iron จากการทดลองพบว่า อัตราการลดลงของสัญญาณ ESR ของสาร spin probe เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในไลโพโปรตีนนั้นจะเกิดในส่วน hydrophobic ได้เร็วกว่า ทั้งนี้อาจสามารถอธิบายได้โดยในส่วนที่เป็น hydrophobic ของชั้น phospholipids นั้นมีความหนาแน่นของ unsaturated double bonds มากกว่าในส่วนที่ใกล้ผิว สารประกอบเหล็กที่สามารถละลายในไขมันได้ดีกว่าเช่น hemin จะสามารถกระตุ้นในเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารประกอบเหล็กที่ละลายน้ำได้ดี เช่น Fe-NTA นอกจากนี้ ยาขับเหล็ก deferiprone (L1) สามารถลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงเมื่อเทียบกับ hemin และผลของ deferiprone ในการลดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระน่าเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของ deferiprone ต่ออนุมูลอิสระโดยตรงนอกเหนือจากการเป็น iron chelator

การทดลองในส่วนที่ 2 ศึกษาความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในผู้ป่วยและผลของยาขับเหล็กต่อการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยเทคนิค ESR spin trapping โดย 5,5-dimethyl-l-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) เป็น spin trapping agent เทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาโดยใช้สมมติฐานว่า ในซีรั่มของผู้ป่วยที่มีภาวะเหล็กเกินมีสารประกอบเหล็กที่สามารถเร่งปฏิกิริยา Fenton reaction ได้ เช่นเหล็กที่อยู่ในรูปของ non-transferrin bound iron (NTBI) ตามปกติปฏิกิริยาอนุมูลอิสระจะไม่สามารถตรวจวัดได้เนื่องจากในซีรั่มมี albumin และโปรตีนอื่นๆ รวมทั้งสารที่เป็น antioxidant มากพอ ดังนั้นจึงต้องขยายปฏิกิริยา Fenton reaction โดยใช้ ascorbic acid ซึ่งส่งเสริมกระบวนการ redox cycling ทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มมากพอที่สามารถตรวจวัดด้วย spin trapping ผลการทดลองชี้ในเห็นว่าสัญญาณ ESR ที่ตรวจวัดได้ซึ่งได้แก่ ascorbyl radical และ carbon centered radical (DMPO-C adduct) นั้นเกี่ยวข้องกับ non-transferrin bound iron (NTBI)

ในผู้ป่วยที่ได้รับยาขับเหล็ก deferiprone ในขนาดเดียว (25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม) พบว่า deferiprone สามารถลดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในผู้ป่วยได้ แต่ถ้าผู้ป่วยมีภาวะเหล็กเกินในเลือดสูงโอกาสที่ผู้ป่วยจะมีสารประกอบเชิงซ้อนของยาและเหล็กแบบไม่สมบูรณ์และมีโอกาสเกิดการกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลในอิสระได้เมื่อระดับยาในเลือดลดต่ำลง ซึ่งน่าจะสอดคล้องกับการศึกษาที่ว่าอาการไม่พึงประสงค์มักจะเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่มีภาวะเหล็กเกินสูง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อให้ยาในระยะยาวแล้วความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในซีรั่มลดต่ำลงอย่างต่อเนื่องในผู้ป่วยส่วน

ใหญ่ ซึ่งอาจเนื่องจากเหล็กในรูปของ NTBI ลดลงและระดับ α-tocopherol ในซีรั่มสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในระยะ 3 เดือนแรกของการได้รับยามีผู้ป่วยบางคนมีการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในซีรั่มเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามหลังจากให้ยาต่อไปปฏิกิริยาอนุมูลอิสระก็ได้ปรับลดลงหรือไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าการได้รับยาขับเหล็กให้ประโยชน์กับผู้ป่วย และ deferiprone น่าจะมีความปลอดภัยในการใช้ ทั้งนี้ไม่พบอาการไม่พึงประสงค์กับผู้ป่วยในการศึกษานี้ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงน่าจะมีความเป็นไปได้ในการใช้ตรวจสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับเหล็กในโรคหรือภาวะอื่นๆจากตัวอย่างซีรั่มของผู้ป่วยได้

การทดลองสุดท้ายเป็นการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในสัตว์ทดลองที่มีชีวิต โดย L-band Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy และ **O**verhauser Enhanced **M**agnetic **R**esonance **I**maging (OMRI) ซึ่งเป็น double resonance technique ระหว่าง MRI และ ESR หลักการทั่วไปคือนำสาร spin probe ได้แก่สารในกลุ่ม piperidine nitroxides, pyrrolidine nitroxides ฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลอง สัญญาณ ESR ของสาร spin probe ในร่างกายจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น ข้อดีของเทคนิคสามารถติดตามปฏิกิริยาอนุมูลอิสระตามเวลาได้ ศึกษาสัตว์ทดลองยังมีชีวิตอยู่และสามารถติดตามปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในระยะยาวได้ สำหรับ OMRI ยังสามารถสามารถสร้างภาพอนุมูลอิสระในอวัยวะต่างๆ จึงสามารถติดตามอนุมูลอิสระในหลายๆอวัยวะได้พร้อมกัน และสามารถบ่งถึงชนิดอนุมูลอิสระได้ในแต่ละส่วนของอวัยวะนั้นๆอีกด้วย

การศึกษานี้ติดตามการลดลงของ carbamoyl-PROXYL ซึ่งเป็นสาร spin probe ที่ผ่านเข้าเซลล์ได้ ฉีดทางเส้นเลือดดำที่หางของหนูภาวะเหล็กเกินโดยให้ Fe-NTA และพบว่าในหนูภาวะเหล็กเกินสัญญาณ ESR ของ nitroxyl spin probe จะลดลงอย่างรวดเร็ว และการลดลงของสัญญาณ เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาอนุมูลอิสระและระดับ glutathione ในหนูมีภาวะเหล็กเกิน เช่นเดียวกันสำหรับการตรวจวัด nitroxyl spin probe ด้วย OMRI มีข้อดีคือสามารถสร้างภาพของ nitroxyl spin probe เห็นการกระจายของ nitroxyl spin probe ได้ทั้งร่างกาย การลดลงของสัญญาณสามารถคำนวณได้ในแต่ละ pixel นั้นหมายความว่าสามารถคำนวณอัตราการลดลงของสัญญาณในแต่ละอวัยวะได้พร้อมๆกันและติดตามจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในแต่ละอวัยวะได้พร้อมกัน แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังเป็นวิธีที่ยังอยู่ในการพัฒนาแต่มีแนวโน้มว่า OMRI น่าจะตรวจวัดอนุมูลอิสระในหนูที่มีภาวะเหล็กเกินได้เช่นกันและจะมีประโยชน์มากในการศึกษาการออกฤทธิ์ของยาต้านอนุมูลอิสระและยาขับเหล็กต่อไป ข้อจำกัดของการศึกษานี้คือเครื่องมือยังไม่มีในประเทศไทยแต่ได้รับความร่วมมือจาก Prof. Hideo Utsumi, Kyushu University, Japan งานวิจัยนี้ยังมีต่อเนื่องและพัฒนาเพื่อศึกษาในหนูธาลัสซีเมียต่อไป

งานวิจัยนี้สามารถกล่าวได้ว่าประสบผลสำเร็จในการพัฒนาเทคนิค ESR spectroscopy เพื่อนำมาใช้ศึกษาเข้าใจพยาธิสรีระวิทยาที่เกี่ยวข้องกับภาวะเหล็กเกินในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดลองตอนที่ 2 ซึ่งขณะนี้ได้นำเทคนิคมาติดตามผลของยาขับเหล็กในผู้ป่วยที่ได้รับยา deferiprone ในระยะยาว และติดตามโอกาสการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ของยาอันเนื่องมาจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กและยาแบบไม่สมบูรณ์ การศึกษาทั้งหมดนี้จะขยายต่อยอดเพื่อศึกษาผลของสารต้านอนุมูลอิสระ และเพื่อทดสอบและปรับปรุงวิธีการรักษาภาวะแทรกซ้อนต่างๆอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ต่อไป

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	i
สรุป (Executive Summary)	iii
สารบัญตาราง	ix
สารบัญรูป	x
ตัวย่อที่ใช้ในงานวิจัย	xiii
เนื้อหางานวิจัย	
I บทนำ	1
II วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
III การทดลอง	
การทดลองส่วนที่ 1:	
หลักการและเหตุผล	4
วัตถุประสงค์	5
วิธีดำเนินการศึกษา	5
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	6
สรุปผลการศึกษาในส่วนที่ 1	7
การทดลองส่วนที่ 2:	
หลักการและเหตุผล	17
วัตถุประสงค์	19
วิธีดำเนินการศึกษา	19
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	21
สรุปผลการศึกษาในส่วนที่ 2	32
การทดลองส่วนที่ 3:	
หลักการและเหตุผล	33
วัตถุประสงค์	35
วิธีดำเนินการศึกษา	35
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	36
สรุปผลการศึกษาในส่วนที่ 3	43

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
IV สรุปการศึกษา (Summary)	44
V บรรณานุกรม (References)	45
ผลงานจากโครงการ (Output)	47
ภาคผนวก (Appendix)	

เอกสารที่ 1. Pharmaco/ferrokinetic-related pro-oxidant activity of deferiprone in β-thalassemia. Free Radical Research, **2009;** 43 (5):485-491.

เอกสารที่ 2. ESR spin labeling studies on the site of iron-induced free radical reaction in low density lipoprotein. Thai Journal of Pharmacology, **2009;** 31: 104-106.

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 Lag time, rate of ESR signal decay และ duration for 50% ESR signal decay ของ 5-DS และ 16-DS ที่ hemin ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อกระตุ้นปฏิกิริยาด้วย *t*-BuOOH 11

1.2 Lag time, rate of ESR signal decay และ duration for 50% ESR signal decay ของ 5-DS และ 16-DS ที่ hemin ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อกระตุ้นปฏิกิริยาด้วย H_2O_2 12

1.3 ผลของยาขับเหล็ก deferiprone (L1) ต่อ lag time, rate of ESR signal decay และ duration for 50% ESR signal decay ของ 5-DS และ 16-DS เมื่อกระตุ้นปฏิกิริยาด้วย 20 μM hemin และ 1 mM *t*-BuOOH 13

1.4 ผลของยาขับเหล็ก deferiprone (L1) ต่อ lag time, rate of ESR signal decay และ duration for 50% ESR signal decay ของ 5-DS และ 16-DS เมื่อกระตุ้นปฏิกิริยาด้วย 20 μM hemin และ 1 mM H_2O_2 16

3.1 สูตรโครงสร้างทางเคมี และ *n*-octanol/water partition coefficients (Po/w) ของ nitroxyl radicals 34

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 การจัดเรียงตัวของ doxyl stearic acid ใน phospholipid layer ของไลโพโปรตีน	8
1.2 ปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ (R) และnitroxyl spin probe	8
1.3 สัญญาณ ESR และการลดลงของสัญญาณเมื่อเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระของ 5-DS และ 16-DS ในไลโพโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ เมื่อกระตุ้นด้วย hemin และ 1mM *t*-BuOOH	9
1.4 ความสูงของสัญญาณ ESR ของ 5-DS และ 16-DS ในไลโพโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ เมื่อกระตุ้นด้วย Fe-NTA และ 1mM *t*-BuOOH หรือ H_2O_2	10
1.5 ค่า order parameter จาก 5-DS และ rotational correlation time จาก 16-DS ในไลโพโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำเมื่อกระตุ้นเมื่อกระตุ้นด้วย hemin และ 1mM *t*-BuOOH	14
1.6 ค่า order parameter จาก 5-DS และ rotational correlation time จาก 16-DS ในไลโพโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำเมื่อกระตุ้นเมื่อกระตุ้นด้วย hemin และ 1mM H_2O_2	15
2.1 ปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับ ascorbic acid (AscH-) และ DMPO	18
2.2 โครงสร้างทางเคมีของ deferiprone และสารประกอบเชิงซ้อนกับเหล็ก	18
2.3 สัญญาณ ESR ของ ascorbyl radical และ DMPO-C adduct ในซีรั่มของผู้ป่วยธาลัสซีเมียเมื่อเติม 2.5 mM ascorbic acid ในภาวะที่ไม่เติม *t*-BuOOH, เติม 1 mM *t*-BuOOH และ เติม 1 mM *t*-BuOOH และ deferiprone	22
2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของสัญญาณ ascorbyl radical ในตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วยธาลัสซีเมียในภาวะที่เติมและไม่เติม 1 mM *t*-BuOOH	23

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

2.5 เปรียบเทียบสัญญาณ ESR ในซีรั่มของคนปกติ และผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ในภาวะที่เติมด้วย 1 mM DMPO, 2.5 mM ascorbic acid และ 1 mM *t*-BuOOH 24

2.6 ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณ DMPO-C adduct และ non transferrin bound iron (NTBI) ในซีรั่มของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย 24

2.7 ความสูงของสัญญาณ ascorbyl radical และ DMPO-C adduct ในซีรั่มของผู้ป่วย ที่เวลาต่างๆหลังจาการเติม t-BuOOH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา **25**

2.8 ระดับยา deferiprone, deferiprone-chelated iron, และ อัตราส่วนระหว่างยาและเหล็ก (L1:iron) ในซีรั่มที่เวลาต่างๆหลังจากผู้ป่วยได้รับยา deferiprone 27

2.9 สัญญาณ ESR ของ ascorbyl radical และ DMPO-C adduct ในซีรั่มของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ที่เวลาก่อนได้รับยา, 45 นาที และ 360 นาทีหลังได้รับยา deferiprone 28

2.10 ความสูงของสัญญาณ ESR ของ DMPO-C adduct และ ascorbyl radical ที่เวลาต่างๆหลังผู้ป่วยได้รับยา deferiprone 29

2.11 การเปลี่ยนแปลงความสูงของสัญญาณ ESR ที่เวลา 360 นาทีหลังผู้ป่วยได้รับยา deferiprone ในกรณีที่อัตราส่วนความเข้มข้น L1:iron <3 และ อัตราส่วนความเข้มข้น L1:iron >3 30

2.12 การเปลี่ยนแปลงสัญญาณ ESR ของ DMPO-C adduct ในซีรั่มที่เวลาต่างๆ หลังจากผู้ป่วยได้รับ deferiprone ต่อเนื่อง 31

3.1 สัญญาณ ESR และการลดลงของสัญญาณ carbamoyl-PROXYL ที่ upper abdomen ของหนูหลังฉีด carbamoyl-PROXYL ทางเส้นเลือดดำที่หาง 37

3.2 ค่าคงที่คงที่อัตราการลดลงของสัญญาณ ESR ของ carbamoyl-PROXYL ในหนูภาวะเหล็กเกิน 38

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ glutathione (GSH) และ ค่าคงที่คงที่อัตราการลดลง ของสัญญาณ ESR ของ carbamoyl-PROXYL ในหนู 38

3.4 แสดง whole body image และ การลดลงของสัญญาณ ESR ของ carbamoyl-PROXYL และ carboxy-PROXYL ในหนูปกติ 40

3.5 แสดงการกระจายของ spin probe, carboxy-PROXYL ที่เวลา 1 นาที หลังจากฉีด spin probe ในหนูที่ได้รับ iron dextran แบบครั้งเดียวและได้รับซ้ำ 5 ครั้ง 41

3.6 ผลของความเข้มข้นของเหล็กต่อสัญญาณ ESR ของ carboxy-PROXYL และ carboxy-PROXYL เติม iron dextran ที่ความเข้มข้นต่างๆ 41

3.7 แสดง whole body image และ การลดลงของสัญญาณ ESR ของ carbamoyl-PROXYL ในหนูปกติ และหนูที่ได้รับ iron dextran และตรวจวัดด้วย OMRI 42

ตัวย่อที่ใช้ในงานวิจัย

t-BuOOH	*tert*-Buthyl hydroperoxide
5-DS	5-Doxyl stearic acid
16-DS	16-Doxyl stearic acid
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide
ESR	Electron Spin Resonance
Fe-NTA	Ferric nitrilotriacetate
H_2O_2	Hydrogenperoxide
LDL	Low density lipoproteins
OMRI	Overhauser Enhanced Magnetic Resonance Imaging
°C	Degree Celsius
g	Gram
hr	Hour
l	Liter
m	Milli
M	Molar
n	nano
rpm	Revolution per minute
S	Order parameter
μ	Micro
τ	Motion parameter

บทนำ

ภาวะเหล็กเกินเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดภาวะแทรกซ้อนและนำไปสู่สาเหตุการตายในผู้ป่วยธาลัสซีเมียและโรคทางพันธุกรรมอื่นๆ ธาลัสซีเมียมีสาเหตุเนื่องจากความผิดปรกติของยีนที่สังเคราะห์สายโปรตีนโกลบิน ส่งผลทำให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลายง่ายและมีอายุขัยสั้น ผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้รับธาตุเหล็กมาจากการได้รับเลือดเพื่อแก้ไขภาวะเลือดจางและร่วมกับการดูดซึมธาตุเหล็กจากทางเดินอาหารเพิ่มขึ้นเนื่องจากการสร้างเม็ดเลือดไม่เพียงพอ (ineffective erythropoiesis)

ในร่างการของมนุษย์ไม่มีกลไกที่กำจัดธาตุเหล็กส่วนเกิน ธาตุเหล็กจึงสะสมอยู่ในอวัยวะต่างๆ ได้แก่ หัวใจ ตับ ม้าม ไตและต่อมไร้ท่อเป็นต้น ธาตุเหล็กอยู่ในร่างกายหลายรูปแบบแต่ที่สำคัญคือ labile iron pool ซึ่งอยู่ในเนื้อเยื่อ และ non-transferrin-bound iron ในพลาสมา เหล็กทั้งสองรูปนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยผ่านปฏิกิริยา Fenton และ Harber-Weiss ให้ผลผลิตคืออนุมูลอิสระได้แก่ hydroxyl radical (•OH) และ superoxide anion radical (O_2•-) และเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของสารชีวโมเลกุลให้ผลผลิตอนุมูลอิสระอื่นๆตามมา สารชีวโมเลกุลเหล่านั้นจะเสียโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีรวมทั้งหน้าที่ นำมาสู่ความเสื่อมของเซลล์และความผิดปกติของการทำงานของอวัยวะในที่สุด ผู้ป่วยธาลัสซีเมียมักเสียชีวิตจาก โรคหัวใจ มะเร็งในตับ และการติดเชื้อ ซึ่งเป็นผลเกี่ยวข้องปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำด้วยเหล็กทั้งสิ้น ดังนั้นการให้ยาขับเหล็กและสารต้านอนุมูลอิสระจึงน่าจะเป็นวิธีการดูแลป้องกันภาวะแทรกซ้อนเหล่านี้ได้

แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระยังมีข้อจำกัดเนื่องจาก อนุมูลอิสระส่วนใหญ่มีค่าครึ่งชีวิตสั้น เช่น hydroxyl radical มีค่าครึ่งชีวิตในระดับ nano second หรือ superoxide anion radical มีค่าครึ่งชีวิตในระดับ micro second เป็นต้น อนุมูลอิสระเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นวิธีทั่วไปในการการติดตามปฏิกิริยาอนุมูลอิสระคือการตรวจวัดผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยาได้แก่ผลผลิตจาก lipid peroxidation, protein oxidation หรือ oxidaized DNA product เป็นต้น แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถติดตามจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาได้ ไม่สามารถจำเพาะตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาโดยเฉพาะการศึกษาในระดับ in vivo ข้อจำกัดของการศึกษาดังกล่าวนี้มีผลทำให้เกิดข้อจำกัดในการประเมินเพื่อเลือกใช้และติดตามประสิทธิภาพของยาขับเหล็กและสารต้านอนุมูลอิสระตามมา

Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy หรือ Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy เป็นเทคนิคเดียวที่สามารถตรวจวัดอะตอมหรือโมเลกุลใดๆที่มีอิเลคตรอนไร้คู่หรืออิเลคตรอนเดี่ยว (unpaired electron) อย่างน้อยหนึ่งตัวในอะตอมหรือโมเลกุลนั้นๆ โดยอิเลคตรอนจะสามารถดูดกลืนพลังงานคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงคลื่นไมโครเวฟเมื่ออิเลคตรอนนั้นอยู่ในสนามแม่เหล็ก สเปคตรัมที่ได้

จาก ESR spectroscopy นี้สามารถนำมาวิเคราะห์ในเชิงปริมาณโดยดูจากความสูงหรือความเข้มของสัญญาณ และในเชิงคุณภาพโดยดูจาก hyperfine structure หรือลักษณะของสเปคตรัม

ประโยชน์ของการใช้ ESR spectroscopy นี้คือสามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งในการทดลองแบบ in vitro และ in vivo สามารถตรวจวัดการเกิดอนุมูลอิสระแบบ real time ติดตามจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาได้ และสามารถจำเพาะตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาได้ในระดับโมเลกุล เนื่องจากอนุมูลอิสระที่สำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพนั้นมักมีค่าครึ่งชีวิตที่สั้นมากการวัดอนุมูลอิสระโดยตรงอาจจะไม่มีความไวพอ ดังนั้นการใช้ ESR spectroscopy จึงต้องเกี่ยวข้องกับวิธีการ spin trapping หรือ spin labeling โดยอาศัยสาร spin probe ชนิดต่างๆ

ในกรณีของ spin trapping นั้นจะใช้สารในกลุ่ม nitrone หรือ nitrosoalkane ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีอิเลคตรอนเดี่ยว ตัวมันจึงไม่ให้สัญญาณ ESR แต่เมื่อไรที่จับกับสารอนุมูลอิสระแล้วจะให้ผลิตผล (spin adduct) เป็นสารกลุ่ม nitroxide radical ซึ่งให้สัญญาณ ESR สัญญาณนี้มีลักษณะจำเพาะต่ออนุมูลอิสระแต่ละตัว ในกรณีของ spin labeling จะใช้สาร nitroxyl probe ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระที่มีค่าครึ่งยาวโดยตัวมันเองให้สัญญาณ ESR อยู่แล้ว แต่ลักษณะของสัญญาณจะเปลี่ยนแปลงไปตามสิ่งแวดล้อมที่อยู่ ดังนั้นโดนทั่วไป spin labeling จะใช้ในการศึกษาการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันในเมมเบรน ความเป็นกรด-เบสในเซลล์ ปริมาณออกซิเจนในเซลล์ หรือระยะห่างระหว่างกลุ่มอะมิโนในโปรตีนเป็นต้น และเนื่องจาก nitroxyl probe เองก็สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้เช่นกัน การใช้ nitroxyl probe อาจนำมาประยุกต์เพื่อศึกษาอัตราการเกิดอนุมูลอิสระได้ทั้งใน in vitro และ in vivo ด้วยเช่นกัน

ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคต่างๆด้วย ESR spectroscopy จึงมีความจำเป็นต่อการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในภาวะโรคต่างๆ ความเข้าใจกลไก ตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยา และจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาจะนำมาสู่การพัฒนาวิธีการป้องกันและรักษา การเลือกใช้สารต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ในการศึกษานี้จะเลือกใช้ทั้ง spin trapping และ spin labeling มาเพื่อศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในซีรั่มและไลโพโปรตีนของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียรวมทั้งศึกษาผลของยาขับเหล็ก นอกจากนี้ยังการนำเทคนิค in vivo ESR spectroscopy และ Overhauser Enhanced MRI technique มาศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในหนูที่มีภาวะเหล็กเกินเพื่อเป็นพื้นฐานต่อการศึกษาในระดับสิ่งมีชีวิตต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. พัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิค ESR spin labeling เพื่อศึกษาตำแหน่งของการเกิดอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็ก ตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยาขับเหล็กและสารต้านอนุมูลอิสระในระดับโมเลกุลโดยใช้ไลโพโปรตีนเป็นแบบจำลอง

2. พัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิค ESR spin trapping เพื่อศึกษาความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในซีรั่มของผู้ป่วยและผลของยาขับเหล็กต่อการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ

3. พัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิค in vivo ESR และ nitroxyl spin probes เพื่อศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในอวัยวะต่างๆของหนูที่มีภาวะเหล็กเกิน และสร้างแบบจำลอง สำหรับศึกษาผลของยาขับเหล็กและสารต้านอนุมูลอิสระในสัตว์ทดลอง (in vivo model)