บทคัดย่อ

T164716

ชื่อโครงการ: การใช้เทคนิค Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy ในการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็ก ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเคลื่อนไหวของไขมันองค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจของไลโพโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง ในภาวะความผิดปรกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮีโมโกบินอี

หัวหน้าโครงการวิจัย: นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส, Ph.D.

Key words: ESR, hemin, lipid mobility, oxidized lipoprotein, spin labeling, thalassemia

บทคัดย่อ:

ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็กนั้น น่าจะเป็นกระบวนการสำคัญในกระบวนการออกซิเดชั่นของไลโพโปรตีนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮีโมโกบินอี และนำมาสู่ความผิดปรกติของหลอดเลือดในผู้ป่วย งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิค spin labeling และตรวจวัดโดย Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy เพื่อตรวจสอบตำแหน่งและการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโพโปรตีน โดยใช้สาร 5-doxyl stearic acid (5-DS) และ 16-doxyl stearic acid (16-DS) ซึ่งเข้าอยู่ในชั้น phospholipids surface ของไลโพโปรตีน ที่ hydrocarbon ตำแหน่งที่ 5 และ 16 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาอนุมูลอิสระนั้นเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในส่วน hydrophobic ของไลโพโปรตีนชนิด LDL และ HDL เมื่อใช้ hemin (iron (III)-protoporphyrin IX) ซึ่งเป็นสารประกอบเหล็กที่พบเป็นปริมาณสูงในซีรั่มของผู้ป่วยเป็นตัวเหนี่ยวนำปฏิกิริยา ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระนี้สามารถยับยั้งได้โดยใช้วิตามินอี (α-tocopherol) ในขณะที่เหล็กในรูป non-transferrin bound iron (NTBI) โดยใช้ ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) ไม่สามารถเหนี่ยวนำปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโพโปรตีนได้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการตรวจพบผลผลิต oxidized lipids และ lipid hydroperoxides ในไลโพโปรตีนที่แยกจากพลาสมาที่เติมด้วย hemin แต่ไม่พบในไลโพโปรตีนที่แยกจากพลาสมาที่เติมด้วย Fe-NTA

ผลการศึกษาจากเทคนิค ESR นี้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงไลโพโปรตีนของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮีโมโกบินอี กล่าวคือมีเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบไขมันและการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันในบริเวณแกนของไลโพโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับภาวะ oxidative stress และระดับความรุนแรงของโรค การลดลงของ cholesteryl esters ที่มีกรดไขมันพันธะคู่เป็นองค์ประกอบได้แก่ cholesteryl arachidonate (CA) และ cholesteryl linoleate (CL) แสดงให้เห็นว่ามีปฏิกิริยาอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในบริเวณแกนของไลโพโปรตีน การศึกษาการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุล

ของไขมันโดยใช้เทคนิค ESR spectroscopy และ fluorescence polarization สนับสนุนว่าการเปลี่ยนแปลงนั้นเกิดขึ้นที่บริเวณแกนมากกว่าที่ผิวของไลโพโปรตีน

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน รวมทั้งภาวะ oxidative stress อาจส่งผลต่อการทำงานของแอนติออกซิเดนซ์เอนซัมย์ในไลโพโปรตีน พบว่าในผู้ป่วยธาลัสซีเมียการทำงานของเอนซัมย์ PAF-AH สูงขึ้นประมาณ 2-4 เท่าใน LDL และ HDL ในขณะที่การทำงานของเอนซัมย์ PON ใน HDL ของผู้ป่วยลดลงประมาณ 2 เท่า การทำงานของเอนซัมย์ PON นั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อมีปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เหนี่ยวนำโดย hemin

ผลงานวิจัยเสนอให้เห็นว่า ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโพโปรตีนนั้นน่าจะเกิดในส่วนแกนหรือส่วน hydrophobic ได้เร็วกว่าที่ผิวของไลโพโปรตีน สารประกอบเหล็กในรูป hemin น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงต่างๆของไลโพโปรตีนในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และเป็นเหตุนำมาสู่ความผิดปรกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยในที่สุด ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค ESR นอกจากจะสามารถนำมาใช้อธิบายปรากฏการณ์ต่างๆที่เกิดขึ้นในภาวะโรคแล้ว ยังอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของยา หรือสารแอนติออกซิเดนซ์อื่นๆที่นำมาใช้ป้องกันภาวะความผิดปรกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยกลุ่มนี้

ABSTRACT

TE164716

Title: ESR Studies of Iron Induced Free Radical Reaction on Alteration of Lipid Mobility, Chemical Compositions and Antiatherogenic Properties of High Density Lipoprotein (HDL) in Vascular Complication of β-Thalassemia/Hemoglobin E

Principle investigator: Noppawan Phumala Morales, Ph.D.

Key words: ESR, hemin, lipid mobility, oxidized lipoprotein, spin labeling, thalassemia

Abstract:

Iron-induced free radical reaction is believed to play a crucial role in lipoprotein oxidation, consequently vascular complications in β-thalassemia/hemoglobin E patients. In attempt to understand the process and site of free radical reaction in lipoproteins, ESR spin labeling technique was developed. Paramagnetic fatty acids, 5- and 16-doxyl stearic acid (5-and 16-DS), were used to label phospholipids layer near polar head group and the deeper hydroprobic region of lipoproteins, respectively. The results demonstrated that hemin (iron (III)-protoporphyrin IX), a degradative produce of hemoglobin that was found with high concentration in serum of the patients, strongly induced free radical reaction at hydrophobic region of the lipoproteins (LDL and HDL). This reaction was inhibited by addition of α-tocopherol. On the other hand ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA), a representative of non transferrin bound iron (NTBI) did not showed the catalytic effect in the lipoproteins. This information from ESR technique agreed with detection of oxidized lipids and lipid hydroperoxides in the lipoproteins separated from hemin-containing plasma, but not from Fe-NTA-containing plasma.

Furthermore, the study of lipoproteins in β-thalassemia/hemoglobin E patients supported the finding from the ESR technique. In the patients, lipid compositions and lipid mobility were significantly changed at the core of the lipoproteins. Those parameters have good correlations with oxidative stress parameters and clinical severity. Decreasing of cholesteryl arachidonate (CA) and cholesteryl linoleate (CL) indicated the free radical production at the core of lipoproteins. ESR technique and fluorescence polarization clearly demonstrated that alteration of lipid mobility was occurred at the core of lipoproteins.

In addition to oxidative stress, the alteration of chemical composition and lipid mobility of lipoproteins may cause the alteration to antioxidant activity in the lipoproteins of the patients. Our results showed that PAF-AH activity was increased 2-4 fold in LDL and HDL of the patients, while PON activity in HDL was decreased about 2 fold. PON activity was sensitive to oxidative stress and it was decreased rapidly by hemin-induced lipoprotein oxidation.

In conclusion, this study demonstrated that free radical reaction was preferentially occurred at the core or the hydrophobic region of the lipoproteins (LDL and HDL). Hemin may play an important role in lipoprotein oxidation in β-thalassemia/hemoglobin E patients, finally leading to vascular complications in the patients. The information obtained from this novel ESR technique, not only explained the pathology of the disease, but also it may apply to evaluate the effect of antioxidants or drugs used to prevent the vascular complication in the patients.