



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้เทคนิค Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy

ในการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็ก

ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเคลื่อนไหวของไขมัน องค์ประกอบทางเคมี และ

คุณสมบัติในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูงใน

ภาวะความผิดปกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮีโมโกลบิน อี

โดย

นพวรรณ ภู่มาศา มอราเลส, Ph.D. และคณะ

30 มิถุนายน พ.ศ. 2548



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้เทคนิค Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy

ในการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็ก

ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเคลื่อนไหวน้ำมัน องค์ประกอบทางเคมี และ
คุณสมบัติในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูงใน
ภาวะความผิดปกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮีโมโกลบิน อี

โดย

นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส, Ph.D. และคณะ

30 มิถุนายน พ.ศ. 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้เทคนิค Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy

ในการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็ก

ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเคลื่อนไหวของไขมัน องค์ประกอบทางเคมี และ
คุณสมบัติในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูงใน
ภาวะความผิดปกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮิโมโกบิน อี

คณะผู้วิจัย

- | | |
|-------------------------------|---|
| 1. ดร. นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส | ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. นางสาวเฉลิมขวัญ เฉลิมช่วง | ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 3. นางสาว ดวงพร ห่วงโรจนวงศ์ | ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 4. ดร. อุมดม จันทารักษ์ศรี | ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |

สนับสนุนโดยสำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ: การใช้เทคนิค Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy ในการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็ก ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเคลื่อนไหวของไขมันองค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง ในภาวะความผิดปกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮิโมโกบินอี

หัวหน้าโครงการวิจัย: นพวรรณ ภูมาลา มอราเลส, Ph.D.

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

บทคัดย่อ:

ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็กนั้น น่าจะเป็นกระบวนการสำคัญในกระบวนการออกซิเดชันของไลโปโปรตีนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮิโมโกบินอี และนำมาสู่ความผิดปกติของหลอดเลือดในผู้ป่วย งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิค spin labeling และตรวจวัดโดย Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy เพื่อตรวจสอบตำแหน่งและการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีน โดยใช้สาร 5-doxyl stearic acid (5-DS) และ 16-doxyl stearic acid (16-DS) ซึ่งเข้าอยู่ในชั้น phospholipids surface ของไลโปโปรตีน ที่ hydrocarbon ตำแหน่งที่ 5 และ 16 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาอนุมูลอิสระนั้นเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในส่วน hydrophobic ของไลโปโปรตีนชนิด LDL และ HDL เมื่อใช้ hemin (iron (III)-protoporphyrin IX) ซึ่งเป็นสารประกอบเหล็กที่พบเป็นปริมาณสูงในซีรัมของผู้ป่วยเป็นตัวเหนี่ยวนำปฏิกิริยา ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระนี้สามารถยับยั้งได้โดยใช้วิตามินอี (α -tocopherol) ในขณะที่เหล็กในรูป non-transferrin bound iron (NTBI) โดยใช้ ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) ไม่สามารถเหนี่ยวนำปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีนได้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการตรวจพบผลผลิต oxidized lipids และ lipid hydroperoxides ในไลโปโปรตีนที่แยกจากพลาสมาที่เติมด้วย hemin แต่ไม่พบในไลโปโปรตีนที่แยกจากพลาสมาที่เติมด้วย Fe-NTA

ผลการศึกษาจากเทคนิค ESR นี้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงไลโปโปรตีนของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮิโมโกบินอี กล่าวคือมีเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบไขมันและการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันในบริเวณแกนของไลโปโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับภาวะ oxidative stress และระดับความรุนแรงของโรค การลดลงของ cholesteryl esters ที่มีกรดไขมันพันธะคู่เป็นองค์ประกอบได้แก่ cholesteryl arachidonate (CA) และ cholesteryl linoleate (CL) แสดงให้เห็นว่ามีปฏิกิริยาอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในบริเวณแกนของไลโปโปรตีน การศึกษาการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุล

ของไขมันโดยใช้เทคนิค ESR spectroscopy และ fluorescence polarization สนับสนุนว่าการเปลี่ยนแปลงนั้นเกิดขึ้นที่บริเวณแกนมากกว่าที่ผิวของไลโปโปรตีน

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบกรดไขมันในระดับโมเลกุลของไขมัน รวมทั้งภาวะ oxidative stress อาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของแอนติออกซิเดนท์เอนไซม์ในไลโปโปรตีน พบว่าในผู้ป่วยธาลัสซีเมียการทำงานของเอนไซม์ PAF-AH สูงขึ้นประมาณ 2-4 เท่าใน LDL และ HDL ในขณะที่การทำงานของเอนไซม์ PON ใน HDL ของผู้ป่วยลดลงประมาณ 2 เท่า การทำงานของเอนไซม์ PON นั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อมีปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เหนี่ยวนำโดย hemin

ผลงานวิจัยเสนอให้เห็นว่า ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีนนั้นน่าจะเกิดในส่วนแกนหรือส่วน hydrophobic ได้เร็วกว่าที่ผิวของไลโปโปรตีน สารประกอบเหล็กในรูป hemin น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงต่างๆของไลโปโปรตีนในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และเป็นเหตุนำมาสู่ความผิดปกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยในที่สุด ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค ESR นอกจากจะสามารถนำมาใช้อธิบายปรากฏการณ์ต่างๆที่เกิดขึ้นในภาวะโรคแล้ว ยังอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของยา หรือสารแอนติออกซิเดนท์อื่นๆที่นำมาใช้ป้องกันภาวะความผิดปกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยกลุ่มนี้

ABSTRACT

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 hydrophobic region of lipoproteins, respectively. The results demonstrated that hemin (iron (III)-protoporphyrin IX), a degradative product 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 show 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.

EXECUTIVE SUMMARY

ภาวะความผิดปกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเดต้า/ฮีโมโกลบินอี มีสมมติฐานว่า น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของไลโปโปรตีนในผู้ป่วย อันเป็นผลเนื่องจากภาวะเหล็กเกิน กระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนจากปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารประกอบเหล็ก รวมทั้งศึกษาผลจากปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อการเปลี่ยนแปลงทางองค์ประกอบของไขมัน คุณสมบัติการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน และการทำงานของไลโปโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein, HDL)

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็นสามส่วนได้แก่

1. การพัฒนาวิธีการ spin labeling และตรวจวัดโดย Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy เพื่อศึกษากลไก และตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ในไลโปโปรตีน
2. การศึกษาคุณสมบัติของไลโปโปรตีนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเดต้า/ฮีโมโกลบินอี ได้แก่ องค์ประกอบของไขมัน คุณสมบัติการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน และการทำงานของแอนติออกซิเจนซ์เอนไซม์
3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของไลโปโปรตีนเมื่อกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในหลอดทดลอง

สำหรับการทดลองที่ 1 ตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีน สามารถศึกษาได้โดยการตรวจวัดสัญญาณ ESR ของ stable nitroxyl radical ที่ติดไว้ที่ตำแหน่งต่างๆ ในไลโปโปรตีน การทดลองนี้ใช้สาร 5-doxyl stearic acid (5-DS) และ 16-doxyl stearic acid (16-DS) ซึ่งเข้าอยู่ในชั้น phospholipids surface ของไลโปโปรตีน ที่ hydrocarbon ตำแหน่งที่ 5 และ 16 ตามลำดับ เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในบริเวณใกล้เคียงและทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของ nitroxyl radical สัญญาณ ESR จะลดลง ดังนั้นการวัดความสูงของสัญญาณตามเวลาที่ผ่านไปสามารถคำนวณอัตราความเร็วของปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การลดลงของสัญญาณ ESR เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาอนุมูลอิสระจริง และอัตราการลดลงของสัญญาณ ESR ขึ้นกับ ชนิด ความเข้มข้นของสารประกอบเหล็ก และ hydroperoxide พบว่าปฏิกิริยาอนุมูลอิสระนั้นเกิดขึ้นในส่วนที่เป็น hydrophobic ได้แก่ ในชั้น phospholipids surface ของไลโปโปรตีน ที่ hydrocarbon ตำแหน่งที่ 16 มากกว่าที่ผิวไลโปโปรตีน ทั้งนี้ hemin (iron (III) protoporphyrin IX) สามารถเหนี่ยวนำปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ดีกว่า non transferrin bound iron (NTBI) ซึ่งในที่นี้ใช้ ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) เป็นตัวแทน

การศึกษาการคุณสมบัติของไลโปโปรตีนในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ/ฮิโมโกลบินลิ พบว่า การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต่างๆของไลโปโปรตีนนั้น มีความสัมพันธ์กับภาวะความรุนแรงของโรค ผู้ป่วยยังมีภาวะ hypolipidemia โดยปริมาณคลอเลสเตอรอล (TC) และไตรกลีเซอไรด์ (TG) ในพลาสมาลดลง ปริมาณคลอเลสเตอรอลอิสระ (FC) หรือคลอเลสเตอรอลที่อยู่บริเวณผิวของไลโปโปรตีน และคลอเลสเตอรอลในรูปเอสเทอร์กับกรดไขมัน (cholesteryl esters) หรือคลอเลสเตอรอลที่อยู่บริเวณแกนของไลโปโปรตีนนั้นมีปริมาณลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอสเทอร์ของกรดไขมันที่มีพันธะคู่เป็นองค์ประกอบได้แก่ cholesteryl arachidonate (CA) และ cholesteryl linoleate (CL) ใน LDL ปริมาณ CA และ CL จะลดลง ประมาณ 42% และ 57% ตามลำดับในผู้ป่วยที่มีระดับความรุนแรงของโรคปานกลางและสูง เช่นเดียวกันใน HDL ปริมาณของ CA และ CL ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคในระดับรุนแรง

เมื่อวิเคราะห์การเคลื่อนไหวของไขมันในระดับโมเลกุลโดยวิธี spin labeling โดยวิธี Electron Spin Resonance Spectroscopy (ESR) และเทคนิค fluorescence polarization พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันในส่วนแกนอย่างมีนัยสำคัญมากกว่าที่ผิวไลโปโปรตีน การทำงานของแอนติออกซิเดนท์เอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์ PAF-AH ซึ่งอยู่ใน LDL และ HDL เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วย ส่วนเอนไซม์ PON ซึ่งพบใน HDL เท่านั้นมีการทำงานลดลง จากข้อมูลพบว่าการเปลี่ยนแปลงต่างๆในไลโปโปรตีนของผู้ป่วยนั้นเกิดขึ้นที่แกนของไลโปโปรตีน และพบว่าภาวะเหล็กเกิน ภาวะ oxidative stress และระดับความรุนแรงของโรคมีความสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางเคมี-กายภาพ-ชีวภาพ ยังมีความสัมพันธ์กันอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน HDL

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของไลโปโปรตีนเมื่อกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในหลอดทดลอง นั้นสนับสนุนว่าเหล็กในรูป hemin สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆในไลโปโปรตีนทั้งใน LDL และ HDL ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า Fe-NTA กล่าวคือ hemin สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในส่วนแกนซึ่งได้แก่ CL และพบการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันในส่วนแกนด้วย ในขณะที่ Fe-NTA กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันในส่วนผิวของ LDL เท่านั้น โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานเอนไซม์ PAF-AH และ PON ลดลงเมื่อมีปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดย hemin โดยเอนไซม์ PON ใน HDL จะมีความไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าเอนไซม์ PAF-AH

ผลการทดลองจากงานวิจัยทั้งสามส่วนสนับสนุนว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชันในไลโปโปรตีนนั้น น่าจะเกิดในส่วนแกนหรือส่วน hydrophobic ได้เร็วกว่าที่ผิวของไลโปโปรตีน ปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้น่าจะผ่านปฏิกิริยานุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง hemein ซึ่งเป็น degradative product ของ ฮีโมโกลบินและสามารถตรวจพบได้ในปริมาณสูงในซีรัมของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮีโมโกลบินอี (12) ปฏิกิริยาออกซิเดชันนำมาซึ่งการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและที่สำคัญการทำงานทางชีวภาพของไลโปโปรตีนในที่สุด ที่สำคัญได้แก่ แอนติออกซิเดนท์เอนไซม์ PON ใน HDL ที่มีความไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันนั้น เมื่อมีการทำงานลดลง คุณสมบัติการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจในผู้ป่วยธาลัสซีเมียก็จะผิดปกติ

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิค spin labeling โดยใช้ ESR spectroscopy และสามารถนำมาใช้ศึกษาปฏิกิริยานุมูลอิสระในโมเลกุลที่ซับซ้อนเช่นไลโปโปรตีน เพื่ออธิบายกลไกของการเปลี่ยนแปลงต่างๆในไลโปโปรตีนอันเนื่องมาจากปฏิกิริยานุมูลอิสระ ข้อมูลเกี่ยวกับตำแหน่งการเกิดอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีน ชนิดของสารประกอบเหล็กในการกระตุ้นปฏิกิริยานุมูลอิสระ ในอนาคตสามารถปรับปรุงการใช้ spin probe ชนิดอื่นๆให้เหมาะสมเพื่อการศึกษาปฏิกิริยานุมูลอิสระในแง่มุมอื่นๆ และเทคนิคนี้สามารถประยุกต์ใช้เป็นวิธีในการประเมินประสิทธิภาพของสารแอนติออกซิเดนท์ และยาขับเหล็ก หรือยาอื่นๆ ที่จะใช้ป้องกันความผิดปกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้ต่อไป

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	i
สรุป (Executive Summary)	v
สารบัญตาราง	ix
สารบัญรูป	x
ตัวย่อที่ใช้ในงานวิจัย	xi
เนื้อหางานวิจัย	
I บทนำ (Introduction)	1
II การทดลองที่ 1: การพัฒนาการใช้เทคนิค spin labeling โดยการตรวจวัดด้วย ESR spectroscopy เพื่อตรวจสอบตำแหน่งการเกิดอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีน	
1.1 วิธีดำเนินการทดลอง (Methods and procedure)	4
1.2 ผลการทดลอง (Results)	6
III การทดลองที่ 2: การศึกษาคุณสมบัติของไลโปโปรตีนในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย	
2.1 วิธีดำเนินการทดลอง (Methods and procedure)	11
2.2 ผลการทดลอง (Results)	14
IV การทดลองที่ 3: การศึกษาคุณสมบัติของไลโปโปรตีนในหลอดทดลอง	
3.1 วิธีดำเนินการทดลอง (Methods and procedure)	24
3.2 ผลการทดลอง (Results)	25
V วิเคราะห์ผลการทดลอง (Discussion)	34
VI บรรณานุกรม (References)	37
ผลงานจากโครงการ (Output)	41
ภาคผนวก (Appendix)	42

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 อัตราการลดลงของสัญญาณ ESR ในไลโปโปรตีน (LDL และ HDL) โดยใช้ hemin และ Fe-NTA	8
1.2 ผลของ α -tocopherol ต่ออัตราการลดลงของสัญญาณ ESR ในไลโปโปรตีน (LDL และ HDL) โดยใช้ hemin	10
2.1 ระดับ oxidative stress และระดับไขมันในพลาสมาของคนปกติและ ผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ	16
2.2 ค่าองค์ประกอบทางเคมีของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL) ของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ	16
2.3 ค่าองค์ประกอบทางเคมีของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง (HDL) ของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ	17
2.4 ค่าการเคลื่อนไหวของไขมันในระดับโมเลกุลของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL) ของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ	18
2.5 ค่าการเคลื่อนไหวของไขมันในระดับโมเลกุลของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง (HDL) ของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ	18
2.6 ค่าการทำงานของแอนติออกซิเดนซ์เอนไซม์ PAF และ PON ของคนปกติ และผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ	19
2.7 ความสัมพันธ์ของระดับเหล็ก วิตามินอี ในพลาสมา และระดับฮีโมโกลบินต่อ องค์ประกอบทางเคมี การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันและการทำงานของ เอนไซม์ใน HDL	19
2.8 ความสัมพันธ์ขององค์ประกอบทางเคมี การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน และการทำงานของเอนไซม์ใน LDL	23
3.1 แสดงระดับวิตามินอี และการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของ ไขมันในไลโปโปรตีนจากพลาสมาที่เติมด้วย hemin หรือ Fe-NTA	26

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 สัญญาณ ESR ของ 5-doxyl stearic acid (5-DS) และ 16-doxyl stearic acid (16-DS) ในไลโปโปรตีน	5
1.2 แสดงการลดลงของสัญญาณ ESR ตามความเข้มข้นต่างๆของ hemin	7
1.3 อัตราการลดลงของสัญญาณ ESR ของ 5-DS และ 16-DS ใน LDL และ HDL ที่ความเข้มข้นต่างๆของ hemin	9
2.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีและการทำงานของเอนไซม์ใน HDL	20
2.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติการเคลื่อนไหวระดับโมเลกุลในไขมันใน HDL	21
2.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีและการทำงานของเอนไซม์ใน HDL	22
3.1 โครมาโตแกรม HPLC ของ Standard linoleate hydroperoxide และ oxidized lipids	27
3.2 โครมาโตแกรม HPLC ของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำและความหนาแน่นสูงที่แยกจากพลาสมาควบคุม และพลาสมาที่เติมด้วย hemin ความเข้มข้น 150 μM	28
3.3 โครมาโตแกรม HPLC ของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำและความหนาแน่นสูงที่แยกจากพลาสมาคนปกติ และพลาสมาผู้ป่วยธาลัสซีเมีย	29
3.4 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ PAF-AH ใน LDL และ HDL และการทำงานของ PON ใน HDL หลังจากกระตุ้นปฏิกิริยา oxidative stress โดย hemin	31
3.5 การเปลี่ยนแปลงระดับวิตามินอี และ TBARs ใน LDL และ HDL หลังจากกระตุ้นปฏิกิริยา oxidative stress โดย hemin	32
3.6 การเปลี่ยนแปลงระดับ CA และ CL ใน LDL และ HDL หลังจากกระตุ้นปฏิกิริยา oxidative stress โดย hemin	33

ตัวย่อที่ใช้ในงานวิจัย

5-DS	5-Doxyl stearic acid
16-DS	16-Doxyl stearic acid
DPH	Diphenlyhexatriene
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESR	Electro spin resonance
CA	Cholesteryl arachidonate
CL	Cholesteryl linoleate
CO	Cholesteryl oleate
CP	Cholesteryl palmitate
Fe-NTA	Ferric nitrilotriacetate
HDL	High density lipoprotein
HPLC	High performance liquid chromatography
LDL	Low density lipoprotein
PAF-AH	Platelet-activating facto acetylhydrolase
PON	Paraoxonase
TBARS	Triobarbituric acid reactive substances
TMA-DPH	Trimethylamino-diphenlyhexatriene
°C	Degree Celsius
g	Gram
hr	Hour
l	Litre
m	Milli
M	Molar
nM	Nanomolar
rpm	Revolution per minute
<i>r</i>	Anisotropy
S	Order parameter
μ	Micro
τ	Motion parameter

I. บทนำ

ภาวะความผิดปกติของหลอดเลือด พบได้บ่อยในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮีโมโกลบิน อี กล่าวคือประมาณ 44% ของผู้ป่วยที่ตัดม้ามมีภาวะหลอดเลือดอุดตันที่ pulmonary artery และนอกจากนี้ ยังพบ cerebral thrombosis และ leg ulcer ได้อีกด้วย (1-4) กลไกความผิดปกติของหลอดเลือดดังกล่าว อาจเกิดขึ้นจากความผิดปกติในการทำงานของเซลล์ต่างๆ ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้แก่ เซลล์เอนโดทีเลียมของหลอดเลือด (vascular endothelial cell) (5) และ เกร็ดเลือด (platelet) (6,7)

ความผิดปกติในการทำงานของเซลล์ต่างๆในระบบหลอดเลือดนั้น มีหลักฐานชี้ชัดว่า เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงไลโปโปรตีนโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidatively modified lipoproteins) (8) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีภาวะเหล็กเกิน ซึ่งส่งเสริมให้เกิดภาวะ oxidative stress และมีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ข้อมูลเบื้องต้นชี้ว่ามีความผิดปกติของไลโปโปรตีนในพลาสมาของผู้ป่วย กล่าวคือมีระดับ α -tocopherol ลดลง แต่มีระดับ lipid peroxidation เพิ่มขึ้น และการเกิด oxidized LDL ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีความสัมพันธ์ต่อความเสี่ยงต่อความผิดปกติของหลอดเลือด atherogenesis (9,10) งานก่อนหน้าของกลุ่มผู้วิจัยในการศึกษาองค์ประกอบของไลโปโปรตีนในผู้ป่วย พบว่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีได้แก่การเปลี่ยนแปลงระดับคลอเรสเตอรอล เอสเตอร์ ในไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein; LDL) และ ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein; HDL) การเปลี่ยนแปลงนี้มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค (11)

กลุ่มผู้วิจัยพบว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮีโมโกลบินอี มีสารประกอบเหล็กในรูป heme (iron (III)-protoporphyrin IX) อยู่ในซีรัมในปริมาณสูง (50-300 μ M) (12) ซึ่ง heme เป็นสารประกอบเหล็กที่มีความรุนแรงสูงในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีน ในหลอดทดลอง (13,14) การศึกษาต่อมาของผู้วิจัยยังพบว่า heme สามารถจับกับไลโปโปรตีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน HDL และกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต่างๆอย่างมีนัยสำคัญ (15) และเช่นเดียวกันยังสามารถตรวจพบ heme ใน HDL ที่แยกจากผู้ป่วยธาลัสซีเมียอีกด้วย ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า heme น่าจะเป็นสาเหตุสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในไลโปโปรตีนของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮีโมโกลบินอี และส่งผลให้เกิดความผิดปกติของ หลอดเลือดดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามในเลือดของผู้ป่วยยังมีเหล็กที่อยู่ในรูปอื่นๆอีกด้วย ที่สำคัญคือ non transferrin bound iron (NTBI) ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นเหล็กที่สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีหลักฐานว่าเหล็กในรูปใดมีบทบาท หลักในการเปลี่ยนแปลงไลโปโปรตีนในผู้ป่วย

เนื่องจากไลโปโปรตีนประกอบด้วยโมเลกุลไขมัน และโปรตีนที่รวมตัวกันอย่างซับซ้อน กล่าวคือในส่วนแกน (core) ประกอบด้วยไขมันที่ไม่ชอบน้ำได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และ คอลอเรสเตอรอลในรูปเอสเตอร์ (cholesteryl esters) และส่วนผิว (surface) เป็นไขมันที่ชอบน้ำ ประกอบด้วย ฟอสโฟลิปิด (phosphor lipids) และคอลอเรสเตอรอลอิสระ (free cholesterol) และยังมี โปรตีนคือ อโปโปรตีน (apoproteins) ต่างๆเป็นองค์ประกอบอีกด้วย ดังนั้นปฏิกิริยาออกซิเดชันอาจ เกิดได้หลายตำแหน่งไม่ว่าในส่วนแกน ผิว ส่วนที่เป็นไขมันหรือโปรตีน ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยตัวกระตุ้นชนิดต่างกัน และมีความแรงที่ต่างกันนั้น จะอยู่ที่โมเลกุลเป้าหมาย (target molecules) ที่ต่างกัน และส่งผลให้เกิดความหลากหลายในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพ และเคมีที่ต่างกัน และอาจส่งผลต่อการทำงานและการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาที่ต่างกันที่สุดในที่สุด

ดังที่กล่าวข้างต้นเนื่องจากไลโปโปรตีนนั้นประกอบด้วยโมเลกุลไขมันและโปรตีนที่รวมตัวกันอย่างซับซ้อน ดังนั้นการศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระในแต่ละส่วนนั้นจึงมีข้อจำกัดอย่างยิ่ง ในงานวิจัยนี้จึงพยายามพัฒนาวิธีที่จะตรวจสอบตำแหน่งของการเกิดอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีน โดยใช้เทคนิค spin labeling และตรวจสอบโดย Electron Spin Resonance (ESR) spectroscopy โดยมีหลักการคือเมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับสาร spin probe ซึ่งเป็น stable nitroxyl radical สัญญาณ ESR นั้นจะลดลง โดยอัตราการลดลงของสัญญาณ ESR จะสัมพันธ์กับอัตราการเกิดขึ้นของอนุมูลอิสระ ด้วยหลักการนี้ได้มีรายงานว่าใช้สำหรับประเมินการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ทั้งในสิ่งมีชีวิต (in vivo) และในหลอดทดลอง (in vitro) (16-18) สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้สาร spin probe สองตัวได้แก่ 5-doxyl stearic acid (5-DS) และ 16-doxyl stearic acid (16-DS) ซึ่งเข้าไปอยู่ในส่วนฟอสโฟลิปิดที่ตำแหน่ง hydrocarbon ที่ 5 และ 16 ตามลำดับ งานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่นำสารทั้งสองนี้มาศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่นอกเหนือไปจากการใช้ในการศึกษาการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน (19-21)

นอกเหนือจากการพัฒนาเทคนิคในการศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยใช้ ESR spectroscopy แล้ว งานวิจัยนี้ยังมีวัตถุประสงค์ที่ศึกษาคุณสมบัติของไลโปโปรตีนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียอีกด้วย ได้แก่องค์ประกอบทางเคมี การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน และการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดเนส เอนซิมส์ ประกอบกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเหล่านี้ในหลอดทดลองโดยกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระโดยสารประกอบหลักต่างชนิดกัน การศึกษาทั้งหมดนี้ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาอธิบายกลไกและผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงของไลโปโปรตีนในภาวะ oxidative stress เมื่อมีภาวะเหล็กเกินดังเช่นในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. พัฒนาวิธีการ spin labeling และตรวจวัดโดยวิธี Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy เพื่อศึกษาดำเนินการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ที่เหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็กในไลโปโปรตีน

2. ศึกษาปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็ก ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน โดยวิธี Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy ในไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ และความหนาแน่นสูงในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเปรียบเทียบกับในหลอดทดลอง

การทดลองที่ 1

การพัฒนาการใช้เทคนิค Spin Labeling โดยการตรวจวัดด้วย Electron Spin Resonance Spectroscopy เพื่อใช้ตรวจสอบตำแหน่งการเกิดอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีน

1.1 วิธีดำเนินการทดลอง

1.1.1 การแยกไลโปโปรตีน

ตัวอย่างเลือดได้จากอาสาสมัครปกติ (มีระดับไขมันปกติ) ที่อดอาหารเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง และนำมาปั่นแยกพลาสมา (heparinized plasma) ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยใช้ความเร็ว 3500 rpm เป็นเวลา 10 นาที

ไลโปโปรตีนชนิด low density lipoprotein (LDL) และ high density lipoprotein (HDL) จากพลาสมา แยกได้โดยวิธี sequential ultracentrifugation ที่ความหนาแน่นของสารละลายเกลือ 1.019-1.063 g/ml สำหรับ LDL และ 1.063-1.024 g/ml สำหรับ HDL โดยใช้เครื่อง Beckman 80 Ti rotor ที่ 50,000 rpm 4°C ไลโปโปรตีนที่แยกได้นำไป dialysis และหาปริมาณโปรตีนก่อนทำการทดลอง

1.1.2 การศึกษาตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีน โดยใช้เทคนิค spin labeling โดยวิธี Electron Spin Resonance Spectroscopy (ESR)

ตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีน สามารถศึกษาได้โดยการตรวจวัดสัญญาณ ESR ของ stable nitroxyl radical ที่ติดไว้ที่ตำแหน่งต่างๆในไลโปโปรตีน การทดลองนี้ใช้สาร 5-doxyl stearic acid (5-DS) และ 16-doxyl stearic acid (16-DS) ซึ่งเข้าอยู่ในชั้น phospholipids surface ของไลโปโปรตีน ที่ hydrocarbon ตำแหน่งที่ 5 และ 16 ตามลำดับ สัญญาณ ESR ของ 5-DS และ 16-DS แสดงในรูป 1.1

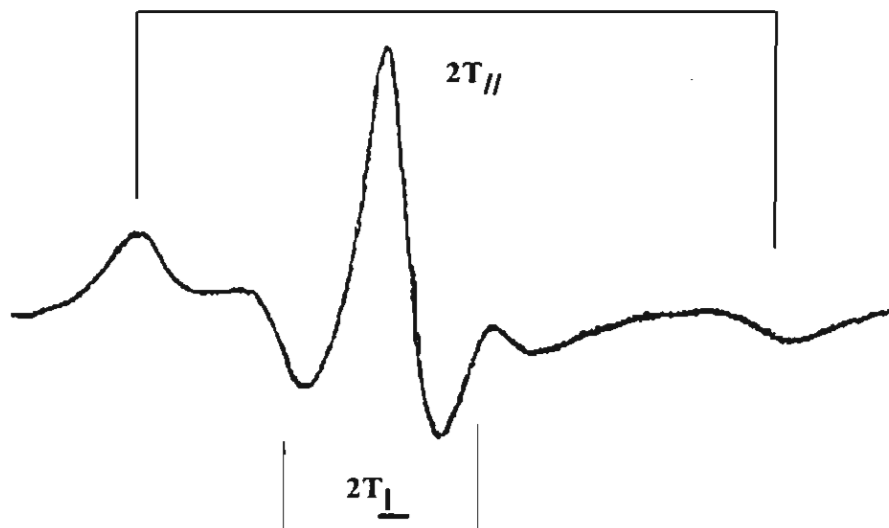
เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในบริเวณใกล้เคียงและทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของ nitroxyl radical สัญญาณ ESR จะลดลง ดังนั้นการวัดความสูงของสัญญาณตามเวลาที่ผ่านไปสามารถคำนวณอัตราความเร็วของปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้

การเตรียม spin probe เตรียมได้โดย ละลาย 5-DS หรือ 16-DS ใน dichloromethane ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 mg/ml คูดสารนี้ปริมาตร 50 μ l ลงในหลอดแก้วสะอาดที่ล้างก่อนด้วย Chloroform:Methanol (1:1) แล้วทำให้สาร spin probe แห้งโดย nitrogen gas

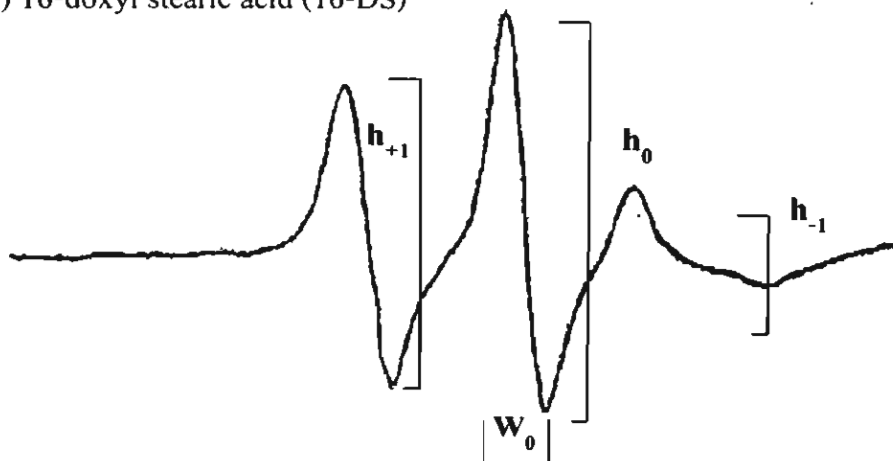
วิธีเตรียม “spin labeled lipoprotein” ทำได้โดยเติมไลโปโปรตีนความเข้มข้น 400 μ g/ml ลงในหลอดแก้วที่มี spin probe ดังกล่าวข้างต้น เขย่าเบาๆทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำ “spin labeled lipoprotein” ทำปฏิกิริยาต่อไป ในการทำปฏิกิริยาจะใช้ “spin labeled lipoprotein” ปริมาณ 20 μ g เติมด้วยสารประกอบเหล็ก และเริ่มปฏิกิริยาโดยใช้ hydroperoxide เป็นตัวกระตุ้นในส่วนผสมปฏิกิริยาทั้งหมด 100 μ l ใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

สัญญาณ ESR ตรวจสอบโดยใช้ เครื่อง ESR Spectrometer (JEOL, RX-2) และ TE011 Cavity โดยใช้ความถี่คลื่น Microwave ที่ 9.4 GHz , power 5 mW, amplitude of 100 kHz field modulation ที่ 0.25 mT สำหรับ 5-DS และ 0.125 mT สำหรับ 16-DS

(a) 5-doxyl stearic acid (5-DS)



(b) 16-doxyl stearic acid (16-DS)



รูปที่ 1.1 สัญญาณ ESR ของ 5-doxyl stearic acid (5-DS) (a), และ 16-doxyl stearic acid (16-DS) (b) ในไลโปโปรตีน

1.2 ผลการทดลอง

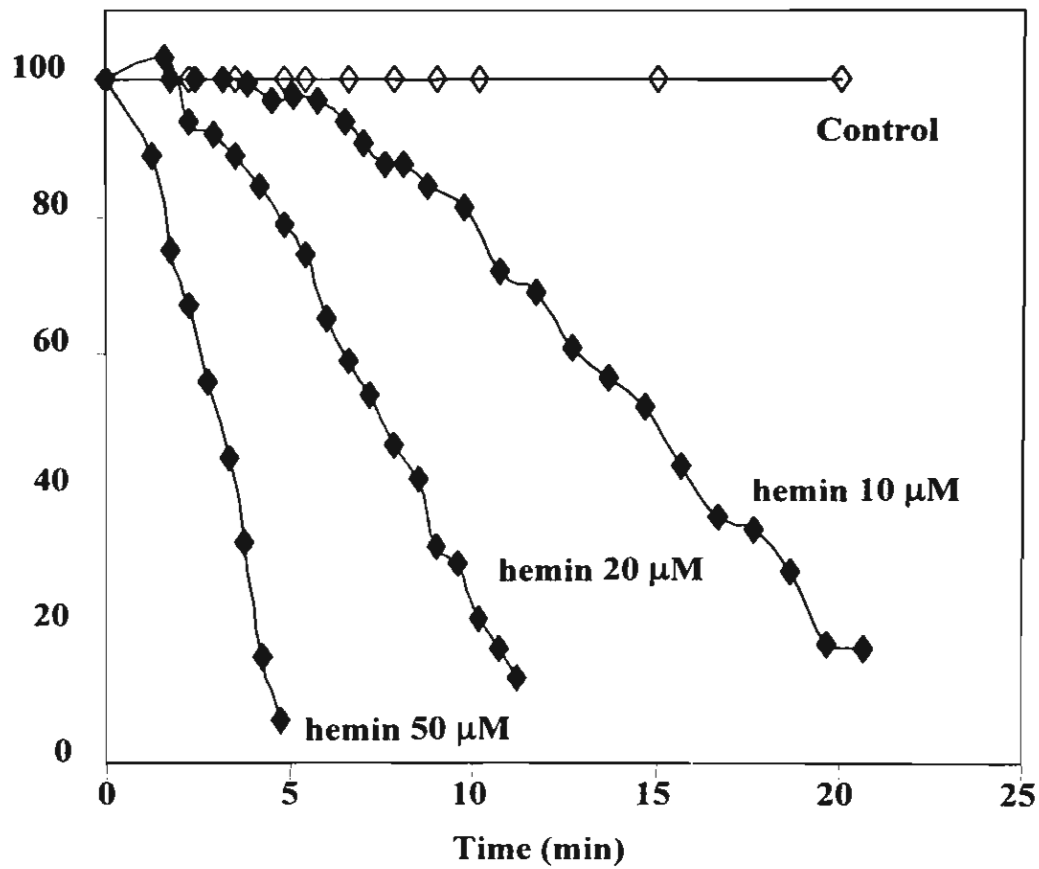
สัญญาณ ESR ที่วัดได้ในไลโปโปรตีนมีลักษณะดังรูปที่ 1.1 ซึ่งลักษณะของสัญญาณนี้แสดงให้เห็นว่า spin probe ได้เข้าไปอยู่ในชั้น phospholipids surface ของไลโปโปรตีน ที่ hydrocarbon ตำแหน่งที่ 5 และ 16 ตามที่ต้องการจริง สัญญาณ ESR นี้คงที่อยู่ได้เป็นเวลานาน แต่เมื่อกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีน สัญญาณ ESR จะลดลงอย่างรวดเร็วดังแสดงในรูปที่ 1.2 อัตราการลดลงของสัญญาณนี้จะขึ้นกับความเข้มข้นและชนิดของสารประกอบเหล็ก รวมทั้งความเข้มข้นและชนิดของ hydroperoxide ถ้าอัตราการลดลงของสัญญาณนั้นเร็วแสดงว่ามีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นตำแหน่งใกล้เคียง spin probe ในปริมาณสูง

ในการทดลองนี้ได้ใช้สารประกอบเหล็ก 2 ชนิดได้แก่ hemin และ ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) เนื่องจาก hemin เป็นสารประกอบ heme ที่พบได้ในกระแสเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมียในปริมาณสูงและ Fe-NTA เป็นตัวแทนของ non-transferrin bound iron (NTBI) ซึ่งเชื่อว่าสารประกอบเหล็กทั้งสองชนิดสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีนได้

จากการทดลองพบว่า hemin มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ดีกว่า Fe-NTA ทั้งใน LDL และ HDL (ตารางที่ 1.1) ถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นต่างกันถึง 10 เท่าก็ตาม ดังนั้นในภาวะของผู้ป่วยธาลัสซีเมียซึ่งมีสารประกอบเหล็กทั้งสองชนิดนี้ในกระแสเลือด hemin น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของไลโปโปรตีนมากกว่า non-transferrin bound iron

จากรูป 1.3 ในปฏิกิริยาที่ใช้ hemin แสดงให้เห็นว่าอัตราการลดลงของสัญญาณ ESR โดยใช้ 16-DS เป็น spin probe ทั้งใน LDL และ HDL นั้นเร็วกว่าอัตราการลดลงของสัญญาณของ 5-DS ในภาวะการทดลองเดียวกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปฏิกิริยาอนุมูลอิสระนี้เกิดขึ้นในส่วน hydrophobic ได้เร็วกว่า นอกจากนี้ยังพบว่า tert-butylhydroperoxide กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ดีกว่า hydrogenperoxide เป็นการสนับสนุนว่าปฏิกิริยาอนุมูลอิสระจาก hemin นั้นน่าจะเกิดขึ้นในส่วน hydrophobic ของไลโปโปรตีนมากกว่าที่ส่วนผิวของไลโปโปรตีน

ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีนโดยใช้ hemin เป็นตัวกระตุ้นนั้นสามารถยับยั้งได้โดยใช้ α -tocopherol หรือวิตามิน อี ในความเข้มข้นสูงดังแสดงในตารางที่ 1.2

ESR Signal Height (%)

รูปที่ 1.2 แสดงการลดลงของสัญญาณ ESR ตามความเข้มข้นต่างๆของ hemin

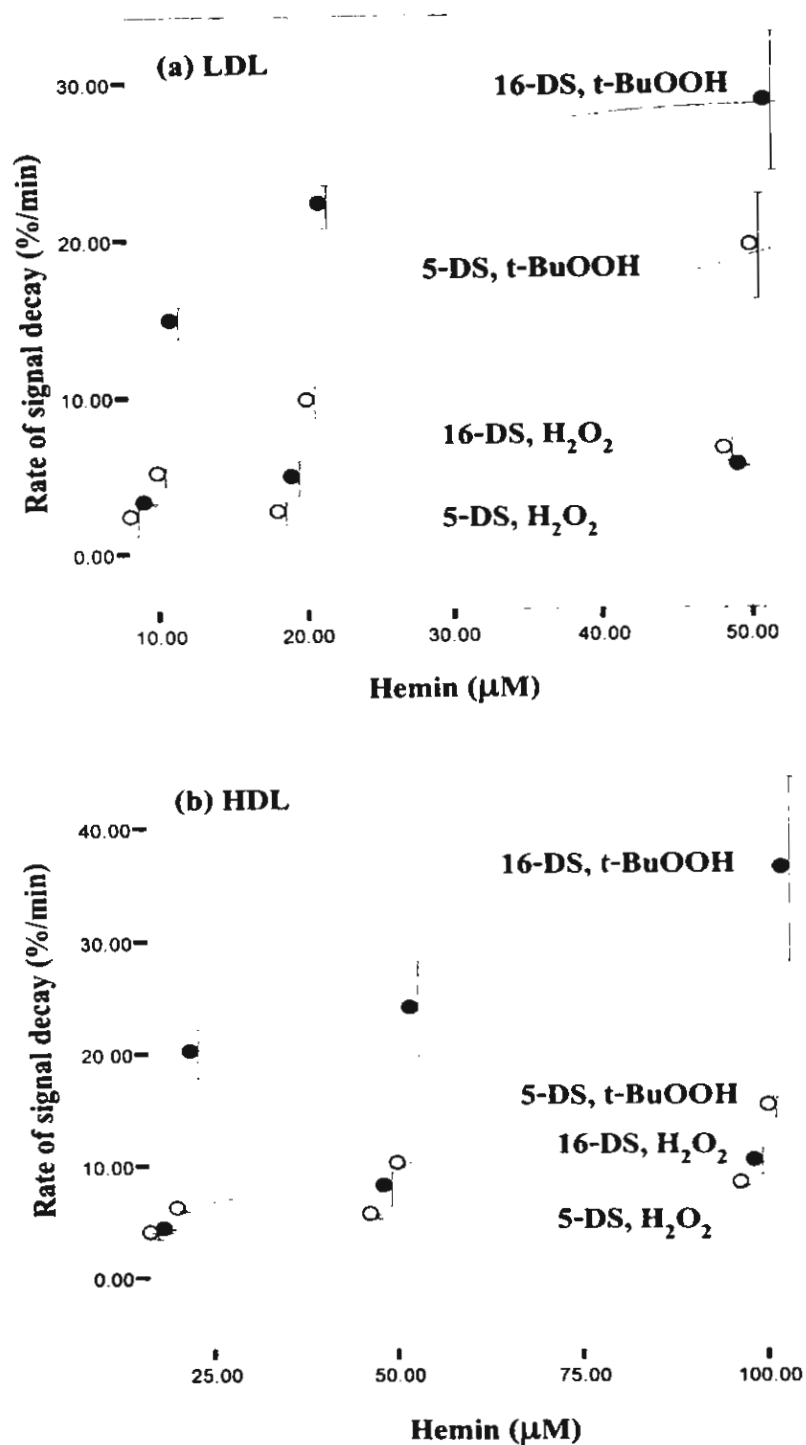
จากรูปเป็นการลดลงของสัญญาณของ 5-DS ใน LDL 20 μ g ใน 10 mM PBS buffer pH 7.4 และใช้ 1 mM tert-butylhydroperoxide เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา

ตารางที่ 1.1 อัตราการลดลงของสัญญาณ ESR ในไลโปโปรตีน (LDL และ HDL) โดยใช้ hemin และ Fe-NTA

Spin Probe	Iron complex/Concentration		Rate of ESR signal decay (%signal height/min)
LDL			
5-DS	Hemin	20 μ M	10.14 $\pm$ 2.37
	Fe-NTA	200 μ M	0.54 $\pm$ 0.32
16-DS	Hemin	20 μ M	18.42 $\pm$ 6.47
	Fe-NTA	200 μ M	1.11 $\pm$ 0.14
HDL			
5-DS	Hemin	20 μ M	7.98 $\pm$ 2.77
	Fe-NTA	200 μ M	0.162 $\pm$ 0.05
16-DS	Hemin	20 μ M	20.02 $\pm$ 5.36
	Fe-NTA	200 μ M	0.64 $\pm$ 0.05

Mean $\pm$ SD (n=3-6)

อัตราการลดลงของปฏิกิริยาศึกษาในไลโปโปรตีน 20 μ g ใน 10 mM PBS buffer pH 7.4 และใช้ 1 mM tert-butylhydroperoxide เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา



รูปที่ 1.3 อัตราการลดลงของสัญญาณ ESR ของ 5-DS และ 16-DS ใน LDL (a) และ HDL (b) ที่ความเข้มข้นต่างๆของ hemin โดยใช้ 0.1 mM tert-buthylhydroperoxide หรือ 0.1 mM hydrogenperoxide เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา

ตารางที่ 1.2 ผลของ α -tocopherol ต่ออัตราการลดลงของสัญญาณ ESR ในไลโปโปรตีน (LDL และ HDL) โดยใช้ hemin

Spin Probe	Iron complex/Concentration	Rate of ESR signal decay (% signal height/min)
LDL		
5-DS	Hemin 20 μ M	10.14 $\pm$ 2.37
	+ α -tocopherol 1.5 mM	10.33 $\pm$ 0.59
	+ α -tocopherol 15 mM	3.29 $\pm$ 0.81
16-DS	Hemin 20 μ M	18.42 $\pm$ 6.47
	+ α -tocopherol 1.5 mM	23.87 $\pm$ 0.1.05
	+ α -tocopherol 15 mM	11.25 $\pm$ 2.97
HDL		
5-DS	Hemin 20 μ M	7.98 $\pm$ 2.77
	+ α -tocopherol 15 mM	3.75 $\pm$ 0.09
16-DS	Hemin 20 μ M	20.02 $\pm$ 5.36
	+ α -tocopherol 15 mM	7.71 $\pm$ 7.36

Mean $\pm$ SD (n=3-6)

อัตราการลดลงของปฏิกิริยาศึกษาในไลโปโปรตีน 20 μ g ใน 10 mM PBS buffer pH 7.4 และใช้ 1 mM tert-butylhydroperoxide เป็นตัวเริ่มปฏิกิริยา

การทดลองที่ 2

การศึกษาคุณสมบัติของไลโปโปรตีนในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

2.1 วิธีดำเนินการทดลอง

2.1.1 อาสาสมัคร

ตัวอย่างเลือดได้จากอาสาสมัครปกติ (มีระดับไขมันปกติ) และผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮีโมโกลบิน อี ที่อดอาหารเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมงใน heparin และนำมาปั่นแยกพลาสมาที่อุณหภูมิ 4 °C โดยใช้ความเร็ว 3500 rpm เป็นเวลา 10 นาที

การวิจัยได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

2.1.2 การแยกไลโปโปรตีน

ไลโปโปรตีนชนิด low density lipoprotein (LDL) และ high density lipoprotein (HDL) จากพลาสมา (heparinized) แยกได้โดยวิธี sequential ultracentrifugation ที่ความหนาแน่นของสารละลายเกลือ 1.019-1.063 g/ml สำหรับ LDL และ 1.063-1.024 g/ml สำหรับ HDL โดยใช้เครื่อง Beckman 80 Ti rotor ที่ 50,000 rpm 4°C ไลโปโปรตีนที่แยกได้นำไป dialysis และหาปริมาณโปรตีนก่อนทำการทดลอง

2.1.3 การวัดปริมาณ cholesterol, cholesteryl esters, α -tocopherol

ปริมาณ free cholesterol, cholesteryl arachidonate (CA), cholesteryl linoleate (CL), cholesteryl oleate (CO), cholesteryl palmitate (CP) และ α -tocopherol ตรวจวัดได้โดยวิธี HPLC โดยวิธีของ Seta et al. (22) และ Zaspel and Csallany (23) โดยใช้ Hypersil BDS C18 column (5 μ ; 4.6 mm X 250 mm) และ acetonitrile: isopropanol (75:25, v/v) เป็น mobile phase ใช้อัตราเร็วของ mobile phase เป็น 1.2 ml/min อุณหภูมิ column 50 °C สำหรับ free cholesterol และ cholesteryl esters นั้น ตรวจวัดโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 210 nm โดยใช้ Water 996 photodiode array detector ส่วน α -tocopherol นั้น ตรวจวัดโดยใช้ Jasco FP 210 spectrofluorometer detector ที่ Ex 295 nm และ Em 370 nm

2.1.4 องค์ประกอบทางเคมีอื่นๆในไลโปโปรตีน (total cholesterol, triglyceride, phospholipids)

ปริมาณ total cholesterol และ triglyceride ตรวจวัดได้โดยใช้ชุด kit จาก Bio-Medical Laboratory (Bangkok) ส่วน ปริมาณ phospholipids ตรวจวัดได้โดยใช้ชุด kit จาก WAKO (Japan)

2.1.5 Lipid peroxidation (TBARs)

ปริมาณของ triobarbituric reactive substances (TBARs) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ภาวะ oxidative stress วัดได้โดยวิธีของ Asakawa et al. และ Uchiyama et al. (24-25) โดยใช้ spectrofluorometer (Perkin Elmer LS55) ที่ Ex 515 nm และ Em 553 nm และใช้ 1,1,3,3,-tetraethoxypropane เป็นสารความเข้มข้นมาตรฐาน

2.1.6 Total iron

ระดับเหล็กในพลาสมาตรวจวัดได้โดยใช้วิธีของ Simpson et al (26) โดยใช้ ferrozine เป็นสารจับเหล็กชนิด non-heme และให้สีที่สามารถตรวจวัดได้ที่ 562 nm โดยใช้ UV-visible spectrometer (Cintra 10e)

2.1.7 การทำงานของเอนไซม์ platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) (27)

การทำงานของเอนไซม์ PAF-AH activity ตรวจวัดได้โดยใช้ 2-Thio PAF เป็นสาร substrate เมื่อ 2-Thio PAF เกิดปฏิกิริยา hydrolysis ที่ตำแหน่ง sn-2 โดยเอนไซม์ PAF-AH จะปล่อย free thiols ซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดยใช้ 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; Ellman's reagent) และติดตามค่าการดูดกลืนแสงในเวลา 10 นาทีโดยใช้ Microplate reader (Wallac) ที่ 405 nm ค่าการทำงานของเอนไซม์แสดงเป็น ปริมาณการถูก hydrolyzed ของ 2-Thio (โดยใช้ค่า $\epsilon = 12.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) เป็น μmol ต่อ นาทีใน 1 ml ของพลาสมาหรือ 1 mg protein ของไลโปโปรตีน

2.1.8 การทำงานของเอนไซม์ paraoxanase (PON) (28)

การทำงานของเอนไซม์ PON ตรวจวัดได้โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของสาร Paraoxon เป็น 4-nitrophenol ซึ่งสามารถตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 412 nm โดยใช้ Spectrophotometer ค่าการทำงานของเอนไซม์แสดงเป็น ปริมาณของ 4-nitrophenol ที่เกิดขึ้น (โดยใช้ค่า $\epsilon = 12.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) เป็น μmol ต่อ นาทีใน 1 ml ของพลาสมาหรือ 1 mg protein ของไลโปโปรตีน

2.1.9 การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันโดยใช้เทคนิค spin labeling โดยวิธี Electron Spin Resonance Spectroscopy (ESR)

การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน สามารถศึกษาได้โดยการตรวจวัดสัญญาณ ESR ของ stable nitroxyl radical ที่ติดไว้ที่ตำแหน่งต่างๆ ในไลโปโปรตีน การทดลองนี้ใช้สาร 5-doxyl stearic acid (5-DS) และ 16-doxyl stearic acid (16-DS) ซึ่งติดอยู่บนส่วนหัวของไลโปโปรตีน ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 และ 16 ตามลำดับ สัญญาณ ESR ของ 5-DS และ 16-DS แสดงในรูป 1.1

ค่าการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน เมื่อใช้สาร 5-doxyl stearic acid (5-DS) จะแสดงค่าเป็น order parameter (S) ถ้าค่านี้เพิ่มขึ้นใกล้เคียง 1 มากเท่าไร แสดงว่าการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันช้า (less fluidity) ค่านี้สามารถคำนวณได้จาก

$$S = 1.732 \times (T// - T\perp - C) / (T// + 2T\perp + 2C); \quad C = 1.4 - 0.053(T// - T\perp)$$

ส่วน 16-doxyl stearic acid (16-DS) นั้นเป็นการวัดการเคลื่อนไหวแบบ long axial rotation ในตำแหน่งคาร์บอนที่ 16 ของฟอสฟอลิปิดที่ส่วนหัวของไลโปโปรตีนแสดงผลเป็นค่า motion parameter (T) ถ้าค่านี้มีค่าสูงแสดงว่าการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันช้า (less fluidity) ค่านี้สามารถคำนวณได้จาก

$$T = 6.51 \times 10^{-10} W_0 [(h_0/h_{\perp})^{1/2} - 1]$$

นอกจากนี้ยังแสดงเป็นค่า $h_0/h_{\perp}$ และ $h_{\perp}/h_0$ ได้อีกด้วย

เมื่อ h_0 = ความสูงของสัญญาณที่ middle field

$h_{\perp}$ = ความสูงของสัญญาณที่ higher field

$h_{\parallel}$ = ความสูงของสัญญาณที่ lower field

W_0 = ความกว้างของสัญญาณที่ middle field

สัญญาณ ESR ตรวจวัดโดยเครื่อง X-band ESR (JEOL RX-2) spectrometer และ TE011 cavity โดยใช้ความถี่คลื่น Microwave ที่ 9.4 GHz , power 5 mW, amplitude of 100 kHz field modulation ที่ 0.25 mT สำหรับ 5-DS และ 0.125 mT สำหรับ 16-DS

2.1.10 การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน โดยใช้เทคนิค Fluorescence polarization (29)

สำหรับวิธี Fluorescence นั้นจะวัดการเปลี่ยนแปลง polarization ของสารเรืองแสงคือ 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-1,3,5-hexatriene (TM-DPH) ซึ่งเป็นการวัดการเคลื่อนไหวของ acyl chains ที่หัวของไลโปโปรตีน ส่วน diphenylhexatriene (DPH) เป็นการติดตามการเคลื่อนไหวในส่วนแกน (core) ของไลโปโปรตีน ค่าการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันนั้นแสดงเป็นค่า anisotropy (r) ถ้าค่านี้มีค่าน้อยแสดงว่ามีการเคลื่อนไหวของโมเลกุลไขมันเร็ว ในทางตรงกันข้ามถ้าค่า r มากขึ้นแสดงว่าการเคลื่อนไหวของโมเลกุลไขมันช้าลง

ค่า anisotropy (r) ของสารเรืองแสงทั้งสองชนิดวัดโดยใช้ปริมาณ phospholipids: fluorescence probe = 500 : 1 โดยใช้เครื่อง Perkin Elmer LS55 luminescence spectrometer ที่ Ex 360 nm และ Em 460 nm และค่า r สามารถคำนวณได้จาก

$$r = (I_{vv} - GF \cdot I_{vh}) / (I_{vv} + 2GF \cdot I_{vh})$$

เมื่อ I คือความเข้มของแสงใน vertical (v) horizontal (h) dielectric vector โดยตัวแรกเป็นของ excitation และตัวหลังเป็น emission

GF = the Grating factor = (I_{hv}/I_{hh})

2.1.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS โดยการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย one way analysis of variance (ANOVA) และใช้ LSD เป็น post test ความสัมพันธ์ของค่าต่างๆใช้ Pearson correlation

2.2 ผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ใช้อาสาสมัครคนปรกติ 15 คนเป็นหญิง 7 คนและชาย 8 คน อายุเฉลี่ย 28.3 ± 4.9 ปี ค่าฮีโมโกลบิน 13.7 ± 1.1 g/dl สำหรับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย 28 คนเป็นหญิง 17 คนและชาย 10 คน อายุเฉลี่ย 26.7 ± 9.9 ปี ในกลุ่มนี้เป็นผู้ป่วยตัดม้าม 12 คนไม่ตัดม้าม 16 คน เมื่อแบ่งกลุ่มตามความรุนแรงของโรคโดยใช้ระดับฮีโมโกลบิน ขนาดของม้าม การเจริญเติบโต ความถี่ของการได้รับเลือด และอายุที่เริ่มแสดงอาการเป็นเกณฑ์ (30) จะได้กลุ่มที่มีความรุนแรงของโรคน้อย ปานกลางและรุนแรง 5, 14 และ 9 คน ตามลำดับ โดยมีค่าฮีโมโกลบินเฉลี่ย 8.4 ± 1.2 , 6.8 ± 1.1 และ 6.7 ± 3.0 g/dl ตามลำดับ

จากตารางที่ 2.1 แสดงถึง ผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีภาวะเหล็กเกิน ร่วมกับมีภาวะ oxidative stress ซึ่งแสดงโดยการลดลงของระดับวิตามินอี และการเพิ่มขึ้นของระดับ lipid peroxidation และผู้ป่วยยังมีภาวะ hypolipidemia โดยปริมาณคอเลสเตอรอล (TC) และไตรกลีเซอไรด์ (TG) ในพลาสมาลดลง ซึ่งค่าต่างๆเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค เมื่อวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมีในไลโปโปรตีนทั้งสองชนิด (LDL ใน ตารางที่ 2.2 และ HDL ในตารางที่ 2.3) พบว่าไตรกลีเซอไรด์ทั้งใน LDL และ HDL มีปริมาณเพิ่มขึ้น สำหรับ LDL ปริมาณคอเลสเตอรอลอิสระ (FC) หรือคอเลสเตอรอลซึ่งอยู่บริเวณผิวของไลโปโปรตีน และคอเลสเตอรอล เอสเทอร์ หรือคอเลสเตอรอลซึ่งอยู่บริเวณแกนของไลโปโปรตีนนั้นมีปริมาณที่มีแนวโน้มลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอสเทอร์ของกรดไขมันที่มีพันธะคู่เป็นองค์ประกอบได้แก่ cholesteryl arachidonate (CA) และ cholesteryl linoleate (CL) ซึ่งมีพันธะคู่จำนวน 4 และ 2 ตามลำดับ ใน LDL ปริมาณ CA และ CL จะลดลง ประมาณ 42% และ 57% ตามลำดับ ในผู้ป่วยที่มีระดับความรุนแรงของโรคปานกลางและสูง เช่นเดียวกันใน HDL ปริมาณของ CA และ CL ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคในระดับรุนแรง

จากข้อมูลจะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีนั้นเกิดขึ้นในบริเวณแกนของไลโปโปรตีนมากกว่าที่ผิวกล่าวคือมีการเปลี่ยนแปลงในปริมาณของ TG, CA, CL อย่างมีนัยสำคัญและเมื่อวิเคราะห์การเคลื่อนไหวของไขมันในระดับโมเลกุล พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในส่วนแกนอย่างมีนัยสำคัญมากกว่าที่ผิวไลโปโปรตีนดังแสดงในตารางที่ 2.4 และ 2.5

ในการศึกษานี้พบว่า ค่าการทำงานของแอนติออกซิเจนเอนไซม์ได้แก่ PAF-AH และ PON ในไลโปโปรตีนของผู้ป่วยนั้นมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 2.6 กล่าวคือมีการทำงานเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ PAF-AH แต่การทำงานของเอนไซม์ PON ใน HDL นั้นลดลง

เมื่อวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ต่างๆดังแสดงในตารางที่ 2.7 เห็นว่าภาวะเหล็กเกิน ภาวะ oxidative stress และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคในที่นี่ได้แก่ระดับฮีโมโกลบินนั้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมี การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน และการทำงานของไลโปโปรตีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อ HDL

เนื่องจาก HDL นั้นมีบทบาทที่สำคัญในการป้องกันภาวะหลอดเลือดอุดตัน และช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ LDL จึงได้วิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ใน HDL พบว่าการทำงานของเอนไซม์นั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของ HDL ได้แก่ ปริมาณ TG, CA และ CL ซึ่งเป็นไขมันที่อยู่ในแกนของไลโปโปรตีนดังแสดงในรูปที่ 2.1 ดังนั้นเมื่อมีภาวะ Oxidative stress ซึ่งอาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลเหล่านี้ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนไป การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีนั้นอาจอธิบายได้ว่า เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีแล้ว ทำให้การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันเปลี่ยนแปลงไป และทำให้รูปทรงสามมิติของโปรตีนบนไลโปโปรตีนนั้นเปลี่ยนแปลงไปด้วย ซึ่งอาจทำให้ส่วนของโปรตีนที่จับกับสาร substrate นั้นมีความแรงต่อการจับสาร substrate เปลี่ยนไป ค่าความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของเอนไซม์-การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน-องค์ประกอบของโปรตีนใน HDL แสดงในรูปที่ 2.2 และรูปที่ 2.3

เช่นเดียวกันใน LDL ค่าความสัมพันธ์ต่างๆแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.1 ระดับ oxidative stress และระดับไขมันในพลาสมาของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ

	Normal	β -thalassemia/Hb E patients		
		Mild	Moderate	Severe
Total iron (nmole/ml)	16.99±6.27	21.91±14.91	34.53±11.73***	36.20±10.89***
α -tocopherol (nmole/ml)	25.32±6.50	3.48±3.14***	2.95±3.00***	2.77±1.95***
TBARs (nmole/ml)	6.81±1.40	10.92±7.08	14.67±14.03*	11.31±7.82
Total cholesterol (mg/ml)	1.79±0.39	0.83±0.26***	0.71±0.26***	0.91±0.36***
Total triglyceride (mg/ml)	0.88±0.36	1.13±0.54	1.04±0.54	1.32±0.33

ค่าแสดงเป็น Mean±SD

***p<0.0001, **p<0.01, *p<0.05 เมื่อเทียบกับคนปกติ

ตารางที่ 2.2 ค่าองค์ประกอบทางเคมีของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL) ของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ

Lipids (μ mol/mg P)	Normal	β -thalassemia/Hb E patients		
		Mild	Moderate	Severe
TG	0.28±0.22	0.80±0.46*	0.68±0.40**	0.99±0.57***
TC	3.27±0.57	3.19±1.42	2.43±0.91*	2.72±0.97
FC	0.86±0.27	0.71±0.20	0.56±0.11**	0.71±0.17
CA	0.07±0.02	0.06±0.03	0.04±0.02**	0.05±0.2
CL	0.96±0.32	0.66±0.23*	0.41±0.10***	0.51±0.19***
CO	0.37±0.11	0.33±0.12	0.24±0.08**	0.29±0.11
CP	0.20±0.09	0.25±0.12	0.17±0.06	0.24±0.09
PL	1.06±0.24	1.12±0.33	0.91±0.16	1.01±0.15

ค่าแสดงเป็น Mean±SD

***p<0.0001, **p<0.01, *p<0.05 เมื่อเทียบกับคนปกติ

TG=Total triglyceride, TC=Total cholesterol, FC=Free cholesterol, CA=Cholesteryl arachidonate (Ch20:4), CL=Cholesteryl linoleate (Ch18:2), CO=Cholesteryl oleate (Ch18:10), CP=Cholesteryl palmitate (Ch18:0), PL=Phospholipid