

ตารางที่ 2.3 ค่าองค์ประกอบทางเคมีของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง (HDL) ของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ

Lipids ($\mu\text{mol/mg P}$)	Normal	β -thalassemia/Hb E patients		
		Mild	Moderate	Severe
TG	0.02 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.15***	0.21 $\pm$ 0.09***	0.31 $\pm$ 0.13***
TC	0.68 $\pm$ 0.12	0.78 $\pm$ 0.10	0.69 $\pm$ 0.14	0.61 $\pm$ 0.08
FC	0.21 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.23	0.37 $\pm$ 0.13**	0.19 $\pm$ 0.14
CA	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.005*
CL	0.27 $\pm$ 0.10	0.27 $\pm$ 0.20	0.25 $\pm$ 0.08	0.14 $\pm$ 0.11*
CO	0.11 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.09	0.15 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.003
CP	0.06 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.02
PL	0.49 $\pm$ 0.08	0.73 $\pm$ 0.09*	0.63 $\pm$ 0.15*	0.61 $\pm$ 0.16*

ค่าแสดงเป็น Mean $\pm$ 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

ตารางที่ 2.4 ค่าการเคลื่อนไหวของไขมันในระดับโมเลกุลของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (LDL) ของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ

Lipid fluidity	Normal	β-thalassemia/Hb E patients		
		Mild	Moderate	Severe
Surface				
Order parameter (S)	0.694±0.023	0.645±0.011**	0.636±0.038***	0.632±0.034***
Anisotropy (TMA-DPH)	0.287±0.005	0.291±0.007	0.271±0.005	0.282±0.010
Core				
Motion parameter (τ)	20.26±1.69	15.63±3.39***	15.09±2.06***	16.89±2.66***
Anisotropy (DPH)	0.225±0.018	0.191±0.015***	0.174±0.011***	0.178±0.018***

ค่าแสดงเป็น Mean±SD

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

ตารางที่ 2.5 ค่าการเคลื่อนไหวของไขมันในระดับโมเลกุลของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นสูง (HDL) ของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ

Lipid fluidity	Normal	β-thalassemia/Hb E patients		
		Mild	Moderate	Severe
Surface				
Order parameter (S)	0.691±0.016	0.660±0.013*	0.668±0.031*	0.665±0.020*
Anisotropy (TMA-DPH)	0.286±0.004	0.286±0.003	0.266±0.038*	0.285±0.009
Core				
Motion parameter (τ)	29.51±2.50	23.36±2.09***	22.09±4.02***	22.20±2.71***
Anisotropy (DPH)	0.185±0.0139	0.158±0.007***	0.148±0.009***	0.162±0.013***

ค่าแสดงเป็น Mean±SD

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

ตารางที่ 2.6 ค่าการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดเนสเอนไซม์ PAF-AH และ PON ของคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ

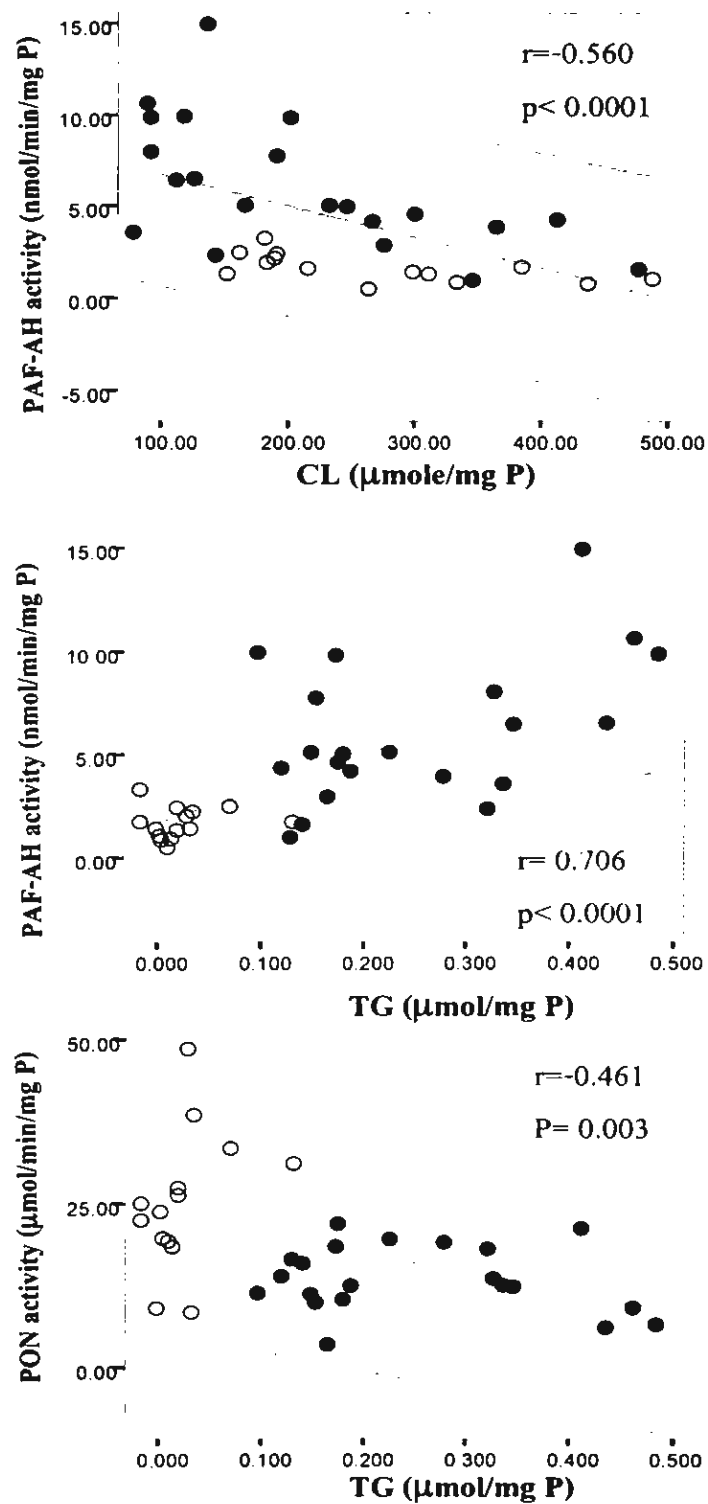
	Normal	β-thalassemia/Hb E patients		
		Mild	Moderate	Severe
PAF-AH activity				
Plasma (nmol/min/ml)	23.15±4.42	41.51±11.88**	43.79±13.75***	49.35±18.32***
LDL (nmol/min/mg P)	11.12±3.77	37.34±19.89**	36.69±13.90***	46.22±19.22***
HDL (nmol/min/mg P)	1.78±0.76	4.12±2.03	5.61±3.02***	8.20±4.04***
PON activity				
Plasma (μmol/min/ml)	45.45±19.69	20.61±8.49**	22.03±16.51***	20.53±11.96***
HDL (μmol/min/mg P)	25.45±10.71	12.49±4.29**	14.56±5.80**	13.71±4.90**

ค่าแสดงเป็น Mean±SD

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

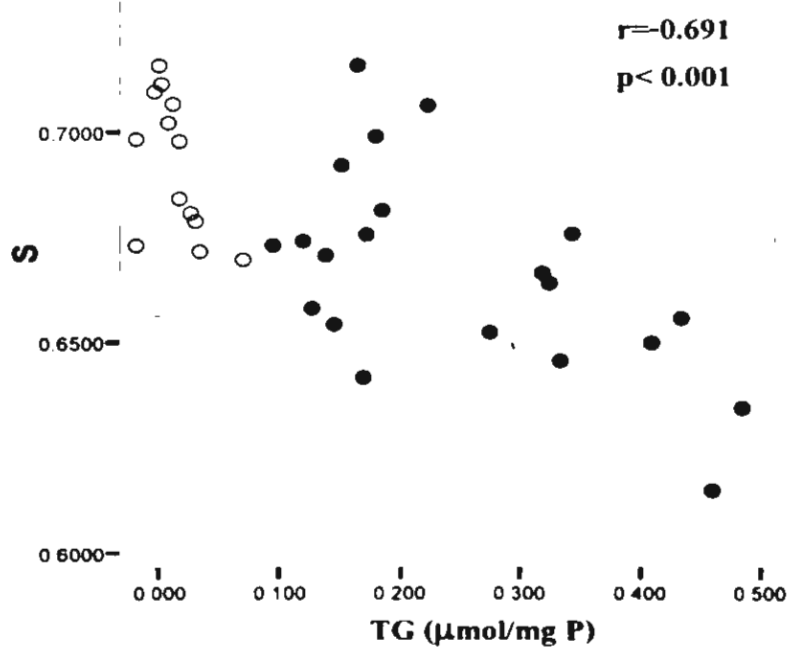
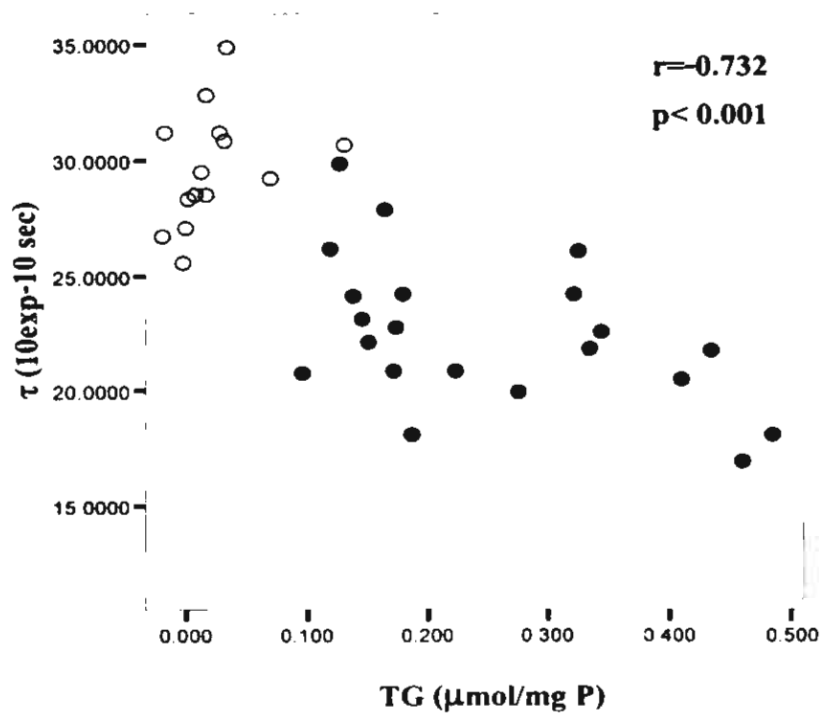
ตารางที่ 2.7 ความสัมพันธ์ของระดับเหล็ก วิตามินอี ในพลาสมา และระดับฮีโมโกลบินต่อองค์ประกอบทางเคมี การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันและการทำงานของเอนไซม์ใน HDL

	Correlation r (p-value)		
	Plasma iron	Plasma α -tocopherol	Hb
Cholesteryl linoleate (CL)	-0.490 (0.001)	0.334 (0.041)	0.287 (0.055)
Motion parameter (τ)	-0.522 (0.001)	0.731 (<0.0001)	0.750 (<0.0001)
Anisotropy (DPH)	-0.421 (0.006)	0.759 (<0.0001)	0.633 (<0.0001)
PAF-AH activity	0.489 (0.001)	-0.534 (0.002)	-0.617 (<0.0001)
PON activity	-0.326 (0.028)	0.711 (<0.0001)	0.479 (0.003)



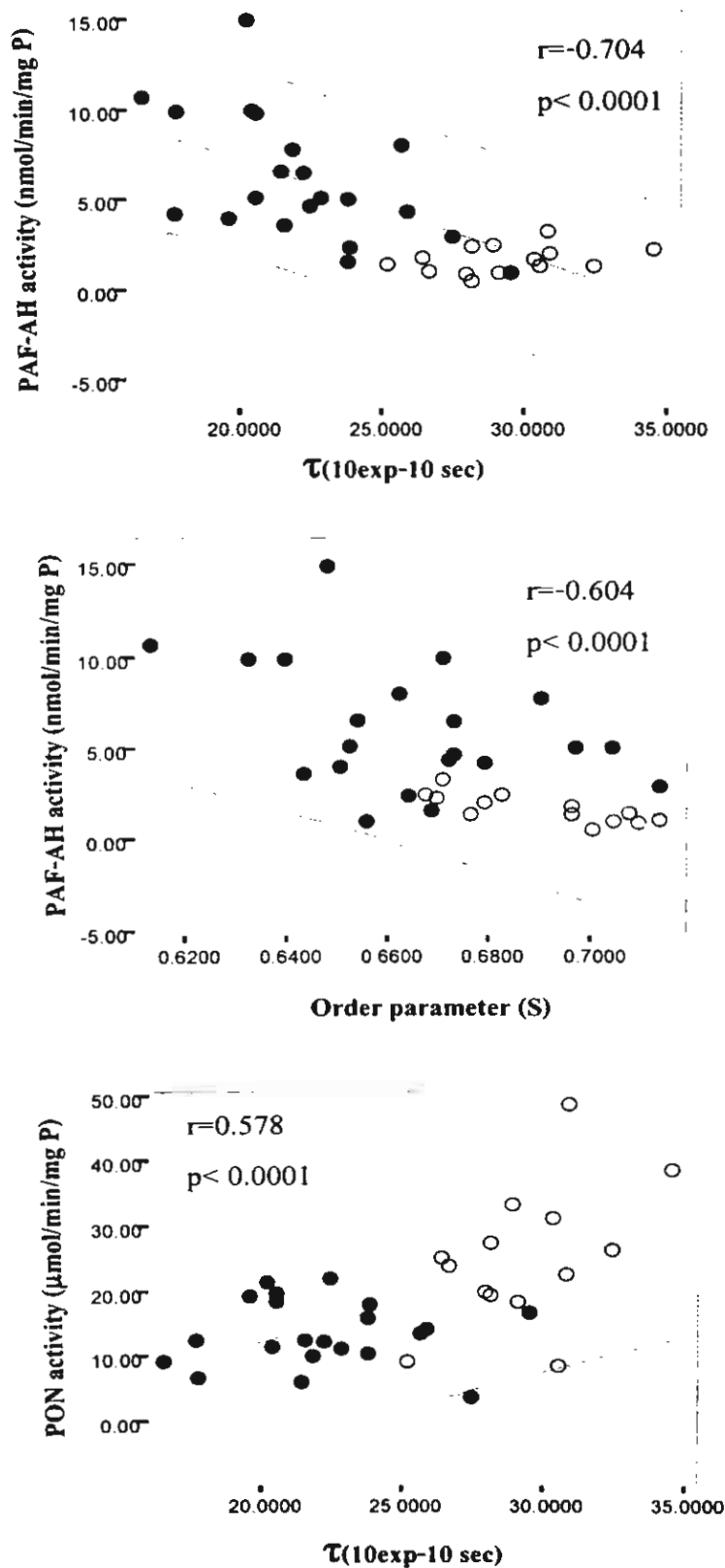
รูปที่ 2.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีและการทำงานของเอนไซม์ใน HDL

(○ อาสาสมัครปกติ , ● ผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ)



รูปที่ 2.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติการเคลื่อนไหวยกระดับโมเลกุลในไขมันใน HDL

(○ อาสาสมัครปกติ , ● ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย)



รูปที่ 2.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีและการทำงานของเอนไซม์ใน HDL

(○ อาสาสมัครปกติ , ● ผู้ป่วยหลอดเลือดหัวใจ)

ตารางที่ 2.8 ความสัมพันธ์ขององค์ประกอบทางเคมี การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันและการทำงานของเอนไซม์ใน LDL

Chemical composition/Fluidity	Correlation	
	r	p
CA/ Anisotropy (DPH)	0.680	<0.0001
CL/ Anisotropy (DPH)	0.789	<0.0001
CL/ Motion parameter (τ)	0.451	0.002
α -tocopherol/ Anisotropy (DPH)	0.693	<0.0001
α -tocopherol/Motion parameter (τ)	0.598	<0.0001
Enzyme activity/ Chemical composition		
PAF-AH/TG	0.625	<0.0001
PAF-AH/ α -tocopherol	-0.539	<0.0001
Enzyme activity/ Fluidity		
PAF-AH/ Anisotropy (DPH)	-0.500	<0.0001
PAF-AH/ Motion parameter (τ)	-0.498	<0.0001

การทดลองที่ 3

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของไลโปโปรตีนในหลอดทดลอง

3.1 วิธีดำเนินการทดลอง

3.1.1 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีและการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันในไลโปโปรตีนเมื่อกระตุ้นปฏิกิริยา oxidative stress ด้วย hemin และ Fe-nitrilotriacetate (Fe-NTA)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าสารประกอบเหล็กชนิดใดในเลือดของผู้ป่วยเป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมี และการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลในไลโปโปรตีน

การทดลองนี้ใช้พลาสมาจากคนปกติ นำมาเติมสารประกอบเหล็กคือ hemin หรือ Fe-nitrilotriacetate (Fe-NTA) (complex 1:2) ที่ความเข้มข้น 150 μM ที่ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแยกไลโปโปรตีนชนิด ความหนาแน่นต่ำ (LDL) และความหนาแน่นสูง (HDL) โดยวิธี sequential density gradient ultracentrifugation (LDL, $d = 1.019-1.063 \text{ g/ml}$; HDL, $d = 1.063-1.20$) ไลโปโปรตีนที่แยกได้นำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ระดับ total cholesterol, triglyceride, free cholesterol, cholesteryl esters, lipid peroxide, oxidized lipid และ ระดับ α -tocopherol และการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันโดยใช้วิธี ESR และ fluorescence anisotropy ดังรายละเอียดแสดงในการทดลองที่ 2

สำหรับการวิเคราะห์ระดับ lipid hydroperoxide ในไลโปโปรตีนนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกันโดยการเติมสารประกอบเหล็ก hemin หรือ Fe-nitrilotriacetate (Fe-NTA) (complex 1:2) ที่ความเข้มข้น 150 μM ที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงมาปั่นแยกไลโปโปรตีนและวิเคราะห์ระดับ lipid hydroperoxide ดังรายละเอียดแสดงในการทดลองที่ 2

3.1.2 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) และ paraoxonase (PON) ในไลโปโปรตีนเมื่อกระตุ้นปฏิกิริยา oxidative stress ด้วย hemin

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ oxidative stress ที่เหนี่ยวนำโดย hemin ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ PAF-AH และ PON ในไลโปโปรตีน เพื่อเป็นข้อมูลนำมาอธิบายการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

การทดลองทำโดยไลโปโปรตีนชนิด ความหนาแน่นต่ำ (LDL) และความหนาแน่นสูง (HDL) นำมาเติม hemin ที่ความเข้มข้น 1.6 nM/100 μg lipoprotein ที่ 37 °C เป็นเวลา 10 ชั่วโมงแล้วตรวจวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ PAF-AH และ Paraoxonase (PON) ที่เวลาต่างๆรวมทั้งวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ได้แก่ ระดับ total cholesterol, triglyceride, free cholesterol,

cholesteryl esters, lipid peroxide, oxidized lipid และ ระดับ α -tocopherol และวัดระดับ oxidative stress โดยวัดระดับ lipid peroxidation (TBARs) และการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวนในระดับโมเลกุลของไขมันในแกนของไลโปโปรตีนโดยใช้ DHP ดังรายละเอียดแสดงในการทดลองที่ 2

3.2 ผลการทดลอง

3.2.1 เปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีและการเคลื่อนไหวนในระดับโมเลกุลของไขมันในไลโปโปรตีนเมื่อกระตุ้นปฏิกิริยา oxidative stress ด้วย hemin และ Fe-nitritotriacetate (Fe-NTA)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าสารประกอบเหล็กชนิดใดในเลือดของผู้ป่วยเป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในไลโปโปรตีน การทดลองนี้ปฏิกิริยานูเมอติสที่เหนี่ยวนำโดยสารประกอบเหล็ก hemin และ Fe-Nitritotriacetate (1:2) ใช้เป็นแบบทดลองปฏิกิริยานูเมอติสที่อาจเกิดขึ้นได้ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ตารางที่ 3.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับวิตามินอี และ การเคลื่อนไหวนในระดับโมเลกุลของไขมันของไลโปโปรตีนที่แยกจากพลาสมาที่เติม hemin และ Fe-NTA ที่ความเข้มข้น 150 μ M จากตารางแสดงให้เห็นว่า hemin มีประสิทธิภาพสูงกว่า Fe-NTA สามารถกระตุ้นให้เกิด oxidative stress เพิ่มขึ้น โดยระดับวิตามินอี ในพลาสมาลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ hemin ยังทำให้มีการเปลี่ยนแปลง การเคลื่อนไหวนในระดับโมเลกุลของไขมันในส่วนแกนของ HDL และที่ผิวของ HDL ในขณะที่ Fe-NTA มีผลต่อส่วนผิวของ LDL เท่านั้น การเปลี่ยนแปลงของการเคลื่อนไหวนในระดับโมเลกุลของไขมันในส่วนแกนของ HDL นั้นมีความสัมพันธ์กับระดับ CA และ CL ($r=0.837$, $p<0.05$ และ $r=0.456$, $p=0.07$ ตามลำดับ)

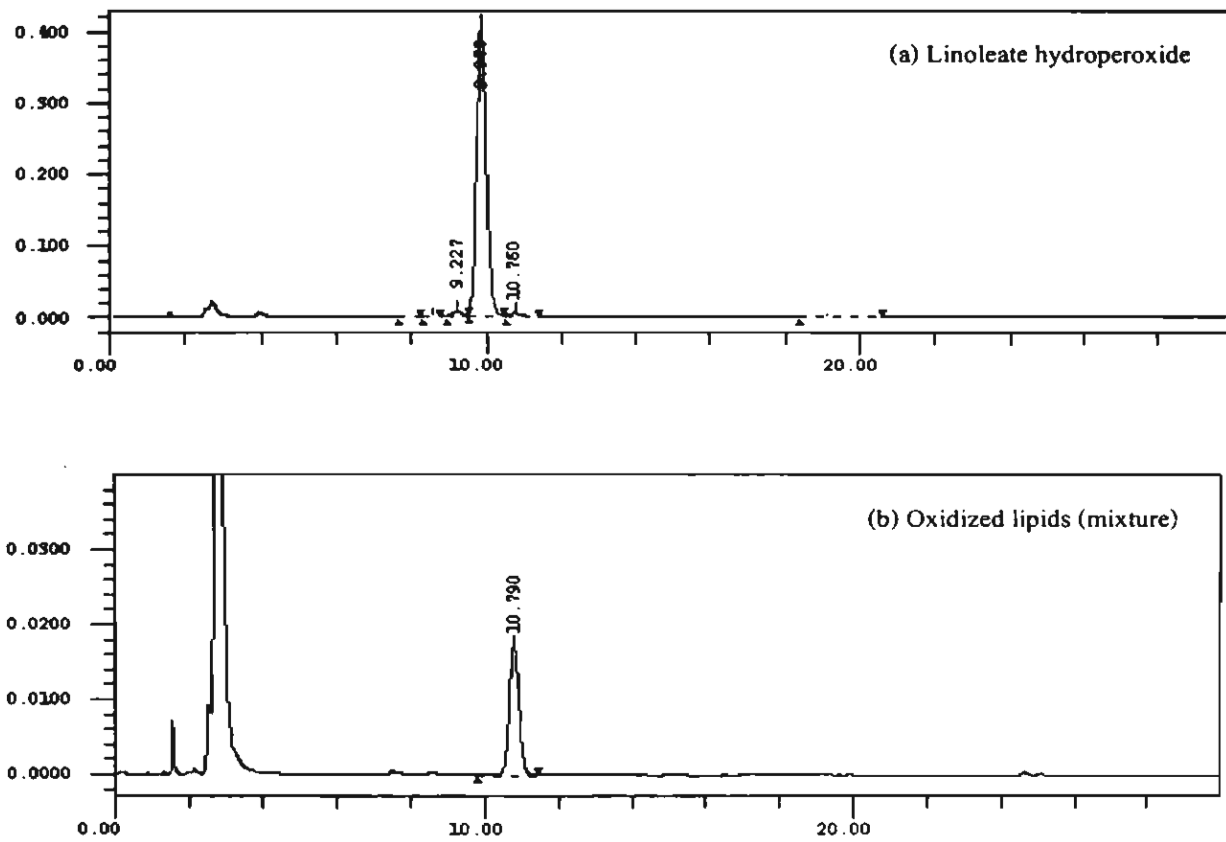
เมื่อวิเคราะห์ oxidized lipids (รูปที่ 3.1 linoleate hydroperoxide (retention time=9.9) และ ผลผลิตของ oxidized linoleic acid and arachidonic acid (retention time=10.7)) พบว่าไลโปโปรตีนที่แยกจากพลาสมาที่เติมด้วย hemin มีผลผลิตของ oxidized lipid เช่นเดียวกับที่พบในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (รูปที่ 3.2 และ 3.3) แต่สำหรับไลโปโปรตีนที่แยกจากพลาสมาที่เติมด้วย Fe-NTA นั้นไม่สามารถตรวจพบผลผลิตของ oxidized lipids

การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า hemin น่าจะเป็นเหตุสำคัญให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไลโปโปรตีนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงใน HDL

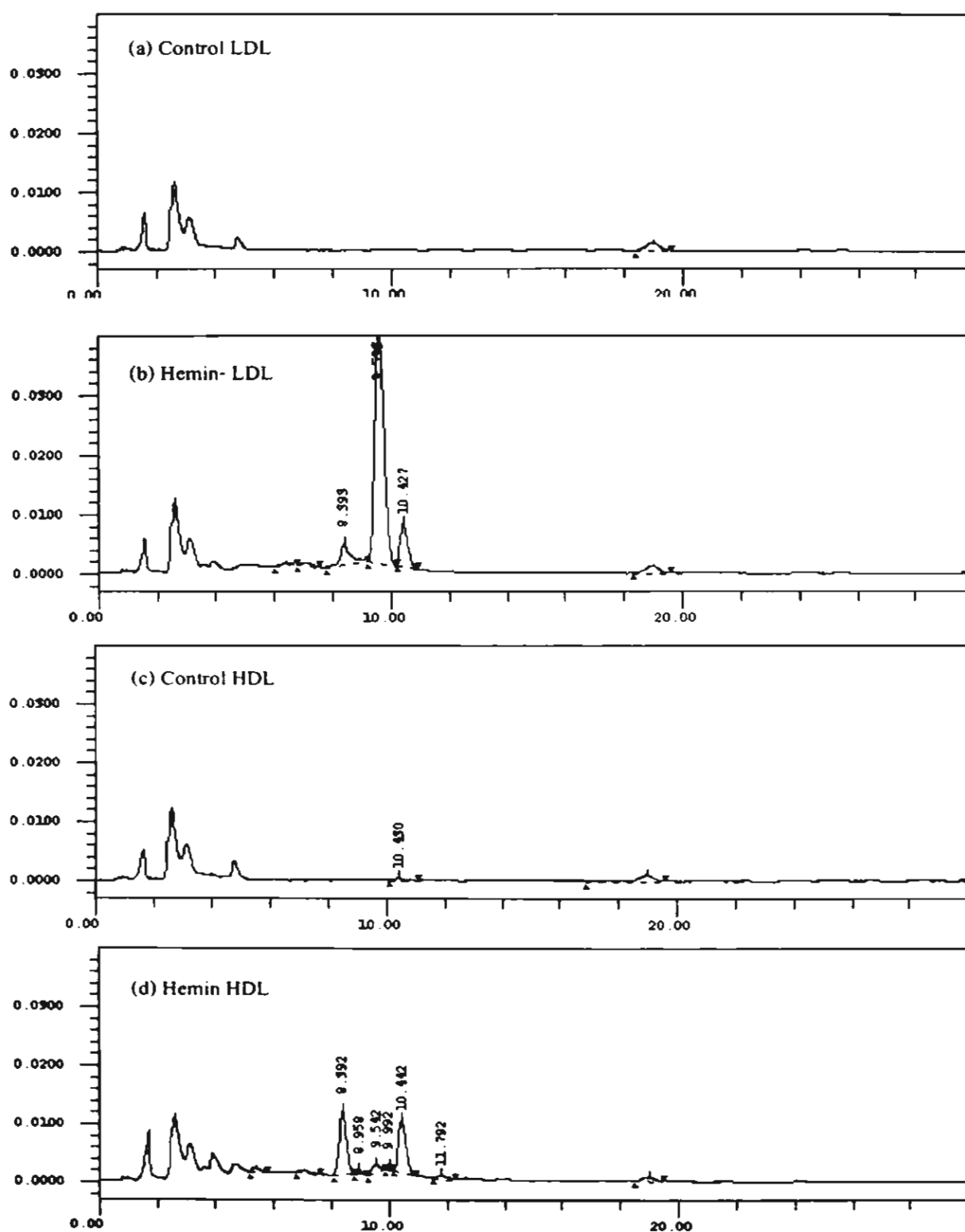
ตารางที่ 3.1 แสดงระดับวิตามินอี และการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันในไลโปโปรตีนจากพลาสมาที่เติมด้วย hemin หรือ Fe-NTA

Parameters	Control-plasma	Hemin-plasma	Fe-NTA-plasma
Plasma			
α -tocopherol (nmol/ml)	15.2 $\pm$ 6.0	3.61 $\pm$ 3.58**	12.9 $\pm$ 6.4
LDL			
Order parameter (S)	0.668 $\pm$ 0.014	0.800 $\pm$ 0.015**	0.788 $\pm$ 0.009**
Anisotropy (TMA-DPH)	0.286 $\pm$ 0.003	0.295 $\pm$ 0.004	0.295 $\pm$ 0.003
Motion parameter (τ)	19.45 $\pm$ 1.74	21.10 $\pm$ 0.54	21.96 $\pm$ 0.39
Anisotropy (DPH)	0.220 $\pm$ 0.008	0.222 $\pm$ 0.016	0.200 $\pm$ 0.009
HDL			
Order parameter (S)	0.684 $\pm$ 0.015	0.682 $\pm$ 0.009	0.657 $\pm$ 0.023
Anisotropy (TMA-DPH)	0.289 $\pm$ 0.004	0.294 $\pm$ 0.006	0.286 $\pm$ 0.004
Motion parameter (τ)	29.88 $\pm$ 1.18	31.95 $\pm$ 1.002	27.96 $\pm$ 3.95
Anisotropy (DPH)	0.188 $\pm$ 0.003	0.217 $\pm$ 0.006***	0.191 $\pm$ 0.008

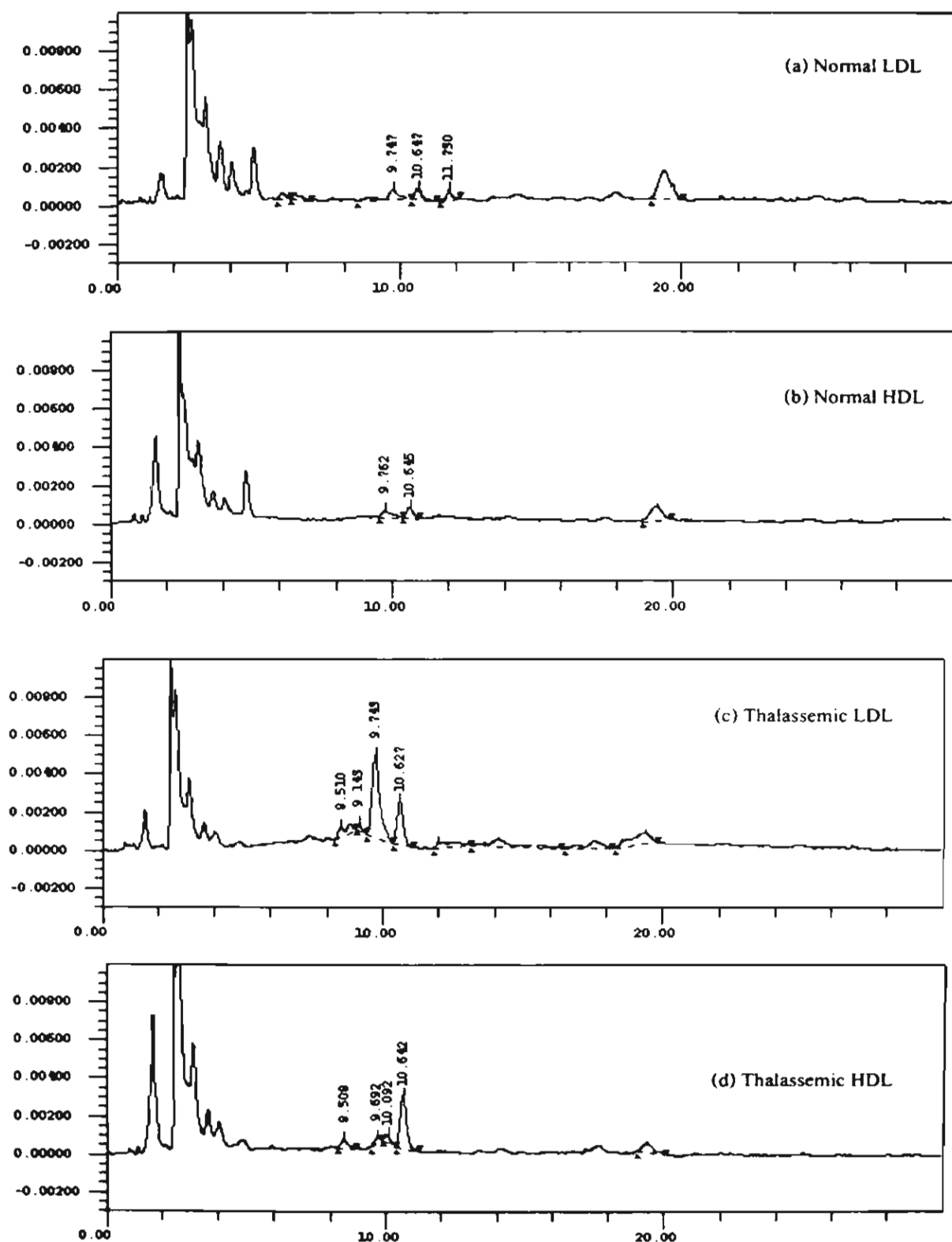
Mean $\pm$ SD (n=3-6) ** p<0.01, ***p<0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 3.1 โครมาโตแกรม HPLC ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตรของ Standard linoleate hydroperoxide (a; retention time = 9.8 นาที) และ oxidized lipids (b; retention time = 10.7 นาที)



รูปที่ 3.2 โครมาโตแกรม HPLC ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตรของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำและความหนาแน่นสูงที่แยกจากพลาสมาควบคุม (a,b) และพลาสมาที่เติมด้วย hemin ความเข้มข้น 150 μM (c,d)

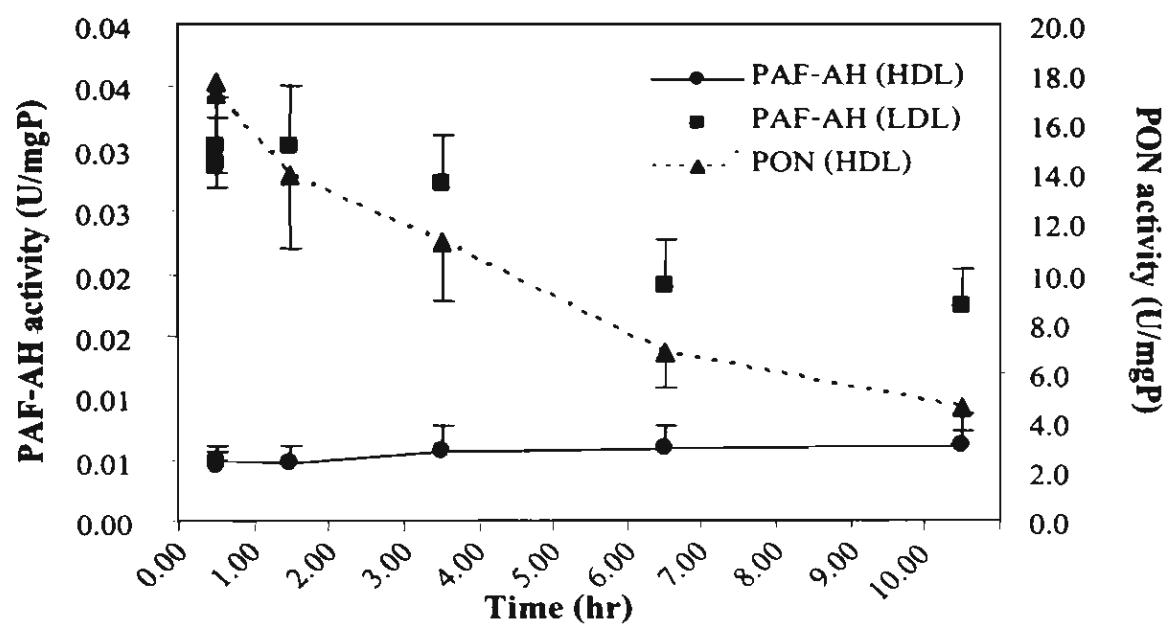


รูปที่ 3.3 โครมาโตแกรม HPLC ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตรของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำและความหนาแน่นสูงที่แยกจากพลาสมาคนปกติ (a,b) และพลาสมาผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (c,d)

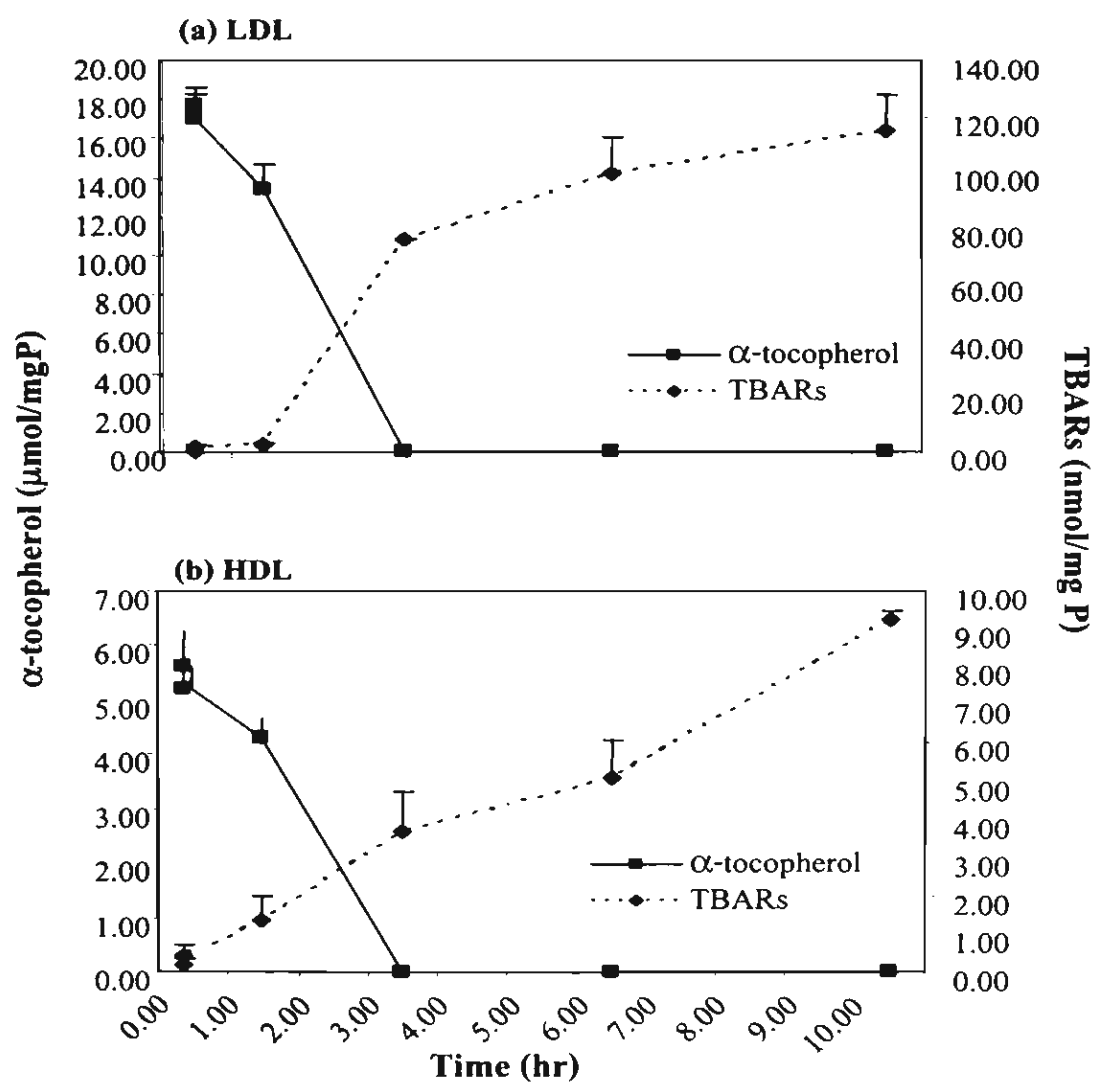
3.1.2 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ PAF-AH และ PON ในไลโปโปรตีนเมื่อกระตุ้นปฏิกิริยา oxidative stress ด้วย hemin

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนั้นลดลงเมื่อมีปฏิกิริยา oxidative stress (รูปที่ 3.4) โดยพบว่าการทำงานของเอนไซม์ PON ใน HDL จะลดลงอย่างรวดเร็วในขณะที่การทำงานของเอนไซม์ PAF-AH ใน HDL ไม่มีการเปลี่ยนแปลง สำหรับใน LDL นั้นไม่มีเอนไซม์ PON พบการทำงานของเอนไซม์ PAF-AH จะเริ่มลดลงหลังจากระดับวิตามินอีหมดไป เมื่อพิจารณาการเพิ่มขึ้นของระดับ oxidative stress (TBARs) จะพบว่าใน LDL นั้น TBARs จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากระดับวิตามินอีหมดไป (รูปที่ 3.5) ในขณะที่ระดับ TBARs ใน HDL เพิ่มขึ้นในอัตราที่ช้ากว่า นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีใน LDL คือมีการลดลงของระดับ CA และ CL ซึ่งอยู่ในส่วนแกนของไลโปโปรตีน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ใน HDL (รูปที่ 3.6)

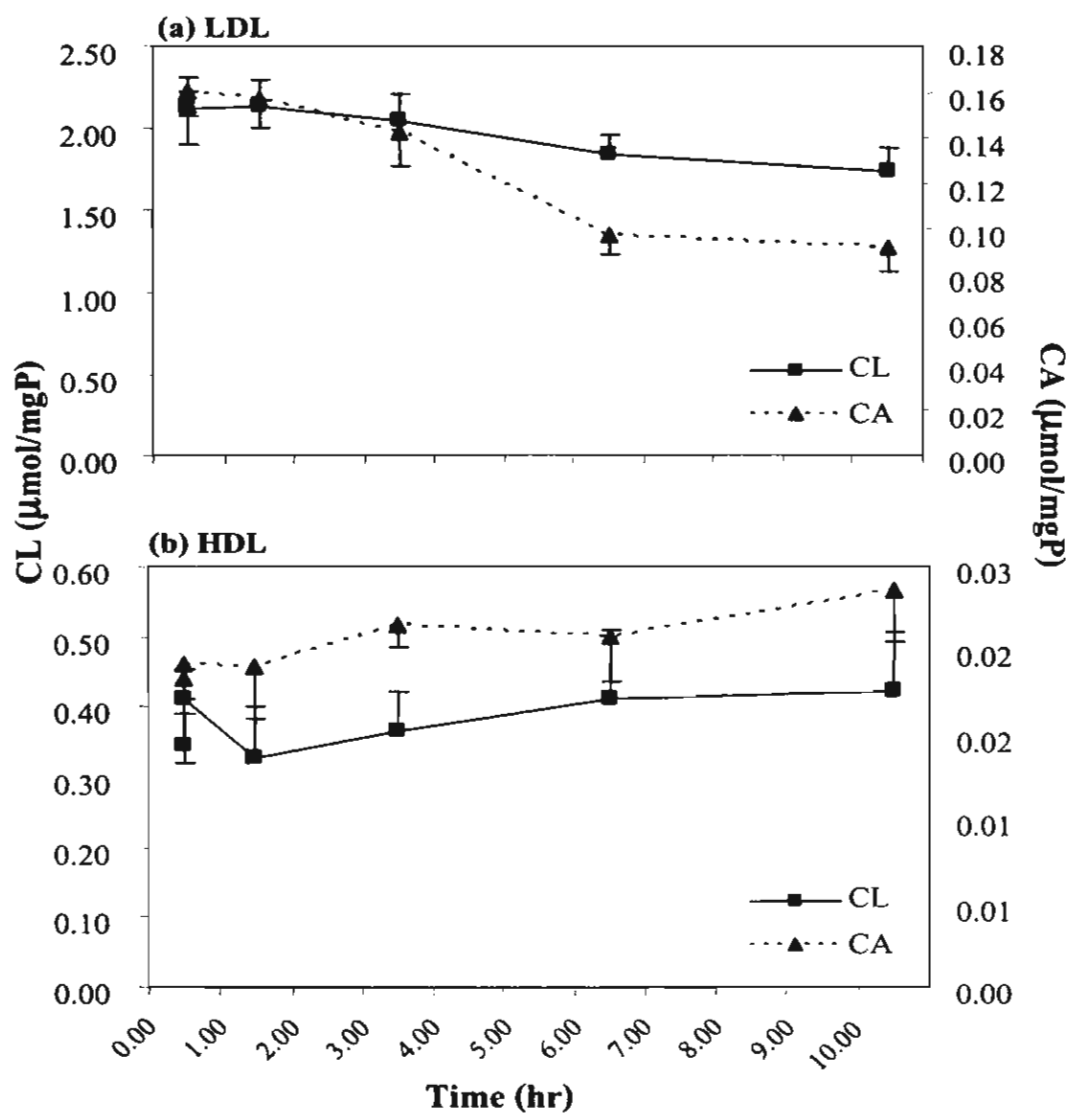
จากผลการทดลองนี้อาจสรุปได้ว่าเอนไซม์ PON ซึ่งมีหน้าที่กำจัด hydroperoxide นั้นเป็นแอนติออกซิเดนท์เอนไซม์ที่สำคัญใน HDL ช่วยเสริมการทำงานของวิตามินอี ในการป้องกันการเกิด lipid peroxidation ในไลโปโปรตีน เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์นี้มีความไวต่อปฏิกิริยา oxidative stress ในภาวะโรคเช่นธาลัสซีเมียการลดลงการทำงานของเอนไซม์นี้น่าจะเป็นเหตุหนึ่งของการเกิดความผิดปกติของหลอดเลือด



รูปที่ 3.4 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ PAF-AH ใน LDL และ HDL และการทำงานของเอนไซม์ PON ใน HDL หลังจากกระตุ้นปฏิกิริยา oxidative stress โดย hemin



รูปที่ 3.5 การเปลี่ยนแปลงระดับวิตามินอี และ TBARs ใน LDL (a) และ HDL (b) หลังจากกระตุ้นปฏิกิริยา oxidative stress โดย hemin



รูปที่ 3.6 การเปลี่ยนแปลงระดับ CA และ CL ใน LDL (a) และ HDL (b) หลังจากกระตุ้นปฏิกิริยา oxidative stress โดย hemin

V วิจารณ์ผลการทดลอง

ภาวะความผิดปกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย นั้น ผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่าน่าจะเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำด้วยสารประกอบเหล็ก จากศึกษาคุณสมบัติของไลโปโปรตีนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดเบต้า/ฮีโมโกลบิน อี นั้นพบว่า ไลโปโปรตีนทั้ง LDL และ HDL นั้นมีการเปลี่ยนแปลงทั้งคุณสมบัติองค์ประกอบทางเคมี การเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมัน และการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดชันเช่น ไซม์ ซึ่งได้แก่ platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) และ paraoxonase (PON) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์กับภาวะเหล็กเกิน ระดับวิตามิน อี และระดับความรุนแรงของโรค

สำหรับการเปลี่ยนแปลงในองค์ประกอบทางเคมีนั้นจะเห็นว่า ปริมาณไขมันที่อยู่ในส่วนแกนนั้นมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากและมีนัยสำคัญได้แก่ไตรกลีเซอไรด์ (TG) และคลอเรสเตอรอลในรูปเอสเตอร์ (cholesteryl esters) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอสเตอร์ของกรดไขมันที่มีพันธะคู่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ cholesteryl arachidonate (CA) และ cholesteryl linoleate (CL) ซึ่งมีพันธะคู่จำนวน 4 และ 2 ตามลำดับ เช่นเดียวกันสำหรับค่าการเคลื่อนไหวของไขมันในระดับโมเลกุล ในบริเวณแกนนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญมากกว่าที่ผิว ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของไลโปโปรตีนทั้งสองชนิดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย นั้นเกิดขึ้นในบริเวณแกนมากกว่าที่ผิว

จากผลการทดลองในหลอดทดลอง ได้ผลในทำนองเดียวกันคือ พบการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีและการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันในบริเวณแกน มากกว่าที่ผิวของไลโปโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่า hemin มีประสิทธิภาพสูงกว่า Fe-NTA ในการกระตุ้นให้การเปลี่ยนแปลงดังกล่าว และการเปลี่ยนแปลงในไลโปโปรตีนอันเนื่องจาก hemin นั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ lipid peroxidation ดังที่เห็นได้จากการเพิ่มขึ้นของ lipid peroxide และ oxidized lipids จากการตรวจวัดโดยวิธี HPLC (การทดลองที่ 3) การทดลองนี้ยังสนับสนุนบทบาทของ hemin ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียอีกด้วย

เมื่อใช้เทคนิค spin labeling โดยการตรวจวัดด้วย ESR spectroscopy สามารถจะอธิบายกลไกที่เกิดขึ้นในการศึกษาไลโปโปรตีนของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และไลโปโปรตีนในหลอดทดลอง โดยเทคนิคนี้แสดงให้เห็นว่า hemin สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่า Fe-NTA และตำแหน่งของปฏิกิริยาก็น่าจะอยู่ในส่วนของไขมันที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เนื่องจากการวิจัยนี้ใช้ spin probe 2 ตัวพบว่าปฏิกิริยาอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในตำแหน่ง hydrocarbon ที่ 16 เร็วกว่าตำแหน่งที่ 5 ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า hemin ซึ่งเป็นสารประกอบเหล็กที่ละลายในไขมันสามารถผ่านเข้า

ไปในส่วนลึกของไลโปโปรตีนและกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ในบริเวณนั้น (31) และเนื่องจากในส่วนในของไลโปโปรตีนจะเป็นบริเวณที่มีพันธะคู่ของกรดไขมันอยู่หนาแน่น ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระจึงเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลที่มีพันธะคู่ ได้แก่ CA และ CL เป็นต้น แต่ในขณะเดียวกันเหล็กที่อยู่ในรูป ferric (Fe^{3+}) เกาะในบริเวณผิวของไลโปโปรตีนเท่านั้น (32)

มีงานวิจัยหลายชิ้นที่พบว่า การเปลี่ยนแปลงของไลโปโปรตีนโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการกระตุ้นจากเอนไซม์ lipoxygenase (33) หรือโดย copper (34) หรือแม้แต่จาก atherosclerotic lesion (35) พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางเคมีนั้นเกิดขึ้นที่ส่วนแกนก่อนได้แก่การเปลี่ยนแปลงของ cholesteryl ester ได้ผลิตเป็น oxidized arachidonic acid และ oxidized linoleic acid ซึ่งเชื่อกันว่าถ้ามีการสะสมของสารเหล่านี้ในไลโปโปรตีนก็จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เร็วขึ้นและสุดท้ายจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟอสโฟลิปิดตามมา ผลผลิตของฟอสโฟลิปิดนั้นส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ในรายงานนี้ก็พบว่า มีผลผลิตของ oxidized arachidonic acid และ oxidized linoleic acid ในไลโปโปรตีนของผู้ป่วยธาลัสซีเมียและในไลโปโปรตีนที่แยกจากพลาสมาที่เติมด้วย hemin ร่วมกับผลการทดลองที่พบโดยวิธี spin labeling และ ESR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถจะอธิบายเหตุการณ์ที่พบในหลอดทดลองได้

HDL มีหน้าที่ป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว โดยทำหน้าที่ขนส่ง cholesterol ส่วนเกินจากเซลล์และไลโปโปรตีนชนิดอื่นกลับเข้าไปทำลายในตับ และมีบทบาทเป็น antioxidant โดยการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างเช่น paraoxonase (PON) และ PAF acylhydrolase (PAF-AH) เป็นต้น ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ LDL ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว ดังนั้นถ้ามี HDL ถูกออกซิเดชันโดยปฏิกิริยาอนุมูลอิสระจะส่งผลให้การทำงานของ HDL ผิดปกติ และส่งผลให้เกิดภาวะความผิดปกติต่างๆตามมา (36)

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ PON ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียนั้นลดลงประมาณ 50 % ของคนปกติ เอนไซม์ PON นี้จะอยู่ใน HDL เท่านั้น และมีหน้าที่กำจัด hydroperoxide ถ้าการทำงานของเอนไซม์นี้ลดลงน่าจะทำให้มีการสะสมของ hydroperoxide เพิ่มขึ้นเป็นเหตุให้มีปฏิกิริยาอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นด้วย การศึกษานี้ยังพบว่า เอนไซม์ PON จะถูกสูญเสียการทำงานอย่างรวดเร็วในภาวะ oxidative stress ซึ่งในที่นี้ใช้ hemin เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยา การสูญเสียการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้อาจอธิบายได้โดยสองกลไกคือ ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระมีผลโดยตรงต่อการทำลายเอนไซม์ (37) หรืออีกกลไกหนึ่งคือการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี และการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันส่งผลทางอ้อมให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนแปลง (38) ดังเห็นได้ว่าการทำงานของเอนไซม์ PON มีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนไหวในระดับโมเลกุลของไขมันด้วย

ในกรณีของเอนซิม PAF-AH ซึ่งพบได้ทั้งใน LDL และ HDL นั้น การทำงานของเอนซิมชนิดนี้สูงขึ้นในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย แต่ผลการทดลองในหลอดทดลองพบว่าเอนซิมนี้ก็ถูกทำลายได้ในภาวะ oxidative stress ได้เช่นกัน การเปลี่ยนแปลงของเอนซิมในผู้ป่วยธาลัสซีเมียน่าจะเกิดจากการปรับตัวเพื่อต้านภาวะ oxidative stress และนอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของการทำงานของเอนซิม PAF-AH มีรายงานในผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อ หรือมีภาวะ hyperbilirbinemia (39) ซึ่งผู้ป่วยธาลัสซีเมียมักมีภาวะเหล่านี้ด้วยเช่นกัน

จากการทดลองในหลอดทดลอง และการทดลองโดยใช้เทคนิค ESR พบว่าการเปลี่ยนแปลงต่างๆรวมทั้งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระนั้นเกิดขึ้นใน LDL ได้ง่ายกว่าใน HDL กล่าวคือในอัตราการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เท่ากันใน LDL นั้นใช้ความเข้มข้นของ hemin ต่ำกว่าเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยา (การทดลองที่ 1) และพบว่ามีอัตราการลดลงอย่างรวดเร็วของ CA และ CL ทั้งการเพิ่มขึ้นของระดับ TBARs อย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับ HDL (การทดลองที่ 3) ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจาก HDL นั้นมีเอนซิม PON เป็นองค์ประกอบ ซึ่งทำงานเสริมกับวิตามิน อี ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในไลโปโปรตีน

ในการทดลองที่มี LDL และ HDL อยู่ร่วมกัน HDL สามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระใน LDL ได้ กล่าวคือโดยใช้เทคนิค ESR เมื่อเติม HDL ลงใน LDL ที่ติดด้วย spin probe แล้วติดตามอัตราของปฏิกิริยาอนุมูลอิสระพบว่า HDL สามารถลดอัตราการเกิดอนุมูลอิสระใน LDL ได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) จากงานวิจัยอื่นๆของผู้วิจัยพบว่าในกรณีที่มี LDL และ HDL อยู่ร่วมกันเช่นในพลาสมาที่เติม hemin หรือในธาลัสซีเมีย จะพบการเปลี่ยนแปลงต่างๆใน HDL มากกว่าใน LDL (15) ซึ่งทำให้สรุปได้ว่าในภาวะร่างกายนั้น HDL มีหน้าที่สำคัญในการปกป้อง LDL ให้อยู่ในภาวะปกติ เพราะถ้ามี oxidized LDL เกิดขึ้นในร่างกายมากขึ้นแล้วจะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการทำงานของเกร็ดเลือด ผนังหลอดเลือด นำมาสู่ความผิดปกติของหลอดเลือดในที่สุด

โดยสรุป งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิค spin labeling โดยใช้ ESR spectroscopy เพื่ออธิบายกลไกของการเปลี่ยนแปลงต่างๆในไลโปโปรตีนอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ข้อมูลเกี่ยวกับตำแหน่งการเกิดอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีน ชนิดของสารประกอบหลักในการกระตุ้นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ร่วมกับข้อมูลที่ได้จากไลโปโปรตีนของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และไลโปโปรตีนในหลอดทดลองสามารถนำมาอธิบายการเปลี่ยนแปลงต่างๆทางเคมี กายภาพ และการทำงานของไลโปโปรตีนในผู้ป่วยได้ นอกจากนี้การใช้เทคนิค spin labeling โดยใช้ ESR spectroscopy อาจมีประโยชน์นำมาใช้เป็นวิธีในการประเมินประสิทธิภาพของของสารแอนติออกซิเจนต์ และยาขับเหล็กหรือยาอื่นๆ ที่จะใช้ป้องกันความผิดปกติของหลอดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้ต่อไป

VI บรรณานุกรม

1. Sonakul, D., Suwanagool, P., Sirivaidyapong, P., and Fucharoen, S. (1988) Distribution of pulmonary thromboembolism lesions in thalassemic patients. *Birth Defects*, 23, 375-384.
2. Sonakul, D., Pacharee, P., Laohap, T., Fucharoen, S. and Wasi, P. (1980) Pulmonary artery obstruction in thalassemia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 11, 516-523.
3. Wong, V., Yu, Y.L., Liang, R.H.S., Tso, W.K., Li, A.M.C. and Chan, T.K. (1990) Cerebral Thrombosis in β -thalassemia/Hemoglobin E disease. *Stroke*, 21, 812-816.
4. Pascher, F. and Keen, R. (1957) Ulcer legs in Cooley's anemia. *New England Journal of Medicine*, 256, 1220-1222.
5. Butthep, P., Bunyaratvej, A., Funahara, Y., Kitaguchi, H., Fucharoen, S., Sata, S. and Bhamarapravati, N. (1995) Alterations in vascular endothelial cell-related plasma proteins in thalassemic patients and their correlation with clinical symptoms. *Thrombosis and Haemostasis*, 74, 1045-1049.
6. Chantharaksri, U., Tonsuwonnont, W., Fucharoen, S. and Wasi, P. (1992) Pathogenesis of hypoxemia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 23 (Suppl 2), 32-35.
7. Unchern, S., Laoharuangpanya, L., N. Phumala, N et al. (2003) The effect of vitamin E on platelet activity in β -thalassemia patients. *British journal of Haematology*, 123, 738-744.
8. Berliner, J.A., and Heinecke, J.W. (1996) Role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical in Biology and Medicine*, 20, 707
9. Livrea, M.A., Tesoriere, L., Maggio, A., Arpa, D.D., Pintauro, A.M. and Pedone, E. (1998) Oxidative modification of low density lipoprotein and atherogenic risk in β -thalassemia. *Blood*, 92, 3936-3934.
10. Tesoriere, L., Arpa, D.D., Maggio, A., Giaccone, V., Pedone, E. and Livrea, M.A. (1998) Oxidation resistance of LDL is correlated with vitamin E status in β -thalassemia intermedia. *Atherosclerosis*, 137, 429-435.
11. Luechapudiporn, R., Morales, N.P., Fucharoen, S., and Chantharaksri U. Cholesteryl esters in lipoproteins as a marker of clinical severity of β -thalassemia/Hemoglobin E disease. Submitted.
12. Phumala, N., Porasuphatana, S., Unchern, S., Pootrakul, P., Fucharoen, S. and Chantharaksri, U. (2003) Hemin: a possible cause of oxidative stress in blood circulation of β -thalassemia Hemoglobin E disease. *Free Radical Research*, 37, 129-135.

13. Miller, Y., and Shaklai, N. (1999) Kinetic of hemin distribution in plasma reveals its role in lipoprotein oxidation. *Biochimica Biophysica Acta*, 1454, 153-164.
14. Bella, G., Jacob, H., Eaton, J., Belcher, J. and Vercellotti, G. (1991) Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 11, 1700-1711.
15. Morales, N.P. Chalermchoung, C., Yamanont, P. Uncham, S. and Chantharaksri U. High density lipoprotein as a target lipoprotein for hemin binding and oxidation in human plasma. In preparation.
16. Aliaga, C., Lissi, E.A., Augusto, O. And Linares, E. (2003) Kinetics and mechanism of the reaction of a nitroxide radical (Tempol) with a phenolic antioxidant. *Free Radical Research*, 37, 225-230.
17. Saphier, S., Silberstein, T., Likhtenshtein, G.I. et al. (2003) The reduction of a nitroxide spin label as a probe of human blood antioxidant properties. *Free Radical Research*, 37, 301-308.
18. Utsumi, H. and Yamada, K. (2003) In vivo electron spin resonance-computed tomography/nitroxyl probe technique for non-invasive analysis of oxidative injuries. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 416, 1-8.
19. Koter, J., Franiak, I., Strychalaska, K., Broncel, M. and Chojnowska-Jezierska, J. (2004) Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36, 205-215.
20. Bruch R.C. and Thayer W.S. (1983) Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance. *Biochimica et Biophysic Acta*, 733, 216-222.
21. Bales, B.L., Lesin E.S. and Oppenheimer, S.B. (1977) On cell membrane lipid fluidity and plant lectin agglutinability. Aspin label study of mouse ascite tumor cells. *Biochimica et Biophysic Acta*, 465, 400-407.
22. Seta, K., Nakamura, H., and Okuyama, T. (1990) Determination of α -tocopherol, free cholesterol, esterified cholesterol and triacylglycerols in human lipoproteins by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 515, 585-589.
23. Zaspel, B. and Csallany, A. (1983) Determination of α -tocopherol in tissues and plasma by high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 130, 146-150.
24. Asakawa, T. and Matsushita, S. (1980) Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxide. *Lipids*, 15, 137-140.

25. Uchiyama, M. and Mihara, M. (1978) Detection of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric test. *Analytical Biochemistry*, 86,271-278.
26. Simson, R. and Peters, T.J. (1990) Forms of soluble iron in mouse stomach and duodenal lumen; significance of mucosal uptake. *British Journal of Nutrition*, 63, 79-89.
27. Aarsman, A.J., Neys, F.W. and van den Bosch, H. (1991) Catabolism of platelet-activating factor and its acyl analog. Differentiation of the activities of lysophospholipase and platelet-activating factor acetylhydrolase. *European Journal of Biochemistry*, 200, 187-193.
28. Gowri, M.S., van der Westhuyzen, D.R., Bridges, S. and Anderson, J.W. (1999) Decreased protection by HDL from poorly control type 2 diabetic subjects against LDL oxidation may be due to the abnormal composition of HDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19, 2226-2233.
29. Ben-Yashar, V. and Barenholz Y. (1991) Characterization of the core and surface of human plasma lipoproteins. *Chem Phys Lipids*, 60, 1-14.
30. Winichagoon, P., Fucharoen, S., Chen, P. and Wasi, P. (2000). Genetic factors affecting clinical severity in β -thalassemia syndrome. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 22, 573-580.
31. Nishida, T. And Kummerow, F. (1962) Interaction of low density lipoproteins of serum with hemin. *Journal of lipid Research*, 3, 448-455.
32. Tribble, D.L., Chu, B.M. Levine, G.A., Krauss, R.M. and Gong, E. (1996) Selective resistance of LDL core lipids to iron-mediated oxidation implication for the biological properties of iron-oxidized LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 16,1580-1587.
33. Belkner, J., Stender, H. and Kuhn, H. (1998) The rabbit 15-lipoxygenase preferentially oxygenates LDL cholesterol ester, and this reaction does not require vitamin E. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 232225-23232.
34. Lenz, M.L., Hughes, H., Mitchell, J.R., et al. (1990) Lipid hydroperoxy and hydroxyl derivatives in copper-catalyzed oxidation of low density lipoprotein. *Journal of lipid Research*, 31, 1043-1050.
35. Kuhn, H., Belkner, J., Wiesner, R., Schewe, T, Lankin, V.Z. and Tikhaze, A.K. (1992) Structure elucidation of oxygenated lipids in human atherosclerotic lesions. *Eicosanoids*, 5, 17-22.
36. Francis, G. (2000) High density lipoprotein oxidation: in vitro susceptibility and potential in vivo consequences. *Biochimica et Biophysic Acta*, 1483, 217-235.

37. Jaouad, L., Milochevitch, C. and Khalil, A. (2003) PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radical Research*, 37, 77-83.
38. Girona, J., La Ville, A.E. Sola, A., Motta, C. And Masana, L. (1997) Decrease fluidity of oxidized high density lipoprotein: Its relation to cholesterol efflux. *Atherosclerosis*, 134, 222.
39. Tjoelker, L.W. and Stafforini, D.M. (2000) Plate-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488: 102-123.

ผลงานจากโครงการ

เสนอผลงาน

1. เสนอผลงานแบบ Oral presentation:

Morales, N.P. ESR studies of hemin induced free radical reaction in lipoproteins. The 1st Asian Symposium for Pharmaceutical Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan. 30th-31st January, 2004.

2. เสนอผลงานแบบ Poster presentation:

Morales, N.P. and Chantharaksri, U. A Novel application of ESR spin labeling technique: Studies of kinetic and site of free radical reaction in lipoproteins. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. กาญจนบุรี, 14-16 มกราคม 2548.

3. เสนอผลงานแบบ Poster presentation:

Wongoganawong, D., Chalermchoung, C., Unchern, S., Chantharaksri, U. and Morales, N.P. Modification of paraoxonase (PON) and platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activities in hemin-induced lipoprotein oxidation. Proceeding of 27th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting, Thai Journal of Pharmacology, 27 (1), 62.

การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆทั้งในและต่างประเทศ

Prof. Hedeo Utsumi, Faculty of Pharmaceutical Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

ปรึกษาเรื่องการพัฒนาการใช้เทคนิค spin labeling โดยใช้ ESR ในการตรวจสอบตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในไลโปโปรตีน ในระหว่างวันที่ 4-5 กุมภาพันธ์ 2547

ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะตีพิมพ์

1. Morales, N.P. Chalermchoung, C. and Chantharaksri, U. A Novel application of ESR spin labeling technique: Studies of kinetic and site of free radical reaction in lipoproteins. Free Radical in Biological and Medicine. *In preparation.*
2. Morales, N.P. Chalermchoung, C. Fucharoen, S. and Chantharaksri, U. Chemical and physical characterization of lipoprotein in β -thalassemia/hemoglobin E patients. Lipids. *In preparation.*

ภาคผนวก

Abstract

1. Morales, N.P. ESR studies of hemin induced free radical reaction in lipoproteins. The 1st Asian Symposium for Pharmaceutical Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan. 30th-31st January, 2004.
2. Morales, N.P. and Chantharaksri, U. A Novel application of ESR spin labeling technique: Studies of kinetic and site of free radical reaction in lipoproteins. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. กาญจนบุรี, 14-16 มกราคม 2548.
3. Wongoganawong, D., Chalermchoung, C., Unchern, S., Chantharaksri, U. and Morales, N.P. Modification of paraoxonase (PON) and platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activities in hemin-induced lipoprotein oxidation. Proceeding of 27th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting, Thai Journal of Pharmacology, 27 (1), 62.

2A-05**ESR STUDIES OF HEMIN INDUCED FREE RADICAL REACTION IN LIPOPROTEINS**

Noppawan Phumala Morales, Ph.D.

Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University,
Bangkok, Thailand.

INTRODUCTION

Atherosclerosis-related vascular complications such as pulmonary thromboembolism, cerebral thrombosis and chronic leg ulcer are common in β -thalassemia/hemoglobin E (β -thal-Hb E) patients, which is a most prevalent type of thalassemia in Thailand. Oxidation of lipoproteins is considered to play a major role in development of atherosclerosis. The relationship between oxidatively modified low density lipoprotein (LDL) and atherogenesis risk has been reported in β -thalassemia¹. Our previous studies have demonstrated the evidences that abnormal lipoproteins in β -thal Hb E related to iron induced oxidative stress: (1) high iron content with high levels of oxidative stress markers were present in LDL and HDL from the patients, (2) long term treatment of iron chelator (LI) in the patients improved quality of lipoproteins, especially HDL.

We have proposed that hemin may responsible for lipoprotein oxidation in the patients². By low temperature electron spin resonance (ESR) spectroscopy has revealed the high concentration of hemin (iron (III)-protoporphyrin (IX)) in serum of the patients. Hemin was present with the level ranging from 50-280 μ M. Its concentration was showed a good correlation with pro-oxidant activity in serum of the patients. The results suggested that serum hemin readily catalyzed free radical reaction and it may responsible for atherogenesis in β -thal HbE patients. Another research of our group³ supported this hypothesis, it recently reported that the lipid oxidative products found in HDL from the patients and from hemin induced oxidation *in vitro* were the same.

In this study, we attempt to apply ESR spin label technique to identify site of hemin induced free radical reaction in lipoproteins. Paramagnetic fatty acid 5- and 16-doxyl stearic acid (5- and 16-DS) were used to label phospholipids layer near polar head group and deeper hydrophobic region of lipoproteins, respectively. This technique may useful for studying free radical reaction in complex bio-molecules such as lipoproteins.

MATERIALS AND METHODS**Chemicals**

Hemin (from bovine) was obtained from Sigma Chemical (St Louis, MO). Stock solution of hemin was freshly prepared in 0.05 N NaOH and diluted to 2 mM by 10 mM PBS pH 7.4. Concentration of hemin stock solution was checked by reading absorbance at 385 and $\epsilon = 58.4 \text{ mmol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Paramagnetic fatty acid 5- or 16-doxyl stearic acid (5- and 16-DS) were used as spin probes. The stock of spin probes (0.05 mg/ml) were dissolved in methylene chloride and 50 μ l of the stock solution was dried under nitrogen gas in iron-free clean tubes.

Sample preparation and lipoprotein separation

Blood samples were obtained from single female volunteer. The EDTA plasma was incubated with hemin to final concentration 50, 100 and 150 μ M at 4 $^{\circ}$ C for 24 hrs. After incubation period, plasma lipoproteins were separated by sequential density gradient ultracentrifugation methods using TL-100 ultracentrifuge. LDL and HDL fraction were

obtained from the density between 1.019-1.063 g/ml and 1.063-1.024 g/ml, respectively. Lipoproteins were dialyzed against 10 mM PBS pH 7.4 for 24 hrs to remove salts and EDTA before using.

Site of hemin induced free radical reaction

The ESR spectrum of 5-doxyl stearic acid provide the information near the polar head group of phospholipid layer while that of 16-doxyl stearic acid provide the information at the deeper hydrocarbon position of phospholipids layer.

The 120 µg lipoprotein was incubated with dried spin probe at room temperature for 3 min with gentle mixing and then transferred to plastic tube. Free radical reaction was initiated by addition of 0.5 mM *tert*-buthyl hydroperoxide; the reaction consisted of labeled lipoprotein 50 µg in 10 mM PBS pH 7.4 and 0.5 mM *tert*-buthyl hydroperoxide. After addition of *tert*-buthyl hydroperoxide, ESR spectra were recorded versus time. Decreasing of the middle field signal height represented the rate of free radical production.

ESR setting

Spectroscopy was performed using X-band ESR (JEOL RX-2) spectrometer equipped with TE011 cavity. The microwave frequency was 9.4 GHz and the power was 10 mT. The amplitude of the 100 kHz field modulation were 0.250 mT and 0.125 mT for 5-DS and 16-DS, respectively. The external magnetic field was swept at scan rate of 5 mT/min and time constant 0.1 sec.

RESULTS AND DISCUSSION

After initiating free radical reaction with 0.5 mM *tert*-buthyl hydroperoxide, ESR signal height of the spin probes were markedly decreased in only HDL separated from hemin-containing plasma, indicating that hemin preferentially bound to HDL and catalyzed free radical reaction in the presence of hydroperoxide. This result corresponded with our previous result observed by low temperature ESR that signal of hemin at $g=6$ was detected only in HDL, but not LDL, separated from hemin-containing plasma.

Rate of ESR signal decay of 16-DS was higher than that of 5-DS, implying that the free radical reaction site should be near hydrophobic part of phospholipids layer of HDL. Moreover, the middle field signal line width of 16-DS was also decreased during the free radical reaction, suggesting the physico-chemical change in this part. Hemin may liberate free iron during the reaction because an iron chelator, desferrioxamine was able to inhibit the ESR signal decay.

This study demonstrated that ESR spin label technique is applicable to study free radical in complex bio-molecules such as lipoproteins. We found that hemin bound preferentially near hydrophobic part of phospholipids layer of HDL and may result in the physico-chemical change near this region. Hemin induced physico-chemical change in hydrophobic region of HDL may be a cause of atherogenesis in β -thal/Hb E patients.

References

1. Livrea, M.A., Tesoriere, A., Maggio, A., Arpa, D.D., Pintaudi, A.M. and Pedone E. Oxidative stress modification of low density lipoprotein and atherogenic risk in β -thalassemia. *Blood* 1998, 92, 3936-3934.
2. Phumala, N., Porasuphatana, S., Unchem, S., Pootrakul, P., Fucharoen, S., Chantharaksri, U. Hemin: a possible cause of oxidative stress in blood circulation of β -thalassemia/hemoglobin E disease. *Free Radical Res* 2003, 37, 129-135.
3. Lucchapudiporn, R. Characterization of lipoproteins in β -thalassemia/Hemoglobin E patients. Ph.D thesis, Mahidol University, 2003.

A novel application of ESR spin labeling technique: Studies of kinetic and site of free radical reaction in lipoproteins

Noppawan Phumala Morales* and Udom Chantharaksri

Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Abstract—Oxidative modification of low and high density lipoprotein (LDL and HDL) is believed to be crucial for the development of atherosclerotic vascular disease. Free radical reaction is an important process in the initiation of lipoprotein oxidation. Since lipoproteins are complex particles, consisting of hydrophobic lipid core and hydrophilic phospholipids surface, kinetic and site of free radical reaction in the specific region have not been elucidated.

In attempt to understand the process of free radical reaction in lipoproteins, ESR spin labeling technique was developed and applied. Paramagnetic fatty acids, 5- and 16-doxy stearic acid (5- and 16-DS), were used to label phospholipids layer near polar head group and the deeper hydrophobic region of lipoproteins, respectively. Characteristic of the ESR spectra showed that the spin labels were incorporated into lipoproteins at the desired sites. Hemin (20 μ M-200 μ M) and hydrogen peroxide or *tert*-buthyl hydroperoxide (0.5 mM-10 mM) was used as a system to induce free radical reaction. Decreasing of middle field ESR signal height was monitored versus time and the rate of signal decay was calculated.

The results demonstrated that the rate of ESR signal decay could represent the rate of free radical reaction in the specific site of lipoproteins. The rate of ESR signal decay depended on concentration of hemin and hydroperoxides. α -Tocopherol, an antioxidant, inhibited ESR signal decay, indicating that free radicals involved in signal decay. *tert*-Buthyl hydroperoxide was more potent than hydrogen peroxide in the induction of ESR signal decay, which may be explained by its lipophilicity. Interestingly, the rate of ESR signal decay of 16-DS was higher than that of 5-DS in all of the experimental conditions, suggesting that free radical reaction was rapidly produced near hydrophobic part of lipoprotein. Moreover, the rate of signal decay of 5- and 16-DS in LDL was about 3-5 folds higher than that in HDL, indicating the higher susceptibility of LDL to free radical damage.

In conclusion, ESR spin labeling technique is applicable to study kinetic and site of free radical reaction in micro-environment region of complex bio-molecules such as lipoproteins. This technique may useful for study kinetic of free radical reaction of oxidants and antioxidants in lipoproteins.

Keywords—Doxy stearic acid, ESR, Free Radical, Lipoproteins, Spin labeling

Output

1. Phumala Morales, N. and Chantharaksri, U. *Free Radica in Biology and Medicinel*, In preparation.

* Corresponding author. Tel.: 02 201 5508; fax: 02 354 7157; e-mail: scnpm@mahidol.ac.th

P19 MODIFICATION OF PARAOXONASE AND PLATELET-ACTIVATING FACTOR ACETYLHYDROLASE ACTIVITIES IN HEMIN-INDUCED LIPOPROTEIN OXIDATION

Wongrojanawong D, Chalermchoung C, Unchern S, Chantharaksri U, Phumala Morales N.

Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400.

Paraoxonase (PON) and platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) are antioxidant enzymes associated with the HDL particle. Their functions are known to protect lipoproteins from oxidative modification. PON activity has been showed to be modified in oxidized HDL and in oxidative related diseases such as atherosclerosis. Although PAF-AH activity has been also reported to be modified in several diseases, there was no evidence related to the oxidative stress conditions. Hemin, a degradative product of hemoglobin, has been reported as a potent oxidative inducer of lipoproteins in vitro. It has become a prime suspect to be responsible for lipoprotein oxidation in thalassemic patients because of its high concentration in the serum of patients. This study was, therefore, aimed to study kinetic of hemin induced oxidation of lipoproteins on the modification of PON (in HDL) and PAF-AH (in LDL and HDL) activities. The results clearly demonstrated that PON was more susceptible to hemin-induced oxidative stress than PAF-AH. In HDL, PON activity was rapidly decreased within 1 hr after incubation with hemin. The activity of PON was continuously decreased. Its activity was remained only 30 % after 10 hr of the incubation. On the other hand, PAF-AH activity was unchanged in HDL but only slightly reduced in LDL, about 20% after 10 hr of the incubation. Our results suggested that the loss of PON activity in hemin induced HDL oxidation may be relevant in vivo and could have an impact in thalassemia.