

บทคัดย่อ

ผลของเหล็กในเมมเบรนเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียต่อการทำลายฤทธิ์ยาอาร์ทีมิซินิน

ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์¹ นกมล ศิริธนารัตนกุล² ยงยุทธ บุทธวงศ์³

1. ภาควิชาจุลหารรณศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2. หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์คลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล 3. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

การดื้อต่อยาอาร์ทีมิซินินและสารอนุพันธ์ของเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมที่เลี้ยงในเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียทั้งชนิด HbH และ HbH/HbCS มีรายงานว่าเกิดจากคุณสมบัติของเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียที่สามารถลดประสิทธิภาพของยาในกลุ่มนี้ได้ โดยฮีโมโกลบิน เอช เป็นองค์ประกอบที่สำคัญอันหนึ่งในเซลล์เม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียที่สามารถจับยาและทำลายฤทธิ์ยาได้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า นอกจากฮีโมโกลบิน เอชแล้ว ฮีมในเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอีกอันหนึ่งที่มีส่วนในการทำลายฤทธิ์ยาในกลุ่มอาร์ทีมิซินิน จากการศึกษาประสิทธิภาพของยาในการฆ่าเชื้อมาลาเรียหลังจาก incubate ยากับเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียทั้งชนิดอัลฟาและเบตาและเม็ดเลือดแดงปกติพบว่าประสิทธิภาพของยาที่ incubate กับเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีของเม็ดเลือดแดงเบตาธาลัสซีเมียหรือเม็ดเลือดแดงปกติ โดยประสิทธิภาพของยาที่ลดลงมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณฮีมในเมมเบรน ($r^2 = 0.453$) แต่ไม่สัมพันธ์กับปริมาณเหล็กชนิดอื่นในเมมเบรนที่ไม่อยู่ในรูปฮีม (ferrozine reactive iron or non heme iron, $r^2 = 0.0001$) เมมเบรนของเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียชนิด HbH/HbCS มีปริมาณฮีมเป็นองค์ประกอบอยู่ (1.024 ± 0.601 mg/mg membrane protein) มากกว่าปริมาณฮีมในเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียชนิด Hb H เม็ดเลือดแดงเบตาธาลัสซีเมียหรือเม็ดเลือดแดงปกติ (0.326 ± 0.173 , 0.254 ± 0.255 และ 0.260 ± 0.087 mg/mg membrane protein ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$, Mann Whitney U-test) ในขณะที่เมมเบรนของเม็ดเลือดแดงเบตาธาลัสซีเมียมีเหล็กที่ไม่อยู่ในรูปฮีมประกอบอยู่ (11.12 ± 11.73 nmol/mg membrane protein) มากกว่าเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมีย (HbH = 5.64 ± 5.13 , HbH/HbCS = 6.60 ± 4.95 nmol/mg membrane protein ตามลำดับ) และเม็ดเลือดแดงปกติ (2.89 ± 1.93 nmol/mg membrane protein) อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.025$, Mann Whitney U-test) ในการศึกษากลไกการทำลายฤทธิ์ยาโดยใช้แบบจำลองเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติที่ถูก oxidized ด้วย phenylhydrazine ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครโมลาร์ เพื่อให้เมมเบรนมีพยาธิสภาพคล้ายเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ phenylhydrazine เซลล์แบบจำลองสามารถทำลายฤทธิ์ยาได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$, Sign Rank test) และตรวจพบปริมาณเหล็กในเมมเบรนทั้ง 2 รูปแบบเพิ่มขึ้น โดยสัดส่วนของปริมาณฮีมในเมมเบรนเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ phenylhydrazine มากกว่าปริมาณเหล็กที่ไม่อยู่ในรูปฮีม เนื่องจากฮีโมโกลบิน เอช เป็นฮีโมโกลบินที่สลายตัวภายใต้ภาวะ oxidative stress ได้ง่ายกว่าฮีโมโกลบินชนิดอื่นๆ ในเม็ดเลือดแดงที่ศึกษา ดังนั้น การสลายตัวของฮีโมโกลบิน เอช น่าจะก่อให้เกิดการเพิ่มของฮีมในเมมเบรนซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำลายฤทธิ์ยาในกลุ่มอาร์ทีมิซินินโดยเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมีย

Abstract

The effect of thalassemic membrane iron on artemisinin inactivation

Phantip Vattanaviboon¹, Noppadol Siritanaratkul² and Yongyuth Yuthavong³.

1 Faculty of Medical Technology, Mahidol University, 2 Faculty of Medicine, Mahidol University,

3 National Science and Technology Development Agency, Bangkok, Thailand.

α -Thalassemic erythrocytes both Hb H และ Hb H/Hb CS were reported to cause host-induced resistance of *Plasmodium falciparum* against antimalarial drugs, artemisinin and its derivatives. Binding of the drug to hemoglobin H and drug preactivation to inactive forms were previously demonstrated. This study showed an additional host factor, membrane heme, that may account in decreasing antimalarial activity of artemisinin. By studying the antimalarial activity of dihydroartemisinin, an artemisinin derivative, after incubating with normal and thalassemic (both α - and β -) red cell membranes. The results showed the correlation of relative drug ineffectiveness to heme content in red cell membranes ($r^2 = 0.453$) but not to ferrozine reactive iron or non heme iron content ($r^2 = 0.0001$). HbH/HbCS red cell membranes contained heme (1.024 ± 0.601 mg/mg membrane protein) with significantly higher amount than that in HbH, β -thalassemia/Hb E and normal red cell membranes (0.326 ± 0.173 , 0.254 ± 0.255 and 0.260 ± 0.087 mg/mg membrane protein, respectively, $p < 0.01$, Mann Whitney U-test). Whereas β -thalassemia/Hb E red cell membranes contained ferrozine reactive iron (11.12 ± 11.73 nmol/mg membrane protein) non-significantly greater than normal (2.89 ± 1.93 nmol/mg membrane protein) and α -thalassemic red cell membranes (Hb H = 5.639 ± 5.130 , Hb H/Hb CS = 6.600 ± 4.945 nmol/mg membrane protein, respectively, $p > 0.025$, Mann Whitney U-test). More explanation on the effect of membrane heme on antimalarial ineffectiveness, normal red blood cells were oxidized with phenylhydrazine (1, 10 and 100 μ M) to mimic thalassemic red blood cell membrane pathology. By treating normal red blood cells with phenylhydrazine, the higher concentration of phenylhydrazine used, the greater was the drug ineffectiveness ($p < 0.01$, Sign Rank test) as well as membrane heme and iron content. The increasing ratio of membrane heme content was higher than that of iron content. Hemoglobin H in α -thalassemic red blood cells was suggested to be more sensitive to oxidation than other hemoglobin types in the cells studied. Therefore, under oxidative stress, hemoglobin H was suggested to be denatured and caused greater membrane heme content which lead to relative artemisinin ineffectiveness against *Plasmodium falciparum* infecting α -thalassemic red blood cells.