



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลของเหล็กในเมมเบรนเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย
ต่อการทำลายฤทธิ์ยาอาร์ทีมิซินิน

The effect of thalassemic membrane iron on
artemisinin inactivation

โดย ผ.ศ. ดร. ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์ และคณะ

ธันวาคม 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลของเหล็กในเมมเบรนเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย
ต่อการทำลายฤทธิ์ยาอาร์ทีมิซินิน

The effect of thalassemic membrane iron on
artemisinin inactivation

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|----------------------------------|--|
| 1. ผ.ศ. ดร. ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์ | คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. ร.ศ. นพ. นกต สิริธนารัตนกุล | คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 3. ศ. ดร. ยงยุทธ ยุทธวงศ์ | สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยีแห่งชาติ |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย
ชุดโครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

บทคัดย่อ

ผลของเหล็กในเมมเบรนเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียต่อการทำลายฤทธิ์ยาอาร์ทีมิซินิน

ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์¹ นกมล ศิริธนารัตนกุล² ขงอุทธา พุทธวงศ์³

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

การคือต่อยาอาร์ทีมิซินินและสารอนุพันธ์ของเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมที่เลี้ยงในเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียทั้งชนิด HbH และ HbH/HbCS มีรายงานว่าเกิดจากคุณสมบัติของเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียที่สามารถลดประสิทธิภาพของยาในกลุ่มนี้ได้ โดยฮีโมโกลบิน เอช เป็นองค์ประกอบที่สำคัญอันหนึ่งในเซลล์เม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียที่สามารถจับยาและทำลายฤทธิ์ยาได้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า นอกจากฮีโมโกลบิน เอชแล้ว ฮีมในเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอีกอันหนึ่งที่มีส่วนในการทำลายฤทธิ์ยาในกลุ่มอาร์ทีมิซินิน จากการศึกษาประสิทธิภาพของยาในการฆ่าเชื้อมาลาเรียหลังจาก incubate ขากับเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียทั้งชนิดอัลฟาและเบตาและเม็ดเลือดแดงปกติพบว่าประสิทธิภาพของยาที่ 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.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ผลของเหล็กในเมมเบรนเม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียต่อการทำลาย
ฤทธิ์ยาอาร์ทีมิซินิน

(ภาษาอังกฤษ) The effect of thalassemic membrane iron on artemisinin inactivation

2. ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ : ผ.ศ. ดร. ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์

ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

10700 โทรศัพท์ 4197169 โทรสาร 4124110 e-mail: mtpvt@mahidol.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย : ร.ศ. นพ. นกมล ศิริธนารัตนกุล

หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์คลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล โทรศัพท์ 4197644 ต่อ 15

ที่ปรึกษาโครงการ : ศ. ดร. ยงยุทธ ยุทธวงศ์

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 73/1 ถนนพระรามที่หก ราชเทวี

กรุงเทพฯ 10400 โทรศัพท์ 6448150-4 ต่อ 128 โทรสาร 6448027-9

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย ขาด้านมาลาเรีย

หรือเสียชีวิตส่วนใหญ่ (80%) มีสาเหตุมาจากเชื้อพลาสมาโมเดียมฟิลิปปินส์(2) จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสมาโมเดียมฟิลิปปินส์ในห้องทดลองพบว่า เชื้อชนิดนี้มีความไวต่อภาวะ oxidative stress ซึ่งมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อลดลง(3) เซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติ เช่น ฮีโมโกลบิน เอส หรือผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จะเกิดภาวะ oxidative stress ได้ง่าย จึงพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อพลาสมาโมเดียมฟิลิปปินส์ลดลงเมื่อถูกเลี้ยงอยู่ในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติ(4,5) ภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นในเซลล์จัดเป็นกลไกในการป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียของเซลล์เหล่านี้

การรักษาโรคมาลาเรียในปัจจุบันจะใช้ยาต้านมาลาเรียมากกว่า 1 ชนิดเนื่องจากปัญหาการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียโดยเฉพาะเชื้อพลาสมาโมเดียมฟิลิปปินส์ ในกลุ่มยาต้านมาลาเรียที่ยังคงประสิทธิภาพในการรักษา อาร์ทีมิซินินและสารอนุพันธ์ยังใช้ได้ผลดีกับเชื้อพลาสมาโมเดียมฟิลิปปินส์ สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาคลอโรควิน กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มนี้จะทำให้เกิดภาวะ oxidative stress โดยมีเหล็กเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยา (6) ดังนั้นการใช้ยาในกลุ่มนี้ในการฆ่าเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติ น่าจะได้ผลดีกว่าเชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงปกติ อย่างไรก็ตาม การทดสอบฤทธิ์ยาในกลุ่มนี้ในห้องทดลองพบว่า มาลาเรียพลาสมาโมเดียมฟิลิปปินส์ที่เลี้ยงในเซลล์เม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียคือต่อยาในกลุ่มนี้เมื่อเทียบกับเชื้อชนิดเดียวกันที่เลี้ยงในเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ (7,8,9) จากการศึกษาพบว่า ปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกรณีนี้เกิดจาก เม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมีย (แม้ในภาวะที่ไม่มีเชื้อมาลาเรีย) มีความสามารถในการสะสมยาเข้าเซลล์ได้มากกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติ (8,9) อีกปัจจัยหนึ่งเกิดจากการที่ฤทธิ์ยาถูกทำลายเมื่อผ่านเข้า-ออกเซลล์เม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมีย(10,11) โดยฮีโมโกลบิน เอส มีส่วนเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการสะสมยา (โดยการจับกับยา) (9) และการทำลายฤทธิ์ยาของเซลล์ (10,11) อย่างไรก็ตาม การทดลองเพิ่มเติมสนับสนุนว่าเมมเบรน (ซึ่งอาจเป็นเหล็กในเมมเบรน) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำลายฤทธิ์ยาดังกล่าว (11) แม้ว่าในเม็ดเลือดแดงเบตาธาลัสซีเมียจะมีความผิดปกติที่เมมเบรนรวมทั้งมีเหล็กสะสมอยู่ในเมมเบรนเช่นเดียวกับในเซลล์เม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมีย แต่ปรากฏการณ์คือยาของเชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในเม็ดเลือดแดงเบตาธาลัสซีเมียไม่ชัดเจนอย่างไรในเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมีย (10,11) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพหุปัจจัยที่ต่างกันระหว่างอัลฟาธาลัสซีเมียและเบตาธาลัสซีเมีย ความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงเบตาธาลัสซีเมียเกิดจากการสลายตัวของสายอัลฟาโกลบินซึ่งเกิดขึ้นตั้งแต่ระยะเซลล์อ่อนในไขกระดูก อัลฟาโกลบินที่สลายตัวแล้วจะถูกกำจัดโดย reticuloendothelial system ในไขกระดูก (12,13) เมื่อเซลล์ออกสู่กระแสโลหิตจึงไม่มีการสลายตัวของสายอัลฟาโกลบินเพิ่มขึ้น ส่วนความผิดปกติในเซลล์เม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียเกิดจากสายเบตาโกลบินที่สลายตัว โดยปกติสายเบตา 4 สาย สามารถรวมตัวกันเองเกิดเป็นฮีโมโกลบิน เอส ซึ่งจะเสถียรกว่าสายอัลฟาในเม็ดเลือดแดงเบตาธาลัสซีเมีย ดังนั้นเซลล์ที่ออกสู่กระแสโลหิตจึงยังคงมีฮีโมโกลบิน เอส อยู่ ฮีโมโกลบิน เอส จะสลายได้ง่ายเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะ oxidative stress

(14) สมมติฐานที่อธิบายกลไกการทำลายฤทธิ์ยาที่เป็นไปได้คือ ในภาวะที่มียาอยู่ในเม็ดเลือดแดง อัลฟาธาลัสซีเมีย ภาวะoxidative stress ที่เกิดในเซลล์จะทำให้ฮีโมโกลบิน เอช สลายตัวและไปจับกับเมมเบรน ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่เมมเบรน (15) ยาที่อยู่บริเวณใกล้เคียงหรือที่จับอยู่กับฮีโมโกลบิน เอช อยู่ก่อนจะถูกทำลายโดยเหล็กที่เมมเบรนซึ่งน่าจะเป็นเหล็กในฮีมของสายเบตาโกลบินที่สลายตัว ซึ่งหากฮีโมโกลบิน เอช มีการสลายตัวมาก การทำลายฤทธิ์ยาน่าจะเกิดมาก วัตถุประสงค์ในการวิจัยนี้เพื่อการศึกษาผลของเหล็กในเมมเบรนเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียในการทำลายฤทธิ์ยาไคไฮโดรอาร์ทีมิซินิน (สารอนุพันธุ์ชนิดหนึ่งของยาอาร์ทีมิซินิน) โดยประเมินความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเหล็กทั้งชนิดเหล็กที่ไม่อยู่ในรูปฮีมและเหล็กในฮีมที่อยู่ในเมมเบรนเม็ดเลือดแดงกับการทำลายฤทธิ์ยาเนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์ของยาไคไฮโดรอาร์ทีมิซินินมีเหล็กเป็นตัวยุทธานุ (6)

8. วัตถุประสงค์

8.1. ทำการศึกษาผลของเหล็กในเมมเบรนเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียในการทำลายฤทธิ์ยาไคไฮโดรอาร์ทีมิซินิน เปรียบเทียบกับเมมเบรนเม็ดเลือดแดงเบตาธาลัสซีเมียและเม็ดเลือดแดงปกติ โดยวัดปริมาณเหล็กทั้งชนิดเหล็กที่ไม่อยู่ในรูปฮีมและเหล็กในฮีมที่อยู่ในเมมเบรนเม็ดเลือดแดง และหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเหล็กในเมมเบรนเม็ดเลือดแดงกับการทำลายฤทธิ์ยา

8.2. ศึกษากลไกการทำลายฤทธิ์ยาโดย oxidize เซลล์ปกติด้วยสาร phenylhydrazine ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อให้ฮีโมโกลบินสลายตัวและเพิ่มปริมาณเหล็กในฮีมที่เมมเบรนเม็ดเลือดแดงเพื่อให้มีพยาธิสภาพคล้ายเซลล์เม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมีย และหาความสัมพันธ์เช่นเดียวกับข้อ 8.1

9. ระเบียบวิธีวิจัย

9.1 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดโดยวิธีปราศจากเชื้อจากคนปกติ ผู้ป่วยอัลฟาและเบตาธาลัสซีเมีย (ที่ไม่ได้รับเลือดมาก่อนอย่างน้อย 8-12 สัปดาห์) รายละ 21 มล. ใส่หลอดที่มีเฮปารินเป็นสารกันเลือดแข็ง 20 มล. เพื่อศึกษาปริมาณเหล็กในเมมเบรน การทำลายฤทธิ์ยาโดยเมมเบรน หรือเพื่อศึกษากลไกการทำลายฤทธิ์ยา ส่วนเลือดอีก 1 มล. ใส่หลอด EDTA เพื่อตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยา

9.2 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

9.2.1 ตรวจเลือดทางโลหิตวิทยาและหาเปอร์เซ็นต์ฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ

นำเลือดที่เก็บในหลอด EDTA มาตรวจนับเม็ดเลือดและหาค่าต่างๆ ทางโลหิตวิทยาโดยเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex K-800 (Sysmex, Japan) และใช้เลือด EDTA เตรียม hemolysate เพื่อตรวจแยกชนิดฮีโมโกลบินและหาเปอร์เซ็นต์ฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ในเม็ดเลือดแดงโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (16)

9.2.2 เตรียมเมมเบรน

เตรียมเมมเบรนโดยวิธีของ Kuross และคณะ (17) โดยนำเลือดที่เก็บในหลอดเฮปารินมาปั่นที่ 4°C ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกพลาสมา เม็ดเลือดขาว และเกร็ดเลือด ล้างเม็ดเลือดแดง 2 ครั้งด้วย ice-cold phosphate buffer saline (PBS) โดยปั่นล้างที่ 4°C ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วย ice-cold lysis buffer (5 mM phosphate buffer, 0.5 mM EDTA, pH 8.0, iron free) ปั่นแยกเมมเบรนและล้างเมมเบรนด้วย ice-cold lysis buffer 5 ครั้ง ที่ 4°C ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างเมมเบรนอีก 2 ครั้งด้วย ice-cold washing buffer (5 mM phosphate buffer, pH 7.4, iron free) เก็บเมมเบรนที่ -30°C เพื่อรอการตรวจขั้นต่อไป

9.2.3 การวัดปริมาณโปรตีนในเมมเบรน

วัดปริมาณโปรตีนของเมมเบรนที่เตรียมได้ด้วยวิธีของ Lowry และคณะ (18) โดยใช้เมมเบรนที่เตรียมได้ 200 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยา 1 มล. ซึ่งประกอบด้วย reagent A (20 g Na₂CO₃ in 0.1 N NaOH) 50 ส่วน กับ reagent B (1% CuSO₄ + 2% NaK tartrate, 1:1) 1 ส่วน ตั้งไว้ 10 นาที แล้วเติมน้ำยา Folin 0.1 มล. ผสมและตั้งไว้ 30 นาที วัด OD ที่ 750 นาโนเมตร อ่านค่าโปรตีนของเมมเบรนโดยเปรียบเทียบกับสารละลายอัลบูมินมาตรฐาน (bovine serum albumin, Sigma, U.S.A.)

9.2.4 การวัดปริมาณเหล็กในเมมเบรน

วัดปริมาณเหล็กที่ไม่อยู่ในรูปฮีมโดยวิธี ferrozine assay ของ Kuross และคณะ (17) ferrozine เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการจับเหล็ก (iron chelator) ชนิด ferrous iron ที่ไม่อยู่ในรูปฮีม การทดสอบประกอบด้วยหลอด 3 หลอดคือ sample, sample blank, buffer blank เมมเบรนที่ทราบความเข้มข้นของโปรตีนแล้วจะถูกนำมาเจือจางด้วย 5 mM sodium phosphate, iron free buffer, pH 7.4 ให้มีความเข้มข้น 1 มก./มล. และใช้เมมเบรนที่ความเข้มข้นนี้ 0.1 มล. ใส่ในหลอด sample และอีก 0.1 มล. ใส่ในหลอด sample blank ส่วนหลอด buffer blank ใส่ 5 mM sodium phosphate, iron free buffer, pH 7.4 ปริมาตร 0.1 มล. เติม 10 % SDS 0.275 มล. ลงในทุกหลอด เติม reagent A (5 ml acetate stock buffer, 3 g. SDS diluted to 50 ml with DW., iron free) 0.1 มล. ลงในทุกหลอด และเมื่อพร้อมจะวัด OD เติม reagent B (30 g ascorbic acid, 1 g sodium metabisulfite, 50 ml acetate stock buffer diluted to 500 ml with DW., iron free) 0.725 มล. ลงในทุกหลอด วัด OD โดยเครื่อง spectrophotometer (Hitachi 150-20, Japan) โดยใช้โปรแกรม kinetics ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร interval time 15 วินาที total time 2 นาที upper limit = 1.000 และ lower limit = 0.000 วัดค่า OD ของหลอดต่างๆ เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น โดยก่อนวัด OD ให้เติม ferrozine reagent (0.4 g ferrozine, 2.5 g thiourea diluted to 100 ml with DW., iron free) หลอดละ 0.1 มล. ลงในหลอด sample และ buffer blank ส่วนหลอด sample blank เติม 5 mM sodium phosphate 0.1 มล. ผสมน้ำยาให้เข้ากัน ทำการวัดหลอด sample ก่อน ตามด้วยหลอด buffer blank แล้วจึงวัด sample blank

แล้วคำนวณปริมาณเหล็กที่ทำปฏิกิริยากับ ferrozine ตามสมการ

$$\text{RBC membrane ferrozine reactive iron} = \frac{[\text{OD sample} - (\text{OD sample blank} + \text{OD buffer blank})] \times 465.9}{1 \text{ mg/ml}}$$

ค่าที่คำนวณได้จะมีหน่วยเป็น nmole Fe/mg protein ค่า factor 465.9 ในสูตรคำนวณจากการหาผลลัพท์ของ OD ด้วยค่า ferrozine extinction coefficient 27.9 mmol/L และคูณด้วยค่า dilution factor 13

วัดปริมาณเหล็กที่อยู่ในรูปของฮีมโดยวิธีของ Kuross และคณะ (19) โดยการวัด total heme iron (ie, hemoglobin, hemichrome, free heme) ที่ OD 398 นาโนเมตร หลังจากละลายเมมเบรนใน formic acid เปรียบเทียบกับ hemoglobin standard (Biosystem, Spain) โดยวัดปริมาณในหน่วย mg heme/mg membrane protein

9.2.5 หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเหล็กในเมมเบรนเม็ดเลือดแดงกับการทำลายฤทธิ์ยา

โดยนำเมมเบรนที่เตรียมได้มา 200 ไมโครกรัม incubate กับสารละลายยา ^{14}C -dihydroartemisinin เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ 1 มล. ที่ 37°C 1 ชม. (12.1 nCi/ml, specific activity 12.1 mCi/mmol Research Triangle Institute, U.S.A.) จากนั้นปั่นแยกเอาสารละลายยาส่วนบนไปวัดความเข้มข้นยา โดยวัดจากปริมาณรังสีของ ^{14}C ก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์ยาด้วยวิธี bioassay ของ Desjardins และคณะ (20) โดยเชื้อยีสต์ที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ใส่ลงในแต่ละหลุมของ sterile 96-well plate เติมน้ำเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในมีเดียเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง 1.5 % และมีเชื้อพลาสมาโมเดียมฟิลิปปินส์ 1-2 % ลงในยาแต่ละหลุม incubate 24 ชม. ที่ 37°C ใน candle jar จากนั้นเติม ^3H -hypoxanthine หลุมละ 0.5 ไมโครคูรี (specific activity 10-30 Ci/mmol, Amersham, UK) incubate ต่ออีก 18-24 ชม. ที่ 37°C ใน candle jar จากนั้นเก็บตัวอย่างแต่ละหลุมโดยดูดตัวอย่างผ่าน glass filter paper (Whatman, UK) ด้วยเครื่อง cell harvester (Nunc, Denmark) ล้าง glass filter paper น้ำ แล้วนำไปวัดปริมาณรังสีของ ^3H คำนวณและหาค่า 50 % inhibitory concentration (IC_{50}) จากกราฟ นำค่า IC_{50} ของยาที่ incubate กับเมมเบรนมาคำนวณกับยาที่ไม่ได้ incubate กับเมมเบรน (control) เพื่อหา drug effectiveness index ตามสมการ

$$\text{Drug effectiveness index} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ of control}}{\text{IC}_{50} \text{ of test}}$$

9.3 ศึกษากลไกการทำลายฤทธิ์ยา

โดยนำเซลล์ปกติมา oxidize ด้วยสาร phenylhydrazine ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 ไมโครโมลาร์ เพื่อให้ฮีโมโกลบินสลายตัวและเพิ่มปริมาณเหล็กในรูปฮีมที่เมมเบรนเม็ดเลือดแดงให้คล้ายกับพยาธิสภาพของเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย วัดปริมาณโปรตีน เหล็ก และศึกษาการทำลาย

ฤทธิ์ยาโดยเซลล์ เม็ดเลือดแดงโดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 9.2

9.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล

หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเหล็กในเมมเบรนเม็ดเลือดแดงที่ไม่อยู่ในรูปฮีโมโกลบินและเหล็กในฮีมกับการเสื่อมฤทธิ์ยาไดไฮโดรอาร์ทีมิซินินโดยวิธี linear regression และศึกษานัยสำคัญทางสถิติของความแตกต่างของข้อมูลโดย Mann Whitney U-test และ Sign Rank test

10. จำนวนโครงการที่ผู้สมัครกำลังดำเนินการอยู่

ชื่อโครงการ ผลของยาด้านมาลาเรียต่อการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบิน

(The effects of antimalarial drug on hemoglobin oxygen affinity)

ระยะเวลาโครงการ 1 ปี ตั้งแต่ พฤษภาคม 2541 ถึง พฤษภาคม 2542

แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน ไม่มี (แต่ได้รับการสนับสนุนน้ำยาทดสอบบางส่วนจาก

Assoc. Prof. Kiyohiro Imai มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น)

สถานะผู้สมัคร X หัวหน้าโครงการ

ผู้ร่วมโครงการ -

เวลาที่ใช้ทำวิจัยในโครงการนี้ 5 ชั่วโมงต่อสัปดาห์

เนื้อหางานวิจัย

ผลการวิจัย

1. ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาของตัวอย่างเลือด

ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาของตัวอย่างเลือดจากคนปกติ 13 คน ผู้ป่วยอัลฟาธาลัสซีเมียชนิด α -thalassemia1/ α -thalassemia2 (HbH) 10 คน ชนิด α -thalassemia1/ hemoglobin Constant Spring (HbH/HbCS) 12 คน และจากผู้ป่วยเบตาธาลัสซีเมียชนิด β -thalassemia/HbE (β /E) ที่ไม่ได้ตัดม้าม 11 คนได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

TABLE 1 : Hematologic data of sample studied

Cell type	n	Mean $\pm$ standard deviation (S.D.)								Hb typing
		WBC $\times 10^9/L$	RBC $\times 10^9/L$	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	Plt $\times 10^9/L$	
Normal	13	6.7 (1.5)	4.4 (0.4)	13.1 (1.0)	39.9 (3.1)	89.0 (7.2)	29.2 (2.5)	32.8 (0.4)	263.0 (47.6)	A ₂ A
HbH	10	7.8 (2.8)	4.2 (1.3)	8.5 (2.5)	28.6 (6.8)	69.7 (13.8)	20.8 (4.8)	29.4 (2.2)	337.6 (79.0)	A ₂ A Bart's H
HbH/ HbCS	12	7.3 (2.6)	4.1 (0.7)	8.1 (1.6)	30.8 (4.4)	77.6 (5.7)	20.0 (1.0)	26.5 (3.1)	249.3 (87.6)	CS A ₂ A Bart's H
β /E	11	7.8 (2.4)	3.6 (0.9)	6.7 (1.7)	20.8 (4.3)	58.0 (3.6)	18.3 (1.0)	31.7 (2.1)	352 (156)	A ₂ E F A

Note : n = number of cases, WBC = white blood cell count, RBC = red blood cell count,

Hb = hemoglobin, Hct = hematocrit, MCV = mean cell volume, MCH = mean cell hemoglobin,

MCHC mean cell hemoglobin concentration, Plt = platelet count

2. ปริมาณเหล็กในเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ

จากการวัดปริมาณเหล็กที่ไม่อยู่ในรูปฮีมในเมมเบรนของเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ โดยวิธี ferrozine assay และวัดปริมาณเหล็กที่อยู่ในรูปฮีมโดยใช้กรด formic acid พบว่า เมมเบรนของเม็ดเลือดแดงเบตาธาลัสซีเมียมีเหล็กที่ไม่อยู่ในรูปฮีมสะสมอยู่โดยเฉลี่ยมากกว่าเมมเบรนของเม็ด

เลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียและเม็ดเลือดแดงปกติ (ตารางที่ 2 รูปที่ 1) แต่ปริมาณเหล็กที่มีอยู่ในเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงที่ศึกษาไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.025$, Mann Whitney U-test) ในขณะที่เม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียชนิด HbH/HbCS มีปริมาณเหล็กที่อยู่ในรูปฮีมสะสมอยู่มากกว่าเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียชนิด HbH เม็ดเลือดแดงเบตาธาลัสซีเมียและเม็ดเลือดแดงปกติ (ตารางที่ 2 รูปที่ 2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$, Mann Whitney U-test)

TABLE 2 : Membrane iron contents and drug effectiveness index of various red blood cells

Cell type	n	Mean $\pm$ standard deviation (S.D.)			
		Ferrozine reactive iron (nmole/mg protein)	Total heme iron (mg/mg protein)	Drug effectiveness index	
				membrane	Intact cell
Normal	5	2.89 ± 1.93	0.26 ± 0.08	1.06 ± 0.23	1.29 ± 0.36 (n = 6)
HbH	10	5.64 ± 5.13	0.33 ± 0.17	0.88 ± 0.39	0.22 ± 0.14 (n = 4)
HbH/HbCS	12	6.60 ± 4.94	1.02 ± 0.60	0.54 ± 0.36	0.20 ± 0.14 (n = 5)
β/E	11	11.12 ± 11.73	0.26 ± 0.25	1.06 ± 0.43	1.10 ± 0.48 (n = 6)

3. การทำลายฤทธิ์ยาไดไฮโดรอาร์ทีมิซินินโดยเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ

การทดสอบคุณภาพยาไดไฮโดรอาร์ทีมิซินินที่อยู่ใน media หลัง incubated ข้างกับเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ พบว่าเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียทั้ง 2 ชนิดสามารถลดประสิทธิภาพยาได้มากกว่าเม็ดเลือดแดง β/E และเม็ดเลือดแดงปกติ (ตารางที่ 2 รูปที่ 3) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$, Mann Whitney U-test) แต่เมื่อศึกษาการทำลายฤทธิ์ยาโดยเมมเบรนเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ พบว่า เมมเบรนเม็ดเลือดแดง HbH/HbCS สามารถลดประสิทธิภาพยาโดยเฉลี่ยได้มากที่สุด รองลงมาเป็นเมมเบรนของเม็ดเลือดแดง HbH, β/E และเม็ดเลือดแดงปกติตามลำดับ (ตารางที่ 2 รูปที่ 4) โดยประสิทธิภาพที่ลดลงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม HbH/HbCS กับ β/E ($p < 0.01$, Mann Whitney U-test)

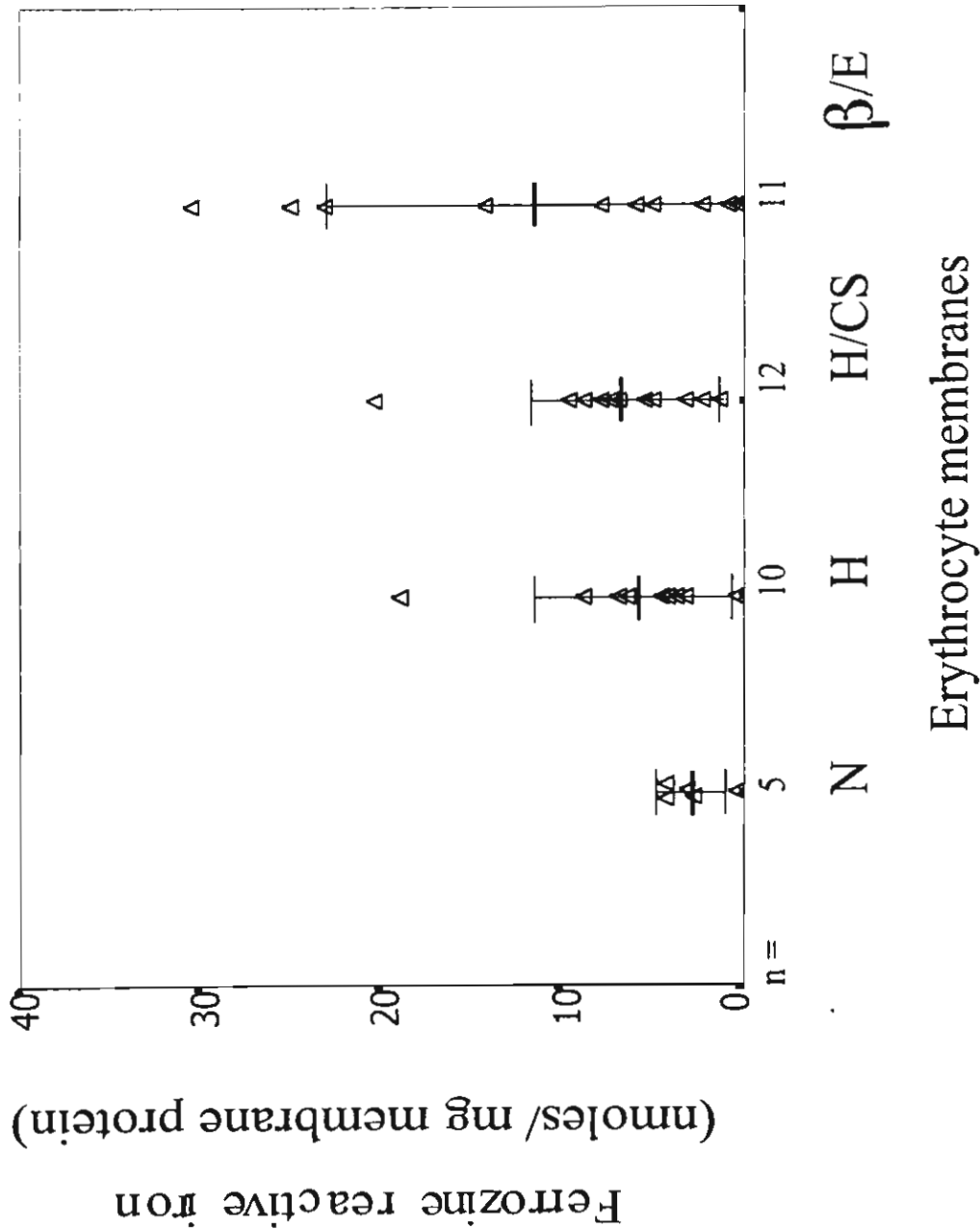


FIGURE 1 : Amount of ferrozine reactive iron in various erythrocyte membranes

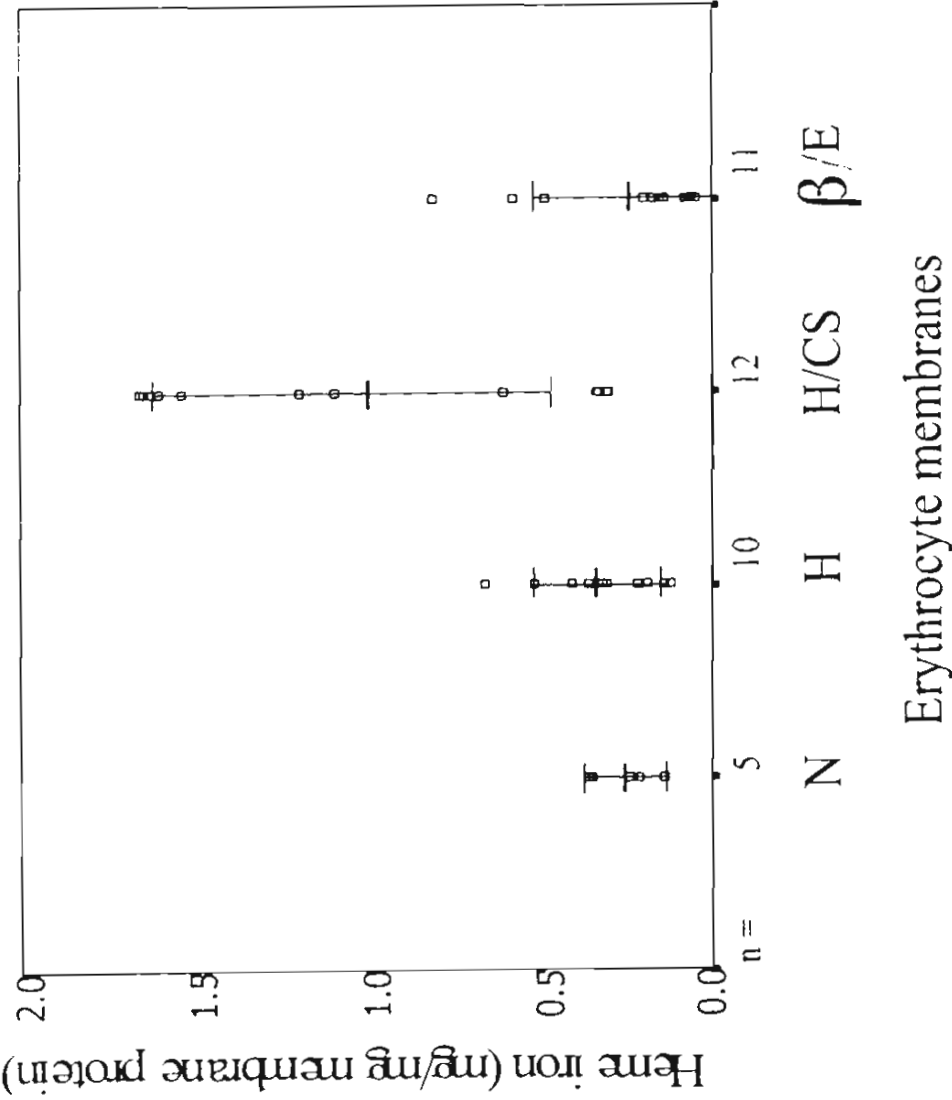


FIGURE 2 : Amount of heme iron in various erythrocyte membranes

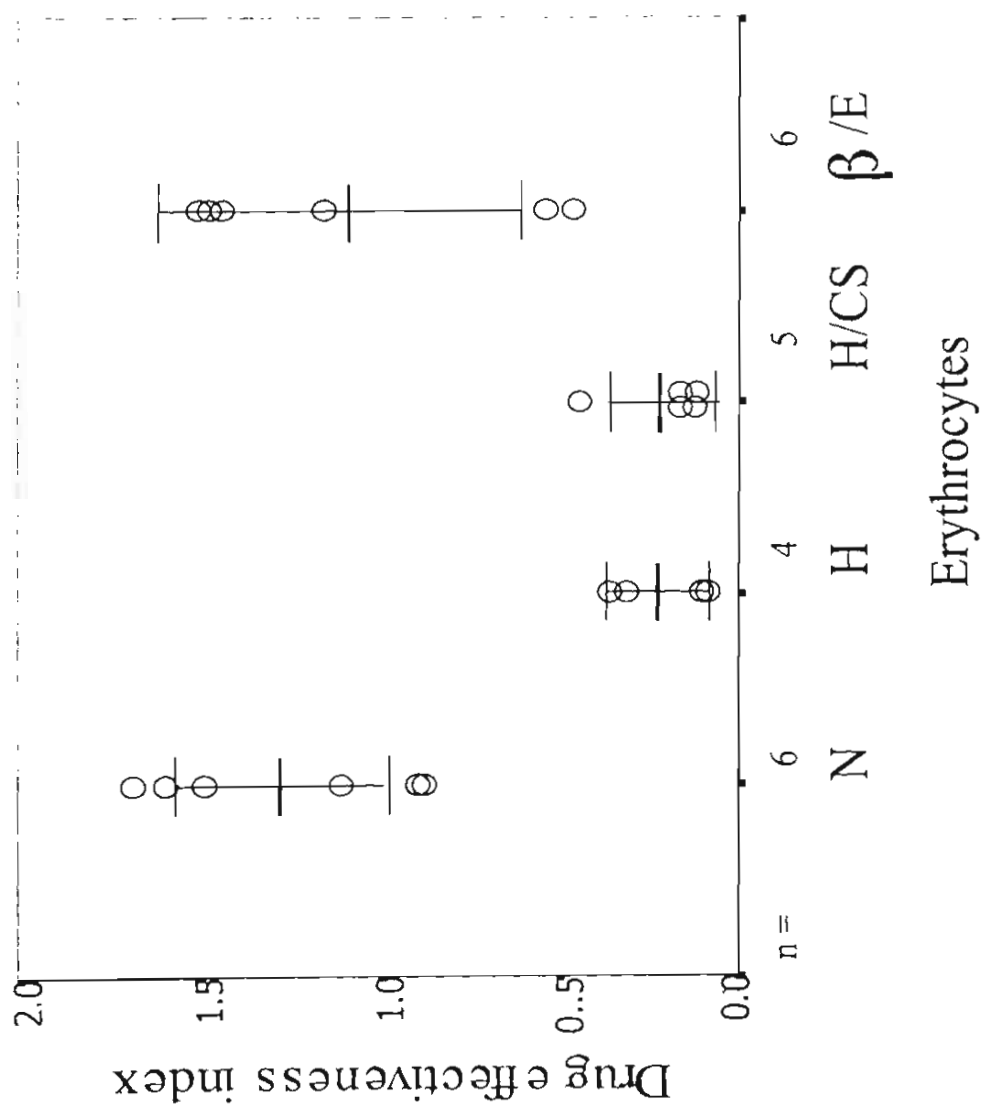


FIGURE 3 : Drug effectiveness index of DHART in the supernatant after incubating with various erythrocytes

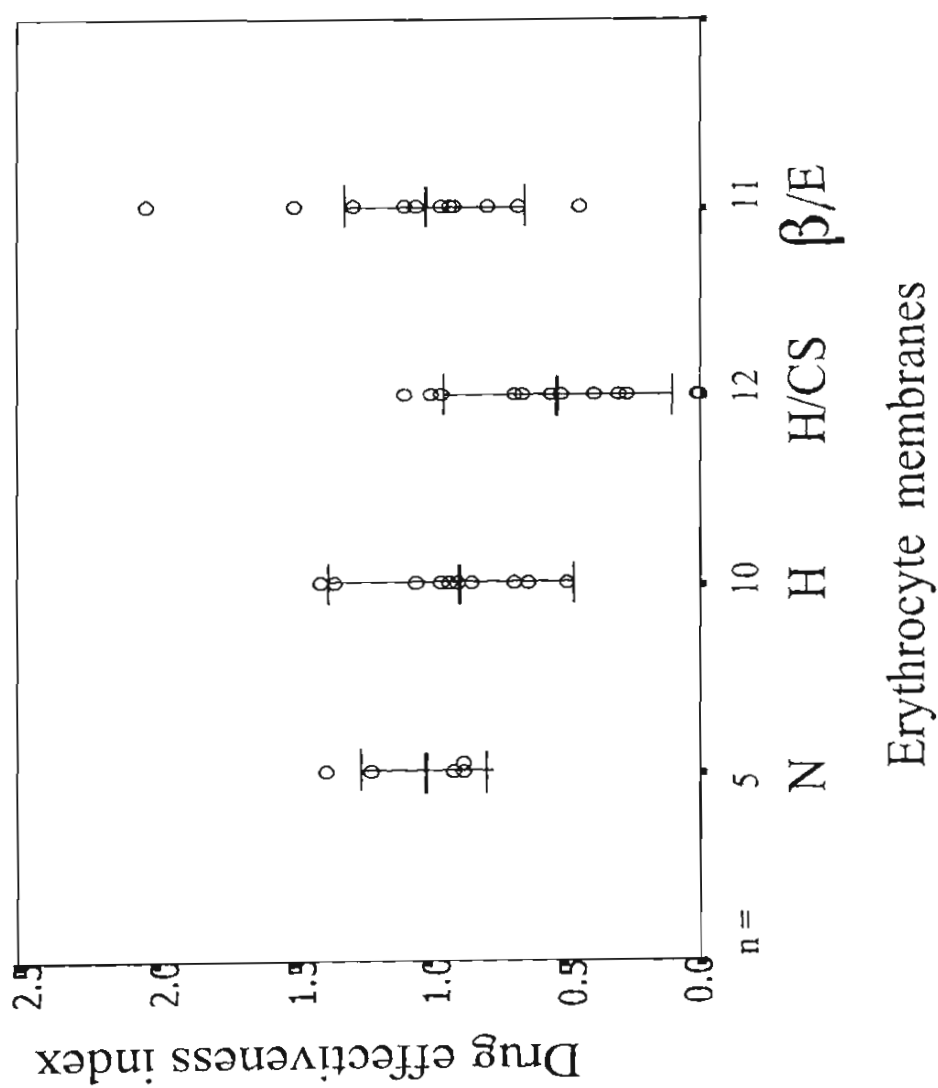


FIGURE 4 : Drug effectiveness index of DHART in the supernatant after incubating with various erythrocyte membranes

4. ความสัมพันธ์ระหว่างเหล็กอิสระหรือเหล็กในฮีมในเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ กับการทำลายฤทธิ์ยาไดไฮโดรอาร์ทีมิซินิน

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพที่ลดลงกับปริมาณเหล็กในเมมเบรนพบว่า ประสิทธิภาพที่ลดลงหลัง incubated ยากับเมมเบรนเม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ จะสัมพันธ์กับเหล็กที่อยู่ในรูปฮีมที่ระดับ $r^2 = 0.453$ (รูปที่ 5) แต่ไม่สัมพันธ์กับเหล็กที่ไม่อยู่ในรูปฮีม (ferrozine reactive iron หรือ non heme iron, รูปที่ 6) เนื่องจากเมมเบรนเม็ดเลือดแดงอัลฟาธาลัสซีเมียชนิด HbH/HbCS มีปริมาณเหล็กที่อยู่ในรูปฮีมมากที่สุด เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพที่ลดลงกับปริมาณเหล็กที่อยู่ในรูปฮีมในเมมเบรนเม็ดเลือดแดง HbH/HbCS พบว่า ประสิทธิภาพที่ลดลงสัมพันธ์กับปริมาณเหล็กในเมมเบรนที่อยู่ในรูปฮีม ที่ระดับ $r^2 = 0.650$ (รูปที่ 7)

5. กลไกการทำลายฤทธิ์ยาไดไฮโดรอาร์ทีมิซินินโดยเหล็กในเมมเบรน

การศึกษากลไกการทำลายฤทธิ์ยาไดไฮโดรอาร์ทีมิซินินโดยเหล็กในเมมเบรนโดยใช้เซลล์แบบจำลองซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติที่ treated ด้วยสาร phenylhydrazine ความเข้มข้น 1, 10, 100 ไมโครโมลาร์ เพื่อให้ฮีโมโกลบินสลายตัวทำให้เกิดพยาธิสภาพที่เมมเบรนคล้ายกับเซลล์เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมีย พบว่า เซลล์แบบจำลองสามารถลดประสิทธิภาพได้มากขึ้นสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสาร phenylhydrazine ที่ใช้ในการ treated เซลล์ (ตารางที่ 3 รูปที่ 8) โดยมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$, Sign Rank test) ที่ความเข้มข้นของสาร phenylhydrazine ตั้งแต่ 10 ไมโครโมลาร์ขึ้นไป ทำนองเดียวกัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร phenylhydrazine มีผลทำให้ปริมาณโดยเฉลี่ยของเหล็กทั้ง 2 รูปแบบในเมมเบรนเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3 รูปที่ 9 และ 10) และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของเหล็กที่เพิ่มขึ้นในเมมเบรนของเซลล์ที่ treated ด้วยสาร phenylhydrazine แต่ละความเข้มข้นกับเซลล์ที่ยังไม่ได้ treated ด้วยสาร phenylhydrazine พบว่า เซลล์ที่ treated ด้วยสาร phenylhydrazine มีเหล็กในรูปฮีมเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยเฉลี่ยมากกว่าเหล็กที่ไม่อยู่ในรูปฮีม (ตารางที่ 3) และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพที่ลดลงกับปริมาณเหล็กที่อยู่ในรูปฮีมที่เพิ่มขึ้นในเมมเบรนของเซลล์ที่ treated ด้วยสาร phenylhydrazine พบว่า มีความสัมพันธ์กันเล็กน้อย ($r^2 = 0.16$)

Table 3 : Drug effectiveness indexes of phenylhydrazine treated red blood cells and iron contents in membranes of phenylhydrazine treated red blood cells

Parameters studied	Phenylhydrazine concentration (μM)			
	0	1	10	100
Drug effectiveness indexes, n=8	$0.716 \pm 0.112^*$	0.581 ± 0.177	0.349 ± 0.135	0.276 ± 0.125
Ferrozine reactive iron, n=8 (ratio, n=6)	6.697 ± 4.705 (1)	6.464 ± 5.232 (0.940 ± 0.265)*	9.900 ± 4.467 (1.157 ± 0.287)	14.677 ± 6.421 (1.673 ± 0.544)
Heme iron, n=8 (ratio, n=8)	0.074 ± 0.077 (1)	0.070 ± 0.063 (1.128 ± 0.489)	0.085 ± 0.090 (2.035 ± 1.759)	0.314 ± 0.397 (5.185 ± 3.704)

*mean $\pm$ standard deviation

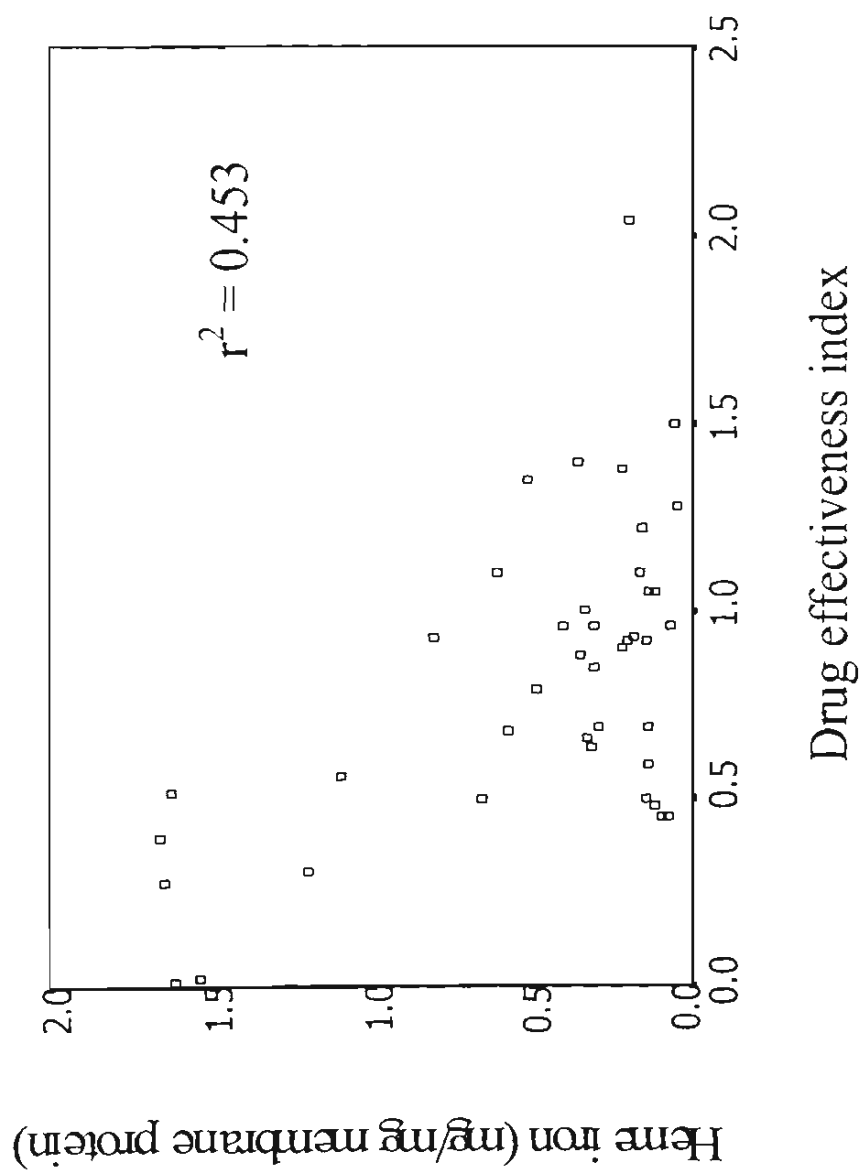


FIGURE 5 : Correlation between drug effectiveness index and heme iron

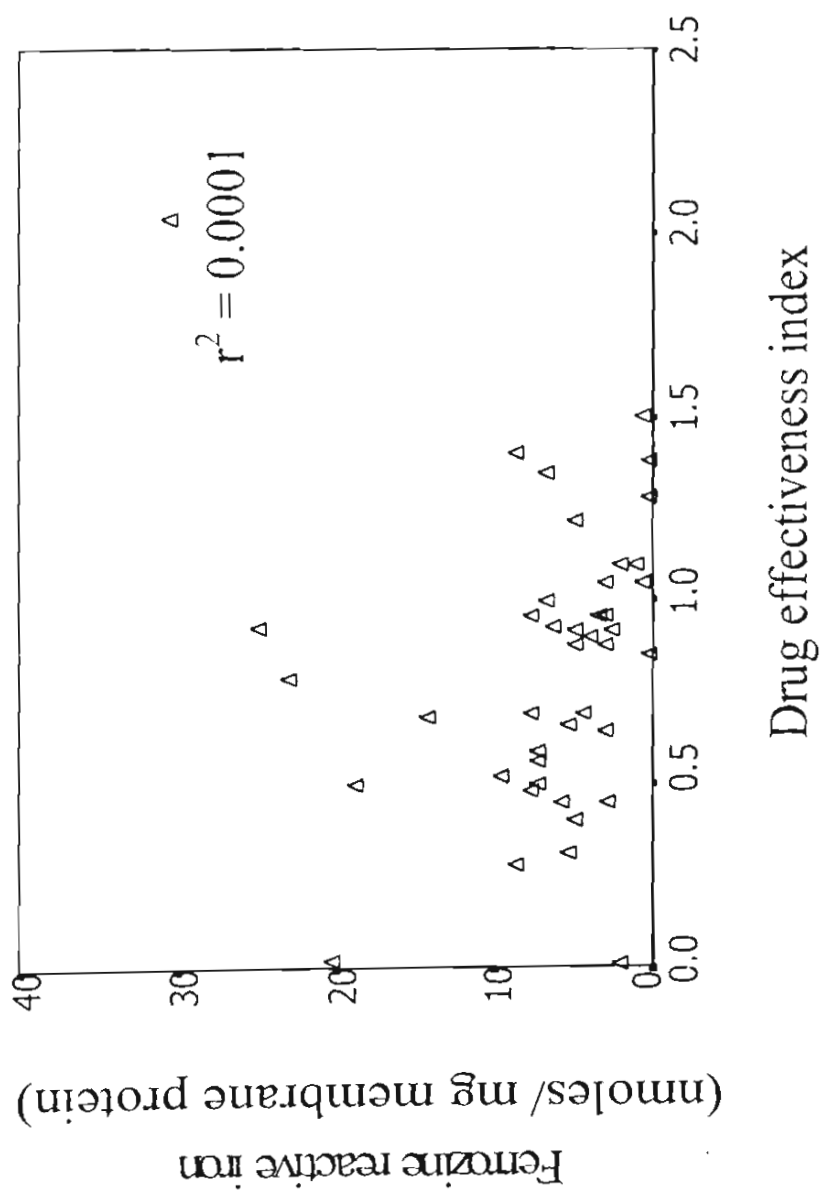


FIGURE 6 : Correlation between drug effectiveness index and ferrozine reactive iron