

**CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF OXIDATIVE
DAMAGE MARKERS IN THALASSEMIC PATIENTS**

CHUTIMA MATAYATSUK

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(ANALYTICAL CHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006**

ISBN 974-04-7689-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีเพื่อหาตัวบ่งชี้ภาวะการถูกทำลายแบบออกซิเดชันในคนไข้ธาลัสซีเมีย
(CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF OXIDATIVE DAMAGE
MARKERS IN THALASSEMIC PATIENTS)

ชุตินา มัชยัสต์สุข 4436358 SCAC/D

ปร.ด. (เคมีวิเคราะห์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ประพิน วิไลรัตน์, Ph.D. (Physical Chemistry), ยุวดี เชี่ยว
วัฒนา, Ph.D. (Analytical Chemistry), ดวงใจ นาคะปรีชา, Ph.D. (Analytical Chemistry),
สุทัศน์ ฟูเจริญ, MD.

บทคัดย่อ

สารที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบและไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species) ทั้งที่เป็นอนุมูลอิสระและเป็นโมเลกุล จะถูกสร้างขึ้นในร่างกายจากขบวนการเมตาโบลิซึมต่างๆ ซึ่งร่างกายจะมีระบบป้องกันออกซิเดชัน (antioxidant system) ที่สามารถกำจัดสารไวต่อปฏิกิริยาเหล่านี้ได้ สารไวต่อปฏิกิริยามีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรคต่างๆ โดยอาจเป็นสาเหตุของโรค หรือถูกสร้างขึ้นมามากกว่าปกติจากสภาวะการเป็นโรค และเกินความสามารถที่ระบบป้องกันออกซิเดชันจะกำจัดได้หมด สารไวต่อปฏิกิริยาเหล่านี้เป็นปัจจัยทำให้โรคมักมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วและมีความรุนแรงยิ่งขึ้น เนื่องจากเกิดความไม่สมดุลระหว่างปริมาณสารไวต่อปฏิกิริยากับระบบป้องกันออกซิเดชัน ทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่าออกซิเดทีฟสเตรส และนำไปสู่ความเสียหายของชีวโมเลกุลที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์เช่น ลิพิด, โปรตีน และดีเอ็นเอ เรียกว่าการเกิดออกซิเดทีฟแดเมจ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคทางพันธุกรรมชนิดหนึ่งที่เกิดสภาวะออกซิเดทีฟสเตรสรวมด้วย เนื่องจากเหล็กเกินในผู้ป่วย แต่การศึกษาสภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในโรคธาลัสซีเมียยังมีไม่มาก การติดตามสภาวะออกซิเดทีฟสเตรส และให้สารที่มีฤทธิ์ป้องกันออกซิเดชัน จะสามารถลดการทำลายชีวโมเลกุล และยับยั้งการพัฒนาและความรุนแรงของโรคได้ วิธีการติดตามสภาวะออกซิเดทีฟสเตรสที่นิยมคือ การวัดปริมาณชีวโมเลกุลที่ถูกทำลาย แต่มีข้อจำกัดจากความไวและความจำเพาะของเครื่องมือวิเคราะห์ รวมทั้งการเตรียมตัวอย่างก่อนการวัดปริมาณ

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่าง, วิธีการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี และใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นรวมทั้งวิธีทางก๊าซโครมาโตกราฟีที่มีการพัฒนามาก่อนแล้ว ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารจากกระบวนการดีเอ็นเอถูกออกซิไดซ์ (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, (8-OHdG)), สารที่เกิดจากโปรตีนถูกออกซิไดซ์ (ortho- and meta-tyrosine) และสารที่เกิดจากลิพิดถูกออกซิไดซ์ (F₂-isoprostanes, (F₂IsoPs)) ในตัวอย่างปัสสาวะ และพลาสมาจากกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และอาสาสมัครสุขภาพดี ทั้งนี้ได้วัดปริมาณครีเอตินิน (creatinine) สำหรับใช้เป็นสารเปรียบเทียบปริมาณสำหรับสารอื่นๆ ที่ขับออกทาง ปัสสาวะ ด้วย

ผลการศึกษาพบว่าปริมาณชีวโมเลกุลที่ถูกออกซิไดซ์ทุกชนิดที่ทำการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วย สูงกว่ากลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ และปริมาณชีวโมเลกุลที่ถูกออกซิไดซ์บางชนิด มีสหสัมพันธ์กับภาวะเหล็กเกินและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) บางชนิดในร่างกายอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีการเตรียมตัวอย่าง และวิธีวิเคราะห์ปริมาณที่พัฒนาขึ้นให้ผลที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และวิธีที่พัฒนาขึ้นรวมทั้งวิธีที่มีผู้เสนอไว้ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ สามารถใช้วัดปริมาณสารที่บ่งชี้ถึงออกซิเดทีฟแดเมจได้

CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF OXIDATIVE DAMAGE MARKERS IN THALASSEMIC PATIENTS
CHUTIMA MATAYATSUK 4436358 SCAC/D
Ph.D. (ANALYTICAL CHEMISTRY)
THESIS ADVISORS: PRAPIN WILAIRAT, Ph.D. (PHYSICAL CHEMISTRY),
JUWADEE SHIOWATANA, Ph.D. (ANALYTICAL CHEMISTRY),
DUANGJAI NACAPRICHA, Ph.D. (ANALYTICAL CHEMISTRY), SUTHAT FUCHAROEN, MD.

ABSTRACT

Reactive oxygen species including radicals and non-radicals are normally generated in the body from metabolism processes and can be counteracted by antioxidant systems. These reactive species play an important role in several degenerative diseases. They are causative of some diseases or overproduced during a disease. The overproduction of reactive species in disease condition exceeds the ability of antioxidant systems. These harmful species will contribute to disease development and severity since reactive species and antioxidants are unbalanced. This condition is known as oxidative stress and leads to the damage of biomolecules, such as lipids, proteins and DNA.

Thalassemia is a genetic disease with reports of oxidative stress resulting from iron overload. However, there are only a few studies on oxidative stress in thalassemia, especially in Thailand. Monitoring oxidative stress status and therapeutic antioxidant supplements can reduce disease severity and development. Monitoring oxidative stress is usually performed by quantitative determination of oxidized molecules. Unfortunately, sensitivity and selectivity of analysis method and complicated sample matrices are problems.

In this thesis, sample pretreatment, high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography/mass spectrometric methods (GC/MS) were used to determine DNA oxidative damage product (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, (8-OHdG)), protein oxidative damage products (*ortho*- and *meta*-tyrosine) and lipid peroxidation products (F₂-isoprostanes, (F₂IsoPs)) in urine and plasma from thalassemic patients and healthy volunteers. In addition, determination of creatinine, the compound used to normalize the variable volume of urine samples, using a modified HPLC method was carried out.

The results showed that the levels of all oxidative damage markers measured in patients were significantly higher than those of healthy subjects. Moreover, high levels of some oxidized markers correlated with different antioxidant levels. These results also indicated that sample preparation procedure and the developed HPLC method are valid and reliable. The chromatographic methods used in this study can be applied to determine oxidative damage markers at *in vivo* levels.

KEYWORDS: OXIDATIVE STRESS / OXIDATIVE DAMAGE / MARKERS /
HPLC / THALASSEMIA

194 pp. ISBN 974-04-7689-9