

**OXIDATIVE STRESS AND LIPID PEROXIDATION-DERIVED
DNA DAMAGE IN THALASSEMIC DISEASE**



MAYURA MEERANG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHYLOSOPHY
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การเสื่อมสลายของดีเอ็นเอ อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ ในปิต้าธาลัสซีเมีย (OXIDATIVE STRESS AND LIPID PEROXIDATION-DERIVED DNA DAMAGE IN THALASSEMIC DISEASE)

มยุรา มีแรง 4636145 MTMT/D

ปร. ด. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุทัศน์ ฟูเจริญ (M. D.), ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์ (Ph. D.),

โกวิท พัฒนาปัญญาสัจย์ (Ph. D.), รัชนิกร กัลล์ประวิทย์ (Ph. D)

บทคัดย่อ

ธาลัสซีเมีย เป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในประเทศไทย ผู้ป่วยมีภาวะเหล็กเกินเป็นอาการแทรกซ้อนที่สำคัญ ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งสามารถทำลายโมเลกุลต่างๆในร่างกาย โดยเฉพาะไขมัน และก่อให้เกิดสารพิษหลายชนิดเข้าไปทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอทำให้เกิดการเสื่อมสลายของดีเอ็นเอที่ตรวจพบในรูปของ DNA adducts ซึ่งก่อให้เกิดการมิวเตชันของยีนและโรคมะเร็ง งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจหา DNA adducts ในเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์, ในปัสสาวะของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และในอวัยวะภายในของหนูทดลองธาลัสซีเมีย โดยใช้วิธีการตรวจวัดที่มีความไวและความจำเพาะสูง

จากการศึกษา ไม่พบ DNA adducts ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยธาลัสซีเมียเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งๆที่ผู้ป่วยได้มีการขับสารดังกล่าวออกมาทางปัสสาวะเพิ่มมากขึ้น ถึง 9-13 เท่าเมื่อเทียบกับคนปกติ และพบว่าระดับของ DNA adducts ในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับระดับของธาตุเหล็กในร่างกาย และเนื่องจาก DNA adducts ที่พบในปัสสาวะอาจมาจากการซ่อมแซมดีเอ็นเอทั่วร่างกายของผู้ป่วย จึงได้ทำการศึกษาการเกิด DNA adducts ในอวัยวะภายในของหนูทดลองธาลัสซีเมีย เพื่อเป็นการสนับสนุนผลการทดลองในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จากการทดลองพบว่ามีการสะสมของ DNA adducts ในตับของหนูธาลัสซีเมียที่มีระดับเหล็กสะสมมากถึงระดับ 2.7 mg Fe/g tissue dry weight และการสะสมของ DNA adducts ยังมีความสัมพันธ์กับระดับเหล็กที่สะสมในตับ ทั้งนี้อัตราการสะสมของ DNA adducts ในเซลล์แต่ละชนิดในตับไม่มีความแตกต่างกัน การสะสมของ DNA adducts ในอวัยวะภายในของผู้ป่วยธาลัสซีเมียอาจนำไปสู่การเกิดมะเร็งโดยเฉพาะมะเร็งตับ การป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระโดยการขับธาตุเหล็กออก และการให้สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสิ่งจำเป็น และการตรวจวัด DNA adducts ในปัสสาวะสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพของการป้องกันได้

124 หน้า

**OXIDATIVE STRESS AND LIPID PEROXIDATION-DERIVED DNA DAMAGE
INTHALASSEMIC DISEASE**

MAYURA MEERANG 4636145 MTMT/D
PH.D. (MEDICAL TECHNOLOGY) DEPARTMENT OF CLINICAL
MICROSCOPY

THESIS ADVISOR: SUTHAT FUCHAROEN (M.D.), PHANTIP
VATANAIBOON (PH. D.), KOVIT PATTANAPANYASAT (PH. D.),
RUCHANEEKORN KALPRAVIDH (PH. D.)

ABSTRACT

Thalassemia is a major public health problem in Thailand. Iron overload, an important secondary complication, is a potential stimulator of lipid peroxidation (LPO) in these patients. LPO-end products react with DNA and generate miscoding DNA adducts, which are excreted in urine. These miscoding DNA lesions lead to increased risk for mutations and subsequent carcinogenesis.

We investigated the formation of adducted DNA, 1,*N*⁶-ethenodeoxyadenosine (εdA), 3,*N*⁴-ethenodeoxycytidine (εdC) and 3-(2-Deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-pyrimido[1,2-α]purin-10(3H)one (M₁dG), in lymphocytes of β-thalassemia/hemoglobin E patients and in organs of thalassemic mice. We also investigated whether urinary levels of εdA and εdC can serve as putative cancer risk markers.

Increased DNA adducts in patients' lymphocytes were not significant although they excreted high levels of these adducts, a 9-13 fold increase compared to controls, in their urine. Urinary εdC-levels were positively correlated with serum non-transferrin bound iron whereas εdA showed only a trend. We conclude that the measurement of DNA adducts in lymphocytes is insensitive as compared to urine bio-monitoring. We further investigated DNA-adducts in internal organs of thalassemic mice in order to compliment our urine measurements.

A significant increase of etheno DNA adducts was observed in the liver of thalassemic mice having liver iron levels above 2.7 mg Fe/g tissue dry weight. Accumulation of etheno DNA adducts in the liver were highly correlated with iron levels. εdA were randomly distributed in all liver cell types as revealed by immunohistochemical staining.

We conclude that the markedly increased urinary excretion of etheno adducts indicates the elevated LPO-induced DNA damage in internal organs, such as the liver, as confirmed by the study in thalassemic mice. These DNA lesions can be potential cancer risk factors for hepatocellular carcinoma in thalassemia patients. Preventive treatment by antioxidants and/or iron chelating agents should be applied to these patients. Urinary etheno adducts (but less so in lymphocytes) could serve as putative markers for the efficacy of preventive interventions.

**KEY WORDS: THALASSEMIA / OXIDATIVE STRESS / LIPID
PEROXIDATION / DNA DAMAGE / ETHENO DNA ADDUCTS**

124 pp.