ผลของสารต้านออกซิเดชันต่อสถานภาพธัยออลและเมแทบอลิซึมของไนตริกออกไซด์ในหนูทดลองฮีโมลัยติคอะนีเมีย

Effects of Antioxidants on Thiols Status and Nitric Oxide Metabolism in Hemolytic Anemic Rats

สุรัสวดี มรรควัลย์ (Surussawadi Mackawan) ดร. ยุพา คู่คงวิริยพันธุ์ (Dr. Upa Kukongviriyapan)***
*ดร. วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์ (Dr. Veerapol Kukongviriya)** ดร. พัชรีวัลย์ ปั้นเหน่งเพ็ชร (Dr. Patchareewan Pannangpetch)****

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาว่าสารต้านออกซิเดชัน 2 ชนิดคือวิตามินอีและสารไทรอนสามารถป้องกันภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดงพร้อมกับช่วยปรับสภาพไหลเวียนเลือดของหนูทดลองที่ชักนำให้เกิดภาวะเลือดจางโดยสาร Phehylhydrazine (PHZ) ให้ดีขึ้นได้โดยใช้หนูขาวพันธุ์ Sprauge Dawley เพศผู้แบ่งเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 8-10 ตัว ทำการฉีดสารละลายต่าง ๆ เข้าทางช่องท้องของหนูขาวเป็นระยะเวลา 7 วัน ดังนี้ กลุ่มที่ 1 และ 2 วิตามินอีขนาด 25 และ 50 มก./กก./วัน กลุ่มที่ 3 4 และ 5 สารไทรอนขนาด 100, 250 และ 500 มก./กก./วัน กลุ่มที่ 6 และ 7 สารตัวทำละลายของวิตามินอีและสารตัวทำละลายไทรอน ในวันที่ 5 ของการทดลองทำการชักนำให้หนูขาวทุกกลุ่มเกิดภาวะเลือดจางโดยการฉีดสาร PHZ ขนาด 125 มก./กก. เข้าทางช่องท้องเพียงครั้งเดียว หนูกลุ่มที่ 8 เป็นกลุ่มควบคุมได้รับการฉีดน้ำเกลือเข้าทางช่องท้องเป็นระยะเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า วิตามินอีและไทรอนสามารถลดความเป็นพิษของสาร PHZ และปรับสภาพการไหลเวียนเลือดให้ดีขึ้นได้ นอกจากนี้ยังพบว่าวิตามินอีและไทรอนขนาดสูงให้ผลเพิ่มความเข้มข้นของ GSH ในเลือดและลดปริมาณ MDA, NOx และ GSNO ได้ด้วย ($p<0.001$) จึงสรุปได้ว่า วิตามินอีและไทรอนไม่เพียงแต่สามารถลดการสร้างอนุมูลอิสระ แต่ยังสามารถลดการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่เกิดตามมาภายหลัง ดังนั้นการนำเอาสารต้านออกซิเดชันไปใช้ในการรักษาร่วมกับวิธีการรักษาอื่น ๆ ในภาวะเลือดจางจึงเป็นสิ่งสำคัญและควรจะได้มีการศึกษาถึงบทบาทของสารต้านออกซิเดชันเหล่านี้ให้ลึกซึ้งต่อไปในอนาคต

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine whether the two antioxidant candidates (vitamin E and tiron) could protect against the oxidative damage and improve the circulatory status in rat-treated with Phenylhydrazine (PHZ). Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 8 groups with 8-10 animals per group. The animals in these groups were intraperitoneally injected with receiving substances for 7 days; Groups 1 and 2 vitamin E 25 and 50 mg/kg/day; Groups 3, 4 and 5-tiron 100, 250 and 500 mg/kg/day; Groups 6 and 7 solvents. On the fifth day of treatments, all animals studied were induced hemolytic anemia by a single peritoneal injection of 125 mg/kg PHZ. The control rats (Group 8) were injected with 0.9% NaCl for 7 days. Results showed that both antioxidants reduced the toxic effects of PHZ and improved the circulatory status. Moreover, the antioxidant effects of vitamin E (50 mg/kg/day) and tiron (250 and 500 mg/kg/day) were found to be associated with an enhancement in blood level of GSH and reductions in plasma levels of MDA, NOx and GSNO ($P<0.001$). In conclusion, the present results demonstrated that treatments of vitamin E and tiron could not only decrease free radicals and ROS productions, but also ameliorate the consequent effects of PHZ. Therefore, a potential application of antioxidant treatment as an adjunct therapy under hemolytic anemic condition is an important indication and should be further explored.

คำสำคัญ: สารต้านออกซิเดชัน ฮีโมลัยติคอะนีเมีย วิตามินอี ไทรอน **Keywords:** Antioxidants, Hemolytic Anemia, Vitamin E, Tiron

* มหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสรีรวิทยาทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

โรคเลือดจางธาลัสซีเมีย เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากมีอุบัติการของการเกิดโรคที่สูงมาก โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าประชากรมีจีนแอลฟาธาลัสซีเมีย ถึงร้อยละ 20-30 มีจีนบีตาธาลัสซีเมีย ร้อยละ 3-9 และยังพบจีนที่มีความผิดปกติของฮีโมโกลบินคือฮีโมโกลบินอีและฮีโมโกลบินคอนสแตนท์ สูงถึงร้อยละ 30-42 และร้อยละ 5 ของประชากรทั้งหมด ตามลำดับ (อานนท์, 2535; สุทัศน์ และปราณี, 2537)

ผู้ป่วยที่มีภาวะเลือดจางนาน ๆ จะมีการปรับสภาพทางสรีรวิทยาหลาย ๆ อย่าง เช่น การปลดปล่อยออกซิเจนจะมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเส้นกราฟ oxyhemoglobin-curve จะเคลื่อนไปทางด้านขวา ซึ่งเริ่มตั้งแต่ปริมาณฮีโมโกลบินเท่ากับ 9 กรัม/เดซิลิตร และเด่นชัดมากขึ้นเมื่อปริมาณฮีโมโกลบินเท่ากับ 5-6 กรัม/เดซิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณ 2, 3 diphosphoglycerate (2, 3-DPG) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นนอกจากนี้หัวใจจะทำงานเพิ่มมากขึ้นเพื่อปรับสภาพร่างกายให้สามารถขนส่งเลือดและออกซิเจนไปทั่วถึงทุกอวัยวะ โดยเฉพาะอวัยวะที่สำคัญ ๆ ดังนั้นค่า cardiac output จึงเพิ่มขึ้น (Aessops et al., 1995)

ปัญหาทางคลินิกของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมักมีสาเหตุมาจากเลือดจางเรื้อรัง ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง กล่าวคือ เมื่อสายโกลบินสายใดสายหนึ่งในโมเลกุลของฮีโมโกลบินลดลง ทำให้สายโกลบินที่ไม่มีคู่จับและเกินมาตกตะกอนภายในโมเลกุลของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน หรือถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงเอง ผลจากการย่อยสลายและการตกตะกอนบางส่วนนี้จะชักนำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันทั้งในและนอกเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจนและอนุมูลว่องไว (reactive oxygen species) เช่น $O_2^{\bullet-}$ $OH^{\bullet}$ H_2O_2 เป็นต้น และอนุมูลอิสระของไนโตรเจน และอนุมูลว่องไว (reactive nitrogen species) เช่น NO $ONOO^-$ ขึ้นมาอย่างมากมาย ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมีสามารถทำลายองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน รวมถึงสารพันธุกรรม DNA ทำให้โมเลกุลเหล่านี้สูญเสียการทำงาน และก่อให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ขึ้นอย่างต่อเนื่อง เป็นผลให้มีการทำลาย phospholipid ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ผลที่สุดเม็ดเลือดแดงจะแตกสลายได้และเกิดภาวะเลือดจางในที่สุด (อานนท์, 2535; สุทัศน์ และปราณี, 2537; Chan, 1999)

ในภาวะปกติร่างกายมีกลไกต่าง ๆ มากมายในการปกป้องอันตรายจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ทั้งจากการทำงานของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระโดยตรง เช่น superoxide dismutase, glutathione peroxidase และ catalase หรือการทำงานของโปรตีนที่สามารถจับเหล็กและทองแดง เพื่อลดการเกิดอนุมูลอิสระตามปฏิกิริยา Fenton ที่มีฤทธิ์รุนแรงเพิ่มขึ้น และยังรวมถึงการทำงานของโมเลกุลที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น reduced glutathione (GSH) ubiguinol uric acids และจากสารต้านออกซิเดชันที่ได้รับจากภายนอก ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี lipoic acid selenium, riboflavin, zinc และ carotenoid เป็นต้น (Reiter, 1999)

จากการศึกษาถึงสถานภาพของสารต้านออกซิเดชันในผู้ป่วยธาลัสซีเมียพบว่ามีการลดลงของสารต้านออกซิเดชันหลายชนิดภายในร่างกายของผู้ป่วย ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี carotenoid GSH และ zinc นอกจากนี้ยังรวมถึงการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase (Reed et al., 1987) สำหรับวิตามินอีนั้นพบว่า มีความสำคัญต่อการปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นอย่างมาก และเนื่องจากการทำงานในการต้านออกซิเดชันของวิตามินอีนั้นมีความสัมพันธ์กับการทำงานของสารต้านออกซิเดชันตัวอื่น ๆ เช่น GSH และ วิตามินซี โดยพบว่าหากปริมาณของวิตามินอีในกระแสเลือดของผู้ป่วยธาลัสซีเมียลดต่ำกว่าระดับปกติ จะเหนี่ยวนำให้วิตามินซีและ GSH เป็นสารชักนำให้เกิดกระบวนการออกซิเดชัน (pro-oxidants) แทนที่จะทำงานเป็นสารต้านออกซิเดชันดังเช่นในภาวะปกติ ดังนั้นการให้วิตามินอีเพื่อทดแทนแก่ผู้ป่วยธาลัสซีเมียจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษาวิจัยเป็นอย่างยิ่ง และเนื่องจากการใช้เอนไซม์ที่มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระได้โดยตรงมีข้อจำกัดค่อนข้างมากในเรื่องของ

ความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งการเกิด ระยะเวลาที่เกิดตลอดจนความเข้มข้นที่ใช้ จึงเป็นการยากที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษา (Reiter, 1999) ด้วยเหตุนี้การรักษาในปัจจุบันจึงหันมาสนใจการใช้สารต้านออกซิเดชันเพราะวิธีการใช้ไม่ยุ่งยาก สามารถตรวจวัดผลการรักษาได้ง่าย และมีประสิทธิภาพสูงในการลดภาวะ เครียดจากออกซิเดชัน

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าวิตามินอีนั้นสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวได้ (polyunsaturated fatty acids: PUFA) ทั้งในระยะเริ่มต้น และระยะแพร่กระจาย จึงลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของ PUFA จึงลดการสะสมไขมันในหลอดเลือด และลดการเจริญที่มากกว่าปกติของผนังหลอดเลือด (Moshen, 1995) นอกจากนั้นการใช้สารที่มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระได้โดยตรงเช่นไทรอน (4, 5-dihydroxy-1, 3 benzenedisulfonic acid disodium salt; Tiron) ก็เป็นสารที่น่าสนใจมากตัวหนึ่ง เนื่องจากไทรอนสามารถแพร่ผ่านเข้าเซลล์ได้อย่างอิสระเนื่องจากมีมวลโมเลกุลต่ำ ดังนั้นจึงมีฤทธิ์ในการกำจัด $O_2^{\bullet-}$ ที่เกิดขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการจับโลหะหนักหลายๆ ชนิด จึงมีความสำคัญในการลดหรือยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่เกิดจากโลหะหนักได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Krishna et al., 1992)

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นถึงภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในภาวะเลือดจางธาลัสซีเมียและแนวโน้มของการนำสารต้านออกซิเดชันมาใช้เพื่อรักษาและประคับประคองโรคนี้ในผู้ป่วยไม่ให้รุนแรงมากขึ้นแต่การศึกษาในมนุษย์ทำได้ค่อนข้างจำกัดและควรทำการศึกษานำร่องในสัตว์ทดลองก่อน ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงได้นำ animal model ที่เกิดภาวะเลือดจางที่คล้ายคลึงกับโรคเลือดจางธาลัสซีเมียโดยการใช้สารเคมีชักนำให้เกิดภาวะฮีโมลัยติคอะนีเมียขึ้นในสัตว์ทดลอง สารดังกล่าวนี้คือ สาร phenylhydrazine (PHZ) ซึ่งเป็นสารที่ชักนำให้เกิดภาวะฮีโมลัยติคอะนีเมียในสัตว์ทดลองได้ง่ายและค่อนข้างรวดเร็วทั้งยังให้ผลแน่นอน (Maple et al., 1987) เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสาร PHZ แล้วพบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเนื่องจาก PHZ มีผลโดยตรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงทำให้เกิดการตกตะกอนและมีการทำลายพลาสมาโปรตีนที่สำคัญในเซลล์เม็ดเลือดแดง (Petty et al., 1991) นอกจากนี้การออกซิเดชันตัวเอง (autooxidation) ของ PHZ ทำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาอย่างมากมายและเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ที่เยื่อเซลล์ จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา พบว่าเมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติเมื่อได้รับสาร PHZ สายแอลฟาโกลบินจะถูกออกซิไดส์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงเปลี่ยนแปลง แตกสลายได้ง่าย และแสดงลักษณะคล้ายเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียคือแตกสลายได้ง่าย (Oliviero et al.,1994)

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารต้านออกซิเดชัน 2 ชนิด คือ วิตามินอีและไทรอนต่อภาวะเครียดจากออกซิเดชันของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นในหนูขาวทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะฮีโมลัยติคอะนีเมียด้วยสาร PHZ ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านโลหิตวิทยาและดัชนีสภาพเหล็ก (iron indices) การเปลี่ยนแปลงพลศาสตร์การไหลเวียนเลือด การวิเคราะห์ปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งจะบ่งชี้ถึงภาวะ lipid peroxidation ที่เกิดขึ้น รวมถึงการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสถานภาพธัยออลและเมแทบอลิซึมของไนตริกออกไซด์ในหนูทดลองภายหลังการได้รับสารต้านออกซิเดชัน

วิธีการศึกษา

รูปแบบของการศึกษานี้เป็นการศึกษาภายในตัวของสัตว์ทดลอง (*in vivo model*) สัตว์ทดลองที่ใช้คือหนูขาวพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้น้ำหนัก 200-230 กรัม จากหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตลอดช่วงการทดลองหนูทดลองจะถูกเลี้ยงในห้องพักสัตว์ทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °ซ และควบคุมแสงสว่าง โดยให้หนูอยู่ในที่มืดและสว่างสลับกันทุก 12 ชม. หนูทดลองได้รับอาหารและน้ำตามปกติ และมีการสังเกตพฤติกรรมตลอดการทดลองดังรายละเอียดดังนี้

ศึกษาผลของสารต้านออกซิเดชันต่อภาวะฮีโมลัยติคอะนีเมียในหนูทดลอง

หนูทดลองจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามชนิดของสารต้านออกซิเดชันที่ทำการศึกษาคือ วิตามินอี (α tocopherol acetate) และสารไทรอน หนูทดลองที่ได้รับสารต้านออกซิเดชันในแต่ละกลุ่มนี้ถูกแบ่งเป็นกลุ่มการทดลองย่อยๆ จำนวน 8-10 ตัว/กลุ่ม ตามขนาดของสารต้านออกซิเดชันหรือสารตัวทำละลายซึ่งให้ติดต่อกัน 7 วัน และในวันที่ 5 ของการทดลองทำการชักนำหนูทดลองให้เกิดภาวะฮีโมลัยติคอะนีเมียโดยการฉีดสาร phenylhydrazine (PHZ) ขนาด 125 มก./กก. และยังคงให้สารต้านออกซิเดชันแก่หนูทดลองต่อไปอีก 2 วัน เพื่อให้ครบ 7 วัน ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้รับวิตามินอีหรือตัวทำละลายของวิตามินอี (medium chain triglyceride: MCT) แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยคือ

กลุ่มที่ 1.1 ได้รับวิตามินอีขนาด 10 มก./กก./วัน โดยการฉีดเข้าทางช่องท้องในปริมาตร 0.5 มล./กก.

กลุ่มที่ 1.2 ได้รับวิตามินอีขนาด 50 มก./กก./วัน โดยการฉีดเข้าทางช่องท้องในปริมาตร 0.5 มล./กก.

กลุ่มที่ 1.3 ได้รับ MCT ซึ่งเป็นตัวทำละลายของวิตามินอี โดยการฉีดเข้าทางช่องท้องในปริมาตร 0.5 มล./กก.

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ได้รับสารไทรอนหรือสารละลายตัวทำละลายของไทรอน (0.9% normal saline; NSS) แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อยคือ

กลุ่มที่ 2.1 ได้รับไทรอนขนาด 100 มก./กก./วัน ฉีดเข้าทางช่องท้องในปริมาตร 2 มล./ กก.

กลุ่มที่ 2.2 ได้รับไทรอนขนาด 250 มก./กก./วัน ฉีดเข้าทางช่องท้องในปริมาตร 2 มล./ กก.

กลุ่มที่ 2.3 ได้รับไทรอนขนาด 500 มก./กก./วัน ฉีดเข้าทางช่องท้องในปริมาตร 2 มล./ กก.

กลุ่มที่ 2.4 ได้รับน้ำเกลือ 0.9% ซึ่งเป็นสารตัวทำละลาย ไทรอน โดยการฉีดเข้าทางช่องท้องปริมาตร 2 มล./กก.

กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุม จะไม่ได้ทั้งสารต้านออกซิเดชันและสาร PHZ แต่จะได้รับน้ำเกลือ 0.9% แทนเป็นระยะเวลา 7 วัน

เมื่อครบ 7 วันของการทดลองทำวัดค่าต่างๆ ของหนูทดลองดังต่อไปนี้

วัดการเปลี่ยนแปลงพลศาสตร์การไหลเวียนเลือดไหลเวียนเลือด

ทำการสลบหนูทดลองโดยฉีด pentobarbitone sodium ขนาด 50 มิลลิกรัม/กก. เข้าทางช่องท้อง เมื่อหนูทดลองสลบเรียบร้อยแล้วทำการตรึงหนูทดลองบนโต๊ะผ่าตัด และผ่าตัดเปิดหลอดลมเพื่อช่วยหายใจจากนั้นใช้ท่อ polyethylene (Becton Dickinson and company, U.S.A.) เบอร์ 20 ยาวประมาณ 1 นิ้ว เมื่ออัตราการหายใจสม่ำเสมอแล้วทำการสอดสายสวนหลอดเลือดแดงโคนขา (femoral artery) เพื่อวัดความดันเลือด (blood pressure: BP) และอัตราเต้นของชีพจร (heart rate: HR) ผ่าน pressure transducer (Biopac system Inc., California, U.S.A) ที่เตรียมไว้เพื่อบันทึกความดันเลือดแดง (arterial pressure curve) ผ่านทางเครื่องคอมพิวเตอร์ (Hewlet Packard, Ulsan, Korea) และนำผลการทดลองไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม Acqknowledge data aquisition and analysis software (BIOPAC system, Inc., California, U.S.A.) เมื่อความดันเลือดคงที่แล้ว ทำการเปิดช่องท้องหนูในแนวลำตัวช่วงล่างแล้วใช้ด้ายคล้องหลอดเลือดช่องท้องส่วนล่าง (lower abdominal aorta) ต่อจากนั้นทำการคล้อง blood flow probe ขนาดพอเหมาะเข้าที่หลอดเลือดแดงช่องท้องที่บริเวณช่วงใต้ไตเพื่อวัดอัตราการไหลของเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะท่อนล่างและขาหลัง (hindquarter blood flow: HLF) โดยใช้เครื่อง electromagnetic flowmeter (Carolina Medical Electronics, Inc., North Carolina, U.S.A.) ซึ่งเชื่อมต่อกับเครื่อง BIOPAC system อีกทีหนึ่ง ดังนั้นค่า BP, HR ซึ่งบันทึกได้จากค่า pressure pluse และค่า HBF จะถูกบันทึกและแสดงบนจอคอมพิวเตอร์พร้อมๆ กัน ตลอดช่วงการบันทึกผลทดลองนี้ควบคุมอุณหภูมิของหนูทดลองให้คงที่ที่ 37 °ซ โดยใช้ผ้าห่มไฟฟ้าและแสงไฟของโต๊ะผ่าตัด สำหรับการวัดอุณหภูมิแกนของหนูทดลองใช้ electronic rectal temperature probe ซึ่งต่อเข้ากับ

เครื่องวัดอุณหภูมิ (Indication temperature controller, Bangkok, Thailand)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการตัดลำตัวของหนูช่วงใต้ไตเหนือบริเวณที่คล้อง flow probe เล็กน้อยดึงชั้นผิวหนังและขนออก จากนั้นนำลำตัวท่อนล่างของหนูไปชั่งน้ำหนักเพื่อเป็นค่าน้ำหนักตัวท่อนล่าง (hindlimb weight; HLW) และนำมาคำนวณหาค่า HBF ในเวลา 1 นาทีต่อหน่วยเนื้อเยื่อ 100 กรัม จากนั้นนำค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial pressure, MAP) และค่า HBF ที่วัดได้มาคำนวณหาค่าความต้านทานของหลอดเลือดบริเวณอวัยวะท่อนล่างและขาหลัง (hindquarter vascular resistance: HVR) เมื่อวัดค่าทางพลศาสตร์การไหลเวียนเลือดเรียบร้อยแล้ว ช่วงสุดท้ายของการทดลองทำการฆ่าหนูทดลองด้วยยาสลบเกินขนาดและทำการดูดเลือดทางหลอดเลือดแดงช่องท้อง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเหล็กในซีรัม จากนั้นนำเลือดที่เหลือใส่ในหลอดแก้วที่มี 0.1มล. 0.05 M EDTA แบ่งเลือด 0.4 มล.เพื่อนำไปวิเคราะห์กลูทาไทออน และ 0.5 มล. เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา ส่วนของพลาสมานำไปวิเคราะห์หาปริมาณ MDA ในพลาสมา ส่วนพลาสมาที่เหลือเก็บไว้ที่ 20 °ซ จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Nitrosoglutathione (GSNO) และ Nitric Oxide (Nox) ต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณกลูทาไทออนในเลือด

การวิเคราะห์หาปริมาณกลูทาไทออนในเลือดจะใช้วิธีการของ Tiezes (Tiezes, 1969) และวัดอัตราการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Jasco Model 78000 UV/VIS spectrophotometer, Japan)

การวิเคราะห์หาปริมาณไนตริกออกไซด์เมแทบอไลต์ในพลาสมา

วิเคราะห์ปริมาณ NOx โดยวิธี enzymatic conversion ตามวิธีการของ Verdon และ Dembny (Verdon, et al., 1995; Dembny et al., 1998) สามารถวัดอัตราการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA Plate Reader (Dynatech MR 5000, UK.)

การวัดการเปลี่ยนแปลงดัชนีสภาพเหล็กในซีรัม

ตั้งหลอดทดลองที่ปราศจากเหล็กอิสระที่มีเลือดทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชม. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 15 นาที ดูดส่วนลอยซึ่งเป็นส่วนของซีรัมใส่ในหลอดทดลองที่มีกรดเกลือความเข้มข้น 50% เคลือบอยู่ 2 หลอดๆ ละ 1 มล. ส่งตรวจค่าเหล็กอิสระในซีรัมและความสามารถในการจับกับโปรตีนของเหล็ก รวมถึงค่าความอิ่มตัวของเหล็กในการจับกับทรานสเฟอริน (transferrin) โดยส่งตรวจที่หน่วยจุลทัศน์วินิจฉัย โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การวิเคราะห์หาปริมาณ Nitrosoglutathione ในพลาสมา

การวิเคราะห์หาปริมาณ Nitrosoglutathione (GSNO) ในพลาสมาใช้วิธีของ Saville (Saville, 1958) และ Park (Park and Peter 1996) วัดโดยเครื่อง fluorescense spectrophotometer (Model 650-40: HITASHI: Japan) ที่ emission เท่ากับ 363 นาโนเมตร และ excitation เท่ากับ 450 นาโนเมตร

การวิเคราะห์หาปริมาณ Malondialdehyde ในพลาสมา

การวิเคราะห์หาปริมาณ Malondialdehyde (MDA) ในพลาสมาใช้วิธีการ ของ Draper และคณะ (Draper et al., 1993) และ Ohkawa และคณะ (Ohkawa,et al., 1979) วัดอัตราการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer (Model 78000, Jasco, Japan)

ผลการทดลองทั้งหมดนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± S.E.M.) และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม Sigma statistics, Version 2 และสถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลคือ Student's t-test, Pearson correlation analysis และ Multiple analysis of varience เมื่อทราบว่ามีความแตกต่างภายในกลุ่มการทดลองทั้งหมด จึงเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยใช้ Fishers LDS Multiple comparison test กำหนดค่าความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$

ผลการศึกษา

ผลการเปลี่ยนแปลงทางพลศาสตร์การไหลเวียนเลือดภายหลังการได้รับสารต้านออกซิเดชัน

ตารางที่ 1 (ก) และ (ข) แสดงการเปลี่ยนแปลงพลศาสตร์การไหลเวียนเลือดเมื่อหนูเลือดจางได้รับสารต้านออกซิเดชัน คือ วิตามินอี และไทรอนแล้วนั้นพบว่าวิตามินอีขนาด 50 มก./กก./วัน ส่วนไทรอนขนาด 250 และ 500 มก./กก./วันมีผลเพิ่มความดันเลือดแดงเฉลี่ย (MAP)อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารต้านออกซิเดชัน และกลุ่มที่ได้รับสารต้านออกซิเดชันในขนาดที่ต่ำกว่า (91.45 ± 3.71, 92.8 ± 2.46, 93.23 ± 1.37 และ 71.96 ± 2.90 ตามลำดับ; $P<0.001$: ตารางที่ 1 (ก) และ (ข)

การให้สารต้านออกซิเดชันในขนาดสูง คือ วิตามินอี 50 มก/กก./วัน และสารไทรอน 250 และ 500มก./กก./วัน มีผลเพิ่มความดันเลือดแดงเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของค่าความดันเลือดจะประมาณ 25-30% ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการที่สารต้านออกซิเดชันมีผลลดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นโดยอนุมูลอิสระเหล่านี้ ได้แก่ $O2^{\bullet-}$ H_2O_2 $OH^{\bullet}$ $ONOO^-$ และ NO ซึ่งปกติแล้วอนุมูลอิสระเหล่านี้มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดส่วนปลายเกิดการคลายตัวได้โดยตรง (Beckman and Willem 1996; Wolin et al., 1998) เมื่ออนุมูลอิสระเหล่านี้ลดลงการคลายตัวของหลอดเลือดส่วนปลายจึงลดลง ทำให้ความต้านทานของหลอดเลือดส่วนปลายเพิ่มขึ้นดังจะเห็นได้จากค่า HVR ของหนูเลือดจางที่ได้รับสารต้านออกซิเดชันคือ วิตามินอีในขนาดสูงสุดนี้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ส่งผลให้ความดันเลือดเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้อนุมูลอิสระเหล่านี้ยังมีผลกระตุ้นการสร้าง prostaglandins ซึ่งเป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว ดังนั้นการที่อนุมูลอิสระลดลงจึงมีผลให้การสร้าง prostaglandins น้อยลง หลอดเลือดจึงคลายตัวได้น้อยลง ทำให้ความต้านทานหลอดเลือดส่วนปลายเพิ่มขึ้น ความดันเลือดแดงเฉลี่ยจึงสูงขึ้น ซึ่งการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าไทรอนขนาด 10 mM สามารถกำจัด $ONOO^-$ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ferdinandy et al., 2000) การศึกษาของ Venditti และคณะ พบว่าเมื่อฉีดวิตามินอีขนาด 100 มก./กก./วัน เป็นระยะเวลา 10 วัน สามารถทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่มีภาวะ ischaemic reperfusion โดยพบว่ามีการลดลงอย่างมากของ MDA และ lipid peroxides ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Venditti et al., 1999)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ GSH ในเลือดภายหลังการได้รับสารต้านออกซิเดชัน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกลูทาไทออนในเลือดภายหลังจากได้รับสารต้านออกซิเดชันแสดงให้เห็นว่าปริมาณกลูทาไทออนในเลือดของหนูเลือดจางภายหลังได้รับสาร PHZ 48 ชั่วโมงจะมีค่าต่ำกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (177.81 ± 10.74 และ 251.96 ± 25.56; $P<0.05$, ภาพที่ 1) แต่เมื่อได้รับสารต้านออกซิเดชัน คือ วิตามินอีและไทรอนเป็นเวลา 7 วันนั้น พบว่าเฉพาะหนูเลือดจางที่ได้รับวิตามินอีขนาดสูง (50 มก./กก./วัน) เท่านั้นที่ความเข้มข้นของกลูทาไทออนในเลือดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเกือบเท่ากับหนูปกติ โดยมีค่าเท่ากับ 202.44 ± 5.56 ไมโครกรัม/มล. ในขณะที่กลุ่มหนูปกติมีค่าเท่ากับ 222.27 ± 11.08 ไมโครกรัม/มล. ส่วนหนูเลือดจางกลุ่มที่ได้วิตามินอีขนาดต่ำรวมถึงสารไทรอนขนาดต่าง ๆ ทั้ง 3 ขนาดนั้น ค่ากลูทาไทออนในเลือดก็ยังคงต่ำกว่ากลุ่มหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ NOx และ GSNO ในพลาสมา

จากภาพที่ 2 และภาพที่ 3 แสดงว่าสารต้านออกซิเดชันในขนาดสูง คือ วิตามินอี 50 มก./กก. และไทรอน 250 และ 500 มก./กก. สามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์เมแทบอไลต์ (NOx) และ nitrosogluta thione (GSNO) ในพลาสมาได้ อย่างไรก็ตาม $ONOO^-$ สามารถเปลี่ยนแปลงเป็น nitrite และ nitrate ได้ในที่สุด หรือที่เรียกว่า NOx นั่นเอง ดังนั้นการที่พบว่าปริมาณ NOxลดลงภายหลังจากหนูเลือดจางได้รับสารต้านออกซิเดชันทั้งสองชนิดก็น่าจะสามารถสื่อนำได้ว่าปริมาณ $ONOO^-$ ลดลงด้วย (Wink et al., 1997) ส่วนการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของ NO ที่สำคัญอีกทางคือ การที่ NO เข้า

ทำปฏิกิริยากับ GSH เปลี่ยนเป็นสารประกอบ GSNO ซึ่งมีผลทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดคลายตัว พบว่าวิตามินอีขนาด 50 มก./กก. /วัน และไทรอนขนาด 500 มก./กก./วัน เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการทำปฏิกิริยานี้ได้ โดยพบว่าปริมาณ GSNO ในพลาสมาของหนูเลือดจางที่ได้รับสารต้านออกซิเดชันทั้งสองชนิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารต้านออกซิเดชัน ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Minamiyama ที่พบว่าการยับยั้งการสร้าง NO มีผลทำให้ GSH ในเซลล์ตับสูงขึ้นได้และ GSNO ในพลาสมาลดลง (Minamiyama et al., 1996)

ผลวิเคราะห์หาปริมาณ MDA ในพลาสมา

วิตามินอีและไทรอนในทุกขนาดมีผลทำให้ปริมาณ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.001$, ภาพที่ 4) เนื่องจากวิตามินอีและไทรอนเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีฤทธิ์ยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้ในทุกขั้นตอน จึงส่งผลให้การทำลายโมเลกุลของไขมันลดลง นอกจากนี้ไทรอนยังมีฤทธิ์ในการเข้าจับโลหะหนักอิสระที่มีเพิ่มขึ้นในเลือดในภาวะเลือดจาง ดังนั้นสารต้านออกซิเดชันทั้งสองชนิดจึงลดการเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้มีการสร้าง $OH^{\bullet-}$ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการทำลายโมเลกุลของไขมันที่ผนังเซลล์ ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา ที่พบว่าวิตามินอีและไทรอนมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ได้โดยตรง (Sethi et al., 2000; Ferdinandy et al., 2000)

สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยในครั้งนี้สรุปได้ว่าสาร PHZ สามารถชักนำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนูทดลอง การใช้สารต้านออกซิเดชันทั้งสองชนิดคือ วิตามินอีและไทรอนในขนาดสูงสามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันโดยพบว่าปริมาณ MDA NO และ GSNO ลดลงและปริมาณ GSH เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเลือดจางกลุ่มที่ไม่ได้รับสารต้านออกซิเดชัน ($p < 0.001$) ส่งผลให้พลศาสตร์การไหลเวียนเลือดดีขึ้น

ข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สารต้านออกซิเดชันเพื่อลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันและปกป้องเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเลือดจางบีตาธาลัสซีเมียได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยที่น่าสนใจที่ควรศึกษาวิจัยต่อไปได้แก่ การตรวจวัดปริมาณ $ONOO^-$ และ $O_2^{\bullet-}$ โดยตรงเพื่อยืนยันภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่เกิดขึ้นและบทบาทของสารทั้งสองชนิดในการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่เกิดขึ้นภาวะเลือดจาง และการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการป้องกันภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่เกิดขึ้น เช่น SOD, catalase และ GSH peroxidase รวมถึงการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ที่สร้าง $O_2^{\bullet-}$ ได้โดยตรง คือ NAD(P)H ว่ามีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่อย่างไร ตลอดจนการใช้สารที่มีผลยับยั้งการทำงานของ NO โดยตรงในภาวะเลือดจาง เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงของสถานภาพธัยออลและพลศาสตร์การไหลเวียนเลือดที่เกิดขึ้นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่นประจำปีงบประมาณ 2542 และทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่นประจำปี 2543-2544

เอกสารอ้างอิง

สุทัศน์ ฟู่เจริญ, ปราณี ฟู่เจริญ. 2537. Thalassemia and hemoglobinopathy. ใน: ถนอมศรี ศรีชัยกุล บรรณาธิการ. **ตำราโลหิตวิทยา: การวินิจฉัยและการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: บริษัททีพี. พริ้นท์ จำกัด. หน้า 202-242.

อานนท์ บุณยะรัตเวช. 2535. ความผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชัน. ใน: อานนท์ บุณยะรัตเวช. บรรณาธิการ. **โลหิตวิทยาเม็ดเลือดแดง**. กรุงเทพฯ: หจก.ฟันนีพับบริชชิ่ง. 231-246.

Aessops A, Stamatelos G, Skoumas V, Vassilopoulos G, Mantzourani M, Loukoulos C. 1995. Pulmonary hypertension and right heart failure in patients with β- thalassemia intermediate. **Chest**.1: 50-53.

Beckman JS, Willem KH. 1996. Nitric Oxide, peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. **Am J Physiol**. 271: C1424-C1437.

Chan AC. 1999. Interaction of Antioxidants and their implication in Genetic Anemia. **P.S.E.B.M.** 222(3): 274-282.

Dembny KD, Roza AM, Johnson C, Adums MB, Pieper GM. 1998. Heparin interferes with the determination of plasma nitric oxide by inhibition of enzymatic conversion of nitrate to nitrite by nitrate reductase. **Clinica Chimica Acta**. 275: 107-114.

Draper HH, Squires EJ, Mahmodi H, Wu J, Agarwal S and Hadley M. 1993. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic Biol Med**. 15: 353-353.

Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. 2000. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine- induced myocardial contractile failure. **Circ Res**. 4: 87(3): 241-247.

Krishna CM, Liebmann JE, Kaufman D, DeGraff W, Hahn SM, McMurry T, Mitchell JB, Russo A. 1992. The catecholic metal sequestering agent 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate confers protection against oxidative cell damage. **Arch Biochem Biophys**. 294(1): 98-106.

Hashmi AN, Saleemudin M. 1996. Phenylhydrazine causes sulfhydryl oxidation and protein aggregation in hemoglobin- free human erythocyte membreane. **Biochem Mol Biol Int**. 40: 543-550.

Maple KR, Jordan SJ, Mason RP. 1987. In vivo rat hemoglobin thiyl free radical formation following phenylhydrazine administration. **Mol Pharmacol**. 30: 344-350.

Minamiyama Y, Takemura S, Koyama K, Yu H, Miyamoto M, Inoue M. 1996. Dynamic aspects of glutathione and nitric oxide metabolism in endotoxemic rats. **Am J Physiol**. 271: G575-G581.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analst Biochem**. 95: 351-358.

Oliviero O, Franceschi LD, Capellini MD, Girelli D, Corrocher R, Brugnara C. 1994. Oxidative damage and erythrocyte membrane transport abnormalities in thalassemias. **Blood**. 184(1): 315-320.

Park JKJ, Peter K. 1997. Fluorometric Detection of Biological S- nitrosothiols. **Anal Biochem**. 249: 61-66.

Petty HR, Zhou M, Zheng Z. 1991. Oxidative damage by phenylhydrazine diminishes erythrocyte anion transport. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1064: 308-304.

Reiter RJ. 1999. Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. **Progress in Neurobiology**. 56: 359-384.

Saville B. 1958. A scheme for colorimetric determination of microgram amounts of thiols. **Analst**. 83: 670-672.

Tietze F. 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidizes glutathiones applications to mammalian blood another tissues. **Anal Biochem**. 27: 502-522.

Verdon CP, Burton BA, Prior RL. 1995. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP+when Griess reaction is used to assay for nitrite. **Anal Biochem**. 224: 502-508.

Wolin MS, Davidson CA, Kaminski PM, Faygersh RP, Mohazzab -HKM. 1998. Oxidant-Nitric Oxide Signalling Mechanism in Vascular Tissue. **Biochemistry (Mosc)**. 63(7): 810-816.

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงพลศาสตร์การไหลเวียนเลือดของหนูเลือดจางภายหลังจากได้รับวิตามินอี (ก) และ สารไทรอน (ข) เป็นเวลา 7 วันเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นหนู ปกติและกลุ่ม MCT และ NSS ซึ่งเป็นตัวทำละลายวิตามินอีและสารไทรอนตามลำดับ

(ก)

Parameter measurements	Control	MCT	Vitamin E 10 mg/kg/day	Vitamin E 50 mg/kg/day
Systolic pressure (mmHg)	130.08 ± 4.05†	106.25 ± 2.16*	114.57 ± 2.27*	128.11 ± 4.7†
Diastolic pressure (mmHg)	96.38 ± 4.22†	56.20 ± 1.40*	61.14 ± 2.04*	73.11 ± 3.39*
Mean arterial pressure (mmHg)	107.62 ± 4.24†	72.88 ± 1.27*	78.95 ± 1.97*	91.45 ± 3.71†
Heart rate (bpm)	367.38 ± 15. 58	354.3 ± 13.39	330.57 ± 13.82	340.00 ± 22.96
Hindquarter blood flow (ml/min/100 g tissue)	13.98 ± 0.96†	19.62 ± 1.75*	15.24 ± 0.58*	17.87 ± 1.14*
Hindquarter vascular resistance (HVR; PRU)	7.90 ± 0.70†	3.91 ± 0.27*	5.14 ± 0.24*†	5.36 ± 0.43*†

† แตกต่างจากกลุ่มหนูเลือดจางที่ได้รับตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

* แตกต่างจากกลุ่มหนูควบคุมอย่างมีนัยสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

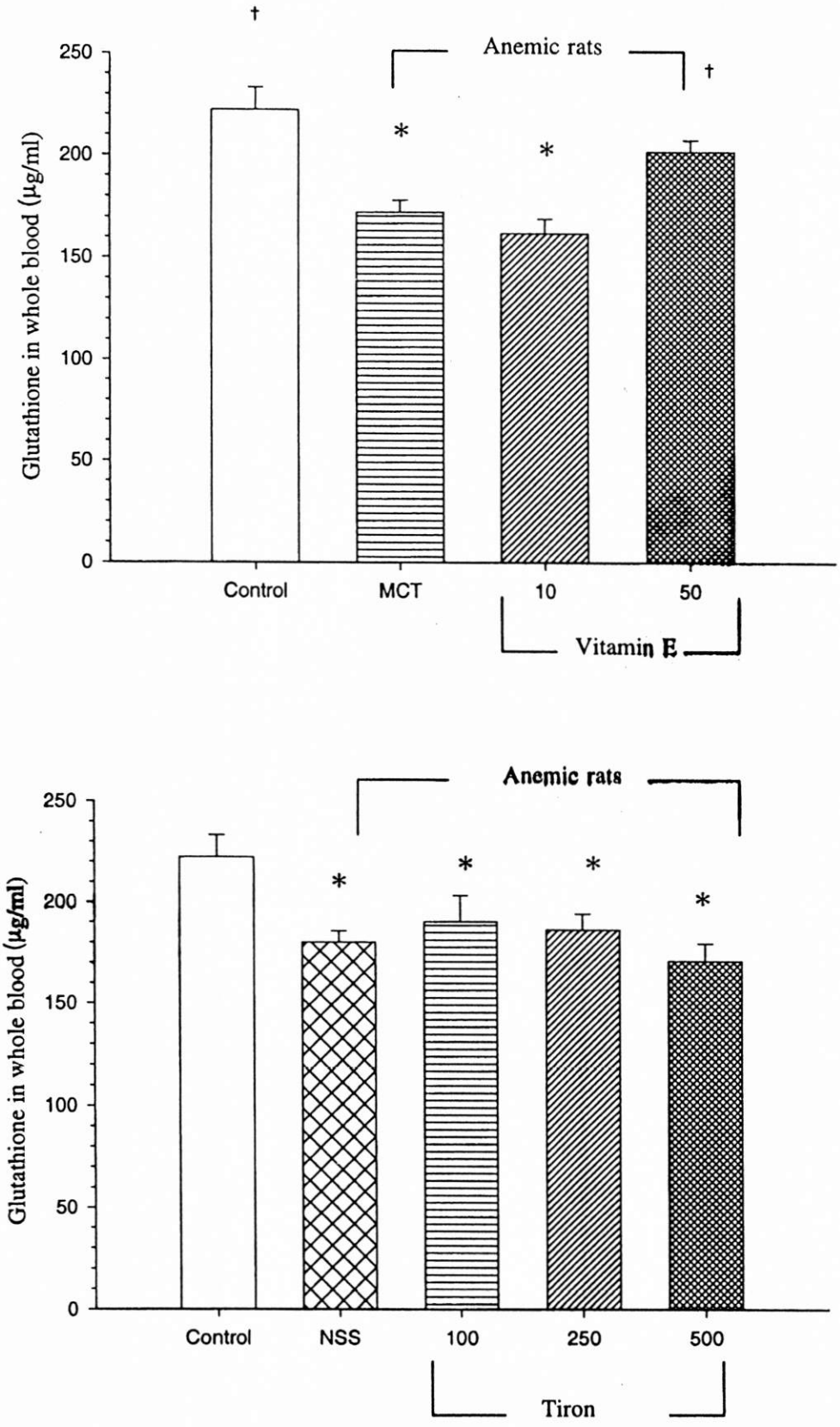
ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงพลศาสตร์การไหลเวียนเลือดของหนูเลือดจางภายหลังจากได้รับวิตามินอี (ก) และ สารไทรอน (ข) เป็นเวลา 7 วันเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นหนูปกติและกลุ่ม MCT และ NSS ซึ่งเป็นตัวทำละลายวิตามินอีและสารไทรอนตามลำดับ (ต่อ)

(ข)

Parameter measurements	Control	NSS	**Tiron 100 mg/kg/day**	**Tiron 250 mg/kg/day**	**Tiron 500 mg/kg/day**
Systolic pressure (mmHg)	130.08 ± 4.05†	105.13± 3.22*	106.13 ± 2.85*	126.00 ±7.8†	126.98 ± 1.82†
Diastolic pressure (mmHg)	96.38± 4.22†	55.38 ± 3.11*	56.25± 4.42*	76.20 ±4.26*	72.28 ± 2.06*
Mean arterial pressure (mmHg)	107.62 ± 4.24†	71.96 ± 2.90*	72.88 ± 3.69*	92.8 ± 2.46†	93.23 ± 1.37†
Heart rate (bpm)	367.38 ± 15. 58	393.75 ± 18.87	363.13 ± 15.29	375.6 ± 32.73	355.72 ± 16.95
Hindquarter blood flow (ml/100g tissue/ min	13.98 ± 0.96†	23.50 ± 1.54*	23.80 ± 2.76*	21.61± 0.54*	23.02 ± 2.04*
Hindquarter vascular resistance (HVR; PRU)	7.90 ± 0.70†	3.14 ± 0.23*	3.28 ± 0.36*	4.30 ± 0.14*	4.45 ± 0.50*

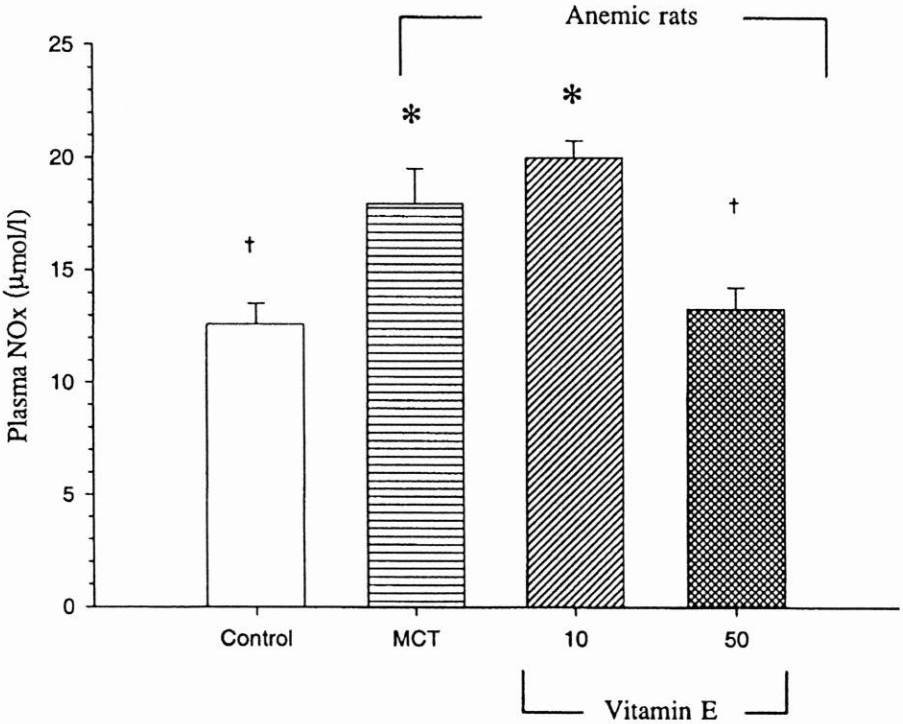
† แตกต่างจากกลุ่มหนูเลือดจางที่ได้รับตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

* แตกต่างจากกลุ่มหนูควบคุมอย่างมีนัยสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

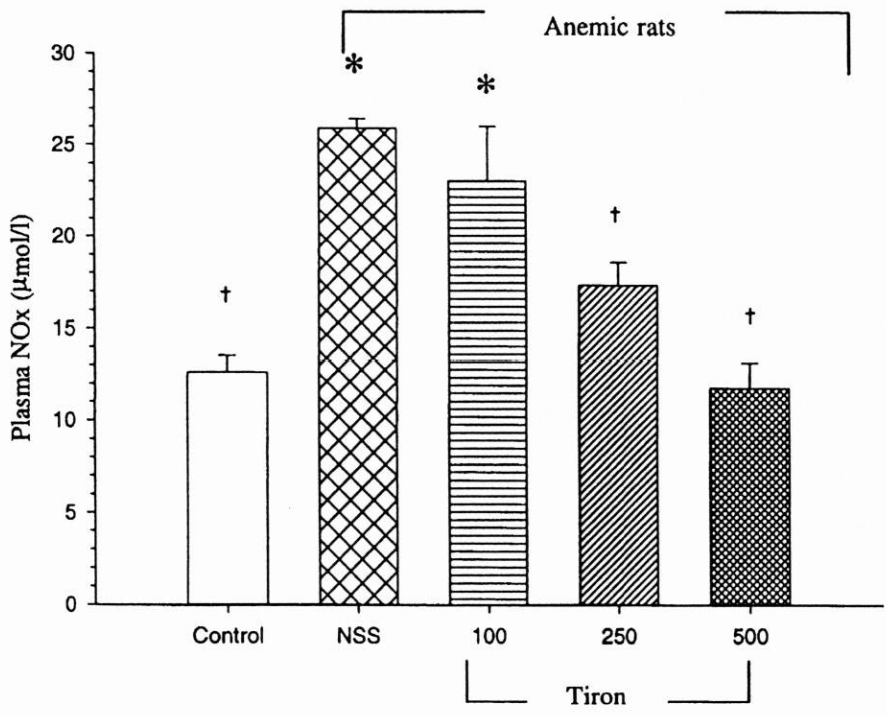


ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูทาไทออนในเลือดของหนูเลือดจางที่ได้รับวิตามินอี (ก) และสารไทรอน (ข) เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นหนูปกติและกลุ่ม MCT และ NSS ซึ่งเป็นสารตัวทำละลายวิตามินอีและสารไทรอนตามลำดับ, † แตกต่างจากกลุ่มหนูเลือดจางที่ได้รับสารตัวทำละลาย * แตกต่างจากกลุ่มหนูปกติ ($P<0.001$)

(ก)



(ข)

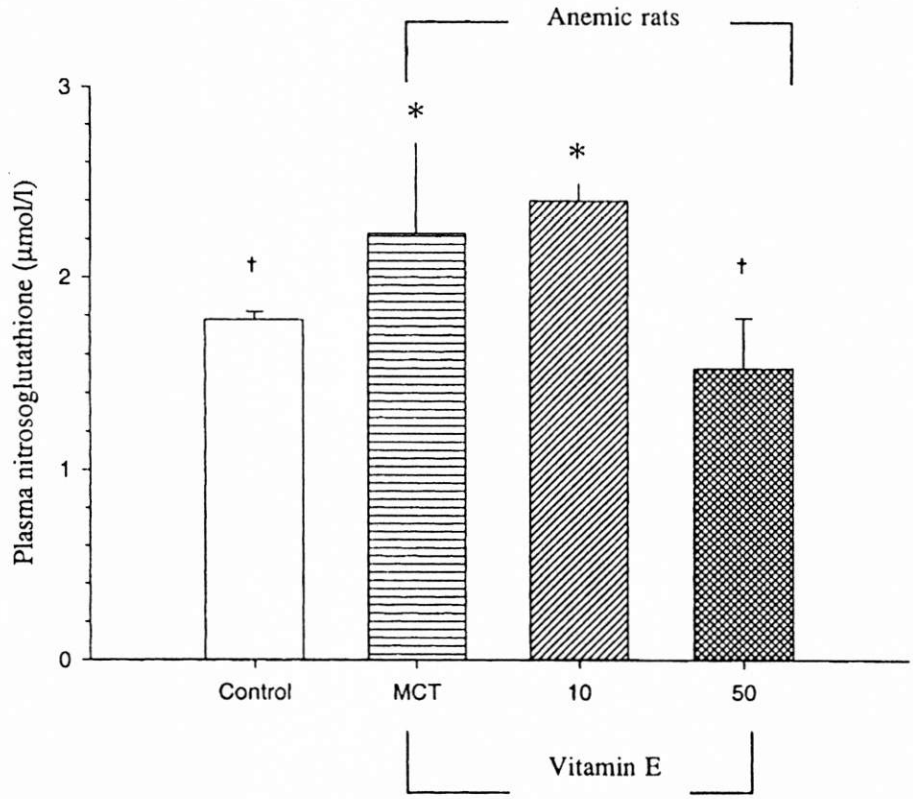


ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ NOx ในพลาสมาของหนูเลือดจางภายหลังจากได้รับ วิตามินอี (ก) และสารไทรอน (ข) เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นหนูปกติและกลุ่ม MCT และ NSS ซึ่งเป็นหนูเลือดจางที่ได้รับสารตัวทำละลายวิตามินอีและสารไทรอนตามลำดับ

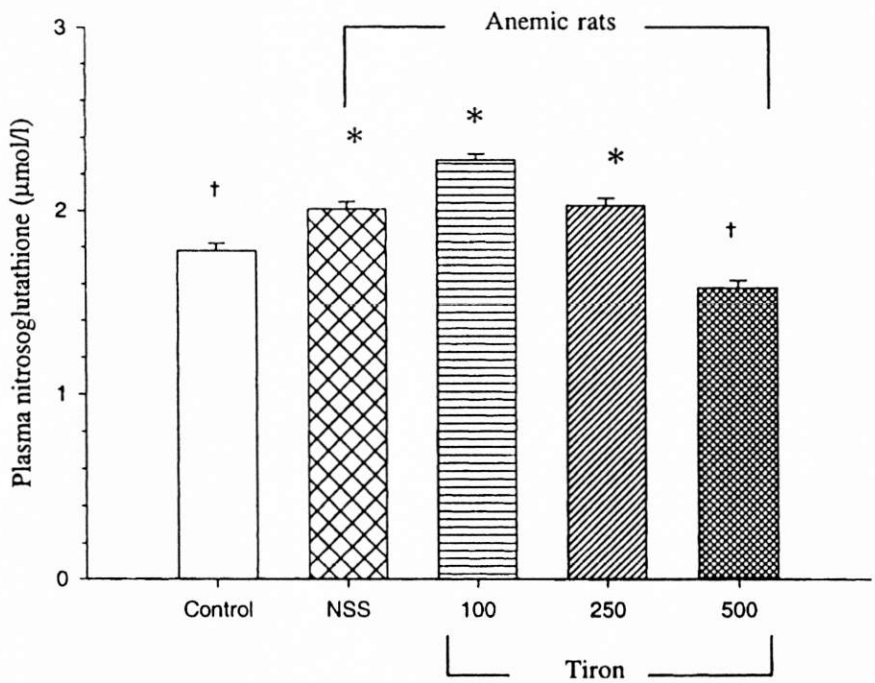
† แตกต่างจากกลุ่มหนูเลือดจางที่ได้รับตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

* แตกต่างจากกลุ่มหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

(ก)



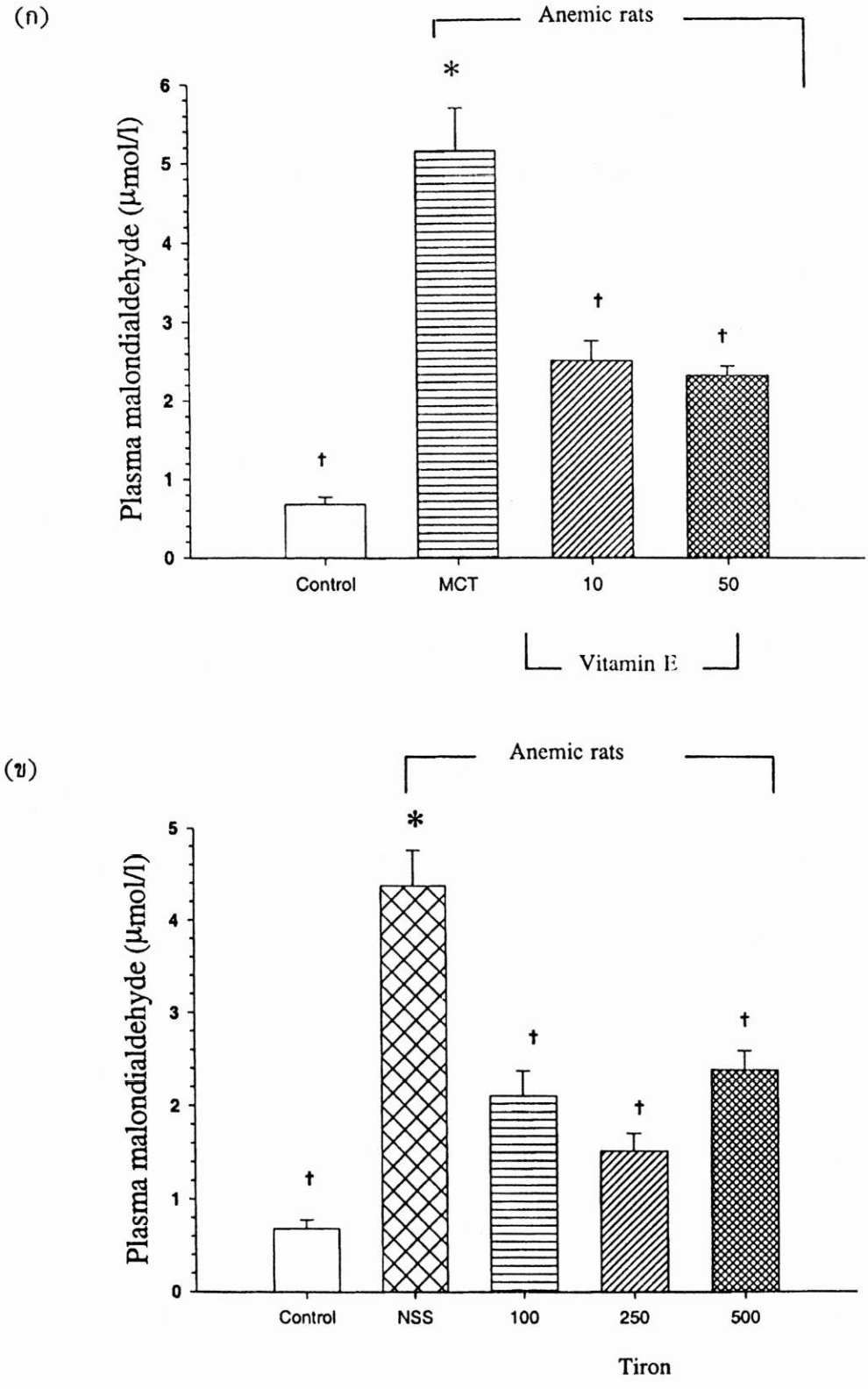
(ข)



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ nitrosoglutathione ในพลาสมาของหนูเลือดจางหลังการได้รับสารต้าน ออกซิเดชันทั้ง 2 ชนิด โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

† แตกต่างจากกลุ่มหนูเลือดจางที่ได้รับตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

* แตกต่างจากกลุ่มหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ malondialdehyde ในพลาสมาของหนูเลือดจางภายหลังจากได้รับ วิตามิน อี (ก) และสารไทรอน (ข) เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นหนูปกติและกลุ่ม MCT และ NSS ซึ่งเป็นหนูเลือดจางที่ได้รับสารตัวทำละลายวิตามินอีและสารไทรอนตามลำดับ † แตกต่างจากกลุ่มหนูเลือดจางที่ได้รับตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) *แตกต่างจากกลุ่มหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)