

Thesis Title Measurement of Hydrogen Peroxide in Urine and Tracheal Aspirate from Lung Disease Patients with Oxidative Stress by Amperometric Sensor Technique

Author Miss Supattra Panya-artd

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc.Prof.Dr. Somdet	Srichairatanakool	Advisor
Lect. Dr.Donrawee	Leelarungrayub	Co-advisor
Lect. Thirasak	Borisuthibandit M.D.	Co-advisor

ABSTRACT

Oxidative stress and airway inflammation are responsible for the disease progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), causing increased bronchial hyperresponsiveness, destruction of airway epithelial cells and impaired function of anti-proteases. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is one of the reactive oxygen species (ROS) that serves as a key regulator for many oxidative stress-related states. Because of its short-lived time and instability, rapid detection must be facilitated via increased sensitivity in testing methods. The aim of this study was to develop an amperometric sensor (AS) technique for measurement of urinary and tracheal

aspiratal H_2O_2 concentrations of COPD patients when will be compared to the standard colorimetric method. Limit of detection, repeatability, measurement range of electrode and interfering substances were investigated. H_2O_2 concentrations were measured in urine and tracheal aspirate samples obtained from the COPD patients ($n = 10$) by using the AS technique and ferrous ion oxidation xylenol orange (FOX) assay. As results, the response current signals of the AS technique were linear in the ranges of 60-360 μM H_2O_2 and the detection limit was 60 μM H_2O_2 . High concentrations of ascorbic acid (30 - 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and uric acid (0.05 - 0.25 mg/ml) reduced the current signals; on the contrary, creatinine (0.5 - 2.0 mg/ml) increased the current signals. Protein contamination in the ranges from 0.05 – 0.20 mg/ml did not affect the signals of measurement. The stability of electrode was approximately seven times of reused.

Urinary H_2O_2 concentrations of healthy volunteers detected by FOX assay ($80.15 \pm 3.24 \mu\text{M}$) were slightly lower than those detected by the AS technique ($88.20 \pm 4.10 \mu\text{M}$) ($p = 0.031$). However, urinary H_2O_2 concentrations of the COPD patients detected by the FOX assay ($97.85 \pm 4.13 \mu\text{M}$) and the AS technique ($99.67 \pm 3.44 \mu\text{M}$) were comparable ($p = 0.548$). Considerably, the urinary H_2O_2 concentrations were higher in the volunteers than in the COPD patients ($p < 0.05$) when assays with the two different methods. In addition, the urinary H_2O_2 concentrations assayed by the two methods were well correlated ($r^2 = 0.565$, correlation coefficient = 0.641) and insignificantly different ($p = 0.268$).

Tracheal aspiratal H_2O_2 concentrations of the COPD patients detected by FOX assay ($32.38 \pm 2.564 \mu\text{M}$) and AS technique ($35.79 \pm 2.43 \mu\text{M}$) was not

significantly different between these two methods ($p = 0.226$). Overall, the hydrogen peroxide concentrations assayed by AS technique were consistent with the ones assayed by FOX method.

In conclusion, AS technique is a rapid, convenient method for measurement of hydrogen peroxide concentrations in clinical specimens. The results are consistent with those detected by the chemical FOX method. Advantages of the AS technique are home-made, simple, versatile and portable.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปัสสาวะและสิ่งคัดลอก
จากหลอดลมของผู้ป่วยโรคปอดที่มีภาวะออกซิเดทีฟสเตรสโดย
เทคนิคแอมเพอโรเมตริกเซนเซอร์

ผู้เขียน นางสาวสุพัตรา ปัญญาอาจ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.สมเดช	ศรีชัยรัตนกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ดร.คณรวิ	ลีลารุ่งระยับ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
นพ.ธีรศักดิ์	บริสุทธิบัณฑิต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ภาวะออกซิเดทีฟสเตรสและการอักเสบเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง ซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการตอบสนองในหลอดลม และส่งผลไปทำลายเซลล์เยื่อและทำให้หน้าที่ด้านการทำงานเอนไซม์โปรตีนเอสบกพร่อง ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารประกอบออกซิเจนที่ไวในการทำปฏิกิริยาและเป็นตัวการควบคุมที่สำคัญในขั้นตอนการเกิดโรคเนื่องจากสลายตัวได้ง่ายและไม่เสถียรจึงต้องตรวจวัด ด้วยวิธีที่มีความรวดเร็วและมีความไววัดสูงประสงค์ของการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคแอมเพอโรเมตริกเซนเซอร์ (AS technique) เพื่อตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปัสสาวะและสิ่งคัดลอกในผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังเทียบกับวิธีทางเคมี ข้อจำกัดของการวัด ความสามารถในการตรวจวัดซ้ำๆ การประเมินช่วงของการใช้ อิเล็กโทรด และ สารรบกวนที่ได้จากการวัด ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ประเมินในตัวอย่างของปัสสาวะ และสิ่งคัดลอกในผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังจำนวน 10 คน โดยใช้ AS technique และ ferrous ion oxidation xylenol orange (FOX) assay ผลการศึกษาพบว่าสัญญาณไฟฟ้าจาก AS technique แปรผันเป็นเส้นตรงในช่วง 60-360 ไมโครโมลาร์

ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้เท่ากับ 60 มิลลิโมลาร์ ระดับวิตามินซี (30-60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และกรดยูริก (0.05 - 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) มีผลลดสัญญาณไฟฟ้าจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ขณะที่ครีเอตินิน (0.5 - 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) มีผลต่อการเพิ่มสัญญาณไฟฟ้าจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การปนเปื้อนของโปรตีน (0.05 - 0.20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ไม่มีผลต่อสัญญาณที่ตรวจวัดอิเล็กโทรดจะมีความเสถียรในการตรวจวัดสารตัวอย่างได้ไม่เกิน 7 ครั้ง

ผลการวัดระดับของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปัสสาวะของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีที่ตรวจวัดโดยวิธี FOX assay พบว่ามีค่าเท่ากับ 80.15 ± 3.24 ไมโครโมลาร์ และมีการลดระดับลงมากกว่าการตรวจวัดโดย AS technique มีค่าเท่ากับ 88.20 ± 4.10 ไมโครโมลาร์ ($p = 0.031$) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ผลการวัดระดับของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังที่ตรวจวัดโดยวิธี FOX assay พบว่ามีค่าเท่ากับ 97.85 ± 4.13 ไมโครโมลาร์ และการตรวจวัดโดย AS technique มีค่าเท่ากับ 99.67 ± 3.44 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกัน ($p = 0.548$) ตามลำดับ มีการเพิ่มของการวัดระดับของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปัสสาวะกลุ่มอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีมากกว่าผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง ($p < 0.05$) เมื่อวัดร่วมกับความแตกต่างของสองวิธีการ นอกจากนี้ การวัดระดับของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปัสสาวะโดยสองวิธีการนี้พบที่มีความสัมพันธ์กัน ($r^2 = 0.565$, ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ = 0.641) และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.2679$)

การวัดระดับของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ใน สิ่งคัดหลั่งของผู้ป่วยโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังที่ตรวจวัดโดยวิธี FOX assay มีค่าเท่ากับ 32.378 ± 2.564 ไมโครโมลาร์ และวิธี AS technique มีค่าเท่ากับ 35.799 ± 2.430 ไมโครโมลาร์ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง 2 วิธีการ ($p = 0.226$)

สรุปผลการศึกษาได้ว่า AS technique เป็นวิธีทางเคมีไฟฟ้าที่สะดวกรวดเร็วสำหรับใช้วัดความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสิ่งส่งตรวจทางคลินิก และให้ผลการตรวจวัดสอดคล้องกับวิธีทางเคมีคือ FOX assay มีข้อดีหลายอย่างเช่นสามารถผลิตขึ้นใช้งานได้ในประเทศ ง่ายในการใช้และนำติดตัวไปใช้วัดที่อื่นได้