หัวข้อวิทยานิพนธ์	เมแทบอลิซึมของธาตุเหล็กและการคีเลชั่นโดยสาร 1-(*เอ็น*-อะซีติล-6-อะมิโนเฮกซิล)-3-ไฮดรอกซี-2-เมธิลไพริดิน-4-โอน (ซีเอ็มวัน) ในเซลล์และหนูธาลัสซีเมียชนิดบีต้าที่มีภาวะเหล็กเกิน
ผู้เขียน	นางสาวกนกวรรณ กุลประชากานต์
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ.ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกูล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ศ.นพ. สุทัศน์ ฟู่เจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. ชฎา พิศาลพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ภาวะธาตุเหล็กเกินสัมพันธ์กับการเกิดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสที่พบได้ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีต้า เนื่องจากมีการดูดซึมธาตุเหล็กที่เพิ่มขึ้นและได้รับการเติมเลือดเป็นประจำ ภาวะเหล็กเกินในตับสามารถพัฒนาหรือทำให้เกิดโรคตับเรื้อรังได้ ยาขับเหล็กที่มีประสิทธิภาพ อาทิเช่น ดีเฟอริโพรน (DFP) และเดสเฟอริออกซามีน (DFO) รวมทั้งสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ในการรักษาเพื่อปรับปรุงคุณภาพชีวิตและการมีชีวิตรอดของผู้ป่วย

ยาขับเหล็กชนิดไบเดนเทรต (bidentate) ชนิดรับประทานตัวใหม่ ชื่อ 1-เอ็น-อะซิติล-6-อะมิโนเฮกซิล-3-ไฮดรอกซี-2-เมธิลไพริดิน-4-โอน หรือซีเอ็มวัน (CM1) ถูกนำมาศึกษาทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* ซีเอ็มวันเป็นยาขับเหล็กที่มีโครงสร้างคล้ายกับดีเฟอริโพรน ซึ่งสามารถจับกับธาตุเหล็กในรูปที่เป็นพิษ ซึ่งรวมถึง non-transferrin bound iron (NTBI), labile plasma iron (LPI) และ labile iron pool ในภาวะสมดุลของธาตุเหล็ก เฮปซิดินซึ่งเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 25 ชนิดและมีพันธะไดซัลไฟด์ 4 แห่ง เฮปซิดินจะทำหน้าที่ควบคุมการขนส่งธาตุเหล็กเข้ามาในเซลล์ลำไส้เล็กและการขนส่งธาตุเหล็กออกจากเซลล์แมคโครฟาจ ระดับการแสดงออกของยีนเฮปซิดินและความเข้มข้นของเฮปซิดินจะสะท้อนให้เห็นถึงสภาวะการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการ

ขาดธาตุเหล็ก การมีธาตุเหล็กมากเกินและสภาวะการเกิดโรคตับบางชนิดได้ เทคนิค competitive ELISA และ LC/MS ถูกนำมาใช้ในการวัดปริมาณความเข้มข้นของเฮปซิดินในพลาสมาและปัสสาวะ อย่างไรก็ตามค่าใช้จ่ายในการตรวจวัดหาปริมาณเฮปซิดินด้วยวิธีการเหล่านี้มีราคาที่สูงมาก

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพของการรักษาด้วยยาขับเหล็กชนิดซีเอ็มวันในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงและหนูทดลองธาลัสซีเมียชนิด Heterozygous β-knockout (BKO) ที่มีภาวะเหล็กเกินและต้องการพัฒนาวิธีการใหม่เพื่อใช้สำหรับการตรวจวัดปริมาณเฮปซิดิน จากการทดลองพบว่ายาขับเหล็กซีเอ็มวันช่วยลดลดระดับของธาตุเหล็กรูป LIP การเกิดอนุมูลอิสระ (ROS) ทั้งในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงและเซลล์มะเร็งตับที่มีภาวะเหล็กเกินในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้น ซีเอ็มวันยังช่วยเพิ่มศักย์ไฟฟ้าระหว่างเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย ($\Delta\Psi_m$) ในเซลล์ตับปฐมภูมิจากหนูเมาส์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การรักษาร่วมกันของยาขับเหล็กซีเอ็มวันกับ DFP ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และ DFO ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ แสดงให้เห็นถึงการลดลงของระดับ LIP ในเซลล์ทั้งสองชนิดและมีแนวโน้มที่จะช่วยลดระดับของ ROS ในเซลล์มะเร็งตับในหนูทดลอง BKO ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินโดยกินอาหารที่มีส่วนผสมของธาตุเหล็กเป็นเวลานาน จากนั้นจึงทำการรักษาโดยการให้ยาขับเหล็กซีเอ็มวัน (50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน) พบว่าปริมาณธาตุเหล็กในรูป NTBI, LPI และ มาลอนไดแอลดีไฮด์ (MDA) ในพลาสมาลดลงแต่ระดับของเฟอร์ริติน (Ft) ไม่ได้ลดลงหลังจากได้รับยาขับเหล็กซีเอ็มวัน

สายเปปไทด์สังเคราะห์สองชนิดคือ GGHG และ DTH-NH_2 ซึ่งมีตำแหน่งในการจับกับโลหะที่คล้ายคลึงกับส่วนปลาย N-terminal ของเฮปซิดินได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับโลหะทองแดง และเฮปซิดินที่มีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงก็ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษานี้ด้วย จากผลการทดลองพบว่าการจับกับโลหะทองแดงของอัลบูมินนั้นไม่สามารถนำมาใช้แสดงเป็นแบบจำลองที่น่าเชื่อถือได้เมื่อทำการทดลองในสายเปปไทด์ที่คล้ายคลึงกับเฮปซิดินทั้งสองชนิดนี้และความเข้มข้นของซีรั่มเฮปซิดินในการเกิดพันธะกับโลหะทองแดงนั้นยังมีค่าน้อยกว่าซีรั่มอัลบูมินมาก นอกจากนี้ยังพบว่าเฮปซิดินที่มีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงสามารถจับกับโลหะทองแดงได้ซึ่งสามารถนำไปใช้พัฒนาเป็นวิธีการตรวจวัดปริมาณเฮปซิดินแบบ competitive fluorescent hepcidin probe ได้

จากการค้นพบของเราจึงช่วยสนับสนุนหลักฐานของสารซีเอ็มวันในการเป็นยาขับเหล็กและมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระในตับที่เกิดภาวะเหล็กเกิน โดยอาจจะมีส่วนช่วยในการปกป้องการเกิดภาวะออกซิเดทีฟในตับและการเกิดการอักเสบ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของการรักษาด้วยยาขับเหล็กซีเอ็มวันยังคงจำเป็นต้องทำการศึกษาในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีต้าที่มีภาวะเหล็กเกินต่อไป

Thesis Title	Iron Metabolism and Chelation by 1-(*N*-Acetyl-6-aminohexyl)-3-hydroxy-2-methylpyridin-4-one (CM1) in Iron Loaded Cells and Beta-Knockout Thalassemic Mice	
Author	Ms. Kanokwan Kulprachakarn	
Degree	Doctor of Philosophy (Biochemistry)	
Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool	Advisor
	Prof. Suthat Fucharoen, M.D.	Co-advisor
	Dr. Chada Phisalaphong	Co-advisor

ABSTRACT

Iron overload associated with oxidative stress is commonly found in β-thalassemia major patients due to increased iron absorption and multiple blood transfusions. Liver iron overload could in turn facilitate the development or persistence of chronic progressive liver disease. Effective iron chelators such as deferiprone (DFP) and desferrioxamine (DFO) and antioxidants are included in medical regime used to improve their quality of life and survival.

Our new orally active bidentate iron chelator called 1-(*N*-acetyl-6-aminohexyl)-3-hydroxy-2-methylpyridin-4-one (CM1) has been investigated extensively both in vitro and in vivo. It is the DFP analogue which can chelate toxic biological irons including non-transferrin bound iron (NTBI), labile plasma iron (LPI) and labile iron pool (LIP). In iron homeostasis, 4-disulfide-bond, 25-amino-acid hepcidin hormone regulates iron transport across duodenal cells and iron efflux from reticuloendothelial macrophage. Levels of hepcidin gene expression and concentration reflect iron deficiency, iron overload and some liver disease conditions. Competitive ELISA and LC/MS techniques are routinely used to measure plasma and urinary hepcidin concentrations; nonetheless, they are very expensive.

The study was purposed to evaluate efficacy of CM1 in treatment of hepatocytes and β-knockout (BKO) thalassemic mice with iron overload and to develop a new method for hepcidin measurement. We found that CM1 decreased levels of LIP, reactive oxygen species (ROS) in iron-loaded mouse hepatocyte and HepG2 cell cultures in a concentration-dependent manner. Importantly, the compound increased mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in the hepatocytes effectively. Combined treatments of CM1 with 25 μM DFP and with 25 μM DFO were demonstrated to decrease the LIP levels in the both cells and tended to reduce ROS in HepG2 cells. BKO mice fed with ferrocene diet resulted in iron overload and CM1 treatment (50 mg/kg/day, *po*) decreased plasma levels of NTBI, LPI and malondialdehyde (MDA), but not ferritin (Ft).

Synthetic peptides (GGHG and DTH-NH_2) mimicing metal-binding motives of the hepcidin N-terminus and fluorescent hepcidin were synthesized and used to investigate Cu^{2+}-binding property. We found that the binding of Cu^{2+} to albumin cannot be modelled reliably by short peptides mimics of hepcidin and serum hepcidin coordinated to Cu^{2+} was much lower than serum albumin. Moreover, Cu^{2+} binding property of fluorescent hepcidin can be used for further development of competitive fluorescent hepcidin probe assay.

Our findings support the evidence of iron-chelating and free radical-scavenging activities of CM1 in the livers with iron overload, which potentially protect against oxidative liver dysfunction and inflammation. Efficacy of CM1 needs to be tried clinically and intensively in β-thalassemia patients with iron overload.