หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความเป็นพิษเชิงชีวเคมีของยาขับเหล็ก 1-(เอ็น-อะซิติล-6-อะมิโนเฮกซิล)-3-ไฮดรอกซี-2-เมธิลไพริดิน-4-โอน ในเซลล์มะเร็งและการประเมินความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง	
ผู้เขียน	นางสาวนิตยา จันชิว	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ.ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกูล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ.ดร.วิโรจน์ ตันติเวชอภิกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร.ชฎา พิศาลพงศ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

แม้ว่าธาตุเหล็กนั้นจะมีความสำคัญมากต่อกระบวนการต่างๆภายในเซลล์ หากมีปริมาณมากเกินไปก็จะทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระและทำลายเซลล์ ปัจจุบันมียาขับเหล็กที่ใช้ทางคลินิคมากมายหลายชนิดที่ใช้ในเพื่อกำจัดเหล็กที่เป็นพิษ แต่ไม่พบยาขับเหล็กชนิดใดที่ปราศจากผลข้างเคียง ทางห้องปฏิบัติการของเราได้พัฒนายาขับเหล็กตัวใหม่ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารไฮดรอกซีไพริดิน ชื่อซีเอ็มวัน (CM1) และมีความสามารถการละลายในชั้นไขมันได้ดีจึงทำให้สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ง่าย ทั้งนี้ได้เคยมีรายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการกำจัดเหล็กเกินของยาขับเหล็กชนิดนี้แล้ว แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการเจริญของมะเร็ง และความเป็นพิษของยาขับเหล็กชนิดนี้ เนื่องจากการรบกวนเมตาบอลิซึมของธาตุเหล็กด้วยยาขับเหล็กสามารถหยุดการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ งานวิจัยนี้จึงรายงานผลความเป็นพิษของซีเอ็มวันต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยง HL-60 และ U937 เซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง HepG2 เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ และเซลล์ตับ พบว่าซีเอ็มวันสามารถหยุดการเจริญของเซลล์มะเร็ง ได้ แต่ไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวปกติและเซลล์ตับ นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการตายแบบอะพอพโตซิสของซีเอ็มวันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิด พบว่าซีเอ็มวันสามารถกระตุ้นการตายแบบอะพอพโตซิส นอกจากนี้ยังสามารถหยุดการเจริญของวงจรเซลล์ ลดการทำงานของความต่างศักย์ไฟฟ้าของผนังเซลล์ และกระตุ้นการทำงานของ caspase 2, 3, 8 และ 9

การศึกษาความเป็นพิษของซีเอ็มวัน โดยทำการศึกษาความเป็นพิษระยะเฉียบพลัน กึ่งเรื้อรัง และเรื้อรัง โดยระยะเวลาการให้ยากับหนูทดลองคือ 14, 90 และ 180 วัน ตามลำดับ จากการศึกษาความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นพิษระยะเฉียบพลันพบว่าไม่มีการตายหรืออาการทางคลินิคเกิดขึ้นที่ระดับยาขับเหล็ก 5 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และเมื่อทำการให้ยาตัวนี้ที่ความเข้มข้น 50,100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 90 วัน พบว่าหนูทดลองทุกตัวมีชีวิตรอดตลอดการทดลองและไม่พบอาการทางคลินิค รวมถึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยา ค่าเคมีในเลือด น้ำหนักอวัยวะและพยาธิวิทยา จึงบอกได้ว่าซีเอ็มวันไม่มีความเป็นพิษต่อหนูทดลองเมื่อมีการให้ยาโดยการกิน และระดับยาที่ไม่พบการเกิดผลข้างเคียงคือ 50 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว นอกจากนี้ยังทำการศึกษาประสิทธิภาพควบคู่กับความเป็นพิษของซีเอ็มวันในหนูทดลองภายใต้สภาวะปกติและภาวะเหล็กเกินเป็นเวลานาน 240 วัน โดยทำการสร้างสภาวะเหล็กเกินโดยการให้หนูทดลองกินอาหารที่มีส่วนผสมของ 0.2% ferrocene เป็นเวลา 240 วันและทำการให้ยาขับเหล็กซีเอ็มวันความเข้มข้น 50,100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 180 วัน พบว่าซีเอ็มวันสามารถลดระดับ LPI และ NTBI ได้ดีในสภาวะเหล็กเกิน แต่อย่างไรก็ตามไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับเฟอริติน นอกจากนี้ซีเอ็มวันยังไม่มีผลต่อระดับฮีโมโกลบิน จำนวนเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด รวมถึงไม่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์ในตับในสภาวะปกติ แต่มีแนวโน้มที่จะมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยของเอ็นไซม์ในตับในสภาวะเหล็กเกิน แต่เมื่อตรวจสอบทางพยาธิวิทยาพบว่าตับ หัวใจและม้ามไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของซีเอ็มวันในหนูเบต้าธาลัสซีเมียซึ่งได้รับยาเป็นเวลา 180 วัน ภายใต้สภาวะปกติและสภาวะเหล็กเกิน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับฮีโมโกลบิน จำนวนเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือดในทั้งสองสภาวะ แต่ที่น่าสนใจคือซีเอ็มวันทำให้ระดับ AST, ALT และ ALP เพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจาก 150 วัน แต่เมื่อตรวจสอบทางพยาธิวิทยายังไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของตับ หัวใจและม้าม จึงสามารถสรุปได้ว่าซีเอ็มวันเป็นยาขับเหล็กที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งหยุดการเจริญและเกิดการตายแบบอะพอพโตซิส ซีเอ็มวันยังสามารถกำจัดธาตุเหล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่ไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น เม็ดเลือดขาวต่ำ เกล็ดเลือดต่ำ และทำให้เอ็นไซม์ตับเพิ่มขึ้น ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะเหล็กเกิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Biochemical Toxicity of Iron Chelator 1-(*N*-acetyl-6-aminohexyl)-3-hydroxy-2-methylpyridin-4-one in Cancer Cell Lines and Safety Evaluation in Animal Model	
Author	Miss Nittaya Chansiw	
Degree	Doctor of Philosophy (Biochemistry)	
Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Wirote Tuntiwechapikul	Co-advisor
	Dr. Chada Phisalaphong	Co-advisor

ABSTRACT

Although iron is crucial for many cellular processes, an excess iron causes oxidative cell damage through reactive oxygen species (ROS) production. Nowadays, there is a wide range of clinically used iron chelators for removal of toxic iron but none are free from side effects. We have developed a new bidentate iron chelator, 1-(*N*-acetyl-6-aminohexyl)-3-hydroxy-2-methylpyridin-4-one (CM1) that is DFP analogue and has higher lipophilicity. Recently, characteristics and iron-chelating activity of CM1 have been reported. Nevertheless, the anti-cancer activity and toxicity of this compound are largely unknown. Interference of iron metabolism with chelators can lead to a significant inhibition of cancer cell growth. In this study, we demonstrated toxicity of the CM1 against human leukemic cells (HL-60 and U937), human hepatocellular carcinoma cells (HepG2), peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and primary hepatocytes *in vitro*, and also investigated its apoptogenic activity in the human leukemic cells. The results showed that CM1 inhibited proliferation and metabolic activity of the cancer cells but did not affect the normal cells. Flow cytometric data clearly showed the dose and time-response of CM1-induced apoptosis in these cells, which the CM1 arrested the cell populations in the sub-G_1 phase after 24 hours of exposure. The cancer cells induced by the CM1 showed a significant decrease of mitochondria membrane potential ($\Delta\psi_m$) and increase of caspase-2,-3,-8 and -9 activities. Acute toxicity study showed no death or treatment-related signs of mice at 5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

g/kg of CM1 over 14 days. After mice had been orally administered with CM1 at 50 - 200 mg/kg for 90 days; all of them survived throughout the study, with no significant changes in their clinical signs, hematological parameters, biochemical parameters, organ weights and histological findings. Wild-type (WT) and β-knockout (BKO) thalassemic mice were fed with normal (N) diet and 0.2% (*w/w*) ferrocene-supplemented (Fe) diet for 240 days and orally given the CM1 for 180 days. CM1 lowered levels of labile plasma iron (LPI) and non-transferrin bound iron (NTBI), but not ferritin level in the Fe diet-fed mice. Importantly, the treatment did not affect blood hemoglobin (Hb) level, white blood cell (WBC) and platelets (PLT) numbers in both normal and iron overload conditions. The CM1 did not markedly elevate plasma aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) activities in the N diet-fed WT mice but it tended to increase their levels slightly in the Fe diet-fed WT mice. The treatment did not markedly alter WBC and PLT numbers, and Hb level in the BKO mice fed with N and Fe diets; however, the compound slightly increased their levels of AST, ALT and ALP activities after 150 days. Pathological changes were not found in the heart, liver and spleen tissues. In conclusion, CM1 could have anti-proliferative activity, significantly induce cell cycle arrest and cell apoptosis in cancer cell lines, effectively chelated toxic irons but did not develop side effects in BKO mice under normal and iron overload conditions.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved