

Thesis Title Expression of L-type Calcium Channel and Iron Uptake
in Cardiomyocytes of Thalassemic Mice

Author Miss Sirinart Kumfu

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Siriporn Chattipakorn Member

ABSTRACT

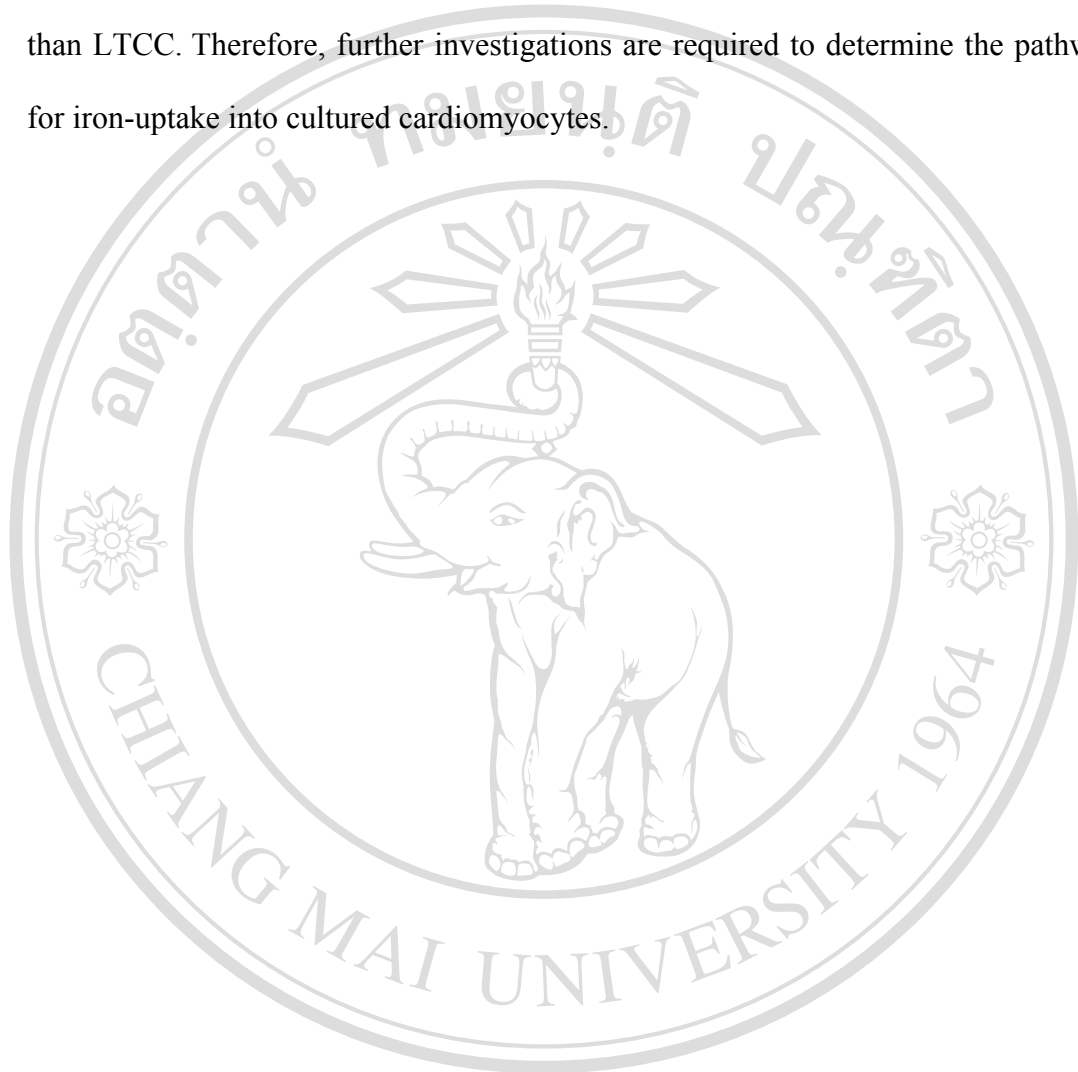
Iron-overloaded condition can be found in β -thalassemic patients with regular blood transfusion. This condition can lead to iron deposition in many tissues especially in the heart. Iron overload has been shown to associate with elevated oxidative stress in tissues. Elevated cardiac iron causes iron-overload cardiomyopathy, a condition which provokes mortality due to heart failure in thalassemic patients. Previous studies demonstrated that myocardial iron uptake may occur via L-type calcium channels (LTCC). However, direct evidence regarding iron uptake via the LTCC as well as its expression and response to iron overloaded condition in cardiomyocytes has not been investigated. Cultured cardiomyocytes

from genetic-altered β -thalassemic mice were used for this investigation. Aims of this study were investigate whether the expression of LTCC and iron uptake in cultured cardiomyocytes from thalassemic mice were different from wild-type mice at the baseline and under iron overload condition. Because thalassemic mice showed a highly significant increase in heart tissue iron compared to wild type mice and previous study demonstrated that LTCC plays an important role in iron-uptake in cardiomyocytes. So, we hypothesize that the amount of iron uptake from culture medium and the expression of LTCC in thalassemic cardiomyocytes are greater than those of wide-type mice. Moreover, the iron uptake into the cardiomyocytes under iron overload may be blocked by LTCC blocker.

Cultured ventricular cardiomyocytes were isolated from the hearts of adult heterozygous β -globin gene knockout thalassemic mice (HT), double heterozygous β -globin gene knockout with HbE (DH) and wild-type mice. Quantification of iron uptake in cardiomyocytes was performed by Calcein-AM fluorescence assay. The expression of LTCC was visualized and quantified by the immunohistochemical method and Scion Image program. Our results showed that iron uptake under iron overloaded condition and the expression of LTCC in the cultured ventricular myocytes of thalassemic mice were greater than those of wild type cells ($p < 0.05$). The iron uptake into the cultured cardiomyocytes from three types of mice could be inhibited by iron chelator desferrioxamine (DFO); however, it was not be blocked by the LTCC blocker.

In conclusion, iron accumulation and uptake is increased in thalassemic cardiomyocytes compared to wild type cells. The LTCC expression of thalassemic cardiomyocytes is greater than wild type cells. However, the blockade of LTCC

could not prevent iron uptake into cardiomyocytes. Our findings suggest that iron uptake mechanisms in cardiomyocytes may be mediated by other pathways rather than LTCC. Therefore, further investigations are required to determine the pathways for iron-uptake into cultured cardiomyocytes.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การแสดงออกของช่องทางนำแคลเซียมแบบแอล

และการนำธาตุเหล็กผ่านเข้าเซลล์คาร์ดิโอไมโอไซต์

ของหนูแรดส์ซีเมีย

ผู้เขียน

นางสาว ศิรินาถ คำฟู

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล ประธานกรรมการ

รศ. ดร. ทพญ. สิริพร นัทรทิพากร กรรมการ

บทคัดย่อ

ภาวะธาตุเหล็กเกินพบได้ในผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดบีตามเจอร์ ที่ได้รับการ
เติมเลือดเป็นประจำ ปริมาณเหล็กเกินนี้สามารถทำให้เกิดการสะสมของเหล็กในเนื้อเยื่อต่างๆ
โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่หัวใจนอกจากนี้ภาวะเหล็กเกินยังมีศักยภาพเร่งการสร้างอนุมูลอิสระและ
สามารถนำไปสู่การออกซิเดชันและทำลายเนื้อเยื่อต่างๆ ตลอดจนการทำหน้าที่ของอวัยวะของ
ร่างกายผิดปกติ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความผิดปกติด้านการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจที่ถูก
ชักนำโดยภาวะเหล็กเกินในหัวใจเป็นสาเหตุหลักที่ชักนำให้เกิดการตายในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จาก

การศึกษาที่ผ่านมาก่อนหน้านี้พบว่าการศึกษาที่มีธาตุเหล็กเกินไปสะสมในหัวใจนั้นมีความสัมพันธ์กับการผ่านเข้าของเหล็กผ่านช่องทาง L-type calcium channel (LTCC) เข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (cardiomyocytes) แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ด้านการแสดงออกของ LTCC และการตอบสนองต่อสภาวะเหล็กเกินในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนูที่เป็นธาลัสซีเมียยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในการศึกษาครั้งนี้เราได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจากหนูที่เป็นธาลัสซีเมียและหนูปกติแล้วทำการศึกษาการแสดงออกของ LTCC และการรับเอาธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจภายใต้สภาวะเหล็กเกิน เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าหนูที่เป็นธาลัสซีเมียมีปริมาณเหล็กสะสมในหัวใจมากกว่าหนูปกติและมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทที่สำคัญของ LTCC ในการรับเอาธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ดังนั้นเราจึงตั้งสมมติฐานว่า (1) การรับเอาธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์และการแสดงออกของ LTCC ในกล้ามเนื้อหัวใจของหนูธาลัสซีเมียมีมากกว่าในหนูปกติและ (2) การรับเอาธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจภายใต้สภาวะเหล็กเกิน สามารถถูกยับยั้งได้โดย LTCC blocker

วิธีการทดลองโดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ได้จากหัวใจหนูธาลัสซีเมีย heterozygous beta-globin knockout mice (HT), double heterozygous beta-globin knockout with HbE (DH) และหนูปกติ ตรวจสอบวัดการรับเอาธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดยวิธี Calcein-AM fluorescence assay ตรวจสอบวัดการแสดงออกของ LTCC ในเซลล์โดยวิธี immunohistochemistry และ Scion image program โดยผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของ LTCC ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนูธาลัสซีเมียมีปริมาณที่มากกว่าในหนูปกติ ($p < 0.001$) นอกจากนี้ภายใต้สภาวะเหล็กเกิน การรับเอาธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหนูธาลัสซีเมียมีปริมาณที่สูงกว่าในหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการรับเอาธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์ถูกยับยั้งได้โดยการให้ desferrioxamine ซึ่งเป็น iron chelator แต่อย่างไรก็ตามการรับเอาธาตุเหล็ก

เข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหนูทั้งสามชนิดนั้นไม่สามารถถูกยับยั้งได้โดย LTCC blocker (verapamil)

ผลการทดลองสรุปได้ว่า การสะสมของธาตุเหล็ก การรับเอาธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์ และการแสดงออกของ LTCC ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนูธาลัสซีเมียมีปริมาณที่มากกว่าในหนูปกติ แต่อย่างไรก็ตามการให้ LTCC blocker ไม่สามารถยับยั้งการรับเอาธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้ จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่า กลไกในการรับเอาธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหนูธาลัสซีเมียนั้นอาจจะผ่านทางช่องทางอื่นๆที่นอกเหนือไปจากทาง LTCC ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved