

Thesis Title	Investigation of Iron Binding capacity of a Novel Oral Iron Chelator: 3-Hydroxypyridin 4-one Conjugate	
Author	Miss Kanjana Pangjit	
Degree	Master of Science (Biochemistry)	
Thesis Advisory Committee:	Dr. Somdet Srichairatanakool	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Ratana Banjerdpongchai	Member
	Dr. Chada Phisalaphong	Member

ABSTRACT

Secondary iron overload is commonly found in β -thalassaemia patients with multiple blood transfusions. Potentially, excessive iron can catalyze free radical formation leading to oxidative tissue damage and organ dysfunction. Non-transferrin-bound iron (NTBI) is a form of iron in the plasma that is bound to ligands other than transferrin. It appears when the large amount of iron released into plasma exceeded transferrin iron binding capacity. Desferrioxamine (DFO) and deferiprone (DFP) are nowadays used for iron chelation therapy while deferasirox (DFX) is in phase III clinical trial. Due to side effects and continuous treatment, development of cheap and effective oral iron chelators is required. This work was performed to study iron-chelating activity and cytotoxicity of a novel tridentate oral iron chelator, 3-hydroxypyridin-4-one conjugate (HPO conjugate), in vitro.

The HPO conjugate was chemically synthesized and purified in our laboratory. Electrospray ionization mass spectrometry (EIS-MS) was used to determine its molecular weight (MW), and X-ray crystallographic technique was used to identify the molecular structure. The compound (MW = 266 dalton) was further assayed for iron-binding activity and cytotoxicity. Chemical iron binding of

the compound was measured spectrophotometrically, and chelating activity of the plasma NTBI was investigated using nitrilotriacetic acid chelation/HPLC technique. Cytotoxic effect on cultured HL-60 cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was determined by using a colorimetric MTT 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide test. Apoptotic activity of the HPO conjugate was investigated with a flow cytometry.

The HPO conjugate dose dependently bound Fe^{3+} and formed a red colored product. The complex had predominant absorption between 480-490 nm and was stable up to 16 hours in the solution, pH 7.0. The HPO conjugate also bound to other metal ions including Zn^{2+} , Cu^+ and Ca^{2+} with different affinity. Removal of the plasma NTBI by the HPO conjugate was both concentration- and time-dependent, and also comparable to those by DFP and DFO. The compound (2.5 μM) chelated approximately 50% of NTBI content in thalassemic plasma; however, increase of the HPO conjugate concentrations did not change the NTBI chelation any more. At equivalent concentrations, it was less toxic to the HL-60 cells than DFO. Interestingly, the HPO conjugate was slightly toxic to the peripheral blood mononuclear cells, PBMC cells (cell viability >90%) when compared to the DFO and DFP. The HPO conjugate was able to induce apoptosis in the HL-60 cell line.

In conclusion, the HPO conjugate would be a novel oral iron chelator that can remove the NTBI in the thalassemic plasma effectively. It was slightly harmful to the PBMC, and potentially inhibited proliferation of the HL-60 cell line by inducing apoptosis. In prospective, the HPO conjugate novel iron chelator needs to be further investigated in iron-overloaded animals and patients to evaluate its efficacy in urinary and fecal iron excretion.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบความสามารถในการจับธาตุเหล็กของยา ขับเหล็กชนิดรับประทานตัวใหม่กลุ่มฮัยดรอกซีพัยริดี โนนสังยุค
ผู้เขียน	นางสาวกาญจนา แปะจิตต์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล ประธานกรรมการ รศ.ดร.พญ. รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย กรรมการ ดร.ชฎา พิศาลพงศ์ กรรมการ
	บทคัดย่อ

ภาวะธาตุเหล็กเกินพบได้ในผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดบีตามาเจอร์ ที่ได้รับการ
เติมเลือดเป็นประจำ ปริมาณเหล็กเกินนี้มีศักยภาพเร่งการสร้างอนุมูลอิสระและสามารถนำไปสู่การ
ออกซิเดชันและทำลายเนื้อเยื่อต่างๆตลอดจนการทำหน้าที่ของอวัยวะของร่างกายผิดปกติได้ ใน
ภาวะเหล็กเกินนี้ส่งผลให้มีปริมาณธาตุเหล็กและความอิ่มตัวของทรานส์เฟอร์รินในพลาสมาเพิ่มสูง
มากกว่าปกติ และมีธาตุเหล็กรูปที่ไม่ได้จับกับทรานส์เฟอร์ริน (เรียกว่า Non-Transferrin Bound
Iron หรือ NTBI) ปรากฏขึ้น ในปัจจุบันยาเคสเฟอร์ร็อกซามีนและดีเฟอร์ริโพรนถูกนำมาใช้
บำบัดรักษาภาวะเหล็กเกิน สำหรับยาดีเฟอร์ราซีร็อกซันชนิดรับประทานที่ถูกผลิตขึ้นมาใหม่ล่าสุดนี้
กำลังอยู่ในการทดลองขั้นที่ 3 ทางคลินิก อย่างไรก็ตามยาเคสเฟอร์ร็อกซามีนและยาดีเฟอร์ริโพรน
มีฤทธิ์ข้างเคียงหลายอย่างที่พึงต้องระมัดระวัง ยาขับเหล็กชนิดรับประทานตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพดี
และราคาถูกจึงถูกผลิตและพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้รักษาภาวะเหล็กเกินในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย การศึกษานี้
มีจุดมุ่งหมายในการศึกษาคุณสมบัติในการจับธาตุเหล็กและความเป็นพิษของสารประกอบฮัยดรอก
ซีพัยริดีโนนสังยุคที่เป็นยาขับเหล็กชนิดรับประทานในหลอดทดลอง

สารฮัยดรอกซีพัยริดีโนนสังยุค ถูกสังเคราะห์ขึ้นด้วยปฏิกิริยาเคมีและถูกทำให้บริสุทธิ์ใน
ห้องปฏิบัติการ วิธีอิเล็กโตรสเปรย์ไอโอโนเซชันแมสสเปคโตรเมตรีถูกนำมาใช้หาน้ำหนักโมเลกุล
สารและวิธีเอกซเรย์คริสตัลโลกราฟีถูกนำมาใช้หาสูตรโครงสร้างโมเลกุลสาร สารฮัยดรอกซีพัยริดี

โนนสังยุคซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 266 คาลตันถูกนำไปศึกษาหาคุณสมบัติในการจับเหล็กและความ เป็นพิษต่อเซลล์ ทำการตรวจวัดความสามารถในการจับเหล็กด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรีและ ความสามารถในการดึงเหล็กรูป NTBI ในพลาสมาด้วยวิธี NTA chelation/HPLC นอกจากนี้ ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60 cells) และเซลล์เม็ดเลือดขาว (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) ด้วยวิธี MTT และทดสอบการเหนี่ยวนำให้ เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบอะพอพโทซิสด้วยเทคนิคโพลไซโตเมตรี

สารฮัยดรอกซีพิริดีโนนสังยุคจับกับธาตุเหล็กรูปไอออนเฟอร์ริกและได้เป็นสารประกอบ สีม่วงแดงที่มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงได้ในช่วง 480-490 นาโนเมตรในลักษณะที่ขึ้นกับความ เข้มข้นและเวลา และคงที่ได้ยาวนานถึง 16 ชั่วโมงในสารละลายที่มีค่าพีเอช 7.0 สารฮัยดรอกซีพิริดี โนนสังยุคมีคุณสมบัติจับกับไอออนธาตุอื่น (เช่น สังกะสี ทองแดงและแคลเซียม) ได้ด้วยความ เฉพาะแตกต่างกัน สารนี้สามารถดึงธาตุเหล็กรูป NTBI ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับเวลาและความเข้มข้น โดยพบว่าสารนี้ที่ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์สามารถลดธาตุเหล็กรูป NTBI ในพลาสมาของ ผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามธาตุเหล็กรูป NTBI ไม่สามารถถูกกำจัด ให้ลดลงไปได้มากกว่านี้แล้วแม้ว่าจะทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารให้มากกว่านี้ ความเป็นพิษ ของสารฮัยดรอกซีพิริดีโนนสังยุค ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวใกล้เคียงกับของยาดีเฟอรัโฟรอน และน้อยกว่ายาเคสเฟอรัร็อกซามีน สารฮัยดรอกซีพิริดีโนนสังยุคมีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็ง เม็ดเลือดขาวเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้

ผลการทดลองสรุปได้ว่าสารฮัยดรอกซีพิริดีโนนสังยุคเป็นยาจับเหล็กชนิดรับประทานตัว ใหม่ที่มีความสามารถในการจับธาตุเหล็กและลดระดับธาตุเหล็กรูป NTBI ในพลาสมาของผู้ป่วย ธาลัสซีเมียได้ สารนี้เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเคียวเล็กน้อยและเหนี่ยวนำให้ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายแบบอะพอพโทซิสได้ การศึกษาต่อไปในอนาคตจึงมีความจำเป็นต้อง ศึกษาสัมฤทธิ์ผลของยาชนิดนี้ในการกำจัดเหล็กเกินออกจากร่างกายของสัตว์ทดลอง และผู้ป่วยที่มีภาวะ เหล็กเกิน