Thesis Title Study of Iron Overload and Oxidative Stress Using Thalassemia and Epilepsy Model

Author Miss Sakaewan Ounjaijean

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool	Advisor
Prof. Suthat Fucharoen, M.D.	Co-advisor
Prof. Dr. Kovit Pattanapanyasat	Co-advisor

ABSTRACT

Though particularly of interest, the role of iron overload as a cause or consequence of disease progression is still unclear. Iron may induce oxidative stress via the production of reactive oxygen species, facilitating pathogenesis. This study investigated the role of iron in relation to oxidative stress as a potential risk factor and significant indicator in the development of iron-related pathology.

We decide to use a Thalassemia model, a common iron overload-related disorder to investigate the effect of natural antioxidants, green tea catechins on subjects having iron overload and oxidative stress. The study was conducted using the thalassemic mice model established by the specific modulation of β-globin gene. Two

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

types of thalassemic mice were included, heterozygous β-knockout (BKO) and double heterozygous β-knock out with human HbE gene (DH) and closely resemble β-thalassemia intermedia patients. Iron overlaod was initiated by feeding mice with a ferrocene-enriched diet for 12 weeks. Thereafter, mice were treated with the crude green tea extract (GTE), purified catechins compound: Epigallocatechingallate (EGCG) or iron chelator: deferiprone (L1) for a further 12 weeks. During this period of time, iron status and oxidative stress parameters were determined.

In iron-loaded animals, elevated plasma levels of non-transferrin bound iron (NTBI), labile phasma iron (LPI) and lipid peroxidation tended to normalize in response to oral therapy with GTE as well as EGCG. At the same time, plasma glutathione was increased. Mice exhibited a decrease of lipid peroxidation and an improvement in the oxidant–antioxidant balance in erythrocytes. GTE and EGCG effectively inhibited hemolysis and thereby prolonged the RBC half-life. Coincidently with the plasma status, GTE and EGCG effectively attenuated iron deposition and oxidative damage to hepatic tissue. This may further prevent iron overload-induced liver damage and fibrosis.

The ability of green tea catechins to improve several of the fundamental pathological disturbances of Thalassemia brings out a clinical potential in diminishing iron overload complication when administered at the early stage of disease development. Combined chelation therapy using catchins with standard iron chelator would be very much be of interest in β-thalassemia patients with iron overload.

Misregulation of iron homeostasis has also been a concern in various kinds of neurodegenerative and neurological disorders. Epilepsy, one of the common neurological disorders, is thought to be related to oxidative stress, although the exact

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

mechanism still remains a mystery. Our epidemiological study revealed a high occurrence of NTBI, a toxic form of iron in this group of patients. It is interesting that from over 130 patients investigated, 50 have shown a positive NTBI value, although their serum iron and ferritin levels stayed within the normal criteria. The iron overload conditions which occurred in these patients might be acute or reversible. Also, the effect of different antiepileptic drug (AED) treatments might be involved.

By data analysis, valproic acid (VPA), a commonly used AED was shown to predominantly affect the presence of NTBI and the levels of oxidative stress. Both iron and oxidative stress parameters were found to increase coincidently with a daily dose of VPA given to patients. Moreover, the effects of VPA were attenuated when patients received other AEDs along with or without VPA, respectively. The study provides a new insight for the involvement of NTBI in the pathology of epilepsy, especially in relation with the induction of oxidative stress. The effect of this drug treatment on patients experiencing iron overload and oxidative stress has been strongly encouraged. The knowledge may be of further importance to indicate the cytotoxicity of VPA drug when used and may also be a suitable tool for the improvement of patient care.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาภาวะธาตุเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสโดยใช้รูปแบบโรคธาลัสซีเมียและอิพิเลพซี
ผู้เขียน	นางสาวสะแกวัลย์ อุ่นใจจีน
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกูล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ศ.นพ. สุทัศน์ ฟู่เจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ศ.ดร. โกวิท พัฒนปัญญาสัตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ภาวะธาตุเหล็กเกินกำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในด้านความเกี่ยวพันกับการก่อโรคหรือการดำเนินไปของโรค หากแต่กลไกที่แท้จริงยังคงไม่ได้รับความกระจ่างแจ้งในปัจจุบัน ความเป็นพิษของเหล็กนั้น เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับความสามารถในการกระตุ้นการผลิตสารอนุมูลอิระในการศึกษานี้จึงได้มุ่งศึกษาผลของภาวะเหล็กเกินที่สัมพันธ์กับภาวะอนุมูลอิสระมากเกิน หรือที่เรียกว่าภาวะออกซิเดทีฟสเตรส ในแง่ของการเป็นปัจจัยเสี่ยงและเป็นตัวบ่งชี้การก่อให้เกิดพยาธิสภาพในโรคที่เกี่ยวข้องกับธาตุเหล็ก โดยเลือกใช้รูปแบบโรคต่างกันสองประเภทมาทำการศึกษา

โรคธาลัสซีเมีย เป็นความผิดปกติของภาวะธาตุเหล็กเกินที่พบได้โดยทั่วไป การศึกษานี้ได้มุ่งวิเคราะห์ผลของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ได้แก่ สารคะเตชินจากชาเขียว ในการต้านหรือชะลอภาวะธาตุเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรส โดยได้ทำการศึกษาโดยใช้หนูทดลองธาลัสซีเมียสองสายพันธุ์ ได้แก่ ชนิด heterozygous β-knockout (BKO) และชนิด double heterozygous β-knock out with human HbE gene (DH) เป็นตัวแทนของผู้ป่วยธาลัสซีเมียแบบรุนแรงปานกลาง หนูทดลองได้ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะธาตุเหล็กเกินโดยการเพิ่มสารเหล็กในอาหารเป็นเวลา12 สัปดาห์ จากนั้นจึงทำการรักษาโดยการให้สารสกัดหยาบจากชาเขียว หรือสารคะเตชินบริสุทธิ์ชนิดอิพิคะเตชินกัลเลต เปรียบเทียบกับผลของการให้ยาขับธาตุเหล็กดิเฟอร์ริโพรน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นเวลาต่อเนื่องอีก 12 สัปดาห์ ผลการทดลองปรากฏว่าการเพิ่มขึ้นของธาตุเหล็กชนิดที่ไม่ได้จับกับทรานส์เฟอร์รินและตัวบ่งชี้ภาวะออกซิเดชันในพลาสมาของหนูทดลองที่ได้รับธาตุเหล็ก มีแนวโน้มลดลงสู่ภาวะปกติ นอกจากนี้ยังส่งผลให้มีการลดระดับตัวบ่งชี้ภาวะออกซิเดชันและการคืนสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงของหนูทดลองอีกด้วย สารคะเตชินจากชาเขียวสามารถพิสูจน์คุณสมบัติในการต้านการแตกของเม็ดเลือดแดง และแสดงสัมฤทธิ์ผลในการยืดอายุเม็ดเลือดแดงในหนูทดลองธาลัสซีเมีย ทั้งยังช่วยลดการสะสมธาตุเหล็กและการถูกทำลายของเนื้อเยื่อตับ คุณสมบัติทางคลินิกของคะเตชินในการชะลอพยาธิสภาพของโรคอันเกิดจากภาวะธาตุเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรส สนับสนุนการศึกษาและพัฒนาการใช้สารคะเตชินจากชาเขียวร่วมกับยาขับธาตุเหล็กในผู้ป่วยธาลัสซีเมียในโอกาสต่อไป

นอกเหนือจากกลุ่มโรคธาลัสซีเมียแล้ว ความผิดปกติของกลไกการควบคุมสมดุลธาตุเหล็กในร่างกายนั้นยังกำลังเป็นที่สนใจอย่างแพร่หลายในแง่การเป็นสาเหตุของโรคสมองเสื่อมและความผิดปกติของสมองอีกหลายชนิด โรคอิพิเลพซีเป็นความผิดปกติของสมองชนิดหนึ่งที่มีอุบัติการณ์ค่อนข้างสูง ในขณะที่สาเหตุของความผิดปกตินี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ได้มีความเชื่อว่ามีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในสมอง ผลการศึกษาระบาดวิทยาพบว่ากลุ่มผู้ป่วยอิพิเลพซี มีอัตราส่วนผู้ป่วยที่มีค่าของเหล็กในรูปที่ไม่ได้จับกับทรานส์เฟอร์ริน (NTBI) เป็นบวกสูงกว่ากลุ่มโรคสมองอื่นๆ ที่ได้ทำการศึกษาพร้อมกัน และเป็นที่น่าสนใจว่า ในผู้ป่วยมีเหล็กในรูปดังกล่าวปรากฏอยู่ ถึงแม้ว่า ค่าปริมาณเหล็กและเฟอร์ริทินในซีรั่มยังคงอยู่ในช่วงปกติ ภาวะเหล็กเกินในผู้ป่วยจึงน่าเชื่อว่าอาจเป็นภาวะเหล็กเกินแบบชั่วคราว นอกจากนี้ยังอาจเป็นผลมาจากยาต้านอิพิเลพซีที่ผู่ป่วยได้รับอีกด้วย

จากการวิเคราะห์ผลพบว่า ยาต้านอิพิเลพซีชนิด Valproic acid (VPA) มีผลต่อระดับเหล็ก NTBI และภาวะออกซิเดทีฟสเตรสสูงกว่ายาชนิดอื่นๆ โดยพบว่า ระดับตัวบ่งชี้ภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณยาที่ได้รับต่อวัน นอกจากนี้ผลของการได้รับ VPA ยังลดต่ำลงในผู้ป่วยที่ได้รับยาชนิดอื่นร่วมกับ VPA และในผู้ป่วยที่ได้รับยาชนิดอื่นแทนที่ VPA ตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องสัมพันธ์ระหว่างเหล็กในรูปที่ไม่ได้จับกับทรานส์เฟอร์รินกับพยาธิสภาพของผู้ป่วยอิพิเลพซี โดยเฉพาะผลของยาในการเหนี่ยวนำภาวะออกซิเดทีฟสเตรส ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อไปในการศึกษาความเป็นพิษของยา VPA และเป็นเครื่องมือสำคัญในการติดตามการรักษาผู้ป่วยให้มีประสิทธิภาพต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved