



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ภาวะออกซิเดทีฟสเตรทที่เหนียวนำโดยภาวะเหล็กเกินและผลกระทบต่อ

เมตาบอริซึมและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ

กระบวนการควบคุมเหล็กในธาลัสซีเมีย

โดย

นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส, Ph.D. และคณะ

มิถุนายน พ.ศ. 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ภาวะออกซิเดทีฟสเตรสที่เหนี่ยวนำโดยภาวะเหล็กเกินและผลกระทบต่อ
เมตาบอริซึมและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ
กระบวนการควบคุมเหล็กในธาลัสซีเมีย

คณะผู้วิจัย

- | | |
|-------------------------------|---|
| 1. ดร. นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส | ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. นางปวีณา ยามานนท์ | ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 3. นางสาวปาริณีย์ ญาติมาก | ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 4. นายสุรศักดิ์ วิชัยโย | ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และสำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือและความอนุเคราะห์จากอาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่จากหลายส่วน ขอขอบพระคุณอย่างสูง ศ. นพ. สุทัศน์ พุเจริญ สำหรับขอเสนอแนะและการสนับสนุน ทุกๆด้านตลอดหลายปีที่ทำงานวิจัย ขอขอบคุณ รศ. ดร. หม่อมหลวง เสาวรส สวัสดิ์วัฒน์ และทีมงานจากศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับคำแนะนำและสนับสนุนหนูธาลัสซีเมีย รศ. ดร. อุไร ไชยศรี ภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับคำแนะนำและการศึกษาในพยาธิชีววิทยาของชิ้นเนื้อจากอวัยวะต่างๆ

Dr. Ronald Enrique Morales Vargas ภาควิชาภูมิวิทยาการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับคำแนะนำและเทคนิคทางชีวโมเลกุล เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือกลาง (CIF) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับความร่วมมือและสนับสนุนด้านเทคนิค นักศึกษาและเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อาจไม่ได้กล่าวถึง

สุดท้ายขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และสำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่สนับสนุนทุนวิจัยโครงการนี้และโครงการอื่นๆที่ผ่านมา ซึ่งทำให้ผู้วิจัยทำงานวิจัยได้ต่อเนื่อง มีความรู้ ความเข้าใจ และพัฒนาเทคโนโลยีต่างๆที่สามารถถ่ายทอดแก่นักศึกษาและต่อยอดงานวิจัยได้ต่อไป

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU5480001

ชื่อโครงการ: ภาวะออกซิเดทีฟสเตรสที่เหนี่ยวนำโดยภาวะเหล็กเกินและผลกระทบต่อเมตาบอริซึมและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมเหล็กในธาลัสซีเมีย

ชื่อนักวิจัย: รศ.นพวรรณ ภูมาลา มอราเลส

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: noppawan.phu@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี (15 มิถุนายน 2554 – 14 มิถุนายน 2557)

ภาวะเหล็กเกินรวมทั้งผลกระทบเหล็กเกินต่อภาวะออกซิเดทีฟสเตรส พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมเหล็ก ศึกษาในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินโดยการฉีด iron dextran ขนาด 1 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมในระยะเวลาต่างๆ การทดลองโดยใช้เทคนิค Overhauser-enhanced MRI (OMRI) และใช้ carbamoyl-PROXYL เป็นสาร spin probe แสดงให้เห็นว่าเหล็กสามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ หรือมีการเปลี่ยนแปลง redox status ในอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะตับและไตของหนูที่มีภาวะเหล็กเกิน การให้ยาขับเหล็ก deferiprone มีแนวโน้มลดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระนี้ได้

เมื่อให้ iron dextran ต่อเนื่อง 9 ครั้งในระยะเวลา 2 สัปดาห์ ในหนูปกติและหนูธาลัสซีเมีย (β -knockout mice) นอกจากเหล็กจะสะสมในตับแล้วยังกระจายไปในส่วนอื่นๆ ที่สำคัญคือหัวใจ ค่าออกซิเดทีฟสเตรสได้แก่ lipid peroxidation และปริมาณแอนติออกซิเจน glutathione และการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase และ catalase มีการเปลี่ยนแปลง เช่นกันการให้ยาขับเหล็ก deferiprone ลดปริมาณเหล็กในหัวใจอย่างมีนัยสำคัญและปรับภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในหัวใจใกล้เคียงหนูที่ไม่ได้รับเหล็ก

เหล็กที่สะสมในปริมาณสูง (iron dextran ต่อเนื่อง 9 ครั้งในระยะเวลา 2 สัปดาห์) มีผลต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีน ของ hepcidin ซึ่งเป็นฮอร์โมนในการควบคุมการดูดซึมเหล็กจากทางลำไส้และการปลดปล่อยเหล็กจาก macrophages เหล็กเกินมีผลให้การแสดงออกของยีน hepcidin (*HAMP1*) เพิ่มขึ้นแต่พบว่าปริมาณโปรตีน hepcidin ในตับที่ตรวจวัดโดย immunofluorescence และในซีรัมที่ตรวจวัดโดย ELISA ต่ำลง การศึกษาชี้ให้เห็นว่าภาวะเหล็กเกินยับยั้งการแสดงออกของยีน *TfR2* และ *furin* ซึ่งเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของ *HAMP1* นอกจากนี้การลดลงของการแสดงออก *furin* ยังอาจมีผลต่อ post translational process ที่เปลี่ยน pro-hepcidin เป็น active hepcidin อีกด้วย

ผลการศึกษานี้อาจอธิบายผลการไม่ตอบสนองต่อยาขับเหล็กในผู้ป่วยบางรายกล่าวคือถ้า active hepcidin ลดลงการดูดซึมเหล็กก็ยังคงดำเนินไปมากกว่าปกติ การให้ยาขับเหล็กในขนาดที่ให้ผู้ป่วยอื่นๆ อาจไม่เพียงพอในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ในอนาคตผู้ป่วยกลุ่มนี้อาจจำเป็นต้องได้รับยาประเภท hepcidin agonist ร่วมกับยาขับเหล็กด้วย ทั้งนี้ตัวยาขับเหล็กทั้ง deferiprone และ deferoxamine ไม่รบกวนการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่กล่าวมา อย่างไรก็ตามสมมติฐานนี้ควรจะต้องได้รับการพิสูจน์ต่อไป

คำหลัก: beta-knockout, hepcidin, iron chelator, iron overload, thalassemia

Abstract

Project Code: RMU5480001

Project Title: Iron overload related oxidative stress and impact on metabolism and expression of iron regulatory gene in thalassemia

Investigator: Associate Prof. Noppawan Phumala Morales

Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address: noppawan.phu@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years (15 June 2554 – 14 June 2557)

Iron overload and its effects on oxidative stress, pathology and expression of iron regulatory genes were studied in iron overloaded mice models using intraperitoneally injection of 1 g/kg body weight iron dextran for several periods. Overhauser-enhanced MRI (OMRI) together with a spin probe, carbamoyl-PROXYL demonstrated the enhanced free radical production in liver and kidney compartments in iron overloaded mice. Deferiprone, an iron chelator, reduced free radical production in those compartments.

Heavily iron overload was produced by injection of iron dextran for 9 doses in two weeks. This model demonstrated iron accumulation in the heart in addition to the liver. Reduction of cardiac iron and also improvement of oxidative status were observed in mice treated with deferiprone.

Hepcidin is a peptide hormone that regulates duodenal iron absorption and iron release from macrophages. Heavily iron overload induced hepcidin gene (*HAMP1*) expression, controversial with reduction of hepatic and serum hepcidin protein as demonstrated by immunofluorescence and ELISA technique, respectively. This result may be explained by the decreasing of *TfR2* and *furin* expression. Furin has important function in post translation process of hepcidin. It cleaves pro-hepcidin to active hepcidin before releasing to the circulation. Insufficiency of furin activity results in lesser production of active hepcidin, even though gene expression is still intact. Our finding may explain the non-responding to iron chelator in some thalassemic patients. The low level of active hepcidin causes progression in duodenal iron absorption, the regular dosage and regiment of iron chelator may insufficient in this case. We propose that hepcidin agonist together with iron chelator may need in some patients. It should be noted that deferiprone and deferoxamine did not interfere *HAMP1* and other gene expression.

Keywords: beta-knockout, hepcidin, iron chelator, iron overload, thalassemia,

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบัญภาพ	v
สารบัญตาราง	vi
บทที่ 1	1
การศึกษาออกซิเดทีฟสเตรส การสร้างอนุมูลอิสระ และผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ในหนูปกติและหนูธาลัสซีเมียที่ได้รับเหล็กเกิน	
บทที่ 2	14
การศึกษาผลของภาวะเหล็กเกินและปฏิกิริยาอนุมูลอิสระต่อ hepcidin mRNA expression และยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมปริมาณเหล็กในร่างกายของหนูธาลัสซีเมีย	
บทที่ 3	26
การพัฒนาการตรวจวัด hepcidin โดยวิธี Liquid chromatography/Mass spectroscopy	
สรุปโครงการวิจัย	34
ผลงานที่ได้จากโครงการ	35

ภาคผนวก

1. Reprint: Yatmark P, et al. Exp Toxicol Pathol, 2014
2. Proceedings: Wichayo S, et al., the Pharmacological & Therapeutic Society of Thailand, 2013
3. Abstract & poster: Wichayo S, et al., the 13th FABOMB Congress, 2012
4. Abstract: Morales NP, et al. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว 2556

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 โครงสร้างทางเคมีของ carbamoyl-PROXYL	2
1.2 ภาพจาก OMRI แสดงการลดลงของสัญญาณ carbamoyl-PROXYL ที่เวลาต่างๆ ในหนูปกติและหนูที่ได้รับเหล็กเกินโดยการให้ iron dextran	4
1.3 อัตราการลดลงของความเข้มสัญญาณ carbamoyl-PROXYL ในอวัยวะต่างๆ	5
1.4 เหล็กในเนื้อเยื่อตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก	9
1.5 เหล็กในเนื้อเยื่อหัวใจของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก	11
2.1 Relative <i>Hamp1</i> expression ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็ก	18
2.2 Immunofluorescence of hepcidin protein ในตับของหนู WT และ BKO กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเหล็ก	19
2.3 Immunofluorescence of hepcidin protein ในตับของหนู WT และ BKO ในหนูได้รับเหล็กเกินและได้รับยาขับเหล็ก DF และ L1	20
2.4 Relative <i>Tfr2</i> expression ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็ก	22
2.5 Relative <i>Furin</i> expression ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็ก	23
3.1 Mass spectrum ของ hepcidin ที่ความเข้มข้น 2 $\mu\text{g/ml}$	28
3.2 MS/MS ของ $[M+5H]^{5+}$, $[M+4H]^{4+}$, $[M+3H]^{3+}$ ที่ fragmentation amplitude 0.8	29
3.3 Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ hepcidin	31
3.4 Standard curve ของ hepcidin เมื่อวิเคราะห์ที่ m/z 558.6, 698.2 และ 930.8	32

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 อัตราการลดลงของความเข้มข้น carbamoyl-PROXYL ในหัวใจ ตับและไต วิเคราะห์โดยใช้ OMRI ที่ 72 ชั่วโมงหลังจากได้รับเหล็กครั้งสุดท้าย	6
1.2 ปริมาณเหล็กและค่าออกซิเดทีฟสเตตในตับ	6
1.3 ปริมาณเหล็กและค่าออกซิเดทีฟสเตตในไต	6
1.4 น้ำหนักตัว น้ำหนักตับและม้ามของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก	7
1.5 ระดับเหล็ก (non-heme iron) ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก	8
1.6 Oxidative status ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก	8
1.7 ระดับเหล็ก (non-heme iron) ในหัวใจของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก	10
1.8 Oxidative status ในหัวใจของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก	10
2.1 Primers สำหรับการตีการแสดงผลของยีน	16
2.2 ระดับเหล็ก ระดับ hepcidin ในซีรัมและในเนื้อเยื่อตับของหนูปกติและหนูธาลัสซีเมีย	17
2.3 Relative <i>Hamp1</i> expression ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก	18
2.4 Relative hepcidin protein ในตับ และ ปริมาณในซีรัมของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก	21

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
2.5 Serum EPO ของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก	22
2.6 Relative <i>TfR2</i> expression ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก	23
2.7 Relative <i>Furin</i> expression ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก	24
3.1 แสดงความเข้มของสัญญาณของ precursor และ product mass หลังจาก fragmentation ที่ amplitude 0.8	30

บทที่ 1

การศึกษาออกซิเดทีฟสเตรท การสร้างอนุมูลอิสระ และผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา

ในหนูปกติและหนูธาลัสซีเมียที่ได้รับเหล็กเกิน

บทนำ

กลไกที่เกี่ยวข้องกับการเสียหายและทำลายเนื้อเยื่อในภาวะเหล็กเกินนั้นเกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระโดยเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา Fenton reaction อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีหลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ hydroxyl radical ($\text{HO}^\bullet$) และ superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) อนุมูลอิสระนี้มีค่าครึ่งชีวิตสั้น อยู่ในระดับ nano หรือ microsecond ตามลำดับ อนุมูลอิสระนี้สามารถทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น ไขมันได้ผลผลิตเป็นอนุมูลอิสระของไขมัน ($\text{L}^\bullet$) และอนุมูลอิสระที่เกิดจากการออกซิเดชันของไขมัน ($\text{LO}^\bullet$, $\text{LOO}^\bullet$)

การตรวจวัดอนุมูลอิสระเหล่านี้มีข้อจำกัด เนื่องจากคุณสมบัติของอนุมูลอิสระที่มีค่าครึ่งชีวิตสั้นเกิดปฏิกิริยาและเปลี่ยนแปลงเป็นสารอื่นๆอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ในร่างกายสารอนุมูลอิสระมีปริมาณน้อยเครื่องมือที่ใช้วัดต้องมีประสิทธิภาพสูง

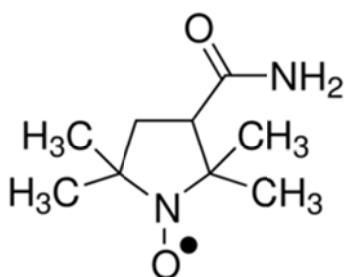
เนื่องจากอนุมูลอิสระมีคุณสมบัติเป็นแม่เหล็ก paramagnetic การวัดอนุมูลอิสระทำได้โดยใช้เทคนิค electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy ต่อมามีการพัฒนาเครื่องมือเพื่อตรวจวัดระดับอนุมูลอิสระในสัตว์ทดลองที่มีชีวิตคือ Overhauser-enhanced MRI (OMRI) เมื่อใช้เครื่องมือนี้ร่วมกับการใช้ nitroxyl spin probe สามารถตรวจวัดอนุมูลอิสระแบบ real time ได้ในสัตว์ทดลอง (Utsumi et al., 2006)

การศึกษาในส่วนนี้จะนำวิธี OMRI ร่วมกับ nitroxyl spin probe ได้แก่ carbamoyl-PROXYL ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นอนุมูลอิสระ (ภาพที่ 1.1) และให้สัญญาณปรากฏและตรวจวัดได้โดย OMRI สาร carbamoyl-PROXYL มีความสามารถในการละลายน้ำได้และผ่านเข้าเซลล์ได้แต่ไม่ผ่าน blood brain barrier มีความสามารถทำปฏิกิริยาอนุมูลอิสระอื่นๆได้เช่น hydroxyl radical และ superoxide ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาจะให้สารผลิตภัณฑ์ไม่เป็นสารอนุมูลอิสระ (hydroxylamine derivative) ผลคือสัญญาณจาก nitroxyl จะลดลง การเปลี่ยนแปลงนี้ยังขึ้นกับระดับสาร reducing agent เช่น glutathione (Morales et al., 2012) และ ascorbic acid อีกด้วยดังนั้นอัตราการลดลงของสัญญาณจาก carbamoyl-PROXYL จะสะท้อนการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระและการเปลี่ยนแปลง redox status ในสัตว์ทดลอง

การตรวจวัดด้วย OMRI สามารถสร้างภาพสัญญาณ carbamoyl-PROXYL จากทั้งตัวสัตว์ทดลอง (whole body) การวิเคราะห์ภาพจากส่วนต่างๆก็สามารถแยกศึกษาปฏิกิริยาจากอวัยวะในบริเวณนั้นๆได้ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงมีข้อดีคือสามารถตรวจวัดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ทั้งร่างกายในสัตว์ทดลองที่มีชีวิต และติดตามปฏิกิริยาในสัตว์ทดลองตัวเดิมได้ ทั้งนี้การเลือกชนิดของ nitroxyl spin probe ก็สามารถเลือกคุณสมบัติต่างๆเช่นการผ่านเข้าออกเซลล์ ตามวัตถุประสงค์การศึกษาได้

การศึกษาในโครงการนี้นอกจากมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดอนุมูลอิสระในภาวะเหล็กเกินแล้วยังจะศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาอีกด้วย โดยเน้นผลต่อดับและหัวใจซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญในการสะสมเหล็กและเกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และศึกษาผลของยาขับเหล็ก deferoxamine (DF) และ deferiprone (L1) ต่อตัวชี้วัดต่างๆ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในส่วนนี้เพื่อ

1. ศึกษาการเกิดอนุมูลอิสระและการกระจายอนุมูลอิสระในร่างกายหนูที่มีภาวะเหล็กเกิน เหนี่ยวนำโดยการฉีด iron dextran เข้าช่องท้อง อวัยวะเป้าหมายที่ศึกษาคือ ดับ และ หัวใจ
2. ศึกษาการสะสมและการกระจายตัวของเหล็ก การเปลี่ยนแปลงของ oxidative status และพยาธิวิทยา เมื่อมีภาวะเหล็กเกินใน ดับและหัวใจ
3. ศึกษาผลของยาขับเหล็ก deferoxamine (DF) และ deferiprone (L1) ต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะดังกล่าว



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของ carbamoyl-PROXYL

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาอนุมูลอิสระในสัตว์ทดลองที่มีภาวะเหล็กเกินโดย iron dextran และตรวจวัดด้วย Overhauser-enhanced MRI (OMRI)

1. การสร้างหนูภาวะเหล็กเกิน

โดยใช้หนู ddY mice เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ น้ำหนัก 23-27 กรัม ฉีดด้วย iron dextran ทางหน้าท้องในขนาด 1 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม 1 ครั้งแล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมงก่อนนำมาศึกษา ในกลุ่มที่ให้อาขับเหล็ก หนูจะได้รับยาขับเหล็ก deferoxamine (DF) หรือ deferiprone (L1) ในขนาด 0.2 มิลลิโมลล์ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมเป็นเวลา 30 นาทีก่อนจะตรวจวัดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสโดย OMRI

ในกรณีให้ iron dextran ซ้ำ หนูจะได้รับ iron dextran ทางหน้าท้องในขนาด 1 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมต่อเนื่องกัน 3 วันแล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมงก่อนนำมาศึกษา ในกลุ่มที่ให้อาขับเหล็ก

หนูจะได้รับยาขับเหล็ก DF หรือ L1 ในขนาด 0.2 มิลลิโมลล์ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม วันละ 1 ครั้ง ต่อเนื่องเป็นเวลา 4 วันโดยเริ่มครั้งแรกหลังจากฉีด iron dextran ไปแล้ว 30 ชั่วโมง เช่นเดียวกันหนูในกลุ่มที่ได้รับยาขับเหล็กจะตรวจวัดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสโดย OMRI หลังจากการได้รับเหล็กครั้งสุดท้ายแล้ว 72 ชั่วโมง

หลังจากสิ้นสุดการทดลองในวันต่อมาจะแยกอวัยวะได้แก่ ตับ หัวใจ ไต เพื่อศึกษาระดับเหล็กและค่าออกซิเดทีฟสเตรส

2. การตรวจวัดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสด้วย OMRI (Kosem et al., 2012)

โดยใช้สาร nitroxyl spin probe ได้แก่ carbamoyl-PROXYL 2 มิลลิโมลล์ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมโดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำที่หาง แล้วบันทึกภาพของสาร spin probe แบบ whole body image ตามเวลาต่างๆแล้วคำนวณอัตราการลดลงของความเข้มของสัญญาณ (k) ที่อวัยวะต่างๆแสดงหน่วยเป็น min^{-1}

3. การตรวจวัด lipid peroxidation

วัดระดับ lipid peroxidation ในเนื้อเยื่ออวัยวะโดยตรวจวัดระดับ HNE-His adduct คือสารผลิตภัณฑ์จากการะบวนการ lipid peroxidation (HNE) ที่จับกับโปรตีน โดยใช้ OxiSelect™ HNE-His adduct ELISA Kit (Cell Biolabs, USA)

การวัด lipid peroxidation โดยวิธี thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) ทำได้โดยใช้วิธีของ (Asakawa, 1980).

4. Total glutathione, glutathione peroxidase และ catalase

Total GSH ตรวจวัดใน tissue homogenate โดยวิธี DTNB-glutathione reductase recycling (Kondo and Sawada, 2000) การทำงานเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ตรวจวัดโดยวิธีของ Takahashi, 2000 และการทำงานของ catalase ตรวจวัดโดยวิธี Kawamura, 2004

5. การตรวจวัดระดับเหล็กในเนื้อเยื่อโดยวิธี ของ Foy et al., (1967) และใช้ ferrozine เป็นสารให้เกิดสี

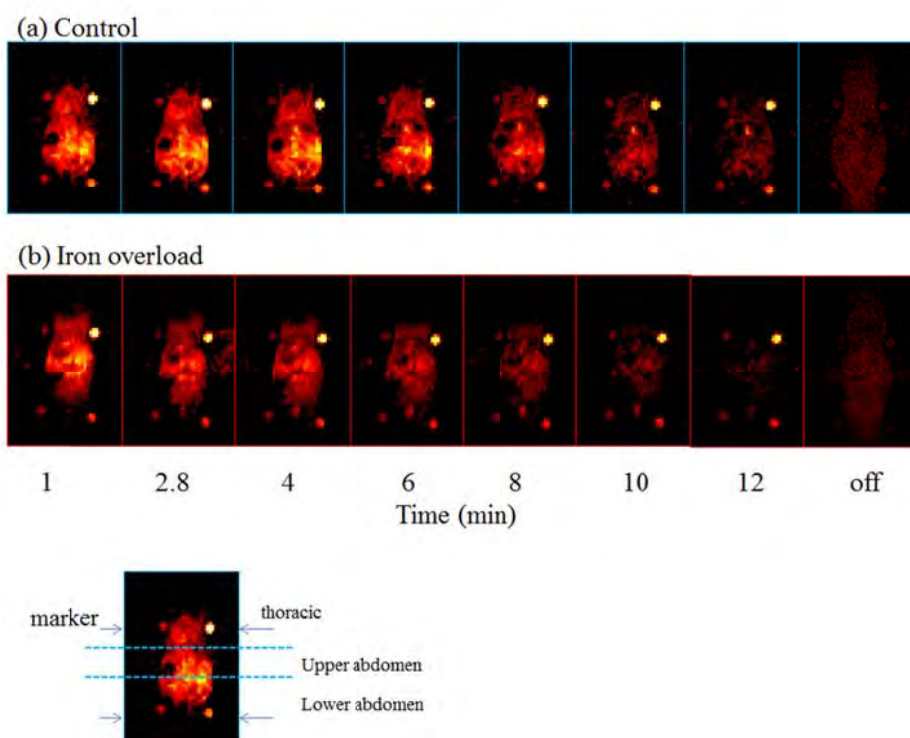
6. ตรวจวัดโปรตีนใน tissue homogenate samples

โดยใช้ Pierce® 660 nm Protein assay (Thermo scientific, USA)

ผลการศึกษา

1. ภาพเอกซเรย์ฟลูออโรสโคปในหนูภาวะเหล็กเกินโดยให้ iron dextran ขนาดเดียววิเคราะห์โดยใช้ OMRI

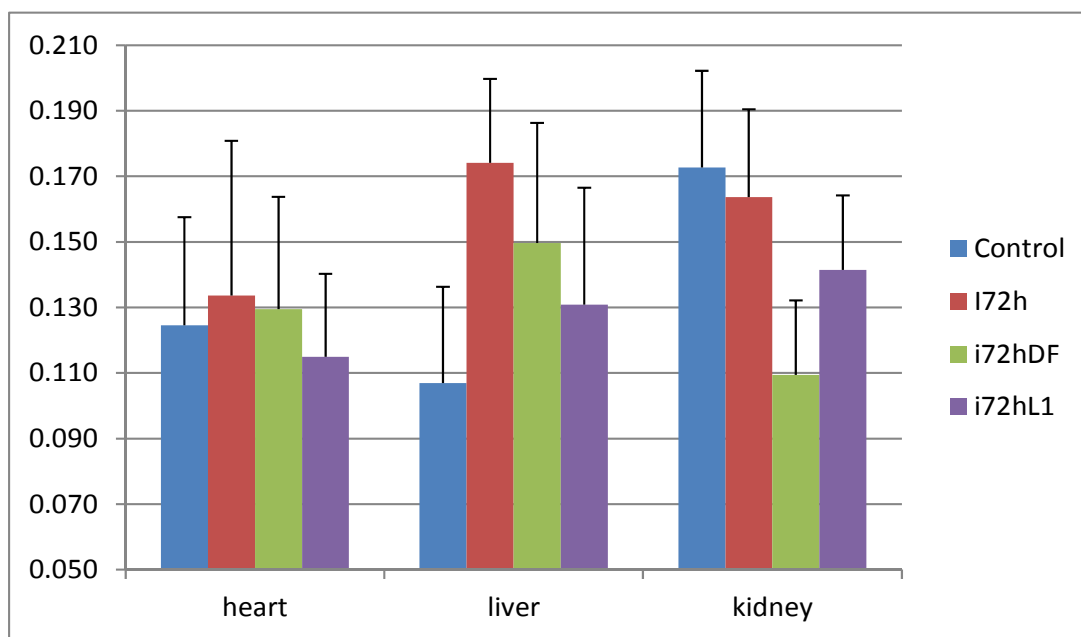
ตัวอย่าง whole body image ของหนูปกติและหนูที่ได้รับเหล็กเกินขนาดเดียวแสดงดังในภาพที่ 1.2 ความเข้มของสัญญาณจาก nitroxyl spin probe (carbamoyl-PROXYL) จะลดลงตามเวลาและอัตราการลดลงจะขึ้นกับปฏิกิริยาอนุมูลอิสระและ redox status ของสัตว์ทดลอง อัตราการลดลงของความเข้มของสัญญาณจาก carbamoyl-PROXYL สามารถคำนวณในแต่ละส่วนดังนั้นค่าอัตรานี้จะสะท้อนปฏิกิริยาอนุมูลอิสระในแต่ละอวัยวะได้



ภาพที่ 1.2 ภาพจาก OMRI แสดงการลดลงของสัญญาณ carbamoyl-PROXYL ที่เวลาต่างๆในหนูปกติ (a) และหนูที่ได้รับเหล็กเกินโดยการให้ iron dextran (b)

เมื่อคำนวณอัตราการลดลงในอวัยวะส่วนต่างๆ ในภาพที่ 1.3 จากข้อมูลจากหนูปกติและหนูที่ได้รับเหล็ก iron dextran ในขนาดเดียวและทิ้งไว้ 72 ชั่วโมงก่อนวัดโดย OMRI จะเห็นว่าในหนูที่ได้รับเหล็กเกินในส่วนของตับจะมีอัตราการลดลงสูงกว่าหนูปกติ ในขณะที่ส่วนของหัวใจไม่มีความแตกต่างกันในหนูทั้งสองกลุ่ม ทั้งนี้เนื่องจากตับเป็นอวัยวะหลักของการสะสมเหล็ก การให้เหล็กในขนาดเดียวอาจไม่มีผลต่อการเพิ่มเหล็กในหัวใจ

เมื่อให้ยาขับเหล็ก DF และ L1 ในขนาดที่เท่ากันพบว่ายาขับเหล็กทั้งสองสามารถลดอัตราการลดลงของสัญญาณได้โดยยา L1 มีแนวโน้มที่ดีกว่า ทั้งนี้เนื่องจาก L1 สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ดีกว่า DF เมื่อตรวจวัดปริมาณ HNE-protein-adduct ในตับหนูปกติมีปริมาณ 0.160 ± 0.488 ไมโครกรัมต่อกรัมโปรตีนซึ่งไม่ต่างจากหนูที่ได้รับเหล็กเกิน 0.166 ± 0.326 ไมโครกรัมต่อกรัมโปรตีน



(mean $\pm$ SD; n=5-6)

ภาพที่ 1.3 อัตราการลดลงของความเข้มสัญญาณ carbamoyl-PROXYL ในอวัยวะต่างๆคำนวณจาก whole body image ในหนูปกติ (แท่งสีฟ้า) หนูภาวะเหล็กเกินโดยได้รับ iron dextran ครึ่งเดียวแล้วทิ้งไว้ 72 ชั่วโมงก่อนตรวจวัด (แท่งสีแดง) หนูภาวะเหล็กเกินที่ได้รับยา deferoxamine (DF, แท่งสีเขียว) และ deferiprone (L1, แท่งสีม่วง)

2. ภาวะออกซิเดทีฟสเตรทในหนูภาวะเหล็กเกินโดยให้ iron dextran ซ้ำและวิเคราะห์โดยใช้ OMRI

เมื่อให้เหล็กทางช่องท้อง 3 ครั้งและวิเคราะห์โดยใช้ OMRI ค่าอัตราการลดลงของสัญญาณ carbamoyl-PROXYL ในหัวใจ ตับ และไตสรุปในตารางที่ 1.1 จากตารางจะเห็นว่าในสัตว์ทดลองที่ได้รับเหล็กเกินอัตราการลดลงของความเข้มสัญญาณมีแนวโน้มสูงขึ้นในตับและไต การได้รับยาขับเหล็ก deferiprone (L1) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าอัตรานี้ ปริมาณเหล็กในเนื้อเยื่อ ค่าออกซิเดทีฟสเตรทในตับและไตแสดงในตารางที่ 1.2 และ 1.3 ตามลำดับ จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าในภาวะทดลองนี้

เมื่อให้เหล็ก 3 ขนาด สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระหรือการเปลี่ยนแปลงทาง redox status ในสัตว์ทดลองแต่การเปลี่ยนแปลงนี้ยังไม่ชัดเจน ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 1.1 อัตราการลดลงของความเข้มข้นของ carbamoyl-PROXYL (k , min^{-1}) ในหัวใจ ตับ และไต วิเคราะห์โดยใช้ OMRI ที่ 72 ชั่วโมงหลังจากได้รับเหล็กครั้งสุดท้าย

Group (n)	Heart	Liver	Kidney
Control (16)	0.225 $\pm$ 0.029	0.222 $\pm$ 0.061	0.231 $\pm$ 0.042
Iron overload (16)	0.231 $\pm$ 0.030	0.245 $\pm$ 0.050	0.275 $\pm$ 0.058
Iron overload + L1 (10)	0.213 $\pm$ 0.037	0.243 $\pm$ 0.063	0.278 $\pm$ 0.060
Mean $\pm$ SD			

ตารางที่ 1.2 ปริมาณเหล็กและค่าออกซิเดทีฟสเตรสในตับ

Group (n)	Iron content (mg)	TBARs (nmol/mgP)	GPx ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mgP}$)	Catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mgP}$)
Control (10)	1.8 $\pm$ 1.5	2.5 $\pm$ 0.1	650.6 $\pm$ 54.6	186.4 $\pm$ 30.1
Iron overload (10)	119.5 $\pm$ 51.2	4.4 $\pm$ 0.8	724.1 $\pm$ 82.3	190.3 $\pm$ 42.2
Iron overload + L1 (10)	109.7 $\pm$ 38.2	4.1 $\pm$ 1.2	588.8 $\pm$ 96.2	77.9 $\pm$ 10.7
Mean $\pm$ SD				

ตารางที่ 1.3 ปริมาณเหล็กและค่าออกซิเดทีฟสเตรสในไต

Group (n)	Iron content (mg)	TBARs (nmol/mgP)	GPx ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mgP}$)	Catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mgP}$)
Control (10)	0.5 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 1.4	629.4 $\pm$ 64.6	115.2 $\pm$ 33.4
Iron overload (10)	1.0 $\pm$ 0.8	3.4 $\pm$ 0.7	484.2 $\pm$ 104.2	50.6 $\pm$ 8.7
Iron overload + L1 (10)	1.6 $\pm$ 1.0	2.8 $\pm$ 1.2	419.8 $\pm$ 91.8	44.9 $\pm$ 18.5
Mean $\pm$ SD				

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาผลของภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสต่อพยาธิสภาพของตับและหัวใจ ในหนูปกติและหนูธาลัสซีเมีย

1. สัตว์ทดลองและการสร้างภาวะเหล็กเกิน

หนู C57BL/6 (wild type, WT) และ heterozygous β -globin knockout (BKO) อายุ 7-8 สัปดาห์ ได้รับจาก ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยมหิดล หนูทั้งสองชนิดแบ่งเป็นชนิดละ 4 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับเหล็ก กลุ่มที่ได้รับเหล็กและยาขับเหล็ก deferoxamine (DF) และกลุ่มที่ได้รับเหล็กและยาขับเหล็ก deferiprone (L1)

ในหนูที่ได้รับเหล็กจะได้ iron dextran ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม 9 ครั้งในเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากการได้รับเหล็กครั้งสุดท้ายแล้ว 3 วัน ให้ยาขับเหล็ก deferoxamine หรือ deferiprone ขนาด 0.2 และ 0.6 มิลลิโมลต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมตามลำดับต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน หลังการให้ยาครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง หนูจะถูก sacrificed โดยการสลบก่อนโดยให้ Nembutal® และตามด้วย cardiac puncture เพื่อเก็บเลือด หลังจากนั้นเก็บอวัยวะต่างๆ

2. การศึกษาทางพยาธิวิทยา

ชิ้นเนื้อตับและหัวใจแยกแช่ใน 4% paraformaldehyde, 5% sucrose และ 150 mM PBS pH 7.4. และ embedded บน paraffin ตัดเป็นแผ่นขนาด 5 ไมครอน แล้วนำมาย้อมด้วย hematoxylin/eosin (H&E) เพื่อศึกษา morphology และ ย้อมด้วย Perl's Prussian blue เพื่อศึกษาการสะสมเหล็ก

ผลการศึกษา

1. ลักษณะทั่วไปของหนูที่ได้รับเหล็กเกิน

จากตารางที่ 1.4 หนู WT และ BKO เมื่อได้รับเหล็กในรูป iron dextran และได้รับยาขับเหล็กมีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างกันในระหว่างกลุ่ม สำหรับหนู BKO มีภาวะม้ามโต น้ำหนักม้ามสูงกว่าหนู WT แต่น้ำหนักตับไม่แตกต่างจากหนู WT

เมื่อทำให้หนูมีภาวะเหล็กเกิน น้ำหนักตับและม้ามของหนู WT และ BKO จะเพิ่มขึ้นในระดับที่เท่าๆกัน การให้ยาขับเหล็กทั้งสองชนิดในเวลา 7 วันหลังจากการให้เหล็กทั้ง DF และ L1 ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักตับและม้าม

ตารางที่ 1.4 น้ำหนักตัว น้ำหนักตับและม้ามของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก

Mice	Group	Body weight (g)	Liver (g)	Spleen (mg)
WT	Control	23.8 ± 0.9	1.0 ± 0.3 ^a	73.8 ± 7.1 ^{c,d}
	Iron overload	21.6 ± 1.1	2.7 ± 0.2 ^a	145.3 ± 29.3 ^c
	Iron overload +DF	23.8 ± 1.4	2.8 ± 0.2	167.3 ± 23.7
	Iron overload +L1	20.5 ± 1.5	2.4 ± 0.2	109.2 ± 15.5
BKO	Control	23.1 ± 0.8	1.1 ± 0.1 ^b	441.8 ± 37.7 ^d
	Iron overload	21.9 ± 1.1	2.6 ± 0.2 ^b	528.5 ± 28.3
	Iron overload +DF	19.8 ± 1.5	2.4 ± 0.3	492.2 ± 75.8
	Iron overload +L1	21.5 ± 0.7	2.5 ± 0.2	568.9 ± 56.5

Data are mean ± SEM (n=4-5). Comparisons for significant differences are indicated by the same alphabet; a...p<0.01; b,c,d...p<0.05.

2. ระดับเหล็ก การกระจายของเหล็กและ oxidative status ในตับ

ระดับเหล็กในรูป non-heme iron ในตับแสดงในตารางที่ 1.5 และ รูปเหล็กสะสมในตับโดยวิธี Perls' Prussian blue staining แสดงในภาพที่ 1.4 จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ iron dextran เหล็กเพิ่มขึ้นในตับอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อให้ยาขับเหล็กในระยะเวลา 7 วัน ปริมาณเหล็กสะสมไม่ลดลง แต่เมื่อวิเคราะห์ภาพทางพยาธิวิทยาพบว่าการกระจายของเหล็กมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อให้ยาขับเหล็ก L1

ตารางที่ 1.5 ระดับเหล็ก (non-heme iron) ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก

Mice	Group	Liver iron (mg/g liver)
WT	Control	0.03 ± 0.0 ^a
	Iron overload	14.5 ± 1.2
	Iron overload +DFO	13.8 ± 0.8
	Iron overload +L1	14.5 ± 1.3
BKO	Control	0.21 ± 0.03 ^a
	Iron overload	14.6 ± 1.9
	Iron overload +DFO	13.0 ± 1.4
	Iron overload +L1	14.0 ± 0.7

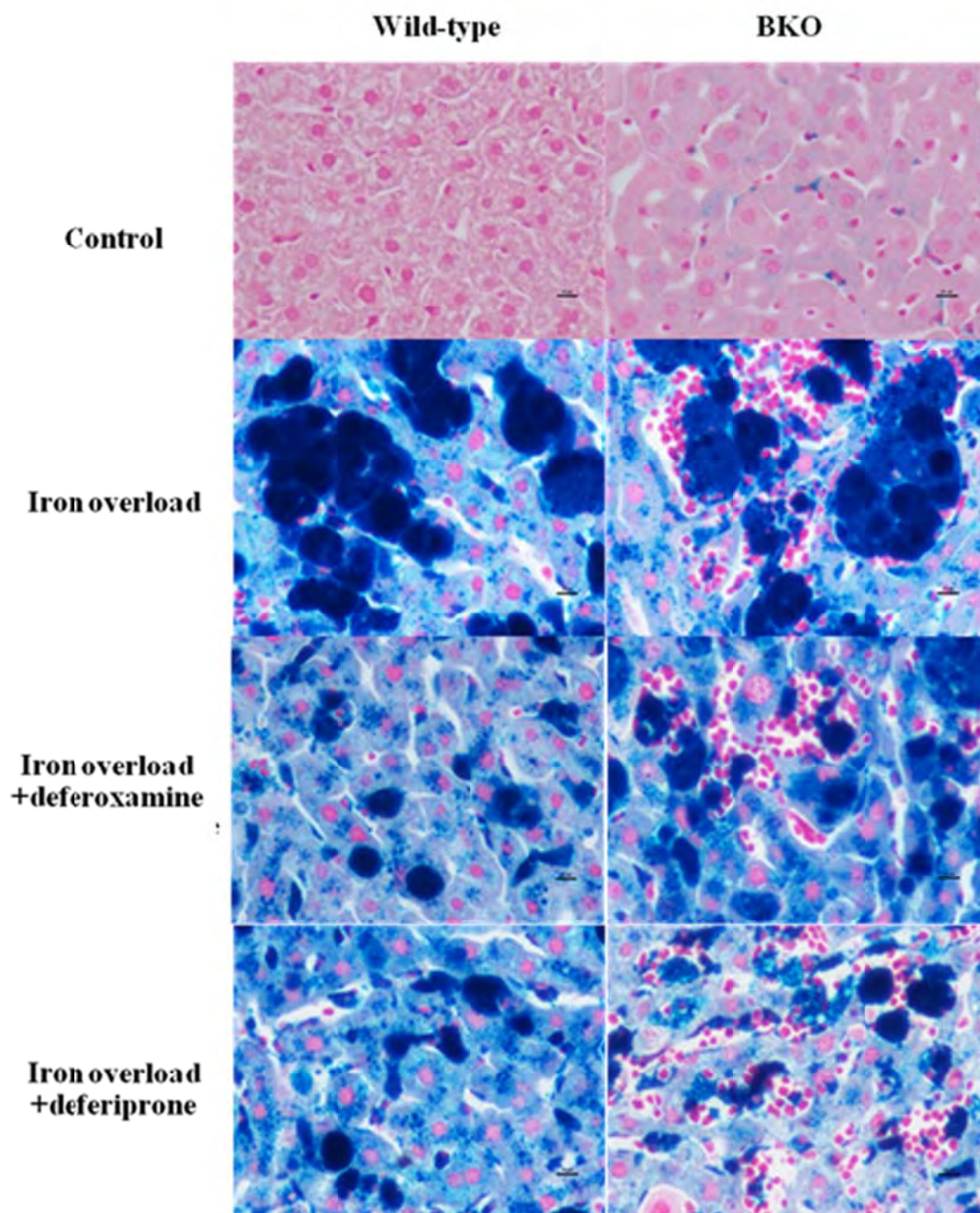
Data are mean ± SEM (n=5). Comparisons for significant differences are indicated by the same alphabet; a...p<0.01.

ตารางที่ 1.6 Oxidative status ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก

Mice	Group	TBARs	GSH	GPx	Catalase
		nmol/mg P	nmol/mg P	uM/min/mg P	uM/min/mg P
WT	Control	2.5 ± 0.4 ^a	57.7 ± 10.5	724.1 ± 75.4 ^b	107.9 ± 10.6
	Iron overload	5.9 ± 0.4 ^a	52.4 ± 6.6	588.0 ± 33.8	94.9 ± 8.9
	Iron overload +DF	4.5 ± 0.4	51.9 ± 5.9	521.2 ± 39.6	76.9 ± 9.6
	Iron overload +L1	4.8 ± 0.4	46.4 ± 10.0	556.8 ± 58.6	90.4 ± 12.1
BKO	Control	4.4 ± 0.7	42.8 ± 5.9	496.4 ± 48.2 ^b	123.7 ± 17.7
	Iron overload	5.9 ± 0.5	41.8 ± 5.2	540.1 ± 62.2	96.1 ± 8.3
	Iron overload +DF	4.8 ± 0.5	31.3 ± 3.7	320.8 ± 37.4	75.5 ± 8.4
	Iron overload +L1	4.5 ± 0.3	34.9 ± 4.5	348.1 ± 23.8	88.5 ± 13.1

Data are mean ± SEM (n=9-10). Comparisons for significant differences are indicated by the same alphabet; a...p<0.001, b...p<0.05

จากตารางที่ 1.6 ศึกษา oxidative status ในตับ สำหรับหนูที่ยังไม่ได้รับเหล็ก เห็นว่าหนู BKO มีค่า lipid peroxidation (TBARs) สูงกว่า และมีระดับ GSH ต่ำกว่าหนู WT แต่เมื่อให้เหล็กในหนูทั้งสอง ชนิดพบว่าค่า TBARs ไม่แตกต่างกัน การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในภาวะเหล็กเกินไม่มีนัยสำคัญใน หนูทั้งสองกลุ่มแต่การทำงานของ catalase มีแนวโน้มลดลงทั้งในหนู WT และ BKO การให้ยาขับ เหล็กในระยะสั้นไม่มีผลต่อตัวชี้วัดเหล่านี้



ภาพที่ 1.4 เหล็กในเนื้อเยื่อตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก โดยวิธี Perl's' Prussian blue staining

2. ระดับเหล็ก การกระจายของเหล็กและ oxidative status ในหัวใจ

ระดับเหล็กในรูป non-heme iron ในหัวใจแสดงในตารางที่ 1.7 และ รูปเหล็กสะสมในหัวใจโดยวิธีPerls' Prussian blue staining แสดงในภาพที่ 1.5 จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าในหนู BKO มีเหล็กสะสมในหัวใจอยู่แล้ว เมื่อให้ iron dextran เหล็กเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูทั้งสองกลุ่ม การให้ยาขับเหล็ก L1 สามารถลดเหล็กในหัวใจได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหนู BKO พบนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 1.7 ระดับเหล็ก (non-heme iron) ในหัวใจของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก

Mice	Group	Cardiac iron (mg/g heart)
WT	Control	0.0 ± 0.0
	Iron overload	5.5 ± 1.8
	Iron overload +DFO	5.7 ± 2.0
	Iron overload +L1	3.5 ± 2.0
BKO	Control	0.1 ± 0.0 ^a
	Iron overload	4.5 ± 1.1 ^b
	Iron overload +DFO	3.5 ± 1.5
	Iron overload +L1	2.5 ± 0.7 ^b

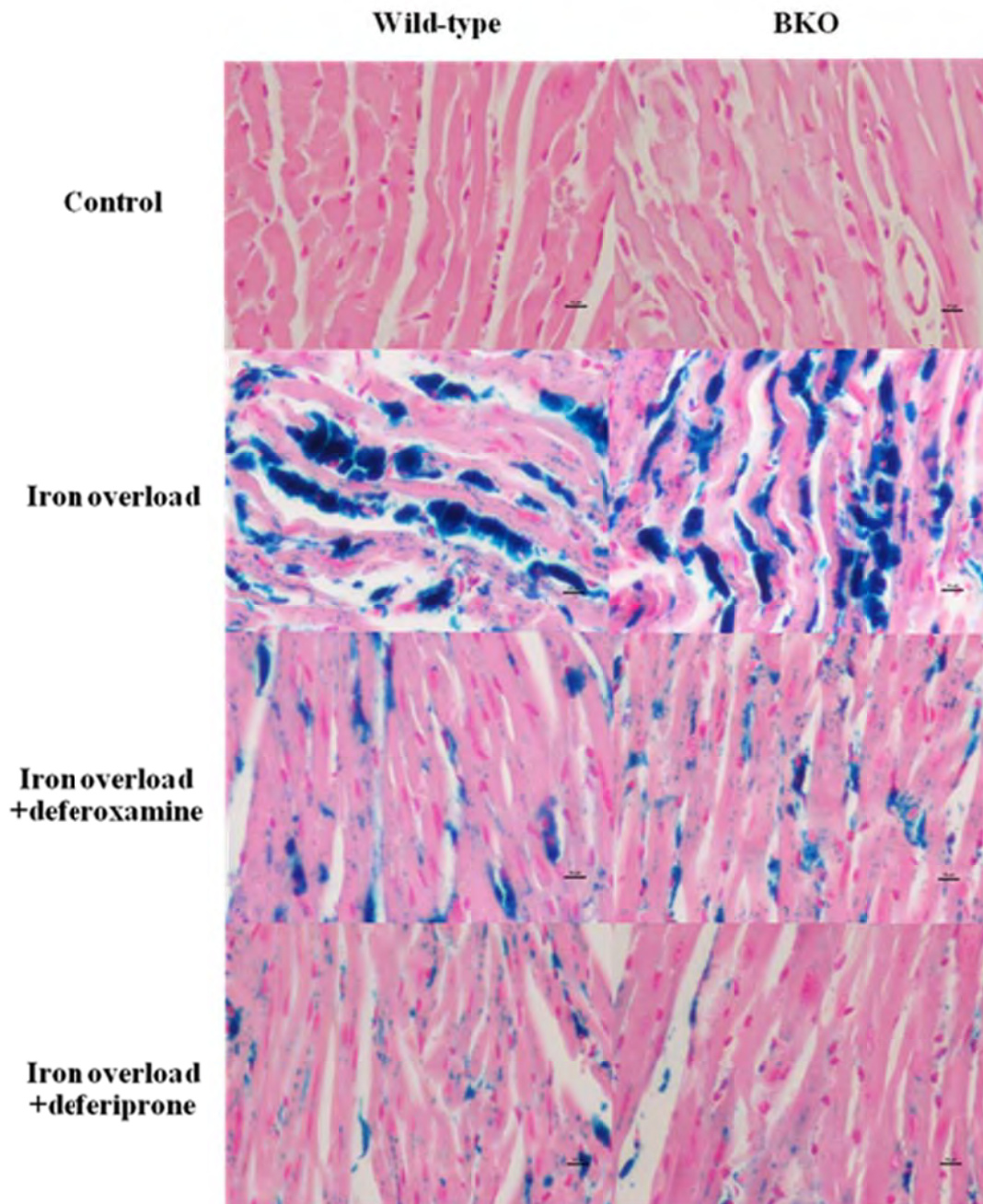
Data are mean ± SEM (n=5). Comparisons for significant differences are indicated by the same alphabet; a...p<0.01, b...p<0.05

ตารางที่ 1.8 Oxidative status ในหัวใจของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก

Mice	Group	TBARs nmol/mg P	GSH nmol/mg P	GPx μM/min/mg P	Catalase μM/min/mg P
WT	Control	4.8 ± 0.2 ^a	15.3 ± 1.5	32.2 ± 2.7	4.1 ± 0.8
	Iron overload	8.0 ± 0.8 ^a	13.5 ± 1.1	35.8 ± 4.9	7.4 ± 0.9
	Iron overload +DF	6.4 ± 0.4	13.9 ± 1.4	26.2 ± 1.1	5.9 ± 0.4
	Iron overload +L1	6.0 ± 0.3	12.8 ± 2.7	27.9 ± 2.7	5.9 ± 0.4
BKO	Control	3.8 ± 0.3	18.0 ± 2.3	32.2 ± 1.86	5.3 ± 0.7
	Iron overload	5.4 ± 0.2	16.2 ± 1.1	27.4 ± 2.2	6.8 ± 0.5
	Iron overload +DF	4.4 ± 0.4	15.2 ± 1.2	23.6 ± 2.5	6.1 ± 0.6
	Iron overload +L1	4.4 ± 0.3	15.5 ± 1.6	25.2 ± 1.2	5.2 ± 1.2

Data are mean ± SEM (n=9-10). Comparisons for significant differences are indicated by the same alphabet; a...p<0.001.

สำหรับค่า oxidative status พบว่าหนูที่ได้รับเหล็กมีค่า TBARs สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในหนู WT และ BKO นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงค่าการทำงานของเอนไซม์ catalase ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับเหล็กเกิน การได้รับยาขับเหล็กลดค่า lipid peroxidation และปรับค่าการทำงานของเอนไซม์เข้าสู่ใกล้เคียงปกติ



ภาพที่ 1.5 เหล็กในเนื้อเยื่อหัวใจของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก โดยวิธี Perl's' Prussian blue staining

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาภาวะออกซิเดทีฟสเตรสโดยใช้ OMRI และ carbamoyl-PROXYL เป็น spin probe ซึ่งสามารถแสดงค่าสะท้อนถึงปฏิกิริยานอนุมูลอิสระที่อวัยวะต่างๆนั้น พบว่าเมื่อสัตว์ทดลองได้รับเหล็กเพียงขนาดเดียว หรือได้รับเหล็ก 3 ครั้งต่อเนื่องจะเห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่ต่ำมากกว่าที่อวัยวะส่วนอื่นๆทั้งนี้อาจเนื่องจากตับเป็นอวัยวะหลักและอวัยวะแรกที่เหล็กเข้าไปสะสม และการได้รับยาขับเหล็กสามารถลดปฏิกิริยานอนุมูลอิสระได้

แต่จากผลการศึกษาการให้เหล็กในปริมาณน้อย ยังไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาอย่างชัดเจน ในโครงการนี้จึงศึกษาโดยการให้เหล็กเพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาที่ 1.2 เมื่อให้เหล็กรวม 9 ครั้ง มีเหล็กสะสมในตับและอวัยวะอื่นๆอย่างชัดเจน ในที่นี้พบว่ามีเหล็กมากพอที่จะสะสมในหัวใจด้วย แม้การศึกษาเมื่อให้เหล็กในปริมาณสูงไม่สามารถ ทดลองเพื่อตรวจวัดโดย OMRI ได้ แต่โดยภาพรวมเห็นว่ารระดับเหล็กสะสมแปรผันกับปริมาณเหล็กที่ให้เข้าไป คาดว่าปฏิกิริยานอนุมูลอิสระน่าจะมากขึ้นด้วยค่า lipid peroxidation มีค่าสูงขึ้นเมื่อสัตว์ทดลองได้รับเหล็กมากขึ้น

เป็นที่น่าสังเกตคือเมื่อสัตว์ทดลองได้รับเหล็กมากขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระได้แก่ glutathione peroxidase (GPx) และ catalase การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับชนิดของหนูและอวัยวะที่เหล็กสะสม เช่นในหัวใจ การทำงานของ catalase มีแนวโน้มสูงขึ้นในภาวะเหล็กเกิน และยาขับเหล็กทำให้การทำงานของเอนไซม์นี้ลดลง ในขณะที่ในตับการทำงานของเอนไซม์ catalase มีแนวโน้มลดลง (การทดลอง 1.2) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์นี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการปรับตัวเมื่อมีภาวะออกซิเดทีฟสเตรส ซึ่งน่าสนใจที่จะศึกษากลไกต่อไป

สำหรับแบบทดลองภาวะเหล็กเกินนี้น่าไปศึกษาถึงผลของภาวะเหล็กเกินต่อกระบวนการควบคุมเหล็กโดย hepcidin ซึ่งผลการศึกษาจะกล่าวในบทต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Asakawa T and Matsusita S. 1980. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxide. *Lipids* 15:137-140.
- Foy AL, Williams HL, Cortell S, Conrad ME. 1967. A modified procedure for the determination of nonheme iron in tissue. *Anal Biochem* 18: 559-563.
- Kawamura N. 2000. Catalase. In *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Taniguchi N and Gutteridge JMC, Ed. Oxford University Press, 77-78.

- Kondo T. and Sawada F. 2000. Glutathione (oxidized and reduced form): assay mixture and measurement. In Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Taniguchi N and Gutteridge JMC, Ed. Oxford University Press, 57-60.
- Kosem N, Naganuma T, Ichikawa K, Morales NP, Yasukawa K, Hyodo F, Yamada K, Utsumi H. 2012. Whole -body kinetic image of a redox probe in mice using Overhauser-enhanced MRI. *Free Radic Biol Med* 53: 328-336.
- Morales NP, Yamaguchi Y, Murakami K, Kosem N, Utsumi H. 2012. Hepatic reduction of carbamoyl-PROXYL in ferric nitrilotriacetate induced iron overloaded mice: an in vivo ESR study. *Biol Pharm Bull* 35: 1035-1040.
- Takahashi K. 2000. Glutathione peroxidase: coupled enzyme assay. In Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Taniguchi N and Gutteridge JMC, Ed. Oxford University Press, 79-80.
- Utsumi H, Yamada K, Ichikawa K, Sakai K, Kinoshita Y, Matsumoto S. 2006. Simultaneous molecular imaging of redox reactions monitored by Overhauser-enhanced MRI with ^{14}N - and ^{15}N -labeled nitroxyl radicals. *PNAS* 103: 1463-1468.

บทที่ 2

การศึกษาผลของภาวะเหล็กเกินและปฏิกิริยาอนุมูลอิสระต่อ hepcidin mRNA expression

และอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมปริมาณเหล็กในร่างกายของหนูธาลัสซีเมีย

บทนำ

ภาวะเหล็กเกินมีบทบาทสำคัญต่อการความเสื่อมของอวัยวะต่างๆ ซึ่งเป็นสาเหตุการตายในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ภาวะเหล็กเกินในผู้ป่วยนอกจากมีผลมาจากการได้รับเลือดเพื่อแก้ไขภาวะเลือดจางแล้ว ยังมีสาเหตุมาจากการเพิ่มขึ้นของชุดซึมเหล็กจากทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากการสังเคราะห์เม็ดเลือดแดงไม่สมบูรณ์ (ineffective erythropoiesis) กระบวนการที่มีผลต่อการควบคุมเหล็กที่สำคัญคือ กระบวนการทำงานของเปปไทด์ฮอร์โมน “hepcidin”

Hepcidin ในรูป active form ประกอบด้วยกรดอะมิโน 25 ตัว สังเคราะห์ในเซลล์ตับในรูปของ pre-pro-hepcidin และเปลี่ยนเป็น pro-hepcidin และ hepcidin ตามลำดับ เมื่อหลั่งเข้าสู่กระแสเลือด hepcidin จะจับกับตัวรับบน iron transporter คือ ferroportin ซึ่งอยู่บนผนังเซลล์ของเซลล์ลำไส้และเซลล์เมคโครฟาส การจับระหว่าง hepcidin และตัวรับ มีผลทำให้ ferroportin ถูกทำลาย ซึ่งผลสุดท้ายคือการนำเหล็กเข้าสู่กระแสเลือดโดยทางการดูดซึมผ่านเซลล์ลำไส้และการนำเหล็กออกจากเมคโครฟาสลดลง และเหล็กในกระแสเลือดลดลง กระบวนการนี้มีความสำคัญในการควบคุมสมดุลเหล็กในร่างกาย

การสังเคราะห์ hepcidin ถูกควบคุมโดยกลไกหลายระดับ คือมีการควบคุมในระดับ transcriptional regulation และ post-translational regulation สำหรับระดับ transcriptional regulation ถูกควบคุมโดยระดับเหล็กในตับและในกระแสเลือด ระดับเหล็กในตับควบคุมผ่านทาง Bone Morphogenetic Protein 6 (BMP6) และ hemojuvelin (HJV) บนผนังเซลล์ตับ ส่วนเหล็กในกระแสเลือดควบคุมผ่าน Transferrin Receptor 2 (TfR2) ซึ่งอาจทำงานร่วมกับ hemochromatosis protein (HFE) นอกจากนี้การควบคุมในระดับ transcriptional regulation นี้สามารถควบคุมด้วยกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยผ่าน IL6 receptor และ JAK/STAT signaling pathway และกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ erythropoiesis activity ซึ่งขึ้นกับระดับของ erythropoietin (EPO) อีกด้วย สำหรับการควบคุมในระดับ post translational regulation ที่สำคัญคือการเปลี่ยนจาก inactive เป็น active hepcidin โดยผ่าน proprotein convertases (PCs) ได้แก่เอนไซม์ furin ซึ่งเอนไซม์นี้ถูกควบคุมโดยผ่าน TfR2 ด้วยเช่นกัน (Ganz and Nemeth, 2012)

ถึงแม้ว่าร่างกายจะมีกลไกการควบคุมระดับเหล็กในร่างกายที่มีประสิทธิภาพ แต่หากเหล็กเพิ่มสูงขึ้นเช่นจากการได้รับเลือดเป็นประจำในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย อาจทำให้กลไกเหล่านี้เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากเหล็กสามารถทำลายการทำงานของเซลล์ได้ในระดับต่างๆ ดังนั้นจึงสนใจศึกษาผลของภาวะเหล็กเกินต่อการแสดงออกของยีน hepcidin และการควบคุม hepcidin ทั้งในหนู wild type และหนู heterozygous β -globin knockout (BKO) รวมทั้งศึกษาผลของยาขับเหล็กได้แก่ deferoxamine (DF) และ deferiprone (L1) ด้วย

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการแสดงออกของยีน hepcidin (*Hamp1*) ในตับและปริมาณของโปรตีน hepcidin ในซีรัมของหนูปกติและหนูธาลัสซีเมียที่ได้รับเหล็กเกิน
2. ศึกษาผลของยาขับเหล็กต่อการแสดงออกของยีน hepcidin (*Hamp1*) ในตับและปริมาณของโปรตีน hepcidin ในซีรัมของหนูปกติและหนูธาลัสซีเมียที่ได้รับเหล็กเกิน
3. ศึกษาปัจจัยการควบคุมการแสดงออกของ hepcidin ได้แก่ erythropoietin, transferrin receptor 2 (*TfR2*) และ furin ในหนูปกติและหนูธาลัสซีเมียที่ได้รับเหล็กเกิน และผลของยาขับเหล็ก

วิธีดำเนินการทดลอง

1. สัตว์ทดลองและการสร้างภาวะเหล็กเกิน

หนู C57BL/6 (wild type, WT) และ heterozygous β -globin knockout (BKO) อายุ 7-8 สัปดาห์ ได้รับจาก ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยมหิดล หนูทั้งสองชนิดแบ่งเป็นชนิดละ 4 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับเหล็ก กลุ่มที่ได้รับเหล็กและยาขับเหล็ก deferoxamine (DF) และกลุ่มที่ได้รับเหล็กและยาขับเหล็ก deferiprone (L1)

ในหนูที่ได้รับเหล็กจะได้ iron dextran ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม 9 ครั้งในเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากการได้รับเหล็กครั้งสุดท้ายแล้ว 3 วัน ให้ยาขับเหล็ก DF หรือ L1 ขนาด 0.2 และ 0.6 มิลลิโมลต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมตามลำดับต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน หลังการให้ยาครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง หนูจะถูก sacrificed โดยการสลบก่อนโดยให้ Nembutal® และตามด้วย cardiac puncture เพื่อเก็บเลือด หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างตับ

2. การตรวจวัดเหล็กในตับ

โดยวิธี colorimetric method ของ Foy et al. (1967) โดยใช้ ferrozine เป็นสารทำให้เกิดสี

3. การตรวจวัดระดับซีรัม hepcidin

ระดับ hepcidin-25 ในซีรัมตรวจวัดโดยวิธี ELISA โดยใช้ Mouse hepcidin ELISA kit (BlueGene Biotech, China) ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรโดย microplate reader (Biotex, USA)

4. การตรวจวัดระดับซีรัม erythropoietin

โดยใช้ Mouse EPO ELISA kit (Abcam, UK) ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรโดย microplate reader (Sunrise-Basic Tecan, Switzerland)

5. การศึกษาการแสดงออกของยีน

การศึกษาการแสดงออกของยีนในตัวอย่างตับ เมื่อหลังจากเก็บตับแล้วตัดแบ่งตับที่ left lobe เก็บใน RNA later® และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 20°C ก่อนนำมา homogenate และ centrifuge ที่ 3,000 rpm ส่วน supernatant นำมาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จ (Ultraclean™ Tissue and cells RNA isolation kit, MO BIO Laboratories (California) และศึกษาการแสดงออกของยีนโดย real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (real time RT-PCR) โดยใช้ SYBR® Green One-step qRT-PCR kit (Life Technologies Co. (California). และใช้ primers ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ยีนที่ศึกษา amplified โดย ABI PRISM 7500 thermo cycler: 50°C for 3 min, 95°C for 5 min ตามด้วย 95°C for 15 sec, 60°C for 30 sec, 40°C for 1 min ทั้งหมด 40 cycles และตามด้วย melting curve analysis และวิเคราะห์ relative quantification ด้วย PCR amplification efficiency correction (or Pfaffl) method (Pfaffl, 2001) และใช้ β -actin เป็น normalizer

ตารางที่ 2.1 Primers สำหรับการศึกษากการแสดงออกของยีน

Gene	Primer sequence (5' 3')
<i>Hamp1</i>	Forward: AGAGCTGCAGCCTTTGCAC Reverse: ACACTGGGAATTGTTACAGCATT
<i>TfR2</i>	Forward: CCTCTATGAACAAGTGGCACTCA Reverse: CCCGATCATCCTCCATGAAG
<i>Furin</i>	Forward: CAGCCTCGGTACACACAGAT Reverse: AGCTACACCTACGCCACAGA
β -actin	Forward: TCCTGGCCTCACTGCTCCAC Reverse: GTCCGCCTAGAAGCACTTGC

6. การแสดงออกของโปรตีน hepcidin ในตับโดยวิธี immunofluorescence

ตัวอย่างตับจาก formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) นำมาศึกษาปริมาณโปรตีน hepcidin โดยวิธี immunofluorescence

ตัวอย่างตัด slide section ความหนา 5 μ m จากนั้นนำมาให้ความร้อน 80°C เวลา 30 นาที และ deparaffinized ใน Unyhol Plus® solution (Bio Optica Milano, Italy) จากนั้นผ่านกระบวนการ rehydration และ retrieve antigen โดยแช่ใน Tris-EDTA buffer, pH 9 เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 95°C หลังจากนั้นแช่ใน 0.1% Triton-X 10 นาที ล้างด้วย PBS และ block ด้วย 5% normal goat serum in 3% BSA-containing PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติม rabbit anti-mouse hepcidin-25 (Abcam, UK) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 3% BSA-containing PBS ที่ 4°C ข้ามคืน (Ohtake et al., 2007)

หลังล้างด้วย PBS เติม 100 ไมโครลิตร Chromeo™ 488 labeled-goat anti-rabbit IgG antibody (1:10000, diluted with 2% normal goat serum in 3% BSA-containing PBS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืด หลังจากล้างด้วย PBS แล้วแช่ใน 0.1% Sudan black in 70% ethanol เป็นเวลา 30 นาที ก่อนล้างและปิด slide ด้วย antifade mounting medium

ภาพจาก fluorescence วิเคราะห์โดย Olympus Fluoview FV 1000 laser-scanning confocal microscope (oil-immersion) with a 60x 1.35 NA (numerical aperture). การวิเคราะห์ความเข้มของ fluorescence ใช้โปรแกรม ImageJ Ver 1.47i และความเข้มรวมของ fluorescence จากภาพที่ได้จากใน 10 non-overlapping field นำมาคำนวณและเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษา

1. ค่าเหล็กในตับ และระดับ hepcidin ในซีรัมและในเนื้อเยื่อตับ

ระดับเหล็กในตับหนูปกติและหนู BKO เมื่อมีภาวะเหล็กเกินและได้ยาขับเหล็กแสดงในตารางที่ 2.2 สำหรับค่า serum hepcidin พบว่าหนู BKO มีแนวโน้มของระดับ serum hepcidin สูงกว่ากลุ่ม WT แต่เมื่อให้เหล็ก พบว่า serum hepcidin ลดต่ำลงทั้งสองกลุ่ม การให้ยาขับเหล็กทำให้ค่า serum hepcidin กลับเข้าสู่ระดับเดียวกับ control ในแต่ละกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญสำหรับระดับ hepcidin ในเนื้อเยื่อตับ

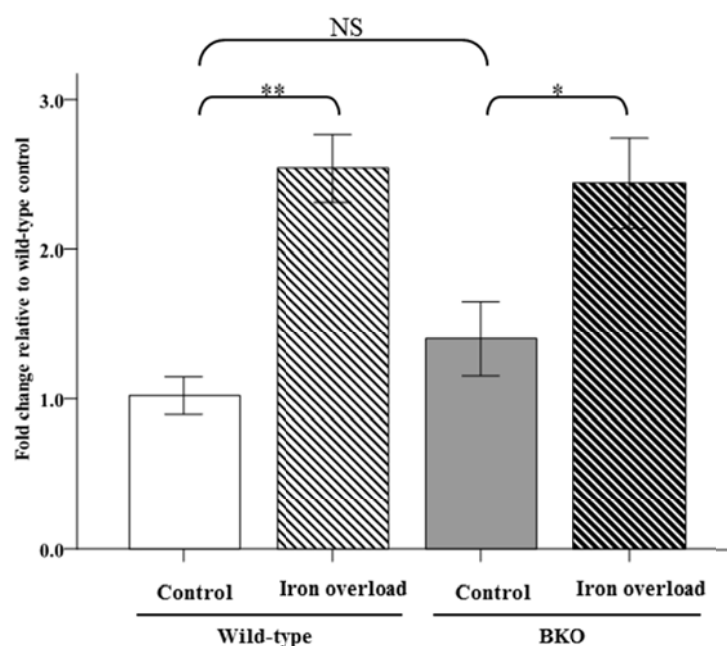
ตารางที่ 2.2 ระดับเหล็ก ระดับ hepcidin ในซีรัมและในเนื้อเยื่อตับของหนูปกติและหนูธาลัสซีเมีย

Group	Total liver iron (mg/g tissue)	Serum hepcidin (ng/ml)	Liver hepcidin (ng/mgP)
WT			
Control	0.03 ± 0.00 ^a	2.6 ± 1.8	0.20 ± 0.04
Iron overload	14.5 ± 1.2	1.5 ± 0.8	0.20 ± 0.03
Iron overload + DF	13.8 ± 0.8	3.0 ± 1.6	0.16 ± 0.04
Iron overload + L1	14.5 ± 1.3	1.6 ± 1.2	0.19 ± 0.00
BKO			
Control	0.21 ± 0.03 ^a	3.4 ± 1.3	0.15 ± 0.03
Iron overload	14.6 ± 1.9	1.9 ± 0.4	0.18 ± 0.04
Iron overload + DF	13.0 ± 1.4	3.3 ± 2.1	0.20 ± 0.08
Iron overload + L1	14.0 ± 0.7	4.0 ± 0.5	0.21 ± 0.06

Mean ± SEM (n=5). Comparison for significant differences are indicated by the same alphabet; a...p<0.01.

2. การแสดงออกของยีนและโปรตีน hepcidin ในตับ

โดยวิธี qRT-PCR การแสดงออกของยีน hepcidin (*Hamp1*) ในหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กเกินแสดงในภาพที่ 2.1 จากภาพแสดงให้เห็นว่าหนู BKO มีการแสดงออกของ *Hamp1* สูงกว่าหนู WT ประมาณ 1.4 เท่า แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อหนูทั้งสองกลุ่มได้รับเหล็กเกินพบว่า แสดงออกของ *Hamp1* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในหนู WT และ BKO การให้ยาขับเหล็กทั้ง DF และ L1 ในหนูที่มีภาวะเหล็กเกินไม่มีผลต่อการแสดงออกของ *Hamp1* (ตาราง 2.3)



ภาพที่ 2.1 Relative *Hamp1* expression ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็ก

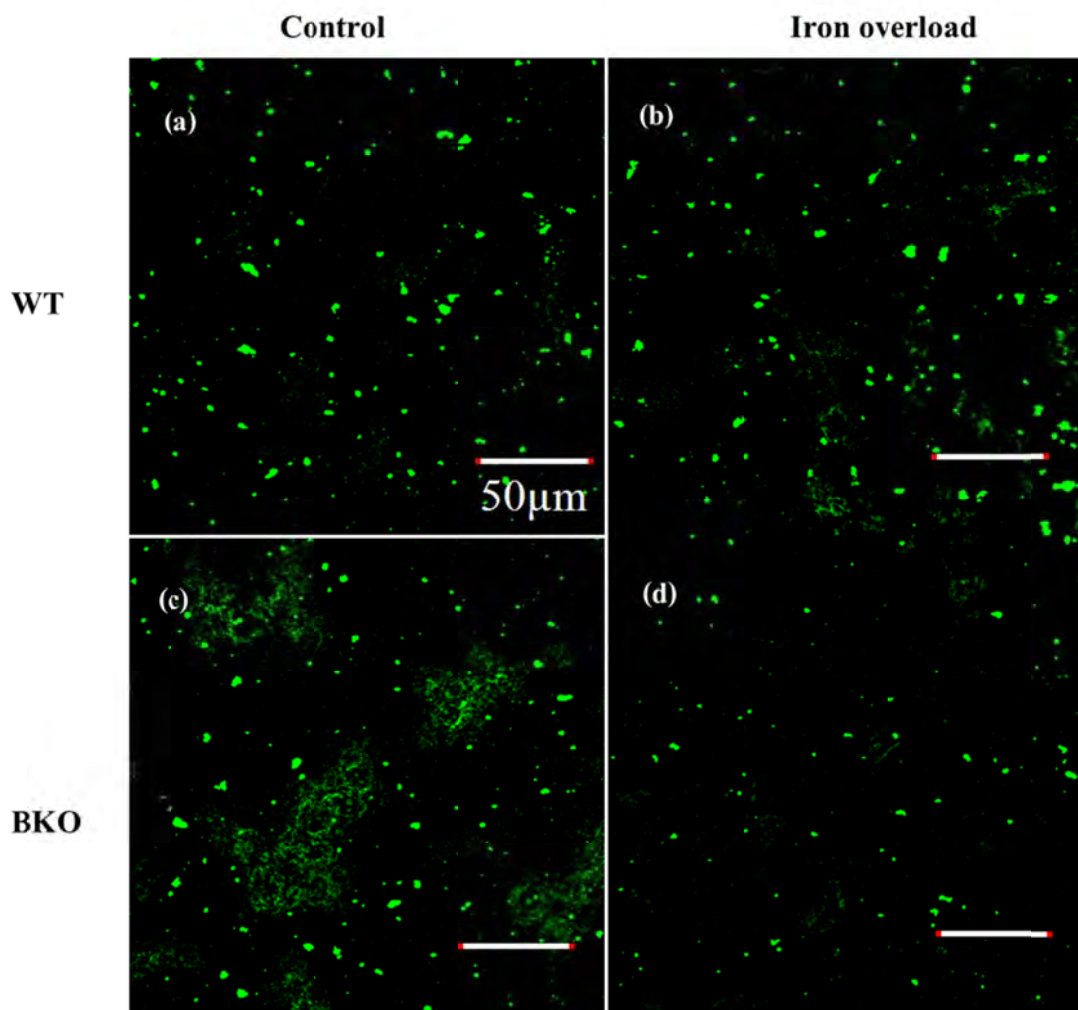
ตารางที่ 2.3 Relative *Hamp1* expression ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก

Mice	Group	<i>Hamp1</i> (fold change)
WT	Control	1.0 ± 0.1 ^a
	Iron overload	2.5 ± 0.2 ^a
	Iron overload +DF	2.9 ± 0.4
	Iron overload +L1	2.7 ± 0.4
BKO	Control	1.4 ± 0.2 ^b
	Iron overload	2.4 ± 0.3 ^b
	Iron overload +DF	2.8 ± 0.6
	Iron overload +L1	2.0 ± 0.3

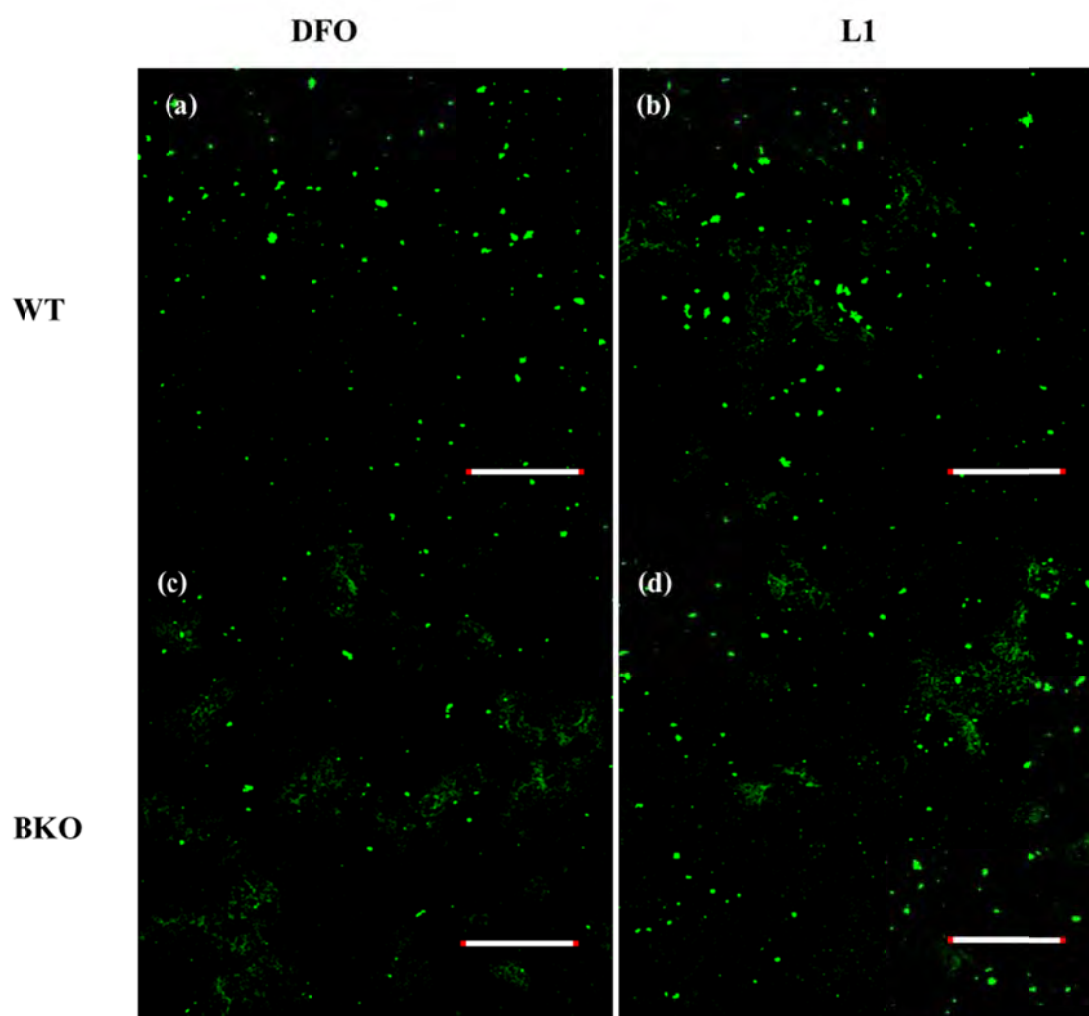
Data are mean ± SEM (n=5). Comparisons for significant differences are indicated by the same alphabet; a...p<0.01; b...p<0.05

โปรตีน hepcidin ในตับแสดงโดยวิธี Immunofluorescence เช่นเดียวกับผลของการแสดงออกของยีน ระดับโปรตีน hepcidin ในกลุ่มหนู BKO สูงกว่าหนู WT ประมาณ 1.5 เท่าแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 2.2 a, c) เมื่อหนูทั้งสองกลุ่มมีภาวะเหล็กเกิน พบว่าการแสดงออกของโปรตีนไม่เพิ่มขึ้นดังผลที่ได้จากการแสดงออกของยีน *Hamp1* ในหนูทั้งสองกลุ่ม ทั้งนี้หนู BKO กลับมีแนวโน้มการแสดงออกของโปรตีนในตับลดลง (ภาพที่ 2.2 b,d, ตารางที่ 2.4) และค่า hepcidin ในตับสอดคล้องกับปริมาณ hepcidin ในซีรัมคือ hepcidin ในซีรัมมีค่าลดลงเมื่อมีภาวะเหล็กเกินในหนูทั้งสองกลุ่ม

เมื่อให้ยาขับเหล็กพบว่าระดับ hepcidin โปรตีนในตับลดลงโดยที่พบ hepcidin ในซีรัมมีค่าสูงใกล้เคียงกับหนูที่ไม่มีภาวะเหล็กเกิน (ภาพที่ 2.3, ตารางที่ 2.4)



ภาพที่ 2.2 Immunofluorescence of hepcidin protein ในตับของหนู WT กลุ่มควบคุม (a) กลุ่มที่ได้รับเหล็ก (b) หนู BKO กลุ่มควบคุม (c) กลุ่มที่ได้รับเหล็ก (d)



ภาพที่ 2.3 Immunofluorescence of hepcidin protein ในตับของหนูที่ได้รับเหล็กเกิน WT ได้รับยา DF (a) และ L1 (b); หนู BKO ได้รับยา DF (c) และ L1 (d)

ตารางที่ 2.4 Relative hepcidin protein ในตับ และ ปริมาณในซีรัมของหนู WT และ BKO ที่ได้รับ เหล็กและผลของยาขับเหล็ก

Mice	Group	Fluorescence intensity (fold change)	Serum hepcidin (ng/ml)
WT	Control	1.0 ± 0.1	2.6 ± 1.8
	Iron overload	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.8
	Iron overload +DF	0.6 ± 0.1	3.0 ± 1.6
	Iron overload +L1	0.9 ± 0.3	1.6 ± 1.2
BKO	Control	1.5 ± 0.4	3.4 ± 1.3
	Iron overload	0.7 ± 0.1	1.9 ± 0.4
	Iron overload +DF	0.6 ± 0.1	3.3 ± 2.1
	Iron overload +L1	0.8 ± 0.2	4.0 ± 0.5

Data are mean ± SEM (n=5).

3. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ *hepcidin* ในภาวะเหล็กเกิน

ปัจจัยหนึ่งของการควบคุมการแสดงออกของ *Hamp1* คือภาวะ ineffective erythropoiesis ซึ่งภาวะนี้ ส่งผลให้มี erythropoietin (EPO) เพิ่มมากขึ้น และมีการดูดซึมเหล็กจากทางเดินอาหารเพิ่มขึ้น และ EPO จะกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้ EPO เป็นปัจจัยซึ่งยับยั้งการแสดงออกของ *Hamp1*

จากการศึกษาพบว่าหนู WT มี EPO ในซีรัมในระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ในขณะที่ หนู BKO มีระดับ EPO ในซีรัมสูง (ตารางที่ 2.5)

เมื่อมีภาวะเหล็กเกินในหนู WT พบว่า EPO ในซีรัมสูงขึ้นอย่างชัดเจนทั้งนี้เพื่อเป็นการกระตุ้นการใช้เหล็กเพื่อสร้างเม็ดเลือด และการให้ยาขับเหล็กในกลุ่มนี้ค่า EPO ในซีรัมลดลงอย่างมีนัยสำคัญสำหรับหนู BKO ซึ่งมีระดับ EPO ในซีรัมสูงอยู่แล้วการให้เหล็กหรือยาขับเหล็กไม่มีผลต่อระดับ EPO

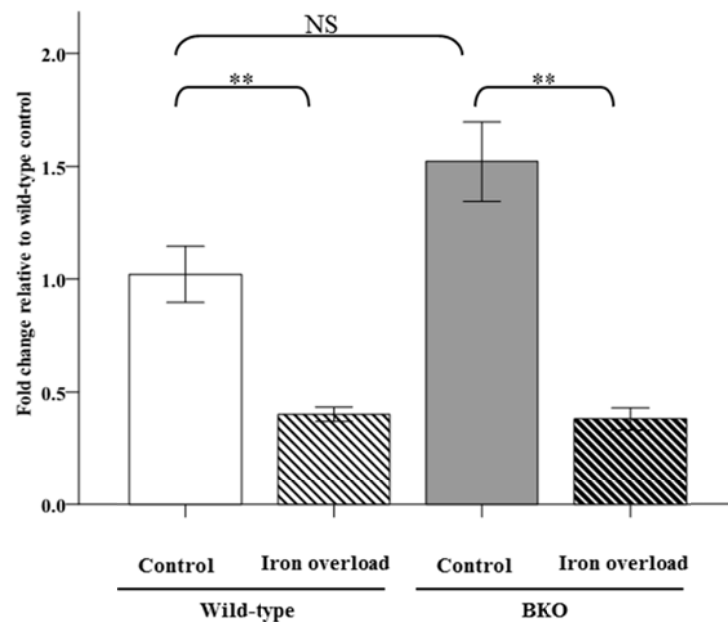
ปัจจัยเสริมให้มีการแสดงออกของ *Hamp1* ได้แก่ การแสดงออกของ transferrin receptor 2 (*TfR2*) ผลการศึกษาพบว่าในหนู BKO มีการแสดงออกของ *TfR2* เพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการแสดงออกของ *Hamp1* ในหนู BKO ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 1.4 เท่า แต่เมื่อมีภาวะเหล็กเกินพบว่า การแสดงออกของ *TfR2* กลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และการให้ยาขับเหล็กไม่มีผลต่อการแสดงออกของ *TfR2* (ภาพที่ 2.4 และ ตารางที่ 2.6)

Furin เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเปลี่ยน pre-pro- และ pro-hepcidin ให้อยู่ในรูป active form (hepcidin-25) Furin ถูกควบคุมโดย *TfR2* จากการศึกษาพบว่า การแสดงออกของ *furin* เป็นไปตามการแสดงออกของ *TfR2* กล่าวคือ เมื่อแสดงออกของ *TfR2* ลดลง การแสดงออกของ *furin* ลดลงตามกัน ทั้งนี้ภาวะเหล็กเกินมีผลให้การแสดงออกของ *furin* ลดลง (ภาพที่ 2.5 และ ตารางที่ 2.7)

ตารางที่ 2.5 Serum EPO ของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก

Mice	Group	Serum EPO (pg/ml)
WT	Control	nd
	Iron overload	292.7 ± 77.9 ^{a,b}
	Iron overload +DF	85.5 ± 21.5 ^a
	Iron overload +L1	103.4 ± 20.5 ^b
BKO	Control	231.0 ± 54.7
	Iron overload	278.9 ± 48.2
	Iron overload +DF	252.4 ± 68.8
	Iron overload +L1	262.3 ± 191.1

Data are mean ± SEM (n=4). Comparisons for significant differences are indicated by the same alphabet; a,b...p<0.05.

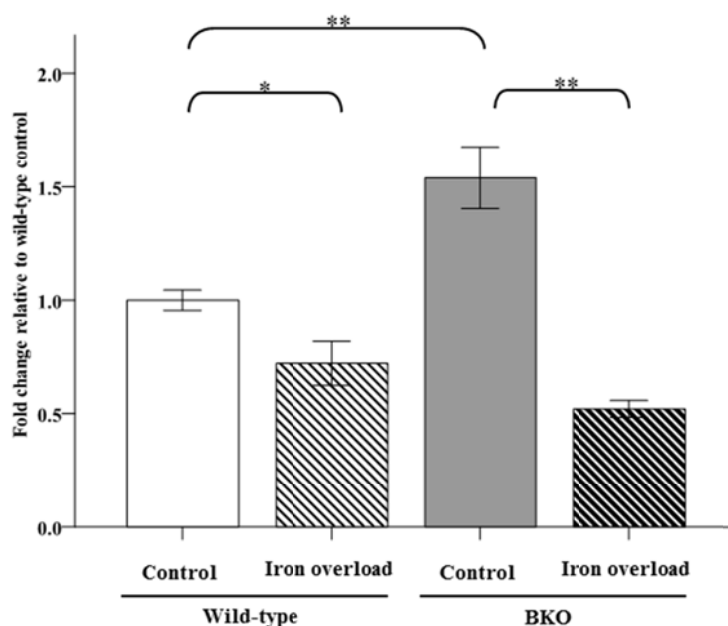


ภาพที่ 2.4 Relative *TfR2* expression ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็ก

ตารางที่ 2.6 Relative *Tfr2* expression ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก

Mice	Group	<i>Tfr2</i> (fold change)
WT	Control	1.0 ± 0.1 ^a
	Iron overload	0.4 ± 0.0 ^a
	Iron overload +DF	0.6 ± 0.1
	Iron overload +L1	0.4 ± 0.1
BKO	Control	1.5 ± 0.2 ^b
	Iron overload	0.4 ± 0.0 ^b
	Iron overload +DF	0.5 ± 0.0
	Iron overload +L1	0.4 ± 0.1

Data are mean ± SEM (n=5). Comparisons for significant differences are indicated by the same alphabet; a,b...p<0.01



ภาพที่ 2.5 Relative *Furin* expression ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็ก

ตารางที่ 2.7 Relative *Furin* expression ในตับของหนู WT และ BKO ที่ได้รับเหล็กและผลของยาขับเหล็ก

Mice	Group	<i>Hamp1</i> (fold change)
WT	Control	1.0 ± 0.1 ^{a,b}
	Iron overload	0.7 ± 0.1 ^a
	Iron overload +DF	0.9 ± 0.1
	Iron overload +L1	0.7 ± 0.1
BKO	Control	1.5 ± 0.1 ^{b,c}
	Iron overload	0.5 ± 0.0 ^c
	Iron overload +DF	0.8 ± 0.2
	Iron overload +L1	0.6 ± 0.1

Data are mean ± SEM (n=5). Comparisons for significant differences are indicated by the same alphabet; a...p<0.05; b,c...p<0.01

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ในหนูธาลัสซีเมีย (BKO) มีเหล็กสะสมอยู่ในตับและมีภาวะม้ามโตเนื่องจาก ineffective erythropoiesis และมีค่า erythropoietin (EPO) สูงขึ้นในเลือด สำหรับการแสดงของยีน *Hamp1* และ โปรตีน hepcidin ในตับและในซีรัมมีค่าสูงกว่าหนู WT เล็กน้อย (ประมาณ 1.4 เท่า) โดยผลนี้สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของแสดงออกของยีน *TfR2* และ *furin* ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 1.4-1.5 เท่าเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า iron pathway โดยผ่าน *TfR2* ยังมีบทบาทในหนูกลุ่มนี้

ตามทฤษฎีระดับ EPO ที่สูงขึ้นในหนู BKO น่าจะกดการสังเคราะห์ hepcidin ให้มีระดับต่ำกว่าหนูในกลุ่ม WT แต่ผลการศึกษาไม่เป็นไปตามที่คาด แต่ยังพบว่าในหนู BKO มีเหล็กสะสมอยู่ในตับและม้ามแสดงให้เห็นว่าระดับ hepcidin ที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยนี้ อาจไม่เพียงพอที่จะยับยั้งการดูดซึมของเหล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ในขณะเดียวกันการเพิ่มขึ้นของ hepcidin อาจทำให้เหล็กสะสมในเมคโครฟาสมากขึ้นดังจะเห็นได้จากขนาดของม้าม ซึ่งน่าสนใจที่จะศึกษาการตอบสนองของลำไส้และเมคโครฟาสต่อ hepcidin ในภาวะนี้ด้วย

การศึกษาภาวะเหล็กเกินในหนู wild-type และ BKO เพื่อศึกษาผลของภาวะเหล็กเกินอย่างเดียวและภาวะเหล็กเกินร่วมกับ ineffective erythropoiesis ตามลำดับ การได้รับเหล็กในหนู WT กระตุ้นการสร้าง EPO เพื่อนำเหล็กไปใช้ในการสร้างเม็ดเลือดแดง ภาวะตับโตม้ามโตพบได้ในหนูทั้ง WT และ BKO

การได้รับเหล็กในหนูทั้งสองกลุ่มมีผลให้ การแสดงออกของ *Hamp1* สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การแสดงออกของโปรตีนในตับและในซีรัมไม่เปลี่ยนแปลงหรือกลับลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในหนู BKO และเมื่อพิจารณาการแสดงออกของ *TfR2* และ *furin* ลดลงเช่นเดียวกัน

การลดลงของ *TfR2* ในหนูได้รับเหล็กเกินน่าจะส่งผลให้การแสดงออกของ *Hamp1* ลดลงแต่ผลการศึกษากลับพบว่าแสดงออกของ *Hamp1* สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญอาจกล่าวได้ว่ามีปัจจัยอื่นๆที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ *Hamp1* เช่น inflammatory pathway โดยผ่าน IL6

การที่ *TfR2* ลดลงนั้นน่าจะมีผลกระทบโดยตรงต่อการแสดงออกของ *furin* ซึ่งทำหน้าที่เป็น convertase และมีบทบาทในการเปลี่ยน pro-hepcidin เป็น hepcidin ในรูปออกฤทธิ์ ดังนั้นการลดลงของการแสดงออกของ *furin* อาจมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนที่ออกฤทธิ์ลดลง ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าภาวะเหล็กเกินนี้เปลี่ยนแปลง hepcidin ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ

ปัจจัยที่นำมาสู่การเปลี่ยนแปลง *TfR2* นั้นยังไม่ชัดเจน แต่คาดว่ามันจะเกี่ยวข้องกับภาวะออกซิเดทีฟสเตรส น่าสังเกตว่าหากระดับของเอนไซม์ convertase ลดลงในภาวะเหล็กเกิน โปรตีนอื่นๆที่ถูกสังเคราะห์ในรูป pro-protein ก็น่าจะถูกระงับเช่นเดียวกับ hepcidin

ถึงแม้ว่าการได้รับยาขับเหล็กส่งผลให้ระดับ EPO ลดลงในหนู WT ที่ได้รับเหล็กเกิน แต่ยาขับเหล็กไม่ส่งผลต่อการแสดงออกและการสังเคราะห์ hepcidin ในภาวะที่ศึกษา ทั้งนี้การได้รับยาในระยะเวลายาวๆและหลังจากภาวะเหล็กเกินอาจจะยังไม่ได้ลดระดับเหล็กในตับได้เพียงพอ

เอกสารอ้างอิง

- Ganz T and Nemeth E. 2012. Heparin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1434-1443
- Pfaffl MW. 2001. A New mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. 2001. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Ohtake T, Saito H, et al. 2007. Heparin is down-regulated in alcohol loading. *Alcohol Clin Exp Res* 31 (Suppl 1): S2-8.

บทที่ 3

การพัฒนาการตรวจวัด hepcidin โดยวิธี Liquid chromatography/Mass spectroscopy

บทนำ

Hepcidin มีหน้าที่สำคัญในการควบคุม body iron homeostasis ความผิดปกติของ hepcidin เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพหลายโรค ได้แก่ภาวะเหล็กเกินซึ่งระดับ hepcidin ในเลือดจะลดต่ำลง ภาวะเลือดจางทางพันธุกรรมหรือการอักเสบเรื้อรัง เกี่ยวข้องกับระดับ hepcidin สูงขึ้นอย่างผิดปกติ ดังนั้นการรักษาโรคเหล่านี้ต้องอาศัยการตรวจวัดระดับ hepcidin อย่างแม่นยำ

แต่อย่างไรก็ตามการศึกษา hepcidin ในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดในการตรวจวัด คือการใช้วิธี immunoassays ซึ่งมีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถบ่งชี้จำเพาะ hepcidin ในรูปแบบต่างๆได้แก่ pro-hepcidin, hepcidin-25 ซึ่งเป็น active hepcidin และ hepcidin-22 ซึ่งเชื่อว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างจาก hepcidin-25 ได้ (Ruchala and Memeth, 2014)

วัตถุประสงค์หนึ่งของการศึกษาในโครงการนี้คือ การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ hepcidin ในซีรัม และปัสสาวะโดยใช้วิธี liquid chromatography และ electrospray ionization/liner ion trap mass spectrometer (LC/MS/MS) เพื่อใช้วิเคราะห์และติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับ hepcidin ในซีรัมในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ได้รับยาต่างๆ

จากการศึกษาพบว่าการตรวจวัด hepcidin ในซีรัม โดยใช้ LC/MS/MS ก็มีข้อจำกัดในด้านเทคนิคต่างๆ เช่น hepcidin ซึ่งมี disulfide bond ถึง 4 bond สามารถเกาะกับโปรตีนในซีรัมหรือมีปฏิกิริยาอื่นๆและทำให้การตรวจวัดค่อนข้างยาก นอกเหนือจากข้อจำกัดด้านเครื่องมือ

ในรายงานนี้จึงกล่าวแต่ผลการศึกษาโดยใช้ hepcidin จากการสังเคราะห์ เพื่อหาภาวะการตรวจวัดที่เหมาะสมในซีรัมและปัสสาวะต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการทดลอง

ภาวะการทดลองที่ใช้พัฒนาและปรับปรุงจาก Li et al., 2009; Bansal et al., 2009 และ Bansal et al., 2010

Standard hepcidin: สาร hepcidin-25 มาตรฐาน (DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT; Peptide Institute, Inc. Osaka, Japan) ละลายเป็น stock solution 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 50/50/0.1 (v/v/v) methanol/water/formic acid และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C การเตรียมสารละลายมาตรฐานนั้นเตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 10-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรใน mobile phase

LC system: Stationary phase โดยใช้ Varian Polaris C18A (5µm, 75x2.1 mm; Lake Forest, CA, USA). Mobile phase A, 0.1% formic acid in water; mobile phase B 0.1% formic acid

in acetonitrile โดยใช้ gradient ที่ flow rate 200 ไมโครลิตรต่อนาที โดยใช้ mobile phase B ที่ 10% 2 นาที และเพิ่มเป็น 40% ภายใน 2 นาที คงสัดส่วนนี้ 8 นาที แล้วลดลงเป็น 10% ภายใน 0.5 นาที

Mass spectroscopy: โดยใช้ Electrospray ionization (ESI)/linear ion trap mass spectrometer (Agilent 1100, Germany), ESI spray voltage +4500 V, source temperature 300 °C, nebulizer gas 20 psi, dry gas flow rate 8 l/min.

Blank serum: เตรียมโดยนำตัวอย่างซีรัมเติมด้วย activated charcoal ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 15,000 g เป็นเวลา 5 นาที แยกซีรัมออกแล้วทำซ้ำขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นอีกครั้ง

การสกัดตัวอย่างซีรัมและปัสสาวะ: สกัดโดย solid phase extraction โดย Oasis® HLB 1cc (10 mg, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA)

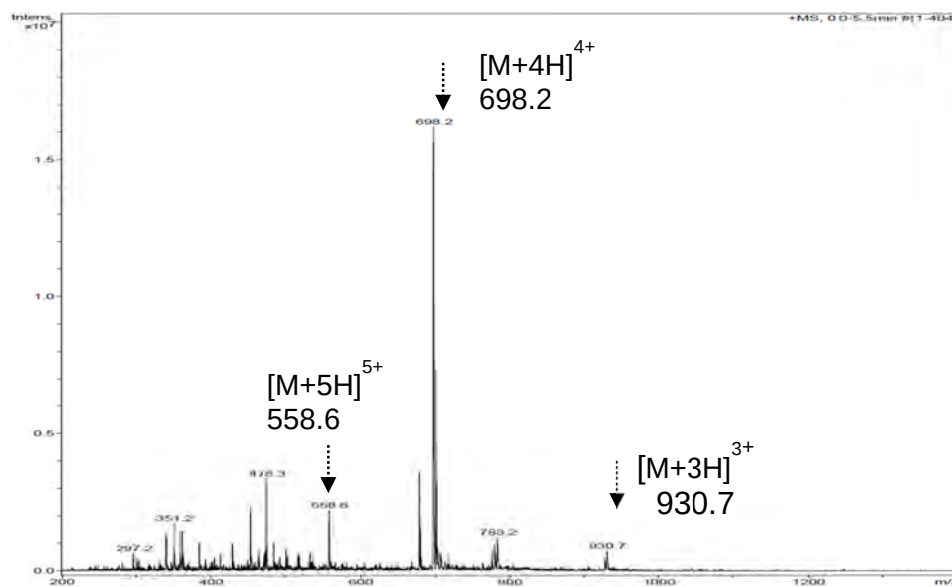
ผลการศึกษาทดลอง และบทวิจารณ์

1. Mass spectrum โดย direct infusion

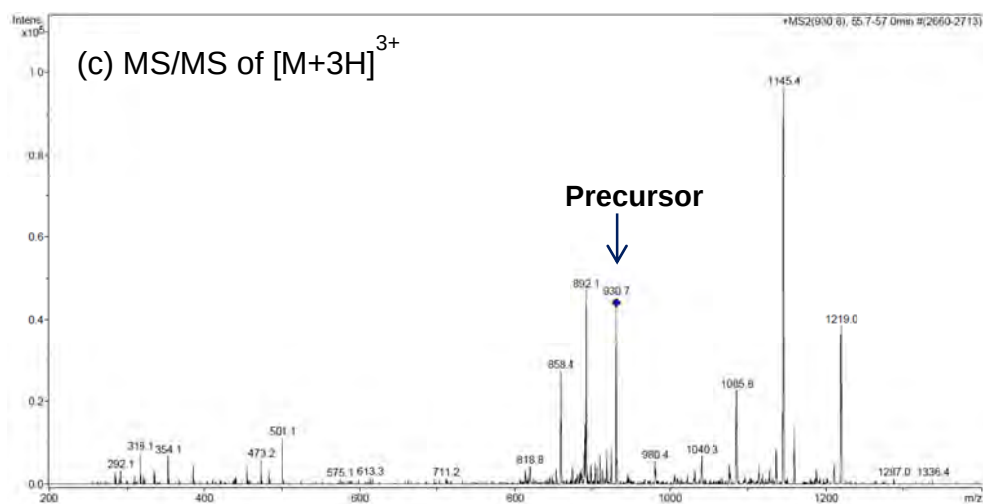
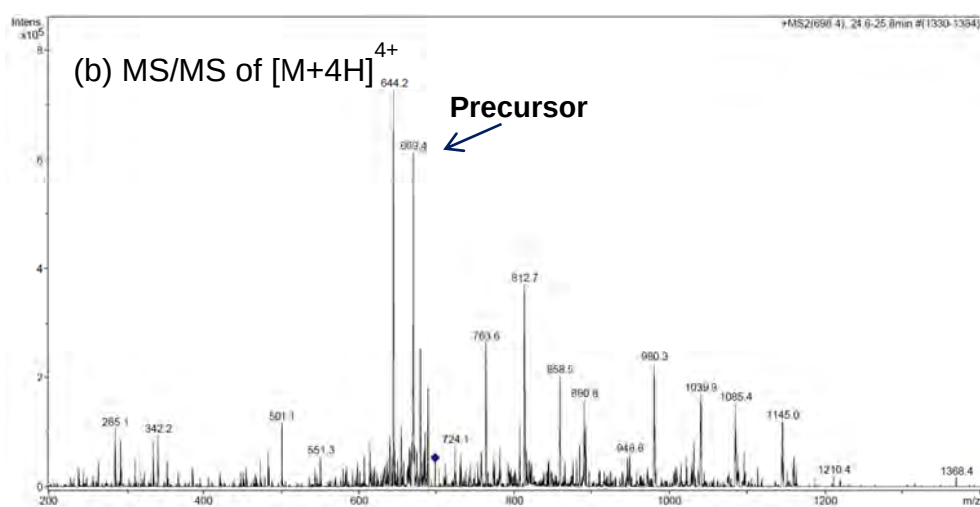
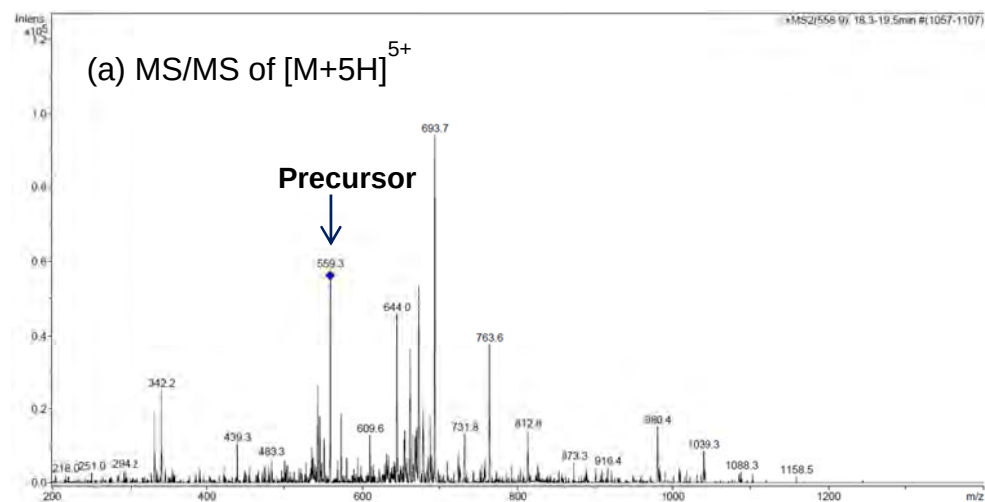
Mass spectrum ของ hepcidin ที่ความเข้มข้น 2 µg/ml ใน 50/50/0.1 (v/v/v) methanol/water/formic acid โดยฉีดตรงเข้า mass spectrometer (direct infusion) แสดงในภาพที่ 3.1 จากภาพสามารถตรวจพบ $[M+4H]^{4+}$ ที่ m/z 698.2, $[M+5H]^{5+}$ ที่ m/z 558.6 และ $[M+3H]^{3+}$ ที่ m/z 930.7 โดยมีความเข้มของสัญญาณ (intensity) เรียงตามลำดับ

เมื่อนำ m/z 698.2, m/z 558.6 และ m/z 930.7 มาทดสอบการเกิด fragmentation โดยใช้ fragment amplitude (collision energy) ต่างๆ พบว่าที่ amplitude 0.80 ให้ product mass ที่มี intensity สูงและยังคง intensity ของ precursor ไว้ในปริมาณที่เหมาะสม ภาพที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 แสดง intensity ของ precursor และ product mass ต่างๆ ซึ่งข้อมูลนี้จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณและโครงสร้างของ hepcidin แบบ MS/MS ต่อไป



ภาพที่ 3.1 Mass spectrum ของ hepcidin ที่ความเข้มข้น 2 $\mu\text{g/ml}$ ใน 50/50/0.1 (v/v/v) methanol/water/formic acid



ภาพที่ 3.2 MS/MS ของ $[M+5H]^{5+}$ (a), MS/MS ของ $[M+4H]^{4+}$ (b), MS/MS ของ $[M+3H]^{3+}$ (c) ที่ fragmentation amplitude 0.8

ตารางที่ 3.1 แสดงความเข้มของสัญญาณของ precursor และ product mass หลังจาก fragmentation ที่ amplitude 0.8

Mass precursor (m/z)	Intensity	Product mass-m/z	Intensity
558.9	5.02×10^4	$(y_{16})^{5+}$ 342.2	2.95×10^4
		$(y_{20})^{5+}$ 439.4	1.02×10^4
		$(y_{19})^{3+}$ 693.2	9.0×10^4
		$(y_{21})^{3+}$ 763.6	4.61×10^4
		$(y_{22})^{3+}$ 812.8	1.36×10^4
		$(y_{19})^{2+}$ 1039.4	7.34×10^3
698.4	4.97×10^5	$(y_{16})^{5+}$ 342.2	1.57×10^5
		(b_4) 501.2	1.03×10^5
		$(y_{23})^{4+}$ 644.0	1.19×10^5
		$(y_{24})^{4+}$ 669.4	1.07×10^6
		$(y_{19})^{3+}$ 693.6	1.02×10^6
		$(y_{21})^{3+}$ 763.6	3.25×10^5
		$(y_{22})^{3+}$ 813.2	4.38×10^5
		$(y_{23})^{3+}$ 858.2	2.74×10^5
		$(y_{19})^{2+}$ 1039.8	2.22×10^5
		$(y_{21})^{2+}$ 1144.8	1.03×10^5
930.8	3.62×10^4	(b_3) 354.2	6.18×10^3
		(b_4) 501.2	1.26×10^4
		$(y_{16})^{2+}$ 858.6	3.16×10^4
		$(y_{24})^{3+}$ 892.2	3.91×10^4
		$(y_{21})^{2+}$ 1145.0	9.90×10^4
		$(y_{22})^{2+}$ 1218.4	4.01×10^4

2. Hepcidin chromatograms

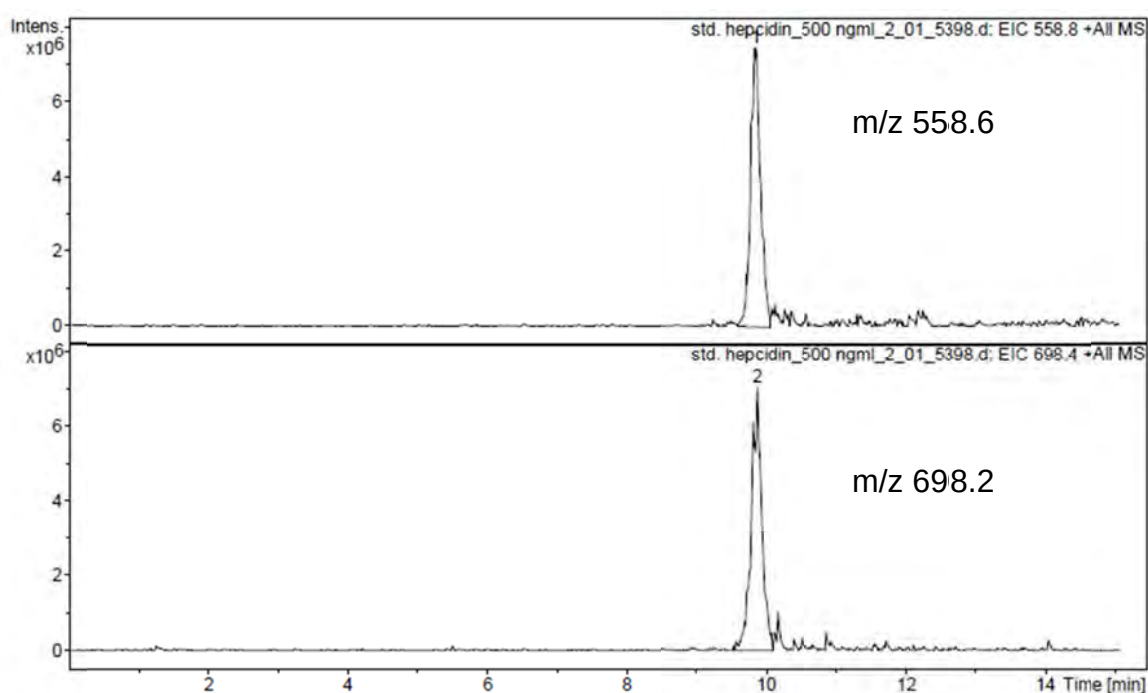
จากการศึกษาได้ปรับ mobile phase และ condition ต่างๆเพื่อการตรวจวัด hepcidin ภาวะที่เหมาะสมที่สุดในขณะที่รายงานนั้นแสดงในส่วนของการทดลอง chromatograms แสดงในภาพที่ 3.3 จากภาพ retention time (RT) ของสาร hepcidin มาตรฐานอยู่ที่ 9.6 นาที mass ที่พบมากที่สุดในระบบนี้คือ m/z 558.6, 698.2 แต่อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบ m/z 930.8 ด้วยเช่นกัน

เมื่อสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสัญญาณจากทั้งสาม mass กับความเข้มข้นจะพบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงตามสมการดังนี้

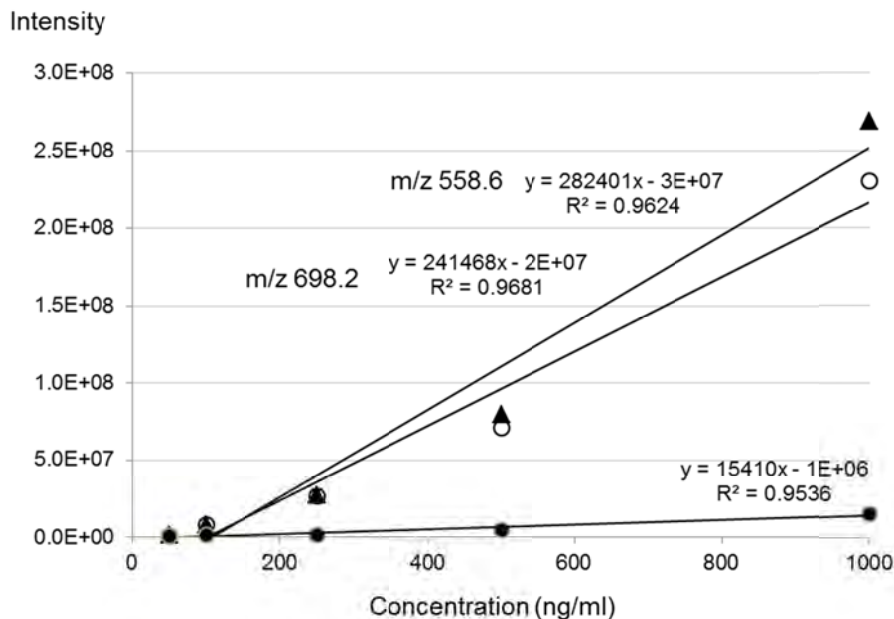
$$m/z\ 558.6; y=282401x-3E+07\ r^2=0.9634$$

$$m/z\ 698.2\ y=241468x-2E+07\ r^2=0.9681\ (\text{ภาพที่ 3.4})$$

จากสมการค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ตรวจวัด (LLOQ) ได้คือ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 3.3 Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์สาร hepcidin มาตรฐานในระบบ LC-MS วิเคราะห์ที่ m/z 558.6 และ 698.2



ภาพที่ 3.4 Standard curve ของ hepcidin เมื่อวิเคราะห์ที่ m/z 558.6, 698.2 และ 930.8

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ผลการศึกษการตรวจวัดระดับ hepcidin จากโปรตีนสังเคราะห์โดยใช้วิธี LC/MS/MS โดยใช้ electrospray ionization/linear ion trap mass spectrometer สามารถปรับภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้ และตรวจวัดได้ในระดับต่ำสุด (LLOQ) ที่ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่ง mass ที่จะใช้วิเคราะห์ต่อไปคือ m/z 558.6 ($[M+5H]^{5+}$) ซึ่งมี sensitivity ดีที่สุด

แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ในซีรัมและปัสสาวะ มีปัญหาในเรื่องของเครื่องมือในการศึกษา จึงได้ผลที่หาภาวะเหมาะสมในการวิเคราะห์

ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการที่เป็นมาตรฐานสำหรับ hepcidin (Goyal et al., 2013) และยังไม่มีค่ามาตรฐานเปรียบเทียบ การวิเคราะห์ในแต่ละห้องปฏิบัติการมีความแปรปรวนสูง ทั้งนี้เนื่องจากหลายปัจจัยเช่นการจับกับโปรตีนในซีรัม การจับกับเกล็ด และ hepcidin ในกระแสเลือดมีหลายรูป วิธีโดยทั่วไปที่ใช้วิเคราะห์ได้แก่ ELISA และ immunofluorescence ซึ่งแต่ละบริษัท มี antibody ที่มี epitope ต่างกัน แต่ทั้งหมดไม่มีความจำเพาะต่อ active hepcidin

เนื่องจากการวิเคราะห์ hepcidin มีความจำเป็นต่อการทำความเข้าใจกระบวนการควบคุมระดับเกล็ดในผู้ป่วย ในอนาคตถ้าหา hepcidin agonist หรือ hepcidin antagonist มาใช้ จำเป็นต้องรู้ระดับของ hepcidin เพื่อให้และปรับขนาดยา การติดตามยาและผลทางชีวภาพ งานวิจัยในส่วนนี้จึงต้องดำเนินการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Abboud S, Haile DJ. 2000. A novel mammalian iron regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 275: 19906-19912.
- Bansal SS, Halkert JM, Fusova, et al. 2009. Quantification of hepcidin using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23: 1531-1542.
- Bansal SS, Abbate V, Bomford A, et al. 2010. Quantitation of hepcidin in serum using ultra-high-pressure liquid chromatography and a linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24: 1251-1259.
- Goyal J, McCleakey B, Adamski J. 2013. Peering into the future: hepcidin testing. *Am J Hematol* 88: 976-978.
- Jordan JB, Poppe L, Haniu M, et al. 2009. Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics and structure. *J Biol Chem* 284: 24155-24167.
- Li H, Rose MJ, Tran L. et al. 2009 Development of a method for the sensitive and quantitative determination of hepcidin in human serum using LC-MS/MS. *J Pharmacol Toxicol Methods* 59: 171-180
- Nemeth E, Ganz T. 2009. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol* 122:78-86.
- Ruchla P, Nemeth E. 2014. The pathophysiology and pharmacology of hepcidin. *Trends in Pharmacological Science* 35:155-161.

สรุปโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะเหล็กเกินและผลกระทบของภาวะเหล็กเกินต่อการเกิดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ภาวะออกซิเดทีฟสเตรส พยาธิวิทยา และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมเหล็กในร่างกาย

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเมื่อสัตว์ทดลองได้รับเหล็กโดยการฉีดทางช่องท้องในขนาดต่างๆ สามารถตรวจวัดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระหรือการเปลี่ยนแปลง redox status ได้โดยใช้ Overhauser-enhanced MRI ยาขับเหล็ก deferiprone สามารถลดปฏิกิริยาเนื่องจากเหล็กเกินได้ นอกจากนี้ยังพบว่าปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างในแต่ละอวัยวะ ในตับจะเห็นปฏิกิริยาอนุมูลอิสระมากที่สุด เนื่องจากตับเป็นอวัยวะหลักในการสะสมเหล็ก ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงค่าออกซิเดทีฟในตับ

สำหรับในหัวใจ เมื่อให้เหล็กในขนาดต่ำ ยังไม่พบว่ามียาขับเหล็กหรือการเปลี่ยนแปลงของ redox status หรือค่าออกซิเดทีฟ แต่เมื่อให้เหล็กปริมาณสูงก็พบเหล็กสะสมในหัวใจ และมีภาวะออกซิเดทีฟสเตรส การให้ยาขับเหล็กโดยเฉพาะอย่างยิ่ง deferiprone สามารถลดระดับเหล็กในหัวใจได้อย่างมีนัยสำคัญ

ภาวะเหล็กเกินมีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่ควบคุมเหล็กในร่างกายคือ hepcidin โดยทั่วไป hepcidin gene (*HAMP1*) expression จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีภาวะเหล็กเกิน ซึ่งจากการศึกษานี้ก็พบว่า *HAMP1* expression เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน แต่ที่น่าสนใจคือปริมาณโปรตีน hepcidin ในตับและในซีรัม ไม่เป็นไปตามผลของ *HAMP1* expression ดังนั้นจึงตรวจสอบกลไกการควบคุมการแสดงออกของ *HAMP1* ผลการศึกษาพบว่าภาวะเหล็กเกิน มีผลต่อ *furin* expression ซึ่ง เกี่ยวข้องกับ post translational process ของ hepcidin อาจจะกล่าวได้ว่าในภาวะเหล็กเกินดังในการทดลองนี้ ถึงแม้ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนแต่ มีผลกระทบต่อกระบวนการสร้าง active hepcidin หรือ post translation ถ้าร่างกายสร้าง active hepcidin ไม่เพียงพอ กระบวนการดูดซึมเหล็กยังดำเนินต่อไปและอาจเพิ่มมากขึ้นในกรณีที่มีภาวะเหล็กเกินสูงขึ้น ผลการศึกษานี้อาจสามารถอธิบายปรากฏการณ์ในผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อยาขับเหล็ก และอาจสนับสนุนการใช้ยา hepcidin agonist ร่วมกับยาขับเหล็กในผู้ป่วยกลุ่มนี้

สุดท้ายงานวิจัยนี้พยายามพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับ hepcidin ในซีรัมเพื่อนำไปใช้ติดตามระดับ hepcidin ของผู้ป่วยในอนาคตแต่เนื่องจากอุปสรรคเกี่ยวกับเครื่องมือทำงานในส่วนนี้ไม่สมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามยังมีการพัฒนางานในส่วนนี้ต่อไป

ภาวะเหล็กเกินเป็นภาวะที่สำคัญและนำมาสู่โรคแทรกซ้อนอื่นๆในผู้ป่วยและเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย การเข้าใจปัญหาหลักที่เกี่ยวข้องกับภาวะเหล็กเกิน มีความจำเป็นต่อการพัฒนาการรักษาผู้ป่วยและการเลือกใช้ในผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกันในอนาคต

ผลงานจากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Yatmark P, Morales NP, Chaisri U, Wichaiyo S, Hemstapat W, Srichairatanakool S, Svasti S, Fucharoen S. Iron distribution and histopathological characterization of the liver and heart of β -thalassemic mice with parenteral iron overload: effects of deferoxamine and deferiprone. Exp Toxicol Pathol 2014; In press (<http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2014.03.002>)

2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

2.1 Proceeding งานประชุมระดับนานาชาติ the 35th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting, 20-22 March 2013, Pitsanulok, Thailand

Wichaiyo S, Yatmark P, Vargas REM, Svasti S, Fucharoen S, Sanvarinda P, Morales NP. Effect of short term deferiprone on Hamp1 expression in iron overloaded mice, the 35th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting 2013; 39-40.

3. การนำเสนอผลงาน

3.1 การนำเสนอผลงานในแบบโปสเตอร์ งานประชุมระดับนานาชาติ 13th FAOBMB Congress 2012, 25-29 November 2012, Bangkok, Thailand หัวข้อเรื่อง Expression and release of hepcidin in mouse models of iron overload and β -thalassemia

3.2 การนำเสนอผลงานด้วยวาจา งานประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบमेธีวิจัยอาวุโส สกว ครั้งที่ 13 วันที่ 16-18 ตุลาคม 2556 หัวข้อเรื่อง Effect of iron overload on hepcidin synthesis in β -thalassemic mice

4. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

4.1 เพื่อพัฒนาการเรียนการสอนและสร้างนักวิจัยใหม่

4.1.1 นางสาวปารณีย์ ญาติมาก ระดับปริญญาเอก ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

4.1.2 นายสุรศักดิ์ วิชัยโย ระดับปริญญาโท ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

4.2 ความร่วมมืองานวิจัย มีโครงการวิจัยต่อเนื่อง

4.2.1 Prof. Hideo Utsumi, Prof. Kazuhiro Ichikawa and
Assist Prof. Nuttavut Kosem, Innovation Center for Medical Redox
Navigation, Kyushu University, Japan

4.2.2 Associate Prof. Ken-ichi Yamada, Department of Bio-Functional Science,
Faculty of Pharmaceutical Science, Kyushu University, Japan

ภาคผนวก

1. Reprint:

Yatmark P, Morales NP, Chaisri U, Wichaiyo S, Hemstapat W, Srichairatanakool S, Svasti S, Fucharoen S. Iron distribution and histopathological characterization of the liver and heart of β -thalassemic mice with parenteral iron overload: effects of deferoxamine and deferiprone. Exp Toxicol Pathol 2014; In press
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2014.03.002>)

2. Proceeding:

งานประชุมระดับนานาชาติ the 35th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting, 20-22 March 2013, Pitsanulok, Thailand

Wichaiyo S, Yatmark P, Vargas REM, Svasti S, Fucharoen S, Sanvarinda P, Morales NP.

Effect of short term deferiprone on Hamp1 expression in iron overloaded mice, the 35th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting 2013; 39-40.

3. Abstract & poster

งานประชุมระดับนานาชาติ 13th FAOBMB Congress 2012, 25-29 November 2012, Bangkok, Thailand หัวข้อเรื่อง Expression and release of hepcidin in mouse models of iron overload and β -thalassemia

4. Abstract

การนำเสนอผลงานด้วยวาจา งานประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว ครั้งที่ 13 วันที่ 16-18 ตุลาคม 2556 หัวข้อเรื่อง Effect of iron overload on hepcidin synthesis in β -thalassemic mice



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental and Toxicologic Pathology

journal homepage: www.elsevier.de/etp



Iron distribution and histopathological characterization of the liver and heart of β -thalassemic mice with parenteral iron overload: Effects of deferoxamine and deferiprone

Paranee Yatmark^{a,1}, Noppawan Phumala Morales^{a,*}, Urai Chaisri^b, Surasak Wichaiyo^a, Warinkarn Hemstapat^a, Somdet Srichairatanakool^c, Saovaros Svasti^d, Suthat Fucharoen^d

^a Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

^b Department of Tropical Pathology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

^c Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

^d Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170 Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 December 2013

Accepted 17 March 2014

Keywords:

Beta-knockout mice

Image analysis

Iron chelator

Iron overload

Liver pathology

Heart pathology

ABSTRACT

The liver and heart are the major target organs for iron accumulation and iron toxicity in β -thalassemia. To mimic the phenomenon of heavy iron overload resulting from repeated blood transfusions, a total of 180 mg of iron dextran was intraperitoneally injected into C57BL/6J mice (WT) and heterozygous β -globin knockout mice ($\mu\beta^{\text{th-3/+}}$, BKO). The effects of deferiprone and deferoxamine in this model were investigated. The iron was distributed homogeneously throughout the 4 liver lobes (left, caudate, right and median) and was present in hepatocytes, Kupffer cells and the sinusoidal space. Iron accumulation in phagocytic macrophages, recruitment of hepatic lymphocytes and nucleus membrane degeneration were observed as a result of iron overload in the WT and BKO mice. However, the expansion of hepatic extramedullary hematopoiesis was observed only in the BKO mice with iron overload. In the heart, the iron accumulated in the cardiac interstitium and myocytes, and moderate hypertrophy of the myocardial fibers and cardiac myocyte degeneration were observed. Although the total liver iron was not significantly altered by iron chelation therapy, image analysis demonstrated a difference in the efficacies of two iron chelators. The major site of chelation was the extracellular compartment, but treatment with deferiprone also resulted in intracellular iron chelation. Interestingly, iron chelators reversed the pathological changes resulting from iron overload in WT and BKO mice despite being used for only a short treatment period. We suggest that some of these effects may be secondary to the anti-inflammatory activity of the chelators.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Organ dysfunction and fatal complications in patients with β -thalassemia are primarily caused by heavy iron deposition in vital organs (Rund and Rachmilewitz, 2005; Beutler, 2007). Iron overload occurs as a result of therapeutic blood transfusions and increased intestinal iron absorption secondary to ineffective erythropoiesis (Taher, 2005). Several factors influence the distribution

and storage of iron in the liver and other organs of β -thalassemia patients, such as the total body iron concentration, the rate of RBC transfusions and the chelation therapy protocol (Kolnagou et al., 2013). The altered iron deposition pattern in iron overload patients has been previously described (Ambu et al., 1995; Anderson et al., 2001; Hankins et al., 2010).

In transfusional iron overload, as occurs in β -thalassemia major, iron typically accumulates in the reticuloendothelial system of the spleen, liver and bone marrow (Ghugre et al., 2009). Liver biopsies from patients show massive iron deposition in the majority of the Kupffer cells. In contrast to thalassemia intermedia and hereditary hemochromatosis, in which iron overload is caused by increased gut iron absorption, iron predominantly accumulates in the hepatocytes (Deugnier et al., 1992; Origa et al., 2007).

The degree of iron overload and the pattern of tissue and cellular iron deposition are important because different cell types exhibit

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand. Tel.: +66 2 201 5507; fax: +66 2 354 7157.

E-mail addresses: noppawan.phu@mahidol.ac.th, noppawan.mor@gmail.com (N.P. Morales).

¹ One of the authors (PY) is a Ph.D. candidate at Mahidol University, and this work is submitted in partial fulfillment of the requirements of the Ph.D.

varying levels of tolerance to iron-mediated toxicity (Nemeth, 2010; Britton et al., 2002). Furthermore, the localization of iron in various compartments can affect the ability of an iron chelator to reach the iron. Likewise, the efficacy of iron chelators is determined by physicochemical properties, including lipid solubility; efficacy is affected by iron mobilization from various intracellular compartments, tissues and organs (Kontoghiorghes et al., 2000, 2003). The variability in disease severity, complications and the response to iron chelation therapy may be partially attributed to individual patterns of iron distribution.

Heterozygous β -knockout mice ($\mu\beta^{\text{th-3/+}}$, BKO) were generated to study the pathophysiology of β -thalassemia and to evaluate novel therapeutic interventions. Their phenotypic characteristics are comparable to those of thalassemia intermedia, including hypochromic microcytic anemia with hemoglobin levels of 7–9 g/dl, splenomegaly, reticulocytosis and ineffective erythropoiesis with progressive liver iron accumulation (Yang et al., 1995; Breda and Rivella, 2003; Jamsai et al., 2005). However, the degree of iron accumulation in these mice was far lower than in human patients (Gardenghi et al., 2007; Huo et al., 2009). Therefore, exogenous iron administered either through diet or by parenteral iron overload has been used to mimic the iron status of these patients. Iron dextran has been used for parenteral iron loading to mimic severe iron overload in β -thalassemia intermedia patients with cardiac iron accumulation (Bartfay et al., 1999) and a marked induction of hepatic iron accumulation (McCullough and Bartfay, 2007). Recently, Moon et al. demonstrated that intraperitoneal injection of iron dextran into C57BL/6 mice resulted in dose-dependent iron accumulation in the liver and heart. This model could be used to characterize cardiomyopathy in patients with secondary iron overload (Moon et al., 2011).

In an attempt to simulate the iron status of thalassemic patients, a murine model of BKO with iron dextran loading was developed to represent iron overload due to repeated blood transfusions together with ineffective erythropoiesis. On the other hand, iron overload in wild-type mice can demonstrate secondary iron overload without ineffective erythropoiesis. The patterns of iron distribution in varying tissues and its toxic consequences were observed in the liver and heart. Image analysis was applied to evaluate the efficacy of tissue iron mobilization with two clinically available iron chelators, deferoxamine (DF) and deferiprone (L1).

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

Male and female wild-type C57BL/6J mice (WT) and heterozygous β -globin knockout mice ($\mu\beta^{\text{th-3/+}}$, BKO) 7 weeks of age and weighing 17–25 g were obtained from the Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Thailand. The animals were acclimatized for 1 week before the experiments and were housed under conventional sterile conditions. The rodent diet (082G/15) and water were provided *ad libitum*. The temperature and humidity were maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $60 \pm 5\%$, respectively, and the animals were kept on a 12 h light/dark cycle. These experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee at the Faculty of Science, Mahidol University of Thailand (Protocol No. 229).

2.2. Iron overloading and treatment with iron chelators

WT and BKO mice were intraperitoneally loaded with iron dextran (Sigma, St. Louis, MO) once daily at a dose of 20 mg iron/mouse for 9 doses over a period of 2 weeks for a total iron administration of 180 mg/mouse (Moon et al., 2011). Mice in the iron chelator-treated

groups were injected with either 0.2 μmol (125 μg)/g body weight deferoxamine (DF, deferoxamine mesylate, Merck, San Diego, CA) or 0.6 μmol (80 μg)/g body weight deferiprone (L1, The Government Pharmaceutical Organization, Bangkok, Thailand) for 7 days beginning 3 days after receiving their last intraperitoneal dose of iron. The mice were sacrificed 24 h after iron chelation by exsanguination from the heart and were perfused with 10 ml saline before removing the organs to determine the tissue iron content. For histopathological studies, the organs were removed without perfusion. Control mice received placebo treatment with saline on the same schedule as the iron-overloaded groups.

2.3. Assay for tissue iron content

The levels of non-heme iron in the liver and heart were determined using a modification of the method described by Foy et al. (1967). In brief, the tissue samples were homogenized in 0.1 M PBS, pH 7.2, with a Qiagen TissueLyser (USA). The iron was extracted three times by boiling 0.5 ml of the homogenate with 0.5 ml of an acid mixture (equal volumes of 1 N HCl and 10% trichloroacetic acid). Aliquots of the supernatant were mixed with chromogen solution (0.5 mM ferrozine in 50 mM sodium ascorbate and 1.05 mM sodium acetate) and left at room temperature for 30 min before measuring the absorbance at 562 nm with a spectrophotometer (GBC Cintra 10e, USA).

2.4. Assay for serum labile iron concentrations

The serum labile iron concentration was measured using the fluorometric method described by Srirachatanakool et al. The method is based on the conversion of the non-fluorescent dihydrorhodamine (DHR) to the oxidized form rhodamine (R), resulting in an increase in fluorescence intensity (FI) (Esposito et al., 2003). Briefly, 20 μl of a serum sample was incubated with and without deferiprone at 37°C for 30 min, and then the DHR solution (Biotium, Hayward, CA) containing ascorbic acid was added. The kinetics of increasing fluorescence was followed immediately for 40 min using a spectrofluorometer at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. The serum labile iron concentration was calculated from the calibration curve relating the difference in slopes with and without DFP versus the standard iron concentration (Srirachatanakool et al., 2013).

2.5. Histopathological studies

The left, caudate, right and median lobes of the liver and the left ventricle of the heart were dissected and preserved for routine histology by fixation in 4% paraformaldehyde, 5% sucrose and 150 mM PBS, pH 7.4. The fixed samples were embedded in paraffin, sectioned to 5 μm , and stained with hematoxylin/eosin for morphological analysis and with Perl's Prussian blue for iron deposition. The tissue slides were examined by light microscopy on a Nikon ECLIPSE E200 (Tokyo, Japan).

The accumulation of iron in the liver was evaluated using the following grading system described by Barton et al. (1995): grade 0, no visible iron deposition; grade 1, small, slight iron deposition in the cytoplasmic space of Kupffer cells; grade 2, prominent iron accumulation in Kupffer cells; grade 3, iron deposition in hepatocytes was observed; and grade 4, same as in 3, with additional iron deposition in the fibrous tissue of the portal tracts or septa.

The heart iron content was graded using the following criteria: grade 0, no visible iron deposition; grade 1, small iron deposits in the cardiac muscle; grade 2, detectable dense aggregates of iron granules in the cardiac muscle; grade 3, visible clumps of iron accumulation; and grade 4, same as in 3, with frequent iron clumps observed in the cardiac muscle.

Table 1

Body weight, liver weight and heart weight.

Group	Body weight (g)		Liver weight(g)	LW and BW ratio	Heart weight (g)	HW and BW ratio
	Initial	After				
Wild type						
Control	20.5 ± 2.1	25.0 ± 2.1	1.5 ± 0.3	0.06 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.005 ± 0.001
Iron overload	19.9 ± 2.8	21.1 ± 2.8	2.6 ± 0.8 [*]	0.13 ± 0.02 [*]	0.11 ± 0.02	0.005 ± 0.001
Iron overload + DF	20.9 ± 2.2	22.8 ± 3.3	3.0 ± 0.7	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.005 ± 0.001
Iron overload + L1	19.9 ± 2.3	22.1 ± 3.6	2.7 ± 0.6	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.005 ± 0.001
β-Knockout						
Control	19.9 ± 1.1	21.9 ± 1.2	1.4 ± 0.5	0.06 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.007 ± 0.001
Iron overload	21.3 ± 2.8	21.2 ± 3.2	2.5 ± 0.6 [*]	0.12 ± 0.02 [*]	0.12 ± 0.02	0.006 ± 0.001
Iron overload + DF	18.3 ± 2.5	19.9 ± 3.4	2.4 ± 0.6	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.007 ± 0.001
Iron overload + L1	19.8 ± 2.0	21.4 ± 2.9	2.6 ± 0.7	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.006 ± 0.001

Values are mean ± SD (n = 9–10).

^{*} Significant difference from the control group (p < 0.05).

The numbers of infiltrating mononuclear and polymononuclear cells and hematopoietic cells in the liver were counted. The average scores from ten non-overlapping areas were determined using the following criteria: score 0, absent; score 1, mild with 1–10 cells; score 2, moderate with 11–50 cells; and score 3, severe with more than 50 cells.

2.6. Image analysis

Semi-quantitative analysis of the iron accumulation in tissues was also performed by analyzing images obtained by Perl's Prussian staining. For each tissue section, 5 non-overlapping fields were photographed with a 400× objective with a Nikon ECLIPSE E200 microscope (Tokyo, Japan). The digital images were analyzed with ImageJ Ver.1.47i software (developed at the National Institute of Health, Maryland). First, a true color image was transformed to an 8-bit grayscale image in which the grayscale intensity ranged from 0 to 256. The gray values of individual pixels were analyzed, and a histogram was constructed. The minimal gray value detected in control tissue was considered as the threshold for detection of areas representing iron (Ortega et al., 2005). Then, the gray values of the pixels above the threshold were integrated. The values presented are the average of 5 areas.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS software version 19.0. The data were expressed as the means ± SD unless otherwise indicated. The comparisons were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's test as a post test. Statistical significance was considered when the p-value < 0.05.

3. Results

3.1. Body, liver and heart weights

The initial body weight of all animal groups showed no significant difference. After the study period, the body weight in all groups was slightly increased, but this increase was only significant in the WT control mice. Hepatomegaly but not cardiomegaly was observed in all of the iron loaded WT and BKO mice. The ratio between the liver weight and the body weight increased by approximately 2-fold during the study period, and treatment with iron chelators for 1 week had no effect on the liver weight or the ratio (Table 1).

3.2. Labile serum iron and tissue iron content

The labile serum iron and total iron levels in the liver and heart are shown in Table 2. Naturally, BKO mice revealed a slight iron

Table 2

Labile serum iron and tissue iron content.

Group	Labile serum iron (μM)	Tissue iron content (mg/g tissue)	
		Liver	Heart
	Mean (min–max)		
Wild type			
Control	0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
Iron overload	1.3 (0.6–1.9) [*]	15.6 ± 2.0 [*]	5.5 ± 1.8 [*]
Iron overload + DF	1.5 (0.6–3.3)	17.0 ± 2.3	5.7 ± 2.0
Iron overload + L1	1.2 (0.0–3.1)	17.3 ± 2.2	3.5 ± 2.0
β-Knockout			
Control	0	0.4 ± 0.5	0.1 ± 0.0
Iron overload	0.4 (0.0–1.1)	18.0 ± 2.6 [*]	4.5 ± 1.1 [*]
Iron overload + DF	0.3 (0.0–0.6)	15.2 ± 5.2	3.5 ± 1.5
Iron overload + L1	0.2 (0.0–0.8)	16.3 ± 7.4	2.5 ± 0.7 [#]

Values are the mean ± SD (n = 9–10).

^{*} Significant difference from the control group (p < 0.05).[#] Significant difference from the iron overload group (p < 0.05).

accumulation in the tissues even without iron loading. Loading with iron dextran markedly increased the labile serum iron levels and the liver and heart iron contents. The total loading of 180 mg of iron produced the same degree of tissue iron accumulation in both WT and BKO mice. Interestingly, the labile serum iron was significantly higher in WT mice than in BKO mice. Treatment with deferiprone reduced heart iron content in WT (p = 0.052) and BKO (p = 0.028) mice.

3.3. Liver histopathology

3.3.1. Iron deposition

Fig. 1 shows a representative image of the Prussian blue staining of the left liver lobes of WT and BKO mice. In BKO mice, spontaneous iron deposition was observed in the Kupffer cells and hepatocytes with a grade of 1 in all of the liver lobes (Fig. 1b and Table 3).

Table 3

Iron deposition score.

Group	Iron deposition score	
	Liver	Heart
Wild type		
Control	0	0
Iron overload	3	3 or 4
Iron overload + DF	3	3 or 4
Iron overload + L1	3	3 or 4
β-Knockout		
Control	1	1
Iron overload	3	4
Iron overload + DF	3	3 or 4
Iron overload + L1	3	3 or 4

Values are mean ± SD (n = 5).

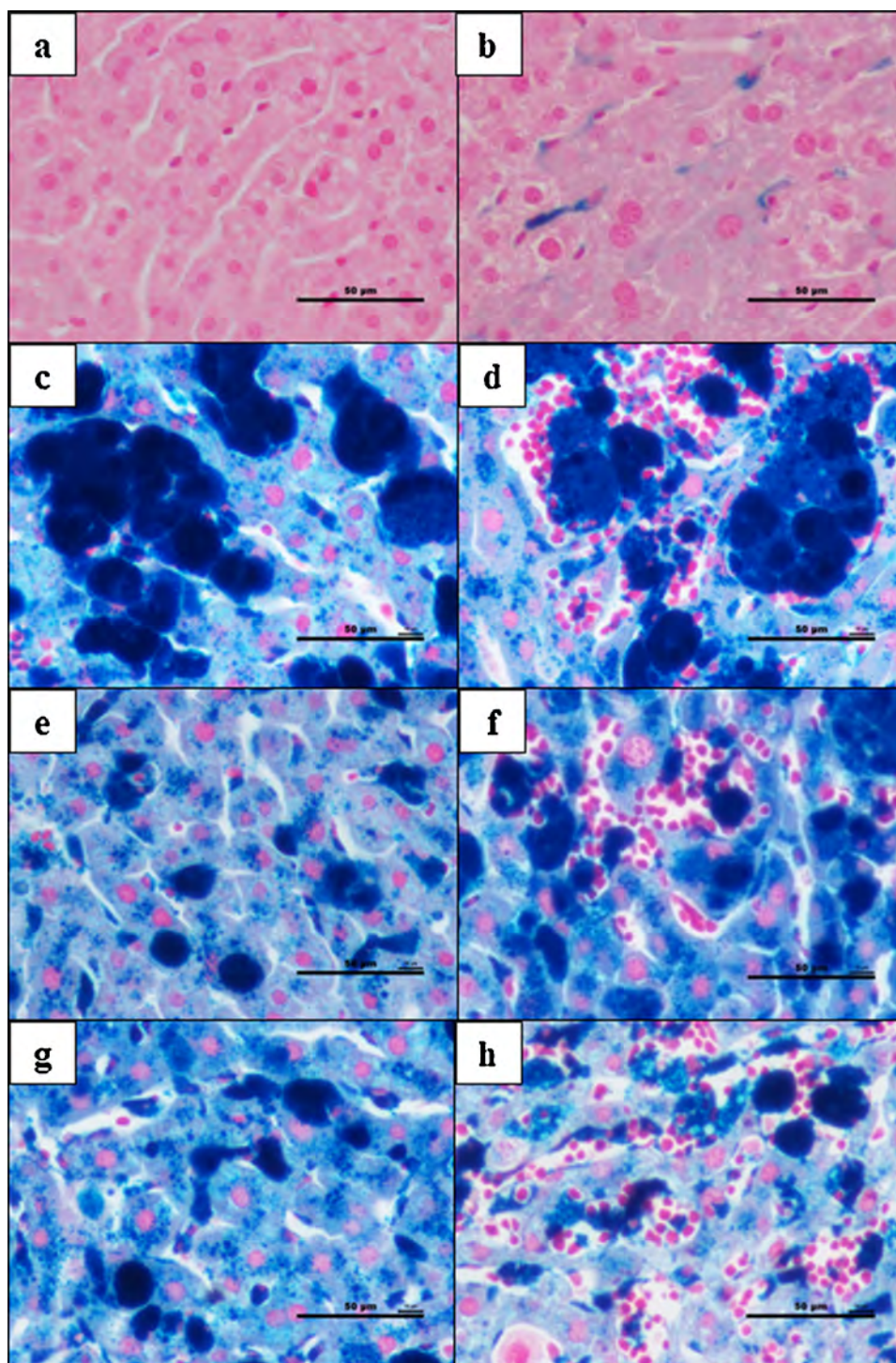


Fig. 1. Prussian blue staining of the left liver lobes of wild-type (left panel) and BKO mice (right panel). Control (a and b), iron overload (c and d) and iron-overloaded mice treated with deferoxamine (e and f) or deferiprone (g and h). The bar represents 50 μm , and the images were taken at 400 $\times$ original magnification.

After iron loading, the iron was largely confined to clusters of phagocytic cells such as the Kupffer cells. Hemosiderin granules were observed in the cytoplasm of hepatocytes with a grade of 3 in all liver lobes (Fig. 1c, d and Table 3). Image analysis of tissue stained with Prussian blue demonstrated the homogenous distribution of iron accumulation in the whole liver. The average of the integrated gray values were approximately $40\text{--}50 \times 10^4$ in left, caudate, right and median liver lobes.

Treatment with iron chelators significantly decreased the size of the clusters of phagocytic cells (Fig. 1e–h). Although high iron accumulation persisted in hepatocytes (grade 3), image analysis indicated that the total liver iron decreased in response to the iron chelators. The efficacy of the iron chelators varied among the liver lobes and between the two strains of mice used in this study. Treatment with deferoxamine significantly decreased iron in the left and caudate lobes of WT mice, and significant effects of iron chelation

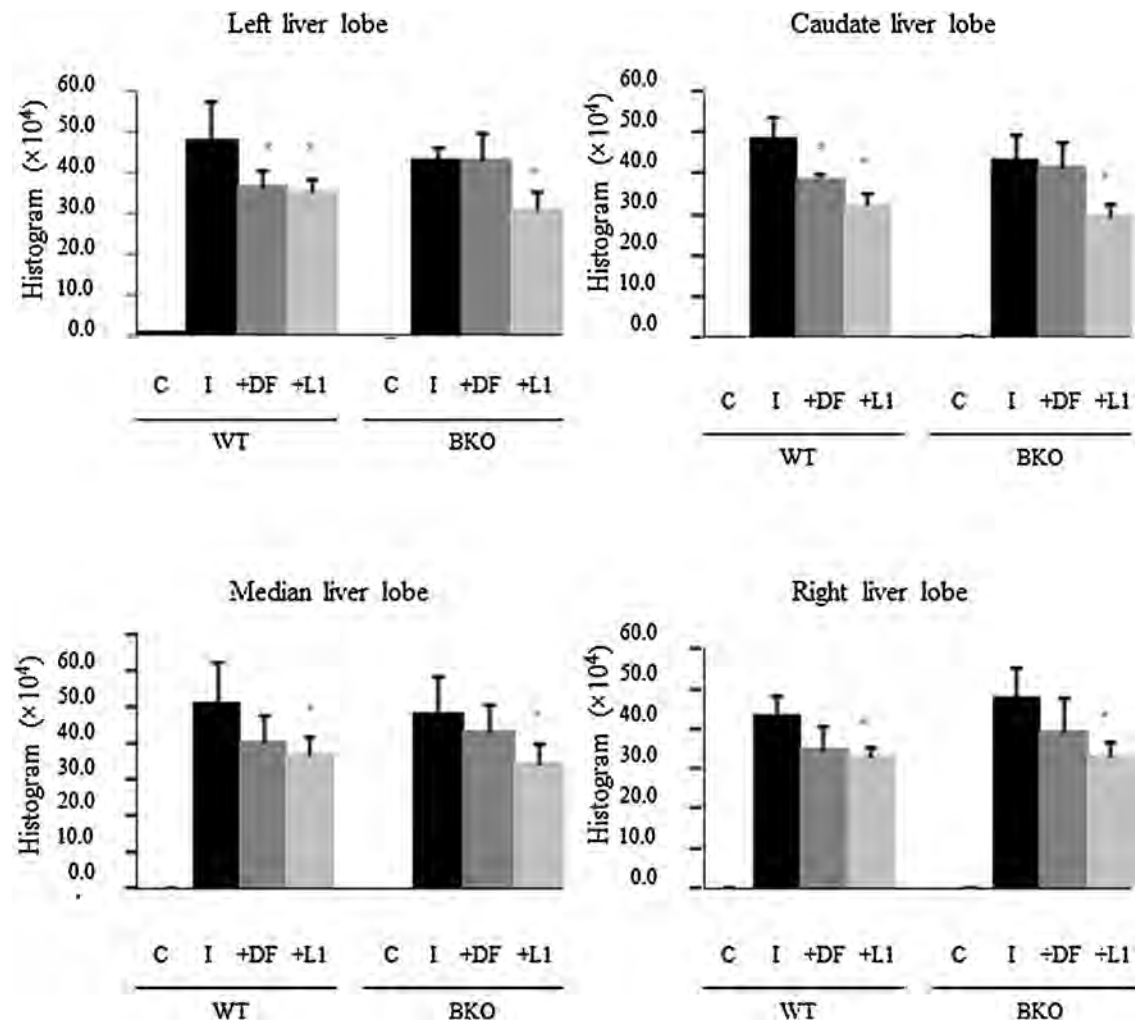


Fig. 2. Image analysis of iron accumulation in the left (a), caudate (b) right (c) and median (d) liver lobes. The data are expressed as the mean $\pm$ SD ($n=5$). *Significant difference from the iron overload group ($p<0.05$).

were observed in all of the liver lobes of both WT and BKO mice after treatment with deferiprone (Fig. 2).

3.3.2. H&E staining

Signs of liver injury, including fatty liver and nuclear membrane degeneration, were observed in the BKO mice (Fig. 3b). Changes in morphology were observed in the iron-overloaded WT and BKO mice, including the presence of clumps of brown pigment in sinusoid-lining cells and swollen Kupffer cells and hepatocytes. A higher frequency of nuclear degeneration in the hepatocytes was observed in iron-overloaded mice (Fig. 3c and d). Interestingly, the nuclear degeneration and hepatocytes swelling was reversed by treatment with the iron chelators (Fig. 3e–h).

In addition to morphological changes, mononuclear cell infiltration and increased hematopoietic cells were observed in the iron-overloaded mice. The mononuclear cell infiltration scores for the 4 liver lobes of WT mice are presented in Fig. 4a. Lymphocytes were the major population in all of the liver lobes of the iron-overloaded WT mice. Treatment with deferioxamine and deferiprone significantly decreased the score in all of the liver lobes. In contrast, the iron-overloaded BKO mice presented characteristics of hepatic extramedullary hematopoiesis with a higher number of erythroblasts adjacent to the iron-laden macrophages (Ginzburg et al., 2009; Sonoda and Sasaki, 2012). Because this study did not differentiate types of the cells, we used the same scoring criteria

as for WT mice to quantify hematopoietic cells. The results showed that the score was not decreased after iron chelation in BKO mice (Fig. 4b). However, treatment with deferiprone decreased the size of the foci, and they became more ellipsoidal than spherical in shape.

3.4. Heart histopathology

3.4.1. Cardiac iron

The Prussian blue staining of the left ventricular tissues is shown in Fig. 5. A slight iron deposition (score of 1) was found in the cardiac myocytes of the control BKO mice. The heart tissues of the iron-overloaded mice had iron deposits in the interstitium and scattered throughout the cardiac muscle (score of 4). Treatment with deferioxamine and deferiprone diminished the iron deposition observed in the cardiac cells. Although the image analysis showed no significant effect between the two iron chelators, deferiprone seemed to be more effective than deferioxamine at removing the iron from the interstitium. However, iron deposition in cardiac myocytes remained detectable even after treatment, with a score of 3 or 4 (Table 3).

3.4.2. H&E staining

Without iron loading, the BKO mice demonstrated mild to moderate hypertrophy of the myocardial fibers and cardiac myocyte

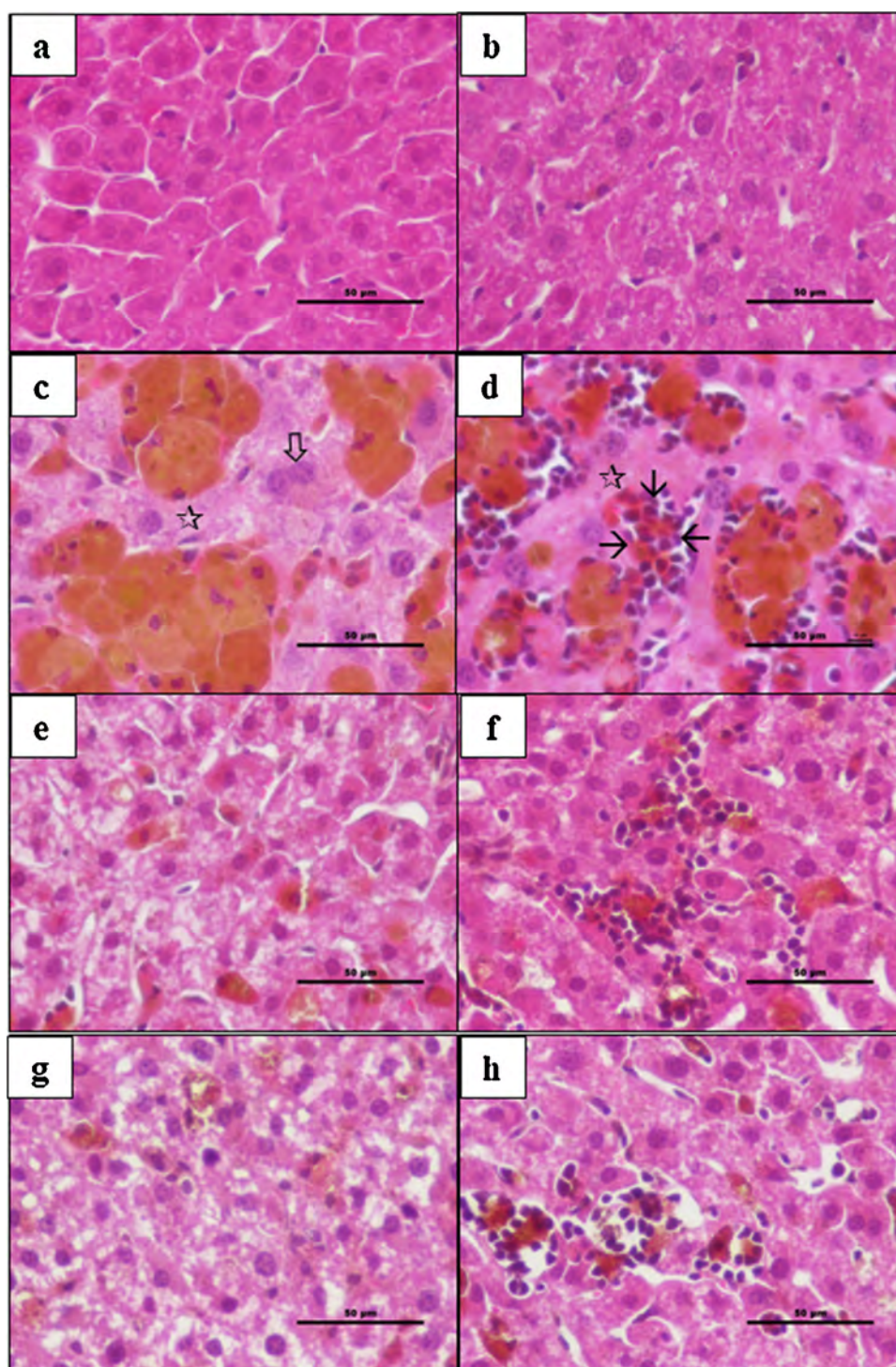


Fig. 3. Hematoxylin and eosin staining of the left liver lobes of wild-type (left panel) and BKO mice (right panel). Control (a and b), iron overload (c and d) and iron-overloaded mice treated with deferoxamine (e and f) or deferiprone (g and h). The bar represents 50 μ m, and the images were taken at 400 $\times$ original magnification. The degeneration of the nuclear membrane is indicated by an arrow ($\rightarrow$). Hepatocyte hypertrophy is indicated by ($\star$). Mononuclear cells and hematopoietic cells are indicated by ($\rightarrow$).

degeneration. The cardiac muscles of the iron-loaded mice showed scattered brown pigments, hypertrophy of the myocardial fibers, cardiac muscle degeneration and nuclear membrane degeneration. In the mice treated with deferoxamine or deferiprone, the heart tissue showed small scattered brown pigments. Deferiprone significantly reversed the pathologic changes in iron-overloaded BKO mice (Fig. 6).

4. Discussion

Iron chelation therapy is a mainstay in preventing and delaying iron toxicity-related complications in thalassemia and genetic hemochromatosis. An improved quality of life and longevity after chelation therapy has been demonstrated in several clinical studies (Borgna-Pignatti et al., 2005; Maggio et al., 2009). Although at least

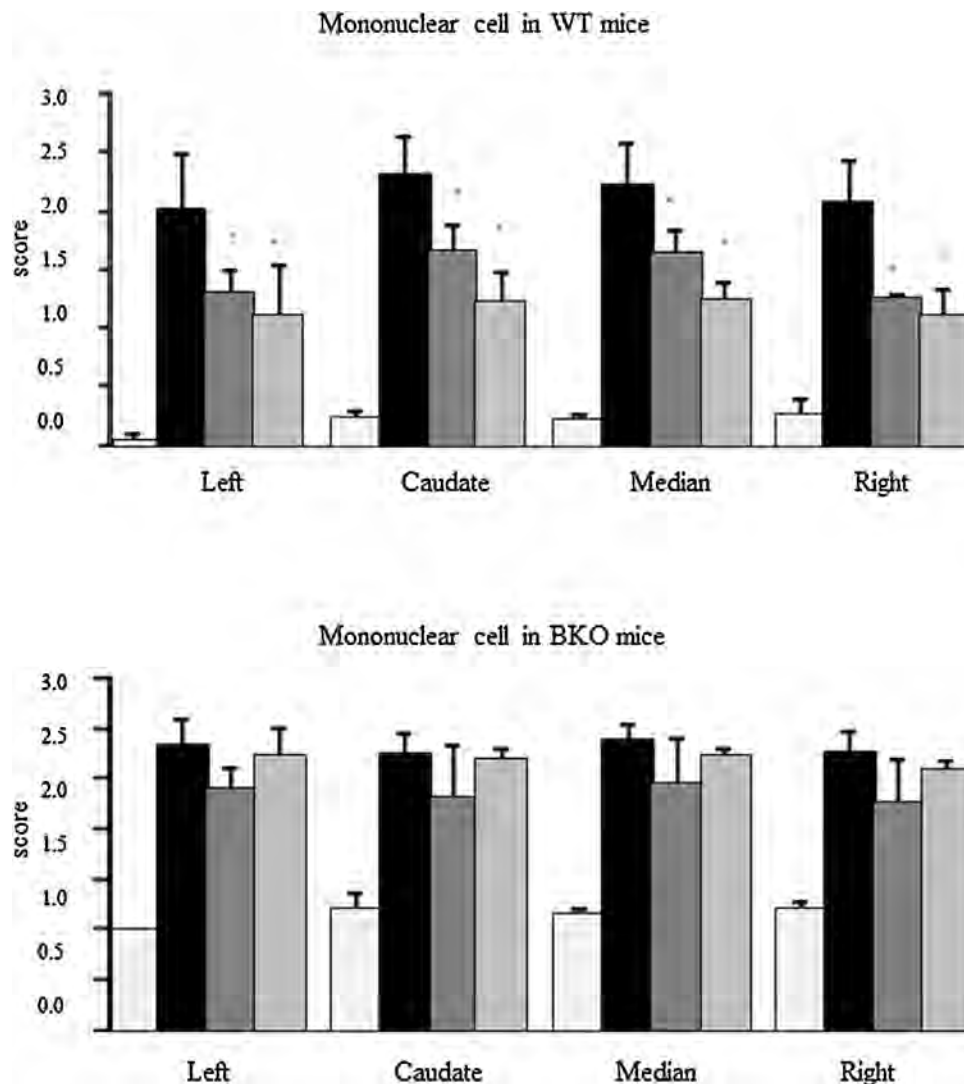


Fig. 4. Quantitative analysis of the mononuclear cells and hematopoietic cells in the 4 liver lobes of wild-type (a) and BKO mice (b). The data are expressed as the mean $\pm$ SD ($n = 5$). *Significant difference compared to the iron overload group ($p < 0.05$).

three iron chelators have been proven effective in the clinic, animal models are still needed to further evaluate the efficacy and toxicity of iron chelators.

Our study used iron loading via intraperitoneal injections of iron dextran to mimic heavily iron overload due to repeated blood transfusions. The dose of iron was easily to be controlled, and the liver iron content of the WT and BKO mice was comparable to a previous report by Moon et al. (2011). Iron-overloaded Kupffer cells with elevated phagolysosomal function were a major microscopic feature. A mixed pattern of parenchymal and mesenchymal iron overload was observed in the liver loaded with iron dextran (Meguro et al., 2005; Deugnier and Turlin, 2011). Moreover, iron accumulated in the myocytes, and cellular damage was observed within 2–3 weeks of iron loading.

Deferoxamine and deferiprone are widely used for iron chelation therapy. Because it is a smaller molecule and has a higher lipid solubility, deferiprone has an advantage over deferoxamine in the mobilization of intracellular iron, especially in cardiac muscle, which is a standard goal for iron chelation therapy (Kontoghiorghes et al., 2003). In agreement with a previous report, the primary sites of chelation were the reticuloendothelial compartment and intercellular spaces such as the liver sinusoid and cardiac interstitium (Wood et al., 2005, 2006). Although histological grading provides

information that can describe the severity and cellular sites of iron storage, this method was not able to differentiate between the efficacies of deferiprone and deferoxamine in the tissues. Deugnier et al. (1982) and Ortega et al. (2005) have introduced image analysis for quantifying iron content during liver iron overload. Their results showed significant correlations between image analysis and histological and biochemical parameters.

In this study, we performed image analysis with the freeware “ImageJ” (NIH). Treatment with equimolar doses of two iron chelators resulted in equal mobilization effects on the liver iron stores in the WT mice. Interestingly, deferiprone was significantly more effective than deferoxamine in reducing the iron content of the left and caudate liver lobes of BKO mice. Deferiprone is able to pass through the cell membrane (Kontoghiorghes et al., 2003), and this may explain its ability to chelate intracellular iron in the liver of BKO mice (Esposito et al., 2003; Sohal et al., 1999). It should be noted that iron complexes with deferiprone are mainly excreted via the urine, and biliary excretion is the major route for iron complexes with deferoxamine (Kontoghiorghes et al., 2003). Therefore, the metabolic and pathologic changes in the livers of BKO mice may also influence iron excretion. In addition, the image analysis clearly showed that both iron chelators, with slightly more effectively of deferiprone, reduced iron content in the heart. As mention earlier,

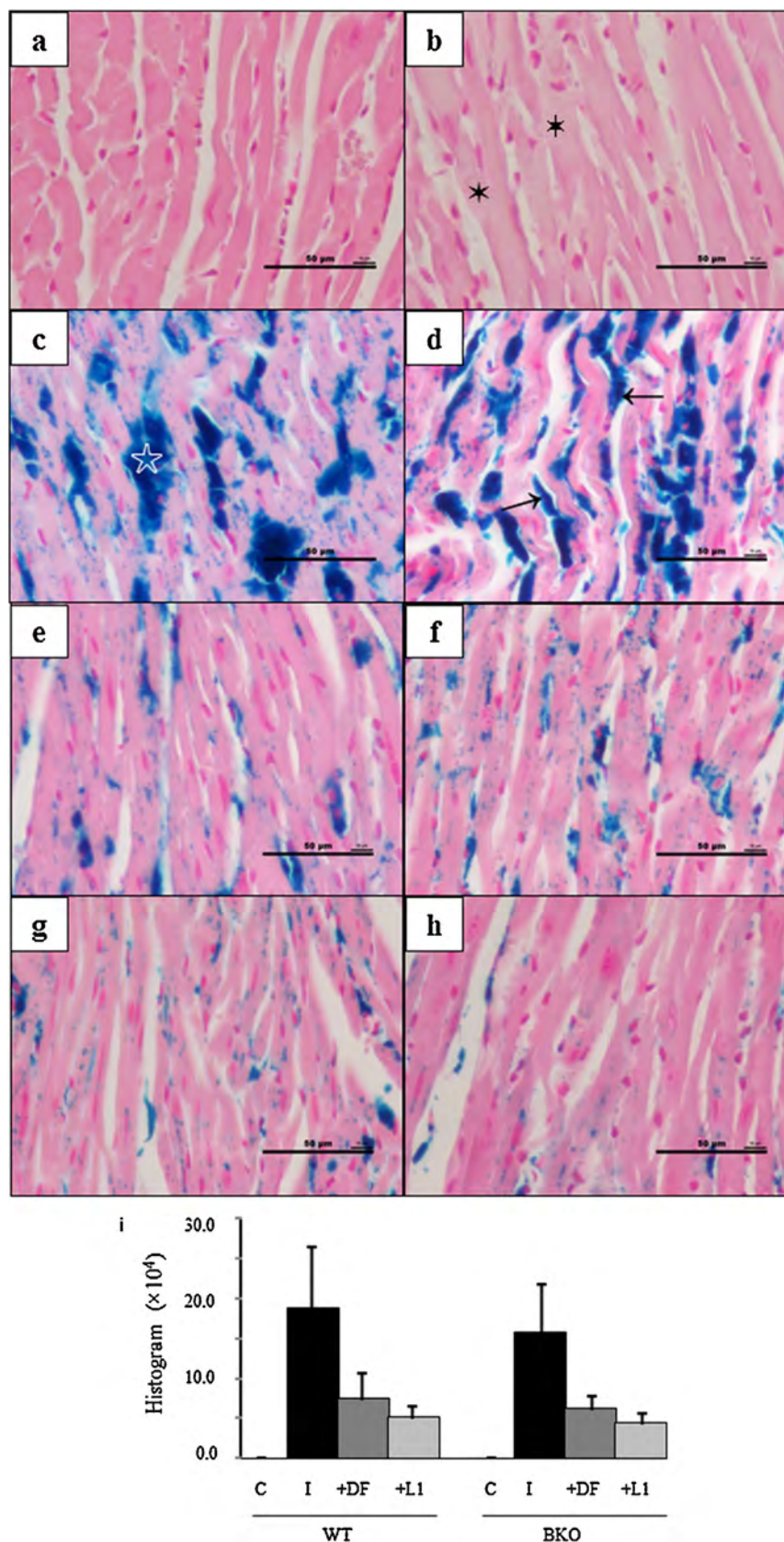


Fig. 5. Prussian blue staining of the left ventricular myocardium of wild-type (left panel) and BKO mice (right panel). Control (a and b), iron overload (c and d) and iron-overloaded mice treated with deferoxamine (e and f) or deferiprone (g and h). BKO mice demonstrated mild to moderate hypertrophy of the myocardial fibers and displayed cardiac myocyte degeneration (*). The iron accumulated primarily in the cardiac interstitium (→) and to a lesser extent in the cardiac myocytes (*). Treatment with iron chelators primarily removed iron from the cardiac interstitium. The image analysis demonstrated significant differences in the cardiac iron content after chelation therapy (i). The bar represents 50 µm, and the images were taken at 400× original magnification.

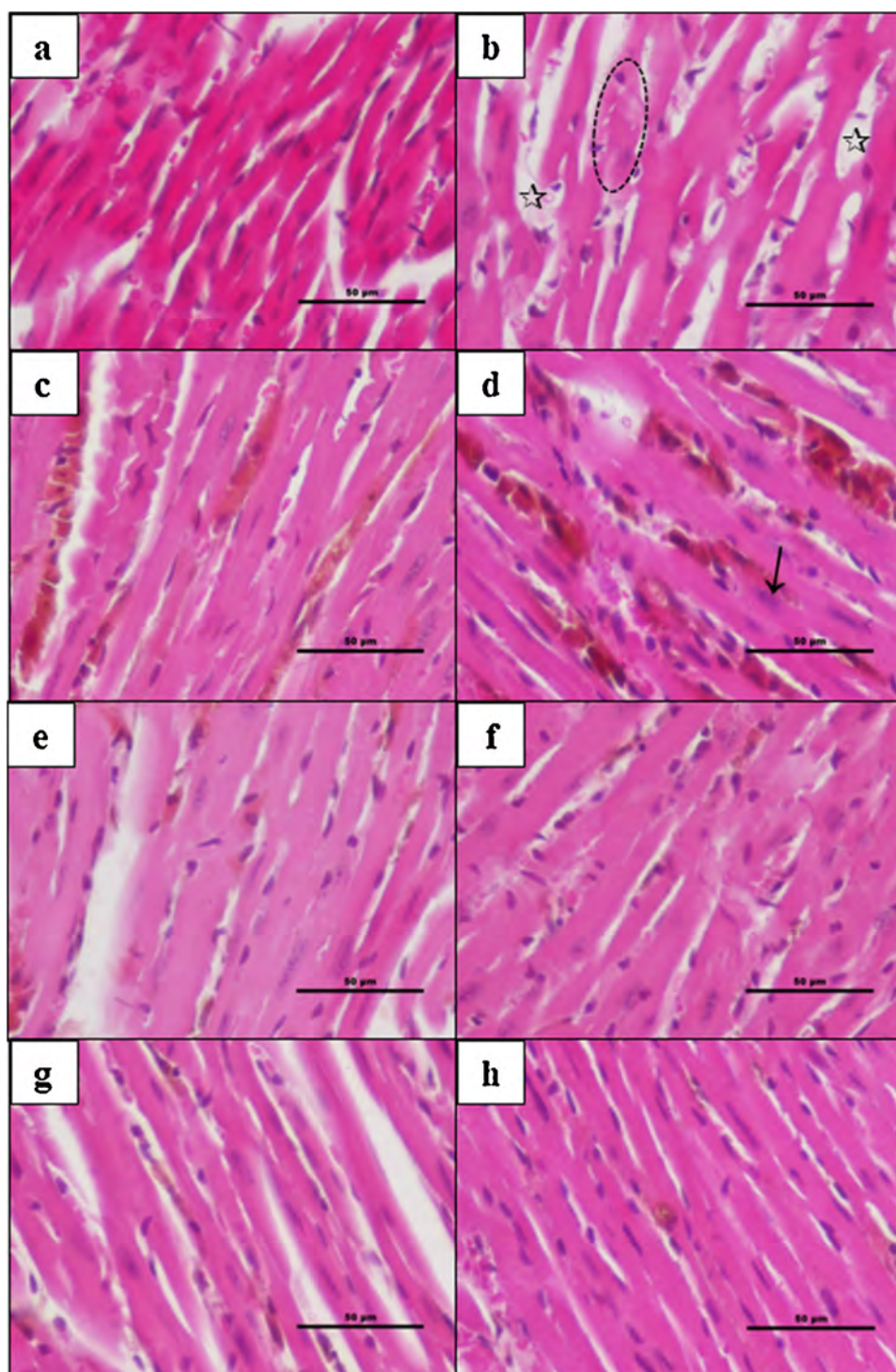


Fig. 6. Hematoxylin and eosin staining of wild-type (left panel) and BKO mice (right panel). Control (a and b), iron overload (c and d) and iron-overloaded mice treated with deferoxamine (e and f) or deferiprone (g and h). The bar represents 50 μm , and the images were taken at 400 $\times$ original magnification. Hypertrophy of the myocardial fibers is indicated by ($\rightarrow$). Cardiac muscle degeneration is indicated by (*). Nuclear membrane degeneration is indicated by (—).

the major site of iron mobilization was the extracellular cardiac interstitium, and the superior effect of deferiprone was likely due to its ability to permeate membranes.

In addition to iron mobilization, the ultimate goal of chelation therapy is the reversal of cellular injury and damage. Redox-active iron catalyzes the formation of reactive oxygen species via the Fenton and Haber–Weiss reactions and results in lipid peroxidation and oxidation of other macromolecules. Oxidative stress disturbs cellular functions and can result in abnormal morphologies,

including hypertrophy of hepatocytes, cardiac myocytes and hepatic lipocytes, all of which were observed in the iron overload mice (Friedman, 1993; Monte, 2005; Park et al., 1987; Wood et al., 2006; Yang et al., 2003). The end stages of hepatic and cardiac iron overload are hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma and cardiomyopathy and cardiac failure, respectively. The mechanisms of these conditions have been reviewed by others (Ramm and Ruddell, 2005; Anderson et al., 2001; Zurlo et al., 1989; Olivieri et al., 1994). In this study, without the presentation of end-stage

morphology (e.g., fibrosis), signs of hepatocyte and myocyte injury were observed throughout the tissues.

Liver inflammation and recruitment of mononuclear cells was also observed in iron-overloaded mice. Iron may contribute to the activation of the Kupffer cells and can induce the chemotaxis of mononuclear cells toward the area of damage. Kartikasari et al. (2004) showed that intracellular iron enhanced the adhesion of monocytes to endothelial cells. Similar to hemochromatosis, lymphocytes were present in the liver tissue. Lymphocyte-derived cytokines activate the Kupffer cells, leading to the increased production of cytokines and growth factors involved in stellate cell activation (Lewindon et al., 2002) and finally resulting in the development of fibrosis.

Interestingly, the iron chelators used in this study were able to reverse the abnormal cell morphology, cell damage, and inflammation, even after a short period of treatment. We should note that this schedule of chelation did not significantly reduce the total body iron store (e.g., total liver iron was not changed), but these effects may result from the reduction of redox-active iron and a subsequent decrease in inflammation. Furthermore, iron chelators may possess intrinsic anti-inflammatory activity. Lastly, the inhibition of adhesion molecule expression and T-cell proliferation in response to iron chelation have been reported in other non-iron overload experimental models (Sweeney et al., 2011; Li and Frei, 2006).

BKO mice have characteristics of ineffective erythropoiesis and markedly increased erythropoietin (Ramos et al., 2010). The spontaneous iron accumulation may result from increased gut iron absorption as it does in β -thalassemia. In agreement with a report by Ginzburg et al. (2009), the expansion of hepatic extramedullary hematopoiesis was observed in iron-overloaded β -thalassemic mice and the mechanism was explained by hepcidin suppression. Our results demonstrated that iron chelation had no effect on the number of hematopoietic cells despite changes in the size and shape of the foci. This effect of iron chelators may partly relate to the alteration of erythropoietin level after chelation therapy (data not show).

In conclusion, our study demonstrated the sites of iron deposition and iron chelation in WT and BKO mice with iron overload. Treatment with deferiprone had effect in intracellular iron mobilization. Interestingly, iron chelators reversed the pathological changes in iron overloaded mice despite being used for only a short treatment period. We suggest that the effects may partly contribute by the anti-inflammatory activity of the chelators.

Acknowledgements

This study was supported by The Office of the Higher Education Commission and Mahidol University under The National Research Universities Initiative, Thailand Research Funds, The Commission on Higher Education" (RMU5480001) and a Research Chair Grant from the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) and Mahidol University. The authors thank Miss Atiitaya Inthana for her assistance and for handling the animals.

References

Ambu R, Crisponi G, Sciort R, Van Eyken P, Parodo G, Iannelli S, et al. Uneven hepatic iron and phosphorus distribution in beta-thalassemia. *J Hepatol* 1995;23:544–9.

Anderson LJ, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier CC, Bunce NH, et al. Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J* 2001;22:2171–9.

Breda L, Rivella S. Mouse models for the cure of β -thalassemia and sickle cell anemia. *Minerva Biotechnol* 2003;15:107–21.

Bartfay WJ, Butany J, Lehotay DC, Sole MJ, Hou D, Bartfay E, et al. A biochemical, histochemical, and electron microscopic study on the effects of iron-loading on the hearts of mice. *Cardiovasc Pathol* 1999;8:305–14.

Barton JC, Edward CQ, Bertoli LF, Shroyer TW, Hudson SL. Iron overload in African Americans. *Am J Med* 1995;99:616–23.

Beutler E. Iron storage disease: facts, fiction and progress. *Blood Cells Mol Dis* 2007;39:140–7.

Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gambineri MR, et al. Survival and complications in thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 2005;1054:40–7.

Britton RS, Leicester KL, Bacon BR. Iron toxicity and chelation therapy. *Int J Hematol* 2002;76(3):219–28.

Deugnier YM, Loréal O, Turlin B, Guyader D, Jouanolle H, Moirand R, et al. Liver pathology in genetic hemochromatosis: a review of 135 homozygous cases and their biochemical correlations. *Gastroenterology* 1992;102:2050–9.

Deugnier Y, Margules S, Brissot P, Deugnier MA, Bisconte JC, Bourel M, et al. Comparative study between biochemical and histological methods and image analysis in liver iron overload. *J Clin Pathol* 1982;35:45–51.

Deugnier Y, Turlin B. Pathology of hepatic iron overload. *Semin Liver Dis* 2011;31:260–71.

Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, Pootrakul P, Hershko C, Cabantchik ZI. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood* 2003;102:2670–7.

Foy AL, Williams HL, Cortell S, Conrad ME. A modified procedure for the determination of nonheme iron in tissue. *Anal Biochem* 1967;18:559–63.

Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828–35.

Gardenghi S, Marongiu MF, Ramos P, Guy E, Breda L, Chadburn A, et al. Ineffective erythropoiesis in β -thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood* 2007;109:5027–35.

Ghugre NR, Gonzalez-Gomez I, Butensky E, Noetzli L, Fischer R, Williams R, et al. Patterns of hepatic iron distribution in patients with chronically transfused thalassemia and sickle cell disease. *Am J Hematol* 2009;84:480–3.

Ginzburg YZ, Rybicki AC, Suzuka SM, Hall CB, Breuer W, Cabantchik ZI, et al. Exogenous iron increases hemoglobin in beta-thalassemic mice. *Exp Hematol* 2009;37:172–83.

Hankins JS, Smeltzer MP, McCarville MB, Aygun B, Hillenbrand CM, Ware RE, et al. Patterns of liver iron accumulation in patients with sickle cell disease and thalassemia with iron overload. *Eur J Haematol* 2010;85:51–7.

Kontoghiorghes GJ, Pattichi K, Hadjigavriel M, Kolnagou A. Transfusional iron overload and chelation therapy with deferoxamine and deferiprone (L1). *Transfus Sci* 2000;23:211–23.

Kartikasari AER, Georgiou NA, Visseren FLJ, van Kats-Renaud H, van Asbeck BS, Marx JJM. Intracellular labile iron modulates adhesion of human monocytes to human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2257–62.

Kolnagou A, Natsiopoulos K, Kleanthus M, Ioannou A, Kontoghiorghes GJ. Liver iron and serum ferritin levels are misleading for estimating cardiac, pancreatic, splenic and total body iron load in thalassemia patients: factors influencing the heterogenic distribution of excess storage iron in organs as identified by MRI T2*. *Toxicol Mech Meth* 2013;23:48–56.

Kontoghiorghes GJ, Neocleous K, Kolnagou A. Benefits and risks of deferiprone in iron overload in thalassemia and other conditions: comparison of epidemiological and therapeutic aspects with deferoxamine. *Drug Saf* 2003;26:553–84.

Huo Y, McConnell SC, Ryan TM. Preclinical transfusion-dependent humanized model of β -thalassemia major. *Blood* 2009;113:4763–70.

Jamsai D, Zaibak F, Khongnium W, Vadolos J, Voullaire L, Fowler KJ, et al. A humanized mouse model for β^0 -thalassemia mutation. *Genomics* 2005;85:453–61.

Li L, Frei B. Iron chelation inhibits NF- κ B-mediated adhesion molecules expression by inhibiting p22phox protein expression and NADPH oxidase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2638–43.

Lewindon PJ, Pereira TN, Hoskins AC, Bridle KR, Williamson RM, Shepherd RW, et al. The role of hepatic stellate cells and transforming growth factor- β_1 in cystic fibrosis liver disease. *Am J Pathol* 2002;160:1705–15.

Maggio A, Vitranò A, Capra M, Cuccia L, Gagliardotto F, Filosa A, et al. Improving survival with deferiprone treatment in patients with thalassemia major: a prospective multicenter randomized clinical trial under the auspices of the Italian Society for Thalassemia and Hemoglobinopathies. *Blood Cells Mol Dis* 2009;42:247–51.

Meguro R, Asano Y, Odagiri S, Li C, Iwatsuki H, Shoumura K. The presence of ferric and ferrous iron in the nonheme iron store of resident macrophages in the different tissues and organs: histological demonstrations by the perfusion-Perls and –Turnbull methods in rat. *Arch Histo Cyto* 2005;68:171–83.

Monte UD. Swelling of hepatocytes injured by oxidative stress suggests pathological changes related to macromolecular crowding. *Med Hypotheses* 2005;64:818–25.

Moon SN, Han JW, Hwang HS, Kim MJ, Lee SJ, Lee JY, et al. Establishment of secondary iron overloaded mouse model: evaluation of cardiac function and analysis according to iron concentration. *Pediatr Cardiol* 2011;32:947–52.

McCullough KD, Bartfay. The dose dependent effects of chronic iron overload on the production of oxygen free radicals and vitamin E concentration in the liver of murine model. *Biol Res Nurs* 2007;8:300–4.

Nemeth E. Hepcidin in β -thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1202:31–5.

Olivieri NF, Nathan DG, MacMillan JH, Wayne AS, Liu PP, McGee A, et al. Survival in medically treated patients with homozygous betathalassaemia. *N Engl J Med* 1994;331:574–8.

Ortega L, Ladero JM, Carreras MP, Alvarez T, Taxonera C, Oliván MP, et al. A computer-assisted morphometric quantitative analysis of iron overload in liver biopsies.

- A comparison with histological and biochemical methods. *Pathol Res Pract* 2005;201:673–7.
- Origa R, Galanello R, Ganz T, Giagu N, Maccioni L, Faa G, et al. Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica* 2007;92:583–8.
- Park CH, Bacon BR, Brittenham GM, Tavill AS. Pathology of dietary carbonyl iron overload in rats. *Lab Invest* 1987;57:555–63.
- Ramos P, Melchiorre L, Gadenghi S, Van-Roijen N, Grady RW, Ginburg Y, et al. Iron metabolism and ineffective erythropoiesis in β -thalassemia mouse models. *Ann NY Acad Sci* 2010;1202:24–30.
- Ramm GA, Ruddell RG. Hepatotoxicity of iron overload: mechanism of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2005;25:433–49.
- Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med* 2005;353:1135–46.
- Sonoda Y, Sasaki K. Hepatic extramedullary hematopoiesis and macrophages in the adults mouse: histometrical and immunohistochemical studies. *Cells Tissues Organs* 2012;196:555–64.
- Sohal RS, Wennberg-Kirch E, Jaiswal K, Kwong LK, Forster M. Effect of age and caloric restriction on bleomycin-chelatable and non-heme iron in different tissue of C57BL/6 mice. *Free Radic Biol Med* 1999;27:287–93.
- Srichairatanakool S, Pangjit K, Phisalaphong C, Fucharoen S. Evaluation of a novel oral iron chelator 1-(N-acetyl-6-aminoethyl)-3-hydroxypyridin-4-one (CM1) for treatment of iron overload in mice. *Adv Biosci Biotechnol* 2013;4:153–63.
- Sweeney ME, Slusser JG, Lynch SG, Benedict SH, Garcia SL, Rues L, et al. Deferiprone modulates in vitro responses by peripheral blood T cells from control and relapsing-remitting multiple sclerosis subjects. *Int Immunopharmacol* 2011;11:1769–801.
- Taher A. Iron overload in thalassemia and sickle cell disease. *Semin Hematol* 2005;42:5–9.
- Wood JC, Otto-Duessel M, Gonzales I, Aguilar MI, Shimada H, Nick H, et al. Deferasirox and deferiprone remove cardiac iron in the iron-overloaded gerbil. *Transl Res* 2006;148:272–80.
- Wood JC, Otto-Duessel M, Gonzales I, Aguilar MI, Shimada H, Nick H, et al. ICL670 removes cardiac iron in a gerbil model of iron overload. *Blood* 2005;106:2695A.
- Yang T, Brittenham GM, Dong WQ, Levy MN, Obejero-Paz CA, Kuryshev YA, et al. Deferoxamine prevents cardiac hypertrophy and failure in the gerbil model of iron-induced cardiomyopathy. *J Lab Clin Med* 2003;142:332–40.
- Yang B, Kirby S, Lewis J, Detloff PJ, Maeda N, Smithies O. A mouse model for β^0 -thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11608–12.
- Zurlo MG, De Stefano P, Borgna-Pignatti C, Di Palma A, Piga A, Melevendi C, et al. Survival and causes of death in thalassaemia major. *Lancet* 1989;2:27–30.

Original article

F01

Effect of Short-Term Deferiprone on *Hamp1* Expression in Iron-Overloaded Mice

Surasak Wichaiyo^{1*}, Paranee Yatmark¹, Ronald Enrique Morales Vargas², Saovaros Svasti³, Suthat Fucharoen³, Pimtip Sanvarinda¹, Noppawan Phumala Morales¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Science; ²Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand; ³Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom 73170, Thailand

E-mail: noppawan.phu@mahidol.ac.th

Abstract

Hepcidin plays a key role in the regulation of systemic iron homeostasis. The expression of hepcidin is activated by iron repletion. On the other hand, it is repressed by erythropoietin (EPO). Inappropriate low level of hepcidin contributes to iron overload. Recently, there was evidence indicated that iron chelation therapy increased serum hepcidin concentration in iron overload condition. However, mechanisms of action remain unclear. The present study investigated the effect of deferiprone (L1), an orally active iron chelator, on hepcidin gene (*Hamp1*) expression in association with liver iron content (LIC) and serum EPO level in an iron-overloaded mice model. C57BL/6 mice were divided into 3 groups; control (no treatment), iron overload, and L1 treatment after iron overload, respectively. To induce iron overload, mice were intraperitoneally (i.p.) injected by 1 mg/g/day iron dextran for 9 doses within 2 weeks. After iron loading, once daily 80 mg/kg L1 was i.p. injected for 1 week in L1-treated group. The results showed that LIC was 14.4 ± 2.6 mg/g liver in iron-overloaded mice. Furthermore, iron overload significantly increased *Hamp1* expression (2.6-fold, $P < 0.01$) along with the elevated serum EPO level (244.8 ± 172.2 pg/mL). L1 treatment did not alter both LIC (14.4 ± 2.8 mg/g liver) and *Hamp1* expression (2.7-fold) in iron-overloaded mice. Despite, a reduction of serum EPO was observed (83.5 ± 72.8 pg/mL, $P = 0.056$). In conclusion, short-term L1 treatment did not affect LIC and *Hamp1* expression but rather tended to decrease serum EPO level in iron overloaded-mice.

Keywords: Deferiprone, Hepcidin, Iron overload, Erythropoietin

Introduction

Hepcidin is a peptide hormone that mainly synthesized by the liver. It limits iron export from duodenal enterocytes, macrophages, and hepatocytes, resulting in a reduction of iron absorption and recycling. Iron overload is a stimulating factor of hepcidin gene expression whereas EPO is considered as an inhibiting factor. Hepcidin insufficiency which contributes to iron overload, has been observed in various disorders (1). Remarkably, deferasirox can increase serum hepcidin concentration in iron-overloaded myelodysplastic syndrome patients (2). Nevertheless, it remains unclear how iron chelators modulate hepcidin production. The present study investigated the effect of L1 on *Hamp1* expression in association with LIC and serum EPO level in iron-overloaded C57BL/6 mice. We hypothesized that iron chelators may alter hepcidin production through the modulation of stimulating and/or inhibiting factors of *Hamp1* expression.

Materials and Methods

Eight-week old C57BL/6 mice were divided into 3 groups (5 mice each) including control (no treatment), iron overload, and L1 treatment after iron overload, respectively. Iron overload was produced by 1 mg/g/day iron dextran i.p. injection for 9 doses within 2 weeks. In L1-treated group, once daily 80 mg/kg L1 i.p. injection was started at three days after the last dose of iron and continued for 1 week. After completion of all treatment, mice were anesthetized by 60 mg/kg pentobarbital i.p. injection and whole blood was collected via cardiac puncture. Subsequently, the liver was removed.

Total LIC was measured by ferrozine method as previously described (3). The serum EPO was analyzed using EPO Mouse ELISA Kit (Abcam plc, Cambridge, UK). Real-time RT-PCR was used to determine mRNA expression: In brief, total liver RNA was isolated by Ultraclean Tissue & Cells RNA isolation kit (MO BIO Laboratories, CA, USA). Real-time RT-PCR was carried using SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (Life Technologies, CA, USA). A Relative mRNA quantification was achieved (4), choosing β -actin as a normalizer. Forward and reverse primers as follows: *Hamp1*, forward 5'-AGAGCTGCAGCCTTTGCAC-3' and reverse 5'-ACACTGGGAATTGTTACAGCATT-3'; β -actin, forward 5'-TCCTGGCC TCACTGTCCAC-3' and reverse 5'-GTCCGCCTAGAAGCACTTGC-3'.

Data were presented as mean $\pm$ SD. The mean differences were compared using Mann-Whitney *U* test. *P*-value < 0.05 was considered as statistically significant. All experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

Results

The data showed that iron overload significantly increased *Hamp1* mRNA expression (2.6-fold) and it was not changed after 1 week of L1 treatment (2.7-fold) (Figure 1). Likewise, unchanged LIC was also observed (14.4 ± 2.8 and 14.4 ± 2.6 mg/g liver in L1-treated and iron-overloaded mice, respectively). However, serum EPO concentration tended to decrease after L1 treatment (83.5 ± 72.8 and 244.8 ± 172.2 pg/mL in L1-treated and iron-overloaded mice, respectively) (Figure 2).

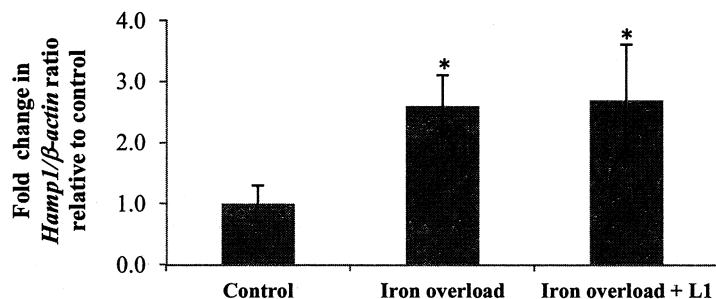


Figure 1. Relative *Hamp1* mRNA expressions in liver. Data are mean $\pm$ SD ($n = 5$). * $P < 0.01$ compare with control.

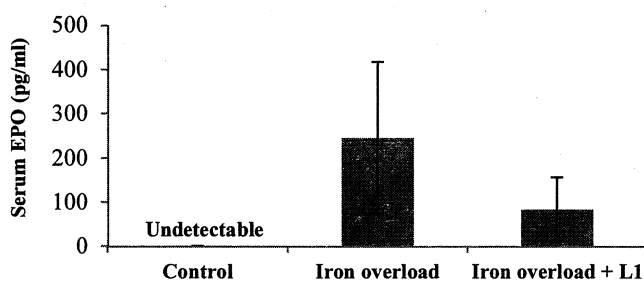


Figure 2. Serum EPO concentrations. Data are mean $\pm$ SD ($n = 5$). L1 tended to decrease serum EPO in iron-overloaded mice ($P = 0.056$).

Discussion

While several regulators of hepcidin gene expression have been introduced (1), we investigated the effect of L1 on two opposite regulators in iron-overloaded mice model; iron as a stimulator and EPO as an inhibitor for *Hamp1* expression. Normally, regulators of hepcidin gene expression should be in balance (2). Our results showed that iron overload significantly increased *Hamp1* expression even in the presence of elevated serum EPO. In this circumstance, the stimulatory effect of excessive iron may overcome the effect of inhibiting factors including EPO. We also demonstrated that 1 week of L1 treatment did not alter both *Hamp1* expression and LIC in iron overloaded-mice. However, it tended (but not significant) to decrease serum EPO level ($P = 0.056$). This finding is supported by previous report that described the effect of iron donor and iron chelator in arising and diminishing EPO production, respectively (5). As a consequence of its EPO-reducing propensity, apparent change of *Hamp1* expression might be observed in long-term L1 treatment.

Conclusion

Short-term L1 treatment did not affect *Hamp1* expression and LIC but rather tended to decrease serum EPO level in iron overloaded-mice. However, long-term L1 treatment is required to elucidate more prominent evidence.

Acknowledgements

This project is supported by Research Grant from the Thailand Research Funds and the Commission on Higher Education (RMU5480001); the Office of the Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research Universities Initiative and the Thalassemia Research Center Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University.

References

1. Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders: Therapeutic implications. *J Hepatol.* 2011; 54:173-81.
2. Ghoti H, Fibach E, Westerman M, Gordana O, Ganz T, Rachmilewitz EA. Increased serum hepcidin levels during treatment with deferasirox in iron-overloaded patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2011; 153:118-20.
3. Rebouche CJ, Wilcox CL, Widness JA. Microanalysis of non-heme iron in animal tissues. *J Biochem Biophys Methods.* 2004; 58:239-51.
4. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:e45.
5. Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2α expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol.* 2007; 14:420-6.

**P-E-66 EXPRESSION AND RELEASE OF HEPCIDIN IN MOUSE MODELS OF IRON OVERLOAD AND β -THALASSEMIA**

Wichiyo S¹, Yatmark P¹, Morales Vargas RE², Svasti S³, Fucharoen S³, Morales NP¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

²Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Bioscience, Mahidol University, Salaya Campus, Nakornphatom, Thailand

Email address: noppawan.phu@mahidol.ac.th

Iron overload and oxidative stress are associated with expression and release of hepcidin, a liver peptide hormone that regulates systemic iron homeostasis. In this study, effects of iron overload on liver expression of hepcidin gene (*Hamp1*) and serum level of hepcidin were investigated in C57BL/6 mice (WT) and a β -thalassemic mice model (β -knockout mice, BKO). Iron overload was induced by intraperitoneally injection of iron dextran for 3 weeks. Two weeks after the last dose, mice were sacrificed and blood was withdrawn by cardiac heart puncture. Liver expression of *Hamp1* was assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Serum concentration of hepcidin was determined by ELISA technique. The results showed that iron overloading enhanced *Hamp1* expression in both WT and BKO mice. On the other hand, serum concentration of hepcidin was decreased. This controversy may be precipitated by post-transcription process of hepcidin. Our study also showed that gene expression of a pro-protein convertase, furin, was also decreased in iron overloaded mice. Hence, the cleavage pro-hepcidin to active hepcidin may be disturbed. The results suggested that iron may implicate hepcidin regulation via transcription and post-transcription pathway.

Keywords: hepcidin, furin, iron overload, β -thalassemia



EXPRESSION AND RELEASE OF HEPCIDIN IN MOUSE MODELS OF IRON OVERLOAD AND THALASSEMIA

Wichiyo S¹, Yatmark P¹, Morales Vargas RE², Svasti S³, Fucharoen S³, Morales NP¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Science Mahidol University, ²Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok

³Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Bioscience, Mahidol University, Salaya Campus, Nakornphatom, Thailand

INTRODUCTION

Hepcidin is a 25 amino acid peptide hormone synthesized in hepatocytes as inactive pre-pro-hepcidin. Pro-hepcidin is cleaved by prohormone convertase, furin, to generate mature hepcidin. Hepcidin inhibits iron entry into the plasma compartment by regulation of an iron transporter, ferroportin that locates on plasma membrane of duodenum and macrophages.

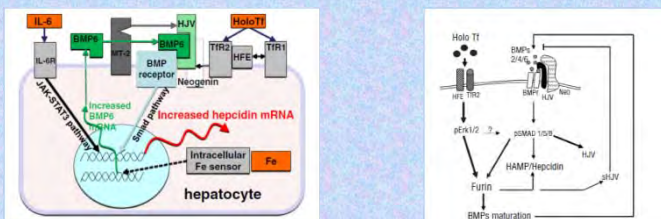


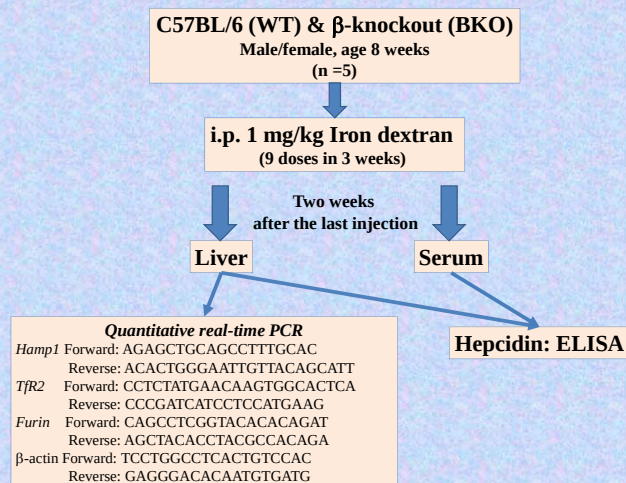
Figure 1: Iron-regulated pathway for hepcidin

There are 3 pathways for hepcidin regulation; iron-regulated pathway, inflammatory pathway and erythroid pathway. Figure 1 shows iron-regulated pathway in which bone morphogenetic protein receptor (BMPR) and its SMAD pathway are central regulatory mechanisms. Holotransferrin by binding to transferrin receptor 2, TfR2, induces Erk1/2 phosphorylation and induces furin expression. Furin participates in the maturation of hepcidin and BMP. Furin also produces the soluble HJV which has inhibitory effect on hepcidin expression.

OBJECTIVE

To study effects of intra-peritoneal injection of iron dextran on iron-regulated pathway of liver expression of hepcidin gene (*Hamp 1*) and hepcidin release to circulation in C57BL/6 (WT) and β -thalassemic mice model (β -knockout mice, BKO).

MATERIALS and METHODS



RESULTS

Iron overloading enhanced *Hamp 1* expression, approximately 2 fold, in both WT and BKO mice. Corresponding with *Hamp 1* expression, total liver hepcidin was significantly increased. However, serum hepcidin level was decreased in iron overloaded mice. Reduction of liver expression of *TfR2* and *furin* expression was observed.

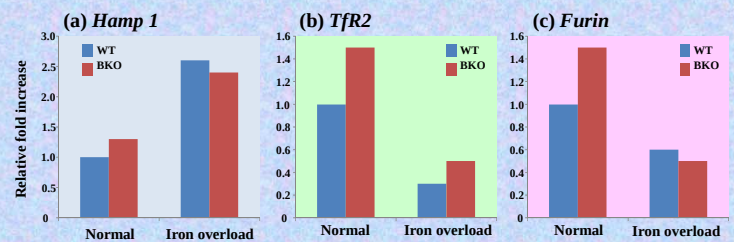


Figure 2: Liver expression of hepcidin, HAMP1 (a) transferrin receptor 2, TfR2 (b) and furin (c) in WT and BKO mice

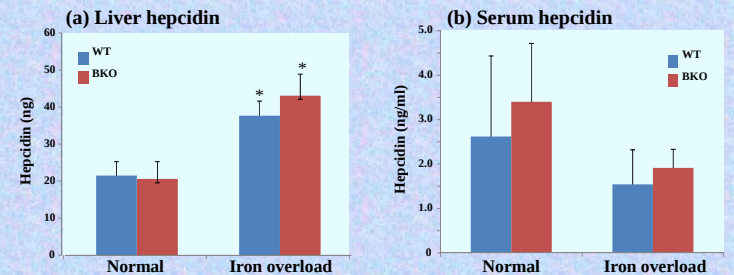


Figure 3: Total liver hepcidin (a) serum hepcidin (b) in WT and BKO mice

DISCUSSION and CONCLUSION

Intra-peritoneal iron loading caused an increased hepcidin gene expression that can be explained by the iron-regulated pathway. Reduction of gene expression of furin may result in decreased production of an inhibitor for hepcidin expression, soluble hemojuvelin (sHJV). In addition, furin acts as a pro-protein convertase. Hence, the cleavage of pro-hepcidin to active hepcidin and its release may be disturbed. The results suggested that iron may implicate hepcidin regulation via transcription and post-transcription processes.

References

- Ganz T and Nemeth E. Hematology 2011; 538-542.
- Poli M, Luscent S, Gandini V, et al. Haematologica 2010; 95: 1832-1840.
- Scamuffa N, Basak A, Lalou C, et al. Gut 2008; 57: 1573-1582.

Acknowledgements

This project is supported by Research Grant from the Thailand Research Funds and the Commission on Higher Education (RMU5480001); the Office of the Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research Universities Initiative and the Thalassemia Research Center Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University.

Effects of Iron Overload on Hepcidin Synthesis in β -Thalassemic Mice

Morales, N. P.^{1*}, Wichaiyo, S.¹, Yatmark, P.¹, Morales Vargas, R. E.²,
Sanvarinda, P.¹, Svasti, S.³, Fucharoen, S.³

¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

²Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus,
Nakorn Pathom, Thailand

Abstract

Hepcidin plays a key role in the regulation of systemic iron homeostasis. Erythropoietic activity and iron signaling via transferrin receptor 2 (*TfR2*) are the major regulators in anemia with iron overload condition such β -thalassemia. In addition, furin, a convertase enzyme, is important for hepcidin maturation. This study aimed to investigate the changes of gene expression hepcidin (*Hamp1*) and its regulators, in C57BL/6 mice (WT) and β -knockout mice (BKO) with iron overload. Iron overload was induced by intraperitoneally (i.p.) injection of iron dextran for 2 weeks, and following by i.p. injection of deferoxamine (125 mg/kg) or deferiprone (80 mg/kg) for 7 days in order to evaluate their effects on hepcidin production. Comparing with WT, BKO mice showed a slightly increase (1.4 fold) in *Hamp1* expression, corresponding with increased levels of liver and serum hepcidin. Elevated erythropoietin (EPO), *TfR2* and *furin* expression was observed in BKO. Although iron overload caused a significant increase in *Hamp1* expression in WT (2.5 fold), it had a slightly effect in BKO (< 1 fold). Moreover, levels of hepcidin in liver and serum were also decreased in iron overload condition. Down-regulation of *TfR2* and *furin* may contribute in such consequences. Treatment with deferoxamine and deferiprone did not affect hepcidin synthesis. In conclusion, both quantity and furin-mediated biological activity of hepcidin may be diminished in iron overload circumstance.

Keywords: deferoxamine, deferiprone, furin, hepcidin, iron overload, thalassemia

*Corresponding author.

Tel.: 0-2201-5507; Fax: 0-2354-7157

E-mail: noppawan.phu@mahidol.ac.th