

Thesis Title	Effect of Curcuminoids on Iron Overload in β -Thalassemic Mice	
Author	Miss Chonthida Thephinlap	
Degree	Doctor of Philosophy (Biochemistry)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool	Chairperson
	Prof. Suthat Fucharoen, M.D.	Member
	Dr. Chada Phisalaphong	Member
	Prof. Dr. Nipon Chattipakorn, M.D.	Member

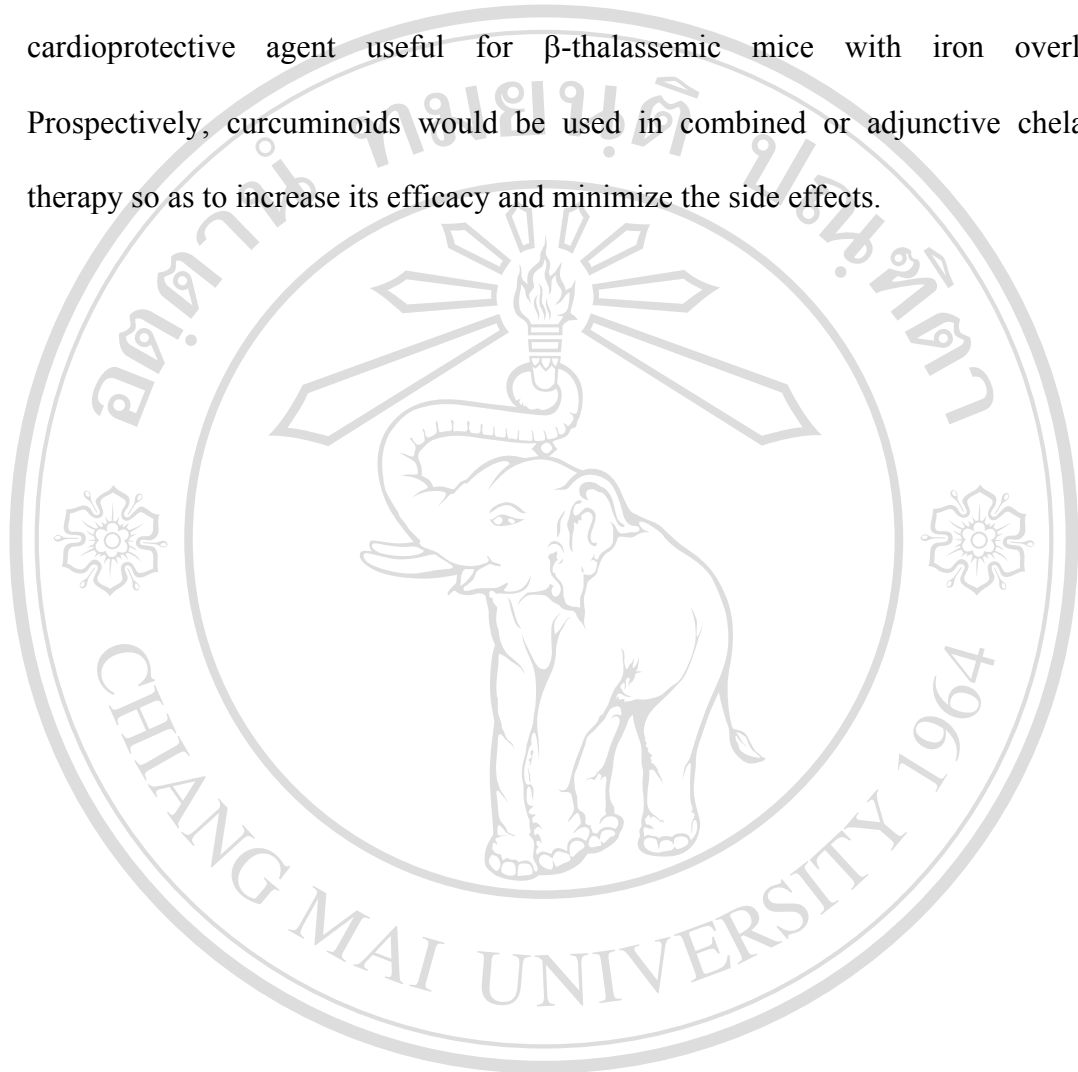
ABSTRACT

Iron overload is commonly found in blood transfusion-dependent β -thalassemia patients. Excessive iron can catalyze generation of free radicals, leading to damage of biomolecules and malfunctions of many organs. Non-transferrin-bound iron (NTBI) is all forms of iron in thalassemia plasma that are bound to ligands other than transferrin. It is a highly toxic, labile iron and potentially causes oxidative biomolecule and tissue damage. Cardiac siderosis and complications are the major cause of sudden death in β -thalassemia major patients. Desferrioxamine (DFO),

deferiprone (DFP) and deferasirox (DFX) are promising iron chelators used for treatment of iron overload; however, they cause adverse effects. Curcuminoids (CUR) from *Curcuma longa* L. tumeric has many biological activities, anti-oxidative and metal ion chelating properties of the CUR are challenging. This study purposed to investigate the effect of CUR on iron overload in β -thalassemic mice. Iron-binding activity of the CUR and tetrahydrocurcumin (THC) was examined using spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic (HPLC) techniques. Iron-chelating capacity of the CUR was studied in wild type ($^{\text{mu}}\beta^{+/+}$) and heterozygous β -knockout ($^{\text{mu}}\beta^{\text{th-/+}}$) mice (C57BL/6 strain), which received ferrocene-supplemented diet (FE diet) together with treatments of CUR (200 mg/kg) and DFP (50 mg/kg) for 2 months. Biochemical, electrophysiological and histochemical analyses were performed in the treated mice.

Apparently, ferric ion (Fe^{3+}) interacted with the CUR and THC to form a Fe^{3+} - (CUR) product (λ_{max} at 510 nm.) and Fe^{3+} -(THC)₂ product (λ_{max} at 420 nm.) respectively in a dose-dependent manner. Plasma NTBI was dramatically decreased by these compounds. FE diet elevated blood hemoglobin levels slightly, plasma NTBI and MDA concentrations significantly of the WT and BKO mice. The FE diet increased non-heme iron, MDA and ferritin levels, but lowered total glutathione concentration in livers of the iron-loaded mice. Perl's staining result showed high iron accumulations in liver, heart and spleen tissues of the FE diet-fed mice. Obviously, CUR and DFP treatments lowered the increasing of plasma NTBI and MDA levels of the iron-loaded mice. The compounds reduced levels of non-heme iron, ferritin and MDA, but increased levels of total glutathione in livers of the mice. Heart rate variability (HRV) was depressed in the FE diet-fed mice; nonetheless, the

CUR and DFP treatments were able to improve the depressed HRV. The results imply that CUR could be an effective iron-chelating, free-radicals scavenging and cardioprotective agent useful for β -thalassemic mice with iron overload. Prospectively, curcuminoids would be used in combined or adjunctive chelation therapy so as to increase its efficacy and minimize the side effects.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของสารเคอร์คูมินอยด์ต่อภาวะเหล็กเกินในหนูทดลองธาลัสซีเมียชนิดบีตา	
ผู้เขียน	นางสาวชลธิชา เทพหินลับ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล	ประธานกรรมการ
	ศ. นพ. สุทัศน์ ฟูเจริญ	กรรมการ
	ดร. ชญา พิศาลพงศ์	กรรมการ
	ศ. ดร. นพ. นิพนธ์ นัตริพิทากร	กรรมการ

บทคัดย่อ

ภาวะเหล็กเกินพบได้บ่อยในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีตาที่ได้รับการเติมเลือดเป็นประจำ ปริมาณธาตุเหล็กมากเกินสามารถเร่งการสร้างอนุมูลอิสระซึ่งนำไปสู่การทำลายสารชีวโมเลกุลและการทำหน้าที่ผิดปกติของอวัยวะต่างๆ ธาตุเหล็กรูปที่ไม่จับกับทรานสเฟอร์รินเป็นเหล็ก (non-transferrin bound iron, NTBI) คือธาตุเหล็กทุกรูปในพลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่จับอยู่กับลิแกนด์อื่น ๆ นอกเหนือจากโปรตีนทรานสเฟอร์ริน ธาตุเหล็กนี้สลายตัวง่ายมีความเป็นพิษสูงรวมทั้งสามารถออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุลและทำลายเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ ภาวะเหล็กสะสมมากเกินไปและอาการแทรกซ้อนที่หัวใจเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตทันทีทันใดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีตามะเร็งเตสเฟอร์หรืออกซามีน ดีเฟอริโพรน และดีเฟอราซิรอกเป็นยาขับเหล็กที่ใช้รักษาภาวะเหล็กเกิน อย่างไรก็ตามยาเหล่านี้ทำให้เกิดฤทธิ์ข้างเคียงขึ้นได้ สารเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids, CUR) สกัดได้จากหัวขมิ้นชัน (*Curcuma Longa* L.) ที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยาหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและจับโลหะเป็นสิ่งที่ท้าทาย การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจสอบผลของเคอร์คูมินอยด์ต่อภาวะเหล็กเกินในหนูทดลองธาลัสซีเมียชนิดบีตา ทำการศึกษาฤทธิ์การจับเหล็กของเคอร์คูมินอยด์และเตทระไฮโดรเคอร์คูมิน (Tetrahydrocurcumin, THC) ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรีและโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง ส่วนการศึกษาความสามารถขับเหล็กของเคอร์คูมินอยด์ทำโดย

ให้หนูทดลองสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่เกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดบีตากินอาหารเสริมธาตุเหล็กเฟอโรโรซินเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินขึ้นแล้วทำการรักษาโดยให้กินเคอร์คูมินอยด์ (200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และดีเฟอริโพรน (50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) เป็นเวลานาน 2 เดือน แล้วตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมี สรีรวิทยาทางไฟฟ้าและเนื้อเยื่อวิทยา

ธาตุเหล็กในรูปเฟอรัริกจับกับเคอร์คูมินอยด์และเตตระไฮโดรเคอร์คูมินได้ในลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณ ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+} -(CUR) และ Fe^{3+} -(THC)₂ ที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 510 และ 420 นาโนเมตรตามลำดับ สารสองชนิดนี้สามารถลดปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI จากพลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีตาได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อหนูทดลองกินอาหารเสริมธาตุเหล็กเข้าไปมีผลทำให้ระดับฮีโมโกลบินในเลือดสูงขึ้นเล็กน้อย ปริมาณธาตุเหล็กรูป NTBI และมาลอนไดอิลดีไฮด์ในพลาสมาเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณธาตุเหล็กและเฟอร์ิตินในเนื้อเยื่อตับเพิ่มมากขึ้น แต่ความเข้มข้นสารกลูตาไธโอนรวมในเนื้อเยื่อตับลดลง ผลการข้อมเนื้อเยื่อตับ หัวใจและม้ามของหนูที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็กด้วยสี่ข้อมพิเศษพบว่ามีปริมาณเหล็กสะสมเพิ่มมากขึ้น การรักษาด้วยเคอร์คูมินอยด์และดีเฟอริโพรนมีผลทำให้ระดับธาตุเหล็กรูป NTBI และมาลอนไดอิลดีไฮด์ในพลาสมาลดลง ปริมาณธาตุเหล็ก เฟอร์ิตินและมาลอนไดอิลดีไฮด์ในเนื้อเยื่อตับลดลง และปริมาณสารกลูตาไธโอนรวมในเนื้อเยื่อตับเพิ่มสูงขึ้น อาหารเสริมธาตุเหล็กกดค่า heart rate variability (HRV) ในหนูสองสายพันธุ์ การรักษาด้วยเคอร์คูมินอยด์และดีเฟอริโพรนช่วยเพิ่มค่า HRV ได้

ผลการศึกษาเหล่านี้เชื่อได้ว่าเคอร์คูมินอยด์มีสัมฤทธิ์ผลในการจับเหล็ก ทำลายอนุมูลอิสระและปกป้องหัวใจซึ่งเป็นประโยชน์กับหนูธาลัสซีเมียชนิดบีตาที่มีภาวะเหล็กเกิน สำหรับการศึกษาต่อไป เคอร์คูมินอยด์ควรจะถูกนำมาใช้ร่วมกับยาขับเหล็กมาตรฐานเพื่อช่วยเพิ่มสัมฤทธิ์ผลของยาขับเหล็กและลดฤทธิ์ข้างเคียงของยาขับเหล็กที่เกิดขึ้น