

Abstract

Project Code : MRG5680059

Project Title : Effects of iron chelators on the expression of iron transport machineries in the duodenum of iron-loaded thalassemic mouse models

Investigator : Patarabutr Masaratana
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine Siriraj Hospital,
Mahidol University

E-mail Address : patarabutr.mas@mahidol.ac.th

Project Period : June 2013 – May 2016

Executive summary:

Background: Thalassemia, one of the global health problems, is caused by mutations of genes encoding adult globin chains resulting in reduced globin synthesis and imbalance between α and non- α globin chains in erythroid cells. One of the major life-threatening complications of thalassemia is iron overload caused by increased iron absorption and/or blood transfusion. Iron chelators have therefore been used to reduce tissue iron deposition. In thalassemia, the expression of iron regulatory peptide, hepcidin, is affected by several regulators including iron loading and ineffective erythropoiesis. However, the expression of iron transport machineries in the duodenum is not only regulated by systemic signal through hepcidin but also by cellular iron status. It is noteworthy that iron status of enterocytes as well as the response of duodenal iron transport machineries to iron chelation and iron loading have not been fully elucidated.

Materials and methods: Male wild type C57BL/6J and th3/+ (BKO; thalassemia mouse model) mice aged 7 weeks old were given intramuscular injection of 5 mg iron dextran for 2 consecutive days. After 2-week equilibration, the mice were administered deferoxamine (DFO) intraperitoneally or deferiprone (DFP; L1) orally for 14 days. Saline injection was used as control. The mice were sacrificed 24 hours after the last dose of the iron chelator. Liver non-heme iron levels were spectrophotometrically measured by ferrozine-based assay. The expression of hepcidin and iron transport machineries was studied by real-time PCR.

Results and discussion: Thalassemia phenotype of BKO mice was confirmed by complete blood count and spleen non-heme iron measurement, however, only substantial changes in liver iron status and hepcidin mRNA expression were noted. Increased mRNA expression of duodenal iron transport machineries, Dcytb and hephaestin, were also observed. Interestingly, wild type and BKO mice displayed differential responses to iron dextran injection. Remarkably increased iron levels were found in liver, spleen and serum of wild type mice, whereas, only spleen non-heme iron levels were affected in BKO mice. Further studies on the expression of iron transporters in duodenum, liver and spleen demonstrated significantly suppressed Dcytb and hephaestin mRNA levels in the duodenum of BKO mice upon iron dextran administration which might be responsible for the lack of iron accumulation in the serum and liver of these mice. In the present study, iron chelation regimens failed to reduce iron loading in both phenotypes. Indeed, serum iron and spleen non-heme iron levels were increased in BKO mice treated with iron chelators suggesting that inadequate chelation might potentially aggravate iron loading in some compartments. However, possible mechanisms underlying such responses remain to be elucidated as iron transporter mRNA expression and duodenal iron status were comparable across all groups. It is speculative that these mechanisms are hepcidin-independent as hepcidin mRNA expression was unaffected by parenteral iron loading or iron chelation.

Keywords : thalassemia, iron, ferroportin, iron chelation, iron overload

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5680059

ชื่อโครงการ : โครงการศึกษาอิทธิพลของยาขับเหล็กต่อการแสดงออกของกลไกในการดูดซึมธาตุเหล็กในลำไส้เล็กส่วนต้นของหนูทดลองธาลัสซีเมียที่มีธาตุเหล็กเกิน

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.นพ.ภัทรบุทร มาศรีตัน
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : patarabutr.mas@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : มิถุนายน 2556 – พฤษภาคม 2559

บทสรุป:

ข้อมูลพื้นฐาน: ธาลัสซีเมียเป็นความผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของสายโกลบินของผู้ใหญ่ ส่งผลให้ร่างกายสังเคราะห์โกลบินได้ลดลง จนนำไปสู่ความไม่สมดุลระหว่างอัลฟาโกลบินและน็อนอัลฟาโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดงอ่อน ภาวะเหล็กเกินเป็นภาวะแทรกซ้อนที่เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตที่สำคัญประการหนึ่งในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยร่างกายจะได้รับเหล็กเกินผ่านการดูดซึมเหล็กที่เพิ่มขึ้นและ/หรือการได้รับเลือด ซึ่งในทางเวชปฏิบัติได้มีการให้ยาขับเหล็กแก่ผู้ป่วยเพื่อลดปริมาณเหล็กที่สะสมในเนื้อเยื่อต่างๆ หนึ่งในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย การแสดงออกของเฮปซิดิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทหลักในการรักษาสมดุลธาตุเหล็กจะอยู่ภายใต้อิทธิพลของปัจจัยต่างๆหลายปัจจัยรวมถึง ภาวะเหล็กเกิน และ ineffective erythropoiesis อย่างไรก็ตามการแสดงออกของโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการขนส่งธาตุเหล็กที่ลำไส้เล็กส่วนต้นยังอาจถูกควบคุมโดยปริมาณธาตุเหล็กในเซลล์ซึ่งเป็นปัจจัยเฉพาะที่นอกเหนือไปจากเฮปซิดินซึ่งเป็นปัจจัยในระดับร่างกาย โดยการศึกษาที่ผ่านมายังขาดข้อมูลเกี่ยวกับสถานะของธาตุเหล็กในเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กส่วนต้น ตลอดจนการตอบสนองของกลไกในการดูดซึมธาตุเหล็กต่อภาวะเหล็กเกิน หรือการได้รับยาขับเหล็กแต่อย่างใด

การดำเนินการทดลอง: ในการศึกษาี้ หนูทดลอง wild type สายพันธุ์ C57BL/6J และหนูธาลัสซีเมีย *th3/+* (BKO) เพศชาย อายุ 7 สัปดาห์ได้รับการฉีดเหล็กในรูปของสารละลาย iron dextran ทางกล้ามเนื้อ วันละ 5 มิลลิกรัม เป็นเวลา 2 วันติดต่อกัน โดยกลุ่มควบคุมได้รับสารละลาย saline ในปริมาณที่เท่ากัน สองสัปดาห์หลังได้รับเหล็ก หนูทดลองจะได้รับยาขับเหล็ก deferoxamine (DFO) เข้าสู่ช่องท้อง หรือ deferiprone (DFP; L1) ทางปาก ทุกวันเป็นเวลา 14 วัน โดยมีการเก็บตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อที่ 24 ชั่วโมงหลังการให้ยาขับเหล็กครั้งสุดท้ายเพื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็ก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแสดงออกของเฮปซิดินและโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการขนส่งธาตุเหล็กด้วยวิธี real-time PCR

ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการศึกษา: พิโนไทป์ของธาลัสซีเมียในหนูทดลองได้รับการยืนยันโดยการวิเคราะห์ complete blood count และปริมาณ non-heme iron ในม้าม อย่างไรก็ตาม พบว่าหนูทดลองธาลัสซีเมียมีระดับการส่งออกของเฮปซิดินและปริมาณ non-heme iron ในตับเพิ่มขึ้นจากหนูทดลองปกติเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ลำไส้เล็กส่วนต้นของหนูดังกล่าวยังมีการส่งออกที่ระดับอาร์เอ็นเอของ Dcytb และ hephaestin ซึ่งมีบทบาทร่วมในการดูดซึมธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นอีกด้วย หนึ่งหนูทดลองธาลัสซีเมียและหนูทดลองปกติมีการตอบสนองต่อการได้รับเหล็กในรูปแบบ iron dextran ที่แตกต่างกัน โดยการบริหารเหล็กในหนูทดลองปกติส่งผลให้ปริมาณธาตุเหล็กในซีรัม ตลอดจน non-heme iron ในตับและม้ามเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่หนูทดลองธาลัสซีเมียจะมีการเพิ่มขึ้นเฉพาะของ non-heme iron ในม้ามเท่านั้น จากการศึกษาการส่งออกของโมเลกุลที่มีบทบาทในการขนส่งธาตุเหล็กในลำไส้เล็กส่วนต้น, ตับ และม้าม พบว่าหนูธาลัสซีเมียที่ได้รับ iron dextran มีระดับอาร์เอ็นเอของ Dcytb และ hephaestin ในลำไส้เล็กส่วนต้นลดน้อยลง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้หนูกลุ่มดังกล่าวไม่ได้มีปริมาณธาตุเหล็กในซีรัมและตับเพิ่มขึ้นแม้จะได้รับเหล็กในรูปแบบ iron dextran ก็ตาม ทั้งนี้มาตรการในการบริหารยาขับเหล็กในการศึกษานี้ไม่สามารถลดปริมาณเหล็กที่เกินในหนูทดลองทั้งหนูปกติและหนูธาลัสซีเมียได้ นอกจากนี้หนูธาลัสซีเมียยังมีระดับธาตุเหล็กในซีรัมและปริมาณ non-heme iron ในม้ามเพิ่มสูงขึ้นหลังได้รับยาขับเหล็กอีกด้วย ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าการได้รับยาขับเหล็กในขนาดและระยะเวลาที่มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการลดปริมาณเหล็กที่เกินในร่างกาย อาจส่งผลให้มีธาตุเหล็กสะสมเพิ่มมากขึ้นในบาง compartment ของร่างกาย สำหรับกลไกที่เป็นสาเหตุของการตอบสนองดังกล่าวในหนูธาลัสซีเมียนั้นยังคงต้องได้รับการศึกษาต่อไปในอนาคต เนื่องจากไม่พบว่าการได้รับยาขับเหล็กมีผลต่อปริมาณเหล็กในลำไส้เล็กส่วนต้นหรือการส่งออกในระดับอาร์เอ็นเอของโมเลกุลที่มีบทบาทในการขนส่งธาตุเหล็กแต่อย่างใด ทั้งนี้ในเบื้องต้นคาดว่ากลไกดังกล่าวไม่ต้องอาศัยเฮปซิดินเนื่องจากหนูทดลองทุกกลุ่มมีระดับการส่งออกของเฮปซิดินไม่แตกต่างกัน

คำหลัก : ธาลัสซีเมีย, ธาตุเหล็ก, ferroportin, ยาขับเหล็ก, ภาวะเหล็กเกิน