

Thesis Title	Investigation of <i>In vitro</i> Effects of Deferiprone and Curcumin on Iron Status and Oxidative Stress in End-Stage Renal Disease Patients on Regular Hemodialysis	
Author	Miss Wachiraporn Tipsuwan	
Degree	Master of Science (Biochemistry)	
Thesis Advisory Committee	Lect. Dr. Somdet Srichairatanakool	Chairperson
	Lect. Dr. Yuttana Munde	Member
	Dr. Derek Bunnachak	Member

ABSTRACT

Incidence of iron overload is increasingly found in end-stage renal disease (ESRD) patients on regular hemodialysis. This condition is probably caused by erythropoietin (EPO) unresponsiveness accompanied with iron administration or by blood transfusions. Excessive iron promotes the formation of reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative stress and damage of biomolecules, tissues and organs. This adverse effect threatens their lives in many ways. Non-transferrin bound iron (NTBI) occurs in patients' plasma where transferrin is fully or almost saturated. Iron chelation is an effective treatment for removing such excessive iron burden in the human body. Deferiprone (DFP) is an effective oral iron chelator widely used alone or in combination with other compounds for treatment of iron-overload patients; nevertheless, it causes many adverse effects. Curcumin from *Curcuma longa* L. has anti-inflammatory, free radical scavenging and iron-chelating properties.

This study was aimed to investigate the oxidative stress and iron status in the ESRD patients on regular hemodialysis. Effectiveness of NTBI removal was examined in both *in vivo* and *in vitro* hemodialysis. Free-radical scavenging and iron-chelating properties of curcumin were also determined *in vitro*. In this study, ESRD patients (n=110) on regular hemodialysis were recruited and divided into two

groups. Group I (n=103) was the patients who had been administered with EPO injection and iron formulation (ESRD-E), and Group II (n=7) was the patients who had received intermittent blood transfusion (ESRD-T). The amount of ROS was measured in dichlorofluorescein (DCF)-labelled red blood cells using the flow cytometry, plasma NTBI was quantified using the NTA chelation/HPLC technique.

The result showed that all ESRD patients were anemic while their iron status was deficient, normal and overloaded. Oxidative stress was higher in ESRD-E erythrocytes than in ESRD-T erythrocytes. NTBI was detectable in some ESRD-E patients and nearly all ESRD-T patients. Plasma malondialdehyde level in ESRD-T was slightly higher than ESRD-E. Curcumin at 100 μM counteracted the increase of ESRD erythrocytes incubated with Fe^{2+} -EDTA and hydrogen peroxide. Interestingly, curcumin dose-dependently bound ferric nitrate as well as ferric citrate to form the colored complex giving a predominant absorption at 500 nm. Curcumin in the presence of 100 μM DFP reduced NTBI concentrations in plasma of ESRD patients. Not only *in vivo* but also *in vitro* hemodialysis got rid of plasma NTBI fairly well, and DFP promoted the NTBI removal during *in vitro* hemodialysis.

In conclusion, oxidative stress and iron status in anemic ESRD patients was varied. NTBI was partially lost during hemodialysis, and increasingly removed when DFP was included in blood samples. Curcumin exhibited both free-radical scavenging and iron-chelating activities.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การตรวจวัดผลในหลอดทดลองของดีเฟอรัโรโพรนและเคอร์คิวมินต่อภาวะธาตุเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสในผู้ป่วยไตวายระยะสุดท้ายที่ได้รับการฟอกเลือดเป็นประจำ	
ผู้เขียน	นางสาวชริราภรณ์ ทิพย์สุวรรณ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล	ประธานกรรมการ
	อ. ดร. ยุทธนา หมั่นดี	กรรมการ
	อ. คิเรก บรรณจักร์	กรรมการ

บทคัดย่อ

อุบัติการณ์ภาวะธาตุเหล็กเกินพบได้มากขึ้นเรื่อยๆ ในผู้ป่วยโรคไตวายระยะสุดท้ายที่ได้รับการฟอกเลือดเป็นประจำ ซึ่งน่าจะมีสาเหตุจากการที่ผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการฉีดกระตุ้นด้วยฮอรัโมนอีรีโพรพอยดีนร่วมกับการได้รับธาตุเหล็กหรือจากได้รับการเติมเลือด ปริมาณธาตุเหล็กที่มากเกินไปสามารถช่วยส่งเสริมให้มีการสร้างอนุมูลอิสระกลุ่มธาตุออกซิเจนในปริมาณที่มากขึ้นกว่าปกติ ก่อให้เกิดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสที่สามารถทำลายสารชีวโมเลกุล เนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ในร่างกายได้ ซึ่งผลดังกล่าวนี้ทำให้มีอายุสั้นลง ธาตุเหล็กรูปที่ไม่ได้จับกับทรานส์เฟอร์รินเกิดขึ้นได้ในพลาสมาของผู้ป่วยหลายกลุ่ม ซึ่งทรานส์เฟอร์รินมีความอิมมิตัวสูงด้วยธาตุเหล็ก การบำบัดด้วยยาขับเหล็กเป็นการรักษาวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดธาตุเหล็กจำนวนมากที่สะสมในร่างกายมนุษย์ ดีเฟอรัโรโพรนเป็นยาขับเหล็กชนิดรับประทานที่มีประสิทธิภาพที่เลือกใช้เพียงชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับยาตัวอื่นเพื่อรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะเหล็กเกิน อย่างไรก็ตามยานี้มีฤทธิ์ที่ไม่พึงประสงค์หลายอย่าง เคอร์คิวมินเป็นสารที่พบในพืชตระกูล *Curcuma longa* L. มีคุณสมบัติด้านการอักเสบ กำจัดอนุมูลอิสระและจับธาตุเหล็กได้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสและภาวะธาตุเหล็กในผู้ป่วยโรคไตวายระยะสุดท้ายที่ได้รับการฟอกเลือดเป็นประจำ เพื่อศึกษาสัมฤทธิ์ผลในการกำจัดธาตุเหล็กรูปที่ไม่ได้จับกับทรานส์เฟอร์ริน โดยวิธีการฟอกเลือด และเพื่อตรวจคุณสมบัติของเคอร์คิวมินในการกำจัดอนุมูล

อิสระและจับธาตุเหล็ก โดยใช้ผู้ป่วยทั้งหมด 110 รายซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 103 ราย เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการฉีดฮอร์โมนอิริโทรพอยตินร่วมกับการรับประทานธาตุเหล็ก กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 7 ราย เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการเติมเลือดร่วมกับการรับประทานธาตุเหล็ก ทำการวัดอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงโดยวิธีโฟลซัยโตเมทรีและวัดปริมาณธาตุเหล็กในรูปที่ไม่ได้จับกับทรานสเฟอร์รินโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีฟลูออโรเมตริก

ผลการทดลองพบว่าผู้ป่วยไตวายระยะสุดท้ายมีภาวะโลหิตจางโดยระดับธาตุเหล็กที่พบได้ทั้งภาวะธาตุเหล็กต่ำ ปกติและภาวะธาตุเหล็กเกิน นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการฉีดฮอร์โมนอิริโทรพอยตินสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการฉีดการเติมเลือด ปริมาณธาตุเหล็กที่ไม่ได้จับกับทรานสเฟอร์รินพบได้ในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม ระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการเติมเลือดมีระดับสูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการฉีดฮอร์โมนอิริโทรพอยติน เคอร์คิวมินความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สามารถลดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยไตวายระยะสุดท้ายที่บ่มกับสารละลายเหล็กเฟอร์รัสและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินสามารถจับกับเฟอร์ริกไนเตรตและเฟอร์ริกซิเตรตเป็น โมเลกุลที่ซับซ้อนวัดได้ที่ค่าดูดกลืนแสง 500 นาโนเมตรในลักษณะแปรผันตามความเข้มข้น เคอร์คิวมินความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์สามารถลดระดับปริมาณธาตุเหล็กที่ไม่ได้จับกับทรานสเฟอร์รินได้ในผู้ป่วยไตวายระยะสุดท้ายทั้งในการฟอกเลือดสภาวะจริงและในหลอดทดลอง

โดยสรุปพบว่าภาวะออกซิเดทีฟสเตรสและปริมาณธาตุเหล็กในผู้ป่วยไตวายระยะสุดท้ายมีหลากหลาย ปริมาณธาตุเหล็กที่ไม่ได้จับกับทรานสเฟอร์รินสามารถลดลงได้ระหว่างการฟอกเลือดและจะลดลงได้ดียิ่งขึ้นเมื่อมีดีเฟอร์ริโพรนร่วมด้วย นอกจากนี้เคอร์คิวมินยังมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระและจับธาตุเหล็ก