



รายงานฉบับสมบูรณ์

(รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2550 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2553)

โครงการ: ศักยภาพของสารเคเตชินจากชาเขียวที่ช่วยลดปริมาณสารประกอบธาตุเหล็กกรดออกซ์
ในเซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหลอดทดลองและสิ่งมีชีวิต

นายสมเดช ศรีชัยรัตนกุล

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(สถาบันของหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(งานวิจัยยังไม่เสร็จสมบูรณ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง)

สัญญาเลขที่ RMU5080074

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

(รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2550 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2553)

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) ศักยภาพของสาร catechins จากชาเขียวที่ช่วยลดปริมาณสารประกอบธาตุเหล็กที่
ดกซึ้นในเซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหลอดทดลองและสิ่งมีชีวิต

(ภาษาอังกฤษ) Green Tea Catechins Potentially Reduce Labile Iron Pools in Hepatocytes
and Cardiomyocytes in vitro and in vivo

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

รศ.ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ศ.นพ. สุทัศน์ พุฒเจริญ ศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล
มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

ศ.ดร. โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Acknowledgement (กิตติกรรมประกาศ)

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) ผู้สนับสนุนงบประมาณให้ “ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษา” เป็นเวลา 3 ปี พร้อมกราบขอบพระคุณ ศ.นพ. สุทัศน์ ฟูเจริญ และ ศ.ดร. โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์ เมธีวิจัยอาวุโส สวก. ทั้งสองท่านนี้เป็นอย่างสูงที่ทำหน้าที่เป็นนักวิจัยพี่เลี้ยงที่ดีเยี่ยมในด้านให้คำแนะนำ ชี้แนะ สร้างโจทย์วิจัยและช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างทำการศึกษาวิจัยตลอดเวลา ผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนทุนค่าลิขสิทธิ์จากศูนย์วิจัยเซลล์ชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล ได้รับการฝึกอบรมปฏิบัติการและอนุเคราะห์สารเคมีจำเป็นบางอย่างในการศึกษาวิจัยด้าน oxidative stress และ red blood cell survival จาก ศ.ดร. โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ดำเนินการตรวจสอบและให้การรับรองขอเสนอจรรยาบรรณการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของหน่วยสัตว์ทดลองของคณะแพทยศาสตร์ทุกท่านที่ช่วยดูแลและให้ความอนุเคราะห์สถานที่เลี้ยงหนูทดลองช่วงระหว่างการศึกษาทดลอง ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือและวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งนางสาวสินีนาง สันติธีรากุล นักวิจัยของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เอื้ออำนวยความสะดวกและสอนวิธีการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูงหลายอย่างในศูนย์เครื่องมือ ทำให้ได้ข้อมูลวิเคราะห์ที่มีคุณค่า

งานวิจัยนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ได้โดยผ่านการผลักดัน สนับสนุนและให้กำลังใจจาก รศ.ดร. พรงาม เดชเกรียงไกรกุล หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ทั้งในด้านให้ความสะดวกในการห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ (ศาสตราจารย์ นพ. บริบูรณ์ พรพิบูลย์) และด้านการบริหารจัดการ

สุดท้ายนี้กระผมขอขอบคุณนักวิจัยอาวุโสและผู้ทรงคุณวุฒิที่มีชื่อเสียงหลายท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ รวมทั้งผู้ช่วยวิจัยและนักศึกษาระดับปริญญาโท-เอก สังกัด Iron Lab ผู้ซึ่งมีส่วนร่วมอย่างมากและแท้จริงในงานวิจัยที่มีคุณค่าและมีประโยชน์ชิ้นนี้เป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณเป็นอย่างสูง



รศ.ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU5080074
ชื่อโครงการ: ศักยภาพของสารเคเตชินจากชาเขียวที่ช่วยลดปริมาณสารประกอบธาตุเหล็กรีดอกซ์ในเซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหลอดทดลองและสิ่งมีชีวิต
ชื่อนักวิจัย: รศ.ดร. สมเดช ศรีชัยรัตน์กุล
สถานที่ทำงาน: ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อีเมล: ssrichai@med.cmu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (กรกฎาคม 2550 – มิถุนายน 2553)

ความรู้พื้นฐาน: ภาวะเหล็กเกินแบบทุติยภูมิพบได้บ่อยครั้งในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีตาที่ได้รับการเติมเลือดเป็นประจำและแสดงให้เห็นธาตุเหล็กในรูปแบบที่เป็นพิษคือ NTBI ในพลาสมา การทำลายเซลล์และไมโทคอนเดรียสามารถเกิดขึ้นได้จากธาตุเหล็กในรูปแบบ LIP ในเซลล์ที่เป็นตัวเร่งการสร้างกลุ่มสาร ROS เซลล์ตับของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีระดับสาร LIP และ ROS สูงกว่าเซลล์ตับคนปกติ ผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกินได้รับการรักษาด้วยยาขับเหล็กเดสเฟอริออกซามีน ดีเฟอริโพรนและดีเฟอราซิรอกเพื่อกำจัดเหล็กส่วนเกินออกจากร่างกายพร้อมด้วยสารแอนติออกซิแดนท์เช่นวิตามินอีเพื่อลดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในร่างกาย ซึ่งมีผลดีต่อสุขภาพหลายอย่าง สารเคเตชินจำพวก EGC, EC, C, EGCG และ ECG พบเป็นส่วนประกอบหลักในสารสกัดชาเขียว ที่สำคัญคือสารสกัดชาเขียวและสาร EGCG มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ยับยั้งการเกิดโรคมะเร็ง กำจัดสารพิษและขับเหล็กในหลอดทดลองและร่างกายสิ่งมีชีวิตได้

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาสมบัติของสารสกัดชาเขียวและสาร EGCG ต่อสถานะของธาตุเหล็กและภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในหนูทดลองปกติ WT หนูทดลองโรคธาลัสซีเมีย BKO และ DH และเซลล์ตับเพาะเลี้ยง รวมทั้งตรวจหาความเป็นพิษของสารทั้งสองนี้ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

วิธีทดลอง: ทำการเตรียมและตรวจวัดคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของตัวอย่างสารสกัดชาเขียวและสาร EGCG สำหรับใช้ตลอดการทดลอง เลี้ยงหนูทดลองด้วยอาหารเสริมธาตุเหล็กเฟอไรซินนาน 3 เดือนเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินแล้วป้อนหนูทดลองด้วยสารสกัดชาเขียวและสาร EGCG นานต่อไปอีก 3 เดือน ทำการตรวจวัดตัวชี้วัดสถานะธาตุเหล็ก (ได้แก่ NTBI, LIP, LIC และ tissue iron deposition) และภาวะออกซิเดทีฟสเตรส (ได้แก่กลูตาไธโอน ศักย์ไฟฟ้าบริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ROS และ MDA) รวมทั้งตรวจหาความเป็นพิษของสารทดสอบทั้งสองต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT dye

ผลการทดลอง: สารสกัดชาเขียวและสาร EGCG ช่วยลดระดับ NTBI และ MDA ในพลาสมา ROS ในเม็ดเลือดแดงและปริมาณเหล็กสะสมในตับ และเพิ่มระดับกลูตาไธโอนได้อย่างมีประสิทธิภาพในหนูที่มีภาวะเหล็กเกิน ผลการย้อมเนื้อเยื่อตับด้วยสีพิเศษแสดงให้เห็นว่ามีเม็ดเลือดขาวจำนวนมากเคลื่อนที่มาอยู่ตรงบริเวณเส้นเลือดดำใหญ่และมีการสะสมเหล็กจำนวนมากในเนื้อเยื่อตับของหนูที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก สารสกัดชาเขียวสาร EGCG สามารถลดการสะสมธาตุเหล็กในเนื้อเยื่อตับ ม้ามและหัวใจได้อย่างชัดเจน สารทดสอบทั้งสองนี้ยังช่วยลดระดับ LIP, ROS และค่าศักย์ไฟฟ้าบริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงที่มีภาวะเหล็กเกินได้อย่างมีนัยสำคัญและขึ้นกับปริมาณสารที่ใช้ด้วย สารทั้งสองนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ primary hepatocyte มากกว่าเซลล์ตับ HepG2 cells และช่วยเพิ่มการมีชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยง

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง: สารเคเตชินจากชาเขียวโดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG สามารถลดความเข้มข้น NTBI ในพลาสมาและการสะสมธาตุเหล็กในตับของหนูทดลองที่มีภาวะเหล็กเกินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ปริมาณเหล็กในร่างกายลดต่ำลงกว่าเดิม สารเคเตชินน่าจะช่วยป้องกันการสร้าง ROS โดยผ่านทางปฏิกิริยาฮาร์เบอร์ไวส์-เฟนตอนที่มีไอออนธาตุเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและทำให้ช่วยบรรเทาการเกิดพยาธิสภาพที่ตับได้ รวมทั้งยังช่วยทำให้กลไกต้านออกซิเดชันดีขึ้นโดยการสร้างกลูตาไธโอนในเซลล์และร่างกายให้มากขึ้น ถ้าผสมสารเคเตชินและสาร EGCG ในปริมาณสูงๆอาจทำหน้าที่เป็นสารโปรออกซิแดนซ์มากกว่าเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ จึงแนะนำว่าสาร EGCG ควรทำหน้าที่สองอย่างพร้อมกันคือเป็นยาขับเหล็กที่เข้าไปกำจัดเหล็กภายในเซลล์ออกไปได้และเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ช่วยทำลายอนุมูลอิสระที่มีอยู่

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต: การทำงานของสารเคเตชินและอีจีซีจีในชาเขียวอาจสัมพันธ์กับการจับตรึงเหล็กในเซลล์และในร่างกายผู้ป่วยที่มีภาวะเหล็กเกิน ยังคงต้องทำการศึกษาผลของชาเขียวและสารเคเตชินต่อไปเพื่อช่วยให้ภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสในผู้ป่วยธาลัสซีเมียดียิ่งขึ้นต่อไป การสร้างสูตรและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชาเขียวเป็นสิ่งจำเป็นในการนำไปใช้ศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีตา

คำหลัก: ชาเขียว คาเมลลียาไซเนนซิส ธาลัสซีเมีย ภาวะเหล็กเกิน ออกซิเดทีฟสเตรส

ABSTRACT

Project Code: RMU5080074
Project Title: Green Tea Catechins Potentially Reduce Labile Iron Pools in Hepatocytes and Cardiomyocytes in vitro and in vivo
Investigator: Somdet Srichairatanakool, Ph.D., Associate Professor
Affiliation: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University
E-mail Address: ssrichai@med.cmu.ac.th
Project Period: 3 years (July 2007 – June 2010)

Background: Secondary iron overload is commonly found in transfusion-dependent patients with β -thalassemia and demonstrates nontransferrin-bound iron (NTBI), a toxic form of iron in their plasma. Cellular and mitochondrial damage can be caused by labile iron pool (LIP) and be mediated by reactive oxygen species (ROS). Liver cells of the thalassemias have greater levels of LIP and ROS than those of healthy persons. Thalassemia patients with iron overload are treated with iron chelators including desferrioxamine (DFO), deferiprone (DFP) and deferasirox (DFX) to remove excess iron, together with antioxidants such as vitamin E to relieve oxidative stress in the body. Tea (*Camellia sinensis*) exerts many beneficial health effects. Epigallocatechin (EGC), epicatechin (EC), catechin (C), epigallocatechin 3-gallate (EGCG) and epicatechin 3-gallate (ECG) are commonly found in green tea extract (GTE). Importantly, GTE and EGCG exhibit anti-oxidation, inhibition of carcinogenesis, detoxification of CYP2E1-catalyzed HepG2 cells and iron chelation in vitro and in vivo.

Objectives: Efficacy of GTE and EGCG on iron status and oxidative stress was examined in iron-loaded wild-type (WT), heterozygous beta-knockout (BKO) and double-heterozygous (DH) thalassemic mice (C57BL/6) as well as in hepatocyte cultures. Cytotoxic effect of the compounds was also determined in the cell cultures.

Research methodology: GTE and EGCG preparations were identified antioxidant property and used throughout the study. The mice were induced iron overload by daily feeding ferrocene-supplemented diet (FE diet) for 3 months, and orally giving the GTE and EGCG for further 3 months. Surrogate markers for iron status including NTBI, LIP, liver iron content (LIC), and Perl's iron staining and for oxidative stress such as reduced glutathione (GSH), ROS,

mitochondrial membrane potential ($m\Psi$) and malondialdehyde (MDA) were measured. Cytotoxic effect of the GTE and EGCG on the treated cells was determined using 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) dye.

Results: The GTE and EGCG reduced levels of plasma NTBI, plasma MDA, erythrocyte ROS, and liver iron, but increased levels of reduced glutathione in the FE diet-fed mice effectively. Histochemical examination showed leukocyte infiltration nearby hepatic portal vein and high iron accumulation in livers of the mice. Perl's staining result demonstrates that the GTE and EGCG were able to decrease the iron deposition clearly in liver and spleen tissues, and slightly in heart tissue. The GTE and EGCG significantly reduced levels of LIP, ROS and $m\Psi$ in iron-loaded hepatocyte cultures in concentration-dependent manner. At equivalent concentrations, these two compounds were more toxic to the primary hepatocytes than the HepG2 cells. GTE and EGCG enhanced viability of the cardiomyocytes.

Discussion and Conclusions: Green tea catechins, particularly EGCG could lower plasma NTBI concentration and hepatic iron accumulation in iron-loaded thalassemic mice effectively, this can lead to negative iron balance. Possibly, they prevent iron-induced generation of ROS via Haber-Weiss and Fenton reactions and relieve liver pathogenesis. The compounds also improve antioxidant defense by increasing glutathione production in the cells and the whole body. GTE and EGCG used at a high dose would be pro-oxidant rather than antioxidant. Suggestively, EGCG would exhibit bi-functions as an iron chelator to sequester the iron from cells and a scavenger to get rid of persisting free radicals.

Comments and Further investigation: Actions of the catechins might be related to iron chelation in the cells and patients with iron overload. Whether these effects can improve iron overload and oxidative stress in thalassemia patients remains to be seen upon further examination. Green tea formulation and standardization is necessary for clinically studying in β -thalassemia patients.

Keywords: green tea, *Camellia sinensis*, thalassemia, iron overload, oxidative stress

สัญญาเลขที่ RMU5080074

โครงการ: ศักยภาพของสารเคเตชินจากชาเขียวที่ช่วยลดปริมาณสารประกอบธาตุเหล็กที่ตกอยู่ในเซลล์
ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหลอดทดลองและสิ่งมีชีวิต

รายงานฉบับสมบูรณ์ของหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ชื่อโครงการ “ศักยภาพของสารเคเตชินจากชาเขียวที่ช่วยลดปริมาณสารประกอบธาตุเหล็กที่ตกอยู่ใน
เซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหลอดทดลองและสิ่งมีชีวิต”

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี (กรกฎาคม 2550 – มิถุนายน 2553)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน รศ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล

รายงานในช่วงตั้งแต่ เดือนกรกฎาคม 2550 ถึง เดือนมิถุนายน 2553

1. การดำเนินงาน

☐ ได้ดำเนินงานตามแผนที่วางไว้

☒ ได้ดำเนินงานล่าช้ากว่าแผนที่วางไว้

☐ ได้เปลี่ยนแผนงานที่วางไว้ดังนี้

ปัญหาที่ทำการวิจัยและความสำคัญของปัญหา (Research questions and Rationale)

ธาลัสซีเมียเป็นโรคผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบได้ในหลายประเทศแถบภาคพื้นทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ตะวันออกกลาง เอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และหมู่เกาะต่างๆในมหาสมุทรอินเดีย (เรียกว่า แถบเข็มขัดธาลัสซีเมีย หรือ Thalassemic belt) พยาธิกำเนิดจากการมีวเตชันที่ยีนส์สร้างฮีโมโกลบินของเซลล์เม็ดเลือดแดง (ineffective erythropoiesis) ทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง (hemolytic anemia) ตามมาและต้องรักษาโดยการเติมเลือดเข้าไปเป็นประจำ ธาตุเหล็กจากเลือดที่เติมเข้าไปเป็นประจำและจากการดูดซึมที่บริเวณลำไส้เล็กเพิ่มมากขึ้นมีส่วนทำให้มีการสะสมธาตุเหล็กเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆในเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย แต่เนื่องจากไม่มีวิถีทางธรรมชาติของร่างกายที่กำจัดธาตุเหล็กส่วนเกินนี้

ออกไป ดังนั้นถ้าไม่ได้รับการบำบัดด้วยยาขับเหล็กที่มีประสิทธิภาพก็จะทำให้เกิดภาวะเหล็กเกิน (iron overload) และอนุมูลอิสระมากเกินไป (oxidative stress) ตามมา จนเกิดการทำลายเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อต่างๆ (oxidative tissue damage) ทำให้อวัยวะสำคัญและต่อมไร้ท่อต่างๆทำหน้าที่ผิดปกติ (vital organ และ endocrine gland dysfunction) และเกิดพยาธิสภาพตามมาได้แก่ โรคเบาหวาน ตีชัน การพัฒนาเพศขั้นทุติยภูมิผิดปกติ การเจริญเติบโตช้าลง ลักษณะกระดูกใบหน้าผิดปกติ ม้ามโต ตับโตและการเกิดพังผืดที่เซลล์ตับ การทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจผิดปกติ ผู้ป่วยธาลัสซีเมียส่วนใหญ่ (ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์) เสียชีวิตด้วยโรคหัวใจวายช่วงอายุ 20-30 ปี รองลงมาคือการติดเชื้อและการแทรกซ้อนอื่น ในช่วง 30-40 ปีที่ผ่านมา มีงานวิจัยโรคธาลัสซีเมียจากประเทศแถบตะวันตกที่แสดงถึงแนวทางการควบคุมและจัดการโรคด้วยการตรวจคัดกรอง (screening) การให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม (genetic counseling) การวินิจฉัยก่อนคลอด (prenatal diagnosis) และการปรับปรุงวิธีการรักษาอาการของโรคให้ดีขึ้น (improvement in symptomatic treatment) เป้าหมาย “สุขภาพดีถ้วนหน้า (Health for All)” ขององค์การอนามัยโลกได้รวมโรคธาลัสซีเมียไว้ด้วย

ในแถบประเทศต่างๆ เหล่านี้มีเด็กทารกเป็นโรคธาลัสซีเมียเกิดขึ้นมาจำนวนหลายพันคนในแต่ละปี ซึ่งหลายคนในจำนวนเหล่านี้ต้องการการบำบัดรักษาเป็นระยะเวลานานเพื่อให้มีชีวิตที่ยืนยาวขึ้น คนไทยมีสายพันธุ์กรรมโรคธาลัสซีเมียอยู่มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์โดยประมาณ ซึ่งเป็นภาวะแฝงธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ อยู่ประมาณเกือบ 1 ใน 3 ของพลเมืองทั้งประเทศหรือประมาณเกือบ 20 ล้านคน (จากทั้งหมด 60 ล้านคน) และแบ่งออกเป็นธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา (α -thalassemia) และธาลัสซีเมียชนิดบีตา (β -thalassemia) ตามตำแหน่งของความผิดปกติที่เกิดขึ้นที่สายโกลบินในอนุฮีมโกลบิน ความชุก (prevalence) ของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีตาในภาคต่างๆ ของประเทศเป็นดังนี้คือ ภาคเหนือจำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 2-6 เปอร์เซ็นต์ ภาคกลางจำนวน 3 เปอร์เซ็นต์ และภาคใต้จำนวน 2-4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความชุกของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดฮีมโกลบินอีพพาในภาคเหนือมีจำนวน 8 เปอร์เซ็นต์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีจำนวน 20-60 เปอร์เซ็นต์ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่จังหวัดสุรินทร์ และสกลนครพบได้ถึงร้อยละ 50-60 ของประชากร) ภาคกลางมีจำนวน 13-17 เปอร์เซ็นต์ และภาคใต้มีจำนวน 9-11 เปอร์เซ็นต์ (ข้อมูลสมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2547) แม้ว่าในปัจจุบันกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุขได้มีโครงการรณรงค์และป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นโดยการแนะนำให้คู่สมรสได้รับการตรวจเลือดก่อนแต่งงาน (marriage counseling) และการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ก่อนคลอด (prenatal diagnosis) อย่างไรก็ตามยังคงมีผู้ป่วยธาลัสซีเมียทารกบางรายที่หลุดลอดการตรวจคัดกรองดังกล่าว รวมทั้งยังมีผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวนมากทั่วโลกที่ต้องได้รับการดูแลรักษาอาการและพยาธิสภาพเพื่อให้สามารถมีชีวิตที่ยืนยาวขึ้นตราบนานกระทั้งผู้ป่วยเสียชีวิต

การบำบัดรักษาดังกล่าวนี้นี้ต้องใช้งบประมาณด้านบุคลากรทางการแพทย์ ยารักษาโรค (เช่นยาลดไข้ ยาบำรุงเลือด ยาป้องกันการติดเชื้อและยาขับเหล็ก) ค่าเลือดและอุปกรณ์เติมเลือดและอื่นๆ ซึ่งเป็นภาระทางสังคมและเศรษฐกิจ มีหลักฐานงานวิจัยที่ยืนยันว่าการให้ผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้รับยาขับเหล็ก

อย่างต่อเนื่องเป็นประจำสามารถช่วยยืดอายุผู้ป่วยให้ยืนยาว ช่วยลดอาการแทรกซ้อนหลายอย่างที่เกิดขึ้นได้ อย่างไรก็ตามยาขับเหล็กที่ใช้บำบัดผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกินในปัจจุบันมีอยู่เพียง 2-3 ชนิด มีราคาแพง บางชนิดต้องใช้อุปกรณ์ช่วยฉีดอัตโนมัติที่มีราคาแพง ต้องใช้อย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้การเสริมสารแอนติออกซิแดนท์ (เช่นวิตามินซี วิตามินอี อะเซทิลซีสเตอีนหรือสารสกัดธรรมชาติ) ให้กับผู้ป่วยเพื่อลดระดับอนุมูลอิสระในร่างกายให้ต่ำลงและบรรเทาอันตรายจากผลการทำลายเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นก็ยังคงมีความจำเป็น อย่างไรก็ตามปริมาณยาขับเหล็กและสารแอนติออกซิแดนท์ที่ให้เข้าไปในร่างกายผู้ป่วยควรอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมและเพียงพอ และไม่ควรทำให้เกิดฤทธิ์ข้างเคียงจากการใช้ยา รวมทั้งฤทธิ์เป็นโปรออกซิแดนท์ของสารแอนติออกซิแดนท์ที่ใช้ในปริมาณสูง

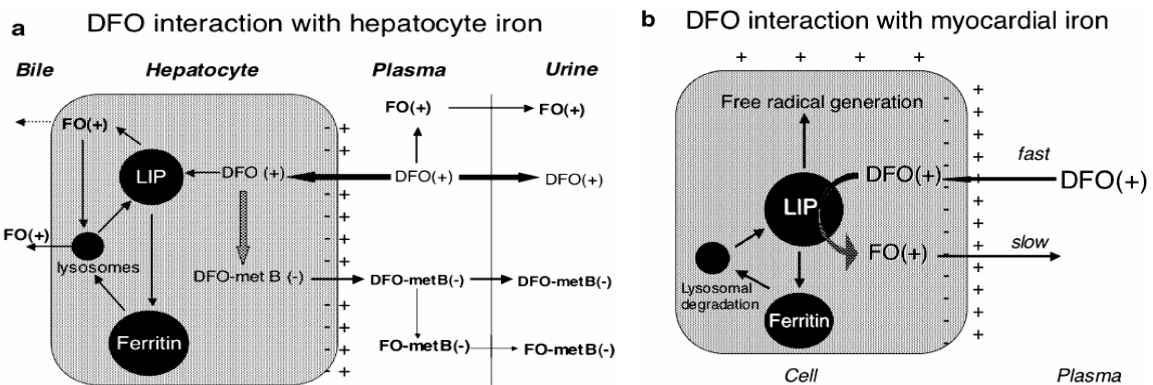
ดังนั้นงานวิจัยและพัฒนา (R&D) เพื่อค้นหายาบำบัดผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีฤทธิ์ในการขับเหล็กออกจากเซลล์อวัยวะสำคัญของร่างกายอย่างมีประสิทธิภาพ (effective iron chelating agent) มีฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (free-radical scavenging) ภายในร่างกาย เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ใช้บริโภคได้และไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย รวมทั้งมีราคาถูกและมีปริมาณมากเพียงพอในประเทศที่ผู้ป่วยธาลัสซีเมียอาศัยอยู่ ทำให้มีความสำคัญอย่างมากทั้งในด้านการรักษาและป้องกันโรคแทรกซ้อนต่างๆที่เกิดขึ้นอันเป็นผลมาจากภาวะเหล็กและอนุมูลอิสระมากเกินไปในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเหล่านี้ ผลที่ได้จากการศึกษาในหลอดทดลอง ในเซลล์เพาะเลี้ยง ในสัตว์ทดลองที่เชื่อถือได้นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการศึกษาในผู้ป่วยธาลัสซีเมียโลหิตจางที่มีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือได้ในขั้นตอนต่อไป

บททวนวรรณกรรม (Literature Reviews)

พยาธิสรีรวิทยาของธาตุเหล็ก (Pathophysiology of iron)

ธาตุเหล็กมีความสำคัญและจำเป็น (essential transition trace element) กับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ต้องได้รับจากภายนอกเข้าไปเพื่อใช้ในกระบวนการสร้างฮีโมโกลบิน ไมโอโกลบิน ไซโตโครมและสารประกอบธาตุเหล็กต่างๆ ตามปกติเมื่อธาตุเหล็กถูกนำเข้าไปในเซลล์และอยู่ในส่วนไซโตพลาสซึมที่เรียกว่า Labile iron pool (LIP) ซึ่งเป็นสารประกอบเหล็กที่เกาะตัวอย่างหลวมๆกับซิเตรท ฟอสเฟต เอทีพี กรดอะมิโนหรือโปรตีนชาเพอโรน ธาตุเหล็กในรูป LIP ถูกนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆหรือเก็บสะสมไว้ในอัญเฟอร์ริติน (ferritin) อย่างไรก็ตามสิ่งมีชีวิต (โดยเฉพาะอย่างยิ่งมนุษย์) มีการควบคุมปริมาณธาตุเหล็กภายในเซลล์และร่างกาย (iron homeostasis) อย่างเป็นระเบียบและเข้มงวดเพื่อไม่ให้มีน้อยเกินไป (iron deficiency) หรือมากเกินไป (iron overload) (Aisen, Enns et al. 2001) รวมทั้งควบคุมไม่ให้ธาตุเหล็กอยู่ในรูปอิสระ (free หรือ unbound iron) ซึ่งอาจจะไปมีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาทางเคมี (Haber-Weiss และ Fenton catalyst) ได้ (Emerit, Beaumont et al. 2001; McCord 2004) การควบคุมดุลของธาตุเหล็กในเซลล์มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพได้ การศึกษาทางระบาดวิทยาแสดงให้เห็นว่าตัวชี้วัดปริมาณเหล็กในร่างกาย (body iron markers) เช่นระดับเฟอร์ริตินในซีรัมและค่าความ

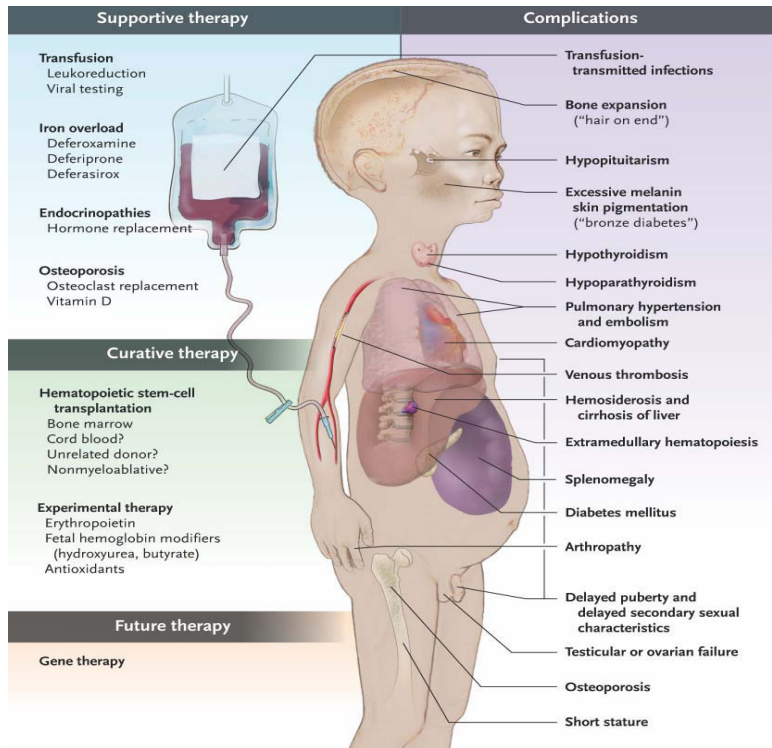
อิมตัวทรานส์เฟอร์รินในเซลล์ไม่ค่อยมีความสัมพันธ์กับอุบัติการณ์การโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคหัวใจ (Lee, Liang et al. 1995; de Valk, Addicks et al. 2000)



รูปที่ 1 ปฏิสัมพันธ์ของยา DFO กับธาตุเหล็กกลุ่ม labile iron pool (LIP) ในเซลล์ตับ (a) และเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (b) (Porter, Rafique et al. 2005)

ในภาวะเหล็กเกินของผู้ป่วยธาลัสซีเมียสามารถตรวจพบธาตุเหล็กกลุ่ม non-transferrin bound (NTBI) ในพลาสมาและรูป labile plasma iron (LPI) ในเซลล์ได้ในปริมาณที่สูงและสามารถแตกตัวเป็นธาตุเหล็กอิสระได้ (Anderson 1999; Cabantchik, Breuer et al. 2005) ธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ถูกตัวกำจัดออกจากพลาสมาโดยกลไกหลายอย่างที่ถูกต้องสมมุติฐานไว้ (Wright and Lake 1990) ปริมาณ LIP และฮีโมไซด์ริน (hemosiderin) ที่เพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์มีคุณสมบัติไวต่อการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์และเป็นพิษต่อเซลล์ (Weir, Gibson et al. 1984) ถ้าปริมาณเหล็กภายในเซลล์มีมากก็จะเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์เฟอร์ริตินเพิ่มมากขึ้นด้วย การศึกษาที่ผ่านมาชี้ได้เน้นถึงความสำคัญของการรักษาผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ช่วยทำให้การทำงานของหัวใจดีขึ้นโดยมุ่งไปที่การใช้อยาขับเหล็กเพื่อกำจัดหรือลดปริมาณธาตุเหล็ก NTBI ในพลาสมาและรูป LIP ในเซลล์เนื้อเยื่อหัวใจอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 1) รวมถึงการใช้วิธีทางฟิสิกส์เช่น SQUID และ MRI (ค่า T2*) เพื่อติดตามวัดปริมาณเหล็กที่สะสมอยู่ในเซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Anderson, Holden et al. 2001) อย่างไรก็ตามวิธีการทั้งสองก็มีข้อจำกัดในด้านเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีจำนวนจำกัดและมีราคาแพง ทำให้มีเพียงบางสถาบันหรือโรงเรียนแพทย์เท่านั้นที่สามารถทำการตรวจวัดได้บ่อยครั้งและต่อเนื่องตลอดการบำบัดรักษา ยาเดสเฟอรอลสามารถกำจัดธาตุเหล็กกลุ่ม LIP ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจอย่างรวดเร็ว รวมทั้งสามารถกำจัดเหล็กที่อยู่ในเฟอร์ริตินและฮีโมไซด์รินได้อย่างช้าๆ (Porter, Rafique et al. 2005) การใช้อยาขับเหล็กยังมีจุดมุ่งหมายเพื่อไม่ให้ปริมาณเหล็กในเซลล์ตับเกิน 15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตับแห้ง 1 กรัม การศึกษาของเฮอร์สโคและคณะแสดงให้เห็นว่าเซลล์หัวใจเฉพาะเลี้ยงที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมธาตุเหล็กมีการหดตัวและเต้นที่ผิดปกติซึ่งเป็นผลจาก peroxidative damage เกิดขึ้นกับส่วนประกอบเชิงซ้อน (complex) ต่างๆบริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นใน และการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้สามารถย้อนกลับได้ด้วยฤทธิ์ของยาเดสเฟอรอกซามีน (Link, Pinson et al. 1985; Hershko, Link et al. 2002) ค่าปริมาณเหล็กในเซลล์ตับ (hepatic liver content, HIC) เกิน 15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้งของตับ 1 กรัมซึ่งเสี่ยงที่จะเกิดโรคหัวใจ

ในผู้ป่วยที่มีเหล็กเกิน (Brittenham, Griffith et al. 1994) ซึ่งผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคหัวใจมีปริมาณธาตุเหล็กสะสมในเนื้อเยื่อหัวใจต่ำกว่าเนื้อเยื่อตับประมาณ 10 เท่า (Maggio, D'Amico et al. 2002)



รูปที่ 2 อาการแทรกซ้อนและการบำบัดคำจุนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกิน (Andrews 1999)

การรักษาผู้ป่วยธาลัสซีเมียทำได้โดยการเติมเลือด (multiple blood transfusion) ผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีตาเมเจอร์ต้องได้รับการรักษาโดยการเติมเลือดเป็นประจำประมาณ 3-4 สัปดาห์ต่อครั้งเพื่อรักษาระดับฮีโมโกลบินในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ 10 กรัมต่อเดซิลิตร ส่วนผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดอีโมโกลบินอีจำเป็นต้องได้รับการเติมเลือดเป็นครั้งคราวเมื่อระดับฮีโมโกลบินในเลือดต่ำกว่าเกณฑ์ดังกล่าว (รูปที่ 2) การรับประทานยากรดโฟลิก (folic acid supplement) เพื่อเร่งการสร้างฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง การตัดม้าม (splenectomy) การปลูกถ่ายไขกระดูกและเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต (bone marrow and stem cell transplantation) (ค่าใช้จ่ายประมาณ 100,000-400,000 บาทต่อราย) การได้รับยาขับเหล็ก (iron chelation therapy) การเสริมสารหรือยาต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant supplement) วิธีการดังกล่าวเป็นการรักษาที่ปลายเหตุและเป็นภาระระยะยาวไปตลอดชีวิต รวมถึงสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายจำนวนมากในการรักษาระยะยาวและไม่สามารถทำให้โรคหายขาดได้

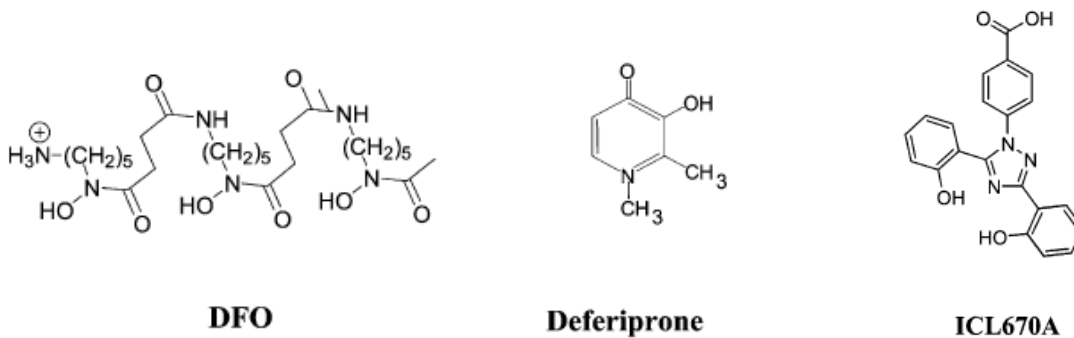
ยาขับเหล็ก (Iron chelators)

ยาเดสเฟอริออกซามีน (desferrioxamine หรือ Desferal®) เป็นยาขับเหล็กชนิดฉีดได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียมานานกว่า 40 ปี เพื่อขับธาตุเหล็กที่สะสมอยู่ตามบริเวณเนื้อเยื่อต่างๆ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ต่อมไร้ท่อต่างๆ ตับและหัวใจ) ออกจากร่างกาย และช่วยให้ผู้ป่วยมี

อายุยืนยาวขึ้น อย่างไรก็ตามโรคหัวใจล้มเหลวยังคงเป็นสาเหตุของการตายในผู้ป่วยนี้ถึงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ (Borgna-Pignatti and Castriota-Scanderbeg 1991) ผู้ป่วยธาลัสซีเมียประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์เกิดโรคหัวใจขึ้นได้ในช่วงอายุก่อน 20 ปี (Gabutti and Piga 1996) การบำบัดด้วยยาขับเหล็กเดสเฟอริออกซามีนร่วมกับยาดีเฟอริโพรนช่วยลดระดับเฟอร์ริตินในพลาสมาให้ต่ำลง (Daar and Pathare 2006) ดังนั้นการเริ่มบำบัดด้วยยาขับเหล็ก การติดตามตรวจวัดปริมาณเฟอร์ริตินในเลือดและธาตุเหล็กในเซลล์ตับเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อพัฒนาการเกิดโรคหัวใจ อย่างไรก็ตามการตรวจวัดปริมาณเฟอร์ริตินในซีรัมและปริมาณเหล็กในเซลล์ตับไม่ได้เป็นตัวทำนายพยากรณ์การเกิดโรคหัวใจ (Piga, Gaglioti et al. 2003) นอกจากผลฤทธิ์ข้างเคียงและค่าใช้จ่ายแล้ว ความไม่พึงพอใจและความเจ็บปวดในการใช้ยาเดสเฟอริออกซามีนก็เป็นปัญหาสำคัญ กลุ่มแพทย์วิจัยจึงได้มีผู้ออกและประเมินรูปแบบยาและการให้นี้ด้วยวิธีต่างๆขึ้นมา

ยาดีเฟอริโพรน (deferiprone หรือ 1,2-dimethyl-3-hydroxypyridin-4-one หรือ L1) เป็นยาขับเหล็กสังเคราะห์ชนิดรับประทานที่มีขนาดอนุเล็กลงกว่าเดสเฟอริออกซามีน มีความเป็นกลางทางประจุในสภาวะที่ค่าพีเอช 7.4 จึงมีศักยภาพผ่านเข้าเซลล์และดึงธาตุเหล็กออกจากเซลล์ต่างๆ (เช่นเม็ดเลือดแดง เซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ) ได้ดีกว่ายาเดสเฟอริออกซามีน (Parkes and Templeton 1994; Parkes, Olivieri et al. 1997; Link, Konijn et al. 2001) ยาดีเฟอริโพรนช่วยลดปริมาณเหล็กในเนื้อเยื่อหัวใจลงได้ (Kushner, Porter et al. 2001) และช่วยให้หัวใจผู้ป่วยที่มีภาวะเหล็กเกินทำงานดีขึ้น (Anderson, Wonke et al. 2002) ผลการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่เคยได้รับยาเดสเฟอริออกซามีนมาก่อน แล้วเปลี่ยนมาได้รับการบำบัดด้วยยาดีเฟอริโพรนมีโอกาเป็นหรืออาการทรุดลงของโรคหัวใจน้อยต่ำลงประมาณ 5 เท่า อย่างไรก็ตามฤทธิ์ข้างเคียงจากการใช้ยาดีเฟอริโพรนรวมและความไม่เสถียรของสารเชิงซ้อนระหว่างยากับธาตุเหล็กยังคงเป็นอ่อนของยาขับเหล็กชนิดนี้ เดสเฟอริออกซามีนเป็นยาขับเหล็กแบบ hexadentate และเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ที่มีสัมฤทธิ์ผลดีมากสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้โดยการจับกับไฮดรอกซีเฟอริริก (Link, Pinson et al. 1989) ยาขับเหล็กอื่นๆที่เป็น bidentate และ tridentate ก็สามารถยับยั้งการทำลายเนื้อเยื่อโดยอนุมูลอิสระได้ (Richardson and Ponka 1998; Santos, Castilho et al. 2001; Britton, Leicester et al. 2002) มีรายงานว่ายาดีเฟอริโพรนช่วยเพิ่มความรุนแรงในการแตกหักของดีเอ็นเอของเซลล์ตับหนูที่ถูกเติมธาตุเหล็กเข้าไป (Cragg, Hebbel et al. 1998) มีความเชื่อมโยงระหว่างธาตุเหล็กกับ NTBI กับปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่ตรวจพบได้ในปริมาณสูงในพลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมียซึ่งแสดงถึงการเกิดลิปิดเพอรอกซิเดชันขึ้น (Cighetti, Duca et al. 2002) การที่ผู้ป่วยธาลัสซีเมียได้กินวิตามินอีเข้าไปมีส่วนช่วยให้ดุลของระบบแอนติออกซิแดนซ์ในร่างกายดีขึ้น (Dissayabutra, Tosukhowong et al. 2005; Tesoriere, Allegra et al. 2006) ทำให้เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยบางรายมีอายุยืนยาวขึ้น (Rachmilewitz, Weizer-Stern et al. 2005) รวมทั้งช่วยลดการทำหน้าที่ของเกร็ดเลือดลงซึ่งมีผลทำให้การขาดออกซิเจนและการอุดตันของเส้นเลือดที่ปอดเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ (Unchern, Laoharungpanya et al. 2003)

ยาดีเฟอราซิรอก (deferasirox, DFX, ICL670) เป็นยาขับเหล็กชนิดรับประทานที่มีสัมฤทธิ์ผลดีกว่ายาดีเฟอริโพรนแต่มีราคาแพงกว่ามาก (Nick, Acklin et al. 2003; Hershko, Link et al. 2005; Barton 2007; Cappellini 2008) แม้ว่าจะยังไม่มีผลข้างเคียงรุนแรงแต่พบว่าผู้ใช้ยานี้มีอาการทางระบบทางเดินอาหารเช่น เลือดออกในกระเพาะอาหาร (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของยาขับเหล็กใช้รักษาผู้ป่วยภาวะเหล็กเกิน (Wong and Richardson 2003)

กรดไขมันโอเมก้า3 (*ω*-Fatty acids)

ผลการศึกษาทางคลินิกได้สนับสนุนบทบาทของกรดไขมันโอเมก้า3 (ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA) และ docosahexaenoic acid (DHA)) ที่พบมากในน้ำมันปลาและเนื้อปลาในการป้องกันอุบัติการณ์การเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจโคโรนารีและการตายแบบเฉียบพลันได้ (Thunell, Andersson et al. 1995; Mozaffarian 2005) โดยมีผลด้านการเต้นหัวใจที่ผิดปกติ ด้านการอักเสบ (Mori and Beilin 2004) ผลต่อช่องทางผ่านเข้า-ออกของโซเดียมและแคลเซียม และผลต่อความแปรปรวนของกาเต้นหัวใจ (heart rate variability, HRV) (Ismail 2005) คนที่บริโภคกรดไขมันโอเมก้า3 มีระดับโคเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นสูง (high-density lipoprotein cholesterol หรือ HDL-cholesterol) ในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นและไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Holub and Holub 2004; Okuda, Ueshima et al. 2005) หนูทดลองที่กินอาหารไขแดงผงเสริมกรดไขมัน DHA มีปริมาณกรดไขมันชนิดนี้เพิ่มสูงขึ้นที่บริเวณเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Gerbi, Bernard et al. 2004) มีการแนะนำให้รับประทานในปริมาณ 250 มิลลิกรัมต่อวัน (Harris 2005) กรดไขมันโอเมก้า3 ยังพบได้ในแหล่งธรรมชาติอื่นๆเช่น สาหร่ายและจุลินทรีย์ทะเล นม ไข่ และเมล็ดพืชต่างๆ (ลินิน วอลนัทและคาโนลา) (Nichols and Bacon 1989; Butarbutar 2004; Covington 2004) มีรายงานว่า การบริโภคอาหารที่มีกรดไขมันโอเมก้า3 ปริมาณสูงไม่มีความสัมพันธ์ร่วมกับการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจโคโรนารีเลย (Ebbesson, Risica et al. 2005) ฮาร์ริสและคณะได้เสนอใช้ค่าผลรวมปริมาณกรดไขมันโอเมก้า3 DHA และ EPA ของเม็ดเลือดแดง (หรือดัชนีค่ากรดไขมันโอเมก้า3) เป็นตัวบ่งชี้สถานะกรดไขมันโอเมก้า3 ของหัวใจ(Harris, Sands et al. 2004) ซึ่งถ้ามีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 8 เปอร์เซนต์แสดงว่ามีการป้องกันการเกิดโรคหัวใจมากที่สุด และถ้าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 เปอร์เซนต์แสดงว่ามีการป้องกันการเกิดโรคหัวใจน้อยที่สุด) กรดไขมันในน้ำมันปลามีผลช่วยทำให้ HRV มีค่าลดลง (Romieu, Tellez-Rojo et

al. 2005) กรดไขมันโอเมกา3 ยับยั้งการเกิดลิพิดเพอรอกซิเดชันที่เซลล์ตับหนูและความคุ้มครองหลังอะโป บี100 จากเซลล์ตับได้ (Pan, Cederbaum et al. 2004) ตราบจนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับ กรดไขมันโอเมกา3 ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเลย

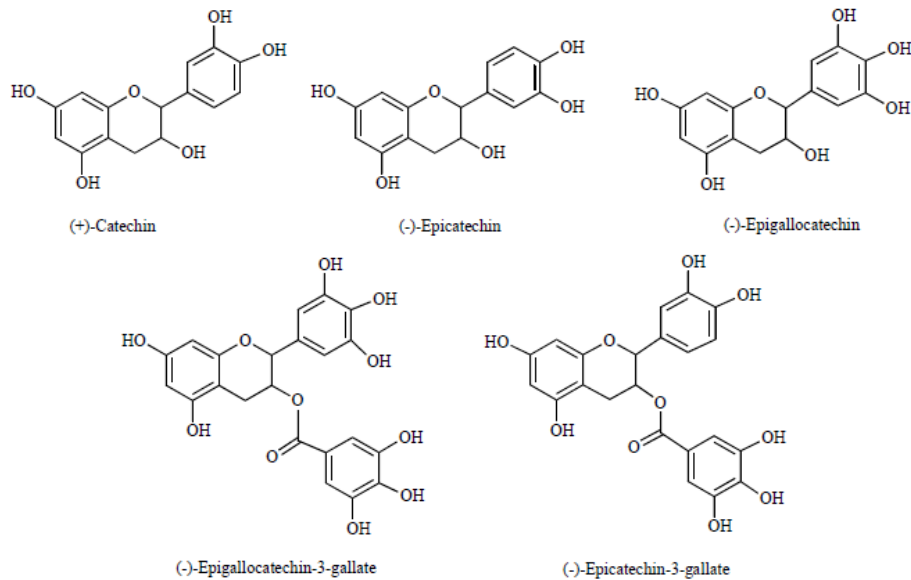
สารต้านออกซิเดชัน (Anti-oxidants)

สารแอนติออกซิแดนท์ช่วยส่งเสริมสุขภาพร่างกายคนทั่วไปให้สามารถทำงานได้อย่างเป็นปกติ สุข รวมทั้งช่วยให้ร่างกายผู้ป่วยภาวะออกซิเดทีฟสเตรสบรรเทาลงหรือกลับคืนสู่ภาวะปกติสุขได้ สารต้านออกซิเดชันที่พบได้ในร่างกายหรือร่างกายสร้างขึ้นเองได้แก่ อัลบูมิน กรดยูริก บิลิรูบินและเมลานิน ส่วนเอนไซม์ต้านออกซิเดชันได้แก่ CAT, SOD, และ GPx (Halliwell and Gutteridge 1988; Halliwell, Gutteridge et al. 1992) สารแอนติออกซิแดนท์เป็นส่วนประกอบของอาหารเสริมสุขภาพ (functional food) ในผัก ผลไม้และธัญพืชต่างๆที่เป็นพฤษาเคมี (phytochemicals) จำพวก tannins, catachins, resveratrol, chlorophyllin, procyanidin, proanthocyanidin, myricetin, quecetin, kaempferol, curcuminoids, caffeic acid, jusmonic acid, anthocyanin, vitamin C, tocopherol, carotenoids, xanthoness, coenzyme Q₁₀ และ polyunsaturated fatty acids (PUFA) (Halliwell 1993; Craig and Beck 1999; Komes, Belscak-Cvitanovic et al. 2010; Tang and Halliwell 2010) เป็นส่วนประกอบสำคัญ ผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่กินวิตามินอีเข้าไปเป็นประจำช่วยให้ดุลของระบบต้านออกซิเดชันในร่างกายดีขึ้น เม็ดเลือดแดงอายุยืนยาวขึ้น การทำงานเกร็ดเลือดลดลง ช่วยชะลอภาวะขาดออกซิเจนและอุดตันเส้นเลือดที่ปอด

ชาเขียวและกลุ่มสารคะเตชิน (Green tea and catechins)

ชาเขียวเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ประกอบด้วยมีสารคะเตชินต่างๆได้แก่ catechins (C), epicatechin (EC), epicatechin 3-gallate, (ECG), epigallocatechin (EGC), galocatechin gallate (GCG) และ epigallocatechin 3-gallate (EGCG) (รูปที่ 4) ซึ่งสาร EGCG มีปริมาณสูงที่สุด ชามีคุณสมบัติทางชีวภาพและเภสัชวิทยาที่สำคัญคือ ลดความดันโลหิตสูง ด้านการอักเสบ ด้านการเจริญเติบโตของจุลชีพที่เป็นโทษ ป้องกันเม็ดเลือดแดงถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ ด้านภาวะไขมันสูงและลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด(Cabrera, Artacho et al. 2006) สารสกัดชาเขียวช่วยลดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสที่เกิดขึ้น (Grinberg, Newmark et al. 1997; Wellejus, Poulsen et al. 2000; Rabovsky, Cuomo et al. 2006) ชาเขียวและสาร EGCG มีคุณสมบัติเป็น antioxidant (Yoneda, Hiramatsu et al. 1995) และ iron-chelating agent (Grinberg, Newmark et al. 1997; Anghileri and Thouvenot 2000; Adiv, Mandel et al. 2004; Mandel and Youdim 2004; Reznichenko, Amit et al. 2006) สามารถ

ผ่านเข้าเซลล์ดีพอสมควรร สาร EGCG ใช้หมู่แกลโลลิลจับไอออนธาตุเหล็กไว้ (Hayakawa, Ishizu et al. 2004) จึงทำลายการอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ (Hu and Kitts 2001; Miyanaga, Inoue et al. 2003)



รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของสารเคเตชินต่างๆ (Thephinlap, Ounjaijean et al. 2007)

ส่วนประกอบของชาเขียวมีฤทธิ์เป็นสารแอนติออกซิแดนท์ ป้องกันการเกิดก้อน thrombin ด้านการอักเสบและช่วยให้เลือดไหลผ่านหลอดเลือดโคโรนารีดียิ่งขึ้นจึงป้องกันหรือต้านการทำลายเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจากอนุมูลอิสระได้ (Toschi, Bordonni et al. 2000; Cheng 2006) สารสกัดชาเขียวมีฤทธิ์ต้านการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยงและป้องกันการตายของกล้ามเนื้อหัวใจจากภาวะขาดออกซิเจนได้ (Toschi, Bordonni et al. 2000; Yusufi, Cheng et al. 2003) สาร EGCG ช่วยให้กล้ามเนื้อหัวใจหนูที่มีการตายแบบอะพอพอโตซิสและบาดเจ็บจากการขาดเลือดไปเลี้ยงบรรเทาลง (Nakagawa, Ninomiya et al. 1999; Aneja, Hake et al. 2004; Townsend, Scarabelli et al. 2004) รวมทั้งยับยั้งการสร้างโปรตีนคอลลาเจนและป้องกันการเกิดพังผืดของเซลล์ตับได้ (Nakamuta, Higashi et al. 2005) ดังนั้นจึงน่ามีศักยภาพยับยั้งการเกิดพังผืดของเซลล์ตับที่มีภาวะเหล็กเกินได้ สารสกัดชาเขียวไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับของหนูทดลอง (Bun, Bun et al. 2006; Singal, Tirkey et al. 2006) ดังที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Galati, Lin et al. 2006)

ผลการศึกษาในช่วงเวลา 2-3 ปีที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบและเคเตชิน EGCG สามารถกำจัดธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ในพลาสมาของผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีตาและหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วยธาตุเหล็ก (Wickramasinghe, Thein et al. 1999; Hamdaoui, Chahed et al. 2005; Thephinlap 2007) สาร EGCG อาจเป็นพิษต่อเซลล์ตับถ้าใช้ปริมาณสูงๆ (Penn, Bobrowski et al. 1997; Galati, Lin et al. 2006) การเปลี่ยนมุมมองจากการใช้ชาเขียวเป็นเครื่องดื่มมาประยุกต์ใช้บำบัดรักษาภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีตาจึงเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจมาก ชาเขียวอาจ

มีประโยชน์ทางเวชบำบัดทางเลือก (alternative medicine) ในการใช้พืชสมุนไพรรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจให้มีพยาธิสรีรวิทยาและอาการแทรกซ้อนลดน้อยลง การออกแบบวิธีศึกษาผลของสารสกัดหยาบและสารเคเทชิน EGCG จากชาเขียวซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีความสำคัญและปลอดภัยในการบริโภค (Chow, Cai et al. 2003) เพื่อนำมาใช้เป็นยาขับเหล็กที่สะสมในเลือดและเนื้อเยื่อต่างๆ ออกจากร่างกาย ทำให้ภาวะเหล็กและอนุมูลอิสระมากเกินไปในร่างกายลดลง ส่งผลช่วยให้หนูทดลองหรือผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นและอายุยืนนานขึ้น

วัตถุประสงค์ (Purposes of the study)

- 1) เพื่อตรวจสอบฤทธิ์สาร GTE และสาร EGCG จากชาเขียวในการลดปริมาณธาตุเหล็ก LIP และระดับออกซิเดทีฟสเตรสในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง
- 2) เพื่อตรวจสอบฤทธิ์สาร GTE และสาร EGCG ในการลดปริมาณธาตุเหล็ก LIP และระดับออกซิเดทีฟสเตรสในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยง
- 3) เพื่อประเมินผลสาร GTE ต่อระดับฮีโมโกลบินและอายุของเม็ดเลือดแดง ระดับธาตุเหล็กในตับ NTBI และระดับ TBARS ในเลือดของหนูทดลองที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก
- 4) เพื่อศึกษาผลสาร GTE ต่อภาวะธาตุเหล็กและออกซิเดทีฟสเตรสในเนื้อเยื่อตับและหัวใจของหนูทดลองที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก
- 5) เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสาร GTE และ EGCG ต่อเซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยง

ขอบเขตการศึกษาวิจัย (Outline of study)

- 1) ศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง mouse primary hepatocytes, HepG2 cells และ mouse cardiomyocytes ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะเหล็กเกินด้วยสารละลาย ferric ammonium citrate (FAC)
- 2) ศึกษาผลสาร GTE และสาร EGCG จากชาเขียวต่อระดับ LIP, ROS และ mitochondrial membrane Ψ ในเซลล์เพาะเลี้ยง mouse primary hepatocytes และ HepG2 cells
- 3) ศึกษาผลสาร GTE และสาร EGCG ต่อระดับ LIP และ ROS ในเซลล์เพาะเลี้ยง mouse primary cardiomyocytes

- 4) ศึกษาผลผลสาร GTE และสาร EGCG ต่อระดับ Hb, NTBI, TBARS, GSH ในเลือดของหนูธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกิน
- 5) ประเมินระดับ non-heme iron, reduced glutathione, collagen ในเนื้อเยื่อตับและกล้ามเนื้อหัวใจของหนูธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกินและได้รับการรักษาด้วยสาร GTE
- 6) การศึกษาความเป็นพิษของสาร GTE และ EGCG ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง hepatocytes และ cardiomyocytes

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

สารสกัดหยาบและสารอีพิแกลโลเคเตชินแกลเลตจากชาเขียว

การเตรียมสารสกัดหยาบจากชาเขียว

ทำการเตรียมสารสกัดหยาบ (green tea extract, GTE) และสารเคเตชินชนิดอีพิแกลโลเคเตชินแกลเลต (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) จากชาเขียวตามวิธีการที่แสดงไว้ (Srichairatanakool, Ounjaijean et al. 2006) โดยนำยอดใบชา (*Camellia sinensis*) สดจำนวน 20 กิโลกรัมมาทำให้แห้งในตู้อบไมโครเวฟ (กำลังไฟ 800 วัตต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 3 นาที นำไปสกัดด้วยน้ำอุ่น 80 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที นำไปอบแห้งภายใต้สุญญากาศ (lyophilization) ได้เป็นผงสกัดหยาบชาเขียว (POWDERED GREEN TEA EXTRACT) โดยส่วนหนึ่งของ GTE ถูกนำไปวิเคราะห์หาเอกลักษณ์สารเคเตชินต่างๆที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี Analytical HPLC โดยใช้คอลัมน์วิเคราะห์ (Waters SpheroSorb-ODS2, 250x4.7 mm, 5- μ m) ตัวทำละลายเคลื่อนที่สำหรับ isocratic elution (0.05% H₂SO₄ : acetonitrile : ethyl acetate = 86:12:2, v/v/v) ด้วยอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และติดตามสารวิเคราะห์ต่างๆที่ถูกชะออกด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารเคเตชิน (C, EC, EGC, EGCG และ ECG) ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน

การเตรียมสารอีพิแกลโลเคเตชินแกลเลตจากสารสกัดหยาบชาเขียว

อีกส่วนหนึ่งนำไปแยกเก็บ EGCG Fraction ด้วยวิธี Semi-preparative HPLC (Thephinlap, Ounjaijean et al. 2007) โดยใช้คอลัมน์หลัก (Luna ODS2, 250X10 mm, 5 μ m, Phenomenex[®], Torrance, California, USA) ต่อกับการ์ดคอลัมน์ (Luna ODS2, 50x10 mm, 5 μ m, Phenomenex[®], Torrance, California, USA) ตัวทำละลายเคลื่อนที่แบบ isocratic elution with solvent (methanol :

H₂O = 29 : 71, v/v) ด้วยอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามสารวิเคราะห์ต่างๆ ที่ถูกชะออก ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

การตรวจวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

นำสาร GTE ที่เตรียมได้มาตรวจวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเทียบกับสารมาตรฐาน trolox (trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) (van den Berg, Haenen et al. 1999) และแสดงค่าที่วัดได้ออกมาเป็นหน่วย “มิลลิกรัมของสาร trolox/น้ำหนักแห้ง 1 กรัม”

น้ำยาเคมีที่ใช้

- 1) สารละลาย ABTS^{•+}: ละลายสาร ABTS ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับผง MnO₂ เป็นเวลานาน 12-16 ชั่วโมงในที่มืดเพื่อออกซิไดซ์ ABTS ให้กลายเป็น ABTS^{•+} แล้วทำการเจือจางต่อด้วยสารละลาย PBS, pH 7.4 จนกระทั่งสารละลาย ABTS^{•+} นี้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเท่ากับ 0.70±0.02
- 2) สารละลาย GTE ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมในสารละลาย PBS, pH 7.4
- 3) สารละลาย trolox ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมในสารละลาย PBS, pH 7.4

วิธีการทดลอง

ผสมสารละลาย GTE, EGCG, ECG และ trolox (10 ไมโครลิตร) กับสารละลาย ABTS^{•+} (1 มิลลิลิตร) แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิห้องนาน 1-6 นาที ติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรเทียบกับสารละลาย sample blank (GTE และ trolox) ซึ่งผลการศึกษาพบว่าค่าต้านออกซิเดชันของ GTE และ EGCG มีค่าเท่ากับ 9.1 และ 4.7 มิลลิโมลาร์ TEAC/น้ำหนักแห้ง 1 กรัมตามลำดับ

การตรวจวิเคราะห์กรดไขมัน (Yamaguchi, Matsunaga et al. 1986; Yamaguchi, Matsunaga et al. 1986)

การศึกษานี้ใช้วิธี fluorescent-derivatized HPLC ที่มีความไวในการตรวจวัดสูงมาก (10^{-12} – 10^{-15} โมลาร์) สำหรับวิเคราะห์กรดไขมันอิสระ (free fatty acids, FFA) จากสารมาตรฐานและจากปฏิกิริยา alcoholic saponification (alcoholic KOH) ของสารองค์ประกอบในน้ำมันงา (Sesame oil) ดับของปลาสาหร่าย รุ้ง พลาสมาและเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีของหมู่คาร์บอกซิลในโมเลกุลกรดไขมันอิสระกับสารเรืองแสง 3-bromomethyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalinone (BMMQ)

ในสภาวะที่มีโพแทสเซียมคาร์บอเนต (รูป potassium carbonate) และสาร 18-crown-6 ether เปลี่ยนไปเป็นสารอนุพันธ์เรืองแสง BMMQ-FFA ต่างๆที่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยวิธี reversed-phase-HPLC โดยการชะแบบ gradient elution ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ นาน 45 นาที และติดตามตรวจวัดสารอนุพันธ์เรืองแสงต่างๆ

การสกัดลิพิดจากสิ่งส่งตรวจ

นำเนื้อเยื่อหัวใจมาทำให้แห้งข้ามคืนโดยวิธี lyophilization ด้วยเครื่องมือ (Savant Speed-Vac Plus) เติมสารละลายน้ำเกลือลงไปแล้วทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication นาน 10-15 นาที ทำการสกัดลิพิดด้วยสารละลาย methanol ซึ่งมีสาร dichloromethane เป็น internal standard ดูดตัวทำละลายชั้นบนแยกออกมาแล้วระเหยให้แห้งด้วยไอก๊าซไนโตรเจน

นำเม็ดเลือดแดงมาทำการสกัดลิพิดด้วยสารละลาย isopropanol ซึ่งมีสาร dichloromethane เป็น internal standard (1:30:14.4, v/v/v) ดูดตัวทำละลายชั้นบนแยกออกมาแล้วระเหยให้แห้งด้วยไอก๊าซไนโตรเจน ส่วนพลาสมาให้นำมาสกัดลิพิดด้วยสารละลาย isopropanol และ NSS ซึ่งมีสาร dichloromethane เป็น internal standard (1:25:75:50, v/v/v/v) ดูดตัวทำละลายชั้นบนแยกออกมาแล้วระเหยให้แห้งด้วยไอก๊าซไนโตรเจน

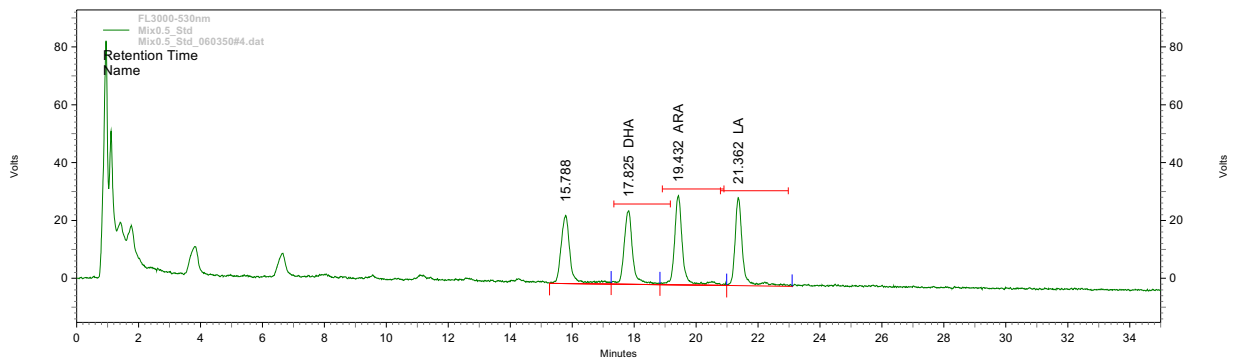
ลิพิดที่ถูกสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ถูกนำมาเติมหมู่เมทิลด้วยสารละลาย BF_3 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เมื่อเย็นลงให้นำมาสกัดด้วยสารละลายเอ็กเซนและน้ำ (1:2:2, v/v/v) ดูดแยกชั้นเอ็กเซนออกมาและนำไประเหยให้แห้งด้วยไอก๊าซไนโตรเจน สารอนุพันธ์ fatty acid methyl ester ที่ได้ถูกนำมาละลายใหม่ในเอ็กเซน และนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี HPLC

การวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ฉีดสารละลายตัวอย่าง (20 ไมโครลิตร) เข้าไปในเครื่องมือ HPLC ภายใต้สภาวะต่อไปนี้ analytical column (NovaPak[®] C18, 3.9mm x 150mm, 4 μm) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, continuous gradient elution (70 $\rightarrow$ 100% acetonitrile) (0 $\rightarrow$ 30 min) อัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามตรวจวัดการเรืองแสงของสารประกอบ FFA-BMMQ ด้วยเครื่องมือ on-line spectrofluorometer ($\lambda_{\text{excitation}}$ 362 nm / $\lambda_{\text{emission}}$ 415 nm) และอินทรีเกตข้อมูลด้วยโปรแกรม ChemStation

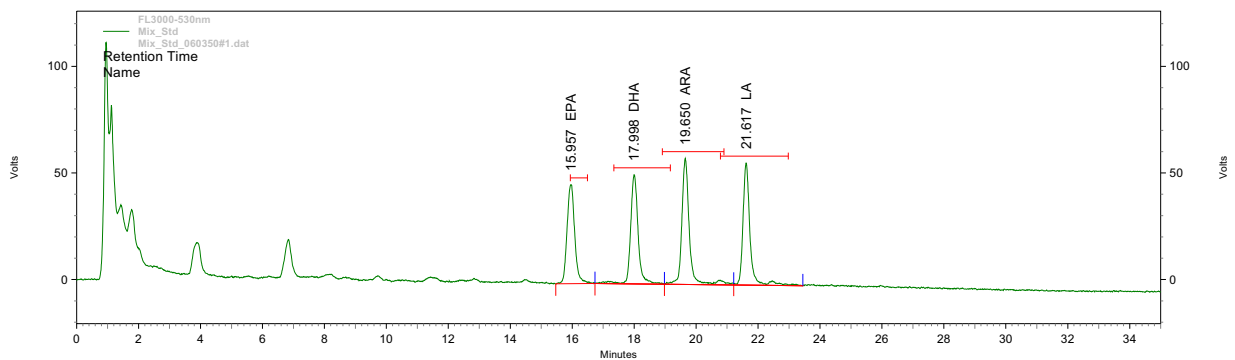
สารละลายกรดไขมันมาตรฐาน: ผสมสารละลาย eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), arachidonic acid (ARA) และ alpha-linolenic acid (ALA) ให้มีความเข้มข้นต่างๆ และนำไปฉีดวิเคราะห์ (50 ไมโครลิตร) ด้วยวิธี HPLC

สารละลายกรดไขมันความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์



Standard fatty acids:	Retention Time	Peak area	%Peak area	Peak height	%Peak height
EPA	15.788 min	490738	23.84	23584	21.38
DHA	17.825 min	490123	23.81	25434	23.06
ARA	19.432 min	561777	27.29	30830	27.95
LA	21.362 min	515958	25.06	30454	27.61

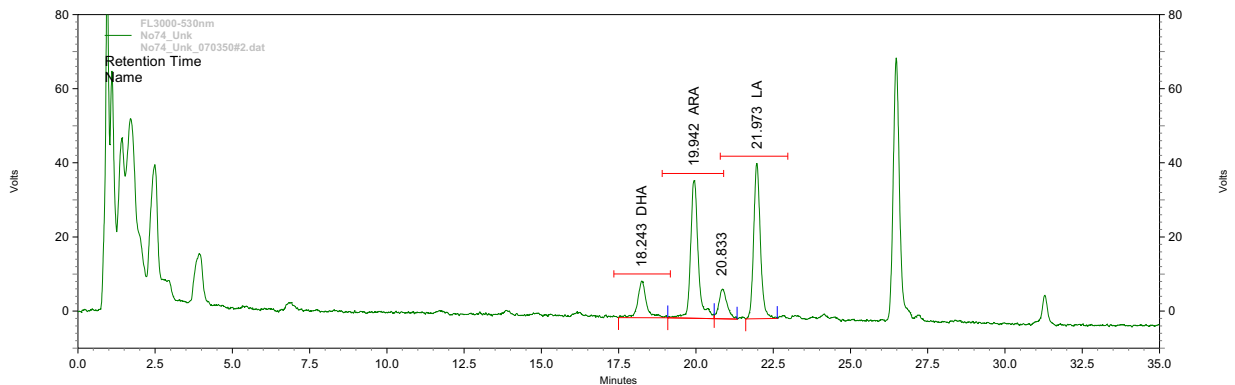
สารละลายกรดไขมันความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์



Standard fatty acids:	Retention Time	Peak area	%Peak area	Peak height	%Peak height
EPA	15.957 min	801470	22.31	46454	21.69
DHA	17.998 min	876135	24.39	51260	23.94

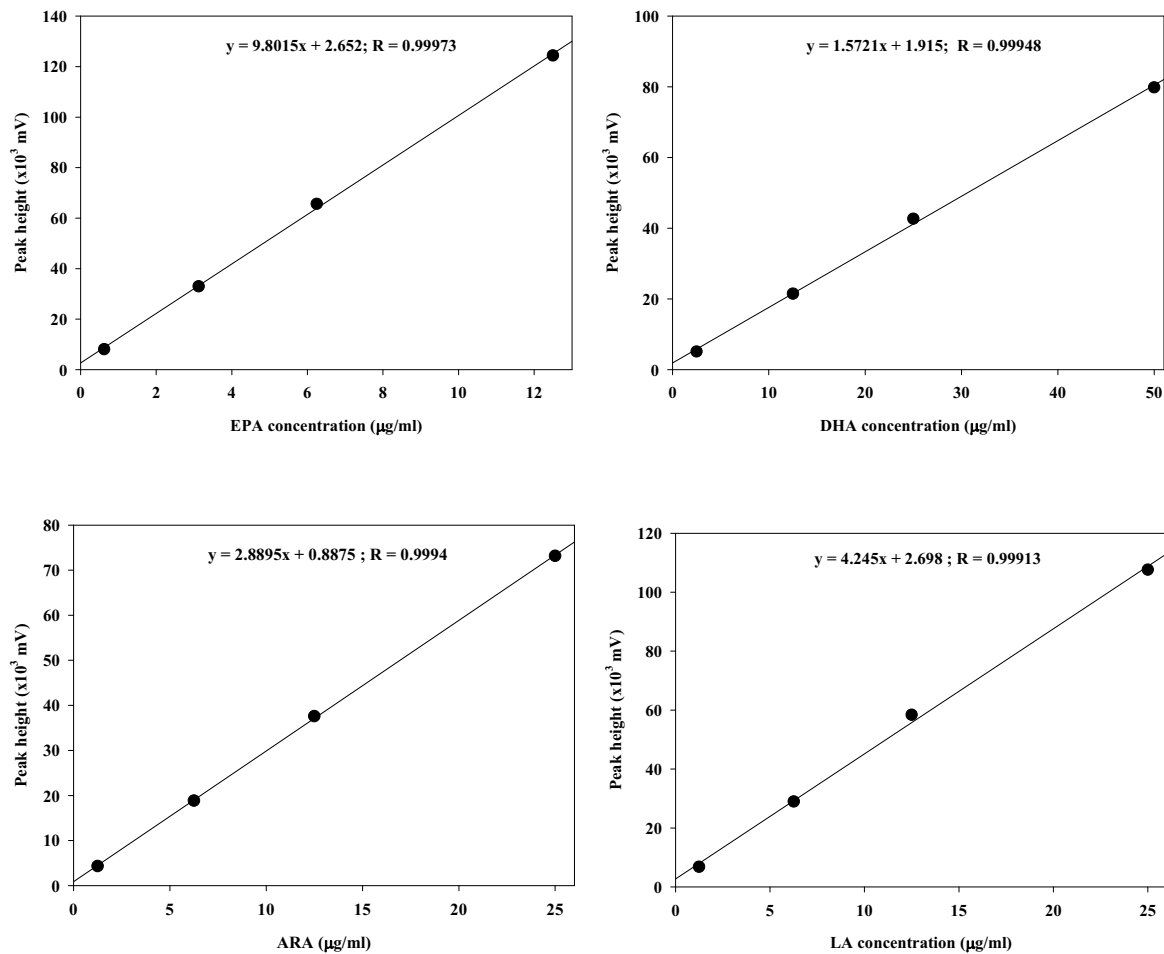
ARA	19.650 min	1003852	27.94	59105	27.60
LA	21.617 min	910949	25.36	57339	26.77

สารสกัดเนื้อเยื่อตับ



Detected fatty acids:	Retention Time	Peak area	%Peak area	Peak height	%Peak height
DHA	18.243 min	195460	12.12	9922	10.24
ARA	19.942 min	639063	39.63	37157	38.36
Unidentified peak	20.833 min	147117	9.12	7801	8.05
LA	21.973 min	630798	39.12	41978	43.34
OA	26.511 min	ND	ND	ND	ND

รูปที่ 5 Profile ของกรดไขมัน ARA, EPA, DHA และ LA ที่ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC/Fluorescent detection



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานของกรดไขมัน ARA, EPA, DHA และ LA ที่วิเคราะห์จากวิธี HPLC

การตรวจฤทธิ์ปกป้องการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง (Albright and White 1982)

สาร GTE และ EGCG มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (anti-oxidation) และทำลายอนุมูลอิสระ (free-radicals scavenging) ได้ ดังนั้นจึงควรมีความสามารถต้านหรือป้องกันการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงจากสารออกซิแดนท์ (hydrogen peroxide-induced red cell hemolysis) ได้ด้วย

น้ำยาเคมีที่ใช้

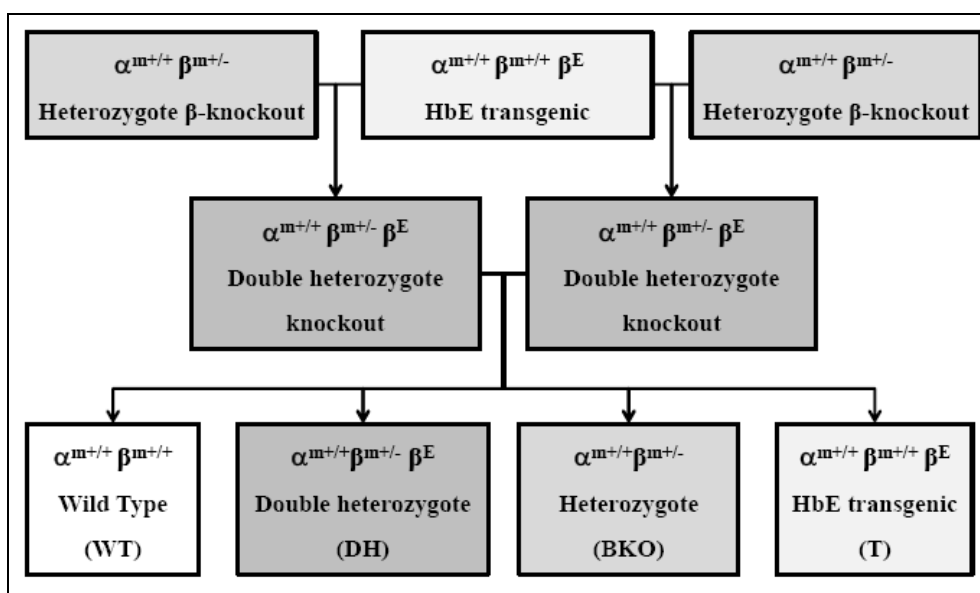
- 1) Red blood cell (RBC) suspension: แยกและเตรียม human normal และ thalassemic RBC ในสารละลาย PBS ให้มีค่า 5% hematocrit
- 2) สารละลาย Fe-NTA (0.1 mM เตรียมในสารละลาย 5 mM MOPS, pH 7.4)
- 3) สารละลาย H_2O_2 (0.1 mM เตรียมในสารละลาย 5 mM MOPS, pH 7.4)

วิธีการทดลอง

ผสม RBC suspension (1 มิลลิลิตร) กับสารละลาย GTE (12.5-100 mg/dl), EGCG (12.5-100 μ M) และ DFP (12.5-100 μ M) (50 ไมโครลิตร) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.1 mM Fe-NTA (100 ไมโครลิตร) และสารละลาย 0.1 mM H_2O_2 (100 ไมโครลิตร) ลงไป ตั้งไว้ในอ่างน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้เติมสารละลาย PBS ลงไป 8 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกเม็ดเลือดแดงออกไป ดูดสารละลายใสขึ้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณหาค่า %hemolysis โดยกำหนดให้เม็ดเลือดแดงที่แตกตัวด้วย hypotonic buffer (5 mM phosphate buffer, pH 7.0) มีค่า %hemolysis เท่ากับ 100

หนูทดลองที่ใช้ศึกษา (Thephinlap, Phisalaphong et al. 2009)

หนูทดลองที่ใช้ตลอดการศึกษาทดลอง ส่วนหนึ่งได้รับความอนุเคราะห์สนับสนุนจากโครงการวิจัยธาลัสซีเมียของศาสตราจารย์ นพ. สุทัศน์ ฟูเจริญ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา อีกส่วนหนึ่งได้รับพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์จากโครงการวิจัยธาลัสซีเมียแล้วนำมาแพร่พันธุ์ต่อ ซึ่งประกอบด้วยหนูกลุ่มปกติ (wild-type, WT) และหนูธาลัสซีเมียชนิด β -thalassemic (BKO, Hbb^{th-3}/Hbb^+) หรือ β -knockout mice และหนูธาลัสซีเมียชนิด double heterozygous knockout (DH, $\alpha^{m+/+} \beta^{m+/-} \beta^E$) (รูปที่ 7) วิธีการศึกษาต่างๆในหนูทดลองได้ยื่นเสนอและได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการใชสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Reference Number 3/2548)



รูปที่ 7 แผนผังการผสมพันธุ์และแพร่พันธุ์หนูธาลัสซีเมีย

ทำการเลี้ยงหนูทดลองในกรงสเตนเลส (3-4 ตัวต่อกรง) ที่รองพื้นด้วยขี้เลื่อย สภาวะห้องหนูทดลองถูกควบคุมให้มีอุณหภูมิคงที่ 23 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 5\%$ ปรับช่วงเวลา (กลางวัน 12 ชั่วโมง/กลางคืน 12 ชั่วโมง) อัตโนมัติ เลี้ยงดูด้วยอาหารปกติสูตรมาตรฐาน (normal formula diet หรือ NF diet) ซึ่งประกอบด้วยความชื้น 12% โปรตีน 24% ไขมัน 4.5% กากใย 5% พลังงาน 3040 กิโลแคลอรีต่อกรัม แคลเซียม 1% ฟอสฟอรัส 0.9% โซเดียม 0.2% โพแทสเซียม 1.17% แมกนีเซียม 0.23% แมงกานีส 171 พีพีเอ็ม ทองแดง 22 พีพีเอ็ม สังกะสี 100 พีพีเอ็ม เหล็ก 180 พีพีเอ็ม โคบอลต์ 1.82 พีพีเอ็ม ซีลีเนียม 0.1% วิตามินเอ 20000 หน่วยสากลต่อกิโลกรัม วิตามินดี 4000 หน่วยสากลต่อกิโลกรัม วิตามินอี 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิตามินเค 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิตามินบีหนึ่ง 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิตามินบีสอง 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิตามินบีหก 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิตามินบีสิบสอง 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม niacin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กรดโฟลิก 6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไบโอติน 0.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และโคลีนคลอไรด์ 1500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับอาหารเสริมธาตุเหล็ก (0.2% w/w ferrocene supplemented diet หรือ FE) เตรียมขึ้นเองโดยการเติมสาร iron ferrene หรือ ferrocene (0.2 กรัม% โดยน้ำหนัก) ลงไปในอาหารสูตรมาตรฐาน หนูทดลองดื่มน้ำกลั่นบริสุทธิ์เองที่บรรจุในขวดพลาสติก (โพลีเอทิลีน) เอง

เดือนที่	0	1	2	3	4	5	6
	ช่วงการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกิน			ช่วงการรักษาด้วยยาขับเหล็ก			
Control:	NF diet						น้ำกลั่น (30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน)
FE:	FE diet						น้ำกลั่น (30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน)
FE/GTE:	FE diet						GTE (300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน)
FE/EGCG:	FE diet						EGCG (50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน)
FE/DFP:	FE diet						DFP (50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน)

หมายเหตุ ส่วนหนูธาลัสซีเมีย β^E -transgenic (TG, Tg (LCRE^G $\gamma^A\gamma\delta\beta^E$) Hbb⁺/Hbb⁺) ไม่ได้ทำการศึกษาเนื่องจากมีอุปสรรคด้านพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์ที่ได้รับมามีสภาพร่างกายไม่ค่อยแข็งแรง ผลการผสมพันธุ์ส่วนใหญ่ให้รุ่นลูกที่เป็นหนู WT (60-75%) และหนู BKO (25-40%) มีบางครั้งได้รุ่นลูกที่เป็นหนู DH (1-2%) แต่ก็มีสภาพร่างกายไม่สมบูรณ์และเสียชีวิตลงเมื่อมีอายุ 1-2 สัปดาห์หรือถูกแมกัดกินจากภาวะเครียดทางร่างกาย ส่วนหนู TG แทบจะไม่สามารถทำการแพร่พันธุ์ลูกหลานได้เลย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาในหนูพันธุ์ปกติ (normal phenotype & genotype) เปรียบเทียบกับหนูธาลัสซีเมีย BKO (thalassemia intermedia phenotype) ที่มีภาวะ mild anemia และมีร่างกายแข็งแรงเพียงพอที่จะรับสภาวะเหล็กเกินได้นาน 6-8 เดือน

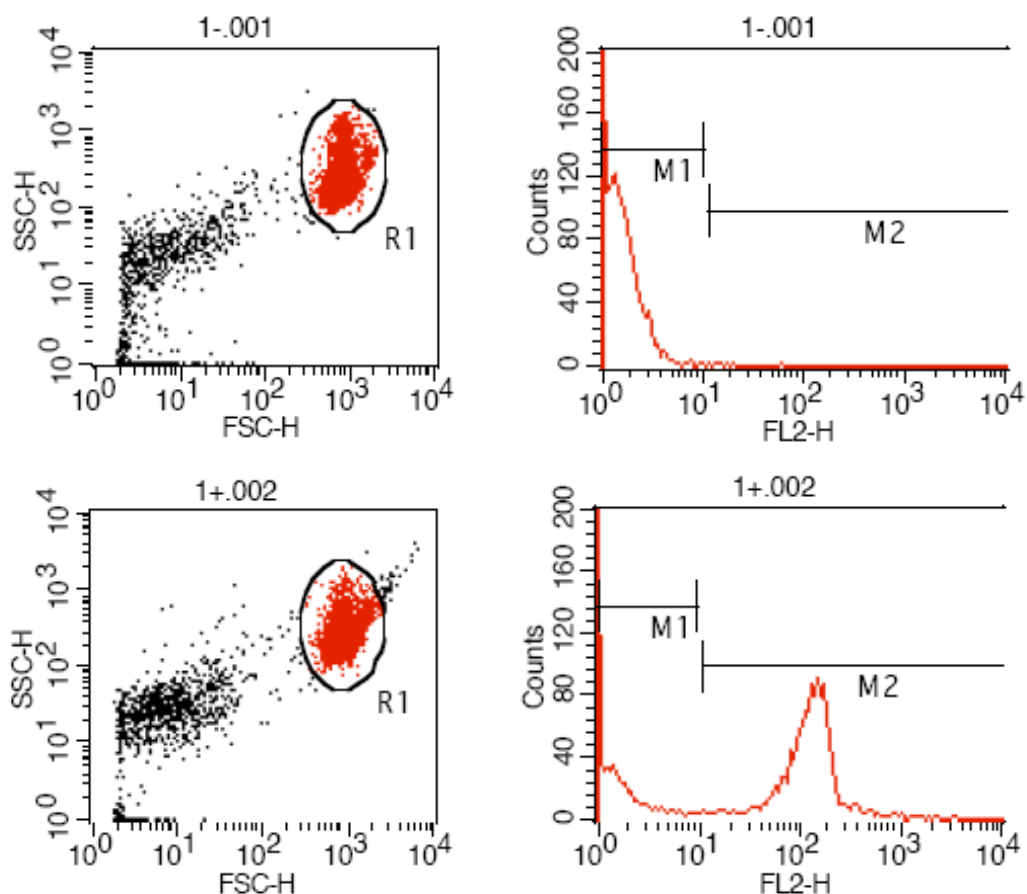
การเหนี่ยวนำหนูทดลองให้มีภาวะเหล็กเกิน (Iron loading) โดยการเลี้ยงด้วยอาหารธาตุเหล็ก (ferrene supplemented diet, FE diet) เป็นเวลา 5 วันต่อสัปดาห์ (จันทร์-ศุกร์) นาน 3 เดือน ช่วงเวลาระหว่างนั้นเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณปลายหางมาทำตรวจวัดระดับ NTBI (Singh, Hider et al. 1990) ทุกสัปดาห์จนพบว่า มีระดับเกิน 1 ไมโครโมลาร์ ต่อจากนั้นจึงทำการแบ่งหนูทดลอง WT และ BKO ที่มีภาวะเหล็กเกินออกเป็นกลุ่มต่างๆและทำการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยาขับเหล็กมาตรฐาน DFP ด้วยวิธีการกิน (ดังแสดงข้างล่าง) เป็นเวลานาน 3 เดือน

ทำการเจาะเลือด (whole blood) จากเส้นเลือดดำบริเวณหางหนู (0.1 มิลลิลิตรต่อครั้ง) ทุกเดือน ใส่ในหลอดทดลองที่มีสาร lithium heparin เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว เพื่อนำไปตรวจวัดค่าตัวชี้วัดต่างๆทางชีวเคมี (ได้แก่ NTBI, TBARS) และทางโลหิตวิทยา (ได้แก่ hemoglobin, erythrocyte oxidative stress) เมื่อครบเวลา 3 เดือนในการบำบัดรักษาด้วยยาขับเหล็ก ให้ทำการรณูฆาตหนูทดลอง โดยทำการสลบด้วยไออีเธอร์ ทำการเปิดช่องท้อง เจาะดูดเลือดจากหัวใจ (cardiac puncture) เพื่อนำไปตรวจวัดระดับค่าตัวชี้วัดต่างๆ ทำการตัดแยกอวัยวะสำคัญ (ได้แก่ตับ ม้ามและหัวใจ) ออกมาชั่งน้ำหนัก (wet weight) และแบ่งแยกเนื้อเยื่อต่างๆเหล่านั้นเพื่อนำไปวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา (ได้แก่ Hematoxylin and Eosin (H&E) staining, Perl's staining และ Mason trichrome staining) และทางชีวเคมี (ได้แก่ Ferrozine colorimetric assay, Ehrlich's reagent-based hydroxyproline assay)

การศึกษาผลของสาร GTE และ EGCG ต่อการมีชีวิตของเม็ดเลือดแดงในหนูทดลอง

สาร catechins (เช่น EGCG และ ECG) ในชาเขียวมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระและจับตรึงธาตุเหล็กได้ ดังนั้นจึงควรมีศักยภาพช่วยยืดอายุของเม็ดเลือดแดง (RBC survival) ในหนู WT และ BKO ให้ยืนยาวขึ้น (โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาวะที่หนูทดลองมีภาวะเหล็กเกิน) เราทำการตรวจวัดอายุเม็ดเลือดแดงด้วยการใช้สารไบโอตินติดฉลากสารไกลโคฟอริน (glycophorin) บนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง แล้วย้อมอีกครั้งด้วยสารละลาย phycoerythrin (PE)-conjugated streptavidin และนำไปตรวจวัดการเรืองแสงสีแดงของเม็ดเลือดแดง (PE-conjugated streptavidin-biotin-glycophorin=RBC) ด้วยวิธีโฟลไซโตเมตรี

ทำการฉีดสารละลายไบโอติน (EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin, Pierce, Rockford, IL, USA) (ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรเข้าเส้นเลือดดำบริเวณหางหนู จากนั้นทำการเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณหางหนูประมาณ 2-3 ไมโครลิตรในช่วงเวลาต่างๆ ทำการปั่นแยกเม็ดเลือดแดงออกมาและล้างด้วยสารละลาย HEPES-buffer saline (HBS) ที่ประกอบด้วย 10 mM HEPES, pH 7.4 และ 165 mM NaCl เตรียมและนำ RBC suspension (5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) มาทำการย้อมด้วยสารละลาย PE-conjugated streptavidin (5 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรในสารละลาย 2.5 mM CaCl_2 -supplemented HBS) และนำไปตรวจวัดค่าการเรืองแสง (fluorescent unit, FI) ด้วยเครื่องมือ FACS-Caliber flow cytometer (Becton-Dickinson) (de Jong, Emerson et al. 2001; Manodori and Kuypers 2002) ซึ่งจะให้ผลการทดลองดังรูปที่ 8 ที่แสดงสัญญาณการเรืองของกลุ่มประชากรเม็ดเลือดแดง



รูปที่ 8 Scatter plot และ Histogram plot ของการเรืองแสง (M2) ของเม็ดเลือดแดง (R1) ที่ไม่ได้ย้อม (แถวบน) และย้อม (แถวล่าง) ด้วยสารเรืองแสง PE

การเตรียมและเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ

น้ำยาและอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

สารละลาย 10x Leffert's buffer (250 mM HEPES, 1.15 M NaCl, 50 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 pH 7.4) ละลาย HEPES 59.57 กรัม NaCl 62.27 กรัม KCl 3.73 กรัม KH_2PO_4 1.36 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วยสารละลาย 10 N NaOH ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน นำมากรองผ่าน filter membrane (0.2 μm)

สารละลาย 1 M CaCl_2 ละลาย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 73.5 กรัมในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ

สารละลาย 0.2 M EGTA (ethyleneglycol tetraacetic acid) ละลาย EGTA จำนวน 38.04 กรัมในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรนำมากรองผ่าน filter membrane (0.2 μm)

สารละลาย Chelation buffer A (1x Leffert's/0.5 mM EGTA) เติม 0.625 มิลลิลิตร ของสารละลาย 0.2 M EGTA ลงไป พร้อมปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วย 1x Leffert's buffer บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

สารละลาย Collagenase buffer (1x Leffert's/1 mM CaCl_2) เติม 0.5 มิลลิลิตรของสารละลาย 1 M CaCl_2 ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วย 1x Leffert's buffer 1 ชั่วโมงก่อน perfusion ทำการละลาย Collagenase type IV 70 มิลลิกรัม ลงในสารละลาย buffer (1x Leffert's/1 mM CaCl_2) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

สารละลาย Buffer C (1x Leffert's/2 mM CaCl_2) เติม 0.5 มิลลิลิตรของสารละลาย 1 M CaCl_2 ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วย 1x Leffert's buffer ก่อนทำการ perfusion ทำการละลาย BSA 1.5 กรัม ลงในสารละลาย buffer (1x Leffert's/2 mM CaCl_2) บ่มในอ่างน้ำแข็ง ในการทดลองอาจจำเป็นต้องเพิ่ม growth factor ที่จำเป็นต่อการเจริญและการมีชีวิตรอดของเซลล์ ตัวอย่างเช่น epidermal growth factor (EGF), insulin, hydrocortisone, transferrin เพื่อให้มีปริมาณเซลล์เพียงพอและอยู่รอดได้นานตลอดช่วงการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์ตับชนิดปฐมภูมิ (Schmidt, Schmitz et al. 2005)

นำตับจากหนูเม้าส์ (C57/BL6) ที่ทำการุณฆาตแล้วมาล้างด้วยบัฟเฟอร์ล้างที่ประกอบด้วย 5.4 mM KCl, 116 mM NaCl, 20 mM HEPES, 25 mM NaHCO_3 , 5.6 mM glucose pH 7.4 และ 0.63 mM EGTA ย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส (0.025%, w/v และมีปริมาณ CaCl_2 0.75 g/l) นำ hepatocyte pellet ที่ได้มาเติมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ Krebs Ringer ที่ประกอบด้วย 3% BSA, 25 mM NaHCO_3 , 20 mM HEPES pH 7.4, penicillin 100U/ml และ streptomycin 100 mg/ml จากนั้นนำ hepatocyte suspension ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Medium (MEM) ที่ประกอบด้วย penicillin 100U/ml, streptomycin 100 mg/ml, Fungizone 3.75 mg/ml, dexamethazone 1 mM, insulin 0.2 U/ml, fetal bovine serum 10% (v/v) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

การเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ HepG2 (Huang, Chen et al. 2001)

นำ HepG2 cells ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Medium (MEM) ที่ประกอบด้วย penicillin 100U/ml, streptomycin 100 mg/ml, Fungizone 3.75 mg/ml, dexamethazone 1 mM, insulin 0.2 U/ml, fetal craft serum 10% (v/v) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่ได้มาตรวจวัดการรอดชีวิตด้วยเทคนิค Trypan blue dye exclusion โดยการแบ่งเซลล์ที่ลงในจานพลาสติกเลี้ยงปราศจากเชื้อโรค ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ เมื่อครบเวลา ดูดเอาสารละลาย Buffer C ออกทิ้ง เติมน้ำย้อม trypan blue ลงไปใน hepatocyte suspension ค่อยๆเขย่าให้ผสมกัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที นำไปหยดลงบนแผ่นสไลด์แก้ว ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ตาย (ติดสีน้ำเงิน) และจำนวนเซลล์มีชีวิต (ไม่ติดสีน้ำเงิน) แล้วคำนวณหา %cell viability

การเตรียมและเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (O'Connell, Rodrigo et al. 2007)

น้ำยาและอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

สารละลาย Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Free $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, pH 7.4 เตรียมโดยละลาย NaCl 8.00 กรัม KCl 0.40 กรัม Glucose 2.70 กรัม NaHCO_3 0.35 กรัม KH_2PO_4 5.99 กรัม และ Na_2HPO_4 4.83 กรัมในน้ำปราศจากไอออนประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วยสารละลาย 10 N. NaOH และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน นำมากรองผ่าน filter membrane (0.22 μm)

สารละลาย collagenase ละลายผงเอนไซม์ collagenase type II 4 มิลลิกรัมในสารละลาย HBSS 2 มิลลิลิตร กวนสารละลายบนอ่างน้ำแข็งนาน 30-60 นาที กรองผ่าน filter membrane (0.22 μm) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย trypsin (0.25 %) ละลายผงเอนไซม์ trypsin 2.5 มิลลิกรัมในสารละลาย 1 mM EDTA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

สารละลาย fungizone ละลายยา clotrimazole 10 มิลลิกรัมใน HBSS 4 มิลลิลิตร

สารละลาย Penicillin/Streptomycin (Pen-Strep) ละลาย Penicillin/Streptomycin 10,000 U/10,000 mg/ml ใน HBSS

สารละลาย serum-free M199 Medium ละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ M199, HEPES 4.76 กรัม (20 mM), NaHCO_3 2.20 กรัม (26.2 mM) ในน้ำกลั่นปราศจากไอออนประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วยสารละลาย 10 N. NaOH ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน นำมากรองผ่าน filter membrane (0.22 μm)

สารละลาย complete M199 Medium นำ Serum-free M199 medium มาเติม Fetal Bovine Serum (20%) และ Pen-Strep solution (1%)

การแยกเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

ทำการดมสลบหนูเมาส์ (adult C57BL6 น้ำหนัก 30 กรัม) ด้วย diethyl ether จากนั้นทำการผ่าเปิดช่องท้อง จากนั้นจึงตัดหัวใจหนูออกมาวางลงใน Petri dish ที่มี Serum-free M199 นำหัวใจหนูไปแช่และจุ่มลงใน HBSS 5 นาที และแช่ใน clotrimazole 5 นาที แล้วนำหัวใจหนูไปล้างใน HBSS 1-2 นาที นำไปแช่และจุ่มใน Pen-Strep 5-10 นาที และล้างใน HBSS อีก 1-2 นาที จากนั้นจึงนำหัวใจหนูไปวางใน Petri dish ที่มี Serum-free M199 อีก plate หนึ่ง แล้วตัดชิ้นเนื้อเอาเฉพาะส่วนของ ventricle และตัดให้มีขนาดเล็กมากๆ โดยใช้ forceps และมีดผ่าตัด

นำ Media และชิ้นเนื้อที่ได้ใส่ใน 15-ml centrifuge tube ทำการปั่นแยกเซลล์กับ suspension โดย centrifuge ที่ 3000 rpm นาน 5 นาที ดูดเอาส่วน supernatant ที่ขึ้น นำชิ้นเนื้อส่วนที่เหลือมาแยกโดยเติมสารละลาย collagenase 2 มิลลิลิตร ดูดขึ้น-ลง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน 5%CO₂ incubator นาน 15 นาที เติม Complete M199 medium ลงไป 4 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นแยกที่ 3000 rpm นาน 5 นาที ดูดเอาส่วน supernatant ที่ขึ้น

เติมสารละลาย trypsin ลงไป 2 มิลลิลิตร ดูดขึ้น-ลง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสใน 5%CO₂ incubator นาน 15 นาที เติม complete M199 ลงไป 4 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นแยกที่ 3000 rpm นาน 5 นาที ดูดเอาส่วน supernatant ที่ขึ้น

การเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

เติม Complete M199 medium ลงไป 5 มิลลิลิตรใส่ใน centrifuge tube ขนาดความจุ 15 มิลลิลิตร เพื่อ resuspend cell pellet แล้วเขย่าผสม จากนั้นจึง pipette cell suspension ที่มี Complete M199 medium อยู่ 5 มิลลิลิตร ลงใน culture T flask และนำไปเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียสใน CO₂ incubator เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์หัวใจปฐมภูมิได้ประมาณ 10 วัน ก็จะมีการ trypsinized เซลล์ แล้วส่วนตะกอนของเซลล์ไปทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค Trypan blue dye exclusion test จากนั้นจึงแบ่งเซลล์และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะผิวภาชนะ

เมื่อครบเวลา ดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารสกัดที่ต้องการทดสอบคือ GTE, FAC, EGCG และ DFP ที่ความเข้มข้นต่างๆลงในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้บ่ม 5%CO₂ incubator เมื่อครบเวลา ดูดเอาสารละลายทิ้ง ตรวจวัดความเป็นพิษ (Cytotoxicity test) ของสารทดสอบต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจด้วยเทคนิค MTT method โดยการเติมสารละลาย MTT dye ลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงดูดสารละลายทั้งหมดทิ้ง และเติมสารละลาย dimethyl sulphoxide (DMSO) ลงไป และทำการบ่มต่ออีก 10 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540/630 นาโนเมตร

การศึกษาผลของ GTE และ EGCG ต่อระดับ LIP ในเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์เพาะเลี้ยง primary hepatocytes, HepG2 cells และ cardiomyocytes มาเติมสารละลาย ferric ammonium citrate (FAC, 1 mM) เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์มีภาวะเหล็กเกิน (Wu and

Cederbaum 2008) แล้วทำการรักษาด้วย GTE, EGCG, DFP และ DFO ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 วัน จากนั้นจึงนำเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไปตรวจวัดระดับ LIP ที่มีอยู่ด้วยวิธี calcein fluorescent method

การศึกษาผลของ GTE และ EGCG ต่อภาวะ oxidative stress ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

นำเซลล์ตับเพาะเลี้ยงมาเติมสารละลาย FAC (ความเข้มข้น 0.1 mM) เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์มีภาวะเหล็กเกินและออกซิดาทีฟสเตรส แล้วทำการรักษาด้วย GTE, EGCG, DFP และ DFO ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 วัน จากนั้นจึงนำเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไปตรวจวัดระดับ ROI ด้วยวิธี DCF fluorescent method

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของ GTE และ EGCG ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

นำเซลล์ตับเพาะเลี้ยงมาเติมด้วยสารละลาย FAC, GTE, EGCG, DFP และ DFO ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 วัน แล้วนำเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไปตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด (viable cells) ด้วยวิธี MTT method (ดังรายละเอียดข้างล่าง)

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของ GTE และ EGCG ต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยง

นำเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยงมาเติมด้วยสารละลาย FAC, GTE, EGCG, DFP และ DFO ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 วัน แล้วนำเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไปตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด (viable cells) ด้วยวิธี MTT method (ดังรายละเอียดข้างล่าง)

การตรวจวัดปริมาณฮีโมโกลบินในเลือด (Gambino and Sunderman 1965)

เติมเลือด heparinized blood (20 ไมโครลิตร) ลงในน้ำยา Drabkin's solution (5 มิลลิลิตร) เขย่าให้ผสมกันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเทียบกับ Drabkin's solution แล้วเทียบหาปริมาณความเข้มข้นของฮีโมโกลบินจากการฟมาตรฐาน

การตรวจวัดปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ในพลาสมา (Singh, Hider et al. 1990)

เติมสารละลาย NTA ความเข้มข้น 800 มิลลิโมลาร์ (50 ไมโครโมลาร์) ลงในพลาสมาตัวอย่าง (450 ไมโครลิตร) เพื่อดึงธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ให้กลายเป็น Fe-(NTA)₂ นำไปปั่นผ่าน ultrafiltration membrane (30-kD molecular weight cut-off) เพื่อกำจัดโปรตีนต่างๆในพลาสมาออกไป นำสารละลายที่ปั่นได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม NTBI ด้วยวิธี RP-HPLC โดยอาศัยหลักการคือ สาร 1-methyl-

2-propyl--3-hydroxypyridin-4-one (หรือCP22) ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ในตัวทำละลายซึ่งประกอบด้วย 19% acetonitrile ใน 5 mM MOPS, pH 7.0 จะเข้าแย่งจับธาตุเหล็กจากสารประกอบ Fe^{3+} -(NTA)₂ แทนที่ แล้วเปลี่ยนเป็นสารประกอบ Fe^{3+} -(CP22)₃ ซึ่งมีสีแดงและสามารถตรวจวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่า peak area ของ NTBI peak ที่แยกได้ไปหาปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน standard Fe curve ที่สร้างขึ้นจากสารละลาย Fe-NTA ความเข้มข้น 0-32 ไมโครโมลาร์

การตรวจวัดระดับธาตุเหล็กในเซลล์ (Cabantchik, Glickstein et al. 1996)

วิธี calcein-fluorescent technique ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจวัดปริมาณเหล็กอิสระที่มีอยู่ในเซลล์ด้วยสาร calcein acetomethoxy (calcein AM) ที่เติมลงไป จะแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์และถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ esterase ในเซลล์ได้เป็นสาร calcein ซึ่งมีคุณสมบัติเรืองแสงถ้าถูกกระตุ้นด้วยลำแสงเลเซอร์ สารประกอบธาตุเหล็กภายในเซลล์เรียกว่า labile iron pool (LIP) หรือ labile cell iron (LCI) เกิดปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุสาร calcein ทำให้เกิดการเรืองแสงของสาร calcein ลดลง สาร iron chelator เช่นยาขับเหล็กดีเฟอริพอน (DFP) และสารสกัดหยาบที่ประกอบด้วย catechins (green tea catechins) สามารถแย่งจับกับ LCI ได้ ทำให้การเรืองแสงกลับเพิ่มมากขึ้น

Hepatocyte culture

นำเซลล์ตับที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin เพื่อแยกเซลล์ตับที่เกาะบนผิวภาชนะให้หลุดออกมา บั่นล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง เติมสารละลาย FAC (1 mM) ลงไปเซลล์ตับเพาะเลี้ยงเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณเหล็กในเซลล์ก่อนและหลังการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP โดยทำการย้อมเซลล์ด้วยสารละลาย calcein AM นำไปวัดการเรืองแสง (calcein) ของเซลล์ด้วยเครื่องมือ 96-well plate reader spectrofluorometer แล้วคำนวณค่าที่วัดเป็น Fluorescence intensity (FI) unit/10⁶ cells

Cardiomyocyte culture

นำเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่เตรียมได้มาเติมสารละลาย FAC (1 mM) ลงไปเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณเหล็กในเซลล์ก่อนและหลังการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP โดยทำการย้อมเซลล์ด้วยสารละลาย calcein AM นำไปวัดการเรืองแสง (calcein) ของเซลล์ด้วยเครื่องมือ 96-well plate reader spectrofluorometer แล้วคำนวณค่าที่วัดเป็น FI unit/10⁶ cells

การตรวจวัดระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Shen, Shi et al. 1996; Amer, Goldfarb et al. 2004)

เอนไซม์ esterase ในเซลล์มีชีวิตจะไฮโดรไลซ์สารเคมี 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ที่แพร่ซึมเข้าไปในเซลล์ให้กลายเป็นสาร 2'-7'-dichlorofluorescein (DCFH) ก่อน จากนั้นสารประกอบ ROI ที่มีอยู่ภายในเซลล์จะออกซิไดซ์สาร DCFH ให้กลายเป็นสาร oxidized dichlorofluorescein (DCF) ที่มีคุณสมบัติเรืองแสงได้ ซึ่งความเข้มของการเรืองแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในเซลล์ ซึ่งแสดงค่าที่วัดได้เป็น FI unit

Hepatocyte cultures

นำเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (cell suspension) มาเติมลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสาร 10 μ M DCFH-DA ลงไป ตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่ม 5%CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างเซลล์ เติมสารละลาย FAC (100 μ M) ลงไปเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเติมสาร GTE และสาร EGCG ลงไป ตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่ม 5%CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดการเรืองแสงของเซลล์ด้วยเครื่องมือ 96-well plate reader spectrofluorometer ($\lambda_{\text{excitation}}$ 488 nm/ $\lambda_{\text{emission}}$ 512 nm) แล้วคำนวณค่าที่วัดออกมาเป็น FI unit

Erythrocytes

เตรียม RBC suspension ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ให้มีปริมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย DCF-DA ลงไป ตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส (5% CO₂ atmospheric condition) นาน 15 นาที นำไปตรวจวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องมือ flow cytometer (Becton Dickinson FACScan (BD Bioscience, CA) และวิเคราะห์ข้อมูลที่วัดได้ด้วยโปรแกรม Cell Quest software (Becton Dickinson)

การตรวจวัดค่าศักยภาพไฟฟ้าบริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (Ran, Xu et al. 2007)

สารเคมี dihydrorhodamine123 (DHR123) เป็น oxidant sensitive-fluorescent probe ที่ใช้ตรวจวัดสาร ROS ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียได้ดีกว่าสาร DCF สาร ROS จะออกซิไดซ์สาร DHR123 ให้กลายเป็นสาร R123 ที่เรืองแสงสีแดง โดยนำเซลล์เพาะเลี้ยงมาเติมลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสาร 10 μ M DHR123 ลงไป ตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่ม 5%CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างเซลล์ และเติมสารละลาย ammonium ferric citrate (100 μ M) ลงไปเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเติมสาร GTE และสาร EGCG ลงไป ตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่ม 5%CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดการเรืองแสงของเซลล์ด้วยเครื่องมือ 96-well plate reader spectrofluorometer ($\lambda_{\text{excitation}}$ 505 nm/ $\lambda_{\text{emission}}$ 529 nm) แล้วคำนวณค่าที่วัดออกมาเป็น FI unit

การตรวจวัดความเป็นพิษเฉียบพลันต่อเซลล์ (Jover, Ponsoda et al. 1992)

สารสกัดจากชาเขียวที่ติดต้องไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มีชีวิตและไม่มีผลทำให้เซลล์เหล่านั้นตายได้ (cell viability) ในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาความเป็นพิษของสาร GTE และ EGCG จากชาเขียวต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay โดยอาศัยหลักการที่เซลล์มีชีวิตยังคงมีการทำงานและเมตาโบลิซึมสำคัญอย่างหนึ่งที่สามารถสร้างสารประกอบรีดิวซ์สมมูลย์ (reducing equivalent compounds) เช่น NAD(P)H, FADH₂ ขึ้นภายในเซลล์ที่มีคุณสมบัติรีดิวซ์สารเคมี 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นผลึกสีม่วง formazan ขึ้นมา ถ้ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้นก็จะทำให้ความเข้มข้นของสีน้ำเงินลดลง

ทำการศึกษาโดยนำเซลล์เพาะเลี้ยงมาเติมด้วยสารละลาย MTT ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาและได้ผลึกสารผลิตภัณฑ์ formazan ทำการละลายผลึก formazan ด้วยสารละลาย 0.1% DMSO นำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องมือ Dual UV-VIS spectrophotometer ($\lambda_{540 \text{ nm}/630 \text{ nm}}$)

การวัดปริมาณธาตุเหล็กในรูปแบบ non-heme iron ในเนื้อเยื่อตับ (Fischer 1964; Imbert-Bismut, Charlotte et al. 1999)

ปริมาณธาตุเหล็กสะสมในตับถือเป็นแหล่งมาตรฐาน (gold standards) ที่แสดงถึงสภาวะธาตุเหล็กในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แม้ว่าวิธี graphite-furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS) เป็นที่ยอมรับสำหรับใช้ตรวจวัดปริมาณเหล็กในเนื้อเยื่อตับแต่ก็มีข้อบกพร่องบางประการ การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการทำให้เหล็กในรูปแบบเฟอร์รัส (Fe²⁺) เกิดสีกับสาร 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)

น้ำยาเคมี

- 1) สารละลาย 1.5 M acetate buffer, pH 5.0
- 2) สารละลาย TPTZ reagent: ละลายสาร TPTZ ปริมาณ 0.1 กรัมในกรด conc. HCl ปริมาตรเล็กน้อย แล้วเติมสาร sodium acetate จำนวน 40 กรัม กรด glacial acetic acid ปริมาตร 29 มิลลิลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตรลงไป ทำให้ละลายเข้ากันดี จากนั้นเติมสาร hydroxylamine hydrochloride ลงไป 3 กรัม
- 3) สารละลายเหล็กมาตรฐาน (2-10 µg/ml) เตรียมในกรด perchloric acid (1:10 dilution)

วิธีการทดลอง

ทำการอบแห้งเนื้อเยื่อตับในเตาเผาอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ชั่งเนื้อเยื่อตับแห้ง 100 มิลลิกรัม ทำการย่อยด้วยสารละลายกรดผสม (conc. HCl : conc. HNO₃ = 1:1, v/v) บน hot

plate จนเห็นไอควันสีเหลืองเกิดขึ้น นำสารละลาย hydrolysate ที่ได้มาปรับปริมาตรใน volumetric flask ให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ผสมสารละลาย hydrolysate กับสารละลาย hydroxylamine hydrochloride (1:1, v/v) แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาทีเพื่อรีดิวซ์เฟอร์ริกเป็นเฟอร์รัส ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลาย 1.5 M acetate buffer เติมสารละลาย TPTZ ลงไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำสารผลิตภัณฑ์สีม่วงที่เกิดขึ้นไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรเทียบกับสารละลาย sample blank (ไม่มี TPTZ) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณธาตุเหล็กในสารละลาย liver homogenate และนำไปคำนวณหาปริมาณธาตุเหล็กในเนื้อเยื่อตับ (mg Fe/g liver tissue dry weight)

การตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี **dye binding assay** (Bradford 1976)

น้ำยาเคมี

- 1) น้ำยา BioRad Coomassie Brilliant blue (CBB) G250: ละลายสาร CBB G250 จำนวน 100 มิลลิกรัมในเมทานอล 50 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว เติมกรด 85% H_3PO_4 ลงไป 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ก่อนนำไปใช้ให้ทำการเจือจาง 1:4 ด้วยน้ำกลั่น
- 2) สารละลายโปรตีน bovine serum albumin (BSA) มาตรฐานความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

นำสารละลายโปรตีนหรือสารละลาย hydrolysate (40 ไมโครลิตร) มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย CBB G250 (2.0 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิห้องนาน 10-15 นาที นำสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากสารละลาย bovine serum albumin (BSA)

การตรวจวัดปริมาณสาร **MDA** ในเนื้อเยื่อตับ (Chirico, Smith et al. 1993)

ชั่งเนื้อเยื่อตับอบแห้ง (100 มิลลิกรัม) นำมา homogenize กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ค่าพีเอช 2.8) ที่มีสาร butyrate hydroxytoluene (BHT) ผสมอยู่ (50 ppm) นำ liver homogenate ที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย 10% trichloroacetic acid ที่มีสาร butyrate hydroxytoluene (BHT) ผสมอยู่ (50 ppm) นำไปปั่นแยกตะกอนโปรตีนออกไป นำสารละลายใสที่ได้มาเติมกรดฟอสฟอริก (0.44 โมลาร์) และสารละลายกรดบาบิทูริก (1%) เขย่าผสมกันดี นำไปต้มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 30 นาที ทำให้เย็นลง เติมสารละลายบิวทานอล 1.5 มิลลิลิตรลงไป เขย่าแรงๆให้

ผสมกัน นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดสารละลายผลิตภัณฑ์สีชมพูในชั้นบิวทานอลไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ทำการหาค่าปริมาณสาร TBARS (MDA equivalent) โดยนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้สาร 1,1,3,3-tetramethoxypropane เป็นสารมาตรฐาน

การตรวจวัดปริมาณสาร Reduced glutathione ในเนื้อเยื่อตับ (Redegeld, van Opstal et al. 1988)

สารกลูตาไธโอนรูปรีดิวซ์ (reduced glutathione, GSH) ทำหน้าที่รีดิวซ์สาร 5, 5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB) ให้เปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) ที่มีสีเหลือง และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์โดยชั่งเนื้อเยื่อตับ (100 มิลลิกรัม) แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 5-sulfosalicylic acid solution (5%, w/v) เพื่อตกตะกอนโปรตีน ทำการปั่นเพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกไป นำสารละลายใสที่มีสาร GSH มาทำปฏิกิริยากับน้ำยา DTNB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารผลิตภัณฑ์ (TNB) ที่เกิดขึ้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ทำการหาปริมาณสารกลูตาไธโอนรูปรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การวัดปริมาณสาร hydroxyproline ของคอลลาเจนในเนื้อเยื่อตับ (Reddy and Enwemeka 1996)

ชั่งเนื้อเยื่อตับอบแห้ง (100 มิลลิกรัม) นำมาย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (ความเข้มข้น 6 โมลาร์) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับค่าพีเอชของสารละลายให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ความเข้มข้น 6 โมลาร์) นำสารละลาย hydrolysate มาทำปฏิกิริยากับสารละลายออกซิไดซ์ (chloramines-T และ *n*-propanol ในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ค่าพีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เติมสารละลาย Ehrlich's reagent ลงไป แล้วนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทำการหาค่าปริมาณ collagen โดยนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้สาร hydroxyproline (ความเข้มข้น 0 – 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นสารมาตรฐาน

การตรวจสอบชิ้นเนื้อตับด้วยวิธี Histochemical techniques

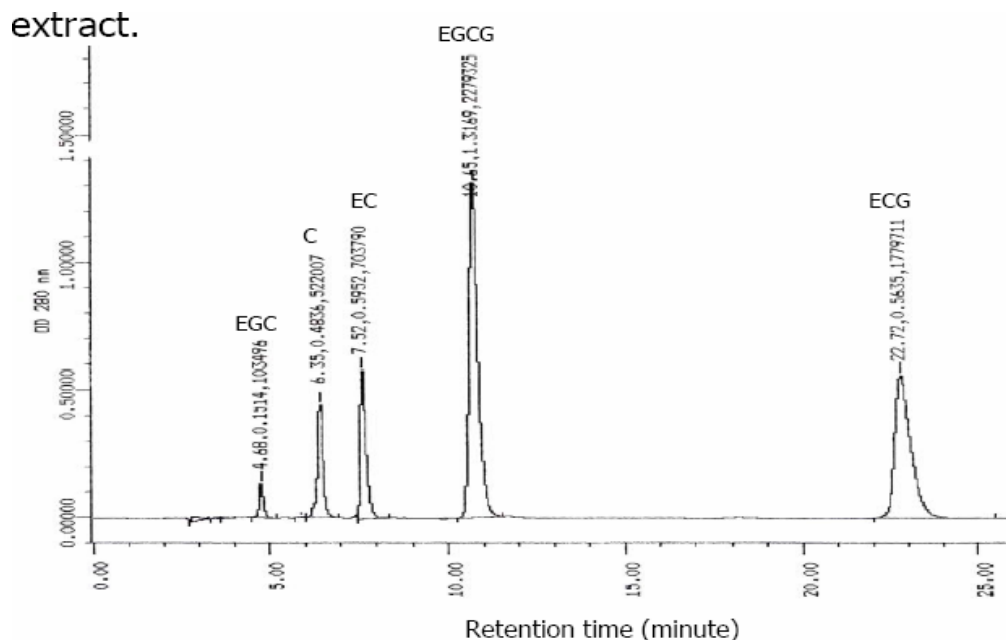
นำเนื้อเยื่อตับมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน (10 % neutral buffered formalin) ล้างในก้อนพาราฟิน นำไปตัดเป็นชิ้นเนื้อบางๆ (หนา 5 ไมครอน) ด้วยเครื่องมือ sliding microtome แล้วนำไปย้อมด้วยสีพิเศษคือ Hematoxylin and Eosin (H&E) stain เพื่อตรวจดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ตับซึ่งนิวเคลียสของเซลล์จะติดสีน้ำเงินเข้มและส่วนอื่นของเซลล์จะติดสีชมพู (Jimenez Brundet 1973) และย้อมด้วยสี Perl's stain (hydrochloric acid-potassium cyanide) เพื่อตรวจดูปริมาณธาตุเหล็กซึ่งจะสังเกตเห็นตะกอนสีน้ำเงินบริเวณที่มีการสะสมธาตุเหล็ก (hemosiderin) ในเซลล์ตับ (Lillie 1976)

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD หรือ mean $\pm$ SEM และทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี ANOVA หรือ Student *t*-test ซึ่งค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง (Results)

สารสกัดหยาบและสารอีพิแกลโลเคเตชินแกลเลตจากชาเขียว



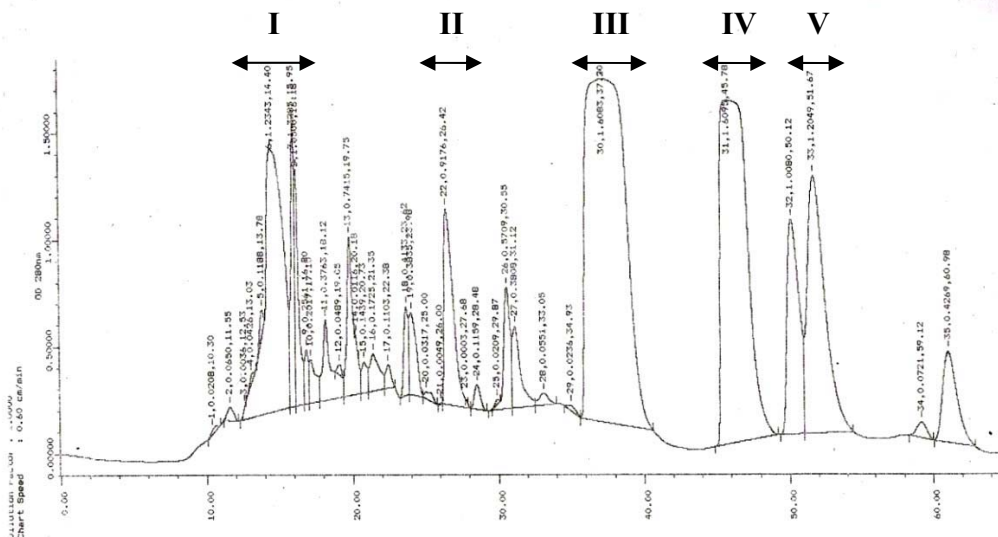
รูปที่ 9 Profile ของสาร catechin ต่างๆในสารสกัดหยาบชาเขียวที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

สาร GTE ที่เตรียมได้มีสารองค์ประกอบหลักจำพวกสารโพลีฟีนอลิกกลุ่ม catechin อย่างน้อย 5 ชนิดคือ EGC, C, EC, EGCG และ ECG (รูปที่ 9) ในปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ดังนี้คือ

ตารางที่ 1 ปริมาณสารเคเตชินชนิดต่างๆที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบชาเขียว GTE)

หน่วยปริมาณ	อนุพันธ์เคเตชิน (mean $\pm$ SD) ในสารสกัดชาเขียว 9 ตัวอย่าง					
	EGC	C	EC	EGCG	ECG	Total
มิลลิโมลาร์	7 $\pm$ 9	0.3 $\pm$ 0.5	4 $\pm$ 3	4 $\pm$ 2	0.2 $\pm$ 0.3	15 $\pm$ 8
มิลลิกรัม/น้ำหนักเปียก 1 กรัม	26 $\pm$ 31	1.5 $\pm$ 2.4	15 $\pm$ 12	25 $\pm$ 12	1.2 $\pm$ 2.1	68 $\pm$ 3
มิลลิกรัม/น้ำหนักแห้ง 1 กรัม	102 $\pm$ 140	5.1 $\pm$ 7.9	54 $\pm$ 43	89 $\pm$ 36	4.3 $\pm$ 7.3	255 $\pm$ 136

ผลการแยกพบว่ามีสารเคเตชินหลัก 5 ชนิดถูกแยกออกมาตามลำดับดังนี้คือ gallic acid (GA) (Fraction I), EC (Fraction II), EGCG (Fraction III), ECG (Fraction IV) และ unidentified compounds (Fraction V) (รูปที่ 10) และพบว่าปริมาณรวมสารเคเตชินมีค่าประมาณ 255 $\pm$ 136 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักใบชาแห้ง 1 กรัม ซึ่งก็ถือว่าตัวอย่างใบชาที่นำมาศึกษานี้อุดมไปด้วยสารเคเตชินที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและเป็นแหล่ง EGCG ที่สำคัญ

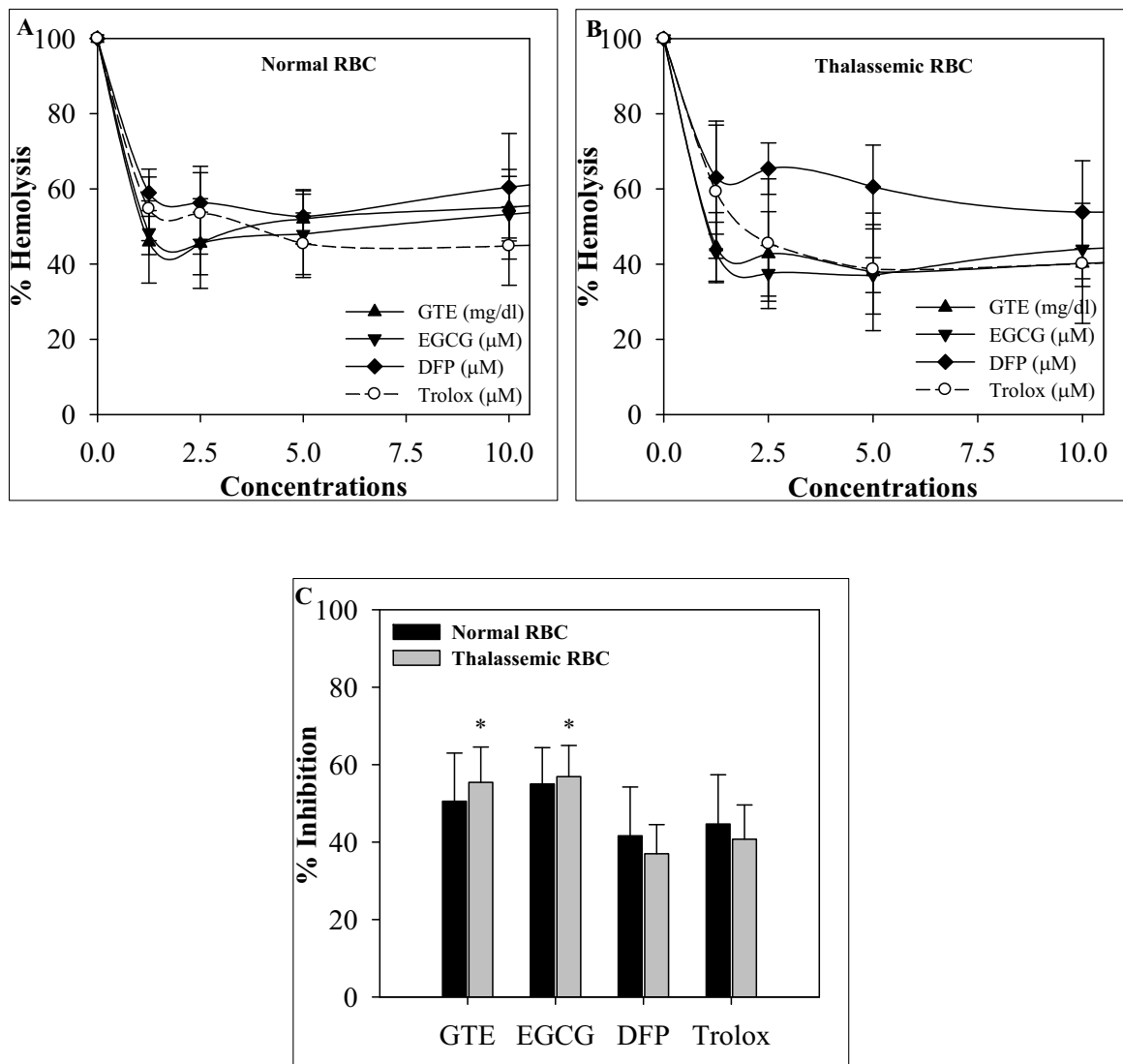


รูปที่ 10 Profile ของสารเคเตชิน GA (Fraction I), EC (Fraction II), EGCG (Fraction III), ECG (Fraction IV) และ unidentified compounds (Fraction V) ที่แยกด้วยวิธี Semi-preparative HPLC

จากนั้นนำส่วน EGCG ที่แยกได้ไปทำให้แห้งโดยการ lyophilization และตรวจหาความบริสุทธิ์ด้วยวิธี analytical HPLC ดังกล่าวข้างต้นเพื่อใช้ต่อไปพบว่าสาร EGCG มีความบริสุทธิ์มากกว่า 98%

การตรวจวัดฤทธิ์ปกป้องการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง

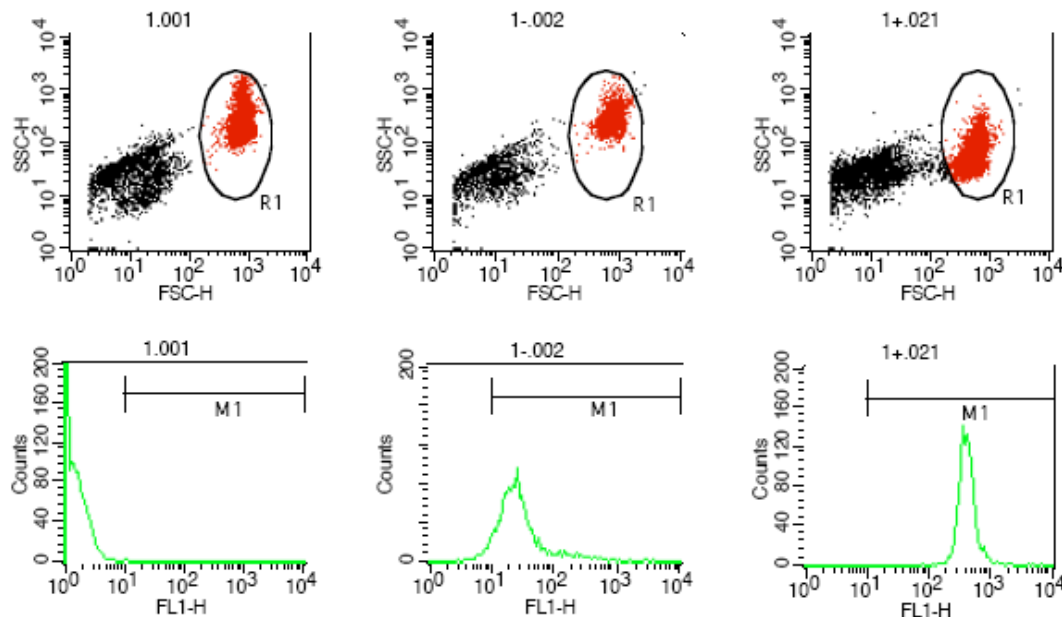
ผลการทดลองในรูปที่ 11 แสดงให้เห็นว่าสาร GTE, EGCG และ trolox มีแนวโน้มยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงของคนปกติและของผู้ป่วยธาลัสซีเมียภายใต้ภาวะออกซิเดทีฟสเตรสที่ถูกกระตุ้นด้วยสารออกซิแดนทีไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ได้ดีกว่ายา DFP และพบว่าสาร GTE ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 12.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร สาร EGCG และ DFP ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 25 ไมโครโมลาร์มีศักยภาพช่วยยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงได้ อย่างไรก็ตามสาร GTE และ EGCG สามารถยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่าสาร trolox



รูปที่ 11 ผลของสาร GTE และ EGCG ช่วยปกป้องการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงจากคนปกติ (A) และ

จากผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (B) และความสามารถยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (C) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน trolox

ผลการทดลองในรูปที่ 12 แสดงการเรืองแสงของเม็ดเลือดแดงเองโดยลำพัง (autofluorescent) (รูป 12 ซ้ายมือสุด) ของเม็ดเลือดแดงที่ย้อมด้วยสารเรืองแสง DCFH (รูป 12 กลาง) และของเม็ดเลือดแดงที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสแล้วย้อมด้วยสารเรืองแสง DCFH (รูป 12 ขวามือสุด)

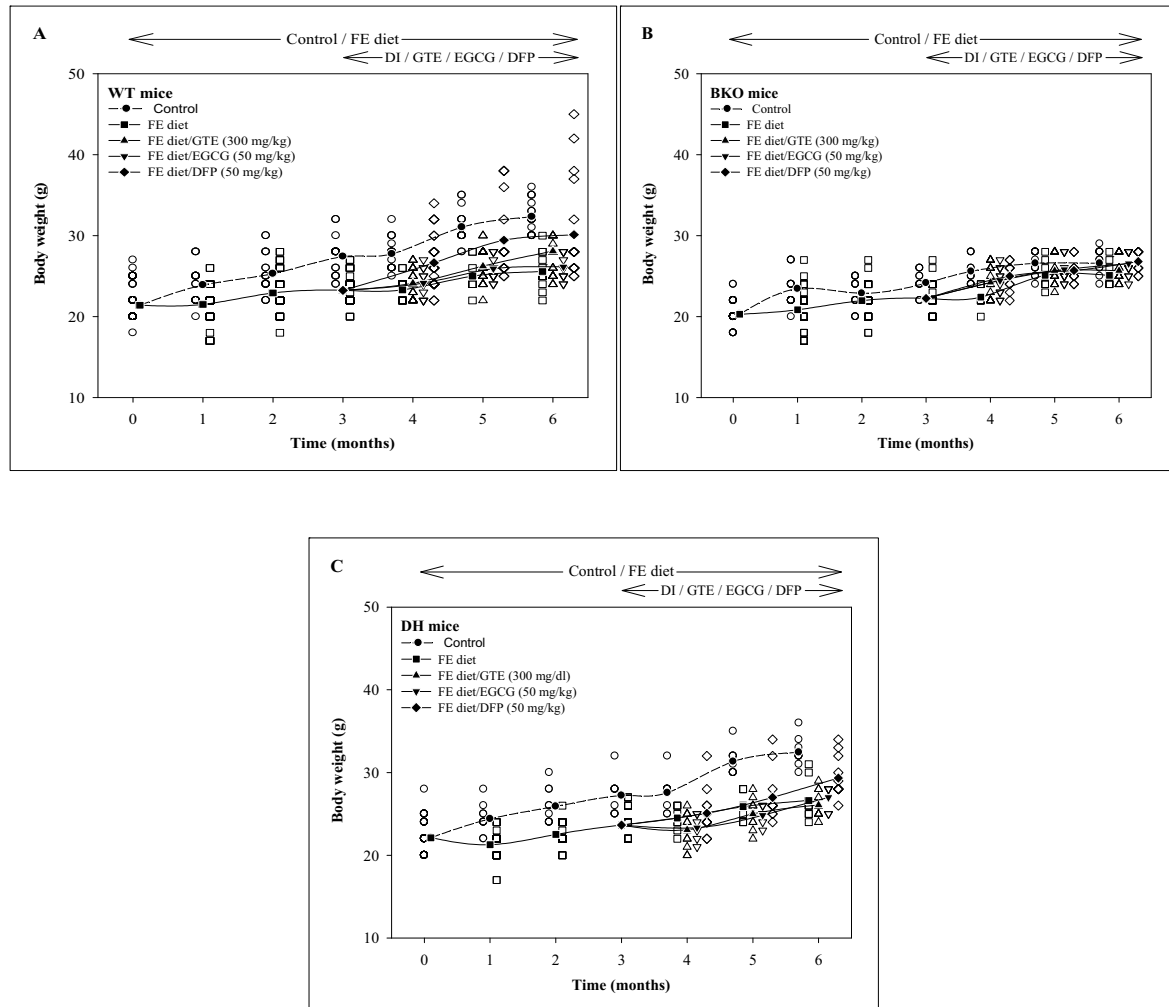


รูปที่ 12 Scattergram (แถวบน) และ histogram (แถวล่าง) ของค่าการเรืองแสง (FI) ที่ชั่ววัดระดับ ROS ในเม็ดเลือดแดงที่วัดด้วยเครื่องมือ flow cytometer คอลัมน์ซ้ายเป็นเม็ดเลือดแดงที่ไม่ได้ย้อมด้วยสารเรืองแสง DCFH คอลัมน์กลางเป็นเม็ดเลือดแดงที่ย้อมด้วยสารเรืองแสง และคอลัมน์ขวาเป็นเม็ดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย 3% H_2O_2 และย้อมด้วยสารเรืองแสง DCFH

ผลของสาร GTE และ EGCG ต่อน้ำหนักตัวของหนูทดลอง

เมื่อหนูทดลอง WT (น้ำหนักตัวเริ่มต้น 21.4 ± 1.9 กรัม), BKO (น้ำหนักตัวเริ่มต้น 20.3 ± 1.2 กรัม) และ DH (น้ำหนักตัวเริ่มต้น 22.1 ± 2.0 กรัม) ได้รับอาหารสูตรปกติ (NF diet) และอาหารสูตรเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) เป็นเวลานาน 3 เดือนจะพบว่าหนูเหล่านั้นมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นตามเวลา (23.3 ± 1.7 , 22.3 ± 1.7 และ 23.6 ± 1.7 กรัมตามลำดับสำหรับอาหารสูตรปกติ; 27.4 ± 2.3 , 24.2 ± 1.5 และ 27.2 ± 2.3 กรัมตามลำดับสำหรับอาหารสูตรเสริมธาตุเหล็ก) อย่างไรก็ตามหนูทดลองกลุ่ม BKO มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นช้ากว่าหนูทดลองกลุ่ม WT เล็กน้อย หนูกลุ่มที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็กมีน้ำหนักตัวเพิ่มสูงขึ้น

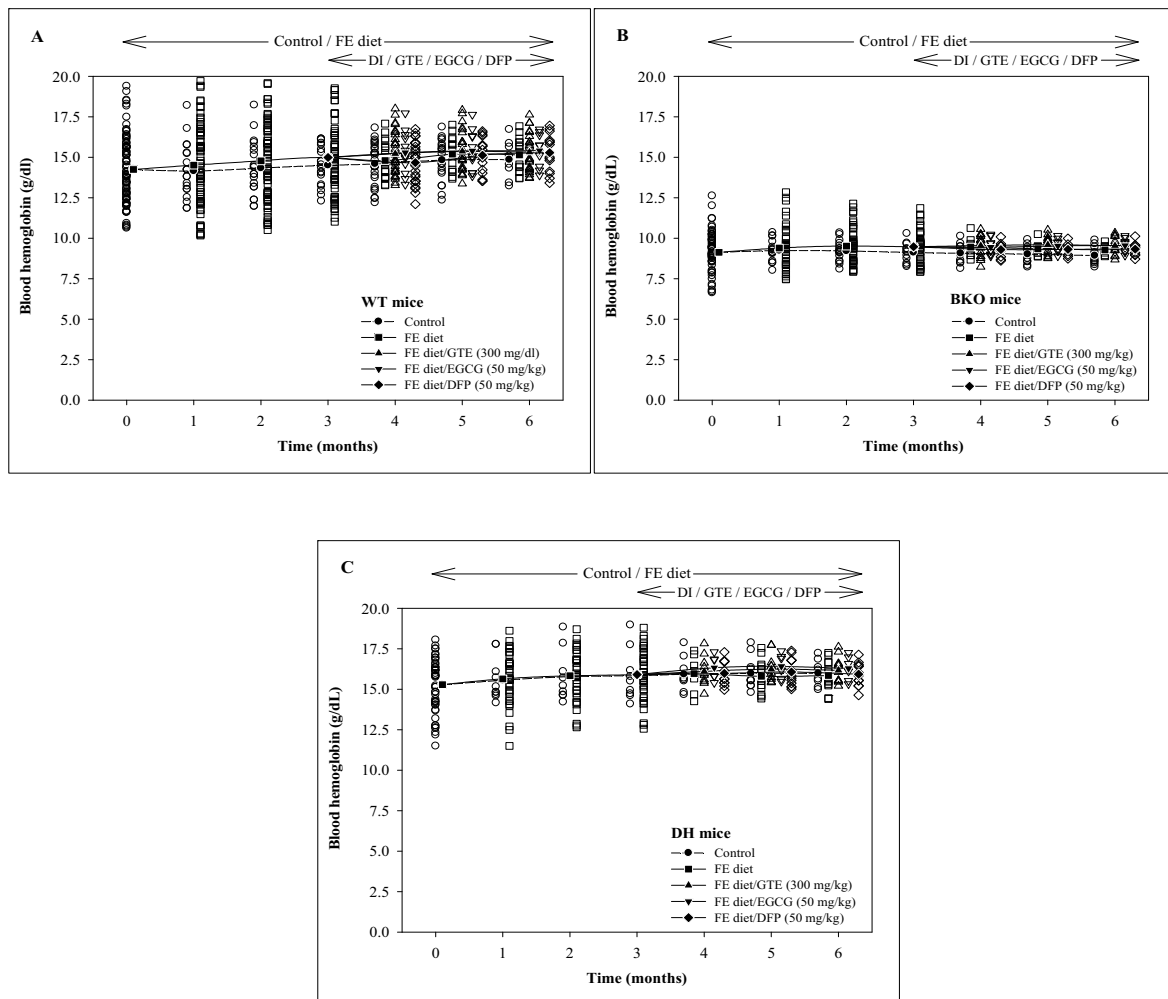
มากกว่าหนูกลุ่มที่กินอาหารสูตรปกติ ผลการรักษานหนู WT, BKO และ DH ที่กินอาหารสูตรปกติและอาหารเสริมธาตุเหล็กด้วยสาร GTE, EGCG และสาร DFP นาน 3 เดือนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูทดลอง WT (n = 24), BKO (n = 14) และ DH (n = 10) ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (NF diet) หรืออาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 6 เดือน โดยได้รับการรักษาด้วยสาร GTE (300 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม), EGCG (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และ DFP (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) นาน 3 เดือน สัญลักษณ์วงกลมโปร่ง (○) แสดงค่าน้ำหนักของหนูแต่ละตัว และสัญลักษณ์วงกลมทึบ (●) แสดงค่าน้ำหนักตัวเฉลี่ย (mean±SD)

ผลของสาร GTE และ EGCG ต่อระดับฮีโมโกลบินของหนูทดลอง

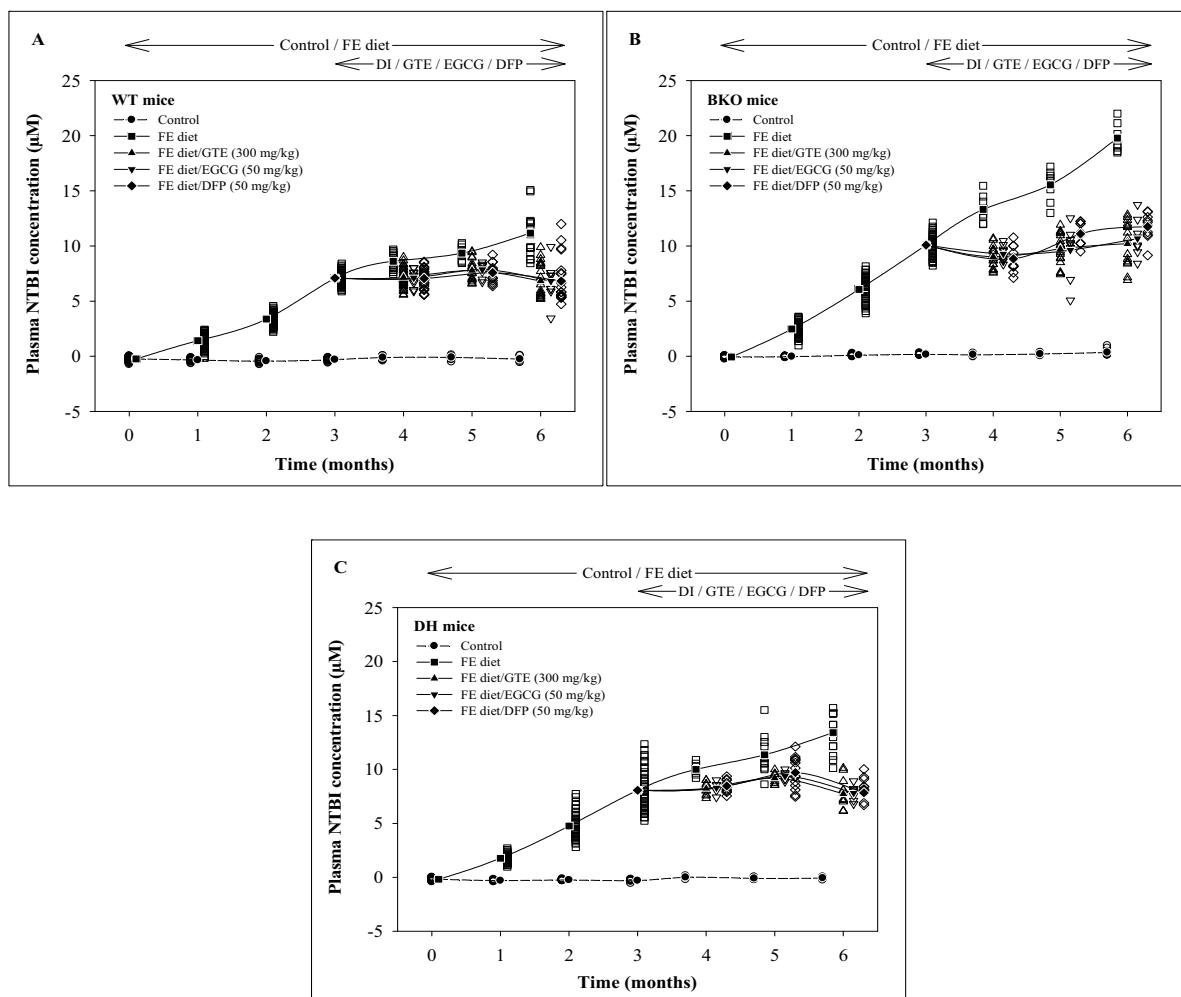
หนูทดลอง BKO มีฟีโนไทป์คล้ายคลึงกับผู้ป่วยธาลัสซีเมียอินเตอร์มีเดียที่มีภาวะโลหิตจางเล็กน้อย (Jamsai, Zaibak et al. 2006) การศึกษานี้พบว่าหนู BKO มีระดับฮีโมโกลบินในเลือดเท่ากับ 9.1 ± 1.4 กรัมต่อเดซิลิตร) เมื่อเทียบกับหนู WT ที่มีระดับฮีโมโกลบินในเลือดเท่ากับ 13.9 ± 2.3 กรัมต่อเดซิลิตร) และหนู DH มีระดับฮีโมโกลบินในเลือดเท่ากับ 15.3 ± 1.8 กรัมต่อเดซิลิตร) การเลี้ยงหนูด้วยอาหารสูตรปกติและอาหารเสริมธาตุเหล็กเป็นเวลานาน 3 เดือนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับฮีโมโกลบินในเลือดของหนูเหล่านี้อย่างชัดเจน รวมทั้งการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP ก็ไม่มีผลต่อระดับฮีโมโกลบินในเลือด (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 ระดับฮีโมโกลบินในเลือดของหนูทดลอง WT, BKO และ DH ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (NF diet) หรืออาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 6 เดือน โดยได้รับการรักษาด้วยสาร GTE (300 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม), EGCG (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และ DFP (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) นาน 3 เดือน สัญลักษณ์วงกลมโปร่ง (○) แสดงค่าน้ำหนักของหนูแต่ละตัว และสัญลักษณ์วงกลมทึบ (●) แสดงค่าน้ำหนักตัวเฉลี่ย (mean±SD)

ผลของสารสกัดชาเขียวต่อภาวะธาตุเหล็กในหนูปกติและหนูธาลัสซีเมีย

เมื่อหนูทดลองกินอาหารที่มีธาตุเหล็กผสมในปริมาณสูง (FE diet) ร่างกายก็จะถูกเหนี่ยวนำให้มีการดูดซึมธาตุเหล็กเพิ่มมากขึ้นจากช่องทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้ทรานส์เฟอร์รินในพลาสมาอิ่มตัวด้วยธาตุเหล็กเพิ่มมากขึ้นจนสามารถตรวจพบธาตุเหล็กรูป non-transferrin bound iron (NTBI) เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลา (รูปที่ 15) ยา DFP สาร GTE และสาร EGCG นาน 3 เดือนสามารถลดระดับ NTBI ในพลาสมาของหนู WT (6.81 ± 2.23 , 6.83 ± 1.49 และ 6.80 ± 1.75 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษา (11.17 ± 0.26 ไมโครโมลาร์), หนู BKO (11.75 ± 1.21 , 10.20 ± 1.92 และ 10.66 ± 1.60 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษา (19.78 ± 1.36 ไมโครโมลาร์) และหนู DH (7.83 ± 1.41 , 7.74 ± 1.38 และ 7.81 ± 0.71 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) ได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษา (13.41 ± 1.84 ไมโครโมลาร์) ยา DFP มีสัมฤทธิ์ผลดีกว่าสาร GTE เล็กน้อย



รูปที่ 15 ระดับธาตุเหล็กรูป NTBI (mean±SD) ในพลาสมาของหนูทดลอง WT และ BKO ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (NF diet) หรืออาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 5 เดือน โดยได้รับการรักษาด้วยสาร GTE (300 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม), EGCG (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และ DFP (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) นาน 2 เดือน

เมื่อธาตุเหล็กจับกับทรานส์เฟอริน (transferrin-bound iron, TBI) แลรูปไม่จับกับทรานส์เฟอริน (non-transferrin bound iron, NTBI) ถูกนำเข้าไปในเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกายเพิ่มมากขึ้น ก็พบว่าการสะสมธาตุเหล็กเพิ่มมากขึ้นในตับของหนูทดลองทั้งสองชนิดอย่างชัดเจนและมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตับของหนูทดลองที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NF diet) (ตารางที่ 2) ซึ่งแสดงให้เห็นมีตะกอนสีน้ำเงินเข้มเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามสาร GTE และยา DFP สามารถลดปริมาณธาตุเหล็กที่สะสมในเนื้อเยื่อตับได้อย่างมีประสิทธิภาพในหนูทดลองทั้งสองสายพันธุ์

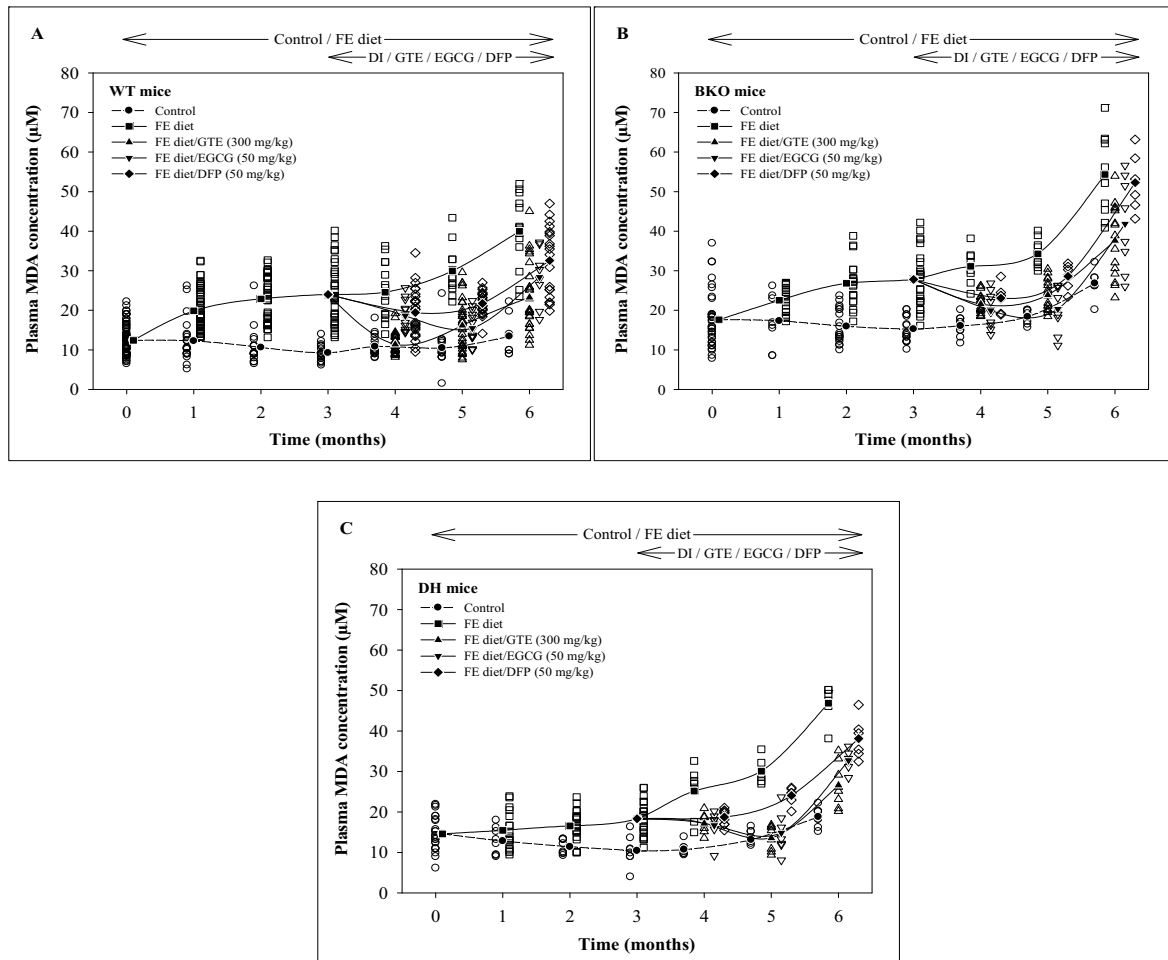
ตารางที่ 2 ปริมาณเหล็ก (mean±SEM) ที่สะสมในตับของหนูปกติ (WT) และหนูธาลัสซีเมีย (BKO) ที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NF diet) และอาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) เป็นเวลานาน 3 เดือน และได้รับการรักษาด้วยสารสกัดชาเขียว (GTE) และยาขับเหล็กดีเฟอริโพรน (DFP) เป็นเวลานาน 2 เดือน

Mice	Diet/Treatment	Liver iron concentrations (LIC)	
		µg Fe/mg protein	ng Fe/ mg dry weight
WT	NF diet	0.504±0.070	9.18±1.15
	FE diet/Placebo	1.713±0.648 [*]	38.31±15.59 [*]
	FE diet/GTE (300 mg/kg)	0.599±0.042 [#]	11.03±0.44 [#]
	FE diet/DFP (50 mg/kg)	0.767±0.111	14.51±14.98
BKO	NF diet	ND	ND
	FE diet/Placebo	1.950±1.049	42.26±24.45
	FE diet/GTE (300 mg/kg)	0.335±0.154 [#]	7.65±3.72 [#]
	FE diet/DFP (50 mg/kg)	0.595±0.050 [#]	1.08±0.90 [#]

^{*} $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ; [#] $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมธาตุเหล็ก

ผลของสารสกัดชาเขียวต่อภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในหนูปกติและหนูธาลัสซีเมีย

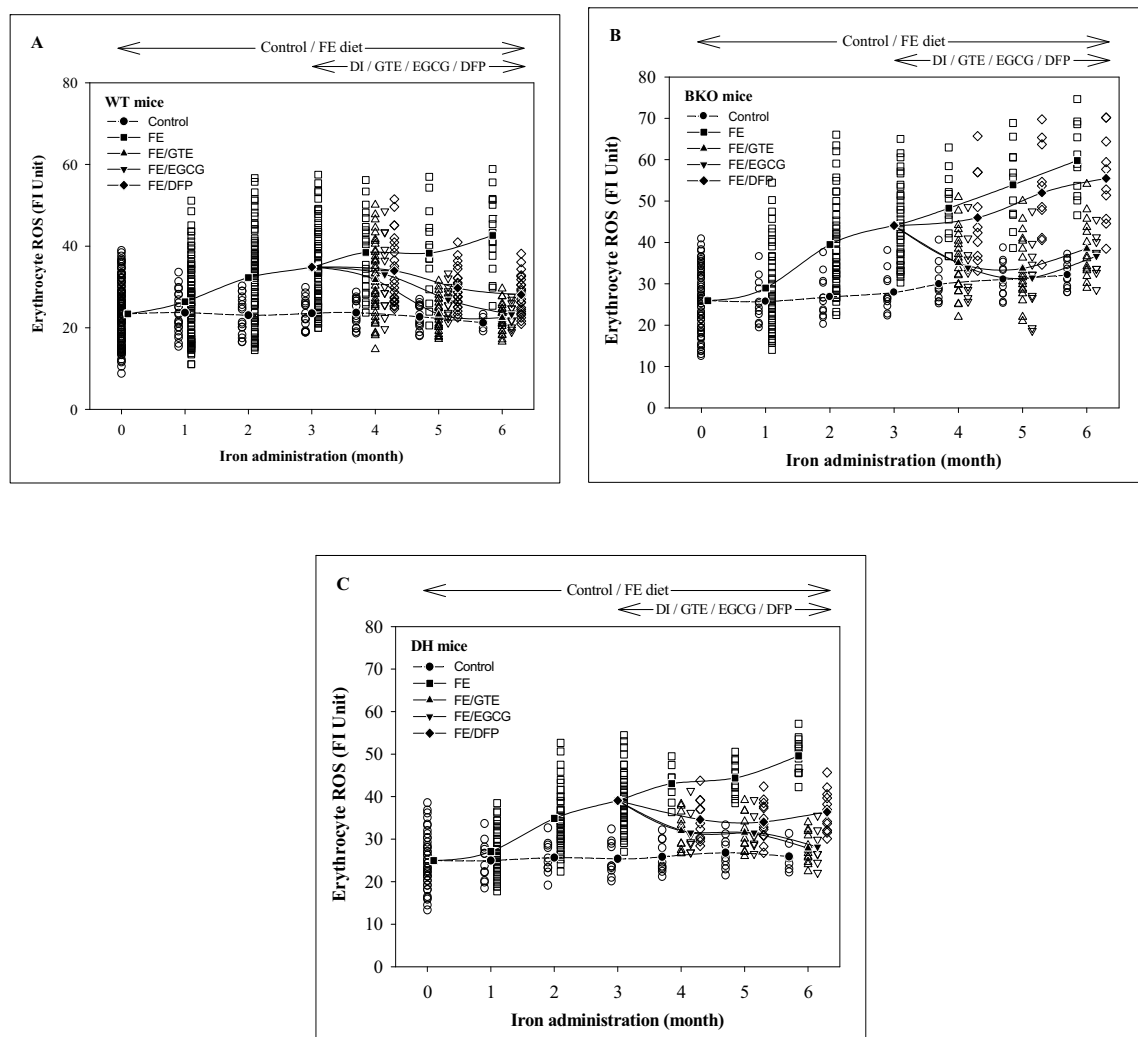
ผลจากการได้รับธาตุเหล็กปริมาณสูงเป็นระยะเวลานานๆทำให้มีการสร้างสารผลิตภัณฑ์จำพวก MDA ซึ่งเป็นผลผลิตตัวหนึ่งของปฏิกิริยาลิพิดเพอรอกซิเดชันเพิ่มมากขึ้นกว่าการได้รับอาหารสูตรปกติ และชี้ให้เห็นถึงการเกิดภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสขึ้นในหนูทดลองทั้งสามชนิด (รูปที่ 16) สาร GTE, EGCG และยา DFP ช่วยลดปริมาณสาร MDA ได้อย่างมีนัยสำคัญ พบว่าสาร GTE และ EGCG มีคุณสมบัติดังกล่าวในหนูทดลอง WT ได้ดีกว่าในหนูทดลอง BKO เป็นที่สังเกตเห็นว่าปริมาณสาร MDA ในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นในหนูทดลองทุกกลุ่มช่วงเดือนที่ 6 อาจเป็นเพราะว่าเป็นช่วงทำการฉายขนาดที่ต้องทำการสลับหนูด้วยไออีเธอร์ซึ่งสามารถทำให้หนูทดลองเกิดความเครียดขึ้นมา ส่งผลให้มีการหลั่งสาร lipid-peroxidation product ออกมามากกว่าปกติ



รูปที่ 16 ระดับ lipid-peroxidation product TBARS (mean±SD) ในพลาสมาของหนูทดลอง WT และ BKO ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (NF diet) หรืออาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 5 เดือน โดยได้รับ

การรักษาด้วยสาร GTE (300 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม), EGCG (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และ DFP (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) นาน 2 เดือน

ในทำนองเดียวกัน อาหารเสริมธาตุเหล็กทำให้เกิดภาวะเหล็กเกินและทำให้เม็ดเลือดแดงอยู่ในภาวะออกซิเดทีฟสเตสขึ้นมาได้ ทำให้มีระดับอนุมูลอิสระในเซลล์เพิ่มมากขึ้นดังแสดงในรูปที่ 17 หนู BKO มีระดับอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงสูงกว่าในหนู WT และ DH ผลการรักษาด้วยสาร GTE และ EGCG ช่วยลดระดับอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงได้ในลักษณะที่ขึ้นกับเวลา (time-dependent manner)



รูปที่ 17 ระดับ total ROS (mean±SD) ในเม็ดเลือดแดงของหนูทดลอง WT, BKO และ DH ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (NF diet) หรืออาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 5 เดือน โดยได้รับการรักษาด้วยสาร GTE (300 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม), EGCG (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และ DFP (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) นาน 2 เดือน

นอกจากนี้ยังพบว่าเม็ดเลือดแดงของหนู WT, BKO และ DH ที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็กมีปริมาณสาร MDA เพิ่มขึ้นและปริมาณสาร GSH ต่ำกว่าในหนูทดลองเหล่านั้นที่อาหารสูตรปกติ

อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3 และตารางที่ 4 ตามลำดับ) ผลการรักษาหนูทดลองทั้งสามกลุ่มด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP ทำให้ระดับสาร MDA ลดลงและปริมาณสาร GSH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วย การรักษาหนูทดลองทั้งสามกลุ่มด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP ยังช่วยทำให้ระดับสาร GSH ในพลาสมาเพิ่มสูงมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5) สมมุติผลดังกล่าวอาจเกิดขึ้นจากสารทดสอบทั้งสามชนิดนี้ไปทำให้ภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสที่ตับลดลง ทำให้ตับมีการทำงานดีขึ้นและสามารถสังเคราะห์สาร GSH เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3 ระดับ MDA (mean±SD) ในเม็ดเลือดแดงของหนูทดลอง WT, BKO และ DH ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (NF diet) หรืออาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 5 เดือน โดยได้รับการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และ DFP นาน 2 เดือน

Diet/Treatment	Erythrocyte MDA (pmol/g Hb)		
	WT mice	BKO mice	DH mice
NF diet	34.69±3.21	46.81±3.50 [§]	41.82±2.56 [§]
FE diet	48.23±6.15 [*]	60.63±3.28 [*]	50.86±1.90 [*]
FE diet/GTE (300 mg/kg)	36.80±3.23 [#]	44.26±2.87 [#]	42.00±2.85 [#]
FE diet/EGCG (50 mg/kg)	36.82±2.71 [#]	44.74±2.79 [#]	40.36±2.83 [#]
FE diet/DFP (50 mg/kg)	39.64±3.95 [#]	49.74±3.76 [#]	45.41±3.05 [#]

^{*}p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ NF diet; [#]p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ FE diet

ตารางที่ 4 ระดับกลูตาไธโอนรูปรีดิวซ์ (GSH) (mean±SD) ในเม็ดเลือดแดงของหนูทดลอง WT, BKO และ DH ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (NF diet) หรืออาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 5 เดือน โดยได้รับการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และ DFP นาน 2 เดือน

Diet/Treatment	Erythrocyte GSH content (μmol/g Hb)		
	WT mice	BKO mice	DH mice
NF diet (Control)	3.64±0.28	2.79±0.24	3.29±0.18

เอกสารแนบหมายเลข 4

FE diet	2.80±0.52 [*]	2.56±0.22	2.76±0.18 [*]
FE diet/GTE (300 mg/kg)	3.61±0.32 [#]	3.31±0.40 [#]	3.49±0.22 [#]
FE diet/EGCG (50 mg/kg)	3.73±0.29 [#]	3.24±0.36 [#]	3.46±0.19 [#]
FE diet/DFP (50 mg/kg)	3.54±0.26 [#]	3.12±0.32 [#]	3.21±0.30 [#]

^{*} $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ

NF diet;

[#] $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ

FE diet

ตารางที่ 5 ระดับกลูตาไธโอนรูปรีดิวซ์ (GSH) (mean±SD) ในพลาสมาของหนูทดลอง WT, BKO และ DH ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (NF diet) หรืออาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 5 เดือน โดยได้รับการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และ DFP นาน 2 เดือน

Diet/Treatment	Plasma reduced glutathione (μM)		
	WT mice	BKO mice	DH mice
NF diet (Control)	11.53±2.50	7.73±4.25	10.97±5.00
FE diet	7.73±4.70 [*]	6.24±3.89	5.81±1.44 [*]
FE diet/GTE (300 mg/kg)	15.15±7.72 [#]	15.12±9.76 [#]	14.78±5.16 [#]
FE diet/EGCG (50 mg/kg)	16.04±6.61 [#]	15.63±7.74 [#]	17.03±7.27 [#]
FE diet/DFP (50 mg/kg)	15.89±8.43 [#]	16.50±8.75 [#]	14.19±4.89 [#]

^{*}p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ NF diet; [#]p<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ FE diet

หนูธาลัสซีเมีย BKO มีค่าดัชนีน้ำหนักของตับและม้ามสูงกว่าหนู WT และ BKO ซึ่งอาจเป็นผลมาจากระบบ reticuloendothelial system (RES) ของอวัยวะทั้งสองนี้ทำงานหนักกว่าปกติ การให้หนูทดลองกินอาหารเสริมธาตุเหล็กส่งผลทำให้ค่าดัชนีน้ำหนักของตับ ม้าม หัวใจและไตเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การให้หนูทดลองกินสาร GTE และ EGCG นาน 3 เดือนมีผลทำให้ค่าดัชนีน้ำหนักของอวัยวะเหล่านั้น (โดยเฉพาะอย่างยิ่งตับและม้าม) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 6)

ผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าหนูทดลองที่ได้รับอาหารเสริมธาตุเหล็กมีการสะสมธาตุเหล็กเพิ่มมากขึ้นหลายเท่าอย่างมีนัยสำคัญในตับ (BKO > DH > WT) การรักษาหนูทดลองเหล่านี้ด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP ทำให้ปริมาณการสะสมธาตุเหล็กที่ตับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ผลจากหนูทดลองกินอาหารเสริมธาตุเหล็กเป็นเวลานาน ทำให้เกิดภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรส มีการสร้างสาร lipid-peroxidation product เช่น MDA ที่ตับเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP มีผลทำให้ปริมาณสาร MDA ที่เพิ่มขึ้นนั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับรักษา

ผลจากภาวะเหล็กและอนุมูลอิสระมากเกินไปในร่างกายและในตับของหนูที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก ทำให้ antioxidant mechanism เช่นปริมาณสาร GSH ที่ในเซลล์ตับลดลงอย่างชัดเจน เมื่อหนูทดลองเหล่านี้ได้รับการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP สามารถทำให้เซลล์ตับทำหน้าที่ได้ดี

ขึ้นและสามารถสร้างสาร GSH เพิ่มมากขึ้นเพื่อที่จะนำไปใช้ทำลายอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อและในกระแสโลหิตได้

ตารางที่ 6 ค่าดัชนีน้ำหนัก (weight index) (mean±SD) ของอวัยวะตับ ม้าม หัวใจและไตจากหนูทดลอง WT, BKO และ DH ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (NF diet) หรืออาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 5 เดือน โดยได้รับการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และ DFP นาน 2 เดือน

Mice/Diet/Treatment		Weight index (% w/w) of vital organs			
		Liver	Spleen	Heart	Kidneys
WT	NF diet	6.10±0.68	0.37±009	0.36±0.07	1.17±0.09
	WT: FE diet	10.36±1.89	0.75±013 [*]	0.51±0.07 [*]	1.45±0.17 [*]
	WT: FE diet/GTE (300 mg/kg)	8.97±0.71 [#]	0.52±010 [#]	0.47±0.13	1.38±0.20
	WT: FE diet/EGCG (50 mg/kg)	8.89±0.63 [#]	0.48±013 [#]	0.46±0.07	1.38±0.21
	WT: FE diet/DFP (50 mg/kg)	9.66±0.84	0.56±007 [#]	0.50±0.10	1.39±0.15
BKO	BKO: NF diet	8.73±1.08	1.48±014	0.53±0.05	1.33±0.09
	BKO: FE diet	11.09±1.62	2.07±029 [*]	0.70±0.07 [*]	1.45±0.06 [*]
	BKO: FE diet/GTE (300 mg/kg)	9.34±1.05 [#]	1.75±034 [#]	0.57±0.09 [#]	1.33±0.18
	BKO: FE diet/EGCG (50 mg/kg)	9.56±0.92 [#]	1.78±029 [#]	0.57±0.09 [#]	1.38±0.14
	BKO: FE diet/DFP (50 mg/kg)	10.21±0.69	1.93±015	0.64±0.06	1.39±0.08
DH	DH: NF diet	7.14±0.55	0.38±007	0.42±0.06	1.20±0.09
	DH: FE diet	10.09±0.39	0.69±020 [*]	0.52±0.07 [*]	1.48±0.16 [*]
	DH: FE diet/GTE (300 mg/kg)	8.97±0.70 [#]	0.54±011 [#]	0.49±0.06	1.41±0.13
	DH: FE diet/EGCG (50 mg/kg)	9.03±0.58 [#]	0.50±007 [#]	0.47±0.05	1.38±0.08
	DH: FE diet/DFP (50 mg/kg)	9.42±0.72 [#]	0.62±006	0.51±0.05	1.39±0.07

^{*} $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ NF diet; [#] $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ FE diet

ภาวะเหล็กเกินสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตับสร้างโปรตีนคอลลาเจนเพิ่มมากขึ้นได้ ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดภาวะไฟโบรซิสที่ตับได้ รวมทั้งอาจทำให้เกิดภาวะตับแข็งและมะเร็งตับได้ ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็กมีระดับคอลลาเจนที่ตับเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP ช่วยลดระดับการสร้างคอลลาเจนที่ตับลงได้

เอกสารปกปิด ห้ามเผยแพร่ก่อนได้รับอนุญาต

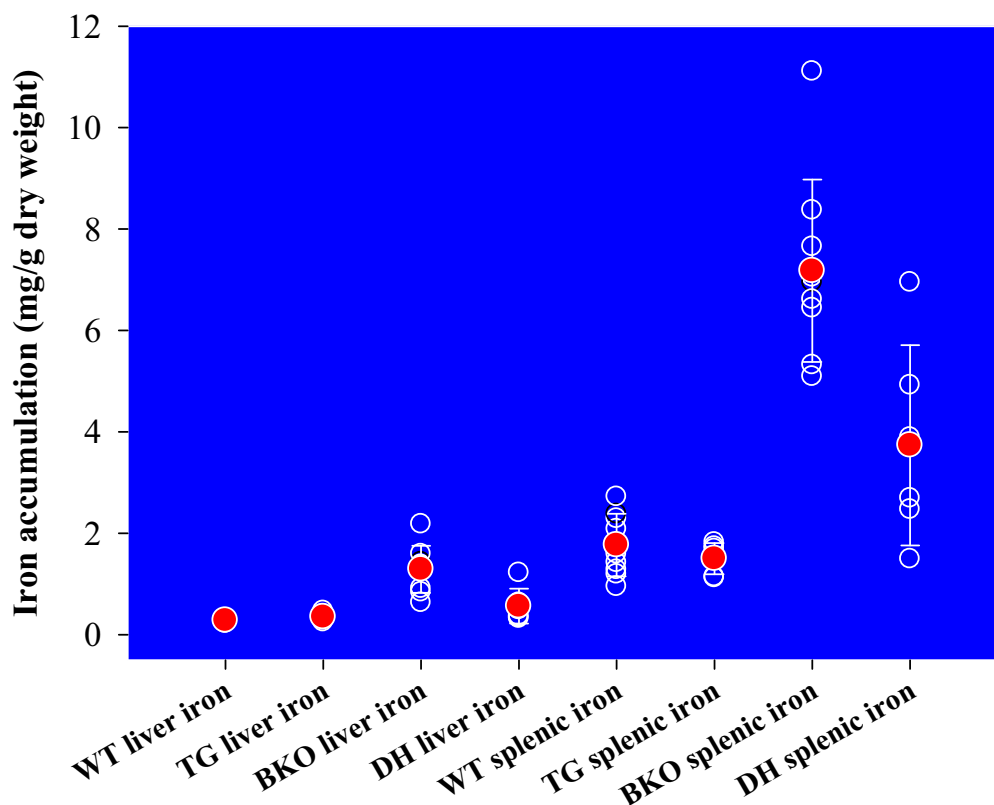
เอกสารแนบหมายเลข 4

ตารางที่ 7 ความเข้มข้น iron, MDA, GSH และ collagen (mean±SEM) ในตับของหนูปกติ (WT) หนูธาลัสซีเมีย BKO และหนูธาลัสซีเมีย DH ที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NF diet) และอาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) เป็นเวลานาน 3 เดือน และได้รับการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP เป็นเวลานาน 2 เดือน

Mice/Diet/Treatment	Iron content (mg/g dry weight)	MDA concentration		GSH concentration		Collagen concentration (nmol/mg protein)
		µmol /g protein	µmol /g dry weight	µmol /g protein	µmol /g dry weight	
WT	NF diet	79±18	3.94±0.83	68.3±14.9	3.44±0.81	0.023±0.005
	FE diet	292±64 [*]	14.55±3.12 [*]	43.6±8.1 [*]	2.17±0.41 [*]	0.041±0.004
	FE diet/GTE (300 mg/kg)	179±23 [#]	8.71±0.85 [#]	78.1±7.2 [#]	3.80±0.35 [#]	0.037±0.009
	FE diet/EGCG (50 mg/kg)	201±47 [#]	10.11±2.39 [#]	86.4±14.3 [#]	4.36±0.85 [#]	ND
	FE diet/DFP (50 mg/kg)	254±45 [#]	13.01±2.41 [#]	67.9±8.9 [#]	3.48±0.50 [#]	0.039±0.017
	NF diet	268±52	13.3±2.8	44.0±5.6	2.19±0.28	0.023±0.005
	FE diet	451±93 [*]	22.6±4.7 [*]	33.9±3.6 [*]	1.69±0.18 [*]	0.041±0.004
	FE diet/GTE (300 mg/kg)	303±66 [#]	15.2±3.30 [#]	145.5±20.9 [#]	7.30±1.06 [#]	0.037±0.009

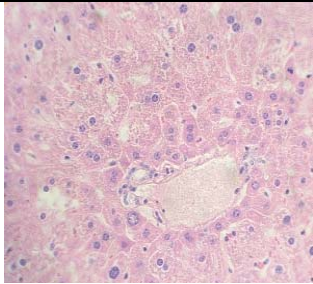
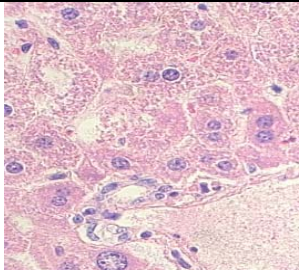
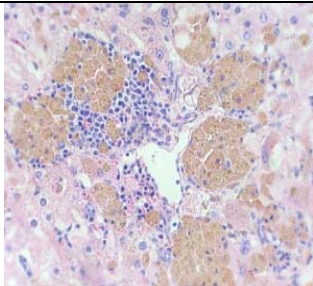
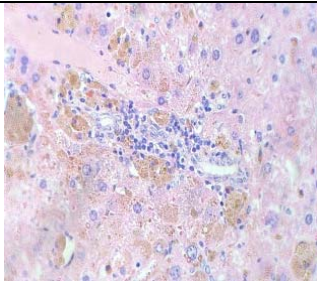
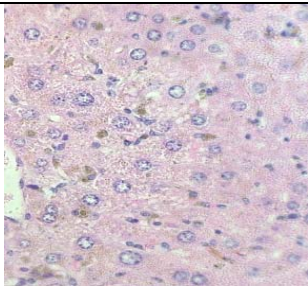
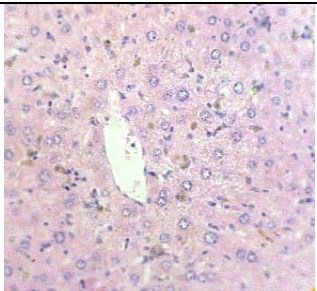
BKO	FE diet/EGCG (50 mg/kg)	27.66±6.35 [#]	315±65 [#]	15.5±3.21 [#]	114.5±20.7 [#]	5.64±1.03 [#]	ND
	FE diet/DFP (50 mg/kg)	28.76±4.69 [#]	393±55 [#]	19.8±2.6 [#]	82.7±15.9 [#]	4.19±0.87 [#]	0.039±0.017
	NF diet	1.12±0.11	98±20	5.0±1.0	59.0±5.6	3.01±0.37	0.023±0.005
	FE diet	30.05±4.14 [*]	324±23 [*]	16.4±1.1 [*]	43.8±7.2 [*]	2.22±0.35 [*]	0.041±0.004
DH	FE diet/GTE (300 mg/kg)	18.75±1.91 [#]	188±43 [#]	9.3±2.2 [#]	74.0±14.4 [#]	3.67±0.69 [#]	0.037±0.009
	FE diet/EGCG (50 mg/kg)	18.60±2.77 [#]	189±36 [#]	9.5±1.8 [#]	73.7±14.4 [#]	3.67±0.63 [#]	ND
	FE diet/DFP (50 mg/kg)	20.31±2.41 [#]	253±36 [#]	12.8±2.3 [#]	60.0±10.5 [#]	3.03±0.60 [#]	0.039±0.017

* p < 0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ NF diet; # p < 0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ FE diet



รูปที่ 18 ปริมาณการสะสมธาตุเหล็กในเนื้อเยื่อตับและม้ามของหนูปกติ (WT) และหนูธาลัสซีเมียชนิด BKO, DH และ TG ที่ได้รับอาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 1 เดือน

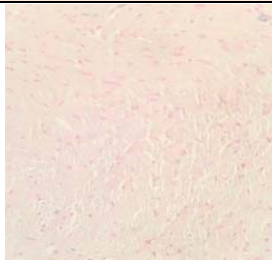
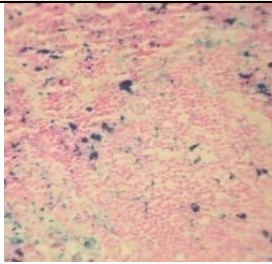
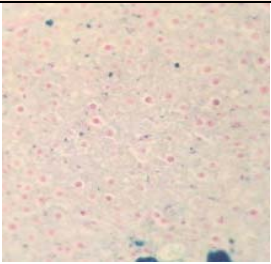
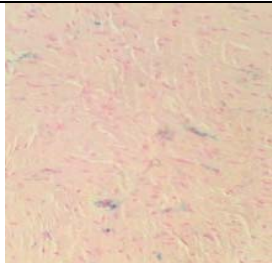
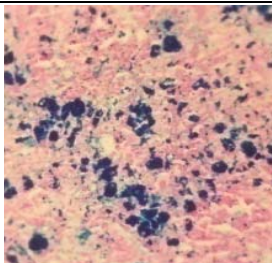
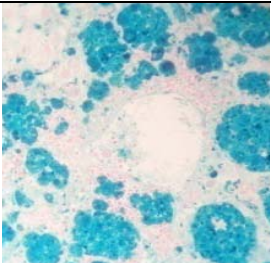
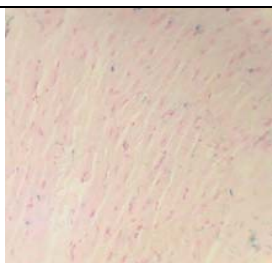
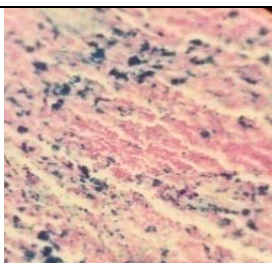
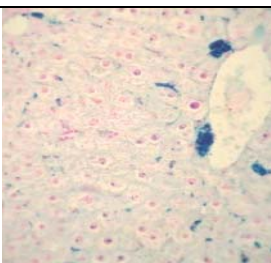
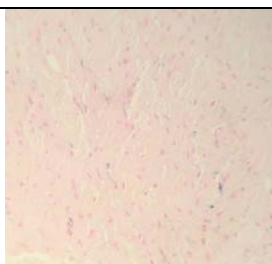
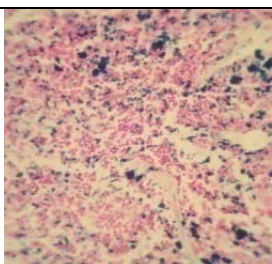
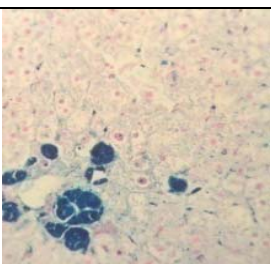
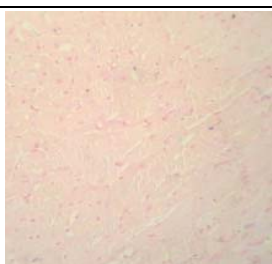
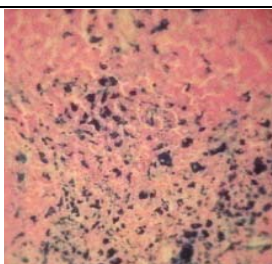
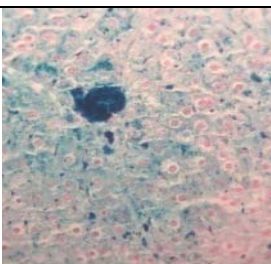
เมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลอง WT, BKO, TG และ DH ด้วยอาหารเสริมธาตุเหล็กนาน 1 เดือน พบว่ามีการสะสมธาตุเหล็กที่ม้ามของหนู BKO มากที่สุดและที่ม้ามของหนู DH รองลงมา รวมทั้งมีการสะสมธาตุเหล็กที่ตับของหนู WT และ DH มากกว่าที่ตับของหนู WT และ TG (รูปที่ 18) ผลการย้อมสี H&E ของเนื้อเยื่อตับของหนู WT และหนูธาลัสซีเมีย BKO แสดงให้เห็นว่าหนูทั้งสองชนิดที่ได้รับอาหารเสริมธาตุเหล็กมีการดูดซึมเหล็กรูป Fe^{2+} บริเวณลำไส้เล็กสูงกว่าปกติ ก่อให้เกิดภาวะเหล็กเกินในร่างกายของหนูทดลองขึ้นเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรปกติ ทำให้เกิดภาวะอักเสบขึ้นที่บริเวณเซลล์ตับ ซึ่งสังเกตได้จากการมีเซลล์เม็ดเลือดขาว (Kuffer's cells) ย้อมติดสีน้ำเงินจำนวนมาก เข้ามา (leukocyte infiltration) ยังแถบบริเวณ portal vein ของเนื้อเยื่อตับ (รูปที่ 19) เมื่อหนูทดลอง WT และ BKO ที่มีภาวะเหล็กและอนุมูลอิสระมากเกินไปได้รับการรักษาด้วยสาร GTE ก็สามารถช่วยป้องกันการอักเสบดังกล่าวได้ (สังเกตจากเม็ดเลือดขาวจำนวนมากหายไป) การรักษาด้วยยา DFP ก็ทำให้ภาวะอักเสบของเนื้อเยื่อตับได้ด้วยเช่นกัน (ไม่ได้แสดงผลให้เห็น)

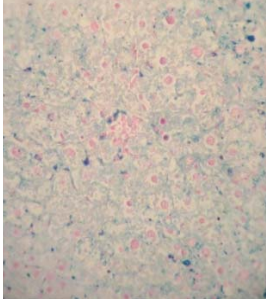
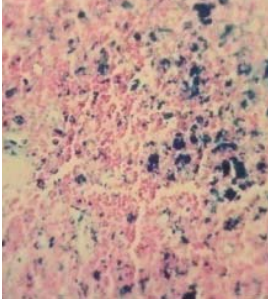
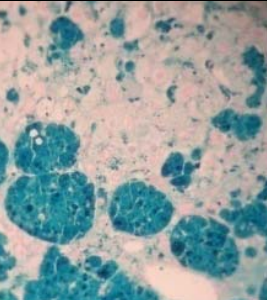
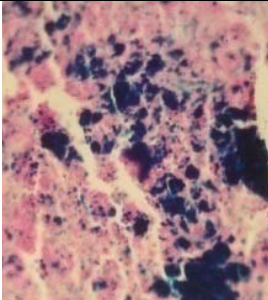
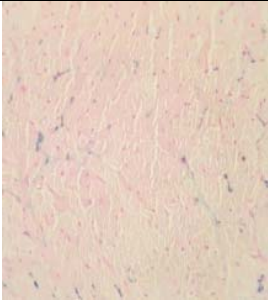
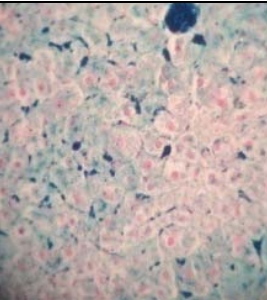
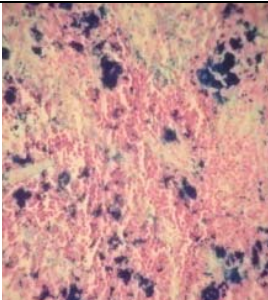
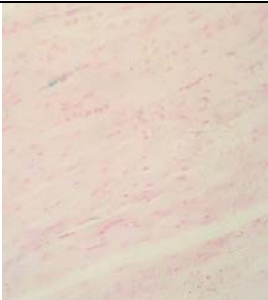
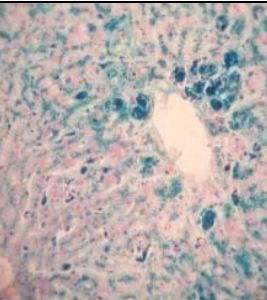
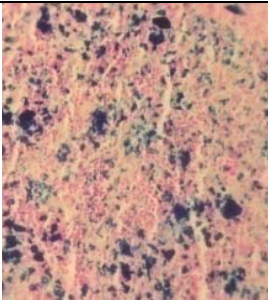
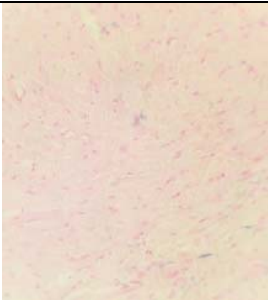
Diet/Treatment	WT mice	BKO mice
NF diet		
FE diet		
FE diet/GTE (300 mg/kg)		
FE diet/DFP (50 mg/kg)	ND	ND

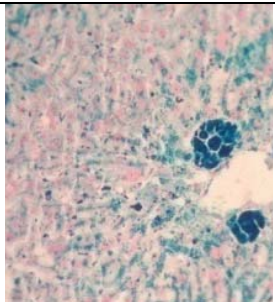
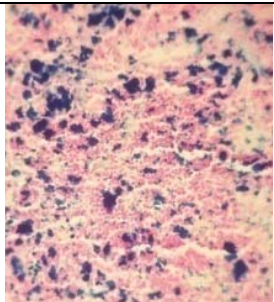
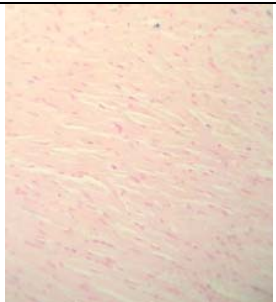
รูปที่ 19 ผล H&E ของเนื้อเยื่อตับหนูปกติ (WT) และหนูธาลัสซีเมีย (BKO) ที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NF diet) และอาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 3 เดือน และได้รับการรักษาด้วยสาร GTE และยาขับเหล็ก DFP นาน 2 เดือน

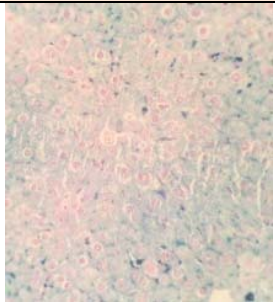
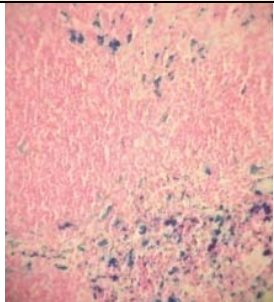
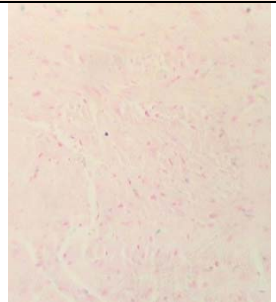
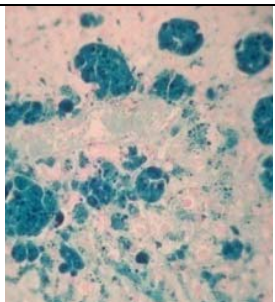
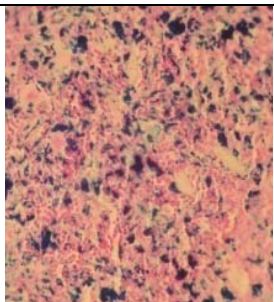
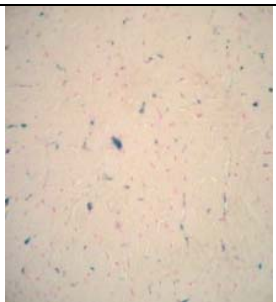
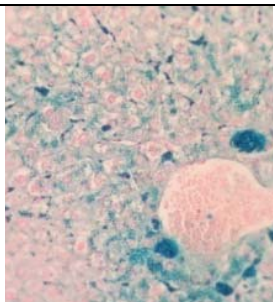
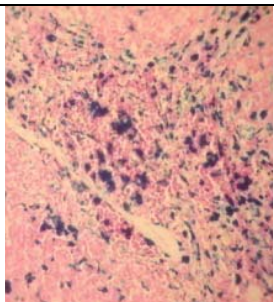
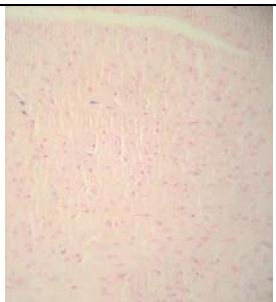
ผลการทดลองในรูปที่ 20 แสดงเนื้อเยื่อตับ ม้ามและหัวใจของหนูทดลอง WT, BKO และ DH ที่ถูกย้อมด้วย Perl's stain เพื่อตรวจดูปริมาณธาตุเหล็กที่สะสมในเนื้อเยื่อเหล่านี้ โดยพบว่าหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมธาตุเหล็ก (WT/FE diet, BKO/FE diet และ DH/FE diet) มีปริมาณการสะสมธาตุเหล็ก (การย้อมติดเป็นตะกอนสีน้ำเงิน) ในเนื้อเยื่อตับ ม้ามและหัวใจเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับหนูทดลองเหล่านั้นที่ได้รับอาหารสูตรปกติ อย่างไรก็ตามผลการรักษาหนูทดลองที่มีภาวะเหล็กเกินด้วยสาร

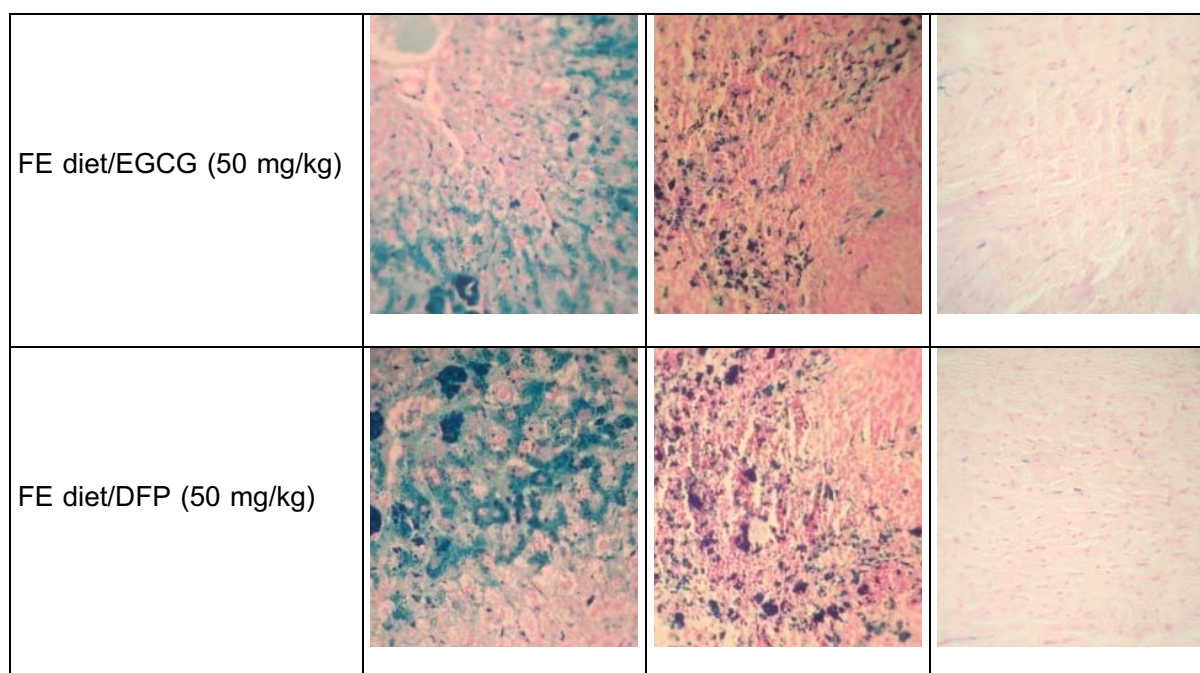
รูปที่ 20 Perl's Prussian blue staining จากเนื้อเยื่อตับ ม้ามและหัวใจจากหนูปกติ (WT) หนูธาลัสซีเมีย BKO และหนูธาลัสซีเมีย DH ที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NF diet) และอาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 3 เดือน และได้รับการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยาขับเหล็ก DFP นาน 2 เดือน

WT mice/Diet/Treatment	Liver	Spleen	Heart
NF diet			
FE diet			
FE diet/GTE (300 mg/kg)			
FE diet/EGCG (50 mg/kg)			
FE diet/DFP (50 mg/kg)			

BKO mice/Diet/Treatment	Liver	Spleen	Heart
NF diet			
FE diet			
FE diet/GTE (300 mg/kg)			
FE diet/EGCG (50 mg/kg)			

FE diet/DFP (50 mg/kg)			
------------------------	---	--	---

DH mice/Diet/Treatment	Liver	Spleen	Heart
NF diet			
FE diet			
FE diet/GTE (300 mg/kg)			



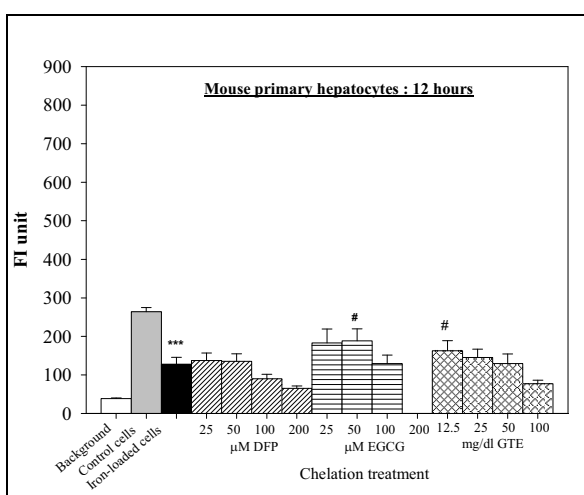
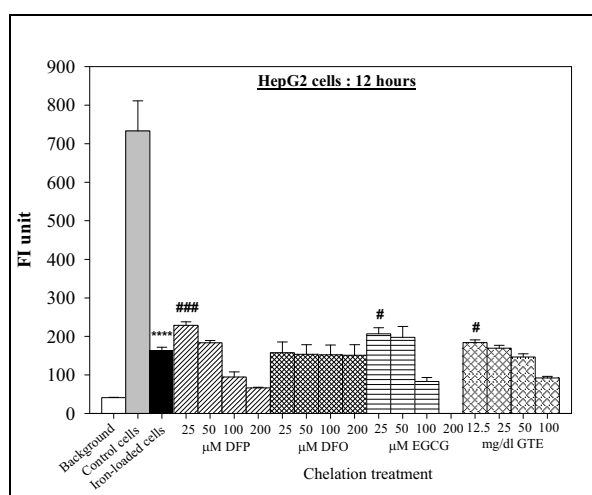
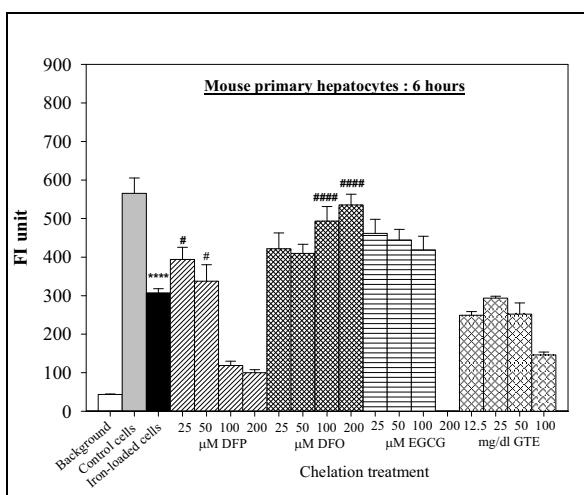
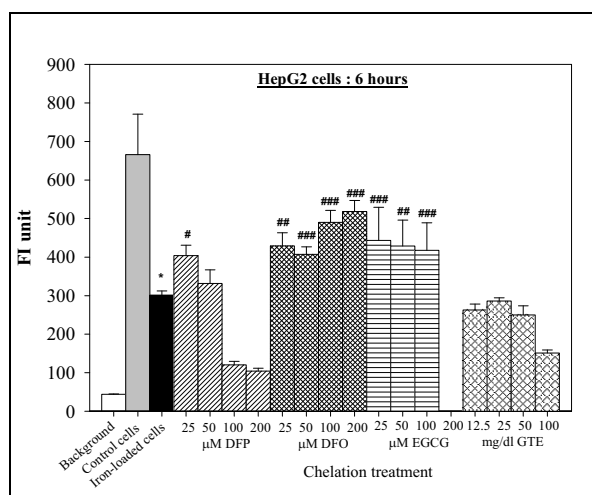
GTE, EGCG และ DFP สามารถลดระดับการสะสมธาตุเหล็กในเนื้อเยื่อไขมันและตับได้อย่างชัดเจน แต่ไม่ค่อยเห็นผลชัดเจนในกล้ามเนื้อหัวใจ

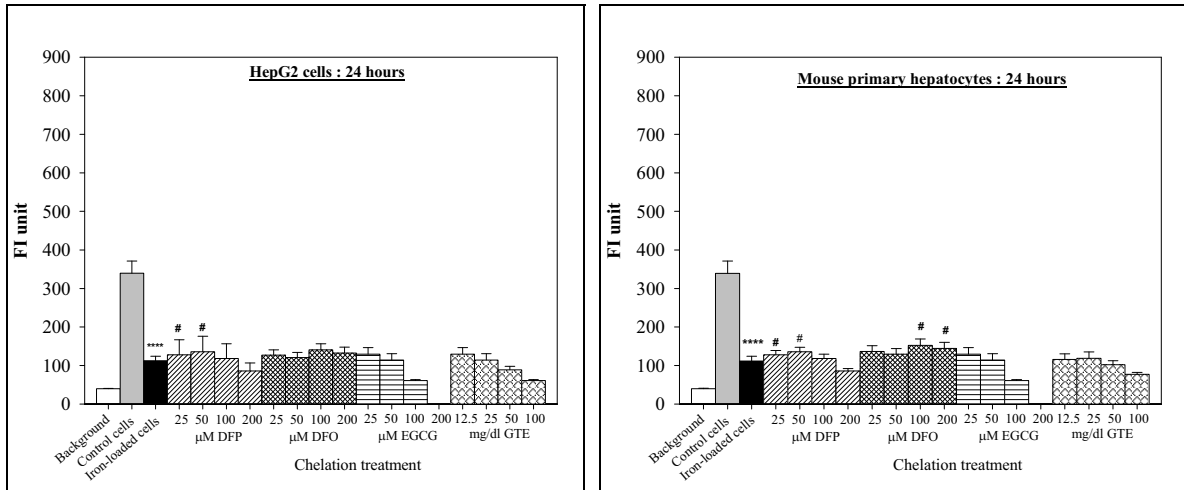
สัมฤทธิ์ผลของสาร GTE และ EGCG ต่อระดับ LIP ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 cells และ mouse hepatocytes

เซลล์ต้นนำธาตุเหล็กรูป transferrin-bound iron และรูป NTBI จากแหล่งภายนอกเซลล์ (เช่น พลาสมาและอาหารเลี้ยงเซลล์) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์โดยผ่านวิธีการทาง transferrin receptor-dependent mechanism และ transferrin receptor-independent mechanism (เช่น facilitate diffusion) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางเมตาโบลิซึมหรือเก็บสะสมไว้ในโปรตีนเฟอร์ริติน

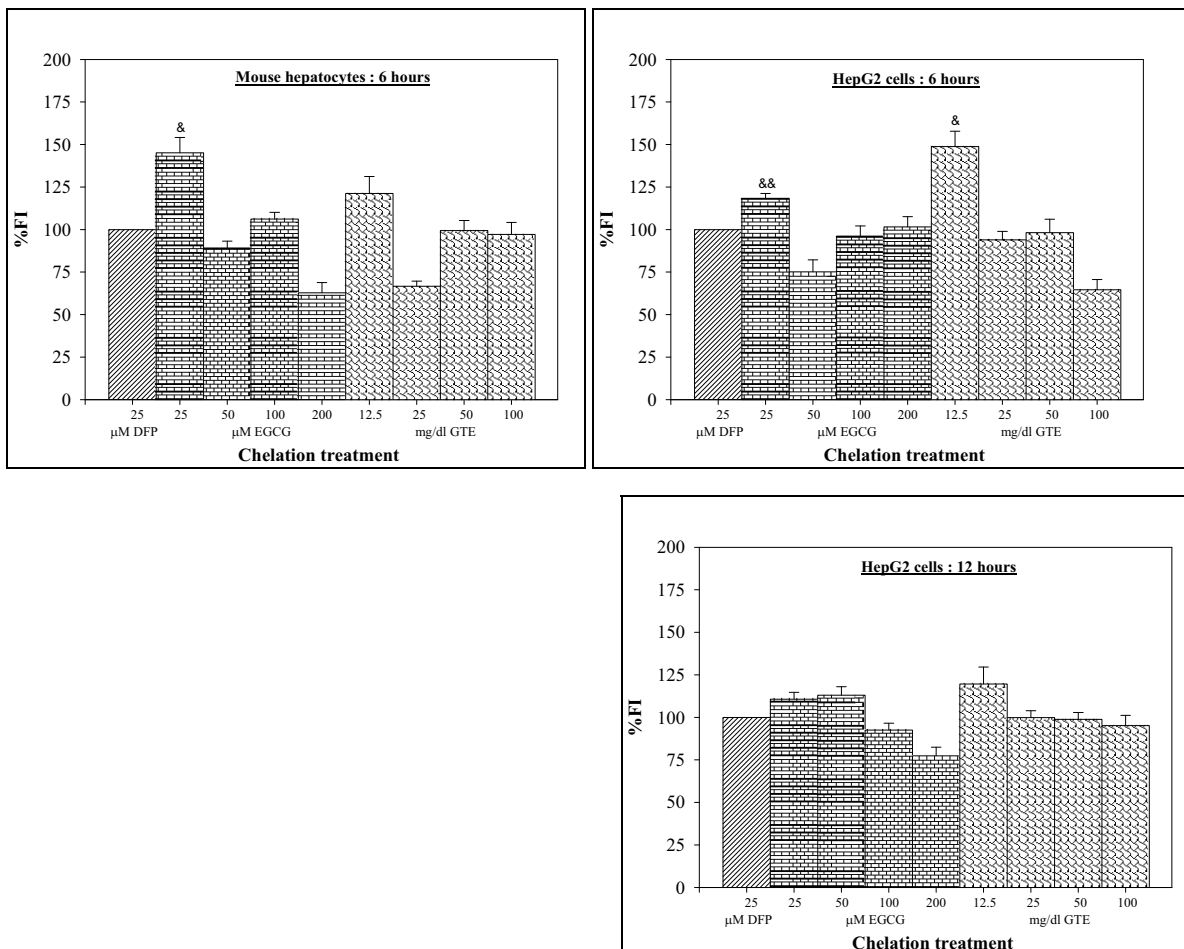
ผลการเติมสารละลาย 1 mM FAC ลงไปในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 cells และ mouse hepatocytes ทำให้ระดับ LIP ในเซลล์ตับเพิ่มสูงขึ้นซึ่งแปรผกผันกับค่า FI ที่วัดได้ โดยพบว่าปริมาณธาตุเหล็กเข้าไปในเซลล์ตับ HepG2 cells เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามเวลา (time dependence) ที่ใช้ incubate กับสารละลาย FAC นาน 6 ชั่วโมง (FI = 302 ± 10), 12 ชั่วโมง (FI = 163 ± 9) และ 24 ชั่วโมง (FI = 112 ± 12) เทียบกับที่ 0 ชั่วโมง (FI = 666 ± 105 unit) (รูปที่ 21 คอลัมน์ซ้ายมือ) การรักษาเซลล์ HepG2 cells ที่มีภาวะเหล็กเกินด้วยสารละลาย DFP (25 μ M), DFO (25-200 μ M) และ EGCG (25-200 μ M) นาน 6 ชั่วโมงสามารถลดระดับ LIP ในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการ incubate เซลล์ตับกับสารทดสอบนาน 12 และ 24 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการขับเหล็กรูป LIP ออกจากเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับที่เวลา 6 ชั่วโมง

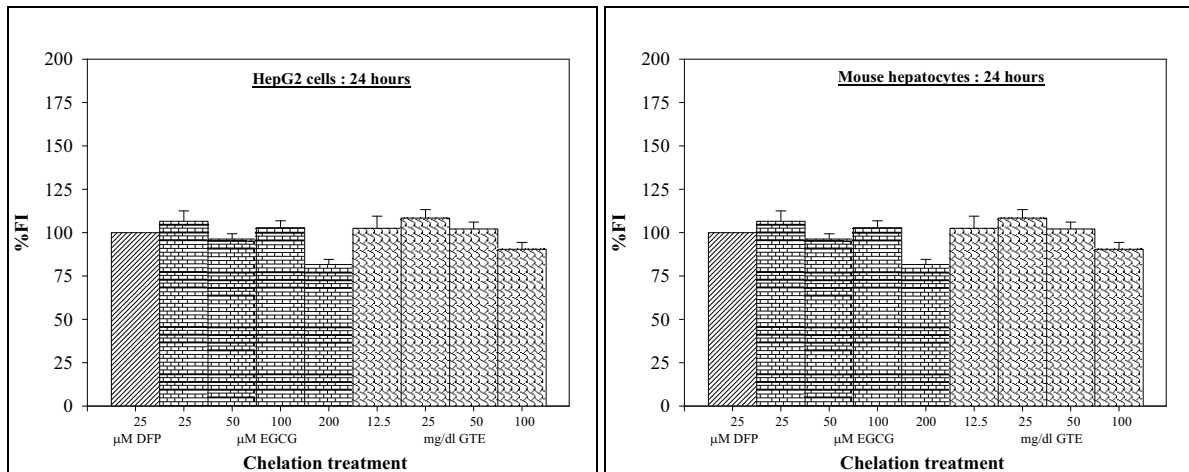
ในทำนองเดียวกัน เซลล์ mouse hepatocytes สามารถนำธาตุเหล็กเข้าไปในเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ incubate กับสารละลาย FAC นาน 6 ชั่วโมง ($FI = 59 \pm 2$), 12 ชั่วโมง ($FI = 128 \pm 18$) และ 24 ชั่วโมง ($FI = 112 \pm 12$) เทียบกับที่ 0 ชั่วโมง ($FI = 339 \pm 32$ unit) (รูปที่ 21 คอลัมน์ขวามือ) การรักษาเซลล์ primary hepatocytes ที่มีภาวะเหล็กเกินด้วยสารละลาย DFP (25-50 μM) และ DFO (100-200 μM) นาน 6 ชั่วโมงสามารถลดระดับ LIP ในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการขับเหล็กกลุ่ม LIP ออกจากเซลล์ลดลงเมื่อทำการ incubate เซลล์กับสารทดสอบนานขึ้นเป็น 12 และ 24 ชั่วโมง สาร GTE ไม่ค่อยมีประสิทธิภาพในการลดระดับ LIP ออกจากเซลล์เมื่อเทียบกับสารทดสอบ DFP, DFO และ EGCG ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าสาร GTE ประกอบด้วยกลุ่มสาร catechins ชนิดต่างๆ (รูปที่ 4) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่และมีขั้วสูงกว่า ทำให้ผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ไม่ดี





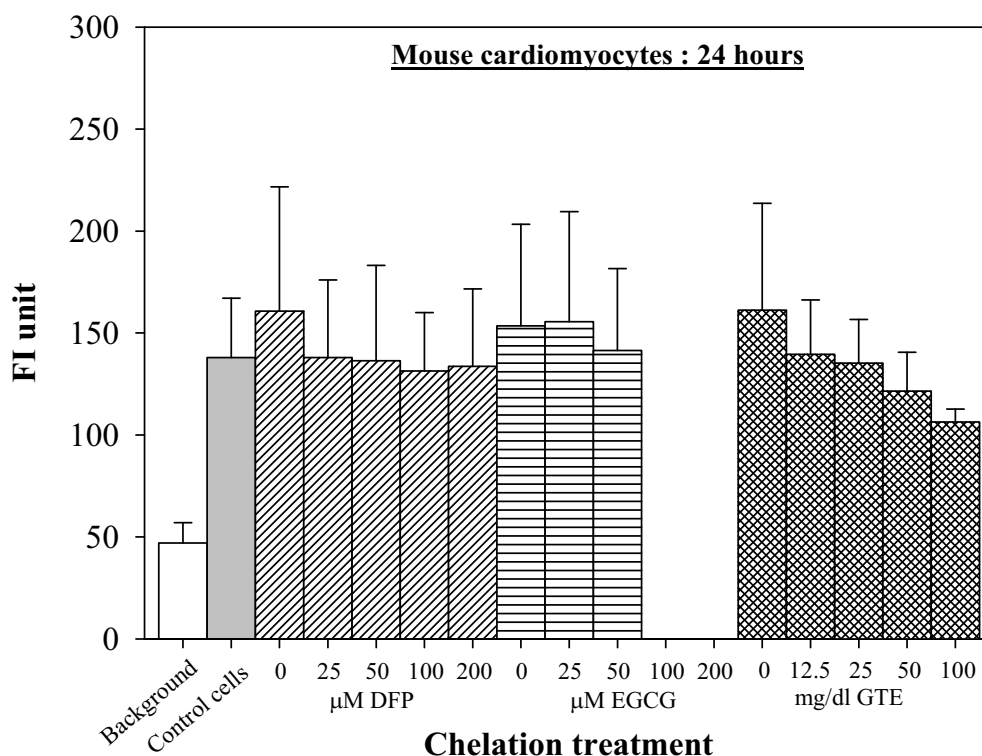
รูปที่ 21 สัมฤทธิ์ผลของสาร GTE, EGCG, DFO และ DFP ต่อระดับ LIP (mean $\pm$ SEM of five independent experiments) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 และ mouse hepatocytes ที่มีภาวะเหล็กเกิน นาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง **** p <0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับ control cells; # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.005, #### p <0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับ iron-loaded cells





รูปที่ 22 สัมฤทธิ์ผลของสาร GTE และ EGCG ร่วมกับ 25 μM DFP ต่อระดับ LIP (mean $\pm$ SEM of five independent experiments) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 และ mouse hepatocytes ที่มีภาวะเหล็กเกิน นาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง & $p<0.05$, && $p<0.01$, &&& $p<0.005$, &&&& $p<0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาด้วย 25 μM DFP อย่างเดียว

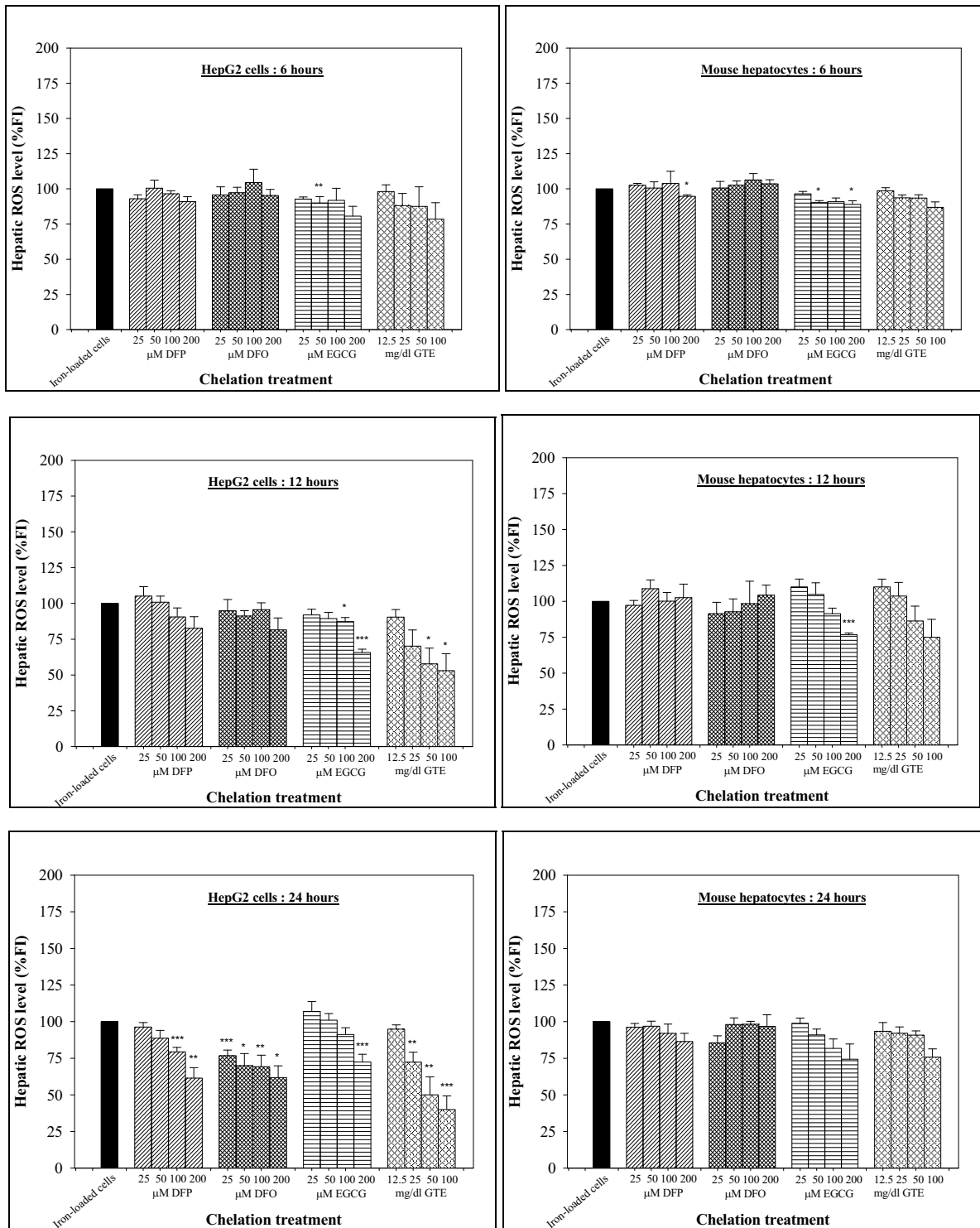
สาร EGCG ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (25 ไมโครโมลาร์) ช่วยเสริมการทำงานของยา DFP (25 ไมโครโมลาร์) ในการลดปริมาณธาตุเหล็กกลุ่ม LIP ในเซลล์ตับ ส่วนสาร GTE ยังคงไม่มีผลช่วยยา DFP ในการขับ LIP ในเซลล์ตับ (รูปที่ 22) ยา DFP สาร GTE และ EGCG ไม่มีผลลดระดับ LIP ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่เพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงได้ (รูปที่ 23)



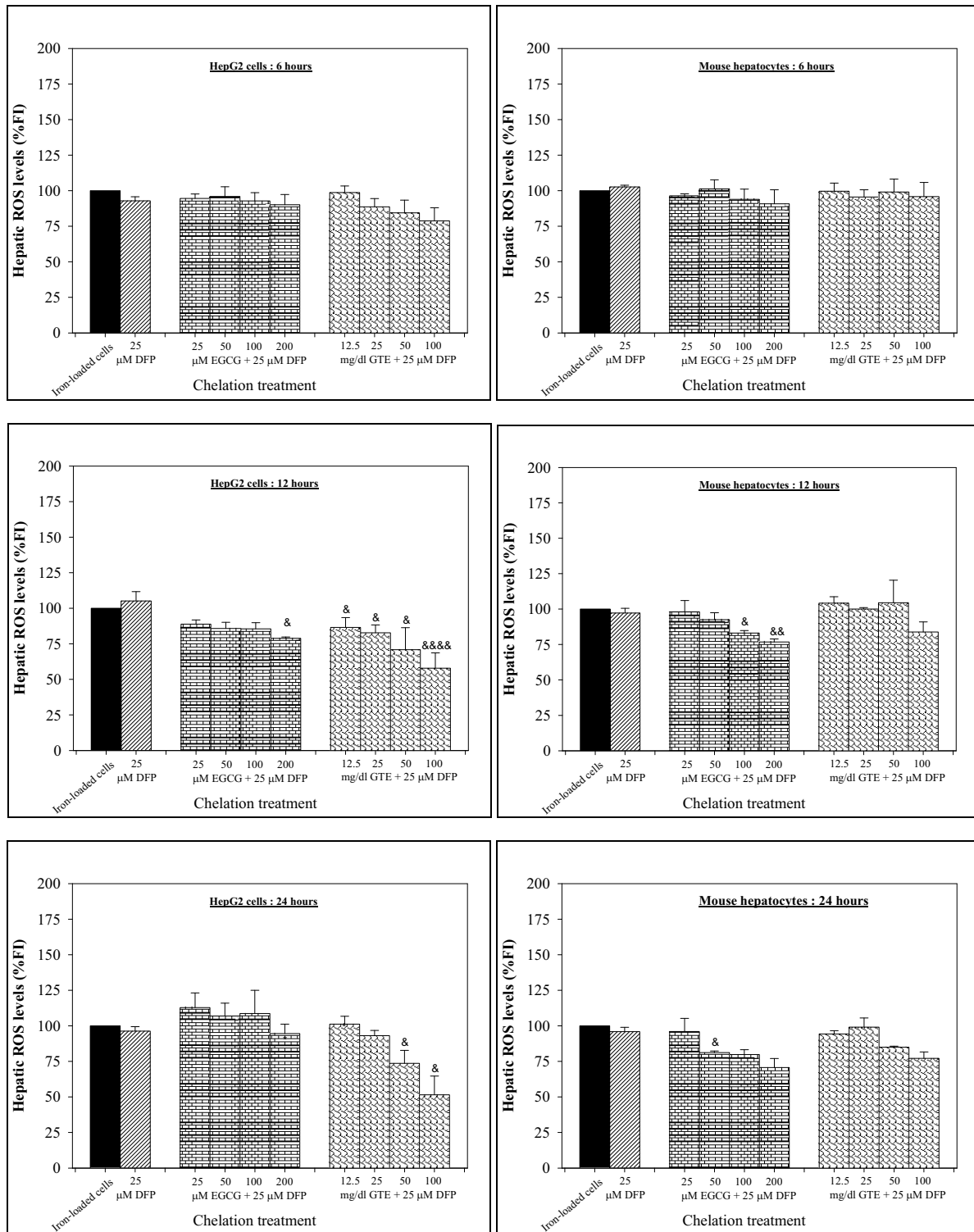
รูปที่ 23 สัมฤทธิ์ผลของสาร GTE, EGCG และ DFP ต่อระดับ LIP (mean±SEM of five independent experiments) ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยงที่มีภาวะเหล็กเกิน นาน 24 ชั่วโมง

สัมฤทธิ์ผลของสาร GTE และ EGCG ต่อระดับ total ROS ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 cells และ mouse hepatocytes

การรักษาเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 cells ด้วยสารทดสอบ DFP, DFO, EGCG และ GTE นาน 6 ชั่วโมงไม่ค่อยมีในการลดระดับอนุมูลอิสระในเซลล์ได้ แต่เมื่อรักษานาน 12 และ 24 ชั่วโมงสารทดสอบเหล่านี้สามารถลดระดับอนุมูลอิสระในเซลล์ได้ (EGCG>GTE>DFP>DFO) ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้น (dose response) และขึ้นกับเวลา (time dependence) (รูปที่ 24 ด้านซ้ายมือ) ในทำนองเดียวกันสารทดสอบเหล่านี้สามารถลดระดับอนุมูลอิสระในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง mouse hepatocytes ได้ (EGCG>GTE>DFP>DFO) ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้นและขึ้นกับเวลา (รูปที่ 24 ด้านขวามือ)



รูปที่ 24 ผลการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG, DFO และ DFP ต่อระดับ total ROS (mean±SEM of five independent experiments) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 และ mouse hepatocytes ที่มีภาวะเหล็กเกิน เป็นเวลานาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง **** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control cells; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.005$, #### $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับ iron-loaded cells

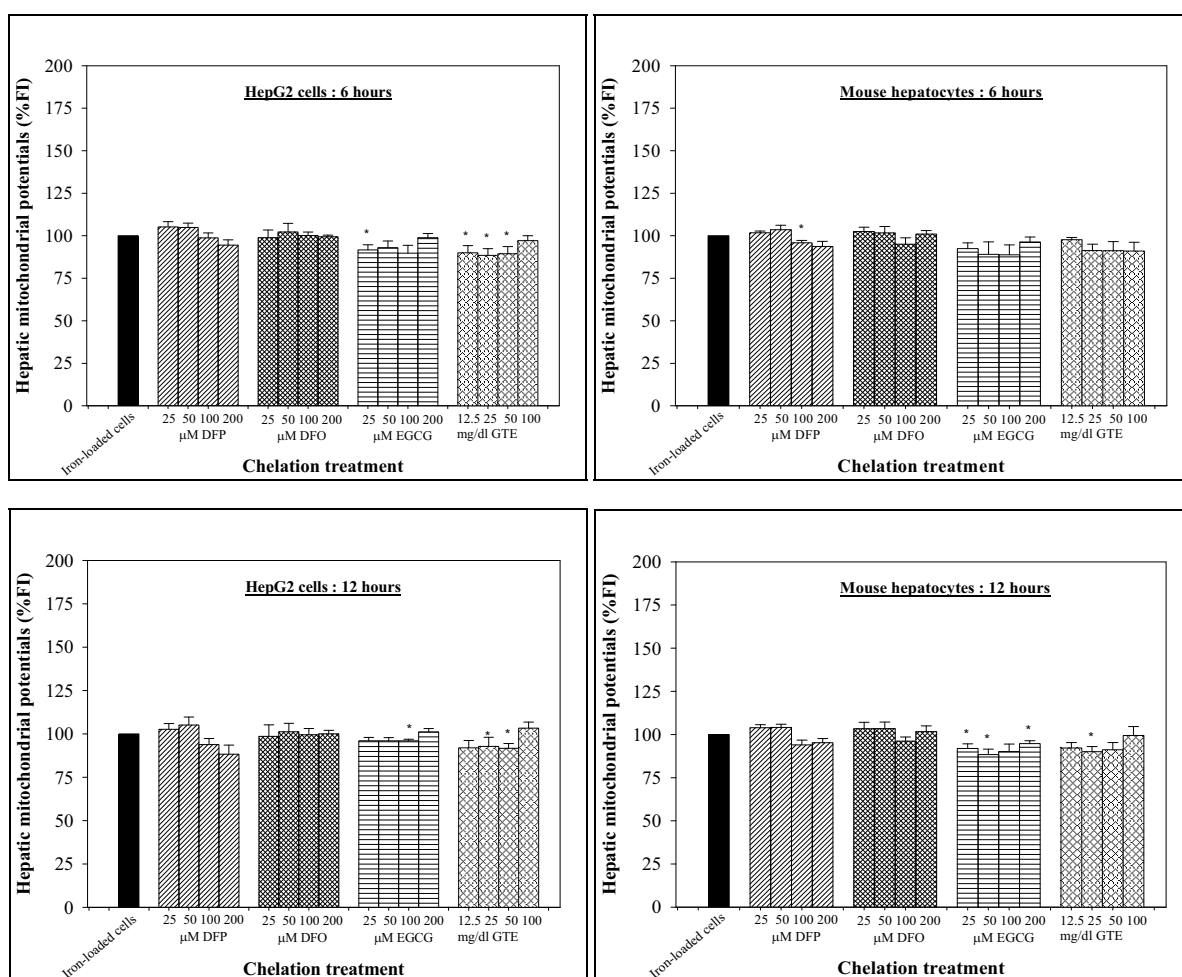


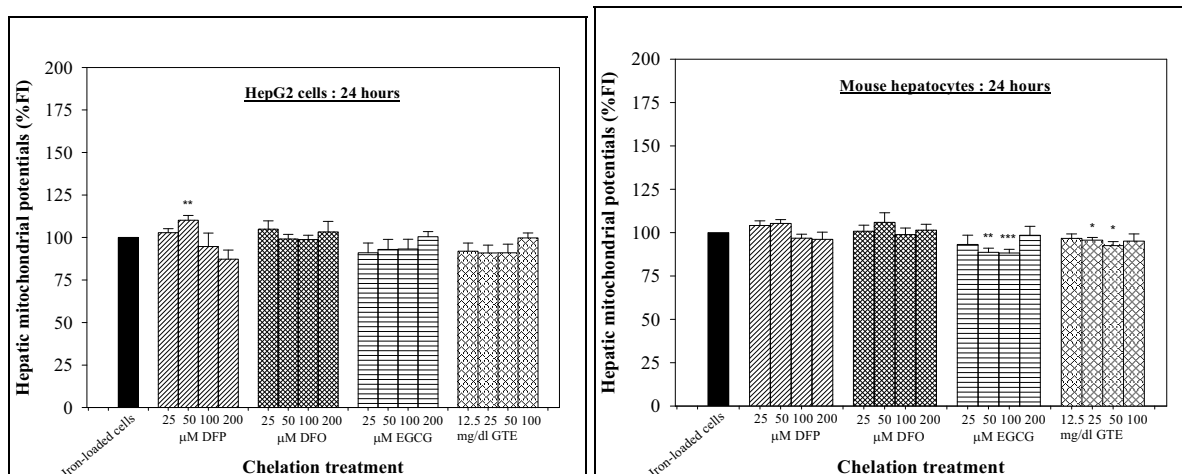
รูปที่ 25 ผลการรักษาด้วยสาร GTE และ EGCG ร่วมกับสาร 25 μM DFP ต่อดัชนี total ROS (mean±SEM of five independent experiments) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 และ mouse hepatocytes ที่มีภาวะเหล็กเกิน เป็นเวลานาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง & $p<0.05$, && $p<0.01$, &&& $p<0.005$, &&&& $p<0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับ การรักษาด้วยยา 25 μM DFP เพียงอย่างเดียว

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 25 สนับสนุนให้เห็นว่าสาร GTE และ EGCG มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ที่สามารถขจัดหรือทำลายอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสาร DFP และ DFO ที่มีคุณสมบัติในการจับและตรึงเหล็ก

สัมฤทธิ์ผลของสาร GTE และ EGCG ต่อระดับ mitochondrial membrane Ψ ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 cells และ mouse hepatocytes

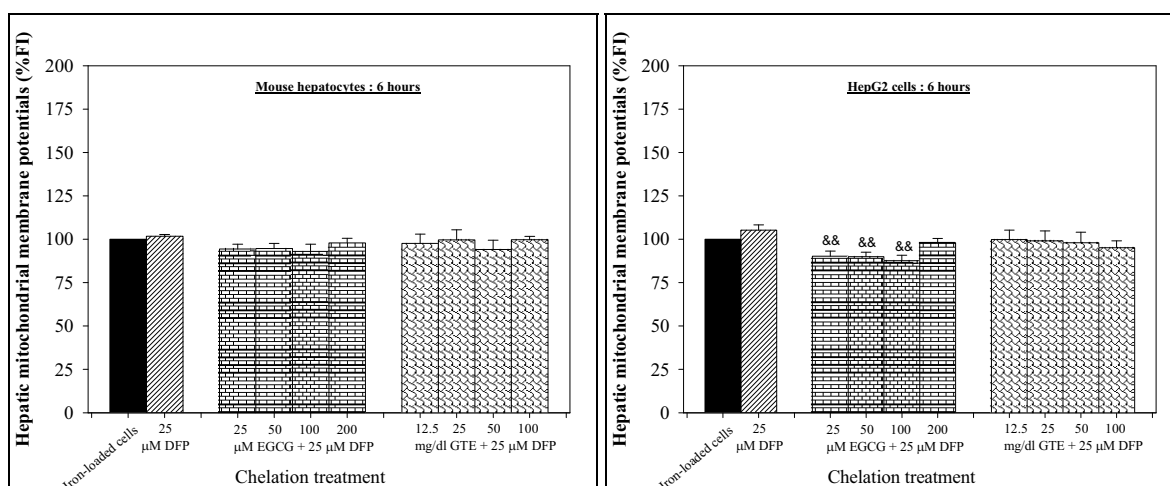
สาร GTE และ EGCG มีศักยภาพดีกว่ายา DFP และ DFO ในการปกป้องการทำลายเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียของเซลล์ตับ HepG2 cells และ mouse hepatocytes จากสารอนุมูลอิสระ ทำให้คุณสมบัติการเป็นตัวขวางกั้น (barrier) สารหรือไอออนในการผ่านเข้า-ออกชั้นไมโทคอนเดรีย การใช้สาร GTE และ EGCG ปริมาณน้อยๆ (เช่น 12.5 และ 25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือ 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) ให้ผลปกป้องเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียดีกว่าการใช้สารในปริมาณสูงๆ (เช่น 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือ 200 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) (รูปที่ 26)

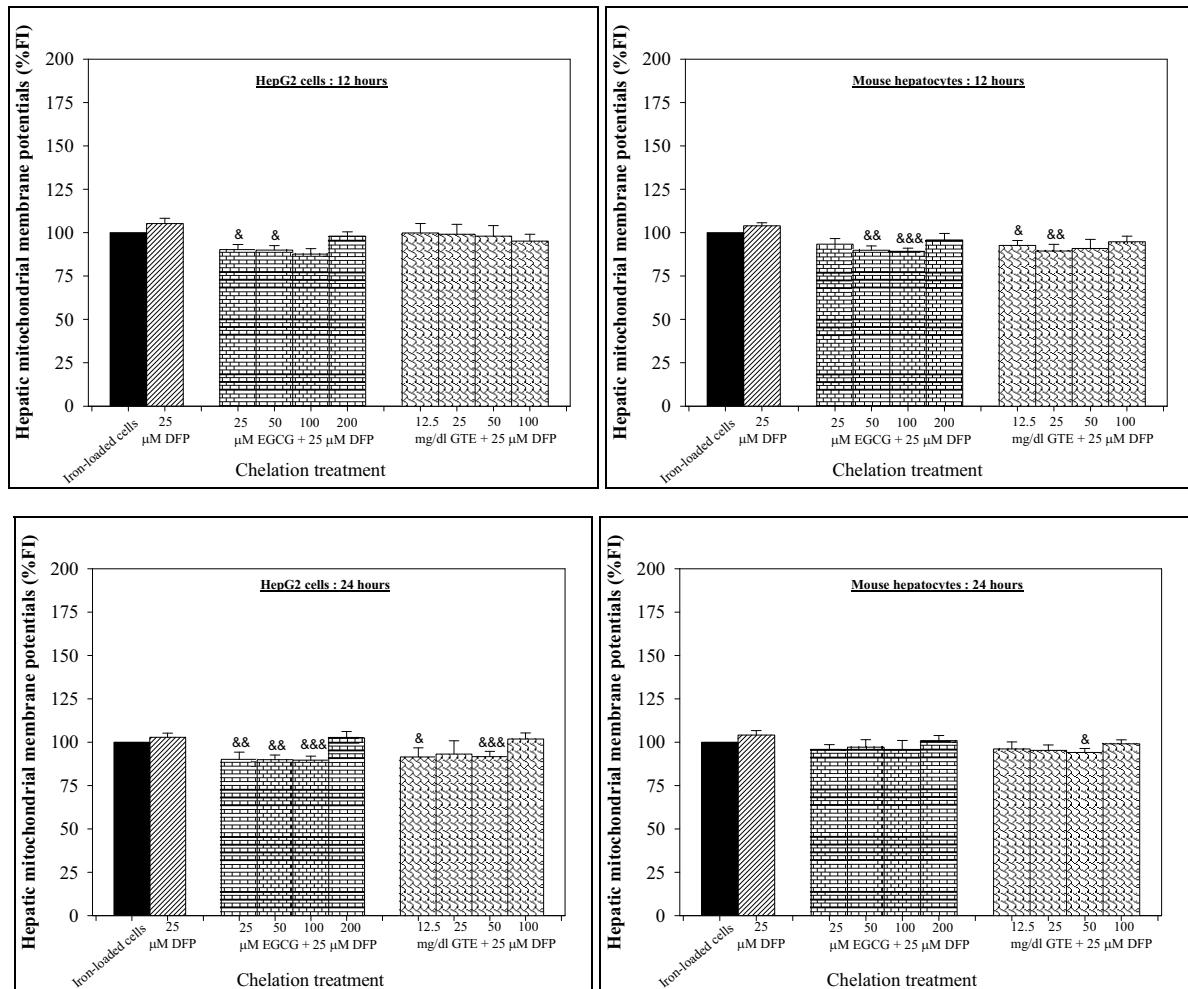




รูปที่ 26 ผลการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG, DFO และ DFP ต่อดัชนี mitochondrial membrane potentials (Ψ) (mean $\pm$ SEM of five independent experiments) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 และ mouse hepatocytes ที่มีภาวะเหล็กเกิน เป็นเวลานาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง **** p <0.001 เทียบกับ control cells; # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.005, #### p <0.001 เทียบกับ iron-loaded cells

สาร EGCG (ความเข้มข้น 25-100 ไมโครโมลาร์) มีฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระและช่วยป้องกันเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียของเซลล์ตับทั้งสองชนิดถูกทำลาย ส่วนสาร GTE ไม่ค่อยมีผลช่วยปกป้องเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (รูปที่ 27) อาจจะเป็นเพราะว่าสาร EGCG มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าสาร catechin ตัวอื่นๆในสารสกัดชาเขียวและสามารถผ่านเข้า-ออกเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียได้ดีกว่าด้วย





รูปที่ 27 ผลการรักษาด้วยสาร GTE และ EGCG ร่วมกับสาร 25 μM DFP ต่อระดับ mitochondrial membrane potentials (Ψ) (mean $\pm$ SEM of five independent experiments) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 และ mouse hepatocytes ที่มีภาวะเหล็กเกิน เป็นเวลานาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง $^{\circ}p<0.05$, $^{\circ\circ}p<0.01$, $^{\circ\circ\circ}p<0.005$, $^{\circ\circ\circ\circ}p<0.001$ เปรียบเทียบกับการรักษาด้วยยา 25 μM DFP เพียงอย่างเดียว

ผลความเป็นพิษของสาร GTE และ EGCG ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

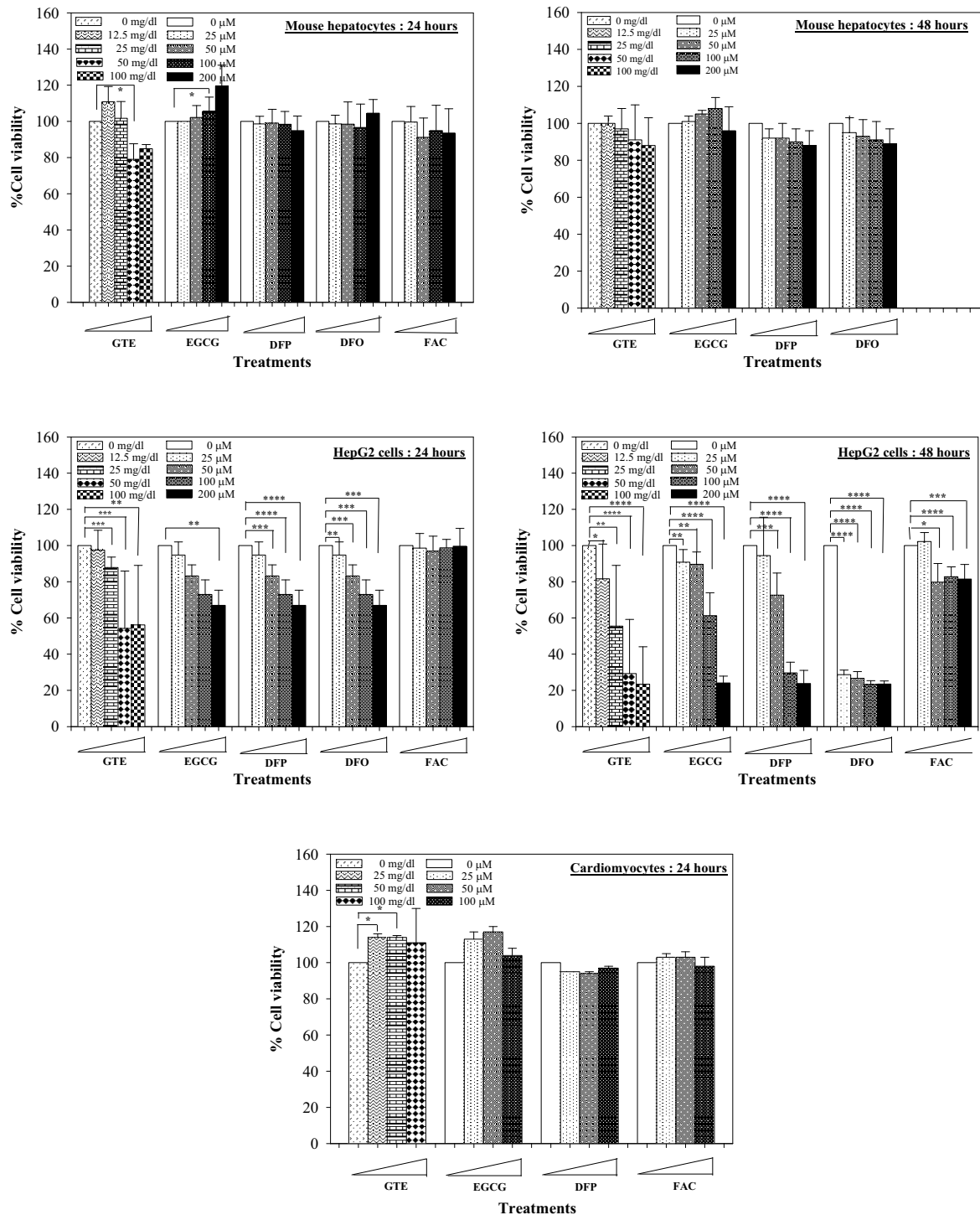
สาร GTE, EGCG และ DFO มีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์ตับปฐมภูมิเพาะเลี้ยงนาน 24 และ 48 ชั่วโมงมีชีวิตรอดมากขึ้น (GTE>EGCG>>>DFO) ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับปริมาณสารเมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารเหล่านี้ ส่วนสาร FAC และยา DFP มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับปฐมภูมิน้อยมาก (%cell viability >95%) ยา DFP มีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ตับปฐมภูมิที่ได้รับสาร GTE และ EGCG ลดต่ำลง (รูปที่ 28 แถวบน)

เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ตับ HepG2 ในสภาวะที่มีสารทดสอบ GTE, EGCG, FAC, DFO และ DFP ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลานาน 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้น GTE>>DFO>DFP>EGCG>FAC ในลักษณะที่ขึ้นกับเวลาและความเข้มข้นของสารที่ใช้ แสดงให้เห็นว่า

เซลล์ HepG2 cells เป็น human hepatocellular carcinoma cells ที่มีความจำเป็นต้องใช้ธาตุเหล็ก (FAC) ปริมาณที่สูงในการเมตาโบลิซึม รวมทั้งการแบ่งตัวและเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นจึงไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell viability >20%) อย่างไรก็ตามสาร EGCG มีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อใช้ปริมาณเพิ่มมากขึ้น ยาขับเหล็ก DFO และ DFP มีฤทธิ์จำกัดปริมาณเหล็ก (iron depletion) ในอาหารเลี้ยงนอกเซลล์ได้ ยา DFP ยังสามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์และกำจัดเหล็กที่มีอยู่ภายในเซลล์และมีผลทำให้เซลล์ตายเพิ่มมากขึ้น และที่น่าสนใจคือสาร GTE มีศักยภาพสูงคล้ายกับยา DFP จึงมีผลทำให้เซลล์ HepG2 cells ตายมากที่สุด (รูปที่ 28 แถวกลาง)

ยา DFP และสารประกอบเหล็ก FAC ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่เพาะเลี้ยงนาน 24 และ 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเราพบว่าสาร GTE ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร รวมทั้งสาร EGCG ความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครโมลาร์มีผลเพิ่มการมีชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่เพาะเลี้ยงได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 28 แถวล่าง)

ผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าสาร GTE และ EGCG มีคุณสมบัติเป็นทั้งสารแอนติออกซิแดนท์และจับธาตุเหล็ก จึงช่วยปกป้องและทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและเป็นอันตรายต่อเซลล์ตับปกติได้ ส่วน DFP เป็นยาขับเหล็กที่มีปฏิสัมพันธ์กับธาตุเหล็กภายในเซลล์และอาจเป็นพิษต่อเซลล์ตับได้ สาร GTE และ EGCG มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cells) จึงอาจมีผลดีในด้านการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับได้ด้วย

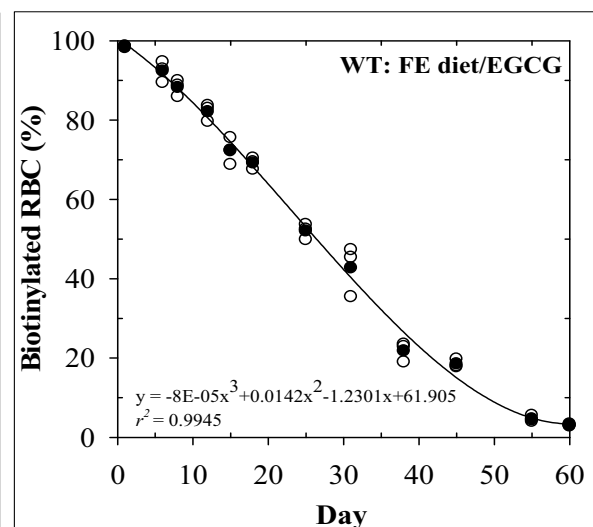
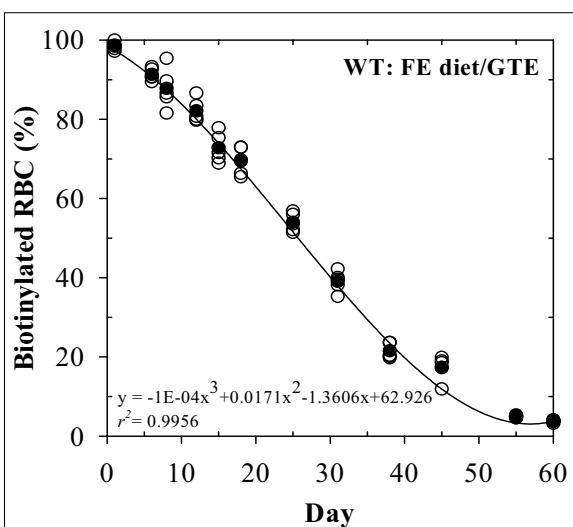
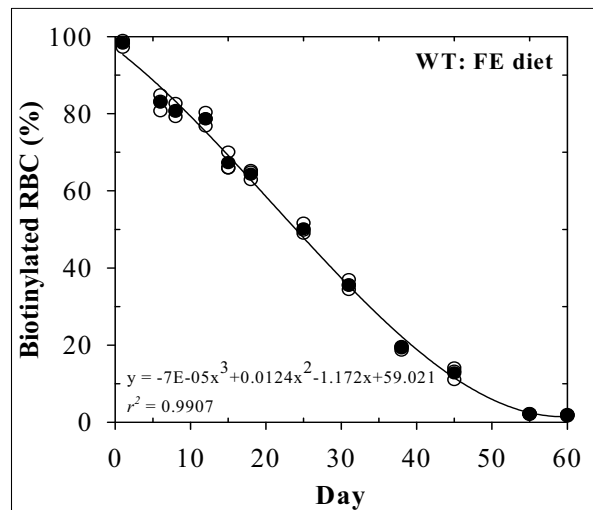
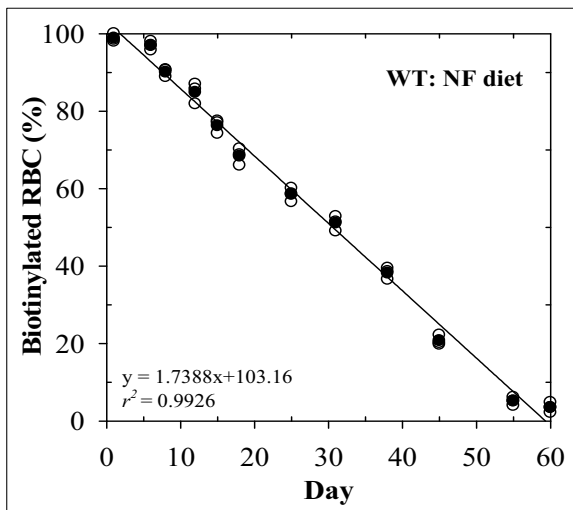


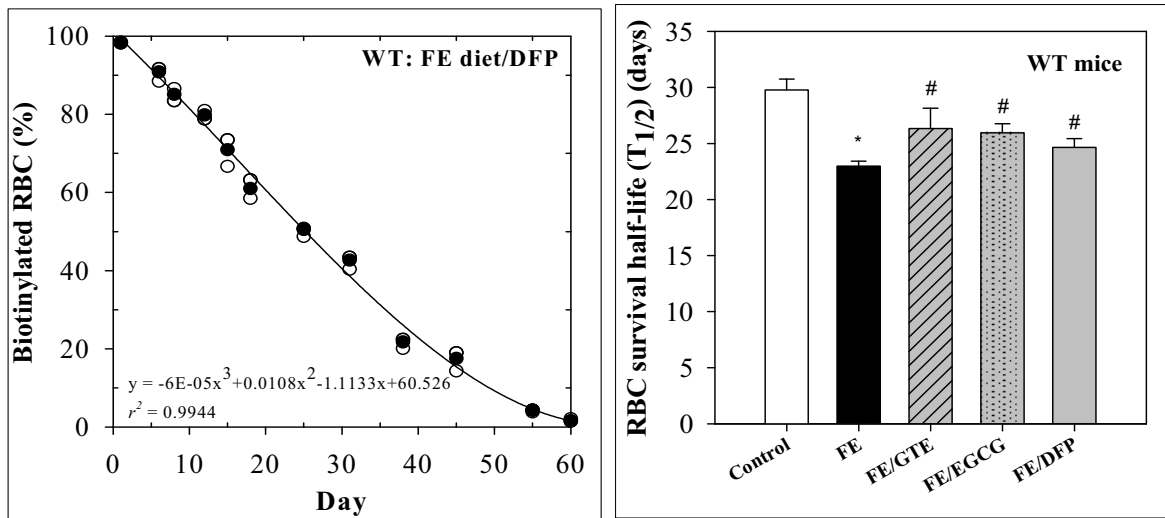
รูปที่ 28 ผลของสาร GTE (0-200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร), EGCG, DFP, DFO และ FAC DFP (0-200 ไมโครโมลาร์) นาน 24 และ 48 ชั่วโมงต่อการมีชีวิตรอด (%cell viability) ของเซลล์เพาะเลี้ยง mouse primary hepatocyte, mouse primary hepatocyte⁸ (in vivo iron loading), HepG2 cells และ

cardiomyocytes ค่าที่วิเคราะห์ได้แสดงเป็น mean $\pm$ SD (three independent triplicate experiments) ซึ่ง * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.005$ และ **** $p<0.0005$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษา

ผลของสารสกัดชาเขียวต่อการมีชีวิตรอดของเม็ดเลือดแดงในหนูปกติและหนูธาลัสซีเมีย

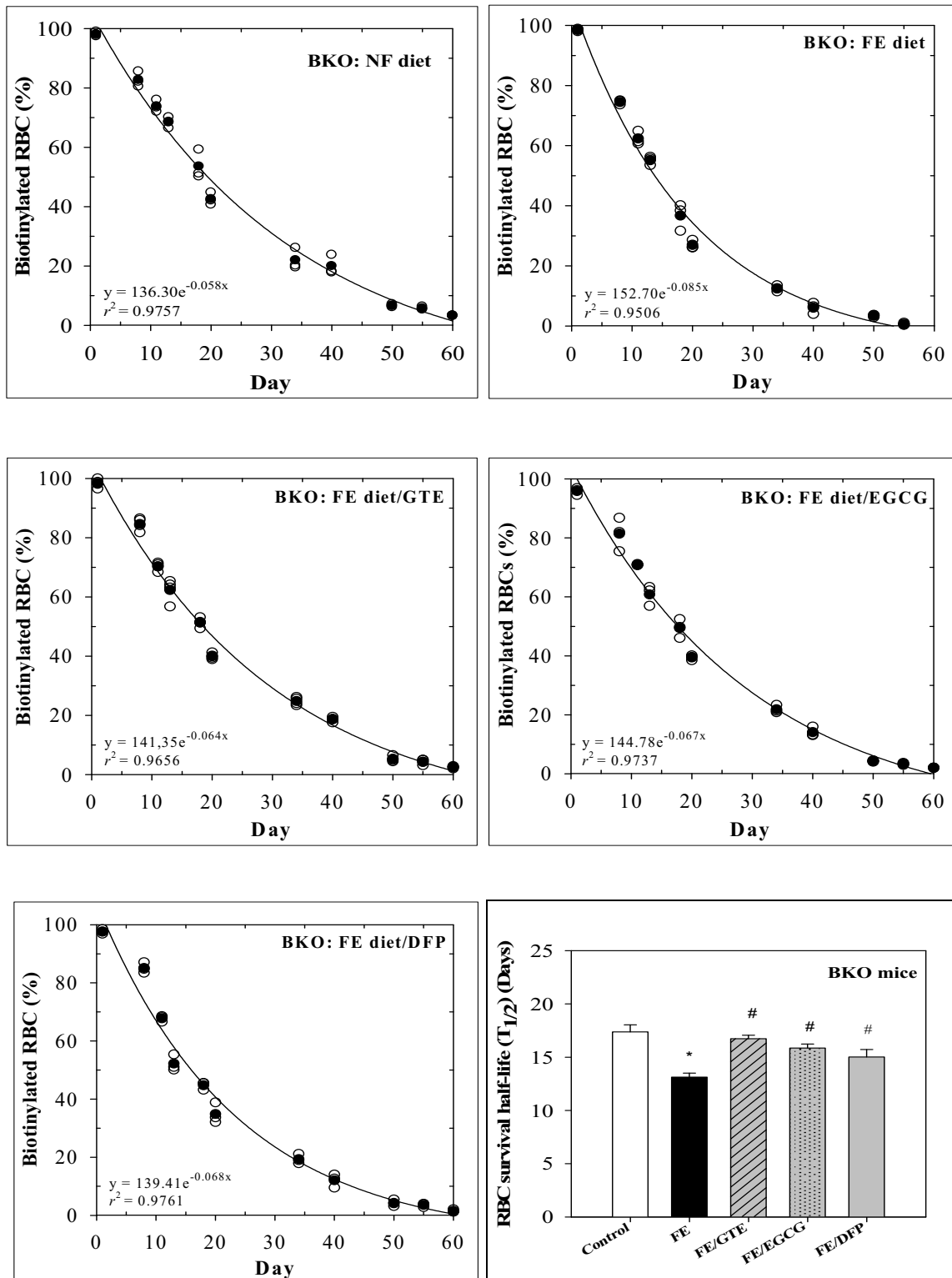
ผลการทดลองรูปที่ 29 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดแดง (แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์) ในหนูทดลอง WT ที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NF diet) อาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) และอาหารเสริมธาตุเหล็กร่วมกับการรักษาด้วยสาร DFP, EGCG และ GTE นาน 30 วัน โดยพบว่าเม็ดเลือดแดงของหนู WT ที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก (RBC survival half-life, $T_{1/2}$, = 23 วัน) มีอายุสั้นกว่าเม็ดเลือดแดงของหนู WT ที่กินอาหารสูตรปกติ ($T_{1/2}$, = 30 วัน) อย่างมีนัยสำคัญ การรักษาหนูทดลอง WT ที่มีภาวะเหล็กเกินด้วยยา DFP สาร EGCG และ GTE ช่วยทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุยืนยาวขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($T_{1/2}$, = 24, 25 และ 26 วันตามลำดับ) (รูปที่ 29 กราฟแท่ง)





รูปที่ 29 กราฟการมีชีวิต (survival) และครึ่งชีวิตของการมีชีวิต (survival half-life, $T_{1/2}$) ของเม็ดเลือดแดงของหนูปกติ (WT) ($n = 5$) ที่กินอาหารสูตรปกติ (NF diet) และอาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) และได้รับการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ NF diet; # $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ FE diet สัญลักษณ์วงกลมโปร่ง (O) แสดงค่าของหนูแต่ละตัว และสัญลักษณ์วงกลมทึบ (●) แสดงค่าเฉลี่ย (mean±SD)

ผลการทดลองรูปที่ 30 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดแดง (แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์) ในหนูทดลอง BKO ที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NF diet) อาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) และอาหารเสริมธาตุเหล็กร่วมกับการรักษาด้วยสาร DFP, EGCG และ GTE นาน 60 วัน โดยพบว่าเม็ดเลือดแดงของหนู BKO ที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก (RBC survival half-life, $T_{1/2}$, = 13 วัน) มีอายุสั้นกว่าเม็ดเลือดแดงของหนู WT ที่กินอาหารสูตรปกติ ($T_{1/2}$, = 17 วัน) อย่างมีนัยสำคัญ การรักษาหนูทดลอง BKO ที่มีภาวะเหล็กเกินด้วยยา DFP สาร EGCG และ GTE ช่วยทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุยืนยาวขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($T_{1/2}$, = 15, 15.5 และ 16 วันตามลำดับ) (รูปที่ 30 กราฟแท่ง) เมื่อเปรียบเทียบอายุเม็ดเลือดแดงของหนู WT กับหนู BKO จะเห็นได้ว่าเม็ดเลือดแดงของหนู WT มีอายุยืนยาวกว่าเม็ดเลือดแดงของหนู BKO ประมาณ 40-50% ซึ่งสอดคล้องกับสิ่งที่มาแล้วว่าเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีอายุสั้นกว่าเม็ดแดงของคนปกติ อันเป็นผลมาจากเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีปริมาณอนุมูลอิสระสูงกว่าและมีระดับกลูตาไธโอนต่ำกว่า รวมทั้งอยู่ในสภาวะพลาสมาที่มีปริมาณเหล็กสูงกว่าปกติ (95-105% transferrin saturation) และมีธาตุเหล็กรูป NTBI (2-20 ไมโครโมลาร์) ที่เป็นตัวการเหนี่ยวนำการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมา



รูปที่ 30 กราฟการมีชีวิต (survival) และครึ่งชีวิตของการมีชีวิต (survival half-life, $T_{1/2}$) ของเม็ดเลือดแดงของหนูทดลองชนิด WT ($n = 5$) ที่กินอาหารสูตรปกติและอาหารเสริมธาตุเหล็ก และได้รับการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ NF diet; # $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ

FE diet สัญลักษณ่วงกลมโปร่ง (O) แสดงค่าของหนูแต่ละตัว และสัญลักษณ่วงกลมทึบ (●) แสดงค่าเฉลี่ย (mean±SD)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลองที่ได้ (Discussion and Conclusions)

ชาเขียวเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่นิยมนำมาใช้เป็นเครื่องดื่มซึ่งประกอบด้วยสารโพลีฟีนอลกลุ่ม catechins ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยาสำคัญหลายอย่าง การศึกษาครั้งนี้เราใช้ตู้ไมโครเวฟอบใบชา ให้แห้งอย่างรวดเร็วภายในเวลา 3 นาที (Srichairatanakool, Ounjaijean et al. 2006) และทำลาย เอนไซม์ polyphenol oxidase ที่มีอยู่ในใบชาสดเพื่อไม่ให้ไปทำลายสาร catechins ที่มีอยู่ สารสกัดหยาบชาเขียว (GTE) และสารองค์ประกอบหลักของชาเขียวคือ EGCG ที่เตรียมแยกขึ้นมาเอง (Thephinlap, Ounjaijean et al. 2007) สารทดสอบทั้งสองนี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงและจับตรึงธาตุเหล็กได้ดี Xu และคณะใช้วิธี Semi-preparative HPLC แยกสาร catechins ต่างๆจาก GTE พบว่าปฏิกิริยา epimerization ของสาร catechins เหล่านั้นเกิดขึ้นได้ระหว่างการเตรียมผลิตภัณฑ์ชาเขียวแต่ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่มีอยู่เดิม (Xu, Yeung et al. 2004) สาร EGCG และ ECG ในชาเขียวเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารประกอบธาตุเหล็กได้ถึง 4 ชนิดและมีการถ่ายทอด อิเลคตรอนไปยังไอออนธาตุเหล็กเกิดขึ้นตามมา (Ryan and Hynes 2007) การศึกษาของ Yoneda และคณะในปี คศ. 1995 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดชาเขียวประกอบด้วยสารบีตา catechins ที่มีคุณสมบัติเป็นสาร แอนติออกซิแดนท์และสามารถลดระดับสาร TBARS และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในสมองหนูทดลองที่เป็นโรคลมชักได้ (Yoneda, Hiramatsu et al. 1995) สาร catechins จากชาเขียวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเพอรอกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดยธาตุเหล็กที่เซลล์มิวโคซา บริเวณลำไส้ใหญ่ของหนูขาวได้และทำงานร่วมกับอาหารที่อุดมด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวหนึ่งพันธะคู่ (Yamamoto, Miyamoto et al. 2006)

สารสกัดชาเขียวและสาร EGCG สามารถลดภาวะเหล็กเกินในหนูทดลองที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก (เช่นลดระดับ NTBI ในพลาสมาและการสะสมเหล็กในเนื้อเยื่อตับ) โดยอาศัยกลไกยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กจากอาหารบริเวณลำไส้เล็ก (Zeyuan, Bingying et al. 1998; Samman, Sandstrom et al. 2001) สารสกัดชาเขียวยังมีศักยภาพช่วยลดการสะสมธาตุเหล็กในเนื้อเยื่อตับของหนูอัลสไซม์ที่มี ภาวะโลหิตจางและได้รับอาหารเสริมธาตุเหล็กเป็นเวลานาน (Saewong, Ounjaijean et al. 2010) อย่างไรก็ตามการบริโภคชาเขียว ชาดำและสารสกัดชาไม่มีผลกระทบต่อระดับธาตุเหล็ก ทองแดงและ สังกะสี (ยกเว้น มังกานีส) ในร่างกาย (Record, McInerney et al. 1996) อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ ขัดแย้งกันของ Chen และคณะที่รายงานว่าชาเขียวไม่สามารถยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กได้ (Cheng 2009) การศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัยที่ทำการเหนี่ยวนำให้หนูขาวเกิดภาวะเหล็กเกินด้วยการฉีด สารละลาย ferric citrate เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหน้าท้องและทำการรักษาโดยการป้อนสารสกัดชาให้กิน ซึ่งพบว่าการศึกษาการฉีดสารละลาย ferric citrate ไม่ได้ทำให้หนูทดลองมีภาวะเหล็กเกินสูงมาก (Ounjaijean, Thephinlap et al. 2008) การศึกษาครั้งนี้จึงใช้หนูเมาส์ที่ไวต่อการกระตุ้นให้เกิดภาวะเหล็กเกินโดยการ ให้หนูทดลองกินอาหารเสริมธาตุเหล็กนาน 2-3 เดือน (Thephinlap, Phisalaphong et al. 2009)

การศึกษาค้นคว้าให้หนูทดลองปกติ (WT) หนูโรธาลัสซีเมีย BKO และ DH กินอาหารเสริมธาตุเหล็กปริมาณสูง (FE diet) และพบว่า มีระดับ NTBI ในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้น 15-20 ไมโครโมลาร์และมีปริมาณเหล็กสะสมในตับเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญซึ่งเป็นผลมาจากการดูดซึมเหล็กบริเวณลำไส้มากขึ้น หนูโรธาลัสซีเมียชนิด BKO มีภาวะโลหิตจางเล็กน้อย (ค่าฮีโมโกลบินในเลือด 8.5-10 กรัมต่อเดซิลิตร) มีฟีโนไทป์เทียบได้กับผู้ป่วยธาลัสซีเมียอินเตอร์มีเดีย การศึกษาค้นคว้านี้ใช้สาร EGCG ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมซึ่งไม่รบกวนการดูดซึมธาตุเหล็กในคนปกติ (Ullmann, Haller et al. 2005)

สาร EGCG และ ECG ในสารสกัดชาเขียวมีหมู่ฟังก์ชันหลักคือกาโลลิล (galloyl group) เป็นโครงสร้างที่ใช้จับกับไอออนโลหะ (เช่น Fe และ Zn) ไปด้วยแรง hexadentate co-ordination bond จึงช่วยกำจัดและบรรเทาภาวะเหล็กเกินในร่างกายและปริมาณการสะสมธาตุเหล็กในเนื้อเยื่อตับลดลงอย่างชัดเจน ฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและยับยั้งขบวนการสร้างอนุมูลอิสระโดยผ่านปฏิกิริยา Haber-Weiss และ Fenton reaction ช่วยป้องกันความเสียหายหรืออันตรายต่อสารชีวโมเลกุลองค์ประกอบของเซลล์ (ได้แก่ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิกและคาร์โบไฮเดรต) และองค์ประกอบของเซลล์ (เช่นเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ไลโซโซมและนิวเคลียส) การหยุดยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากช่วยทำให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ MDA (หรือ TBARS) ในเนื้อเยื่อตับลดลงได้ จึงสามารถช่วยป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของตับ (เช่นการอักเสบ การเกิดไฟโบรซิสและการเกิดตับแข็ง) ขึ้นตามมาได้ สาร EGCG มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุดที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไลปิดเพอรอกซิเดชันที่สมองของหนูเจอบิลได้ (Lee, Im et al. 2003) การบริโภคชาที่มีปริมาณแคเทชินสูงช่วยป้องกันตับอักเสบและตับเกิดไฟโบรซิสในหนูทดลองได้ (Abe, Ijiri et al. 2005; Abe, Suzuki et al. 2007) นอกจากนี้สารสกัดชาเขียวไม่มีผลทำให้ระดับโปรตีนคอลลาเจนในเนื้อเยื่อตับของหนูทดลองทั้งสองกลุ่มเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน สารโพลีฟีนอลในสารสกัดชาเขียวน่าจะยับยั้งการเกิดออกซิเดทีฟสเตรสในเซลล์โดยการทำงานผ่าน ROS-NO pathway (Guo, Bezaud et al. 2005)

สารสกัดชาเขียวและสาร EGCG ช่วยยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงที่ภาวะออกซิเดทีฟสเตรส ลดปริมาณ ROS และ TBARS เพิ่มปริมาณสารกลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงของหนูโรธาลัสซีเมีย BKO และ DH รวมทั้งช่วยยืดอายุเม็ดเลือดแดงของหนูทดลอง สารทดสอบทั้งสองอาจทำหน้าที่ช่วยทำลายอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในเม็ดเลือดแดง เพิ่มปริมาณสารกลูตาไธโอนรูปรีดิวซ์ (GSH) โดยออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ glutathione synthase ในเซลล์ตับช่วยเร่งการสังเคราะห์สารกลูตาไธโอนจากสารตั้งต้น (คือ glutamic acid, cysteine และ glycine) หรือทำหน้าที่เป็น reducing agent คล้ายกับโคเอนไซม์ NADPH ที่ช่วยในปฏิกิริยาการรีดิวซ์ (redox recycling) GSSG กลับมาเป็น GSH ซึ่งเร่งการทำงานโดยเอนไซม์ glutathione reductase การศึกษาของ Grinberg และคณะในปี ค.ศ. 1997 แสดงให้เห็นว่าสารโพลีฟีนอลกลุ่มแคเทชินในชาเขียวและชาดำเป็นสารประกอบที่สามารถจับเหล็กได้ จึงมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงได้ (Grinberg, Newmark et al. 1997) การศึกษาในหลอด

ทดลองรายงานว่าสารสกัดชาเขียวสามารถยับยั้งปฏิกิริยาปิดเพอรอกซิเดชันของเม็ดเลือดแดงที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารเฟนิลไฮโดรควิโนนและไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ที่เป็นสารออกซิแดนท์ (Biswas, Bhattacharyya et al. 2005)

สารเคเตชินในชาเขียวมีคุณสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนท์ที่สามารถทำลายอนุมูลอิสระในพลาสมา เซลล์ตับและหนูธาลัสซีเมียที่มีเหล็กเกินได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้ในปริมาณที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามสารเคเตชิน EGC และ EC ในสารสกัดชาเขียวและชาดำอาจมีคุณสมบัติเป็นโปรออกซิแดนท์ (pro-oxidant) ที่เหนี่ยวนำการสร้างสารออกซิแดนท์ (เช่นไฮโดรเจนเพอรอกไซด์และอนุมูลไฮดรอกซิล) ได้ถ้าใช้ในปริมาณต่ำๆ (Shin, Kim et al. 2007) นอกจากนี้ชาเขียวมีสารโพลีฟีนอลที่สามารถจับและสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับธาตุเหล็กแล้ว ยังตรวจพบว่ามีธาตุอลูมิเนียมเป็นองค์ประกอบที่สามารถแข่งการดูดซึมกับธาตุเหล็กได้ (Marouani, Chahed et al. 2007) ทำให้หนูและผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีการดูดซึมธาตุเหล็กลดลง สาร EGCG จับกับ Zn^{2+} ในสารละลายดีมากและสามารถจับกับ labile zinc ในเซลล์ตับ HepG2 cells ได้ จึงช่วยป้องกันการทำงานของ Zn-metalloprotein ที่ทำหน้าที่ควบคุมการ signal transduction และ metabolic pathway ภายในเซลล์รวมทั้งอาจช่วยป้องกันการอักเสบของเซลล์ตับได้ด้วย (Quesada, Bustos et al. 2010) การศึกษาที่ผ่านมารายงานความเป็นพิษของสารเคเตชินต่างๆต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยงตามลำดับดังนี้คือ $EGCG > propyl gallate > ECG > GA$, $EGC > EC$ โดยการทำให้ความต่างศักย์บริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียพังลงและสารเคเตชินเป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้าง ROS (Galati, Lin et al. 2006; Babich, Zuckerbraun et al. 2007) อย่างไรก็ตามหนูขาวที่กินสารสกัดชาเขียวปริมาณสูงๆ (100-500 ไมโครกรัมของสารสกัด/มิลลิลิตร) สามารถเกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อตับได้ซึ่งอาจเป็นผลจากสาร EGCG (Schmidt, Schmitz et al. 2005) การศึกษาของ Chan และคณะได้แสดงให้เห็นว่าสารเมตาโบไลต์ที่ได้จากสารสกัดชาเขียวสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับของหนูขาวและหนูเมาส์ได้ (Chan, Ramot et al. 2010)

ผลการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าสาร GTE มี EGCG เป็นส่วนประกอบหลักและมีความสามารถช่วยลดระดับธาตุเหล็กรูป NTBI ในพลาสมา รูป hemosiderin ในเนื้อเยื่อตับและม้ามของหนูทดลองที่มีภาวะเหล็กเกิน รูป LIP ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง mouse primary hepatocytes และ HepG2 cells ที่มีภาวะเหล็กเกินได้ในลักษณะขึ้นปริมาณสารที่ใช้ ส่งผลทำให้เกิด negative iron balance ในร่างกายและอวัยวะตับ สารทดสอบทั้งสองนี้ช่วยลดระดับอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดง ลดระดับสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาปิดเพอรอกซิเดชัน (เช่น MDA) ในพลาสมาและเนื้อเยื่อตับ และลดระดับสารแอนติออกซิแดนท์ (เช่น GSH) ในเนื้อเยื่อตับของหนูทดลองที่มีภาวะเหล็กเกินอย่างมีประสิทธิภาพ สาร EGCG และ GTE สามารถลดระดับอนุมูลอิสระและช่วยปกป้องการทำลายเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียของเซลล์ตับเพาะเลี้ยงที่มีภาวะเหล็กเกินได้ ช่วยทำให้เม็ดเลือดแดงของในหนูทดลองที่มีภาวะเหล็กเกินมีอายุยืนยาวขึ้นแต่ไม่มีผลกระทบต่อการสร้างฮีโมโกลบิน ช่วยลดการสร้างโปรตีนคอลลาเจน (ตัวชี้วัดการเกิดไฟโบรซิสที่ตับ) ในเนื้อเยื่อตับของหนูทดลอง WT, BKO และ DH ได้ และไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยงที่มีเหล็กเกิน การนำผลิตภัณฑ์ซาเขียวไปใช้ศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสเป็นสิ่งที่ท้าทายและน่าสนใจในอนาคตอันใกล้

เอกสารอ้างอิง

- Abe, K., M. Ijiri, et al. (2005). "Green tea with a high catechin content suppresses inflammatory cytokine expression in the galactosamine-injured rat liver." Biomed Res **26**(5): 187-92.
- Abe, K., T. Suzuki, et al. (2007). "The anti-fibrotic effect of green tea with a high catechin content in the galactosamine-injured rat liver." Biomed Res **28**(1): 43-8.
- Adiv, O. E., H. Mandel, et al. (2004). "Influence of co-administration of oral insulin and docosahexaenoic acid in mice." J Nutr Biochem **15**(10): 638-43.
- Aisen, P., C. Enns, et al. (2001). "Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism." Int J Biochem Cell Biol **33**(10): 940-59.
- Albright, R. K. and R. P. White (1982). "Red blood cell susceptibility to hydrogen peroxide (H₂O₂) lysis in chronic hemodialysis patients." Clin Exp Dial Apheresis **6**(4): 223-8.
- Amer, J., A. Goldfarb, et al. (2004). "Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells." Cytometry A **60**(1): 73-80.
- Anderson, G. J. (1999). "Non-transferrin-bound iron and cellular toxicity." J Gastroenterol Hepatol **14**(2): 105-8.
- Anderson, L. J., S. Holden, et al. (2001). "Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload." Eur Heart J **22**(23): 2171-9.
- Anderson, L. J., B. Wonke, et al. (2002). "Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassaemia." Lancet **360**(9332): 516-20.
- Andrews, N. C. (1999). "Disorders of iron metabolism." N Engl J Med **341**(26): 1986-95.
- Aneja, R., P. W. Hake, et al. (2004). "Epigallocatechin, a green tea polyphenol, attenuates myocardial ischemia reperfusion injury in rats." Mol Med **10**(1-6): 55-62.
- Anghileri, L. J. and P. Thouvenot (2000). "Natural polyphenols-iron interaction: its biological importance." Biol Trace Elem Res **73**(3): 251-8.
- Babich, H., H. L. Zuckerbraun, et al. (2007). "In vitro cytotoxicity of (-)-catechin gallate, a minor polyphenol in green tea." Toxicol Lett **171**(3): 171-80.
- Barton, J. C. (2007). "Chelation therapy for iron overload." Curr Gastroenterol Rep **9**(1): 74-82.
- Biswas, S., J. Bhattacharyya, et al. (2005). "Oxidant induced injury of erythrocyte-role of green tea leaf and ascorbic acid." Mol Cell Biochem **276**(1-2): 205-10.

- Borgna-Pignatti, C. and A. Castriota-Scanderbeg (1991). "Methods for evaluating iron stores and efficacy of chelation in transfusional hemosiderosis." Haematologica **76**(5): 409-13.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brittenham, G. M., P. M. Griffith, et al. (1994). "Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major." N Engl J Med **331**(9): 567-73.
- Britton, R. S., K. L. Leicester, et al. (2002). "Iron toxicity and chelation therapy." Int J Hematol **76**(3): 219-28.
- Bun, S. S., H. Bun, et al. (2006). "Effect of green tea extracts on liver functions in Wistar rats." Food Chem Toxicol.
- Butarbutar, T. B. (2004). "Fatty acid and cholesterol in eggs: a review." Southeast Asian J Trop Med Public Health **35**(4): 1036-8.
- Cabantchik, Z. I., W. Breuer, et al. (2005). "LPI-labile plasma iron in iron overload." Best Pract Res Clin Haematol **18**(2): 277-87.
- Cabantchik, Z. I., H. Glickstein, et al. (1996). "A fluorescence assay for assessing chelation of intracellular iron in a membrane model system and in mammalian cells." Anal Biochem **233**(2): 221-7.
- Cabrera, C., R. Artacho, et al. (2006). "Beneficial effects of green tea--a review." J Am Coll Nutr **25**(2): 79-99.
- Cappellini, M. D. (2008). "Long-term efficacy and safety of deferasirox." Blood Rev **22 Suppl 2**: S35-41.
- Chan, P. C., Y. Ramot, et al. (2010). "Fourteen-week toxicity study of green tea extract in rats and mice." Toxicol Pathol **38**(7): 1070-84.
- Cheng, T. O. (2006). "All teas are not created equal: the Chinese green tea and cardiovascular health." Int J Cardiol **108**(3): 301-8.
- Cheng, T. O. (2009). "Green tea does not inhibit iron absorption." Int J Cardiol **133**(1): 112.
- Chirico, S., C. Smith, et al. (1993). "Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test." Free Radic Res Commun **19**(1): 51-7.

- Chow, H. H., Y. Cai, et al. (2003). "Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals." Clin Cancer Res **9**(9): 3312-9.
- Cighetti, G., L. Duca, et al. (2002). "Oxidative status and malondialdehyde in beta-thalassaemia patients." Eur J Clin Invest **32 Suppl 1**: 55-60.
- Covington, M. B. (2004). "Omega-3 fatty acids." Am Fam Physician **70**(1): 133-40.
- Cragg, L., R. P. Hebbel, et al. (1998). "The iron chelator L1 potentiates oxidative DNA damage in iron-loaded liver cells." Blood **92**(2): 632-8.
- Craig, W. and L. Beck (1999). "Phytochemicals: Health Protective Effects." Can J Diet Pract Res **60**(2): 78-84.
- Daar, S. and A. V. Pathare (2006). "Combined therapy with desferrioxamine and deferiprone in beta thalassemia major patients with transfusional iron overload." Ann Hematol: 1-5.
- de Jong, K., R. K. Emerson, et al. (2001). "Short survival of phosphatidylserine-exposing red blood cells in murine sickle cell anemia." Blood **98**(5): 1577-84.
- de Valk, B., M. A. Addicks, et al. (2000). "Non-transferrin-bound iron is present in serum of hereditary haemochromatosis heterozygotes." Eur J Clin Invest **30**(3): 248-51.
- Dissayabutra, T., P. Tosukhowong, et al. (2005). "The benefits of vitamin C and vitamin E in children with beta-thalassemia with high oxidative stress." J Med Assoc Thai **88 Suppl 4**: S317-21.
- Ebbesson, S. O., P. M. Risica, et al. (2005). "Eskimos have CHD despite high consumption of omega-3 fatty acids: the Alaska Siberia project." Int J Circumpolar Health **64**(4): 387-95.
- Emerit, J., C. Beaumont, et al. (2001). "Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury." Biomed Pharmacother **55**(6): 333-9.
- Fischer, D. S. a. P., D.C. (1964). "A simple serum iron method using the new sensitive chromogen tripyridyl-s-triazine." Clin Chem **10**(1): 21-31.
- Gabutti, V. and A. Piga (1996). "Results of long-term iron-chelating therapy." Acta Haematol **95**(1): 26-36.
- Galati, G., A. Lin, et al. (2006). "Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins." Free Radic Biol Med **40**(4): 570-80.
- Gambino, S. R. and F. W. Sunderman (1965). "Letter to the Editor. Cyanmethemoglobin Standards." Am J Clin Pathol **44**: 210-3.

- Gerbi, A., M. Bernard, et al. (2004). "Dose dependent accretion of docosahexaenoic acid (DHA) in cardiac membranes of rats fed egg yolk powder enriched in DHA." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **50**(7): 855-60.
- Grinberg, L. N., H. Newmark, et al. (1997). "Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells." Biochem Pharmacol **54**(9): 973-8.
- Guo, S., E. Bezard, et al. (2005). "Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS-NO pathway." Free Radic Biol Med **39**(5): 682-95.
- Halliwell, B. (1993). "Antioxidants in wine." Lancet **341**(8859): 1538.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1988). "Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease." Hum Toxicol **7**(1): 7-13.
- Halliwell, B., J. M. Gutteridge, et al. (1992). "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?" J Lab Clin Med **119**(6): 598-620.
- Hamdaoui, M. H., A. Chahed, et al. (2005). "Effect of green tea decoction on long-term iron, zinc and selenium status of rats." Ann Nutr Metab **49**(2): 118-24.
- Harris, W. S. (2005). "Extending the cardiovascular benefits of omega-3 Fatty acids." Curr Atheroscler Rep **7**(5): 375-80.
- Harris, W. S., S. A. Sands, et al. (2004). "Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation." Circulation **110**(12): 1645-9.
- Hayakawa, F., Y. Ishizu, et al. (2004). "Prooxidative activities of tea catechins in the presence of Cu²⁺." Biosci Biotechnol Biochem **68**(9): 1825-30.
- Hershko, C., G. Link, et al. (2002). "Cardioprotective effect of iron chelators." Adv Exp Med Biol **509**: 77-89.
- Hershko, C. M., G. M. Link, et al. (2005). "Iron chelation therapy." Curr Hematol Rep **4**(2): 110-6.
- Holub, D. J. and B. J. Holub (2004). "Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease." Mol Cell Biochem **263**(1-2): 217-25.
- Hu, C. and D. D. Kitts (2001). "Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro." Mol Cell Biochem **218**(1-2): 147-55.
- Huang, Z. Z., C. Chen, et al. (2001). "Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration." FASEB J **15**(1): 19-21.

- Imbert-Bismut, F., F. Charlotte, et al. (1999). "Low hepatic iron concentration: evaluation of two complementary methods, colorimetric assay and iron histological scoring." J Clin Pathol **52**(6): 430-4.
- Ismail, H. M. (2005). "The role of omega-3 fatty acids in cardiac protection: an overview." Front Biosci **10**: 1079-88.
- Jamsai, D., F. Zaibak, et al. (2006). "A humanized BAC transgenic/knockout mouse model for HbE/beta-thalassemia." Genomics **88**(3): 309-15.
- Jimenez Brundele, P. (1973). "The combined perls-hematoxylin-eosin stain." Stain Technol **48**(4): 173-5.
- Jover, R., X. Ponsoda, et al. (1992). "Evaluation of the cytotoxicity of ten chemicals on human cultured hepatocytes: Predictability of human toxicity and comparison with rodent cell culture systems." Toxicol In Vitro **6**(1): 47-52.
- Komes, D., A. Belscak-Cvitanovic, et al. (2010). "Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis." Phytochem Anal.
- Kushner, J. P., J. P. Porter, et al. (2001). "Secondary iron overload." Hematology (Am Soc Hematol Educ Program): 47-61.
- Lee, S. F., Y. C. Liang, et al. (1995). "Inhibition of 1,2,4-benzenetriol-generated active oxygen species and induction of phase II enzymes by green tea polyphenols." Chem Biol Interact **98**(3): 283-301.
- Lee, S. R., K. J. Im, et al. (2003). "Protective effect of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and other antioxidants on lipid peroxidation in gerbil brain homogenates." Phytother Res **17**(3): 206-9.
- Lillie, R. D. (1976). "Histopathologic Technic and Practical Histochemistry." **4th ed., New York, McGraw-Hill**: 507.
- Link, G., A. M. Konijn, et al. (2001). "Exploring the "iron shuttle" hypothesis in chelation therapy: effects of combined deferoxamine and deferiprone treatment in hypertransfused rats with labeled iron stores and in iron-loaded rat heart cells in culture." J Lab Clin Med **138**(2): 130-8.
- Link, G., A. Pinson, et al. (1985). "Heart cells in culture: a model of myocardial iron overload and chelation." J Lab Clin Med **106**(2): 147-53.

- Link, G., A. Pinson, et al. (1989). "Iron loading modifies the fatty acid composition of cultured rat myocardial cells and liposomal vesicles: effect of ascorbate and alpha-tocopherol on myocardial lipid peroxidation." J Lab Clin Med **114**(3): 243-9.
- Maggio, A., G. D'Amico, et al. (2002). "Deferiprone versus deferoxamine in patients with thalassemia major: a randomized clinical trial." Blood Cells Mol Dis **28**(2): 196-208.
- Mandel, S. and M. B. Youdim (2004). "Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases." Free Radic Biol Med **37**(3): 304-17.
- Manodori, A. B. and F. A. Kuypers (2002). "Altered red cell turnover in diabetic mice." J Lab Clin Med **140**(3): 161-5.
- Marouani, N., A. Chahed, et al. (2007). "Both aluminum and polyphenols in green tea decoction (Camellia sinensis) affect iron status and hematological parameters in rats." Eur J Nutr **46**(8): 453-9.
- McCord, J. M. (2004). "Iron, free radicals, and oxidative injury." J Nutr **134**(11): 3171S-3172S.
- Miyanaga, Y., N. Inoue, et al. (2003). "Quantitative prediction of the bitterness suppression of elemental diets by various flavors using a taste sensor." Pharm Res **20**(12): 1932-8.
- Mori, T. A. and L. J. Beilin (2004). "Omega-3 fatty acids and inflammation." Curr Atheroscler Rep **6**(6): 461-7.
- Mozaffarian, D. (2005). "Effects of Dietary Fats versus Carbohydrates on Coronary Heart Disease: A Review of the Evidence." Curr Atheroscler Rep **7**(6): 435-445.
- Nakagawa, K., M. Ninomiya, et al. (1999). "Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans." J Agric Food Chem **47**(10): 3967-73.
- Nakamuta, M., N. Higashi, et al. (2005). "Epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea, suppresses both collagen production and collagenase activity in hepatic stellate cells." Int J Mol Med **16**(4): 677-81.
- Nichols, G. M. and B. R. Bacon (1989). "Hereditary hemochromatosis: pathogenesis and clinical features of a common disease." Am J Gastroenterol **84**(8): 851-62.
- Nick, H., P. Acklin, et al. (2003). "Development of tridentate iron chelators: from desferriethiocin to ICL670." Curr Med Chem **10**(12): 1065-76.
- O'Connell, T. D., M. C. Rodrigo, et al. (2007). "Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes." Methods Mol Biol **357**: 271-96.
- Okuda, N., H. Ueshima, et al. (2005). "Relation of long chain n-3 polyunsaturated fatty acid intake to serum high density lipoprotein cholesterol among Japanese men in Japan and

- Japanese-American men in Hawaii: the INTERLIPID study." Atherosclerosis **178**(2): 371-9.
- Ounjaijean, S., C. Thephinlap, et al. (2008). "Effect of green tea on iron status and oxidative stress in iron-loaded rats." Med Chem **4**(4): 365-70.
- Pan, M., A. I. Cederbaum, et al. (2004). "Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production." J Clin Invest **113**(9): 1277-87.
- Parkes, J. G., N. F. Olivieri, et al. (1997). "Characterization of Fe²⁺ and Fe³⁺ transport by iron-loaded cardiac myocytes." Toxicology **117**(2-3): 141-51.
- Parkes, J. G. and D. M. Templeton (1994). "Iron transport and subcellular distribution in Hep G2 hepatocarcinoma cells." Ann Clin Lab Sci **24**(6): 509-20.
- Penn, D., P. J. Bobrowski, et al. (1997). "Neonatal nutritional carnitine deficiency: a piglet model." Pediatr Res **42**(1): 114-21.
- Piga, A., C. Gaglioti, et al. (2003). "Comparative effects of deferiprone and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassemia major: a retrospective analysis." Haematologica **88**(5): 489-96.
- Porter, J. B., R. Rafique, et al. (2005). "Recent insights into interactions of deferoxamine with cellular and plasma iron pools: Implications for clinical use." Ann N Y Acad Sci **1054**: 155-68.
- Quesada, I. M., M. Bustos, et al. (2010). "Dietary catechins and procyanidins modulate zinc homeostasis in human HepG2 cells." J Nutr Biochem **22**(2): 153-63.
- Rabovsky, A., J. Cuomo, et al. (2006). "Measurement of plasma antioxidant reserve after supplementation with various antioxidants in healthy subjects." Clin Chim Acta.
- Rachmilewitz, E. A., O. Weizer-Stern, et al. (2005). "Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants?" Ann N Y Acad Sci **1054**: 118-23.
- Ran, Z. H., Q. Xu, et al. (2007). "Apoptotic effect of Epigallocatechin-3-gallate on the human gastric cancer cell line MKN45 via activation of the mitochondrial pathway." World J Gastroenterol **13**(31): 4255-9.
- Record, I. R., J. K. McInerney, et al. (1996). "Black tea, green tea, and tea polyphenols. Effects on trace element status in weanling rats." Biol Trace Elem Res **53**(1-3): 27-43.
- Reddy, G. K. and C. S. Enwemeka (1996). "A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues." Clin Biochem **29**(3): 225-9.

- Redegeld, F. A., M. A. van Opstal, et al. (1988). "Determination of glutathione in biological material by flow-injection analysis using an enzymatic recycling reaction." Anal Biochem **174**(2): 489-95.
- Reznichenko, L., T. Amit, et al. (2006). "Reduction of iron-regulated amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cell cultures: implications for iron chelation in Alzheimer's disease." J Neurochem.
- Richardson, D. R. and P. Ponka (1998). "Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs: potential orally effective iron-chelating agents for the treatment of iron overload disease." J Lab Clin Med **131**(4): 306-15.
- Romieu, I., M. M. Tellez-Rojo, et al. (2005). "Omega-3 fatty acid Prevents Heart Rate Variability Reductions associated with Particulate Matter." Am J Respir Crit Care Med.
- Ryan, P. and M. J. Hynes (2007). "The kinetics and mechanisms of the complex formation and antioxidant behaviour of the polyphenols EGCg and ECG with iron(III)." J Inorg Biochem **101**(4): 585-93.
- Saewong, T., S. Ounjaijean, et al. (2010). "Effects of green tea on iron accumulation and oxidative stress in livers of iron-challenged thalassemic mice." Med Chem **6**(2): 57-64.
- Samman, S., B. Sandstrom, et al. (2001). "Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption." Am J Clin Nutr **73**(3): 607-12.
- Santos, N. C., R. F. Castilho, et al. (2001). "The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe(II)-citrate." Eur J Pharmacol **428**(1): 37-44.
- Schmidt, M., H. J. Schmitz, et al. (2005). "Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture." Food Chem Toxicol **43**(2): 307-14.
- Shen, H. M., C. Y. Shi, et al. (1996). "Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1." Free Radic Biol Med **21**(2): 139-46.
- Shin, J. K., G. N. Kim, et al. (2007). "Antioxidant and pro-oxidant effects of green tea extracts in oxygen radical absorbance capacity assay." J Med Food **10**(1): 32-40.
- Singal, A., N. Tirkey, et al. (2006). "Green tea (Camellia sinensis) extract ameliorates endotoxin induced sickness behavior and liver damage in rats." Phytother Res **20**(2): 125-9.
- Singh, S., R. C. Hider, et al. (1990). "A direct method for quantification of non-transferrin-bound iron." Anal Biochem **186**(2): 320-3.
- Singh, S., R. C. Hider, et al. (1990). "Separation and identification of desferrioxamine and its iron chelating metabolites by high-performance liquid chromatography and fast atom

- bombardment mass spectrometry: choice of complexing agent and application to biological fluids." Anal Biochem **187**(2): 212-9.
- Srichairatanakool, S., S. Ounjaijean, et al. (2006). "Iron-chelating and free-radical scavenging activities of microwave-processed green tea in iron overload." Hemoglobin **30**(2): 311-27.
- Tang, S. Y. and B. Halliwell (2010). "Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies?" Biochem Biophys Res Commun **394**(1): 1-5.
- Tesoriere, L., M. Allegra, et al. (2006). "Cytoprotective effects of the antioxidant phytochemical indicaxanthin in beta-thalassemia red blood cells." Free Radic Res **40**(7): 753-61.
- Thephinlap, C., S. Ounjaijean, et al. (2007). "Epigallocatechin-3-gallate and epicatechin-3-gallate from green tea decrease plasma non-transferrin bound iron and erythrocyte oxidative stress." Med Chem **3**(3): 289-96.
- Thephinlap, C., Ounjaijean, S., Khansuwan, U., Fucharoen, S., Porter, J.B., Srichairatanakool, S. (2007). "Epigallocatechin-3-gallate and epicatechin-3-gallate from green tea decrease plasma non-transferrin bound iron and erythrocyte oxidative stress." Current Medicinal Chemistry **X**(X): xxx-yyy.
- Thephinlap, C., C. Phisalaphong, et al. (2009). "Efficacy of curcuminoids in alleviation of iron overload and lipid peroxidation in thalassemic mice." Med Chem **5**(5): 474-82.
- Thunell, S., C. Andersson, et al. (1995). "Markers for vulnerability in acute porphyria. A hypothesis paper." Eur J Clin Chem Clin Biochem **33**(4): 179-94.
- Toschi, T. G., A. Bordoni, et al. (2000). "The protective role of different green tea extracts after oxidative damage is related to their catechin composition." J Agric Food Chem **48**(9): 3973-8.
- Townsend, P. A., T. M. Scarabelli, et al. (2004). "Epigallocatechin-3-gallate inhibits STAT-1 activation and protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-induced apoptosis." Faseb J **18**(13): 1621-3.
- Ullmann, U., J. Haller, et al. (2005). "Epigallocatechin gallate (EGCG) (TEAVIGO) does not impair nonhaem-iron absorption in man." Phytomedicine **12**(6-7): 410-5.
- Unchern, S., N. Laoharuangpanya, et al. (2003). "The effects of vitamin E on platelet activity in beta-thalassaemia patients." Br J Haematol **123**(4): 738-44.

- van den Berg, R., G. R. M. M. Haenen, et al. (1999). "Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurement of mixtures." Food Chem **66**: 511 - 517.
- Weir, M. P., J. F. Gibson, et al. (1984). "Haemosiderin and tissue damage." Cell Biochem Funct **2**(4): 186-94.
- Wellejus, A., H. E. Poulsen, et al. (2000). "Iron-induced oxidative DNA damage in rat sperm cells in vivo and in vitro." Free Radic Res **32**(1): 75-83.
- Wickramasinghe, S. N., S. L. Thein, et al. (1999). "Determinants of iron status and bilirubin levels in congenital dyserythropoietic anaemia type I." Br J Haematol **107**(3): 522-5.
- Wong, C. and D. R. Richardson (2003). "Beta-thalassaemia: emergence of new and improved iron chelators for treatment." Int J Biochem Cell Biol **35**(7): 1144-9.
- Wright, T. L. and J. R. Lake (1990). "Mechanisms of transport of nontransferrin-bound iron in basolateral and canalicular rat liver plasma membrane vesicles." Hepatology **12**(3 Pt 1): 498-504.
- Wu, D. and A. I. Cederbaum (2008). "Development and properties of HepG2 cells that constitutively express CYP2E1." Methods Mol Biol **447**: 137-50.
- Xu, J. Z., S. Y. Yeung, et al. (2004). "Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers." Br J Nutr **91**(6): 873-81.
- Yamaguchi, M., R. Matsunaga, et al. (1986). "Highly sensitive determination of free polyunsaturated, long-chain fatty acids in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection." Anal Biochem **155**(2): 256-61.
- Yamaguchi, M., R. Matsunaga, et al. (1986). "Highly sensitive determination of free fatty acids in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection." J Chromatogr **375**(1): 27-35.
- Yamamoto, M., S. Miyamoto, et al. (2006). "Effect of dietary green tea catechin preparation on oxidative stress parameters in large intestinal mucosa of rats." Biosci Biotechnol Biochem **70**(1): 286-9.
- Yoneda, T., M. Hiramatsu, et al. (1995). "Antioxidant effects of "beta catechin"." Biochem Mol Biol Int **35**(5): 995-1008.
- Yusufi, A. N., J. Cheng, et al. (2003). "Differential effects of low-dose docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid on the regulation of mitogenic signaling pathways in mesangial cells." J Lab Clin Med **141**(5): 318-29.

Zeyuan, D., T. Bingying, et al. (1998). "Effect of green tea and black tea on the metabolisms of mineral elements in old rats." Biol Trace Elem Res **65**(1): 75-86.

ผลผลิตที่ได้ (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) พร้อมแจ้งสถานะของการตีพิมพ์ เช่น submitted, accepted, in press, published
 - 1.1 Saewong, T., Ounjaijean, S., Munde, Y., Pattanapanyasat, K., Fucharoen, S., Porter, J. B., **Srichairatanakool, S.** (2010) Effects of Green Tea on Iron Accumulation and Oxidative Stress in Livers of Iron-Challenged Thalassemic Mice. *Med. Chem.* 6(2): 57-64. (Correspondent Author, IF = 1.602)
 - 1.2 **S. Srichairatanakool**, K. Kulprachakarn, K. Pangit, K. Pattanapanyasat, J.B. Porter, S. Fucharoen. Green tea extract and epigallocatechin 3-gallate reduced labile iron pool and protected oxidative stress in iron-loaded cultured hepatocytes. (Submitted to the Journal of Hepatology, 2011).
 - 1.3 S. Ounjaijean, S. Fucharoen, J.B. Porter, T. Westermarck, F. Atroschi, **S. Srichairatanakool**. Green tea attenuates erythrocyte oxidative stress in β -thalassemic mice with iron overload. (Submitted to the Acta Haematologica Journal, 2011)
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - 2.1 เชิงพาณิชย์ ยังไม่มี
 - 2.2 เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
 - 2.3 เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง) ยังไม่มี
 - 2.4 เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่) เป็นการศึกษาวิจัยทางคลินิกของแพทย์ประจำบ้านชั้นปีที่ 2 โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ที่มีความสนใจฤทธิ์ทางชีวภาพของชาเขียวและสารสกัดชาเขียวไปให้อาสาสมัครรับประทานเป็นเวลา 2-3 เดือน เพื่อติดตามว่ามีศักยภาพหรือประสิทธิผลช่วยลดระดับกรดยูริกในเลือดได้จริงหรือไม่ และถ้าสามารถลดได้จริง ๆ ก็จะนำไปศึกษาในผู้ป่วยโรคเกาต์เพื่อใช้รักษาให้มีระดับกรดยูริคลดลง เพื่อเปรียบเทียบและใช้แทนยารักษาโรคเกาต์คือ allopurinol ต่อไป

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
- 3.1 รายงานฉบับสมบูรณ์เรื่อง “ศักยภาพของสารเคเตชินจากชาเขียวที่ช่วยลดปริมาณสารประกอบธาตุเหล็กที่ตกอยู่ในเซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหลอดทดลองและสิ่งมีชีวิต” จำนวน 10 ฉบับ
- 3.2 กนกวรรณ กุลประชากรนัต มาณนัท บุญบางยาง และสมเดช ศรีชัยรัตนกุล เรื่อง “ความเป็นพิษของชาเขียวในเซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยง (Cytotoxicity of Green Tea in Cultured Hepatocytes and Cardiomyocytes)” Proceeding ในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ เกษตร วิศวกรรมและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา ครั้งที่ 2 ในวันที่ 25 สิงหาคม 2553 ณ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา
- 3.3 การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Effect of Green Tea on Iron Accumulation and Oxidative Stress in Livers of Iron Challenged Thalassemic Mice” ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิทย์อาวุธ สกว. ครั้งที่ 9 วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
- 3.4 การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Green Tea Extract and Epigallocatechin 3-gallate Reduced Labile Iron Pool and Protected Oxidative Stress in Iron-Loaded Cultured Hepatocytes” ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิทย์อาวุธ สกว. ครั้งที่ 10 วันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
- 3.5 การนำเสนอผลงานแบบบรรยาย ในงานประชุมวิชาการ 1st International Conference on Metal Chelation in Biology & Medicine (MCIBM) เรื่อง “Green tea extract and epigallocatechin-3-gallate reduced labile iron pool and protected oxidative stress in iron-loaded HepG2 cells” วันที่ 11-14 ธันวาคม 2552 ณ University of Bath, Bath, United Kingdom
- 3.6 ส่วนหนึ่งในวิทยานิพนธ์เรื่อง “Effect of catechins and chitosan on fibrogenesis of liver in mice challenged with iron loading and fat accumulation” ของ Thidararat Saewong M.Sc. Thesis 2009 Chiang Mai University

- 3.7 ส่วนหนึ่งในวิทยานิพนธ์เรื่อง “Free-radicals scavenging and iron-chelating properties of crude extract and epigallocatechin 3-gallate of green tea in iron-loaded cultured hepatocytes” ของ Kanokwan Kulprachakarn M.Sc. Thesis 2009 Chiang Mai University
- 3.8 ส่วนหนึ่งในวิทยานิพนธ์เรื่อง “Study of iron overload and oxidative stress using thalassemia and epilepsy model” ของ Sakaewan Ounjaijean Ph.D. Thesis 2010 Chiang Mai University.

ปัญหาและอุปสรรคที่พบ

1. หนูทดลองธาลัสซีเมียชนิด BKO และ DH ไม่มีจำหน่ายในประเทศไทย ส่วนหนึ่งต้องขอความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยมหิดล และอีกส่วนหนึ่งต้องเพาะพันธุ์มาใช้เอง ทำให้มีปริมาณหนูไม่เพียงพอในระหว่างทำการทดลองวิจัย
2. ในระหว่างทำการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกินในหนูทดลอง มีหนูบางตัวเกิดพยาธิสภาพรุนแรงจนเสียชีวิต ทำให้มีหนูทดลองในบางกลุ่มเหลืออยู่ในจำนวนน้อยกว่าที่วางแผนไว้
3. เนื่องจากหนูเมาส์มีขนาดเล็กและน้ำหนักตัวน้อย การเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณหางเพื่อนำมาวิเคราะห์ระดับตัวชี้วัดนั้นได้เลือด (whole blood) ออกมาปริมาณน้อยมากเพียง (80-100 ไมโครลิตร) ทำให้ไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้วัดปริมาณตัวชี้วัดทางชีวเคมีและทางโลหิตวิทยาได้ครบทุกชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณ free fatty acid และ hydroxycholesterol ที่ต้องใช้พลาสมาปริมาณมากเพื่อนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทำการตรวจวัดระดับตัวชี้วัดอื่นที่มีความสำคัญเพิ่มเติม
4. หนูเมาส์มีขนาดเล็ก เมื่อนำมาแยกเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้ได้ปริมาณเซลล์น้อยมากและไม่เพียงพอสำหรับการทดลองกับสารทดสอบหลายๆตัวได้ในแต่ละครั้ง

1.

Appendix (ภาคผนวก)

Reprint 1 เรื่อง “Effects of Green Tea on Iron Accumulation and Oxidative Stress in Livers of Iron-Challenged Thalassemic Mice. T. Saewong, S. Ounjaijean, Y. Munde, K. Pattanapanyasat, S. Fucharoen, J.B. Porter and **S. Srichairatanakool*** Med Chem 2010; 6(2): 57-64

Medicinal Chemistry, 2010, xx, 000 - 00

Effects of Green Tea on Iron Accumulation and Oxidative Stress in Livers of Iron-Challenged Thalassemic Mice

T. Saewong^{1#}, S. Ounjaijean^{1#}, Y. Munde², K. Pattanapanyasat³, S. Fucharoen⁴, J.B. Porter⁵, S. Srichairatanakool^{1*}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, ²Department of Clinical Microscopy, Faculty of Medical Technology, Chiang Mai University, Chiang Mai, ³Office of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, ⁴Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus, Nakornpathom, Thailand, ⁵Department of Haematology, Royal Free and University College Medical School, University College London, London England

Abstract: Liver is affected by secondary iron overload in transfusions dependent β -thalassemia patients. The redox iron can generate reactive oxidants that damage biomolecules, leading to liver fibrosis and cirrhosis. Iron chelators are used to treat thalassemias to achieve negative iron balance and relieve oxidant-induced organ dysfunctions. Green tea (GT) (*Camellia sinensis*) catechins exhibit anti-oxidation, the inhibition of carcinogenesis, the detoxification of CYP2E1-catalyzed HepG2 cells and iron chelation. The purpose of this study was to investigate the effectiveness of GT in iron-challenged thalassemic mice. Heterozygous BKO type-thalassemia (BKO) mice (C57BL/6) experienced induced iron overload by being fed a ferrocene-supplemented diet (Fe diet) for 8 weeks, and by orally being given GT extract (300 mg/kg) and deferiprone (DFP) (50 mg/kg) for a further 8 weeks. Liver iron content (LIC) was analyzed by TPTZ colorimetric and Perl's staining techniques. Concentrations of liver reduced glutathione (GSH), collagen and malondialdehyde (MDA) were also measured. Dosages of the GT extract and DFP lowered LIC in the Fe diet-fed BKO mice effectively. The extract did not change any concentrations of liver glutathione, collagen and MDA in the BKO mice. Histochemical examination showed leukocyte infiltration in the nearby hepatic portal vein and high iron accumulation in the livers of the iron-loaded BKO mice, however GT treatment lowered the elevated iron deposition. In conclusion, green tea inhibits or delays the deposition of hepatic iron in regularly iron-loaded thalassemic mice effectively. This will prevent the iron-induced generation of free radicals via Haber-Weiss and Fenton reactions, and consequently liver damage and fibrosis. Combined chelation with green tea would be investigated in β -thalassemia patients with iron overload.

Key Words: green tea, thalassemia, iron overload, collagen, malondialdehyde, liver

INTRODUCTION

Thalassemia patients with iron-overload suffer from endocrinal gland malfunctions, liver fibrosis and cardiac arrhythmia [1]. Eventually, this condition will be fatal unless suitable iron chelation therapy is managed [2]. When transferrin in thalassemia plasma is fully saturated with iron, a toxic form of iron called nontransferrin-bound iron (NTBI) is detectable [3]. The NTBI is taken up increasingly in cardiac myocytes, HepG2 cells and rat primary hepatocytes [4]. Possible mechanisms of the NTBI uptake could be divalent metal transporter (DMT) [5, 6], L-type

calcium channel (LTCC) [7, 8] and Zip14 (a member of SLC39A zinc transporter family [9]). Labile iron pool (LIP) is redox-active and highly increased in iron overload, as a result of changes in iron import and ferritin degradation. It plays a role in free radical generation and is the main target of chelators [10].

In chronic injuries, activated hepatic stellate cells (HSC) display proliferation and fibrogenic myofibroblast phenotype, alpha-smooth muscle actin (α -SMA), enhanced contractibility and a high synthesis of extracellular matrix (ECM) component, especially collagen [11]. Increased collagen synthesis in liver cells leads to fibrosis and eventually cirrhosis. Hepatic parenchymal and Kupffer cells also promote the HSC activation by producing lipid hydroperoxides. Increased hepatic iron concentration (HIC) in β -thalassemia patients is associated with liver toxicity, fibrosis, cirrhosis and carcinogenesis

*Address correspondence to this author at the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 THAILAND. E-mail: ssrichai@med.cmu.ac.th

#Equal contribution to this work

[12-15]. Presumably, NTBI could be a tumor promoter in T51B rat liver epithelial cells that can deregulate cell cycle [16]. Additionally, chronic active hepatitis C and an increase of liver iron would be the major causative factors of liver fibrosis [17]. Iron-overload patients with primary hemochromatosis showed raised serum alanine aminotransferase (ALT) activity [18]. Intraperitoneal injection of iron dextran increases amounts of cytosolic hemosiderin and ferritin in the liver of iron-loaded rats. Measurements of liver iron concentration by means of a semi-quantitative inductive device (SQUID), R2-magnetic resonance imaging (MRI) and Perl's staining are used to evaluate efficacy of chelation therapy [19-21].

Desferrioxamine (DFO) and deferiprone (DFP) chelation can decrease levels of ferritin and NTBI in the plasma compartment and the amount of iron burden in the liver of hereditary sideroblastic anemia patients [22] and β -thalassemia major patients [23]. The main target organs of chelation therapy are the liver and heart which accumulate a large amount of iron in cytosolic ferritin, hemosiderin and transitory pool [24-26]. Green tea (*Camellia sinensis*) contains at least five catechin derivatives including epigallocatechin (EGC), catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechin 3-gallate (EGCG) and epicatechin 3-gallate (ECG), of which EGCG and ECG are the major constituents. Most importantly, anti-oxidative and metal-chelating properties of green tea can protect cells from free-radicals imbalance and toxicity in many pathologic conditions. We investigated if green tea would suppress iron overload and oxidative stress in the livers of thalassemic mice.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents

β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form, NADPH); 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB); 5-sulfosalicylic acid (SSA); thiobarbituric acid (TBA); butylated hydroxytoluene (BHT); 2,4,6-tripyridyl-*s*-triazine (TPTZ) and hydroxylammonium chloride were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Company. HPLC-grade acetonitrile, ethylacetate and methanol were purchased from Merck Company. Other chemicals and standards were AnalaR grade or the highest pure chemical available. DFP was kindly donated by Dr. Chada Phisalaphong at the Government Pharmaceutical Organization, Bangkok, Thailand.

Green Tea Preparation

Fresh tea shoots were harvested and immediately dried in a microwave oven (3 minutes, 800 watts,

100°C) [27, 28]. Dry tea leaves were extracted with hot deionized water (80 °C) for 15 minutes and filtered through 0.45- μ m membrane (cellulose acetate type, Millipore, Maidstone, England). Green tea (GT) crude extract was dried under a vacuum, and the powder was stored at -20°C till further use. Catechin derivatives in the GT extract were analyzed using a reverse-phase HPLC technique [29]. Conditions of the HPLC include analytical column (Waters SpheroSorb-ODS2, 250x4.7 mm, 5- μ m), mobile-phase solvent (0.05% H₂SO₄ : acetonitrile : ethyl acetate = 86:12:2, v/v/v), a flow rate of 1.0 ml/min and optical detection of eluents at 280 nm. Concentrations of the eluted catechins were determined by comparison with authentic standard catechins. Amounts of the persisting EGC, C, EC, EGCG, ECG and total catechins were 102, 5.1, 53.9, 88.7, 4.3 and 255 mg/g dry weight, respectively.

Animals and Treatments

Adult male C57/BL6 mice (9-12 months old), wild type (μ^{μ}/μ^{μ})(WT) and heterozygous β^{KO} type ($\mu^{\mu}/\beta^{\text{KO}}$) (BKO), were provided by Professor Sutthacharn at Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya Campus. The BKO thalassemic mice were generated according to Jamsai and colleagues' technique [30, 31]. The WT mice have normal levels of hemoglobin, SI and ROS production. The BKO mice show decreased hemoglobin level, increased SI and ROS productions, but depressed heart rate variability (HRV) value indicating cardiac complications [32]. Their mild anemia and depressed HRV complications are similar to those observed in human thalassemia intermedia. All animal studies were conducted with approval of the Institutional Animal Care and Use Committee of Faculty of Medicine, Chiang Mai University (Reference Number -3/2548). Mice were housed in stainless steel cages in the conventional clean room where the temperature (25 $\pm$ 2 °C) and humidity (60 $\pm$ 5%) were maintained on a 12-hours light/dark cycle. The mice had free access to a normal chow diet (control diet) and drinking water *ad libitum*.

WT and BKO mice were fed with a ferrocene-supplemented diet (0.2%, w/w) (Fe diet) for 90 days to induce iron overload. Iron status including blood hemoglobin and plasma NTBI levels were detected weekly until the NTBI was detectable. They were randomly divided into three subgroups (4 mice each) for oral administrations of normal saline solution (placebo), GT extract (300 mg/kg/day) and DFP (50 mg/kg body weight) altogether with the Fe diet for another 60 days. At termination, the mice were sacrificed by diethyl ether anesthesia and their livers

were dissected for further quantitative and histochemical analyses.

Blood Analysis

Blood samples from the vein of rat tails were collected into anticoagulant tubes (sodium heparin) every month for determination of blood hemoglobin and plasma NTBI concentrations. Hemoglobin concentration was assayed using a cyanmethemoglobin method [33].

Plasma NTBI was measured based on NTA chelation/HPLC technique with slight modification [28]. Briefly, plasma (0.45 ml) was incubated with nitrotriacetic acid (NTA) solution (80 mM in 5 mM MOPS buffer pH 7.0) (0.05 ml) in a polypropylene tube (Eppendorf 1.5-ml capacity) at room temperature for 30 min. Produced Fe-(NTA)₂ complex was separated from plasma proteins by spinning the mixture through a filtration membrane (polysulfone type, 0.5-ml capacity, 30-kD cut-off, NanoSep[®], Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA) in a temperature-controlled bench-top centrifuge 12,000rpm (10620g) (Hettich Centrifugation Germany), 15 °C for 30 min. The filtrate was analyzed using the HPLC system by the following conditions: PEEK solvent delivery tube; a dual-piston high pressure pump (ConstaMetric[®] 3500 LDC Milton-Roy Inc., Florida USA); Rheodyne7125 manual injector assembled with 50-μl PEEK loop; a glass column (ChromSep ODS1 type, 100x10 mm, 5 μm; Chrompak International, Middleberg, the Netherlands); mobile-phase solvent (3 mM 1-ethyl-2-propyl-3-hydroxypyrid-4-one in 19% acetonitrile buffered with 5 mM MOPS pH 7.0), a flow rate of 1.0 ml/min, a UV-VIS flow-cell detector (SpecMonitor[®] 2300, LDC Milton-Roy Inc., Florida USA). Optical density of a red-colored product Fe-(CP22)₂ representing NTBI was detected at 450 nm. Data analysis was conducted with BDS software (BarSpec Ltd, Rehovot Israel). The NTBI peak was calculated with a calibration curve made from different iron concentrations (0-16 μM Fe-(NTA)₂ prepared in 80 mM NTA pH 7.0 solution.

Measurement of Liver Iron Concentration

Non-heme iron in the liver was measured using a colorimetric technique as described by the method established by Fischer and Price [34, 35]. All glassware was cleaned with 6 N HCl overnight and washed 4-5 times with deionized distilled water; otherwise, plasticware was used. Liver tissues were lyophilized for 24 hours, weighed (expressed as mg dry weight) and digested with a mixture of concentrated sulfuric acid and concentrated nitric acid (1:1, v/v) at 65 °C for 20 hours. Afterwards, the

clear yellow solution was transferred to a clean test tube and adjusted to a final volume of exactly 10 ml with deionized water. Tissue iron was reduced with ascorbic acid and reacted with TPTZ at room temperature (25 °C) for 30 minutes to form an intense violet-colored product. OD of the product was measured at 595 nm against reagent solution. Additionally, protein concentration of the liver tissue was estimated according to the Bradford method.

Analysis of Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) Concentration

Liver tissue (100 mg) was homogenized in the solution containing 50 mM phosphate buffer pH 2.8 (0.8 ml), methanol (0.1 ml) and BHT (50 ppm) in an ice bath. A 0.5-ml aliquot of the homogenate was transferred to 1.1 ml of 10% (w/v) trichloroacetic acid containing BHT (50 ppm), mixed well and centrifuged at a low speed to achieve clear supernatant. The solution (0.5 ml) was mixed with 0.44 M H₃PO₄ (1.5 ml) and TBA solution (0.6%, w/v) (1.0 ml), incubated in a water bath at 90 °C for 30 minutes. The solution was filtered through the 0.45-μm syringe filter and measured for OD of the pink-colored product at 532 nm against reagent blank. A standard curve was constructed by using standard 1,1,3,3-tetramethoxypropane solution. TBARS concentration was determined from the standard curve and reported as the MDA equivalent [36].

Measurement of Hepatic Glutathione Concentration

Liver tissue was weighed and deproteinized with 5-sulfosalicylic acid solution (5%). After centrifugation at 3500 rpm, 4 °C for 15 min reduced glutathione (GSH) concentration in supernatant was measured colorimetrically using Ellman's method. Basically, GSH converts 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) while generated oxidized glutathione (GSSG) will be recycled by glutathione reductase and NADPH is converted to GSH. Optical density (OD) of the yellow-colored product TNB was measured at 412 nm against reagent blank.

Determination of Liver Collagen Concentration

Dry liver tissue (100 mg) was hydrolyzed with 6 N HCl at 60 °C for 24 hr and neutralized with 6 N NaOH. The hydrolysate (100 μl) was incubated with an oxidizing solution (chloramines-T and n-propanol in citrate buffer pH 6.0) (200 μl) at room temperature for 5 min. The mixture was added to Ehrlich's reagent (200 μl) and incubated at 60 °C for 45 min. Optical density of colored product was measured photometrically at 570 nm against reagent blank. Standard hydroxylproline solution (0 - 50 μg/ml) was

used to make a calibration curve and determine collagen concentration.

Histochemical Examination

Another part of the liver tissue was fixed immediately in 10 % neutral buffered formalin, prepared on tissue slides and stained with hematoxylin & eosin (H&E) supravital dye and hydrochloric acid-potassium ferrocyanide (Perl's) solutions. The stained tissues were examined by an expert pathologist and photographed with a digital camera. Pink cytoplasm, red nucleus and Prussian blue iron granules appeared according to Perl's staining [35]. Full cellular detail was obtained from H&E staining.

Data Analysis

The results were expressed as mean $\pm$ SD. Statistical significance of the data was determined by a Student's *t*-test, $p < 0.05$ is considered significant.

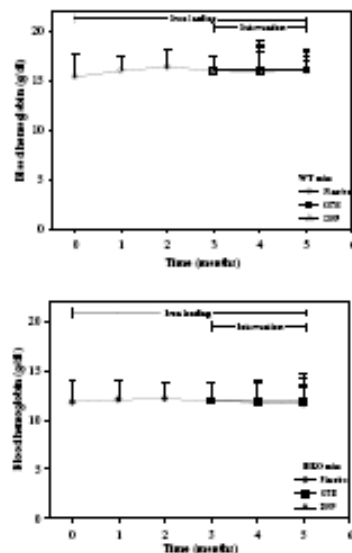


Fig. (1) Blood hemoglobin concentrations of Fe diet-fed WT (top) and BKO (bottom) mice following intervention with placebo, GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg) for 60 days. Data are shown as mean $\pm$ SD (n = 6).

RESULTS

Blood Analysis

Results in Fig. (1) show that ferrocene-supplemented diet (Fe diet) did not enhance hemoglobin synthesis nor erythropoiesis in WT mice as well as mild anemic BKO mice. Neither GTE nor DFP altered the hemoglobin concentration in the treated mice any more. The Fe diet induced formation of NTBI in plasma of the WT and BKO mice in a time-dependent manner. Expectedly, the GTE and DFP were able to decrease the plasma NTBI concentrations of the treated mice, which the GTE being slightly more effective than the DFP as depicted in Fig. (2).

Liver Iron Concentration

As shown in Table 1, Fe diet increased the LIC of the WT mice significantly ($\Delta = 1.209 \pm 0.578$ μ g Fe/mg protein, 29.13 ± 14.44 ng Fe/mg dry weight).

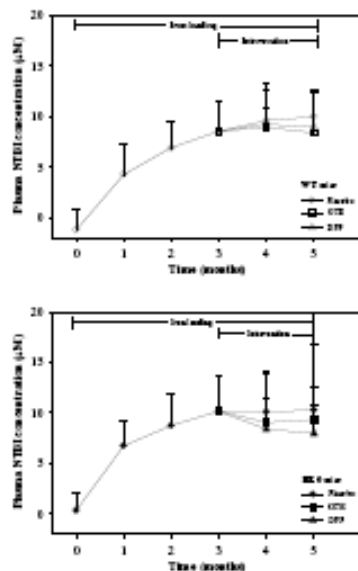


Fig. (2) Plasma NTBI concentrations of Fe diet-fed WT (top) and BKO (bottom) mice following intervention with placebo, GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg) for 60 days. Data are shown as mean $\pm$ SD (n = 6).

Table 1 Effect of green tea extract (GTE) and deferiprone (DFP) on liver iron concentrations in Fe diet fed-WT and BKO mice. Data are shown as mean±SEM.

Mice	Diet/Treatment	Liver iron concentrations	
		µg Fe/mg protein	ng Fe/mg dry weight
WT	Normal diet	0.504±0.070	9.18±1.15
	Fe diet/Placebo	1.713±0.648*	38.31±15.59*
	Fe diet/GTE	0.599±0.042*	11.03±0.44*
	Fe diet/DFP	0.767±0.111	14.31±14.98
BKO	Normal diet	ND	ND
	Fe diet/Placebo	1.950±1.049	42.26±24.45
	Fe diet/GTE	0.335±0.154*	7.65±3.72*
	Fe diet/DFP	0.595±0.050*	1.08±0.90*

*p<0.05 when compared to normal diet; *p<0.05 when compared to Fe diet.

Apparently, GTE lowered the increase of LIC ($\Delta = -1.114 \pm 0.606 \mu\text{g Fe/mg protein}$, $-27.28 \pm 15.15 \text{ ng Fe/mg dry weight}$; $p < 0.05$) and DFP was also effective ($\Delta = -0.946 \pm 0.537 \mu\text{g Fe/mg protein}$, $-23.80 \pm 0.61 \text{ ng Fe/mg dry weight}$). Given an Fe diet, LIC of the BKO mice ($1.950 \pm 1.049 \mu\text{g Fe/mg protein}$, $42.26 \pm 24.45 \text{ ng Fe/mg dry weight}$) was slightly higher than that of WT mice ($1.713 \pm 0.648 \mu\text{g Fe/mg protein}$, $38.31 \pm 15.59 \text{ ng Fe/mg dry weight}$). GTE and DFP decreased the LIC of Fe diet-fed BKO thalassemic mice ($\Delta = -1.615 \pm 0.895 \mu\text{g Fe/mg protein}$ and $-1.355 \pm 0.999 \text{ ng Fe/mg dry weight}$, respectively) significantly. The result indicates that GTE and DFP exhibited iron-chelating activities and

removed iron deposition in the livers of the WT and BKO mice.

Liver TBARS Concentration

The Fe diet markedly increased liver TBAR concentrations ($3.08 \pm 0.66 \mu\text{g Fe/mg protein}$, $0.066 \pm 0.015 \text{ ng Fe/mg dry weight}$) when compared to the normal diet ($2.34 \pm 1.23 \mu\text{g Fe/mg protein}$, $0.041 \pm 0.020 \text{ ng Fe/mg dry weight}$). Importantly, both GTE and DFP effectively decreased the inclining liver TBARS concentrations in the WT mice ($\Delta = -0.60$ and $-0.36 \text{ ng Fe/mg dry weight}$, respectively) as well as the BKO mice ($\Delta = 0.069$ and $-0.071 \text{ ng Fe/mg dry weight}$, respectively; $p < 0.05$) (Table 2).

Table 2 Effect of GTE and DFP on liver TBARS concentrations in Fe diet fed WT and BKO mice. Data are shown as mean±SEM.

Mice	Diet/Treatment	Liver TBARS concentrations (MDA equivalent)	
		µg Fe/mg protein	ng Fe/mg dry weight
WT	Normal diet	2.34±1.23	0.041±0.020
	Fe diet/Placebo	3.08±0.66	0.066±0.015
	Fe diet/GTE	0.35±0.16*	0.006±0.003*
	Fe diet/DFP	1.61±0.93	0.030±0.017
BKO	Normal diet	ND	ND
	Fe diet/Placebo	3.80±0.09	0.080±0.002
	Fe diet/GTE	0.47±0.29*	0.011±0.007*
	Fe diet/DFP	0.46±0.07*	0.009±0.001*

*p<0.05 when compared to normal diet; *p<0.05 when compared to Fe diet.

The results suggest that GT catechins, particularly EGCG, exhibit iron-chelating properties like DFP that can inhibit the generation of free-radicals. Consequently, the compound can prevent lipid peroxidation and oxidative damage of iron-loaded liver tissue.

Liver Glutathione and Collagen Concentrations

The Fe diet did not influence levels of liver glutathione; nonetheless, GTE and DFP tended to increase the glutathione concentrations of the WT mice (Table 3). Unexpectedly, the GTE and DFP reduced the levels of liver glutathione of the BKO mice. In addition, the Fe diet increased the levels of liver collagen of the WT mice. The GTE and DFP were able to lower the inclining trend of the collagen concentrations in the WT and BKO mice.

Table 3 Effect of GTE and DFP on liver reduced glutathione (GSH) and collagen concentrations in Fe diet fed WT and BKO mice. Data are shown as mean $\pm$ SEM.

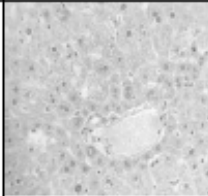
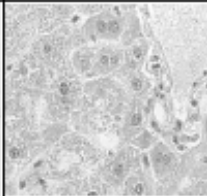
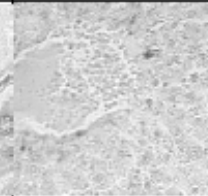
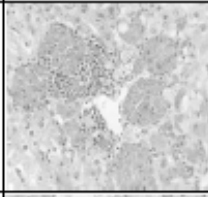
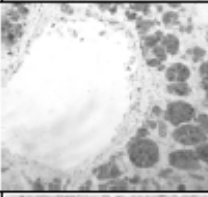
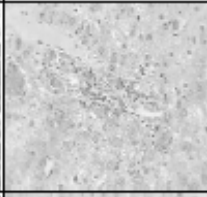
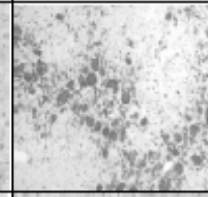
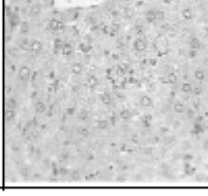
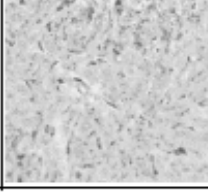
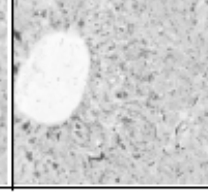
Mice	Diet/Treatment	Liver GSH concentration (nmol/mg protein)	Liver collagen concentration (nmol/mg protein)
WT	Normal diet	3.45 $\pm$ 1.25	0.023 $\pm$ 0.005
	Fe diet/Placebo	3.95 $\pm$ 0.37	0.041 $\pm$ 0.004
	Fe diet/GTE	4.04 $\pm$ 1.48	0.037 $\pm$ 0.009
	Fe diet/DFP	4.28 $\pm$ 0.63	0.039 $\pm$ 0.017
BKO	Normal diet	ND	ND
	Fe diet/Placebo	4.32 $\pm$ 0.79	0.020 $\pm$ 0.002
	Fe diet/GTE	3.53 $\pm$ 0.62	0.025 $\pm$ 0.003
	Fe diet/DFP	3.10 $\pm$ 0.60	0.022 $\pm$ 0.008

Histochemical Examinations

As shown in Fig. (3) Perl's staining observation showed that Fe diet enhanced iron deposition in liver tissues of both WT and BKO mice. Incredibly, GT was efficient in reducing the iron deposition (less density in Prussian blue granules). As seen in H&E

stained tissues, Fe diet enhanced leukocyte infiltration onto liver cells of the WT and BKO mice of the nearby portal vein (H&E staining), indicating potential tissue inflammation. However, the leukocyte infiltration disappeared after the mice were treated with the GTE.

Fig. (3) Hematoxylin & Eosin and Perl's Prussian blue staining results of liver tissues from Fe diet fed-WT and BKO mice treated with GTE.

Diet/Treatment	WT		BKO	
	H&E stain (x40)	Perl's stain (x40)	H&E stain (x40)	Perl's stain (x40)
Normal diet				
Fe diet/Placebo				
Fe diet/GTE				

DISCUSSION

As mentioned before, NTBI is present in the plasma of β -thalassaemia patients. Our current study has demonstrated that NTBI is detectable in plasma compartments of the Fe diet-fed mice according to the time [37]. However, low concentrations of NTBI can be detected in plasma of the ferric citrate-treated rats [38]. A previous study reported the amount of iron deposition was low in the bone marrow, but high in the liver and spleen of β -thalassaemia intermedia. Administration of iron dextran increased blood hemoglobin levels in β -thalassaemic mice [39]. However, our two studies observe that ferrocene diet did not increase blood hemoglobin levels in the β -thalassaemic mice [37]. Highly accumulated iron in transfusional patients with β -thalassaemia can lead to liver inflammation, fibrosis, cirrhosis and functional insufficiency [40]. Splenectomized and cirrhotic thalassaemias had higher degrees of iron accumulation and fibrosis than non-splenectomized and non-cirrhotic ones [41]. Hepatocyte siderosis correlates slightly better with chemical liver iron content than does the degree of endothelial and Kupffer cell siderosis [42]. Strong evidence has shown that green tea catechins can inhibit galactosamine- and reactive oxidant-induced hepatotoxicity [43, 44]. Contradictory, intraperitoneal administration of green tea can induce hepatotoxicity in mice [45]. Grege and Lyle found that rats fed a green tea-supplemented normal diet did not experience an alteration alter in liver radio-iron (^{59}Fe) concentrations or in gastrointestinal iron absorption [46]. Previous studies have demonstrated that green tea catechins like EGCG, exhibit antifibrogenic activity that can suppress and inhibit collagen synthesis in hepatic stellate cells [47-49]. Omara and colleagues have demonstrated that iron overload impairs macrophage phagocytosis and enhances inflammatory evidence in iron-loaded rats [50]. GTE can decrease focal necrosis and leukocyte infiltration in ischemic/perfused livers [51].

In our study, the quantitative and histochemical examinations confirm that green tea extract really lowers the iron accumulation in the livers of WT and BKO mice. Possibly, the metal-binding activity of polyphenolic catechins; especially EGCG and ECG, interfere with luminal iron absorption and also remove intrahepatic iron pools. Green tea catechins counteract iron catalysis in ROS generation via Haber-Weiss and Fenton reactions and lower peroxidative damage of membrane phospholipids. Therefore, levels of liver lipid peroxidation products such as MDA of the GTE-treated mice were less than those of untreated mice. Treatment by antioxidant green tea catechins did not increase levels of intracellular anti-oxidative glutathione as expected.

The result implies that catechins only scavenge produced free radicals, but neither enhances the endogenous glutathione synthesis nor recycles oxidized glutathione to reduced glutathione. Increased amounts of collagen reflect to fibrogenesis. The 2-month iron loading may not be sufficient to increase the collagen synthesis in the livers of the WT and BKO mice. Treatment with GT itself would not influence the collagen synthesis either.

Based on these findings, green tea can effectively lower the liver iron concentrations of iron-loaded thalassaemic mice by 1) the interference of intestinal iron absorption, 2) chelation of plasma NTBI before entering into liver cells, 3) the mobilization of transient and storage pools of hepatic iron. It can be speculated that green tea extract containing high EGCG and ECG contents could be utilized as phytochemical iron-chelating agents or adjunctive agents with oral iron chelators (eg. deferiprone and deferasirox) in iron-overload patients with β -thalassaemia in the future. We are certain that green tea chelation will give compliance, be cost effective and produce minimal side effects to the chelated patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education through Dr. Somdet Srichairatanakool (RMU5080074). We thank Mr. Russell Kirk Hollis from the Department of English, Faculty of Humanities, Chiang Mai University for his helpful English proof-reading services.

REFERENCES

- [1] Cunningham, M. J.; Macklin, E. A.; Neufeld, E. J.; Cohen, A. R. Complications of beta-thalassaemia major in North America. *Blood*, 2006, 104, 34-39.
- [2] Porter, J. B. Monitoring and treatment of iron overload: state of the art and new approaches. *Semin Hematol*, 2005, 42, S14-18.
- [3] Pootrakul, P.; Breuer, W.; Samethand, M.; Sirankaparcha, P.; Hensko, C.; Cabantchik, Z. I. Labile plasma iron (LPI) as an indicator of chelatable plasma redox activity in iron-overloaded beta-thalassaemia/HbE patients treated with an oral chelator. *Blood*, 2004, 104, 1504-1510.
- [4] Barisani, D.; Berg, C. L.; Wessling-Resnick, M.; Gollan, J. L. Evidence for a low Km transporter for non-transferrin-bound iron in isolated rat hepatocytes. *Am. J. Physiol*, 1995, 269, G570-576.
- [5] Randell, E. W.; Parkes, J. G.; Olivieri, N. F.; Templeton, D. M. Uptake of non-transferrin-

- bound iron by both reductive and nonreductive processes is modulated by intracellular iron. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 16046-16053.
- [6] Garrick, L. M.; Dolan, K. G.; Romano, M. A.; Garrick, M. D. Non-transferrin-bound iron uptake in Belgrade and normal rat erythroid cells. *J. Cell Physiol.*, 1999, 178, 349-358.
- [7] Oudit, G. Y.; Sun, H.; Trivieri, M. G.; Koch, S. E.; Dawood, F.; Ackerley, C.; Yazdanpanah, M.; Wilson, G. J.; Schwartz, A.; Liu, P. P.; Backx, P. H. L-type Ca^{2+} channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nature Med.*, 2003, 9, 1187-1194.
- [8] Oudit, G. Y.; Trivieri, M. G.; Khaper, N.; Liu, P. P.; Backx, P. H. Role of L-type Ca^{2+} channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy. *J. Mol. Med. (Berlin, Germany)*, 2006, 84, 349-364.
- [9] Liuzzi, J. P.; Aydemir, F.; Nam, H.; Knutson, M. D.; Cousins, R. J. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, 103, 13612-13617.
- [10] Livrea, M. A.; Tesoriere, L.; Pintaudi, A. M.; Calabrese, A.; Maggio, A.; Freisleben, H. J.; D'Arpa, D.; D'Anna, R.; Bongiorno, A. Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. *Blood*, 1996, 88, 3608-3614; 1996.
- [11] Arthur, M. J. Iron overload and liver fibrosis. *J. Gastroenterol. & Hepatol.*, 1996, 11, 1124-1129.
- [12] Asare, G. A.; Mossanda, K. S.; Kew, M. C.; Paterson, A. C.; Kahler-Venter, C. P.; Siziba, K. Hepatocellular carcinoma caused by iron overload: a possible mechanism of direct hepatocarcinogenicity. *Toxicology*, 2006, 219, 41-52.
- [13] Stål, P.; Broome, U.; Scheynius, A.; Befrits, R.; Hulcrantz, R. Kupffer cell iron overload induces intercellular adhesion molecule-1 expression on hepatocytes in genetic hemochromatosis. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 1995, 21, 1308-1316.
- [14] George, D. K.; Goldwurm, S.; MacDonald, G. A.; Cowley, L. L.; Walker, N. I.; Ward, P. J.; Jazwinska, E. C.; Powell, L. W. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterol.*, 1998, 114, 311-318.
- [15] Fletcher, L. M.; Bridle, K. R.; Crawford, D. H. Effect of alcohol on iron storage diseases of the liver. *Best Pract. & Res.*, 2003, 17, 663-677.
- [16] Messner, D. J.; Kowdley, K. V. Neoplastic transformation of rat liver epithelial cells is enhanced by non-transferrin-bound iron. *BMC Gastroenterol.*, 2008, 8, 2.
- [17] Tondury, P.; Zimmermann, A.; Nielsen, P.; Hirt, A. Liver iron and fibrosis during long-term treatment with deferriprone in Swiss thalassaemic patients. *Br. J. Haematol.*, 1998, 101, 413-415.
- [18] Bhavnani, M.; Lloyd, D.; Bhattacharyya, A.; Marples, J.; Elton, P.; Worwood, M. Screening for genetic haemochromatosis in blood samples with raised alanine aminotransferase. *Gut*, 2000, 46, 707-710.
- [19] Fischer, R.; Piga, A.; Harmatz, P.; Nielsen, P. Monitoring long-term efficacy of iron chelation treatment with biomagnetic liver susceptibility. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2005, 1054, 350-357.
- [20] St Pierre, T. G.; Clark, P. R.; Chus-anusorn, W.; Fleming, A. J.; Jeffrey, G. P.; Olynyk, J. K.; Pootrakul, P.; Robins, E.; Lindeman, R. Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood*, 2005, 105, 855-861.
- [21] Thakerngpol, K.; Sonakul, D.; Fucharoen, S.; Vathanopas, V.; Steinimankarn, T. Histochemical study of liver tissue from thalassaemic patients. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.*, 1988, 23, 193-198.
- [22] Meo, A.; Ruggeri, A.; La Rosa, M. A.; Zanghi, L.; Morabito, N.; Duca, L. Iron burden and liver fibrosis decrease during a long-term phlebotomy program and iron chelating treatment after bone marrow transplantation. *Hemoglobin*, 2006, 30, 131-137.
- [23] Nielsen, P.; Fischer, R.; Engelhardt, R.; Tondury, P.; Gabbe, E. E.; Janka, G. E. Liver iron stores in patients with secondary haemosiderosis under iron chelation therapy with deferoxamine or deferriprone. *Br. J. Haematol.*, 1995, 91, 827-833.
- [24] Britton, R. S.; Leicester, K. L.; Bacon, B. R. Iron toxicity and chelation therapy. *Int. J. Hematol.*, 2002, 76, 219-228.
- [25] Cappellini, M. D. Long-term efficacy and safety of deferasirox. *Blood Rev.*, 2008, 22 Suppl 2, S35-41.
- [26] Cappellini, M. D.; Piga, A. Current status in iron chelation in hemoglobinopathies. *Curr. Mol. Med.*, 2008, 8, 663-674.
- [27] Ounjaijean, S. Iron-chelating property of green tea extract in iron-overload status. M.Sc. Thesis Chiang Mai University, 2004.
- [28] Srichairatanakool, S.; Ounjaijean, S.; Thephinlap, C.; Khasuwan, U.; Phisalpong, C.; Fucharoen, S. Iron-chelating and free-radical

- scavenging activities of microwave-processed green tea in iron overload. *Hemoglobin* 2006, 30, 311-327.
- [29] Chen, Z.; Zhu, Q. Y.; Tsang, D.; Huang, Y. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 477-482.
- [30] Jamsai, D.; Zaibak, F.; Khongnium, W.; Vadolas, J.; Voullaire, L.; Fowler, K.J.; Gazeas, S.; Fucharoen, S.; Williamson, R.; Ioannou, P.A. A humanized mouse model for a common β 0-thalassemia mutation. *Genomics* 2005, 85, 453-461.
- [31] Jamsai, D.; Zaibak, F.; Vadolas, J.; Voullaire, L.; Fowler, K.J.; Gazeas, S.; Peters, H.; Fucharoen, S.; Williamson, R.; Ioannou, P.A. A humanized BAC transgenic/knockout mouse model for HbE/ β -thalassemia. *Genomics*, 2006, 88, 309-315.
- [32] Incharoen, T.; Thephinlap, C.; Sricharatanakool, S.; Chatipakorn, S.; Winichagoon, P.; Fucharoen, S.; Vadolas, J.; Chatipakorn, N. Heart rate variability in β -thalassemic mice. *Int. J. Cardiol.*, 2007, 121, 203-204.
- [33] King, J. W.; Willis, C. E. Cyanmethemoglobin certification program of the College of American Pathologists. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1970, 54, 496-501.
- [34] Fischer, D. S. a P., D.C. A simple serum iron method using the new sensitive chromogen tripyridyl-s-triazine. *Clin. Chem.*, 1964, 10, 21-31.
- [35] Imbert-Bismut, E.; Charlotte, F.; Turlin, B.; Khalil, L.; Pilon, A.; Brissot, P.; Le Charpentier, Y.; Delatne, J.; Opolon, P.; Deugnier, Y.; Poynard, T. Low hepatic iron concentration: evaluation of two complementary methods, colorimetric assay and iron histological scoring. *J. Clin. Pathol.*, 1999, 52, 430-434.
- [36] Cighetti, G.; Duca, L.; Borbone, L.; Sala, S.; Nava, L.; Fiorelli, G.; Cappellini, M. D. Oxidative status and malondialdehyde in beta-thalassemia patients. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2002, 32 Suppl 1, 55-60.
- [37] Thephinlap, C.; Phisalaphong, C.; Fucharoen, S.; Porter, J. B.; Sricharatanakool, S. Efficacy of Curcuminoids in Alleviation of Iron overload and Lipid Peroxidation in Thalassemic Mice. *Med. Chem.*, 2009, 5, 474-482.
- [38] Ounjaijean, S.; Thephinlap, C.; Khansawan, U.; Phisalaphong, C.; Fucharoen, S.; Porter, J. B.; Sricharatanakool, S. Effect of green tea on iron status and oxidative stress in iron-loaded rats. *Med. Chem.*, 2008, 4, 365-370.
- [39] Gimzburg, Y. Z.; Rybicki, A. C.; Suzuki, S. M.; Hall, C. B.; Breuer, W.; Cabantchik, Z. I.; Bouhassira, E. E.; Fabry, M. E.; Nagel, R. L. Exogenous iron increases hemoglobin in beta-thalassemic mice. *Exp. Hematol.*, 2009, 37, 172-183.
- [40] Bacon, B. R.; Britton, R. S. Hepatic injury in chronic iron overload. Role of lipid peroxidation. *Chemico-Biol. Interact.*, 1989, 70, 183-226.
- [41] Thakerngpol, K.; Fucharoen, S.; Boonyaphipat, P.; Srisook, K.; Sahaphong, S.; Vathanophas, V.; Sittimankarn, T. Liver injury due to iron overload in thalassemia: histopathologic and ultrastructural studies. *Biomater.*, 1996, 9, 177-183.
- [42] Aldouri, M. A.; Wonke, B.; Hoffbrand, A. V.; Flynn, D. M.; Lulic, M.; Fenton, L. A.; Scheuer, P. J.; Kibbler, C. C.; Alwood, C. A.; Brown, D.; et al. Iron state and hepatic disease in patients with thalassaemia major, treated with long term subcutaneous desferrioxamine. *J. Clin. Pathol.*, 1987, 40, 1353-1359.
- [43] Abe, K.; Ijiri, M.; Suzuki, T.; Taguchi, K.; Koyama, Y.; Isemura, M. Green tea with a high catechin content suppresses inflammatory cytokine expression in the galactosamine-injured rat liver. *Biomed. Res.*, 2005, 26, 187-192.
- [44] Anghileri, L. J.; Thouvenot, P. Natural polyphenols-iron interaction: its biological importance. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2000, 73, 251-258.
- [45] Galati, G.; Lin, A.; Sultan, A. M.; O'Brien, P. J. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic. Biol Med.*, 2006, 40, 570-580.
- [46] Greger, J. L.; Lyle, B. J. Iron, copper and zinc metabolism of rats fed various levels and types of tea. *J. Nutr.*, 1988, 118, 52-60.
- [47] Sakata, R.; Ueno, T.; Nakamura, T.; Sakamoto, M.; Torimura, T.; Sata, M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cell line LI90. *J. Hepatol.*, 2004, 40, 52-59.
- [48] Nakamura, M.; Higashi, N.; Kohjima, M.; Fukushima, M.; Ohta, S.; Kotoh, K.; Kobayashi, N.; Enjoji, M. Epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea, suppresses both collagen production and collagenase activity in hepatic stellate cells. *Int. J. Mol. Med.*, 2005, 16, 677-681.
- [49] Yumei, F.; Zhou, Y.; Zheng, S.; Chen, A. The antifibrogenic effect of (-)-epigallocatechin gallate results from the induction of de novo synthesis of glutathione in passaged rat hepatic stellate cells. *Lab. Invest.*, 2006, 86, 697-709.

- [50] Omara, F. O.; Blakley, B. R.; Huang, H. S. Effect of iron status on endotoxin-induced mortality, phagocytosis and interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha production. *Ver. Hum Toxicol*, 1994, 36, 423-428.
- [51] Zhong, Z.; Froh, M.; Connor, H. D.; Li, X.; Conzelmann, L. O.; Mason, R. P.; Lemasters, J. J.; Thurman, R. G. Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by green tea extract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, 2002, 283, G957-964.

Manuscript 1**Green Tea Attenuates Erythrocyte Oxidative Stress in β -Thalassemic Mice with Iron Overload**

S. Ounjaijean^{1,5}, S. Fucharoen², K. Pattanapanyasat³, T. Westermarck⁴, F. Atroshi⁵, S. Srichairatanakool^{1*}

ORIGINAL ARTICLE**Green Tea Attenuates Erythrocyte Oxidative Stress in β -Thalassemic Mice with Iron Overload**

S. Ounjaijean^{1,5}, S. Fucharoen², K. Pattanapanyasat³, T. Westermarck⁴, F. Atroshi⁵, S. Srichairatanakool^{1*}

¹*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand*

²*Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus, Nakornpathom, Thailand,*

³*Office of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand,*

⁴*Rimakehti Research Centre, Espoo, Finland,*

⁵*Department of Pharmacology and Toxicology, University of Helsinki, Helsinki, Finland*

Abstract: β -Thalassemia patients suffer from iron overload caused by regular blood transfusions and increased iron absorption. Iron plays a critical role in formation of reactive oxygen species (ROS). Accumulation of nonheme iron on thalassemic erythrocyte membrane triggers an oxidative cascade that leads to their suicidal erythrocyte death. Iron chelators are used for treatment of iron overload and oxidative stress in β -thalassemia patients. Green tea catechins having iron-chelating and antioxidant properties are applied to treat oxidative stress in vitro and in vivo. In this study, we prepared the microwave-processed green tea and investigated if green tea extract (GTE) could ameliorate oxidative stress and prolong survival of red blood cells in iron-loaded thalassemic mice. Mice (C57BL/6J) as wild type (WT) and β -knockout (BKO) thalassemia were fed with ferrocene-supplemented diet (FE diet) for 12 weeks and orally administered with the GTE (300 mg/kg) or DFP (50 mg/kg) for additional 12 weeks. Plasma non-transferrin bound iron (NTBI) was quantified by using HPLC method. Red blood cells labeled with phycoerythrin were detected with flow cytometry. Erythrocyte thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and hemolysis were measured colorimetrically. Result. Elevated plasma levels of NTBI and lipid peroxidation tended to normalize in response to oral therapy with GTE. At the same time, plasma GSH were increased up to 2-fold. Mice exhibit decreased of lipid peroxidation and improvement in the oxidant-antioxidant balance in erythrocytes. GTE effectively inhibit hemolysis and thereby prolonged RBC half-life. **Conclusion.** Our study demonstrates the ability of GTE to improve several of the fundamental pathological disturbances of Thalassemia. GTE may have clinical potential in diminishing iron overload complication when administered early in disease development. Combined

chelation therapy using GTE with standard iron chelator would be interested in β -thalassemia patients with iron overload.

Keywords: green tea, thalassemia, iron overload, oxidative stress, hemolysis, red cell survival

*Address correspondence to this author at the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 THAILAND. E-mail: ssrichai@mail.med.cmu.ac.th

1. INTRODUCTION

Beta-thalassemias are a heterogeneous group of red blood cell (RBC) disorders resulting from reduced or absent synthesis of β -globin chains of haemoglobin. The presence of excess unpaired α -globin chains in RBCs gives rise to aggregates or Heinz bodies, and morphologic changes, causing damage to the RBC membrane. The affected RBCs are prematurely hemolysed in the bone marrow and spleen, resulting in increased RBC turnover, ineffective erythropoiesis, and severe anemia, which can be corrected only by regular blood transfusions [1].

Iron overload, results from enhances iron absorption due to ineffective erythropoiesis and further aggravated by transfusion therapy, is one of the major causes of morbidity and mortality in thalassemic patients. In situations of iron excess the iron-binding capacity of transferrin is highly saturated, resulting in the appearance of nontransferrin-bound iron (NTBI) in the plasma [2, 3]. The toxicity of NTBI is significantly greater than transferrin-bound iron as exemplified by its ability to catalyze free-radical reactions that have life-threatening consequences [4]. NTBI, is thought to catalyze the formation of highly reactive oxygen radicals that generate lipid peroxidation processes, resulting to a breakdown of biomembrane functions and finally leading to cell death.

Administration of iron chelators, desferrioxamine (DFO) or defeniprone (DFP), is commonly promising to prevent or decrease iron-loading burden and accumulation of NTBI in the plasma of β -thalassemia major patients. However, these drugs are issued by being cause of serious side effects, treatment complications and high cost.

Green tea (*Camellia sinensis*) as an excellent source of polyphenols namely catechins, has been shown the protective effect in various oxidative-related pathologic conditions. Our previous studies demonstrated that, green tea catechins contain both anti-oxidative and iron-chelating properties [5, 6], which responsible for the inhibitory effect of green tea extract (GTE) to decreased iron overload and oxidative stress in iron-challenged murine models

[7, 8]. In this study, we investigated if GTE have a protective effect against iron-mediated oxidative damage to the RBCs and prolong RBCs survival of iron-challenged thalassemic mice.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals and Reagents

All HPLC-grade solvents were purchased from Merck Company. Unless other indicated, chemicals and standards were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company with AnalAR grade or the highest pure chemical available. DFP was kindly donated by Dr. Chada Phulsalaphong at the Government Pharmaceutical Organization, Bangkok, Thailand.

2.2 Green Tea Preparation

Fresh tea shoots were harvested and immediately dried in a microwave oven (3 minutes, 800 watts, 100°C) [5, 9]. Dry tea leaves were extracted with hot deionized water (80 °C) for 15 minutes and filtered through 0.45-µm membrane (cellulose acetate type, Millipore, Maidstone, England). Green tea extract (GTE) was dried under a vacuum, and the powder was stored at -20°C till further use. Catechin derivatives contained in the GTE were quantitated using a reverse-phase HPLC technique [10]. Conditions of the HPLC include analytical column (Waters SpheroSorb-ODS2, 250x4.7 mm, 5-µm), mobile-phase solvent (0.05% H₂SO₄ : acetonitrile : ethyl acetate = 86:12:2, v/v/v), a flow rate of 1.0 ml/min and optical detection of eluents at 280 nm. Concentrations of each catechins were determined by comparison with authentic standard catechins. Amounts of the persisting C, EC, EGC, ECG, EGCG and total catechins in GTE were 68.3, 8.1, 26.9, 9.5, 83.8 and 198.3 mg/g dry weight of tea leaves, respectively.

2.3 Animals and Treatments

Adult C57BL/6J mice (initial age 75-120 days), wild type (β^{Hb})(WT) and heterozygous β -knock out type ($\beta^{\text{Hb}}/\beta^{\text{Hb}^0}$) (BKO), were provided by Professor Suthat Fucharoen at Thalassemia Research Center, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University. The BKO thalassemic mice were generated by gene targeting technique according to Jamsai and colleagues [11]. Hematological data of BKO mice resemble human Thalassemia intermedia patients with the transfusion-dependent phenotype [12, 13]. All animal studies were conducted with approval of the Institutional Animal Care and Use Committee of Faculty of Medicine, Chiang Mai

University (Reference Number -3/2548). Mice were housed in non-metallic cages in the conventional clean room where the temperature ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) and humidity ($50\pm 10\%$) were maintained on 12-hours day/night cycle. The mice had free access to diet and drinking water *ad libitum*.

WT and BKO mice were fed with a ferrocene-supplemented chow diet (FE diet: CP082 diet enriched with 0.2% w/w ferrocene; containing 780 mg Fe/ kg diet) 5 days per week for 12 weeks to induce iron overload. After iron loading period, mice were randomly divided into four subgroups of 12 mice each for oral administrations of deionized water (placebo), GTE (300 mg GT/kg BW/day) and DFP (50 mg/kg BW/day) altogether with the FE diet for another 12 weeks. WT and BKO mice fed with standard diet (CP082; containing 180 mg Fe/kg diet), and administered with deionized water were served as non-iron loading control.

2.4 Blood Analysis

Heparinized blood was collected monthly by tail vein or heart puncture and centrifuged at 3000 rpm, 4°C for 10 minutes. Erythrocytes were washed and resuspended in PBS, pH 7.4. Plasma was removed and kept frozen at -80°C for further analysis. Blood hemoglobin concentration was assayed using a cyanmethemoglobin method [14].

Level of total glutathione in erythrocyte and plasma were determined colorimetrically by DTNB method [15] using Glutathione Assay Kit CS0260 (Sigma, St.Louis, MO, USA).

Determination of reactive oxygen species (ROS).

Level of ROS generated in red blood cells (RBCs) were determined by flow cytometric assay modified from Amer *et al* [16]. Briefly, 0.4 mM dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to RBCs suspension (1×10^6 cell/mL in PBS) and incubated at 37°C for 15 min in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . Fluorescence intensity (FI) of DCF from the intact RBCs was analyzed with a Becton Dickinson FACScan (BD Bioscience, CA), and data were analyzed using Cell Quest software (Becton Dickinson). The absolute FI of sample obtained by subtract FI of sample from FI of negative (unlabeled) control for each sample, representing the extent of ROS level in the RBCs. The positive control of each sample had been assessed together by H_2O_2 activation.

Analysis of plasma non-transferrin bound iron (NTBI)

Plasma NTBI was measured based on NTA chelation/HPLC technique with slight modification [5]. Briefly, plasma (27 μl) was incubated with nitrotriacetic acid (NTA) solution (final concentration 80 mM in 5 mM MOPS

buffer pH 7.0) at room temperature for 30 min. Produced Fe-(NTA)₃ complex was separated from plasma proteins by spinning the mixture through a filtration membrane (polysulfone type, 0.5-ml capacity, 30-kD cut-off, NanoSep®, Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA) at 12,000 rpm at 15 °C for 30 min. The filtrate was analyzed using the HPLC system via a glass column (ChromSep ODS1, 100x10 mm, 5 µm; Chrompak International, Middleberg, Netherlands); mobile-phase solvent (3 mM 1-ethyl-2-propyl-3-hydroxypyrid-4-one (CP22) in 19% acetonitrile buffered with 5 mM MOPS pH 7.0), a flow rate of 1.0 ml/min. Optical density of a red-colored product Fe-(CP22)₃, representing NTBI was monitored on-line at 450 nm. Data analysis was conducted with BDS software (BarSpec Ltd, Rehovot Israel). The NTBI peak was calculated with a calibration curve made from varied concentrations of 0-16 µM Fe-(NTA)₃, prepared in 80 mM NTA, pH 7.0.

Measurement of lipid peroxidation

Malondialdehyde (MDA) as index of lipid peroxidation was determined from plasma sample using HPLC-based TBARS assay described by Halliwell and Chirico [17]. Twenty-seven µl of plasma sample was mixed with the reaction mixture; 0.2% BHT solution (3 µl), 0.44 M H₃PO₄ (180 µl) and Thiobarbituric acid (0.6% w/v) (60 µl) and incubated at 90°C for 30 minutes. The pink-colored product was filtered through 0.45-µm syringe filter and analyzed with the HPLC system via analytical column (Water Spherosorb ODS2, 250x4.3 mm, 5 µm), mobile-phase solvent of 50 mM KH₂PO₄: methanol (65:35, v/v) at a flow rate of 1.0 ml/min. Eluents were detected on-line at 532 nm. Plasma TBARS concentrations were determined from the standard curve constructed by varied concentration of 1,1,3,3-tetramethoxypropane and reported as µmol/l of MDA equivalents.

To assess the level of lipid peroxidation in erythrocytes, packed cells were separated from plasma by centrifugation at 3000 x g for 10 min and resuspended in PBS, pH 7.4. To 50 µl of erythrocyte suspension, reaction mixture was added and incubated at 90°C for 30 minutes. Following incubation, it was allowed to stand on ice for 10 min before adding 150 µl trichloroacetic acid (20% w/v). After centrifugation at 12,000 x g for 10 min, the peroxide content in the supernatant was determined by spectrophotometrically at 532 nm. MDA values were evaluated by compared to the absorbance of standard tetramethoxypropane and expressed as pmol/g Hb

2.5 Red blood cells survival study

To investigate the effect of green tea catechins on prolong red cell survival, three male mice were randomly taken from each experimental group after iron loading and treatment period. Iron administration and treatment

intervention were continued for 2 month during survival study. *In vivo* biotinylation of the entire RBCs was achieved by tail vein injection of 200 μ l, 15 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Pierce, Rockford, IL, USA). A 2-3 μ l blood sample was collected at different period of time by tail vein puncture. Red cells were washed in 10 mmol/l HEPES, pH 7.4, 165 mmol/l NaCl (HBSM), and the number of biotinylated RBCs was determined by incubation of the red cells suspension (5×10^6 cells/ml) with 5 μ g/ml phycoerythrin-conjugated streptavidin (BD Bioscience, CA) in HBSM buffer containing 2.5 mmol/l CaCl_2 . Flow cytometric determination was carried out with FACScan (BD Bioscience, CA) and data were analyzed using Cell Quest software (Becton Dickinson) as described earlier [18, 19]. The RBC survival curve was created for determination of the duration that biotinylated RBCs reduced to 50% (T_{50} , survival half-time).

2.6 *In vitro* assay inhibition of red blood cells hemolysis

The inhibition of red blood cells hemolysis by GTE or DFP was evaluated by hemolysis test, performed in present of iron chelate and H_2O_2 as free radical initiators. RBCs were separated from plasma and buffy coat by centrifugation ($1,500 \times g$, 10 min at 4°C) and were washed three times by centrifugation ($1,500 \times g$, 5 min) in 10 volumes of 10 mM PBS, pH 7.4. RBCs suspension at 5% hematocrit was preincubated with 50 μ l of PBS (negative control), GTE or DFP at different concentrations (1.25 – 20 μ g/ml in PBS pH 7.4) for 30 min. Then 100 μ l of 100 μ M ferric-NTA (in 5 mM MOPS, pH 7.4) and 100 μ l of 100 μ M H_2O_2 (in PBS, pH 7.4) was added. The reaction mixture was shaken gently while being incubated at 37°C for 3 hr. After incubation, the reaction mixture was diluted with 8 ml PBS and centrifuge at $2,000 \times g$ for 10 min. The resulting supernatant was measured spectrophotometrically at 540 nm. The percentage of hemolysis was calculated by taking hemolysis of hypotonic buffer (PBS, pH 7.4) as 100%. The inhibitory effect of GTE or DFP was compared with standard antioxidant; Trolox (water-soluble tocopherol derivative) (1.25 – 20 μ g/ml in PBS pH 7.4).

2.7 Data Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS software (Version 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data are expressed as mean $\pm$ SD. The normality of distribution was tested by Skewness/Kurtosis test. Statistical comparison between different groups was performed by using the Student's T Test or Mann-Whitney's U test

depending of the distribution. Bivariate correlation was computed using Pearson's rank correlation. Two-tail significant value was used and a *P* value less than 0.05 was considered as statistically significant.

3. RESULTS

3.1 Effect of GTE on iron overload and oxidative stress parameters in plasma compartment.

Plasma NTBI concentration

The FE diet induced formation of NTBI in plasma of the WT and BKO mice in a time-dependent manner, which BKO mice were more susceptible to iron overload than WT mice. As expected, the increase of NTBI concentration was deteriorated by treatment with GTE and DFP. In contrast with equally effective effect observed in WT mice, GTE was significantly more effective to reduced NTBI concentration than DFP in BKO mice after two months of intervention (Figure 1).

Plasma Lipid peroxidation

Coincidentally with the increase of NTBI in the plasma, mice fed with FE diet have had markedly increase plasma lipid peroxidation in time-dependent fashion (Figure 2). GTE showed more effectively to neutralize the plasma MDA concentrations than DFP either in the WT mice or the BKO mice.

Plasma glutathione content

Plasma glutathione concentration of FE diet-fed mice was slightly decreased but not statistically significant compared to control mice fed with normal diet (Figure 3). Three months administration with GTE, as well as DFP, enhanced the plasma level of glutathione approximately 2-fold and 2.5-fold compared to WT and BKO mice received FE diet with placebo, respectively.

3.2 Effect of GTE on hemoglobin level and oxidant-antioxidant status in RBCs compartment.

Blood hemoglobin concentration

As shown in (Figure 4), the supplementation of iron-enrich diets insignificantly increase hemoglobin level in WT mice as well as mild anemic BKO mice. Neither GTE nor DFP show significant improved of hemoglobin synthesis in the treated mice.

Erythrocyte ROS formation

Generation of ROS in erythrocyte of either WT or BKO mice were induced in time-dependent manner by iron administration (Figure 5). When administrated with GTE, the iron-induced ROS formation in erythrocytes was neutralized into normal level. In addition, DFP show lower efficacy than GTE to replete erythrocyte ROS in WT mice and had no significant effect in BKO mice.

Lipid peroxidation of RBCs membrane

As a consequence of ROS formation, induction of lipid peroxidation in the erythrocyte reflected by the generation of MDA (Figure 6). The amount of MDA in the erythrocytes in WT and BKO control group measured were 35.13 ± 4.09 and 48.70 ± 3.65 pmol/g Hb, respectively. Induction of iron overload by FE diet administration to mice results in significantly increased of MDA concentration in the erythrocyte (50.05 ± 6.70 pmol/g Hb in WT mice and 57.30 ± 3.81 pmol/g Hb in BKO mice). The iron-mediated induction of erythrocyte MDA production was efficiently inhibited by treatment with GTE.

Intracellular glutathione content

Long term feeding with FE diet cause significantly decreased in levels of erythrocyte glutathione both in WT and BKO mice (Figure 7). Treatment with the GTE and DFP could restore the levels of glutathione into baseline level in both types of mice. In addition, the concentration of glutathione in erythrocyte was decreased coincidently with the increased level of erythrocyte MDA ($r = -0.916$, $P < 0.001$).

3.3 Red cells survival study

Survival curves plotted in Figure 8 show that RBC removal was linear for the WT control mice, as reported earlier [18-20]. The number of biotinylated cells decreased approximately 1.9 % per day, with 50% surviving ($T_{1/2}$) at 30 days and an extinction time of 60 days.

In contrast, (Figure 8, BKO) thalassemic RBCs demonstrated exponential removal, with both age-dependent and -independent processes. The survival curve was fitted to the equation: $A(t) = A_0[1 - (t/T)]e^{-kt}$ [21] where $A(t)$ stand for the number of biotinylated RBC at time (t); A_0 is the initial number of biotinylated RBC at $t = 0$; T is the time of senescent death of RBC (extinction time); and k is the sum of the rates of elution of the label and random removal.

Analysis of the exponential curve fit, indicated a more rapid removal of subpopulation of RBCs ($k = 0.053$) in thalassemic mice as compared to the WT controls with survival half-time ($T_{1/2}$) approximately 17.5 days. In contrast to normal RBCs, by day 30 only 23% of the RBCs of the thalassemic mice were survived. These data indicated that some thalassemic RBCs are removed prematurely, whereas others exhibit normal survival.

Administration with FE diet resulted in the significantly decreased of survival half-time (Figure 9). The $T_{1/2}$ in WT mice on FE diet and without iron-chelation treatment are decreased to 23 days, while in BKO mice are decreased to only 13 day.

Treatment with GTE potentially protects red cells from being destroyed by iron-induced oxidative damage. Chelators treated animals had RBC $T_{1/2}$ values intermediate between untreated (placebo group) and non iron-induced controls. The survival rate of WT RBCs in GTE-treated mice were increased approximately 15 % compared to whom received placebo. Furthermore, protective effect of GTE was more predominantly in BKO RBCs, which the survival rate was increased up to 27 % compared to placebo group. As expected, the effect of GTE was slightly more potent than DFP to protect RBCs from senescence.

3.4 GTE inhibit hemolysis of RBCs *in vitro*

In order to determine whether GTE can protect red cells from hemolysis caused by iron-catalyzed free radical generation, *in vitro* investigation of hemolysis of RBCs in the present of iron chelate (ferric-NTA) and H_2O_2 were performed.

The results revealed that pre-incubation with GTE protect red cells from hemolysis in concentration-dependent manner. At concentration as low as 1.25 $\mu\text{g/ml}$, GTE can inhibit hemolysis (by 50% in WT RBCs and by 55% in BKO RBCs) compared to the negative control (pre-incubated with PBS). The protective effect of GTE was more potent when compared to iron chelator, DFP or antioxidant, Trolox, taking together.

4. DISCUSSION AND CONCLUSION

Thalassemia is a hereditary anemia resulting from genetic defects in hemoglobin production which affects multiple organs and is associated with considerable morbidity and mortality. Lifelong blood transfusion is currently only mainstay treatment to suppress the anemic state, eventually, results in iron overload and consequently oxidative damage of cells and tissues.

Administration of iron dextran had been shown to increase blood hemoglobin levels in β -thalassemic mice [22]. However, we cannot conclude from our result that hemoglobin levels in β -thalassemic mice were increased by ferrocene diet administration. Neither GTE nor DFP cause significant changed in blood hemoglobin level. This result suggested erythropoiesis, either in wild type (WT) or thalassemic (BKO) mice, was not improved in our experimental model.

Iron administration, on the other way, induce iron overload in our experimental mice as determined by the significantly increased of NTBI in the plasma. The toxicity of NTBI to catalyze the generation of free radical was approved by the coincidently increased of plasma MDA concentration as well as depleted of plasma GSH.

The pathology of thalassemia is, to a certain extent, associated with the generation of labile iron in the pathological RBC [23]. The appearance of such form of iron at the inner and outer cell surface exposes the cell to condition whereby the labile metal promotes self-amplifying redox reactions which simultaneously deplete cellular reducing potential (eg, GSH), catalyze the formation of ROS and accelerate RBC destruction [24].

Our study demonstrated that iron overload cause by extracellular iron administration to the mice resulting in the decreased of intracellular antioxidant GSH, increased of ROS in the RBCs and increased of peroxidative damage of RBC membrane. The overall changes of extracellular environment and intracellular condition of RBC lead to shortening of RBC life.

When administered to β -thalassemic mice, GTE show protective effects to RBCs demonstrated by several oxidant-antioxidant parameters investigated. The results indicated that GTE plays an important role as an erythrocyte antioxidant on different levels. Iron chelating activity of GTE primarily prevented an iron overload in the mice and consequently depleted the iron-induced oxidative stress. GTE also shown intracellular protective antioxidant properties in the RBCs by induced increased of intracellular GSH content, decreased level of ROS and decreased lipid peroxidation of RBC membrane. Their synergistic properties protect cells form hemolysis and thereby prolong red cell survival.

The results obtained herein allowed concluding that besides acting as antioxidants, catechins in GTE can also effectively show the iron chelating properties *in vivo*. These substances neutralize, at least in part, some of the damage that has been caused by the iron-induced production of reactive oxygen radicals. The benefit such as less toxicity and the plasma levels achievable by orally ingestion are support the therapeutic potential of green tea to be used as alternative medicine for such iron overload diseases. Since the major pathophysiology of β -thalassemia is

related to membrane damage, green tea probably useful in protecting the RBC from oxidative stress, prolonging RBC lifespan and eventually ameliorating anemic progression.

However, despite their apparent complimentary effects on erythrocytes were observed, GTE have not yet been shown to effectively ameliorate the anemia of thalassemia. GTE may be more effective if used in combination treatment with iron chelators to neutralize the deleterious effects of iron overload and oxidative stress in RBCs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study work was supported by a grant from the Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education through Dr. Somdet Srichairatanakool (PMU5080074) and Centre for International Mobility (CIMO) Fellowships Programme 2010 for Sakaewan Ounjaijean (TM-08-6077). We thank Prof.Kovit Pattanapanyasat from Center of Excellence for Flow Cytometry, Office for Research and Development, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University for his kindly support of chemicals and advices on flow cytometric analysis performing.

REFERENCES

- [1] Rachmilewitz, E. A.; Weizer-Stern, O.; Adamsky, K.; Amariglio, N.; Rechavi, G.; Breda, L.; Rivella, S.; Cabanich, Z. I. Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: Can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants? *Ann NY Acad Sci* 1054:118-123; 2005.
- [2] Andrews, N. C. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 341:1986-1995; 1999.
- [3] Pootrakul, P.; Breuer, W.; Samefband, M.; Sirankapracha, P.; Hershko, C.; Cabanich, Z. I. Labile plasma iron (LPI) as an indicator of chelatable plasma redox activity in iron-overloaded beta-thalassemia/HbE patients treated with an oral chelator. *Blood* 104:1504-1510; 2004.
- [4] Cabanich, Z. I.; Breuer, W.; Zaminelli, G.; Cianciulli, P. LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best Pract Res Clin Haematol* 18:277-287; 2005.
- [5] Srichairatanakool, S.; Ounjaijean, S.; Thephinlap, C.; Khansuwan, U.; Phisalpong, C.; Fucharoen, S. Iron-chelating and free-radical scavenging activities of microwave-processed green tea in iron overload. *Hemoglobin* 30:311-327; 2006.

- [6] Thephinlap, C.; Ounjaijean, S.; Khansuwan, U.; Fucharoen, S.; Porter, J. B.; Srichairatanakool, S. Epigallocatechin-3-gallate and epicatechin-3-gallate from green tea decrease plasma non-transferrin bound iron and erythrocyte oxidative stress. *Med Chem* 3:289-296; 2007.
- [7] Ounjaijean, S.; Thephinlap, C.; Khansuwan, U.; Phisalapong, C.; Fucharoen, S.; Porter, J. B.; Srichairatanakool, S. Effect of green tea on iron status and oxidative stress in iron-loaded rats. *Med Chem* 4:365-370; 2008.
- [8] Saewong, T.; Ounjaijean, S.; Munde, Y.; Pattanapanyasat, K.; Fucharoen, S.; Porter, J. B.; Srichairatanakool, S. Effects of green tea on iron accumulation and oxidative stress in livers of iron-challenged thalassemic mice. *Med Chem* 6:57-64; 2010.
- [9] Ounjaijean, S. Iron-chelating property of green tea extract in iron-overload status. *Biochemistry*. Chiang Mai: Chiang Mai University; 2004: 1-157.
- [10] Chen, Z.; Zhu, Q. Y.; Tsang, D.; Huang, Y. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J Agric Food Chem* 49:477-482; 2001.
- [11] Jamsai, D.; Zaibak, F.; Khongnium, W.; Vadolas, J.; Voullaire, L.; Fowler, K.J.; Gazens, S.; Fucharoen, S.; Williamson, R.; Ioannou, P.A. A humanized mouse model for a common β 0-thalassemia mutation. *Genomics* 85:453-461; 2005.
- [12] Meerang, M.; Nair, J.; Sirankapracha, P.; Thephinlap, C.; Srichairatanakool, S.; Arab, K.; Kalpravidh, R.; Vadolas, J.; Fucharoen, S.; Bartsch, H. Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions in iron-overloaded thalassemic mouse livers: comparison with levels in the lymphocytes of thalassemia patients. *Int J Cancer* 125:759-766; 2009.
- [13] Srinoun, K.; Svasti, S.; Chumworathayee, W.; Vadolas, J.; Vattanaviboon, P.; Fucharoen, S.; Winichagoon, P. Imbalanced globin chain synthesis determines erythroid cell pathology in thalassemic mice. *Haematologica* 94:1211-1219; 2009.
- [14] King, J. W.; Willis, C. E. Cyanmethemoglobin certification program of the College of American Pathologists. *Am J Clin Pathol* 54:496-501; 1970.
- [15] Akerboom, T. P.; Sies, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77:373-382; 1981.

- [16] Amer, J.; Goldfarb, A.; Fibach, E. Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells. *Cytometry A* **60**:73-80; 2004.
- [17] Halliwell, B.; Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* **57**:715S-724S; discussion 724S-725S; 1993.
- [18] de Jong, K.; Emerson, R. K.; Butler, J.; Bastacky, J.; Mohandas, N.; Knypers, F. A. Short survival of phosphatidylserine-exposing red blood cells in murine sickle cell anemia. *Blood* **98**:1577-1584; 2001.
- [19] Manodori, A. B.; Knypers, F. A. Altered red cell turnover in diabetic mice. *J Lab Clin Med* **140**:161-165; 2002.
- [20] Popp, R. A.; Popp, D. M.; Johnson, F. M.; Skow, L. C.; Lewis, S. E. Hematology of a murine beta-thalassemia: a longitudinal study. *Ann NY Acad Sci* **445**:432-444; 1985.
- [21] Landaw, S. A. *Homeostasis, survival, and red cell kinetics: Measurement and imaging of red cell production*. New York: Churchill Livingstone; 1991.
- [22] Ginzburg, Y. Z.; Rybicki, A. C.; Suzuka, S. M.; Hall, C. B.; Breuer, W.; Cabantchik, Z. I.; Bouhassira, E. E.; Fabry, M. E.; Nagel, R. L. Exogenous iron increases hemoglobin in beta-thalassemic mice. *Exp Hematol* **37**:172-183; 2009.
- [23] Rumi, D.; Rachmilewitz, E. Advances in the pathophysiology and treatment of thalassemia. *Crit Rev Oncol Hematol* **20**:237-254; 1995.
- [24] Rumi, D.; Rachmilewitz, E. New trends in the treatment of beta-thalassemia. *Crit Rev Oncol Hematol* **33**:105-118; 2000.

LIST OF FIGURE

Figure 1 Plasma NTBI concentrations of FE diet-fed WT (top) and BKO (bottom) mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg). Data are expressed as mean±SD (n = 12).

Figure 2 Plasma MDA concentration of FE diet-fed WT (top) and BKO (bottom) mice following intervention with placebo, GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg) for 3 months. Data are expressed as mean±SD (n = 12).

Figure 3 Plasma total glutathione concentrations of of FE diet-fed WT and BKO mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg) for 3 months. Representative data at the day termination (6 months iron-loading with 3 months intervention) are expressed as mean±SD (n = 12). ^aP <0.05 compared to WT-FE; ^aP <0.05 compared to BKO-Control; ^bP <0.05 compared to BKO-FE.

Figure 4 Blood hemoglobin concentrations of FE diet-fed WT (top) and BKO (bottom) mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg). Data are expressed as mean±SD (n = 12).

Figure 5 Erythrocyte ROS formation of FE diet-fed WT (top) and BKO (bottom) mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg). Data are expressed as mean±SD (n = 12).

Figure 6 Erythrocyte MDA concentration of FE diet-fed WT (top) and BKO (bottom) mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg). Representative data at the day termination (6 months iron-loading with 3 months intervention) are expressed as mean±SD (n = 12). ^aP <0.05 compared to WT-Control; ^aP <0.05 compared to WT-FE; ^aP <0.05 compared to BKO-Control; ^bP <0.05 compared to BKO-FE.

Figure 7 Erythrocyte total glutathione concentrations of of FE diet-fed WT and BKO mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg) for 3 months. Representative data at the day termination (6 months iron-loading with 3 months intervention) are expressed as mean±SD (n = 12). ^aP <0.05 compared to WT-Control; ^aP <0.05 compared to WT-FE; ^aP <0.05 compared to BKO-Control; ^bP <0.05 compared to BKO-FE.

Figure 8 Reduced RBC survival in thalassemic mice (BKO mice) compared to WT mice. At day = 0, murine RBCs were biotinylated by tail vein injection of sulfo-NHS-biotin. Blood was drawn at indicated time intervals. Biotinylated RBCs were labeled with phycoerythrin-conjugated streptavidin and quantified by flow cytometry. *Open circles*, values from single WT control mice; *closed circles*, averaged values from three of WT

control mice used for the curve fit; *open squares*; values from single BKO control mice; *closed square*, average values from three of BKO control mice.

Figure 9 Red blood cells survival half-life of FE diet-fed WT and BKO mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg) for 3 months. Values are expressed as mean $\pm$ SD (n = 3). * $P < 0.05$ compared to WT-Control; [#] $P < 0.05$ compared to WT-FE; ^{*} $P < 0.05$ compared to BKO-Control; ^b $P < 0.05$ compared to BKO-FE; ^c $P < 0.05$ compared to BKO-FE/GTE.

Figure 10 *In vitro* protective effect of 1.25 μ g GTE or DFP against iron and H₂O₂ induced hemolysis of red cells compared to negative control (PBS) and positive control (Trolox). Percentage of hemolysis was calculated by taking hemolysis occurred in negative control as 100%. Values are expressed as mean $\pm$ SD of 6 independent experiments. * $P < 0.05$ compared to WT-PBS; [#] $P < 0.05$ compared to BKO-PBS; [†] $P < 0.05$ compared to BKO-GTE.

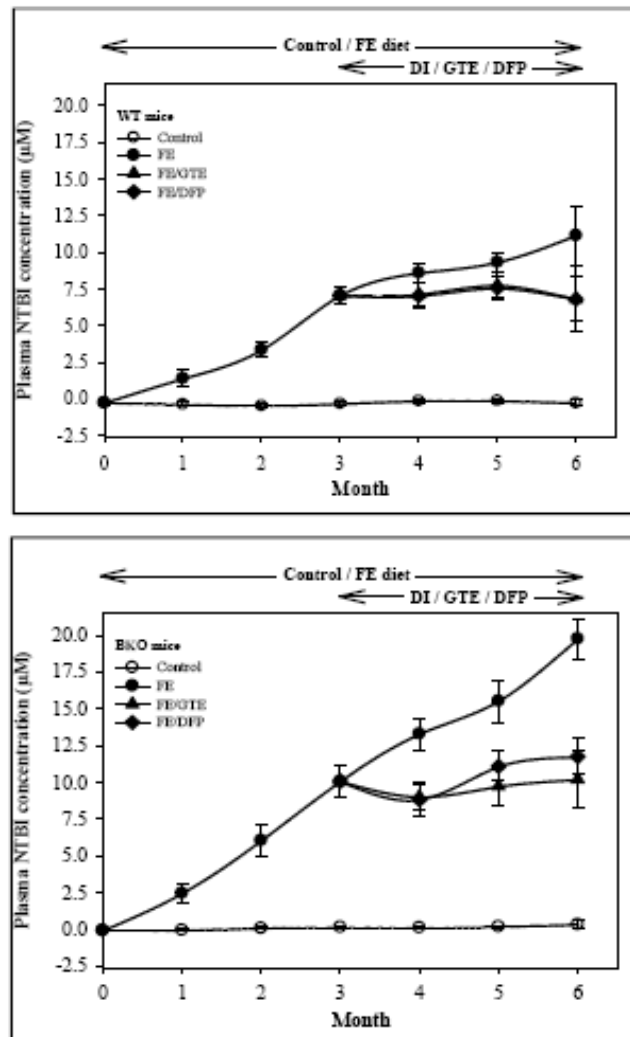


Figure 1 Plasma NTBI concentrations of FE diet-fed WT (top) and BKO (bottom) mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg). Data are expressed as mean±SD (n = 12).

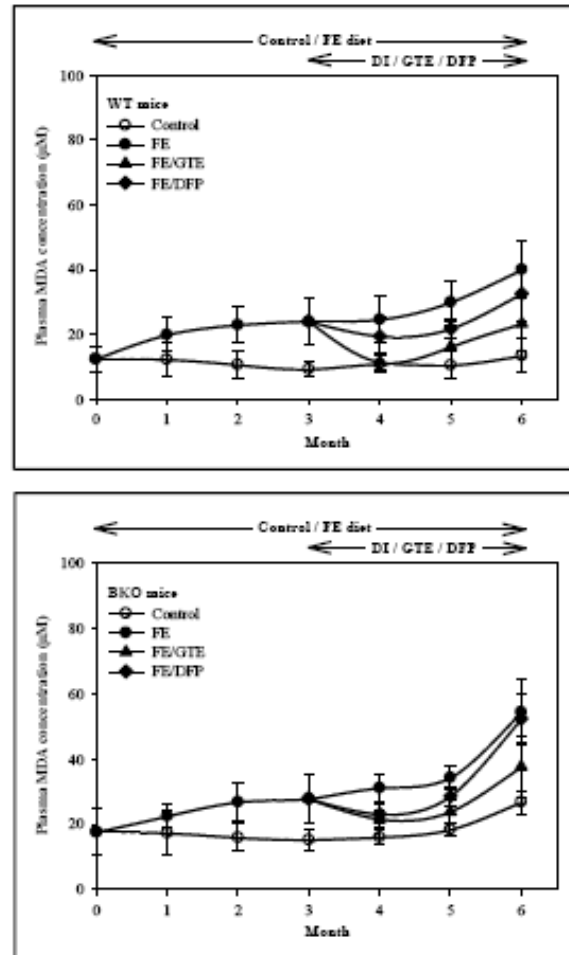


Figure 2 Plasma MDA concentration of FE diet-fed WT (top) and BKO (bottom) mice following intervention with placebo, GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg) for 3 months. Data are expressed as mean±SD (n = 12).

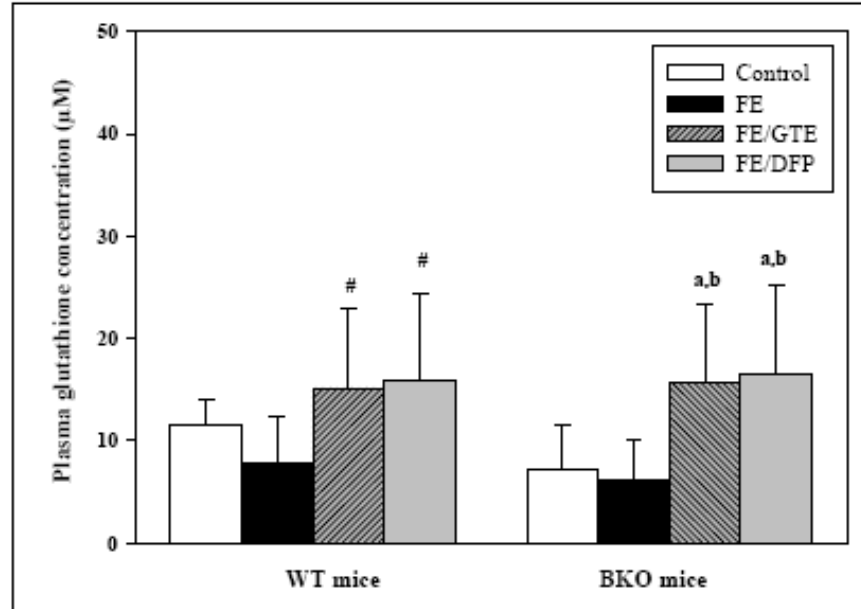


Figure 3 Plasma total glutathione concentrations of of FE diet-fed WT and BKO mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg) for 3 months. Representative data at the day termination (6 months iron-loading with 3 months intervention) are expressed as mean±SD (n = 12). [#]*p* <0.05 compared to WT-FE; ^a*p* <0.05 compared to BKO-Control; ^b*p* <0.05 compared to BKO-FE.

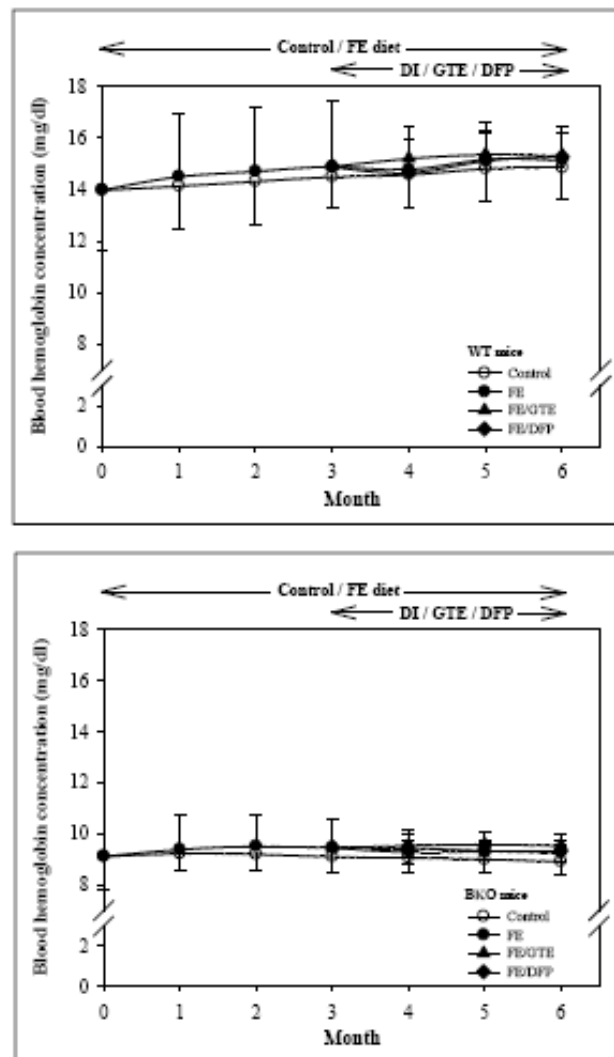


Figure 4 Blood hemoglobin concentrations of FE diet-fed WT (top) and BKO (bottom) mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg). Data are expressed as mean $\pm$ SD (n = 12).

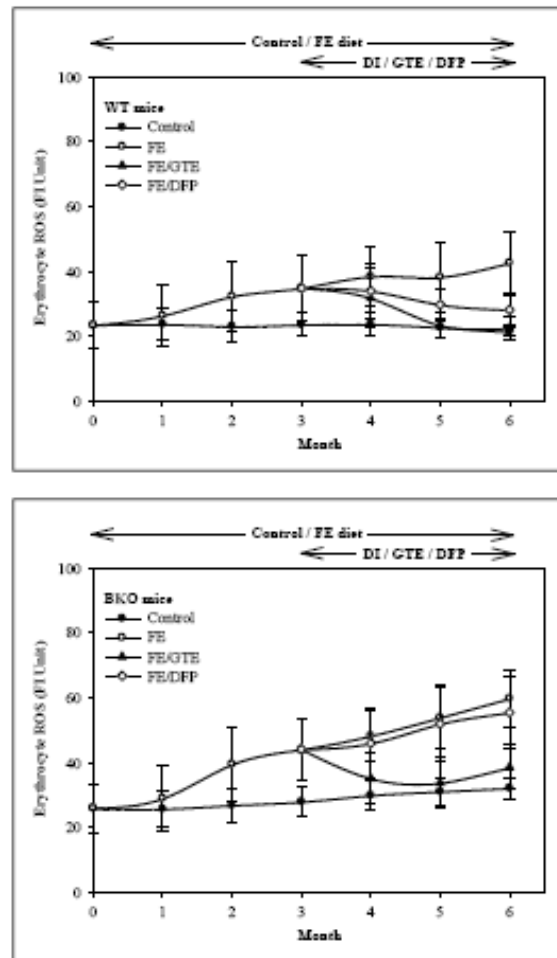


Figure 5 Erythrocyte ROS formation of FE diet-fed WT (top) and BKO (bottom) mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg). Data are expressed as mean±SD (n = 12).

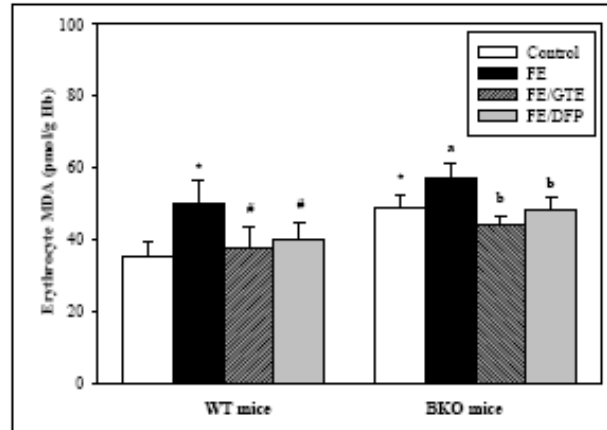


Figure 6 Erythrocyte MDA concentration of FE diet-fed WT (top) and BKO (bottom) mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg). Representative data at the day termination (6 months iron-loading with 3 months intervention) are expressed as mean±SD (n = 12). * $P < 0.05$ compared to WT-Control; # $P < 0.05$ compared to WT-FE; ^a $P < 0.05$ compared to BKO-Control; ^b $P < 0.05$ compared to BKO-FE.

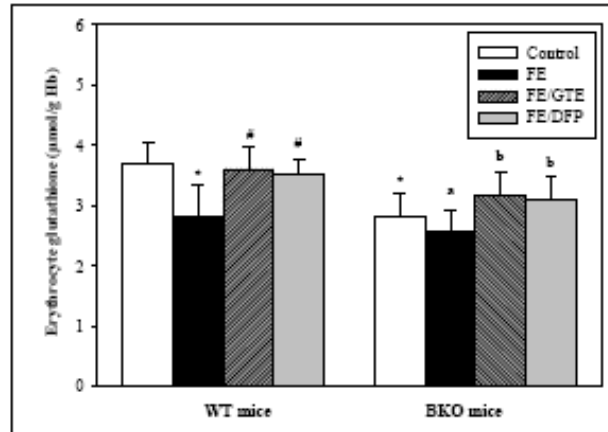


Figure 7 Erythrocyte total glutathione concentrations of of FE diet-fed WT and BKO mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg) for 3 months. Representative data at the day termination (6 months iron-loading with 3 months intervention) are expressed as mean±SD (n = 12). * $P < 0.05$ compared to WT-Control; [#] $P < 0.05$ compared to WT-FE; ^a $P < 0.05$ compared to BKO-Control; ^b $P < 0.05$ compared to BKO-FE.

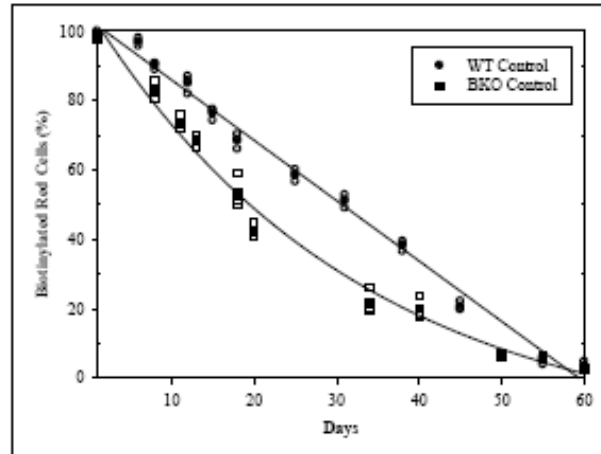


Figure 8 Reduced RBC survival in thalassemic mice (BKO mice) compared to WT mice. At day = 0, murine RBCs were biotinylated by tail vein injection of sulfo-NHS-biotin. Blood was drawn at indicated time intervals. Biotinylated RBCs were labeled with phycoerythrin-conjugated streptavidin and quantified by flow cytometry. *Open circles*, values from single WT control mice; *closed circles*, averaged values from three of WT control mice used for the curve fit; *open squares*, values from single BKO control mice; *closed square*, average values from three of BKO control mice.

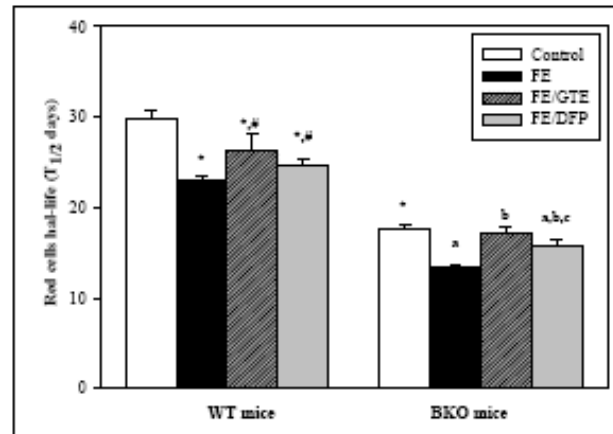


Figure 9 Red blood cells survival half-life of FE diet-fed WT and BKO mice following intervention with placebo (300 ml/kg), GTE (300 mg/kg) and DFP (50 mg/kg) for 3 months. Values are expressed as mean±SD (n = 3). * $P < 0.05$ compared to WT-Control; [#] $P < 0.05$ compared to WT-FE; ^a $P < 0.05$ compared to BKO-Control; ^b $P < 0.05$ compared to BKO-FE; ^c $P < 0.05$ compared to BKO-FE/GTE.

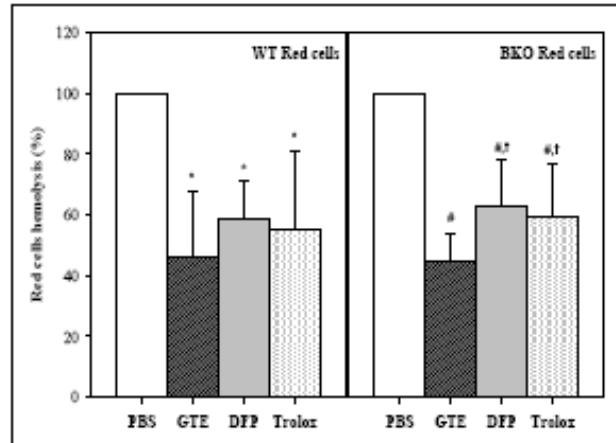


Figure 10 *In vitro* protective effect of 1.25 µg/ml GTE or DFP against iron and H₂O₂ induced hemolysis of red cells compared to negative control (PBS) and positive control (Trolox). Percentage of hemolysis was calculated by taking hemolysis occurred in negative control as 100%. Values are expressed as mean±SD of 6 independent experiments.

**P*<0.05 compared to WT-PBS; #*P*<0.05 compared to BKO-PBS; †*P*<0.05 compared to BKO-GTE.

Manuscript 2

Green Tea Extract and Epigallocatechin 3-gallate Reduced Labile Iron Pool and Protected Oxidative Stress in Iron-Loaded Cultured Hepatocytes

S. Srichairatanakool, K. Kulprachakarn, K. Pangit, K. Pattanapanyasat, J.B. Porter, S. Fuchaeron^{*}

ORIGINAL ARTICLE

Green Tea Extract and Epigallocatechin 3-gallate Reduced Labile Iron Pool and Protected Oxidative Stress in Iron-Loaded Cultured Hepatocytes

S. Srichairatanakool¹, K. Kulprachakarn¹, K. Pangit^{1,2}, K. Pattanapanyasat³, J.B. Porter⁴, S. Fuchaeron^{5*}

¹*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai Thailand,*

²*College of Medicine and Public Health, Ubol University, Thailand,*

³*Office of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand,*

⁴*Department of Haematology, UCL Cancer Institute, Paul O'Gorman Building, University College London, United Kingdom,*

⁵*Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University Salaya Campus, Nakornprathom, Thailand.*

ABSTRACT

β -thalassaemia patients suffer from secondary iron overload and therefore require effective iron chelation with desferrioxamine (DFO), deferiprone (DFP) and deferasirox (DFX). Cellular and mitochondrial damage can be caused by labile iron pool (LIP) and be mediated by reactive oxygen species (ROS). Liver cells of the thalassaemias have greater levels of LIP and ROS than those of healthy persons. Green tea extract (GTE) and epigallocatechin 3-gallate (EGCG) can protect human beings from cancer, hypertension, diabetes and aging. Importantly, GTE and EGCG exhibit anti-oxidative and iron-chelating activities in vitro and in vivo. We studied effects of GTE and EGCG on levels of both intracellular LIP and ROS, as well as the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) in mouse hepatocyte and human hepatoma (HepG2) cell cultures. Calcein-AM, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFHDA) and dihydrorhodamine 123 (DHR123) were used as specific fluorescent probes for the detection of LIP, ROS and membrane potential, respectively. Treatment with GTE and EGCG efficiently reduced levels of LIP and ROS in a concentration-dependent manner. Interestingly, these two compounds tended to increase viability of the normal hepatocytes while decreasing viability of the HepG2 cells. These results suggest that GTE and EGCG would remove the cytosolic LIP and ROS, but would not be harmful to the cells and mitochondria. Their actions might be related to iron chelation in iron-overloaded cells and iron

depletion in cancer cells. Whether these effects can improve iron overload and oxidative stress in thalassemia patients remains to be seen upon further examination.

Keywords: Green tea, epigallocatechin gallate, hepatocytes, labile iron pool, iron, reactive oxygen species.

*Please address correspondence to this author at the Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University Salaya Campus, Nakornprathom, Thailand. E-mail: grfc@mahidol.ac.th

INTRODUCTION

Iron is essential for many biological reactions; however, excess iron catalyzes the production of the reactive oxygen species (ROS), particularly a highly toxic hydroxyl radical via Fenton/Haber-Weiss reaction (Lemafsky 1994). ROS are known to induce oxidation of proteins, lipids and lipoproteins, nucleic acids, carbohydrates as well as other cellular components (Britton, Ramu et al. 1994; Emerit, Beaumont et al. 2001). Accordingly, deleterious effects include cell and organelle damage, cell death, tissue necrosis, and organ dysfunction. Physiologically, transferrin-bound iron (TBI) in plasma is mainly taken up into cells via ATP-dependent transferrin receptor (TFR)-mediated endocytosis. In the event of iron overload, plasma non-transferrin bound iron (NTBI) can be taken up by facilitate diffusion, possibly via divalent metal transporter 1 (DMT1), stimulator of iron transport (SIT), zinc transport protein (Zip14) and calcium channels (Barisani, Berg et al. 1995; Parkes, Randell et al. 1995; Graham, Morgan et al. 1998; Andrews 1999; Scheiber-Mojdehkar, Zimmermann et al. 1999; Conrad and Umbreit 2000; Fleming, Migas et al. 2000; Chua, Olynyk et al. 2004; Linzzi, Aydemir et al. 2006). Iron could function as a priming or sensitizing factor to modulate the biochemical and toxicologic actions of microsomal cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in rat hepatocytes and HepG2 cells (Cederbaum 2003). A previous study demonstrated that cultured hepatocytes took up TBI at very low levels. However, NTBI took up low-molecular-weight ferric ammonium citrate at high levels (Richardson, Chua et al. 1999). The release of iron from the cells was facilitated by apotransferrin and DFO (Hirsh, Kouijn et al. 2002).

An intracellular accessible iron called transient iron or labile iron pool (LIP) constitutes a crossroads of metabolic pathways of iron-containing compounds and is midway between the cellular iron requirement and the hazard of ROS production. It has been postulated the LIP would be redox-active, have low-molecular-mass, and be considered a weakly chelated iron (Fe^{2+} rather than Fe^{3+}). A wide range of LIP concentrations (3.5-230 μM) has been reported from different assays (Petrat, de Groot et al. 2002). LIP concentrations have been reported 0.9-

2.1 μM in erythroid and myeloid cells (Epsztejn, Kakhlon et al. 1997), $0.17 \pm 0.85 \mu\text{M}$ in peripheral blood lymphocytes (Geckowski, Krukowski et al. 2002), $0.18\text{--}0.57 \mu\text{M}$ in mouse lymphoma cells (Lipinski, Drapier et al. 2000), $5.0 \pm 2.0 \mu\text{M}$ in rat hepatocytes, $6.6 \pm 2.9 \mu\text{M}$ in rat hepatocyte nucleus, $11.8 \pm 3.9 \mu\text{M}$ in rat liver endothelial cell nuclei, $4.8 \pm 2.3 \mu\text{M}$ in mitochondria of rat hepatocytes, $9.2 \pm 2.7 \mu\text{M}$ in mitochondria of rat liver endothelial cells and $15.8 \pm 4.1 \mu\text{M}$ in lysosomal/endosomal compartments (Petrat, de Groot et al. 2001). LIP plays a role in the induction of cellular and tissue oxidative damage. High LIP content can cause DNA damage in the nucleus and is positively correlated with DNA damage in mouse lymphoma cells L5178Y and human lymphocytes.

Liver is the main body site for iron stores and homeostasis. Under liver iron overload and oxidative stress, free radicals and membrane oxidation by-products can trigger liver organelle dysfunction, inflammation, fibrosis, and eventually cell death (Corradini, Ferrara et al. 2004). Treatment of LIP with iron chelators or antioxidants prevents nuclear and mitochondrial DNA breaks of the liver cells. Uptake of DFO into hepatocytes was several hundred-fold times faster than the uptake of DFO into red cells (Porter, Rafique et al. 2005). The formation of pores or leaks in the mitochondrial membrane possibly occurred through the activation or dimerization of pro-apoptotic proteins including Bax, activated Bid, Bak and Bad. The activation or dimerization of such proteins, the collapse of electrochemical gradient or potentials ($\Delta\psi$) across mitochondrial membrane, the release of cytochrome c into cytoplasm, and the activation of caspases are responsible for cell apoptosis. An association of CYP2E1-dependent oxidative stress, mitochondrial membrane-potential collapse, and GSH homeostasis possibly contributes toward the developing toxicity of iron to the liver (Caro and Cedarbaum 2004).

The extract of leaves of *Pistacia lentiscus* exerted antioxidant activity in HepG2 cell culture but had a hepatotoxic effect in rats (Ljubuncic, Azzizeh et al. 2005). EGCG of green tea protected HepG2 cells from CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity (Jimenez-Lopez and Cedarbaum 2004). The treatment of antioxidants (such as N-acetyl cysteine and vitamin E) together with iron chelator could neutralize deleterious effect of oxidative stress in thalassemia patients with iron overload (Rachmilewitz, Weiner-Stern et al. 2005). Green tea (*Camellia sinensis*) contains at least five catechin derivatives including gallic acid (GA), epigallocatechin (EGC), epicatechin (EC), epigallocatechin 3-gallate (EGCG), and epicatechin 3-gallate (ECG), of which EGCG is a major active ingredient (Khokhar, Venema et al. 1997; Srichairatanakool, Ounjaijean et al. 2006). Our recent studies have shown that green tea reduced iron overload and oxidative stress in rats (Ounjaijean, Thepinlap et al. 2007) and inhibited the accumulation of iron in the livers of wild-type and thalassemic mice (Saewong, Ounjaijean et al. 2010). Recently, green tea catechins have been shown to

counteract oxidative mitochondrial damage in the livers of reserpine-treated rats (Al-Blonschi, Safer et al. 2009). However, the order of cytotoxicity of tea catechins derivatives to primary rat hepatocytes has been reported EGCG>ECG>GA, EGC>EC (Galati, Lin et al. 2006). Some antioxidant compounds such as curcumin and quercetin induced apoptosis in human HepG2 cells through mitochondrial DNA damage and hyperpolarization (Cao, Liu et al. 2007; Chang, Hsu et al. 2009). The combination of chloroform extract from *Zizyphus jujube* and green tea enhanced the inhibition of HepG2 cell growth (Huang, Kojima-Yusa et al. 2008).

We studied the effects of crude extract and EGCG of green tea on levels of LIP, ROS, mitochondrial membrane potential in primary hepatocyte and HepG2 cell cultures. Cytotoxicity of the compounds to the hepatocytes was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents

Acetonitrile, absolute ethanol, ethyl acetate, and methanol are the highest pure solvents. Calcein-AM solution (Invitrogen Corporation, CA, USA), dihydrodichlorodamine 123 (DHR123) (Biotium, Inc., CA, USA), and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFHDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) are fluorescent probes. Collagenase type IV, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Kreb-Ringer buffer (KRB), penicillin-streptomycin, 0.5% trypsin-EDTA solution and fetal bovine serum were purchased from GIBCO® Invitrogen, CA, USA. Insulin (Humulin®R) is a product of Health Central Network Inc., USA. Dexamethazone, dihydrogen phosphate potassium salt (KH_2PO_4), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT dye), ethylene glycol-bis(2-aminoethyl)ether -N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), hydrogen peroxide (30%), and epigallocatechin 3-gallate (EGCG) were obtained from Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Fisher Scientific, UK), ferric ammonium citrate (FAC) (BDH, England) and Desferrioxamine mesylate (DFO) (Novartis, Switzerland) were purchased from a drug store in Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. Desferiprone (DFP) was kindly donated by Dr. Chada Phaisalspong, Government Pharmaceutical Organization Thailand.

Green tea and EGCG preparations

Fresh tea shoots were harvested and immediately dried in a microwave oven (3 minutes, 800 watts, 100°C). Dry tea leaves were extracted with hot deionized water (80°C) for 15 minutes and filtered through 0.45-µm membrane (cellulose acetate type, Millipore, Maidstone, England) and dried under a vacuum. Results of HPLC

analysis using the column (Waters SpheroSorb-ODS2, 250x4.7 mm, 5- μ m), mobile-phase solvent (0.05% H_2SO_4 : acetonitrile : ethyl acetate = 86:12:2, w/w/v), a flow rate of 1.0 ml/min as well as the detection of 280 nm indicated amounts of EGC, C, EC, EGCG, ECG and total catechins persisting in the GTE were 102, 5.1, 53.9, 88.7, 4.3 and 255 mg/g dry weight, respectively (Srichairatanakool, Ounjaijeen et al. 2006; Saeuwong, Ounjaijeen et al. 2010).

EGCG was isolated from green tea extract (5.0%, w/v) using semi-preparative HPLC (Thephinsap 2007) according to following conditions: main column (Luna ODS2, 250X10 mm, 5 μ m, Phenomenex®, Torrance, California, USA) connected to guard column (Luna ODS2, 50x10 mm, 5 μ m, Phenomenex®, Torrance, California, USA), isocratic elution with solvent (methanol:H₂O = 29:71, w/v) at a flow rate of 1.0 ml/min, and detection of catechins derivatives at 280 nm. EGCG fraction was pooled and checked for purity using the analytical HPLC as described above. Methanol constituted in the pooled fractions was removed under a vacuum using a freeze-dry technique. Prior to being used, lyophilized EGCG fraction was stored in the dark at -20°C.

Isolation and cultures of hepatocytes

Mice (C57/BL6, 9 to 12 weeks old, 30 to 35 g) were provided by Professor Sutthat Fuchareon at Thalassemia Research Center, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University and used as a source of primary hepatocytes. The animal study was conducted with the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Faculty of Medicine, Chiang Mai University (Reference Number -3/2548).

Mice were anesthetized with vapor diethyl ether and their chests were opened. The liver was perfused *in situ* via the portal vein with the Krebs-Ringer buffer (KRB), pH 7.4 comprising 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 25 mM NaHCO₃ and 0.63 mM EGTA at 37°C, a flow rate of 1 ml/min for 20 minutes and with the KRB buffer containing 1 mM CaCl₂, 0.025% (w/v) collagenase type IV for 20 minutes. The livers were excised, teased apart, incubated at 37°C for a further 15 minutes in the collagenase solution, and isolated hepatocytes were harvested through nylon mesh (250-61 μ m). Crude cells were sedimented by differential centrifugation (60g) for 5 minutes at 25°C and resuspended in the 20 mM HEPES buffer containing 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, pH 7.4. Cell viability was assayed using trypan blue exclusion technique. Cell numbers were adjusted to 4×10^5 viable cells/ml and cultured in DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS, 2.0 mM glutamine, 100 U/ml penicillin/100 U/ml streptomycin, 200 mU/ml insulin and 1 μ M dexamethasone (Schmidt, Schmitz et al. 2005).

Human hepatoma (HepG2) cells were used to study the biochemical and toxicological properties due to their increased oxidative stress, loss of mitochondrial function, and loss of viability when challenged with

proxidants such as iron (Wu and Cederbaum 2008). Cells were cultured in complete DMEM containing 2 mM glutamine, pyridoxine hydrochloride, 110 mg/l sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 44 mM NaHCO₃, 10% (v/v) inactivated FBS and 0.01% (w/v) penicillin-streptomycin 37°C (Huang, Chen et al. 2001).

Chelation of intracellular LIP of hepatocyte cultures by GTE and EGCG

Primary hepatocytes and HepG2 cells (5x10³ cells/well) were exposed to FAC solution (0.5 mM) at 37°C under 5% CO₂ atmospheric conditions for 24 hours and washed three times with PBS solution, pH 7.4 to remove the excess iron (Trinder, Boley et al. 1990; McAbee and Ling 1997). Solutions of GTE (0-100 mg/dl), EGCG (0-200 µM), DFP (0-200 µM), DFO (0-200 µM), GTE (0-100 mg/dl) with 25 µM DFP and EGCG (0-200 µM) with 25 µM DFP were freshly prepared in 50 mM HEPES buffer, pH 7.2 and filtered through a membrane (cellulose type 0.22 µm). The cells were incubated with the GTE, EGCG, DFP, DFO, GTE plus DFP and EGCG plus DFP solutions at 37°C for 6, 12 and 24 hours (Staubli and Boelsterli 1998). The treated cells were washed three times with the culture medium and labeled with calcein-AM solution (50 µM in DMSO). Fluorescent intensity (FI), which was inversely proportional to the analyzed amount of LIP, was measured with a 96-well plate reader spectrofluorometer (absorption/excitation wavelengths 485 nm/530 nm) (Epstein, Kishlon et al. 1997). Viability of studied cells was greater than 80% and was not changed during the assay.

Reduction of ROS levels of cultured hepatocytes by GTE and EGCG

DCFH-DA can simply diffuse into the cells and be hydrolyzed by esterase in viable cells to produce 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH), which will be subsequently oxidized by existing ROS to 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). An increase of a green fluorescent signal indicates increased intracellular oxidative stress. The hepatocytes were incubated with the compounds as above at 37°C for 0, 6, 12 and 24 hours. The treated cells were washed three times with the culture medium, labeled with DCFH-DA solution (10 µM in methanol) for 30 minutes, and challenged with H₂O₂ solution (125 µM). FI was measured using the spectrofluorometric technique (excitation/emission wavelengths 485 nm/530 nm) (Perez-de-Arce, Foncea et al. 2005).

Effects of GTE and EGCG on mitochondrial membrane potentials of cultured hepatocytes

A cationic probe dihydrochodamine 123 (DHR123) is used to signal the loss of mitochondrial membrane potential which results in changes in the fluorescent intensity termed redistribution signals. Nonfluorescent DHR123 readily enters most of the cells into the mitochondrial matrix in response to mitochondrial membrane potential and can be oxidized by cellular ROS or redox system to the fluorescent R123 that accumulates in

mitochondrial membranes (Petit, Izbicla et al. 1999). Briefly, the hepatocytes treated with the compound(s) as above were centrifuged at 1000g, 4°C for 1 minute. Cell pellet was resuspended in 2 ml of the medium containing 1.5 μ M DHR123, incubated under 5% CO₂ atmospheric conditions at 37°C for 10 minutes. After incubation, the cells were separated by centrifugation at 1000g, 4°C for 1 minute and FI was measured using the spectrofluorometric technique (excitation/emission wavelengths 490 nm/520 nm). The capacity of mitochondria to take up the R123 was calculated as the difference of FI between untreated cells (control) and treated cells (Galati, Lin et al. 2006).

Statistical Analysis

The data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) of measurements. The statistical difference of analyzed data was determined by using the Student's *t*-test or ANOVA. A comparison between groups was done using the non-parametric Mann-Whitney U test. *p* < 0.05 was considered significant difference.

RESULTS AND DISCUSSION

Normally, iron is essential for many biochemical functions and metabolic pathways of human life and higher vertebrates. Pathophysiologically, iron imbalance can cause anemia and oxidative stress. Diseases that are related to or associated with iron overload can be exemplified by hereditary hemochromatosis, β -thalassaemia, fibrosis, cirrhosis, and cancer. Oxidative stress is a consequence from overproduction of iron-catalyzed free radicals via Haber-Weiss and Fenton reactions. This can deteriorate the functions of several vital organs such as heart, liver, kidneys, brain and pancreas. Liver is the main organ for iron storage and metabolism, which can be affected by excessive redox iron and reactive oxidants. Drug regimens such as iron-chelator or antioxidant are recommended for these patients to relieve oxidative tissue damage and improve their quality of life (Olivieri, Brittenham et al. 1995; Porter 1997). So far, DFO, DFP and DFX have been world widely used for treatment of thalassemia patients with iron overload. Their side effects are associated and carefully monitored (Porter 1997; Britton, Leicester et al. 2002). Importantly, the development of an economical and orally effective iron chelator is of great importance (Porter 2009). Iron-overload diseases frequently develop hepatocellular carcinoma, which the pathogenesis might involve an oxidative process via the intermediate production of reactive oxygen species.

Phytochemicals possess outstanding antioxidant and free radical-scavenging properties, suggesting a possible protective role in man (Scott, Butler et al. 1993). Green tea (GT) is an excellent source of antioxidative polyphenols including catechin, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, and

gallicocatechin gallate. The beneficial effects of green tea catechins would be applicable for treatments of β -thalassaemia major patients.

Examination of the hepatocellular iron content of liver specimen is required for the diagnosis of iron overload (Valberg, Ghent et al. 1978). D-tagatose, an antioxidant and weak iron chelator, removed redox-active iron and decreased oxidative stress in primary cultures of hepatocytes derived from male C57BL/6 mice (Paterna, Boess et al. 1998).

Under the iron overload, non-specific iron is called NTBI or LIP is transported in transferrin-saturated plasma and rapidly cleared by the liver. An *in vitro* study reported that rat hepatocytes in primary culture had a high capacity to take up the NTBI in forms of ferric citrate and small-molecular-weight iron complexes by facilitated diffusion (Baker, Baker et al. 1998; Richardson, Chua et al. 1999).

Iron uptake into the cultured hepatocytes of wild type mice were less than the cultured HepG2 cells because HepG2 cells as a human hepatoma cell line. It used iron for growth and proliferation more than normal cells. Especially, at 6 hours it was found that the iron uptake of treated-hepatocytes and HepG2 cells cultured were decreased. Primary hepatocytes are widely used as a cell culture model to identify mechanisms of hepatocellular damage, though there are some examples for compounds causing hepatic damage *in vivo* which could not be demonstrated in liver cells *in vitro*.

Our study has shown that GTE and EGCG decreased concentrations of chelatable, transient iron implied as LIP in both primary hepatocytes and HepG2 cells cultures in dose-dependent manner. Interestingly, the natural products cooperated with DFP to remove the persisting LIP in the target cells. Similarly, standard iron chelators as DFP and DFO were able to lowered the LIP concentrations in the hepatocytes. It can be summarized that GTE and EGCG are potential to chelate intracellular transient iron and work together with DFP for the chelation in the liver cells with iron overload. Dose of the phytochemical compounds is important and needs optimizing to achieve effective chelation and minimal adverse effects. Gaborian and colleagues showed that CP20 (or DFP) and CP411 efficiently protected cultured primary rat hepatocytes and rat hepatoma cells from toxic effect of iron load (Gaborian, Chantrel-Grossard et al. 2004). One study demonstrated that DFO penetrate into the hepatocytes and chelated cytosolic LIP slowly whereas DFP and DFX readily entered the cells and efficiently chelated the LIP (Glickstein, El et al. 2005). Synthetic α -ketohydroxypyridine chelators such as 1,2-dimethyl (DFP) and 1-ethyl-2-methyl derivatives of 3-hydroxypyrid-4-one were active in removing iron from reticuloendothelial system and hepatocytes, and superior to DFO (Brock, Liceaga et al. 1990).

GTE and EGCG immediately reduced levels of ROS in the cultured primary hepatocytes as well as HepG2 cells in dose-dependent manner. DFP and DFO did not change any levels of the ROS persisting in the cells. Suggestively, green tea catechins, particularly EGCG exhibit not only antioxidative but also iron-chelating properties, which can penetrate into the cells and interact with intracellular reactive oxidants including redox-active iron and free radicals. Since HepG2 cells are highly metabolic human hepatoma cells and produce larger amounts of reactive oxidants, their free-radical scavenging activity seems to be more apparent than that of primary hepatocytes. EGCG was postulated to be a potent antioxidant and effectively afforded protection of rat primary hepatocytes from free radicals-mediated diseases (Ramirez-Mares and de Mejia 2003). Mushroom (*Phellinus linteus*) protected primary rat hepatocytes from FeNTA-induced oxidative damage and attenuated cytotoxicity of other oxidants, possibly by increasing antioxidant (such as reduced glutathione) concentration and enhancing antioxidant enzyme activities (such as glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase) (Meloche and O'Brien 1993; Ye, Hou et al. 2007).

The liver is chiefly responsible for taking up and storing excessive amounts of iron. The major hepatic toxicities of iron overload include damage to multiple cell types (hepatocytes, Kupffer cells, hepatic stellate cells) and to multiple subcellular organelles (mitochondria, lysosomes, and smooth endoplasmic reticulum) (Bonkovsky and Lambrecht 2000). GTE and EGCG were able to decrease fluorescent intensity of rhodamine 123 (R123) representing mitochondrial ROS in primary hepatocytes and HepG2 cells. DFP and DFO induced ROS formation, affected and collapsed mitochondria membrane potential, particularly at 6 hours.

An evidence showed that tea phenolic acids and catechins containing gallic acid moieties were toxic toward isolated rat hepatocytes, which the order of cytotoxicity was EGCG>propyl gallate>ECG>gallic acid, EGC>EC (Galati, Lin et al. 2006). Our study has demonstrated that GTE, EGCG, DFP and DFO were toxic to the HepG2 cells, depending on applied doses and degree of the toxicity, which was GTE>DFO>DFP>EGCG. Duration of treatment and chelation also influenced the cytotoxic effect. GTE and EGCG treatments slightly increased number of viable primary hepatocytes, it is probable that the normal primary hepatocytes utilized their antioxidant activity to prevent cellular oxidative damage and brought their nutritional constituents of growth and development. Recently, researchers have mentioned that combination of the chloroform fraction from drink tea (*Zizyphus jujube*) and GTE enhanced inhibition of HepG2 cell growth in G1 arrest phase, suggesting synergism in anticancer activity (Huang, Kojima-Yuasa et al. 2008). Extract of herbal tea (*Ardisia compressa*) had an antioxidant protective effect on rat hepatocytes when exposed to 1-NP and was superior to EGCG anti-oxidation (de Mejia and Ramirez-Mares 2002). EGCG was best at suppressing growth, inducing apoptosis in human

prostate cancer DU145 cells and also displayed strong growth inhibitory effects against the lung tumor cell line H661.

Previous studies have shown that iron suppressed the expression of chimeric human transferrin genes in the livers of transgenic mice and regulated the synthesis of endogenous transferrin in the HepG2 cells (Baronius-Huckins and Adrian, Cell Biol Int., 2000). Iron was found to be cytotoxic in CYP 2E1-overexpressing HepG2 cells (E47 cells). Stimulation with bacterial lipopolysaccharide increased uptake of transferrin-bound iron into hepatic parenchymal cells and HepG2 cells (Hirayama et al. Hepatology, 1993). In development of toxicity by exposure of the hepatocytes to the tested compounds, the toxicity was prevented by antioxidants.

Makino (*Crossostephium chinensis* L.) showed antioxidant, iron-chelating and anti-proliferative activity in HepG2 cells (Chang et al. Am J Chin Med, 2009). The toxicity of increased ROS and arachidonic acid in the HepG2 cells when the cells are enriched with arachidonic acid can be prevented by antioxidants and iron chelator DFO (Chen et al. Alcohol Clin Exp Res, 1998). DFP and DFO have been shown to inhibit HepG2 cell proliferation in the S-phase of cell cycle (Chenoufi et al. Biochem Pharmacol, 1998). The ratio of DFP to iron (at least 3:1) is optimal to inhibit ROS generation; nevertheless, lower concentrations of the DFP can potentiate oxidative DNA damage in iron-loaded HepG2 cells (Cragg et al. Blood, 1998).

In conclusion, water extract of green tea (*Camellia sinensis*) and epigallocatechin 3-gallate could reduce excessive redox-active, transient (labile) iron and reactive oxygen species in cytosolic compartment of ex-vivo mouse primary hepatocytes as well as HepG2 cell cultures. The EGCG scavenges mitochondrial free radicals in the hepatocytes effectively, which the benefit would prevent mitochondrial membrane damage, hepatocyte apoptosis and liver damage. Green tea extract and EGCG are not toxic to the primary hepatocytes but toxic to the HepG2 cells when treat at high dose. The extract also enhances growth and viability of the hepatocytes, it would probably regenerate the damaged livers exposed to iron, free radicals and xenobiotics. Collectively, our findings imply protective and therapeutic effects of green tea catechins on the liver with iron overload and oxidative stress. Most importantly, it needs designing the merit adjunctive study of green tea products and deferoxamine to prevent liver pathogenesis in thalassemia patients with iron overload in the near future.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded mainly by Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education through Dr. Somdet Srichairatanakool (RMU1080074) and partially by Graduate School of Chiang Mai University through Miss K. Kulprachakarn. We thank Professor K. Pattanapanyasart (TRF Senior Research Scholar) for helpful comments and Thalassemia Research Center, Mahidol University for supplying C57/BL6

nice. Expert linguistic advice by Mr. R. K. Hollis from Faculty of Humanities, Chiang Mai University is gratefully recognized.

REFERENCES

- Al-Bloushi, S., A. M. Safer, et al. (2009). "Green tea modulates reserpine toxicity in animal models." *J Toxicol Sci* 34(1): 77-87.
- Andrews, N. C. (1999). "The iron transporter DMT1." *Int J Biochem Cell Biol* 31(10): 991-4.
- Baker, E., S. M. Baker, et al. (1998). "Characterisation of non-transferrin-bound iron (ferric citrate) uptake by rat hepatocytes in culture." *Biochim Biophys Acta* 1380(1): 21-30.
- Barisani, D., C. L. Berg, et al. (1995). "Evidence for a low Km transporter for non-transferrin-bound iron in isolated rat hepatocytes." *Am J Physiol* 269(4 Pt 1): G570-6.
- Boukovsky, H. L. and R. W. Lambrecht (2000). "Iron-induced liver injury." *Clin Liver Dis* 4(2): 409-29, vi-viii.
- Britton, R. S., K. L. Leicester, et al. (2002). "Iron toxicity and chelation therapy." *Int J Hematol* 76(3): 219-28.
- Britton, R. S., G. A. Ramm, et al. (1994). "Pathophysiology of iron toxicity." *Adv Exp Med Biol* 356: 239-53.
- Brock, J. H., J. Liscaga, et al. (1990). "Effect of novel 1-alkyl-3-hydroxy-2-methylpyrid-4-one chelators on uptake and release of iron from macrophages." *Am J Hematol* 34(1): 21-5.
- Cao, J., Y. Liu, et al. (2007). "Curcumin induces apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA damage in human hepatoma G2 cells." *Free Radic Biol Med* 43(6): 968-75.
- Caro, A. A. and A. I. Cedarbaum (2004). "Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 27-42.
- Cedarbaum, A. I. (2003). "Iron and CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity." *Alcohol* 30(2): 115-20.
- Chang, Y. F., Y. C. Hsu, et al. (2009). "Quercetin induces oxidative stress and potentiates the apoptotic action of 2-methoxyestradiol in human hepatoma cells." *Nutr Cancer* 61(5): 735-45.
- Chua, A. C., J. K. Olynyk, et al. (2004). "Nontransferrin-bound iron uptake by hepatocytes is increased in the Hfe knockout mouse model of hereditary hemochromatosis." *Blood* 104(5): 1519-25.
- Coumad, M. E. and J. N. Umbreit (2000). "Iron absorption and transport-an update." *Am J Hematol* 64(4): 287-98.
- Corradini, E., F. Ferrara, et al. (2004). "Iron and the liver." *Pediatr Endocrinol Rev* 2 Suppl 2: 245-8.
- de Mejia, E. G. and M. V. Ramirez-Mares (2002). "Leaf extract from *Ardisia compressa* protects against 1-nitropyrene-induced cytotoxicity and its antioxidant defense disruption in cultured rat hepatocytes." *Toxicology* 179(1-2): 151-62.

- Emerit, J., C. Beaumont, et al. (2001). "Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury." Biomol Pharmacother 55(6): 333-9.
- Epstein, S., O. Kishlon, et al. (1997). "Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells." Anal Biochem 248(1): 31-40.
- Fleming, R. E., M. C. Miga, et al. (2000). "Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis." Proc Natl Acad Sci U S A 97(5): 2214-9.
- Gaboriau, F., K. Chantrel-Groussard, et al. (2004). "Iron mobilization, cytoprotection, and inhibition of cell proliferation in normal and transformed rat hepatocyte cultures by the hydroxypyridinone CP411, compared to CP20: a biological and physicochemical study." Biochem Pharmacol 67(8): 1479-87.
- Gackowski, D., M. Kruzewski, et al. (2002). "Lymphocyte labile iron pool, plasma iron, transferrin saturation and ferritin levels in colon cancer patients." Acta Biochim Pol 49(1): 269-72.
- Galeti, G., A. Liu, et al. (2006). "Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins." Free Radic Biol Med 40(4): 570-80.
- Glickstein, H., R. B. El, et al. (2005). "Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells." Blood 106(9): 3242-50.
- Graham, R. M., E. H. Morgan, et al. (1998). "Ferric citrate uptake by cultured rat hepatocytes is inhibited in the presence of transferrin." Eur J Biochem 253(1): 139-45.
- Hirsh, M., A. M. Komijn, et al. (2002). "Acquisition, storage and release of iron by cultured human hepatoma cells." J Hepatol 36(1): 30-8.
- Huang, X., A. Kojima-Yunsa, et al. (2008). "Green tea extract enhances the selective cytotoxic activity of Zizyphus jujube extracts in HepG2 cells." Am J Chin Med 36(4): 729-44.
- Huang, Z. Z., C. Chen, et al. (2001). "Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration." FASEB J 15(1): 19-21.
- Jimenez-Lopez, J. M. and A. I. Cedeno (2004). "Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate protects HepG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity." Free Radic Biol Med 36(3): 359-70.
- Khokhar, S., D. Venema, et al. (1997). "A RP-HPLC method for the determination of tea catechins." Cancer Lett 114(1-2): 171-2.
- Lezefsky, E. J. (1994). "Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury." Adv Exp Med Biol 366: 129-46.

- Lipinski, P., J. C. Drapier, et al. (2000). "Intracellular iron status as a hallmark of mammalian cell susceptibility to oxidative stress: a study of L5178Y mouse lymphoma cell lines differentially sensitive to H₂O₂." *Blood* 95(9): 2960-6.
- Liuzzi, J. P., F. Aydemir, et al. (2006). "Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Ljubuncic, P., H. Azzizeh, et al. (2005). "Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel." *J Ethnopharmacol* 99(1): 43-7.
- McAbee, D. D. and Y. Y. Ling (1997). "Iron-loading of cultured adult rat hepatocytes reversibly enhances lactoferrin binding and endocytosis." *J Cell Physiol* 171(1): 75-86.
- Meloche, B. A. and P. J. O'Brien (1993). "S-nitrosyl glutathione-mediated hepatocyte cytotoxicity." *Xenobiotica* 23(8): 863-71.
- Olivieri, N. F., G. M. Brittenham, et al. (1995). "Iron-chelation therapy with oral deferasiprone in patients with thalassemia major." *N Engl J Med* 332(14): 918-22.
- Onujajee, S., C. Thephimlap, et al. (2007). "Effect of green tea on iron status and oxidative stress in iron-loaded rats." *Haematologica* xx(xx): xxx-yyy (Submission).
- Parkes, J. G., E. W. Randell, et al. (1995). "Modulation by iron loading and chelation of the uptake of non-transferrin-bound iron by human liver cells." *Biochim Biophys Acta* 1243(3): 373-80.
- Paterna, J. C., F. Boess, et al. (1998). "Antioxidant and cytoprotective properties of D-tagatose in cultured murine hepatocytes." *Toxicol Appl Pharmacol* 148(1): 117-25.
- Perez-de-Arce, K., R. Fouca, et al. (2005). "Reactive oxygen species mediates homocysteine-induced mitochondrial biogenesis in human endothelial cells: modulation by antioxidants." *Biochem Biophys Res Commun* 338(2): 1103-9.
- Petit, T., E. Izobick, et al. (1999). "Activity of MKT 077, a rhodacyanine dye, against human tumor colony-forming units." *Anticancer Drugs* 10(3): 309-15.
- Petrat, F., H. de Groot, et al. (2001). "Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells." *Biochem J* 356(Pt 1): 61-9.
- Petrat, F., H. de Groot, et al. (2002). "The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity." *Biol Chem* 383(3-4): 489-502.
- Porter, J. B. (1997). "A risk-benefit assessment of iron-chelation therapy." *Drug Saf* 17(6): 407-21.
- Porter, J. B. (2009). "Optimizing iron chelation strategies in beta-thalassemia major." *Blood Rev* 23 Suppl 1: S3-7.

- Porter, J. B., R. Rafique, et al. (2005). "Recent insights into interactions of deferoxamine with cellular and plasma iron pools: Implications for clinical use." Ann N Y Acad Sci 1054: 155-68.
- Rachmilewitz, E. A., O. Weizer-Stern, et al. (2005). "Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: Can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants?" Ann N Y Acad Sci 1054: 118-23.
- Ramirez-Mares, M. V. and E. G. de Mejia (2003). "Comparative study of the antioxidant effect of ardisin and epigallocatechin gallate in rat hepatocytes exposed to benomyl and 1-nitropyrene." Food Chem Toxicol 41(11): 1527-35.
- Richardson, D. R., A. C. Chua, et al. (1999). "Activation of an iron uptake mechanism from transferrin in hepatocytes by small-molecular-weight iron complexes: implications for the pathogenesis of iron-overload disease." J Lab Clin Med 133(2): 144-51.
- Saeuwong, T., S. Ounjaijeem, et al. (2010). "Effects of Green Tea on Iron Accumulation and Oxidative Stress in Livers of Iron-Challenged Thalassemic Mice." Med Chem 6: 000-000.
- Scheiber-Mojdehkar, B., I. Zimmermann, et al. (1999). "Differential response of non-transferrin bound iron uptake in rat liver cells on long-term and short-term treatment with iron." J Hepatol 31(1): 61-70.
- Schmidt, M., H. J. Schmütz, et al. (2005). "Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture." Food Chem Toxicol 43(2): 307-14.
- Scott, B. C., J. Butler, et al. (1993). "Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins." Free Radic Res Commun 19(4): 241-53.
- Srichairatanakool, S., S. Ounjaijeem, et al. (2006). "Iron-chelating and free-radical scavenging activities of microwave-processed green tea in iron overload." Hemoglobin 30(2): 311-27.
- Staubli, A. and U. A. Boelsterli (1998). "The labile iron pool in hepatocytes: prooxidant-induced increase in free iron precedes oxidative cell injury." Am J Physiol 274(6 Pt 1): G1031-7.
- Thephinpul, C., Ounjaijeem, S., Khansuwan, U., Fuchareon, S., Porter, J.B., Srichairatanakool, S. (2007). "Epigallocatechin-3-gallate and epicatechin-3-gallate from green tea decrease plasma non-transferrin bound iron and erythrocyte oxidative stress." Current Medicinal Chemistry X(X): xxx-yyy.
- Trinder, D., R. G. Batey, et al. (1990). "Effect of cellular iron concentration on iron uptake by hepatocytes." Am J Physiol 259(4 Pt 1): G611-7.
- Valberg, L. S., C. N. Ghent, et al. (1978). "Diagnostic efficacy of tests for the detection of iron overload in chronic liver disease." Can Med Assoc J 119(3): 229-36.
- Wu, D. and A. I. Cederbaum (2008). "Development and properties of HepG2 cells that constitutively express CYP2E1." Methods Mol Biol 447: 137-50.

Ye, S. F., Z. Q. Hou, et al. (2007). "Protective effects of *Phellinus linteus* extract against iron overload-mediated oxidative stress in cultured rat hepatocytes." *Phytother Res* 21(10): 948-53.

LIST OF FIGURES

Figure 1 Levels of LIP in iron-loaded hepatocyte cultures treated with GTE, EGCG, DFP and DFO for 6, 12 and 24 hours. Data were obtained from three independent triplicate experiments and shown as mean±SD. * $p<0.05$ when compared to control cells; ^a $p<0.05$, ^{ab} $p<0.01$, ^{abc} $p<0.005$ when compared to iron-loaded cells.

Figure 2 Levels of LIP in iron-loaded hepatocyte cultures treated with GTE and EGCG together with 25 μ M DFP for 6, 12 and 24 hours. Data were obtained from three independent triplicate experiments and shown as mean±SD. ^a $p<0.05$, ^{ab} $p<0.01$, ^{abc} $p<0.001$ when compared to treatment with 25 μ M DFP alone.

Figure 3 Levels of ROS in iron-loaded hepatocyte cultures treated with GTE, EGCG, DFP and DFO for 6, 12 and 24 hours. Data were obtained from three independent triplicate experiments and shown as mean±SD. * $p<0.05$ when compared to control cells; ^a $p<0.05$, ^{ab} $p<0.01$, ^{abc} $p<0.005$ when compared to iron-loaded cells.

Figure 4 Levels of ROS in iron-loaded hepatocyte cultures treated with GTE and EGCG together with 25 μ M DFP for 6, 12 and 24 hours. Data were obtained from three independent triplicate experiments and shown as mean±SD. ^a $p<0.05$, ^{ab} $p<0.01$, ^{abc} $p<0.001$ when compared to treatment with 25 μ M DFP alone.

Figure 5 Levels of mitochondrial membrane potentials (mΨ) in iron-loaded hepatocyte cultures treated with GTE, EGCG, DFP and DFO for 6, 12 and 24 hours. Data were obtained from three independent triplicate experiments and shown as mean±SD. * $p<0.05$ when compared to control cells; ^a $p<0.05$, ^{ab} $p<0.01$, ^{abc} $p<0.005$ when compared to iron-loaded cells.

Figure 6 Levels of mitochondrial membrane potentials (mΨ) in iron-loaded hepatocyte cultures treated with GTE and EGCG together with 25 μ M DFP for 6, 12 and 24 hours. Data were obtained from three independent triplicate experiments and shown as mean±SD. ^a $p<0.05$, ^{ab} $p<0.01$, ^{abc} $p<0.001$ when compared to treatment with 25 μ M DFP alone.

Figure 1 Levels of LIP in iron-loaded hepatocyte cultures treated with GTE, EGCG, DFP and DFO for 6, 12 and 24 hours. Data were obtained from three independent triplicate experiments and shown as mean $\pm$ SD. * p <0.05 when compared to control cells; [#] p <0.05, ^{##} p <0.01, ^{###} p <0.005 when compared to iron-loaded cells.

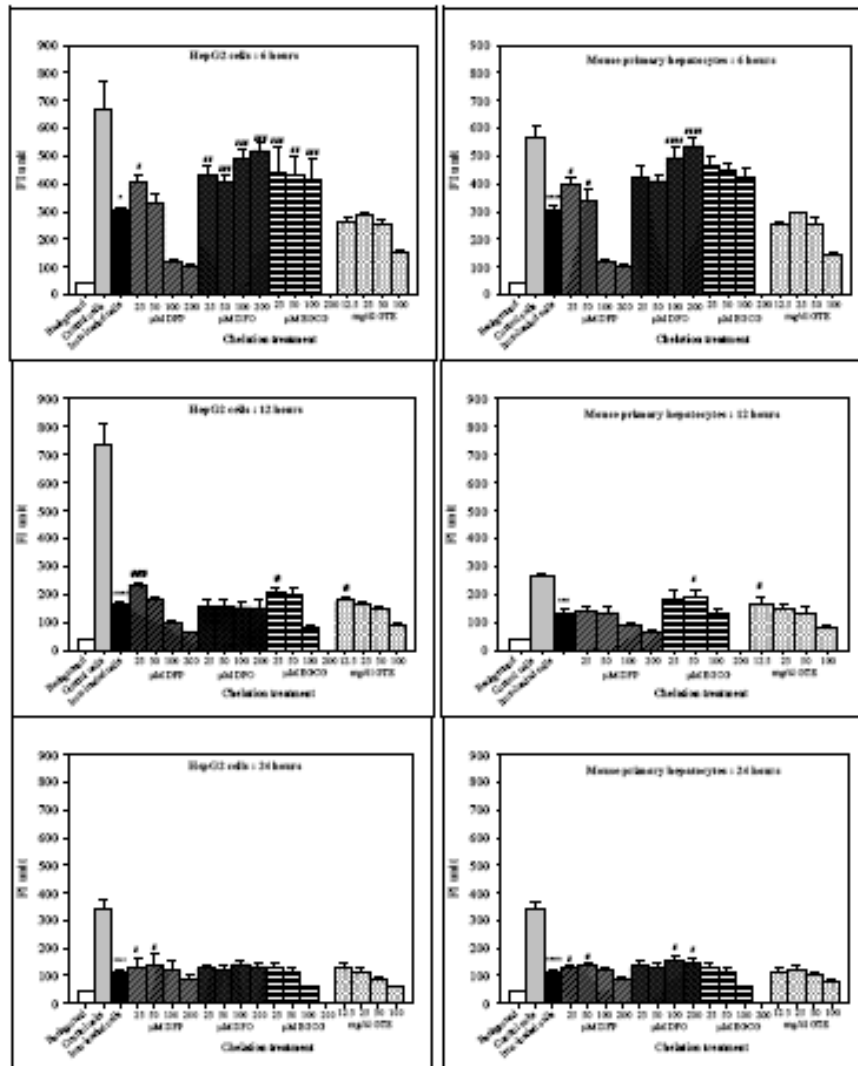


Figure 2 Levels of LIP in iron-loaded hepatocyte cultures treated with GTE and EGCG together with 25 μ M DFP for 6, 12 and 24 hours. Data were obtained from three independent triplicate experiments and shown as mean $\pm$ SD. ^ap<0.05, ^{aa}p<0.01, ^{aaa}p<0.001 when compared to treatment with 25 μ M DFP alone.

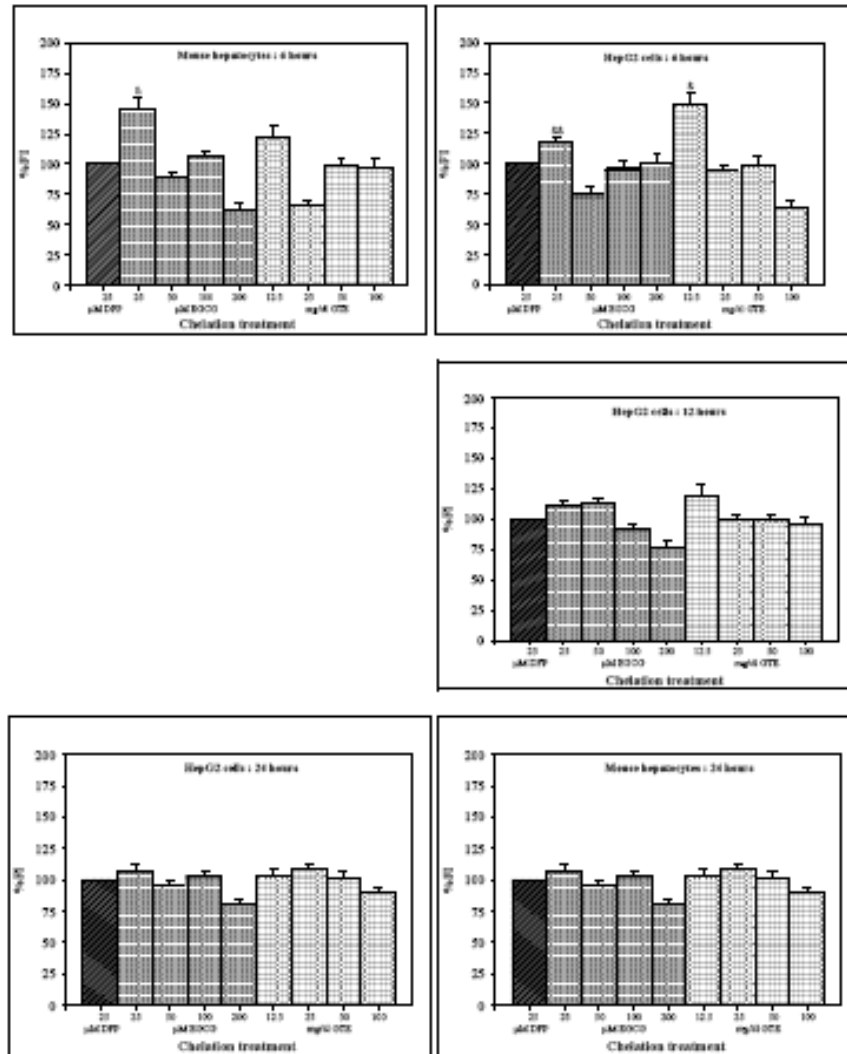


Figure 3 Levels of ROS in iron-loaded hepatocyte cultures treated with GTE, EGCG, DFP and DFO for 6, 12 and 24 hours. Data were obtained from three independent triplicate experiments and shown as mean $\pm$ SD. * p <0.05 when compared to control cells; [#] p <0.05, ^{##} p <0.01, ^{###} p <0.005 when compared to iron-loaded cells.

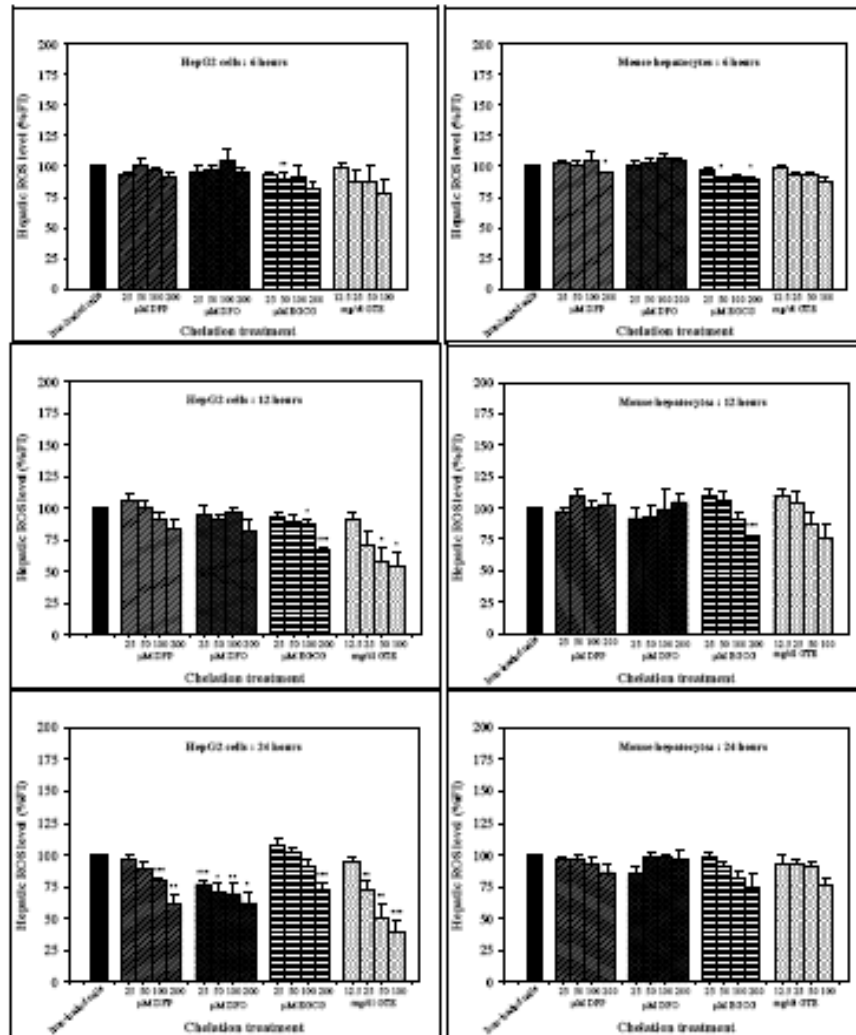


Figure 4 Levels of ROS in iron-loaded hepatocyte cultures treated with GTE and EGCG together with 25 μ M DFP for 6, 12 and 24 hours. Data were obtained from three independent triplicate experiments and shown as mean $\pm$ SD. ^Ap<0.05, ^{AA}p<0.01, ^{AAA}p<0.001 when compared to treatment with 25 μ M DFP alone.

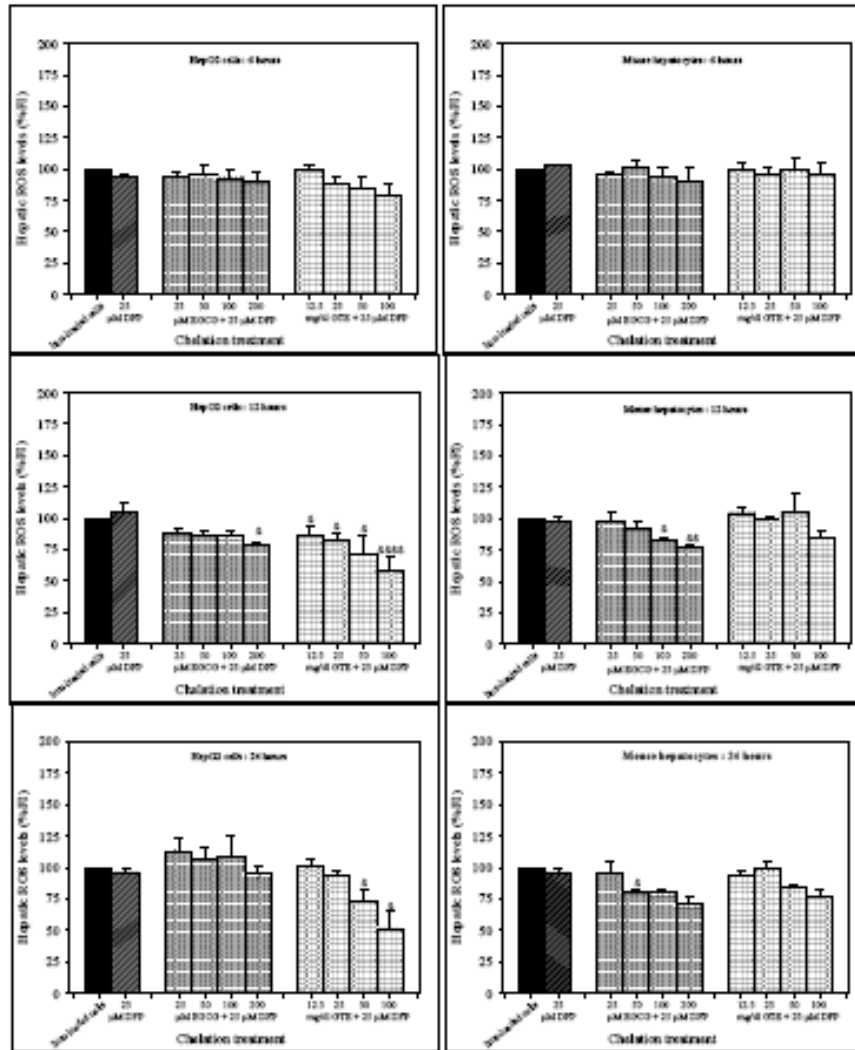


Figure 5 Levels of mitochondrial membrane potentials ($m\Psi$) in iron-loaded hepatocyte cultures treated with GTE, EGCG, DFP and DFO for 6, 12 and 24 hours. Data were obtained from three independent triplicate experiments and shown as mean $\pm$ SD. * p <0.05 when compared to control cells; [#] p <0.05, ^{##} p <0.01, ^{###} p <0.005 when compared to iron-loaded cells.

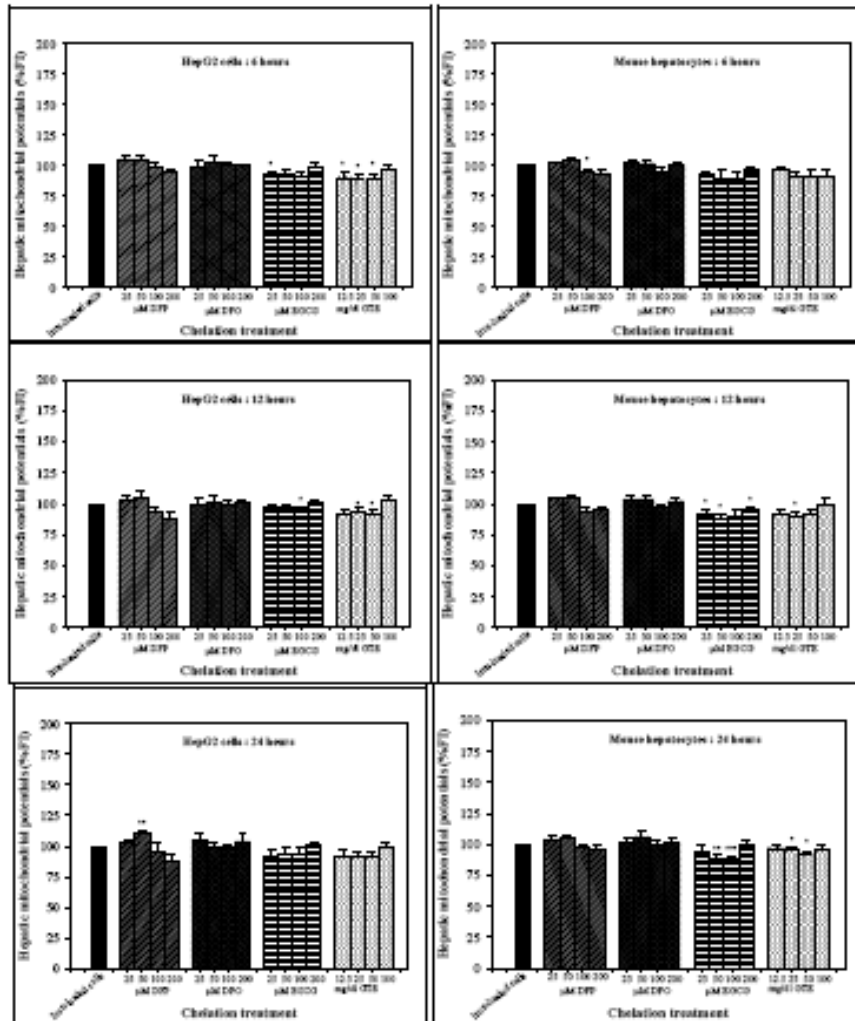
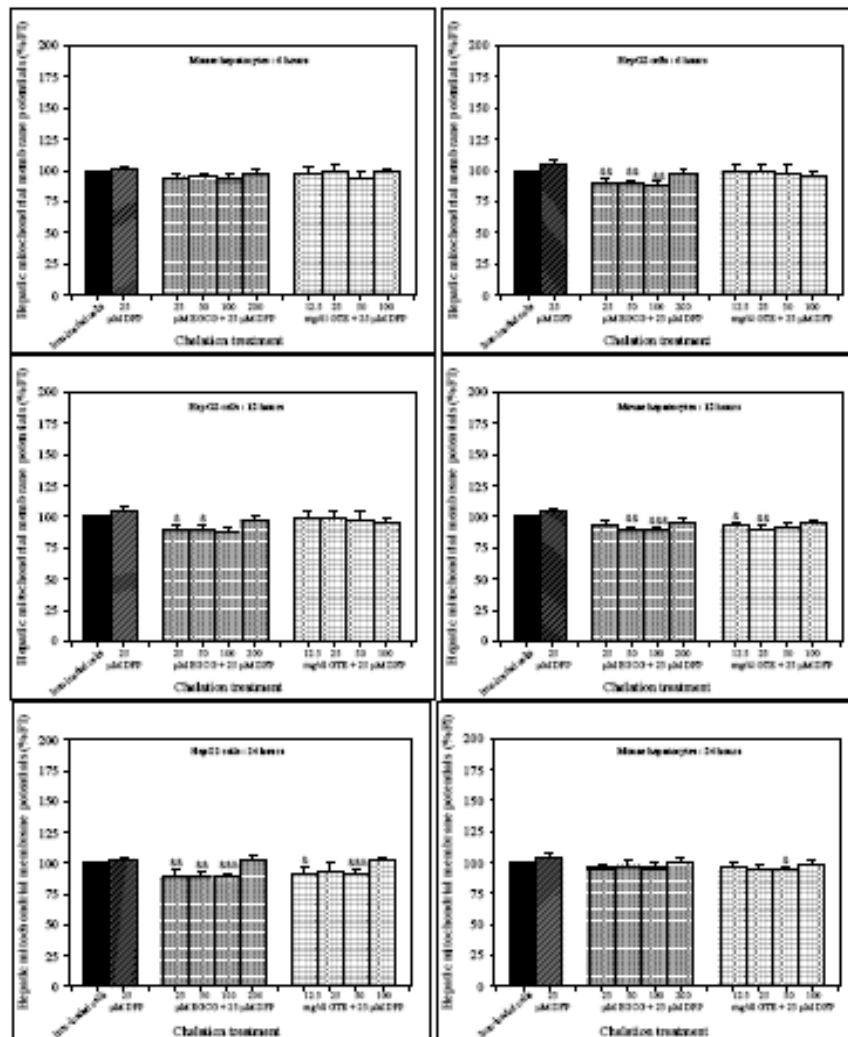


Figure 6 Levels of mitochondrial membrane potentials ($m\Psi$) in iron-loaded hepatocyte cultures treated with GTE and EGCG together with 25 μ M DFP for 6, 12 and 24 hours. Data were obtained from three independent triplicate experiments and shown as mean $\pm$ SD. ^a p <0.05, ^{AB} p <0.01, ^{AAA} p <0.001 when compared to treatment with 25 μ M DFP alone.



Conference Abstract 1

First International Conference On Metal Chelation in Biology & Medicine



**UNIVERSITY OF
BATH** Bath, United Kingdom. December 11-14, 2009.



Conference Organisers:

Chairman of the Conference
Prof Robert Evans , Brunel University, UK
Email: robertevans49@yahoo.co.uk
President of the Local Organising Committee
Dr Charareh Pourzand, University of Bath, UK
Email: prscap@bath.ac.uk

MAIN TOPICS

Cellular Metal Trafficking
Metal-related Oxidative stress and Disorders,
Metal Chelation Therapy of Diseases
Proteins of Metal Homeostasis
Heme, Heme-oxygenase
Iron, Immunity and inflammation
Iron, Cancer, Neurodegenerative and Iron-overload
disease
Chelator Design, Chemistry & Pharmacology

CALL FOR ABSTRACTS

MINISYMPOSIA TOPICS

Skin, Iron, Oxidative Stress
Photodynamic Therapy of Cancer

Abstract submission Deadline: 14th September 2009
Abstracts should be submitted electronically to prscap@bath.ac.uk
Early Registration Deadline: 28th September 2009
Final Accommodation Deadline: 30th October 2009

Preliminary Programme:
Friday 11th December 2009: Early Evening- Registration;
Late evening - Welcome 'Civic' Reception by the Chair of Bath and North-East Somerset Council
Saturday 12th December 2009: Scientific & Poster Sessions
Sunday 13th December 2009: Scientific Sessions and Social Programme
Monday 14th December 2009: Morning - Free Time and Social Programme
Afternoon - Scientific Sessions & Closing

Contact Information: Dr Charareh Pourzand ,Department of Pharmacy & Pharmacology,
University of Bath, Claverton Down, Bath BA2 7AY;
Phone: +44 1225 383 590; Fax: +44 386 114 ; Email: prscap@bath.ac.uk

Green tea extract and epigallocatechin 3-gallate reduced labile iron pool and protected oxidative stress in iron-loaded HepG2 cells

¹Kulprachakarn Kanokwan, ¹Thaokaen Yuwasara, ²Fuchaeron Suthat & ¹Srichairatanakool Somdet

¹*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai Thailand*

²*Thalassemia Research Center, Institute of Research and Development in Science and Technology, Mahidol University Salaya Campus, Nakornprathom Thailand*

E-mail: ssrichai@med.cmu.ac.th

Abstract

Green tea (GT) contains polyphenolic catechins, which epigallocatechin 3-gallate (EGCG) is the major active ingredients. Their free-radical scavenging and iron-chelating activities can protect human beings from many pathogeneses such as cancer, hypertension, diabetes and aging. β -thalassemia patients suffer from secondary iron overload caused by regular transfusions and increase of duodenal iron absorption. Iron is a chemical catalyst of Haber-Weiss and Fenton reactions that contributes reactive oxygen species (ROS) production and oxidative stress. In this study we purposed to investigate effect of GT crude extract and EGCG on oxidative stress and iron overload in cultured HepG2 cells and primary hepatocytes. Levels of labile iron pool (LIP) in the treated hepatocytes were measured with calcein fluorescence technique. Toxicity of the green tea product to the treated cells was determined using MTT assay. Apparently, the crude extract and EGCG reduced the LIP concentration in concentration-dependent manner and showed lower cytotoxicity than used standard iron chelators, desferrioxamine and deferiprone.

Keywords: Green tea, catechin, β -thalassemia, oxidative stress, iron

5. ความเห็นและข้อเสนอแนะ

ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามแผนที่วางไว้จนได้ผลลัพธ์และผลผลิตเกิดขึ้นจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ แม้ว่าบางครั้งอาจต้องพบอุปสรรคและปัญหาสำคัญบางประการ แต่ก็ได้ปรึกษาหารือกับนักวิจัยพี่เลี้ยงจนสามารถดำเนินการวิจัยมาจนเสร็จสิ้น อย่างไรก็ตามผู้วิจัยมีความมุ่งมั่นและจุดประสงค์ที่จะทำการศึกษาวิจัยต่อยอดจากงานวิจัยนี้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์และแก้ไขปัญหาด้านสุขภาพของผู้ป่วยธาลัสซีเมียต่อไป



ลงนาม

(รศ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

6. แผนการดำเนินงานที่วางไว้

กิจกรรม	ปี 2550							ปี 2551							ปี 2552														ปี 2553																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	มี	กค	สค	กย	ตค	พย	ธค	มค	กพ	มี	เม	พค	คค	เม	มิ	กค	สค	กย	ตค	พย	ธค	มค	กพ	มี	เม	พค	คค	เม	มิ	กค	สค	กย	ตค	พย	ธค	มค	กพ	มี	เม	พค																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
1.เตรียมสารสกัด พยาบและ EGCG จากชาเขียว	/	/	/																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

[illegible]