



รายงานฉบับสมบูรณ์

(รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2550 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2553)

โครงการ: ศักยภาพของสารเคเตชินจากชาเขียวที่ช่วยลดปริมาณสารประกอบธาตุเหล็กที่ติดอกซ์
ในเซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหลอดทดลองและสิ่งมีชีวิต

นายสมเดช ศรีชัยรัตนกุล

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

(สถาบันของหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(งานวิจัยยังไม่เสร็จสมบูรณ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง)

600251277

246859

เอกสารปกปิด ห้ามเผยแพร่ก่อนได้รับอนุญาต

เอกสารแนบหมายเลข 4



ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



รายงานฉบับสมบูรณ์

(รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2550 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2553)

โครงการ: ศักยภาพของสารอะเตซินจากชาเขียวที่ช่วยลดปริมาณสารประกอบธาตุเหล็กกรดออกซ์
ในเซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหลอดทดลองและสิ่งมีชีวิต

นายสมเดช ศรีชัยรัตนกุล

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน) (สถาบันของหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(งานวิจัยยังไม่เสร็จสมบูรณ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง)

สัญญาเลขที่ RMU5080074

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

(รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2550 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2553)

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) ศักยภาพของสาร catechins จากชาเขียวที่ช่วยลดปริมาณสารประกอบธาตุเหล็กที่
ตกอยู่ในเซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหลอดทดลองและสิ่งมีชีวิต

(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 ฟูเจริญ ศูนย์วิจัยชาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล
มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

ศ.ดร. โกวิท พัฒนปัญญาสัตย์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Acknowledgement (กิตติกรรมประกาศ)

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

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ดำเนินการตรวจสอบและให้การรับรองข้อเสนอจรรยาบรรณการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของหน่วยสัตว์ทดลองของคณะแพทยศาสตร์ทุกท่านที่ช่วยดูแลและให้ความอนุเคราะห์สถานที่เลี้ยงหนูทดลองช่วงระหว่างการศึกษาทดลอง ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือและวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งนางสาวสินีนานู สันติธรากุล นักวิจัยของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เอื้ออำนวยความสะดวกและสอนวิธีการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูงหลายอย่างในศูนย์เครื่องมือฯ ทำให้ได้ข้อมูลวิเคราะห์ที่มีคุณค่า

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

สุดท้ายนี้กระผมขอขอบคุณนักวิจัยอาวุโสและผู้ทรงคุณวุฒิที่มีชื่อเสียงหลายท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ รวมทั้งผู้ช่วยวิจัยและนักศึกษาระดับปริญญาโท-เอก สังกัด Iron Lab ผู้ซึ่งมีส่วนร่วมอย่างมากและแท้จริงในงานวิจัยที่มีคุณค่าและมีประโยชน์อันนี้เป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณเป็นอย่างสูง



รศ

.ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล

บทคัดย่อ

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

246859

ความรู้พื้นฐาน: ภาวะเหล็กเกินแบบทุติยภูมิพบได้บ่อยครั้งในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีตาที่ได้รับการเติมเลือดเป็นประจำและแสดงให้เห็นธาตุเหล็กรูปที่เป็นพิษคือ NTBI ในพลาสมา การทำลายเซลล์และไมโทคอนเดรียสามารถเกิดขึ้นได้จากธาตุเหล็กรูป LIP ในเซลล์ที่เป็นตัวเร่งการสร้างกลุ่มสาร ROS เซลล์ตับของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีระดับสาร LIP และ ROS สูงกว่าเซลล์ตับคนปกติ ผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกินได้รับการรักษาด้วยยาขับเหล็กเดสเฟอโรกซามีน ดีเฟอริโพรนและดีเฟอราซิรอกเพื่อกำจัดเหล็กส่วนเกินออกจากร่างกายพร้อมด้วยสารแอนติออกซิแดนซ์เช่นวิตามินอีเพื่อลดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในร่างกาย ขามีผลดีต่อสุขภาพหลายอย่าง สารอะเทชินจำพวก EGC, EC, C, EGCG และ ECG พบเป็นส่วนประกอบหลักในสารสกัดชาเขียว ที่สำคัญคือสารสกัดชาเขียวและสาร EGCG มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ยับยั้งการเกิดโรคมะเร็ง กำจัดสารพิษและขับเหล็กในหลอดทดลองและร่างกายสิ่งมีชีวิตได้

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

วิธีทดลอง: ทำการเตรียมและตรวจวัดคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของตัวอย่างสารสกัดชาเขียวและสาร EGCG สำหรับใช้ตลอดการทดลอง เลี้ยงหนูทดลองด้วยอาหารเสริมธาตุเหล็กเฟอโรซีนนาน 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 ผลการข้อมนื้อเยื่อตับด้วยสีพิเศษแสดงให้เห็นว่ามีเม็ดเลือดขาวจำนวนมากเคลื่อนที่มาอยู่ตรงบริเวณเส้นเลือดดำใหญ่และมีการสะสมเหล็กจำนวนมากในเนื้อเยื่อตับของหนูที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก สารสกัดชาเขียวสาร EGCG สามารถลดการสะสมธาตุเหล็กในเนื้อเยื่อตับ ม้ามและหัวใจได้อย่างชัดเจน สารทดสอบทั้งสองนี้ยังช่วยลดระดับ LIP, ROS และค่าศักย์ไฟฟ้าบริเวณเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงที่มีภาวะเหล็กเกินได้อย่างมีนัยสำคัญและขึ้นกับปริมาณสารที่ใช้ด้วย สารทั้งสองนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ primary hepatocyte มากกว่าเซลล์ตับ HepG2 cells และช่วยเพิ่มการมีชีวิตของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยง

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง: สารคะเดซินจากชาเขียวโดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร EGCG สามารถลดความเข้มข้น NTBI ในพลาสมาและการสะสมธาตุเหล็กในตับของหนูทดลองที่มีภาวะเหล็กเกินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ปริมาณเหล็กในร่างกายลดต่ำกว่าเดิม สารคะเดซินน่าจะช่วยป้องกันการสร้าง ROS โดยผ่านทางปฏิกิริยาฮาร์เบอร์ไวส์-เฟนตอนที่ไอออนธาตุเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและทำให้ช่วยบรรเทาการเกิดพยาธิสภาพที่ตับได้ รวมทั้งยังช่วยทำให้กลไกต้านออกซิเดชันดีขึ้นโดยการสร้างกลูตาไธโอนในเซลล์และร่างกายให้มากขึ้น ถ้าฝัศจรรย์คะเดซินและสาร EGCG ในปริมาณสูงๆอาจทำหน้าที่เป็นสารโปรออกซิแดนท์มากกว่าเป็นสารแอนติออกซิแดนท์และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ จึงแนะนำว่าสาร EGCG ควรทำหน้าที่สองอย่างพร้อมกันคือเป็นยาขับเหล็กที่เข้าไปกำจัดเหล็กภายในเซลล์ออกไปได้และเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ช่วยทำลายอนุมูลอิสระที่มีอยู่

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต: การทำงานของสารคะเดซินและอีจิจีจีในชาเขียวอาจสัมพันธ์กับการจับตรึงเหล็กในเซลล์และในร่างกายผู้ป่วยที่มีภาวะเหล็กเกิน ยังคงต้องทำการศึกษาผลของชาเขียวและสารคะเดซินต่อไปเพื่อช่วยให้ภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสในผู้ป่วยธาลัสซีเมียดีขึ้นต่อไป การสร้างสูตรและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชาเขียวเป็นสิ่งจำเป็นในการนำไปใช้ศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีตา

คำหลัก: ชาเขียว คามลลีสไซเนนซิส 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)

246859

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