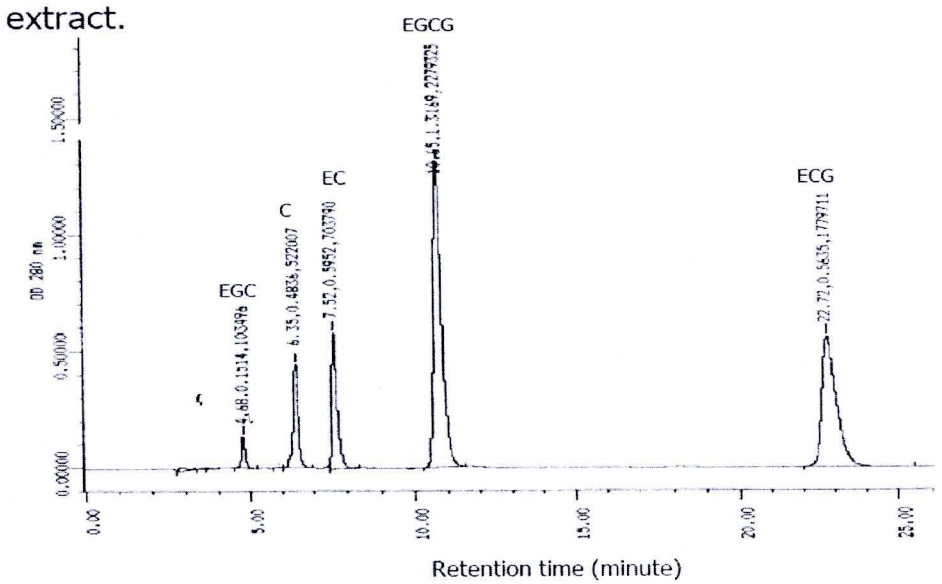
ผลการทดลอง (Results)

สารสกัดหยาบและสารอิพิแกลโลคะเตชินแกเลตจากชาเขียว



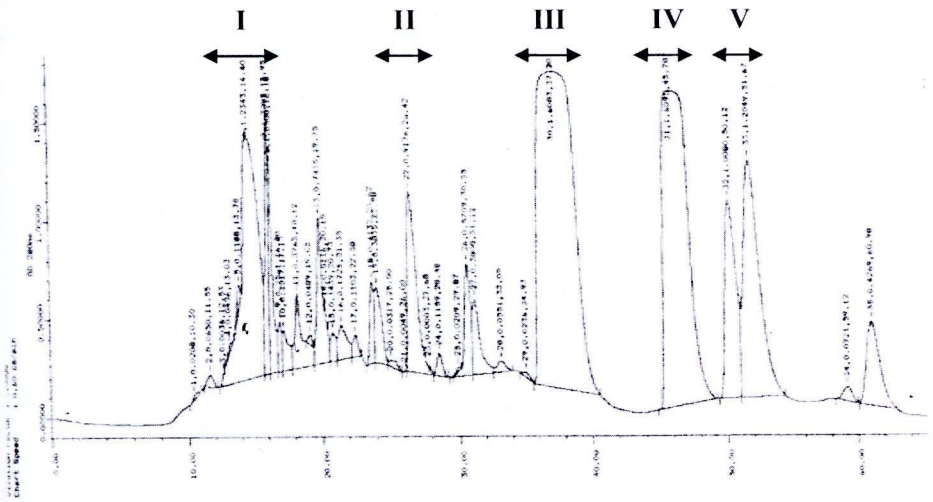
รูปที่ 9 Profile ของสารคะเตชินต่างๆในสารสกัดหยาบชาเขียวที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

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

ตารางที่ 1 ปริมาณสารคะเตชินชนิดต่างๆที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบชาเขียว GTE)

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

ผลการแยกพบว่ามีสารคะเตชินหลัก 5 ชนิดถูกแยกออกมาตามลำดับดังนี้คือ gallic acid (GA) (Fraction I), EC (Fraction II), EGCG (Fraction III), ECG (Fraction IV) และ unidentified compounds (Fraction V) (รูปที่ 10) และพบว่าปริมาณรวมสารคะเตชินมีค่าประมาณ 255±136 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักใบชาแห้ง 1 กรัม ซึ่งก็ถือว่าตัวอย่างใบชาที่นำมาศึกษานี้อุดมไปด้วยสารคะเตชินที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและเป็นแหล่ง EGCG ที่สำคัญ

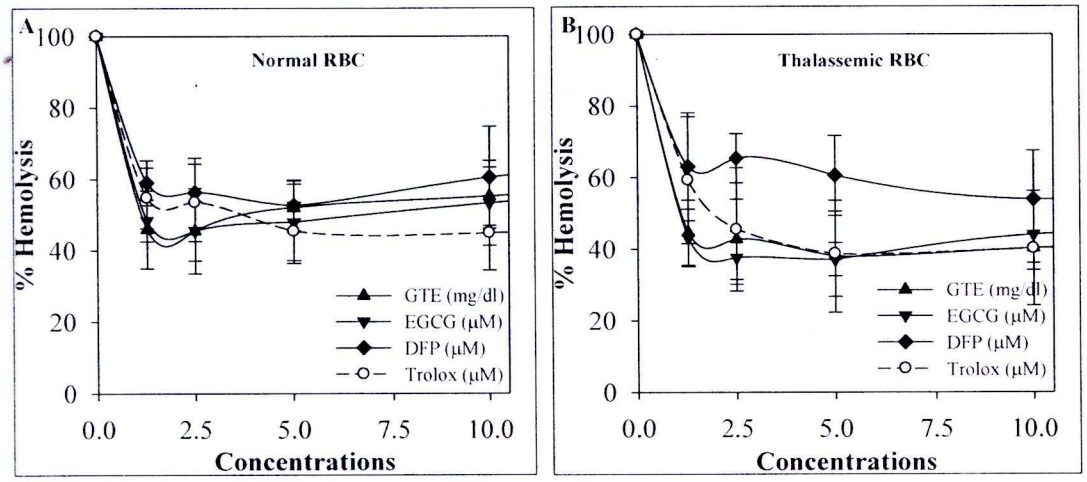


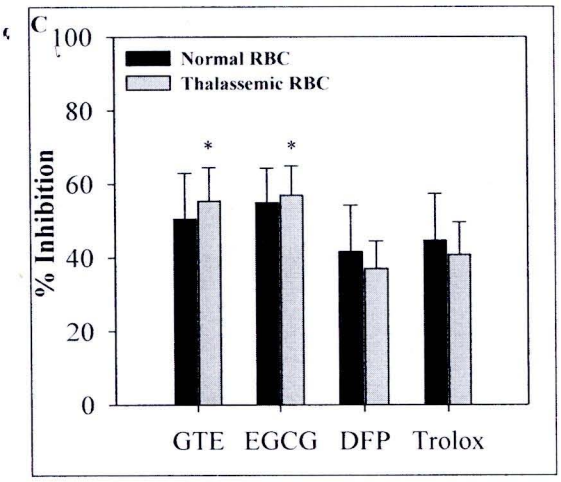
รูปที่ 10 Profile ของสารคะเตชิน GA (Fraction I), EC (Fraction II), EGCG (Fraction III), ECG (Fraction IV) และ unidentified compounds (Fraction V) ที่แยกด้วยวิธี Semi-preparative HPLC

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

การตรวจวัดฤทธิ์ปกป้องการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง

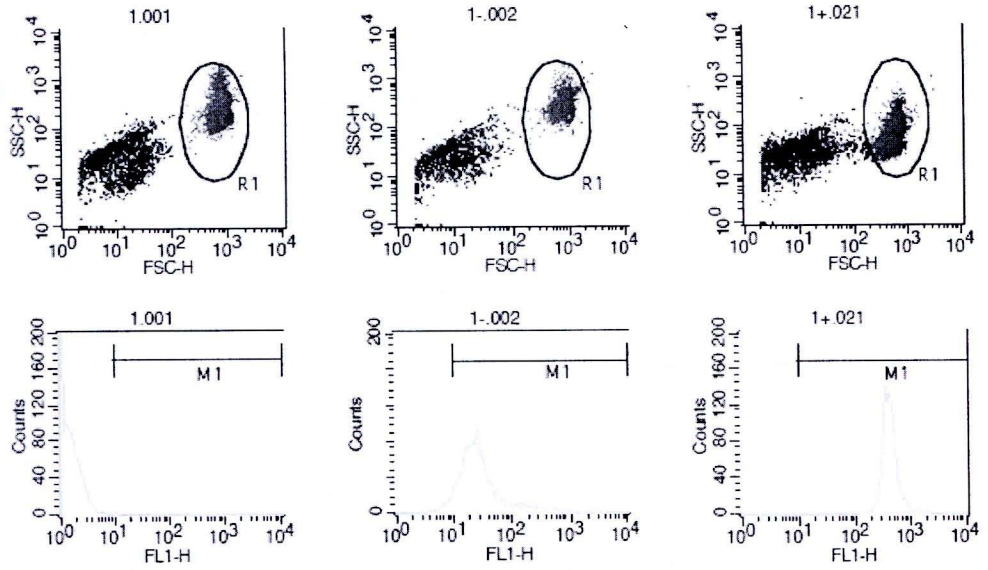
ผลการทดลองในรูปที่ 11 แสดงให้เห็นว่าสาร GTE, EGCG และ trolox มีแนวโน้มยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงของคนปกติและของผู้ป่วยธาลัสซีเมียภายใต้ภาวะออกซิเดทีฟสเตรสที่ถูกกระตุ้นด้วยสารออกซิแดนท์ไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ได้ดีกว่ายา DFP และพบว่าสาร GTE ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 12.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร สาร EGCG และ DFP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





รูปที่ 11 ผลของสาร GTE และ EGCG ช่วยปกป้องการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงจากคนปกติ (A) และจากผู้ป่วยธาลัสซีเมีย (B) และความสามารถยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (C) $p<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน trolox

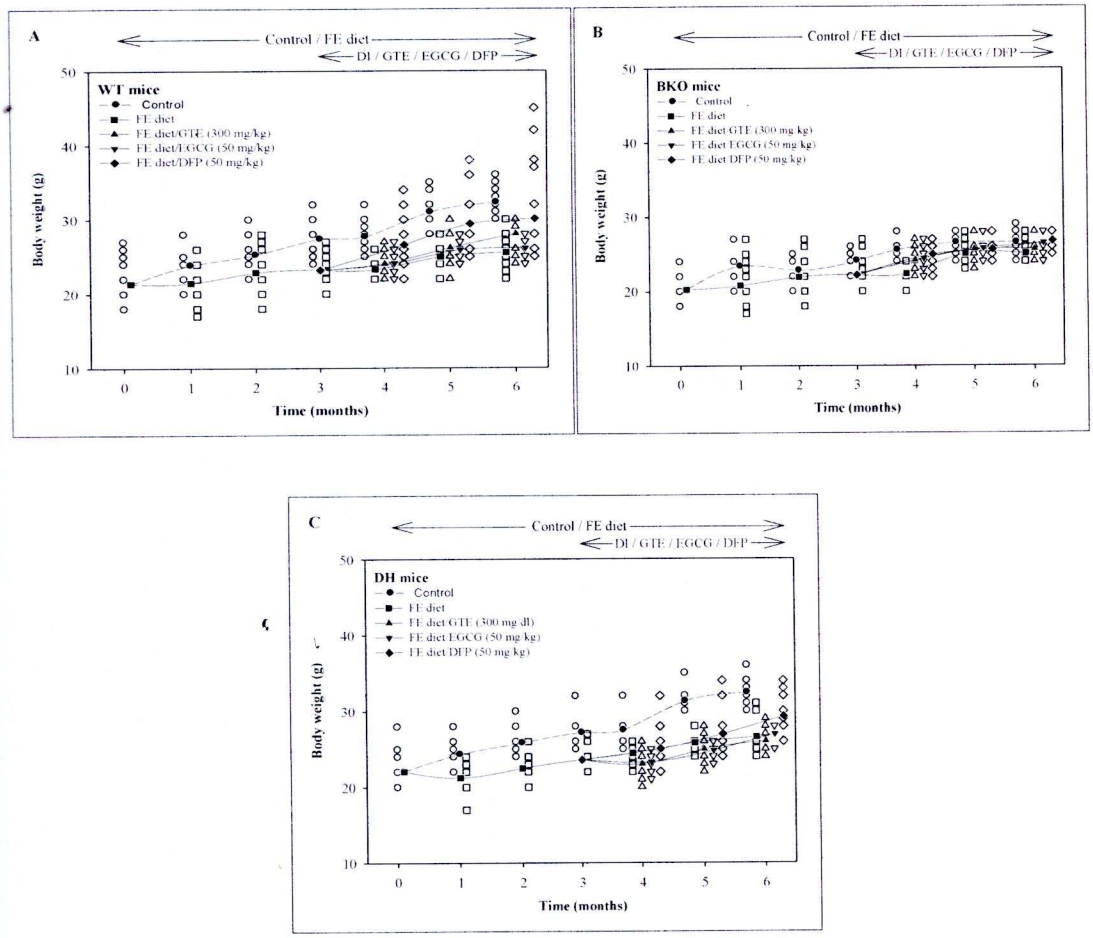
ผลการทดลองในรูปที่ 12 แสดงการเรืองแสงของเม็ดเลือดแดงเองโดยลำพัง (autofluorescent) (รูป 12 ซ้ายมือสุด) ของเม็ดเลือดแดงที่ย้อมด้วยสารเรืองแสง DCFH (รูป 12 กลาง) และของเม็ดเลือดแดงที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสแล้วย้อมด้วยสารเรืองแสง DCFH (รูป 12 ขวามือสุด)



รูปที่ 12 Scattergram (แถวบน) และ histogram (แถวล่าง ของค่าการเรืองแสง (FI) ที่ชี้วัดระดับ 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 หนูกลุ่มที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็กมีน้ำหนักตัวเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าหนูกลุ่มที่กินอาหารสูตรปกติ ผลการรักษาหนู WT, BKO และ DH ที่กินอาหารสูตรปกติและอาหารเสริมธาตุเหล็กด้วยสาร GTE, EGCG และสาร DFP นาน 3 เดือนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว (รูปที่ 13)

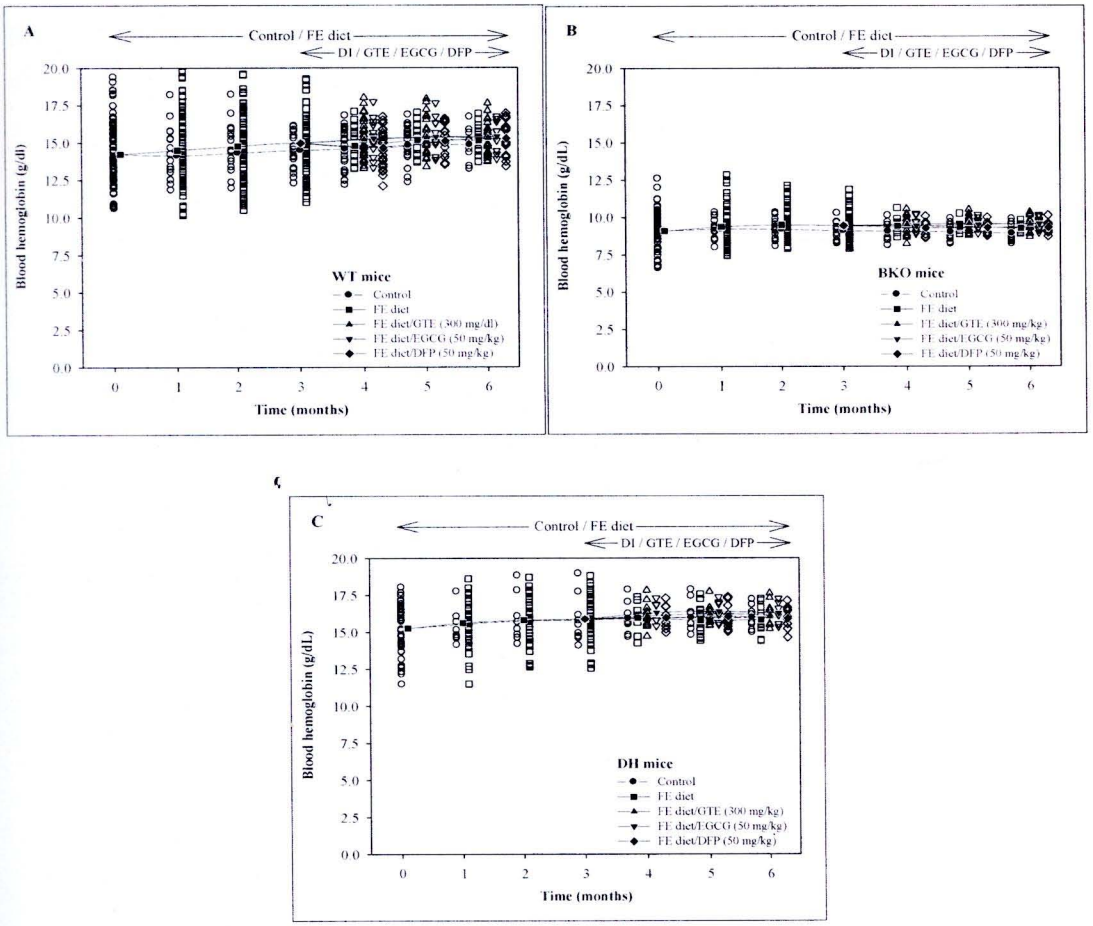


รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูทดลอง WT (n = 24), BKO (n = 14) และ DH (n = 10) ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (NF diet) หรืออาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 6 เดือน โดยได้รับการรักษาด้วยสาร GTE (300 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม), EGCG (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และ DFP (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว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

ผลของสาร GTE และ EGCG ต่อระดับฮีโมโกลบินของหนูทดลอง

หนูทดลอง BKO มีฟีโนไทพ์คล้ายคลึงกับผู้ป่วยธาลัสซีเมียอินเตอร์มีเดียที่มีภาวะโลหิตจางเล็กน้อย (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 เดือนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ

ฮีโมโกลบินในเลือดของหนูเหล่านั้นอย่างชัดเจน รวมทั้งการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP ก็ไม่มีผลต่อระดับฮีโมโกลบินในเลือด (รูปที่ 14)

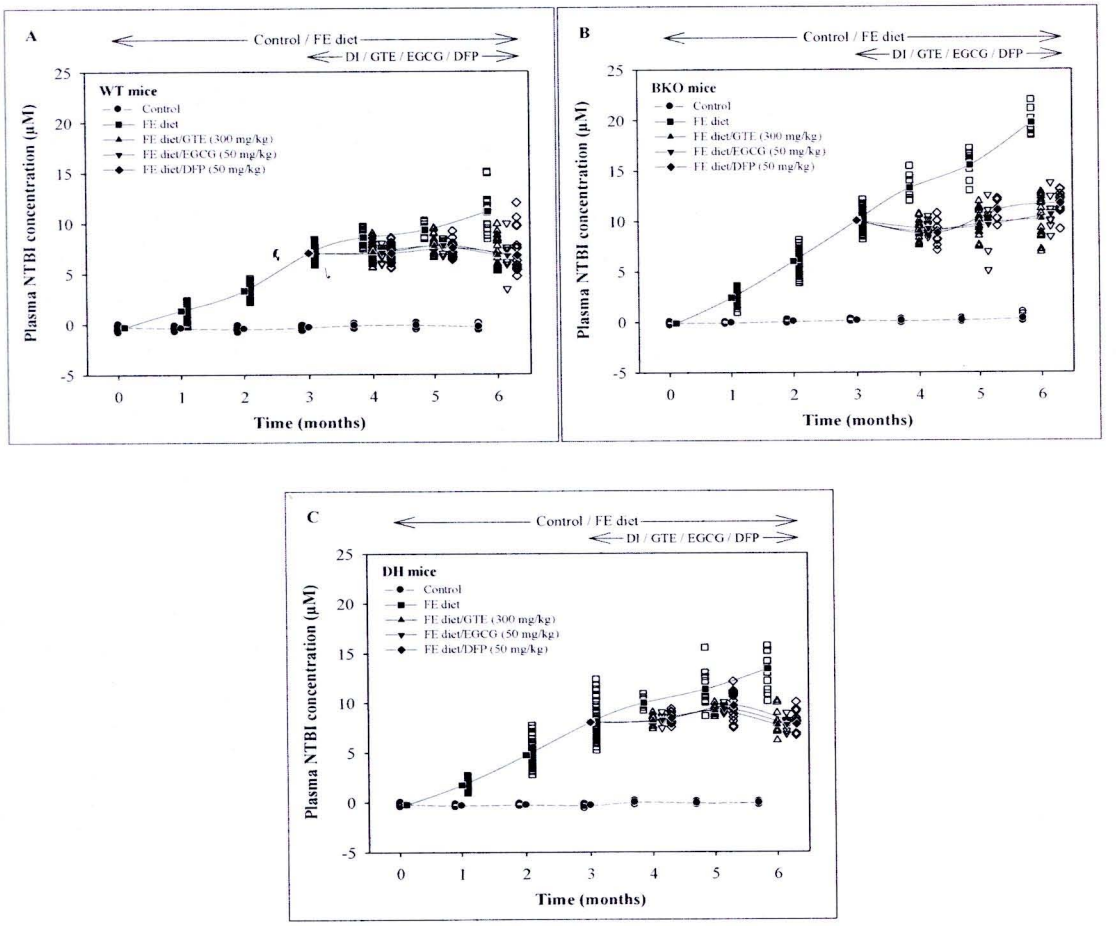


รูปที่ 14 ระดับฮีโมโกลบินในเลือดของหนูทดลอง WT, BKO และ DH ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (NF diet) หรืออาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) นาน 6 เดือน โดยได้รับการรักษาด้วยสาร GTE (300 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม), EGCG (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และ DFP (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) นาน 3 เดือน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

ผลของสารสกัดชาเขียวต่อภาวะธาตุเหล็กในหนูปกติและหนูธาลัสซีเมีย

เมื่อหนูทดลองกินอาหารที่มีธาตุเหล็กผสมในปริมาณสูง (FE diet) ร่างกายก็จะถูกเหนี่ยวนำให้มีการดูดซึมธาตุเหล็กเพิ่มมากขึ้นจากช่องทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้ทรานส์เฟอรินในพลาสมาอิ่มตัวด้วยธาตุเหล็กเพิ่มมากขึ้นจนสามารถตรวจพบธาตุเหล็กรูป 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 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ) 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 มีสัมฤทธิผลดีกว่าสาร 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

เมื่อธาตุเหล็กรูปจับกับทรานส์เฟอริน (transferrin-bound iron, TBI) และรูปไม่จับกับทรานส์เฟอริน (non-transferrin bound iron, NTBI) ถูกนำเข้าไปในเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกายเพิ่มมากขึ้น ก็

พบว่ามีการสะสมธาตุเหล็กเพิ่มมากขึ้นในตับของหนูทดลองทั้งสองชนิดอย่างชัดเจนและมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตับของหนูทดลองที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (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

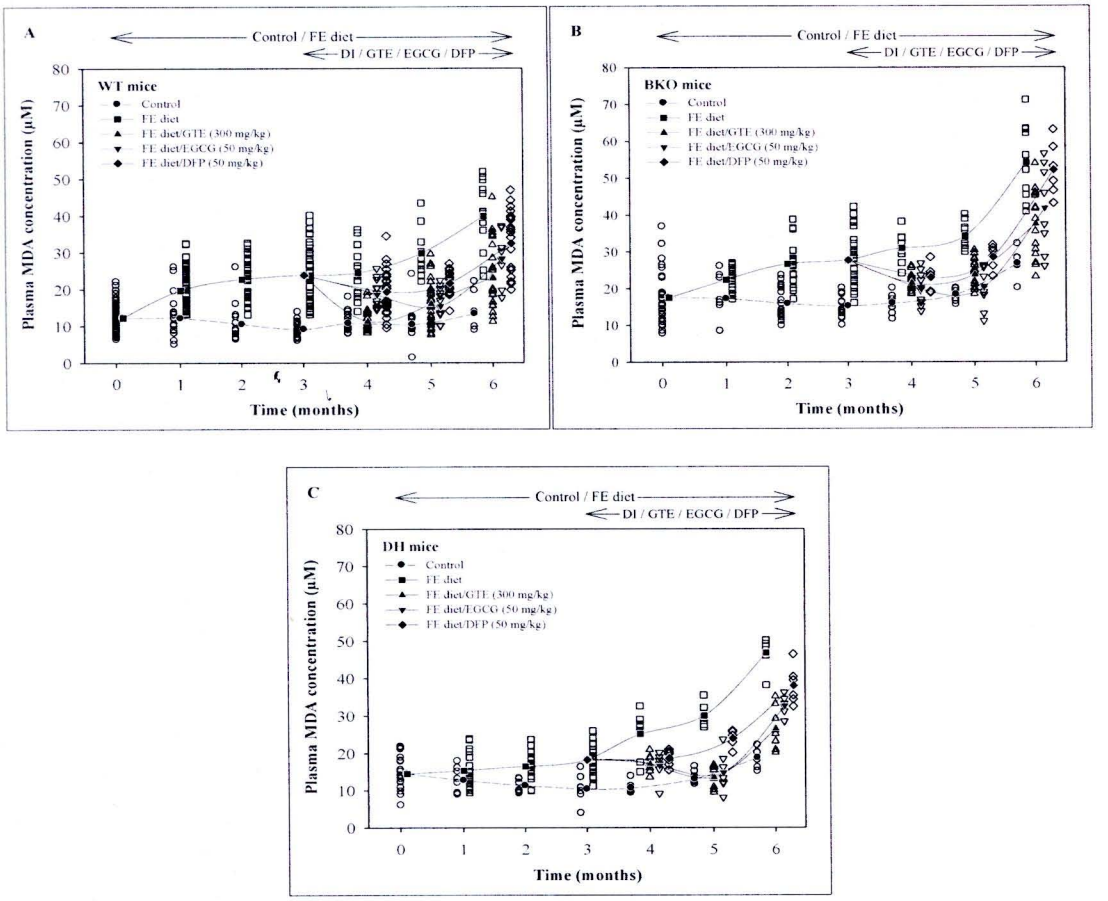
Mice	Diet/Treatment	Liver iron concentrations (LIC)	
		μg Fe/mg protein	ng Fe/ mg dry weight
WT	NF diet	0.504±0.070	9.18±1.15
	FE diet/Placebo	1.713±0.648*	38.31±15.59*
	FE diet/GTE (300 mg/kg)	0.599±0.042#	11.03±0.44#
	FE diet/DFP (50 mg/kg)	0.767±0.111	14.51±14.98
BKO	NF diet	ND	ND
	FE diet/Placebo	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

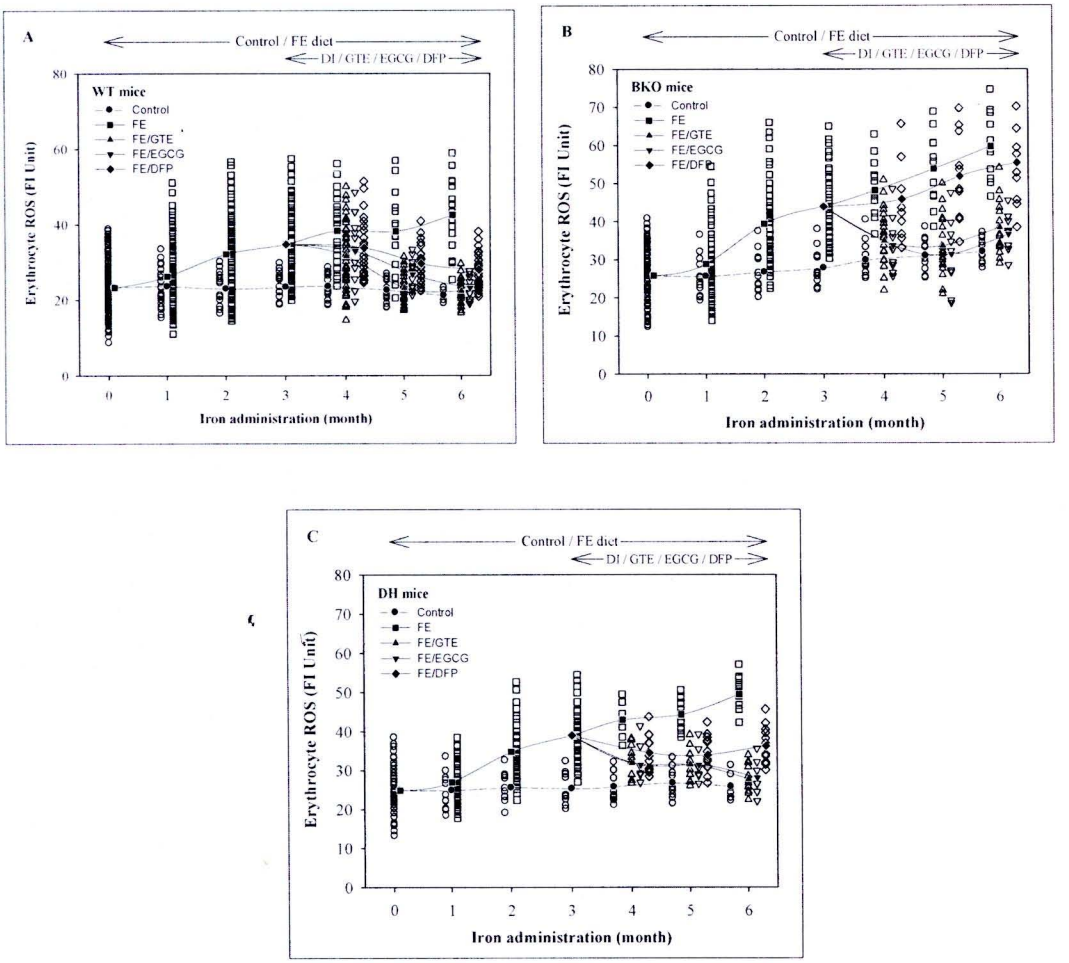
ผลจากการได้รับธาตุเหล็กปริมาณสูงเป็นระยะเวลานานๆทำให้มีการสร้างสารผลิตภัณฑ์จำพวก MDA ซึ่งเป็นผลผลิตตัวหนึ่งของปฏิกิริยาลิปิดเพอรอกซิเดชันเพิ่มมากขึ้นกว่าการได้รับอาหารสูตรปกติ และชี้ให้เห็นถึงการเกิดภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสขึ้นในหนูทดลองทั้งสามชนิด (รูปที่ 16) สาร GTE, EGCG และยา DFP ช่วยลดปริมาณสาร MDA ได้อย่างมีนัยสำคัญ พบว่าสาร GTE และ EGCG มีคุณสมบัติดังกล่าวในหนูทดลอง WT ได้ดีกว่าในหนูทดลอง BKO เป็นที่สังเกตเห็นว่าปริมาณ

สาร MDA ในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นในหนูทดลองทุกกลุ่มช่วงเดือนที่ 6 อาจเป็นเพราะว่าเป็นช่วงทำการรุญฆาตที่ต้องทำการสลบหนูด้วยไออีเธอร์ซึ่งสามารถทำให้หนูทดลองเกิดความเครียดขึ้นมา 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 โดยได้รับการรักษาด้วยสาร GTE (300 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม), EGCG (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) และ DFP (50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) นาน 2 เดือน

ในทำนองเดียวกัน อาหารเสริมธาตุเหล็กทำให้เกิดภาวะเหล็กเกินและทำให้เม็ดเลือดแดงอยู่ในภาวะออกซิเดทีฟสเตรสขึ้นมาได้ 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 เพิ่มมากขึ้นและปริมาณสาร GSH ต่ำกว่าในหนูทดลองเหล่านั้นที่อาหารสูตรปกติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3 และตารางที่ 4 ตามลำดับ) ผลการรักษาหนูทดลองทั้งสามกลุ่มด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP ทำให้ระดับสาร MDA ลดลงและปริมาณสาร GSH เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วย การรักษาหนูทดลองทั้งสามกลุ่มด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP ยังช่วยทำให้ระดับสาร GSH ในพลาสมาเพิ่มสูงมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5) สัมฤทธิผลดังกล่าวอาจเกิดขึ้นจากสารทดสอบทั้งสามชนิดนี้ไปทำให้ภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสที่ตับลดลง ทำให้ตับมีการทำงานดีขึ้นและสามารถสังเคราะห์สาร GSH เพิ่มมากขึ้น

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
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

ผลจากภาวะเหล็กและอนุมูลอิสระมากเกินในร่างกายและในตับของหนูที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก ทำให้ antioxidant mechanism เช่นปริมาณสาร GSH ที่ในเซลล์ตับลดลงอย่างชัดเจน เมื่อหนูทดลองเหล่านี้ได้รับการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP สามารถทำให้เซลล์ตับทำหน้าที่ได้ดีขึ้นและสามารถสร้างสาร 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

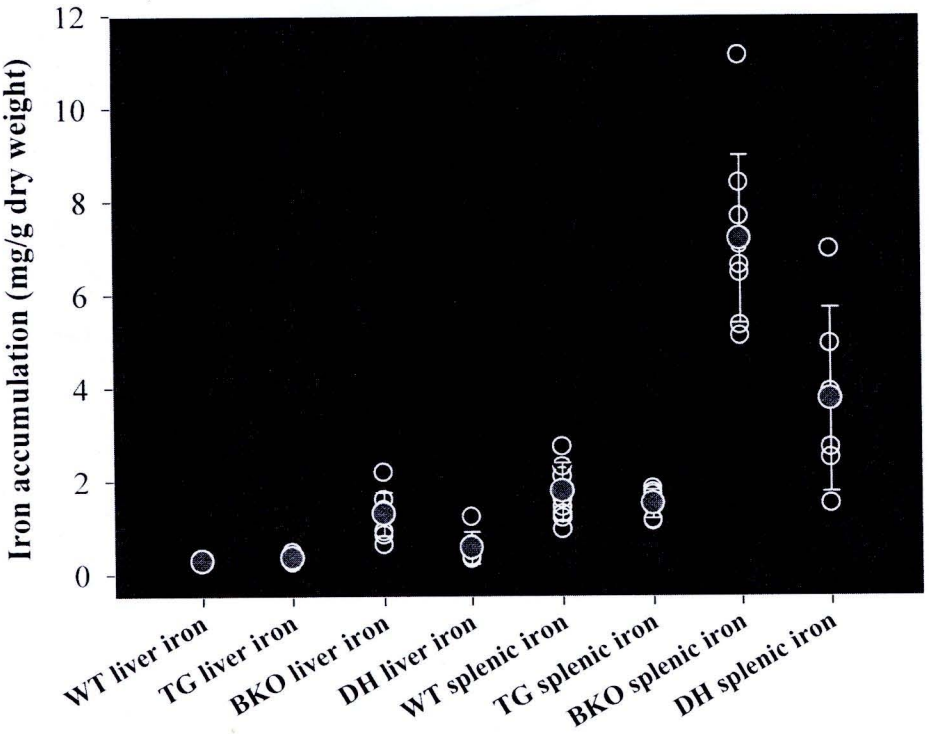
ภาวะเหล็กเกินสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตับสร้างโปรตีนคอลลาเจนเพิ่มมากขึ้นได้ ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดภาวะไฟโบรซิสที่ตับได้ รวมทั้งอาจทำให้เกิดภาวะตับแข็งและมะเร็งตับได้ ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็กมีระดับคอลลาเจนที่ตับเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP ช่วยลดระดับการสร้างคอลลาเจนที่ตับลงได้

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	0.73±0.29	79±18	3.94±0.83	68.3±14.9	3.44±0.81	0.023±0.005
	FE diet	28.75±7.33*	292±64*	14.55±3.12*	43.6±8.1*	2.17±0.41*	0.041±0.004
	FE diet/GTE (300 mg/kg)	15.39±2.25#	179±23#	8.71±0.85#	78.1±7.2#	3.80±0.35#	0.037±0.009
	FE diet/EGCG (50 mg/kg)	14.39±3.03#	201±47#	10.11±2.39#	86.4±14.3#	4.36±0.85#	ND
	FE diet/DFP (50 mg/kg)	16.69±2.99#	254±45#	13.01±2.41#	67.9±8.9#	3.48±0.50#	0.039±0.017
	NF diet	3.85±0.60	268±52	13.3±2.8	44.0±5.6	2.19±0.28	0.023±0.005
	FE diet	44.26±4.47*	451±93*	22.6+4.7*	33.9±3.6*	1.69±0.18*	0.041±0.004
	FE diet/GTE (300 mg/kg)	28.69±6.40#	303±66#	15.2±3.30#	145.5±20.9#	7.30±1.06#	0.037±0.009

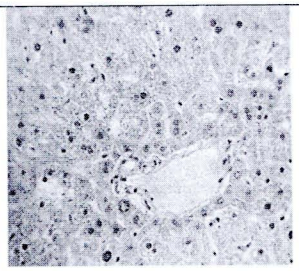
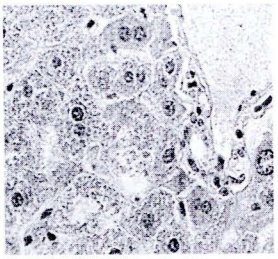
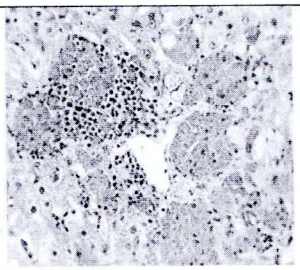
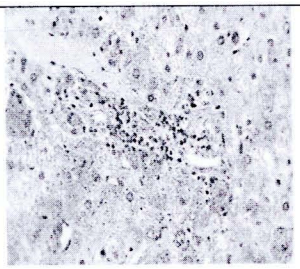
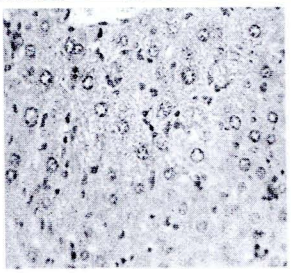
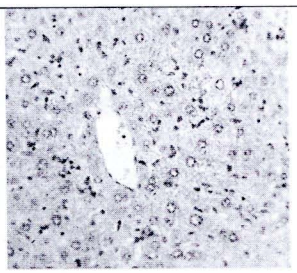
BKO	FE diet/EGCG (50 mg/kg)	27.66±6.35#	315±65#	15.5±3.21#	114.5±20.7#	5.64±1.03#	ND
	FE diet/DFP (50 mg/kg)	28.76±4.69#	393±55#	19.8±2.6#	82.7±15.9#	4.19±0.87#	0.039±0.017
DH	NF diet	1.12±0.11	98±20	5.0±1.0	59.0±5.6	3.01±0.37	0.023±0.005
	FE diet	30.05±4.14*	324±23*	16.4±1.1*	43.8±7.2*	2.22±0.35*	0.041±0.004
	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

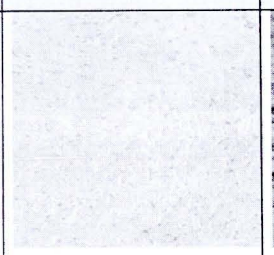
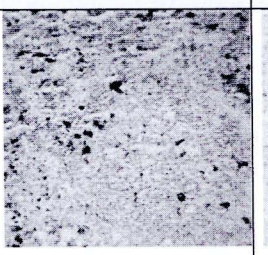
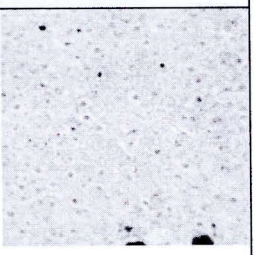
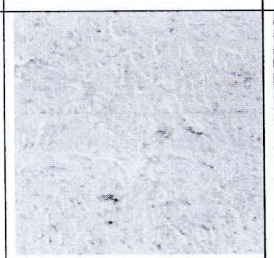
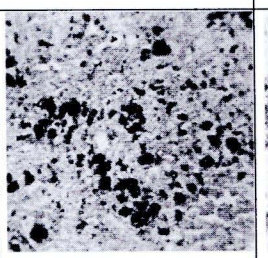
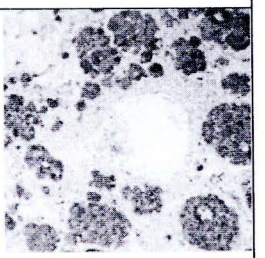
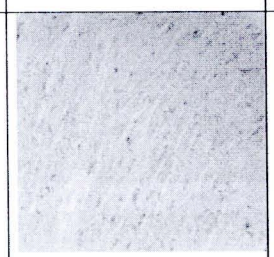
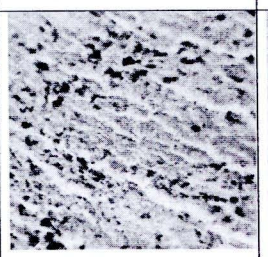
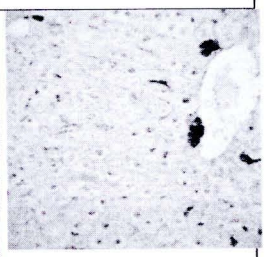
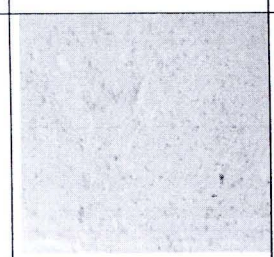
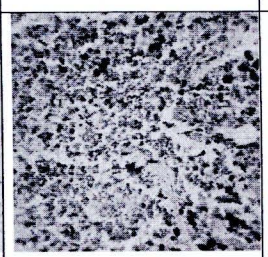
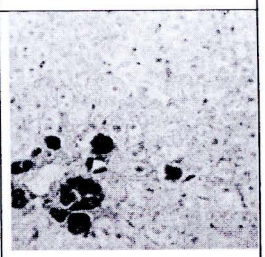
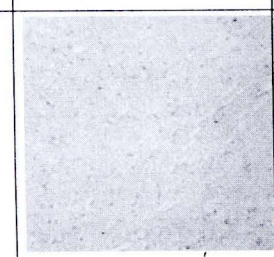
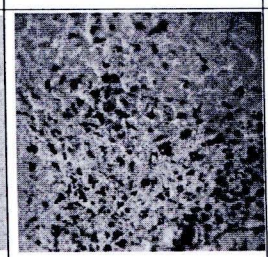
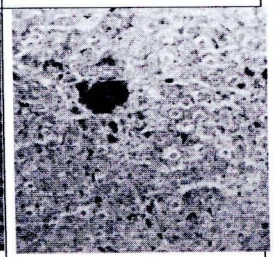
เมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลอง WT, BKO, TG และ DH ด้วยอาหารเสริมธาตุเหล็กนาน 1 เดือน พบว่ามีการสะสมธาตุเหล็กที่ม้ามของหนู BKO มากที่สุดและที่ม้ามของหนู DH รองลงมา รวมทั้งมีการสะสมธาตุเหล็กที่ตับของหนู WT และ DH มากกว่าที่ตับของหนู WT และ TG (รูปที่ 18) ผลการย้อมสี H&E ของเนื้อเยื่อตับของหนู WT และหนูธาลัสซีเมีย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

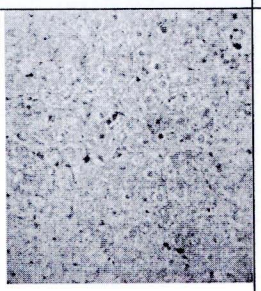
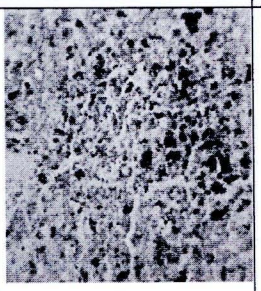
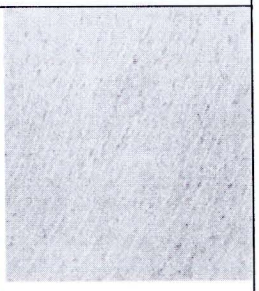
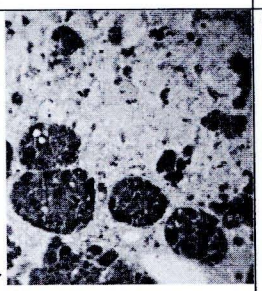
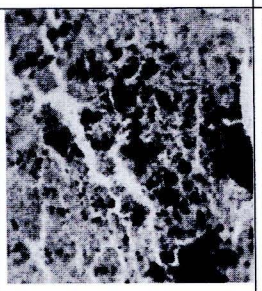
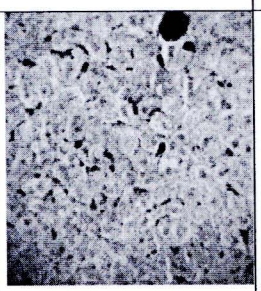
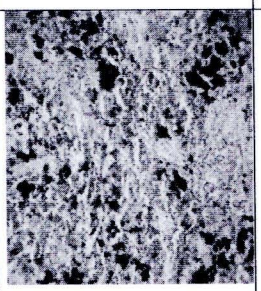
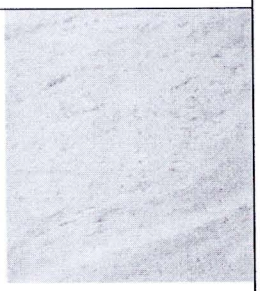
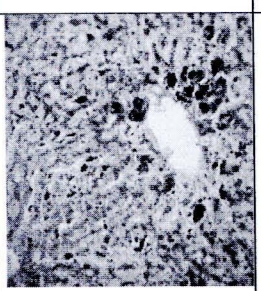
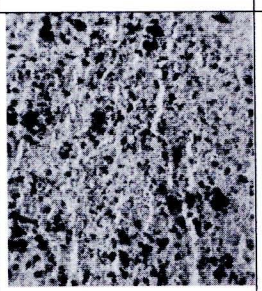
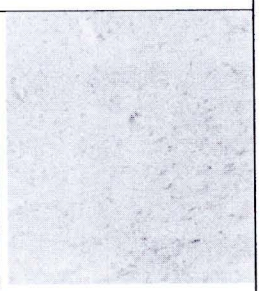
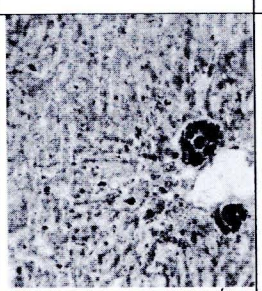
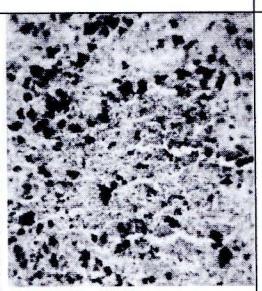
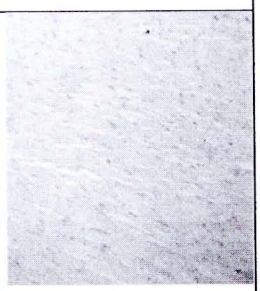
Diet/Treatment	WT mice	BKO mice
NF diet		
FE diet		
FE diet/GTE (300 mg/kg)		
FE diet/DFP (50 mg/kg)	ND	ND

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

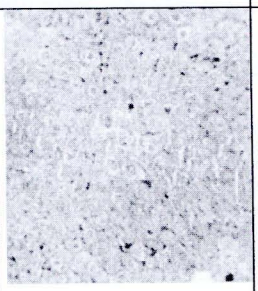
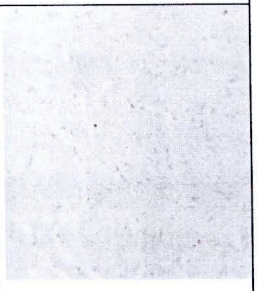
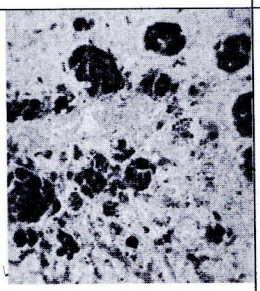
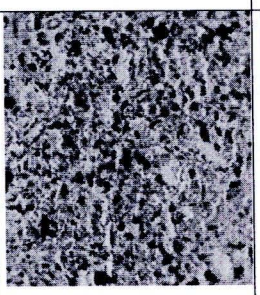
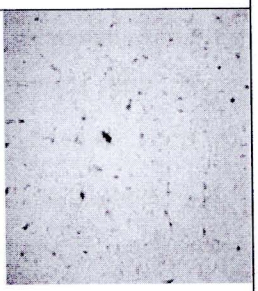
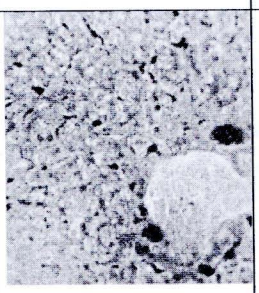
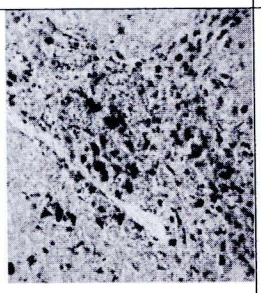
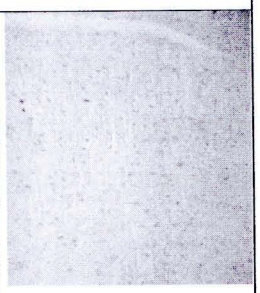
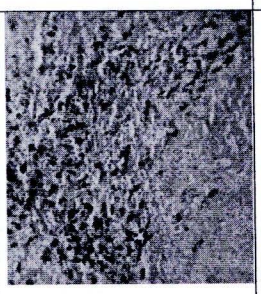
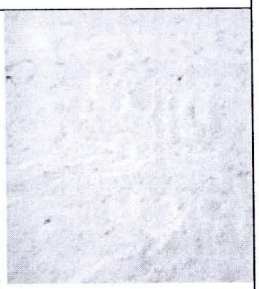
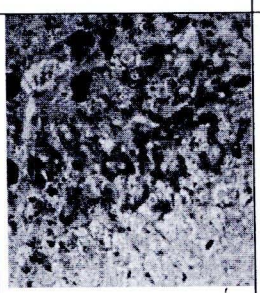
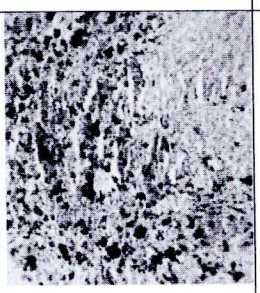
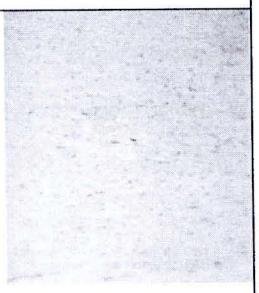
ผลการทดลองในรูปที่ 20 แสดงเนื้อเยื่อตับ ม้ามและหัวใจของหนูทดลอง WT, BKO และ DH ที่ถูกย้อมด้วย Perl's stain เพื่อตรวจดูปริมาณธาตุเหล็กที่สะสมในเนื้อเยื่อเหล่านี้ โดยพบว่าหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมธาตุเหล็ก (WT/FE diet, BKO/FE diet และ DH/FE diet) มีปริมาณการสะสมธาตุเหล็ก (การย้อมติดเป็นตะกอนสีน้ำเงิน)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

รูปที่ 20 Perl's Prussian blue staining จากเนื้อเยื่อตับ ม้ามและหัวใจจาก หนูปกติ (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)			

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

DH 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)			

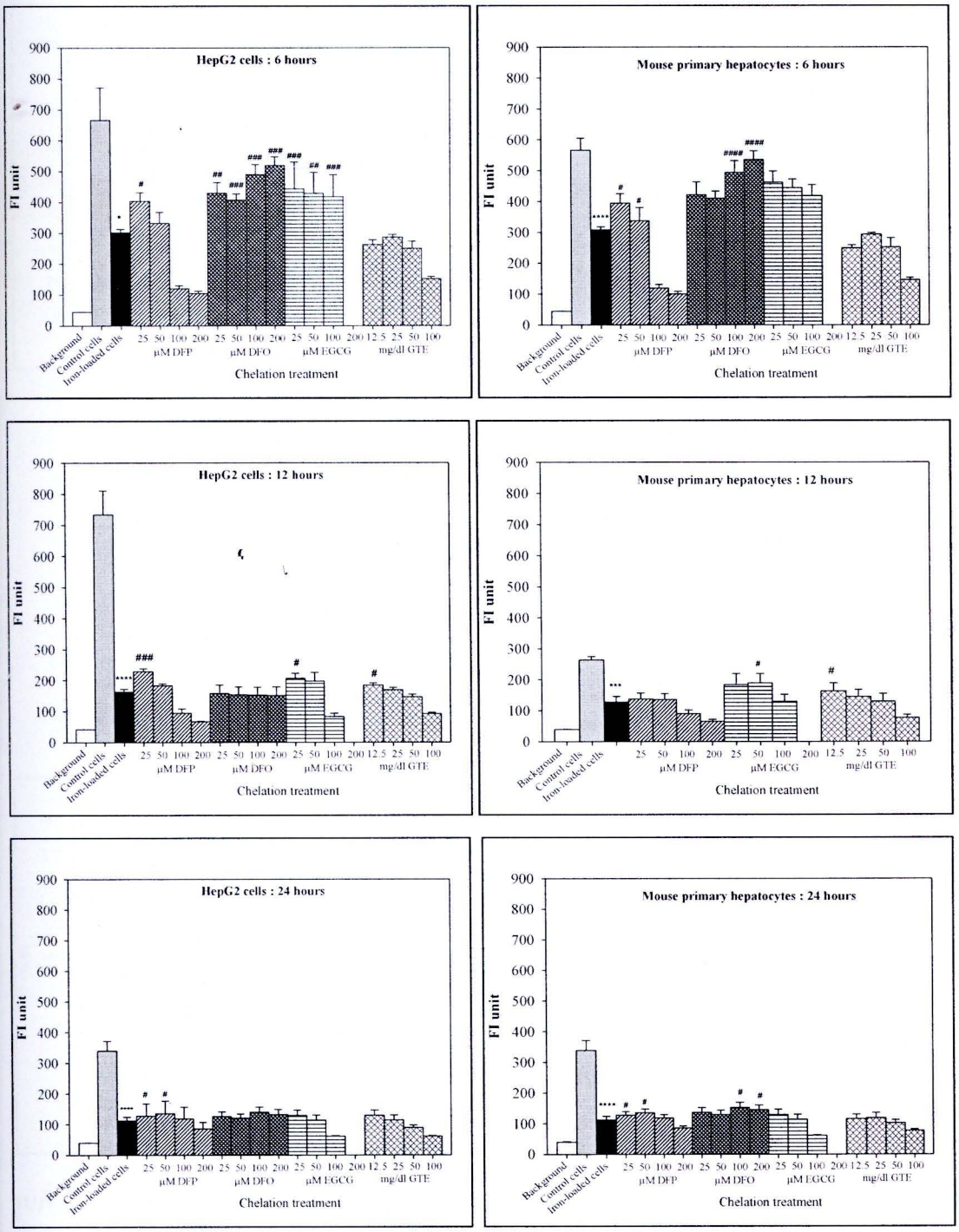
GTE, EGCG และ DFP สามารถลดระดับการสะสมธาตุเหล็กในเนื้อเยื่อม้ามและตับได้อย่างชัดเจน แต่ไม่ค่อยเห็นผลชัดเจนในกล้ามเนื้อหัวใจ

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

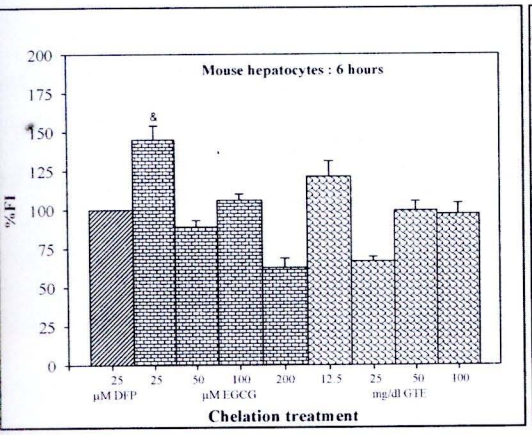
เซลล์ตับนำธาตุเหล็กรูป transferrin-bound iron และรูป NTBI จากแหล่งภายนอกเซลล์ (เช่น พลาสมาและอาหารเลี้ยงเซลล์) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์โดยผ่านวิถีทาง transferrin receptor-dependent mechanism และ transferrin receptor-independent mechanism (เช่น facilitate diffusion) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางเมตาโบลิสซึมหรือเก็บสะสมไว้ในโปรตีนเฟอริติน

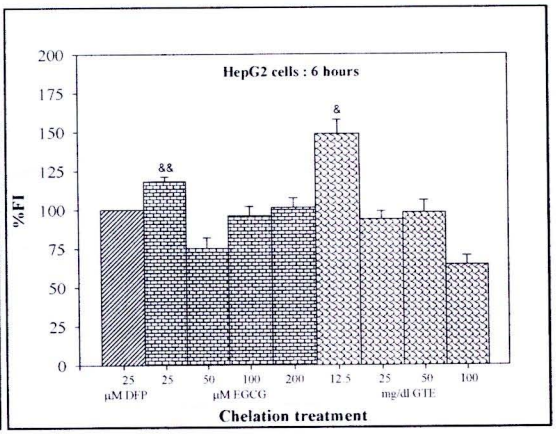
ผลการเติมสารละลาย 1 mM FAC ลงไปในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 cells และ mouse hepatocytes ทำให้ระดับ LIP ในเซลล์ตับเพิ่มสูงขึ้นซึ่งแปรผกผันกับค่า FI ที่วัดได้ โดยพบว่าปริมาณธาตุเหล็กเข้าไปในเซลล์ตับ HepG2 cells เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามเวลา (time dependence) ที่ใช้ incubate กับสารละลาย FAC นาน 6 ชั่วโมง (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 μM), DFO (25-200 μM) และ EGCG (25-200 μM) นาน 6 ชั่วโมงสามารถลดระดับ LIP ในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการ incubate เซลล์ตับกับสารทดสอบนาน 12 และ 24 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการขับเหล็กรูป LIP ออกจากเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับที่เวลา 6 ชั่วโมง

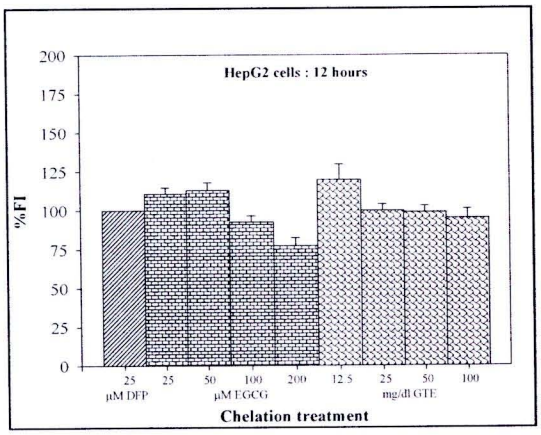
ในทำนองเดียวกัน เซลล์ mouse hepatocytes สามารถนำธาตุเหล็กเข้าไปในเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ incubate กับสารละลาย FAC นาน 6 ชั่วโมง (FI = 59±2), 12 ชั่วโมง (FI = 128±18) และ 24 ชั่วโมง (FI = 112±12) เทียบกับที่ 0 ชั่วโมง (FI = 339±32 unit) (รูปที่ 21 คอลัมน์ขวามือ) การรักษาเซลล์ primary hepatocytes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

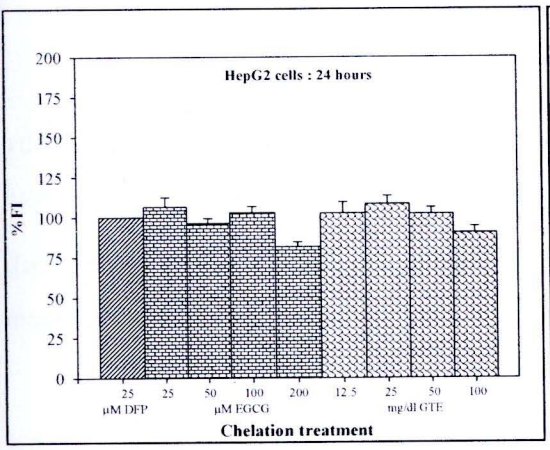


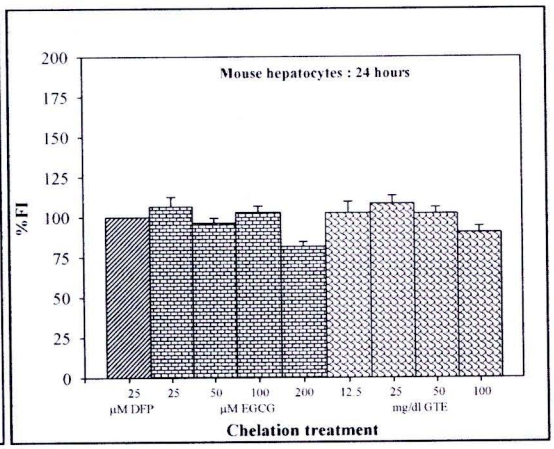
รูปที่ 21 สัมฤทธิผลของสาร GTE, EGCG, DFO และ DFP ต่อระดับ LIP (mean±SEM of five independent experiments) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 และ mouse hepatocytes ที่มีภาวะเหล็กเกิน นาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง $^{****}p<0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control cells; $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$, $^{\#\#\#}p<0.005$,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





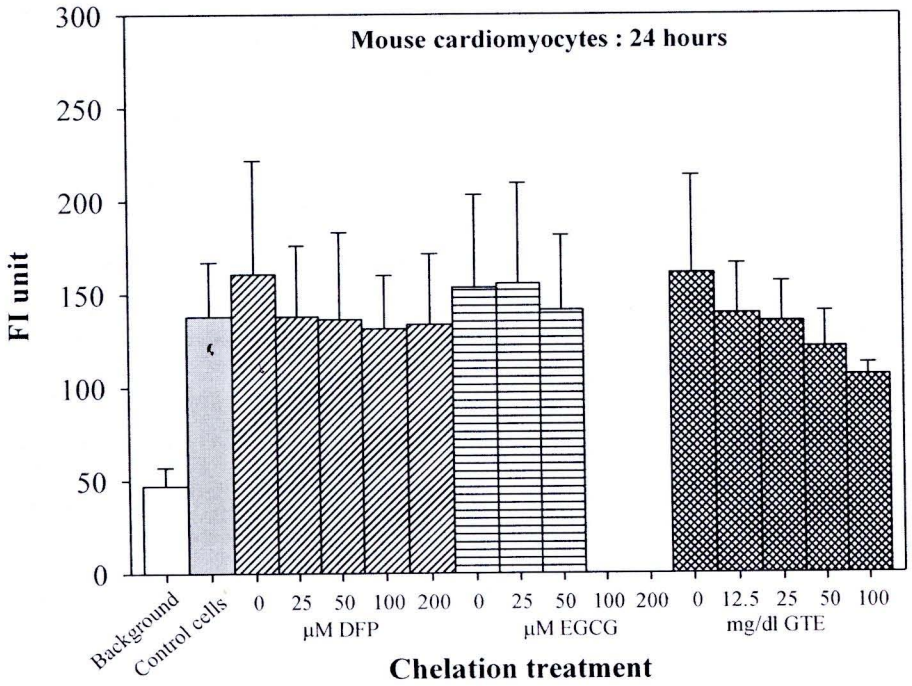






รูปที่ 22 สัมฤทธิผลของสาร GTE และ EGCG ร่วมกับ 25 µM DFP ต่อระดับ LIP (mean±SEM of five independent experiments) ใน เซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 และ mouse hepatocytes ที่มีภาวะเหล็กเกิน นาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง $^{\&}p<0.05$, $^{\&\&}p<0.01$, $^{\&\&\&}p<0.005$, $^{\&\&\&\&}p<0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาด้วย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

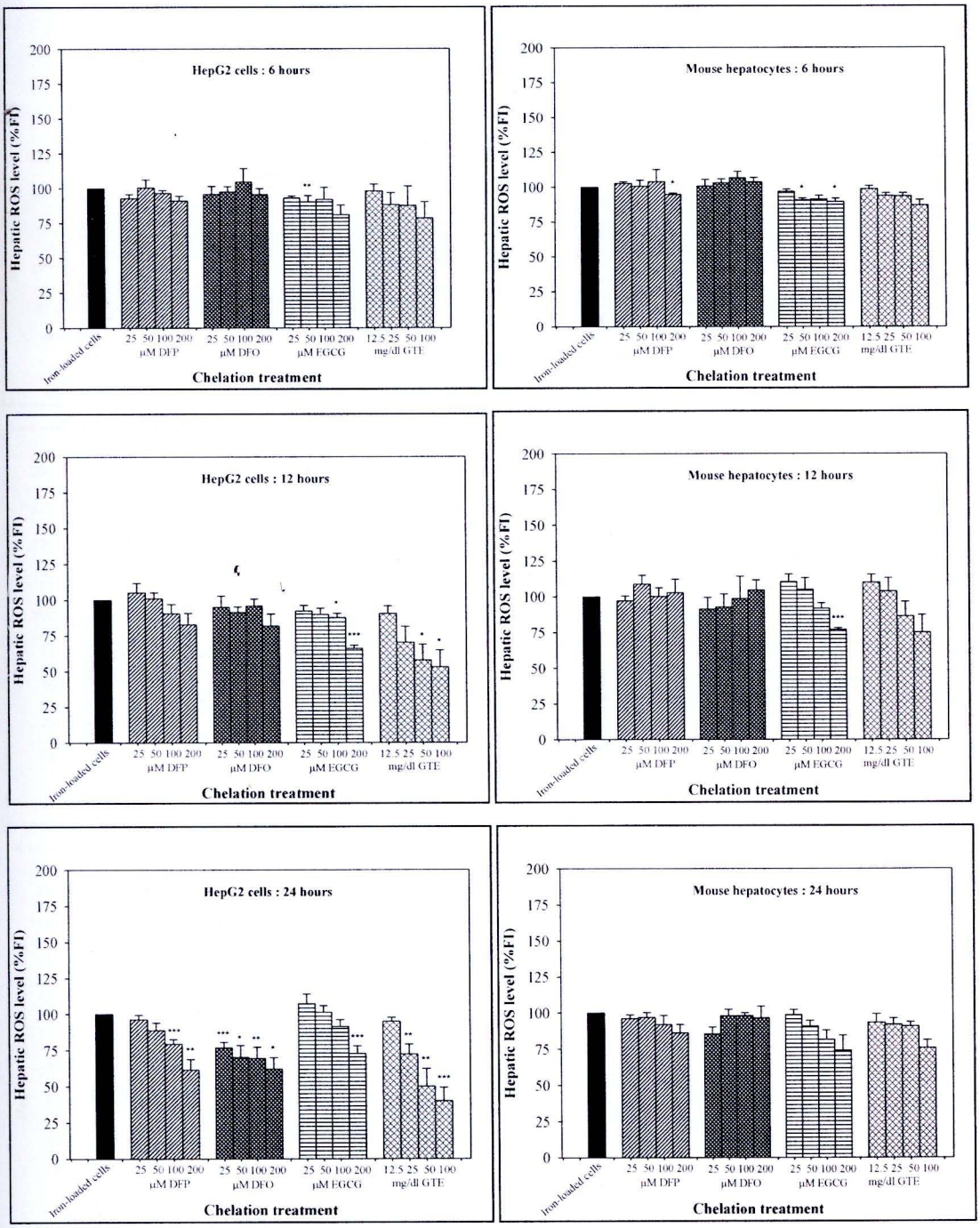
สาร EGCG ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (25 ไมโครโมลาร์) ช่วยเสริมการทำงานของยา DFP (25 ไมโครโมลาร์) ในการลดปริมาณธาตุเหล็กรูป LIP ในเซลล์ตับ ส่วนสาร GTE ยังคงไม่มีผลช่วยยา DFP ในการขับ LIP ในเซลล์ตับ (รูปที่ 22) ยา DFP สาร GTE และ EGCG ไม่มีผลลดระดับ LIP ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่เพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงได้ (รูปที่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



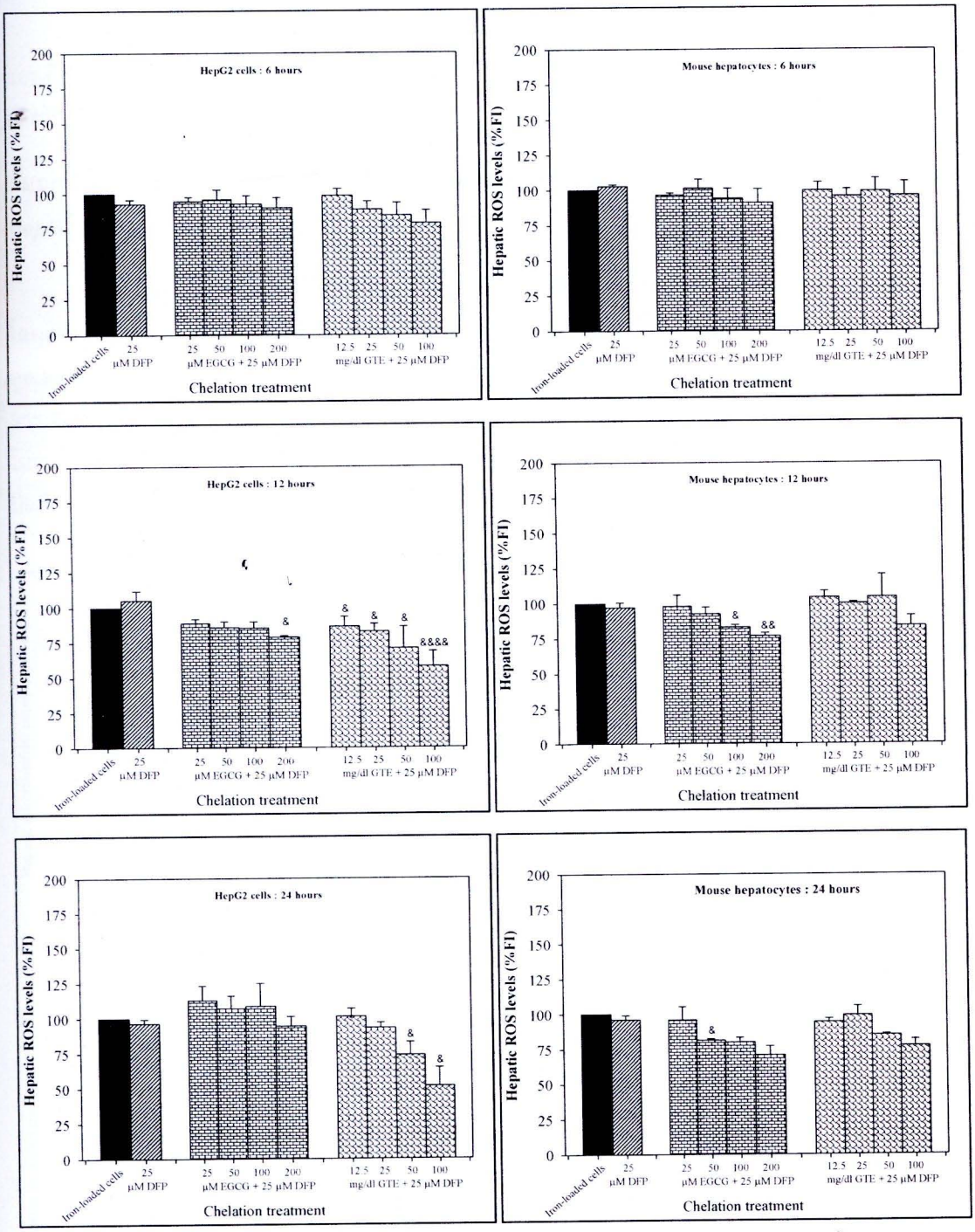
รูปที่ 23 สัมฤทธิผลของสาร GTE, EGCG และ DFP ต่อระดับ LIP (mean±SEM of five independent experiments) ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยงที่มีภาวะเหล็กเกิน นาน 24 ชั่วโมง

สัมฤทธิผลของสาร 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 เป็นเวลา 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

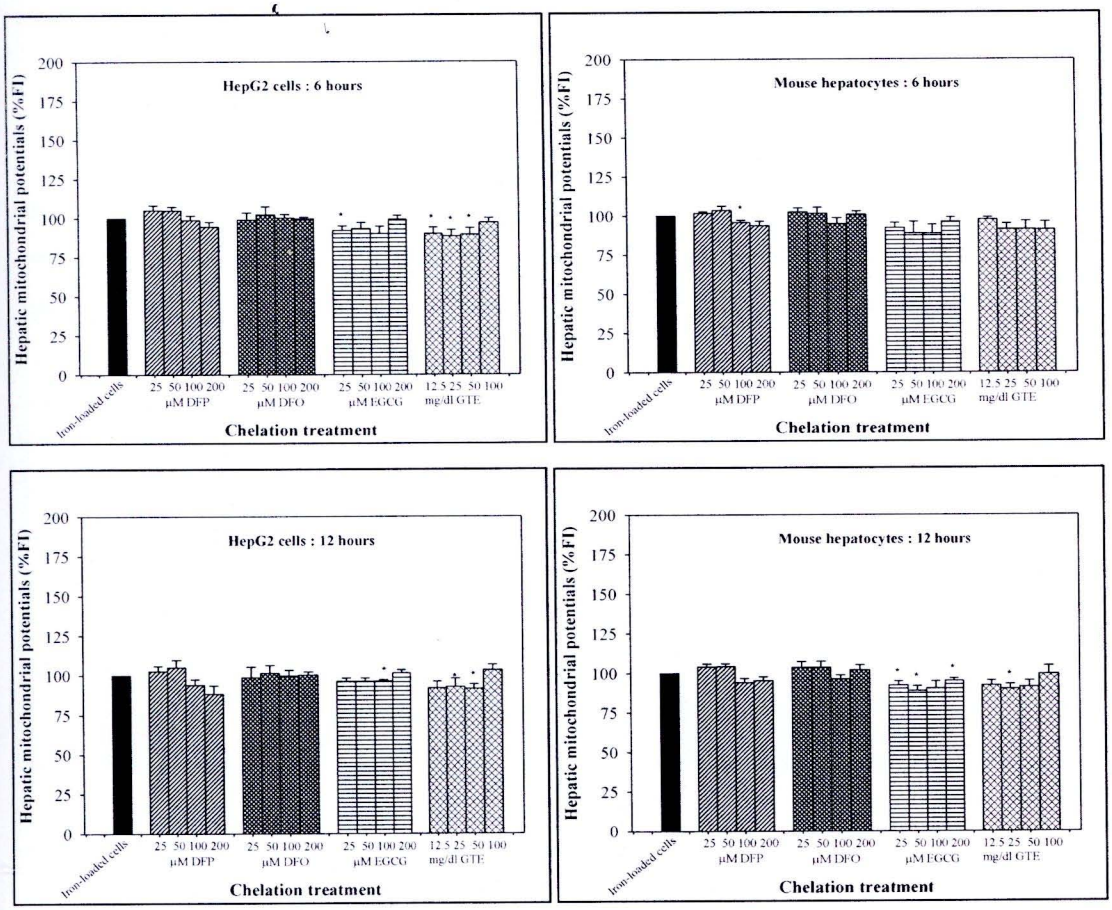


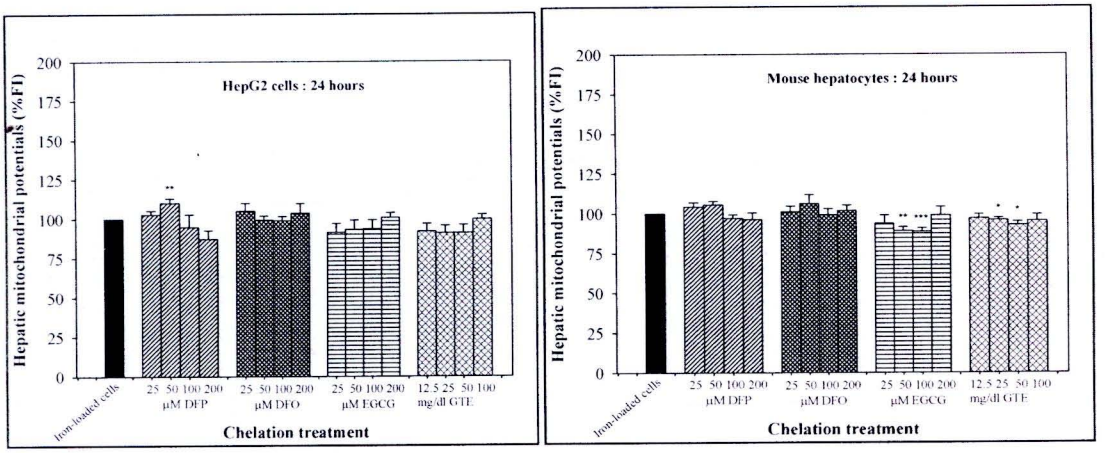
รูปที่ 25 ผลการรักษาด้วยสาร GTE และ EGCG ร่วมกับสาร 25 µM DFP ต่อระดับ total ROS (mean±SEM of five independent experiments) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 และ mouse hepatocytes ที่มีภาวะเหล็กเกิน เป็นเวลานาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง $^{\&}p<0.05$, $^{\&\&}p<0.01$, $^{\&\&\&}p<0.005$, $^{\&\&\&\&}p<0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาด้วยยา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

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 25 สนับสนุนให้เห็นว่าสาร GTE และ EGCG มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ที่สามารถขจัดหรือทำลายอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสาร DFP และ DFO ที่มีตุณสมบัติในการจับและตรึงเหล็ก

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

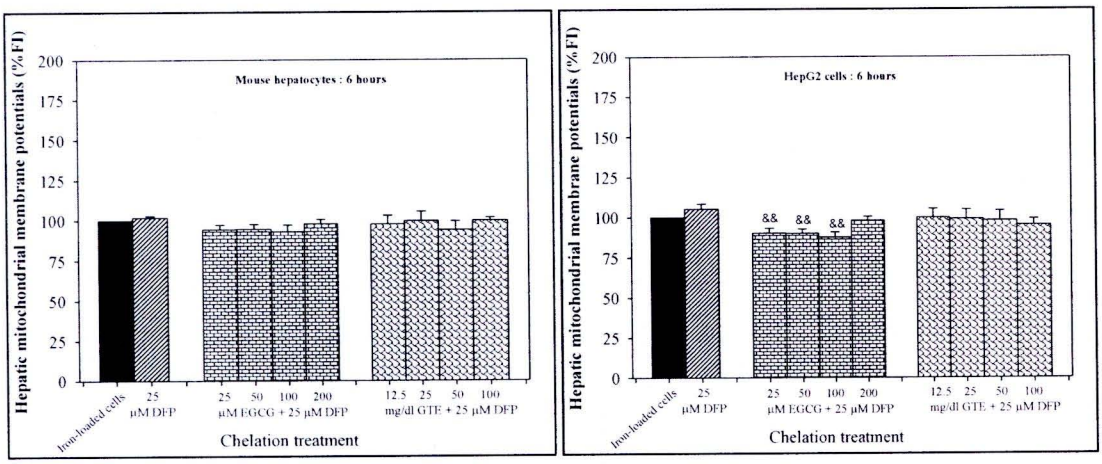
สาร GTE และ EGCG มีศักยภาพดีกว่ายา DFP และ DFO ในการปกป้องการทำลายเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียของเซลล์ตับ HepG2 cells และ mouse hepatocytes จากสารอนุมูลอิสระ ทำให้คงคุณสมบัติการเป็นตัวขวางกั้น (barrier) สารหรือไอออนในการผ่านเข้า-ออกชั้นไมโตรคอนเดรีย การใช้สาร GTE และ EGCG ปริมาณน้อยๆ (เช่น 12.5 และ 25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือ 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) ให้ผลปกป้องเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียดีกว่าการใช้สารในปริมาณสูงๆ (เช่น 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือ 200 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) (รูปที่ 26)

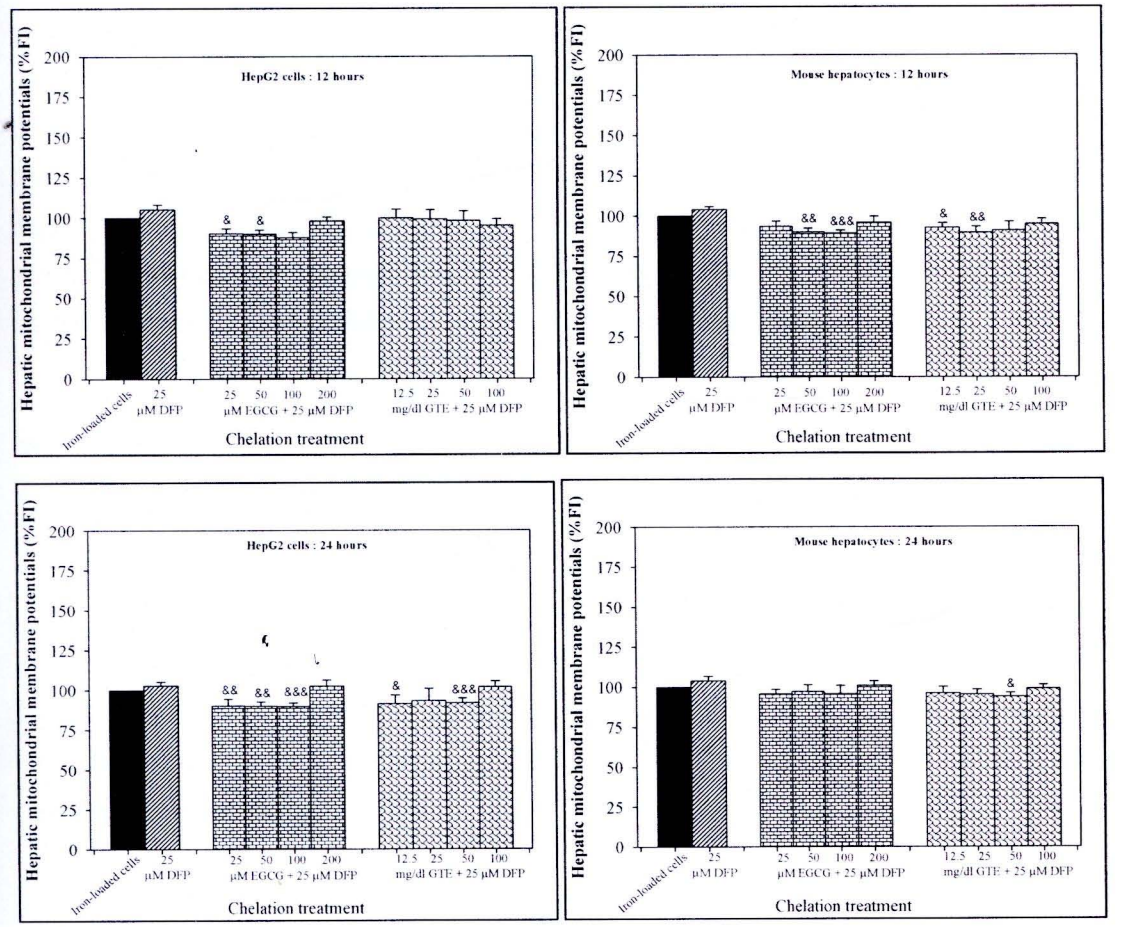




รูปที่ 26 ผลการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG, DFO และ DFP ต่อระดับ mitochondrial membrane potentials (Ψ) (mean±SEM of five independent experiments) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง HepG2 และ mouse hepatocytes ที่มีภาวะเหล็กเกิน เป็นเวลา นาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง $^{****}p<0.001$ เทียบกับ control cells; $^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p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

สาร EGCG (ความเข้มข้น 25-100 ไมโครโมลาร์) มีฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระและช่วยป้องกันเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียของเซลล์ตับทั้งสองชนิดถูกทำลาย ส่วนสาร GTE ไม่ค่อยมีผลช่วยปกป้องเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย (รูปที่ 27) อาจจะเป็นเพราะว่าสาร EGCG มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าสาร catechin ตัวอื่นๆในสารสกัดชาเขียวและสามารถผ่านเข้า-ออกเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียได้ดีกว่าด้วย





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

ผลความเป็นพิษของสาร GTE และ EGCG ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

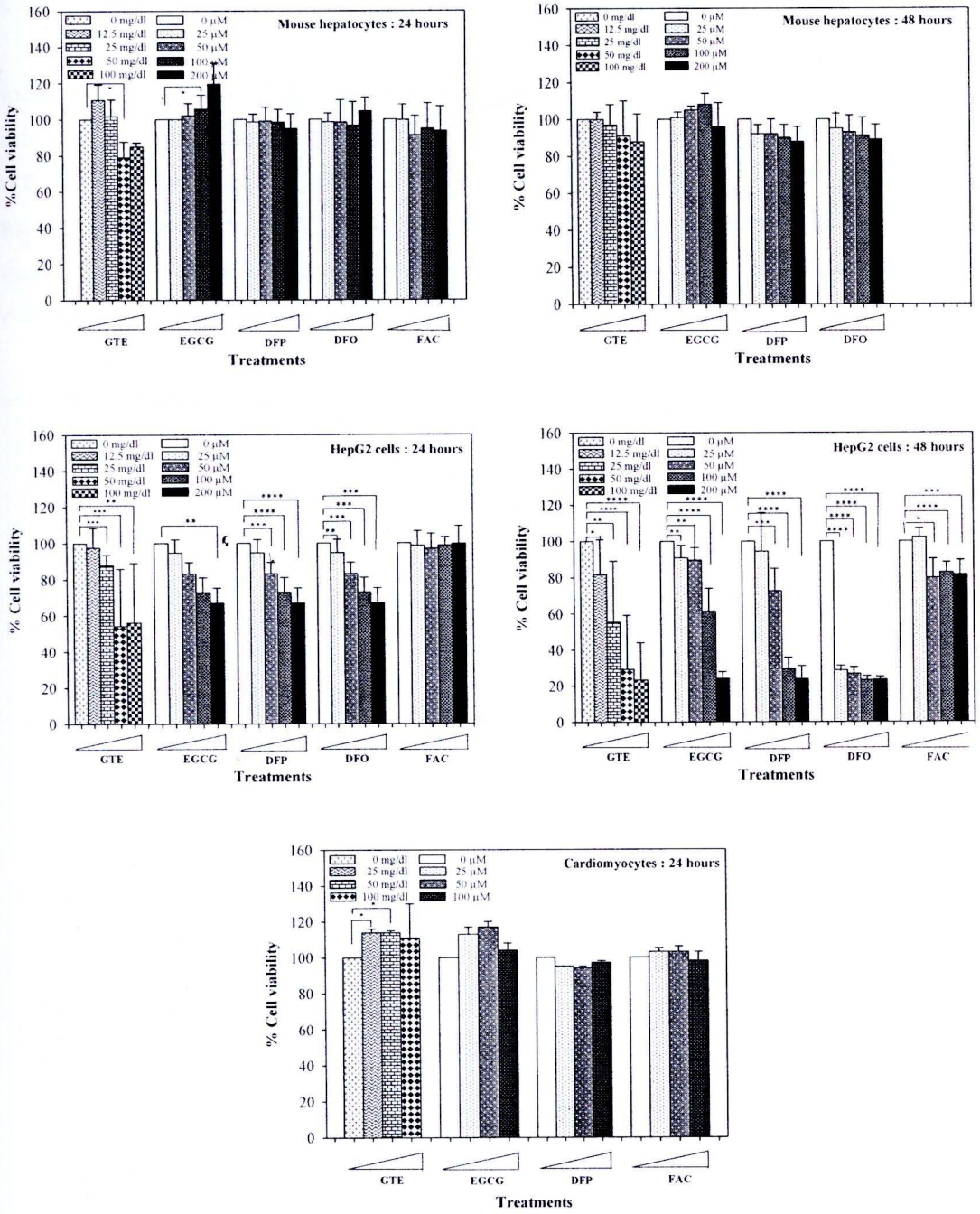
สาร GTE, EGCG และ DFO มีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์ตับปฐมภูมิเพาะเลี้ยงนาน 24 และ 48 ชั่วโมงมีชีวิตรอดมากขึ้น (GTE>EGCG>>>DFO) ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับปริมาณสารเมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารเหล่านี้ ส่วนสาร FAC และยา DFP มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับปฐมภูมิน้อยมาก (%cell viability >95%) ยา DFP มีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ตับปฐมภูมิที่ได้รับสาร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

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

เซลล์ HepG2 cells เป็น human hepatocellular carcinoma cells ที่มีความจำเป็นต้องใช้ธาตุเหล็ก (FAC) ปริมาณที่สูงในการเมตาโบลิสซึม รวมทั้งการแบ่งตัวและเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นจึงไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell viability >20%) อย่างไรก็ตามสาร EGCG มีผลทำให้การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเมื่อใช้ปริมาณเพิ่มมากขึ้น 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)

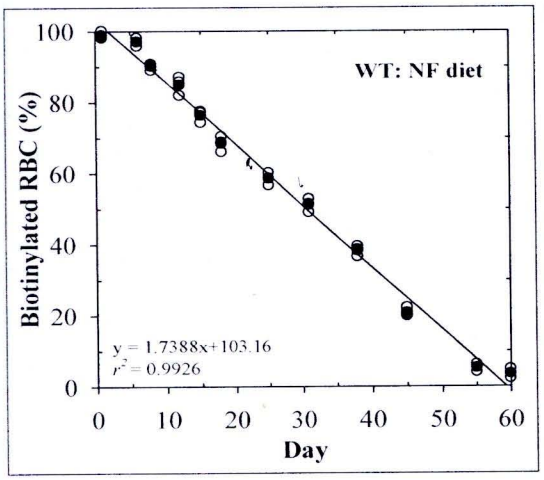
ผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าสาร GTE และ EGCG มีคุณสมบัติเป็นทั้งสารแอนติออกซิแดนท์และจับธาตุเหล็ก จึงช่วยปกป้องและทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและเป็นอันตรายต่อเซลล์ตับปกติได้ ส่วน DFP เป็นยาขับเหล็กที่มีปฏิสัมพันธ์กับธาตุเหล็กภายในเซลล์และอาจเป็นพิษต่อเซลล์ตับได้ สาร GTE และ EGCG มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ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

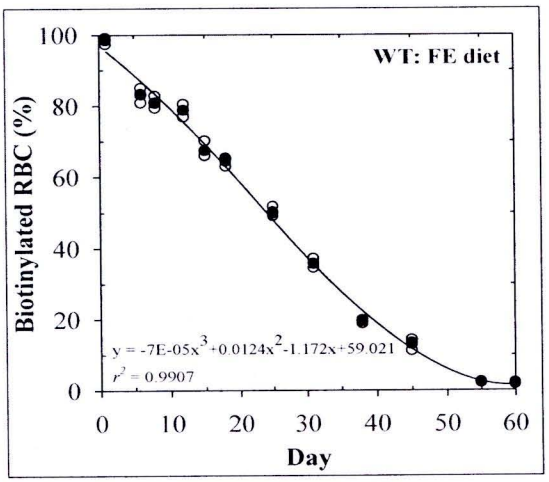


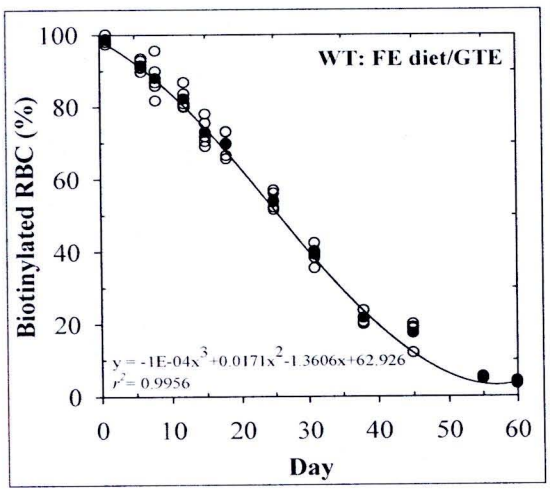
รูปที่ 28 ผลของสาร GTE (0-200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร), EGCG, DFP, DFO และ FAC DFP (0-200 ไมโครโมลาร์) นาน 24 และ 48 ชั่วโมงต่อการมีชีวิตรอด (%cell viability) ของเซลล์เพาะเลี้ยง mouse primary hepatocyte, mouse primary hepatocyte[&] (in vivo iron loading), HepG2 cells และ cardiomyocytes ค่าที่วิเคราะห์ได้แสดงเป็น mean±SD (three independent triplicate experiments) ซึ่ง $^{*}p<0.05$; $^{**}p<0.01$; $^{***}p<0.005$ และ $^{****}p<0.0005$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษา

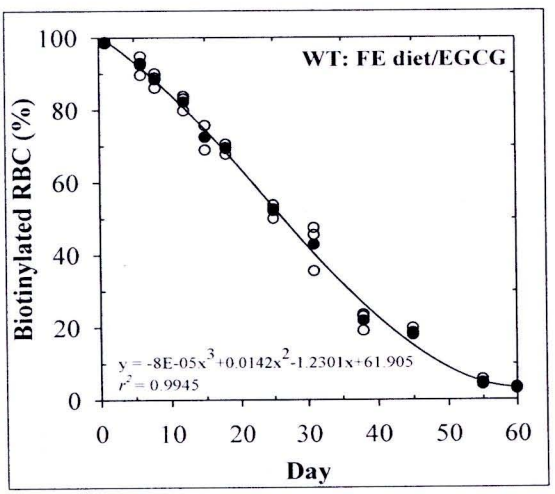
ผลของสารสกัดชาเขียวต่อการมีชีวิตของเม็ดเลือดแดงในหนูปกติและหนูธาลัสซีเมีย

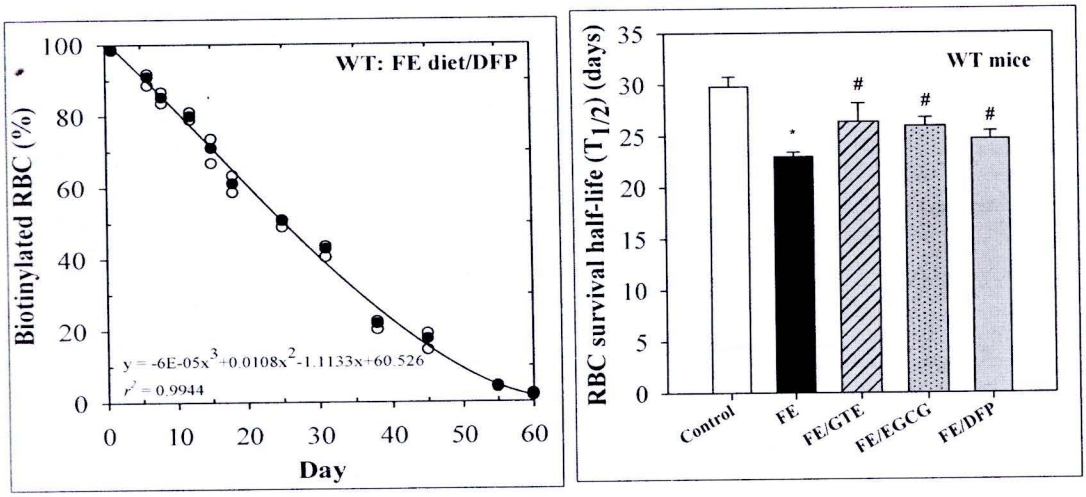
ผลการทดลองรูปที่ 29 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดแดง (แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์) ในหนูทดลอง WT ที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NF diet) อาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) และอาหารเสริมธาตุเหล็กร่วมกับการรักษาด้วยสาร DFP, EGCG และ GTE นาน 30 วัน โดยพบว่าเม็ดเลือดแดงของหนู WT ที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก (RBC survival half-life, $T_{½}$, = 23 วัน) มีอายุสั้นกว่าเม็ดเลือดแดงของหนู WT ที่กินอาหารสูตรปกติ ($T_{½}$, = 30 วัน) อย่างมีนัยสำคัญ การรักษาหนูทดลอง WT ที่มีภาวะเหล็กเกินด้วยยา DFP สาร EGCG และ GTE ช่วยทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุยืนยาวขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($T_{½}$, = 24, 25 และ 26 วันตามลำดับ) (รูปที่ 29 กราฟแท่ง)





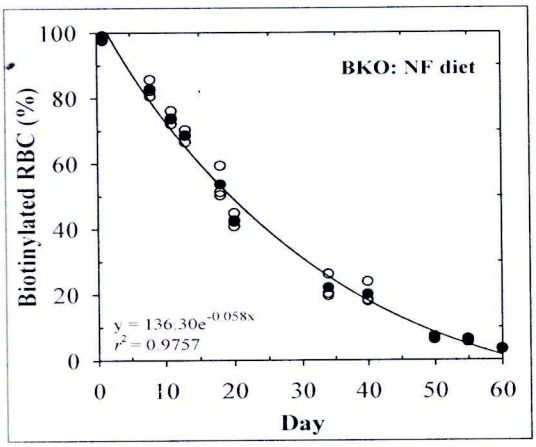


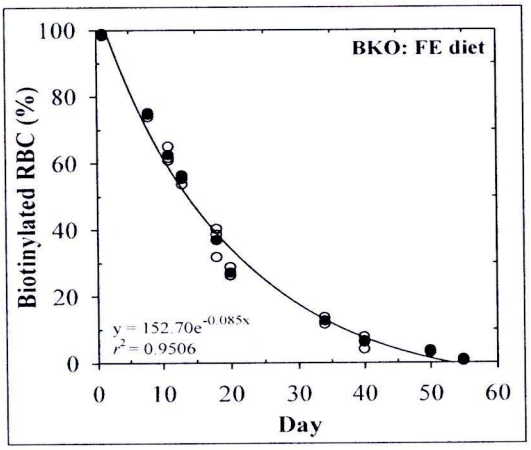


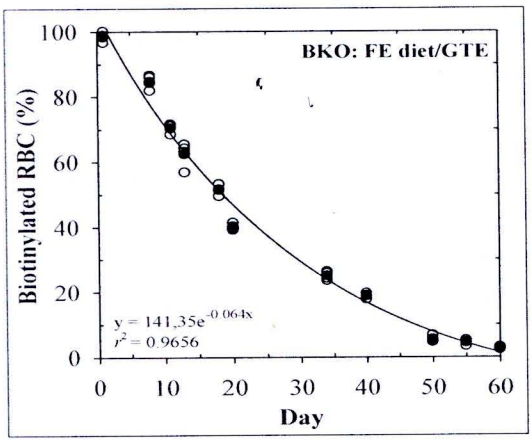


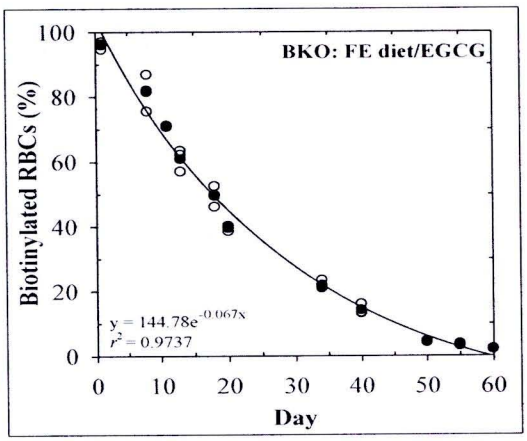
รูปที่ 29 กราฟการมีชีวิต (survival) และครึ่งชีวิตของการมีชีวิต (survival half-life, $T_{1/2}$) ของเม็ดเลือดแดงของหนูปกติ (WT) (n = 5) ที่กินอาหารสูตรปกติ (NF diet) และอาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) และได้รับการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP $^{*}p$ <0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ NF diet; $^{\#}p$ <0.05 เปรียบเทียบกับ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

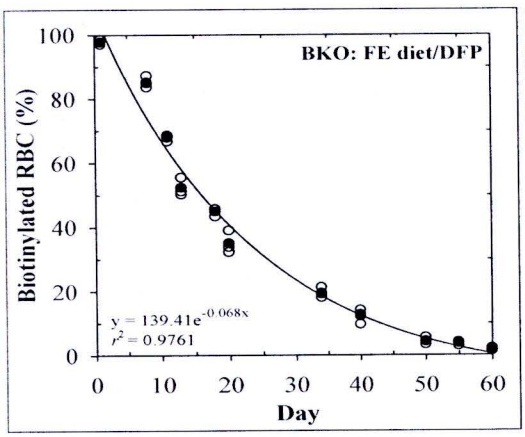
ผลการทดลองรูปที่ 30 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดแดง (แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์) ในหนูทดลอง BKO ที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NF diet) อาหารเสริมธาตุเหล็ก (FE diet) และอาหารเสริมธาตุเหล็กร่วมกับการรักษาด้วยสาร DFP, EGCG และ GTE นาน 60 วัน โดยพบว่าเม็ดเลือดแดงของหนู BKO ที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก (RBC survival half-life, $T_{½}$, = 13 วัน) มีอายุสั้นกว่าเม็ดเลือดแดงของหนู WT ที่กินอาหารสูตรปกติ ($T_{½}$, = 17 วัน) อย่างมีนัยสำคัญ การรักษาหนูทดลอง BKO ที่มีภาวะเหล็กเกินด้วยยา DFP สาร EGCG และ GTE ช่วยทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุยืนยาวขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($T_{½}$, = 15, 15.5 และ 16 วันตามลำดับ) (รูปที่ 30 กราฟแท่ง) เมื่อเปรียบเทียบอายุเม็ดเลือดแดงของหนู WT กับหนู BKO จะเห็นได้ว่าเม็ดเลือดแดงของหนู WT มีอายุยืนยาวกว่าเม็ดเลือดแดงของหนู BKO ประมาณ 40-50% ซึ่งสอดคล้องกับสิ่งที่มาแล้วว่าเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีอายุสั้นกว่าเม็ดแดงของคนปกติ อันเป็นผลมาจากเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีปริมาณอนุมูลอิสระสูงกว่าและมีระดับกลูต้าไธโอนต่ำกว่า รวมทั้งอยู่ในสภาวะพลาสมาที่มีปริมาณเหล็กสูงกว่าปกติ (95-105% transferrin saturation) และมีธาตุเหล็กรูป NTBI (2-20 ไมโครโมลาร์) ที่เป็นตัวการเหนี่ยวนำการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมา

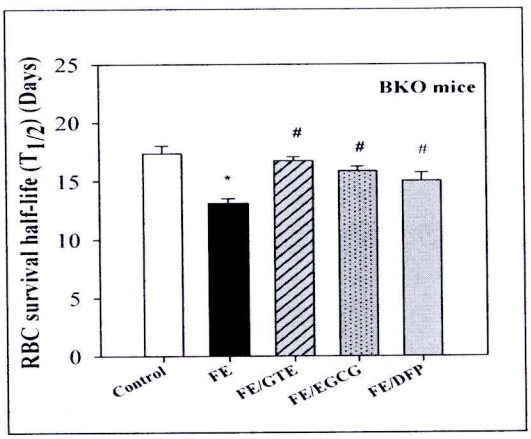












รูปที่ 30 กราฟการมีชีวิต (survival) และครึ่งชีวิตของการมีชีวิต (survival half-life, $T_{1/2}$) ของเม็ดเลือดแดงของหนูธาลัสซีเมีย WT (n = 5) ที่กินอาหารสูตรปกติและอาหารเสริมธาตุเหล็ก และได้รับการรักษาด้วยสาร GTE, EGCG และยา DFP $^{*}p$ <0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับ NF diet; $^{\#}p$ <0.05 เปรียบเทียบกับ

FE diet สัญลักษณ์วงกลมโปร่ง (O) แสดงค่าของหนูแต่ละตัว และสัญลักษณ์วงกลมทึบ (●) แสดงค่าเฉลี่ย (mean±SD)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลองที่ได้ (Discussion and Conclusions)

ชาเขียว เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่นิยมนำมาใช้เป็นเครื่องดื่มซึ่งประกอบด้วยสารโพลีฟีนอลกลุ่มคะเตชินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยาสำคัญหลายอย่าง การศึกษาครั้งนี้เราใช้ตู้ไมโครเวฟอบใบชาให้แห้งอย่างรวดเร็วภายในเวลา 3 นาที (Srichairatanakool, Ounjaijean et al. 2006) และทำลายเอนไซม์ polyphenol oxidase ที่มีอยู่ในใบชาสดเพื่อไม่ให้ไปทำลายสารคะเตชินที่มีอยู่ สารสกัดหยาบชาเขียว (GTE) และสารองค์ประกอบหลักของชาเขียวคือ EGCG ที่เตรียมแยกขึ้นมาเอง (Thephinlap, Ounjaijean et al. 2007) สารทดสอบทั้งสองนี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงและจับตรึงธาตุเหล็กได้ดี Xu และคณะใช้วิธี Semi-preparative HPLC แยกสารคะเตชินต่างๆจาก GTE พบว่าปฏิกิริยา epimerization ของสารคะเตชินเหล่านั้นเกิดขึ้นได้ระหว่างการเตรียมผลิตภัณฑ์ชาเขียวแต่ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่มีอยู่เดิม (Xu, Yeung et al. 2004) สาร EGCG และ ECG ในชาเขียวเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารประกอบธาตุเหล็กได้ถึง 4 ชนิดและมีการถ่ายทอดอิเลคตรอนไปยังไอออนธาตุเหล็กเกิดขึ้นตามมา (Ryan and Hynes 2007) การศึกษาของ Yoneda และคณะในปี คศ. 1995 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดชาเขียวประกอบด้วยสารบีตาคะเตชินที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์และสามารถลดระดับสาร TBARS และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในสมองหนูทดลองที่เป็นโรคลมชักได้ (Yoneda, Hiramatsu et al. 1995) สารคะเตชินจากชาเขียวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเพอรอกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดยธาตุเหล็กที่เซลล์มิวโคซาบริเวณลำไส้ใหญ่ของหนูขาวได้และทำงานร่วมกับอาหารที่อุดมด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวหนึ่งพันธะคู่ (Yamamoto, Miyamoto et al. 2006)

สารสกัดชาเขียวและสาร EGCG สามารถลดภาวะเหล็กเกินในหนูทดลองที่กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก (เช่นลดระดับ NTBI ในพลาสมาและการสะสมเหล็กในเนื้อเยื่อตับ) โดยอาศัยกลไกยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กจากอาหารบริเวณลำไส้เล็ก (Zeyuan, Bingying et al. 1998; Samman, Sandstrom et al. 2001) สารสกัดชาเขียวยังมีศักยภาพช่วยลดการสะสมธาตุเหล็กในเนื้อเยื่อตับของหนูธาลัสซีเมียที่มีภาวะโลหิตจางและได้รับอาหารเสริมธาตุเหล็กเป็นเวลานาน (Saewong, Ounjaijean et al. 2010) อย่างไรก็ตามการบริโภคชาเขียว ชาดำและสารสกัดชาไม่มีผลกระทบต่อระดับธาตุเหล็ก ทองแดงและสังกะสี (ยกเว้น มังกานีส) ในร่างกาย (Record, McInerney et al. 1996) อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ขัดแย้งกันของ Chen และคณะที่รายงานว่าชาเขียวไม่สามารถยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กได้ (Cheng 2009) การศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัยที่ทำการเหนี่ยวนำให้หนูขาวเกิดภาวะเหล็กเกินด้วยการฉีดสารละลาย ferric citrate เข้าใต้ผิวหนังบริเวณหน้าท้องและทำการรักษาโดยการป้อนสารสกัดชาให้กิน ซึ่งพบว่าการฉีดสารละลาย ferric citrate ไม่ได้ทำให้หนูทดลองมีภาวะเหล็กเกินสูงมาก (Ounjaijean, Thephinlap et al. 2008) การศึกษาครั้งนี้จึงใช้หนูเมาส์ที่ไวต่อการกระตุ้นให้เกิดภาวะเหล็กเกินโดยการให้หนูทดลองกินอาหารเสริมธาตุเหล็กนาน 2-3 เดือน (Thephinlap, Phisalaphong et al. 2009) การศึกษาครั้งเราให้หนูทดลองปกติ (WT) หนูโรค์ธาลัสซีเมีย BKO และ DH กินอาหารเสริมธาตุเหล็ก

ปริมาณสูง (FE diet) และพบว่ามีระดับ NTBI ในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้น 15-20 ไมโครโมลาร์และมีปริมาณเหล็กสะสมในตับเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญซึ่งเป็นผลมาจากการดูดซึมเหล็กบริเวณลำไส้มากขึ้น หนูธาลัสซีเมียชนิด BKO มีภาวะโลหิตจางเล็กน้อย (ค่าฮีโมโกลบินในเลือด 8.5-10 กรัมต่อเดซิลิตร) มีฟีโนไทพ์เทียบได้กับผู้ป่วยธาลัสซีเมียอินเตอร์มีเดีย การศึกษาครั้งนี้ใช้สาร EGCG ปริมาณ 300 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมซึ่งไม่รบกวนการดูดซึมธาตุเหล็กในคนปกติ (Ullmann, Haller et al. 2005)

สาร EGCG และ ECG ในสารสกัดชาเขียวมีหมู่ฟังชันหลักคือกาโลอิล (galloyl group) เป็นโครงสร้างที่ใช้จับกับไอออนโลหะ (เช่น Fe และ Zn) ไว้ด้วยแรง hexadentate co-ordination bond จึงช่วยกำจัดและบรรเทาภาวะเหล็กเกินในร่างกายและปริมาณการสะสมธาตุเหล็กในเนื้อเยื่อตับลดลงอย่างชัดเจน ฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและยับยั้งขบวนการสร้างอนุมูลอิสระโดยผ่านปฏิกิริยา Haber-Weiss และ Fenton reaction ช่วยป้องกันความเสียหายหรืออันตรายต่อสารชีวโมเลกุลองค์ประกอบของเซลล์ (ได้แก่ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลิอิกและคาร์โบไฮเดรต) และองค์ประกอบของเซลล์ (เช่นเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย ไลโซโซมและนิวเครียส) การหยุดยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากช่วยทำให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ MDA (หรือ TBARS) ในเนื้อเยื่อตับลดลงได้ จึงสามารถช่วยป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของตับ (เช่นการอักเสบ การเกิดไฟโบรซิสและการเกิดตับแข็ง) ขึ้นตามมาได้ สาร EGCG มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุดที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเพอรอกซิเดชันที่สมองของหนูเจอบิลได้ (Lee, Im et al. 2003) การบริโภคชาที่มีปริมาณคะเตชินสูงช่วยป้องกันตับอักเสบและตับเกิดไฟโบรซิสในหนูทดลองได้ (Abe, Ijiri et al. 2005; Abe, Suzuki et al. 2007) นอกจากนี้สารสกัดชาเขียวไม่มีผลทำให้ระดับโปรตีนคอลลาเจนในเนื้อเยื่อตับของหนูทดลองทั้งสองกลุ่มเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน สารโพลีฟีนอลในสารสกัดชาเขียวน่าจะยับยั้งการเกิดออกซิเดทีฟสเตรสในเซลล์โดยการทำงานผ่าน ROS-NO pathway (Guo, Bezard et al. 2005)

สารสกัดชาเขียวและสาร EGCG ช่วยยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงที่ภาวะออกซิเดทีฟสเตรส ลดปริมาณ ROS และ TBARS เพิ่มปริมาณสารกลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงของหนูธาลัสซีเมีย BKO และ DH รวมทั้งช่วยยืดอายุเม็ดเลือดแดงของหนูทดลอง สารทดสอบทั้งสองอาจทำหน้าที่ช่วยทำลายอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในเม็ดเลือดแดง เพิ่ม ปริมาณสารกลูตาไธโอนรูปรีดิวซ์ (GSH) โดยออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ glutathione synthase ในเซลล์ตับช่วยเร่งการสังเคราะห์สารกลูตาไธโอนจากสารตั้งต้น (คือ glutamic acid, cystein และ glycine) หรือทำหน้าที่เป็น reducing agent คล้ายกับโคเอนไซม์ NADPH ที่ช่วยในปฏิกิริยาการรีดิวซ์ (redox recycling) GSSG กลับมาเป็น GSH ซึ่งเร่งการทำงานโดยเอนไซม์ glutathione reductase การศึกษาของ Grinberg และคณะในปี ค .ศ. 1997 แสดงให้เห็นว่าสารโพลีฟีนอลกลุ่มคะเตชินในชาเขียวและชาดำเป็นสารประกอบที่สามารถจับเหล็กได้จึงมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงได้ (Grinberg, Newmark et al. 1997) การศึกษาในหลอดทดลองรายงานว่าสารสกัดชาเขียวสามารถยับยั้งปฏิกิริยาลิปิดเพอรอกซิเดชันของเม็ดเลือดแดงที่ถูก

เหนี่ยวนำโดยสารเฟนิลไฮดราซีนและไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ที่เป็นสารออกซิแดนท์ (Biswas, Bhattacharyya et al. 2005)

สารคะเตชินในชาเขียวมีคุณสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนท์ที่สามารถทำลายอนุมูลอิสระในพลาสมา เซลล์ตับและหนูธาลัสซีเมียที่มีเหล็กเกินได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้ในปริมาณที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามสารคะเตชิน EGC และ EC ในสารสกัดชาเขียวและชาดำอาจมีคุณสมบัติเป็นโปรออกซิแดนท์ (pro-oxidant) ที่เหนี่ยวนำการสร้างสารออกซิแดนท์ (เช่นไฮโดรเจนเพอรอกไซด์และอนุมูลไฮดรอกซิล) ได้ถ้าใช้ในปริมาณต่ำๆ (Shin, Kim et al. 2007) นอกจากชาเขียวมีสารโพลีฟีนอลที่สามารถจับและสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับธาตุเหล็กแล้ว ยังตรวจพบว่ามีธาตุอลูมิเนียมเป็นองค์ประกอบที่สามารถแข่งการดูดซึมกับธาตุเหล็กได้ (Marouani, Chahed et al. 2007) ทำให้หนูและผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีการดูดซึมธาตุเหล็กลดน้อยลง 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) การศึกษาที่ผ่านมารายงานความเป็นพิษของสารคะเตชินต่างๆต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยงตามลำดับดังนี้คือ EGCG>propyl gallate>ECG>GA, EGC>EC โดยการทำให้ความต่างศักย์บริเวณเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียพังลงและสารคะเตชินเป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้าง 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 ลดระดับสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลิปิดเพอรอกซิเดชัน (เช่น MDA) ในพลาสมาและเนื้อเยื่อตับ และลดระดับสารแอนติออกซิแดนท์ (เช่น GSH) ในเนื้อเยื่อตับของหนูทดลองที่มีภาวะเหล็กเกินอย่างมีประสิทธิภาพ สาร EGCG และ GTE สามารถลดระดับอนุมูลอิสระและช่วยปกป้องการทำลายเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียของเซลล์ตับเพาะเลี้ยงที่มีภาวะเหล็กเกินได้ ช่วยทำให้เม็ดเลือดแดงของในหนูทดลองที่มีภาวะเหล็กเกินมีอายุยืนยาวขึ้นแต่ไม่มีผลกระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบิน ช่วยลดการสร้างโปรตีนคอลลาเจน (ตัวชี้วัดการการเกิดไฟโบรซิสที่ตับ) ในเนื้อเยื่อตับของหนูทดลอง WT, BKO และ DH ได้ และไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

ตับและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพาะเลี้ยงที่มีเหล็กเกิน การนำผลิตภัณฑ์ชาเขียวไปใช้ศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสเป็นสิ่งท้าทายและน่าสนใจในอนาคตอันใกล้นี้