

Thesis Title	Free-radical Scavenging and Iron-chelating Properties of Crude Extract and Epigallocatechin 3-gallate of Green Tea in Iron-loaded Cultured Hepatocytes	
Author	Miss Kanokwan Kulprachakarn	
Degree	Master of Science (Biochemistry)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool	Chairperson
	Prof. Suthat Fucharoen, M.D.	Member

ABSTRACT

Tea (*Camellia sinensis*) contains polyphenolic catechins which epigallocatechin 3-gallate (EGCG) is a major active ingredient in green tea crude extract (GTE). Its free-radical scavenging and iron chelating activities can protect human beings from pathogenesis including cancer, hypertension, diabetic mellitus and aging. β -thalassemia patients suffer from secondary iron overload caused by increased duodenal iron absorption and multiple blood transfusions. Iron is a chemical catalyst of Haber-Weiss and Fenton reactions and contributes to generation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress, leading to vital organ dysfunction. Liver is one of the most affected organs which the iron is highly accumulated, potentially causing fibrogenesis, cirrhosis and cancer. Iron chelators (such as desferrioxamine (DFO), deferiprone (DFP) and deferasirox (DFX)) and antioxidants (such as vitamin C, vitamin E and N-acetylcysteine) are used for treatment and alleviation of such iron overload and oxidative stress.

This study purposed to examine effects of GTE and EGCG alone and those together with deferiprone (DFP) on oxidative stress and iron overload in cultured hepatocytes. The GTE was prepared from the microwave-processed tea shoots and

catechins composition was determined using HPLC method. The EGCG was fractionated from the GTE using a semi-preparative HPLC technique, which its purity was >85%. The hepatocytes, human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) and primary mouse (C57/BL6) hepatocytes, were loaded with ferrous ammonium citrate (FAC) (500 μ M) and determined labile iron pool (LIP) by using calcein fluorescence technique. Cellular ROS level was measured using dichlorohydrofluorescein fluorescence method and mitochondrial ROS (membrane potentials) was measured using rhodamine123 method. Toxic effect of GTE and EGCG on the hepatocytes was investigated with a colorimetric technique called 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide or MTT test.

Apparently, the GTE and EGCG reduced the LIP level in the hepatocytes in concentration-dependent manner within 6 hours and did not reduce any more after 24 hours. Most importantly, the tested compounds also lowered cellular and mitochondrial ROS levels in concentration- and time-dependent manners.

In conclusion, crude extract and epigallocatechin 3-gallate of green tea themselves and along with deferiprone could reduce intracellular free iron and also scavenge intracellular and mitochondrial free radicals in hepatocytes effectively. The benefits imply protective and therapeutic effects of green tea catechins on the liver with iron overload and oxidative stress. Therefore, it needs to further study adjunctive effect of green tea product and deferiprone to prevent liver pathogenesis in thalassemia patients with iron overload.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ คุณสมบัติในการทำลายอนุมูลอิสระและจับธาตุเหล็ก

ของสารสกัดหยาบและสารอิพิแกลโลเคเทชิน 3-แกลเลต ของชาเขียวในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงที่มีภาวะเหล็กเกิน

ผู้เขียน นางสาวกนกวรรณ กุลประชาภานต์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล

ประธานกรรมการ

ศ. นพ. สุทัศน์ พุเจอร์ญ

กรรมการ

บทคัดย่อ

ชา มีสารประกอบโพลีฟีนอลกลุ่มคะเทชิน ซึ่งสารอิพิแกลโลเคเทชิน 3-แกลเลต (อีจีซีจี) เป็นสารออกฤทธิ์หลักที่พบมากในสารสกัดหยาบชาเขียว ฤทธิ์ทำลายอนุมูลอิสระและจับธาตุเหล็กของชาเขียวสามารถช่วยปกป้องมนุษย์จากการเกิดพยาธิสภาพหลายอย่างเช่น มะเร็ง ความดันโลหิตสูง เบาหวาน และชราภาพ ผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียชนิดบีตาได้รับความลำบากจากภาวะเหล็กเกินชนิดทุติยภูมิที่มีสาเหตุจากได้รับการเติมเลือดเป็นประจำและดูดซึมธาตุเหล็กบริเวณคูโอดีนัมมากกว่าปกติ ธาตุเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีฮาเบอร์ไวส์ และเฟนตอนซึ่งมีส่วนในการสร้างกลุ่มสารประกอบออกซิเจนไวต่อการเกิดปฏิกิริยาและออกซิเดทีฟสเตรส ซึ่งจะมีผลทำให้การทำงานของอวัยวะที่สำคัญผิดปกติไป โดยเฉพาะตับซึ่งเป็นอวัยวะที่ได้รับผลกระทบมากที่สุดและถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไฟโบรซิสที่ตับ ตับแข็งและมะเร็งตับได้ ยาจับเหล็ก (เช่น เคสเฟอริออกซามิน ดีเฟอริโพรนและดีเฟอราซีร็อก) และสารแอนติออกซิเดนท์ (เช่น วิตามินซี วิตามินอี และเอ็น-อะเซทิลซิสเตอีน) ถูกนำมาใช้รักษาและบรรเทาภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรสที่ตับ

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจสอบผลของสารสกัด หยาบและสารอีจีซีจีโดยลำพังและสารเหล่านี้ร่วมกับยาดีเฟอริโพรน ต่อภาวะออกซิเดทีฟสเตรส และเหล็กเกินในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

สารสกัดหยาบถูกเตรียมจากยอดใบชาอบแห้งด้วยไมโครเวฟและวิเคราะห์หาปริมาณคะเตชินที่เป็นองค์ประกอบด้วยวิธี HPLC สารอีจีสซิจีถูกแยกจากสารสกัดหยาบชาเขียวด้วยวิธี Semi-preparative HPLC และพบว่ามีควมบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 85 เซลล์ตับคือ human hepatocellular carcinoma (HepG2) และเซลล์ตับปฐมภูมิจากหนูเมาส์สายพันธุ์ C57/BL6 ถูกนำมาเติมด้วยเฟอร์สแอมโมเนียมซัลเฟต (ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์) ลงไปเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเหล็กเกิน หลังจากนั้นจึงทำการตรวจวัดระดับธาตุเหล็กรูป labile iron pool (LIP) ด้วยวิธีเทคนิค calcein fluorescence ทำการตรวจวัดระดับอนุมูลอิสระ (ROS) ในเซลล์ด้วยเทคนิค dichlorohydrofluorescein fluorescence และระดับอนุมูลอิสระที่ไม่โตคอนเดรีย (ศักย์ไฟฟ้าระหว่างเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย) ด้วยวิธี rhodamine123 fluorescence ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบและสารอีจีสซิจีต่อเซลล์ตับถูกตรวจวัดด้วยวิธีการเปลี่ยนสีสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT test)

ผลเป็นที่ประจักษ์ชัดว่าสารสกัดหยาบและอีจีสซิจีช่วยลดระดับธาตุเหล็กรูป LIP ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้นภายในช่วงเวลา 6 ชั่วโมงและไม่สามารถลดปริมาณได้มากกว่านี้ภายหลังจากทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ที่สำคัญมากที่สุดคือสารทดสอบสองชนิดนี้สามารถ ลดปริมาณอนุมูลอิสระในเซลล์และไมโทคอนเดรียของเซลล์ตับได้ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้นและเวลาด้วย

สรุปได้ว่าสารสกัดหยาบและสารอีพิกแกลโลเคเทชิน 3-แกลเลตจากชาเขียวโดยลำพังและสารทั้งสองนี้ร่วมกับยาดีเฟอรัริโพรนสามารถลดปริมาณธาตุเหล็กอิสระภายในเซลล์ รวมทั้งสามารถทำลายอนุมูลอิสระในเซลล์และไมโทคอนเดรียอย่างมีประสิทธิภาพ จึงช่วยบรรเทาภาวะเหล็กและอนุมูลอิสระมากเกินไปในเซลล์ตับได้ ข้อดีเหล่านี้ชี้ถึงผลปกป้องและรักษาขององค์ประกอบคะเตชินในชาเขียวต่อตับที่มีภาวะเหล็กเกินออกซิเดทีฟสเตรส ดังนั้นจึงควรที่จะทำการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับผลร่วมกันของผลิตภัณฑ์ชาเขียวกับยาขับเหล็กดีเฟอรัริโพรนในการช่วยปกป้องการเกิดพยาธิสภาพตับของผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีเหล็กเกิน