

**Thesis Title** Effect of Catechins and Chitosan on Fibrogenesis of Liver  
in Mice Challenged with Iron Loading and Fat Accumulation

**Author** Miss Thidarat Saewong

**Degree** Master of Science (Biochemistry)

**Thesis Advisor:** Assoc. Prof. Dr. Somdet Srichairatanakool

### ABSTRACT

Increased intestinal iron absorption and repeated blood transfusions can result in secondary iron overload and vital organ dysfunction. The liver is commonly affected by excessive iron accumulation, leading to generation of reactive oxygen intermediates (ROI). Thalassemias lead to liver fibrosis due to hepatic iron overload results in hepatocellular carcinoma. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) due to hyperlipidemia is the latest known cause of liver fibrosis and cirrhosis. Iron overload, HCV infection and fatty liver are tend to cause liver fibrosis. Desferrioxamine (DFO), deferiprone (DFP) and deferasirox (DFX) are promising iron chelators used for treatment of  $\beta$ -thalassemia patients with iron overload. Green tea (*Camellia sinensis*) catechins exhibit anti-oxidative and iron-chelating properties. Chitosan is a biopolymer of glucosamine which shows hypolipidemic, antioxidant and iron cross-linking effects. It is hypothesized that green tea catechins and chitosan will reduce hepatic iron deposition, oxidative stress and fat accumulation, and consequently prevent liver tissue damage.

Accordingly, this study investigates biochemical changes of iron and ROI in hepatocytes of iron-loaded wild-type (WT) and heterozygous <sup>BKO</sup> type-thalassemia (BKO) mice, and whether green tea crude extract alleviates iron overload and oxidative stress of the hepatocytes or not. Effectiveness of chitosan in lowering

nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and liver fibrosis of high fat-fed rats were also examined.

Two animal models, Wistar rats and C57/BL6 mice, were used. WT and BKO mice were induced to iron overload by the feeding of a ferrocene-supplemented diet (Fe diet, 0.2% *w/w*) for 8 weeks and with oral administration of the green tea extract (300 mg/kg) and a standard iron chelator, deferiprone (DFP) (50 mg/kg) for further 8 weeks. Rats were fed with normal fat (NF) and high-fat (HF) diets for 12 weeks. They were then orally administered with cornstarch (5% *w/w*), chitosan (5% *w/w*) and orlistat (25 mg/kg) for further 8 weeks. Blood samples of the treated rats were collected for measuring levels of plasma cholesterol, triglyceride, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). Concentrations of iron, ferritin, triglyceride, glutathione (GSH), collagen and malondialdehyde (MDA) were analyzed in their liver tissues. Histochemical examinations including hematoxylin & eosin (H&E), Pearl's Prussian blue and Mason trichrome staining were also performed in the liver tissue sections.

The results showed that chitosan inhibited a progressive increase of triglyceride levels in plasma and liver of the rats significantly. It reduced ferritin concentrations, but did not affect levels of GSH in their livers. The compound increased liver iron and collagen concentrations slightly. Green tea extract decreased iron deposition in livers of the iron-loaded WT and BKO mice effectively and significantly. The green tea did not change GSH concentrations in livers of the iron-loaded WT, and slightly decreased GSH concentrations in livers of BKO mice. Most importantly, chitosan and green tea were able to decrease levels of liver MDA significantly. However, chitosan was not harmful to livers of the treated rats. In conclusion, green tea would be effective in chelating iron pools and inhibiting lipid peroxidation in the liver cells. Chitosan can lower hepatic fat accumulation and oxidative stress. Altogether, combined treatment of green tea and chitosan would inhibit or prevent liver fibrosis caused by excessive iron and fat accumulation. Prospectively, the adjunctive therapy should to be further investigated in  $\beta$ -thalassemia patients with iron overload.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของคะเตชินและโคโคแซนต่อการเกิดไฟโบรซิสของตับ

ในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเหล็กเกินและไขมันสะสม

ผู้เขียน นางสาวธิดารัตน์ แซ่หว่อง

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.สมเดช ศรีชัยรัตนกุล

#### บทคัดย่อ

การเพิ่มการดูดซึมธาตุเหล็กที่ลำไส้และการเต็มเลือดเป็นประจำ สามารถทำให้เกิดภาวะเหล็กเกินทุตยภูมิ และการทำหน้าที่ของอวัยวะที่สำคัญผิดปกติไป ตับมักเป็นอวัยวะที่ได้รับผลกระทบบ่อยมาจากการสะสมธาตุเหล็กเกินซึ่งนำไปสู่การสร้างสารประกอบตัวกลางออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ผู้ป่วยธาลัสซีเมียสามารถเกิดภาวะไฟโบรซิสที่ตับได้เนื่องจากภาวะเหล็กเกินและการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดซีซึ่งส่งผลทำให้เกิดโรคมะเร็งตับ โรคตับคั่งไขมันที่ไม่ได้มีสาเหตุจากแอลกอฮอล์ซึ่งมีสาเหตุจากไขมันในเลือดสูงกว่าปกติเป็นสาเหตุของการเกิดไฟโบรซิสและตับแข็ง ภาวะเหล็กเกิน การติดเชื้อตับอักเสบนชนิดซี และตับคั่งไขมันสามารถนำไปสู่การเกิดไฟโบรซิสที่ตับ ยาเดฟาร็อกซามีน ดีเฟอริโพร และดีเฟอราซีรอกซ์ เป็นยาขับเหล็กที่ใช้เพื่อรักษาผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีต้าที่มีภาวะเหล็กเกิน

สารคะเตชินจากชาเขียวมีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันและขับเหล็ก โคโคแซนเป็นสารชีวโพลีเมอร์ของกลูโคซามีนซึ่งแสดงผลลดไขมันในเลือด ต้านออกซิเดชัน และขับเหล็กได้จึงมีสมมติฐานว่าคะเตชินจากชาเขียว และโคโคแซนน่าจะช่วยลดการสะสมธาตุเหล็ก ออกซิเดทีฟสเตรท และการสะสมไขมันที่ตับส่งผลทำให้ช่วยป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อตับได้

ดังนั้นการศึกษานี้เป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของธาตุเหล็กและสารตัวกลางออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาในเซลล์ตับของหนูทดลองที่มีภาวะเหล็กเกินและศึกษาว่าสารสกัดจากชาเขียวสามารถบรรเทาภาวะเหล็กเกินและออกซิเดทีฟสเตรทของเซลล์ตับเหล่านั้นได้หรือไม่ รวมทั้งทดสอบสัมฤทธิ์ผลของโคโคแซนที่ช่วยลดการอักเสบและการเกิดไฟโบรซิสของตับในหนูทดลองที่รับประทานอาหารไขมันสูง

การศึกษานี้ใช้หนูทดลองสองแบบ หนูขาวสายพันธุ์วิสต้าและหนูเม้าท์สายพันธุ์ C57/BL6 ทำการเหนี่ยวนำหนูเม้าท์ให้เกิดภาวะเหล็กเกิน โดยการเลี้ยงด้วยอาหารเสริมเฟอโรซีน (0.2% โดยน้ำหนัก) เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ และทำการรักษาด้วยการให้หนูทดลองกินสารสกัดชาเขียว ปริมาณ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว ยาตีเฟอโรโพนปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อไปอีก 8 สัปดาห์ เลี้ยงหนูขาวด้วยอาหารไขมันปกติและไขมันสูงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ แล้วทำการเลี้ยงด้วยแป้งข้าวโพดปริมาณ 5% โดยน้ำหนัก ไคโตแซน 5% โดยน้ำหนัก และยาออร์ลิสแตทปริมาณ 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อไปอีก 8 สัปดาห์ ทำการเจาะตัวอย่างเลือดหนู เพื่อนำมาวิเคราะห์ระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และเอนไซม์ aspartate aminotransferase และ alanine aminotransferase รวมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นธาตุเหล็ก เฟอร์ริทิน ไตรกลีเซอไรด์ กลูตาไทโอน คอลาเจน และมาลอนไดอัลดีไฮด์ ในเนื้อเยื่อตับของหนูทดลอง และตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของเนื้อเยื่อตับด้วยวิธี hematoxylin & eosin (H&E), Pearl's Prussian blue และ Mason trichrome

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไคโตแซนยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาและเซลล์ตับของหนูทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ไคโตแซนสามารถลดความเข้มข้นเฟอร์ริทิน แต่ไม่มีผลต่อระดับกลูตาไทโอนในเซลล์ตับ สารประกอบนี้มีผลทำให้ความเข้มข้นของเหล็กและคอลาเจนในตับเพิ่มขึ้นเล็กน้อย สารสกัดชาเขียวช่วยลดการสะสมของธาตุเหล็กในเซลล์ตับของหนูเม้าท์ที่มีภาวะเหล็กเกินอย่างมีประสิทธิภาพและนัยสำคัญ สารสกัดชาเขียวไม่ทำให้ความเข้มข้นของกลูตาไทโอนในเซลล์ตับของหนูเม้าท์สายพันธุ์ปกติที่มีเหล็กเกินเปลี่ยนแปลงไป แต่ส่งผลให้ความเข้มข้นของกลูตาไทโอนในตับของหนูเม้าท์สายพันธุ์อัลลีลซีเมียลดลงเล็กน้อย สิ่งที่สำคัญที่สุดคือ ไคโตแซนและชาเขียวสามารถลดระดับของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเซลล์ตับอย่างมีนัยสำคัญ ไคโตแซนไม่เป็นอันตรายต่อตับของหนูขาวที่ได้รับสารไคโตแซน

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าชาเขียวน่าจะมีสัมฤทธิ์ผลในการกำจัดเหล็กและยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในเซลล์ตับได้ ไคโตแซนสามารถช่วยทำให้การสะสมไขมันและออกซิเดทีฟสเตรสที่ตับลดลงได้ การรักษาร่วมกันด้วยชาเขียวและไคโตแซนน่าจะช่วยยับยั้งและป้องกันการเกิดไฟโบรซิสของตับที่มีสาเหตุจากการสะสมธาตุเหล็กและไขมันมากเกินไป ในการศึกษาต่อไปภายหน้าการบำบัดร่วมนี้จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไปในผู้ป่วยธาลัสซีเมียชนิดบีต้าที่มีภาวะเหล็กเกิน