

ผลของเอ็นอะซิทีลชีสทีอินต่อภาวะออกซิเดทีฟสเตรส
ในหนูขาวที่มีภาวะดัดอ็อกเสบจากไขมันลงตับ



นางสาว สุจิตรา สมุหเสนีโต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสารวิทย์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2551-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE ON OXIDATIVE STRESS IN RATS
WITH NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

Miss Suchitra Samuhasaneeto

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Physiology

(Inter-Department)

Graduated School

Chulalongkorn University

Academic year 2005

ISBN 974-53-2551-1

481870

สุจิตรา สมุหเสนีโต : ผลของเอ็นอะซีทิลซีสทีนต่อภาวะออกซิเดทีฟสเตรส
 ในหนูขาวที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับ (EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE
 ON OXIDATIVE STRESS IN RATS WITH NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS)
 อ. ที่ปรึกษา : รศ.พญ. ดวงพร ทองงาม, อ. ที่ปรึกษาช่วย : ผศ.พญ.ดร. อรอนงค์ กุละพัฒน์,
 94 หน้า ISBN 974-53-2551-1

การศึกษานี้เพื่อศึกษาผลของ เอ็นอะซีทิลซีสทีน (NAC) ในการลดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในหนูขาวที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับ โดยทำการทดลองในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley แบ่งโดยการสุ่มออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มควบคุมปกติได้รับอาหารหนูเป็นเวลา 6 สัปดาห์ กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มตับอักเสบจากไขมันลงตับซึ่งได้รับอาหารประกอบด้วยไขมันร้อยละ 100 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ส่วนกลุ่มที่ 3-5 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารประกอบด้วยไขมันร้อยละ 100 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นเปลี่ยนมาให้อาหารหนูปกติ โดยกลุ่มที่ 3 เปลี่ยนอาหารเพียงอย่างเดียว (NASH+diet) กลุ่มที่ 4 เปลี่ยนอาหารและให้ NAC ขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ทางปาก (NASH+diet+NAC₂₀) และกลุ่มที่ 5 เปลี่ยนอาหารและให้ NAC ขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ทางปาก (NASH+diet+NAC₅₀₀) เป็นเวลาอีก 4 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองเก็บตัวอย่างเลือดและตับ ผลการทดลองพบระดับของกลูตาไทโอนและโคเลสเตอรอลในเลือด มาลอนไดอะดีไฮด์ในตับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มหนูตับอักเสบจากไขมันลงตับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ พยาธิสภาพของตับในกลุ่มที่ 2 มีปริมาณไขมันขนาดใหญ่ในไซโทพลาสซึมปานกลางถึงมาก เซลล์ตับวม มีการอักเสบและการตายของเซลล์ตับ การรักษาด้วยอาหารหรืออาหารร่วมกับ NAC สามารถลดระดับของกลูตาไทโอนและโคเลสเตอรอลในเลือด และมาลอนไดอะดีไฮด์ในตับให้กลับคืนระดับปกติได้ และพยาธิสภาพของตับดีขึ้นโดยลดการสะสมไขมัน การตายและการอักเสบในเซลล์ตับ แต่ผลการให้อาหารหนูปกติร่วมกับ NAC ไม่ได้แตกต่างกับการให้อาหารหนูปกติเพียงอย่างเดียว

ผลการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า การให้อาหารหนูปกติหรือการให้อาหารหนูปกติร่วมกับ NAC สามารถลดภาวะออกซิเดทีฟสเตรสและทำให้พยาธิสภาพของตับดีขึ้น และผลของการให้ NAC ร่วมด้วย ไม่ต่างจากการให้อาหารหนูปกติเพียงอย่างเดียว

สาขาวิชา สรีรวิทยา (สหสาขาวิชา)

ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต..... สุจิตรา สมุหเสนีโต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4689170420 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD : N-ACETYLCYSTEINE / OXIDATIVE STRESS / LIPID PEROXIDATION /
NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

SUCHITTRA SAMUHASANEETO : EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE ON
OXIDATIVE STRESS IN RATS WITH NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. DUANGPORN THONG-NGAM, M.D., THESIS
CO-ADVISOR : ASST. PROF. ONANONG KULAPUTANA, M.D., Ph.D.

The study was conducted to prove the attenuated effects of N-acetylcysteine (NAC) on oxidative stress in rats with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups. Group 1 (normal control) was fed regular dry rat chow (RC) for 6 weeks. Group 2 (NASH) was fed 100% fat diet for 6 weeks. Group 3-5 were fed 100% fat diet for 6 weeks, and then switched to RC alone (NASH+diet ; group 3), to RC+20 mg/kg/day of NAC orally (NASH+diet+NAC₂₀ ; group 4) or to RC+500 mg/kg/day of NAC orally (NASH+diet+NAC₅₀₀ ; group 5) for 4 weeks, respectively. They were sacrificed to collect blood, and liver samples at the end of the study. The results showed that levels of total glutathione (GSH), serum cholesterol, and hepatic malondialdehyde (MDA) were increased significantly in NASH group as compared with normal control. Liver histopathology from group 2 showed moderate to severe macrovesicular steatosis, hepatocyte ballooning, and necroinflammation. Treatment with diet or diet plus NAC reduced the levels of GSH, cholesterol, and hepatic MDA back to normal. Liver sections from group 3-5 showed a decrease in fat deposition and necroinflammation in hepatocytes. However, no differences on all variables existed between diet alone or diet plus NAC groups.

Our data indicate that diet or diet plus NAC treatment could attenuate oxidative stress and improve liver histopathology of NASH. However, the addition of NAC is not better than diet treatment alone.

(Inter-Department)

Field of study Physiology

Academic year 2005

Student's signature... *suchitra samuhasaneeto*

Advisor's signature... *Duangporn Thong-ngam*

Co-Advisor's signature... *Onanong Kulaputana*

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Duangporn Thong-Ngam and my co-advisor, Assistant Professor Onanong Kulaputana for their excellent instruction, guidance, encouragement, and constructive criticism which enable me to carry out my study successfully.

I am deeply beholden to Associate Professor Naruemon Wisedopas for histopathological examination.

I am grateful to Associate Professor Suthiluk Pathumraj for supporting chemical and equipments.

I would like to thank Assistant Professor Krittaya Sutheesophon for biochemical analysis and all the staffs of the Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their technical help in this thesis.

A financial support from grant of Graduated School and grant of Ratchadapisek Somphok, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University are gratefully acknowledged.

Finally, I am thanks to my family and my friends for their loves and supports during this educational experience.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II REVIEW OF THE LITERATURE	
-The liver.....	3
-The liver and lipid metabolism.....	7
-Nonalcoholic steatohepatitis (NASH).....	8
-Oxidative stress.....	13
-Antioxidant system.....	16
-Model of NASH.....	29
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	
-Animal preparation.....	32
-Experimental protocols.....	32
-Data collection.....	33
-Data analysis.....	44
CHAPTER IV RESULTS	
-Effect of 100% fat diet for 6 weeks on serum biochemical parameters, oxidative stress markers, and liver histopathology in rats.....	45
-Body weight.....	45
-Total glutathione level in whole blood.....	45
-Serum biochemical parameters.....	45

-Hepatic malondialdehyde (MDA) content.....	46
-Histopathological examination.....	46
-Effect of N-acetylcysteine on serum biochemical parameters, oxidative stress markers, and liver histopathology in rats with nonalcoholic steatohepatitis.....	46
-Body weight.....	46
-Total glutathione level in whole blood.....	46
-Serum biochemical parameters.....	47
-Hepatic malondialdehyde (MDA) content.....	47
-Histopathological examination.....	47
CHAPTER V DISCUSSION AND CONCLUSION.....	72
REFERENCES.....	77
BIOGRAPHY.....	94

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1. Effects of 100% fat diet for 6 weeks on body weight, serum biochemical parameters, and oxidative stress markers in rats.....	49
2. Effects of 100% fat diet for 6 weeks on liver histopathology in rats : summary of the scores of steatosis and necroinflammation.....	50
3. Effect of NAC on body weight, serum biochemical parameters, and oxidative stress markers in rats with NASH.....	58
4. Effects of NAC on liver histopathology in rats with NASH : summary of the scores of steatosis and necroinflammation.....	59

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1. A liver lobule.....	5
2. Blood flow through the liver and return to the heart.....	6
3. The hepatic acinus.....	7
4. Hematoxylin and eosin stain of human liver histopathology in NASH	9
5. Change in the structure of lipid due to hydrogen abstraction by free radical.....	15
6. Three steps of lipid peroxidation: initiation, propagation and termination.....	18
7. Free radical damage of membranes.....	19
8. Antioxidant system to deal with the production of reactive oxygen species.....	20
9. Synthesis of glutathione.....	22
10. Structure of GSH and GSSG.....	23
11. Regeneration of reduced glutathione by glutathione reductase.....	24
12. Chemical structure of N-acetylcysteine.....	25
13. Experiment diagram.....	34
14. GSH recycling.....	35
15. Effect of 100% fat diet for 6 weeks on body weight.....	51
16. Effect of 100% fat diet for 6 weeks on total GSH.....	52
17. Effect of 100% fat diet for 6 weeks on serum AST.....	53
18. Effect of 100% fat diet for 6 weeks on serum ALT.....	54
19. Effect of 100% fat diet for 6 weeks on serum cholesterol.....	55
20. Effect of 100% fat diet for 6 weeks on serum triglycerides.....	56
21. Effect of 100% fat diet for 6 weeks on hepatic MDA content.....	57
22. Effect of NAC on body weight in rats with NASH.....	60

23. Effect of NAC on total GSH level in rats with NASH.....	61
24. Effect of NAC on serum AST level in rats with NASH.....	62
25. Effect of NAC on serum ALT level in rats with NASH.....	63
26. Effect of NAC on serum cholesterol in rats with NASH.....	64
27. Effect of NAC on serum triglycerides in rats with NASH.....	65
28. Effect of NAC on hepatic MDA content in rats with NASH.....	66
29. Hematoxylin and eosin stain of liver sections in normal control group....	67
30. Hematoxylin and eosin stain of liver sections in rats fed with 100% fat diet group.....	68
31. Hematoxylin and eosin stain of liver sections in NASH+diet group.....	69
32. Hematoxylin and eosin stain of liver sections in NASH+diet+NAC ₂₀ group.....	70
33. Hematoxylin and eosin stain of liver sections in NASH+diet+NAC ₅₀₀ group.....	71

LIST OF ABBREVIATIONS

ALT	=	Alanine aminotransferase
AST	=	Aspartate aminotransferase
BSA	=	Bovine serum albumin
CAT	=	Catalase
CCl_3^\cdot	=	Trichloromethyl radical
CCl_4	=	Carbon tetrachloride
$-\text{CH}_2$	=	Methylene group
CYP 2E1	=	Cytochrome P450 enzyme 2E1
FAS	=	Fatty acid synthase
FFA	=	Free fatty acid
GPX	=	Glutathione peroxidase
GSH	=	Glutathione
GSSH	=	Glutathione disulfide
HIV	=	Human immunodeficiency virus
4-HNE	=	4-Hydroxynonenal
H_2O_2	=	Hydrogen peroxide
MDA	=	Malondialdehyde
NAC	=	N-acetylcysteine
NAFLD	=	Nonalcoholic fatty liver disease
NASH	=	Nonalcoholic steatohepatitis
NO^\cdot	=	Nitric oxide radical
NO_2^\cdot	=	Nitric dioxide radical
O_2	=	Oxygen
O_2^\cdot	=	Superoxide anion radical
OH^\cdot	=	Hydroxyl radical

PPAR	=	Peroxisome proliferator-activated receptors
PPAR α	=	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PUFA	=	Polyunsaturated fatty acid
ROS	=	Reactive oxygen species
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
SEM	=	Standard error of the mean
-SH	=	Sulfhydryl group
SOD	=	Superoxide dismutase
TBA	=	Thiobarbituric acid
TCA	=	Tricarboxylic acid
TG	=	Triglycerides
TGF- β	=	Tissue growth factor beta
TMP	=	1,1,3,3-Tetramethoxypropane
TNB	=	5-Thio-2-nitrobenzoic acid
TNF	=	Tumor necrosis factor
UCP-2	=	Uncoupling protein-2
VLDL	=	Very low-density lipoproteins