بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز در برابر سمیّت کبدی ایزونیازید در موش صحرایی

داریوش مهاجری[1*]، یوسف دوستار[1]، جعفر رحمانی[2]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، تبریز، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، تبریز، ایران
* *نویسنده مسئول مکاتبات: mohajeri@iaut.ac.ir*
(دریافت مقاله: ۹۰/۸/۲۰، پذیرش نهایی: ۹۰/۹/۳)

چکیده

بیماری سلّ هم چنان به عنوان یک مسئله بهداشت عمومی در سراسر جهان مطرح است. ایزونیازید که به عنوان یک آنتی‌بیوتیک به طور معمول برای درمان بیماری سلّ مورد استفاده قرار می‌گیرد، یک عامل توکسیک قوی برای کبد به شمار می‌رود. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز در مقابل سمیّت کبدی ایزونیازید در موش صحرایی می‌باشد. موش‌های صحرایی نر ویستار به طور تصادفی در موش‌ها به‌طور تصادفی به ٤ گروه ۱۰ سری شامل: ۱-گروه شاهد سالم ۲- گروه سالم تیمار با عصاره ۳-گروه داروی سمی و ٤- گروه تیمار با عصاره و داروی سمی تقسیم شدند. از زمان شروع آزمایش تا پایان ۸ هفته در گروه‌های ۲ و ٤ از محلول عصاره ۱/۵٪ برای نوشیدن استفاده شد. در اواسط دوره آزمایش (هفته‌های چهارم و پنجم آزمایش) به گروه‌های ۳ و ٤ داروی ایزونیازید روزانه و به‌میزان ۵۰mg/kg به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. در پایان دوره آزمایش، ماحصل پراکسیداسیون لیپیدی (مالون دی آلدئید)، فعالیت سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو در هموژنات بافت کبد مورد سنجش قرار گرفت. گروه‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی با هم مقایسه گردیدند. سطح معنی‌داری $p<0/05$ در نظر گرفته شد. عصاره چای سبز به طور معنی‌داری میزان پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش و سطوح آنتی اکسیدان‌ها را در موش‌های تیمار شده با ایزونیازید افزایش داد. بررسی حاضر نشان داد که اثرات محافظتی عصاره چای سبز در آسیب اکسیداتیو کبدی ناشی از ایزونیازید، ممکن است با خواص آنتی‌اکسیدانی و زدایندگی رادیکال آزاد آن مرتبط باشد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۹۰، دوره ۵، شماره ۲، پیاپی ۱۸، صفحات: ۱۲۳۱-۱۲۲۱.
کلید واژه‌ها: چای سبز، ایزونیازید، سمّیت کبدی، آنتی‌اکسیدان، موش صحرایی

مقدمه

بیماری سلّ همچنان به‌عنوان یک مسئله بهداشت عمومی در سراسر جهان مطرح می‌باشد، به‌خصوص اینکه با شیوع بیماری ایدز یکی از عوامل عمده منجر به فوت در مبتلایان بزرگسال می‌باشد (۱۰). ایزونیازید (Isoniazid) که به‌عنوان یک داروی مؤثر به‌طور معمول برای درمان بیماری سل مورد استفاده قرار می‌گیرد، یک عامل توکسیک قوی برای کبد به شمار می‌رود. از آنجائی‌که کبد مکان اصلی سم‌زدایی داروی ضد سل ایزونیازید می‌باشد، لذا تجویز آن اختلالات متعدد

Archive of SID
www.SID.ir

متابولیک و مورفولوژیک را در کبد ایجاد می‌کند. این دارو توسط مکانیسم‌های متعددی باعث بروز هپاتیت می‌شود که با کاهش غلظت سرمی آلبومین و افزایش گلوبولین‌های سرمی بسته به شدت و مدت بیماری، مشخص می‌گردد. نشان داده شده است که پراکسیداسیون لیپیدهای آندوژن اصلی‌ترین فاکتور در سیتوتوکسیسیتی ایزونیازید می‌باشد. آسیب‌های اکسیداتیو ناشی ایزونیازید به تشکیل گونه‌های بسیار فعال اکسیژن که باعث پراکسیداسیون لیپیدی و تخریب و آسیب غشاءهای لیپیدی می‌شوند، نسبت داده می‌شود (۱۱). تغییر در مکانیسم‌های متعدد تدافعی سلول شامل اجزای آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک (گلوتاتیون احیاء reduced glutathione; GSH.) در هپاتوتوکسیسیتی ناشی از ایزونیازید گزارش شده است (۳۹).

استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها، به سرعت در حال توسعه می‌باشد. توجه ویژه‌ای به اثرات محافظتی آنتی اکسیدان‌های با منشاء طبیعی در برابر مسمومیت‌های ناشی از عوامل شیمیایی شده است (۹). امروزه، چای به عنوان منبعی با فعالیت‌های بیولوژیک و فارماکولوژیک مفید برای سلامتی انسان مورد توجه قرار گرفته است. خواص درمانی عصاره چای و پلی‌فنل‌های کاتچینن (catechin polyphenols) آن، منجر به انجام بررسی‌های علمی در جهت پیشگیری و درمان بیماری‌های متعددی توسط این عصاره شده است (۲۱ و ۲۸). Crespy و Williams در سال ۲۰۰٤ گزارش کرده‌اند که عصاره چای سبز دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و زدایندگی رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۳). Mohamadin و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که هم‌آوری (supplementation) عصاره چای سبز، آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از سیکلوسپورین- A را کاهش می‌دهد (۲۳). مشخص شده است که کاتچین‌های چای سبز از پراکسیداسیون لیپیدی توسط مواد شیمیایی در کبد و کلیه حیوانات جلوگیری می‌کند (۳۵). همچنین، تحقیقات نشان داده است که پلی‌فنل‌های چای سبز، دارای خواص ضد سرطانی در انسان می‌باشد (۱۹ و ٤۰).

با توجه به اثرات مفید و متعدد درمانی چای سبز، گمان می‌رود این گیاه بتواند کبد را در مقابل اثرات اکسیداتیو توکسیک ایرونیازید محافظت کند. در هر صورت با توجه به بررسی منابع، مطالعه‌ای در رابطه با اثرات محافظتی عصاره چای سبز در مقابل سمیّت کبدی ایرونیازید وجود ندارد. بنابراین تحقیق حاضر برای اولین بار جهت ارزیابی اثرات محافظتی عصاره چای سبز در مقابل سمیّت کبدی ایزونیازید طراحی گردیده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی مداخله‌گر آزمایشگاهی می‌باشد. برای انجام این مطالعه، از تعداد ۱۰۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰ ± ۲۰۰ گرم و در محدوده سنی ۹ هفته استفاده شد. شرایط تغذیه و نگه‌داری برای تمام گروه‌ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای ۲ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد بود. جیره غذایی یکسان و آب نیز به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفته و پس از یک هفته عادت به شرایط جدید، آزمایش شروع شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به ٤ گروه مساوی شامل: ۱- گروه شاهد سالم ۲- گروه سالم تیمار با عصاره ۳-گروه داروی سمی (Toxicant Control) ٤- گروه تیمار با عصاره و داروی سمی تقسیم شدند. عصاره طبق روش Maity و همکاران در سال ۱۹۹۸ تهیه گردید. به این صورت که ۱۵ گرم پودر چای سبز تازه در یک لیتر آب مقطر جوشان به مدت ۵ دقیقه خیسانده شده و محلول به دست آمده صاف و عصاره ۱/۵٪ تهیه شد. این محلول به عنوان تنها منبع آب نوشیدنی برای موش‌های تیمار با عصاره، مورد استفاده قرار گرفت (۲۰). آزمایش مدت ۸ هفته به طول انجامید. از زمان شروع آزمایش تا پایان ۸ هفته در گروهای ۱ (شاهد سالم) و ۳ (گروه داروی سمی) صرفاً از آب مقطر و در گروه‌های ۲ (سالم تیمار با

Archive of SID

عصاره) و ٤ (عصاره + داروی سمی) از محلول عصاره ۱/۵٪ برای نوشیدن استفاده شد. در اواسط دوره آزمایش (هفته‌های چهارم و پنجم آزمایش) به گروه‌های ۳ و ٤ داروی ایزونیازید روزانه و به‌میزان ۵۰mg/kg به شکل محلول در آب مقطر استریل (۱۰ ml/kg) به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید (۳۱ و ۳۸). به گروه‌های ۱ و ۲ نیز به‌طور همزمان فقط آب مقطر استریل به همان ترتیب تزریق شد.

در پایان دوره آزمایش (۸ هفته) و ٢٤ ساعت پس از آخرین تیمار، هم زمان همه موش‌ها با ایجاد دررفتگی در مهره‌های گردن راحت‌کشی شدند. کبد موش‌ها سریعاً خارج و در سالین بسیار سرد شستشو و هموژنات ۱۰٪ در ۱/۱۵٪ (w/v) کلرور پتاسیم تهیه گردید. هموژنات با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و محلول شناور جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از طریق اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde) و همچنین برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دسموتاز (Superoxide dismutase)، کاتالاز (Catalase)، گلوتاتیون پرکسیداز (Glutathione peroxidase) و گلوتاتیون ردوکتاز (Glutathione reductase) مورد استفاده قرار گرفت.

الف) اندازه گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید

مالون‌دی‌آلدئید، به عنوان مقیاسی از پراکسیداسیون چربی، در قالب TBARS (Thiobarbituric acid reacting substances) و با استفاده از روش Esterbauer و Cheesman مورد سنجش قرار گرفت (۸). به طور خلاصه، مخلوط واکنشگری متشکل از ۰/۲ میلی‌لیتر لوریل سولفات سدیم ۸/۱ درصد، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول اسید استیک ۲۰ درصد با pH=۳/۵ و ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول آبی ۰/۸ درصد تیوباربیتوریک اسید در ۰/۲ میلی لیتر PMS ۱۰ درصد (w/v)، ایجاد گردید. حجم مخلوط به دست آمده، توسط آب مقطر به ٤ میلی لیتر افزایش یافت، سپس به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد.

پس از خنک شدن در آب جاری، ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵ میلی‌لیتراز مخلوط n–بوتانول و پیریدین (۱۵:۱، v/v) به آن افزوده سپس سانتریفیوژ گردید. لایه ارگانیک آن برداشته شد و شدت جذب در (nm) ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری گردید. میزان TBARS با استفاده از ضریب ۱۰۵M–۱ cm–۱ ۱/۵٦ اندازه‌گیری و به‌صورت نانومول TBARS در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید. پروتئین بافتی با استفاده از روش بیوره اندازه گیری و مقدار TBARS به صورت نانومول در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

ب) اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دسموتاز

فعالیت سوپراکسید دسموتاز توسط روش Nishikimi (۲۷) مورد سنجش و توسط روش Kakkar (۱۷) نیز تعدیل گردید. در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین‌های تام هر یک از هموژنات‌های کبدی با بافر پیروفسفات سدیم، PMT (Phenazine methosulfate) و NBT (Nitro-blue Terazolium) مخلوط گردید. واکنش با افزودن NADH (Nicotinamide-adenine dinucleotide) آغاز گردید. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه انکوبه و با افزودن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگزای تشکیل شده در ۵٦۰nm اندازه‌گیری گردید. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین گردید.

ج) اندازه گیری فعالیت کاتالاز

فعالیت کاتالاز توسط روش Claiborne (۲) و براساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲٤۰nm، مورد سنجش قرار گرفت. به طور خلاصه، مخلوط مورد سنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی‌لیتر بافرفسفات (۰/۰۵ M, pH= ۷)، ۱ میلی‌لیتر پرکسید هیدروژن (۰/۰۱۹ M) و ۰/۰۵ میلی‌لیتر PMS (۱۰٪) در حجم نهایی ۳

Archive of SID

www.SID.ir

میلی‌لیتر بود. تغییرات در جذب در ۲٤۰nm اندازه‌گیری گردید. در نهایت نتیجه به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه گردید.

د) اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از روش Rotruck و همکاران (۳۳) و بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.

$H_2O_2 + 2GSH$ (گلوتاتیون احیاء) $\rightarrow 2H_2O +$ GSSG (گلوتاتیون اکسید)

گلوتاتیون پراکسیداز، در هموژنات بافتی، گلوتاتیون را اکسیده کرده که به طور همزمان پراکسید هیدروژن به آب احیاء می‌گردد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه توسط تری‌کلرواستیک اسید متوقف و گلوتاتیون باقیمانده توسط محلول DTNB (Dithiobis nitrobenzoic acid) مجدداً فعال گردیده و منجر به تشکیل ترکیب رنگی می‌گردد که با اسپکتروفتومتر در ٤۲۰nm اندازه‌گیری می‌شود. مخلوط واکنشگر متشکل از ۰/۲ میلی‌لیتر EDTA (Ethylenediamine tetra-acetic acid) ۰/۸mM، ۰/۱ میلی‌لیتر آزید سدیم (Sodium azide) ۱۰mM، ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۲/۵mM، ۰/۲ میلی‌لیتر هموژنات بود که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد متوقف و لوله‌ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۳ میلی‌لیتر دی سدیم هیدروژن ۰/۸ mM و ۰/۱ میلی‌لیتر DTNB ۰/۰٤ درصد به محلول شناور افزوده شد و بلافاصله رنگ حاصله در ٤۲۰nm اندازه‌گیری شد. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به صورت میکرومول گلوتاتیون اکسید/دقیقه/میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

هـ) اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز

فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز با استفاده از روش Mohandas و همکاران (۲٤) بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.

$NADPH + H^+ + GSSG \rightarrow NADP^+ + 2GSH$

در حضور گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون اکسیده، احیاء گردیده و هم زمان، NADPH به +NADP اکسیده می‌شود. فعالیت آنزیم در دمای اتاق توسط سنجش میزان ناپدید شدن NADPH/ دقیقه در ۳٤۰nm، با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید.

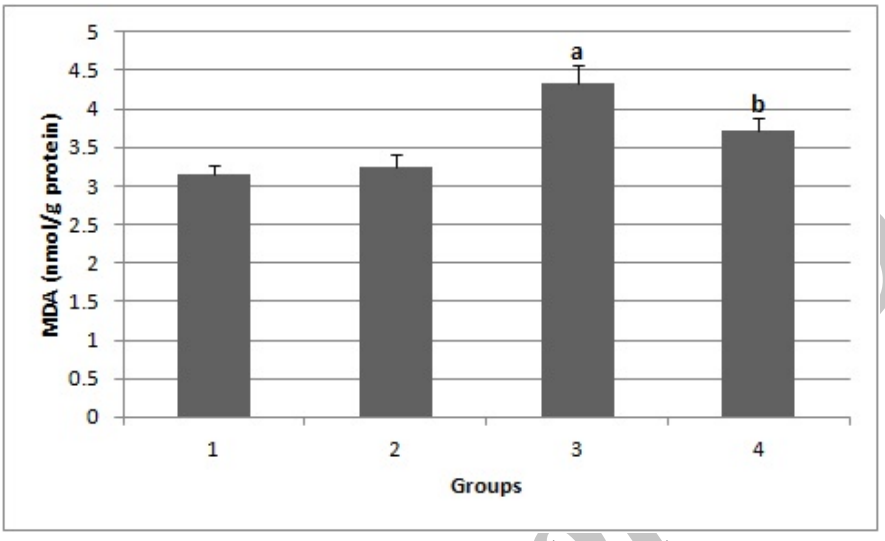
تحلیل آماری

برای تحلیل داده‌ها از بسته نرم افزاری SPSS ویرایش ۱۳ استفاده شد. داده‌های به دست آمده کمّی، به صورت میانگین ± انحراف استاندارد ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی مورد ارزیابی قرار گرفت. اختلافات در سطح $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شد.

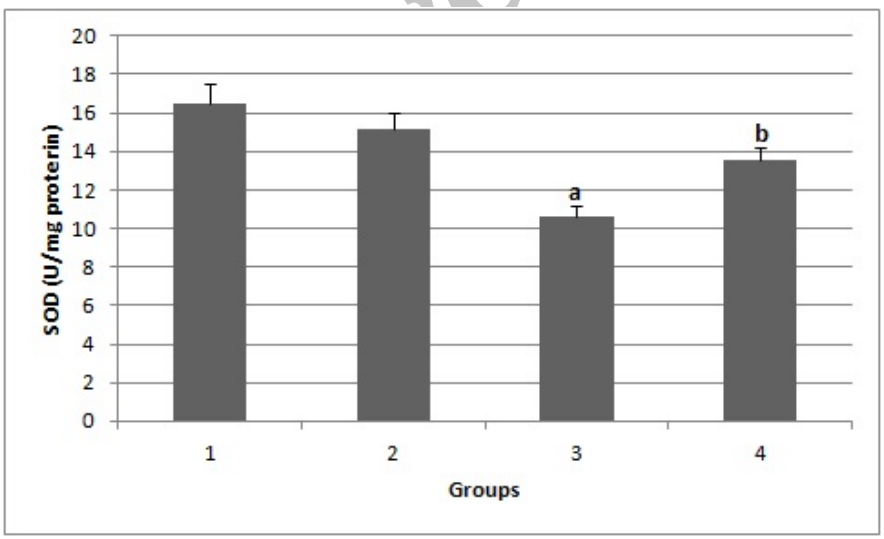
یافته‌ها

در موش‌های صحرایی سالم مصرف عصاره تغییر معنی‌داری را در میزان پارامترهای مورد سنجش در مقایسه با گروه شاهد ایجاد نکرد. در موش‌های صحرایی تیمار شده با ایزونیازید مقادیر آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز، در مقایسه با گروه شاهد، به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) کاهش و میزان مالون دی آلدئید به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) افزایش یافت. تیمار با محلول ۱/۵٪ عصاره چای سبز مقادیر آنزیم‌های آنتی اکسیدانی فوق را که در اثر ایزونیازید کاهش یافته بود، به طور معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) افزایش داد، لکن این میزان مصرف عصاره هرگز نتوانست مقادیر آنزیم‌های مذکور را به حد طبیعی برساند. تیمار با عصاره چای سبز مقدار افزایش یافته مالون دی آلدئید را در موش‌های تیمار شده با ایزونیازید نیز به طور معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) کاهش داد، لکن این میزان مصرف عصاره هم چنان نتوانست مقدار مالون دی آلدئید را در موش‌های تیمار شده با ایزونیازید به حد طبیعی خود برساند (نمودارهای ۱ تا ۵).

Archive of SID
www.SID.ir

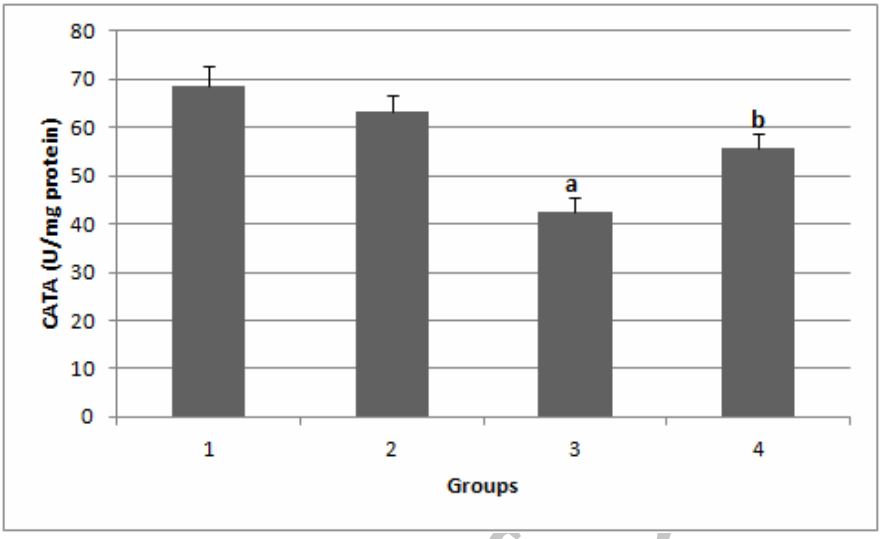


نمودار ۱- تأثیر عصاره چای سبز بر میزان مالون‌دی‌آلدئید کبد در آسیب ناشی از ایزونیازید در موش صحرایی (میانگین ± انحراف استاندارد) a: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ۱، b: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ۳

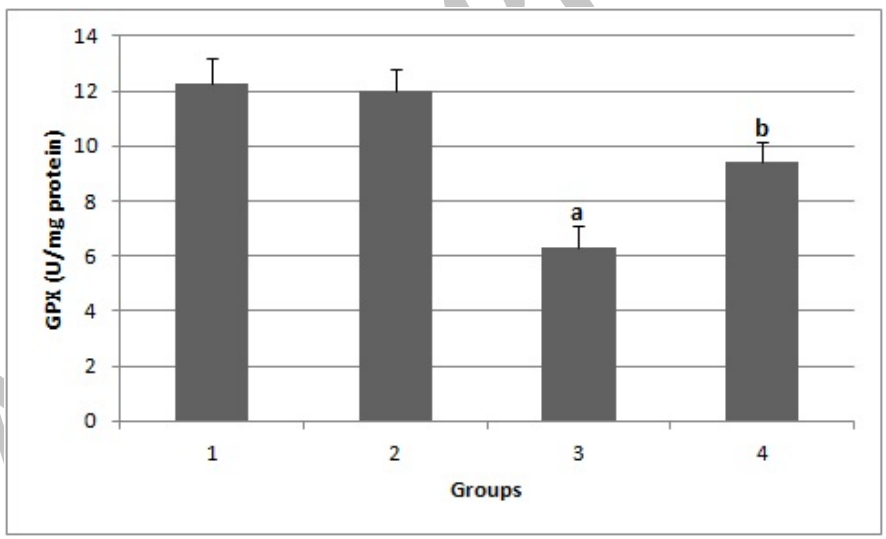


نمودار ۲- تأثیر عصاره چای سبز بر فعالیت سوپراکسید دسموتاز کبد در آسیب ناشی از ایزونیازید در موش صحرایی (میانگین ± انحراف استاندارد) a: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ۱، b: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ۳

www.SID.ir

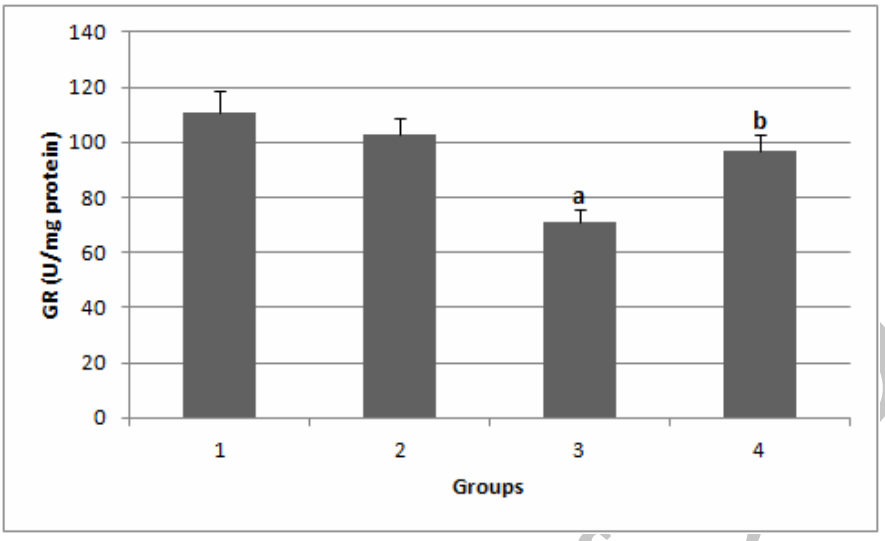


نمودار ۳- تأثیر عصاره چای سبز بر فعالیت کاتالاز کبد در آسیب ناشی از ایزونیازید در موش صحرایی (میانگین ± انحراف استاندارد) a: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ۱، b: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ۳



نمودار ٤- تأثیر عصاره چای سبز بر فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز کبد در آسیب ناشی از ایزونیازید در موش صحرایی (میانگین ± انحراف استاندارد) a: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ۱، b: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ۳

www.SID.ir



نمودار ۵- تأثیر عصاره چای سبز بر فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز کبد در آسیب ناشی از ایزونیازید در موش صحرایی (میانگین ± انحراف استاندارد) a: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ۱، b: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ۳

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی حاضر، همان طورکه قبلاً نیز به آن اشاره شد، اولین مطالعه‌ای است که به بررسی اثرات محافظتی عصاره چای سبز در برابر سمیت کبدی ایزونیازید پرداخته است. در این مطالعه، تزریق داخل صفاقی ایزونیازید به میزان ۵۰mg/kg در مدت ۸ هفته باعث آسیب شدید کبد شد به طوری که افزایش قابل توجه میزان مالون‌دی‌آلدئید و کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز را در بافت کبد به همراه داشت. نتایج بررسی حاضر از این لحاظ با یافته‌های Prabakan و همکارانش در سال ۲۰۰۰، Tasduq و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Santhosh و همکاران در سال ۲۰۰۷ همخوانی دارد (۳۱، ۳۶ و ۳۹).

ایزونیازید یک القاء کننده قوی سیستم سیتوکروم P450 است که تولید متابولیت‌های سمی داروها و اتصال کووالان آنها به ماکرومولکول‌های کبدی را سبب می‌گردد (۳۰). به عبارتی دیگر، بیوترانسفورماسیون ایزونیازید به متابولیت‌های فعال که قادر به اتصال به ماکرومولکول‌های سلول‌های کبدی هستند، منجر به آسیب کبد می‌شود (۱۱). تحقیقات نشان داده است که استرس اکسیداتیو مکانیسم اصلی ایزونیازید در ایجاد اثرات توکسیک در کبد موش‌های صحرایی است (۱). یافته‌های مطالعه حاضر الگوی فوق را مورد تأیید قرار می‌دهد به طوری که، در بافت کبد موش‌های گروه دریافت‌کننده ایزونیازید (گروه ۳) افزایش معنی‌داری در میزان پراکسیداسیون لیپیدی مشاهده شد که این خود در راستای کاهش معنی‌دار آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مورد مطالعه بود.

در این مطالعه به نظر می‌رسد که رادیکال‌های آزاد حاصل از واکنش متابولیت‌های ایزونیازید با اکسیژن یا واکنش رادیکال‌های سوپراکسید با پراکسیدهیدروژن باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و همچنین اسیدهای چرب غیر اشباع توری داخل سیتوپلاسمی گردیده است که منجر به تشکیل پراکسیدهای لیپیدی (مالون‌دی‌آلدئید) و از بین رفتن تمامیت غشاء سلول و در نهایت آسیب کبد شده است. افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید در موش‌های تیمارشده با ایزونیازید، نشاندهنده افزایش واکنش‌های پراکسیداسیونی است که به ضعف مکانیسم‌های تدافعی آنتی‌اکسیدانی نیز منجر گردیده و بدین ترتیب ممانعت از تولید مفرط رادیکال‌های آزاد هم مقدور نخواهد بود (۲۵). به عبارتی دیگر افزایش میزان مالون

Archive of SID

www.SID.ir

دی‌آلدئید در کبد در اثر ایزونیازید حاکی از افزایش پراکسیداسیون لیپیدی است که منجر به آسیب بافت کبد و هم چنین ناتوانی مکانیسم تدافعی آنتی اکسیدانی در ممانعت از تشکیل بی‌رویه رادیکال‌های آزاد می‌گردد.

سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که یک سیستم تدافعی را علیه گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species; ROS) تشکیل داده‌اند (۱۸).

کاهش فعالیت سوپراکسید دسموتاز شاخصی حساس در مورد آسیب سلول‌های کبدی است. این آنزیم یکی از مهم‌ترین عوامل در سیستم تدافعی آنتی اکسیدانی آنزیماتیک است. سوپراکسید دسموتاز آنیون سوپراکسید را از طریق تبدیل آن به پراکسید هیدروژن پاکسازی نموده و بدین ترتیب اثرات توکسیک آن را کاهش می‌دهد (٦). در بررسی حاضر، میزان سوپراکسید دسموتاز در موش‌های تیمار شده با ایزونیازید به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، به طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین فعالیت آنزیم‌های زداینده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نیز در این موش‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت. به نظر می‌رسد که غیرفعال شدن سوپراکسید دسموتاز توسط آنیون‌های افزایش یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود. در مطالعه ما، مصرف عصاره چای سبز مانع از کاهش سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز شد که این ممکن است در اثر زدایش رادیکال‌ها توسط عصاره باشد که منجر به حفظ و بقاء این آنزیم‌ها شده است.

کاتالاز آنزیم آنتی‌اکسیدانی است که در بافت‌های حیوانی به طور گسترده‌ای منتشر بوده و دارای بیشترین فعالیت در کبد و گلبول‌های قرمز است. کاتالاز پراکسید هیدروژن را تجزیه می‌کند و باعث محافظت بافت‌ها از رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل می‌شود (٤). بنابراین کاهش فعالیت کاتالاز ممکن است منجر به برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن گردد.

گلوتاتیون ردوکتاز یک آنزیم سیتوزولی کبدی است که در کاهش گلوتاتیون اکسید (GSSG) –به عنوان محصول نهایی فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بر روی گلوتاتیون احیاء (GSH)– دخیل است (٢٦). در بررسی حاضر، متعاقب تیمار با ایزونیازید کاهش قابل توجهی در میزان گلوتاتیون پراکسیداز حاصل گردید که منجر به دسترسی گلوتاتیون ردوکتاز به سوبسترا شده و بدین ترتیب فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز کاهش یافته است. در بررسی ما، چای سبز در کنار ایزونیازید فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز را مجدداً برقرار نموده که مصرف گلوتاتیون اکسید را جهت تشکیل گلوتاتیون احیاء و افزایش سم‌زدایی متابولیت‌های فعال توسط کونژوگاسیون با گلوتاتیون احیاء برقرار کرده است.

پلی‌فنل‌ها (polyphenols)، به‌خصوص کاتچین‌ها (catechins) از عمده‌ترین اجزای محلول در آب چای سبز می‌باشند. مهم‌ترین کاتچین‌های چای سبز عبارتند از: اپیکاتچین (epicatechin; EC)، اپیگالوکاتچین (epigallocatechin; EGC)، اپیکاتچین گالیت (epicatechin gallate) و اپیگالوکاتچین گالیت (epigallocatechin gallate). تحقیقات درون‌تنی (*in vitro*) و برون‌تنی (*in vivo*) انجام شده طی دهه اخیر، نشان داده است که چای سبز و پلی‌فنل‌های آن دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشند (۱۲، ۱۳، ۳۷ و ٤١). کاتچین‌های چای سبز، زداینده‌های قدرتمند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های هیدروکسیل و نیتریک اکسید حاصل از مواد شیمیایی مختلف می‌باشند. کاتچین‌ها همچنین به دلیل ساختار کاتکولی (catechol structure) خود به فلزات متصل شده و مانع از تشکیل رادیکال‌های آزاد توسط آنها می‌گردند (۳۲). به‌علاوه، کاتچین‌های چای سبز خواص آنتی اکسیدانی اورات، بتا کاروتن، ویتامین C و ویتامین E را در محافظت از سلول دارا می‌باشند (۲۹). مطالعات زیادی در

Archive of SID

مورد اثرات محافظتی چای سبز در مقابل اثرات توکسیک مواد شیمیایی مختلف انجام شده است. Jiao و همکارانش در سال ۲۰۰۳ اثرات محافظتی پلی‌فنل‌های چای سبز را در برابر سمیت داروی فنوفیبرات (داروی کاهنده چربی خون) بر سلول‌های HepG2 انسانی نشان داده‌اند (۱۶). Guo و همکارانش در سال ۲۰۰۵ اثرات محافظتی پلی‌فنل‌های چای سبز را در برابر آپوپتوزیس سلول‌های SH-SY5Y در اثر داروی ضد پارکینسون 6-OHDA (6-hydroxydopamine)، گزارش کرده‌اند (۱٤). Sai و همکاران وی در سال ۱۹۹۸ اثرات محافظتی چای سبز را در برابر سمیت کبدی، آسیب اکسیداتیو DNA و پرولیفراسیون سلولی در کبد موش‌های صحرایی، در پی تجویز مکرر خوراکی ۲-نیتروپروپان (2-Nitropropane) به اثبات رسانده‌اند (۳٤). مطالعات انجام شده توسط Mehana و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داده است که عصاره چای سبز قادر است کبد موش‌های صحرایی را در برابر سمیت کبدی سرب محافظت کند (۲۲). Chuan و همکارانش در سال ۲۰۰۷ اثرات محافظتی پلی‌فنل‌های چای سبز را بر سمّیت کبدی میکروسیستین (microcystin-LR) در موش گزارش کرده‌اند (۵). Dobrzyńska و همکاران در سال ۲۰۰۵ تأثیر حفاظتی چای سبز را بر غشاء گلبول‌های قرمز موش‌های صحرایی با سنین مختلف که توسط اتانول مسموم شده بودند، مشخص کردند (۷). در تحقیقاتی که Hong و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام دادند، اثرات محافظتی چای سبز را بر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی مغز در موش‌های بیابانی مغولی (Mongolian gerbils) نشان دادند (۱۵). نتایج مطالعه ما نیز گزارش فوق را در خصوص اثرات آنتی اکسیدانی و زدایش رادیکال آزاد چای سبز مورد تائید قرار می‌دهد.

نتایج بررسی حاضر، اثرات مفید فارماکولوژیکی عصاره چای سبز را در برابر سمیّت کبدی ایزونیازید نشان می‌دهد که پس از انجام کارآزمایی‌های شاهدار اتفاقی و حصول نتایج مثبت، این گیاه می‌تواند به عنوان یک داروی گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی، به‌صورت مکمل و افزودنی غذایی و یا از طریق صنایع داروسازی جهت پیشگیری از آسیب‌های کبدی ناشی از استرس اکسیداتیو متعاقب درمان با ایزونیازید در مورد انسان مورد استفاده قرار گیرد. لکن، تعیین تأثیر دوزهای مختلف عصاره و شناخت دقیق مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مولکولی و سلولی مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن نیاز به مطالعات آتی دارد.

سپاسگزاری

هزینه تحقیق حاضر توسط معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز تأمین گردیده است. مؤلفین مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز ابراز می‌دارند.

منابع

1. Attri S, Rana SV, Vaiphei K, Sodhi CP, Kaytal R, Goel RC, et al. Isoniazid and rifampicin induced oxidative hepatic injury protection by N-acetylcysteine. Hum Exp Toxicol 2000; 19: 517-22.
2. Claiborne, A. Catalase activity. In: Boca Raton FL, editor. CRC Handbook of methods for oxygen radical research. Florida: CRC Press, Boca Raton; 1985.P.283-4.
3. Crespy V and Williamson G. 2004. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models, J Nutr 134:3431S–3440S.
4. Chance B, Greenstein DS, Roughton RJW. The mechanism of catalase action. 1. Steady-state analysis. Arch Biochem Biophys 1952; 37:301-21.
5. Chuan Xu, Wei-Qun Shu, Zhi-Qun Qiu, Ji-An Chen, Qing Zhao and Jia Cao. 2007. Protective effects of green tea polyphenols against subacute hepatotoxicity induced by microcystin-LR in mice. Environmental Toxicology and Pharmacology. 24(2):140-148.

Archive of SID
www.SID.ir

6. Curtis SJ, Mortiz M, Sondgrass PJ. Serum enzyme derived from liver cell fractions. The response of carbon tetrachloride intoxication in rats. Gastroentrology 1972; 62:84-92.
7. Dobrzyńska I, Szachowicz-Petelska B, Ostrowska J, Skrzydlewska E and Figaszewski Z. 2005. Protective effect of green tea on erythrocyte membrane of different age rats intoxicated with ethanol. Chemico-Biological Interactions. 156(1):41-53.
8. Esterbauer H, Cheesman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol 1990; 186:407-21.
9. Frei B and Higdon J. 2003. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies, J Nutr 133:3275-3284.
10. Gajalakshmi V, Peto R, Kanaka TS, Jha P. 2003. Smoking and mortality from tuberculosis and other diseases in India: retrospective study of 43000 adult male deaths and 35000 controls. Lancet 362(9383):507-15.
11. Georgieva N, Gadjeva V, Tolekova A. New isonicotinoylhydrazones with SSA protect against oxidative-hepatic injury of isoniazid. TJS 2004; 2:37-43.
12. Guo Q, Zhao BL, Shen SR, Hou JW, Hu JG and Xin WJ. 1999. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. Biochim. Biophys. Acta 1427:13–23.
13. Guo Q, Zhao BL, Li MF, Shen SR and Xin WJ. 1996. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. Biophys. Acta 1304:210–222.
14. Guo S, Bezard E and Zhao B. 2005. Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS–NO pathway. Free Radical Biology and Medicine. 39(5): 682-695.
15. Hong JT, Ryua SR, Kima HJ, Leea JK, Leea SH, Yunb YP, et al. 2001. Protective effect of green tea extract on ischemia/reperfusion-induced brain injury in Mongolian gerbils. Brain Research. 888(1):11-18.
16. Jiao HL, Ye P. and Zhao BL. 2003. Protective effects of green tea polyphenols on human HepG2 cells against oxidative damage of fenofibrate. Free Radical Biology and Medicine. 35(9):1121-1128.
17. Kakkar P, Das B, Viswanathan PN. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase, Indian J Biochem Biophys 1984;21:130-2.
18. Lil JL, Stantman FW, Lardy HA. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Arch Biochem Biophys 1988;263:150-6.
19. Lung HL, Ip WK, Wong CK, Mak NK, Chen ZY and Leung KN. 2002. Anti-proliferative and differentiation-inducing activities of the green tea catechin epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the human eosinophilic leukemia EoL-1 cell line, Life Sci. 72 (3):257–268.
20. Maity S, Vadasiromoni J and Ganguly D. 1998. Role of glutathione in the antiulcer effect of hot water extract of black tea. Jpn J Pharmacol 78:285–292.
21. Mandel S, Weinreb O, Reznichenk L, Kafon L and Amit T. 2006. Green tea catechins as brain-permeable, non toxic iron chelators to 'iron out iron' from the brain. J Neural Transm 71:249–257.
22. Mehana EE, Meki AR, Fazili KM. 2010. Ameliorated effects of green tea extract on lead induced liver toxicity in rats. Experimental and Toxicologic Pathology. Article in Press.
23. Mohamadin A, El-Beshbishy H and El-Mahdy M. 2005. Green tea extract attenuates cyclosporine A-induced oxidative stress in rats. Pharm Res 51:51–57.
24. Mohandas J, Marshall JJ, Duggin GG, Horvath JSL, Tiller DG. Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. Cancer Res 1984; 44:5086-91.
25. Naik SR. Antioxidants and their role in biological functions: An overview. Indian Drugs 2003; 40:501-16.
26. Naik SR, Panda VS. Hepatoprotective effect of Ginkgoselect Phytosome in rifampicin induced liver injury in rats: evidence of antioxidant activity. Fitoterapia 2008; 79:439-45.
27. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. Biochem Biophys Res Commun 1972; 46:849-54.
28. Ostrowska J and Skrzydlewska E. 2006. The comparison of effect of catechins and green tea extract on oxidative modification of LDL in vitro, Adv Med Sci 51: 298–303.
29. Pietta PG, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P and Bombardeli E. 1998. Catechin metabolites after intake of green tea infusions. Biofactors 8:111–118.
30. Powell-Jackson PR, Tredger JM, Smith HM, Davis M, Williams R. Effect of isoniazid administration on selected rat and mouse hepatic microsomal mixed-function oxidases and in vitro [14C]acetylhydrazine-derived covalent binding. Biochem Pharmacol 1982;31:4031-34.
31. Prabakan M, Anandan R, Devaki T. Protective effect of Hemidesmus indicus against rifampicin and isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. Fitoterapia 2000; 71:55-9.

Archive of SID

www.SID.ir

32. Rice-Evans C. and Miller N. 1997. Measurement of the antioxidant status of dietary constituents, low-density lipoproteins, and plasma. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 57:499–505.
33. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science 1973; 179:588-90.
34. Sai K, Kai S, Umemura T, Tanimura A, Hasegawa R, Inoue T and Kurokawa Y. 1998. Protective Effects of Green Tea on Hepatotoxicity, Oxidative DNA Damage and Cell Proliferation in the Rat Liver Induced by Repeated Oral Administration of 2-Nitropropane. Food and Chemical Toxicology. 36(12):1043-1051.
35. Sano M, Takahashi Y, Yoshino K, Shimoi K, Nakamura Y, Tomita I, Oguni I and Konomoto H. 1995. Effect of tea (Camellia sinensis L.) on lipid peroxidation in rat liver and kidney: a comparison of green and black tea feeding, Biol. Pharm. Bull. 18 (7):1006–1008.
36. Santhosh S, Sini TK, Anandan R, Mathew PT . Hepatoprotective activity of chitosan against isoniazid and rifampicin-induced toxicity in experimental rats. Eur J Pharmacol; 2007; 572:69-73.
37. Shen SR, Yang XQ, Yang FJ, Zhao BL and Xin WJ. 1993. Synergic antioxidant effect of tea catechins. J. Tea Sci. 13:141–146.
38. Sodhi CP, Rana SV, Mehta SK, Vaiphei K, Attari S and Mehta S. 1997. Study of oxidative-stress in isoniazid-rifampicin induced hepatic injury in young rats. Drug Chem Toxicol 20(3):255-269.
39. Tasduq SA, Peerzada K, Koul S, Bhat R, Johri RK. Biochemical manifestations of anti-tuberculosis drugs induced hepatotoxicity and the effect of silymarin. Hepatol Res 2005; 31:132-5.
40. Yang CS, Kim S, Yang GY, Lee MJ, Liao J, Chung JY and Ho CT. 1999. Inhibition of carcinogenesis by tea: bioavailability of tea polyphenols and mechanisms of actions, Proc. Exp. Bio. Med. 220(4):213–217.
41. Zhao BL, Li XJ, He R, Cheng SJ and Xin WJ. 1989. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active radicals. Cell Biophys. 14:175-185.

Archive of SID

www.SID.ir