تأثیر عصاره چای سبز بر آسیب‌شناسی بافتی و شاخص‌های سرمی آسیب بافت کبد در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

علی اکبر ابوالفتحی[1*]، علی رضایی[2]، غفور موسوی [2]، محمدرضا ولیلو[3]، بهبود جعفری[4]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، گروه زیست شناسی، اهر، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، گروه علوم درمانگاهی، تبریز، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، گروه دامپزشکی، شبستر، ایران
٤. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، گروه میکروبیولوژی، اهر، ایران
* *نویسنده مسئول مکاتبات: abolfathiak@yahoo.co.uk*
(دریافت مقاله: ۹۰/۷/٤، پذیرش نهایی: ۹۰/۱۰/۱۰)

چکیده

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی آسیب کبد در دیابت ملیتوس و بررسی اثرات محافظتی عصاره چای سبز در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین می باشد. برای این منظور، ٤٠ سر موش صحرایی نر به ٤ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند: ۱) گروه شاهد سالم، ۲) گروه سالم تیمار با عصاره چای سبز، ۳) گروه دیابتی و ٤) گروه دیابتی تیمار با عصاره چای سبز. برای دیابتی کردن موش‌ها، استرپتوزوتوسین با تک دز ٦٥ mg/kg به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. از زمان شروع آزمایش، موش‌های تیمار با عصاره، عصاره چای سبز (۱/۵، w/v٪) را در آب آشامیدنی به مدت ۸ هفته دریافت کردند. در انتهای آزمایش سطوح سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز(AST)، آلکالین فسفاتاز (AP)، آلبومین و بیلی روبین تام اندازه-گیری شدند. برای آسیب‌شناسی بافت کبد نیز برش‌هایی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، طبق روش‌های معمول تهیه مقاطع هیستوپاتولوژی تهیه گردید. موش‌های صحرایی دیابتی افزایش معنی‌دار شاخص‌های سرمی آسیب بافت کبد را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند (p<۰/۰۵)، در حالی که در گروه دیابتی تیمار با عصاره چای سبز، این شاخص‌ها در مقایسه با گروه دیابتی به‌طور معنی داری کاهش نشان داد (p<۰/۰۵). یافته‌های آسیب‌شناسی بافت کبد در توافق با نتایج بیوشیمیایی سرم نشانگر بهبود ساختار بافت آسیب دیده کبد در موش‌های دیابتی بود. نتایج این مطالعه نشان داد عصاره چای سبز دارای اثرات محافظت از بافت کبد در دیابت القاء شده با استرپتوزوتوسین می‌باشد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۹۰، دوره ۵، شماره ۳، پیاپی ۱۹، صفحات: ۱۳۲٤-۱۳۱۵.
کلید واژه‌ها: دیابت، کبد، چای سبز ، شاخص‌های آسیب کبد، آسیب‌شناسی بافتی، موش صحرایی

مقدمه

فاکتورهای ژنتیکی متفاوتی منجر به دیابت نوع ۱ و دیابت ملیتوس نوع۲ می گردند. با این حال هر کدام از آنها مستعد بروز عوارضی مانند نفروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی اعصاب محیطی و افزایش فشار خون هستند (۱٦ و ٤۲). بیماری دیابت به عنوان یکی از عومل اصلی شیوع اختلالات کبدی در ایالات متحده محسوب می شود. بسیاری از تحقیقات نشان می دهند

که بیماری کبد یکی از علل مهم مرگ و میر در دیابت تیپ ۲ می باشد (۸). از این رو شیوع بالای بیماری‌های کبدی در بیماران دیابتی و نیز بروز دیابت در بیماران کبدی گزارش شده است. به نظر می‌رسد که بروز بیماری‌های کبدی بیشتر در دیابت نوع ۲ اتفاق می‌افتد که عوارضی همچون غیر طبیعی بودن آنزیم‌های کبدی، کبد چرب غیرالکلی (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) ، سیروز، کارسینومای سلول‌های کبدی و نارسایی حاد کبدی را در بر دارد (۵۱).

افزایش خفیف ترانس آمینازها اغلب در بیماران دیابتی تیپ ۲ وجود دارد. علاوه بر آن، برای کنترل عوارض کبدی دیابت اقداماتی نظیر همودیالیز یا فوتوکوآگولاسیون شبکیه (Retinal photo- coagulation) موجود نمی‌باشد. بنابراین، با وجود اینکه عوارض کبدی دیابت کمتر معمول می‌باشد، ولی می‌توان آنرا در کنار عوارضی همچون گلومروپاتی (Glomerulopathy)، رتینوپاتی و نفروپاتی قرار داد. آزمایشات سالانه برای مشخص شدن بیماری کبد می‌تواند به‌وسیله آنالیزهای بیوشیمیایی ساده مثل آلانین آمینوترنسفراز انجام شود (۲). استرس اکسیداتیو به تازگی به‌عنوان یکی از سازوکارهای دخیل در دیابت ملیتوس و عوارض ناشی از آن مطرح شده است (۱٤). رادیکال های آزاد به‌طور مستمر در بدن در نتیجه فرایندهای طبیعی متابولیک و تعامل با محرک های محیطی تولید می شوند. در شرایط فیزیولوژیک، طیف وسیعی از دفاع آنتی اکسیدانی علیه اثرات مضر ناشی از فرآوردهای رادیکال های آزاد در بدن موجود زنده وجود دارد (۱٤). استرس اکسیداتیو از عدم تعادل بین تولید گونه‌های بازفعال اکسیژن (ROS) و عوامل آنتی اکسیدان که سبب پاکسازی و حذف ROS هستند، ایجاد می شود. به‌عنوان مثال افزایش تولید ROS یا کاهش عوامل آنتی اکسیدان و یا تغییرات هردوی آنها می تواند منجر به استرس اکسیداتیوگردد. در دیابت، گلیکاسیون پروتئینی و اتواکسیداسیون گلوکز می‌تواند رادیکال‌های آزاد تولید کند که به نوبه خود باعث کاتالیز پراکسیداسیون لیپیدی می‌شوند (۳ و ۳٦). به‌علاوه، در دیابت بروز اختلالات سیستم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی اعم از تغییر در آنزیم‌های آنتی اکسیدان (٤٦)، اختلال در متابولیسم گلوتاتیون (۳٤)، و کاهش سطوح اسید اسکوربیک نشان داده شده است (۱۹ و ۵۹). تا به حال، افزایش استرس اکسیداتیو در محیط زنده به وضوح نشان داده نشده است. با این وجود، چندین مطالعه بر روی انسان و مدل‌های حیوانی که از روش Thiobarbituric acid reactive)TBARS substances; TBARS) استفاده شده، افزایش پراکسیداسیون لیپید در غشا و لیپوپروتئین را در دیابت نشان داده است (۱۲، ۲۲، ۳۱، ۳۸، ٤۷ و ۵۲). Feillet-Coudray و همکارانش وضعیت آنتی اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی بافت کبد را در دیابت تجربی مورد مطالعه قرار داده‌اند (۱۱). در مطالعه‌ای دیگر، نشان داده شده است که، عوامل ضددیابتی می‌توانند سطوح بیومارکرهای سرمی شاخص آسیب کبد را کاهش دهند (۱۵)، اما این عوامل می توانند اثرات جانبی شدیدی به همراه داشته باشند (۱).

استفاده ازگیاهان دارویی بعنوان درمان های جایگزین سالم و موثر در هایپرگلیسمی و مسمومیت کبدی در نظر گرفته می‌شوند. تاثیر شگرف، اثرات جانبی ناچیز و قیمت نسبتاً پائین آنها باعث علاقه و توجه روزافزون به درمان با گیاهان دارویی شده است. داروهای گیاهی یا عصاره های آنها حتی در مواقعی که ترکیبات فعال زیستی‌شان نامشخص بوده از دیر باز به‌طور گسترده کاربرد داشته‌اند (۱۳). بنابراین، مطالعه بر روی عصاره‌های گیاهی برای پی بردن به مکانیسم عمل، کارآیی و سالم بودنشان می‌تواند بسیار مفید واقع گردد. چای سبز (leaves of *Camellia sinensis*, Theaceae) به‌عنوان نوشیدنی معروف در آسیای شرقی و به عنوان یک گیاه درمانی در اروپا و آمریکای شمالی مطرح می‌باشد. افزایش مصرف چای سبز می‌تواند خطر بیماری کبد را کاهش دهد. به طوری که، مطالعات بالینی جمعیت–محور نشان داده است که در مردان با مصرف

بیش از ۱۰ فنجان چای سبز در روز احتمال کمتری از شیوع بیماری و اختلالات کبدی وجود دارد. همچنین به‌نظر می رسد که این گیاه کبد را از اثرات مضر مواد سمی مثل الکل محافظت می‌کند (۲۰). برگ این گیاه به‌عنوان یک عامل ضد التهابی، آنتی اکسیداتیوی، ضد موتاژنی (Antimutagenic) و ضدکارسینوژنی در نظر گرفته می شود (٤ و ٥٥) و می‌تواند از اختلالات قلبی ممانعت به‌عمل آورد. بررسی‌های اپیدمیولوژیکی نشان داده است که مصرف چای سبز از دیابت تیپ ۲ جلوگیری می کند (٤٣ و ٥٧). Tsuneki و همکاران نشان داده‌اند که چای سبز اثر ضد هایپرگلیسمی در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین ایجاد می‌کند (٥٠). Crespy و Williamson گزارش کردند که عصاره چای سبز ویژگی-های پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و آنتی اکسیدانی از خود نشان می‌دهند (٦). با توجه به ویژگی‌های ضد هایپرگلیسمی و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی چای سبز، هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات حفاظت از کبدی عصاره چای سبز در دیابت القا شده با استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این در این مطالعه ٤٠ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰-۱۸۰ گرم از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز تهیه و به طورتصادفی به ٤ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند: ۱) گروه شاهد سالم، ۲) گروه سالم تیمار با عصاره چای سبز، ۳) گروه دیابتی و ٤) گروه دیابتی تیمار با عصاره چای سبز. موش‌ها برای سازگاری با محیط جدید، قبل از شروع مطالعه به مدت یک هفته در قفس‌های مخصوص در دمای $۲۳ \pm ۲^{\circ}C$ با شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده و در طول آزمایش دسترسی کامل به آب و غذای استاندارد را داشتند. در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز بود. برای دیابتی کردن موش‌ها، استرپتوزوتوسین (ساخت شرکت سیگما) با تک دز ٦٥ mg/kg به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. بعد از ۱۸ ساعت حیوانات ناشتا با سطح گلوکز خون بیشتر از (١٦/٥mmol/L)دیابتی در نظر گرفته شده و در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند (۱۰). از زمان شروع آزمایش، موش-های تیمار با عصاره، عصاره چای سبز را در آب آشامیدنی (w/v ،١/٥٪) به‌مدت ۸ هفته دریافت کردند. عصاره چای سبز نیز بر اساس پروتوکل Maity و همکارانش (۱۹۹۸) با مخلوط کردن ۱۵ گرم پودر چای سبز در ۱ لیتر آب مقطر در حال جوش بمدت ۵ دقیقه تهیه شد . این محلول به‌عنوان تنها منبع نوشیدنی در اختیار موش‌ها قرار گرفت (۳۲).

در پایان آزمایش نمونه خون ناشتا از سینوس پشت کره چشم (Retro-orbital plexus) جمع آوری و برای ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شده و سرم آن جداسازی شد. بیومارکرسرمی فعالیت کبد شامل ALT ، AST، ALP، آلبومین و بیلی‌روبین تام (۲٦، ۳۰، ۳۳ و ٤١) با استفاده از کیت های موجود اندازه گیری شدند. پس از آسان‌کشی موش‌ها توسط ایجاد جابجایی در مهره‌های گردن (Cervical dislocation)، کبد موش‌ها خارج و نمونه‌گیری بافتی انجام و پس از پایدارسازی در فرمالین بافری ۱۰٪ و قالب‌گیری در پارافین برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و مقاطع هیستوپاتولوژیک با رنگ-آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین تهیه گردید. از میکروسکوپ نوری NIKON مدلECLIPSE E200 برای برررسی تغییرات بافتی بهره گرفته شد. تحلیل آماری: برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS-13 استفاده شد. برای تعیین نرمال بودن توزیع پراکندگی داده‌ها از آزمون آماری کلموگروف–اسمیرنف (Kolmogrov-Smirnov) استفاده شد. داده‌های به‌دست آمده کمّی توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مورد تحلیل قرار گرفت. $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد

و مقادیر به‌دست آمده به صورت میانگین±انحراف استاندارد (mean±SEM) گزارش شدند.

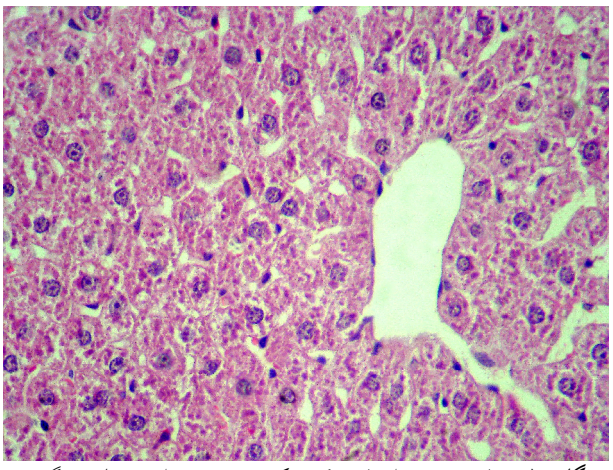
یافته‌ها

جدول ۱ سطوح سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (AP)، آلبومین و بیلی‌روبین تام را در چهار گروه نشان می‌دهد. مقادیر سرمی ALT، AST، AP و بیلی روبین تام در گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). این پارامترها در گروه دیابتی تیمار با عصاره چای سبز به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه دیابتی کاهش یافته بود ($p<۰/۰۵$). سطح سرم آلبومین در گروه دیابتی به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بود و این پارامتر در گروه دیابتی تیمار با عصاره در مقایسه با گروه دیابتی به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($p<۰/۰۵$). تیمار با عصاره در گروه سالم تیمار با عصاره چای سبز هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در پارامترهای یاد شده ایجاد نکرد. در آسیب‌شناسی بافتی کبد از گروه شاهد، بافت کبد کاملاً سالم و طبیعی بود (نگاره ۱). در گروه سالم تیمار با عصاره چای سبز نیز هیچگونه تغییر پاتولوژیکی خاصی در بافت کبد در اثر تیمار با عصاره ایجاد نشده بود (نگاره ۲). در گروه موش‌های دیابتی تغییر چربی کاملاً مشخصی در نواحی مرکز لوبولی (Centrilobular portions) ایجاد شده بود (نگاره ۳). در بافت کبد گروه دیابتی تیمار با عصاره چای سبز، تغییر پاتولوژیک قابل توجهی مشاهده نشد (نگاره ٤).

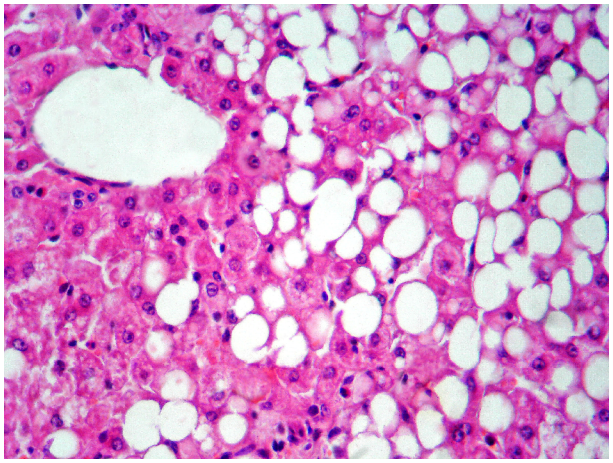
جدول ۱- مقایسه تأثیر عصاره چای سبز بر شاخص‌های سرمی آسیب بافت کبد در موش‌های صحرایی مورد مطالعه

گروه‌ها	فراسنجه‌های مورد آزمایش				
	آلانین آمینوترانسفراز (U/L)	آسپاراتات آمینوترانسفراز (U/L)	آلکالین فسفاتاز (U/L)	بیلی‌روبین تام (Mg/dl)	آلبومین (g/dl)
شاهد سالم	۷٦/٦±۲/٦	۱٦۰/۳±٥	۱۹۰/۸۷±۷/۲	۰/۸۲±۰/۰٤	٤/٤±۰/٥
سالم تیمار با عصاره چای سبز	۷۸/٤±۲/۹	۱٥٤/۱±٤/۹	۲۰٥/٤٤±٦/۹	۰/۸±۰/۰۷	٤/۳۱±۰/٤۱
دیابتی	۱٤۰/٥±۳/۸[a]	۲۱٥/۸±۷/۲[a]	۲٦٥/۷±۸/٥[a]	۱/۱٦±۰/۰۷	۲/۸۹±۰/۳۱[a]
دیابتی تیمار با عصاره چای سبز	۷۸/۲±۳/۱[b]	۱۷۱/۹±٤/۳[b]	۲۰۰/٦۸±۹/۱[b]	۰/۸٦±۰/۰٥[b]	۹٥/۳±۰/۳٥[b]
آنالیز واریانس یکطرفه	P=۰/۰۰	P=۰/۰۰	P=۰/۰۰	P=۰/۰۰	P=۰/۰۰

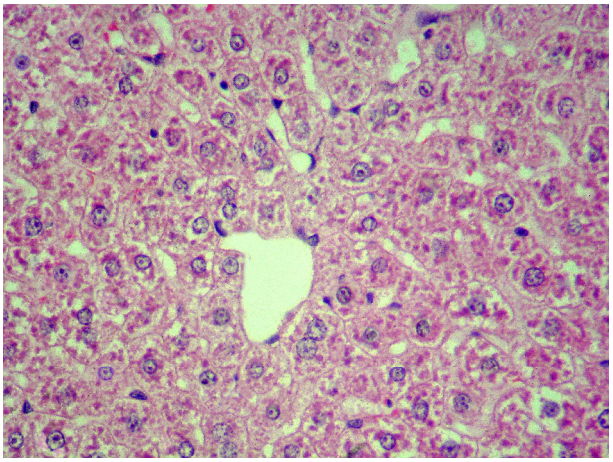
*$p<۰/۰۵$ a: در مقایسه با گروه شاهد، b: در مقایسه با گروه دیابتی



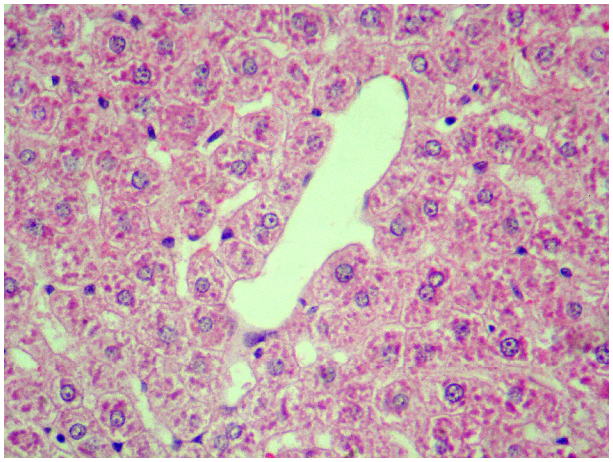
نگاره ۱- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرایی متعلق به گروه شاهد. ساختار بافت کبد کاملاً طبیعی می‌باشد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ×۱۰۰).



نگاره ۳- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرایی متعلق به گروه دیابتی. تغییر چربی هپاتوسیت‌ها در نواحی مرکز لبولی کبد به‌صورت تشکیل ماکروووزیکول‌های انباشته از چربی مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ×۱۰۰).



نگاره ۲- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرایی متعلق به گروه سالم تیمار با عصاره چای سبز. ساختار بافت کبد کاملاً سالم بوده و تغییر پاتولوژیک خاصی در آن ایجاد نشده است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ×۱۰۰).



نگاره ٤- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرایی متعلق به گروه دیابتی تیمار با عصاره چای سبز. تغییر پاتولوژیک قابل توجهی در هپاتوسیت‌ها و ساختار بافت کبد مشاهده نمی‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ×۱۰۰).

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، کاهش قابل ملاحظه ی سطح آلبومین سرمی و افزایش شاخص‌های آسیب های کبدی (ALT، AST، ALP و بیلی روبین) نشانگرآسیب سلول‌های کبدی در دیابت تجربی می‌باشد. این نتیجه با یافته‌های Ramesh و همکاران در سال ۲۰۰۷ مطابقت دارد (٤٠). افراد مبتلا به دیابت تیپ ۲ از ناهنجاری مارکرهای کبدی بیشتری نسبت به افراد بدون دیابت برخوردار هستند (۱۵) که این یافته نیز با نتایج ما همخوانی دارد. یافته‌های بررسی حاضر همچنین نشان می‌دهد که درمان روزانه با عصاره چای سبز به‌طور قابل ملاحظه‌ای وضعیت بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژی کبد موش‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین را بهبود می‌بخشد .

تست‌های عملکرد کبد (Liver function tests; LFTs) به‌طور معمول در مراکز درمانی برای کنترل و بررسی بیماری‌های کبدی، پایش پیشرفت بیماری و بررسی اثرات داروهایی که احتمالاً سمیت کبدی دارند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. معمول‌ترین LFTs شامل آمینوترنسفرازهای سرمی، آلکالین فسفاتاز، بیلی روبین و آلبومین می‌باشد. تخریب سلول-های کبدی منجر به آزاد شدن این آنزیم‌ها به جریان خون می-شود. اگر در سرم مقدار AST افزایش یابد نشان‌دهنده آسیب کبد مشابه هپاتیت ویروسی، انفارکتوس و تخریب عضلانی می-باشد. ALT که واسطه تبدیل آلانین به پیرووات و گلوتامات می‌باشد، برای کبد اختصاصی و شاخص مناسبی برای جراحات کبدی است. افزایش سطوح این آنزیم‌ها شاخصی مناسب برای ارتشاح سلولی و اختلال عملکردی غشای سلول‌های کبدی است (۹). به‌علاوه، ALP که در غشای بافت وجود دارد و تغییر آن احتمالاً بر روی نفوذپذیری غشا و ایجاد اختلال و بی نظمی در انتقال متابولیت‌ها اثر می‌گذارد (۳۵). از سوی دیگر مقادیر بیلی‌روبین و آلبومین با عملکرد سلول‌های کبدی در ارتباط هستند (۳۷).

بازگشت آنزیم‌های مذکور به سطح سرمی نرمال به‌دنبال مصرف عصاره چای سبز ممکن است ناشی از ممانعت از نشت و تراوش آنزیم‌های داخل سلولی به محیط خارج به‌دلیل پایدار شدن غشای سلولی یا رژنراسیون سلولی باشد (٤٩). کنترل موثر بیلی‌روبین و آلبومین بهبود در عملکرد و مکانیسم ترشحی سلول‌های کبدی را نشان می‌دهد. در این مطالعه، بررسی هیستوپاتولوژی بافت کبد، نشان‌دهنده بروز تغییر چربی در قسمت های مرکز لبولی کبد در موش‌های دیابتی است. Ramesh و همکاران در سال ۲۰۰۷ تاثیر مثبت محافظت از کبدی Umbelliferone در موش‌های دیابتی تجربی توسط استرپتوزوتوسین را گزارش کردند که نتایج حاضر با یافته‌های ایشان مطابقت دارد (٤٠). در مطالعه ما طی درمان با چای سبز در موش‌های صحرایی دیابتی هیچگونه تغییر چربی قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد که این پدیده اثر محافظتی چای سبز را در برابر عوارض کبدی دیابت نشان می‌دهد همچنین، یافته‌های پاتولوژیکی در این مطالعه با نتایج بیوشیمیایی به‌دست آمده تطابق دارد.

در بررسی‌های قبلی نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو یکی از عوامل مهم در ایجاد دیابت و نیز علت بروزعوارض مربوط به آن در انسان می‌باشد (٥٦). نقش دقیق استرس اکسیداتیو در اتیولوژی دیابت انسانی ناشناخته است ولی ثابت شده است که استرس اکسیداتیو در دیابت همراه با کاهش در وضعیت آنتی اکسیدانی بدن است (۷ و ۲۱). همچنین نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو بر روی گلیسکاسیون پروتئینی، غیرفعال سازی آنزیم‌ها و نیز در تغییر در عملکرد ساختاری کلاژن غشای پایه نقش مهمی دارد (۳). همچنین ممکن است دارای تأثیر مهمی در پروتئین ناقل گلوکز (Glucose transport protein; GLUT) یا رسپتور انسولین (Insulin receptor) باشد (۱۷).

عوامل ضد استرس اکسیداتیو ممکن است باعث کاهش سطح افزایش یافته گلوکز سرم در دیابت شده و دیابت و عوارض

ثانویه آنرا کاهش دهد. در هایپرگلیسمی، گلوکز دچار خوداکسیداسیون می‌شود و سوپراکسید را تولید می‌کند که باعث تولید رادیکال‌های آزاد می‌شودکه نهایتاً منجر به پراکسیداسیون لیپید در لیپوپروتئین‌ها می‌شود . در هر صورت، شواهد نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در پاتوژنز دیابت ملیتوس و عوارض دیابتی ایفا می‌کنند (۱٤). کبد یکی از مهمترین ارگان‌هایی است که سطوح گلوکز خونی را در حد طبیعی نگه می‌دارد . بنابراین، افزایش قند خون منجر به عدم تعادل در واکنش‌های اکسیداسیون-احیا در سلول‌های کبدی می‌شود. لذا هایپرگلیسمی از طریق افزایش AGEs (Advanced glycation end products) باعث تولید رادیکال های آزاد از طریق اختلال در محصول ROS مثل SOD و CAT را تسهیل می کند (۵، ۱۸ و ۲۳). بنابراین، چنین برمی‌آید که که جراحات کبدی دیابتی از چندین عامل ناشی می‌شود و تنها از طریق ممانعت هایپرگلیسمی قابل کنترل نیست (۲۸). به‌عبارت دیگر، گرچه در مراحل ابتدایی دیابت، آسیب‌های ناشی از طریق هایپرگلیسمی ایجاد می‌شوند، اما با پیشرفت آن در مراحل بعدی دیگر به هایپرگلیسمی ارتباطی ندارد (۵۳). بنابراین، برای کنترل عوارض دیابت،کنترل گلوکز خون به تنهایی کافی نیست لذا داروی مناسب باید هم آنتی اکسیدان خوبی باشد هم توانایی کاهش گلوکز خون را داشته باشد (۳۹). عصاره چای سبز شامل پلی‌فنول‌های کاتچین (Catechin)، اپی‌کاتچین (Epicatechin)، اپی‌گالوکاتچین (Epigallocatechin) و گالات (Gallates) و همچنین تئین (Teanin) و کافئین (Caffeine) می‌باشد . عصاره همچنین شامل پیرلوکینولین کینون (Pyrroloquinoline quinone) (ویتامین تازه شناخته شده) می‌باشد (۲٤). نشان داده شده است که برخی اجزای اصلی چای سبز سبب افزایش جذب گلوکز پایه و القا شده توسط انسولین در سلول‌های چربی موش‌های صحرایی می شوند (۵۸) تا از طریق بلوک ناقل‌های گلوکز وابسته به سدیم در سلول‌های اپی تلیال روده خرگوش از جذب روده‌ای گلوکز ممانعت کنند (۲۷). عصاره این گیاه سبب کاهش سطح گلوکز سرم در موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان می‌شود (٤٤). کاتچین به عنوان یکی از آنتی اکسیدان موجود در چای سبز، گزارش شده است که ممکن است سیستم دفاعی ارگانیسم‌های مختلف بدن را بهبود بخشد همانطور که در مدل‌های آزمایشگاهی و محیط زنده به اثبات رسیده است (٤۵، ٤۸ و ۵٤). عصاره چای سبز نسبت به اپی‌گالوکاتچین گالات (Epigallocatechin gallate) خالص(جز اصلی چای سبز) به‌دلیل حضور آنتی اکسیدانت های دیگر در عصاره پایدارتر هستند (۲۵). به‌طور کلی داروهای گیاهی ترکیبی از اجزای مختلف هستند که اغلب به-طور سینرژیستیک عمل کرده و اثر مفیدشان را به‌عنوان عصاره گیاهی القا می‌کنند (۲۹).

در مجموع، در مطالعه حاضر مشخص گردید که چای سبز با کاهش بیومارکرهای سرمی آسیب کبد و نیز کاهش آسیب بافتی عملکرد این ارگان را در موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان بهبود می بخشد که این پدیده احتمالاً از طریق فعالیت هایپرگلیسمی و آنتی‌اکسیدانی عصاره اعمال می‌شود. بنابراین، مصرف چای سبز می‌تواند با کاهش خطر آسیب کبد در افراد به‌ظاهر سالم همراه باشد. به‌علاوه گمان می‌رود که اثرات مفید مشاهده شده چای سبز در درجه اول به‌دلیل بهبود وضعیت آنتی اکسیدانی بافت‌های محیطی، مثل کبد باشد.

سپاسگزاری

این طرح پژوهشی با اعتبارات مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر به انجام رسیده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی این دانشگاه صمیمانه قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Akhtar, M.S. and Iqbal J. 1991. Evaluation of the hypoglycemic effect of achyranthes aspera in normal and alloxan diabetic rabbits. J. Ethnopharmacol., 31: 49-57.
2. Athyros, V.G., Mikhailidis, D.P. and Didangelos, T.P. 2006. Effect of multifactorial treat- ment on nonalcoholic fatty liver disease in metabolic syndrome: a randomised study. Curr Med Res Opin., 22:873-883.
3. Baynes, J.W. 1991. Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. Diabetes 40:405-412.
4. Benelli, R., Vene, R., Bisacchi, D., Garbisa, S. and Albini, A. 2002. Anti-invasive effects of green tea polyphenol epigallocatechin-3-galleate (EGCG), a natural inhibitor of metallo and serine proteases. Biol Chem., 383: 101-105.
5. Cameron, N.E., Gibson, T.M., Nangle, M.R. and Cotter, M.A. 2005. Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes. Ann N Y Acad Sci., 1043: 784-792.
6. 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.
7. Curcio, F., Pegoraro, I., Dello Russo, P., Falleti, E., Perrella, G. and Ceriollo A. 1995. SOD and GSH inhibit the high glucose induced oxidative damage and the PGDF increased secretion in cultured human endothelial cells. Thromb Haemost, 74: 969-973.
8. de Marco, R., Locatelli, F., Zoppini, G., Verlato, G., Bonora, E. and Muggeo, M. 1999. Cause-specific mortality in type 2 diabetes: The Verona Diabetes Study. Diabetes Care, 22:756-761.
9. Drotman, R. and Lawhan, G. 1978. Serum enzymes are indications of chemical induced liver damage. Drug Chem Toxicol., 1(2): 163-171.
10. Eddouks, M., Maghrani, M. and Michel, J.B. 2005. Hypoglycaemic effect of Triticum repens P. Beauv. in normal and diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, 102(2): 228-232.
11. Feillet-Coudray, C., Rock, E., Coudray, C., Grzelkowska, K., Azais-Braesco, V., Dardevet D. and Mazur, A. 1999. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. Clinica Chimica Acta., 284(1): 31-43.
12. Griesmacher, A., KinderHauser, M. and Andert, S. 1995. Enhanced serum levels of thiobarbituric acid-reactive substances in diabetes mellitus. Am J Med., 98: 469-475.
13. Gupta, R.K., Kesari, A.N., Murthy, P.S., Chandra, R., Tandon, V. and Watal, G. 2005. Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology, 99(1): 75-81.
14. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine (2nd ed.), Clarendon Press, Oxford.
15. Harris, E.H. 2005. Elevated Liver Function Tests in Type 2 Diabetes. Clinical diabetes, 23(3): 115-119.
16. Hendriksen, P.H., Oey, P.L., Wieneke, G.H., Bravenboer, B. and Banga, J.D. 1992. Subclinical diabetic neuropathy: similarities between electrophysiological results of patients with type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus, Diabetologia, 35: 690-695.
17. Jacqueline, M.S., Jongsoon, L. and Paul, F.P. 1997. Tumor necrosis factor-α -induced insulin resistance in 3T3- L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. J Biol Chem., 272(2): 971-976.
18. Jandeleit-Dahm, K.A., Lassila, M. and Allen, T.J. 2005. Advanced glycation end products in diabetes-associated atherosclerosis and renal disease: interventional studies. Ann N Y Acad Sci., 1043: 759-766.
19. Jennings, P.B., Chirico, S. Jones, A.F., Lunec, J. and Barnett, A.H. 1987. Vitamin C metabolites and microangiopathy in diabetes mellitus. Diab Res., 6:151-154.
20. Jin, X., Zheng, R.H. and Li, Y.M. 2008. Green tea consumption and liver disease: a systematic review. Liver Int. 28(7): 990-996.
21. Kakkar, R., Kalra, J., Mantha, S.V. and Prasad, K. 1995. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. Mol Cell Biochem., 151: 113-119.
22. Kakkar, R., Mantha, S.V., Radhi, J., Prasad K. and Kalra, J. 1998. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. J Clin Sci., 94: 623-632.

23. Kalia, K., Sharma, S., Mistry, K. 2004. Non-enzymatic glycosylation of immunoglobulins in diabetic nephropathy. Clinical & Chemical Acta., 347(1-2): 169-176.
24. Kasahara, T. and Kato, T. 1993. A new redox-cofactor vitamin for mammals. Nature, 422:832
25. Kaszkin, M., Beck K-F., Eberhardt, W. and Pfeilschfter, J. 2004. Unravelling green tea's mechanisms of action: More than meets the eye. Mol Pharmacol., 65: 15-17.
26. Kind, P.R. and King, E.J. 1954. Estimation of plasma phosphates by determination of hydrolyzed phenol with antipyrin. J Clin Pathol., 7(4): 322-326.
27. Kobayashi, Y., Suzuki, M., Satsu, H., Arai, S., Hara, Y., Suzuki, K., Miyamaoto, Y., Shimizu, M. 2000. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. J Agric Food Chem., 48: 5618-5623.
28. Liu, H.R., Tang, X.Y., Dai, D.Z. and Dai, Y. 2008. Ethanol extracts of Rehmannia complex (Di Huang) containing no corni fructus improve early diabetic nephropathy by combining suppression on the ET-ROS axis with modulate hypoglycemic effect in rats. J Ethnopharmacol., 118(3): 466-472.
29. Loew, D. and Kaszkin, M. 2002. Approaching the problem of bioequivalence of herbal medicinal products. Phytother Res., 16: 705-711.
30. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. and Farr, A.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem., 193(1): 265-275.
31. MacRury, S.M., Gordon, D. and Wilson, R. 1993. A comparison of different methods of assessing free radical diabetes and peripheral vascular disease. Diabet Med., 10: 331-335.
32. 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.
33. Malloy, H.T. and Evelyn, K.A. 1937. The determination of bilirubin level with the photoelectric colorimeter. J Biol Chem., 119(2): 481-484.
34. McLennan, S.V., Heffernen, S. and Wright L. 1991. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes* 40: 344-348.
35. Mehana, E.E., Meki, A.R. and Fazili, K.M. 2010. Ameliorated effects of green tea extract on lead induced liver toxicity in rats Exp Toxicol Pathol., In press.
36. Mullarkey, C.J., Edelstein, D. and Brownlee, L. 1990. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. Biochem Biophys Res Commun 173: 932-939.
37. Muriel, P., Garcipiana, T., Perez-Adverez, V., Mourelle, M. 1992. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. J Applied Toxicol., 12(6): 439-442.
38. Niskanen, L.K., Salonen, J.T., Nyssonen, K. and Uusitupa, M.I.J. 1995. Plasma lipid peroxidation and hyperglycemia: a connection through hyperinsulinaemia?. Diabet Med., 12: 802-808
39. Ramesh, B. and Pugalendi, K.V. 2006. Impact of umbelliferone (7-hydroxycoumarin) on hepatic marker enzymes in streptozotocin diabetic rats. Indian J Pharmacol., 38(3): 209-210.
40. Ramesh, B., Viswanathan, P. and Pugalendi, K.V. 2007. Protective effect of Umbelliferone on membranous fatty acid composition in streptozotocin-induced diabetic rats. European Journal of Pharmacology, 566(1-3): 231-239.
41. Reitman, S. and Frankel, S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. Am J Clin Pathol., 28(1): 56-63.
42. Ritz, E., Hasslacher, C. and Tschope, W. 1990. Diabetic nephropathy — are there differences between type I and type II?, Miner Electrolyte Metab., 16: 69-72.
43. Ryu, O.H., Lee, J. and Lee, K.W. 2006. Effects of green tea consumption on inflammation, insulin resistance and pulse wave velocity in type 2 diabetes patients. Diabetes Res Clin Pract., 71(3): 356-358.
44. Sabu, M.C., Smitha, K. and Kuttan, R. 2002. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. J Ethnopharmacol, 83: 109-116.
45. Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P. and Rice-Evans, C. 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. Arch Biochem Biophys., 322: 339-346.
46. Strain, J.J. 1991. Disturbances of micronutriment and antioxidant status in diabetes. Proc Nutr Soc., 50: 591-604.

47. Sundaram, R.K., Bhaskar, A., Vijayalingam, S., Viswanatthan, M., Moha, R. and Shanmugasundaram, K.R. 1996. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. Clin Sci., 90: 255-260.
48. Terao, J., Piskula, M. and Yao, Q. 1994. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. Arch Biochem Biophys**, 308:** 278-284.
49. Thabrew, M. and Joice, P. 1987. A comparative study of the efficacy of Pavetta indica and Osbeckia octanda in the treatment of liver dysfunction. Planta Med., 53(3): 239-241.
50. Tsuneki, H., Ishizuka, M., Terasawa, M., Wu, J-B., Sasaoka, T. and Kimura, I. 2004. Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. BMC Pharmacology, 4:18.
51. Tolman, K.G., Fonseca, V., Dalpiaz, A. and Tan, M.H. 2007. Spectrum of Liver Disease in Type 2 Diabetes and Management of Patients With Diabetes and Liver Disease. Diabetes care, 30(3): 734-743.
52. Velazques, B., Winocour, P.H., Kesteven, P., Alberti, K.G.M.M. and Lakeer, M.F. 1991. Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes. Diabet Med 8: 752-758.
53. Vestra, M.D. and Fioretto, P. 2003. Diabetic nephropathy: renal structural studies in type 1 and type 2 diabetic patients. Internatrional Congress Series, 1253: 163-169.
54. Wang, W. and Goodman, M.T. 1999. Antioxidant property of dietary phenolic agents in a human LDL-oxidation ex vivo model: interaction of protein binding activity. Nutr Res., 19: 191-202.
55. Weisburger, J.H. and Chung, F.L. 2002. Mechanisms of chronic diseases causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. Food Chem Toxicol., 40:1145-1154.
56. Wilson, R.L. 1998. Free radicals and tissue damage, mechanistic evidence from radiation studies. In: Biochemical mechanisms of Liver Injury. New York, Academic Press, 123-125.
57. Wu, L-Y., Juan, C-C., Ho, L-T., Hsu, Y-P., Hwang, L-S. 2004. Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats. J Agric Food Chem., 52: 643-648.
58. Wu, L.Y., Juan, C.C., Hwang, L.S., Hsu, Y.P., Ho, P.H. and Ho, L.T. 2004. Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. Eur J Nutr, 43: 116-124.
59. Young, I.S., Torney, J.J. and Trimble, E.R. 1992. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. Free Rad Biol Med**.,** 13:41-46.

Vet. J. of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch. 5, 3:1315-1324, 2011

Effects of Green tea extract on liver histopathology and serum biomarkers of hepatic tissue injury in streptozotocin-induced diabetic rats

Abolfathi, A.A.[1*], Rezaie, A.[2], Mousavi, Gh.[2], Valilou, M.[3], Jafari, B.[4]

1-Department of Biological Science, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
2-Department of Clinical Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3- Department of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran
4-Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

[*]***Corresponding author's email:*** abolfathiak@yahoo.co.uk

(Received: 2011/9/24, Accepted: 2011/12/31)

Abstract

The aim of present study was to evaluate the liver injury as a complication of diabetes mellitus and to assess the hepatoprotective properties of Green tea extract in streptozotocin-induced diabetic rats. For this purpose, 40 male Wistar rats were randomly separated into four groups, each containing 10 animals: Group 1, healthy control rats; Group 2, normal rats treated with Green tea extract (1.5%, w/v) was given in drinking water; Group 3, diabetic rats and Group 4, diabetic rats treated with Green tea extract (1.5%, w/v) in drinking water. The extract was injected in intraperitoneal route for a period of 8 weeks. Control groups received normal saline in similar manner. Diabetes was induced by single injection of STZ (75 mg/kg i.p.). At the end of experiment, serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), albumin and bilirubin were measured. For histopathological evaluation, tissue specimens were fixed in 10% buffered formalin and 5 micron thick sections with H&E stain were prepared using routine hitopathological techniques. In diabetic rats, serum levels of functional liver markers were found to be significantly increased in comparison with control group ($p<0.05$), while this markers in diabetic rats treated with Green tea extract significantly decreased as compared to diabetic rats. Histopathological findings were in consistent with biochemical results. The data obtained proved that Green tea extract has hepatoprotective activity against diabetic hepatopathy in streptozotocin-induced diabetic rats.

Keywords: Diabetes mellitus, Liver, Green tea, Biomarkers of hepatic tissue injury, Histopathology, Rat