

Original Article

***Study of Neuroprotective Effects of Green Tea Antioxidant on
Spinal Cord Injury of Rat***

***Khalatbary A., Ph.D.* , Tiraihi T., Ph.D., Beigi Boroujeni M., Ph.D., Ahmadvand H.,
Ph.D., Tavafi M., Ph.D., Tamjidipoor A., M.Sc.***

** P.O.Box: 381351698 Razi Herbal Medicine Research Center, Lorestan University of Medical
Sciences, Khoramabad, Iran*

Abstract

Purpose: Recent studies revealed the neuroprotective effects of green tea antioxidant on experimental cerebral ischemia, but these effects on spinal cord injury (SCI) has not yet been studied.

Materials and Methods: Rats were randomly divided into three groups of 18 rats each as follows: sham group(laminectomy), control group (SCI) and experimental group (EGCG). Spinal cord samples were taken 24 h after injury and studied for determination of lipid peroxidation levels and TUNEL reaction. Behavioral testing was performed weekly upto six weeks post-injury. Then, the rats were euthanized for histopathological assessment.

Results: The results showed that lipid peroxidation levels were significantly decreased in experimental group. EGCG significantly reduced TUNEL-positive rate. Also, EGCG reduced significantly lesion area, and improved behavioral function more than the control group.

Conclusion: EGCG treatment decreased secondary spinal cord injury.

Keywords: Epigallocatechin gallate (EGCG), Spinal cord injury, Immunohistochemistry

بررسی خواص نوروپروتکتیو آنتی اکسیدان موجود در چای سبز در ضایعات نخاعی موش صحرایی

علی‌رضا خلعتبری Ph.D.*، تقی طریحی Ph.D.**، ماندانا بیگی بروجنی Ph.D.*

حسن احمدوند Ph.D.**، مجید طوافی Ph.D.*، احمد نمجیدی پور M.Sc.*

* گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی، خرم‌آباد، ایران
** گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
*** گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
تاریخ وصول: شهریور ماه ۸۸، تاریخ پذیرش: آذر ماه ۸۸

چکیده

هدف: بررسی خواص نوروپروتکتیو آنتی اکسیدان موجود در چای سبز روی ضایعات نخاعی
مواد و روش‌ها: در این مطالعه از سه گروه ۱۸ تایی موش صحرایی ماده استفاده شد: گروه شم (فقط لامینکتومی صورت گرفت)، گروه کنترل (پس از ضایعه نخاعی، تزریق سرم فیزیولوژیک صورت گرفت) و گروه تجربی (پس از ضایعه نخاعی، تزریق EGCG (Epigallocatechin gallate) صورت گرفت). ۲۴ ساعت پس از ضایعه، ۶ حیوان از هر گروه برای بررسی میزان پراکسیداسیون چربی و ۶ حیوان نیز برای بررسی میزان آپوپتوزیس در بخش ضایعه دیده نخاع استفاده شد. همچنین آزمون رفتاری در ۶ حیوان باقیمانده از هر گروه به صورت هفتگی و تا پایان هفته ششم صورت گرفته و سپس میزان تخریب بافت نخاعی اندازه‌گیری شد.
یافته‌ها: تزریق EGCG موجب کاهش میزان پراکسیداسیون چربی و نیز کاهش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در بخش ضایعه دیده نخاع در گروه تجربی شد. همچنین تزریق EGCG موجب افزایش میزان توانایی حرکتی اندام‌های فلج شده و نیز کاهش میزان تخریب بافت نخاعی در بخش آسیب دیده در گروه تجربی شد.
نتیجه‌گیری: تزریق EGCG موجب کاهش علائم ثانویه آسیب نخاعی می‌شود.
کلیدواژه‌ها: Epigallocatechin gallate (EGCG)، ضایعه نخاعی، ایمونوهیستوشیمی

مقدمه

رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های التهابی، واکنش‌های سیستم ایمنی و نیز تغییرات ایجاد شده در عروق خونی نخاع آسیب دیده، اشاره نمود [۲]. همچنین فرایند آپاپتوزیس نیز نقش کلیدی و مهمی را در آسیب ثانویه نخاعی ایفا می‌نماید که خود تحت تأثیر افزایش میزان گلوتامات، رادیکال‌های آزاد، سیتوکین‌ها و نیز افزایش واکنش‌های التهابی در بخش آسیب دیده نخاع است [۳].

دو مکانیسم در شدت علائم ناشی از ضایعات نخاعی نقش دارند: ۱- ضایعه مکانیکی اولیه، ۲- فرایند دژنراسیون ثانویه [۱]. فرایند دژنراسیون ثانویه (آسیب ثانویه) خود ناشی از یک‌سری واکنش‌های سلولی، مولکولی و بیوشیمیایی است که از جمله آن‌ها می‌توان به تبدلات یونی، پراکسیداسیون چربی ناشی از

آدرس مکاتبه: ایران، خرم‌آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، گروه علوم تشریح و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی، صندوق پستی: ۳۸۱۳۵۱۶۹۸
E-mail: khalat90@yahoo.com

بلافاصله پس از ضایعه) نیز صورت گرفت. سپس هر یک از گروه‌ها به سه زیر گروه ۶ تایی برای مطالعه میزان پراکسیداسیون چربی بخش ضایعه دیده نخاع، میزان آپاپتوز بخش ضایعه دیده نخاع و نیز میزان توانایی حرکتی اندام‌های فلج شده و میزان تخریب بافت نخاعی بخش ضایعه دیده تقسیم شدند.

ضایعه نخاعی

ضایعه نخاعی به روش دانشگاه نیویورک وارد شد. به این ترتیب که پس از بیهوش کردن حیوان (با ۷۵mg/kg کتامین و ۱۰ mg/kg زایلایزین)، برشی در امتداد ستون فقرات در پوست داده شد و سپس عضلات متصل به مهره‌های T9, T8 و T10 جدا و لامیناهای مهره T9 تراشیده شد. آنگاه ضربه‌ای به‌طور مستقیم با استفاده از استوانه‌ای فلزی (وزن ۱۰ گرم، قطر ۲/۵ میلی‌متر، از ارتفاع ۲/۵ سانتی‌متر) وارد شد. پس از وارد نمودن ضربه، عضلات، فاسیایها و پوست بخیه زده شد. مراقبت‌های لازم نیز شامل تزریق زیر پوستی سرم لاکتات، تزریق داروی ضد درد، تزریق آنتی‌بیوتیک و نیز تخلیه دستی مثانه تا زمان به‌دست آوردن کنترل ادرار توسط حیوان، صورت گرفت [۱۰].

آنالیز بیوشیمیایی

۲۴ ساعت پس از ضایعه، ۶ حیوان از هر گروه را کشته و نخاع بخش ضایعه دیده از ستون مهره خارج شد. سپس مننژ و خون روی نمونه‌ها برداشته شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان (MDA) Malondialdehyde به‌عنوان یک شاخص مهم واکنش پراکسیداسیون چربی که با Thiobarbituric acid (TBA) واکنش می‌دهد، به روش می‌هارا (Mihara) و همکارانش و توسط اسپکتروفوتومتر در ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۱]. غلظت وکنش TBA در مقیاس نانومول/گرم بیان شد.

رنگ‌آمیزی تانل (TUNEL)

۲۴ ساعت پس از ضایعه، ۶ حیوان از هر گروه توسط بافر فرمالین پرفیوز شده و نخاع بخش آسیب‌دیده خارج و

تحقیقات صورت گرفته در سال‌های اخیر اغلب متوجه آسیب‌های ثانویه نخاعی بوده است به‌طوری که ترکیبات به‌کار برده شده برای کاهش علائم و عوارض آسیب نخاعی دارای خواص ضد آپاپتوزی، ضد التهابی و مهارکننده رادیکال‌های آزاد است.

چای سبز حاوی تعدادی ترکیب پلی‌فنولی تحت عنوان کتکین (Catechin) است [۴]. gallat(EGCG) Epigallocatechin فراوانترین ترکیب پلی‌فنول چای سبز بوده و به نظر می‌رسد که بخش عمده فعالیت‌های بیولوژیک چای سبز مربوط به همین ترکیب باشد [۵]. تحقیقات نشان داده است که EGCG دارای آثار حفاظتی در مقابل آسیب‌های ایسکمی مغزی [۶ و ۷] و نیز بیماری‌های نورودژنراتیو است [۹ و ۸]. بررسی‌ها نشان داده است که کتکین‌ها (از جمله EGCG) آثار نوروپروتکتیو خود را از طریق مهار رادیکال‌های آزاد، کاهش پراکسیداسیون چربی، کاهش آپاپتوز و نیز آثار ضد التهابی اعمال می‌نمایند [۵].

با وجود نتایج به‌دست آمده از مطالعات آزمایشگاهی در خصوص آثار نوروپروتکتیو EGCG در مدل‌های تجربی ایسکمی مغزی و نیز بیماری‌های نورودژنراتیو، تاکنون گزارشی در خصوص آثار این ترکیب روی ضایعات نخاعی ارائه نشده است؛ بنابراین در تحقیق حاضر، آثار نوروپروتکتیو EGCG در مدل حیوانی ضایعه نخاعی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

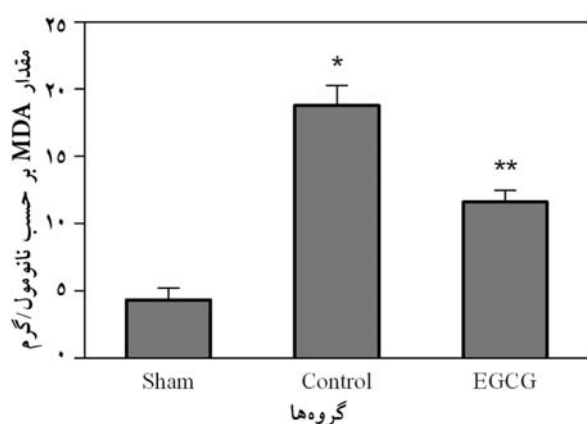
گروه‌های مورد مطالعه

تعداد ۵۴ سر رت بالغ ماده نژاد Spargue-Dawley (به وزن تقریبی ۳۰۰-۲۵۰ گرم) در این تحقیق استفاده شد و در شرایط استاندارد نگهداری شد. حیوانات به‌طور تصادفی به سه گروه ۱۸ تایی تقسیم شدند: (۱) گروه شم، در این گروه فقط لامیناهای مهره T9 برداشته شد؛ (۲) گروه کنترل، در این گروه علاوه بر لامینکتومی، ضایعه نخاعی نیز وارد شد و سپس تزریق داخل صفاقی سرم فیزیولوژیک صورت گرفت؛ (۳) گروه تجربی، در این گروه علاوه بر لامینکتومی و وارد نمودن ضایعه نخاعی، تزریق داخل صفاقی EGCG به میزان ۵۰mg/kg (یک تزریق

یافته‌ها

میزان پراکسیداسیون چربی

شکل ۱، میزان MDA موجود در بخش ضایعه دیده نخاع را (۲۴ ساعت پس از ضایعه) در گروه‌های مورد آزمایش نشان می‌دهد. میانگین میزان MDA در گروه‌های شام، کنترل و تجربی به ترتیب $1/54 \pm 4/34$ ، $2/54 \pm 1/80$ و $1/51 \pm 11/59$ محاسبه شد. القای ضایعه نخاعی موجب افزایش معنی‌دار میزان پراکسیداسیون چربی در بخش آسیب‌دیده نخاع شد. میزان MDA در گروه تجربی به‌طور معنی‌دار کمتر از گروه کنترل بود.



شکل ۱. مقادیر MDA را ۲۴ ساعت پس از ضایعه در بخش آسیب دیده نخاع گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. $p < 0/05$: * در مقابل گروه شام، $p < 0/05$: ** در مقابل گروه کنترل

میزان آپاپتوز

تعداد سلول‌های مثبت به واکنش تانل (هسته‌های قهوه‌ای) در گروه شام بسیار ناچیز بود (شکل ۲A) ولی در گروه کنترل افزایش داشته است (شکل ۲B). از طرف دیگر تعداد سلول‌های واکنش داده شده در گروه تجربی کاهش داشته است (شکل ۲C). شکل شماره ۳، درصد سلول‌های آپاپتوتیک را در بخش ضایعه‌دیده نخاع گروه‌های مورد آزمایش نشان می‌دهد. تعداد سلول‌های آپاپتوتیک در گروه تجربی نسبت به گروه شام، کاهش معنی‌دار داشته است.

بلوک‌های پارافینی تهیه شد و سپس برش‌های ۸ میکرونی از آن‌ها تهیه شد. رنگ‌آمیزی با استفاده از کیت تانل و براساس دستورالعمل شرکت مورد نظر (Roche) صورت گرفت. به‌طور کلی پس از آبگیری، برش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با H_2O_2 ، ۱۵ دقیقه با پروتئیناز K (Proteinase-K)، ۶۰ دقیقه با محلول واکنش تانل، ۳۰ دقیقه با پی‌ادی (POD)، ۵ دقیقه با دی‌ای بی (DAB) و ۱ دقیقه با هماتوکسیلین (Hematoxylin) انکوبه شد. همچنین آزمون کنترل منفی نیز انجام شد. آنالیز کمی تعداد سلول‌های واکنش داده به تانل، در ۱۰ بخش از هر بلوک (۵ ناحیه در هر بخش) صورت گرفت و سپس درصد سلول‌های مثبت به تانل (نسبت به سلول‌های واکنش نداده) محاسبه شد.

آزمون حرکتی

میزان توانایی حرکتی در ۶ حیوان از هر گروه تا پایان هفته ششم به روش BBB (Basso-Beattie-Bresnahan) اندازه‌گیری شد [۱۲]. به این صورت که ۲۴ ساعت پس از ضایعه و نیز در پایان هر هفته از حرکات حیوانات فیلمبرداری شده و سپس میزان توانایی حرکتی با استفاده از جدول حرکتی آزمون مذکور اندازه‌گیری شد (فلج کامل = ۰، طبیعی = ۲۱).

اندازه‌گیری میزان تخریب بافت نخاعی

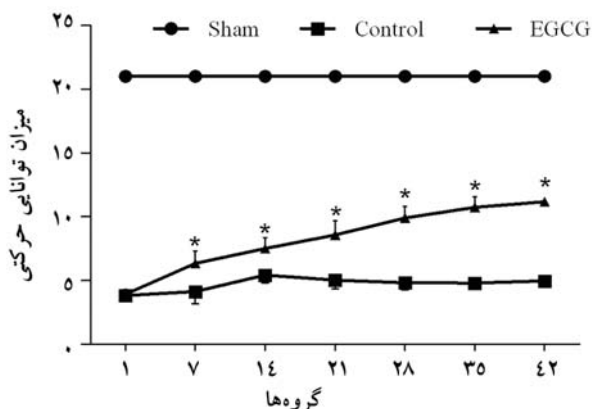
در پایان هفته ششم از نخاع بخش آسیب‌دیده حیوانات پرفیوز شده (در ۶ حیوانی که آزمون حرکتی انجام شده بود) مقاطع پارافینی به ضخامت ۸ میکرون تهیه شد. سپس مقاطع به‌صورت تصادفی از بخش ابتدایی، میانی و انتهایی منطقه آسیب‌دیده انتخاب شد و ضمن اندازه‌گیری وسعت کل مقطع و نیز وسعت منطقه آسیب‌دیده در همان مقطع (با استفاده از نرم‌افزار Motic)، نسبت منطقه آسیب‌دیده به کل مقطع نیز محاسبه شد.

آنالیز داده‌ها

کلیه آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۰) انجام شده و داده‌ها به‌صورت $Mean \pm SD$ محاسبه شد. همچنین $p < 0/05$ ملاک معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد.

میزان توانایی حرکتی

شکل ۴، میزان توانایی حرکتی را در گروه‌های مورد آزمایش نشان می‌دهد. میزان توانایی حرکتی در گروه شم نرمال [۲۱] بوده است. در پایان هفته ششم، میزان توانایی حرکتی در حیوانات گروه تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار داشته است.



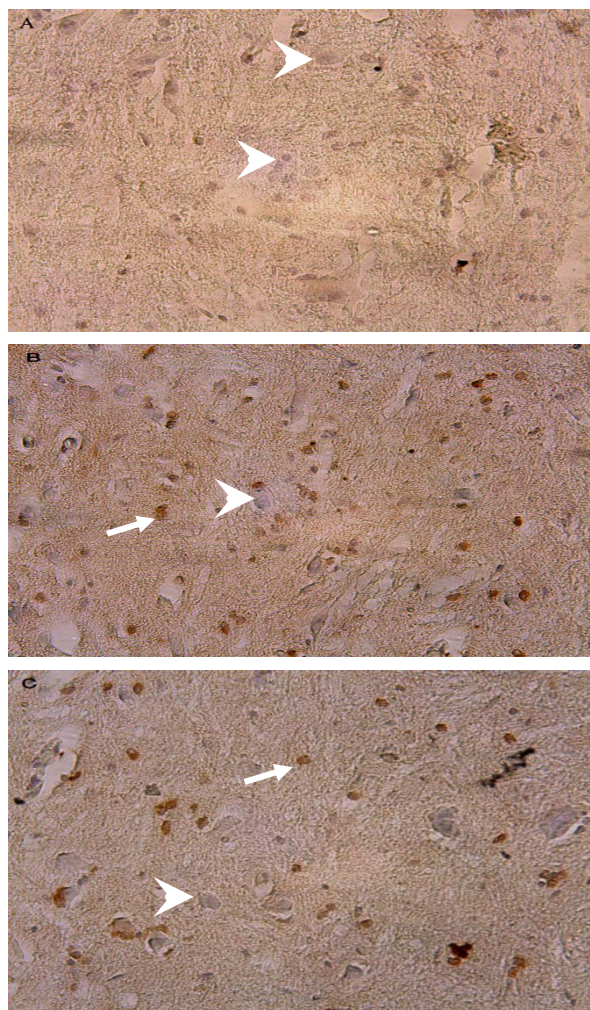
شکل ۴. میزان توانایی حرکتی در مقیاس BBB را در گروه‌های مورد مطالعه و در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. $p < 0.05$: * در مقابل گروه کنترل و در زمان مشترک

میزان تخریب بافتی

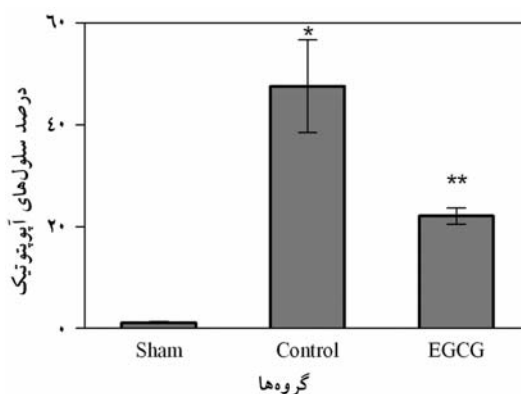
اشکال ۵A، ۵B، ۵C به ترتیب مقاطع تهیه شده از بخش مرکزی آسیب دیده در گروه‌های شم، کنترل و تجربی را نشان می‌دهد. شکل شماره ۶، درصد منطقه آسیب دیده را در گروه‌های مورد آزمایش نشان می‌دهد (شم = ۰/۰۰، کنترل = ۶۸/۵۲ ± ۴/۷۷، تجربی = ۳۱/۷۳ ± ۵/۲۹). وسعت منطقه آسیب دیده در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار داشته است.

بمٹ

فرایند تخریبی ثانویه در پی ضایعات تروماتیک نخاعی، دارای پاتولوژی پیچیده ای نظیر تولید رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون چربی و آپاپتوزیس است [۱۳]، بنابراین هر نوع عامل درمانی کاهش دهنده فرایندهای ثانویه، موجب کاهش وسعت آسیب نخاعی و بروز عوارض ناشی از آن می‌شود.



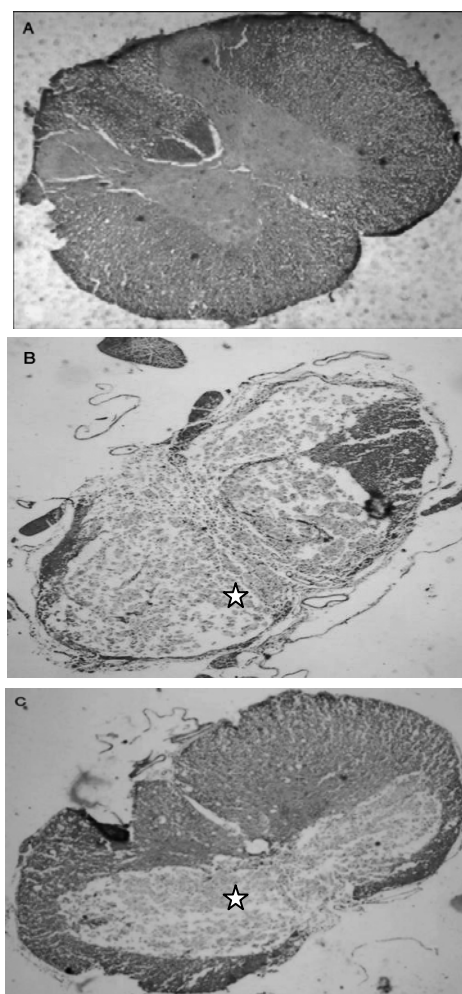
شکل ۲. تصاویر میکروسکوپی از واکنش تانل (سلول آپوتوتیک به رنگ قهوه‌ای با علامت پیکان دنباله‌دار، سلول سالم به رنگ آبی با علامت پیکان دوشاخه) در بخش ضایعه دیده نخاع را ۲۴ ساعت پس از ضایعه در گروه‌های شم (A)، کنترل (B) و تجربی (C) نشان می‌دهد (بزرگنمایی: ×۲۰۰).



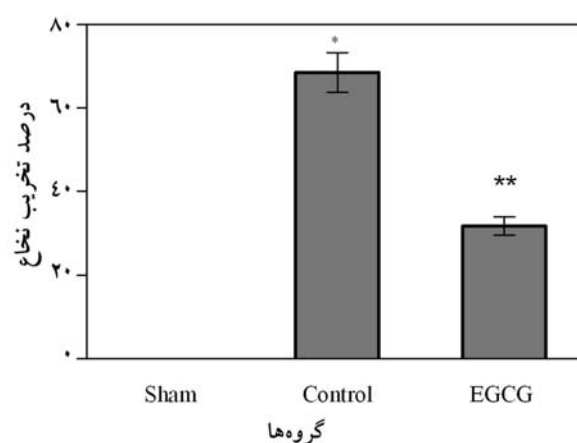
شکل ۳. میزان سلول‌های آپوتوتیک را ۲۴ ساعت پس از ضایعه برحسب درصد در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. $p < 0.05$: * در مقابل گروه شم، $p < 0.05$: ** در مقابل گروه کنترل

رادیکال‌های آزاد مولکول‌هایی با الکترون‌های منفرد (unpaired) هستند، بنابراین نسبت به چربی‌ها بسیار واکنش‌پذیر بوده و موجب اکسیداسیون آن‌ها می‌شوند [۱۴]. پراکسیداسیون چربی یکی از عوامل مهم در روند تخریب بافت نخاعی پس از ضایعات تروماتیک است [۱۵]. پس مهار پراکسیداسیون چربی به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی عملکرد عوامل درمانی ضایعات نخاعی مطرح است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان MDA (در نتیجه شکسته شدن اسیدهای چرب غیر اشباع نخاع به‌عنوان شاخص مهم پراکسیداسیون چربی) در بخش آسیب دیده نخاع نشان داد که تزریق EGCG، میزان پراکسیداسیون چربی را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌دهد. براساس مطالعات صورت گرفته روی خواص نوروپروتکتیو EGCG در بیماری‌های نورودژنراتیو [۸] و ایسکمی مغزی [۵]، یکی از مکانیسم‌های احتمالی پیشنهادی توسط محققین، اثر مهاری این ترکیب روی پراکسیداسیون چربی القا شده توسط رادیکال‌های آزاد است. پلی‌فنول‌های موجود در چای سبز (به‌ویژه EGCG) به‌واسطه گروه‌های هیدرکسیل موجود در ساختارشان، می‌توانند به رادیکال‌های آزاد متصل شده و آن‌ها را خنثی نمایند [۵]. همچنین آن‌ها می‌توانند به‌طور غیر مستقیم میزان آنتی‌اکسیدان‌های آندوژن بدن را افزایش دهند [۱۶]. اخیراً گروهی از محققین گزارش‌هایی مبنی بر کاهش میزان MDA به‌دنبال تزریق EGCG در مدل حیوانی پیری (aging) ارائه داده‌اند [۹].

آپاتوزیس یکی از مکانیسم‌های کلیدی آسیب‌های ثانویه نخاعی بوده که توسط پروتئین‌های خانواده Bcl-2 تنظیم می‌شود [۱۷]. به‌دنبال تروماهای وارده به طناب نخاعی، موج پیش‌رونده‌ای از مرگ سلولی آپاتوزیس در سلول‌های عصبی شکل می‌گیرد؛ بنابراین یکی از راه‌های کاهش آسیب ثانویه نیز مهار این پدیده است [۲]. در تحقیق حاضر برای تعیین میزان آپاتوز سلول‌های عصبی از روش تانل استفاده شد و نتایج بیانگر کاهش معنی‌دار میزان آپاتوز سلول‌های عصبی در گروه تجربی نسبت به گروه



شکل ۵. مقاطع عرضی از بخش مرکزی محل ضایعه دیده (*) را ۶ هفته پس از ضایعه در گروه‌های شم (A)، کنترل (B) و تجربی (C) نشان می‌دهد (بزرگنمایی: $\times 40$).



شکل ۶. میزان تخریب بافت نخاعی آسیب دیده را ۶ هفته پس از ضایعه بر حسب درصد در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. $p < 0/05$: * در مقابل گروه شم، $p < 0/05$: ** در مقابل گروه کنترل

نسبت به گروه کنترل است. بررسی‌ها نشان داده است که تزریق EGCG موجب کاهش حجم منطقه آسیب دیده بافت عصبی در مدل حیوانی سگته مغزی می‌شود [۵]. همچنین تحقیقات نشان داده است که تزریق EGCG موجب کاهش آسیب وارده به ماده سفید اطراف بطن‌های مغزی در مدل حیوانی هیدروسفال می‌شود [۱۹]. برای بررسی میزان توانایی حرکتی اندام‌های فلج شده در گروه‌های مورد مطالعه و نیز میزان تاثیر EGCG در آن، از آزمون حرکتی BBB استفاده شد. نتایج نشان داد که تزریق EGCG موجب افزایش توانایی حرکتی حیوانات فلج شده نسبت به گروه کنترل می‌شود. در مجموع نتایج حاصل از بررسی بیوشیمی بافتی، ایمنو هیستوشیمی، هیستوپاتولوژی و نیز حرکتی در تحقیق حاضر بیانگر آثار نوروپروتکتیو EGCG در ضایعات تروماتیک نخاعی است.

کنترل بود. بررسی‌های انجام شده در محیط *In vivo* و *In vitro* بیانگر نقش ضد آپتوزی EGCG از طریق تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با آپتوز است. مطالعات اخیر نشان داده است که EGCG موجب مهار فعالیت کاسپاز-۳ (Caspase-3) در بیماری ALS (amyotrophic lateral sclerosis) [۱۸] و نیز Aging القا شده توسط گالاکتوز در موش می‌شود [۹].

به منظور هرچه محدود کردن نقایص نورولوژیک ناشی از تروماهای نخاعی، حفظ هر چه بیشتر بافت نخاعی ضروری است. از طرف دیگر یکی از تغییرات پیشرونده موجود در بافت نخاعی آسیب دیده، تشکیل حفرات متعدد (ناشی از تخریب بافت عصبی و نیز بیگانه‌خواری سلول‌های مرده) است [۱۰]. بررسی‌های هیستوپاتولوژیک صورت گرفته در این تحقیق بیانگر کاهش میزان تخریب بافتی و تشکیل حفرات در بخش آسیب دیده نخاع حیوانات گروه تجربی

References

1. **Amar AP, Levy ML.** Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 1999; 44: 1027-39.
2. **Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR.** Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J* 2004; 4: 451-64.
3. **Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS.** Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 1997; 3: 73-76.
4. **Kakuda T.** Neuroprotective effects of the green tea components theanine and catechins. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1513-18.
5. **Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I.** Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 291-306.
6. **Choi YB, Kim YI, Lee KS, Kim BS, Kim DJ.** Protective effect of epigallocatechin gallate on brain damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 2004; 1019: 47-54.
7. **Lee H, Bae JH, Lee SR.** Protective effect of green tea polyphenol EGCG against neuronal damage and brain edema after unilateral cerebral ischemia in gerbils. *J Neurosci Res* 2004; 77: 892-900.
8. **Weinreb O, Mandel S, Amit T, Youdim MB.** Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 506-16.
9. **He M, Zhao L, Wei MJ, Yao WF, Zhao HS, Chen FJ.** Neuroprotective effects of epigallocatechin-3-gallate on aging mice induced by D- galactose. *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 55-60.
10. **Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC.** Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol* 1996; 139: 244-56.
11. **Mihara M, Uchiyama M.** Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; 86: 271-8.

12. **Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC.** A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995; 12: 1-21.
13. **Collins WF.** A review and update of experimental and clinical studies of spinal cord injury. *Paraplegia* 1983; 21: 204-19.
14. **Hall ED, Andrus PK, Yonkers PA, Smith SL, Zhang JR, Taylor BM, et al.** Generation and detection of hydroxyl radical following experimental head injury. *Ann NY Acad Sci* 1994; 738: 15-24.
15. **Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR.** Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J* 2004; 4: 451-64.
16. **Skrzydowska E, Ostrowska J, Farbiszewski R, Michaela K.** Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine* 2002; 9: 232-38.
17. **Reed JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S.** Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 127-37.
18. **Koh SH, Lee SM, Kim HY, Lee KY, Lee YJ, Kim HT, et al.** The effect of epigallocatechin gallate on suppressing disease progression of ALS model mice. *Neurosci Lett* 2006; 395: 103-107.
19. **Etus V, Altuq T, Belce A, Ceylan S.** Green tea polyphenol epigallocatechin gallate prevents oxidative damage on periventricular white matter of infantile rats with hydrocephalus. *Tohoku J Exp Med* 2003; 200: 203-9.