Archi

ORIGINAL ARTICLE

Effect of Gallic Acid on Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Diazinon in Vitro and in Vivo

Farzaneh Sadat Motafeghi[1],
Mohammad Ali Ebrahimzadeh[2],
Pegah Karbalaei[3],
Hamidreza Mohammadi [4]

[1] PhD Student in Toxicology, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Pharmaceutical Chemistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Doctor of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar International Unit, Sari, Iran
[4] Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received January 22, 2020 ; Accepted August 2, 2020)

Abstract

Background and purpose: Diazinon is an organophosphate insecticide that binds to the acetylcholinesterase enzyme after metabolization causing its inactivation. Galic acid is a polyphenolic compound with nucleophilic properties. The aim of this study was to investigate the effects of gallic acid on reactivation of acetylcholine and butyrylcholinesterase inhibited by diazinon in mice and human serum and erythrocytes.

Materials and methods: The animals were divided into seven groups, including a control group that received corn oil as a solvent and other groups that received diazinon (80 mg/kg), atropine (20 mg/kg), and pralidoxime (20 mg/kg). Gallic acid was injected intraperitoneally at 50, 100, and 200 mg/kg. Cholinesterase levels (acetylcholine and butyrylcholinesterase) were evaluated after 3 and 24 h of intoxication in mice serum and erythrocytes. In addition, in vitro studies were done in human serum and RBCs.

Results: Activities of cholinesterase in serum and erythrocytes significantly decreased after 3 and 24 hours of poisoning in diazinon-treated group compared to control group in vivo and in vitro. Co-treatment with atropine and gallic acid (at all doses) significantly increased cholinesterase activity compared to the diazinon group in vitro and in vivo ($P< 0.0001$).

Conclusion: Combination therapy with gallic acid (at different doses) and atropine reduced inhibition of cholinesterase activity caused by diazinon and improved its reactivation. Gallic acid reactivates cholinesterase activity which might be due to hydroxyl groups in its compounds.

Keywords: Cholinesterase, diazinon, gallic acid, atropine

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (189): 1-13 (Persian).

*** Corresponding Author: Hamidreza Mohammadi -** Pharmaceutical Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: hmohammadi@farabi.tums.ac.ir)

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره ۱۸۹ مهر سال ۱۳۹۹ (۱۳-۱)

بررسی تاثیر گالیک اسید بر فعالسازی مجدد آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز مهار شده با سم دیازینون: مطالعه درون تنی و برون تنی

فرزانه السادات متفقی[۱]
محمدعلی ابراهیم زاده[۲]
پگاه کربلایی[۳]
حمید رضا محمدی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: دیازینون یک حشره کش ارگانوفسفره است که بعد از متابولیزه شدن به آنزیم استیل کولین استراز متصل شده و آن را غیر فعال می نماید. گالیک اسید یک ترکیب پلی فنولی است و دارای خاصیت نوکلئوفیل می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر گالیک اسید بر فعال‌سازی مجدد آنزیم استیل کولین و بوتیریل کولین استراز مهار شده با سم دیازینون در موش سوری و گلبول قرمز انسانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: دراین مطالعه موش‌ها به گروه های کنترل، دیازینون (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، آتروپین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، پرالیدوکسیم (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گالیک اسید (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. میزان فعالیت آنزیم کولین استراز بعد از ۳ و ۲۴ ساعت در سرم و اریتروسیت موش ها و همچنین در مطالعه In vitro مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان فعالیت آنزیم‌های کولین استراز در زمان های ۳ و ۲۴ ساعت در سرم و اریتروسیت در مطالعات in vivo و in vitro به صورت معنی‌داری در گروه‌های دریافت کننده دیازینون نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P <$ ۰/۰۰۰۱)، در حالی که درمان همزمان آتروپین، پرالیدوکسیم و گالیک اسید به طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کولین استرازی نسبت به گروه دیازینون شد ($P <$ ۰/۰۰۰۱).

استنتاج: تجویز همزمان آتروپین و گالیک اسید به همراه پرالیدوکسیم، مهار فعالیت آنزیم‌های کولین استرازی ناشی از دیازینون را کاهش و بازسازی آنزیم‌ها را نیز بهبود می‌بخشد. فعال سازی مجدد آنزیم‌ها توسط گالیک اسید می‌تواند ناشی از گروه‌های هیدروکسیل در ساختار این ترکیب باشد.

واژه های کلیدی: کولین استراز، دیازینون، گالیک اسید، آتروپین

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره ترکیبات آلی فسفردار مشتق از اسید فسفریک هستند(۲،۱) که به طور وسیع به عنوان آفت‌کش وحشره‌کش درکشاورزی و مکان‌های مختلف استفاده می‌شوند و جزو سمی‌ترین حشره‌کش‌ها محسوب

مولف مسئول: حمیدرضا محمدی– ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی E-mail: hmohammadi@farabi.tums.ac.ir
۱. دانشجوی دکتری تخصصی (Ph.D) سم شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دکتری داروسازی، واحد پردیس خودگردان رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران
۴. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۸/۱۱/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۸/۱۲/۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۹/۵/۱۲

www.SID.ir

Archive of SID

می‌گردند(۴،۳). دیازینون سم متوسط الاثری است(۵) که عوارض سوء کم‌تری نسبت به سایر ارگانوفسفره‌ها دارد(۶). این ترکیب به سرعت در محیط تجزیه می‌شود اما از لحاظ بیولوژیکی تا حدود ۶ ماه به صورت فعال در خاک باقی می‌ماند(۷). متابولیت سمی دیازینون، دیازوکسون می‌باشد(۸،۶). سموم ارگانوفسفره به آنزیم کولین استراز متصل شده و آن را فسفریله می‌نمایند، در نتیجه آن، مهار آنزیم کولین استرازی و اختلال در روند تجزیه استیل‌کولین، تجمع بیش از حد این واسطه شیمیایی در پایانه‌های عصبی (پایانه عصبی- عضله، گانگلیون‌های اتونوم و سیستم اعصاب مرکزی) اتفاق می‌افتد(۱۰،۹). مهار آنزیم استیل‌کولین استراز به وسیله سموم ارگانوفسفره در ابتدا به وسیله پیوند یونی صورت می‌گیرد که در نهایت به سمت یک پیوند کووالان و غیرقابل برگشت پیشرفت می‌کند. این فرایند ۴۸-۲۴ ساعت زمان برده و به نام پدیده فرسودگی (Aging) معروف است. این دوره زمانی به عنوان یک فاصله زمانی بحرانی محسوب می‌گردد، زیرا در خلال این زمان، تجویز آنتی دوت موثر بوده و باعث برگشت فرایند مهار آنزیم می‌شود. زمانی که پدیده Aging تکمیل شود، امکان فعالیت مجدد آنزیم وجود ندارد. اگرچه زمان Aging معمولا می‌تواند ۴۸-۲۴ ساعت طول بکشد و توسط سموم مختلف ارگانوفسفره این زمان متفاوت است(۱۱).

اسید گالیک (۳ و ۴ و ۵ تری هیدروکسی بنزوئیک اسید) یک ترکیب نوکلئوفیل و یکی از مهم‌ترین ترکیبات پلی‌فنولی در گیاهان و محصول هیدرولیز تانن‌ها می‌باشد که به وفور در میوه‌ها و مواد غذایی و در گیاهان مختلف مانند بلوط، چای سبز و سیاه، سماق، دانه انگور و سیب وجود دارد(۱۲). استر موجود در اسید گالیک با کاهش استرس اکسیداتیو از آسیب‌های سلولی جلوگیری می‌کند(۱۳). تحقیقات نشان داده که اسید گالیک دارای فعالیت‌های بیولوژیکی مانند فعالیت‌های ضد باکتری، ضد ویروسی، ضد التهابی، آنتی اکسیدان و اثرات ضد توموری است(۱۴). در صورت مسمومیت حاد با سموم ارگانوفسفره، پرالیدوکسیم پس از اتصال به سم ارگانوفسفره (البته وابسته به نوع سم) ترکیبی واسط را به نام POX (Phosphorylated Oximes) را تولید می‌نماید که می‌تواند دوباره با آنزیم استیل کولین استراز واکنش داده و آن را مجددا مهار کند. بنابراین احتمال واکنش سم ارگانوفسفره با ترکیباتی که به راحتی بتوانند گروه OH خود را (مانند سرین) در اختیار این ترکیب قرار بدهند وجود دارد(۱۵). با توجه به مکانیسم ترکیبات اکسیم‌ها (با خاصیت نوکلئوفیلیک)، گالیک اسید نیز احتمالاً دارای این خاصیت می‌باشد و احتمال می رود که بتواند به فعال سازی آنزیم مهار شده توسط سم ارگانوفسفره کمک نماید و باعث فعال شدن دوباره‌ی آنزیم استیل کولین استراز درگیر با ارگانوفسفره گردد(۱۶).

در این طرح پژوهشی سعی بر این است که اثر گالیک اسید به عنوان ترکیبی که احتمالا بتواند با آنزیم مهار شده استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز (استراز کاذب) در خون و سرم توسط سم ارگانوفسفره دیازینون، واکنش داده و این آنزیم را دوباره فعال کند و همچنین مقایسه آن با داروی پرالیدواکسیم (درمان استاندارد) مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، اسید گالیک (CAS Number: 149-91-7) شرکت‌های سیگما، پرالیدوکسیم SERB Paris (CAS number:6735-59-7) و سم دیازینون از شیمی کشاورز، کیت بوتیریل کولین استراز (شرکت زیست شیمی) و سایر مواد شیمیایی از شرکت‌های Merck و Sigma Aldrich خریداری شدند.

در این مطالعه از موش‌های سوری نر بالغ در ۶ گروه ۱۲ تایی با وزن تقریبی ۲۵-۲۰ گرم استفاده شد که از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه شدند و در شرایط مناسب در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و همگی با دسترسی آزاد به آب و

www.SID.ir

Archive of SID

غـذا نگهـداری شـده و مطـابق پروتکـل دانشـگاه مـورد آزمایش قرار گرفتند.

مطالعه in vivo

بر اساس مطالعات صورت گرفته پیشین، گروه‌هـای مورد آزمایش شامل ۶ گروه و هر گروه حاوی ۱۲ عـدد موش سوری به شرح زیر بودند:

۱. گروه کنتـرل (روغـن ذرت)، ۲. گـروه دریافـت کننده دیـازینون (80 mg/kg)، ۳. گـروه دریافـت‌کننـده دیــازینون + آتــروپین (20 mg/kg) + پرالیدوکســیم (20 mg/kg)، ۴. گروه دریافت کننده دیازینون + آتـروپین (20 mg/kg) + گالیـک اسـید (50 mg/kg)، ۵. گـروه دریافت کننده دیازینون + آتروپین (20 mg/kg) + گالیـک اسید (100 mg/kg)، ۶. گـروه دریافـت کننـده دیـازینون + آتروپین (20 mg/kg) + گالیک اسید (200 mg/kg).

دیازینون، آتروپین، پرالیدوکسیم و گالیک اسید از طریـق داخـل صـفاقی بـه مـوش‌هـا تزریـق شـد. بعـد از گذشت ۱۵ دقیقه از تزریق دیـازینون، درمـان‌هـا شـروع شدند که شامل اسید گالیـک، پرالیدوکسـیم و آتـروپین (درمان استاندارد) بود و بعد از ۳ و ۲۴ سـاعت مـوش‌هـا با اتر بیهوش شـده و خـونگیری انجـام شـد. نمونـه‌هـای خونی به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژکرده (۵۰۰۰ RPM) تـا گلبول‌های قرمز و پلاسما جدا شد و بر روی هر کدام به صورت جداگانـه، میـزان فعالیـت آنـزیم اسـتیل کـولین استراز مورد بررسی قرار گرفت(۱۸،۱۷).

مطالعه in vitro

۱۵ سی‌سی خون از پنج داوطلب سـالم و غیرسـیگاری کـه در ۶ مـاه اخیـر هیچگونـه مواجهـه‌ای بـا سـموم ارگانوفسفره نداشته‌اند، دریافت شد. نمونه‌های خونی به ۵ گروه مجزای ۲ میلی‌لیتری تقسیم گردیـد. گـروه‌هـا شامل موارد زیر بود:

۱- گروه کنترل، ۲- گـروه کنتـرل (روغـن ذرت)، ۳- گروه دیـازینون (۴۰۰ میکروگـرم بـر میلـی‌لیتـر)، ۴- دیازینون + پرالیدوکسیم (۷۴/۵ میکروگرم بـر میلـی‌لیتـر یا ۳۰۰ میکرومول بر لیتر)، ۵- دیازینون + اسـید گالیـک (۵۰ میکروگـرم بـر میلـی‌لیتـر)، ۶- دیـازینون + اسـید گالیک (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر).

در ابتدا به نمونه‌هـای خـون گرفتـه شـده بـه میـزان 3.8% w/v سیترات سدیم اضافه شد (جهـت جلـوگیری از انعقـاد) و سـپس بـه گـروه‌هـای ۲ میلـی‌لیتـری تقسـیم گردیدند. به جز گروه کنتـرل، بـه سـایر گـروه هـا مـاده مورد نظر (دیازینون ،پرالیدوکسیم، اسید گالیک) اضـافه گردیـد. نمونـه‌هـا بـه مـدت ۳ سـاعت در شـرایط اتـاق انکوبه شد و سپس به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدنـد (5000 RPM) و گلبول های قرمز و پلاسما جدا گردید. بر روی هر کدام از نمونه ها به صورت جداگانـه، میـزان فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در اریتروسیت‌ها

ابتدا ۳ میلی لیتر از محلـول DTNB بـا ۱۰۰ میکرولیتـر به عنوان سوبسترا در لوله آزمـایش ریختـه بـه مـدت ۳۰ ثانیه در حمام آب ۳۷ درجـه سـانتی‌گـراد قـرار گرفـت. سپس به لوله تست، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه همولیز شده اضافه کرده و به لوله شـاهد نیـز ۱۰۰ میکرولیتـر آب دو بار تقطیر اضافه نموده تـا تغییـر حجـم محسـوس نباشـد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۳۷ درجـه سـانتی‌گـراد قـرار گرفتنـد. سـپس ۱ میلـی‌لیتـر هیـامین (بنزاتونیوم کلراید) به عنـوان متوقـف‌کننـده واکـنش بـه لوله‌ها اضافه شد و سپس جـذب آن هـا توسـط دسـتگاه اسپکتروفتومتر در مقابل شـاهد کـه فاقـد نمونـه همـولیز شده بود، در طول موج ۴۴۰ nm خوانده شد. جذب هـر نمونه، سه بار با فاصله ۳۰ ثانیه خوانده و سـپس میـانگین سه عدد در فـاکتور ۱۷/۸۷ ضـرب گردیـد. ایـن فـاکتور نتیجـه محاسـبه رقـت / زمـان واکـنش × جـذب مـولی می‌باشد که در آن رقت ۲۵۶۲ و جذب مـولی ۱۴۳۴۰ و زمان واکنش ۱۰ دقیقه است(۱۸).

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز در پلاسما

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم کولین استراز پلاسمایی (بوتیریل کولین استراز) بر اساس پروتکل کیت (شرکت زیست شیمی) انجام شد. اساس آزمایش بدین صورت بود که در این آزمایش، آنزیم کولین استراز، بوتیریل تیوکولین را هیدرولیز کرده و تیوکولین و اسید بوتیریک آزاد می‌گردد. تیوکولین آزاد شده، پتاسیم هگزاسیانوفرات سه ظرفیتی زرد رنگ را به پتاسیم هگزاسیانوفرات دو ظرفیتی که بی رنگ است، کاهش می‌دهد. سرعت کاهش رنگ زرد محلول معرف در طول موج ۴۰۵ نانومتر قابل اندازه‌گیری است و رابطه مستقیم با میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در پلاسما دارد.

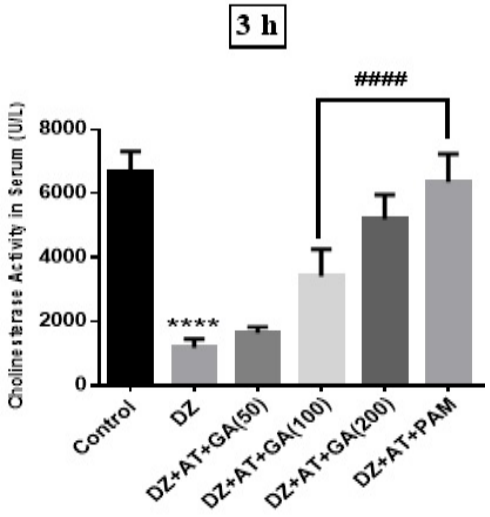
روش های آماری

در این مطالعه، نتایج بر حسب میانگین ± انحراف معیار حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده و همه‌ی آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری Graphpad Prism مدل ۶ انجام شد. تست‌های آماری مورد استفاده شامل آنالیز واریانس یکطرفه (one-way ANOVA test) با post-hoc Tukey test بود ($P <$ ۰/۰۵ به عنوان حد معناداری انتخاب گردید.)

یافته ها

تاثیر گالیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز و استیل کولین استراز در سرم و گلبول های قرمز موش های دریافت کننده دیازینون در ۳ ساعت و ۲۴ ساعت بعد از مسمومیت

میزان فعالیت آنزیم‌های بوتیریل کولین استراز در گروه‌های دریافت‌کننده دیازینون به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که از نظر آماری این کاهش نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P <$ ۰/۰۰۰۱) (نمودار شماره ۱). تزریق گالیک اسید در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به همراه آتروپین، تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم نسبت به گروه دیازینون نشان داد ($P <$ ۰/۰۰۰۱). با تزریق آتروپین و پرالیدوکسیم (گروه کنترل مثبت)، میزان فعالیت آنزیم افزایش یافت که نسبت به گروه دیازینون دارای اختلاف معنی‌داری بود.



نمودار شماره ۱: اثر گالیک اسید در دوزهای ۲۰۰ و ۱۰۰، ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر میزان فعالیت آنزیم کولین استراز سرمی (بوتیریل کولین استراز) در موش های دریافت کننده دیازینون (۳ ساعت بعد از مسمومیت با دیازینون)

DZ: Diazinon; AT: Atropine;
GA: Gallic Acid; PAM: Pralidoxime

**** دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($P <$ ۰/۰۰۰۱)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون ($P <$ ۰/۰۰۰۱)

میزان فعالیت آنزیم بعد از ۲۴ ساعت (نمودار شماره ۲) نشان داد که این اثرات مهاری با تزریق گالیک اسید به صورت وابسته به دوز به شدت کاهش یافت به طوری که این اثرات در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گالیک اسید به همراه آتروپین نسبت به گروه دیازینون از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری بود (به ترتیب ($P <$ ۰/۰۰۰۱، $P <$ ۰/۰۰۱، $P <$ ۰/۰۱) (نمودار شماره ۲).

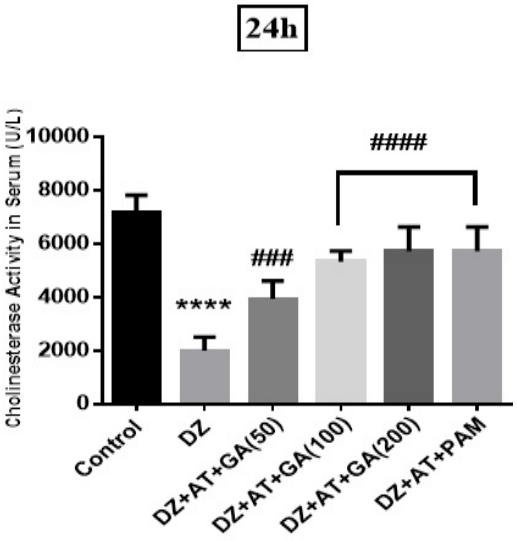
میزان فعالیت آنزیم‌های کولین استراز در هر دو گروه (۳ ساعت و ۲۴ ساعت بعد از مسمومیت) در موش‌های

www.SID.ir

Archive of SID

دریافت کننده دیازینون به طور معنی‌داری کاهش یافت که نسبت به گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌داری بود (P <۰/۰۰۰۱). همچنین گروه‌های دریافت‌کننده گالیک اسید باعث کاهش میزان مهاری آنزیم کولین استراز ناشی از سم دیازینون شد که از نظر آماری در همه دوزهای دریافت کننده گالیک اسید نسبت به گروه دیازینون دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد (P <۰/۰۰۰۱) (نمودار شماره ۳).

در گروه ۲۴ ساعته، اثرات کاهشی فعالیت آنزیم کولین استراز با تزریق گالیک اسید به همراه آتروپین به شدت بهبود یافت که از نظر آماری نسبت به گروه دریافت کننده دیازینون دارای تفاوت معنی داری بود (P <۰/۰۰۰۱) (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۲: اثر گالیک اسید در دوزهای ۲۰۰ و ۱۰۰، ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر میزان فعالیت آنزیم کولین استراز سرمی (بوتیریل کولین استراز) در موش های دریافت کننده دیازینون (۲۴ ساعت بعد از مسمومیت)

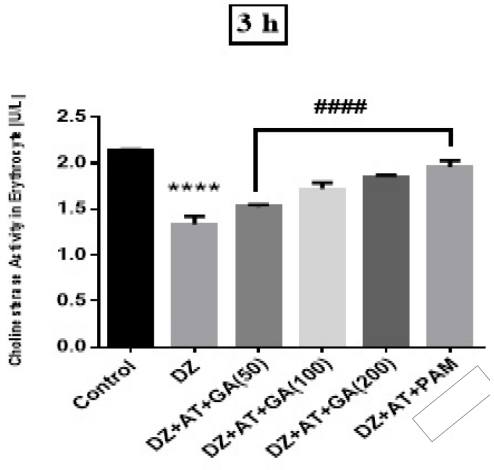
DZ: Diazinon; AT: Atropine;

GA: Gallic Acid; PAM: Pralidoxime

**** دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل (P <۰/۰۰۰۱)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون (P <۰/۰۰۰۱)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون (P <۰/۰۰۱)



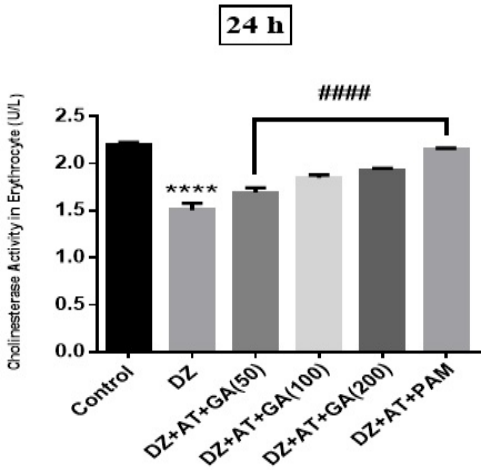
نمودار شماره ۳: اثر گالیک اسید در دوزهای ۲۰۰ و ۱۰۰، ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در اریتروسیت موش های دریافت کننده دیازینون (۳ ساعت بعد از مسمومیت)

DZ: Diazinon; AT: Atropine;

GA: Gallic Acid; PAM: Pralidoxime

**** دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل (P <۰/۰۰۰۱)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون (P <۰/۰۰۰۱)



نمودار شماره ۴: اثر گالیک اسید در دوزهای ۲۰۰ و ۱۰۰، ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در اریتروسیت موش های دریافت کننده دیازینون (۲۴ ساعت بعد از مسمومیت)

DZ: Diazinon; AT: Atropine;

GA: Gallic Acid; PAM: Pralidoxime

**** دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل (P <۰/۰۰۰۱)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون (P <۰/۰۰۰۱)

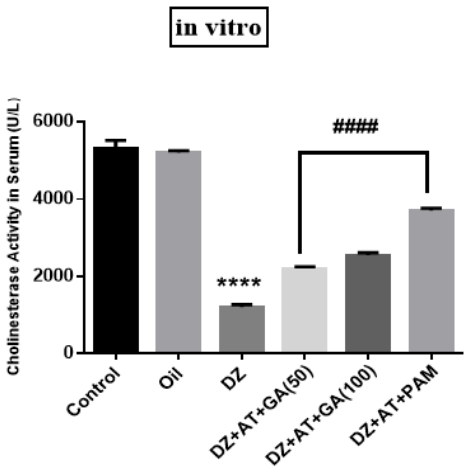
www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر گالیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز و استیل کولین استراز در سرم و اریتروسیت های انسانی (in vitro)

نمودار شماره ۵ نتایج حاصل از مواجهه خون انسانی با دیازینون و گروه‌های گالیک اسید با دوزهای متفاوت و میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز را نشان داده است. در گروه‌های خونی مواجهه یافته با دیازینون، میزان فعالیت آنزیم کولین استراز نسبت به گروه کنترل کاهش شدیدی یافت‌که از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار (P <۰/۰۰۰۱) در مقایسه با گروه کنترل بود که با اضافه کردن گالیک اسید و پرالیدوکسیم همراه با آتروپین این میزان کاهش در فعالیت استراز افزایش نشان داد و دارای اختلاف معنی‌داری (P <۰/۰۰۰۱) با گروه دریافت کننده دیازینون بود (نمودار شماره ۵). پس از مواجهه خون با دیازینون و سایر ترکیبات درمانی، اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در اریتروسیت‌های جدا شده از خون مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که دیازینون باعث کاهش قابل توجه میزان آنزیم استیل کولین استراز در اریتروسیت‌ها گردید که نسبت به گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌داری بود (P <۰/۰۰۰۱). پس از اضافه کردن گالیک.

اسید و آتروپین، میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در اریتروسیت به‌طور محسوسی افزایش یافت که از نظر آماری فقط در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه دیازینون دارای اختلاف معنی‌داری شد (P <۰/۰۰۱). همچنین در گروه‌های دریافت‌کننده پرالیدوکسیم شاهد افزایش فعالیت آنزیم بودیم که نسبت به گروه مواجهه یافته با دیازینون دارای تفاوت معنی‌داری گردید (P <۰/۰۰۰۱) (نمودار شماره ۶).



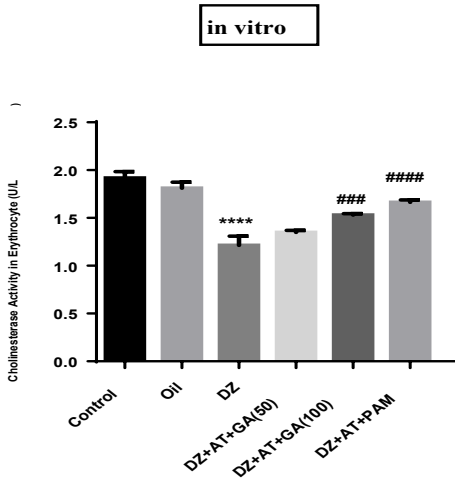
نمودار شماره ۵: اثر گالیک اسید در غلظت های ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز سرمی در خون انسان مواجهه یافته با دیازینون

DZ: Diazinon; AT: Atropine;

GA: Gallic Acid; PAM: Pralidoxime

**** دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل (P <۰/۰۰۰۱)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون (P <۰/۰۰۰۱)



نمودار شماره ۶: اثر گالیک اسید در غلظت های ۲۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در اریتروسیت جدا شده از خون انسانی مواجهه یافته با دیازینون

DZ: Diazinon; AT: Atropine;

GA: Gallic Acid; PAM: Pralidoxime

**** دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل (P <۰/۰۰۰۱)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون (P <۰/۰۰۰۱)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون (P <۰/۰۰۱)

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

مطالعه حاضر به بررسی تاثیر گالیک اسید بر فعال‌سازی مجدد آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز مهار شده با سم دیازینون به صورت یک مطالعه درون‌تنی و برون‌تنی پرداخت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که دیازینون باعث مهار یا کاهش فعالیت آنزیم‌های استیل و بوتیریل کولین استراز در اریتروسیت‌ها و سرم در زمان‌های ۳ ساعت اول و ۲۴ ساعت بعد از مسمومیت می‌گردد. همچنین این مطالعه نشان داد که گالیک اسید به همراه آتروپین به صورت وابسته به دوز، باعث فعال‌سازی مجدد آنزیم‌های استیل و بوتیریل کولین استراز در اریتروسیت‌ها و سرم می‌گردد.

ترکیبات ارگانوفسفره، ترکیبات شیمیایی هستند که به‌طور وسیع به‌عنوان آفت‌کش وحشره‌کش درکشاورزی و مکان‌های مختلف استفاده می‌شوند و سمی‌ترین حشره‌کش برای حیوانات مهره‌دار به شمار می‌روند(۳). به دلیل دسترسی آسان به این ترکیبات و سمیت بالای آن‌ها، باعث مسمومیت‌های تصادفی و حتی خودکشی می‌گردند(۲۰،۱۹). این ترکیبات سومین عامل مسمومیت در جانداران گزارش شده‌اند(۲). مهم‌ترین راه تجزیه این ترکیبات، شکسته شدن پیوند استری است(۶). سموم ارگانوفسفره به‌طور عمده از طریق کلیه حذف می‌شوند(۲۱) اما بخشی از این سموم از طریق کبد تبدیل به متابولیت‌های سمی (مانند دیازوکسون) و گونه‌های فعال اکسیژن شده که می‌توانند اثرات سمی غیر قابل جبرانی را در ارگان‌های مختلف انسان‌ها و حیوانات ایجاد نمایند(۸،۶).

استیل کولین یکی از مهم‌ترین واسطه‌های شیمیایی در پایانه‌های عصبی محسوب می‌گردد که توسط آنزیم استیل‌کولین استراز به اسید استیک و کولین هیدرولیز می‌گردد. این عمل از انتقال بیش از حد پیام‌های عصبی در سیناپس‌ها جلوگیری می‌کند(۱۰،۹). مهم‌ترین مکانیسم عملکردی ارگانوفسفره‌ها، مهار آنزیم استیل‌کولین استراز است که منجر به اثرات سمی مختلف شده که در نهایت باعث فلج تنفسی و کولاپس قلبی عروقی می‌گردند(۲۲). سموم ارگانوفسفره از طریق اتصال به گروه هیدروکسیل آمینواسید سرین در جایگاه فعال آنزیم استیل‌کولین استراز مانع از فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز می‌گردند(۲۳). کولین استرازها به دو دسته کولین استراز اصلی یا نسجی (شامل کولین استراز موجود در دستگاه عصبی و گلبول‌های قرمز) و کولین استراز کاذب یا بوتیریل‌کولین استراز(کولین استراز سرمی) تقسیم می‌شوند. به نظر می‌رسد که از بین رفتن ۷۵ درصد کولین استراز اصلی سبب مرگ می‌گردد، در حالی‌که کولین استرازهای سرمی ارزش کم‌تری در ارزیابی بالینی بیمار دارد. سموم فسفره آلی بر روی هر دو نوع کولین استراز اثر می‌کنند و باعث مهار این آنزیم‌ها می‌گردند(۲). بنابراین آنزیم‌های مورد هدف سموم ارگانوفسفره مانند دیازینون، کولین استراز ها (شامل استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز) می‌باشند(۲۴). آنزیم بوتیریل کولین استراز یک سم‌زدای عمومی است که در سرم و کبد وجود دارد و اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم بیش‌تر بیانگر تماس مزمن با سموم ارگانوفسفره‌ها می‌باشد، اگرچه در مواقع حاد مسمومیت با سموم ارگانوفسفره نیز این آنزیم مورد ارزیابی قرار می‌گیرد ولی فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز یا کولین استراز واقعی که در سیناپس عصبی و همچنین محل اتصال عصب عضله (NMJ) وجود دارد، شاخص بهتری برای ارزیابی شدت مسمومیت می‌باشد(۲۵). این آنزیم‌ها پس از فسفریله شدن غیر فعال می شوند. بنا براین این امر موجب اختلال در فعالیت آنزیم جهت تجزیه نوروترانسمیتر استیل کولین می‌شود. نتایج مطالعاتی که همسو با نتایج مطالعه ما بوده است، نشان داده که دیازینون فعالیت استیل کولین استراز در اریتروسیت و سرم را تحت تاثیر قرار داده و باعث کاهش فعالیت این نوروترانسمیتر می‌شود(۲۷،۲۶) و مشخص شده که استفاده از ویتامین E به همراه دیازینون سطح استیل کولین استراز موجود در سرم و اریتروسیت را به طور قابل توجهی در مقابل با گروه دیازینون افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

داده است(۲۸). در گزارشی دیگر مشاهده شده که دریافت N-استیل سیستئین، سبب افزایش سطح گلوتاتیون و کولین استراز مهار شده با سم ارگانوفسفره دیازینون می گردد(۲۹).

گزارشات نشان داده که ترکیبات ارگانوفسفره باعث کاهش کلسترول تام و فسفولیپیدهای غشای اریتروسیت شده است. همچنین افزایش فرایند لیپید پراکسیداسیون به دنبال مواجهه با مالاتیون گزارش شده است. اساس سمیت ارگانوفسفره‌ها در تولید رادیکال‌های آزاد، ممکن است به علت ایجاد اختلال در چرخه ردوکس و تغییر در هموستاز بدن باشد(۳۱،۳۰). در مواجهه با دیازینون، سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی بدن برای محافظت در مقابل رادیکال های آزاد فعال می‌شود(۸). وظیفه آنتی اکسیدان‌ها، پاکسازی رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. به عنوان مثال آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز که فرایند تبدیل رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن را کاتالیز می‌کند و به دنبال فعالیت آن، آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز، پراکسید هیدروژن را به آب تبدیل می‌کنند، نقش مهمی در سم‌زدایی و کاهش رادیکال‌های آزاد را در بدن دارند(۳۲).

اسیدگالیک و مشتقات آن به فرم‌های متیله شده مانند (سیرنژیک اسید) یا فرم‌های گالوئیلی در بسیاری از عملکردهای بیولوژیکی و فارماکولوژیکی مانند اثرات ضد التهابی و حفاظتی در بدن دخالت دارند. این عملکردها احتمالاً ناشی از پتانسیل ضداکسیدانی این ترکیبات است که به قابلیت آن‌ها در جلوگیری از آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد و نیز جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد منجر می‌گردد(۲۶). گالیک اسید دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی می‌باشد که با در اختیار قرار دادن اتم هیدروژن در گروه هیدروکسیل فنلیک ساختار خود، می‌تواند با رادیکال‌های آزاد تولید شده اتصال یافته و آن‌ها را خنثی نماید(۲۷).

چندین مطالعه که نتایج آن‌ها همسو با نتایج این مطالعه بوده است نشان داده که ترکیبات فنلی، خاصیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد را دارند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی اساسا به خاصیت اسکونجری (پاک کردن) رادیکال‌های آزاد توسط آن‌ها نسبت داده می‌شود. گالیک اسید به دلیل ظرفیت بالای پاکسازی رادیکال‌های آزاد، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری از خود نشان داده است. همچنین اثرات ضد باکتریایی، ضد سرطانی و کاهنده آسیب کبدی ناشی از استرس اکسیداتیو توسط این ترکیب گزارش شده است(۳۳).

در مطالعه حاضر گالیک اسید به همراه آتروپین به طور معنی‌داری باعث کاهش مهار فعالیت و افزایش مجدد فعالیت آنزیم‌های کولین استراز سرمی و اریتروسیتی در موش‌های مواجهه یافته با دیازینون در زمان‌های ۳ ساعت و ۲۴ ساعت بعد از مسمومیت با سم‌دیازینون گردید. مطالعات گذشته نشان داده‌اندکه گالیک اسید دارای خاصیت ضد التهابی قوی می‌باشد و بر اساس بررسی‌های انجام شده مشخص گردید که اثر ضد التهابی این ترکیب می‌تواند ناشی از مهار آنزیم سیکلواکسیژناز باشد(۲۷). نتایج مطالعات دیگر نشان داده است که گالیک اسید از طریق کاهش استرس اکسیداتیو باعث ترمیم بافت‌های آسیب دیده می‌گردد(۳۴). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که توانایی آنتی‌اکسیدانی اسید گالیک در متوقف کردن مرحله انتشار در فرایند اکسایش، به معنای واکنش سریع‌تر آن با رادیکال‌های آزاد نسبت به اسیدهای چرب غیراشباع است. مشخص شده که اسید گالیک از توانایی بیش‌تری در خصوص مهار رادیکال آزاد برخوردار است(۳۵).

در خصوص مکانیسم ترکیب گالیک اسید مورد استفاده می‌توان گفت که این ترکیب با توجه به ساختارش می‌تواند با دو مکانیسم پیشنهادی باعث کاهش سمیت ایجاد شده ناشی از سم ارگانوفسفره دیازینون گردد. مکانیسم پیشنهادی اول اینکه احتمال فعال سازی آنزیم کولین استراز (حقیقی و کاذب) در گلبول قرمز و

www.SID.ir

Archive of SID

پلاسما توسط این ترکیب می‌تواند شبیه به ترکیبات نوکلئوفیل باشد. احتمال این‌که این ترکیب مانند یک نوکلئوفیل عمل نماید و بتواند به گروه P-O متصل شده به آنزیم حمله کند و آنزیم را از مهار این ترکیب آزاد نماید (مشابه اثر ترکیب پرالیدوکسیم)، وجود دارد. البته با توجه به اینکه این ترکیب بی‌خطر می‌باشد و عدم سمیت آن هم در تست‌های In Vitro و In Vivo به اثبات رسیده است بنابراین عدم سمیت آن نسبت به ترکیب سمی پرالیدوکسیم می‌تواند یکی از محاسن مصرف این ترکیب در درمان باشد(۳۷،۳۶).

نظریه دوم قابل طرح برای ترکیب گالیک اسید مورد استفاده، احتمال واکنش این ترکیب با سم دیازینون آزاد و موجود در جریان خون می باشد. با توجه به این‌که در مسمومیت های شدید، با غلظت‌های بالایی از سم ارگانوفسفره مواجه هستیم و در این مطالعه نیز از غلظت بالای سم (0.5 LD50) دیازینون جهت مسمومیت حاد استفاده شد، پس این احتمال دور از ذهن نمی‌باشد که ترکیب گالیک اسید با داشتن گروه‌های OH آزاد در مولکول خود می‌تواند به راحتی با سم ارگانوفسفره دیازینون در قسمت P=O واکنش داده و آن را خنثی نمایند. بنابراین تمام فرضیه‌های مطرح فوق نیاز به آزمایش‌های بیش‌تر جهت اثبات مکانیسم‌های احتمالی ترکیب گالیک اسید مورد استفاده را دارد.

این مطالعه نقش استفاده همزمان گالیک اسید و آتروپین در فعال‌سازی مجدد آنزیم کولین استراز در سمیت ناشی از دیازینون را بررسی نمود. در مطالعه انجام شده، تجویز دیازینون با دوز mg/kg ۸۰ منجر به افزایش مهار کولین استراز سرمی و اریتروسیتی گردید که تجویز همزمان داروی آتروپین و ترکیب گالیک اسید در دوزهای مختلف، منجر به تعدیل و بهبود سمیت و کاهش مهار فعالیت آنزیم‌های کولین استرازی گردید. احتمالا گالیک اسید به خاطر دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل فراوان در فعال‌سازی مجدد آنزیم و یا اتصال به سم ارگانوفسفره دیازینون و همچنین در به دام اندازی رادیکال‌های آزاد ناشی از متابولیسم سم موجب کاهش اثرات تخریبی دیازینون می‌گردد. همچنین احتمال این‌که گالیک اسید مانند یک نوکلئوفیل عمل نماید و بتواند به گروه P-O متصل شده به آنزیم حمله کند و آنزیم را از مهار این ترکیب آزاد نماید نیز دور از ذهن نمی‌باشد که البته همه موارد ذکر شده نیاز به بررسی‌ها و تحقیقات بیش‌تری دارد.

References

1. Hai D, Varga SI, Matkovics B. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (Cyprinus carpio) and catfish (Ictalurus nebulosus). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology. Toxicology and Endocrinology 1997; 117(1): 83-88.
2. Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, Shadnia S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology 2004; 137(1): 29-34 (Persian).
3. Zhang C, Malhotra SV. Increased paraoxon detection by acetylcholinesterase inactivation with ionic liquid additives. Talanta 2005; 67(3): 560-563.
4. Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Kalender S, Durak D, Bayrakdar F, Kalender Y. The effects of organophosphate insecticide diazinon on malondialdehyde levels and myocardial cells in rat heart tissue and protective role of vitamin E. Pesticide Biochemistry and Physiology 2006; 86(2): 93-98.
5. Gupta RC. Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. 1ST ed, Academic

www.SID.ir

Archive of SID

Press; 2011.

6. Abdou HM, El Mazoudy RH. Oxidative damage, hyperlipidemia and histological alterations of cardiac and skeletal muscles induced by different doses of diazinon in female rats. J Hazard Mater 2010; 182(1-3): 273-278.
7. Larkin DJ, Tjeerdema RS. Fate and effects of diazinon. Rev environ contam toxicol 2000; 166: 49-82.
8. Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. Food Chem Toxicol 2010; 48(12): 3345-3353.
9. Voicu VA, Thiermann H, Rădulescu FŞ, Mircioiu C, Miron DS. The toxicokinetics and toxicodynamics of organophosphonates versus the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxime antidotes: biological consequences. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2010; 106(2): 73-85.
10. Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. Chem Biol Interact 2006; 159(1): 18-46.
11. Vale J. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. Toxicology Letters 1998; 102-103: 649-652.
12. Wang K, Zhu X, Zhang K, Zhu L, Zhou F. Investigation of gallic acid induced anticancer effect in human breast carcinoma MCF-7 cells. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 2014; 28(9): 387-393.
13. Hsieh SC, Wu CC, Hsu SL, Yen JH. Molecular mechanisms of gallic acid-induced growth inhibition, apoptosis, and necrosis in hypertrophic scar fibroblasts. Life Sciences 2016; 179: 130-138.
14. Liao CL, Lai KC, Huang AC, Yang JS, Lin JJ, Wu SH, et al. Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells through suppressing the matrix metalloproteinase-2/-9, protein kinase B (PKB) and PKC signaling pathways. Food and Chemical Toxicology 2012; 50(5): 1734-1740.
15. Luo C, Saxena A, Ashani Y, Leader H, Radić Z, Taylor P, et al. Role of edrophonium in prevention of the re-inhibition of acetylcholinesterase by phosphorylated oxime. Chem Biol Interact 1999; 119-120: 129-135.
16. Patocka J, Cabal J, Kuca K, Jun D. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. J Appl Biomed 2005; 3(2): 91-99.
17. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 1961; 7(2): 88-90.
18. Mohammadi H, Jalilian J, Karimi MY, Shetab Boushehri SV. In vitro cysteine reactivates organophosphate insecticide dichlorvos-inhibited human cholinesterases. Sultan Qaboos University Medical Journal 2017; 17(3): e293-e300.
19. Astroff AB, Freshwater KJ, Eigenberg DA. Comparative organophosphate-induced effects observed in adult and neonatal Sprague–Dawley rats during the conduct of multigeneration toxicity studies. Reproductive Toxicology. 1998;12(6):619-645.
20. Yen DH, Chan JY, Tseng H, Huang C, Lee C, Chan SH, et al. Depression of mitochondrial respiratory enzyme activity in rostral ventrolateral medulla during acute mevinphos intoxication in the rat. Shock 2004; 21(4): 358-363.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Wang X, Liu Q, Zhong W, Yang L, Yang J, Covaci A, et al. Estimating renal and hepatic clearance rates of organophosphate esters in humans: impacts of intrinsic metabolism and binding affinity with plasma proteins. Environment International. 2020; 134: 105321.
22. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaiee A. Pesticides and oxidative stress: a review. Med Sci Monit 2004; 10(6): RA141-RA147.
23. Karami Osboo R, Mirabolfathy M, Kamran R, Shetab Boushehri M, Sarkari S. Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran. Food Control 2012; 23(1): 271-274 (Persian).
24. El Shenawy NS, AlSalmy F, Al Eisa RA, El Ahmary B. Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver. Pesticide Biochemistry and Physiology 2010; 96(2): 101-107.
25. Kim JH, Stevens RC, MacCoss MJ, Goodlett DR, Scherl A, Richter RJ, et al. Identification and characterization of biomarkers of organophosphorus exposures in humans. Adv Exp Med Biol 2010; 660: 61-71.
26. Sargazi Z, Nikravesh M, Jalali M, Sadeghnia H. The protective effect of vitamin E on serum and erythrocytes cholinesterase levels in poisoning of Diazinon, in adult female rats. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences 2016; 7(4):801-812 (Persian).
27. Shokrzade Lamoki M, Pakravan N, Sheikholeslamian S. The protective effect of N-acetyl cysteine on glutathione levels and serum cholinesterase in acute poisoning of diazinon, in mice. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 22(2-3): 2-11 (Persian).
28. Ogut S, Gultekin F, Nesimi Kisioglu A, Kucukoner E. Oxidative stress in the blood of farm workers following intensive pesticide exposure. Toxicology and Industrial Health 2011; 27(9): 820-825.
29. Altuntas I, Delibas N, Sutcu R. The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. Human & Experimental Toxicology 2002; 21(12): 681-685.
30. Akturk O, Demirin H, Sutcu R, Yilmaz N, Koylu H, Altuntas I. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat heart and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. Cell Biology and Toxicology 2006; 22(6): 455-461.
31. Daglia M, Di Lorenzo A, F Nabavi S, S Talas Z, M Nabavi S. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! Current Pharmaceutical Biotechnology 2014; 15(4): 362-372.
32. Dewick PM, Haslam E. Phenol biosynthesis in higher plants. Gallic acid. Biochem J 1969; 113(3): 537-542.
33. Goudarzi M, Kalantar M, Kalantar H. The Hepatoprotective effect of gallic acid on mercuric chloride-induced liver damage in rats. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 2017; 12(4): e12345 (Persian).
34. Hosseinzadeh A HG, Goudarzi M, Sezavar SH, Mehrzadi S, Mansouri E, et al. Ameliorative effect of gallic acid on sodium arsenite-induced spleno-, cardio-and hemato-toxicity in rats. Life Sciences 2019; 217: 91-100 (Persian).
35. Farahmandfar R, Asnaashari M. Assessment of antioxidant activity and kinetic oxidative parameters of syringic acid and gallic acid in

www.SID.ir

Archive of SID

sunflower oil. Journal of Food Science and Technology 2018; 15(83): 1-14 (Persian).

36. Roberts AT, Martin CK, Liu Z, Amen RJ, Woltering EA, Rood JC, et al. The safety and efficacy of a dietary herbal supplement and gallic acid for weight loss. Journal of Medicinal Food 2007; 10(1): 184-188.

37. Rajalakshmi K, Devaraj H, Devaraj SN. Assessment of the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of gallic acid in mice. Food and Chemical Toxicology 2001; 39(9): 919-922.

www.SID.ir