

بررسی تأثیر سموم ارگانوفسفره بر فعالیت کولین استراز اریتروسیت در کارگران مزارع برنج

دکتر محمد علی ابراهیم زاده*، محمد شکرزاده لموکی**، دکتر مهشاد بیوک آبادی***

چکیده:

زمینه و هدف: استفاده از سموم ارگانوفسفره به عنوان حشره کش یا علف کش از دیر باز در استانهایی مانند مازندران بعلت و فور مزارع کشاورزی رواج داشته است. از آنجا که بسیاری از کارگران مزارع در تماس با این سموم قرار می گیرند بنابراین امکان جذب این سموم از طریق پوست وجود دارد. این کار تحقیقی به منظور بررسی میزان جذب سموم از طرق مختلف در این کارگران انجام شده است.

روش مطالعه: بدین منظور از روش رنگ سنجی المن در سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE) استفاده شد. نمونه ها از ۳۵ کارگر زمین کشاورزی برنج که ۱۰ تا ۱۵ روز پس از استفاده از سموم ارگانوفسفره، در داخل زمین کشاورزی بطور پاره برهنه کار می کردند، گرفته شد و ۳۵ نفر نمونه به عنوان شاهد از بین افراد سالم با شرایط یکسان انتخاب شدند با این تفاوت که در تماس یا مواجهه با این سموم نبوده و در زمین کشاورزی نیز کار نمی کردند. فعالیت آنزیم استیل کولین استراز به صورت واحد در میلی لیتر گلبول قرمز محاسبه شد.

نتایج: تفاوت معنی داری بین میانگین فعالیت آنزیم در مردان و زنان شاهد بدست نیامد اما این تفاوت در مردان و زنان کارگر از نظر آماری معنی دار نشان داده شد ($P < 0/05$). بررسی آماری نشان داد که میان فعالیت این آنزیم در مردان کارگر با گروه شاهد تفاوت معنی داری وجود دارد ($P < 0/05$). تفاوت معنی داری نیز بین میانگین فعالیت آنزیم در زنان کارگر با افراد شاهد بدست آمد ($P < 0/05$).

نتیجه گیری: میزان جذب سموم در کارگران مزرعه بالاست. امکان کاهش آن با استفاده نمودن از چکمه و دستکش و همچنین اجتناب از بکارگیری کارگران قبل از گذشت دو هفته پس از سم پاشی وجود دارد.

واژه های کلیدی: کولین استراز، روش المن، کارگران مزارع کشاورزی، سموم ارگانوفسفره.

مقدمه:

<p>ترکیبات ارگانوفسفره بطور گسترده ای به عنوان حشره کش مورد استفاده قرار می گیرند. این ترکیبات در افرادی که در مواجهه یا تماس با آنها هستند، خطرات و مشکلاتی را ایجاد می کنند. مهار برگشت ناپذیر استیل کولین استراز</p>	<p>(AChE, EC 3.1.1.7) و بوتیریل کولین استراز (BChE, EC 3.1.1.8) مکانیسم اصلی سمیت با ارگانوفسفره ها بوده که موجب اختلال در عملکرد اعضای متعددی در بدن می شود (۱۲،۶). اطلاع از وضعیت این آنزیم در تشخیص اولیه مسمومیت در</p>
---	---

*استادیار گروه شیمی دارویی - دانشگاه علوم پزشکی مازندران: دانشکده داروسازی ساری - گروه فارماکولوژی - تلفن: ۳۲۵۹۱۰۲ - ۰۱۵۱، Email: zadeh20@yahoo.com. (مؤلف مسئول).

عضو هیات علمی گروه داروسازی-دانشگاه علوم پزشکی مازندران. *دکتر داروساز-مسئول فنی کارخانه پاک و داروخانه هلال احمر.

مواد و روشها:

مواد شیمیایی و دستگاهها:

کلیه مواد مصرفی شامل دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبه، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، سولفات کینیدین، اسید دی تیو بیس نیترو بنزوئیک، استیل تیو کولین یداید و هیامین ۱۶۲۲ از شرکت فلوکا (سوئیس) خریداری شد. هپارین، سرنگ و سایر نیازمندی ها در مرحله خونگیری از جمله پنبه، الکل، گار و غیره از داروخانه ها تهیه شد. برای قرائت میزان جذب از دستگاه اسپکترو فتومتر Shimadzu UV-mini 1240 ساخت ژاپن استفاده شد. عملیات سانتریفیوژ نیز به کمک دستگاه Hettich Universal ساخت آلمان انجام شد.

واکنشگر ها:

بافر فسفات (PP, 0.1 mol/L, pH=7.4)، محلول یک: ۱۷/۸ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبه در یک لیتر آب مقطر حل شد (۱). محلول دو: ۲/۷۲ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید سپس از محلول دو به محلول یک اضافه شد تا pH در دمای اتاق به ۷/۴ برسد (حدود ۶۰ میلی لیتر از محلول دو لازم می باشد). این محلول در دمای یخچال تا ۲ هفته قابل استفاده می باشد (۱۴).

واکنشگر DTNB (dithiobis nitrobenzoic acid):

۰/۲۷ میلی مول (۱۰۷ میلی گرم) از DTNB و ۲۰ میکرو مول (۱۶ میلی گرم) سولفات کینیدین در یک لیتر از بافر فسفات تهیه شده از روش قبل حل گردید. این محلول در بطری تیره در دمای یخچال قابل نگهداری می باشد.

مواجهه با سموم ارگانوفسفره یا سمیت زدائی آن، حیاتی می باشد (۲). از آنجا که کولین استراز عضلات برای اندازه گیری مستقیم در دسترس نمی باشد، کولین استراز گلوبول قرمز جانشین قابل اعتمادی بدین منظور می باشد (۱۴). سطح این آنزیم یک شاخص مهم بیوشیمیایی و یک پارامتر حساس از برخورد با سموم و یا حضور مواد سمی در بدن است (۳).

روش های حساس و اختصاصی متعددی برای تعیین فعالیت کولین استراز گزارش شده اند از جمله: الکترومتری، pH stat، تیترومتری، رادیومتری و رنگ سنجی (۱۱). اما استفاده روتین از آنها بعلت مشکلات در تهیه نمونه، زمان اندازه گیری طولانی، اختصاصی نبودن سوبسترا به اندازه کافی و اختلال توسط محیط نمونه امکان پذیر نمی باشد. روش رنگ سنجی Ellman (۵،۴) عموماً روش ارجح در مانیتور نمودن بیماران مسموم شده با حشره کش ها می باشد (۱۳). استفاده از سموم حشره کش و علف کش کشاورزی از دیر باز در استانهایی مانند مازندران به علت وفور مزارع کشاورزی رواج داشته است. این ترکیبات در آب حل شده و سپس مزارع با این آب آبیاری و یا سمپاشی می شود. از طرفی این مزرعه محل کار بسیاری از کارگران مزرعه می باشد که بطور پابرهنه در آن کار می کنند لذا منطقی بنظر می رسد که این افراد در تماس با این سموم قرار گیرند. در این تحقیق میزان جذب سموم از طریق پوست بدن در کارگرانی که ساعت ها به طور پابرهنه در مزرعه مشغول بکار هستند مورد مطالعه قرار گرفت. این سموم بخوبی از طریق دهانی، پوستی و تنفسی در انسان قابلیت جذب دارند (۷).

محلول سوبسترا:

از حل نمودن ۰/۲ مول استیل تیو کولین یداید در یک لیتر آب مقطر حاصل شد. در عمل به جهت تازه بودن این محلول، ۵۷۸ میلی گرم از استیل تیو کولین یداید در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید.

واکنشگر متوقف کننده:

از حل نمودن ۴۳ میلی مول بر لیتر (۲۰ گرم در لیتر) هیامین ۱۶۲۲ در آب مقطر یا محلول اشباع سولفات کینیدین (حدود ۷ گرم در لیتر) در آب مقطر تهیه شد. این محلول در بطری تیره در دمای یخچال قابل نگهداری می باشد (۵).

نمونه ها:

نمونه های خونی بکار رفته در این تحقیق از ۳۵ کارگر زمین کشاورزی برنج (با محدوده سنی ۳۸-۲۷) که ۱۰ تا ۱۵ روز پس از استفاده از سموم ارگانو فسفره، در داخل زمین کشاورزی به طور پا برهنه کار می کردند، گرفته شد. این افراد در خلال ماه قبل سابقه بیماری نداشته، در بیمارستان بستری نشده و داروئی استفاده نکرده بودند. توسط کارشناس آزمایشگاه ۵ میلی لیتر خون از ورید ساعد این افراد گرفته شد. خون ها پس از انجام چند مرحله، همولیز گردید و سپس تا زمان آزمایش (صبح روز بعد) با سرعت در فریزر منجمد شدند. نمونه های شاهد از همان تعداد افراد سالم با شرایط یکسان انتخاب شدند با این تفاوت که در تماس یا مواجهه با سموم ارگانو فسفره نبوده و در زمین کشاورزی نیز کار نمی کردند.

محلول همولیز:

خون ها بلا فاصله پس از خروج از بدن هپارینه گردیده و با سرعت سانتریفیوژ شدند (۲۰ دقیقه با سرعت

۵۰۰۰ دور در دقیقه). بدین ترتیب سرم های جدا شده توسط سرنجک خارج شد. به جهت عاری نمودن محیط از کولین استراز سرمی (بوتیریل کولین استراز، پسودو کولین استراز یا کولین استراز کاذب) عمل شستشوی گلوبول قرمز با محلول نرمال سالین سه بار و هر بار با مقدار هم حجم خود انجام شد. این محلول از آن جهت انتخاب شد که در حین انجام عمل شستشو همولیزی صورت نگیرد. پس از هر بار شستشو عمل سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام شده و هر بار مایع فوقانی با سرنجک کشیده و دور ریخته شد. پس از آخرین مرحله ۱۰۰ میکرو لیتر گلوبول قرمز به ۶ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد تا همولیز صورت پذیرد (این محلول همولیز تا رسیدن زمان انجام کار بصورت فریز قابل نگهداری است).

روش انجام مرحله سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز:

۳ میلی لیتر از واکنشگر DTNB و ۱۰۰ میکرو لیتر محلول سوبسترا (محلول استیل تیو کولین یداید) در لوله شیشه ای به مدت ۱۰ ثانیه در حمام آبی ۳۷ درجه گذاشته شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر محلول همولیز برای شروع واکنش به آن اضافه شد. لوله شیشه ای در حمام آب ۳۷ درجه گذاشته شد و دقیقاً پس از ۱۰ دقیقه ۱ میلی لیتر واکنشگر متوقف کننده به مجموعه اضافه شد. محتویات داخل لوله شیشه ای بهم زده شده و به خارج از حمام آبی منتقل شد. نمونه های بلانک دقیقاً به شرح فوق تهیه شدند با این تفاوت که ۱۰۰ میکرو لیتر محلول همولیز در مرحله آخر پس از افزودن واکنشگر متوقف کننده و سپری شدن زمان مربوطه، در خارج حمام آبی به هر لوله شیشه ای اضافه شد. از آنجا که هر نمونه همولیز شده جذب خود را دارا می باشد لذا بدین ترتیب برای سنجش فعالیت آنزیم در هر نمونه، یک بلانک

افراد شاهد وجود داشت. بررسی آماری نشان داد که میان فعالیت این آنزیم در مردان کارگر با گروه شاهد تفاوت معنی داری وجود دارد ($P < 0/05$). تفاوت محسوسی نیز بین میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در زنان کارگر با میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در افراد شاهد وجود داشت. بررسی آماری نشان داد که میان فعالیت این آنزیم در زنان کارگر نیز با گروه شاهد تفاوت معنی داری وجود دارد ($P < 0/05$).

بحث:

کولین استرازها جزء بتا استرازها بوده که توسط مهارکننده‌هایی از قبیل سموم ارگانوفسفره، آنتی کولین استرازها و برخی فلزات سنگین (مانند سرب و کادمیوم) مهار می‌شوند (۱). این آنزیم پس از مهار شدن قادر به هیدرولیز ماده اولیه اختصاصی خود نمی‌باشد. هر دو گروه کولین استرازها شامل کولین استراز حقیقی یا استیل کولین استراز که در گلبول قرمز و بافت عصبی وجود دارد و کولین استراز کاذب (غیر اختصاصی) یا بوتیریل کولین استراز که علاوه بر سرم، در سلول‌های ژلیال (glial cells) و کبد یافت می‌شود قادر به هیدرولیز استیل کولین می‌باشند. ولی در مواردی از قبیل ویژگی سوبسترا، pH مناسب، پراکندگی یا پخش در بدن، تنوع مهارکننده‌ها با یکدیگر اختلاف دارند (۹). ترکیبات ارگانوفسفره یکی از مهمترین گروه‌های آفت کش می‌باشند. این ترکیبات به عنوان حشره کش و به میزان کمتر به عنوان ارگانوفسفره مورد مصرف قرار می‌گیرند. از آنجا که این ترکیبات از طریق مهار آنزیم استیل کولین استراز (AChE) عمل می‌کنند، تعیین فعالیت این آنزیم در گلبول قرمز و یا آنزیم پ سودو کولین استراز در سرم یا پلاسما مطمئن‌ترین و گسترده‌ترین شاخص

بطور مستقل تهیه گردید. بلافاصله جذب هر نمونه در مقابل بلانک خود در طول موج ۴۴۰ نانومتر خوانده شد. این عمل برای هر نمونه همولیز سه بار انجام شد و در نهایت میانگین این اعداد در محاسبات بعدی بکار رفت. بدین ترتیب جذب برای کلیه نمونه‌های همولیز شده اعم از نمونه‌های کارگران و نمونه‌های سالم (افراد شاهد) انجام شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بصورت واحد در میلی لیتر گلبول قرمز (U / ml of packed erythrocytes) تفاوت جذب نمونه با شاهد در فاکتور ۱۷/۸۷ ضرب شد. این فاکتور از نسبت رقت بر جذب مولی در زمان واکنش بدست آمده است، جایی که رقت ۲۵۶۲، جذب مولی ۱۴۳۴۰ لیتر بر مول در سل (cell) ۱۰ میلی لیتری و زمان واکنش ۱۰ دقیقه ای می‌باشد. بررسی‌های آماری توسط two tailed student t-test انجام شد.

نتایج:

میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مردان شاهد $12/11 \pm 4/43$ (میزان جذب $0/6778 \pm 0/2480$) و در زنان شاهد $12/60 \pm 4/83$ (میزان جذب $0/7052 \pm 0/2705$) بدست آمد. این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود. میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مردان کارگر $8/17 \pm 4/47$ (میزان جذب $0/4573 \pm 0/2502$) و در زنان کارگر $5/18 \pm 2/44$ (میزان جذب $0/2897 \pm 0/1364$) بدست آمد. تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی دار نشان داده شد ($P < 0/05$). در واقع با اطمینان ۹۵ درصد می‌توان قضاوت نمود که فعالیت این آنزیم در مردان کارگر بیش از زنان کارگر می‌باشد. تفاوت محسوسی بین میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مردان کارگر با میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در

این pH هیدرولیز استیل تیو کولین یداید کاهش می یابد (۱۴).

در مطالعه ما تفاوت میانگین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مردان و زنان شاهد از نظر آماری معنی دار نبود. گزارشاتی وجود دارد که صحت عملیات فوق را اثبات می کنند. در مطالعات دیگر آمده است که تفاوتی در میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در زنان و مردان سالم وجود ندارد اما فعالیت کولین استراز سرمی (بوتیریل کولین استراز) بطور قابل ملاحظه ای در مردان بیشتر است (۹). تفاوت معنی دار آماری میان فعالیت این آنزیم در زنان و مردان کارگر با گروه شاهد ($P < 0.05$) زنگ خطر جدی را برای اصلاح روش سنتی کشت برنج در مزارع به صدا در آورده است. بخصوص در مورد زنان که امکان حاملگی و یا شیر دهی در این زمان نیز وجود دارد. مورد اخیر خود سر فصل مطالعه دیگری با انگیزه اثبات وجود این سموم و تعیین مقدار آنها در نوزادان شیرخوار مادرانی خواهد بود که در این زمان به کار کشاورزی اشتغال دارند.

پیشنهادات:

به منظور کاهش میزان جذب سموم علف کش کشاورزی پیشنهاد می گردد که کارگران در هنگام کار در مزارع از چکمه استفاده نموده و همواره دستکش در دست داشته باشند. رعایت این موضوع از جذب سموم ممانعت خواهد کرد. از طرفی تأکید می شود که بایستی از شروع بکار کارگران قبل از گذشت دو هفته پس از سم پاشی جلوگیری نمود. زیرا بر اساس نیمه عمر این سموم، میزان ترکیبات فوق الذکر (به عبارت دیگر غلظت این سموم) پس از این مدت، نصف خواهد شد.

بیولوژیک برای تماس انسان با سموم ارگانو فسفره می باشد (۹). در مقالات به منظور بررسی میزان تماس انسان با ترکیبات ارگانو فسفره از دو روش کلی استفاده شده است: در روش اول حشره کش و یا علف کش به شکل سالم و دست نخورده یا متابولیت های آنها در خون یا ادرار مورد تجسس قرار می گیرد و در روش دوم اثرات بیولوژیک اولیه ناشی از مواجهه با سموم بررسی می گردد (۹). روش رنگ سنجی المن عموماً روش ارجح در مانیتور نمودن بیماران مسموم شده با حشره کش ها می باشد. گرچه این روش سریع، ساده و ارزان می باشد ولی از مشکلات این روش تداخل جذب هموگلوبین با جذب TNB- (آنیون ۳- کربوکسی-۴- نیترو بنزن تیولات) معرف رنگی اندازه گیری AChE می باشد. برای حل این مشکل از موادی مانند هیامین استفاده می شود که جذب معرف رنگی را به طول موج بالاتر انتقال داده اما چندان موجب افزایش طول موج جذبی هموگلوبین نمی شود (۵). از طرفی به جهت تصحیح خطای ناشی از فعالیت BChE در اندازه گیری فعالیت AChE در خون کامل از مهار کننده های انتخابی مختلف از جمله کینیدین (۸) و یا مشتقات فنوتیازین (۱۰) استفاده می شود. استیل کولین استراز اریتروسیت توسط رشته های کلاژن به غشای گلبول قرمز متصل شده است. در تعیین فعالیت این آنزیم ابتدا گلبول قرمز باید با شستشوی متوالی با سرم فیزیولوژیک با دقت از پلاسما جدا شود تا امکان تداخل آن با کولین استراز سرمی حذف گردد. سپس هیدرولیز گلبول قرمز انجام شده و آنزیم توسط سانتریفیوژ از باقیمانده غشای لیز شده گلبول قرمز جدا گردد. در انجام سنجش فعالیت آنزیم کولین استراز در این مقاله از pH ۷/۴ بجای ۸ که در مقاله Ellman پیشنهاد شده، استفاده گردیده است. در

تشکر و قدردانی:

و بودجه استان مازندران که با پرداخت هزینه های موجود انجام این طرح را امکان پذیر نموده و همچنین معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که با پیگیری های فراوان بستری مناسب را برای انجام این طرح فراهم نموده اند، سپاسگزاری می گردد.

این مقاله به جناب آقای دکتر محمد عبدالهی دانشیار گروه سم شناسی دانشکده داروسازی تهران که مستقیماً حق استادی بر هر سه نویسنده این مقاله دارند، تقدیم می شود.
همچنین بدینوسیله از مدیریت محترم سازمان برنامه

Reference:

1. Abdollahi M.; Biukabadi M.; Ebrahimzadeh MA. *In vitro* inhibition of acetyl cholinesterase activity in human red blood cells by cadmium and lead. *Acta Med Iranica*, 36(2): 74-8, 1998.
2. Ballantyne B.; Marrs TC. Overview of the biological and clinical aspects of organo phosphates and carbamates. In: Ballantyne B.; Marrs TC. *Clinical and experimental toxicology of organo phosphates and carbamates: From Butterworth & Heinemann*. Oxford: UK, 3-14, 1992.
3. Devi M.; Fingerman M. Inhibition of acetyl cholinesterase activity in the CNS of red swamp crayfish by Mercury, Cadmium and Lead. *Bull Environ Contam Toxicol*, 55: 746-50, 1995.
4. Ellman GL.; Courtney KD.; Andres V.; Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetyl cholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7: 88-95, 1961.
5. George PM.; Abernethy MH. Improved ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. *Clin Chem*, 29(2): 365-8, 1983.
6. Holmstedt B. Pharmacology of organ phosphorous cholinesterase inhibitors. *Pharmacol Rev*, 11: 567-88, 1959.
7. Kocabiyyik N.; Tuncok Y.; Guven H.; Ates M. Cholinesterase activity in agricultural workers exposed to organophosphates. *Book of Abstracts EUROTOX 95. Toxicol Lett Suppl*, 1(78): 47, 1995.
8. Magnotti RA.; Dowling K.; Eberly JP. Field measurement of plasma and erythrocyte cholinesterase. *Clin Chim Acta*, 315: 315-32, 1988.
9. Maroni M.; Colosio C.; Ferioli A.; Fait A. Organ phosphorous pesticides. *Toxicology*, 143: 9-37, 2000.
10. Meuling WJA.; Jongen MJM.; Van Hemmen JJ. An automated method for the determination of acetyl and pseudo cholinesterase in hemolyzed whole blood. *Am J Ind Med*, 22: 231-41, 1992.
11. Omer-Vev ST.; Rottinghause GE. Biomedical determination of cholinesterase activity in biological fluids and tissues. In: Ballantyne B.; Marrs TC. *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates: From Butterworth & Heinemann*. Oxford: UK, 15-27, 1992.
12. Sramek J.; Cutler N. RBC Cholinesterase inhibition: a useful surrogate marker for cholinesterase inhibitor activity in Alzheimer disease therapy? *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 14(4): 216-27, 2000.

13. Wilson BW.; Sanborn JR.; O'malley MA. Monitoring the pesticide worker. Occup Med, 12: 347-63, 1997.

14. Worek F.; Mast U.; Kiderlen D.; Diepold C.; et al. Improved determination of acetyl cholinesterase activity in human whole blood. Clin Chim Acta, 288: 73-90, 1999.

تاریخ دریافت مقاله: ۸۲/۹/۱۵

تاریخ تأیید نهایی: ۸۳/۷/۵

