مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۱، شماره‌ی ۸٤ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۲، صفحات ۱۳ تا ۲۳

نقش سمیت پاراکسون در ایجاد استرس اکسیداتیو در در بافت طحال و قلب موش صحرایی

مریم صالحی[۱]، دکتر مهوش جعفری[۲]، دکتر علیرضا عسگری[۳]، صدیق احمدی[٤]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، دانشکده‌ی پزشکی، گروه بیوشیمی m.jafari١٤٥@gmail.com

دریافت: ۹۱/۵/۲۵ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: *پاراکسون به عنوان فرم فعال پاراتیون، یکی از مهم‌ترین حشره‌کش‌های ارگانوفسفره است که در کشاورزی استفاده می‌شود. بعضی از ارگانوفسفره‌ها قادرند باعث تولید رادیکال‌های آزاد و القای اختلال در سیستم آنتی اکسیدان بدن شوند. هدف از این مطالعه بررسی اثر پاراکسون بر القای استرس اکسیداتیو در بافت‌های قلب و طحال موش صحرایی بود.*

روش بررسی: *موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به ٤ گروه (در هر گروه ۷ سر) تقسیم شدند. گروه کنترل روغن ذرت را به‌عنوان حلال پاراکسون و سه گروه که دوزهای مختلف پاراکسون (۰/۳، ۰/۷ و ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲٤ ساعت پس از تزریق حیوانات با اتر بیهوش و بافت‌های قلب و طحال جدا گردید و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) همچنین غلظت گلوتاتیون (GSH) و مالون دی آلدیید (MDA) توسط روش‌های بیوشیمیایی تعیین شدند.*

یافته‌ها: *فعالیت آنزیم‌های SOD و GST در بافت های قلب و طحال و فعالیت CAT در قلب در دوزهای بالاتر از ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم پاراکسون به‌طور معنی‌دار افزایش یافته، در حالی‌که فعالیت CAT در بافت طحال و غلظت GSH در هر دو بافت کاهش یافت. کاهش فعالیت آنزیم LDH و افزایش غلظت MDA در دوز ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم پاراکسون در بافت قلب مشاهده شد.*

نتیجه‌گیری: *پاراکسون تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو وابسته به دوز را القا می‌کند. بافت قلب حساسیت بیشتری را در مقابل اثرات پاراکسون بر روی القای استرس اکسیداتیو نسبت به بافت طحال دارد.*

واژگان کلیدی: پاراکسون، استرس اکسیداتیو، قلب، طحال، موش صحرایی

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره استر، آمید یا مشتقات تیولی متداولی از اسید فسفونیک هستند که طیف وسیعی (بیشتر از ۵۰۰۰۰) از عوامل شیمیایی با ماهیت بیولوژیکی را تشکیل می‌دهند (۱). این ترکیبات در کشاورزی، صنعت، باغبانی، دامپزشکی و

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی

۲- دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی

۳- دکترای تخصصی فیزیولوژی، استاد دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی

٤- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

Archive of SID

www.SID.ir

منازل استفاده می‌شوند. اغلب ترکیبات ارگانوفسفره به‌طور کامل و یا تقریباً کامل و سریع از طریق پوست، دهان، موکوس تنفسی و گوارش جذب می‌گردند و توزیع آن‌ها در بدن نیز وسیع می‌باشد. انواع لیپوفیل این ترکیبات از پوست بدن نیز عبور می‌کنند (۲). به‌دلیل دسترسی آسان و سمیت بالای این ترکیبات، میزان بروز مسمومیت‌های تصادفی و خودکشی وسیع بوده، مسوول حدود صد هزار مسومیت در هر سال در دنیا است (۳). در ایران این ترکیبات یکی از علل مرگ و میر ناشی از مسمومیت هستند (٤). پاراکسون یا O، O دی اتیل O- ٤- نیتروفنیل فسفات محصول متابولیسم اکسیداتیو پاراتیون در کبد است (از تبدیل P=S→ P=O) که به‌عنوان یکی از سمی‌ترین آفت‌کش‌ها در نظر گرفته می‌شود. پاراکسون مثل دیگر ارگانوفسفره‌ها فعالیت آنزیم کولین استراز را از طریق فسفریلاسیون سرین در جایگاه فعال آنزیم مهار کرده، آنزیم مهار شده قادر به تجزیه‌ی استیل کولین نمی‌باشد. افزایش استیل کولین باعث تحریک‌پذیری زیاد گیرنده‌های نیکوتینی و موسکارینی می‌شود (٤) که در نهایت منجر به وقوع بحران کولینرژیک تشنج و در موارد حاد ضایعه‌ی مغزی و مرگ می‌شود. پاراکسون در بدن توسط پاراکسوناز موجود در پلاسما و کبد متابولیزه می‌شود (٦و ٥). بسیاری از اثرات ارگانوفسفره‌ها ارتباطی با مهار آنزیم استیل‌کولین استراز نداشته، بلکه توسط مکانیسم‌های دیگر سلولی القا می‌شود. یکی از مکانیسم‌هایی که بسیار مورد توجه قرار گرفته است، تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن [Reactive Oxygen Species(ROS)] توسط این ترکیبات است. این رادیکال‌های آزاد قادرند با ماکرومولکول‌های مهم بدن نظیر لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش دهند. سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی بدن در مقابل آسیب‌های رادیکال‌های آزاد فعال و باعث خنثی شدن اثرات آنها می‌شوند. عدم تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و به دنبال آن تغییرات بیوشیمیایی و پاتولوژیک در بدن می‌گردد (۷). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که حشره‌کش‌های ارگانوفسفره می‌توانند بر سیستم آنتی‌اکسیدان بدن اثر گذاشته و باعث عدم تعادل در این سیستم و در نتیجه باعث استرس اکسیداتیو گردد. مطالعات دوراک و همکاران نشان دادند که آنکوباسیون اریتروسیت‌های انسان با دوزهای مختف مالاتیون باعث افزایش سطح پراکسیداسیون و کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) می‌شود (۸). اوروک نشان داد که تجویز دیازینون به ماهی آب آزاد باعث افزایش فعالیت SOD، CAT و گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) بعد از ۵، ۱۵ و ۳۰ روز در بافت کبد می‌شود. افزایش سطح لیپیدپراکسیداسیون فقط بعد از ۱۵ روز در کبد مشاهده گردید (۹). یلماز و همکاران نشان دادند که دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD و سطح مالوندی آلدیید (MDA) بدون تغییر فعالیت CAT در مغز موش صحرایی می‌شود (۱۰). وجه تمایز مطالعه‌های مختلف تفاوت در نوع وگونه مورد بررسی، دوز و زمان مواجهه است. به‌دلیل تنوع استخلاف‌ها در ساختمان شیمیایی ارگانوفسفره‌ها و اثرات متفاوت بر روی بافت‌های مختلف، مطالعه‌های تکمیلی جهت درک مکانیسم عمل این ترکیب‌ها ضروری است. مطالعات بر روی اثر پاراکسون بر روی سیستم آنتی اکسیدان بافت‌ها در موجود زنده (*In vivo*) بسیار اندک است. در مطالعه‌ی حاضر اثر تجویز دوزهای حاد پاراکسون بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت‌های قلب و طحال موش صحرایی بررسی شد.

روش بررسی

مواد شیمیایی: نیتروبلوتترازولیوم (NBT)، ۱-کلرو ۲،٤ دی نیترو بنزن (CDNB)، دی تیو- بیس- نیترو بنزوئیک اسید (DTNB)، تری کلرو استیک اسید (TCA) و دیگر مواد شیمیایی با درجه‌ی خلوص بالا از شرکت مرک و

Archive of SID

www.SID.ir

سیگمای آلمان خریداری شد. پاراکسون از شرکت سیگمای آلمان خریداری شد و محلول ذخیره (استوک) ٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در روغن ذرت به‌صورت تازه تهیه گردید.

حیوانات: این مطالعه‌ی تجربی بر روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد. موش‌ها در حیوانخانه‌ی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تحت شرایط طبیعی نور، تاریکی، غذا و آب قرار گرفتند. موازین اخلاقی کار با حیوان‌های آزمایشگاهی که مورد تایید کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) بود، هنگام کار با موش‌های آزمایشگاهی رعایت شد.

تیمار حیوانات: حیوانات به روش تصادفی به ٤ گروه (در هر گروه ۷ سر) تقسیم شدند: گروه کنترل که روغن ذرت را به عنوان حلال و سه گروه آزمایش که دوزهای مختلف پاراکسون (۰/۳، ۰/۷ و ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم) را به‌صورت داخل صفاقی در حجم نیم میلی‌لیتر دریافت نمودند. ٢٤ ساعت بعد از تزریق با بیهوش نمودن حیوانات به‌وسیله‌ی اتر بافت‌های قلب و طحال خارج گردید و به نیتروژن مایع انتقال داده شد. در روز آزمایش، بافت‌های منجمد شده به دقت توزین و به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین هموژنه شد و سپس نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ گرم در ٤ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رویی جهت سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی مورد نظر استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم SOD: فعالیت SOD با استفاده از روش وینتربون سنجیده شد (۱۱). حجم مناسبی از بافت هموژنیزه شده، EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار و NBT ۱/۵ میلی‌مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰٦۷ مولار با pH=۷/۸ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ٥٦۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم CAT: فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش آبی و با دنبال نمودن تجزیه‌ی پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در طول موج ۲٤۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۲). به‌حجم معینی از عصاره‌ی بافتی اتانول مطلق (۰/۰۱ میلی‌لیتر در میلی‌لیتر) اضافه و به مدت نیم ساعت در یخ انکوبه شد. سپس به آن تریتون X-۱۰۰ ده درصد با غلظت نهایی یک درصد اضافه شد. این محلول جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. واکنش با اضافه کردن H_2O_2 ۳۰ میلی‌مولار به حجم مناسبی از عصاره‌ی نمونه بافتی در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ شروع شد. سپس جذب در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲٤۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم GST: فعالیت آنزیم GST با روش هابیگ سنجیده شد (۱۳). یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار pH=۷/٤ شامل EDTA یک میلی‌مولار، گلوتاتیون (GSH) ۲۰ میلی‌مولار و CDNB ۲۰ میلی مولار است. واکنش با اضافه کردن حجم معینی از عصاره‌ی بافتی شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۳٤۰ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH): فعالیت آنزیم LDH توسط کیت پارس آزمون صورت گرفت. اساس این اندازه‌گیری بر پایه‌ی احیای پیروات به لاکتات می‌باشد که در حضور $NADH_2$ صورت می‌گیرد. جذب نمونه‌ها در طی ۳ دقیقه در طول موج ۳٤۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

سنجش غلظت GSH: برای تعیین میزان GSH بافت از روش تیتر استفاده شد (۱٤). غلظت مناسبی از نمونه‌ی هموژنه با اسیدسولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط شد. نمونه

Archive of SID

www.SID.ir

در ٤ درجه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ گرم سانتریفوژ شد. حجم مناسبی از محلول فوقانی به بافر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن معرف DTNB ۰/۰٤ درصد در سیترات سدیم ۱ درصد واکنش شروع شد. تغییرات جذب در ٤۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوتاتیون یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر منحنی استاندارد رسم و غلظت گلوتاتیون نمونه‌ها بر حسب نانومول در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش غلظت MDA: برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها (MDA) از روش ساتو (Satho) استفاده شد (۱۵). به حجم مناسبی از بافت هموژنه، تری کلرواستیک اسید (TCA) ده درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از جدا کردن مایع رویی، تیوباربیتوریک اسید ۰/٦۷درصد اضافه کرده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش قرارگرفت. سپس n- بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید به‌مدت ۱۵ دقیقه در ٤۰۰۰ گرم سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد MDA با استفاده از ۱،۱،۳و۳ تتراتوکسی پروپان رسم شد و از روی این منحنی میزان غلظت MDA بر حسب نانومول در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش میزان پروتئین: برای سنجش میزان پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۱٦). حجم مناسبی از عصاره بافتی را به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده و ۳ میلی‌لیتر از محلول برادفورد به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب قرائت شد و غلظت پروتئین نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد پروتئین با استفاده از محلول یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار INSTAT و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و توکی تحلیل شد. P<۰/۰۵ مرز معنی‌دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد. نتایج به‌صورت میانگین± انحراف معیار بیان شدند.

یافته‌ها

اثر غلظت‌های مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم SOD در جدول ۱ نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم SOD در دوزهای بالاتر از ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم پاراکسون در بافت قلب و طحال در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. افزایش معنی‌دار فعالیت SOD در بافت‌های طحال (P<۰/۰۵) و قلب (P<۰/۰۱) در دوز ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم در مقایسه با دوز ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم پاراکسون مشاهده شد.

اثر غلظت‌های مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم CAT در جدول ۱ نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم در دوزهای بالاتر از ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم پاراکسون در بافت قلب در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌دار افزایش یافته، در حالی‌که فعالیت این آنزیم در طحال در این دوزها به‌طور معنی‌دار کاهش را نشان داد. همچنین افزایش معنی‌دار فعالیت CAT در بافت‌های طحال (P<۰/۰۵) و قلب (P<۰/۰۱) در دوز ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم در مقایسه با دوز ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم پاراکسون مشاهده شد. اثر دوزهای مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم GST در جدول ۱ نشان می‌دهد که افزایش فعالیت آنزیم در بافت‌های قلب و طحال در دوزهای بالاتر از ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم پاراکسون در مقایسه با کنترل معنی‌دار است. فعالیت آنزیم GST قلب (P<۰/۰۰۰۱) و طحال (P<۰/۰۱) در دوز ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم در مقایسه با دوز ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم و همچنین فعالیت آنزیم GST قلب (P<۰/۰۵)، طحال (P<۰/۰۵) در دوز ۰/۷ میلی‌گرم در کیلوگرم در مقایسه با دوز ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. اثر دوزهای مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم LDH در جدول ۱ نشان می‌دهد

Archive of SID

www.SID.ir

که کاهش فعالیت آنزیم LDH در قلب در دوز ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم پاراکسون در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است، در حالی‌که کاهش فعالیت آنزیم LDH در طحال در دوزهای مختلف پاراکسون معنی‌دار نیست. تغییرات فعالیت آنزیم LDH در بافت‌های طحال و قلب در دوزهای مختلف پاراکسون در مقایسه با دوزهای دیگر معنی‌دار نیست.

جدول ۱: اثر دوزهای مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و آنزیم LDH در قلب و طحال موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت

پارامترها (U/mg protein)	کنترل (بدون پاراکسون)	پاراکسون (میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)		
		۰/۳	۰/۷	۱
SOD				
قلب	۲۹/۲۷±۳/۰۵	۳۲/۰۳±۳/۸۳	۳۶/۲۶±۳/۴۷^{xx}	۳۹/۱۷±۲/۹۳^{xxx}
طحال	۳۱/۸۶±۲/۱۳	۳۳/۷۲±۳/۰۷	۳۷/۳۳±۳/۳۴^{x}	۳۸/۱۵±۲/۰۷^{xx}
CAT				
قلب	۲۷/۷۹±۳/۳۷	۲۹/۲۰±۴/۹۶	۳۶/۸۳±۴/۰۷^{xx}	۳۴/۶۷±۳/۶۱^{x}
طحال	۱۷/۹۲±۲/۰۴	۱۶/۹۲±۱/۹۷	۱۴/۷۷±۲/۰۸^{x}	۱۳/۴۱±۱/۳۰^{xx}
GST				
قلب	۳۹/۵۱±۵/۶۶	۴۶/۲۶±۵/۷۵	۵۵/۹۷±۶/۲۹^{xx}	۶۵/۵۲±۷/۷۲^{xxx}
طحال	۱۱۹/۸۷±۱۵/۵۵	۱۲۵/۹۷±۱۴/۱۹	۱۴۹/۵۱±۱۶/۴۵^{x}	۱۵۷/۸۲±۱۳/۰۳^{xx}
LDH				
قلب	۱۵۵/۲۸۱±۱۷/۴۷	۱۴۱/۶۹±۱۴/۳۶	۱۳۷/۱۱±۱۵/۱۵	۱۲۴/۰۳±۱۳/۱۶^{x}
طحال	۱۱۰/۰۴۹±۱۴/۱۵	۱۱۶/۹۸±۱۵/۲۳	۱۲۲/۹۴±۱۶/۴۹	۱۳۰/۹۲±۱۸/۰۱

$P<0/05^{*}$، $P<0/01^{**}$ و $P<0/0001^{***}$ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.

جدول ۲: اثر دوزهای مختلف پاراکسون بر روی غلظت‌های GSH و MDA در قلب و طحال موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت

پارامترها (nmol/mg protein)	کنترل (بدون پاراکسون)	پاراکسون (میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)		
		۰/۳	۰/۷	۱
GSH				
قلب	۱۱/۰۱±۱/۹۴	۸/۷۱±۱/۲۱	۸/۲۳±۱/۴۲^{x}	۷/۴۹±۱/۲۴^{xx}
طحال	۳۱/۰۸±۳/۸۵	۲۷/۲۷±۳/۴۲	۲۴/۶۹±۴/۲۲^{x}	۲۲/۸۲±۳/۴۸^{xx}
MDA				
قلب	۹/۹۹±۰/۸۴	۱۰/۰۸±۱/۱۱	۱۰/۸۲±۱/۳۲	۱۲/۰۸±۱/۲۳^{x}
طحال	۲۰/۸۳±۲/۰۲	۲۱/۶۳±۲/۰۶	۲۲/۸۷±۱/۰۶	۲۳/۴۴±۲/۱۰

$P<0/05^{*}$ و $P<0/01^{**}$ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج حاصل از اثر دوزهای مختلف پاراکسون بر غلظت GSH در جدول ۲ نشان می‌دهد که غلظت GSH در بافت‌های قلب و طحال در دوزهای بالاتر از ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم پاراکسون به‌طور معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. کاهش غلظت GSH در طحال و قلب در دوزهای مختلف پاراکسون در مقایسه با دوزهای دیگر معنی‌دار نیست. نتایج حاصل از اثر دوزهای مختلف پاراکسون بر غلظت MDA در جدول ۲ نشان می‌دهد که افزایش غلظت MDA در دوزهای بالاتر از ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم پاراکسون در بافت قلب معنی‌دار است. افزایش غلظت MDA در طحال در دوزهای مختلف پاراکسون معنی‌دار نیست.

بحث

ارگانوفسفره‌ها مواد شیمیایی بسیار سمی هستند که روی بسیاری از بافت‌ها اثر می‌گذارند (۱۷). بافت قلب به‌صورت یک پمپ جهت خون رسانی به سایر بافت‌ها عمل می‌کند. ماهیچه قلب نمی‌تواند اکسیژن را جهت استفاده ذخیره کند و باید اکسیژن و سایر مواد مغذی پیوسته جهت عمل مناسب قلب تامین شود. از طرفی دیگر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان این بافت در مقایسه با سایر بافت‌های دیگر اندک می‌باشد. به‌همین دلیل نسبت به استرس اکسیداتیو حساس‌تر است (۱۸). همچنین طحال یکی از اعضای سیستم لنفاوی است و نقش مهمی در سیستم ایمنی و دفاعی بدن با تولید لنفوسیت‌ها ایفا می‌کند. همچنین محل ذخیره گلبول‌های قرمز است و در موارد کمبود، آن‌ها را در خون آزاد می‌کند و به‌دلیل داشتن ماکروفاژ فراوان در تصفیه‌ی خون و پاکسازی سلول‌های غیرطبیعی و عوامل بیماری‌زا شرکت می‌کند. عوامل شیمیایی مختلف می‌تواند باعث تغییر عملکرد طحال شوند (۱۹). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که در اثر فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیموتاز (SOD) در دوزهای بالاتر از ۰/۳ میلی‌گرم در کیلوگرم پاراکسون در بافت قلب و طحال به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد، همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در این دوزها در بافت قلب افزایش و در بافت طحال کاهش می‌یابد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بیانگر مقابله‌ی بافت هدف در جلوگیری از ایجاد استرس اکسیداتیو است. افزایش فعالیت SOD با تبدیل رادیکال سوپر اکسید به H_2O_2 باعث افزایش میزان H_2O_2 و کاهش رادیکال‌های سوپراکسید می‌شود و افزایش فعالیت CAT باعث کاهش میزان H_2O_2 و جلوگیری از آسیب بافت قلب می‌گردد، ولی کاهش فعالیت آنزیم CAT در بافت طحال منجر به افزایش غلظت H_2O_2 در این بافت شده که در نهایت ممکن است موجب استرس اکسیداتیو شود (۷). نتایج این تحقیق موافق نتایج مطالعاتی است که نشان می‌دهند تجویز متیل پاراتیون، دیازینون، مالاتیون، پاراکسون، و کلروپیریفوس موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت‌های مغز، قلب و اریتروسیت ماهی و موش صحرایی می‌گردد (۲۳-۲۰)، در حالی‌که مطالعات دیگر کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت‌های مختلف را نشان می‌دهند (۲۵و ۲٤، ۲۲). این اختلاف نتایج در مطالعات مختلف ممکن است ناشی از نوع، نژاد و گونه حیوان، نوع سم و بافت، مسیر تجویز ماده‌ی سمی و دوز و زمان مواجهه باشد. گلوتاتیون یک تری پپتید حاوی تیول یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های سلولی بدن است که عملکردهای بیولوژیکی مختلفی دارد. گلوتاتیون (GSH) نقش مهمی در پاکسازی ROS و غیر سمی کردن داروها و مواد شیمیایی دارد. به‌علاوه می‌تواند به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون S- ترانسفراز در سم‌زدایی پراکسید هیدروژن، لیپیدهیدرو پراکسیدها و ترکیبات الکتروفیلیک شرکت نماید (۲٦و ۷). مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که

Archive of SID

www.SID.ir

تجـویز پاراکـسون در دوزهـای بـالاتر از ۰/۳ میلـی‌گـرم در کیلوگرم موجب کاهش غلظـت گلوتـاتیون در بافـت قلـب و طحال می‌گردد. کاهش GSH احتمالاً ناشی از افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون S ترانـسفر از (GST) است که به GSH نیاز دارند. کاهش GSH باعث افزایش سمیت دیازینون می‌شود. مطالعات نشان مـی‌دهـد کـه دیازینون و متیل پاراتیون باعث کاهش GSH کلیه، ریـه، کبـد و اریتروسیت‌ها می‌شود (۲۸ و۲۷). شـارما و همکـاران نـشان دادند که تجویز ارگانوفـسفره دیمتـوات بـه‌صـورت خـوراکی به‌موش صحرایی، موجب تغییـری در میـزان گلوتـاتیون کبـد نمی‌شود (۲۹). در این مطالعه افزایش فعالیت آنزیم GST در بافت‌های قلب و طحال در دوزهای بالاتر از ۰/۳ میلی‌گـرم در کیلوگرم پاراکسون معنی‌دار است. آنـزیم GST بـا اسـتفاده از GSH باعث افـزایش حلالیـت سـموم و دفـع آن‌هـا از بـدن می‌گردد. بنابراین نقش مهمی در محافظت بافـت‌هـا بـر علیـه آسیب و استرس اکسیداتیو دارد (۱۳). افـزایش GST در اثـر تزریق پاراکـسون نـشان دهنـده‌ی افـزایش مـصرف GSH و افزایش دفاع بدن در مقابل این سـم جهـت خنثـی سـازی آن است. مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهنـد کـه بـه‌دنبـال تجـویز بعضی از ارگانوفسفره‌ها، فعالیت GST بدون تغییر (۳۱ و۳۰) یا افزایش (۲۷و ۹) و یا کاهش (۳۳و ۳۲) را نـشان مـی‌دهـد. معمولاً دوزهای کم سموم منجر به افزایش و دوزهـای بـالای آن باعث مهار فعالیت آنزیم‌ها می‌گردند. نتایج حاصـل از ایـن مطالعه کـاهش فعالیـت آنـزیم LDH بافـت قلـب را در دوز ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم پاراکسون نشان می‌دهـد، در حـالی‌کـه کاهش فعالیت این آنزیم در طحال مشاهده نمـی‌شـود. LDH آنزیمی سیتوپلاسمی است که جهت بررسی آسـیب سـلولی و به عنوان مارکر جهت بررسی سمیت یـک مـاده‌ی شـیمیایی و لیز سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد و غلظت ایـن آنـزیم بـا میزان مرگ و لیز سلولی رابطه‌ی مستقیم دارد (۳٤). مطالعـات حیوانی نیز افـزایش فعالیـت LDH را پـس از مـسمومیت بـا پاراکسون (۲۰) و دیازینون (۳۵) نـشان داده‌انـد، در حـالی‌کـه تجویز ارگانوفسفره RPR-II به ماهی، موجب کاهش فعالیت LDH کبد و عضله اسکلتی مـی‌گـردد (۳٦). نتـایج مختلـف می‌تواند ناشی از اختلاف در غلظت سم مـورد اسـتفاده، نـوع بافت و حتـی ایزوآنـزیم‌هـای خـاص LDH باشـد. یکـی از اهداف اصلی رادیکال‌هـای آزاد، پراکـسیداسیون زنجیـره‌هـای اسـیدهـای چـرب غیراشـباع فـسفولیپیدها مـی‌باشـد. مـالون دی‌آلدهید (MDA) آخرین محصول پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و به‌عنوان مارکر استرس اکسیداتیو شناخته می‌شود (۲۰). نتایج مطالعات متعـدد نـشان مـی‌دهـد کـه سـطوح پـایین یـا فقدان پراکسیداسیون لیپیدی، منعکس کننده‌ی اثرات محافظتی آنزیم‌های آنتی‌اکـسیدان مـی‌باشـد (۳۷). در مطالعـه‌ی حاضـر تجویز پاراکـسون در دوز ۱ میلـی‌گـرم در کیلـوگـرم بـه‌طـور معنی‌دار باعث افزایش غلظت MDA در بافت قلـب گردیـده که منجر به پراکـسیداسیون لیپیـدهای غـشا و ایجـاد اسـترس اکسیداتیو در بافت قلب می‌شود. عدم تغییر غلظت MDA در بافـت طحـال احتمـالا نـشاندهنده‌ی فعـال شـدن سیـستم آنتی‌اکسیدان جهت جلوگیری از آسیب بـه غـشا و یـا وجـود استرس اکسیداتیو در مراحل اولیه مـی‌باشـد. مطالعـات نـشان می‌دهند کـه تجـویز خـوراکی دی متـوآت، متیـل پـاراتیون و مالاتیون به موش صحرایی موجب تغییـر فعالیـت آنـزیم‌هـای آنتی‌اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در اریتروسیت‌ها می‌گردد (۳۹ و ۳۸). به علاوه بـا مطالعـه‌ی اثـر دیـازینون بـر بافت‌های مختلف ماهی در بعضی بافـت‌هـا افـزایش MDA (آبشش، ماهیچه و لوله‌ی گـوارش) و در بعـضی عـدم تغییـر (کلیه) مشاهده شده است (۳۷).

نتیجه‌گیری

در مجمـوع نتـایج پیـشنهاد مـی‌کنـد کـه اثـر پاراکـسون روی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان قلب و طحال در یـک طـرح وابسته به دوز است. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکـسیدان و

Archive of SID
www.SID.ir

کاهش غلظت گلوتاتیون پس از مواجهه با این ارگانوفسفره نشان‌دهنده‌ی تولید رادیکال‌های آزاد و وقوع استرس اکسیداتیو می‌باشد. افزایش میزان MDA در قلب می‌تواند ناشی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشای و آسیب اکسیداتیو بافت قلب باشد. مقایسه‌ی میزان MDA و فعالیت آنزیم LDH در دو بافت نشان می‌دهد که قلب بافتی حساس‌تر در مقابل دوزهای مختلف پاراکسون است.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی مرکز تحقیقات شیمیایی و علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) در قالب طرح تحقیقاتی انجام گردید که بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسوولین آن مرکز ابراز می‌دارند.

References

1- Kwong TC. Organophosphate Pestisides: Therapeutic Drug Monitoring. *Biochem Clin Toxicol*. 2002; 144: 1.

2- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaiee A. Pestisides and oxidative stress. *Med Sci Monit*. 2004; 10: RA 141-7.

3- Sudakin DL, Power LE. Organophosphate exposures in the United States: a longitudinal analysis of incidents reported to poison centers. *J Toxicol Environ Health*. 2007; 70: 141-7.

4- Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, Shadnia S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in salvia and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp Biochem Physiol*. 2004; 137: 29-34.

5- Jafari M, Pourheidari GR. The reactivation effect of pralidoxime in human blood on parathion and paraoxon–induced cholinesterase inhibition. *DARU*. 2006; 14: 37-43.

6- Mehrani H. Simplified procedures for purification and stabilization of human plasma butylcholinesterase. *Process Biochem*. 2004; 39: 877-82.

7- Limon-Pacheco J, Gonsebatt ME**.** The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Res Gen Toxicol Environ Mut.* 2009; 674:137-147.

8- Durak D, Uzun FG, Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Kalender Y. Malathion-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. *Environ Toxicol*. 2009; 24: 235-42.

9- Oruc E. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of Cyprinus carpio (L.). *Environ Toxicol*. 2010; 26: 571-8.

10- Yilmaz N, Yilmaz M, Altuntas I. Diazinon-induced brain toxicity and protection by vitamins E plus C. *Toxicol Ind Health*. 2012; 28: 51-7.

11- Winterbourn C, Hawkins R, Brian M, Carrell R. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med*. 1975; 85: 337.

Archive of SID

www.SID.ir

12- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 121-6.

13- Habig WT, Jakoby WB. Glutathion S-transferase (rat and human). *Method Enzymol*. 1981; 77: 218-31.

14- Tietz F. Enzymic method for quantitatve determination of nanogram amount of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biocham*. 1969; 27: 502-22.

15- Satoh K. Serum lipid peroxidation in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta*. 1978; 90: 37-43.

16- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the priniple of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.

17- Aardema H, Meertens JHJM, Ligtenberg JJM, Peters-Polman OM, Tulleken JE, Zijlstra JG. Organophosphorus pesticide poisoning: cases and developments. *Netherlands J Med*. 2008; 66: 149-53.

18- Bishop ML, Duben-Engelkirk Jl, Fody Ep. Clinical chemistry, 4th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

19- Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 606-16.

20- Ghani E. Mohmmadi M, Jafari M, et al. Evaluation of oxidative stress index in brain tissue of rats after expose to paraoxon. *Kowsar Med J*. 2008; 1: 1-8 (Persian).

21- Sutcu R, Altuntas I, Buyukvanli B, et al. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Hum Exp Toxicol*. 2007; 26: 491-8.

22- Kaur R, Sandhu HS. In vivo changes in antioxidant system and protective role of selenium in chlorpyrifos-induced subchronic toxicity in bubalus bubalis. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2008; 26: 45-8.

23- Mansour SA, Mossa AH. Oxidative damage, biochemical and histological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pes Biochem Physiol*. 2010; 96: 14-23.

24- Abdou HM, El Mzoudy RH. Oxidative damage, hyperlipidemia and histological alterations of cardiac and skeletal muscles induced by different doses of diazinon in female rats. *J Hazardous Materials*. 2010; 182: 273-8.

25- Astiz M, de Alaniz MJT, Marra CA. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with Agrochemicals. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009; 28: 465-73.

26- Masella R, Benedetto RD, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nut Biochem*. 2005; 16: 577-86.

27- Celik I, Suzek H. Subacute effects of methyl parathion on antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats. *Food ChemToxicol*. 2008; 46: 2796-801.

Archive of SID

www.SID.ir

28- Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol*. 2010: 48: 3345-53.

29- Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Dogra TD. Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. *Toxicol*. 2005; 206: 49-57.

30- Varo I, Navarro JC, Nunes, B, Guilhermino L. Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (Sparus aurata L.) fingerlings. *Aquaculture*. 2007; 266: 87-96.

31- Astiz M, de Alaniz MJT, Marra CA. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with Agrochemicals. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009; 28: 465-73.

32- Goel A, Dani V, Dhawan DK. Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chem Biol Interact*. 2005; 156: 131-40.

33- Khan SM, Sobti RC, Katarial L. Pesticide-induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. *Clinica Chim Acta*. 2005; 358: 131-38.

34- El-Demerdash FM. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49: 1346-52.

35- Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarciki M, et al. Diazinon on-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology*. 2005; 211: 197-206.

36- Rao JV. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, oreochromis mossambicus. *Comp Biochem Physiol*. Part C. 2006; 43: 492-8.

37- Oruc E, Usta D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in defferent tissues of Cyprinus carpio. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2007; 23: 48-55.

38- Ananya R, Subeena S, Kumar DA, Kumar DT, Kumar MS. Oxidative stress and histopathological changes in the heart following oral lindane (gammahexachlorohexane) administration in rats. *Med Sci Monit*. 2005; 11: 325-329.

39- Durmaz H, Sevgiler Y, Uner N. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in oreochromis niloticus. *Pes Biochem Physiol*. 2006; 84: 215-226.

Archive of SID

www.SID.ir

The Role of Paraoxon Toxicity on Oxidative Stress Induction in Rat Heart and Spleen

Salehi M[1], Jafari M[2], Asgari AR[3], Ahmadi S[4]

[1]Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[2]Applied Neuro Sciences Research Center, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[3]Sport Physiology Research Center, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[4]Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Jafari M, Applied Neuro Sciences Research Center, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: m.jafari145@gmail.com

Received: 15 Aug 2012 **Accepted:** 1 Jan 2013

Backgrounds and Objective: Paraoxon as the active form of parathion is one of the most of organophosphates (OPs) used in agriculture. Some OPs are capable of producing free radicals and inducing disturbance in the body antioxidant systems. The aim of this study was to investigate the effects of paraxaon on oxidative stress induction in the heart and spleen tissues in rats.

Materials and Methods: Male Wistar rats were randomly divided into four groups (7 in each groups) as follows: control group received corn oil as paraoxon solvent, and the other three groups received different doses of paraxaon (0.3, 0.7, and 1mg/kg) by intraperitoneal injection. Animals were ether anesthesized 24 hours following the injection, their hearts and spleens were removed, and the levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and lactate dehydrogenase (LDH) activities, and glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were determined by biochemical methods.

Results: Our data indicate that at doses higher than 0.3 mg/kg of paraoxon, SOD and GST levels significantly increases in both the heart and spleen. While there was also an increased CAT activity observed in the heart , both CAT and GSH levels showed a decrease in the spleen. Finally, a decreased LDH activity and increased MDA level in the heart tissue were observed at 1mg/kg dose of paraoxon.

Conclusion: Paraoxon induces the production of free radicals and oxidative stress in a dose- dependent manner. The heart tissue appears to be more sensitive to the effects of paraoxon on oxidative stress induction compared to the spleen.

Keywords: Paraxaon, Oxidative stress, Heart, Spleen, Rat

Archive of SID

www.SID.ir