مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره چهاردهم، شمارهٔ ۱، دی۱۳۹۰، صفحه ۵۲-۴۵

اثر پاراکسان بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و فعالیت لاکتات دهیدروژناز در کبد موش صحرایی

اسماعیل غنی(MSc)[۱*]، مسلم محمدی(PhD)[۲]، مهوش جعفری(PhD)[۳]، علی خوش باطن(PhD)[۴]، علیرضا عسگری(PhD)[۴]

۱- گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
۲- گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳- گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله
۴- مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله

دریافت: ۸۹/۱۱/۹، اصلاح: ۹۰/۲/۱۴، پذیرش: ۹۰/۶/۱۶

خلاصه

سابقه و هدف: پاراکسان (متابولیت فعال پاراتیون) یکی از سمی‌ترین ترکیبات ارگانوفسفره است. مکانیسم اصلی مسمومیت حاد با این ترکیبات مهار آنزیم استیل کولین استراز است. تولید رادیکالهای آزاد و اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدان سلول از جمله اثرات غیرکولینرژیک این ترکیبات است که اخیرا مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه اثر تجویز حاد پاراکسان به موش صحرایی بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو کبد و فعالیت لاکتات دهیدروژناز کبد و پلاسما بررسی شد.

مواد و روشها: این مطالعه تجربی بر روی ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. حیوانات به طور تصادفی در ۴ گروه (حداقل ۶ سر موش در هر گروه) قرار گرفتند: گروه کنترل (روغن ذرت به عنوان حلال پاراکسان) و سه گروه آزمایش که دوزهای مختلف پاراکسان (۰/۰۷، ۰/۳۵ و ۰/۷ میلی گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن) را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. ۴ ساعت پس از تزریق، با بیهوش نمودن حیوانات به وسیله اتر یک نمونه خون گرفته شد و سپس بافت کبد آنها خارج گردید و تا زمان سنجش شاخص های مورد نظر در نیتروژن مایع نگهداری شد. فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و لاکتات دهیدروژناز و میزان گلوتاتیون و مالون دی آلدهید در هموژنه بافت کبد به وسیله روشهای بیوشیمیایی تعیین گردید.

یافته ها: پاراکسان در دوزهای ۰/۳۵ و ۰/۷ میلی‌گرم به طور معنی دار موجب افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاهش فعالیت کاتالاز گردید ($p<0/05$). میزان گلوتاتیون کبدی در تمامی مقادیر پاراکسان نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت ($p<0/05$). پاراکسان در هر سه دوز به طور معنی‌دار موجب افزایش فعالیت لاکتات دهیدروژناز پلاسما و کاهش فعالیت لاکتات دهیدروژناز کبدی شد. تغییرات معنی‌دار در میزان مالون دی آلدهید مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که حتی تجویز عوامل ارگانوفسفره به صورت حاد نیز می تواند با تولید رادیکال‌های آزاد و بر هم زدن تعادل سیستم آنتی اکسیدان موجب آسیب سلولی گردد. بنابراین اندازه گیری فعالیت لاکتات دهیدروژناز پلاسما ممکن است یک مارکر مفید برای ارزیابی مسمومیت با عوامل ارگانوفسفره باشد.

واژه های کلیدی: پاراکسان، استرس اکسیداتیو، کبد، لاکتات دهیدروژناز، موش صحرایی.

مقدمه

به علت استفاده گسترده از ترکیبات ارگانوفسفره در کشاورزی، دامپزشکی، صنعت، باغبانی و منازل و همچنین کاربرد نظامی از آنها به عنوان عوامل اعصاب، میزان بروز مسمومیت های تصادفی و خودکشی با این ترکیبات وسیع می‌باشد (۲و۱). سالانه ۳ میلیون مسمومیت انسانی با عوامل ارگانوفسفره رخ می‌دهد که حدود۲۰۰۰۰۰ مورد آن منتهی به مرگ می‌شود (۲). در ایران ترکیبات ارگانوفسفره به عنوان سومین علت مسمومیت و علت اصلی مرگ و میر ناشی از مسمومیت گزارش شده اند (۳). پاراتیون یکی از سمی‌ترین آفت‌کش‌های شیمیایی است که در بدن به وسیله سیستم سیتوکروم P450 کبدی از طریق دسولفوراسیون اکسیداتیو به متابولیت فعال پاراکسان تبدیل می‌شود (۵و۴). مهار آنزیم استیل کولین استراز و بروز بحران کولینرژیک مهمترین علت مسمومیت حاد با این ترکیبات می‌باشد (۲و۱). با این وجود، بسیاری از سایر اثرات این ترکیبات ارتباطی با مهار آنزیم استیل کولین استراز ندارد و اخیراً اثرات غیرکولینرژیک این سموم بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. اثرات سمی برخی از ارگانوفسفره‌ها (مانند پاراکسان و سارین) محدود به مهار کولین استراز نمی باشد، بلکه به دنبال بحران کولینرژیک تغییرات در پارامترهای نوروتوکسیک غیرکولینرژیک مانند آسیب به غشاهای سلولی مشاهده شده است (۶). متابولیسم داخل سلولی ترکیبات

▣ این مقاله حاصل پایان نامه اسماعیل غنی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: شیراز، دانشگاه علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی، تلفن: ۰۷۱۱-۲۳۰۲۰۲۶
e-mail: esmaeel_ghani@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.7.9]

ارگانوفسفره منجر به تولید رادیکال‌های آزاد، بر هم زدن تعادل آنتی‌اکسیدانی سلول و بروز استرس اکسیداتیو می‌شود (۸و۷و۵). تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد با آسیب به لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA موجب تغییرات ساختاری و عملکردی می‌گردد (۹). استرس اکسیداتیو همچنین در مرگ نورونی نکروتیک و آپوپتوتیک ناشی از مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره دخیل است (۱۱و۱۰). با مطالعه بر روی اریتروسیت و پلاسمای افراد مسموم و یا افرادی که در کارخانجات بسته‌بندی آفت‌کش‌ها در معرض این ترکیبات هستند مهار آنزیم استیل‌کولین استراز، تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها گزارش شده است (۱۵-۱۲). به علاوه، افزایش فعالیت لاکتات دهیدروژناز و شاخص‌های آسیب کبدی در پلاسمای افراد پخش کننده آفت‌کش‌ها گزارش شده است (۱۶). مطالعه بر روی حیوانات آزمایشگاهی نیز نشان داد که آفت‌کش‌ها موجب تولید رادیکال‌های آزاد، استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی می‌گردند. به دنبال مواجهه موش صحرایی با ترکیبات ارگانوفسفره، تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در اریتروسیت، پلاسما، بزاق و قلب مشاهده شده است (۱۸و۱۷و۳). با مطالعه اثر کلرپیریفوس و سیپرمترین بر کبد موش کوچک آزمایشگاهی، کاهش میزان گلوتاتیون و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش غلظت‌های سرمی شاخص‌های آسیب کبدی و میزان مالون دی آلدهید گزارش شده است (۱۹).

با مطالعه اثر پاراکسان به صورت in vitro بر روی لنفوسیت‌های بند ناف جنینی و سلولهای خونی بالغین سمیت ژنی این ترکیب گزارش شده است (۲۰). کبد در فرآیند سم‌زدایی ترکیبات ارگانوفسفره و دفع محصولات حاصل از متابولیسم آنها نقش مهمی به عهده دارد. آسیب‌پذیری کبد در برابر استرس ناشی از مواجهه با ترکیبات آفت‌کش به تعادل بین میزان استرس اکسیداتیو و قابلیت آنتی‌اکسیدانی این ارگان بستگی دارد (۲۱و۱۹). تفاوت در نوع ترکیب، گونه و بافت مورد بررسی، دوز تجویز شده و مدت زمان مواجهه با ترکیب ارگانوفسفره وجه تمایز مطالعات مختلف است. اغلب مطالعات اثرات ترکیبات ارگانوفسفره را به صورت مزمن بررسی نموده اند. این مطالعه به منظور بررسی اثرات مواجهه حاد با ترکیبات ارگانوفسفره بر شاخص های استرس اکسیداتیو کبد و فعالیت لاکتات دهیدروژناز کبد و پلاسما انجام شد.

مواد و روشها

این مطالعه تجربی بر روی ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. حیوانات تا زمان آزمایش در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی هنگام کار با حیوانات رعایت شد. از روغن ذرت به عنوان حلال پاراکسان استفاده شد. حیوانات به روش تصادفی به ۴ گروه (حداقل۶ سر موش در هر گروه) تقسیم شدند. پاراکسان با خلوص ۹۰ درصد (*O,O*-diethyl-*p*-nitrophenyl phosphate)، NADH، تترا اتوکسی پروپان، پراکسید هیدروژن، و اسید تری‌کلرواستیک از شرکت سیگمای آلمان و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری شد. روغن ذرت (گروه کنترل) و پاراکسان در دوزهای ۰/۰۷، ۰/۳۵ و ۰/۷ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن حیوان به صورت داخل صفاقی تزریق گردید، که به ترتیب برابر با ۰/۱، ۰/۵ و ۱ برابر LD_{50} پاراکسان (به وسیله تزریق داخل صفاقی) می باشد. دوز LD_{50} ۰/۵ پاراکسان مرز شروع علائم کولینرژیک است، در حالی که در دوز LD_{50} بحران کولینرژیک مشهود است (۲۲). ۴ ساعت پس از تزریق، حیوانات را به وسیله اتر بیهوش نموده، پس از گرفتن نمونه خون بافت کبد بیرون آورده شد. پس از شستن بافتها در بافر فسفات سدیم تا زمان سنجش‌های مورد نظر در نیتروژن مایع نگهداری شدند. در زمان سنجش، پس از توزین، بافت های جمع آوری شده با نسبت وزنی-حجمی ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سدیم با pH=۷/۴ هموژن شد و در g ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس از محلول رویی جهت اندازه‌گیری شاخص‌های مورد نظر استفاده شد. تمامی شاخص‌های مورد بررسی به روش کالریمتری اندازه‌گیری شد. میزان پروتئین نمونه‌های بافتی به وسیله روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (۲۳). جهت اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز از روش Aebi استفاده شد. اصول کلی واکنش تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به H_2O و O_2، توسط آنزیم کاتالاز، و بررسی کاهش جذب در۲۴۰ نانومتر می باشد (۲۴). اکسیداسیون NAD(P)H به وسیله آنیون سوپراکسید و دنبال نمودن کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر اساس سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می باشد. یک واحد فعالیت سوپراکسید دسموتاز مقدار آنزیمی است که اکسیداسیون NAD(P)H را به میزان ۵۰ درصد مهار نماید (۲۵). برای اندازه گیری میزان مالون دی آلدهید از روش Satoh استفاده شد (۲۶).

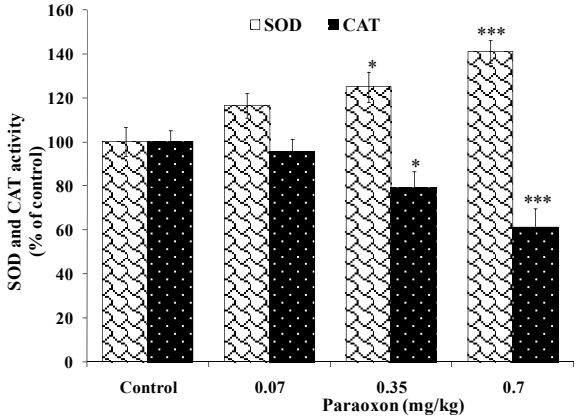
واکنش مالون دی آلدهید با اسید تیوباربیتوریک در دمای جوش، منجر به تولید رنگ صورتی می شود که به وسیله n- بوتانول استخراج گردید و جذب آن در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. از تترا اتوکسی پروپان جهت به دست آوردن منحنی استاندارد استفاده شد. میزان گلوتاتیون بر اساس ترکیب گروه های حاوی سولفیدریل با DTNB و تغییر جذب در ۴۱۲ نانومتر سنجش گردید (۲۷). از گلوتاتیون احیاء جهت به دست آوردن منحنی استاندارد استفاده شد. میزان فعالیت لاکتات دهیدروژناز بر اساس واکنش تبدیل پیروات به لاکتات اندازه گیری شد (۲۸). در نتیجه این واکنش، اکسیداسیون NADH به NAD^+ موجب کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر می گردد. میزان فعالیت یا سطح شاخص‌های مذکور بر واحد میلی‌گرم پروتئین بافت محاسبه شد و بر اساس درصد تغییرات آن نسبت به گروه کنترل، مقایسه و گزارش گردید. تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از آزمون آنالیز- واریانس یک طرفه به همراه تست توکی انجام و $p<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثر پاراکسان بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز کبد در دوزهای ۰/۳۵ و ۰/۷ میلی گرم فعالیت سوپراکسیددسموتاز کبدی را به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد، در حالی که در دوزهای مذکور موجب مهار معنی دار فعالیت کاتالاز کبدی شد (به ترتیب با $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$) (نمودار ۱). پاراکسان در هر سه دوز تجویز شده، میزان گلوتاتیون کبد را به طور معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد (با $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$). تغییرات در میزان مالون دی آلدهید در هیچ کدام از دوزهای پاراکسان معنی دار نبود (نمودار ۲). نتایج حاصل از این مطالعه همچنین

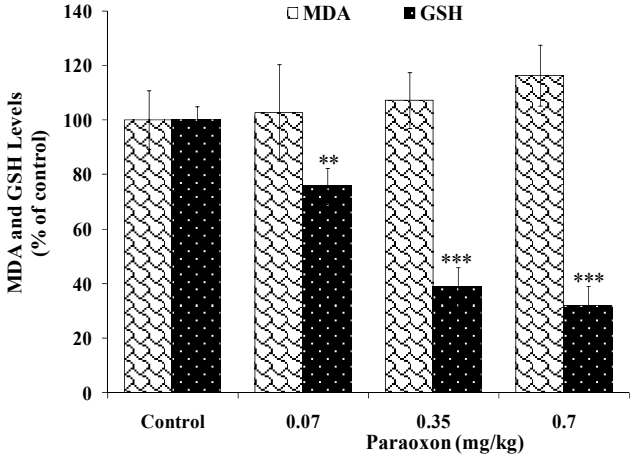
[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.7.9]

نشان داد که پاراکسان در هر سه دوز تجویز شده موجب مهار معنی دار فعالیت لاکتات دهیدروژناز در کبد و افزایش معنی دار فعالیت آن در پلاسما شد (با p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱) (نمودار ۳).



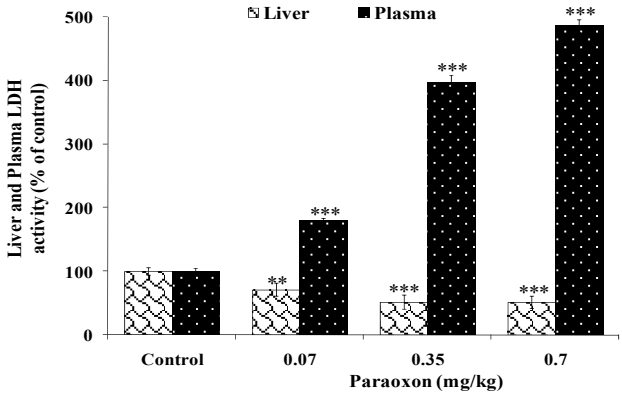
نمودار ۱. مقایسه اثر تجویز حاد پاراکسان با گروه کنترل بر فعالیت آنزیمهای سوپراکسیدا دیسموتاز و کاتالاز کبد

p<۰/۰۰۱ *** p<۰/۰۵ **



نمودار ۳. اثر تجویز حاد پاراکسان به موش صحرایی بر میزان MDA و GSH در کبد و پلاسما

p<۰/۰۰۱ *** p<۰/۰۱ **



نمودار ۳. مقایسه اثر تجویز حاد پاراکسان با گروه کنترل بر میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در کبد و پلاسما

p<۰/۰۰۱ *** p<۰/۰۱ **

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که اثر تجویز حاد پاراکسان بر فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز متفاوت است. سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی نقش دفاعی مهمی در برابر آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد به عهده دارد. آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز از آنزیمهای کلیدی این سیستم هستند (۳۰و۲۹). عملکرد هماهنگ یا سینرژیک آنزیم‌های مذکور محافظت از سلول را تضمین می نماید. تعادل در فعالیت این سه آنزیم موجب کسب محافظت مطلوب می گردد. میزان تولید رادیکال‌های آزاد و کارآیی سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی سلول شرایط حاکم بر سلول را تعیین می نماید (۲۹). بر هم خوردن تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد موجب بروز استرس اکسیداتیو می گردد (۳۲و۳۱). تحت شرایط استرس اکسیداتیو فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان القاء می گردد (۳۰و۲۹). آنیون سوپر اکسید اولین محصول احیاء اکسیژن است و منشا تولید سایر انواع (Reactive Oxygen Species, ROS) می باشد (۳۳و۹). آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به عنوان اولین خط دفاعی سلول در برابر آسیب ناشی از آنیون سوپراکسید موجب کاتالیز دیسموتاسیون آن به اکسیژن مولکولی و پراکسید هیدروژن می گردد (۲۹). آنزیم کاتالاز به سرعت با پراکسید هیدروژن جهت تشکیل آب و اکسیژن مولکولی واکنش می‌دهد (۳۴و۳۲و۹). آنیون سوپراکسید به دو روش مجزا موجب مهار فعالیت آنزیم کاتالاز می گردد. در مهار سریع، آنزیم کاتالاز به حالت فروکسی (ترکیب نوع III) تبدیل می شود. در این شرایط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز قدرت جلوگیری از مهار آنزیم و برگرداندن فعالیت آن را دارد. در مهار آهسته، آنزیم کاتالاز به حالت فریل (ترکیب نوع Π) تبدیل می‌شود. در این شرایط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز قادر به جلوگیری از مهار آنزیم کاتالاز است اما قابلیت برگرداندن فعالیت آنزیم را ندارد. مهار کاتالاز به وسیله آنیون سوپراکسید نشان دهنده تعامل بین فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز است که بسیار مهم می‌باشد (۳۶و۳۵).

پس از تجویز مزمن عواملی از جمله لیندان، مالاتیون و دی متوآت به موش صحرایی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و CAT در قلب، پلاسما، مغز و کبد گزارش شده است (۳۷و۱۷و۳). در مطالعات انسانی نیز پس از مواجهه حاد یا مزمن با آفت‌کش‌ها افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در پلاسما و اریتروسیت گزارش شده است (۱۴-۱۲). از طرف دیگر، برخی از مطالعات نشان داده اند که تجویز ترکیبات آفت‌کش موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌گردد. با مطالعه اثر کلرپیریفوس و سیپرمترین بر کبد موش کوچک آزمایشگاهی، کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز مشاهده شده است (۱۹). با بررسی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بافت‌های مختلف ماهی پس از تجویز متیل پاراتیون و دیازینون، افزایش، کاهش و یا عدم تغییر فعالیت مشاهده شد (۸-۶). پس از تجویز خوراکی کلرپیریفوس به موش صحرایی افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاهش فعالیت CAT کبدی مشاهده شد (۲۱). در مطالعه دیگری که در آزمایشگاه انجام شد به دنبال تزریق داخل صفاقی پاراکسان به موش صحرایی در دوزهای ۰/۳۵ و ۰/۷ میلی گرم افزایش معنی دار فعالیت هر دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در مغز مشاهده شد (۳۸). با بررسی اثر ترکیبات مختلف آفت‌کش بر گونه‌های مختلف می توان گفت که اثر ترکیبات آفت‌کش بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به نوع ترکیب، گونه و بافت مورد بررسی، دوز تجویز شده و مدت زمان مواجهه بستگی دارد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.7.9]

در مطالعه حاضر به دنبال تجویز حاد پاراکسان بـه مـوش صـحرایی تخلیـه گلوتاتیون کبدی مشاهده شد. نتایج مشابهی از کاهش گلوتـاتیون در مغـز و کبـد موش صحرایی پس از تجویز مزمن دی متوآت، کلرپیریفوس، مالاتیون و لینـدان مشاهده شده است (۳۷و۲۱و۱۷و۳). تجـویز داخـل صـفاقی پاراکسـان بـه مـوش صحرایی در دوز mg/kg ۰/۷ نیز موجب کاهش میزان گلوتاتیون مغز شد (۳۸). کاهش میزان گلوتاتیون اریتروسیت پس از تجویز تک دوز خوراکی دی متـوآت و مالاتیون به موش صحرایی گزارش شده است (۱۸). در انسان نیز به دنبال مواجهه مزمن با آفت‌کش‌ها، کاهش میزان گلوتاتیون پلاسما و اریتروسیت مشـاهده شـده است (۱۶-۱۴). تری پپتید گلوتاتیون، تیول غیر پروتیینی اصلی موجودات هوازی و فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی داخـل سـلولی مـی‌باشـد (۹). گلوتـاتیون در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، سم‌زدایی داروها و مواد شیمیایی نقـش مهمـی بـه عهده دارد. گلوتاتیون می تواند به طور مستقیم پذیرنده رادیکال‌های آزاد باشد و یا به عنوان سوبسترای آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون-s-ترانسـفراز در سم‌زدایی پراکسـید هیـدروژن، لیپیـد هیدروپراکسـیدها و ترکیبـات الکتروفیلیـک شرکت نماید (۳۹و۹). افزایش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز منجر به کاهش سـطح کلی گلوتـاتیون داخـل سـلولی مـی شـود کـه ممکـن اسـت منجـر بـه افـزایش پراکسیداسیون لیپیدها، آسـیب بـه DNA، و کـاهش مقاومـت در برابـر آسـیب اکسیداتیو گردد (۳۱).

لاکتات دهیدروژناز (Lactate Dehydrogenase, LDH)، آنزیمـی سیتوپلاسمی است که می توان از آن به عنوان یک مارکر جهـت بررسـی آسـیب سلولی استفاده کرد (۴۰). افزایش فعالیت لاکتات دهیدورژناز سرم در مسمومیت با عوامل ارگانوفسفره گزارش شده است (۴۱). در مطالعات آزمایشـگاهی نیـز نتـایج مشابهی به دست آمده است (۴۳و۴۲). از طرف دیگر، مطالعات نشان دادند تجـویز خوراکی ترکیبات ارگانوفسـفره polychlorocomphen و chlorpyrifos به صورت تک دوز یا دوزهای تکراری به موش صحرایی موجب کـاهش فعالیـت لاکتات دهیدروژناز کبدی می گردد (۴۴و۲۱). پس از مواجهه مـاهی بـا ترکیبـات ارگانوفسفره، کاهش فعالیت لاکتات دهیـدروژناز در کبـد، مغـز و عضـله اسـکلتی گزارش شده است (۴۶و۴۵). در حالی که در مطالعه دیگری کاهش فعالیت لاکتات دهیدروژناز در کبد و عضله اسکلتی و افزایش فعالیت آن در آبشش و مغـز مـاهی پس از مواجهه با ترکیب ارگانوفسفره RPR-II گزارش شده است (۴۷). افزایش میزان لاکتات دهیدروژناز در سرم، احتمالا به علت آسیب به کبد، کلیه و بافت‌های عضلانی و رها شدن آنزیم به داخل خـون اسـت (۴۰). کـاهش فعالیـت لاکتـات دهیدروژناز کبد و افزایش لاکتات دهیـدروژناز سـرم را ناشـی از تغییـر در فرآینـد بیوسنتز آنزیم، کاهش ظرفیت گلیکولیتیک بافت و یا افزایش نفوذپذیری بافتی در نظر می‌گیرند (۴۷و۴۴). کاهش در فعالیـت هگزوکینـاز، سوکسـینات دهیـدروژناز، لاکتات دهیدروژناز و محتوای گلیکوژن کبد و افزایش فعالیت گلیکوژن فسـفریلاز به دنبال تجویز کلرپیریفوس به موش صحرایی گزارش شده است (۲۱). در مـورد اثر اندوسولفان بر فعالیت لاکتات دهیدروژناز در کبد مـوش صـحرایی ادعـا شـده است که تشکیل کمپلکس بین آنزیم و ترکیب ارگانوفسفره علت احتمالی کـاهش فعالیت آنزیم است (۴۵). در مطالعـه حاضـر، کـاهش فعالیـت دهیـدروژناز کبـد و افزایش فعالیـت آن در پلاسـما پـس از تجـویز پاراکسـان بیـانگر وقـوع اسـترس اکسیداتیو در این بافت می‌باشد.

واکنش رادیکال‌های آزاد با فسفولیپیدهای غشاء منجر به شکستن پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیر اشـباع، پراکسیداسـیون و تخریـب غشـاهای لیپیـدی مـی گـردد (۴۸و۹). مـالون دی آلدهیـد، یکـی از آلدهیـدهای مهـم ناشـی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌باشد (۴۸). افزایش میزان مالون دی آلدهیـد در کبد، مغز، پلاسما و قلب موش صحرایی پس از تجویز خوراکی ترکیباتی از جملـه دی‌متوآت (۳۰ روز)، کلرپیریفوس (۸ هفته)، مالاتیون (۴ هفته)، و لیندان (۳ هفته) گزارش شده است (۳۷و۲۱و۱۷و۳). از طرف دیگر، در بعضی از مطالعات نیـز عـدم تغییر در میزان مالون دی آلدهید پس از مواجهه با ترکیبات آفت‌کش گزارش شده است. Shadnia و همکاران با مطالعه بر روی نمونه‌های خونی افراد با مواجهـه مزمن با آفت‌کش‌ها، عدم تغییر در میزان مالون دی آلدهید با وجود افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را گزارش نمودند (۱۵). ۴ سـاعت پـس از تزریـق داخـل صفاقی پاراکسان به موش صحرایی تغییرات معنی دار در میزان مالون دی آلدهید مغز گزارش نشد (۳۸). با تجویز دیـازینون بـه مـاهی افـزایش میـزان مـالون دی آلدهید در برخی از بافتها (آبشش، ماهیچه و لوله گوارش) و عدم تغییر آن در سایر بافتها (کلیه) مشاهده شد (۲۹و۶). نتایج مطالعات مختلف نشان می دهد که سطوح پایین و یا فقـدان پراکسیداسـیون لیپیـدی بیـانگر اثـرات محـافظتی آنـزیم‌هـای آنتی‌اکسیدان است (۲۹).

وجه تمایز مطالعه حاضر با اغلب مطالعات دیگر بررسی اثرات حاد پاراکسـان بر سیستم آنتی‌اکسیدان است. نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز حاد پاراکسان به موش صحرایی موجب برهم زدن تعادل فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان و تخلیه گلوتاتیون بافت کبد می‌گردد. افزایش فعالیت لاکتات دهیدروژناز پلاسما و کاهش فعالیت آن در کبد بیانگر تخریب بافت کبد توسط پاراکسان می‌باشد. ممکن اسـت بتوان فعالیت لاکتات دهیدروژناز پلاسما را به عنوان شاخصی برای بررسی مواجهه با ترکیبات ارگانوفسفره مورد استفاده قرار داد. با اندازه گیری تولید رادیکـال هـای آزاد به روش مستقیم نتایج دقیقتری حاصل می شود که می تواند مکمل ارزیـابی وضعیت اکسیداتیو با اندازه گیری شاخص های استرس اکسیداتیو باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر صحرایی به جهت راهنمایی‌های علمـی و از آقایـان جواد رسولی و حسین مهدوی نسب به جهت همکـاری هـای تکنیکـی صـمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.7.9]

Effect of Paraoxon on the Oxidative Stress Indices and Lactate Dehydrogenase Activity in Rat Liver

E. Ghani (MSc) [*1], M. Mohammadi (PhD) [2], M. Jafari (PhD) [3], A. Khoshbaten (PhD) [4], A.R. Asgari (PhD) [4]

1. Department of Physiology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
2. Department of Physiology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3. Department of Biochemistry, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Exercise Physiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

J Babol Univ Med Sci; 14(1); Jan 2012

Received: Jan 29th 2011, Revised: May 4th 2011, Accepted: Sep 7th 2011.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Paraoxon (active metabolite of parathion) is one of the most toxic organophosphate (OP) compounds. Acetyl cholinesterase inhibition is the main acute toxic mechanisms of OP_s. Free radicals production and disruption of antioxidant defense systems is one of non-cholinergic effects of these compounds. In the present study, the effect of acute paraoxon administration on the oxidative stress indices in rat liver and lactate dehydrogenase (LDH) activity in plasma and liver were evaluated.

METHODS: In the present study, 32 male Wistar rats (200-250 g) were randomly divided into 4 groups (6 animals in each group): control (corn oil as paraoxon solvent) and three experimental groups received different doses of paraoxon (0.07, 0.35, or 0.7 mg/kg body weight) intraperitoneally. Four hours after injection, under ether anesthesia, blood sample is given, liver tissue removed and transferred to liquid nitrogen. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and LDH activities and the levels of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were determined in liver tissue homogenates.

FINDINGS: Significant increase in SOD activity and decrease in CAT activity at doses of 0.35 and 0.7 mg/kg of paraoxon were observed ($p<0.05$). The level of glutathione significantly decreased in all doses of paraoxon. Paraoxon in all treatments induced significant increase in plasma LDH activity and decrease in liver LDH activity. MDA concentration did not show any significant alteration.

CONCLUSION: Present findings indicate that acute OP administration induces free radical generation, impairment of cell antioxidant balance and predispose the cells to oxidative stress. So measurement of plasma LDH activity might be a beneficial marker in OP toxicity.

KEY WORDS: *Paraoxon, Oxidative Stress, Liver, Lactate Dehydrogenase, Rat.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Department of Physiology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
Tel: +98 711 2302026
E-mail: esmaeel_ghani@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.7.9]

References

1.Storm JE, Rozman KK, Doull J. Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. Toxicology 2000;150(1-3):1-29.

2.Karalliedde L. Organophosphorus poisoning and anaesthesia. Anaesthesia 1999;54(11):1073-88.

3.Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, Shadnia S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2004;137(1):29-34.

4.Zhang C, Malhotra SV. Increased paraoxon detection by acetylcholinesterase inactivation with ionic liquid additives. Talanta 2005;67(3):560-3.

5.Abel EL, Bammler TK, Eaton DL. Biotransformation of methyl parathion by glutathione S-transferases. Toxicol Sci 2004;79(2):224-32.

6.Durmaz H, Sevgiler Y, Üner N. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in oreochromis niloticus. Pestic Biochem Physiol 2006;84(3):215-26.

7.Bianchini A, Monserrat JM. Effects of methyl parathion on Chasmagnathus granulatus hepatopancreas: protective role of sesamol. Ecotoxicol Environ Saf 2007;67(1):100-8.

8.Monteiro DA, de Almeida JA, Rantin FT, Kalinin AL. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, Brycon cephalus, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2006;143(2):141-9.

9.Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med 2001;31(11):1287-312.

10.Yokoyama K. Our recent experiences with sarin poisoning cases in Japan and pesticide users with references to some selected chemicals. Neurotoxicology 2007;28(2):364-73.

11.Abou-Donia MB. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. Arch Environ Health 2003;58(8):484-97.

12.Vidyasagar J, Karunakar N, Reddy MS, Rajnarayana K, Surender T, Krishna DR. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. Indian J Pharmacol 2004;36(2):76-9.

13.Ranjbar A, Pasalar P, Abdollahi M. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. Hum Exp Toxicol 2002;21(4):179-82.

14.Ranjbar A, Pasalar P, Sedighi A, Abdollahi M. Induction of oxidative stress in paraquat formulating workers. Toxicol Lett 2002;131(3):191-4.

15.Shadnia S, Azizi E, Hosseini R ,Khoei S, Fouladdel S, Pajoumand A, et al. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. Hum Exp Toxicol 2005;24(9):439-45.

16.Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. Clin Chim Acta 2001;310(2):107-12.

17.Ananya R, Subeena S, Kumar DA, Kumar DT, Kumar MS. Oxidative stress and histopathological changes in the heart following oral lindane (gamma hexachlorohexane) administration in rats. Med Sci Monit 2005;11(9):325-9.

18.John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. J Nutr Biochem 2001;12(9):500-4.

19.Khan SM, Sobti RC, Kataria L. Pesticide-induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. Clin Chim Acta 2005;358(1-2):131-8.

20.Islas-Gonzalez K, Gonzalez-Horta C, Sanchez-Ramirez B, Reyes-Aragon E, Levario-Carrillo M. In vitro assessment of the genotoxicity of ethyl paraoxon in newborns and adults. Hum Exp Toxicol 2005;24(6):319-24.

21.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(2-3):131-40.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.7.9]

22.Mohammadi M, Ghani E, Ghasemi A, Khoshbaten A, Asgari AR. Determination of the inhibition and recovery of the plasma, cerebral cortex and hippocampus acetylcholinesterase activity in male paraoxon-treated rats. J Babol Univ Med Sci 2010;12(1):8-15. [in Persian]

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

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

25.Paoletti F, Mocali A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. Methods Enzymol 1990;186:209-20.

26.Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chim Acta 1978;90(1):37-43.

27.Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of hematology, In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders 1994; pp:1990-1.

28.Moss DW, Henderson AR. Enzymes, In: Tietz textbook of clinical chemistry. Burtis CA, Ashwood ER, editors. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders 1994; pp: 812-18.

29.Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. Free Radic Biol Med 1994;17(3):235-48.

30.Oruç EÖ, Usta D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of Cyprinus carpio. Environmental Toxicology and Pharmacology 2007;23(1):48-55.

31.McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am J Med 2000;108(8):652-9.

32.Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem 1999;32(8):595-603.

33.Cardoso SM, Pereira C, Oliveira R. Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. Free Radic Biol Med 1999;26(1-2):3-13.

34.McCord JM, Keele BB Jr, Fridovich I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. Proc Nat Acad Sci 1971;68(5):1024-7.

35.Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. J Biol Chem 1982;257(10):5751-4.

36.Kono Y, Fridovich I. Inhibition and reactivation of Mn-catalase. Implications for valence changes at the active site manganese. J Biol Chem 1983;258(22):13646-8.

37.Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Nag TC, Dogra TD. Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. Toxicology 2005;215(3):173-81.

38.Ghani E, Mohammadi M, Jafari M, Khoshbaten A, Asgari AR. Evaluation of oxidative stress indices in rat brain following exposure to paraoxon. Kowsar Med J 2008;13(1):1-7. [in Persian]

39.Masella R, Di Benedetto R, Varì R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nutr Biochem 2005;16(10):577-86.

40.Agrahari S, Pandey KC, Gopal K. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, Channa punctatus (Bloch). Pestic Biochem Physiol 2007;88(3):268-72.

41.Sahin I, Onbasi K, Sahin H, Karakaya C, Ustun Y, Noyan T. The prevalence of pancreatitis in organophosphate poisonings. Hum Exp Toxicol 2002;21(4):175-7.

42.Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, Das S. Repeated dose toxicity of alfa-cypermethrin in rats. J Vet Sci 2004;5(3):241-5.

43.Gokcimen A, Gulle K, Demirin H, Bayram D, Kocak A, Altuntas I. Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues. Pestic Biochem Physiol 2007;87(2):103-8.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.7.9]

44.Kuz'minskaya UA, Alekhina SM. Effect of chlorocamphene on the isoenzyme spectrum of lactate dehydrogenase in rat serum and liver. Environ Health Perspect 1976;13:127-32.

45.Mishra R, Shukla SP. Endosulfan mediated effects on lactate dehydrogenase from the catfish. Toxicol Lett 1998;95(Supplement 1):145.

46.Tripathi G, Verma P. Fenvalerate-induced changes in a catfish, Clarias batrachus: metabolic enzymes, RNA and protein. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2004;138(1):75-9.

47.Venkateswara Rao J. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, Oreochromis mossambicus. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2006;143(4):492-8.

48.Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med 1991;11(1):81-128.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.14.1.7.9]