

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

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

- 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 اخیراً مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه اثر تجویز حاد پاراکسان به موش صحرایی بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو 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 (۰/۷، ۰/۳۵، ۰/۰۷ 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 شاخص‌های مورد نظر در نیتروژن مایع نگهداری شد. فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و لاکتات دهیدروژناز و میزان گلوتاتیون و مالون دی آلدید در هموزنه بافت کبد به وسیله روشهای بیوشیمیایی تعیین گردید.

یافته ها: پاراکسان در دوزهای ۰/۳۵ و ۰/۷ میلی گرم 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 معنی دار موجب افزایش فعالیت لاکتات دهیدروژناز پلاسما و کاهش فعالیت لاکتات دهیدروژناز کبدی شد. تغییرات معنی دار در میزان مالون دی آلدید 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

اکسیداتیو به متابولیت فعال پاراکسان تبدیل می‌شود (۴). مهار آنزیم استیل کولین استراز و بروز بحران کولینرژیک مهمترین علت مسمومیت حاد با این ترکیبات می‌باشد (۱و۲). 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

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 مسمومیت‌های تصادفی و خودکشی با این ترکیبات وسیع می‌باشد (۱و۲). سالانه ۳ میلیون مسمومیت انسانی با عوامل ارگانوفسفره رخ می‌دهد که حدود ۲۰۰۰۰۰ 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

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

و ۱ برابر LD₅₀ پاراکسان (به وسیله تزریق داخل صفاقی) می باشد. دوز LD₅₀ ۰/۵ پاراکسان مرز شروع علائم کولینرژیک است، در حالی که در دوز LD₅₀ 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 سنجش های 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 ۱۵۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس از محلول رویی جهت اندازه گیری شاخص های مورد نظر استفاده شد. تمامی شاخص های مورد بررسی به روش کالریمتری اندازه گیری شد. میزان پروتئین نمونه های بافتی به وسیله روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه گیری شد (۲۳). جهت اندازه گیری فعالیت کاتالاز از روش Aebi استفاده شد. اصول کلی واکنش تجزیه پراکسید هیدروژن (H₂O₂) به H₂O و O₂، توسط آنزیم کاتالاز، و بررسی کاهش جذب در ۲۴۰ 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 دیسموتاز مقدار آنیمی است که اکسیداسیون NAD(P)H را به میزان ۵۰ درصد مهار نماید (۲۵). برای اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید از روش Satoh استفاده شد (۲۶).

واکنش مالون دی آلدئید با اسید تیوباریتوریک 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 گلوکاتینون بر اساس ترکیب گروه های حاوی سولفیدریل با DTNB و تغییر جذب در ۴۱۲ نانومتر سنجش گردید (۲۷). از گلوکاتینون 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 شاخص های مذکور بر واحد میلی گرم 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 معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثر پاراکسان بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز کبد در دوزهای ۰/۳۵ و ۰/۷ میلی گرم فعالیت سوپراکسید دیسموتاز 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 گلوکاتینون کبد را به طور معنی دار در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد (با p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱). تغییرات در میزان مالون دی آلدئید در هیچ کدام از دوزهای پاراکسان معنی دار نبود (نمودار ۲). نتایج حاصل از این مطالعه همچنین

ارگانوفسفره منجر به تولید رادیکال های آزاد، بر هم زدن تعادل آنتی اکسیدانی سلول و بروز استرس اکسیداتیو می شود (۵ و ۷). تولید بیش از اندازه رادیکال های آزاد با آسیب به لیپیدها، پروتئین ها و DNA موجب تغییرات ساختاری و عملکردی می گردد (۹). استرس اکسیداتیو همچنین در مرگ نورونی نکروتیک و آپوپتوتیک ناشی از مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره دخیل است (۱۱ و ۱۰). با مطالعه بر روی اریتروسیت و پلاسمای افراد مسموم و یا افرادی که در کارخانجات بسته بندی آفت کش ها در معرض این ترکیبات هستند مهار آنزیم استیل کولین استراز، تغییر در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها گزارش شده است (۱۵-۱۲). به علاوه، افزایش فعالیت لاکتات دهیدروژناز و شاخص های آسیب کبدی در پلاسمای افراد پخش کننده آفت کش ها گزارش شده است (۱۶). مطالعه بر روی حیوانات آزمایشگاهی نیز نشان داد که آفت کش ها موجب تولید رادیکال های آزاد، استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی می گردند. به دنبال مواجهه موش صحرایی با ترکیبات ارگانوفسفره، تغییر در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در اریتروسیت، پلاسمای بزاق و قلب مشاهده شده است (۱۸ و ۱۷ و ۳). با مطالعه اثر کلریپرفوس و سیپرترین بر کبد موش کوچک آزمایشگاهی، کاهش میزان گلوکاتینون و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و افزایش غلظت های سرمی شاخص های آسیب کبدی و میزان مالون دی آلدئید گزارش شده است (۱۹).

با مطالعه اثر پاراکسان به صورت in vitro بر روی لنفوسیت های بند ناف جنینی و سلول های خونی بالغین سمیت ژنی این ترکیب گزارش شده است (۲۰). کبد در فرآیند سم زدایی ترکیبات ارگانوفسفره و دفع محصولات حاصل از متابولیسم آنها نقش مهمی به عهده دارد. آسیب پذیری کبد در برابر استرس ناشی از مواجهه با ترکیبات آفت کش به تعادل بین میزان استرس اکسیداتیو و قابلیت آنتی اکسیدانی این ارگان بستگی دارد (۲۱ و ۱۹). 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 پلاسمای انجام شد.

مواد و روشها

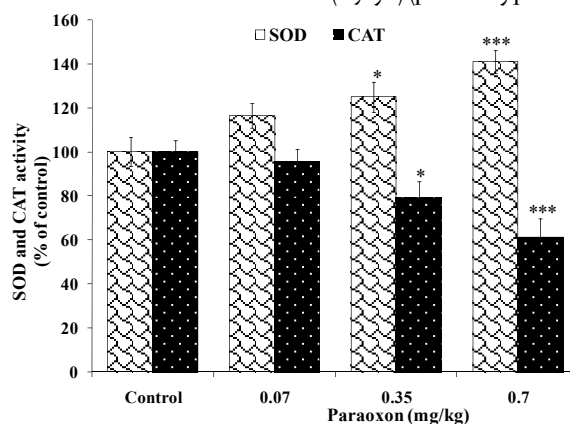
این مطالعه تجربی بر روی ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. حیوانات تا زمان آزمایش در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی هنگام کار با حیوانات رعایت شد. از روغن ذرت به عنوان حلال پاراکسان استفاده شد. حیوانات به روش تصادفی به ۴ گروه (حداقل ۶ 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 تری کلرواستیک 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 میلی گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن حیوان به صورت داخل صفاقی تزریق گردید، که به ترتیب برابر با ۰/۱، ۰/۵

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که اثر تجویز حاد پاراکسان بر فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز متفاوت است. سیستم آنتی اکسیدان آنزیمی نقش دفاعی مهمی در برابر آسیب ناشی از رادیکالهای آزاد به عهده دارد. آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز از آنزیمهای کلیدی این سیستم هستند (۳۰ و ۲۹). 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 کارایی سیستم آنتی اکسیدان 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 (۳۲ و ۳۱). تحت شرایط استرس اکسیداتیو فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان القاء می گردد (۳۰ و ۲۹). آنیون سوپر اکسید اولین محصول احیاء اکسیژن است و منشا تولید سایر انواع (Reactive Oxygen Species, ROS) می باشد (۳۳ و ۹). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز 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 می دهد (۳۴ و ۳۳ و ۹). 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 II) تبدیل می شود. 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 می باشد (۳۶ و ۳۵).

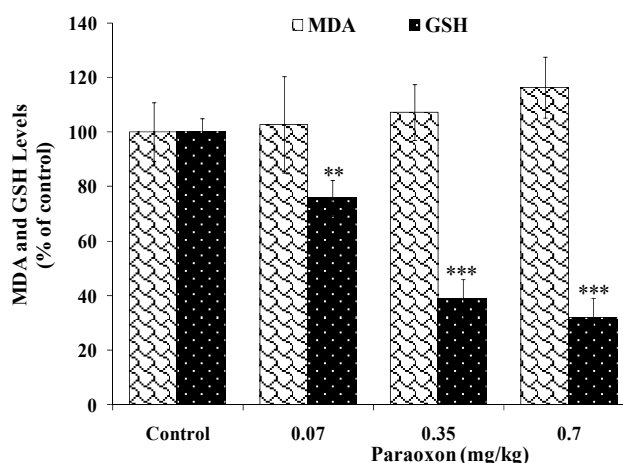
پس از تجویز مزمن عواملی از جمله لیندان، مالاتیون و دی متوات به موش صحرایی، افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و CAT در قلب، پلاسما، مغز و کبد گزارش شده است (۳۷ و ۱۷ و ۳). در مطالعات انسانی نیز پس از مواجهه حاد یا مزمن با آفت کش ها افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان در پلاسما و اریتروسیت گزارش شده است (۱۴-۱۲). از طرف دیگر، برخی از مطالعات نشان داده اند که تجویز ترکیبات آفت کش موجب کاهش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان می گردد. 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 بافت های 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 آفت کش بر گونه های مختلف می توان گفت که اثر ترکیبات آفت کش بر فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان به نوع ترکیب، گونه و بافت مورد بررسی، دوز تجویز شده و مدت زمان مواجهه بستگی دارد.

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 $p < 0.01$ و $p < 0.001$) (نمودار ۳).



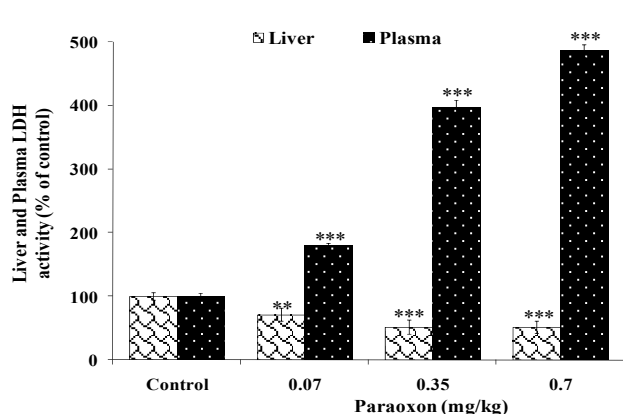
نمودار ۱. مقایسه اثر تجویز حاد پاراکسان با گروه کنترل بر فعالیت آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز کبد

$p < 0.001$ *** $p < 0.05$ **



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

$p < 0.001$ *** $p < 0.01$ **



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

$p < 0.001$ *** $p < 0.01$ **

اثر اندوسولفان بر فعالیت لاکتات دهیدروژناز در کبد موش صحرایی ادعا شده است که تشکیل کمپلکس بین آنزیم و ترکیب ارگانوفسفره علت احتمالی کاهش فعالیت آنزیم است (۴۵). در مطالعه حاضر، کاهش فعالیت دهیدروژناز کبد و افزایش فعالیت آن در پلاسما پس از تجویز پاراکسان بیانگر وقوع استرس اکسیداتیو در این بافت می باشد.

واکنش رادیکال های آزاد با فسفولیپیدهای غشاء منجر به شکستن پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیر اشباع، پراکسیداسیون و تخریب غشاهای لیپیدی می گردد (۹ و ۴۸). مالون دی آلدئید، یکی از آلدئیدهای مهم ناشی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می باشد (۴۸). افزایش میزان مالون دی آلدئید در کبد، مغز، پلاسما و قلب موش صحرایی پس از تجویز خوراکی ترکیباتی از جمله دی متوات (۳۰ روز)، کلریپرفوس (۸ هفته)، مالاتیون (۴ هفته)، و لیندان (۳ هفته) گزارش شده است (۳۷ و ۱۷ و ۳). از طرف دیگر، در بعضی از مطالعات نیز عدم تغییر در میزان مالون دی آلدئید پس از مواجهه با ترکیبات آفت کش گزارش شده است. Shadnia و همکاران با مطالعه بر روی نمونه های خونی افراد با مواجهه مزمن با آفت کش ها، عدم تغییر در میزان مالون دی آلدئید با وجود افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان را گزارش نمودند (۱۵). ۴ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی پاراکسان به موش صحرایی تغییرات معنی دار در میزان مالون دی آلدئید مغز گزارش نشد (۳۸). با تجویز دیازینون به ماهی افزایش میزان مالون دی آلدئید در برخی از بافتها (آبشش، ماهیچه و لوله گوارش) و عدم تغییر آن در سایر بافتها (کلیه) مشاهده شد (۲۹ و ۶). نتایج مطالعات مختلف نشان می دهد که سطوح پایین و یا فقدان پراکسیداسیون لیپیدی بیانگر اثرات محافظتی آنزیم های آنتی اکسیدان است (۲۹).

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

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر صحرایی به جهت راهنمایی های علمی و از آقایان جواد رسولی و حسین مهدوی نسب به جهت همکاری های تکنیکی صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

در مطالعه حاضر به دنبال تجویز حاد پاراکسان به موش صحرایی تخلیه گلوکاتینون کبدی مشاهده شد. نتایج مشابهی از کاهش گلوکاتینون در مغز و کبد موش صحرایی پس از تجویز مزمن دی متوات، کلریپرفوس، مالاتیون و لیندان مشاهده شده است (۳۷ و ۲۱ و ۱۷ و ۳). تجویز داخل صفاقی پاراکسان به موش صحرایی در دوز 0.7 mg/kg نیز موجب کاهش میزان گلوکاتینون مغز شد (۳۸). کاهش میزان گلوکاتینون اریتروسیت پس از تجویز تک دوز خوراکی دی متوات و مالاتیون به موش صحرایی گزارش شده است (۱۸). در انسان نیز به دنبال مواجهه مزمن با آفت کش ها، کاهش میزان گلوکاتینون پلاسما و اریتروسیت مشاهده شده است (۱۶-۱۴). تری پتید گلوکاتینون، تیول غیر پروتئینی اصلی موجودات هواری و فراوان ترین آنتی اکسیدان غیر آنزیمی داخل سلولی می باشد (۹). گلوکاتینون در خنثی سازی رادیکال های آزاد، سم زدایی داروها و مواد شیمیایی نقش مهمی به عهده دارد. گلوکاتینون می تواند به طور مستقیم پذیرنده رادیکال های آزاد باشد و یا به عنوان سوپسترای آنزیم های گلوکاتینون پراکسیداز و گلوکاتینون-S-ترانسفراز در سم زدایی پراکسید هیدروژن، لیپید هیدروپراکسیدها و ترکیبات الکتروفیلک شرکت نماید (۳۹ و ۹). افزایش فعالیت گلوکاتینون پراکسیداز منجر به کاهش سطح کلی گلوکاتینون داخل سلولی می شود که ممکن است منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب به DNA، و کاهش مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو گردد (۳۱).

لاکتات دهیدروژناز (Lactate Dehydrogenase, LDH)، آنزیمی سیتوپلاسمی است که می توان از آن به عنوان یک مارکر جهت بررسی آسیب سلولی استفاده کرد (۴۰). افزایش فعالیت لاکتات دهیدروژناز سرم در مسمومیت با عوامل ارگانوفسفره گزارش شده است (۴۱). در مطالعات آزمایشگاهی نیز نتایج مشابهی به دست آمده است (۴۳ و ۴۲). از طرف دیگر، مطالعات نشان دادند تجویز خوراکی ترکیبات ارگانوفسفره polychlorocomphen و chlorpyrifos به صورت تک دوز یا دوزهای تکراری به موش صحرایی موجب کاهش فعالیت لاکتات دهیدروژناز کبدی می گردد (۴۴ و ۲۱). پس از مواجهه ماهی با ترکیبات ارگانوفسفره، کاهش فعالیت لاکتات دهیدروژناز در کبد، مغز و عضله اسکلتی گزارش شده است (۴۶ و ۴۵). در حالی که در مطالعه دیگری کاهش فعالیت لاکتات دهیدروژناز در کبد و عضله اسکلتی و افزایش فعالیت آن در آبشش و مغز ماهی پس از مواجهه با ترکیب ارگانوفسفره RPR-II گزارش شده است (۴۷). افزایش میزان لاکتات دهیدروژناز در سرم، احتمالاً به علت آسیب به کبد، کلیه و بافت های عضلانی و رها شدن آنزیم به داخل خون است (۴۰). کاهش فعالیت لاکتات دهیدروژناز کبد و افزایش لاکتات دهیدروژناز سرم را ناشی از تغییر در فرایند بیوستز آنزیم، کاهش ظرفیت گلیکولیتیک بافت و یا افزایش نفوذپذیری بافتی در نظر می گیرند (۴۷ و ۴۴). کاهش در فعالیت هگزوکیناز، سوکسینات دهیدروژناز، لاکتات دهیدروژناز و محتوای گلیکوزن کبد و افزایش فعالیت گلیکوزن فسفریلاز به دنبال تجویز کلریپرفوس به موش صحرایی گزارش شده است (۲۱). در مورد

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 OPs. 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

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, Levorio-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.

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, Vari 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.

- 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.