

پاسخ سیستم دفاعی آنتی اکسیدان مغز موش صحرایی به دوزهای حاد پاراکسون

مریم صالحی^۱، *مهوش جعفری^۲، علیرضا عسگری^۳، مسعود صالح مقدم^۴، محمد سلیمیان^۵، مریم عباس نژاد^۶، منصوره حاج غلامعلی^۷

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۸/۹/۱۹

تاریخ اعلام وصول: ۸۸/۶/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: اثرات سمی برخی از ارگانوفسفره‌ها از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در سیستم‌های آنتی اکسیدان بدن است. پاراکسون یکی از سمی‌ترین ارگانوفسفره‌ها است که محصول متابولیسم اکسیداتیو پاراتیون می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر پاراکسون بر سیستم آنتی اکسیدانت مغز موش صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر یک مطالعه تحقیقاتی می‌باشد. در شروع کار موش‌های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به ۴ گروه (در هر گروه ۷ نفر) تقسیم شدند: گروه کنترل و سه گروه آزمایش که دوزهای مختلف پاراکسون (۱-۰/۳ mg/kg) را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت پس از تزریق حیوانات با اتر بیهوش و بافت مغز جدا گردید. بعد از هموژنه کردن بافت کلیه، فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکوتاتیون S- ترانسفراز (GST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) و همچنین غلظت گلوکوتاتیون (GSH) و مالون دی آلدید (MDA) توسط روش‌های بیوشیمیایی تعیین شد. این مطالعه برگرفته از یک پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد.

یافته‌ها: فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT و GST مغز به دنبال تجویز پاراکسون در دوزهای بالاتر از ۰/۳ mg/kg و فعالیت آنزیم LDH در هر سه دوز در مقایسه با کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد، درحالی‌که میزان گلوکوتاتیون مغز در این دوزها به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. میزان MDA تغییر معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.

نتیجه‌گیری: تجویز پاراکسون باعث القا تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت نشان‌دهنده فعال شدن سیستم دفاعی سلول جهت خنثی سازی رادیکال‌های آزاد و تخلیه سطح گلوکوتاتیون ناشی از نارسایی سیستم دفاعی آنتی اکسیدانت سلول در مقابله با رادیکال‌های آزاد است.

کلمات کلیدی: پاراکسون، سیستم آنتی اکسیدانت، موش صحرایی، بافت مغز

مقدمه

شیمیایی مهم هستند. سمیت حاد ناشی از این عوامل ۳ تا ۴ برابر شدیدتر از حشره‌کش‌های ارگانوفسفره مشابه است (۲). این گروه از ارگانوفسفره‌ها ابتدا بر سیستم تنفسی اثر می‌کنند و از این ناحیه باعث صدمه به افراد می‌شوند. مسمومیت با ارگانوفسفره‌ها در موقعیت‌های متفاوتی ممکن است اتفاق بیفتد و مشکلات بهداشتی مهمی را به

ارگانوفسفره‌ها به عنوان حشره‌کش در کشاورزی و عامل اعصاب در جنگ شیمیایی استفاده می‌شوند. عراق از این عوامل بارها بر علیه اشخاص نظامی و غیر نظامی ایرانی در جنگ ایران - عراق استفاده نموده است (۱). سارین، تابون و VX از جمله عوامل

۱- پژوهشگر علوم پایه، مشهد، دانشگاه علوم پایه پیام‌نور مشهد، گروه بیوشیمی، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی
۲- دانشیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی (*نویسنده مسوول)
تلفن: ۰۲۱) ۲۲۲۸۹۹۴۲ آدرس الکترونیک: jafari@bms.ac.ir

۳- استاد، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

۴- استادیار، ایران، مشهد، دانشگاه علوم پایه پیام‌نور مشهد، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی

۵- پژوهشگر علوم پزشکی، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی

۶- پژوهشگر علوم پایه، ایران، تهران، دانشگاه پیام‌نور تهران، گروه بیوشیمی، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی

۷- پژوهشگر علوم پایه، ایران، تهران، دانشگاه پیام‌نور تهران، گروه بیوشیمی، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی

قرار گرفتن به صورت حاد موشهای صحرایی با دیمتوات فعالیت چندین آنزیم آنتی اکسیدانت نظیر SOD، CAT و گلو تاتیون پراکسیداز (GPX) را در مغز و کبد تحت تاثیر قرار می دهد (۱۱). تجویز مالاتیون، کلروپیروفوس به موشهای صحرایی منجر به افزایش در پراکسیداسیون لیپیدها و آنزیمهای آنتی اکسیدانت در کبد، خون و ریه می شود (۱۲). تفاوت در نوع ترکیب و گونه مورد بررسی، دوز و زمان مواجهه وجه تمایز مطالعات مختلف است. در مطالعه حاضر اثر تجویز حاد پاراکسون بر شاخصهای استرس اکسیداتیو در مغز موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روشها

نوع مطالعه، مطالعه تحقیقاتی (تجربی - آزمایشگاهی) می باشد. مواد شیمیایی: نیترو بلو ترازولیوم (NBT)، ۱-کلرو ۲، ۴ دی نیترو بنزن (CDNB)، دی تیو- بیس - نیترو بنزوتیک اسید (DTNB)، تری کلرو استیک اسید (TCA) و سایر مواد شیمیایی با درجه خلوص بالا از شرکت مرک و سیگما خریداری شد. اتیل پاراکسون (خلوص ۹۹ درصد) از شرکت سیگما خریداری شد. محلول ذخیره آن با غلظت ۴ mg/ml در روغن ذرت تهیه شد و رقتهای مناسب با استفاده از بافر فسفات سدیم ۱۰ میلی مولار pH=۷ از آن به دست آمد.

حیوانات: این مطالعه بر روی موشهای آزمایشگاهی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گرفت. حیوانات در مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... تحت شرایط طبیعی نور، تاریکی، غذا و آب قرار گرفتند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی که مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... (عج) بود، هنگام کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

تیمار حیوانات: حیوانات به روش تصادفی به ۴ گروه (در هر گروه ۷سمر) تقسیم شدند: گروه کنترل که روغن ذرت را به عنوان حلال و ۳ گروه آزمایش که دوزهای مختلف پاراکسون (۰/۳، ۰/۷ و ۱) را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. ۲۴ ساعت بعد از تزریق با بیهوش نمودن حیوانات به وسیله اتر بافت مغز خارج گردید و به نیتروژن مایع انتقال داده شد. در روز آزمایش بافتهای منجمد شده به دقت توزین و با نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سالین همورژنه شد. سپس نمونه ها در ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در

واسطه عدم کنترل بر روی خرید و فروش و استفاده های سالم از آنها به وجود آورد. مسمومیت با حشره کش های یکی از دلایل مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه است و هر ساله ۳ میلیون مورد مسمومیت حاد و ۲۲۰۰۰۰ مورد مرگ با این ترکیبات گزارش شده است (۳). ارگانوفسفره ها فعالیت آنزیم کولین استراز را از طریق فسفویلاسیون سرین در جایگاه فعال آنزیم مهار کرده و آنزیم مهار شده قادر به تجزیه استیل کولین نمی باشد. افزایش استیل کولین باعث تحریک پذیری زیاد گیرنده های نیکوتینی و موسکارینی می شود (۴)، که در نهایت منجر به وقوع بحران کولینرژیک تشنج و در موارد حاد ضایعه مغزی و مرگ می شود. پاراکسون یکی از حشره کش های ارگانوفسفره است که برای کنترل انواع حشرات در مزارع مختلف کشاورزی به کار می رود. این ترکیب متابولیت فعال پاراتیون بوده و در اثر اکسیداسیون و دسولفوراسیون آن در بدن تولید می گردد (۵). پاراکسون در بدن توسط پاراکسوناز موجود در پلاسما و کبد متابولیزه می شود (۵).

به طور طبیعی در طی متابولیسم بدن گونه های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species: ROS) تشکیل می گردد که قادرند با ماکرومولکول های مهم بدن نظیر لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش دهند (۶). در شرایط طبیعی بین تولید و حذف ROS تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیند منجر به استرس اکسیداتیو و تغییرات پاتولوژیک در سلول های مختلف می شود. اثرات مضر ROSها از طریق سیستم حمایتی آنتی اکسیدانت سلولی شامل آنزیم هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) همچنین با استفاده از گلو تاتیون (GSH) به عنوان آنتی اکسیدانت غیر آنزیمی داخل سلولی خنثی می شود (۶).

بسیاری از اثرات ارگانوفسفره ها ارتباطی با مهار آنزیم استیل کولین استراز نداشته، بلکه توسط مکانیسم های دیگر سلولی القا می شود یکی از مکانیسم هایی که بسیار مورد توجه قرار گرفته است، تولید رادیکال های آزاد توسط این ترکیبات و به دنبال آن تغییر در سیستم آنتی اکسیدانت سلول و پراکسیداسیون لیپیدهای غشأ می باشد (۷، ۸، ۹).

به دنبال تجویز خوراکی مالاتیون به موش صحرایی تغییر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، در اریتروسیت، بزاق و پلاسما گزارش شده است (۱۰). در معرض

۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ g سانتریفوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۸۱۰ میکرولیتر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن ۹۰ میکرولیتر معرف DTNB ۰/۰۴ درصد در سیترات سدیم ۰/۱ درصد واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در ۴۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوکاتایون ۱mg/ml منحنی استاندارد رسم و غلظت گلوکاتایون نمونه‌ها محاسبه گردید.

تعیین غلظت MDA: برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها (MDA) از روش Satho استفاده شد (۱۷). به حجم مناسبی از بافت هموزنه، TCA ده درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. به ۱/۵ میلی لیتر از مایع رویی، ۲ میلی لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷ درصد اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت. سپس ۲ میلی لیتر n بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از ۱، ۱، ۳، ۳، ۳ ترا توکسی پروپان به عنوان استاندارد تعیین شد.

تعیین غلظت پروتئین: برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۱۸). حجم مناسبی از عصاره بافتی را به حجم ۱ میلی لیتر رسانده و ۳ میلی لیتر از محلول برادفورد به آن اضافه و به مدت دقیقه ۱۰ انکوبه گردید. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب قرائت شد. غلظت پروتئین با رسم استاندارد با استفاده از محلول ۱ mg/ml آلبومین سرم گاوی (BSA) محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار INSTAT به صورت آزمون آنالیز واریانس یک طرفه به همراه تست توکی انجام شد. $P < 0/05$ مرز معنی دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ بیان شدند.

یافته‌ها

اثر دوزهای مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم SOD و CAT در شکل‌های ۱، ۲ نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در دوزهای ۰/۷ و ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن به‌طور معنی‌داری در مقایسه با کنترل افزایش می‌یابد. افزایش فعالیت آنزیم SOD در دوز ۱ mg/kg پاراکسون در مقایسه با دوز ۰/۷ mg/kg آن به‌طور معنی‌دار

۴°C سانتریفوژ گردید. از محلول رویی جهت سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی مورد نظر استفاده شد.

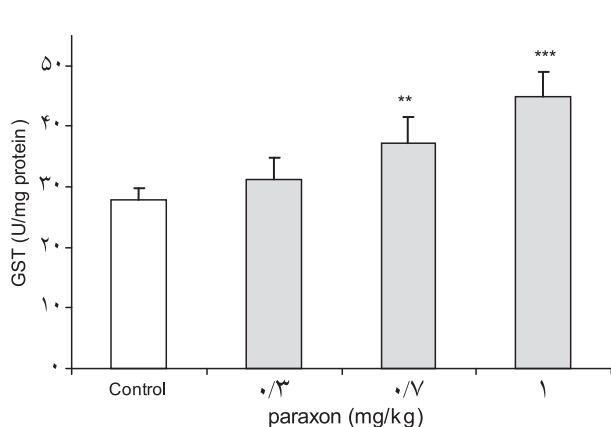
سنجش فعالیت آنزیم SOD: فعالیت آنزیم SOD با روش Worthington سنجیده شد (۱۳). به حجم مناسبی از بافت هموزنه، EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی مولار و NBT ۱/۵ میلی مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس ریبو فلاوین ۰/۱۲ میلی مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار با $\text{pH} = 7/8$ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم CAT: فعالیت آنزیم CAT با روش Aebi سنجیده شد (۱۴). به حجم معینی از عصاره بافتی اتانول مطلق (۰/۰۱ ml/ml) اضافه و به مدت نیم ساعت در یخ اینکوبه گردید. سپس به آن تریتون ۱۰۰-X 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 میلی مولار به حجم مناسبی از عصاره نمونه بافتی در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار $\text{pH} = 7$ شروع شد. سپس جذب را در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

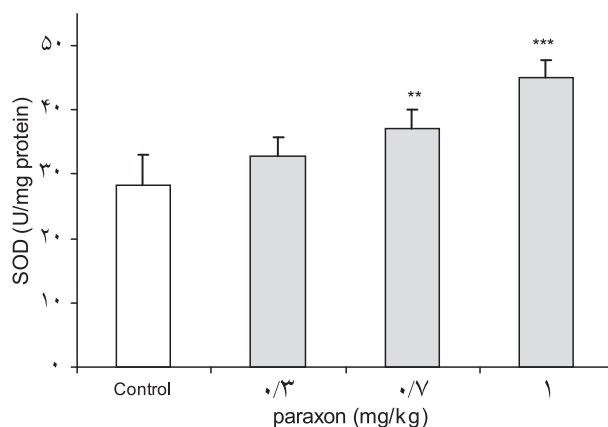
سنجش فعالیت آنزیم GST: فعالیت آنزیم GST با روش Habig سنجیده شد (۱۵). یک میلی لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار $\text{pH} = 7/4$ شامل EDTA یک میلی مولار، GSH ۲۰ میلی مولار و CDNB ۲۰ میلی مولار است. واکنش با اضافه کردن حجم معینی از عصاره بافتی شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت گردید. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم LDH: فعالیت آنزیم LDH با استفاده از کیت پارس آزمون سنجیده شد. جذب نمونه‌ها در طی ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین بیان شد.

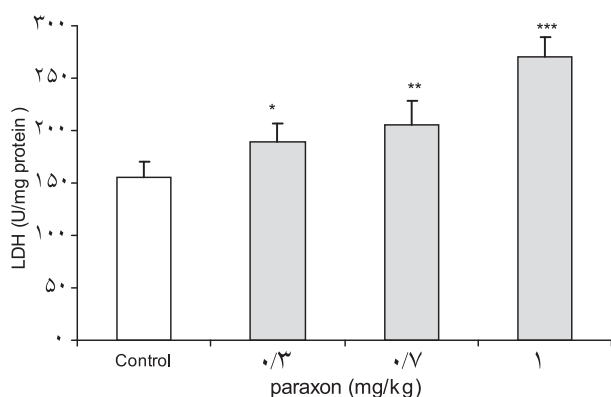
تعیین غلظت GSH: برای تعیین میزان GSH بافت از روش Thietz استفاده شد (۱۶). غلظت مناسبی از نمونه هموزنه با اسید سولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط شد. نمونه در ۴ درجه به مدت



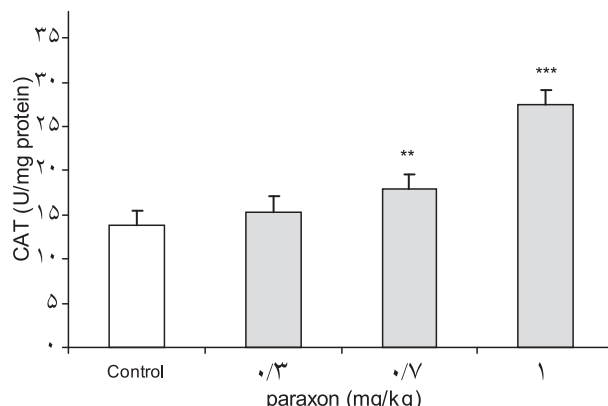
شکل ۳- فعالیت آنزیم گلو تاتیون S- ترانسفراز مغز در حضور دوزهای مختلف پاراکسون بعد از ۲۴ ساعت. $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است.



شکل ۱- فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مغز در حضور دوزهای مختلف پاراکسون بعد از ۲۴ ساعت. $P < 0.01$ و $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است.



شکل ۴- فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز مغز در حضور دوزهای مختلف پاراکسون بعد از ۲۴ ساعت. $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ و $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است.



شکل ۲- فعالیت آنزیم کاتالاز مغز در حضور دوزهای مختلف پاراکسون بعد از ۲۴ ساعت. $P < 0.01$ و $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است.

دوز در مقایسه با کنترل به طور معنی داری افزایش می یابد فعالیت آنزیم GST در دوز ۱ mg/kg پاراکسون در مقایسه با دوز ۰/۷ و ۰/۳ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن آن (به ترتیب $p < 0.01$ و $p < 0.001$) و همچنین دوز ۰/۷ mg/kg آن در مقایسه با ۰/۳ mg/kg به طور معنی دار افزایش می یابد ($p < 0.05$).

بررسی اثر پاراکسون بر میزان غلظت GSH و MDA مغز (جدول ۱)

افزایش می یابد ($p < 0.01$). همچنین افزایش فعالیت CAT در دوز ۱ mg/kg پاراکسون در مقایسه با دوزهای ۰/۳ و ۰/۷ میلی گرم بر کیلوگرم آن معنی دار است ($P < 0.001$).

همچنین اثر دوزهای مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیمهای GST و LDH مغز در شکل های ۳، ۴ نشان می دهد که فعالیت آنزیم GST در دوزهای بالاتر از ۰/۳ mg/kg و فعالیت آنزیم LDH در هر سه

جدول ۱- اثر دوزهای مختلف دیازینون بر غلظت گلو تاتیون و مالون دی آلدئید مغز

پاراکسون (mg/kg)			شاخص	
۱	۰/۷	۰/۳	کنترل	(nmol/mg protein)
۴/۴۲۳±۱/۴۵۸***	۶/۲۵۸±۱/۰۵۴**	۷/۵۳۶±۱/۰۶۰	۹/۱۰۴۲±۱/۳۱۹	گلو تاتیون
۵/۲۲۱±۰/۶۳۱۰	۵/۰۹۲۸±۰/۴۷۵	۴/۶۵۴±۰/۳۹۵۴	۴/۴۸۶±۰/۵۲۴۱	مالون دی آلدئید

$P < 0.01$ و $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز هر سه دوز پاراکسون باعث افزایش فعالیت آنزیم LDH بافت مغز می‌شود. غلظت این آنزیم با میزان مرگ سلولی و لیزسولول‌ها رابطه مستقیم دارد. مطالعات Alpaslan و همکاران نشان دادند که تجویز دیازینون به موش صحرائی بعد از ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم LDH در بافت کبد و پانکراس گردید (۲۵). در مطالعات حیوانی نیز افزایش فعالیت LDH سرم پس از تجویز ترکیباتی از جمله دیازینون و α -cpermethriny توسط Manna و همکاران گزارش شده است (۲۶). Mishra و همکاران نشان دادند که تجویز اندوسولفان به ماهی، موجب کاهش فعالیت LDH کبد و عضله اسکلتی می‌گردد (۲۷). مطالعات غنی و همکاران نشان داد که تجویز پاراکسون به موش صحرائی بعد از ۴ ساعت باعث افزایش LDH بافت کبد و افزایش مختصری در بافت مغز می‌گردد (۲۳). نتایج مختلف می‌تواند ناشی از اختلاف در نوع مسیر تجویز، غلظت سم مورد استفاده، نژاد و گونه حیوان، نوع بافت و حتی ایزو آنزیم‌های خاص LDH باشد (۲۸). آنزیم GST با استفاده از GSH باعث افزایش حلالیت سموم و دفع آنها از بدن می‌گردد. بنابراین نقش مهمی در محافظت بافت‌ها علیه آسیب و استرس اکسیداتیو دارد. در این مطالعه پاراکسون (mg/kg) موجب افزایش فعالیت آنزیم GST در بافت مغز می‌گردد. این افزایش نشان دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل این سم و دفع سریع‌تر آن است. افزایش فعالیت GST دلیل افزایش مصرف GSH نیز می‌تواند باشد. مطالعات Diana و همکاران نشان دادند که تجویز متیل پاراتیون به ماهی برای ۹۶ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم GST در بافت آبشش، کلیه و ماهیچه می‌گردد (۲۹). البته در بعضی مطالعات کاهش GST را نشان داده‌اند. مطالعات Khan و همکاران نشان دادند که اثر سیپرمترین و مالاتیون بر روی کبد موش صحرائی باعث کاهش فعالیت GST می‌شود (۲۴).

گلوکوتایون می‌تواند به‌طور مستقیم یا به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌های گلوکوتایون پراکسیداز و گلوکوتایون S - ترانسفراز در سم زدایی پراکسید هیدروژن، لیپید هیدروپراکسیدها و ترکیبات الکتروفیلیک شرکت نماید (۳۰، ۳۱). تخلیه گلوکوتایون ممکن است منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب به DNA، توقف تکامل و کاهش مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو گردد (۳۰، ۳۱). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تجویز پاراکسون در دوزهای بالاتر از mg/kg ۰/۳

نشان می‌دهد که غلظت GSH در دوزهای ۰/۷ و mg/kg ۱ به‌طور معنی‌دار کاهش می‌یابد و میزان سطح MDA مغز در مقایسه با کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

بافت مغز به دلایل بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و آناتومی خاص در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو آسیب‌پذیر است (۱۹). این بافت ۲۰ درصد اکسیژنی که در بدن تولید می‌شود، مصرف می‌کند و میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت آن پایین است (۲۰). مجموعه آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز اولین خط دفاعی سلول در برابر سمیت ناشی از رادیکال‌های آزاد هستند (۷). آنزیم SOD باعث تبدیل رادیکال سوپراکسید به H_2O_2 شده و آنزیم CAT باعث خنثی شدن H_2O_2 و تبدیل آن به H_2O و O_2 می‌شود. در این مطالعه تجویز حاد پاراکسون (mg/kg) $>0/3$ موجب افزایش فعالیت آنزیم SOD و CAT بافت مغز می‌گردد. افزایش فعالیت SOD باعث کاهش رادیکال سوپراکسید و افزایش H_2O_2 در بافت مغز می‌گردد و افزایش فعالیت CAT باعث خنثی‌سازی H_2O_2 می‌شود. افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بیانگر تطابق سلول یا بافت با استرس ایجاد شده است (۲۱ و ۱۲). بنابر این فعالیت هماهنگ دو آنزیم مانع از بروز استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی می‌شود.

نتایج این مطالعه موافق نتایج بعضی مطالعات است نظیر مطالعات Elif و همکاران که نشان دادند تجویز دیازینون به ماهی برای ۵، ۱۵ و ۳۰ روز باعث افزایش فعالیت SOD در بافت کلیه، ماهیچه و آبشش می‌گردد (۲۱). مطالعات Aturk و همکاران نشان دادند که مصرف دیازینون توسط موش صحرائی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت قلب می‌گردد (۲۲). مطالعات غنی و همکاران نشان دادند که تزریق پاراکسون به‌صورت داخل صفاقی بعد از ۴ ساعت در موش صحرائی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت مغز می‌گردد (۲۳). از طرف دیگر در بعضی از مطالعات به دنبال تجویز ترکیبات آفت کش، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گزارش شده است. Khan و همکاران با مطالعه اثر کلر پیریفوس و سیپرمترین (تجویز به مدت ۲ هفته) بر کبد موش صحرائی کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT را گزارش نمودند (۲۴).

خون، شش می گردید (۱۲).

مطالعات Gokalp و همکاران نشان دادند که مصرف دیازینون به مدت ۲ ساعت در موش صحرایی (دوز) موجب افزایش سطح MDA و پراکسیداسیون لیپیدها در سرم گردید (۳۵). مطالعات غنی و همکاران نشان دادند که تجویز پاراکسون به موش صحرایی به مدت ۴ ساعت تغییرات معنی داری را در میزان MDA مغز نشان نداد (۲۳). در مجموع نتایج پیشنهاد می کند که تجویز پاراکسون به صورت حاد در یک طرح وابسته به دوز موجب افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و تخلیه گلوکوتاتیون در بافت مغز می گردد. افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان به طور احتمالی ناشی از افزایش ظرفیت سم زدایی بافت مغز است و کاهش GSH نشان دهنده نارسایی سیستم دفاعی آنتی اکسیدانت برای مقابله با ROS می باشد. عدم تغییر میزان مالون دی آلدید بیانگر وجود استرس اکسیداتیو در مراحل اولیه است.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... در قالب طرح تحقیقاتی (شماره ثبت: ۳۲۸) انجام گردیده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین آن مرکز ابراز می دارند.

موجب کاهش غلظت گلوکوتاتیون در بافت مغز می گردد. مطالعات Isik و همکاران نشان دادند که تجویز دیازینون و متیل پاراتیون به ماهی به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت باعث کاهش GSH در بافت کبد و آبشش می گردد (۳۲). مطالعات Diana و همکاران نشان دادند که تجویز متیل پاراتیون به مدت ۹۶ ساعت در ماهی باعث کاهش GSH در بافت آبشش، کلیه و ماهیچه می گردد (۲۹). مطالعات Khan و همکاران نشان دادند که مصرف سیپرترین و مالاتیون توسط موش صحرایی موجب کاهش گلوکوتاتیون کبد می گردد (۲۴). مطالعات غنی و همکاران نشان دادند که تجویز پاراکسون به مدت ۴ ساعت به موش صحرایی باعث کاهش GSH در بافت مغز می گردد (۲۳). MDA به عنوان مارکر کراس ترس اکسیداتیو، آخرین محصول تجزیه لیپیدها است افزایش سطح MDA نشان دهنده افزایش آسیب غشاء سلولی است (۳۳). در مطالعه حاضر تجویز پاراکسون افزایش معنی داری را در میزان MDA نشان نمی دهد که نشان دهنده حضور استرس اکسیداتیو در مراحل اولیه است که هنوز منجر به پراکسیداسیون لیپیدها نگردیده است. مطالعات Ayse و همکاران نشان دادند که مصرف دیازینون برای مدت ۷ هفته در موش صحرایی باعث افزایش میزان MDA در بافت قلب گردید (۳۴). مطالعات Amehd و همکاران نشان دادند که تجویز مالاتیون، ایندوسولفات یا کلرپیرفوس به موش های صحرایی موجب افزایش سطح MDA و پراکسیداسیون لیپیدها و آنزیم های آنتی اکسیدانت در بافت کبد،

References

- 1- United Nations Security Council. Report of the mission dispatched by the secretary-general to investigate allegations of the use of chemical weapons in the conflict between the Islamic Republic of Iran and Iraq. New York: United Nations; 1987. p. S18852.
- 2- Watson AP, Jones TD, Adams JD. Relative potency estimates of acceptable residues and reentry intervals after nerve agent release. *Ecotoxicol Environ Safety* 1992;23:328-42.
- 3- Seth V, Banjerjee BD, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakravorty AK. Pesticide induced alterations in acetylcholinesterase and gamma glutamyl Transpeptidase activities and glutathione level in lymphocytes of human poisoning cases. *Clinic BioChem* 2001;24:427-9.
- 4- Mehrani H. Simplified procedures for purification and stabilization of human plasma butylcholinesterase. *Process Biochem* 2004;39:877-82.
- 5- Jeyarasasingam G. Nitric oxide is involved in acetylcholinesterase inhibitor induced myopathy in rats. *J pharmacol Exp Ther* 2000;295:314-20.
- 6- Zhang CH, Malhorta SV. Increased paraoxon detection by acetylcholinesterase inactivation with ionic liquid additives. *Talanta* 2005;67:560-3.
- 7- Ranjbar A, Pasalar P, Abdollahi M. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. *Hum Exp Toxicol* 2002;21:179-82.
- 8- Karalliedde L. Organophosphorus poisoning and anaesthesia. *Anaesthesia* 1999;54:1073-88.
- 9- Vidyasagar J, Karunakar N, Reddy MS, Rajnarayana K, Surender T, Krishna DR. Oxidative stress and antioxidant status in acute ganophosphorous insecticide poisoning. *Indian J Pharmacol* 2004;36 (2):76-9.

- 10- Ranjbar A, Pasalar P, Sedighi A, Abdollahi M. Induction of oxidative stress in paraquat formulating workers. *Toxicol Lett* 2002;131:191-4.
- 11- Shirma Y, Basher S, Irshad M, Nagtc-Dogra TD. Dimethoate induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats flowing subchronic exposure. *Toxicology* 2005;215:173-81.
- 12- Ahmad RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD. Influence of dietary ginger (*zingiber officinales* ROS) on oxidative stress induced by malathion in rat. *Food Chem Toxicol* 2000;38:443-50.
- 13- Winterbourn C, Hawkins R, Brian M, Carrell R. The Estimation of Red Cell Superoxide Dismutase Activity. *J Lab Clin Med* 1975;85:337.
- 14- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
- 15- Habig WT, Jakoby WB. Glutathion S-Transferas (rat and human). *method enzymolo* 1981;77:218-31.
- 16- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed. USA, Philadelphia: W.B.Saunders; 1994. 1990-1.
- 17- Satoh K. Serum lipid peroxidation in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978;90:37-43.
- 18- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the priniple of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-54.
- 19- Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1999;49:577-87.
- 20- Somani SM. Exereise, drugs, and tissue specific antioxidant system. *Pharmacology in sport and exercise* 1996;57-95.
- 21- Elif O, Demet U. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of cyprinus carpio. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2007;23:48-55.
- 22- Akturk O, Demirin H, Sutcu R, Yilmaz N, Koynu H, Altuntas I. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat heart and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. *Cell biology and toxicology* 2006;6:455-61.
- 23- Ghani S, Mohammadi M, Jafari M, Khosh-baten A, Asgari A. Arzyabie shakhes haye stress ossidative dar maghz-e moush-e sahraie pas az movajehe ba paraksoun. *Kosar* 1387;1:1-8.
- 24- Khan SM, Sobti RC, Kataria L. Pesticide-induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. *Clinica Chimica Acta* 2005;358:131-8.
- 25- Alpaslan G, Kanat G, Hilmi D, Dilek B, Ahmed K, Irfan A. Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2007;87:103-8.
- 26- Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, Das S. Repeated dose toxicity of alfa-cypermethrin in rats. *J Vet Sci* 2004;5:241-5.
- 27- Mishra R, Shukla SP. Endosulfan mediated effects on lactate dehydrogenase from the catfish. *Toxicology Letters* 1998;95:145.
- 28- Papirmeister B, Feister AJ, Obinson SI, Ford RD. Medical defense against mustard gas, Boca Raton FL. Science Application Internatonal Corporatron Jappa. Maryland:CRC Press; 1991.
- 29- Amaral-Monteiro D, Tadeu-Rantin F, Lúcia-Kalinin A. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish *matrinxã*, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 2009;149:40-49.
- 30- Nordberg J, Arner E. Reactive oxygen species, antioxidant, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;31(11):1287-312.
- 31- 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. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2005;16:577-86.
- 32- Ismail Isik, Ismail Celik. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2008;92: 38-42.
- 33- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullas M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2006;64:178-89.
- 34- Ayse-Ogutcu A, Meltem-Uzunhisarcikli A, Suna-Kalender B, Dilek-Durak C, Fatma-Bayrakdar A, Yusuf-Kalender. The effects of organophosphate insecticide diazinon on malondialdehyde levels and myocardial cells in rat heart tissue and protective role of vitamin E. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2006;86:93-8.
- 35- Gokalp O, Buyukvanli B, Cicek E, Kaya-Ozer M, Koyu A, Altuntas I, et al. The effects of diazinon on pancreatic damage and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2005;81:123-8.

Response of brain antioxidant defense system to acute doses of paraoxon in male rats

Salehi. M; MSc.¹, *Jafari. M; PhD.², Asgari. AR; PhD.³, Saleh Moqadam. M; PhD.⁴, Salimian. M; MSc.⁵, Abasnejad. M; MSc., Haggholamali. M; MSc.

Received: 3 Sep 2009

Accepted: 10 Dec 2009

Abstract

Background: The toxic effects of some Organophosphates (OPs) are not limited to inhibition of cholinesterase, they are capable to produce free radicals and induce disturbance in body antioxidant systems. Paraoxon is an OP, which is the active form of parathion. The aim of this study was to investigate the effects of paraoxon on oxidant-antioxidant system in rat brain tissue.

Materials and Methods: Wistar rats were randomly divided in to four groups (n=7) as followed: control (corn oil as paraoxon solvent) and three of groups of paraoxon receiving different doeses (0.3, 0.7 and 1 mg/kg) by intraperitoneal injection. 24 hours after injection, animal to ether anesthesia and brain tissue removed. After brain tissue hemogenation, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), lactate dehydrogenase (LDH) and glutathione S- transferase (GST) activities, glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels were determined by biochemical methods.

Results: At doses higher than 0.3 mg/kg paraoxon, the enhanced activities of kidney SOD, CAT and GST and LDH activity (≥ 0.3 mg/kg) were significantly increased, comparing with the control, while GSH level was significantly decreased. There were no significant changes observed in MDA level.

Conclusions: The results suggest that paraoxon induces the production of free radicals and oxidative stress in a dose- dependent manner. The enhanced activity of antioxidant enzymes in brain of rats probably as a function of the increased detoxification capacity. Depletion of tissue GSH is a prime factor, which can impair the cell's defense against the toxic actions of free radicals.

Keywords: Paraoxon, Antioxidant defense system, Rat, Brain tissue

1- Basis Sciences Researcher, Basis Sciences University of Payam Noor, Department of Biochemistry, Mashhad, Iran

2- (*Corresponding author) Associate Professor, Baqiyatallah (a,s) University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Applied Neuroscinces Research Center, Tehran, Iran. Tel: 021-22389942 E-mail: jafari@bmsu.ac.ir

3- Professor, Baqiyatallah (a,s) University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Basis Sciences University of Payam Noor, Department of Biochemistry, Mashhad, Iran

5- Medical Sciences Researcher, Baqiyatallah (a,s) University of Medical Sciences, Department of Biochemistry, Applied Neuroscinces Research Center, Mashhad, Iran

6- Basis Sciences Researcher, Payam Noor University, Department of Biochemistry, Mashhad, Iran