

ارزیابی شاخص های استرس اکسیداتیو در مغز موش صحرایی پس از مواجهه با پاراکسان

اسماعیل غنی^{M.Sc}، مسلم محمدی^{Ph.D}، مهوش جعفری^{Ph.D}،
علی خوش باطن^{Ph.D}، علیرضا عسگری^{Ph.D}

چکیده

هدف: ارزیابی شاخص های استرس اکسیداتیو در مغز موش صحرایی به دنبال تجویز حاد سه دوز مختلف پاراکسان
مواد و روش ها: موش های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) به روش تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند: کنترل، و سه
گروه آزمایش (تزریق داخل صفاقی پاراکسان در دوزهای ۰/۰۷ mg/kg، ۰/۳۵، و ۰/۷). چهار ساعت پس از تزریق، حیوانات با اتر
بیهوش و بافت مغز خارج گردید. فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT)، و میزان گلوتاتیون (GSH)
و مالون دی آلدئید (MDA) اندازه گیری شد.

یافته ها: به دنبال تجویز پاراکسان، میزان فعالیت آنزیم های SOD و CAT در دوزهای ۰/۳۵ و ۰/۷ میلی گرم، به طور معنی دار
افزایش یافت. کاهش معنی دار در میزان گلوتاتیون مغز در دوز ۰/۷ پاراکسان مشاهده شد. میزان مالون دی آلدئید مغز تغییرات
معنی دار نکرد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد تجویز حاد پاراکسان موجب افزایش تولید رادیکال های آزاد می گردد. افزایش فعالیت
آنزیم های آنتی اکسیدان و کاهش میزان گلوتاتیون مغز نشان دهنده فعال شدن سیستم دفاعی سلول جهت خنثی سازی رادیکال های
آزاد است.

واژه های کلیدی: پاراکسان، استرس اکسیداتیو، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون، موش صحرایی

دریافت: ۸۷/۱/۸ پذیرش: ۸۷/۳/۵

کاتبه نویسنده مسئول: گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله... تلفن/ فاکس: ۲۲۲۸۱۵۶۱ E-mail: esmaeel_ghani@yahoo.com
* گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله
** دانشیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله
*** استاد مرکز آسیب های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله

مقدمه

دنبال آن تغییر در سیستمهای آنتی اکسیدان سلول و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می باشد (۱۱ و ۱۰ و ۳). به دنبال تجویز خوراکی مالاتیون به موش صحرایی تغییر فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در اریتروسیت، بزاق و پلاسما گزارش شده است (۱۲ و ۳). نتایج مشابهی با مطالعه اثر لیندان بر قلب موش صحرایی به دست آمده است (۱۳). از طرف دیگر، با مطالعه اثر کلرپیرفوس و سیپرترین بر کبد موش کوچک آزمایشگاهی، افزایش غلظت های سرمی شاخص های عملکرد کبدی و تغییر در شاخص های آنتی اکسیدان گزارش شده است (۱۱). تفاوت در نوع ترکیب و گونه مورد بررسی، دوز و زمان مواجهه وجه تمایز مطالعات مختلف است. در مطالعه حاضر، اثر تجویز حاد پاراکسان (متابولیت فعال پاراتیون) بر شاخص های استرس اکسیداتیو در مغز موش صحرایی بررسی شد. به این منظور پاراکسان در دوزهای ۰/۷، ۰/۳۵، ۰/۰۷ mg/kg BW، و ۰/۷ به صورت داخل صفاقی تزریق گردید که به ترتیب برابر با ۰/۱، ۰/۵ و ۱ برابر LD50 پاراکسان می باشد. تجویز پاراکسان به صورت داخل صفاقی در دوز ۰/۰۷ mg/kg موجب مهار استیل کولین استراز مغز نمی گردد. دوز ۰/۳۵ mg/kg مز شروع علائم کولینرژیک است در حالیکه پاراکسان در دوز ۰/۷ mg/kg موجب بروز بحران کولینرژیک می گردد.

روش بررسی

حیوانات

این مطالعه بر روی موشهای آزمایشگاهی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گرفت (n=۶). حیوانات به روش تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند: کنترل، و ۳ گروه آزمایش با تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف پاراکسان (۰/۰۷، ۰/۳۵، ۰/۰۷ mg/kg). چهار ساعت پس از تزریق، با بیهوش نمودن حیوانات به وسیله اتر، بافت مغز را خارج گردید و به نیتروژن مایع انتقال داده شد. بافت های منجمد شده پس از توزین، با نسبت وزنی-حجمی ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سدیم pH=۷/۴ هموژن نموده و در ۱۲۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. از محلول رویی جهت سنجش شاخص های مورد نظر استفاده شد.

با توجه به استفاده وسیع از ترکیبات ارگانوفسفره در کشاورزی، دامپزشکی، صنعت، باغبانی و منازل مطالعه بر روی مکانیسم عمل این ترکیبات ادامه دارد (۱ و ۲). در ایران ترکیبات ارگانوفسفره به عنوان سومین علت مسمومیت و علت اصلی مرگ و میر ناشی از مسمومیت گزارش شده اند (۳). تاکنون طیف وسیعی از اثرات متفاوت برای ترکیبات ارگانوفسفره گزارش شده است. مکانیسم اصلی عملکرد ترکیبات ارگانوفسفره مهار آنزیم استیل کولین استراز و بروز بحران کولینرژیک می باشد. بسیاری از سایر اثرات این ترکیبات ارتباطی با مهار آنزیم استیل کولین استراز ندارد. به دلیل تنوع استخلافها در ساختمان شیمیایی ترکیبات ارگانوفسفره در مورد سایر اثرات غیر وابسته به مهار استیل کولین استراز، این عوامل تفاوت های بارزی با یکدیگر دارند و باید هر یک از این ترکیبات را جداگانه مورد بررسی قرار داد (۱).

در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیندها منجر به استرس اکسیداتیو و بروز تغییرات پاتولوژیک متعدد در سطح ماکرومولکولهای سلولی میگردد (۴). آنتی اکسیدانهای آنزیمی و غیر آنزیمی سیستم های اصلی دفاعی بدن در برابر آسیب ناشی از رادیکال های آزاد هستند. آنزیمهای کلیدی این سیستم شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) می باشد (۵ و ۶). خصوصیت مهم این آنزیمها، قابل القاء بودن آنها تحت شرایط استرس اکسیداتیو است (۷). هر آنزیم دارای یک عملکرد ویژه و منحصر به فرد است. آنها همگی برای زنده ماندن سلول، حتی در شرایط نرمال، ضروری هستند (۴). آنیون سوپراکسید اولین رادیکال آزاد مشتق از اکسیژن است که به وسیله SOD به اکسیژن و پراکسید هیدروژن خنثی می گردد. آنزیم های CAT و GPx موجب تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می شوند (۶). تری پپتید گلوکوتاتیون، تیول غیرپروتئینی اصلی موجودات هوازی و فراوان ترین آنتی اکسیدان غیر آنزیمی داخل سلولی می باشد (۸). مالون دی آلدئید (MDA)، یکی از آلدئیدهای مهم ناشی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می باشد (۹). یکی از مکانیسم های اثرات آفت کش ها تولید رادیکال های آزاد و به

مواد

آلبومین سرم گاوی، β -NADH، اسید تری کلرو استیک، نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NADH)، تترا اتوکسی پروپان، و اتیل پاراکسان (خلوص ۹۰ درصد) از شرکت سیگما (آلمان)، و سایر مواد از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

روشهای سنجش

برای اندازه گیری پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۱۴). منحنی استاندارد پروتئین با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به دست آمد. فعالیت کاتالاز با استفاده از روش Aebi با دنبال نمودن تجزیه پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد (۱۵). سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز بر اساس اکسیداسیون NAD(P)H در طول موج ۳۴۰ نانومتر با استفاده از روش Paoletti انجام گرفت (۱۶). برای اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید از روش Satoh استفاده شد (۱۷). واکنش مالون دی آلدئید با اسید تیو باربیتوریک در دمای جوش، منجر به تولید رنگ صورتی می شود که به وسیله π بوتانول استخراج گردید و جذب آن در طول موج

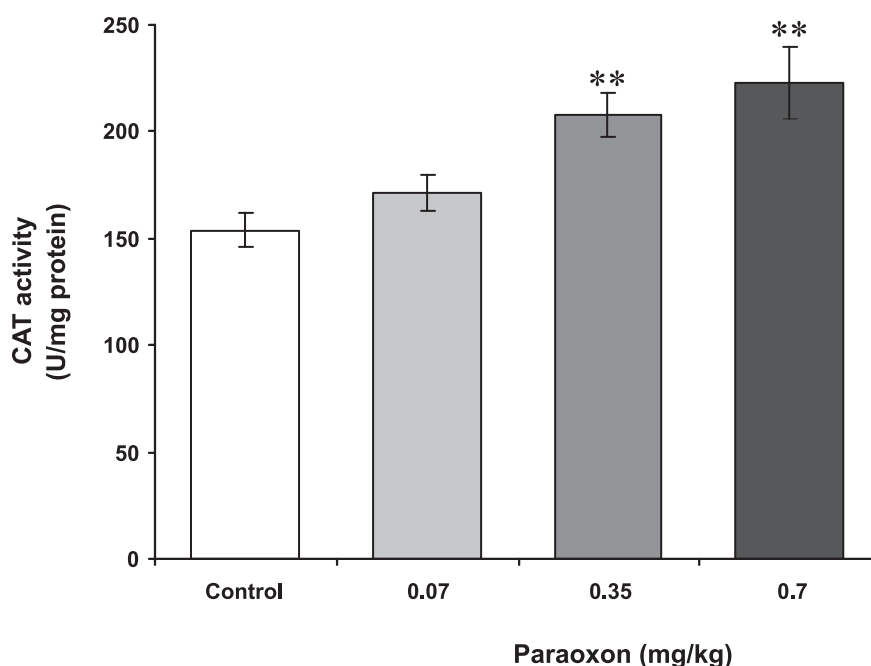
۵۳۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد مالون دی آلدئید با استفاده از تترا اتوکسی پروپان به دست آمد. میزان گلوکاتایون بر اساس ترکیب گروههای حاوی سولفیدریل با DTNB و تغییر جذب در ۴۱۲ نانومتر سنجش گردید (۱۸). از گلوکاتایون احیاء جهت به دست آوردن منحنی استاندارد استفاده شد.

تجزیه و تحلیل دادهها

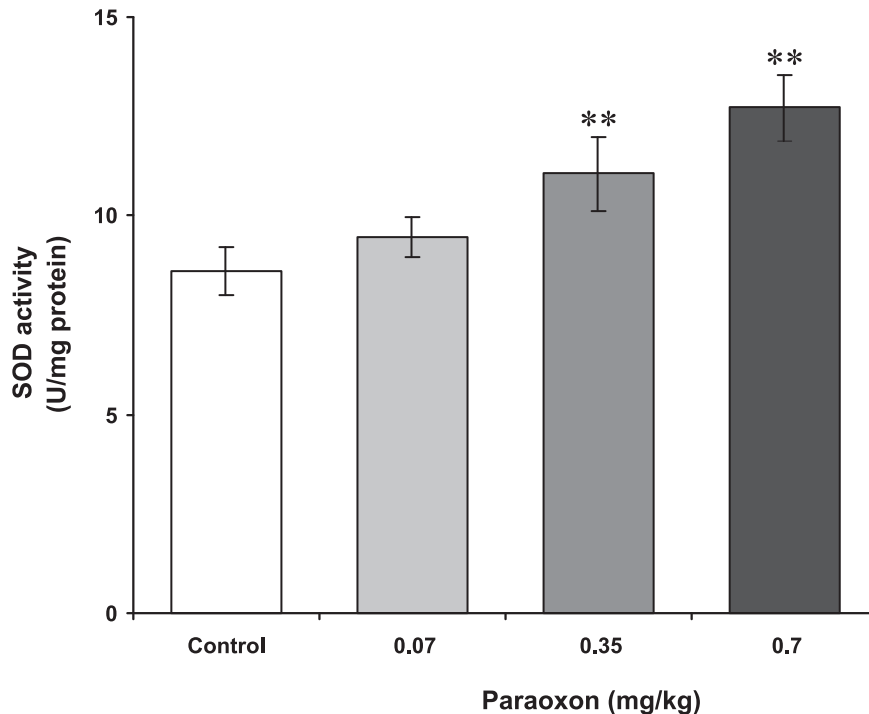
تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از آزمون آنالیز-واریانس یک طرفه به همراه تست توکی انجام شد. $P < 0.05$ مرز معنی دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر پاراکسان بر فعالیت آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مغز در شکلهای ۱ و ۲ آمده است. فعالیت کاتالاز مغز در دوزهای ۰/۳۵ و ۰/۷ میلی گرم پاراکسان در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی دار افزایش یافت ($P < 0.01$). به علاوه، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز مغز نیز در دوزهای مذکور در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی



شکل ۱. اثر دوزهای مختلف پاراکسان بر فعالیت آنزیم کاتالاز مغز (***) با $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است).



شکل ۲. اثر دوزهای مختلف پاراکسان بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز مغز (*، **): به ترتیب با $P < 0.05$ و $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است.

گزارش شده است (۳ و ۱۳). با مطالعه بر روی پلاسما و اریتروسیت افرادی که در مواجهه مزمن با ترکیبات آفت کش قرار گرفته بودند افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان مشاهده شد (۱۹ و ۲۰). از طرف دیگر، در بعضی از مطالعات به دنبال تجویز ترکیبات آفت کش کاهش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان گزارش شده است. Khan و همکاران با مطالعه اثر کلرپیریفوس و سیپرترین (تجویز به مدت ۲ هفته) بر کبد موش کوچک آزمایشگاهی، کاهش فعالیت آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را گزارش نمودند (۱۱). Goel و همکاران نشان دادند تجویز خوراکی کلرپیریفوس به موش صحرایی (۸ هفته) موجب کاهش فعالیت کاتالاز و افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز کبدی گردید (۲۱). نتایج مطالعات نشان می دهد نوع تغییر در فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان با توجه به نوع ترکیب، گونه مورد مواجهه، بافت مورد بررسی، دوز و زمان مواجهه متفاوت می باشد. مجموعه آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز-کاتالاز به علت اثرات مهاری بر تشکیل رادیکالهای اکسیژن اولین خط دفاعی سلول در برابر مسمومیت ناشی از رادیکالهای آزاد هستند (۴). مواجهه سلول

دار افزایش یافت (به ترتیب با $P < 0.05$ و $P < 0.01$). از میان سه گروه آزمایش، فقط دوز ۰/۷ میلی گرم پاراکسان موجب کاهش معنی دار در میزان گلوتاتیون مغز در مقایسه با گروه کنترل گردید ($P < 0.01$). پاراکسان موجب تغییرات معنی دار در میزان مالون دی آلدئید مغز نشد (جدول ۱).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد تجویز پاراکسان به صورت حاد موجب افزایش فعالیت آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و تخلیه گلوتاتیون مغز می گردد. به دنبال تجویز پاراکسان پس از ۴ ساعت تغییرات معنی دار در میزان مالون دی آلدئید مغز حاصل نشد. Sharma و همکاران نشان دادند تجویز خوراکی dimethoate به موش صحرایی (۳۰ روز) موجب افزایش وابسته به دوز در فعالیت آنزیمهای کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مغز و کبد گردید (۱۰). افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان در قلب و پلاسمای موش صحرایی پس از تجویز لیندان (۳ هفته) و مالتیون (۴ هفته) نیز

جدول ۱: اثر پاراکسان بر میزان گلوکاتیبون و مالون دی آلدئید مغز

پاراکسان (mg/kg)			کنترل	گلوکاتیبون (nmol/mg protein)
۰/۷	۰/۳۵	۰/۰۷		
۰/۲ ± ۱۱/۷**	۰/۴ ± ۱۲/۱	۰/۲ ± ۱۲/۵	۰/۳ ± ۱۲/۹	مالون دی آلدئید (nmol/mg protein)
۰/۱ ± ۳/۴	۰/۲ ± ۳/۳	۰/۱ ± ۳/۲	۰/۱ ± ۳/۱	

** $p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است.
تمامی اعداد به صورت Mean \pm SEM بیان شده‌اند.

مالون دی آلدئید مغز مشاهده نشد. افزایش میزان مالون دی آلدئید کبد، پلاسما، و قلب موش صحرایی پس از تجویز خوراکی مزمن ترکیباتی از جمله کلریپریفوس (۸ هفته)، مالاتیون (۴ هفته)، و لیندان (۳ هفته) گزارش شده است (۳ و ۱۳ و ۲۱). شادنا و همکاران عدم تغییر در میزان مالون دی آلدئید در پلاسما افرادی که به طور مزمن در مواجهه با آفت کشها قرار گرفته بودند را گزارش نمودند (۱۹). به علاوه، با مطالعه اثر دیاژینون بر بافتهای مختلف ماهی در بعضی از بافتهای افزایش میزان مالون دی آلدئید (آبشش، ماهیچه و لوله گوارش) و در بعضی دیگر عدم تغییر (کلیه) مشاهده شده است (۲۵ و ۷). نتایج مطالعات متعدد نشان می‌دهد که سطوح پایین یا فقدان پراکسیداسیون لیپیدی، منعکس کننده اثرات محافظتی آنزیمهای آنتی اکسیدان است (۷).

نتیجه گیری

در این مطالعه بر خلاف اغلب مطالعات دیگر اثرات پاراکسان بر سیستم آنتی اکسیدان به صورت حاد بررسی شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد تجویز پاراکسان به صورت حاد موجب افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، و تخلیه گلوکاتیبون در بافت مغز می‌گردد. عدم تغییر میزان مالون دی آلدئید بیانگر تطابق سلول با استرس اکسیداتیو ایجاد شده است. به منظور بررسی اثر پاراکسان بر میزان مالون دی آلدئید لازم است زمان مواجهه به عنوان یک متغیر مورد بررسی قرار گیرد.

با استرس اکسیداتیو منجر به القای آنها می‌گردد (۱۲). آنزیمهای مذکور با یکدیگر به طور سینرژیک عمل می‌نمایند و یک مجموعه آنزیمی محافظتی متقابل را تشکیل می‌دهند (۲۲). افزایش در فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان بیانگر تطابق سلول با بافت با استرس ایجاد شده است (۱۲).

گلوکاتیبون می‌تواند به طور مستقیم و یا به عنوان سوسترای آنزیمهای گلوکاتیبون پراکسیداز (GPx) و گلوکاتیبون-S-ترانسفراز (GST)، در سم زدایی پراکسید هیدروژن، لیپید هیدروپراکسیدها و ترکیبات الکتروفیلیک شرکت نماید (۲۳ و ۲۴). تخلیه گلوکاتیبون ممکن است منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب به DNA، توقف تکامل و کاهش مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو گردد (۱۱ و ۲۴). مطالعه حاضر نشان می‌دهد تجویز مقادیر بالای پاراکسان به صورت حاد موجب تخلیه گلوکاتیبون مغز می‌گردد. کاهش میزان گلوکاتیبون در مغز و کبد موش صحرایی پس از تجویز ترکیباتی از جمله کلریپریفوس، مالاتیون، و لیندان گزارش شده است (۳ و ۱۳ و ۲۱). به علاوه، کاهش میزان گلوکاتیبون پلاسما و اریتروسیت در نمونه‌های انسانی پس از مواجهه مزمن با آفت کشها گزارش شده است (۲۰ و ۱۹).

واکنش رادیکالهای آزاد با زنجیره‌های اسیدهای چرب غیراشباع فسفولیپیدها منجر به شکستن پیوندهای دوگانه آنها، پراکسیداسیون و تخریب غشاهای لیپیدی می‌گردد (۹). در مطالعه حاضر، به دنبال تجویز حاد پاراکسان به موش صحرایی تغییرات معنی دار در میزان

8. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 2000;62:649-71.
9. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biolo Med* 1991; 11: 81-128.
10. 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. *Toxicol* 2005; 215: 173-81.
11. 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.
12. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nut Biochem* 2001; 12: 500-4.
13. 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: 325-9.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-54.
15. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.
16. 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.

تقدیر و تشکر

این مطالعه قسمتی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... می باشد. بدینوسیله نویسندگان کمال تشکر خود را از حمایت های مالی مرکز مذکور ابراز می دارند.

References

1. Storm JE, Rozman KK, Doull J. Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. *Toxicol* 2000; 150: 1-29.
2. Hoffman U, Papendorf T. Organophosphate poisonings with parathion and dimethoate. *Intensive Care Med* 2006; 32: 464-8.
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* 2004; 137: 29-34.
4. 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: 235-48.
5. Nordberg J, Arner E. Reactive oxygen species, antioxidant, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1287-312.
6. Mates JM, Perez-Gomez C, Decastro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
7. Oruc EO, Usta D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007; 23: 48-55.

- 131-40.
22. Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 1982; 257: 5751-4.
23. Jafari M. Dose- and time-dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat. *Toxicol* 2007; 231: 30-9.
24. 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.
25. Durmaz H, Sevgiler Y, Uner N. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. *Pes Biochem Physiol* 2006; 84: 215-26.
17. Satoh K. Serum lipid peroxidation in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 37-43.
18. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of hematology, In: Tietz textbook of clinical chemistry, edited by Burtis CA, Ashwood ER. 2nd ed. Saunders: Philadelphia; 1994. P. 1990-1.
19. Shadnia S, Azizi E, Hosseini R, Khoei S, Fouladdel S, Pajoumand A, Jalali N, Abdollahi M. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum Exp Toxicol* 2005; 24: 439-45.
20. Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin Chim Acta* 2001; 310: 107-12/11
21. Goel A, Dani V, Dhawan DK. Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 2005; 156:

