

تأثیر پاراکسون بر سیستم آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدهای بافت کبد موش صحرائی

منصوره حاجی‌غلامعلی (MSc)^{۱*} - دکتر مهوش جعفری (Ph D)^۱ - دکتر علیرضا عسگری (Ph D)^۱ - دکتر رضا حاجی حسینی (Ph D)^۲ - مریم عباس نژاد (MSc)^۲ - مریم صالحی (MSc)^۲ - محمد سلیمان (MSc)^۱

* نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات شیمیایی

پست الکترونیک: jafari@bmsu.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۵

چکیده

مقدمه: آثار سمی برخی از ارگانوفسفاتها از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در سیستم‌های آنتی‌اکسیدان بدن است. پاراکسون متابولیت فعال پاراتیون است. **هدف:** ارزیابی تأثیر پاراکسون بر سیستم آنتی‌اکسیدان کبد موش صحرائی. **مواد و روش‌ها:** موش‌های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی در ۴ گروه قرار گرفتند: گروه کنترل (حلال دیازینون) و سه گروه آزمایش که دوزهای مختلف پاراکسون (۰/۳، ۰/۷ و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت پس از تزریق، حیوانات با اتر بی‌هوش و بافت کبد خارج شد. بعد از هموزنه کردن بافت کبد، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتایون S - ترانسفراز (GSH) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) و همچنین غلظت گلوکاتایون (GSH) و مالون دی‌آلدید (MDA) توسط روش‌های بیوشیمیایی تعیین شد. **نتایج:** پاراکسون فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و LDH و میزان MDA را در دوزهای بالاتر از ۰/۳ mg/kg افزایش می‌دهد، در حالی که غلظت GSH را در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌دار کاهش داد. فعالیت GST به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) در دوزهای ۰/۳ و ۰/۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن پاراکسون افزایش و در دوز ۱ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. **نتیجه‌گیری:** پاراکسون احتمالاً باعث القای تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو وابسته به دوز می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ناشی از افزایش ظرفیت سم‌زدایی بافت کبد است. کاهش GSH نشان‌دهنده نارسایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان برای مقابله با رادیکال‌های آزاد است و افزایش MDA با پراکسیداسیون غشای کبد همراه است.

کلید واژه‌ها: آنتی‌اکسیدان‌ها / پاراکسون / پراکسیداسیون لیپید / کبد / موش صحرائی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره نوزدهم شماره ۷۵، صفحات: ۱۰-۱

مقدمه

ارگانوفسفاتها ترکیبات شیمیایی است که در کشاورزی، صنعت، باغبانی، دامپزشکی و منازل استفاده می‌شوند (۱ و ۲). در ایران این ترکیبات به عنوان سومین علت مسمومیت و علت اصلی مرگ و میر ناشی از مسمومیت گزارش شده است (۳). این ترکیبات به صورت برگشت‌ناپذیر باعث فسفریله شدن سرین موجود در جایگاه فعال آنزیم کولین استراز می‌شود. با مهار این آنزیم و تجمع استیل‌کولین، یک بحران کولی‌نرژیک ایجاد می‌گردد (۱ و ۲). پاراکسون متابولیت فعال حشره‌کش پاراتیون و یکی از سمی‌ترین آفت‌کش‌ها است. شدت مسمومیت حاد این ارگانوفسفاتها نسبت به سایر عوامل دارای اهمیت است و با وجود ممنوعیت استفاده از این

ارگانوفسفاتها ترکیبات شیمیایی است که در کشاورزی، صنعت، باغبانی، دامپزشکی و منازل استفاده می‌شوند (۱ و ۲). در ایران این ترکیبات به عنوان سومین علت مسمومیت و علت اصلی مرگ و میر ناشی از مسمومیت گزارش شده است (۳). این ترکیبات به صورت برگشت‌ناپذیر باعث فسفریله شدن سرین موجود در جایگاه فعال آنزیم کولین استراز می‌شود. با مهار این آنزیم و تجمع استیل‌کولین، یک بحران کولی‌نرژیک ایجاد می‌گردد (۱ و ۲). پاراکسون متابولیت فعال حشره‌کش پاراتیون و یکی از سمی‌ترین آفت‌کش‌ها است. شدت مسمومیت حاد این ارگانوفسفاتها نسبت به سایر عوامل دارای اهمیت است و با وجود ممنوعیت استفاده از این

سولفوسالسیلیک (SSA)، گلوکاتینون، ریبوفلاوین و سایر مواد شیمیایی با درجه خلوص بالا از شرکت مرک (Merk) و سیگمای (Sigma) آلمان خریداری شد. اتیل پاراکسون (خلوص ۹۹ درصد) از شرکت سیگما خریداری شد. محلول ذخیره آن با غلظت ۴mg/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 روی موش‌های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم انجام شد. حیوانات در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) 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 شد.

تیمار حیوانات: موش‌های صحرایی به صورت تصادفی در ۴ گروه (در هر گروه ۷ سر) تقسیم شدند: گروه کنترل روغن ذرت را به عنوان حلال پاراکسون و سه گروه آزمایش که پاراکسون را در دوزهای ۰/۳، ۰/۷ و ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. ۲۴ ساعت پس از تزریق، موش‌ها با اتر بیهوش و بافت کبد خارج و به نیتروژن مایع انتقال داده شد. در روز آزمایش، بافت‌های منجمد شده به دقت توزین و با نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین همورنه شد. پس از آن نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰g در ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. از محلول رویی برای سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی مورد نظر استفاده شد.

سنجش میزان پروتیین: برای اندازه‌گیری پروتیین، حجم مناسبی از بافت همورنه را به حجم ۱ml رسانده و ۳ml از محلول برادفورد (حاوی کوماسی بریلیانت بلو در اتانول و اسیدفسفریک) به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب قرائت شد و غلظت پروتیین نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد پروتیین با استفاده از محلول ۱mg/ml آلبومین سرم گاوی (BSA) محاسبه شد (۱۶).
سنجش فعالیت SOD: فعالیت SOD بر پایه قدرت سوپراکسید دیسموتاز در مهار احیاء نیتروبلوترازولیوم به وسیله یون سوپراکسید انجام گرفت (۱۷). به حجم مناسبی از

تفاوت‌های بارزی با یکدیگر دارند و باید هر یک از این ترکیبات را جداگانه بررسی کرد.

در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیند سبب القای استرس اکسیداتیو و بروز تغییرات پاتولوژی در سطح ماکرومولکول‌های سلولی می‌شود (۸). آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی نظیر گلوکاتینون، سیستم‌های اصلی دفاع بدن در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد است (۹ و ۱۰). خصوصیت مهم آنزیم SOD و CAT قابل القا بودن آنها تحت شرایط استرس اکسیداتیو است (۱۱). این دو برای زنده ماندن سلول، حتی در شرایط طبیعی ضروری است (۸).

مطالعات نشان می‌دهد که ارگانوفسفات‌ها با تولید رادیکال‌های آزاد باعث تغییر در سیستم‌های آنتی‌اکسیدان سلول و پراکسیداسیون لیپیدی غشاء می‌شوند (۳، ۱۲ و ۱۳). تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در اثر تجویز خوراکی مالاتیون به موش صحرایی، در اریتروسیت، بزاق و پلاسما گزارش شده است (۳ و ۱۴). نتایج مشابهی با مطالعه اثر لیندان بر قلب موش صحرایی به دست آمده است (۱۵). از طرف دیگر، با مطالعه اثر کلرپیریفوس و سپرترین بر کبد موش کوچک آزمایشگاهی، افزایش غلظت‌های سرمی شاخص‌های عملکرد کبدی و تغییر در شاخص‌های آنتی‌اکسیدان گزارش شده است (۱۳). تفاوت در نوع ترکیب و گونه مورد بررسی، دوز و زمان مواجهه وجه تمایز مطالعات مختلف است. در این مطالعه، اثر تجویز حاد پاراکسون بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و لیپید پراکسیداسیون در بافت کبد موش صحرایی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: مواد مورد نیاز شامل آلبومین سرم گاوی (BSA)، اسید تری کلرواستیک (TCA)، نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NADH)، اسید تیوباربتوریک (TBA)، تترائوکسی پروپان، ۱-کلرو-۲،۴-دی‌نیتروبنزن (CDNB)، دی‌تیوبیس نیتروبنزویک اسید (DTNB)، اسید

اضافه شد. سپس با اضافه کردن معرف DTNB ۰/۰۴ درصد در سیترات سدیم ۱ درصد واکنش شروع شد. تغییرات جذب در ۴۱۲ نانومتر طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوکاتایون ۱mg/ml منحنی استاندارد رسم و غلظت گلوکاتایون نمونه‌ها محاسبه شد (۲۰).

سنجش غلظت MDA: برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها (MDA)، به حجم مناسبی از بافت هموژنه، TCA ده درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریژ شد. بعد از جدا کردن مایع رویی، تیوباریتوریک اسید ۰/۶۷ درصد اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار گرفت. سپس n-بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتیفریژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد مالون‌دی‌آلدید با استفاده از ۱ و ۳ و ۳ تراآتوکسی پروپان رسم شد و از روی آن میزان غلظت MDA بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (۲۱).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار INSTAT به صورت آزمون آنالیز واریانس یک طرفه به همراه تست Tukey انجام شد. $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد و نتایج بصورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ بیان شد.

نتایج

اثر غلظت‌های مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم SOD کبد در شکل ۱ نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم به‌طور معنی‌دار در دوزهای بالاتر از ۰/۳mg/kg در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. همچنین افزایش فعالیت آنزیم SOD در دوز ۰/۷mg/kg کبد موش صحرائی در مقایسه با دوز ۰/۳mg/kg معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$).

اثر غلظت‌های مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم CAT کبد در شکل ۲ نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم به‌طور معنی‌دار در سه دوز در مقایسه با گروه کنترل افزایش یابد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم CAT در دوز ۱mg/kg کبد موش صحرائی در مقایسه با دوزهای ۰/۳ ($P < ۰/۰۰۱$) و ۰/۷ ($P < ۰/۰۵$) میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن معنی‌دار است.

بافت هموژنه، EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار و NBT ۱/۵ میلی‌مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس ریپوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار با $\text{pH} = ۷/۸$ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. جذب طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: به حجم معینی از بافت هموژنه اتانول مطلق (۰/۰۱ml/ml) اضافه و به مدت نیم‌ساعت در یخ انکوبه شد. سپس به آن تریتون X-۱۰۰ ده‌درصد با غلظت نهایی یک درصد اضافه شد. این محلول برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. واکنش با اضافه کردن H_2O_2 ۳۰ میلی‌مولار به حجم مناسبی از بافت هموژنه در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = ۷$ شروع شد. سپس جذب در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد (۱۸). فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم GST: یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار $\text{pH} = ۷/۴$ شامل EDTA یک میلی‌مولار، GSH ۲۰ میلی‌مولار و CDNB ۲۰ میلی‌مولار است. واکنش با اضافه کردن حجم معینی از بافت هموژنه شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد (۱۹). فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم LDH: میزان LDH توسط کیت پارس آزمون صورت گرفت. اساس این اندازه‌گیری بر پایه احیای پیرووات به لاکتات است که در حضور NADH_2 صورت می‌گیرد. جذب نمونه‌ها طی ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

سنجش غلظت GSH: غلظت مناسبی از نمونه هموژنه با اسیدسولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط شد. نمونه در ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰g سانتیفریژ شد. حجم مناسبی از محلول فوقانی به بافر دی‌سدیم فسفات ۰/۳ مولار

دوزهای بالاتر از ۰/۳mg/kg در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. همچنین افزایش فعالیت آنزیم LDH در دوز ۰/۷mg/kg کبد موش صحرائی در مقایسه با دوز ۰/۳mg/kg معنی دار بود ($P < 0/05$).

بررسی اثر پاراکسون بر غلظت GSH و MDA در جدول ۱ نشان می‌دهد که کاهش غلظت GSH و افزایش غلظت MDA در دوزهای بالاتر از ۰/۳mg/kg کبد موش صحرائی در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود.

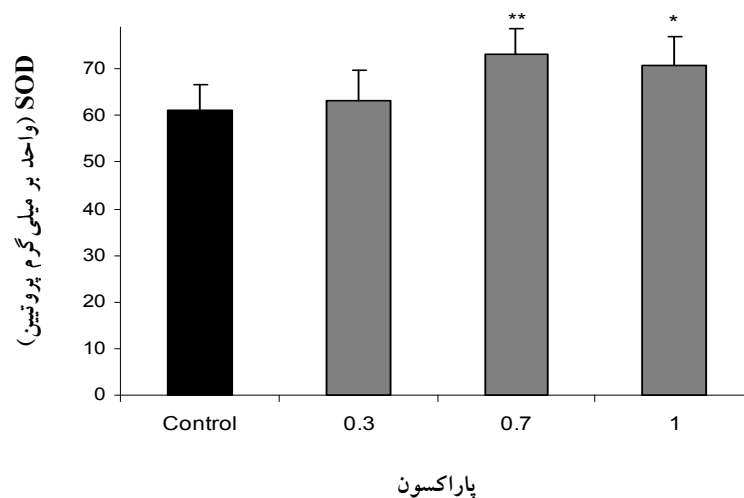
اثر غلظت‌های مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم GST کبد در شکل ۳ نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم به‌طور معنی‌دار در دوز ۰/۷mg/kg در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته، در حالی‌که در دوز ۱mg/kg کاهش می‌یابد. همچنین تغییرات فعالیت آنزیم GST در دوز ۱mg/kg کبد موش صحرائی در مقایسه با دوز ۰/۳ و ۰/۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن معنی‌دار ($P < 0/001$) F,N.

اثر غلظت‌های مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم LDH کبد در شکل ۴ نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم به‌طور معنی‌دار در

جدول ۱: اثر دوزهای مختلف پاراکسون بر غلظت گلوکوتایون و مالون‌دی‌آلدید کبد موش صحرائی بعد از ۲۴ ساعت.

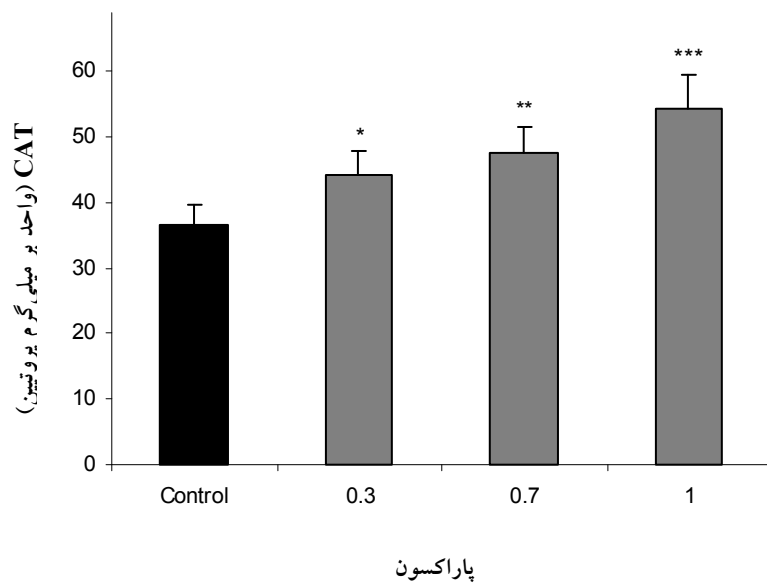
پاراکسون (mg/kg)			کنترل	شاخص (nmol/mg protein)
۱	۰/۷	۰/۳		
۸۷/۰۱۵±۸/۹۵۴*	۸۹/۲۱±۵/۴۸۷*	۹۷/۵۵۱±۸/۰۸۷	۱۰۳/۶۶۵±۹/۵۸۵	GSH
۹/۱۵۵±۰/۹۳۶**	۸/۶۴۱±۱/۰۸۱*	۸/۲۰۵±۰/۹۹۸	۶/۴۴۵±۱/۱۹۷	MDA

* $P < 0/05$ و ** $P < 0/01$ نسبت به گروه کنترل معنی دار است.

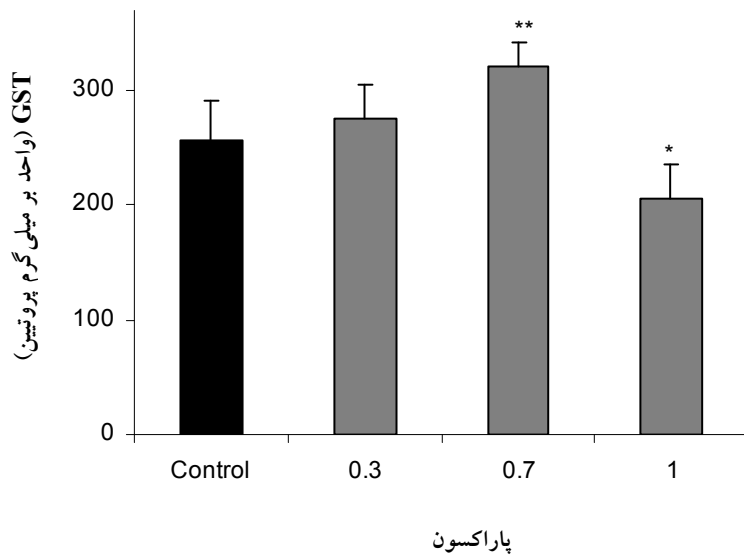


شکل ۱: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کبد در حضور غلظت‌های مختلف پاراکسون (mg/kg) بعد از ۲۴ ساعت.

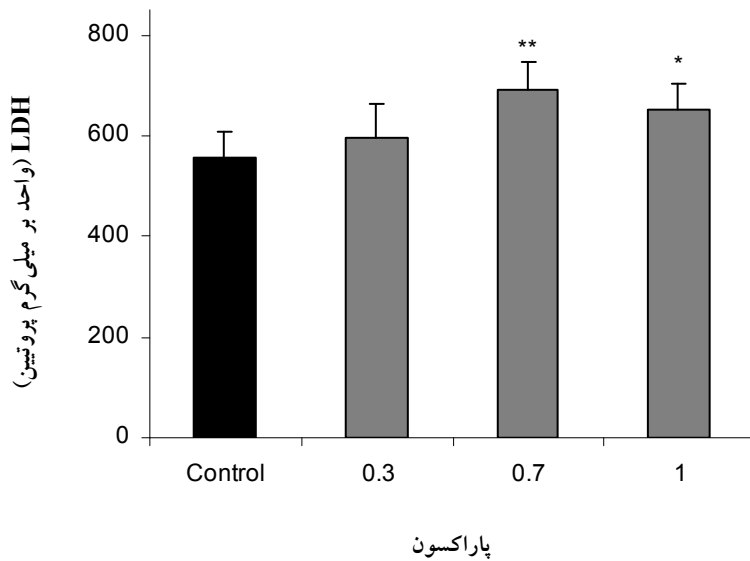
* $P < 0/05$ و ** $P < 0/01$



شکل ۲: فعالیت آنزیم کاتالاز کبد در حضور غلظت‌های مختلف پاراکسون (mg/kg) بعد از ۲۴ ساعت. $P < 0.001$ *** و $P < 0.01$ **, $P < 0.05$ *



شکل ۳: فعالیت آنزیم GST کبد در حضور غلظت‌های مختلف پاراکسون (mg/kg) بعد از ۲۴ ساعت. $P < 0.01$ ** و $P < 0.05$ *



شکل ۴: فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز کبد در حضور غلظت‌های مختلف پاراکسون (mg/kg) بعد از ۲۴ ساعت. $P < 0.01$ ** و $P < 0.05$ *

بحث و نتیجه گیری

مطالعات Altuntas (۲۴) و Buyukokuroglu (۲۵)، افزایش فعالیت SOD را طی مسمومیت با دیازینون و فن تیون نشان دادند. مطالعات Monterio و همکاران نشان داد که متیل پاراتیون یا فولی سوپر باعث تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم SOD و CAT کبد و ماهیچه ماهی می‌شود (۲۶ و ۲۷). مطالعات Akturk و همکاران نشان داد که مصرف دیازینون توسط موش صحرایی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت قلب و گلبول قرمز می‌شود (۲۸). مطالعات غنی و همکاران نشان داد که مصرف پاراکسون بصورت داخل صفاقی بعد از ۴ ساعت در موش صحرایی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت مغز می‌شود (۲۹). مطالعات Isik و همکاران نشان دادند که تجویز دیازینون و متیل پاراتیون به ماهی بعد از ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD در کبد و ریه می‌شود (۳۰). از طرف دیگر در بعضی از مطالعات به دنبال تجویز ترکیبات آفت‌کش، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گزارش شده است. Khan و همکاران با مطالعه اثر کلریپریفوس و سیپرترین (تجویز به مدت ۲ هفته) بر کبد موش آزمایشگاهی، کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT را گزارش نمودند (۱۳). ارگانوفسفوره فوزالون در دوز بالا باعث کاهش

کبد اولین اندام مهم برای جذب و متابولیسم مواد شیمیایی و آگزورنی مختلف و سموم است. آسیب سلولی ناشی از پاراکسون که دنبال افزایش رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود، سبب فعال شدن سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانتی می‌شود. یکی از این سیستم‌ها که قادر به پاکسازی رادیکال‌های آزاد است، آنزیم‌های SOD و CAT است (۹ و ۱۰). آنزیم SOD یک متالوآنزیم است که سطح رادیکال سوپراکسید را پایین نگه می‌دارد و باعث تبدیل رادیکال سوپراکسید به H_2O_2 می‌شود و آنزیم CAT باعث خنثی شدن H_2O_2 و تبدیل آن به H_2O و O_2 می‌شود (۹ و ۲۲). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز پاراکسون بصورت حاد باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT کبد می‌شود. افزایش فعالیت SOD باعث کاهش رادیکال سوپراکسید و افزایش H_2O_2 در بافت کبد می‌گردد و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز باعث خنثی شدن H_2O_2 تولید شده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که ارگانوفسفوره‌های فسفومیدون، تری‌کلروفون و دی‌کلرووس سبب مهار فعالیت SOD می‌شود (۲۳). Sharma و همکاران نشان دادند تجویز خوراکی دی‌متوات به موش صحرایی موجب افزایش وابسته به دوز در فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT مغز و کبد می‌شود (۱۲).

تکامل و کاهش مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو شود (۴۳ و ۱۰،۹). مطالعه ما نشان می‌دهد که تجویز پاراکسون در دوزهای بالاتر از ۰/۳mg/kg موجب کاهش غلظت گلوکاتایون در بافت کبد می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که تجویز آندوسولفان (۴۴)، فن‌تیون (۴۵)، سیپرترین و مالاتیون توسط موش صحرایی (۱۳) و مصرف دیازینون و متیل پاراتیون توسط ماهی (۲۷ و ۳۰) موجب کاهش گلوکاتایون کبد می‌شود.

MDA به‌عنوان نشانگر استرس اکسیداتیو، آخرین محصول تجزیه لیپیدها است. افزایش سطح MDA نشان‌دهنده افزایش آسیب غشای سلولی است (۴۶). در مطالعه ما تجویز پاراکسون در دوزهای بالاتر از ۰/۳mg/kg به‌طور معنی‌دار باعث افزایش غلظت MDA شد که منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که تجویز خوراکی دی‌متوات، متیل‌پاراتیون و مالاتیون به موش صحرایی موجب تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در اریتروسیت می‌شود (۱۴ و ۴۷). به‌علاوه با مطالعه اثر دیازینون بر بافت‌های مختلف ماهی در بعضی بافت‌ها، افزایش MDA (آبشش، ماهیچه و لوله گوارش) و در بعضی عدم تغییر (کلیه) مشاهده شده است (۴۸).

در مجموع بر اساس یافته‌های مطالعه ما می‌توان گفت که اثر پاراکسون روی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت کبد در یک طرح وابسته به دوز است. افزایش فعالیت آنزیم‌ها احتمالاً ناشی از افزایش ظرفیت سم‌زدایی بافت کبد است. کاهش GSH نشان‌دهنده نارسایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت برای مقابله با ROS است و افزایش MDA با پراکسیداسیون غشای کبد همراه است که نشان‌دهنده آسیب اکسیداتیو بافت کبد است.

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

فعالیت SOD می‌شود (۳۱). مطالعات Tuzmen و همکاران و Yousef و همکاران نشان دادند که پس از مواجهه با دوزهای متفاوت دلتامترین کاهش در فعالیت SOD مشاهده می‌شود (۳۲ و ۳۳). علت اختلاف مطالعات در فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدان احتمالاً ناشی از نوع، ترکیب، گونه مورد مطالعه، بافت مورد بررسی، دوز و زمان مواجهه است.

در این مطالعه میزان LDH کبد با افزایش دوز مواجهه با پاراکسون در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌یابد. غلظت این آنزیم با میزان مرگ سلولی و لیز شدن سلول‌ها رابطه مستقیم دارد (۳۴). در مطالعات حیوانی نیز افزایش فعالیت LDH پس از مسمومیت با سیپرترین (۳۵)، دیازینون (۳۶)، لیندون (۳۷) و کلرپیریفوس (۳۸) مشاهده شده است، در حالی‌که تجویز آندوسولفان به ماهی، موجب کاهش فعالیت LDH کبد و عضله اسکلتی می‌شود (۳۹). نتایج مختلف می‌تواند ناشی از اختلاف در غلظت سم مورد استفاده، نوع بافت و حتی ایزوآنزیم‌های خاص LDH باشد.

آنزیم GST با استفاده از GSH سبب افزایش حلالیت و دفع طیف وسیعی از سموم و ترکیبات الکتروفیل از سلول می‌گردد. بنابراین نقش مهمی در محافظت بافت‌ها بر علیه آسیب و استرس اکسیداتیو دارد. افزایش GST در اثر تزریق پاراکسون نشان‌دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل این سم و دفع سریع‌تر آن است (۴۰). اثر غلظت‌های مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم GST کبد نشان می‌دهد که افزایش فعالیت آنزیم در دوز ۰/۷mg/kg و کاهش آن در دوز ۱mg/kg معنی‌دار است. مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهد که به‌دنبال تجویز بعضی از ارگانوفسفره‌ها، فعالیت GST بدون تغییر (۴۱) یا افزایش (۲۶ و ۲۷) یا کاهش فعالیت (۴۲) را نشان می‌دهد. معمولاً دوزهای کم سموم منجر به افزایش و دوزهای بالای آن باعث مهار فعالیت آنزیم‌ها می‌شود.

گلوکاتایون می‌تواند به‌طور مستقیم یا به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌های گلوکاتایون پراکسیداز و گلوکاتایون S-ترانسفراز در سم‌زدایی پراکسیدهدروژن، لیپیدهدروپراکسیدها و ترکیبات الکتروفیلی شرکت نماید. تخلیه گلوکاتایون ممکن است منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب به DNA، توقف

1. Senanayak N, Johnson R. Acute Polyneuropathy after Poisoning by a new Organophosphate Insecticide. *N Engle J Med* 1992; 302:155_157.
2. Zhang CH, Malhorta SV. Increased Paraoxon Detection by Acetylcholin Esterase Inactivation with Ionic liquid Additives. *Talanta* 2005; 67:560_563.
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. Storm JE, Rozmank K, Doull J. Occupational Exposure Limits for 30 Organophosphate Pesticides Based on Inhibition of Red Blood Cell Acetylcholinesterase. *Toxicol* 2000; 150:1_29.
5. Hoffman U, Papendorf T. Organophosphate Poisonings with Parathion and Dimethoate. *Intensive Care Med* 2006; 32:464_468.
6. NTI Country Overview. South Africa, Chemical Capabilities: Paraoxon, Wikipedia the free encyclopedia, 2010 June 5. Available From URL: <http://www.nti.org/eresearch/profiles/SAfrica/Chemical/24403598.html>.
7. Saulsbury MD, Heyliger SO, Wang K, et al. Chlorpyrifos Induces Oxidative Stress in Oligodendrocyte Progenitor Cells. *Toxicology* 2009; 259: 1_9.
8. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-Glutathione Peroxidase, Catalase and Cu/Zn-SOD for Cell Cervical Against Oxidative Stress. *Free Radical Biol Med* 1994; 17:235_48.
9. Nordberg J, Arner E. Reactive Oxygen Species, Antioxidant, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Boilological Medicine* 2001; 31: 1287_1312.
10. Mates JM, Perez-Gomez C, Decastro IN. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry* 1999; 32: 595_603.
11. Oruc EO, Usta D. Evaluation of Oxidative Stress Responses and Neurotoxicity Potential of Diazinon in Different Tissues of Cyprinus Carpio. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2007; 23:48_55.
12. Sharma Y, Basher S, Irshad M, Nag TC, Dogra TD. Dimethoate- Induced Effects on Antioxidant Status of Liver and Brain of Rats Following Subchronic Exposure. *Toxicology* 2005; 215:173_181.
13. Khan SM, Sobti RC, Katarial. Pesticide - Induced Alteration in Mice Hepato-Oxidative Status and Protective Effects ofB lack Tea Extract *Chimica Acta* 2005; 358:131_138.
14. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective Effect of Vitamine E in Climethoate and Malathion Induced Oxidative Stress in Rat Erythrocytes. *J Nut Biochem* 2001; 12:500_504.
15. Ananya R, Subeena S, Kumar DA, Kumar D.T, Kumar MS. Oxidative Stress and Histopathological Changes in the Heart Following Oral Lindane (Gamma Hexachlorohexane) Administration in Rats. *Med Sci Monit* 2005; 11: 325_329.
16. Bradford MM. A Rapid and SensitiveM ethod for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248_254.
17. Winterbourn C, Hawkins R, Brian M, Carrell R. the Estimation of Red Cell Superoxide Dismutase Activity. *J Lab Clin Med* 1975; 85: 337.
18. Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121_126.
19. Habig WT, Jakoby WB. Glutathion S-Transferas (Rat and Human). *Method Enzymology* 1981; 77:218_231.
20. Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd Edition. Philadelphia; WB. Saunders, 1990_1.
21. Satoh K. Serum Lipid Peroxidation in Cerebrovascular Disorders Determined by a New Colorimetric Method. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 37_43.
22. Fridovich I. Superoxide Dismotase. *J Biol Chem* 1989; 264: 7761_7764.
23. Naqvi SM, Hasan M. Acetylhomocystein Thiolactone Protection Against Phosphamidon-Induced Alteration of Regional Superoxide Dismutase Activity in the Central Nervous System and its Correlation With Altered Lipid Peroxidation. *Indian Journal of Experimental Biology* 1992; 30: 850_852.
24. Altuntas L, Kilinc L, Orhan O, Demiral R. The Effect of Diazinon on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Erythrocytes in Vitro. *Human Experimental Toxicology* 2004; 23(1): 9_13.
25. Buyukokuroglu ME, Cemek M, Yurumez Y. Antioxidative Role of Melatonin in Organophosphate Toxicity in Rats. *Cell Biology and Toxicology* 2008; 24: 151_158.
26. Monterio DM, Almeida JA, Rantin F T, Kalinin AL. Oxidative Stress Biomarkers in the Freshwater Characid Fish, Brycon Cephalus, Exposed to Organophosphorus Insecticide Folisuper 600 (Methyl Parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology* 2006; 143: 140_149.
27. Monterio DM, Rantin FT, Kalinin AL. The Effects of Selenium on Oxidative Stress Biomarkers in the Freshwater Characid Fish Matrinx, Brycon Cephalus Exposed to Organophosphate Insecticide Folisuper 600

- br® (Methyl Parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology* 2009; 149: 40_49
28. Akturk O, Demirin H, Sutcu R, Yilmaz N, Koylu 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_461.
29. Ghani E, Mohammadi M, Jafari M, et al. Evaluation of Oxidative Stress Index in Brain Tissue of Rats after Expose to Paraoxon. *Kowsar Med J* 2008; 1: 1_8 [Text In Persian].
30. Isik I, Celik I. 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
31. Altuntas I, Delibas N, Doguc D, Ozmen S. Role of Reactive Oxygen Species in Organophosphate Insecticide Phosalone Toxicity in Erythrocytes in Vitro. *Toxicology in Vitro* 2003; 17: 153_157.
32. Tuzmen N, Candan N, Kays E, Demiryas N. Biochemical Effects of Chlorpyrifos and Deltamethrin on Altered Antioxidative Defense Mechanisms and Lipid Peroxidation in Rat Liver. *Cell Biochemical Function* 2008; 26: 119_124.
33. Yousef MI, Awad TI, Mohamed ETI. Deltamethrin, Induced Oxidative Damage and Biochemical Alterations in Rat and its Attenuation by Vitamin E. *Toxicology* 2006; 27: 240_247.
34. Agrahari SH, Pandey KC, Gopal K. Biochemical Alteration Induced by Monocrotophos in the Blood Plasma of Fish, *Channa Punctatus* (Bloch). *Pes Biochem Physiol* 2007; 88: 268_72.
35. Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, Das S. Repeated Dose Toxicity of Alfa-Cypermethrin in Rats. *J Vet Sci* 2004; 5: 241_5.
36. Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarciki M, et al. Diazinon On-Induced Hepatotoxicity and Protective Effect of Vitamin E on Some Biochemical Indices and Ultrastructural Changes. *Toxicology* 2005; 211: 197_206.
37. Etim OE, Farombi EO, Ushoh IF, et al. The Protective Effect of Aloe Vera Juice on Lindane Induced Hepatotoxicity and Genotoxicity. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science* 2006; 19: 337_40.
38. Ncibis, Ben Othman M, Akacha A. *Opuntia Ficus Indica* Extract Protects Against Chlorpyrifos-Induced Damage on Mice Liver. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 797_802.
39. Mishra R, Shukla SP. Endosulfan Mediated Effects on Lactate Dehydrogenase from the Catfish. *Toxicol Lett* 1998; 95:145.
40. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S – Transferases. *J Biol Chem* 1984; 249: 7130_7139.
41. Oruc E, Uner N. Combined Effects of 2, 4 -d and Azinphosmethyl on Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Liver of *Oreochromis Niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2002; 127: 291_296.
42. Giordano G, Afsharinejad Z, Guizzetti M, et al. Organophosphorus Insecticides Chlorpyrifos and Diazinon and Oxidative Stress in Neuronal Cells in a Genetic Model of Glutathione Deficiency. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 219: 181_189.
43. 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_586.
44. Dorval J, Hontela A. Role of Glutathione Redox cycle and Catalase in Defense Against Oxidative Stress Induced by Endosulfan in Adrenocortical Cells of Rainbow Trout. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2003; 192: 191_200.
45. Buyukokuroglu M, Cemek M, Tosun M. Dantrolene May Prevent Organophosphate-Induced Oxidative Stress and Muscle Injury. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2008; 92: 156_163.
46. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. Molecular Biomarkers of Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Toxic Environmental Pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2006; 64: 178_189.
47. Celik I, Suzek H. Subacute Effects of Methyl Parathion on Antioxidant Defense Systems and Lipid Peroxidation in Rats. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 2796_2801.
48. Durmaz H, Sevgiler Y, Uner N. Tissue-specific Antioxidative and Neurotoxic Responses to Diazinon in *Oreochromis Niloticus*. *Pes Biochem Physiol* 2006; 84: 215_226.

Effect of Paraoxon on Antioxidant System and Lipid Peroxidation in Liver of Rat

Hajigholamali M.(MSc)^{1,2} - *Jafari M.(Ph D)¹- Asgari A.R.(Ph D)¹- Haji Hossaini R.(Ph D)²- Abasnejad M.(MSc)²- Salehi M.(MSc)³ -Salimian M.(MSc)¹

*Corresponding Address: Chemical Injuries Research Center - Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: jafari@bmsu.ac.ir

Received: 1/Nov/2009 Accepted : 5/May/2010

Abstract

Introduction: The toxic effects of some organophosphate pesticides (OPs) which are capable to produce free radicals and induce disturbance in body antioxidant systems. Paraoxon is an OP that is the active form parathion.

Objective: To evaluate the effect of paraoxon on liver antioxidant system of rat.

Materials and Methods: Wister rats were randomly divided into four groups including: control (paraoxon solvent), and three groups receiving different doses of paraoxon (0.3, 0.7 and 1 mg/kg) by intraperitoneal injection. Animal were anesthetized and liver tissue removed 24 hours after injection. After hemogenation of liver tissue 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: Paraoxon increased CAT, LDH and SOD activities and MDA level at doses higher than 0.3 mg/kg while GSH level was decreased significantly, as compare with the control group. GST activity was increased significantly at 0.3 and 0.7 mg/kg concentration ($P<0.05$), but at 1 mg/kg concentration was decreased as compare with the control group.

Conclusion: Probably Paraoxon induced the production of free radicals and oxidative stress in a dose- dependent manner. The enhanced activity of antioxidant enzymes of liver is due to increase the detoxification capacity. Decrease of tissue GSH content indicatives of oxidative tissue injury and the increase of MDA level indicatives per oxidation that occurs in membranes of liver.

Key word: Antioxidants / Lipid per oxidation / Liver/ Paraoxon / Rats

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 75, Pages:1- 10