

Effect of Gallic Acid on Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Diazinon in Vitro and in Vivo

Farzaneh Sadat Motafeghi¹,
Mohammad Ali Ebrahimzadeh²,
Pegah Karbalaee³,
Hamidreza Mohammadi⁴

¹ PhD Student in Toxicology, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Pharmaceutical Chemistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Doctor of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar International Unit, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received January 22, 2020 ; Accepted August 2, 2020)

Abstract

Background and purpose: Diazinon is an organophosphate insecticide that binds to the acetylcholinesterase enzyme after metabolization causing its inactivation. Galic acid is a polyphenolic compound with nucleophilic properties. The aim of this study was to investigate the effects of gallic acid on reactivation of acetylcholine and butyrylcholinesterase inhibited by diazinon in mice and human serum and erythrocytes.

Materials and methods: The animals were divided into seven groups, including a control group that received corn oil as a solvent and other groups that received diazinon (80 mg/kg), atropine (20 mg/kg), and pralidoxime (20 mg/kg). Gallic acid was injected intraperitoneally at 50, 100, and 200 mg/kg. Cholinesterase levels (acetylcholine and butyrylcholinesterase) were evaluated after 3 and 24 h of intoxication in mice serum and erythrocytes. In addition, in vitro studies were done in human serum and RBCs.

Results: Activities of cholinesterase in serum and erythrocytes significantly decreased after 3 and 24 hours of poisoning in diazinon-treated group compared to control group in vivo and in vitro. Co-treatment with atropine and gallic acid (at all doses) significantly increased cholinesterase activity compared to the diazinon group in vitro and in vivo ($P < 0.0001$).

Conclusion: Combination therapy with gallic acid (at different doses) and atropine reduced inhibition of cholinesterase activity caused by diazinon and improved its reactivation. Gallic acid reactivates cholinesterase activity which might be due to hydroxyl groups in its compounds.

Keywords: Cholinesterase, diazinon, gallic acid, atropine

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (189): 1-13 (Persian).

* Corresponding Author: Hamidreza Mohammadi - Pharmaceutical Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: hmohammadi@farabi.tums.ac.ir)

بررسی تاثیر گالیک اسید بر فعالسازی مجدد آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز مهار شده با سم دیازینون: مطالعه درون تنی و برون تنی

فرزانه السادات متفقی^۱

محمدعلی ابراهیم زاده^۲

پگاه کربلایی^۳

حمید رضا محمدی^۴

چکیده

سابقه و هدف: دیازینون یک حشره کش ارگانوفسفره است که بعد از متابولیزه شدن به آنزیم استیل کولین استراز متصل شده و آن را غیر فعال می نماید. گالیک اسید یک ترکیب پلی فنولی است و دارای خاصیت نوکلئوفیل می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر گالیک اسید بر فعالسازی مجدد آنزیم استیل کولین و بوتیریل کولین استراز مهار شده با سم دیازینون در موش سوری و گلبول قرمز انسانی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه موش ها به گروه های کنترل، دیازینون (۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، آتروپین (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، پرالیدوکسیم (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و گالیک اسید (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. میزان فعالیت آنزیم کولین استراز بعد از ۳ و ۲۴ ساعت در سرم و اریتروسیت موش ها و همچنین در مطالعه *In vitro* مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: میزان فعالیت آنزیم های کولین استراز در زمان های ۳ و ۲۴ ساعت در سرم و اریتروسیت در مطالعات *in vivo* و *in vitro* به صورت معنی داری در گروه های دریافت کننده دیازینون نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0/0001$)، در حالی که درمان همزمان آتروپین، پرالیدوکسیم و گالیک اسید به طور معنی داری باعث افزایش فعالیت آنزیم های کولین استرازی نسبت به گروه دیازینون شد ($P < 0/0001$).

استنتاج: تجویز همزمان آتروپین و گالیک اسید به همراه پرالیدوکسیم، مهار فعالیت آنزیم های کولین استرازی ناشی از دیازینون را کاهش و بازسازی آنزیم ها را نیز بهبود می بخشد. فعال سازی مجدد آنزیم ها توسط گالیک اسید می تواند ناشی از گروه های هیدروکسیل در ساختار این ترکیب باشد.

واژه های کلیدی: کولین استراز، دیازینون، گالیک اسید، آتروپین

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره ترکیبات آلی فسفردار مشتق از اسید فسفریک هستند (۲،۱) که به طور وسیع به عنوان آفت کش و حشره کش در کشاورزی و مکان های مختلف استفاده می شوند و جزو سمی ترین حشره کش ها محسوب

مؤلف مسئول: حمیدرضا محمدی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی E-mail: hmohammadi@farabi.tums.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری تخصصی (Ph.D) سم شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه شیمی دارویی، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دکتری داروسازی، واحد پردیس خودگردان رامسر، دانشکده علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

۴. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۸/۱۲/۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۵/۱۲

می‌گردند (۴،۳). دیازینون سم متوسط الایتری است (۵) که عوارض سوء کم‌تری نسبت به سایر ارگانوفسفرها دارد (۶). این ترکیب به سرعت در محیط تجزیه می‌شود اما از لحاظ بیولوژیکی تا حدود ۶ ماه به صورت فعال در خاک باقی می‌ماند (۷). متابولیت سمی دیازینون، دیازوکسون می‌باشد (۸،۶). سموم ارگانوفسفره به آنزیم کولین استراز متصل شده و آن را فسفریله می‌نمایند، در نتیجه آن، مهار آنزیم کولین استرازی و اختلال در روند تجزیه استیل کولین، تجمع بیش از حد این واسطه شیمیایی در پایانه‌های عصبی (پایانه عصبی - عضله، گانگلیون‌های اتونوم و سیستم اعصاب مرکزی) اتفاق می‌افتد (۱۰،۹). مهار آنزیم استیل کولین استراز به وسیله سموم ارگانوفسفره در ابتدا به وسیله پیوند یونی صورت می‌گیرد که در نهایت به سمت یک پیوند کووالان و غیرقابل برگشت پیشرفت می‌کند. این فرایند ۲۴-۴۸ ساعت زمان برده و به نام پدیده فرسودگی (Aging) معروف است. این دوره زمانی به عنوان یک فاصله زمانی بحرانی محسوب می‌گردد، زیرا در خلال این زمان، تجویز آنتی دوت موثر بوده و باعث برگشت فرایند مهار آنزیم می‌شود. زمانی که پدیده Aging تکمیل شود، امکان فعالیت مجدد آنزیم وجود ندارد. اگرچه زمان Aging معمولاً می‌تواند ۲۴-۴۸ ساعت طول بکشد و توسط سموم مختلف ارگانوفسفره این زمان متفاوت است (۱۱).

اسید گالیک (۳ و ۴ و ۵ تری هیدروکسی بنزوئیک اسید) یک ترکیب نوکلئوفیل و یکی از مهم‌ترین ترکیبات پلی فنولی در گیاهان و محصول هیدرولیز تانن‌ها می‌باشد که به وفور در میوه‌ها و مواد غذایی و در گیاهان مختلف مانند بلوط، چای سبز و سیاه، سماق، دانه انگور و سیب وجود دارد (۱۲). استر موجود در اسید گالیک با کاهش استرس اکسیداتیو از آسیب‌های سلولی جلوگیری می‌کند (۱۳). تحقیقات نشان داده که اسید گالیک دارای فعالیت‌های بیولوژیکی مانند فعالیت‌های ضد باکتری، ضد ویروسی، ضد التهابی، آنتی اکسیدان و اثرات ضد توموری است (۱۴). در صورت مسمومیت حاد با سموم

ارگانوفسفره، پرایدوکسیم پس از اتصال به سم ارگانوفسفره (البته وابسته به نوع سم) ترکیبی واسطه را به نام POX (Phosphorylated Oximes) را تولید می‌نماید که می‌تواند دوباره با آنزیم استیل کولین استراز واکنش داده و آن را مجدداً مهار کند. بنابراین احتمال واکنش سم ارگانوفسفره با ترکیباتی که به راحتی بتوانند گروه OH خود را (مانند سرین) در اختیار این ترکیب قرار بدهند وجود دارد (۱۵). با توجه به مکانیسم ترکیبات اکسیم‌ها (با خاصیت نوکلئوفیلیک)، گالیک اسید نیز احتمالاً دارای این خاصیت می‌باشد و احتمال می‌رود که بتواند به فعال سازی آنزیم مهار شده توسط سم ارگانوفسفره کمک نماید و باعث فعال شدن دوباره‌ی آنزیم استیل کولین استراز در گیر با ارگانوفسفره گردد (۱۶).

در این طرح پژوهشی سعی بر این است که اثر گالیک اسید به عنوان ترکیبی که احتمالاً بتواند با آنزیم مهار شده استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز (استراز کاذب) در خون و سرم توسط سم ارگانوفسفره دیازینون، واکنش داده و این آنزیم را دوباره فعال کند و همچنین مقایسه آن با داروی پرایدواکسیم (درمان استاندارد) مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، اسید گالیک (CAS Number: 149-91-7) شرکت‌های سیگما، پرایدوکسیم (CAS number: 6735-59-7) SERB Paris و سم دیازینون از شیمی کشاورز، کیت بوتیریل کولین استراز (شرکت زیست شیمی) و سایر مواد شیمیایی از شرکت‌های Merck و Sigma Aldrich خریداری شدند.

در این مطالعه از موش‌های سوری نر بالغ در ۶ گروه ۱۲ تایی با وزن تقریبی ۲۵-۳۰ گرم استفاده شد که از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه شدند و در شرایط مناسب در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری و همگی با دسترسی آزاد به آب و

غذا نگهداری شده و مطابق پروتکل دانشگاه مورد آزمایش قرار گرفتند.

مطالعه *in vivo*

بر اساس مطالعات صورت گرفته پیشین، گروه‌های مورد آزمایش شامل ۶ گروه و هر گروه حاوی ۱۲ عدد موش سوری به شرح زیر بودند:

۱. گروه کنترل (روغن ذرت)، ۲. گروه دریافت کننده دیازینون (80 mg/kg)، ۳. گروه دریافت کننده دیازینون + آتروپین (20 mg/kg) + پرایدوکسیم (20 mg/kg)، ۴. گروه دریافت کننده دیازینون + آتروپین (20 mg/kg) + گالیک اسید (50 mg/kg)، ۵. گروه دریافت کننده دیازینون + آتروپین (20 mg/kg) + گالیک اسید (100 mg/kg)، ۶. گروه دریافت کننده دیازینون + آتروپین (20 mg/kg) + گالیک اسید (200 mg/kg).

دیازینون، آتروپین، پرایدوکسیم و گالیک اسید از طریق داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از تزریق دیازینون، درمان‌ها شروع شدند که شامل اسید گالیک، پرایدوکسیم و آتروپین (درمان استاندارد) بود و بعد از ۳ و ۲۴ ساعت موش‌ها با اتر بیهوش شده و خونگیری انجام شد. نمونه‌های خونی به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کرده (5000 RPM) تا گلبول‌های قرمز و پلاسما جدا شد و بر روی هر کدام به صورت جداگانه، میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مورد بررسی قرار گرفت (۱۸، ۱۷).

مطالعه *in vitro*

۱۵ سی‌سی خون از پنج داوطلب سالم و غیرسیگاری که در ۶ ماه اخیر هیچگونه مواجهه‌ای با سموم ارگانوفسفره نداشته‌اند، دریافت شد. نمونه‌های خونی به ۵ گروه مجزای ۲ میلی‌لیتری تقسیم گردید. گروه‌ها شامل موارد زیر بود:

۱- گروه کنترل، ۲- گروه کنترل (روغن ذرت)، ۳- گروه دیازینون (۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ۴-

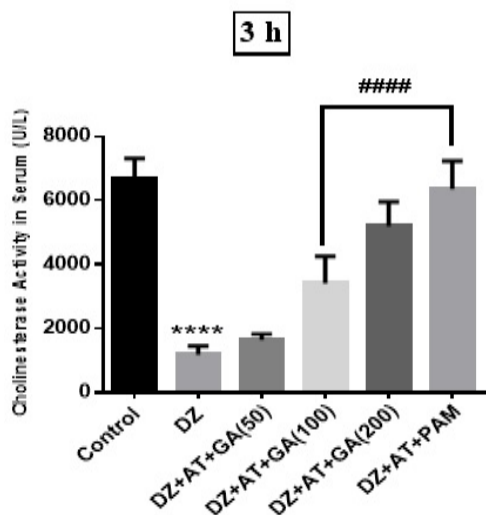
دیازینون + پرایدوکسیم (۷۴/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر یا ۳۰۰ میکرومول بر لیتر)، ۵- دیازینون + اسید گالیک (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ۶- دیازینون + اسید گالیک (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر).

در ابتدا به نمونه‌های خون گرفته شده به میزان 3.8% w/v سترات سدیم اضافه شد (جهت جلوگیری از انعقاد) و سپس به گروه‌های ۲ میلی‌لیتری تقسیم گردیدند. به جز گروه کنترل، به سایر گروه‌ها ماده مورد نظر (دیازینون، پرایدوکسیم، اسید گالیک) اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در شرایط اتاق انکوبه شد و سپس به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند (5000 RPM) و گلبول‌های قرمز و پلاسما جدا گردید. بر روی هر کدام از نمونه‌ها به صورت جداگانه، میزان فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در اریتروسیت‌ها

ابتدا ۳ میلی‌لیتر از محلول DTNB با ۱۰۰ میکرولیتر به عنوان سوبسترا در لوله آزمایش ریخته به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به لوله تست، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه همولیز شده اضافه کرده و به لوله شاهد نیز ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر اضافه نموده تا تغییر حجم محسوس نباشد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۱ میلی‌لیتر هیامین (بنزاتونیوم کلراید) به عنوان متوقف‌کننده واکنش به لوله‌ها اضافه شد و سپس جذب آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل شاهد که فاقد نمونه همولیز شده بود، در طول موج ۴۴۰ nm خوانده شد. جذب هر نمونه، سه بار با فاصله ۳۰ ثانیه خوانده و سپس میانگین سه عدد در فاکتور ۱۷/۸۷ ضرب گردید. این فاکتور نتیجه محاسبه رقت / زمان واکنش × جذب مولی می‌باشد که در آن رقت ۲۵۶۲ و جذب مولی ۱۴۳۴۰ و زمان واکنش ۱۰ دقیقه است (۱۸).

تفاوت معنی داری در فعالیت آنزیم نسبت به گروه دیازینون نشان داد ($P < 0/0001$). با تزریق آتروپین و پرایدوکسیم (گروه کنترل مثبت)، میزان فعالیت آنزیم افزایش یافت که نسبت به گروه دیازینون دارای اختلاف معنی داری بود.



نمودار شماره ۱: اثر گالیک اسید در دوزهای ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر میزان فعالیت آنزیم کولین استراز سرمی (بوتیریل کولین استراز) در موش های دریافت کننده دیازینون (۳ ساعت بعد از مسمومیت با دیازینون)

DZ: Diazinon; AT: Atropine;

GA: Gallic Acid; PAM: Pralidoxime

**** دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($P < 0/0001$)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون ($P < 0/0001$)

میزان فعالیت آنزیم بعد از ۲۴ ساعت (نمودار شماره ۲) نشان داد که این اثرات مهاري با تزریق گالیک اسید به صورت وابسته به دوز به شدت کاهش یافت به طوری که این اثرات در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم گالیک اسید به همراه آتروپین نسبت به گروه دیازینون از نظر آماری دارای اختلاف معنی داری بود (به ترتیب $P < 0/0001$ ، $P < 0/001$) (نمودار شماره ۲).

میزان فعالیت آنزیم های کولین استراز در هر دو گروه (۳ ساعت و ۲۴ ساعت بعد از مسمومیت) در موش های

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز در پلاسما

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم کولین استراز پلاسمایی (بوتیریل کولین استراز) بر اساس پروتکل کیت (شرکت زیست شیمی) انجام شد. اساس آزمایش بدین صورت بود که در این آزمایش، آنزیم کولین استراز، بوتیریل تیو کولین را هیدرولیز کرده و تیو کولین و اسید بوتیریک آزاد می گردد. تیو کولین آزاد شده، پتاسیم هگزاسیانوفرات سه ظرفیتی زرد رنگ را به پتاسیم هگزاسیانوفرات دو ظرفیتی که بی رنگ است، کاهش می دهد. سرعت کاهش رنگ زرد محلول معرف در طول موج ۴۰۵ نانومتر قابل اندازه گیری است و رابطه مستقیم با میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در پلاسما دارد.

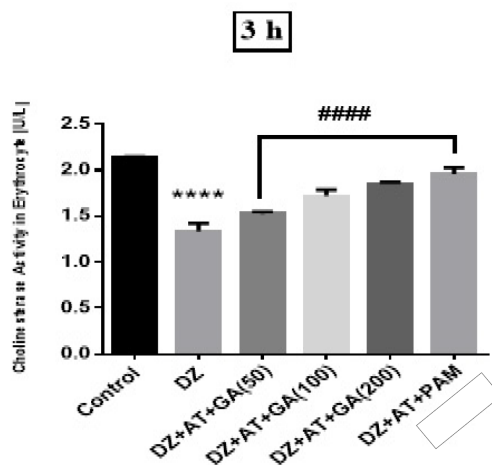
روش های آماری

در این مطالعه، نتایج بر حسب میانگین $\pm$ انحراف معیار حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده و همه ی آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری Graphpad Prism مدل ۶ انجام شد. تست های آماری مورد استفاده شامل آنالیز واریانس یکطرفه (one-way ANOVA test) با post-hoc Tukey test بود ($P < 0/05$ به عنوان حد معناداری انتخاب گردید).

یافته ها

تأثیر گالیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز و استیل کولین استراز در سرم و گلبول های قرمز موش های دریافت کننده دیازینون در ۳ ساعت و ۲۴ ساعت بعد از مسمومیت

میزان فعالیت آنزیم های بوتیریل کولین استراز در گروه های دریافت کننده دیازینون به طور معنی داری کاهش یافت که از نظر آماری این کاهش نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0/0001$) (نمودار شماره ۱). تزریق گالیک اسید در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به همراه آتروپین،



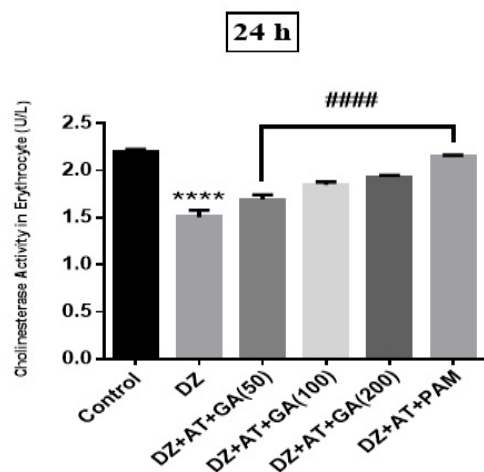
نمودار شماره ۳: اثر گالیک اسید در دوزهای ۲۰۰ و ۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در اریتروسیت موش های دریافت کننده دیازینون (۳ ساعت بعد از مسمومیت)

DZ: Diazinon; AT: Atropine;

GA: Gallic Acid; PAM: Pralidoxime

**** دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($P < 0.0001$)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون ($P < 0.0001$)



نمودار شماره ۴: اثر گالیک اسید در دوزهای ۲۰۰ و ۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در اریتروسیت موش های دریافت کننده دیازینون (۲۴ ساعت بعد از مسمومیت)

DZ: Diazinon; AT: Atropine;

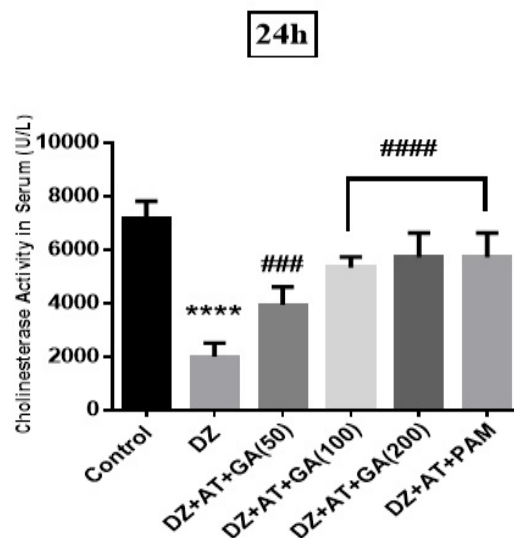
GA: Gallic Acid; PAM: Pralidoxime

**** دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($P < 0.0001$)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون ($P < 0.0001$)

دریافت کننده دیازینون به طور معنی داری کاهش یافت که نسبت به گروه کنترل دارای تفاوت معنی داری بود ($P < 0.0001$). همچنین گروه های دریافت کننده گالیک اسید باعث کاهش میزان مهارت آنزیم کولین استراز ناشی از سم دیازینون شد که از نظر آماری در همه دوزهای دریافت کننده گالیک اسید نسبت به گروه دیازینون دارای اختلاف معنی داری می باشد ($P < 0.0001$) (نمودار شماره ۳).

در گروه ۲۴ ساعته، اثرات کاهشی فعالیت آنزیم کولین استراز با تزریق گالیک اسید به همراه آتروپین به شدت بهبود یافت که از نظر آماری نسبت به گروه دریافت کننده دیازینون دارای تفاوت معنی داری بود ($P < 0.0001$) (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۲: اثر گالیک اسید در دوزهای ۲۰۰ و ۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر میزان فعالیت آنزیم کولین استراز سرمی (بوتیریل کولین استراز) در موش های دریافت کننده دیازینون (۲۴ ساعت بعد از مسمومیت)

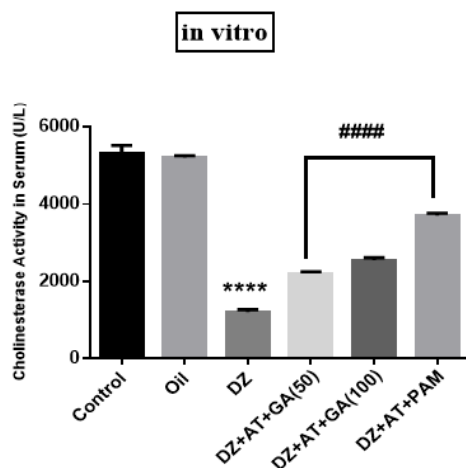
DZ: Diazinon; AT: Atropine;

GA: Gallic Acid; PAM: Pralidoxime

**** دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($P < 0.0001$)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون ($P < 0.0001$)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون ($P < 0.001$)



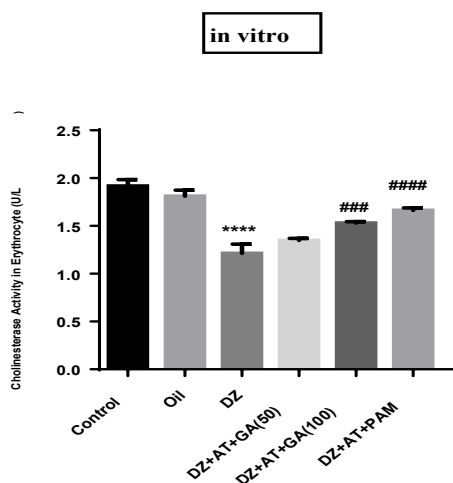
نمودار شماره ۵: اثر گالیک اسید در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز سرمی در خون انسان مواجهه یافته با دیازینون

DZ: Diazinon; AT: Atropine;

GA: Gallic Acid; PAM: Pralidoxime

**** دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($P < 0/0001$)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون ($P < 0/0001$)



نمودار شماره ۶: اثر گالیک اسید در غلظت های ۲۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در اریتروسیت جدا شده از خون انسانی مواجهه یافته با دیازینون

DZ: Diazinon; AT: Atropine;

GA: Gallic Acid; PAM: Pralidoxime

**** دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($P < 0/0001$)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون ($P < 0/0001$)

دارای اختلاف معنی دار با گروه دیازینون ($P < 0/001$)

تأثیر گالیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز و استیل کولین استراز در سرم و اریتروسیت های انسانی (*in vitro*)

نمودار شماره ۵ نتایج حاصل از مواجهه خون انسانی با دیازینون و گروه های گالیک اسید با دوزهای متفاوت و میزان فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز را نشان داده است. در گروه های خونی مواجهه یافته با دیازینون، میزان فعالیت آنزیم کولین استراز نسبت به گروه کنترل کاهش شدیدی یافت که از نظر آماری دارای تفاوت معنی دار ($P < 0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل بود که با اضافه کردن گالیک اسید و پرالیدوکسیم همراه با آتروپین این میزان کاهش در فعالیت استراز افزایش نشان داد و دارای اختلاف معنی داری ($P < 0/0001$) با گروه دریافت کننده دیازینون بود (نمودار شماره ۵). پس از مواجهه خون با دیازینون و سایر ترکیبات درمانی، اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در اریتروسیت های جدا شده از خون مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که دیازینون باعث کاهش قابل توجه میزان آنزیم استیل کولین استراز در اریتروسیت ها گردید که نسبت به گروه کنترل دارای تفاوت معنی داری بود ($P < 0/0001$). پس از اضافه کردن گالیک.

اسید و آتروپین، میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در اریتروسیت به طور محسوسی افزایش یافت که از نظر آماری فقط در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه دیازینون دارای اختلاف معنی داری شد ($P < 0/001$). همچنین در گروه های دریافت کننده پرالیدوکسیم شاهد افزایش فعالیت آنزیم بودیم که نسبت به گروه مواجهه یافته با دیازینون دارای تفاوت معنی داری گردید ($P < 0/0001$) (نمودار شماره ۶).

بحث

مطالعه حاضر به بررسی تاثیر گالیک اسید بر فعال سازی مجدد آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز مهار شده با سم دیازینون به صورت یک مطالعه درون تنی و برون تنی پرداخت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که دیازینون باعث مهار یا کاهش فعالیت آنزیم های استیل و بوتیریل کولین استراز در اریتروسیت ها و سرم در زمان های ۳ ساعت اول و ۲۴ ساعت بعد از مسمومیت می گردد. همچنین این مطالعه نشان داد که گالیک اسید به همراه آتروپین به صورت وابسته به دوز، باعث فعال سازی مجدد آنزیم های استیل و بوتیریل کولین استراز در اریتروسیت ها و سرم می گردد.

ترکیبات ارگانوفسفره، ترکیبات شیمیایی هستند که به طور وسیع به عنوان آفت کش و حشره کش در کشاورزی و مکان های مختلف استفاده می شوند و سمی ترین حشره کش برای حیوانات مهره دار به شمار می روند (۳). به دلیل دسترسی آسان به این ترکیبات و سمیت بالای آنها، باعث مسمومیت های تصادفی و حتی خودکشی می گردند (۲۰، ۱۹). این ترکیبات سومین عامل مسمومیت در جانداران گزارش شده اند (۲). مهم ترین راه تجزیه این ترکیبات، شکسته شدن پیوند استری است (۶). سموم ارگانوفسفره به طور عمده از طریق کلیه حذف می شوند (۲۱) اما بخشی از این سموم از طریق کبد تبدیل به متابولیت های سمی (مانند دیازوکسون) و گونه های فعال اکسیژن شده که می توانند اثرات سمی غیر قابل جبرانی را در ارگان های مختلف انسان ها و حیوانات ایجاد نمایند (۸، ۶).

استیل کولین یکی از مهم ترین واسطه های شیمیایی در پایه های عصبی محسوب می گردد که توسط آنزیم استیل کولین استراز به اسید استیک و کولین هیدرولیز می گردد. این عمل از انتقال بیش از حد پیام های عصبی در سیناپس ها جلوگیری می کند (۹، ۱۰). مهم ترین مکانیسم عملکردی ارگانوفسفره ها، مهار آنزیم استیل کولین استراز است که منجر به اثرات سمی مختلف شده که در

نهایت باعث فلج تنفسی و کولاپس قلبی عروقی می گردند (۲۲). سموم ارگانوفسفره از طریق اتصال به گروه هیدروکسیل آمینواسید سرین در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز مانع از فعالیت آنزیم استیل کولین استراز می گردند (۲۳). کولین استرازها به دو دسته کولین استراز اصلی یا نسجی (شامل کولین استراز موجود در دستگاه عصبی و گلبول های قرمز) و کولین استراز کاذب یا بوتیریل کولین استراز (کولین استراز سرمی) تقسیم می شوند. به نظر می رسد که از بین رفتن ۷۵ درصد کولین استراز اصلی سبب مرگ می گردد، در حالی که کولین استرازهای سرمی ارزش کمتری در ارزیابی بالینی بیمار دارد. سموم فسفره آلی بر روی هر دو نوع کولین استراز اثر می کنند و باعث مهار این آنزیم ها می گردند (۲). بنابراین آنزیم های مورد هدف سموم ارگانوفسفره مانند دیازینون، کولین استرازها (شامل استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز) می باشند (۲۴). آنزیم بوتیریل کولین استراز یک سم زدای عمومی است که در سرم و کبد وجود دارد و اندازه گیری فعالیت این آنزیم پیش تر بیانگر تماس مزمن با سموم ارگانوفسفره ها می باشد، اگرچه در مواقع حاد مسمومیت با سموم ارگانوفسفره نیز این آنزیم مورد ارزیابی قرار می گیرد ولی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز یا کولین استراز واقعی که در سیناپس عصبی و همچنین محل اتصال عصب عضله (NMJ) وجود دارد، شاخص بهتری برای ارزیابی شدت مسمومیت می باشد (۲۵). این آنزیم ها پس از فسفریله شدن غیر فعال می شوند. بنا براین این امر موجب اختلال در فعالیت آنزیم جهت تجزیه نوروترانسمیتر استیل کولین می شود. نتایج مطالعاتی که همسو با نتایج مطالعه ما بوده است، نشان داده که دیازینون فعالیت استیل کولین استراز در اریتروسیت و سرم را تحت تاثیر قرار داده و باعث کاهش فعالیت این نوروترانسمیتر می شود (۲۶، ۲۷) و مشخص شده که استفاده از ویتامین E به همراه دیازینون سطح استیل کولین استراز موجود در سرم و اریتروسیت را به طور قابل توجهی در مقابل با گروه دیازینون افزایش

داده است (۲۸). در گزارشی دیگر مشاهده شده که دریافت N-استیل سیستین، سبب افزایش سطح گلو تاتیون و کولین استراز مهار شده با سم ارگانوفسفره دیازینون می گردد (۲۹).

گزارشات نشان داده که ترکیبات ارگانوفسفره باعث کاهش کلسترول تام و فسفولیپیدهای غشای اریتروسیت شده است. همچنین افزایش فرایند لیپید پراکسیداسیون به دنبال مواجهه با مالاتیون گزارش شده است. اساس سمیت ارگانوفسفره ها در تولید رادیکال های آزاد، ممکن است به علت ایجاد اختلال در چرخه ردوکس و تغییر در هموستاز بدن باشد (۳۰، ۳۱). در مواجهه با دیازینون، سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی بدن برای محافظت در مقابل رادیکال های آزاد فعال می شود (۸). وظیفه آنتی اکسیدان ها، پاکسازی رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن می باشد. به عنوان مثال آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز که فرایند تبدیل رادیکال سوپر اکسید به پراکسید هیدروژن را کاتالیز می کند و به دنبال فعالیت آن، آنزیم های کاتالاز و گلو تاتیون پراکسیداز، پراکسید هیدروژن را به آب تبدیل می کنند، نقش مهمی در سم زدایی و کاهش رادیکال های آزاد را در بدن دارند (۳۲).

اسید گالیک و مشتقات آن به فرم های متیله شده مانند (سیرنژیک اسید) یا فرم های گالوئیلی در بسیاری از عملکردهای بیولوژیکی و فارماکولوژیکی مانند اثرات ضد التهابی و حفاظتی در بدن دخالت دارند. این عملکردها احتمالاً ناشی از پتانسیل ضد اکسیدانی این ترکیبات است که به قابلیت آن ها در جلوگیری از آسیب ناشی از رادیکال های آزاد و نیز جلوگیری از تولید رادیکال های آزاد منجر می گردد (۲۶). گالیک اسید دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی می باشد که با در اختیار قرار دادن اتم هیدروژن در گروه هیدروکسیل فنلیک ساختار خود، می تواند با رادیکال های آزاد تولید شده اتصال یافته و آن ها را خنثی نماید (۲۷).

چندین مطالعه که نتایج آن ها همسو با نتایج این مطالعه بوده است نشان داده که ترکیبات فنلی، خاصیت پاکسازی رادیکال های آزاد را دارند. فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی اساساً به خاصیت اسکونجری (پاک کردن) رادیکال های آزاد توسط آن ها نسبت داده می شود. گالیک اسید به دلیل ظرفیت بالای پاکسازی رادیکال های آزاد، خاصیت آنتی اکسیدانی بیش تری از خود نشان داده است. همچنین اثرات ضد باکتریایی، ضد سرطانی و کاهنده آسیب کبدی ناشی از استرس اکسیداتیو توسط این ترکیب گزارش شده است (۳۳).

در مطالعه حاضر گالیک اسید به همراه آتروپین به طور معنی داری باعث کاهش مهار فعالیت و افزایش مجدد فعالیت آنزیم های کولین استراز سرمی و اریتروسیتی در موش های مواجهه یافته با دیازینون در زمان های ۳ ساعت و ۲۴ ساعت بعد از مسمومیت با سم دیازینون گردید. مطالعات گذشته نشان داده اند که گالیک اسید دارای خاصیت ضد التهابی قوی می باشد و بر اساس بررسی های انجام شده مشخص گردید که اثر ضد التهابی این ترکیب می تواند ناشی از مهار آنزیم سیکلواکسیژناز باشد (۲۷). نتایج مطالعات دیگر نشان داده است که گالیک اسید از طریق کاهش استرس اکسیداتیو باعث ترمیم بافت های آسیب دیده می گردد (۳۴). همچنین مطالعات نشان داده اند که توانایی آنتی اکسیدانی اسید گالیک در متوقف کردن مرحله انتشار در فرایند اکسایش، به معنای واکنش سریع تر آن با رادیکال های آزاد نسبت به اسید های چرب غیر اشباع است. مشخص شده که اسید گالیک از توانایی بیش تری در خصوص مهار رادیکال آزاد برخوردار است (۳۵).

در خصوص مکانیسم ترکیب گالیک اسید مورد استفاده می توان گفت که این ترکیب با توجه به ساختارش می تواند با دو مکانیسم پیشنهادی باعث کاهش سمیت ایجاد شده ناشی از سم ارگانوفسفره دیازینون گردد. مکانیسم پیشنهادی اول اینکه احتمال فعال سازی آنزیم کولین استراز (حقیقی و کاذب) در گلبول قرمز و

فرضیه‌های مطرح فوق نیاز به آزمایش‌های بیش‌تر جهت اثبات مکانیسم‌های احتمالی ترکیب گالیک اسید مورد استفاده را دارد.

این مطالعه نقش استفاده همزمان گالیک اسید و آتروپین در فعال‌سازی مجدد آنزیم کولین استراز در سمیت ناشی از دیازینون را بررسی نمود. در مطالعه انجام شده، تجویز دیازینون با دوز ۸۰ mg/kg منجر به افزایش مهار کولین استراز سرمی و اریتروسیستی گردید که تجویز همزمان داروی آتروپین و ترکیب گالیک اسید در دوزهای مختلف، منجر به تعدیل و بهبود سمیت و کاهش مهار فعالیت آنزیم‌های کولین استرازی گردید. احتمالاً گالیک اسید به خاطر دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل فراوان در فعال‌سازی مجدد آنزیم و یا اتصال به سم ارگانوفسفره دیازینون و همچنین در به دام اندازی رادیکال‌های آزاد ناشی از متابولیسم سم موجب کاهش اثرات تخریبی دیازینون می‌گردد. همچنین احتمال این‌که گالیک اسید مانند یک نوکلئوفیل عمل نماید و بتواند به گروه P-O متصل شده به آنزیم حمله کند و آنزیم را از مهار این ترکیب آزاد نماید نیز دور از ذهن نمی‌باشد که البته همه موارد ذکر شده نیاز به بررسی‌ها و تحقیقات بیش‌تری دارد.

پلاسمای توسط این ترکیب می‌تواند شبیه به ترکیبات نوکلئوفیل باشد. احتمال این‌که این ترکیب مانند یک نوکلئوفیل عمل نماید و بتواند به گروه P-O متصل شده به آنزیم حمله کند و آنزیم را از مهار این ترکیب آزاد نماید (مشابه اثر ترکیب پرالیدوکسیم)، وجود دارد. البته با توجه به اینکه این ترکیب بی‌خطر می‌باشد و عدم سمیت آن هم در تست‌های In Vivo و In Vitro به اثبات رسیده است بنابراین عدم سمیت آن نسبت به ترکیب سمی پرالیدوکسیم می‌تواند یکی از محاسن مصرف این ترکیب در درمان باشد (۳۶، ۳۷).

نظریه دوم قابل طرح برای ترکیب گالیک اسید مورد استفاده، احتمال واکنش این ترکیب با سم دیازینون آزاد و موجود در جریان خون می‌باشد. با توجه به این‌که در مسمومیت‌های شدید، با غلظت‌های بالایی از سم ارگانوفسفره مواجه هستیم و در این مطالعه نیز از غلظت بالای سم (0.5 LD50) دیازینون جهت مسمومیت حاد استفاده شد، پس این احتمال دور از ذهن نمی‌باشد که ترکیب گالیک اسید با داشتن گروه‌های OH آزاد در مولکول خود می‌تواند به راحتی با سم ارگانوفسفره دیازینون در قسمت P=O واکنش داده و آن را خنثی نمایند. بنابراین تمام

References

- Hai D, Varga SI, Matkovics B. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 1997; 117(1): 83-88.
- Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, Shadnia S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology* 2004; 137(1): 29-34 (Persian).
- Zhang C, Malhotra SV. Increased paraoxon detection by acetylcholinesterase inactivation with ionic liquid additives. *Talanta* 2005; 67(3): 560-563.
- Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Kalender S, Durak D, Bayrakdar F, Kalender Y. 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(2): 93-98.
- Gupta RC. *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds*. 1st ed, Academic

- Press; 2011.
6. Abdou HM, El Mazoudy RH. Oxidative damage, hyperlipidemia and histological alterations of cardiac and skeletal muscles induced by different doses of diazinon in female rats. *J Hazard Mater* 2010; 182(1-3): 273-278.
 7. Larkin DJ, Tjeerdema RS. Fate and effects of diazinon. *Rev environ contam toxicol* 2000; 166: 49-82.
 8. Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(12): 3345-3353.
 9. Voicu VA, Thiermann H, Rădulescu FŞ, Mircioiu C, Miron DS. The toxicokinetics and toxicodynamics of organophosphonates versus the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxime antidotes: biological consequences. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2010; 106(2): 73-85.
 10. Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem Biol Interact* 2006; 159(1): 18-46.
 11. Vale J. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters* 1998; 102-103: 649-652.
 12. Wang K, Zhu X, Zhang K, Zhu L, Zhou F. Investigation of gallic acid induced anticancer effect in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2014; 28(9): 387-393.
 13. Hsieh SC, Wu CC, Hsu SL, Yen JH. Molecular mechanisms of gallic acid-induced growth inhibition, apoptosis, and necrosis in hypertrophic scar fibroblasts. *Life Sciences* 2016; 179: 130-138.
 14. Liao CL, Lai KC, Huang AC, Yang JS, Lin JJ, Wu SH, et al. Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells through suppressing the matrix metalloproteinase-2/-9, protein kinase B (PKB) and PKC signaling pathways. *Food and Chemical Toxicology* 2012; 50(5): 1734-1740.
 15. Luo C, Saxena A, Ashani Y, Leader H, Radić Z, Taylor P, et al. Role of edrophonium in prevention of the re-inhibition of acetylcholinesterase by phosphorylated oxime. *Chem Biol Interact* 1999; 119-120: 129-135.
 16. Patocka J, Cabal J, Kuca K, Jun D. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. *J Appl Biomed* 2005; 3(2): 91-99.
 17. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 1961; 7(2): 88-90.
 18. Mohammadi H, Jalilian J, Karimi MY, Shetab Boushehri SV. In vitro cysteine reactivates organophosphate insecticide dichlorvos-inhibited human cholinesterases. *Sultan Qaboos University Medical Journal* 2017; 17(3): e293-e300.
 19. Astroff AB, Freshwater KJ, Eigenberg DA. Comparative organophosphate-induced effects observed in adult and neonatal Sprague-Dawley rats during the conduct of multigeneration toxicity studies. *Reproductive Toxicology*. 1998;12(6):619-645.
 20. Yen DH, Chan JY, Tseng H, Huang C, Lee C, Chan SH, et al. Depression of mitochondrial respiratory enzyme activity in rostral ventrolateral medulla during acute mevinphos intoxication in the rat. *Shock* 2004; 21(4): 358-363.

21. Wang X, Liu Q, Zhong W, Yang L, Yang J, Covaci A, et al. Estimating renal and hepatic clearance rates of organophosphate esters in humans: impacts of intrinsic metabolism and binding affinity with plasma proteins. *Environment International*. 2020; 134: 105321.
22. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaiee A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 2004; 10(6): RA141-RA147.
23. Karami Osboo R, Mirabolfathy M, Kamran R, Shetab Boushehri M, Sarkari S. Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran. *Food Control* 2012; 23(1): 271-274 (Persian).
24. El Shenawy NS, AlSalmy F, Al Eisa RA, El Ahmary B. Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2010; 96(2): 101-107.
25. Kim JH, Stevens RC, MacCoss MJ, Goodlett DR, Scherl A, Richter RJ, et al. Identification and characterization of biomarkers of organophosphorus exposures in humans. *Adv Exp Med Biol* 2010; 660: 61-71.
26. Sargazi Z, Nikravesh M, Jalali M, Sadeghnia H. The protective effect of vitamin E on serum and erythrocytes cholinesterase levels in poisoning of Diazinon, in adult female rats. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences* 2016; 7(4):801-812 (Persian).
27. Shokrzade Lamoki M, Pakravan N, Sheikholeslamian S. The protective effect of N-acetyl cysteine on glutathione levels and serum cholinesterase in acute poisoning of diazinon, in mice. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 22(2-3): 2-11 (Persian).
28. Ogut S, Gultekin F, Nesimi Kisioglu A, Kucukoner E. Oxidative stress in the blood of farm workers following intensive pesticide exposure. *Toxicology and Industrial Health* 2011; 27(9): 820-825.
29. Altuntas I, Delibas N, Sutcu R. The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Human & Experimental Toxicology* 2002; 21(12): 681-685.
30. 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; 22(6): 455-461.
31. Daglia M, Di Lorenzo A, Nabavi S, S Talas Z, M Nabavi S. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2014; 15(4): 362-372.
32. Dewick PM, Haslam E. Phenol biosynthesis in higher plants. Gallic acid. *Biochem J* 1969; 113(3): 537-542.
33. Goudarzi M, Kalantar M, Kalantar H. The Hepatoprotective effect of gallic acid on mercuric chloride-induced liver damage in rats. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 2017; 12(4): e12345 (Persian).
34. Hosseinzadeh A HG, Goudarzi M, Sezavar SH, Mehrzadi S, Mansouri E, et al. Ameliorative effect of gallic acid on sodium arsenite-induced spleno-, cardio-and hemato-toxicity in rats. *Life Sciences* 2019; 217: 91-100 (Persian).
35. Farahmandfar R, Asnaashari M. Assessment of antioxidant activity and kinetic oxidative parameters of syringic acid and gallic acid in

- sunflower oil. Journal of Food Science and Technology 2018; 15(83): 1-14 (Persian).
36. Roberts AT, Martin CK, Liu Z, Amen RJ, Woltering EA, Rood JC, et al. The safety and efficacy of a dietary herbal supplement and gallic acid for weight loss. Journal of Medicinal Food 2007; 10(1): 184-188.
37. Rajalakshmi K, Devaraj H, Devaraj SN. Assessment of the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of gallic acid in mice. Food and Chemical Toxicology 2001; 39(9): 919-922.