

The study regarding effect of paraoxon on oxidative stress index in kidney tissue of rats

Maryam Abbasnezhad¹, Mahvash Jafari², Alireza Asgari³, Reza Hajihoseini⁴,
Mansoureh Hajigholamali⁴, Maryam Salehi⁵, Mohammad Salimian¹

¹ Department of Biochemistry, Chemical Injuries Research Center, Faculty of Medicine, Military medicine Institute, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Department of Biochemistry, Applied Neuroscience Research Center, Faculty of Medicine, Military medicine Institute, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Department of Physiology, Sport Physiology Research Center, Faculty of Medicine, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Department of Biochemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran

⁵ Department of Biochemistry, Razavi Khorasan Payame Noor University, Mashhad, Iran

(Received 14 July, 2009 ; Accepted 23 December, 2009)

Abstract

Background and purpose: Paraoxon is the active form of parathion, which is an organophosphate pesticide (OP). The toxic effects of some OPs are not limited to inhibition of cholinesterase, they are capable to produce free radicals and induce disturbance in body antioxidant systems. The purpose of this study was to evaluate the effect of paraoxon on oxidative stress index in the kidney of rat.

Materials and methods: Wistar male rats were randomly divided in four groups including: control (corn oil as paraoxon solvent) and three paraoxon groups receiving different doses (0.3, 0.7 and 1mg/kg) by intraperitoneal injection. 24 hours after injection, animal was given anesthesia and kidney tissue removed. After kidney 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, kidney SOD and CAT activities were significantly increased, comparing with the control, while GSH level was significantly decreased. There were no significant changes observed in GST, LDH activities and MDA levels.

Conclusion: The results suggest that paraoxon induces the production of free radicals and oxidative stress. The enhanced activity of antioxidant enzymes in kidney of rats probably was 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.

Key words: Paraoxon, oxidative stress index, rat, kidney tissue

J Mazand Univ Med Sci 2009; 19(73): 17-26 (Persian).

بررسی اثر پاراکسون بر شاخص های استرس اکسیداتیو بافت کلیه موش صحرایی

مریم عباس نژاد^۱ مهوش جعفری^۲ علیرضا عسگری^۳ رضا حاجی حسینی^۴
منصوره حاجی غلامعلی^۴ مریم صالحی^۵ محمد سلیمیان^۱

چکیده

سابقه و هدف: پاراکسون از گروه ارگانوفسفره بوده که متابولیت فعال پاراتیون در بدن می باشد. اثرات سمی برخی از ارگانوفسفره ها تنها محدود به مهار کولین استراز نمی باشد، بلکه آنها قادر به تولید رادیکال های آزاد و اختلال در سیستم های آنتی اکسیدان بدن هستند. هدف از این مطالعه ارزیابی شاخص های استرس اکسیداتیو در بافت کلیه موش صحرایی به دنبال تجویز حاد پاراکسون بود.

مواد و روش ها: موش های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار بطور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل که روغن ذرت را بعنوان حلال پاراکسون و سه گروه آزمایش که دوزهای مختلف پاراکسون (۰/۳، ۰/۷، ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را بصورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت پس از تزریق، حیوانات با اتر بیهوش و بافت کلیه آنها خارج گردید. بعد از هموژنه کردن بافت کلیه، فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون اس- ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز و همچنین غلظت گلوکاتیون و مالون دی آلدئید توسط روش های بیوشیمیایی تعیین شد.

یافته ها: به دنبال تجویز پاراکسون، میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در غلظت های بالاتر از ۰/۳ mg/kg پاراکسون بطور معنی داری افزایش یافت، در حالی که غلظت گلوکاتیون در این دوزها بطور قابل توجهی کاهش یافت. فعالیت گلوکاتیون اس- ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز و میزان مالون دی آلدئید در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی داری نداشت.

استنتاج: نتایج پیشنهاد می کند که تجویز حاد پاراکسون باعث القا تولید رادیکال های آزاد و استرس اکسیداتیو می شود. افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت نشان دهنده فعال شدن سیستم دفاعی سلول جهت خنثی سازی رادیکال های آزاد و تخلیه سطح گلوکاتیون ناشی از نارسایی سیستم دفاعی آنتی اکسیدانت سلول در مقابله با رادیکال های آزاد می باشد.

واژه های کلیدی: پاراکسون، شاخص های استرس اکسیداتیو، موش صحرایی، بافت کلیه

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره دسته ای از آفت کش های شیمیایی هستند که بطور وسیع در کشاورزی، دامپزشکی، صنعت، باغبانی و منازل استفاده می شوند. مسمومیت با این مواد یکی از مشکلات بهداشتی در جهان می باشد (۱).

E-mail: jafari@bmsu.ac.ir

مؤلف مسئول: مهوش جعفری - تهران: دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، پژوهشکده طب رزمی

۲. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، پژوهشکده طب رزمی

۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزش دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)

۴. گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور تهران، واحد علوم پایه

۵. گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور مشهد، واحد علوم پایه

تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۲۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۸/۶/۷ تاریخ تصویب: ۸۸/۱۰/۲

افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در اریتروسیت‌ها، بزاق و پلاسما گزارش شده است (۱۲،۲). نتایج مشابهی با مطالعه اثر لیندان بر قلب موش صحرایی بدست آمده است (۱۳). از طرف دیگر، در مطالعه اثر کلرپیرفوس و سیپرترین بر کبد موش کوچک آزمایشگاهی، افزایش غلظت‌های سرمی شاخص‌های عملکرد کبدی و تغییر در شاخص‌های آنتی‌اکسیدان گزارش شده است (۱۱). تفاوت در نوع ترکیب و گونه مورد بررسی، دوز و زمان مواجهه، وجه تمایز مطالعات مختلف می‌باشد. به دلیل تنوع استخلاف‌ها در ساختمان شیمیایی ارگانوفسفره‌ها و اثرات متفاوت بر روی بافت‌های مختلف، مطالعات تکمیلی جهت درک مکانیسم عمل این ترکیبات ضروری است. مطالعات روی اثر پاراکسون بر روی سیستم آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها بصورت *in vivo* بسیار اندک است. در این مطالعه اثر تجویز حاد پاراکسون بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و لیپید پراکسیداسیون در بافت کلیه موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد:

نیتروبلوترازولیم (NBT)، دی‌تیوبیس نیترو بنزوئیک اسید (DTNB) و تتراتوکسی پروپان از شرکت سیگما (آلمان) و ۱-کلرو-۲،۴-دی نیترو بنزن (CDNB)، تری کلرو استیک اسید (TCA) و آلبومین سرم گاوی (BSA) از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. 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 میلی‌مولار با pH=۷ از آن بدست آمد. از دستگاه اسپکتروفتومتری مدل GENE sys 10UV جهت قرائت جذب‌ها در طول موج مختلف استفاده گردید.

و در ایران بعنوان سومین علت مسمومیت و علت اصلی مرگ و میر ناشی از مسمومیت گزارش شده است (۲). این ترکیبات مهارکننده آنزیم‌های کولین استراز هستند که با فسفریله کردن اسید آمینه سرین موجود در جایگاه فعال آنزیم، پیوندی قوی و غیر قابل برگشت با آنزیم ایجاد نموده و با مهار آنزیم باعث افزایش سطح استیل کولین می‌شوند که منجر به وقوع بحران کولینرژیک، تشنج و در موارد حاد ضایعه مغزی و مرگ می‌شوند (۳). پاراکسون محصول متابولیسم اکسیداتیو پاراتیون است که یکی از سمی‌ترین آفت‌کش‌ها محسوب می‌شود. شدت مسمومیت حاد این ارگانوفسفره نسبت به سایر عوامل حائز اهمیت است و با وجود ممنوعیت استفاده از این ارگانوفسفره، هنوز استفاده آن بطور وسیع ادامه دارد (۴،۵).

در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیندها موجب استرس اکسیداتیو می‌گردد که اگر این استرس شدید یا طولانی شود می‌تواند باعث آسیب‌های جدی سلولی گردد (۶). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان عهده‌دار عمل سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد می‌باشند که کاتالاز^۱ (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز^۲ (SOD) از آنزیم‌های کلیدی این سیستم بشمار می‌روند و گلوتاتیون^۳ (GSH)، تیول غیر پروتئینی اصلی موجودات هوازی و فراوانترین آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی داخل سلولی می‌باشد (۷،۸).

تاکنون طیف وسیعی از اثرات متفاوت برای ترکیبات ارگانوفسفره گزارش شده است. بسیاری از این اثرات ارتباطی با مهار آنزیم استیل کولین استراز ندارد، بلکه توسط مکانیسم‌های دیگر سلولی القا می‌شود (۹). مطالعات نشان می‌دهد که ارگانوفسفره‌ها با تولید رادیکال‌های آزاد باعث تغییر در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی سلول و پراکسیداسیون لیپیدی غشاء می‌شوند (۱۰،۱۱). به دنبال تجویز خوراکی مالاتیون به موش صحرایی تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و

1. Catalase
2. Superoxide Dismutase
3. Glutathione

حیوانات:

این مطالعه بر روی موش‌های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم خریداری شده از دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... انجام گرفت. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) نگهداری می‌شدند. دسترسی حیوانات به آب و غذا (خوراک موش تهیه شده از شرکت خوراک دام پارس ایران) آزاد بود. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی که مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) بود، هنگام کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

تیمار حیوانات:

حیوانات بطور تصادفی به ۴ گروه (در هر گروه ۷ سر) تقسیم شدند: گروه کنترل که روغن ذرت را بعنوان حلال و ۳ گروه آزمایش که دوزهای مختلف پاراکسون یعنی ۰/۳، ۰/۷ و ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن که بترتیب ۵۰LD₅₀/۰، ۵۰LD₅₀ و ۱۵۰LD₅₀ پاراکسون است، را بصورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت پس از تزریق، با بیهوش نمودن حیوانات بوسیله اتر، بافت کلیه خارج گردید و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی و خارج شدن خون و جدا کردن قسمت‌های زاید، 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 دور ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. از محلول رویبی جهت سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی مورد نظر استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم SOD:

سنجش فعالیت آنزیم SOD بر پایه قدرت سوپراکسید دیسموتاز در مهار احیاء نیتروبلوترازولیوم بوسیله یون سوپراکسید با استفاده از روش Winterbourn

انجام گرفت (۱۴). ۲۰ میکرولیتر از بافت همورنه، EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی مولار و ۱/۵ NBT میلی مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ تا ۸ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس بعد از اضافه کردن ربوفلاوین ۱۲/۰ میلی مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/۶۷ مولار با pH=۷/۸، به مدت ۱۰ تا ۱۲ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده و جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم CAT:

فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Aebi (۱۵) و با استفاده از تجزیه پراکسید هیدروژن (H₂O₂) در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. به حجم معینی از عصاره بافتی اتانول مطلق (۰/۰۱ mg/ml) اضافه و به مدت نیم ساعت در یخ اینکوبه گردید. سپس به آن تریتون X-100 ده درصد با غلظت نهایی یک درصد اضافه شد. این محلول جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه با بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH=۷ و محلول H₂O₂ ۳۰ میلی مولار مخلوط کرده و جذب در طی ۳ دقیقه قرائت شد و فعالیت ویژه آنزیم بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم GST:

اندازه گیری فعالیت این آنزیم به روش Habig انجام شد (۱۶). یک میلی لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار pH=۷/۴ شامل یک میلی مولار EDTA، ۲۰ میلی مولار GSH و ۲۰ میلی مولار CDNB می‌باشد. واکنش با اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر از عصاره بافتی شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۵ دقیقه قرائت شد. فعالیت ویژه آنزیم 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 آنزیم بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

تعیین غلظت GSH:

برای سنجش میزان گلو تاتیون بافت‌ها از روش Tietze استفاده شد (۱۷). ۲۰ میکرولیتر از نمونه هموژنه رقیق شده با اسید-۵ سولفوسالسیلیک ۵ درصد (غلظت نهایی ۵ درصد) مخلوط شد. نمونه در دمای ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ 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 ۰/۴ 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 گلو تاتیون ۱mg/ml منحنی استاندارد رسم و غلظت گلو تاتیون نمونه‌ها محاسبه گردید.

سنجش غلظت MDA^۱:

برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها (MDA) از روش Satho استفاده شد (۱۸). به ۵۰۰ میکرولیتر از بافت هموژنه، TCA ده درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. به ۱/۵ میلی لیتر از مایع رویی، ۲ میلی لیتر تیوباریتوریک اسید ۰/۶۷ درصد اضافه شد 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 دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از ۱۰ و ۳ و ۳۰ ترا اتوکسی پروپان به عنوان استاندارد تعیین شد.

تعیین غلظت پروتئین:

برای اندازه گیری پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۱۹). ۵ میکرولیتر از عصاره بافتی را به حجم ۱ میلی لیتر رسانده و ۳ میلی لیتر از محلول برادفورد به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه اینکوبه گردید. سپس جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد و منحنی استاندارد پروتئین با استفاده از محلول ۱ mg/ml BSA رسم و غلظت پروتئین با استفاده از نمودار محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده ها:

تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار INSTAT بصورت آزمون آنالیز واریانس یک طرفه به همراه تست Tukey انجام شد. $p < 0.05$ مرز معنی دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد.

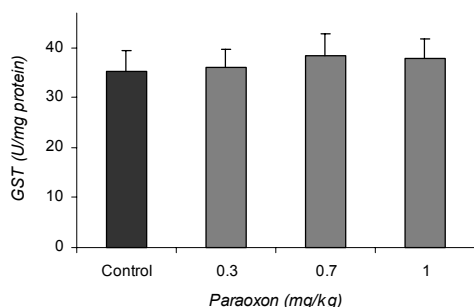
یافته ها

اثر دوزهای مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز بافت کلیه در نمودارهای شماره ۱ و ۲ آمده است. فعالیت هر دو آنزیم در دوزهای ۰/۷ و ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن پاراکسون در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان می‌دهد. افزایش فعالیت SOD در دوز ۱ mg/kg پاراکسون در مقایسه با دوز ۰/۳ معنی دار می‌باشد ($p < 0.05$) و همچنین افزایش فعالیت CAT در دوزهای ۰/۷ ($p < 0.001$) و ۱ ($p < 0.01$) میلی گرم بر کیلوگرم پاراکسون در مقایسه با دوز ۰/۳ mg/kg معنی دار می‌باشد.

اثر دوزهای مختلف پاراکسون بر فعالیت آنزیم‌های GST و LDH کلیه در نمودارهای شماره ۳ و ۴ نشان داده شده است. افزایش فعالیت آنزیم GST و کاهش فعالیت آنزیم LDH در دوزهای مختلف پاراکسون در مقایسه با گروه کنترل و بین دوزهای مختلف معنی دار نمی‌باشد.

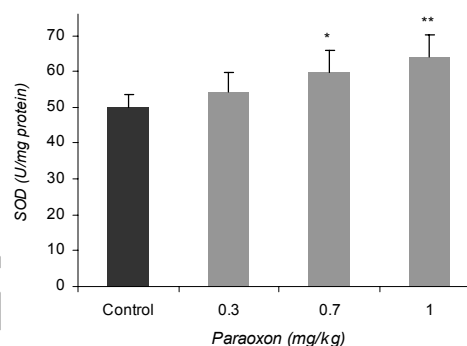
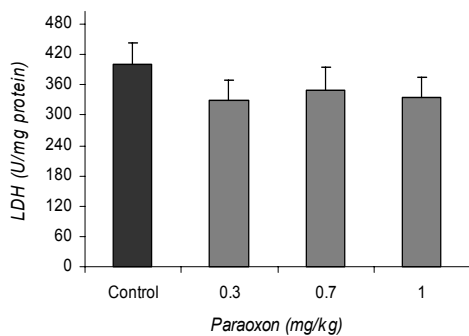
بررسی اثر پاراکسون بر روی غلظت GSH و MDA (جدول شماره ۱) نشان می‌دهد که غلظت GSH در

1. Malondialdehyde



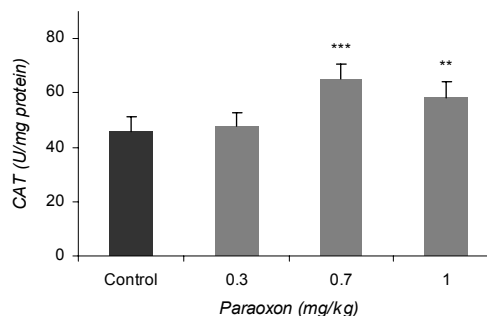
دوزهای ۰/۷ و ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش بطور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته و این کاهش در بین دوزهای مختلف معنی دار نمی باشد. افزایش غلظت MDA در دوزهای مختلف پاراکسون در مقایسه با گروه کنترل و بین دوزهای مختلف معنی دار نمی باشد.

نمودار شماره ۳: فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون S-ترانسفراز کلیه در حضور دوزهای مختلف پاراکسون بعد از ۲۴ ساعت



نمودار شماره ۱: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کلیه در حضور دوزهای مختلف پاراکسون بعد از ۲۴ ساعت ($p < 0.05$ و $p < 0.01$ در مقایسه با کنترل)

نمودار شماره ۴: فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز کلیه در حضور دوزهای مختلف پاراکسون بعد از ۲۴ ساعت



نمودار شماره ۲: فعالیت آنزیم کاتالاز کلیه در حضور دوزهای مختلف پاراکسون بعد از ۲۴ ساعت ($p < 0.01$ و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل)

بحث

کلیه جایگاه حذف و حفظ متابولیت های فعال است. متابولیت های پاراکسون از طریق کلیه ها دفع می گردند. کلیه ها مسئول برداشتن گلوکوتاتیون از جریان خون بوده و ۵۰ تا ۶۰ درصد نوسازی گلوکوتاتیون پلاسما را انجام می دهند (۲۰). مجموعه آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز اولین خط دفاعی سلول در برابر سمیت ناشی از رادیکال های آزاد می باشد (۷). آنزیم SOD باعث تبدیل

جدول شماره ۱: اثر پاراکسون بر روی غلظت گلوکوتاتیون و مالون دی آلدئید

پاراکسون (mg/kg)			کنترل	شاخص (nmol/mg protein)
۱	۰/۷	۰/۳		
انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	گلوکوتاتیون
۲۸/۹۴ ± ۴/۸۶**	۳۰/۲۷ ± ۵/۵۹*	۳۴/۸۳ ± ۴/۲۹	۳۹/۵۳ ± ۴/۱۸	گلوکوتاتیون
انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	مالون دی آلدئید
۱۲/۳۳ ± ۱/۹۸	۱۱/۲۵ ± ۱/۸۷	۱۰/۳۰ ± ۱/۵۱	۱۰/۳۴ ± ۱/۶۷	مالون دی آلدئید

$p < 0.05$ و $p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل

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 می شود. در این مطالعه تجویز حاد پاراکسون ($>0.3 \text{ mg/kg}$) موجب افزایش فعالیت آنزیم SOD و CAT بافت کلیه گردید. افزایش فعالیت SOD باعث کاهش رادیکال سوپراکسید در بافت کلیه شد و H_2O_2 تولید شده در طی این واکنش با افزایش فعالیت CAT خنثی شد. افزایش در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان بیانگر تطابق سلول یا بافت با استرس ایجاد شده است (۲۱، ۲۲).

مطالعه Kaur و همکاران نشان داد که مصرف کلروپیریفوس در موش ها، فعالیت SOD و CAT را بطور معنی داری در اريتروسیت ها افزایش می دهد (۲۲). همچنین مطالعه غنی و همکارانش نشان داد که مصرف پاراکسون بصورت داخل صفاقی در موش صحرایی بعد از ۴ ساعت موجب افزایش فعالیت آنزیم های SOD و CAT در بافت مغز می گردد (۲۳). از طرف دیگر در بعضی از مطالعات به دنبال تجویز ترکیبات آفت کش، کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت گزارش شده است. Fetoui و همکاران با مطالعه اثر LTC (Lambda-Cyhalothrin) که نوعی حشره کش است، کاهش فعالیت SOD و افزایش فعالیت CAT مغز و اريتروسیت های موش را گزارش نمودند (۲۴). مطالعه Yu نشان داد که کلروپیریفوس باعث کاهش فعالیت آنزیم های SOD و CAT شبکه چشم موش ها می شود (۲۵). این اختلاف نتایج در مطالعات مختلف ناشی از نوع، نژاد و گونه حیوان، نوع بافت، مسیر تجویز ماده سمی و دوز و زمان مواجهه می باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که کاهش فعالیت LDH در غلظت های مختلف پاراکسون معنی دار نیست. غلظت این آنزیم با میزان مرگ سلولی و لیز شدن سلول ها رابطه مستقیم دارد (۲۶). چندین گزارش نشان دادند که فعالیت LDH در بافت ها تحت شرایط سمیت با حشره کش های مختلف کاهش می یابد (۲۷، ۲۸). در مطالعه ای که توسط Fetoui و همکارانش انجام شد،

فعالیت LDH در مغز موش ها بطور معنی داری در مواجهه با LTC کاهش یافته، در حالیکه در اريتروسیت های موش ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش پیدا کرد (۲۴). Mishra و همکاران نیز نشان دادند که تجویز اندوسولفان به ماهی، موجب کاهش فعالیت LDH کبد و عضله اسکلتی می گردد (۲۹).

آنزیم GST با استفاده از GSH باعث افزایش حلالیت سموم و دفع آنها از بدن می گردد. بنابراین نقش مهمی در محافظت بافت ها بر علیه آسیب و استرس اکسیداتیو دارد (۳۰). این مطالعه نشان داد که پاراکسون باعث تغییرات معنی داری در فعالیت آنزیم GST نمی شود. مطالعه Kaur و همکاران نشان داد که با تجویز روزانه کلروپیریفوس (0.5 mg/kg) به موش ها برای ۲۰ هفته متوالی بطور معنی داری فعالیت GST را افزایش می دهد (۲۲). در مطالعه ای دیگر Khan و همکارانش نشان دادند که اثر سیرمترین و مالاتیون بر روی کبد موش صحرایی باعث کاهش فعالیت GST می شود (۱۱). مطالعه اثر سم آزینافوس متیل بر گونه ای از ماهی نشان داد که در میزان فعالیت GST کبد و کلیه تغییری ایجاد نمی شود (۳۱).

GSH یک تری پپتید حاوی تیول بوده و یکی از مهمترین آنتی اکسیدان های سلولی به شمار می رود که عملکردهای بیولوژیکی مختلفی دارد و انواع اکسیژن و متابولیت های واکنش پذیر را از بین می برد. بعلاوه، می تواند به عنوان یک سوپراکسید برای آنزیم های گلوکوتاتیون پراکسیداز و گلوکوتاتیون S- ترانسفراز که خنثی کننده سموم هستند، عمل کند (۳۲، ۳۳). تخلیه GSH در نهایت باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می شود که منجر به آسیب DNA، توقف کامل و کاهش مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو می گردد (۳۴، ۳۵). مطالعه حاضر نشان داد که تجویز حاد پاراکسون ($>0.7 \text{ mg/kg}$) موجب کاهش غلظت گلوکوتاتیون در بافت کلیه می گردد. مطالعه Buyukokuroglu و همکاران نشان دادند که مصرف فنتیون به مدت ۲۴ ساعت در

دیمتوات در موش‌های بالغ و نوزادان آنها بررسی شد که سطح MDA افزایش پیدا کرد (۴۳). افزایش‌های متشابهی هم در سطوح MDA در بافت‌های مختلف موش‌های صحرایی بالغ بعد از تزریق ارگانوفسفرها گزارش شده است (۴۴، ۴۵). نتایج مطالعات متعدد نشان می‌دهد که سطوح پائین یا فقدان پراکسیداسیون لیپیدی، منعکس کننده اثرات محافظتی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است (۴۶).

نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که تجویز پاراکسون بصورت حاد موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تخلیه گلوپروتئین در بافت کلیه می‌گردد. افزایش فعالیت آنزیم‌ها احتمالاً ناشی از افزایش ظرفیت سم‌زدایی بافت کلیه است و کاهش GSH نشان‌دهنده نارسایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان برای مقابله با ROS و القاء استرس اکسیداتیو است. عدم تغییر میزان مالون دی‌آلدئید بیانگر وجود استرس اکسیداتیو در مراحل اولیه است. با توجه به نتایج متضاد بدست آمده بنظر می‌رسد که برای درک مکانیسم دقیق ارگانوفسفرها، بررسی اثر این ترکیبات بر روی بافت‌های مختلف و با روش‌های دیگر لازم می‌باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی مرکز تحقیقات شیمیایی و علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... در قالب طرح تحقیقاتی انجام گردیده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسوولین آن مراکز ابراز می‌دارند.

References

1. Zhang CH, Malhorta SV. Increased paraoxon detection by acetylcholinesterase inactivation with ionic liquid additives. *Talanta* 2005; 67: 560-563.
2. Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi

ماهیه‌چنه انسان سطح GSH را کاهش می‌دهد (۳۵). همچنین مطالعه Monteiro و همکاران نشان داد که مصرف متیل پاراتیون توسط ماهی موجب کاهش گلوپروتئین در بافت‌های کبد، ماهیه‌چنه سفید و آبشش می‌گردد (۳۶). مطالعه دیگری که توسط Catalgol و همکارانش انجام شد نشان داد که تری کلروفن سطح GSH را در اریتروسیت‌های انسان در حدود ۶۶ تا ۷۹ درصد کاهش داد (۳۷).

MDA یکی از مهمترین و رایج‌ترین مارکرهای پراکسیداسیون لیپیدی است و افزایش سطح MDA نشان‌دهنده اختلال در مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی و آنزیمی است (۳۸). مطالعات اخیر نشان داده‌اند بل‌دنبال سمیت ارگانوفسفرها، سطح MDA در بافت یا خون افزایش می‌یابد، ولی در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد (۳۹). در این مطالعه به دنبال تجویز پاراکسون پس از ۲۴ ساعت تغییرات معنی‌داری در میزان مالون دی‌آلدئید کلیه مشاهده نشد. شادنی و همکاران عدم تغییر در میزان مالون دی‌آلدئید در پلاسما افراد که بطور مزمن در مواجهه با آفت‌کش‌ها قرار گرفته بودند را گزارش نمودند (۴۰). بعلاوه، با مطالعه اثر دیازینون بر بافت‌های مختلف ماهی در بعضی از بافت‌ها مانند آبشش، ماهیه‌چنه و لوله گوارش، افزایش میزان مالون دی‌آلدئید و عدم تغییر آن در کلیه مشاهده شده است (۴۱). Isik و همکاران نشان دادند که سطح MDA در ماهی‌های آلوده شده با متیل پاراتیون و دیازینون در طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت در بافت‌های کبد و ماهیه‌چنه افزایش می‌یابد (۴۲). در مطالعه دیگری اثر

- S, Shadnia S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats followig subchronic exposure to malathion. *Comp Biochem Physiol* 2004; 137: 29-34.
3. Worek F, Diepold C, Eyer P. Dimethyl

- phosphoryl-inhibited human cholinesterase inhibition. Reactivation and aging kinetics. *Arch Toxicol* 1998; 73: 7-14.
4. Lee BW, London L, Paulauskis j, Myers I, Chrisiani DC. Association between human paraoxonase gene polymorphism and chronic symptoms in pesticide exposed workers. *J Occup Environ Med* 2003; 45: 118-122.
 5. Staiones L, Beseler C, Pesticide illness, farm practices, and neurological symptoms among Farm residents in colorad. *Environ Res* 2002; 90: 89-97.
 6. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathion peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell cervical against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 235-248.
 7. Coban T, Mobsout A, Eke BC, Bulbul D, Berberoglu U. Glutathion and lipid peroxidation levels in human breast tumors. *Neoplasma* 1908; 48(3): 161-165.
 8. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 2000; 62: 649-671.
 9. Stom 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.
 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: 173-181.
 11. Khan SM, Sobti RC, Kataria L. Pesticide-induced altration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. *Clin Chim Acta* 2005; 358: 131-138.
 12. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamine E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nut Biochem* 2001; 12: 500-504.
 13. Ananya R, Subeena S, Kumar DA, Kumar DT, Kumar MS. Oxidative stress and histopathological changes in the heart following oral lindane (gammahexachlorohexane) administration in rats. *Med Sci Monit* 2005; 11: 325-329.
 14. Winterbourn C, Hawkins R, Brian M, Carrell R. The Estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975; 85: 337.
 15. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
 16. Habig WT, Jakoby WB. Glutathion S-Transferas (rat and human). *Methods Enzymol* 1981; 77: 218-231.
 17. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd Edition, Philadelphia: W.B. Saunders; USA; 1994. P 1990-1991.
 18. Satoh K. Serum lipid peroxidation in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 37-43.
 19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the priniple of protein-dye binding. *Analytical Biochem* 1976; 72: 248-254.
 20. Haberle D, Wahllander A, Sies H. Assessment of the kidney function in maintenance of plasma glutathione concentration and redox state in anaesthetized rats. *FEBS Lett* 1979; 108: 335-340.
 21. Anderson HR, Nielsen JB, Nielsen F. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chemis* 1997; 43: 562-568.
 22. Kaur R, Sandhu HS. In vivo changes in antioxidant system and protective role of selenium in chlorpyrifos-induced subchronic

- toxicity in bubalus bubalis. *Environ Toxicol Pharmacol* 2008; 26: 45-48.
23. Gani E, Mohammadi M, Jafari M, Khoshbatene A, Asgari A. Evaluation of oxidative stress index in brain tissue of rats after expose to paraoxon. *Kowsar Med J* 2008; 1: 1-8(Persian).
 24. Fetoui H, Garoui EM, Makniyadi F, Zeghal N. Oxidative stress induced by lambda-cyhalothrin in rat erythrocytes and brain: Attenuation by vitamin C. *Environ Toxicol Pharmacol* 2008; 26: 225-231.
 25. Yu F, Wang Z, Ju B, Wang Y, Wang J, Bai D. Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of cobination of vitamin C and E. *Exp Toxicol Pathology* 2008; 59: 415-423.
 26. 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: 268-272.
 27. Tripathi G, Shukla, SP. Malate and lactate dehydrogenases of a freshwater cat fish, impact of endosulfan. *Biomed Environ Sci* 1990; 3: 52-58.
 28. Mishra R, Shukla SP. Endosulfan effects on muscle malate dehydrogenase of the freshwater catfish *Clarias batrachus*. *Ecotoxicol Environ* 2003; 56: 425-433.
 29. Mishra R, Shukla SP. Endosulfan mediated effects on lactate dehydrogenase from the catfish. *Toxicol Lett* 1998; 95: 145.
 30. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 1984; 249: 7130-7139.
 31. Oruc E, Uner N. Combined effects of 2, 4 -d and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of oreochromis niloticus. *Comp Biochem Physiol. Part C* 2002; 127: 291-296.
 32. Winkler BS, Orselli SM, Rex TS. The redox couple between glutathione, ascorbic Acid: A chemical and physiological perspective. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 333-349.
 33. Nordberg J, Arner E. Reactive oxygen species, antioxidant, and the mammalian thioredoxin system. *Free. Radic Biol Med* 2001; 31: 1287-1312.
 34. 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 Nutrition Biochem* 2005; 16: 577-586.
 35. Buyukokuroglu ME, Cemek M, Tosun M, Yurumez Y, Bas O, Yavuz Y. Dantrolen may prevent organophosphate-induced oxidative stress and muscle injury. *Pes Biochem Physiol* 2008; 92: 156-163.
 36. Monteiro DA, Rantin FT, Kalinin AL. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Bryconcephalus* exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600. *Comp Biochem Physio* 2009; 149: 40-49.
 37. Catalgol BK, Ozden S, Alpertunga B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. *Toxicol in vitro* 2007; 21: 1538-1544.
 38. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotox Environ Safety* 2006; 64: 178-189.
 39. Altuntas I, Kilinc I, Orhan H, Demirel R, Koylu H, Delibas N. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes in vitro. *Hum Exp Toxicol* 2004; 23: 9-13.
 40. Shadnia S, Azizi E, Hosseini R, Khoei S,

- Fouladdel S, Pajoumand A, et al. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum Exp Toxicol* 2005; 24: 439-445.
41. Durmaz H, Sevgiler Y, Uner N. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in oreochromis niloticus. *Pes Biochem Physiol* 2006; 84: 215-226.
42. Isik I, Celik I. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on ceratin biomarkers in various tissues of rainbowtrout. *Pes Biochem Physiol* 2008; 92: 38-42.
43. Mahjoubisamet A, Fetoui H, Zeghal N. Nephrotoxicity induced by dimethoate in adult rats and their Suckling Pups. *Pes Biochem Physiol* 2008; 91: 96-103.
44. Fortunato JJ, Agostinho FR, Petronilho GZ, Dal-Pizzolre F, Quevedo J. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. *Neurotox Res* 2005; 9: 23-28.
45. Possamai FP, Fortunato JJ, Feier G, Agostinho FR, Quevedo J, Filho DW, et al. Oxidative stress after acute and sub chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007; 23: 198-204.
46. Oruc EO, Usta D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in defferent tissues of Cyprinus carpio. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007; 23: 48-55.