مقاله پژوهشی

بررسی پاسخ سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان طحال و اریتروسیت‌ها به اثرات N-استیل سیستئین در کاهش سمیت پاراکسون در موش صحرایی

سعید خزایی[۱]، مهوش جعفری[*۲]، جواد حیدری[۳]، فاطمه سالم[٤]

تاریخ دریافت 1393/11/24 تاریخ پذیرش 1394/02/02

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: پاراکسون به‌عنوان یک ارگانوفسفره، متابولیت فعال پاراتیون است که به‌طور وسیع در کشاورزی استفاده می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها سلول‌ها را از استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند. در این مطالعه اثر N – استیل سیستئین (NAC) در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از پاراکسون در طحال و اریتروسیت‌های موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، موش صحرایی نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل (روغن ذرت به‌عنوان حلال پاراکسون)، گروه پاراکسون (۰/۷ mg/kg)، گروه NAC (۱۶۰ mg/kg) و گروه پاراکسون-NAC به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. بعد از ۲۴ ساعت، موش‌ها بی‌هوش و بافت طحال جدا و خون از قلب حیوانات گرفته و اریتروسیت‌ها تهیه شد. سپس فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون S– ترانسفراز (GST) و غلظت گلوتاتیون (GSH) و مالون دی آلدئید (MDA) توسط روش بیوشیمیایی تعیین شد.

یافته‌ها: پاراکسون با افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و GSTو کاهش غلظت GSH در طحال و اریتروسیت‌ها و افزایش فعالیت CAT و غلظت MDA در اریتروسیت‌ها و کاهش فعالیت CAT در طحال می‌شود. تجویز NAC تاحدی مانع تغییرات این پارامترها می‌شود.

نتیجه‌گیری: پاراکسون با تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش غلظت GSHباعث استرس اکسیداتیو در طحال و اریتروسیت‌ها می‌شود. تجویز NACبه‌عنوان آنتی‌اکسیدان از طریق حذف رادیکال‌های آزاد و افزایش سنتز گلوتاتیون تا حدی باعث کاهش سمیت پاراکسون می‌شود.

واژگان کلیدی: پاراکسون، N– استیل سیستئین، استرس اکسیداتیو، طحال، اریتروسیت‌ها، موش صحرایی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره سوم، ص 184-176، خرداد 1394

آدرس مکاتبه: تهران، بلوار ارتش، سه‌راه اراج، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، تلفن: ۰۹۱۲۳۰۷۹۷۳۲

Email: m.jafari145@gmail.com

مقدمه

ارگانوفسفره‌ها متداول‌ترین ترکیبات شیمیایی هستند که برای کنترل آفت‌های کشاورزی استفاده می‌شوند و به‌عنوان سمی‌ترین حشره‌کش‌ها برای حیوانات مهره‌دار بشمار می‌روند. همچنین برخی از آن‌ها مانند تابون، سارین و سومان جزء عوامل مخرب اعصاب در جنگ شیمیایی استفاده شدند. این ترکیبات به دلیل قابلیت تجمع پائین و ماندگاری کوتاه‌مدت در محیط‌زیست به میزان فراوان مورداستفاده قرار می‌گیرند و منبع مهم آلودگی محیط‌زیست به‌شمار می‌آیند. هر سال میلیون‌ها مورد مسمومیت شدید و ۲۲۰۰۰۰ مرگ در اثر مسمومیت با ارگانوفسفره‌ها رخ می‌دهد که اکثریت این مسمومیت‌ها و ۹۹ درصد مرگ‌های ناشی از آن در جهان سوم رخ می‌دهد. این عوامل به‌عنوان سومین علت مسمومیت و علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از مسمومیت در ایران می‌باشند (۱-۳).

ترکیبات ارگانوفسفره از طریق فسفریلاسیون اسیدآمینه سرین در جایگاه فعال آنزیم کولین استراز موجب غیرفعال شدن این آنزیم به‌صورت غیرقابل‌برگشت و عدم هیدرولیز استیل کولین می‌شوند. درنتیجه منجر به تجمع استیل کولین در سیناپس‌های سیستم عصبی مرکزی و محیطی و تحریک بیش‌ازحد سیناپس‌های کولینرژیک نیکوتینی و موسکارینی می‌گردند.

[۱] کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

[۲] استاد بیوشیمی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

[٤] کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

اثرات ناشی از مسمومیت با این ترکیبات بسیار متنوع و پیچیده می‌باشد. مهم‌ترین عوارض کلینیکی مسمومیت با ارگانوفسفره‌ها ناشی از مهار استیل کولین استراز می‌باشد (۴). پاراکسون یکی از حشره‌کش‌های ارگانوفسفره است که متابولیت فعال پاراتیون بوده و در اثر اکسیداسیون و دسولفوراسیون آن در کبد تولید می‌گردد. پاراکسون در بدن توسط پاراکسوناز موجود در پلاسما و کبد متابولیزه می‌شود. همچنین این ترکیب به‌عنوان یک داروی مؤثر بر روی گلوکوم در چشم‌پزشکی نیز کاربرد دارد (۵, ۶).

در شرایط طبیعی یک تعادل پایه بین تولید رادیکال‌های آزاد مشتق از اکسیژن و تخریب آن‌ها به‌وسیله سیستم‌های آنتی‌اکسیدان سلولی وجود دارد. این تعادل می‌تواند توسط سموم شیمیایی با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و یا به‌وسیله کاهش سیستم‌های دفاعی بدن شکسته شده و باعث القاء استرس اکسیداتیو می‌گردد (۶, ۷). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که بعضی از سموم ارگانوفسفره با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و تغییر فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان می‌شوند. مطالعات نشان داده‌اند که تجویز دیازینون موجب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) و افزایش مالون دی آلدئید (MDA) به‌عنوان بیومارکر پراکسیداسیون لیپیدها در بافت‌های مغز و قلب و اریتروسیت‌های موش صحرایی می‌شود (۸, ۹). همچنین تجویز پاراکسون به‌صورت داخل صفاقی در بافت‌های مختلف موش صحرایی بعد از ۴ و ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GST و کاهش میزان گلوتاتیون (GSH) و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و درنهایت ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود (۲, ۵, ۱۰, ۱۱).

درمان استاندارد مسمومیت با ارگانوفسفره‌ها تجویز آتروپین و انواع اکسایم‌ها نظیر پرالیدواکسایم است که آنزیم استیل کولین استراز را از مهارشدگی رهایی می‌دهد (۱۲). با توجه به تأثیر ارگانوفسفره‌ها بر روی سیستم آنتی‌اکسیدان احتمالاً استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در جهت درمان این افراد می‌تواند کمک کند (۹, ۱۳). NAC یک آنتی‌اکسیدان قوی است که به‌عنوان پیش ساز L- سیستئین و گلوتاتیون عمل می‌کند و همچنین می‌تواند به‌طور مستقیم گونه رادیکال‌های آزاد را حذف کند (۱۴). Shadnia و همکاران اثر حفاظتی NAC و آلفا- توکوفرول را در کاهش استرس اکسیداتیو القاء شده توسط دیازینون خوراکی بعد از ۴ هفته نشان دادند (۱۵, ۱۶). Pena-Llopisو همکاران نشان دادند که تزریق داخل صفاقی NAC قبل از تجویز دی کلروس به ماهی باعث افزایش غلظت GSH و GST می‌شود (۱۷). ایزدی و همکاران نشان دادند که دیازینون سبب القاء استرس اکسیداتیو در کبد و کلیه و تجویز NAC باعث کاهش آن می‌شود (۱۸).

برای درک مکانیسم عمل دقیق ارگانوفسفره‌ها با توجه به تنوع ساختمان شیمیایی و اثرات متفاوت آن‌ها بر روی بافت‌های مختلف و همچنین اثرات مختلف آنتی‌اکسیدان‌ها بر این سمیت، مطالعات تکمیلی را ضروری می‌نماید. اگرچه چندین مطالعه روی نقش حفاظتی NAC روی کاهش سمیت ارگانوفسفره‌ها انجام شده است (۱۵-۱۸)، ولیکن مطالعاتی روی تجویز این آنتی‌اکسیدان و پاراکسون به‌صورت داخل صفاقی بر روی بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف انجام نشده است. در مطالعه حاضر نقش NAC در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از پاراکسون در طحال و اریتروسیت‌های موش صحرایی با سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: ۱-کلرو ۲، ۴ دی نیترو بنزن (CDNB)، نیتروبلوتترازولیوم (NBT)، دی تیو – بیس- نیتروبنزوئیک اسید (DTNB)، تری کلرواستیک اسید (TCA) و دیگر مواد شیمیایی موردنیاز با درجه خلوص بالا از شرکت مرک و سیگما (المان) خریداری شد. NAC و اتیل پاراکسون با خلوص ۹۹ درصد از شرکت سیگمای آلمان خریداری شد. اتیل پاراکسون با غلظت ۴ mg/ml در روغن ذرت و NAC با غلظت ۱۶۰ mg/ml در آب مقطر به‌صورت تازه تهیه شد.

حیوانات: این مطالعه بر روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه آ... قرار گرفتند. دسترسی حیوانات به آب و غذا آزاد بود. موازین اخلاقی کار با حیوان‌های آزمایشگاهی که مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه آ... (عج) بود، هنگام کار با موش‌های آزمایشگاهی رعایت شد.

تیمار حیوانات: در این مطالعه تجربی، حیوانات به‌طور تصادفی به ۴ گروه (در هر گروه ۶ سر) تقسیم شدند: گروه کنترل که روغن ذرت را به‌عنوان حلال پاراکسون، گروه پاراکسون که ۰/۷ mg/kg پاراکسون، گروه NAC که ۱۶۰ mg/kg و گروه پاراکسون- NAC که به‌طور همزمان پاراکسون و NAC را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. دوز مؤثر پاراکسون که جهت القای استرس اکسیداتیو مناسب بود، با استفاده از مطالعات قبلی ما انتخاب شد (۱۱, ۱۹). همچنین از مطالعات دیگر محققین دوزی از NAC انتخاب شد که جهت القاء سنتز GSH در شرایط فیزیولوژیکی

بدن مناسب باشد (۱۶, ۱۸, ۱۹). ۲۴ ساعت (۲۰, ۲۱). بعد از تزریق با بی‌هوش نمودن حیوانات به‌وسیله اتر، خون از قلب حیوانات گرفته شد و به لوله‌های حاوی ۵ میلی‌گرم سیترات سدیم منتقل شد. بعد از جدا کردن پلاسما، گلبول‌های قرمز سه بار با ۵ برابر حجم در بافر فسفات سالین شسته شده و تا انجام آزمایش در ۷۰°C- نگهداری گردید. همچنین بافت طحال خارج گردید و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی و خارج شدن خون و جدا کردن قسمت‌های زاید، به نیتروژن مایع انتقال داده شد و سپس در دمای ۷۰- تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد.

در روز آزمایش بافت طحال را توزین و با نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سالین هموژنه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰g در ۴°C سانتریفوژ گردید. همچنین گلبول‌های قرمز شسته شده با ۱۰ برابر حجم در آب مقطر دوبار تقطیر سرد لیز و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰g در ۴°C سانتریفوژ گردید. از مایع رویی جهت سنجش شاخص‌های موردنظر استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم SOD: فعالیت آنزیم SOD به روش Winterbourn سنجیده شد (۲۲). به حجم مناسبی از بافت هموژنه و یا از گلبول‌های قرمز لیز شده، ۰/۱EDTA مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی مولار و NBT ۱/۵ میلی مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در ۳۷°C قرار گرفت. سپس ریبو فلاوین ۰/۱۲ میلی مولار در بافرفسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار با pH=۷/۸ اضافه و به مدت ۱۲ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. جذب در طی ۵ دقیقه در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین و یا واحد بر گرم هموگلوبین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم CAT: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Abei استفاده شد (۲۳). واکنش با اضافه کردن H_2O_2 ۳۰ میلی مولار به حجم مناسبی از عصاره نمونه بافتی و یا از گلبول‌های قرمز لیز شده در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار pH = ۷شروع شد. سپس جذب را در طی ۳ دقیقه در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت ویژه برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین و یا واحد بر گرم هموگلوبین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت GST: اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم به روش Habig انجام شد (۲۴). یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی بافرفسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH= ۷/۴ شامل EDTA یک میلی مولار، GSH ۲۰ میلی مولار و CDNB ۲۰ میلی مولار است. واکنش با اضافه کردن حجم معینی از عصاره بافتی و یا از گلبول‌های قرمز لیز شده شروع شد. تغییرات جذب در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت گردید. فعالیت ویژه برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین و یا واحد بر گرم هموگلوبین بیان شد.

سنجش میزان GSH: برای سنجش میزان گلوتاتیون بافت از روش Tietz استفاده شد (۲۵). غلظت مناسبی از نمونه هموژنه و یا از گلبول‌های قرمز لیز شده با ۱۰ میکرو لیتر اسیدسولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰۰ g سانتریفوژ شد. ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی برداشته به ۸۱۰ میکرو لیتر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن ۹۰ میکرو لیتر DTNB ۰/۴ درصد محلول در سیترات سدیم ۱ درصد واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در طول‌موج ۴۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوتاتیون ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول استاندارد گلوتاتیون در غلظت‌های ۲۰۰ – ۲۵ میکرومولار تهیه شد و منحنی استاندارد گلوتاتیون رسم گردید و غلظت گلوتاتیون برحسب نانومول در میلی‌گرم پروتئین و یا نانومول بر گرم هموگلوبین محاسبه گردید.

سنجش میزان مالون دی آلدئید (MDA): برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها از روش Kei استفاده شد (۲۶). به ۵۰۰ میکرو لیتر گلبول‌های قرمز لیز شده ۱/۵ میلی‌لیتر TCA ۱۰ درصد اضافه شد. به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی را برداشته و ۲ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک ۰/۶۷ درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر n- بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ g سانتریفوژ شد. سپس جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد MDA با استفاده از ۱،۱،۳ و۳ تتراتوکسی پروپان رسم شد و از روی این منحنی میزان غلظت MDA برحسب نانومول در میلی‌گرم پروتئین و یا نانومول بر گرم هموگلوبین محاسبه شد.

تعیین غلظت پروتئین: برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۲۷). حجم مناسبی از عصاره بافتی را به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده و ۳ میلی‌لیتر از محلول برادفورد به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر جذب قرائت شد. غلظت پروتئین را با رسم استاندارد با استفاده از محلول ۱mg/ml آلبومین سرم گاوی (BSA)محاسبه گردید.

تعیین غلظت هموگلوبین: ۲۰۰ میکرو لیتر از نمونه‌های گلبول قرمز را با ۵ میلی‌لیتر محلول درابکینز (۰/۲ گرم پتاسیم فری سیانید [$K_3Fe(CN_6)$]، ۰/۰۵ گرم KCN و ۱ گرم $NaHCO_3$ در یک لیتر) مخلوط کرده و با دستگاه هموگلوبینمتری میزان غلظت هموگلوبین برحسب g/dl به دست آمد (۲۸).

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: تجزیه‌وتحلیل اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار InStat ورژن 3.3. به‌صورت آنالیز واریانس یک‌طرفه به همراه تست توکی انجام شد. نتایج به‌صورت Mean ± SEM بیان شد. $p<۰/۰۵$ مرز معنی‌دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از اثر پاراکسون و NAC به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان طحال و اریتروسیت‌ها در جدول ۱ نشان می‌دهد که پاراکسون باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های SOD ($p<۰/۰۱$)، CAT ($p<۰/۰۱$) و GST ($p<۰/۰۱$) اریتروسیت‌ها و افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های SOD ($p<۰/۰۵$) و GST ($p<۰/۰۵$) و کاهش فعالیت آنزیم CAT ($p<۰/۰۵$) طحال در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. همچنین تجویز پاراکسون به همراه NAC باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD اریتروسیت‌ها ($p<۰/۰۱$) و کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم CAT طحال ($p<۰/۰۵$) در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد. تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گروه پاراکسون- NAC در مقایسه با گروه پاراکسون معنی‌دار نیست.

جدول (1): اثر پاراکسون و NAC به‌تنهایی و در ترکیب باهم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در طحال و اریتروسیت‌های موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت

	پارامترها	کنترل	پاراکسون	NAC	پاراکسون-NAC
SOD	طحال	۳۱/۷۶±۱/۲۸	۳۸/۷۸±۱/۴۳*	۲۸/۳۲±۱/۲۹	۳۶/۴۵±۱/۲۱
	اریتروسیت‌ها	۲۱۹۷/۸۱±۱۰۰/۱۲	۲۷۸۹/۱۴±۸۱/۴۶**	۲۰۱۵/۴۷±۸۸/۸۱	۲۷۴۵/۸۹±۹۰/۶۹**
CAT	طحال	۱۶/۸۸±۰/۷۹	۱۳/۷۴۵±۰/۵۹*	۱۵/۹۸۵±۰/۴۱	۱۳/۶۵۲±۰/۶۰*
	اریتروسیت‌ها	۲۷/۹۱±۱/۲۱	۳۷/۴۷۷±۱/۵۹**	۲۹/۳۳±۱/۸۹	۳۴/۸۴±۱/۶۹
GST	طحال	۱۱۴/۳۵±۵/۰۸	۱۳۷/۲۵۵±۴/۰۵*	۱۱۷/۲۱±۱۱/۸۴	۱۳۴/۱۱±۵/۰۸
	اریتروسیت‌ها	۱۹/۶۵±۰/۸۲	۲۵/۹۷±۱/۰۱**	۲۱/۲۵±۰/۷۴	۲۳/۸۹±۱/۲۸

$p<۰/۰۵$*، $p<۰/۰۱$** نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است. واحد فعالیت آنزیم‌ها در طحال برحسب U/mg protein و در اریتروسیت‌ها برحسب U/gHb است. NAC: N–استیل سیستئین، SOD: سوپراکسیددیسموتاز، CAT: کاتالاز، GST: گلوتاتیون S- ترانسفراز.

نتایج حاصل از اثر پاراکسون و NAC به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر غلظت‌های GSH و MDA طحال و اریتروسیت‌ها در جدول ۲ نشان می‌دهد که کاهش غلظت GSH در گروه پاراکسون در طحال ($p<۰/۰۵$) و اریتروسیت‌ها ($p<۰/۰۱$) و گروه پاراکسون- NAC در اریتروسیت‌ها ($p<۰/۰۵$) در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است. همچنین افزایش غلظت MDA در گروه پاراکسون ($p<۰/۰۱$) و گروه پاراکسون- NAC ($p<۰/۰۵$) در اریتروسیت‌ها در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است. کاهش غلظت MDA و افزایش غلظت GSH در گروه پاراکسون-NAC در مقایسه با گروه پاراکسون معنی‌دار نیست.

جدول (2): اثر پاراکسون و NAC به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر غلظت‌های GSH و MDA در طحال و اریتروسیت‌های موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت

	پارامترها	کنترل	پاراکسون	NAC	پاراکسون-NAC
GSH	طحال	۳۵/۹۱±۱/۵۴	۲۸/۲۹±۱/۴۴*	۳۳/۲۳±۱/۳۲	۲۹/۸۵±۱/۴۱
	اریتروسیت‌ها	۱/۷۵±۰/۰۷۶۳	۱/۴۱±۰/۰۴**	۱/۵۸±۰/۰۵	۱/۴۱±۰/۰۵*
MDA	طحال	۹/۱۵±۰/۴۶	۱۰/۵۵±۰/۵۶	۸/۷۲±۰/۴۲	۹/۹۷±۰/۳۹
	اریتروسیت‌ها	۳/۷۶±۰/۱۷	۵/۲۵±۰/۲۲**	۳/۹۸±۰/۱۶	۴/۹۸±۰/۱۹*

$p<۰/۰۵$*، $p<۰/۰۱$** و نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است. واحد غلظت پارامترها در طحال برحسب nmol/mg protein و در اریتروسیت‌ها برحسب nmol/gHb است. NAC: N – استیل سیستئین، GSH: گلوتاتیون و MDA: مالون دی آلدئید.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که پاراکسون با افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و GST و کاهش غلظت GSH در طحال و اریتروسیت‌ها و افزایش فعالیت CAT و غلظت MDA در اریتروسیت‌ها و کاهش فعالیت CAT در طحال باعث القاء استرس اکسیداتیو در هر دو بافت می‌شود. تجویز NAC تاحدی مانع تغییرات این پارامترها می‌شود. طحال نقش مهمی در سیستم ایمنی و دفاعی بدن با تولید لنفوسیت‌ها ایفاء می‌کند و محل ذخیره گلبول‌های قرمز است که در موارد کمبود آن‌ها را در خون آزاد می‌کند و به دلیل داشتن ماکروفاژ فراوان در تصفیه خون و پاک‌سازی سلول‌های غیرطبیعی و عوامل بیماری‌زا شرکت می‌کند. باتوجه به اهمیت بافت طحال، عوامل شیمیایی مختلف می‌تواند باعث تغییر عملکرد طحال شوند (۲۹). همچنین به دلیل غلظت بالای اکسیژن و هموگلوبین در اریتروسیت‌ها برای تولید اکسی رادیکال‌ها و بالا بودن میزان اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشاء آن‌ها، بسیار حساس به استرس اکسیداتیو هستند (۳۰).

بعضی از ارگانوفسفره‌ها باعث تولید رادیکال‌های آزاد و فعال شدن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی مانند آنزیم‌های SODو CAT می‌شوند (۸-۱۱). آنزیم SOD یک متالوانزیم است که باعث تبدیل رادیکال سوپر اکسید به H_2O_2 و آنزیم CAT باعث خنثی شدن H_2O_2 به H_2Oو O_2 می‌شود (۶, ۷). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که پاراکسون باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD در بافت‌های طحال و اریتروسیت موش صحرایی و افزایش فعالیت آنزیم CATدر اریتروسیت‌ها و کاهش آن در طحال می‌شود. تجویز NAC تا حدی سبب تغییر فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در طحال و اریتروسیت‌ها می‌گردد. افزایش فعالیت SOD باعث کاهش رادیکال سوپراکسید و افزایش H_2O_2 شده و افزایش فعالیت CATموجب خنثی شدن H_2O_2 در اریتروسیت‌ها می‌شود ولیکن کاهش فعالیت آنزیم CAT در طحال منجر به افزایش غلظت H_2O_2 در این بافت شده که درنهایت ممکن است موجب استرس اکسیداتیو شود. تغییر فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT بعد از استفاده از NAC، احتمالاً مربوط به توانایی این آنتی‌اکسیدان‌ها در حذف مستقیم ROS ها می‌باشد (۳۱). مطالعات نشان داده‌اند که تجویز دیازینون، پاراکسون و دیمتوات موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت‌های مختلف در موش صحرایی و ماهی می‌شود (۸, ۱۱, ۱۳)، درحالی‌که مطالعات دیگر کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT را در بافت‌های مختلف بعد از تجویز دیازینون، مالاتیون، کلروپیریفوس و پاراکسون نشان می‌دهند (۱۰, ۱۱, ۳۲, ۳۳). این اختلاف نتایج در مطالعات مختلف ناشی از نوع، نژاد و گونه حیوان، نوع سم و بافت، مسیر تجویز ماده سمی و دوز و زمان تیمار می‌باشد. ایزدی و همکاران نشان دادند که دیازینون سبب افزایش فعالیت SOD و CAT کبد و کلیه و تجویز همزمان NAC باعث کاهش فعالیت SOD کبد و فعالیت آنزیم CAT در کبد و کلیه می‌شود (۱۸). Uner و همکاران نشان دادند تجویز فنتون به‌تنهایی و به همراه NAC روی فعالیت SOD و CAT تأثیری ندارد (۳۴).

گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) یکی دیگر از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که با اتصال GSH به تعدادی از سوبستراهای الکتروفیل، ترکیباتی با سمیت کمتر ایجاد می‌کند بنابراین نقش مهمی در حفاظت از بافت‌ها در برابر آسیب و استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۱). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پاراکسون سبب افزایش فعالیت GST در طحال و اریتروسیت‌های موش صحرایی شده و تجویز NAC سبب کاهش فعالیت این آنزیم در مقایسه با گروه پاراکسون می‌شود. افزایش فعالیت GST با افزایش مصرف GSH همراه است. افزایش GST در اثر تزریق دیازینون نشان‌دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل این سم و دفع سریع‌تر آن است (۲۴). مطالعات دیگر نشان می‌دهند که به دنبال تجویز بعضی از ارگانوفسفره‌ها، فعالیت GST بدون تغییر (۳۵) یا افزایش (۱۱, ۳۴, ۳۶) و یا کاهش (۸, ۳۳) را نشان می‌دهد. معمولاً دوزهای کم سموم منجر به افزایش و دوزهای بالای آن باعث مهار فعالیت آنزیم‌ها می‌گردند. Pena-Llopis و همکاران نشان دادند که تزریق داخل صفاقی N- استیل سیستئین سه ساعت قبل از تجویز دی کلروس به ماهی در زمان‌های مختلف تا ۹۶ ساعت باعث افزایش فعالیت GST می‌شود. NAC باعث افزایش تحمل به این ارگانوفسفره می‌شود (۱۷). Uner و همکاران نشان دادند فنتون باعث افزایش GST و تزریق داخل صفاقی NAC قبل از تجویز فنتون به ماهی باعث کاهش GST می‌شود (۳۴). ایزدی و همکاران نشان دادند که دیازینون سبب افزایش فعالیت GST کبد و کلیه و تجویز NAC باعث کاهش فعالیت GSTکبد می‌شود (۱۸).

گلوتاتیون تری‌پپتید حاوی تیول و یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های سلولی است که باعث جمع‌آوری مستقیم ROSها می‌شود. همچنین می‌تواند به‌عنوان یک سوبسترا برای آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و GST عمل کند. تخلیه GSH درنهایت باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی آسیب به DNA، توقف تکامل و کاهش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود (۸, ۱۱). در این مطالعه تجویز پاراکسون سبب کاهش غلظت گلوتاتیون در طحال و اریتروسیت‌های موش صحرایی و تجویز NAC تاحدی سبب افزایش گلوتاتیون در مقایسه با گروه

پاراکسون می‌شود. از آنجائی که فعالیت GST نیز در طحال و اریتروسیت‌ها در اثر پاراکسون افزایش پیدا کرده است، کاهش گلوتاتیون این بافت‌ها هم می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم GST و مصرف آن به‌عنوان سوبسترا توسط این آنزیم و هم مربوط به عملکرد مستقیم آن جهت حذف رادیکال‌های آزاد باشد. جبران کاهش گلوتاتیون می‌تواند ناشی از عمل NAC به‌عنوان پیش ساز گلوتاتیون و شرکت آن در سنتز این آنتی‌اکسیدان سلولی باشد (۳۱). چندین مطالعه نشان دادند که تجویز ارگانوفسفره‌های مختلف باعث کاهش گلوتاتیون در بافت‌های مختلف شده و تجویز NAC باعث بهبود آن می‌شود (۱۷, ۱۸, ۳۴, ۳۷). Yurumez و همکاران نشان دادند که تجویز NAC یک ساعت قبل و بعد از مسمومیت با فن تیون باعث ذخیره گلوتاتیون و کاهش MDA خون در هر دو حالت حفاظتی و درمانی می‌شود (۳۸).

بیومارکر پراکسیداسیون لیپیدها MDA است که افزایش آن نشان‌دهنده اختلال در مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی و آنزیمی است (۳۹). در مطالعه حاضر افزایش سطح MDA در اریتروسیت‌ها در اثر تجویز پاراکسون مشاهده می‌شود که این افزایش ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد توسط پاراکسون و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌باشد. استفاده از NAC سبب کاهش سطح MDA در اریتروسیت‌ها می‌شود. کاهش سطح MDA می‌تواند مربوط به قابلیت NAC در حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدها توسط رادیکال‌های آزاد است. چندین مطالعه نشان دادند که تجویز ارگانوفسفره‌های مختلف نظیر فن تیون و دیازینون باعث افزایش غلظت MDA در بافت‌های مختلف شده و تجویز NAC باعث کاهش غلظت آن می‌شود (۱۵, ۱۶, ۱۸, ۳۴, ۳۷).

نتیجه‌گیری

درمجموع نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که پاراکسون با تولید رادیکال‌های آزاد، تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش غلظت گلوتاتیون باعث القاء استرس اکسیداتیو در بافت طحال و اریتروسیت‌های موش صحرایی می‌شود و تجویز NAC به‌عنوان آنتی‌اکسیدان از طریق سنتز گلوتاتیون و پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از پاراکسون می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم است از مریم صالحی، جواد رسولی و حسین مهدوی نسب جهت یاری در مراحل اولیه مطالعه تشکر نمایند. این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه آ... (عج) انجام شده است که بدین‌وسیله از کلیه مسئولین مرکز مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1. Baconi DL, Bârcă M, Manda G, Ciobanu A-M, Bălălău C. Investigation of the toxicity of some organophosphorus pesticides in a repeated dose study in rats. Rom J Morphol Embryol 2013;54(2):349-56.
2. Salehi M, Jafari M, Asgari A, Saleh Moqadam M, Salimian M, Abasnejad M, et al. Response of Brain Antioxidant Defense System to Acute Doses of Paraoxon in Male Rats. Ann Mil Health Sci Res 2009;7(3):156-62. (Persian)
3. Bhatti G, Sidhu I, Saini N, Puar S, Singh G, Bhatti J. Ameliorative role of melatonin against cypermethrin induced hepatotoxicity and impaired antioxidant defense system in Wistar rats. Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT) 2014; 8:39-48.
4. Abdollahi M, Karami-Mohajeri S. A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrome caused by organophosphate poisoning. Toxicol Appl Pharmacol 2012;258(3):309-14.
5. Malmir S, Jafari M. Comparison of the effects of diazinon and paraoxon on the antioxidant system of rat lung. J Kurdistan Univ Med Sci 2014;19(2):124-33. (Persian)
6. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. Nutr Rev 2012;70(5):257-65.
7. Rafieian-Kopaei M, Baradaran A, Rafieian M. Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. J Res Med Sci 2013;18(7):628.
8. Jafari M, Salehi M, Ahmadi S, Asgari A, Abasnezhad M, Hajigholamali M. The role of

oxidative stress in diazinon-induced tissues toxicity in Wistar and Norway rats. Toxicol Mech Methods 2012;22(8):638-47.

9. Mossa A-TH, Heikal TM, Mohafrash SMM. Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by aspirin and diazinon: the protective role of selenium. Asian Pac J Trop Biomed 2014;4:S603-S9.
10. Ghani E, Mohammadi M, Jafari M, Khoshbaten A, Asgari A. Evaluation of oxidative stress index in brain tissue of rats after expose to paraoxon. Kowsar Med J 2008;13(1):1-8. (Persian)
11. Jafari M, Salehi M, Asgari A, Ahmadi S, Abbasnezhad M, Hajihoosani R, et al. Effects of paraoxon on serum biochemical parameters and oxidative stress induction in various tissues of Wistar and Norway rats. Environ Toxicol Pharmacol 2012;34(3):876-87.
12. Togun N, Kose A, Gunay N, Tarakcioglu M, Demiryurek AT. Formulation of effects of atropine, pralidoxime and magnesium sulfate on cardiac tissue levels of nitric oxide, malondialdehyde and glutathione in organophosphate poisoning using artificial neural network. Comput Biol Med 2010;40(1):29-36.
13. Abdallah FB, Gargouri B, Bejaoui H, Lassoued S, Ammar□Keskes L. Dimethoate□induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of Vitamins C and E in vitro. Environ Toxicol 2011;26(3):287-91.
14. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. Pharmacol Ther 2014;141(2):150-9.
15. Shadnia S, Abdollahi M, Sasanian G. Effects of N-acetyl-cysteine and tocopherol on diazinon toxicity. Curr Med Chem 2003;10:2705-8.
16. Shadnia S, Dasgar M, Taghikhani S, Mohammadirad A, Khorasani R, Abdollahi M. Protective effects of α-tocopherol and n-acetyl-cysteine on diazinon-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. Toxicol Mech Methods 2007;17(2):109-15.
17. Peña-Llopis S, Ferrando MD, Peña JB. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. Aquatic Toxicol 2003;65(4):337-60.
18. Izadi F, Jafari M, Bahdoran H, Asgari A, Divsalar A, Salehi M. The Role of N-Acetyl Cysteine on Reduction of Diazinon-Induced Oxidative Stress in Rat Liver and Kidney. J Rafsenjan Univ Med Sci 2014;12(11):895-906. (Persisn)
19. 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 (Oncorhynchus mykiss). Toxicol Appli Pharmacol 2003;192(2):191-200.
20. Gokalp O, Buyukvanlı B, Cicek E, Ozer MK, Koyu A, Altuntas I, et al. The effects of diazinon on pancreatic damage and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. Pestic Biochem Physiol 2005;81(2):123-8.
21. 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). Pestic Biochem Physiol 2008;92(1):38-42.
22. Winterbourn CC, Hawkins R, Brian M, Carrell R. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J Lab Clin Med 1975;85(2):337-41.
23. Abei H. Catalase in vitro. Methods Enzymol 1984;105:121-6.
24. Habig W, Jakoby W. Glutathione S-transferases (rat and human). Methods Enzymol 1981;77:218.
25. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian

blood and other tissues. Anal Biochem 1969;27(3):502-22.

26. Kei S. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin chimica acta 1978;90(1):37-43.
27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72(1):248-54.
28. Van Kampen E, Zijlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. New York: Academic Press; 1965.
29. Ahmadi S, Jafari M, Asgari A, Salehi M. Acute effect of diazinon on lipid peroxidation level and activities of antioxidant enzymes in rat spleen. J Kermanshah Univ Med Sci 2012;16(1):1-9. (Persian)
30. Kurata M, Suzuki M, Agar NS. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. Comp Biochem Physiol B 1993;106(3):477-87.
31. Mostafalou S, Abdollahi M, Eghbal MA, Kouzehkonani NS. Protective effect of NAC against malathion-induced oxidative stress in freshly isolated rat hepatocytes. Adv Pharm Bull 2012;2(1):79.
32. Elzoghby RR, Ahlam FH, Abdel-Fatah A, Farouk M. Protective role of vitamin C and green tea extract on malathion-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. Am J Pharmacol Toxicol 2014;9(3):177-88.
33. Nisar NA, Sultana M, Waiz HA, Para PA, Baba NA, Zargar FA, et al. Experimental study on the effect of vitamin C administration on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rats exposed to chlorpyriphos and lead acetate. Veterinary World 2013;6(8):461-6.
34. Üner N, Sevgiler Y, Durmaz H, Piner P, Çınkıloğlu E. N-Acetylcysteine provides dose-dependent protection against fenthion toxicity in the brain of Cyprinus carpio L. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2009;150(1):33-8.
35. Astiz M, de Alaniz MJ, Marra CA. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. Environ Toxicol Pharm 2009;28(3):465-73.
36. Saxena R, Garg P. Vitamin E provides protection against in vitro oxidative stress due to pesticide (Chlorpyrifos and Endosulfan) in goat RBC. Bull Biosci 2010;1:1-6.
37. Oksay T, Nazıroğlu M, Ergün O, Doğan S, Özatik O, Armağan A, et al. N□acetyl cysteine attenuates diazinon exposure□induced oxidative stress in rat testis. Andrologia 2013;45(3):171-7.
38. Yurumez Y, Cemek M, Yavuz Y, Birdane YO, Buyukokuroglu ME. Beneficial effect of N-acetylcysteine against organophosphate toxicity in mice. Biol Pharm Bull 2007;30(3):490-4.

Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicol Environ saf 2006;64(2):178-89.

Original Article

INVESTIGATING RESPONSE OF SPLEEN AND ERYTHROCYTES ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM ON THE EFFECTS OF N-ACETYL CYSTEINE AGAINST PARAOXON TOXICITY IN RAT

Saeed Khazaie[1], Mahvash Jafari[2], Javad Heydari[3], Fatemeh Salem[4]*

Received: 13Feb , 2015; Accepted: 22 Apr , 2015

Abstract

Background & Aims: Paraoxon (POX) as an organophosphate pesticide is the active form of parathion that is widely used in agriculture. Antioxidants can protect cells from oxidative stress. The aim of this study was to investigate the effect of NAC as an antioxidant against POX- induced oxidative stress in rat spleen and erythrocytes.

Material & Methods: In the present experimental study, male Wistar rats were randomly divided into four groups including: control group (corn oil as POX solvent), POX group (0.7 mg/kg), NAC group (160 mg/kg), and NAC+POX all of which were given intraperitoneally. Then, 24 hours after injection, the animals were anesthetized, spleen tissues were quickly removed and blood was also collected by cardiac puncture; and erythrocytes were obtained. Then, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) activities, as well as glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels were determined by biochemical methods.

Results: POX increased SOD and GST activities and decreased GSH content in rat spleen and erythrocytes. Also, POX increased CAT activity and MDA level in erythrocytes and decreased CAT activity in spleen. Administration of NAC inhibited the changes in these parameters.

Conclusion: POX with free radical production and depleted GSH content leads to oxidative stress induction in spleen and erythrocytes. Administration of NAC as antioxidant decreases POX-induced oxidative stress by scavenging free radicals and GSH synthesis, but it does not protect completely.

Keywords: Paraoxon, N-acetyl cysteine, Oxidative stress, Spleen, Erythrocyte, Rat

Address**:** Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Tel**:** +982122289942
Email**:** m.jafari145@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2015: 26(3): 184 ISSN: 1027-3727

[1] MSc of Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran (Corresponding Author)
[3] MSc of Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] MSc of Biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran