مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره دوازدهم، شمارهٔ ۱، فروردین – اردیبهشت ۱۳۸۹، صفحه ۱۵-۸

تعیین مهار و بازیافت فعالیت استیل کولین استراز پلاسما، قشر مغز و هیپوکامپ در موشهای صحرایی نر تیمار شده با پاراکسان

مسلم محمدی(PhD) [*۱]، اسماعیل غنی(PhD student) [۲]، اصغر قاسمی(MD) [۳]، علی خوش باطن(PhD) [۴]، علیرضا عسگری(PhD) [۴]

۱- گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲- گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
۳- مرکز تحقیقات غدد درون ریز دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله

دریافت: ۸۸/۵/۱۱ ، اصلاح: ۸۸/۷/۸، پذیرش: ۸۸/۹/۱۸

خلاصه

سابقه و هدف: ترکیبات ارگانوفسفره موادی فوق العاده سمی هستند که به عنوان حشره کش کاربرد وسیعی در کشاورزی و مصارف خانگی دارند. مهار استیل کولین استراز مکانیسم اصلی ایجاد مسمومیت حاد با ترکیبات ارگانوفسفره در موجود زنده می باشد. در این مطالعه پس از تجویز سیستمیک سه دوز پاراکسان به موش صحرایی، نحوه مهار و بازیافت فعالیت استیل کولین استراز پلاسما، قشر مغز و هیپوکامپ و ارتباط بین آنها در سه زمان مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: در این مطالعه از ۸۴ سر موش موشهای صحرایی نر نژاد ویستار به وزن۲۷۰-۲۰۰ گرم استفاده شد و به گروههای ۷ تایی تقسیم شدند. حیوانات روغن ذرت (گروه حلال) یا یکی از دوزهای پاراکسان (۰/۷ ، ۰/۳ ، ۰/۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و ۳۰ دقیقه، ۴ و ۱۸ ساعت بعد از مواجهه، فعالیت استیل کولین استراز پلاسما، قشر مغز و هیپوکامپ با استفاده از روش اصلاح شده Ellman اندازه گیری و مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: فعالیت استیل کولین استراز پلاسما و مغز توسط پاراکسان بصورت وابسته به دوز مهار شد. ۱۸ ساعت پس از مواجهه با دوزهای ۰/۳ و ۰/۷ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پاراکسان، فعالیت استیل کولین استراز پلاسما به ترتیب ۳۲٪ و ۴۲٪ بازیافت شد (p<۰/۰۰۱). ۱۸ ساعت پس از تجویز دوز ۰/۷ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پاراکسان، فعالیت استیل کولین استراز در هر دو ناحیه مغز به میزان ۲۰٪ بازیافت شد (p<۰/۰۰۱). در حیوانات تیمار شده با پاراکسان (۰/۷ و ۰/۳ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، فعالیت استیل کولین استراز پلاسما همبستگی معنی داری با فعالیت استیل کولین استراز قشر مغز و هیپوکامپ داشت.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که تنها دوز ۰/۷ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن پاراکسان پس از ۳۰ دقیقه در هر دو ناحیه مغز فعالیت استیل کولین استراز را فراتر از حد لازم برای القاء تشنج مهار می کند و مهار فعالیت استیل کولین استراز پلاسما تنها در مسمومیتهای شدید می تواند به عنوان شاخصی برای مواجهه با ترکیبات ارگانوفسفره استفاده شود.

واژه های کلیدی: *پاراکسان، استیل کولین استراز، بازیافت، قشر مغز، هیپوکامپ.*

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره (Organophosphorus, OPs) مشتقات استری، آمیدی یا تیولی اسید فسفریک هستند و خانواده بزرگی (بیش از ۵۰۰۰۰ ترکیب) از عوامل شیمیایی با خواص بیولوژیکی متفاوت را شامل می شوند (۲و۱).

این ترکیبات موادی فوق العاده سمی هستند که بصورت عوامل اعصاب (تابون، سارین، سومان و VX) و حشره کش، استفاده می شوند (۵-۳ و۱). حشره کشهای ارگانوفسفره رایج ترین نوع حشره کشها هستند که کاربرد وسیعی در

* مسئول مقاله:
آدرس: ساری، میدان خزر، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، تلفن: ۳-۳۵۴۳۰۸۱-۰۱۵۱
e-mail: mohammadimo@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.1.1.3]

کشاورزی و مصارف خانگی دارند (۶). سالانه یک میلیون مسمومیت تصادفی جدی و دو میلیون خودکشی با حشره کشها در سراسر دنیا اتفاق می افتد که از این موارد ۲۰۰۰۰۰ مورد به مرگ منتهی می شود (۷). ترکیبات ارگانوفسفره بعد از جذب از راه پوست، غشاهای مخاطی و دستگاه تنفس به دنبال مواجهه تصادفی یا بلع به علت خودکشی مسمومیت ایجاد می کنند. در سالهای اخیر استفاده از بعضی حشره کشهای ارگانوفسفره به دلیل ایجاد مسمومیت عصبی و پایداری محیطی غیر قابل پیش بینی ممنوع شده است (۸). اگرچه این ترکیبات در بدن به تعدادی از آنزیم ها اتصال می یابند، اما عمل آنها بر روی آنزیم استیل کولین استراز اهمیت کلینیکی دارد. عوامل ارگانوفسفره با اتصال به جایگاه فعال این آنزیم، آن را فسفریله کرده و عملکرد طبیعی آن را مهار می کنند. اتصال بین جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز و اتم فسفر پایدار بوده و بسته به نوع ترکیب شکستن آن به ساعتها یا هفته ها زمان نیاز دارد (۷و۲). به دنبال مهار آنزیم استیل کولین استراز، استیل کولین در پایانه های عصبی کولینرژیک سراسر بدن تجمع می یابد و منجر به بروز تظاهرات بالینی می گردد (۹و ۷).

پاراتیون (دی اتیل پاراتیون)، یکی از سمی ترین آفت کشها است و به راحتی از طریق پوست و غشاهای مخاطی جذب می شود. در سال ۲۰۰۳ پاراتیون دلیل اصلی مسمومیت و مرگ و میر شغلی و تصادفی در بین آفت کشها بود و به دلیل سمیت بالا، به عنوان آفت کشی با استفاده محدود در آمده است. با این وجود به دلیل ارزان بودن و سهولت دسترسی به آن هنوز در سراسر دنیا خصوصاً در کشورهای در حال توسعه استفاده گسترده ای دارد (۱۱و ۱۰و ۷). پاراتیون آنتی کولین استراز ضعیفی است که از نظر متابولیکی باید به وسیله سیتوکروم P450 و به طور عمده در کبد دسولفوره شده و با جایگزینی اکسیژن به جای سولفور به متابولیت فعال پاراکسان تبدیل شود تا بتواند مسمومیت ایجاد کند (۱۴–۱۲و ۶). از آنجاییکه مهار آنزیم استیل کولین استراز مکانیسم اصلی ایجاد مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره می باشد، اندازه گیری میزان مهار این آنزیم در تعیین شدت مسمومیت کاربرد دارد. بعلاوه ارزیابی رابطه بین میزان مهار کولین استراز در نواحی مختلف نیز می تواند در تعیین میزان مسمومیت با این عوامل نقش داشته باشد (۱۶و۱۵). علی رغم مطالعات فراوانی که به منظور بررسی اثرات ترکیبات مختلف ارگانوفسفره بر فعالیت استیل کولین استراز در نواحی مختلف صورت گرفت (۱۹–۱۶)، تاکنون مطالعه جامعی به منظور بررسی اثر تجویز سیستمیک پاراکسان بر فعالیت استیل کولین استراز بصورت in vivo انجام نشده است. تفاوت در زمان مواجهه و گونه مورد بررسی وجه تمایز مطالعاتی است که در این زمینه صورت گرفته است. به علاوه در این مطالعات تنها اثرات دوزهای بالا و تشنج زای پاراکسان مورد بررسی قرار گرفت (۲۲–۲۰و ۶). لذا در این مطالعه به دنبال تزریق منفرد سه دوز پاراکسان (اعم از دوزهای پایین، بینابینی و بالا)، نحوه مهار و بازیافت (Recovery) فعالیت استیل کولین استراز پلاسما، قشر مغز و هیپوکامپ و ارتباط بین آنها در سه زمان مختلف به طور همزمان در موش صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

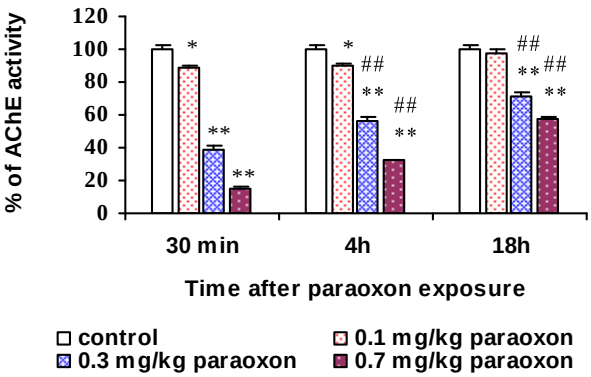
در این مطالعه از ۸۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۷۰–۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات تا زمان آزمایش در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده و آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی، هنگام کار با حیوانات رعایت گردید. تعداد ۷ سر موش به ازای هر گروه برای اندازه گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مورد استفاده قرار گرفت. از روغن ذرت به عنوان حلال به منظور تهیه محلول پاراکسان (O,O'-diethyl-p–nitrophenyl phosphate، شرکت سیگمای آلمان) استفاده شد و محلولها به گونه ای ساخته شدند که به ازای هر کیلوگرم وزن بدن یک میلی لیتر محلول تزریق گردد. از یک دوز پایین (۰/۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و یک دوز بالا و تشنج زای پاراکسان (۰/۷میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به منظور ایجاد مسمومیت در حیوانات استفاده شد. به علاوه، یک دوز حد واسط (۰/۳ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) نیز جهت ایجاد مسمومیت مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات روغن ذرت (گروه حلال به عنوان گروه کنترل) و یا یکی از دوزهای پاراکسان را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. حیوانات ۳۰ دقیقه (زمان شروع علائم)، ۴ و ۱۸ ساعت (به ترتیب برای بررسی اثرات اولیه و تاخیری ناشی از تزریق تک دوز پاراکسان) بعد از تزریق کشته شدند (۲۳و ۲۲) و پارامترهای مورد نظر مورد مطالعه قرار گرفت.

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز از روش Ellman و همکاران استفاده شد (۲۴). بعد از گذشت زمانهای مورد نظر به دنبال تزریق روغن ذرت یا پاراکسان، حیوان با استفاده از دی اتیل اتر بیهوش و با باز نمودن قفسه سینه به خونگیری از قلب حیوان در یک سرنگ آغشته به هپارین اقدام نمودیم (۲۵). سپس به کمک قیچی از منتهی الیه محل تماس گردن و سر، سر را جدا کرده و با دو برش به سمت گوشها کل مغز خارج گردید و داخل بافر هموژن قرار داده شد. پس از جداسازی هیپوکامپ و قشر مغز، آنها را جداگانه وزن نموده و هر کدام بصورت جداگانه در بافر هموژن (۰/۳۲ مولار سوکروز) حاوی تریتون X-۱۰۰ (۱ درصد) و NaCl (۱ مولار) با نسبت وزنی حجمی ۱ به ۱۰ هموژن شدند. برای بدست آوردن پلاسما، خون به مدت ۱۵ دقیقه در g× ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. از بافر ۰/۴۲۳ مولار ۵ و´۵– دی تیوبیس (۲– نیتروبنزوآت) (DTNB، شرکت مرک آلمان) در بافر ۰/۱ مولار فسفات به عنوان کروموژن و از استیل تیوکولین (ATC، شرکت سیگمای آلمان) به عنوان سوبسترا استفاده شد (غلظت نهایی ۰/۱ مولار) و افزایش جذب به مدت ۵ دقیقه در طول موج ۴۱۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر خوانده شد. محتوای پروتئین نمونه های بافتی با استفاده از روش برادفورد اندازه گیری شد (۲۶). از آلبومین سرم گاوی (BSA، شرکت فلوکای سوئیس) به عنوان استاندارد استفاده شد. فعالیت استیل کولین استراز در قشر مغز و هیپوکامپ بر حسب نانومول در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین و در پلاسما بر حسب نانومول در دقیقه به ازای هر میلی لیتر پلاسما بیان شد. به منظور مقایسه میزان فعالیت استیل کولین استراز بین قشر مغز و هیپوکامپ از آزمون Independent T-Test استفاده شد. میزان فعالیت استیل کولین استراز داخل هر گروه و بین گروهها با استفاده از آزمون آماری One-way analysis of variance (ANOVA) مورد مقایسه قرار گرفت، در صورت معنی دار بودن از آزمون Tukey برای مقایسه بعدی استفاده شد. ضریب همبستگی پیرسون بین فعالیت استیل کولین استراز پلاسما با فعالیت این آنزیم در قشر مغز و هیپوکامپ محاسبه شد و $p<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.1.1.3]

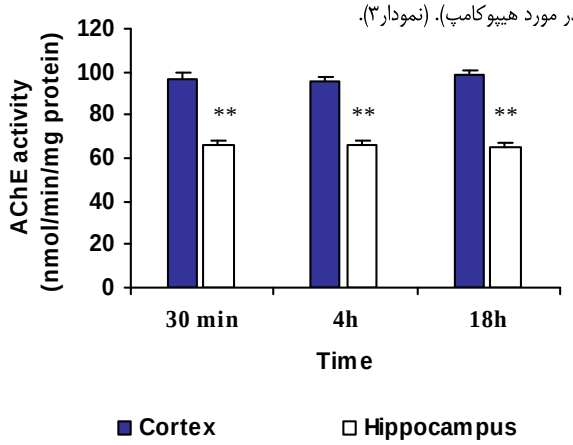
یافته ها

طی ۳۰ دقیقه پس از تزریق پاراکسان، تنها در گروهی که با دوز ۰/۷ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پاراکسان مسموم شده بودند علائم و نشانه های شدید بحران کولینرژیک (ترشح اشک و بزاق، دفع ادرار، جویدن، فاسیکولاسیون و لرزش و تشنج) مشاهده شد. در گروههای دریافت کننده دوزهای پایین تر پاراکسان (۰/۳ و ۰/۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) علایم واضحی از مسمومیت در طول مطالعه مشاهده نشد. به هر حال تمام علائم مسمومیت بعد از ۱۸ ساعت فروکش کردند. پاراکسان بصورت وابسته به دوز منجر به کاهش فعالیت استیل کولین استراز پلاسما شد. فعالیت پلاسمایی این آنزیم در همه گروههای دریافت کننده پاراکسان در زمانهای ۳۰ دقیقه و ۴ ساعت بعد از تزریق در مقایسه با گروههای کنترل مربوطه کاهش معنی دار نشان داد. ۱۸ ساعت بعد از تزریق دوز ۰/۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پاراکسان، فعالیت پلاسمایی استیل کولین استراز به طور کامل بازیافت شد. ۴ و ۱۸ ساعت بعد از تزریق دوزهای بینابینی و بالای پاراکسان، استیل کولین استراز پلاسما خودبخود فعال شد (حدوداً ۱۷ درصد در مقایسه با زمانهای قبلی)، اما پس از ۱۸ ساعت همچنان کاهش معنی داری ($p<۰/۰۰۱$) بین میزان فعالیت آن با گروه کنترل وجود داشت (بترتیب ۲۸/۴ و ۴۲/۲٪). فعالیت استیل کولین استراز پلاسما در گروههای کنترل در زمانهای مورد مطالعه بترتیب ۲۶۰±۵/۹، ۲۵۹/۷±۶/۴ و ۲۶۱/۷±۵/۸ نانومول در دقیقه به ازای هر میلی لیتر بود (نمودار ۱).



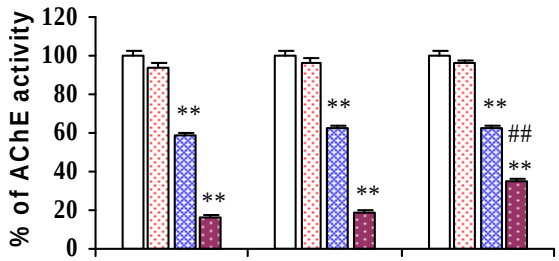
نمودار ۱. اثر پاراکسان بر فعالیت استیل کولین استراز پلاسما در زمانهای مورد مطالعه. مقادیر بیانگر درصد فعالیت باقیمانده در مقایسه با گروه کنترل مربوطه بوده و بصورت mean± S.E.M نشان داده شده اند.
$p<۰/۰۵$* و $p<۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل، $p<۰/۰۰۱$## اثر زمان**

در گروه کنترل فعالیت استیل کولین استراز پس از ۳۰ دقیقه، ۴ و ۱۸ ساعت در قشر مغز به ترتیب ۹۷/۱±۲/۲، ۹۶±۲/۱ و ۹۸/۷±۲/۱ نانومول در دقیقه و در هیپوکامپ به ترتیب ۶۵/۷ ±۲/۳، ۶۶/۳±۲/۳ و ۶۵/۶±۲ نانومول در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین بود. در تمامی زمانهای مورد مطالعه فعالیت آنزیم استیل کولین استراز قشر مغز بالاتر از میزان فعالیت این آنزیم در هیپوکامپ بود ($p<۰/۰۰۱$) (نمودار ۲). تزریق دوز ۰/۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پاراکسان منجر به مهار قابل ملاحظه فعالیت استیل کولین استراز قشر مغز و هیپوکامپ نشد، اما دوزهای ۰/۳ و ۰/۷ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پاراکسان فعالیت استیل کولین استراز هر دو ناحیه را در تمامی زمانهای مورد مطالعه بصورت وابسته به دوز و معنی دار ($p<۰/۰۰۱$) کاهش داشت. ۱۸ ساعت بعد از تزریق پاراکسان (۰/۷میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، فعالیت استیل کولین استراز در هر دو قسمت مغز تقریباً به میزان ۲۰٪ بازیافت شد ($p<۰/۰۰۱$)، اما همچنان در هر دو ناحیه مهار قابل ملاحظه ای ($p<۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروههای کنترل مربوطه وجود داشت (۶۴/۳٪ در مورد قشر مغز و ۶۵٪ در مورد هیپوکامپ). (نمودار۳).

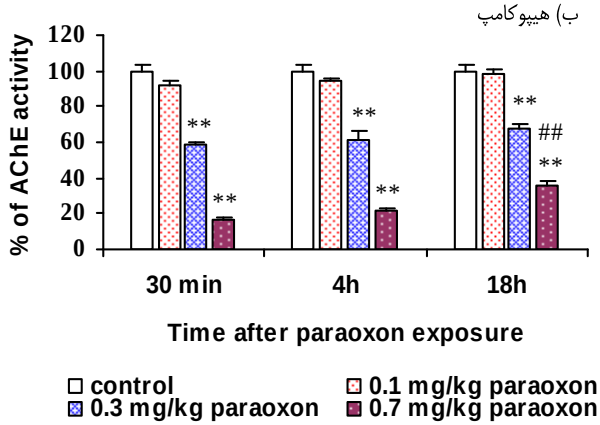


نمودار ۲. مقایسه فعالیت آنزیم استیل کولین استراز قشر مغز با هیپوکامپ در گروه کنترل در زمانهای مورد مطالعه. مقادیر بصورت mean±S.E.M نشان داده شده اند. $p<۰/۰۰۱$ در مقایسه با قشر مغز**

الف) قشر مغز



ب) هیپوکامپ



نمودار ۳. اثر پاراکسان بر فعالیت استیل کولین استراز قشر مغز (الف) و هیپوکامپ (ب). مقادیر بیانگر درصد فعالیت باقیمانده در مقایسه با گروه کنترل مربوطه بوده و بصورت mean±S.E.M نشان داده شده اند. $p<۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل، $p<۰/۰۰۱$ ## اثر زمان**

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.1.1.3]

ضریب همبستگی پیرسون با ترسیم فعالیت باقیمانده استیل کولین استراز پلاسما در مقابل فعالیت باقیمانده این آنزیم در قشر مغز یا هیپوکامپ و نیز بین فعالیت این آنزیم در قشر مغز با هیپوکامپ بین ۳۰ دقیقه و ۱۸ ساعت بعد از تزریق دوزهای پاراکسان محاسبه شد. در حیواناتی که دوزهای بینابینی و بالای پاراکسان (به ترتیب ۰/۳ و ۰/۷ میلی گرم به ازای وزن بدن) را دریافت کردند ارتباط معنی داری بین فعالیت استیل کولین استراز پلاسما با قشر مغز و هیپوکامپ مشاهده شد (جدول۱). تنها در حیوانات دریافت کننده دوز ۰/۷میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پاراکسان ارتباط معنی داری بین فعالیت آنزیم استیل کولین استراز قشر مغز با هیپوکامپ مشاهده شد (r=۰/۸۷۶ و p<۰/۰۰۱).

جدول ۱. ضرایب همبستگی فعالیت استیل کولین استراز پلاسما، قشر مغز و هیپوکامپ

دوز پاراکسان (mg/kg)	ضریب همبستگی(r)		
	پلاسما با قشر مغز	پلاسما با هیپوکامپ	قشر مغز با هیپوکامپ
۰/۱	۰/۱۸۱	۰/۲۳۹	۰/۳۳۶
۰/۳	۰/۴۸۷ *	۰/۵۹۱ **	۰/۱۲۴
۰/۷	۰/۹۵۵ **	۰/۸۴۵ **	۰/۸۷۶ **

** p<۰/۰۰۱ و * p<۰/۰۵

بحث و نتیجه گیری

پاراکسان بصورت وابسته به دوز فعالیت آنزیم استیل کولین استراز پلاسما، قشر مغز و هیپوکامپ را کاهش داد. با گذشت زمان استیل کولین استراز پلاسما، قشر مغز و هیپوکامپ مجدداً فعال شد. ۱۸ ساعت بعد از تزریق دوزهای ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۷ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پاراکسان، فعالیت استیل کولین استراز پلاسما به ترتیب به طور کامل، ۳۲ و ۴۲ درصد بازیافت شد. بالاتر بودن فعالیت استیل کولین استراز در قشر مغز نسبت به هیپوکامپ در گروه کنترل احتمالاً از عصب دهی کولینرژیک بیشتر قشر مغز در مقایسه با هیپوکامپ حکایت دارد. در هیچکدام از زمانهای مورد مطالعه، درصد فعالیت استیل کولین استراز بین قشر مغز و هیپوکامپ در گروه کنترل اختلاف آماری معنی دار نشان نداد. تنها ۱۸ ساعت به دنبال تزریق دوز ۰/۷ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پاراکسان بازیافت قابل ملاحظه ای (حدود ۲۰٪) در فعالیت استیل کولین استراز قشر مغز و هیپوکامپ مشاهده شد. این نتیجه با مشاهدات Prioux-Guyonneau و همکاران همخوانی دارد. آنها در مطالعه خود موشهای صحرایی را با تزریق داخل صفاقی پاراکسان (۱میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) مسموم نموده و پس از ۴ و ۱۸ ساعت فعالیت استیل کولین استراز چهار ناحیه مغز را اندازه گیری کردند. ۴ ساعت پس از تزریق بیش از ۷۰ درصد از فعالیت کولین استراز مغز مهار شد و ۱۸ ساعت بعد از تزریق پاراکسان، فعالیت استیل کولین استراز در نواحی مختلف مغز به طور معنی داری (حدود ۳۰-۲۰ درصد) بازیافت شد (۲۲).

نتایج مطالعه Carr و همکاران از مهار ۸۳ درصدی فعالیت استیل کولین استراز قشر مغز و پلاسمای موش صحرایی دو ساعت پس از تزریق داخل صفاقی پاراکسان (۰/۷میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) حکایت داشت. ۲۴ ساعت پس از تزریق، فعالیت استیل کولین استراز قشر مغز و پلاسما به طور معنی داری (به ترتیب به میزان ۲۰ و ۳۳ درصد) بهبود یافت (۲۱) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. مهار و بازیافت فعالیت استیل کولین استراز پلاسما سریعتر از فعالیت استیل کولین استراز قشر مغز و هیپوکامپ اتفاق افتاد. بازیافت سریعتر فعالیت استیل کولین استراز پلاسما توسط محققین دیگر نیز گزارش شد (۲۵و۲۱و۲۰). به دنبال مهار آنزیم استیل کولین استراز به وسیله ترکیبات ارگانوفسفره، دفسفریلاسیون خودبخودی و یا سنتز مجدد آنزیم برای برگشت عملکرد طبیعی آن لازم است. سرعت دفسفریلاسیون، در صورتی که آنزیم دچار فرآیند پیری نشده باشد، بسیار آهسته بوده و به نوع عامل ارگانوفسفره نیز بستگی دارد. سنتز مجدد آنزیم کولین استراز پلاسمایی که به طور مداوم به وسیله کبد صورت می گیرد مسئول بازیافت سریع فعالیت پلاسمایی این آنزیم می باشد (۲۰و ۷). بررسی ارتباط بین فعالیت استیل کولین استراز پلاسما با فعالیت کولین استراز قشر مغز و هیپوکامپ بعد از تزریق دوزهای مختلف پاراکسان از همبستگی قابل ملاحظه ای بین فعالیت آنزیم در پلاسما با فعالیت آن در قشر مغز و هیپوکامپ به دنبال تجویز دوزهای بینابینی و بالای پاراکسان حکایت داشت. قویترین ارتباط بین فعالیت پلاسمایی آنزیم با فعالیت آن در قشر مغز (r=۰/۹۵۵) و هیپوکامپ (r=۰/۸۴۵) بعد از تزریق دوز ۰/۷ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن پاراکسان مشاهده شد. مطالعات دیگر نیز از همبستگی قابل ملاحظه بین فعالیت استیل کولین استراز خون کامل و اجزاء آن با فعالیت آنزیم در قسمتهای مختلف مغز خبر دادند (۲۷و۲۵). Guilhermino و همکاران ۲۴ ساعت بعد از تزریق داخل صفاقی پاراتیون همبستگی قابل ملاحظه ای (r=۰/۹۶) را بین فعالیت کولین استراز خون و قشر فرونتال مغز مشاهده کردند (۲۷).

Pope و همکاران موشهای صحرایی نوزاد و بالغ را با حداکثر دوز قابل تحمل سه حشره کش ارگانوفسفره (متیل پاراتیون، پاراتیون و کلرپیریفوس) مسموم کردند. در موشهای نوزاد فعالیت کولین استراز پلاسما و اریتروسیت ارتباط نسبتاً خوبی (r=۰/۷۹۴-۰/۹۴۳) با فعالیت کولین استراز مغز طی ۴ ساعت و ۷ روز بعد از مواجهه داشت. چنین ارتباطی در موشهای بالغ تغییرات بیشتری (r=۰/۲۱۱-۰/۹۱۷) نشان داد (۲۵). همبستگی قابل ملاحظه ای بین فعالیت کولین استراز خون، اریتروسیت و پلاسما با فعالیت آنزیم در نواحی مختلف مغز بعد از تزریق کلرپیریفوس و پاراکسان به وسیله Padilla و همکاران مشاهده شد. ارتباط بین فعالیت استیل کولین استراز خون و اریتروسیت با فعالیت این آنزیم در مغز بهتر از این ارتباط بین پلاسما با مغز بود (۲۰). نتایج بررسی فعالیت استیل کولین استراز پلاسما با فعالیت کولین استراز قشر مغز و هیپوکامپ در این مطالعه و دیگر مطالعات (۲۷و۲۵و۲۰)، بیانگر آن است که در مسمومیتهای شدید فعالیت استیل کولین استراز گردش خون می تواند به عنوان یک شاخص در دسترس در پیش بینی میزان مهار کولین استراز مغز به دنبال مواجه شدن با عوامل ارگانوفسفره استفاده شود. نشانه های مسمومیت سیستمیک با عوامل ارگانوفسفره که به علت تحریک بیش از حد سیستم کولینرژیک به دنبال مهار آنزیم استیل کولین استراز بروز می کنند، معمولاً زمانی که بیش از ۷۰-۶۰ درصد فعالیت آنزیم مهار شود، ظاهر می شوند (۲۹و۲۸و۱۷). در این مطالعه نشانه های مسمومیت با پاراکسان تنها در حیوانات دریافت کننده دوز بالای پاراکسان و طی ۳۰ دقیقه بعد از تزریق بصورت واضح مشاهده شد. ۳۰ دقیقه بعد از تزریق این دوز بیش از ۸۰٪ فعالیت آنزیم استیل کولین استراز پلاسما، قشر مغز و هیپوکامپ مهار شد. به هر

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.1.1.3]

حال، ۱۸ ساعت بعد از تزریق کلیه نشانه های ناشی از مسمومیت در تمامی حیوانات فروکش کردند، در این زمان میزان مهار باقیمانده فعالیت آنزیم در پلاسما و نواحی مغز به ترتیب کمتر از ۴۵ و ۶۵ درصد بود. در مطالعه حاضر غلظت پاراکسان در پلاسما و مغز اندازه گیری نشد و از میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز پلاسمایی و مغز به منظور بررسی مسمومیت استفاده شد. پاراکسان حلالیت بالایی در فاز چربی دارد و می تواند به راحتی از سد خونی– مغزی عبور کرده و آنزیم استیل کولین استراز مغز را مهار کند (۳۰). با توجه به وجود پاراکساناز شماره ۱ (PON1) در سرم می توان انتظار داشت بعد از ورود پاراکسان به داخل خون، بخشی از آن قبل از رسیدن به مغز تخریب شده باشد و این موضوع خصوصاً در کاهش بروز نشانه های مسمومیت با دوزهای پایین مورد استفاده در این مطالعه اهمیت داشته است. در کل نتایج این مطالعه از مهار وابسته به دوز فعالیت استیل کولین استراز پلاسما، قشر مغز و هیپوکامپ در موش صحرایی توسط پاراکسان حکایت دارد. مهار فعالیت استیل کولین استراز پلاسما تنها در مسمومیتهای شدید میتواند بعنوان شاخصی برای بررسی مواجهه با ترکیبات ارگانوفسفره استفاده شود.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.1.1.3]

Determination of the Inhibition and Recovery of the Plasma, Cerebral Cortex and Hippocampus Acetylcholinesterase Activity in Male Paraoxon-Treated Rats

M. Mohammadi (PhD) [1*], E. Ghani (PhD Student) [2], A. Ghasemi (MD) [3], A. Khoshbaten (PhD) [4], A.R. Asgari (PhD) [4]

1. Department of Physiology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2. Department of Physiology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3. Endocrinology and Metabolism Rsearch Center, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Department of Physiology and Biophysics, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: Aug 8th 2009, Revised: Sep 30th 2009, Accepted: Dec 9th 2009.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Organophosphorus (OP) compounds are highly toxic and are widely used as an insecticide in agriculture and domestic consumptions. Acetylcholinesterase (AChE) inhibition is the primary mechanism of acute in vivo toxicity of organophosphorus compounds. In the present study we evaluated inhibition and recovery of the plasma, cerebral cortex and hippocampus AChE activity and their correlations following systemic administration of three doses of paraoxon in three different time points in rat.

METHODS: Eighty four male Wistar rats (200-270 g) were used in this study and divided into groups of seven. Animals were given a single intraperitoneal injection of corn oil (vehicle group) or one of the doses of paraoxon (0.1, 0.3, or 0.7 mg/kg) and AChE activity in the plasma, cerebral cortex, and hippocampus was measured at 30 min, 4 h, and 18 h after exposure using the modified method of Ellman.

FINDINGS: Plasma and brain AChE activity was inhibited in a dose dependent manner by paraoxon. After 18 h, plasma AChE activity was recovered 32, and 42 percent ($p<0.001$) in animals exposed to 0.3, and 0.7 mg/kg paraoxon, respectively. 18 h after 0.7 mg/kg paraoxon, AChE activity was significantly recovered ($p<0.001$) in both brain areas (about 20%). Plasma AChE activity correlated significantly with both cerebral cortex and hippocampus AChE activity in rats treated with paraoxon (0.3 and 0.7 mg/kg).

CONCLUSION: In both brain areas, paraoxon (only 0.7 mg/kg) inhibited AChE activity to induce seizure activity after 30 min. Inhibition of the plasma AChE activity can use as a marker of exposure only in severe toxicities with OP compounds.

KEY WORDS: *Paraoxon, Acetylcholinesterase, Recovery, Cerebral cortex, Hippocampus.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Physiology & Pharmacology Department, Medical School, Kilometer 18 of Khazarabad Road, Khazar Sq., Sari, Iran
Tel: +98 151 3543081-3
E-mail: mohammadimo@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.1.1.3]

References

1. Karalliedde L. Organophosphorus poisoning and anaesthesia. Anaesthesia 1999;54(11):1073-88.
2. Kamanyire R, Karalliedde L. Organophosphate toxicity and occupational exposure. Occup Med (Lond) 2004;54(11):69-75.
3. Shih TM, McDonough JH. Organophosphorus nerve agents-induced seizures and efficacy of atropine sulfate as anticonvulsant treatment. Pharmacol Biochem Behav 1999;64(1):147-53.
4. Shih TM, McDonough JH, Koplovitz I. Anticonvulsants for soman-induced seizure activity. Biomed Sci 1999;6(2):86-96.
5. Tuovinen K. Organophosphate-induced convulsions and prevention of neuropathological damages. Toxicology 2004; 196(1-2):31-9.
6. Carr RL, Richardson JR, Guarsico JA, et al. Effects of PCB exposure on the toxic impact of organophosphorus insecticides. Toxicol Sci 2002;67(2):311-21.
7. Singh S, Sharma N. Neurological syndromes following organophosphate poisoning. Neurol India 2000;48(4):308-13.
8. Jameson RR, Seidler FJ, Slotkin TA. Nonenzymatic functions of acetylcholiesterase splice variants in the developmental neurotoxicity of organophosphates: chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and diazinon. Environ Health Perspect 2007;115(1):65-70.
9. Shih TM, McDonough JH Jr. Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. J Appl Toxicol 1997;17(4): 255-64.
10. Santos HR, Cintra WM, Aracava Y, Maciel CM, Castro NG, Albuquerque EX. Spine density and dendritic branching pattern of hippocampal CA_1 pyramidal neurons in neonatal rats chronically exposed to the organophosphate paraoxon. Neurotoxicology 2004;25(3):481-94.
11. Liu J, Karanth S, Pope C. Dietary modulation of parathion-induced neurotoxicity in adult and juvenile rats. Toxicology 2005;210(2-3):135-45.
12. Chambers JE, Chambers HW. Time course of inhibition of acetylcholinesterase and aliesterase following parathion and paraoxon exposures in rats. Toxicol Appl Pharmacol 1990;103(3):420- 9.
13. Kaliste-Korhonen E, Tuovinen K, H?nninen O. Effect of Phenobarbital and β-naphthoflavone on activities of different rat esterases after paraoxon exposure. Gen Pharmacol 1998; 31(2): 307-12.
14. Sheikh J, Pope CN. Combined forced running stress and subclinical paraoxon exposure have little effect on pyridostigmine-induced acute toxicity in rats. Toxicology 2003;190(3): 221-30.
15. Ray A, Liu J, Karanth S, Gao Y, Brimijoin S, Pope C. Cholinesterase inhibition and acetylcholine accumulation following intracerebral administration of paraoxon in rats. Toxicol Appl Pharmacol 2009;236(3):341-7.
16. Maxwell DM, Brecht KM, Koplovitz I, Sweeney RE. Acetylcholinesterase inhibition: does it explain the toxicity of organophosphorus compounds? Arch Toxicol 2006;80(11):756-60.
17. Moser VC, Padilla S. Age-and gender-related differences in the time course of behavioral and biochemical effects produced by oral chlorpyrifos in rats. Toxicol Appl Pharmacol 1998;149(1):107-19.
18. Worek F, Reiter G, Eyer P, Scinicz L. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. Arch Toxicol 2002;76(9):523-9.
19. Ray DE, Richards PG. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. Toxicol Lett 2001;120(1-3):343-51.
20. Padilla S, Wilson VZ, Bushnell PJ. Studies on the correlation between blood cholinesterase inhibition and target tissue inhibition in pesticide-treated rats. Toxicology 1994;92(1-3):11- 25.
21. Carr RL, Chambers JE. Acute effects of the organophosphate paraoxon on scheduled-controlled behavior and esterase activity in rats: dose-response relationship. Pharmacol Biochem Behav 1991;40(4):929-36.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.1.1.3]

22. Prioux-Guyonneau M, Coudray-Lucas C, Coq HM, Cohen Y, Wepierre J. Modification of rat brain 5-hydroxytryptamine metabolism by sublethal doses of organophosphate agents. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 1982;51(4):278-84.
23. Coudray-Lucas C, Prioux-Guyonneau M, Sentenac H, Cohen Y, Wepierre J. Effects of physostigmine, paraoxon and soman on brain GABA level and metabolism. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)1984;55(2):153-7.
24. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Featherstone RM. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 1961;7:88-95.
25. Pope CN, Chakraborti TK, Chapman ML, Farrar JD, Arthun D. Comparison of in vivo cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides. Toxicology 1991;68(1):51-61.
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
27. Guilhermino L, Soares AMVM, Carvalho AP, Lopes MC. Correlation between whole blood cholinesterase activity and cerebral cortex cholinesterase activity in rats treated with paraoxon. Chemosphere 1998;37(7):1385-93.
28. Slotkin TA. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. Toxicol Appl Pharmacol 2004;198(2):132-51.
29. Clegg DJ, Van Gemert M. Determination of the reference dose for chlorpyrifos: preceedings of an expert panel. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 1999;2(3):211-55.
30. Rocha ES, Swanson KL, Aracava Y, Goolsby JE, Maelicke A, Albuquerque EX. Paraoxon: cholinesterase-independent stimulation of transmitter release and selective block of ligand-gated ion channels in cultured hippocampal neurons. J Pharmacol Exp Ther 1996;278(3):1175-87.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.1.1.3]

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.1.1.3]