

# بررسی اثر مالاتیون بر نیتروزاتیو استرس در کبد موش صحرائی نر

هژیر سیف پناهی شعبانی<sup>۱</sup>، فرشاد رستم پور<sup>۱</sup>، \*اکرم رنجبر<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان  
<sup>۲</sup> گروه آموزشی داروشناسی - سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان

\* نویسنده مسئول: همدان، رو به روی پارک مردم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان، دانشکده داروسازی، گروه آموزشی داروشناسی - سم شناسی

ایمیل: akranjbar1389@yahoo.com

## مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه و هدف:** ترکیبات ارگانوفسفره مهمترین و پرمصرف ترین حشره کش ها هستند و مالاتیون یکی از این سموم است که در سطح جهان به صورت گسترده مورد استفاده قرار می گیرد. القای اکسیداتیو استرس و نیتروزاتیو استرس از مکانیسم های جدید سمیت این ترکیبات می باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثر مالاتیون بر سطح نیتروتیروزین در سلول های کبدی موش صحرائی نر می باشد.

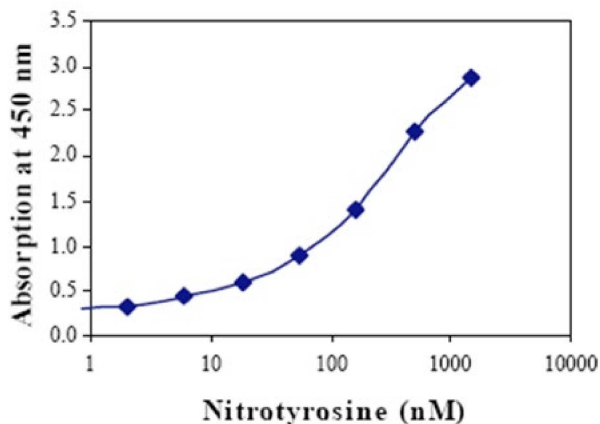
**مواد و روش ها:** این مطالعه از نوع تجربی بوده که در آن ۱۲ رأس موش صحرائی نر نژاد ویستار با محدوده ی وزنی ۲۵۰-۱۸۰ در ۲ گروه ۶ تایی مورد و شاهد تقسیم شدند که گروه مورد به مدت یک هفته به میزان ۲۰۰ mg/kg/day مالاتیون گرفتند و گروه شاهد نیز نرمال سالیین دریافت کردند. سپس کبد موش ها جدا شد، هموژنیزه گردید و در بافت کبد آن ها میزان بیومارکر نیتروتیروزین با کیت الایزای نیتروتیروزین اندازه گیری شد. سپس داده ها توسط نرم افزار PSSS نسخه ی ۱۶ و با آزمون آماری تی تست مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی داری نیز  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

**یافته ها:** نتایج تست های آماری نشان داد که میانگین بیومارکر نیتروتیروزین بافت کبد در گروه مورد  $n \text{ mol/mg}$  ۰۹۴±۰/۲۶۵ و در گروه شاهد  $n \text{ mol/mg protein}$  ۰/۰۷±۰/۱۸۰ بود و مقدار  $P=0.051$  بدست آمد.

**بحث و نتیجه گیری:** با توجه به بسیار نزدیک بودن اختلاف بین دو گروه به سطح معناداری و بیشتر بودن میانگین در گروه مورد نسبت به گروه شاهد به نظر می رسد که مالاتیون باعث افزایش نیتروتیروزین و در نتیجه القای نیتروزاتیو استرس در کبد موش های صحرائی می گردد.

**واژه های کلیدی:** مالاتیون، نیتروتیروزین، کبد، نیتروزاتیو استرس

ساندویچی ایمونواسی بر یک فاز جامد متصل به آنزیم می باشد.



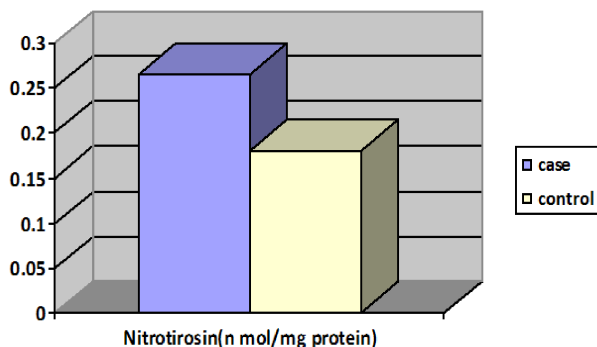
منحنی استاندارد نیتروتیروزین

اندازه گیری غلظت پروتئین: غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد انجام شد. که در اندازه گیری مقدار پروتئین بافت کبد انجام شد. اساس روش بر اساس تعادل بین اشکال مختلف پروتئونه و پروتئونه عامل کوماسی بلو G۲۵۰ است. این ترکیب در شرایط اسیدی قرمز رنگ است. کوماسی آبی با اتصال به پروتئین تقریباً به طور کامل پروتئونه و پایدار بوده و به رنگ آبی دیده می شود. بهترین استاندارد نسبی بکار رفته یکی از رنگهایی است که نتیجه مشابه با پروتئین مورد سنجش دارد. پروتئین پلاسمایی استاندارد پیشنهاد می شود آلبومین گاوی است. که غلظتهای مختلف از آن تهیه می گردد. و سپس جذب نمونه ها بر اساس منحنی استاندارد محاسبه غلظت می گردد (۱۲).

در پایان داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ی ۱۶ و با آزمون آماری stett Student مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، همچنین سطح معنی داری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته ها

میانگین بیومارکر نیتروتیروزین بافت کبد در موش های گروه مورد  $0.265 \pm 0.094$  niertorp gm/lomn و در موش های گروه شاهد  $0.180 \pm 0.007$  niertorp gm/lomn بود و مقدار  $P = 0.052$  بدست آمد.



نمودار ۱: میزان نیتروتیروزین بافت کبد در دو گروه مورد مطالعه

### مقدمه

امروزه در دنیا بیش از هزاران ترکیب فسفره شناسایی شده است که حدود ۱۰۰ مورد از آنها را اگانوفسفره های حشره کش و آفت کش تشکیل می دهند، مالاتیون نیز از پرمصرف ترین حشره کش هایی است که در تمام دنیا برای مبارزه با آفات، به ویژه در ایران جهت کنترل آفات مورد استفاده قرار می گیرد و از طریق تماس، گوارش و تنفس بر روی انسان و دیگر موجودات اثر می گذارد (۱، ۲). مطالعات نشان می دهد که اثرات سمی برخی از ارگانوفسفره ها محدود به مهار آنزیم کولین استراز نیست، بلکه به دنبال بحران کلینرژیک تغییراتی مانند آسیب به غشاهای سلولی، تولید رادیکال های آزاد و اختلال در سیستم آنتی اکسیدانی بدن نیز مشاهده می شود (۳، ۴). در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرایند موجب استرس اکسیداتیو خواهد شد (۵). مطالعات نشان می دهد که اختلال عملکرد میتوکندری در اغلب بافتهای بدن به علت مصرف زیاد اکسیژن باعث افزایش تولید رادیکالهای آزاد از جمله رادیکالهای نیتریک اکساید و پروکسی نیتريت میگردد و در نتیجه اکسیداتیو استرس و نیتروزیاتو استرس ایجاد می گردد که باعث ایجاد آسیب بافتها به ویژه کبد می گردد (۶-۸). کبد به خاطر همین ذخائر (آنتی اکسیدانی) از جمله بافت ها ی مهم در سم زدایی سموم به شمار می رود (۹، ۱۰).

هدف از این مطالعه بررسی اثر مالاتیون بر سطح نیتروتیروزین در سلول های کبدی موش صحرایی نر می باشد.

### مواد و روش ها

در این مطالعه ی تجربی تعداد ۱۲ رأس موش صحرایی نر از نژاد ویستار با محدوده ی وزنی ۱۸۰-۲۵۰g به دو گروه ۶ تایی مورد و شاهد تقسیم شدند، به گروه مورد به مدت یک هفته روزانه به میزان ۲۰۰ mg/kg مالاتیون و به گروه شاهد نیز به همین مقدار نرمال سالین داده شد و کبد موش ها بعد از جدا شدن هموژنیزه گردید و سپس در بافت کبد آنها مقدار بیومارکر نیتروتیروزین بوسیله ی کیت الایزای نیتروتیروزین اندازه گیری شد.

مواد شیمیایی مورد استفاده شامل مالاتیون، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، سوکروز، کوماسی بلو، سرم آلبومین گاوی (BSA) و دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت سیگما خریداری شد. کیت اندازه گیری نیترو تیروزین نیز از شرکت Hbt تهیه شد.

تهیه و جدا سازی بافت کبد: جهت تهیه و جداسازی بافت، کبد موش های نر صحرایی پس از جدا شدن، چند بار آن را شستشو داده و همزمان به وسیله قیچی ریز می کردند. بافت به دست آمده به این طریق توسط هموژنایزر در بافر ایزوتونیک هموژن گردید. این کار با ۸ الی ۱۰ مرتبه بالا و پایین بردن پوتر انجام شد. جدا کردن هموژن کبد با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ انجام شد. سپس نمونه ها در ۸۰- جهت سنجش شاخصهای بیوشیمیایی فریز و نگهداری شدند (۱۱).

اندازه گیری نیتروتیروزین (NOx): Nox با استفاده از کیت نیتروتیروزین توسط ELISA سنجیده شد، اساس آن بر مدل

مطالعات نشان می دهد رادیکالهای آزاد نیتروژندار و اکسیژندار بسیار سمی بوده و اولین هدف آنها اکسیداسیون لیپیدها و پروتئین ها به ویژه پروتئین های گوگرد دار می باشد. نیتروتیروزین به عنوان یک مارکر التهابی و تولید NO شناخته شده است. نیتروتیروزین در حضور متابولیت فعال NO تشکیل می شود. راههای متفاوتی شامل تولید پروکسی نیتريت منجر به تولید نیتروتیروزین می گردد. از آنجائیکه نیتروتیروزین محصول نهایی اکسیداسیون پروکسی نیتريت است ارزیابی غلظت پلاسمایی آن شاید مارکر مفیدی از آسیب وابسته به NO در محیط *in vivo* باشد. از آنجائیکه NOx اندیکاتور تولید زیاد NO است. پروتئین همراه با نیتروتیروزین شاید مارکر مناسبی برای آسیب القاء شده به وسیله گونه های فعال اکسیژن مشتق شده از NO باشد (۲۳-۲۵).

با توجه به نتایج این مطالعه که ارگانوفسفره هایی مانند مالاتیون باعث افزایش رادیکالهای آزاد نیتروژن دار و در نتیجه نیتروزاتیو استرس می گردند می توان به کسانی که در تماس حاد و مزمن با این آفت کش می باشند توصیه نمود که سیستم دفاع انتی اکسیدانی خود را با مصرف انتی اکسیدانها تقویت نموده تا آسیب نیتروزاتیو و اکسیداتیو ناشی از این سموم به حداقل ممکن برسد.

### بحث و نتیجه گیری

یافته های این مطالعه نشان داد که تجویز مالاتیون باعث افزایش معنی داری در میزان بیومارکر نیتروتیروزین در بافت کبد نسبت به گروه کنترل شد. ارگانو فسفره ها دسته ای از حشره کشها هستند که بطور گسترده ای در کشاورزی استفاده می شوند. بنابراین با توجه به خصوصیات تجزیه پذیری آنها این ترکیبات کاندیدای مناسبی برای این هدف می باشند (۱۳). بهر حال سمیت القاء شده توسط ارگانو فسفره ها غیر قابل اجتناب است. بدیهی است که مکانیسم اصلی سمیت آنها مهار آنزیم کولین استراز است (۱۴). اما در سالهای اخیر ثابت شده است که عمده ترین مکانیسم در سمیت حاد و مزمن توسط ارگانو فسفره ها از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می باشد (۳، ۱۵). مطالعات اخیرا نشان می دهد که ارگانوفسفره هایی همانند مالاتیون بخشی از سمیتشان را مستقل از فعالیت های آنتی کولین استرازیشان القاء همانند القاء استرس اکسیداتیو از طریق افزایش رادیکالهای آزاد یا تضعیف سیستم آنتی اکسیدانی در بافتهایی همانند مغز (۱۶، ۱۷)، کبد (۱۱) و خون (۱۵، ۱۸، ۱۹) می کنند. شواهدی نیز وجود دارد مبنی بر اینکه آنتی اکسیدانها از آسیب اکسیداتیو و نیتروزاتیوی که توسط ارگانوفسفره ها ایجاد می شود، جلوگیری می کنند (۲۰-۲۲).

### منابع

- Marrs TC. Organophosphate poisoning. *Pharmacology & therapeutics*. 66-51:(1)58;1993.
- Yamashita M, Tanaka J, Ando Y. Human mortality in organophosphate poisonings. *Veterinary and human toxicology*. 84:(2)39;1997.
- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 6(10):2004):RA7-141.
- Ranjbar A, Pasalar P, Abdollahi M. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. *Human & experimental toxicology*. 82-179:(4)21;2002.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*. 10-405:(9)7;2002.
- Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Archives of toxicology*. 48-519:(6)83;2009.
- Wu D, Cederbaum AI, editors. *Oxidative stress and alcoholic liver disease*. Seminars in liver disease; 2009: © Thieme Medical Publishers.
- Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatology international*. 36-526:(4)3;2009.
- Rickett G, Kelly FJ. Developmental expression of antioxidant enzymes in guinea pig lung and liver. *Development*. 6-331:(2)108;1990.
- Melega S, Canistro D, De Nicola G, Lazzeri L, Sapone A, Paolini M. Protective effect of Tuscan black cabbage sprout extract against serum lipid increase and perturbations of liver antioxidant and detoxifying enzymes in rats fed a high-fat diet. *The British journal of nutrition*. 2013:1.
- Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. Biochemical evidence for free radical induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human & experimental toxicology*. 11-205:(4)22;2003.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

- protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 54-248:(1)72;1976.
13. Kwong TC. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic drug monitoring*. 9-144:(1)24;2002.
  14. Smisaert H. Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science*. 31-129:(3602)143;1964.
  15. 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 Part C: Toxicology & Pharmacology*. 34-29:(1)137;2004.
  16. El-Demerdash FM. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food and Chemical Toxicology*. 52-1346:(6)49;2011.
  17. Ranjbar A, Ghahremani MH, Sharifzadeh M, Golestani A, Ghazi-Khansari M, Baeri M, et al. Protection by pentoxifylline of malathion-induced toxic stress and mitochondrial damage in rat brain. *Human & experimental toxicology*. 64-851:(10)29;2010.
  18. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *The Journal of nutritional biochemistry*. 4-500:(9)12;2001.
  19. Ranjbar A, Solhi H, Mashayekhi FJ, Susanabdi A, Rezaie A, Abdollahi M. Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 91-88:(1)20;2005.
  20. Vidyasagar J, Karunakar N, Reddy M, Rajnarayana K, Surender T, Krishna D. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. *Indian journal of Pharmacology*. 76:(2)36;2004.
  21. Schweikert K, Burritt DJ. The organophosphate insecticide Coumaphos induces oxidative stress and increases antioxidant and detoxification defences in the green macroalgae *Ulva pertusa*. *Aquatic Toxicology*. 2012.
  22. EL-Gendy KS, Aly NM, Mahmoud FH, Kenawy A, El-Sebae AKH. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*. 21-215:(1)48;2010.
  23. Halliwell B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS letters*. 60-157:(2)411;1997.
  24. Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia*. 8-834:(7)44;2001.
  25. Pennathur S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Heinecke JW. Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, ortho-tyrosine, and o, o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-2, 1, 6, 3-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Biological Chemistry*. 8-34621:(49)274;1999.

# The study of malathion on nitrosative stress in rat liver

Hajir Sifpanahi<sup>1</sup>, Farshad Rostampour<sup>1</sup>, Akram Ranjbar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Students' Research Committee (SRC), Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences and Health Services, Hamadan, Iran

<sup>2</sup> Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran

## Research article

### Abstract

**Introduction:** Organophosphorus compounds are the most important and most widely used insecticides and malathion is one of this toxins that has been used in the world widely. Oxidative stress and nitrosative stress are the new mechanisms of these compounds. The aim of this study was evaluate the effect of malathion on nitrotyrosins' cosentration in rat liver.

**Material & Methods:** In this experimental study 12 male wistar rats with 250-180grs were separated into case and control equal groups. Case group administrated 200mg/kg/day for a week and control group have normal salin at this course. Then rats' livers were homogenized and biomarkers of nitrotyrosin were measured by ELISA test in them. The statistical software used for this analysis was SPSS version 16 and  $P < 0.05$  was considered as the minimum level of significance.

**Results:** Mean of nitrotyrosins' biomarker in liver tissue for case group were  $0.094 \pm 0.265$  nmol/mg protein reported and the mean of nitrotyrosins' biomarker in liver tissue for control group were  $0.007 \pm 0.180$  nmol/mg protein reported,  $P = 0.051$ .

**Conclusion:** The Difference between two groups is very near to level of significance and mean of case group is more than control group, thus we result that malathion increase nitrotyrosin level and increase nitrosative stress in liver rat.

**Key Words:** Malathion, Nitrotyrosin, Liver, Nitrosative Stress