بررسی استرس اکسیداتیو وفعالیت آنزیم استیل کولین استراز در کارگران در تماس با سموم ارگانو فسفره و افراد سالم

اکرم رنجبر[1]، دکترپروین پاسالار[2]،دکتر محمد عبداللهی[3]، دکترمصطفی دلاور[4]

چکیده

مقدمه: استرس اکسیداتیو یکی از عوامل ایجاد سمیت در تماس مزمن با سموم ارگانو فسفره می‌باشد. در این بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو و مهار آنزیم استیل کولین استراز(AChE)[5] کارگران کارخانه فرموله کننده آفت کشهای ارگانوفسفره بررسی گردید .

روش کار: این پژوهش مطالعه‌ای مقطعی تحلیلی است که برروی ۴۵ کارگر دارای حداقل سابقه کاری یک سال و محدوده سنی ۲۳ تا ۵۵ سال صورت گرفت. گروه کنترل نیز کارگران کارخانه بسته‌بندی مواد غذایی بودند که از نظر سنی با آنها هم سان شدند. استرس اکسیداتیو در این افراد به صورت موادی که با تیوباربیتوریک اسید واکنش می‌دهند (TBARS[6]) نشان دهنده میزان پراکسیداسیون لیپیدی (LPO[7]) ، توانایی پلاسما در احیای یون‌های فریک به فرو (FRAP[8]) نشان دهنده ظرفیت آنتی اکسیدان‌های تام سرم، گروه‌های تیول پلاسما و همچنین فعالیت آنزیم گاماگلوتامیل ترانس پپتیداز پلاسما (GGT[9]) و فعالیت آنزیم استیل کولین استراز AChE در ایتروسیت‌ها بررسی گردید.

نتایج: یافته‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم AChE و میزان FRAP و همچنین گروه‌های تیول در گروه مورد در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری دارد. همچنین میزان TBARS نیز در این کارگران در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد. کاهش فعالیت آنزیم AChE با افزایش TBARS و کاهش FRAP در کارگران فرموله کننده ارگانو فسفره ارتباط داشت. این نتایج نشان داد که در کارگران فرموله کننده ارگانو فسفره که در تماس با این مواد هستند استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد. البته اندازه گیری فعالیت AChE اریتروسیت در کارگران فرموله کننده ارگانوفسفره نیز نشان دهنده تماس مزمن این افراد با مواد مذکور می‌باشد.

نتیجه‌گیری : با توجه به نتایج فوق می‌توان به افرادی که در تماس مزمن با سموم ارگانو فسفره هستند توصیه نمود که علاوه بر فعالیت آنزیم AChE ارزیابی استرس اکسیداتیو نیز به طور مرتب انجام گیرد و این افراد برای کاهش آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو آنتی اکسیدانهای بیشتری مصرف نمایند.

وا ژگان کلیدی : ارگانوفسفره، استرس اکسیداتیو ، پراکسیداسیون لیپیدی

مقدمه

مسمومیت با عوامل آفت کش مهم‌ترین علت مرگ ومیر در بسیاری از کشورهاست. سالانه حدود سه میلیون مورد مسمومیت شدید و ۲۲۰۰۰۰ مورد مرگ در جهان در اثر همین عوامل آفت کش می باشد(۱). کارگران فرموله کننده آفت کش به اندازه کافی از وسایل حفاظتی استفاده نمی‌کنند و به همین دلیل ممکن است در تماس مزمن با آفت‌کش‌ها قرار گیرند. بیشترین

۱- عضو هیات علمی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک.

۲- دانشیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران.

۳- دانشیار گروه سم شناسی ـ دارو شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران.

۴- عضو هیات علمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک.

5- Acetylcholinestrase.
6-Thiobarbituric acid reactive substances.
7- Lipid peroxidation.
8- Ferric reducing ability of plasma
9- Gammaglutamyltranspeptidase

تماس مزمن در بارگیری و تجهیزات کارخانجات آفت‌کش با ترکیبات ارگانوفسفره است. ترکیبات ارگانوفسفره مهم‌ترین حشره‌کش‌هایی هستند که اغلب به عنوان سلاح جنگی در جنگ‌های جهانی مورد استفاده قرار می گیرند(۲). بسیاری از اثرات خطرناک ارگانوفسفره‌ها در مسمومیت‌های حاد باعث مهار فعالیت کولین استراز خون (شامل دو نوع کولین استراز اریتروسیت و پلاسما) می‌گردد(۳). آنزیم استیل کولین استراز در غشاهای اریتروسیت قرار دارد و نشان دهنده تماس مزمن با ارگانوفسفره‌هاست(۴،۵)، اگر چه مدارک زیادی وجود دارد که مهار آنزیم AChE نشان دهنده سمیت ارگانوفسفره‌هاست(۶). بررسی‌ها نشان می‌دهد که سموم ارگانوفسفره ممکن است استرس اکسیداتیو را در تماس‌های حاد حیوانات افزایش دهند(۷، ۸، ۹، ۱۰). استرس اکسیداتیو حالتی است که در اثر عدم توازن بین تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی پیش می‌آید. اصولاً استرس اکسیداتیو در انسان به علت کاهش فعالیت آنتی اکسیدان‌های بدن همانند گاماگلوتامیل ترانس پپتیداز با افزایش گونه‌های فعال اکسیژندار[1] می‌باشد که منجر به ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد(۱۱). اندازه‌گیری محصولات پراکسیداسیون لیپیدی مانند مالون دی آلدئید[2] و ظرفیت کل آنتی اکسیدان‌ها نشان دهنده بررسی اثرات رادیکال‌های آزاد اکسیژن[3] در بدن می‌باشد. از آنجا که گزارشات کمی در مورد ارزیابی محصولات پراکسیداسیون لیپیدی ووضعیت آنتی اکسیدانی در حیوانات آزمایشگاهی در تماس با ارگانو فسفره‌ها وجود دارد، بر آن شدیم تا مطالعه‌ای را به هدف بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو و فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در کارگران در تماس با سموم ارگانوفسفره انجام دهیم.

روش کار

این مطالعه از نوع مقطعی تحلیلی بودکه در آن ٤٥ کارگر کارخانه فرموله کننده آفت کش در محدوده سنی ۲۳ تا ۵۵ سال با حداقل سابقه کار یک سال و حداکثر ۵ سال مورد بررسی قرار گرفتند. این کارگران در ۵ شیفت کاری هفتگی مشغول به کار بودند. شروع کار درساعت ۳۰ / ۷ صبح و اتمام آن در ساعت ٤ بعدازظهر بود. افراد گروه کنترل نیز٤٥ کارگر بسته بندی مواد غذایی بودند که هیچ‌گونه سابقه تماسی با آفت‌کش‌ها نداشتند. هم‌چنین از نظر وضعیت اقتصادی ـ اجتماعی جنس و تغذیه نیز هم سان شدند. هر فرد پرسش‌نامه‌ای در رابطه با وضعیت سلامتی‌اش که شامل سوالاتی در مورد سابقه مصرف دارو، ابتلا به بیماری زمینه ای و کشیدن سیگار بود پر نمود. هم‌چنین رضایت‌نامه کتبی برای شرکت در این مطالعه از آنان اخذ گردید. افرادی که هر یک از شرایط مورد نظر را نداشتند از مطالعه خارج شدند. برای انجام کار ۵ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ افراد گرفته شد.

در این مطالعه از موادی همانند n استیل تیوکولین یداید ، کینیدین ، تیوبیس ۲ نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) تریس (base) ۱ و ۱ و ۳ و ۳ تترامتوکسی پرویان (شرکت سیگما[4])، هیامین ۱۶۲۲ بنزاتونیوم کلراید ، ۲تیوباربیتوریک اسید (TBA)،n بوتانل(مرک، آلمان) ۲ و ٤ و ٦ تری پیریدیل – S تریازین

1 - ROS:Reactive oxygen species
2 - MDA: Malondialdeyde
3 - OFR : Oxygen free radicals

4- Sigma , Dorset , Uk

(TPTZ) (فلوکا، ایتالیا) بافرگلایسین و گلوپا ـ C ـ سوبسترا (شرکت زیست شیمی) استفاده شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در خون هپارینه شده افراد بعد از سانتریفوژ سلولهای قرمز سرعت هیدرولیز استیل تیوکولین در ٤١٢ نانومتر اندازه گیری شد. در اثر واکنش تیوکولین یداید با DTNB یون زرد رنگ ٥ تیوبیس نیتروبنزوات تشکیل می‌شود(١٢).

هم‌چنین جهت ارزیابی موادی که با تیوباربیتوریک اسید واکنش می‌دهند(TBARS) نمونه پلاسما با تری کلرواستیک اسید ٢٠ درصد مخلوط شده وسپس با H2SO4 شستشو داده شد. سپس TBA (٢ درصد در سولفات سدیم ٢ مولار) اضافه شد و به مدت ٣٠ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. محصولات TBARS به وسیله n بوتانل استخراج و جذب آنها در ٥٣٢ نانومتر اندازه گیری شد(١٣).

بررسی (FRAP) ظرفیت آنتی اکسیدان‌های خون با اندازه گیری توانایی پلاسما در احیای یون‌های فریک به فرو صورت گرفت. کمپلکس آبی رنگ بین Fe^{2+} و TPTZ با ماکزیمم جذب در ٥٩٣ نانومتر بود(١٤).

گروههای SH پلاسما با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در ٤١٢ نانومتر با استفاده از DTNB به عنوان معرف ارزیابی شد(١٥).

ارزیابی فعالیت آنزیم گاماگلوتامیل ترانس پپتیداز(GGT) براساس جذب ٥ آمین ٢ نیتروبنزوات که در اثر واکنش L ـ گاماگلوتامیل ٣ کربوکسیل ٤ نیترانیلید با گلایسین در ٤٠٥ نانومتر اندازه گیری شد(١٦).

آزمون تی دانش آموزی برای ارزیابی معنی دار بودن تفاوت مشاهده شده بین گروههای مورد مطالعه تعیین شد. آزمون فیشر برای تعیین توزیع نرمال واریانس بین گروه‌ها انجام شد. ارتباط بین گروه‌ها به وسیله تست پیرسون بررسی وp کمتر از ٠/٠١ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

مقدار TBARS، گروههای تیول، AChE ، FRAP، GGT به طور کامل در جدول شماره ١ آورده شده است . افزایش معنی داری در LPO ($p<٠/٠١$) در کارگران تولید آفت کش مشاهده شد. میزان TBARS در کارگران آفت کش ٠/٧٥±٩٨ / ١١ نانومول در میلی لیتر و گروه کنترل ٧٤ /٧/٦±٠ نانومول در میلی لیتر بود. هم‌چنین سطح FRAP به طور معنی داری در کارگران تولید آفت کش در مقایسه با گروه کنترل با کمتر بود($p<٠/٠١$) و میزان آن در کارگران ٠/٠٥ ±٣٨ / ١ میکرومول در میلی لیترو در گروه کنترل ٠/٠٥ ±١/٦٠ میکرومول در میلی لیتر بود. گروههای SH کارگران تولید آفت کش به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود به طوری که در این افراد ٠١/ ٠±٠/١٤میلی مول و در گروه کنترل ٠١/ ٠ ±٠/ ٢٥ میلی مول بود. هم‌چنین فعالیت آنزیم AChE کارگران تولید آفت‌کش ٣ / ١ ±٣٠ / ١١ واحد در لیتر به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل ٥٦ / ١ ±١٤/٩٣ واحد در لیتر بود ($p<٠/٠١$).

فعالیت آنزیم GGT در کارگران در تماس افزایش نشان داد اما این افزایش معنی‌دار نبود. مهار فعالیت AchE ارتباط معنی‌داری با افزایش TBARS ($d F=٤٣$ و $p<٠/٠١$، $r^2=٠/٠٤٥$) و کاهش FRAP ($dF =٤٣$ و $p<٠/٠١$، $r^2=٠/٣٨$) نشان داد. هم‌چنین

ارتباط معنی‌داری بین افزایش میزانTBARS و کاهش FRAP (r^2=۰/۵، p<۰/۰۱ و d F=۴۳) وجود داشت.

جدول ۱. پارامترهای استرس اکسیداتیو و فعالیت آنزیم AChE در کارگران فرموله کننده ارگانوفسفره وگروه کنترل

پارمترهای اندازه گیری شده	کارگران شاهد تعداد=۴۵ میانگین ± انحراف معیار	کارگران در تماس تعداد=۴۵ میانگین ± انحراف معیار	P
AChE واحد در لیتر	۱۴/۹۳ ± ۱/۵۶	۱۱/۳۰± ۱/۳	P<۰/۰۱
TBARS نانومول در میلی لیتر	۷/۶۲± ۰/۷۴	۱۱/۹۸± ۰/۷۵	P<۰/۰۱
FRAP میکرومول در میلی لیتر	۱/۶۰± ۰/۰۵	۱/۳۸± ۰/۰۵	P<۰/۰۱
GGT واحد در لیتر	۸۵۶۱± ۱۳۶	۸۷۶۵± ۳۳۵	-
Totol SH groups میلی مول	۰/۲۵± ۰/۰۱	۰/۱۴± ۰/۰۱	P<۰/۰۱

بحث

علی رغم استفاده از وسایل حفاظتی در صنایع آفت کش احتمال دارد افراد در محل کار در تماس با ذرات، مایع یا پودرآن سموم قرار گیرد . اندازه گیری فعالیت کولین استراز (کولین استراز کاذب) و کولین استراز حقیقی یا استیل کولین استراز به عنوان مارکر خوبی از تماس ارگانوفسفره هاست . استیل کولین استراز باغشاءاریتروسیت باند شده پایدارتراز کولین استراز کاذب است. کولین استراز پلاسما طی چندین هفته توسط آنزیم های جدید سنتز شده در کبد به حالت اول بر می گردد(۱۷، ۱۸). بنابراین اندازه گیری فعالیت کولین استراز اریتروسیت می تواند نشانه ای از تماس مزمن با آفت کش‌های ارگانو فسفره باشد.

مطالعات زیادی ارتباط بین فعالیت کولین استراز و سمیت ارگانو فسفره‌ها در کارگران تولید آفت کش را نشان می دهد(٤). در این بررسی فعالیت‌هایAChE کارگران در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته و افزایش معنی‌دار LPO و هم‌چنین کاهش معنی‌داری در گروه‌های تیول و ظرفیت آنتی اکسیدان‌ها مشاهده شد. هم‌چنین نقش LPO در ایجاد استرس اکسیداتیودر حیوانات در تماس با ارگانو فسفره نشان داده شده است (۷). مطالعه دیگری نشان می دهد که سمیت القاءشده توسط Bidrine در سلول‌های اپی تلیال توبولار کلیوی در اثر تولید ROS می‌باشد به طوری که MDA و LPO افزایش می‌یابند(۱۹). هم‌چنین مطالعه دیگری نشان می‌دهد رت‌هایی که حدود پانزده روز در تماس با Quinolphose قرار گرفتند دچار آسیب بافت

تستیکولار به واسطه تولید رادیکال‌های آزاد شدند. در انسان نیز گزارش شده است که در مسمومیت حادبا مالاتیون سطح TBARS، سوپر اکسید دیسموتار[1] و کاتالاز [2] افزایش یافته است. ارتباطی بین کاهش فعالیت AChE و سطح TBARS مشاهده نشد(۲۰). هم‌چنین شواهدی مبنی بر تماس تحت مزمن با مالاتیون وجود دارد که به علت افزایش MDA، فعالیت SOD، CAT، GPX [3]و گلوتاتیون ترانسفراز[4] و کاهش گلوتاتیون احیاء[5] می‌باشد(۲۱). استرس اکسیداتیوزمانی به وجود می‌آید که یا تولید رادیکال‌های آزاد افزایش یافته و یا سیستم دفاع آنتی اکسیدانی تضعیف شده باشد. بنابراین افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و تغییرات پارامترهای دیگر نشان دهنده القاء استرس اکسیداتیو در اثر تماس با ارگانو فسفره‌هاست. در این مطالعه ظرفیت آنتی اکسیدان‌های تام سرم به وسیله FRAP اندازه‌گیری شد. FRAP همه آنتی اکسیدان‌های تام سرم را به جز گلوتاتیون ارزیابی می‌کند.

گروه‌های تیول نیز در این مطالعه اندازه‌گیری شد که بطور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد. پروتئین‌ها واجد گروه‌های سولفیدریل در مقابل رادیکال‌های آزاد مهم هستند زیرا به فلزات واسطه متصل شده و تولید رادیکال‌های آزاد کاهش می‌یابد. در استرس اکسیداتیو گلو تا تیون احیاء GSH دائماً به گلوتاتیون اکسید[6] تبدیل می‌شود. در نتیجه باندهای سولفیدی آن با گروه‌های سولفیدریل در پروتئین‌ها مخلوط می‌گردد. کاهش میزان FRAP و گروه‌های تیول نشان دهنده کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن می‌باشد. افزایش میزان TBARS نشان دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است. از آنجائی که استرس اکسید اتیو عدم توازن بین تولید رادیکال آزاد و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی است، ارتباط معنی‌داری بین افزایش میزان TBARS و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی مشاهده می‌شد.

با توجه به نتایج فوق کارگران فرموله کننده آفت کش که در تماس با این مواد هستند استرس اکسیداتیو دارند. به طوری که افزایش میزان TBARS ، در کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی و هم‌چنین کاهش فعالیت AChE نیز همگی عامل مناسبی برای سمیت آفت کش‌های ارگانوفسفره می‌باشد و با اثبات وجود استرس اکسیداتیو در این افراد می‌توان سیستم‌های آنتی اکسیدانی آنزیمی آنان را با مصرف بیشتر میوه و سبزیجات و ویتامین‌ها تقویت نمود.

1 - SOD: Superoxid dismutase
2 - CAT: Catalase
3 - GPX: Glutathione peroxidase
4 - GST: Glutathione s transferase
5- GSH:Glutathione
6 - GSSG: Glutathione disulfide

منابع

1.WHO. Guideline for poison control. Geneva: WHO in collaboration with UNEP and ILO 1997;3.

2.Abiol FA, Sera A,Sawadogo G. Cholinestrase exposed to organophosphorous pesticides. Bull Environ Contam Toxicol 1988; 41: 483-88.

3.Sanz P,Roddriguez-Vinecent MC.Red blood cell and total blood acetylcholinestrase and plasma pesudocholinestrase in humans: observed variances. Clin Toxicol 1991;29: 81-90.

4. Abdollhi M, Jalali N, Jafari A. Chronic toxicity in organophosphate exposed workers. MJIRI 1995; 9: 221-25.

5.Tinoco R, Haleperine D. Poverty, production and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase via occupational exposure to organophosphate insecticides

in chipas, Mexico. Arch Environ Health 1998; 53: 29-35.
6-Ciesielki S, Loomis DP, Mims SR. Pesticide exposure cholinesterase depression and symptoms among North Carolina migrant farmworkers. Am J Public Health 1994;84: 446-51
7.Banerjee BD,Seth V,Bhattacharya A.Biochemical effects of pesticide on lipid peroxidation and free radicals scavengers. Toxicol Lett 1999;107: 33-77.
8.Alemedia MG,Fanini F,Davino S. Pro and antioxidant parameters in rat liver after short term exposure to hexacholorobenzen. Hum Exp Toxicol 1997; 16: 257-61.
9.Vandana S,Poovala V. Role of reactive oxygen metabolites in organophosphate Bidrine induced renal tubular cytotoxicity. J AM Soc Nephrol 1999;10: 1746-52.
10.Dipanker D,Tapas M. Study of Quinalphos formulation induced damage of testicular tissues and antioxidant. Appl Toxicol 2000;20: 197-204.
11.Halliwel B,Gutteridge JMC.Oxidants and human disease:some concepts. FASEB J 1984; 1:385-87.
12.George PM, Abernethy MH. Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. Clin Chem 1981; 29: 365-68.
13.Satho K. Serum lipid peroxidation in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chem Acta 1978;90: 37-43.
14.Iris F,Benzi F, Strain S. Ferric reducing antioxidant assay. Methode Enzymol 1999; 292: 15-27.
15.Hu ML,Dillared CJ. Plasma SH and GSH measurement. Method Enzymol 1994; 233:385-87.
16.Novogorodsky A,Tate SS,Mister A. Gamma glutamyl transpeptidase is a lymphoide cell surface marker:relationship to blastogenesis,differential and neoplasia. Pro Nat Sci USA 1976; 37:2414-18.
17.Ellenhorn MJ, Schonowall S, Ordog G, Wasserberger J. Ellenhorn medical toxicology :diagnosis and treatment of human poisoning. Maryland: Williams and Wilkins;1997. p.1614-63.
18.Yang ZP,Dettbarn WD. Disopropylphorofluridate induced cholinergic hyperactivity and lipid peroxidation. Toxicol Appl Pharmacol 1996; 138: 48-53.
19.Ahmad RS,Seth V,Pasha ST,Banerjee BD. Influence of dietary ginger(Zingiber officinales rose) on oxidative stress induced by Malathlone in rats. Food Chem Toxicol 2000; 38: 443-50.
20.Yang ZP,Dettbarn WD. Lipid peroxidation and changes in cytochrome c oxidase and xanthine oxidase activity in organophosphorus anticholinesterase induced myopathy. J Physiol Paris 1998; 92: 157-61.
21.Gupta RC,Milatovic D,Dettbarn WD. Deplation of energy metabolites following acetylchollinestrase inhibator induced status epilepticus:protection by antioxidants. Neurotoxicology 2001; 22: 271-82.