

تأثیر خردل گوگردی بر آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های مختلف موش صحرائی

مهوش جعفری^{۱*}، حسینعلی مهرانی^۱، علی زارعی^۲، رضا رضایی^۳، جواد رسولی^۳

چکیده

زمینه و هدف: خردل گوگردی از عوامل لیپوفیل تاوولزا است که با آلکیله کردن ماکرومولکول‌های سلولی مانند DNA، RNA و پروتئین‌ها باعث مرگ سلولی در بافت‌های مختلف می‌شود. با وجود مطالعات بسیار، مکانیسم عمل خردل به صورت کامل شناخته نشده است. در این مطالعه اثر خردل گوگردی بر آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدان بافت‌های مختلف موش صحرائی بررسی شد.

روش بررسی: موش‌های صحرائی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی در هفت گروه قرار گرفتند. گروه کنترل (دریافت کننده دی‌متیل سولفوکسید، به عنوان حلال) و گروه‌های ۷-۲ به عنوان گروه تجربی، خردل گوگردی (دوزهای ۸۰-۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را یک‌بار به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از تزریق، حیوانات بیهوش و بافت‌های کلیه، ریه و قلب آنها جدا شد. سپس خونگیری از قلب حیوانات به عمل آمد و پلاسما و اریتروسیت‌ها تهیه گردید. فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx)، گلوکوتاتیون ردوکتاز (GR) و گلوکوتاتیون S- ترانسفراز (GST) در بافت‌های مختلف به وسیله روش‌های بیوشیمیایی تعیین گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و GST در ریه و GST در قلب با دوزهای کمتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل مشاهده گردید، در حالی که فعالیت همه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بافت‌های مختلف در دوزهای بالاتر خردل کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: خردل گوگردی بر سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان در همه بافت‌ها در یک طرح وابسته به دوز تأثیر می‌گذارد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در غلظت‌های کمتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل ناشی از پاسخ جبرانی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در غلظت‌های بالاتر، نشان‌دهنده استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی در بافت‌ها می‌باشد.

کلید واژه‌ها: خردل؛ گوگرد؛ آنتی‌اکسیدان؛ موش؛ بافت‌ها.

^۱استاد بیوشیمی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران.

^۲دانشیار بیوشیمی، مرکز تحقیقات پزشکی و مهندسی جانپازان، تهران، ایران.

^۳کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

مهوش جعفری، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
m.jafari145@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۶

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Jafari M, Mehrani HA, Zarei A, Rezaei R, Rasouli J. The effect of sulfur mustard on antioxidant system enzymes in different tissues of rat. Qom Univ Med Sci J 2015;9(3):20-31. [Full Text in Persian]

مقدمه

خردل گوگردی یا ۲، ۲-دی‌کلرو اتیل سولفید از عوامل مهم شیمیایی تاول‌زا است که به نام گاز خردل معروف است. این عامل در جنگ تحمیلی ۸ ساله عراق علیه ایران به دفعات، به میزان وسیعی توسط نیروهای عراقی بر علیه نظامیان و غیرنظامیان ایرانی و عراقی مورد استفاده قرار گرفت که اثرات زیانباری را بر جای گذاشت. ضایعات کوتاه‌مدت، ناشی از تماس با غلظت‌های نسبتاً بالای خردل به صورت پوستی، چشمی، تنفسی و سیستم اعصاب بروز می‌کند که در صورت شدید بودن باعث مرگ می‌شود. در صورتی که عوارض دیررس خردل عمدتاً بر روی دستگاه تنفسی و سیستم مغز استخوان مصدوم متمرکز است. شدت ضایعات آن نیز بستگی به غلظت و مدت زمان مواجهه دارد (۱-۴).

خردل در بدن به یک ترکیب حلقوی به نام اتیلن سولفونیوم با یک بار مثبت تبدیل می‌شود. این ترکیب قادر است با مراکز نوکلئوفیل اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها واکنش داده و عمل طبیعی این ماکرومولکول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد و در طی چند دقیقه از محیط بیولوژیکی ناپدید گردد. بنابراین، ناپدید شدن خردل گوگردی از بدن بسیار سریع است، اما ترشح آن در ادرار انسان با تأخیر صورت می‌گیرد (۲، ۱). دفع خردل بیشتر از طریق ادرار و مقدار کمی از طریق مدفوع بوده که ۵۰٪ آن در ۶ ساعت اول و ۹۰٪ در اولین روز صورت می‌گیرد. در انسان ۵۰٪ آن طی ۲ روز دفع می‌شود (۲). مهم‌ترین مسیر متابولیسم خردل در بدن، واکنش با عوامل اکسیدکننده است که باعث تشکیل سولفوکسید و سولفون می‌شود. سپس این ترکیبات به گلوکاتایون (GSH) یا سیستمین متصل می‌شوند. خردل قادر است با گلوکاتایون واکنش داده و به صورت غیرمتابولیزه برای مدت طولانی در چربی بدن ذخیره شود (۲، ۱).

در شرایط فیزیولوژیکی بدن، حدود ۵-۲٪ اکسیژن به گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen Species, ROS) مانند آنیون سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال هیدروکسیل تبدیل شده که در طی فرآیندهای شیمیایی متعدد در سلول‌های هوازی ایجاد می‌گردد. ROS می‌تواند با همه ماکرومولکول‌های حیاتی واکنش داده و باعث آسیب شدید سلولی و در نهایت، مرگ

سلولی شود. در بدن آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR) و گلوکاتایون S-ترانسفراز (GST) و آنتی‌اکسیدانهای غیرآنزیمی نظیر گلوکاتایون، سیستم‌های اصلی دفاع بدن برای مقابله با ROS هستند. در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیند سبب القای استرس اکسیداتیو و بروز تغییرات پاتولوژیک در سطح ماکرومولکول‌های سلولی می‌شود (۷-۵). خردل گوگردی باعث تغییر در سیستم آنتی‌اکسیدان سلول، کاهش گلوکاتایون احیاشده (GSH) و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی غشا می‌شود (۱۳-۸). مطالعه انجام‌شده توسط حسین و همکاران نشان داد تجویز خردل به صورت داخل پوستی در موش صحرایی باعث کاهش فعالیت SOD گلبول‌های سفید (WBC)، پلاکت‌ها، طحال و مغز و کاهش فعالیت CAT در اریتروسیت‌ها، WBC، طحال و کاهش فعالیت GPx به طور معنی‌دار در WBC، طحال و کبد می‌شود (۱۴). تماس با خردل به مدت ۳۰ دقیقه، منجر به افزایش فعالیت SOD و غلظت مالون دی‌الدئید (MDA) به عنوان مارکر لیپید پراکسیداسیون پلاکت خون می‌شود (۱۵). با توجه به اینکه اثرات خردل بر روی ماکرومولکول‌های سلولی نظیر آنزیم‌ها در بافت‌های گونه‌های مختلف حیوانی وابسته به دوز، مسیر تزریق و مدت زمان تماس، متفاوت است (۱۸-۱۶)، بنابراین بررسی اثرات خردل با توجه به شرایط و روش‌های مختلف مطالعه به شناخت بهتر مکانیسم عمل خردل در بافت‌های مختلف، شناسایی روش‌های تشخیص آلودگی به این عامل و یافتن روش‌های درمانی مناسب برای جلوگیری از ایجاد ضایعات کمک می‌کند. با وجود تحقیقات زیاد، هنوز مطالعات تکمیلی دیگر در زمینه‌های مختلف ضروری است، به طوری که هنوز پژوهش‌ها در این زمینه ادامه دارد (۲۱-۱۹). مطالعات در زمینه اثر خردل بر روی سیستم اکسیدان-آنتی‌اکسیدان در موجود زنده (in vivo) از طریق داخل صفاقی (i.p.) اندک می‌باشد (۱۶). این مطالعه با هدف تعیین اثر این عامل بر فعالیت آنزیم‌های مختلف سیستم آنتی‌اکسیدان در بافت‌های مختلف انجام گرفت تا شاید نتایج و اطلاعات حاصل از آن، ره توشه تحقیقات بعدی قرار گیرد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، ۱- کلرو ۲،۴ دی‌نیترو بنزن (CDNB)، دی تیو- بیس - نیترو بنزوئیک اسید (DTNB)، GSH، گلو تاتیون اکسید شده (GSSG) و گلو تاتیون ردو کتاز و سایر مواد شیمیایی با درجه خلوص بالا، از شرکت مرک و سیگما خریداری شد. خردل گوگردی (خلوص ۹۸٪) با محلول ذخیره با غلظت ۱۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر در دی‌متیل سولفو کسید (DMSO) هر بار به صورت تازه تهیه گردید.

موش‌های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۱۵۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور ایران به مدت ۲ هفته تحت شرایط مناسب از نظر غذا، نور، آب و حرارت در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) نگهداری شدند تا به شرایط محیط عادت کنند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی که مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) بود، هنگام کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. حیوانات به طور تصادفی به هفت گروه (در هر گروه شش سر) تقسیم شدند: گروه کنترل که دی‌متیل سولفو کسید را به عنوان حلال و شش گروه دیگر که دوزهای مختلف خردل (۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. تمامی نکات لازم در هنگام تزریق خردل برای جلوگیری از احتمال آلودگی انجام گرفت. ۲۴ ساعت پس از تزریق، تمام حیوانات با اتر بیهوش شده و ۳-۵ میلی لیتر خون از آئورت قلب گرفته شد و به لوله‌های حاوی ۵ میلی گرم سیترات سدیم منتقل گردید. بعد از سانتریفوژ، پلاسما جدا و گلبول‌های قرمز سه بار با سه حجم بافر فسفات سالین شسته شدند. بافت‌های قلب، کلیه و ریه جدا شد و در ازت مایع (۱۸۰- درجه سانتیگراد) سریعاً منجمد گردید. پلاسما، گلبول‌های قرمز شسته شده و بافت‌ها تا انجام آزمایش در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

بافت‌های منجمد شده در ۷۰- درجه سانتیگراد به دقت توزین و با نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی مولار pH=۷/۴ حاوی ۱ میلی مولار EDTA) توسط هموژنایزر هموژنه گردید. سپس نمونه‌ها در ۱۶۰۰۰ دور در ۴ درجه سانتیگراد برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع فوقانی (سوپرناتانت) جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها به کار برده شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم SOD از روش Paoletti استفاده گردید (۲۲). بافت‌های منجمد شده با ترازو توزین و با نسبت حجمی ۱:۱۰ در بافر ۱۰۰ میلی مولار TDB (۱۰۰ میلی مولار تری اتانول آمین، ۱۰۰ میلی مولار دی اتانول آمین و ۱۶۴ میلی مولار HCl غلیظ با pH=۷/۴) به وسیله هموژنایزر به مدت ۳۰ ثانیه هموژنه شدند. در ادامه، نمونه‌ها در ۱۶۰۰۰ دور در ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس مایع فوقانی جدا و از ستون سفادکس G-25 عبور داده شد تا ترکیبات با وزن مولکولی کم (نمک، EDTA و سیترات سدیم) برداشته شود. برای حذف هموگلوبین و RBC، مخلوط کلروفورم- اتانول (۱:۲) به بافت‌ها اضافه شد. بعد از سانتریفوژ کردن، مایع رویی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به کار رفت. ۰/۸ میلی لیتر بافر TDH با pH=۷/۴؛ ۴۰ میکرو لیتر NADH، ۷/۵ میلی مولار؛ ۲۵ میکرو لیتر محلول EDTA/MnCl₂ (۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار) و ۱۰۰ میکرو لیتر نمونه بافتی (یا بافر برای کنترل) به یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن، مدتی به حال خود گذاشته شد تا جذب آن در ۳۴۰ نانومتر ثابت گردد. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر محلول بتا- مرکاپتواتانول ۱۰ میلی مولار اضافه شد. کاهش جذب در مدت ۵ دقیقه قرائت گردید. (یک واحد فعالیت SOD، مقدار آنزیم مورد نیاز برای مهار ۵۰٪ سرعت اکسیداسیون NADH می‌باشد. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین بیان می‌شود).

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Cohen اندازه‌گیری شد (۲۳). در ادامه، به حجم معینی از عصاره بافتی، اتانول مطلق (۰/۱۰ میلی لیتر بر میلی لیتر) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ انکوبه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه تریتون ۱۰۰-X، ۱۰٪ با غلظت نهایی ۱٪ اضافه گردید. این محلول جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به کار برده شد. واکنش با اضافه کردن H₂O₂ (۶ میلی مولار) به نمونه بافتی یا پلاسما و یا گلبول قرمز در بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی مولار pH=۷) شروع شد. بعد از مدت ۳ دقیقه، واکنش با اضافه کردن H₂SO₄ (۶ نرمال) متوقف گردید. سپس پرمنگنات پتاسیم ۰/۰۱ نرمال اضافه شد و جذب نمونه‌ها بلافاصله در ۴۸۰ نانومتر قرائت گردید.

می‌شود. فعالیت ویژه برحسب میلی واحد بر میلی گرم پروتئین بیان می‌گردد).

برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۲۷). حجم مناسبی از نمونه را به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده و ۳ میلی‌لیتر از محلول برادفورد به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب قرائت شد. غلظت پروتئین با رسم استاندارد با استفاده از محلول یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA) محاسبه گردید. برای تعیین غلظت هموگلوبین، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های گلبول قرمز با ۵ میلی‌لیتر محلول درابکینز (۰/۲) گرم پتاسیم فری‌سیانید، ۰/۰۵ گرم KCN و ۱ گرم NaHCO_3 در یک لیتر مخلوط شده و با دستگاه هموگلوبین‌متری، میزان غلظت هموگلوبین برحسب گرم بر دسی‌لیتر به دست آمد (۲۸).

تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار INSTAT به صورت آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه به همراه تست توکی انجام شد. سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ بیان گردید.

یافته‌ها

کاهش فعالیت SOD در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل در بافت‌های کلیه و اریتروسیت‌ها و در غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بافت‌های قلب و پلاسما در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود. فعالیت آنزیم SOD در بافت ریه با افزایش غلظت خردل افزایش نشان داد که این افزایش در غلظت‌های بیشتر از یک میلی‌گرم بر کیلوگرم معنی‌دار بود. کاهش فعالیت آنزیم SOD در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل در مقایسه با غلظت‌های ۱۰-۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با غلظت‌های ۵-۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بافت‌های کلیه، قلب، پلاسما و اریتروسیت‌ها و در تمامی غلظت‌ها در بافت ریه، معنی‌دار بود. افزایش فعالیت آنزیم SOD در بافت ریه در مقایسه با سایر بافت‌ها (در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل) معنی‌دار بود ($p < 0.001$). تغییر فعالیت آنزیم SOD در سایر بافت‌ها در مقایسه با هم، معنی‌دار نبود (جدول شماره ۱).

از غلظت‌های مختلف پرمنگنات (۰، ۱۰، ۲۵، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد. (یک واحد فعالیت کاتالاز برابر با مقدار یک میکرومول از H_2O_2 است، که در مدت یک دقیقه تجزیه می‌شود. فعالیت ویژه برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان می‌شود). فعالیت آنزیم GPx به روش تغییر یافته Paglia انجام شد (۲۴). مخلوط واکنش {شامل: بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 7.4$ حاوی ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱ میلی‌مولار سدیم آزید، ۱ میلی‌مولار GSH، ۰/۱ میلی‌مولار NADPH ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) و ۰/۲۴ واحد گلوکاتایون ردوکتاز} به ۱۰ میکرولیتر نمونه عصاره بافتی یا پلاسما و یا گلبول‌های قرمز اضافه گردید. بعد از چند دقیقه، با افزودن ۱/۵ میلی‌مولار Cumene Hydroperoxide، واکنش شروع و تغییرات جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت گردید. (یک واحد فعالیت آنزیم GPx برابر است با مقدار یک میکرومول از NADPH که در یک دقیقه اکسید می‌شود. فعالیت ویژه برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان می‌گردد). فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز به روش Carlbery انجام شد (۲۵). به یک کووت ۱ میلی‌لیتری، ۹۱۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 7.4$ حاوی ۱ میلی‌مولار EDTA، NADPH، ۰/۲ میلی‌مولار در تریس HCl، ۱۰ میلی‌مولار $\text{pH} = 7$ و GSSG ۰/۲ میلی‌مولار اضافه گردید. واکنش با افزودن ۱۰ میکرولیتر نمونه بافتی یا پلاسمایی و یا گلبول قرمز به کووت شروع و کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر به مدت ۵ دقیقه قرائت گردید. (یک واحد فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز برابر است با یک میکرومول از NADPH که در دقیقه اکسید می‌شود. فعالیت ویژه برحسب میلی واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان می‌گردد).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم GST به روش Habig انجام شد (۲۶). یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 7.4$ شامل: ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱ میلی‌مولار GSH و ۱ میلی‌مولار CDNB ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) است. واکنش با افزودن حجم معینی از عصاره بافتی یا پلاسما و یا گلبول‌های قرمز شروع و تغییرات جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۵ دقیقه قرائت گردید. (یک واحد فعالیت آنزیم برابر است با یک میکرومول از محصول که در یک دقیقه تشکیل

جدول شماره ۱: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در حضور غلظت‌های مختلف خردل گوگردی و گروه کنترل در بافت‌های مختلف، ۲۴ ساعت بعد از تزریق

خردل (میلی گرم بر کیلوگرم)	بافت‌ها				
	کلیه	ریه	قلب	پلازما	اریتروسیت‌ها
کنترل	۴۵/۶±۴/۹	۲۸/۵±۲/۷	۳۲/۲±۳/۲	۴/۵±۰/۴	۸۲۴/۵±۴۵/۲
۱	۴۸/۱±۳/۹	۲۹/۶±۲/۲	۳۲/۵±۲/۲	۴/۶±۰/۴	۸۳۲/۵±۵۳/۱
۵	۵۳/۲±۴/۲	۳۲/۷±۱/۱ [°]	۳۵/۴±۳/۴	۴/۹±۰/۴	۸۹۹/۲±۳۲/۱
۱۰	۴۰/۱±۵/۵	۳۴/۴±۲/۳ ^{***}	۳۸/۱±۳/۶	۴/۲±۰/۵	۷۴۵/۶±۵۰/۵
۲۰	۳۷/۲±۴/۹ [°]	۳۸/۳±۲/۴ ^{***}	۲۹/۰±۳/۹	۴/۱±۰/۴	۷۲۱/۱±۴۹/۵ [*]
۴۰	۳۴/۳±۳/۹ ^{***#}	۴۰/۵±۲/۲ ^{***#}	۲۵/۷±۳/۶ ^{***#}	۳/۷±۰/۴ ^{***#}	۷۰۰/۴±۵۴/۱ ^{**#}
۸۰	۲۹/۵±۴/۱ ^{***#}	۴۵/۲±۱/۹ ^{***#†}	۲۳/۹±۳/۴ ^{***#}	۳/۴±۰/۴ ^{**#}	۶۲۲/۱±۷۵/۰ ^{***#}

$p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است. $p < 0.05$ در مقایسه با سایر بافت‌های خردل معنی‌دار است.

$p < 0.05$ در مقایسه با سایر بافت‌ها معنی‌دار است. واحد فعالیت در اریتروسیت بر حسب U/gHb و در سایر بافت‌ها U/mg protein می‌باشد (n=6)

در بافت‌های پلازما و اریتروسیت‌ها ($p < 0.01$) و با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل در مقایسه با غلظت‌های ۱-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بافت‌های کلیه، پلازما و اریتروسیت‌ها ($p < 0.01$)، معنی‌دار بود. افزایش فعالیت آنزیم CAT در بافت قلب در مقایسه با سایر بافت‌ها (در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل)، معنی‌دار بود ($p < 0.001$). تغییر فعالیت آنزیم CAT در سایر بافت‌ها در مقایسه با هم معنی‌دار نبود (جدول شماره ۲).

افزایش فعالیت آنزیم CAT در بافت ریه (با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل) در مقایسه با گروه کنترل، معنی‌دار بود و فعالیت این آنزیم (با غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل) در بافت‌های کلیه، ریه، پلازما و اریتروسیت‌ها، کاهش معنی‌داری نشان داد. افزایش فعالیت آنزیم CAT در بافت قلب در تمامی غلظت‌ها در مقایسه با گروه کنترل، معنی‌دار نبود. کاهش فعالیت آنزیم CAT (با غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل) در مقایسه با غلظت‌های ۱-۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بافت‌های کلیه و ریه ($p < 0.001$) و غلظت‌های ۱-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم

جدول شماره ۲: فعالیت آنزیم کاتالاز در حضور غلظت‌های مختلف خردل گوگردی و گروه کنترل در بافت‌های مختلف، ۲۴ ساعت بعد از تزریق

خردل (میلی گرم بر کیلوگرم)	بافت‌ها				
	کلیه	ریه	قلب	پلازما	اریتروسیت‌ها
کنترل	۵۰/۴±۴/۲	۲۵/۲±۲/۵	۱۸/۵±۱/۴	۵/۲±۰/۵	۲۸/۱±۲/۹
۱	۵۲/۵±۳/۵	۲۵/۹±۲/۲	۱۸/۸±۱/۲	۵/۳±۰/۵	۲۹/۱±۲/۵
۵	۵۷/۱±۴/۲	۲۷/۳±۲/۴	۱۹/۶±۱/۵	۵/۶±۰/۵	۳۱/۵±۳/۱
۱۰	۴۸/۰±۳/۵	۲۹/۵±۳/۱	۱۹/۹±۲/۱	۵/۰±۰/۵	۲۵/۷±۲/۹
۲۰	۴۵/۶±۳/۸	۳۱/۴±۳/۲ ^{**}	۲۰/۳±۱/۷	۴/۶±۰/۵	۲۴/۵±۲/۸
۴۰	۴۲/۸±۴/۳ ^{***#}	۲۰/۴±۱/۲ [°]	۲۰/۶±۱/۱	۴/۳±۰/۵ [#]	۲۲/۵±۲/۶ ^{*#}
۸۰	۴۰/۱±۴/۱ ^{***#}	۱۹/۸±۱/۶ ^{***#}	۲۱/۱±۱/۲ [†]	۴/۰±۰/۵ ^{**#}	۲۱/۰±۳/۱ ^{**#}

$p < 0.05$ و $p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است. $p < 0.05$ در مقایسه با سایر غلظت‌های خردل معنی‌دار است.

$p < 0.05$ در مقایسه با سایر بافت‌ها معنی‌دار است. واحد فعالیت در اریتروسیت‌ها بر حسب U/gHb و در سایر بافت‌ها U/mg protein می‌باشد (n=6)

کاهش فعالیت آنزیم GPx (در غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در بافت‌های کلیه، ریه و اریتروسیت و در غلظت‌های بالاتر از ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل در پلاسما و قلب در مقایسه با گروه کنترل، معنی‌دار بود. کاهش فعالیت آنزیم GPx در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل در مقایسه با غلظت‌های ۱-۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بافت‌های کلیه و اریتروسیت‌ها (در غلظت‌های ۵-۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بافت‌های ریه، قلب و پلاسما) ($p < 0.01$) و در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل در مقایسه با غلظت‌های ۵-۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بافت‌های کلیه، ریه، قلب و اریتروسیت‌ها، معنی‌دار بود ($p < 0.01$). تغییر فعالیت آنزیم GPx در سایر بافت‌ها در مقایسه با هم، معنی‌دار نبود (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز در حضور غلظت‌های مختلف خردل گوگردی و گروه کنترل در بافت‌های مختلف، ۲۴ ساعت بعد از تزریق

خردل (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	بافت‌ها				
	کلیه	ریه	قلب	پلاسما	اریتروسیت‌ها
کنترل	۱۲۸/۱±۹/۹	۴۸/۲±۲/۱	۷۲/۴±۳/۵	۱۲/۴±۱/۶	۳۱/۹±۱/۲
۱	۱۳۰/۹±۱۱/۵	۵۰/۷±۳/۴	۷۳/۰±۴/۰	۱۲/۶±۰/۹	۳۳/۰±۱/۶
۵	۱۳۷/۷±۷/۱	۵۳/۹±۳/۲	۷۴/۶±۴/۱	۱۲/۰±۱/۰	۳۶/۰±۱/۹
۱۰	۱۴۲/۵±۹/۳	۴۵/۸±۳/۷	۷۰/۱±۴/۰	۱۱/۶±۰/۸	۳۰/۴±۳/۰
۲۰	۱۱۸/۷±۱۱/۵	۴۳/۴±۴/۶	۶۷/۳±۵/۰	۱۱/۵±۰/۸	۲۹/۲±۲/۵
۴۰	۱۰۹/۲±۹/۰ ^{°#}	۴۱/۳±۳/۵ ^{°#}	۶۵/۳±۳/۰ [#]	۱۱/۰±۱/۲	۲۷/۳±۳/۲ ^{*#}
۸۰	۱۰۱/۶±۱۲/۶ ^{°°#}	۴۰/۱±۴/۱ ^{°°#}	۶۲/۸±۵/۱ ^{°°#}	۱۰/۰±۰/۹ ^{**#}	۲۵/۹±۲/۹ ^{**#}

$p < 0.05$ و $p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است. $p < 0.05$ در مقایسه با سایر غلظت‌های خردل معنی‌دار است. واحد فعالیت در اریتروسیت بر حسب U/gHb و در سایر بافت‌ها U/mg protein می‌باشد (n=۶).

کاهش فعالیت آنزیم GR در بافت‌های کلیه، قلب، پلاسما و اریتروسیت‌ها (در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل) در مقایسه با گروه کنترل، معنی‌دار بود. تغییر فعالیت آنزیم GR در بافت ریه (در تمامی غلظت‌های خردل) در مقایسه با گروه کنترل، معنی‌دار نبود. کاهش فعالیت آنزیم GR در غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل در مقایسه با غلظت‌های

جدول شماره ۴: فعالیت آنزیم گلوکوتایون ردوکتاز در حضور غلظت‌های مختلف خردل گوگردی و گروه کنترل در بافت‌های مختلف، ۲۴ ساعت بعد از تزریق

خردل (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	بافت‌ها				
	کلیه	ریه	قلب	پلاسما	اریتروسیت‌ها
کنترل	۱۴۲/۱±۵/۹	۷۸/۱±۵/۳	۳۴/۰±۲/۵	۱/۱±۰/۱	۱۲/۳±۰/۹
۱	۱۴۳/۳±۴/۶	۷۸/۳±۲/۹	۳۳/۶±۳/۱	۱/۱±۰/۱	۱۲/۱±۱/۱
۵	۱۴۶/۵±۷/۸	۷۸/۸±۴/۶	۳۲/۸±۳/۱	۱/۱±۰/۱	۱۱/۸±۱/۱
۱۰	۱۴۹/۹±۵/۹	۷۹/۶±۳/۷	۳۱/۲±۲/۴	۱/۱±۰/۱	۱۱/۴±۱/۲
۲۰	۱۵۲/۱±۶/۲	۸۱/۶±۲/۵	۳۰/۵±۳/۶	۱/۱±۰/۱	۱۱/۲±۰/۷
۴۰	۱۳۳/۶±۵/۹ [#]	۸۳/۷±۳/۸	۲۹/۸±۲/۷	۰/۹±۰/۱ ^{*#}	۱۰/۹±۰/۹
۸۰	۱۲۹/۵±۴/۲ [#]	۸۴/۱±۴/۶ [†]	۲۸/۵±۳/۳ [*]	۰/۸۴±۰/۱ ^{**#}	۱۰/۷±۰/۹

$p < 0.05$ و $p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است. $p < 0.05$ در مقایسه با سایر غلظت‌های خردل معنی‌دار است. $p < 0.01$ در مقایسه با سایر بافت‌ها معنی‌دار است. واحد فعالیت در اریتروسیت بر حسب U/gHb و در سایر بافت‌ها U/mg protein می‌باشد (n=۶).

غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل در مقایسه با غلظت‌های ۲۰-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بافت‌های کلیه و اریتروسیت‌ها، معنی‌دار بود ($p < 0.05$). افزایش فعالیت آنزیم GST در بافت ریه (با غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل) در مقایسه با غلظت‌های ۴۰-۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم، معنی‌دار بود ($p < 0.05$). افزایش فعالیت آنزیم GST در بافت قلب و ریه (در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل) در مقایسه با سایر بافت‌ها، معنی‌دار بود ($p < 0.01$). تغییر فعالیت آنزیم GST در سایر بافت‌ها در مقایسه با هم، معنی‌دار نبود (جدول شماره ۵).

فعالیت آنزیم GST در بافت ریه (در غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و در قلب (با غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل) در مقایسه با گروه کنترل، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. کاهش فعالیت آنزیم GST در بافت اریتروسیت (در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در کلیه و پلاسما (با غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل) در مقایسه با گروه کنترل، معنی‌دار بود. کاهش فعالیت آنزیم GST در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل در مقایسه با غلظت‌های ۲۰-۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بافت‌های کلیه و اریتروسیت‌ها و در

جدول شماره ۵: فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون اس- ترانسفراز در حضور غلظت‌های مختلف خردل گوگردی و گروه کنترل در بافت‌های مختلف، ۲۴ ساعت بعد از تزریق

بافت‌ها					
خردل (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	کلیه	ریه	قلب	پلاسما	اریتروسیت‌ها
کنترل	۲۹/۱±۱/۵	۴۷/۹±۴/۷	۳۶/۱±۴/۵	۵/۲±۰/۵	۲۰/۱±۲/۰
۱	۳۰/۰±۳/۱	۴۹/۲±۴/۵	۳۶/۲±۲/۸	۵/۳±۰/۴	۲۰/۶±۲/۰
۵	۳۲/۳±۴/۴	۵۲/۱±۴/۱	۳۶/۹±۳/۳	۵/۶±۰/۴	۲۱/۲±۱/۸
۱۰	۳۴/۱±۴/۸	۵۳/۴±۴/۷	۳۷/۳±۴/۲	۵/۸±۰/۴	۲۲/۳±۱/۵
۲۰	۳۵/۰±۳/۴	۵۵/۴±۴/۸	۳۸/۲±۳/۷	۶/۲±۰/۵	۲۳/۷±۲/۲*
۴۰	۲۵/۶±۴/۲#	۵۹/۱±۵/۱**	۳۹/۵±۴/۹	۴/۷±۰/۵	۱۶/۳±۱/۹*#
۸۰	۲۲/۲±۳/۸*#	۶۹/۰±۵/۸***#†	۴۲/۳±۴/۸†	۴/۴±۰/۵	۱۴/۹±۲/۳**#

* $p < 0.05$ ، ** $p < 0.01$ و *** $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است. # $p < 0.05$ در مقایسه با سایر غلظت‌های خردل معنی‌دار است. † $p < 0.001$ در مقایسه با سایر بافت‌ها معنی‌دار است. واحد فعالیت در اریتروسیت بر حسب U/gHb و در سایر بافت‌ها U/mg protein است (n=6).

بحث

فعالیت GPx وابسته به فعالیت GR است (۶). GST در موجودات زنده از پستانداران تا ارشیاکلی وجود دارد و در بیشتر بافت‌های انسان نیز یافت می‌شود. GST اتصال طیف وسیعی از سموم، ترکیبات الکتروفیلی و کارسینوژن‌ها را با GSH کاتالیز کرده و با افزایش حلالیت به دفع آنها از سلول کمک می‌کند. بنابراین، نقشی حیاتی در محافظت بافت‌ها علیه آسیب و استرس اکسیداتیو دارد (۶، ۲۹). بافت کلیه، جایگاه حذف و حفظ متابولیت‌های فعال است. متابولیت‌های گاز خردل از طریق کلیه‌ها دفع می‌شوند. کلیه‌ها مسئول برداشتن گلوکوتاتیون از جریان خون بوده و ۶۰-۵۰٪ نوسازی گلوکوتاتیون پلاسما را انجام می‌دهند (۳۰). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پی تجویز دوزهای بالاتر خردل کاهش می‌یابد. کاهش فعالیت SOD، نشان‌دهنده عدم قدرت بافت کلیه جهت پاک‌سازی سوپراکسید اضافی است که باعث استرس اکسیداتیو می‌شود.

مطالعات نشان داده است خردل گوگردی باعث افزایش ROS می‌شود (۸-۱۳). برای مقابله با افزایش ROS، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان وارد عمل می‌شوند. آنزیم SOD، اولین سد دفاعی در مقابل رادیکال‌های آنیون سوپراکسید بوده که آن را به H_2O_2 و اکسیژن تبدیل می‌کند. H_2O_2 به‌وسیله دو آنزیم CAT و GPx به آب تبدیل می‌شود (۵، ۶). طیف عمل GPx وسیع‌تر از CAT است. این آنزیم به کمک گلوکوتاتیون علاوه بر H_2O_2 ، هیدروپراکسیدهای آلی را نیز خنثی می‌کند (۱۶). آنزیم GR احیای گلوکوتاتیون اکسیدشده (GSSG) را به GSH در حضور NADPH کاتالیز کرده و به‌طور وسیع در همه بافت‌ها و سلول‌های خونی موجود است. این آنزیم برای سیکل ردوکس GSH ضروری بوده و نسبت بالای GSH به GSSG باعث حفاظت سلول‌ها در مقابل استرس اکسیداتیو می‌شود.

از سوی دیگر، افزایش سوپراکسید باعث غیرفعال شدن فعالیت GPx (۳۱) و کاتالاز (۳۲) می‌گردد. بنابراین، افزایش ROS می‌تواند باعث لیپید پراکسیداسیون و آسیب سلولی در گلوامرول‌ها و سلول‌های میان بافتی تبولی شود و محصولات رادیکالی حدواسط نیز می‌توانند ماکرومولکول‌های دیگر را مبتلا سازند. البته اثرات خردل در بافت کلیه در مقایسه با کبد کمتر است (۱۶). کاهش فعالیت GST در کلیه ممکن است سعی برای حفظ سطح گلوتاتیون باشد. فعالیت GR نیز برای دوباره ذخیره شدن GSH ضروری است. با افزایش ROS، تشکیل GSSG افزایش یافته و با کاهش فعالیت GR، نسبت GSH/GSSG کاهش می‌یابد که به‌عنوان بیومارکر استرس اکسیداتیو عمل می‌کند. همچنین GSSG با گروه‌های سولفیدریل در جایگاه فعال واکنش داده و اثرات ناخوشایندی بر روی فعالیت آنزیم می‌گذارد (۳۳).

ریه از بافت‌های هدف خردل گوگردی است و دائماً در تماس با بالاترین فشار اکسیژن و آلودگی هوا قرار دارد که به دلیل ظرفیت کم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، این بافت به تولید رادیکال آزاد بسیار حساس است (۳۴). در این مطالعه، افزایش فعالیت آنزیم SOD به همراه افزایش فعالیت آنزیم CAT در غلظت‌های کم خردل (<40 میلی‌گرم بر کیلوگرم) مشاهده گردید. افزایش فعالیت آنزیم‌ها، بیانگر مقابله بافت ریه در جلوگیری از ایجاد استرس اکسیداتیو است. افزایش فعالیت SOD با تبدیل رادیکال سوپراکسید به H_2O_2 باعث افزایش میزان H_2O_2 و کاهش رادیکال‌های سوپراکسید می‌شود و افزایش فعالیت CAT باعث کاهش میزان H_2O_2 و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو بافتی می‌گردد (۵-۶). همچنین افزایش فعالیت SOD به همراه کاهش فعالیت CAT و GPx، در غلظت‌های بالاتر خردل نیز (>20 میلی‌گرم بر کیلوگرم) مشاهده شده است. افزایش فعالیت SOD برای خنثی کردن آنیون سوپراکسیدهای اضافی بوده و H_2O_2 تولیدشده به‌وسیله آنزیم‌های CAT و GPx خنثی نمی‌شود که در نتیجه منجر به افزایش لیپید پراکسیداسیون و القای استرس اکسیداتیو می‌گردد (۳۵). افزایش آنزیم GST ممکن است ناشی از پاسخ جبرانی برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد باشد (۳۶). بافت قلب به‌صورت یک پمپ جهت خون‌رسانی به سایر بافت‌ها عمل می‌کند.

ماهیه قلب نمی‌تواند اکسیژن را جهت استفاده ذخیره کرده و بایستی اکسیژن و سایر مواد مغذی، پیوسته جهت عمل مناسب قلب تأمین گردد. از طرفی، میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان این بافت در مقایسه با سایر بافت‌های دیگر اندک است. به‌همین دلیل این بافت نسبت به استرس اکسیداتیو حساس‌تر می‌باشد (۳۷). در مطالعه حاضر، خردل در غلظت‌های بالا باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD، GPx و GR قلبی بدون تغییر در فعالیت آنزیم‌های CAT و GST شد. قلب دارای میزان کم فعالیت CAT است، بنابراین، GPx در این بافت جهت خنثی‌سازی H_2O_2 و هیدروپراکسیدهای دیگر مهم است (۳۸). کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان قلب، انعکاسی از عدم قدرت قلب برای پاک‌سازی آنیون سوپراکسید اضافی و هیدروپراکسیدهای آلی، در پاسخ به غلظت‌های بالای خردل است که منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود. کاهش فعالیت آنزیم GR قلب منجر به کاهش GSH و افزایش GSSG، همچنین افزایش جریان خون به ماهیچه قلب و حمل GSH به اندام‌ها می‌شود. اختلاف پاسخ‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بین بافت‌ها می‌تواند ناشی از مقدار توزیع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این بافت‌ها باشد که در قلب خیلی کمتر از کبد می‌باشد (۳۳).

فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، GPx و در پلاسما پایین است و خواص آنتی‌اکسیدانی آن وابسته به مولکول‌های کوچک مانند اسیداسکوربیک، بیلی‌روبین، اسیداوریک، فریتین و ترانسفرین می‌باشد (۸). در این مطالعه تغییرات فعالیت آنزیم‌ها در غلظت‌های کمتر از ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل، معنی‌دار نبود، ولی فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، GPx و GST در غلظت‌های بالاتر خردل کاهش نشان داد. اکسیداسیون SH به‌وسیله خردل، در جایگاه فعال آنزیم‌ها باعث غیرفعال شدن غیرقابل برگشت آنزیم‌ها می‌شود (۳۱). مهار فعالیت آنزیم GPx پلاسما، انعکاسی از اختلال در متابولیسم GSH و NADPH بوده و مهار آنزیم GR نیز باعث عدم تبدیل GSSG به GSH می‌شود که انعکاس مستقیم سمیت خردل و عدم قدرت پلاسما برای حفظ هموستاز گلوتاتیون می‌باشد. همچنین مهار فعالیت GR ممکن است انعکاسی از اختلال در متابولیسم NADPH و کمبود فعالیت آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD) باشد.

و ROO- که سنتز پروتئین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را مهار می‌کند؛ ۴- تخلیه GSH و NADPH که برای فعالیت GPx، GR و GST ضروری هستند (۴۴،۱۶،۶).

نتایج این تحقیق توسط نتایج مطالعات دیگر نیز تأیید شده است. Husain و همکاران نشان دادند فعالیت آنزیم SOD در سلول‌های گلوبول سفید (WBC)، پلاکت‌ها، طحال و مغز، همچنین فعالیت آنزیم CAT در اریتروسیت‌ها، WBC و طحال و فعالیت آنزیم GPx در WBC، طحال و کبد بعد از تجویز داخل پوستی خردل در موش‌های صحرایی کاهش می‌یابد (۱۴). جعفری در مطالعه خود نشان داد تجویز داخل صفاقی خردل باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بدون تغییر در سطح GSH و MDA در غلظت‌های کمتر از ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل در بافت‌های کبد و مغز موش صحرایی بعد از ۲ و ۷ روز می‌شود، درحالی‌که کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سطح GSH، افزایش سطح MDA و پراکسیداسیون لیپیدها در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خردل مشاهده شد (۱۶). مطالعه دیگر نشان داد فعالیت آنزیم SOD، غلظت MDA و پلاکت خون در تماس با خردل، به مدت ۳۰ دقیقه افزایش می‌یابد (۱۵). در چند مطالعه دیگر، افزایش فعالیت GST در پی تجویز زیرجلدی مشتقات خردل در بافت‌های کلیه، مغز و ریه بعد از یک و ۲۴ ساعت در موش سوری نشان داده شده است (۴۶،۴۵،۳۶). مطالعه Pohanka و همکاران نیز نشان داد کاهش غلظت GSH، آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما، افزایش سطح لیپید پراکسیداسیون و فعالیت آنزیم GR، ۲۴ ساعت بعد از تجویز داخل پوستی خردل با غلظت‌های ۵، ۲۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قابل‌مشاهده است (۱۲،۱۰). در مطالعات دیگر مشخص شده است تجویز خردل به‌صورت داخل پوستی با غلظت ۱۹/۴ و ۸/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD، GPx، GR و غلظت GSH و افزایش غلظت MDA در کبد موش سوری بعد از ۷ روز می‌شود (۴۸،۴۷). مطالعه Pohanka و همکاران نشان داد ۲۴ ساعت بعد از تجویز داخل پوستی خردل با غلظت‌های ۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، غلظت GSH کاهش، آنزیم GR فعال و سطح لیپید پراکسیداسیون خون افزایش می‌یابد (۲۰). بررسی تأثیر درازمدت خردل بر روی سیستم آنتی‌اکسیدانی مصدومین شیمیایی نشان داد

تولید ROS نیز ممکن است به‌وسیله نوتروفیل‌های تحریک‌شده به‌وسیله خردل، فعال شده و باعث تلف شدن ATP و ایجاد فرآیند التهاب گردد که در واقع، مشابه شروع پاسخ به آسیب‌های حرارتی است (۳۹). کاهش ATP نیز منجر به افزایش AMP سلولی شده که در نتیجه به گزانتین و هیپوگزانتین کاتابولیزه می‌شود. گزانتین و هیپوگزانتین، سوبستراهایی برای آنزیم گزانتین اکسیداز جهت تشکیل H_2O_2 می‌باشند (۴۰). اریتروسیت بافت مهم برای حمل اکسیژن بوده و به دلیل غلظت بالای اکسیژن و هموگلوبین برای تولید اکسی‌رادیکال‌ها، همچنین بالا بودن میزان اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشای آنها، بسیار حساس به استرس اکسیداتیو هستند (۴۱). در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، GPx، GR و GST در غلظت‌های بالای خردل (>20 میلی‌گرم بر کیلوگرم) کاهش نشان داد. فعالیت GPx در اریتروسیت‌ها در مقایسه با کاتالاز بالاتر است که به‌طور اختصاصی به H_2O_2 متصل شده و میل ترکیبی CAT برای H_2O_2 کمتر می‌باشد. همچنین به دلیل کاهش فعالیت SOD، تجمع آنیون سوپراکسید باعث مهار فعالیت GPx و CAT می‌شود (۳۲،۳۱). سوپراکسید قادر است از طریق کانال‌های یونی از غشا عبور کرده و به رادیکال پراکسی نیتريت تبدیل شود که با افزایش اسیدیته، محیط این رادیکال بسیار فعال‌تر از سوپراکسید است و اثر تخریبی شدیدتری نیز بر روی پروتئین‌ها و لیپیدهای غشا می‌گذارد (۴۲). از طرفی، کاهش فعالیت آنزیم GR موجب کاهش غلظت GSH سوبسترای آنزیم‌های GPx و GST می‌شود و فعالیت این دو آنزیم کاهش می‌یابد. همچنین رادیکال‌های آزاد با هموگلوبین واکنش داده و باعث ناپایداری هم و ساختمان گلوبین می‌شوند که آهن آزادشده نقش مهمی در سنتز متابولیت‌های فعال اکسیژن دارد. ترکیبات آهن و آهن آزاد می‌توانند فرآیند پراکسیداسیون لیپیدها را باعث شوند (۴۳). در مجموع، مهار آنزیم‌های مختلف آنتی‌اکسیدان می‌تواند به دلایل مختلف باشد:

۱- اتصال مستقیم خردل یا متابولیت‌های آن به گروه‌های سولفیدریل آنزیم‌ها و غیرفعال شدن اکسیداتیو آنزیم‌ها؛ ۲- کاهش شدید منیزیم، روی، مس و سلنیوم که برای فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx ضروری است؛ ۳- افزایش پراکسیدهای آلی، NO

ریه بیشتر از قلب و پلاسما است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت خردل در غلظت‌های کمتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس و در غلظت‌های بالاتر منجر به مرگ سلولی از نوع نکروز می‌شود.

افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، GPx بدون تغییر در فعالیت GR در لاواژ ریوی، پلاسما و اریتروسیت‌ها، همچنین افزایش فعالیت GST و کاهش غلظت GSH در لاواژ ریوی قابل مشاهده است (۳۴).

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد خردل گوگردی روی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان در همه بافت‌ها در یک طرح وابسته به دوز اثر می‌گذارد. این عامل با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف می‌شود. اثر خردل به ترتیب بر روی بافت کلیه، اریتروسیت‌ها و

تشکر و قدردانی

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌... (عج) در قالب طرح تحقیقاتی (به شماره: ۱۲۶۴) انجام گرفت که بدین وسیله نویسندگان مقاله، مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین آن مرکز ابراز می‌دارند.

References:

- Behravan E, Moallem SA, Khateri S, Maraghi E, Jowsey P, Blain PG, et al. Deoxyribonucleic acid damage in Iranian veterans 25 years after wartime exposure to sulfur mustard. *J Res Med Sci* 2013;18(3):239-44.
- Batal M, Boudry I, Mouret S, Clery-Barraud C, Wartelle J, Berard I, et al. DNA damage in internal organs after cutaneous exposure to sulphur mustard. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014;278:39-44.
- Chauhan S, D'Cruz R, Faruqi S, Singh KK, Varma S, Singh M, et al. Chemical warfare agents. *Environ toxicol pharmacol* 2008;26:113-22.
- Ghanei M, Poursaleh Z, Harandi AA, Emadi SE, Emadi SN. Acute and chronic effects of sulfur mustard on the skin: A comprehensive review. *Cutan Ocul Toxicol* 2010;29(4):269-77.
- Limon-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 2009;674(1-2):137-47.
- Mates JM, Perez-Gomez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32(8):595-603.
- McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993;26(5):351-7.
- Naghii MR. Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants. *Mil Med* 2002;167(7):573-5.
- Brimfield AA, Soni SD, Trimmer KA, Zottola MA, Sweeney RE, Graham JS. Metabolic activation of sulfur mustard leads to oxygen free radical formation. *Free Radic Biol Med* 2012;52(4):811-17.
- Pohanka M, Sobotka J, Jilkova M, Stetina R. Oxidative stress after sulfur mustard intoxication and its reduction by melatonin: Efficacy of antioxidant therapy during serious intoxication. *Drug Chem Toxicol* 2010;34(1):85-91.
- Pal A, Tewari-Singh N, Gu M, Agarwal C, Huang J, Day BJ, et al. Sulfur mustard analog induces oxidative stress and activates signaling cascades in the skin of SKH-1 hairless mice. *Free Radic Biol Med* 2009;47(11):1640-51.
- Pohanka M, Sobotka J, Stetina R. Sulfur mustard induced oxidative stress and its alteration by epigallocatechin gallate. *Toxicol Lett* 2011;201(2):105-9.

13. Laskin JD, Black AT, Jan YH, Sinko PJ, Heindel ND, Sunil V, et al. Oxidants and antioxidants in sulfur mustard-induced injury. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1203:92-100.
14. Husain K, Dube SN, Sugendran K, Sing HR, Das Gupta S, Somani SM. Effects of topically applied sulphur mustard on antioxidant enzymes in blood cells and body tissues of rats. *J Appl Toxicol* 1996;16(3):245-8.
15. Buczynski A, Gnitecki W. Effect of mustard gas on superoxide dismutase activity on the level of malonyl dialdehyde: In vitro studies. *Int J Occup Med Environ Health* 1999;12(2):119-22.
16. Jafari M. Dose- and time-dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat. *Toxicology* 2007;231(1):30-39.
17. Jafari M, Pirzad G, Zaree A, Saberi M. Study of the effect of sulfur mustard on cells viability and DNA fragmentation in the human skin fibroblast cells. *J Mil Med* 2014;16(1):45-51. [Full Text in Persian]
18. Vijayaraghavan R, Kulkarni A, Pant SC, Kumar P, Rao PV, Gupta N, et al. Differential toxicity of sulphur mustard administered through percutaneous, subcutaneous, and oral routes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;202(2):180-8.
19. Mirbagheri L, Habibi Roudkenar M, Imani Fooladi AA, Ghanei M, Nourani MR. Downregulation of super oxide dismutase level in protein might be due to sulfur mustard induced toxicity in lung. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2013;12(2):153-60.
20. Pohanka M, Sobotka J, Svobodova H, Stetina R. Sulfur mustard induced oxidative stress and its alteration using asoxime (HI-6). *Interdiscip Toxicol* 2013;6(4):198-202.
21. Tekiner A, Yucel D, Bayar MA, Yucel O, Erdem Y, Karakaya J. The effect of nitrogen mustard on the enzymatic antioxidant defense of rat brain tissue and the therapeutic value of proanthocyanidin. *Turk Neurosurg* 2011; 21(4):461-6.
22. Paoletti F, Mocali A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD (P)H oxidation. *Methods Enzymol* 1990;186:209-20.
23. Cohen G, Dembiec D, Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* 1970;34:30-38.
24. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
25. Carlberg I, Mannervik B. Glutathion reductase. *Methods Enzymol* 1985;113:484-95.
26. Habig WH, Jakoby WB. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol* 1981;77:218-22.
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;72:248-54.
28. Van Kampen EJ, Zijlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Adv Clin Chem* 1965;8:141-87.
29. Nourani MR, Azimzadeh S, Ghanei M, Imani Fooladi AA. Expression of glutathione S-transferase variants in human airway wall after long-term response to sulfur mustard. *J Recept Signal Transduct Res* 2014;34:125-30.
30. Haberle D, Wahllander A, Sies H, Linke I, Lachenmaier C. Assessment of the kidney function in maintenance of plasma glutathione concentration and redox state in anaesthetized rats. *FEBS Lett* 1979;108(2):335-40.
31. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1985;240(2):500-508.
32. Kono Y, Fridorich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 1982;257(10):5751-4.
33. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983;52:711-60.

34. Jafari M, Ghanei M. Evaluation of plasma, erythrocytes, and brochoalveolar lavage fluid antioxidant defense system in sulfur mustard-injured patients. *Clin Toxicol (Phila)* 2010;48(3):184-92.
35. Nicholls P, Schonbaum GR. Catalases. In: Boyer PD, Lardy H, Myrback K, editors. *The Enzymes*. New York: Academic press; 1963. p. 147-225.
36. Elsayed NM, Omaye ST. Biochemical changes in mouse lung after subcutaneous injection of the sulfur mustard 2-chloroethyl 4-chlorobutyl sulfide. *Toxicology* 2004;199(2-3):195-206.
37. Bishop ML, Duben-Engelkirk JI, Fody Ep. *Clinical chemistry*. 4th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
38. Jones DP, Kennedy FG. Function of glutathione peroxidase in decomposition of hydrogen peroxide in isolated liver and heart cells. In: Larsson A, Orrenius S, Holmgren A, Mannervik B, editors. *Functions of glutathione*. New York: Raven Press; 1983. p. 109-16.
39. Eldad A, Ben Meir P, Breiterman S, Chauat M, Shafran A, Ben- Bassat H. Superoxide dismutase (SOD) for mustard gas burns. *Burns* 1998;24(2):114-19.
40. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312(3):159-63.
41. Clemens MR, Waller HD. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 1987;45(2-4):251-68.
42. Weglicki WB, Dickens BF, Tong Mak IT. Enhanced lysosomal phospholipid degradation and lysophospholipids production due to free radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;124(1):229-35.
43. Pradhan D, Weser M, Lumley-Sapanski K, Frazier D, Kemper S, Williamson P, et al. Peroxidation-induced perturbation of erythrocyte lipid organization. *Biochim Biophys Acta* 1990;1023(3):398-404.
44. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 1990;51(3):283-97.
45. Omaye ST, Elsayed NM, Klain GJ, Korte DW Jr. Metabolic changes in mouse kidney after subcutaneous injection of butyl 2-chloroethyl sulfide. *J Toxicol Environ Health* 1991;33(1):19-27.
46. Elsayed NM, Omaye ST, Klain GJ, Inase JJ, Dahlberg ET, Wheeler CR, et al. Response of mouse brain to a single subcutaneous injection of the monofunctional sulfur mustard, butyl 2-chloroethyl sulfide (BCS). *Toxicology* 1989;58(1):11-20.
47. Vijayaraghavan R, Gautam A, Sharma M, Satish HT, Pant SC, Ganesan K. Comparative evaluation of some flavonoids and tocopherol acetate against the systemic toxicity induced by sulphur mustard. *Indian J Pharmacol* 2008; 40(3):114-20.
48. Gautam A, Vijayaraghavan R. Prophylactic effect of gossypin against percutaneously administered sulfur mustard. *Biomed Environ Sci* 2007;20(3):250-9.

The Effect of Sulfur Mustard on Antioxidant System Enzymes in Different Tissues of Rat

Mahvash Jafary^{1*}; Hossein Ali Mehrani¹; Ali Zarei²; Reza Rezaie³; Javad Rasouli³

¹Professor of Biochemistry, Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

²Associate Professor of Biochemistry, Janbazan Medical & Engineering Research Center, Tehran, Iran.

³Master of Sciences in Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Mahvash Jafary, Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email:
m.jafari145@gmail.com

Received: 5 Feb, 2014

Accepted: 7 Sep, 2014

Abstract

Background and Objectives: Sulfur mustard (SM) is a lipophilic blistering agent that alkylates a wide range of cellular macromolecules including DNA, RNA and protein, leading to cell death in different tissues. In spite of numerous studies, the mechanism of action of SM is still unknown. The aim of this study was to investigate the effect of SM on antioxidant system enzymes in different tissues of rats.

Methods: Male Wistar rats were randomly divided into seven groups as followed: Group 1 control that received DMSO (dimethyl sulfoxide used as solvent), group 2-7 as experimental groups that received SM (1-80mg/kg) by intraperitoneal injection only once. 24 hours after injection, animals were anesthetized and kidney, lung and heart tissues were quickly removed. Blood was also collected by cardiac puncture, plasma and erythrocytes were obtained. Then, the enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) in different tissues were determined by biochemical methods. The data were analyzed using one way variance analysis followed by post hoc analysis using Tukey test. The significance level was considered as $p < 0.05$.

Results: At doses lower than 20mg/kg SM, the increased SOD and GST activities in lung and GST activity in heart were observed, while antioxidant enzymes activities in different tissues were decreased at higher doses of SM.

Conclusion: SM affects the antioxidant defense system in a dose-dependent manner. At lower doses than 20mg/kg, the enhanced activity of antioxidant enzymes may be a compensatory response to scavenge reactive oxygen species and the decreased activity of antioxidant enzymes at higher doses of SM is indicative the induction of oxidative stress and cell death in tissues.

Keywords: Mustard; Sulfur; Antioxidant; Rat; Tissues.