

دور الجلوتاثيون في إزالة سمية الميتابوليتات السامة لنوعين من المبيدات: Oxadixyl و Zolone في كبد الفئران وأمعائها

عبد الله ولجاوي⁽¹⁾؛ عبد الحكيم بليعيدي⁽¹⁾ وساعد ساقع⁽²⁾

الملخص

يتضح من النتائج العلمية التي حصلنا عليها أهمية النظام الدفاعي للجلوتاثيون ونجاعته في حماية الخلية الحية، وذلك بإزالة سمية مختلف الميتابوليتات السامة داخلية كانت أم خارجية. فعند معاملة الفئران بثلاث جرعات متزايدة: $1/10LD_{50}$, $2/10LD_{50}$ & $3/10 LD_{50}$ من نوعين من المبيدات: Oxadixyl و Zolone. سجلنا انخفاضاً في نسبة الجلوتاثيون المختزل GSH عند الفئران المعاملة بالجرعات المختلفة من المبيدين، وذلك في كل من الكبد والأمعاء. يوضح انخفاض نسبة GSH في كل من الكبد والأمعاء ومع مختلف الجرعات للمبيدين مدى أهمية النظام الدفاعي للجلوتاثيون في إزالة سمية مختلف المواد الغريبة.

الكلمات المفتاحية: GSH, Pesticides, Toxicity سمية، مبيدات، الجلوتاثيون

⁽¹⁾ قسم العلوم الطبيعية والحياة، جامعة العربي بن مهيدي بأم البواقي، الجزائر.

⁽²⁾ قسم البيولوجيا، جامعة عنابة، الجزائر.

The Role of Glutathione In The Detoxification of Toxic Metabolites of Two Pesticides: Zolone and Oxadixyl on Liver and Intestine of Rats

Weljawi. A.⁽¹⁾; Baleed. A.⁽¹⁾
and Saed. S.⁽²⁾

ABSTRACT

Results arising from the present work reveals the importance of the Glutathione system in cells protection, through the detoxification of various, endogenic or exogenic toxic metabolites. Treatment of Wister Rats with three different doses 1/10LD₅₀, 2/10LD₅₀ & 3/10 LD₅₀ of the pesticides Zolone and Oxadixyl provokes an increase in Glutathione redox status as indicated by GSH in liver and intestine. GSH level was reduced in all treated animals. This has been accepted, as GSH plays an important role in the detoxification of foreign agents.

Key Words: Glutathion, GSH, Pesticides, toxicity, Zolone, Oxadixyl.

⁽¹⁾ Depatmet des sciences de la nature et de la vie, Faculty des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie, Univesite d'Oum El Bouaghi, Algeria.

⁽²⁾ Department of Biology, Enabaa Universiyt, Algeria.

المقدمة

عُزل الجلوتاثيون أول مرة من الخميرة عام 1880 من قبل العالم Rey Phailhad، وقد أعطى له العالم Hopkins سنة 1921 اسم الجلوتاثيون (Edward, M. K. & Nechema, S. K., 1976) ويعرف الجلوتاثيون بأنه المركب الثيولي غير البروتيني الأكثر انتشاراً في الوسط الداخلي خلوي، سواء عند الحيوانات، والنباتات، أم عند الكائنات الدقيقة (Kosower, N. S. & Kosower, E. M., 1976).

الجلوتاثيون عبارة عن بيبتيدي ثلاثي يتكون من ارتباط تنالتي ثلاثة أحماض أمينية:

Glycine، Cysteinyl، Glutanyl، ويعرف بالجلوتاثيون المختزل (GSH)، ويسمى المشتق ثنائي الكبريت للجلوتاثيون والنتاج من أكسدة مجموعة الثيول (SH) بالجلوتاثيون المؤكسد، ويرمز له بـ (GSSG) (Edward, M. K. & Nechema, S. K., 1976; Smith, I.K. et al., 1990).

غالبية الجلوتاثيون الموجودة في الخلية الحية يكون بشكله المختزل إذ يبلغ تركيزه نحو $10^{-5} \times (10-5)$ مول/ملغ بروتينا، أما الشكل المؤكسد فيراوح بين $10^{-5} \times (10-5)$ مول/ملغ بروتينا، ومن ثم فالنسبة الطبيعية لـ GSH /GSSG تقدر دائماً في حدود 100/1، وأي انخفاض عن هذه النسبة خاصة في الأعضاء ذات الدور الدفاعي كالكلب والأمعاء، والكلى، والطحال... إلخ قد يؤدي إلى اضطرابات خطيرة جداً في نشاط العضوية الحية (Kosower, N. S. & Kosower, E. M., 1976).

يؤدي الجلوتاثيون العديد من الأدوار في الخلية الحية وأهمها على الإطلاق دوره في تفاعلات إزالة التسمم للمركبات السامة الغريبة عن الجسم جميعها منها الإندوجينية (Endogenic) أو الإكزوجينية (Exogenic) مثل المركبات الإلكترونية، والبيروكسيدات، Xenobiotics، Carcinogenes وذلك من خلال تفاعلات الاندماج (Conjugated reactions) في وجود إنزيمات Glutathiones-S-Transferases (GSTs) حيث تنتج مشتقات مندمجة مع GSH (Conjugated – Derivate) غير سامة التي تتعرض لسلسلة من التفاعلات الكيميائية لتعطي في النهاية أحماض الميركبتوريك ذائبة في الماء لتطرح مع البول أو الصفراء (Chasseaud L.F., 1979)، أما الميتابوليتات البروكسيدية فتختزل وتزال آثارها السامة من خلال تفاعلات الأكسدة الاختزالية Réaction – Oxido - Réduction، بفعل إنزيمات Peroxidase (GPx) Glutathione وإنتاج كحولات أولية مرافقة غير سامة، ومن ثم يتحول الـ GSH إلى الـ GSSG مما يؤدي إلى انخفاض مستوى GSH في الخلية، وتتغير النسبة الطبيعية GSH/GSSG (Kosower, N.S & Kosower, E.M., 1978).

مواد البحث و طرائقه

استعملنا 40 فأراً أبيضَ ذكراً من نوع Albino - Wistar، ذات عمر متوسط (90 يوماً)، غُذيت على نظام غذائي حر، عوملت بثلاث جرعات متزايدة 10/1LD₅₀، 10/2LD₅₀، 10/3LD₅₀، وهما مبيدان مختلفان مستعملان للأغراض الفلاحية وهما: Zolone واسمه الكيميائي Methyl Phosphoro Dioate (6-Chloro-2-) و O.O. Diethyl -S (Oxobenzaxaline 3-yl) C₁₂ وهو ذو صيغة كيميائية عامة H₃₅ CL- NO₄ PS₂، وله نصف جرعة مميتة (LD 50) تساوي 120 ملغ لكل كيلوغرام وزن فأر.

ومبيد Oxadixyl acet 2- : 2-Methoxy - N-(2-oxo-1.3-oxazoline -3 yl)-acet 2- 6-xylydide

وهو ذو صيغة كيميائية عامة C₁₄H₁₈N₂O₄ ونصف الجرعة المميتة له هي: 3480 ملغ/1 كلغ وزن فأر.

يمنع الغذاء عن الفئران مدة 18 ساعة، وبعد ذلك تُعامل بمحاليل مائية من المبيدين عن طريق الفم (per os)، وبعد ساعتين من المعاملة تُقتل الفئران عن طريق قطع الرأس Décapitation، لتستعمل بعدها الأعضاء في دراسة تركيز (GSH)، وقد قيس تركيز (GSH) في كبد الفئران المعاملة والشاهدة وأمعانها بطريقة المطياف الضوئي لـ Weckbaker and Cory (Weckbaker, G. & Cory, J. G., 1988).

قيست الكثافة الضوئية الناتجة عن تكوين 2-nitro 5 -Mercaptonic Acide من خلال اختزال المركب 5.5-dithiobis 2 nitro benzoic acid بواسطة مجاميع SH الخاصة بالجلوثاثيون (GSH). أما البروتين فقيسَ حسب طريقة BRADFORD (Bradford, M. M., 1976) باستعمال الكاشف "G 250" Blue de Komassie.

النتائج

1 - نسبة الجلوثاتيون في كبد الفئران

أصبح من المؤكد الدور الفعال الذي يؤديه الجلوثاتيون في تمثيل وإزالة سمية مختلف المركبات الغريبة عن الجسم مثل البيروكسيدات، والمسرطنات، الكسينوبوتيك وغيرها، فعند قياس تركيز GSH في كبد الفئران المعاملة بثلاثة تراكيز متزايدة وهي: LD₅₀ 1/10، LD₅₀ 2/10، LD₅₀ 3/10 من مبيدي Zolone و Oxadixyl ومقارنة ذلك بالفئران الشاهدة، سجلنا انخفاضاً معنوياً طردياً في تركيز GSH مع زيادة تركيز

المبيدين، وقد بلغ تركيز الـ GSH في كبد الفئران الشاهدة 0.51 ± 22.94 nM/mg، ثم نقص هذا المستوى بعد المعاملة بثلاث جرعات من مبيد Zolone (LD_{50} 1/10، LD_{50} 2/10، LD_{50} 3/10)، ليصبح هذا التركيز 1.51 ± 20.64 ، 0.61 ± 11.76 و 0.10 ± 7.40 nM/mg prot على التوالي.

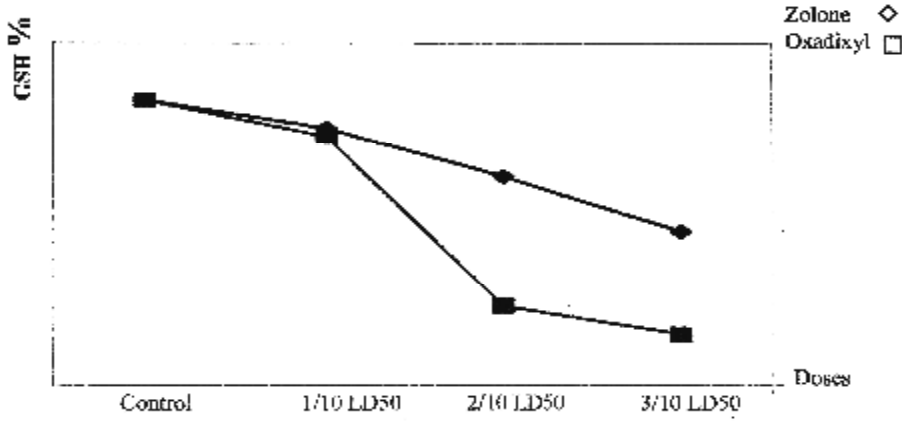
في حين بلغ تركيز GSH في كبد الفئران المعاملة بثلاث جرعات LD_{50} 1/10، LD_{50} 2/10، LD_{50} 3/10 من مبيد Oxadixyl كما يأتي: 0.79 ± 34.46 ، 0.23 ± 31.85 و 0.53 ± 29.55 nM/mg prot على التوالي مقارنة بالفئران الشاهدة 1.52 ± 46.44 nM/mg prot، إذ يمكن ملاحظة أن تركيز GSH ينخفض طردياً مع الزيادة في تركيز كل من المبيدين، بمعنى كلما زاد تركيز المبيدين، زاد استهلاك GSH في تفاعلات إزالة التسمم، ومن ثم نسجل نقصه المستمر. (الجدول 1).

الجدول (1) تركيز GSH (nM/mg prot) في كبد الفئران الشاهدة والمعاملة بـ LD_{50} :
1/10، 2/10، 3/10 من مبيد Zolone و Oxadixyl (n=5).

الجرعة	Zolone	Oxadixyl
الشاهد	22.94 ± 0.51	46.44 ± 1.5
1/10 LD_{50}	20.64 ± 1.51 *	34.46 ± 0.79 *
2 /10 LD_{50}	11.76 ± 0.6 ***	31.85 ± 0.23 ***
3/10 LD_{50}	7.40 ± 0.1 ***	29.5 ± 0.53 ***

***P < 0.001 **P < 0.01 *P < 0.05

وهذا دليل على التأثير السام والمخرب لكلا المبيدين في الخلية الحية، غير أن هذا التأثير يختلف من مبيد إلى آخر ومن جرعة إلى أخرى. وقد بلغت النسب المئوية لتركيز GSH في كبد الفئران المعاملة بـ LD_{50} 1/10، LD_{50} 2/10، LD_{50} 3/10 من مبيد Zolone 90%، 51%، 32% على التوالي مقارنة بالفئران الشاهدة (100%)، بينما كانت هذه النسب من كبد الفئران المعاملة بالتركيز نفسه من المبيد الآخر Oxadixyl 74%، 68.6%، 63.6% على التوالي مقارنة بالشواهد - 100% - أي إن تأثير Zolone ضعيف نسبياً عند التركيز الأقل وقوي جداً عند التركيزين (LD_{50} 1/10، LD_{50} 2/10، LD_{50} 3/10)، في حين أن تأثير Oxadixyl متوسط ومتقارب عند مختلف الجرعات المدروسة (الشكل 1).



الشكل (1) النسب المئوية لتركيز GSH، في كبد الفئران المعاملة بـ: 1/10 LD50، 2/10 LD50، 3/10 LD50، من مبيدي Zolone و Oxadixyl بالنسبة إلى تركيزه في كبد الفئران الشاهدة.

2- نسبة الجلوثاثيون في أمعاء الفئران:

ومن أجل معرفة دور الأمعاء في عمليات إزالة السمية لنواتج المبيدات قمنا بقياس تركيز الجلوثاثيون في هذا العضو المهم، كونه أكثر الأعضاء عرضة للأثار السمية والمخرية للمركبات السامة، حيث نقص مستوى GSH نقصاً معنوياً في أمعاء الفئران المعاملة بكلا المبيدين، وفي الجرعات جميعها مقارنة دائماً بالفئران الشاهدة.

إذ بلغ تركيز GSH في أمعاء الفئران الشاهدة 1.89 ± 35.44 nM/mg prot وبعد المعاملة بمبيد Zolone وبثلاث جرعات متزايدة وهي: 1/10 LD50، 2/10 LD50، 3/10 LD50 نقص GSH، حيث سجلنا على التوالي - وحسب الجرعات المتزايدة: 0.36 ± 32.18 ، 1.44 ± 25.89 و 2.92 ± 19.36 nM/mg prot .

ومن هنا يمكن التأكيد مرة أخرى بأن النقص في مستوى الـ GSH يتناسب طردياً مع الزيادة في الجرعة المدروسة، وذلك نظراً إلى اشتراك الـ GSH في مختلف تفاعلات إزالة التسمم.

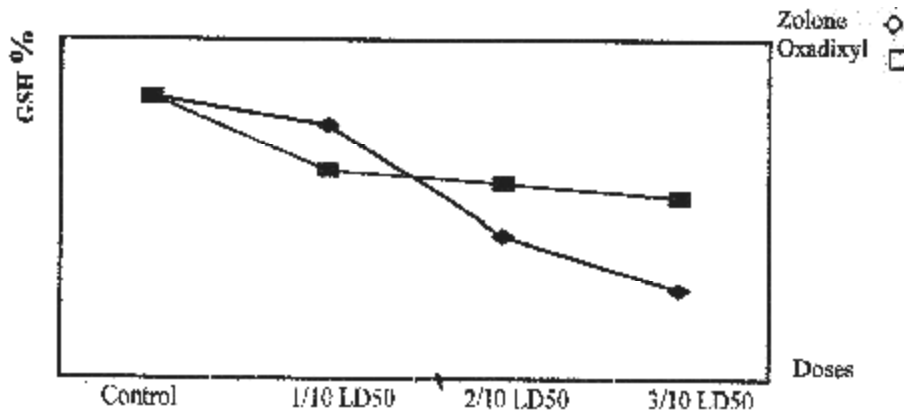
عند المعاملة بمبيد Oxadixyl، وبالجرعات المدروسة سابقاً لوحظ نقص تركيز GSH في الأمعاء، لكن بنسب مختلفة حيث وصل (2.16 ± 59.52) ، (0.26 ± 19.06) و (0.23 ± 12.15) nM/mg prot، وذلك حسب الزيادة في الجرعة المأخوذة: 1/10 LD50، 2/10 LD50، 3/10 LD50 على التوالي من مبيد Oxadixyl، في حين بلغ تركيز GSH عند الفئران الشاهدة (3.55 ± 68.20) nM/mg prot. (جدول 2).

الجدول (2) تركيز GSH (nM/mg prot) في أمعاء الفئران الشاهدة والمعاملة بـ LD₅₀ Oxadixyl و Zolone من مبيدي 3/10 LD₅₀، 2/10 LD₅₀، 1/10 LD₅₀

Oxadixyl	Zolone	الجرعة الشاهد
68.20 ± 3.55	35.44 ± 1.89	
59.59 ± 2.16 ***	32.18 ± 0.63 **	1/10 LD ₅₀
19.66 ± 0.26 ***	25.89 ± 1.44 ***	2 /10 LD ₅₀
12.15 ± 0.23 ***	19.36 ± 2.92***	3/10 LD ₅₀

***P < 0.001 **P < 0.01

بمقارنة تأثير هذين المبيدين Oxadixyl و Zolone ومع مختلف الجرعات في فعالية الأمعاء، نجد أن مبيد Zolone أقل تأثيراً خاصة عند التركيز الأقل (1/10 LD₅₀)، ثم يزيد هذا التأثير بزيادة تركيز المبيد أي إن هناك تناسباً طردياً مثالياً: كلما زاد تركيز Zolone زاد استهلاك GSH ومن ثم يزيد النقص في مستواه، إذ بلغت النسب المئوية لتركيز GSH من أمعاء الفئران المعاملة بـ 3/10 LD₅₀ و 2 /10 LD₅₀، 1/10 LD₅₀ من مبيد Zolone بـ 90%، 73%، 54%، على التوالي مقارنة بالفئران الشاهدة (100%). في حين أن تأثير مبيد Oxadixyl كان ضعيفاً نسبياً عند التركيز LD₅₀، 1/10 ثم يزداد تأثيره وبشكل قوي جداً عند التركيزين 2 /10 LD₅₀ و 3 /10 LD₅₀ فكانت هذه النسب في أمعاء الفئران المعاملة بالتركيز المتزايدة ذاتها من مبيد Oxadixyl بـ 87%، 28% و 18% على التوالي مقارنة بالشاهد (100%). (الشكل 2).



الشكل (2) النسب المئوية لتركيز GSH في أمعاء الفئران المعاملة بـ 1/10 LD₅₀، 2/10 LD₅₀، 3/10 LD₅₀ من مبيد Oxadixyl و Zolone بالنسبة إلى تركيز GSH في أمعاء الفئران.

مناقشة النتائج

تحليل مختلف النتائج المدونة في الجدولين (1 و 2) والشكلين (1 و 2) يمكن القول: بأن لمبيد Zolone تأثيراً ضعيفاً نسبياً في العضوين عند التركيز $1/10 LD_{50}$ ، ثم يزداد هذا التأثير تدريجياً طردياً بزيادة التركيز ($2/10 LD_{50}$ ، $3/10 LD_{50}$)، في حين كان التأثير قوياً نسبياً في الكبد عند مختلف الجرعات المدروسة، مقارنة بالأعضاء حيث كان التأثير أقل نسبياً عند الجرعة ($1/10 LD_{50}$)، ثم يزداد التأثير مع الزيادة في الجرعة، فضلاً عن النتائج المتحصل عليها في هذا البحث، فإن مختلف البحوث الأخرى تؤكد الدور الفعال للكبد والأمعاء، اللذين يعدان من أهم الأعضاء المستهدفة لمختلف الميتابوليتات (Metabolites) السامة، حيث يحتويان على أنجع الأنظمة الأنزيمية الدفاعية القادرة على تخليص الجسم من الآثار السامة لمثل هذه الميتابوليتات من خلال العديد من تفاعلات الأكسدة الاختزالية التي يشارك فيها الـ GSH من خلال منحه بروتون المجموعة الثيولية (SH) من أجل اختزال مختلف البيروكسيدات السامة في وجود الإنزيم Glutathione Peroxydase (GPx) (Chasseaud L.F., 1979). أو من خلال تفاعلات الاندماج لـ GSH مع مختلف المركبات الإلكتروليفية و Xenobiotics , Carcinogenes وتحويلها إلى Mercaptoric-acid غير السامة تحت تأثير إنزيم Glutathione-s- transferase (Kosower N.S & Kosower E.M., 1978).

فقد حدث نقص بنسبة 30% عند معاملة الفئران بالمركب السام -2 Butyl Chloro ethyl - sulfate مع ملاحظة زيادة في نشاط إنزيم Gpx (Stanley, O.T. et al., 1991) كما تحصل Upreti, K. K. et al., (1989) انخفاض في تركيز GSH في كبد الفئران بنسبة 30% و 63% عند معاملتها بـ 05% من مركب Argemone السام مدة 30 و 60 يوماً على التوالي، كما لاحظ Steel et al (1985) هذا النقص عند تعرض الفئران للمركبات: P,P- Benzo pyrène و dichloro diphenyle trichloro methyl methane (D.D.T) مع تغيير نشاط الإنزيم GST، كما أوضح SAKA و Popova أن المبيد السام في كبد الفئران ورحمها أدى إلى نقص في تركيز GSH (Saka, S. & Popova, P. 1995). والنتائج التي حصلنا عليها جاءت متوافقة كذلك مع نتائج (Aouachria W. et al., 2005)، إذ إن معاملة فئران التجارب بجرعة $1/10 LD_{50}$ من مبيد الفاميثرين Alphamethrin أدى إلى انخفاض مستوى الجلوتاثيون الكبدي بنسبة 60% (P<0.001)، في حين زاد نشاط إنزيم Glutathione peroxidase وإنزيم Glutathione reductase بنسبة 52% لكليهما عن معاملة الفئران بالجرعة نفسها.

المراجع REFERENCES

- 1- Aouacheri W., Saad Saka and R. Djafer 2005. Effect of Alphamethrin on Glutathione Redox System in Rats. *J. King Saud Univ.*, Vol. 18, *Agric. Sci.* (1), pp. 51-56, Riyadh.
- 2-Bradford, M. M., 1976. Rapid and sensitive methods for the quantities of microgram quantities of utilising the principale of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- 3-Chasseaud L.F., 1979. The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer Res.*, 29: 174-75.
- 4- Edward, M. K. and S. K. Nechemia, 1976. Chemical basis of the perturbation of the glutathione- glutathione disulfide status of biological system by Diazenes, 139-57, in *glutathione: metabolism and function*, Raven Press, New York, Ed. by Arias, I. M. and Jakoby, W. B.
- 5- Kosower, N. S. and E. M. Kosower, 1976. Functional aspects of Glutathione disulfide and hidden forms of Glutathione, in *Glutathione: metabolism and function*, Ed. by Arias, I. M. and Jakoby W. B. Raven press, New York, 159-173.
- 6-Kosower N.S and E. M. Kosower, 1978. The glutathione status of cells. *Int. Rev. Sytol.*, 54:109-160.
- 7- Saka, S. and P. Popova, 1995. The effect of alphamethrin compound on Glutathione redox system. *Compt. Rendu Acad. Bulg. Sci.*, 11.
- 8- Satya Narayan, A., S.R., Baspai, T. Yagi, and U. K. Miska, 1985. Effect of intratracheal administration of D.D.T. and endosulfan on cytochrome P450 and liver of rats. *Bull. Environ. Coutan. Toxicol.*, 34, 55-62.
- 9- Smith, I. K., A. H. Polle, and H. Rennenber, 1990. *Glutathione in stress responses in plants: Adaptation and acclimation Mechanisms*. Wiley-Liss, Inc., 2d., 201-215.
- 10- Stanley, O.T., N.M. Elsayed, J. k. Georgy, and W. D. Korte, 1991. Metabolic changes in the mouse kidney after subcutaneous injection of Butyl 2-chloroethyl sulphide. *journal of Toxicol. Envir. Health*, 33, 19-27.
- 11-Upreti, K. K., M. Das, A. Kuman, G. B. Singh, and S. K. Khanna, 1989. Biochemical toxicology of argemone oil in short-term oral feeding response in rats. *Toxicol.*, 58, 285-89.
- 12- Weckbeker, G. and J. G. Cory, 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*.40, 257-64.

Received	2010/12/14	إيداع البحث
Accepted for Publ.	2011/10/18	قبول البحث للنشر