مقاله پژوهشی

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال بیست و پنجم/شماره ۸۷/زمستان ۱۳۸۶

تغییرات مقدار گلوتاتیون اکسید ناشی از پاراکوات در پلاسمای موش صحرایی در روش اندازه‌گیری کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC)

زهرا حامی*، دکتر محسن امینی**، امیر کیانی*، دکتر محمود قاضی خوانساری*.

* گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

** دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت: ۸۶/۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۸۶/۹/۱۰

چکیده

مقدمه: گلوتاتیون یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های بدن می‌باشد و به کارگیری روشی دقیق و حساس برای اندازه‌گیری آن در پلاسما برای ارزیابی آسیب‌شناختی بسیاری از بیماری‌ها سودمند است. اکسیداتیو استرس القاء شده توسط علف‌کش پاراکوات منجر به تغییراتی در میزان این تری‌پپتید حیاتی در بدن می‌شود. برای ارزیابی این تغییرات از یک روش HPLC با دتکتور فلورسانس استفاده شد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی بنیادی، تعداد ۳۰ موش صحرایی نر از نژاد wistar-albino، به کار گرفته شد. پلاسمای جمع‌آوری شده از موش‌های صحرایی که در مواجهه با پاراکوات در ۴ دوز ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ mg/kg قرار گرفته بودند با استونیتریل مخلوط و در سانتریفوژ ۵۰۰۰ rpm برای رسوب پروتئین قرار داده شد، محلول رویی در بن ماری ۴۰°C تحت جریان هوای ناشی از پمپ هوا خشک گردید. ۵۰ µl آب معمولی، ۵۰ µl بافر بورات ۰/۵ مولار با pH=۹ و ۱۰۰ µl محلول ۵۰۰ µg/ml FMOC به آن اضافه شد و پس از مخلوط کردن، در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه برای تکمیل فرایند مشتق‌سازی قرار گرفت. سپس ۲۰ µl از این ماده به دستگاه HPLC با ستون C18، فاز متحرک متانول- بافر فسفات (v/v؛ ۴۰:۶۰) و λex=۲۶۰nm، λem= ۳۱۵ nm تزریق گردید. پس از جمع‌آوری داده‌ها، شاخص‌های میانگین و انحراف معیار برای هر گروه با استفاده از نرم‌افزار SPSS محاسبه شد.

یافته‌ها: از میان موش‌هایی که در مواجهه با پاراکوات قرار گرفته بودند، در دوز ۶۰ mg/kg افزایش معنی‌داری در میزان گلوتاتیون اکسید (GSSG) نسبت به گروه شاهد دیده شد. روش مشتق‌سازی و جداسازی به کار برده شده در این مطالعه، امکان اندازه‌گیری مقادیر کم گلوتاتیون را به خوبی فراهم می‌آورد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های فوق نشان‌دهنده‌ی اهمیت به کارگیری روشی دقیق و حساس برای اندازه‌گیری گلوتاتیون، که یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های بدن در برابر شرایط اکسیداتیو استرس است، می‌باشد.

واژگان کلیدی: گلوتاتیون اکسید (GSSG)، پاراکوات، ۹- فلوئورنیل متیل کلروفرمات (FMOC)، HPLC

تعداد صفحات: ۹

تعداد جدول‌ها: -

تعداد نمودارها: ۵

تعداد منابع: ۱۶

آدرس نویسندهٔ مسئول: دکتر محمود قاضی خوانساری، استاد گروه فارماکولوژی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

E-mail: ghazikha@sina.tums.ac.ir

www.mui.ac.ir

مقدمه

گلوتاتیون یک تیول تری‌پپتید منحصر به فرد است که در اغلب گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و تمام بافت‌های پستانداران وجود دارد (۱) و به دلیل قدرت احیاکنندگی بالا، به عنوان یکی از عملکردهای حیاتی خود، حفاظت سلول در برابر آسیب‌های اکسیداتیو را بر عهده دارد (۲). عوامل بسیاری از جمله اکسیداتیو استرس منجر به کاهش سطح گلوتاتیون احیا (GSH) و افزایش میزان گلوتاتیون اکسید (GSSG) می‌شوند. اکسیداتیو استرس منجر به تشکیل رادیکال‌های آزاد و متابولیت‌هایی نظیر سوپراکسید و هیدروژن پراکسید می‌شوند (۳). این متابولیت‌های سمی، با عملکرد متوالی آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در چرخه‌ی اکسیداتیو احیا می‌شوند که در این میان GSH به GSSG اکسید می‌گردد (۶-۴) بنابراین اکسیداتیو استرس منجر به تخلیه‌ی GSH سلولی می‌شود. یکی از عوامل ایجاد کننده‌ی اکسیداتیو استرس سم پاراکوات است که به عنوان علف کش استفاده می‌شود (۷). پاراکوات تحت تأثیر NADPH – سیتوکروم P450 ردوکتاز دچار احیای تک الکترونی شده، رادیکال پاراکوات را تشکیل می‌دهد. در حضور اکسیژن رادیکال پاراکوات به سرعت اتواکسیده شده، منجر به تولید پاراکوات دی‌کاتیون و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از قبیل هیدروژن پراکسید، سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل می‌شود (۱۰-۸). مطالعات زیادی در مورد تأثیر پاراکوات بر محتوای گلوتاتیون که یک آنتی‌اکسیدان مهم در بدن می‌باشد صورت گرفته است. GSH، اکی‌والان‌های احیاکننده را برای احیای هیدروژن پراکسید (ناشی از متابولیسم پاراکوات) به آب تأمین می‌کند و خود به GSSG اکسید می‌شود. اندازه‌گیری افزایش میزان GSSG، وسیله‌ای حساس برای ارزیابی و سنجش وضعیت اکسیداتیو احیا است، زیرا غلظت آن در حالت عادی نسبت به GSH خیلی کم است (۱۱). بنابراین اندازه‌گیری اختصاصی و حساس GSH و GSSG به منظور ادامه‌ی پژوهش‌ها در مورد متابولیسم گزنوبیوتیک‌ها ضروری است. غلظت گلوتاتیون خون می‌تواند بازتاب وضعیت گلوتاتیون در بافت‌هایی که کم‌تر در دسترس می‌باشند، محسوب گردد؛ از این رو، اندازه‌گیری گلوتاتیون خون شاخصی مفید برای ارزیابی پاتولوژیکی بسیاری از بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود. برای اندازه‌گیری گلوتاتیون در نمونه‌های بیولوژیک روش‌های متعددی از جمله روش آنزیماتیک (۱۲)، کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC) (۱۳)، اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) (۱۴) و الکتروفورز کاپیلاری (۱۵) مورد استفاده قرار گرفته است. روش‌های اندازه‌گیری قدیمی، مثل روش آنزیماتیک حد تشخیص کافی نداشته، بنابراین تکرار پذیری پایینی هم دارند. روش‌های آنزیماتیک نیاز به تجهیزات پیشرفته ندارد ولی پر زحمت و وقتگیرند و در نتیجه برای آنالیزهای معمول مناسب نمی‌باشند.

روش‌های اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) و الکتروفورز کاپیلاری به دلیل هزینه‌ی بالا کم‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند. از میان روش‌های فوق، HPLC روشی دقیق، حساس و انتخابی است و برای اندازه‌گیری گلوتاتیون در نمونه‌هایی مانند پلاسما که میزان گلوتاتیون آن کم است، روش مناسب‌تری به نظر می‌رسد؛ زیرا آشکارساز فلورسانس مورد استفاده در این روش،

www.mui.ac.ir

حساسیت بسیار بالایی دارد. در این مطالعه امکان‌پذیر بودن مشتق‌سازی گلوتاتیون با ۹- فلوئورنیل متیل کلروفرمات (FMOC)، به عنوان یک عامل فلورسانس و اندازه‌گیری مشتق حاصله با HPLC مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

این مطالعه‌ی بنیادی بر روی ۳۰ سر موش صحرایی نر از نژاد wistar-albino با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم صورت گرفت. موش‌ها در قفسه‌ای جداگانه در اتاق کنترل با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد در مواجهه با ۱۲ ساعت نور و روشنایی قرار داشتند. موش‌ها در ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. یک گروه به عنوان شاهد و ۴ گروه دیگر مربوط به ۴ دوز پاراکوات (۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ mg/kg) از هم جدا گردید. نمک دی‌کلراید پاراکوات (سیگما-آمریکا) حل شده در آب دیونیزه در ۴ دوز ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ mg/kg به روش داخل صفاقی (IP) (۱۶) به موش‌ها تزریق شد و پس از گذشت ۴ ساعت خونگیری از قلب موش صورت گرفت. بدین منظور موش‌ها ابتدا با اتر بی‌هوش شده و سپس ۲ سی‌سی خون توسط سرنگ آغشته به هپارین از بطن قلب جمع‌آوری و به لوله‌های حاوی هپارین منتقل شد. در این مرحله، برای پیشگیری از پاره شدن گلبول‌های قرمز، خونگیری از قلب و انتقال آن به لوله‌های حاوی هپارین باید با دقت صورت پذیرد. از موش‌های گروه شاهد (نرمال سالین) نیز به همین روش خونگیری شد. لوله‌های حاوی خون بلافاصله در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. ۱۰۰ µl از محلول رویی (پلاسما) به لوله‌ی دیگری منتقل و برای رسوب پروتئین‌های پلاسما، ۳۰۰µl استونیتریل به آن اضافه گـردید. پس از ورتکـس، لوله‌ها در سانتریفوژ ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. محلول رویی حاصل از سانتریفوژ جهت تبخیر حلال در داخل بن ماری ۴۰°C تحت جریان هوای ناشی از پمپ هوا قرار گرفت. پس از خشک شدن کامل، مقدار ۵۰ میکرولیتر آب معمولی، ۵۰ µl بافر بورات ۰/۵ مولار با pH=۹ و ۱۰۰µl محلول FMOC ۵۰۰ µg/ml به آن اضافه شد و پس از مخلوط کردن، در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه برای تکمیل فرآیند مشتق‌سازی قرار گرفت. برای تهیه‌ی محلول‌های استاندارد گلوتاتیون، در یک بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری مقدار ۱۰ میلی‌گرم گلوتاتیون با آب معمولی به حجم بالن رسانده شد تا غلظت ۱ mg/ml به دست آید. برای به دست آوردن غلظت mg/ml ۰/۵، ۵ سی‌سی از این محلول در بالن ژوژه‌ای دیگر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. این کار را تکرار گردید تا غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ و ۰/۰۳۱۲۵ mg/ml به دست آید. برای تبدیل GSH به GSSG اجازه داده شد تا محلول‌های حاصل یک روز در دمای اتاق بماند. مشتق‌سازی در دمای اتاق، به مدت ۱۵ دقیقه با افزودن ۵۰ µl بافر بورات ۰/۵ مولار با pH=۹ و ۱۰۰ µl ماده‌ی مشتق‌ساز FMOC ۵۰۰ µg/ml به ۵۰ µl از هر کدام ازمحلول‌های استاندارد صورت گرفت. بنابراین غلظت نهایی محلول‌ها به ترتیب ۰/۸۱۳، ۰/۴۰۷، ۰/۲۰۳، ۰/۱۰۲ و ۰/۰۲۵ µmol/ml شد. مقدار ۲۰ µl مشتق حاصل از غلظت‌های مختلف گلوتاتیون و نیز نمونه‌های پلاسما به دستگاه HPLC با مشخصات زیر تزریق گردید.

فاز متحرک شامل مخلوطی از متانول- بافر فسفات با نسبت حجمی ۴۰:۶۰، ستون C18 (ODS – 3 5 µm 250×4.6 mm)، سیستم شویش ایزوکراتیک با سرعت ۲ ml/min، λex=۲۶۰ nm،

www.mui.ac.ir

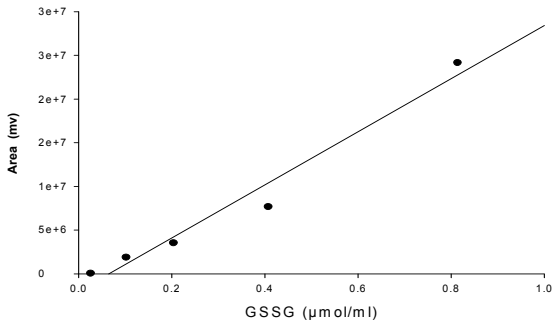
λem= ۳۱۵ m بود. حجم نمونه با استفاده از فرمول ذیل و داده‌های موجود محاسبه می‌گردد. با z مساوی ۱/۹۶ و دقت (d) مساوی ۱ و انحراف معیار مساوی ۱/۲۵، n تعداد نمونه حدود ۶ می‌شود.

$$n = (z\,\alpha / 2)2 \times \sigma 2 / d2$$

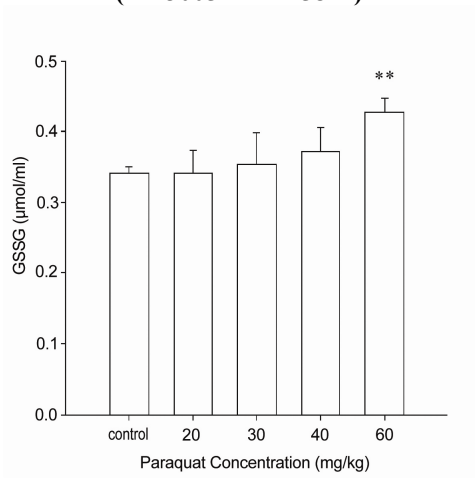
پس از جمع‌آوری داده‌ها، شاخص‌های میانگین و انحراف معیار برای هر یک از نمونه‌های آزمایشی و شاهد با استفاده از برنامه‌ی (SPSS, Inc. Chicago, IL) SPSS محاسبه و سپس به منظور بررسی وجود اختلاف معنی‌دار، بین هر یک از گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد، همچنین بین خود گروه‌های آزمایشی آزمون Tukey Kamber Multiple Comparison test (اختلاف بین گروه‌ها در هر نقطه با p<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شده است) مورد استفاده قرار گرفت. برای رسم نمودار نیز از برنامه‌ی Sigma Plot استفاده شد.

یافته‌ها

نمودار ۱ نشانگر منحنی استاندارد گلوتاتیون تام است (در این جا منظور از گلوتاتیون تام، همان گلوتاتیون اکسید است، زیرا گلوتاتیون احیا به GSSG اکسید شده است) و نمودار ۲، میزان افزایش گلوتاتیون تام را در مواجهه با پاراکوات در دوزهای۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ mg/kg در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد. همان طور که نمودار نشان می‌دهد، میزان گلوتاتیون تام تنها در گروه مواجه شده با پاراکوات در دوز ۶۰ mg/kg افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهد. سایر گروه‌ها اندکی افزایش در میزان GSSG نشان دادند ولی این افزایش معنی‌دار نبود. شکل ۱، کروماتوگرام محلول بلانک (بافر بورات + FMOC)، شکل ۲، کروماتوگرام محلول استاندارد گلوتاتیون (گلوتاتیون + بافر بورات +FMOC) و شکل ۳، کروماتوگرام نمونه‌ی پلاسما (پلاسما + بافر بورات + FMOC) را نشان می‌دهد.



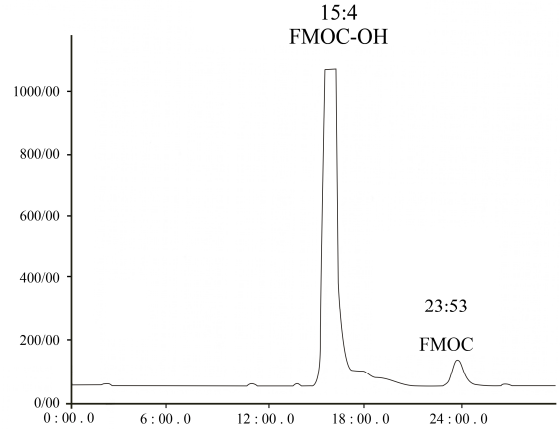
نمودار ۱. منحنی استاندارد گلوتاتیون اکسید (Y= 30052X-2115811)



نمودار ۲. تغییرات ناشی از اکسیداتیو استرس ایجاد شده به وسیله‌ی پاراکوات.

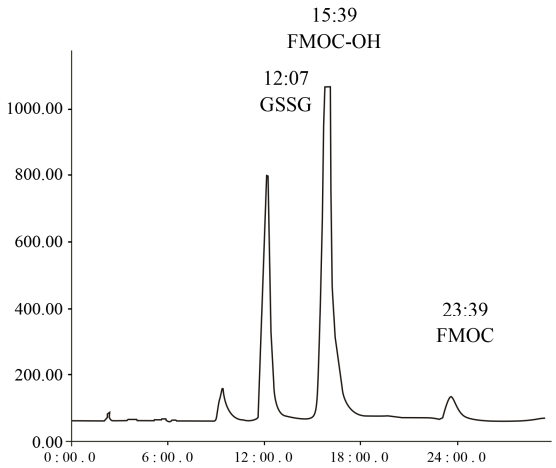
تمام داده‌ها (n=۶) به صورت Mean±SE بیان شده‌اند.

**** تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد**

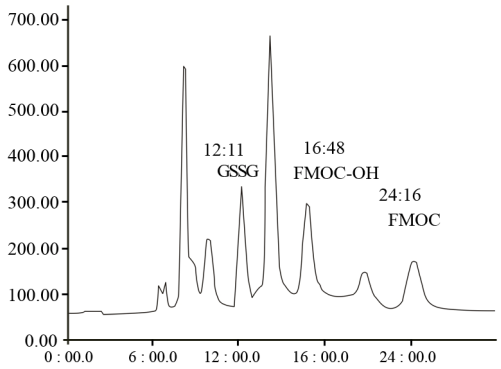


شکل ۱. کروماتوگرام محلول بلانک (بافر بورات+FMOC)

www.mui.ac.ir



شکل ۲. کروماتوگرام محلول استاندارد گلوتاتیون اکسید (گلوتاتیون+بافر بورات+FMOC)



شکل ۳. کروماتوگرام نمونه‌ی پلاسما (پلاسما+بافر بورات+FMOC)

بحث

جهت دنبال کردن غلظت گلوتاتیون اکسید در پلاسما و اندازه‌گیری تغییرات آن پس از مواجهه حیوان با سم پاراکوات، روشی مورد نیاز است که دارای حساسیت بالا و در محدوده‌ی غلظت‌های مورد نظر خطی باشد. برای حصول این امر، روش‌های مختلفی چه در مراحل مشتق‌سازی و چه در مراحل کار با دستگاه HPLC به کار گرفته شد. به منظور set up کردن روش مشتق‌سازی گلوتاتیون با FMOC شیوه‌های متعددی مورد آزمایش قرار گرفت که در ادامه به آنها پرداخته می‌شود. FMOC اغلب برای مشتق‌سازی آمین‌های نوع ۱ و ۲ به کار می‌رود اما قابلیت مشتق‌سازی گروه‌هایی نظیر OH– و SH– را نیز دارد. گلوتاتیون در ساختمان خود دارای گروه‌های عاملی SH– و NH2– می‌باشد که هر دو قابلیت مشتق‌سازی با FMOC را دارند. گروه تیول (-SH) در گلوتاتیون به سرعت اکسید شده، به دی سولفید (-S-S-) تبدیل می‌شود؛ پس برای انجام عملیات مشتق‌سازی گروه تیول، استفاده از یک ماده‌ی احیاکننده مانند NaBH4 ضروری می‌نمود. در عین حال از محلول ۴ میلی‌مولار EDTA نیز به منظور حذف یون‌های مزاحم نظیر Ca2+، Mg2+، Na+ و Fe2+ که فرایند اکسید شدن گروه تیول به دی‌سولفید را تسهیل می‌کنند، استفاده گردید. برای رسوب پروتئین‌های پلاسما نیز از محلول ۱۰٪ TCA (تری کلرواستیک اسید) استفاده گردید. TCA محیط واکنش را بسیار اسیدی می‌کرد، در حالی که برای مشتق‌سازی با FMOC شرایط گسترده مورد نیاز می‌باشد و از آن جا که حجم مواد مورد استفاده برای مشتق‌سازی در حد میکرولیتر بود، تنظیم pH این محلول با حجم بسیار کم از pH اسیدی به قلیایی، کاری بسیار مشکل و با درصد خطای بالا بود و نتایج این عدم دقت و خطای زیاد در پیک‌های کروماتوگرام به وضوح دیده می‌شد؛ چرا که روند خطی برای غلظت‌های مختلف گلوتاتیون به دست نیامد، بنابراین تصمیم گرفته شد که از استونیتریل به جای TCA برای رسوب پروتئین‌های پلاسما استفاده گردد. بدین منظور سه حجم استونیتریل به ازای یک حجم پلاسما استفاده گردید و پس از vortex در سانتریفوژ به منظور رسوب پروتئین‌های پلاسما قرار داده شد. محلول رویی به ویال درپوش‌دار منتقل گردید. ۲۵ µl محلول سدیم بوروهیدرید در سود به ۱۰۰ µl محلول رویی اضافه

www.mui.ac.ir

شد و در دمای ۵۰°C به مدت ۰/۵ ساعت قرار گرفت. در این روش هم گروه تیول و هم گروه آمین گلوتاتیون با FMOC واکنش نشان داد و چند پیک در کروماتوگرام ایجاد کرد، ولی به دلیل این که گروه تیول بسیار مستعد اکسید شدن است با وجود استفاده از عامل احیاکننده، شدت پیک‌های گلوتاتیون روند منطقی نشان نمی‌داد. پس تصمیم گرفته شد، برای این که ماده‌ی مشتق‌ساز با گلوتاتیون، تنها یک پیک با خصوصیات مولکولی شناخته شده تشکیل دهد، گروه تیول حذف و تنها به مشتق‌سازی گروه آمین پرداخته شد. برای حذف گروه تیول محلول گلوتاتیون در آب معمولی (Tab water) که حاوی یون‌های مختلف نظیر +Ca2 است، تهیه شد. این یون‌ها گروه SH- را به دی‌سولفید تبدیل می‌کنند. گروه تیول، بسیار مستعد اکسید شدن است و در دمای اتاق ظرف مدت چند دقیقه اکسید می‌شود؛ بنابراین تمامی GSH به GSSG تبدیل می‌شود. آن گاه ماده‌ای که مشتق‌سازی گردید GSSG (گلوتاتیون اکسید) بود. برای بهینه کردن شرایط مشتق‌سازی، pHهای مختلف از ۴ تا ۱۰ مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که pH اسیدی و خنثی برای مشتق‌سازی با FMOC مناسب نیست. از همین رو، برای قلیایی کردن محیط واکنش، از تری‌اتیل آمین استفاده شد. محلول تری‌اتیل آمین در استونیتریل در حجم‌های مختلف (۱۰-۵۰ µl) به محیط واکنش اضافه شد ولی پس از بررسی کروماتوگرام‌ها چنین نتیجه‌گیری شد که شدت پیک‌ها با توجه به غلظت‌های مختلف گلوتاتیون روند خطی نداشته، تکرارپذیری مناسبی ندارند. در نهایت تصمیم گرفته شد برای قلیایی کردن محیط واکنش از بافر بورات با pH قلیایی استفاده شود. برای تعیین بهترین pH قلیایی، بافر بورات با pH ۸، ۸/۵، ۹، ۹/۵ و ۱۰ تهیه گردید. بررسی کروماتوگرام‌ها نشان داد که در pH=۹ پیک گلوتاتیون از شدت بیشتری برخوردار است، پس برای ادامه‌ی کار، pH=۹ انتخاب شد. متغیر دیگری که برای بهبود مشتق‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفت عامل دما بود. بدین منظور مشتق‌سازی در دماهای ۸۰°C و ۷۰ و ۶۰ و ۴۰ و نیز دمای اتاق انجام شد و مشاهده گردید که مشتق‌سازی با FMOC در دمای اتاق دارای بهترین نتیجه است؛ چرا که مشتق‌سازی در دماهای بالا پیک‌های زیادی در کروماتوگرام ایجاد می‌کند که احتمال دارد ناشی از تجزیه‌ی FMOC باشد. برای تعیین زمان لازم برای مشتق‌سازی، پس از انجام مراحل مشتق‌سازی زمان‌های مختلف از ۵ تا ۴۵ دقیقه در نظر گرفته شد و محصول مشتق‌سازی به دستگاه HPLC تزریق گردید؛ ملاحظه شد که مشتق‌سازی در عرض ۱۵ دقیقه در دمای اتاق می‌تواند صورت گیرد. فاز متحرکی که برای مراحل جداسازی با HPLC مناسب تشخیص داده شد مخلوطی از متانول و بافر فسفات بود. این بافر از حل کردن ۳ میلی‌لیتر تری‌اتیل آمین در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب و سپس تنظیم pH تا میزان ۳/۲ با اسید فسفریک تهیه شد. همچنین از روش شویش ایزوکراتیک با سرعت جریان فاز متحرک ml/min ۲ استفاده و سپس نسبت‌های مختلف فاز متحرک بررسی شد. ابتدا ۷۵٪ متانول و ۲۵٪ بافر فسفات مورد استفاده قرار گرفت. سپس نسبت‌های ۱۵:۸۵، ۲۰:۸۰، ۲۷:۷۳، ۱۴:۸۶، ۱۲:۸۸ و ۱۷:۸۳ نیز بررسی شد که درصد بالاتر مربوط به متانول و درصد پایین‌تر مربوط به بافر است. هیچ‌یک از این نسبت‌ها نتوانستند جداسازی گلوتاتیون مشتق‌سازی شده را از FMOC به خوبی انجام دهند.

www.mui.ac.ir

در شرایط فوق، پیک‌های مربوط به FMOC که شامل پیک FMOC و پیک FMOC-OH بود (FMOC-OH محصول واکنش FMOC با آب است) با پیک گلوتاتیون مشتق‌سازی شده هم‌پوشانی داشتند و در محدوده‌ی ۱۰-۸ دقیقه این پیک‌ها ناحیه‌ی شلوغی را تشکیل می‌دادند. برای جداسازی بهتر از نسبت حجمی ۴۰:۶۰ استفاده گردید که ۶۰٪ متانول و ۴۰٪ بافر فسفات را شامل می‌شد. در این شرایط پیک مربوط به GSSG مشتق‌سازی شده از پیک‌های FMOC به طور کامل جدا گردید و به دلیل محور بودن بیشتر زودتر از ستون خارج گردیده، با فاصله‌ای منطقی از پیک‌های FMOC در کروماتوگرام قرار گرفت. با این شرایط، زمان بازداری پیک گلوتاتیون حدود ۱۲ دقیقه و زمان‌های بازداری پیک FMOC-OH و FMOC به ترتیب حدود ۱۶ و ۲۴ دقیقه می‌باشند. از آن جا که FMOC معرف مناسبی برای مشتق‌سازی آمین‌های نوع اول و دوم است، در این مطالعه با اکسید کردن تعمدی GSH از مشتق‌سازی عامل تیول جلوگیری و تنها به مشتق‌سازی عامل آمین پرداخته شد، بنابراین آن چه که مشتق‌سازی گردید و توسط HPLC جداسازی و شناسایی شد GSSG بود. پاراکوات یک عامل ایجاد کننده‌ی اکسیداتیو استرس است و باعث اکسید شدن GSH به GSSG می‌گردد. بنابراین اندازه‌گیری افزایش میزان GSSG که در حالت عادی نسبت به GSH خیلی کم است، وسیله‌ای حساس برای ارزیابی و سنجش وضعیت اکسیداتیو احیا می‌باشد. در این مطالعه، امکان‌پذیر بودن واکنش مشتق‌سازی FMOC با عامل آمین گلوتاتیون، برای اندازه‌گیری تغییرات میزان گلوتاتیون ناشی از پاراکوات در پلاسمای موش صحرایی به روش HPLC بررسی گردید. نمودارهای ۴-۲ نشان دهنده‌ی تأثیر ۴ دوز پاراکوات بر روی میزان افزایش GSSG می‌باشد. همان طور که در این نمودار مشاهده می‌گردد تنها در دوز ۶۰ mg/kg تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد وجود دارد و سایر گروه‌ها افزایش اندکی را در میزان GSSG نسبت به گروه شاهد نشان داده‌اند. مطالعه‌ی حاضر، یک برآورد نیمه کمی از تغییرات GSSG ناشی از سم پاراکوات به ما ارائه داد و برای به دست آوردن نتایج با کمیت و کیفیت بالاتر، تحقیقات بیشتری به منظور بهینه کردن شرایط مشتق‌سازی و نیز شرایط کروماتوگرافی لازم است.

تقدیر و تشکر

این مطالعه از طریق طرح تحقیقاتی شماره‌ی ۱۳۲/۱۱۳۸ مورخه‌ی ۱۳۸۵/۱۲/۲۷ دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد حمایت قرار گرفته است. بدین وسیله از همه‌ی کسانی که در این امر ما را یاری دادند صمیمانه سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع

1. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radic Biol Med 1999; 27(9-10):951-65.

2. Kidd PM. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. Altern Med Rev 1997; 1:155-76.

3. Tsukamoto M, Tampo Y, Sawada M, Yonaha M. Paraquat-induced oxidative stress and dysfunction of the glutathione redox cycle in pulmonary microvascular endothelial cells. Toxicol Appl Pharmacol 2002; 178(2):82-92.

4. Arteel GE, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Sies H. Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. Biol Chem 1998; 379(8-9): 1201-5.

www.mui.ac.ir

5. Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem J 1980; 191(2):421-7.
6. Rahman I, Antonicelli F, MacNee W. Molecular mechanism of the regulation of glutathione synthesis by tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone in human alveolar epithelial cells. J Biol Chem 1999; 274(8):5088-96.
7. Kao CH, Hsieh JF, Ho YJ, Hung DZ, Lin TJ, Ding HJ. Acute paraquat intoxication: using nuclear pulmonary studies to predict patient outcome. Chest 1999; 116(3):709-14.
8. Florkowski CM, Bradberry SM, Ching GW, Jones AF. Acute renal failure in a case of paraquat poisoning with relative absence of pulmonary toxicity. Postgrad Med J 1992; 68(802):660-2.
9. Bismuth C, Garnier R, Baud FJ, Muszynski J, Keyes C. Paraquat poisoning. An overview of the current status. Drug Saf 1990; 5(4):243-51.
10. Nakagawa I, Suzuki M, Imura N, Naganuma A. Involvement of oxidative stress in paraquat-induced metallothionein synthesis under glutathione depletion. Free Radic Biol Med 1998; 24(9):1390-5.
11. Loughlin AF, Skiles GL, Alberts DW, Schaefer WH. An ion exchange liquid chromatography/mass spectrometry method for the determination of reduced and oxidized glutathione and glutathione conjugates in hepatocytes. J Pharm Biomed Anal 2001; 26(1):131-42.
12. Hiraku Y, Murata M, Kawanishi S. Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay. Biochim Biophys Acta 2002; 1570(1):47-52.
13. Abukhalaf IK, Silvestrov NA, Menter JM, von Deutsch DA, Bayorh MA, Socci RR et al. High performance liquid chromatographic assay for the quantitation of total glutathione in plasma. J Pharm Biomed Anal 2002; 28(3-4):637-43.
14. Giustarini D, Dalle-Donne I, Colombo R, Milzani A, Rossi R. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. Free Radic Biol Med 2003; 35(11):1365-72.
15. Parmentier C, Leroy P, Wellman M, Nicolas A. Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetric detection. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 719(1-2):37-46.
16. Ghazi-Khansari M, Mohammadi-Karakani A, Sotoudeh M, Mokhtary P, Pour-Esmaeil E, Maghsoud S. Antifibrotic effect of captopril and enalapril on paraquat-induced lung fibrosis in rats. J Appl Toxicol 2007; 27(4):342-9.

www.mui.ac.ir