

Oksidativni i nitrozativni stres - medijatori neurotoksičnosti dikvata

Mirjana Đukić¹, Milica Ninković², Ivana Stevanović²,
Marijana Ćurčić¹, Katarina Ilić³, Dragan Đurđević²,
Dragana Vujanović¹

¹ Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović”, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

² Institut za medicinska istraživanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija

³ Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmakologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

Adresa autora za korespondenciju: Dr sc. Mirjana Đukić, profesor
Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Farmaceutski fakultet
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija
e-mail: mirjana.djukic@pharmacy.bg.ac.rs
Telefon (kancelarija): +381 11 3951 308; Faks: +381 11 3972840
URL: <http://www.pharmacy.bg.ac.rs/fakultet/ljudi/nastavnik/64>

Kratak sadržaj

Najčešće zapaženi efekti sistemskog trovanja herbicidom dikvatom (DK) na centralni nervni sistem (CNS) su opšta depresija i letargija. Opšte je prihvaćeno da se toksičnost DK ostvaruje posredstvom povećanog stvaranja superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$) tokom njegovog red-oks metabolizma, u prisustvu molekularnog kiseonika, koji dalje inicira lančanu reakciju radikalskog tipa i razvoj oksidativnog stresa (OS). Do danas mehanizmi neurotoksičnog efekta DK nisu u potpunosti poznati.

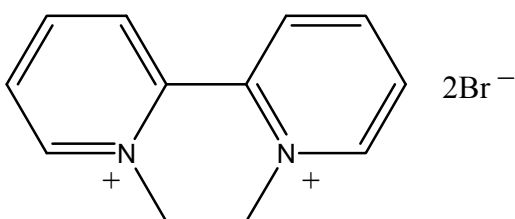
Cilj ove studije je bio da ispitamo da li OS posreduje u neurotoksičnosti indukovanoj DK. Eksperiment je sproveden na mužjacima Wistar pacova, intrastrijatalno tretiranih (*i.s.*) DK. Parametri oksidativnog statusa, kao što su: superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), nitrati (NO_3^-), kao finalni metaboliti reaktivnih vrsta azota; malondialdehid (MDA), indikator lipidne peroksidacije; aktivnost enzima; superoksid dizmutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GPx); i glutation (GSH) mereni su u hipokampusu, 30 minuta, 24 sati i 7 dana posle tretmana.

Stopa smrtnosti od 30 do 40 % ustanovljena je u grupi pacova tretiranih DK, tokom 2-3 sata od buđenja iz anestezije. Dodatno, pacovi ove grupe su pokazali neurološke simptome letargije. Značajno povećana lipidna peroksidacija pokazuju da OS posreduje u neurotoksičnom odgovoru indukovanom *i.s.* primenom DK.

Ključne reči: dikvat, neurotoksičnost, oksidativni stres, hipokampus

Skraćenice: DK, dikvat; i.s., intrastrijatalno; i.p., intraperitonealno; LPO, lipidna peroksidacija; O₂, molekularni kiseonik; MDA, malondialdehid; NADPH, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; NO_x azotni oksidi; NO₃⁻, nitrati; NS, nitrozativni stres; O₂^{•-}, superoksidni anjon radikal; OS, oksidativni stres; PK, parakvat; SOD, superoksidna dizmutaza; RAV, reaktivne azotove vrste; RKV, reaktivne kiseonične vrste.

Uvod



Dikvat (DK) (1,1'-etilen-2,2'-dipiridin) spada u grupu kontaktnih herbicida sa neselektivnim, ali brzim delovanjem (desikanat i regulator rasta biljaka) (1). Sa ekološkog aspekta, DK se smatra pogodnim herbicidom zbog brze bio- i fotodegradacije (2, 3). Maksimalna dozvoljena koncentracija (MDK) u vazduhu za DK iznosi 0,5 mg/m³, što odgovara dozi od 0,07 mg/kg dnevnog unosa. Oralna smrtna doza za 50 % eksperimentalnih životinja (LD₅₀) za DQ iznosi: 120 mg/kg za pacove, 233 mg/kg za miševe, 188 mg/kg za zečeve, 187 mg/kg za zamorce i pse. Dikvat može da se unese u organizam oralnim putem, inhalacijom i preko kože. Trovanja su najčešće samoubilačka, a mogu biti i profesionalna ili slučajna (1, 5, 6). Kod sistemskog trovanja DK dolazi do oštećenja gastrointestinalnog trakta, bubrega i jetre, a ključni poremećaj predstavlja poremećen metabolizam vode i stanje dehidracije; pri većim dozama DK, opisani su i neurološki poremećaji kao što su tremor i konvulzije. Patofiziološki mehanizam promena u centralnom nervnom sistemu (CNS) nije razjašnjen, mada se zna da DK prolazi krvno-moždanu barijeru (7).

Dikvat podleže redukciji u mitohondrijskoj i mikrozomskoj frakciji ćelija jetre, pluća i bubrega. U jetri se DK metaboliše do netoksičnog metabolita dikvat-monopiridona (6',7',-dihidro-4-okso-[1,2-a':2',1'-c] pirazinijum jon) (8). Postoji više potvrda da je sistemska toksičnost DK posredovana povećanim stvaranjem slobodnih radikala (9, 10). Poznato je da se tokom oksidativnog stresa (OS) troše reduktivne ćelijske rezerve nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NAD(P)H) i glutation (GSH), tako je u proksimalnim tubulima bubrega pokazano da DK smanjuje odnos

NAD(P)H/NAD(P)⁺. Dodatno, DK utiče na povećano oslobađanje gvožđa iz feritina, što doprinosi stvaranju hidroksilnih radikala (HO[•]), posredstvom Fentonove reakcije (11). Dikvat je u prometu u formi di-katjona (DK²⁺). Pod dejstvom citohroma P450 reduktaze DK²⁺ se redukuje do bipiridil monokatjon radikala (DK^{•+}), koji se dalje, u reakciji sa O₂ oksidiše nazad do DK²⁺, a O₂ redukuje do superoksid anjon radikala (O₂^{•-}) (12). U poređenju sa parakvatom (PK) (široko primenjen herbicid, dipiridinski analog DK), DK je snažniji oksidans, bazirano na njihovim redoks potencijalima (EO' = - 349 mV za DK i EO' = - 446 mV za PK) (13). Studije Fussella i saradnika (2011) na rekombinantnoj humanoj NADPH-citohrom P450 reduktazi su pokazale da je DK 10-40 puta efikasniji u stvaranju ROS od PK i da je oko 10 puta potentniji u stvaranju H₂O₂ (koristeći mikrozome jetre pacova) (12). Povećano stvaranje O₂^{•-}, kroz redoks metabolizam DK, pokreće lanac lančanih reakcija. Posredstvom superoksid dizmutaze (SOD), O₂^{•-} se spontano i brzo prevodi u H₂O₂ i O₂, (~10⁵ M⁻¹s⁻¹ pri pH 7,0). Poznato je da je H₂O₂ jedan od izvora HO[•], najsnažnijeg pokretača oksidativnih oštećenja svih klasa biomolekula, uključujući lipide tj. inicira lipidnu peroksidaciju (LPO) ćelijskih membrana i nastanak citotoksičnih efekata (14). Masivan utrošak O₂ tokom intenzivnog redoks metabolizma DK, prouzrokuje anoksiju tkiva, koja u CNS rezultira letargijom (15).

Moždano tkivo je posebno podložno oksidativnim oštećenjima (16, 17). Brojne eksperimentalne studije pokazale su da su pojedini delovi mozga osetljiviji u odnosu na druge moždane strukture na različite faktore oštećenja (otrovi, ishemija, starenje, neurodegenerativni procesi CNS). U ove strukture spadaju i piramidni neuroni CA₁ i CA₃ sektora hipokampus. Uzimajući u obzir prethodno navedene činjenice, a u cilju razjašnjenja patofiziološkog mehanizma neurotoksičnosti DK, opredelili smo se da parametre oksidativnog stresa merimo u hipokampusu, selektivno osetljivoj strukturi na OS.

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi: a) da li je povećana produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) i reaktivnih azotovih vrsta (RAV) u hipokampusu nakon *i.s.* aplikacije DK; b) da li se razvija OS i/ili nitrozativni stres (NS) u obimu koji ishoduje oksidativnim oštećenjem lipida; i c) da li je glutationski ciklus uključen u odgovor selektivno osetljivih struktura na neurotoksični efekat DK.

Materijal i metode

Eksperimentalne životinje

Eksperimentalne životinje su tretirane u skladu sa vodičem za eksperimentalne studije, No. 282-12/2002 (Etički komitet Vojnomedicinske akademije, Beograd, Srbija). Eksperimenti su izvođeni na odraslim mužjacima Wistar pacova težine oko 220 g. Pacovi su bili podeljeni u tri grupe (dve kontrolne i jedna eksperimentalna), smešteni u

kavezima pod standardizovanim uslovima (temperatura: 23 ± 2 °C, relativna vlažnost: 55 ± 3 % i ciklus svetlo/tamno: 13/11 sati) i imali su slobodan pristup hrani i vodi. Svi eksperimenti su rađeni posle adaptacije životinja na laboratorijske uslove od 7 dana i u periodu od 9h ujutru do 13h popodne.

Eksperimentalni dizajn

Pacovi su anestetizirani pentobarbital natrijumom [45 mg/kg telesne mase (TM)] intraperitonealno (*i.p.*). Testirane supstance su aplikovane u pojedinačnoj jednokratnoj dozi, intrastrijatalno (*i.s.*) u finalnoj koncentraciji od 10 μ L, da se nervno tkivo ne bi opteretilo volumenom. Supstance su aplikovane u zapremini od 10 μ L *i.s.* preko Hamiltonovog šprica, pomoću stereotaksičnog instrumenta, a prema odgovarajućim koordinatama za male laboratorijske životinje (koordinate: 8,4 mm iza bregme, 2,6 mm levo od srednje linije suture i 4,8 mm ventralno od dure) (18).

Životinje su podeljene u tri eksperimentalne grupe: dve kontrolne grupe: intaktna grupa (netretirani pacovi), n=8 i lažno-operisani pacovi (0.9% NaCl), n=8; i jedna eksperimentalna DK grupa (2.5 μ g DK /10 μ L), n=24. Radi praćenja efekta neurotoksiciteta DQ na parametre OS/NS u hipokampusu, eksperimentalne životinje su dekapitovane, 30 minuta, 24 h i 7 dana od tretmana, (n=8 / terminu). Biohemijski parametri OS mereni su ipsi- i kontra-lateralnom hipokampusu.

Reagensi

Korišćene hemikalije su analitičke čistoće: Diquat - Reglone® (200 g/L) (Zeneca - Agrochemicals); Pentobarbital natrijum - Vetanarcol® (0,162 g/mL) (Werfft - Chemie, Vienna, Austria); glutation reduktaza (EC 1.6.4.2), Tip III, iz kvasca [9001-48-3], Sigma Chemical Co (St Luis, MO, USA) – visoko rafinisana suspenzija u 3.6M (NH₄)₂SO₄, na pH 7,0; 2500 U/1,6 mL (9,2 mg prot/mL) 170 U/mg proteina (1 jedinica redukuje 1 μ mol GSSG/min, pH 7,6 na 25 °C); fiziološki rastvor (0,9 % NaCl) (Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija); glutation, glutation disulfid i NADPH (Boehringer Corp. - London, UK); NaNO₃ (Mallinckrodt Chemical Works - St. Louis, MO, USA); etilendiamintetra sirćetna kiselina – EDTA (Sigma - Sr. Louis, USA); natrijum fosfat - Na₂HPO₄, kalijum dihidrogen fosfat - KH₂PO₄, trihlorsirćetna kiselina, tiobarbiturna kiselina – TBA (Merck - Darmstadt, Germany); natrijum tetraborat i borna kiselina (Zorka - Šabac, Srbija); karbonatni pufer (50 mM, pH 10.2), (Serva, Feinbiochemica - Heidelberg, New York); NaNO₃, Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, USA); natrijum glukonat, Merck (Darmstadt, Germany); glicerol, Merck (Darmstadt, Germany); metanol, HPLC čistoće, Merck (Darmstadt, Germany); acetonitril, HPLC čistoće, Merck (Darmstadt, Nemačka); standardni puferi pH 7,0 i pH 10,0, HI 7710P (Vila do Conde, Portugal). Dejonizovana voda je pravljena preko Millipor mili-Q sistema za prečišćavanje vode (Waters - Millipore, Milford, MA, USA).

Priprema tkiva i merenja

Homogenat selektivno osetljive moždane strukture hipokampusa pripreman je kao što je opisano ranije (19). Izolovan je ipsi i kontralateralni hipokampus i sve vreme procedure držan je na ledu. Izolovana moždana struktura je prebačena u saharozni medijum (0,25 mol/L saharoza, 0,1 mmol/L EDTA u natrijum-kalijum fosfatnom puferu, pH 7) i homogenizovana u staklenom homogenizeru s teflonskim tučkom na 800 obrtaja/min (Tehnica Zelezniki Manufacturing, Slovenia). Nakon dva uzastopna centrifugiranja na 1000 g, u trajanju od 15 min na 4 °C, odvojen je supernatant, a grubi talog je resuspendovan u 1 mL dejonizovane vode. Solubilizacija subcelularnih membrana u hipotoničnom rastvoru postignuta je Pasterovom pipetom konstantnim mešanjem od 1h. Zatim su homogenati centrifugirani na 2000 x g, 15 min na 4 °C, a dobijeni supernatant je korišćen za analizu. Ukupna koncentracije proteina je merena metodom po Lowriju (20).

Analitika parametara oksidativnog i nitrozativnog stresa

Parametri OS/NS (superoksid anjon radikal, nitrati, superoksid dizmutaza, malondialdehid, ukupni glutatoin i glutatoin peroksidaza) mereni su obostrano u hipokampusu posle 30 min, 24h i 7 dana nakon tretmana.

Superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) - Sadržaj $O_2^{\bullet-}$ je određivan metodom koja se bazira na redukciji nitroblutetrazolijuma (NBT) u monoformazan, posredstvom $O_2^{\bullet-}$. Žuta boja redukovano produkta merena je spektrofotometrijski na 550 nm (21). Rezultati se izražavaju kao μmol redukovano NBT/mg proteina.

Nitrati (NO_3^-) - Tečna hromatografija pod visokim pritiskom sa UV-diode array (HPLC-DA) detekcijom korišćena je za merenje sadržaja nitrata u homogenizatu hipokampusa. Merenje je vršeno na sobnoj temperaturi. Mobilna faza sadrži boratni pufer/glukonat koncentrat: metanol: acetonitril: dejonizovana voda (2:12:12:74, V/V/V/V), pH = 8,5. Boratni pufer/glukonat koncentrat se sastoji od 0,07 mol/L natrijum glukonata, 0,3 mol/L H_3BO_3 , 0,1 mol/L $Na_2B_4O_7$, 3,8 mol/L glicerola u dejonizovanoj vodi (1,6 g natrijum glukonata, 1,8 g H_3BO_3 , 2,5 g $Na_2B_4O_7$, 25 ml glicerola i dejonizovana voda do 100 ml). Boratnim puferom je podešen pH mobilne faze na 8,5. Kalibracija pH-metra na pH 7,01 i pH 10,01 je vršena standardnim puferkim rastvorima. Pre upotrebe mobilna faza je filtrirana kroz membranski filter veličine pora 0,45 μm . UV-DAD detekcija je vršena na talasnoj dužini 214 nm. Protok mobilne faze je bio 1,3 mL/min. Zapremina uzorka koji se injektuje u tečni hromatograf iznosi 50 μL (22).

HPLC Aparatura: pumpa HPLC (LKB 2150, Bromma, Sweden); petlja za injektovanje, 50 μL ; detektor, UV-diode array (UV-DAD) (LKB 2152, Bromma, Sweden); program za obradu podataka, Wavescan EG/Nelson commander (LKB,

Bromma, Sweden); hromatografska anjonska kolona (bazirana na strukturi kvaternernih amina): IC-PAK™, (Waters, Millipore, Milford, MA, USA), 50 mm x 4,6 mm, 10 µm veličine pora; i predkolona: Anion Guard-PAK™, (Waters, Millipore, Milford, MA, USA).

Superoksid dizmutaza (SOD) - Aktivnost SOD je merena spektrofotometrijski, inhibicijom spontane autooksidacije adrenalina na 480 nm. Kinetika enzimske aktivnosti praćena je u karbonatnom puferu (50 mM, pH 10.2, sadrži 0.1 mM EDTA), posle dodavanja 10 mM adrenalina (23). Rezultati se izražavaju kao U SOD/mg proteina.

Malondialdehid (MDA) - Koncentracija MDA se određuje spektrofotometrijskim metodom (24). MDA, kao sekundarni produkt LPO daje crvenu boju posle inkubacije sa tiobarbiturnim reagensom (15 % trihlorsirćetna kiselina i 0,375 % TBA), na 95 °C i pH 3,5. Absorbanca je merena na 532 nm. Rezultati se predstavljaju kao pmol MDA/mg proteina.

Glutation (GSH) - Za određivanje ukupnog GSH koristi se reciklirajuća reakcija oksidacije GSH do GSSG u prisustvu Elmanovog reagensa: 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina (DTNB), a zatim se nastali GSSG redukuje nazad do GSH uz prisustvo enzima glutation reduktaze (GR) (25). Rezultati se izražavaju u nmol GSH/mg proteina.

Glutation peroksidaza (GPx) - Ova metoda se zasniva na indirektnom određivanju aktivnosti GPx spektrofotometrijskim merenjem potrošnje NADPH na 340 nm. Ukratko, enzim GPx katalizuje redukciju lipidnih hidroperoksida u alkohol/H₂O korišćenjem redukujućih ekvivalenata GSH, pri čemu nastaje GSSG. U prisustvu GR GSSG se redukuje do GSH, uz utrošak NADPH (donor reduktivnih ekvivalenata). Za redukciju svakog mola GSSG potreban je jedan mol NADPH (26). Rezultati su predstavljeni kao U GPx/mg proteina.

Statistička analiza

Podaci su analizirani korišćenjem verzije Statistica software 7.0 (Stat Soft, Inc.). Poređenje parametara OS sa kontrolnim vrednostima je urađeno korišćenjem nezavisnog Student t-testa. Razlike su smatrane statistički značajne za $p < 0,05$.

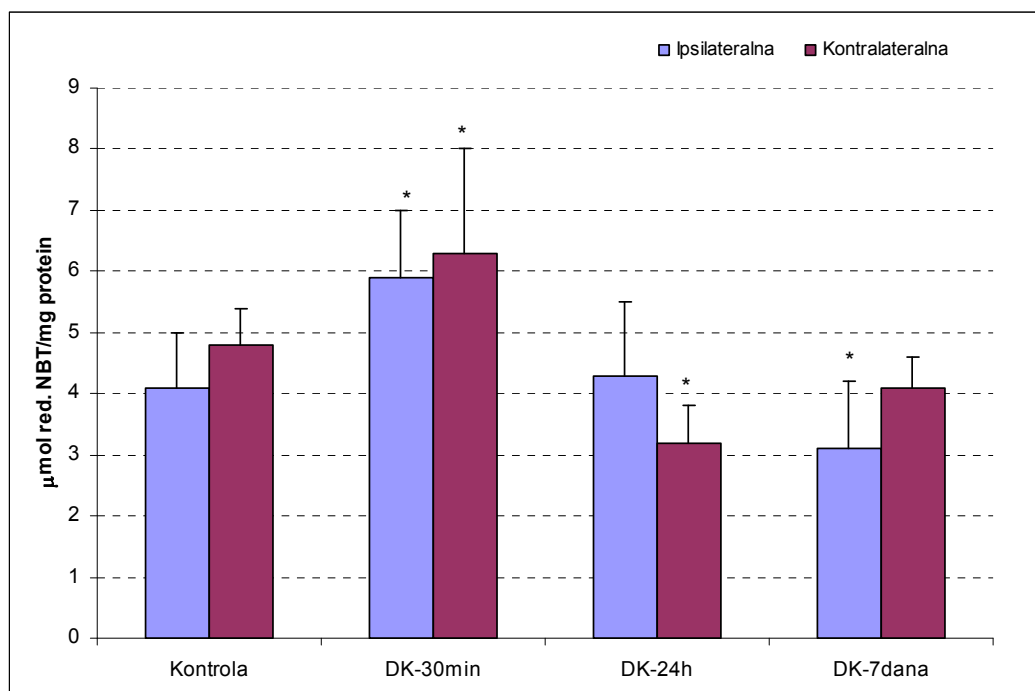
Rezultati

Ne postoji značajna razlika u analiziranim parametrima OS/NS između intaktne i lažno-operisane grupe, što govori da sam tretman nije doveo do oksidativne povrede moždanog tkiva (rezultati nisu predstavljeni). Rezultati analiziranih parametara OS/NS su predstavljeni grafički za obe strane hipokampusa, a kontrolne vrednosti se odnose na lažno-operisane pacove. Rezultati pokazuju da se nakon *i.s.* aplikacije DK razvio

OS/NS u hipokampusu obostrano, kako tretirane (ipsilateralne) tako i suprotne, kontralateralne strane.

Eksperimentalne grupe životinja su bile pod aktivnim nadzorom tokom trajanja eksperimenta. Životinje koje su tretirane DK su nakon buđenja iz anestezije pokazivale letargičnost, a tokom 2-3 sata zapažena je značajna stopa smrtnosti od 30 - 40 %.

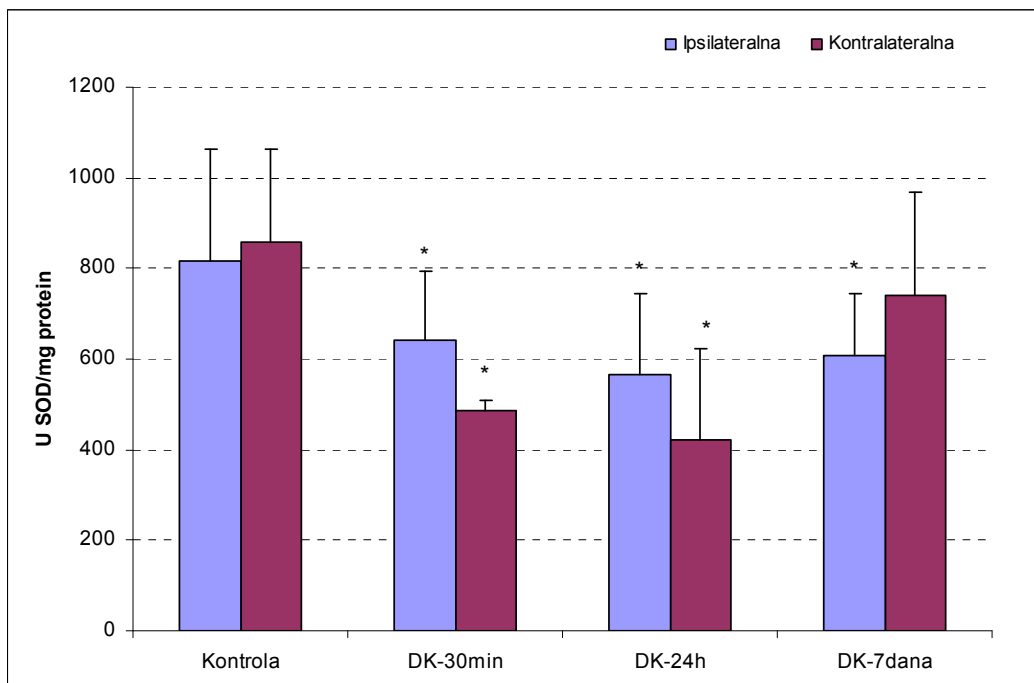
Koncentracija $O_2^{\bullet-}$ je povećana u hipokampusu obostrano ($p < 0,05$) 30 minuta nakon aplikacije DK. U ipsilateralnom hipokampusu, 24. časa izmerena koncentracija $O_2^{\bullet-}$ je na nivou kontrolnih vrednosti, dok se 7. dana nakon tretmana, značajno smanjuje ($p < 0,05$). U kontralateralnom hipokampusu, koncentracija $O_2^{\bullet-}$ nakon 24 časa je značajno niža ($p < 0,05$), a 7. dana je u nivou kontrolnih vrednosti (Grafik 1).



Grafik 1: Sadržaj superoksidnog anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$) u hipokampusu posle jednokratne intrastrijatalne administracije dikvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: $\mu\text{mol red. NBT/mg proteina}$. Broj pacova/terminu žrtvovanja, $n = 8$. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$ (Student T-test).

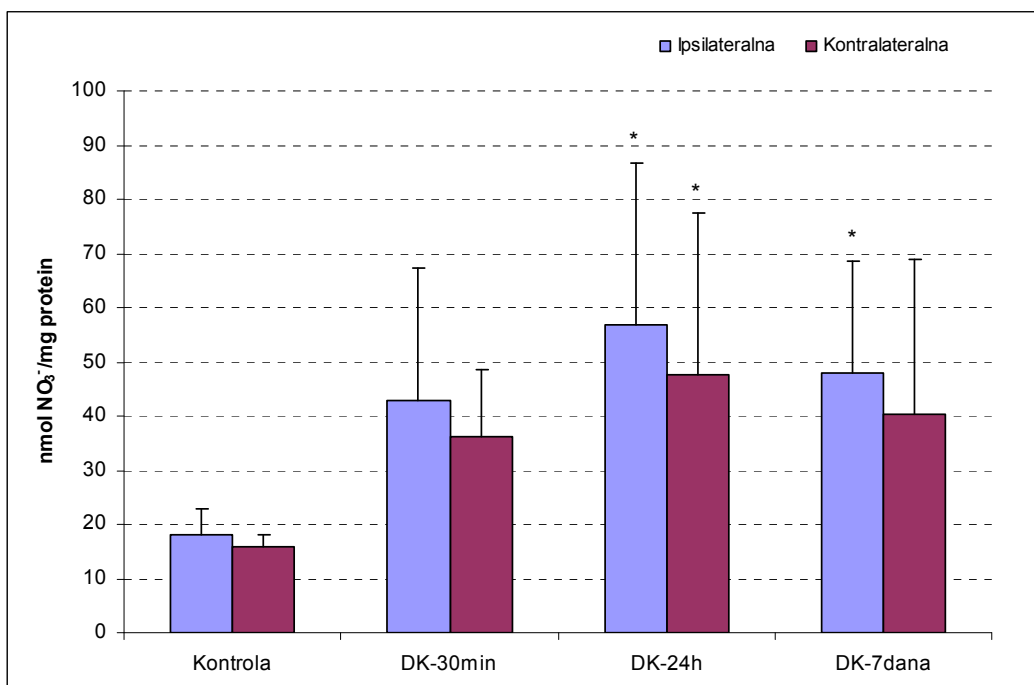
Aktivnost SOD je značajno smanjena u hipokampusu obostrano ($p < 0,05$) tokom 24 časa od aplikacije DK, nakon čega postoji blagi trend porasta aktivnosti SOD, mada je aktivnost SOD i dalje značajno niska ($p < 0,05$) u ipsilateralnom hipokampusu 7. dana (Grafik 2).



Grafik 2: Aktivnost superoksidne dizmutaze (SOD) u hipokampusu posle jednokratne intrastrijatalne administracije dikvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: U SOD /mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, $n = 8$. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$ (Student T-test).

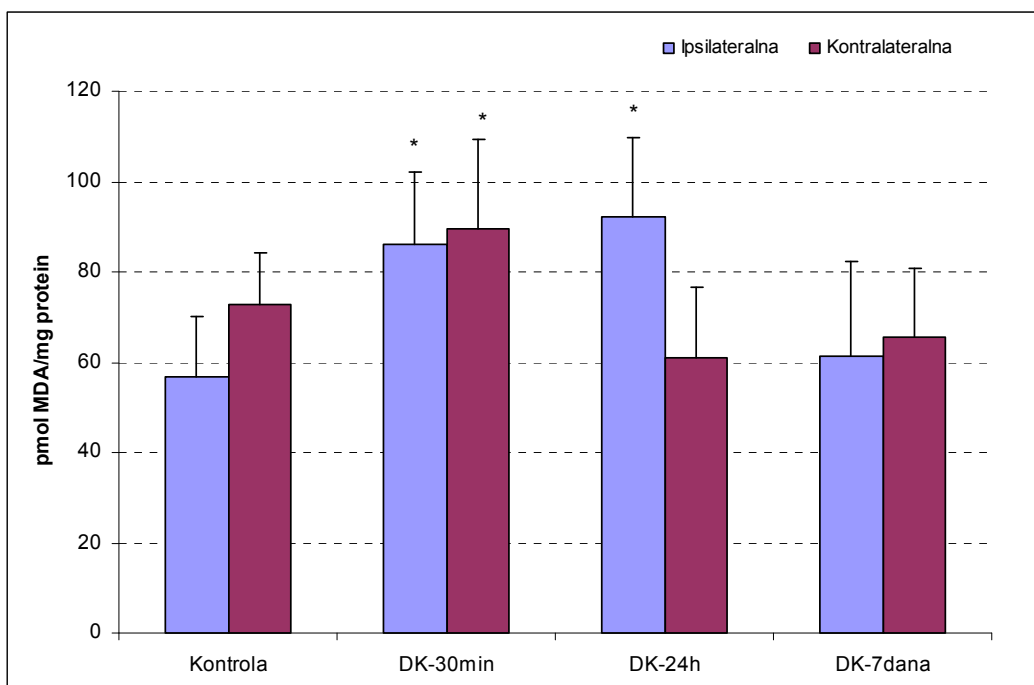
Poređenjem vrednosti sadržaja NO_3^- dobijenih nakon davanja DK sa kontrolnim vrednostima, statistički značajno više vrednosti dobijene su u hipokampusu 24. sata obostrano ($p < 0,05$) i 7. dana u ipsilateralnoj strani ($p < 0,05$) (Grafik 3).



Grafik 3: Sadržaj nitrata (NO₃⁻) u hipokampusu posle jednokratne intrastrijatalne administracije dikvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: nmol NO₃⁻ /mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, n = 8. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za p < 0,05 (Student T-test).

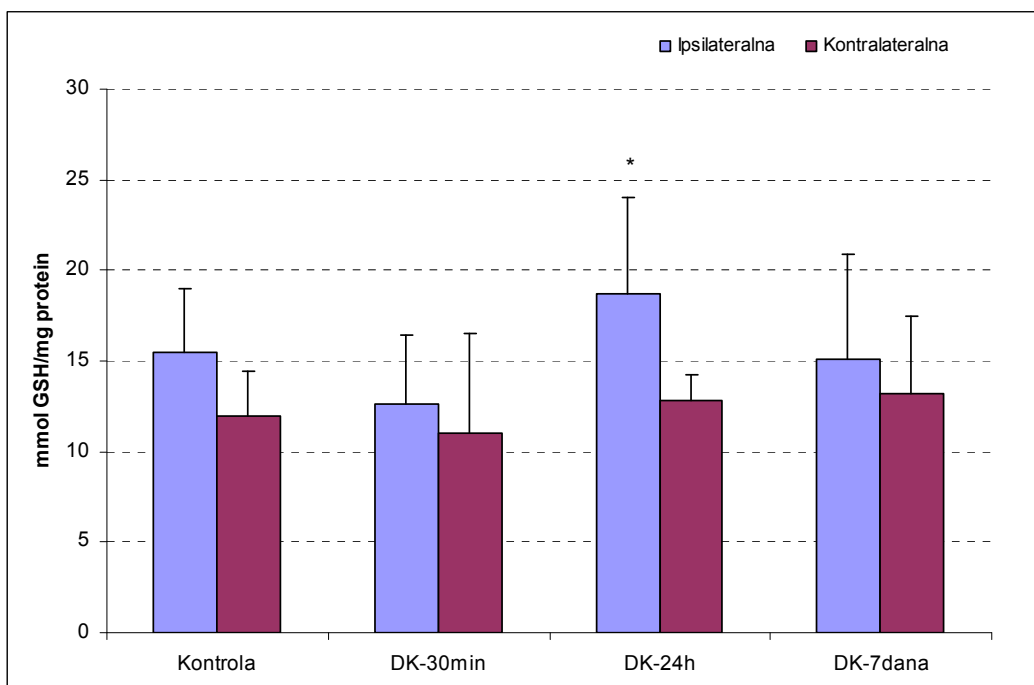
Lipidna peroksidacija je značajno povećana 30. minuta nakon aplikacije DK, obostrano (p < 0,05) i u ipsilateralnom hipokampusu 24. časa (p < 0,05). Kasnije tokom eksperimenta, MDA vrednosti nisu značajno odstupale od kontrolnih vrednosti (Grafik 4).



Grafik 4: Lipidna peroksidacija u hipokampusu posle jednokratne intrastrijatalne administracije dikvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: pmol MDA /mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, $n = 8$. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$ (Student T-test).

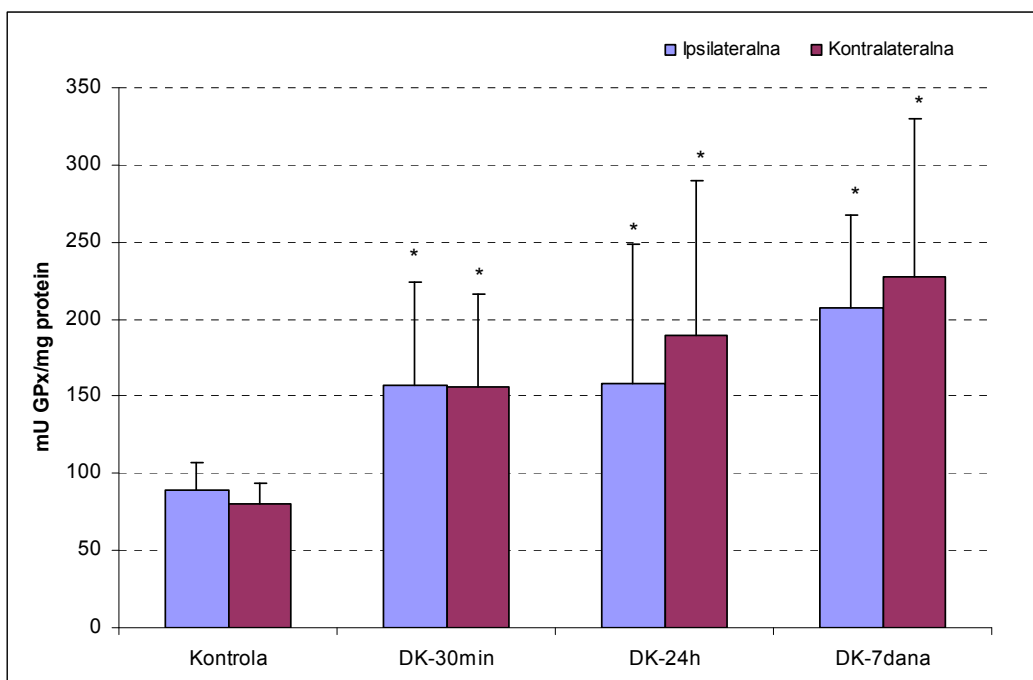
Značajnost promena sadržaja GSH u smislu povećanja izmerena je samo 24. časa u ipsilateralnom hipokampusu ($p < 0,05$) (Grafik 5).



Grafik 5: Sadržaj ukupnog glutationa (tGSH) u hipokampusu posle jednokratne intrastrijatalne administracije dikvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: nmol GSH /mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, $n = 8$. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$ (Student T-test).

Aktivnost GPx se nakon aplikovanja DK značajno povećava, obostrano, od 30. minuta do 7. dana ($p < 0,05$) (Grafik 6).



Grafik 6: Aktivnost glutation peroksidaze u kontralateralnom strijatumu posle jednokratne intrastrijatalne administracije dikvata

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD i izražene su u jedinicama: mU GPx/mg proteina. Broj pacova/terminu žrtvovanja, $n = 8$. Predstavljene su vrednosti za ipsi- i kontralateralnu stranu hipokampusa. Razlike u odnosu na kontrolne vrednosti su smatrane statistički značajnim za $p < 0,05$ (Student T-test).

Diskusija

U našem eksperimentu je zabeležena učestala smrtnost Wistar pacova (30 - 40 %) neposredno po trovanju DK (tokom 2 - 3 časa od buđenja iz anestezije), što je u korelaciji sa redoks potencijalom DK (27). Takođe, životinje koje su tretirane DK nakon buđenja iz anestezije su pokazale simptome letargije.

Dobijeni rezultati potvrđuju nastanak OS kao pokretača neurotoksičnih efekata DK u hipokampusu u periodu od 24 h nakon njegove aplikacije. Specifična biohemijska organizacija ove moždane strukture, obilje glutamatnih receptora, visok metabolički obrt glutamata, posebno piramidne neurone sektora C1 i C3, čini je podložnim OS. U našem eksperimentu pokazali smo da se toksični efekti delovanja DK koji je aplikovan u strijatum, proširuje i na hipokampus. Povezanost energetskeg metabolizma, stvaranje

slobodnih radikala, funkcionisanje jonskih pumpi, kao i nivo intracelularnog, naročito mitohondrijskog Ca^{2+} , sustiču se kako u celokupnom funkcionisanju ćelije, tako i u indukovanju programirane smrti ćelija mozga (28). Na osnovu literaturnih podataka pretpostavljeno je da *i.s.* aplikacija DK kod Wistar pacova dovodi do neurotoksičnih efekata u selektivno osetljivim moždanim regijama (korteks, strijatum i hipokampus) posredovanjem OS (preko RKS) i NS (preko RAV, posebno azot oksida - NO). Naš eksperiment je potvrdio da primarno oštećenje jednog dela moždanog tkiva neminovno vodi kasnijem poremećaju u drugim strukturama i da se odvija slična dinamika promena sadržaja ispitivanih indikatora OS u ispitivanom periodu od 30. minuta do 7. dana (Grafici 1-6). Objašnjenje podjednake propagacije procesa OS/NS nakon jednokratne aplikacije otrova, leži u anatomsko-funkcionalnoj organizaciji ovih moždanih struktura. Poznato je da peroksinitrit (ONOO^-) difunduje u okolno tkivo i za nekoliko ćelijskih dijametara, ovo bi mogao da bude jedan od načina prostorne i vremenske propagacije neurotoksičnog efekata dipiridila na moždane strukture koje su udaljene od primarnog mesta aplikacije.

Povećano stvaranje $\text{O}_2^{\bullet-}$ u hipokampusu, 30 minuta nakon aplikacije DK je u korelaciji sa smanjenjem aktivnosti SOD, što govori o nemogućnosti enzimskog sistema da ukloni povećanu koncentraciju $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Grafici 1 i 2). Toksični efekti povećanog stvaranja $\text{O}_2^{\bullet-}$ koji su uočeni obostrano već nakon 30 minuta od aplikovanja DK, potenciraju se redoks metabolizmom DK, pri čemu u reakciji $\text{O}_2^{\bullet-}$ sa NO, nastaje toksični ONOO^- koji je i verovatniji put metabolisanja $\text{O}_2^{\bullet-}$. Normalizacija sadržaja $\text{O}_2^{\bullet-}$ u hipokampusu nakon 24 časa, stoga ne bi morala da znači smanjeno stvaranje $\text{O}_2^{\bullet-}$, već njegovu intenzivnu reakciju sa NO u kojoj nastaje toksični ONOO^- .

Uloga NO u ovim procesima je praćena merenjem sadržaja nitrata, krajnjih produkata metabolizma NO i drugih RAV (Grafik 3). Literaturni podaci govore da se 70 % nastalog ONOO^- razgrađuje do NO_3^- , a preostalih 30 % do CO_2 i NO_2 , pa delimično potkrepljuju tvrdnju da povećana produkcija ONOO^- vodi povećanju koncentracije nitrata (28).

Potvrđeno je da ONOO^- može procesom nitrozilacije da smanji aktivnost SOD, što bi moglo da objasni nađeno smanjenje SOD u najranijem terminu, od 30 minuta do 24^h, od aplikovanja DK. U literaturi se navodi da ONOO^- može da istisne Fe i Cu iz stabilnih kompleksa, kakvi su metaloproteini, što bi značilo da ONOO^- na taj način može inhibirati metaloenzim SOD, koji sadrži upravo Cu (29). Aktivnost enzima SOD bi trebalo da ima negativan uticaj na sadržaj NO_3^- , s obzirom da „uklanja” $\text{O}_2^{\bullet-}$, polazno jedinjenje pored NO za sintezu ONOO^- , a time i njegov krajnji metabolički produkt NO_3^- . Poznato je da od aktivnosti ovog enzima umnogome zavisi koncentracije $\text{O}_2^{\bullet-}$ u mikrosredini, jer se ovaj enzim praktično takmiči sa NO za reakciju sa $\text{O}_2^{\bullet-}$, uz napomenu da je reakcija sa NO ipak brža (28). Uklanjanje $\text{O}_2^{\bullet-}$ putem autooksidacije (dizmitacije) je četiri puta sporija (reakcija katalizovana enzimom SOD). Tako se

smatra de je vanćelijski prostor, gde je koncentracija SOD vrlo niska, najverovatnije mesto produkcije ONOO⁻ *in vivo*. Dobijeni rezultati sadržaja NO₃⁻ i aktivnosti SOD u istim vremenskim intervalima govore u prilog teoriji o povezanosti ova dva mehanizma u okviru kompleksnog biohemijskog procesa uključenog u razvoj OS/NS.

Sedam dana nakon toksičnog delovanja DK, aktivnost SOD se približava kontrolnim vrednostima što je verovatno rezultat normalizacije redoks stanja u ovoj selektivno osetljivoj moždanoj strukturi.

Nastalo povećanje LPO u hipokampusu koje se obostrano registruje već nakon 30 minuta i održava se u ipsilateralnom hipokampusu do 24. časa (Grafik 4) potvrđuje razvoj OS kao mehanizma oštećenja ćelijskih membrana čija je funkcionalnost od posebnog značaja sa aspekta ekscitabilnosti, ali i ekscitotoksičnosti (29). Pretpostavljeno metaboličko usmerenje reakcije O₂^{•-} sa NO je potkrepljeno literaturnim podacima o povećanoj regionalnoj distribuciji azot oksid sintaze (NOS) i gvožđa u selektivno osetljivim moždanim strukturama (30). Montague i sar. su pokazali da aktivacija N-metil-d-aspartat (NMDA) receptora, kojima obiluje hipokampus, usled oslobađanja glutamata iz presinaptičkih terminala, korelira sa oslobađanjem NO, koji difunduje i van ćelije, reagujući tako i sa stvorenim O₂^{•-} (31). Važno je istaći, da su naši rezultati pokazali podudarnost promena sadržaja NO₃⁻ i O₂^{•-} u istim vremenima u okviru iste moždane regije kod trovanja DK.

U odnosu na vremenski determinisane promene u oksidativnom stanju hipokampusa, promene u koncentraciji GSH i aktivnosti GPx podržavaju napred iznete pretpostavljene događaje. U ranom terminu, 30 minuta nakon aplikovanja DK, nema smanjenja koncentracije GSH i pored povećane aktivnosti GPx što govori o izraženoj osetljivosti i velikom antioksidativnom potencijalu ovog enzima. Poznato je da je GSH donor reduktivnih ekvivalenata u reakcijama redukcije lipidnih hidroperoksida i vodonik peroksida, katalizovanim GPx.

U toksičnom delovanju DK očuvanost (i čak povećanje) GSH (Grafik 5) doprinosi povećanoj aktivnosti GPx. Sedmog dana od tretmana, značajno se povećava aktivnost GPx (Grafik 6) što je od značaja za smanjenje procesa LPO (Grafik 4). Naši rezultati o povećanoj aktivnosti GPx u neurotoksičnosti DK su u skladu sa literaturnim podacima (32).

Poznato je da GSH u reakciji sa NO gradi S-nitroso produkt, GSNO. Potencijalna kompeticija za NO od strane GSH i O₂^{•-}, može rezultirati zaštitnim efektom ako je reakcija usmerena ka stvaranju GSNO umesto toksičnog ONOO⁻. Imajući u vidu da sadržaj GSH nije bio snižen i pored povećane funkcije GPx, očigledno da je put stvaranja ONOO⁻ bio favorizovan, što se može potvrditi povećanom LPO u ovom periodu. Naša pretpostavka, bazirana na literaturnim podacima, jeste da verovatno neki

od intermedijera izomeracije degradacionih produkata ONOO⁻ doprinose citotoksičnom efektu dipiridila, uključujući DK (34).

Zaključak

Rezultati našeg istraživanja potvrđuju prostorno i vremensko širenje toksičnog efekta jednokratne I.S. aplikacije DK u hipokampus, strukturu koja je prostorno odvojena, ali funkcionalno povezana sa strijatumom, mestom aplikacije DK. Oštećenje se manifestuje ranim razvojem OS i NS - već posle 30 minuta, a održava se i 24 časa nakon aplikacije, što se podudara sa visokom stopom mortaliteta pacova iz DK grupe u ovom periodu. Intenzivan oksidativni metabolizam DK, direktno dovodi do anoksije tretiranih moždanih struktura, neposredno posle *i.s.* administracije DK, Sedmog dana od *i.s.* aplikacije DK, tkivo hipokampusa obnavlja svoje homeostatsko oksidativno stanje.

Zahvalnost

Zahvaljujemo recenzentima na konstruktivnim sugestijama. Ovaj rad je podržan sredstvima sa projekata Ministarstva prosvete i nauke, Republike Srbije (Projekat No. III 41018) i Ministarstva odbrane Republike Srbije (Projekat No. MMA/06-10/B.3).

Literatura

1. Occupational Health Services, Inc. 1991 (Sept. 16). MSDS for Diquat. OHS Inc., Secaucus, NJ.
2. Hayes WJ. Pesticides studied in man. Baltimore: Williams and Wilkins, 1990.
3. Maceljki M, Hrlec G, Ostojić Z. Pregled sredstava za zaštitu bilja u Jugoslaviji. Glasnik zaštite bilja 1986; 9: 65.
4. Pasi A. The toxicity of paraquat, diquat and morfamquat. Vienna: Hans Huber publisher, 1978: 13-5.
5. Badah H, Nazimek T, Kaminska IA. Pesticide content in drinking water samples collected from orchard areas in central Poland. Ann Agric Environ Med. 2007; 14: 109-14.
6. INCHEM: International Programme on Chemical Safety: Eenvironmental health criteria 39: Paraquat and Diquat. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc39.htm> 1984.
7. Hayes, W. J. Pesticides studied in man. Baltimore, MD: Williams and Wilkins. 1982.
8. WSSA Herbicide Handbook Committee. Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America, 6th Ed. WSSA, Champaign, IL. EXTOUNET 1989.
9. Fuke C, Ameno K, Ameno S, Kiriu T, Shinohara T, Ijiri I. In vitro studies of the metabolism of paraquat and diquat using rat liver homogenates-isolation and identification of the metabolites of paraquat and diquat. Nippon Hoigaku Zasshi 1993; 47(1): 33-45.
10. Wolfgang GH, Jolly R, Petry T. Inhibition of diquat-induced lipid peroxidation and toxicity in precision-cut liver slices by novel antioxidants. Toxicol Appl Pharmacol 1991; 108(2): 321-329.

11. Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 8-14.
12. Fussella KC, Udasina RG, Grayb JP, Mishina V, Smithe P, Heckd DE, Laskine JD. Redox cycling and increased oxygen utilization contribute to diquat-induced oxidative stress and cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells overexpressing NADPH-cytochrome P450 reductase. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011; 50(7): 874–882.
13. Lewinson E, Gressel J. Benzyl Viologen-Mediated Counteraction of Diquat and Paraquat Phytotoxicities. *Plant Physiol*. 1984; 76: 125-130.
14. Heinrich, Peter; Georg Löffler; Petro E. Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie (German Edition)*. Berlin: Springer - Lehrbuch. 2006: 123
15. Swamy M, Salleh Mohd Jamsani Mat, Sirajudeen K N S, Wan Yusof Wan Roslina, Chandran G. Nitric oxide (NO), citruline - NO cycle enzymes, glutation synthetase and oxidative stress in anoxia (hypobaric anoxia) and reperfusion in rat brain. *J Med Sci*. 2010; 7(3): 147-154.
16. Đukic M, Curcic-Jovanovic M, Ninkovic I, Vasiljevic M, Jovanovic M. The role of nitric oxide in paraquat-induced oxidative stress in rat striatum. *Ann Agric Environ Med* 2007; 14(2): 247-52.
17. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Gluthatione metabolism and its implication for health. *J Nutr* 2004; 134: 489–92.
18. König JFR, Klippel RA. The rat brain. The Williams and Wilkins Company A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Baltimore, USA. 1963: 53.
19. Gurd JW, Jones LR, Mahler HR, Moore WJ. Isolation and partial characterisation of rat brain synaptic plasma membrane. *J Neurochem* 1974; 2: 281-90.
20. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
21. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA. Ed. *Handbook of methods for oxygen radicals research*, CRC Press, Inc, Boca Raton, 1985: 123-32.
22. Curcic Jovanovic M, Đukic M, Vasiljevic I, Ninkovic M, Jovanovic M. Determination of nitrate by the IE-HPLC-UV method in the brain tissues of Wistar rats poisoned with paraquat. *J Serb Chem Soc* 2007; 72(4): 347-56.
23. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine auto-oxidation. *Anal Biochem* 1978; 90: 81-9.
24. Villacara A, Kumami K, Yamamoto T, Mrsulja BB, Spatz M. Ischemic modification of cerebrocortical membranes: 5-hydroxytryptamine receptors, fluidity and inducible in vitro lipid peroxidation. *J Neurochem* 1989; 53: 595-601.
25. Anderson ME. Tissue glutathione. The DTNB-GSSG reductase recycling assay for total glutathione (GSH+1/2 GSSG). In: Greenwald RA. ed. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Reseach*, CRC Press Inc, Florida, 1986: 317-23.
26. Maral J, Puget K, Michelson AM. Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 77: 1525-35.

27. Abe T, Kinda T, Takano Y, Chikazawa S, Higuchi M, Kawasaki N, Orino K, Watanabe K. Relationship between body iron stores and diquat toxicity in male Fischer-344 rats *Biometals* 2006; 19: 651–7.
28. Eiserich JP, Patel RP, ODonnell VB. Pathophysiology of Nitric Oxide and Related Species: Free Radical Reactions and Modification of Biomolecules. *Mol Aspects Med* 1998; 19: 221-357.
29. Farooqui AA and Horrocks LA. Excitatory amino acids receptors, neuronal membrane, phospholipid metabolism and neuronal disorders. *Brain Res Rev* 1991; 16: 171-91.
30. Prakash T, Kotresha D, Nedendla RR. [Neuroprotective activity of Wedelia calendulacea on cerebral ischemia/reperfusion induced oxidative stress in rats.](#) *Indian J Pharmacol.* 2011 Nov;43(6):676-82.
31. Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 1994; 263(5149): 973-7.
32. Fu Y, Cheng WH, Ross AD, Lei XG. Cellular glutathione peroxidase protects mice against lethal oxidative stress induced by various doses of diquat. *Pros Soc Exp Biol Med.* 1999; 222: 164-169.
33. Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte JA, Sánchez Navarro A, Bastos ML, Carvalho F. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicol* 2006; 27: 1110-22.
34. Ebadi M, Sharma SK. Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease, *Antioxid Redox Signal.* 2003; 5: 319-35.

Dozvola Etičkog odbora za rad sa životinjama

Autori su obavljali eksperiment u skladu sa institucionalnom politikom humanog i etičkog tretmana eksperimentalnih životinja, i spremni su da dostave o tome podatke i originalne materijale, ako se traži. Eksperimentalne životinje su tretirane u skladu sa Smernicama za proučavanje životinja, br 282-12/2002 (Etički komitet Vojnomedicinske akademije, Beograd, Srbija).

Izjava o originalnosti rada

Rezultati predstavljeni u rukopisu nisu objavljeni ili predati za objavljivanje negde drugde.

Izjava o sukobu interesa

Autori izjavljuju da nema sukoba interesa.

Oxidative and nitrosative stress - mediators of diquat neurotoxicity

Mirjana Đukić¹, Milica Ninković², Ivana Stevanović²,
Marijana Ćurčić¹, Katarina Ilić³, Dragan Đurđević²,
Dragana Vujanović¹

¹ University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology
„Academician Danilo Soldatovic”, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

² Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Crnotravska 17, 11000
Belgrade, Serbia

³ University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Vojvode
Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Correspondence address: Mirjana Đukic, PhD. Professor,
Department of Toxicology „Academician Danilo Soldatovic”, Faculty of Pharmacy,
Belgrade University, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia.
e-mail: mirjana.djukic@pharmacy.bg.ac.rs
Phone (office): +381 11 3951 308; fax: +381 11 3972840
URL: <http://www.pharmacy.bg.ac.rs/fakultet/ljudi/nastavnik/64>.

Summary

Most commonly observed central nervous system (CNS) effects induced by systemic toxicity of herbicide diquat (DQ) are general depression and lethargy. Generally, it is accepted that DQ exerts its toxicity through the production of superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) during its red-ox metabolism in the presence of molecular oxygen, which further initiates radical chain reaction, contributing developing of oxidative stress (OS) as well. Mechanisms of DQ neurotoxic effect is not rationalized till now.

The objective of the study was to examine whether OS contributes to DQ neurotoxicity. For this purpose, male Wistar rats were intrastriatally (*i.s.*) treated with DQ and oxidative status parameters such as: superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$); nitrates (NO_3^-), as a final metabolite of reactive nitrogen species; malondialdehyde (MDA), an indicator of lipid peroxidation; activity of superoxide dismutase (SOD); glutathione peroxidase (GPx), and glutathione (GSH), were measured in the hippocampus at 30 minutes, 24 hours and 7 days post treatment.

Noteworthy, mortality rate (30 - 40 %) was observed in the group of rats treated with DQ, within 2-3 hours after awakening from anesthesia. Additionally, lethargy was the only neurological symptom observed in that group. Analyzed parameters indicate that OS mediates DQ neurotoxicity, which is documented with significant increase of lipid peroxidation.

Key words: diquat, oxidative stress, neurotoxicity, hippocampus.
