مقاله پژوهشی

بررسی نقش N-استیل سیستئین بر استرس اکسیداتیو ناشی از پاراکسون در کبد و کلیه موش صحرایی

مریم صالحی[۱]، مهوش جعفری[۲*]، علیرضا عسگری[۳]، جواد رسولی[۴]

۱- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
۳- مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
۴- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۷/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: پاراکسون به عنوان یکی از سمی ترین آفت کش‌های ارگانوفسفره، به طور وسیع در کشاورزی استفاده می‌شود و باعث کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی سلول‌ها می‌شود. در این مطالعه اثر N – استیل سیستئین (NAC) به عنوان آنتی اکسیدان در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از پاراکسون در کبد و کلیه موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۴ گروه کنترل (روغن ذرت به عنوان حلال پاراکسون)، پاراکسون (۰/۷ mg/kg)، NAC (۱۶۰ mg/kg) و پاراکسون-NAC تقسیم شدند. ۲۴ ساعت بعد از تزریق داخل صفاقی، موش‌ها بیهوش و بافت‌های کبد و کلیه جدا و هموژنه شدند. سپس فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون S– ترانسفراز (GST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) و غلظت گلوتاتیون (GSH) و مالون دی آلدئید (MDA) توسط روش‌های بیوشیمیایی تعیین شدند. معنی دار بودن نتایج توسط آنالیز واریانس ANOVA به همراه تست توکی تعیین شد.

نتایج: پاراکسون باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و GST و کاهش غلظت GSH در بافت‌های کبد و کلیه در مقایسه با کنترل می‌گردد. همچنین افزایش غلظت MDA و کاهش فعالیت LDH در بافت کبد مشاهده می‌شود. تجویز NAC تاحدی از تغییرات این پارامترها جلوگیری می‌کند.

نتیجه‌گیری: NAC به عنوان آنتی اکسیدان از طریق حذف رادیکال‌های آزاد و افزایش سنتز گلوتاتیون تا حدی باعث کاهش استرس اکسیداتیو القاء شده توسط پاراکسون در کبد و کلیه می‌شود.

کلمات کلیدی: پاراکسون، N– استیل سیستئین، استرس اکسیداتیو، کبد، کلیه، موش صحرایی

مقدمه

حشره کش‌ها گروه بسیار مهمی از آلودگی‌های محیطی به شمار می‌روند که در کشاورزی، پزشکی و صنعت استفاده می‌شوند. ارگانوفسفره‌ها گروه بزرگی از حشره کش‌ها را تشکیل می‌دهند که بیشتر از ۶۰ سال جهت حفاظت از محصولات، احشام و همچنین به عنوان عوامل اعصاب در جنگ بین عراق – ایران استفاده می‌شوند. مسمومیت با این مواد مسئول حدود صد هزار مسمومیت در هر سال در دنیا است که در ایران این ترکیبات یکی از علل مرگ و میر ناشی از مسمومیت هستند. اثرات ناشی از مسمومیت با این ترکیبات بسیار متنوع و پیچیده می‌باشد.

***نویسنده مسئول: مهوش جعفری**، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
Email: m.jafari145@gmail.com

مهم‌ترین عوارض کلینیکی مسمومیت با ارگانوفسفره‌ها ناشی از مهار استیل کولین استراز می‌باشد که منجر به تجمع استیل کولین در سیناپس‌های سیستم عصبی مرکزی و محیطی و تشنج و در نهایت مرگ می‌شوند (۱-۳). با توجه به ساختمان ارگانوفسفره‌ها، شدت سمیت و عوارض آن‌ها متفاوت است، برای مثال سمیت دی کلروووس (Dichlorvos) به سرعت اتفاق می‌افتد، در حالی که سمیت دی متوات (Dimethoate) چندین ساعت به طول می‌انجامد (۴).

پاراکسون به عنوان سمی ترین آفت کش‌ها، از متابولیسم اکسیداتیو پاراتیون در کبد تولید می‌شود که منجر به افزایش مهار آنزیم استیل کولین استراز می‌گردد. این ترکیب در بدن

www.SID.ir

توسط پاراکسوناز موجود در پلاسما و کبد متابولیزه می‌شود. همچنین پاراکسون باعث آسیب به DNA و ناهنجاری‌های کروموزومی می‌گردد (۵ و ۶).

ارگانوفسفره‌ها دارای اثرات مختلفی بر روی بدن هستند که از طریق مکانیسم‌های مختلف نظیر مهار آنزیم کولین استراز و القاء استرس اکسیداتیو عمل می‌کنند (۵-۶). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که بعضی از ارگانوفسفره‌ها از طریق تولید رادیکال‌های آزاد باعث تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و S - گلوتاتیون ترانسفراز (GST)، کاهش غلظت گلوتاتیون (GSH) و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در بافت‌ها شده که در نهایت منجر به استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی می‌شوند (۷-۹). آنتی اکسیدآن‌ها به عنوان موادی که در غلظت کم وجود دارند و باعث به تاخیر افتادن و یا مهار اکسیداسیون مواد اکسید شونده می‌شوند و سلول را در برابر اثرات زیان آور عوامل محیطی محافظت می‌کنند (۱۰-۱۱). N- استیل سیستئین یک ترکیب سولفیدریلی و مشتق از اسید آمینه L- سیستئین می‌باشد که به عنوان یک آنتی اکسیدان و پیش ساز گلوتاتیون می‌تواند به طور طبیعی اثرات آسیب‌های داخل سلولی رادیکال‌های آزاد را خنثی کند. این ماده برای جلوگیری یا کاهش صدمات کبدی ناشی از استامینوفن استفاده می‌شود (۱۲-۱۳). چندین مطالعه اثر حفاظتی NAC را در کاهش استرس اکسیداتیو القا شده توسط ارگانوفسفره‌ها در بافت‌های مختلف حیوانات نشان داده‌اند (۱۸-۱۴).

با توجه به کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی سلول‌ها بعد از تماس با ارگانوفسفره‌ها و اثرات متفاوت این ترکیبات با توجه به تنوع ساختمان شیمیایی آن‌ها بر روی بافت‌های مختلف و همچنین اثرات مختلف آنتی اکسیدان‌ها بر این سمیت، مطالعات تکمیلی ضروری به نظر می‌رسد. اگرچه چندین مطالعه روی نقش حفاظتی NAC بر کاهش سمیت ارگانوفسفره‌ها انجام شده است (۱۴-۱۸)، ولیکن مطالعاتی روی تجویز این آنتی اکسیدان و پاراکسون به صورت داخل صفاقی بر روی بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف انجام نشده است. در مطالعه حاضر نقش NAC در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از پاراکسون در بافت‌های کبد (محل اصلی متابولیسم ارگانوفسفره) و کلیه (محل دفع مواد متابولیزه ارگانوفسفره) موش صحرایی با سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

۱-کلرو ۲، ۴ دی نیترو بنزن (CDNB)، نیتروبلوتترازولیوم (NBT)، دی تیو – بیس- نیتروبنزوئیک اسید (DTNB)، تری کلرواستیک اسید (TCA) و دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بالا از شرکت مرک و سیگما (آلمان) خریداری شد. NAC و اتیل پاراکسون با خلوص ۹۹ درصد از شرکت سیگمای آلمان خریداری شد. اتیل پاراکسون با غلظت mg/ml ۴ در روغن ذرت و NAC با غلظت mg/ml ۱۶۰ در آب مقطر به صورت تازه تهیه شد.

حیوانات

این مطالعه بر روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی گراد در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... قرار گرفتند. دسترسی حیوانات به آب و غذا آزاد بود. موازین اخلاقی کار با حیوان‌های آزمایشگاهی که مورد تایید کمیته اخلاق (کد: ۲۳۴) دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) بود، هنگام کار با موش‌های آزمایشگاهی رعایت شد.

تیمار حیوانات

در این مطالعه تجربی، حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه (در هر گروه ۶ سر) تقسیم شدند: گروه کنترل که روغن ذرت را به عنوان حلال پاراکسون، گروه پاراکسون که mg/kg ۰/۷ پاراکسون، گروه NAC که mg/kg ۱۶۰ NAC و گروه پاراکسون- NAC که به طور هم زمان پاراکسون و NAC را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از تزریق با بیهوش نمودن حیوانات به وسیله اتر، بافت‌های کبد و کلیه خارج گردید و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی و خارج شدن خون و جدا کردن قسمت‌های زاید، به نیتروژن مایع انتقال داده شد و سپس در دمای ۷۰°C- تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد.

در روز آزمایش بافت‌ها توزین و با نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سالین هموژنه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰g در ۴°C سانتریفوژ گردید. از مایع رویی جهت سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم SOD

فعالیت آنزیم SOD به روش Winterbourn سنجیده شد (۱۹). به حجم مناسبی از بافت هموژنه، EDTA ۰/۱ مولار در

Archive of SID
www.SID.ir

سدیم سیانید ۰/۳ میلی مولار و NBT ۱/۵ میلی مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در ۳۷°C قرار گرفت. سپس ریبو فلاوین ۰/۱۲ میلی مولار در بافرفسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار با pH=۷/۸ اضافه و به مدت ۱۲ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گـرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم CAT

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Abei استفاده شد (۲۰). واکنش با اضافه کردن H_2O_2 ۳۰ میلی مولار به حجم مناسبی از عصاره نمونه بافتی در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار pH = ۷ شروع شد. سپس جذب را در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه گیری فعالیت GST

اندازه گیری فعالیت این آنزیم به روش Habig انجام شد (۲۱). یک میلی لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH= ۷/۴ شامل EDTA یک میلی مولار، GSH ۲۰ میلی مولار و CDNB ۲۰ میلی مولار است. واکنش با اضافه کردن حجم معینی از عصاره بافتی شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت گردید. فعالیت ویژه بر حسب واحـد برمیلی گرم پروتئین بیان شد.

سنجش میزان GSH

برای سنجش میزان گلوتاتیون بافت از روش Tietz استفاده شد (۲۲). غلظـت مناسـبی از نمونـه هموژنـه و یا از گلبول‌های قرمزلیز شده با ۱۰ میکرولیتر اسیدسولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور g ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته به ۸۱۰ میکرولیتر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن ۹۰ میکرولیتر DTNB ۰/۴ درصد محلول در سیترات سدیم ۱ درصد واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوتاتیون ۱ میلی گرم بر میلی لیتر محلول استاندارد گلوتاتیون در غلظت‌های ۲۰۰ – ۲۵ میکرومولار تهیه شد و منحنی استاندارد گلوتاتیون رسم گردید و غلظت گلوتاتیون بر حسب نانومول در میلی گرم پروتئین و یا نانومول بر گرم هموگلوبین محاسبه گردید.

سنجش میزان مالون دی آلدئید (MDA)

برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها از روش Kei استفاده شد (۲۳). به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره بافتی، ۱/۵ میلی لیتر TCA ۱۰ درصد اضافه شد. به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۱/۵ میلی لیتر از مایع رویی را برداشته و ۲ میلی لیتر اسید تیوباربیتوریک ۰/۶۷ درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد. سپس ۲ میلی لیتر n- بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در g ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد MDA با استفاده از ۱،۱،۳و۳ تتراتوکسی پروپان رسم شد و از روی این منحنی میزان غلظت MDA بر حسب نانومول در میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

تعیین غلظت پروتئین

برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۲۴). حجم مناسبی از عصاره بافتی را به حجم ۱ میلی لیتر رسانده و ۳ میلی لیتر از محلول برادفورد به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب قرائت شد. غلظت پروتئین را با رسم استاندارد با استفاده از محلول ۱mg/ml آلبومین سرم گاوی (BSA) محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار InStat نسخه 3.3 به صورت آنالیز واریانس یک طرفه به همراه تست توکی انجام شد. نتایج به صورت Mean ± SD بیان شد. $p<۰/۰۵$ مرز معنی دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از اثر پاراکسون و NAC به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کبد و کلیه در جدول ۱ نشان می‌دهد که پاراکسون باعث افزایش معنی دار فعالیت آنزیم‌های SOD ($p<۰/۰۱$)، CAT ($p<۰/۰۱$) و GST ($p<۰/۰۱$) و کاهش فعالیت آنزیم LDH ($p<۰/۰۵$) در کبد و افزایش معنی دار فعالیت آنزیم‌های SOD ($p<۰/۰۱$)، CAT ($p<۰/۰۱$) و GST ($p<۰/۰۵$) در کلیه در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. همچنین تجویز پاراکسون به همراه NAC باعث افزایش معنی دار فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT ($p<۰/۰۵$) در کبد و کلیه و افزایش معنی دار فعالیت آنزیم GST ($p<۰/۰۵$) در کبد در مقایسه با

Archive of SID
www.SID.ir

گروه کنترل می‌شود. تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گروه پاراکسون- NAC در مقایسه با گروه پاراکسون معنی دار نیست.

جدول ۱. اثر پاراکسون و NAC به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کبد و کلیه موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت

پارامترها U/mg protein		کنترل	پاراکسون	NAC	پاراکسون-NAC
SOD	کبد	۵۲/۶±۶۴/۶۶	۶۹/۷±۱۳/۷۸**	۵۱/۵±۰۱/۰۵	۶۶/۶±۰۲/۷۸*
	کلیه	۴۶/۵±۲۳/۶۷	۶۰/۸±۶۹/۳۳**	۴۹/۵±۱۵/۰۴	۵۸/۴±۴۹/۷۱*
CAT	کبد	۳۵/۴±۰۹/۵۹	۴۸/۶±۰۵/۵۵**	۳۳/۴±۸۵/۹۴	۴۵/۵±۳۱/۷۴*
	کلیه	۴۸/۶±۷۳/۲۹	۶۳/۶±۵۲/۶۹**	۵۲/۴±۰۵/۸۱	۵۸/۵±۴۱/۰۶*
GST	کبد	۲۷۳/۲۳±۵۱/۵۱	۳۳۵/۳۲±۶۷/۰۴**	۲۸۰/۲۴±۵۸/۳۵	۳۲۷/۲۶±۹۵/۹۸*
	کلیه	۲۷/۴±۹۵/۷۵	۳۸/۶±۴۱/۱۹*	۳۱/۴±۹۱/۶۱	۳۵/۵±۲۲/۱۵
LDH	کبد	۶۵۵/۵۲±۴۱/۵۲	۵۴۷/۶۰±۱۸/۶۶*	۶۱۸/۵۶±۴۸/۰۶	۵۹۸/۵۷±۱۳/۲۸
	کلیه	۴۱۹/۴۴±۹۸/۶۶	۳۶۸/۳۹±۱۴/۴۵	۴۲۵/۴۶±۶۹/۲۵	۳۷۹/۴۵±۴۵/۶۶

*p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است. NAC: N – استیل سیستئین، SOD: سوپراکسیددیسموتاز، CAT: کاتالاز، GST: گلوتاتیون S- ترانسفراز، LDH: لاکتات دهیدروژناز

نتایج حاصل از اثر پاراکسون و NAC به تنهایی و در ترکیب با هم بر غلظت‌های GSH و MDA کبد و کلیه در جدول ۲ نشان می‌دهد که کاهش غلظت GSH در گروه پاراکسون در کبد (p<۰/۰۱) و کلیه (p<۰/۰۵) و افزایش غلظت MDA در گروه پاراکسون (p<۰/۰۵) در کبد در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است. همچنین تجویز پاراکسون به همراه NAC باعث کاهش غلظت GSH (p<۰/۰۵) در کبد و کلیه در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است. تغییرات غلظت‌های MDA و GSH در گروه پاراکسون-NAC در مقایسه با گروه پاراکسون معنی دار نیست.

جدول ۲. اثر پاراکسون و NAC به تنهایی و در ترکیب با هم بر غلظت‌های GSH و MDA کبد و کلیه موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت.

پارامترها (nmol/mg protein)		کنترل	پاراکسون	NAC	پاراکسون-NAC
GSH	کبد	۹۹/۱۰±۴۸/۷۱	۸۰/۸±۲۹/۳۲**	۹۷/۸±۹۴/۲۳	۸۳/۹±۴۸/۹۳*
	کلیه	۳۶/۴±۶۹/۰۸	۲۸/۳±۹۸/۸۲*	۳۸/۴±۳۶/۰۴	۲۹/۳±۷۱/۱۳*
MDA	کبد	۵/۰±۸۹/۶۱	۷/۰±۰۵/۵۴*	۵/۰±۵۹/۶۹	۶/۰±۸۴/۶۹
	کلیه	۱۱/۱±۳۳/۳۲	۱۳/۰±۰۵/۹۷	۱۱/۱±۱۱/۶۵	۱۲/۰±۶۶/۸۹

*p<۰/۰۵ و **p<۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است. NAC: N – استیل سیستئین، GSH: گلوتاتیون و MDA: مالون دی آلدئید

بحث و نتیجه‌گیری

کبد از جمله فعالترین اندام‌ها از نظر متابولیکی و اولین اندام مهم برای سم زدایی مواد شیمیایی و سموم است. این اندام دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی و آنزیم‌های مربوطه می‌باشد. بنابراین اندام اصلی جهت سم زدایی ترکیبات سمی است (۲۵). کلیه نقش حیاتی در ثبات محیط داخلی موجودات زنده ایفا می‌کند و هدف سموم شیمیایی است که می‌توانند عملکرد آن را دچار اختلال کنند. کلیه‌ها مسئول برداشتن گلوتاتیون از جریان خون هستند و ۶۰-۵۰ درصد نوسازی گلوتاتیون پلاسما را انجام می‌دهند (۹). کبد و کلیه دو بافت هدف برای ارگانوفسفره‌ها نظیر پاراکسون به شمار می‌رود (۹، ۱۴ و ۱۵).

Archive of SID
www.SID.ir

بعضی از ارگانوفسفره‌ها باعث تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند و برای مقابله با افزایش رادیکال‌ها، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان وارد عمل می‌شوند (۹-۵). آنزیم SOD اولین سد دفاعی در مقابل رادیکال‌های آنیون سوپراکسید است که آن را به H_2O_2 تبدیل می‌کند که آن هم متعاقباً توسط آنزیم CAT به H_2O و O_2 تبدیل می‌شود (۱۰-۱۱). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پاراکسون باعث افزایش معنی دار فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت‌های کبد و کلیه موش صحرایی می‌شود. افزایش فعالیت SOD باعث کاهش رادیکال سوپراکسید و افزایش H_2O_2 شده و افزایش فعالیت CAT موجب خنثی شدن H_2O_2 در بافت‌ها می‌شود. تجویز NAC سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های SODو CAT در هر دو بافت در مقایسه با گروه پاراکسون می‌گردد که احتمالاً مربوط به توانایی این آنتی اکسیدان در حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱۵).

نتایج این مطالعه هم سو با نتایج چند مطالعه است. مطالعات Oruc و همکارش نشان دادند که تجویز دیازینون به ماهی آب آزاد باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD بعد از ۵ روز در کبد و شش و افزایش فعالیت آنزیم CAT بعد از ۱۵ روز در بافت کبد می‌شود (۸ و ۲۵). John و همکاران نشان دادند که تجویز خوراکی دیمتوآت (Dimethoate) با دوز ۳ mg/kg یا مالاتیون (Malathion) با دوز ۱۳/۵ mg/kg به موش صحرایی بعد از سه روز موجب افزایش فعالیت SOD و کاتالاز در اریتروسیت‌ها می‌گردد (۲۶). مطالعه غنی و همکاران نشان دادند که مصرف پاراکسون به صورت داخل صفاقی در دوزهای ۰/۳۵ mg/kg و ۰/۷ بعد از ۴ ساعت در موش صحرایی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت مغز می‌گردد (۶). مطالعه جعفری و همکاران نشان دادند که تجویز پاراکسون در دوزهای ۰/۱-۷mg/kg به صورت داخل صفاقی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در قلب، کلیه، مغز، کبد و طحال بعد از ۲۴ ساعت می‌شود (۵). از طرف دیگر، چند مطالعه نشان دادند که تجویز دیازینون و متیل پاراتیون به ماهی بعد از ۲۴ ساعت در کبد و شش (۲۷) و تجویز داخل صفاقی دیازینون در کبد موش بعد از ۱۴ روز قی منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT می‌شود (۲۸). این اختلاف نتایج در مطالعات مختلف ناشی از نوع، نژاد و گونه حیوان، نوع سم و بافت، مسیر تجویز ماده سمی و دوز و زمان تیمار می‌باشد. Uner و همکاران نشان دادند تجویز فن تیون (۱/۷۲ mg/L) به تنهایی و به همراه NAC (۴۰۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی روی فعالیت SOD و CAT مغز برای ۹۶ ساعت تاثیری ندارد، در حالی که NAC با غلظت ۰/۵ mg/kg به تنهایی باعث افزایش فعالیت SOD می‌شود (۲۹). ایزدی و همکاران نشان دادند که دیازینون (۱۰۰ mg/kg) سبب افزایش فعالیت SOD و CAT کبد و کلیه و تجویز همزمان NAC (۱۶۰ mg/kg) باعث کاهش فعالیت SOD کبد و فعالیت آنزیم CAT در کبد و کلیه می‌شود (۱۴).

آنزیم GST از آنزیم‌های کمکی آنتی اکسیدان است که کونژوگه کردن طیف وسیعی از سموم و ترکیبات الکتروفیلی و کارسینوژن‌ها را با GSH کاتالیز می‌کند و با افزایش حلالیت به دفع آن‌ها از سلول کمک می‌کند (۵). نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پاراکسون سبب افزایش فعالیت GST در کبد و کلیه موش صحرایی شده و تجویز NAC تا حدی سبب کاهش فعالیت این آنزیم در مقایسه با گروه پاراکسون می‌شود. افزایش فعالیت GST با افزایش مصرف GSH همراه است. افزایش GST در اثر تزریق پاراکسون نشان دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل این سم و دفع سریعتر آن است (۲۱). نتایج چند مطالعه با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. مطالعه Oruc و همکارش نشان داد که تجویز دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم GST در کبد ماهی آب آزاد بعد از ۵ و ۱۵ بدون تغییر در ۳۰ روز می‌شود (۲۵). مطالعات جعفری و همکاران نشان دادند که تجویز دیازینون در دوزهای ۵۰-۲۰۰ mg/kg در مغز و قلب (۷) و تجویز پاراکسون در دوزهای ۱/۵-۱ mg/kg در قلب، کلیه و طحال باعث افزایش فعالیت آنزیم GST بعد از ۲۴ ساعت می‌شود (۵). از طرف دیگر این محققین نشان دادند که تجویز پاراکسون در دوزهای مشابه در مغز و قلب باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌گردد (۵). معمولاً دوزهای کم سموم منجر به افزایش و دوزهای بالای آن باعث مهار فعالیت آنزیم‌ها می‌گردند. Pena-Llopis و همکاران نشان دادند که تزریق داخل صفاقی N- استیل سیستئین (mmol/kg ۱۶۰) سه ساعت قبل از تجویز دی کلروس در دوز ۱/۵ mg/L به ماهی در زمان‌های مختلف تا ۹۶ ساعت باعث افزایش فعالیت GST می‌شود. NAC باعث افزایش تحمل به این ارگانوفسفره می‌شود (۱۸). Uner و همکاران نشان دادند فنتون باعث افزایش GST و تزریق داخل صفاقی NAC قبل از تجویز فنتون به ماهی باعث کاهش GST می‌شود (۲۹). ایزدی و همکاران نشان دادند که دیازینون سبب افزایش فعالیت GST کبد و کلیه و تجویز NAC باعث کاهش فعالیت GST کبد می‌شود (۱۴).

Archive of SID
www.SID.ir

گلوتاتیون از مهم‌ترین آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی سلول است که باعث جمع آوری مستقیم رادیکال‌های آزاد می‌شود و می‌تواند به عنوان یک سوبسترا برای آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و GST عمل کند. تخلیه GSH در نهایت باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب به DNA و کاهش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود (۵ و ۷). در این مطالعه تجویز پاراکسون سبب کاهش غلظت گلوتاتیون در کبد و کلیه موش صحرایی و تجویز NAC تاحدی سبب افزایش گلوتاتیون در مقایسه با گروه پاراکسون می‌شود. از آنجائی که فعالیت GST نیز در کبد و کلیه در اثر پاراکسون افزایش پیدا کرده است، کاهش گلوتاتیون این بافت‌ها هم می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم GST و مصرف آن به عنوان سوبسترا توسط این آنزیم و هم مربوط به عملکرد مستقیم آن جهت حذف رادیکال‌های آزاد باشد. جبران کاهش گلوتاتیون توسط NAC می‌تواند ناشی از عمل NAC به عنوان پیش ساز گلوتاتیون و شرکت آن در سنتز این آنتی اکسیدان سلولی و همین طور عملکرد مستقیم آن در حذف رادیکال‌های آزاد باشد (۱۵). مطالعات دیگر هم سو با نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که تجویز دیازینون و پاراکسون موجب کاهش گلوتاتیون در بافت‌های مختلف می‌گردد (۵ و ۷). چندین مطالعه اثر حفاظتی NAC را در کاهش گلوتاتیون توسط فن تیون، دی کلروس و دیازینون در بافت‌های مختلف نشان داده‌اند (۱۴، ۱۷-۱۸ و ۳۰-۲۹).

در این مطالعه پاراکسون سبب کاهش فعالیت آنزیم LDH در کبد شده که تجویز NAC فعالیت این آنزیم را در مقایسه با گروه دیازینون افزایش می‌دهد. کاهش فعالیت آنزیم LDH به عنوان بیومارکر لیز سلولی و سمیت سلولی، احتمالاً نشان دهنده تخریب غشاء سلولی و تراوش آنزیم به داخل خون می‌باشد (۳۱). استفاده از NAC سبب احیاء رادیکال‌های آزاد ناشی از تجویز پاراکسون و در نتیجه جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و مانع از آزادشدن آنزیم LDH می‌شود. El-Shenawy و همکاران نشان دادند که تجویز دیازینون در دوزهای ۱۶/۲۵ mg/kg و ۳۲/۵ به صورت داخل صفاقی منجر به کاهش مارکرهای سمیت کبدی مانند LDH در موش بعد از ۱۴ روز می‌شود (۲۸). مطالعه Abdou و همکارش، افزایش فعالیت LDH سرم موش صحرایی ماده بعد از تجویز خوراکی دیازینون در دوزهای ۸-۲۰ mg/kg به مدت سه هفته را نشان دادند (۳۲). مطالعات دیگر نشان می‌دهد که فعالیت LDH در بافت‌های طحال، مغز، قلب، کبد و کلیه بعد از تجویز دیازینون و پاراکسون کاهش می‌یابد (۵ و ۷). ایزدی و همکاران نشان دادند که دیازینون سبب افزایش فعالیت LDH کبد و تجویز NAC باعث کاهش فعالیت LDH می‌شود (۱۴).

MDA شاخص اصلی اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع است و به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو نشان دهنده اختلال در مکانیسم‌های دفاعی آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی و آنزیمی است (۳۳). در مطالعه حاضر افزایش سطح MDA در کبد در اثر تجویز پاراکسون مشاهده می‌شود که این افزایش ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد توسط پاراکسون و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌باشد. استفاده از NAC سبب کاهش سطح MDA در کبد می‌شود. کاهش سطح MDA می‌تواند مربوط به قابلیت NAC در سنتز گلوتاتیون و مهار پراکسیداسیون لیپیدها توسط رادیکال‌های آزاد است. مطالعه غنی و همکاران نشان دادند که تجویز پاراکسون به صورت داخل صفاقی در دوزهای mg/kg ۰/۳۵و ۰/۷ بعد از ۴ ساعت در موش صحرایی بر غلظت MDA در بافت مغز تاثیری ندارد (۶). مطالعه جعفری و همکاران نشان دادند که تجویز پاراکسون در دوزهای ۰/۱-۷ mg/kg به صورت داخل صفاقی باعث افزایش موجب افزایش لیپیدپراکسیداسیون در قلب، کلیه، مغز و کبد بعد از ۲۴ ساعت می‌شود (۵). همچنین مطالعات دیگر نشان داده‌اند که تجویز ارگانوفسفره‌های مختلف نظیر فن تیون و دیازینون باعث افزایش غلظت MDA در بافت‌های مختلف شده و تجویز NAC باعث کاهش غلظت آن می‌شود (۱۴، ۱۶، ۱۷، ۲۹ و ۳۴).

در مجموع نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که پاراکسون با تولید رادیکال‌های آزاد، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و کاهش غلظت گلوتاتیون باعث القاء استرس اکسیداتیو در بافت‌های کبد و کلیه موش صحرایی می‌شود و تجویز NAC به عنوان آنتی اکسیدان از طریق سنتز گلوتاتیون و پاکسازی رادیکال‌های آزاد باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از پاراکسون می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حسین مهدوی نسب جهت یاری در مراحل اولیه مطالعه تشکر می نمایند. این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی

Archive of SID
www.SID.ir

مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) انجام شده است که بدین وسیله از کلیه مسئولین مرکز مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Baconi DL, Barca M, Manda G, Ciobanu AM, Balalu C. Investigation of the toxicity of some organophosphorus pesticides in a repeated dose study in rats. Rom J Morphol Embryol. 2013;54(2): 349-56.
2. Bhatti GK, Sidhu IPS, Saini NK, Puar SK, Singh G, Bhatti JS. Ameliorative role of melatonin against cypermethrin induced hepatotoxicity and impaired antioxidant defense system in Wistar rats. IOSR Journal of Environmental Science, Toxicol Food Technol (IOSR-JESTFT). 2014;8(1): 39-48.
3. Malmir S, Jafari M. Comparing of the effects of diazinon and paraoxon on antioxidant system of rat lung. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences (SJKU). 2014; 19(2): 124-33[article in Persian].
4. Rosenbaum C, Bird SB. Non-muscarinic therapeutic targets for acute organophosphorus poisoning. J Med Toxicol. 2010;6(4): 408-12.
5. Jafari M, Salehi M, Asgari A, Ahmadi S, Abbasnezhad M, Hajihoosani R, et al. Effects of paraoxon on serum biochemical parameters and oxidative stress induction in various tissues of Wistar and Norway rats. EnvironToxicol Pharmacol. 2012;34(3): 876–87.
6. Ghani E. Mohmmadi M, Jafari M, Khoshbaten A, Asgari A. Evaluation of oxidative stress index in brain tissue of rats after expose to paraoxon. Kowsar Med J. 2008;13(1):1-7 [article in Persian].
7. Jafari M, Salehi M, Ahmadi S, Asgari A, Abasnezhad M, Hajigholamali M. The role of oxidative stress in diazinon-induced tissues toxicity in Wistar and Norway rats. Toxicol Mech Methods. 2012; 22(8): 638-47.
8. Oruc E, Usta D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of Cyprinus carpio. Environ Toxicol Pharmacol 2007;23(1): 48-55.
9. Abbasnezhad M, Jafari M, Asgari A, Hajihoseini R, Hajigholamali M, Salehi M, et al. The study regarding effect of paraoxon on oxidative stress index in kidney tissue of rats. J Mazand Univ Med Sci. 2009; 19 (73): 17-26 [article in Persian].
10. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. Nutr Rev. 2012;70(5): 257 65.
11. Rafieian-Kopaei M, Baradaran A, Rafieian M. Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. J Res Med Sci. 2013;18(7): 629.
12. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine: a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. Curr Opin Pharmacol. 2007;7(4): 355-9.
13. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. Pharmacol Ther. 2014;141(2): 150-9.
14. Izadi F, Jafari M, Bahadoran H, Asgari AR, Divsalar A, Salehi M. The role of N-acetyl cysteine on reduction of diazinon-induced oxidative stress in rat liver and kidney. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2014;12(11):895-906 [article in Persian].
15. Mostafalou S, Abdollahi M, Eghbal MA, Saeedi Kouzehkonani N. Protective effect of NAC against malathion-induced oxidative stress in freshly isolated rat hepatocytes. Adv Pharm Bull. 2012; 2(1): 79-88.
16. Shadnia S, Abdollahi M, Sasanian G. Effects of N-acetyl-cysteine and tocopherol on diazinon toxicity. Curr Med Chem. 2003;10: 2705-8.
17. Shadnia S, Dasgar M, Taghikhani S, Mohammadirad A, Khorasani R, Abdollahi M. Protective effects of alpha-tocopherol and N-acetyl-cysteine on diazinon-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. Toxicol Mech Methods. 2007;17(2): 109-15.
18. Pena-Llopis S, Ferrando MD, Pena JB. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. Aquat Toxicol. 2003;65(4): 337–60.
19. Winterbourn C, Hawkins R, Brian M, Carrell R. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J Lab Clin Med. 1975;85(2): 337.
20. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984; 105: 121-6.
21. Habig WH, Jakoby WB. Glutathion S-transferases (rat and human). Methods Enzymol. 1981; 77: 218-31.
22. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized

Archive of SID
www.SID.ir

glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. Anal Biochem. 1969;27(2): 502-22.
23. Kei S. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chim Acta. 1978;90(1): 37-43.
24. 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(1-2): 248-54.
25. Oruc E. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of Cyprinus carpio (L.). Environ Toxicol. 2011; 26(6): 571-8.
26. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. J Nut Biochem 2001;12(9): 500-4.
27. Isik I, Celik I. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbowtrout (Oncorhynchus mykiss). Pes Biochem Physiol. 2008;92(1): 38–42.
28. El-Shenawy NS, El-Salmy F, Al-Eisa RA, El-Ahmary B. Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver. Pest Biochem Physiol. 2010;96(2):101–7.
29. Uner N, Sevgiler Y, Durmaz H, Piner P, Cinkiloglu E. N-Acetylcysteine provides dose-dependent protection against fenthion toxicity in the brain of Cyprinus carpio L. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2009; 150(1): 33-8.
30. Yurumez Y, Cemek M, Yavuz Y, Birdane YO, Buyukokuroglu ME. Beneficial effect of N-acetylcysteine againts organophosphate toxicity in mice. Biol Pharm Bull. 2007;30(3):490–494.
31. Salehi M, Jafari M, Saleh-Moqadam M, Asgari A. The comparison of the effect of diazinon and paraoxon on biomarkers of oxidative stress in rat serum. Zahedan J Res Med Sci. 2012;14(3):18-23.
32. Abdou HM, El Mzoudy RH. Oxidative damage, hyperlipidemia and histological alterations of cardiac and skeletal muscles induced by different doses of diazinon in female rats. J Hazard Mater. 2010;182(1-3):273–8.
33. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotox Environ Safety. 2006;64(2):178–89.
34. Oksay T, Nazıroglu M, Ergun O, Dogan S, Ozatik O, Armagan A, et al. N-acetyl cysteine attenuates diazinon exposure-induced oxidative stress in rat testis. Andrologia. 2013;45(3): 171-177.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

The Impact of N-acetyl Cysteine on Paraoxon-induced Oxidative Stress in Rat Liver and Kidney

Salehi M [1], Jafari M [2*], Asgari A[3], Rasouli J [4]

1- Neurosciences Research Center, Baqiyatallah, University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah, University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Sport Physiology Research Center, Baqiyatallah, University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 11 Oct 2015 Accepted: 25 Jan 2016

Abstract

Background & Objective: Paraoxon (POX) as one of the most toxic organophosphorus pesticides, is widely used in agriculture, which can reduce the antioxidant capacity of the cell. The aim of this study was to investigate the effect of N-acetyl cysteine (NAC) as an antioxidant against POX-induced oxidative stress in rat liver and kidney.

Material & Methods: In the present experimental study, male Wistar rats were randomly divided into four groups; control (corn oil as POX solvent), POX (0.7 mg/kg), NAC (160 mg/kg), and NAC+POX. 24 hours after the intraperitoneal injection, animals were anesthetized and the liver and kidney tissues were quickly removed. Followed by the tissues hemogenation, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and lactate dehydrogenase (LDH) activities, as well as glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels were determined by the biochemical methods. The data were statistically analyzed using the analysis of variance (ANOVA) followed by the post hoc analysis using Tukey test.

Results: POX increased SOD, CAT and GST activities and decreased GSH content in rat liver and kidney as compared to control. In addition, the increased MDA level and decreased LDH activity were observed in the liver. The administration of NAC inhibited changing of these parameters.

Conclusion: The administration of NAC as antioxidant, ameliorates POX-induced oxidative stress in rat liver and kidney by scavenging the free radicals and GSH synthesis, but does not provide the complete protection.

Keywords: Paraoxon, N-acetyl cysteine, Oxidative stress, Liver, Kidney, Rat

***Corresponding author: Mahvash Jafari,** Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: m.jafari145@gmail.com.

www.SID.ir