دانشور
پزشکی

اثر سمیت حاد دیازینون روی سیستم آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی کلیه موش صحرایی

مریم عباس‌نژاد[۱]، دکتر مهوش جعفری*[۲]، دکتر علیرضا عسگری[۳]، دکتر رضا حاجی حسینی[٤]، منصوره حاجی غلامعلی[۱]، مریم صالحی[٥]، محمد سلیمیان[٦]

۱- دانشجوی کارشناس ارشد- گروه بیوشیمی، واحد علوم پایه، دانشگاه پیام نور تهران،
۲- دانشیار- دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج) دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی- پژوهشکده طب رزمی، مرکز تحقیقات شیمیایی
۳- استاد گروه فیزیولوژی- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)،
٤- استادیار- گروه بیوشیمی واحد علوم پایه، دانشگاه پیام نور تهران،
٥- دانشجوی کارشناسی ارشد- گروه بیوشیمی واحد علوم پایه، دانشگاه پیام نور مشهد،
٦- دانشجوی کارشناس ارشد گروه بیوشیمی پژوهشکده طب رزمی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)

***نویسنده مسئول:** **Eamil: jafari@bmsu.ac.ir**

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم- شماره ۸۳
آبان ۱۳۸۸

وصول: ۸۸/۵/۱۵
آخرین اصلاحات: ۸۸/۷/۲۵
پذیرش: ۸۸/۷/۲۶

چکیده

مقدمه و هدف: دیازینون یکی از گسترده ترین ارگانوفسفره‌هایی است که در کشاورزی به کار می‌رود. اثرات سمی‌این ترکیب از طریق مهار آنزیم استیل کولین استراز اعمال می‌شود که برای عملکرد صحیح سیستم عصبی لازم است. مطالعات نشان می‌دهد، ارگانوفسفره‌های مختلف قادر به تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدان بدن هستند. هدف از این مطالعه ارزیابی تأثیر دیازینون روی سیستم آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدهای کلیه موش صحرایی است.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند که شامل گروه کنترل و سه گروه آزمایش بودند که دوزهای مختلف دیازینون (سی، پنجاه و صد میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را به صورت داخل صفاتی دریافت کردند. ۲۴ ساعت پس از تزریق حیوانات بیهوش و بافت کلیه جدا شد. فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون S – ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز و همچنین غلظت گلوتاتیون و مالون دی‌آلدئید با روش‌های بیوشیمیایی تعیین شد.

نتایج: فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در دوزهای بالاتر از ۳۰ mg/kg دیازینون و میزان مالون دی آلدئید در دوز ۱۰۰mg/kg در مقایسه با کنترل افزایش یافته، در حالی که سطح گلوتاتیون در این غلظت‌ها کاهش می‌یابد. فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون S – ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز تغییر معناداری در مقایسه با گروه کنترل نشان نمی‌دهند.

نتیجه‌گیری: دیازینون باعث القاء تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت همراه با تخلیه سطح GSH نشان‌دهنده آسیب اکسیداتیو بافت کلیه است.

واژگان کلیدی: دیازینون، کلیه، سیستم آنتی‌اکسیدان، پراکسیداسیون لیپیدها، موش صحرایی

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی مرکز تحقیقات شیمیایی و علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... در قالب طرح تحقیقاتی انجام شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره در سطح گسترده در سراسر جهان به عنوان حشره‌کش در کشاورزی به کار می‌روند مسمومیت با این مواد یکی از مشکلات بهداشت جهانی است [۱]. ارگانوفسفره‌ها مهارکننده‌های کولین استراز هستند که با فسفریله کردن اسید آمینه سرین موجود در جایگاه فعال آنزیم، پیوندی محکم و غیرقابل برگشت با آنزیم ایجاد کرده و آن را مهار و باعث افزایش سطح استیل کولین می‌شوند و بروز مسمومیت ناشی از تجمع پیش از حد استیل کولین می باشد [۲]. همچنین این ترکیبات در چندین حمله شیمیایی نیروهای عراقی طی جنگ ایران- عراق به کار رفته است. به دلیل دسترسی آسان و سمیت بالای این ترکیبات، میزان بروز مسمومیت‌های تصادفی و خودکشی وسیع بوده و باعث حدود صد هزار مسمومیت در هر سال در دنیا است. در ایران این ترکیبات یکی از علل مرگ و میر ناشی از مسمومیت هستند [۳]. دیازینون یکی از ترکیبات جدید و مهم ارگانوفسفره است که به عنوان حشره‌کش علیه آفات نباتی و حشرات منازل استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر از این سم به طور وسیع برای کنترل کرم ساقه‌خوار برنج نیز استفاده می‌شود [٤].

تاکنون طیف وسیعی از اثرات متفاوت برای ترکیبات ارگانوفسفره گزارش شده است. بسیاری از این اثرات، ارتباطی با مهار آنزیم استیل کولین استراز ندارند، بلکه با مکانیسم‌های دیگر سلولی القا می‌شود [٦-٥]. یکی از این مکانیسم‌ها تولید رادیکال‌های آزاد و به وسیله این ترکیبات و اختلال در سیستم‌های آنتی‌اکسیدان بدن هستند. به دلیل تنوع استخلاف‌ها در ساختمان شیمیایی ارگانوفسفره‌ها در مورد سایر اثرات غیروابسته به مهار کولین استراز، این عوامل تفاوت‌های آشکاری با یکدیگر دارند و باید هر یک از این ترکیبات را جداگانه مورد بررسی قرار داد.

در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیندها موجب استرس اکسیداتیو شده که اگر این استرس شدید یا طولانی باشد، می‌تواند باعث آسیبهای جدی سلولی شود [۷]. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان عهده دار عمل سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد هستند که سوپراکسید دیسموتاز [SOD] و کاتالاز [CAT] از آنزیم‌های کلیدی این سیستم به شمار می‌روند و گلوتاتیون [GSH]، تیول غیرپروتئینی اصلی موجودات هوازی و فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی داخل سلول است [۹-۸].

مطالعات نشان می‌دهند که ارگانوفسفره‌ها با تولید رادیکال‌های آزاد باعث تغییر در سیستم‌های آنتی‌اکسیدان سلول و پراکسیداسیون لیپیدی غشاء می‌شوند [۱۱و۱۰و۳]. به دنبال تجویز خوراکی مالاتیون به موش صحرایی، تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در اریتروسیت، بزاق و پلاسما گزارش شده است [۱۲و۳]. با مطالعه اثر لیندان بر قلب موش صحرایی نتایج مشابهی به دست آمده است [۱۳]. از طرف دیگر، با مطالعه اثر کلرپیریفوس و سیپرمترین بر کبد موش کوچک آزمایشگاهی، افزایش غلظت‌های سرمی شاخص‌های عملکرد کبدی و تغییر در شاخص‌های آنتی‌اکسیدان گزارش شده است [۱۱]. تفاوت در نوع ترکیب و گونه مورد بررسی، دوز و زمان مواجهه، وجه تمایز مطالعات مختلف است. در مطالعه حاضر، اثر تجویز دیازینون بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و لیپید پراکسیداسیون بافت کلیه موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد

نیتروبلوتترازولیوم [NBT]، ۱- کلرو-۲ و٤ دی‌نیتروبنزن [CDNB]، دی تیوبیس نیترو بنزوئیک اسید [DTNB]، تری‌کلرواستیک اسید [TCA]، آلبومین سرم گاوی [BSA]، نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید [NADH]، تترااتوکسی پروپان وسایر مواد از شرکت سیگما [آلمان] و شرکت مرک [آلمان] خریداری شدند. دیازینون [خلوص صددرصد] از شرکت Supelco–USA خریداری شد. محلول ذخیره با غلظت ٤۰۰ mg/ml در روغن ذرت

Archive of SID

www.SID.ir

تهیه شد و رقت‌های مناسب با استفاده از بافر فسفات سدیم ۱۰ میلی‌مولار pH =۷ از آن به دست آمد.

حیوانات

این مطالعه روی موش‌های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گرفت. حیوانات در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله [عج] تحت شرایط طبیعی نور، تاریکی، غذا و آب قرار گرفتند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی که مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله [عج] بود، هنگام کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد.

تیمار حیوانات

حیوانات به طور تصادفی به چهار گروه [در هر گروه هفت سر] تقسیم شدند: کنترل، که روغن ذرت به عنوان حلال و سه گروه آزمایش که دوزهای مختلف دیازینون [سی، پنجاه و صد میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن] را بصورت داخل صفاتی دریافت کردند. ۲٤ ساعت پس از تزریق، با بیهوش کردن حیوانات بت وسیله اتر، بافت کلیه خارج و به نیتروژن مایع انتقال داده شد. در روز آزمایش، بافت‌های منجمدشده به دقت توزین و با نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین هموژنه شد. پس از آن نمونه‌ها در g ۱۲۰۰۰ در ٤°C به مدت پانزده دقیقه سانتریفوژ شد. از محلول رویی برای سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی موردنظر استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم SOD

سنجش فعالیت آنزیم SOD بر پایه قدرت سوپراکسید دیسموتاز در مهار احیاء نیتروبلوتترازولیوم به وسیله یون سوپراکسید با استفاده از روش Winterbourn انجام گرفت [١٤]. به حجم مناسبی از بافت هموژنه، EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار و NBT ۱/۵ میلی‌مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۸-۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس بعد از اضافه کردن ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/٦۷ مولار با pH=۷/۸، به مدت ۱۲-۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده و جذب طی پنج دقیقه در طول موج ٥٦۰ نانومتر خوانده و فعالیت ویژه آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم CAT

فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Aebi [۱۵] و با استفاده از تجزیه پراکسید هیدروژن [H_2O_2] در طول موج ۲٤۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. به حجم معینی از عصاره بافتی، اتانول مطلق [۰/۰۱ml/ml] اضافه و به مدت نیم ساعت در یخ اینکوبه شد. سپس به آن تریتون X-100 ده درصد با غلظت نهایی یک درصد اضافه شد. این محلول برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. مقدار مناسبی از نمونه با بافر فسفات پتاسیم پنجاه میلی‌مولار با pH=۷ و محلول H_2O_2 سی میلی‌مولار مخلوط کرده و جذب طی سه دقیقه خوانده و فعالیت ویژه آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم GST

اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم به روش Habig انجام شد [١٦]. یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم پنجاه میلی‌مولار pH =۷/٤ شامل یک میلی‌مولار EDTA، بیست میلی‌مولار GSH و بیست میلی‌مولار CDNB است. واکنش با اضافه کردن حجم معینی از عصاره بافتی شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۳٤۰ نانومتر به مدت پنج دقیقه خوانده و فعالیت ویژه آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت LDH

فعالیت آنزیم LDH با استفاده از کیت پارس آزمون سنجیده شد. جذب نمونه‌ها طی سه دقیقه در طول موج ۳٤۰ نانومتر خوانده و فعالیت ویژه آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

تعیین غلظت GSH

برای سنجش میزان گلوتاتیون از روش Beutler استفاده شد [۱۷]. غلظت مناسبی از نمونه هموژنه رقیق شده با اسید- ٥- سولفوسالیسیلیک پنج درصد [غلظت نهایی پنج درصد] مخلوط شد. نمونه در ٤°C به مدت ده دقیقه با دور g ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. صد میکرولیتر از محلول رویی به ۸۱۰ میکرولیتر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار

Archive of SID

www.SID.ir

اضافه شد. سپس با اضافه کردن نود میکرولیتر معرف DTNB ۰/۰٤ درصد در سیترات سدیم ۰/۱ درصد واکنش شروع شد. تغییرات جذب در ٤۱۲ نانومتر طی پنج دقیقه خوانده و با استفاده از محلول گلوتاتیون ۱mg/ml منحنی استاندارد رسم و غلظت گلوتاتیون نمونه‌ها محاسبه شد.

سنجش غلظت MDA

برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها [MDA] از روش Satho استفاده شد [۱۸]. به حجم مناسبی از بافت هموژنه، TCA ده درصد اضافه و به مدت ده دقیقه سانتریفوژ شد. به ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی، دو میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/٦۷ درصد اضافه کرده و به مدت سی دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت. سپس دو میلی‌لیتر n– بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید به مدت پانزده دقیقه در ٤۰۰۰g سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده و غلظت مالون دی‌آلدئید با استفاده از ۱، ۱، ۳ و۳ تترا اتوکسی پروپان به‌عنوان استاندارد تعیین شد.

تعیین غلظت پروتئین

برای اندازه‌گیری پروتئین از روش برادفورد استفاده شد [۱۹]. حجم مناسبی از عصاره بافتی را به حجم یک میلی‌لیتر رسانده و سه میلی‌لیتر از محلول برادفورد به آن اضافه و به مدت ده دقیقه اینکوبه شد. سپس جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده و منحنی استاندارد پروتئین با استفاده از محلول BSA mg/ml ۱ رسم و غلظت پروتئین با استفاده از نمودار محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار INSTAT به صورت آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه به همراه تست Tukey انجام شد. P< ۰/۰۵ مرز معنادار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد. نتایج به صورت mean ± SD بیان شدند.

نتایج

اثر دوزهای مختلف دیازینون بر فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT بافت کلیه در شکل‌های ۱ و۲ آمده است. فعالیت آنزیم SOD در همه دوزهای دیازینون در مقایسه با گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافته، در حالی که افزایش فعالیت آنزیم CAT در دوزهای` پنج و صد میلی‌گرم بر کیلوگرم دیازینون معنادار است. افزایش فعالیت SOD در دوز mg/kg ۱۰۰ دیازینون در مقایسه با دوز mg/kg ۳۰ معنی‌دار است [p<۰/۰۱] و همچنین افزایش فعالیت CAT در دوزهای پنجاه [۰/۰۵ >pو ۱۰۰ [p<۰/۰۰۱] میلی‌گرم بر کیلوگرم دیازینون در مقایسه با دوز mg/kg ۳۰ معنادار است.

اثر دوزهای مختلف دیازینون بر فعالیت آنزیم‌های GST و LDH کلیه در شکل‌های ۳ و٤ نشان داده شده است. افزایش فعالیت آنزیم GST و کاهش فعالیت آنزیم LDH در دوزهای مختلف دیازینون درمقایسه با گروه کنترل و بین دوزهای مختلف معنادار نیست.

بررسی اثر دیازینون روی غلظت GSH و MDA [جدول ۱] نشان داد، غلظت GSH در دوزهای پنجاه و صد میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش به طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته و کاهش غلظت GSH در دوز mg/kg ۱۰۰ دیازینون در مقایسه با دوز mg/kg ۳۰ معنادار است [p<۰/۰۵]. غلظت MDA در دوز mg/kg ۱۰۰ دیازینون به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. افزایش غلظت MDA بین دوزهای مختلف دیازینون درمقایسه با هم معنادار نیست.

بحث و نتیجه‌گیری

کلیه، جایگاه حذف و حفظ متابولیت‌های فعال است. متابولیت‌های دیازینون از طریق کلیه‌ها دفع می‌شوند. کلیه‌ها مسئول برداشتن گلوتاتیون ازجریان خون هستند و پنجاه تا شصت درصد نوسازی گلوتاتیون پلاسما را انجام می‌دهند [۲۰]. مجموعه آنزیمی‌سوپراکسید دیسموتاز وکاتالاز اولین خط دفاعی سلول در برابر سمیت ناشی از رادیکال‌های آزاد هستند [۷]. آنزیم

Archive of SID

www.SID.ir

SOD باعث تبدیل رادیکال سوپراکسید به H_2O_2 شده و آنزیم CAT باعث خنثی شدن H_2O_2 و تبدیل آن به H_2O و O_2 می‌شود. در این مطالعه تجویز حاد دیازینون موجب افزایش فعالیت آنزیم SOD و CAT بافت کلیه می‌شود. افزایش فعالیت SOD باعث کاهش رادیکال سوپراکسید در بافت کلیه می‌شود و H_2O_2 تولیدی طی این واکنش با افزایش فعالیت CAT خنثی می‌شود. افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بیانگر تطابق سلول یا بافت با استرس ایجاد شده است [۲۱ و۱۲].

مطالعات Kaur و همکاران نشان دادند، مصرف کلروپیریفوس [CPF] در موش‌ها فعالیت SOD و CAT را به طور معناداری در اریتروسیت‌ها افزایش می‌دهد [۲۲]. Sharma و همکاران نشان دادند تجویز خوراکی دی متوآت به موش صحرایی موجب افزایش وابسته به دوز در فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT مغز و کبد می‌شود [۱۰]. مطالعات Altuntas و همکاران و Buyukokuroglu و همکاران، افزایش فعالیت SOD را طی مسمومیت با دیازینون و فن تیون نشان دادند [۲۴-۲۳]. براساس مطالعات Monterio و همکاران تحت تأثیر متیل پاراتیون یا فولی سوپر در ماهی، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم SOD و CAT گزارش شد [۲۵]. مطالعات Aturk و همکاران نشان داد، مصرف دیازینون به وسیله موش صحرایی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت قلب می‌شود [۲۶]. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در قلب و پلاسمای موش صحرایی پس از تجویز لیندان [سه هفته] و مالاتیون [چهار هفته] نیز گزارش شده است [۱۳]. همچنین مطالعات غنی و همکارانش نشان دادند، مصرف پاراکسون بصورت داخل صفاتی بعد از چهار ساعت در موش صحرایی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت مغز می‌شود [۲۷].

از طرف دیگر در بعضی از مطالعات به دنبال تجویز ترکیبات آفت کش، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گزارش شده است. Fetoui و همکاران با مطالعه اثر LTC [lambda-Cyhalothrin] که نوعی حشره‌کش است، کاهش فعالیت SOD و افزایش فعالیت CAT مغز و اریتروسیت‌های موش را گزارش کردند [۲۸]. مطالعه Yu نشان داد، کلروپیریفوس باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT شبکیه چشم موش‌ها می‌شود [۲۹]. Khan و همکاران با مطالعه اثر کلرپیریفوس و سیپرمترین [تجویز به مدت دو هفته] بر کبد موش آزمایشگاهی، کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT را گزارش دادند [۱۱]. ارگانوفسفره فوزالون در دوز بالا باعث کاهش فعالیت SOD می‌شود [۳۰]. گزارش Amer و همکاران نشان داد حضور حشره‌کش‌های حاوی کاربامات سبب مهار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت SOD و گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود [۳۱]. طی مطالعات Tuzmen و همکاران [۳۲] و Yousef و همکاران [۳۳] نشان دادند، پس از مواجهه با دوزهای متفاوت دلتامترین، کاهش در فعالیت SOD مشاهده می‌شود. این اختلاف نتایج در مطالعات مختلف ناشی از نوع، نژاد و گونه حیوان، نوع بافت، مسیر تجویز ماده سمی‌و دوز و زمان مواجهه است.

این مطالعه نشان می‌دهد، کاهش فعالیت LDH در غلظت‌های مختلف دیازینون معنادار نیست. غلظت این آنزیم با میزان مرگ سلولی و لیز شدن سلول‌ها رابطه مستقیم دارد [۳۴]. در مطالعه‌ای که Fetoui و همکارانش انجام دادند، فعالیت LDH در مغز موش‌ها به‌طور معناداری در مواجهه با LTC کاهش یافته، در حالی که در اریتروسیت‌های موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش پیدا کرد [۲۸]. Kalender و همکاران [۳۵] و Etim و همکاران [۳۶] نشان دادند، پس از مسمومیت با دیازینون و لیندون، سطح LDH و آلکالین فسفاتاز نیز افزایش می‌یابد. Petroianu و همکاران نشان دادند، ارگانوفسفره کلروس وابسته به دوز و زمان، تغییرات متفاوتی در سطح LDH ایجاد می‌کند، در این مطالعه پس از چهار تا هفت هفته سطح آلکالین فسفاتاز و LDH افزایش می‌یابد [۳۷].

آنزیم GST با استفاده از GSH باعث افزایش حلالیت سموم و دفع آن‌ها از بدن می‌شود. بنابراین نقش مهمی

Archive of SID

www.SID.ir

در محافظت بافت‌ها بر علیه آسیب و استرس اکسیداتیو دارد [۳۸]. در این مطالعه دیازینون به تغییرات معناداری در فعالیت آنزیم GST منجر نمی‌شود. مطالعه Kaur و همکاران نشان داد، با تجویز کلروپیریفوس [۰/۵ mg/kg] روزانه برای بیست هفته متوالی به موش‌ها به طور معناداری فعالیت GST را افزایش می‌دهد [۲۲]. در مطالعه‌ای دیگر Khan و همکارانش نشان دادند، اثر سیپرمترین و مالاتیون بر روی کبد موش صحرایی باعث کاهش فعالیت GST می‌شود [۱۱]. افزایش GST در اثر تزریق پاراکسون نشان دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل این سم و دفع سریع‌تر آن است [۲۵]. مطالعه اثر سم آزینفوس متیل برگونه‌ای از ماهی نشان داد، در میزان فعالیت GST کبد و کلیه تغییری ایجاد نمی‌شود [۳۹]. مطالعه Monterio و همکاران نشان دادند، تجویز متیل پاراتیون یا فولی سوپر در ماهی موجب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت GST در آبشش‌ها، اندام تناسلی، عضلات سفید و کبد می‌شود و در ماهی‌هایی که تحت تأثیر رژیم سلنیوم قرار گرفتند، در تمامی بافت‌ها افزایش فعالیت GST مشاهده شد [۲۵]. بررسی‌های Bagnyukova روی تکامل جنین نوعی وزغ در سال ۲۰۰۶ نشان داد، دو حشره‌کش متیل آزینفوس و کاربریل سبب افزایش در فعالیت GST می‌شود [۴۰].

گلوتاتیون GSH]]، تری پپتید حاوی تیول، یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های سلولی مهم است که با عملکردهای بیولوژیکی مختلف، که انواع اکسیژن و متابولیت‌های واکنش‌پذیر را از بین می‌برد. به علاوه، می‌تواند به‌عنوان یک سوبسترا برای آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز [GPx] و گلوتاتیون S – ترانسفراز که خنثی‌کننده سموم هستند، عمل کند [۸ و ۹ و ۴۱]. تخلیه GSH در نهایت باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود که به آسیب DNA، توقف کامل و کاهش مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو منجر می‌شود [۴۲ و ۸]. مطالعه حاضر نشان می‌دهد، تجویز حاد دیازینون [>۵۰mg/kg] موجب کاهش غلظت گلوتاتیون در بافت کلیه می‌شود. کاهش GSH احتمالاً ناشی از متابولیسم و دفع دیازینون است که به GSH نیاز دارد و کاهش GSH باعث کاهش متابولیسم و افزایش سمیت دیازینون می‌شود. مطالعات Buyukokuroglu و همکاران نشان دادند، مصرف فن‌تیون Fenthion]] بعد از ۲۴ ساعت سطح GSH ماهیچه انسان را کاهش می‌دهد [۴۳]. همچنین مطالعات Monteiro و همکاران نشان دادند، مصرف متیل پاراتیون [MP] در ماهی موجب کاهش گلوتاتیون در بافت‌های کبد، ماهیچه سفید و آبشش می‌شود [۲۵]. مطالعه دیگری که توسط Catalgol و همکارانش انجام دادند، تری کلروفن سطح GSH را در حدود ۷۹– ٦٦درصد در اریتروسیت‌های انسان کاهش داد [٤٤]. مطالعات Khan و همکاران نشان دادند، مصرف سیپرمترین و مالاتیون در موش صحرایی موجب کاهش گلوتاتیون کبد می‌شود [۱۱].

MDA یکی از مهم‌ترین و رایج‌ترین مارکرهای پراکسیداسیون لیپیدی است و افزایش سطح MDA نشان‌دهنده اختلال در مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی و آنزیمی است [٤٥]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند به دنبال سمیت ارگانوفسفره‌ها، سطح MDA در بافت یا خون افزایش یافته، اما در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها به طور معناداری کاهش می‌یابد [۳٦]. در این مطالعه، افزایش غلظت MDA به دنبال تجویز ۱۰۰mg/kg دیازینون پس از ۲٤ ساعت تغییرات معناداری در کلیه مشاهده شد. شادنیا و همکاران، عدم تغییر در میزان مالون دی‌آلدئید را در پلاسمای افرادی که به طور مزمن در مواجهه با آفت‌کش‌ها قرار گرفته بودند، گزارش کردند [٤٦]. به علاوه، با مطالعه اثر دیازینون بر بافت‌های مختلف ماهی در بعضی از بافت‌ها مانند آبشش، ماهیچه و لوله گوارش، افزایش میزان مالون دی‌آلدئید و عدم تغییر آن در کلیه مشاهده شده است [٤٧]. Isik و همکاران نشان دادند، محتوای MDA در ماهی‌های آلوده‌شده با متیل پاراتیون دیازینون طی۲٤ تا ٤٨ ساعت در بافت‌های کبد و رماهیچه افزایش می‌یابد [٤٨]. در مطالعه دیگری، اثر دیمتوآت [DM] در موش‌های بالغ و نوزادان آن‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی شد که سطح MDA افزایش پیدا کرد [۴۹]. افزایش‌های مشابهی نیز در سطوح MDA در بافت‌های مختلف موش‌های صحرایی بالغ بعد از تزریق ارگانوفسفره‌ها گزارش شده است [۵۱ و۵۰]. نتایج مطالعات متعدد نشان می‌دهد، سطوح پائین یا فقدان پراکسیداسیون لیپیدی، منعکس‌کننده اثرات محافظتی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است [۵۲]. مطالعات Altuntase و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داد، ارگانوفسفره فوزالون سبب افزایش سطح MDA در اریتروسیت‌ها در محیط آزمایشگاهی شد [۳۰]. John و همکاران نشان دادند، تجویز خوراکی دی‌متوآت و مالاتیون به موش صحرایی موجب تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در اریتروسیت می‌گردد [۱۲]. مطالعه Buyukokuroglu و همکاران نیز نشان داد، اثر فن‌تیون روی موش صحرایی سبب افزایش سطح MDA در خون می‌شود [۴۳].

در مجموع، نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند، تجویز دیازینون به صورت حاد موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تخلیه گلوتاتیون در بافت کلیه می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم‌ها احتمالاً ناشی از افزایش ظرفیت سم‌زدایی بافت کلیه است و کاهش GSH نشان‌دهنده نارسایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت برای مقابله با ROS است و افزایش میزان مالون دی‌آلدئید ممکن است ناشی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلول‌های کلیه باشد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی مرکز تحقیقات شیمیایی و علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله [عج] در قالب طرح تحقیقاتی انجام شده است که به این وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین آن مراکز ابراز می‌دارند.

منابع

1- Kwong TC. Organophosphate Pestisides: Therapeutic Drug Monitoring. Biochem Clin Toxicol. 2002; 144: 1.

2- Habtrani F, Noovran Z, Asgati A. Noncholinergic effects of organophosphates J Milit Med.1389; 3: 47-53.

3- Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, Shadnia S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. Comp Biochem Physiol. 2004; 137: 29-34.

4- Dutta HM, Maxwell LB. Histological examination of sablethal effects of diazinon on ovary of blugill, lepomis macrochirus, Environ Pollut. 2003; 121: 95-102.

5- Staiiones L, Beseler C, Pesticide illness, farm practices, and neurological symptoms among Farm residents in colorad. Environ Res. 2002; 90: 89-97.

6- Storm JE, Rozmank K, Doull J. Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. Toxicology. 2000; 150:1-29.

7- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glotathion peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell cervival against oxidative stress. Free Radic Biol Med. 1994; 17: 235-248.

8- Nordberg J, Arner E. Reactive oxygen species, antioxidant, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med. 2001; 31: 1287-1312.

9- Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. Prog Neurobiol. 2000; 62: 649-671.

10- Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Nag TC, Dogra TD. Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. Toxicology. 2005; 215: 173-181.

11- Khan SM, Sobti RC, Kataria L. Pesticide-induced altration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. Clin Chim Acta. 2005; 358: 131-138.

12- John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamine E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. J Nut Biochem. 2001; 12: 5000-5004.

13- Ananya R, Subeena S, Kumar DA, Kumar DT, Kumar MS. Oxidative stress and histopathological changes in the heart following oral lindane [gammahexachlorohexane] administration in rats. Med Sci Monit. 2005; 11: 325-329.

14- Winterbourn C, Hawkins R, Brian M, Carrell R. The Estimation of red cell superoxide dismutase activity. J Lab Clin Med. 1975; 85: 337.

15- Aebi H. Catalase in vitro..Methods Enzymol. 1984; 105: 121-126.

16- Habig WT, Jakoby WB. Glutathion S-Transferas [rat and human]. Methods Enzymol. 1981; 77: 218-231.

17- Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med. 61: 882-888.

18- Satoh K. Serum lipid peroxidation in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chim Acta. 1978; 90: 37–43.

19- Bradford MM.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254.

20- Haberle D, Wahllander A, Sies H. Assessment of the kidney function in maintenance of plasma glutathione concentration and redox state in anaestheitized rats. FEBS Lett. 1979; 108: 335-340.

21- Anderson HR, Nielsen JB, Nielsen F, et al, Antioxidative enzyme activties in human erytrocytes. Clin Chem. 1997; 43: 562-568.

Archive of SID

www.SID.ir

22- Kaur R, Sandhu HS. In vivo changes in antioxidant system and protective role of selenium in chlorpyrifos-induced subchronic toxicity in bubalus bubalis. Enviromental Toxicol pharmacol. 2008; 26: 45-48.

23- Altuntas L, Kilinc L, Orhan O, Demiral R. The effect of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes in vitro. Human Experimental Toxicology. 2004; 23: 9-13.

24- Buyukokuroglu ME. Cemek M. Yurumez Y. Antioxidative role of melatonin in organophosphate toxicity in rats. Cell Biol Toxicol. 2008; 24: 151-158.

25- Monterio D, Rantin F, Kalinin A. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxa, brycon cephalus exposed to organophosphate insecticide folisuper 600 br® [methyl parathion]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, 2006; 149: 40-49.

26- Aturk O, Demirin H, Sutcu R, Yilmaz N, Koylu H, Altuntas I. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat heart and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. Cell Biol Toxicol. 2006; 6: 455-461.

27- Gani E. Mohmmadi M, Jafari M, Khoshbatene A, Asgari A. Evaluation of oxidative stress index in brain tissue of rats after expose to paraoxon. Kowsar Med J. 2008; 1: 1-8 [Persian].

28- Fetoui H, Garoui EM, Makniayadi F, Zeghal N. Oxidative stress induced by lambda-cyhalothrin in rat erythrocytes and brain: Attenuation by vitamin C. Environ Toxicol Pharmacol. 2008; 26: 225-231.

29- Yu F, Wang Z, Ju B, Wang Y, Wang J, Bai D. Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of cobination of vitamin C and E. Exper Toxicol Patol. 2008; 59: 415-423.

30- Altuntas I, Delibas N, Doguc D, Ozmen S. Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro. Toxicol in Vitro. 2003; 17: 153-157.

31- Amer M, Metwalli M, Abu El-Magd Y. Skin diseases and enzymatic antioxidant activity among workers exposed to pesticides. East Mediter. Health J. 2002; 8:363-373.

32- Tuzmen N, Candan N, Kays E, Demiryas N. Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. Cell Biochem Fun. 2008; 26: 119-124.

33- Yousef MI, Awad T.I, Mohamed E.T.I. Deltamethrin, induced oxidative damdge and biochemical altrations in rat and its attenuation by vitamin E. Toxicology. 2006; 27: 240-247.

34- Agrahari SH, Pandey KC, Gopal K. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, Channa punctatus [Bloch]. Pes Biochem Physiol. 2007; 88: 268-272.

35- Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarciki M, Acik Goz F. Diazinon on-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. Toxicology. 2005; 211: 197-206.

36- Etim OE, Farombi EO, Usoh IF, Akpan EJ. The protective effect of aloe vera juice on lindane induced hepatotoxicity and genotoxicity. Pakistan J Pharm Science. 2006; 19: 337-340.

37- Petroianu GA, Hasan MY, Nurulain SM, Shafiullah M, Sheen R, Nagelkerke N. Ranitidine in acute high dose organophosphate exposure in rats effect of the time-point of administration and comparison with pyridostigmine. Basic Clin Pharm Toxicol. 2006; 99: 312-316.

38- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S – transferases. J Biol Chem. 1984; 249: 7130 – 7139.

39- Oruc E, Uner N. Combined effects of 2, 4 -d and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of oreochromis niloticus. Comp Biochem Physiol. Part C, 2002; 127: 291-296.

40- Bagnyukova TV, Chahrak OI, Lushchak VI. Coordinated responses of goldfish antioxidant defensesnto environmental stress. Aquat Toxicol. 2006; 78: 325-331.

41- Winkler BS, Orselli SM, Rex TS. The redox couple between glutathione, ascorbic Acid: A chemical and physiological perspective. Free Radic Biol Med. 1994; 17: 333–349.

42- Masella R, Benedetto RD, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nut Biochem. 2005; 16: 577–586.

43- Buyukokuroglu ME, Cemek M, Tosun M, Yurumez Y, Bas O,Yavuz Y. Dantrolen may prevent organophosphate-induced oxidative stress and muscle injury. Pes Biochem Physiol. 2008; 92: 156-163.

44- Catalgol BK, Ozden S, Alpertunga B. Effects of trichiorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. Toxicol in vitro 2007; 21: 1538-1544.

45- 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: 178–189.

46- Shadnia S, Azizi E, Hosseini R, Khoei S, Fouladdel S, Pajoumand A, Jalali N, Abdollahi M. Evalution of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. Hum Exp Toxicol. 2005; 24: 439-45.

47- Durmaz H, Sevgiler Y, Uner N. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in oreochromis niloticus. Pes Biochem Physiol. 2006; 84: 215-226.

48- Isik I, Celik I. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on ceratin biomarkers in various tissues of rainbowtrout. Pes Biochem Physiol. 2008; 92: 38-42.

49- Mahjoubisamet A, Fetoui H, Zeghal N. Nephrotoxicity induced by dimethoate in adult rats and their Suckling Pups. Pes Biochem Physiol. 2008; 91: 96-103.

50- Fortunato JJ, Agostinho FR, Petronilho GZ, Dal-Pizzolre F, Quevedo J. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. Neurotox Res. 2005; 9: 23–28.

51- Possamai FP, Fortunato JJ, Feier G, Agostinho FR, Quevedo J, Wilhelm Filho D, Dal-Pizzol F. Oxidative stress after acute and sub chronic malathion intoxication in Wistar rats. Environ Toxicol Pharmacol. 2007; 23: 198–204.

52- Oruc EO, Usta D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in defferent tissues of Cyprinus carpio. Environ Toxicol Pharmacol. 2007; 23: 48-55.

Archive of SID

www.SID.ir

Daneshvar

Medicine

Acute Toxicity Effect of Diazinon on Antioxidant System and Lipid Peroxidation in Kidney Tissues of Rats

[1]basnejad[1], M. Jafari[*2], M. Asgari[3], A Haji Hossaini[4], R. [1]Hajigholamali[1], M. Salehi[5], M. and Salimian. M[6].

1- Student of Biochemistry at Payame Noor University, Department of Biochemistry, Tehran, Iran
2- Associate Professor at the Department of Biochemistry – Chemical Research Center, Faculty of Medicine - Military medicine Institute, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences.
3- Assistant Professor at Payame Noor University, Department of Biochemistry, Tehran, Iran.
4- Professor at the Department of Physiology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5. Student of Biochemistry at Razavi Khorasan Payame Noor University, Department of Biochemistrym, Mashhad, Iran.
6- Student of Biochemistry at the Department of Biochemistry – Applied Neuroscience Research Center, Faculty of Medicine - Military medicine Institute, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

***Email address:jafari@bmsu.ac.ir**

Abstract

Background and Objective: Diazinon is one of the most widely used organophosphates (OPs) in agriculture. Toxic effects of diazinon are due to the inhibition of acetylcolinesterase, an enzyme needed for proper nervous system function. Investigates show that different classes of OPs may induce the production of free radicals and in cause disturbance in body antioxidant systems. The purpose of this study was to evaluate the effects of diazinon on oxidant-antioxidant system in the kidney of rat.

Materials and Methods: Wistar male rats were randomly divided into four groups including: control (corn oil as diazinon solvent) and three groups of diazinon receiving different doeses (30, 50 and 100 mg/kg) by intraperitoneal injection. 24 hours after injection, the rats to ether anesthesia and the kidney tissue was removed. The hemogenation, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), lactate dehydrogenase (LDH), glutathione S-transferase (GST) activities, glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels were determined through biochemical methods.

Results: The enhanced activities of CAT and SOD at doses higher than 30 mg/kg diazinon, and the increased MDA level at 100 mg/kg dose were observed; whereas, the GSH level was significantly decreased comparing to the control group.No significant changes were observed with regard to GST and LDH activities.

Conclusion: Diazinon induces the production of free radicals and oxidative stress. The enhanced activity of antioxidant enzymes and depleted GSH content is indicative of oxidative tissue injury.

Keywords: Diazinon, Kidney, Antioxidant system, Lipid peroxidation, Rat

Scientific-Research Journal of Shahed University Sixteenth Year, No.83 October-November. 2009

Received: 6/8/2009
Last revised: 17/10/2009
Accepted: 18/10/2009

دوماهنامه علمی- پژوهشی دانشور پزشکی/ دانشگاه شاهد/ آبان ۸۸/ سال شانزدهم/ شماره ۸۳

www.SID.ir