دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وسوم–شماره ۱۲۲
اردیبهشت ۱۳۹۵

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۶
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۰۱/۲۴
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۳۰

بررسی اثر N – استیل سیستئین و ویتامین‌های E و C بر استرس اکسیداتیو القا شده با دیازینون در اریتروسیت‌های موش صحرایی

نویسندگان: محمدصالح عابدینی[1]، مهوش جعفری[2*]، سیدمجتبی میرزاده[1]، فاطمه سالم[3]

۱. دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات دانشجویان، دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله (عج)، تهران، ایران.

۲. استاد بیوشیمی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله(عج)، تهران، ایران.

۳. کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله(عج)، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: مهوش جعفری **E-mail: m.jafari145@gmail.com**

چکیده

مقدمه و هدف: دیازینون به‌عنوان حشره‌کش‌های ارگانوفسفره برای کنترل حشرات در منازل و کشاورزی استفاده می‌شود. در این مطالعه، اثر N – استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های E و C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در اریتروسیت‌های موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعهٔ تجربی، موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به ۸ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه دیازینون (۱۰۰mg/kg)، گروه NAC (۱۶۰mg/kg)، گروه ویتامین E (۱۵۰mg/kg)، گروه ویتامین C (۲۰۰mg/kg)، گروه دیازینون-NAC، گروه دیازینون- E و گروه دیازینون-C که دیازینون را به‌همراه آنتی‌اکسیدان‌ها به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. بعد از ۲۴ ساعت، خون جمع‌آوری و اریتروسیت‌ها تهیه شد. سپس آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) و غلظت‌های گلوتاتیون (GSH) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) توسط روش‌های بیوشیمیایی تعیین شدند.

نتایج: دیازینون سبب افزایش فعالیت SOD ($p<0/001$) و GST ($p<0/01$) و غلظت MDA ($p<0/05$) و کاهش فعالیت آنزیم‌های CAT ($p<0/01$) و LDH ($p<0/01$) و غلظت GSH ($p<0/01$) در اریتروسیت‌ها می‌گردد. تجویز آنتی‌اکسیدان‌ها باعث تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش غلظت MDA و افزایش غلظت GSH اریتروسیت‌ها می‌شود.

نتیجه‌گیری: NAC ازطریق افزایش سنتز گلوتاتیون و ویتامین‌های E و C ازطریق پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد، تا حدی باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون می‌شوند.

واژگان کلیدی: دیازینون، N– استیل سیستئین، ویتامین‌های E و C، استرس اکسیداتیو، اریتروسیت‌های موش صحرایی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سموم ارگانوفسفره‌ها به‌عنوان حشره‌کش به‌طور گسترده در کنترل حشرات استفاده می‌شوند. همچنین این ترکیبات نظیر تابون، سارین و مالاتیون در چندین حملهٔ شیمیایی به‌عنوان گاز اعصاب توسط نیروهای عراقی در طی جنگ ایران و عراق به‌کار رفته است. مسمومیت با این ترکیبات از مشکلات جهانی است و به‌عنوان سومین علت مسمومیت و علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از مسمومیت در ایران می‌باشد. این ترکیبات با فسفریلاسیون اسید آمینهٔ سرین در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز باعث مهار آنزیم و تجمع استیل کولین در سیناپس‌های کولینرژیک شده و وقوع بحران کولینرژیک تشنج و در موارد حاد، ضایعهٔ مغزی و مرگ را به‌دنبال دارد (٤-١). دیازینون از مهم‌ترین حشره‌کش‌های ارگانوفسفره است که برای کنترل انواع حشرات در محصولات کشاورزی استفاده می‌شود. این ترکیب به‌آسانی از روده جذب شده و به‌سرعت در طی چند ساعت جذب می‌شود و در کبد توسط سیستم سیتوکروم P450 ازطریق دسولفوراسیون اکسیداتیو به متابولیت فعال سمی خود دیازوکسون تبدیل می‌گردد (٤،٥).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که بعضی از ارگانوفسفره‌ها ازطریق تولید رادیکال‌های آزاد باعث تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان 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 (٦-٤). باتوجه‌به تأثیر ارگانوفسفره‌ها بر روی سیستم اکسیدان- آنتی‌اکسیدان، احتمالاً استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در جهت درمان این افراد می‌تواند کمک کند (٩-٧). N– استیل سیستئین (NAC) به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و پیش‌ساز گلوتاتیون می‌تواند به‌طور طبیعی اثرات آسیب‌های داخل سلولی رادیکال‌های آزاد را خنثی کند (١٠،١١). ویتامین E (آلفا- توکوفرول) از آنتی‌اکسیدان‌های مهم محلول در چربی موجود در غشای بیولوژیکی است که در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش پراکسیداسیون لیپیدها در غشاء نقش مهمی دارد. ویتامین C (اسید آسکوربیک) آنتی‌اکسیدان محلول در آب از ترکیبات سلولی بر علیه رادیکال‌های آزاد در مایعات خارج سلولی است. این ویتامین می‌تواند ویتامین E اکسیدشده را مجدداً احیا نماید و به‌همراه یکدیگر، از القای استرس اکسیداتیو جلوگیری نمایند (١٢،٩).

چندین مطالعه نشان می‌دهد که ویتامین‌های E و C می‌توانند سمیّت سلولی ارگانوفسفره‌ها را کاهش دهند و از تغییرات بعضی از پارامترهای بیوشیمیایی جلوگیری کنند (١٢،٩). Shadnia و همکاران اثر حفاظتی NAC و آلفا- توکوفرول را در کاهش استرس اکسیداتیو القا شده توسط دیازینون خوراکی بعد از ٤ هفته نشان دادند (١٣،١٤). Pena-Llopis و همکاران نشان دادند که تزریق داخل صفاقی NAC قبل از تجویز دی کلروس به ماهی باعث افزایش غلظت GSH و GST می‌شود (١٥).

با توجه به تنوع ساختمان شیمیایی ارگانوفسفره‌ها و اثرات متفاوت آن‌ها بر روی بافت‌های مختلف و همچنین اثرات مختلف آنتی‌اکسیدان‌ها بر این سمیت، برای درک مکانیسم عمل دقیق ارگانوفسفره‌ها، مطالعات تکمیلی را ضروری می‌نماید. اگرچه چندین مطالعه روی نقش حفاظتی NAC روی کاهش سمیت ارگانوفسفره‌ها انجام شده است (١٥-١٣) و همچنین اثر حفاظتی و درمانی ویتامین‌های E و C بر روی پارامترهای آسیب سلولی در خون و سلول بررسی شده است؛ ولیکن مطالعات اندکی روی تجویز این آنتی‌اکسیدان‌ها و دیازینون به‌صورت داخل صفاقی بر روی بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف انجام شده است (١٦). در ضمن مطالعات انجام‌شده در دوز سم، روش تزریق، نوع بافت، نوع حیوان و مدت زمان تیمار با هم

Archive of SID

www.SID.ir

متفاوت هستند. اریتروسیت‌ها برای حمل اکسیژن، مهم و به‌دلیل غلظت بالای اکسیژن و هموگلوبین برای تولید اکسی رادیکال‌ها و همچنین بالابودن میزان اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشاء آن‌ها، بسیار حساس به استرس اکسیداتیو هستند. همچنین به‌عنوان بافت مهم در تشخیص مسمومیت ارگانوفسفره به‌شمار می‌رود (۱۷). در مطالعهٔ حاضر، نقش NAC و ویتامین‌های E و C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در اریتروسیت‌های موش صحرایی با سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

۱-کلرو ۲، ٤ دی نیترو بنزن (CDNB)، نیتروبلوتترازولیوم (NBT)، دی‌تیو- بیس- نیتروبنزوئیک اسید (DTNB)، تری کلرواستیک اسید (TCA) و دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز با درجهٔ خلوص بالا از شرکت مرک و سیگما (آلمان) خریداری شد. NAC، ویتامین‌های E و C از شرکت سیگما و دیازینون از شرکت Supelco – USA با بیشتر از ۹۸درصد خلوص خریداری شد. دیازینون با غلظت ٤۰۰mg/ml و ویتامین E با غلظت ٦۰۰mg/ml در روغن ذرت و NAC با غلظت ۱٦۰ mg/ml و ویتامین C با غلظت ۲۰۰mg/ml در آب مقطر به‌صورت تازه تهیه شد.

حیوانات

این مطالعه بر روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدودهٔ وزنی ۲۰۰تا۲۵۰ گرم انجام شد. موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله قرار گرفتند. دسترسی حیوانات به آب و غذا آزاد بود. موازین اخلاقی کار با حیوان‌های آزمایشگاهی که موردتأیید کمیتهٔ اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله(عج) بود، هنگام کار با موش‌های آزمایشگاهی رعایت شد.

تیمار حیوانات

در این مطالعهٔ تجربی، حیوانات به‌طور تصادفی به ۸ گروه (در هر گروه ٦ سر) تقسیم شدند: گروه کنترل که روغن ذرت را به‌عنوان حلال دیازینون، گروه دیازینون که ۱۰۰ mg/kg دیازینون، گروه NAC که ۱٦۰ mg/kg NAC، گروه E که ۱۵۰mg/kg ویتامین E، گروه C که ۲۰۰mg/kg ویتامین C، گروه دیازینون- NAC، گروه دیازینون-E و گروه دیازینون-C که به‌طور هم‌زمان دیازینون به‌همراه آنتی‌اکسیدان‌ها را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲٤ ساعت بعد از تزریق، با بیهوش‌نمودن حیوانات به‌وسیلهٔ اتر، خون از قلب حیوانات گرفته شد و به لوله‌های حاوی ۵ میلی‌گرم سیترات سدیم منتقل شد. بعد از جداکردن پلاسما، گلبول‌های قرمز سه‌بار با ۵ برابر حجم در بافر فسفات سالین شسته شده و تا انجام آزمایش در ۷۰°C- نگهداری گردید. در روز آزمایش، گلبول‌های قرمز شسته‌شده با ده‌برابر حجم در آب مقطر دوبار تقطیر سرد لیز نموده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰g در ٤°C سانتریفوژ گردید. از مایع رویی جهت سنجش شاخص‌های موردنظر استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم SOD

فعالیت آنزیم SOD به روش Winterbourn سنجیده شد (۱۸). به حجم مناسبی از گلبول‌های قرمز لیز شده، EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار و NBT ۱/۵ میلی‌مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط‌کردن به مدت ۵ دقیقه در ۳۷°C قرار گرفت. سپس ریبو فلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰٦۷ مولار با pH=۷/۸ اضافه و به مدت ۱۲ دقیقه در درجهٔ حرارت اتاق قرار گرفت. جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵٦۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه برحسب واحد بر گرم هموگلوبین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم CAT: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Abei استفاده شد (۱۹). واکنش

Archive of SID

www.SID.ir

با اضافه‌کردن H2O2 ۳۰ میلی‌مولار به ۵۰ میکرولیتر از گلبول‌های قرمز لیز شده در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار pH =۷ شروع شد. سپس جذب را در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲٤۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت ویژه برحسب واحد بر گرم هموگلوبین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت GST

اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم به روش Habig انجام شد (۲۰). یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷/٤ شامل EDTA یک میلی‌مولار، GSH ۲۰ میلی‌مولار و CDNB ۲۰ میلی‌مولار است. واکنش با اضافه‌کردن حجم معینی از گلبول‌های قرمز لیز شده شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۳٤۰ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت گردید. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر گرم هموگلوبین بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH): اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز با استفاده از کیت پارس آزمون انجام شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه را با یک میلی‌لیتر از محلول مخلوط‌شده ۱و۲ موجود در کیت اضافه و اختلاف جذب بین صفر و ۳ دقیقه در طول موج ۳٤۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم برحسب واحد بر گرم هموگلوبین محاسبه گردید.

سنجش میزان مالون دی آلدئید (MDA):

برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها از روش Kei استفاده شد (۲۱). به ۵۰۰ میکرولیتر گلبول‌های قرمز لیز شده ۱/۵ میلی‌لیتر TCA ۱۰درصد اضافه شد. به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی را برداشته و ۲ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک ۰/٦۷درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار داده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر n– بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در ٤۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس جذب محلول رویی صورتی‌رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از ۱و۱٬و۳و۳٬ تترا اتوکسی پروپان به‌عنوان استاندارد تعیین شده و غلظت مالون دی آلدئید بر حسب نانومول بر گرم هموگلوبین محاسبه شد. محلول استاندارد MDA در غلظت‌های ۲۰-۰/۲ میکرومولار در اسیدسولفوریک ۱۰درصد تهیه شد.

سنجش میزان GSH

برای سنجش میزان گلوتاتیون بافت از روش Tietz استفاده شد (۲۲). ۱۰۰ میکرولیتر از گلبول‌های قرمز لیز شده با ۱۰ میکرولیتر اسید سولفوسالسیلیک ۵درصد مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجهٔ سانتی‌گراد با دور ۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته به ۸۱۰ میکرولیتر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه‌کردن ۹۰ میکرولیتر DTNB ۰/٤درصد محلول در سیترات سدیم ۱ درصد واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در طول موج ٤۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوتاتیون ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول استاندارد گلوتاتیون در غلظت‌های ۲۵تا۲۰۰ میکرومولار تهیه شد ومنحنی استاندارد گلوتاتیون رسم گردید و غلظت گلوتاتیون برحسب نانومول بر گرم هموگلوبین محاسبه گردید.

تعیین غلظت هموگلوبین

۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های گلبول قرمز را با ۵ میلی‌لیتر محلول درابکینز (۰/۲ گرم پتاسیم فری‌سیانید [K3Fe (CN6)]، ۰/۰۵ گرم KCN و ۱ گرم NaHCO3 در یک لیتر) مخلوط کرده و با دستگاه هموگلوبینومتری میزان غلظت هموگلوبین برحسب g/dl به‌دست آمد (۲۳).

Archive of SID

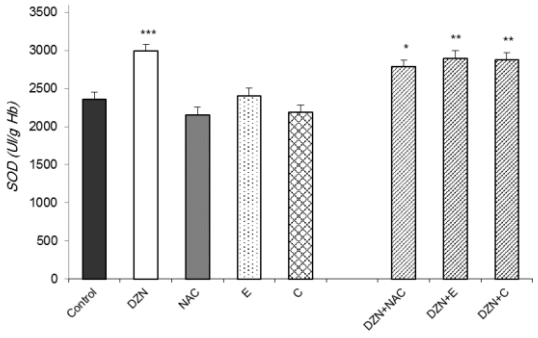
www.SID.ir

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

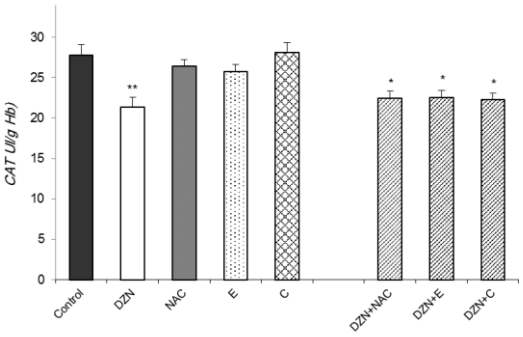
تجزیه‌وتحلیل اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار InStat به‌صورت آنالیز واریانس یک‌طرفه به‌همراه تست توکی انجام شد. $p<۰/۰۵$ مرز معنی‌داربودن اطلاعات درنظر گرفته شد و نتایج به‌صورت Mean ± SEM بیان شد.

نتایج

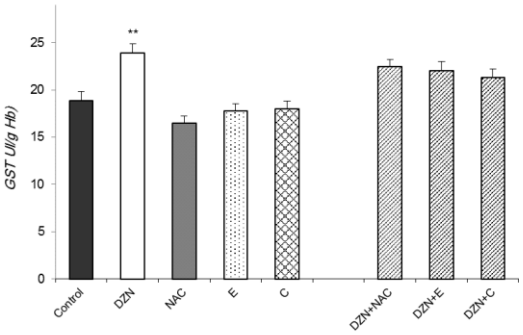
نتایج حاصل از اثر دیازینون، NAC و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و LDH اریتروسیت‌ها در نمودارهای ٤-١ نشان می‌دهد که دیازینون باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های SOD ($p<۰/۰۰۱$) و GST ($p<۰/۰۱$) و کاهش فعالیت آنزیم‌های CAT و LDH ($p<۰/۰۱$) در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. همچنین تجویز دیازینون با NAC و یا ویتامین‌های C و E باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD و کاهش فعالیت آنزیم CAT ($p<۰/۰۵$) در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد. تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گروه‌های دیازینون- NAC، دیازینون- ویتامین E و دیازینون- ویتامین C در مقایسه با گروه دیازینون معنی‌دار نیست.



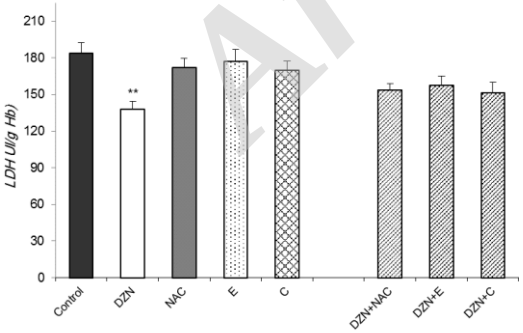
نمودار ۱. اثر دیازینون، N- استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) اریتروسیت‌های موش صحرایی بعد از ٢٤ ساعت. $p<۰/۰۵^{*}$ و $p<۰/۰۱^{**}$ $p<۰/۰۰۱^{***}$ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.



نمودار ۲. اثر دیازینون، N- استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) اریتروسیت‌های موش صحرایی بعد از ٢٤ ساعت. $p<۰/۰۵^{*}$ و $p<۰/۰۱^{**}$ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.



نمودار ۳. اثر دیازینون، N- استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم S- گلوتاتیون ترانسفراز (GST) اریتروسیت‌های موش صحرایی بعد از ٢٤ ساعت. $p<۰/۰۱^{**}$ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.

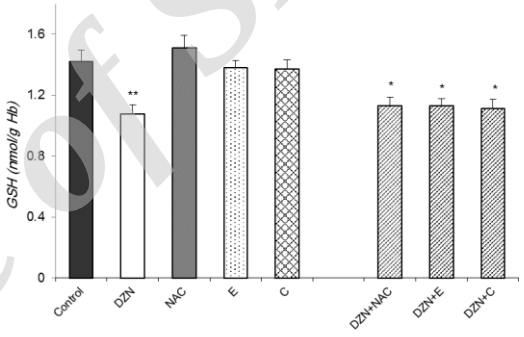


نمودار ٤. اثر دیازینون، N- استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) اریتروسیت‌های موش صحرایی بعد از ٢٤ ساعت. $p<۰/۰۱^{**}$ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.

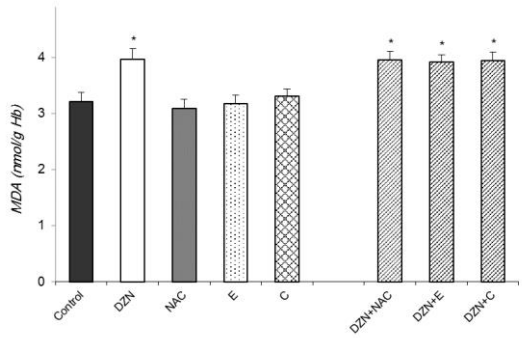
Archive of SID

www.SID.ir

نتایج حاصل از اثر دیازینون، NAC و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب باهم بر غلظت‌های GSH و MDA اریتروسیت‌ها در نمودارهای ٦-٥ نشان می‌دهد که دیازینون باعث کاهش معنی‌دار غلظت GSH ($p<۰/۰۱$) و افزایش معنی‌دار غلظت MDA ($p<۰/۰۵$) و همچنین تجویز دیازینون با NAC و یا ویتامین‌های C و E باعث کاهش غلظت GSH و افزایش غلظت MDA ($p<۰/۰۵$) در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. کاهش غلظت MDA و افزایش غلظت GSH در گروه‌های دیازینون-NAC، دیازینون- ویتامین E و دیازینون- ویتامین C در مقایسه با گروه دیازینون معنی‌دار نیست.



نمودار ۵. اثر دیازینون، N– استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر روی غلظت گلوتاتیون (GSH) اریتروسیت‌های موش صحرایی بعد از ۲٤ ساعت. $p<۰/۰۵^{*}$ و $p<۰/۰۱^{**}$ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.



نمودار ۶. اثر دیازینون، N– استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر روی غلظت مالون دی آلدئید (MDA) اریتروسیت‌های موش صحرایی بعد از ۲٤ ساعت. $p<۰/۰۵^{*}$ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.

بحث

بعضی از ارگانوفسفره‌ها باعث تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند (٦-١). رادیکال‌های آزاد قادرند با ماکرومولکول‌های مختلف در بدن نظیر پروتئین، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک اتصال و باعث تخریب ساختمان و عمل آن‌ها شوند. رادیکال‌های آزاد در بدن توسط آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر SOD، CAT و GST و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند GSH خنثی می‌شود. آنزیم SOD آنیون‌های سوپراکسید را به H_2O_2 تبدیل می‌کند. آنزیم CAT باعث خنثی‌شدن H_2O_2 و تبدیل آن به آب و اکسیژن مولکولی می‌شود (۷،۸). GST از آنزیم‌های کمکی در سیستم آنتی‌اکسیدان است که باعث اتصال GSH به مواد سمی شده و آن‌ها را به ترکیبات محلول‌تر با سمیت کمتر تبدیل می‌کند (۲۰،۷). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و GST و کاهش فعالیت آنزیم CAT و غلظت GSH در اریتروسیت‌های موش صحرایی می‌شود. افزایش فعالیت SOD ناشی از تجویز دیازینون بیانگر فعال‌شدن سیستم دفاعی آنزیمی سلول برای خنثی‌نمودن رادیکال‌های آزاد تولیدشده است. افزایش فعالیت SOD باعث کاهش رادیکال‌های سوپراکسید و افزایش میزان H2O2 شده و کاهش فعالیت آنزیم CAT منجر به افزایش غلظت H2O2 در این بافت شده که درنهایت ممکن است موجب آسیب بافتی شود. افزایش GST در اثر تزریق دیازینون نشان‌دهندهٔ افزایش دفاع بدن در مقابل این سم است که با افزایش مصرف GSH همراه است. همچنین عملکرد مستقیم GSH برای حذف رادیکال‌های آزاد سبب کاهش GSH در این بافت می‌شود که همراه با آسیب بافتی و القای استرس اکسیداتیو می‌باشد (۲٥،۲٤). تجویز NAC و ویتامین‌های E و C تا حدی سبب کاهش فعالیت آنزیم SOD و افزایش فعالیت آنزیم CAT و غلظت گلوتاتیون و کاهش فعالیت آنزیم GST در مقایسه با گروه دیازینون می‌گردد. تغییر این پارامترها بعد از استفاده از NAC و ویتامین‌های

Archive of SID

www.SID.ir

E و C، احتمالاً می‌تواند ناشی از عمل NAC به‌عنوان پیش‌ساز گلوتاتیون و شرکت آن در سنتز این آنتی‌اکسیدان سلولی و همین‌طور عملکرد مستقیم ویتامین‌های C و E در حذف رادیکال‌های آزاد باشد (۹، ۲۶).

چند مطالعه نشان دادند که دیازینون سبب افزایش فعالیت SOD و CAT کبد و کلیه و قلب و تجویز هم‌زمان NAC و ویتامین‌های E و C باعث کاهش فعالیت این آنزیم‌ها می‌شود (۳۱،۱۶–۲۷). Uner و همکاران نشان دادند تجویز فنتون به‌تنهایی و به‌همراه NAC روی فعالیت SOD و CAT تأثیری ندارد (۳۲). چندین مطالعه نشان دادند که تجویز ارگانوفسفره‌های مختلف باعث افزایش فعالیت GST و کاهش گلوتاتیون در بافت‌های مختلف شده و تجویز NAC و ویتامین‌های E و C باعث بهبود آن می‌شود (۳۲،۵).

در این مطالعه دیازینون سبب کاهش فعالیت LDH و افزایش MDA اریتروسیت‌ها شده و تجویز NAC و ویتامین‌های C و E تا حدی از تغییرات این پارامترها جلوگیری می‌کند. MDA از مهم‌ترین بیومارکرهای پراکسیداسیون لیپیدها است و افزایش غلظت MDA نشان‌دهندهٔ اختلال در مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی و آنزیمی است (۳۳). رادیکال‌های آزاد تولیدشده با هموگلوبین واکنش داده و باعث ناپایداری هِم و ساختمان گلوبین می‌شوند که آهن آزادشده، نقش مهمی در سنتز متابولیت‌های فعال اکسیژن داشته و ترکیبات آهن و آهن آزاد می‌توانند فرایند پراکسیداسیون لیپیدها را باعث شوند (۳۴). افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء ناشی از افزایش تولید رادیکال‌های آزاد توسط دیازینون، باعث تراوش آنزیم‌های سیتوزولی مثل LDH می‌شود (۲۵). کاهش فعالیت آنزیم LDH احتمالاً ناشی از افزایش آسیب بافتی و تراوش آن به داخل سرم می‌باشد (۳۵). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به‌سبب احیاء رادیکال‌های آزاد تولیدشده توسط دیازینون و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، مانع از آزادشدن آنزیم LDH می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت LDH در بافت‌های طحال، مغز، قلب، کبد و کلیه بعد از تجویز دیازینون و پاراکسون کاهش می‌یابد (۲۴،۲۵)؛ ولیکن مطالعات دیگر، افزایش فعالیت LDH را در کبد، پانکراس، مغز و قلب پس از تجویز دیازینون نشان می‌دهد (۳۸–۳۶)، همچنین مطالعات دیگر نشان می‌دهد که تجویز دیازینون و دی‌کلروس (Dichlorvos) باعث افزایش فعالیت LDH و ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف موش صحرایی می‌گردد و تجویز ویتامین‌های C و E باعث بهبود فعالیت این آنزیم‌ها می‌شود (۴۰،۳۹). یک مطالعه نشان داد که تجویز دیازینون برای ۱۴ روز باعث افزایش فعالیت LDH کبد شده و تجویز ترکیبی با ویتامین‌های A، C و E کاهش فعالیت آنزیم را به‌دنبال دارد (۴۱). چندین مطالعه نشان دادند که تجویز ارگانوفسفره‌های مختلف نظیر دیازینون، فن تیون، کلروپیریفوس و آندوسولفان باعث افزایش غلظت MDA شده و تجویز NAC و ویتامین‌های E و C باعث کاهش غلظت آن می‌شود (۴۳،۹). Yurumez و همکاران نشان دادند که تجویز NAC یک ساعت قبل و بعد از مسمومیت با فن‌تیون باعث ذخیرهٔ گلوتاتیون و کاهش MDA خون در هر دو حالت حفاظتی و درمانی می‌شود (۴۴).

نتیجه‌گیری

نتایج پیشنهاد می‌کند که دیازینون با تولید رادیکال‌های آزاد و تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش لیپید پراکسیداسیون و کاهش غلظت گلوتاتیون باعث القاء استرس اکسیداتیو در اریتروسیت‌ها می‌شود. NAC ازطریق افزایش سنتز گلوتاتیون و ویتامین‌های E و C ازطریق پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد، تا حدی باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون می‌شوند.

Archive of SID

www.SID.ir

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم است از فریده ایزدی، مریم صالحی، جواد رسولی و حسین مهدوی‌نسب جهت یاری در مراحل اولیهٔ مطالعه تشکر نمایند. این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله (عج) انجام شده است که بدین‌وسیله از کلیهٔ مسئولین مرکز مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

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. Romanian Journal of Morphology and Embryology. 2013; 54: 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, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT). 2014; 8: 39-48.
3. Hajigholamali M, Jafari M, Hajihossaini R, Asgari A, Abbasnezhad M, Salehi M. Evaluation of oxidative stress biomarkers of rat liver exposed to acute doses of diazinon. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences. 2012; 15: 20-29. (Full Text in Persian)
4. Ahmadi S, Jafari M, Asgari A, Salehi M. Acute effect of diazinon on the antioxidant system of rat's heart tissue. Kowsar Medical Journal. 2011; 16: 87-93. (Full Text in Persian)
5. Oruc E. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of Cyprinus carpio (L.). Environmental Toxicology. 2010; 26: 571-8.
6. Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. Food and Chemical Toxicology. 2010; 48: 3345–53.
7. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. Nutrition Reviews. 2012; 70: 25765.
8. Rafieian-Kopaei M, Baradaran A, Rafieian M. Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. Journal of Research in Medical Sciences. 2013; 18: 629.
9. Yilmaz N, Yilmaz M, Altuntas I. Diazinon-induced brain toxicity and protection by vitamins E plus C. Toxicology and Industrial Health. 2012; 28: 51-7.
10. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. Current Opinion in Pharmacology. 2007; 7: 355-9.
11. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. Pharmacology and Therapeutics. 2014; 141: 150-9.
12. Abdel-Monem UM, Qar H, Attwa RA. Detoxification of dietary diazinon by clay, vitamin C and vitamin E in rabbits. World Applied Sciences Journal. 2012; 19: 144-52.
13. Shadnia S, Abdollahi M, Sasanian G. Effects of N-acetyl-cysteine and tocopherol on diazinon toxicity. Current Medicinal Chemistry. 2003; 10: 2705-8.
14. 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. Toxicology mechanisms and methods. 2007; 17: 109-15.
15. 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. Aquatic Toxicology. 2003; 65:337–60.
16. 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. Journal of Rafsenjan University of Medical Sciences. 2014; 12: 895-906. (Full Text in Persian)
17. Kurata M, Suzuki M, Agar NS. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. 1993; 106B:477–87.

Archive of SID

www.SID.ir

18. Winterbourn C, Hawkins R, Brian M, Carrell R. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 1975; 85: 337.
19. Aebi H. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. 1984; 105: 121-6.
20. Habig WH, Jakoby WB. Glutathion S-transferases (rat and human). Methods in Enzymology. 1981; 77: 218-31.
21. Kei S. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clinica Chimica Acta. 1978; 90: 37-43.
22. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. Analytical Biochemistry 1969; 27: 502-22.
23. Van Kampen EJ, Zljlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. Advances in Clinical Chemistry. 1965; 8: 141–87.
24. 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. Toxicology mechanisms and methods. 2012; 22: 638-47.
25. 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. Environmental toxicology and pharmacology. 2012; 34: 876–87.
26. Mostafalou S, Abdollahi M, Eghbal MA, Saeedi Kouzehkonani N. Protective effect of NAC against malathion-induced oxidative stress in freshly isolated rat hepatocytes. Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2012; 2: 79-88.
27. 3. Tahmasebi K, Jafari M, Ahmadi A. Evaluation of oxidative stress biomarkers in rat heart exposed to diazinon and vitamins E and C. Quarterly of the Horizon of Medical Sciences 2015; 21(1):13-9. (Full Text in Persian)
28. Abdallah FB, Gargouri B, Bejaoui H, Lassoued S, Ammar-Keskes L. Dimethoate-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. Environmental Toxicology. 2011; 26(3): 287-91.
29. Elzoghby RR, Hamuoda AF, Abdel-Fatah A, Farouk M. Protective role of vitamin C and green tea extract on malathion-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. American Journal of Pharmacology and Toxicology. 2014; 9(3): 177-88.
30. Salehi M, Jafari M, Asgari A. Response of liver antioxidant defense system to vitamins E and C against diazinon toxicity in rat. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2015; 21 (6): 1081-9. (Full Text in Persian)
31. Tahmasebi K, Jafari M, Izadi F. Study of the protective role of N-acetyl cysteine against acute diazinon-induced oxidative stress in rat brain and heart. Journal of Ardabil University of Medical Sciences 2015; 15(2): 116-27. (Full Text in Persian)
32. Uner N, Sevgiler Y, Durmaz H, Piner P, Cinkiloğlu E. N-Acetylcysteine provides dose-dependent protection against fenthion toxicity in the brain of Cyprinus carpio L. Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology. 2009; 150: 33-8.
33. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2006; 64: 178–89.
34. Pradnan D, Weser M, Lumley – Sapnski K, Frazier D, Kemper S, Williamson P, et al. Peroxidation – induced perturbation of erythrocyte lipid organization. Biochimica Biophysica Acta. 1990; 1023: 398-404.
35. 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 University of Medical Sciences. 2012; 14: 18-23.
36. Abdou HM, ElMzoudy RH. Oxidative damage, hyperlipidemia and histological alterations of cardiac and skeletal muscles induced by different doses of diazinon in female rats. Journal of Hazardous Materials. 2010; 182: 273–8.
37. 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. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2010; 96: 101–7.
38. Gokalp O, Buyukvanl B, Cicek E, Ozer MK, Koyu A, Altuntas I, et al. The effects of diazinon on pancreatic damage and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2005; 81: 123–8.
39. Oral B, Guney M, Demirin H, Ozguner M, Giray SG, Take G, et al. Endometrial damage and apoptosis in rats induced by dichlorvos and ameliorating effect of antioxidant Vitamins E and C. Reproductive Toxicology. 2006; 22: 783–90.

Archive of SID

www.SID.ir

40. Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Kalender S, Durak D, Bayrakdar F, Kalender Y. The effects of organophosphate insecticide diazinon on malondialdehyde levels and myocardial cells in rat heart tissue and protective role of vitamin E. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2006; 86: 93–8.
41. Shokrzadeh M, Shobi S, Attar H, Shayegan S, Payam SS, Ghorbani F. Effect of vitamin A, E and C on liver enzyme activity in rats exposed to organophosphate pesticide diazinon. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2012; 15: 936-41.
42. Saxena R, Garg P. Vitamin E provides protection against in vitro oxidative stress due to pesticide (Chlorpyrifos and Endosulfan) in goat RBC. GERF Bulletin of Biosciences. 2010, 1: 1-6.
43. Nisar NA, Sultana M, Waiz HA, Para PA, Baba NA, Zargar FA, et al. Experimental study on the effect of vitamin C administration on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rats exposed to chlorpyriphos and lead acetate. Veterinary World. 2013; 6: 461-6
44. Yurumez Y, Cemek M, Yavuz Y, Birdane YO, Buyukokuroglu ME. Beneficial effect of N-acetylcysteine againts organophosphate toxicity in mice. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2007; 30: 490–494.

Archive of SID

www.SID.ir