

ارزیابی بیومارکرهای استرس اکسیداتیو کبد موش صحرایی بعد از مواجهه با دوزهای حاد دیازینون

منصوره حاجی غلامعلی*
 دکتر مهوش جعفری**
 دکتر رضا حاجی حسینی***
 دکتر علیرضا عسگری****
 مریم عباس نژاد*
 مریم صالحی****

* کارشناس ارشد بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) تهران
 ** دانشیار بیوشیمی مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) تهران
 *** استادیار بیوشیمی واحد علوم پایه دانشگاه پیام نور تهران
 **** استاد فیزیولوژی مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزش دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) تهران
 ***** کارشناس ارشد بیوشیمی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) تهران

آدرس نویسنده مسؤول: تهران، بلوار ارتش، سه راه اراج، دانشکده پزشکی دانشگاه بقیه ...، گروه بیوشیمی

تلفن ۰۲۱-۲۲۲۸۹۹۴۲ و ۰۹۱۲۳۰۷۹۷۳۲

Email: jafari@bmsu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۱۴

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۵

* چکیده

زمینه: دیازینون یکی از مهم‌ترین ارگانوفسفره‌هایی است که به طور وسیع در کشاورزی استفاده می‌شود. بعضی از ارگانوفسفره‌ها سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و تخریب سیستم آنتی اکسیدان بدن می‌شوند.

هدف: مطالعه به منظور تعیین اثر دیازینون بر روی سیستم اکسیدان - آنتی اکسیدان کبد موش صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) انجام شد. ۲۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند، یک گروه شاهد (حلال دیازینون) و سه گروه آزمایش که دوزهای مختلف دیازینون (۳۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. موش‌ها ۲۴ ساعت پس از تزریق بی‌هوش و بافت کبد آن‌ها جدا شد. سپس فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکوتایون S - ترانسفراز (GST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) و همچنین غلظت گلوکوتایون (GSH) و مالون دی آلدئید (MDA) توسط روش‌های بیوشیمیایی تعیین شد. داده‌ها با آزمون‌های آماری آنالیز واریانس و توکی تحلیل شدند.

یافته‌ها: افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GST و میزان MDA در دوزهای بالاتر از ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دیازینون مشاهده شد، در حالی که میزان GSH در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت. فعالیت LDH در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P < 0/01$).

نتیجه‌گیری: دیازینون به طور احتمالی باعث القا تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو وابسته به دوز می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان همراه با کاهش غلظت GSH نشان‌دهنده آسیب اکسیداتیو بافت کبد است. افزایش MDA با پراکسیداسیون غشای کبد همراه است.

کلیدواژه‌ها: دیازینون، استرس اکسیداتیو، کبد موش صحرایی

* مقدمه

می‌کنند.^(۱) به دلیل دسترسی آسان و درجه سمی بالای ارگانوفسفره‌ها، میزان بروز مسمومیت‌های تصادفی و خودکشی وسیع بوده و سالانه مسؤول حدود صد هزار مسمومیت در دنیا است. در ایران این ترکیب‌ها یکی از

دیازینون ارگانوفسفره مهمی است که به عنوان حشره‌کش علیه آفت‌های نباتی و حشره‌های منازل استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر از این سم به طور وسیع جهت کنترل کرم ساقه خوار برنج نیز استفاده

* مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) بر روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد. موش‌ها در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه... تحت شرایط طبیعی نور، تاریکی، غذا و آب قرار گرفتند. موازین اخلاقی کار با حیوان‌های آزمایشگاهی که مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) بود، هنگام کار با موش‌های آزمایشگاهی رعایت شد.

دیازینون با خلوص ۱۰۰ درصد از شرکت سوپلکو امریکا خریداری و محلول ذخیره با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در روغن ذرت به صورت تازه تهیه شد.

۲۸ سر موش صحرایی به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه شاهد که روغن ذرت را به عنوان حلال و ۳ گروه دیگر دوزهای مختلف دیازینون (۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت پس از تزریق، با بی‌هوش کردن موش‌ها به وسیله اتر، بافت کبد خارج و به نیتروژن مایع منتقل شد. در روز آزمایش، بافت‌های منجمد شده به دقت توزین و به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین هم‌وزنه شدند. پس از آن نمونه‌ها با دور ۱۲۰۰۰g در ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رویی جهت سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی مورد نظر استفاده شد.

فعالیت SOD با استفاده از روش ورثینگتون سنجیده شد.^(۱۲) حجم مناسبی از بافت هم‌وزن‌یافته شده با ۰/۱ مولار EDTA در ۰/۳ میلی مولار سدیم سیانید و ۱/۵ میلی مولار نیتروبلوتتراز ولیوم (NBT) در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس ریپرفلاوین ۰/۱۲ میلی مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار با PH=۷/۸ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. جذب طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت و فعالیت ویژه برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

فعالیت آنزیم کاتالا با استفاده از روش ابی و با دنبال نمودن تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.^(۱۳) اتانول مطلق (۰/۱ میلی‌لیتر

علل مرگ و میر ناشی از مسمومیت‌ها هستند.^(۳) ارگانوفسفره‌ها با فسفریلاسیون اسید آمینه سرین در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز باعث مهار آنزیم می‌شوند که به افزایش استیل کولین و وقوع بحران کولینرژیک، تشنج و در موارد حاد ضایعه مغزی و مرگ منجر می‌شوند.^(۴) یکی دیگر از مکانیسم‌های عمل این ترکیب‌ها تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در سیستم آنتی اکسیدان بدن است.^(۴)

در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیندها موجب استرس اکسیداتیو و متعاقب آن آسیب‌های جدی سلولی می‌شود. کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از آنزیم‌های کلیدی سیستم آنتی اکسیدان هستند و گلوکوتیون (GSH) به عنوان فراوان‌ترین آنتی اکسیدان غیر آنزیمی داخل سلول، جهت پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند.^(۶)

مطالعه بر روی بعضی ارگانوفسفره‌ها نشان می‌دهد که این ترکیب‌ها با تولید رادیکال‌های آزاد باعث تغییر در سیستم‌های آنتی اکسیدان سلول و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شوند.^(۴) مالاتیون باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مثل SOD و CAT در اریتروسیت‌ها، بزاق و پلاسما و نواحی مختلف مغز نظیر هیپوکامپ و کورتکس می‌شود.^(۸) نتایج مشابهی با مطالعه اثر لیندان بر قلب موش صحرایی به دست آمده است.^(۱۰) از طرف دیگر اثر سمی کلرپیریفوس و دیازینون بر سیستم مرکزی اعصاب را به القای استرس اکسیداتیو نسبت می‌دهند.^(۱۱) تفاوت در نوع و گونه مورد بررسی، دوز و زمان مواجهه، وجه تمایز مطالعه‌های مختلف است. به دلیل تنوع استخلاف‌ها در ساختمان شیمیایی ارگانوفسفره‌ها و اثرات متفاوت بر روی بافت‌های مختلف، مطالعه‌های تکمیلی جهت درک مکانیسم عمل این ترکیب‌ها ضروری است. مطالعه اثر دیازینون بر روی سیستم آنتی اکسیدان بافت‌ها در موجود زنده (in vivo) بسیار اندک است. مطالعه حاضر به منظور تعیین اثر تجویز دوزهای حاد دیازینون بر روی سیستم اکسیدان- آنتی اکسیدان کبد موش صحرایی انجام شد.

(MDA) از روش Satho استفاده شد.^(۱۶) به حجم مناسبی از بافت هموژنه، اسید تری کلرواستیک (TCA) ده درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از جدا کردن مایع رویی، اسید تیوباریتوریک ۰/۶۷ درصد اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش داده شد. سپس n- بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰g سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. سپس منحنی استاندارد MDA با استفاده از ۱، ۳، ۱، ۳ و ۳ تترائتوکسی پروپان رسم و از روی این منحنی، میزان غلظت MDA برحسب نانومول در میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

برای سنجش میزان پروتئین از روش برادفورد استفاده شد.^(۱۷) 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 شد. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب قرائت و غلظت پروتئین نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد پروتئین با استفاده از محلول یک میلی گرم در میلی لیتر آلبومین سرم گاوی محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار این استات و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و توکی تحلیل و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند.

* یافته‌ها:

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به طور معنی داری در همه دوزهای دیازینون در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. افزایش فعالیت آنزیم SOD در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم دیازینون در مقایسه با دوزهای ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن معنی دار بود ($P < 0.001$). افزایش فعالیت CAT به طور معنی دار در دوزهای بالاتر از ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (نمودارهای شماره ۱ و ۲).

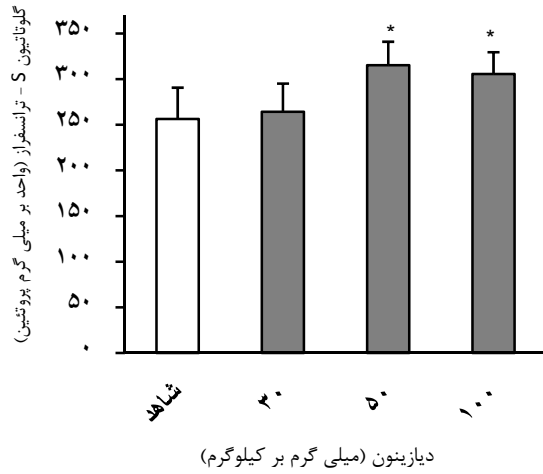
در میلی لیتر) به حجم معینی از عصاره بافتی اضافه و به مدت نیم ساعت در یخ انکوبه شد. سپس به آن تریتون X-100 ده درصد با غلظت نهایی یک درصد اضافه و این محلول جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. واکنش با اضافه کردن H_2O_2 ۳۰ میلی مولار به حجم مناسبی از عصاره نمونه بافتی در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با $PH=7$ شروع شد. سپس جذب طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت و فعالیت ویژه برحسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

فعالیت آنزیم GST نیز با روش هایبگ سنجیده شد.^(۱۴) محلول واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با $PH=7.4$ ، EDTA یک میلی مولار، GSH ۲۰ میلی مولار و ۱-کلرو-۲،۴-دی نیترو بنزن (CDNB) ۲۰ میلی مولار بود. واکنش با اضافه کردن حجم معینی از عصاره بافتی شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر طی ۵ دقیقه قرائت و فعالیت ویژه برحسب واحد بر میلی گرم پروتئین بیان شد.

فعالیت LDH توسط کیت پارس آزمون اندازه گیری شد، اساس این اندازه گیری بر پایه احیای پیرووات به لاکتات بود که در حضور $NADH_2$ انجام شد. جذب نمونه‌ها طی ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت و فعالیت ویژه برحسب واحد بر میلی گرم پروتئین بیان شد. برای تعیین میزان GSH بافت از روش تیتز استفاده^(۱۸) و غلظت مناسبی از نمونه هموژنه با اسید سولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط شد. نمونه در ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰g سانتریفوژ و حجم مناسبی از محلول فوقانی به بافر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس واکنش با اضافه کردن معرف دی تیو- بیس- نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) ۰/۰۴ درصد در سیترات سدیم ۱ درصد شروع شد. تغییرات جذب در ۴۱۲ نانومتر طی ۵ دقیقه قرائت شد. منحنی استاندارد با استفاده از محلول گلوکاتایون یک میلی گرم در میلی لیتر رسم و غلظت گلوکاتایون نمونه‌ها محاسبه شد.

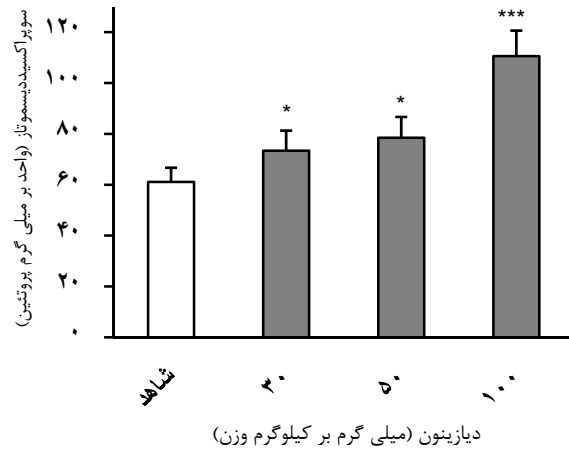
برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها

نمودار ۳- فعالیت آنزیم گلوکوتایون S- ترانسفراز کبد در حضور دوزهای مختلف دیازینون بعد از ۲۴ ساعت



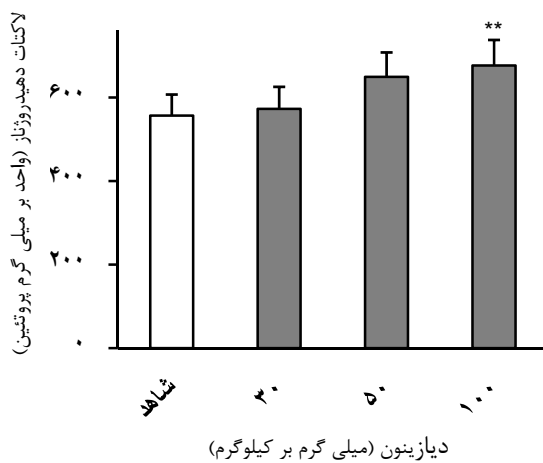
* $P < 0.05$ در مقایسه با گروه شاهد

نمودار ۱- فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کبد در حضور دوزهای مختلف دیازینون بعد از ۲۴ ساعت



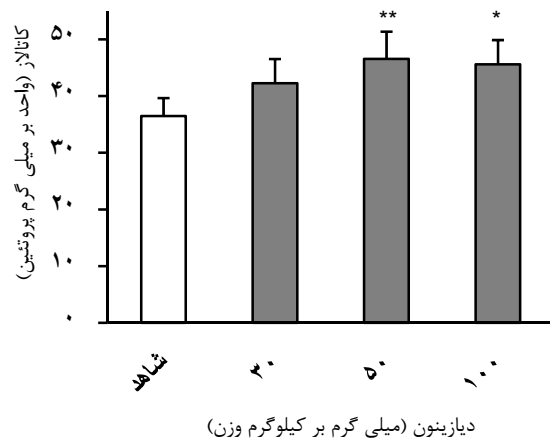
* $P < 0.05$
*** $P < 0.001$ در مقایسه با گروه شاهد

نمودار ۴- فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز کبد در حضور دوزهای مختلف دیازینون بعد از ۲۴ ساعت



** $P < 0.01$ در مقایسه با گروه شاهد

نمودار ۲- فعالیت آنزیم کاتالاز کبد در حضور دوزهای مختلف دیازینون بعد از ۲۴ ساعت



* $P < 0.05$
** $P < 0.01$ در مقایسه با گروه شاهد

کاهش غلظت GSH و افزایش MDA در دوزهای بالاتر از ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم دیازینون در مقایسه با گروه شاهد معنی دار بود، تغییرات غلظت GSH و MDA در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم معنی دار بود ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱).

فعالیت GST در دوزهای بالاتر از ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم دیازینون در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی دار افزایش یافت و افزایش فعالیت آنزیم GST در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم دیازینون در مقایسه با دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم معنی دار بود ($P < 0.05$). افزایش فعالیت آنزیم LDH کبد در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه شاهد ($P < 0.01$) و دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم ($P < 0.05$) معنی دار بود (نمودارهای شماره ۳ و ۴).

جدول ۱- اثر دوزهای مختلف دیازینون بر غلظت گلوکوتایون و مالون دی آلدئید

دیازینون (mg/kg)			شاهد	شاخص گروه nmol/mg (protein)
۱۰۰	۵۰	۳۰		
۸۳/۲۵۹±۷/۳۰**	۸۹/۳۰±۶/۲۳۵*	۹۸/۴۳±۷/۵۵۹	۱۰۳/۶۶۵±۹/۵۸۵	گلوکوتایون
۹/۰۷۳±۰/۸۸**	۸/۵۹۸±۱/۰۴۱*	۷/۰۵۶۶±۰/۹۳۵	۶/۴۴۴±۱/۱۹۷	مالون دی آلدئید

* $P < 0.05$ و ** $P < 0.01$ در مقایسه با گروه شاهد

* بحث و نتیجه گیری:

بر کیلوگرم دیازینون به طور معنی داری افزایش یافت. فعالیت این آنزیم با میزان مرگ سلولی و لیز شدن سلولها رابطه مستقیم دارد.^(۲۹) با توجه به این که با لیز شدن سلول، تراوشهای سلولی به داخل خون می ریزد و افزایش آنزیم در بافت می تواند ناشی از افزایش سنتز LDH یا آسیب شدید بافتی باشد، به طوری که محتویات به طور کامل وارد خون نشده باشد. لیکن برای ارایه دلیل دقیق تر به مطالعه های پیش تری نیاز است. مطالعه های حیوانی نیز افزایش فعالیت LDH پس از مسمومیت با سیپرترین، دیازینون، لیندون و کلرپیریفوس را نشان داده اند.^(۳۰-۳۳) در حالی که تجویز اندوسولفان به ماهی، موجب کاهش فعالیت LDH کبد و عضله اسکلتی شده است.^(۳۴) نتایج مختلف می تواند ناشی از اختلاف در غلظت سم مورد استفاده، نوع بافت و حتی ایزوآنزیم های خاص LDH باشد.

آنزیم GST با استفاده از GSH، سبب افزایش حلالیت و دفع طیف وسیعی از سموم و ترکیب های الکتروفیل از سلول می شود. بنابراین نقش مهمی در محافظت بافتها بر علیه آسیب و استرس اکسیداتیو دارد.^(۳۵) در این مطالعه فعالیت آنزیم GST در دوزهای بالاتر از ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم دیازینون افزایش یافت. افزایش GST در اثر تزریق دیازینون نشان دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل این سم و دفع سریع تر آن است. مطالعه های دیگر نیز نشان داده اند که به دنبال تجویز بعضی از ارگانوفسفره ها، فعالیت

این مطالعه نشان داد که تجویز دیازینون به صورت حاد باعث افزایش فعالیت آنزیم های SOD و CAT کبد می شود. کبد اولین اندام مهم برای جذب و متابولیسم مواد شیمیایی و سموم است. آسیب سلولی ناشی از دیازینون که افزایش رادیکال های آزاد را به دنبال دارد، سبب فعال شدن سیستم های دفاعی آنتی اکسیدانی می شود. یکی از این سیستمها که قادر به پاک سازی رادیکال های آزاد است، آنزیم های SOD و CAT می باشد.^(۶) آنزیم SOD باعث تبدیل رادیکال سوپر اکسید به H_2O_2 می شود و آنزیم CAT باعث خنثی شدن H_2O_2 و تبدیل آن به H_2O و O_2 می شود.^(۱۸،۶) افزایش فعالیت SOD در این مطالعه باعث کاهش رادیکال سوپر اکسید و افزایش H_2O_2 در بافت کبد شد و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز باعث خنثی شدن H_2O_2 تولید شده گردید. مطالعه ها نشان داده اند که مصرف دیازینون، مالاتیون، پاراکسون، کلروپیریفوس و لیندن توسط موش صحرائی موجب افزایش فعالیت آنزیم های SOD و CAT در بافت های مغز، قلب و اریتروسیت می شود.^(۱۹-۲۳،۱۰) البته مطالعه های دیگر کاهش فعالیت آنزیم های SOD و CAT را در بافت های مختلف نشان داده اند.^(۲۴-۲۸) این اختلاف نتایج در مطالعه های مختلف ناشی از نوع، نژاد و گونه حیوان، نوع سم، نوع بافت، مسیر تجویز ماده سمی، دوز و زمان مواجهه است. در مطالعه حاضر فعالیت LDH کبد در دوز ۱۰۰ میلی گرم

MDA با پراکسیداسیون غشای کبد همراه بود که نشان‌دهنده آسیب اکسیداتیو بافت کبد است.

* سپاس‌گزاری:

این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی مرکز تحقیقات شیمیایی و علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... انجام شده است که بدین وسیله از کلیه مسؤولین مراکز مذکور قدردانی می‌شود.

* مراجع:

1. Dutta HM, Maxweu LB. Histological examination of sublethal effects of diazinon on ovary of blugill, *lepomis macrochirus*. Environ Pollut 2003; 121 (1): 95-102
2. Garfitt SJ, Jones K, Mason HJ, Cocker J. Exposure to the organophosphate diazinon: data from a human volunteer study with oral and dermal doses. Toxicol Lett 2002 Aug 5; 134 (1-3): 105-13
3. Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, Shadnia S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in salvia and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2004 Jan; 137 (1): 29-34
4. Stom JE, Rozman KK, Doull J. Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. Toxicology 2000 Sep 7; 150 (1-3): 1-29
5. Saulsbury MD, Heyliger SO, Wang K, Johnson DJ. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. Toxicology 2009 May 2; 259 (1-2): 1-9
6. Limon-Pacheco J, Gonsbatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutat Res 2009 Mar; 674 (1-2): 137-47

GST بدون تغییر باقی می‌ماند^(۳۶) یا افزایش^(۳۷-۳۸ و ۳۹) یا کاهش داشته است.^(۱۲) به طور معمول دوزهای کم سموم منجر به افزایش و دوزهای بالا باعث مهار فعالیت آنزیم‌ها شده‌اند.

گلوکوتایون می‌تواند به طور مستقیم یا به عنوان سوپسترای آنزیم‌های گلوکوتایون پراکسیداز و گلوکوتایون-S-ترانسفراز در سم زدایی پراکسید هیدروژن لیبید هیپرو پراکسیدها و ترکیب‌های الکتروفیلیک شرکت کند. تخلیه گلوکوتایون ممکن است به افزایش پراکسیداسیون لیبیدها، آسیب به DNA، توقف تکامل و کاهش مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو منجر شود.^(۴۰ و ۳۹) مطالعه حاضر نشان داد که تجویز دیازینون در دوزهای بالاتر از ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم موجب کاهش غلظت گلوکوتایون در بافت کبد می‌شود. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که تجویز آندوسولفان، فن تیون، سیپرترین و مالاتیون به موش صحرائی و تجویز دیازینون و متیل پاراتیون یا فولی سوپر به ماهی موجب کاهش گلوکوتایون کبد می‌شود.^(۴۱-۴۳ و ۳۸ و ۳۴)

MDA به عنوان شناساگر استرس اکسیداتیو، آخرین محصول تجزیه لیبیدهاست. افزایش سطح MDA نشان‌دهنده افزایش پراکسیداسیون لیبیدها و آسیب غشای سلولی است.^(۴۴) در مطالعه حاضر تجویز دیازینون در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به طور معنی‌داری باعث افزایش غلظت MDA گردید که به پراکسیداسیون لیبیدهای غشاء و ایجاد استرس اکسیداتیو منجر شد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که تجویز خوراکی دی‌متوات، متیل پاراتیون و مالاتیون به موش صحرائی موجب تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیبیدها در اریتروسیت می‌شود.^(۴۵ و ۸) به علاوه با مطالعه اثر دیازینون بر بافت‌های مختلف ماهی در بعضی بافت‌ها و اندام‌ها (آبشش، ماهیچه و لوله گوارش) افزایش MDA و در بعضی (کلیه) تغییری مشاهده نشده است.^(۴۶)

در مجموع اثر دیازینون بر روی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان کبد در این مطالعه وابسته به دوز بود و افزایش فعالیت آنزیم‌ها احتمالاً ناشی از افزایش ظرفیت سم‌زدایی بافت کبد بود. کاهش GSH نشان‌دهنده نارسایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان برای مقابله با ROS است و افزایش

7. Sleven H, Gibbs JE, Heales S, et al. Depletion of reduced glutathione precedes inactivation of mitochondrial enzymes following limbic status epilepticus in the rat hippocampus. *Neurochem Int* 2006 Jan; 48 (2): 75-82
8. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamine E in climethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nut Biochem* 2001 Sep; 12 (9): 500-4
9. Fortunato JJ, Feier G, Vitali AM, et al. Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions. *Neurochem Res* 2006 May; 31 (5): 671-8
10. Ananya R, Subeena S, Kumar DA, et al. Oxidative stress and histopathological changes in the heart following oral lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) administration in rats. *Med Sci Monit* 2005 Sep; 11 (9): BR 325-9
11. Giordano G, Afsharinejad Z, Guizzetti M, et al. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007 Mar; 219 (2-3): 181-9
12. Winterbourn C, Hawkins R, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975 Feb; 85 (2): 337-41
13. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6
14. Habig WH, Jakoby WB. Glutathion S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol* 1981; 77: 218-31
15. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969 Mar; 27 (3): 502-22
16. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978 Nov 15; 90 (1): 37-43
17. 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 May 7; 72: 248-54
18. Okado - Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 2001 Oct 19; 276 (42): 38388-93
19. Altuntas L, Kilinc L, Orhan H, et al. The effect of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes in vitro. *Hum Exp Toxicol* 2004 Jan; 23 (1): 9-13
20. Buyukokuroglu ME, Cemek M, Yurumez Y, et al. Antioxidative role of melatonin in organophosphate toxicity in rats. *Cell Biol Toxicol* 2008 Apr; 24 (2): 151-8
21. Ghani E, Mohammadi M, Jafari M, et al. Evaluation of oxidative stress index in brain tissue of rats after expose to paraoxon. *Kowsar Med J* 2008; 1: 1-8 [In Persian]
22. Kaur R, Sandhu HS. In vivo changes in antioxidant system and protective role of selenium in chlorpyrifos-induced subchronic toxicity in bubalus bubalis. *Environ Toxicol Pharmacol* 2008 Jul; 26 (1): 45-8
23. Aturk O, Demirin H, Sutcu R, et al. 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 Nov; 22 (6): 455-61
24. Khan SM, Sobti RC, Kataria L. Pesticide - induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. *Clin Chim Acta* 2005 Aug; 358 (1-2): 131-8
25. Altuntas I, Delibas N, Doguc K, et al. Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro. *Toxicol In Vitro* 2003 Apr; 17 (2): 153-7
26. Amer M, Metwalli M, Abu El-Magd Y.

- Skin diseases and enzymatic antioxidant activity among workers exposed to pesticides. *East Mediterr Health J* 2002 Mar-May; 8 (2-3): 363-73
27. 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 Funct* 2008 Jan-Feb; 26 (1): 119-24
28. Yousef MI, Awad TI, Mohamed EH. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology* 2006 Oct 29; 227 (3): 240-7
29. 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: 268-72
30. Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, Das S. Repeated dose toxicity of alfa-cypermethrin in rats. *J Vet Sci* 2004 Sep; 5 (3): 241-5
31. Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, et al. Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology* 2005 Aug 1; 211 (3): 197-206
32. Etim OE, Farombi EO, Usoh IF, Akpan EJ. The protective effect of aloe vera juice on lindane induced hepatotoxicity and genotoxicity. *Pak J Pharm Sci* 2006 Oct; 19 (4): 337-40
33. Ncibi S, Ben Othman M, Akacha A, et al. *Opuntia ficus indica* extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver. *Food Chem Toxicol* 2008 Feb; 46 (2): 797-802
34. Rendon-von Osten J, Ortíz-Arana A, Guilhermino L, Soares AM. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere* 2005; 58: 627-36
35. Masella R, Benedetto RD, Vari R, et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005 Oct; 16 (10): 577-86
36. 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 C Toxicol Pharmacol* 2000 Dec; 127 (3): 291-6
37. Monterio DA, de Almedia JA, Rantin FT, Kalinin AL. Oxidative stress biomarkers in the fresh water characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorous insecticide Folispur 600 (methyl parathion). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006 Jun; 143 (2): 141-9
38. Monteiro DA, Rantin FT, Kalinin AL. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish *matrinxã*, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR (methyl parathion). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2009 Jan; 149 (1): 40-9
39. Nordberg J, Arner E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001 Dec 1; 31 (11): 1287-312
40. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005 Oct; 16 (10): 577-86
41. Dorval J, Hontela A. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Toxicol Appl Pharmacol* 2003 Oct 15; 192 (2): 191-200
42. Buyukokuroglu M, Cemek M, Tosun M. Dantrolene may prevent organophosphate-

induced oxidative stress and muscle injury.

Pes Biochem Physiol 2008; 92: 156-63

43. 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: 38-42

44. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic

environmental pollutants. Ecotoxicol Environ Saf 2006 Jun; 64 (2): 178-89

45. Celik I, Suzek H. Subacute effects of methyl parathion on antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats. Food Chem Toxicol 2008 Aug; 46 (8): 2796-801

46. Durmaz H, Sevgiler Y, Uner N. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *oreochromis niloticus*. Pes Biochem Physiol 2006; 84: 215-26