

## ارزیابی فعالیت آنزیم کولین استراز اریتروسیت و سرم در موش‌های صحرائی نر تیمار شده با دیازینون و نقش حفاظتی ویتامین E

فاطمه رحیمی عنبرکه<sup>۱</sup>، دکتر محمدرضا نیکروش<sup>۲</sup>، دکتر مهدی جلالی<sup>۲</sup>، دکتر حمیدرضا صادق نیا<sup>۳</sup>، زینت سرگزی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

<sup>۲</sup> استاد گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

<sup>۳</sup> استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

نشانی نویسنده مسئول: دکتر محمدرضا نیکروش، استاد علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

E-mail: Nikraveshmr@mums.ac.ir

وصول: ۹۳/۲/۲۷، اصلاح: ۹۳/۳/۲۸، پذیرش: ۹۳/۴/۸

### چکیده

**زمینه و هدف:** دیازینون یکی از حشره‌کش‌های ارگانوفسفره است که فعالیت کولین استراز را مهار و استرس اکسیداتیو را در ارگان‌های هدف، از قبیل سیستم تولید مثلی القاء می‌کند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات دیازینون بر روی فعالیت کولین استراز سرم و اریتروسیت-های خون در رت نر و بررسی نقش محافظت‌کنندگی ویتامین E بود

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۰ سر موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم به پنج گروه ۶ تایی شامل: گروه کنترل (هیچ ماده‌ای دریافت نکرد)، گروه شم (دریافت روغن زیتون خالص)، گروه تجربی ۱ (دریافت دیازینون با دوز ۶۰ mg/kg)، تجربی ۲ (دریافت دیازینون و ویتامین E با همان دوزها) و تجربی ۳ (دریافت ویتامین E با دوز ۲۰۰ mg/kg) تقسیم شدند. دیازینون و حلال از طریق تزریق داخل صفاقی و ویتامین از طریق گاواژ استفاده شد. بعد از ۶ هفته ۳ میلی لیتر خون از بافت قلب گرفته شد و از روش تیترمتری و المان به ترتیب برای سنجش کولین استراز سرم و اریتروسیت استفاده شد. داده‌ها با کمک نرم افزار SPSS آنالیز شدند و مقدار  $P < 0/05$  تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان دادند که دیازینون در گروه تجربی ۱، فعالیت استیل کولین استراز ( $P = 0/000$ ) و کولین استراز سرم ( $P = 0/01$ ) را نسبت به گروه کنترل کاهش داد. مهار فعالیت کولین استراز اریتروسیت و سرم در گروه تجربی ۲ (مصرف توام دیازینون به همراه ویتامین E) بهبود نیافت.

**نتیجه‌گیری:** باتوجه به مهار فعالیت دو آنزیم مهم کولین استراز اریتروسیت و سرم در رت‌های تیمار شده با دیازینون، امکان سمیت سلولی در کشاورزان و افرادی که در تماس با این ترکیبات می‌باشد وجود دارد. از سوی دیگر فعالیت کولین استراز توسط ویتامین E احتمالاً به علت ماهیت رقابتی مهار آنزیم توسط دیازینون بهبود نیافت. بنابراین، باید مراقبت لازم برای جلوگیری از ورود سم به بدن انجام شود.

**واژه‌های کلیدی:** استیل کولین استراز، دیازینون، کولین استراز کاذب، ویتامین E.

**مقدمه**

حشره‌کش‌های ارگانوفسفره گروه عمدۀ ای از حشره‌کش‌های شیمیایی هستند که استفاده از آن در سراسر دنیا به خصوص در کشورهای در حال توسعه رو به افزایش است. دیازینون یک حشره‌کش ارگانوفسفره می‌باشد که به طور وسیعی برای کنترل حشرات خانگی و محصولات کشاورزی استفاده می‌شود (۱). بقایای ارگانوفسفره‌ها در خاک، آب، سبزیجات و دیگر مواد غذایی مشاهده شده است. این سموم در حین سم‌پاشی از طریق پوست، غشاهای مخاطی، از طریق خوراکی و استنشاقی جذب بدن شده (۲ و ۳) و روی ارگان‌های مختلف، از قبیل کبد (۴)، کلیه و پانکراس (۵)، سیستم ادراری (۶) و تولیدمثلی اثر می‌گذارد (۷). تحقیقات نشان داده است که چندین فاکتور مانند مدت زمان و غلظت دیازینون، می‌تواند در میزان سمیت موثر باشد (۸).

حشره‌کش‌های ارگانوفسفره به طور غیر قابل برگشت عمل آنزیم استیل‌کولین استراز را متوقف نموده و باعث تجمع استیل‌کولین در سیناپس‌های موسکارینی و نیکوتینی می‌شوند که این خود باعث ایجاد علائم موسکارینی و نیکوتینی می‌شود که در کنار علائم عصبی ناشی از مسمومیت به عنوان راهنمای تشخیص مسمومیت نیز به کار می‌رود (۹ و ۱۰). بنابراین مشابه با سایر ارگانوفسفره‌ها، دیازینون نیز از طریق مهار فعالیت آنزیم استیل‌کولین که یک نوروترانسمیتر است و با اثر بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد، می‌تواند باعث تغییرات هورمون‌های جنسی و اختلال در سیستم تولیدمثلی گردد (۱۱). آنزیم استیل‌کولین استراز دارای دو ایزوفرم متفاوت کولین استراز واقعی (Acetylcholinesterase) و کولین استراز کاذب (pseudocholinesterase) می‌باشد که نوع واقعی آن در سیستم عصبی-عضلانی و گلبول‌های قرمز و نوع کاذب آن که ساختاری مشابه با کولین استراز واقعی دارد در سرم، سلول‌های مغزی و کبد وجود دارد (۱۴-۱۲). استیل‌کولین استراز باعث تجزیه استیل‌کولین و مانع

از تجمع این نوروترانسمیتر در سیناپس‌ها می‌شود (۱۵). استرس اکسیداتیو مکانیسم دیگر موثر در سمیت دیازینون می‌باشد که منجر به تولید رادیکال‌های آزاد و تغییر فعالیت آنزیم همراه با مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی در بدن می‌شود (۱۶). در مقابل آسیب اکسیداتیو، آنزیم‌هایی مانند: کاتالاز، سوپر اکساید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و گلوکاتایون - اس - ترانسفراز رادیکال‌های آزاد را جاروب می‌کنند. بنابراین شدت استرس اکسیداتیو القا شده توسط دیازینون را می‌توان با اندازه‌گیری این آنزیم‌ها سنجید (۱۷ و ۱۸).

از سوی دیگر با توجه به استفاده گسترده از دیازینون، یکی از راه‌های مقابله با سمیت ایجاد شده، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد. ویتامین E بعنوان یک آنتی‌اکسیدان محلول در چربی شناخته می‌شود که باعث وقفه در انتشار لیپیدپراکسیداسیون در غشای پلاسمایی و بنابراین حفظ یکپارچگی غشاء و فرایندهای غشایی می‌شود. مطالعات زیادی نشان می‌دهد که ویتامین E باعث مهار استرس اکسیداتیو و لیپید پراکسیداسیون القا شده توسط حشره‌کش‌های ارگانوفسفره در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود (۱۹). با توجه به شواهدی که ذکر آن گذشت، هدف از این مطالعه تعیین اثر دیازینون بر کولین استراز خون رت نر و ارزیابی این مسئله است که آیا ویتامین E ممکن است بتواند باعث جلوگیری یا بهبود این سوء تأثیر شود. برای دستیابی به این هدف، بمدت شش هفته (پیرو مطالعه قبلی و بر اساس مدت زمان سیکل جنسی رت نر) دیازینون تزریق داخل صفاقی و ویتامین E نیز گاوآژ شد و سپس سطح کولین استراز اریتروسیت و سرم خون مورد بررسی و مقایسه بین گروهی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها**

در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۰ سر رت نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم به پنج گروه ۶ تایی

شامل: گروه کنترل (هیچ ماده ای دریافت نکرد)، گروه شم (دریافت روغن زیتون خالص)، گروه تجربی ۱ (دریافت روزانه دیازینون با دوز  $60 \text{ mg/kg}$  محلول در روغن زیتون)، تجربی ۲ (دریافت دیازینون  $60 \text{ mg/kg}$  و ویتامین E با دوز  $200 \text{ mg/kg}$ ) و تجربی ۳ ( ویتامین E -  $200 \text{ mg/kg}$ ) تقسیم شدند. دیازینون و حلال تزریق داخل صفاقی (IP) و ویتامین E گاواژ (۲۰) شد. در پایان هفته ۶ با خونگیری از رت‌ها سطح استیل‌کولین استراز اریتروسیت و سرم اندازه‌گیری شد. مطالعه حاضر در آزمایشگاه فارماکولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد. تمام پروتکل‌های تجربی توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی مشهد مورد تأیید قرار گرفت.

برای این مطالعه، دیازینون تکنیکال ۹۸٪ تهیه شده از شرکت آریا شیمی مورد استفاده قرار گرفت. محلول استوک از دیازینون با غلظت  $60 \text{ mg/ml}$  در روغن زیتون بصورت تازه تهیه گردید. ویتامین E از سیگما خریداری شد.

برای اندازه‌گیری کولین‌استراز اریتروسیت و سرم همه گروه‌ها بعد از ۶ هفته تحت بی‌هوشی با کلروفورم قرار گرفتند و با باز نمودن قفسه سینه به خون‌گیری از قلب حیوان اقدام گردید، که ۳ میلی‌لیتر خون با سرنگ هپارینه (میزان هپارین مورد نیاز برای هر میلی‌لیتر خون بین ۲۵-۱۰۰ واحد می‌باشد) از قلب حیوان گرفته شد و برای سنجش مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز خون از روش المان استفاده شد (۲۱). بدین منظور پس از خون‌گیری از حیوان و سانتریفوژ کردن نیمی از آن توسط همولیزات، ۳ میلی‌لیتر از واکنشگر DTNB (dithiobis (nitrobenzoic acid)) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (استیل تیوکولین یدید) در لوله شیشه‌ای به مدت ۱۰ ثانیه در حمام آبی ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول همولیز جهت شروع واکنش به آن اضافه شد. لوله شیشه‌ای در حمام آب ۳۷ درجه گذاشته شد و دقیقاً پس از ۱۰ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر

واکنشگر متوقف‌کننده به مجموعه افزوده شد. محتویات داخل لوله شیشه‌ای بهم‌زده شده و به خارج از حمام آبی منتقل شد. نمونه‌های بلانک دقیقاً به شرح فوق تهیه - شدند، با این تفاوت که ۱۰۰ میکرولیتر محلول همولیز در مرحله آخر پس از افزودن واکنشگر متوقف‌کننده و سپری شدن زمان مربوطه، در خارج حمام آبی به هر لوله شیشه‌ای اضافه شد. از آن جا که هر نمونه همولیز شده، جذب خود را دارا می‌باشد، لذا بدین ترتیب برای سنجش فعالیت آنزیم در هر نمونه، یک بلانک به طور مستقل تهیه شد و بلافاصله جذب هر نمونه در مقابل بلانک خود در طول موج ۴۴۰ نانومتر خوانده شد. این عمل برای هر نمونه همولیز سه بار انجام گرفت و در نهایت میانگین اعداد در محاسبات بعدی استفاده شد. کولین‌استراز سرم به روش تیترمتری انجام می‌شود. محلول اصلی استیل‌کولین کلراید است که ۱۰ میلی‌لیتر محلول آماده استیل‌کولین کلراید را در ارن ۵۰ میلی‌لیتری می‌ریزیم و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر سرم را اضافه می‌کنیم. ۲ قطره معرف کروزل رد) اندیکاتور PH که در محیط اسیدی زرد و در محیط قلیایی بنفش است) اضافه کرده و مخلوط می‌کنیم. به محیط استیل‌کولین کلراید جهت پایداری بیش تر اسید استیک ۱۰ درصد اضافه شده است و اسیدی است. ابتدا با سود ۰/۱ نرمال تیتر می‌کنیم تا رنگ اولیه اسید استیک از بین برود و بنفش شود. ساعت زمان می‌گیریم و در بن‌ماری ۳۷ درجه قرار می‌دهیم. تغییر رنگ محیط به زرد را هر چند دقیقه بررسی می‌کنیم. اگر محیط زرد رنگ شده بود با سود ۰/۰۱ نرمال تیتر می‌کنیم تا محیط مجدداً بنفش شود. در طول یک ساعت میزان تیتر را به میلی‌لیتر یادداشت می‌کنیم که هر میلی‌لیتر نشان‌دهنده ۱۰ درصد فعالیت آنزیم است.

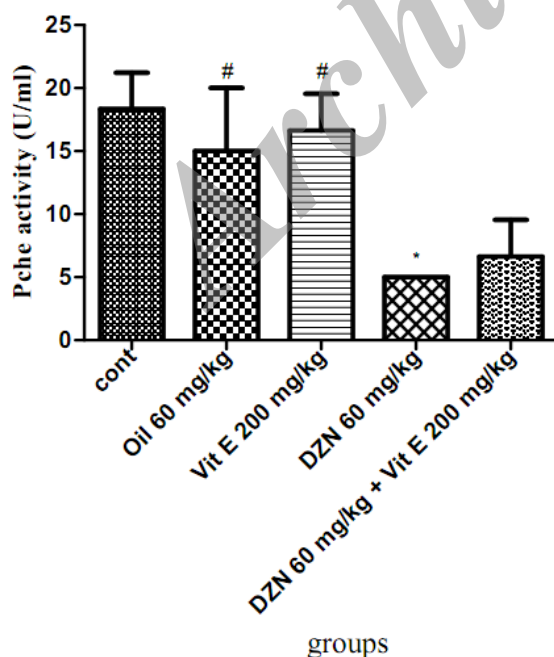
در مطالعه حاضر برای ارائه نتایج تاثیر دیازینون بر فعالیت آنزیم‌های کولین‌استراز اریتروسیت و سرم، از نسخه ۱۶ نرم افزار spss استفاده شد، برای این منظور آنالیز آماری کولین‌استراز اریتروسیت براساس آزمون

ANOVA به دنبال آن تست Tukey-Kramer برای مقایسه تفاوت بین میانگین‌ها استفاده شد. و با توجه به این که داده‌های کولین استراز سرم به صورت درصد بیان شد آنالیز آماری این آنزیم نیز براساس آزمون Mann-Whitney Test برای مقایسه بین گروهی میانگین‌ها استفاده شد. تفاوت آماری معنی دار  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد و نتایج براساس  $Mean \pm SD$  و به صورت نمودار بیان شد.

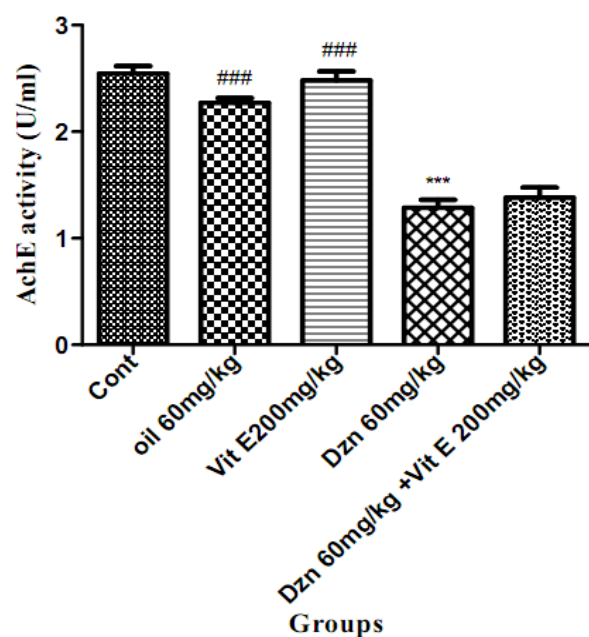
### یافته ها

همان طور که در نمودار یک مشاهده می‌شود و با توجه به مقادیر میانگین فعالیت آنزیم کولین استراز اریتروسیت، از لحاظ آماری هیچ تفاوت قابل توجهی در فعالیت این آنزیم بین سه گروه کنترل ( $2/65 \pm 0/055$ )، شم ( $2/41 \pm 0/031$ ) و گروه تجربی سه ( $2/48 \pm 0/091$ ) مشاهده نشد. دیازینون در گروه تجربی یک باعث کاهش فعالیت این آنزیم شد و تفاوت مشاهده شده بین این گروه و سه گروه کنترل، شم و تجربی سه از نظر آماری معنی دار نشان داده شد

میانگین و انحراف معیار فعالیت آنزیم کولین- استراز سرم در گروه کنترل  $18/15 \pm 2/73$  و در گروه شم و تجربی سه به ترتیب  $15/31 \pm 2/72$  و  $17/98 \pm 4/47$  به دست آمد که تفاوت آماری معنی دار بین این سه گروه مشاهده نشد. اما میانگین فعالیت این آنزیم در این سه گروه به طور قابل توجهی بیش تر از گروه تجربی یک ( $2/23 \pm 0/22$ ) و تجربی دو ( $6/36 \pm 2/74$ ) بود ( $P = 0/01$ ). همان طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، بین گروه تجربی یک و دو نیز از نظر آماری تفاوت معنی داری مشاهده نشد ( $P = 0/51$ ). بنابراین دیازینون در گروه تجربی یک باعث مهار فعالیت این آنزیم شد، و استفاده



نمودار ۲: اثر دیازینون بر میزان فعالیت Pche سرم رت‌ها. \* مقایسه گروه کنترل و دیازینون ( $P = 0/01$ )، # مقایسه گروه دیازینون با سایر گروه‌ها ( $P = 0/01$ )



نمودار ۱: اثر دیازینون بر میزان فعالیت آنزیم کولین استراز اریتروسیت. \*\*\* مقایسه گروه کنترل و دیازینون ( $P = 0/000$ )، ### مقایسه گروه دیازینون با سایر گروه‌ها ( $P = 0/000$ )

هم زمان ویتامین E در گروه تجربی دو نیز تغییری در بهبود فعالیت این آنزیم ایجاد نکرد.

## بحث

دیازینون یک حشره‌کش ارگانوفسفره است که به طور وسیعی برای کنترل حشرات خانگی و محصولات کشاورزی استفاده می‌شود. دیازینون با ایجاد تغییر در DNA یا در پروتئین‌های باند شده می‌تواند به بیضه آسیب برساند و از طریق جهش‌های ایجاد شده در اسپرماتوسیت نیز در نهایت منجر به ایجاد تغییراتی در اسپرم می‌شود (۲۲ و ۲۳). هم چنین با مهار فعالیت نوروترنسمیتر کولین استراز در سیناپس‌ها روی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد، اثر گذاشته و باعث تغییرات هورمون‌های جنسی و اختلال در سیستم تولیدمثلی می‌گردد (۱۱). در مطالعه حاضر، اثر حفاظتی ویتامین E در مقابل سمیت القاء شده دیازینون بررسی شده است. برای این منظور رت‌ها به مدت ۶ هفته با دیازینون (۶۰ mg/kg) و ویتامین-E (۲۰۰ mg/kg) تحت تیمار و درمان قرار گرفتند و در نهایت برای بیان میزان سمیت، فعالیت کولین استراز اریتروسیت و سرم اندازه‌گیری شد. دیازینون در غلظت‌های متفاوت استرس اکسیداتیو را القاء می‌کند و بنابراین القاء گونه‌های فعال اکسیژن باعث آسیب اکسیداتیو ماکرومولکول‌های مهم مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها می‌شود (۲۳). از طرفی حشره‌کش‌های ارگانوفسفره به طور غیر قابل برگشت عمل آنزیم استیل کولین استراز را متوقف می‌کنند و باعث تجمع استیل کولین در سیناپس‌های موسکارینی و نیکوتینی می‌شوند که این خود باعث ایجاد علائم موسکارینی و نیکوتینی می‌شود که در کنار علائم عصبی ناشی از مسمومیت به عنوان راهنمای تشخیص مسمومیت نیز بکار می‌رود (۱۰). در مطالعه‌ی قبلی ما دیازینون با افزایش سطح مالون دی آلدئید و کاهش محتوای گلوتاتیون باعث القاء استرس اکسیداتیو در بافت بیضه شد و در مطالعه حاضر نیز که به

دنبال مطالعه قبلی انجام شد دیازینون در گروه تجربی ۱ در مقایسه با گروه کنترل، باعث کاهش قابل توجهی در فعالیت کولین استراز اریتروسیت ( $P=0/000$ ) و سرم ( $P=0/01$ ) شد. بنابراین نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه Cha و همکاران که فعالیت کولین استراز سرم را در موش‌های تیمار شده با دیازینون بررسی کردند هم خوانی دارد، به طوری که آن‌ها نشان دادند فعالیت کولین استراز سرم توسط دیازینون کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند (۲۴). در مطالعه رژیم غذایی دیازینون Donald و همکاران که بر روی رت‌های نر و ماده انجام شد، فعالیت کولین استراز اریتروسیت، سرم و مغز رت‌های گروه دریافت کننده دیازینون نسبت به گروه کنترل تغییر قابل توجهی را نشان داد (۲۵). هم چنین نتایج مطالعات Wu و همکاران نشان داد که مقادیر هردو آنزیم کولین استراز اریتروسیت و سرم در رت‌های دریافت‌کننده دیازینون داخل‌وریدی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد این در حالی بود که در مصرف خوراکی، مهار آنزیم کولین استراز اریتروسیت از کولین استراز سرم بیش تر بود (۲۶). Katsumaro و همکاران یافتند که با در معرض قرارگیری با دیازینون فعالیت آنزیم کولین استراز پلاسما و اریتروسیت به سرعت مهار می‌شود که این مهار در اریتروسیت‌ها بیش تر از پلاسماست (۲۷). ElMazoudy و همکاران گزارش کردند که استفاده از دیازینون سطوح کولین استراز پلاسما را کاهش می‌دهد که این کاهش وابسته به دوز بود (۲۸). در مطالعه ابراهیم‌زاده و همکاران، استفاده از سموم ارگانوفسفره تفاوت معنی‌دار آماری میان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در زنان و مردان کارگر با گروه شاهد نشان داد (۲۹). برخورداری و همکاران در مطالعه توصیفی-تحلیلی خود گزارش کردند که میانگین غلظت آنزیم‌های کولین استراز اریتروسیت (AChE) و سرم (PchE) در افراد مورد مطالعه (سم‌پاش) کم تر از شاهد می‌باشد (۳۰). Yehia و همکاران در مطالعه خود که بر روی خرگوش انجام شد، دریافتند که دیازینون باعث مهار

دادند اما با گذشت ۳۲ روز سطح AchE تمام گروه‌ها مشابه با گروه کنترل بود (۳). بنابراین در مطالعه حاضر و مطالعاتی که ذکر آن گذشت ویتامین E نقش حفاظتی بر فعالیت کولین استراز نداشت، ولی نتایج مطالعه انجام شده توسط Oral و همکاران و Hariri و همکاران بیانگر نقش محافظتی ویتامین‌های E و C در برابر مهار فعالیت کولین استراز توسط اورگانوفسفرها بوده است (۱۰ و ۳۵)، که با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی ندارد. بنابراین در مطالعه حاضر فعالیت کولین استراز اریتروسیت و سرم در مواجهه با دیازینون مهار شد اما ویتامین E نیز احتمالا به خاطر ماهیت رقابتی مهار کولین استراز توسط اورگانوفسفر نتوانست باعث کاهش یا بهبود مهار فعالیت کولین استراز اریتروسیت و سرم گردد، البته بهبود و احیای فعالیت کولین استراز اریتروسیت‌ها می‌تواند به احیای اریتروسیت‌ها و شکست گلبول‌های قرمز قدیمی تر و هم چنین بهبود فعالیت کولین استراز سرم نیز به سنتز پروتئین در کبد وابسته باشد (۱۹).

مطالعات زیادی نشان می‌دهند که ویتامین E نقش حفاظتی خود را از طریق جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اعمال می‌دارد، چنان که مطالعاتی برای بررسی نقش محافظتی ویتامین E در برابر آسیب ایجاد شده ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی در سایر بافت‌ها انجام شده است (۳۶).

### نتیجه‌گیری

با توجه به مهار فعالیت دو آنزیم مهم کولین استراز اریتروسیت و سرم در رت‌های تیمار شده با دیازینون می‌توان به امکان بروز چنین سمیت سلولی در کشاورزان و افرادی که در تماس با این ترکیبات هستند اشاره نمود و بر لزوم مراقبت و رعایت نکات لازم جهت جلوگیری از ورود سم به بدن که سبب ساز اختلالات عمده‌ای شامل اختلالات عملکرد گنادی و احتمالا منجر به ناباروری می‌شود، تأکید نمود.

فعالیت استیل کولین استراز در بافت مغز و کاهش این فعالیت در سلول‌های کبدی می‌شود، اما به تدریج در سلول‌های گلمرولی کلیه افزایش می‌یابد (۱۱). بنابراین با توجه به شواهدی که ذکر آن گذشت دیازینون از طریق مهار فعالیت کولین استراز که مکانیسم اصلی ایجاد سمیت می‌باشد روی سیستم‌های مختلف بدن از جمله سیستم عصبی و محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد اثر گذاشته و باعث تغییرات هورمونی مهم در بدن شود. البته میزان فعالیت این آنزیم با توجه به سن، جنس، مصرف داروها، وجود بیماری و روش اندازه‌گیری تغییر می‌کند (۳۱).

در مواجهه با دیازینون، سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی بدن برای محافظت در مقابل ROS فعال می‌شود (۳۲ و ۳۳). ویتامین E، یک ویتامین محلول در چربی است که در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد نقش دارد (۳۴). در مطالعه قبلی ما ویتامین E توانست استرس اکسیداتیو القاء شده توسط دیازینون را با کاهش مقادیر مالون دی‌آلدئید و افزایش سطح گلووتاتیون به طور معنی‌داری کاهش دهد اما در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری بین گروه تجربی ۲ و گروه تجربی ۱ (دیازینون) مشاهده نشد. John و همکاران که به مدت ۶ هفته رت‌ها را با سموم اورگانوفسفره‌ی مالاتیون و دیموت تیمار کردند به این نتیجه رسیدند که ویتامین E استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد اما بر روی مهار فعالیت کولین استراز اریتروسیت و سرم چنین اثری ندارد و در نتیجه باعث کاهش یا بهبود مهار فعالیت این آنزیم‌ها نمی‌شود (۱۹).

Kalender و همکاران در مطالعه خود دریافتند که دیازینون باعث کاهش قابل توجه فعالیت کولین استراز کاذب می‌گردد که این کاهش با استفاده همزمان ویتامین E نیز جبران نشد، بطوریکه گروه‌های دیازینون و دیازینون + ویتامین E در مقایسه با یکدیگر تغییر معنی‌داری نداشتند (۱۳). Sarabia و همکاران گزارش کردند در روز اول تزریق، همه گروه‌هایی که دیازینون را دریافت کرده بودند کاهش در سطح AchE را در مقایسه با گروه کنترل نشان

**تشکر و قدردانی**

تامین اعتبار لازم امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند، هم چنین از سرکارخانم متجدد مسئول محترم آزمایشگاه هیستوشیمی گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی و مسئول محترم خانه حیوانات دانشکده پزشکی مشهد صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

مطالعه حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی می‌باشد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که طبق قرارداد با شماره ۹۱۱۰۹۶ و

**References**

1. Koprucu SS, Koprucu K, Ural MS, Ispir U, Pala M. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2006; 86(2): 99-105.
2. Contreras HR, Bustos-Obregon E. Morphological alterations in mouse testis by a single dose of malathion. *J Exp Zool*. 1999;284(3): 355-9.
3. Sarabia L, Maurer I, Bustos-Obregon E. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on the mouse testis. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2009;72(3):663-8.
4. Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Açikgoz F, Durak D, Ulusoy Y, Kalender Y. Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology*. 2005;211(3): 197-206.
5. Gokalp O, Buyukvanlı B, Cicek E, Ozer MK, Koyu A, Altuntas I, Koylu H. The effects of diazinon on pancreatic damage and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2005;81(2): 123-28.
6. Rodrigo L, Hernández AF, López-Caballero JJ, Gil F, Pla A. Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role. *Chem Biol Interact*. 2001;137(2): 123-37.
7. Joshi SC, Mathur R, Gajraj A, Sharma T. Influence of methyl parathion on reproductive parameters in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2003;14(3): 91-8.
8. Üner N, Oruç EÖ, Sevgiler Y, Şahin N, Durmaz H, Usta D. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2006;21(3): 241-5.
9. de Blaquièrre GE, Waters L, Blain PG, Williams FM. Electrophysiological and biochemical effects of single and multiple doses of the organophosphate diazinon in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;166(2): 81-91.
10. Oral B, Guney M, Demirin H, Ozguner M, Giray SG, Take G, Mungan T, Altuntas I. Endometrial damage and apoptosis in rats induced by dichlorvos and ameliorating effect of antioxidant vitamins E and C. *Reprod Toxicol*. 2006;22(4): 783-90.
11. Yehia MA, El-Banna SG, Okab AB. Diazinon toxicity affects histophysiological and biochemical parameters in rabbits. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2007;59(3): 215-25.
12. Mehrani H. Protective effect of polyurethane immobilized human butyrylcholinesterase against parathion inhalation in rat. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2004;16(3): 179-85.
13. Kalender Y, Uzunhisarcikli M, Ogutcu A, Acikgoz F, Kalender S. Effects of diazinon on pseudocholinesterase activity and haematological indices in rats: the protective role of vitamin E. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2006;22(1): 46-51.
14. Boyd AE, Marnett AB, Wong L, Taylor P. Probing the active center gorge of acetylcholinesterase by fluorophores linked to substituted cysteines. *J Biol Chem*. 2000;275(29): 22401-8.
15. Massa R, Blevins S, Chao SL. Role of acetylcholinesterase and glutathione-S-transferase following exposure to nicosulfuron and diazinon in *Helicoverpa zea*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2008;71(1): 230-5.
16. Kalender Y, Kaya S, Durak D, Uzun FG, Demir F. Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012;33(2): 141-8.
17. Hosseinzadeh Colagar A, Bidmeshkipour A, Gholinezhad Chari M. Total antioxidant capacity and malondialdehyde levels in seminal plasma among the varicocele-suffering men. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2009;17(2): 15-23. [persian]
18. Lukaszewicz-Hussain A. Subchronic intoxication with chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide,

- affects rat brain antioxidative enzymes and glutathione level. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(1): 82-6.
19. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem.* 2001;12(9): 500-4.
  20. Uzunhisarcikli M, Kalender Y, Dirican K, Kalender S, Ogutcu A, Buyukkomurcu F. Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 2007;87(2):115-22.
  21. Shokrzade M, Pakrava N, Sheikholeslamian S. The protective effect of n-acetyl cysteine on glutathione levels and serum cholinesterase in acute poisoning of diazinon, in mice. *J Mazand Uni Med Sci.* 2013;22(2): 2-11. [persian]
  22. Wyrobek A, Bruce W. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(11): 4425-9.
  23. Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Design.* 2004;10(14): 1611-26.
  24. Cha SW, Gu HK, Lee KP, Lee MH, Han SS, Jeong TC. Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome P450. *Toxicology letters.* 2000; 115(3): 173-8.
  25. Davies DB, Holub BJ. Comparative subacute toxicity of dietary diazinon in the male and female rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1980;54(3):359-67.
  26. Wu HX, Evreux-Gros C, Descotes J. Diazinon toxicokinetics, tissue distribution and anticholinesterase activity in the rat. *Biomed Environ Sci.* 1996; 9(4): 359-69.
  27. Tomokuni K, Hasegawa T. Diazinon concentrations and blood cholinesterase activities in rats exposed to diazinon. *Toxicol Lett.* 1985; 25(1): 7-10.
  28. ElMazoudy RH, Attia AA. Endocrine-disrupting and cytotoxic potential of anticholinesterase insecticide, diazinon in reproductive toxicity of male mice. *J Hazard Mater.* 2012;209: 111-20.
  29. Ebrahimzadeh MA, Shokrzade LM, Biokabadi M. Effect of organophosphate insecticides on acetyl cholinesterase activity in Rice fields workers. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences.* 2005;7(1): 1-7. [persian]
  30. Barkhordari A RT, Hekmatimoghaddam H, Mosaddegh MD, Fallahzadeh H. Assessment of Ache in worker exposed to OP pesticides. *Journal of community medicine.* 2012;4(1,2): 9-16. [persian]
  31. Coye MJ, Lowe JA, Maddy KT. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticide: cholinesterase activity determination. *J Occp Med.* 1986, 28(8 ), 619-27.
  32. Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(12): 3345-53.
  33. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1990;8(6): 583-99.
  34. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2): 351-8.
  35. Hariri AT, Moallem SA, Mahmoudi M, Memar B, Hosseinzadeh H. Sub-acute effects of diazinon on biochemical indices and specific biomarkers in rats: protective effects of crocin and safranal. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(10): 2803-8.
  36. Uzunhisarcikli M, Kalender Y. Protective effects of vitamins C and E against hepatotoxicity induced by methyl parathion in rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2011;74(7): 2112-8.



## Assessment of erythrocyte and serum cholinesterase activity in male rats treated with diazinon, and protective role of vitamin E

**Rahimi Anbarkeh Fatemeh., M.Sc**

MSc. student, Department of Anatomy and cell biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

**Nikravesh Mohammad Reza., Ph.D**

Professor, Department of Anatomy and cell biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

**Jalali Mehdi .,Ph.D**

Professor, Department of Anatomy and cell biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

**Sadeghnia Hamid Reza., Ph.D**

Assistant professor , Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

**Sargazi Zinat., M.Sc**

MSc. student, Department of Anatomy and cell biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received:17/05/2014, Revised:18/06/2014, Accepted:29/06/2014

### Corresponding author:

Fatemeh Rahimi Anbarkeh,  
Mashhad University of Medical  
Sciences, Mashhad, Iran  
E-mail: Rahimiaf901@mums.ac.ir

### Abstract

**Background:** Diazinon (DZN) is an organophosphate (OP) that inhibit cholinesterase activity and induce oxidative stress in the target tissues such as the the reproductive system .The aim of present study was to evaluate the effects of diazinon on cholinesterase activity in blood serum and erythrocytes of male rats and to assess the protective role of vitamin E.

**Material and Methods:** In this experimental study, thirty adult male wistar rats (200 - 250 gr) were divided into 5 groups (n = 6): control group (did not receive any material), sham group (received only pure olive oil), experimental group 1 (DZN, 60 mg/kg), experimental group 2 (received DZN+Vit E daily, with the same dose) and experimental group 3(Vit E 200 mg/kg). DZN and solvent was injected intraperitoneally (IP) and vitamin E was administrated by gavage. After 6 weeks, 3 ml blood from the heart tissue was taken and titrimetric and Ellman's method respectively was used for serum and erythrocyte cholinesterases activity evaluation. Data were analyzed using SPSS software. P<0.05 value was taken as statistically significant.

**Results:** The results showed that diazinon, reduced activity of acetylcholinesterase (P= 0.000) and pseudocholinesterase (P=0.01) in experimental group 1 compared to the control group. Inhibition in erythrocyte and serum cholinesterase activity was not recovered in experimental group 2 (use of diazinon plus vitamin E diazinon).

**Conclusion:** According to inhibit the activity of two important enzymes of erythrocyte and serum cholinesterase in rats treated with diazinon ,there are possibility of cytotoxicity at farmers and people who are in contact with these compounds. On the other hand,cholinesterase activity did not recovered by vitamin E probably due to the competitive nature of enzyme inhibition by diazinon. Therefore, care should be taken to prevent from entering toxin to the body.

**Keywords:** Acetylcholinesterase, Diazinon , Pseudocholinesterase , Vitamin E.