

بررسی اثر حفاظتی ویتامین E بر سطح آنزیم کولین استراز سرمی و اریتروسیت خون رت ماده بالغ، در مسمومیت ناشی از دیازینون

زینت سرگزی^۱، محمدرضا نیکروش^{۲*}، مهدی جلالی^۲، حمیدرضا صادق نیا^۳
، فاطمه رحیمی عنبرکه^۱

^۱مربی، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران
^۲استاد گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۳استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^{*}نویسنده مسئول: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
پست الکترونیک: Nikraveshmr@mums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: دیازینون یک حشره کش ارگانوفسفره است که یکی از مکانیسم های اصلی سمیت آن، مهار آنزیم کولین استراز می باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات دیازینون بر روی فعالیت کولین استراز خون رت ماده بالغ و بررسی اثر محافظت کنندگی ویتامین E بوده است که به دنبال مطالعه دیگری با موضوع استرس اکسیداتیو القا شده با دیازینون در بافت تخمدان، انجام شد.

مواد و روش کار: تعداد ۳۰ سر موش صحرایی ماده بالغ از نژاد ویستار به پنج گروه شامل: کنترل (بدون هرگونه مداخله)، شام (فقط دریافت روغن زیتون خالص)، تجربی ۱ (دریافت دیازینون با دوز ۶۰ mg/kg محلول در روغن زیتون)، تجربی ۲ (دریافت ویتامین E با دوز ۲۰۰ mg/kg و دیازینون با دوز ۶۰ mg/kg)، تجربی ۳ (دریافت ویتامین E با دوز ۲۰۰ mg/kg) تقسیم شدند. بعد از ۲ هفته، ۳ میلی لیتر خون توسط سرنگ هیپارینه از قلب گرفته شد و فعالیت کولین استراز اریتروسیت (AChE) و کولین استراز سرم (PChE) بررسی شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد که دیازینون سطح AChE را به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ($p < 0/001$). دیازینون سطح PChE را در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش داد ($p < 0/05$). علاوه براین، استفاده از ویتامین E همراه با دیازینون، سطح AChE را به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه دیازینون افزایش داد ($p < 0/001$) و افزایش معنی داری در سطح PChE نیز وجود داشت ($p < 0/05$).

نتیجه گیری: این یافته ها نشان داد که دیازینون باعث کاهش سطح کولین استراز سرم و اریتروسیت ها می گردد. استفاده از ویتامین E، باعث افزایش این سطوح در خون می شود. پس ویتامین E به عنوان آنتی اکسیدان باعث بهبود مهار آنزیم AChE می شود و سمیت دیازینون را کاهش می دهد.

واژه های کلیدی: دیازینون، کولین استراز سرمی، کولین استراز اریتروسیت، رت، ویتامین E

وصول: ۹۳/۲/۲۲

اصلاح: ۹۳/۴/۲

پذیرش: ۹۳/۵/۱۱

مقدمه

و موسکارینی می شوند [۱۱]. مسمومیت حاد توسط ارگانوفسفره ها باعث تحریک گیرنده های موسکارینی و درد شکم، اسهال، تعریق، افزایش ترشحات برونشیل و تولید بیش از حد بزاق می شود [۱۴]. تحریک گیرنده های نیکوتینی در اتصالات عصبی-عضلانی عضلات اسکلتی باعث کشش، ضعف و فلج عضلانی می شود. تحریک مسمومیت با این سموم بخش عمده ای از موارد مسمومیت را تشکیل می دهد. در نتیجه تعیین فعالیت استیل کولین استراز خون از مهمترین روش های شناسایی مسمومیت با این مواد می باشد [۱]. دو آنزیم کولین استراز حقیقی و کولین استراز کاذب توانایی هیدرولیز استیل کولین را دارند. این آنزیم ها را با توجه به منشأ به ترتیب کولین استراز موجود در گلبول قرمز و کولین استراز سرمی می نامند [۱۵]. فعالیت آنزیم کولین استراز سرم (PchE)، نشان دهنده مسمومیت حاد بوده ولی کاهش آنزیم استیل کولین استراز اریتروسیت (AChE) بیانگر مسمومیت مزمن می باشد. لذا فعالیت PchE به طور ویژه قبل از فعالیت AChE به علت مسمومیت کاهش می یابد [۱۶]. دیازینون اثر سمی خود را از طریق اتصال اکسیژن آنالوگش به آنزیم عصبی AChE اعمال می کند که منجر به تجمع اندوژن استیل کولین در بافت های عصبی و ارگان های هدف می شود [۳]. آنتی اکسیدان ها به عنوان تمیز کننده هایی هستند که ROS اضافی را رفع مسمومیت می کنند و دارای نقش مهمی در ستیابی به تعادل سیستم اکسیدان-آنتی اکسیدان بدن هستند. در این رابطه دو نوع آنتی اکسیدان وجود دارد: آنزیمی و غیرآنزیمی [۱۷]. ویتامین E (آلفا-توکوفرول)، یک آنتی اکسیدان غیرآنزیمی و از ویتامین های محلول در چربی است و در سلول به عنوان آنتی اکسیدان عمل می کند که برای محافظت غشای سلولی و لیپوپروتئین ها از پراکسیداسیون شناخته می شوند. علاوه بر این مطالعات متعددی نشان داده اند که آلفا توکوفرول شکل گیری رادیکال های آزاد را مهار می کند و ممکن است به طور موثری پراکسیداسیون لیپیدی را در سیستم های بیولوژیکی کاهش دهد [۵]. گزارش شده است که ویتامین E، هپاتوتوکسیته ناشی از دیازینون را کاهش می دهد و از برخی شاخص های بیوشیمیایی محافظت می کند [۸].

آفت کش ها و علف کش ها گروهی از ترکیبات شیمیایی پایدار و خطرناک محسوب می شوند که به طور گسترده در کشاورزی برای بالا بردن سطح تولید غذا استفاده می شوند. از جمله این آفت کش ها سموم ارگانوفسفره هستند که دارای فسفر مشتق شده از اسیدفسفریک هستند و به طور معمول به عنوان حشره کش استفاده می شوند و به طور کلی سمی ترین آفت کش موثر بر مهره داران شناخته شده اند [۱]. ترکیبات ارگانوفسفره به مدت ۵ دهه برای از بین بردن حشرات، کرم ها، کنه ها، نماتودها، قارچ ها و علف های هرز [۲] در کشاورزی، صنعت، طب، باغبانی، نگهداری حیوانات و مصارف خانگی استفاده شده اند [۳-۵]. متأسفانه استفاده بی رویه این محصولات به محیط زیست (گیاهان، حیوانات، آب، زمین یا خاک) صدمه می زند و باعث ایجاد مقاومت آفت ها نسبت به خاصیت آفت کشی نیز می شود و بر نگرانی ها در این زمینه می افزاید [۶، ۷]. مقادیر باقیمانده ارگانوفسفره ها و تثبیت آن ها در خاک، بافت های بدن موجودات زنده، گیاهان، غلات و دیگر محصولات غذایی قابل تشخیص هستند [۷]. از سوی دیگر گزارش شده است که سموم ارگانوفسفره باعث ایجاد عوارض جانبی در بافت های مختلف از قبیل کبد، کلیه، سیستم ایمنی، پانکراس، قلب و دیواره های عروقی و تغییرات هماتولوژیکی و بیوشیمیایی می شوند [۸، ۹]. دیازینون یک حشره کش ارگانوفسفره با دامنه وسیع فعالیت است که فعالیت استیل کلین استراز را مهار می کند. این ترکیب به طور گسترده و موثر در سراسر جهان با کاربردهایی در کشاورزی و باغبانی جهت کنترل حشرات در برابر محصولات، گیاهان زینتی، چمن، میوه ها و گیاهان استفاده می شود و به عنوان یک آفت کش در مصارف خانگی، کنترل سلامت عمومی، کشاورزی و کاربردهای دامپزشکی می باشد [۳، ۷، ۱۰-۱۲]. تحقیقات به عمل آمده نشان می دهد که دیازینون می تواند از طریق دستگاه گوارش، پوست و یا از طریق مخاط نفسی جذب شود [۱۳]. این ترکیبات یا متابولیت های فعالشان که آنزیم استیل کولین استراز را مهار می کنند، توسط تجمع استیل کولین در سیناپس های کلینرژیک به شدت سمی هستند که منجر به افزایش فعالیت گیرنده های نیکوتینی

همه گروه ها بعد از ۲ هفته تحت بیهوشی با کلروفورم قرار گرفتند و پس از شکافتن شکم و قفسه سینه، ۳ میلی لیتر خون با سرنگ هپارینه (میزان هپارین مورد نیاز برای هر میلی لیتر خون بین ۲۵-۱۰۰ واحد می باشد) از قلب حیوان گرفته شد و برای سنجش مهار آنزیم استیل کولین استراز خون از روش Elman استفاده شد [۱۹]. بدین منظور پس از خون گیری از حیوان و سانتریفوژ کردن نیمی از آن توسط همولیزات (۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه)، ۳ میلی لیتر از واکنشگر DTNB (dithiobis (nitrobenzoic acid) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوپسترا (استیل تیوکولین یدید) در لوله شیشه ای 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 شیشه ای در حمام آب ۳۷ درجه گذاشته شد و دقیقا پس از ۱۰ دقیقه، ۱ میلی لیتر واکنش گر متوقف کننده (از حل نمودن ۴۳ میلی مول بر لیتر هیامین ۱۶۲۲ در آب مقطر یا محلول اشباع سولفات کینیدین در حدود ۷ گرم در لیتر تهیه شد) به مجموعه افزوده شد. محتویات داخل لوله شیشه ای بهم زده شده و به خارج از حمام آبی منتقل شد. نمونه های بلانک دقیقا به شرح فوق تهیه شدند، با این تفاوت که ۱۰۰ میکرولیتر محلول همولیز در مرحله آخر پس از افزودن واکنشگر متوقف کننده و سپری شدن زمان مربوطه، در خازج حمام آبی به هر لوله شیشه ای اضافه شد. از آن جا که هر نمونه همولیز شده، جذب خود را دارا می باشد، 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 [۱۹].

اندازه گیری کولین استراز سرم به روش تیترومتري انجام شد. جهت انجام این روش، محلول اصلی استیل کولین کلراید بود که ۱۰ میلی لیتر محلول آماده استیل کولین کلراید را در ارلن ۵۰ میلی لیتری ریختیم و به آن ۰/۵ میلی لیتر سرم را اضافه نمودیم. سپس ۲ قطره معرف کروزل رد (اندیکاتور PH که در محیط اسیدی زرد و در

استفاده از سموم حشره کش و علف کش کشاورزی از دیرباز در جهان و از جمله در استان های مختلف کشور رواج داشته است. اکثریت کشاورزان معیشتی جهان را زنان تشکیل می دهند که تولید ۵۰-۶۰ درصد غذای جهان را بر عهده دارند [۱۸]. این سموم در آب حل شده و سپس مزارع با این آب، آبیاری یا سمپاشی می شود که این مزارع محل کار بسیاری از کارگران مزارع اعم از زنان و مردان است و در نتیجه جمعیت وسیعی از زنان در تماس با این سموم قرار دارند. با توجه به مطالعات قبلی که در آنها اهمیت تفاوت جنسیتی در میزان مسمومیت با ارگانوفسفره ها اثبات گردیده است [۱۹-۲۲]، و با توجه به اینکه سطح این آنزیم ها از شاخص های مهم در تشخیص اولیه مسمومیت با سموم ارگانوفسفره یا سمیت زدایی آن است، هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات حشره کش ارگانوفسفره دیازینون بر روی سطح آنزیم کولین استراز اریتروسیت و سرم در رت ماده بالغ و اثر حفاظتی ویتامین E بود تا از این طریق اقدامات حفاظتی مناسب در این زمینه اعمال گردد.

روش کار

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی بر روی ۳۰ سر موش صحرایی ماده بالغ با وزن ۱۹۰-۲۰۰ گرم از نژاد ویستار انجام شد که به پنج گروه شامل: کنترل (بدون هرگونه مداخله)، شم (فقط دریافت روغن زیتون خالص)، تجربی ۱ (دریافت دیازینون با دوز ۶۰ mg/kg محلول در روغن زیتون)، تجربی ۲ (دریافت ویتامین E با دوز ۲۰۰ mg/kg و دیازینون با دوز ۶۰ mg/kg)، تجربی ۳ (دریافت ویتامین E با دوز ۲۰۰ mg/kg تقسیم شدند. در این مطالعه از روغن زیتون به عنوان حلال استفاده گردید که دیازینون و حلال از طریق تزریق داخل صفاقی و ویتامین E از طریق گاوژ استفاده شد. مطالعه حاضر در آزمایشگاه فارماکولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد. تمام پروتکل های تجربی توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی مشهد مورد تایید قرار گرفت.

با توجه به اینکه این مطالعه به دنبال مطالعه دیگری با موضوع استرس اکسیداتیو القا شده با دیازینون در بافت تخمدان انجام شد [۲۳]، مطابق با سیکل جنسی رت ماده،

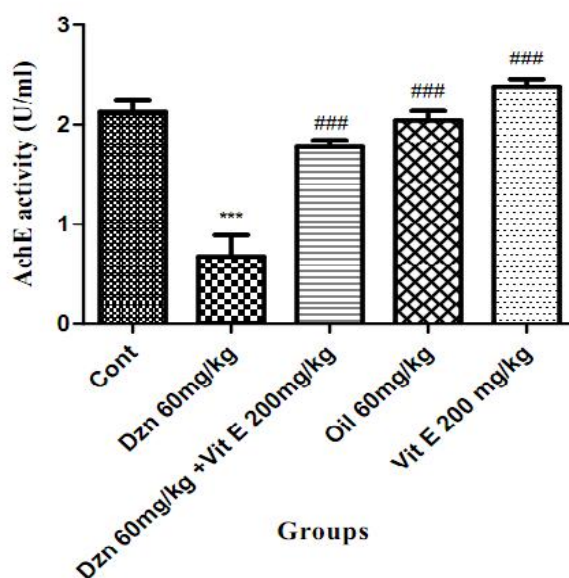
یافته ها

اثر ویتامین E و دیازینون بر روی سطح استیل کولین استراز اریتروسیت: مطابق با نمودار ۱، در معرض قرارگیری با دیازینون، به طور معنی داری سطح استیل کولین استراز را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ($P < 0.001$). میانگین و انحراف معیار آنزیم کولین استراز اریتروسیت در گروه کنترل $3/178 \pm 0/06$ بود که از لحاظ آماری در مقایسه با میانگین این آنزیم در گروه تجربی یک که $0/13 \pm 1/67$ می باشد، معنی دار بود. در گروه تجربی ۲، استفاده از ویتامین E (200 mg/kg) همراه با دیازینون، سطح استیل کولین استراز را در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازینون، به طور معنی داری افزایش داد ($P < 0.001$). در واقع تفاوت قابل توجهی بین میانگین و انحراف معیار آنزیم های کولین استراز اریتروسیت در گروه تجربی دو ($2/81 \pm 0/88$) در مقایسه با گروه تجربی یک ($0/13 \pm 1/67$) وجود دارد که این بیانگر نقش محافظتی ویتامین E در گروه تجربی دو می باشد.

در گروه تجربی سه (دریافت کننده ویتامین E)، افزایش قابل توجهی بر روی سطح آنزیم استیل کولین استراز در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازینون مشاهده شد

محیط قلیایی بنفش است) اضافه کردیم و هم زدیم. به محیط استیل کولین کلراید، جهت پایداری بیشتر اسید استیک ۱۰ درصد اضافه نمودیم. ابتدا با سود ۰/۱ نرمال تیترا کردیم تا رنگ اولیه اسید استیک از بین رفت و بنفش شد. سپس به مدت ۱ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه قرار دادیم. محیط را هر چند دقیقه از نظر تغییر رنگ به زرد بررسی نمودیم. وقتی محیط زرد رنگ شد، با سود ۰/۰۱ نرمال تیترا نمودیم تا محیط مجدداً بنفش گردید. در طول یک ساعت میزان تیترا را به میلی لیتر یادداشت می کنیم که هر میلی لیتر نشان دهنده ۱۰ درصد فعالیت آنزیم است. آنالیز آماری: در مطالعه حاضر برای آنالیز آماری نتایج از نسخه ۱۶ نرم افزار SPSS استفاده شد. نتایج براساس $\text{Mean} \pm \text{SD}$ بیان شد. آنالیز آماری استیل کولین استراز اریتروسیت براساس آزمون ANOVA به دنبال تست Tukey-Kramer برای مقایسه تفاوت بین میانگین ها استفاده شد.

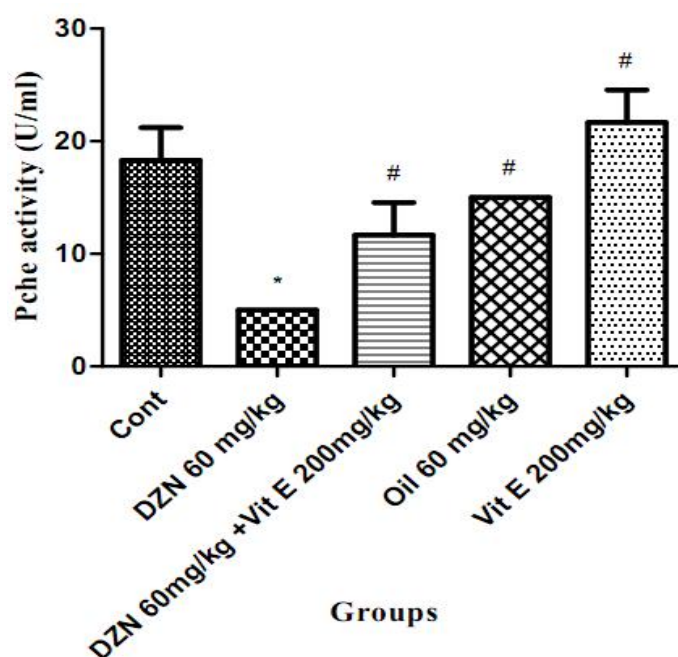
آنالیز آماری کولین استراز سرم براساس آزمون Mann-Whitney Test برای مقایسه تفاوت بین میانگین ها استفاده شد. در هر دو آنالیز، تفاوت آماری معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.



نمودار ۱: اثرات دیازینون و ویتامین E بر روی سطح AchE

*** مقایسه گروه کنترل و دیازینون ($P < 0.001$)، ### مقایسه گروه دیازینون با سایر گروه ها ($P < 0.001$)

آنالیز آماری براساس آزمون ANOVA به دنبال تست Tukey-Kramer



نمودار ۲: اثرات دیازینون و ویتامین E بر روی سطح PchE

* مقایسه گروه کنترل و دیازینون ($P < 0.05$)، # مقایسه گروه دیازینون با سایر گروه‌ها ($P < 0.05$)

آنالیز آماری Mann-Whitney Test

در واقع تفاوت قابل توجهی بین میانگین و انحراف معیار آنزیم های کولین استراز سرمی گروه تجربی دو ($7/54 \pm$) و ($11/14$) در مقایسه با گروه تجربی یک ($6/71 \pm 4/79$) وجود دارد که این بیانگر نقش محافظتی ویتامین E در گروه تجربی دو می باشد. در گروه دریافت کننده ویتامین E، افزایش قابل توجهی بر روی سطح آنزیم کولین استراز سرمی در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازینون مشاهده شد ($P < 0.05$). مطابق با نمودار، سطح آنزیم کولین استراز سرمی در گروه های کنترل، شم و دریافت کننده ویتامین E، تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. میانگین این آنزیم در گروه شم و گروه تجربی سه مشابه با گروه کنترل می باشد ($p > 0.05$) که میانگین و انحراف معیار بترتیب در گروه شم و تجربی سه، $15/01 \pm 4/12$ و $14/22 \pm 8/14$ بودند.

($P < 0.001$). میانگین این آنزیم در گروه شم و گروه تجربی سه مشابه با گروه کنترل می باشد ($p > 0.05$) که میانگین و انحراف معیار بترتیب در گروه شم و تجربی سه، $3/10 \pm 0/053$ و $3/175 \pm 0/069$ بودند.

اثر ویتامین E و دیازینون بر روی سطح کولین استراز سرمی (PchE): مطابق با نمودار ۲، در معرض قرارگیری با دیازینون، به طور قابل ملاحظه ای سطح PchE را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می دهد ($p < 0.05$) که میانگین و انحراف معیار آنزیم کولین استراز سرمی در گروه کنترل رت های ماده $4/53 \pm 15/28$ می باشد که از لحاظ آماری در مقایسه با میانگین این آنزیم در گروه تجربی یک که $6/71 \pm 4/79$ می باشد معنی دار بود. با استفاده از ویتامین E (200 mg/kg) همراه با دیازینون، سطح کولین استراز سرمی را در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازینون، افزایش معنی دار نشان داد ($p < 0.05$).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دیازینون باعث کاهش سطح کولین استراز سرم و اریتروسیت ها می گردد و استفاده از آنتی اکسیدان ویتامین E، باعث افزایش این سطوح در خون و بهبود مهار آنزیم AchE می شود و احتمالاً سمیت دیازینون را کاهش می دهد. دیازینون یک حشره کش ارگانوفسفره است که نه تنها در کنترل آفات گیاهان و میوه ها استفاده می شود، بلکه برای انگل زدایی خارجی از احشام نیز دارای مصارف دامپزشکی است [۲۴]. گزارش شده است که ارگانوفسفره ها از راه معده و روده جذب و به سرعت متابولیزه می شوند [۸]. این ترکیبات باعث ایجاد تغییرات بیوشیمیایی و هماتولوژیکی می شود و عوارض جانبی مختلف در ارگان های متعدد از قبیل کبد، کلیه، سیستم ایمنی، پانکراس و دیواره قلبی-عروقی را القا می کنند [۲۵، ۲۶]. دیازینون از طریق ایجاد رادیکال های آزاد باعث القای استرس اکسیداتیو می شود. همچنین مهار آنزیم کولین استراز از مکانیسم های اصلی مسمومیت ناشی از دیازینون است. این مطالعه به دنبال مطالعه ای با موضوع بررسی سمیت تخمدانی و استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون و اثر پیشگیری کننده ویتامین E انجام شد که در آن دیازینون باعث افزایش قابل توجه در سطح مالون دی الدئید و همچنین کاهش میزان گلووتاتیون و در نتیجه ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت تخمدان رت ماده بالغ گردید و استفاده از ویتامین E باعث بهبود استرس اکسیداتیو ایجاد شده گردید. مطالعه حاضر برای بررسی اثرات سمی حشره کش دیازینون بر روی رت ماده بالغ و اثر محافظت کنندگی ویتامین E انجام شد که یکی از مکانیسم های سمیت، مهار آنزیم کولین استراز می باشد. برای سنجش مهار آنزیم استیل کولین استراز اریتروسیت از روش Elman و برای سنجش مهار آنزیم کولین استراز سرم از روش تیترومتري استفاده شد. مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از دیازینون (

۶۰ mg/kg) باعث کاهش معنی دار در سطح کولین استراز سرمی ($p < 0.05$) و کولین استراز اریتروسیت ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل گردید. در همین

راستا، سارابیا^۱ و همکاران نشان دادند که اولین معیاری که توسط آن درجه مسمومیت حیوان را می توان یافت، با اندازه گیری فعالیت استیل کولین استراز با استفاده از متد Elman است که نتایج، کاهش قابل توجه در سطح استیل کولین استراز پلاسما را در اثر در معرض بودن با دیازینون نشان می دهد [۲۷]. وئو^۲ و همکاران نشان دادند که در رت های دریافت کننده دیازینون داخل وریدی، هردو آنزیم استیل کولین استراز حقیقی و کاذب به سرعت کاهش می یابد که در مصرف خوراکی، مهار آنزیم استیل کولین استراز گلبول قرمز (حقیقی) از پلاسمایی (کاذب) بیشتر بود [۲۸]. کاتسومارو^۳ و همکاران یافتند که با در معرض قرارگیری با دیازینون فعالیت آنزیم کولین استراز پلاسما و اریتروسیت به سرعت مهار می شود که مهار در اریتروسیت ها بیشتر از پلاسماست [۲۹]. در مطالعه ای که توسط توموکنی^۴ و همکاران انجام شد، مهار کولین استراز خون در مسمومیت با دیازینون در موش های صحرائی و سوری که به صورت تک دوز سم را دریافت کردند، به ثبت رسید و نشان داده شد که علی رغم اینکه در معرض قرارگیری با دیازینون در پلاسما بیشتر از اریتروسیت ها است اما مهار در اریتروسیت ها بیشتر است [۳۰]. اونر^۵ و همکاران یافتند که دیازینون فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را مهار می کند و باعث القای لیپیدپراکسیداسیون در ماهی *Oreochromis niloticus* می شود [۳۱]. گوکسیمن^۶ و همکاران نشان دادند که فعالیت آنزیم کولین استراز در رت های دریافت کننده دیازینون به طور قابل توجهی کاهش می یابد [۳۲]. چا^۷ و همکاران نشان دادند که تیمار موشها با دیازینون بطور کامل فعالیت کلین استراز را بلوک می کند [۳۳]. در تمامی این مطالعات که مطابق با نتایج مطالعه ما بودند، استفاده از دیازینون باعث مهار فعالیت آنزیم کولین استراز و کاهش سطوح آنزیمهای کولین استراز سرمی و اریتروسیت گردید.

1-Sarabia

2 -Wu

3-Katsumaro

4 -Tomokuni

5 -Uner

6-Gokcimen

7 -Cha

کولین استراز شد، در حالی که استفاده از ترکیب ویتامین های C و E همراه با DDVP، باعث بازیابی نسبی فعالیت کولین استراز در مقایسه با گروهی شد که DDVP را به تنهایی دریافت کرده بودند [۴۴]. حریری و همکاران نیز نشان دادند که در مسمومیت تحت حاد ناشی از دیازینون، Crocin Safranl Vit E بر مهار آنزیم کولین استراز اثر محافظتی دارند [۴۵].

البته کلندر^۳ و همکاران نشان دادند که استفاده از ویتامین ویتامین E نمی تواند از فعالیت کلین استراز کاذب در رت های تحت درمان با دیازینون محافظت کند و در واقع به دنبال استفاده از این ویتامین، مجددا کاهش قابل توجه را مشاهده کردیم [۱۱]. همچنین التونتاس^۴ و دلیباس^۵ نشان دادند که ویتامین C و E نمی تواند از فعالیت کلین استراز کاذب در رتهای تحت درمان با فنتیون محافظت کند [۴۶] که این مطالعات با نتایج ما مطابقت نداشت که در این مطالعات، فعالیت کولین استراز سرم در مواجهه با دیازینون مهار شد، اما ویتامین احتمالا به خاطر ماهیت رقابتی مهار کولین استراز توسط ارگانوفسفره، نتوانست باعث کاهش یا بهبود مهار فعالیت کولین استراز سرم گردد. علاوه بر این، بهبود و احیای فعالیت کولین استراز سرم می تواند به سنتز پروتئین در کبد وابسته باشد [۴۷] علاوه براین، میزان فعالیت آنزیم با توجه به سن، جنس، مصرف داروها، وجود بیماری و روش اندازه گیری تغییر می کند [۴۸].

نتیجه گیری

بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش و مطالعه قبلی که بر روی استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون بر روی تخمدان بوده است، به نظر می رسد در شرایطی که دیازینون با ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت تخمدان و کاهش سطح کولین استراز سرم و اریتروسیت های خون رت ماده، اثرات سمی غیر قابل انکاری را در رت ماده بروز می دهد، اما به موازات آن، استفاده از ویتامین E، باعث افزایش این سطوح آنزیمی و بازیابی نسبی فعالیت آنها در رت ماده می شود. بر این اساس چنین به

سلول راه های متعددی برای کاهش اثرات استرس اکسیداتیو دارد، با ترمیم کردن آسیب (نوکلئوتیدهای آسیب دیده و پراکسیداسیون لیپیدی ایجاد شده توسط محصولات) و یا با کاهش دادن آسیب های اکسیداتیو توسط آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی [۷]. از جمله آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی ویتامین E است که یک ویتامین محلول در چربی حاضر در غشاهای زیستی است [۳۴،۳۵].

ویتامین E، لیپیدپراکسیداسیون غشای پلاسمایی را متوقف می کند و باعث حفظ یکپارچگی و تمامیت آن می شود. همچنین مطالعات زیادی نشان داده اند که این آنتی اکسیدان، لیپیدپراکسیداسیون و استرس اکسیداتیو ناشی از حشره کشهای ارگانوفسفره را مهار می کند [۳۶-۳۹] که ما در مطالعه قبلی خود شاهد این اثر مهاری بر روی استرس اکسیداتیو تخمدانی ناشی از دیازینون بودیم.

در مطالعه حاضر، ویتامین E به مدت ۱۴ روز از طریق گاواژ استفاده گردید که گروه تجربی ۲، ویتامین را همراه با دیازینون دریافت نمودند و گروه تجربی ۳، ویتامین را به تنهایی دریافت نمود که استفاده از ویتامین E همراه با دیازینون، باعث افزایش معنی دار در سطح AchE در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازینون گردید (۰/۰۰۱ < p). همچنین در این گروه، افزایش معنی داری در سطح PchE را مشاهده کردیم (۰/۰۵ < p). بنابراین ویتامین E، مهار آنزیم کولین استراز را بهبود بخشید. در همین راستا، متکوویس^۱ و همکاران نشان دادند که مهار فعالیت استیل کولین استراز توسط ارگانوفسفره ها، توسط ویتامین های A و E بهتر جبران می شود [۴۰]. در تعدادی از مطالعات نشان داده شده است که متیداتیون که از جمله سموم ارگانوفسفره است، باعث کاهش قابل توجه در فعالیت کولین استراز می شود و استفاده از ترکیب ویتامینهای C و E بعد از تجویز این سم، باعث افزایش قابل توجهی در فعالیت کولین استراز در مقایسه با گروهی شد که سم را به تنهایی دریافت کرده بودند [۴۳-۴۱، ۴۲]. اورال^۲ و همکاران یافتند، که از جمله سموم ارگانوفسفره است، باعث کاهش قابل توجهی در فعالیت

3 -Kalender
4 -Altuntas
5 -Delibas

1 -Matkovics
2 -Oral

نظر می رسد که پس از تجویز ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان تاثیر گذار، می توان بهبود مهار آنزیم کولین استراز را در رت ماده انتظار داشت که احتمالا اثرات توکسیک دیازینون را کاهش می دهد و تا حدی اثر محافظتی در برابر این مسمومیت ایجاد می کند

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که طبق قرارداد با شماره ۹۱۱۰۹۷ و تامین اعتبار لازم امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند، همچنین از خانم لیلا محمدزاده، سرکار خانم متجدد مسئول محترم آزمایشگاه هیستوشیمی گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی و مسئول محترم خانه حیوانات دانشکده پزشکی مشهد صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Shah MD, Iqbal M, Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats, *Food Chem Toxicol* 2010; 48(12): 3345-53
2. Reece R, Handson P, Observations on the accidental poisoning of birds by organophosphate insecticides and other toxic substances, *Vet Rec* 1982; 111(20): 453-55.
3. Yehia MA, El-Banna SG, Okab AB, Diazinon toxicity affects histophysiological and biochemical parameters in rabbits, *Exp Toxicol Pathol* 2007; 59(3): 215-25.
4. Jahromi VH, Koushkaki MNER, Kargar H, The Effects of Malathion Insecticide on Ovary in Female Rats, *Nationalpark-forschung in der schweiz (Switzerland Research Park Journal) (SRPJ)* 2012; 101(5): 231-35.
5. Uzun FG, Kalender S, Durak D, Demir F, Kalender Y, Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E, *Food Chem Toxicol* 2009; 47(8): 1903-908.
6. Casas E, Bonilla E, Ducolomb Y, Betancourt M, Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro, *Toxicol In Vitro* 2010; 24(1): 224-30.
7. 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, *Pestic Biochem Physiol* 2006; 86(2): 93-98.
8. Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Açikgoz F, Durak D, Ulusoy Y, "et al", Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes, *Toxicology* 2005; 211(3): 197-206.
9. Güney M, Demirin H, Oral B, Özgüner M, Bayhan G, Altuntas I, Ovarian toxicity in rats caused by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C, *Hum Exp Toxicol* 2007; 26(6): 491-98.
10. ElMazoudy RH, Attia AA, AbdElGawad HS, Evaluation of developmental toxicity induced by anticholinesterase insecticide, diazinon in female rats, *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2011; 92(6): 534-42.
11. 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.
12. Whyatt RM, Garfinkel R, Hoepner LA, Holmes D, Borjas M, Williams MK, "et al", Within-and between-home variability in indoor-air insecticide levels during pregnancy among an inner-city cohort from New York City, *Environ Health Perspect* 2007; 115(3): 383-89.
13. Altuntas I, Kilinc I, Orhan H, Demirel R, Koylu H, Delibas N, The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes in vitro, *Hum Exp Toxicol* 2004; 23(1): 9-13.
14. Buyukokuroglu ME, Cemek M, Yurumez Y, Yavuz Y, Aslan A, Antioxidative role of melatonin in organophosphate toxicity in rats, *Cell Biol Toxicol* 2008; 24(2): 151-58.
15. Darreh-Shori T, Soininen H, Effects of cholinesterase inhibitors on the activities and protein levels of cholinesterases in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimers disease: A review of recent clinical studies, *Curr Alzheimer Res* 2010; 7(1): 67-73.
16. Barkhordari A RT, Hekmatimoghaddam H, Mosaddegh MD, Fallahzadeh H, Assessment of Ache in worker exposed to OP pesticides, *J Community Med* 2012; 4(1,2): 9-16[Persian].
17. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S, The effects of oxidative stress on female reproduction: a review, *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10(49): 1-31.
18. Shahroudi AS, Chizari M, Tavasoli B, Impact on indigenous knowledge of rural woman on stable sustainable of agriculture. *Monthly Scientific, Social, Economic Jahad* 2006; 271:138-150[Persian].
19. Ebrahimzadeh MA, Shokrzadeh M, Biokabadi M, Effect of organophosphates on erythrocyte cholinesterase activity on rice farmer workers. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences (JMUMS)* 2005; 7(1): 1-7[Persian].
20. Gaines TB. The acute toxicity of pesticides to rats, *Toxicol Appl Pharmacol* 1960;2(1):88-99.
21. Edson E, Noakes D, The comparative toxicity of six organophosphorus insecticides in the rat, *Toxicol Appl Pharmacol* 1960;2(5):523-39.

22. Davies DB, Holub BJ, Comparative subacute toxicity of dietary diazinon in the male and female rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980;54(3):359-67.
23. Sargazi Z, Nikravesh M, Jalali M, Sadeghnia H, Rahimi Anbarkeh F, Mohammadzadeh L, Diazinon-induced ovary toxicity and protection by vitamin E, *Iranian Journal of Toxicology*, In press 2014.
24. Garfitt S, Jones K, Mason H, Cocker J, Exposure to the organophosphate diazinon: data from a human volunteer study with oral and dermal doses, *Toxicol Lett* 2002; 134(1): 105-113.
25. Yavuz T, Delibas N, Yildirim B, Altuntas I, Candir O, Cora A, " et al", Vascular wall damage in rats induced by organophosphorus insecticide methidathion, *Toxicol Lett* 2005; 155(1): 59-64.
26. Gomes J, Dawodu A, Lloyd O, Revitt D, Anilal S, Hepatic injury and disturbed amino acid metabolism in mice following prolonged exposure to organophosphorus pesticides, *Hum Exp Toxicol* 1999; 18(1): 33-37.
27. Sarabia L, Maurer I, Bustos-Obregon E, Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA, *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72(2): 663-68.
28. Wu H, Diazinon toxicokinetics, tissue distribution and anticholinesterase activity in the rat, *Biomed Environ Sci* 1996; 9(4): 359-69.
29. Katsumaro T, Tohru H, Diazinon concentrations and blood cholinesterase activities in rats exposed to diazinon, *Toxicol Lett* 1985; 25(1): 7-10.
30. Tomokuni K, Hasegawa T, Hirai Y, Koga N, The tissue distribution of diazinon and the inhibition of blood cholinesterase activities in rats and mice receiving a single intraperitoneal dose of diazinon, *Toxicology* 1985; 37(1): 91-98.
31. Üner N, Oruç EÖ, Sevgiler Y, ahin 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): 241-45.
32. Gokcimen A, Gulle K, Demirin H, Bayram D, Kocak A, Altuntas I, Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues, *Pestic Biochem Physiol* 2007; 87(2): 103-108.
33. 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, *Toxicol Lett* 2000; 115(3): 173-78.
34. Senthil kumar J, Banudevi S, Sharmila M, Murugesan P, Srinivasan N, Balasubramanian K, " et al", Effects of Vitamin C and E on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress ,androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells, *Reprod Toxicol* 2004; 19(2): 201-208.
35. 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): 2112-18.
36. 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): 500-504.
37. Wolf R, Wolf D, Ruocco V, Vitamin E: the radical protector, *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998; 10(2): 103-17
38. Parra T, de Arriba G, Conejo JR, Cantero M, Arribas I, Rodríguez-Puyol D, "et al", cyclosporine increases local glomerular synthesis of reactive oxygen species in rats1: Effect of vitamin E on cyclosporine nephrotoxicity, *Transplantation* 1998; 66(10): 1325-29.
39. Andrés D, Cascales Ma, Novel mechanism of Vitamin E protection against cyclosporine A cytotoxicity in cultured rat hepatocytes, *Biochem Pharmacol* 2002; 64(2): 267-76.
40. Matkovics B, Szabo L, Ivan J, Gaal I, Some further data on the effects of two organophosphate pesticides on the oxidative metabolism in the liver, *Gen Pharmacol: The Vascular System* 1983; 14(6): 689-91.
41. Altuntas I, Delibas N, Sutcu R, The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C, *Hum Exp Toxicol* 2002; 21(12): 681-85.
42. Altuntas I, Delibas N, Demirci M, Kilinc I, Tamer N, The effects of methidathion on lipid peroxidation and some liver enzymes: role of vitamins E and C, *Arch Toxicol* 2002; 76(8): 470-73.

43. Yavuz T, Altuntas I, Delibas N, Yildirim B, Candir O, Corâ A, " et al", Cardiotoxicity in rats induced by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C, Hum Exp Toxicol 2004; 23(7): 323-29.
44. 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, Reprod Toxicol 2006; 22(4): 783-90.
45. 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): 2803-808[Persian].
46. Altuntas I, Delibas N, The effects of fenthion on lipid peroxidation and some liver enzymes: The possible protective role of Vitamins E and C, Turkish J Med Sci 2002; 32: 293-97
47. John St, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D, Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes, The Journal of Nutritional Biochemistry 2001; 12(9): 500-504.
48. Coye M.J, Lowe J.A, Maddy K.t, Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticide: cholinesterase activity determination, J Occp Med 1986;28(8): 619-627.

The Protective Effect of Vitamin E on Serum and Erythrocytes Cholinesterase Levels in Poisoning of Diazinon, in adult female rats

Sargazi Z¹, Nikravesh MR^{2*}, Jalali M², Sadeghnia HR³, Rahimi Anbarkeh F¹

¹Lecture, Department of Basic Sciences, TorbatHeydariyeh University of Medical Sciences, TorbatHeydariyeh, Iran

² Professor, Department of Anatomy and cell biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³Assistant professor, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

*Corresponding Author: Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Email: Nikraveshmr@mums.ac.ir

Abstract

Background & objectives: Diazinon (DZN) is an OP insecticide that one of its main mechanisms of toxicity is the inhibition of cholinesterase. The aim of the present study was to investigate the effects of diazinon on cholinesterase activity in adult female rat and protective role of vitamin E that performed following other study on diazinon-induced ovary oxidative stress.

Material & Methods: In total 30 adult female wistar rats were divided into 5 groups: control (without any intervention), placebo (received only pure olive oil), experimental 1 (DZN+olive oil, 60 mg/kg), experimental 2 (DZN, 60 mg/kg +Vit E, 200 mg/kg) and experimental 3 (Vit E, 200 mg/kg). After 2 weeks, 3ml blood from the heart was collected with a heparinated syringe. The Serum and erythrocytes cholinesterases inhibition activity was determined.

Results: The results revealed that DZN reduces AchE level in erythrocyte significantly in comparison with those of control group ($p < 0.001$). Also DZN reduced PchE level in serum significantly ($p < 0.05$). In addition, Vit E plus DZN increased AchE level in erythrocyte significantly in comparison with those of DZN group ($p < 0.001$). A significant increase in PchE level was observed ($p < 0.05$).

Conclusion: The findings of this study indicate DZN decreases AchE and PchE levels in blood while in contrast use of vit E, increase their levels. Therefore, it can be concluded that vit E as antioxidants has a protective effect on AchE activity and reduce the toxicity of DZN in adult female rats.

Keyword: Diazinon, erythrocyte cholinesterase, Rat, Serum cholinesterase, Vitamin E.