

Comparison of antioxidant properties of N- acetylcysteine and vitamins E and C on diazinon-induced oxidative stress in rat spleen

Javad Heydari¹, Mahvash Jafari², Saeed Khazaie¹

Background and Aim: Organophosphate insecticides such as diazinon (DZN) can disrupt the body's antioxidant defense system. Antioxidants protect cells against oxidative stress.

In the present study, antioxidant properties of N- acetylcysteine (NAC) and vitamins E and C in reducing oxidative stress caused by DZN in rat spleen were compared.

Materials and Methods: In this experimental study, 48 male Wistar rats were randomly divided into eight equal groups including. control, DZN (100 mg/kg), NAC (160 mg/kg), vitamin E (150 mg/kg), vitamin C (200 mg/kg), NAC+DZN, vitamin E+DZN, and vitamin C+DZN groups. Twenty-four hours after intraperitoneal injection the animals were anesthetized and their spleen tissues were quickly removed. After tissues' hemogenation superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), lactate dehydrogenase activities, as well as glutathione (GSH) and malondialdehyde levels were determined using biochemical methods.

Results: DZN increased SOD and GST activities, but it decreased CAT activity and GSH content in the spleen. Administration of the antioxidant NAC or vitamin E caused SOD and GAT improvement.

Conclusion: DZN induces oxidative stress in the spleen. NAC, through increasing the synthesis of GSH, vitamins E, and C- by removing free radicals- reduce DZN-induced oxidative stress. Comparing the effects of these antioxidants on GSH and GST activity indicates that the antioxidant value of NAC is greater than vitamins E and C.

Key Words: Diazinon, N-acetyl cysteine, Vitamins E and C, Oxidative stress, Rat spleen

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2016; 23(2):101-109.

Received: January 16, 2016

Accepted: August 23, 2016

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

² **Corresponding Author;** Chemical Injuries Research Center, Department of Biochemistry, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email: m.jafari145@gmail.com

Tel: +982182483422

Fax: +982126127281

مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی N-استیل‌سیستئین و ویتامین‌های E و C بر روی استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در طحال موش صحرائی

جواد حیدری¹، مهوش جعفری² سعید خزایی¹

چکیده

زمینه و هدف: حشره‌کش‌های ارگانوفسفره نظیر دیازینون می‌توانند سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن را مختل کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها از استرس اکسیداتیو سلول‌ها محافظت می‌کنند. در این مطالعه، خواص آنتی‌اکسیدانی N-استیل‌سیستئین (NAC) و ویتامین‌های E و C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در بافت طحال موش صحرائی مقایسه شد. **روش تحقیق:** در این مطالعه تجربی، تعداد 48 موش صحرائی نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به 8 گروه مساوی شامل گروه‌های: کنترل، دریافت‌کننده دیازینون (100 mg/kg)، دریافت‌کننده NAC (160 mg/kg)، دریافت‌کننده ویتامین E (150 mg/kg)، دریافت‌کننده ویتامین C (200 mg/kg)، دریافت‌کننده دیازینون با NAC، دریافت‌کننده دیازینون با ویتامین E و دریافت‌کننده دیازینون با ویتامین C تقسیم شدند. 24 ساعت بعد از تزریق داخل صفاقی، حیوانات بیهوش و بافت‌های طحال آنها جدا شدند. بعد از هموژنه‌کردن بافت‌ها، آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلووتاتیون S-ترانسفراز (GST) و لاکتات دهیدروژناز و غلظت‌های گلووتاتیون (GSH) و مالون‌دی‌آلدئید از طریق روش‌های بیوشیمیایی تعیین شدند. **یافته‌ها:** دیازینون سبب افزایش فعالیت SOD و GST و کاهش فعالیت آنزیم CAT و غلظت GSH در طحال گردید ($P < 0/01$). تجویز آنتی‌اکسیدان‌های NAC و یا ویتامین E، سبب بهبود SOD و GAT گردید. **نتیجه‌گیری:** دیازینون باعث القای استرس اکسیداتیو در طحال می‌شود. NAC از طریق افزایش سنتز گلووتاتیون و ویتامین‌های E و C از طریق پاکسازی رادیکال‌های آزاد، باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون می‌شود. مقایسه اثرات این آنتی‌اکسیدان‌ها بر روی غلظت گلووتاتیون و فعالیت GST نشان می‌دهد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی NAC بیشتر از ویتامین‌های E و C است.

واژه‌های کلیدی: دیازینون، N-استیل‌سیستئین، ویتامین‌های E و C، استرس اکسیداتیو، طحال

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1395؛ 23 (2): 101-109.

دریافت: 1394/10/26 پذیرش: 1395/06/02

1 گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران

2 نویسنده مسؤول؛ مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران

آدرس: تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

تلفن: 021-82483422 نمابر: 021-26127281 پست الکترونیکی: m.jafari145@gmail.com

مقدمه

دیازینون یا دیمپلایت (Dimpylate)، یکی از ترکیبات مهم ارگانوفسفره است که به عنوان حشره کش در کشاورزی، باغبانی، دام پزشکی و منازل استفاده می شود. در سال های اخیر از این سم به طور وسیع برای کنترل کرم ساقه خوار برنج و همچنین به عنوان داروی ضد انگل استفاده می گردد. دیازینون بعد از جذب در خاک، به میزان کمی توسط نور و در محیط های آبی به سرعت تخریب می گردد. نیمه عمر این سم ممکن است در خاک های معدنی هوازی بیش از یک ماه باشد و می تواند به صورت فعال بیولوژیکی، 6 ماه یا بیشتر در خاک باقی بماند. دیازینون از طریق پوست، دستگاه گوارش و مسیر هوایی (در صورت تبخیر) جذب شده و به سرعت در زمان کوتاهی در کبد توسط آنزیم های میکروزومی، اکسید شده و به دیازوکسون تبدیل می شود (1-3).

اثرات سمی ارگانوفسفره ها توسط چند مکانیسم در سطح سلول القا می شود. این ترکیبات با فسفریله نمودن اسید آمینه سرین موجود در جایگاه فعال آنزیم کولین استراز، باعث مهار این آنزیم و افزایش سطح استیل کولین و اختلالات کولینرژیک و وقوع تشنج می شود (3، 4). همچنین ارگانوفسفره ها با افزایش تولید رادیکال های آزاد، باعث القای استرس اکسیداتیو و در نهایت مرگ سلولی می گردد (1، 3-5). با توجه به اینکه آنتی اکسیدان ها قادرند با افزایش تولید رادیکال های آزاد مقابله کنند، استفاده از آنها می تواند برای کاهش سمیت ارگانوفسفره ها مفید باشد. ویتامین های E (آلفا-توکوفرول) و C (اسید آسکوربیک) و N-استیل سیستئین (NAC)، سه آنتی اکسیدان مهم هستند که در پاکسازی رادیکال های آزاد شرکت می کنند (3، 6). چندین مطالعه نشان دادند که NAC و ویتامین های E و C می توانند سمیت سلولی ارگانوفسفره ها را کاهش دهند و از تغییرات بعضی از پارامترهای بیوشیمیایی جلوگیری کنند (3، 6-8). مطالعات قبلی اثر حفاظتی NAC و آلفا-توکوفرول را در کاهش استرس اکسیداتیو القاشده توسط دیازینون خوراکی

بعد از 4 هفته را نشان دادند (9، 10). Pena-Llopis و همکاران نشان دادند که تزریق داخل صفاقی NAC قبل از تجویز دی کلروس به ماهی، باعث افزایش فعالیت سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی بدن می شود (11).

به منظور مقابله با اثرات ناخوشایند ارگانوفسفره ها، شناخت مکانیسم عمل دقیق آن برای تولید داروهای جدید و به کارگیری روش های درمانی مناسب و در نهایت به حداقل رساندن صدمات و تلفات، لازم و ضروری است. با توجه به پاسخ های مختلف سیستم آنتی اکسیدان بدن به انواع مختلف ارگانوفسفره ها در بافت های مختلف و همچنین اثرات مختلف آنتی اکسیدان ها بر این سمیت، مطالعات تکمیلی برای درک عملکرد این ترکیبات ضروری می نماید. با وجود مطالعات مختلف روی نقش این آنتی اکسیدان ها بر روی کاهش سمیت ارگانوفسفره ها (6-11)، مقایسه خواص آنتی اکسیدانی این آنتی اکسیدان ها و دیازینون به صورت داخل صفاقی بر روی نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو در بافت طحال انجام نشده است.

طحال به دلیل داشتن ماکروفاژ فراوان و تولید لنفوسیت ها، نقش مهمی در سیستم ایمنی و دفاعی بدن ایفا می کند. با توجه به اهمیت بافت طحال، عوامل شیمیایی مختلف می تواند باعث تغییر عملکرد طحال شوند (12). در مطالعه حاضر، خواص آنتی اکسیدانی NAC و ویتامین های E و C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در بافت طحال موش صحرایی، با سنجش شاخص های استرس اکسیداتیو مقایسه شد.

روش تحقیق

این مطالعه تجربی بر روی 48 سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار در محدوده وزنی 200-250 گرم انجام شد. موش ها در شرایط 12 ساعت نور و 12 ساعت تاریکی در دمای $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ، در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... نگهداری شدند. دسترسی

استیک اسید (EDTA) 0/1 مولار در سدیم سیانید 0/3 میلی‌مولار و نیتروبولوترازولیم 1/5 میلی‌مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت 5 دقیقه، در دمای 37°C قرار گرفت؛ سپس ریوفلاوین 0/12 میلی‌مولار در بافر فسفات پتاسیم 0/067 مولار با $\text{pH}=7/8$ اضافه و به مدت 12 دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. جذب در طی 5 دقیقه در طول موج 560 نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، از روش Abei استفاده شد (14). واکنش، با اضافه کردن H_2O_2 30 میلی‌مولار به حجم مناسبی از عصاره نمونه بافتی در بافر فسفات سدیم 50 میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ ، شروع شد؛ سپس جذب در طی 3 دقیقه در طول موج 240 نانومتر قرائت شد. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت گلوکوتاتیون S- ترانسفراز (GST) به روش Habig انجام شد (15). یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم 50 میلی‌مولار با $\text{pH}=7/4$ شامل: EDTA یک میلی‌مولار، GSH 20 میلی‌مولار و 1- کلرو 2، 4 دی نیترو بنزن 20 میلی‌مولار است. واکنش با اضافه کردن حجم معینی از عصاره بافتی شروع شد. تغییرات جذب در طول موج 340 نانومتر در طی 5 دقیقه قرائت گردید. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) با استفاده از کیت پارس‌آزمون انجام شد. 10 میکرولیتر نمونه با یک میلی‌لیتر از محلول مخلوط شده 1 و 2 موجود در کیت، اضافه و اختلاف جذب بین صفر و 3 دقیقه در طول موج 340 نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

برای سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها، از روش Satho استفاده شد (16). به حجم معینی از عصاره بافتی، 1/5 میلی‌لیتر TCA 10 درصد اضافه شد و به مدت 10 دقیقه

حیوانات به آب و غذا آزاد بود. موازین اخلاقی کار با حیوان‌های آزمایشگاهی که مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) بود، هنگام کار با موش‌های آزمایشگاهی رعایت شد.

حیوان‌ها به‌روش تصادفی به 8 گروه (در هر گروه 6 سر) تقسیم شدند که عبارت بودند از: 1) گروه کنترل که روغن ذرت را به‌عنوان حلال دیزاینون دریافت کردند؛ 2) گروه دریافت‌کننده 100mg/kg دیزاینون؛ 3) گروه دریافت‌کننده 150mg/kg NAC؛ 4) گروه دریافت‌کننده 200mg/kg ویتامین C؛ 5) گروه دریافت‌کننده 200mg/kg ویتامین E؛ 6) گروه دریافت‌کننده دیزاینون به‌همراه NAC؛ 7) گروه دریافت‌کننده دیزاینون به‌همراه ویتامین E و 8) گروه دریافت‌کننده دیزاینون به‌همراه ویتامین C که به‌طور هم‌زمان دیزاینون را به‌همراه آنتی‌اکسیدان‌ها یکبار و تک دوز به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

کلیه مواد شیمیایی مورد نیاز، با درجه خلوص بالا از شرکت Sigma و Merck (آلمان) خریداری شد. NAC، ویتامین C و ویتامین E از شرکت Sigma و دیزاینون از شرکت Supelco آمریکا خریداری گردید. دیزاینون با غلظت 400mg/ml NAC با غلظت 160mg/ml ویتامین E با غلظت 600mg/ml در روغن ذرت و ویتامین C با غلظت 200mg/ml در آب مقطر به‌صورت تازه تهیه شد.

24 ساعت بعد از تزریق، با بیهوش نمودن حیوان‌ها به‌وسیله اتر، بافت طحال خارج گردید و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی و خارج شدن خون، به نیتروژن مایع انتقال داده شد؛ سپس در دمای 70°C - تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. در روز آزمایش، بافت‌ها به دقت توزین و با نسبت 1 به 10 در بافر فسفات‌سالیین هم‌وزنه شد و به مدت 15 دقیقه با دور 16000g در دمای 4°C سانتریفوژ گردید. از مایع رویی برای سنجش شاخص‌های مورد نظر استفاده شد.

فعالیت آنزیم SOD به‌روش Winterbourn سنجیده شد (13). حجم مناسبی از بافت هم‌وزنه اتیلن‌دی‌آمین‌ترا

گاوی (BSA) محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار InStat (ویرایش 3/3) با کمک آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه به همراه تست توکی انجام شد. $P < 0/05$ مرز معنی دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد و نتایج به صورت $Mean \pm SEM$ بیان شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از اثر دیازینون، NAC و ویتامین‌های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و LDH بافت طحال که در جدول یک ارائه شده است، نشان داد که دیازینون باعث افزایش معنی دار فعالیت آنزیم‌های SOD و GST ($P < 0/01$) و کاهش فعالیت آنزیم CAT ($P < 0/01$) بدون تغییر فعالیت آنزیم LDH در مقایسه با گروه کنترل شد. همچنین تجویز دیازینون با ویتامین‌های C و E، باعث افزایش فعالیت آنزیم GST در مقایسه با گروه کنترل گردید ($P < 0/05$). تغییر فعالیت آنزیم SOD در گروه دیازینون - ویتامین E و تغییر فعالیت آنزیم CAT در گروه دیازینون - NAC در مقایسه با گروه دیازینون، معنی دار بود ($P < 0/05$).

نتایج حاصل از اثر دیازینون، NAC و ویتامین‌های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر غلظت‌های GSH و MDA اریتروسیت‌ها که در جدول 1 ارائه شده است، نشان داد که دیازینون باعث کاهش معنی دار غلظت GSH ($P < 0/01$) بدون تغییر در غلظت MDA و همچنین تجویز دیازینون با ویتامین‌های C و E باعث کاهش غلظت GSH ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل شد. NAC به تنهایی باعث افزایش غلظت GSH گردید ($P < 0/05$). افزایش غلظت GSH در گروه‌های آنتی‌اکسیدان‌ها با دیازینون در مقایسه با گروه دیازینون معنی دار نبود.

سانتریفوژ گردید. سپس 1/5 میلی لیتر از مایع رویی برداشته و 2 میلی لیتر اسید تیوباربیتریک 0/67 درصد اضافه شد و به مدت 30 دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد. سپس 2 میلی لیتر n-بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت 15 دقیقه در 4000g سانتریفوژ شد. سپس جذب محلول رویی صورتی رنگ، در طول موج 532 نانومتر خوانده شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از 1 و 1 و 3 و 3 ترا اتوکسی پروپان به عنوان استاندارد تعیین شده و غلظت مالون‌دی‌آلدئید بر حسب نانومول بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد. محلول استاندارد MDA در غلظت‌های 20 - 0/2 میکرومولار در اسیدسولفوریک 10 درصد تهیه شد.

برای سنجش میزان گلوکاتایون بافت، از روش Tietz استفاده شد (17). غلظت مناسبی از نمونه هموژنه با 10 میکرولیتر اسیدسولفوسالسیلیک 5 درصد مخلوط و به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد با دور 2000g سانتریفوژ شد. 100 میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و به 810 میکرولیتر دی‌سدیم فسفات 0/3 مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن 90 میکرولیتر دی‌تیو-بیس-نیتروبنزوئیک اسید 0/4 درصد محلول در سیترات سدیم 1 درصد، واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در طول موج 412 نانومتر در طی 5 دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوکاتایون یک میلی گرم بر میلی لیتر، منحنی استاندارد گلوکاتایون رسم گردید و غلظت گلوکاتایون بر حسب نانومول بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد. محلول استاندارد گلوکاتایون در غلظت‌های 200 - 25 میکرومولار تهیه شد.

برای تعیین غلظت پروتئین از روش Bradford استفاده شد (18). حجم مناسبی از عصاره بافتی، به حجم یک میلی لیتر رسانده شد و 3 میلی لیتر از محلول Bradford به آن اضافه و به مدت 10 دقیقه انکوبه گردید؛ سپس در طول موج 595 نانومتر، جذب قرائت شد. غلظت پروتئین، با رسم منحنی استاندارد با استفاده از محلول 1mg/ml آلبومین سرم

جدول 1- مقایسه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و لاکتات‌دهیدروژناز (LDH) در بافت طحال موش صحرائی در بین گروه‌های کنترل و تیمار بعد از 24 ساعت

| MDA | GSH | LDH | GST | CAT | SOD | پارامترها |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|----------------------|
| U/mg protein | U/mg protein | U/mg protein | U/mg protein | U/mg protein | U/mg protein | |
| 9/59±0/82 | 37/85±1/75 | 111/38±3/90 | 113/26±5/44 | 17/08±0/80 | 33/24±1/45 | کنترل |
| 11/42±0/13 | 28/90±1/49** | 94/46±4/41 | 145/13±5/17** | 13/05±0/61** | 41/06±1/72** | دیازینون |
| 9/25±0/74 | 44/46±1/65*،# | 114/33±3/72 | 116/66±4/31 | 18/82±0/84 | 33/26±1/09 | NAC |
| 9/41±0/76 | 37/39±1/28 | 115/05±4/92 | 118/44±5/96 | 17/66±0/56 | 32/39±1/46 | ویتامین E |
| 9/79±0/82 | 36/34±1/30 | 112/44±5/58 | 121/13±5/41 | 17/13±0/76 | 32/83±1/22 | ویتامین C |
| 11/56±0/81 | 32/72±1/29 | 101/05±4/69 | 132/22±4/49 | 16/25±0/49# | 38/39±1/17 | دیازینون - NAC |
| 9/89±0/88 | 30/99±1/05* | 102/01±4/85 | 138/29±4/32* | 14/58±0/40 | 34/85±1/42# | دیازینون - ویتامین E |
| 10/64±0/89 | 30/15±1/49* | 99/97±5/85 | 139/32±5/17* | 14/67±1/01 | 35/73±1/12 | دیازینون - ویتامین C |

نتایج به صورت Mean±SEM بیان شد. *P<0/05 و **p<0/01 نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است. #P<0/05 نسبت به گروه دیازینون معنی‌دار است. NAC: N - استیل سیستین، SOD: سوپراکسیددیسموتاز، CAT: کاتالاز، GST: گلوکوتایون S- ترانسفراز و LDH: لاکتات‌دهیدروژناز، #P<0/001 نسبت به سه گروه دیازینون-آنتی‌اکسیدان معنی‌دار است.

بحث

افزایش فعالیت SOD ناشی از تجویز دیازینون، بیانگر فعال شدن سیستم دفاعی آنزیمی سلول برای خنثی‌نمودن رادیکال‌های آزاد تولید شده است. افزایش فعالیت SOD باعث کاهش رادیکال‌های سوپراکسید و افزایش میزان H_2O_2 شده و کاهش فعالیت آنزیم CAT منجر به عدم خنثی‌شدن H_2O_2 شده که در نهایت ممکن است موجب آسیب بافتی شود. تغییر فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT بعد از استفاده از NAC و ویتامین‌های E و C، احتمالاً مربوط به توانایی این آنتی‌اکسیدان‌ها در حذف مستقیم ROS می‌باشد (7، 20).

مطالعات نشان دادند که به‌دنبال تجویز بعضی از ارگانوفسفره‌ها، فعالیت دو آنزیم SOD و CAT افزایش (1)، 5، 7، 21) و یا کاهش (4، 6، 22) می‌یابد. این اختلاف نتایج در مطالعات مختلف؛ ناشی از نوع، نژاد و گونه حیوان، نوع سم و بافت، مسیر تجویز ماده سمی و دوز و زمان تیمار می‌باشد. 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

نتایج این مطالعه نشان داد که دیازینون با افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و GST و کاهش فعالیت CAT و غلظت GSH، باعث القای استرس اکسیداتیو در بافت طحال می‌شود. تجویز NAC و ویتامین‌های E و C مانع تغییرات این پارامترها می‌شود. تجویز بعضی از ارگانوفسفره‌ها باعث تولید رادیکال‌های آزاد و آسیب به ساختمان و عمل ماکرومولکول‌های مختلف بدن می‌شود. برای خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد در بدن، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر: SOD و CAT فعال می‌شوند. 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 (19).

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD و کاهش فعالیت آنزیم CAT در بافت طحال می‌شود. تجویز NAC و ویتامین‌های E و C، سبب کاهش فعالیت آنزیم SOD و افزایش فعالیت آنزیم CAT در مقایسه با گروه دیازینون گردید. در این مطالعه

نشان‌دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل این سم است که با افزایش مصرف GSH همراه است (15). جبران کاهش گلوتاتیون می‌تواند ناشی از عمل NAC به‌عنوان پیش‌ساز گلوتاتیون و همین‌طور عملکرد مستقیم ویتامین‌های C و E در حذف رادیکال‌های آزاد باشد (20). 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 (5، 9-11، 25).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که دیازینون احتمالاً از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش غلظت گلوتاتیون، باعث القای استرس اکسیداتیو در بافت طحال می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها شامل NAC از طریق افزایش سنتز گلوتاتیون و ویتامین‌های E و C از طریق پاکسازی رادیکال‌های آزاد، باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون می‌شود. اگرچه مقایسه اثرات آنتی‌اکسیدانی هر سه آنتی‌اکسیدان نسبت به هم معنی‌دار نبود، اما با توجه به غلظت گلوتاتیون و فعالیت GST به نظر می‌رسد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی NAC تا حدودی بیشتر از ویتامین E و C است.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی با کد 328 و کد اخلاق IR.bmsu.1393.184 است که با حمایت مالی مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... (عج) انجام شد. بدین‌وسیله از خانم‌ها فریده ایزدی و مریم صالحی و آقایان جواد رسولی و حسین مهدوی‌نسب برای همکاری در مراحل اولیه مطالعه و نیز از کلیه مسئولین مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، تشکر و قدردانی می‌شود.

(3، 6، 21-24). Uner و همکاران نشان دادند تجویز فنتون به‌تنهایی و به‌همراه NAC، روی فعالیت SOD و CAT تأثیری ندارد (25).

افزایش تولید رادیکال‌های آزاد توسط دیازینون، منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می‌شود که یکی از نشانگرهای زیستی شاخص آن MDA است. افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، باعث تراوش آنزیم‌های سیتوزولی مثل LDH به داخل سرم می‌شود (6، 23). در مطالعه حاضر، تجویز دیازینون افزایش معنی‌داری را در میزان MDA و فعالیت LDH نشان نداد که نشان‌دهنده حضور استرس اکسیداتیو در مراحل اولیه است که هنوز منجر به پراکسیداسیون لیپیدها نگردیده است. مطالعات جعفری و همکاران (1391) و طهماسبی و همکاران (1391) نشان دادند که افزایش غلظت MDA و کاهش فعالیت LDH در بافت‌های طحال، مغز، قلب، کبد و کلیه، بعد از تجویز دیازینون و پاراکسون مشاهده می‌شود (4، 5). چندین مطالعه نشان دادند که تجویز ارگانوفسفره‌های مختلف نظیر: دیازینون، فن‌تیون و مالاتیون باعث افزایش غلظت MDA و کاهش فعالیت LDH شده و تجویز NAC و ویتامین‌های E و C باعث تعدیل این دو پارامتر می‌شود (7، 9، 22، 25).

گلوتاتیون از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های داخل سلولی است که برای پاکسازی مستقیم رادیکال‌های آزاد و همچنین به‌عنوان کوفاکتور برای آنزیم GST عمل می‌کند. GST از آنزیم‌های کمکی سیستم آنتی‌اکسیدان است که با اتصال GSH به مواد سمی، باعث تولید ترکیباتی با سمیت کمتر می‌شود. تخلیه GSH در نهایت باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (4، 5).

در این مطالعه تجویز دیازینون سبب افزایش فعالیت GST و کاهش غلظت GSH در بافت طحال موش صحرایی شد و تجویز NAC و ویتامین‌های C و E سبب بهبودی این پارامترها گردید. افزایش GST در اثر تزریق دیازینون،

منابع:

- 1- Oruc E. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of *Cyprinus carpio* (L.). *Environ Toxicol*. 2011; 26(6): 571-8.
- 2- Abdou HM, ElMzoudy RH. Oxidative damage, hyperlipidemia and histological alterations of cardiac and skeletal muscles induced by different doses of diazinon in female rats. *J Hazard Mater*. 2010; 182(1-3): 273-8.
- 3- Tahmasebi K, Jafari M, Ahmadi A. Evaluation of oxidative stress biomarkers in rat Heart exposed to diazinon and vitamins E and C. *Ofoogh-e-Danesh*. 2015; 21(1):13-9. [Persian]
- 4- 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. *Toxicol Mech Methods*. 2012; 22(8): 638-47.
- 5- 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. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012; 34(3): 876-87.
- 6- 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. *J Ardabil Univ Med Sci*. 2015; 15(2): 116-27. [Persian]
- 7- Yilmaz N, Yilmaz M, Altuntas I. Diazinon-induced brain toxicity and protection by vitamins E plus C. *Toxicol Ind Health*. 2012; 28(1): 51-7.
- 8- Abdel-Monem UM, Qar H, Attwa RA. Detoxification of dietary diazinon by clay, vitamin C and vitamin E in rabbits. *World Appl Sci J* 2012; 19(1): 144-52.
- 9- Abedini MS, Jafari M, Mirzadeh SM, Salam F. The effect of N-acetyl cysteine and vitamins E and C on diazinon-induced oxidative stress in rat erythrocytes. *Daneshvar Medicine*. 2016; 23(122) :53-62. [Persian]
- 10- 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. *Toxicol Mech Methods*. 2007; 17(2): 109-15.
- 11- Pena-Llopis S, Ferrando MD, Pe?a JB. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquat Toxicol*. 2003; 65(4): 337-60.
- 12- Khazaie S, Jafari M, Heydari J, Salem F. Investigation of response of spleen and erythrocytes antioxidant defense system to the effects of N-acetyl cysteine against paraoxon toxicity in rat. *Urmia Med J*. 2015; 26(3): 176-84. [Persian]
- 13- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med*. 1975; 85(2): 337-41.
- 14- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.
- 15- Habig WH, Jakoby WB. Glutathion S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol*. 1981; 77: 218-31.
- 16- Satho K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin ChimActa*.1978; 90(1): 37-43.
- 17- 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; 27(3): 502-22.
- 18- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- 19- Rafieian-Kopaei M, Baradaran A, Rafieian M. Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. *J Res Med Sci*. 2013; 18(7): 629.
- 20- Mostafalou S, Abdollahi M, Eghbal MA, Saeedi Kouzehkonani N. Protective effect of NAC against malathion-induced oxidative stress in freshly isolated rat hepatocytes. *Adv Pharm Bull*. 2012; 2(1): 79-88.
- 21- 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. *Environ Toxicol*. 2011; 26(3): 287-91.

- 22- 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. *Am J Pharmacol Toxicol*. 2014; 9(3): 177-88.
- 23- 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. *J Rafsanjan Univ Med Sci*. 2014; 12(11): 895-906. [Persian]
- 24- Salehi M, Jafari M, Asgari A. Response of liver antioxidant defense system to vitamins E and C against diazinon toxicity in rat. *J Sabzevar Univ Med Sci*. 2015; 21(6): 1081-9. [Persian]
- 25- 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. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2009; 150(1): 33-8.