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

Javad Heydari[1], Mahvash Jafari[2], Saeed Khazaie[1]

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

مقاله اصیل پژوهشی

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

جواد حیدری[1]، مهوش جعفری[2] سعید خزایی[1]

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 صحرایی مقایسه شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، تعداد 48 موش صحرایی 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)، گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) و لاکتات دهیدروژناز و غلظت‌های گلوتاتیون (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 گلوتاتیون 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 گلوتاتیون و فعالیت GST نشان می‌دهد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی NAC بیشتر از ویتامین‌های E و C است.

واژه‌های کلیدی: دیازینون، N–استیل سیستئین، 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**

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

2**نویسنده مسؤول؛** مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(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 دیمپلیت (Dimpylate)، یکی از ترکیبات مهم ارگانوفسفره است که به‌عنوان حشره‌کش در کشاورزی، باغبانی، دام‌پزشکی و منازل استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر از این سم به‌طور وسیع برای کنترل کرم ساقه‌خوار برنج و همچنین به‌عنوان داروی ضدّ انگل استفاده می‌گردد. دیازینون بعد از جذب در خاک، به‌میزان کمی توسط نور و در محیط‌های آبی به‌سرعت تخریب می‌گردد. نیمه عمر این سم ممکن است در خاک‌های معدنی هوازی بیش از یک ماه باشد و می‌تواند به‌صورت فعّال بیولوژیکی، 6 ماه یا بیشتر در خاک باقی بماند. دیازینون از طریق پوست، دستگاه گوارش و مسیر هوایی (در صورت تبخیر) جذب شده و به‌سرعت در زمان کوتاهی در کبد توسط آنزیم‌های میکروزومی، اکسید شده و به دیازوکسون تبدیل می‌شود (1-3).

اثرات سمّی ارگانوفسفره‌ها توسط چند مکانیسم در سطح سلول القا می‌شود. این ترکیبات با فسفریله‌نمودن اسید آمینه سرین موجود در جایگاه فعال آنزیم کولین استراز، باعث مهار این آنزیم و افزایش سطح استیل‌کولین و اختلالات کولینرژیک و وقوع تشنّج می‌شود (3، 4). همچنین ارگانوفسفره‌ها با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، باعث القای استرس اکسیداتیو و در نهایت مرگ سلولی می‌گردد (1، 3-5). با توجه به اینکه آنتی‌اکسیدان‌ها قادرند با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد مقابله کنند، استفاده از آنها می‌تواند برای کاهش سمیّت ارگانوفسفره‌ها مفید باشد. ویتامین‌های E (آلفا- توکوفرول) و C (اسید آسکوربیک) و N– استیل‌سیستئین (NAC)، سه آنتی‌اکسیدان مهم هستند که در پاکسازی رادیکال‌های آزاد شرکت می‌کنند (3، 6). چندین مطالعه نشان دادند که NAC و ویتامین‌های E و C می‌توانند سمیّت سلولی ارگانوفسفره‌ها 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 دی‌کلروس به ماهی، باعث افزایش فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن می‌شود (11).

به‌منظور مقابله با اثرات ناخوشایند ارگانوفسفره‌ها، شناخت مکانیسم عمل دقیق آن برای تولید داروهای جدید و به‌کارگیری روش‌های درمانی مناسب و در نهایت به‌حداقل رساندن صدمات و تلفات، لازم و ضروری است. با توجه به پاسخ‌های مختلف سیستم آنتی‌اکسیدان بدن به انواع مختلف ارگانوفسفره‌ها در بافت‌های مختلف و همچنین اثرات مختلف آنتی‌اکسیدان‌ها بر این سمیّت، مطالعات تکمیلی برای درک عملکرد این ترکیبات ضروری می‌نماید. با وجود مطالعات مختلف روی نقش این آنتی‌اکسیدان‌ها بر روی کاهش سمیّت ارگانوفسفره‌ها (6- 11)، مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی این آنتی‌اکسیدان‌ها و دیازینون به‌صورت داخل صفاقی بر روی نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو در بافت طحال انجام نشده است.

طحال به‌دلیل داشتن ماکروفاژ فراوان و تولید لنفوسیت‌ها، نقش مهمی در سیستم ایمنی و دفاعی بدن ایفا می‌کند. با توجه به اهمیّت بافت طحال، عوامل شیمیایی مختلف می‌تواند باعث تغییر عملکرد طحال شوند (12). در مطالعه حاضر، خواص آنتی‌اکسیدانی NAC و ویتامین‌های E و C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در بافت طحال موش صحرایی، با سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو مقایسه شد.

روش تحقیق

این مطالعه تجربی بر روی 48 سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار در محدوده وزنی 250-200 گرم انجام شد. موش‌ها در شرایط 12 ساعت نور و 12 ساعت تاریکی در دمای 22±2°C، در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... نگهداری شدند. دسترسی

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 دیازینون دریافت کردند؛ 2) گروه دریافت‌کننده 100mg/kg دیازینون؛ 3) گروه دریافت‌کننده NAC 160mg/kg؛ 4) گروه دریافت‌کننده 150mg/kg ویتامین E، 5) گروه دریافت‌کننده 200mg/kg ویتامین C؛ 6) گروه دریافت‌کننده دیازینون به‌همراه NAC؛ 7) گروه دریافت‌کننده دیازینون به‌همراه ویتامین E و 8) گروه دریافت‌کننده دیازینون به‌همراه ویتامین C که به‌طور هم‌زمان دیازینون را به‌همراه آنتی‌اکسیدان‌ها یکبار و تک دوز به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

کلّیه مواد شیمیایی مورد نیاز، با درجه خلوص بالا از شرکت Merek و Sigma (آلمان) خریداری شد. NAC، ویتامین C و ویتامین E از شرکت Sigma و دیازینون از شرکت Supelco آمریکا خریداری گردید. دیازینون 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 بیهوش‌نمودن حیوان‌ها به‌وسیله اتر، بافت طحال خارج گردید و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی و خارج‌شدن خون، به نیتروژن مایع انتقال داده شد؛ سپس در دمای 70°C- تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. در روز آزمایش، بافت‌ها به دقّت توزین و با نسبت 1 به 10 در بافر فسفات‌سالین هموژنه شد و به‌مدت 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 هموژنه اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید (EDTA) 0/1 مولار در سدیم‌سیانید 0/3میلی‌مولار و نیتروبلوتترازولیوم 1/5میلی‌مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط‌کردن به‌مدت 5دقیقه، در دمای 37°C قرار گرفت؛ سپس ریبوفلاوین 0/12 میلی‌مولار در بافر فسفات‌پتاسیم 0/067مولار با pH=7/8 اضافه و به‌مدّت 12دقیقه 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 اضافه‌کردن H_2O_2 30میلی‌مولار به حجم مناسبی از عصاره نمونه بافتی در بافر فسفات‌سدیم 50میلی‌مولار با 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 گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) ابه‌روش Habig انجام شد (15). یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات‌پتاسیم 50میلی‌مولار با pH=7/4 شامل: EDTA یک میلی‌مولار، GSH 20 میلی‌مولار و 1- کلرو 2، 4 دی نیترو بنزن 20میلی‌مولار است. واکنش با اضافه‌کردن حجم معینی از عصاره بافتی شروع شد. تغییرات جذب در طول موج 340نانومتر در طی 5دقیقه قرائت گردید. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز (LDH) با استفاده از کیت پارس‌آزمون انجام شد. 10 میکرولیتر نمونه با یک میلی‌لیتر از محلول مخلوط‌شده 1 و 2 موجود در کیت، اضافه و اختلاف جذب بین صفر و 3 دقیقه در طول موج 340نانومتر 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، 1/5میلی‌لیتر TCA 10درصد اضافه شد و به‌مدّت 10دقیقه

سانتریفوژ گردید. سپس 1/5 میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته و 2 میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک 0/67 درصد اضافه شد و به‌مدّت 30دقیقه در بن‌ماری جوش قرار داده شد. سپس 2میلی لیتر n-بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید، به‌مدت 15دقیقه 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 تترا اتوکسی پروپان به‌عنوان استاندارد تعیین شده و غلظت مالون‌دی‌آلدئید بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. محلول استاندارد MDA در غلظت‌های 20 – 0/2 میکرومولار در اسیدسولفوریک 10درصد تهیه شد.

برای سنجش میزان گلوتاتیون بافت، از روش Tietz استفاده شد (17). غلظت مناسبی از نمونه هموژنه با 10میکرولیتر اسیدسولفوسالسیلیک 5درصد مخلوط و به‌مدت 10دقیقه در دمای 4درجه سانتی‌گراد با دور 2000g سانتریفوژ شد. 100میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و به 810میکرولیتر دی‌سدیم‌فسفات 0/3مولار اضافه شد. سپس با اضافه‌کردن 90میکرولیتر دی‌تیو–بیس-نیتروبنزوئیک اسید 0/4 درصد محلول در سیترات سدیم 1درصد، واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در طول موج 412 نانومتر در طی 5دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوتاتیون یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، منحنی استاندارد گلوتاتیون رسم گردید و غلظت گلوتاتیون بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. محلول استاندارد گلوتاتیون 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 میلی‌لیتر رسانده شد و 3 میلی‌لیتر از محلول Bradford به آن اضافه و به‌مدّت 10دقیقه انکوبه گردید؛ سپس در طول موج 595نانومتر، جذب قرائت شد. غلظت پروتئین، با رسم منحنی استاندارد با استفاده از محلول 1mg/ml آلبومین سرم گاوی (BSA) محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار InStat (ویرایش 3/3) با کمک آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه به‌همراه تست توکی انجام شد. P<0/05 مرز معنی‌دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد و نتایج به‌صورت Mean ± SEM بیان شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از اثر دیازینون، NAC و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی 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 معنی‌دار 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، معنی‌دار بود (P<0/05).

نتایج حاصل از اثر دیازینون، NAC و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر غلظت‌های GSH و MDA اریتروسیت‌ها که در جدول 1 ارائه شده است، نشان داد که دیازینون باعث کاهش معنی‌دار 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 به‌تنهایی باعث افزایش غلظت GSH گردید (P<0/05). افزایش غلظت GSH در گروه‌های آنتی‌اکسیدان‌ها با دیازینون در مقایسه با گروه دیازینون معنی‌دار نبود.

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

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

نتایج به‌صورت 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 سیستئین، SOD: سوپراکسیددیسموتاز، CAT: کاتالاز، GST: گلوتاتیون S- ترانسفراز و LDH: لاکتات دهیدروژناز،
P<0/001# نسبت به سه گروه دیازینون-آنتی اکسیدان معنی‌دار است.

بحث

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 افزایش فعالیت SOD ناشی از تجویز دیازینون، بیانگر فعال‌شدن 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 ها 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

(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 سمیّت 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، 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 ا... (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 مسئوولین مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، تشکر و قدردانی می‌شود.

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. Ofogh-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. [Persisn]

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.