جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

اثر حاد دیازینون بر روی سطح لیپید پراکسیداسیون و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بافت طحال موش صحرایی

صدیق احمدی[۱]؛ مهوش جعفری[۲]*؛ علیرضا عسگری[۳]؛ مریم صالحی[٤]

چکیده

زمینه: دیازینون یکی از مهم‌ترین ارگانوفسفره‌ها است که به‌عنوان حشره‌کش در کشاورزی و صنعت استفاده می‌شود. بعضی از ارگانوفسفره‌ها قادرند باعث تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدان شوند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) و گلوتاتیون (GSH)، مانع اثرات نامساعد رادیکال‌های آزاد می‌شوند. هدف این مطالعه ارزیابی اثر دیازینون بر سیستم آنتی‌اکسیدان طحال موش صحرایی است.

روش‌ها: موش‌های نر نژاد ویستار به‌صورت تصادفی در چهار گروه قرار گرفتند: گروه کنترل، روغن ذرت را به‌عنوان حلال دیازینون و سه گروه آزمایش، دیازینون را در دوزهای ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. ۲٤ ساعت پس از تزریق، حیوانات بیهوش و بافت طحال جدا گردید. بعد از هموژنه کردن بافت طحال، فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، GST و لاکتات دهیدروژناز (LDH) و نیز میزان GSH و مالون دی‌آلدئید (MDA) توسط روش‌های بیوشیمیایی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: فعالیت آنزیم‌های SOD و GST در دوزهای بالاتر از ۳۰ mg/kg دیازینون به‌طور معنادار افزایش یافت، در حالی‌که فعالیت CAT و غلظت GSH در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد.

نتیجه‌گیری: سم دیازینون باعث القاء تولید رادیکال آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو وابسته به دوز می‌گردد. تغییر فعالیت آنزیم‌ها و کاهش غلظت GSH، احتمالاً نشان‌دهنده نارسایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان برای مقابله با رادیکال‌های آزاد و آسیب اکسیداتیو بافتی می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: دیازینون، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، لیپیدپراکسیداسیون، موش صحرایی، طحال

«دریافت: ۱۳۹۰/۳/۱۲ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۷/۱۹»

۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

۳. مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

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

* **عهده‌دار مکاتبات: تهران**، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، تلفن همراه: ۰۹۱۲۳۰۷۹۷۳۲

تلفن محل کار: ۳۳٤- ۲۲۲۸۹۹٤۲-۰۲۱ Email: jafari@bmsu.ac.ir

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره به‌عنوان حشره‌کش، به‌طور وسیع در باغات و مزارع کشاورزی استفاده می‌شوند. عراق از این عوامل، بارها بر علیه اشخاص نظامی و غیرنظامی ایرانی در جنگ ایران – عراق استفاده نموده است (۱). مسمومیت با این ترکیبات از مشکلات جهانی است و میزان بروز مسمومیت با این آفت‌کش‌ها در کشورهای در حال توسعه طی ۱۰ سال گذشته دو برابر شده است. این ترکیبات به‌عنوان سومین علت مسمومیت و علت اصلی مرگ و میر ناشی از مسمومیت در ایران

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مطرح هستند (۲). ترکیبات ارگانوفسفره از طریق فسفریلاسیون اسید آمینه سرین در جایگاه فعال آنزیم کولین استراز، موجب غیرفعال شدن این آنزیم به‌صورت غیرقابل‌برگشت می‌شود. بعد از آن آنزیم کولین استراز دیگر قادر به هیدرولیز استیل کولین نخواهد بود. در نتیجه موجب تجمع استیل‌کولین در سیناپس‌های سیستم عصبی مرکزی و محیطی و تحریک بیش از حد سیناپس‌های کولینرژیک نیکوتینی و موسکارینی می‌شود. اثرات ناشی از مسمومیت با این ترکیبات بسیار متنوع و پیچیده است. مهم‌ترین عوارض کلینیکی مسمومیت با ارگانوفسفره‌ها ناشی از مهار استیل کولین استراز می‌باشد (۱ و ۳). اکثر ترکیبات ارگانوفسفره در بدن توسط سیستم سیتوکروم P_{450} کبدی از طریق دسولفوراسیون اکسیداتیو به متابولیت فعال سمی خود تبدیل می‌گردند (٤). دیازینون که نام اصلی آن دیمپلیت (Dimpylate) و نام شیمیایی آن O و O دی اتیل- O-۲- ایزوپروپیل- S- متیل پیریمیدین-٤- اتیل- فسفوروتیوات است، یکی از ترکیبات جدید و مهم ارگانوفسفره می‌باشد که به‌عنوان حشره‌کش علیه آفات نباتی و حشرات منازل استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر از این سم به‌طور وسیع برای کنترل کرم ساقه‌خوار برنج نیز استفاده می‌شود و همچنین به‌عنوان داروی ضد انگل به‌کار می‌رود (۵ و ٦). این ترکیب از راه روده به آسانی و به‌سرعت در طی چند ساعت جذب و به سرعت در زمان کوتاهی در کبد به دیازوکسون متابولیزه می‌شود (۵).

تاکنون طیف وسیعی از اثرات متفاوت برای ترکیبات ارگانوفسفره گزارش شده است. بسیاری از این اثرات، ارتباطی با مهار آنزیم استیل کولین استراز ندارد، بلکه با مکانیسم‌های دیگر سلولی القا می‌شود (۱ و ۷). یکی از این مکانیسم‌ها تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در سیستم‌های آنتی‌اکسیدان بدن است. در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیندها موجب استرس اکسیداتیو می‌شود. اگر این استرس شدید یا طولانی باشد، می‌تواند باعث آسیب‌های جدی سلولی شود (۸). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، عهده‌دار عمل سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد هستند. سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) از آنزیم‌های کلیدی این سیستم به‌شمار می‌روند. گلوتاتیون (GSH) به‌عنوان آنتی‌اکسیدان باعث افزایش حلالیت سموم و دفع سموم از طریق کلیه می‌شود (۹ و ۱۰).

مطالعات نشان می‌دهند که ارگانوفسفره‌ها با تولید رادیکال‌های آزاد باعث تغییر در سیستم‌های آنتی‌اکسیدان سلول و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شوند (۲، ۱۱ و ۱۲). گزارش شده است که مصرف پاراکسون، دیازینون و کلروپیریفوس توسط موش صحرایی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت‌های مغز، قلب و اریتروسیت‌ها می‌گردد (۱۵-۱۳). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در قلب و پلاسمای موش صحرایی پس از تجویز لیندان به‌عنوان یک ارگانوکلره (۳ هفته) (١٦) و مالاتیون (٤ هفته) (۳) نیز گزارش شده است. به‌دلیل تنوع استخلاف‌ها در ساختمان شیمیایی ارگانوفسفره‌ها و اثرات متفاوت بر روی بافت‌های مختلف، مطالعات تکمیلی جهت درک مکانیسم عمل این ترکیبات ضروری است. مطالعات روی اثر دیازینون بر روی سیستم آنتی‌اکسیدان بافت‌ها به‌صورت in vivo بسیار اندک است. در مطالعه حاضر، اثر تجویز دیازینون بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و لیپید پراکسیداسیون بافت طحال موش صحرایی بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی موش‌های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گرفت. حیوانات در مرکز نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) تحت شرایط طبیعی نور، تاریکی، غذا و آب قرار گرفتند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی که مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... بود، هنگام کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مواد شیمیایی مورد استفاده شامل ۱-کلرو ۲، ٤ دی نیترو بنزن (CDNB)، نیتروبلوتترازولیوم (NBT)، دی تیو – بیس- نیتروبنزوئیک اسید (DTNB)، تری کلرواستیک‌اسید (TCA) و دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بالا از شرکت مرک و سیگما خریداری شد. دیازینون خالص از شرکت Supelco آمریکا (۱۰۰۰mg/ml) خریداری شد و محلول ذخیره (استوک) با غلظت ٤۰۰mg/ml در روغن ذرت به‌صورت تازه تهیه گردید.

حیوانات به روش تصادفی به چهار گروه (هر گروه ۷ سر) تقسیم شدند. گروه کنترل، روغن ذرت را به‌عنوان حلال و سه گروه آزمایشی که دوزهای مختلف دیازینون ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (LD_{50} دیازینون ۱۰۰ mg/kg می‌باشد) را به‌صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. ۲٤ ساعت بعد از تزریق، با بیهوش نمودن حیوانات به وسیله اتر، بافت طحال خارج گردید. بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی و خارج شدن خون و جدا کردن قسمت‌های زاید، بافت طحال به نیتروژن مایع انتقال داده شد و سپس تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- سانتی‌گراد نگه‌داری شد. در روز آزمایش، بافت مورد نظر توزین و با نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سالین هموژنه شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰g در ٤ °C سانتریفوژ گردید. از مایع رویی جهت سنجش شاخص‌های موردنظر استفاده شد.

فعالیت آنزیم SOD با روش Winterbourn سنجیده شد (۱۷). به حجم مناسبی از بافت هموژنه ۰/۱EDTA مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار و NBT ۱/۵ میلی‌مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به‌مدت ۵ دقیقه در ۳۷°C قرار گرفت. سپس ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار در بافرفسفات پتاسیم ۰/۰٦۷ مولار با pH=۷/۸ اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ٥٦۰ نانومتر قرائت و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

فعالیت آنزیم CAT با روش Aebi سنجیده شد (۱۸). به حجم معینی از عصاره بافتی، اتانول مطلق (۰/۰۱ml/ml) اضافه و به‌مدت نیم‌ساعت در یخ اینکوبه گردید. سپس به آن تریتون X-۱۰۰ ده درصد با غلظت نهایی یک درصد اضافه شد. این محلول جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. واکنش با اضافه کردن ۳۰H_2O_2 میلی‌مولار به حجم مناسبی از عصاره نمونه بافتی در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار pH=۷ شروع شد. سپس جذب در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲٤۰ نانومتر قرائت و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

فعالیت آنزیم ترانسفر (GST) به روش Habig سنجیده شد (۱۹). یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار pH=۷/٤ شامل EDTA یک میلی‌مولار، GSH ۲۰ میلی‌مولار و CDNB ۲۰ میلی‌مولار است. واکنش با اضافه کردن حجم معینی از عصاره بافتی شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۳٤۰ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت گردید. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) بااستفاده از کیت پارس آزمون سنجیده شد. جذب نمونه‌ها در طی ۳ دقیقه در طول موج ۳٤۰ نانومتر قرائت و فعالیت ویژه برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

برای تعیین میزان GSH بافت از روش Thietz استفاده شد (۲۰). غلظت مناسبی از نمونه هموژنه با اسید سولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰g در ٤ °C سانتریفوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۸۱۰ میکرولیتر دی‌سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن ۹۰ میکرولیتر معروف DTNB ۰/۰٤ درصد در سیترات سدیم ۰/۱ درصد واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در طول موج ٤۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد سپس با استفاده از محلول گلوتاتیون ۱mg/ml، منحنی استاندارد رسم و غلظت گلوتاتیون نمونه‌ها محاسبه شد.

در ادامه غلظت مالون دی آلدئید (MDA) به‌ترتیب ذیل تعیین شد. برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها (MDA) از روش Satho استفاده شد (۲۱). ۰/۵ میلی‌لیتر از بافت هموژنه با ۱/۵ میلی‌لیتر TCA ده درصد اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. به ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی، ۲ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/٦۷ درصد اضافه شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول n - بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید به‌مدت ۱۵ دقیقه در ٤۰۰۰g سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از ۱,۱, ۳,۳ تترا اتوکسی پروپان به‌عنوان استاندارد تعیین شد.

برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۲۲). حجم مناسبی از عصاره بافتی را به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده، ۳ میلی‌لیتر از محلول برادفورد به آن اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب قرائت شد. غلظت پروتئین با رسم استاندارد با استفاده از محلول ۱mg/ml آلبومین سرم گاوی (BSA) محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار INSTAT به‌صورت آزمون آنالیز واریانس یک طرفه به‌همراه تست توکی انجام شد.

یافته‌ها

بررسی اثر دوزهای مختلف دیازینون بر فعالیت آنزیم SOD طحال نشان داد که فعالیت SOD در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، دیازینون به‌ترتیب ۲۰ (p<۰/۰۵) و ۲۷ (p<۰/۰۰۱) درصد بود که به‌طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است. همچنین افزایش فعالیت آنزیم SOD در دوز ۱۰۰mg/kg دیازینون در مقایسه با دوز ۳۰ mg/kg معنادار بود (p<۰/۰۵) (جدول ۱).

مطالعه اثر دوزهای مختلف دیازینون بر فعالیت آنزیم CAT طحال نشان داد که کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در دوزهای ۵۰ (۷۸/٦٪، p<۰/۰۵) و ۱۰۰ (٦۷/۵٪، p<۰/۰۰۱) میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، دیازینون در مقایسه با گروه کنترل (۱۰۰٪) معنادار است. همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز در دوز ۱۰۰mg/kg در مقایسه با دوز ۳۰mg/kg به‌طور معنادار کاهش یافت (p<۰/۰۱) (جدول ۱).

جدول ۱– اثردوزهای مختلف دیازینون بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و غلظت GSH و MDA طحال موش صحرایی بعد از ٢٤ ساعت

شاخص		دیازینون (mg/kg)		
	کنترل	۳۰	۵۰	۱۰۰
SOD	۳۱/۸٦ ±۲/۱۳٤	۳٤/۷۱۸ ±۳/۳٤۸	۳۸/۲۸٦±۳/۳۹۸*	٤۰/۷۳٤±٤/۰۳***
CAT	۱۷/۹۲٤ ±۲/۰٤	۱٦/٦۰٤ ±۱/۹٦٤	۱٤/۰۹۹±۱/۸٦۵*	۱۲/۱۰۸±۱/۹۳***
GST	۱۱۹/۸۷ ±۱۵/۵٤٦	۱۲۱/٤۳ ±۱۲/۳٤۵	۱٤٤/۲۸±۱۲/۲۳۲*	۱٤۹/٤۵±۱٦/٦۳۹*
LDH	۱۰۳/۵۹ ±۱۷/٤۱	۹۵/۰۵٦ ±۱۲/۲٦۷	۸۸/۸۳۸±۱٤/۷۵۵	۸٤/۵۸۵±۱٦/۹۵۹
GSH	۳۱/۰۷۸ ±۳/۸۵	۲٤/۰۸۰۸ ±٤/۵۱۳	۲۲/۰۹۰۷±٤/۸۹۷*	۲۰/۰۲٤۹±۳/۸۰**
MDA	۲۰/۸۲۸±۲/۰۱۵	۲۱/۰٤۷±۲/۱۰۰	۲۲/۵۱۷±۱/۷۱۷	۲۳/۲۳۳±۱/۸۳٤

واحد فعالیت آنزیم های SOD، CAT، GST و LDH بر حسب (U/mg protein) و غلظت گلوتاتیون و مالون دی آلدئید بر حسب (nmol/mg protein) می باشد. *P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱ و ***P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل معنادار است.

اثر دوزهای مختلف دیازینون بر فعالیت آنزیم GST
طحال نشان داد که فعالیت آنزیم GST در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن، دیازینون به‌ترتیب ۲۰ و ۲٤ درصد به‌طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است ($p<۰/۰۵$). همچنین افزایش فعالیت آنزیم GST در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰mg/kg دیازینون در مقایسه با دوز ۳۰mg/kg معنادار بود (به‌ترتیب $P<۰/۰۵$ و $P<۰/۰۱$).

اثر دوزهای مختلف دیازینون بر فعالیت آنزیم LDH
طحال نشان داد که کاهش فعالیت آنزیم LDH در دوزهای مختلف دیازینون معنادار نیست.

بررسی اثر دوزهای مختلف دیازینون بر میزان غلظت GSH و MDA نشان داد که غلظت GSH در دوزهای ۵۰ (۷۱/۰۸٪، $p<۰/۰۵$) و ۱۰۰ (٦٤/٤٪، $p<۰/۰۱$) میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، دیازینون به‌طور معنادار در مقایسه با گروه کنترل (۱۰۰٪) کاهش یافته است. افزایش غلظت MDA در دوزهای مختلف دیازینون معنادار نبود (جدول ۱).

بحث

طحال یکی از اعضای سیستم لنفاوی است و نقش مهمی در سیستم ایمنی و دفاعی بدن با تولید لنفوسیت‌ها ایفاء می‌کند. همچنین محل ذخیره گلبول‌های قرمز است و در موارد کمبود، آن‌ها را در خون آزاد می‌کند و به‌دلیل داشتن ماکروفاژ فراوان در تصفیه خون و پاکسازی سلول‌های غیرطبیعی و عوامل بیماری‌زا شرکت می‌کند. عوامل شیمیایی مختلف می‌تواند باعث تغییر عملکرد طحال شوند (۲۳). در این مطالعه، اثرات دیازینون بر سیستم آنتی‌اکسیدان بافت طحال بررسی شد.

حشره‌کش‌های ارگانوفسفره، قادر به تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در سیستم‌های آنتی‌اکسیدان بدن هستند. در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیندها موجب استرس اکسیداتیو می‌گردد. رادیکال‌های آزاد به دلیل تمایل به جذب الکترون می‌توانند به ماکرومولکول‌های مهم بدن از جمله پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA آسیب برسانند (۸ و ۹). مجموعه آنزیمی SOD و CAT اولین خط دفاعی سلول در برابر سمیت ناشی از رادیکال‌های آزاد هستند. آنزیم SOD سبب تبدیل رادیکال سوپراکسید به H_2O_2 می‌شود، آنزیم CAT با میل ترکیبی بالا با H_2O_2 واکنش می‌دهد و باعث خنثی شدن سمیت H_2O_2 و تبدیل آن به آب و O_2 می‌شود (۲٤ و ۲۵). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز دیازینون به‌صورت حاد موجب افزایش فعالیت آنزیم SOD و کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود. افزایش فعالیت SOD باعث کاهش رادیکال سوپراکسید و افزایش H_2O_2 در بافت طحال می‌گردد. با توجه به کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز، غلظت بالای H_2O_2 در این بافت موجب آسیب بافتی و ایجاد استرس اکسیداتیو می‌گردد.

مطالعات نشان می‌دهد که ارگانوفسفره‌های فسفومیدون، تری‌کلرفون و دی کلرووس سبب مهار فعالیت SOD می‌شود (۲٦). Sharma و همکاران نشان دادند تجویز خوراکی دی متوآت به موش صحرایی موجب افزایش وابسته به دوز در فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT مغز و کبد می‌شود (۱۱). مطالعات Altuntas (۲۷) و Buyukokuroglu (۲۸)، افزایش فعالیت SOD را طی مسمومیت با دیازینون و فن تیون نشان دادند. مطالعات Monterio و همکاران نشان داد که متیل پاراتیون یا فولی سوپر باعث تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم SOD و CAT کبد و ماهیچه ماهی می‌شود (۳۰-۲۹). مطالعات Akturk و همکاران نشان داد که مصرف دیازینون توسط موش صحرایی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت قلب و گلبول قرمز می‌شود (۳۱). مطالعات غنی و همکاران نشان داد که تزریق پاراکسون به‌صورت داخل صفاقی بعد از ٤ ساعت در موش صحرایی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت مغز می‌شود (۱۳). مطالعات Isik و همکاران نشان داد که تجویز دیازینون و

متیل پاراتیون به ماهی بعد از ٢٤ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD در کبد و شش می‌شود (٣٢).

از طرف دیگر در بعضی از مطالعات به دنبال تجویز ترکیبات آفت‌کش، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گزارش شده است. Khan و همکاران با مطالعه اثر کلرپیریفوس و سیپرمترین به‌عنوان یک پیروتروئید (تجویز به مدت ٢ هفته) بر کبد موش آزمایشگاهی، کاهش فعالیت آنزیم‌هایSOD و CAT را گزارش نمودند (١٢). در یک مطالعه، ارگانوفسفره فوزالون در دوز بالا باعث کاهش فعالیت SOD شده بود (٣٣). Tuzmen و همکاران و Yousef و همکاران نشان دادند که پس از مواجهه با دوزهای متفاوت دلتامترین، کاهش در فعالیت SOD مشاهده می‌شود (٣٤ و ٣٥). علت اختلاف مطالعات در فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدان، احتمالاً ناشی از نوع، ترکیب، گونه مورد مطالعه، بافت مورد بررسی، دوز و زمان مواجهه است.

فعالیت آنزیم LDH با میزان مرگ و میر سلولی رابطه مستقیم دارد. LDH، آنزیمی سیتوپلاسمی است که جهت بررسی آسیب سلولی و به‌عنوان مارکر جهت بررسی سمیت یک ماده شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (٣٦). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز حاد دیازینون باعث کاهش معنادار فعالیت آنزیم LDH بافت طحال نمی‌شود. در مطالعه Alpaslan و همکاران، تجویز دیازینون به موش صحرایی بعد از ٢٤ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم LDH در بافت کبد و پانکراس گردید (٣٧). در مطالعات حیوانی نیز افزایش فعالیت LDH سرم پس از تجویز ترکیباتی از جمله دیازینون و سیپرمترین توسط Manna و همکاران گزارش شده است (٣٨). Mishra و همکاران نشان دادند که تجویز اندوسولفان به ماهی، موجب کاهش فعالیت LDH کبد و عضله اسکلتی می‌گردد (٣٩). مطالعات غنی و همکاران نشان داد که تجویز پاراکسون به موش صحرایی بعد از ٤ ساعت باعث افزایش LDH بافت کبد و افزایش مختصری در بافت مغز می‌گردد (١٣). نتایج مختلف می‌تواند ناشی از اختلاف در نوع مسیر تجویز، غلظت سم مورد استفاده، نژاد و گونه حیوان، نوع بافت و حتی ایزوآنزیم‌های خاص LDH باشد.

آنزیم GST با استفاده از GSH باعث افزایش حلالیت سموم و دفع آن‌ها از بدن می‌گردد، بنابراین نقش مهمی در محافظت بافت‌ها علیه آسیب و استرس اکسیداتیو دارد (١٩). در مطالعه حاضر، دیازینون موجب افزایش فعالیت آنزیم GST در بافت طحال شد که نشان‌دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل این سم و دفع سریع‌تر آن است. افزایش فعالیت GST با افزایش مصرف GSH همراه است (٤٠). مطالعات Monteiro و همکاران نشان دادند که تجویز متیل پاراتیون در ماهی با دوز ٢mg/L به‌مدت ٩٦ ساعت، افزایش فعالیت آنزیم GST در بافت آبشش، کلیه، کبد و ماهیچه سفید را به دنبال دارد (٣٠). البته بعضی مطالعات کاهش GST را نشان داده‌اند. Khan و همکاران نشان دادند که تجویز سیپرمترین و مالاتیون به موش صحرایی باعث کاهش فعالیت آنزیم GST در بافت کبد می‌شود (١٢). در برخی از مطالعات دیگر فعالیت این آنزیم، بدون تغییر گزارش شده است (٤١). معمولاً دوزهای کم سموم منجر به افزایش و دوزهای بالای آن باعث مهار فعالیت آنزیم‌ها می‌شود.

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که در دوزهای بالاتر از ٣٠mg/kg دیازینون، کاهش میزان غلظت گلوتاتیون معنادار است. گلوتاتیون تری پپتید حاوی تیول، یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های سلولی مهم است که با عملکردهای بیولوژیکی مختلف، انواع اکسیژن و متابولیت‌های واکنش‌پذیر را از بین می‌برد. به علاوه، می‌تواند به‌عنوان یک سوبسترا برای آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و GST که خنثی‌کننده سموم هستند، عمل کند (٩، ١٠ و ٤٢). تخلیه GSH در نهایت باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود که به آسیب DNA، توقف کامل و کاهش مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو منجر می‌شود (٤٣ و ٩). کاهش GSH احتمالاً ناشی از افزایش فعالیت آنزیم‌هایی نظیر GPx و GST

است که به GSH نیاز دارند. کاهش GSH باعث افزایش سمیت دیازینون می‌شود. مطالعات Buyukokuroglu و همکاران نشان داد مصرف فن‌تیون (Fenthion) بعد از ۲٤ ساعت، سطح GSH ماهیچه انسان را کاهش می‌دهد (٤٤). مطالعات Monteiro و همکاران نشان داد که مصرف متیل پاراتیون در ماهی موجب کاهش گلوتاتیون در بافت‌های کبد، ماهیچه سفید و آبشش می‌شود (۳۰). مطالعه Catalgol و همکارانش نشان داد که تری‌کلروفن، سطح GSH را در حدود ۷۹-٦٦ درصد در اریتروسیت‌های انسان کاهش می‌دهد (٤٥). مطالعات Khan و همکاران نشان داد مصرف سیپرمترین و مالاتیون در موش صحرایی موجب کاهش گلوتاتیون کبد می‌شود (۱۲).

MDA به‌عنوان مارکر استرس اکسیداتیو، آخرین محصول تجزیه لیپیدها است. افزایش سطح MDA نشان‌دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب غشاء سلولی است (٤٦). در مطالعه حاضر، تجویز دیازینون، افزایش معناداری را در میزان MDA نشان نداد که نشان‌دهنده حضور استرس اکسیداتیو در مراحل اولیه است به‌طوری‌که هنوز منجر به پراکسیداسیون لیپیدها نگردیده است. شادنیا و همکاران، عدم تغییر در میزان مالون دی‌آلدئید را در پلاسمای افرادی که به‌طور مزمن در مواجهه با آفت‌کش‌ها قرار گرفته بودند، گزارش کردند (٤٧). به علاوه، با مطالعه اثر دیازینون بر بافت‌های مختلف ماهی در بعضی از بافت‌ها مانند آبشش، ماهیچه و لوله گوارش، افزایش میزان مالون دی‌آلدئید و عدم تغییر آن در کلیه مشاهده شده است (٤٨). Isik و همکاران نشان دادند محتوای MDA در ماهی‌های آلوده‌شده با متیل پاراتیون دیازینون طی ٤٨-٢٤ ساعت در بافت‌های کبد و ماهیچه افزایش می‌یابد (۳۲). در مطالعه دیگری، اثر دیمتوآت در موش‌های بالغ و نوزادان آن‌ها بررسی شده و گزارش شد که سطح MDA افزایش پیدا می‌کند (٤۹). افزایش‌های مشابهی نیز در سطوح MDA در بافت‌های مختلف موش‌های صحرایی بالغ بعد از تزریق ارگانوفسفره‌ها گزارش شده است (۵۱-۵۰). مطالعات Altuntase و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داد ارگانوفسفره فوزالون سبب افزایش سطح MDA در اریتروسیت‌ها در محیط آزمایشگاهی می‌شود (۳۳). John و همکاران نشان دادند تجویز خوراکی دی‌متوآت و مالاتیون به موش صحرایی موجب تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در اریتروسیت می‌گردد (۵۲). مطالعه Buyukokuroglu و همکاران نیز نشان داد اثر فن‌تیون روی موش صحرایی سبب افزایش سطح MDA در خون می‌شود (٤٤).

نتیجه‌گیری

اثر دیازینون روی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان طحال وابسته به دوز است. دیازینون با تغییر فعالیت آنزیم‌ها و کاهش غلظت GSH با اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدان، باعث القاء استرس اکسیداتیو در این بافت می‌گردد. عدم تغییر میزان مالون دی‌آلدئید، بیانگر وجود استرس اکسیداتیو در مراحل اولیه است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی مرکز تحقیقات شیمیایی و علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) و در قالب طرح تحقیقاتی با شماره ثبت ۳۲۸ انجام گردید. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله، مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین آن مرکز ابراز می‌دارند.

References

1. Storm JE, Rozman KK, Doull J. Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. Toxicolology. 2000; 150(1-3): 1-29.

2. Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, Shadnia S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2004; 137(1):29-34.
3. Worek F, Diepold C, Eyer P. Dimethylphosphoryl-inhibited human cholinesterase: inhibition, reactivation, and aging kinetics. Arch Toxicol. 1998; 73(1): 7-14.
4. Zhang HX, Sultatos LG. Biotransformation of the organophosphorus insecticides parathtion and methyl parathion in male and female rat livers perfused in situ. Drug Metab Dispos. 1991; 19(2): 473 –7.
5. GarWtt SJ, Jones K, Mason HJ, Cocker J. Exposure to the organophosphate diazinon: data from a human volunteer study with oral and dermal doses. Toxicol Lett. 2002; 134(1-3): 105–13.
6. Dutta HM, Maxwell LB. Histological examination of sablethal effects of diazinon on ovary of blugill, lepomis macrochirus. Environ Pollut. 2003; 121(1): 95-102.
7. Stallones L, Beseler C. Pesticide illness, farm practices, and neurological symptoms among farm residents in Colorado. Environ Res. 2002;90(2):89-97.
8. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glotathion peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell cervival against oxidative stress. Free Radic Biol Med. 1994; 17(3): 235-48.
9. Nordberg J, Arnér ES.Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med. 2001;31(11):1287-312.
10. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. Prog Neurobiol. 2000; 62(6): 649-71.
11. Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Nag TC, Dogra TD. Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. Toxicology. 2005; 215(3): 173-81.
12. Khan SM, Sobti RC, Kataria L. Pesticide-induced altration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. Clin Chim Acta. 2005; 358(1-2): 131-8.
13. Ghani E, Mohammadi M, Jafari M, Khoshbaten A, Asgari A. [Evaluation of oxidative stress index in brain tissue of rats after expose to paraoxon(Persian)]. Kowsar Medical Journal. 2008; 13(1): 1-7.
14. Akturk O, Demirin H, Sutcu R, Yilmaz N, Koylu H, Altuntas I. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat heart and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. Cell Biol Toxicol. 2006; 22(6): 455-61.
15. Kaur R, Sandhu HS. In vivo changes in antioxidant system and protective role of selenium in chlorpyrifos-induced subchronic toxicity in bubalus bubalis. Environ Toxicol Pharmacol. 2008;26(1):45-8.
16. Ananya R, Subeena S, Kumar DA, Kumar DT, Kumar MS. Oxidative stress and histopathological changes in the heart following oral lindane (gamma hexachlorohexane) administration in rats. Med Sci Monit. 2005;11(9):BR325-9.
17. Winterbourn C, Hawkins R, Brian M, Carrell R. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J Lab Clin Med. 1975; 85(2): 337-41.
18. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121-6.
19. Habig WH, Jakoby WB. Glutathione S-transferases (rat and human). Methods Enzymol. 1981;77:218-31.
20. 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.
21. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chim Acta. 1978;90(1):37-43.
22. 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.
23. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. Nat Rev Immunol. 2005; 5(8): 606-16.
24. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. J Biol Chem. 1989; 264(14):7761-4.
25. Mates JM, Perez-Gomez C, Decastro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem. 1999; 32(8): 595-603.
26. Naqvi SM, Hasan M. Acetylhomocystein thiolactone protection against phosphamidon-induced alteration of regional superoxide dismutase activity in the central nervous system and its correlation with altered lipid peroxidation. Indian J Exp Biol. 1992; 30(9): 850-2.
27. 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.
28. 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):151-8.
29. Monteiro DA, de Almeida JA, Rantin FT, Kalinin AL. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, Brycon cephalus, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2006;143(2):141-9.
30. Monteiro DA, Rantin FT, Kalinin AL. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, Brycon cephalus (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR (methyl parathion). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2009; 149(1):40-9.

31. Akturk O, Demirin H, Sutcu R, Yilmaz N, Koylu H, Altuntas I. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat heart and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. Cell Biol Toxicol 2006; 22(6): 455-61.
32. Isik I, Celik I. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbowtrout (Oncorhynchus mykiss). Pest Biochem Physiol. 2008; 92(1): 38–42.
33. Altuntas I, Delibas N, Doguc DK, Ozmen S, Gultekin F. Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro. Toxicol In Vitro. 2003;17(2):153-7.
34. Tuzmen N, Candan N, Kaya E, Demiryas N. Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. Cell Biochem Funct. 2008;26(1):119-24.
35. Yousef MI, Awad TI, Mohamed EH. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. Toxicology. 2006;227(3):240-7.
36. Stegink LD, Vestling CS. Rat liver lactate dehydrogenase. Amino-terminal and acetylation status. J Biol Chem. 1966;241(21):4923-30
37. Gokcimen A, Gulle K, Demirin H, Bayram D, Kocak A, Altuntas I. Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues. Pest Biochem Physiol 2007; 87: 103–8.
38. Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, Das S. Repeated dose toxicity of alfa-cypermethrin in rats. J Vet Sci. 2004; 5(3): 241–5.
39. Mishra R, Shukla SP. Endosulfan mediated effects on lactate dehydrogenase from the catfish. Toxicol Lett 1998; 95(suppl 1):145.
40. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem. 1974;249(22):7130-9.
41. Oruç EO, Uner N. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of Oreochromis niloticus. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2000;127(3):291-6.
42. Winkler BS, Orselli SM, Rex TS. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. Free Radic Biol Med. 1994;17(4):333-49.
43. Masella R, Di Benedetto R, Varì R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nutr Biochem. 2005;16(10):577-86.
44. Buyukokuroglu ME, Cemek M, Tosun M, Yurumez Y, Bas O,Yavuz Y. Dantrolen may prevent organophosphate-induced oxidative stress and muscle injury. Pest Biochem Physiol 2008; 92: 156-63.
45. Karademir Catalgol B, Ozden S, Alpertunga B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. Toxicol In Vitro. 2007;21(8):1538-44.
46. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicol Environ Saf. 2006;64(2):178-89.
47. Shadnia S, Azizi E, Hosseini R, Khoei S, Fouladdel S, Pajoumand A, et al. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. Hum Exp Toxicol. 2005;24(9):439-45.
48. Durmaz H, Sevgiler Y, Uner N. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in oreochromis niloticus. Pest Biochem Physiol 2006; 84: 215-26.
49. Mahjoubisamet A, Fetoui H, Zeghal N. Nephrotoxicity induced by dimethoate in adult rats and their Suckling Pups. Pest Biochem Physiol 2008; 91: 96-103.
50. Fortunato JJ, Agostinho FR, Réus GZ, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. Neurotox Res. 2006;9(1):23-8.
51. Possamai FP, Fortunato JJ, Feier G, Agostinho FR, Quevedo J, Wilhelm Filho D, et al. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. Environ Toxicol Pharmacol. 2007;23(2):198-204.
52. 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.