مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۲، بهمن ۱۳۹۲، ۹۰۶-۸۹۵

بررسی نقش N – استیل سیستئین در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در کبد و کلیه موش صحرایی

فریده ایزدی[۱]، مهوش جعفری[۲]، حسین بهادران[۳]، علیرضا عسگری[۴]، عادله دیو سالار[۵]، مریم صالحی[۶]

دریافت مقاله: ۹۱/۰۴/۰۶ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۱/۰۴/۲۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده:۹۱/۱۰/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۱/۱۲/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: دیازینون [Diazinon: (DZN)] به عنوان یک سم ارگانوفسفره سبب تولید رادیکال‌های آزاد و القاء استرس اکسیداتیو می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر N – استیل سیستئین [N- acetyl cysteine: (NAC)] به عنوان آنتی‌اکسیدان بر کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از سمیت دیازینون در کبد و کلیه موش صحرایی است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی ۲۴ سر موش نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۴ گروه (در هر گروه ۶ سر) تقسیم شدند. گروه کنترل (روغن ذرت)، گروه DZN (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، گروه NAC (۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و گروه NAC+DZN که هم زمان DZN و NAC را به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. بعد از ۲۴ ساعت، موش‌ها بیهوش و بافت‌های کبد و کلیه جدا شدند. پس از هموژنه کردن بافت‌ها، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و غلظت گلوتاتیون (GSH) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) توسط روش بیوشیمیایی تعیین شد. معنی‌دار بودن نتایج توسط آنالیز واریانس (ANOVA) به همراه تست توکی تعیین شد.

یافته‌ها: دیازینون سبب افزایش فعالیت SOD، CAT و GST کبد و کلیه و افزایش فعالیت LDH کبد و کاهش میزان GSH و افزایش میزان MDA می‌گردد. تجویز NAC باعث کاهش فعالیت SOD، GST و LDH کبد و فعالیت آنزیم CAT در کبد و کلیه و افزایش غلظت GSH کبد و کلیه و کاهش غلظت MDA کبد می‌شود.

نتیجه‌گیری: احتمالاً دیازینون با تولید رادیکال‌های آزاد سبب افزایش لیپیدپراکسیداسیون غشاء و کاهش غلظت GSH سلول‌های کبد و کلیه می‌شود. تجویز NAC به عنوان آنتی‌اکسیدان از طریق حذف رادیکال‌های آزاد و افزایش سنتز گلوتاتیون به طور نسبی باعث کاهش سمیت دیازینون می‌شود.

واژه‌های کلیدی: دیازینون، N–استیل سیستئین، استرس اکسیداتیو، کبد، کلیه، موش صحرایی

۱- کارشناس ارشد گروه آموزشی بیوشیمی، دانشکده بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد غرب تهران، ایران
۲- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج) تهران، ایران
تلفن: ۲۲۲۸۹۹۴۲-۰۲۱، دورنگار: ۲۲۸۳۰۲۶۲-۰۲۱، پست الکترونیکی: m.jafari145@gmail.com
۳- استادیار گروه آموزشی آناتومی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج) تهران، ایران
۴- استاد گروه آموزشی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزش دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
۵- استادیار گروه آموزشی بیوشیمی، دانشکده بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد غرب تهران، ایران
۶- کارشناس ارشد گروه آموزشی بیوشیمی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

مقدمه

ارگانوفسفره‌ها متداول‌ترین ترکیبات شیمیایی هستند که برای کنترل آفت‌های کشاورزی استفاده می‌شوند و به عنوان سمی‌ترین حشره‌کش‌ها برای حیوانات مهره‌دار به شمار می‌روند. این ترکیبات به دلیل قابلیت تجمع پایین و ماندگاری کوتاه مدت در محیط زیست به میزان فراوان مورد استفاده قرار می‌گیرند. مسمومیت با این ترکیبات یکی از مشکلات بهداشت جهانی بوده و در ایران سومین علت مرگ و میر را به خود اختصاص داده است. ارزیابی سازمان بهداشت جهانی نشان داده است که شیوع مسمومیت با حشره‌کش‌ها در کشورهای در حال توسعه در طی ۱۰ سال گذشته دو برابر شده است. این ترکیبات منبع مهم آلودگی محیط زیست به شمار می‌آیند [۳-۱].

دیازینون یکی از حشره‌کش‌های ارگانوفسفره است که به طور گسترده در مزارع برنج گیلان، مازندران، گلستان و سایر مناطق ایران استفاده می‌شود. مصرف سالیانه دیازینون در ایران ۳۷۷۵ تن تخمین زده شده است و گزارش شده که برخی آب‌های سطحی و محیط‌های اطراف در ایران با سموم ارگانوفسفره مثل دیازینون و مشتقات آن آلوده شده‌اند [۴].

این حشره کش از طریق پوست، سیستم گوارش و مسیر هوایی (در صورت تبخیر) جذب شده و عمدتاً از راه کلیه دفع می‌شود. آنزیم‌های میکروزومی کبد دیازینون را اکسید می‌کنند و ترکیبات مهارکننده استیل کولین استراز قوی‌تری نظیر دیازوکسون، هیدروکسی دیازوکسون و هیدروکسی دیازینون تولید می‌کنند [۱]. این ترکیب تا حدی در آب محلول است و در سیستم‌های بیولوژیکی تجمع پیدا نمی‌کند و به علت ویژگی‌های شیمیایی آن به طور وسیع در کشاورزی استفاده می‌شود [۵].

ارگانوفسفره‌ها با فسفریلاسیون اسید آمینه سرین در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز باعث مهار آنزیم شده که تجمع استیل کولین در سیناپس‌های کولینرژیک و وقوع بحران کولینرژیک تشنج و در موارد حاد ضایعه مغزی و مرگ را به دنبال دارد [۶، ۱]. بسیاری از اثرات ارگانوفسفره‌ها ارتباطی به مهار آنزیم استیل‌کولین استراز نداشته، بلکه توسط سازوکارهای دیگر سلولی القاء می‌شود.

یکی از سازوکارهایی که اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته است، تولید رادیکال‌های آزاد توسط این ترکیبات می‌باشد [۶، ۲-۱]. رادیکال‌های آزاد می‌توانند ماکرومولکول‌های زیستی نظیر لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را اکسید کنند و سبب پراکسیداسیون چربی‌ها، آسیب به غشاء و غیرفعال کردن آنزیم‌ها شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان موادی که در غلظت پایین وجود دارند و به مقدار قابل توجهی اکسید شدن ماده اکسید شونده را به تأخیر می‌اندازند یا مهار می‌کنند و سلول را در برابر اثرات زیان‌آور عوامل محیطی محافظت می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز [Superoxide dismutase (SOD)]، کاتالاز [Catalase (CAT)] و گلوتاتیون S- ترانسفراز [Glutathione S-transferase (GST)] و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی‌شامل ویتامین‌ها و گلوتاتیون [Glutathione (GSH)] می‌باشند. اختلال در توازن اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های بدن منجر به آسیب‌های بافتی و استرس اکسیداتیو می‌شود [۸-۷].

N–استیل سیستئین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قادر است که گلوتاتیون را سنتز نماید و به طور طبیعی اثرات آسیب‌های داخل سلولی رادیکال‌های آزاد را به وسیله ترمیم آسیب‌های اکسیداتیو یا به طور مستقیم با جمع‌آوری رادیکال‌های فعال اکسیژن خنثی کند [۹، ۳].

مطالعات روی تجویز دیازینون به صورت داخل صفاقی و اثر N - استیل سیستئین بر کاهش سمیت ارگانوفسفره‌ها در بافت‌های مختلف بسیار کم انجام شده است. Shadnia و همکاران اثر حفاظتی NAC و آلفا-توکوفرول در کاهش استرس اکسیداتیو القاء شده توسط دیازینون خوراکی را نشان دادند [۴]. Pena-Llopis و همکاران نشان دادند که تزریق NAC سه ساعت قبل از تجویز دی‌کلروس به عنوان یک ارگانوفسفره به ماهی در زمان‌های مختلف تا ۹۶ ساعت باعث افزایش فعالیت GST می‌شود [۱۰]. هدف از این مطالعه بررسی نقش N- استیل سیستئین بر کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در بافت‌های کبد (محل اصلی متابولیسم عوامل ارگانوفسفره) و کلیه (محل دفع مواد متابولیزه عوامل ارگانوفسفره) موش صحرایی است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی است که در طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ انجام شده است.

مواد شیمیایی: ۱-کلرو ۴،۲ دی‌نیتروبنزن، نیتروبلوتترازولیوم، دی تیو – بیس- نیتروبنزوئیک اسید، تری‌کلرواستیک اسید و دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بالا از شرکت‌های Sigma و Merck (آلمان) خریداری شدند. دیازینون از شرکت Supelco–USA با بیشتر از ۹۸٪ خلوص خریداری شد و محلول ذخیره (استوک) با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روغن ذرت به صورت تازه تهیه گردید. N–استیل سیستئین از شرکت Sigma خریداری و محلول ذخیره با غلظت ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در آب مقطر به صورت تازه تهیه گردید.

حیوانات: این مطالعه بر روی ۲۴ سر موش آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گرفت. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به آب و غذا و دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد در حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) نگه‌داری می‌شدند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) قرار گرفت که هنگام کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

تیمار حیوانات: حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه (در هر گروه ۶ سر) تقسیم شدند: گروه کنترل که روغن ذرت را به عنوان حلال دیازینون، گروه دیازینون که ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیازینون، گروه NAC که ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم NAC و گروه دیازینون- NAC که به طور هم‌زمان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیازینون و ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم NAC را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. دقیقاً ۲۴ ساعت بعد از تزریق با بیهوش نمودن حیوانات به وسیله اتر، بافت‌های کبد و کلیه خارج گردید و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی و خارج شدن خون و جدا کردن قسمت‌های زاید، به نیتروژن مایع انتقال داده شد و سپس در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگه‌داری گردید. در روز آزمایش بافت‌ها به دقت توزین و با نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سالین هموژنه شده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ گرم در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. از مایع رویی جهت سنجش شاخص‌های مورد نظر استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: فعالیت آنزیم SOD به روش Winterbourn سنجیده شد [۱۱]. به حجم مناسبی از بافت هموژنه ۰/۱EDTA مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار و نیتروبلوتترازولیوم ۱/۵ میلی‌مولار

در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار در بافرفسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار با pH=۷/۸ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Abei استفاده شد [۱۲]. به حجم معینی از عصاره بافتی اتانول مطلق (۰/۰۱ ml/ml) اضافه و به مدت نیم ساعت در یخ انکوبه گردید. سپس به آن تریتون X-۱۰۰ ۱۰٪ با غلظت نهایی ۱٪ اضافه شد. عصاره بافتی حاصله جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. واکنش با اضافه کردن H_2O_2 ۳۰ 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 ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون S- ترانسفراز: اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم به روش Habig انجام شد [۱۳]. یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی بافرفسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷/۴ شامل EDTA یک میلی‌مولار، گلوتاتیون ۲۰ میلی‌مولار و ۱-کلرو ۴،۲ دی‌نیتروبنزن ۲۰ میلی‌مولار است. واکنش با اضافه کردن حجم معینی از عصاره بافتی شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت گردید. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH): اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (تهران- ایران) انجام شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر نمونه را با یک میلی‌لیتر از محلول مخلوط شده ۱ و ۲ موجود در کیت اضافه و اختلاف جذب بین صفر و ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA): برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها از روش Satho استفاده شد [۱۴]. به ۵۰۰ میکرولیتر بافت هموژنه ۱/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی را برداشته و ۲ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک ۰/۶۷٪ اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر n- بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ گرم سانتریفوژ گردید. سپس جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ۱ و ۱ و ۳ و ۳ تتراتوکسی پروپان به عنوان استاندارد تعیین و غلظت مالون‌دی‌آلدئید بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. محلول استاندارد MDA در غلظت‌های ۲۰ – ۰/۲ میکرومولار در اسیدسولفوریک ۱۰٪ تهیه شد.

سنجش میزان GSH: برای سنجش میزان گلوتاتیون بافت از روش Tietz استفاده شد [۱۵]. غلظت مناسبی از نمونه هموژنه با ۱۰ میکرولیتر اسیدسولفوسالسیلیک ۵٪ مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور g ۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته به ۸۱۰ میکرولیتر دی‌سدیم‌فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن ۹۰ میکرولیتر دی‌تیو- بیس- نیتروبنزوئیک اسید ۰/۴٪ محلول در سیترات سدیم ۱٪ واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در

طول موج ۴۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوتاتیون ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منحنی استاندارد گلوتاتیون رسم گردید و غلظت گلوتاتیون بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید. محلول استاندارد گلوتاتیون در غلظت‌های ۲۰۰-۲۵ میکرومولار تهیه شد.

تعیین غلظت پروتئین: برای تعیین غلظت پروتئین از روش Brodford استفاده شد [۱۶]. حجم مناسبی از عصاره بافتی را به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده و ۳ میلی‌لیتر از محلول Brodford (۱۰۰ میلی‌گرم کوماسی بیریلیانت بلو، ۵۰ میلی‌لیتر اتانول و ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵٪ در یک لیتر) به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب قرائت شد. غلظت پروتئین را با رسم استاندارد با استفاده از محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA) محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: نتایج به صورت Mean±SD بیان شد. تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار INSTAT به صورت آنالیز واریانس یک طرفه به همراه تست توکی انجام گردید. در تمامی آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر دیازینون و N–استیل سیستئین به تنهایی و در ترکیب با هم روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و LDH در کبد و کلیه موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت در جدول ۱ نشان می‌دهد که دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GST کبد و کلیه و افزایش فعالیت LDH کبد در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. میزان افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در کبد و کلیه در گروه دیازینون- NAC در مقایسه با گروه دیازینون کمتر بوده، ولی تأثیری روی فعالیت SOD کلیه ندارد.

جدول ۱-اثر دیازینون و N –استیل سیستئین (NAC) به تنهایی و در ترکیب با هم بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و LDH در کبد و کلیه موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت

پارامترها (U/mg protein)		کنترل	دیازینون	NAC	دیازینون- NAC
سوپراکسیددیسموتاز	کبد	۶۱/۰۱۵±۶/۵۷۴	۸۷/۷۲۲±۹/۵۱۲***	۵۹/۶۹۱±۹/۲۰۵	۸۰/۹۱۸±۹/۹۰۵**
	کلیه	۵۳/۵۵۶±۵/۰۴۴	۷۵/۴۵۶±۸/۰۴۵***	۵۳/۴۳۷±۴/۸۷۳	۷۳/۱۲۶±۶/۴۶۳***
کاتالاز	کبد	۳۹/۹۳۴±۵/۰۷۳	۵۴/۵۲۴±۶/۸۲۷**	۳۸/۶۹۳±۴/۸۱۱	۵۰/۲۶۸±۶/۷۲۶*
	کلیه	۴۲/۰۳۴±۵/۱۰۶	۵۷/۳۹۶±۴/۵۹۷***	۴۳/۱۵۱±۴/۶۳۷	۵۱/۲۸۳±۶/۸۸۶*
گلوتاتیونS-ترانسفراز	کبد	۲۲۷/۲۱۲±۳۰/۵۶۳	۳۰۴/۸۴۶±۳۲/۵۳۳**	۲۳۴/۴۳۷±۲۹/۳۶۳	۲۸۷/۰۸۱±۲۷/۸۹۳*
	کلیه	۳۱/۵۰۵±۳/۳۰۹	۳۸/۳۷۸±۴/۶۸۱*	۲۹/۷۶۳±۲/۷۹۷	۳۵/۰۵۶±۴/۱۸۶
لاکتات دهیدروژناز	کبد	۳۶۳/۷۹۲±۵۰/۰۱۸	۴۶۵/۰۰۸±۳۶/۶۱۶**	۳۵۵/۴۵۶±۴۸/۵۲۸	۴۵۵/۴۸۱±۴۵/۲۳۶*
	کلیه	۳۸۹/۸۴۳±۳۳/۴۷۲	۳۲۵/۹۲۱±۳۷/۸۰۷	۳۶۶/۷۸۱±۳۱/۱۴۵	۳۳۶/۱۸۹±۴۰/۱۷۵

با آنالیز واریانس (ANOVA) و تست توکی *: $p<۰/۰۵$ **: $p<۰/۰۱$ و ***: $p<۰/۰۰۱$ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.

اثر توأم دیازینون و N-استیل سیستئین روی غلظت گلوتاتیون و مالون‌دی‌آلدئید در کبد و کلیه موش صحرایی در جدول ۲ نشان می‌دهد که دیازینون باعث کاهش غلظت گلوتاتیون و افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدئید در کبد و کلیه در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. تجویز NAC به همراه دیازینون سبب کاهش کمتر غلظت گلوتاتیون در کبد و کلیه در مقایسه با گروه دیازینون می‌شود. بهبودی غلظت گلوتاتیون کبد بیشتر از کلیه است. همچنین، تجویز NAC با دیازینون باعث افزایش کمتر غلظت مالون‌دی‌آلدئید در کبد می‌شود، ولی تأثیری روی غلظت مالون‌دی‌آلدئید کلیه ندارد.

جدول ۲- اثر دیازینون و N –استیل سیستئین (NAC) به تنهایی و در ترکیب با هم بر روی غلظت GSH و MDA در کبد و کلیه موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت

پارامترها (nmol/mg protein)		کنترل	دیازینون	NAC	دیازینون- NAC
گلوتاتیون	کبد	۱۰۸/۲۱۷±۱۱/۸۳۶	۷۵/۰۱۸±۱۱/۶۷۲***	۹۹/۲۶۳±۱۳/۲۱۲	۹۰/۸۷۹±۹/۷۵۱
	کلیه	۴۱/۷۶۶±۴/۹۴۴	۲۹/۵۱۱±۳/۵۱۲**	۴۰/۱۲۴±۳/۸۰۴	۳۳/۰۴۵±۴/۶۱۹*
مالون دی آلدئید	کبد	۶/۳۲۴±۰/۷۴۴	۸/۴۷۷±۰/۹۸۶**	۶/۳۵۷±۰/۸۵۳	۸/۰۰۹±۰/۹۱۲*
	کلیه	۱۰/۵۵۳±۱/۱۱۱	۱۲/۸۹۷±۱/۵۲۱*	۱۰/۷۲۸±۰/۹۹۱	۱۲/۷۱۶±۱/۰۸۹*

با آنالیز واریانس (ANOVA) و تست توکی *: $p<0/05$، **: $p<0/01$ و ***: $p<0/001$ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.

بحث

سازوکار اصلی سمیت دیازینون مانند دیگر ارگانوفسفره‌ها مهار فعالیت استیل کولین استراز توسط متابولیت‌های آن می‌باشد. همچنین، دیازینون می‌تواند سبب القاء استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن [Reactive oxygen species (ROS)] شود [۱۷]. کبد در مهره‌داران فعال‌ترین بافت از نظر متابولیکی است و دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های مربوطه می‌باشد. بنابراین، ارگان اصلی جهت سم‌زدایی گزنوبیوتیک‌هاست. کلیه نیز نقش حیاتی در ثبات محیط داخلی موجودات زنده ایفا می‌کند و هدف سموم شیمیایی است که می‌توانند عملکرد آن را دچار اختلال کنند و سبب اختلال موقت یا دایم هموستازی شوند [۱].

آنزیم‌های SOD و CAT اولین خط دفاعی سلول در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند. SOD آنیون‌های سوپراکسید را به H_2O_2 و O_2 تبدیل می‌کند که آن هم متعاقباً توسط آنزیم CAT به H_2O و O_2 تبدیل می‌شود [۷]. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که دیازینون سبب افزایش قابل توجهی در فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در کبد و کلیه موش صحرایی می‌شود و تجویز NAC تا حدی سبب کاهش فعالیت آنزیم SOD در کبد و فعالیت CAT در کبد و کلیه موش صحرایی می‌گردد. افزایش فعالیت SOD سبب افزایش میزان H_2O_2 و کاهش

رادیکال‌های سوپراکسید و افزایش فعالیت CAT باعث کاهش میزان H_2O_2 و جلوگیری از آسیب بافتی می‌شود. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها مربوط به سازوکارهای دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو است. افزایش فعالیت SOD و CAT احتمالاً ناشی از افزایش تولید ROS توسط دیازینون می‌باشد و کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT بعد از استفاده از NAC، احتمالاً مربوط به توانایی NAC در حذف مستقیم ROSها می‌باشد [۹]. نتایج این تحقیق موافق نتایج مطالعاتی است که نشان می‌دهند که تجویز خوراکی دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت کبد ماهی و مغز و قلب موش صحرایی می‌شود [۲۰-۱۸]. مطالعات دیگر کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT را بعد از تجویز خوراکی دیازینون در بافت‌های کلیه، قلب و ماهیچه نشان می‌دهند [۲۱، ۲]. 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 مواجهه می‌باشد.

GST یکی دیگر از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که مواد سمی‌را با اتصال به گلوتاتیون تبدیل به مواد با سمیت کمتر می‌کند [۷]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد دیازینون سبب افزایش فعالیت GST در کبد و کلیه موش صحرایی شده و تجویز NAC تا حدی سبب کاهش فعالیت این آنزیم در هر دو بافت در مقایسه با گروه دیازینون می‌شود. افزایش GST در اثر تزریق دیازینون نشان دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل این سم و دفع سریع‌تر آن است. مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهند که به دنبال تجویز دیازینون فعالیت GST در ماهی نشان می‌دهد [۱۸، ۲۳-۲۲]. Llopis و همکاران نشان دادند که تزریق داخل صفاقی N- استیل سیستئین سه ساعت قبل از تجویز دی‌کلروس به ماهی در زمان‌های مختلف تا ۹۶ ساعت باعث افزایش فعالیت GST می‌شود. NAC باعث افزایش تحمل به این ارگانوفسفره می‌شود [۱۰].

LDH یک آنزیم سیتوپلاسمی می‌باشد که جهت بررسی آسیب سلولی و به عنوان شاخص جهت بررسی سمیت یک ماده شیمیایی و لیز سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۴]. در این مطالعه دیازینون سبب افزایش فعالیت LDH کبد شده که تجویز NAC در کبد تا حدی فعالیت این آنزیم را در مقایسه با گروه دیازینون کاهش می‌دهد. افزایش LDH کبدی می‌تواند ناشی از کمبود اکسیژن بافت باشد. افزایش فعالیت LDH مغز و قلب پس از تجویز خوراکی دیازینون مشاهده می‌شود [۲۴، ۲۱]. استفاده از NAC سبب احیاء رادیکال‌های آزاد ناشی از تجویز دیازینون و در نتیجه جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و مانع از آزادشدن آنزیم LDH می‌شود.

گلوتاتیون فراوان‌ترین و مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان سلولی است که قادر است مستقیماً ROSها را جمع‌آوری کند [۸]. همچنین، GSH به عنوان کوفاکتور برای آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و GST عمل می‌کند [۲۵]. بر طبق نتایج مطالعه حاضر تجویز دیازینون سبب کاهش غلظت گلوتاتیون در کبد و کلیه موش صحرایی می‌شود. از آن جایی که فعالیت GST در هر دو بافت کبد و کلیه در اثر دیازینون افزایش پیدا کرده است، کاهش گلوتاتیون این بافت‌ها می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم GST و مصرف آن به عنوان سوبسترا توسط این آنزیم باشد و هم مربوط به عملکرد مستقیم آن جهت حذف رادیکال‌های آزاد باشد. کاهش غلظت گلوتاتیون بافت‌های کبد و کلیه تا حد زیادی در اثر استفاده NAC جبران می‌شود. این نتیجه می‌تواند ناشی از عمل NAC به عنوان پیش ساز گلوتاتیون

و شرکت آن در سنتز این آنتی‌اکسیدان سلولی و همین طور عملکرد مستقیم آن در حذف رادیکال‌های آزاد باشد [۹]. مطالعات دیگر نشان می‌دهد که تجویز خوراکی دیازینون موجب کاهش گلوتاتیون کبد، کلیه و قلب می‌گردد [۲۶، ۱۹، ۲]. دو مطالعه دیگر نشان داد که تزریق داخل صفاقی N- استیل سیستئین قبل از تجویز آندوسولفان و دی کلروس به ماهی باعث افزایش غلظت گلوتاتیون، نسبت GSH/GSSG و فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز کبدی می‌شود [۲۷، ۱۰].

لیپیدها به ویژه اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء سلولی جزء حساس‌ترین مولکول‌های بیولوژیکی هستند که در معرض حمله ROSها قرار می‌گیرند و این مسأله موجب افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود [۲۸]. MDA شاخص اصلی اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع است و به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها به شمار می‌رود [۲۹]. در مطالعه حاضر افزایش سطح MDA در کبد و کلیه در اثر تجویز دیازینون مشاهده می‌شود که این افزایش ناشی از تولید ROSها توسط دیازینون و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌باشد. استفاده از NAC در کبد تا حدودی سبب کاهش سطح MDA می‌شود. کاهش سطح MDA می‌تواند مربوط به قابلیت NAC در حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدها توسط ROS می‌باشد. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که تجویز خوراکی دیازینون موجب تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در مغز، کلیه، قلب و ماهیچه می‌شود [۳۰، ۲۱، ۲]. Shadnia و همکاران نشان دادند که تجویز خوراکی دیازینون به مدت ۴ هفته باعث افزایش مواد فعال اسیدتیوباربیتوریک (TBARS) به عنوان شناساگر لیپیدپراکسیداسیون، کاهش مولکول‌های تیول کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل به عنوان شناساگر استرس اکسیداتیو می‌شود. اثر حفاظتی NAC و آلفا- توکوفرول به همراه دیازینون باعث کاهش استرس اکسیداتیو القاء شده توسط دیازینون می‌شود [۴].

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که دیازینون با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و میزان MDA و کاهش غلظت گلوتاتیون در بافت‌های کبد و کلیه باعث تولید رادیکال‌های آزاد و وقوع استرس اکسیداتیو می‌شود. NAC به عنوان آنتی‌اکسیدان از طریق حذف رادیکال‌های آزاد و افزایش سنتز گلوتاتیون تا حدی باعث کاهش سمیت دیازینون می‌شود.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی مرکز تحقیقات شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... انجام شده است که بدین وسیله از کلیه مسئولین مرکز مربوطه تشکر و قدردانی به‌عمل می‌اید.

References

[1] Oruc EO, Usta D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of Cyprinus carpio. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007; 23: 48-55.

[2] Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 3345-53.

[3] Xue C, Liu W, Wu J, Yang X, Xu H. Chemoprotective effect of N-acetylcysteine (NAC) on cellular oxidative damages and apoptosis induced by nano titanium dioxide under UVA irradiation. *Toxicol in Vitro* 2011; 25: 110-6.

[4] Shadnia S, Abdollahi M, Sasanian G. Effects of N-acetyl-cysteine and tocopherol on diazinon toxicity. *Curr Med Chem* 2003; 10: 2705-8.

[5] Durmaz H, Sevgiler Y, ÜnerN. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in Oreochromis niloticus. *Pest Biochem Physiol* 2006; 84: 215-26.

[6] Saulsbury MD, Heyliger SO, Wang K, Johnson DJ. Chlorpyrifus induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. *Toxicology* 2009; 259: 1-9.

[7] Limon-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 2009; 674: 137-47.

[8] Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995; 251: 3-7.

[9] De Flora S, Bennicelli C, Camoirano A, Serra D, Romano M, Rossi GA, et al. In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis* 1985; 6: 1735-45.

[10] Pena-Llopis S, Ferrando MD, Pena JB. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquat Toxicol* 2003; 65: 337-60.

[11] Winterbourn C, Hawkins R, Brian M, Carrell R. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975; 85: 337.

[12] Aebi H. Catalase in vitro. *Methodes Enzymol* 1984; 105: 121-6.

[13] Habig WH, Jakoby WB. Glutathion S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol* 1981; 77: 218-31.

[14] Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 37-43.

[15] 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: 502-22.

[16] 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.

[17] Uner N, Oruc EO, Sevgiler Y, Sahin 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: 241-5.

[18] Oruc E. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of Cyprinus carpio (L.). *Environ Toxicol* 2010; 26: 571-8.

[19] 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: 455-61.

[20] Salehi M, Jafari M, Saleh Moqadam M, Salimian M, Asghari A, Nateghi M, et al. The effect of diazinon on rat brain antioxidant system. *Toxicol Lett* 2009; 189: S123.

[21] Abdou HM, El Mzoudy RH. Oxidative damage, hyperlipidemia and histological alterations of cardiac and skeletal muscles induced by different doses of diazinon in female rats. *J Hazardous Materials* 2010; 182: 273-8.

[22] Ezemonye L, Tongo L. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (Bufo regularis). *Chemosphere* 2010; 81: 214-7.

[23] 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: 38-42.

[24] El-Demerdash FM. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 1346-52.

[25] Lopez-Cruz RI, Zenteno-Savin T, Galvan-Magana F. Superoxide production, oxidative damage and enzymatic antioxidant defenses in shark skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol, Part A*, 2010; 156: 50-6.

[26] Ahmadi S, Jafari M, Asgari A, Salehi M. Acute effect of diazinon on the antioxidant system of rat's heart tissue. *Kowsar Med J* 2011; 16: 87-93. [Farsi]

[27] Dorval J, Hontela A. Role of glutathione redox cycle and catalase in defanse against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 192: 191-200.

[28] Caylak E, Aytekin M, Halifeoglu I. Antioxidant effects of methionine, a-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. *Exper Toxicol Pathol* 2008; 60: 289-94.

[29] Liu Y, Zhang H, Zhang L, Zhou Q, Wang X, Long J, et al. Antioxidant N-acetylcysteine attenuates the acute liver injury caused by X-ray in mice. *Euro J Pharmacol* 2007; 575: 142-8.

[30] Yilmaz N, Yilmaz M, Altuntas I. Diazinon-induced brain toxicity and protection by vitamins E plus C. *Toxicol Ind Health* 2012; 28: 51-7.

The Role of N-Acetyl Cysteine on Reduction of Diazinon-Induced Oxidative Stress in Rat Liver and Kidney

F. Izadi[1], M.. Jafari[2], H. Bahadoran[3], A.R. Asgari[4], A. Divsalar[5], M. Salehi[6]

Received: 26/06/2012 Sent for Revision: 18/07/2012 Received Revised Manuscript: 14/01/2013 Accepted: 17/03/2013

Background and Objective: Diazinon (DZN) as an organophosphate (OP) pesticide induces the production of free radicals and oxidative stress. The aim of this study was to investigate the effect of N-acetyl cysteine (NAC) as an antioxidant against DZN- induced oxidative stress in rat liver and kidney.

Materials and Methods: In the present experimental study, male Wistar rats were randomly divided into four groups including: control (vehicle, corn oil), DZN group (100 mg/kg), NAC group (160 mg/kg), and experimental group: co-treatment with NAC and DZN. Twenty four hours after injection, animals were anesthetized by ether, and then liver and kidney tissues were quickly removed. After tissues hemogenation, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and lactate dehydrogenase (LDH) activities, and the levels of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were measured by biochemical methods. The data was statistically analysed using analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc analysis using Tukey tests.

Results: DZN increased SOD, CAT and GST activities in liver and kidney and LDH activity in liver. The decreased GSH content and increased MDA level in liver and kidney were also observed. Administration of NAC significantly decreased SOD, GST and LDH activities in liver and decreased CAT activity in liver and kidney. NAC increased GSH level in liver and kidney and decreased MDA level in liver.

Conclusion: Diazinon probably causes free radical production, which leads to the enhanced lipid peroxidation membrane and depleted GSH content in liver and kidney. Administration of NAC by directly eliminating ROS and GSH synthesis and decreasing DZN toxicity, but it does not protect completely.

Key words: Diazinon, NAC, Oxidative stress, Liver, Kidney, Rat

Funding: This work was supported by a grant from Chemical Injuries Research Center of Baqiyatallah University of Medical Sciences (Tehran, Iran).

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of the institute approved the experimental protocol and all efforts were made to minimize the animal suffering

How to cite this article: Izadi F, Jafari M, Bahadoran H, Asgari A.R, 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. [Farsi]

1- MSc Dept. of Biochemistry, Faculty of Biology, Islamic Azad University Western Branch, Tehran, Iran
2- Associate Prof., Dept. of Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran (Corresponding author) Tel: (021) 22289942, Fax: (021) 22830262, E- mail: m.jafari145@gmail.com
3- Assistant Prof., Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Prof. Dept. of Physiology, Sport Physiology Research Center, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Assistant Prof., Dept. of Biochemistry, Faculty of Biology, Islamic Azad University Western Branch, Tehran, Iran
6- MSc Dept. of Biochemistry, Applied Neuroscience Research Center, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran