

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

صدیق احمدی^۱؛ مهوش جعفری^{۲*}؛ علیرضا عسگری^۳؛ مریم صالحی^۴

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)، گلوکوتایون S- ترانسفراز (GST) و گلوکوتایون (GSH)، مانع اثرات نامساعد رادیکال‌های آزاد می‌شوند. هدف این مطالعه ارزیابی اثر دیازینون بر سیستم آنتی‌اکسیدان طحال موش صحرائی 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. ۲۴ ساعت پس از تزریق، حیوانات بیهوش و بافت طحال جدا گردید. بعد از هموزنه 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 صحرائی، طحال

«دریافت: ۱۳۹۰/۳/۱۲ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۷/۱۹»

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

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

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

۴. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

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

Email: jafari@bmsu.ac.ir

تلفن محل کار: ۰۲۱-۲۲۲۸۹۹۴۲-۳۳۴

مقدمه

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

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

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. گلوکوتایون (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 (۱۳-۱۵). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در قلب و پلاسمای موش صحرایی پس از تجویز لیندان به‌عنوان یک ارگانوکلره (۳ هفته) (۱۶) و مالاتیون (۴ 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 بقیه‌ا... (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.

مطرح هستند (۲). ترکیبات ارگانوفسفره از طریق فسفریلاسیون اسید آمینه سرین در جایگاه فعال آنزیم کولین استراز، موجب غیرفعال شدن این آنزیم به‌صورت غیرقابل برگشت می‌شود. بعد از آن آنزیم کولین استراز دیگر قادر به هیدرولیز استیل کولین نخواهد بود. در نتیجه موجب تجمع استیل کولین 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 P₄₅₀ کبدی از طریق دسولفوراسیون اکسیداتیو به متابولیت فعال سمی خود تبدیل می‌گردند (۴). دیازینون که نام اصلی آن دیمپلیت (Dimpylate) و نام شیمیایی آن O و O دی اتیل - ۲-O - ایزوپروپیل - S - متیل پیریمیدین - ۴- اتیل - فسفورتیوات 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 ۶). این ترکیب از راه روده به آسانی و به‌سرعت در طی چند ساعت جذب و به‌سرعت 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

فعالیت آنزیم CAT با روش Aebi سنجیده شد (۱۸). به حجم معینی از عصاره بافتی، اتانول مطلق (۰/۱ ml/ml) اضافه و به مدت نیم ساعت در یخ اینکوبه گردید. سپس به آن تریتون X-۱۰۰ ده درصد با غلظت نهایی یک درصد اضافه شد. این محلول جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. واکنش با اضافه کردن $30 \text{H}_2\text{O}_2$ میلی مولار به حجم مناسبی از عصاره نمونه بافتی در بافر فسفات سدیم 50 میلی مولار $\text{pH}=7$ شروع شد. سپس جذب در طی 3 دقیقه در طول موج 240 نانومتر قرائت و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

فعالیت آنزیم ترانسفر (GST) به روش Habig سنجیده شد (۱۹). یک میلی لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم 50 میلی مولار $\text{pH}=7/4$ شامل EDTA یک میلی مولار، 20 GSH میلی مولار و 20 CDNB میلی مولار 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 میلی گرم پروتئین بیان شد.

فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) با استفاده از کیت پارس آزمون سنجیده شد. جذب نمونه ها در طی 3 دقیقه در طول موج 340 نانومتر قرائت و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین بیان شد.

برای تعیین میزان GSH بافت از روش Thietz استفاده شد (۲۰). غلظت مناسبی از نمونه همورنه با اسید سولفوسالسیلیک 5 درصد مخلوط شد. نمونه ها به مدت 10 دقیقه با دور 2000g در 4°C سانتریفوژ شد. 100 میکرو لیتر از محلول رویی به 810 میکرو لیتر دی سدیم فسفات $0/3$ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن 90 میکرو لیتر معروف DTNB $0/04$ درصد در سیترات سدیم $0/1$ درصد واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در طول موج 412 نانومتر در طی 5 دقیقه قرائت شد سپس با استفاده از محلول گلو تاتیون 1mg/ml ، منحنی استاندارد رسم و غلظت گلو تاتیون نمونه ها محاسبه شد.

مواد شیمیایی مورد استفاده شامل ۱-کلرو ۲، ۴ دی نیترو بنزن (CDNB)، نیترو بلوترازولیوم (NBT)، دی تیو بیس - نیترو بنزوئیک اسید (DTNB)، تری کلرو استیک اسید (TCA) و دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بالا از شرکت مرک و سیگما خریداری شد. دیازینون خالص از شرکت Supelco آمریکا (1000mg/ml) خریداری شد و محلول ذخیره (استوک) با غلظت 400mg/ml در روغن ذرت به صورت تازه تهیه گردید.

حیوانات به روش تصادفی به چهار گروه (هر گروه ۷ سر) تقسیم شدند. گروه کنترل، روغن ذرت را به عنوان حلال و سه گروه آزمایشی که دوزهای مختلف دیازینون 30 ، 50 و 100 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن (LD_{50} دیازینون 100mg/kg می باشد) را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. 24 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 قسمت های زاید، بافت طحال به نیتروژن مایع انتقال داده شد و سپس تا زمان انجام آزمایش در دمای -70 سانتی گراد نگهداری شد. در روز آزمایش، بافت مورد نظر توزین و با نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سالین همورنه شد و به مدت 15 دقیقه با دور 12000g در 4°C سانتریفوژ گردید. از مایع رویی جهت سنجش شاخص های مورد نظر استفاده شد.

فعالیت آنزیم SOD با روش Winterbourn سنجیده شد (۱۷). به حجم مناسبی از بافت همورنه $0/1$ EDTA مولار در سدیم سیانید $0/3$ میلی مولار و $1/5$ NBT میلی مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت 5 دقیقه در 37°C قرار گرفت. سپس ریوفلاوین $0/12$ میلی مولار در بافر فسفات پتاسیم $0/67$ مولار با $\text{pH}=7/8$ اضافه و به مدت 10 دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. جذب در طی 5 دقیقه در طول موج 560 نانومتر قرائت و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار INSTAT به صورت آزمون آنالیز واریانس یک طرفه به همراه 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 به ترتیب ۲۰ (p<۰/۰۵) و ۲۷ (p<۰/۰۰۱) درصد بود که به طور 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 (p<۰/۰۵، /۰/۷۸/۶) و ۱۰۰ (p<۰/۰۰۱، /۰/۶۷/۵) 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 به طور معنادار کاهش یافت (p<۰/۰۱) (جدول ۱).

در ادامه غلظت مالون دی آلدئید (MDA) به ترتیب ذیل تعیین شد. برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها (MDA) از روش Satho استفاده شد (۲۱). ۰/۵ میلی‌لیتر از بافت هموزنه با ۱/۵ میلی‌لیتر TCA ده درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی، ۲ میلی‌لیتر تیوباریتوریک اسید ۰/۶۷ درصد اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول n - بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از ۳،۳،۱،۱ - تترا اتوکسی پروپان به عنوان 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 به مدت 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.

جدول ۱- اثر دوزهای مختلف دیازینون بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و غلظت GSH و MDA طحال موش صحرائی بعد از ۲۴ ساعت

شاخص	دیازینون (mg/kg)			
	۱۰۰	۵۰	۳۰	کنترل
SOD	۴۰/۷۳۴±۴/۰۳***	۳۸/۲۸۶±۳/۳۹۸*	۳۴/۷۱۸±۳/۳۴۸	۳۱/۸۶±۲/۱۳۴
CAT	۱۲/۱۰۸±۱/۹۳***	۱۴/۰۹۹±۱/۸۶۵*	۱۶/۶۰۴±۱/۹۶۴	۱۷/۹۲۴±۲/۰۴
GST	۱۴۹/۴۵±۱۶/۶۳۹*	۱۴۴/۲۸±۱۲/۲۳۲*	۱۲۱/۴۳±۱۲/۳۴۵	۱۱۹/۸۷±۱۵/۵۶۶
LDH	۸۴/۵۸۵±۱۶/۹۵۹	۸۸/۸۳۸±۱۴/۷۵۵	۹۵/۰۵۶±۱۲/۲۶۷	۱۰۳/۵۹±۱۷/۴۱
GSH	۲۰/۰۲۴۹±۳/۸۰***	۲۲/۰۹۰۷±۴/۸۹۷*	۲۴/۰۸۰۸±۴/۵۱۳	۳۱/۰۷۸±۳/۸۵
MDA	۲۳/۲۳۳±۱/۸۳۴	۲۲/۵۱۷±۱/۷۱۷	۲۱/۰۴۷±۲/۱۰۰	۲۰/۸۲۸±۲/۰۱۵

واحد فعالیت آنزیم های SOD، CAT، GST و LDH بر حسب (U/mg protein) و غلظت گلوکوتاتیون 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.

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 ختنی شدن سمیت H_2O_2 و تبدیل آن به آب و O_2 می‌شود (۲۴) و (۲۵). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز دیازینون به صورت 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، تری کلرفون و دی کلروس سبب مهار فعالیت SOD می‌شود (۲۶). Sharma و همکاران نشان دادند تجویز خوراکی دی متوات به موش صحرائی 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 (۲۹-۳۰). مطالعات Akturk و همکاران نشان داد که مصرف دیازینون توسط موش صحرائی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت قلب و گلبول قرمز می‌شود (۳۱). مطالعات غنی و همکاران نشان داد که تزریق پاراکسون به صورت داخل صفاقی بعد از ۴ ساعت در موش صحرائی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت مغز می‌شود (۱۳). مطالعات Isik و همکاران نشان داد که تجویز دیازینون و

اثر دوزهای مختلف دیازینون بر فعالیت آنزیم GST طحال نشان داد که فعالیت آنزیم GST در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، دیازینون به ترتیب ۲۰ و ۲۴ درصد به طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است ($p < 0/05$). همچنین افزایش فعالیت آنزیم GST در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg دیازینون در مقایسه با دوز ۳۰ mg/kg معنادار بود (به ترتیب $P < 0/05$ و $P < 0/01$).

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 و ۱۰۰ (۶۴/۴٪، $p < 0/01$) میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، دیازینون به طور 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 به دلیل 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

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 (۱۹). 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 (۴۰). مطالعات Monteiro و همکاران نشان دادند که تجویز متیل پاراتیون در ماهی با دوز ۲mg/L به مدت ۹۶ ساعت، افزایش فعالیت آنزیم GST در بافت آبشش، کلیه، کبد و ماهیچه سفید را به دنبال دارد (۳۰). البته بعضی مطالعات کاهش GST را نشان داده‌اند. Khan و همکاران نشان دادند که تجویز سیپرمترین و مالاتیون به موش صحرائی باعث کاهش فعالیت آنزیم GST در بافت کبد می‌شود (۱۲). در برخی از مطالعات دیگر فعالیت این آنزیم، بدون تغییر گزارش شده است (۴۱). 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 ۳۰mg/kg دیازینون، کاهش میزان غلظت گلوکوتاتیون معنادار است. گلوکوتاتیون 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 گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) و GST که خشی‌کننده سموم هستند، عمل کند (۹، ۱۰ و ۴۲). تخلیه GSH در نهایت باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود که به آسیب DNA، توقف کامل و کاهش مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو منجر می‌شود (۴۳ و ۹). کاهش احتمالاً ناشی از افزایش فعالیت آنزیم‌هایی نظیر GPx و GST

متیل پاراتیون به ماهی بعد از ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD در کبد و شش می‌شود (۳۲).

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 پیروترئوئید (تجویز به مدت ۲ هفته) بر کبد موش آزمایشگاهی، کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT را گزارش نمودند (۱۲). در یک مطالعه، ارگانوفسفره فوزالون در دوز بالا باعث کاهش فعالیت SOD شده بود (۳۳). Tuzmen و همکاران و Yousef و همکاران نشان دادند که پس از مواجهه با دوزهای متفاوت دلتامترین، کاهش در فعالیت SOD مشاهده می‌شود (۳۴ و ۳۵). 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 (۳۶). 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 صحرائی بعد از ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم LDH در بافت کبد و پانکراس گردید (۳۷). در مطالعات حیوانی نیز افزایش فعالیت LDH سرم پس از تجویز ترکیباتی از جمله دیازینون و سیپرمترین توسط Manna و همکاران گزارش شده است (۳۸). Mishra و همکاران نشان دادند که تجویز اندوسولفان به ماهی، موجب کاهش فعالیت LDH کبد و عضله اسکلتی می‌گردد (۳۹). مطالعات غنی و همکاران نشان داد که تجویز پاراکسون به موش صحرائی بعد از ۴ ساعت باعث افزایش LDH بافت کبد و افزایش مختصری در بافت مغز می‌گردد (۱۳). نتایج مختلف می‌تواند ناشی

دیمتوات در موش‌های بالغ و نوزادان آن‌ها بررسی شده و گزارش شد که سطح MDA افزایش پیدا می‌کند (۴۹). 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 اريتروسیت‌ها در محیط آزمایشگاهی می‌شود (۳۳). John و همکاران نشان دادند تجویز خوراکی دی‌متوات و مالاتیون به موش صحرایی موجب تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در اريتروسیت می‌گردد (۵۲). مطالعه Buyukokuroglu و همکاران نیز نشان داد اثر فن‌تیون روی موش صحرایی سبب افزایش سطح MDA در خون می‌شود (۴۴).

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.

است که به GSH نیاز دارند. کاهش GSH باعث افزایش سمیت دیازینون می‌شود. مطالعات Buyukokuroglu و همکاران نشان داد مصرف فن‌تیون (Fenthion) بعد از ۲۴ ساعت، سطح GSH ماهیچه انسان را کاهش می‌دهد (۴۴). مطالعات Monteiro و همکاران نشان داد که مصرف متیل پاراتیون در ماهی موجب کاهش گلوکوتاتیون در بافت‌های کبد، ماهیچه سفید و آبشش می‌شود (۳۰). مطالعه Catalgol و همکارانش نشان داد که تری‌کلروفن، سطح GSH را در حدود ۶۶-۷۹ درصد در اريتروسیت‌های انسان کاهش می‌دهد (۴۵). مطالعات Khan و همکاران نشان داد مصرف سیپرترین و مالاتیون در موش صحرایی موجب کاهش گلوکوتاتیون 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 (۴۶). 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 (۴۷). 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 (۴۸). Isik و همکاران نشان دادند محتوای MDA در ماهی‌های آلوده‌شده با متیل پاراتیون دیازینون طی ۴۸-۲۴ ساعت در بافت‌های کبد و ماهیچه افزایش می‌یابد (۳۲). در مطالعه دیگری، اثر

References

1. Storm JE, Rozman KK, Doull J. Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. *Toxicology*. 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 parathion 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 sublethal effects of diazinon on ovary of bluegill, *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-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival 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, Solti RC, Kataria L. Pesticide-induced alteration 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 exposure 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, Vari 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, Scoullou 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.