

بررسی اثر محافظتی رزوراترول بر استرس اکسیداتیو القا شده ناشی از مواجهه تحت حاد دیازینون در بافت کلیه موش صحرایی

امیرحسین رهبری^۱ (Ph.D Student)، حبیب‌اله ناظم^۱ (Ph.D)، محمد فضیلتی^۱ (Ph.D)، فرشته مهری^{۲*} (Ph.D)

^۱ - دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ - مرکز تحقیقات سلامت تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۳۰

Freshteh_mehri@yahoo.com

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱-۳۸۲۸۰۰۱۶

چکیده

هدف: دیازینون به عنوان یک ارگانوفسفره در کشاورزی استفاده می‌شود. این ترکیب قادر به تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن و تولید استرس اکسیداتیو می‌شود. رزوراترول به عنوان آنتی‌اکسیدان می‌تواند باعث کاهش استرس اکسیداتیو شود. هدف از این مطالعه بررسی نقش محافظتی رزوراترول بر استرس اکسیداتیو القا شده ناشی از مواجهه تحت حاد دیازینون در بافت کلیه است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۸ موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۴ گروه کنترل، دیازینون (۷۰mg/kg)، دیازینون (۷۰mg/kg) + رزوراترول (۵mg/kg)، دیازینون (۷۰mg/kg) + رزوراترول (۱۰mg/kg) به مدت ۴ هفته به صورت تقسیم شدند و به مدت ۴ هفته دوزهای ذکر شده را به صورت خوراکی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از آخرین دوز دریافتی نمونه ادرار جمع‌آوری شد. بعد از بی‌هوشی ۳ میلی‌لیتر خون از قلب حیوان گرفته شد. غلظت دیازینون در ادرار و سطح پروتئین، کراتینین، اوره، مالون دی‌آلدئید (MDA) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) به ترتیب با استفاده از دستگاه HPLC (کروماتوگرافی مایع) و روش‌های بیوشیمیایی در سرم و بافت کلیه تعیین شد.

یافته‌ها: آنالیز نمونه ادرار نشان داد سطح دیازینون در گروه دیازینون به طور معنی‌داری بالاتر از گروه دیازینون (۷۰mg/kg) + رزوراترول (۵Mg/kg و ۱۰) بود ($P < 0.05$). همچنین دیازینون باعث افزایش پروتئین ادرار، سطح سرمی اوره، کراتینین، MDA و کاهش TAC بافتی و سرمی شد ($P < 0.05$). در حالی که رزوراترول این اثرات را کاهش داد. نتیجه‌گیری: رزوراترول وضعیت آنتی‌اکسیدانی بدن را در برابر سمیت دیازینون بهبود بخشید، بنابراین می‌تواند باعث بهبود عملکرد کلیه در حیوانات در مواجهه با دیازینون شود.

واژه‌های کلیدی: دیازینون، کلیه، رزوراترول، استرس اکسیداتیو

مقدمه

آفت‌کش‌ها یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های محیطی هستند که به منظور ارتقاء سطح تولیدات غذایی به طور گسترده در کشاورزی کاربرد دارند این ترکیبات به دلیل قابلیت تجمع و ماندگاری بلندمدت در محیط زیست، باعث آلودگی محیط زیست و افزایش ریسک مسمومیت به شکل حاد و مزمن در افراد می‌شوند [۱، ۲]. مسمومیت با آفت‌کش‌ها یکی از مشکلات بهداشت جهانی است [۳]. از میان تمامی آفت‌کش‌ها ترکیبات ارگانوفسفره بیش‌ترین سمیت را برای مهره‌داران دارند. دیازینون پس از مالاتیون یکی از پرکاربردترین ترکیبات ارگانوفسفره در جهان است. دیازینون از طریق پوست، دستگاه گوارش و مسیر هوایی جذب شده و عمدتاً از راه کلیه دفع می‌شود [۴]. این

ترکیب در کبد توسط آنزیم‌های میکروزومی اکسید شده و به دیازوکسون تبدیل می‌شود که مهارکننده قوی‌تر برای آنزیم کولین استراز می‌باشد [۵]. ارگانوفسفره با فسفریله نمودن اسید آمینه سرین موجود در جایگاه فعال آنزیم کولین استراز باعث مهار این آنزیم، افزایش سطح استیل کولین، اختلالات کولینرژیک و وقوع تشنج می‌شود [۶]. مکانیسم مهم دیگر ترکیبات ارگانوفسفره القاء تولید رادیکال آزاد و استرس اکسیداتیو است که به عنوان عامل اصلی مکانیسم سمیت بافت کلیه شناسایی شده است. به طوری که تفاوت در نوع ترکیب، گونه، زمان و دوز مواجهه وجه تمایز سمیت کلیوی دیازینون در مطالعات مختلف است. مطابق با مطالعات منتشر شده سموم ارگانوفسفره مانند دیازینون با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد

۲۵۰ گرم انجام شد. موش‌ها در حیوان‌خانه دانشگاه تحت شرایط طبیعی نور، تاریکی، غذا و آب قرار گرفتند. موازین اخلاقی کار با حیوان‌های آزمایشگاهی که مورد تأیید کمیته اخلاق (IR.UMSHA.REC.1399.443) دانشگاه علوم همدان بود، هنگام کار با موش‌های آزمایشگاهی رعایت شد. دیازینون با خلوص ۱۰۰ درصد از شرکت سوپلکو امریکا خریداری و محلول ذخیره با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در روغن ذرت به صورت تازه تهیه و نگهداری شد. رزوراترول از شرکت (Sumabe، استرالیا) خریداری و محلول ذخیره با غلظت ۱۶۰ mg/ml در آب مقطر به صورت تازه تهیه گردید. ۲۸ موش صحرایی به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه ۱ کنترل که روغن ذرت را به عنوان حلال دیازینون بدون هیچ مداخله‌ای دریافت کردند، گروه ۲ که روزانه دیازینون ۷۰ mg/kg/bw را دریافت می‌کردند، گروه ۳ که دیازینون ۷۰ mg/kg/bw با رزوراترول ۵ mg/kg/bw و گروه ۴ که دیازینون ۷۰ mg/kg/bw با رزوراترول ۱۰ mg/kg/bw به صورت خوراکی به مدت ۴ هفته دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از آخرین دوز حیوانات برای جمع‌آوری نمونه‌های ادرار به قفسه‌های متابولیک منتقل شدند بعد از جمع‌آوری ادرار، حیوانات با استفاده از اتر بی‌هوش شدند. بعد از شکافتن شکم و سینه حیوان ۳ میلی‌لیتر خون با سرنگ هیپارینه از قلب حیوان گرفته شد. جهت تهیه سرم نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند سرم و ادرار تهیه شده تا روز آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز شد. در ادامه بافت کلیه حیوانات بعد از شست‌وشو با سرم فیزیولوژی، خارج کردن خون و جدا کردن قسمت‌های زاید، به نیتروژن مایع انتقال داده شد و سپس در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. در روز آزمایش بافت‌ها به دقت توزین و با نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سالین هموزن شده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. از مایع رویی جهت سنجش شاخص‌های مورد نظر استفاده شد.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی. آزمایشات سنجش میزان اوره و کراتینین در سرم و میزان پروتئین در نمونه ادرار با استفاده از کیت‌های پارس‌آزمون (تهران، ایران) انجام شد. سنجش بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در بافت کلیه و سرم:

اندازه‌گیری سطح آنتی‌اکسیدانی تام (TAC). ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان اشاره به میزان کلی مواد آنتی‌اکسیدانی در نمونه بیولوژیک دارد و تغییرات آن سهم بزرگی در ایجاد بیماری‌های مرتبط با افزایش رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کند. به منظور سنجش

باعث تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، افزایش پراکسیداسیون لیپید (MDA) و در نهایت ایجاد استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی در بافت کلیه می‌شوند. تحقیقات انجام شده مؤید اثر تخریبی سم دیازینون بر مرفولوژی و فیزیولوژی بافت کلیه از جمله از بین رفتن و تحلیل سلول‌های اپیتلیوم مجاری کلیوی، نکروز مجاری کلیوی، تحلیل گلوبول‌ها و افزایش فضای کپسول بومن در بافت کلیه است [۷]. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیبات شیمیایی هستند که با دادن یک الکترون به رادیکال‌های آزاد آن‌ها را به یک مولکول بی‌ضرر تبدیل می‌کنند. این ترکیبات با جلوگیری از تولید رادیکال آزاد، سلول‌های بدن را در مقابل واکنش‌های اکسیداتیو زیان‌آور محافظت می‌کنند [۸]. بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها جهت کاهش سمیت ارگانوفسفره‌ها می‌تواند در جهت کاهش سمیت مفید است. رزوراترول (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) یک ترکیب پلی فنولیک فینوآلکسین است که به طور طبیعی در گیاهان متعددی از جمله انگور، انواع توت و بادام‌زمینی یافت می‌شود طیف وسیعی از عملکردهای بیولوژیکی به این مولکول نسبت داده که عمدتاً بر تنظیم اکسیداسیون و التهاب متمرکز است [۹]. مطالعات تجربی و پیش‌تجربی متعدد اثرات سودمند این ماده را در کاهش استرس اکسیداتیو در هیپوتوسیت‌های حیوانی نشان داده‌اند [۱۰]. رزوراترول اثرات آنتی‌اکسیدانی خود را با القاء آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تعدیل متابولیسم چربی و کاهش پراکسیداسیون چربی اعمال می‌کند [۱۱]. در مطالعه‌ای که جلیلی و همکارانش به منظور بررسی اثر رزوراترول بر روی سمیت مالاتیون انجام دادند نتایج آن‌ها نشان داد تجویز رزوراترول باعث کاهش سطح پراکسیداسیون چربی، افزایش آنتی‌اکسیدان‌های نظیر CAT و SOD در بافت کبد شد [۱۲]. فقیه‌زاده و همکارانش نشان دادند مکمل یاری با رزوراترول باعث بهبود آنزیم‌های کبدی و درجه استئاتوز کبدی در بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی شد [۱۳]. از آنجایی‌که تا کنون هیچ مطالعه‌ای به منظور بررسی اثرات محافظتی رزوراترول بر روی سمیت دیازینون انجام نشده است. بنابراین در این مطالعه برآن شدیم برای اولین بار اثرات محافظتی رزوراترول بر روی استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون با استفاده از ارزیابی‌های بیوشیمیایی و سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت کلیه مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در دانشگاه علوم پزشکی همدان بر روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا

تجزیه و تحلیل داده‌ها. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار spss-18 و آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و بونفرونی تحلیل و سطح معنی‌دار ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند.

نتایج

ارزیابی نمونه‌های ادراری برای تعیین غلظت دیازینون. غلظت دیازینون در نمونه‌های ادرار در گروه‌های مختلف بعد از ۴ هفته درمان با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع ارزیابی شد. مطابق با جدول ۱، نتایج به دست آمده از منحنی استاندارد، معادله خط، LOD، LOQ و همچنین بازده روش نشان داد روش دارای بازده بالایی برای شناسایی دیازینون در ادرار بود. به عنوان دیده شده در شکل ۱، غلظت دیازینون در نمونه ادرار 0.1 ± 0.056 ($\mu\text{g/ml}$) به دست آمد. در حالی که غلظت دیازینون + رزوراترول ۵ و ۱۰ mg/kg به ترتیب 0.1 ± 0.047 و 0.17 ± 0.042 ($\mu\text{g/ml}$) به دست آمد که روند کاهشی را نشان داد. بنابراین درمان با رزوراترول به طور معنی‌داری سطح دیازینون را در ادرار کاهش داد.

جدول ۱. نتایج اعتبار سنجی روش اندازه‌گیری دیازینون در نمونه‌های ادرار با استفاده از HPLC

رنج غلظت $\mu\text{g/mL}$	زمان ماندگاری دقیقه	معادله خط	ضریب همبستگی	LOD* ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ** ($\mu\text{g/ml}$)
۰/۲-۱/۸	۸/۰۴	$Y=0.003x-0.018$	۰/۹۹۹	۰/۱۲	۰/۴۵

* کمترین حد کمی شناسایی، **LOQ کمترین حد تشخیص شناسایی: LOD*

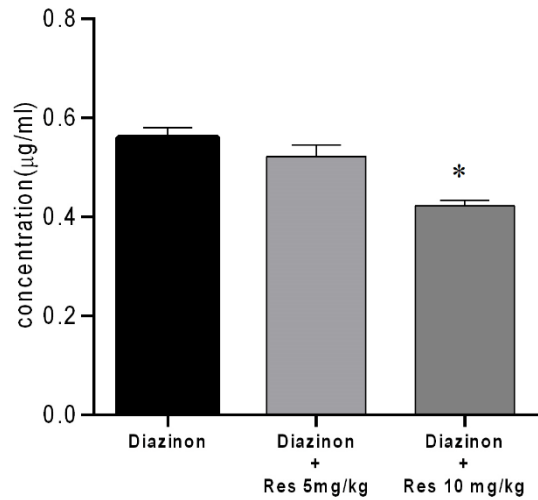
ارزیابی مارکرهای عملکرد بافت کلیه. نتایج حاصل از اثر دیازینون و دوزهای مختلف رزوراترول بر روی سطح کراتینین، اوره سرم و همچنین پروتئین ادرار در جدول ۲ نشان می‌دهد که دیازینون در مقایسه با گروه کنترل باعث افزایش معنی‌داری در سطح این بیومارکرها شد ($P < 0.05$). در حالی که درمان با دیازینون + رزوراترول 5mg/kg به طور معنی‌داری موجب کاهش سطح کراتینین سرم نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.05$) در سایر بیومارکرها تغییر معنی‌داری دیده نشد. در گروه دریافت‌کننده دیازینون + رزوراترول 10mg/kg سطح کراتینین و اوره سرم و همچنین پروتئین ادرار نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$).

TAC در نمونه‌ها، محلول تهیه شده در سانتیفریژ یخچال‌دار در 2000g به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریژ شدند [۱۴]. در این بررسی جهت سنجش میزان TAC از کیت شرکت کیازیست استفاده شد که در این آزمایش کوپریک (Cu^{2+}) در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها به کوپرو (Cu^{1+}) احیا می‌شود و در حضور کروموزن رنگ تولید می‌کند. این رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر جذب دارد و قابل خوانش است. مزیت این روش، اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌هایی هم‌چون تیول می‌باشد که در روش‌هایی هم‌چون FRAP که با آهن کار می‌کند مشخص نمی‌شوند. میزان جذب با مقدار آنتی‌اکسیدان رابطه مستقیم دارد. این میزان در طول موج ۴۵۰ نانومتر قابلیت خوانش دارد.

اندازه‌گیری لیپیدپراکسیداسیون (MDA). دیراکسیداسیون لیپیدی مطابق با روش Yagi و با اسپکتروفتومتری انجام شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه (۱۰۰ میکرولیتر SDS، ۱/۵ میلی‌لیتر اسید استیک، ۱/۵ میلی‌لیتر TBA و ۲۰۰ میکرولیتر آب) اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در حمام ۹۵ درجه قرار داده شد. سپس به لوله‌ها ۳ میلی‌لیتر بوتانول اضافه و به شدت تکان داده شد. بعد از سانتیفریژ با نیروی $1000 \times \text{g}$ لایه بوتانول برداشته و در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از رقت‌های مختلف تترا اتوکسی پروپان (TEP) Tetraethoxypropane استفاده شد [۱۵].

اندازه‌گیری دیازینون در ادرار با استفاده از روش HPLC به منظور تعیین سطح دیازینون در نمونه‌های ادرار از دستگاه HPLC (سیستم کروماتوگرافی مایع Knauer آلمان) همراه با ستون C18 با مشخصات (۲ سانتی‌متر \times ۴/۰ میلی‌متر ۵ میکرومتر) و دتکتور UV (Knauer آلمان) استفاده شد. در این روش به منظور اعتبارسازی روش به نمونه‌های ادرار (۰/۲ میلی‌لیتر) از موش‌های کنترل غلظت‌های مختلف از ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از دیازینون اسپایک شد و با اسید استیک ۱M مولار به $\text{pH}=5$ رسید. منحنی استاندارد، LOD (The limit of detection) و LOQ (The limit of quantification) دستگاه تعیین گردید. به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها از ستون‌های استخراج SPE (Solid-phase extraction) (۳ میلی‌لیتری/۲۰۰ میلی‌گرمی) استفاده شد فاز متحرک استفاده شده ایزوکراتیک آب/ استونیتریل (حجمی/حجمی ۷۰:۳۰) بود که با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های آماده شده از گروه‌های مختلف به دستگاه تزریق شد و در طول موج ۲۵۴ نانومتر شناسایی صورت گرفت.

ارزیابی مارکرهای استرس اکسیداتیو در سرم و بافت مطابق با جدول شماره ۲، نتایج حاصل از دیازینون با دوزهای مختلف رزوراترول بر روی سطح MDA سرم و بافت کلیه نشان داد سطح MDA در بافت و سرم از گروه دیازینون ۷۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت ($P < 0.05$). در گروه دیازینون ۷۰ mg/kg + رزوراترول ۷۰ mg/kg ۵ تغییر معنی دار در سطح MDA سرم و بافت نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که این اثر کاهشی در سطح بافت به طور معنی دارتر بیش تر از سطح سرم بود. افزایش در دوز رزوراترول تغییر معنی داری در سطح MDA ایجاد نکرد. هم چنین با توجه به جدول شماره ۳ سطح آنتی اکسیدانی TAC در نمونه های سرم و بافت کلیه در گروه دیازینون به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. در گروه های دریافت کننده دیازینون ۷۰ mg/kg + رزوراترول ۵ mg/kg و ۱۰ mg/kg + رزوراترول ۷۰ mg/kg به طور معنی داری افزایش یافت.



شکل ۱. سطح دیازینون در نمونه ادرار. مقادیر به صورت میانگین \pm SD از ۷ نمونه در گروه های مختلف بیان شده است. * $p < 0.05$

جدول ۲. اثرات دوزهای مختلف رزوراترول بر روی بیومارکرهای بیوشیمیایی سرم و ادرار در موشهای تحت درمان با دیازینون ۷۰ میلی گرم

گروه ها	وزن بدن (گرم)	سطح سرمی کراتینین (mg/dl)	سطح سرمی اوره (mg/dl)	پروتئین ادرار (g/dl)
کنترل	۲۲۱/۱۳ ± ۱۲/۹۱	۰/۰ ± ۶۱/۰۷ ^c	۴۷/۰۲ ± ۵/۷۲ ^c	۵۰/۱۱ ± ۱۲/۸۳ ^c
دیازینون	۲۱۹/۱۸ ± ۳۴/۹۱	۱/۰ ± ۰۴/۱۹	۵۵/۰۳ ± ۵/۰۶	۹۲/۱۵ ± ۴۰/۸۸
دیازینون ۷۰ + رزوراترول ۵ میلی گرم	۲۳۴/۲۱ ± ۴۴/۱۴	۰/۰ ± ۷۵/۱۳ ^a	۵۴/۷۰ ± ۴/۰۲	۹۴/۸ ± ۰۷/۷۲
دیازینون ۷۰ + رزوراترول ۱۰ میلی گرم	۲۲۷/۲۴ ± ۴۵/۵۴	۰/۰ ± ۶۷/۰۹ ^b	۴۹/۵۱ ± ۳/۱۲ ^c	۷۰/۸ ± ۰۷/۷۳ ^a

a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$; c, $p < 0.001$

جدول ۳. اثرات دوزهای مختلف رزوراترول بر روی بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در سرم و ادرار موشهای تحت درمان با دیازینون ۷۰ میلی گرم

گروه ها	کنترل	دیازینون	دیازینون ۷۰ + رزوراترول ۵ میلی گرم	دیازینون ۷۰ + رزوراترول ۱۰ میلی گرم
MDA سرم (µM/L)	۷۰/۰ ± ۰۳/۹۸ ^b	۱۲/۲ ± ۹۱/۹۴	۶/۱ ± ۴۶/۶۹ ^a	۵/۰ ± ۰۸/۷۷ ^a
MDA بافت (µM/g)	۷/۱ ± ۵۱/۶۰ ^c	۱۷/۲ ± ۴۶/۱۴	۵/۱ ± ۹۲/۲۵ ^c	۴/۱ ± ۷۵/۱ ^c
TAC سرم (U/ml)	۲۰/۸ ± ۲۷/۱۱ ^c	۱۳/۱ ± ۲۱/۰۷	۲۶/۷ ± ۱۲/۳۱ ^b	۴۳/۱۲ ± ۵۵/۴۲ ^c
TAC بافت (µmol/g)	۱۰/۱ ± ۱۶/۱۱ ^a	۷۵/۱۰ ± ۳۴/۶۹	۱۲/۱ ± ۱۸/۰۲/۴۹ ^b	۱۵/۳ ± ۱۹/۰۴/۸۸ ^c

a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$; c, $p < 0.001$

کلیه ها جایگاه مهمی در حذف متابولیت های سمی در بدن دارند، به طوری که متابولیت های سمی دیازینون از طریق کلیه ها دفع می شوند. در حالت عادی بین تولید متابولیت های سمی و دفع آن یک توازن برقرار است. اما اگر به هر دلیلی این توازن بهم بخورد منجر به انباشتگی این متابولیت ها و سمیت آن ها در بدن می شود [۱۷، ۱۶]. سمیت دیازینون از طریق ایجاد رادیکال های آزاد، تولید متابولیت های سمی و القاء استرس اکسیداتیو صورت می گیرد. تداوم تماس با دیازینون می تواند منجر به تولید رادیکال های آزاد فراوانی در بافت کلیه و آسیب بافتی شود که این آسیب در مطالعه حاضر با تغییر در سطح سرمی اوره، کراتینین و غلظت پروتئین ادرار مشاهده شد. مطالعه

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد دیازینون با اثر بر عملکرد بافت کلیه باعث افزایش سطح سرمی اوره، کراتینین و غلظت پروتئین ادرار در حیوانات در معرض تماس می شود، که نتایج به دست آمده از آنالیز نمونه های ادراری با دستگاه HPLC این تغییرات بیوشیمیایی را تایید کرد. هم چنین در ارزیابی های انجام شده بر روی سرم و بافت کلیه مشخص شد دیازینون به طور معنی داری باعث افزایش سطح MDA و کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی TAC شد. تجویز رزوراترول به طور معنی داری توانست از این تغییرات جلوگیری کند.

سطح MDA در هر دو بافت شد. مطالعات پیشین بیان کردند این کاهش می‌تواند به دلیل نقش پلی‌فنل و آنتی‌اکسیدان قوی رزوراترول باشد که مستقیماً توانایی حذف و مقابله با رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش اکسیداسیون لیپیدهای را دارد [۲۴]. در تأیید نتایج مطالعه حاضر، wang و همکاران نشان داده‌اند تجویز رزوراترول از طریق افزایش توان تنفسی میتوکندریایی، کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی سبب کاهش آسیب کلیوی به دنبال شوک هموراژیک در رت‌ها می‌گردد [۲۵]. Ara و همکاران نشان داده‌اند که تجویز رزوراترول سبب کاهش میزان MDA در کلیه رت‌های مبتلا به انسداد مجاری صفراوی می‌شود [۲۶]. Moridi و همکاران گزارش کردند که تجویز دوزهای مختلف رزوراترول (۱، ۵ و ۱۰ mg/kg) سبب کاهش MDA در بافت کلیه در رت‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل گردید [۲۷]. در مطالعه دیگری که توسط Pan و همکارانش انجام شد نشان داده شد که میزان MDA در بافت کلیه به عنوان شاخصی از استرس اکسیداتیو در موش‌های دریافت‌کننده رژیم غذایی پرچرب افزایش یافت و تجویز رزوراترول به علت خواص آنتی‌اکسیدانی با این شرایط مقابله نموده و میزان آن را کاهش داد [۲۸]. بنابراین مطابق با مطالعات ذکر شده می‌توان به این نکته اشاره نمود که رزوراترول می‌تواند در کاهش سمیت استرس اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله اورگانوفسفره‌ها موثر باشد. از جمله یافته‌های دیگر این مطالعه کاهش سطح آنتی‌اکسیدان کل (TAC) سرم و بافت حیوانات تحت تیمار با دیازینون نسبت به گروه کنترل پس از گذشت ۴ هفته بود که می‌توان آن را به تولید مداوم رادیکال‌های آزاد حاصل از متابولیسم دیازینون نسبت داد، نتایج بررسی‌های انجام شده توسط Banaee و همکارانش نشان داد غلظت‌های تحت حاد دیازینون بر سلول‌های هپاتوسیت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب کاهش سطح TAC در این مطالعه شد [۲۹]. در یک مطالعه مشابه، القاء دیازینون بر موش‌های مورد آزمایش موجب کاهش TAC در بافت عضله نمونه‌های تحت تیمار شود. نتایج این مطالعه همسو با مطالعه ما بود و نشان داد افزایش فرایندهای اکسیداتیو توسط گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در طول فرایند سم‌زدایی آفت‌کش‌ها منجر به کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های مورد مطالعه می‌شود [۳۰]. به طور کلی از آنجایی که بخش غیرآزمی دفاع آنتی‌اکسیدانی سهم مهمی از میزان TAC را به خود اختصاص می‌دهند، در نتیجه افزایش مقدار این بخش از دفاع سلولی در پی استفاده از افزایش‌دهنده‌های آنتی‌اکسیدانی بدن به خصوص رزوراترول می‌تواند نقش اساسی جهت افزایش سطح دفاع آنتی‌اکسیدانی کل سلول ایفاء کند. به طور کلی

ما نشان داد رزوراترول با بی‌اثر کردن رادیکال‌های آزاد مانع از تولید متاولیت‌های سمی و بهبود عملکرد کلیه به وسیله کاهش سطح اوره، کراتینین و پروتئین ادرار شد. اثر رزوراترول در بهبود عملکرد بافت کلیه را می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و نیز تنظیم‌کننده ایمنی این ترکیب نسبت داد. در بررسی‌های انجام شده متأسفانه مطالعه‌ای که به بررسی اثر محافظتی رزوراترول بر روی سمیت با دیازینون پرداخته باشد یافت نشد اما به طور غیر مستقیم به مطالعات و شواهدی می‌توان اشاره کرد که از نتایج مطالعه حاضر حمایت می‌کنند.

Akbel و همکارانش نشان دادند رزوراترول با غلظت ۵ و ۱۰ mg/kg سطح اوره و کراتینین را در حیوانات در معرض تماس با مالاتیون به طور معنی‌داری کاهش داد، آن‌ها بیان کردند این اثر کاهش می‌تواند به دلیل نقش رزوراترول در تغییر مالاتیون به متابولیت‌های غیرسمی و یا افزایش دفع ادراری آن باشد [۱۸]. خامنه و همکارانش نشان دادند رزوراترول میزان قند خون، اوره و کراتینین را در موش‌های مبتلا به دیابت کاهش داد که این اثر با افزایش دوز معنی‌دارتر بود [۱۹]. همچنین مطالعات گذشته نشان داده‌اند تجویز رزوراترول به موش‌های دچار عفونت کلیوی در مقایسه با گروه کنترل به شکل معنی‌دار سبب بهبود آن‌ها گردید [۲۰]. مطابق با نتایج به دست آمده، دیازینون به طور معنی‌داری سطح MDA را افزایش و فعالیت آنتی‌اکسیدانی TAC را کاهش داد. مطالعات پیشین نشان می‌دهد که ارگانوفسفره‌ها باعث تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند رادیکال‌های آزاد قادرند با ماکرومولکول‌های مختلف در بدن نظیر پروتئین، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک متصل شده و باعث تخریب ساختمان و عملکرد آن‌ها شوند [۲۱]. MDA از مهم‌ترین بیومارکرهای پراکسیداسیون لیپیدی است و افزایش غلظت MDA نشان‌دهنده اختلال در مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان است [۲۲]. در مطالعه حاضر افزایش سطح MDA در سرم و بافت کلیه به دلیل تجویز دیازینون می‌تواند ناشی از تولید رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) به عنوان اکسیدکننده قوی و عامل کلیدی در شروع فرایند اکسیداسیون لیپیدها و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء باشد. داوودشاه و همکاران نشان دادند که دیازینون در یک حالت وابسته به دوز باعث القاء استرس اکسیداتیو و کاهش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کلیه موش‌های صحرایی شد [۹]. جعفری و همکاران با بررسی اثر دیازینون بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدهای مغز موش صحرایی نشان دادند که به دنبال تجویز دیازینون در دوزهای بالاتر از ۱۰۰ mg/kg سطح MDA به طور معنی‌داری افزایش یافت [۲۳]. نتایج این مطالعات در تایید مطالعه حاضر بود. از طرفی استفاده از رزوراترول سبب کاهش

مشارکت و نقش نویسندگان

ایده و طرح پژوهشی: فرشته مهری، انجام آزمایشات: امیر حسین رهبری، آنالیز و تفسیر نتایج: حبیب الله ناظم و محمد فضلنتی، نوشتن مقاله: فرشته مهری و امیرحسین رهبری. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

منابع

- [1] Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Homayounfar H, Khaste Khodaie Z. Protective effects of chronic administration of silymarin on blood glucose and lipids and oxidative stress in diabetic rats. *Koomesh* 2009; 10: 143-150. (Persian).
- [2] Ghazavi A, Ranjbar A, Vakilian K. Comparison of oxidative stress in preeclampsia, normal pregnancy and non-pregnant women. *Koomesh* 2006; 8: 41-46. (Persian).
- [3] Baconi DL, Bârca M, Manda G, Ciobanu AM, Balalau C. Investigation of the toxicity of some organophosphorus pesticides in a repeated dose study in rats. *Rom J Morphol Embryol* 2013; 54: 349-356.
- [4] Mehri F, Goodarzi MT, Esfahani M. The possible protective effect of resveratrol on diazinon-induced oxidative stress and hepatic injury. *Avicenna J Med Biochem* 2020; 8: 44-48.
<https://doi.org/10.34172/ajmb.2020.06>
- [5] 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.
- [6] Oruc E. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of *Cyprinus carpio* (L.). *Environ Toxicol* 2011; 26: 571-578.
<https://doi.org/10.1002/tox.20573>
PMid:20196151
- [7] Massry SG, Glasscock RJ. *Textbook of nephrology*: Williams & Wilkins; 1989.
- [8] Salehi M, Asgari A, Ahmadi S. The role of paraoxon toxicity on oxidative stress induction in rat heart and spleen. *J Adv Med Biomed Res* 2013; 21: 13-23.
- [9] Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 3345-3353.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.003>
PMid:20828599
- [10] Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol* 2008; 591: 66-72.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.067>
PMid:18616940
- [11] Shang J, Chen LI, Xiao FX, Sun H, Ding HC, Xiao H. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29: 698-706.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00807.x>
PMid:18501116
- [12] Jalili C, Farzaei MH, Roshankhah S, Salahshour MR. Resveratrol attenuates malathion-induced liver damage by reducing oxidative stress. *J Lab Physicians* 2019; 11: 212.
https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_43_19
PMid:31579256 PMCID:PMC6771320
- [13] Faghizadeh F, Adibi P, Hekmatdoost A. Effects of dietary resveratrol supplementation on liver enzymes, hs-CRP, and hepatic steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Iran J Nutr Sci Food Technol* 2014; 8: 41-49.

می‌توان گفت که آنتی‌اکسیدان کل، مجموعه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های موجود در سلول و شاخصی برای بیان کل مقادیر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی است به عبارتی دیگر، TAC وابسته به فعالیت یک یا دو آنزیم نیست و علاوه بر آنزیم‌های داخل سلولی، مجموعه‌ای از ویتامین C، E، آلبومین، بتاکاروتن و غیره را نیز در بر می‌گیرد [۳۱]. از طرفی یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهند که استفاده از رزوراترول به صورت وابسته به دوز به عنوان بخش آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی می‌تواند موجب افزایش TAC در موش‌های تحت تیمار دیازینون شود. طی یک مطالعه که توسط جلالی و همکاران انجام شد آن‌ها نشان دادند استفاده از مکمل رزوراترول به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در موش‌های تحت سمیت با مالاتیون می‌تواند موجب کاهش TAC کل شود [۳۲]. هم‌چنین در مطالعه دیگری تأثیر حفاظتی رزوراترول بر سمیت ناشی از اورگانوفسفره مورد بررسی قرار گرفت این مطالعه نشان داد که به دنبال استفاده از این ترکیب آنتی‌اکسیدان سطح TAC به طور معنی‌داری افزایش یافت [۳۳]. با توجه به مطالب مذکور می‌توان بیان کرد که سطح آنتی‌اکسیدان کل به نوعی توانایی موجود زنده در حذف و پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد را نشان می‌دهد به طوری که، هر چقدر سطح TAC افزایش یابد توانایی موجود زنده جهت خنثی‌سازی و مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش می‌یابد [۳۴].

نتایج نشان داد که دیازینون با تولید رادیکال‌های آزاد، کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام و افزایش لیپیدپراکسیداسیون در بافت کلیه، باعث القاء استرس اکسیداتیو می‌شود. رزوراترول به عنوان یک آنتی‌اکسیدان از طریق پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی تا حدی باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون و باعث بهبود عملکرد کلیه می‌شود. این مطالعه اگرچه نتایج ارزشمندی در مورد کاهش سمیت دیازینون در حیوانات تحت درمان با رزوراترول نشان داد، اما دارای محدودیت در تعداد گروه‌ها بود که مطالعات پیش‌تری در آینده به منظور بررسی اثرات حفاظتی در گروه و دوزهای مختلف و هم‌چنین سایر بافت تحقیقات لازم است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می‌دانند از خانم دکتر مریم اصفهانی جهت یاری در مراحل اولیه مطالعه تشکر نمایند. این طرح تحقیقاتی با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام شده است که بدین وسیله از کلیه مسئولین مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود.

- expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1313-1321.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.46661-0>
 PMid:17005777
- [26] Ara C, Karabulut AB, Kirimlioglu H, Coban S, Ugras M, Kirimlioglu V, et al. Protective effect of resveratrol against renal oxidative stress in cholestasis. *Ren Fail* 2005; 27: 435-440.
<https://doi.org/10.1081/JDI-65221>
<https://doi.org/10.1081/JDI-200065221>
 PMid:16060133
- [27] Moridi H, Karimi J, Sheikh N, Goodarzi MT, Saidijam M, Yadegarazari R, et al. Resveratrol-dependent down-regulation of receptor for advanced glycation end-products and oxidative stress in kidney of rats with diabetes. *Int J Endocrinol Metab* 2015; 13: e23542.
<https://doi.org/10.5812/ijem.23542>
 PMid:25892997 PMCID:PMC4394675
- [28] Pan QR, Ren YL, Zhu JJ, Hu YJ, Zheng JS, Fan H, et al. Resveratrol increases nephrin and podocin expression and alleviates renal damage in rats fed a high-fat diet. *Nutrients* 2014; 6: 2619-2631.
<https://doi.org/10.3390/nu6072619>
 PMid:25025298 PMCID:PMC4113760
- [29] Banaee M, Sureda A, Mirvaghefi A, Ahmadi K et al. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochem Physiol* 2011; 99: 1-6.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.09.001>
- [30] Amirkabirian N, Teimouri F, Esmaily H, Mohammadirad A, Aliahmadi A, Abdollahi M. Protection by pentoxifylline of diazinon-induced toxic stress in rat liver and muscle. *Toxicol Mech Methods* 2007; 17: 215-221.
<https://doi.org/10.1080/15376510600943783>
 PMid:20020971
- [31] Mirvaghefi A, Ali M, Poorbagher H. Effects of vitamin C on oxidative stress parameters in rainbow trout exposed to diazinon. *Ege J Fisher Aquat Sci* 2016; 33: 113-120.
<https://doi.org/10.12714/egejfas.2016.33.2.04>
- [32] Jalili C, Roshankhah S, Salahshoor MR, Mohammadi MM. Resveratrol attenuates malathion induced damage in some reproductive parameters by decreasing oxidative stress and lipid peroxidation in male rats. *J Family Reprod Health* 2019; 13: 70.
<https://doi.org/10.18502/jfrh.v13i2.1912>
 PMid:31988642 PMCID:PMC6969894
- [33] Jalili C, Roshankhah S, Moradi Y, Salahshoor MR. Resveratrol attenuates malathion-induced renal damage by declining oxidative stress in rats. *Int J Pharmace Invest* 2018; 8: 192-199.
https://doi.org/10.4103/jphi.JPHI_7_19
- [34] Karaoz E, Gultekin F, Akdogan M, Oncu M, Gokcimen A. Protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on lung toxicity induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2002; 54: 97-108.
<https://doi.org/10.1078/0940-2993-00236>
 PMid:12211644
- [14] Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 3345-3353.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.003>
 PMid:20828599
- [15] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- [16] Kaya Y, Bas O, Hanci H, Cankaya S, Nalbant I, Odaci E, et al. Acute renal involvement in organophosphate poisoning: histological and immunochemical investigations. *Ren Fail* 2018; 40: 410-415.
<https://doi.org/10.1080/0886022X.2018.1489289>
 PMid:30012025 PMCID:PMC6052427
- [17] Mehri F, Faizi M, Salimi A, Seydi E, Pourahmad J. Toxicity of 4-methylimidazole on isolated brain mitochondria: using both in vivo and in vitro methods. *Toxicol Environ Chem* 2015; 97: 663-673.
<https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1058054>
- [18] Akbel E, Arslan-Acaroz D, Demirel HH, Kucukurt I, Ince S. The subchronic exposure to malathion, an organophosphate pesticide, causes lipid peroxidation, oxidative stress, and tissue damage in rats: the protective role of resveratrol. *Toxicol Res* 2018; 7: 503-512.
<https://doi.org/10.1039/C8TX00030A>
 PMid:30090600 PMCID:PMC6062150
- [19] Khameneh S, Soufi FG, Alipour MR, Afshar F, Mirzaei F. The efficacy of long-term resveratrol administration on the activity of cyclooxygenase 1 and 2 and nuclear factor kappa B in type 2 diabetic rat kidney. *Med J Tabriz Univ Med Sci Health Serv* 2013; 35. (Persian).
- [20] Saldanha JF, Leal VdO, Stenvinkel P, Carraro-Eduardo JC, Mafra D. Resveratrol: why is it a promising therapy for chronic kidney disease patients? *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 963217.
<https://doi.org/10.1155/2013/963217>
 PMid:24489988 PMCID:PMC3893857
- [21] 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: 178-189.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
 PMid:16406578
- [22] Etim O, Farombi E, Usoh I, Akpan E. The protective effect of aloe vera juice on lindane induced hepatotoxicity and genotoxicity. *Pak J Pharm Sci* 2006; 19: 337-340.
- [23] Salehi M, Jafari M, Asgari A, Saleh Moghaddam M, Salimian M, Abbasnejad M, et al. Study of diazinon Effect on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in rat's brain. *Razi J Med Sci* 2010; 17: 15-23. (Persian).
- [24] Gharib M, Samani K, ZarrinAbadi Z, Mokhtari M, Heydarian E. Effect of resveratrol supplementation on antioxidant parameters, lipids profile and several biochemical indices in type 2 diabetic patients: a double-blind randomized-controlled clinical trial. *Iran J Nutr Sci Food Technol* 2018; 12: 33-42. (Persian).
- [25] Wang WB, Lai HC, Hsueh PR, Chiou RY, Lin SB, Liaw SJ. Inhibition of swarming and virulence factor

Protective effect of resveratrol against sub-acute diazinon-induced oxidative stress in rat kidney

Amirhossein Rahbari (Ph.D Student)¹, Habibollah Nazem (Ph.D)¹, Mohammad Fazilati (Ph.D)¹, Fereshteh Mehri (Ph.D)^{*2}

1 - Faculty of Paramedicine, Payame Noor University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Nutrition Health Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

* Corresponding author. +98 81 38380016 freshteh_mehri@yahoo.com

Received: 29 Nov 2020; Accepted: 20 Jun 2021

Introduction: Diazinon is used as an organophosphate pesticide in agriculture. Studies showed that a lot of organophosphates can produce free radicals and disrupt antioxidant system. Resveratrol as an antioxidant can reduce oxidative stress in kidney tissue. The study aimed to investigate the protective role of resveratrol on oxidative stress induced by sub-acute diazinon exposure in kidney tissue of rats.

Materials and Methods: Twenty-eight Wistar rats were randomly divided into 4 groups: control, diazinon (70 mg/kg), diazinon (70 mg/kg) + resveratrol (5 mg/kg), diazinon (70 mg/kg) + resveratrol (10 mg/kg) groups. The treatments were administered by gavage daily for four weeks. Urine samples were collected 24 hours after the last dose. The rats were anesthetized with ether and 3 mL of blood samples was taken from animals. Diazinon level in urine was measured using HPLC. The serum level of creatinine, urea, protein, malondialdehyde (MDA), and total antioxidant activity (TAC) were evaluated by biochemical methods.

Results: The results showed that the diazinon level in the diazinon group was significantly higher than that of the diazinon (70 mg/kg) + resveratrol group (5 and 10 mg/kg) ($P<0.05$). In addition to the protein levels of urine, serum levels of urea, creatinine, MDA and TAC in the diazinon group were significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). Resveratrol improved these changes.

Conclusion: Our findings implied that resveratrol improves the antioxidant status of the body against diazinon toxicity, so it can improve renal function in the face of diazinon.

Keywords: Diazinon, Kidney, Resveratrol, Oxidative Stress