

مقایسه اثر Diazینون و پاراکسون بر بیومارکرهای استرس اکسیداتیو سرم موش صحرائی

مریم صالحی^۱، مهوش جعفری^۲، مسعود صالح مقدم^۳، علیرضا عسگری^۴

۱. کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور مشهد
۲. دانشیار بیوشیمی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)
۳. استادیار بیوشیمی، دانشگاه پیام نور مشهد
۴. استاد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزش، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)

چکیده

زمینه و هدف: Diazینون و پاراکسون دسته‌ای از ارگانوفسفره‌های آفت کش هستند که به‌طور وسیع در کشاورزی استفاده می‌شوند. بعضی از ارگانوفسفره‌ها سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردند. هدف از این مطالعه مقایسه اثر Diazینون و پاراکسون بر بیومارکرهای استرس اکسیداتیو سرم موش صحرائی است.

مواد و روش کار: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) انجام شد. ۴۹ سر موش‌های صحرائی نر نژاد ویستار به‌صورت تصادفی در ۷ گروه قرار گرفتند: گروه کنترل روغن ذرت را به‌عنوان حلال Diazینون و پاراکسون و شش گروه آزمایش که Diazینون را در دوزهای ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ و پاراکسون را در دوزهای ۰/۳، ۰/۷ و ۱ به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت پس از تزریق، خون از قلب حیوانات گرفته و سرم تهیه گردید. سپس فعالیت آنزیم‌های بوتیریل کولین استراز (BChE)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) و میزان گلوکوتاتیون (GSH) به‌وسیله روش‌های شیمیایی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT و میزان GSH به دنبال تجویز Diazینون (بیش از ۳۰ mg/kg) و پاراکسون (بیش از ۰/۳ mg/kg) در مقایسه با کنترل معنی‌دار است، در حالی که فعالیت آنزیم LDH به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد. کاهش فعالیت BChE در مقایسه با کنترل معنی‌دار نمی‌باشد.

نتیجه‌گیری: Diazینون و پاراکسون باعث القاء تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو وابسته به دوز می‌شوند. کاهش فعالیت آنزیم‌ها و GSH احتمالاً نشان‌دهنده نارسایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت برای مقابله با رادیکال‌های آزاد و آسیب اکسیداتیو بافتی می‌باشد. اثر پاراکسون شدیدتر از Diazینون است. [م ت ع پ ز، : (-]

کلیدواژه‌ها: Diazینون، پاراکسون، استرس اکسیداتیو، موش صحرائی، سرم

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره به‌طور گسترده در کنترل حشرات و آلودگی‌های زیست محیطی استفاده می‌شوند. همچنین این ترکیبات نظیر تابون، سارین و مالاتیون در چندین حمله شیمیایی توسط نیروهای عراقی در طی جنگ ایران و عراق به کار رفته است. به‌دلیل دسترسی آسان و سمیت بالای این ترکیبات، میزان بروز مسمومیت‌های تصادفی و خودکشی وسیع بوده و مسئول حدود صد هزار مسمومیت در هر سال در دنیا است. در ایران این ترکیبات یکی از علل مرگ و میر ناشی از مسمومیت هستند.^{۱،۲} Diazینون و پاراکسون از مهمترین حشره‌کش‌های ارگانوفسفره هستند که برای کنترل انواع حشرات در محصولات کشاورزی، گیاهان زینتی و میوه و سبزیجات استفاده می‌شوند. این ترکیبات با فسفریلاسیون اسید آمینه سرین در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز باعث مهار آنزیم شده و تجمع استیل کولین در سیناپس - های کولینرژیک و وقوع بحران کولینرژیک تشنج و در موارد حاد ضایعه مغزی و مرگ را به دنبال دارد.^۳ در معرض قرارگیری حاد و تحت حاد با بعضی از ارگانوفسفره‌ها علاوه بر مهار کولین استراز، باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود.^۴ واکنش رادیکال‌های آزاد با لیپیدها در غشای سلولی باعث پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب ساختمان غشا می‌شود. اثرات مضر رادیکال‌های آزاد از طریق سیستم حمایتی آنتی‌اکسیدان سلولی شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) خنثی می‌شود. هم‌چنین گلوکوتاتیون (GSH) به‌عنوان آنتی

روش کار

مواد شیمیایی: نیترو بلو ترازولیم (NBT)، دی تیوبیس نیتروبنزوئیک اسید (DTNB)، تری کلرواستیک اسید (TCA) و دیگر مواد شیمیایی با درجه خلوص بالا از شرکت مرک و سیگما-آلمان خریداری شد.

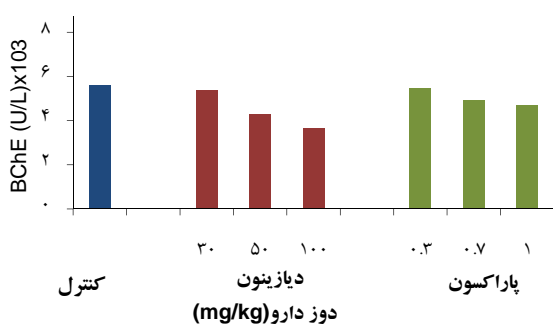
اکسیدانت باعث افزایش حلالیت سموم و دفع آن‌ها از طریق کلیه می‌شود. عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت بدن را استرس اکسیداتیو می‌نامند که علت ایجاد بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد.^۵ یک مطالعه نشان می‌دهد که به‌دنبال تجویز خوراکی مالاتیون به موش صحرائی تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در اریتروسیت‌ها، بزاق و پلاسما مشاهده می‌شود.^۶ از طرف دیگر با مطالعه اثر کلرپیریفوس و سپیرترین بر کبکد موش کوچک آزمایشگاهی، افزایش غلظت‌های سرمی شاخص‌های عملکرد کبدی و تغییر در شاخص‌های آنتی‌اکسیدان گزارش شده است.^۷ 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 Diazینون بر روی سیستم آنتی‌اکسیدانت به‌صورت In-vivo بسیار اندک است. در مطالعه حاضر اثرات دو سم Diazینون و پاراکسون بر برخی از شاخص‌های استرس اکسیداتیو سرم موش صحرائی مقایسه شده است.

سنجش فعالیت آنزیم LDH: فعالیت آنزیم LDH با استفاده از کیت پارس آزمون ایران سنجیده شد. جذب نمونه‌ها در طی ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین بیان شد.

تعیین غلظت GSH: برای تعیین میزان GSH از روش Thietz استفاده شد.^{۱۱} حجم مناسبی از سرم با اسید سولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط شد. نمونه در ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۸۱۰ میکرولیتر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن ۹۰ میکرولیتر معرف DTNB ۰/۰۴ درصد در سیرتات سدیم ۰/۱ درصد واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در ۴۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلو تاتیون ۱mg/ml منحنی استاندارد رسم و غلظت گلو تاتیون نمونه‌ها محاسبه گردید. برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد.^{۱۲} حجم مناسبی از سرم را به حجم ۱ میلی لیتر رسانده و ۳ میلی لیتر از محلول برادفورد به آن اضافه و به مدت دقیقه ۱۰ انکوبه گردید. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب قرائت شد. غلظت پروتئین با رسم استاندارد با استفاده از محلول ۱ mg/ml آلومین سرم گاوی (BSA) محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار INSTAT به صورت آزمون آنالیز واریانس یک طرفه به همراه تست توکی انجام شد. $p < 0.05$ مرز معنی دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین بیان شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از اثر دوزهای مختلف دیازینون و پاراکسون بر فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز در نمودار ۱ نشان می‌دهد که تغییر فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز در مقایسه با کنترل معنی دار نیست.



نمودار ۱: فعالیت آنزیم بوتیریل کولین استراز سرم درمغز دوزهای مختلف دیازینون و پاراکسون بعد از ۲۴ ساعت

نتایج حاصل از اثر دوزهای مختلف دیازینون و پاراکسون بر فعالیت آنزیم SOD سرم در نمودار ۲ نشان می‌دهد که کاهش فعالیت SOD در دوزهای بالاتر از ۳۰ mg/kg دیازینون و ۰/۳ mg/kg پاراکسون در مقایسه با کنترل

دیازینون (خلوص ۱۰۰ در صد) از شرکت Supelco -USA و اتیل پاراکسون (خلوص ۹۹ درصد) از شرکت سیگما خریداری شدند. محلول‌های ذخیره (استوک) دیازینون با غلظت ۴۰۰mg/ml و پاراکسون با غلظت ۴mg/ml در روغن ذرت به صورت تازه تهیه گردیدند.

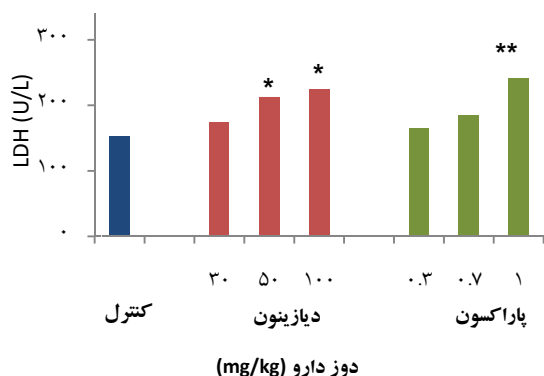
این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) انجام شد. ۴۹ سر موش آزمایشگاهی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم به مدت یک هفته جهت عادت کردن به محیط در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه... تحت شرایط طبیعی نور، تاریکی، غذا و آب قرار گرفتند. سپس حیوانات به طور تصادفی به ۷ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل که روغن ذرت را به عنوان حلال و ۶ گروه آزمایش که دوزهای مختلف دیازینون (۳۰mg/kg، ۵۰ و ۱۰۰) و پاراکسون در دوزهای (۰/۳mg/kg، ۰/۷، ۱) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت پس از تزریق، خون از قلب حیوانات گرفته و سرم تهیه گردید و در ۷۰- تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

سنجش فعالیت بوتیریل کولین استراز: برای اندازه گیری فعالیت کولین استراز از روش Ellman استفاده شد.^۹ ۱۰ میکرولیتر سرم را به کووت حاوی DTNB ۰/۴۲۵ میلی مولار محلول در بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار به همراه ۴۹۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر بوتیریل تیوکولین یدید ۲۰ میلی مولار به عنوان سوبسترا به کووت اضافه شد. به مدت ۵ دقیقه در ۳۷°C قرار داده شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر کونیتیدین سولفات جهت توقف واکنش اضافه شد. جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر به مدت ۵ دقیقه قرائت گردید. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

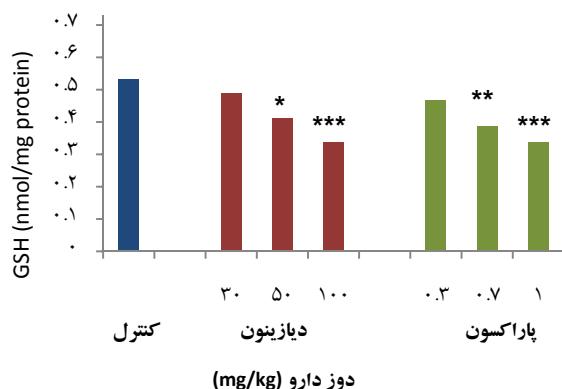
سنجش فعالیت آنزیم SOD: فعالیت آنزیم SOD با روش Winterbourn سنجیده شد.^۹ به حجم مناسبی از سرم، EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی مولار و NBT ۱/۵ میلی مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در ۳۷°C قرار گرفت. سپس ربیوفلاوین ۰/۱۲ میلی مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار با PH=۷/۸ 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 میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم CAT: فعالیت آنزیم CAT با روش Aebi سنجیده شد.^{۱۰} به حجم معینی از سرم اتانول مطلق (۱ml/ml) اضافه و به مدت نیم ساعت در یخ انکوبه گردید. سپس به آن تریتون X-100 ده درصد با غلظت نهایی یک درصد اضافه شد. این محلول جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. واکنش با اضافه کردن ۳۰ H₂O₂ میلی مولار به حجم مناسبی از عصاره نمونه بافتی در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار pH=۷ شروع شد. سپس جذب در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

دوزهای بیشتر از ۳۰ mg/kg Diazinon و ۰/۳ mg/kg پاراکسون در مقایسه با کنترل معنی دار است. هم چنین غلظت GSH در دوز ۱۰۰ mg/kg Diazinon در مقایسه با دوز ۳۰ mg/kg آن ($p < 0/01$) و دوز ۱ mg/kg پاراکسون در مقایسه با دوز ۰/۳ mg/kg ($p < 0/01$) به طور معنی داری کاهش می یابد.



نمودار ۴: مقایسه فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز سرم در مضمون دوزهای مختلف Diazinon و پاراکسون بعد از ۲۴ ساعت ($P < 0/05$ *) و ($P < 0/01$ ** در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است)

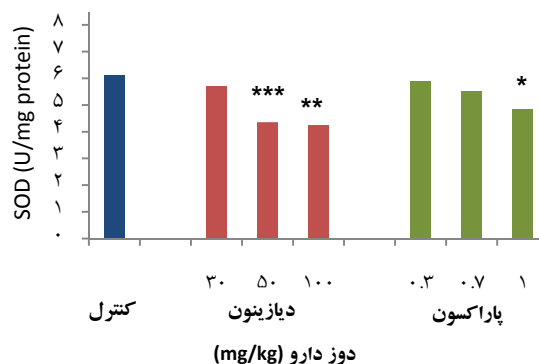


نمودار ۵: مقایسه غلظت گلوکوتیون در مضمون دوزهای مختلف Diazinon و پاراکسون در سرم بعد از ۲۴ ساعت ($P < 0/05$ *)، ($P < 0/01$ ** و ($P < 0/001$ *** در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است)

بحث

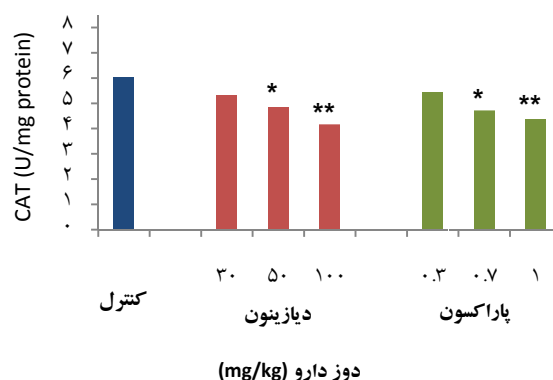
نتایج این مطالعه نشان می دهد که فعالیت آنزیم های SOD و CAT در دوزهای بالاتر از ۳۰ mg/kg Diazinon و ۰/۳ mg/kg پاراکسون کاهش می یابد. سرم دارای SOD، CAT، GPX کمی است و خواص آنتی اکسیداتیو آن وابسته به مولکول های کوچک مثل آسکوربیک اسید، بیلی روبین، اسید اوریک، فریتین و ترانسفرین می باشد. SOD^{۱۳} اولین سد دفاعی در مقابل رادیکال های آنیون سوپراکسید است که آن را به H₂O₂ و O₂ تبدیل می کند. توسط آنزیم CAT به H₂O و O₂ تبدیل می شود. کاهش فعالیت SOD احتمالاً باعث افزایش رادیکال سوپراکسید شده، این

معنی دار است. هم چنین کاهش فعالیت آنزیم SOD در دوز ۱۰۰ mg/kg در مقایسه با دوز ۳۰ mg/kg Diazinon معنی دار است ($p < 0/01$).



نمودار ۶: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سرم در مضمون دوزهای مختلف Diazinon و پاراکسون بعد از ۲۴ ساعت ($P < 0/05$ *)، ($P < 0/01$ ** و ($P < 0/001$ *** در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است)

نتایج حاصل از اثر دوزهای مختلف Diazinon و پاراکسون بر فعالیت آنزیم CAT سرم در تصویر ۳ نشان می دهد که کاهش فعالیت CAT در دوزهای بالاتر از ۳۰ mg/kg Diazinon و ۰/۳ mg/kg پاراکسون در مقایسه با کنترل معنی دار است. هم چنین فعالیت آنزیم CAT در دوز ۱ mg/kg در مقایسه با دوز ۰/۳ mg/kg پاراکسون به طور معنی داری کاهش می یابد ($p < 0/05$).



نمودار ۷: مقایسه فعالیت آنزیم کاتالاز سرم در مضمون دوزهای مختلف Diazinon و پاراکسون بعد از ۲۴ ساعت ($P < 0/05$ *) و ($P < 0/01$ ** در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است)

نتایج حاصل از اثر دوزهای مختلف Diazinon و پاراکسون بر فعالیت آنزیم LDH سرم در تصویر ۴ نشان می دهد که افزایش فعالیت LDH در دوزهای بالاتر از ۳۰ mg/kg Diazinon و دوز ۰/۷ mg/kg پاراکسون در مقایسه با کنترل معنی دار است. هم چنین فعالیت آنزیم LDH در دوز ۱ mg/kg در مقایسه با دوز ۰/۳ mg/kg پاراکسون به طور معنی داری افزایش می یابد ($p < 0/01$). نتایج حاصل از اثر دوزهای مختلف Diazinon و پاراکسون بر غلظت GSH سرم در نمودار ۵ نشان می دهد که کاهش غلظت GSH در

مسیر تجویز، غلظت سم مورد استفاده، نژاد و گونه حیوان، نوع بافت و حتی ایزو آنزیم‌های خاص LDH باشد. GSH یک تری پپتید حاوی تیول از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های سلولی است که در سیتوپلاسم کبد سنتز و از طریق خون به سایر بافت‌ها برده می‌شود. GSH نقش مهمی در پاکسازی ROS و غیر سمی کردن داروها و مواد شیمیایی دارد.^{۲۶} GSH برای تبدیل دهیدروآسکوربیک به آسکوربات ضروری است که به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت جهت خنثی کردن سوپراکسید عمل می‌کند.^{۲۷} در مطالعه حاضر غلظت GSH سرم در دوزهای بالاتر از ۳۰ mg/kg دیاژینون و ۰/۳ mg/kg پاراکسون کاهش می‌یابد. کاهش GSH احتمالاً ناشی از متابولیسم و دفع دیاژینون و پاراکسون است که به GSH نیاز دارد و کاهش GSH باعث کاهش متابولیسم و افزایش سمیت دیاژینون و پاراکسون می‌شود. هم‌چنین کاهش GSH سرم انعکاسی از کاهش سنتز GSH کبدی است که باعث کاهش GSH پلاسمایی و GSH بافت‌های خارج کبدی می‌شود و هم‌ساز GSH کل بدن را مختل می‌کند.^{۲۵} مطالعات Buyukokuroglu و همکاران نشان دادند، مصرف فن تیون بعد از ۲۴ ساعت سطح GSH ماهیچه انسان را کاهش می‌دهد.^{۲۸} هم‌چنین مطالعات Monteiro و همکاران نشان دادند، مصرف متیل پاراتیون (MP) در ماهی موجب کاهش گلوکوتایون در بافت‌های کبد، ماهیچه سفید و آبشش می‌شود.^{۱۸} مطالعات Khan و همکاران نشان دادند، مصرف سیپرمترین و مالاتیون در موش صحرایی موجب کاهش گلوکوتایون کبد می‌شود.^{۲۹}

بوتیریل کولین استراز یکی از آنزیم‌های مورد هدف ارگانوفسفره‌ها (دیاژینون و پاراکسون) می‌باشد که اثرات سمی آن‌ها به واسطه مهار کولین استراز ایجاد می‌شود که برای عملکرد سیستم عصبی لازم است.^{۳۳} این آنزیم در سرم و کبد وجود دارد و از نظر فارماکولوژی و سم‌شناسی اهمیت ویژه‌ای دارد و اثر حاد ارگانوفسفره‌ها را به سرعت آشکار می‌کند. اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم در تشخیص مسمومیت با مواد حشره‌کش از ارزش بالایی برخوردار است.^{۳۰} در مطالعه حاضر در اثر تجویز دیاژینون و پاراکسون فعالیت BChE سرم تغییر معنی داری را نشان نمی‌دهد. احتمالاً این نتیجه ناشی از بهبود فعالیت BChE سرم بعد از ۲۴ ساعت و وجود عملکرد سیستم‌های دیگر بدن مانند سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان می‌باشد. هم‌چنین اثر ارگانوفسفره‌ها بر فعالیت BChE وابسته به دوز مصرفی، مدت زمان تماس، نوع بافت و نوع حیوان مورد نظر می‌باشد. مطالعات Sun و همکاران نشان داد که فعالیت آنزیم BChE به‌دنبال تجویز Human BChE و به‌دنبال آن تجویز سومان بعد از ۱۴ ماه در نمونه خونی هیچ تغییری ایجاد نمی‌کند.^{۳۱} مطالعات Sayim و همکارانش نشان داد که فعالیت آنزیم BChE به‌دنبال تجویز دیمتوات در موش صحرایی برای ۹۰ روز متوالی کاهش پیدا می‌کند.^{۳۳} مطالعات نیکوکار و همکاران نشان داد که به‌دنبال تجویز مالاتیون به مدت ۱۴ روز به موش صحرایی باعث کاهش فعالیت BChE در کبد و سرم می‌شود.^{۲۲} مقایسه اثر دیاژینون و پاراکسون بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو سرم نشان می‌دهد که هر دو سم مشابه عمل می‌کنند، ولی با توجه

افزایش خود یک اثر مهار بر فعالیت CAT داشته و باعث کاهش فعالیت CAT می‌شود که می‌تواند منجر به آسیب بافتی و ایجاد استرس اکسیداتیو گردد.^۴ نتایج این تحقیق موافق نتایج مطالعاتی است که نشان دادند ارگانوفسفره‌های فسفومیدون، تری کلروفون و دی کلرووس سبب مهار فعالیت SOD می‌شود.^{۱۴} Khan و همکاران با مطالعه اثر کلرپیرفوس و سیپرمترین (تجویز به مدت ۲ هفته) بر کبد موش آزمایشگاهی، کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT را گزارش نمودند.^{۱۵} از طرف دیگر در بعضی از مطالعات به‌دنبال تجویز ترکیبات آفت‌کش، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گزارش شده است. Sharma و همکاران نشان دادند تجویز خوراکی دی‌متوات به موش صحرایی موجب افزایش وابسته به دوز در فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT مغز و کبد می‌شود.^{۱۶} مطالعات Altuntas^{۲۲} افزایش فعالیت SOD را طی مسمومیت با دیاژینون و فن تیون نشان دادند.^{۱۷} مطالعات Monterio و همکاران نشان داد که متیل پاراتیون یا فولی‌سوپر باعث تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم SOD و CAT کبد و ماهیچه ماهی می‌شود.^{۱۸} مطالعات Akturk و همکاران نشان داد که مصرف دیاژینون توسط موش صحرایی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت قلب و گلبول قرمز می‌شود.^{۱۹} مطالعات غنی و همکاران نشان داد که مصرف پاراکسون به‌صورت داخل صفاقی بعد از ۴ ساعت در موش صحرایی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در بافت مغز می‌شود.^{۲۰} مطالعات Isik و همکاران نشان دادند که تجویز دیاژینون و متیل پاراتیون به ماهی بعد از ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD در کبد و شش می‌شود.^{۲۱} این اختلاف نتایج در مطالعات مختلف ناشی از نوع، نژاد و گونه حیوان، نوع بافت، مسیر تجویز ماده سمی و دوز و زمان مواجهه می‌باشد.

LDH آنزیمی سیتوپلاسمی است که جهت بررسی آسیب سلولی و به‌عنوان مارکر جهت بررسی سمیت یک ماده شیمیایی و لیز سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. فعالیت این آنزیم با میزان مرگ سلول‌ها رابطه مستقیم دارد.^{۲۲} در مطالعه حاضر اثر دیاژینون و پاراکسون بر فعالیت LDH سرم نشان می‌دهد که در دوزهای بالاتر از ۳۰ mg/kg دیاژینون و در دوز ۱ mg/kg پاراکسون، فعالیت آنزیم LDH افزایش می‌یابد. افزایش این آنزیم احتمالاً ناشی از افزایش آسیب بافتی و تراوش آن به داخل سرم می‌باشد. مطالعات Gokcimen و همکاران نشان دادند که تجویز دیاژینون به موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم LDH در بافت کبد و پانکراس گردید.^{۲۳} در مطالعات حیوانی نیز افزایش فعالیت LDH سرم پس از تجویز ترکیباتی از جمله الفا-سپرمترین توسط Manna و همکاران گزارش شده است.^{۲۴} Mishra و همکاران نشان دادند که تجویز اندوسولفان به ماهی، موجب کاهش فعالیت LDH کبد و عضله اسکلتی می‌گردد.^{۲۵} مطالعات غنی و همکاران نشان داد که تجویز پاراکسون به موش صحرایی بعد از ۴ ساعت باعث افزایش LDH بافت کبد و افزایش مختصری در بافت مغز می‌گردد.^{۲۰} نتایج مختلف می‌تواند ناشی از اختلاف در نوع

نهایت منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود. اثرات پاراکسون بسیار شدیدتر می‌باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی مرکز تحقیقات شیمیایی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... در قالب طرح تحقیقاتی (شماره ثبت: ۳۲۸) انجام گردیده است.

به دوز به کار رفته پاراکسون که بسیار کمتر از Diazinon است، نشان‌دهنده سمیت بیشتر آن است. در ساختمان Diazinon پیوند P=S وجود دارد که در ساختمان پاراکسون به پیوند P=O مبدل شده است. این تغییر باعث فعالیت شدیدتر این ارگانوفسفره می‌شود.^{۳۴،۳۵}

در مجموع نتایج پیشنهاد می‌کند که اثر Diazinon و پاراکسون روی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت سرم در یک طرح وابسته به دوز است. کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش میزان گلوکاتایون نشان‌دهنده نارسایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت برای مقابله با رادیکال آزاد می‌باشد که در

References

- Storm JE, Rozman KK, Doull J. Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. *Toxicology* 2000; 150: 1-29.
- Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, et al. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in salvia and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp Biochem Physiol* 2004; 137: 29-34.
- Kappers WA, Edwards RJ, Murray S and Boobis AR. Diazinon is activated by CYP2C19 in human liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 177: 68-76.
- Limon-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Res Gen Toxicol Environ Mut* 2009; 674: 137-147.
- Sleven H, Gibbs JE, Heales S, et al. Depletion of reduced glutathione precedes inactivation of mitochondrial enzymes following limbic status epilepticus in the rat hippocampus. *Neurochemistry International* 2006; 48: 75-82.
- John S, Kale M, Rathore N and Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nut Biochem* 2001; 12: 500-4.
- Giordano G, Afsharinejad Z, Guizzetti M, et al. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 219: 181-9.
- Ellman GL, Kourtney KD, Andres VJR, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
- Winterbourn C, Hawkins R, Brian M and Carrell R. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975; 85: 337.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
- 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.
- 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: 248-254.
- Naghii MR. Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants. *Military Med* 2002; 167: 573-575.
- 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 Exper Biol* 1992; 30: 850-852.
- Khan SM, Sobti RC, Katarial A. Pesticide-induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. *Clin Chimica Acta* 2005; 358: 131-138.
- Sharma Y, Basher S, Irshad M, et al. Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. *Toxicology* 2005; 215: 173-181.
- Altuntas L, Kilinc L, Orhan O and Demiral R. The effect of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes in vitro. *Hum Exper Toxicol* 2004; 23: 9-13.
- Monterio DM, Rantin FT, Kalinin AL. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxá, brycon cephalus exposed to organophosphate insecticide folisuper 600 br® (methyl parathion). *Comp Biochem Physiol* 2009; 149: 40-49.
- Akturk O, Demirin H, Sutcu R, et al. 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; 6: 455-461.
- Ghani E, Mohammadi M, Jafari M, et al. [Evaluation of oxidative stress index in brain tissue of rats after exposure to paraoxon] Persian. *Kowsar Med J* 2008; 1: 1-8.
- Isik I, Celik I. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pest Biochem Physiol* 2008; 92: 38-42.
- Agrahari SH, Pandey KC, Gopal K. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pest Biochem Physiol* 2007; 88: 268-272.
- Gokcimen A, Gulle K, Demirin H, et al. Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues. *Pest Biochem Physiol* 2007; 87: 103-108.
- Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK and Das S. Repeated dose toxicity of alfa-cypermethrin in rats. *J Vet Sci* 2004; 5: 241-245.
- Mishra R, Shukla SP. Endosulfan mediated effects on lactate dehydrogenase from the catfish. *Toxicol Lett* 1998; 95: 145.

26. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem*; 52: 711-760.
27. Winkler BS, Orselli SM, Rex TS. The redox couple between glutathione, ascorbic acid: A chemical and physiological perspective. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 333-349.
28. Buyukokuroglu ME, Cemek M, Tosun M, et al. Dantrolen may prevent organophosphate-induced oxidative stress and muscle injury. *Pest Biochem Physiol* 2008; 92: 156-163.
29. Khan SM, Sobti RC, Kataria L. Pesticide-induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. *Clin Chimica Acta* 2005; 358: 131-8.
30. Mishra H. Simplified procedures for purification and stabilization of human plasma butylcholinesterase. *Process Biochem* 2004; 39: 877-882.
31. Sun W, Bhupendra P, Lenz DE and Saxena A. Long-term effects of human butyrylcholinesterase pretreatment followed by acute soman challenge in cynomolgus monkeys. *Chem Biol Int*; 175: 2008: 428-430.
32. Sayim AF. Dimethoate-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats. *Exp Toxicol Pathol* 2007; 59: 237-243.
33. Nikokar N. [Study of correlation between rat liver and serum carboxylesterase and cholinesterase exposed to malathion] Persian [dissertation]. Tehran: Tehran University.
34. Mutch E, Blain PG, Williams FM. The role of methabolism in determining susceptibility to parathion toxicity in man. *Toxicol Lett* 1999; 107: 177-187.
35. Arufe MI, Romero JL, Gamero JJ and Mereno MJ. Oxidation of cholinesterase-inhibiting pesticides: A simple experiment to illustrate the role of bioactivation in the toxicity of chemicals. *Biochem Educat* 2000; 28: 174-177.

Comparing the effect diazinon and paraoxon on oxidative stress biomarkers of rat serum

Maryam Salehi,¹ Mahvash Jafari,² Masoud Saleh-Moqadam,³ Alireza Asgari⁴

Background: Diazinon and paraoxon are the most widely used organophosphates (OPs) in agriculture. Some OPs are capable to produce free radicals and induce disturbance in body antioxidant system. The aim of this study was to investigate the effects of diazinon and paraoxon on oxidative stress biomarkers in rat serum.

Materials and Method: This experimental study was carried out in Baqiyatallah University of Medical Sciences in 1389. Forty-nine male Wistar rats were randomly divided in to seven groups as followed: control (corn oil as diazinon and paraoxon solvent) and six experimental groups receiving of different doses diazinon (30, 50 and 100 mg/kg) and paraoxon (0.3, 0.7, 1 mg/kg) by intraperitoneal injection only once. Twenty-four hours after injection, blood was collected by cardiac puncture and serum was obtained. Then, buterylcholinesterase (BChE), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and lactate dehydrogenase (LDH) activities, as well as glutathione (GSH) level were determined by biochemical methods.

Results: At doses higher than 30 mg/kg diazinon and 0.3 mg/kg paraoxon, the activities of SOD, CAT and GSH level were significantly decreased, while LDH activity was increased. No significant changes observed in BChE activity.

Conclusion: Diazinon induces the production of free radicals and oxidative stress in a dose-dependent manner. The enhanced activity of antioxidant enzymes and depleted GSH content is indicative of oxidative tissue injury. The effect of paraoxon on antioxidant system is more than diazinon.

Keywords: Diazinon, paraoxon, oxidative stress, rat, serum

1. Msc of Biochemistry, Mashhad Payame Noor University, Mashhad, Iran.
2. Associate Professor of Biochemistry, Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor of Biochemistry, Mashhad Payame Noor University, Mashhad, Iran.
4. Professor of Physiology, Sport Physiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Please cite this article as: Salehi M, Jafari M, Saleh-Moqadam M, Asgari A. Comparison of effect of diazinon and paraoxon on oxidative stress biomarkers of rat serum. Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS)