

# دانشور

## پزشکی

### بررسی اثر N – استیل سیستئین و ویتامین های E و C بر استرس اکسیداتیو القا شده با دیازینون در اریتروسیت های موش صحرایی

نویسندگان: محمد صالح عابدینی<sup>۱</sup>، مهوش جعفری<sup>۲\*</sup>، سیدمجتبی میرزاده<sup>۱</sup>، فاطمه سالم<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات دانشجویان، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

۲. استاد بیوشیمی، مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

۳. کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

E-mail: m.jafari145@gmail.com

\* نویسنده مسئول: مهوش جعفری

#### چکیده

مقدمه و هدف: دیازینون به عنوان حشره کش های ارگانوفسفره برای کنترل حشرات در منازل و کشاورزی استفاده می شود. در این مطالعه، اثر N – استیل سیستئین (NAC) و ویتامین های E و C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در اریتروسیت های موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، موش های صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۸ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه دیازینون (۱۰۰ mg/kg)، گروه NAC (۱۶۰ mg/kg)، گروه ویتامین E (۱۵۰ mg/kg)، گروه ویتامین C (۲۰۰ mg/kg)، گروه دیازینون-NAC، گروه دیازینون-E و گروه دیازینون-C که دیازینون را به همراه آنتی اکسیدان ها به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. بعد از ۲۴ ساعت، خون جمع آوری و اریتروسیت ها تهیه شد. سپس آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتایون S- ترانسفراز (GST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) و غلظت های گلوکاتایون (GSH) و مالون دی آلدئید (MDA) توسط روش های بیوشیمیایی تعیین شدند.

نتایج: دیازینون سبب افزایش فعالیت SOD ( $p < 0.001$ ) و GST ( $p < 0.01$ ) و غلظت MDA ( $p < 0.05$ ) و کاهش فعالیت آنزیم های CAT ( $p < 0.01$ ) و LDH ( $p < 0.01$ ) و غلظت GSH ( $p < 0.01$ ) در اریتروسیت ها می گردد. تجویز آنتی اکسیدان ها باعث تغییر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و کاهش غلظت MDA و افزایش غلظت GSH اریتروسیت ها می شود.

نتیجه گیری: NAC از طریق افزایش سنتز گلوکاتایون و ویتامین های E و C از طریق پاک سازی رادیکال های آزاد، تا حدی باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون می شوند.

واژگان کلیدی: دیازینون، N- استیل سیستئین، ویتامین های E و C، استرس اکسیداتیو، اریتروسیت های موش صحرایی

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست و سوم-شماره ۱۲۲  
اردیبهشت ۱۳۹۵

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۶  
آخرین اصلاح ها: ۱۳۹۵/۰۱/۲۴  
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۳۰

## مقدمه

را خنثی کند (۱۱، ۱۰). ویتامین E (آلفا-توکوفرول) از آنتی‌اکسیدان‌های مهم محلول در چربی موجود در غشای بیولوژیکی است که در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش پراکسیداسیون لیپیدها در غشاء نقش مهمی دارد. ویتامین C (اسید آسکوربیک) آنتی‌اکسیدان محلول در آب از ترکیبات سلولی بر علیه رادیکال‌های آزاد در مایعات خارج سلولی است. این ویتامین می‌تواند ویتامین E اکسید شده را مجدداً احیا نماید و به همراه یکدیگر، از القای استرس اکسیداتیو جلوگیری نمایند (۹، ۱۲).

چندین مطالعه نشان می‌دهد که ویتامین‌های E و C می‌توانند سمیت سلولی ارگانوفسفرها را کاهش دهند و از تغییرات بعضی از پارامترهای بیوشیمیایی جلوگیری کنند (۹، ۱۲). Shadnia و همکاران اثر حفاظتی NAC و آلفا-توکوفرول را در کاهش استرس اکسیداتیو القا شده توسط دیازینون خوراکی بعد از ۴ هفته نشان دادند (۱۴، ۱۳). Pena-Llopis و همکاران نشان دادند که تزریق داخل صفاقی NAC قبل از تجویز دی کلروس به ماهی باعث افزایش غلظت GSH و GST می‌شود (۱۵).

با توجه به تنوع ساختمان شیمیایی ارگانوفسفرها و اثرات متفاوت آن‌ها بر روی بافت‌های مختلف و همچنین اثرات مختلف آنتی‌اکسیدان‌ها بر این سمیت، برای درک مکانیسم عمل دقیق ارگانوفسفرها، مطالعات تکمیلی را ضروری می‌نماید. اگرچه چندین مطالعه روی نقش حفاظتی NAC روی کاهش سمیت ارگانوفسفرها انجام شده است (۱۵-۱۳) و همچنین اثر حفاظتی و درمانی ویتامین‌های E و C بر روی پارامترهای آسیب سلولی در خون و سلول بررسی شده است؛ ولیکن مطالعات اندکی روی تجویز این آنتی‌اکسیدان‌ها و دیازینون به صورت داخل صفاقی بر روی بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف انجام شده است (۱۶). در ضمن مطالعات انجام شده در دوز سم، روش تزریق، نوع بافت، نوع حیوان و مدت زمان تیمار با هم

سموم ارگانوفسفرها به عنوان حشره‌کش به طور گسترده در کنترل حشرات استفاده می‌شوند. همچنین این ترکیبات نظیر تابون، سارین و مالاتیون در چندین حمله شیمیایی به عنوان گاز اعصاب توسط نیروهای عراقی در طی جنگ ایران و عراق به کار رفته است. مسمومیت با این ترکیبات از مشکلات جهانی است و به عنوان سومین علت مسمومیت و علت اصلی مرگ و میر ناشی از مسمومیت در ایران می‌باشد. این ترکیبات با فسفریلاسیون اسید آمینه سرین در جایگاه فعال آنزیم استیل کولین استراز باعث مهار آنزیم و تجمع استیل کولین در سیناپس‌های کولینرژیک شده و وقوع بحران کولینرژیک تشنج و در موارد حاد، ضایعه مغزی و مرگ را به دنبال دارد (۴-۱). دیازینون از مهم‌ترین حشره‌کش‌های ارگانوفسفره است که برای کنترل انواع حشرات در محصولات کشاورزی استفاده می‌شود. این ترکیب به آسانی از روده جذب شده و به سرعت در طی چند ساعت جذب می‌شود و در کبد توسط سیستم سیتوکروم P450 از طریق دسولفوراسیون اکسیداتیو به متابولیت فعال سمی خود دیازوکسون تبدیل می‌گردد (۵، ۴).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که بعضی از ارگانوفسفرها از طریق تولید رادیکال‌های آزاد باعث تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و S-گلوتاتیون ترانسفراز (GST)، کاهش غلظت گلوتاتیون (GSH) و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در بافت‌ها شده که در نهایت منجر به استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی می‌شوند (۶-۴). با توجه به تأثیر ارگانوفسفرها بر روی سیستم اکسیدان-آنتی‌اکسیدان، احتمالاً استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در جهت درمان این افراد می‌تواند کمک کند (۹-۷). N-استیل سیستئین (NAC) به عنوان یک آنتی‌اکسیدان و پیش‌ساز گلوتاتیون می‌تواند به طور طبیعی اثرات آسیب‌های داخل سلولی رادیکال‌های آزاد

رعایت شد.

#### تیمار حیوانات

در این مطالعه تجربی، حیوانات به طور تصادفی به ۸ گروه (در هر گروه ۶ سر) تقسیم شدند: گروه کنترل که روغن ذرت را به عنوان حلال دیازینون، گروه دیازینون که ۱۰۰ mg/kg دیازینون، گروه NAC که ۱۶۰ mg/kg NAC، گروه E که ۱۵۰ mg/kg ویتامین E، گروه C که ۲۰۰ mg/kg ویتامین C، گروه دیازینون-NAC، گروه دیازینون-E و گروه دیازینون-C که به طور همزمان دیازینون به همراه آنتی اکسیدانها را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از تزریق، با بیهوش نمودن حیوانات به وسیله اتر، خون از قلب حیوانات گرفته شد و به لوله های حاوی ۵ میلی گرم سیترات سدیم منتقل شد. بعد از جدا کردن پلاسما، گلبول های قرمز سه بار با ۵ برابر حجم در بافر فسفات سالین شسته شده و تا انجام آزمایش در  $7^{\circ}\text{C}$  - نگهداری گردید. در روز آزمایش، گلبول های قرمز شسته شده با ده برابر حجم در آب مقطر دوبار تقطیر سرد لیز نموده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰g در  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفوژ گردید. از مایع رویی جهت سنجش شاخص های مورد نظر استفاده شد.

#### سنجش فعالیت آنزیم SOD

فعالیت آنزیم SOD به روش Winterbourn سنجیده شد (۱۸). به حجم مناسبی از گلبول های قرمز لیز شده، 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  $37^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت. سپس ریبو فلاوین ۰/۱۲ میلی مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار با  $\text{pH}=7/8$  اضافه و به مدت ۱۲ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد و فعالیت ویژه برحسب واحد بر گرم هموگلوبین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم CAT: برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Abei استفاده شد (۱۹). واکنش

متفاوت هستند. اریتروسیت ها برای حمل اکسیژن، مهم و به دلیل غلظت بالای اکسیژن و هموگلوبین برای تولید اکسی رادیکال ها و همچنین بالابودن میزان اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشاء آنها، بسیار حساس به استرس اکسیداتیو هستند. همچنین به عنوان بافت مهم در تشخیص مسمومیت ارگانوفسفره به شمار می رود (۱۷). در مطالعه حاضر، نقش NAC و ویتامین های E و C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در اریتروسیت های موش صحرائی با سنجش شاخص های استرس اکسیداتیو بررسی شده است.

#### مواد و روش ها

##### مواد شیمیایی

۱- کلرو ۲، ۴ دی نیترو بنزن (CDNB)، نیتروبلوتترازولیوم (NBT)، دی تیو- بیس- نیتروبنزوثیک اسید (DTNB)، تری کلرواستیک اسید (TCA) و دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بالا از شرکت مرک و سیگما (آلمان) خریداری شد. NAC، ویتامین های E و C از شرکت سیگما و دیازینون از شرکت Supelco - USA با بیشتر از ۹۸ درصد خلوص خریداری شد. دیازینون با غلظت ۴۰۰ mg/ml و ویتامین E با غلظت ۱۶۰ mg/ml در روغن ذرت و NAC با غلظت ۱۶۰ mg/ml و ویتامین C با غلظت ۲۰۰ mg/ml در آب مقطر به صورت تازه تهیه شد.

##### حیوانات

این مطالعه بر روی موش های صحرائی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد. موش ها در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی گراد در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله قرار گرفتند. دسترسی حیوانات به آب و غذا آزاد بود. موازین اخلاقی کار با حیوان های آزمایشگاهی که مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) بود، هنگام کار با موش های آزمایشگاهی

خوانده شد. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از  $1.0 \times 10^{-3}$  تتراتوکسی پروپان به‌عنوان استاندارد تعیین شده و غلظت مالون دی آلدئید بر حسب نانومول بر گرم هموگلوبین محاسبه شد. محلول استاندارد MDA در غلظت‌های ۲۰-۰/۲ میکرومولار در اسیدسولفوریک ۱۰ درصد تهیه شد.

#### سنجش میزان GSH

برای سنجش میزان گلوتاتیون بافت از روش Tietz استفاده شد (۲۲). ۱۰۰ میکرولیتر از گلوبول‌های قرمز لیز شده با ۱۰ میکرولیتر اسید سولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته به ۸۱۰ میکرولیتر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن ۹۰ میکرولیتر DTNB ۰/۴ درصد محلول در سیترات سدیم ۱ درصد 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 محلول استاندارد گلوتاتیون در غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میکرومولار تهیه شد و منحنی استاندارد گلوتاتیون رسم گردید و غلظت گلوتاتیون برحسب نانومول بر گرم هموگلوبین محاسبه گردید.

#### تعیین غلظت هموگلوبین

۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های گلوبول قرمز را با ۵ میلی‌لیتر محلول درابکینز (۰/۲ گرم پتاسیم فری سیانید  $[K_3Fe(CN)_6]$ ، ۰/۰۵ گرم KCN و ۱ گرم  $NaHCO_3$  در یک لیتر) مخلوط کرده و با دستگاه هموگلوبینومتری میزان غلظت هموگلوبین برحسب g/dl به‌دست آمد (۲۳).

با اضافه کردن  $H_2O_2$  ۳۰ میلی‌مولار به ۵۰ میکرولیتر از گلوبول‌های قرمز لیز شده در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار  $pH=7$  شروع شد. سپس جذب را در طی ۳ دقیقه در طول موج ۴۴۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت ویژه برحسب واحد بر گرم هموگلوبین محاسبه شد.

#### اندازه‌گیری فعالیت GST

اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم به روش Habig انجام شد (۲۰). یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با  $pH=7.4$  شامل EDTA یک میلی‌مولار، GSH ۲۰ میلی‌مولار و CDNB ۲۰ میلی‌مولار است. واکنش با اضافه کردن حجم معینی از گلوبول‌های قرمز لیز شده شروع شد. تغییرات جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت گردید. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر گرم هموگلوبین بیان شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH): اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز با استفاده از کیت پارس آزمون انجام شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه را با یک میلی‌لیتر از محلول مخلوط‌شده ۲۰۱ موجود در کیت اضافه و اختلاف جذب بین صفر و ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم برحسب واحد بر گرم هموگلوبین محاسبه گردید.

#### سنجش میزان مالون دی آلدئید (MDA):

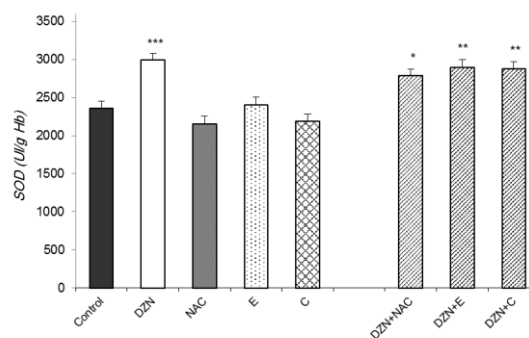
برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها از روش Kei استفاده شد (۲۱). به ۵۰۰ میکرولیتر گلوبول‌های قرمز لیز شده ۱/۵ میلی‌لیتر TCA ۱۰ درصد اضافه شد. به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی را برداشته و ۲ میلی‌لیتر اسید تیوباربتوریک ۰/۶۷ درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار داده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر  $n$ -بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس جذب محلول رویی صورتی‌رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

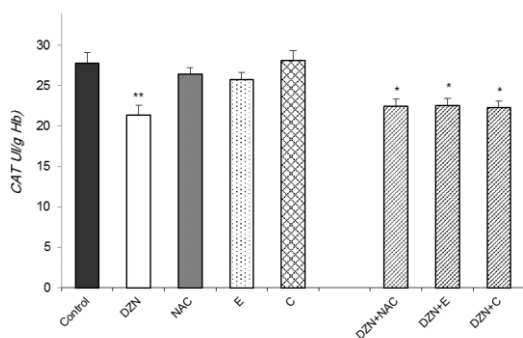
تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار InStat به صورت آنالیز واریانس یک طرفه به همراه تست توکی انجام شد.  $p < 0/05$  مرز معنی‌دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد و نتایج به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  بیان شد.

### نتایج

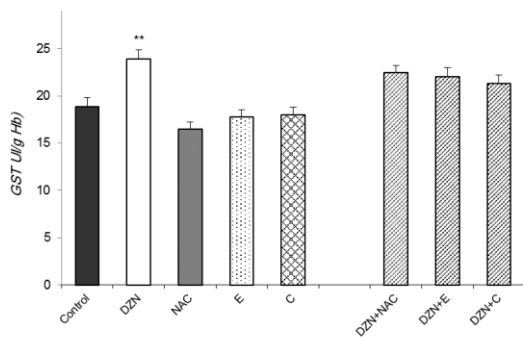
نتایج حاصل از اثر دیازینون، NAC و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و LDH اریتروسیت‌ها در نمودارهای ۱-۴ نشان می‌دهد که دیازینون باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های SOD ( $p < 0/001$ ) و GST ( $p < 0/01$ ) و کاهش فعالیت آنزیم‌های CAT و LDH ( $p < 0/01$ ) در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. همچنین تجویز دیازینون با NAC و یا ویتامین‌های C و E باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD و کاهش فعالیت آنزیم CAT ( $p < 0/05$ ) در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد. تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گروه‌های دیازینون- NAC، دیازینون- ویتامین E و دیازینون- ویتامین C در مقایسه با گروه دیازینون معنی‌دار نیست.



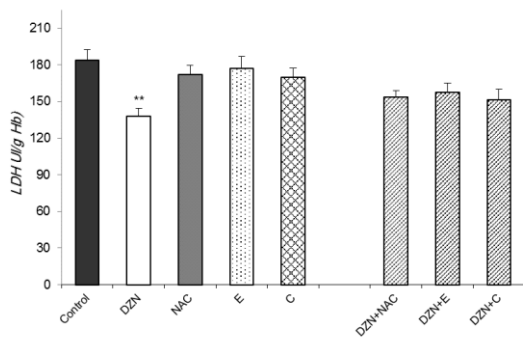
نمودار ۱. اثر دیازینون، N-استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) اریتروسیت‌های موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت.  $p < 0/05$  \* و  $p < 0/01$  \*\*  $p < 0/001$  \*\*\* نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.



نمودار ۲. اثر دیازینون، N-استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) اریتروسیت‌های موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت.  $p < 0/05$  \* و  $p < 0/01$  \*\* نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.



نمودار ۳. اثر دیازینون، N-استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم S-گلوتاتیون ترانسفراز (GST) اریتروسیت‌های موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت.  $p < 0/01$  \*\* نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.



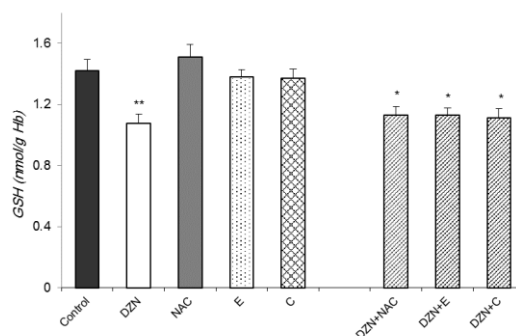
نمودار ۴. اثر دیازینون، N-استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) اریتروسیت‌های موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت.  $p < 0/01$  \*\* نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.

از ۲۴ ساعت.  $p < 0.05$ \* نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.

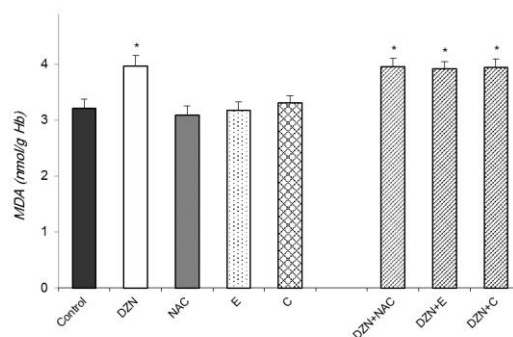
#### بحث

بعضی از ارگانوفسفره‌ها باعث تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند (۶-۱). رادیکال‌های آزاد قادرند با ماکرومولکول‌های مختلف در بدن نظیر پروتئین، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک اتصال و باعث تخریب ساختمان و عمل آن‌ها شوند. رادیکال‌های آزاد در بدن توسط آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر SOD، CAT و GST و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند GSH خنثی می‌شود. آنزیم SOD آنیون‌های سوپراکسید را به  $H_2O_2$  تبدیل می‌کند. آنزیم CAT باعث خنثی‌شدن  $H_2O_2$  و تبدیل آن به آب و اکسیژن مولکولی می‌شود (۷، ۸). GST از آنزیم‌های کمکی در سیستم آنتی‌اکسیدان است که باعث اتصال GSH به مواد سمی شده و آن‌ها را به ترکیبات محلول‌تر با سمیت کمتر تبدیل می‌کند (۷، ۲۰). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و GST و کاهش فعالیت آنزیم CAT و غلظت GSH در اریتروسیت‌های موش صحرائی می‌شود. افزایش فعالیت SOD ناشی از تجویز دیازینون بیانگر فعال‌شدن سیستم دفاعی آنزیمی سلول برای خنثی‌نمودن رادیکال‌های آزاد تولیدشده است. افزایش فعالیت SOD باعث کاهش رادیکال‌های سوپراکسید و افزایش میزان  $H_2O_2$  شده و کاهش فعالیت آنزیم CAT منجر به افزایش غلظت  $H_2O_2$  در این بافت شده که در نهایت ممکن است موجب آسیب بافتی شود. افزایش GST در اثر تزریق دیازینون نشان‌دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل این سم است که با افزایش مصرف GSH همراه است. همچنین عملکرد مستقیم GSH برای حذف رادیکال‌های آزاد سبب کاهش GSH در این بافت می‌شود که همراه با آسیب بافتی و القای استرس اکسیداتیو می‌باشد (۲۴، ۲۵). تجویز NAC و ویتامین‌های E و C تا حدی سبب کاهش فعالیت آنزیم SOD و افزایش فعالیت آنزیم CAT و غلظت گلوکوتایون و کاهش فعالیت آنزیم GST در مقایسه با گروه دیازینون می‌گردد.

نتایج حاصل از اثر دیازینون، NAC و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب باهم بر غلظت‌های GSH و MDA اریتروسیت‌ها در نمودارهای ۵-۶ نشان می‌دهد که دیازینون باعث کاهش معنی‌دار غلظت GSH ( $p < 0.01$ ) و افزایش معنی‌دار غلظت MDA ( $p < 0.05$ ) و همچنین تجویز دیازینون با NAC و یا ویتامین‌های C و E باعث کاهش غلظت GSH و افزایش غلظت MDA ( $p < 0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. کاهش غلظت MDA و افزایش غلظت GSH در گروه‌های دیازینون-NAC، دیازینون-ویتامین E و دیازینون-ویتامین C در مقایسه با گروه دیازینون معنی‌دار نیست.



نمودار ۵. اثر دیازینون، N-استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب باهم بر روی غلظت گلوکوتایون (GSH) اریتروسیت‌های موش صحرائی بعد از ۲۴ ساعت.  $p < 0.05$ \* و  $p < 0.01$ \* نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.



نمودار ۶. اثر دیازینون، N-استیل سیستئین (NAC) و ویتامین‌های C و E به‌تنهایی و در ترکیب باهم بر روی غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) اریتروسیت‌های موش صحرائی بعد

غشاء، مانع از آزاد شدن آنزیم LDH می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت LDH در بافت‌های طحال، مغز، قلب، کبد و کلیه بعد از تجویز دیازینون و پاراکسون کاهش می‌یابد (۲۴، ۲۵)؛ ولیکن مطالعات دیگر، افزایش فعالیت LDH را در کبد، پانکراس، مغز و قلب پس از تجویز دیازینون نشان می‌دهد (۳۶-۳۸)، همچنین مطالعات دیگر نشان می‌دهد که تجویز دیازینون و دی‌کلرووس (Dichlorvos) باعث افزایش فعالیت LDH و ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف موش صحرایی می‌گردد و تجویز ویتامین‌های C و E باعث بهبود فعالیت این آنزیم‌ها می‌شود (۳۹، ۴۰). یک مطالعه نشان داد که تجویز دیازینون برای ۱۴ روز باعث افزایش فعالیت LDH کبد شده و تجویز ترکیبی با ویتامین‌های A، C و E کاهش فعالیت آنزیم را به‌دنبال دارد (۴۱). چندین مطالعه نشان دادند که تجویز ارگانوفسفره‌های مختلف نظیر دیازینون، فن تیون، کلروپیریفوس و آندوسولفان باعث افزایش غلظت MDA شده و تجویز NAC و ویتامین‌های C و E باعث کاهش غلظت آن می‌شود (۴۳، ۹). Yurumez و همکاران نشان دادند که تجویز NAC یک ساعت قبل و بعد از مسمومیت با فن تیون باعث ذخیره گلوکوتایون و کاهش MDA خون در هر دو حالت حفاظتی و درمانی می‌شود (۴۴).

### نتیجه‌گیری

نتایج پیشنهاد می‌کند که دیازینون با تولید رادیکال‌های آزاد و تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش لیپید پراکسیداسیون و کاهش غلظت گلوکوتایون باعث القاء استرس اکسیداتیو در اریتروسیت‌ها می‌شود. NAC از طریق افزایش سنتز گلوکوتایون و ویتامین‌های C و E از طریق پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد، تا حدی باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون می‌شوند.

تغییر این پارامترها بعد از استفاده از NAC و ویتامین‌های E و C، احتمالاً می‌تواند ناشی از عمل NAC به‌عنوان پیش‌ساز گلوکوتایون و شرکت آن در سنتز این آنتی‌اکسیدان سلولی و همین‌طور عملکرد مستقیم ویتامین‌های C و E در حذف رادیکال‌های آزاد باشد (۹، ۲۶).

چند مطالعه نشان دادند که دیازینون سبب افزایش فعالیت SOD و CAT کبد و کلیه و قلب و تجویز هم‌زمان NAC و ویتامین‌های E و C باعث کاهش فعالیت این آنزیم‌ها می‌شود (۲۷-۳۱، ۱۶). Uner و همکاران نشان دادند تجویز فنتون به‌تنهایی و به‌همراه NAC روی فعالیت SOD و CAT تأثیری ندارد (۳۲). چندین مطالعه نشان دادند که تجویز ارگانوفسفره‌های مختلف باعث افزایش فعالیت GST و کاهش گلوکوتایون در بافت‌های مختلف شده و تجویز NAC و ویتامین‌های E و C باعث بهبود آن می‌شود (۳۲، ۵).

در این مطالعه دیازینون سبب کاهش فعالیت LDH و افزایش MDA اریتروسیت‌ها شده و تجویز NAC و ویتامین‌های C و E تا حدی از تغییرات این پارامترها جلوگیری می‌کند. MDA از مهم‌ترین بیومارکرهای پراکسیداسیون لیپیدها است و افزایش غلظت MDA نشان‌دهنده اختلال در مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی و آنزیمی است (۳۳). رادیکال‌های آزاد تولیدشده با هموگلوبین واکنش داده و باعث ناپایداری هم و ساختمان گلوبین می‌شوند که آهن آزادشده، نقش مهمی در سنتز متابولیت‌های فعال اکسیژن داشته و ترکیبات آهن و آهن آزاد می‌توانند فرایند پراکسیداسیون لیپیدها را باعث شوند (۳۴). افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء ناشی از افزایش تولید رادیکال‌های آزاد توسط دیازینون، باعث تراوش آنزیم‌های سیتوزولی مثل LDH می‌شود (۲۵). کاهش فعالیت آنزیم LDH احتمالاً ناشی از افزایش آسیب بافتی و تراوش آن به داخل سرم می‌باشد (۳۵). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به‌سبب احیاء رادیکال‌های آزاد تولیدشده توسط دیازینون و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای

## تشکر و قدردانی

علوم پزشکی بقیةالله (عج) انجام شده است که بدین‌وسیله از کلیه مسئولین مرکز مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود.

نویسندگان لازم است از فریده ایزدی، مریم صالحی، جواد رسولی و حسین مهدوی‌نسب جهت یاری در مراحل اولیه مطالعه تشکر نمایند. این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه

## منابع

- Baconi DL, Barca M, Manda G, Ciobanu AM, Balalu C. Investigation of the toxicity of some organophosphorus pesticides in a repeated dose study in rats. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2013; 54: 349-56.
- Bhatti GK, Sidhu IPS, Saini NK, Puar SK, Singh G, Bhatti JS. Ameliorative role of melatonin against cypermethrin induced hepatotoxicity and impaired antioxidant defense system in Wistar rats. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)*. 2014; 8: 39-48.
- Hajigholamali M, Jafari M, Hajihossaini R, Asgari A, Abbasnezhad M, Salehi M. Evaluation of oxidative stress biomarkers of rat liver exposed to acute doses of diazinon. *The Journal of Qazvin University of Medical Sciences*. 2012; 15: 20-29. (Full Text in Persian)
- Ahmadi S, Jafari M, Asgari A, Salehi M. Acute effect of diazinon on the antioxidant system of rat's heart tissue. *Kowsar Medical Journal*. 2011; 16: 87-93. (Full Text in Persian)
- Oruc E. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of *Cyprinus carpio* (L.). *Environmental Toxicology*. 2010; 26: 571-8.
- Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48: 3345-53.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition Reviews*. 2012; 70: 25765.
- Rafieian-Kopaei M, Baradaran A, Rafieian M. Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2013; 18: 629.
- Yilmaz N, Yilmaz M, Altuntas I. Diazinon-induced brain toxicity and protection by vitamins E plus C. *Toxicology and Industrial Health*. 2012; 28: 51-7.
- Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Current Opinion in Pharmacology*. 2007; 7: 355-9.
- Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacology and Therapeutics*. 2014; 141: 150-9.
- Abdel-Monem UM, Qar H, Attwa RA. Detoxification of dietary diazinon by clay, vitamin C and vitamin E in rabbits. *World Applied Sciences Journal*. 2012; 19: 144-52.
- Shadnia S, Abdollahi M, Sasanian G. Effects of N-acetyl-cysteine and tocopherol on diazinon toxicity. *Current Medicinal Chemistry*. 2003; 10: 2705-8.
- Shadnia S, Dasgar M, Taghikhani S, Mohammadirad A, Khorasani R, Abdollahi M. Protective effects of alpha-tocopherol and N-acetyl-cysteine on diazinon-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. *Toxicology mechanisms and methods*. 2007; 17: 109-15.
- 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. *Aquatic Toxicology*. 2003; 65:337-60.
- Izadi F, Jafari M, Bahadoran H, Asgari AR, Divsalar A, Salehi M. The role of N-acetyl cysteine on reduction of diazinon-induced oxidative stress in rat liver and kidney. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2014; 12: 895-906. (Full Text in Persian)
- Kurata M, Suzuki M, Agar NS. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comparative Biochemistry and*



- Physiology Part B: Comparative Biochemistry. 1993; 106B:477-87.
18. Winterbourn C, Hawkins R, Brian M, Carrell R. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1975; 85: 337.
  19. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 121-6.
  20. Habig WH, Jakoby WB. Glutathion S-transferases (rat and human). *Methods in Enzymology*. 1981; 77: 218-31.
  21. Kei S. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*. 1978; 90: 37-43.
  22. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 1969; 27: 502-22.
  23. Van Kampen EJ, Zijlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Advances in Clinical Chemistry*. 1965; 8: 141-87.
  24. Jafari M, Salehi M, Ahmadi S, Asgari A, Abasnezhad M, Hajjholamali M. The role of oxidative stress in diazinon-induced tissues toxicity in Wistar and Norway rats. *Toxicology mechanisms and methods*. 2012; 22: 638-47.
  25. Jafari M, Salehi M, Asgari A, Ahmadi S, Abbasnezhad M, Hajihoosani R, et al. Effects of paraoxon on serum biochemical parameters and oxidative stress induction in various tissues of Wistar and Norway rats. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2012; 34: 876-87.
  26. Mostafalou S, Abdollahi M, Eghbal MA, Saeedi Kouzehkonani N. Protective effect of NAC against malathion-induced oxidative stress in freshly isolated rat hepatocytes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2012; 2: 79-88.
  27. 3. Tahmasebi K, Jafari M, Ahmadi A. Evaluation of oxidative stress biomarkers in rat heart exposed to diazinon and vitamins E and C. *Quarterly of the Horizon of Medical Sciences* 2015; 21(1):13-9. (Full Text in Persian)
  28. Abdallah FB, Gargouri B, Bejaoui H, Lassoued S, Ammar-Keskes L. Dimethoate-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. *Environmental Toxicology*. 2011; 26(3): 287-91.
  29. Elzoghby RR, Hamuoda AF, Abdel-Fatah A, Farouk M. Protective role of vitamin C and green tea extract on malathion-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2014; 9(3): 177-88.
  30. Salehi M, Jafari M, Asgari A. Response of liver antioxidant defense system to vitamins E and C against diazinon toxicity in rat. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2015; 21 (6): 1081-9. (Full Text in Persian)
  31. Tahmasebi K, Jafari M, Izadi F. Study of the protective role of N-acetyl cysteine against acute diazinon-induced oxidative stress in rat brain and heart. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences* 2015; 15(2): 116-27. (Full Text in Persian)
  32. Uner N, Sevçiler Y, Durmaz H, Piner P, Cinkiloğlu E. N-Acetylcysteine provides dose-dependent protection against fenthion toxicity in the brain of *Cyprinus carpio* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*. 2009; 150: 33-8.
  33. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2006; 64: 178-89.
  34. Pradhan D, Weser M, Lumley – Sapinski K, Frazier D, Kemper S, Williamson P, et al. Peroxidation – induced perturbation of erythrocyte lipid organization. *Biochimica Biophysica Acta*. 1990; 1023: 398-404.
  35. Salehi M, Jafari M, Saleh-Moqadam M, Asgari A. The comparison of the effect of diazinon and paraoxon on biomarkers of oxidative stress in rat serum. *Zahedan University of Medical Sciences*. 2012; 14: 18-23.
  36. Abdou HM, ElMzoudy RH. Oxidative damage, hyperlipidemia and histological alterations of cardiac and skeletal muscles induced by different doses of diazinon in female rats. *Journal of Hazardous Materials*. 2010; 182: 273-8.
  37. El-Shenawy NS, El-Salmy F, Al-Eisa RA, El-Ahmary B. Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010; 96: 101-7.
  38. Gokalp O, Buyukvanl B, Cicek E, Ozer MK, Koyu A, Altuntas I, et al. The effects of diazinon on pancreatic damage and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2005; 81: 123-8.
  39. Oral B, Guney M, Demirin H, Ozguner M, Giray SG, Take G, et al. Endometrial damage and apoptosis in rats induced by dichlorvos and ameliorating effect of antioxidant

- Vitamins E and C. *Reproductive Toxicology*. 2006; 22: 783-90.
40. Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Kalender S, Durak D, Bayrakdar F, Kalender Y. The effects of organophosphate insecticide diazinon on malondialdehyde levels and myocardial cells in rat heart tissue and protective role of vitamin E. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2006; 86: 93-8.
41. Shokrzadeh M, Shobi S, Attar H, Shayegan S, Payam SS, Ghorbani F. Effect of vitamin A, E and C on liver enzyme activity in rats exposed to organophosphate pesticide diazinon. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2012; 15: 936-41.
42. Saxena R, Garg P. Vitamin E provides protection against in vitro oxidative stress due to pesticide (Chlorpyrifos and Endosulfan) in goat RBC. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2010, 1: 1-6.
43. Nisar NA, Sultana M, Waiz HA, Para PA, Baba NA, Zargar FA, et al. Experimental study on the effect of vitamin C administration on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rats exposed to chlorpyrifos and lead acetate. *Veterinary World*. 2013; 6: 461-6
44. Yurumez Y, Cemek M, Yavuz Y, Birdane YO, Buyukokuroglu ME. Beneficial effect of N-acetylcysteine against organophosphate toxicity in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2007; 30: 490-494.

## The effect of N-acetyl cysteine and vitamins E and C on diazinon-induced oxidative stress in rat erythrocytes

Mohammad Saleh Abedini<sup>1</sup>, Mahvash Jafari<sup>2\*</sup>, Seyed Mojtabah Mirzadeh<sup>1</sup>, Fatemeh Salem<sup>3</sup>

1. Students Research Center, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

\* Corresponding author e-mail: [m.jafari145@gmail.com](mailto:m.jafari145@gmail.com)

### Abstract

**Background and Objective:** Diazinon (DZN) as an organophosphate is used for household and agricultural pest control. The aim of this study was to investigate the effect of N-acetyl cysteine (NAC) and vitamins E and C against DZN-induced oxidative stress in rat erythrocytes.

**Materials and Methods:** In present experimental study, male Wistar rats were randomly divided into eight groups: control group (corn oil as DZN solvent), DZN group (100 mg/kg), NAC group (160 mg/kg), vitamin E group (150 mg/kg), vitamin C group (200 mg/kg) group, and NAC+DZN group, vitamin E+DZN group and vitamin C+DZN group, all of which were given intraperitoneally. 24 hours after injection, blood was collected and erythrocytes were obtained. Then, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and lactate dehydrogenase (LDH) activities, as well as glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels were determined by biochemical methods.

**Results:** DZN increased SOD ( $p<0.001$ ) and GST ( $p<0.01$ ) activities and MDA ( $p<0.05$ ) level and decreased CAT ( $p<0.01$ ) and LDH ( $p<0.01$ ) activities and GSH content in erythrocytes. Administration of antioxidants changed antioxidant enzymes activities, decreased MDA level and increased GSH level.

**Conclusion:** NAC by increasing the synthesis of GSH and vitamins E and C by scavenging free radicals reduces DZN-induced oxidative stress, but they do not protect completely.

**Key words:** Diazinon, N-acetyl cysteine, Vitamins E and C, Oxidative stress, Rat erythrocytes