

## بررسی نقش حفاظتی ویتامین های C و E در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در کلیه موش صحرایی

مریم صالحی<sup>۱</sup>، مهوش جعفری<sup>۲\*</sup>، علی رضا عسگری<sup>۳</sup>، کاووس طهماسبی<sup>۴</sup>

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

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

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

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

تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۱۶

### چکیده

**مقدمه:** دیازینون یکی از مهم ترین حشره کش ارگانوفسفره است که به طور وسیع برای کنترل حشرات در منازل و کشاورزی استفاده می شود. این عامل باعث القاء استرس اکسیداتیو در بافت های مختلف می شود. هدف از این مطالعه بررسی نقش حفاظتی ویتامین های E و C به عنوان آنتی اکسیدان در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در بافت کلیه موش صحرایی است.

**مواد و روش ها:** در مطالعه تجربی حاضر، موش های صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل (روغن ذرت به عنوان حلال دیازینون)، گروه دیازینون (۱۰۰ mg/kg)، گروه ویتامین E (۱۵۰ mg/kg)، گروه ویتامین C (۲۰۰ mg/kg) و گروه دیازینون- ویتامین E و گروه دیازینون- ویتامین C را به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از تزریق، موش ها توسط اتر بی هوش و کلیه ها به سرعت جدا شد. پس از هموژنه کردن بافت ها، فعالیت آنزیم های سوپراکسیددیسموتاز (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.

**یافته های پژوهش:** دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم های SOD، CAT و GST در کلیه ها می شود. هم چنین کاهش غلظت GSH و افزایش غلظت MDA مشاهده می گردد. تجویز ویتامین های E و C مانع تغییرات این پارامترها در کلیه ها می شود.

**بحث و نتیجه گیری:** دیازینون با افزایش لیپیدپراکسیداسیون غشاء و کاهش غلظت GSH باعث استرس اکسیداتیو در کلیه ها می شود. تجویز ویتامین های E و C به عنوان آنتی اکسیدان از طریق پاک سازی رادیکال های آزاد باعث کاهش سمیت دیازینون اما نه به طور کامل می شود.

**واژه های کلیدی:** دیازینون، ویتامین های E و C، استرس اکسیداتیو، کلیه، موش صحرایی

\*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه (...عج)، تهران، ایران

Email: jafari@bmsu.ac.ir



## مقدمه

سموم ارگانوفسفره به طور گسترده برای کنترل حشرات خانگی، صنعتی و کشاورزی استفاده می شوند. این ترکیبات با فسفریله نمودن اسید آمینه سرین موجود در جایگاه فعال آنزیم کولین استراز، اتصالی محکم و غیر قابل برگشت با آنزیم ایجاد نموده و آن را مهار و باعث افزایش سطح استیل کولین و اختلالات کولینرژیک می شود. استفاده بی رویه این حشره کش ها اثرات متنوعی بر سیستم بیولوژیکی موجودات زنده می گذارد (۱-۳). مسمومیت با این مواد یکی از مشکلات بهداشت جهانی است که 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 (۴). دیازینون (DZN) یکی از ترکیبات مهم ارگانوفسفره است که به عنوان حشره کش علیه آفات نباتی و حشرات منازل استفاده می گردد. در سال های اخیر از این سم به طور وسیع برای کنترل کرم ساقه خوار برنج نیز استفاده می کنند. دیازینون از راه پوست، دستگاه گوارش (خوردن و آشامیدن) و تنفسی جذب شده و به سرعت در زمان کوتاهی در کبد به دیازوکسون متابولیزه می شود که از مهارکننده قوی آنزیم استیل کولین استراز می باشد (۵-۷).

بسیاری از اثرات ترکیبات ارگانوفسفره در بدن، ارتباطی با مهار آنزیم استیل کولین استراز ندارد، بلکه با مکانیسم های دیگری موجب اختلال در بدن می گردند (۱-۵). یکی از این مکانیسم ها تولید رادیکال های آزاد توسط این ترکیبات و اختلال در سیستم های آنتی اکسیدان بدن است. در صورت عدم تعادل بین تولید و حذف رادیکال های آزاد منجر به استرس اکسیداتیو می شود که می تواند باعث آسیب های جدی سلولی شود. آنزیم های آنتی اکسیدان مهم مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکوتاتیون-S-ترانسفراز (GST) از آنزیم های کلیدی جهت سم زدایی رادیکال های آزاد به شمار می روند. گلوکوتاتیون (GSH) به عنوان آنتی اکسیدان غیرآنزیمی باعث افزایش حلالیت و دفع سموم از کلیه ها می شود (۸،۹). مطالعات مختلف نشان می دهد که بعضی ارگانوفسفره ها از طریق تولید رادیکال های آزاد باعث

تغییر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، کاهش غلظت گلوکوتاتیون و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در بافت ها شده که در نهایت منجر به استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی می شود (۱۱،۱۰،۴،۱).

آنتی اکسیدان ها قادرند سلول ها را در برابر اثرات مخرب عوامل مختلف مانند موادمشیمیایی محافظت کنند (۱۴-۱۲). ویتامین E (آلفا-توکوفرل) آنتی اکسیدان فعال و محلول در چربی موجود در غشای بیولوژیکی است که در پاکسازی رادیکال های آزاد و کاهش پراکسیداسیون لیپیدها در غشاء نقش مهمی دارد و به ثبات و پایداری غشاء کمک می کند (۲). ویتامین C (آسکوربیک اسید) آنتی اکسیدان مهم محلول در آب است و مهم ترین پاکسازکننده رادیکال های آزاد در مایعات خارج سلولی است. این ویتامین می تواند ویتامین E اکسید شده را مجدداً احیا نماید. بنا بر این فعالیت دو ویتامین E و C با هم در ارتباط بوده و به طور موثر با میانکنش مستقیم با رادیکال های آزاد در محیط آبی از لیپیدپراکسیداسیون جلوگیری می کنند (۱۵،۶،۲). چندین مطالعه نشان داده اند که ویتامین های E و C می توانند سمیت سلولی ارگانوفسفره ها را کاهش دهند و از تغییرات بعضی از پارامترهای بیوشیمیایی جلوگیری کنند (۱۸-۱۶،۳،۱-۱).

با توجه به تنوع ساختمان شیمیایی ارگانوفسفره ها و اثرات متفاوت آن ها بر روی بافت های مختلف و هم چنین اثرات مختلف آنتی اکسیدان ها بر این سمیت، مطالعات تکمیلی جهت درک مکانیسم عمل دقیق این ترکیبات را ضروری می نماید. اگر چه اثرات حفاظتی و درمانی ویتامین ها بر روی پارامترهای آسیب سلولی در خون و سلول بررسی شده است، اما مطالعات آن ها بر روی بیومارکرهای استرس اکسیداتیو اندک است. در ضمن مطالعات انجام شده در دوز سم، مسیر تزریق، نوع بافت، نوع حیوان و مدت زمان تماس با هم متفاوت هستند. در مطالعه حاضر اثر ویتامین های E و C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در کلیه های موش صحرایی با سنجش شاخص های استرس اکسیداتیو بررسی شده است.

## مواد و روش ها

کلیه مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت مرک و سیگما (آلمان) خریداری شد. ویتامین C و ویتامین E از شرکت سیگما و دیازینون از شرکت Supelco-USA خریداری شد. دیازینون با غلظت ۴۰۰ mg/ml و ویتامین E با غلظت ۶۰۰ mg/ml در روغن ذرت و ویتامین C با غلظت ۲۰۰ mg/ml در آب مقطر به صورت تازه تهیه شد.

این مطالعه بر روی موش های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. موش ها در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۲±۲ درجه سانتی گراد در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) قرار گرفتند. دسترسی حیوانات به آب و غذا به صورت پلیت (خوراک موش تهیه شده از شرکت خوراک دام پارس، ایران) آزاد بود. موازین اخلاقی کار با حیوان های آزمایشگاهی که مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) بود، هنگام کار با موش های آزمایشگاهی رعایت شد.

در این مطالعه تجربی، حیوانات به روش تصادفی به ۶ گروه (در هر گروه ۶ سر) تقسیم شدند: گروه کنترل (فقط روغن ذرت دریافت نمودند) گروه DZN که ۱۰۰ mg/kg دیازینون، گروه E که ۱۵۰ mg/kg ویتامین E، گروه C که ۲۰۰ mg/kg ویتامین C، گروه DZN+C که ۱۰۰ mg/kg دیازینون و ۲۰۰ mg/kg ویتامین C و گروه DZN+E که ۱۰۰ mg/kg دیازینون و ۱۵۰ mg/kg ویتامین E را به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از تزریق با بیهوش نمودن حیوانات به وسیله اتر بافت کلیه خارج گردید و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی و خارج شدن خون و جدا کردن قسمت های زاید، به نیتروژن مایع انتقال داده شد و سپس در دمای -۷۰ درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. در روز آزمایش بافت ها به دقت توزین و با نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سالین همورژنه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه

با دور ۱۶۰۰۰ g در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. از مایع رویی جهت سنجش شاخص های مورد نظر استفاده شد.

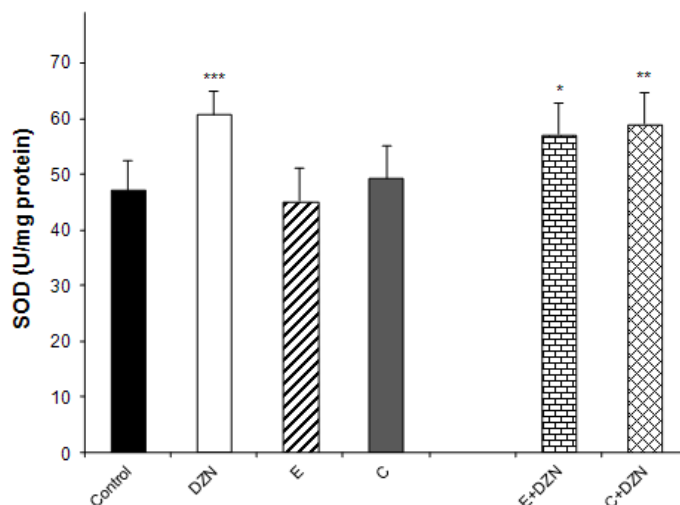
فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) به روش Winterbourn سنجیده شد (۱۹). برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Abei استفاده شد (۲۰). اندازه گیری فعالیت گلوکوتاتیون-S- ترانسفراز (GST) به روش Habig انجام شد (۲۱). اندازه گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) با استفاده از کیت پارس آزمو انجام شد. فعالیت ویژه آنزیم ها بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

برای تعیین میزان MDA به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها از روش Satho استفاده شد (۲۲). برای سنجش میزان GSH بافت از روش Tietz استفاده شد (۲۳). برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۲۴).

تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار InStat vol.3 به صورت آنالیز واریانس یک طرفه به همراه تست توکی انجام شد.  $P < 0.05$  مرز معنی دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد و نتایج به صورت  $Mean \pm SD$  بیان شد.

## یافته های پژوهش

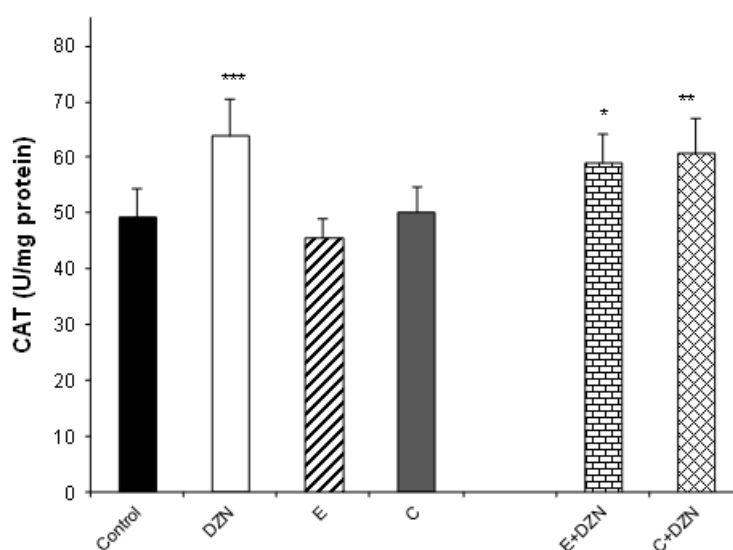
نتایج حاصل از اثر DZN و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم SOD در کلیه در نمودار شماره ۱ نشان می دهد که افزایش فعالیت آنزیم SOD در گروه DZN ( $P < 0.001$ )، گروه E+DZN ( $P < 0.05$ ) و گروه C+DZN ( $P < 0.01$ ) در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است. تغییرات فعالیت آنزیم SOD در کلیه در گروه E در مقایسه با گروه DZN ( $P < 0.001$ )، گروه E+DZN ( $P < 0.01$ ) و گروه C+DZN ( $P < 0.01$ ) در مقایسه با گروه DZN ( $P < 0.01$ ) و گروه C+DZN ( $P < 0.05$ ) معنی دار است.



نمودار شماره ۱. اثر دیازینون و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) در کلیه موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت.  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  نسبت به گروه کنترل معنی دار است.

آنزیم CAT در کلیه در گروه DZN در مقایسه با گروه E و C ( $P < 0.001$ )، گروه E+DZN ( $P < 0.001$ ) و گروه C+DZN ( $P < 0.001$ ) و گروه E در مقایسه با گروه E+DZN ( $P < 0.01$ ) و گروه C+DZN ( $P < 0.001$ ) و گروه C در مقایسه با گروه C+DZN ( $P < 0.05$ ) معنی دار است.

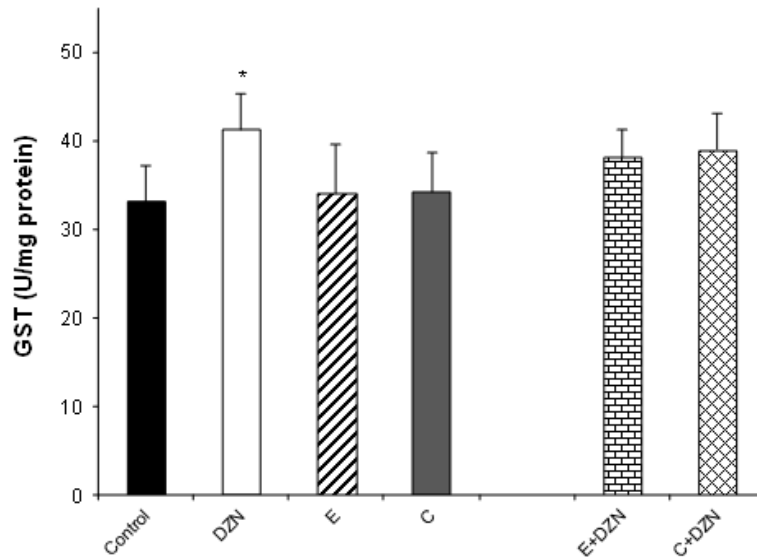
نتایج حاصل از اثر DZN و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم CAT در کلیه در نمودار شماره ۲ نشان می دهد که افزایش فعالیت آنزیم CAT در گروه DZN ( $P < 0.001$ )، گروه E+DZN ( $P < 0.05$ ) و گروه C+DZN ( $P < 0.01$ ) در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است. تغییرات فعالیت



نمودار شماره ۲. اثر دیازینون و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در کلیه موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت.  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  نسبت به گروه کنترل معنی دار است.

مقایسه با گروه کنترل معنی دار است. افزایش فعالیت آنزیم GST کلیه در سایر گروه ها در مقایسه با هم معنی دار نیست.

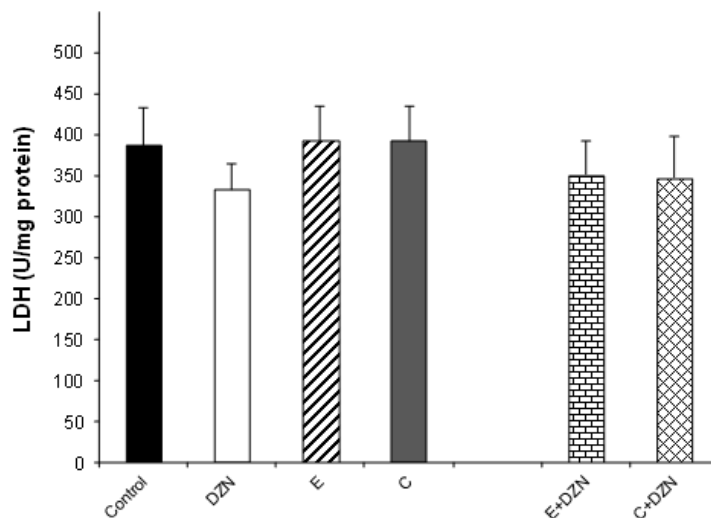
نتایج حاصل از اثر DZN و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم GST در کلیه در نمودار شماره ۳ نشان می دهد که افزایش فعالیت آنزیم GST در گروه DZN ( $P < 0.05$ ) در



نمودار شماره ۳. اثر دیازینون و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون-S-ترانسفراز (GST) در کلیه موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت.  $P < 0.05$ \* نسبت به گروه کنترل معنی دار است.

فعالیت آنزیم LDH در گروه های مختلف در مقایسه با گروه کنترل و با هم معنی دار نیست.

نتایج حاصل از اثر DZN و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم LDH در کلیه در نمودار شماره ۴ نشان می دهد که تغییرات



نمودار شماره ۴. اثر دیازینون و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در کلیه موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت

C در مقایسه با گروه DZN ( $P<0.05$ ) معنی دار است. افزایش غلظت MDA در گروه DZN ( $P<0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است. افزایش غلظت MDA کلیه در گروه E در مقایسه با گروه DZN ( $P<0.05$ ) معنی دار است.

نتایج حاصل از اثر DZN و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر غلظت های GSH و MDA در کلیه در جدول شماره ۱ نشان می دهد که کاهش غلظت GSH در گروه DZN ( $P<0.01$ ) و گروه C+DZN ( $P<0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل معنی دار است. کاهش غلظت GSH در کلیه در گروه

جدول شماره ۱. اثر دیازینون و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر روی غلظت های گلوپروتئین (GSH) و مالون دی آلدئید (MDA) در کلیه موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت.

MDA	GSH	پارامترها (nmol/mg protein)
۱۰/۲۱±۱/۲۶	۳۷/۷۶±۳/۲۵	کنترل
۱۲/۲۷±۱/۰۶*	۲۸/۱۳±۳/۴۵**	دیازینون
۱۰/۰۱±۰/۹۶	۳۴/۶۶±۴/۵۸	ویتامین E
۱۰/۴۱±۱/۰۳	۳۵/۶۵±۵/۱۵	ویتامین C
۱۰/۵۲±۱/۱۱	۳۱/۲۵±۴/۴۲	دیازینون-ویتامین E
۱۱/۳۲±۱/۱۳	۲۹/۰۱±۳/۹۱*	دیازینون-ویتامین C

\*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$  نسبت به گروه کنترل معنی دار است.

خنثی شدن  $H_2O_2$  تولید شده می شود. کاهش فعالیت آنزیم های SOD و CAT بعد از تجویز ویتامین های E و C، احتمالاً مربوط به توانایی آن ها در حذف مستقیم رادیکال های آزاد می باشد (۱۴،۱۶). مطالعات نشان داده اند که تجویز دیازینون، مالاتیون، پاراکسون و دیمتوات بعنوان ترکیبات ارگانوفسفره موجب افزایش فعالیت آنزیم های SOD و CAT در بافت های مختلف در موش صحرایی و ماهی می شود (۱۰،۱۱،۱۶،۲۵،۲۶). در حالی که مطالعات دیگر کاهش فعالیت آنزیم های SOD و CAT را در بافت های مختلف نشان می دهند (۱،۲۷،۲۸). این اختلاف نتایج در مطالعات مختلف احتمالاً ناشی از نوع، نژاد و گونه حیوان، نوع سم، نوع بافت، مسیر تجویز ماده سمی، دوز و زمان مواجهه می باشد. چندین مطالعه اثر ویتامین های E و C را بر کاهش سمیت ارگانوفسفره هایی مانند دیازینون، میتل پاراتیون، مالاتیون و کلروپیریفوس در بافت های مختلف موش ها نشان می دهند (۱۲-۱۸،۱۶).

## بحث و نتیجه گیری

کلیه نقش حیاتی در ثبات محیط داخلی موجودات زنده ایفا می کند و هدف سموم شیمیایی است که می توانند عملکرد آن را دچار اختلال کنند. کلیه ها مسئول برداشتن گلوپروتئین از جریان خون هستند و ۵۰-۶۰ درصد نوسازی گلوپروتئین پلاسما را انجام می دهند (۲۵). نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم های SOD و CAT کلیه موش صحرایی می شود. تجویز ویتامین های E و C تا حدی سبب کاهش فعالیت این آنزیم ها در مقایسه با گروه دیازینون می گردد. دیازینون با افزایش رادیکال های آزاد سبب فعال شدن سیستم های دفاعی آنتی اکسیدان شامل آنزیم های SOD و CAT می شود. آنزیم SOD باعث تبدیل رادیکال سوپراکسید به  $H_2O_2$  می شود و آنزیم CAT باعث خنثی شدن  $H_2O_2$  و تبدیل آن به  $H_2O$  و  $O_2$  می شود (۸). افزایش فعالیت SOD در این مطالعه باعث کاهش رادیکال سوپراکسید و افزایش  $H_2O_2$  در بافت کلیه می گردد و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز باعث

گلوپتاتینون-S-ترانسفراز (GST) یکی دیگر از آنزیم های آنتی اکسیدان است که با اتصال GSH به تعدادی از سوبستراهای الکتروفیل، ترکیباتی با سمیت کمتر ایجاد می کند (۸،۲۱). نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که دیازینون سبب افزایش فعالیت GST در کلیه موش صحرایی شده و تجویز ویتامین های E و C سبب کاهش فعالیت این آنزیم در مقایسه با گروه دیازینون می شود. افزایش فعالیت GST با افزایش مصرف GSH همراه است (۲۱). افزایش GST در اثر تزریق دیازینون نشان دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل این سم و دفع سریع تر آن است. مطالعات دیگر نیز نشان می دهند که به دنبال تجویز بعضی از ارگانوفسفره ها، فعالیت GST بدون تغییر (۲۹) یا افزایش (۳۰،۳۱) و یا کاهش فعالیت (۱۴) را نشان می دهد. معمولاً دوزهای کم سموم منجر به افزایش و دوزهای بالای آن باعث مهار فعالیت آنزیم ها می گردند. هم چنین بررسی های مختلف نشان می دهند که تجویز ویتامین های E و C از تغییرات فعالیت GST ناشی از ارگانوفسفره ها در بافت های مختلف جلوگیری می کند (۲۶،۳۲).

MDA از مهم ترین بیومارکرهای پراکسیداسیون لیپیدها است و افزایش غلظت MDA نشان دهنده اختلال در مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی و آنزیمی است (۳۳). در مطالعه حاضر افزایش سطح MDA در کلیه در اثر تجویز دیازینون مشاهده می شود که این افزایش ناشی از تولید رادیکال های آزاد توسط دیازینون و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می باشد. استفاده از ویتامین های E و C در کلیه سبب کاهش سطح MDA می شود. کاهش سطح MDA می تواند مربوط به قابلیت این ویتامین ها در حذف مستقیم رادیکال های آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدها به وسیله رادیکال های آزاد باشد. مطالعات نشان می دهند که تجویز خوراکی دیازینون موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در بافت های مختلف می شود (۱،۲۷،۳۴). چندین مطالعه نشان دادند که تجویز ارگانوفسفره های مختلف نظیر دیازینون، کلروپیرفوس و دیمتوات باعث افزایش غلظت MDA شده و تجویز ویتامین های E و

C باعث کاهش غلظت آن می شود (۱۴،۱۶-۱۲). لیپیدپراکسیداسیون غشاء باعث تراوش آنزیم های سیتوزولی مثل LDH می شود. LDH شاخص سمیت یک ماده شیمیایی و نشان دهنده لیز سلولی است (۳۱). در این مطالعه کاهش فعالیت LDH در کلیه بعد از تجویز دیازینون و ویتامین های C و E معنی دار نیست. کاهش فعالیت این آنزیم احتمالاً ناشی از افزایش آسیب بافتی و تراوش آن به داخل سرم می باشد (۲۸). استفاده از ویتامین های C و E به سبب احیاء رادیکال های آزاد ناشی از تجویز دیازینون و در نتیجه جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و مانع از آزاد شدن آنزیم LDH می شود. مطالعات نشان می دهد که فعالیت LDH کبد، پانکراس، مغز و قلب پس از تجویز دیازینون افزایش می یابد (۲۷،۳۵)، اما مطالعات دیگر کاهش فعالیت LDH را در بافت های طحال، مغز، قلب، کبد و کلیه بعد از تجویز دیازینون و پاراکسون نشان می دهد (۳۱-۳۰). هم چنین مطالعات دیگر نشان می دهد که تجویز کلروپیرفوس و دی کرووس باعث افزایش فعالیت LDH و ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت های مختلف موش صحرایی می گردد و تجویز ویتامین های C و E باعث بهبود فعالیت این آنزیم ها می گردد (۳،۳۶). یک مطالعه نشان داد که تجویز دیازینون برای ۱۴ روز باعث افزایش فعالیت LDH کبد شده و تجویز ترکیبی آن با ویتامین های A، C و E، کاهش فعالیت آنزیم را به دنبال دارد (۳۷).

گلوپتاتینون (GSH) تری پپتید حاوی تیول و یکی از مهم ترین آنتی اکسیدان های سلولی است که باعث پاکسازی مستقیم رادیکال های آزاد می شود. هم چنین می تواند به عنوان یک سوبسترا برای آنزیم های گلوپتاتینون پراکسیداز و GST عمل کند. تخلیه GSH در نهایت باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می شود که منجر به آسیب DNA، توقف کامل و کاهش مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو می گردد (۹،۳۱). در این مطالعه تجویز دیازینون سبب کاهش غلظت گلوپتاتینون در کلیه موش صحرایی می شود. کاهش غلظت گلوپتاتینون بافت کلیه تا حدی در اثر ویتامین های E و C جبران می شود. از آن جایی که فعالیت GST نیز در بافت کلیه در اثر دیازینون افزایش پیدا



های آنتی اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و کاهش غلظت گلوتاتیون باعث استرس اکسیداتیو در کلیه ها می شود. ویتامین های E و C به عنوان آنتی اکسیدان از طریق پاکسازی رادیکال های آزاد باعث کاهش سمیت دیازینون اما نه به طور کامل می شود.

### سپاسگزاری

نویسندگان لازم است از جواد رسولی و حسین مهدوی نسب جهت یاری در مراحل اولیه مطالعه تشکر نمایند. این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی مرکز تحقیقات شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) انجام شده است که بدین وسیله از کلیه مسئولین مرکز مربوطه تشکر و قدردانی می شود.

کرده است، کاهش گلوتاتیون این بافت می تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم GST و مصرف آن به عنوان سوبسترا توسط این آنزیم باشد و هم مربوط به عملکرد مستقیم آن جهت حذف رادیکال های آزاد باشد. با توجه به نقش ویتامین های E و C جهت حذف رادیکال های آزاد، مصرف گلوتاتیون را کاهش می دهد. مطالعات دیگر نشان می دهد که تجویز خوراکی دیازینون موجب کاهش گلوتاتیون کبد، کلیه و قلب می گردد (۱،۱۸،۳۸). چندین مطالعه نشان داند که تجویز ارگانوفسفره های مختلف باعث کاهش گلوتاتیون در بافت های مختلف و تجویز ویتامین های A، E و C باعث بهبود آن شود (۱۵،۱۸).

نتایج این مطالعه پیشنهاد می کند که دیازینون با افزایش تولید رادیکال های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم

### References

1. Shah MD, Iqbal M. Diazinon induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 3345–53.
2. Sulak O, Altuntas I, Karahan N, Yildirim B, Akturk O, Yilmaz HR, et al. Nephrotoxicity in rats induced by organophosphate insecticide methidathion and ameliorating effects of vitamins E and C. *Pest Biochem Physiol* 2005; 83: 21–8.
3. 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. *Pest Biochem Physiol* 2006; 86: 93–8.
4. Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, Shadnia S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in salvia and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp Biochem Physiol*. 2004; 137: 29-34. Bottom of Form
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. (Persian)
6. Abdel-Monem UM, Qar H, Attwa RA. Detoxification of dietary diazinon by clay, vitamin C and vitamin E in rabbits. *World Appl Sci J* 2012; 19:144-52.
7. Chovancova H, Bobonova I, Martiniakova M, Omelka R, Adamkovicova M, Toman R. The investigation of co-administration to cadmium, diazinon and selenium on growth characteristics of adult male rats. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 2013; 2: 1231-43.
8. Limon Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 2009; 674:137-47.
9. Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995; 251: 3–7.
10. Oruc E. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of *Cyprinus carpio*. *Environ Toxicol* 2010; 26:571-8.
11. Salehi M, Jafari M, Asgari A, Ahmadi S. [The role of paraoxon toxicity on oxidative stress induction in rat heart and spleen]. *ZJMS* 2013; 21: 13-23. (Persian)
12. Sutcu R, Altuntas I, Buyukvanli B, Akturka O, Ozturka O, Koylu H, et al. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Toxicol Ind Health* 2007; 23:13–7.
13. 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. *Toxicol Mech Methods* 2007; 17:109-15.
14. Uzun FG, Kalender Y. Protective effect of vitamins C and E on malathion induced nephrotoxicity in male rats. *Gu J Sci* 2011; 24: 193-201.
  15. Verma RS, Mehta A, Srivastava N. Comparative studies on chlorpyrifos and methyl parathion induced oxidative stress in different parts of rat brain: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pest Biochem Physiol* 2009; 95: 152-8.
  16. Yilmaz N, Yilmaz M, Altuntas I. Diazinon induced brain toxicity and protection by vitamins E plus C. *Toxicol Ind Health* 2012; 28: 51-7.
  17. Yassa VF, Girgis SM, Abumourad IMK. Potential protective effects of vitamin E on diazinon induced DNA damage and some haematological and biochemical alterations in rats. *J Mediterranea Ecol* 2011; 11:31-9.
  18. Elshenawy NS, Elsalmy F, Aleisa RA, Elahmary B. Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver. *Pest Biochem Physiol* 2010; 96: 101-7.
  19. Winterbourn C, Hawkins R, Brian M, Carrell R. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975; 85:337.
  20. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.
  21. Habig WH, Jakoby WB. Glutathion S transferases rat and human. *Methods Enzymol* 1981; 77: 218-31.
  22. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta*. 1978; 90: 37-43.
  23. 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.
  24. 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.
  25. Abbasnezhad M, Jafari M, Asgari A, Hajihoseini R, Hajigholamali M, Salehi M, et al. [The study regarding effect of paraoxon on oxidative stress index in kidney tissue of rats]. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2009; 19: 17-26 (Persian)
  26. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nut Biochem* 2001; 12: 500-4.
  27. Abdou HM, EIMzoudy RH. Oxidative damage, hyperlipidemia and histological alterations of cardiac and skeletal muscles induced by different doses of diazinon in female rats. *J Hazard Mater* 2010; 182: 273-8.
  28. Salehi M, Jafari M, Salehmoqadam M, Asgari A. The comparison of the effect of diazinon and paraoxon on biomarkers of oxidative stress in rat serum. *Zahedan J Res Med Sci* 2012; 14: 18-23.
  29. Astiz M, de Alaniz MJT, Marra CA. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with Agrochemicals. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009; 28: 465-73.
  30. Jafari M, Salehi M, Ahmadi S, Asgari A, Abasnezhad M, Hajigholamali M. The role of oxidative stress in diazinon-induced tissues toxicity in Wistar and Norway rats. *Toxicol Mech Methods* 2012; 22: 638-47.
  31. Jafari M, Salehi M, Asgari A, Ahmadi S, Abbasnezhad M, Hajihosani R, et al. Effects of paraoxon on serum biochemical parameters and oxidative stress induction in various tissues of Wistar and Norway rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012; 34: 876-87.
  32. Durak D, Uzun FG, Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Kalender Y. Malathion-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. *Environ Toxicol* 2009; 24: 235-42.
  33. 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: 178-89.
  34. Leong CT, Dsouza UJ, Iqbal M, Mustapha ZA. Lipid peroxidation and decline in antioxidant status as one of the toxicity measures of diazinon in the testis. *Redox Rep* 2013; 18: 155-64.

35. 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. *Pest Biochem Physiol* 2005; 81:123–8.

36. 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. *Rep Toxicol* 2006; 22:783–90.

37. 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. *Pak J Biol Sci* 2012; 15: 936-41.

38. Ahmadi S, Jafari M, Asgari A, Salehi M. Acute effect of diazinon on lipid peroxidation level and activities of antioxidant enzymes in rat spleen. *J Kermanshah Uni Med Sci* 2012; 16:1-9.



## Study of Protective Role of Vitamins E and C in Reduction of Diazinon-Oxidative Stress in Rat Kidney

Salehi M<sup>1</sup>, Jafari M<sup>2\*</sup>, Asgari A<sup>3</sup>, Tahmasebi K<sup>4</sup>

(Received: February 5, 2014

Accepted: February 5, 2014)

### Abstract

**Introduction:** Diazinon is one of the most important organophosphate insecticide that widely used for insect control in homes and agriculture. This factor causes induces oxidative stress in different tissues. The aim of this study was to study the protective role of vitamins E and C as antioxidant in reduction of DZN-induced oxidative stress in rat kidney.

**Materials & methods:** In present experimental study, male Wistar rats were randomly divided into six groups including: control group received (corn oil as a DZN solvent), DZN group (100 mg/kg), vitamin E group (150 mg/kg), vitamin C group (200 mg/kg), vitamin E+DZN group and vitamin C+DZN group, intraperitoneally. 24 hours after injection, rats were anesthetized by ether and kidneys were removed quickly. After tissues hemogenation, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and lactate

dehydrogenase (LDH) enzymes activities and glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) concentrations were determined by biochemical methods.

**Findings:** DZN increased SOD, CAT and GST activities in kidneys. Also, reduced GSH concentration and increased concentrations of MDA were observed. Administration of vitamins E and C prevent changes in these parameters in the kidneys.

**Discussion & Conclusion:** DZN by increasing lipid peroxidation membrane and reduced GSH concentration cause oxidative stress in kidneys. Administration of vitamins E and C as an antioxidant decrease DZN toxicity via purging the free radicals but not completely.

**Keyword:** Diazinon, Vitamins E and C, Oxidative stress, Kidney, Rat

1. Neuroscience research center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2. Chemical injuries research center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Exercise physiology research center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4. Dept of Biochemistry, faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran Iran.

\*corresponding author Email: jafari@bmsu.ac.ir