

## پاسخ سیستم دفاعی آنتی اکسیدان کبد به اثرات ویتامین های C و E در کاهش سمیت دیازینون در موش صحرایی

مریم صالحی<sup>۱</sup>، دکتر مهوش جعفری<sup>۲</sup>، دکتر علیرضا عسگری<sup>۳</sup>

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

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

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

نشانی نویسنده مسئول: تهران، اقدسیه، بلوار ارتش، سه راه اراج، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، دکتر مهوش جعفری

E-mail: m.jafari145@gmail.com

وصول: ۹۳/۵/۱۵، اصلاح: ۹۳/۶/۳۰، پذیرش: ۹۳/۷/۳۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** دیازینون یکی از مهم ترین ارگانوفسفره هایی است که به طور وسیع در کشاورزی استفاده می شود. ویتامین های E و C به عنوان آنتی اکسیدان های بالقوه، سلول ها را از استرس اکسیداتیو محافظت می کنند. هدف از این مطالعه بررسی نقش ویتامین های E و C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در کبد 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 بیهوش و بافت کبد به سرعت جدا شد. پس از هموژنه کردن بافت ها، فعالیت آنزیم های سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) و غلظت های گلوتاتیون (GSH) و مالون دی آلدنید (MDA) از طریق روش های بیوشیمیایی تعیین شدند. معنی دار بودن نتایج توسط آنالیز واریانس (ANOVA) به همراه تست توکی تعیین شد.

**یافته ها:** دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم های SOD، CAT، LDH و GST، افزایش غلظت MDA و کاهش غلظت GSH در کبد می شود. تجویز ویتامین های E و C مانع تغییرات این پارامترها می شود.

**نتیجه گیری:** ویتامین های E و C به عنوان آنتی اکسیدان از طریق پاکسازی رادیکال های آزاد در کبد باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون به طور ناقص می شود.

**کلید واژه ها:** دیازینون، ویتامین های E و C، استرس اکسیداتیو، کبد، موش صحرایی.

### مقدمه

همچنین این ترکیبات نظیر تابون، سارین و مالاتیون در چندین حمله شیمیایی توسط نیروهای عراقی طی جنگ ایران - عراق به کار رفته است. دیازینون از گروه حشره

ترکیبات ارگانوفسفره به طور گسترده در کنترل حشرات و آلودگی های زیست محیطی استفاده می شوند.

کش های ارگانوفسفره است؛ که به طور گسترده برای کنترل حشرات خانگی، صنعتی و کشاورزی استفاده می شود. این حشره کش از طریق پوست، سیستم گوارش و مسیر هوایی (در صورت تبخیر) جذب شده و در کبد توسط آنزیم های میکروزومی اکسید شده و به ترکیبات قویتر نظیر دیازوکسون تبدیل می شود. به دلیل دسترسی آسان و درجه سمی بالای ارگانوفسفره ها، میزان بروز مسمومیت ها بالا بوده و در ایران این ترکیب ها یکی از علل مرگ و میر ناشی از مسمومیت ها هستند (۱-۳).

ارگانوفسفره ها علاوه بر مهار آنزیم استیل کولین استراز و تجمع استیل کولین در سیناپس های کولینرژیک و وقوع تشنج، قادر است باعث تولید رادیکال های آزاد شوند (۲و۴). برای خنثی کردن رادیکال های آزاد در بدن سیستم دفاعی آنتی اکسیدان شامل سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، S - گلوکوتایون ترانسفراز (GST) و گلوکوتایون (GSH) فعال می شود (۵). Oruc نشان داد که دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم های SOD، CAT و GST و افزایش مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان مارکر لیپیدپراکسیداسیون در بافت کبد ماهی می شود (۶). چندین مطالعه دیگر نشان می دهد که دیازینون باعث تغییر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، کاهش غلظت گلوکوتایون و افزایش لیپیدپراکسیداسیون در بافت های مختلف شده که در نهایت منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی می شود (۲و۷-۸).

درمان استاندارد مسمومیت با ارگانوفسفره ها تجویز آتروپین و انواع اکسایم ها است که آنزیم استیل کولین استراز را از مهار شدگی رهایی می دهد (۹). با توجه به تأثیر ارگانوفسفره ها بر روی سیستم آنتی اکسیدان احتمالاً استفاده از آنتی اکسیدان ها در جهت درمان این افراد می تواند کمک کند (۱۰-۱۲). ویتامین E (آلفا-توکوفرل) مهم ترین آنتی اکسیدان لیپوفیلی است که به طور طبیعی در غشای سلول موجود است و به پایداری غشا کمک می کند (۱۲).  $\alpha$  - توکوفرول بیشترین فرم

فعال ویتامین E در بدن اولین سطح دفاعی علیه استرس اکسیداتیو است. ویتامین C (اسید آسکوربیک) آنتی اکسیدان محلول در آب با وزن مولکولی کم از ترکیبات سلولی علیه رادیکال های اکسیژن و نیتروژن است. این ویتامین می تواند ویتامین E اکسید شده را دوباره احیا نماید و به همراه یکدیگر از آسیب های ناشی از رادیکال های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو جلوگیری نمایند (۱۰و۱۲). چندین مطالعه نشان دادند که ویتامین های E و C می توانند سمیت سلولی ارگانوفسفره ها را کاهش دهند و از تغییرات بعضی از پارامترهای بیوشیمیایی جلوگیری کنند (۸و۱۳). مطالعه El-Shenawy و همکاران روی اثر حفاظتی ویتامین E روی سمیت دیازینون در کبد موش سوری بعد از ۴روز نشان دادند که ویتامین E از القای استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون جلوگیری می کند (۱۴)

درک مکانیسم عمل دقیق این ترکیبات با توجه به تنوع ساختمان شیمیایی ارگانوفسفره ها و اثرات متفاوت آنها بر روی بافت های مختلف و همچنین اثرات مختلف آنتی اکسیدان ها بر این سمیت، مطالعات تکمیلی را ضروری می نماید. اگرچه اثر حفاظتی و درمانی ویتامین ها بر پارامترهای آسیب سلولی در خون و سلول ها بررسی شده است، ولیکن مطالعات اندکی بر روی بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در بافت های مختلف انجام شده است. در ضمن مطالعات انجام شده در دوز سم، روش تزریق، نوع بافت، نوع حیوان و مدت زمان تیمار با هم متفاوت هستند. در مطالعه حاضر نقش ویتامین های E و C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در کبد موش صحرائی با سنجش شاخص های استرس اکسیداتیو بررسی شد.

### مواد و روش ها

مواد شیمیایی: کلیه مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بالا از شرکت مرک و سیگما (آلمان)

فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Abei استفاده شد (۱۶). اندازه گیری فعالیت آنزیم GST به روش Habig انجام شد (۱۷). اندازه گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) با استفاده از کیت پارس آزمون انجام شد. فعالیت ویژه آنزیم ها بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

تعیین غلظت های GSH، مالون دی آلدئید (MDA) و پروتئین: برای تعیین میزان MDA به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها از روش Satho استفاده شد (۱۸). برای سنجش میزان GSH بافت از روش Tietz استفاده شد (۱۹). برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۲۰).

تجزیه و تحلیل داده ها: تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار InStat ورژن 3.3 به صورت آنالیز واریانس یک طرفه به همراه تست Tukey انجام شد.  $p < 0/05$  مرز معنی دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد و نتایج به صورت  $Mean \pm SD$  بیان شد.

## یافته ها

نتایج حاصل از اثر دیازینون و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کبد در جدول ۱ نشان می دهد که دیازینون باعث افزایش معنی دار فعالیت آنزیم های SOD ( $p < 0/001$ )، CAT ( $p < 0/001$ ) و GST ( $p < 0/01$ ) و کاهش فعالیت آنزیم LDH ( $p < 0/01$ ) در مقایسه با گروه کنترل می شود. همچنین ترکیب تجویز دیازینون با ویتامین های E و C باعث افزایش معنی دار فعالیت های SOD و CAT ( $p < 0/01$ ) و کاهش معنی دار فعالیت آنزیم LDH کبد ( $p < 0/05$ ) در مقایسه با گروه کنترل می گردد. کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در گروه های دیازینون- ویتامین E و دیازینون- ویتامین C در مقایسه با گروه دیازینون معنی دار نیست.

نتایج حاصل از اثر دیازینون و ویتامین های C و

خریداری شدند. 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.

حیوانات: این مطالعه بر روی موش های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. موش ها در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تحت شرایط طبیعی نور، تاریکی، غذا و آب قرار گرفتند. موازین اخلاقی کار با حیوان های آزمایشگاهی که مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) با کد ۶۵۴۵ بود، هنگام کار با موش های آزمایشگاهی رعایت شد.

تیمار حیوانات: در این مطالعه تجربی، حیوانات به روش تصادفی به ۶ گروه (در هر گروه ۶ سر) تقسیم شدند: گروه کنترل که روغن ذرت را به عنوان حلال دیازینون، 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 کبد خارج گردید و بعد از شست و شو با سرم فیزیولوژی و خارج شدن خون و جدا کردن قسمت های زاید، به نیتروژن مایع انتقال داده شد و سپس در دمای  $70^{\circ}\text{C}$ - تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. در روز آزمایش بافت ها به دقت توزین و با نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سالین همورثه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ g در  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفوژ گردید. از مایع رویی جهت سنجش شاخص های مورد نظر استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم ها: فعالیت آنزیم SOD به روش Winterbourn سنجیده شد (۱۵). برای اندازه گیری

جدول ۱: اثر دیازینون و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کبد موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت

پارامترها (U/mg protein)	SOD	CAT	GST	LDH
کنترل	۶۶/۱۴±۶/۵۸	۳۷/۷۷±۴/۰۳	۲۲۴/۲۵±۲۵/۶۶	۶۱۵/۶۶±۴۹/۶۶
دیازینون	۸۶/۸۷±۷/۹۸***	۵۰/۹۹±۵/۳۲***	۲۸۹/۳۶±۲۳/۵۶**	۴۹۹/۳۳±۴۹/۶۴**
ویتامین E	۶۸/۸۱±۷/۶۶	۳۴/۶۶±۴/۵۶	۲۳۵/۶۶±۲۹/۶۸	۶۰۱/۳۲±۴۵/۷۸
ویتامین C	۷۰/۳۲±۸/۱۴	۳۹/۸۹±۵/۶۶	۲۲۹/۳۶±۲۶/۴۸	۵۹۸/۶۵±۵۰/۳۶
دیازینون- ویتامین E	۸۱/۴۴±۶/۴۸*	۴۸/۸۵±۴/۱۷**	۲۶۵/۳۲±۲۰/۱۴	۵۲۳/۶۵±۵۵/۶۶*
دیازینون- ویتامین C	۸۲/۳۶±۷/۶۶**	۴۹/۰۳±۴/۰۱**	۲۶۱/۱۲±۲۴/۶۲	۵۱۱/۳۶±۵۸/۶۹*

p<۰/۰۵، \*p<۰/۰۱ و \*\*p<۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل معنی دار است.

جدول ۲: اثر دیازینون و ویتامین های C و E به تنهایی و در ترکیب با هم بر روی غلظت های GSH و MDA کبد موش صحرایی بعد از ۲۴ ساعت

پارامترها (nmol/mg protein)	GSH	MDA
کنترل	۹۴/۷۵±۱۰/۳۲	۸/۳۲±۰/۵۴
دیازینون	۶۹/۷۶±۸/۰۶***	۸/۰۲±۰/۷۶**
ویتامین E	۹۴/۲۵±۸/۹۵	۶/۶۳±۰/۶۹
ویتامین C	۹۹/۲۶±۹/۲۶	۶/۷۵±۰/۷۱
دیازینون- ویتامین E	۷۸/۱۹±۸/۹۷*	۷/۷۷±۰/۸۵*
دیازینون- ویتامین C	۷۸/۳۳±۸/۶۶*	۷/۸۲±۰/۸۱*

p<۰/۰۵، \*p<۰/۰۱ و \*\*p<۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل معنی دار است.

SOD و CAT در کبد موش صحرایی می شود. تجویز ویتامین های E و C تا حدی سبب کاهش فعالیت این آنزیم ها در کبد در مقایسه با گروه دیازینون می گردد. این آنزیم ها اولین خط دفاعی سلول در برابر رادیکال های آزاد اکسیژن هستند. آنیون های سوپراکسید توسط آنزیم SOD به H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و سپس H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> توسط آنزیم CAT به H<sub>2</sub>O و O<sub>2</sub> تبدیل می شوند (۵). افزایش فعالیت SOD سبب افزایش میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و کاهش رادیکال های سوپراکسید و افزایش فعالیت CAT باعث کاهش میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و جلوگیری از آسیب بافتی می شود. افزایش فعالیت این آنزیم ها مربوط به مکانیسم های دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو است. افزایش فعالیت SOD و CAT احتمالاً ناشی از افزایش تولید ROS توسط دیازینون می باشد و کاهش فعالیت های SOD و CAT بعد از تجویز ویتامین های E و C، احتمالاً مربوط به توانایی آنها در حذف مستقیم ROS ها می باشد (۸ و ۱۰). نتایج این تحقیق موافق نتایج مطالعاتی است که نشان می دهند که تجویز خوراکی دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم

E به تنهایی و در ترکیب با هم بر غلظت های GSH و MDA کبد در جدول ۲ نشان می دهد که دیازینون باعث کاهش معنی دار غلظت GSH (p<۰/۰۰۱) و افزایش معنی دار غلظت MDA (p<۰/۰۱) و همچنین تجویز ترکیب دیازینون با ویتامین های E و C باعث کاهش غلظت GSH و افزایش غلظت MDA (p<۰/۰۱) در مقایسه با گروه کنترل می شود (p<۰/۰۵). کاهش غلظت MDA و افزایش غلظت GSH در گروه های دیازینون- ویتامین E و دیازینون- ویتامین C در مقایسه با گروه دیازینون معنی دار نیست.

## بحث

کبد از جمله فعال ترین اندام ها از نظر متابولیسم و اولین اندام مهم برای سم زدایی مواد شیمیایی و سموم است. این اندام دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی و آنزیم های مربوط می باشد. بنابراین، اندام اصلی جهت سم زدایی گزنوبیوتیک هاست (۶). نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم های

فعالیت (۱۰) را نشان می دهد. معمولاً دوزهای کم سموم منجر به افزایش و دوزهای بالای آن باعث مهار فعالیت آنزیم ها می گردند. همچنین چندین بررسی 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 و ۱۱).

LDH یک آنزیم سیتوپلاسمی می باشد که جهت بررسی آسیب سلولی و به عنوان شاخص جهت بررسی سمیت یک ماده شیمیایی و لیز سلولی مورد استفاده قرار می گیرد (۲۷). در این مطالعه دیازینون سبب کاهش فعالیت LDH کبد شده که تجویز ویتامین های C و E تا حدی فعالیت این آنزیم را در مقایسه با گروه دیازینون افزایش می دهد. کاهش فعالیت این آنزیم احتمالاً ناشی از افزایش آسیب بافتی و تراوش آن به داخل سرم می باشد (۲۲). استفاده از ویتامین های C و E به سبب احیاء رادیکال های آزاد ناشی از تجویز دیازینون و در نتیجه جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و مانع از آزاد شدن آنزیم LDH می شود. مطالعات نشان می دهد که فعالیت LDH در بافت های طحال، مغز، قلب، کبد و کلیه بعد از تجویز دیازینون و پاراکسون کاهش می یابد (۲۵ و ۲۷). ولیکن مطالعات دیگر، افزایش فعالیت LDH را در کبد، پانکراس، مغز و قلب پس از تجویز دیازینون نشان می دهد (۱۴ و ۲۱ و ۲۸)، همچنین مطالعات دیگر نشان می دهد که تجویز کلروپیرفوس (Chlorpyrifos) و دی کلرووس (Dichlorvos) 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 شود (۲۹-۳۰). یک مطالعه نشان داد که تجویز دیازینون برای ۱۴ روز باعث افزایش فعالیت LDH کبد شده و تجویز ترکیبی با ویتامین های A، C و E کاهش فعالیت آنزیم را به دنبال دارد (۳۱).

گلوکوتاتیون از مهم ترین آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی است که قادر است به طور مستقیم ROS ها را

های SOD و CAT در بافت کبد ماهی و مغز و قلب موش صحرایی می شود (۸-۶)، مطالعات دیگر کاهش فعالیت آنزیم های SOD و CAT را بعد از تجویز خوراکی دیازینون در بافت های کلیه، قلب و ماهیچه نشان می دهند (۲۱ و ۲۲). این اختلاف نتایج در مطالعات مختلف ناشی از نوع، نژاد و گونه حیوان، نوع سم و بافت، مسیر تجویز ماده سمی و دوز و زمان تیمار می باشد. El-Shenawy و همکاران نشان دادند که دیازینون با کاهش فعالیت آنزیم های SOD و CAT باعث القای استرس اکسیداتیو در کبد موش سوری بعد از ۱۴ روز می شود و درمان همزمان با ویتامین E مانع و یا باعث کاهش استرس اکسیداتیو می شود (۱۴). همچنین Yilmaz و همکاران نشان دادند که دیازینون باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD بدون تغییر فعالیت CAT در مغز موش صحرایی می شود. ترکیب ویتامین های E و C مانع استرس اکسیداتیو در مغز می شود (۸). مطالعه Sutcu و همکاران نشان دادند که مصرف خوراکی دیازینون باعث افزایش فعالیت SOD و CAT و ایجاد استرس اکسیداتیو در اریتروسیت های موش صحرایی شده و تجویز ویتامین C و E باعث بهبود فعالیت این آنزیم ها می گردد (۲۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد دیازینون سبب افزایش فعالیت GST در کبد موش صحرایی شده و تجویز ویتامین های E و C سبب کاهش فعالیت این آنزیم در مقایسه با گروه دیازینون می شود. GST یکی از آنزیم های آنتی اکسیدان کمکی است که گلوکوتاتیون را به مواد سمی متصل کرده و آنها را به موادی با سمیت کم تر تبدیل می کند. افزایش فعالیت GST با افزایش مصرف GSH همراه است (۵ و ۱۷). افزایش GST در اثر تزریق دیازینون نشان دهنده افزایش دفاع بدن در مقابل این سم و دفع سریع تر آن است. مطالعات دیگر نشان می دهند که به دنبال تجویز بعضی از ارگانوفسفره ها، فعالیت GST بدون تغییر (۲۴) یا افزایش (۶ و ۲۵) و یا کاهش

کبد تا حدودی 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 توسط ROS باشد. مطالعات نشان می دهند که تجویز خوراکی دیازینون موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در بافت های مختلف می شود (۲۱ و ۳۳). چندین مطالعه نشان دادند که تجویز ارگانوفسفره های مختلف نظیر دیازینون، کلروپیریفوس و دیمتوات (Dimethoate) باعث افزایش غلظت MDA شده و تجویز ویتامین های E و C باعث کاهش غلظت آن می شود (۸ و ۱۲).

### نتیجه گیری

دیازینون با تولید رادیکال های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و کاهش غلظت گلوکوتاتیون باعث القای استرس اکسیداتیو در بافت کبد می شود. ویتامین های E و C به عنوان آنتی اکسیدان از طریق پاکسازی رادیکال های آزاد تا حدی باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون می شود.

### تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) انجام شده است که بدین وسیله از کلیه مسؤولین مرکز مربوط تشکر و قدردانی می شود.

پاکسازی کند. همچنین GSH به عنوان کوفاکتور برای آنزیم های گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) و GST عمل می کند (۲۷). در این مطالعه تجویز دیازینون سبب کاهش غلظت گلوکوتاتیون در کبد موش صحرایی می شود. کاهش غلظت گلوکوتاتیون بافت کبد تا حد زیادی در اثر ویتامین های E و C جبران می شود. از آن جایی که فعالیت GST نیز در بافت کبد در اثر دیازینون افزایش پیدا کرده است، کاهش گلوکوتاتیون این بافت هم می تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم GST و مصرف آن به عنوان سوبسترا توسط این آنزیم 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، کاهش فعالیت GST و مصرف گلوکوتاتیون به دنبال دارد. مطالعات دیگر نشان می دهد که تجویز خوراکی دیازینون موجب کاهش گلوکوتاتیون کبد و کلیه می گردد (۴ و ۱۴). چندین مطالعه نشان دادند که تجویز ارگانوفسفره های مختلف باعث کاهش گلوکوتاتیون در بافت های مختلف و تجویز ویتامین های A، E و C باعث بهبود آن شود (۴ و ۳۲).

میان کنش رادیکال های آزاد با اسیدهای چرب غیراشباع موجب پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می شود. MDA شاخص اصلی اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع است و به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو در پاتورژن بسیاری از بیماری ها استفاده می شود (۲۵). در مطالعه حاضر افزایش سطح MDA در کبد در اثر تجویز دیازینون مشاهده می شود که این افزایش ناشی از تولید ROS ها توسط دیازینون و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می باشد. استفاده از ویتامین های E و C در

### References

1. Abdel-Monem UM, Qar H, Attwa RA. Detoxification of dietary diazinon by clay, vitamin C and vitamin E in rabbits. *World ApplSci J.* 2012; 19 (1): 144-52.
2. Ahmadi S, Jafari M, Asgari A, Salehi M. Acute effect of diazinon on the antioxidant system of rat's heart tissue. *Trauma Monthly.* 2011; 16: 87-93. [Persian]
3. 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*

- MicrobiolBiotechnol Food Sci. 2013; 2 (Special issue 1): 1231-43.
4. Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48(12): 3345-53.
  5. 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(1-2):137-47.
  6. Oruc E. Effects of diazinon on antioxidant defense system and lipid peroxidation in the liver of *Cyprinus carpio* (L.). *Environ Toxicol*. 2011; 26(6): 571-8.
  7. Salehi M, Jafari M, Saleh Moghaddam M, Salimian M, Asghari A, Abbasnejad M, Haj Gholamali. Study of Diazinon Effect on Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Rat's Brain. *RJMS*. 2010; 17 (70) :15-23. [Persian]
  8. Yilmaz N, Yilmaz M, Altuntas I. Diazinon-induced brain toxicity and protection by vitamins E plus C. *Toxicol Ind Health*. 2012; 28(1): 51-7.
  9. Togun N, Kose A, Gunay N, Tarakcioglu M, Demiryurek AT. Formulation of effects of atropine, pralidoxime and magnesium sulfate on cardiac tissue levels of nitric oxide, malondialdehyde and glutathione in organophosphate poisoning using artificial neural network. *Comput Biol Med*. 2010; 40(1): 29-36.
  10. Uzun FG, Kalender Y. Protective effect of vitamins C and E on malathion-induced nephrotoxicity in male rats. *GU J Sci*. 2011; 24(2): 193-201.
  11. 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(3): 235-42.
  12. Sulak O, Altuntas I, Karahan N, Yildirim B, Akturk O, Yilmaz HR, Delibas N. Nephrotoxicity in rats induced by organophosphate insecticide methidathion and ameliorating effects of vitamins E and C. *Pest Biochem Physiol*. 2005; 83(1): 21-8.
  13. 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. *Journal of Mediterranean Ecology*. 2011; 11: 31-9.
  14. 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. *Pest Biochem Physiol*. 2010; 96(2): 101-7.
  15. Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med*. 1975; 85(2): 337-41.
  16. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 121-6.
  17. Habig WH, Jakoby WB. Glutathion S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol*. 1981; 77: 218-31.
  18. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta*. 1978; 90(91): 37-43.
  19. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*. 1969; 27(3): 502-22.
  20. 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.
  21. Abdou HM, ElMzoudy 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(1-30): 273-8.
  22. 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 J Res Med Sci* 2012; 14: 18-23. [Persian]
  23. Sutcu R, Altuntas I, Buyukvanli B, Akturka O, Ozturka O, Koylu H, Delibas N. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Toxicol Ind Health*. 2007; 23(1): 13-7.
  24. Astiz M, de Alaniz MJT, Marra CA. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with Agrochemicals. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009; 28(3): 465-73.
  25. Jafari M, Salehi M, Ahmadi S, Asgari A, Abbasnezhad M, Hajigholamali M. The role of oxidative stress in diazinon-induced tissues toxicity in Wistar and Norway rats. *Toxicol Mech Methods*. 2012; 22(8): 638-47.
  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(90): 500-4.
  27. Jafari M, Salehi M, Asgari A, Ahmadi S, Abbasnezhad M, Hajihosani R, Hajigholamali M. Effects of paraoxon on serum biochemical parameters and oxidative stress induction in various tissues of Wistar and Norway rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012; 34(3): 876-87.
  28. Gokalp O, Buyukvanli B, Cicek E, Ozer MK, Koyu A, Altuntas I, Koylu H. The effects of diazinon on pancreatic damage and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. *Pest Biochem Physiol*. 2005; 81(2):

- 123-8.
29. Oral B, Guney M, Demirin H, Ozguner M, Giray SG, Take G, Mungan T, Altuntas I. Endometrial damage and apoptosis in rats induced by dichlorvos and ameliorating effect of antioxidant Vitamins E and C. *Reprod Toxicol*. 2006; 22(4): 783-90.
  30. 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(2): 93-8.
  31. 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(19): 936-41.
  32. Verma RS, Mheta A, Srivastava N. In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: attenuation by antioxidant vitamins. *Pest Biochem Physiol*. 2007; 88(2): 191-6.
  33. Leong CT, D'Souza 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(4): 155-64.

# Response of liver antioxidant defense system to vitamins E and C against diazinon toxicity in rat

**Maryam Salehi,**

MSc in biochemistry, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Mahvash Jafari,**

Professor in Biochemistry, Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Alireza Asgari,**

Professor in Physiology, Sport Physiology Research Center, Baqiyatallah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received:16/08/2014, Revised:21/09/2014, Accepted:22/10/2014

## Corresponding Author:

Mahvash Jafari ,  
Professor in Biochemistry,  
Chemical Injuries Research  
Center, Baqiyatallah (a.s)  
University of Medical Sciences,  
Tehran, Iran.  
E-mail: m.jafari145@gmail.com

## Abstract

**Background:** Diazinon (DZN) is one of the most widely used organophosphates in agriculture. Vitamins C and E are antioxidants protecting cells from oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the protective role of vitamins E and C as antioxidant in reduction of DZN-induced oxidative stress in rat liver.

**Materials and Methods:** In present experimental study, male Wistar rats were randomly divided into six groups including control group (corn oil as 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 which were given intraperitoneally. Animals were anesthetized by ether 24 hours after injection and liver tissues were quickly removed. After tissues homogenization, 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. The data were statistically analysed using analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc analysis using Tukey test.

**Results:** DZN increased SOD, CAT, LDH and GST activities and MDA level and decreased GSH content in liver. Administration of vitamins E and C inhibited the changed in these parameters.

**Conclusion:** Vitamins E and C as antioxidant decrease DZN-induced oxidative stress in rat liver by scavenging free radicals but they does not protect completely.

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