

بررسی تأثیر دیازینون و نقش حفاظتی ویتامین E بر فعالیت کولین استراز پلاسما و گلبول های قرمز موش صحرائی نر و ماده

فاطمه رحیمی عنبرکه*، دکتر محمدرضا نیکروش**، دکتر مهدی جلالی**، دکتر حمیدرضا صادق نیا***
زینت سرگزی*

دریافت: ۹۳/۵/۳۰ پذیرش: ۹۳/۹/۲۵

چکیده:

مقدمه و هدف: دیازینون یک حشره کش ارگانوفسفره است که یکی از مکانیسم‌های سمیت آن، مهار آنزیم کولین استراز می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثرات دیازینون بر روی فعالیت کولین استراز سرم و اریتروسیت‌های خون در رت نر و ماده و تعیین نقش محافظت کنندگی ویتامین E می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی تعداد ۶۰ سر موش صحرائی بالغ (۳۰ سر ماده و ۳۰ سر نر) از نژاد ویستار انتخاب و هر کدام از این گروه‌های ۳۰ تایی نر و ماده به پنج گروه ۶ تایی شامل: کنترل (بدون هرگونه مداخله)، شم (دریافت روزانه روغن زیتون خالص)، تجربی ۱ (دریافت روزانه دیازینون با دوز ۶۰ mg/kg)، تجربی ۲ (دریافت روزانه دیازینون و ویتامین E با همان دوزها) و تجربی ۳ (دریافت روزانه ویتامین E ۲۰۰ mg/kg) تقسیم شدند. دیازینون و حلال از طریق تزریق داخل صفاقی و ویتامین از طریق گاوژ استفاده شد. بعد از ۲ هفته ۳ میلی لیتر خون از بافت قلب گرفته شد و از روش تیترومتري و المان به ترتیب برای سنجش کولین استراز سرم و اریتروسیت استفاده گردید.

نتایج: در هر دو جنس، به علت استفاده از دیازینون کاهش معنی داری در فعالیت کولین استراز اریتروسیت و سرم مشاهده شد. ویتامین E فعالیت کولین استراز اریتروسیت و سرم را در گروه تجربی ۲ رت‌های ماده افزایش داد اما مهار فعالیت کولین استراز در گروه تجربی ۲ رت‌های نر احیا نشد.

نتیجه‌نهایی: با توجه به کاهش بیشتر فعالیت این آنزیم‌ها در رت‌های ماده به دنبال استفاده از دیازینون می‌توان این نتیجه را گرفت که رت‌های ماده حساس تر از رت‌های نر می‌باشند و همچنین با احتیاط می‌توان گفت ویتامین E بعنوان آنتی اکسیدان اثر حفاظتی روی فعالیت کولین استراز دارد و سمیت دیازینون را کاهش می‌دهد.

کلید واژه ها: دیازینون / کولین استراز / موش صحرائی / ویتامین E

مقدمه:

ترکیبات ارگانوفسفره به مدت ۵ دهه برای از بین بردن حشرات، کرم‌ها، کنه‌ها، نماتودها، قارچ‌ها و علف‌های هرز (۲) در کشاورزی، صنعت، طب، باغبانی، نگهداری حیوانات و مصارف خانگی استفاده شده‌اند (۳-۵). استفاده بی‌رویه این محصولات به محیط‌زیست (گیاهان، حیوانات، آب، زمین یا خاک) صدمه می‌زند و باعث ایجاد مقاومت آفت‌ها نسبت به خاصیت آفت‌کشی می‌شود و بر نگرانی‌ها در این زمینه می‌افزاید (۶،۷). از سوی دیگر گزارش شده است که

آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌ها گروهی از ترکیبات شیمیایی پایدار و خطرناک محسوب می‌گردند که به‌طور گسترده در کشاورزی برای بالابردن سطح تولید غذا استفاده می‌شوند. گرچه تقاضا برای تولید و توزیع آفت-کش‌ها که باعث افزایش بهبود کیفیت و کارایی کشاورزی می‌شوند محرز است ولی احتمال بکارگیری ناپجا و غیرمعقول از آن بسیار زیاد می‌باشد (۱).

* دانشجوی دوره کارشناسی ارشد علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** استاد گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (nikraveshmr@mums.ac.ir)

*** استادیار گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

هدف می‌شود. بنابراین مشابه با سایر ارگانوفسفره‌ها، ديازینون نیز از طریق مهار فعالیت آنزیم استیل کولین که یک نوروترنسمیتر است و با اثر بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد، می‌تواند باعث تغییرات هورمون‌های جنسی و اختلال در سیستم تولیدمثلی دو جنس نر و ماده گردد (۳). از سوی دیگر با توجه به استفاده گسترده از ديازینون، یکی از راه‌های مقابله با سمیت ایجاد شده، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد. ویتامین E بعنوان یک آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی محلول در چربی شناخته می‌شود که باعث وقفه در انتشار لیپیدپراکسیداسیون در غشای پلاسمایی و بنابراین حفظ یکپارچگی غشاء و فرایندهای غشایی می‌شود (۱۴). علاوه بر این مطالعات متعددی نشان داده‌اند که آلفا-توکوفرول شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کند و ممکن است به‌طور موثری پراکسیداسیون لیپیدی را در سیستم‌های بیولوژیکی کاهش دهد (۵).

با توجه به مطالب فوق الذکر و اینکه جمعیت وسیعی از زنان در کنار مردان در بخش کشاورزی فعالیت دارند و در معرض سموم ارگانوفسفره از جمله ديازینون قرار دارند، این مطالعه با هدف مقایسه بین گروهی اثرات حشره‌کش ارگانوفسفره ديازینون بر روی سطح آنزیم کولین استراز اریتروسیت و سرم در جنس نر و ماده رت و تعیین اثر حفاظتی ویتامین E انجام شد.

روش کار:

در این مطالعه تجربی تعداد ۶۰ سر موش صحرایی بالغ (۳۰ سر ماده و ۳۰ سر نر) از نژاد ویستار انتخاب و هرکدام از این گروه‌های ۳۰ تایی نر و ماده به پنج گروه ۶ تایی شامل: کنترل (بدون هرگونه مداخله) شام (دریافت روزانه روغن زیتون خالص)، تجربی ۱ (دریافت روزانه ديازینون با دوز ۶۰ mg/kg محلول در روغن زیتون)، تجربی ۲ (دریافت روزانه ديازینون با دوز ۶۰ mg/kg و ویتامین E با دوز ۲۰۰ mg/kg) و تجربی ۳ (دریافت روزانه ویتامین E ۲۰۰ mg/kg) تقسیم شدند (۱۵). در این مطالعه از روغن زیتون به‌عنوان حلال استفاده گردید که ديازینون و حلال از طریق تزریق داخل صفاقی و ویتامین E از طریق گاوژ استفاده شد. بعد از ۲ هفته، ۳ میلی لیتر خون از بافت قلب گرفته شد و از روش تیترومتري و المان (Elman) به ترتیب برای سنجش کولین استراز سرم و اریتروسیت استفاده شد. لازم به ذکر است تمام پروتکل‌های تجربی

سموم ارگانوفسفره باعث ایجاد عوارض جانبی در بافت‌های مختلف از قبیل کبد، کلیه، سیستم‌ایمنی، پانکراس، قلب و دیواره‌های عروقی و تغییرات هماتولوژیکی و بیوشیمیایی می‌شوند (۸،۹). تحقیقات به‌عمل آمده نشان می‌دهد که ديازینون می‌تواند از طریق دستگاه گوارش، پوست و یا از طریق مخاط تنفسی جذب شود و در بافت‌های بدن از جمله در اندام‌های جنسی تاثیرات منفی برجای بگذارد (۱۳). تحقیقات نشان داده است که چندین فاکتور مثل مدت زمان و غلظت ديازینون، می‌تواند در میزان سمیت موثر باشد (۸).

در بعضی از مطالعات افزایش ناهنجاری در ساختار اسپرم، آتروفی شدن سلول‌های لایدیگ، کاهش سطح هورمون‌های جنسی، کاهش قطر سلول‌های ژرمینال و مجاری اسپرم ساز گزارش شده است. عوارض ديازینون در جنس ماده باعث نکروز بافت تخمدان، افزایش فولیکولهای آتریک، کاهش قطر تخمدان و کاهش سطح استرادیول می‌شود، همچنین باعث کاهش تقسیم سلولی در مراحل ابتدایی تقسیم میتوزی شده و با ایجاد جهش در ژن‌ها، ناهنجاری‌های جنینی را در مراحل اولیه تکامل موجب می‌شود (۹). آنزیم استیل کولین استراز دارای دو ایزوform متفاوت کولین استراز واقعی (Acetylcholinesterase) و کولین استراز کاذب (Pseudocholinesterase) می‌باشد که نوع واقعی آن در سیستم عصبی-عضلانی و گلبول‌های قرمز و نوع کاذب آن که ساختاری مشابه با کولین استراز واقعی دارد در سرم، سلول‌های مغزی و کبد وجود دارد (۱۰،۱۱). حشره‌کش‌های ارگانوفسفره بطور غیر قابل برگشت عمل آنزیم استیل کولین استراز را متوقف می‌کنند و باعث تجمع استیل کولین در سیناپس‌های موسکارینی و نیکوتینی می‌شوند که این خود باعث ایجاد علائم موسکارینی و نیکوتینی می‌گردد که در کنار علائم عصبی ناشی از مسمومیت به‌عنوان راهنمای تشخیص مسمومیت نیز بکار می‌رود (۱۲). فعالیت آنزیم کولین استراز سرم (PChE)، نشان‌دهنده مسمومیت حاد بوده ولی کاهش آنزیم استیل کولین استراز اریتروسیت (AChE) بیانگر مسمومیت مزمن می‌باشد. لذا فعالیت PChE به‌طور ویژه قبل از فعالیت AChE به‌علت مسمومیت کاهش می‌یابد (۱۳). ديازینون اثر سمی خود را از طریق اتصال اکسیژن-آنالوگش به آنزیم عصبی AChE اعمال می‌کند که منجر به تجمع اندوژن استیل کولین در بافت‌های عصبی و ارگانهای

توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی مشهد مورد تأیید قرار گرفت.

مواد شیمیایی: برای این مطالعه، دیازینون تکنیکال ۹۸٪ تهیه شده از شرکت آریا شیمی مورد استفاده قرار گرفت. محلول استوک از دیازینون با غلظت ۶۰ mg/ml در روغن زیتون بصورت تازه تهیه گردید و دیازینون در روغن زیتون حل شد. ویتامین E از سیگما خریداری شد.

اندازه‌گیری کولین استراز اریتروسیت و سرم: بعد از گذشت ۲ هفته، ۳ میلی‌لیتر خون با سرنگ هپارینه (میزان هپارین مورد نیاز برای هر میلی‌لیتر خون بین ۱۰۰-۲۵ واحد می‌باشد) از موش‌های صحرایی نر و ماده گرفته شد و برای سنجش مهار آنزیم استیل کولین استراز خون از روش المان استفاده شد (۱۶). بدین منظور پس از خون‌گیری از حیوان و سانتریفوژ کردن نیمی از آن توسط همولیزات، ۳ میلی‌لیتر از واکنشگر DTNB (dithiois nitrobenzoic acid) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول-سوبسترا (استیل تیوکولین دیدید) در لوله شیشه‌ای به مدت ۱۰ ثانیه در حمام آبی ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول همولیز جهت شروع واکنش به آن اضافه شد. لوله شیشه‌ای در حمام آب ۳۷ درجه گذاشته شد و دقیقاً پس از ۱۰ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر واکنش‌گر متوقف کننده به مجموعه افزوده شد. محتویات داخل لوله شیشه‌ای بهم زده شده و به خارج از حمام آبی منتقل شد. نمونه‌های بلانک دقیقاً به شرح فوق تهیه شدند، با این تفاوت که ۱۰۰ میکرولیتر محلول همولیز در مرحله آخر پس از افزودن واکنش‌گر متوقف کننده و سپری شدن زمان مربوطه، در خارج حمام آبی به هر لوله شیشه‌ای اضافه شد. از آن جا که هر نمونه همولیز شده، جذب خود را دارا می‌باشد. بنابراین، برای سنجش فعالیت آنزیم در هر نمونه، یک بلانک بطور مستقل تهیه شد و بلافاصله جذب هر نمونه در مقابل بلانک خود در طول موج ۴۴۰ نانومتر خوانده شد. این عمل برای هر نمونه همولیز سه بار انجام گرفت و در نهایت میانگین اعداد در محاسبات بعدی استفاده شد.

کولین استراز سرم به روش تیترومتری انجام می‌شود. محلول اصلی استیل کولین کلراید است که ۱۰ میلی‌لیتر محلول آماده استیل کولین کلراید در ارلن ۵۰ میلی‌لیتری می‌ریزیم و به آن ۰/۵ میلی لیتر سرم را اضافه می‌کنیم. ۲ قطره معرف کروزل رد (انسدیکاتور PH که در محیط اسیدی زرد و در محیط قلیایی بنفش است) اضافه

می‌کنیم و هم می‌زنیم. به محیط کستیل کولین کلراید جهت پایداری بیشتر اسید استیک ۱۰ درصد اضافه شده است و اسیدی است. ابتدا با سود ۰/۱ نرمال تیترو می‌کنیم تا رنگ اولیه اسید استیک از بین برود و بنفش شود. ۱ ساعت زمان می‌گیریم و در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم. هر چند دقیقه از نظر تغییر رنگ محیط به زرد بررسی می‌کنیم. اگر محیط زرد رنگ شده بود با سود ۰/۰۱ نرمال تیترو می‌کنیم تا محیط مجدداً بنفش شود. در طول یک ساعت میران تیترو را به میلی‌لیتر یادداشت می‌کنیم که هر میلی‌لیتر نشان دهنده ۱۰ درصد فعالیت آنزیم است.

آنالیز آماری: برای ارائه نتایج تاثیر دیازینون بر فعالیت آنزیم‌های کولین استراز اریتروسیت و سرم، از نسخه ۱۶ نرم افزار SPSS استفاده شد، آنالیز ابتدا در هر جنس بصورت جداگانه انجام شد که برای این منظور آنالیز آماری کولین استراز اریتروسیت براساس آزمون ANOVA به دنبال تست Tukey-Kramer برای مقایسه تفاوت بین میانگین‌ها استفاده شد. و با توجه به اینکه داده‌های کولین استراز سرم بصورت درصد بیان شد، آنالیز آماری این آنزیم در هر جنس نیز براساس آزمون Mann-Whitney Test برای مقایسه بین گروهی میانگین‌ها استفاده شد. تفاوت آماری معنی دار $P < 0/05$ در نظر گرفته شد و نتایج براساس $Mean \pm SD$ بیان شد.

برای مقایسه درصد میزان تاثیر گذاری دیازینون بر میزان فعالیت دو آنزیم کولین استراز اریتروسیت و سرم در دو گروه نر و ماده و برای مشابه سازی دو گروه از نظر مقدار پایه، مقدار به دست آمده بعد از مداخله از مقدار پایه در هر رت کسر شده است. ابتدا با توجه به حجم نمونه کم و اطمینان از نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف - اسمیرونف استفاده شد. برای مقایسه میانگین تغییرات در دو جنس نر و ماده از آزمون تی تست نمونه ای مستقل استفاده گردید.

نتایج:

فعالیت آنزیم‌های کولین استراز اریتروسیت و سرم و اثر حفاظتی ویتامین E در رت‌های نر: خلاصه نتایج مربوط به میزان فعالیت آنزیم کولین استراز اریتروسیت و سرم بین هر پنج گروه جنس نر در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار غلظت آنزیم های کولین استراز در رت های نر و مقایسه گروهها با کنترل

p-value	p-value	p-value	p-value	کولین استراز	اریتروسیت (AChE)
مقایسه گروهها با دیازینون	مقایسه گروهها با کنترل	کولین استراز سرم (PchE)	مقایسه گروهها با دیازینون	مقایسه گروهها با کنترل	
۰/۰۰۶	-	۱۸/۳۳±۴/۰۸	۰/۰۰۰	-	۲/۵۴±۰/۰۶۸
-	۰/۰۰۶	۱۰/۵±۶/۰۵	-	۰/۰۰۰	۱/۲۸±۰/۰۸۶
۰/۵۴	۰/۰۰۷	۱۱/۰۸±۶/۶۶	۰/۶۸	۰/۰۰۰	۱/۳۰±۰/۰۸۵
۰/۰۰۶	۰/۹۷	۱۸/۱۹±۸/۱	۰/۰۰۰	۰/۶۵	۲/۵۱±۰/۱۲
۰/۰۰۷	۰/۸۴	۱۸/۰۱±۴/۰۸	۰/۰۰۰	۰/۱۷	۲/۴۵±۰/۰۷

ترتیب $۲/۱۷۸ \pm ۰/۰۵۶$ و $۱۴/۶۸ \pm ۴/۴۹$ می باشد که از لحاظ آماری در مقایسه با میانگین این دو آنزیم در گروه تجربی یک که به ترتیب $۰/۶۷ \pm ۰/۰۹$ و $۵/۷۱ \pm ۴/۷۵$ می باشد معنی دار است و با توجه به میانگین سایر گروهها پایین ترین سطح فعالیت این آنزیم مربوط به گروه تجربی یک می باشد. همچنین میانگین و انحراف معیار آنزیم های کولین استراز اریتروسیت و سرم در گروه تجربی ۲ رت های ماده به ترتیب $۰/۰۸۴ \pm ۱/۱۸۱$ و $۱۰/۱۴ \pm ۷/۵$ می باشد که تفاوت معنی داری بین میانگین و انحراف معیار آنزیم های کولین استراز اریتروسیت و سرم در گروه تجربی دو در مقایسه با گروه تجربی یک وجود دارد که این بیانگر نقش محافظتی ویتامین E در گروه تجربی دو می باشد. میانگین این دو آنزیم در گروه شم و گروه تجربی سه مشابه با گروه کنترل می باشد.

مقایسه میانگین ها نشان می دهد که هیچ تفاوت قابل ذکری بین سه گروه کنترل، شم و تجربی ۳ وجود ندارد. همانطور که ملاحظه می شود میانگین و انحراف معیار کولین استراز اریتروسیت و سرم به ترتیب در گروه کنترل $۲/۵۴ \pm ۰/۰۶۸$ و $۱۸/۳۳ \pm ۴/۰۸$ و در گروه تجربی یک به ترتیب $۱/۲۸ \pm ۰/۰۸۶$ و $۱۰/۵ \pm ۶/۰۵$ می باشد که تفاوت بین این دو گروه از لحاظ آماری معنی دار می باشد اما در گروه تجربی دو (دیازینون + ویتامین E)، میانگین و انحراف معیار آنزیم کولین استراز اریتروسیت و سرم به ترتیب $۱/۳۰ \pm ۰/۰۸۵$ و $۱۱/۰۸ \pm ۶/۶۶$ می باشد که تفاوت معنی داری با گروه تجربی یک ندارد. فعالیت آنزیم های کولین استراز اریتروسیت و سرم و اثر محافظتی ویتامین E در رت های ماده: نتایج جدول ۲ نشان می دهد که میانگین و انحراف معیار آنزیم های کولین استراز اریتروسیت و سرم در گروه کنترل رت های ماده به

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار غلظت آنزیم های کولین استراز در رت های ماده و مقایسه گروهها با کنترل

p-value	p-value	p-value	p-value	کولین استراز	اریتروسیت (AChE)
مقایسه گروهها با دیازینون	مقایسه گروهها با کنترل	کولین استراز سرم (PchE)	مقایسه گروهها با دیازینون	مقایسه گروهها با کنترل	
۰/۰۰۴	-	۱۴/۶۸±۴/۴۹	۰/۰۰۰	-	۲/۱۷۸±۰/۰۵۶
-	۰/۰۰۴	۵/۷۱±۴/۷۵	-	۰/۰۰۰	۰/۶۷±۰/۰۹
۰/۰۱	۰/۰۲	۱۰/۱۴±۷/۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۸۱±۰/۰۸۴
۰/۰۰۶	۰/۹۷	۱۴/۲۲±۸/۱	۰/۰۰۰	۰/۶۹	۲/۱۰±۰/۰۴۹
۰/۰۰۷	۰/۹۵	۱۴/۰۱±۴/۰۸	۰/۰۰۰	۰/۹۷	۲/۱۷۵±۰/۰۶۵

رت‌های نر ۴۲ درصد و در رت‌های ماده تا ۶۱ درصد کاهش یافت. در گروه تجربی دو نیز به ترتیب در دو جنس نر و ماده کاهش ۳۹ درصدی و ۲۸ درصدی مشاهده شد، اما مقایسه گروه تجربی دو با تجربی یک افزایش ۵ درصدی در رت‌های نر و افزایش ۴۳ درصدی در رت‌های ماده را نشان داد با توجه به مقایسه میانگین تغییرات به دست آمده در جنس نر تفاوت معنی‌داری بین گروه تجربی یک و دو مشاهده نشد اما این تفاوت در رت‌های ماده معنی‌دار بود.

بحث:

از دهه ی ۱۹۵۰ به بعد اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کولین استراز پلاسمایی و اریتروسیتهی برای پی بردن به مسمومیت‌های حاد و آلودگی مزمن در افرادی که با آفت کش‌ها سروکار دارند انجام شده است (۱۷). دیازینون یک حشره‌کش ارگانوفسفره است که در غلظت‌های متفاوت استرس اکسیداتیو را القاء می‌کند و بنابراین با القاء گونه‌های فعال اکسیژن باعث آسیب اکسیداتیو ماکرومولکول‌های مهم مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها می‌شود (۱۸). از طرفی حشره کش‌های ارگانوفسفره بطور غیر قابل برگشت عمل آنزیم استیل کولین استراز را متوقف می‌کنند، این آنزیم پس از مهار شدن قادر به هیدرولیز نمودن ماده اولیه اختصاصی خود نمی‌باشد. هر دو گروه کولین استرازها شامل استیل کولین استراز که در گلبول قرمز و بافت عصبی وجود دارد و کولین استراز کاذب که در سرم، سلول‌های گلیال و کبد یافت می‌شود قادر به هیدرولیز نمودن استیل کولین می‌باشند، تعیین فعالیت این آنزیم‌ها در گلبول قرمز و سرم

مقایسه میانگین تغییرات آنزیم کولین استراز اریتروسیته و سرم در رت‌های جنس نر و ماده: برای مقایسه میزان تاثیر گذاری دیازینون بر فعالیت کولین استراز اریتروسیته در دو جنس نر و ماده و برای مشابه سازی دو گروه از نظر مقدار پایه، مقادیر به دست آمده بعد از مداخله از مقدار پایه (کنترل) در هر موش صحرایی کسر شده است. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود و مطابق با میانگین‌ها تغییرات این آنزیم در تمام گروه‌ها بین هر دو جنس تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P = 0/000$). همچنین در همه گروه‌ها بجز گروه تجربی دو، فعالیت این آنزیم در جنس نر بیشتر از جنس ماده می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده و در مقایسه با گروه کنترل، درصد کاهش فعالیت این آنزیم در گروه تجربی یک در جنس نر ۴۹ درصد و در جنس ماده ۶۹ درصد می‌باشد که این نشان دهنده ی حساسیت بیشتر جنس ماده می‌باشد. نتایج آنالیز آماری گروه تجربی دو در مقایسه با گروه تجربی یک، افزایش ۱ درصدی این آنزیم در جنس نر و افزایش ۶۲ درصدی در جنس ماده را نشان داد.

میانگین تغییرات آنزیم کولین استراز سرم در گروه‌های مختلف رت‌های نر و ماده نیز در جدول ۳ مشاهده می‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده، فعالیت این آنزیم در همه گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را بین هر دو جنس نشان داد همچنین در همه گروه‌ها (بجز گروه تجربی دو)، فعالیت آنزیم کولین استراز سرم در جنس نر بیشتر از جنس ماده بود. مقایسه میانگین و انحراف معیار فعالیت این آنزیم بین دو گروه کنترل و تجربی یک در هر دو جنس نشان داد که فعالیت این آنزیم در گروه تجربی یک

جدول ۳: درصد تغییرات آنزیم کولین استراز اریتروسیته و سرم در دو جنس

تغییرات فعالیت AchE در رت‌های نر در مقایسه با گروه کنترل	تغییرات فعالیت AchE در رت‌های ماده در مقایسه با گروه کنترل	p-value مقایسه بین دو گروه مشابه از هر دو جنس	تغییرات فعالیت PchE در رت‌های نر در مقایسه با گروه کنترل	تغییرات فعالیت PchE در رت‌های ماده در مقایسه با گروه کنترل	p-value مقایسه بین دو گروه مشابه از هر دو جنس
-	-	۰/۰۲۱	-	-	۰/۰۰۰
۴۹	۶۹	۰/۰۰۸	۴۲	۶۱	۰/۰۰۰
۴۸	۱۶	۰/۳۲	۳۹	۲۹	۰/۰۰۰
۱	۳	۰/۰۳۱	۰/۷	۳	۰/۰۰۰
۳	۰/۱	۰/۰۲۸	۱	۴	۰/۰۰۰

به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (۲۴). المازودی و همکاران گزارش کردند که استفاده از دیازینون سطوح کولین استراز پلاسما را کاهش می‌دهد که این کاهش وابسته به دوز بود (۲۵) بنابراین، کاهش فعالیت آنزیم‌های کولین استراز در مطالعات انجام شده و مطالعه حاضر نشان دهنده ایجاد سمیت توسط دیازینون می‌باشد.

در مواجهه با دیازینون، سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی بدن برای محافظت در مقابل ROS فعال می‌شود. ویتامین E، یک ویتامین محلول در چربی است که در پاکسازی رادیکال‌های آزاد نقش دارد (۲۶،۲۷). در مطالعه حاضر ویتامین E به مدت ۱۴ روز از طریق گاوآژ استفاده گردید که در گروه تجربی ۲ رت‌های ماده، استفاده از ویتامین E همراه با دیازینون، باعث افزایش معنی‌دار در سطح کولین استراز اریتروسیت در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دیازینون گردید. همچنین در این گروه‌ها، افزایش معنی‌داری در سطح کولین استراز سرم مشاهده گردید. بنابراین، در رت‌های ماده ویتامین E باعث بهبود مهار آنزیم کولین استراز شد. در همین راستا، ماکوویس و همکاران نشان دادند که مهار فعالیت استیل-کولین استراز توسط ارگانوفسفره‌ها، توسط ویتامین‌های A و E بهتر جبران می‌شود (۲۸). اورال و همکاران دریافتند، DDVP که از جمله سموم ارگانوفسفره است، باعث کاهش در فعالیت کولین استراز شد، در حالی‌که استفاده از ترکیب ویتامین‌های C و E همراه با DDVP، باعث بازیابی نسبی فعالیت کولین استراز در مقایسه با گروهی شد که DDVP را به تنهایی دریافت کرده بودند (۱۲). حریری و همکاران نیز به این نتیجه رسیدند که در مسمومیت تحت حاد ناشی از دیازینون، Vit E، Safranl و Crocin بر مهار آنزیم کولین استراز اثر محافظتی دارند (۲۹) اما در گروه تجربی ۲ رت‌های نر، برخلاف رت‌های ماده هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه تجربی ۲ و گروه تجربی ۱ (دیازینون) مشاهده نشد. در همین راستا کلندر و همکاران نشان دادند که استفاده از ویتامین E نمی‌تواند از کاهش فعالیت کولین استراز کاذب در رت‌های تحت درمان با دیازینون محافظت کند، بطوریکه گروه‌های دیازینون و دیازینون + ویتامین E در مقایسه با یکدیگر تغییر معنی‌داری نداشتند (۱۰). جون و همکاران که به مدت ۶ هفته رت‌ها را با سموم اورگانوفسفره‌ی مالاتیون و دیموت تیمار کردند به این نتیجه رسیدند که ویتامین E استرس

مطمئن‌ترین و گسترده‌ترین شاخص بیولوژیک برای تماس با سموم ارگانوفسفره می‌باشد (۱۹). در مطالعه حاضر، اثر حفاظتی ویتامین E در مقابل سمیت الفاء شده دیازینون بررسی شد. برای این منظور رت‌های نر و ماده به مدت ۲ هفته با دیازینون (۶۰ mg/kg) و ویتامین E (۲۰۰ mg/kg) تحت تیمار و درمان قرار گرفتند و در نهایت برای سنجش مهار آنزیم استیل کولین استراز اریتروسیت از روش المان و برای سنجش مهار آنزیم کولین استراز سرم از روش تیترومتری استفاده شد.

در این مطالعه، نتایج فعالیت این دو آنزیم در تمام گروه‌ها (بجز گروه تجربی دو) بین هر دو جنس نر و ماده تفاوت معنی‌داری را نشان داد، همچنین فعالیت این آنزیم‌ها در تمام گروه‌های جنس نر بیشتر از جنس ماده بود. نتایج حاصل از مقایسه میانگین غلظت آنزیم‌های کولین استراز اریتروسیت و سرم اندازه‌گیری شده در گروه تجربی ۱ که تنها دیازینون را دریافت کرده بودند در هر دو جنس کمتر از مقدار آن در گروه کنترل بود و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نشان داده شد. بنابراین، نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه چا و همکاران که فعالیت کولین استراز سرم را در موش‌های تیمار شده با دیازینون بررسی کردند همخوانی دارد، به طوری که آن‌ها نشان دادند فعالیت کولین استراز سرم توسط دیازینون کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند (۲۰). وو و همکاران نشان دادند که در رت‌های دریافت‌کننده دیازینون داخل وریدی هر دو آنزیم استیل کولین استراز حقیقی و کاذب به سرعت کاهش می‌یابد که در مصرف خوراکی، مهار آنزیم استیل-کولین استراز گلوبول قرمز (حقیقی) از پلاسمایی (کاذب) بیشتر بود (۲۱). کانسومارو و همکاران گزارش نمودند که با در معرض قرارگیری با دیازینون فعالیت آنزیم کولین استراز پلاسما و اریتروسیت به سرعت مهار می‌شود که مهار در اریتروسیت‌ها بیشتر از پلاسماست (۲۲). در مطالعه‌ای که توسط توموکنی و همکاران انجام شد، مهار کولین استراز خون در مسمومیت با دیازینون در موش‌های صحرائی و سوری که به صورت تک دوز سم را دریافت کرده بودند، به ثبت رسید و نشان داده شد که علی‌رغم اینکه در معرض قرارگیری با دیازینون در پلاسما بیشتر از اریتروسیت‌ها است اما مهار در اریتروسیت‌ها بیشتر است (۲۳). گوک سیمن و همکاران نشان دادند که فعالیت آنزیم کولین استراز در رت‌های دریافت‌کننده دیازینون

گیری تغییر می‌کند. در زنان فعالیت آنزیم کولین استراز سرم وابسته به سن است ولی در مردان رابطه‌ای بین سطح این آنزیم و سن وجود ندارد. البته این وابستگی در مورد آنزیم کولین استراز اریتروسیت دیده نمی‌شود. فعالیت کولین استراز اریتروسیت در اریتروسیت‌های جوان زیادتر است و با افزایش سن گلوبول قرمز کاهش می‌یابد (۳۲، ۳۳). در مطالعه رژیم غذایی دیازینون دیویس و همکاران که بر روی رت‌های نر و ماده انجام شد، فعالیت کولین استراز اریتروسیت، سرم و مغز رت‌های گروه دریافت کننده دیازینون نسبت به گروه کنترل تغییر معنا داری را نشان داد، آنان همچنین گزارش کردند که رت‌های ماده با توجه به کاهش بیشتر فعالیت استیل کولین استراز حساس‌تر از رت‌های نر بوده‌اند (۳۴). در مطالعه ابراهیم‌زاده و همکاران، استفاده از سموم ارگانوفسفره تفاوت معنی‌دار آماری میان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در زنان و مردان کارگر با گروه شاهد نشان داد که کاهش فعالیت این آنزیم در زنان بیشتر از مردان بود (۳۵).

نتیجه نهایی:

با توجه به کاهش بیشتر فعالیت آنزیم‌های کولین استراز اریتروسیت و سرم در رت‌های ماده به دنبال استفاده از دیازینون می‌توان این نتیجه را گرفت که رت‌های ماده حساس‌تر از رت‌های نر می‌باشند. ویتامین E بعنوان آنتی اکسیدان می‌تواند اثر حفاظتی روی فعالیت کولین استراز داشته باشد و سمیت دیازینون را کاهش دهد اما از سویی دیگر بنابه دلایلی مانند تفاوت در شیوه تجویز دیازینون و ویتامین، تفاوت طول مدت مطالعه، جنسیت متفاوت رت‌ها ممکن است نتواند باعث بهبود سمیت دیازینون گردد. بنابراین باید مراقبت لازم برای جلوگیری از ورود سم به بدن انجام شود، همچنین از آنجایی که امروزه زنان نقش مهمی در کشاورزی ایفا می‌کنند باید تمهیدات لازم برای آنان با توجه به اینکه ممکن است در دوره حاملگی یا شیردهی باشند در نظر گرفته شود.

سپاسگزاری:

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد علوم تشریحی می‌باشد. بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، از سرکار خانم متجدد مسئول محترم آزمایشگاه هیستوشیمی و همچنین مسئولین محترم خانه حیوان دانشکده پزشکی قردانی می‌گردد.

اکسیداتیو را کاهش می‌دهد اما بر روی مهار فعالیت کولین استراز اریتروسیت و سرم چنین اثری ندارد و در نتیجه باعث کاهش یا بهبود مهار فعالیت این آنزیم‌ها نمی‌شود (۱۴). همچنین آلتانتاس و دلیباس نشان دادند که ویتامین C و E نمی‌تواند از فعالیت کولین استراز کاذب در رت‌های تحت درمان با فنتیون محافظت کند (۳۰).

سارابیا و همکاران گزارش کردند در روز اول تزریق، همه گروه‌هایی که دیازینون را دریافت کرده بودند کاهش در سطح AchE را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند اما با گذشت ۳۲ روز سطح AchE تمام گروه‌ها مشابه با گروه کنترل بود (۳۱). بنابراین، مطابق با نتایج گروه تجربی ۲ رت‌های ماده، ویتامین E از یک سو، بعنوان یک آنتی اکسیدان تأثیرگذار می‌تواند باعث بهبود مهار فعالیت آنزیم‌های کولین استراز اریتروسیت و سرم گردد و تا حدودی اثر محافظتی در برابر این مسمومیت ایجاد کند و از سویی دیگر همانطور که در گروه تجربی ۲ رت‌های نر مشاهده شد، ویتامین E نتوانست باعث بهبود فعالیت این آنزیم‌ها گردد. دلیل اختلاف در این مطالعه و سایر مطالعات را می‌توان در تفاوت طول مدت مطالعه، اختلاف در میزان مصرف دیازینون و ویتامین E، تفاوت در شیوه تجویز دیازینون و ویتامین، تفاوت در نوع سم و جنسیت متفاوت رت‌ها توجیه کرد. البته لازم به ذکر است که بهبود و احیای فعالیت کولین استراز اریتروسیت‌ها می‌تواند به احیای اریتروسیت‌ها و شکست گلوبول‌های قرمز قدیمی تر و همچنین بهبود فعالیت کولین استراز سرم نیز به سنتز پروتئین در کبد وابسته باشد (۱۴).

میزان فعالیت آنزیم با توجه به سن، جنس، مصرف داروها، وجود بیماری و روش اندازه‌گیری تغییر می‌کند (۱۷). همانطور که در نتایج مشاهده شد دیازینون در گروه تجربی ۱ در جنس نر به ترتیب باعث کاهش ۴۹ و ۴۲ درصدی فعالیت آنزیم‌های کولین استراز اریتروسیت و سرم در مقایسه با گروه کنترل گردید و در جنس ماده نیز به ترتیب باعث کاهش ۶۰ و ۶۹ درصدی فعالیت آنزیم‌های کولین استراز اریتروسیت و سرم شد که مقایسه درصد کاهش این آنزیم‌ها در هر دو جنس نشان دهنده کاهش بیشتر فعالیت این آنزیم‌ها در جنس ماده می‌باشد و می‌توان به این نتیجه دست یافت که رت‌های ماده حساسیت بیشتری نسبت به رت‌های نر دارند. میزان فعالیت آنزیم در جمعیت‌های مختلف با توجه به سن، جنس و روش اندازه

منابع:

1. Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(12): 3345-53
2. Reece R, Handson P. Observations on the accidental poisoning of birds by organophosphate insecticides and other toxic substances. *Vet Rec* 1982; 111(20): 453-55.
3. Yehia MA, El-Banna SG, Okab AB. Diazinon toxicity affects histophysiological and biochemical parameters in rabbits. *Exp Toxicol Pathol* 2007; 59(3): 215-25.
4. Jahromi VH, Koushkaki MNER, Kargar H. The Effects of Malathion Insecticide on Ovary in Female Rats. *Switzerland Rese Park J* 2012; 101(5): 231-35.
5. Uzun FG, Kalender S, Durak D, Demir F, Kalender Y. Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(8): 1903-908.
6. Casas E, Bonilla E, Ducolomb Y, Betancourt M. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicol In Vitro* 2010; 24(1): 224-30.
7. 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. *Pestic Biochem Physiol* 2006; 86(2): 93-98.
8. Üner N, Oruç EÖ, Sevgiler Y, Şahin N, Durmaz H, Usta D. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006;21(3): 241-45.
9. Dutta H, Meijer H. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. *Environ Pollut* 2003;125(3):355-60.
10. Kalender Y, Uzunhisarcikli M, Ogutcu A, Acikgoz F, Kalender S. Effects of diazinon on pseudocholinesterase activity and haematological indices in rats: the protective role of vitamin E. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006; 22(1): 46-51.
11. Mehrani H. Protective effect of polyurethane immobilized human butyrylcholinesterase against parathion inhalation in rat. *Environ Toxicol Pharmacol* 2004;16(3): 179-85.
12. 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. *Reprod Toxicol* 2006; 22(4): 783-90.
13. Barkhordari ART, Hekmatimoghaddam H, Mosaddegh MD, Fallahzadeh H. [Assessment of Ache in worker exposed to OP pesticides]. *J Community Med* 2012; 4(1,2): 9-16. (Persian)
14. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nutr Biochem* 2001;12(9): 500-504.
15. Uzunhisarcikli M, Kalender Y, Dirican K, Kalender S, Ogutcu A, Buyukkomurcu F. Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pestic Biochem Physiol* 2007;87(2):115-22.
16. Shokrzade M, Pakrava N, Sheikholeslamian SK. [The protective effect of n-acetyl cysteine on glutathione levels and serum cholinesterase in acute poisoning of diazinon, in mice]. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 23: 2-11. (Persian)
17. Coye, M.J., Lowe. J.A., Maddy, K.t. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticide: cholinesterase activity determination. *J Occup Med* 1986; 28(8): 619-627.
18. Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des* 2004; 10(14): 1611-26.
19. Maroni M, Colosio C, Ferioli A. organ phosphorus pesticides. *Toxicology* 2000; 143: 9-37.
20. Cha SW, Gu HK, Lee KP, Lee MH, Han SS, Jeong TC. Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome P450. *Toxicol Lett* 2000; 115(3): 173-78.
21. Wu H. Diazinon toxicokinetics, tissue distribution and anticholinesterase activity in the rat. *Biomed Environ Sci* 1996; 9(4): 359-69.
22. Katsumaro T, Tohr H. Diazinon concentrations and blood cholinesterase activities in rats exposed to diazinon. *Toxicol Lett* 1985; 25(1): 7-10.
23. Tomokuni K, Hasegawa T, Hirai Y, Koga N. The tissue distribution of diazinon and the inhibition of blood cholinesterase activities in rats and mice receiving a single intraperitoneal dose of diazinon. *Toxicology* 1985;37(1):91-98.
24. Gokcimen A, Gulle K, Demirin H, Bayram D, Kocak A, Altuntas I. Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues. *Pestic Biochem Physiol* 2007; 87(2): 103-108.
25. El Mazoudy RH, Attia AA. Endocrine-disrupting and cytotoxic potential of anticholinesterase insecticide, diazinon in reproductive toxicity of male mice. *J Hazard Mater* 2012; 209: 111-20.
26. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95(2):351-58.
27. Shariatzadeh SMA, Soleimanimehranjani M,

- Hamta A, Ghandizadehdezfuli M. [The stereological study of the effect of vitamin E on the structure of ovary and its number of follicles during ovary development in rats treated with sodium arsenite]. *Arak Med Univ J* 2012; 15(61): 54-64. (Persian)
28. Matkovics B, Szabo L, Ivan J, Gaal I. Some further data on the effects of two organophosphate pesticides on the oxidative metabolism in the liver. *Gen Pharmacol* 1983; 14(6): 689-91.
29. Hariri AT, Moallem SA, Mahmoudi M, Memar B, Hosseinzadeh H. Sub-acute effects of diazinon on biochemical indices and specific biomarkers in rats: protective effects of crocin and safranal. *Food Cheml Toxicol* 2010; 48(10): 2803-808.
30. Altuntas I, Delibas N. The effects of fenthion on lipid peroxidation and some liver enzymes: The possible protective role of Vitamins E and C. *Turkish J Med Sci* 2002; 32: 293-97.
31. Sarabia L, Maurer I, Bustos-Obregon E. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on the mouse testis. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72(3):938-42.
32. Kaplan E, Tildon JT. Changes in red cell enzyme activity in relation to red cell survival in infancy. *Pediatrics* 1963;32(3):371-5.
33. Kaplan E, Herz F, Hsu KS. Erythrocyte acetylcholinesterase activity in ABO hemolytic disease of the newborn. *Pediatrics* 1964; 33(2): 205-11.
34. Davies DB, Holub BJ. Comparative subacute toxicity of dietary diazinon in the male and female rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 54(3): 359-67.
35. Ebrahimzadeh MA, Shokrzade LM, Biokabadi M. [Effect of organophosphate insecticides on acetyl cholinesterase activity in Rice fields' workers]. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2005;7(1): 1-7. (Persian)

Original Article

The Effect of Diazinon on Cholinesterase Activity in Plasma and Erythrocytes of Male and Female Rats and the Protective Role of Vitamin E

F. Rahimi Anbarkeh, M.Sc.^{*}; M.R. Nikravesh, Ph.D.^{**}; M. Jalali, Ph.D.^{**}
H.R. Sadeghnia, Ph.D.^{***}; Z. Sargazi, M.Sc.^{*}

Received: 21.8.2014 Accepted: 16.12.2014

Abstract

Introduction & Objective: Diazinon (DZN) is an organophosphate insecticide that one of the mechanisms of toxicity is the inhibition of cholinesterase. The aim of the present study was to evaluate the effects of diazinon on cholinesterase activity in blood serum and erythrocytes of male and female rats and to assess the protective role of vitamin E.

Materials & Methods: In this experimental study, 60 adult wistar rats including 30 male and 30 female rats were selected and divided into 5 groups (n = 6): control group (without any intervention), sham group (received only pure olive oil daily), experimental group 1 (DZN daily, 60 mg/kg), experimental group 2 (received DZN+ vitamin E daily, with the same dose) and experimental group 3 (received vitamin E daily 200 mg/kg). Diazinon and solvent were injected intraperitoneally and vitamin E was given by gavage. After 2 weeks 3 ml blood was taken from the heart tissue, and titrimetric and Ellman's method respectively were used for serum and erythrocyte cholinesterases activity assay.

Results: In both genders, due to administration of diazinon, we observed significant reduction in serum and erythrocytes cholinesterase activity. The use of vitamin E increased serum and erythrocytes cholinesterase activity in experimental group 2 of female rats but inhibition in erythrocyte and serum cholinesterase activity was not recovered in experimental group 2 of male rats.

Conclusion: According to a further reduction of these enzymes activity in female rats with the use of diazinon, it can be concluded that female rats are more sensitive than male rats and it seems that vitamin E as an antioxidants has a protective effect on cholinesterase activity and reduces the toxicity of DZN.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2015; 21 (4):294-303)

Keywords: Cholinesterase / Diazinon / Rats / Vitamin E

^{*} M.Sc. student, Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine
Meshed University of Medical Sciences & Health Services, Meshed, Iran.

^{**} Professor, Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine
Meshed University of Medical Sciences & Health Services, Meshed, Iran. (nikraveshmr@mums.ac.ir)

^{***} Assistant Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine
Meshed University of Medical Sciences & Health Services, Meshed, Iran.