

## ***Pathology examination of liver and kidney in diazinon exposed rat and role of L- carnitine***

Mohammad Shokrzade<sup>1</sup> Ali Abbasi<sup>2</sup> Amir Shadborestan<sup>3</sup> Mahmoud Omid<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran

<sup>2</sup>Forensic Mazandaran

<sup>3</sup>Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

(Received January 5, 2013; Accepted February 20, 2013)

### ***Abstract***

**Background and purpose:** Diazinon, is the common name an organophosphorus pesticide (OP), used to control pest insects in soil, on ornamental plants, and on fruit and vegetable field crops. DZN induce oxidative stress leading to generation of free radicals and change in antioxidants system and caused pathological change in body.

The purpose of this study was to assess the protective effects of L-Carnitine against pathological change of kidney and liver induced by diazinon in rat

**Materials and methods:** In this study, used male Wistar rats in the range of  $200 \pm 250$  gr (n =5). Animals were randomly divided into 9 groups and received chemicals for 4 weeks intraperitoneally. After necropsy, liver and kidneys of all animals were isolated and fixed in 10% buffered formalin. Using examples of common practices pathology tissue sections, 5 microns thick sections by microtome and prepared for staining with hematoxylin - eosin were prepared.

**Results:** in the liver of groups that diazinon had received, focal hepatic necrosis was created. Exposure also causes dilation of sinusoids in the liver parenchyma. Liver and kidney pathology in the groups receiving doses of 50mg / kg carnitine as a control group.in a dose 150mg / kg central venous distention was seen in the liver. in the groups of receiving diazinon and L - carnitine central venous inflammation, congestion and necrosis were evident. The dose 150 mg / kg inflammation persists, but necrosis was significantly reduced. The pathology of the kidney tissue in the groups receiving diazinon showed inflammation and congestion

**Conclusion:** This study showed that diazinon has the ability to induced liver damage although damage to kidney tissue is lesser. It also was shown that L-carnitine in dose-dependent manner is able to reduced diazinon induced damage

**Keywords:** Diazinon, L-carnitine, Pathology, Rat

## بررسی پاتولوژیکی کبد و کلیه در موش های صحرایی تحت مواجهه با دیازینون و نقش ال-کارنیتین

دکتر محمد شکرزاده<sup>۱</sup>.....دکتر علی عباسی<sup>۲</sup>.....امیر شادبورستان<sup>۳</sup>.....محمود امیدی<sup>۳</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** دیازینون یکی از آفت کش های ارگانوفسفره است که می تواند از طریق القای استرس اکسیداتیو منجر به تولید رادیکال های آزاد شود و از این طریق تعادل سیستم آنتی اکسیداتی بدن را تغییر دهد. آنتی اکسیدان نقش مهمی در پیشگیری از آسیب های ناشی از رادیکال های آزاد ایفا می کنند. این مطالعه به ارزیابی اثر آنتی اکسیداتی ال-کارنیتین در موش های مواجهه یافته با دیازینون پرداخته است.

**مواد و روش ها:** این مطالعه روی موش های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار در محدوده ای وزنی ۲۵۰-۲۰۰g انجام گرفت (n=۵). حیوانات به مدت ۴ هفته مواد شیمیایی را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. بعد از کالبدگشایی کبد و کلیه تمامی حیوانات جداسازی شد و سپس در فرمالین بافری ۱۰ درصدی پایدار گردید. از نمونه های فوق با استفاده از شیوه های رایج پاساژ بافت و تهیه مقاطع آسیب شناسی، برش هایی با ضخامت ۵ میکرون توسط میکروتوم تهیه و جهت رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-ئوزین آماده گردیدند.

**یافته ها:** در کبد گروه هایی که دیازینون دریافت کرده بودند، نکروز فوکال و کانونی هپاتوسیت ها ایجاد گردید. همچنین باعث اتساع سینوزوئیدها و خونریزی در پارانشیم کبد گردید. پاتولوژی کبد و کلیه در گروه های دریافت کننده کارنیتین در دوز ۵۰ mg/kg مانند گروه کنترل بود در دوز ۱۵۰ mg/kg اتساع ورید مرکزی در کبد دیده شد. در گروه دیازینون و ال-کارنیتین التهاب ورید مرکزی، پرخونی و نکروز مشهود بود. در دوز ۱۵۰ mg/kg التهاب همچنان وجود داشت ولی نکروز به طور قابل ملاحظه ای کاهش یافته بود. در آسیب شناسی بافت کلیه نیز التهاب و پرخونی سینوزوئیدها در گروه دریافت کننده دیازینون وجود داشت.

**استنتاج:** این مطالعه نشان داد که دیازینون توانایی ایجاد آسیب در بافت کبد را داراست هر چند در بافت کلیه آسیب کمتری ایجاد کرد همچنین نشان داده شد که ال کارنیتین به صورت وابسته به دوز قادر است آسیب ناشی از دیازینون را در بافت کبد و کلیه کاهش دهد.

**واژه های کلیدی:** دیازینون، ال-کارنیتین، پاتولوژی، موش صحرایی

### مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره به طور وسیع در کنترل حشرات به کار می روند و قدیمی ترین ترکیبات شیمیایی هستند که به عنوان عوامل اعصاب در جنگ به کار برده شده اند (۱). شناخته شده ترین مکانیسم این ترکیبات مهار

آنزیم استیل کولین استراز است اما مکانیسم های دیگری از جمله تأثیر در متابولیسم چربی، کربوهیدرات و پروتئین و همچنین القای استرس اکسیداتیو هم پیشنهاد شده است (۲). مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره شامل سه فاز

**مؤلف مسئول:** امیر شادبورستان - گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

amir.shadboorestan@gmail.com

۱. گروه سم شناسی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. پزشکی قانونی استان مازندران

۳. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۱/۷/۲۲ تاریخ تصویب: ۹۱/۱۱/۱۷

مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره شامل سه فاز بحران حاد کولینرژیک، سندرم بینابینی و نوروپاتی تاخیری است (۳).

دیازینون یکی از آفت کش های ارگانوفسفره است که به منظور کنترل حشرات در خاک، گیاهان زینتی و یا در میوه و سبزیجات به کار می رود. دیازینون یک ترکیب سنتتیک بوده و در محیط به شکل طبیعی ایجاد نمی شود (۴).

مطالعات اخیر نشان داده اند که سمیت حاد و مزمن ترکیبات ارگانوفسفره از جمله دیازینون از طریق القای استرس اکسیداتیو منجر به تولید رادیکال های آزاد شود و از این طریق تعادل سیستم آنتی اکسیداتی بدن را تغییر دهد و به دنبال آن، شرایط ایجاد تغییرات پاتولوژیک در بدن فراهم می آید (۵).

مواجهه با دیازینون باعث آسیب های هستوپاتولوژیک شدیدی در کلیه، کبد و مغز می شود. نشان داده شده است که مواجهه طولانی مدت خرگوش با دیازینون باعث التهاب فوکال و فیروز در کلیه و کبد می شود (۶). ترکیبات آنتی اکسیدان نقش مهمی در پیشگیری از آسیب های ناشی از رادیکال های آزاد ایفا می کنند. ال- کارنیتین از استرس اکسیداتیو جلوگیری می کند و تنظیم کننده نیتریک اسید، تنفس سلولی و فعالیت آنزیم های دخیل در استرس اکسیداتیو است. همچنین ال- کارنیتین دارای اثر حفاظت کنندگی روی فعالیت آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز و نیز فعالیت آنزیم های آنتی اکسیداتی کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز در مقابل نورو توکسیسیته ناشی از ۳-NPA است (۷۸). سیستم آنتی اکسیداتی از سه آنزیم تشکیل شده است که عبارتند از: گلو تاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز. ال- کارنیتین در نقش آنتی اکسیداتی می تواند این آنزیم ها را در مقابل

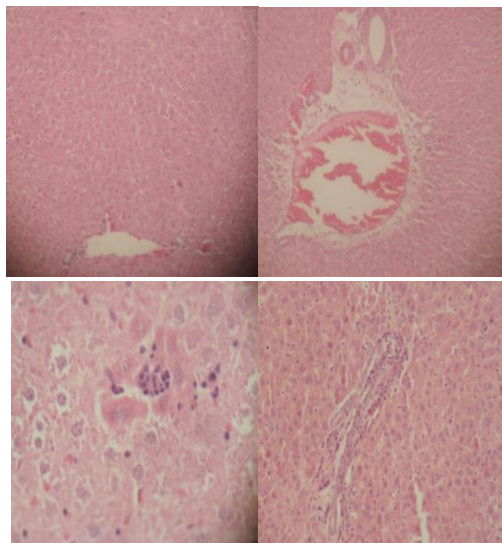
آسیب های اکسیداتیو حفاظت کرده و نیز در تعدیل تغییرات مرتبط با سن بسیار موثر باشد (۹). به علاوه مطالعات اخیر نشان داده است استیل ال کارنیتین (استر اسیل زنجیر کوتاه) باعث افزایش یادگیری در حیوانات مسن، بهبود علائم اختلالات دژنراتیو عصبی از جمله آلزایمر و تقلیل آسیب های نرولوژیک به دنبال ایسکمی می گردد (۱۰).

منابع غذایی کارنیتین بسیار مهم هستند. تقریباً ۷۵ درصد از کل کارنیتین بدن از منابع غذایی کارنیتین، لیزین و متیونین دار تامین می شود (۱۱). وضعیت کارنیتین در بدن انسان تابع ترکیب بدن، جنس و رژیم غذایی است. دو منبع رژیم غذایی و تجزیه پروتئین های اندوژن برای این آمینو اسیدها وجود دارد (۱۲). ریز مغذی ها از جمله ویتامین C، آهن، پیریدوکسین و نیاسین برای سنتز کارنیتین ضروری هستند. جذب غذایی کارنیتین در دستگاه گوارش تابع مصرف خوراکی آن است برای مثال در رژیم های غذایی با مقدار بالای کارنیتین (بیش از ۶ گرم) تقریباً ۱۵-۵ درصد کارنیتین جذب می شود. در عوض در رژیم های غذایی با کارنیتین پایین (کمتر از ۱ گرم) بیش از ۷۵ درصد آن جذب می شود (۱۲). با توجه به اینکه ترکیبات ارگانوفسفره واز جمله دیازینون از طریق تولید رادیکال های آزاد و استرس اکسیداتیو منجر به آسیب در بدن می شوند در این مطالعه به ارزیابی اثر آنتی اکسیداتی ال- کارنیتین در موش های مواجهه یافته با دیازینون پرداخته شد.

## مواد و روش ها

مواد شیمیایی: ال- کارنیتین، فرمالین، از شرکت مرک و دیازینون تکنیکال با درجه خلوص ۹۵ درصد از شرکت گل سم گرگان خریداری شد. این مطالعه روی موش های صحرایی نر نژاد ویستار سن ۸ تا ۱۰

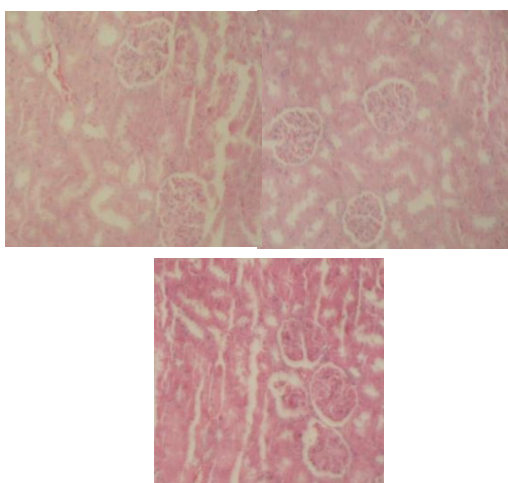
داشت ولی نکروز به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته بود (تصویر شماره ۱). در آسیب‌شناسی بافت کلیه نیز التهاب و پرخونی سینوزوئیدها در گروه دریافت‌کننده دیازینون وجود داشت. تفاوت معناداری بین گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده روغن سویا دیده نشد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: بافت کبد

گروه کنترل کبد (A) دیازینون ۲۰ mg/kg (B)

ال کارنیتین ۱۵۰ mg/kg (C) دیازینون و ال کارنیتین ۵۰ mg/kg (D)



تصویر شماره ۲: بافت کلیه

گروه کنترل (A) دیازینون ۲۰ mg/kg (B)

دیازینون و ال کارنیتین ۱۵۰ mg/kg (C)

هفته و وزن  $225 \pm 250$  گرم پس از انتقال از انستیتو پاستور آمل به حیوان خانه دانشکده داروسازی ساری به ۹ گروه ۵ تایی تقسیم شده و در قفس‌های مربوطه قرار گرفتند و به مدت یک هفته به منظور عادت کردن حیوانات به محیط جدید بدون هیچ‌گونه تزریقی نگهداری شدند. سپس به مدت ۴ هفته مواد ذیل را که به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه ۱ (نرمال سالین)، ۲ (روغن سویا)، ۳ (دیازینون ۲۰ mg/kg)، گروه‌های ۴، ۵ و ۶ (دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ mg/kg ال-کارنیتین)، و گروه‌های ۷ و ۸ و ۹ (دوزهای ۱۰۰، ۵۰، ۱۵۰ mg/kg ال-کارنیتین + دیازینون ۲۰ mg/kg).

بعد از کالبدگشایی، کبد و کلیه تمامی حیوانات جداسازی شد. سپس در فرمالین بافری ۱۰ درصدی پایدار گردید. از نمونه‌های فوق با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافت و تهیه مقاطع آسیب‌شناسی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون توسط میکروتوم تهیه و جهت رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین آماده گردید. و نمونه‌های بافتی توسط پاتولوژیست بررسی شد (بزرگنمایی تصاویر  $\times 400$ ).

## یافته‌ها

در کبد گروه‌هایی که دیازینون دریافت کرده بودند، نکروز فوکال و کانونی هپاتوسیت‌ها ایجاد گردید. همچنین باعث اتساع سینوزوئیدها و خونریزی در پارانشیم کبد گردید. پاتولوژی کبد و کلیه در گروه‌هایی دریافت‌کننده کارنیتین در دوز ۵۰ mg/kg مانند گروه کنترل بود و در دوز ۱۵۰ mg/kg اتساع ورید مرکزی در کبد دیده شد. در گروه دیازینون و ال-کارنیتین التهاب ورید مرکزی، پرخونی و نکروز مشهود بود. در دوز ۱۵۰ mg/kg التهاب همچنان وجود

بحث

غذایی موش صحرائی باعث بهبود وضعیت آنتی اکسیدانتی در آن‌ها شد (۱۴).

Augustyniak و همکاران در مطالعه‌ای اثر حفاظتی ال-کارنیتین بر استرس اکسیداتیو ناشی از اتانول را بررسی کردند. در مطالعه آن‌ها الکل باعث افزایش سطوح MDA، ۴-HNE و کاهش سطح ویتامین E و گلوکاتایون می‌شود و تجویز ال-کارنیتین سطوح MDA و ۴-HNE را کاهش و منجر به افزایش سطح گلوکاتایون احیا می‌شود (۱۵). نتایج حاصل از این تحقیقات با نتایج ما هم خوانی دارد و نشان دهنده‌ی این امر است که ال-کارنیتین توانایی افزایش سطح گلوکاتایون را دارد.

از نظر بررسی پاتولوژیکی نشان داده شد که دیازینون باعث نکروز در هیپاتوسیت‌ها می‌شود که این امر در مطالعات مختلفی نشان داده شده است. علاوه بر این دیازینون در بافت کلیه باعث پرخونی و التهاب گردید که با مطالعه انجام شده توسط Shah و همکاران هم‌خوانی داشت که در مطالعه مذکور توانایی دیازینون در تولید رادیکال آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو را مهمترین علت این امر دانسته بودند. ال کارنیتین به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدانت که قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد است قادر به کاهش آسیب‌های ناشی از دیازینون در بافت‌های کبد و کلیه است.

Shah و همکاران نشان دادند که دیازینون (۳۰، ۱۵ و ۱۰ mg/kg به مدت ۸ هفته) به صورت وابسته به دوز باعث کاهش سطح گلوکاتایون احیا می‌گردد که این امر ناشی از کاهش فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم گلوکاتایون و نیز افزایش سطح اکسیدانت‌ها در کلیه می‌باشد. تمامی دوزهای دیازینون که در این تحقیق به کار رفتند باعث ایجاد التهاب و محو فضای کپسول بومن، nuclear pycnosis، تخریب سلول‌های اپیتلیال کلیوی، نکروز پروگزیمال لوله‌های کلیوی و انسداد وریدها شدند (۱۳).

هر چند در این بررسی دیازینون تنها باعث ایجاد التهاب گردید ولی نتوانست تغییر قابل ملاحظه‌ای در کلیه موش‌های صحرائی ایجاد کند به نحوی که نکروز و تخریب سلول‌های اپیتلیال قابل مشاهده نبود.

Gulcin در مطالعه‌ای به بررسی اثرات آنتی اکسیدانتی و آنتی رادیکالی ال-کارنیتین پرداخته است. وی نشان داد که این ترکیب می‌تواند باعث از بین رفتن رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروژن پراکسید می‌شود. همچنین ال-کارنیتین می‌تواند از لیپید پراکسیداسیون ممانعت کند (۷).

Arockia Rani و همکاران در یک بررسی نشان دادند که در پیری سطح گلوکاتایون، آسکوربیک اسید و ویتامین E کاهش می‌یابد. افزودن ال-کارنیتین به رژیم

References

1. Moshiri M , Darchini-Maragheh E, Balali-Mood M. Advances in toxicology and medical treatment of chemical warfare nerve agents. DARU 2012;20(1):81.  
2. Karami-Mohajeri S, Abdollahi M. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular

metabolism of lipids, proteins and carbohydrates: a systematic review. Hum Exp Toxicol 2011; 30(9):1119–1140.  
3. Karami-Mohajeri S, Abdollahi M. Mitochondrial dysfunction and organophosphorus compounds . Toxicol Appl Pharmacol 2013. pii: S0041-008X(13)00134-8.

- doi: 10.1016/j.taap.2013.04.001. [Epub ahead of print]
4. Elmazoudy R.H, Attia A.A. Endocrine-disrupting and cytotoxic potential of anticholinesterase insecticide, diazinon in reproductive toxicity of male mice. *J Hazard Mater* 2012; 209–210: 111–120.
  5. Razavi B.M, Hosseinzadeh H, Movassaghi AH, Imenshahidi M, Abnous K. Protective effect of crocin on diazinon induced cardiotoxicity in rats in subchronic exposure. *Chem Biol Interact* 2013. pii: S0009-2797(13)00071-9. doi: 10.1016/j.cbi.2013.03.010. [Epub ahead of print]
  6. Tsitsimpikou C, Tzatzarakis M, Fragkiadaki P, Kovatsi L, Stivaktakis P, Kalogeraki A, et al. Histopathological lesions, oxidative stress and genotoxic effects in liver and kidneys following long term exposure of rabbits to diazinon and propoxur. *Toxicology* 2012. pii: S0300-483X(12)00385-X. doi: 10.1016/j.tox.2012.11.002. [Epub ahead of print]
  7. Kolodziejczyk J, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. L-carnitine protects plasma components against oxidative alterations. *Nutrition*. 2011; 27(6): 693–9.
  8. Ribas G, Manfredini V, Marco M, Vieira R, Wayhs C, Vanzin C, et al. Prevention by l-carnitine of DNA damage induced by propionic and l-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. *Mutat Res* 2010; 702(1):123–128
  9. Arokia Rani P, Panneerselvam C. Carnitine as a free radical scavenger an aging. *Exp Gerontol* 2001; 36(10): 1713-26.
  10. Jones L, McDonald D, Boruma P. Acylcarnitines: Role in brain. *Prog Lipid Res* 2010;49(1):61-75.
  11. Steiber A, Kerner J, Hoppel C. Carnitine: a nutritional, biosynthetic and functional perspective. *Mol Aspects Med* 2004; 25(5-6):455-73.
  12. Sayed-Ahmed M. Role of carnitine in cancer chemotherapy-induced multiple organ toxicity. *Saudi Pharm J* 2010; 18(4): 195–206
  13. Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* 2010 ;48(12):3345-53
  14. Augustyniak A, Skrzydlewska E. L-Carnitine in the lipid and protein protection against ethanol-induced oxidative stress. *Alcohol* 2009;43(3):217-23