ORIGINAL ARTICLE

The Protective Effect of N-Acetyl Cysteine on Glutathione Levels and Serum Cholinesterase in Acute Poisoning of Diazinon, in mice

Mohammad Shokrzade[1], Nasrin Pakravan[1], S.Camellia Sheikholeslamian[2]

[1] Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran
[2] Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran

(Received January 15, 2013; Accepted February 11, 2013)

Abstract

Background and Purpose: The wide spread usage of pesticides for improving agricultural programs is a risk factor of acute and chronic human poisoning, especially farmers. Diazinon is one of the most common organophosphates insecticides that cause oxidative stress and lipid peroxidation. The mechanism of organophosphates is postulated to be non-irreversible anticholinesterase action. This study is about the protective effect of N-Acetyl cysteine (NAC) on glutathione levels and serum cholinesterase in acute poisoning of diazinon in mice.

Materials and Methods: This study was performed on 30-40gr weight male mices. The animals were randomly divided into 7 groups (n=5). The following chemicals were injected intraperitoneally: group 1(Normal salin), 2(Soya oil), 3(Diazinon 20 mg/kg), 4(NAC 100mg/kg),5(NAC 100mg/kg + Diazinon 20mg/kg),6(Pralidoxim 20mg/kg + Diazinon 20mg/kg),7(Pralidoxim 20 mg/kg + Diazinon 20 mg/kg +NAC 100mg/kg).

24 hours after last injection, the animals were sacrificed after receiving ketamine anesthesia then their liver tissues were removed. Furthurmore, Glutathione (GSH) level were determined by Elman method. After injury, 3ml blood from the heart tissue was taken with heparin syringe and cholinesterase inhibition activity was determined by Elman method.

Results: in comparison with the control group, an increased level of glutathione and blood cholinesterase was observed in the cases; although this increasing was not significant ($p>0.05$).

Conclusion: It seems that NAC has a protective effect on anticholinesterase activity and body's antioxidant status against organophosphate pesticide, such as diazinon. The protective effect was not significant in acute poisoning .The confined opportunity of the cell to utilize cysteine as the substrate in producing glutathione may be considered as the main reason of this process.

Keywords: Organophosphate, Glutathione (GSH), Cholinesterase, N-Acetyl cysteine

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(suppn-2): 2-11 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم ویژه نامه۲ اسفند ۱۳۹۱ (۱۱-۲)

بررسی اثر حفاظتی N ـ استیل سیستئین بر سطح گلوتاتیون کبد و آنزیم استیل کولین استراز خون در موش سوری، در مسمویت حاد ناشی ازدیازینون

محمد شکرزاده[۱] نسرین پاکروان[۱] سیده کاملیا شیخ الاسلامیان[۲]

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از آفت کش ها به منظور ارتقاء سطح تولیدات غذایی سبب بروز مسمومیت به شکل حاد و مزمن در افراد مخصوصاً کشاورزان شده است. دیازینون از پرکاربردترین سموم ارگانوفسفره می‌باشد که باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی می گردد. مهار برگشت ناپذیر آنزیم کولین استراز نیز از مکانیسم‌های اصلی مسمومیت با این ترکیبات است. هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی N- استیل سیستئین بر سطح گلوتاتیون کبد و آنزیم استیل کولین استراز خون در موش سوری، در مسمویت حاد ناشی ازدیازینون می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه روی موش‌های آزمایشگاهی نر در محدوده‌ی وزنی ۴۰gr-۳۰ انجام شد. نمونه‌ها به طور تصادفی به ۷ گروه (۵ تایی) تقسیم شده بودند و تزریقات داخل صفاقی به صورت زیر انجام شد: گروه ۱ـ نرمال سالین ۲ـ روغن سویا ۳ـ دیازینون (۲۰ mg/kg) ۴ـ N استیل سیستئین (۱۰۰ mg/kg) ۵ ـ N ـ استیل سیستئین (۱۰۰ mg/kg) + دیازینون (۲۰ mg/kg) ۶ ـ پرالیدوکسیم (۲۰ mg/kg) + دیازینون (۲۰ mg/kg) ۷ـ پرالیدوکسیم (۲۰ mg/kg) + دیازینون (۲۰ mg/kg) + N ـ استیل سیستئین (۱۰۰ mg/kg).۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق با بیهوش نمودن حیوانات، بافت کبدی خارج و ۳ ml خون از قلب حیوان نیز گرفته شد که به ترتیب میزان گلوتایتون احیا (GSH) و مهار آنزیم کولین استراز با استفاده از روش Elman در آن‌ها اندازه گیری شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از اثر دیازینون و N ـ استیل سیستئین بر سطح گلوتاتیون احیاء و استیل کولین استراز خون نشان می‌دهد که دیازینون در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش سطح گلوتاتیون و کولین استراز خون می‌شود و دریافت N- استیل سیستئین سبب افزایش هر دو مورد می گردد. گرچه این افزایش معنی‌دار نبوده است ($P > ۰/۰۵$).

استنتاج: N- استیل سیستئین باعث بهبود مهار استیل کولین استراز و وضعیت آنتی اکسیدانتی بدن در مقابل سم ارگانو فسفره دیازینون می‌شود و از طریق افزایش گلوتاتیون احیاء در سمیت زدایی رادیکال‌های آزاد ناشی ازدیازینون مؤثر است ولی این اثر حفاظتی در مسمومیت حاد، از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد که شاید بتوان علت آن را در فرصت کمی که در اختیار سلول است تا از سیستئین به عنوان پیش سازگلوتاتیون استفاده کند، دانست.

واژه های کلیدی: ارگانوفسفره، گلوتاتیون، کولین استراز، N ـ استیل سیستئین

مقدمه

آفت کش‌ها در کنترل حشرات مضر نقش مهمی دارند. در نتیجه به طور وسیعی در کشاورزی و بهداشت برای حفظ سلامت محصول و از بین بردن حشرات مضر و عوامل ناقل بیماری استفاده می گردند. استفاده گسترده

مولف مسئول: سیده کاملیا شیخ الاسلامیان – ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی
E-mail: eslami.camellia@yahoo.com

۱. مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۱۰/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۱/۱۱/۲ تاریخ تصویب : ۱۳۹۱/۱۱/۲۳

باعث بروز مسمومیت ناشی از آن‌ها به صورت حاد و مزمن شده است. WHO شیوع مسمومیت با آفت کش‌ها در طی دهه اخیر در کشورهای توسعه یافته را دو برابر گزارش کرده است. از میان تمامی آفت کش‌ها، ترکیبات ارگانوفسفره بیشترین سمیت را در مهره داران دارند(۱).

دو آنزیم توانایی هیدرولیز استیل کولین را دارند: کولین استراز حقیقی و کولین استراز کاذب. این آنزیم‌ها بر اساس منشأشان به ترتیب کولین استراز موجود در گلبول قرمز و کولین استراز سرمی نامیده می‌شوند(۲). اثرات مهاری حشره کش‌های ارگانوفسفره به کولین استراز به خوبی شناخته شده است. یکی از این حشره کش‌ها دیازینون می‌باشد که در مواد صنعتی و خانگی بسیار پرکاربرد است(۳). کشاورزان و کارگران صنایع شیمیایی بیشترین موارد مسمومیت استنشاقی یا تماسی با این مواد را دارند. مسمومیت با این سموم بخش عمده‌ای از موارد مسمومیت را تشکیل می‌دهد در نتیجه تعیین سطح فعالیت استیل کولین استراز خون از مهم ترین روش‌های شناسایی مسمومیت با این مواد می‌باشد(۴). سمیت ناشی از دیازینون در حیوانات با اندازه گیری فعالیت کولین استراز خون، گلبول قرمز و مغز تخمین زده می‌شود(۳).

چهار مرحله در مسمومیت با سموم ارگانوفسفره مشاهده می‌شود: که سه مرحله اول آن حاد و مرحله آخر آن مزمن است(۵).

- بحران کولینرژیکی حاد (Acute cholinergic crisis)
- سندرم بینابینی (Intermediate syndrome)
- نوروپاتی تأخیری القاء شده توسط ارگانوفسفره (organophosphate induced delayed uropathy)
- اختلال عصبی روانی مزمن القاء شده توسط ارگانوفسفره (Chronic organophosphate induced disorder)

برخی از سموم ارگانوفسفره نظیر دیازینون قادر به تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد اختلالاتی در سیستم آنتی اکسیدانتی بدن می‌باشند. به طور طبیعی آنتی اکسیدانت‌های آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک نظیر SOD[1]، CAT[2]، GST[3] و GSH[4] با اثرات تخریبی ناشی از رادیکال‌های آزاد مقابله می‌کنند(۶). گلوتاتیون در داخل سلول‌ها از اتصال ۳ اسید آمینه سیستئین، گلوتامات و گلایسین ساخته می‌شود و یکی از ساده‌ترین پروتئین‌هاست. در عین حال گلوتاتیون اصلی ترین آنتی اکسیدانت بدن جانوران است(۷).

اگر عاملی تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم آنتی اکسیدانتی بدن را بر هم بزنند، استرس اکسیداتیو رخ داده و به دنبال آن شرایط پاتولوژیک بدن تغییر می‌کند. مطالعات مختلف حاکی از آن است که ترکیبات ارگانوفسفره سبب بروز استرس اکسیداتیو می‌شوند(۸). N- استیل سیستئین یک ترکیب سولفیدریلی و مشتقی از اسید آمینه L- سیستئین می‌باشد که خواص آنتی اکسیدانتی دارد. N- استیل سیستئین برای جلوگیری یا کاهش صدمات کبدی ناشی از دریافت استامینوفن و هم چنین به عنوان یک ترکیب موکولیتیک که سبب کاهش ویسکوزیته موکوس می‌گردد، استفاده می‌شود(۹).

Oksay و همکاران دریافتند که N- استیل سیستئین بر استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در تستیس موشهای صحرایی که به مدت یک ماه دیازینون دریافت می‌کردند اثر محافظتی دارد (۱۰). اثر حفاظتی α توکوفرول و N-استیل سیستئین در موش‌هایی که به صورت تحت مزمن، به مدت ۴ هفته دیازینون دریافت کرده بودند، توسط شادنیا و همکاران، مشخص شد(۱۱). لذا مسمومیت با این سموم بخش عمده ای از موارد مسمومیت را تشکیل می دهد. در نتیجه تعین فعالیت استیل کولین استراز خون از مهمترین روش‌های شناسایی مسمومیت با این مواد می‌باشد(۴). هدف این مطالعه بررسی اثر حفاظتی N- استیل سیستئین بر سطح گلوتاتیون کبد و آنزیم استیل کولین استراز خون در

1. Super oxide dismutase
2 . Catalase
3 . Glutathione S-Transferase
4. Glutathione

موش سوری، در مسمویت حاد ناشی ازدیازینون می‌باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی روی موش‌های سوری نر با سن ۸ تا ۱۰ هفته و وزن ۴۰-۳۰ گرم (وزن شده توسط ترازوی sarturius با دقت ۰/۰۰۱) انجام شد. نمونه‌ها نیز به طور تصادفی به ۷ گروه تقسیم شده بودند که در هر گروه ۵ موش قرار گرفت. تعداد نمونه‌ها بیش از ۳ موش انتخاب شد تا میانگین و انحراف معیار با دقت بیشتری محاسبه شود. تزریقات داخل صفاتی (IP) به صورت زیر انجام شد:

گروه‌های ۱-نرمال سالین ۲-روغن سویا (حلال دیازینون) ۳-دیازینون به میزان (۲۰ mg/kg) (۱۲) ۴-N-استیل سیستئین (۱۰۰ mg/kg) ۵-N-استیل سیستئین (۱۰۰ mg/kg) + دیازینون (۲۰ mg/kg) ۶-پرالیدوکسیم (۲۰ mg/kg) + دیازینون (۲۰ mg/kg) ۷-پرالیدوکسیم (۲۰ mg/kg)+ دیازینون (۲۰ mg/kg) + N-استیل سیستئین (۱۰۰ mg/kg)(۱۳ و ۱۴).

پس از انجام محاسبات برای یک موش سوری با وزن ۴۰ گرم، ۲۰ mg/kg از دیازینون با دانسیته ۱/۱ gr/cm^3، معادل ۰/۸ mg یا ۰/۰۰۰۷ ml می‌شود که با حل کردن در ۱۰۰ سی سی روغن سویا آماده شد. هم چنین ۱۰۰ mg/kg از N-استیل سیستئین با دانسیته ۷۳۰gr/ml معادل ۴ mg یا ۰/۰۰۶ میکرولیتر و ۲۰ mg/kg پرالیدوکسیم (ویال 1gr/20 ml) معادل ۰/۰۱۶ ml شد (دانسیته مواد طبق اعداد درج شده توسط کارخانه سازنده می‌باشد).

۲۴ ساعت پس از تزریق، ۱۰ میلی لیتر از کتامین با غلظت ۱۰۰ mg/kg و ۱/۵ میلی لیتر از زایلزین با همان غلظت را با هم مخلوط کرده و از ترکیب حاصله ۰/۱ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن حیوان به صورت داخل صفاقی تزریق شده که این ماده نیم ساعت به حیوان بیهوشی عمومی می‌دهدو پس از بیهوشی جراحی گردیدند(۱۵).

بلافاصله پس از شکافتن شکم و سینه حیوان، ۳ میلی‌لیتر خون با سرنگ هپارینه (میزان هپارین مورد نیاز به ازای هر میلی‌لیتر خون بین ۱۰۰-۲۵ واحد می‌باشد) از قلب حیوان اخذ و برای سنجش میزان مهار آنزیم کولین استراز از روش Elman، استفاده شد. بدین منظور پس از خون گیری از حیوان و سانتریفیوژ کردن (۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه) نیمی توسط همولیزات، ۳ میلی لیتر از واکنشگر DTNB (۵ ـ ۵ دی تیوبیس ۲-نیترو بنزوئیک اسید) و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استیل تیوکولین یداید در لوله‌ای شیشه‌ای به مدت ۱۰ ثانیه در حمام آبی ۳۷ درجه گذاشته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول همولیز برای شروع واکنش به آن اضافه شد.

لوله شیشه‌ای در حمام آب ۳۷ درجه قرار داده شد و دقیقاً پس از گذشت ۱۰ دقیقه، یک میلی لیتر واکنشگر متوقف کننده (که از حل نمودن ۴۳ میلی مول بر لیتر (۳۰ گرم در لیتر) هیامین ۱۶۲۲ در آب مقطر یا محلول اشباع سولفات کینیدین (حدود ۷ گرم) در لیتر تهیه شد) به مجموعه اضافه شد. محتویات داخل لوله شیشه‌ای بهم زده شد و به خارج از حمام آبی منتقل گشت. نمونه‌های بلانک نیز دقیقاً مطابق با روش مذکور 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، لذا بدین ترتیب 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(۱۶).

برای اندازه‌گیری گلوتاتیون احیاء نیز از روش Elman استفاده شد. بدین منظور ۰/۱ گرم از کبد موش را به لوله هموژ نایزر منتقل،۱ میلی لیتر EDTA به آن افزوده شد و چند بار عمل هموژن کردن صورت گرفت تا مخلوط یکنواختی به دست آمد. سپس محتویات آن به لوله سانتریفیوژ منتقل و ۰/۵ میلی لیتر دیگر EDTA به آن اضافه شد. در مرحله بعد ، به لوله سانتریفیوژ ۱/۵ میلی لیتر TCA با خلوص ۱۰ درصد اضافه شد. سپس لوله‌ها در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس یک میلی لیتر از محلول رویی به لوله سانتریفیوژ دیگر منتقل گردید و به آن ۲/۵ میلی لیتر بافر تریس ۰/۴ مولار (PH=۸/۹) و ۰/۵ میلی لیتر DTNB اضافه شد. لوله به آرامی تکان داده شد تا رنگ زرد یکنواختی در آن پدیدار گردیده بود. در نهایت جذب محلول حاصل در طول موج ۴۲۱ nm قرائت شد. با مقایسه جذب حاصل با منحنی استاندارد، غلظت گلوتاتیون محاسبه و براساس میکرومول بر هر گرم وزن کبد ($\mu mol/g$) ارائه شد(۱۷).

مواد شیمیایی: N- استیل سیستئین، گلوتاتیون استاندارد، دی تیوبیس نیتروبنزوئیک اسید (DTNB)، بافر تریس (تری کلرواستیک اسید PH=۸/۹)، EDTA و پرالیدوکسیم همه از شرکت MERCK، استیل تیوکولین یداید، هیامین ۱۶۲۲ و سولفات کینیدین از شرکت Fluka (سوئیس) و ویال کتامین و زایلزین از دارو پخش خریداری شد. دیازینون با خلوص ۹۵ درصد با مارک Fortoun چین نیز از شرکت گل سم گرگان دریافت شد. هپارین، سرنگ و سایر نیازمندی‌ها در مرحله خونگیری مثل پنبه، الکل، گاز و غیره از داروخانه‌ها تهیه گردید. قرائت میزان جذب توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر Shimadzu UV – mini ۱۲۴۰ ساخت ژاپن و عملیات سانتریفیوژ به کمک دستگاه Hettich Universal ساخت آلمان انجام شد.

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۱۸ و با استفاده از آزمون آماری One way ANOVA و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند و (P <۰/۰۵) به عنوان سطح معنی داری تلقی گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از اثر دیازینون و N- استیل سیستئین بر گلوتاتیون نشان می‌دهد که بیشترین مقدار مربوط به گروه کنترل و کمترین مقدار مربوط به گروه دریافت کننده دیازینون بود و دیازینون در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی داری (P <۰/۰۵). در سطح گلوتاتیون شده بود(جدول ۱).

همچنین نتایج نشان دادند که N- استیل سیستئین به تنهایی سبب افزایش سطح گلوتاتیون نسبت به گروه کنترل (که فقط روغن سویا دریافت کرده بودند) شده بود (P <۰/۰۵). استفاده از N- استیل سیستئین پس از مسمومیت با دیازینون سبب افزایش سطح گلوتاتیون نسبت به گروه دریافت کننده سم شد، ولی این افزایش معنی دار نبود. به طور مشابه استفاده از پرالیدوکسیم (ترکیبی که سبب بازگشت فعالیت استیل کولین استراز باند شده به سموم ارگانو فسفره می‌گردد) سبب افزایش غیر معنی داری در سطح گلوتاتیون نسبت به گروه دریافت کننده دیازینون شد، هرچند این مقدار کمتر از حالتی بود که از N- استیل سیستئین استفاده شد. استفاده هم زمان از پرالیدوکسیم و N- استیل سیستئین نیز سبب افزایش سطح GSH گشت ولی این افزایش هم معنی دار نبود. اما مقدار این افزایش از ۲ گروه قبلی بیشتر بود.

نتایج حاصل از اثر دیازینون و N- استیل سیستئین بر کولین استراز سرم در جدول شماره ۲ آمده است. بیشترین مقدار مربوط به گروه کنترل و کمترین مقدار مربوط به گروه دریافت کننده دیازینون می باشد. نتایج حاکی از آن است که دیازینون در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی

داری (P <۰/۰۵) در سطح گلوتاتیون شده بود. N - استیل سیستئین پس از مسمومیت با دیازینون سبب افزایش کولین استراز سرمی نسبت به گروه دریافت کننده سم گردید، ولی این افزایش معنی دار نبود.

اگرچه استفاده هم زمان از N- استیل سیستئین و پرالیدوکسیم سبب افزایش سطح کولین استراز شد و افزایش آن از حالتی که پرالیدوکسیم و N- استیل سیستئین به تنهایی استفاده شدند، بیشتر بود ولی سطح آن معنی دار نبود.

جدول شماره ۱: میزان گلوتاتیون کبدی (GSH) در حیوانات مواجهه یافته با دیازینون (DAZ)، N ـ استیل سیستئین (NAC) و پرالیدوکسیم

ردیف	گروه‌ها	میانگین و انحراف معیار (µmo/gr)
۱	Normal Salin	0.324±0.015
۲	Soya Oil	0.341±0.017
۳	DAZ(20mg/kg)	0.283±0.023
۴	NAC(100mg/kg)	0.338±0.023
۵	NAC(100mg/kg)+DAZ(20mg/kg)	0.295±0.030
۶	Prad(20mg/kg)+DAZ(20mg/kg)	0.291±0.017
۷	Prad(20mg/kg)+NAC(100mg/kg)+DAZ(20mg/kg)	0.315±0.012

جدول شماره ۲: میزان کولین استراز خون حیوانات مواجهه یافته با دیازینون (DAZ)، N ـ استیل سیتسئین (NAC) و پرالیدوکسیم

ردیف	گروه ها	انحراف معیار± میانگین واحد کولین استراز خون
۱	Normal Salin	5155.667±753.673
۲	Soya Oil	3738.333±217.415
۳	DAZ(20mg/kg)	263.333±10.599
۴	NAC(100mg/kg)	3436.521±96.521
۵	NAC(100mg/kg)+DAZ(20mg/kg)	825.672±8.505
۶	Pralidoxime(20mg/kg)+DAZ(20mg/kg)	646.931±11.590
۷	Pralidoxime(20mg/kg)+NAC(100mg/kg)+DAZ(20mg/kg)	738.462±17.214

بحث و نتیجه گیری

در بدن جانوران همواره تحت تأثیر واکنش‌های مختلف یا عوامل محیطی، اکسی رادیکال‌های آزاد مختلف با اوربیتال خارجی جفت نشده تولید می‌شود. این اوربیتال مولکولی خالی در اکسیژن یا در نیتروژن وجود دارد که به ترتیب Reactive oxygen species یا Reactive Nitrogen Species, ROS یا RNS گفته می‌شود(۱۸).

رادیکال‌های آزاد در شرایط استرس اکسیداتیو افزایش یافته و باعث آسیب به پروتئین‌ها، نوکلئیک اسید و غشاء سلولی و ... می‌شوند(۱۹).

از منابع خارجی رادیکال‌های آزاد می‌توان به سیگار، اشعه یونیزان، آلوده کننده‌های محیط، حلال‌های آلی مثل تتراکلرید کربن و سموم دفع آفات نظیر ارگانوفسفره‌ها و... اشاره کرد(۲۰).

انواع آنتی اکسیدانت‌ها مثل سوپر اکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در میتوکندری و سیتوزول، کاتالاز در پراکسی زوم‌ها، گلوتاتیون که عمدتاً در سیتوپلاسم است، پروتئین متصل به فلزات، α توکوفرول (Vit E)، کاروتنوئیدها و عناصری نظیر سلنیوم یا منگنز و ... در غلظت‌های کم با سوبسترا اکسید شونده رقابت می‌کنند و به طور معنی داری اکسیداسیون آن سوبسترا را به تأخیر می اندازند(۲۱،۲۲).

همان طور که ذکر شد گلوتاتیون که ترکیبی از ۳ اسید آمینه L-glycine، L-Cysteine و L-glutamate

است، در حالت طبیعی به فرم احیاء شده اش یافت می‌شود و تعادلی با فرم اکسید شده و دی سولفیدی یعنی GSSG دارد. GSH بعد از اکسید شدن به GSSG تبدیل می‌شود. موادی مانند ویتامین C، ویتامین E، اوروکینون-۱ و... می‌توانند این مسیر را معکوس کنند تا مجدداً گلوتاتیون اولیه یا همان GSH تولید شود(۲۳).

اسید آمینه سیستئین که در ساختار گلوتاتیون نیز وجود دارد، به طور آزاد سمی است و در لوله معدی روده‌ای و یا پلاسمای خون کاتابولیزه و تخریب می‌شود اما اگر به صورت دی پپتید سیستئین - سیستئین در آید بسیار پایدارتر است و بدون آنکه کاتابولیسم شود از لوله معدی روده‌ای جذب شده و در جریان خون سیستمیک حرکت می‌کند با اتصال پیوند دی سولفیدی و تشکیل دی پپتید سیستئین، جفت الکترون‌های سیستئین درگیر پیوند با یکدیگر می‌شوند و قابلیت آنتی اکسیدانتی خود را از دست می‌دهند. بنابراین سنتز ترکیب پایداری مثل گلوتاتیون می‌تواند تا علاوه بر پایداری، به طور رقابتی رادیکال‌های آزاد را مهار نماید(۲۴).

N - استیل سیستئین به علت دارا بودن اسید آمینه سیستئین به عنوان یکی از پیش سازهای گلوتاتیون خواص آنتی اکسیدانتی دارد(۲۵). دیازینون از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد باعث القای استرس اکسیداتیو می‌شود. هم چنین مهار آنزیم استیل کولین استراز از مکانیسم‌های اصلی مسمومیت ناشی از دیازینون می‌باشد.

یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که سطح گلوتاتیون احیاء و استیل کولین استراز سرمی در گروه دریافت کننده دیازینون نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود و استفاده از N- استیل سیستئین باعث افزایش سطح گلوتاتیون و کولین استراز سرمی نسبت به گروه دریافت کننده سم شده بود.

Wu و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان داده بودند که در موش‌های صحرایی که به صورت داخل وریدی دیازینون دریافت کردند، هر دو آنزیم استیل کولین استراز حقیقی و کاذب به سرعت کاهش یافت، ولی در مصرف خوراکی، مهار استیل کولین استراز گلبول قرمز از کولین استراز پلاسمایی بیشتر بود(۲۶). هم چنین در مطالعه‌ای توسط Tomokuni و همکاران در سال ۱۹۸۷ مهار کولین استراز خون در مسمومیت با دیازینون در موش‌های صحرایی و سوری که به‌صورت تک دوز سم را دریافت کردند، به ثبت رسیده بود(۲۷).

جعفری و همکاران در سال ۱۳۹۱ با بررسی اثر دیازینون بر آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و پراکسیداسیون لیپیدی در مغز، قلب و طحال موش‌های صحرایی نشان داده بودند که دیازینون در دوزهای بالاتر سبب افزایش سطح مالون دی آلدئید، سوپر اکسید دسموتاز، گلوتاتیون S ترانسفراز و کاهش سطح گلوتاتیون احیاء، لاکتات دهیدروژناز و فعالیت کولین استراز در قلب، مغز و طحال موش شد(۲۸). احمدی و همکاران نیز در مطالعه‌ای بر روی اثرات حاد ناشی از دیازینون بر پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی در طحال موش به نتایج مشابهی رسیده بودند(۶).

در مطالعه‌ای دیگر شاه و همکاران دریافتند که فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت نظیر کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز، گلوتاتیون S- ترانسفراز و مقدار گلوتاتیون احیاء در موش‌های صحرایی که تحت مواجهه با دیازینون بودند، کاهش یافته بود(۴). نتایج استفاده ی Atkuri و همکاران در سال ۲۰۰۷ از N- استیل سیستئین به عنوان یک آنتی دوت در فقدان سیستئین - گلوتاتیون، حاکی از آن بود که تجویز N- استیل سیستئین به عنوان یک پیش دارو، سبب افزایش سطح گلوتاتیون داخل سلولی می‌گردد(۲۹).

Pena-Liopis و همکاران اثر حفاظتی N- استیل سیستئین بر ماهیانی که در معرض سم ارگانوفسفره قرار داشتند، را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که

پس از دریافت mg/kg ۱/۵ از سم، کاهش در کولین استراز خون رخ می‌دهد و با دریافت mmol/kg ۱ از N- استیل سیستئین، سطح گلوتاتیون احیاء، گلوتاتیون ردوکتاز کبدی و گاماگلوتامیل ترانسفراز و گلوتامات سیستئین لیگاز افزایش می‌یابد(۳۰). در بررسی دیگری، Yurmez و همکاران در سال ۲۰۰۷ به مطالعه اثر N- استیل سیستئین در مسمومیت حاد ناشی از ارگانوفسفره‌ها در موش پرداختند. Fenthion به عنوان یک سم ارگانوفسفره سبب افزایش سطح مالون دی آلدئید و کاهش سطح گلوتاتیون احیاء شد. پروفیلاکسی و درمان با N- استیل سیستئین نیز سبب کاهش سطح مالون دی آلدئید و افزایش سطح گلوتاتیون احیا شده بود(۳۱). Cankayali و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز با آنالیز تاثیرN- استیل سیستئین در استرس اکسیداتیو ناشی از مسمومیت با ارگانوفسفره‌ها به این نتیجه رسیده بودند که در موش‌های صحرایی دریافت کننده DDVP، N- استیل سیستئین جلوی افزایش لیپید پراکسیداسیون و سطح آنزیم سوپراکسید دسموتازو کاتالاز را گرفته و اثر محافظتی دارد(۳۲).

در مطالعه‌ای که Oksay و همکاران بر روی اثر حفاظتی N- استیل سیستئین بر استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در تستیس موش صحرایی انجام داده بودند، مشخص گردید در موش‌هایی که به مدت یک ماه به صورت مزمن دیازینون دریافت کرده بودند، N- استیل سیستئین سبب کاهش صدمات ناشی از دیازینون شده بود(۱۰).

در تحقیق دیگری که توسط شادنیا و همکارن انجام شد، اثر حفاظتی α- توکوفرول وN- استیل سیستئین در موش‌هایی که به مدت ۴ هفته دیازینون دریافت کرده بودند، مشخص گردید و سطح مالون دی آلدئید به عنوان یک شاخص استرس اکسیداتیو در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت(۱۱).

اثر حفاظتی Vit E و Curcumin بر استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در خون، کبد و اریتروسیت موش‌های صحرایی در مطالعه‌ای توسط Messarah و همکاران مورد بررسی قرار گرفته بود. در موش‌هایی که به مدت ۲۱ روز در معرض دیازینون قرار داشتند، پس از دریافت آنتی اکسیدانت‌های طبیعی نظیر Vit E و Curcumin سطح افزایش یافته آنزیم‌های ترانس آمیناز، لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز کاهش یافته بود(۳۳).

Hariri و همکاران نیز به این نتیجه رسیده بودند که در مسمومیت تحت حاد ناشی از دیازینون، Vit E و Safranl و Crocin بر مهار آنزیم کولین استراز اثر محافظتی دارند(۳۴).

Gokalp و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ای که به بررسی اثرات دیازینون بر پانکراس موش‌های صحرایی و نقش تعدیل کننده ویتامین‌های C و E اختصاص داشت، نشان داده بودند که دیازینون باعث افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز، گاماگلوتامیل ترانسفراز، آمیلاز و لیپاز می‌شود و ویتامین C و E به عنوان یک آنتی اکسیدانت سبب بهبود این وضعیت شده بود(۳۵).

داده‌های حاصل از این تحقیق نیز با مطالعات دیگر هم خوانی دارد و حاکی از اثرات آنتی اکسیدانتی N- استیل سیستئین است که توانایی حذف رادیکال‌های آزاد و بهبود وضعیت آنتی اکسیدانتی بدن را دارند. علاوه بر آن در بهبود مهار آنزیم استیل کولین استراز نیز موثر است.

تفاوت مطالعه اخیر با برخی از مطالعات ذکر شده، در مدت زمان مسمومیت با دیازینون می باشد. در این مطالعه مسمومیت حاد مورد بررسی قرار گرفت. به عبارت دیگر ۲۴ ساعت پس از تزریق سم،تزریق NAC صورت گرفت.اثر آنتی اکسیدانتی NAC به دلیل وجود اسید آمینه سیستئین که به عنوان پیش ساز گلوتاتیون در بدن عمل می‌کند، در مطالعات اثبات شده است. اما در بالین از این ترکیب به عنوان آنتی دوت در مسمومیت‌های ناشی از دیازینون استفاده نمی‌شود.

امروزه در بخش‌های اورژانس تنها از پرالیدوکسیم استفاده می‌گردد که در مطالعه اخیر تقریباً اثر مشابهی نسبت به NAC دارد (حتی میزان کولین استراز و گلوتاتیون احیا در گروه مسموم دریافت کننده NAC بیشتر از گروه دریافت کننده پرالیدوکسیم بود).

اثر آنتی اکسیدانتی ویتامین‌هایی نظیر ویتامین E، C و A را می‌توان به مهار رادیکال‌های آزاد نسبت داد. در حالی که N- استیل سیستئین در بدن به سیستئین تبدیل می‌شود که سوبسترای آنتی پورتر گلوتامات- سیستئین است و در نتیجه باعث جابه‌جایی معکوس گلوتامات به فضای خارج سلولی شده، در نهایت رهاسازی گلوتامات از سیناپس‌ها را کاهش می‌دهد. در جریان استرس اکسیداتیو، غلظت گلوتاتیون کاهش پیدا می‌کند. مصرف N- استیل سیستئین این کمبود را مرتفع ساخته، به این ترتیب با افزایش گلوتاتیون به عنوان یک آنتی اکسیدانت عمل می‌کند(۳۶).

هر چند نتایج آماری معنی داری حاصل نشد ولی احتمال داده می شود علت معنی دار نبودن داده‌های آماری در فرصت کمی که در مسمومیت حاد در اختیار سلول است تا از سیستئین به عنوان پیش ساز گلوتاتیون استفاده کند، باشد. شاید در مسمومیت مزمن زمان کافی برای دریافت سیستئین به عنوان پیش ساز گلوتاتیون و طی شدن پروسه تولید این پروتئین، برای سلول فراهم آید.

با توجه به نتایج این مطالعه حدس زده می‌شود N- استیل سیستئین می‌تواند به همراه دیگر عوامل آنتی اکسیدانت از جمله ویتامین‌ها، در تعدیل استرس اکسیداتیو ناشی از ترکیبات ارگانوفسفره موثر باشد. با توجه به سمیت بالای سموم ارگانوفسفره می‌توان با انجام مطالعات بیشتر به ورود NAC به عنوان آنتی دوت در بالین اندیشید.

سپاسگزاری

این مقاله نتیجه کار تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی مازندران و بخشی از پایان نامه خانم سیده کاملیا شیخ الاسلامیان، دانشجوی دکترای داروسازی دانشکده داروسازی مازندران می‌باشد.

از تمام کسانی که ما را در انجام این پروژه یاری کردند کمال تقدیر و تشکر را داریم.

References

1. Balali-Mood M, Saber H. Recent advances in the treatment of organophosphorous poisonings. Iran Med Sci 2012;37(2): 74-91(Persian).
2. Darreh-Shori T, Soininen H. Effect of cholinesterase inhibitors on the activities and protein levels of cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer s disease. Curr Alzheimer Res 2010;7(1):67-73. PMID:20205672
3. Guber SJ, Munn MD. Organophosphate and carbamate in secticide in agricultural water and cholinesterase inhibition in common carp (cyprinus carpio).Arch Environ Contam Toxicol 1998;35(3): 391-396.
4. Shah MD, Iqbal M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. Food Chem Toxicol 2010 ;48(12): 3345-3353.PMID:20828599.
5. Singh S, Sharma N.Neurological syndromes following organophosphate poisoning. Neurol India 2000;48(4):308-313.PMID:11146591.
6. Ahmadi S, Jafari M, Asgari A, Salehi M. Acute effect of diazinon on lipid peroxidation level and activities of antioxidant enzyme in rat spleen. J Kermanshah Univ Med Sci 2012; 16(1): 1-9

7. Meister A, Anderson M. Glutathion 983;5:711-760.PMID:6137189
8. 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(2):87-93(Persian)
9. Ballatori N, Lieberman M, Wang W. Nacetylcysteine as an antidote in methylmercury poisoning. Environ Health Perspect 1998; 106(5): 267–271.
10. Oksay T, Naziroglu M, Ergun O, Dagan S, Ozatik O, Armagan A, et al. N-acetyl cysteine attenuates diazinon exposure-induced oxidative stress in rat testis. Andrologia. 2013 ;45(3):171-7. PMID: 22742659
11. Shadnia S, Dasgar M, Taghikhani S, Mohammadirad A, Khorasani R, Abdollahi M. Protective effect of alpha-tocopherol and N-acetyl cysteine on diazinon-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats.Toxicol Mech Methods 2007;17(2):109-115.PMID:20020979
12. Shokrzadeh M, Ahangar N, Abdollahi M, Shadboorestan I, Omidi M, Hosseinipayam S. Diazinon Effects on Hepatic Glutathione Levels in Rats and Protective Role of Selenium and L-Carnitine. J Mazand Univ Med Sci 2012; 22 (91) :30-38(Persian)
13. Shokrzadeh M, Hosseini Payam S, Zargari M, Abasi A, Abedian S, Layali I, et al . The Protective Effect of Vitamin A, C, and E on the Superoxide Dismutase Enzyme Activity in Rat Erythrocytes Exposed to Diazinon. J Mazand Univ Med Sci. 2012; 21 (1):30-38(Persian)
14. Balahoroglu R, Dulger H, Ozbek H, Bayram I, Ramazan M. protective effect bof antioxidants on the experimental liver and kidney toxicity in mice. Eur J Gen Med 2008;5(3):157-164
15. Zadi R, Banu N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. Clin Chim Acta 2004;340(1-2):229 - 233 .PMID:14734217
16. Ebrahimzadeh MA, Shokrzadeh M, Biokabadi M. Effect of organophosphates on erythrocyte cholinesterase activity on rice farmer workers. J Mazand Uni Med Sci 2005;7(1):1-7(Persian)
17. Mirzaei R, Allameh A, Mortazavi B, Khavanin A, Kamalian N. Effect of loud noise on oxidation and lipid peroxidation variation of liver tissue of rabbit.Tabibe-Shargh 2009;11(2):11-17(Persian)
18. Peter H, Edward R. Free radicals and human disease. Physiol Chem Physics Medical NMR 1984;16:175-195.
19. Storz G, Imali J.Oxidative stress.Curr Opin Microbiol 1999;2(2):345-348 .PMID:10322176
20. Ames B. DNA damage from micronutrient deficies is likely to be a major cause of cancer. Mutat Res 2001;475(1-2):7-20.PMID:11295149
21. Kohen R, Nyska A. Oxidative of biological system: oxidative stress phenomena antioxidant, redox reaction and method of their quantification. Toxicol Pathol 2002;30(6):620-650.PMID:12512863
22. Rojikind M, Dominguez J, Nieto N, Greenwell P. Role of hydrogen proxide and oxidative stress in healing response . Cell Mol Sci 2002;59(11):1872- 1891. PMID:12530519
23. Cotgreave I, Gerdes R. Recent trends in glutathione biochemistry glutahione-protein intractions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation. Biochem Bio-Phys Res Common 1998;242(1):1-9.PMID:9439600
24. Vina J, Saez GT, Wiggins D,Roberts AF,Hems R,Kerbs HA. The effect of cysteine

oxidation on isolated hepatocytes.Biochem J 1983;212:39-44

25. Filik L.Protective effect of N-acetyl cysteine on antituberculosis drug-induced hepatotoxicity .Eur J Gastroenterol Hepatol 2011;23(2):193.PMID:21228682
26. Wu Hx,Evureux-Gros C,Descotes J.Diazinon toxicokinetics ,tissue distribution and anticholinesterase activity in rat.Biomed Environ Sci 1996;9(4):359- 369.PMID:8988804
27. Tomokuni K,Hasegawa T,Hirai Y,Koga N.The tissue distribution of diazinon and the inhibition of blood cholinesterase activities in rat and mice receiving a single intraperitoneal dose of diazinon.Toxicology 1987;37(1-2):91-98.PMID:4060172
28. Jafari M.Salehi M,Ahmadi S,Asgari A,Abasnezhad M,Hajigholamali M.The role of oxidative stress in diazinon-induced tissue toxicity in wistar and Norway rats.Toxicology Mech Methods 2012;22(8):638-647.PMID:22871176
29. Atkuri KR, Mantovani JJ,Herzenberg LA.N-acetyl cysteine –a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency .Curr O Pin Pharmacol 2007;7(4): 335- 339.PMID:170602868
30. Pena-Liopis S,Ferrando MD,Pena JB.Fish tolerance to organophosphate- induced oxidative stress in dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-Acetyl cysteine .Food Chem Toxicol 2003;65(4):337-360.PMID:114568351
31. Yurmez Y,Cemek M,Yavuz Y,Birdane YO,Buyukokuroglu ME.Benefical effect of N-acetyl cysteine against organophosphates toxicity in mmice.Biol Pharm Bull 2007;30(3):490-494.PMID:17329844
32. Cankayali I, Demirag K,Eris O,Ersoz B,Moral AR.The effect of N-acetyl cysteine on oxidative stress in organophosphate poisoning model. Adu Ther 2005;22(2) :107-116.PMID:16020401
33. Messarah M,Amamra W,Boumendjel A,Barkat L,Bouasla L,Abdennour C ,et al. Ameliorating effect of curcumin and vitamin E on diazinon-induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes. Toxicol Ind Health 2013;29(1):77-88. PMID:22609857
34. Hariri AT, Moallem SA, Mahmoudi M, Memar B, Hosseinzadeh H. Sub-acute effect of diazinon on biochemical indicate and specific biomarkers in rats:protective effect of crocin and safranal.Food Chem Toxicol 2010;48(10):2803-2808. PMID : 20637253
35. Gokalp O,Buyukvanli B,Cicek E,Ozer MK, Koyu A, Altuntas I, et al.The effect of diazinon on pancreatic damage and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. Pestic Biochem Phys 2005;81:123-128
36. McFarland K, Lapish CC, Kalivas PW. Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. J Neurosci 2003; 23: 3531-7.