مقاله پژوهشی

بررسی نقش حفاظتی N – استیل سیستئین و S– متیل سیستئین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از مصرف استامی پراید در سرم و کلیه موش صحرایی

نازنین خورنق، باقر سید علیپور*، علی طراوتی

گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۳/۰۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۷/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: استامی پراید (ACP) به‌عنوان یک سم شبه نیکوتینی سبب تولید رادیکال‌های آزاد و القاء استرس اکسیداتیو در موجودات مختلف می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی نقش آنتی‌اکسیدانی N- استیل سیستئین (NAC) و S - متیل سیستئین (SMC) بر کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از سمیت استامی پراید در سرم و کلیه موش صحرایی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۴۲ سر موش نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به ۶ گروه ۷ تایی تقسیم شدند که شامل گروه کنترل، گروه شم (نرمال سالین) و ۵ گروه تجربی که ACP (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، NAC (۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، SMC (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ACP+SMC، ACP+NAC و ACP+SMC+NAC را به‌صورت داخل صفاقی به مدت یک هفته دریافت کردند. بعد از جداسازی سرم و بافت کلیه، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون S-ترانسفراز (GST) و سطح گلوتاتیون (GSH)، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و توتال آنتی‌اکسیدان (TAC) اندازه‌گیری شد.

نتایج: استامی‌پراید باعث افزایش فعالیت GST در بافت کلیه و سرم (P<۰/۰۱)، CAT در بافت کلیه و سرم (P<۰/۰۵) ولی افزایش غیر معنی‌دار MDA و کاهش غیر معنی‌دار GSH و TAC نسبت به کنترل گردید. NAC و SMC به‌تنهایی و در ترکیب با ACP باعث تعدیل در سطح TAC، GSH و MDA و فعالیت GST و CAT شدند.

نتیجه‌گیری: احتمالاً استامی پراید با تولید رادیکال‌های آزاد سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش فعالیت CAT و GST و کاهش غلظت GSH و TAC می‌شود. تجویز NAC وSMC به‌عنوان آنتی‌اکسیدان به‌واسطه کاهش نسبی رادیکال‌های آزاد باعث کاهش سمیت استامی پراید می‌شوند.

کلمات کلیدی: استامی پراید، S- متیل سیستئین، N- استیل سیستئین، موش صحرایی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

مقدمه

شبه نیکوتین‌ها یک کلاس نسبتاً جدید از آفت‌کش‌ها هستند که برای محافظت از محصولات کشاورزی در برابر آفات تأثیر قوی و سیستمیک دارند (۱). این ترکیبات آگونیست گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین بوده و مکانیسم اثر متفاوتی در پستانداران و حشرات دارند (۲) که سبب می‌شود به‌عنوان سموم رایج و متداول برای مهار آفات کشاورزی مطرح شوند. این سموم و متابولیت‌های آن‌ها با تأثیر بر مسیرهای پیام‌رسانی سلول‌ها می‌توانند منجر به بروز پاسخ‌های حاد داخل سلولی در پستانداران شوند. استامی پراید (ACP) یکی از سموم شبه نیکوتینی با ساختار آلفا-کلرو- ان هتروآروماتیک با گروه کلروپیریدینی، فرمول شیمیایی *N*-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-*N'*-cyano-*N*-methyl-acetamidine و فرمول مولکولی $C_{10}H_{11}ClN_4$ از مؤثرترین و پرفروش‌ترین گروه حشره‌کش‌ها برای حفاظت از محصولات در جهان است (۳). استامی پراید انحلال‌پذیری بالایی در آب و قابلیت نفوذ زیادی در ترکیبات موجود در خاک و آب‌های سطحی دارد (۴). استامی پراید سمیت بالقوه در انسان ایجاد می‌کند (۵) و استنشاق آن باعث ایجاد علائمی از قبیل

*نویسنده مسئول: **باقر سیدعلیپور**، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
Email: b.alipour81@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-3854-9328

سردرد، سرگیجه، تهوع و استفراغ می‌شود (۶).ACP یک آگونیست نیکوتین است که با گیرنده‌های استیل کولین نیکوتین (nACh-R) واکنش می‌دهد. این گیرنده‌ها در دندریت‌های پس سیناپسی همه نورون‌های مغز، نخاع و اتصالات عضلانی قرار دارند. فعال شدن گیرنده‌های nACh-R باعث افزایش فعالیت و اسپاسم عضلانی و درنهایت مرگ می‌شود (۲ و ۷).

ACP با خاصیت سمی باعث تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) در موجودات زنده می‌شود. مطالعات بسیاری نشان دادند ROS با بیماری‌هایی مثل سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی، نفروپاتی دیابتی و حتی با فرآیندهایی نظیر پیری و ناباروری نیز ارتباط دارد (۸). در حالت عادی بین تولید رادیکال‌های آزاد در بدن و سطح سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی توازن برقرار است. اما مواجهه با عواملی چون آلاینده‌های محیطی، داروها و سموم سبب تولید بیش‌ازحد رادیکال‌های آزاد در بدن و درنتیجه برهم خوردن تعادل بین تولید رادیکال‌ها و اجزای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (۹ و۱۰) و حالتی به نام استرس اکسیداتیو به وجود می‌آورد که منجر به آسیب بافتی می‌شود (۱۱). اما بدن موجودات تا حد ممکن با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی با عوامل ایجادکننده استرس اکسیداتیو مبارزه می‌کند. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که در غلظت کم وجود دارند و باعث به تأخیر افتادن یا مهار اکسیداسیون مواد اکسیدکننده می‌شوند و سلول را در برابر اثرات زیان‌آور عوامل محیطی حفظ می‌کنند (۱۲ و ۱۳). N- استیل سیستئین (NAC) یک ترکیب سولفیدریلی و مشتق از اسیدآمینه L-سیستئین است که پیش ساز گلوتاتیون در بدن است. این ترکیب با خواص آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به‌طور طبیعی اثرات داخل سلولی رادیکال‌های آزاد را خنثی کند. این ماده برای جلوگیری یا کاهش صدمات کبدی ناشی از استامینوفن استفاده می‌شود (۱۴ و ۱۵). S-متیل سیستئین (SMC) یک ترکیب ارگانوسولفور محلول در آب با خواص آنتی‌اکسیدانی است (۱۶) که در گیاهان متنوعی ازجمله سیر، پیاز و باقالا وجود دارد (۱۷). ازآنجایی‌که یکی از راه‌های مقابله با گونه‌های واکنشگر که موجب استرس‌اکسیداتیو می‌شود، تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی است به همین جهت فرض بر این است که با تزریق SMC و NAC سلول‌ها را برای مقابله با سمیت حاصل از استرس‌اکسیداتیو ناشی از استامی پراید مجهز خواهد کرد.

آفت‌کش‌های شبه نیکوتینی پس از جذب و تجمع در اندام‌های بدن ایجاد سمیت می‌کنند. آن‌ها با مهار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین القاء تولید ROS باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شوند؛ بنابراین اندازه‌گیری بیومارکرهای استرس اکسیداتیو برای مطالعه آسیب اکسیداتیو ناشی از اثر سمیت استامی پراید می‌تواند بسیار مهم باشد. با توجه به مطالب عنوان‌شده، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر محافظتی NAC و SMC به‌تنهایی و باهم بر کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از استامی پراید در سرم و بافت کلیه (محل دفع مواد متابولیزه ارگانو فسفره) در موش صحرایی است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۵۰ گرم که از انستیتو پاستور واحد شمال خریداری شد استفاده گردید. بر اساس شرایط نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مطابق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه مازندران و با کد اخلاق زیستی UMZ. REC. 396005 صورت گرفت. حیوانات در قفس‌های پلی‌اتیلنی با دسترسی به آب و غذای کافی و تحت کنترل دمای مناسب (۲۳-۲۲ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند و قبل از شروع آزمایش به‌منظور سازگاری با محیط به مدت چند روز در خانه حیوانات دانشگاه مازندران با دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. جهت انجام این مطالعه استامی پراید (CAS Number 135410-20-7)، N - استیل سیستئین (CAS Number 616-91-1) و S- متیل سیستئین (CAS Number 1187-84-4) از شرکت سیگما آلدریچ Sigma-Aldrich (Chemical Co. St. Louis, MO, USA) به‌صورت پودر خریداری و در محلول نرمال سالین حل شدند.

طرح آزمایش

۴۲ سر موش صحرایی به‌طور تصادفی به ۷ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. روزانه با استفاده از سرنگ انسولین ماده تزریقی به‌صورت درون صفاقی به مدت یک هفته تزریق شد (ماده تزریقی روزانه تهیه‌شده و در هر مرحله قبل از تزریق به مدت ۱۵ دقیقه در نرمال سالین حل گردید). در رابطه با دوز انتخابی، با توجه به LD_{50} استامی پراید دوز تزریقی گروه‌های آزمایشی را کمتر از دوز LD_{50} استامی پراید تعیین شد (۱۸) در مورد دوز N-استیل سیستئین (۱۹) و S-متیل سیستئین (۲۰) نیز دوزهای تزریقی

گروه‌های آزمایشی را با توجه به دوز تزریق‌شده در مقالات مشابه انتخاب گردید. گروه‌ها به‌صورت زیر تقسیم شدند:

گروه تجربی ۱: گروه کنترل که هیچ حلال دارویی را دریافت نکردند، روزانه فقط آب و غذای کافی دریافت کرد.

گروه تجربی ۲: گروه شم که روزانه ۰/۵ سی‌سی محلول نرمال سالین به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه تجربی ۳: ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم استامی پراید حل‌شده در نرمال سالین به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه تجربی ۴: ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم N- استیل سیستئین حل‌شده در نرمال سالین به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه تجربی ۵: به‌طور هم‌زمان ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم استامی پراید و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم S- متیل سیستئین حل‌شده در نرمال سالن به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه تجربی ۶: به‌طور هم‌زمان ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم استامی پراید و ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم N- استیل سیستئین حل‌شده در نرمال سالین به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه تجربی ۷: به‌طور هم‌زمان ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم استامی پراید، ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم N- استیل سیستئین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم S- متیل سیستئین حل‌شده در نرمال سالین به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

پس از آخرین تزریق با رعایت شرایط ناشتا، خون‌گیری از قلب تحت بیهوشی عمیق صورت گرفت. ابتدا موش را بی‌هوش کرده، جانور را فیکس و عمل جمع‌آوری خون از قلب به‌وسیله سرنگ ۵ سی‌سی انجام گرفت. سپس نمونه خون به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد تا سرم از لخته جدا شود. نمونه‌های سرم جمع‌آوری‌شده تا زمان انجام سنجش تست‌های آنتی‌اکسیدانی در دمای ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین بعد از بی‌هوش نمودن حیوانات بافت کلیه خارج گردید و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی و خارج شدن خون و جدا کردن قسمت‌های زائد، به نیتروژن مایع انتقال داده شد و سپس در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. در روز آزمایش بافت‌ها به‌دقت توزین و با نسبت ۱ به ۵ در بافر فسفات سالین هموژنه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۶۰۰۰ سانتریفوژ گردید. از مایع رویی جهت سنجش شاخص‌های موردنظر استفاده شد.

سنجش میزان مالون دی آلدئید (MDA)

اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدهید با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و بر اساس روش Buege and Aust انجام شد (۲۱). معرف MDA شامل تیوباربیتوریک اسید (TBA)، تری کلرواستیک (TCA)، هیدروکلریک اسید (HCL) در آب مقطر است. جهت تهیه محلول کار MDA ابتدا حدود ۶ گرم از تری کلرو استیک اسید (Trichloroacetic acid, MW= 163.39 g/mol, Merck) با ۸۳۰ میکرولیتر از HCl و ۰/۱۵ گرم از تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric acid, MW= 144.14 g/mol, Merck) به حجم ۴۰ میلی‌لیتر از آب مقطر رسانده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه در ۱۹۵۰ میکرولیتر معرف MDA اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه قرار داده شد. بعد از خنک شدن محلول به مدت ۸ دقیقه با دور g ۲۵۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس جذب محلول رویی نمونه سانتریفیوژ شده در طول‌موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد. همچنین محلول بلانک حاوی ۵۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۹۵۰ میکرولیتر از معرف MDA است. غلظت MDA با استفاده از ضریب خاموشی mM^{-1} $^{1}cm^{-1}$ ۱۵۶ بر اساس قانون بیر لامبرت ($A=\varepsilon dc$) محاسبه، به‌طوری‌که برای سرم برحسب µmol و برای کلیه به‌صورت nmol/ mg tissue گزارش گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز در سرم و بافت هموژنیزه شده کلیه به‌وسیله اندازه‌گیری مصرف آب‌اکسیژنه مطابق با روش Aebi.H و همکاران انجام شد (۲۲). واکنش با اضافه نمودن آب‌اکسیژنه ۳۰ میلی‌مولار به حجم مناسبی از نمونه بافتی در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ شروع شد. سپس جذب در طول‌موج ۲۴۰ nm به مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی $0.0436\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه شد. یک واحد فعالیت آنزیمی مقداری است که یک میکرومول آب‌اکسیژنه را در مدّت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ تجزیه کند.

سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون S –ترانسفراز

اندازه‌گیری گلوتاتیون s-ترانسفراز با استفاده از روش‌ـ William H.Habigو همکاران انجام شد (۲۳). برای اندازه‌گیری GST در نمونه سرم: به ۵۰ میکرولیتر از نمونه سرم ۲۸۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر

گلوتاتیون افزوده شد و به‌عنوان بلانک با آن دستگاه صفر گردید. سپس با افزودن ۵۰ میکرولیتر ۱-کلرو۲،۴ دی نیترو بنزن (CDNB) افزایش جذب در طی ۵ دقیقه در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد. برای اندازه‌گیری GST در نمونه بافت هموژنه، به ۲۰ میکرولیتر از نمونه بافت هموژنه ۲۸۸۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=6.5 و ۵۰ میکرولیتر گلوتاتیون یک میلی‌مولار افزوده شد و به‌عنوان بلانک با آن دستگاه صفر گردید. سپس با افزودن ۵۰ میکرولیتر CDNB یک میلی‌مولار افزایش جذب در طی ۵ دقیقه در طول‌موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی ۱-کلرو۲ و ۴ دی نیترو بنزن $9/6\ mM^{-1}Cm^{-1}$ محاسبه، به‌طوری‌که برای سرم برحسب U/ml و برای کلیه به‌صورت u/mg tissue گزارش گردید.

سنجش میزان GSH

برای سنجش میزان گلوتاتیون از روش sedlak and Lindsayاستفاده شد (۲۴). به غلظت مناسبی از نمونه ۴/۴ میلی‌لیتر اتیلن دی‌آمین ترا استیک‌اسید (EDTA) ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰۰ میکرولیتر TCA ۱۰ درصد اضافه و به مدت ۳ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس محلول روی را برداشته با ۵۰ میکرولیتر ۵،۵- دی تیو بیس نیترو بنزوئیک اسید (DTNB) ۱۰ درصد مخلوط و تغییرات جذب در طول‌موج ۴۱۲ نانومتر قرائت گردید. با استفاده از محلول استاندارد گلوتاتیون در غلظت‌های ۲۰۰-۱۲/۵ میکرومولار منحنی استاندارد گلوتاتیون رسم گردید و غلظت گلوتاتیون برحسب میکرومولار برای سرم وµM/g tissue برای بافت کلیه محاسبه گردید.

سنجش سطح توتال آنتی‌اکسیدان

اندازه‌گیری توتال آنتی‌اکسیدان با استفاده از روش Benzie and Strain (۲۵) انجام شد. روش FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power) با استفاده از کمپلکس آهن‌دار TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazin) انجام گرفت. اساس این روش احیای آهن فریک به فرو در حضور آنتی‌اکسیدان است. محلول FRAP شامل بافر استات سدیم ۰/۳ مولار (pH: 3.6)، محلول TPTZ ۱۰ میلی مولار در HCl ۴۰ میلی‌مولار و محلول $FeCl_3$. $6\ H_2O$ ۲۰ میلی‌مولار است. جهت انجام آزمایش، ۵۰ میکرولیتر از نمونه را به ۱/۵ میلی‌لیتر معرف FRAP افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷°C قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۹۳ نانومتر جذب قرائت گردید. جهت محاسبه میزان آنتی‌اکسیدان توتال موجود در نمونه‌های موردمطالعه از نمودار استاندارد $FeCl_3$. $6H_2O$ با غلظت ۵۰-۱۰۰۰ میکرومولار استفاده شد و نتایج برحسب میکرومول بر لیتر (µmol/L) گزارش شد.

آنالیز آماری

پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه‌وتحلیل آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. جهت آنالیز داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (آنوا) و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی استفاده شد. مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف از معیار محاسبه گردید و اختلاف در سطح احتمال P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از اثر استامی پراید به‌تنهایی و در ترکیب با N - استیل سیستئین و S- متیل سیستئین بر وزن مطلق و نسبی بافت کلیه (وزن نسبی کلیه با تقسیم وزن اندام (گرم) به وزن بدن (گرم) ضربدر صد بیان می‌شود) در بین گروه‌های موردمطالعه در جدول ۱ نشان داده شد. آنالیز آماری نشان داد که مقدار وزن مطلق کلیه راست (P<۰/۰۵) و کلیه چپ (P<۰/۰۱) در گروه‌های موردمطالعه تغییرات معنی‌داری را نشان داد. بر اساس تست تعقیبی توکی، وزن مطلق کلیه چپ در گروه ACP (P<۰/۰۵)، گروه ACP +SMC (P<۰/۰۱) و گروه ACP+NAC (P<۰/۰۱) نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱). همچنین بین گروه ACP با گروه شم (P<۰/۰۱) کاهش معنی‌داری در وزن مطلق کلیه چپ مشاهده شد. آنالیز آماری با آزمون ANOVA نشان داد که مقدار وزن نسبی کلیه راست (P<۰/۰۱) و کلیه چپ (P<۰/۰۵) در گروه‌های موردمطالعه تغییرات معنی‌داری دارد. بر اساس تست تعقیبی توکی، وزن نسبی کلیه راست در تمام گروه‌ها نسبت به کنترل تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد درحالی‌که وزن نسبی کلیه چپ در گروه NAC (P<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱). وزن نسبی کلیه چپ و راست بین گروه‌های موردمطالعه با گروه ACP تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد.

نتایج حاصل از اثر استامی پراید به‌تنهایی و در ترکیب با N - استیل سیستئین و S- متیل سیستئین بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز بافت کلیه در گروه‌های موردمطالعه تغییرات معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵). همان‌طوری که در نمودار ۱ مشاهده

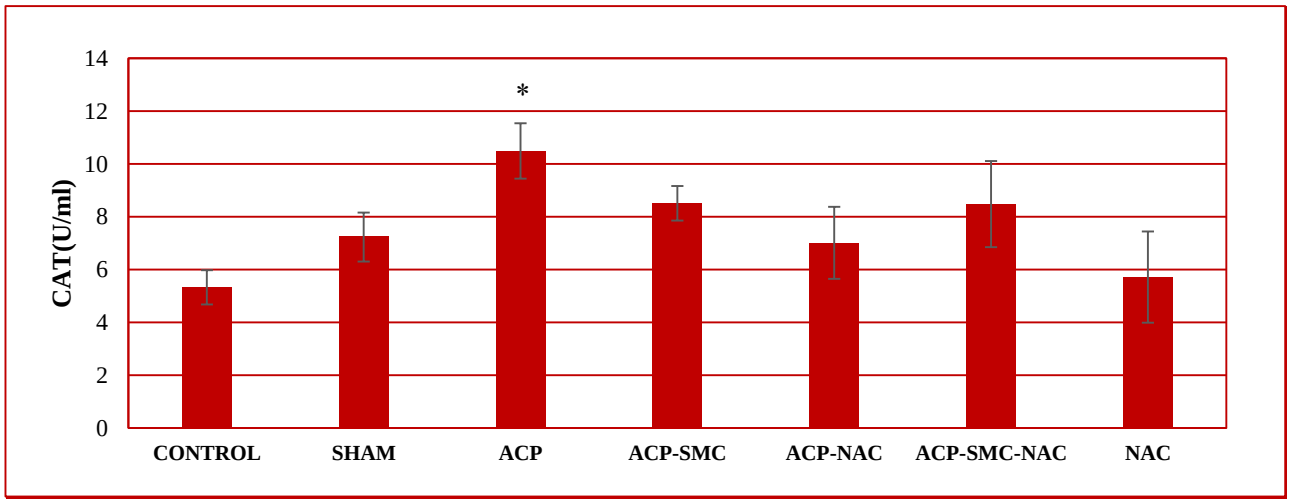
می‌شود فعالیت آنزیم کاتالاز بافت کلیه در گروه ACP نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵)، درحالی‌که در سایر گروه‌ها نسبت به گروه کنترل تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد. در هیچ‌کدام از گروه‌ها نسبت به گروه ACP تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد.

آنالیز آماری با آزمون ANOVA نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز سرم در گروه‌های موردمطالعه تغییرات معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۱). بر اساس تست تعقیبی توکی، فعالیت آنزیم کاتالاز سرم در گروه ACP (P<۰/۰۵)، گروه ACP+NAC (P<۰/۰۵)، گروه ACP+SMC+NAC (P<۰/۰۵)، نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری مشاهده شد (نمودار ۲)، درحالی‌که در سایر گروه‌ها نسبت به گروه کنترل تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد. بین گروه ACP و شم تغییرات معنی‌داری (P<۰/۰۵) مشاهده شد، در سایر گروه‌ها نسبت به ACP تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۱– تأثیر استامی پراید به‌تنهایی و در ترکیب با N- استیل سیستئین و S- متیل سیستئین بر تغییرات وزن مطلق و نسبی بافت کلیه در موش صحرایی

متغیر	کنترل	شم	ACP	ACP+SMC	ACP+NAC	ACP+SMC+NAC	NAC
وزن مطلق بافت کلیه راست (mg)	۱/۰۶۳±۰/۰۲۴۷	۱/۱۰۵±۰/۰۳۱	۰/۸۳۲±۰/۰۷۹	۰/۷۶۵±۰/۳۲۹	۰/۹۶۰±۰/۱۵۸	۰/۹۴۶±۰/۰۲۸	۱/۱۲۸±۰/۲۰۵
وزن نسبی بافت کلیه راست (mg/g)	۰/۰۰۴۱±۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۴۳±۰/۰۰۰۱۵	۰/۰۰۴۵±۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۴۷±۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۴۸±۰/۰۰۵	۰/۰۰۴۴±۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۴۹±۰/۰۰۰۱۲
وزن مطلق بافت کلیه چپ (mg)	۱/۰۳۶±۰/۰۳۳۶	۱/۰۷±۰/۰۱۴۶$^{++}$	۰/۸۳۴±./۰۷۴۳*	۰/۷۷۰±۰/۰۳۲۲***	۰/۸۱۴±۰/۰۳۵۵**	۰/۹۹۶±۰/۰۳۳۴	۱/۰۰۱±۰/۰۳۰۶
وزن نسبی بافت کلیه چپ (mg/g)	۰/۰۰۴۵±۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۴۲±۰/۰۰۰۰۹	۰/۰۰۴۵±۰/۰۰۰۱۸	/۰۰۴۶±۰/۰۰۰۱۶	۰/۰۰۴۵±۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۴۶±۰/۰۰۰۱۳	۰/۰۰۵۲±۰/۰۰۰۶۸*

(n=۷)، نتایج به‌صورت Mean±SD بیان‌شده است. اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (*P<۰/۰۵)، (**P<۰/۰۱)، (***P<۰/۰۰۱)، اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه سم (ACP) ($^{+}$P<۰/۰۵)، ($^{++}$ P<۰/۰۱)، ($^{+++}$ P<۰/۰۰۱).

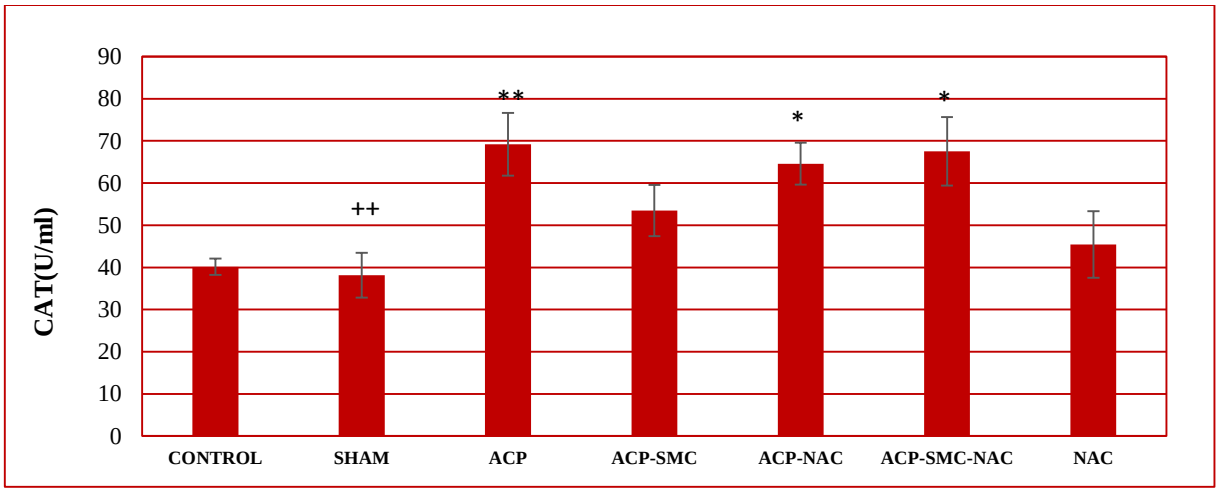


نمودار ۱– اثر استامی پراید به‌تنهایی و در ترکیب با N- استیل سیستئین و S- متیل سیستئین بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت کلیه موش صحرایی

Control= کنترل بدون هیچ تزریقی: Shame = شم تزریق فقط حلال: ACP = استامی پراید با دوز 5 mg/kg: NAC = ان استیل سیستئین با دوز 160 mg/kg: SMC+ACP=استامی پراید با دوز 5 mg/kg + S- متیل سیستئین با دوز 100 mg/kg: NAC + ACP= استامی پراید + ان استیل سیستئین با دوز 160 mg/kg: SMC + NAC + ACP = استامی پراید + ان استیل سیستئین + S- متیل سیستئین

(n=۷)، نتایج به‌صورت Mean±SD بیان‌شده است. اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (*P<۰/۰۵)

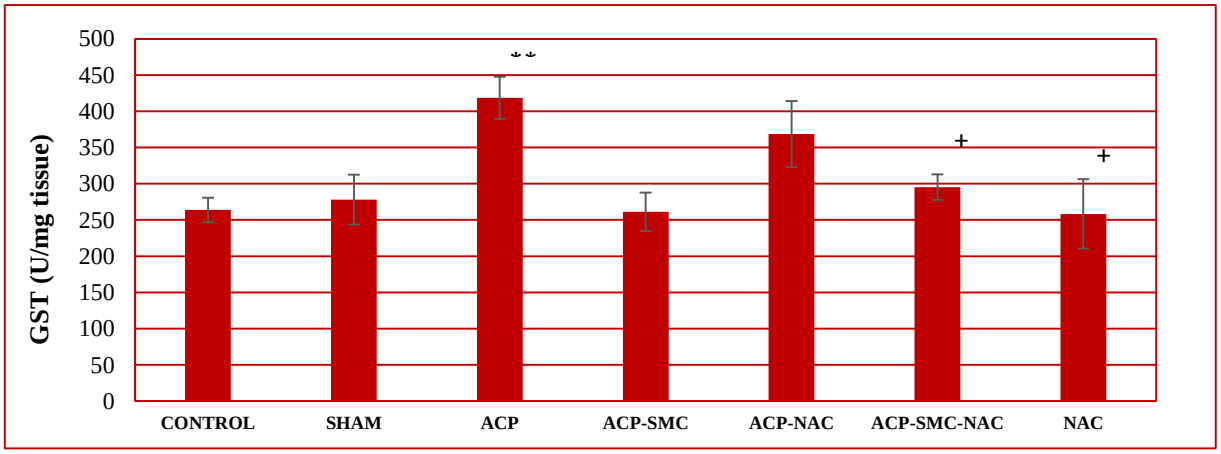
نمودار ۳ فعالیت آنزیم گلوتاتیون S ترانسفراز در بافت کلیه در بین گروه‌های موردمطالعه در طول آزمایش را نشان می‌دهد. آنالیز آماری با آزمون ANOVA نشان داد که فعالیت آنزیم گلوتاتیون S ترانسفراز در گروه‌های موردمطالعه تغییرات معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۱). بر اساس تست تعقیبی توکی، فعالیت آنزیم GST در گروه ACP نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۱)، درحالی‌که در سایر گروه‌ها نسبت به گروه کنترل تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد. تغییرات معنی‌داری بین گروه



نمودار ۲– اثر استامی پراید به‌تنهایی و در ترکیب با N- استیل سیستئین و S- متیل سیستئین بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز در سرم موش صحرایی

Control= کنترل بدون هیچ تزریقی: Shame = شم تزریق فقط حلال: ACP = استامی پراید با دوز 5 mg/kg: NAC = ان استیل سیستئین با دوز 160 mg/kg: SMC+ACP= استامی پراید با دوز 5 mg/kg S- + متیل سیستئین با دوز 100 mg/kg: NAC + ACP= استامی پراید + ان استیل سیستئین با دوز 160 mg/kg: SMC + NAC + ACP = استامی پراید + ان استیل سیستئین + S- متیل سیستئین

(n=۷)، نتایج به‌صورت Mean±SD بیان‌شده است. اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۵*)، (P<۰/۰۱**)، (P<۰/۰۰۱***)، اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه سم (ACP) به‌صورت (P<۰/۰۵+)، (P<۰/۰۱++)، (P<۰/۰۰۱+++).



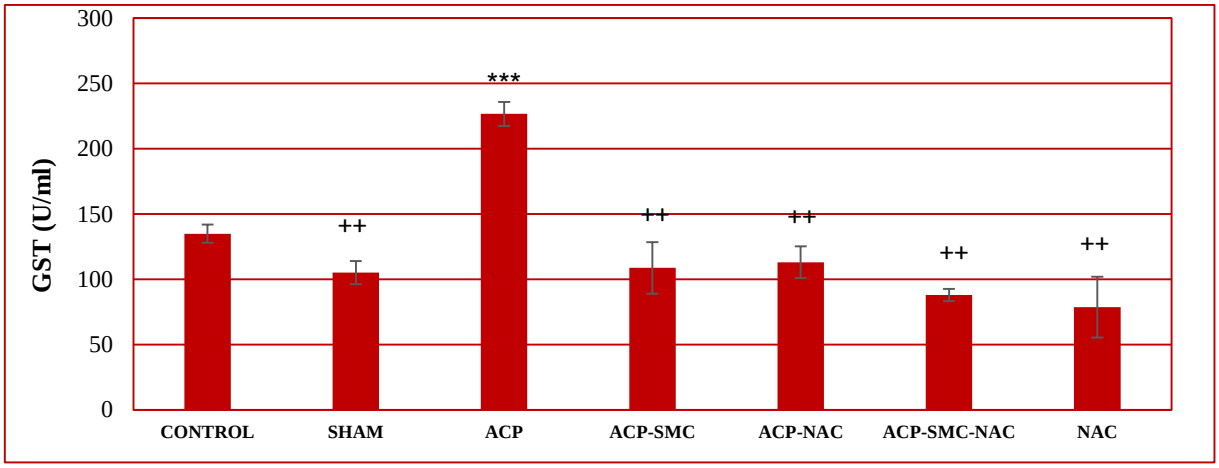
نمودار ۳– اثر استامی پراید به‌تنهایی و در ترکیب با N- استیل سیستئین و S- متیل سیستئین بر روی فعالیت آنزیم گلوتاتیون S ترانسفراز در بافت کلیه موش صحرایی

Control= کنترل بدون هیچ تزریقی: Shame = شم تزریق فقط حلال: ACP = استامی پراید با دوز 5 mg/kg: NAC = ان استیل سیستئین با دوز 160 mg/kg: SMC+ACP= استامی پراید با دوز 5 mg/kg S- + متیل سیستئین با دوز 100 mg/kg: NAC + ACP= استامی پراید + ان استیل سیستئین با دوز 160 mg/kg: SMC + NAC + ACP = استامی پراید + ان استیل سیستئین + S- متیل سیستئین

(n=۷)، نتایج به‌صورت Mean±SD بیان‌شده است. اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۵*)، (P<۰/۰۱**)، (P<۰/۰۰۱***)، اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه سم (ACP) به‌صورت (P<۰/۰۵+)، (P<۰/۰۱++)، (P<۰/۰۰۱+++).

ACP با شم (P<۰/۰۵)، ACP+SMC (P<۰/۰۱)، ACP+SMC+NAC (P<۰/۰۵)، NAC (P<۰/۰۵) مشاهده شد. در سایر گروه‌ها نسبت به ACP تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد.

نتایج حاصل از اثر استامی پراید به‌تنهایی و در ترکیب با NAC و SMC بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون S ترانسفراز سرم، در بین گروه‌های موردمطالعه تغییرات معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۱). بر اساس تست تعقیبی توکی، فعالیت آنزیم GST



نمودار ۴– اثر استامی پراید به‌تنهایی و در ترکیب با N- استیل سیستئین و S- متیل سیستئین بر روی فعالیت آنزیم گلوتاتیون S ترانسفراز در سرم موش صحرایی

Control= کنترل بدون هیچ تزریقی: Shame = شم تزریق فقط حلال: ACP = استامی پراید با دوز 5 mg/kg: NAC = ان استیل سیستئین با دوز 160 mg/kg: SMC+ACP= استامی پراید با دوز S – 5 mg/kg متیل سیستئین با دوز 100 mg/kg: NAC + ACP = استامی پراید + ان استیل سیستئین با دوز SMC + NAC + ACP:160 mg/kg = استامی پراید + ان استیل سیستئین + S- متیل سیستئین

(n=۷)، نتایج به‌صورت Mean±SD بیان‌شده است. اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (*P<۰/۰۵)، (**P<۰/۰۱)، (***P<۰/۰۰۱)، اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه سم (ACP) به‌صورت (+P<۰/۰۵)، (++P<۰/۰۱)، (+++P<۰/۰۰۱)

جدول ۲– اثر استامی پراید به‌تنهایی و در ترکیب با N – استیل سیستئین و S- متیل سیستئین بر MDA، GSH و FRAP در سرم و بافت کلیه موش صحرایی

پارامترها		کنترل	شم	ACP	ACP+SMC	ACP+NAC	ACP+SMC+NAC	NAC
MDA	سرم (µM)	۶/۷۳±۰/۶۴	۸/۰۶±۰/۲۸	۹/۰۵±۰/۷۴	۷/۵۴±۰/۶۰	۹/۲۰±۰/۶۱	۹/۵۶±۰/۸۵*	۱۱/۹۵±۰/۶۶***
	کلیه (nmol/mg tissue)	۴۰±۴/۱۴	۴۰/۷۷±۵/۴۸	۵۵/۲۶±۴/۹۷	۴۳/۷۳±۱/ ۹۰+	۴۰±۳/۹۰	۴۵/۲۶±۳/۱۷	۵۲/۲۵±۶/۱۵
GSH	سرم (µM)	۲۲/۰۱±۱/۷۶	۱۶/۸۲±۱/۹۹	۱۶/۳۳±۱/۴۰	۱۶/۸۲±۲/۳۲	۱۵/۸۴±۱/۱۷	۱۲/۲۳±۱/۹۸*	۵۲/۲۵±۶/۱۵
	کلیه (µM/g tissue)	۷/۴۳±۰/۸۵	۹/۷۱±۰/۶۲	۸/۳۰±۰/۷۷	۷/۱۴±۰/۵۳	۸/۹۵±۰/۴۰	۸/۸۸±۱/۶۰	۸/۸۸±۰/۱۴
FRAP	سرم (µM)	۵۴۳/۴۰±۴۸/۰۸	۵۸۷±۴۵/۳۱	۵۱۱/۶۶±۳۹/۴۸	۴۶۲/۱۳±۳۱/۰۲	۴۵۱±۵۵/۳۳	۴۶۱/۴±۴۲/۸۷	۶۸۶/۶۶±۷۶/۸۲
	کلیه (µM/g tissue)	۱۳۸/۵۷±۱۵/۹۷	۱۳۱/۲۸±۸/۱۸	۱۲۴/۲۸±۷/۷۴	۱۲۸/۳۳±۴/۳۱	۱۳۱/۸۵±۲۸/۲۲	۱۲۶/۴۲±۶/۵۶	۱۴۸/۳۳±۲۱/۴۴

(n=۷)، نتایج به‌صورت Mean±SD بیان‌شده است. اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (*P<۰/۰۵)، (**P<۰/۰۱)، (***P<۰/۰۰۱)، اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه سم (ACP) به‌صورت (+P<۰/۰۵)، (++P<۰/۰۱)، (+++P<۰/۰۰۱)

سرم در گروه ACP (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری مشاهده شد (نمودار ۴)، درحالی‌که در سایر گروه‌ها نسبت به گروه کنترل تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد. تغییرات معنی‌داری بین گروه ACP با شم، ACP+SMC، ACP+NAC ، ACP+SMC+NAC و NAC مشاهده شد (P<۰/۰۱).

نتایج حاصل از اثر استامی پراید به‌تنهایی و در ترکیب با NAC و SMC بر تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP)، تغییرات میزان مالون دی آلدئید (MDA) و تغییرات غلظت گلوتاتیون (GSH) در سرم و بافت کلیه در بین گروه‌های موردمطالعه، در جدول ۲ نشان داده شد. آنالیز آماری با آزمون آنوا نشان داد که مقدار مالون دی آلدئید در بافت کلیه (P<۰/۰۵) و سرم (P<۰/۰۱) در گروه‌های موردمطالعه تغییرات معنی‌داری را نشان دادند. بر اساس تست تعقیبی توکی، مقدارMDA سرم در گروه ACP+SMC+NAC (P<۰/۰۵) و NAC (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد. بین گروه ACP با گروه ACP+SMC (P<۰/۰۵) در بافت کلیه تغییرات معنی‌داری مشاهده شد. آنالیز آماری با آزمون آنوا نشان داد که غلظت گلوتاتیون سرم در گروه‌های موردمطالعه تغییرات معنی‌داری دارد (P<۰/۰۵). بر اساس تست تعقیبی توکی مشخص شد که غلظت GSH سرم در گروه ACP+SMC+NAC نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری دارد (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از این تحقیق تغییرات معنی‌داری را در گروه‌های موردمطالعه در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کلیه نشان دادند (P<۰/۰۱). بر اساس تست تعقیبی توکی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کلیه و سرم در هر سه گروهی که سم (ACP) را دریافت کرده بودند (ACP+SMC+NAC،ACP+NAC،ACP+SMC)کاهش پیدا کرد ولی این کاهش معنی‌دار نبود.

بحث

مطالعات زیادی نشان می‌دهند که حشره‌کش‌های شبه نیکوتینی قادر به تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی بسیاری از اندام‌های بدن هستند (۲۶). کلیه نقش مهمی در هومئوستاز موجودات زنده، دفع مواد زائد و تصفیه پلاسما دارد و یکی از بافت‌های هدف سموم شیمیایی است که ممکن است توسط سموم مختلف دچار اختلال عملکردی دائم یا موقت شود (۲۷). بدین منظور وزن بدن و همچنین وزن مطلق و نسبی بافت کلیه در نمونه‌های موردمطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که وزن مطلق و نسبی بافت کلیه چپ و راست در گروه ACP نسبت به گروه کنترل کاهش‌یافته است. مطالعات چاکرون نشان داد که دوز بالای استامی پراید باعث کاهش وزن بدن نسبت به کنترل می‌شود (۱۸). همچنین در مطالعات دیوان و همکاران کاهش معنی‌داری در وزن بدن در دوز بالای استامی پراید در هر دو جنس درروش مشابه با مطالعات چاکرون مشاهده شد که با مطالعات ما همخوانی داشت (۲۸). پژوهش ارفات و همکاران نشان می‌دهد که بعد از ۱۵روز مصرف سم شبه نیکوتینی ایمیداکلوپراید بر موش آزمایشگاهی، وزن بافت کبد و کلیه در دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هیچ تفاوت معنی‌داری با کنترل نداشت ولی در دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنی‌داری در موش آزمایشگاهی مشاهده شد که با نتایج ما مطابقت نداشت (۲۹). قرار گرفتن در معرض آفت‌کش‌های مختلف باعث آسیب ساختاری به اندام‌ها و بافت‌ها می‌شود که منجر به بروز تغییرات پاتولوژیک و التهابی می‌شود. بنابراین کاهش جذب مواد غذایی ممکن است به دلیل اثرات مداخله کننده و سمی آفت‌کش‌ها باشد که باعث جذب کمتر مواد غذایی و کاهش وزن بدن شود. بنابراین نوع سم، مسیر تجویز، دوز و زمان و حتی نژاد موش می‌تواند دلیل بر این تفاوت‌ها باشد. مطالعات Singh و همکاران نشان داد مصرف استامی پراید به مدت ۳۵ روز باعث کاهش وزن بدن موش آزمایشگاهی به‌صورت وابسته به دوز شد (۴). بنابراین، کاهش وزن ایجادشده پس از قرار گرفتن در معرض ACP می‌تواند عمدتاً به دلیل اختلال در جذب غذا باشد.

لیپیدهای غشاء جزء مولکول‌های حساس در برابر حمله ROSها هستند و در اثر مواجهه با آن‌ها دچار پراکسیداسیون می‌شوند. MDA یک محصول انتهایی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها است که به‌عنوان یک شاخص مناسب جهت بررسی وضعیت اکسیداتیو مورداستفاده قرار می‌گیرد (۳۰). افزایش سطح MDA نشان‌دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب غشاء سلولی است. در این مطالعه استامی پراید باعث افزایش MDA شد که این افزایش ناشی از تولید ROSها توسط استامی پراید و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است. تحقیقات انجام‌شده توسط چاکرون و همکاران نیز نشان می‌دهد که استامی پراید باعث افزایش MDA می‌شود که موافق با این مطالعه است و هرچه دوز استامی پراید بیشتر می‌شود میزان MDA هم افزایش می‌یابد (۱۸). در این پژوهش مقدار MDA در

گروه ACP+SMC به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه ACP در بافت کلیه کاهش یافت که نشان می‌دهد احتمالاً S- متیل سیستئین با عملکرد آنتی‌اکسیدانی خود تا حدی مانع از این افزایش شد. در مطالعات ژانگ و همکاران نیز گزارش شد که S- متیل سیستئین باعث کاهش MDA وLPO می‌شود (۳۱). طبق تحقیقات یان و همکاران S- متیل سیستئین، S- آلیل سیستئین و S- پروپیل سیستئین باعث کاهش MDA افزایش‌یافته ناشی از اتانول می‌شوند و اثر سمیت اتانول را در موش آزمایشگاهی کم می‌کنند (۳۲). در پژوهش حاضر در گروه ACP+SMC+NAC و NAC مقدار MDA به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که می‌تواند ناشی از تداخل NAC، SMC و همچنین دوز بالای N- استیل سیستئین باشد. مطالعات پیشین اثر جانبی NAC را گزارش کرده‌اند به‌طوری‌که NAC در دوزهای پایین اثر محافظتی بر موش‌های مسموم شده با یک اندوتوکسین داشته و به کاهش رادیکال‌های آزاد و کاهش مرگ‌ومیر کمک می‌کند، اما در غلظت‌های بالا اثر معکوس داشته و باعث افزایش میزان مرگ‌ومیر در موش‌های مسموم شده با اندوتوکسین شد (۳۳، ۳۴).

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام پلاسما از روش FRAP استفاده شد. نتایج ما نشان داد که ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام پس از تزریقACP کاهش‌یافته که ممکن است به علت استرس اکسیداتیو ناشی از تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن باشد. ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام در گروه‌های ACP+SMC، ACP+NAC و ACP+SMC+NAC نسبت به گروه ACP کاهش یافت ولی این کاهش معنی‌دار نبود؛ بنابراین NAC و SMCبه‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مانع از کاهش بیش‌ازحد TAC توسط ACP می‌شوند. در گروه NAC مقدار TAC در سرم و بافت کلیه افزایش یافت که احتمالاً ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی NAC است. نتایج حاصل از پژوهش نوری و همکاران (۳۵) نیز نشان می‌دهد که NAC و سیلیمارین باعث تعدیل در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم موش صحرایی نر می‌شود که در اثر سمیت با دیکلوفناک کاهش‌یافته بود.

آنزیم CAT بخشی از اولین خط دفاعی سلول در برابر سمیت ناشی از رادیکال‌های آزاد است. آنزیم کاتالاز با میل ترکیبی بالا باعث خنثی شدن H_2O_2 و تبدیل آن به آب و O_2 می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که استامی پراید باعث افزایش فعالیت CAT می‌شود که احتمالاً ناشی از افزایش ROS تولیدشده توسط استامی پراید است تا با افزایش کاتالاز از ازدیاد H_2O_2 و آسیب بافتی تا حد ممکن جلوگیری شود؛ بنابراین می‌توان گفت که افزایش فعالیت کاتالاز می‌تواند نوعی مکانیسم‌های دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو باشد (۳۶). اسیدآمینه سیستئین که در ساختار گلوتاتیون نیز وجود دارد، به‌طور آزاد سمی است و در پلاسمای خون کاتابولیزه و تخریب می‌شود. اما اگر به‌صورت دی پپتید سیستین درآید بسیار پایدارتر است و قابلیت آنتی‌اکسیدانی خود را از دست می‌دهد. بنابراین گلوتاتیون می‌تواند علاوه بر پایداری، به‌طور رقابتی رادیکال‌های آزاد را مهار نماید. N- استیل سیستئین به علت دارا بودن اسیدآمینه سیستئین به‌عنوان یکی از پیش سازهای گلوتاتیون خواص آنتی‌اکسیدانی دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز NAC تا حدی سبب کاهش فعالیت آنزیم CAT در کلیه و سرم شد. بنابراین کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز بعد از استفاده از NAC به‌تنهایی و در ترکیب با ACP احتمالاً به دلیل توانایی NAC در حذف گونه‌های واکنشگر اکسیژن است. اما در تحقیقاتی که چاکرون و همکاران (۱۸) انجام دادند در اثر تجویز استامی پراید بر موش صحرایی طی ۶۰ روز فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش‌یافته و هر چه دوز تزریقی استامی پراید بیشتر باشد این کاهش فعالیت بیشتر می‌شود، این تناقض می‌تواند ناشی از تفاوت در طول دوره تزریق باشد. درواقع احتمالاً تزریق استامی پراید طی دوره کوتاه‌مدت باعث تولید ROS شده که متعاقباً سیستم دفاعی موجود زنده با افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز سعی در تعدیل اثر سم دارد. اما زمانی که تزریق استامی پراید طی یک دوره طولانی تداوم می‌یابد با افزایش زیاد ROS موجب تضعیف سیستم دفاعی و کاهش فعالیت کاتالاز می‌شود. نتایج حاصل از تحقیقات یان و همکاران (۳۷) نیز شاهدی بر این ادعاست که بعد از ۷ روز تزریق متوالی سم شبه نیکوتینی نیتن پیرام، فعالیت آنزیم کاتالاز زیاد می‌شود و هرچه دوز تزریقی نیتن پیرام بیشتر شد این افزایش بیشتر مشاهده گردید، اما بعد از ۲۸ روز تزریق متوالی نیتن پیرام فعالیت آنزیم کاتالاز کم شد. بنابراین نتایج مختلف می‌تواند به دلیل نوع سم، مسیر تجویز، دوز و زمان مواجهه باشد.

در این مطالعه افزایش معنی‌دار GST در سرم و بافت کلیه تحت اثر استامی پراید نسبت به کنترل مشاهده گردید. استفاده از N- استیل سیستئین و S- متیل سیستئین تا حدی باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم GST در سرم و کلیه نسبت به گروه ACP گردید. مقدار GSH سرم نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد اما معنی‌دار نبود درحالی‌که در گروه ACP+SMC+NAC

مقدار GSH در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد که می‌تواند ناشی از تداخل در عملکرد SMC با NAC باشد. به‌طورکلی جبران کاهش گلوتاتیون توسط NAC می‌تواند ناشی از عمل NAC به‌عنوان پیش ساز در سنتز گلوتاتیون و همین‌طور عملکرد مستقیم آن در حذف رادیکال‌های آزاد باشد. آنزیم GST با استفاده از GSH باعث افزایش حلالیت سموم و دفع آن‌ها از بدن می‌گردد؛ بنابراین نقش مهمی در محافظت بافت‌ها علیه آسیب و استرس اکسیداتیو دارد. گلوتاتیون نیز یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های سلولی است که هم می‌تواند مستقیماً باعث حذف ROSها شود و هم به‌عنوان ماده اولیه برای آنزیم GST باشد (۳۸). مطالعات قبلی انجام‌شده نیز نشان می‌دهد افزایش GST در اثر تزریق استامی پراید نشان‌دهنده افزایش مصرف GSH و افزایش دفاع بدن در مقابل این سم جهت خنثی‌سازی آن است (۳۹) که با مطالعات ما همخوانی دارد. ازآنجایی‌که افزایش فعالیت GST پس از مصرف ACP همراه با کاهش مقدار GSH بوده است بنابراین می‌توان گفت که کاهش GSH می‌تواند هم به علت افزایش فعالیت GST و مصرف آن به‌عنوان ماده اولیه توسط این آنزیم باشد و هم مربوط به مصرف آن به‌عنوان یکی از اجزاء سیستم دفاعی بدن برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد باشد. نتایج حاصل از تحقیقات بال و همکاران نشان داد (۴۰) که بعد از تزریق سم شبه نیکوتینی کلوتیانیدین به مدت ۹۰ روز به موش صحرایی نر مقدار GSH کاهش یافت. گسمی و همکاران (۴۱) نیز نشان دادند که اثر استامی پراید بر موش صحرایی باعث کاهش GSH و افزایش GST در موش صحرایی می‌شود. استامی پراید با تولید رادیکال‌های آزاد سبب افزایش لیپیدپراکسیداسیون غشاء، کاهش غلظت GSH، افزایش فعالیت GST، کاهش سطح آنتی‌اکسیدانی تام و افزایش فعالیت CAT در سرم و بافت کلیه می‌شود. مطالعات زیادی نشان دادند که تجویز S- متیل سیستئین و N- استیل سیستئین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان با کاهش رادیکال‌های آزاد به‌طور نسبی باعث کاهش سمیت می‌شوند (۴۲-۴۴).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد، استامی پراید باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های GST، CAT در بافت کلیه و سرم نسبت به کنترل گردید. NAC و SMC به‌تنهایی و در ترکیب با ACP باعث تعدیل در افزایش آنزیم‌های MDA CAT، GST و تعدیل در کاهش GSH و TAC شد؛ بنابراین نتایج پژوهش ما نشان داد N- استیل سیستئین و S- متیل سیستئین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان با کاهش رادیکال‌های آزاد به‌طور نسبی باعث کاهش سمیت استامی پراید می‌شوند.

کنترل شیمیایی حشره‌کش‌ها در حال حاضر با سموم نئونیکوتینیدی مانند استامی پراید صورت می‌گیرد که کاربرد آن‌ها با چالش‌های بزرگی روبرو است. استامی پراید دارای اثر تماسی، گوارشی و با خاصیت بسیار قوی سیستمیک و نفوذ موضعی زیاد، سرعت عمل بالا ولی سمیت کم برای پستانداران است. این ترکیب موجب اختلال در سیستم عصبی حشرات شده و در مقابل نور خورشید به‌سرعت تجزیه می‌شود. با توجه به نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌گردد در شرایط نگهداری، زمان مصرف، چگونگی و نحوه مصرف، شرایط جوی محیط و اختلاط آن با سایر سموم و ترکیبات شیمیایی، مقدار و دوز مصرفی سم استامی پراید نظارت شود تا اثرات نامطلوب آن بر محیط‌زیست و بافت‌های مختلف کاسته شود و از آنتی‌اکسیدان‌های NAC و SMC برای نقش حفاظتی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی خانم نازنین خورنق با کد ره‌گیری ۱۳۲۱۴۶۰ مورخه ۹۵/۱۰/۲۶ است که با حمایت دانشگاه مازندران انجام شد. بدین‌وسیله از کلیه مسئولین کمال تشکر را می‌نماییم. بر اساس شرایط نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مطابق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه مازندران و با کد اخلاق زیستی 396005 UMZ. REC. صورت گرفت.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Tomizawa M, Casida JE. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005;45:247-68.
2. Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, Kawano H. Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats. PLoS ONE. 2012; 7(2): e32432.
3. Kevin A. Ford, John E. Casida. Chloropyridinyl Neonicotinoid Insecticides: Diverse Molecular Substituents Contribute to Facile Metabolism in Mice. Chem Res Toxicol. 2006; 19 (7): 944–951.
4.Singh T, Mukhopadhayay S, Sar T, Ganguly S. Acetamiprid induces toxicity in mice under experimental conditions with prominent effect on the hematobiochemical parameters. J Drug Metab Toxicol. 2012;3(6):134.
5. Pramanik S, Bhattacharyya J, Dutta S, Dey P, Bhattacharyya A. Persistence of Acetamiprid in/on Mustard (Brassica juncea L.). Bull Environ Contam Toxicol. 2006;76(2):356-360.
6. Todani M, Kaneko T, Hayashida H, Kaneda K, Tsuruta R, Kasaoka S, et al. Acute poisoning with neonicotinoid insecticide acetamiprid. Chudoku kenkyu. 2008;21(4):387-90.
7. Sanchez-Bayo FP. Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms". J Environ Anal Toxicol.2012; 4. 1 – 11.
8. Montezano AC, Touyz RM. Oxidative stress, Noxs, and hypertension: experimental evidence and clinical controversies. Ann Med. 2012;44(1):S2-S16.
9. Juránek I, Nikitovic D, Kouretas D, Hayes AW, Tsatsakis AM. Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants. Food Chem Toxicol. 2013;61:240-7.
10. Juranek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species-cause or consequence of tissue injury? Gen Physiol Biophys. 2005;24(3):263.
11. Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2001; 20(2):77-88.
12. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. Nutr Res. 2012;70(5):257-65.
13. Rafieian-Kopaei M, Baradaran A, Rafieian M. Oxidative stress and the paradoxical effects of antioxidants. J Res Med Sci. 2013;18(7):629. [in persian]
14. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. Curr Opin Pharmacol. 2007;7(4):355-9.
15. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. Pharmacol Ther. 2014;141(2):150-9.
16. Kumari K, Augusti K. Antidiabetic and antioxidant effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from onions (Allium cepa Linn) as compared to standard drugs in alloxan diabetic rats. Indian J Exp Biol. 2002;40:1005-1009.
17. Thomas S, Senthilkumar GP, Sivaraman K Bobby Z, Paneerselvam S, Harichandrakumar KT. Effect of S-Methyl-L-Cysteine on Oxidative Stress, Inflammation and Insulin Resistance in Male Wistar Rats Fed with High Fructose Diet. Iran J Med Sci. 2015;40(1):45-50.
18. Chakroun S, Ezzi L, Grissa I, Kerkeni E, Neffati F, Bhouri R, et al. Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. Environ Sci Pollut Res. 2016;23(24):25191-9.
19. Sehirli AO, Sener G, Satiroglu H, Ayanoğlu-Dülger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. J Nephrol. 2003; 16(1):75-80.
20. Kumari K, Augusti KT. Lipid lowering effect of S-methyl cysteine sulfoxide from Allium cepa Linn in high cholesterol diet fed rats. J Ethnopharmacol. 2007; 109(3):367-71.
21. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods in enzymology. 1978;52:302-10.
22. Aebi H. Catalase in vitro. Methods in enzymology. 1984;105:121-6.
23. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem. 1974;249(22):7130-9.
24. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal. Biochem. 1968;25:192-205.
25. Benzie IF, Strain J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in enzymology. 1999;299:15-27.

26. Zhang J, Yi W, Xiang H, Li MX, Li WH, Wang X, et al. Oxidative stress: role in acetamiprid-induced impairment of the male mice reproductive system. Agr Sci China. 2011;10(5):786-96.
27. Oruç EÖ, Usta D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of Cyprinus carpio. Environ Toxicol Pharmacol. 2007;23(1):48-55.
28. Devan RS, Mishra A, Prabu P, Mandal T, Panchapakesan S. Sub-chronic oral toxicity of acetamiprid in Wistar rats. Toxicol Environ Chem. 2015;97(9):1236-52.
29. Arfat Y, Mahmood N, Tahir MU, Rashid M, Anjum S, Zhao F, et al. Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. Toxicology Reports. 2014;1:554-61.
30. Russell JR, Sexten WJ, Kerley MS, Hansen SL. Relationship between antioxidant capacity, oxidative stress, and feed efficiency in beef steers. J Anim Sci. 2016;94(7):2942-53.

31. Zhang J, Meng G, Zhai G, Yang Y, Zhao H, Jia L. Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides of spent mushroom compost of Ganoderma lucidum. Int j biol macromol. 2016;82:432-9.
32. Yan Sl, Yin Mc. Protective and Alleviative Effects from 4 Cysteine-Containing Compounds on Ethanol-Induced Acute Liver Injury through Suppression of Oxidation and Inflammation. J Food Sci. 2007;72(7):S511-5.
33. Sandilands E, Bateman D. Adverse reactions associated with acetylcysteine. Clin Toxicol. 2009;47(2):81-8.
34. Orinne Sprong R, Winkelhuyzen-Janssen AML, Aarsman CJ, van oirschot JF, van der bruggen T, Sweder van Asbeck B. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. Am J Respir Crit Care Med. 1998; 157(4):1283-93.
35. Nouri A, Heidarian E, Nikoukar M. Effects of N-acetyl cysteine on oxidative stress and TNF-α gene expression in diclofenac-induced hepatotoxicity in rats. Toxicol Mech Methods. 2017 Oct;27(8**):**561-567.
36. Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2009;674(1):137-47.
37. Yan S, Wang J, Zhu L, Chen A, Wang J. Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (Danio rerio) livers. Ecotoxicol Environ Saf. 2015;122:54-60.
38. López-Cruz RI, Zenteno-Savín T, Galván-Magaña F. Superoxide production, oxidative damage and enzymatic antioxidant defenses in shark skeletal muscle. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2010;156(1):50-6.
39. Gasmi S, Rouabhi R, Kebieche M, Salmi A, Boussekine S, Toualbia N, et al. Neurotoxicity of Acetamiprid in Male Albino Rats and the Opposite Effect of Quercetin. Biotechnol Ind J. 2016;12(7):113.
40. Bal R, Türk G, Tuzcu M, Yılmaz Ö, Kuloğlu T, Baydaş G, et al. Effects of the neonicotinoid insecticide, clothianidin, on the reproductive organ system in adult male rats. Drug Chem Toxicol. 2013;36(4):421-9.
41. Gasmi S, Kebieche M, Rouabhi R, Touahria C, Lahouel A, Lakroun Z, et al. Alteration of membrane integrity and respiratory function of brain mitochondria in the rats chronically exposed to a low dose of acetamiprid. Environ Sci Pollut Res Int. 2017;24(28):22258-64.
42. Arafa MH, Mohamed DA, Atteia HH. Ameliorative effect of N-acetyl cysteine on alpha-cypermethrin-induced pulmonary toxicity in male rats. Environ Toxicol. 2015;30(1):26-43.
43. Nishikawa-Ogawa M, Wanibuchi H, Morimura K, Kinoshita A, Nishikawa T, Hayashi S, et al. N-acetylcysteine and S-methylcysteine inhibit MeIQx rat hepatocarcinogenesis in the post-initiation stage. Carcinogenesis. 2005;27(5):982-8.
44. Thong-Ngam D, Onanong Kulaputana M, Klaikeaw N. Effects of N-acetylcysteine on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. J Med Assoc Thai. 2007;90(4):788-97.

Original Article

Investigating the Protective Role of N-Acetyl Cysteine and S-Methyl Cysteine in the Activity of Antioxidant Enzymes and the Level of lipid Peroxidation Due to Acetamiprid Administration in Rat Kidney and Serum

Khovarnagh N, Seyedalipour B*, Taravati A

Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Received: 23 May 2019 Accepted: 05 Oct 2019

Abstract

Background & Objectives: Acetamiprid (ACP), as a neonicotinoid toxin, causes free radicals production and oxidative stress in various organisms. The aim of this study was to evaluate the antioxidative effects of N-acetylcysteine (NAC) and S-methylcysteine (SMC) on reducing acetaminoprid-induced oxidative stress in serum and kidney of rats.

Materials & Methods: In this experimental study, 42 male Wistar rats were randomly divided into 6 groups of 7 including one control, one sham (normal saline) and five experimental groups, which intra-peritoneally received ACP (5 mg/kg), NAG (160 mg/kg), SMC (100 mg/kg), ACP+NAC, ACP+SMC, and ACP+ NAC+SMC for one week. After separation of serum and kidney tissue, the activity of the catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione concentration (GSH), malondialdehyde (MDA) and total antioxidant (TAC) was determined.

Results: Acetamiprid caused significant increase in GST activity in serum and kidney ($p< 0.01$), CAT activity in serum and kidney ($p< 0.05$) but insignificant increase in MDA level and insignificant decrease in GSH and TAC compared to control. NAC and SMC, alone and in combination with ACP, restored the levels of TAC, GSH and MDA and activities of CAT and GST.

Conclusion: Acetamiprid increases lipid peroxidation, activity of CAT and GST, and decreases the concentration of GSH and TAC, presumably by producing free radicals. Administration of NAC and SMS as antioxidants causes a decrease in acetamiprid toxicity due to relative reduction of free radicals.

Keywords: Acetamiprid, N-acetyl cysteine, S-methyl cysteine, Rat, Antioxidant enzymes

***Corresponding Author: Seyedalipour Bagher,** Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
Email: b.alipour81@gmail.com
https://orcid.org/ 0000-0002-3854-9328

Journal of Fasa University of Medical Sciences 10 (2020): 2081-2093