بررسی اثرات کاربرد ماکروسیکلیک دی‌آمید دی‌بنزوسولفوکسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو، بیومارکرهای حاصل از تخریب رادیکال‌های اکسیژنی و خصوصیات بافت‌شناسی کبد و بیضهٔ موش نژاد Balb/C

مسعود مشهدی اکبر بوجار، مهناز آذرنیا، عباس شکروی:
دانشگاه تربیت معلم
حامد دانش‌پژوه: دانشگاه پیام نور

چکیده

ماکروسیکلیک دی‌آمید دی‌بنزوسولفوکسید، ترکیبی است با ساختار حلقوی-تاجی شکل و دارای گروه‌های فعال آمیدی، اکسیژنی و سولفوکسید. داخل حلقه آن آب گریز است و می‌تواند با کاتیون‌های سدیم، پتاسیم یا کلسیم پیوند دهد و به دلیل خاصیت چربی‌دوستی در خارج از حلقه خود می‌تواند از عرض غشاء عبور کند. پژوهش حاضر با هدف تعیین پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو به اثر غلظت‌های متفاوت این ترکیب پس از تزریق درون صفاقی به موش‌های نژاد Balb/C انجام گرفت. هم چنین مقادیر بیومارکرهای حاصل از تخریب رادیکال‌های اکسیژنی بررسی شدند. نتایج نشان داد که میزان LD_{50} این دارو ۲۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن است. به موش‌های بررسی شده دوز $subLD_{50}$ با غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت منفرد تزریق شد. بعد از یک هفته بررسی بافت‌شناسی کبد نشان داد که سلول‌های هپاتوسیت، طناب‌های هپاتوسیتی، سلول‌های کوپفر، سینوزوئیدها و فضای پورتال در مقایسه با گروه شاهد هیچ گونه تغییر معنی‌داری نیافتند. در حالی‌که بافت‌شناسی بیضه‌ها نشان داد که حجم و وزن بیضه، تعداد سلول‌های بینابینی، قطر لوله‌های منی‌ساز، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A و B، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید و سلول‌های سرتولی به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز در کبد و بیضه در یک روند وابسته به غلظت رو به افزایش گذاشتند در صورتی که این افزایش برای بیومارکرهای تخریب اکسیداتیو یعنی مالون دی‌آلدئید و دی‌تیروزین فقط در بافت بیضه و در خون محیطی مشاهده شد. بنا بر این با توجه به پژوهش حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که ترکیب مورد استفاده دارای اثرات سمی بوده است. بعد از یک هفته از کاربرد آن در زیر غلظت LD_{50}، بافت بیضه به نحو شاخص تحت تأثیر قرار گرفت، ولی بافت کبد احتمالاً به دلیل قابلیت‌های متابولیک زیاد در متابولیسم مواد و توان بیش‌تر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اثرات نامطلوب بافتی نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: ماکروسیکلیک دی‌آمید، سمیت زیست شناختی، آسیب اکسیداتیو، آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو، بیضه، کبد
دریافت ۸۶/۱۰/۲۴ پذیرش ۸۷/۵/۲۰

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

ماکروسیکلیک دی‌آمیدها ترکیباتی هستند که در مسیر تولید آزاکرون اترها (Aza Crown Ethers) به وجود آمده و خالص می‌گردند. بنا بر این بسیاری از خواص کرون اترها را که ترکیباتی هتروسیکلیک هستند دارا می‌باشند؛ از جمله این که همانند آن‌ها از واحدهای اتیلن اکساید با پیوندهای کووالانس که مجموعاً یک حلقه تاجی شکل تشکیل می‌دهند ساخته شده‌اند. در ماکروسیکلیک دی‌آمیدها به جای اتم‌های اکسیژن کرون اتر، (NR-NH)n جای‌گزین می‌شود و در نتیجه آزاکرون اتر به‌وجود می‌آید. در ترکیب بررسی شده، عامل سولفوکسید به جای یک اتم اکسیژن مستقر شده و بدین ترتیب سه اتم اکسیژن، گوگرد و ازت دارند. این جای‌گزینی‌ها به ثبات بیشتر و همچنین قدرت افزون‌تری اتصالات فلز به داخل حلقه تاجی شکل می‌انجامد[۱]، [۲].

این مواد با داشتن عوامل شیمیایی غیرقطبی در خارج از حلقهٔ خود، خاصیت آب‌گریزی و در داخل خود خاصیت آب‌دوستی دارند. از همین روی، می‌توانند از محیط لیپیدی غشاهای زیستی عبور کنند این در حالی است که یون‌های فلزات قلیایی خاکی و کلسیم می‌توانند به داخل حلقه نفوذ و سپس به آن متصل شده و با انتقال از عرض غشاء منجر به تغییر غلظت این یون‌ها در یکی از دو طرف غشاء گردند که پیامدهای متابولیک و فیزیولژیک به دنبال دارد [۳]،[۴].

بررسی کرون اترها و مشتقات آن‌ها در طی سال‌های اخیر دستاوردهای جدید و با ارزشی در داروشناسی و زیست‌شناسی داشته است که زمینهٔ استفادهٔ گسترده از آن‌ها را حتی در پزشکی فراهم نموده است؛ به طوری که برخی از آن‌ها به دلیل اثرات ضدایسکمی [۵] و ضد سرطانی [۶] مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از آنجا که همواره گونه‌های جدید از این ترکیبات ساخته می‌شوند، لازم است اثرات سمیت سلولی-بافتی آن‌ها، خصوصاً در شرایط in vivo پیش از کاربرد در انسان بررسی شود تا در صورت لزوم در سطوح پایین‌تر از غلظت سمی، امکان استفاده هدف‌دار از آن‌ها فراهم شود. در صورتی‌که اثرات سمی از این مواد شیمیایی به عنوان مواد گزنوبیوتیک مشاهده شود القای استرس اکسیداتیو می‌تواند از مؤثرترین مسیرهای متابولیکی برای اعمال این‌گونه اثرات زیستی باشد که طی آن تولید گونه‌های رادیکال اکسیژنی افزایش می‌یابد[۷].

این رادیکال‌ها به‌طور طبیعی در موجودات هوازی در طی متابولیسم تولید می‌شوند، ولی غلظت آن‌ها با سیستم دفاعی همواره در سطح پایین نگه داشته می‌شود [۸]. هنگام رویارویی سیستم زنده با مواد شیمیایی و مداخلهٔ آن‌ها با مسیرهای متابولیک اکسیداتیو ممکن است تولید این گونه رادیکال‌های اکسیژنی افزایش یابد. در این صورت به دلیل فعالیت و واکنش‌پذیری فوق‌العاده، این رادیکال‌ها به مولکول‌های پروتئین، لیپید و حتی DNA سلول‌ها آسیب وارد می‌کنند [۹]،[۱۰]. پژوهش‌گران برای بررسی این گونه فرایندهای اکسیداتیو، مقدار تام "رادیکال‌های اکسیژنی" را در بافت‌ها اندازه‌گیری می‌کنند ولی به دلیل نیمه عمر کوتاه رادیکال‌های اکسیژنی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

سنجش آن‌ها دقیق نیست. از این رو محصولات پایدار حاصل از تخریب آن‌ها را به عنوان "بیومارکرهای تخریب اکسیداتیو" می‌سنجند. معتبرترین و باارزش‌ترین این بیومارکرها شامل مالون دی‌آلدئید و دی‌تیروزین است که به ترتیب به عنوان بیومارکرهای تخریب اکسیداتیو لیپید و پروتئین تولید می‌شوند [۱۱]. از سوی دیگر، برای مقابله با عوامل رادیکالی اکسیژنی سیستم دفاعی آنزیم‌ها وجود دارد که مهم‌ترین اعضای آن شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز است. سوپراکسید دیسموتاز باعث تبدیل رادیکال سوپراکسید به آب اکسیژنه می‌شود که خود هم با سایر آنزیم‌ها خصوصاً کاتالاز تجزیه می‌گردد [۱۳]،[۱۲]. گلوتاتیون پراکسیداز هم از تخریب اکسیداتیو لیپیدهای غشاء جلوگیری می‌کند [۱۴].

هدف پژوهش حاضر، تعیین اثرات کاربرد ماکروسیکلیک دی‌آمید دی‌بنزوسولفوکسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو، بیومارکرهای حاصل از تخریب رادیکال‌های اکسیژنی و خصوصیات بافت‌شناسی کبد و بیضهٔ موش نژاد Balb/C به طریق تزریق درون صفاقی است. همچنین سطح سمیت آن بر این حیوان ارزیابی می‌شود.

مواد و روش‌ها

حیوان

از آن‌جا که نوع بررسی، تجربی بوده است برای این منظور موش‌های بالغ نژاد Balb/C از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و پس از انتقال به حیوان‌خانه مدتی برای سازگاری با محیط جدید نگه‌داری شدند. در طول آزمایش دمای محیط ۲۴±۲°C بود غذای موش‌ها یکسان و به‌صورت پلیت آماده شده استاندارد از شرکت دام و طیور پارس تهیه گردید.

مواد

مواد شیمیایی مورد استفاده خصوصاً آنزیم‌ها همگی با خلوص زیاد از کارخانه مِرک و سیگما تهیه شدند. ماکروسیکل دی‌آمید دی‌بنزوسولفوکسید از آزمایشگاه شیمی آلی دانشگاه تربیت معلم تهران با خلوص ۹۸/۹۹% در اختیار پژوهندگان قرار گرفت.

تزریق

بر اساس وزن هر موش (۲۲-۲۵ گرم) مقدار ماده تزریقی که محلول آن با فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون استریل شده بود تعیین و با سرنگ به درون حفرهٔ صفاقی تزریق گردید. از آب مقطر به عنوان حلال استفاده شد.

خون‌گیری، استخراج بافت‌ها و تهیهٔ مقاطع بافتی

درموش‌های گروه‌های شاهد و تجربی سه سرموش استفاده و پس از پایان زمان تیمار، موش‌ها با اتر بی‌هوش

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

و با قطع کردن بزرگ سیاهرگ زیرین و زبرین خون‌گیری انجام شد. سپس حفره شکم باز شده، کبد و بیضه‌ها خارج و هر کدام با سرم فیزیولوژی شستشو شدند.

تعیین غلظت LD_{50}

بدین منظور مادهٔ مورد نظر با غلظت‌های مختلف، ولی حجم‌های مساوی در فاصلهٔ غلظتی صفر تا ۲۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن موش‌ها به آنان تزریق شد. مقادیر غلظتی شامل ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بودند. پس از ۲۴ ساعت ضمن مشخص شدن LD_{50} که در آن ۵۰% موش‌ها مرده بودند از همه موش‌های تیمار شده و شاهد خون‌گیری و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و بیومارکرهای تخریب اکسیداتیو ارزیابی شدند.

ثبوت بافتی و رنگ‌آمیزی

نمونه‌های بافتی در فیکساتور بوئن به مدت ۱۸ تا ۲۴ساعت قرار گرفتند سپس مراحل آب‌گیری با الکل اتیلیک انجام گرفت. نمونه‌ها با تولوئن الکل‌گیری شدند. در مرحلهٔ بعد پارافین در اتوکلاو به نمونه‌ها نفوذ داده شد و سپس قالب‌گیری و برش زده شد. نوارهای پارافین برش زده شد با فرمالین ۲% پوشیده شد و نهایتاً روی لام پهن و خشک گردیدند. برای رنگ‌آمیزی هستهٔ سلول‌ها از هماتوکسیلین و برای سیتوپلاسم از ائوزین استفاده شد.

جداسازی سلول‌های خون

مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر خون محیطی جدا و پلاسمای آن پس از سانتریفیوژ در ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه تفکیک شد. لایهٔ سلول‌های قرمز برداشت و در سالین ایزوتونیک با نسبت دو برابر حجم سلول‌ها با PH=۷ شستشو گردید این سلول‌ها با دو برابر حجم خود با آب مقطر همولیز شدند. سپس در ۱۵۰۰۰g به مدت ۴۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی جهت سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی استفاده شد [۱۵].

شمارش سلول‌های اسپرماتوزوئید

سه میدان دید از مرکز لوله‌های منی‌ساز در هر یک از گروه‌های کنترل و تجربی انتخاب و شمارش سلول‌ها در میدان دید میکروسکوپ نوری به روش Glezerman و همکاران [۱۶] به دست کارشناس با تجربه انجام گرفت. میانگین به‌دست آمده برحسب در صد از کل سلول‌ها بیان شد.

آماده‌سازی بافت‌ها برای تعیین شاخص‌های بیوشیمیایی

بافت‌های جدا شده پس از شستشو با سالین نرمال و استریل در محلول KCl، ۱/۱۵% (با نسبت ۱۰% وزن به حجم) با هموژنایزر تفلنی و در مجاورت یخ هموژن گردید. سپس در ۱۳۰۰۰g به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ و

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

محلول رویی برداشت گردید [۱۷]. از این عصاره قسمتی برای سنجش پروتئین تام با روش Lowry [۱۸] و مابقی برای سنجش‌های بیوشیمیایی استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بر اساس متد Spitz انجام گرفت [۱۹]. در این روش احیای محلول نیتروبلو تترازولیوم (۱۵ میلی مول) حاوی بتاکوپرین سولفات (۰/۳۵ میلی مول) در طی ۱ دقیقه ارزیابی و فعالیت بر حسب واحد بین‌المللی بر میلی‌گرم پروتئین تام گزارش شد. سنجش فعالیت کاتالاز بر اساس روش Beer و همکاران انجام شد. در این روش تجزیهٔ آب اکسیژنه در محلول بافر فسفات PH=۷/۴ در ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ارزیابی و منحنی استاندارد با آب اکسیژنه ۰/۰۲ مول استفاده گردید [۲۰]. برای سنجش گلوتاتیون پراکسیداز، محلول واکنش حاوی ۵۰ میلی‌مول تریس (PH=۷/۷) و ۰/۰۲۵ مول NADPH بوده پس از اضافه شدن۱۰۰ میکرولیتر نمونه به این محلول، به مدت ۲ دقیقه در ۲۵°C انکوبه و به آن پراکسید هیدروژن اضافه شد. سپس تغییر جذب در ۳۴۰ نانومتر ارزیابی شد[۲۱].

سنجش کامل "عوامل رادیکال اکسیژنی" (ROS)

این سنجش بر اساس روش Doria انجام شد [۲۲]. در عمل ۲۰ میکرولیتر محلول نمونه به محلول حاوی ۲ میکرومول دی‌هیدرو اتیدیوم اضافه شد. این محلول هم چنین حاوی RPMI-۴۶۴۰ به مقدار ۴۰۰ میکرولیتر بود. احیای دی‌هیدرواتیدیوم با اسپکتروفتومتر در دو طول موج ۴۲۰ و ۶۴۰ نانومتر ارزیابی و نسبت جذب ۶۴۰/۴۲۰ برای سنجش عوامل رادیکال اکسیژنی استفاده شد. مقادیر عوامل رادیکال اکسیژنی در نمونه تیمار به مقادیر عوامل رادیکال اکسیژنی نمونهٔ نرمال به صورت نسبت بیان شد.

ارزیابی مالون دی‌آلدئید و دی‌تیروزین

با دستگاه HPLC بر اساس روش Brid و همکاران مقدار مالون دی‌آلدئید که با تیوباربیتوریک اسید (۰/۰۲۵ مول) ترکیب شد با استفاده از ستون Supelcosil به قطر۵ میلی‌متر (LC-۱۸) به روش reverse phase اندازه‌گیری شد [۲۳]. دی‌تیروزین نیز با روش reverse phase-HPLC و ستون ODS_2 و به کمک محلول استاندارد از این ماده ارزیابی شد [۲۴].

آنالیز آماری

هر آزمایش بر روی نمونه‌ها سه مرتبه تکرار شد. میانگین مقادیر به‌دست آمده و انحراف معیار آن‌ها محاسبه و به منظور مقایسه نتایج از آزمون ANOVA در نرم افزار آماری SPSS استفاده شد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

نتایج

وزن حیوانات در گروه تیمار (۰/۴۲۴±۲۰/۶۴۷ گرم) نسبت به گروه شاهد (۰/۴۰۹±۲۰/۸۸۴ گرم) در سطح P<۰/۰۵ کاهش معنی‌دار نشان نداد.

در خصوص بافت بیضه همان‌طور که در جدول ۱ مربوط به خصوصیات کمی این بافت مشاهده می‌شود، وزن و حجم بیضه در گروه تیمار، کاهش معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل نشان نداد. بیضه درون کیسه‌ای به نام غلاف کیسموئید قرار گرفته که مقدار زیادی کلاژن دارد. بررسی مقطع میکروسکوپی این غلاف نشان داد که قطر آن در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش داشته است، ولی این کاهش معنی‌دار نبوده است(شکل۱). بافت همبند در بیضه‌ها بافتی است که لوله‌های منی‌ساز را پشتیبانی می‌کند. در این بافت سلول‌های بیضی شکل بنام سلول‌های بینابینی قرار دارند. این سلول‌ها از نظر تعداد در گروه تیمار کاهش معنی‌دار در سطح P<۰/۰۱ نسبت به گروه شاهد داشتند(شکل۲).

بررسی لوله‌های منی‌ساز(شکل۳) نشان داد که قطر آن‌ها در سطح P<۰/۰۱ در گروه تیمار شده نسبت به گروه شاهد کاهش داشته است. هنگامی که اولین گروه سلول‌های اسپرماتوگونی، یعنی گروه A که رنگ‌پذیری متوسط داشتند بررسی شدند تعداد آن‌ها در گروه تیمار در سطح P<۰/۰۱ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار داشت.

سلول‌های اسپرماتوگونی نوع B، سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه، سلول‌های اسپرماتید و نهایتاً سلول‌های اسپرماتوزوئید نیز در گروه تیمار شده در سطح P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار نشان دادند (شکل ۴). بررسی سلوهای سرتولی نشان داد که تعداد آن‌ها نیز در گروه تیمار شده در سطح P<۰/۰۵ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار دارد.

در خصوص کبد، بررسی مقاطع میکروسکوپی کبد (اشکال ۶و۵) نشان داد که تعداد سلول‌های هپاتوسیت، سلول‌های کوپفر، سینوزوئیدها، قطر طناب‌های هپاتوسیتی، و ابعاد فضای پورتال در گروه تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارند.

سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، غلظت بیومارکرهای تخریب اکسیداتیو لیپید و پروتئین و نسبت کل "عوامل رادیکال اکسیژنی" در خون محیطی موش‌ها پس از ۲۴ ساعت از دریافت مادهٔ شیمیایی در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

مقدار LD_{50} ۲۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن تعیین گردید. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، هیچ یک از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت افزایش معنی‌داری در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به کنترل نشان نداد. از سوی دیگر با افزایش غلظت‌های کاربردی هر یک از بیومارکرهای مالون

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

دی‌آلدئید و دی‌تیروزین روند افزایشی چشم‌گیری در خون نسبت به شاهد نشان دادند به‌طوری که در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن و غلظت‌های افزون‌تر از مادهٔ مصرفی، هر دو عامل مورد نظر به نحو معنی‌داری نسبت به کنترل افزایش داشته‌اند و در غلظت ۲۵۰۰ این افزایش معنی‌دار به بیش‌ترین مقدار خود در بین غلظت‌های تزریقی رسید. نظر به مشارکت "عوامل رادیکال اکسیژنی" در تخریب ماکرومولکول‌های پروتئین و لیپیدها، سنجش تام این عوامل نسبت به گروه شاهد در این جدول نشان داد که از غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به بعد این شاخص افزایش یافته و در غلظت ۲۵۰۰ به حدود ۴-۳ برابر مقدار نرمال رسید.

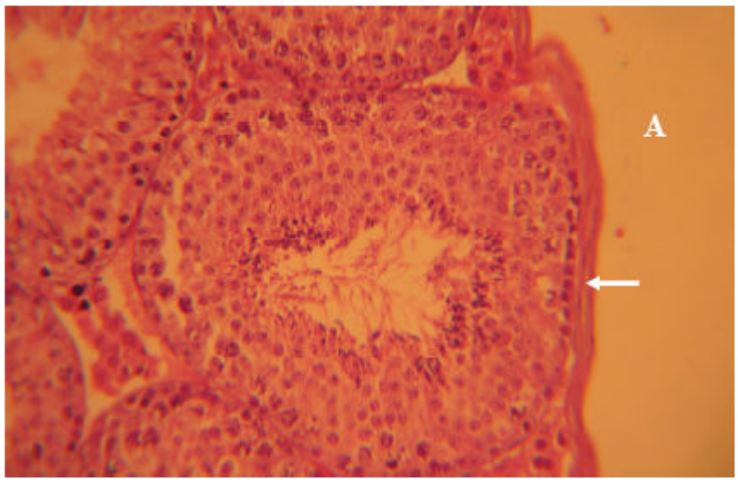
مقادیر همین شاخص‌های بیوشیمایی خون محیطی موش‌ها که غظت‌های کم‌تر از غلظت LD_{50} را دریافت کردند پس از یک هفته در جدول ۳ مشاهده می‌شود. بر این اساس فعالیت هر یک از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در روندی وابسته به غلظت ترکیب مورد استفاده رو به افزایش گذاشت به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد. افزایش مشاهده شده در سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم در گروه تیمار شده معنی‌دار نبود. از سوی دیگر، سنجش "عوامل رادیکال اکسیژنی" نشان داد که مقادیر کامل آن‌ها در غلظت‌های کاربردی از ماده شیمیایی حتی تا غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه شاهد تغییراتی داشتند که معنی‌دار نبود. در این‌جا نیز سطح مالون دی‌آلدئید ودی‌تیروزین (بیومارکرهای تخریب اکسیداتیو) افزایش معنی‌دار در هر یک از غلظت‌های تزریقی در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل نشان داد. افزایش در مقدار آن‌ها تا غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن شاخص و از آن به بعد از شدت آن کاسته شده است به‌طوری‌که اختلاف بین غلظت ۱۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن معنی‌دار نبوده است.

جدول۴ مقادیر شاخص‌های بیوشیمیایی را در بافت بیضهٔ موش‌ها پس از یک هفته دریافت غلظت‌های مختلف از مادهٔ شیمایی تا غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن نشان می‌دهد. بر این اساس، فعالیت هر یک از آنزیم‌های مورد نظر در بافت بیضه در روند وابسته به غلظت مادهٔ شیمیایی رو به افزایش گذاشت. فعالیت آنزیم‌ها تا غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به شدت فعالیتشان افزایش یافت. در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن افزایش فعالیت آنزیم‌ها خفیف‌تر شد. به‌طوری که تفاوت فعالیت آنزیم‌ها بین دو غلظت ۱۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن معنی‌دار نبود. مقادیر مربوط به دو شاخص مالون دی‌آلدئید و دی‌تیروزین نیز در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن از مادهٔ شیمیایی به‌کار رفته به‌طور معنی‌دار نسبت به شاهد افزایش یافتند و به حداکثر مقدار خود نسبت به گروه شاهد رسیدند. مقدار

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

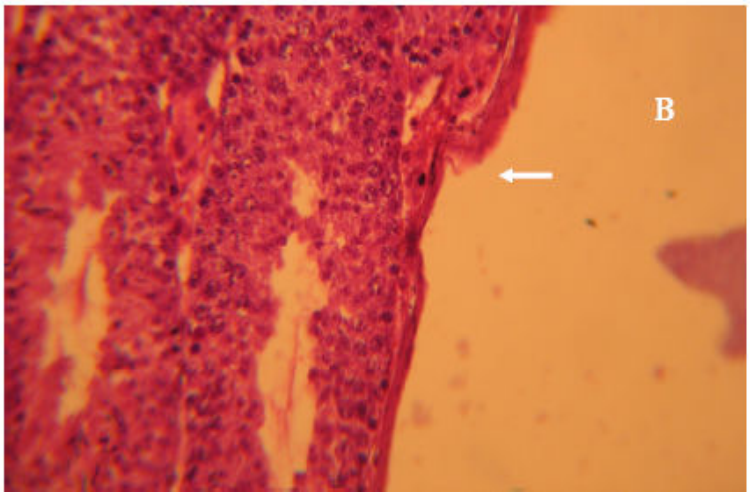
دی‌تیروزین در این غلظت از ماده شیمیایی به‌کار رفته تقریباً به سه برابر دی‌تیروزین در گروه کنترل رسید. مقدار هر یک از دو شاخص مالون دی‌آلدئید و دی‌تیروزین در ۱۵۰۰ نسبت به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن از مادهٔ شیمیایی بکار رفته تفاوت معنی‌دار نشان نداد.

جدول ۵ شاخص‌های بیوشیمایی را در کبد نشان می‌دهد. سطح فعالیت هر یک از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در بافت کبد در روند وابسته به غلظت ترکیب شیمیایی بررسی شده تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن افزایش یافت. در ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن از ترکیب شیمیایی بررسی شده، فعالیت هر یک از آنزیم‌ها اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد. در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن، فعالیت دو آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز نسبت به فعالیت آن‌ها در ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن کاهش یافت. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در غلظت۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن از ترکیب شیمیایی بررسی شده نسبت به فعالیت آن در ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن افزایش نشان داد. با این حال اختلاف فعالیت هر یک از این سه آنزیم در غلظت ۱۵۰۰ نسبت به ۱۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن از ترکیب شیمیایی بررسی شده معنی‌دار نبود. مقادیر مالون دی‌آلدئید و دی‌تیروزین در دامنه غلظت ترکیب شیمیایی بررسی شده حتی در ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه شاهد تغییرات معنی‌دار نشان ندادند.

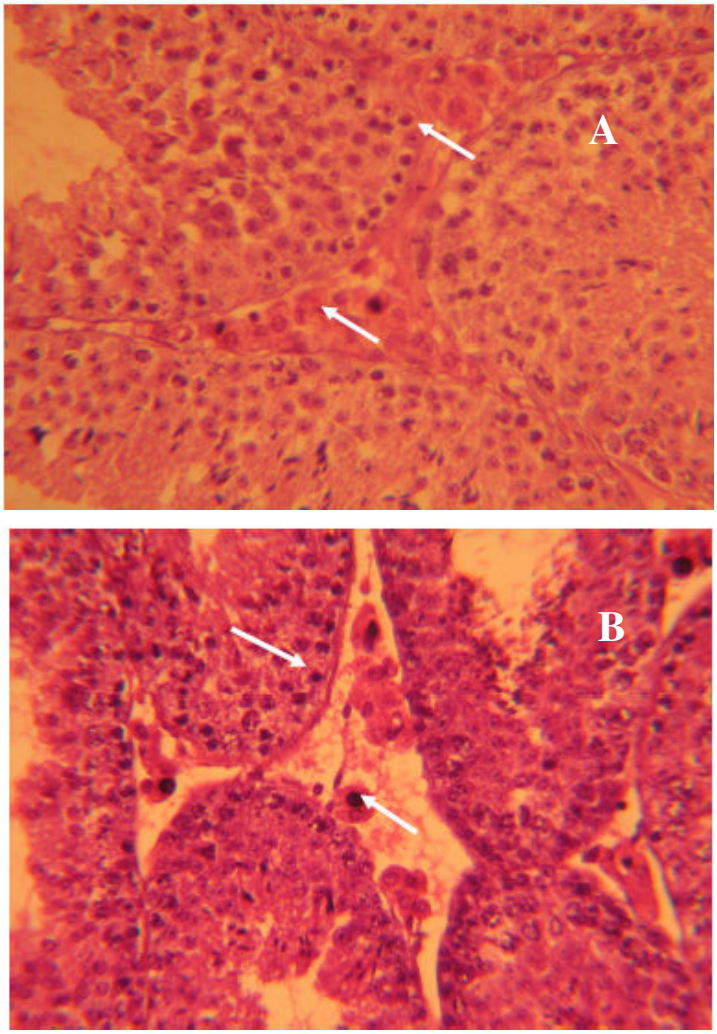


شکل۱. فتومیکروگراف از غلاف سفید بیضه در گروه‌های کنترل (شکل A) و تجربی تیمار شده با ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بعد از یک هفته (شکل B)، رنگ‌آمیزی شده با آئوزین -هماتوکسیلین. به کاهش قطر غلاف سفید در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل توجه شود(بزرگ‌نمایی× ۴۰۰)

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

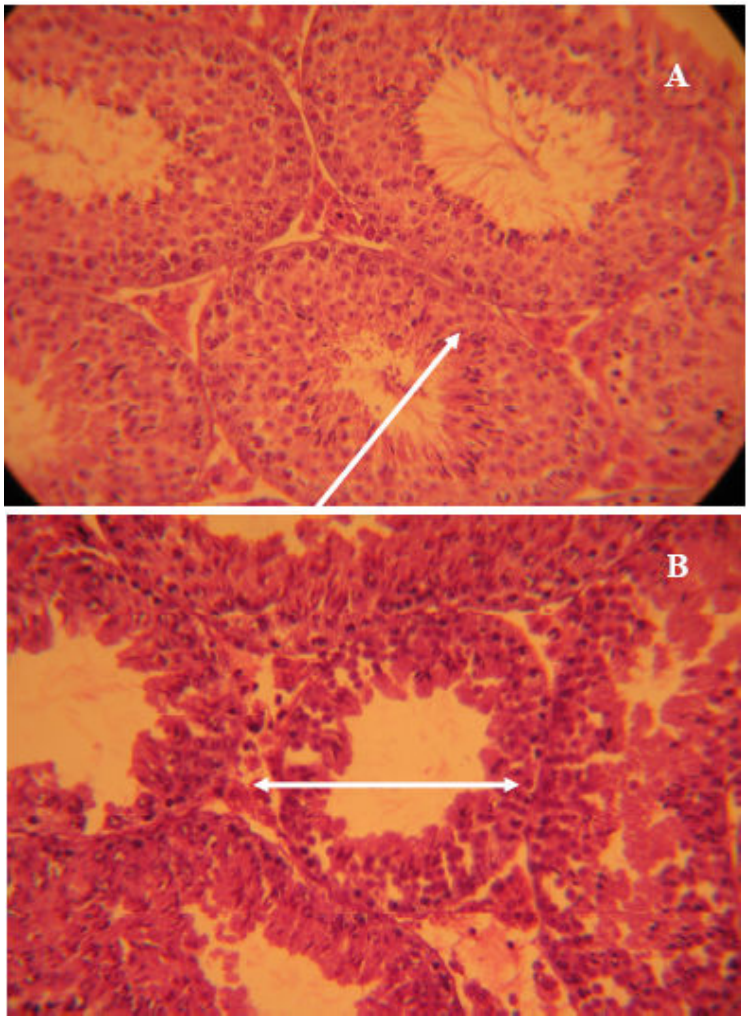


شکل۱. فتومیکروگراف از غلاف سفید بیضه در گروه‌های کنترل (شکل A) و تجربی تیمار شده با ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بعد از یک هفته (شکل B)، رنگ‌آمیزی شده با آئوزین -هماتوکسیلین. به کاهش قطر غلاف سفید در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل توجه شود(بزرگ‌نمایی× ۴۰۰)

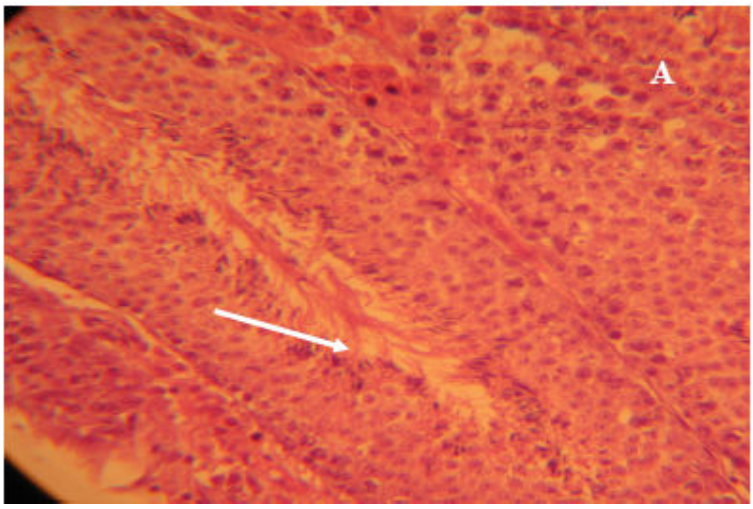


شکل ۲. فتومیکروگراف از سلول‌های بینابینی گروه‌های کنترل (شکل A) و تجربی تیمار شده با ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بعد از یک هفته (شکل B)، رنگ‌آمیزی شده با آئوزین-هماتوکسیلین. به تعداد سلول‌های بینابینی در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل توجه شود(بزرگ‌نمایی × ۴۰۰)

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

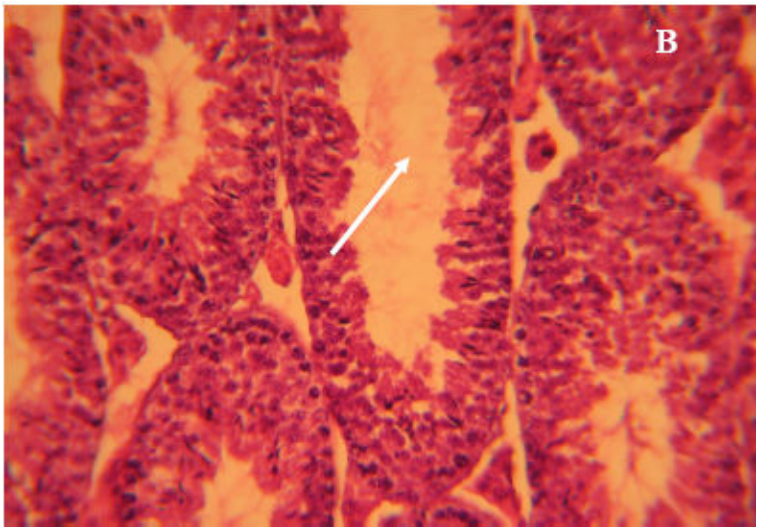


شکل ۳. فتومیکروگراف از لوله‌های منی‌ساز در گروه‌های کنترل(شکل A) و تجربی تیمار شده با۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بعد از یک هفته (شکل B)، رنگ آمیزی شده با آئوزین. هماتوکسیلین. به قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل توجه شود (بزرگ‌نمایی× ۱۰۰)

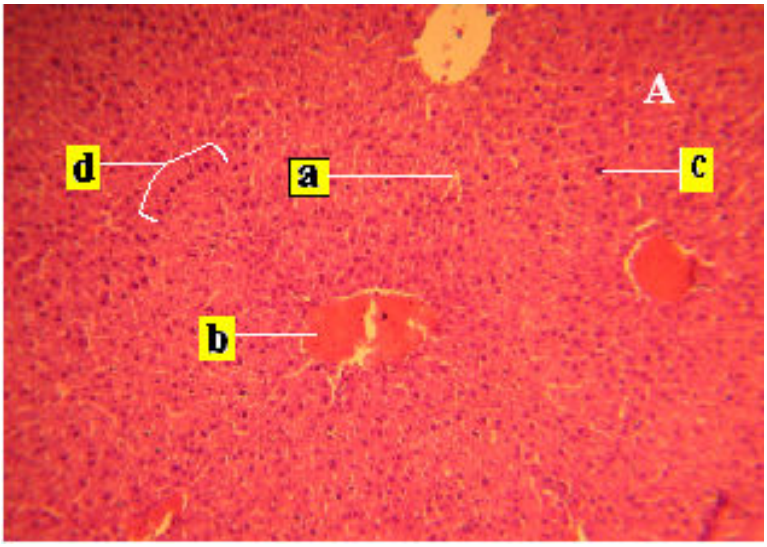


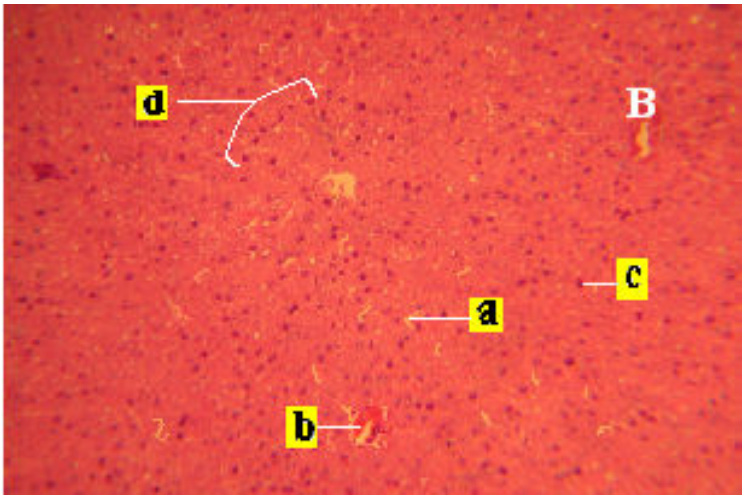
شکل۴

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]



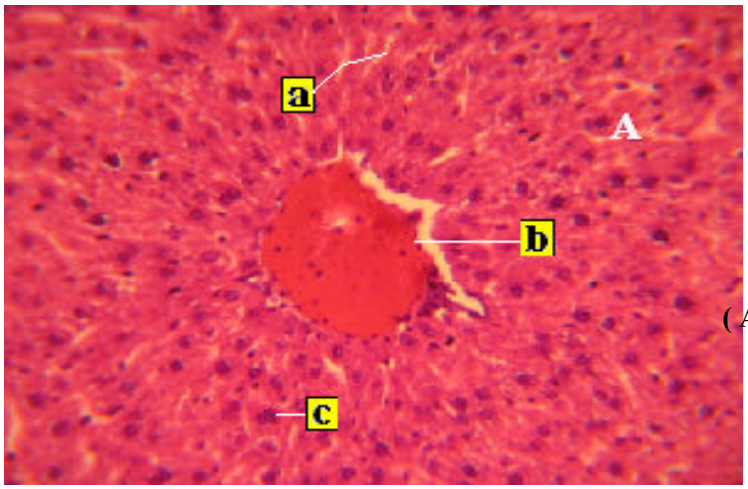
شکل۴. فتومیکروگراف از سلول‌های اسپرماتوزوئید در گروه‌های کنترل (شکل A) و تجربی تیمار شده با ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بعد از یک هفته(شکل B)، رنگ‌آمیزی شده با آئوزین-هماتوکسیلین. به کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوزوئید در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل توجه شود (بزرگ‌نمایی ×۴۰۰).

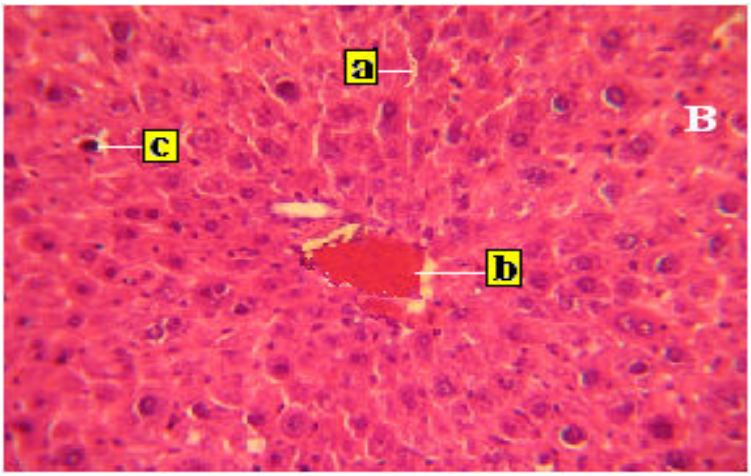




شکل ۵. فتومیکروگراف از فضاهای سینوزویید (a)، پورتال (b)، سلول‌های هپاتوسیت (c) و طناب‌های هپاتوسیتی (d) کبد در گروه‌های کنترل (شکل A) و تجربی تیمار شده با۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بعد از یک هفته (شکل B)، رنگ‌آمیزی شده با آئوزین-هماتوکسیلین (بزرگ‌نمایی× ۱۰۰)

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]





شکل۶. فتومیکروگراف از فضاهای سینوزویید (a)، پورتال (b)، سلول‌های کوپفر(c) در کبد گروه‌های کنترل(شکل A) و تجربی تیمار شده با ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بعد از یک هفته (شکل B)، رنگ‌آمیزی شده با آئوزین-هماتوکسیلین.(بزرگ‌نمایی × ۴۰۰)

جدول۱. کمیت‌های سلولی بافتی بیضه‌های موش‌های گروه کنترل و گروه تیمار شده با ۱۵۰۰ میکرو گرم بر کیلوگرم وزن بدن از کرون اتر بعد از یک هفته.*

شاخص	گروه کنترل	گروه تیمار شده	تفاوت آماری
وزن بیضه‌ها (گرم)	۰/۱۲۰ ± ۰/۰۰۴	۰/۱۰۱ ±۰/۰۰۲	درسطح P<۰/۰۵
حجم بیضه‌ها (سانتی‌متر مکعب)	۰/۲۰۷ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۹۲ ± ۰/۰۰۳	درسطح P<۰/۰۵
قطر غلاف سفید (میکرون)	۱۱/۶۸۱ ± ۰/۲۵۹	۱۱/۳۱۷ ± ۰/۳۱۱	_
تعداد سلول‌های لیدیگ	۵۸/۶۰۰ ± ۱/۲۲۲	۴۸/۵۳۳ ± ۰/۶۹۸	درسطح P<۰/۰۱
قطر لوله‌های منی‌ساز (میکرون)	۱۷۷/۰۹۷ ± ۱/۱۳۹	۱۷۱/۳۶۸ ± ۱/۴۵۹	درسطح P<۰/۰۱
تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی A	۶/۵۳۴ ± ۰/۳۳۶	۴/۸۰۰ ± ۰/۴۷۰	درسطح P<۰/۰۱
تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی B	۵۵/۷۳۳ ± ۱/۷۹	۴۱/۵۳۳ ± ۱/۴۵۰	درسطح P<۰/۰۰۱
اسپرماتوسیت اولیه	۶۶/۸ ± ۱/۵۸۶	۴۱/۵۲۵ ± ۱/۲۰۶	درسطح P<۰/۰۰۱
اسپرماتید	۱۰۹/۴۰ ± ۱/۶۶۴	۹۸/۹۳۳ ± ۱/۹۶۷	درسطح P<۰/۰۰۱
اسپرماتوزوئید	۷۶/۹۳۳ ± ۰/۹۳۸	۶۳/۰۶۴ ± ۰/۹۲۳	درسطح P<۰/۰۰۱
سلول‌های سرتولی	۱۲/۷۳۳ ± ۰/۶۹۳	۱۰/۰۶۴ ± ۰/۷۵۲	درسطح P<۰/۰۵

* مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف معیارند.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

جدول ۲. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و سطح بیو مارکرهای تخریب اکسیداتیو لیپیدی و پروتئینی خون محیطی موش بعد از ۲۴ ساعت تزریق صفاقی ازغلظت‌های مختلف کرون اتر. *

شاخص بیوشیمیایی	غلظت کرون اتر (میکرو گرم بر کیلوگرم وزن بدن)					
	۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۲۵۰۰
سوپر اکسید دیسموتاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۱۸/۱۵ ± ۳/۷۲	۱۶/۳۸ ± ۲/۷۶	۱۹/۲۷ ± ۲/۵۴	۱۷/۴۹ ± ۳/۸۶	۲۳/۴۰ ± ۳/۸۶	۲۴/۶۲ ± ۴/۳۸
کاتالاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۷/۳۱ ± ۱/۱۶	۸/۱۰ ± ۱/۲۳	۶/۸۸ ± ۱/۰۷	۹/۳۹ ± ۱/۴۸	۷/۹۱ ± ۱/۳۰	۱۰/۱۵ ± ۱/۸۹
گلوتاتیون پر اکسیداز (نانومول بر میلی‌گرم پروتئین)	۲۳/۴۶ ± ۴/۲۱	۲۰/۸۳ ± ۳/۸۶	۲۴/۱۵ ± ۴/۰۲	۱۹/۰۵ ± ۲/۵۷	۲۲/۱۶ ± ۲/۱۲	۲۵/۰۷ ± ۲/۸۳
مالون دی آلدئید (نانومول بر ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین)	۳۶/۱۵ ± ۴/۱۰	۳۸/۰۵ ± ۳/۱۶	۴۳/۲۰ ± ۴/۰۵	۵۸/۴۵ ± ۴/۷۳	۶۹/۷۰ ± ۵/۰۴	۹۱/۴۲ ± ۶/۳۴
دی تیروزین (نانومول بر ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین)	۵/۸۱ ± ۰/۸۴	۵/۱۲ ± ۰/۷۱	۷/۴۳ ± ۱/۰۸	۹/۱۰ ± ۱/۳۹	۱۳/۵۲ ± ۱/۷۰	۱۸/۶۳ ± ۲/۱۶
رادیکال‌های آزاد اکسیژن (نسبت به گروه کنترل)	۱	۱	۱/۳۶ ± ۰/۰۴	۲/۴۸ ± ۰/۱۸	۳/۱۲ ± ۰/۴۱	۳/۸۵ ± ۰/۵۴

* مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف معیارند.

جدول ۳. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و سطح بیو مارکرهای تخریب اکسیداتیولیپیدی و پروتئینی خون محیطی بعد از یک هفته تزریق درون صفاقی ازغلظت‌های مختلف کرون اتر.*

شاخص بیوشیمیایی	غلظت کرون اتر (میکرو گرم بر کیلوگرم وزن بدن)			
	۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰
سوپر اکسید دیسموتاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۱۹/۲۲ ± ۲/۸۳	۲۴/۱۰ ± ۳/۰۵	۳۱/۲۸ ± ۳/۲۲	۳۴/۵۲ ± ۳/۳۸
کاتالاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۷/۰۶ ± ۱/۰۳	۹/۳۶ ± ۱/۴۴	۱۳/۷۴ ± ۲/۰۵	۱۴/۲۸ ± ۲/۱۷
گلوتاتیون پر اکسیداز (نانومول بر میلی‌گرم پروتئین)	۲۲/۱۵ ± ۳/۲۹	۲۸/۷۲ ± ۳/۶۳	۳۵/۴۲ ± ۴/۱۰	۳۷/۱۰ ± ۴/۲۲
مالون دی‌آلدئید (نانومول بر ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین)	۳۸/۷۲ ± ۵/۱۲	۴۷/۱۱ ± ۵/۵۱	۵۸/۳۷ ± ۵/۶۲	۶۲/۱۵ ± ۶/۱۱
دی‌تیروزین (نانومول بر ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین)	۵/۵۴ ± ۰/۷۱	۷/۸۵ ± ۰/۸۲	۱۰/۱۴ ± ۱/۰۴	۱۱/۳۲ ± ۱/۱۵
رادیکال‌های آزاد اکسیژن (نسبت به گروه کنترل)	۱	۱	۱/۱۶ ± ۰/۰۵	۱/۲۱ ± ۰/۱۴

* مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف معیارند.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

جدول ۴. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و سطح بیو مارکرهای تخریب اکسیداتیو لیپیدی و پروتئینی بافت بیضه موش بعد از یک هفته تزریق درون صفاقی ازغلظت‌های مختلف کرون اتر.*

شاخص بیوشیمیایی	غلظت کرون اتر (میکرو گرم بر کیلوگرم وزن بدن)			
	۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰
سوپر اکسید دیسموتاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۱۳۸/۵۵ ± ۱۰/۱۶	۱۵۰/۳۱ ± ۱۲/۱۱	۱۴/۲۲ ± ۱۸۲/۷۱	۱۹۰/۲۴ ± ۱۵/۴۲
کاتالاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۳۷/۱۲ ± ۲/۹۴	۴۴/۶۴ ± ۳/۸۱	۷۰/۲۳ ± ۶/۵۵	۷۶/۱۸ ± ۶/۸۲
گلوتاتیون پر اکسیداز (نانومول بر میلی‌گرم پروتئین)	۵۵/۱۰ ± ۴/۱۲	۶۰/۸۵ ± ۵/۳۲	۸۲/۱۱ ± ۷/۶۰	۸۰/۳۲ ± ۷/۱۵
مالون دی‌آلدئید (نانومول بر ۱۰۰ میلی گرم پروتئین)	۸۱/۱۳ ± ۷/۲۵	۹۲/۱۰ ± ۸/۰۳	۱۱۳/۶۵ ± ۸/۴۰	۱۲۳/۱۷ ± ۹/۷۸
دی‌تیروزین (نانومول بر ۱۰۰ میلی‌گرم پروتئین)	۱۶/۵۶ ± ۱/۰۳	۲/۷۴ ± ۱/۸۲	۴۳/۱۵ ± ۴/۱۸	۵۰/۸۳ ± ۴/۵۶
رادیکال‌های آزاد اکسیژن (نسبت به گروه کنترل)	۱	۱ ± ۰/۰۷	۱	۱

*** مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف معیارند.**

جدول ۵. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و سطح بیو مارکرهای تخریب اکسیداتیو لیپیدی و پروتئینی بافت کبد موش بعد از یک هفته تزریق درون صفاقی ازغلظت‌های مختلف کرون اتر.*

شاخص بیوشیمیایی	غلظت کرون اتر (میکرو گرم بر کیلوگرم وزن بدن)			
	۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰
سوپر اکسید دیسموتاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۵۴/۷۱ ± ۶/۵۱	۶۷/۱۴ ± ۶/۸۳	۹۴/۵۲ ± ۸/۱۲	۸۸/۴۶ ± ۷/۵۱
کاتالاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۱۸/۱۲ ± ۱/۸۰	۲۸/۴۷ ± ۲/۱۵	۴۳/۱۴ ± ۳/۵۱	۴۱/۶۳ ± ۳/۴۰
گلوتاتیون پر اکسیداز (نانو مول بر میلی‌گرم پروتئین)	۳۱/۵۶ ± ۲/۶۲	۵۷/۳۱ ± ۴/۱۰	۶۹/۷۷ ± ۵/۲۳	۷۱/۲۵ ± ۵/۶۴
مالون دی آلدئید (نانو مول بر ۱۰۰ میلی گرم پروتئین)	۶۸/۲۴ ± ۵/۴۷	۷۴/۱۴ ± ۶/۱۱	۷۸/۲۶ ± ۷/۴۰	۸۰/۱۱ ± ۷/۶۳
دی تیروزین (نانو مول بر ۱۰۰ میلی گرم پروتئین)	۱۲/۳۷ ± ۱/۰۳	۱۳/۴۶ ± ۲/۱۴	۱۵/۸۱ ± ۲/۲۸	۱۶/۵۷ ± ۳/۴۳
رادیکال‌های آزاد اکسیژن (نسبت به گروه کنترل)	۱	۱ ± ۰/۰۶	۱	۱

*** مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف معیارند.**

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

بحث

هتروماکروسیکلیک بررسی شده در این پژوهش، خود الیگومری ازدی‌اکسان است که واحد بنیادی آن اکسی‌اتیلن است. در این ترکیب گروه‌های شیمیایی همچون سولفوکسید و آمید وجود دارند که بر خصوصیات شیمیایی آن تأثیر می‌گذارند. با توجه به تنوع ساختار این مواد برای بررسی اثرات زیستی و کاربردهای بالینی آن‌ها تلاش زیادی صورت گرفته است: ولی همچنان برای روشن شدن جنبه‌های مختلف اثرات آن‌ها آزمایش‌های گوناگون انجام می‌گیرند.

در پژوهش حاضر ۲۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌عنوان غلظت LD_{50} تعیین شد. مرگ موجود زنده مربوط به سمیت این ماده شیمیایی است. چنین اثر سمیتی از سایر کرون اترها نیز مشاهده شده، به‌طوری که در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها حتی منجر به مرگ سلول‌های مورد آزمایش شده است. پژوهندگان اعلام کرده‌اند که میزان غلظت برای بروز اثرات سمی، وابسته به نوع جانشینی موجود در حلقه تاجی شکل ماده مصرفی و همچنین به نوع سلول یا حیوان بررسی شده وابسته بوده است [۲۵]،[۲۶]. بررسی منابع، مکانیسم‌های مختلفی را برای ایجاد سمیت نشان داده‌اند که یکی از آن‌ها، اثرات حاصل از افزایش رادیکال‌های آزاد در پاسخ به همین ماده به عنوان مادهٔ گزنوبیوتیک در کشت سلول‌های V79 و مشتقات شبیه به آن در سلول‌های WI38 بوده است [۲۸]،[۲۷]. این مکانیسم از آن جهت حائز اهمیت است که موش به عنوان مدلی مناسب در این گونه تحقیقات، موجودی هوازی بوده و به‌طور طبیعی مقادیر کمی از "رادیکال‌های آزاد اکسیژنی" (Reactive Oxygen Species=ROS) در بدن آن تولید می‌شود.

مادهٔ شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش در بخش خارجی ملکول خود ویژگی لیپید دوستی دارد که به آن خصوصیت نفوذپذیری چشمگیری در غشاهای زیستی می‌دهد. همچنین داخل ساختار حلقه‌ای آن توانایی جذب یون‌های فلزی دارد. بر این اساس پژوهش گران نشان داده‌اند در رویارویی سلول‌ها با ترکیبات شیمیایی که دارای چنین خصوصیاتی هستند احتمال دارد که این ترکیبات با دخالت در فعالیت‌های طبیعی غشا یا شرکت در انتقال یون‌ها، تعادل غلظتی آن‌ها را در دو سوی غشا بر هم زنند و یا با تأثیر غیرمستقیم بر واکنش‌های اکسیداتیو، تعادل طبیعی که بین تولید و تجزیهٔ "رادیکال‌های آزاد اکسیژنی" وجود دارد مختل کنند و از آن به بعد با افزایش میزان رادیکال‌های آزاد و تأثیرات تخریبی بر ماکروملکول‌ها باعث بروز سمیت زیستی گردند [۲۹].

بر این اساس، هدف از پژوهش حاضر پس از مشخص شدن سطح سمیت LD_{50} ماده مورد نظر بررسی این فرضیه است که آیا سمیت مشاهده شده این ماده می‌تواند مربوط به کارکرد تخریبی "رادیکال‌های آزاد اکسیژنی" (ROS) باشد؟ بررسی انجام شده نشان داد که ۲۴ ساعت پس از زمان تزریق مادهٔ شیمیایی، مقدار رادیکال‌های آزاد اکسیژنی در خون موش‌ها در روندی وابسته به غلظت افزایش یافته و در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

کیلوگرم وزن بدن که معادل LD_{50} است به تقریباً ۴ برابر مقدار طبیعی رسید. مشابه چنین نتیجه‌ای در تحقیقات Stephen و همکاران [۳۰] بیان شده است. در بررسی آنان مکانیسم افزایش و تأثیر رادیکال‌های آزاد اکسیژنی در پاسخ به اثرات مواد شیمیایی بررسی شده و بر اساس آن چگونگی شکل‌گیری پدیدهٔ مرگ سلولی بیان شده است. با افزایش غلظت این رادیکال‌های اکسیژنی و رسیدن آن‌ها به بافت‌های بدن، شبکه‌ای از اثرات تخریبی بر ملکول‌های زیستی شکل می‌گیرد که محصولات باقی مانده از این تخریب‌ها به همراه جریان خون در سراسر بدن توزیع می‌شوند. چنین فرایندی نهایتاً منجر به از کار افتادن اندام‌ها و مرگ موجود زنده می‌شود [۳۱]. پدیده‌ای که در پژوهش حاضر در غلظت LD_{50} مشاهده شد.

مالون دی‌آلدئید و دی‌تیروزین به ترتیب از تخریب لیپیدها و پروتئین‌ها تحت تأثیر رادیکال‌های آزاد اکسیژنی بوجود می‌آیند. در این پژوهش، غلظت بالای این بیومارکرهای تخریب به همراه افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژنی مشاهده شد. این مشاهده خود می‌تواند تأییدی بر مشارکت رادیکال‌های اکسیژنی در وقوع آسیب‌های بافت‌ها باشد [۳۲].

عدم تغییر در سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گروه تیمار شده با مادهٔ شیمیایی در این تحقیق نسبت به گروه شاهد می‌تواند ناشی از سرعت عمل‌کرد و تأثیرات این ماده در القای تولید رادیکال‌های اکسیژنی باشد؛ در حالی که دفاع آنتی‌اکسیدانتی به زمان بیش‌تری برای فعال شدن نیاز داشته است. دلیل زمان تأخیر در تحقیقات مختلف بررسی شده است و این نتیجه حاصل شده است که برای فعال شدن ژن‌های این آنزیم‌ها وجود مدت زمانی بعد از افزایش در غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژنی ضروری است [۳۴]،[۳۳]،[۱۲].

برای آن‌که اثرات سمی این مادهٔ شیمیایی از نظر بافت شناسی نیز بررسی شود، بافت کبد به عنوان مهم‌ترین مرکز متابولیسم مواد شیمیایی و غدهٔ بیضه که محل تولید سلول‌های جنسی است انتخاب شدند. موش‌ها با تزریق مادهٔ مورد نظر تا غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن توانستند حداقل یک هفته زنده بمانند. بقای این گروه تیمار شده احتمالاً با القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و فعالیت شاخص و معنی‌دار آن‌ها در خون محیطی مرتبط بوده است. به‌طوری که بررسی نشان داد گروه تیمار شده توانستند در طول مدت یک هفته از افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژنی خون جلوگیری کنند و آن را در پایان این زمان به محدوده گروه کنترل برسانند. این یافته با نتایج تحقیقات James و همکاران [۳۵] و Scott و همکاران [۳۶] مطابقت دارد. آنان اظهار داشتند که افزایش اولیه در غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژنی پس از مدتی به القای سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌انجامد و آن نیز منجر به کاهش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژنی می‌گردد. از آن‌جا که در پایان یک هفته هنوز مقادیر بیومارکرهای تخریب اکسیداتیو در غلظت‌های کاربردی ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به نحو معنی‌دار بیش از گروه کنترل بوده است؛ به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در حدی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

نبوده است که به‌طور کامل مقادیر این بیومارکرها را به محدودهٔ طبیعی برگرداند. از سوی دیگر، انتقال بخشی از این بیومارکرها از بافت‌های مختلف به خون، منبع افزایش دهندهٔ آن‌ها در خون محیطی بوده است. در تأیید این موضوع می‌توان به تحقیقاتی اشاره کرد که در آن‌ها فعالیت فیزیولژیک اندام‌های مختلف تحت تأثیر مواد شیمیایی منجر به تولید مقادیر مختلفی از بیومارکرهای تخریب اکسیداتیو شده‌اند [۳۷و۲۹]. بر این اساس در تحقیق حاضر، بررسی بافت‌شناسی بیضه در حداکثر دوز قابل تحمل موش‌ها برای مدت یک هفته (۱۵۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) کاهش معنی‌دار در حجم غده، تعداد سلول‌های لیدیگ، قطر لوله‌های منی‌ساز، تعداد سلول‌های جنسی و سلول‌های پیش‌ساز آن‌ها را نشان داد. در این بافت، افزایش چشم‌گیر و معنی‌دار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مشاهده شده است؛ با این حال افزایش فعالیت آن‌ها در حدی نبوده که به‌طور کامل مانع این آسیب‌ها شود. احتمالاً افزایش بیومارکرهای تخریب اکسیداتیو در این بافت نیز ناشی از تأثیرات تخریبی افزایش اولیهٔ رادیکال‌های آزاد اکسیژنی بوده است. هم چنین همان‌طور که پیش‌تر گفته شد، با ورود بخشی از این بیومارکرها به جریان خون، به طور غیرمستقیم از منابع بالا افزایندهٔ میزان غلظت آن‌ها در خون بوده است. در تأیید این مطالب می‌توان به تحقیقات مشابهی که Aydos وهمکاران [۳۸]، Habib و همکاران [۳۹] و Filho و همکاران [۴۰] انجام داده‌اند اشاره کرد که طی آن‌ها نشان دادند پس از القا در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی بیضه، متعاقباً مقادیر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت افزایش نشان داده‌اند و در پایان به دلیل کمبود واکنش‌های ترمیمی در این بافت مقادیر چشم‌گیری از بیومارکرهای تخریب اکسیداتیو در حضور آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو موجود بوده‌اند.

هنگامی که بافت کبد ارزیابی شد، برخلاف بیضه، اثرات نامطلوب مشاهده نگردید. این در حالی است که نه تنها مقادیر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت افزایش معنی‌داری در گروه تیمار شده داشته‌اند، بلکه سطح بیومارکرهای تخریب اکسیداتیو نیز در بافت کبد تغییرات عمده‌ای نشان ندادند. بر این اساس، احتمالاً پاسخ آنزیمی به رادیکال‌های آزاد اکسیژنی که به صورت افزایش فعالیت این آنزیم‌ها بروز کرده توانسته است در طی یک هفته از اثرات نامطلوب رادیکال‌های آزاد ایجاد شده جلوگیری کند. از سوی دیگر به دلیل فعالیت چشم‌گیر بافت کبد به عنوان جایگاه متابولیسم مواد شیمیایی احتمالاً با متابولیسم سریع مادهٔ شیمیایی منجر به کاهش تأثیرات آن نسبت به بافت بیضه شده است. مطلبی که در تحقیقات مختلف در زمینهٔ تأثیر مواد شیمیایی مختلف بر بافت کبد بیان شده است [۴۱]،[۴۲]،[۴۳].

در مجموع این تحقیق نشان داد که مادهٔ شیمیایی بررسی شده توانایی تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی دارد و از طریق آن به واسطهٔ تخریب اکسیداتیو لیپیدها و پروتئین‌ها، اثرات سمی خود را در غلظت‌های بالا بر بافت‌ها و نهایتاً موش‌های تیمار شده برجای گذاشته است. دخالت و تأثیر این ماکروسیکلیک‌ها ممکن است به توانایی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

حمل یونی و نفوذپذیری آن در غشاهای سلول که از خصوصیات دیگر ترکیبات مشابه آن است ارتباط داشته باشد. تغییر در ویژگی‌های فسفولیپیدهای غشا براثر پراکسیداسیون لیپیدی که شاهد آن افزایش مالون دی‌آلدئید است منجر به از دست دادن ثبات و کارکرد طبیعی آن شده و آن هم منجر به افزایش نفوذپذیری غشا می‌شود که مجموعاً از عوامل مهم مرگ سلولی هستند [۴۴]. از سوی دیگر، فضای داخل حلقهٔ تاجی شکل این ماکروسیکلیک امکان اتصال به کلسیم و سدیم را دارد. یون‌هایی که تغییر در تعادل غلظتی آن‌ها در سلول منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی و به دنبال آن بروز سمیت و مرگ سلولی می‌شود [۴۴]،[۴۵]،[۴۶]. نهایتاً اگر چه این تحقیق بخشی از شواهد را برای تأثیر سمی این ترکیب ماکروسیکلیك نشان داد، با وجود این بررسی‌های بیش‌تری برای روشن شدن مکانیسم‌های مرتبط با اثرات آن نیاز است.

منابع

1. G. W. Gokel, M. W. Leevy, M. E. Webert, Crown ethers, *Chem. Rev*, 104 (2004) 2723- 2750.
2. A. Shockravi, T. S. Bavili, Synthesis of new dibenzosulfoxide macrocyclic diamides, *Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chem*., 52 (2005), 223-227.
3. C. J. Pederson, The discovery of crown ethers, *Science.*, 241 (1988) 156-540.
4. A. Shockravi, T. S. Bavili, E. Rostami, A. Yousefi, et al., Synthesis of new dibenzosulfide and dibenzosulfoxide macrocyclic compounds, *Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chem*., 49 (2004) 163-166.
5. K. Gurbanov, A. A. Paperno, Antiischemic properties of crown ethers derivatives, EKSP Kin. *Farmakol.*, 56 (1993) 18-21.
6. M. Mark, M. M. Mcphee, S. M. Kerwin, Synthesis, DNA cleavage and cytotoxicity of a series of bis(propargylic) sulfone crown ethers, Bioorg. *Med. Chem*., 9 (2001) 2809-2818.
7. L. Z. Loeckie, J. Meerman, N. M. Jan, Biomarkers of free radicals damage application in experimental animals and human, Free Radicals. *Bioi. Med*., 26 (1999) 202-226.
8. A. Anterio, Biomarkers and their use in occupational medicine, Scan. J. *Work Environ. Health*, 25 (1999) 521-528.
9. B. Hallhvell, J. M. C. Gutteridge, Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: Halliwel B., Gutteridge J. M. C., editors. *Free radicals in biology and medicine*. Chapter 4. Third edition. Oxford Scientific Publication, (1989) 247-252.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

10. B. Chantal-Capeillere, V. Gausson, Biochemical and spectrophotometric significance of advanced protein products, *Biochemica Biopysica Acta*, 1689 (2004) 91-102.

11. P. Suhel, R. Sheikh, Protein carbonyls: new biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol*., 20 (2005) 112-117.

12. T. Kobayashi, J. M. Robinson, H. Seguchi, Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils. J. *Cell Sci*., 111 (1998) 81-91.

13. J. C. Fruchart, P. Duriez, Free radicals and atherosclerosis. In: A. Catherine, E. Rice, H. B. Roy, editors. Free radical damage and its controls. Elsevier, (1994) 258-260.

14.M. Kantol, M. Sarranen, P. T. Vanha, Selenium and glutathione peroxidase in serum, plasma of men and bulls, *J. Reprod. Fertil*., 83 (1988) 785-794.

15. C. Dibeyendu, B. C. Matitree, Antioxidant defense status of red blood cells of patients with B-thalassemia and EB- thalassemia. *Clin. Chim*. Acat, 305 (2001) 123-129.

16. M. Glezerman, B. Bartoov, Semen analysis. In: Infertility. *Male and female*. 2nd ed. V. Insler and B. Lunenfeld, Eds., New York, Churchill Livingston, 1993. pp:285-315.

17. A. Ilgazil, C. Sengul, H. Maral, et al., The effects of Thinner inhalation on Superoxide dismutase activities malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs. *Clin. Chim*. Acta, 343 (2004) 141-144.

18. O. H. Lowery, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Radall, Protein measurement with phenol reagent, *J. Biol. Chem*., 193 (1951) 265-275.

19. D. R. Spitz, L. W. Oberley, An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates, *Anal. Biochem*., 179 (1989) 8-18.

20. R. F. Beers, I. W. Sizer, A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *J. BioI. Chem*., 195 (1952) 133-140.

21. S. D. K. Clair, C. K. Chow, Glutathione peroxidase: activity and steady-state level of mRNA. In: N. A. Punchard, F. J. Kelly, editors. *Free radicals. A practical approach*. New York: oxford University Press, (1996) 227- 240.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

22. R. Dorian, H. Morjani, B. Chenais, Free radical production and labile iron pool decrease triggered by subtoxic concentration of aclarubicin in human leukemia cell lines, *Leukemia Research*, 26 (2002) 927-931.

23. B. R. Bird, S. S. O. Hung, M. Hadley, H. H. Draper, Determination of malonaldehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 128 (1983) 240- 244.

24. R. Amado, R. Aeschbach, H. Neukom, Dityrosine: in vitro production and characterization, *Methods Enzymo1.*, 107 (1984) 377- 388.

25. P. Arenaz, L. Bit ticks, K. Pannell, S. Garcia, Genotoxic potential of crown ethers in Salmonella typhimurium, *Mutagenesis*, 4 (1989) 437-438.

26. S. C. Gad, W. J. Conroy, Mc Klevey, R. A Turney, Behavioral and neuropharmacological toxicology of macrocyclic ether 18-crown-6, *Drug Chem., Toxicol.*, 114 (1979) 339-353.

27. M. M. A. Boojar, A. Shockravi, On the cytotoxicity and status of oxidative stress of two novel synthesized tri-aza macrocyclic diamides as studied in the V79 cell lines, *Bioorg. Med. Chem.*, 15 (2007) 3437-3444.

28. M. M. A. Boojar, F. Goodarzi. Cytotoxicity and the levels of oxidative stress parameters in Wl38 cells following two macrocyclic crown ethers treatment, *Clin. Chem.* Acta, 364 (2006) 321-327.

29. L. Bergendi, L. Belles, M. Ferencik, Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sciences*, 65 (1999) 1865-1874.

30. S. Stephen, Redox-active metal ions, reactive oxygen species and apoptosis, *Free Rad. Bioi. Med.*, 37 (2004) 1921-1942.

31. F. Bice and H. Andera, Role of reactive oxygen species in lung injury and diseases, *Free Rad. Bioi. Med.*, 34 (2003) 1507-1516.

32. R. B. Scott, K. S. Reddy, E. C. Husain, Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung and kidney in rat. *Pathophysiology* 7 (2002) 25-32.

33. L. F. Chery, C. Ling- y, et al., Enhanced Bleomycine-induced pulmonary damage in mice lacking extra cellular Superoxide dismutase, *Free Rad. Bioi. Med.*, 35 (2003) 763-771.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

34. Foyouzi N, Berkkanoglu M, Arici A, Kwintkiewicz J, Izquierdo D, Duleba AJ. Effects of oxidants and antioxidants on proliferation of endometrial stromal cells. *Fertility and Sterility* 2004; 82 (supplement 3):1019-1022.

35. B. M. James, C. K. Murali, Clinical uses of nitroxides as superoxide-dismutase mimics. In: J. R. Christopher, editors: Toxicology of the Human Environment, the Critical Role of Free Radicals. Liverpool John Moores University, *Taylor and Francis publication*, (2000) 313-316.

36. R. B. Scott, K. S. Reddy, E. C. Husaill, L. P. Schlorff, Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung, and kidney in Rat, *Pathophysiology*, 7 (2000) 25-32.

37. M. Carolina, F. Massimo, C. Venera, et al., Ethallol-induced injury in rat primary cortical astrocytes involves oxidative stress: effect of idebenone. *Neuroscience letters*, 329 (2002) 21-24.

38. K. Aydos, B. Kupeli, T. Soygur, A. Ullsal, E. Erden, O. Tulullay, S. Kupeli Analysis of the relationship between histological alterations and the generation of reactive oxygen species in vasectomized rat testes, *Urology,* 51 (1998) 510- 515.

39. T. Habib, T. Abul, T. Chacko Mathew, A. Fawzi, A. Hilal. M. Hussein Dashti, Antioxidant enzyme level in the testes of cirrhotic rats, *Nutrition,* 18(2002) 56-59.

40. D. W. Filho, A. M. Torres, A. L. B. Bordill, B. Tinia et al., Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusioll injury, *Molecular Aspects of Medicine,* 25 (2004) 199-210.

41. J. C. Lipscomb, Evaluating the relationship between variance in enzyme expression and toxicant concentration in health risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment*, 10 (2004) 38-55.

42. G. Malgorzata, Induction of hepatic enzyme activity in rat by polycyclic aromatic hydrocarbons, *Toxicology Letters*, 88 (1996) 91-94.

43. R.M Izatt, J.S. Bradshaw, S.A. Nielson, J.D. Lamb Thermodynamic and kinetic data for cation macrocyclic interaction. *Chem Rev* 1985; 85:271-339.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

44. K.G. Gurbanov, A.A. Paperno S.A. Bogomaz, Investigation of antiischeemic properties and mechanism of action of Azacrown ether derivatives. *Acta Physiol Pharmacol Bulgarica* 1992; 18:27-31.

45. T.I. Daphna, S. Michaela, K. Yoel, A. Irit Stimulation of neutrophils by pernylcysteine analogs; Ca^{2+} release and influx. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1451:187-195.

46. J.I. Goldhaber Free radicals enhance Na^{+}/Ca^{2+} exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1996; 271:H823-H833.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]