IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

سال ۱۳۹۸، دوره ۳، شماره ۳، پیاپی ۱۰، صفحه ۱۶۸-۱۵۹

مقاله پژوهشی

مطالعه اثرات سرطان‌زایی و سمیت سلولی دیازینون در موش سوری در شرایط درون تنی و برون تنی

مژگان اصغری[۱]، گودرز صادقی هشجین*[۱]، علی اکبر گلابچی فر[۱]، محمد کاظم کوهی[۱]، احد محمدنژاد[۲]، ساناز ریسمانچی[۲]، محمد طاهری[۳]، غلامرضا شمس[۱]

۱. گروه علوم زیستی مقایسه ای، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیولوژی سرطان، انستیتو کانسر ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. آزمایشگاه مرکزی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

دریافت: ۸ دی‌ماه ۱۳۹۸ پذیرش: ۱۲ بهمن‌ماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینه و هدف: در این تحقیق اثرات سمیت و سرطان‌زایی دیازینون به عنوان یک آفت‌کش ارگانوفسفره پرمصرف، بر موش سوری تحت شرایط درون‌تنی و اثر سمیت سلولی آن به‌صورت برون‌تنی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها: موش ها به دو گروه ۱۵تایی تیمار و شاهد تقسیم شدند. در گروه تیمار، دیازینون با غلظت ppm ۱ به میزان ۱ میلی لیتر به مدت ۱۲ هفته روی پوست ریخته شد. در پایان دوره پس از کالبدگشایی، نمونه‌های بافتی از ارگان‌های موردنظر برداشت گردید. سپس دیازینون با غلظت های۱۰، ۲۵ ،۵۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کشت سلول‌های های فیبروبلاست L۹۲۹ موش اضافه شد. سمیت سلولی با استفاده از تست MTT و میکرونوکلئوس و کاریوتیپ به صورت برون‌تنی مورد سنجش قرار گرفته و درصد IC۵۰ تعیین گردید.

یافته‌ها: مشاهدات میکروسکوپی بافت کلیه مبین سمیت سلولی خفیف در لوله‌های پیچیده نزدیک، سمیت کبدی خفیف در بافت کبد وکارسینوما در بافت بیضه داشت. درصد فراوانی میکرونوکلئوس ها در غلظت µg/ml ۱۰۰ در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود. در تست MTT میانگین جذب نوری در غلظت‌های µg/ml ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ به‌طور معنی‌داری با میانگین جذب نوری با گروه کنترل متفاوت بود ($p < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: تماس پوستی دیازینون علاوه بر ایجاد آثار پاتولوژیک در ارگان‌های مختلف موش سبب سمیت سلولی و پیش‌سرطان‌زایی در آزمون‌های سمیت سلولی شد.

واژه‌های کلیدی: ارگانوفسفات‌ها، دیازینون، سرطان، موش سوری، *MTT*

مقدمه

در سال‌های اخیر همزمان با رشد و توسعه جوامع در دنیا و دسترسی زیاد افراد به سموم و داروها، میزان مسمومیت‌های ناشی از این عوامل افزایش زیادی یافته است. حجم بالای سموم مصرفی مانند آفت‌کش‌ها، مواجهه انسان را با این‌گونه سموم تقریباً غیرقابل‌اجتناب کرده به طوری که می‌تواند به صورت غیرعمدی و تصادفی و یا به دلیل باقیمانده‌های این سموم در محیط زیست و یا اسباب و وسایل، سبب مسمومیت افراد گردد [۱]. تماس با آفت‌کش‌ها به‌خصوص سموم ارگانوفسفره که در بخش کشاورزی بیشترین مصرف را دارند منجر به بروز اثرات حاد و مزمن می‌گردد. از جمله اثرات مزمن تماس با آفت‌کش‌های ارگانوفسفره می‌توان به پتانسیل سرطان‌زایی و اختلالات عصبی اشاره کرد [۲].

دیازینون از جمله سموم ارگانوفسفره است که به‌طورگسترده برای کنترل حشرات خانگی صنعتی و کشاورزی استفاده

* نویسنده مسئول مکاتبات: gsadeghi@ut.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-3355-9375)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-14]

می‌شود و به دلیل دسترسی آسان و درجه سمی بالای آن میزان بروز مسمومیت‌ها بالا بوده و در ایران این ترکیب یکی از علل مرگ و میر ناشی از مسمومیت‌ها هست [۳].

چندین مطالعه اپیدمیولوژیک از بروز شیوع سرطان در انسان‌هایی که یک مرتبه یا مکرر در معرض تعدادی از حشره‌کش‌ها از جمله دیازینون قرار گرفته‌اند، گزارش کرده‌اند. بااین‌حال، نمی‌توان افزایش شیوع سرطان را منحصراً به دیازینون نسبت داد.

یک مطالعه مورد- شاهد حاکی از وجود ارتباط احتمالی بین افراد خانواده کشاورزان در معرض دیازینون (و سایر حشره‌کش‌ها) و افزایش بروز سرطان مغزی در کودکان (نوع نامشخص) است. با این حال، در این مطالعه، گزارشی مبنی بر مقدار مدت یا دفعات قرارگیری در معرض دیازینون یا سایر حشره‌کش‌ها وجود ندارد [۴].

یک مطالعه مورد شاهدی دیگر حاکی از ارتباط مثبت بین افزایش شیوع لنفوم غیرهوچکین در کشاورزان نسبت به غیرکشاورزان بود. این گزارش افزایش شیوع لنفوم را به حشره‌کش‌های ارگانوفسفر، از جمله دیازینون نسبت می‌دهد. یک مطالعه مورد شاهدی سوم ارتباط بین افزایش بروز میلوماهای متعدد و قرارگرفتن در معرض بالای حشره‌کش‌ها، از جمله دیازینون را نشان داد [۵].

هیچ مطالعه‌ای در مورد سرطان در حیوانات پس از قرارگرفتن در معرض پوستی دیازینون وجود ندارد. در مطالعات صورت‌گرفته در مورد احتمال سرطان‌زایی ترکیبات ارگانوفسفره (تتراکلروینفوس، پاراتیون، مالاتیون و دیازینون) پاراتیون در گروه B ۲ یعنی سرطان‌زای محتمل برای انسان طبقه‌بندی شد و دیازینون منجر به تومور سلول‌های کبدی در موش و توبول‌های کلیوی و ناهنجاری وریدی طحال در موش نر شد [۶]. برخی مطالعات برای یافتن رابطه مالاتیون و پاراتیون با سرطان ارتباط این ترکیبات را با سرطان لنف در موش ماده و سرطان ریه در موش‌های نر و نیز تومورهای بدخیم پانکراس و سرطان یا تورم قشر آدرنال نشان داده است [۷].

ترکیبات دیازینون هم که در کشاورزی علیه انواع حشرات مصرف می‌شود به‌تنهایی سبب افزایش بروز سرطان خون به صورت تجمعی توسط گروه مطالعات گسترده سلامت کشاورزی گزارش شد. مصرف دیازینون در ایران بیش از سه میلیون لیتر در سال و از جمله خطرناک‌ترین سموم برای آبزیان و پرندگان است. مطالعات حاکی از ارتباط مثبت بین دیازینون و سرطان پروستات در کشاورزان در معرض با سابقه خانوادگی سرطان پروستات وجود دارد [۸].

در مطالعه‌ای که توسط عرب و همکاران به منظور بررسی اثرات سمی دیازینون و تعیین میزان آن در بافت‌های مختلف خرگوش پس از تماس تحت بالینی با سم انجام شد، مشاهدات بالینی از ایجاد مسمومیت در خرگوش‌های مواجه شده با دیازینون حکایت داشت که به‌صورت اسهال و کاهش وزن نمایان شد. میزان دیازینون خون با افزایش میزان سم افزایش پیدا کرد. نتایج حاصل از این مطالعه تاکیدی بر تجمع بافتی و امکان بروز اثرات سمی دیازینون در صورت قرار گرفتن در تماس تحت بالینی با سم می‌باشد [۹]. همچنین گزارشات متناقضی وجود دارند که نشان‌دهنده اثرات سرطان‌زایی ارگانوفسفات‌ها در مدل‌های حیوانی هستند و مطالعات اپیدمیولوژیک در انسان نیز در این مورد هشداردهنده می‌باشد. با این حال، تحقیقات قاطع و جامعی دراین‌رابطه صورت نگرفته است در این پژوهش ارتباط بین در معرض‌قرارگرفتن دیازینون و افزایش بروز سرطان را بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد استفاده

۳۰ سر موش نر بالغ نژاد بالب سی[1] با وزن متوسط ۳۰-۲۰ گرم و سن متوسط ۱۰ تا ۱۲ هفته از انستیتو پاستور ایران تهیه و به طور تصادفی به ۲ گروه ۱۵ تایی شامل: گروه‌های کنترل و در معرض دیازینون تقسیم شدند. موش‌ها در اتاق حیوانات و تحت شرایط کنترل‌شده ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای $22 \pm 2\ ^{o}C$ و دسترسی آزاد به ب و غذا نگهداری شدند. در این مطالعه، کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد اجرا قرار گرفت (کد اخلاق با شماره ۷۵۰۶۰۲۱/۶/۱۹).

نحوه تجویز مواد در حیوانات

حیوانات شاهد در طول درمان صرفاً با تجویز سرم

[1] BALB/c

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-14]

فیزیولوژی از هر طریقی که سایر مواد تجویز شدند در معرض قرار گرفتند و در گروه دیازینون به مدت ۱۲ هفته روزانه یک بار از طریق چکاندن ۱ میلی لیتر از محلول ppm۱ دیازینون بر روی پوست در ناحیه پشت تحت آزمایش قرار گرفتند.

مطالعه آسیب‌شناسی در شرایط درون‌تنی

دو تا از موش‌های گروه مورد آزمایش قبل از اتمام دوره ۸۴ روزه (۱۲ هفته) یعنی در روزهای ۸۰ و ۸۲ تلف گردیدند که بلافاصله کالبدگشایی شدند و تغییرات مرضی آن‌ها ثبت گردید. باقیمانده گروه تیمار و حیوانات گروه شاهد در روز ۸۴ مورد کالبدگشایی قرار گرفتند و نمونه‌های بافتی نازک اخذشده از ارگان‌های مختلف در فرمالین ۱۰ درصد بافر پایدار گردید و پس از تهیه مقاطع بافتی در مرکز تحقیقات بیولوژی سرطان در انستیتو کانسر ایران مربوط به دانشگاه علوم پزشکی تهران واقع در بیمارستان امام‌خمینی تهران مورد آزمون هیستوپاتولوژی قرار گرفتند.

مطالعه سمیت سلولی در شرایط برون‌تنی

اثر سمیت سلولی دیازینون به‌صورت برون‌تنی با استفاده از تست MTT و میکرونوکلئوس و اثر مهارکنندگی آن‌ها بر روی رده سلولی فیبروبلاست نرمال موش L۹۲۹ مورد ارزیابی قرار گرفت همچنین تغییرات مورفولوژی رده سلولی در مجاورت دیازینون نیز ارزیابی و ثبت گردید در ادامه به منظور بررسی ناهنجاری کروموزومی کاریوتیپ هم صورت گرفت.

کشت سلول های L۹۲۹، ارزیابی مورفولوژی سلولی و آزمون MTT

ابتدا سلول‌های L۹۲۹ (تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، تهران) را در فلاسک‌های کشت سلولی ۲۵ میلی‌لیتری (نانک، دانمارک)[2] در محیط پی آر ام آی ۱۶۴۰-[3] همراه با افسی‌اس ۱۰٪[4]، ۲ میکرومولار ال-گلوتامین، ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین، ۱۲/۵ میکرومولار اچ.پی.ای.اس[5] (گیپ کو[6]، اسکاتلند)، و در دمای ۳۷ ^{o}C و در ۵٪ CO_2 در انکوباتور Co_2 (اریکوکس- آلمان[7]) کشت و پاساژ داده تا اینکه سلول‌ها از لحاظ تعداد و مورفولوژی به حد مطلوب برسند (بعد از ۴-۳ پاساژ) پس از جداکردن سلول‌ها از سطح فلاسک توسط تریپسین_ ادیتات[8] (گیپ کو، اسکاتلند) شمارش و ارزیابی حیاتی سلول‌ها با استفاده از تست تریپان‌بلو[9]، انجام شد. تعداد 5×10^4 cell/ml را در چاهک‌های پلیت ۶ خانه مخصوص کشت سلولی (نانک، دانمارک) به همراه و یا بدون دیازینون کشت دادیم. غلظت‌های مورد استفاده (۵۰، ۲۵، ۱۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود که به سلول‌های L۹۲۹ اضافه شد [۹،۱۰]. تغییرات مورفولوژی و خصوصیات عمومی سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت از نظر قابلیت اتصال به سطح پلیت و میزان گرانولیتی با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (موتیک، چین[10]) مورد ارزیابی قرار گرفت و با استفاده از دوربین دیجیتال ثبت گردید.

اثر سمیت سلولی ترکیبات با استفاده از تست رنگ‌سنجی MTT و ارزیابی کمی پرولیفراسیون سلولی در برون‌تنی مورد سنجش قرار گرفته و درصد سلول‌های زنده با استفاده از کنترل از روش فرمول زیر محاسبه گردید (فرمول شماره۱).

(فرمول شماره ۱) $\frac{\text{OD بلانک} - \text{OD چاهک‌های تحت‌تاثیر دارو}}{\text{OD بلانک} - \text{OD کنترل}} \times ۱۰۰$

در نهایت، با توجه به مقادیر جذب نوری به‌دست‌آمده به وسیله دستگاه خوانش الایزا درصد مهار رشد مربوط به هر غلظت با به‌کارگیری فرمول شماره ۲ محاسبه شد.

(فرمول شماره ۲)
درصد مهار رشد سلولی = $\left(\frac{\text{میانگین درصد OD برای هر گروه تیمار}}{\text{میانگین درصد OD برای گروه کنترل}}\right) \times ۱۰۰$

IC_{50} پس از رسم منحنی با به‌کارگیری غلظت‌های مختلف سموم و درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید.

آزمون میکرونوکلئوس

روش بررسی، در این آزمون سلول‌های دوهسته‌ای متوقف در مرحله سیتوکینز براساس روش پیشنهادی فنچ بود که بعد از

[2] Nunc, Denmark
[3] PRMI-1640
[4] 10% FCS
[5] HEPES
[6] Gibco

[7] Uricox Company, Germany
[8] EDTA
[9] trypan blue exclusion test
[10] Motic, China

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-14]

کشت سلول و اضافه‌کردن دیازینون با غلظت‌های مختلف، پس از گذشت ۲۴ ساعت برداشت سلولی انجام شد. بدین منظور پس از جدا کردن سلول‌ها با تریپسین ۲۵٪ و سانتریفیوژ آن (سیگما ۱۰-۳)، به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۱۰۰۰، فیکساتور (متانول ۱:۸ اسید استیک) به رسوب سلولی اضافه شد. پس از شستشوی مجدد سلول با فیکساتور، در نهایت رسوب سلولی در مقدار کمی فیکساتور معلق شد. سوسپانسیون حاصل بر روی لام گسترش داده شد و در دمای اطاق خشک گردید.

رنگ‌آمیزی لام‌ها با رنگ گیمسا و به مدت ۷ دقیقه انجام شد. شمارش سلولی توسط میکروسکوپ الیمپاس با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ انجام شد. در هر لام حدود ۳۰۰ تا ۷۰۰ سلول دوهسته‌ای شمارش شد. و درصد سلول‌های دوهسته‌ای دارای میکرونوکلئوس محاسبه شد. همچنین تعداد کل سلول‌های دوهسته ای محاسبه شد.

درصد میکرونوکلئوس= تعداد سلول های دو هسته ای دارای میکرونوکلئوس/ تعداد کل سلول های دو هسته ای × ۱۰۰

انجام مطالعه کاریوتایپینگ

پس از کشت سلول، دیازینون در غلظت‌های به‌دست‌آمده(۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰) به کشت سلول اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس کلشی سین (سیگمالدریچ[11]) را به میزان ۳/. میکروگرم بر میلی‌لیتر به آن اضافه شده و مجدد به مدت ۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از طی شدن این زمان سلول‌ها تریپسینه شدند بدین‌صورت که تریپسین را با محیط سرم خنثی شده و با سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. کلراید پتاسیم ۴/.٪ اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در $37\ ^oC$ انکوبه شد سپس محلول را به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰ دور در سانتریفیوژ قرار گرفت. پس از خارج کردن از انکوباتور، محلول رویی دور ریخته شد و ۵ سی سی محلول فیکساتور (اتانول ۳ قسمت و اسید استیک ۱ قسمت) به آن اضافه شد. محلول در یخچال به مدت ۴۰ دقیقه قرار داده شد. پس از خارج‌کردن از یخچال به مدت ۵ دقیقه در سانترفیوژ با دور ۱۷۰۰ قرار گرفت. محلول رویی دور ریخته شد و چندبار پیپتینگ شد و لام گرم‌شده، از فاصله ۱۲ تا ۴۰ سانتی‌متری روی لام چکانده شد. و اجازه داده شد تا لام به مدت ۵ دقیقه خشک شود. سپس رنگ‌آمیزی گیمسا انجام و با میکروسکوپ مشاهده شد. تصاویر به کمک نرم افزار CIP[12] مورد تجزیه تحلیل و بررسی قرار گرفت.

روش تجزیه تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. با توجه به این‌که بر اساس نتایج آزمون کولموگروف- اسمیرنوف، توزیع داده‌ها نرمال بود، آزمون‌های پارامتریک استفاده شد. برای پی بردن به محل اختلاف بین میانگین‌ها در مواردی که اختلاف آماری گروه‌های مختلف معنادار بود، آزمون دانکن بکار گرفته شد. محاسبات آماری به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام و سطح معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ درنظر گرفته شد. داده‌ها در بخش نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

یافته‌ها

مطالعات هیستوپاتولوژیک کبد

به منظور بررسی اثرات دیازینون در بافت کبد از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین[13] برای شناسایی تغییرات بافت‌شناسی در مقایسه با بافت طبیعی استفاده شد (شکل ۱). پارامترهای مورد مطالعه عبارت بودند از: بررسی تومور و سمیت سلولی و نکروز در نواحی مرکزی، هپاتیت، احتباس صفرا، استئاتوز بود. در گروه در معرض با دیازینون سمیت کبدی خفیف مشاهده شد (شکل ۱).

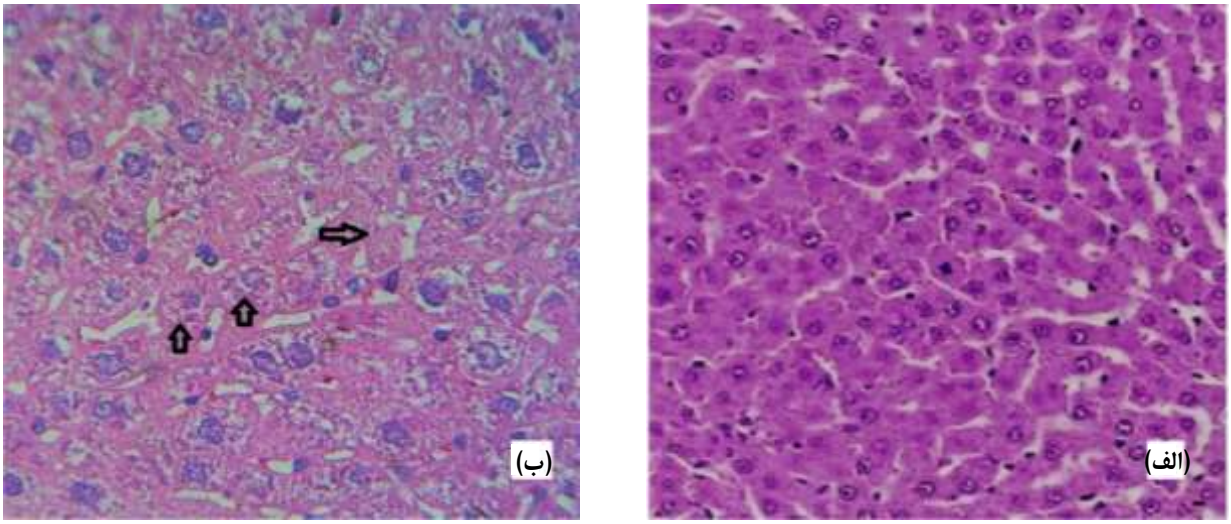
مطالعات هیستوپاتولوژیک کلیه

در گروه های مختلف پارامترهای مورد مطالعه شامل موارد زیر بودند: بررسی تومور، سمیت سلولی، نکروز در نواحی لوله‌های پیچیده پروکسیمال و لوله‌های پیچیده دیستال و

[11] Sigma Aldrich

[12] Chromosome Image Processing
[13] H & E

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-14]



شکل ۱- اثرات دیازینون روی بافت کبد موش سوری. دیازینون به میزان ۱ میلی لیتر با غلظت ppm ۱ از طریق چکاندن در ناحیه پوست پشت حیوان تجویز شد. (H & E ×۴۰۰). الف: بافت کبد در گروه شاهد با مورفولوژی طبیعی نشان داده شده است. ب: نکروز و استئاتوز خفیف در تصویر مشخص است. نکروز هپاتوسیت‌ها (نشان‌گر) به صورت اسیدوفیل‌تر شدن سیتوپلاسم سلول کبدی و نابودی هسته کاملاً واضح است. همچنین نفوذ سلول‌های التهابی، گنجیدگی‌های داخل سیتوپلاسمی در بافت کبدی نشانگر سمیت کبدی ملایم در موش سوری است.

مجاری جمع‌کننده ، اختلالات گلومرول و نفریت بینابینی بود. همان‌طور که (شکل ۲) نشان داده شده است در گروه در معرض با دیازینون سمیت سلولی خفیف در لوله‌های پیچیده پروکزیمال مشاهده شد.

مطالعات هیستوپاتولوژیک بیضه

در گروه مورد آزمایش تغییرات ماکروسکوپی بیضه وجود داشت (التهاب، قرمزی و تورم) که در مطالعه هیستوپاتولوژی کارسینومای بدخیم همراه با سمیت سلولی متوسط مشاهده شد (شکل ۳).

مطالعات مورفولوژی سلولی

نتایج مورفولوژی رده سلولی L۹۲۹ فیبروبلاست نشان داد که دیازینون تغییرات قابل‌توجهی در مقایسه با سلول‌های گروه شاهد در خصوصیات مورفولوژی سلولی ایجاد نموده است. سلول‌ها در مجاورت دیازینون قابلیت وابستگی به سطح خود را از دست داده و به‌صورت گرد و سوسپانسیون ظاهر شدند. همچنین میزان گرانولیتی سلول ها در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشته و از رشد سلول‌ها نیز کاسته شد. این تغییرات مورفولوژیک وابسته به غلظت دیازینون بوده و با افزایش آن بر شدت تغییرات افزوده شده تا جایی که در بالاترین غلظت استفاده شده، سلول‌ها به طور کامل متلاشی و ازبین رفته‌اند. تغییرات در مورفولوژی سلولی بعد از ۴۸ ساعت ظاهر شدند.

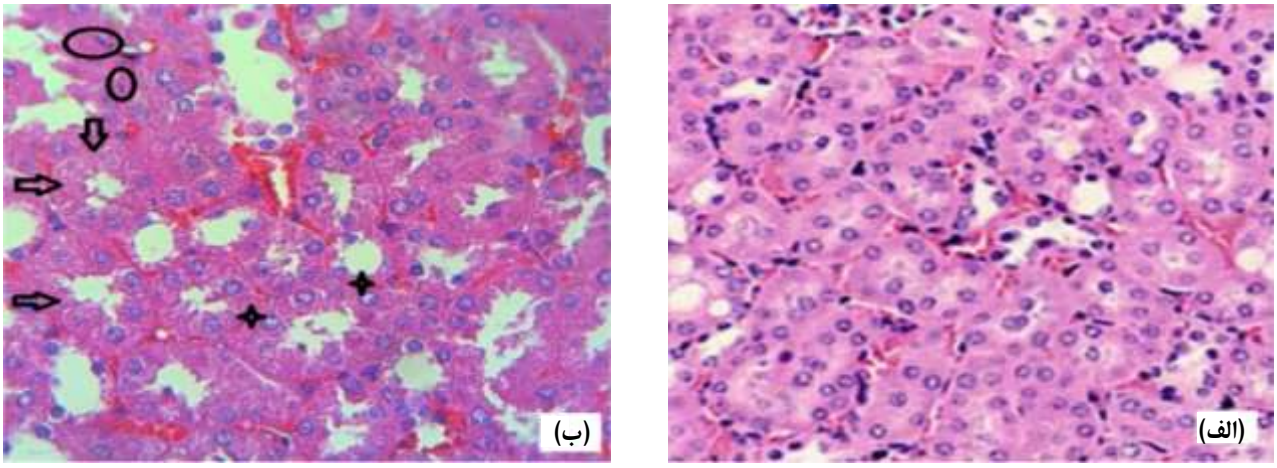
بررسی میزان سمیت سلولی با روش MTT

با تاثیردادن غلظت‌های مختلف از دیازینون (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برروی سلول‌های L۹۲۹ فیبروبلاست موش، مهارکنندگی رشد سلول‌ها قابل‌ملاحظه بود (جدول ۱). در نمودار ۱، اثر غلظت‌های متفاوت دیازینون بر سلول‌های فیبروبلاست L۹۲۹ موش و IC ۵۰ برای این رده سلولی نشان داده شده است.

آزمایش میکرونوکلئوس

از آنجا که بررسی سیتولوژیک نشان می‌داد که دیازینون بر مورفولوژی فیبروبلاست‌ها تاثیر گذاشته است، احتمال می‌رود این تاثیرگذاری در سطوح مولکولی و کروموزومی نیز مشاهده شود. به منظور بررسی ترکیبات بر ایجاد آسیب کروموزومی میانگین درصد میکرونوکلئوس در سلول‌های موردآزمایش با غلظت‌های مختلف با کنترل مقایسه شد (جدول ۲). یکی از راه‌های بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی استفاده از کاریوتیپ است. در بررسی وضعیت کروموزوم‌ها به‌طور متداول از رنگ‌آمیزی گیمسا استفاده می‌شود و در این تحقیق مشاهده

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-14]



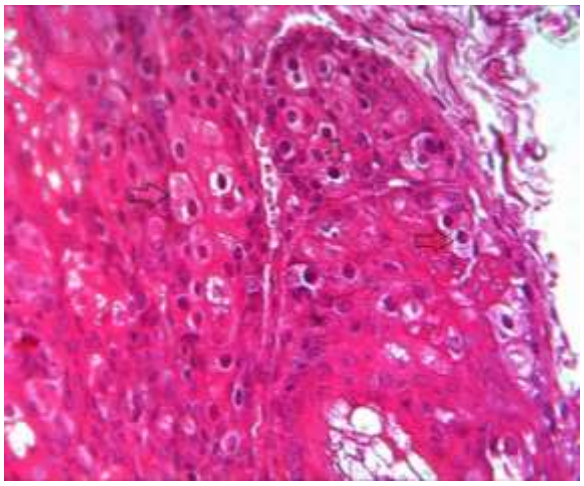
شکل ۲- اثرات دیازینون روی بافت کلیه موش سوری. دیازینون به میزان ۱ میلی لیتر با غلظت ppm ۱ از طریق چکاندن در ناحیه پوست پشت حیوان تجویز شد. (H & E ×۴۰۰). الف: بافت کلیه در گروه شاهد با مورفولوژی طبیعی نشان داده شده است. ب: پیکنوز هسته سلول پوششی لوله پروکزیمال (نشان‌گر ستاره)، نکروز و جداشدن سلول پوششی از غشای پایه، نفوذ سلول‌های آماسی مابین غشای پایه و سلول‌های پوششی لوله ادراری در تصویر مشاهده می‌شود (دور سلول دایره کشیده شده) به‌علاوه نابودی هسته نیز در تعدادی از لوله‌ها قابل تشخیص است (نشان‌گر) که نشانه سمیت سلولی خفیف در لوله‌های پیچیده پروکزیمال می‌باشد.

شد که غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بالاتر از دیازینون سبب تغییرات و بروز ناهنجاری در سلول‌های فیبروبلاست شده است که در نهایت با استفاده از نرم افزار CIP آنالیز صورت گرفت و نتایج نشان داد که کروموزوم‌ها تلوسنتریک و ساب متاسنتریک بودند.

بحث

تحقیقات صورت گرفته بعد از اوایل دهه ۱۹۸۰ مدارک جدید و گسترده‌ای در خصوص مواجهات زیست‌محیطی مرتبط با سرطان فراهم آورده است که از آن جمله می‌توان به آلاینده‌های هوا و خاک مثل ارسنیک، نیترات، بنزن و فرآورده‌های صنعتی اشاره کرد [۱۰]. در محیط‌های کار و تحت‌شرایط کاری ویژه، مواد و ترکیبات متعددی به‌عنوان عامل بروز سرطان در کارگران شناخته شده‌اند. با توجه به شدت و یا مدت این مواجهه، بار سرطان در میان کارگران می‌تواند بسیار بالا باشد. حدود ۵-۴٪ کل سرطان‌ها در جوامع پیشرفته به‌علت عوامل شغلی است [۱۱].

هفده محقق از ۱۱ کشور در آژانس بین‌المللی پژوهش‌ها بر روی سرطان در سال ۲۰۱۵ گرد آمدند و احتمال سرطان‌زایی ترکیبات ارگانو فسفات تتراکلروینفوس، پاراتیون، مالاتیون و دیازینون را ارزیابی کردند. بر اساس یافته‌های این گروه تحقیقاتی، پاراتیون در گروه 2 B یعنی "سرطان زای محتمل" برای انسان طبقه‌بندی شد. دیازینون منجر به تومور سلول‌های کبدی در موش و تومور توبول‌های کلیوی و ناهنجاری وریدی طحال در موش نر اعلام شد [۱۲].



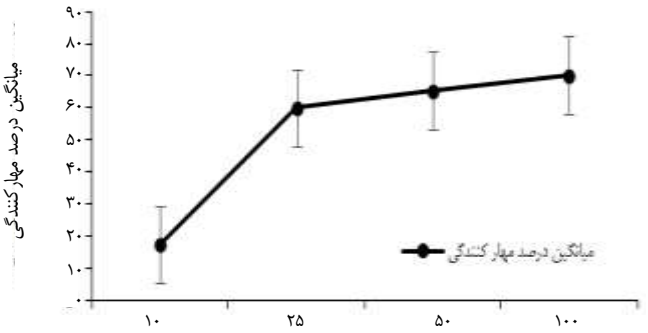
شکل ۳- کارسینوما (تومور متشکل از سلول های اپی‌تلیایی) در بیضه موش سوری متعاقب تجویز دیازینون. دیازینون به میزان ۱ میلی لیتر با غلظت ppm ۱ از طریق چکاندن در ناحیه پوست پشت حیوان تجویز شد. (H & E ×۴۰۰). سلول‌های توموری بیضی تا دوکی‌شکل، بزرگ با سیتوپلاسم ائوزینوفیلی فراوان که گاهی واکوئل‌های داخل سیتوپلاسمیک نیز در آن مشاهده شده است (نشان‌گر). هسته‌های تخم‌مرغی‌شکل و هستک‌های برجسته بودند.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-14]

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف دیازینون بر سلول‌های فیبروبلاست L۹۲۹ موش

غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)	جذب نوری (میانگین ± انحراف معیار)	درصد مهارکنندگی (میانگین)
۰ (شاهد)	۰/۲ ± ۰/۰۲۱	
۱۰	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰۲	*۱۷/۵۰
۲۵	۰/۰۵۵ ± ۰/۰۱	*۶۰
۵۰	۰/۰۶۹ ± ۰/۰۷	*۶۵/۳۲
۱۰۰	۰/۰۸۳ ± ۰/۰۰۲	*۷۰/۱۳

*: تفاوت معنی‌دار در مقایسه با شاهد با $p < ۰/۰۵$



نمودار ۱- اثر غلظت‌های متفاوت دیازینون (µg/l ۱۰-۱۰۰) بر سلول‌های فیبروبلاست L929 موش پس از۲۴ ساعت توسط آزمون MTT هر نقطه بیانگر میانگین ± انحراف معیار است. تعداد تکرار برای هر غلظت ۳ بار می‌باشد. IC_{50} دارو برای این رده سلولی بعد از ۲۴ ساعت ۷۵/۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

ترکیبات مالاتیون و دیازینون در گروه ۲A یعنی "با احتمال قوی سرطان زا" برای انسان قرار داده شده‌اند. استفاده از حشره‌کش‌های خانگی احتمال ابتلای کودکان به سرطان خون را ۴۷٪ و لنفوم را ۴۳٪ افزایش می‌دهند. علاوه بر این، باعث اثرات سمی در سلول‌های خونی، طحال، تیموس و غده‌های لنفاوی می‌گردند [۱۳].

کلیه‌ها مرکز اصلی برداشت و تخریب پروتئین‌ها و پپتیدهای با وزن مولکولی کم هستند و این امر توسط لوله‌های پروکزیمال انجام می‌شود. وو[14] و همکارانش طی بررسی‌های انجام‌شده بر روی موش‌هایی که سم دیازینون را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کرده بودند اعلام نمودند که باقیمانده سم دیازینون در کلیه‌ها از سایر ارگان‌های مورد آزمایش بیشتر است که این نتیجه می‌تواند علت آسیب‌های وارده به کلیه‌ها را متعاقب مصرف سم دیازینون توجیه کند [۱۴].

در بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی مواد مختلف بر سموم ارگانوفسفره بیان کردند که استفاده از این سموم باعث کف‌آلودشدن لوله‌های پروکسیمال کلیه و ظهور واکوئل سفید رنگ که نشانه تجمع آب است در سیتوپلاسم سلول‌ها می‌شود که سلول‌ها در نتیجه افزایش آب متورم می‌شوند و مجراهای درگیر تنگ می‌شوند. هسته این سلول‌ها پیکنوز شده و سیتوپلاسم ائوزینوفیلیک‌تر می‌شود [۱۵]. از سوی دیگر سمیت کلیوی دیازینون هنوز به طور کامل مشخص نشده است. در مطالعه‌ای که وستر[15] و همکاران در سال ۱۹۹۳ بر روی انسان انجام دادند جذب پوستی سم دیازینون را ۳۴٪ دوز مصرفی اعلام نمودند [۱۶]. در تحقیقات دیگری که توسط کلندر[16] و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت آثار پاتولوژیک متنوعی در کبد موش‌های صحرایی که با دیازینون مسموم شده بودند گزارش گردید. دیازینون از دستگاه گوارش، پوست و یا سیستم تنفسی درصورت استنشاق جذب می‌شود و راه عمده دفع آن

جدول ۲- اثر دیازینون بر فراوانی میکرونوکلئوس‌های فیبروبلاست‌ها

غلظت دیازینون (میکروگرم بر میلی لیتر)	میکرونوکلئوس (درصد فراوانی)
۰	۳/۰۴
۱۰	۳/۱۴
۲۵	۴/۰۳
۵۰	۴/۸۷
۱۰۰	*۶/۰۲

*: تفاوت معنی‌دار در مقایسه با شاهد با $p < ۰/۰۵$

[14] Wu

[15] Wester
[16] Kalender

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-14]

از طریق کلیه است. دیازینون باعث تغییر در آنزیم‌های کبدی و شاخص‌های بیوشیمیایی و تورم میتوکندری در هپاتوسیت‌ها می‌شود [۱۷].

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دیازینون سبب سمیت خفیف در لوله‌های پیچیده پروکسیمال و همچنین باعث پرخونی و چروکیدگی در کپسول بومن، جسمک مالپیگی، در بافت کلیه شده است که احتمالاً این اثر را به واسطه مکانیسم سویه‌های فعال اکسیژن اعمال می‌کند. آنچه که مسلم است بیشتر حشره‌کشهای ارگانوفسفره اثرات سمی مشابهی دارند.

کلندر و همکارانش در سال ۲۰۰۵ موش های صحرایی را در معرض سم دیازینون قرار دادند و کاهش معنی‌داری را در پروتئین تام و آلبومین و افزایش معنی‌داری را در آنزیم‌های کبدی مشاهده نمودند و علت این تغییرات را آسیب کبدی ذکر کردند [۱۸]. گوکسیمن[17] و همکاران در تحقیقات خود در سال ۲۰۰۶ موش‌های صحرایی را در معرض دیازینون قرار دادند و آثار پاتولوژیک شامل نکروز هپاتوسیت ها و نفوذ سلول‌های آماسی را گزارش کردند و علت این تغییرات را فعالیت سم‌زدایی کبد و تجمع سم در کبد و بعلاوه تولید میزان زیاد رادیکال آزاد در سلول‌های کبدی ذکر نمودند [۱۹]. این موضوع توسط محققین دیگر نیز تایید شده است [۲۰] .

سنجش MTT روشی ساده سریع و پرکاربرد است که می‌توان با استفاده از آن به مقایسه میزان رشد دودمان‌های سلولی مختلف شناخت و مقایسه عملکرد ترکیبات دارویی جدید و نیز به بررسی اثرات ترکیبی داروها با یکدیگر پرداخت. یکی از فاکتورهای موثر در MTT تعداد سلول‌های زنده است که برای اطمینان از درصد سلول‌های زنده، زنده‌مانی[18] سلول‌ها را با تریپان‌بلو محاسبه می‌کنند. باید توجه نمود که اساس بررسی سمیت سلولی ترکیب بر سلول‌ها، مشاهده تغییرات مورفولوژیکی آن‌ها می‌باشد این تغییرات که شامل سطوح واکوئله شده و کاهش اندازه تراکم هسته‌ها است می‌تواند بازتاب تغییرات متابولیکی باشد که تنها در سطح مولکولی در سلول‌های تیمار شده قابل بررسی است. در مطالعه حاضر، با تاثیردادن غلظت‌های مختلف از دیازینون بر سلول‌های L ۹۲۹ فیبروبلاست موش، مهارکنندگی رشد سلول‌ها قابل‌ملاحظه بود. میانگین مهارکنندگی رشد سلول در غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر به طور معنی‌داری با گروه کنترل متفاوت می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تماس پوستی دیازینون باعث آثار سمیت سلولی در پاتولوژی و همچنین سبب پیش‌سرطان‌زایی در تست‌های آزمون سمیت سلولی در موش می‌گردد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکترای تخصصی رشته فارماکولوژی مژگان اصغری می‌باشد. از همکاری بخش علوم‌زیستی مقایسه‌ای دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

م.ا: انجام مطالعه، نگارش مقاله، آنالیز آماری؛ گ.ص.ه: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله؛ ع.گ.ف: نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله؛ م.ک.ک: نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله؛ س.ر: نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله؛ م.ط: نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله؛ غ.ش: نظارت بر حسن اجرای مطالعه

فهرست منابع

[1] Deziel NC, Beane Freeman LE, Hoppin JA, Thomas K, Lerro CC, Jones RR, Hines CJ, Blair A, Graubard BI, Lubin JH, Sandler DP, Chen H, Andreotti G, Alavanja MC, Friesen MC, An algorithm for quantitatively estimating non-occupational pesticide exposure intensity for spouses in the agricultural health study. ***Expo Sci Environ Epidemiol*** 3 (2019) 344–357.

[2] Louis LM, Lerro CC, Friesen MC,Andreoti G, Koutros S, Sandler D, Blair A, Roson M, Beane Freeman L, A prospective study of cancer risk among agricultural health study farm spouses associated with personal use of organochlorine insecticides. ***Environ Health*** 16 (2017) 16-95.

[17] Gokcimen
[18] viability

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-14]

[3] Jones RR, Barone-Adesi F, Koutros S, Lerro CC, Blair A, Lubin J, Heltshe SL, Hoppin JA, Alavanja MC, Beane Freeman LE, Incidence of solid tumours among pesticide applicators exposed to the organophosphate insecticide diazinon in the agricultural health study: an updated analysis. ***Occup Environ Med*** 7 (2015) 496-503.

[4] Niehoff NM, Nichols HB, White AJ, Parks GC, D'Aloisio AA, Sandler DP, Childhood and adolescent pesticide exposure and breast cancer risk. ***Epidemiology Europe PMC 27*** (2016) 326–333.

[5] Narayan S, Liew Z, Paul K, Lee PC, Sinsheimer JS, Bronstein JM, Ritz B, Household organophosphorus pesticide use and Parkinson's disease. ***Int J Epidemiol*** 42 (2013) 1476–1485.

[6] International Agency for Research on Cancer. Some organophosphate insecticides and herbicides: tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon and glyphosate. IARC Working Group. Lyon. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum. (2015) 3-10

[7] National Toxicology Program. Bioassay of parathion for possible carcinogenicity. ***National Cancer Inst Carcinog Tech Rep Ser*** 70 (1979) 1–123.

[8] Adeli N, Ghareyazie B, Comparison between the impact of transgenic insect resistant crop plants and their traditional counterparts on human health and the environment. **Gen engineering Biosafety Journal** 2(2013) 1-28

[9] Arab H, Goudarzi M, Koohi M, Shams M, Blood and tissue levels of diazinon in rabbit following a subacute dermal exposure to incremental doses. ***Iran J Vet Med*** (2013) 213-219

[10] Clapp RW, Howe GK, Jacobs M, Environmental and occupational causes of cancer re-visited. ***Pub Health Pol*** 27 (2006) 61-76.

[11] Leon M E, Schinasi L H, Lebailly P, Beane L E, Use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway, and the USA: A meta-analysis from the AGRICOH Consortium Int. ***Int J Epidemiol*** 48 (2019) 1519-1535.

[12] Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti Ch, Mattock H, Straif K, Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. ***Lancet Oncol*** 16 (2015) 490–491.

[13] Ghasemi-Pirbalot A, Shahvali SH, Azizi B, Hamedi., Effect of extract of chicory (*Cichorium intybus* L) essential oil and celery Bakhtiari (Kelussiaorderatassima Mozaff.) On Nash's detoxify organophosphate in rats. ***Herbs*** 2 (2010) 31-33.

[14] Wu HX, Evreux- Gros C, Descotes J, Diazinon toxic kinetics, tissue distribution and anticholinesterase activity in the rat. ***Biomed Environ Sci*** 9 (1996) 359-369.

[15] Gockcimen A, Gulle k, Demirin H, Bayram D, Kocak A, Altunsa I, Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues. ***Pest Bp*** 87 (2007) 103-108.

[16] Wester RC, Sedik L, Meelendres JF, Logan F, Maibach HI, Russell I, Percutaneous absorption of diazinon in humans.food. ***Chem Toxicol*** 31(1993) 569-572.

[17] Rafati-Rahimzadeh M, Moghadamniya AA, Poisoning with organophosphorus compounds. ***Babol Univ Med Sci*** 12 (2010) 72- 85.

[18] Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Acikgoz F, Durak D, Ulusoy Y, Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. ***Toxicology*** 211 (2005) 197-206.

[19] Gockcimen A, Gulle k, Demirin H, Bayram D, Kocak A, Altunsa I, Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues. ***Pest Bp*** 87 (2007) 103-108.

[20] Hazarika A, Sarkar SN, Hajare S, Kataria M, Malik JK, Influence of malathion pretreatment an the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study**.** ***Toxicology*** 185(2003) 1- 8.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-14]

Research paper

Carcinogenic and cytotoxic effects of Diazinon in the mouse: an *in vivo* and *in vitro* study

Mozhgan Asghari[1], Goudarz Sadeghi Hashjin[1], Aliakbar Golabchifar[1], Mohammad Kazem Koohi[1], Ahad Mohammadnejad[2], Sanaz Rismanchi[2], Mohammad Taheri[3], Gholamreza Shams[1]

1. Department of Comparative Biosciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Cancer Biology Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Central Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 29 December 2019 Accepted: 1 February 2020

Abstract

Background and aims: In this study, the toxicity and carcinogenicity of an organophosphate pesticide, diazinon, were studied in the mouse by MTT, micronucleus and karyotype methods. Morphological changes of cell lines in the vicinity of diazinon were also evaluated and recorded.

Methods: Mice were randomly divided into two groups (n=15 per group): treatment and control groups. In the treatment group, diazinon (1 ml of 1 ppm concentration) was applied once daily topically on the shaved skin and for 12 weeks; in the controls, physiological salt solution was used. At the end of the period, tissue samples were taken from the organs after autopsy. Murine L929 fibroblast cells were cultured with and without diazinon (10, 25, 50, 100 µg/ml). The morphological changes of the cells were evaluated after 48 hours. The cytotoxicity was assessed in vitro by MTT assay and micronucleus and karyotype and IC50 percent were also determined.

Results: Microscopic observations of kidney tissue revealed mild cytotoxicity in proximal tubules. Mild hepatotoxicity was also observed in the liver tissue. Morphological results of cell line showed that diazinon (50 µg/ml) had a significant effect compared to the control group. The percentage of micronucleus in the group treated with 100 µg/ml of diazinon was significantly higher than the control. In the MTT assay, the mean optical absorption at concentrations of 10, 25, 50, 100 µg/ml was significantly different from that of the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: Skin contact with Diazinon induces pathologic effects on organs, cytotoxicity, and procarcinogenic effect in mice.

Keywords: Organophosphates, Diazinon, Cancer, mice, MTT

Please cite this article as follows:

Asghari M, Sadeghi Hashjin G, Golabchifar A, Koohi MK, Mohammadnejad A, Rismanchi S, Taheri M, Shams G, Carcinogenic and Cytotoxic Effects of Diazinon in the Mouse: An *in vivo* and *in vitro* Study. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 3 (2019) 159-168.

*Corresponding author: gsadeghi@ut.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-3355-9375)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-06-14]