Original Article

Protective Effect of N-acetyl-cysteine Against Rat Liver Mitochondrial Toxicity Induced by CuSO4

Sohrab Rahmani[1], Mohsen Rezaei[2*]

[1] *MSc, Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.*

[2] *Associate Professor, Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.*

[*] ***Corresponding Author:*** **Mohsen Rezaei;** Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Email: rezaei.m@modares.ac.ir, rezaei.mohsen@gmail.com

Received: 18 Jun, 2020
Accepted: 25 Aug, 2020

Abstract

Background and Objectives: Copper sulfate (CuSO4) is a toxic substance with a broad range of applications; however, the ingestion of high levels of it cause a wide range of complications in the liver tissue. According to previous studies, mitochondria are potential targets for CuSO4 toxicity. The present study aimed to examine the role of N-acetyl-cysteine as an antioxidant agent in the protection of mitochondria against toxicity induced by CuSO4.

Methods: This study was performed on isolated liver mitochondria extracted from male Wistar rats (180-200 g) by multiple centrifuges and finally divided into 5 different groups. Group 1 was the control group, while group 2 received a single dose of 106 µM of CuSo4. The other groups were pretreated with different concentrations of N-acetyl-cysteine (1, 2, 5 mM) and exposed to 106 µM of CuSO4. Subsequently, MTT assay, lipid peroxidation, and GSH (reduced glutathione) were determined in each group. Finally, the collected data were analyzed using the one-way analysis of variance test.

Results: The results of the present study revealed that significant changes in mitochondrial indexes such as mitochondrial complex Ⅱ function, mitochondrial glutathione reduction, and lipid peroxidation levels were evident in rat liver mitochondria exposed to CuSO4. On the other hand, it was found that pre-treatment with N-acetylcysteine efficiently inhibited CuSO4 toxicity.

Conclusion: The results confirmed the protective effects of N-acetyl-cysteine against CuSO4 toxicity on rat liver mitochondria, which may be due to its ability to scavenge reactive oxygen species.

Keywords: Acetylcysteine; Barth syndrome; CuSO4; Glutathione.

DOI: 10.29252/qums.14.6.9

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره چهاردهم، شماره ششم، شهریور ۹۹
صفحه ۹ الی ۱۷

مقاله پژوهشی
(Original Article)

اثر محافظتی ان استیل سیستئین در مقابل سمیت میتوکندریایی ناشی از مس سولفات در میتوکندری‌های استخراج‌شده از کبد موش صحرایی

سهراب رحمانی [۱]، محسن رضایی [۲*]

[۱] کارشناسی ارشد، گروه سم‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

[۲] دانشیار، گروه سم‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: مس سولفات ماده‌ای سمی با کاربردی‌های بسیار زیاد است که در مقادیر زیاد باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از عوارض در بافت کبد می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند میتوکندری‌ها اهداف بالقوه‌ای برای سمیت مس سولفات هستند. در این مطالعه از ان استیل سیستئین به‌عنوان نوعی عامل آنتی‌اکسیدان برای محافظت میتوکندری‌ها در مقابل سمیت ایجادشده با مس سولفات استفاده شد.

روش بررسی: در این مطالعه از موش‌های نر نژاد ویستار (با وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم) استفاده شد. میتوکندری‌های ایزوله استخراج‌شده از کبد موش صحرایی از طریق روش سانتریفیوژهای متعدد استخراج و درنهایت به ۵ گروه مختلف تقسیم‌بندی شدند. گروه اول به‌عنوان کنترل قرار گرفت. گروه دوم فقط دُز ۱۰۶ میکرومولار از مس سولفات را دریافت کردند. دیگر گروه‌ها با غلظت‌های ۱، ۲ و ۵ میلی‌مولار از ان استیل سیستئین پیش‌تیمار شدند و سپس در معرض دُز ۱۰۶ میکرومولار از مس سولفات قرار گرفتند. سپس آزمون‌های MTT، لیپید پراکسیداسیون و گلوتاتیون احیا در هر گروه تعیین شد. داده‌ها با استفاده از آزمون یک‌طرفه تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج پژوهش حاضر نشان داد کاهش قابل‌توجهی در شاخص‌های میتوکندریایی نظیر میزان عملکرد کمپلکس ۲ میتوکندریایی، میزان گلوتاتیون احیای میتوکندریایی و لیپید پراکسیداسیون در میتوکندری‌های کبد موش صحرایی مشهود بود که در معرض مس سولفات قرار داشتند. از سوی دیگر مشخص شد تیمار با ان استیل سیستئین به‌طور مؤثری از سمیت مس سولفات جلوگیری می‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج تأییدکننده اثرات محافظتی ان استیل سیستئین در مقابل سمیت مس سولفات در میتوکندری‌های کبد موش صحرایی است. این اثرات ممکن است به دلیل توانایی آن در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد باشد.

کلیدواژه‌ها: استیل سیستئین؛ سندروم بارت؛ گلوتاتیون؛ مس سولفات.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
محسن رضایی؛ گروه سم‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
rezaei.m@modares.ac.ir;
rezaei.mohsen@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۰۴

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:
Rahmani S, Rezaei M. Protective Effect of N-acetyl-cysteine Against Rat Liver Mitochondrial Toxicity Induced by CuSO4. Qom Univ Med Sci J 2020;14(6):9-17. [Full Text in Persian]

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مقدمه

مس یکی از عناصر ضروری برای ارگانیسم‌های زنده است و به‌عنوان نوعی کوفاکتور برای آنزیم‌های مختلف نظیر سیتوکروم c اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، سرولوپلاسمین و مونواکسیژنازها مطرح است که نقشی اساسی در متابولیسم سلولی دارند (۱). سولفات مس پنج آبه ($Cuso_4.5H_2O$) به‌عنوان ماده‌ای پرکاربرد در صنعت مطرح است. این ماده کاربردهای فراوانی در صنعت و کشاورزی دارد. سولفات مس به‌عنوان نوعی قارچ‌کش مؤثر در کنترل بیماری‌های گیاهی و همچنین به‌عنوان ماده ریزمغذی در کودهای شیمیایی استفاده می‌شود. به دلیل استفاده‌های وسیع این ماده در صنعت یکی از مهم‌ترین آلوده‌کننده‌های محیط‌زیست در اثر ورود پساب‌های صنعتی به محیط‌زیست است (۴-۲).

جذب مس در بدن انسان به عوامل مختلفی از قبیل فرم شیمیایی و حضور سایر عناصر در رژیم غذایی بستگی دارد. متوسط مصرف روزانه مس در آمریکا حدود ۱ میلی‌گرم است که منبع اصلی آن رژیم غذایی است (۵). حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد از مس عمدتاً در روده کوچک و مقدار بسیار کمی از آن در معده جذب می‌شود. مس جذب‌شده از روده کوچک در خون با آلبومین و ترانسکوپرین (Transcuprein) حمل می‌شود. همچنین سرولوپلاسمین پروتئین اصلی است که مس با آن جفت می‌شود و حدود ۶۰ تا ۹۰ درصد مس موجود در خون به فرم سرولوپلاسمین (Ceruloplasmin) است (۶،۷). دفع صفراوی اصلی‌ترین مسیر ازبین‌بردن مس است (۵).

در انسان تماس بیش‌ازحد با ترکیبات حاوی مس با بیماری‌های مختلفی نظیر نکروز شدید کبدی، سرطان و بیماری ویلسون ارتباط دارد (۷،۸). زمانی که مس با پروتئین‌های حمل‌کننده خود در بدن جفت نشود، می‌تواند باعث آسیب‌هایی به ارگان‌های مختلف بدن شود و درنتیجه موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بدن نظیر آنیون‌های سوپر اکسید، هیدروژن پراکسید و ... شود که این محصولات در اثر تماس مس با میتوکندری‌های بدن ایجاد می‌شوند. با توجه به مطالعات قبلی، کبد محل اصلی ذخیره و یکی از مهم‌ترین ارگان‌های هدف برای سمیت مس است (۷،۹). با توجه به مطالعات قبلی می‌توان دریافت که میتوکندری نقش مهمی را در بیماری‌های مرتبط با سمیت مس در بدن ایفا می‌کند. مس می‌تواند موجب اختلال در عملکرد آنزیم‌های میتوکندریایی و همچنین آسیب به غشای میتوکندری‌ها شود. علاوه‌براین، متالوتیونین میتوکندریایی که به‌عنوان پروتئین اصلی جفت‌شونده با مس مطرح است، ممکن است موجب پیشگیری از اکسیداتیو استرس شود یا به‌عنوان شلاتور برای فلزات ضروری نظیر مس و روی عمل کند (۸،۱۰). همچنین مس می‌تواند به‌صورت مستقیم با پروتئین‌های تیول‌دار جفت شود و باعث اکسیداسیون و اختلال در عملکرد این پروتئین‌ها شود (۱۱).

آنتی‌اکسیدان‌ها عواملی هستند که باعث خنثی‌شدن گونه‌های فعال اکسیژن در بدن می‌شوند و درنتیجه باعث پیشگیری از اثرات مخرب آن‌ها بر بدن می‌شوند؛ بنابراین، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها برای پیشگیری و درمان مسمومیت‌های ناشی از سمیت مس ضروری است. ان استیل سیستئین نوعی پیش‌ساز مستقیم برای سنتز گلوتاتیون است. این دارو مکملی تغذیه‌ای است که گلوتاتیون‌های داخل سلولی را دوباره بازسازی می‌کند (۱۲). ان استیل سیستئین هم به‌صورت مستقیم و هم غیرمستقیم می‌تواند باعث خنثی‌سازی اثرات رادیکال‌های آزاد بر بدن شود. این ماده در درمان کمبود گلوتاتیون (GSH: Glutathione) در طیف وسیعی از عفونت‌ها، نقایص ژنتیکی و اختلالات متابولیکی نظیر بیماری ایدز و انسداد مزمن ریوی کاربرد دارد. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند ان استیل سیستئین می‌تواند باعث کاهش رادیکال‌های آزاد شود (۱۲-۱۵). با توجه به اثرات مفید و درمانی ان استیل سیستئین، مخصوصاً اثرات آنتی‌اکسیدانی آن، این احتمال وجود دارد که بتواند در مقابل اثرات سمی ناشی از مس مفید واقع شود. ازآنجایی‌که تاکنون اثرات محافظتی این ماده بر سمیت القاشده مس بر میتوکندری‌های ایزوله کبدی گزارش نشده است، بر آن شدیم این اثرات را بررسی کنیم تا با انجام این مطالعه، اثرات محافظتی ان استیل سیستئین را بر سمیت القاشده مس روی میتوکندری‌های ایزوله نشان دهیم.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی از موش‌های نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده شد که در شرایط

International License Creative Commons Attribution License 4.0

استاندارد ازنظر دسترسی به آب و غذا و سیکل ۱۲ ساعته روشنایی و تاریکی نگهداری شده بودند. تمام آزمایش‌های انجام‌شده با توجه به دستورالعمل‌های ثبت‌شده در کمیته آزمایش‌های حیوانی دانشگاه تربیت مدرس صورت گرفت. در این مطالعه از کبد موش‌های سالم میتوکندری تخلیص و استفاده شد. همچنین هر آزمایش حداقل سه بار در روزهای متفاوت تکرار شد. ان استیل سیستئین از شرکت داروسازی اکسیر تهیه شد. مس سولفات و بقیه مواد استفاده‌شده از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

جداسازی و تخلیص میتوکندری سلول‌های کبد موش صحرایی

پس بیهوشی کامل حیوان با اتر، بافت کبد آن خارج و با بافر مانیتول (شامل مانیتول ۲۰۰ میلی‌مولار، سوکروز ۷۰ میلی‌مولار، HEPES ۱۰ میلی‌مولار و EGTA ۱ میلی‌مولار) سرد به‌خوبی شست‌وشو داده شد. سپس بافت کبد قطعه‌قطعه و با هموژنایزر دستی بافت کبد هموژن شد (تمام مراحل با استفاده از یخ انجام شد). سپس بافت هموژن‌شده با سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت g۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله هسته، سلول‌های شکسته‌شده و دیگر بافت‌های سلولی حذف می‌شوند. سپس محلول رویی برداشته و بار دیگر با سرعت g۱۰۰۰۰، در همان دما و زمان سانتریفیوژ شد. در این مرحله محلول رویی دور ریخته و به رسوب دوباره بافر اضافه می‌شود. در ادامه با همان دور g۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ انجام می‌شود. درنهایت رسوب حاصل از مرحله آخر که حاوی میتوکندری است، به حجم رسانده و در آزمایش‌ها استفاده می‌شود.

سوسپانسیون نهایی میتوکندری در ۵ گروه مختلف تقسیم شد. هر آزمایش حداقل ۳ بار در روزهای مختلف تکرار شد. گروه اول به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. ۴ گروه بعدی گروه‌های تیمارشده در نظر گرفته شدند و به ترتیب در معرض ۱۰ میکرولیتر از غلظت IC۵۰ مس سولفات به‌تنهایی (گروه ۲) و گروه‌های بعدی در معرض غلظت‌های ۱، ۲، و ۵ میلی‌مولار از ان استیل سیستئین (غلظت‌های به‌دست‌آمده با توجه به مطالعات قبلی (۱۶، ۱۷) و مطالعات پایلوت انتخاب شدند) به همراه غلظت IC۵۰ قرار گرفتند. مدت‌زمان تماس میتوکندری‌ها با مس سولفات ۴۰ دقیقه در نظر گرفته شد و این محدوده زمانی با آزمایش‌های پایلوت صورت‌گرفته برای به‌دست‌آمدن حداقل تغییرات در پاسخ‌های سمی برای آزمایش‌های بعدی در نظر گرفته شد.

تعیین غلظت پروتئین

غلظت پروتئین با معرف کوماسی‌بلو با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. در تمامی آزمایش‌ها از سوسپانسیون میتوکندری با غلظت پروتئینی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد (۱۸).

سنجش میزان زنده‌مانی میتوکندری‌ها به روش MTT Assay

این روش رنگ‌سنجی معیاری کمّی برای تعیین زنده‌مانی است که در آن نمک زردرنگ تترازولیوم با سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری است، احیا و شکسته و موجب تشکیل کریستال‌های بنفش‌رنگ فورمازان غیرمحلول می‌شود (۱۹). پس از استخراج میتوکندری‌ها، آن‌ها را در گروه‌های مختلف در معرض غلظت‌های مختلفی از مس سولفات قرار دادیم و میزان IC50 به‌وسیله این آزمون سنجش شد. سپس در مراحل بعد میتوکندری‌ها را در تماس با غلظت‌های مختلف از ان استیل سیستئین (۱،۲ و ۵ میلی‌مولار) به همراه غلظت IC50 مس سولفات قرار دادیم. درنهایت جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر در دستگاه الایزا ریدر قرائت شد.

آزمون لیپید پراکسیداسیون

زمانی که اکسیداتیو استرس ایجاد می‌شود، با حمله رادیکال‌های آزاد به لیپیدها آلدهیدهای گوناگون ازجمله مالون دی‌آلدهید (MDA: Malondialdehyde) به‌عنوان محصول ثانویه این واکنش‌ها ایجاد می‌شوند که با تیوباربیتوریک اسید در PH اسیدی و در دمای زیاد واکنش می‌دهند. به‌طور خلاصه به ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میتوکندری تیمارشده ۲۵۰ میکرولیتر تری‌کلرواسید ۲۰ درصد اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دور g۳۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از پایان سانتریفیوژ، مایع رویی برداشته و به آن ۱ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۳ درصد

International License Creative Commons Attribution License 4.0

اضافه شد. سپس نمونه‌ها داخل بن‌ماری در حال جوش به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. درنهایت جذب حاصل‌شده در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد (۲۰).

اندازه‌گیری گلوتاتیون احیا در نمونه

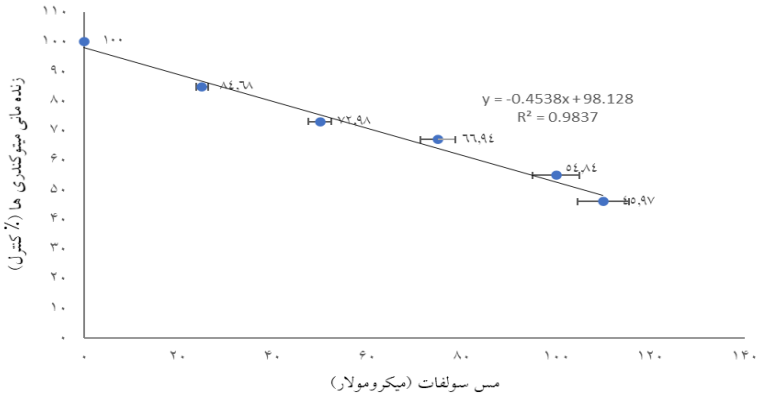
محتوای گلوتاتیون میتوکندری با استفاده از معرف DTNB صورت گرفت. در این حالت پس از تماس ماده محافظتی و سم با میتوکندری‌ها، آن‌ها سانتریفیوژ شدند و به رسوب حاصل‌شده ۱ میلی‌لیتر بافر تخلیص اضافه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از DTNB ۰/۴ درصد به آن اضافه و رنگ زرد ایجادشده در طول موج ۴۱۲ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد (۲۱).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Graph pad prism نسخه ۸ تحلیل شدند. برای هر سری از داده‌ها میانگین سطح متغیر به‌صورت میانگین±انحراف استاندارد بیان شد. برای مقایسه میانگین‌ها از تحلیل واریانس آنووا استفاده شد. برای بررسی و تعیین اختلاف میانگین‌ها و معنی‌دار بودن نتایج تحلیل از آنووای یک‌راهه و آزمون تکمیلی توکی در محدوده P<۰/۰۵ استفاده شد.

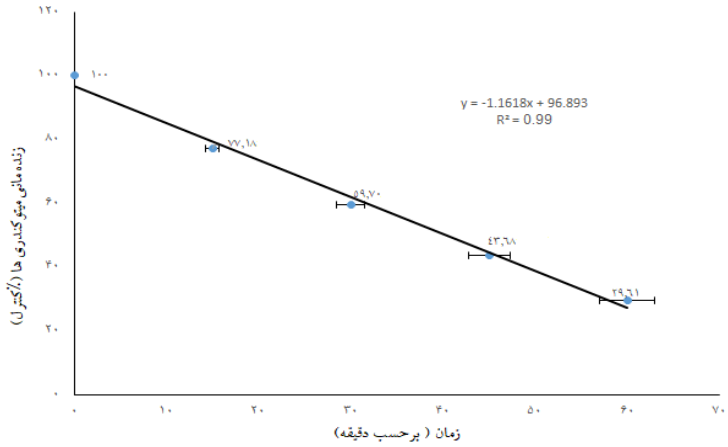
یافته‌ها

همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، در اثر تماس غلظت‌های مختلف مس سولفات با میتوکندری‌های ایزوله، مس سولفات سبب کاهش میزان زنده‌مانی میتوکندری‌ها شده است. با توجه به این داده‌ها غلظت ۱۰۶ میکرومولار از مس سولفات به‌عنوان IC50 (غلظتی که به ازکارافتادن ۵۰ درصد از میتوکندری‌ها منجر می‌شود) تعیین و برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

پس از به‌دست‌آوردن غلظت IC50، میتوکندری‌ها در زمان‌های مختلف در تماس با مس سولفات قرار داده شدند و پس از محاسبات صورت‌گرفته مدت‌زمان ۴۰ دقیقه تماس برای آزمایش‌های بعدی تکرار شد. (نمودار ۲).



نمودار شماره ۱: محاسبه غلظت IC50 مس سولفات



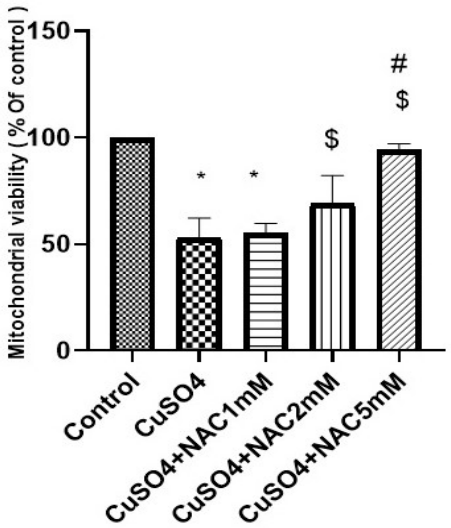
نمودار شماره ۲: اثر زمان بر زنده‌مانی میتوکندری‌ها

International License Creative Commons Attribution License 4.0

بحث

مطالعات سال‌های اخیر نشان می‌دهند میتوکندری‌ها اندامک‌های بسیار مهمی در بدن انسان هستند و نقش مهمی را در پاتولوژی بسیاری از بیماری‌ها نظیر سرطان، بیماری‌های متابولیک، پیری و بیماری‌های نورودژنریتیو نظیر آلزایمر، پارکینسون و ... ایفا می‌کنند. میتوکندری‌ها با داشتن زنجیره انتقال الکترون، منبع مهمی برای تولید رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شوند. هرگونه اختلال در عملکرد طبیعی میتوکندری‌ها می‌تواند موجب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در بدن شود و این خود زمینه‌ساز بروز بیماری‌های مختلف است (۲۲،۲۳). مس سولفات ماده پرمصرفی در صنعت و کشاورزی است؛ به همین دلیل مسمومیت حاد و مزمن با آن شایع است. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند تماس بیش‌ازحد با مس می‌تواند باعث بروز مسمومیت در انسان‌ها و حیوانات شود (۲۴). به همین دلیل با توجه به اهمیت میتوکندری و نیز اثرات مضر مس سولفات بر سلامتی انسان، در این مطالعه سعی شد از این ارگانل به‌عنوان مدل تحقیقاتی استفاده شود. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد مس سولفات می‌تواند سبب اختلال در عملکرد میتوکندری‌های ایزوله استخراج‌شده از کبد موش صحرایی شود. مطالعه حاضر در این خصوص نتایج مطالعات قبلی در همین راستا را تأیید می‌کند (۴،۲۵).

مس به‌عنوان عنصری ریزمغذی برای بدن مطرح است، اما در مقادیر زیاد می‌تواند سبب سمیت بر روی میتوکندری‌ها و باعث اختلال در سیکل ردوکس شود. این آسیب اکسیداتیو می‌تواند با پیش‌تیمارکردن میتوکندری‌ها توسط آنتی‌اکسیدان‌ها جلوگیری شود. آزمون MTT درواقع نوعی آزمون ارزیابی میزان سلامت میتوکندری است. به همین دلیل در این مطالعه سلامت و عملکرد میتوکندری‌ها با استفاده از آزمون MTT ارزیابی شد. نتایج نشان‌دهنده این بود که در اثر تماس میتوکندری‌ها با مس سولفات، میزان زنده‌مانی میتوکندری‌ها در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) کاهش می‌یابد (نمودار ۳). به همین ترتیب نتایج نشان داد پیش‌تیمار میتوکندری‌ها با ان استیل سیستئین به‌صورت وابسته به غلظت سبب کاهش سمیت مس سولفات در میتوکندری‌های کبد شد که این اثر در غلظت‌های ۲



نمودار شماره ۳: بررسی میزان زنده‌مانی و اثر محافظتی ان استیل سیستئین روی سمیت میتوکندریایی مس سولفات در میتوکندری‌های ایزوله از کبد موش صحرایی.

نتایج به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار و با ۳ بار تکرار نمایش داده شده است (n=۹).

*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است (P<۰/۰۵).

$: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروهی است که مس سولفات به‌تنهایی دریافت کرده است (P<۰/۰۵).

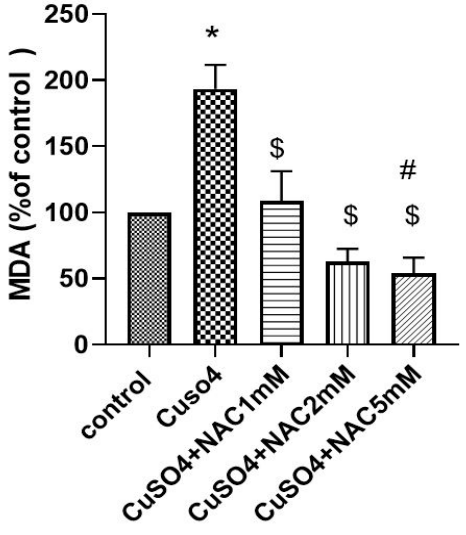
#: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هایی است که غلظت‌های مختلف از ماده محافظتی ان استیل سیستئین را دریافت کرده‌اند (P<۰/۰۵).

و ۵ میلی‌مولار از نظر آماری معنی‌دار بود.

لیپید پراکسیداسیون با اندازه‌گیری میزان تولید مالون دی‌آلدهید در میتوکندری‌های ایزوله تعیین می‌شود. همان‌طور که در نمودار ۴ نشان داده شده است، لیپید پراکسیداسیون در گروهی که مس سولفات دریافت کردند، در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) داشته است و در گروه‌هایی که غلظت‌های ۲ و ۵ میلی‌مولار ان استیل سیستئین به همراه مس سولفات دریافت کردند، میزان مالون دی‌آلدهید به‌صورت معنی‌دار کمتر از گروهی بود که مس سولفات را به‌تنهایی دریافت کردند. درنهایت بین غلظت‌های مختلف از ان استیل سیستئین اختلاف معنی‌داری در میزان اثر محافظتی آن‌ها وجود داشت.

گلوتاتیون یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های دفاعی غیرآنزیمی در میتوکندری است که نقش مهمی را در خنثی‌کردن گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده در میتوکندری‌ها به عهده دارد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌های ما، میزان گلوتاتیون موجود در

International License Creative Commons Attribution License 4.0



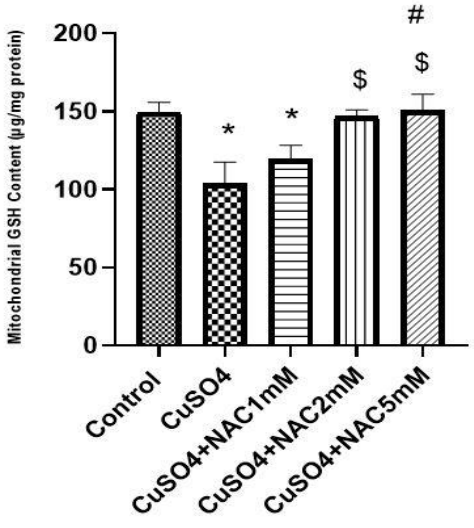
نمودار شماره ٤: تأثیر ان استیل سیستئین در میزان لیپید پراکسیداسیون ناشی از سمیت مس سولفات در میتوکندری‌های ایزوله کبد

نتایج به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار و با ۳ بار تکرار نمایش داده‌شده است (n=۹).

*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است (P<۰/۰۵).

$: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروهی است که مس سولفات به‌تنهایی دریافت کرده است (P<۰/۰۵).

#: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هایی است که غلظت‌های مختلف از ماده محافظتی ان استیل سیستئین را دریافت کرده‌اند (P<۰/۰۵).



نمودار شماره ٥: تأثیر ان استیل سیستئین بر محتوای گلوتاتیون ناشی از سمیت مس سولفات در میتوکندری‌های کبدی

نتایج به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار و با ۳ بار تکرار نمایش داده‌شده است (n=۹).

*: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل است (P<۰/۰۵).

$: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروهی است که مس سولفات به‌تنهایی دریافت کرده است (P<۰/۰۵).

#: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌هایی است که غلظت‌های مختلف از ماده محافظتی ان استیل سیستئین را دریافت کرده‌اند (P<۰/۰۵).

گروهی که مس سولفات دریافت کردند در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). همچنین گلوتاتیون در گروه‌هایی که مس سولفات به همراه ان استیل سیستئین دریافت کردند، نسبت به گروهی که فقط مس سولفات دریافت کرده بودند، بیشتر بود. درنهایت در گروه‌هایی که ان استیل سیستئین دریافت کرده بودند، اختلاف معنی‌دار مشاهده شد.

ان استیل سیستئین نوعی ترکیب سولفیدریل‌دار است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی مستقیم و غیرمستقیم دارد. مطالعات مختلفی این اثرات آنتی‌اکسیدانی را تأیید کرده‌اند. گروه سولفیدریل در مولکول ان استیل سیستئین به‌طور مستقیم رادیکال‌های آزاد را به دام می‌اندازند. همچنین این مولکول به‌صورت غیرمستقیم می‌تواند سبب افزایش سطح گلوتاتیون داخل سلولی شود که یکی از مهم‌ترین سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی بدن است (۱۴). در همین راستا نتایج این مطالعه بیانگر آن است که ان استیل سیستئین به‌عنوان یک ترکیب تیول‌دار می‌تواند باعث افزایش سطح گلوتاتیون و همچنین کاهش سطح مالون دی‌آلدهید و درنهایت افزایش زنده‌مانی میتوکندری‌ها شود؛ اما نتایج این مطالعه نشان می‌دهد این اثرات به غلظت وابسته است. این اثرات محافظتی در غلظت‌های ۲ و ۵ میلی‌مولار مشاهده شد و غلظت ۱ میلی‌مولار از این ماده نتوانست میتوکندری‌ها را در مقابل اثرات سمی مس سولفات محافظت کند، درصورتی‌که در مطالعات قبلی (۲۵) این اثر محافظتی در غلظت ۱ میلی‌مولار دیده شده بود. به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها به دلیل مدت‌زمان این ماده است. در مطالعات کشت سلولی به دلیل مدت‌زمان تماس بیشتر ماده، اثرات ان استیل سیستئین بیشتر نمایان می‌شود.

در خصوص مطالعه حاضر و تفاوت آن با روش‌های برون‌تن (In vivo) می‌توان به این موضوع اشاره کرد که در مطالعه حاضر به دلیل مواجهه سریعی (Accelerated toxicity) که ایجاد می‌شود، میزان غلظت IC50 به‌دست‌آمده ممکن است با شرایط برون‌تن متفاوت باشد؛ این موضوع می‌تواند به دلیل عوامل تأثیرگذاری همچون زمان مواجهه سم و تفاوت‌های کینتیکی (جذب، توزیع و دفع) در این دو نوع مطالعه باشد (۲۶).

International License Creative Commons Attribution License 4.0

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه دریافتیم که ان استیل سیستئین می‌تواند به‌عنوان نوعی آنتی‌اکسیدان عمل کند و از اثرات سمی مس سولفات بر روی میتوکندری‌های ایزوله جلوگیری کند، اما برای درک مکانیسم‌های دقیق‌تر به مطالعات مولکولی بیشتری نیاز است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد میتوکندری می‌تواند به‌عنوان ارگانل هدف برای سمیت ناشی از مس سولفات مطرح باشد و نقش مهمی را در سمیت هپاتوسیت‌ها و آسیب کبدی ایفا کند. مطابق با نتایج مطالعات قبلی، مس سولفات بیشترین اثرات سمی خود را از طریق استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش گلوتاتیون اعمال می‌کند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد ان استیل سیستئین به‌عنوان احیاکننده گلوتاتیون عمل می‌کند و از این طریق مانع اختلال میتوکندری‌ها در تماس با مس سولفات می‌شود. این یافته برای پیشگیری یا درمان بیماری‌های وابسته به اختلال میتوکندری یا در درمان بیماری‌های مرتبط با مس می‌تواند استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت دانشگاه تربیت مدرس (کد اخلاق: IR.MODARES.REC.1397.116 و کد پروپوزال ۷۶۷۷۲۰) انجام شد. از تمام کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

References:

1. Isani G, Falcioni ML, Barucca G, Sekar D, Andreani G, Carpenè E, et al. Comparative toxicity of CuO nanoparticles and CuSO4 in rainbow trout. Ecotoxicol Environ Saf 2013;97:40-6. PMID: 23932511
2. Zarei I, Pourkhabbaz A, Alipour H, Khazaei SH. Acute toxicity and the effects of copper sulphate (CuSO4. 5H2O) on the behavior of the black fish (Capoeta fusca). Iran J Toxicol 2013;6(19):771-8. Link
3. Al Sulimani M, Kelany A, Ahmad W, Shaikh Omar A, ElShazly H. Structural destabilization in renal and hepatic cells and tissues subjected to CuSO4 toxicity in male mice. J Med Biomed Discoveries 2018;2018(1):1-7. Link
4. Saporito-Magriñá C, Musacco-Sebio R, Acosta JM, Bajicoff S, Paredes-Fleitas P, Boveris A, et al. Rat liver mitochondrial dysfunction by addition of copper (II) or iron (III) ions. J Inorg Biochem 2017;166:5-11. PMID: 27815982
5. Barceloux DG. Copper. J Toxicol Clin Toxicol 1999;37(2):217-30. PMID: 10382557
6. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicology 2003;189(1-2):147-63. PMID: 12821289
7. Royer A, Sharman T. Copper toxicity. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. PMID: 32491388
8. Hosseini MJ, Shaki F, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of copper on isolated liver mitochondria: impairment at complexes I, II, and IV leads to increased ROS production. Cell Biochem Biophys 2014;70(1):367-81. PMID: 24691927
9. Hashish EA, Elgaml SA. Hepatoprotective and nephroprotective effect of curcumin against copper toxicity in rats. Indian J Clin Biochem 2016;31(3):270-7. PMID: 27382197
10. Mehta R, Templeton DM, O'Brien PJ. Mitochondrial involvement in genetically determined transition metal toxicity: II. Copper toxicity. Chem Biol Interact 2006;163(1-2):77-85. PMID: 16824500
11. Arciello M, Rotilio G, Rossi L. Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. Biochem Biophys Res Commun 2005;327(2):454-9. PMID: 15629136
12. Dhouib IE, Jallouli M, Annabi A, Gharbi N, Elfazaa S, Lasram MM. A minireview on N-acetylcysteine: an old drug with new approaches. Life Sci 2016;151:359-63. PMID: 26946308

International License Creative Commons Attribution License 4.0

13. Aboubakr HM, Elzohairy EA, Ali AA, Rashed LA, Elkady NK, Soliman AS. Therapeutic effects of N-acetylcysteine against malathion-induced hepatotoxicity. Egyp J Foren Sci 2019;9(1):34. Link

14. Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. Free Radic Res 2018;52(7):751-62. PMID: 29742938

15. 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;27(8):561-7. PMID: 28535741

16. Aykin-Burns N, Franklin EA, Ercal N. Effects of N-acetylcysteine on lead-exposed PC-12 cells. Arch Environ Contam Toxicol 2005;49(1):119-23. PMID: 15981033

17. Pawłowska-Góral K, Kurzeja E, Stec M. N-acetylcysteine protects against fluoride-induced oxidative damage in primary rat hepatocytes. Toxicol Vitro 2013;27(8):2279-82. PMID: 24095861

18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72(1-2):248-54. PMID: 942051

19. Rezaei M, Keshtzar E, Khodayar MJ, Javadipour M. SirT3 regulates diabetogenic effects caused by arsenic: An implication for mitochondrial complex II modification. Toxicol Lett 2019;301:24-33. PMID: 30385301

20. Zhang F, Xu Z, Gao J, Xu B, Deng Y. In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain. Environ Toxicol Pharmacol 2008;26(2):232-6. PMID: 21783917

21. Piggott AM, Karuso P. Fluorometric assay for the determination of glutathione reductase activity. Anal Chem 2007;79(22):8769-73. PMID: 17924649

22. Cabral-Costa J, Kowaltowski A. Neurological disorders and mitochondria. Mol Aspects Med 2020;71:100826. PMID: 31630771

23. Zong WX, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and cancer. Mol Cell 2016;61(5):667-76. PMID: 26942671

24. Kalita J, Kumar V, Misra UK, Bora HK. Memory and learning dysfunction following copper toxicity: biochemical and immunohistochemical basis. Mol Neurobiol 2018;55(5):3800-11. PMID: 28536976

25. Yang F, Pei R, Zhang Z, Liao J, Yu W, Qiao N, et al. Copper induces oxidative stress and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in chicken hepatocytes. Toxicol Vitro 2019;54:310-6. PMID: 30389602

26. Kumar V, Kalita J, Misra U, Bora H. A study of dose response and organ susceptibility of copper toxicity in a rat model. J Trace Elem Med Biol 2015;29:269-74. PMID: 25022334

International License Creative Commons Attribution License 4.0