

## ارزیابی اثرات N-استیل سیستین در مهار التهاب و آسیب بافتی در ریه رت‌های مواجهه یافته با دوزهای حاد و مزمن سرب

نجمه رنجی<sup>۱\*</sup>، هادی حبیب‌اللهی<sup>۲</sup>، ریحانه کوچکی‌نژاد<sup>۳</sup>، محمد مهدی جعفرزاده<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۱۰/۰۳ تاریخ پذیرش ۱۴۰۱/۰۲/۲۴

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** سرب (Pb) یک فلز سنگین سمی است که باعث عوارض نامطلوبی بر سلامتی انسان‌ها و حیوانات می‌شود. N-استیل سیستین (NAC) به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی، آسیب‌های بافتی و التهابات را کاهش می‌دهد. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات N-استیل سیستین بر بیان ژن‌های IL-10 و TGF- $\beta$  در ریه رت‌های مواجهه یافته با سرب (Pb) بود.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه شبه تجربی رت‌ها به‌طور تصادفی در پنج گروه شامل (۱) کنترل، (۲) دوز حاد سرب، (۳) دوز حاد سرب + دوز پیوسته NAC، (۴) دوز مزمن سرب و (۵) دوز مزمن سرب و دوز پیوسته NAC تقسیم‌بندی شدند. دوز حاد سرب (70 mg/kg) در روز اول مطالعه، دریافت شد. دوز مزمن سرب (2 mg/kg) و مصرف پیوسته NAC (50 mg/kg) هر روز طی چهار هفته صورت گرفت. N-استیل سیستین و سرب هر دو در آب استریل حل شده و به‌صورت گاوژ خوراکی در رت‌ها مصرف شد. آنالیز هیستوپاتولوژی با رنگ‌آمیزی بافت‌ها با هماتوکسیلین و اتوزین (H&E) انجام شد. روش qRT-PCR و آزمون‌های آماری One-Way ANOVA با سطح معنی‌داری  $P < 0.05$  برای ارزیابی بیان ژن‌های IL-10 و TGF- $\beta$  استفاده شدند.

**یافته‌ها:** سرب در دوزهای حاد و مزمن باعث التهاب بافتی شد. آنالیز با qRT-PCR، کاهش معنی‌دار بیان IL-10 و افزایش معنی‌دار بیان TGF- $\beta$  را نشان داد. در حالی که مصرف NAC به همراه سرب، باعث کاهش التهاب، افزایش بیان IL-10 و کاهش بیان TGF- $\beta$  در ریه رت‌ها شد. **نتیجه‌گیری:** نتایج ما پیشنهاد می‌کند که N-استیل سیستین می‌تواند از طریق کاهش التهاب از ریه در برابر سمیت سرب، محافظت کند. **کلیدواژه‌ها:** IL-10، ریه، N-استیل سیستین، سرب، رت، التهاب

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره یازدهم، ص ۸۳۹-۸۳۱، بهمن ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، تلفن: ۱۳۳۳۴۲۴۰۸۰

Email: n\_ranjii@iaurasht.ac.ir

### مقدمه

مدل‌های آزمایشگاهی جذب ۱۰ تا ۵۰ درصدی این فلز سمی را نشان می‌دهد. جذب ۶۳ درصدی سرب از طریق مصرف خوراکی غذاهای حاوی سرب و جذب ۷۱ درصدی آن از طریق نوشیدن آب حاوی سرب در بافت‌هایی چون مغز، کبد، ریه‌ها و کلیه‌ها گزارش شده است (۳). یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های سمیت فلزاتی چون سرب و کادمیوم، ایجاد استرس اکسیداتیو است (۲). افزایش تولید گو نه‌های اکسیژن فعال‌شده (ROS) و کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باعث تجزیه سریع ماکرو مولکول‌های زیستی چون پروتئین‌ها و DNA می‌شود (۴). این فلزات سنگین به لیگاند‌های اکسیژن، نیتروژن و سولفور در آنزیم‌ها و دیگر پروتئین‌ها متصل

سرب به‌عنوان یک فلز سمی در منابع محیطی مختلفی چون آب و خاک وجود دارد (۱) و به‌عنوان یکی از آلودگی‌های غیر قابل تجزیه زیستی (۲)، باعث مشکلات عدیده و مهمی بر سلامت انسان در سراسر دنیا می‌شود (۳). سمیت با سرب باعث سقط‌جنین و ناهنجاری‌های تکاملی می‌شود و اثرات سمی سرب بر سیستم اعصاب مرکزی شناخته شده است. سرب عوارضی همچون موتاژن، تراژون و کاسینوزن بودن داشته و سمیت آن برای جنین تأیید شده است (۳). سرب به‌راحتی از طریق غشاء سلول‌ها به بافت‌ها نفوذ کرده و در آن‌ها تجمع می‌یابد. مصرف خوراکی سرب در

<sup>۱</sup> استادیار ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> استادیار زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

<sup>۳</sup> دانشجوی دکتری تخصصی شیمی تجزیه، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

<sup>۴</sup> دانش‌آموخته دکتری تخصصی زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

سن ۸ تا ۱۰ هفته) با میانگین وزنی ۱۵۰-۲۰۰ گرم از انستیتو پاستور ایران (تهران) خریداری شد. مجوز انجام تیمارها از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت با شناسه IR.IAU.RASHT.REC.1400.015 گرفته شد. رت‌ها در قفس از جنس پلی کرینات (۱۵ در ۱۵ در ۳۰ سانتی‌متر)، در شرایط یکسان (دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت  $50 \pm 5$  درصد، و سیکل شب و روز ۱۲:۱۲) و با رژیم غذایی استاندارد در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. پس از انطباق رت‌ها با محیط آزمایشگاهی (به مدت یک هفته)، گروه‌بندی صورت گرفت و رت‌ها در پنج گروه تحت تیمار قرار گرفتند. گروه کنترل (G1) به مدت ۴ هفته تحت رژیم غذایی اس‌تا ندارد قرار گرفتند. رت‌های دریافت‌کننده تیمارها، در چهار گروه G2 (دریافت‌کننده دوز حاد یا تک‌دوز (70 mg/kg) سرب)، G3 (دوز حاد سرب (70 mg/kg) + دوز پیوسته NAC (50 mg/kg))، G4 (دوز مزمن یا دوز پیوسته (2 mg/kg) سرب) و G5 (دوز پیوسته سرب (2 mg/kg) + دوز پیوسته NAC (50 mg/kg)) قرار گرفتند. تعیین غلظت سرب و NAC بر اساس مطالعات پیشین تعیین شد (۱۰-۱۲). دریافت استات سرب و NAC به صورت گاوآذ انجام شد. دوز حاد سرب فقط در روز اول تیمار، دوز مزمن سرب و دوز پیوسته NAC هر روز به مدت ۴ هفته دریافت کردند.

#### تهیه نمونه بافتی:

۴۸ ساعت بعد از انجام آخرین تیمارها، تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلوزین با نسبت ۵ به ۲ به حیوانات (بعد از تحمل ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی) صورت گرفته و حیوانات بی‌هوش شدند. نمونه‌های بافت ریه جداسازی و در فسفات بافر (pH 7/0) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه هموژنایزر هموژنیزه گردید. سپس با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید (۱۳). محلول رویی در دمای ۸۰- سانتی‌گراد برای مطالعات مولکولی نگهداری شد. بخشی از بافت ریه بلافاصله پس از بیهوش کردن رت‌ها جداسازی، و جهت بررسی هیستوپاتولوژیکی به روش میکروسکوپی، در فرمالین ۱۰٪ نگهداری شد.

#### بررسی بیان ژن‌های IL-10 و TGF-β به روش RT-PCR کمی:

از پنج گروه رت‌ها، RNA تام از بافت‌های ریه با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناکلون، تهران) استخراج شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت TakaRa PrimScript RT reagent Kit، ژاپن صورت گرفت. جهت بررسی بیان ژن‌ها از دستگاه Rotor

شده و به‌واسطه میانکنش با عناصر زیستی، باعث مهار اپوپتوز، تغییر در ساختار DNA، مهار ترمیم DNA ی آسیب‌دیده و بیان ناصحیح ژن‌ها می‌شوند (۲).

التهاب و آسیب بافتی از عوارض مواجهه با غلظت‌های بالای فلزات سنگین همچون سرب و کادمیوم می‌باشد (۵). اینترلوکین ۱۰ (IL-10) یک سیتوکین چند عملکردی است که مهم‌ترین نقش آن در پاسخ‌های ایمنی، اثرات ضدالتهابی آن است. IL-10، باعث مهار پاسخ ایمنی هم در سطح همورال و هم در سطح سلولی می‌شود. IL-10، از طریق دو فرآیند: (۱) مهار ارائه آنتی‌ژن توسط سلول‌های دندریتیک (APCs<sup>۱</sup>) و (۲) مهار فعالیت و نفوذ ماکروفاژ به محل آسیب، باعث کاهش آسیب حاصل از پاسخ التهابی می‌شود. همچنین IL-10 مسیرهای اپوپتوتیک نظیر p38-MAPK را از طریق مسیر سیگنالینگ STAT3 مهار کرده و به این طریق میزان مرگ سلولی را در موضع دچار آسیب بافتی کاهش می‌دهد. ماکروفاژها به‌عنوان اهداف مهم IL-10 به دو گروه فعال‌شده کلاسیک (M1) و متغیر یا فرعی ۲ (M2) تقسیم می‌شوند. سلول‌های M1 تحت القاء آنتی‌ژن‌های باکتریایی، IFN-γ، TNF-α، فاکتور التهابی نیتریک اکسید و ROS فعال می‌شوند. در حالیکه سلول‌های M2 به‌واسطه IL-4/IL-13 و IL-10 در پاسخ به آسیب فعال می‌شوند و با کاهش التهاب و تحریک تشکیل ماتریکس خارج سلولی، باعث شروع بهبود آسیب می‌شوند. همچنین سلول‌های M2 باعث شروع کلاژن‌سازی و فیبروز از طریق به‌کارگیری و فعال‌سازی س به‌واسطه TGF-β در موضع آسیب، می‌شود (۶). TGF-β یک القاء‌کننده مهم فیبروز در بافت‌ها است که در کبد باعث افزایش مهارکننده‌های بافتی متالوپروتئازها<sup>۲</sup> (TIMPs) و در نتیجه مهار تجزیه ماتریکس خارج سلولی می‌شود (۷).

N-استیل سیستئین (NAC) یک ترکیب با توان آنتی‌اکسیدانی مستقیم و غیرمستقیم است. گروه تیول آزاد NAC قادر به اتصال به گروه الکترون دوست ROS و ایجاد دی سولفید NAC است. NAC، پیش‌ساز گلوپتاتین نیز است (۸). گلوپتاتین کوآنزیم آنزیم‌هایی است که در محافظت علیه رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ترکیبات سمی نقش دارد (۹). هدف از این مطالعه بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی NAC بر بیان ژن‌های IL-10 و TGF-β در ریه رت‌های مواجهه یافته با سرب بود.

#### مواد و روش کار

مطالعه حاضر از نوع مداخله‌ای (تجربی و شبه تجربی) است. در این پژوهش، تعداد ۳۰ موش صحرایی (رت) نر نژاد ویستار (با

<sup>3</sup> Tissue Inhibitors Of Matrix Metalloproteases

<sup>1</sup> Antigen Presenting Cells

<sup>2</sup> Alternatively Activated Species

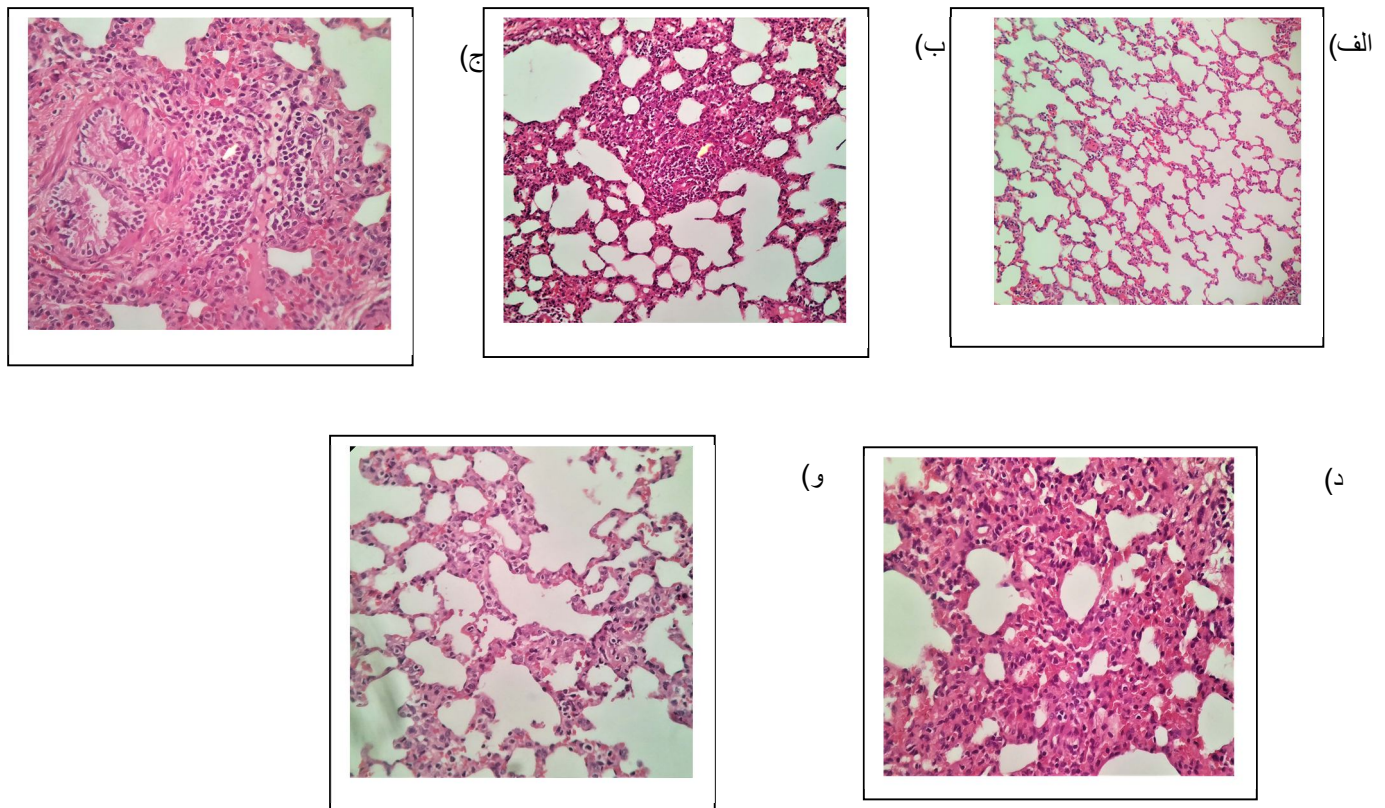
شدند.

### یافته‌ها

نتایج هیستوپاتولوژیکی بافت ریوی گروه‌های مورد مطالعه، در شکل ۱ نشان داده شده است. هیچ نوع علامتی از ناهنجاری یا آسیب ساختاری در سلول‌های ریوی در گروه کنترل یا G1 مشاهده نگردید. باین‌حال برش بافتی ریه در رت‌های گروه G2 (دریافت‌کننده دوز حاد سرب) و G4 (دریافت‌کننده دوز مزمن سرب) دال بر افزایش التهاب و ناهنجاری‌های ساختاری بود. در برش‌های بافتی گروه‌های دریافت‌کننده NAC و سرب (گروه‌های G3 و G5) کاهش ناهنجاری‌های بافتی در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده سرب (گروه‌های G2 و G4) مشاهده شد. تیمار مکمل NAC منجر به کاهش تعداد سلول‌های التهابی و در نتیجه خفیف شدن پروسه التهابی در ریه رت‌های دریافت‌کننده سرب گردید (شکل ۴-۱).

Gene 6000 (Corbett Research, Australia) بهره برده شد. برنامه دمایی واکنش RT-PCR کمی برای هر سه ژن *IL-10*، *TGF-β* و *GAPDH* به ترتیب شامل این دماها بود: مرحله واسرشت شدن ابتدایی ( $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه) و  $40^{\circ}\text{C}$  سیکل شامل  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۰ ثانیه و  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۰ ثانیه. از ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن کنترل داخلی (ژن مرجع) استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است. آنالیز بیان ژن‌ها به کمک معادله  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  صورت گرفت.

برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین نتایج در گروه‌های تحت تیمار، از آزمون (Post-Hoc Tukey) One Way ANOVA استفاده شد. سطح معنی‌داری برای تمام محاسبات  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد. کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه



شکل (۱): نتیجه هیستوپاتولوژی در گروه‌های مختلف. الف) گروه کنترل (G1)، ب) گروه مواجهه یافته با تک‌دوز (دوز حاد) سرب (G2)، ج) گروه مواجهه یافته با تک‌دوز سرب و N-استیل سیتئین (G3)، د) گروه مواجهه یافته با دوز مزمن سرب (G4)، و) گروه مواجهه یافته با دوز مزمن سرب و N-استیل سیتئین (G5).

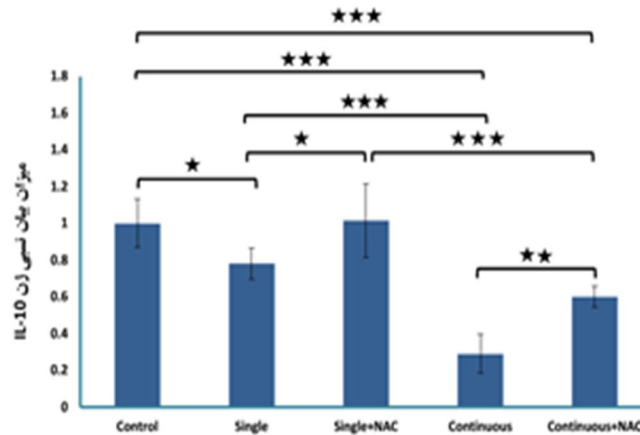
رت‌های مواجهه یافته با دوز حاد (G2) ( $0.78 \pm 0.12$ ) برابر) ( $P = 0.03$ ) و دوز مزمن (G4) ( $0.28 \pm 0.1$ ) برابر) ( $P < 0.001$ ) در مقایسه با گروه کنترل (G1) مشاهده شد. در حالیکه دریافت

### بررسی بیان ژن *IL-10*:

بررسی بیان ژن *IL-10* در ریه پنج گروه رت به روش RT-PCR کمی بررسی شد و کاهش معنی‌دار بیان این ژن در ریه

بیان ژن IL-10 ( $0.6 \pm 0.06$  برابر) در ریه رت‌های گروه G5 (دوز مزمن یا پیوسته سرب + NAC) نسبت به گروه G4 (دوز مزمن یا پیوسته سرب) ( $0.1 \pm 0.28/1$  برابر) مشاهده شد (نمودار ۱).

NAC باعث افزایش بیان ژن IL-10 در ریه رت‌های گروه G3 (دوز حاد سرب + NAC) ( $1.0 \pm 0.2$  برابر) نسبت به گروه G2 (دوز حاد یا تک‌دوز سرب) گزارش شد. همچنین افزایش معنی‌دار ( $P < 0.01$ )

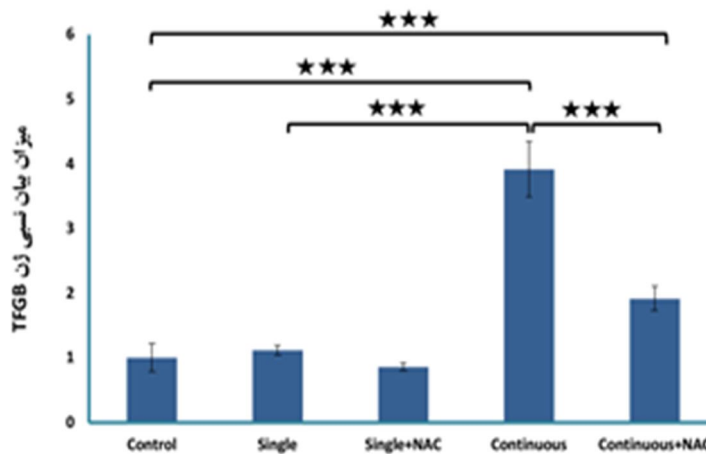


**نمودار (۱):** نمودار تغییرات بیان ژن IL-10 در ریه رت‌های مواجهه یافته با سرب و NAC. هر آزمون حداقل سه بار تکرار شد. نتایج آزمون‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است ( $P < 0.05$ ,  $*P < 0.01$ ,  $**P < 0.001$ ).

برابر) در مقایسه با گروه کنترل (G1) و گروه G2 ( $P < 0.01$ ) گزارش شد. دریافت NAC باعث کاهش بیان ژن TGF- $\beta$  در ریه رت‌های گروه G3 (تک‌دوز یا دوز حاد سرب + NAC) ( $0.86 \pm 0.05$  برابر) نسبت به گروه G2 (تک‌دوز یا دوز حاد سرب) ( $P = 0.34$ ) گزارش شد. همچنین کاهش معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بیان این ژن در ریه رت‌های گروه G5 (دوز پیوسته سرب + NAC) نسبت به گروه G4 (دوز پیوسته سرب) ( $3.0 \pm 0.92/4$  برابر) مشاهده شد (نمودار ۲).

#### بررسی بیان ژن: TGF- $\beta$

بررسی بیان ژن TGF- $\beta$  در ریه پنج گروه رت به روش RT-PCR کمی ارزیابی شد. در این مطالعه افزایش بیان ژن TGF- $\beta$  در ریه رت‌های تحت تیمار با تک‌دوز یا دوز حاد سرب (G2) ( $1.12 \pm 0.07$  برابر) ( $P = 0.95$ ) در مقایسه با گروه کنترل (G1) مشاهده شد. همچنین افزایش بیان معنی‌دار این ژن در ریه رت‌های در معرض دوز پیوسته یا مزمن سرب (G4) ( $3.92 \pm 0.4$ )



**نمودار (۲):** نمودار تغییرات بیان ژن TGF- $\beta$  در ریه رت‌های مواجهه یافته با سرب و NAC. هر آزمون حداقل سه بار تکرار شد. نتایج آزمون‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است ( $**P < 0.001$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

سمیت با فلزات سنگین یکی از معضلات بشر بوده و سرب به‌عنوان یک فلز سنگین در غلظت‌های بالا قادر به استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی خواهد بود (۱۴). در این تحقیق اثرات زیان‌بار سرب و همچنین اثرات محافظت‌کنندگی N-استیل سیستین (NAC) بر ریه‌های مواجهه یافته با سرب بررسی شد.

فلزات سنگین همچون سرب و کادمیوم به‌عنوان ترکیبات سمی توان آسیب به بافت‌های مختلف از جمله ریه را دارند. در مطالعه Attafi و همکاران مصرف خوراکی سه روزه نیترات سرب (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدنی) باعث افزایش سلول‌های دچار اپوپتوز در ریه و تغییر بیان ژن‌های مؤثر در التهابات و استرس اکسیداتیو گردید (۱۵). در مطالعه Lu و همکاران در رت نژاد ویستار بعد از مواجهه ۵ هفته با سرب (ppm ۲۲۰۰) افزایش التهاب و آسیب بافتی از طریق افزایش بیان TNF- $\alpha$  و کاهش بیان Nrf2 مشاهده شد. افزایش بیان Nrf2 در شرایط استرس اکسیداتیو، باعث کاهش آسیب‌های بافتی می‌شود (۱۶). هرچند غلظت کم سرب در آلاینده‌های محیط قادر به آسیب به سلول‌های ایمنی نیست اما در آزمایشات روتین سرب توانسته باعث تأثیر بر عملکرد و فعالیت سیستم ایمنی شود. در مطالعه مروری Metryka و همکاران گزارش شده که سیتوکین‌های پیش التهابی همچون IL-4، IL-6، TGF- $\beta$ 1، TNF- $\alpha$  بعد از مواجهه رت‌ها با سرب افزایش بیان نشان می‌دهند (۱۷).

در مطالعه Flohé و همکاران، سلول‌های مغز استخوان در محیط کشت تحت تیمار با سرب افزایش بیان فاکتورهای التهابی همچون TNF- $\alpha$ ، IL-6 و IL-12 و کاهش بیان IL-10 را نشان دادند (۱۸). در مطالعه Elrasoul و همکاران افزایش بیان فاکتورهای التهابی TNF- $\alpha$  و IL-1 $\beta$  و کاهش بیان فاکتور ضدالتهابی IL-10 بعد از مواجهه رت‌ها با استات سرب mg/kg ۱۰۰ به مدت ۶۰ روز در کبد مشاهده شد (۱۹). IL-10 به‌عنوان یک سیتوکین ضدالتهابی در ناحیه آسیب بافتی باعث القاء اپوپتوز از طریق کاهش NF-Kb و کاهش آسیب بافتی با القاء اپوپتوز می‌شود (۲۰). در مطالعه Turley و همکاران کاهش IL-10، ۴۸ ساعت بعد از مواجهه رت‌ها با کادمیوم (۳۲ ppm) در آب آشامیدنی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد اما بعد از ۷۲ ساعت افزایش نشان داد (۲۱). در مطالعه Jiao و همکاران افزایش سیتوکین‌های التهابی چون IL-4، IL-6 و IL-17 در بورس فابریوس جوجه مواجهه یافته با سرب مشاهده شد (۲۲). با توجه به اینکه در مطالعات مختلف نیز گزارش شده، مواجهه با فلزات سنگین همچون

سرب و کادمیوم، باعث افزایش و یا کاهش سیتوکین‌های التهابی و ضدالتهابی در بافت آسیب دیده با فلز سنگین می‌شود. در مطالعه حاضر نیز کاهش اینترلوکین ۱۰ در دوزهای حاد و مزمن سرب را بعد از ۴۸ ساعت نشان داد. این امر نشان‌دهنده این است که در این رت‌ها با وجود التهاب، سطح اینترلوکین ۱۰ کاهش یافته و از نتایج آسیب به بافت ریه در اثر وجود التهاب در این بافت می‌باشد.

بیان TGF- $\beta$  در بیماری‌های ریوی از جمله فیبروز ریوی، آمفیژم (انسداد ریه)، آسم و سرطان ریه افزایش می‌یابد. فیبروز ریوی در جایی که تکرار جراحی و ترمیم آن رخ می‌دهد باعث تغییر ساختار غیرقابل برگشت و سختی بافت می‌شود. TGF- $\beta$  یکی از مهم‌ترین عوامل القاء تمایز میوفیبروبلاست‌ها است و افزایش بیان آن در ریه‌های دچار فیبروز گزارش شده است. بیان TGF- $\beta$  در سلول‌های اپی‌تلیال کوچک ریه افراد سیگاری و افراد با انسداد مزمن ریه مشاهده شده است. در مدل حیوانی فقدان مسیر سیگنالینگ TGF- $\beta$ ، مستعد به ایجاد انسداد ریوی بود، اما به ایجاد فیبروز مقاوم شده بود (۲۳). در مطالعه حاضر افزایش بیان TGF- $\beta$  در ریه‌های مواجهه یافته با دوزهای حاد و مزمن سرب، تأیید کننده عوارض سمی این فلز سنگین در ایجاد آسیب بافتی و فیبروز در ریه رت‌ها است.

در مطالعه Jiao و همکاران از سلنیوم برای کاهش اثرات سمی فلز سنگین سرب استفاده شد و مشخص شد که سلنیوم قادر است سطح سیتوکین‌های التهابی را در بورس فابریوس جوجه مواجهه یافته با سرب کاهش دهد (۲۲). در مطالعه Eyb1 و همکاران استفاده از کورکومین به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در کبد رت‌های مواجهه یافته با کادمیوم، میزان گلوتاتیون را در مقایسه با رت‌های در یافت‌کننده کادمیوم افزایش داد (۲۴). در مطالعه Khalaf و همکاران دریافت سرب، در مغز رت‌ها باعث کاهش سطح گلوتاتیون و سوپر اکسید دسموتاز، افزایش قطعه قطعه شدن DNA و آسیب بافتی شد در حالیکه مصرف چای سبز این عوارض را در مغز رت‌های دریافت‌کننده چای سبز به همراه سرب کاهش داد (۲۵). در مطالعه Arfsten و همکاران استفاده از NAC در رت باعث افزایش گلوتاتیون به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در مقایسه با گروه کنترل (بدون دریافت NAC) شد (۲۶). در مطالعه مروری Bhatti و همکاران نشان داده شد که NAC قادر به کاهش سطح واسطه‌های استرس اکسیداتیو و پاسخ‌های التهابی در سطح سلول و بافت و کاهش مرگ سلولی بدون عارضه جانبی است (۲۷). در مطالعه Meurer و همکاران بر روی سلول‌های فعال شده استیلالات کبدی نشان داده شد که NAC به‌عنوان یک مهار کننده اختصاصی TGF- $\beta$  قادر به هدف قرار دادن اجزای مسیر

مطالعات، فضای مورد نیاز برای مطالعه همزمان چند فلز سمی با چند آنتی‌اکسیدان بر گروه‌های مورد مطالعه است. همچنین برای انجام مطالعات هم سلولی و هم مولکولی نیاز به صرف هزینه و زمان بیشتری است که از موانع این تحقیق بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه نتایج هیستوپاتولوژی، التهاب بافت ریه در مواجهه با سرب را نشان داد. در ریه رت‌های مواجهه یافته با دوزهای حاد و مزمن سرب کاهش بیان *IL-10* و افزایش بیان *TGF-β* رخ داد. اما در ریه رت‌های مواجهه یافته با *NAC* + دوزهای دوزهای حاد و مزمن سرب، *NAC* توانست اثرات آنتی‌اکسیدانی خود را با کاهش التهاب از طریق افزایش سیتوکین ضدالتهابی *IL-10* و با کاهش آسیب بافتی از طریق کاهش بیان *TGF-β* اعمال نماید.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت بابت تأمین هزینه‌های این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارد.

سیگنالینگ  $TGF-\beta$  است (۲۸). قادر به در مطالعه حاضر افزایش سطح *IL-10* و کاهش سطح  $TGF-\beta$  در رت‌های دریافت‌کننده *NAC* به همراه دوزهای حاد و مزمن سرب در مقایسه با رت‌های دریافت‌کننده دوزهای حاد و مزمن سرب نشان‌دهنده اثر آنتی‌اکسیدانی *NAC* است. *NAC* توانسته با کاهش استرس اکسیداتیو در کاهش التهاب از مسیرهای مختلف از جمله افزایش سیتوکین‌های ضدالتهابی چون *IL-10* مؤثر باشد؛ همچنین نقش مهمی در کاهش آسیب بافتی و مهار فیبروز از طریق کاهش عوامل مؤثر در ایجاد فیبروز از جمله  $TGF-\beta$  داشته باشد.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، اثرات این آنتی‌اکسیدان مهم (*NAC*) و چند آنتی‌اکسیدان بالقوه دیگر بر فاکتورهای التهابی و ضدالتهابی، ژن‌های مؤثر بر استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی در ریه رت‌های مواجهه یافته با فلزات سنگین چون سرب، کادمیوم، قلع، منگنز و آرسنیک مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان برای کاهش عوارض این گونه فلزات خطرناک استراتژی‌های درمانی مفیدی ارائه نمود. هر چند از مشکلات مهم در انجام این نوع

### References:

- Shaban NZ, Abd El-Kader SE, Mogahed FAK, El-Kersh MAL, Habashy NH. Synergistic protective effect of Beta vulgaris with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced neurotoxicity in male rats. *Sci Rep* 2021;11(1): 252.
- Andjelkovic M, Buha Djordjevic A, Antonijevic E, Antonijevic B, Stanic M, Kotur-Stevuljevic J, et al. Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead Exposure in Rat Blood, Liver, and Kidney. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16(2): 274.
- Winiarska-Mieczan A, Kwiecień M. The Effect of Exposure to Cd and Pb in the Form of a Drinking Water or Feed on the Accumulation and Distribution of These Metals in the Organs of Growing Wistar Rats. *Biol Trace Elem Res* 2016;169(2): 230-6.
- Kumar A, Siddiqi NJ, Alrashood ST, Khan HA, Dubey A, Sharma B. Protective effect of eugenol on hepatic inflammation and oxidative stress induced by cadmium in male rats. *Biomed Pharmacother* 2021;139: 111588.
- Riaz MA, Nisa ZU, Anjum MS, Butt H, Mehmood A, Riaz A, et al. Assessment of metals induced histopathological and gene expression changes in different organs of non-diabetic and diabetic rats. *Sci Rep* 2020;10(1): 5897.
- Steen EH, Wang X, Balaji S, Butte MJ, Bollyky PL, Keswani SG. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. *Adv Wound Care* 2020;9(4): 184-98. Epub 2020/02/07.
- Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* 2010;30(3): 245-57. Epub 2010/07/21.
- Dekhuijzen PNR. Antioxidant properties of *N*-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004;23(4): 629-36.
- Dalvi SM, Patil VW, Ramraje NN. The roles of glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase and the carbonyl protein in pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. *J Clin Diagn Res* 2012;6(9): 1462-5.

10. Andjelkovic M, Djordjevic AB, Antonijevec E, Antonijevec B, Stanic M, Kotur-Stevuljevic J, et al. Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead Exposure in Rat Blood, Liver, and Kidney. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16: 1-21.
11. de Oliveira Filho LD, Ruggeri Saad K, Fernandes Saad P, Kiyomi Koike M, Maria da Silva S, de Souza Montero EF. Effect of N-acetylcysteine in hearts of rats submitted to controlled hemorrhagic shock. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2015;30: 173-81.
12. Dickey DT, Muldoon LL, Doolittle ND, Peterson DR, Kraemer DF, Neuwelt EA. Effect of N-acetylcysteine route of administration on chemoprotection against cisplatin-induced toxicity in rat models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;62: 235-41.
13. Ma Z, Chu L, Liu H, Wang W, Li J, Yao W, et al. Beneficial effects of paeoniflorin on non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Sci Rep* 2017;7: 44819.
14. Zou H, Sun J, Wu B, Yuan Y, Gu J, Bian J, et al. Effects of Cadmium and/or Lead on Autophagy and Liver Injury in Rats. *Biol Trace Elem Res* 2020;198(1): 206-15. Epub 2020/02/02.
15. Attafi IM, Bakheet SA, Ahmad SF, Belali OM, Alanazi FE, Aljarboa SA, et al. Lead Nitrate Induces Inflammation and Apoptosis in Rat Lungs Through the Activation of NF- $\kappa$ B and AhR Signaling Pathways. *Environ Sci Pollut Res* 2022;28: 1-2.
16. Lu J, Jiang H, Liu B, Baiyun R, Li S, Lv Y, et al. Grape seed procyanidin extract protects against Pb-induced lung toxicity by activating the AMPK/Nrf2/p62 signaling axis. *Food Chem Toxicol* 2018;116: 59-69.
17. Metryka E, Chibowska K, Gutowska I, Falkowska A, Kupnicka P, Barczak K, et al. Lead (Pb) Exposure Enhances Expression of Factors Associated with Inflammation. *Int J Mol Sci* 2018;19(6): 1813.
18. Flohé SB, Brüggemann J, Herder C, Goebel C, Kolb H. Enhanced proinflammatory response to endotoxin after priming of macrophages with lead ions. *J Leukoc Biol* 2002;71(3): 417-24.
19. Elrasoul ASA, Mousa AA, Orabi SH, Mohamed MAE-G, Gad-Allah SM, Almeer R, et al. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Apoptotic Effects of *Azolla pinnata* Ethanolic Extract against Lead-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Antioxidants* 2020;9(10): 1014.
20. Odewumi C, Latinwo LM, Sinclair A, Badisa VLD, Abdullah A, Badisa RB. Effect of cadmium on the expression levels of interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-10 cytokines in human lung cells. *Mol Med Rep* 2015;12(5): 6422-6. Epub 2015/09/10.
21. Turley AE, Zagorski JW, Kennedy RC, Freeborn RA, Bursley JK, Edwards JR, et al. Chronic low-level cadmium exposure in rats affects cytokine production by activated T cells. *Toxicol Res* 2019;8(2): 227-37.
22. Jiao X, Yang K, An Y, Teng X, Teng X. Alleviation of lead-induced oxidative stress and immune damage by selenium in chicken bursa of Fabricius. *Environ Sci Pollut Res* 2017;24(8): 7555-64.
23. Saito A, Horie M, Nagase T. TGF- $\beta$  Signaling in Lung Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2018;19(8): 2460.
24. Eybl V, Kotyzova D, Bludovska M. The effect of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the liver of rats and mice. *Toxicol Lett* 2004;151(1): 79-85. Epub 2004/06/05.
25. Khalaf AA, Moselhy WA, Abdel-Hamed MI. The protective effect of green tea extract on lead induced oxidative and DNA damage on rat brain. *Neurotoxicol* 2012;33(3): 280-9. Epub 2012/02/22.
26. Arfsten DP, Johnson EW, Thitoff AR, Jung AE, Wilfong ER, Lohrke SM, et al. Impact of 30-Day Oral Dosing with N-acetyl-l-cysteine on Sprague-Dawley Rat Physiology. *Int J Toxicol* 2004;23(4): 239-47.
27. Bhatti J, Nascimento B, Akhtar U, Rhind SG, Tien H, Nathens A, et al. Systematic Review of Human and Animal Studies Examining the Efficacy and Safety of N-Acetylcysteine (NAC) and N-Acetylcysteine Amide (NACA) in Traumatic Brain Injury: Impact on Neurofunctional Outcome and Biomarkers of

- Oxidative Stress and Inflammation. *Front Neurol* 2018;8: 744-.
28. Meurer SK, Lahme B, Tihaa L, Weiskirchen R, Gressner AM. N-acetyl-L-cysteine suppresses TGF-beta signaling at distinct molecular steps: the biochemical and biological efficacy of a multifunctional, antifibrotic drug. *Biochem Pharmacol* 2005;70(7): 1026-34.



## EVALUATION OF N-ACETYL CYCTEIN EFFECTS IN INHIBITION OF INFLAMMATION AND TISSUE DAMAGE ON THE LUNGS OF RATS EXPOSED TO ACUTE AND CHRONIC DOSES OF LEAD

Najmeh Ranji<sup>1\*</sup>, Hadi Habibollahi<sup>2</sup>, Reihaneh Kochakinegad<sup>3</sup>, Mohammad Mehdi Jafarzadeh<sup>4</sup>

Received: 24 December, 2021; Accepted: 14 May, 2022

### Abstract

**Background & Aims:** Lead (Pb) is a toxic heavy metal which causes adverse health effects on humans and animals. N-acetylcysteine (NAC), as an antioxidant agent, decreases tissue damages and inflammations. The aim of this study was to evaluate the effects of N-acetylcysteine on the expression of *IL-10* and *TGF-β* genes in the lung of rats exposed to Pb.

**Materials & Methods:** In this interventional quasi-experimental study, the rats were randomly divided into 5 groups, including 1) control, 2) acute dose of Pb, 3) acute dose of Pb + continuous administration of NAC, 4) chronic dose of Pb, and 5) chronic dose of Pb + continuous administration of NAC. Acute dose of Pb (70 mg/kg) was administrated on the first day of the study. Chronic dose of Pb (2 mg/kg) and Continuous administration of N-acetylcysteine (50 mg/kg) was used every day for 4 weeks. Both N-acetylcysteine and Pb were dissolved in sterile water and administrated to rats orally by gavage. Histopathological analysis was performed by tissues staining with hematoxylin-eosin (H&E). qRT-PCR method and one-Way ANOVA statistical tests with a significant level of  $P < 0.05$  were used to evaluate the expression of *IL-10* and *TGF-β* genes.

**Results:** Pb induced inflammation in acute and chronic doses. qRT-PCR analysis showed a significant decrease in IL-10 and a significant increase in TGF-β expressions. However, administration of NAC with Pb led to a decrease in inflammation by upregulation of IL-10 and downregulation of TGF-β genes in the lungs of rats.

**Conclusion:** Our results suggest that N-acetylcysteine can protect the lungs against Pb toxicity by *reducing* inflammation.

**Keywords:** *IL-10*, Lung, N-acetylcysteine, Pb, Rat, *TGF-β*

**Address:** Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. P.O.Box: 3516-41335

**Tel:** +98 1333424080. Fax: +98 1333447060

**Email:** n\_ranji@iaurasht.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2022; 32(11): 839 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2022 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

<sup>1</sup> Assistant Professor, Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Assistant Professor, Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

<sup>3</sup> PhD student, Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

<sup>4</sup> PhD, Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran