

## بررسی اثر تحریکی استامینوفن روی میزان القاء گلوتاتیون (GSH) بوسیله N-استیل سیستئین (NAC) و L-۲-اکسوتیازولیدین-۴- کربوکسیلات (OTC) و نقش حفاظتی آن در سلولهای HF۲FF آلوده به خردل در محیط کشت

علی بمان زارعی محمودآبادی\*<sup>Ph.D.</sup>، مهدی صابری\*\*<sup>Ph.D.</sup>، ژیلا پیرزاد\*\*<sup>M.Sc.</sup>  
لیلا گل منش\*<sup>M.Sc.</sup>

### چکیده

**هدف:** اثر ان-استیل سیستئین (NAC) و L-۲-اکسوتیازولیدین-۴-کربوکسیلات (OTC) بر میزان GSH داخل سلولی در رده سلولی HF۲FF و تأثیر استرس اکسیداتیو بر آن در محیط کشت مورد مطالعه قرار گرفته است. سپس تأثیر حفاظتی GSH سلولی روی عوارض ناشی از آلودگی با خردل در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی:** در مطالعه حاضر، غلظتهای مختلف NAC و OTC در حضور و عدم حضور استامینوفن بعنوان محرک افزوده و تأثیر آن را بر میزان القاء GSH و آنزیمهای مربوطه  $\gamma$ -GCS و GSSGR در هموژن سلولهای القاء شده و نرمال مورد بررسی قرار گرفت. پس از تایید القا گلوتاتیون در سلول، سلولهای القاشده و سلولهای نرمال را در محیط کشت در معرض غلظت ۱۸۰ میکرومولار سولفورموستارد قرار داده و پس از یک ساعت انکوباسیون، میزان مرگ و میر سلول مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل نشان داد که افزایش ۰/۱ mM از NAC به سلولهای HF۲FF که با ۲۵ mM استامینوفن بعنوان محرک انکوبه شده بود میزان GSH از  $0.331 \pm 0.12 \mu\text{mol/mg protein}$  به  $11.703 \pm 2.25 \text{ nmol}$   $\gamma$ -GCS فعالیت که میزان فعالیت  $39.8 \pm 4 \text{ nmol NADH/min/mg protein}$  و فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز (GSSGR) از  $0.123 \pm 0.06 \text{ nmol NADPH/min/mg protein}$  به  $0.046 \pm 0.01 \text{ nmol NADPH/min/mg protein}$  افزایش می‌یابد. انکوباسیون این سلولها با ۰/۱ mM NAC و ۱ mM OTC در حضور استامینوفن منجر به افزایش گلوتاتیون تا  $0.962 \pm 0.07 \mu\text{M/mg protein}$  و فعالیت  $\gamma$ -GCS به میزان  $112.28 \pm 11.85 \text{ nmol}$   $\text{NADH/min/mg protein}$  می‌شود ولی اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت GSSGR در مقایسه با انکوباسیون سلولها با NAC به تنهایی دیده نمی‌شود. میزان مرگ و میر سلولهای القاشده در مقایسه با سلولهای نرمال با افزایش غلظت ۱۸۰ میکرومولار خردل از ۴۷٪ به ۷۳٪ رسید که افزایشی معادل ۱/۵۵ برابر را نشان می‌دهد و این افزایش معنی دار است ( $P < 0.001$ ).

**نتیجه‌گیری:** این نتایج بیانگر آن است که NAC و OTC در حضور استامینوفن به عنوان محرک موجب افزایش بیش از سه برابر در میزان GSH شده و می‌تواند سلول را در مقابل اثرات سمی ناشی از عوامل اکسیداتیو نظیر سولفورموستارد محافظت کند.

**واژه‌های کلیدی:** گلوتاتیون، گلوتاتیون ردوکتاز، گاما-گلوتامیل سیستئین ستتاز، N-استیل سیستئین، ۲-اکسوتیازولیدین-۴-کربوکسیلات، رده سلولی HF۲FF

دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۱۱/۷، پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۶/۱

کئوئوسنده مسئول: استادیار گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله... تهران - ایران، \* گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات بیولوژی ملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله... \*\* گروه فارماکولوژی و پژوهشکده آسیبهای شیمیایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله... «عج»

آدرس پست الکترونیکی: Alizare80@yahoo.com

## مقدمه

گلوتاتیون (GSH) به تنهایی صد برابر سایر سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در بدن است (۱) و نقش فیزیولوژیکی اصلی را در حفظ هموستاز بدن و حفاظت سلولها در مقابل عوامل اکسیدان، سموم، عوامل تخریب کننده DNA و کارسینوژنهای داخل و خارج سلولی بعهده دارد. هم‌چنین خط مقدم دفاع سلولی در مقابل سموم، عفونتها، اشعه UV، تولید رادیکالهای آزاد و ترکیبات سرطانزا ست. (۲،۱) با افزایش سن میزان گلوتاتیون کاهش می‌یابد و تنزل میزان آن بطور مستقیم با شیوع بیماریهای مختلف در سنین بالا نظیر آلزایمر، پارکینسون و فرمهای مختلف سرطان ارتباط دارد و تحقیقات اخیر نشان داده است که تامین سوبسترای لازم جهت سنتز GSH از طریق رژیم غذایی، میزان سلولی آن را بطور قابل توجهی افزایش می‌دهد. (۳-۵)

روشهای مختلفی به منظور افزایش میزان GSH سلولی مورد استفاده قرار گرفته که نتیجه اغلب آنها منفی بوده است. برای مثال، استفاده از ملکول GSH، که بدلیل بزرگی اندازه به طور موثر بداخل سلولها منتقل نمی‌شود. هم‌چنین استفاده از L-CYS که اسید آمینه کنترل‌کننده سرعت در سنتز داخل سلولی این تری پپتید (۷-گلوتامیل-L-سیستئینیل گلیسین) است مناسب نمی‌باشد، چون سرعت اکسید شده و برای انسان سمی است. (۶) ضمن اینکه غلظت داخل سلولی سیستئین نیز بشدت تحت کنترل است و افزایش سریع آن از طریق رژیم غذایی منجر به فعال شدن آنزیم سیستئین دی‌اکسیژناز شده و سیستئین را تخریب می‌کند. یک استراتژی موثر در خصوص افزایش GSH سلولی استفاده از OTC است. این ترکیب سمیت کم داشته، براحتی وارد سلول شده و موجب تحریک سنتز GSH می‌گردد. (۷) N-استیل-L-سیستئین (NAC)، نیز شامل اسید آمینه CYS به همراه یک گروه استیل است که به انتهای N آن متصل بوده و در سلولها براحتی داستیله شده و تولید L-CYS می‌کند که موجب تشدید سنتز GSH می‌شود. (۸، ۹، ۲، ۶، ۸)

تصور می‌شود که NAC هم از طریق تامین CYS برای سنتز GSH و هم جمع‌آوری مستقیم رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS) عمل می‌کند. (۱۰) NAC کاربردهای بالینی گسترده‌ای در درمان و حفاظت در مقابل بیماریهای تنفسی از جمله التهاب حاد و مزمن برونش، سندرم زجر تنفسی و سندرم شبه آنفولانزا دارد. (۱۱، ۱۲) هم‌چنین NAC در مهار موتازنیستی مستقیم ناشی از ROS نیز کاملاً موثر است. (۱۳، ۱۴)

سلولهای فیروبلست پوست انسان از جمله سلولهایی است که بدلیل اینکه در معرض عوامل مختلف اکسیدان خارجی نظیر: سولفورموستارد و اشعه UV قرار دارد در معرض تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن و هم‌چنین تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی و بالاخص GSH قرار دارند و بنظر می‌رسد که کاهش GSH بعنوان یک عامل موثر در بروز اثرات تخریبی این عوامل بویژه سولفورموستارد است. به همین علت در این مطالعه القاء سیستم گلوتاتیون که در سلولهای پستانداران بروش De novo سنتز شده و بعنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان موثر است به منظور بررسی اثر آن روی کاهش اثرات تخریبی سولفورموستارد، با استفاده از NAC و OTC و در حضور یک عامل محرک در رده سلولی HF<sub>2</sub>FF مد نظر قرار گرفت.

## روش بررسی

مواد. رده سلولی (No.NCBI-C1۹۰) HF<sub>2</sub>FF از انستیتو پاستور ایران، گلوتاتیون (GSH)، گلوتاتیون‌اکسید (GSSG)، گلوتاتیون‌ردوکتاز (GSSGR)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، پیرووات کیناز، ۱-کلرو-۲-دی‌نیتروبنزن (CDNB)، دی‌تی‌و بیس نیترو بنزوئیک اسید، (DTNB)، NADH، NADPH، ATP، N-استیل سیستئین (NAC)، L-۲-اکسوتیازولیدین-۴-کربوکسیلیک اسید (OTC)، فسفوانول پیرووات (PEP)، α-L-آمینوبوتیرات و L-گلوتامات از کمپانی سیگما خریداری شد. محیط HBSS و محیط کشت RPMI از شرکت ICN Biomedical Inc، FBS،

جذب محلول فوق را در ۴۱۲nm و به مدت ۴ دقیقه قرائت گردید و با استفاده از منحنی کالیبراسیون میزان گلوکوتایون سلولی بر حسب  $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$  محاسبه شد

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم  $\gamma$ -گلوکوتامیل سیستین سنتتاز (GCS- $\gamma$ ). میزان فعالیت GCS- $\gamma$  در سلولهای کشت داده شده بر اساس روش Gail F. Seelig and Altonm اندازه‌گیری شد. (۱۶) برای این منظور فلاسک حاوی  $5 \times 10^6$  سلول را پس از تریپسینه کردن و از طریق سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در  $125\text{g}$  با PBS سرد شستشو داده و به رسوبات سلولی حاصل میزان ۱ میلی‌لیتر بافر لیز کننده ( $\text{Tris-HCl } 50\text{mM}, 5\text{mM MgCl}_2, 2\text{mM DTT}, \text{pH}=7.4$ ) افزوده و روی یخ قرار داده شد و با استفاده از سونیکاتور و به مدت ۵ دقیقه و با فاصله زمانی ۱۰ ثانیه هموزن گردید (لیز شدن کامل سلول را با رنگ آمیزی تریپان بلو و با کمک میکروسکوپ بررسی شد) و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای  $4^\circ\text{C}$  و  $15000\text{g}$  سانتریفیوژ و از محلول رویی آن جهت سنجش فعالیت آنزیمهای مختلف استفاده شد.

فعالیت GCS- $\gamma$  بر اساس روش سینتیکی و به صورت زیر تعیین شد مخلوط واکنش حاوی ( $\text{pH}=8.37^\circ\text{C}$ ),  $\text{Tris-HCl } 0.1\text{M}$ ,  $\text{KCl } 150\text{mM}$ ,  $\text{ATP } 5\text{mM}$ ,  $\text{PEP } 2\text{mM}$ ,  $\text{MgCl}_2 20\text{mM}$ ,  $\text{L-Glu } 10\text{mM}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA } 2\text{mM}$ ,  $\text{L-(-amino butyrate)} 10\text{mM}$ ,  $\text{NADH } 0.2\text{mM}$ ,  $17\mu\text{g}$  پیرووات کیناز و  $17\mu\text{g}$  لاکتات دهیدروژناز و نمونه حاوی آنزیم به حجم نهایی ۱ میلی لیتر، پس از انکوباسیون در  $37^\circ\text{C}$ ، کاهش جذب در  $340\text{nm}$  به مدت ۴ دقیقه سنجیده شده و فعالیت آنزیمی بر حسب  $\text{nmolNADH}/\text{min}/\text{mg protein}$  محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکوتایون ردوکتاز (GSSGR). فعالیت آنزیم GSSGR با استفاده از محلول رویی حاصل از هموزن سلولی و طبق روش Callberg I, Mannervik B اندازه‌گیری شد. (۱۷) مخلوط واکنش شامل:

$\text{PBS } 0.2\text{M}$ ,  $\text{pH}=7$ ,  $\text{EDTA } 2\text{mM}$ ,  $\text{GSSG } 20\text{mM}$ ,  $\text{NADPH}$

از شرکت Biochrom AM آلمان، تریپسین، لوله‌های فالكون، ظروف کشت، فیلتر سر سرنگی و سایر مواد مورد نیاز با درجه خلوص بالا از کمپانی مرک آلمان و بیوژن تهیه شد.

نحوه کشت رده سلولی HF $\gamma$ FF. این سلول‌ها در محیط RPMI که شامل ۱۰٪ FBS، ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی‌سیلین G و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین و بیکربنات سدیم (۲gr/lit) بود در دمای  $37^\circ\text{C}$  و ۵٪  $\text{CO}_2$  در هوای مرطوب و در فلاسک‌های ۵۰cc کشت داده شدند پس از اینکه سلولها به ۸۰٪ کانفلوئنسی رسیدند، محیط کشت HBSS حاوی  $25\text{mM}$  استامینوفن به فلاسک افزوده و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون محیط فوق تخلیه و مجدداً محیط HBSS حاوی غلظتهای مختلف ( $1, 1/8, 3\text{mM OTC}$ ) و NAC با غلظتهای ( $1, 0.1, 0.01\text{mM}$ ) به فلاسک افزوده تحت شرایط معمول کشت یک ساعت انکوبه شده و پس از تخلیه محیط، سلولها را شستشو داده و در حضور محیط RPMI به مدت ۲۴ ساعت انکوبه و سپس با استفاده از تریپسین، سلولها جمع آوری و پس از دو بار شستشو با PBS سرد به مدت ۱۰ دقیقه در  $125\text{g}$  سانتریفیوژ، و رسوب سلولی حاصل در ۱ میلی لیتر بافر لیزکننده جمع آوری شد. زمانهای انکوباسیون ۳۰ دقیقه، ۱ و ۲۴ ساعت به کاررفته بطور تجربی و طی آزمونهای مختلف در همین پژوهش بدست آمد.

اندازه‌گیری گلوکوتایون. میزان گلوکوتایون احیا در سلول بر اساس روش Tietze F تعیین شد. (۱۵) به‌طور اختصار به هر اپندورف حاوی  $1 \times 10^6$  سلول میزان  $120\mu\text{l}$  از محلول ۲/۵٪ اسیدسولفوسالیسیک سرد افزوده و پس از مخلوط کردن محلول حاصل را به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس محلول را به مدت ۱۰ دقیقه در  $10000\text{g}$  و در دمای  $4^\circ\text{C}$  سانتریفیوژ نموده، و از محلول رویی برای اندازه‌گیری گلوکوتایون استفاده شد. برای تعیین مقدار گلوکوتایون میزان  $730$  میکرولیتر از محلول  $0.3\text{M/L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  و  $90$  میکرولیتر DTNB ( $40\text{mg}/\text{dl}$  در محلول سترات سدیم  $1\text{gr}/\text{dl}$ ) بعنوان سوبسترا و  $180$  میکرولیتر از سوپرناتانت سلولی استفاده شد و تغییرات

مجاورت با ترکیب القا کننده و ۲۴ ساعت انکوباسیون لیز و میزان گلو تاتیون ، فعالیت آنزیم‌ها و مقدار پروتئین اندازه‌گیری شد. میزان گلو تاتیون بر حسب میلی گرم پروتئین و هم چنین فعالیت آنزیم‌ها بر حسب فعالیت ویژه (میلی گرم پروتئین/فعالیت) گزارش شد.

با افزودن غلظت‌های مختلف NAC به محیط کشت این سلولها، اختلاف معنی‌دار در میزان گلو تاتیون و فعالیت آنزیم‌های  $\gamma$ -GCS و GSSGR در غلظت‌های مختلف و بین گروه‌های شاهد و القا شده با NAC مشاهده شد ( $p < 0.001$ ) ولی بجز فعالیت GSSGR میزان افزایش در سایر موارد در غلظت‌های بالاتر از ۰/۱ خطی نبود (جدول ۱).

جدول ۱. تأثیر NAC بر میزان GSH، GSSGR،  $\gamma$ -GCS و سلولهای HF۲FF

NAC	GSH	$\gamma$ -GCS	GSSGR
۰/۰	۰/۳۳۱ ± ۰/۱۲	۱۱/۷ ± ۳/۲۵	۰/۰۴۶ ± ۰/۰۱
۰/۰۱	*۰/۶۷ ± ۰/۱	*۲۹/۷۳ ± ۳/۳۵	*۰/۰۶۸ ± ۰/۰۱
۰/۱	**۰/۷۸۴ ± ۰/۱۱	**۳۹/۸ ± ۴/۱	**۱/۲۳ ± ۰/۰۶
۱	*۰/۶۶ ± ۰/۰۳	*۳۲/۸ ± ۳/۰۴	**۱/۰۶ ± ۰/۰۴

GSSGR: (nmol NADPH/min/mgprotein),  $\gamma$ -GCS: (nmol ADH/min/mg protein), GSH: ( $\mu$ M/mg protein), NAC (mM)

\*\* افزایش فعالیت نسبت به کنترل و سایر غلظتها معنی دار است ( $P < 0.001$ ), \* افزایش نسبت به کنترل معنی دار اما نسبت به سایر غلظتها معنی دار نیست.

جدول ۲. تأثیر القاء گلو تاتیون سلولی بر میزان Viability سلولها در محیط کشت

سلول	تعداد	Viability (mean±SE)
کنترل	۳۲	۱۰۰
القا نشده (نرمال)	۳۲	۴۷/۱۵ ± ۲/۵۱
القا شده	۳۲	۷۳/۸۸ ± ۳/۰۸*

\* افزایش Viability نسبت به گروه القا نشده معنی دار است ( $P < 0.001$ )

۱۰ mM Tric-Hcl، pH=۷، ۲ mM در آب و نمونه حاوی آنزیم با حجم نهایی ۱ میلی لیتر، پس از انکوباسیون در ۳۰°C، کاهش جذب مخلوط را در ۳۴۰ nm و به مدت ۴ دقیقه قرائت شد. فعالیت آنزیمی بر حسب کاهش NADPH در دقیقه به صورت  $\mu$ mol NADPH/min/mg protein محاسبه شد

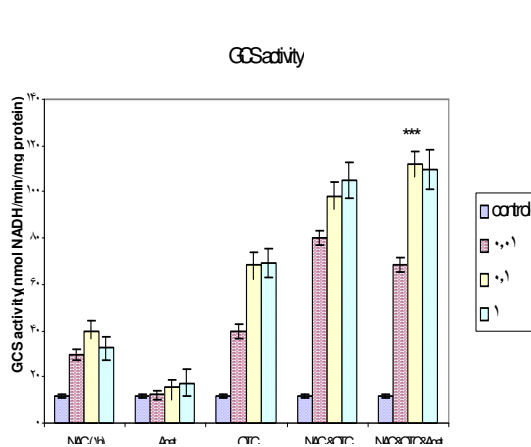
بررسی Viability سلولهای آلوده به خردل به روش کریستال ویوله (GV). غلظت ایتیموم خردل ۱۸۰ میکرومولار (که به طور تجربی بدست آمد) در محیط کشت تهیه و به سلولهای نرمال و القاشده در حضور گروه کنترل افزوده شد و پس از یک ساعت مجاورت، محیط کشت تخلیه و پس از شستشو محیط کشت تازه افزوده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس میزان Viability سلولهای فوق به روش کریستال ویوله (GV) مورد مطالعه قرار گرفت. (۱۸) به طور مختصر، پس از حذف محیط کشت، سلولها را قبل از فیکس کردن با HBSS شستشو داده و سپس با فرم‌آلدئید (۴٪ V/V) در PBS به مدت ۲۰ دقیقه و در ۲۰°C فیکس شد. پس از فیکس کردن و خارج نمودن محلول فیکس کننده، سلولها با کریستال ویوله (۱٪ W/V) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شده و با آب شستشو داده شد. به منظور محلول کردن رنگ متصل به سلول از تریتون X-۱۰۰ (۲٪ V/V) استفاده گردید و پس از یک ساعت انکوباسیون و ۵ دقیقه شیک کردن جذب رنگ محلول، در مقابل محلول بلانک در ۵۹۰ nm اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پروتئین تام . مقدار پروتئین تام در نمونه‌های حاصل از هموژناسیون سلولهای کشت داده شده با استفاده از روش برادفورد (۱۹) اندازه‌گیری و از آلبومین سرم گاوی بعنوان استاندارد استفاده شد.

آنالیز آماری . یافته‌های کمی حاصل در این مطالعه بر حسب میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است. و مقایسه آماری با استفاده از روش ANOVA دو طرفه انجام شده است.

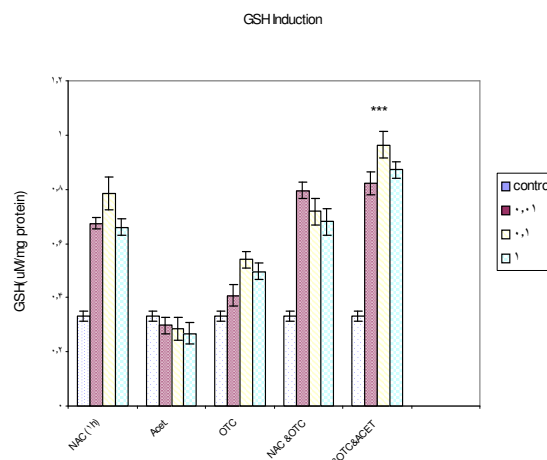
## یافته‌ها

سلولهای HF۲FF طبق روش ارائه شده کشت داده و پس از

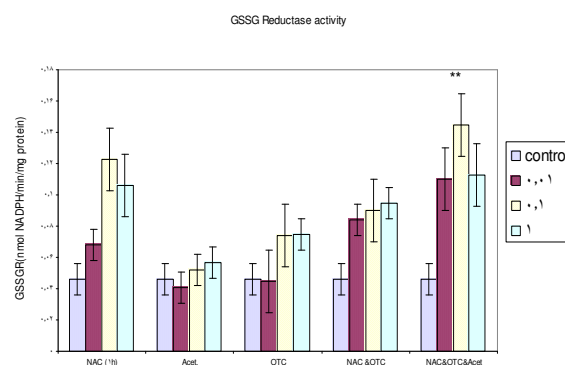


شکل ۳. اثر NAC و OTC در حضور و در غیاب محرک (استامینوفن) بر فعالیت آنزیم  $\gamma$ -GCS در سلولهای HF $\gamma$ FF در محیط کشت. \*\*\* بطور معنی داری با گروه کنترل تفاوت دارند ( $P=0.0$ )

سلولهای شاهد معنی دار نیست. ولی فعالیت آنزیم GSSGR را بطور معنی دار افزایش می دهد ( $p<0.01$ ) (جدول ۱). میزان افزایش گلووتاتیون در حضور NAC محدود است ولی تحریک سلول بوسیله یک محرک منجر به افزایش بیشتر گلووتاتیون می شود. به همین منظور از استامینوفن با غلظت ۲۵mM و طبق قسمت روشها بعنوان محرک استفاده شد و سپس NAC به محیط افزوده شد که منجر به افزایش معنی دار در میزان GSH (شکل ۱) و فعالیت GSSGR در مقایسه با عدم حضور استامینوفن بعنوان محرک شد (شکل ۲) اما افزایش فعالیت  $\gamma$ -GCS در حضور محرک در مقایسه با NAC بدون حضور محرک معنی دار نبود (شکل ۳). به منظور بررسی نقش  $\gamma$ -GCS در میزان GSH سلولی از OTC بعنوان القا کننده آنزیم در غلظت های مختلف استفاده شد و افزایش مشاهده شده در میزان GSH (شکل ۱)،  $\gamma$ -GCS و GSSGR در مقایسه با سلولهای شاهد و مراحل قبل از افزایش OTC معنی دار بود ( $p<0.01$ ) (شکل های ۲ و ۳) لذا می توان نتیجه گرفت که افزایش میزان GSH ناشی از سنتز و هم چنین تبدیل گلووتاتیون اکسید به احیا است. در نتیجه با القا آنزیم  $\gamma$ -GCS و در حضور



شکل ۱. اثر NAC و OTC در حضور استامینوفن ۲۵ میلی مولار بعنوان محرک و در غیاب محرک بر : میزان GSH در سلولهای HF $\gamma$ FF در محیط کشت. \*\*\* بطور معنی داری با گروه کنترل تفاوت دارند ( $P=0.0$ )



شکل ۲. اثر OTC و NAC در حضور استامینوفن ۲۵ میلی مولار بعنوان محرک و در غیاب محرک بر : فعالیت آنزیم GSSGR در سلولهای HF $\gamma$ FF در محیط کشت. بطور معنی داری با گروه کنترل تفاوت دارند ( $P=0.0$ )

NAC بعنوان سوبسترا موجب افزایش تولید GSH و همچنین تبدیل GSSG به GSH می شود بنابراین، روی میزان فعالیت آنزیمهای  $\gamma$ -GCS و GSSGR تأثیر دارد. افزایش غلظتهای مختلف NAC موجب افزایش فعالیت آنزیم  $\gamma$ -GCS می شود که این افزایش متناسب با غلظت NAC است ولی در مقایسه با

میزان GSH تام را به فرم گلوتاتیون احیا حفظ می‌کند. (۲۳) هر چند چرخه بین GSSG و GSH نمی‌تواند تأثیر عمده‌ای روی میزان GSH سلول داشته باشد. از طرف دیگر استرس اکسیداتیو می‌تواند سرعت میزان GSH را کاهش و به GSSG تبدیل کند. بخشی از سلولها GSSG را دفع کرده و تمایل سلول برای سنتز De novo را افزایش می‌دهند. پیش‌بینی می‌شود که افزایش بیان  $\gamma$ -GCS ، افزایش میزان L-Cys و همچنین کاهش میزان GSH داخل سلولی ، سرعت سنتز GSH را افزایش دهد ولی نمی‌توان میزان تغییر ناشی از هر فاکتور را پیش‌بینی کرد. لذا میزان GSH داخل سلولی را برای هر نوع سلول یا بافت براساس اطلاعات مربوط به میزان سوپسترا و آنزیم‌ها قابل پیش‌بینی نیست. (۲۳) از آنجا که سلولهای پوستی انسان بویژه در افرادی که در معرض آلودگی‌هایی نظیر As ، Co ، Cd ، pb و عواملی نظیر سولفورموستارد و حتی نور UV قرار دارند منجر به بروز عوارض اکسیداتیو شده و ضایعاتی را در پی خواهد داشت و تقویت سطح گلوتاتیون در این رده‌های سلولی می‌تواند در محافظت سلول در مقابل این عوامل موثر باشد. در مطالعه حاضر از رده سلولی HF<sup>2</sup>FF انسانی (سلول فیبروبلاست پوست انسان) در محیط کشت استفاده شد و به منظور القاء GSH ابتدا از غلظتهای مختلف NAC، (۱mM، ۰/۱، ۰/۰۱) بعنوان سوپسترا در محیط کشت استفاده شد که تا غلظت ۰/۱mM NAC میزان GSH سلولی بطور معنی‌داری افزایش یافت ولی در غلظتهای بالاتر این افزایش مشاهده نشد که احتمالاً ناشی از محدودیت در جذب NAC بداخل سلول است. طبق گزارشات سایر محققین (۲۴) مبنی بر تأثیر NAC بر سنتز و همچنین تبدیل GSSG به GSH ، فعالیت  $\gamma$ -GCS و GSSGR بعنوان مسیرهای احتمالی موثر در افزایش میزان GSH در نمونه‌های فوق اندازه‌گیری شد که افزایش فعالیت GSSGR متناسب با افزایش غلظت NAC و محدودیت این افزایش از غلظتهای بالا تأییدی بر محدودیت احتمالی ناشی از ورود NAC بداخل سلول است بر اساس گزارش Richie JP (۲۵) مبنی بر ارتباط بین تحریک سلول با واسطه ترکیبات

غلظت مناسب سوپسترا و با استفاده از تأثیرات یک محرک مناسب می‌توان غلظت گلوتاتیون احیای سلولی را تا حد قابل ملاحظه‌ای افزایش داد. سولفورموستارد موجب مرگ سلول می‌شود لذا یکی از شاخصهای مهم در حفاظت سلول افزایش مقاومت و یا viability سلول است که طبق نتایج حاصل میزان Viability سلولهای القا شده نسبت به سلولهای نرمال از ۴۷٪ به ۷۳٪ افزایش نشان می‌دهد (جدول ۲).

## بحث

مطالعات گذشته نشان داده است که GSH در فرایندهای مهم سلولی نظیر متابولیسم و حفظ گروههای تیول پروتئین‌ها و ترکیبات کوچکتر نظیر Cys و COASH و در تشکیل دزاکسی ریبونوکلوئیدها نقش دارد. GSH در حفاظت سلول در مقابل تخریب اکسیداتیو ناشی از ROS تشکیل شده طی فرایند طبیعی متابولیسم دخالت دارد. به همین جهت کاهش گلوتاتیون می‌تواند منجر به اختلال در سیستم حفاظتی سلول در مقابل لپید پراکسیداسیون و یا تخریب ماکرومولکولهای حیاتی از طریق تشکیل تیواترها شود. (۲۰، ۲۱) چون GSH نقش حیاتی در سم‌زدایی الکتروفیلها و عوامل استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو بازی می‌کند. (۲۰) استراتژی‌های مختلفی به منظور حفظ یا افزایش میزان GSH مورد توجه قرار گرفته است که از آن جمله تأمین L-Cys به عنوان سوپسترا برای سنتز GSH است. چون L-Cys بطور خودبخود به L-سیستین نامحلول اکسید می‌شود و گزارشات مکرر مبنی بر سمی بودن آن برای سلولهای کشت داده شده ارائه شده است (۲۲)، لذا در بیشتر مطالعات از NAC بعنوان ترکیبی که هم به روش خوراکی و هم در محیط کشت کاربرد دارد و براحتی در داخل سلول داستیله شده و L-Cys تولید می‌کند استفاده کرده اند.  $\gamma$ -GCS بعنوان محدودکننده سرعت مسیر سنتز گلوتاتیون است و میزان GSH سلولی تابع تعادل بین سنتز و دفع آن است و همانگونه که اشاره شد سنتز De novo آن شامل سنتز با استفاده از اسیدهای آمینه و تبدیل GSSG به GSH با واسطه GSSGR است. GSSGR بطور طبیعی

prequersors between the immune system and the skeletal muscle; pathogenesis and chronic fatuge syndrome. *Med Hypothesis* ۱۹۹۹; ۵۳(۴): ۳۴۷-۳۴۹.

۲. Sen CK. Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutrational supplements. *Molecular & Cellular Biochemistry* ۱۹۹۹; ۱۹۶: ۳۱-۴۲.

۳. Bounous G, Baruchel S, Falutz J, Gold P. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. *Clin Invest Med* ۱۹۹۲; ۱۶(۳): ۲۰۴-۲۰۹.

۴. Bounous G, Gold P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clin Invest Med* ۱۹۹۱; ۱۴(۴): ۲۹۶-۳۰۹.

۵. Lands LC, Grey VL and Smountas AA. Effects of a cysteine donor on muscular performance. *J Appl Physiol* ۱۹۹۹; ۸۷(۴): ۱۳۸۱-۸۵.

۶. Meister A. Metabolism and function of glutathione: in Dolphin D, Poulson R. and Avramovis, O. (eds) *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects*. John Wiley. New York ۱۹۸۹, P, ۳۹۶-۳۷۴

۷. Breborowicz A, Partrikarea A, Martis L. Oreopoulos DG. L-γ-Oxothiazolidine-ε-carboxylate and acetylsteyne vare precursors of intracellular glutathione in human peritoneal mesothelial cells. *Blood Purif* ۱۹۹۶; ۱۴(۱), ۱-۷.

۸. Gregcvy S, Kelly ND. Clinical application of N-acetyl-cysteine. *Alt Med Rev* ۱۹۹۸; ۳(۲): ۱۱۴-۱۲۳.

۹. Ruffman R and Wendel A. GSH rescue by N-acetyl-cysteine. *Klin Wochenschr* ۱۹۹۱; ۶۹: ۸۵۷-۸۶۲.

۱۰. De Flora S, Balansky R, Binnicelli C. Mechanisms of carcinogenesis: the example of N-acetyl-cysteine. In Ioannides, C. and Lewis, DFV (eds) *Drug, Diet and*

اکسیدان و افزایش در میزان GSH از استامینوفن ۲۵mM بعنوان عامل تحریک کننده که از طریق کاهش اولیه در میزان GSH موجب تحریک سلول در محیط کشت می شود استفاده شده و مشاهده گردید که در حضور این ترکیب میزان تولید GSH در حضور NAC به میزان معنی داری در مقایسه با NAC تنها افزایش می یابد. عامل محدودگر مهم در سنتز سلولی میزان فعالیت γ-GCS است که بعنوان آنزیم کنترل کننده سرعت سنتز بوده و GSH تولید شده می تواند بصورت رقابتی آن را مهار کند در نتیجه سطح گلوپتایون تولیدی را محدود می کند. نتایج حاصل بیانگر آن است که استفاده از OTC بعنوان القا کننده γ-GCS منجر به افزایش معنی دار در فعالیت آنزیم و میزان گلوپتایون در مقایسه با NAC بدون حضور OTC می شود هر چند نیاز به مطالعات بیشتر و اطلاعات تکمیلی وجود دارد. لیکن چون گلوپتایون بعنوان مهار کننده آنزیم عمل می کند لذا احتمالاً افزایش فعالیت γ-GCS ناشی از افزایش بیان آنزیم است. **نتیجه گیری:** نتایج حاصل از مطالعه حاضر بیانگر افزایشی معادل سه برابر در میزان گلوپتایون (کنترل ۰,۳۳۱۵۰,۱۲ μmol/mg protein و سلول القاشده ۰,۹۶۲۵۰,۰۷ μmol/mg protein در سلولهای القا شده را نشان می دهد که با توجه به نقش حفاظتی گلوپتایون در سلول می تواند موجب حفاظت رده سلولی HF۲FF در مقابل عوامل اکسیدان، اشعه UV، عوامل کارسینوژن و... گردد.

لازم به ذکر است که به منظور بررسی تأثیر غلظت GSH در سلولهای القاشده بر استرس اکسیداتیو، سلولها در معرض سولفورموستارد قرار گرفتند و میزان Viability آنها در مقایسه با سلولهای نرمال افزایش ۱/۵۵ برابری را نشان می داد (viability از ۴۷٪ به ۷۳٪ افزایش یافت) که بیانگر افزایش قابل قبول در مقاومت سلول در مقابل اثرات مخرب سولفورموستارد در دوز مورد مطالعه است.

## References

۱. Bounous G, Molson J. Competition for glutathione

- Disease, ۱۹۹۵, Vol ۱, Mechanistic Approaches to Cancer. Ellis Horwood, Hemel Hempstead, UK, pp. ۱۵۱-۲۰۳.
۱۱. Stey C, Steurer J, Bachmann S, Medicit C, and Tramer MR. The effects of oral N-acetyl-cysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review. *Eur Respir J* ۲۰۰۰; ۱۶: ۲۵۳-۲۶۲.
۱۲. De Flora S, Grassi C, Carati L. Attenuation of influenza-like symptomatology and improvement of cell-mediated immunity with long-term N-acetylcysteine treatment. *Eur Respir J* ۱۹۹۷; ۱۰: ۱۵۳۵-۴۱.
۱۳. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. The oxidative stress study group. oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* ۱۹۹۷; ۱۵۶: ۳۴۱-۳۵۷.
۱۴. De Flora. Mutagenicity of active oxygen species in bacteria and its enzymatic or chemical inhibition. *Mutat Res* ۱۹۸۹; ۲۱۴: ۱۵۳-۱۵۸.
۱۵. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized induced depletion of glutathione and cysteine in the aging mouse kidney. *Biochem Pharmacol* ۱۹۹۲; ۷: ۴۴(۱): ۱۲۹-۱۳۵.
۱۶. Dale A, Dickinson and Henry J. Forman Glutathione in defense and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. ۲۰۰۲; ۹۷۳: ۴۸۸-۵۰۴.
۱۷. Callberg I, Mannervik B. Glutathione Reductase. *MethodS Enzymol* ۱۹۸۵; ۱۱۳: ۴۸۴-۴۹۰.
۱۸. Gareth D. Examination of the toxicity of several protein toxins of plant origin using bovine pulmonary endothelial cells. *Toxicology* ۹۰(۱۹۹۴) ۱۱-۲۷.
۱۹. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* ۱۹۷۶; ۷۲: ۲۴۸-۲۵۴.
۲۰. Tzeon-Jye Chiou, Woan – Fany Tzeng. The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. *Toxicology* ۲۰۰۰; ۱۵۴: ۷۵-۸.
۲۱. Mary E, Anderson ????. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interaction* ۱۹۹۸; ۱۱۱-۱۱۲, ۱-۱۴.
۲۲. Yuan Z, Smith PB, Brundrett RB, Colvin M, enselau C. Glutathione conjugation with phosphoramidate mustard and cyclophosphamide-A mechanistic study using tandem mass spectrometry. *Drug Metab. Dispos* ۱۹۹۱; ۱۹: ۶۲۵-۶۲۹.
۲۳. Kehrer JP, Lundl G. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med* ۱۹۹۴; ۱۷: ۶۵-۷۵.
۲۴. Owen W, Griffith. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis, *Free Radical Biology & Medicine* ۱۹۹۹; ۲۷(۹): ۹۲۲-۹۳۵.
۲۵. Richie JP Jr, Lang CA, Chen TS. Acetaminophen induced depletion of glutathione and cysteine in the aging mouse kidney. *Biochem Pharmacol* ۱۹۹۲; ۷: ۴۴(۱): ۱۲۹-۱۳۵.



