

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر جیوه و کادمیوم بر استرس اکسیداتیو و مسیر AHR-CYP1A1 در کبد موش سوری

مهدی سلطان اوغلی^۱، افشین محمدی بردبری^۲، شکوفه حسنی^۳، امیر شادبورستان^۴،
علی غفاریان بحرمان^۵، مجید کشاورزی^۶، محمود امیدی^{۷*}

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۲. گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۳. مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. گروه سم‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵. مرکز تحقیقات محیط کار، دانشکده علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۶. گروه فارماکودینامی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۷. گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، هرمزگان، ایران

پذیرش: ۸ شهریور ۱۴۰۲

دریافت: ۱۳ مرداد ۱۴۰۲

چکیده

زمینه و هدف: گیرنده آریل هیدروکربن (AHR) یک حسگر محیطی حساس به تغییر اکسیداتیو می‌باشد. با این حال، اطلاعات کمی در مورد اثرات استرس به ویژه اکسیداتیو استرس بر روی سیگنالینگ AHR وجود دارد. بنابراین هدف این مطالعه بررسی اثرات ترکیبات اکسیدکننده بر عملکرد AHR در موش سوری بود.

روش‌ها: بدین منظور در موش‌های سوری با تزریق فرمیلندولو کاربازول (FICZ)، بوتیونین سولفوکسیمین (BSO)، کادمیوم (Cd) و جیوه (Hg) اثرات مواد اکسیدکننده بر روی عملکرد AHR در مدت ۳ و ۲۴ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های حاصل از این پژوهش برای اولین بار ارتباط روشنی را بین میزان فعالیت ایزوفریم 1A1 از آنزیم سیتوکروم P450 (CYP1A1) و تغییرات در وضعیت اکسیداتیو سلولی نشان داد. یافته‌های مطالعات درون‌تنی در این تحقیق حاکی از آن بود که مدت زمان فعال شدن یا مهار AHR با افزایش یا کاهش نسبت گلووتاتیون احیا به اکسید (GSH/GSSG) رابطه مستقیمی دارد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که بسیاری از آلاینده‌های محیط زیست از قبیل فلزات سنگین و اکسیدان‌ها با تغییر در پتانسیل اکسیداتیو داخل سلولی ممکن است بر عملکرد طبیعی آنزیم‌های هدف گیرنده‌ای آریل هیدروکربن از جمله CYP1A1 تأثیر بگذارند.

واژه‌های کلیدی: گیرنده آریل هیدروکربن، فلزات سنگین، فرمیلندولو کاربازول (FICZ)، نسبت گلووتاتیون احیا به اکسید

مقدمه

پروتئین شوک حرارتی ۹۰ (HSP90)^۱، کوچاپرون P23 و یک پروتئین ۴۳ کیلو دالتونی به نام XAP^۲ از سال ۱۹۷۰ [۱]، بسته به نوع اتصال به لیگاند، کمپلکس لیگاند-رسپتور از زیر واحدهای

گیرنده آریل هیدروکربن (AHR) یک فاکتور رونویسی کننده وابسته به لیگاند سیتوزولی متعلق به خانواده پروتئینی bHLH^۱ می‌باشد. این رسپتور در سیتوزول به دو زیرواحد

³ X-associated protein 2

¹ Basic helix-loop-helix

² Heat shock protein 90

گیرنده‌های آریل هیدروکربن بیشترین میزان تمایل را برای اتصال به این گیرنده دارد. این ترکیب یک سوپرسرای بسیار خوب برای CYP1A1 محسوب می‌شود. FICZ توسط CYP1A1 و آنزیم‌های کانژوگه کننده به فرم غیرفعال درمی‌آید به گونه‌ای که دیگر توانایی اتصال به گیرنده‌های آریل هیدروکربن را ندارد [۴].

بوتیونین سولفوکسیمین (BSO) آنالوگ گلوتامات، مهارکننده رقابتی سنتز GSH می‌باشد و باعث تخلیه گلوکاتایون درون سلولی می‌شود. این ماده امکان دارد به پیشگیری از مقاومت در برابر برخی از داروهای ضدسرطان کمک کند [۵]. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که برخی فلزات سنگین از قبیل کادمیوم (Cd^{2+}) و جیوه (Hg^{2+}) که جز آلاینده‌های محیطی نیز می‌باشند باعث مهار القای وابسته به لیگاند آنزیم CYP1A1 می‌شوند [۶، ۷]. مطالعات متعددی بر روی سمیت Cd^{2+} و Hg^{2+} صورت گرفته است. مواجهه با کادمیوم باعث استرس اکسیداتیو در محیط کشت سلولی و مهار زنجیره انتقال الکترون و افزایش سطوح مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود [۸، ۹]. به علاوه، Cd^{2+} باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود [۱۰]. نتایج حاصل از مطالعات درون تنی و برون تنی حاکی از آن بوده است که استرس اکسیداتیو باعث کاهش فعالیت ایزوآنزیم‌های متعلق به خانواده CYP450 می‌شود که نتیجه این رویداد، تغییر در پتانسیل ردوکس سلولی است [۱۱]. با توجه به نتایج حاصل از مطالعات گذشته، فرضیه ما در این پژوهش بر این استوار است که استرس اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین ذکر شده می‌تواند باعث برهم‌زدن فعالیت AHR شود. از دیگر فرضیه‌های این مطالعه این است که افزایش یا کاهش نسبت گلوکاتایون احیا به اکسید (GSH/GSSG) در نتیجه مواجهه با Cd^{2+} و Hg^{2+} می‌تواند نقشی کلیدی در فعالیت عملکردی AHR داشته باشد. برای بررسی این فرضیات و اثرات ناشی از اکسیداتیو استرس ناشی از این فلزات بر فعالیت عملکردی AHR، موش‌های آزمایشگاهی با این فلزات سنگین در حضور یا عدم حضور لیگاند اندوژن AHR (FICZ) و ماده پیش‌اکسیدانت BSO^۸ مورد ارزیابی قرار

HSP90 جدا شده و وارد هسته می‌شود و در آنجا با هترودایمر هسته‌ای خود به نام انتقال‌دهنده هسته‌ای گیرنده آریل هیدروکربن (ARNT)^۴ به بخش پروموتور متصل به DNA به نام فاکتور پاسخگوی زنبیوتیک (XRE^۵) اتصال می‌یابد و باعث بیان ژن‌های هدف مسیر انتقال پیام AHR می‌شود [۲]. برخی از این ژن‌های بیان‌شده در فرایندهای متفاوتی دخیل هستند مانند: آنزیم‌های متابولیزه‌کننده داروها به ویژه آنزیم‌های دخیل در فاز I تبدیل زیستی شامل سیتوکروم P450A1 (CYP1A1)، CYP1A2، CYP1B1 و CYP2S1. همچنین آنزیم‌های دخیل در فاز II تبدیل زیستی از قبیل NADPH کینون اکسیدورودوکتاز (NQO1)^۶، زیر واحد ya گلوکاتایون S-ترانسفراز (GST ya)، آلدئید دهیدروژناز سیتوزولی و UDP^۷-گلوکورونیل ترانسفراز. اگرچه القای آنزیم‌های دخیل در فاز II مختص مکانیسم‌های سم‌زدایی برای بسیاری از مواد جهش‌زا، سرطان‌زا و دیگر ترکیبات سمی هستند، القای آنزیم‌های CYP1A1، CYP1A2 و CYP1B1 برای این روند دارای اثرات زیان باری است. باتوجه به این که بسیاری از لیگاند‌های AHR آلاینده‌های محیطی هستند که نه تنها برای AHR به عنوان لیگاند عمل می‌کنند و به میزان ناچیزی متابولیزه می‌شوند، بلکه به عنوان سوپستراهی مناسبی برای القای آنزیم‌های فاز I عمل می‌کنند. تبدیل لیگاند‌های AHR توسط آنزیم‌های مذکور از قبیل CYP1A1 به ترکیبات دیول اپوکسید باعث تشکیل پیوندهای کووالانسی و تولید متابولیت‌های فعال ژنوتوکسیک با ساختارهای گوانوزینی برخی ژن‌ها می‌شود که این به نوبه خود می‌تواند آغازگر پروسه تومورزایی و دیگر پاسخ‌های سمی شود [۳]. علاوه بر ترکیبات سنتتیک و شیمیایی، برخی ترکیبات اندوژن طبیعی نیز می‌توانند به عنوان لیگاند برای AHR عمل کنند. یکی از این ترکیبات مولکول FICZ^۸ می‌باشد. این ترکیب، یک محصول جانبی تجزیه نوری اسید آمینه تریپتوفان است که در غلظت‌های پیکومولار می‌تواند باعث فعال‌سازی مسیر انتقال پیام AHR شود. از طرفی FICZ یک سوپسترا با میل ترکیبی بالا برای آنزیم CYP1A1 است و برای آن نقش‌های فیزیولوژیک یک متعددی بر شمرده‌اند. FICZ در حقیقت در میان تمام لیگاند‌های

^۸ 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole^۹ Buthionine sulfoximine^۴ Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator^۵ Xenobiotic response element^۶ NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1^۷ Uridine diphosphate

گرفتند.

اندازه‌گیری لیپیدپراکسیون

۵۰۰ میلی گرم از بافت کبد را پس از شستشو با نرمال سالین سرد با ۴/۵ میلی لیتر سوکروز ۰/۲۵ مولار هموژنیزه کرده و با دور ۱۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی را با معرف تیوباربتوریک اسید مخلوط کرده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از اضافه کردن ۱ میلی لیتر n-butanol به ۱ میلی لیتر محلول رویی در دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید و جذب UV را در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت کرده و میزان آن را با استفاده از منحنی استاندارد و نرمالایز کردن داده‌ها با میزان پروتئین بافتی به روش برادفورد محاسبه شد [۱۵].

مواد و روش‌ها

لیست مواد شیمیایی

در این پژوهش FICZ از کمپانی Syntastic AB سوئد، NaHBO₄ از کمپانی ACROSS بلژیک و دیگر ترکیبات شامل کلرید کادمیوم، کلرید جیوه، BSO، اتوکسی رزوروفین O-داتیلاز (EOR)، گلوتاتیون احیا (GSH) و اکسید (GSSG)، تیوباربتوریک اسید، و کلاسیم کلراید از کمپانی Merck آلمان خریداری گردید.

نحوه آنته‌خاب و شرایط نگهداری حیوانات مورد

آزمایش

در این تحقیق تعداد ۱۰۰ سر موش سوری (25 ± 5 گرم) از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری و به مدت ۲ هفته جهت تطابق با محیط نگهداری شد. روش کار با حیوانات و نگهداری از آن‌ها با کسب اجازه و تحت نظارت کمیته اخلاق تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شیراز (IR.SUMS.REC.1398.369) انجام شد. در طول مدت این پژوهش حیوانات در شرایط مناسب، با درجه حرارت کنترل شده 23 ± 2 درجه سانتی گراد، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت ۶۰-۴۰ درصد نگهداری شدند. موش‌ها به صورت تصادفی در ۱۰ گروه (۵ تایی) تقسیم شدند شامل: کنترل (DMSO حل شده در نرمال سالین با غلظت نهایی ۱٪)، FICZ (۱۰۰ میکرو گرم بر کیلو گرم)، Cd (۵ میلی گرم بر کیلو گرم)، BSO (۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم)، FICZ + Cd، FICZ + BSO، FICZ + Cd + BSO، حیوانات برای مدت ۳ و ۲۴ ساعت با ترکیبات فوق به صورت تزریق داخل صفاقی تیمار شدند و پس از آن طبق اصول اخلاقی با تیوپنتال (۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن) بیهوش شده و کبد آن‌ها برای آزمایشات بعدی جدا گردید. آنته‌خاب دوزها بر اساس مطالعات قبلی می‌باشد (۱۲-۱۴).

اندازه‌گیری گلوتاتیون احیا (GSH) و اکسید (GSSG)

ابتدا ۰/۲ گرم از بافت موردنظر به نسبت ۱:۱۰ در TCA^{۱۱} (۷/۵ درصد وزنی-حجمی) هموژن و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. برای هر نمونه دو میکرو تیوب (یکی برای GSH و دیگری برای GSH توتال) اختصاص داده شد. سپس در میکرو تیوب مربوط به GSH به ترتیب ۱۰ میکرو لیتر از سوپرناتانت جدا شده، ۳۰ میکرو لیتر آب دوبار تقطیر شده، ۹۴۰ میکرو لیتر PBS (۲۰۰ میلی مولار) و در آخر ۲۰ میکرو لیتر از محلول DTNB^{۱۱} (۲۰ میلی مولار) اضافه و بعد از ۱۰ دقیقه جذب آن را در ۴۱۲ نانومتر قرائت شد [۱۶]. در میکرو تیوب مربوط به GSH توتال به ترتیب ۱۰ میکرو لیتر سوپرناتانت جدا شده، ۲۰ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر شده، ۸۴۰ میکرو لیتر بافر PBS (۲۰۰ میلی مولار) و ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول تازه تهیه شده NaBH₄ اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از این زمان به آن ۱۰ میکرو لیتر از HCL (۲/۷ نرمال) اضافه و خوب هموژن گردید و اجازه داده شد که محلول موردنظر هم دمای محیط شود. در نهایت، ۲۰ میکرو لیتر از محلول DTNB اضافه و بعد از ۱۰ دقیقه جذب آن در ۴۱۲ نانومتر قرائت شد. در نهایت از تفاضل گلوتاتیون توتال و احیا میزان GSSG محاسبه شد.

آماده‌سازی میکروزوم‌های کبدی

۵ گرم از بافت کبد را جدا نموده و به خوبی با قیچی جراحی

¹¹ 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)

¹⁰ Trichloroacetic acid

(الف) پس از تزریق داخل صفاقی ترکیبات فوق گروه‌های تیمار FICZ + Hg ($p < 0.01$) و همچنین گروه‌های FICZ + Hg + BSO، FICZ + Cd + BSO، FICZ + BSO دارای اختلاف معنی‌دار ($p < 0.001$) با کنترل بودند در حالی که در تیمار ۲۴ ساعته تنها گروه تیمار کادمیوم و جیوه به‌تنهایی دارای اختلاف معنی‌دار ($p < 0.001$) با گروه کنترل بود (ب).

اثرات تیمار ۳ و ۲۴ ساعته با FICZ، BSO، کادمیوم و جیوه بر میزان GSH و GSSG

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود ۳ ساعت (الف) پس از تزریق داخل صفاقی ترکیبات فوق میزان GSH در تمامی گروه‌های تیمار (بجز گروه FICZ به‌تنهایی) به‌شکل کاملاً معناداری ($p < 0.001$) نسبت به گروه کنترل کاهش داشته است. این الگو برای میزان GSSG نیز صادق بوده با این تفاوت که برای گروه‌های تیمار FICZ + Cd + BSO و FICZ + Hg + BSO افزایش میزان GSSG کمتر از سایر گروه‌های تیمار (بجز گروه FICZ به‌تنهایی) در مقایسه با گروه کنترل بوده است. جالب توجه اینکه نسبت GSH/GSSG در تمامی گروه‌های تیمار کمتر از کنترل بوده و کمترین نسبت مربوط به گروه‌های Cd به‌تنهایی، FICZ + Cd + BSO و FICZ + Hg + BSO بوده است. این در حالی است که ۲۴ ساعت (ب) پس از تزریق داخل صفاقی ترکیبات فوق، الگوی تغییرات سطوح کبدی GSH مانند آنچه که در تیمار ۳ ساعته بود مشاهده شد. درحالی که سطوح GSSG تنها در گروه‌های تیمار FICZ + BSO، FICZ + Cd + BSO و FICZ + Hg + BSO بیشترین افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل داشته‌اند. در ضمن نسبت GSH/GSSG تمامی گروه‌های تیمار کمتر از کنترل بوده و کمترین نسبت مربوط به گروه‌های تیمار FICZ + Cd + BSO و FICZ + Hg + BSO بوده است.

اثرات تیمار ۳ و ۲۴ ساعته با FICZ، BSO، کادمیوم و جیوه بر میزان فعالیت آنزیم CYP1A1 در بافت کبد

همانطور که در نمودار ۲الف نشان داده شده، فعالیت آنزیم

خرد کرده و به یک فالکن ۵۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار حاوی سوکروز ۰/۲۵ مولار اضافه و هموژنه گردید. مخلوط حاصل در ساتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس محلول رویی جدا شده و به آن کلسیم کلراید ۸ میلی‌مولار اضافه و به مدت ۱۰-۲۰ دقیقه بر روی استیرر قرار گرفت و سپس در دور ۲۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه ساتریفیوژ گردید. در ادامه محلول رویی را دور ریخته و به مخلوط ته‌نشین شده بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار (حاوی گلیسرول ۲۰ درصدوزنی-حجمی و $EDTA^{12}$ ۱۰ میلی‌مولار با pH معادل ۷/۴) اضافه گردید و تا زمان آزمایش در فریزر -۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۷].

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم CYP1A1 با استفاده از تست EROD^{۱۳}

میکروزوم‌ها با EOR ۰/۵ میکرومولار (حجم نهایی ۰/۵ میلی‌لیتر) به‌عنوان یک سوپسترای استاندارد در بافر ۵۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم (با pH معادل ۷/۴) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی‌مولار NADPH آغاز شد و شدت فلورسانس در طول موج‌های ۵۳۵ و ۵۹۰ نانومتر در طول زمان ۱ دقیقه ثبت شد. میزان EROD در نهایت با تقسیم داده‌های خروجی بر غلظت پروتئین نمونه مورد نظر محاسبه گردید و فعالیت آنزیم بر حسب (pmol resorufin/mg protein) گزارش گردید [۲۰-۱۸].

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار Graphpad Prism نسخه‌ی ۶ با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تکمیلی توکی انجام شد. سطح معنی‌داری در این تحقیق $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

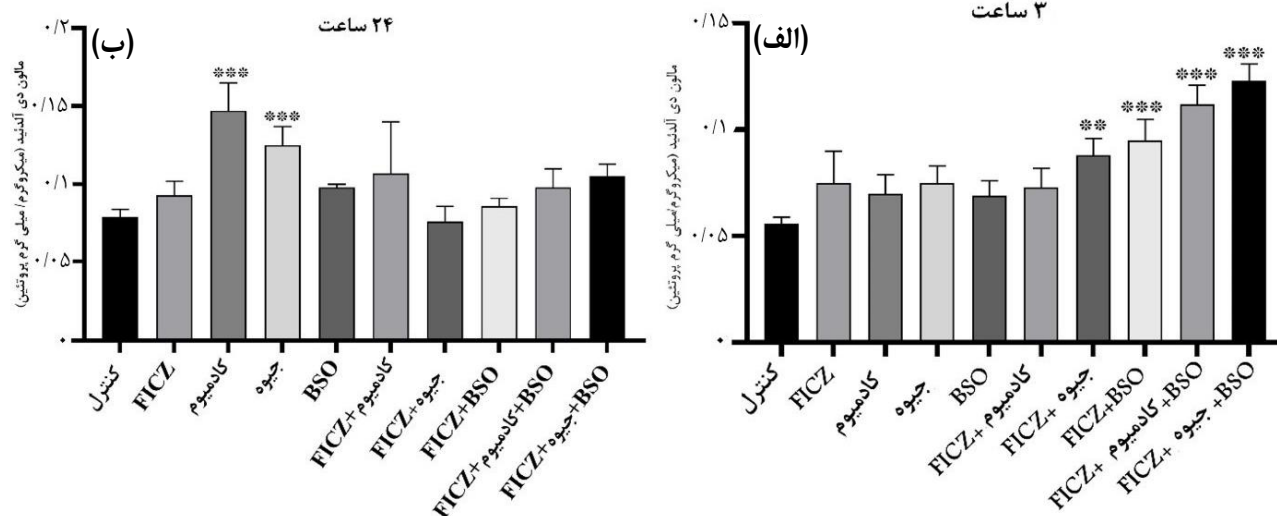
اثرات تیمار ۳ و ۲۴ ساعته با FICZ، BSO، کادمیوم و جیوه بر میزان مالون‌دی‌آلدئید در بافت کبد همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود ۳ ساعت

¹³ Ethoxyresorufin-O-deethylase

¹² Ethylenediaminetetraacetic acid

O-داتیلاز) پس از ۳ ساعت تیمار با FICZ به حداکثر میزان

CYP1A1 و بالطبع مقدار EROD (اتوکسی ایزوایزوفین



نمودار ۱- اثرات ترکیبات FICZ، BSO، کادمیوم و جیوه بر میزان مالون دی آلدئید در بافت کبد. موش‌های سوری ۳ ساعت (الف) و ۲۴ ساعت (ب) پس از دریافت ترکیبات فوق به صورت داخل صفاقی، کبد آن‌ها خارج و غلظت مالون دی آلدئید بافت کبد بر حسب میکروگرم/میلی گرم پروتئین بافت کبد محاسبه شد ($n = 5$). ** و *** به ترتیب نمایانگر اختلاف معنی داری $p < 0.01$ و $p < 0.001$ با گروه کنترل می‌باشند.

Cd و Hg + BSO + FICZ با گروه FICZ اختلاف معنادار مشاهده شده است. جالب توجه اینکه گروه تیمار FICZ+BSO+Cd با سطح معنی داری $p < 0.001$ نسبت به گروه FICZ+Cd افزایش معنادار داشته است.

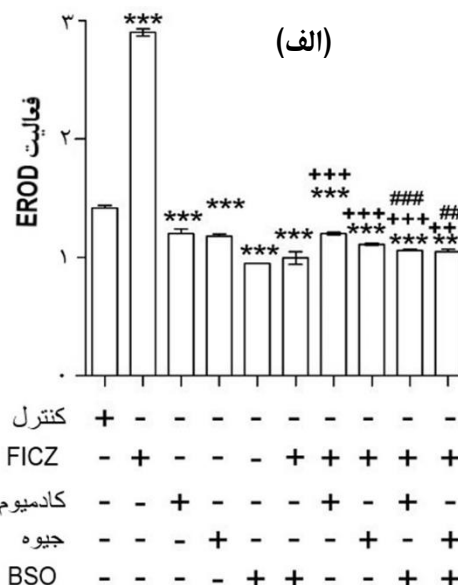
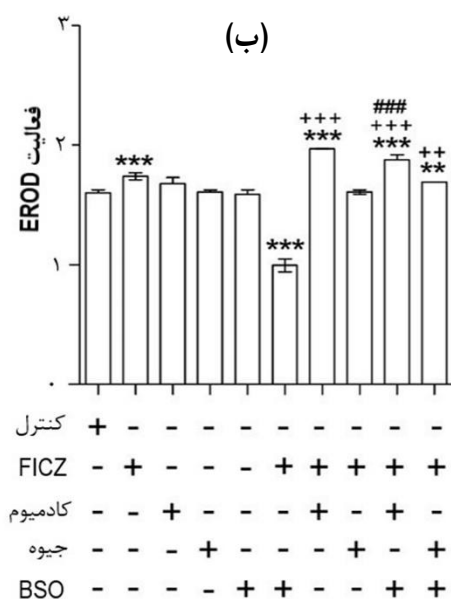
بحث

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد، افزایش استرس اکسیداتیو به همراه کاهش نسبت GSH/GSSG می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم CYP1A1 و بالطبع مسیر پیامرسانی AhR شود. این یافته در تضاد با مطالعه‌ای است که اخیراً انجام شده است [۱۹]. نتایج مطالعه ما و محققان دیگر حاکی از آن بوده که شرایط استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم CYP1A1 شود. علاوه نشان داده شده که سایر فاکتورهای رونویسی‌کننده، به تغییرات اکسیداتیو محیطی حساس هستند و دچار تغییرات عملکردی می‌شوند. به عنوان مثال نشان داده شده که وضعیت ردوکس داخل سلولی می‌تواند یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده در فعال‌سازی مسیرهای

خود رسیده است که اختلاف معناداری ($p < 0.001$) با گروه کنترل و سایر گروه‌های تیمار حاوی FICZ داشته است. جالب توجه اینکه میزان فعالیت آنزیم CYP1A1 تمامی گروه‌های تیمار (بجز FICZ) کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل داشته اند ($p < 0.001$). از طرفی میزان EROD که محصول فعالیت آنزیم CYP1A1 است در گروه‌های تیمار FICZ + BSO + Cd و FICZ + BSO + Hg به ترتیب نسبت به گروه‌های تیمار FICZ+Cd و FICZ + Hg کاهش معناداری داشته است ($p < 0.001$). همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود الگوی فعالیتی آنزیم CYP1A1 در تیمار ۲۴ ساعته تا حد قابل توجهی با تیمار سه ساعته متفاوت است. بسیاری از گروه‌های تیمار به لحاظ میزان EROD تفاوت معناداری با گروه کنترل و یا FICZ ندارند و اختلاف معنادار با گروه کنترل محدود به گروه‌های FICZ + Cd، FICZ + BSO + Cd و FICZ + BSO + Hg است که فعالیت آنزیم CYP1A1 در آن‌ها افزایش یافته است. جالب توجه اینکه موش‌هایی که FICZ + BSO در بافت کبد کرده‌اند کاهش معناداری در میزان EROD بافت کبد آن‌ها نسبت به گروه کنترل مشاهده شده است ($p < 0.001$). در بین گروه‌های تیمار حاوی FICZ که یکی از سوبستراهای آنزیم CYP1A1 است گروه‌های FICZ + Cd، FICZ + BSO +

پیامرسانی NF- κ B^{۱۴} و Nrf2^{۱۵} باشد [۲۰]. به نظر می‌رسد

گروه‌های تیولی (-SH) موجود در کمپلکس AhR به گروه‌های



نمودار ۲- اثرات ترکیبات FICZ، BSO، کادمیم و جیوه بر میزان فعالیت آنزیم CYP1A1 (pmol resorufin/mg protein) در بافت کبد. موش‌های سوری ۳ ساعت (الف) و ۲۴ ساعت (ب) پس از دریافت ترکیبات فوق به صورت داخل صفاقی، کبد آن‌ها خارج و میکروزوم‌های آن‌ها ایزوله شد و میزان تولید EROD که محصول فعالیت آنزیم CYP1A1 است اندازه‌گیری شد. در نهایت داده‌ها با توجه به غلظت پروتئین بافت کبد نمونه مورد نظر نرمالایز و محاسبه شد ($n = 5$). $***$ و $+++$ به ترتیب نمایانگر اختلاف معنی‌داری $p < 0.001$ با گروه کنترل و FICZ می‌باشد. $##$ و $###$ به ترتیب نمایانگر اختلاف معناداری $p < 0.01$ و $p < 0.001$ با گروه‌های تیمار FICZ+Hg و FICZ+Cd می‌باشد.

تنظیم‌شده‌ای هستند، زیرا نقش مهمی در عملکرد طبیعی هموستاز سلولی ایفا می‌کند [۲۴]. نشان داده شده است که تغییرات در مقادیر GSH و GSSG و وضعیت ردوکس سلولی می‌تواند با بسیاری از شرایط آسیب‌ناختی از جمله سرطان‌ها، اختلالات عصبی و احتمالاً با پیری در ارتباط باشد. یافته‌های این مطالعه نشان داد سطح GSH در گروه دریافت‌کننده کادمیم و جیوه کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل داشته است. از سوی دیگر همراه شدن این دو ماده (کادمیم و جیوه) هر کدام به تنهایی با FICZ و BSO نیز روند کاهش سطح گلوتاتیون را تشدید کرد.

نتایج مطالعه ما نشان داد که کاهش در نسبت GSH/GSSG به واسطه تیمار با BSO در نتیجه افزایش سطوح GSSG می‌باشد. جالب توجه اینکه شدت کاهش این نسبت زمانی که تیمار علاوه بر BSO، با ترکیبات اکسند دیگر از قبیل کادمیم و جیوه همراه بود، بیشتر شد. همچنین یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که فعالیت

تیولی ترکیبات واکنش‌پذیر محیطی از قبیل فلزات سنگین حساس باشد [۲۱]. بنابراین، به نظر می‌رسد که یک سطح بهینه از GSH داخل سلولی برای فعال سازی AHR مؤثر باشد. با توجه به پیچیدگی کلی بیوشیمی و وضعیت ردوکس در سلول، این مطالعه برای پوشش‌دادن تمامی زوایای این پدیده بیوشیمیایی طراحی نشده، بلکه جهت ارائه یک دیدگاه انتخابی در فرآیندهای مرتبط با تیول بوده است.

با توجه به سطوح بالای غلظتی و کارایی قابل توجه، GSH مهمترین بافر ردوکس در سلول‌ها است که امکان تنظیم دقیق محیط ردوکس سلولی را فراهم می‌کند. نسبت احیا به فرم اکسیده شده GSH اغلب به عنوان نشانگر مهم در تفسیر استرس اکسیداتیو استفاده می‌شود [۱۲]. در شرایط عادی، غلظت GSH از ۱ تا ۱۰ میلی‌مولار [۲۲] و نسبت GSH/GSSG در حدود ۱۰۰ به ۱ است، در حالی که در شرایط استرس اکسیداتیو، این نسبت می‌تواند از ۱۰ به ۱ و حتی ۱ به ۱ متغیر باشد [۲۳]. تغییرات GSH فرایندهای بسیار

¹⁵ Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

¹⁴ Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

قابل توجهی وابسته به زمان می باشد. پس از تیمار عملکرد آنزیم CYP1A1 به وسیله تست EROD اندازه گیری شد که نتایج

CYP1A1 توسط تغییرات هر کدام از GSH یا GSSG به تنهایی تحت تأثیر قرار نمی گیرد، بلکه متأثر از تغییرات ناشی از نسبت GSH/GSSG است (جدول ۱). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میزان فعالیت آنزیم CYP1A1 به طور

جدول ۱- اثرات تیمار ۳ ساعته و ۲۴ ساعته ترکیبات BSO، FICZ، کادمیوم و جیوه بر میزان گلوتاتیون احیا و اکسید در بافت کبد

مواجهه ۳ ساعته		مواجهه ۲۴ ساعته		گروه ها
GSH (nM/mg protein)	GSSG (nM/mg protein)	GSH (nM/mg protein)	GSSG (nM/mg protein)	
۹۷/۷ ± ۹/۳۰	۱/۰ ± ۸۵/۰۱	۰/۷۶ ± ۷۱/۶۰	۰/۱۰ ± ۲/۲۰	DMSO
۳/۵۳ ± ۹۸/۷۵	۵/۴۶ ± ۷/۱۸	۱/۵۰ ± ۶۹/۱۰	۰/۴۹ ± ۲/۸۰	FICZ
***۷/۶۶ ± ۲۳/۸۱	***۰/۴۴ ± ۱۵/۳۸	***۱/۱۰ ± ۵۰/۱۰	***۰/۲۶ ± ۸/۱۰	Cd
***۳/۱۰ ± ۲۵/۶۷	***۱/۹۹ ± ۱۹/۹۵	***۱/۵۰ ± ۵۲/۴۰	۰/۷۰ ± ۷/۶۰	Hg
***۱/۴۰ ± ۳۵/۴۷	***۳/۱۷ ± ۱۵/۶	***۵/۵۰ ± ۵۴/۵۰	۰/۹۵ ± ۳/۰۰	BSO
***۶/۷۹ ± ۴۲/۵۷	***۰/۶۸ ± ۱۰/۱۳	***۱/۲۳ ± ۵۶/۳	***۰/۴۳ ± ۴/۱۲	FICZ + BSO
***۱۰/۳۶ ± ۳۵/۷۸	***۳/۰۹ ± ۱۵/۱۵	***۱/۰۰ ± ۴۸/۰۰	۲/۲۰ ± ۷/۲۰	FICZ + Cd
***۱۰/۴۵ ± ۲۶/۲۳	***۱/۶۱ ± ۱۲/۴۷	***۱/۲۵ ± ۵۰/۲۳	۰/۵۵ ± ۸/۶۳	FICZ + Hg
***۰/۳۱ ± ۱۵/۳۷	*۱/۰۳ ± ۷/۳۵	***۰/۸۵ ± ۳۲/۱۰	**۰/۹۵ ± ۱۳/۰۳	FICZ + Cd + BSO
***۱/۹۷ ± ۱۴/۰۵	*۰/۶۰ ± ۴/۹	***۱/۶۹ ± ۲۹/۴۰	**۱۰ ± ۱۴/۰۰	FICZ + Hg + BSO

داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار از میانگین برای هر گروه ($n = 5$) ذکر شده است. *، ** و *** به ترتیب نمایانگر اختلاف معنی داری $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ با گروه کنترل می باشند. صرفاً داده های مربوط به گروه های DMSO، FICZ و BSO در زمان ۳ ساعت برگرفته از کار قبلی نویسندگان می باشد [۱۵] که جهت انتشار آن ها از مجله اجازه نشر با کد 5601870424823 اخذ شده است.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که فعالیت AHR تحت تأثیر اکسیداتیو استرس قرار می گیرد. بنابراین عملکرد این گیرنده در حالی که سلول پتانسیل احیا کمتری دارد، نسبت به حالت نرمال متفاوت است که این حالت می تواند باعث کم شدن عملکرد گیرنده و در نتیجه ایجاد بیماری های مرتبط با آن گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز به دلیل حمایت از این مطالعه تشکر می کنند.

ملاحظات مالی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شیراز صورت پذیرفت.

تعارض در منافع

به دست آمده بیانگر این موضوع بود که هنگامی که موش ها با FICZ تیمار شدند، فعالیت آنزیم CYP1A1 پس از ۲۴ ساعت به حداقل میزان خود نسبت به ۳ ساعت پس از تیمار رسید. تعداد زیادی از ترکیبات می توانند سبب فعال شدن AHR شوند که از جمله آن ها فلزات سنگینی هم چون کادمیوم و جیوه و داروهای شیمیایی هم چون BSO می باشند. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم CYP1A1 در حضور این فلزات سنگین و BSO کاهش می یابد. با افزودن FICZ میزان فعالیت CYP1A1 در ۳ ساعت افزایش می یابد و این به دلیل القای فعالیت آن از طریق فعال شدن AHR می باشد. اما در ۲۴ ساعت به دلیل این که خود FICZ سوبسترای آنزیم CYP1A1 می باشد، میزان فعالیت AHR و در نتیجه میزان فعالیت آنزیم CYP1A1 کاهش می یابد و به کمترین میزان فعالیت خود می رسد. با رجوع به منابع علمی متوجه می شویم که سیستم های ردوکس دیگر، مانند خانواده تیورودوکسین در حفظ حالت ردوکس سلول نقش دارند. با این حال، این سیستم ردوکس همچنین می تواند به کوپل ردوکسی GSH مرتبط باشد [۲۵].

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

م.س، ش. ح: اجرای مطالعه؛ اش، ع، غ: نگارش مقاله؛
م.ک: آنالیز آماری.

نقش نویسندگان

م.ا، ام: ایده، طراحی و نظارت بر حسن اجرای مطالعه؛

فهرست منابع

1. Uemura S, Nakajima Y, Yoshida Y, Furuya M, Matsutani S, Kawate S, Ikeda S-i, Tsuji N, Grave E, Wakui H, Itoh H, Biochemical properties of human full-length aryl hydrocarbon receptor (AhR). *J Biol Chem* 168 (2020) 285-294.
2. Wang H, Pan L, Zhang X, Ji R, Si L, Cao Y, The molecular mechanism of AhR-ARNT-XREs signaling pathway in the detoxification response induced by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in clam *Ruditapes philippinarum*. *Environ Res* 183 (2020) 1-12.
3. Bose P, Siddique MUM, Acharya R, Jayaprakash V, Sinha BN, Lapenna A, Pattanayak SP, Quinazolinone derivative BNUA-3 ameliorated [NDEA+2-AAF]-induced liver carcinogenesis in SD rats by modulating AhR-CYP1B1-Nrf2-Keap1 pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 47 (2020) 143-157.
4. Arabnezhad M-R, Montazeri-Najafabady N, Chatrabnous N, Ghafarian Bahreman A, Mohammadi-Bardbori A, Anti-androgenic effect of 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) in LNCaP cells is mediated by the aryl hydrocarbon-androgen receptors cross-talk. *Steroids* 153 (2020) 1-6.
5. Gilge JL, Fisher M, Chai YC, The effect of oxidant and the non-oxidant alteration of cellular thiol concentration on the formation of protein mixed-disulfides in HEK 293 cells. *PLoS One* 3 (2008) e4015.
6. Jiaxin S, Shengchen W, Yirong C, Shuting W, Shu L, Cadmium exposure induces apoptosis, inflammation and immunosuppression through CYPs activation and antioxidant dysfunction in common carp neutrophils. *Fish Shellfish Immunol* 99 (2020) 284-290.
7. Silvestre F, Signaling pathways of oxidative stress in aquatic organisms exposed to xenobiotics. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol* 333 (2020) 436-448.
8. Ramos A, dos Santos MM, de Macedo GT, Wildner G, Prestes AS, Masuda CA, Dalla Corte CL, Teixeira da Rocha JB, Barbosa NV, Methyl and Ethylmercury elicit oxidative stress and unbalance the antioxidant system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Biol Interact* 315 (2020) 1-9.
9. Wang C, Nie G, Yang F, Chen J, Zhuang Y, Dai X, Liao Z, Yang Z, Cao H, Xing C, Hu G, Zhang C, Molybdenum and cadmium co-induce oxidative stress and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in duck renal tubular epithelial cells. *J Hazard Mater* 383 (2020) 1-10.
10. Khafi AS, Iranbakhsh A, Afshar AS, Nejad RAK, RBOH expression and ROS metabolism in *Citrullus colocynthis* under cadmium stress. *Rev Bras Bot* 43 (2020) 35-43.
11. Esteves F, Campelo D, Gomes BC, Urban P, Bozonnet S, Lautier T, Rueff J, Truan G, Kranendonk M, The role of the FMN-Domain of human cytochrome P450 oxidoreductase in its promiscuous interactions with structurally diverse redox partners. *Front Pharmacol* 11(2020) 1-16.
12. Omid M, GhafarianBahraman A, MohammadiBardbori A, GSH/GSSG redox couple plays central role in aryl hydrocarbon receptor- dependent modulation of cytochrome P450 1A1. *J Biochem Mol Toxicol* 32 (2018) 1-8.
13. Omid M, Niknahad, H, Noorafshan, A, Fardid R, Nadimi E, Naderi S, Bakhtari A, Moham madi-Bardbori A, Co-exposure to an aryl hydrocarbon receptor endogenous ligand, 6-Formylindolo [3,2-b]carbazole (FICZ), and cadmium induces cardiovascular developmental abnormalities in mice. *Biol Trace Elem Res* 187 (2019) 442–451.
14. Amara IE, Anwar-Mohamed A, Abdelhamid G, El-Kadi AO, Effect of mercury on aryl hydrocarbon receptor-regulated genes in the extrahepatic tissues of C57BL/6 mice. *Food Chem Toxicol* 50 (2012) 2325-2334.
15. Kruger NJ, The bradford method for protein quantitation. *The Protein Protocols Handbook*, 3rd ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2009: 17-24
16. Tietze F, Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* 27 (1969) 502-522.
17. Zamaratskaia G, Zlabek V, EROD and MROD as markers of cytochrome P450 1A activities in hepatic microsomes from entire and castrated male pigs. *Sensors* 9 (2009) 2134-2147.
18. Mohammadi-Bardbori A, Assay for quantitative determination of CYP1A1 enzyme activity using 7-Ethoxyresorufin as standard substrate (EROD assay). *Protocol Exchange* 10 (2014) 1-9.
19. Mohammadi-Bardbori A, Bastan F, Akbarizadeh A-R, The highly bioactive molecule and signal substance 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) plays bi-functional roles in cell growth and apoptosis in vitro. *Arch Toxicol* 91 (2017) 3365-3372.
20. Mohammadi-Bardbori A, Vikström Bergander L, Rannug U, Rannug A, NADPH oxidase-dependent mechanism explains how arsenic and other oxidants can activate aryl hydrocarbon receptor signaling. *Chem Res Toxicol* 28 (2015) 2278-2286.
21. Xu C, Siu C-S, Pasco DS, DNA binding activity of the aryl hydrocarbon receptor is sensitive to redox changes in intact cells. *Arch Biochem Biophys* 358 (1998) 149-156.
22. Locigno R, Castronovo V, Reduced glutathione system: role in cancer development, prevention and treatment. *Int J Oncol* 19 (2001) 221-236.
23. Chai Y, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB Jr, Thomas JA, S-Thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys* 310 (1994) 273-281.
24. Rahman I, Biswas SK, Jimenez LA, Torres M, Forman HJ, Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxid Redox Signal* 7 (2005) 42-

59. Björnstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, Holmgren A, The thioredoxin and glutaredoxin systems are

efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 269 (1994) 29382-29384.

Research paper

Cadmium and Mercury effects on the stress oxidative and AHR-CYP1A1 pathway in liver of mice

Mehdi Soltan-Oghli¹, Afshin Mohammadi-Bardbori², Shokoufeh Hassani³, Amir Shadboorestan⁴, Ali Ghafarian-Bahreman⁵, Majid Keshavarzi⁶, Mahmoud Omidi^{7*}

1. Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
2. Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3. Toxicology and Diseases Group (TDG), Pharmaceutical Sciences Research Center (PSRC), the Institute of Pharmaceutical Sciences (TIPS), Tehran, Iran
4. Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5. Occupational Environment Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
6. Department of Pharmacodynamics and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
7. Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Hormozgan University of Medical Sciences, Hormozgan, Iran

Received: 4 August 2023

Accepted: 30 August 2023

Abstract

Background and aim: Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) is an environmental sensor and sensitive to oxidative change. However, little is known about the effects of stress, especially oxidative stress, on aryl hydrocarbon receptor signaling. Therefore, this study aimed to investigate the effects of oxidizing compounds on the function of aryl hydrocarbon receptor in mice.

Methods: For this purpose, in mice treated with Formylindolo[3,2-b] carbazole (FICZ), buthionine sulfoximine (BSO), cadmium (Cd), and mercury (Hg), the effects of oxidants on the function of aryl hydrocarbon receptors were studied for 3 and 24 hours.

Results: For the first time, the data of this research unveil a clear relationship between Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1 (CYP1A1) activity and cellular oxidative status. The *in vivo* findings indicated that the duration of activation/inhibition of aryl hydrocarbon receptors was directly related to the increase/decrease of the reduced glutathione/oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio.

Conclusion: This study showed that many environmental pollutants such as heavy metals and oxidants might affect the normal function of AHR target enzymes like CYP1A1 by altering intracellular oxidative potential.

Keywords: Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR), FICZ, GSH/GSSG, Heavy Metals

Please cite this article as follows:

Soltan-Oghli M, Mohammadi-Bardbori A, Hassani S, Shadboorestan A, Ghafarian-Bahreman A, Keshavarzi M, Omidi M, Cadmium and Mercury effects

on the stress oxidative and AHR-CYP1A1 pathway in liver of mice. *Iran J Physiol Pharmacol* 7 (2023) 75-83.

*Corresponding authors: toxicology@hums.ac.ir (ORCID: 0000-0001-8298-7221)