

## بررسی بیان متالوپروتئین‌های MMP2 و MMP9 در کبد رت های نر ویستار در

### معرض سرب و N-استیل سیتئین

نجمه رنجی<sup>۱</sup>، هادی حبیب الهی<sup>۲</sup>، ریحانه کوچکی نژاد<sup>۳</sup>، عیسی وفقی<sup>۴</sup>، محمد مهدی جعفرزاده<sup>۵</sup>

۱-دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. نویسنده مسئول: [na.ranji@iaau.ac.ir](mailto:na.ranji@iaau.ac.ir)

۲-استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

۳-دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

۴-دانش آموخته دکتری تخصصی، آزمایشگاه پاتوبیولوژی البرز، رشت، ایران..

۵-دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۰۲/۰۸

#### چکیده

**زمینه و هدف:** متالوپروتئین‌ها (MMP2 و MMP9) نظیر MMP2 و MMP9، ماتریکس خارج سلولی را تجزیه می کنند. سرب (Pb) یک آلاینده شناخته شده محیطی است که می تواند به فعالیت MMP ها آسیب برساند. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات N-استیل سیتئین، به عنوان یک آنتی اکسیدان، بر بیان ژن های MMP2 و MMP9، در کبد رت های مواجهه یافته با سرب (Pb) بود.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه، ۳۰ رت نر بطور تصادفی در پنج گروه (n=6) (۱: کنترل، ۲: دوز حاد سرب (۷۰ mg/kg)، ۳: دوز حاد سرب (۷۰ mg/kg) + دوز پیوسته NAC (۵۰ mg/kg)، ۴: دوز مزمن سرب (۲ mg/kg) و ۵: دوز مزمن سرب (۲ mg/kg) + دوز پیوسته NAC (۵۰ mg/kg) تقسیم بندی شدند. دوز حاد سرب در روز اول مطالعه، و دوز مزمن سرب و مصرف پیوسته NAC هر روز طی چهار هفته به صورت گرفت. N-استیل سیتئین و سرب هر دو در آب استریل حل شده و بصورت گاوژ خوراکی در رت ها مصرف گاوژ بود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انوزین (H&E) برای مطالعه تغییرات هیستوپاتولوژی استفاده شد. بیان ژن های MMP2 و MMP9، با استفاده از RT-PCR کمی ارزیابی شد.

**نتایج:** در کبد رت های مواجهه یافته با سرب (Pb) بخصوص در دوز مزمن، ناهنجاریهای ساختاری و افزایش التهاب مشاهده شد. آنالیز Q-RT-PCR، نشان داد که ژن های MMP2 و MMP9 در کبد مواجهه یافته با سرب افزایش و در کبد دریافت کننده NAC بعد از مواجهه با سرب، کاهش بیان داشتند.

**نتیجه گیری:** نتایج ما پیشنهاد می کند که NAC می تواند کبد رت ها را از طریق کاهش بیان متالوپروتئین‌ها بعد از مواجهه با سرب محافظت کند و التهاب و آسیب بافتی را کاهش دهد.

**کلمات کلیدی:** کبد، MMP2، MMP9، N-استیل سیتئین، سرب، رت.

## مقدمه

ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs (Matrix Metalloproteinases) یا متالوپپتیدازها گروهی از آنزیم های وابسته به روی و تجزیه کننده پروتئین ها هستند که در تجزیه و رمودلینگ اجزای ماتریکس خارج سلولی (ECM (Extracellular Matrix) و عبارتی حذف سدهای ساختاری جهت مهاجرت سلولی نقش دارند. MMP ها در فرآیندهای فیزیولوژیک همچون جنین زایی (Embryogenesis) ، چرخه تولید مثلی (Reproduction Cycle) و یا ترمیم زخم نقش دارند. اما افزایش غیر معمول بیان آنها با مشکلات پاتولوژیک همچون دیابت، بیماریهای قلبی- عروقی، اختلالات نورودژنراتیو و خود ایمنی، متاستاز و پیشرفت تومورهای بدخیم همراه است. MMP2 و MMP9 دو متالوپروتئیناز از گروه ژلاتینازها (Gelatinases) هستند که در تجزیه ژلاتین، کلاژن و الاستین نقش دارند (۱). کبد به عنوان یکی از ارگانهای مهم و حیاتی در انسان، در متابولیسم ماکرومولکولها، میکرومولکولها (۲)، پاسخ ایمنی (محافظت از بدن بر علیه آنتی ژنهای موجود در ترکیبات غذایی و دارویی) (۳) و تصفیه خون نقش دارد (۲). ماتریکس متالوپروتئینازها در نوسازی کبد بعد از انواع بیماری های کبدی همچون التهاب کبدی، کبد چرب، هپاتیتیس و سیروز، فیبروز و سرطان هپاتیت نقش دارند (۴). اگرچه MMP ها بخاطر توان تجزیه ماتریکس خارج سلولی خواص ضد فیبروزی باید داشته باشند، اما تحت شرایط پاتولوژیک می توانند باعث ایجاد فیبروز شوند (۲). در فیبروز کبدی MMP2 یا ژلاتیناز A در میوفیبروبلاستها (Myofibroblasts) افزایش یافته و نقش پیش-فیبروژنیک (Profibrogenic) دارد. MMP9 یا ژلاتیناز B در آسیب های ایسکمی و ریپرفیوژن

## کبدی (Liver Ischemia and Reperfusion Injury)

(Iri). افزایش بیان نشان می دهد (۲).

سرب به عنوان یک فلز سنگین و مضر و به عنوان یک سم بالقوه قادر به اختلال در عملکرد طبیعی فرآیندهای بیولوژیک و فیزیولوژیک در بدن می شود (۵). استرس اکسیداتیو حاصل از مواجهه با سرب باعث آسیب به غشاء، DNA و پروتئین ها می شود (۶). اولین بافت تحت تاثیر سرب (چه خوراکی و چه استنشاقی)، بافت کبد است که در مطالعات مشخص شده بالاترین مقدار این فلز در این بافت تجمع می یابد و عوارضی همچون التهاب و مرگ سلولهای کبدی و تغییرات شدید در اندامکهای درون سلولی نظیر میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی دارد (۵). استرس اکسیداتیو به علت عدم وجود ظرفیت آنتی اکسیدانی ایجاد می شود و باعث افزایش تولید رادیکال آزاد می گردد. در برابر استرس اکسیداتیو، دو نوع دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی (همچون سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز) و غیر آنزیمی (همچون ویتامین E، اسکوربات و گلوتاتیون) وجود دارد (۷).

N-استیل سیستئین (NAC) یکی از مشتقات سیستئین با یک گروه استیل است که استیل به اتم نیتروژن سیستئین متصل شده و مشابه با اکثر تیول ها (RSH) قادر به اکسیده شدن با انواع رادیکال های آزاد است و هم می تواند به عنوان یک عامل هسته دوست (Nucleophile) (دهنده جفت الکترون) عمل کند (۸). NAC مستقیماً از طریق گروه تیول آزادش قادر است به گروههای الکتروفیل ROS متصل شود (۹). همچنین اثرات آنتی اکسیدانی غیر مستقیم N-استیل سیستئین مربوط به نقش آن به عنوان پیش ساز گلوتاتیون (GSH) است که برای سنتز گلوتاتیون، گلوتامیک اسید، سیستئین و گلايسین مورد استفاده قرار می گیرد. سنتز GSH در کبد و ریه ها رخ می دهد (۱۰).

هدف از این مطالعه بررسی اثرات آنتی اکسیدانی N-استیل سیستئین (NAC) بر بهبود وضعیت بافت کبد رت

مطالعات پیشین تعیین شد (۱۱-۱۳). دوز حاد سرب فقط در روز اول تیمار، دوز مزمن سرب و دوز پیوسته NAC هر روز به مدت ۴ هفته دریافت کردند. دریافت استات سرب و NAC در آب آشامیدنی به روش گاواژ صورت گرفت.

#### جداسازی بافت

بعد از اتمام تیمار با NAC و سرب، رت ها ۴۸ ساعت بدون تیمارها و در شرایط عادی قرار گرفتند. سپس جهت بی‌هوشی، تزریق داخل صفاقی کتامین (30-50 mg/kg) و زایلوزین (3-5 mg/kg) به رت ها (بعد از تحمل ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی) صورت گرفت. جداسازی بافت کبد از رت ها در گروه‌های پنج گانه صورت گرفت. جهت انجام آزمایشات هیستوپاتولوژی، بافت کبدی از گروه‌های مختلف در فرمالین ۱۰٪ حداقل به مدت ۴۸ ساعت تثبیت شد. بافت ها دهیدراته و سپس با میکروتوم در قطعات ۴ تا ۵ میلی متری برش داده شد. سپس قطعات بافتی با همتوکسیلین-اُوزین (H&E) رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

برای مطالعات مولکولی، قطعه ای از بافت بعد از بی‌هوشی جداسازی و در فسفات بافر (pH ۷/۰) در دمای ۴ درجه سانتیگراد توسط دستگاه هموژنایزر هموژنیزه گردید. بافتهای هموژنیزه، با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید (۱۴).

ها بعد از مواجهه با سرب و بررسی بیان ژنهای *MMP2* و *MMP9* در این گروهها بود.

#### مواد و روش ها

#### گروه‌بندی و تیمار رت‌ها

در این مطالعه، ۳۰ موش صحرایی (رت) نر نژاد ویستار (با 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 رفته شد. رت ها در شرایط دمایی یکسان (دمای  $2 \pm 22$  درجه سانتیگراد، رطوبت  $5 \pm 50$  درصد، و سیکل شب و روز ۱۲:۱۲) و با رژیم غذایی استاندارد در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند و سپس در پنج گروه تحت تیمار قرار گرفتند. رت‌ها در گروه کنترل (C)، به مدت ۴ هفته تحت رژیم غذایی استاندارد قرار گرفتند. رت های دریافت کننده سرب در دو گروه P1 (دریافت کننده تک دوز mg/kg) 70 (سرب) و P2 (دوز پیوسته 2 mg/kg) (سرب) تقسیم بندی شدند. رت های گروههای چهار و پنج دریافت کننده سرب و NAC به دو گروه PN1 (تک دوز سرب mg/kg) 70 + دوز پیوسته NAC (50 mg/kg) و PN2 (دوز پیوسته سرب 2 mg/kg) + دوز پیوسته NAC (50 mg/kg) تقسیم شدند. تعیین غلظت سرب و NAC بر اساس

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

Genes	Forward	Reverse
<i>MMP2</i>	5'-CCGTCGCCCATCATCAAGT-3'	5'-GCAGCCATAGAAAGTGTTCAGGT-3'
<i>MMP9</i>	5'-ACCACCGCCA ACTATGACCAG-3'	5'-TGCTTGCC CAGGAAGACGA-3'
<i>GAPDH</i>	5'-AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3'	5'-CATACTCAGCACCAGCATCACC-3'

تهران) استخراج شد. سپس با استفاده از کیت PrimScript RT reagent Kit (TakaRa، ژاپن)، سنتز cDNA صورت گرفت. جهت بررسی بیان ژن‌ها از

#### بررسی بیان ژنهای *MMP2* و *MMP9*

RNA تام از بافت های کبد هموژنیزه شده (با هموژنایزر)، با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناکلون،

خفیف شدن پروسه التهابی در کبد رت های دریافت کننده سرب گردید (شکل ۱).

### بررسی بیان ژن *MMP2* در کبد رت های

#### دریافت کننده سرب و NAC

در کبد پنج گروه رت بیان ژن *MMP2* مورد بررسی کمی قرار گرفت. نتایج real-time PCR، افزایش  $1/46 \pm 0/1$  برابری ( $P=0/1$ ) بیان *MMP2* را در گروه P1 (تک دوز سرب) و افزایش معنی دار  $5/61 \pm 0/6$  برابری ( $P<0/001$ ) بیان این ژن را در گروه P2 (دوز پیوسته سرب) نسبت به گروه کنترل (C) نشان داد. درحالیکه دریافت NAC در گروه PN1 (تک دوز سرب و دوز پیوسته NAC) باعث بیان ژن *MMP2* به میزان  $1/01 \pm 0/06$  برابری نسبت به گروه کنترل شد که تفاوت معنی داری با گروه کنترل نشان نداد. اما بیان این ژن در گروه دریافت کننده سرب تک دوز و NAC (PN1) نسبت به گروه P1 کاهش نشان داد اما اختلاف آنها معنی دار نبود ( $P=0/18$ ). دریافت NAC در گروه PN2 (دوز پیوسته سرب و دوز پیوسته NAC) باعث کاهش معنی دار بیان ژن *MMP2* به میزان  $2/77 \pm 0/36$  برابر نسبت به گروه P2 (دوز پیوسته سرب) ( $P<0/001$ ) شد (نمودار ۱).

### بررسی بیان ژن *MMP9* در کبد رت های

#### دریافت کننده سرب و NAC

در این مطالعه با روش real-time PCR بیان کمی ژن *MMP9* در چهار گروه رت دریافت کننده سرب و NAC و گروه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت. افزایش بیان  $1/33 \pm 0/15$  برابری ( $P=0/2$ ) ژن *MMP9* در گروه P1 (تک دوز سرب) و افزایش بیان معنی دار  $4/82 \pm 0/54$  برابری ( $P<0/001$ ) این ژن در گروه P2 (دوز پیوسته سرب) نسبت به گروه کنترل (C) مشاهده شد.

دستگاه Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Australia) استفاده شد. برنامه دمایی واکنش RT-PCR کمی برای ژنهای *MMP2*، *MMP9* 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* به عنوان ژن کنترل داخلی (ژن مرجع) استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ ذکر شده است. آنالیز بیان ژن‌ها به کمک معادله  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  صورت گرفت. تجزیه و تحلیل آماری جهت مقایسه نتایج در گروههای تحت تیمار، از آزمون (Post-Hoc Tukey) One Way ANOVA استفاده شد. سطح معنی داری برای تمام محاسبات  $P<0/05$  در نظر گرفته شد. کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند.

#### نتایج

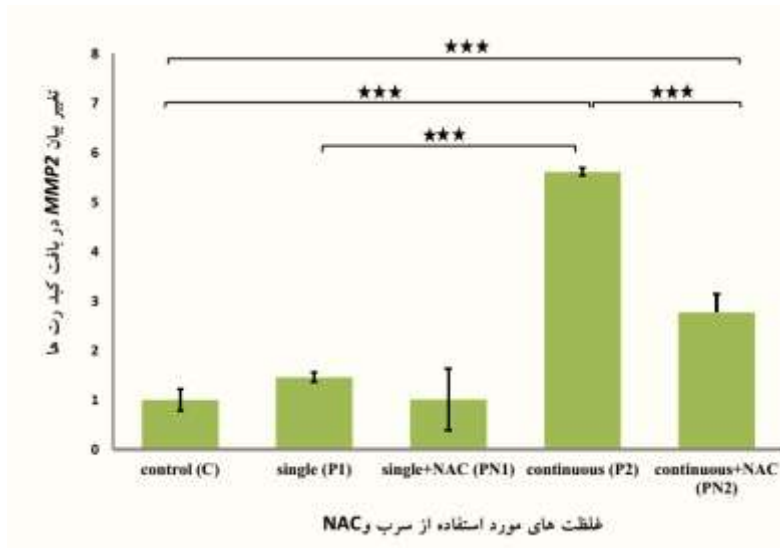
### نتایج هیستوپاتولوژیک در کبد رت های دریافت

#### کننده سرب و NAC

نتایج هیستوپاتولوژیکی بافت کبد در پنج گروه رت مورد مطالعه، در شکل ۱ نشان داده شده است. هیچ نوع علامتی از ناهنجاری یا آسیب ساختاری در سلولهای کبدی در گروه کنترل یا C مشاهده شد. با این حال برش بافتی کبد، افزایش التهاب و ناهنجاری های ساختاری در رت های گروه P1 (دریافت کننده تک دوز سرب) و بخصوص در گروه P2 (دریافت کننده دوز پیوسته سرب) را با افزایش حضور سلولهای کوپفر نشان داد. برشهای بافتی در گروه های دریافت کننده NAC و سرب (گروههای PN1 و PN2) نشان دهنده کاهش التهابات و تغییرات ساختاری در مقایسه با گروه های صرفا دریافت کننده سرب بود. تیمار مکمل NAC منجر به کاهش تعداد سلول های التهابی و در نتیجه



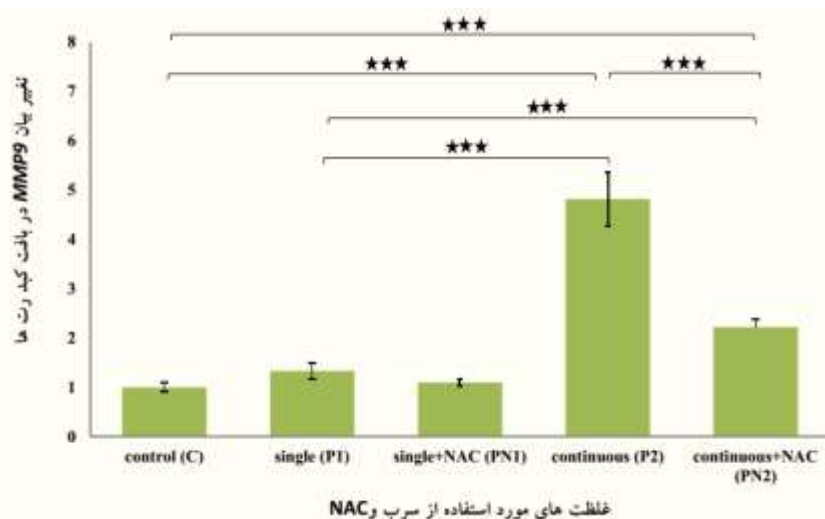
شکل ۱. نتیجه هیستوپاتولوژی با کمک رنگ آمیزی H&E با میکروسکوپ نوری در گروههای مختلف رت. الف) گروه کنترل (C)، ب) گروه مواجهه یافته با تک دوز سرب (P1، فلش آبی رنگ نشان دهنده سلولهای کوپفر و التهاب است)، ج) گروه مواجهه یافته با تک دوز سرب و N-استیل سیتئین (PN1)، د) گروه مواجهه یافته با دوز مزمن سرب (P2، فلش آبی رنگ نشان دهنده سلولهای کوپفر است)، و) گروه مواجهه یافته با دوز پیوسته سرب و دوز پیوسته N-استیل سیتئین (PN2).



نمودار ۱. میزان تغییرات بیان ژن MMP2 در کبد پنج گروه مواجهه یافته با سرب و NAC شامل گروههای کنترل (C)، دریافت کننده تک دوز سرب (P1)، دریافت کننده پیوسته سرب (P2)، دریافت کننده تک دوز سرب و دوز پیوسته NAC (PN1)، دریافت کننده دوز پیوسته سرب و دوز پیوسته NAC (PN2). هر آزمون حداقل سه بار تکرار شد. نتایج آزمون ها بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ذکر شده است ( $P < 0.001$ ).

معنی دار نبود ( $P=0/56$ ). دریافت NAC در گروه PN2 (دوز پیوسته سرب و دوز پیوسته NAC) باعث کاهش معنی دار بیان ژن *MMP9* به میزان  $2/21 \pm 0/15$  برابر نسبت به گروه P2 (دوز پیوسته سرب) ( $P < 0/001$ ) شد (نمودار ۲).

در حالیکه دریافت NAC در گروه PN1 (تک دوز سرب و دوز پیوسته NAC) باعث بیان ژن *MMP9* به میزان  $1/1 \pm 0/07$  برابری نسبت به گروه کنترل شد که تفاوت معنی داری با گروه کنترل نشان نداد ( $P=0/97$ ). بیان این ژن در گروه دریافت کننده سرب تک دوز و NAC (PN1) نسبت به گروه P1 کاهش نشان داد اما اختلاف آنها



نمودار ۲. میزان تغییرات بیان ژن *MMP9* در کبد پنج گروه مواجهه یافته با سرب و NAC شامل گروههای کنترل (C)، دریافت کننده تک دوز سرب (P1)، دریافت کننده پیوسته سرب (P2)، دریافت کننده تک دوز سرب و دوز پیوسته NAC (PN1)، دریافت کننده دوز پیوسته سرب و دوز پیوسته NAC (PN2). هر آزمون حداقل سه بار تکرار شد. نتایج آزمون ها بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ذکر شده است ( $P < 0/001$ ).

اکسیدان قادر است عوارض سرب را در ایجاد آسیب بافت کبدی، از طریق کاهش بیان ژنهایی همچون *MMP2* و *MMP9* کاهش دهد.

در مطالعه *Meki* و همکاران مشخص شد که مواجهه با سرب دریافتی کبد، کلیه ها و مغز باعث افزایش تجمع این فلز در این بافتها و آسیب به این بافتها می شود (۱۶). در مطالعه *Shaban El-Neweshy* و همکاران مشخص شد که استفاده از استات سرب (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم) بمدت ۶۰ روز بصورت گاواژ، باعث آسیب به کبد، کلیه ها، مغز و بیضه ها می شود (۱۷). در مطالعه *Abdelhamid*

## بحث

سمیت فلزات سنگین یکی از قدیمی ترین مشکلات محیط زیستی است که به عنوان یک معضل مهم و خطرناک تهدید کننده سلامت انسان محسوب می شود و از طریق هوا، آب آشامیدنی، غذا و مواد صنعتی، به بدن وارد می شود (۱۵). در این مطالعه تلاش شد اثرات محافظت کنندگی N-استیل سیستئین (NAC) بر بافت کبدی رت های نژاد ویستار در معرض سرب در دوز تک و دوز پیوسته، هم در سطح بافت و هم در سطح مولکولی مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج این مطالعه نشان داد NAC به عنوان یک آنتی

بافتی بود و نشان دهنده تاثیرات مخرب افزایش بیان این دو ژن در ایجاد آسیب بافتی بواسطه خواص تجزیه ماتریکس خارج سلولی در کبد رت های این دو گروه بعد از دریافت سرب بود.

در مطالعه Winiarska-Mieczan مشخص شد که انواع چای سبز، سیاه، قرمز و سفید قادر به کاهش غلظت سرب تجمع یافته در مغز، کبد و کلیه ها و افزایش سطح سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز در رت های مواجهه یافته با غلظت ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم سرب می باشد. در این مطالعه مصرف هر نوع چای به عنوان یک روش مناسب برای کاهش عوارض بد آلودگی های محیطی از جمله سرب را در بدن انسان پیشنهاد می کند (۲۴). در مطالعه Winiarska-Mieczan نشان داده شد که مصرف تانیک اسید با توان آنتی اکسیدانی زیاد، می تواند میزان کادمیوم و سرب را در مغز رت های دریافت کننده این دو فلز سنگین کاهش دهد. (۲۵). N- استیل سیتئین نیز یک ترکیب آنتی اکسیدان شناخته شده است. در واقع N- استیل سیتئین احیاء کننده پیش ساز گلووتاتیون (GSH) است. GSH یک آنتی اکسیدان شناخته شده است که سوبسترای چندین آنزیم آنتی اکسیدان می باشد. N- استیل سیتئین همچنین می تواند با شکستن پیوند دی سولفیدی، گروه تیول را از پروتئینها جدا و پروتئینها را احیاء کند (۲۶). N- استیل سیتئین به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدانی، شلات کننده رادیکالهای آزاد است، آنزیم های آنتی اکسیدان را فعال کرده و مانع استرس اکسیداتیو می شود (۲۷). در مطالعه Poli و همکاران مشخص شد که N- استیل سیتئین، روی و ویتامین D قادرند آسیب های بافتی ایجاد شده به واسطه کادمیوم را در کبد و کلیه رت های نژاد ویستار کاهش دهند (۲۸). در مطالعه Lin و همکاران مشخص شد که N- استیل سیتئین بواسطه خاصیت آنتی اکسیدانی، باعث کاهش آسیب های مجاری

همکاران با مواجهه ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم از استات سرب به مدت چهار هفته در رت، آسیب اکسیداتیو در کبد و بیضه مشاهده شد (۱۸). در مطالعه Winiarska-Mieczan در مواجهه رت ها با سرب و کادمیوم گزارش شد که جذب و تجمع سرب چه از طریق آب آشامیدنی و چه از طریق غذا بیشتر از جذب و تجمع کادمیوم در بافتها است. همچنین بیشترین تجمع سرب در بافتها به ترتیب در کبد، کلیه ها، مغز، طحال و قلب گزارش شد (۱۹). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که سرب باعث افزایش التهاب و تغییرات ساختاری و آسیب بافتی کبد (بخصوص در شرایط دریافت دوز پیوسته سرب) می شود.

در مطالعه Li و همکاران بر مغز رت های مواجهه یافته با سرب، افزایش بیان بیان ژنهای MMP2 و MMP9 به همراه عوارض نوروتوکسیک گزارش شد (۲۰). در مطالعه کسایی زاده و همکاران مشخص شد که کادمیوم باعث افزایش بیان ژنهای MMP2 و MMP9 در کبد موشهای صحرایی می شود (۲۱). در مطالعه González-Puebla و همکاران در زنان باردار با دریافت سرب بیشتر از  $4 \mu\text{g}/\text{dl}$  افزایش بیان MMP2 و MMP9 بیشتر از زنان بارداری بود که سرب کمتر از  $4 \mu\text{g}/\text{dl}$  دریافت کرده بودند. افزایش بیان MMP2 و MMP9 با افزایش ناهنجاری های جفت، تولد زودرس و سقط جنین همراه است (۲۲). در مطالعه Naim و همکاران نشان داده شد که افزایش MMP2 در فیبروز کبدی و افزایش MMP9 در آسیب های ایسکمی و ریپرفیوژن کبدی مشاهده می شود (۲). در مطالعه Liu و همکاران مشاهده شد که در رت های دریافت کننده سرب، با افزایش بیان MMP2 و MMP9 بواسطه خاصیت متالوپروتئازی باعث از دست دادن یا نشت سد مغزی شده و باعث آسیب به مغز می شوند (۲۳). در مطالعه حاضر نیز افزایش بیان این دو ژن بعد از مواجهه با سرب در کبد رت های گروه های P1 و P2 مشاهده شد که همراه با آسیب

### نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص شد که بیان *MMP2* و *MMP9* در کبد رت های مواجهه یافته با سرب افزایش یافته و با افزایش تجزیه ماتریکس خارج سلولی در کبد باعث آسیب به این بافت می شوند. لذا استفاده همزمان N-استیل سیستئین با سرب، با کاهش بیان این دو ژن باعث کاهش تجزیه ماتریکس خارج سلولی و کاهش عوارض بافتی سرب شد.

### تعارض منافع

نویسندگان مقاله تعارض در منافع ندارند.

### فهرست منابع

1. Matysiak-Kucharek M, Czajka M, Sawicki K, Kruszewski M, Kapka-Skrzypczak L. Effect of nanoparticles on the expression and activity of matrix metalloproteinases. *Nanotechnology Reviews*. 2018;7(6):541-53.
2. Naim A, Pan Q, Baig MS. Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Liver Diseases. *J Clin Exp Hepatol*. 2017;7(4):367-72. Epub 2017/10/03.
3. Bogdanos DP, Gao B, Gershwin ME. Liver immunology. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(2):567-98. Epub 2013/05/31.
4. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2015;44-46:147-56. Epub 2015/01/21.
5. Renu K, Chakraborty R, Myakala H, Koti R, Famurewa AC, Madhyastha H, et al. Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel

کلیوی بعد از مواجهه با سرب در رت های نژاد Sprague-Dawley شد (۲۹). در مطالعه حاضر مشاهده شد که N-استیل سیستئین باعث کاهش عوارض آسیب بافت کبدی در رت های مواجهه یافته با سرب از طریق کاهش تجزیه ماتریکس خارج سلولی در کبد شد. این کاهش عوارض بواسطه کاهش بیان *MMP2* و *MMP9* در رت های گروه پنج (دوز پیوسته سرب و دوز پیوسته NAC) به طور معنی دار نسبت به گروه سه (دوز پیوسته سرب) مشاهده شد. این امر، بخاطر عوارض بیشتر دوز پیوسته سرب در کبد رت ها بود که به همان نسبت N-استیل سیستئین توانسته بطور معنی داری کاهش آسیب ها را از مسیرهای مختلف از جمله کاهش بیان این دو ژن مهم باعث شود.

and Cadmium) - induced hepatotoxicity – A review. *Chemosphere*. 2021;271:129735.

6. Patra RC, Rautray AK, Swarup D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet Med Int*. 2011;2011:457327.-
7. Moradi R, Nazeri Z, Azizidoost s, Cheraghzadeh M, Kheirollah A. Evaluating the Level of Malondialdehyde (MDA) in Sialic Acid-Treated Human Astroglia. 2019. 2019:7. Epub 2019-06-27.
8. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(8):4117-29. Epub 2013/04/27.
9. Moldéus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung Protection by a Thiol-Containing Antioxidant: N-Acetylcysteine. *Respiration*. 1986;50(suppl 1)(Suppl. 1):31-42.
10. Dekhuijzen PNR. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*. 2004;23(4):629-36.



**11.** Andjelkovic M, Djordjevic AB, 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;16:1-21.

**12.** 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.

**13.** 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.

**14.** 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. *Scientific reports*. 2017;7:44819.

**15.** Zhai Q, Narbad A, Chen W. Dietary strategies for the treatment of cadmium and lead toxicity. *Nutrients*. 2015;7(1):552-71. Epub 2015/01/17.

**16.** Meki A-R, Alghasham A, El-Deeb E-S. Effect of green tea extract on lead toxicity in different organs of rats. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2011;5(2 Suppl 1):12-5.

**17.** Shaban El-Neweshy M, Said El-Sayed Y. Influence of vitamin C supplementation on lead-induced histopathological alterations in male rats. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2011;63(3):221-7. Epub 2010/01/09.

**18.** Abdelhamid FM, Mahgoub HA, Ateya AI. Ameliorative effect of curcumin against lead acetate-induced hemato-biochemical alterations, hepatotoxicity, and testicular oxidative damage in rats.

*Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27(10):10950-65.

**19.** 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. *Biological Trace Element Research*. 2016;169(2):230-6. Epub 2015/06/27.

**20.** Li N, Li X, Li L, Zhang P, Qiao M, Zhao Q, et al. Original Research: The expression of MMP2 and MMP9 in the hippocampus and cerebral cortex of newborn mice under maternal lead exposure. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016;241(16):1811-8. Epub 2016/05/02.

**21.** Kasaezadeh F, Asghari-Moghaddam N, Shahla S. The Effect of Crocin on the Expression of MMP-2 and MMP-9 Genes in the Liver Tissue of Cadmium-Treated Rats: A Short Report. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2021;19(10):1123-30.

**22.** González-Puebla E, González-Horta C, Infante-Ramírez R, Sanin LH, Levario-Carrillo M, Sánchez-Ramírez B. Altered expressions of MMP-2, MMP-9, and TIMP-2 in placentas from women exposed to lead. *Human & Experimental Toxicology*. 2012;31(7):662-70.

**23.** Liu X, Su P, Meng S, Aschner M, Cao Y, Luo W, et al. Role of matrix metalloproteinase-2/9 (MMP2/9) in lead-induced changes in an in vitro blood-brain barrier model. *Int J Biol Sci*. 2017;13(11):1351-60.

**24.** Winiarska-Mieczan A. The potential protective effect of green, black, red and white tea infusions against adverse effect of cadmium and lead during chronic exposure - A rat model study. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*. 2015;73(2):521-9. Epub 2015/10/17.

**25.** Winiarska-Mieczan A. Protective effect of tannic acid on the brain of adult rats exposed to cadmium and lead. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2013;36(1):9-18. Epub 2013/03/30.

**26.** Wang SX, Zhang XZ, Cai SX, Du HK, Zhang SW. [The expression of lung nitric oxide synthase in rat exposed to silica]. *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi = Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi = Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases*. 2004;22(1):51-3. Epub 2004/03/23.

**27.** Żukowski P, Maciejczyk M, Matczuk J, Kurek K, Waszkiel D, Żendzian-Piotrowska M, et al. Effect of N-Acetylcysteine on

Antioxidant Defense, Oxidative Modification, and Salivary Gland Function in a Rat Model of Insulin Resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018:6581970.

**28.** Poli V, Madduru R, Aparna Y, Kandukuri V, Motireddy SR. Amelioration of Cadmium-Induced Oxidative Damage in Wistar Rats by Vitamin C, Zinc and N-Acetylcysteine. *Med Sci (Basel)*. 2022;10(1). Epub 2022/03/01.

**29.** Lin W, Zhenyong W, Jianzhu L. Protective effect of N-acetylcysteine on experimental chronic lead nephrotoxicity in immature female rats. *Human & Experimental Toxicology*. 2010;29(7):581-91.



## Evaluation of metalloproteinases *MMP2* and *MMP9* expression in liver of male Wistar rats exposure to Lead and N-acetylcysteine

Najmeh Ranji<sup>1</sup>, Hadi Habibollahi<sup>2</sup>, Reihaneh Kochakinegad<sup>3</sup>, Eisa Vefghi<sup>4</sup>, Mohammad Mehdi Jafarzadeh<sup>5</sup>

1- Associate professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. Corresponding Author: [na.ranji@iau.ac.ir](mailto:na.ranji@iau.ac.ir)

2- Assistant professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

3- PhD, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

4- PhD, Alborz Pathobiology laboratory, Rasht, Iran.

5- PhD, Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Received:2023.06. 15

Accepted: 2023.09.30

### Abstract

**Background & Aim:** Matrix metalloproteinases (MMPs) as MMP2 and MMP9 degrade extracellular matrix. Lead (Pb) is a well-known environmental contaminant which could impair the activity of MMPs. The aim of this study was to investigate the effects of N-acetylcysteine, as an antioxidant, on the expression of *MMP2* and *MMP9* genes in the liver of rats exposed with Pb.

**Materials & Methods:** In this study, the 30 male rats were randomly divided into five groups(n=6): 1) control, 2) acute dose of Pb (70 mg/kg), 3) acute dose of Pb (70 mg/kg) + continuous administration of NAC (50 mg/kg), 4) chronic dose of Pb (2 mg/kg), and 5) chronic dose of Pb (2 mg/kg) + continuous administration of NAC (50 mg/kg). Acute dose of Pb was administrated on the first day of study and chronic dose of Pb and Continuous administration of NAC was used every day for 4 weeks as gavage. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was used to study histopathological changes. The expression of *MMP2* and *MMP9* genes was evaluated using Quantitative RT-PCR

**Results:** In the liver of rats exposed with Lead (Pb) especially at chronic dose, was observed structural abnormality and increased inflammatory. Q-RT-PCR analysis showed the expression of *MMP2a* and *MMP9* genes increased in Pb exposed liver and decreased in NAC administrated liver after Pb exposure.

**Conclusion:** Our results suggest that NAC can protect the liver of rats through downregulation of metalloproteinases after Pb exposure and decrease inflammation and tissue damage.

**Keywords:** Liver, *MMP2*, *MMP9*, N-acetylcysteine, Pb, Rat.