

# بررسی اثر تزریق عامل سلول بنیادی بر میزان فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون-اس- ترانسفراز و بهبود آسیب‌های بافتی در کبد موش‌های تحت مسمومیت حاد با استامینوفن

سید علی هاشمی<sup>۱</sup>، محمد سجاد امامی آل آقا<sup>۱</sup>، محسن امامی آل آقا<sup>۲</sup>، عبدالامیر علامه<sup>۳\*</sup>

- ۱- کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
- ۳- استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی  
Email: allameha@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۷/۰۱

دریافت مقاله: ۹۳/۰۳/۰۳

## چکیده

**هدف:** دوزهای بالای استامینوفن ایجاد آسیب‌های کبدی می‌کند. عامل سلول بنیادی و گیرنده آن c-kit باعث بهبود آسیب‌های کبدی ناشی از سمیت استامینوفن می‌شوند. مطالعه حاضر به بررسی اثر فاکتور سلول بنیادی بر فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون-اس- ترانسفراز در سمیت استامینوفن پرداخته است.

**مواد و روش‌ها:** ۴۵ سر موش نر نژاد Balb/c به ۳ دسته هر یک شامل ۳ گروه (هر گروه ۵ سر) تقسیم شدند: (۱) تزریق ۳۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن استامینوفن درون صفاقی (۲) تیمار با ۴۰ میکروگرم / کیلوگرم وزن بدن فاکتور سلول بنیادی، ۳۰ دقیقه پس از تزریق استامینوفن (۳۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن) و (۳) تیمار با نرمال سالین (گروه کنترل). دسته موش‌ها به ترتیب پس از ۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت کشته شدند. ارزیابی سمیت با آسیب‌شناسی کبد و سنجش نشانگرهای سرمی آسیب کبدی (آلانین آمینو ترانسفراز و آسپاراتات آمینو ترانسفراز) در موش‌های دسته ۲۴ ساعت انجام شد. میزان پروتئین c-kit، و فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون-اس- ترانسفراز سنجش شد.

**نتایج:** مشاهدات هیستوپاتولوژی و افزایش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) سطح آلانین آمینو ترانسفراز و آسپاراتات آمینو ترانسفراز، سمیت کبدی ناشی از تزریق دوز ۳۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن از استامینوفن را نشان داد. فاکتور سلول بنیادی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت گلوکاتایون-اس- ترانسفرازها و کاهش معنی‌دار در میزان پروتئین c-kit پس از ۲۴ ساعت شد.

**نتیجه‌گیری:** اتصال فاکتور سلول بنیادی به گیرنده آن (c-kit) در کبد باعث بهبود آسیب‌های کبدی ناشی از استامینوفن به واسطه افزایش فعالیت گلوکاتایون-اس- ترانسفرازها در کبد موش می‌شود.

**کلیدواژگان:** عامل سلول بنیادی، استامینوفن، سمیت کبدی، گلوکاتایون-اس- ترانسفرازها

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، صفحات: ۷۵-۸۷

## مقدمه

دوز: (Over Dose) که به صورت آگاهانه و ناآگاهانه انجام می‌شود، منجر به آسیب‌های حاد کبدی می‌شود [۱-۴]. سمیت

استامینوفن (APAP) در دوزهای درمانی آن یک داروی مسکن و تب‌بر است، اما مصرف بیش از دوز درمانی آن (آور

## تعدیل سمیت استامینوفن توسط عامل سلول بنیادی

می‌شود. تاکنون تحقیقات فراوانی در ارتباط با آثار درمانی مواد و ترکیبات مختلف بر بهبود یا جلوگیری از مسمومیت ناشی از استامینوفن انجام گرفته است. عامل‌های رشد از جمله ترکیبات مورد استفاده در درمان مسمومیت ناشی از استامینوفن و بهبود آسیب‌های کبدی است [۱۸-۲۱]. آنتی دت (Antidote) عامل رشد شبه انسولینی - I (Insulin-Like Growth Factor 1)، باعث آثار محافظتی در رده‌های سلولی چانگ کبدی (Chang Cell Line) درگیر در مسمومیت ناشی از استامینوفن می‌شود [۲۲]. عامل سلول‌های بنیادی (Stem Cells Factor: SCF) یا کیت لیگاند (Kit Ligand) یک عامل رشد پپتیدی متصل به غشای سیتوپلاسمی است و همچنین توسط آنزیم‌های پروتئازی نظیر ماتریکس متالوپپتیداز-۹ (Matrix Metalloproteinase 9: MMP-9) از غشا جدا شده و یک سیتوکین محلول در پلاسما را تولید می‌نماید [۲۳].

تزریق SCF با منشا خارجی باعث افزایش روند بازسازی سلول‌های کبدی در موش‌هایی با ۷۰ درصد هیپاتکتومی (Hepatectomy) می‌شود [۲۴]. بیان ژن‌های مربوط به پروتئین‌های SCF و c-kit بعد از مسمومیت ناشی از استامینوفن در آسیب‌های کبدی افزایش می‌یابد. همچنین تزریق SCF با منشا خارجی باعث کاهش مرگ و میر در موش‌ها و تکثیر هیپاتوسیت‌ها شده و از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) ناشی از استامینوفن جلوگیری می‌کند [۲۴، ۲۵]. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر تزریق SCF بر فعالیت آنزیم‌های GST در کبد موش‌های تحت مسمومیت حاد با یک دوز سمی استامینوفن است.

## مواد و روش‌ها

### مواد

استامینوفن از شرکت Sigma (آمریکا)، تریس باز (Tris Base)، گلوکاتینون، آلومین سرم گاوی، Dithio nitro benzoic و CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) از

حاد ناشی از استامینوفن، به علت اهمیت بالینی آن یکی از مدل‌های رایج برای مطالعات سم‌شناسی آسیب‌های کبد و کلیه محسوب می‌شود و مکانیسم‌های مولکولی دخیل در آن تا حدودی مشخص شده است [۵]. استامینوفن در دوزهای درمانی به وسیله دو مکانیسم سولفاسیون (Sulfation) و گلوکوروئیداسیون (Glucuronidation) کونژوگه شده و از طریق سیستم گردش خون و صفرا از بدن دفع می‌شود. افزایش دوز (دوز سمی) استامینوفن موجب فعال شدن آنزیم CYP2E1 میکروزومی (کلاس اصلی سیتوکروم P450 در متابولیسم استامینوفن) می‌شود [۶]، که در نتیجه استامینوفن تبدیل به یک متابولیت ناپایدار و واکنشگر به نام ان-استیل پاراکوئینو بنزن (N-Acetyl-P-Benzoquinone Imine: NAPQI) می‌شود و قادر است به مولکول‌های حیاتی نظیر چربی‌ها و پروتئین‌ها در ساختار سلول آسیب برساند و فرآیند مرگ و تخریب سلولی را فراهم نماید. همچنین علاوه بر CYP2E1 آنزیم‌های CYP3A و CYP1A2 نیز در تشکیل NAPQI در میکروزوم کبد انسان مشارکت می‌کنند [۷-۱۱]. NAPQI به صورت آنزیمی به وسیله آنزیم‌های گلوکوتاتیون-اس-ترانسفراز (Glutathione S-Transferases: GSTs) مثل GST Pi یا به صورت خود به خودی با گلوکوتاتیون (GSH) درون سلول کونژوگه می‌شود و در این حالت فعالیت چندانی ندارد. اما مصرف بیش از دوز درمانی استامینوفن منجر به تخلیه GSH سلولی می‌شود [۱۲-۱۵]. این اتفاق به NAPQI اجازه می‌دهد تا به پروتئین‌های سلولی متصل شود و از طرفی دیگر باعث پراکسیداسیون لیپیدها در سلول شده و ایجاد آسیب کبدی می‌کند [۱۶، ۱۷].

GSTها یک خانواده چند ژنی از آنزیم‌های دیمری است که دارای نقش حیاتی کاتالیتیک در سم‌زدایی مواد الکتروفیل به طریق کونژوگاسیون با گلوکوتاتیون احیا است. کونژوگاسیون داروها و مواد زنبیوتیک (Xenobiotic) با گلوکوتاتیون به وسیله آنزیم‌های GST منجر به دفع سریع‌تر آن‌ها توسط پروتئین‌های انتقال دهنده (Multidrug Resistance Protein) MRP است

موش) تقسیم و به شرح زیر تیمار شدند: گروه اول؛ تیمار با ۳۰۰ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن استامینوفن درون صفاقی، گروه دوم؛ تیمار با ۴۰ میکروگرم / کیلوگرم وزن بدن SCF، ۳۰ دقیقه پس از تزریق استامینوفن (۳۰۰ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن) و گروه سوم؛ تیمار با نرمال سالین (گروه کنترل). دسته‌های موش‌ها به ترتیب در فواصل زمانی ۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از دریافت تیمار با اتیل اتر بیهوش شدند و پس از خونگیری از قلب از بافت کبد نمونه برداری شد. با نگاهی به مطالعات گذشته [۲۶] و انجام مطالعات پایلوت برای تعیین دوز دقیق دارو، دوز مناسب استامینوفن برای ایجاد سمیت در این مطالعه (۳۰۰ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن) در نظر گرفته شد. تعیین دوز مناسب از SCF نیز بر اساس مطالعه انجام شده توسط سیمپسون (Simpson) و همکاران انجام شد [۲۵].

همچنین برشی از بافت کبد با چاقوی جراحی تهیه شد و در فرمالین ۱۰ درصد، به منظور تهیه لام آسیب‌شناسی در آزمایشگاه هیستوپاتولوژی نگهداری شد.

## روش اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدید

### (Malondialdehyde: MDA)

معرف TBA (Thiobarbitoric Acid) ذخیره حاوی تری کلردریک اسید (TCA) ۱۵ درصد (وزنی - حجمی)، تری باربیتوریک اسید (TBA) ۰/۳۷۵ درصد (وزنی - حجمی) و هیدروکلریدریک اسید (HCL) ۰/۲۵ نرمال است. همگن ۲۰ درصد بافت کبد به مدت ۵ دقیقه در دور پایین سانتریفوژ شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی به لوله در دار منتقل شد و به آن ۲ میلی‌لیتر از TBA اضافه شد و ورتکس (Vortex) شد. در لوله بسته شده و سپس ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن لوله در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه با قدرت ۵۰۰ سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ اگر محلول رویی باز هم کدر باشد، می‌توان آن را با بوتانل استخراج کرد. جذب محلول رویی در مقابل بلانک در ۵۳۵ نانومتر توسط دستگاه خوانده شد. اساس اندازه‌گیری بر اساس اتصال TBA به MDA و

شرکت Merck (آلمان) خریداری شد. کیت‌های سنجش میزان آلانین آمینو ترانسفراز (Alanine Aminotransferase: ALT) و آسپاراتات آمینو ترانسفراز (Aspartate Aminotransferase: AST) از شرکت Biosystems (اسپانیا) خریداری شد. عامل سلول بنیادی نو ترکیب موشی (rmSCF) از شرکت Invitrogen (آمریکا) خریداری شد که به صورت ۲۵ میلی‌گرم پودر لیوفلیزه بود. این محصول درای ۱۶۷ آمینواسید و ۱۸/۵ کیلو دالتون وزن و دارای درصد خلوص بالاتر از ۹۵ درصد است. آنتی‌بادی اولیه علیه پروتئین c-kit موشی تهیه شده از سرم بز - و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با پراکسیداز هورس رادیش (Horseradish Peroxidase) - ضد IgG بزی - تهیه شده از سرم خرگوش - به ترتیب از شرکت‌های Santa Cruz (آمریکا) و رازی طب خریداری شد.

تمامی مواد دیگر مورد استفاده در این آزمایش دارای درصد خلوص بالا بود و از شرکت‌های معتبر Sigma یا Merck خریداری شد.

## حیوانات

موش‌های نژاد Balb/c، نر بالغ (سن ۸ تا ۱۰ هفته)، با وزن تقریبی ۲۵ گرم ( $\pm 2$ ) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس تا قبل از انجام آزمایش‌ها نگهداری شد. حیوانات در شرایط معمول تغذیه با دسترسی آزادانه به آب و غذا بودند اما به منظور حذف اثر مداخله‌ای میزان مصرف غذا بر آزمایش‌ها، از ۱۲ ساعت قبل از دریافت تیمار، موش‌ها تحت محرمیت از غذا (نه آب) قرار گرفتند.

تمامی آزمایش‌های انجام شده روی حیوانات، مطابق با قوانین کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

## نحوه تیمار حیوانات

در این مطالعه ۴۵ سر موش به سه دسته ۱۵ تایی تقسیم شدند و هر دسته خود به سه گروه (هر گروه شامل ۵ سر

۴۱۲ نانومتر خوانده شد.

### سنجش پروتئین C-kit به روش الایزا

در تحقیق حاضر از الایزای ( Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) غیر مستقیم برای مقایسه سطح بیان پروتئین C-kit بین نمونه‌های بافت کبد موش‌های تحت تیمار APAP و تیمار APAP+SCF و نمونه‌های کنترل در ساعات ۱۲ و ۲۴ ساعت استفاده شده است. در این روش پس از پوشاندن سطح چاهک‌های پلیت ELISA با نمونه‌های استخراج شده از بافت کبد موش‌ها، آنتی‌بادی اولیه و ثانویه به‌منظور شناسایی و سنجش سطح آنتی‌ژن به‌کار گرفته می‌شود. مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت کبد توزین شد و ۰/۲۵ میلی‌لیتر محلول رویی جدا شده و پس از سنجش غلظت پروتئین، برای انکوباسیون در چاهک‌های پلیت ELISA مورد استفاده قرار گرفت. از بافر RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer) حاوی مهارکننده پروتئاز (Sigma، آمریکا) با غلظت ۱ درصد (حجمی/حجمی) و فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF) (Sigma، آمریکا) با غلظت ۱ میلی‌مولار توسط هموژنایزر (Hemogenizer) همگن شد. همگن تهیه شده بین ۵-۱۵ دقیقه در داخل ظرف یخ نگهداری شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ شد. به‌منظور بررسی نمودار جذب نوری (۴۵۰ نانومتر) در مقابل غلظت نمونه، رقت‌های مختلف از محلول حاصل از مرحله قبل، با استفاده از فسفات بافر سالین (Phosphate Buffered Saline: PBS) (۷/۴ = pH) تهیه شد و پس از اندازه‌گیری جذب نوری نمونه‌ها که به‌صورت دوتایی تهیه شده بود، نمودار مذکور رسم شد. با توجه به نمودار، دامنه غلظتی که در آن رابطه خطی بین مؤلفه‌های نمودار برقرار باشد تعیین شد و برای سنجش آنتی‌ژن (c-Kit) در نمونه‌ها استفاده شد.

سنجش پروتئین C-kit با استفاده از روش ELISA غیرمستقیم که به‌صورت متداول در تحقیقات گذشته به‌کار رفته است، انجام شد [۲۹]. به این صورت که ۱۰۰ میکرولیتر

تشکیل یک محصول به رنگ ارغوانی است. با اندازه‌گیری میزان جذب نوری این محصول در طول موج ۵۳۵ نانومتر غلظت MDA موجود در نمونه اندازه‌گیری می‌شود. ضریب خاموشی MDA  $10^5 \times 1/56$  در سانتی‌متر در مول است و نتیجه مقدار پراکسیداسیون را به‌صورت میزان MDA تشکیل شده بیان می‌کند [۲۷].

### سنجش گلوکوتائون احیا در بافت کبد

سنجش گلوکوتائون با روش لینسی و سدلاک ( Sedlak & Lindsay) انجام گرفت [۲۸]. در این روش از دی تیو نیترو بنزن (Dithionitro-Benzoic Acid: DTNB) که معرف المن (Elman Indicator) است استفاده می‌شود. این ترکیب شیمیایی به‌منظور اندازه‌گیری غلظت یا تعداد گروه‌های تیول در یک نمونه به‌کار برده می‌شود. ریشه‌های تیول با معرف واکنش داده و منجر به شکست باندهای سولفیدی می‌شود. نتیجه این واکنش تولید ترکیب شیمیایی ۲- نیترو، ۵-تیو بنزوات (2-Nitro-5-Thiobenzoate: NTB) است که در آب یا pH قلیایی و خشی، یونیزه شده و تولید رنگ زرد می‌کند. جذب نوری ترکیب یونیزه NTB<sup>2-</sup> در ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت گروه‌های تیول با استفاده از ضریب خاموشی  $1 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  در ۱۴۱۵۰ در محلول بافری اندازه‌گیری شد [۲۸].

۱۰۰ میلی‌گرم بافت در ۴ میلی‌لیتر اتیل ان دی آمین تترا استیک اسید (Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) ۰/۰۲ مولار همگن شد. به ۲/۵ میلی‌لیتر از این همگن ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول TCA (Trichloroacetic Acid) ۵۰ درصد اضافه شد و به‌مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه توسط ورتکس مخلوط شد. سپس مخلوط به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰ دور و در دمای اتاق سانتریفوژ شد تا پروتئین‌های بافتی کاملاً رسوب کند. ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۴ میلی‌لیتر محلول تریس ۰/۴ مولار حاوی EDTA ۰/۲ مولار (pH = ۸/۹) و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول DTNB ۰/۰۱ مولار مخلوط شد و بلافاصله جذب نوری آن در طول موج

این مطالعه پارامتر زمان و فواصل زمانی بین هر قرائت، به ترتیب ۳ و ۱ دقیقه در نظر گرفته شد. محلول‌های واکنش که شامل ۵۰ میکرولیتر ۲۰ میلی‌مولار گلوکوتایون، ۵۰ میکرولیتر CDNB ۲۰ میلی‌مولار، ۸۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر نمونه بود، مخلوط شد و به داخل کوت (Cuvette) ریخته و در داخل دستگاه قرار داده شد تا تغییرات جذب آن در واحد زمان توسط دستگاه اندازه‌گیری و به صورت نمودار نشان داده شود. شیب این نمودار بیانگر سرعت تغییرات جذب در واحد زمان است. تهیه نمونه بلانک دقیقاً مشابه نمونه آزمایش است. با این استثنا که در آن همگن بافت استفاده نمی‌شود.

اندازه‌گیری میزان پروتئین تام و سطح فعالیت سرمی آنزیم‌های ALT، AST توسط کیت‌های تجاری شرکت Biosystems (اسپانیا) انجام گرفت.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آمار غیرپارامتری استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار استاندارد بیان شده است. برای مقایسه میانگین بین دو گروه از آزمون غیرپارامتری من-ویتنی (Mann-Whitney) و برای مقایسه میانگین بیش از دو گروه از معادل غیرپارامتری آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way Analysis of Variance: ANOVA)، یعنی آزمون کوریسکال-والیس (Kuriskal-Wallis) استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### نتایج

شکل ۱ میزان MDA در کبد موش‌های گروه‌های کنترل و تیمار (شامل استامینوفن و استامینوفن + SCF) در ساعات مختلف (۱، ۱۲ و ۲۴) پس از تیمار را نشان می‌دهد. طبق این نمودار تزریق دوز ۳۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن

از نمونه حاوی آنتی‌ژن (C-kit) به درون چاهک‌های پلیت پلی استایرن (Nunc، دانمارک) ریخته شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. چاهک‌ها ۵ بار با تریس بافر سالین توئین‌دار (Tris-Buffered Saline and Tween 20: TBS-T) حاوی ۰/۱ درصد توئین ۲۰ شسته شد. ۳۰۰ میکرولیتر از بافر مسدود کننده (بلاکینک) حاوی آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) ۲ درصد به درون چاهک‌ها ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد.

پس از ۵ بار شستشو با بافر TBS-T، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی اولیه Anti c-kit polyclonal goat anti mouse C-kit به درون هر چاهک ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۵ بار با بافر TBS-T شسته شد. ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه HRP- conjugated rabbit anti goat IgG antibody به درون هر یک از چاهک‌ها ریخته شد و نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد.

پس از ۵ بار شستشو با بافر TBS-T، سوبسترای آنزیم پراکسیداز تترا متیل بنزیدین (TMB) به درون چاهک‌ها ریخته شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق ۵۰ میکرولیتر محلول توقف واکنش ( $0.36 \text{ H}_2\text{SO}_4$  مولار) به درون چاهک‌ها اضافه شد و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت گر میکروپلیت (Microplate Reader) خوانده شد. تمامی سنجش‌ها با دو بار تکرار انجام شد.

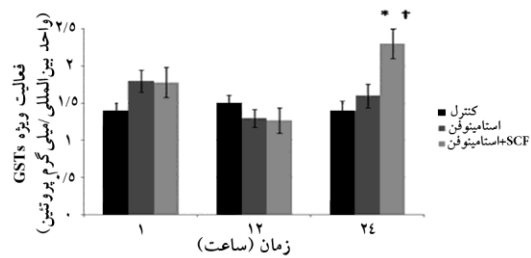
در این تحقیق برای بررسی فعالیت GSTs از سوبسترای ۱ کلسو-۲-۴-دی نیتروبنزن (CDNB) به عنوان یک سوبسترای عمومی برای کلاس‌های مختلف آنزیم‌های GST کبد استفاده شد. واکنش گلوکوتایون با CDNB در مجاورت GSTs تولید محصولی کمپلکسی می‌کند که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد دارای بیشترین جذب در ۳۴۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ (Nanodrop) است [۳۰].

از آن جایی که باید تغییرات جذب را در حداقل زمان ممکن که برای GSTs برابر ۳ دقیقه است، اندازه‌گیری کرد، در

### تعدیل سمیت استامینوفن توسط عامل سلول بنیادی

می‌شود، این تغییرات در ساعات ۱ و ۱۲ از نظر آماری معنی‌دار است اما در ۲۴ ساعت معنی‌دار نیست. نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده است.

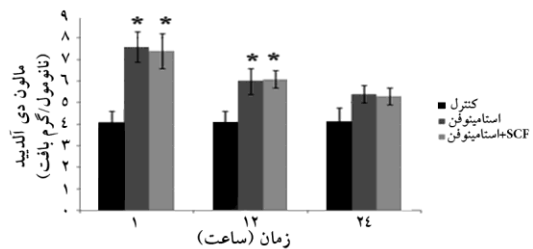
فعالیت ویژه آنزیم‌های GST با استفاده از سوبسترای CDNB (1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene) در زمان‌های ۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق دوز ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن استامینوفن اندازه‌گیری شد (شکل ۳). طبق شکل ۳، فعالیت آنزیم‌های GST در گروه تیمار شده با استامینوفن توأم با SCF (APAP+SCF) دارای افزایش ۱/۶ برابری نسبت به گروه کنترل بود که این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار است. نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده است.



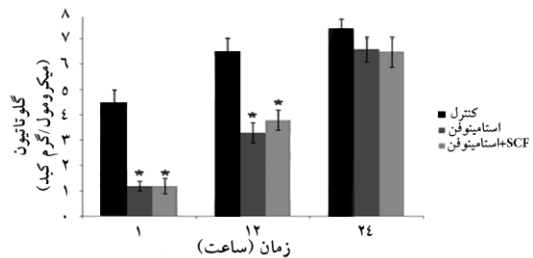
شکل ۳ فعالیت ویژه آنزیم‌های GST بافت کبد در زمان‌های ۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار استامینوفن یا استامینوفن + SCF در مقایسه با گروه‌های کنترل (تیمار شده با نرمال سالین). (\* به معنی وجود تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل و † به معنی تفاوت معنی‌دار گروه APAP+SCF با گروه APAP است).

به‌منظور مقایسه میزان پروتئین c-kit گروه‌های تیمار و کنترل، با استفاده از روش متداول ELISA میزان جذب نوری محصول واکنش ELISA که برآوردی از میزان اتصال آنتی‌بادی اولیه ضد c-kit به گیرنده c-kit است، در طول موج ۴۵۰ نانومتر سنجش شد و نتایج آن در شکل ۴ ارائه شده است. طبق این نمودار میزان پروتئین c-kit در گروه تیمار شده با استامینوفن دارای افزایش به‌ترتیب ۱/۴ و ۱/۳ برابری نسبت به گروه‌های کنترل و استامینوفن + SCF است که هر دو از نظر آماری معنی‌دار است. نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده است.

استامینوفن توأم با تیمار ۴۰ میکروگرم / کیلوگرم وزن بدن SCF (بعد از ۳۰ دقیقه) یا در غیاب آن باعث افزایش سطح MDA در بافت کبد موش‌ها در ۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد می‌شود، این تغییرات در ساعات ۱ و ۱۲ از نظر آماری معنی‌دار است اما در ۲۴ ساعت معنی‌دار نیست. نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده است.



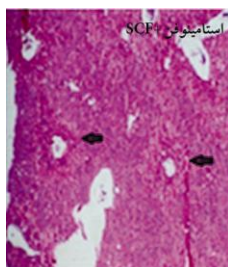
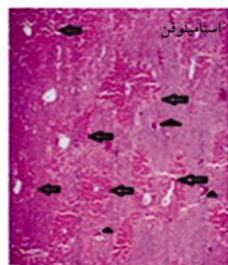
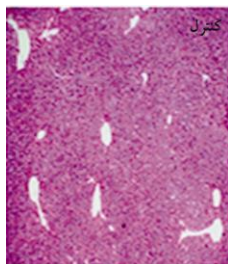
شکل ۱ میزان MDA بافت کبد در زمان‌های ۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار استامینوفن یا استامینوفن + SCF در مقایسه با گروه‌های کنترل (تیمار شده با نرمال سالین). (\* به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل است).



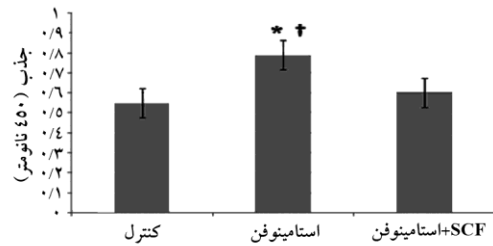
شکل ۲ میزان گلووتاتیون بافت کبد در زمان‌های ۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار استامینوفن یا استامینوفن + SCF در مقایسه با گروه‌های کنترل (تیمار شده با نرمال سالین). (\* به معنی وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل است).

شکل ۲ سطح گلووتاتیون در کبد موش‌های گروه‌های کنترل و تیمار (شامل استامینوفن و استامینوفن + SCF) در ساعات مختلف (۱، ۱۲ و ۲۴) پس از تیمار را نشان می‌دهد. طبق این نمودار تزریق دوز ۳۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن استامینوفن توأم با تیمار ۴۰ میکروگرم / کیلوگرم وزن بدن SCF (بعد از ۳۰ دقیقه) یا در غیاب آن باعث کاهش سطح MDA در بافت کبد موش‌ها در ۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد

شکل ۵ نشان می‌دهد که نمونه‌های گروه کنترل کاملاً از نظر بافت‌شناسی (هیستولوژی) طبیعی و فاقد مناطقی با نکروز (Necrosis) وسیع است. در گروه تیمار شده با استامینوفن مناطق وسیع نکروتیک در اطراف سیاهرگ مرکزی دیده شد. علاوه بر مناطق نکروتیک، خونریزی (هموراژ: Hemorrhage) در داخل بافت کبد گروه تیمار شده با استامینوفن نیز دیده شد. طبق نظر آسیب‌شناس در گروه تیمار شده با استامینوفن توأم با SCF اگرچه مناطق نکروتیک قابل مشاهده است اما وسعت و میزان این مناطق در مقایسه با گروه تیمار شده با استامینوفن به طور قابل توجهی کاهش یافته است. همچنین شدت هموراژ نیز در گروه تیمار شده با استامینوفن توأم با SCF کاهش قابل توجهی را نشان داده است.



شکل ۵ بررسی هیستوپاتولوژیک (Histopathology Study) بافت کبد در زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار استامینوفن یا استامینوفن + SCF در مقایسه با گروه کنترل (تیمار شده با نرمال سالین) (بزرگنمایی  $\times 40$ ). وجود برخی مناطق نکروتیک در اطراف سیاهرگ‌های مرکزی با علامت  $\leftarrow$  و هموراژ با علامت  $\blacktriangle$  مشخص شده است.



شکل ۴ مقایسه میزان پروتئین گیرنده c-kit در بافت کبد موش‌ها در زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار استامینوفن یا استامینوفن + SCF در مقایسه با گروه کنترل (تیمار شده با نرمال سالین). (\*به معنی وجود تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل و † به معنی تفاوت معنی‌دار گروه APAP با گروه APAP+SCF است).

جدول ۱ میزان فعالیت آنزیم‌های سرمی ALT و AST را در گروه‌های تیمار و کنترل، ۲۴ ساعت پس از تیمار نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول نشان داده شده است میزان فعالیت ALT در زمان ۲۴ ساعت پس از تزریق دوز ۳۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن استامینوفن به ترتیب به میزان ۱۰/۷ و ۲/۱۳ برابر نسبت به گروه‌های کنترل و گروه استامینوفن + SCF، افزایش نشان می‌دهد که هر دو این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار است. همچنین جدول ۱ نشان می‌دهد که میزان فعالیت AST در گروه تیمار شده با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن استامینوفن دارای افزایش میزان ۴/۲ برابری نسبت به گروه‌های کنترل است که این افزایش نیز از نظر آماری معنی‌دار است و همچنین دارای افزایش ۱/۳ برابری نسبت به گروه تیمار شده با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن استامینوفن توأم با تیمار ۴۰ میکروگرم / کیلوگرم وزن بدن SCF (بعد از ۳۰ دقیقه) است که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نیست. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده است.

جدول ۱ میزان نشانگرهای بیوشیمیایی سرمی ALT و AST

پارامتر	گروه	
	کنترل	استامینوفن
ALT (واحد بین المللی / لیتر)	۵/۶ $\pm$ ۳/۷	*۹/۳ $\pm$ ۲/۶
AST (واحد بین المللی / لیتر)	۹۷/۴ $\pm$ ۴/۴	*۳۵۶ $\pm$ ۲۰/۸

\*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل

†: تفاوت معنی‌دار بین گروه استامینوفن و گروه استامینوفن + SCF

## تعدیل سمیت استامینوفن توسط عامل سلول بنیادی

AST در سرم که شاخص‌های متداول ارزیابی آسیب کبدی است، نشان داد که تزریق SCF به موش‌های تحت مسمومیت حاد با استامینوفن منجر به بهبود معنی‌دار آسیب‌های بافتی در کبد این موش‌ها در مقایسه با موش‌هایی که تیمار SCF را دریافت نکرده بودند، می‌شود.

نتایج نشان داد که در هیچ یک از ساعات سمیت، تفاوت معنی‌داری در میزان شاخص‌های آسیب اکسیداتیو بافتی یعنی گلوکوتاتیون و MDA، بین دو گروه تیمار APAP و APAP+SCF وجود نداشت. همچنین نتایج نشان داد که میزان گلوکوتاتیون از شروع سمیت تا ۲۴ ساعت بعد یک روند افزایشی را در هر سه گروه نشان می‌دهد. در مطالعات گذشته نیز چنین روند تغییراتی برای گلوکوتاتیون گزارش شده است و به نظر می‌رسد که علت آن القای بازسازی مجدد ذخایر گلوکوتاتیون سلولی پس از شروع سمیت است [۳۲، ۳۳]. از طرفی طبق دستورالعمل مورد استفاده در این مطالعه، تمامی موش‌ها مدت ۱۲ ساعت قبل از تیمار در محرومیت غذایی به سر بردند و پس از تیمار، دارای دسترسی آزادانه به منبع غذایی بودند، بنابراین میزان گلوکوتاتیون سلولی حتی در گروه کنترل نیز با گذشت زمان از آغاز سمیت رو به افزایش گذاشت که علت آن جبران بازسازی منابع از دست رفته گلوکوتاتیون سلولی ناشی از محرومیت غذایی است. یافته‌های بررسی حاضر روند تغییرات مشابهی برای MDA نشان می‌دهد که نتایج مطالعات گذشته را نیز پشتیبانی می‌کند [۳۴، ۳۵]. با توجه به دستورالعمل مورد استفاده در این تحقیق، متابولیزه شدن استامینوفن و تشکیل متابولیت سمی آن یعنی NAPQI غیر قابل اجتناب به نظر می‌رسد، زیرا SCF به فاصله ۳۰ دقیقه پس از تزریق دوز سمی استامینوفن به موش‌ها تیمار شده بود؛ بنابراین از نظر منطقی امکان تداخل در متابولیسم استامینوفن را در (حداقل بخشی از) ساعت اول نداشته است. اگرچه عدم وجود تفاوت در میزان کاهش معنی‌دار گلوکوتاتیون بافتی نسبت به گروه کنترل، بین دو گروه APAP و APAP+SCF در ساعت اول قابل انتظار بود، با این حال عدم تغییر معنی‌دار

تحقیقات انجام گرفته تاکنون نقش SCF در بهبود آسیب‌های سلولی و کاهش نرخ مرگ و میر حیوانات تحت تیمار با SCF در سمیت ایجاد شده ناشی از دوزهای بالای استامینوفن در کبد موش‌ها را بررسی کرده است. در سال ۲۰۰۳ سیمپسون و همکاران نشان دادند که با تزریق SCF میزان مرگ و میر و آسیب بافتی در موش‌های تحت مسمومیت با استامینوفن به مقدار قابل توجه در مقایسه با نمونه‌های کنترل کاهش می‌یابد. همچنین تیمار حیوانات با آنتی‌بادی ضد SCF (anti-SCF) قبل از تزریق دوزهای نیمه کشنده استامینوفن باعث افزایش مرگ و میر ناشی از استامینوفن در این حیوانات شد. در سال ۲۰۰۸ هو و کالتی (Hu & Colleti) گزارش کردند که تزریق SCF از طرفی با مهار مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و افزایش بیان عامل‌های ضد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده مانند Bcl-2 و Bcl-xL و از طرفی دیگر با افزایش رشد سلولی، باعث بهبود آسیب سلولی ناشی از سمیت استامینوفن می‌شود [۲۴]. همچنین مطالعه‌ای نشان داده است که SCF دارای خواص میتوژنیک (Mitogenic)، پس از هپاتکتومی (Hepatectomy) جزئی در کبد موش است [۳۱]. بنابراین اگرچه این تحقیقات نقش SCF به‌عنوان یک عامل مهم رشد سلولی در حفاظت و ترمیم بافت کبد پس از ایجاد آسیب بافتی ناشی از استامینوفن را آشکار می‌سازند، اما آثار SCF بر مسیر متابولیسم استامینوفن در این مطالعات مورد غفلت قرار گرفته است.

در تحقیق حاضر با تلاش برای بررسی اثر SCF بر میزان تشکیل MDA، سطح بافتی GSH و بیان آنزیم‌های GSTs در ساعات مختلف سمیت ناشی از دوز بالای استامینوفن (۳۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم وزن بدن استامینوفن) و همچنین آثار SCF در بخش مهمی از متابولیسم استامینوفن بررسی شد.

همان‌طور که از پیش انتظار می‌رفت، نتایج به‌دست آمده از بررسی (آسیب‌شناسی) لام‌های تهیه شده از بافت کبد موش‌ها و همچنین سنجش نشانگرهای زیستی بیوشیمیایی ALT و



گلوکوتایون بین دو گروه تیمار در ساعات بعدی نشان می‌دهد که بر خلاف ان - استیل سیستئین (N-Acetylcysteine) (داروی معمول در درمان موارد بالینی سمیت استامینوفن)، SCF قادر به افزایش تولید پیش‌ساز گلوکوتایون و بالابردن سطح گلوکوتایون به منظور خنثی‌سازی متابولیت فعال NAPQI به روشی مشابه ان - استیل سیستئین نیست. از طرف دیگر؛ نتایج نشان داد که SCF اثری در پیشگیری یا کاهش تشکیل عوامل ایجاد کننده پراکسیداسیون لیپیدها و تشکیل MDA ندارد. بنابراین برخلاف بسیاری از ترکیبات مطالعه شده نظیر ان - استیل سیستئین، ویتامین‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدان گیاهی مختلف نظیر سیلیمارین (Silymarin) و رسوراترول (Resveratrol) و کورکومین (Curcumin) و ... که دارای اثر کاهش سمیت استامینوفن هستند [۳۶، ۳۷]، یافته‌های بررسی حاضر نشان می‌دهد که بهبود آسیب‌های کبدی در ساعت ۲۴ از سمیت استامینوفن که به دنبال تیمار SCF در این مطالعه مشاهده شد، به علت کاهش آسیب‌های اکسیداتیو در ساعات اولیه سمیت فراهم نمی‌آید.

بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های GST به‌عنوان یکی از آنزیم‌های مهم در متابولیسم استامینوفن در این تحقیق، نتایج جالبی را نشان داد. اگرچه همانند MDA و GSH، فعالیت آنزیم‌های GSTs در ساعات ۱ و ۱۲ از سمیت استامینوفن، تحت تأثیر تیمار با SCF قرار نگرفت، با این حال میزان فعالیت این آنزیم‌ها در ساعت ۲۴ سمیت به میزان معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و گروه تیمار با استامینوفن افزایش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد اثر بهبوددهندگی که به دنبال تیمار SCF پس از سمیت حاد ناشی از استامینوفن در مطالعه حاضر مشاهده شده است، به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های GST در بافت کبد موش‌ها اتفاق می‌افتد. در مطالعات قبلی گزارش شده است که در رده‌های سلولی فیروبلستی که فعالیت GSTP1 (S-Glutathione Transferase P) (فراوان‌ترین ایزوform GST در کبد) به خاطر جهش دچار اختلال شده است، تقسیم سلولی با سرعت کمتری نسبت به رده‌های سلولی طبیعی اتفاق می‌افتد [۳۸]. از طرف

دیگر؛ آلدِر (Adler) و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که GSTP1 می‌تواند به‌عنوان مهار کننده کیناز انتهایی آمینی c-jun (C-Jun N-Terminal Kinases: JNK) عمل کند [۳۹]. گوناوان (Gunawan) و همکاران در سال ۲۰۰۶ و هاناوا (Hanawa) و همکاران در سال ۲۰۰۸، به نقش مسیر پیام‌دهی JNK در سمیت استامینوفن پی بردند. این دانشمندان متوجه شدند که مهار فعالیت JNK، به طور معنی‌داری مانع آسیب‌های کبدی ناشی از استامینوفن در موش‌ها می‌شود. این در حالی است که مهار مسیر پیام‌دهی JNK، تأثیری بر متابولیسم استامینوفن ندارد [۴۰، ۴۱]. بنابراین به نظر می‌رسد که تیمار SCF باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های GST در بافت کبد موش می‌شود و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها با افزایش سرعت تقسیم سلول‌های کبدی و همچنین ممانعت از فعالیت JNK به ترمیم آسیب‌های کبدی ناشی از مسمومیت با استامینوفن کمک می‌کند. همان‌طور که در مطالعه هو و کالتی در ۲۰۰۸ نشان داده شده است، نتایج مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد که میزان پروتئین c-kit در سمیت ناشی از استامینوفن افزایش می‌یابد و تیمار موش‌های تحت مسمومیت استامینوفن با SCF موجب کاهش معنی‌دار بیان گیرنده آن می‌شود. از طرف دیگر؛ تحقیقات نشان داده است که کبد همواره سطح بالایی از SCF را تولید می‌کند و سمیت ناشی از استامینوفن باعث کاهش میزان SCF در بافت کبد می‌شود و بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش میزان c-kit به‌عنوان مکانیسمی جبرانی برای انتقال SCF بیشتر به درون بافت کبدی عمل می‌کند و بنابراین تزریق SCF خارجی نیاز به تولید بیشتر برای انتقال SCF بیشتر به درون بافت کبدی و جبران کمبود SCF ناشی از مسمومیت با استامینوفن را در نهایت کاهش می‌دهد [۲۴].

در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که SCF باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های GST و بهبود آسیب‌های بافتی در کبد موش‌های تحت مسمومیت حاد با استامینوفن می‌شود.

## تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه آقایان سید علی هاشمی و

## منابع

- [1] Latchoumycandane C, Goh CW, Ong MMK, Boelsterli UA. Mitochondrial protection by the JNK inhibitor leflunomide rescues mice from acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* 2007; 45(2): 412-21.
- [2] Herndon CM, Dankenbring DM. Patient perception and knowledge of acetaminophen in a large family medicine service. *J Pain Palliat Care Pharmacother* 2014; 28(2): 109-16.
- [3] Kheradpezhoh E, Ma L, Morphett A, Barritt GJ, Rychkov GY. TRPM2 channels mediate acetaminophen-induced liver damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(8): 3176-81.
- [4] Dear JW, Antoine DJ. Stratification of paracetamol overdose patients using new toxicity biomarkers: current candidates and future challenges. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2014; 7(2): 181-9.
- [5] Boutis K, Shannon M. Nephrotoxicity after acute severe acetaminophen poisoning in adolescents. *J Toxicol Clin Toxicol* 2001; 39(5): 441-5.
- [6] Estabrook RW. A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab Dispos* 2003; 31(12): 1461-73.
- [7] Eneigh Hart SG, Wyand DS, Khairallah EA, Cohen SD. Acetaminophen nephrotoxicity in the CD-1 mouse. II. Protection by probenecid and AT-125 without diminution of renal covalent binding. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 136(1): 161-9.
- [8] Nedelcheva V, Gut I. P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* 1994; 24(12): 1151-75.
- [9] Cheung C, Yu AM, Ward JM, Krausz KW, Akiyama TE, Feigenbaum L, Gonzalez FJ. The cyp2e1-humanized transgenic mouse: role of cyp2e1 in acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(3): 449-57.
- [10] Raucy JL, Lasker JM, Lieber CS, Black M. Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIIc1 and P450IA2. *Arch Biochem Biophys* 1989; 271(2): 270-83.
- [11] Jaeschke H, Knight TR, Bajt ML. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 2003; 144(3): 279-88.
- [12] Manov I, Hirsh M, Iancu TC. N-acetylcysteine does not protect HepG2 cells against acetaminophen-induced apoptosis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 94(5): 213-25.
- [13] Wan J, Bae MA, Song BJ. Acetaminophen-induced accumulation of 8-oxodeoxyguanosine through reduction of Ogg1 DNA repair enzyme in C6 glioma cells. *Exp Mol Med* 2004; 36(1): 71-7.
- [14] Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci* 2006; 89(1): 31-41.
- [15] Posadas I, Vellecco V, Santos P, Prieto-Lloret J, Ceña V. Acetaminophen potentiates staurosporine-induced death in a human

- neuroblastoma cell line. *Br J Pharmacol* 2007; 150(5): 577-85.
- [16] Hart SG, Beierschmitt WP, Wyand DS, Khairallah EA, Cohen SD. Acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice. I. Evidence of a role for in situ activation in selective covalent binding and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 126(2): 267-75.
- [17] Kon K, Ikejima K, Okumura K, Aoyama T, Arai K, Takei Y, Lemasters JJ, Sato N. Role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S49-52.
- [18] Valdovinos-Flores C, Gonsbatt ME. Nerve growth factor exhibits an antioxidant and an autocrine activity in mouse liver that is modulated by buthionine sulfoximine, arsenic, and acetaminophen. *Free Radic Res* 2013; 47(5): 404-12.
- [19] Donahower B, McCullough SS, Kurten R, Lamps LW, Simpson P, Hinson JA, James LP. Vascular endothelial growth factor and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291(1): G102-9.
- [20] Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A, Shibuya M, Fujiwara K. Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254(3): 587-93.
- [21] Taniguchi E, Sakisaka S, Matsuo K, Tanikawa K, Sata M. Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Histochem Cytochem* 2001; 49(1): 121-30.
- [22] Hwang HJ, Kwon MJ, Nam TJ. Chemo-protective effect of insulin-like growth factor I against acetaminophen-induced cell death in Chang liver cells via ERK1/2 activation. *Toxicology* 2007; 230(1): 76-82.
- [23] Fazel SS, Chen L, Angoulvant D, Li SH, Weisel RD, Keating A, Li RK. Activation of c-kit is necessary for mobilization of reparative bone marrow progenitor cells in response to cardiac injury. *FASEB J* 2008; 22(3): 930-40.
- [24] Hu B, Colletti LM. Stem cell factor and c-kit are involved in hepatic recovery after acetaminophen-induced liver injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295(1): G45-G53.
- [25] Simpson K, Hogaboam CM, Kunkel SL, Harrison DJ, Bone-Larson C, Lukacs NW. Stem cell factor attenuates liver damage in a murine model of acetaminophen-induced hepatic injury. *Lab Invest* 2003; 83(2): 199-206.
- [26] Jaeschke H, Williams CD, McGill MR, Xie Y, Ramachandran A. Models of drug-induced liver injury for evaluation of phytotherapeutics and other natural products. *Food Chem Toxicol* 2013; 55: 279-89.
- [27] McClain CJ, Kromhout JP, Peterson FJ, Holtzman JL. Potentiation of acetaminophen hepatotoxicity by alcohol. *JAMA* 1980; 244(3): 251-3.
- [28] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25(1): 192-205.
- [29] Layene E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins.

- In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 1957; p: 447-55.
- [30] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249(22): 7130-9.
- [31] Ren X, Hogaboam C, Carpenter A, Colletti L. Stem cell factor restores hepatocyte proliferation in IL-6 knockout mice following 70% hepatectomy. *J Clin Invest* 2003; 112(9): 1407-18.
- [32] James LP, McCullough SS, Lamps LW, Hinson JA. Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice: relationship to reactive nitrogen and cytokine formation. *Toxicol Sci* 2003; 75(2): 458-67.
- [33] Bessems JG, Vermeulen NP. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit Rev Toxicol* 2001; 31(1): 55-138.
- [34] Mason RP, Fischer V. Free radicals of acetaminophen: their subsequent reactions and toxicological significance. *Fed Proc* 1986; 45(10): 2493-9.
- [35] Nagi MN, Almakki HA, Sayed-Ahmed MM, Al-Bekairi AM. Thymoquinone supplementation reverses acetaminophen-induced oxidative stress, nitric oxide production and energy decline in mice liver. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(8-9): 2361-5.
- [36] Hinson JA, Bucci TJ, Irwin LK, Michael SL, Mayeux PR. Effect of inhibitors of nitric oxide synthase on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Nitric Oxide* 2002; 6(2): 160-7.
- [37] Ulusoy S, Ozkan G, Yucesan FB, Ersöz Ş, Orem A, Alkanat M, Yuluğ E, Kaynar K, Al S. Anti-apoptotic and anti-oxidant effects of grape seed proanthocyanidin extract in preventing cyclosporine A-induced nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2012; 17(4): 372-9.
- [38] Kumari A, Kakkar P. Lupeol protects against acetaminophen-induced oxidative stress and cell death in rat primary hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(5): 1781-9.
- [39] Holley SL, Fryer AA, Haycock JW, Grubb SE, Strange RC, Hoban PR. Differential effects of glutathione S-transferase pi (GSTP1) haplotypes on cell proliferation and apoptosis. *Carcinogenesis* 2007; 28(11): 2268-73.
- [40] Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ronai Z. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J* 1999; 18(5): 1321-34.
- [41] Gunawan BK, Liu ZX, Han D, Hanawa N, Gaarde WA, Kaplowitz N. c-Jun N-terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 2006; 131(1): 165-7878.
- [42] Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol Chem* 2008; 283(20): 13565-77.