زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۱، صفحات ۱۴۲- ۱۳۳

مقاله پژوهشی

تاثیر آنتی‌اکسیدانی ان-استیل سیستئین بر بیان ژن‌های SOD و HO1 در سلول‌های فیبروبلاست پوستی انسانی در محیط با گلوکز بالا

بهاره صفوی، زینب پیراور*، مینا رمضانی

گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* مسئول مکاتبات: Saba.piravar@gmail.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1949310.1353

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۵

چکیده

رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست پوست جهت درمان زخم در بیماران دیابتی به دلیل وجود استرس اکسیداتیو، با تاخیر اتفاق می افتد. در این مطالعه تغییرات مولکولی موثر در رشد و بقای سلول‌های فیبروبلاست پوستی انسانی در محیط با گلوکز بالا و همچنین تاثیر آنتی‌اکسیدانی ان استیل سیستئین (NAC) بر بیان ژن‌های دخیل در استرس اکسیداتیو از جمله *SOD* و *HO1* بررسی می‌گردد. سلول‌های فیبروبلاست پوستی انسانی در محیط با غلظت‌های مختلف گلوکز شامل ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار به مدت ۷۲ ساعت کشت داده می‌شوند. میزان سمیت سلولی توسط تست MTT ارزیابی می‌گردد. بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی *SOD* و *HO1* توسط روش ریل تایم PCR بررسی می‌شود. اثر آنتی اکسیدانی NAC 1mM بر سلول‌های فیبروبلاستی پوستی مطالعه می‌گردد. سلول‌های فیبروبلاستی کشت شده در محیط با غلظت‌های مختلف گلوکز به مدت ۷۲ ساعت با روش MTT، کاهش بقا و تکثیر سلول‌ها در غلظت‌های بالای گلوکز به ویژه در غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار نسبت به گروه کنترل داد. این تاثیر در گروه‌های تیمار شده با NAC تغییر معنی‌داری نسبت به کنترل نداشت. سطح بیان ژن‌های *SOD* و *HO1* در محیط‌های با گلوکز بالا افزایش معنی‌داری داشته و این تغییر در گروه‌های NAC تغییرات معنی‌داری را نشان ندادند. گلوکز بالا تکثیر و بقای سلول‌های فیبروبلاستی را دچار اختلال کرده و به دلیل ایجاد استرس اکسیداتیو بیان ژن‌های دخیل در استرس اکسیداتیو مانند *SOD* و *HO1* افزایش می‌یابد. اثر آنتی‌اکسیدانی NAC باعث کاهش آسیب ناشی از محیط با گلوکز بالا بر سلول‌های فیبروبلاست پوستی می‌گردد.

کلمات کلیدی: استرس اکسیداتیو، کلوگز بالا، سوپراکسید دسموتاز، هم اکسیژناز ۱، ان استیل سیستئین.

مقدمه

دیابت بیماری است که با افزایش میزان قند خون مشخص می‌شود. به دلیل اختلال در متابولیسم گلوکز، لیپیدها و پروتئین‌ها در افراد مبتلا به دیابت، خطر ابتلا به بیماری‌های دیگری مانند رتینوپاتی، نوروپاتی، نفروپاتی و بیماری‌های قلبی عروقی در این افراد افزایش می‌یابد (۱۹). به علاوه تاخیر در ترمیم زخم‌ها از دیگر مشکلات این بیماران می‌باشد. متأسفانه این عارضه موجب مزمن شدن زخم شده و حتی ممکن است به قطع عضو نیز منجر شود (۱۵). به طور حتم قطع عضو بیماران دیابتی بار روانی و اقتصادی بسیاری برفرد و جامعه تحمیل کرده و کیفیت زندگی چنین بیمارانی را کاهش می‌دهد. التیام زخم فرآیند پیچیده

ای شامل برهمکنش‌های شیمیایی و بیولوژیکی مختلف میان سلول‌ها، فاکتورهای رشد و التهابی و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی است (۹). هایپرگلیسمی با ایجاد مشکلات التهابی برای بیماران و با مهار آنژیوژنز بافت‌ها ترمیم زخم‌ها را به تعویق می‌اندازد. مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد هایپرگلیسمی باعث کاهش مهاجرت، تکثیر و سنتز فاکتورهای حیاتی مانند کلاژن در سلول‌ها شده و سرعت آپوپتوز را افزایش می دهد (۲). ترمیم زخم نیازمند به هماهنگی بین سلول‌های مختلف مانند کراتینوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اندوتلیالی، ماکروفاژها و پلاکت‌ها است. ترمیم کامل زخم نیز در نتیجه مجموعه وقایع سلولی مانند مهاجرت و تکثیر و سنتز کلاژن و بازسازی مجدد بستر، انقباض زخم و آنژیوژنز است (۲۰).

فیبروبلاست‌ها فراوانترین سلول‌های بافت همبند هستند که ماتریکس خارج سلولی را سنتز می‌کنند. از این رو نقش مهمی در ترمیم زخم‌ها دارند. پاسخ فیبروبلاست‌ها به افزایش غلظت گلوکز، نقش مهمی در ترمیم زخم‌های پوستی در بیماران دیابتی دارد (۳). از عوارض دیابت، افزایش استرس اکسیداتیو است که عوامل پاتوژن مهمی محسوب می‌شود. در بیماران دیابتی محصولات نهایی حاصل از سوخت و ساز گلوکز، عامل انباشت استرس اکسیداتیو است که در نتیجه آن آبنرمالیتی‌های سلولی و پتانسیل آسیب‌های بافتی را افزایش می‌دهد (۹). رادیکال‌های ازاد اکسیژن ناشی از استرس اکسیداتیو، می توانند به مولکول‌های مختلفی چون اسید نوکلئیک، پروتئین‌ها و فسفولیپیدها متصل شده و باعث آسیب به آنها شوند. آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز و هم اکسیژناز ۱، می-توانند برای حفظ هموستازی سلول آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و هم اکسیژناز ۱ (HO1) آنیون‌های سوپراکسید را کاهش می‌دهند.

اثرات آنتی اکسیدانی ترکیباتی مانند ان استیل سیستئین (NAC) در کاهش استرس اکسیداتیو در سلول‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. مکانیسم‌های احتمالی مختلفی برای ارتباط بین دیابت و پاسخ‌های التهابی پوستی مطرح می‌شوند هرچند مکانیسم‌های مولکولی مشخصی هنوز برای این رابطه مشخص نشده است زیرا سلول‌های مختلف پاسخ‌های متفاوتی می‌دهند (٦). در مطالعه حاضر اثرات پیشگیری کننده NAC در کاهش استرس اکسیداتیو و تغییر بیان آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی در فیبروبلاست‌های پوستی انسانی که در معرض گلوکز بالا بودند بررسی می گردد.

مواد و روش‌ها

سلول‌های پوستی انسانی جدا از پره پوس نوزادان از مرکز تحقیقات پوست بیمارستان شهداء تجریش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM/F12 به همراه ۱۰ درصد FBS کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سلول‌ها از پاساژ ٤ الی ٦ برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. سلول‌ها در یک گروه کنترل با محیط کشت حاوی قند نرمال (۵/۵ میلی‌مولار) و سه گروه قندی حاوی غلظت‌های مختلف گلوکز (۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار) به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. در گروه های تیمار شده با آنتی اکسیدان NAC، سلول‌های فیبروبلاستی با NAC 1mM کشت شده و پس از رسیدن به تراکم ۸۰٪ محیط آنها با محیط حاوی گلوکز مانند گروه‌های بالا به اضافه NAC 1mM تعویض شده و به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. جهت مطالعه میزان سمیت سلولی غلظت‌های بالای گلوکز بر سلول‌های فیبروبلاست پوستی انسانی، از تست MTT بعد از ٢٤ ساعت، ٤٨ ساعت و ۷۲ ساعت استفاده شد. به این ترتیب سلول‌ها در گروه‌های مورد مطالعه در پلیت-

های ۹۶ خانه کشت شده و بعد از ۷۲ ساعت محیط رویی سلول‌ها خارج شده و به سلول‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT (Sigma, USA) اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه می شود. محیط رویی را خارج کرده و پس از اضافه کردن DMSO و حل شدن کریستال‌های فورمازون OD محلول با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 570nm خوانده می‌شود. برای بررسی بیان ژن‌های *SOD* و *HO1* در ابتدا کل RNA سلول استخراج شده (Favrogen Kit, Taiwan) و میزان خلوص آن با دستگاه نانودراپ (Termo Scientific 2000) در طول موجهای 260-280nm مشخص شد. cDNA از روی RNAهای استخراج شده سنتز شده (کیت سنتز cDNA یکتا تجهیز آزما، ایران) و واکنش ریل تایم PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده با نرم‌افزار الیگو (Oligo 7.6O) و سنتز شده توسط شرکت سیناکلون، برای ژن‌ها و کیت SYBER Maser (Sigma) در دمای ذوب ۶۰ درجه با استفاده از دستگاه Roche LC96 و مستر میکس Green high (ROX ™Amplicon, Denmark) انجام شد. مواد مورد نیاز برای ریل تایم به ترتیب زیر مخلوط شدند: مستر میکس ۱۲ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر dNTP پرایمرهای هر کدام ۰/۵ میکرولیتر، ۲ میکرولیتر DNA و ۹/۵ میکرولیتر DDW. برنامه دمایی ریل تایم PCR به صورت زیل اجرا شد. هر سیکل شامل: ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ °C، ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ °C، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰°C و در پایان ۳۰ ثانیه در ۷۲ °C می‌باشد. برای آنالیز نتایج ریل تایم PCR از فرمول 2-ΔΔCt (Livak) استفاده شد. از ژن β-Catenin به عنوان ژن کنترل استفاده گردید (جدول۱). نتایج با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA One-Way و آزمون Tukey و $P\ value \leq$ ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار مورد بررسی قرار گرفتند و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

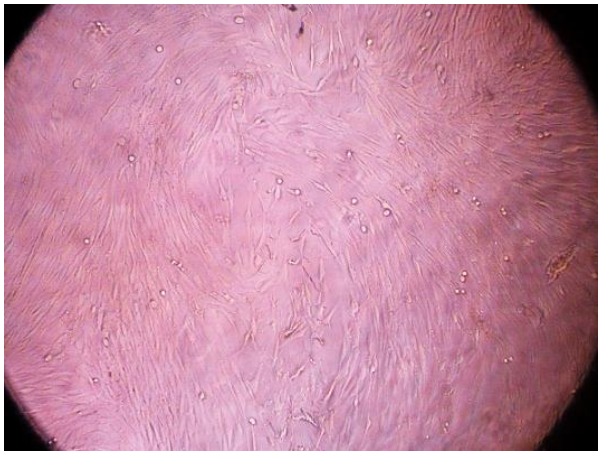
جدول ۱- توالی پرایمرهای ژن‌های *SOD* و *HO1* و β-actin.

Genes		Primer sequences
β-actin	Forward	5-GGCATCCTCACCCTGAAGTA -3´
	Reverse	5´-GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA -3'
HO1	Forward	5´-ACATCCAGCTCTTTGAGGAGT-3´
	Reverse	5´-TGAGTGTAAGGACCCATCGGA-3´
SOD	Forward	5´-CCAGTGCAGGGCATCATCAA-3´
	Reverse	5´-TCTTCATCCTTTGGCCCACC-3´

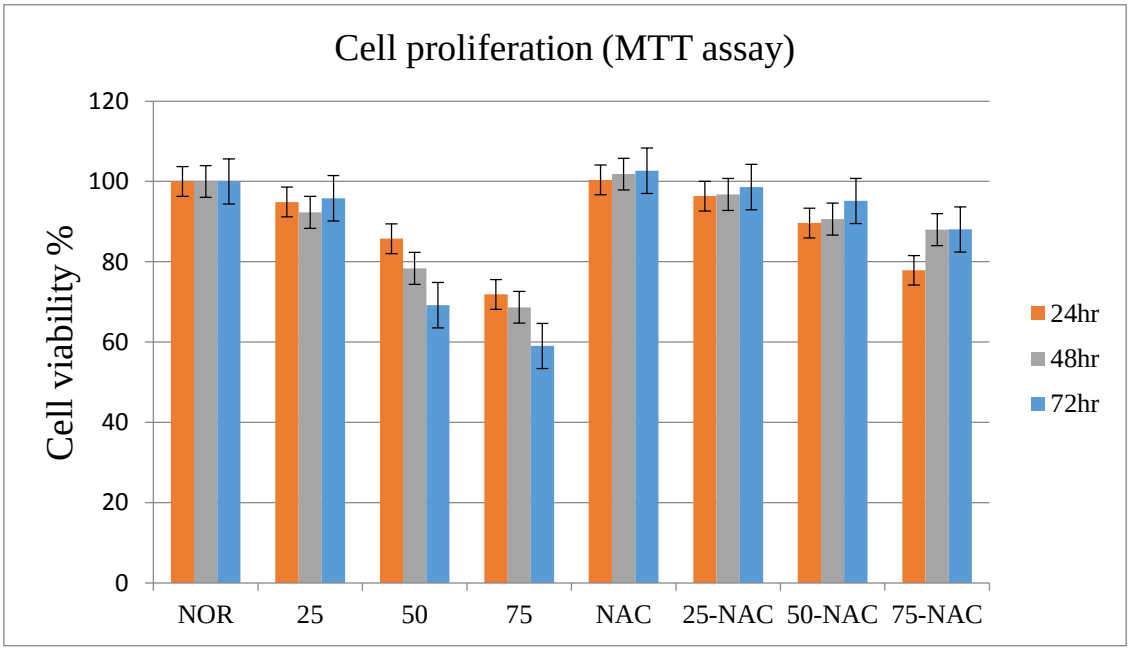
نتایج

کشت سلول‌های فیبروبلاستی پوستی انسانی در سه گروه قندی با غلظت‌های گلوکز ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی-مولار و گروه‌های تیمار شده با NAC بعد از ۷۲ ساعت بوسیله آنالیز MTT جهت بررسی سمیت سلولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهد با افزایش مقدار گلوکز تعداد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل (گلوکز ۵/۵ میلی‌مولار) کاهش پیدا کرده و با تاثیر NAC میزان رشد و زنده مانی سلول‌ها به گروه کنترل نزدیک می‌شود (شکل ۱ و نمودار۱). برای بررسی اثر گلوکز بالا بر بیان ژن‌هایی که در

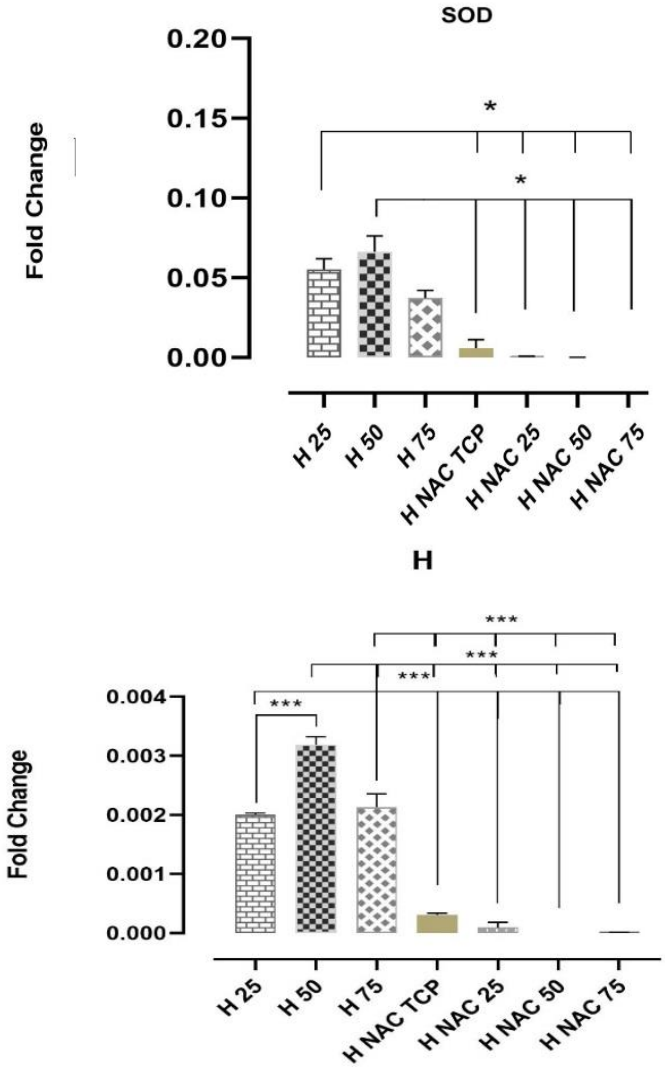
استرس اکسیداتیو نقش دارند، واکنش ریل تایم PCR انجام گرفت. در گروه های مورد مطالعه ژن‌های SOD و HO1 افزایش معنی داری ($p \leq$ ۰/۰۵ برای SOD و $p \leq$ ۰/۰۰۱ برای HO) در گروه‌های حاوی گلوکز به خصوص در غلظت ۵۰ میلی‌مولار گلوکز نسبت به گروه‌های کنترل و تیمار شده با NAC نشان دادند. در بیان ژن *SOD* در بین گروه‌های تیمار شده با گلوکز ۲۵ و ۵۰ نسبت به گروه ۷۵ میلی‌مولار اختلاف معنی-دار مشاهده شد ($p \leq$ ۰/۰۵). در بیان ژن *HO1* بین گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف گلوکز نیز اختلاف معنی‌دار و $p \leq$ ۰/۰۰۱ نشان داده شد. در گروه‌های تیمار شده با NAC کاهش بیان ژن‌های *SOD* و *HO1* نسبت به گروه‌های دارای غلظت‌های مختلف گلوکز به خصوص نسبت به گروه‌های دارای گلوکز ۵۰ میلی‌مولار نشان داده شده است و نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری ندارند ($p >$ ۰/۰۵) (نمودار۲).



شکل ۱- سلول‌های فیبروبلاست پوستی انسانی پس از کشت به مدت ۷۲ ساعت کشت در محیط دارای گلوکز. بزرگنمایی 40x.



نمودار ۱- تست سمیت سلولی فیبروبلاست پوستی انسانی با روش MTT پس از کشت در محیط های با گلوکز 25mM، 50mM و 75mM و گروه های تیمار شده با NAC (ان-استیل سیستئین) بعد از ۲۴ ساعت،۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت.



نمودار ۲- بیان ژن‌های دخیل در استرس اکسیداتیو. سطح بیان ژن‌های A) *SOD* و B) *HO1* با روش ریل تایم PCR در گروه‌های کشت شده در گلوکز ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار به مدت ۷۲ ساعت و مقایسه آنها با گروه‌های تیمار شده با آنتی اکسیدان NAC.. ***: $p \leq$ ۰/۰۰۱ و * $p \leq$ ۰/۰۵.

بحث

مطالعات مختلف ارتباط بین اختلال در ترمیم زخم‌ها و دیابت را نشان می‌دهند (۱، ۱۰). در واقع پس از جراحت، بهبود و ترمیم آسیب‌های پوستی در بیماران دیابتی کاهش چشمگیری را نشان می دهد. شواهد بسیاری نشان می‌دهند که غلظت‌های بالای گلوکز بر عملکرد سلول‌های مختلف در بافت‌ها و ارگان‌های متفاوت تاثیرات مخرب دارد. به عنوان مثال غلظت گلوکز ۲۰ میلی‌مولار باعث القاء استرس اکسیداتیو در سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده دارد (۲۶). به علاوه غلظت‌های بالاتر گلوکز مانند ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار باعث کاهش سنتز کلاژن در فیبروبلاست‌ها می‌شود (۸). گزارش شده است که گلوکز ۳۰ و ۳۵ میلی‌مول باعث افزایش آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال و کراتینوسیت‌ها می‌گردد اما بر بقاء فیبروبلاست‌ها

تاثیر ندارد (۲۱). مطالعات نشان می‌دهند که فیبروبلاست‌ها در مقایسه با سایر انواع سلول‌ها، مقاوم ترین سلول‌ها به غلظت‌های بالای گلوکز هستند. غلظت اپتیمال گلوکز برای سلول‌های فیبروبلاست‌ها در محیط in Vitro بالاتر از غلظت اپتیمال آن در محیط in Vivo است (٤). غلظت‌های بالاتر مانند ۱۰۰ میلی‌مول گلوکز بعد از ۹ ساعت می‌تواند اتصالات سلول‌های کشت شده را از بین ببرد (۲). عامل تشخیصی برای دیابت اندازه‌گیری غلظت گلوکز خون > ۱۰۰mg/dl است (١٦). در این مطالعه ۵/۵ میلی-مولار گلوکز معادل ۱۰۰ mg/dl است و به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شده است و گروه‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار گروه‌های دارای گلوکز بالا هستند. برای روشن شدن تاثیر گلوکز بالا بر سلول‌های فیبروبلاستی پوستی کشت شده، از تستهای MTT و ریل تایم PCR بعد از ۷۲ ساعت کشت استفاده گردید. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با نتایج مطالعات دیگری که تاثیر گلوکز بالا را بر میزان مهاجرت و تکثیر فیبروبلاست‌های بدست آمده از بافت‌های مختلف بررسی کردند، همخوانی دارد (١٦). میزان سمیت سلولی با افزایش غلظت گلوکز افزایش معنی‌داری در گلوکز ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار نسبت به گروه کنترل نشان داد. یافته‌های ما با نتایج بدست آمده از مطالعات گذشته در رابطه با ترمیم زخم‌های دیابتی و فیبروبلاست‌های گرفته شده از بیماران دیابتی در کاهش تکثیر و افزایش سطح آپوپتوز این سلول‌های همخوانی دارد (۱۷). سطح بالای ROS عملکردهای سلول را مانند مهاجرت، تکثیر و ترشح ماتریکس خارج سلولی در سلول‌های فیبروبلاستی و کراتینوسیت‌ها مختل می‌کند (۷، ۱۳). تحقیقات مختلف تاثیر استرس اکسیداتیو را در تولید ROS در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ نشان داده‌اند (۱۹). براساس نتایج ما و مطالعات گذشته افزایش مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدانی در دیابت مشاهده می شود (۲۰، ۲۸). در مطالعاتی که روی سلول‌های مختلف انجام شده نقش NAC را در تکثیر سلول‌ها و مهار آپوپتوز آنها نشان داده است (۵). NAC در غلظت‌های مختلف با به دام انداختن رادیکال‌های آزاد مانند OH، H_2O_2 و O_2 نقش آنتی‌اکسدانی را ایفا می‌کند (۱۲). در آزمایش ما تیمار سلول‌های فیبروبلاست پوستی با 1mM NAC می‌تواند تکثیر و بقاء سلول‌ها را در غظت‌های بالای گلوکز حفظ کند. سلول‌ها برای عملکرد نرمال خود به سطح معینی از ROS احتیاج دارند. مصرف آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند NAC که باعث کاهش قابل توجهی در ROS داخل سلولی می‌شود، ممکن است تعادل ROS داخل سلولی لازم برای فعالیت‌های فیزیولوژیک سلول را به هم بزند (۲۲). اما این پدیده در غلظت اپتیمال گلوکز در سلول‌های فبروبلاستی کشت شده ممکن است اتفاق بیوفتد. در زمانی که غلظت گلوکز بالا است NAC 1mM تنها بخشی از سمیت سلولی ایجاد شده در اثر گلوکز بالا را مهار می کند (۲۷). به علاوه باید توجه داشته باشیم که تاخیر در پروسه ترمیم در شرایط گلوکز بالا به دلیل افزایش استرس اکسیداتیو در فیبروبلاست‌ها است (۲۳). مطالعه حاضر نشان داد نشانگر های آنتی اکسیدانی مانند *SOD* و *HO1* در شرایط گلوکز بالا برای به دام انداختن ROS تولید شده در سلول افزیش چشمگیری می‌کنند. مکانیسم‌های احتمالی که در بیماری‌های پوستی ناشی از دیابت نقش دارند هنوز کاملا شناخته نشده و بحث برانگیزند. اما مطالعات نشان داده است که گلوکز بالا میزان Nf-KB را افزایش می‌دهد (۱۸). به علاوه افزایش ROS باعث افزایش IL-8 شده و کاهش مهاجرت سلول‌ها به دلیل فعالیت ناکافی small Rho GTPase RAC1 و مهار bFGF از طریق سرکوب JNK است (۱۱). مطالعات بیشتری نیاز است تا جزئیات مکانیسم‌هایی را که در

شرایط هایپرگلیسمی بر عملکردهای سلولی مانند مهاجرت و تکثیر آنها در بافت‌های پوستی اثر می-گذارد و اینکه آیا این اختلال‌ها به دلیل افزایش استرس اکسیداتیو است یا مقاومت انسولین و یا بیان ژن‌های التهابی نیز دخیل هستند یا نه مشخص شود (۲۹، ۳۰). یکی از مکانیسم‌های احتمالی که باعث تحریک آپوپتوز توسط ROS می‌شود، از طریق مهار مسیر JNK (c-Jun N-terminal kinase) است که باعث مهار فاکتورهای آنتی‌آپوپتوتیک مانند BCL-2 (B cell lymphoma 2) می شود. در نتیجه فاکتورهای پروآپوپتوتیک مانند BAX (Bcl-2-associated X protein) می شود و ترمیم زخم را دچار اختلال می-کند (۲٤).

نتیجه‌گیری

در مجموع گلوکز بالا مهاجرت و تکثیر سلول‌ها را مختل کرده و باعث آسیب فیبروبلاست‌های پوستی می‌شود. به علاوه اختلال عملکرد فیبروبلاست‌ها به دلیل استرس اکسیداتیو ناشی از گلوکز بالا است. شرایط in vitro ایجاد شده در این مطالعه در واقع باز سازی و تقلیدکننده شرایط دیابتی در بدن است. بنابراین مطالعه حاضر می‌تواند پایه‌ای برای مطالعات گسترده‌تر در زمینه اختلال در ترمیم زخم‌ها در افراد دیابتی باشد. به علاوه تحقیقات بیشتری لازم است تا نقش آنتی اکسیدانی NAC جهت کاربرد های درمانی برای بیماران دیابتی روشن تر شود.

تشکر و قدردانی

از تمام عزیزانی که ما را در طی مراحل مختلف یاری نمودند قدردانی می شود. به ویژه سرکار خانم دکتر شاهی کارشناس پژوهشگاه مهندسی بافت دانشگاه آزاد واحد تهران مرکزی. نویسندگان مقاله اعلام می دارند هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Buranasin P., Mizutani K., Iwasaki K., 2018. High Glucose-induces Oxidative Stress Impaires Proliferation and Migration of Human Gingival Fibroblasts. *PLOS One*, 13(8): 1-19.

2. Chen P.Y., Shih N., Hao W., Chen C., Liu J., Sung L., 2018. Inhibitory Effects of Momordicine I on High-Glucose-Induced Cell Proliferation and Collagen Synthesis in Rat Cardiac Fibroblasts. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018: 3939714.

3. den Dekker A., Davis F., Kunkel S., Gallagher K., 2019. Targeting epigenetic mechanisms in diabetic wound healing. *Translational Research*, 204: 39-50.

4. Dong, C., Wu G., Li H., Qiao Y., Goa S., 2020. Ampelopsin inhibits high glucose-induced extracellular matrix accumulation and oxidative stress in mesangial cells through activating the Nrf2/HO-1 pathway. *Phytotherapy Research*, 34(8): 2044-2052.

5. Gerber P.A., Rutter G., 2017. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxidants and Redox Signaling*, 26(10): 501-518.

6. Gu X., Fang T., Kang P., Hu J., Yu Y., Li Z., Cheng X., Gao Q. 2017. Effect of ALDH2 on High Glucose-Induced Cardiac Fibroblast Oxidative Stress, Apoptosis, and Fibrosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 9257967.

7. Kaleci B., Koyuturk M. 2020. Efficacy of resveratrol in the wound healing process by reducing oxidative stress and promoting fibroblast cell proliferation and migration. *Dermatology Therapy*, 33(6): e14357.

8. Kido D., Mizutani K., Takeda K., Mikami R., Matsuura T., Iwasaki A., Izumi Y. 2017. Impact of diabetes on gingival wound healing via oxidative stress. *PLOS One*, 12(12): e0189601.

9. Kulprachakarn, K., Ounjaijean S., Wungrath J., Mani R., Rerkasem K. 2017.

17. Omidi Z., Piravar Z., Ramezani M., 2020. The effect of acrylamide on mitochondrial membrane potential and glutathione extraction in human spermatozoa: A laboratory study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 18(10): 855-864.

18.Ozkaya H., Omma T., Bag Y., Uzanoglu K., Isildak M., Duymus M., Kismet K., Senes K., Fidansi V. 2019. Topical and Systemic Effects of N-acetyl Cysteine on Wound Healing in a Diabetic Rat Model. *Wounds*, 31(4): 91-96.

19. Pang L., Wang Y., Zheng M., Wang Q., Lin H., Zhang L., Wu L. 2016. Transcriptomic study of highglucose effects on human skin fibroblast cells. *Molecular Medicine Reports*, 13(3): 2627-34.

20. Patel S., Srivastava S., Singh M., Singh D. 2019. Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 112: 108615.

21. Rizwan H., Pal S., Sabnam S., Pal A. 2020. High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis via stress signalling cascades in keratinocytes. *Life Sci*, 241:117148.

22. Ramaesh T., Ramaesh K., Riley S., West J., DhillonB. 2012. Effects of N-acetylcysteine on matrix metalloproteinase-9 secretion and cell migration of human corneal epithelial cells. *Eye* (*Lond*), 26(8): 1138-44.

23. Seyedian R., Shabankareh Fard E., Najafiasl M., Assadi M., Zaeri S. 2020. N-acetylcysteine-loaded electrospun mats improve wound healing in mice and human fibroblast proliferation in vitro: a potential application of nanotechnology in wound care. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(12): 1590-1602.

24. Shi C., Pang L., Ji C., Wang J., Lin N., Chen J. 2016. Obesityassociated miR148a is regulated by cytokines and adipokines

Micronutrients and natural compounds status and their effects on wound healing in the diabetic foot ulcer. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 16(4): 244-250.

10. Kumar D., Jena K., Ram M., Lingaraju M., Singh V., Prasad R. 2019. Hemin attenuated oxidative stress and inflammation to improve wound healing in diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 392(11): 1435-1445.

11. Liang W.J., Yang H., Liu H., Qian W., Chen X., 2020. HMGB1 upregulates NF-kB by inhibiting IKB-alpha and associates with diabetic retinopathy. *Life Science*, 241: 117146.

12. Li J., Zhou C., Luo C., Qian B., Liu S., Zeng Y., Hou J., Deng B. 2019. N-acetyl cysteine-loaded graphene oxide-collagen hybrid membrane for scarless wound healing. *Theranostics*, 9(20): 5839-5853.

13. Li C., Zhang J., Xue M., Li X., Han F., Liu X., Xu L., Lu Y., Cheng Y., Li T., Yu X., Sun B., Chen L. 2019. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovascular Diabetology*, 18(1): 15.

14. Li X., Xie X., Lian W., Shi R., Han S., Zhang H., Lu L., Li M. 2018. Exosomes from adipose-derived stem cells overexpressing Nrf2 accelerate cutaneous wound healing by promoting vascularization in a diabetic foot ulcer rat model. *Experimental and Molecular Medicine*, 50(4): 1-14.

15. Liu J.Q., Liu H., Wang Y., Feng Y., Goa H. 2011. [The biological effect of high glucose on human periodontal ligament fibroblast]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*,. 20(3): 225-9.

16. Mizutani K., Park k., Mima A., Katagiri S., King G., 2014 Obesity-associated Gingival Vascular Inflammation and Insulin Resistance. *Journal of Dentistry Research*, 93(6): 596-601.

via a transcriptional mechanism. *Mol Med Rep*, 14(6): 5707-5712.

25. Soydas T., Sarac E., Cinar S., Dogan S., Solakoglu S., Tunkdemir M., Sultuybek G. 2018. The protective effects of metformin in an in vitro model of aging 3T3 fibroblast under the high glucose conditions. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 74(2): 273-281.

26. Sun S., Liu L., Tian X., Guo Y., Cao Y., Mei Y., Wang C. 2019. Icariin Attenuates high glucose-induced apoptosis, oxidative stress, and inflammation in human umbilical venous endothelial cells. *Planta Medica*, 85(6): 473-482.

27. Xia N., Diaber A., Forstermann U., Li H. 2017., Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, 174(12): 1633-1646.

28. Yu J., Nam D., Park K.S. 2020. Substance P enhances cellular migration and inhibits senescence in human dermal fibroblasts under hyperglycemic conditions. *Biochemistry and Biophysics Research Community*, 522(4): 917-923.

29. Hu L., huang B., Bai S., Tan J., Liu Y., Chen H., Zho L., Zhang J. 2021. SO2 derivatives induce dysfunction in human trophoblasts via inhibiting ROS/IL-6/STAT3 pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safty*, 210: 111872.

30. Karlowicz-Bodalska K., Han S., Freier S., Smolenski M., Bodalska A. 2017., Curcuma Longa as Medicinal Herb in the Treatment of Diabet- Ic Complications. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 74(2): 605-610.

The Antioxidant Effect of N-Acetylcysteine on the Expression of SOD and HOG Genes in Human Dermal Fibroblast in High Glucose State

Bahareh Safavi, Zeinab Piravar*, Mina Ramezani

Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Wound healing in diabetic patients is delayed, because of oxidative stress. This study aims at investigating the molecular changes in Human Dermal Fibroblasts (HDFs) in a high-glucose state and improving the effect of N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) and gene expression of oxidative genes Super-Oxide Dismutase (SOD) and Heme Oxygenase1 (*HO1*). HDFs were cultured in 5.5, 25, 50, and 75 mM glucose concentrations for 72 hours. Cell proliferation was examined via 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assays. Oxidative stress markers of *SOD* and *HO1* were quantified with real-time Polymerase Chain Reaction (PCR). The antioxidant effect of NAC on 1 mM was examined to evaluate oxidative markers in the glucose effects on the HDFs. The MTT assay revealed a decline in cell viability in 50 and 75 mM glucose concentrations. mRNA level of *SOD* and *HO1* was upregulated. The antioxidant addition of NAC reduced the inhibitory effect of the high-glucose state on the proliferation of the HDFs. A high-glucose state impairs the *in vitro* proliferation and migration of HDFs and may, therefore, induce increased oxidative stress and cellular dysfunction. The antioxidant effect of NAC ameliorates the damaging impact of a high-glucose state.

Keywords: Oxidative stress, High glucose, Superoxide dismutase, Heme Oxygenase1, N-acetyl cysteine