



Original Research Paper

The effects of N-acetyl cysteine on the expression of *MMP9* and *TIMP2* genes in the liver tissue of cadmium exposed rats

Mohammad Mahdi Jafarzadeh ¹, Najmeh Ranji ^{1*}, Ehsan Aboutaleb ^{1,2}

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

² Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Key Words

Cadmium
MMP9
 N-acetylcysteine
 Oxidative stress
TIMP2

Abstract

Introduction: The aim of this experimental study was to investigate the effect of cadmium (Cd) on the expression of matrix metalloproteinase 9 (*MMP9*) and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (*TIMP2*) genes and to investigate the protective role of N-acetylcysteine (NAC) on cadmium toxicity in the liver tissue of rats.

Materials & Methods: In this study, male Wistar rats were randomly divided into 5 groups: control (G1), single dose of cadmium (80 mg/kg) (G2), continuous dose of cadmium (2.5 mg/kg) (G3), Single dose of cadmium (80 mg / kg) and continuous dose of NAC (50 mg/kg) (G4) and continuous dose of cadmium (2.5 mg/kg) and continuous dose of NAC (50 mg/kg) (G5). Hematoxylin and eosin (H&E) staining was used to study histopathological changes. Cadmium concentration was measured by graphite furnace spectroscopy in the liver samples. The expression of *MMP9* and *TIMP2* genes was evaluated using RT-PCR.

Results: Cadmium exposure, especially at continuous dose, was associated with severe tissue damage and increased inflammatory cells in the liver. The mean tissue of cadmium concentration was significantly increased by 27% ($P<0.05$) in the G2 group and 60% ($P<0.01$) in G3 group. NAC treatment in G4 group ($P<0.01$) and G5 group ($P<0.01$) significantly reduced the tissue concentration of cadmium. Cadmium also increased the expression of *MMP9* gene ($P<0.001$) and *TIMP2* gene ($P<0.01$) in G2 and G3 groups. NAC treatment significantly reversed these effects.

Conclusion: Results suggested that NAC protects liver cells by decreasing the accumulation of cadmium and reducing the expression of *TIMP2* and *MMP9* genes.

* Corresponding Author's email: n_ranji@iaurasht.ac.ir

Received: 21 December 2020; Reviewed: 26 January 2021; Revised: 31 March 2021; Accepted: 3 May 2021

(DOI): 10.22034/AEJ.2021.280495.2495

مقاله پژوهشی

تأثیر N-استیل سیستئین بر بیان ژن‌های *MMP9* و *TIMP2* در بافت کبدی رت‌های مواجهه یافته با کادمیوم

محمد مهدی جعفرزاده^۱، نجمه رنجی^{۱*}، احسان ابوطالب^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

^۲ گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: هدف از این مطالعه تجربی بررسی اثر کادمیوم (Cd) بر بیان ژن‌های ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (*MMP9*) و مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز ۲ (*TIMP2*) و بررسی نقش محافظتی N-استیل سیستئین (NAC) بر سمیت کادمیوم در بافت کبد رت‌ها بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، رت‌های نر ویستار به‌طور تصادفی به ۵ گروه: شاهد (G1)، تک دوز کادمیوم (۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) (G2)، دوز پیوسته کادمیوم (۲/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) (G3)، تک دوز کادمیوم (۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و دوز پیوسته NAC (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) (G4) و دوز پیوسته کادمیوم (۲/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و دوز پیوسته NAC (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) (G5) تقسیم شدند. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) برای مطالعه تغییرات هیستوپاتولوژی استفاده شد. غلظت کادمیوم به‌روش اسپکتروسکوپی کوره‌گرافیتی در نمونه‌های کبدی اندازه‌گیری شد. بیان ژن‌های *MMP9* و *TIMP2* با استفاده از RT-PCR ارزیابی شد.

نتایج: مواجهه با کادمیوم، به‌ویژه در دوز پیوسته با آسیب شدید بافتی و افزایش سلول‌های التهابی در بافت کبدی همراه بود. میانگین غلظت بافتی کادمیوم ۲۷٪ در گروه G2 ($P < 0/05$) و ۶۰٪ در گروه G3 ($P < 0/01$) افزایش معنی‌دار داشت. تیمار با NAC در گروه G4 ($P < 0/01$) و G5 ($P < 0/01$) به‌طور معنی‌داری غلظت بافتی کادمیوم را کاهش داد. کادمیوم هم‌چنین بیان ژن *MMP9* ($P < 0/001$) و *TIMP2* ($P < 0/01$) را در گروه‌های G2 و G3 افزایش داد. تیمار با NAC به‌طور معنی‌داری این اثرات را معکوس کرد.

نتیجه‌گیری و بحث: یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که NAC سلول‌های کبدی را با کاهش تجمع کبدی کادمیوم و کاهش بیان ژن‌های *MMP9* و *TIMP2* محافظت می‌کند.

مقدمه

MMPs تاثیر شدیدی بگذارد (۹). مطالعات نشان داده‌اند که افزایش استرس اکسیداتیو باعث افزایش بیان *MMP9* و آسیب مغزی (۱۰) در سکنه حاد ایسکمیک (۱۱) در بیماران مبتلا به سندرم حاد عروق کرونر (۱۲) و در سلول‌های اندوتلیال به واسطه کادمیوم می‌شود (۱۳). با توجه به القاء استرس اکسیداتیو توسط کادمیوم، در این مطالعه تلاش شد عوارض این فلز سنگین با مصرف آنتی‌اکسیدان NAC را در رت‌های تحت تیمار کاهش داده و سپس میزان عوارض بافتی، سطح کادمیوم بافتی و بیان دو ژن *MMP9* و *TIMP2* در هر پنج گروه تیمار شده با کادمیوم و یا NAC مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جامعه آماری و گروه‌بندی رت‌ها: در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۰ رت نر نژاد ویستار (با سن ۸ تا ۱۰ هفته) با میانگین وزنی ۲۰۰-۱۵۰ گرم از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتوپاستور ایران (تهران) خریداری و وارد مطالعه شدند. رت‌ها به تعداد ۳ عدد در هر قفس از جنس پلی‌کربنات (۱۵ در ۱۵ در ۳۰ سانتی‌متر)، در شرایط آب و هوایی کنترل شده یکسان (دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 50 ± 5 درصد، و سیکل شب و روز ۱۲:۱۲) و با رژیم غذایی استاندارد و آب مورد نیاز در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. پس از این که رت‌ها به مدت یک هفته با محیط و شرایط آزمایشگاه منطبق شدند، به پنج گروه تقسیم شدند. رت‌ها در گروه کنترل (G1) به مدت ۴ هفته تحت رژیم غذایی استاندارد قرار گرفتند، در حالی که رت‌های گروه دریافت‌کننده کادمیوم، به ۴ زیرگروه ۶ تایی شامل گروه دریافت‌کننده تک دوز خوراکی کادمیوم (G2)، دوز پیوسته کادمیوم (G3)، تک دوز کادمیوم + دوز پیوسته NAC (G4) و دوز پیوسته کادمیوم + دوز پیوسته NAC (G5) تقسیم شدند. تعیین غلظت کادمیوم و NAC براساس مطالعات پیشین تعیین شد (۱۴، ۱۵). تجویز کادمیوم و NAC به صورت گاوژ انجام شد.

تیمار موش‌ها: رت‌ها در گروه G2 علاوه بر غذای استاندارد، تک دوز محلول Cd (غلظت ۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) در روز اول مطالعه دریافت کردند. رت‌ها در گروه G3 دوز پیوسته Cd (با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) هر روز به مدت ۴ هفته دریافت کردند. رت‌ها در گروه G4 تک دوز محلول Cd (غلظت ۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) فقط در روز اول مطالعه و NAC (غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) هر روز به مدت ۴ هفته دریافت کردند. رت‌ها در گروه G5 دوز پیوسته Cd (با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و دوز پیوسته NAC (با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) هر روز به مدت ۴ هفته دریافت کردند.

کادمیوم (Cd) کاربردهای متعددی در صنایع مختلف نظیر آبکاری فلزات، رنگ‌رزی، پلاستیک‌سازی و باتری‌سازی دارد، اما به عنوان عنصر ضروری بدن محسوب نمی‌گردد و افزایش آن منجر به اثرات پاتولوژیک شدیدی بر روی بدن می‌گردد و افزایش این عنصر، اثرات زیست‌محیطی بر آب‌های زیرزمینی، جانداران آبی و محصولات کشاورزی دارد (۱، ۲). مطالعات نشان داده که کادمیوم حتی در غلظت‌های پائین نیز برای انسان سمی و خطرناک بوده و سبب مشکلات مختلفی نظیر آسیب و تخریب کلیه، مشکلات ربوی، صدمات استخوانی، سرطان و غیره می‌شود (۳). عنصر کادمیوم از طریق مسیرهای مختلفی از جمله آب، خاک، هوا، محصولات حیوانی، آلودگی‌های کارخانجات، غذاهای دریایی و غیره وارد زنجیره غذایی انسان می‌شود. انسان از طریق رژیم غذایی، آب، آلوده‌کننده‌های محیطی، دود سیگار و غیره در معرض آلودگی با کادمیوم قرار می‌گیرد (۴). کادمیوم به طور معمول از طریق تنفس، گوارش و یا پوست جذب بدن می‌شود و از طریق کلیه‌ها، ادرار و به ندرت از راه تعریق دفع می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که عنصر کادمیوم عوارض پاتولوژیک بر انسان داشته که مهم‌ترین آن اختلالات کبدی و کلیوی می‌باشد (۵). مطالعات نشان داده‌اند یکی از مکانیسم‌های تخریبی کادمیوم بر بافت‌ها، افزایش استرس اکسیداتیو و افزایش فعالیت پروتئاز‌هایی نظیر ماتریکس متالوپروتئینازها (*MMPs*) می‌باشد. ماتریکس متالوپروتئینازها یک گروه از آنزیم‌های اندونوکلاز وابسته به عنصر روی هستند که نقش مهمی در هضم پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی (ECM= Extra cellular matrix) به‌ویژه کلاژن‌ها دارند. در واقع *MMPs* در فرآیندهای مهمی از جمله تکامل جنینی، مورفوژنز، رمدولینگ بافت‌ها، رگزایی، رشد استخوان، ترمیم زخم‌ها و ترمیم بافت‌ها نقش مهمی دارند. مطالعات اخیر نشان داده که *MMPs* در رشد، مهاجرت، تمایز، فرآیندهای التهابی و آپوپتوز سلولی دارای اهمیت هستند (۶). این پروتئازها در سلول‌های مختلفی از جمله فیبروبلاست‌ها، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شوند. تاکنون بیش از ۲۰ نوع *MMPs* در پستانداران شناخته شده است که به ۶ خانواده تقسیم‌بندی می‌شوند (۷). مهار کننده‌های بافت متالوپروتئینازها (*TIMPs*)، یک خانواده چهار عضوی در انسان هستند که تنظیم‌کننده‌های *MMPs* هستند. *TIMP2* قابلیت اتصال به دومین‌های هموپکسین مربوط به *MMP2* و *MMP9* و ایجاد یکی از قوی‌ترین تعاملات جفتی *TIMP/MMP* را دارد (۸). بیان *TIMPs* توسط انواعی از سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد کنترل می‌گردد. بنابراین، تغییر در بیان و ترشح انواعی از سایتوکاین‌های پیش التهابی و فاکتورهای رشد می‌تواند نهایتاً بر روی بیان و فعالیت *TIMPs*

معنی‌داری برای تمام محاسبات $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد.

جدول ۲: مقایسه تغییرات نسبت بیانی ژن MMP9 در گروه‌های مختلف مواجهه یافته با کادمیوم و NAC

P-value	نوع بیان	میزان تغییرات		نوع مقایسه بین گروه‌ها
		بیان	بیان	
۰/۰۴۶	کاهش	۳/۶۳۷	کنترل در مقابل تک دوز کادمیوم	
<۰/۰۰۱	کاهش	۴۳/۱۲۵	کنترل در مقابل دوز پیوسته کادمیوم	
۰/۰۹۹	کاهش	۰/۵۷۵	کنترل در مقابل تک دوز کادمیوم + NAC	
۰/۰۳۷	کاهش	۷/۷۵۹	کنترل در مقابل دوز پیوسته کادمیوم + NAC	
۰/۰۰۷	کاهش	۱۱/۸۵۸	تک دوز کادمیوم در مقابل دوز پیوسته کادمیوم	
۰/۰۷۹	کاهش	۲/۱۳	تک دوز کادمیوم در مقابل دوز پیوسته کادمیوم + NAC	
۰/۰۳۹	کاهش	۶/۳۲۷	تک دوز کادمیوم + NAC در مقابل تک دوز کادمیوم	
<۰/۰۰۱	کاهش	۷۵/۰۲۲	تک دوز کادمیوم + NAC در مقابل دوز پیوسته کادمیوم	
۰/۰۱۸	کاهش	۱۳/۴۹۸	تک دوز کادمیوم + NAC در مقابل دوز پیوسته کادمیوم + NAC	
۰/۰۲۳	کاهش	۵/۵۵۸	دوز پیوسته کادمیوم + NAC در مقابل دوز پیوسته کادمیوم	

$P \text{ value} < 0.05$ به‌عنوان میزان معنی‌داری در نظر گرفته شد. از آزمون ANOVA یک‌طرفه (Post Hoc-Tukey) برای مقایسه میانگین بیان ژن MMP9 بین گروه‌های مختلف استفاده شد.

نتایج

نتایج هیستوپاتولوژیکی بافت کبدی گروه‌های مورد مطالعه، در شکل ۱ نشان داده شده است. هیچ نوع علامتی از ناهنجاری یا آسیب ساختاری در سلول‌های کبدی در گروه شاهد یا G1 مشاهده نگردید با این حال برش بافتی کبدی در رت‌های گروه G3 (دریافت‌کننده دوز پیوسته کادمیوم) دال بر افزایش التهاب و ناهنجاری‌های ساختاری بود. برش‌های بافتی در گروه‌های دریافت‌کننده NAC و کادمیوم (گروه‌های G4 و G5) نشان‌دهنده کاهش ناهنجاری‌ها در مقایسه با گروه‌های صرفاً دریافت‌کننده کادمیوم بود. تیمار مکمل NAC منجر به کاهش تعداد سلول‌های التهابی و در نتیجه خفیف شدن پروسه التهابی در رت‌های دریافت‌کننده کادمیوم گردید (شکل ۱). میانگین غلظت بافتی عنصر کادمیوم در گروه‌های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. غلظت کادمیوم در بافت کبدی رت‌های دریافت‌کننده تک دوز

نمونه‌گیری: پس از اتمام دوره تیمار، تمام حیوانات با شرایط کاملاً مشابه و به‌دنبال ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی و ۴۸ ساعت پس از آخرین تیمارها، با تزریق داخل صفاقی کتامین ۱۰ درصد (Bermer Pharma, Germany) با غلظت ۶۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم و زایلوزین (Bimerda, Canada) با غلظت ۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن و با نسبت ۵ به ۲ بی‌هوش شدند. نمونه‌های بافت کبدی (حدود ۱۵۰ میلی‌گرم) در فسفات بافر (pH ۷/۰) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه هموژنیز هموژنیزه شده و سپس در دور ۱۲۰۰۰ rpm با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید (۱۶). محلول رویبی در دمای ۸۰- سانتی‌گراد برای مطالعات مولکولی نگهداری شد. بخشی از بافت کبدی بلافاصله پس از بی‌هوش کردن رت‌ها جداسازی و جهت بررسی هیستوپاتولوژیکی به روش میکروسکوپی، در فرمالین ۱۰٪ نگه‌داری شد.

بررسی بیان ژن‌های MMP9 و TIMP2: از پنج گروه رت‌ها، تخلیص RNA نام از بافت‌های کبدی با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناکلون، تهران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. RNA تخلیص شده از لحاظ کمی توسط نانودراپ (۱۰۰۰ Thermo Fisher Scientific، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت. سپس cDNA طبق دستورالعمل کیت PrimScript RT reagent Kit (TakaRa، ژاپن) سنتز گردید. جهت بررسی بیان ژن‌ها از دستگاه Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Australia) طبق برنامه‌دمایی جدول ۱ استفاده شد. جهت نرمال‌سازی نتایج از ژن GAPDH به‌عنوان ژن رفرنس استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول ۲ نشان داده شده است. برنامه دمایی واکنش Q-RT-PCR به ترتیب شامل این موارد بود: مرحله وا سرشت شدن ابتدایی (۹۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه) و ۴۰ سیکل شامل ۹۵ °C به مدت ۲۰ ثانیه و ۶۰ °C به مدت ۲۰ ثانیه. آنالیز بیان ژن‌ها به کمک معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گرفت.

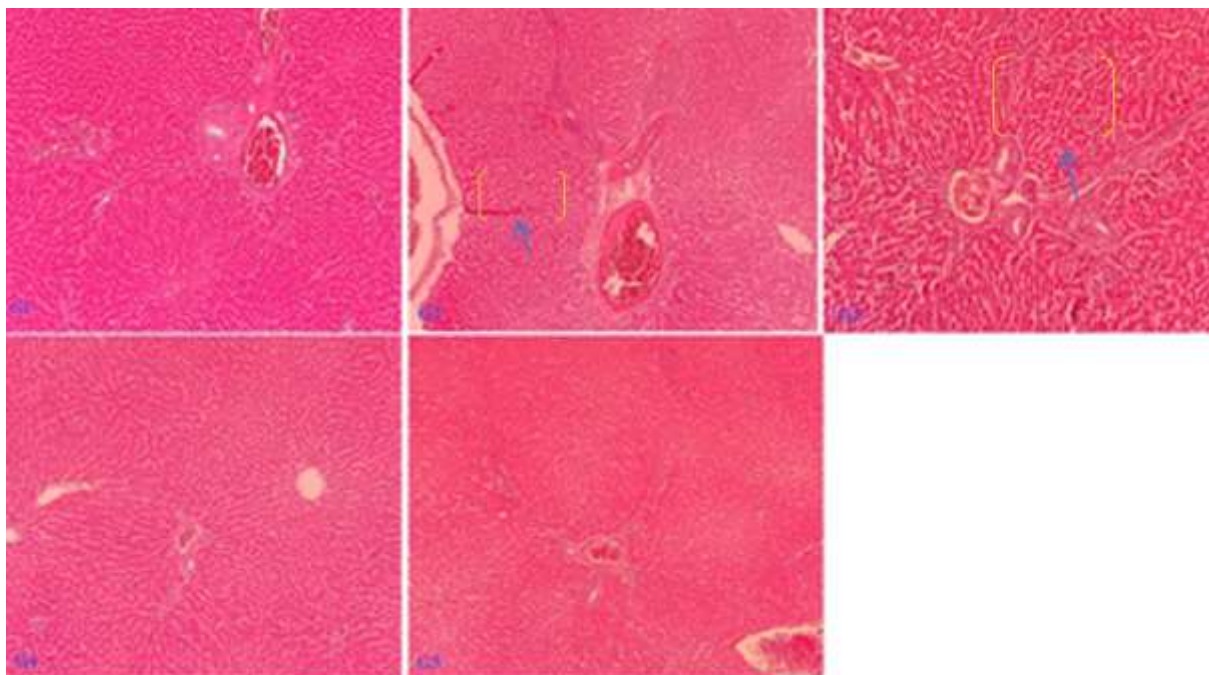
جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Q-RT-PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر
MMP9-F	5'-ACCACCGCCAACTATGACCAG-3'
MMP9-R	5'-TGCTTGCCAGGAAGACGA-3'
TIMP2-F	5'-GTTTTGCAATGCAGATGTAG-3'
TIMP2-R	5'-ATGTCGAGAACTCCTGCTT-3'
GAPDH-F	5'-AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3'
GAPDH-R	5'-CATACTCAGCACCAGCATCACC-3'

آنالیزهای آماری: نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شدند. برای بررسی معنی‌داری هریک از متغیرهای مورد تحقیق بین گروه‌های مختلف، از روش آنالیز One Way ANOVA و در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار آماری از آزمون تعقیبی توکی در برنامه ANOVA جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد. سطح

ترتیب به‌میزان ۳/۶۳ برابر ($P=0/046$) و ۴۳/۱۲ برابر ($P<0/001$) نشان دادند (جدول ۲). در مقایسه با گروه شاهد، تیمار رت‌ها در گروه‌های تک دوز کادمیوم ($G2$) و دوز پیوسته کادمیوم ($G3$) منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن $TIMP2$ به‌ترتیب به‌میزان ۵/۱۴ برابر ($P<0/001$) و ۱۲/۶۱ برابر ($P<0/001$) گردید (جدول ۳). رت‌های دریافت‌کننده کادمیوم + NAC در هر دو گروه $G4$ و $G5$ کاهش بیان ژن‌های $TIMP2$ و $MMP9$ در مقایسه با رت‌های دریافت‌کننده صرفاً کادمیوم نشان دادند. میزان بیان ژن $TIMP2$ و $MMP9$ در رت‌های دریافت‌کننده تک دوز کادمیوم + دوز پیوسته NAC ($G4$) به‌طور معنی‌داری به‌ترتیب ۴/۶۰ برابر ($P=0/033$) و ۶/۳۲ برابر ($P=0/039$) در مقایسه با رت‌های دریافت‌کننده صرفاً تک دوز کادمیوم ($G2$) کاهش داشت (جدول ۲ و ۳). میزان بیان ژن $TIMP2$ و $MMP9$ در رت‌های دریافت‌کننده تک دز کادمیوم و NAC ($G4$) و رت‌های دریافت‌کننده دوز پیوسته کادمیوم و NAC (گروه $G5$) به‌طور معنی‌داری به‌ترتیب به اندازه ۳/۱۲ برابر ($P=0/014$) و ۵/۵۵ برابر ($P=0/023$) در مقایسه با رت‌های دریافت‌کننده صرفاً تک دوز ($G2$) یا دوز پیوسته کادمیوم ($G3$) کاهش نشان دادند.

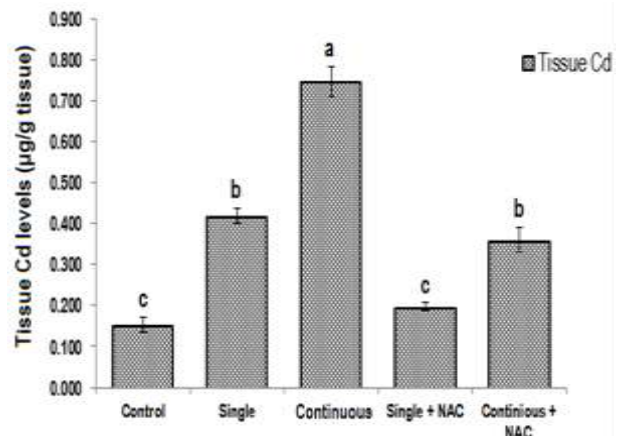
کادمیوم ($G2$) به‌میزان ۲۷٪ ($P<0/05$) و در رت‌های دریافت‌کننده دوز پیوسته کادمیوم ($G3$) به‌میزان ۶۰٪ ($P<0/01$) افزایش یافت. میانگین غلظت عنصر کادمیوم در نمونه‌های بافت کبدی رت‌های دریافت‌کننده تک‌دوز کادمیوم برابر با $0/41 \pm 0/045$ میکروگرم/گرم بود. درحالی‌که میانگین غلظت عنصر کادمیوم در نمونه‌های بافت کبدی رت‌های دریافت‌کننده دوز پیوسته کادمیوم برابر با $0/74 \pm 0/045$ میکروگرم/گرم بود. مصرف مکمل NAC به‌طور معنی‌داری سبب کاهش غلظت عنصر کادمیوم در بافت کبدی رت‌های گروه $G4$ ($0/19 \pm 0/025$ میکروگرم/گرم) و گروه $G5$ ($0/36 \pm 0/075$ میکروگرم/گرم) گردید (شکل ۲). تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های $TIMP2$ و $MMP9$ بین گروه‌ها مشاهده گردید ($P<0/01$). رت‌های تیمار شده با غلظت تک دوز ($G2$) و دوز پیوسته کادمیوم ($G3$) افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های $TIMP2$ و $MMP9$ در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان دادند. درحالی‌که، تجویز NAC به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش بیان ژن‌های $TIMP2$ و $MMP9$ در رت‌های گروه $G4$ و $G5$ گردید. در مقایسه با گروه شاهد، رت‌ها در گروه‌های تک دوز کادمیوم ($G2$) و دوز پیوسته کادمیوم ($G3$) افزایش معنی‌دار بیان ژن $MMP9$ را به



شکل ۱: بررسی میکروسکوپی از برش‌های بافتی کبدی در گروه‌های مختلف. بافت کبد رت‌ها در گروه شاهد ($G1$) از لحاظ ساختاری طبیعی و سالم بود، درحالی‌که برش‌های بافتی رت‌ها در گروه دریافت‌کننده تک دوز کادمیوم ($G2$) و دوز پیوسته کادمیوم ($G3$) افزایش سلول‌های خونی در مجاری مرکزی (central vein) و افزایش سطح سلول‌های التهابی را نشان می‌دهد. تجویز NAC منجر به کاهش تعداد سلول‌های التهابی در رت‌های دریافت‌کننده کادمیوم در گروه‌های $G4$ (تک دوز کادمیوم و دوز پیوسته NAC) و $G5$ (دوز پیوسته کادمیوم و دوز پیوسته NAC) گردید (میزان بزرگ‌نمایی X20 می‌باشد).

بحث

در این مطالعه، تاثیر فلز سنگین کادمیوم و ترکیب آنتی‌اکسیدانی N-استیل سیستئین (NAC) بر بافت کبدی، غلظت عنصر کادمیوم در کبد و همچنین بیان ژن‌های *TIMP2* و *MMP9* در گروه‌های مختلف رت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که کادمیوم به‌ویژه در دوز پیوسته (G3)، باعث آسیب‌های ساختاری یا مورفولوژیکی سلول‌های بافت کبدی گردید. مطالعات نشان داده‌اند که دریافت کادمیوم با آسیب شدید ساختاری در بافت‌های مختلف همراه می‌باشد. در مطالعه EL-Shahat و همکاران، مشخص شد که دریافت کادمیوم با دز (۰/۴ درصد w/v) منجر به آسیب‌های ساختاری شدید و همچنین تجمع سلول‌های التهابی در بافت بیضه رت‌ها گردید (۱۷). در مطالعه Hao و همکاران، تاثیر دوز حاد (۲۹ میلی‌گرم بر لیتر) و دوز مزمن کادمیوم (۰/۲-۷۵/۹ میلی‌گرم/لیتر) بر مورفولوژی بافت کبد و روده کوچک رت‌ها بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد که کادمیوم منجر به تغییرات ساختاری شدیدی در بافت کبدی و روده‌ای و همچنین وقوع نکروز در این بافت‌ها شد (۱۸). نتایج مطالعه اخیر نشان داد که دریافت کادمیوم به‌ویژه در دوز پیوسته (۲/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) در گروه G3 به‌طور معنی‌داری با تجمع کبدی عنصر کادمیوم در رت‌های مورد مطالعه همراه بود. به‌نظر می‌رسد که کادمیوم از طریق مکانیسم‌های مختلفی منجر به آسیب مورفولوژیکی شدید بافتی می‌گردد. برخی از این مطالعات بر این عقیده‌اند که القاء استرس اکسیداتیو، واکنش‌های التهابی و در پی آن فعال شدن برخی از آنزیم‌های مخرب به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم در آسیب ساختاری بافتی می‌باشد (۱۹، ۲۰، ۲۱). اگرچه سطح بافتی عنصر کادمیوم و بیان ژن‌های *TIMP2* و *MMP9* در بافت کبدی رت‌های مواجهه یافته با دوز پیوسته کادمیوم (گروه G3) تا حدودی بالا بود، اما NAC این ناهنجاری‌ها را به‌طور معنی‌داری در گروه دریافت‌کننده دوز پیوسته کادمیوم + دوز پیوسته NAC (گروه G5) کاهش داد. همچنین در گروه دریافت‌کننده تک دوز کادمیوم در صورت مصرف روزانه NAC به‌مدت ۴ هفته (G4) میزان کادمیوم در بافت کبدی در مقایسه با گروه دریافت‌کننده تک دوز کادمیوم (G2) کاهش شدیدی داشت. مطالعات انجام‌شده توسط دیگران نشان‌دهنده تجمع کادمیوم در بافت کبد رت پس از مواجهه با دزهای حاد و مزمن می‌باشد (۲۲، ۲۳، ۲۱). به‌نظر می‌رسد مصرف NAC با کاهش غلظت کادمیوم در بافت کبدی، منجر به کاهش سطح رادیکال‌های آزاد و در نتیجه استرس اکسیداتیو می‌گردد. در تعداد زیادی از مطالعات انجام‌شده با کادمیوم، اثرات آنتی‌اکسیدانی NAC چه در رده سلولی کبد و چه در بافت کبد رت نشان داده شده است (۲۴، ۲۵، ۲۶). بنابراین، این



شکل ۲: مقایسه سطح عنصر کادمیوم در بافت کبدی گروه‌های مختلف. تفاوت معنی‌داری در سطح بافتی عنصر کادمیوم بین گروه‌های با حروف آلفابتیک مشابه دیده نشد. میانگین سطح عنصر کادمیوم به ترتیب مقابل بود $a > b > c$. از تست One-Way ANOVA: Post Hoc-Tukey برای مقایسه سطح عنصر کادمیوم بین گروه‌ها استفاده گردید. میزان عنصر کادمیوم به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار در نمودار نشان داده شده است.

جدول ۳: مقایسه تغییرات نسبت بیانی ژن *TIMP2* در گروه‌های مختلف مواجهه یافته با کادمیوم و NAC

P-value	نوع بیان	میزان تغییرات بیان	نوع مقایسه بیان ژن
<0/001	کاهش	۵/۱۴	کنترل در مقابل تک دوز کادمیوم
<0/001	کاهش	۱۲/۶۱	کنترل در مقابل دوز پیوسته کادمیوم
۰/۹۶	کاهش	۱/۳۸	کنترل در مقابل تک دوز کادمیوم + NAC
۰/۰۴۱	کاهش	۶/۵۴	کنترل در مقابل دوز پیوسته کادمیوم + NAC
۰/۰۰۳	کاهش	۳/۴۸	تک دوز کادمیوم در مقابل دوز پیوسته کادمیوم
۰/۸۳	افزایش	۱/۲۹	تک دوز کادمیوم در مقابل دوز پیوسته کادمیوم + NAC
۰/۰۰۴	کاهش	۳/۲۱	تک دوز کادمیوم + NAC در مقابل تک دوز کادمیوم
<0/001	کاهش	۵/۸۲	تک دوز کادمیوم + NAC در مقابل دوز پیوسته کادمیوم
۰/۰۱۸	کاهش	۳/۷۷	تک دوز کادمیوم + NAC در مقابل دوز پیوسته کادمیوم + NAC
۰/۰۲۲	کاهش	۲/۹۴	دوز پیوسته کادمیوم + NAC در مقابل دوز پیوسته کادمیوم

$P \text{ value} < 0/05$ به‌عنوان میزان معنی‌داری در نظر گرفته شد. از آزمون ANOVA یک‌طرفه (Post Hoc-Tukey) برای مقایسه میانگین بیان ژن *TIMP2* بین گروه‌های مختلف استفاده شد.

مکمل NAC سلول‌های بافت کبدی را در برابر آسیب‌های سلولی، ژنوتوکسیسیته و استرس اکسیداتیو ناشی از سرب محافظت می‌کند (۳۱). در مطالعه Shieh و همکاران گزارش شد که مصرف مکمل NAC پاسخ‌های استرس اکسیداتیو القاء شده با مالاشیون (malathion) را معکوس کرده و با تنظیم بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک (Bax, Bcl2، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹) مانع از آپوپتوز سلول‌های نرمال آستروسیت انسانی می‌گردد (۳۲). در مطالعه Fievez و همکاران، بیان *MMP2*، *MMP9* و بازدارنده‌های بافتی متالوپروتئیناز ۱ و ۲ (*TIMP1* و *TIMP2*) در رت‌های در معرض نبولاسیون (Nebulisation) کادمیوم بررسی شد. نتایج این مطالعه حاکی از افزایش قابل توجهی در بیان *MMP2*، *MMP9* و فعالیت *TIMP2* در نمونه‌ها بود، در حالی که تغییر در بیان *TIMP1* معنی‌دار نبود (۳۳). در مطالعه Al-Nahdi و همکاران مشخص شد که NAC نه تنها استرس اکسیداتیو القاء شده توسط استرپتوزوتوسین (Streptozotocin) را کاهش می‌دهد، بلکه آسیب DNA و بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک را در سلول‌های بتا پانکراس نیز مهار می‌کند (۳۴). مطالعه González-Puebla و همکاران، نشان داد که در مادران با غلظت خونی ۴/۶۸ میکروگرم بر دسی‌لیتر سرب، افزایش قابل توجهی در بیان *MMP2*، *MMP9* در پره‌های جفت دیده می‌شود. این در حالی بود که بیان *TIMP2* کاهش بسیار شدیدی نشان داد که خود باعث افزایش قابل توجه نسبت *MMP2/TIMP2* شد، که احتمالاً در ترمیم آسیب وارده القاء شده با سرب به واسطه *MMP2* موثر باشد (۳۵). در مطالعه‌ای که توسط Rezaei و همکاران انجام شد، مشخص شد که NAC با اثرات ضد ROS ضمن کاهش ۶۵ درصدی میزان *MMP2*، بیان *TIMP2* را در کبد رت‌های دارای فیروز کبدی کاهش داده و وضعیت آنتی‌اکسیداتیو کبد را بهبود می‌بخشد (۳۶). در مطالعه Shirin Sokhan و همکاران مشخص شد که میزان بیان *MMP2* و *MMP9*، در بافت ریه رت‌های مواجهه یافته با غلظت‌های تک دوز و دوز پیوسته کادمیوم افزایش یافته است. اگر چه استفاده از مکمل NAC توانسته این اثرات را تعدیل کند (۳۷). با توجه به نتایج مطالعات پیشین به نظر می‌رسد افزایش *TIMP2* در اکثر موارد برای کاهش اثرات *MMP2* رخ داده، با این حال *TIMP2* دارای قابلیت اتصال به *MMP9* نیز هست و می‌تواند این پروتئین را نیز مهار کند. هم‌چنین با توجه به این که کادمیوم از مسیر استرس اکسیداتیو و فعال‌سازی سیتوکین‌ها، می‌تواند اکثر *MMPs* را فعال کند افزایش هم‌زمان *MMP2*، *MMP9* در بافت کبد رخ داده و *TIMP2* در پاسخ به این افزایش و برای خنثی‌سازی اثرات رمدلینگ این دو افزایش بیان داشته است. مطالعه Chen و همکاران، اثر درمانی NAC (غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) را علیه آپوپتوز و استرس اکسیداتیو ناشی از کادمیوم نشان دادند. آن‌ها

نتایج دال بر این می‌باشد که NAC به‌طور جالب توجهی نه تنها تجمع کادمیوم بافتی را کاهش می‌دهد، بلکه با کاهش سطح استرس اکسیداتیو کمک زیادی به بهبود وضعیت آنتی‌اکسیداتیو خواهد داشت و احتمالاً به همین منظور بهبود مورفولوژیکی یا ساختاری در بافت رخ داده است. در این مطالعه، بیان ژن‌های پروتئیناز *TIMP2* و *MMP9* به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های احتمالی آسیب بافت کبدی در رت‌های دریافت‌کننده کادمیوم بررسی گردید. نتایج مطالعه اخیر نشان داد که مصرف کادمیوم به‌ویژه در دوز پیوسته (گروه G3) به طور معنی‌داری با افزایش بیان ژن‌های *TIMP2* و *MMP9* در بافت کبدی همراه بوده است. به‌نظر می‌رسد که افزایش بیان و فعالیت این آنزیم‌های پروتئیناز یکی از مکانیسم‌های مهم آسیب بافتی در رت‌های دریافت‌کننده کادمیوم باشد. در یک مطالعه مشخص شد که دریافت کادمیوم با غلظت ۵۰ میکرومولار به‌صورت وابسته به دوز منجر به افزایش بیان ژن *MMP9* در سلول‌های ریوی در شرایط *in vitro* می‌گردد (۲۷). مطالعات قبلی نیز گزارش کردند که فعال‌سازی ماکروفاژهای بافتی در اثر پاسخ به کادمیوم یک منبع مهم برای القاء واسطه‌های التهابی IL-1، IL-6، TNF- α و IL-8 و در نتیجه افزایش بیان و فعال‌سازی پروتئینازهای *MMPs* می‌باشند (۲۸). در یک مطالعه نشان دادند که کادمیوم در غلظت‌های بالا (۱ میکروگرم/کیلوگرم وزن بدن برای ۳۷ روز) به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش فعالیت *MMP9* در بافت مغزی موش‌ها گردید (۲۹). در مطالعه دیگر مشخص شد که عنصر کادمیوم از طریق مسیرهای وابسته به EGFR، ROS، AP-1 و NF-Kb منجر به افزایش بیان ژن *MMP9* در سلول‌های اندوتلیال انسانی می‌گردد (۱۳). با توجه به این که کادمیوم منجر به تخلیه آنتی‌اکسیدان‌ها و افزایش بیان *MMPs* و در پی آن التهاب می‌گردد، به‌نظر می‌رسد که مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیداتیو احتمالاً نقش مهمی در کاهش اثرات توکسیسیته ناشی از کادمیوم داشته باشد. به‌همین منظور، در مطالعه حاضر اثرات مصرف مکمل NAC بر سطح بافتی عنصر کادمیوم و هم‌چنین بیان ژن‌های *TIMP2* و *MMP9* در بافت کبدی رت‌ها ارزیابی گردید. نتایج تحقیق اخیر نشان داد که مصرف مکمل NAC به‌طور معنی‌داری آسیب‌های مورفولوژیکی و التهابی سلول‌های بافت کبدی را کاهش می‌دهد. در مطالعه Gomes De Amorim گزارش شد که تجویز NAC منجر به بهبود ساختار مورفولوژیکی تخمدان در رت‌های دریافت‌کننده پیوند می‌گردد (۳۰). در مطالعه Wang و همکاران مشخص شد که دریافت NAC باعث کاهش سطح بیومارکرهای استرس اکسیداتیو، بیان ژن‌های Bax، کاسپازهای ۳ و ۹ بعد از مواجهه با ترکیب زیرالنون (Zearalenone) یک مایکوتوکسین استروژنی غیراستروئیدی موجود در مواد غذایی می‌گردد (۲۴). در مطالعه Yedjou و همکاران مشخص شد که مصرف

4. **Godt, J. and Al., E., 2006.** The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol.* 22: 1-12.
5. **Barbier, O. and Al., E., 2005.** Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol.* 99: 105-110.
6. **Woessner, J.F., Dannenberg, A.M., Pula, P.J., Selzer, M.G., Ruppert, C.L., Higuchi, K., Kajiki, A., Nakamura, M., Dahms, N.M., Kerr, J.S., 1990.** Extracellular collagenase, proteoglycanase and products of their activity, released in organ culture by intact dermal inflammatory lesions produced by sulfur mustard. *J Invest Dermatol.* 95: 717-26.
7. **Chakrabarti, S. and Patel, K.D., 2005.** Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res.* 31: 599-621.
8. **Raezadeh-Sarmazdeh, M., Do, L.D. and Hritz, B.G., 2020.** Metalloproteinases and their inhibitors: potential for the development of new therapeutics. *Cells.* 9: 1313.
9. **Roach, D.M., Fitrudge, R.A., Laws, P.E., Millard, S.H., Varelias, A. and Cowled, P.A., 2002.** Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 23: 260-269.
10. **Yu, F., Kamada, H., Niizuma, K., Endo, H. and Chan, P.H., 2008.** Induction of mmp-9 expression and endothelial injury by oxidative stress after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma.* 25: 184-195.
11. **Kelly, P.J., Morrow, J.D., Ning, M., Koroshetz, W., Lo, E.H., Terry, E., Milne, G.L., Hubbard, J., Lee, H. and Stevenson, E., 2008.** Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the Biomarker Evaluation for Antioxidant Therapies in Stroke (BEAT Stroke) study. *Stroke.* 39: 100-104.
12. **Bittner, A., Alcaíno, H., Castro, P.F., Pérez, O., Corbalán, R., Troncoso, R., Chiong, M., Mellado, R., Moraga, F. and Zanolli, D., 2010.** Matrix metalloproteinase-9 activity is associated to oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. *International journal of cardiology.* 143: 98-100.
13. **Lian, S., 2015.** Cadmium induces matrix metalloproteinase-9 expression via ROS-dependent EGFR, NF- κ B, and AP-1 pathways in human endothelial cells. *Toxicology.* 338: 104-116.
14. **Andjelkovic, M., Djordjevic, A.b., Antonijevic, E., Antonijevic, B., Stanic, M. and Kotur-Stevuljevic, J., 2019.** Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead Exposure in Rat Blood, Liver, and Kidney. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 16: 1-21.
15. **Dickey, D.T., Muldoon, L.L., Doolittle, N.D., Peterson, D.R., Kraemer, D.F. and Neuwelt, E.A., 2008.** Effect of N-acetylcysteine route of administration on chemoprotection against cisplatin-induced toxicity in rat models. *Cancer Chemother Pharmacol.* 62: 235-241.
16. **Ma, Z., Chu, L., Liu, H., Wang, W., Li, J., Yao, W., Yi, J. and Gao, Y., 2017.** Beneficial Effects Of Paeoniflorin On Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Induced By High-Fat Diet In Rats. *Sci Rep.* 7: 44819.
17. **El-Shahat, E., 2009.** Altered Testicular Morphology and Oxidative Stress Induced by Cadmium in Experimental Rats and Protective Effect of Simultaneous Green Tea Extract. *Int. J. Morphol.* 27: 757-764.
18. **Hao, W.U., 2015.** Bioaccumulation, morphological changes, and induction of metallothionein gene expression in the digestive system of the freshwater crab *Sinopotamon*

مشاهده کردند که مصرف مزمن کادمیوم (در غلظت‌های ۱۰ تا ۵۰ میلی‌گرم/لیتر) به‌طور معنی‌داری با افزایش تولید ROS، آسیب مغزی و آپوپتوز سلول‌های نورونی همراه می‌باشد (۳۸). همچنین مصرف مکمل NAC به‌طور معنی‌داری تولید ROS القاء شده با کادمیوم را کاهش داد و همچنین آسیب مغزی و مرگ سلول‌های نورونی ناشی از اثر کادمیوم را با افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPX و همچنین افزایش سطح GSH در بافت مغز کاهش داد (۳۸). بنابراین، براساس نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعات انجام شده پیشین، افزایش بیان ژن‌های *TIMP2* و *MMP9* در پی افزایش استرس اکسیداتیو و التهاب احتمالاً به‌عنوان واسطه‌های مهم سمی کادمیوم بر روی بافت کبدی محسوب می‌شوند. از طرفی دیگر، به‌نظر می‌رسد مصرف مکمل NAC به‌طور قابل توجهی اثرات ژنوتوکسیسیته و توکسیسیته ناشی از کادمیوم را کاهش می‌دهد که به مطالعات تکمیلی در این زمینه نیاز دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که مصرف کادمیوم، به‌ویژه به‌صورت پیوسته، به‌طور معنی‌داری با افزایش تجمع کادمیوم در بافت کبدی همراه بوده و این حالت با افزایش بیان ژن‌های *TIMP2* و *MMP9* در بافت کبدی و آسیب سلول‌های کبدی همراه بود. از طرفی مصرف NAC نقش مهمی در حفاظت بافت کبدی اعمال کرد که این اثر از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش بیان ژن‌های *TIMP2* و *MMP9*، کاهش آسیب‌های ساختاری در بافت کبدی بود. بنابراین، مصرف مکمل NAC برای افرادی که در معرض طولانی مدت با کادمیوم می‌باشند توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آقای اصغر بیگی هرچگانی و آقای نیما رحمانی طلائی بابت کمک‌های بی‌دریغشان کمال تشکر و قدردانی را دارد.

منابع

1. **Gholami, M., Fatemi, S.M.R., Falahi, M., Esmaili Sari, A. and Mashinchian, A., 2013.** Influence of individual and mix heavy metal (Cu, Cd) and detergent (LAS) on *Daphnia magna*. *Journal of Animal Environment.* 4(4): 43-48. (In Persian)
2. **Farahmand, F., 2015.** Survey of environmental effects of Fe, As and Cd on the underground water sources of Tehran suburb villages for the use in artificial lakes of fish farming. *Journal of Animal Environment.* 7(1): 229-238. (In Persian)
3. **García-Esquinas, E., 2014.** Cadmium Exposure and Cancer Mortality in a Prospective Cohort: The Strong Heart Study. *Environ Health Perspect.* 122: 363-370.

- cadmium nebulisation in rats. *European journal of pharmacology*. 606: 210-214.
34. **Al-Nahdi, A., John, A. and Raza, H., 2018.** Cytoprotective Effects of N-Acetylcysteine on Streptozotocin- Induced Oxidative Stress and Apoptosis in RIN-5F Pancreatic β -Cells. *Cell Physiol Biochem*. 51: 201-216.
 35. **González-Puebla, E., González-Horta, C., Infante Ramírez, R., Sanin, L., Levario-Carrillo, M. and Sánchez-Ramírez, B., 2012.** Altered expressions of MMP 2, MMP-9, and TIMP-2 in placentas from women exposed to lead. *Human & experimental toxicology*. 31: 662-670.
 36. **Rezaei, A., Ardestani, S.K., Forouzandeh, M., Tavangar, S.M., Khorramizadeh, M.R., Payabvash, S., Nezami, B.G., Jahanshahi, Z., Tavakoli, Z., Shariftabrizi, A. and Dehpour, A.R., 2008.** The effects of N-acetylcysteine on the expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in hepatic fibrosis in bile duct ligated rats. *Hepatol Res*. 38: 1252-1263.
 37. **Shirinsokhan, A., Koohpar, Z.K. and Ranji, N., 2020.** Effects of N-Acetyl Cysteine on the Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in the Lung Tissue of Rats Exposed to Cadmium. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 22: 165-178.
 38. **Chen, S. Ren, Q., Zhang, J., Ye, Y., Zhang, Z. and Xu, Y., 2014.** N-acetyl-L-cysteine protects against cadmium-induced neuronal apoptosis by inhibiting ROS-dependent activation of Akt/mTOR pathway in mouse brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 40: 759-777.
 19. **Koyu, A., Gokcimen, A., Ozguner, F., Bayram, D.S. and Kocak, A., 2006.** Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. *Molecular and cellular biochemistry*. 284: 81-85.
 20. **El-Refaiy, A.L. and Eissa, F.L., 2013.** Histopathology and cytotoxicity as biomarkers in treated rats with cadmium and some therapeutic agents. *Saudi journal of biological sciences*. 20: 265-280.
 21. **Andjelkovic, M., Buha Djordjevic, A., Antonijevic, E., Antonijevic, B., Stanic, M., Kotur-Stevuljevic, J., Spasojevic-Kalimanovska, V., Jovanovic, M., Boricic, N. and Wallace, D., 2019.** Toxic effect of acute cadmium and lead exposure in rat blood, liver, and kidney. *International journal of environmental research and public health*. 16: 274-285.
 22. **Erdem, O., Yazihan, N., Kocak, M.K., Sayal, A. and Akcil, E., 2016.** Influence of chronic cadmium exposure on the tissue distribution of copper and zinc and oxidative stress parameters in rats. *Toxicology and industrial health*. 32: 1505-1514.
 23. **Banni, M., Messaoudi, I., Said, L., El Heni, J., Kerkeni, A. & Said, K. 2010.** Metallothionein gene expression in liver of rats exposed to cadmium and supplemented with zinc and selenium. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 59: 513-519.
 24. **Wang, J., Li, M., Zhang, W., Gu, A., Dong, J. and Li, J., 2018.** Protective Effect of N-Acetylcysteine against Oxidative Stress Induced by Zearalenone via Mitochondrial Apoptosis Pathway in SIEC02 Cells. *Toxins (Basel)*. 10: 407.
 25. **Rahmani Talatappeh, N., Ranji, N. and Beigi Harchegani, A., 2021.** The effect of N-acetyl cysteine on oxidative stress and apoptosis in the liver tissue of rats exposed to cadmium. *Archives of Environmental & Occupational Health*. 1-8.
 26. **Kwok, M.L. and Chan, K.M., 2020.** Oxidative stress and apoptotic effects of copper and cadmium in the zebrafish liver cell line ZFL. *Toxicology reports*. 7: 822-835.
 27. **Yaghooti, H., Firoozrai, M. and Khorramizadeh, M.R., 2012.** Acute cadmium exposure augments MMP-9 secretion and disturbs MMP-9/TIMP-1 balance. *Asian Biomedicine*. 6: 445-451.
 28. **Sarkar, S. and Vw., Y., 2009.** Inflammatory cytokine modulation of matrix metalloproteinase expression and invasiveness of glioma cells in a 3-dimensional collagen matrix. *J Neurooncol*. 91: 157-64.
 29. **Fomenko, O., Shiyntum, H.O.S. and Al, E., 2017.** Effects of Cadmium on the Activity of Matrix Metalloproteinases and Metallothionein Level in the Rat Brain. *Neurophysiology*. 49: 154-157.
 30. **Gomes De Amorim, E.M., 2014.** N-acetylcysteine improves morphologic and functional aspects of ovarian grafts in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 29: 1-8.
 31. **Yedjou, C.G., Waters, D. and Tchounwou, P.B., 2008.** N-Acetyl-cysteine Protection Against Lead-Induced Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Liver Carcinoma (HepG2) Cells. *Met Ions Biol Med*. 10: 419-424.
 32. **Shieh, P., Jan, C.R. and Liang, W.Z., 2019.** The protective effects of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) against oxidative stress-associated apoptosis evoked by the organophosphorus insecticide malathion in normal human astrocytes. *Toxicology*. 417: 1-14.
 33. **Fiévez, L., Kirschvink, N., Zhang, W.H., Lagente, V., Lekeux, P., Bureau, F. and Gustin, P., 2009.** Effects of betamethasone on inflammation and emphysema induced by