



Original Article

Downregulation of Pulmonary Genes *P38-MAPK*, *NF-κB*, and *TGF-β* after Aerobic Exercise and Nanoselenium Supplementation in Male Rats Induced by Cigarette Smoke Extract

Abbas Sheikhol-Islami¹, Fatemeh Shabkhiz^{2*} , Hossein Shirvani³ , Rahman Soori⁴

¹ PhD student of exercise physiology, International Pardis Unit, University of Tehran, Tehran, Iran

² Associate Professor of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Associate Professor of Exercise Physiology, Exercise Physiology Research Center, Baqiyatullah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Full Professor, Exercise Physiology Department, School of Physical Education and Sports Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

***Corresponding author:** Fatemeh Shabkhiz, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: shabkhiz@ut.ac.ir.

DOI: [10.32592/nkums.16.4.35](https://doi.org/10.32592/nkums.16.4.35)

How to Cite this Article:

Sheikhol-Islami A, Shabkhiz F, Shirvani H, Soori R. Downregulation of Pulmonary Genes *P38-MAPK*, *NF-κB*, and *TGF-β* after Aerobic Exercise and Nanoselenium Supplementation in Male Rats Induced by Cigarette Smoke Extract. J North Khorasan Univ Med Sci. 2024;16(4):35-42. DOI: [10.32592/nkums.16.4.35](https://doi.org/10.32592/nkums.16.4.35)

Received: 20 May 2024

Accepted: 11 Aug 2024

Keywords:

Aerobic Exercise
Cigarette Smoke
Lung Disease
Nano Supplement
Selenium

Abstract

Introduction: The present study aimed to assess the effect of aerobic exercise and nanoselenium supplementation on nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B lymphocytes (*NF-κB*), mitogen-activated protein kinase P38 (*P38-MAPK*), and transforming growth factor beta (*TGF-β*) gene expression in the lung tissue of male rats induced by cigarette smoke extract (CSE).

Method: In this experimental study, 40 healthy 6-week-old Wistar male rats with an average weight of 200-220 grams were assigned to five groups, including healthy control group, CSE, CSE+nanoselenium, CSE +aerobic interval training (AIT), and CSE+AIT+nanoselenium supplement. For the CSE group, cigarette smoke extract was injected once every seven days (150 μl by IP injection, one day per week for six weeks). Nanoselenium supplement was also given at the rate of 2.5 mg/kg body weight by gavage, 3 days/week for 6 weeks to the supplemented group. Aerobic interval training was also performed for 49 minutes per day, 5 days/week for 6 weeks as an interval for the training group.

Results: Cigarette smoke extract significantly increased the expression of *P38-MAPK*, *NF-κB*, and *TGF-β* genes in the lungs of rats compared to the healthy control group ($P<0.05$). As a result of the two-way analysis variance test, the effect of pure training ($P<0.05$) and supplementation ($P<0.05$) was significant. Nonetheless, the interactive effect of supplemental training was not significant for *P38-MAPK* and *NF-κB* genes ($P>0.05$). On the contrary, the pure effect of training, the pure effect of supplementation, and the interaction effect for *TGF-β* gene expression were not significant ($P>0.05$).

Conclusion: It seems that six weeks of exercise or supplementation can be effective in controlling cell damage caused by cigarette smoke, especially through the *P38-MAPK/NF-κB* pathway in lung tissue. Nevertheless, since the interactive effect of training and supplementation on this pathway was not significant, more studies with different doses and time periods are needed.



تنظیم منفی بیان ژن‌های ریوی P38-MAPK، NF-κB و TGF-β بعد از تمرین هوازی و مصرف مکمل نانوسلنیوم در رت‌های نر تحت القای عصاره دود سیگار

عباس شیخ‌الاسلامی^۱، فاطمه شب‌خیز^{۲*}، حسین شیروانی^۳، رحمان سوری^۴

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی ورزشی، واحد پردیس بین‌الملل، دانشگاه تهران، تهران، ایران
^۲ دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
^۳ دانشیار فیزیولوژی ورزشی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزش، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران
^۴ استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
* نویسنده مسئول: فاطمه شب‌خیز، دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
ایمیل: shabkhiz@ut.ac.ir

DOI: 10.32592/nkums.16.4.35

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۱
مقدمه: هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی و مصرف مکمل نانوسلنیوم بر ژن‌های فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا از لنفوسیت‌های B فعال‌شده (NF-κB)، پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن P38 (P38-MAPK) و بیان ژن فاکتور رشد تغییردهنده بتا (TGF-β) در بافت ریه رت‌های نر تحت القای عصاره دود سیگار (CSE) است. روش کار: پژوهش حاضر از نوع تجربی بود. ۴۰ سر رت نر سالم نژاد ویستار ۶ هفته‌ای با میانگین وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم به ۵ گروه شامل گروه کنترل سالم، کنترل بیمار، بیمار + نانوسلنیوم، بیمار + تمرین هوازی تناوبی یا AIT و بیمار + ترکیب تمرین و مکمل نانوسلنیوم تقسیم شدند. برای گروه بیمار، عصاره دود سیگار هر هفت روز یک‌بار تزریق شد (۱۵۰ میکرولیتر با تزریق صفاقی، ۱ روز در هفته به مدت ۶ هفته). مکمل نانوسلنیوم نیز به میزان ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاوژ، ۳ روز در هفته به مدت ۶ هفته به حیوانات گروه مکمل خوراند. تمرین هوازی تناوبی نیز ۴۹ دقیقه در روز، ۵ روز/هفته به مدت ۶ هفته به صورت تناوبی برای گروه تمرین انجام شد.	واژگان کلیدی: دود سیگار بیماری ریوی تمرین هوازی سلنیوم، مکمل نانو
یافته‌ها: عصاره دود سیگار موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های P38-MAPK/NF-κB و TGF-β در ریه رت‌ها نسبت به گروه کنترل سالم شد ($P < 0.05$). در نتیجه، آزمون تحلیل واریانس دوره‌ای اثر خالص تمرین ($P < 0.05$) و اثر خالص مکمل ($P < 0.05$) معنی‌دار، اما اثر تعاملی تمرین مکمل برای ژن‌های P38-MAPK و NF-κB معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). در مقابل، اثر خالص تمرین، اثر خالص مکمل و اثر تعاملی برای بیان ژن TGF-β معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد ۶ هفته تمرین یا مکمل می‌تواند در کنترل تخریبات سلولی ناشی از دود سیگار، به‌ویژه مسیر P38-MAPK/NF-κB، در بافت ریه مؤثر باشد. اما از آنجایی که اثر تعاملی تمرین و مکمل بر این مسیر معنی‌دار نبود، مطالعات بیشتر با دوز و دوره‌های زمانی متفاوت مورد نیاز است.	

مقدمه

شیمیایی سمی متعدد [۲] از جمله متابولیت‌های مشتق‌شده از اکسیژن یا گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species-ROS) است که نقش اساسی در فعالیت ضد میکروبی، سیگنال‌دهی سلولی و سایر مکانیسم‌های لازم برای حفظ هموستاز دارند. با این حال، تجمع بیش از حد این مواد سمی به تغییرات مضر در پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA منجر می‌شود [۳].

همان‌طور که اشاره شد، دود سیگار عامل خطر اصلی برای ایجاد COPD است [۴]. تخریب ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix-ECM) ناشی از استنشاق مواد مضر هم به شکل‌گیری مجدد (رمودلینگ) راه هوایی و هم به آمفیزم ریوی کمک می‌کند

ریه‌ها اندام‌های پیچیده با سلول‌های متعددی هستند که به‌طور مداوم در معرض عوامل عفونی، دود سیگار (Cigarette smoke-CS) و آلاینده ها قرار می‌گیرند. اختلال در هموستاز در پاسخ به مواد استنشاقی مضر به تغییرات مورفولوژیکی و عملکردی برگشت‌ناپذیر در ریه‌ها منجر می‌شود. آسیب‌شناسی مولکولی بیماری انسدادی مزمن ریه (Chronic obstructive pulmonary disease-COPD) تحت تأثیر زمینه‌های ژنتیکی، پیری سلولی و استنشاق مزمن و نفوذ ذرات مضر، مانند ذرات موجود در CS است. ذرات سمی دود سیگار باعث التهاب راه هوایی می‌شود که در بیماران COPD این امر تشدید می‌شود. چنین التهاب مزمنی حتی پس از ترک سیگار نیز ادامه دارد [۱]. CS حاوی مواد

می‌دهند که ورزش منظم باعث کاهش بروز بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو می‌شود [۱۷] که این پدیده را نتیجه سازگاری ناشی از ورزش می‌دانند. بنابراین، ورزش منظم کاهش عملکرد ریه و خطر ابتلا به بیماری COPD را در بین سیگاری‌های فعال کاهش می‌دهد [۱۸]. با این حال، مکانیسم‌های سلولی درگیر در این اثر هنوز به خوبی شناخته نشده است. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی و مصرف مکمل نانوسلنیوم بر بیان مسیر $TGF-\beta$ و $P38-MAPK/NF-\kappa B$ در بافت ریه رت‌های نر تحت القای عصاره دود سیگار است.

روش کار

حیوانات و گروه‌بندی

با توجه به اینکه آزمودنی‌های پژوهش حاضر را رت‌های ویستار نر تشکیل می‌دادند، پژوهش حاضر از نوع کاربردی و نیمه تجربی است. در این مطالعه از ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار (۲۰۰ تا ۲۲۰ گرم) استفاده شد. در مطالعه حاضر، تعیین حجم نمونه براساس مطالعات قبلی [۱۹] و بر مبنای محاسبه حجم نمونه تعیین شد [۲۰]. حیوانات از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شدند. حیوانات مورد آزمایش در قفس‌های پلی‌کربنات نگهداری شدند (هر قفس ۴ سر رت). دمای محیط $22 \pm 4/1$ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت $55 \pm 4/6$ درصد بود. تمامی حیوانات به آب و غذای ویژه موش دسترسی آزاد داشتند. تمام ضوابط و حقوق حیوانی براساس قوانین NIH اجرا شد. همچنین، این پژوهش به تصویب کمیته اخلاق دانشکده دام‌پزشکی دانشگاه تهران رسید (کد اخلاق: ۱۴۰۲.۰۶۰. IR.UT.VETMED.REC). پس از آشنایی ۲ هفته حیوانات با محیط آزمایشگاه، رت‌ها به صورت تصادفی در ۵ گروه زیر تقسیم‌بندی شدند (هر گروه ۸ سر):

- ۱- گروه کنترل سالم (تزریق صفاقی نرمال سالین در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵، ۴۲)
- ۲- گروه کنترل بیمار (تزریق صفاقی عصاره دود سیگار در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵، ۴۲)
- ۳- گروه بیمار+ Aerobic interval training-AIT (تزریق صفاقی عصاره دود سیگار در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵، ۴۲ و تمرین هوازی تناوبی ۵ روز در هفته)
- ۴- گروه بیمار+ نانوسلنیوم (تزریق صفاقی عصاره دود سیگار در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵، ۴۲ و گاوژ مکمل نانوسلنیوم ۳ روز در هفته)
- ۵- گروه بیمار+ AIT+ نانوسلنیوم (تزریق صفاقی عصاره دود سیگار در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵، ۴۲ و تمرین ۵ روز در هفته و گاوژ مکمل نانوسلنیوم ۳ روز در هفته)

روش القای آسیب ریوی با عصاره دود سیگار (CSE)

عصاره دود سیگار یا Cigarette smoke extract-CSE براساس مطالعات قبل تهیه شد [۲۱]. به طور خلاصه، سه نخ سیگار وینستون (حاوی tar

[۵]. برخی از مطالعات اخیر نشان داده‌اند که $TGF-\beta 1$ به صورت موضعی در بافت ریه با COPD افزایش یافته است و می‌تواند با فعال کردن فیبروبلاست‌ها و شروع فرایند تمایز آن‌ها به میوفیبروبلاست‌ها، تولید EMC را تحریک کند. ECM می‌تواند تکثیر فیبروبلاست‌ها را تقویت کند و باعث رسوب غیرطبیعی توسط مسیر سیگنالینگ $TGF-\beta 1/Smads$ شود. سپس می‌تواند فیبروبلاست‌ها را برای ترشح بیشتر $TGF-\beta 1$ تحریک و در نتیجه راه تنفسی را مختل کند. علاوه بر این، مشخص شده است که بسیاری از واسطه‌های التهابی موجود در ریه COPD تحت تأثیر فاکتور رونویسی هسته‌ای کاپا (Nuclear Factor-kappaB-NF-kB) و کیناز سیگنال‌دهی بالادست آن قرار می‌گیرند [۶]. به بیان دیگر، سطوح بالاتری از NF-kB فعال شده در بیوپسی برونش و سلول‌های التهابی افراد با آسیب‌های ریوی یافت شده است [۷]. NF-kB می‌تواند فاکتور پایین دست P38-MAPK را در بافت ریه COPD تنظیم کند [۸]. مشخص شده است که تنظیم بالای $miR558$ فعال شدن مسیرهای TAK1/MAPK/NF-kB را سرکوب می‌کند که نشان می‌دهد نقش محافظتی خود را در COPD با محدود کردن مسیر TAK1/MAPK/NF-kB اعمال می‌کند [۹]. بنابراین، کنترل فاکتور $TGF\beta$ و همچنین تنظیم مسیر MAPK/NF-kB در بافت ریه آسیب‌دیده با سیگار می‌تواند به عنوان یک راهکار درمانی ارائه شود.

از جمله راهکارهای کنترل آسیب‌های ریوی در افراد COPD ناشی از دود سیگار، تقویت بافت عضلانی و همچنین رژیم غذایی با آنتی‌اکسیدان بالاست [۱۱، ۱۰]. سلنیوم یک عنصر کمیاب ضروری با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی است که از طریق توانایی آن در افزایش فعالیت آنزیم‌های گلو‌تاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase enzymes-GPx) عمل می‌کند. در مطالعات ریوی تأیید شده است که سلنیوم می‌تواند در درمان سرطان ریه مؤثر باشد. نشان داده شده است که سلنیوم آسیب DNA را در شرایط آزمایشگاهی مهار می‌کند و متاستاز ریوی و سرطان‌زایی ناشی از تشعشع را در داخل بدن کاهش می‌دهد [۱۳، ۱۲].

نانو کردن این نوع مکمل‌ها سبب فراهمی زیستی بالاتر، تحویل هدفمند و ماندگاری طولانی‌مدت می‌شود. در این رابطه، عرب‌زاده و همکاران (۲۰۲۴) تأیید کردند که شکل نانوشده مکمل سلنیوم همراه با تمرین ورزشی سبب افزایش سطوح سرمی و ریوی آیریزین و سلفورین A^۳ می‌شود که نقش محافظتی در بافت ریه رت‌های در معرض عصاره دود سیگار داشت [۱۴]. نشان داده شده است که در افراد سیگاری فعالی که فعالیت بدنی متوسط یا زیاد انجام می‌دهند، در مقایسه با گروه کم‌تحرک، خطر ابتلا به COPD کاهش می‌یابد [۱۵]. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که فعالیت بدنی، مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو در عضلات اسکلتی و ریه را افزایش می‌دهد [۱۶]. برخی از مطالعات اپیدمیولوژیک نشان

استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis (مدل LAMBDA 365 شرکت PerkinElmer، کشور آمریکا) تعیین شد [۲۳]. SeNPs در دُر (۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به گروه مکمل با گاوآذ خوراکی ۱ در روز و به مدت ۳ بار در هفته به گروه‌های مکمل داده شد [۲۴].

اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی

پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتا) با تزریق داخل‌صفافی ترکیبی کتامین (۵ mg/kg) زایلازین (۵ mg/kg) بیهوش شدند. خون‌گیری از بافت قلب صورت گرفت. بافت ریه بلافاصله پس از جداسازی، وزن‌کشی و شست‌وشو با سرم فیزیولوژیک فوراً در تیوب‌های حاوی RNA later برای جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شد و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد.

بیان ژن

برای بررسی بیان ژن‌های *P38-MAPK*، *NF-κB* و *TGF-β* در هر گروه از تکنیک PCR Real Time استفاده شد. برای آماده‌سازی پرایمرها از آب‌مقطر حاوی پرایمر لیوفیلیزه ۱۰ میکرولیتر، پرایمر پیشرو (Primer Forward) و پرایمر پیرو (Primer Revers) ۰/۵ میکرولیتر، cDNA (میکرولیتر ۱) و آب دی‌اتیل‌پیروکربنات (DEPC Water) ۸ میکرولیتر استفاده گردید. برای بررسی بیان ژن به روش qRT-PCR کل سلول با استفاده از محلول کیازول و براساس پروتکل شرکت سیناژن (ایران) استخراج شد. کیفیت RNA های استخراج‌شده با دستگاه اسپکتروفتومتری ارزیابی گردید. جهت تهیه cDNA تک‌رشته‌ای از پرایمر Oligo dt و آنزیم نسخه‌برداری معکوس براساس پروتکل مربوط انجام شد. هر واکنش PCR در دستگاه ABI Step One (آمریکا) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. چرخه‌های واکنشی Real-Time PCR برای ژن‌های *P38-MAPK*، *NF-κB* و *TGF-β* با سه دمای ۹۴، ۶۰ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نمودار ذوب (Melting) جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام گرفت. از گلیسرآلدئید ۳ فسفات (GAPDH) به‌عنوان ژن مرجع *P38-MAPK*، *NF-κB* و *TGF-β* استفاده شد. میزان بیان ژن‌های کنترل و تجربی به‌صورت هم‌زمان اندازه‌گیری گردید. پرایمرهای مورداستفاده در جدول ۲ آمده است.

به مقدار ۱۲ میلی گرم، نیکوتین، ۰/۹ میلی گرم) سوزانده و دود آن با استفاده از پمپ خلأ به ظرفی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر PBS منتقل شد. محلول CSE-PBS برای هر مجموعه آزمایش تازه تهیه شد و سپس از طریق فیلتر ۰/۲۲ میلی‌متری میلیپور (Millipore) برای از بین بردن ذرات و باکتری‌ها تصفیه گردید. به موش‌های گروه کنترل سالم، به میزان ۱۵۰ میکرولیتر (μL) سرم فیزیولوژیک (Vehicle) به‌صورت داخل‌صفافی، درحالی‌که به گروه‌های کنترل بیمار و تمرین بیمار و مکمل بیمار به میزان ۱۵۰ میکرولیتر (μL) محلول CSE-PBS در روزهای ۱، ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵، ۴۲ به صورت داخل‌صفافی تزریق شد [۲۱].

پروتکل تمرینی

قبل از شروع تمرین اصلی و به‌منظور آشنایی با چگونگی فعالیت توسط تردمیل (تجهیز گستر ایرانیان، ایران)، موش‌ها در یک هفته طی پنج جلسه، به مدت پنج دقیقه با سرعت ۸-۱۰ متر بر دقیقه با شیب صفر فعالیت کردند. پروتکل تمرین تناوبی هوازی (AIT) شامل ۱۰ دقیقه گرم کردن [۵۰ تا ۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی (VO_{2max})، هفت دوره تمرینات تناوبی (هر دوره ۴ دقیقه با ۸۰ تا ۹۰ درصد VO_{2max} و مجزأ شده با ۳ دقیقه با ۶۵ تا ۷۵ درصد VO_{2max}) و ۱ دقیقه سردکردن بود [۲۲]. برای تنظیم سرعت دویدن و حفظ شدت تمرین نسبی، از آزمون سنجش غیرمستقیم VO_{2max} برای رت‌های ویستار هر دو هفته یک‌بار استفاده شد (جدول ۱).

مکمل نانوسلنیوم

در این تحقیق از نانوسلنیوم ساخت شرکت آرمینانو (شرکت مهندسی آرمینا، تهران، ایران) استفاده شد. برای تهیه مخلوط، ابتدا براساس توضیحات شرکت، از عصاره آبی زنجبیل به‌دست‌آمده به‌عنوان پیش‌ساز سنتز نانوسلنیوم استفاده شد. عصاره زنجبیل (۲ میلی‌لیتر) به‌صورت قطره‌ای به محلول ۲۰ میلی‌لیتری SeO_3 (۱۰ میلی‌مولار) با هم زدن شدید اضافه شد. مخلوط با قرار دادن محلول بر روی دستگاه تکان‌دهنده چرخشی با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه، ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در شرایط تاریک انکوبه گردید. کاهش یون‌های سلنیوم با نمونه‌برداری (۳ میلی‌لیتر) از مخلوط در فواصل ۲۴ ساعت و به‌دنبال آن اندازه‌گیری حداکثر جذب کنترل شد. حداکثر جذب با اندازه‌گیری چگالی نوری محتوا از طول موج ۳۵۰ تا ۷۰۰ نانومتر با

جدول ۱. پروتکل برنامه تمرینی برای رت‌ها

گرم کردن	تمرین تناوبی هوازی	سرد کردن
هفته ۱ و ۲	۱۰ دقیقه	
هفته ۳ و ۴	۵۰ تا ۵۵٪ VO_{2max}	۷ ست ۳ دقیقه: ۱ دقیقه
هفته ۵ و ۶		۵ تا ۸ متر/دقیقه

جدول ۲. توالی پرایمرهای تهیه‌شده برای $TGF-\beta$ و $P38-MAPK$, $NF-\kappa B$

کد دسترسی	طول محصول	توالی پرایمر	ژن
NM_031020.2	nt۱۴۴	Forward: TGTGATTGGTCTGTTGGATGTGT Reverse: TGTGGATTATGTCAGCCGAGTG	$p38-MAPK$
NM_199267.2	nt۱۷۱	Forward: ACGCAAAAGGACCTACGAGA Reverse: ATGGTGCTGAGGGATGTTGA	$NF-\kappa B$
NM_021578.2	nt۱۱۵	Forward: AGAAGTCACCCGCGTGCTAAT Reverse: CACTGCTTCCCGAATGTCTGA	$TGF-\beta 1$
NM_017008.4	nt۱۰۲	Forward: CAAGTTCAACGGCACAGTCA Reverse: CCCCATTTGATGTTAGCGGG	$GAPDH$

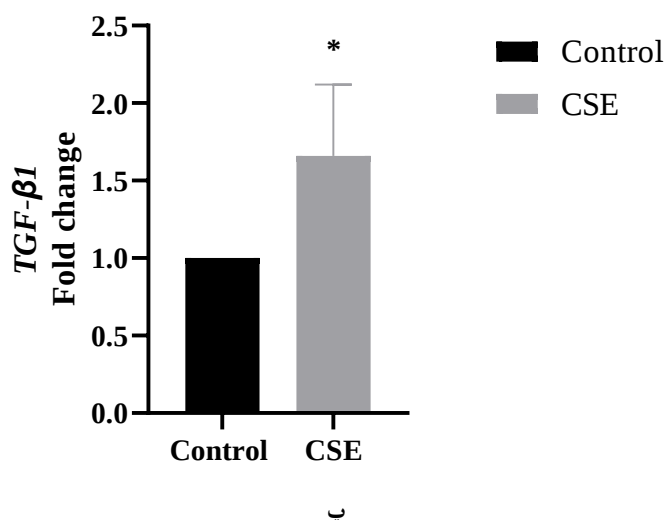
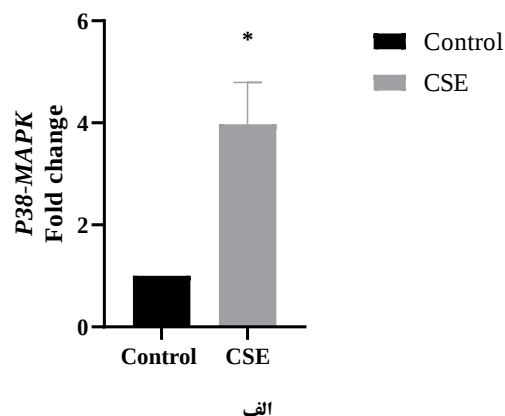
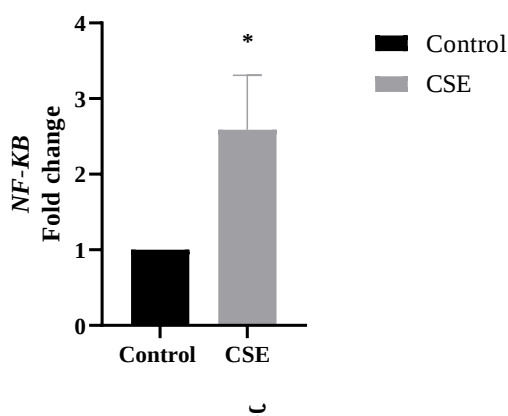
از $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. همه محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ انجام گرفت.

یافته‌ها

برای بررسی مقایسه بین گروه کنترل سالم و بیمار، از آزمون t مستقل استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که القای عصاره دود سیگار موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های $P38-MAPK$ ($t = -8/802$) و $TGF-\beta 1$ ($t = -3/824$) و $NF-\kappa B$ ($t = -5/711$) ($P = 0.001$) و ($P = 0.005$) در رت‌ها می‌شود (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل آماری

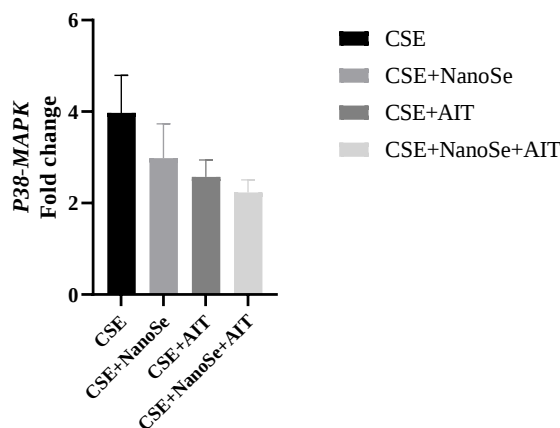
از شاخص‌های آمار توصیفی (میانگین و انحراف استاندارد) برای توصیف متغیرها استفاده شد. در بخش آمار استنباطی، از آزمون شاپیرو-ویلک برای ارزیابی طبیعی بودن داده‌ها در گروه‌های مطالعه استفاده گردید. پس از تأیید وضعیت طبیعی داده‌ها، از آزمون t مستقل برای مقایسه در دو گروه سالم و بیمار (CSE) و از آزمون تحلیل واریانس دوراهه برای بررسی اثر تعاملی تمرین و مکمل استفاده شد. سطح معناداری برای همه آزمون‌های آماری



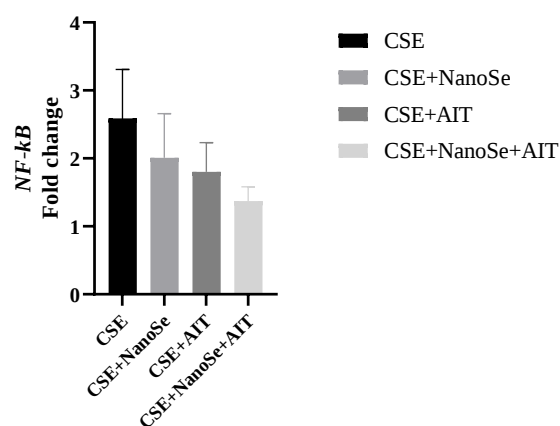
شکل ۱. تأثیر القای عصاره دود سیگار بر بیان ژن‌های $P38-MAPK$ (الف)، $NF-\kappa B$ (ب) و $TGF-\beta 1$ (پ) در رت‌ها (گروه کنترل سالم و گروه کنترل بیمار) * نشانه معنی‌داری نسبت به گروه کنترل است ($P < 0.05$). داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. CSE: گروه عصاره دود سیگار، Control: گروه کنترل

تغییرات در بیان ژن‌های *TGF-β1* و *P38-MAPK*, *NF-κB* در گروه‌های بیمار در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج آزمون آنوای دواراهه، اثر خالص تمرین ($P \leq 0/001$) و اثر خالص مکمل ($P = 0/004$) معنی‌دار بود، اما اثر تعامل ($P = 0/142$) برای بیان ژن *P38-MAPK* معنی‌دار نبود. برای

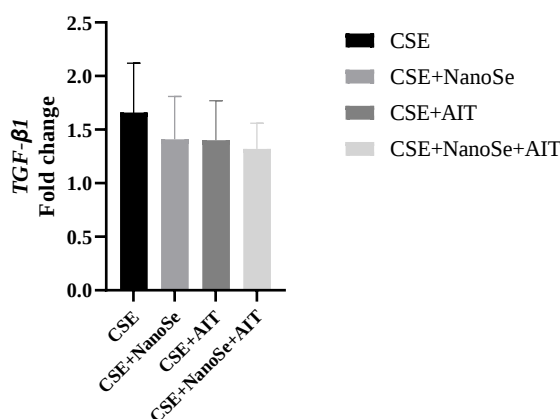
بیان ژن *NF-κB* نیز اثر خالص تمرین ($P = 0/001$) و اثر خالص مکمل ($P = 0/013$) معنی‌دار بود، اما اثر تعامل ($P = 0/693$) معنی‌دار نبود. درمقابل، اثر خالص تمرین ($P = 0/199$)، اثر خالص مکمل ($P = 0/246$) و اثر تعامل ($P = 0/547$) برای بیان ژن *TGF-β1* معنی‌دار نبود.



الف



ب



پ

شکل ۲. تأثیر شش هفته تمرین هوازی و مصرف مکمل نانوسلنیوم بر بیان ژن‌های *P38-MAPK* (الف)، *NF-κB* (ب) و *TGF-β1* (پ) بافت ریه رت‌های نر تحت القای عصاره دود سیگار معنی‌داری $P < 0/05$ در نظر گرفته شده است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. CSE: گروه عصاره دود سیگار، CSE+NanoSe: گروه عصاره دود سیگار + مکمل نانوسلنیوم، CSE+AIT: گروه عصاره دود سیگار + تمرین تناوبی هوازی، CSE+NanoSe+AIT: گروه عصاره دود سیگار + مکمل نانوسلنیوم + تمرین تناوبی هوازی

بحث

دود سیگار حاوی ترکیبات شیمیایی متعددی از جمله گونه‌های فعال اکسیژن/نیترژن و آلدئیدها و بسیاری دیگر از مواد سرطان‌زاست. سیگار کشیدن طولانی‌مدت به‌طور قابل توجهی خطر ابتلا به بیماری‌های ریوی مختلف، از جمله بیماری مزمن انسدادی ریه و سرطان ریه را افزایش می‌دهد و به مرگ زودرس کمک می‌کند. بسیاری از مطالعات *in vitro* و *in vivo* مکانیسم‌های دخیل در التهاب ناشی از دود سیگار، آسیب DNA، اتوفازی و آسیب سلولی متعاقب آن، از جمله مرگ سلولی، پیری سلولی و تخریب هموستاز سلول‌ها و مسیرهای سیگنالینگ را نشان داده‌اند [۲۵، ۲۶]. در این مطالعه نیز تغییرات بیان ژن‌های *P38-MAPK*، *NF-κB* و *TGF-β1* ریوی بعد از تمرین هوازی و مصرف مکمل نانوسلنیوم در رت‌های نر تحت القای عصاره دود سیگار بررسی شد. براساس نتایج مطالعه حاضر، مشخص شد که عصاره دود سیگار سبب افزایش معنی‌دار در بیان ژن‌های *P38-MAPK*، *NF-κB* و *TGF-β1* در بافت ریه نسبت به گروه کنترل سالم شد. همسو با نتایج مطالعه حاضر، Moretto و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که عصاره دود سیگار با افزایش سیگنال‌دهی *P38/MAPK* به التهاب نوتروفیل در ریه کمک می‌کند [۲۷]. همچنین، Wang و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که جین‌سنوزید ۳ Rb (یک ترکیب طبیعی با خواص ضدالتهابی و تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی) از التهاب و استرس اکسیداتیو ناشی از CSE و همچنین تجمع بیش‌ازحد ECM در سلول‌های WI-38 و 16HBE برای محافظت در برابر آسیب سلولی با مهار مسیرهای *p38 MAPK/NF-κB* و *TGF-β1/VEGF* که با عصاره دود سیگار افزایش یافته بود، جلوگیری کرد [۲۸]. در مطالعه حاضر نیز مکمل نانوسلنیوم و تمرین ورزشی به‌تنهایی تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های *p38 MAPK/NF-κB* ریوی داشت، اما تعامل تمرین و ورزش تأثیر معنی‌داری بر آن‌ها نداشت. بیان شده است که قرار گرفتن در معرض دود سیگار، پاسخ‌های التهابی متعدد ریوی و سیستمیک را افزایش می‌دهد [۲۹]. از آنجایی که در مطالعه حاضر در طول دوره، عصاره دود سیگار تزریق می‌شد، به نظر می‌رسد برای بهره‌برداری از خواص بیشتر ترکیب تمرین و مکمل، دوره درمانی طولانی‌تری باید در نظر گرفت تا التهاب و مسیرهای التهابی ناشی از عصاره دود سیگار را کاهش دهد.

مسیر سیگنال‌دهی *p38 MAPK* با التهاب و استرس اکسیداتیو ناشی از CSE مرتبط است و فعال شدن مسیر *p38 MAPK/NF-κB* باعث رونویسی ژن‌های پیش‌التهابی از جمله IL-8 و TNF-α می‌شود [۳۰]. در سلول‌های

تحریک‌نشده، p65 واقع در سیتوپلاسم با IκBα بدون فعالیت رونویسی ترکیب می‌شود. در پاسخ به محرک‌های التهابی، IκBα کیناز بالادست با فسفوریلاسیون آن فعال می‌شود که به تخریب IκBα منجر می‌گردد. بدون مهار IκBα، NF-κB p65 می‌تواند به هسته منتقل شود و رونویسی ژن‌های هدف خاص مانند TNF-α و IL-8 را آغاز کند [۳۱]. در مطالعه حاضر هرچند تغییرات فاکتورهای التهابی بررسی نشد، اما به نظر می‌رسد عصاره دود سیگار در افزایش فاکتورهای التهابی نیز نقش مهمی داشته است. تمرین ورزشی از جمله عوامل مثبت مرتبط با سبک زندگی است که در کنترل التهاب، حتی در سلول‌های ریوی، نقش دارد. غلام‌نژاد و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه مروری خود تأیید کردند که تمرینات ورزشی در کاهش التهاب ناشی از لیپوپولی‌ساکاریدها در بافت ریه نقش مهمی دارد [۳۱]. شهابی و همکاران (۲۰۲۱) نیز در مطالعه خود تأیید کردند که نانوذره سلنیوم اثر محافظتی و ضدالتهابی در برابر آسیب ریوی ناشی از بلئومایسین در موش‌های صحرایی نر دارد [۳۲]. از آنجایی که در مطالعه حاضر فاکتورهای التهابی اصلی اندازه‌گیری نشدند، به نظر می‌رسد تأثیر تمرین و مکمل نانوسلنیوم در کنترل التهاب ناشی از عصاره دود سیگار در بافت ریه مجزا از مسیر سلولی *p38-MAPK*، *NF-κB* و *TGF-β1* باشد. همچنین، قطعاً دُز بالاتر مکمل مصرفی و شدت و مدت تمرینی متنوع‌تر می‌تواند تأثیرات بیشتری بر متغیرهای وابسته مطالعه حاضر داشته باشد که در این زمینه به مطالعات متعدد نیاز است.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، عصاره دود سیگار در سطح ژنی تخریب بالایی در ریه، به‌ویژه مسیر *p38-MAPK*، *NF-κB* و *TGF-β1* ایجاد می‌کند که تمرین و مکمل نانوسلنیوم می‌تواند در کنترل این مسیر مؤثر باشد. اما از آنجایی که تعامل تمرین و مکمل بر این مسیر معنی‌دار نبود، به نظر می‌رسد برای بهره‌برداری از تأثیرات مفید تمرین و مکمل نانوسلنیوم جهت کنترل آسیب دود سیگار بر بافت ریه از دوره‌های زمانی طولانی‌تر تمرین و دوزهای بیشتر مکمل باید استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از زحمات مسئول آزمایشگاه دانشگاه جهت یاری در این پروژه تقدیر و تشکر می‌شود (کد اخلاق: ۱۴۰۲.۰۶۰. IR.UT. (VETMED.REC).

تعارض منافع

نویسندگان در این پژوهش، هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

References

- Wang Y, Xu J, Meng Y, Adcock IM, Yao X. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018;13:3341-8. [DOI: 10.2147/COPD.S176122] [PMID: 30349237]
- Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite A. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;686(1):12-27. [DOI: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb39148.x] [PMID: 8512242]
- cGuinness AJA, Sapay E. Oxidative stress in COPD: sources, markers, and potential mechanisms. *J Clin Med*. 2017;6(2):21. [DOI: 10.3390/jcm6020021] [PMID: 28212273]
- un SY, Hwang YI, Kim JH, Park S, Jang SH, Seo JY, et al. Awareness of chronic obstructive pulmonary disease in current smokers: a nationwide survey. *Korean J Intern Med*. 2015;30(2):191-7. [DOI: 10.3904/kjim.2015.30.2.191] [PMID: 25750560]

5. Churg A, Cosio M, Wright JL. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(4):L612-L631. [DOI: 10.1152/ajplung.00390.2007] [PMID: 18223159]
6. Rastrick JM, Stevenson CS, Eltom S, Grace M, Davies M, Kilty I, et al. Cigarette smoke induced airway inflammation is independent of NF- κ B signalling. *PLoS One*. 2013;8(1):e54128. [DOI: 10.1371/journal.pone.0054128] [PMID: 23349803]
7. Caramori G, Romagnoli M, Casolari P, Bellettato C, Casoni G, Boschetto P, et al. Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations. *Thorax*. 2003;58(4):348-51. [DOI: 10.1136/thorax.58.4.348] [PMID: 12668802]
8. Pera T, Atmaj C, van der Vegt M, Halayko AJ, Zaagsma J, Meurs H. Role for TAK1 in cigarette smoke-induced proinflammatory signaling and IL-8 release by human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303(3):L272-L8. [DOI: 10.1152/ajplung.00291.2011] [PMID: 22523282]
9. Jing X, Luan Z, Liu B. miR-558 reduces the damage of HBE cells exposed to cigarette smoke extract by targeting TNFRSF1A and inactivating TAK1/MAPK/NF- κ B pathway. *J Immunol Inves*. 2022;51(4):787-801. [DOI: 10.1080/08820139.2021.1874977] [PMID: 33459100]
10. Kubo H, Asai K, Kojima K, Sugitani A, Kyomoto Y, Okamoto A, et al. Exercise ameliorates emphysema of cigarette smoke-induced COPD in mice through the exercise-irisin-Nrf2 axis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2019;2507-16. [DOI: 10.2147/COPD.S226623] [PMID: 31814716]
11. Nyunoya T, March TH, Tesfaigzi Y, Seagrave J. Antioxidant diet protects against emphysema, but increases mortality in cigarette smoke-exposed mice. *COPD*. 2011;8(5):362-8. [DOI: 10.3109/15412555.2011.600361] [PMID: 21834692]
12. Knizhnikov VA, Shandala NK, Komleva VA, Knyazhev VA, Tutelyan VA. The effect of dietary levels of selenium on radiation resistance and radiation-induced carcinogenesis. *Nut Res*. 1996;16(3):505-16. [DOI: 10.1016/0271-5317(96)00031-0]
13. Muecke R, Schomburg L, Glatzel M, Berndt-Skorka R, Baaske D, Reichl B, et al. Multicenter, phase 3 trial comparing selenium supplementation with observation in gynecologic radiation oncology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;78(3):828-35. [DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.08.013] [PMID: 20133068]
14. Arabzadeh E, Shirvani H, Masjedi MR, Ghanei M, Hofmeister M, Rostamkhani F. Treadmill exercise with nanoselenium supplementation affects the expression of Irisin/FNDC5 and semaphorin 3A in rats exposed to cigarette smoke extract. *3 Biotech*. 2024;14(1):4. [DOI: 10.1007/s13205-023-03849-9]
15. Garcia-Aymerich J, Lange P, Benet M, Schnohr P, Antó JM. Regular physical activity modifies smoking-related lung function decline and reduces risk of chronic obstructive pulmonary disease: a population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(5):458-63. [DOI: 10.1164/rccm.200607-896OC] [PMID: 17158282]
16. Radák Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, et al. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflügers Archiv*. 2002;445:273-8. [DOI: 10.1007/s00424-002-0918-6] [PMID: 12457248]
17. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):153-9. [DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.029] [PMID: 18191751]
18. Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJ, Moriya HT, et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J*. 2012;39(2):254-64. [DOI: 10.1183/09031936.00003411] [PMID: 21700603]
19. Gomes LHLS, Drummond LR, Campos HO, Rezende LMTd, Carneiro-Júnior MA, Oliveira A, et al. Thermoregulation in hypertensive rats during exercise: effects of physical training. *Arq Bras Cardiol*. 2019;112:534-42. [DOI: 10.5935/abc.20190050] [PMID: 30892385]
20. Armitage P, Berry G, Matthews JNS. Statistical methods in medical research: John Wiley & Sons. 2008 [Link].
21. Li A, Liu Y, Zhu X, Sun X, Feng X, Li D, et al. Protective effect of methylallyl sulfone in the development of cigarette smoke extract-induced apoptosis in rats and HFL-1 cells. *BBRC*. 2018;498(3):627-32. [DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.033] [PMID: 29524412]
22. Qin F, Xu M-X, Wang Z-W, Han Z-N, Dong Y-N, Zhao J-X. Effect of aerobic exercise and different levels of fine particulate matter (PM_{2.5}) on pulmonary response in Wistar rats. *Life sci*. 2020;254:117355. [DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117355] [PMID: 31987872]
23. Abou Zaid OAR, El-Sonbaty SM, Barakat W. Ameliorative effect of selenium nanoparticles and ferulic acid on acrylamide-induced neurotoxicity in rats. *Ann Med Biomed Sci*. 2017;3(2):35-45. [Link]
24. Ali HF, El-Sayed NM, Ahmed AA, Hanna PA, Moustafa YM. Nano selenium ameliorates oxidative stress and inflammatory response associated with cypermethrin-induced neurotoxicity in rats. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;195:110479. [DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110479] [PMID: 32199213]
25. Nyunoya T, Mebratu Y, Contreras A, Delgado M, Chand HS, Tesfaigzi Y. Molecular processes that drive cigarette smoke-induced epithelial cell fate of the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(3):471-82. [DOI: 10.1165/rcmb.2013-0348TR] [PMID: 24111585]
26. Duffney PF, Embong AK, McGuire CC, Thatcher TH, Phipps RP, Sime PJ. Cigarette smoke increases susceptibility to infection in lung epithelial cells by upregulating caveolin-dependent endocytosis. *PLoS One*. 2020;15(5):e0232102. [DOI: 10.1371/journal.pone.0232102]
27. Moretto N, Bertolini S, Iadicicco C, Marchini G, Kaur M, Volpi G, et al. Cigarette smoke and its component acrolein augment IL-8/CXCL8 mRNA stability via p38 MAPK/MK2 signaling in human pulmonary cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303(10):L929-L38. [DOI: 10.1152/ajplung.00046.2012]
28. Wang M, Chen X, Jin W, Xu X, Li X, Sun L. Ginsenoside Rb3 exerts protective properties against cigarette smoke extract-induced cell injury by inhibiting the p38 MAPK/NF- κ B and TGF- β 1/VEGF pathways in fibroblasts and epithelial cells. *Biomed Pharmacother*. 2018;108:1751-8. [DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.018]
29. Gessner C, Scheibe R, Wötzel M, Hammerschmidt S, Kuhn H, Engelmann L, et al. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2005;99(10):1229-40. [DOI: 10.1016/j.rmed.2005.02.041] [PMID: 16140223]
30. Cartwright T, Perkins ND, Wilson C. NFKB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J*. 2016;283(10):1812-22. [DOI: 10.1111/febs.13627] [PMID: 26663363]
31. Gholamnezhad Z, Safarian B, Esparham A, Mirzaei M, Esmailzadeh M, Boskabady MH. The modulatory effects of exercise on lipopolysaccharide-induced lung inflammation and injury: A systemic review. *Life Sci*. 2022;293:120306. [DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120306] [PMID: 35016883]
32. Shahabi R, Anissian A, Javadmoosavi SA, Nasirinezhad F. Protective and anti-inflammatory effect of selenium nanoparticles against bleomycin-induced pulmonary injury in male rats. *Drug Chem Toxicol*. 2021;44(1):92-100. [DOI: 10.1080/01480545.2018.1560466] [PMID: 31146593]