



دانشگاه شهید بهشتی

## فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی

بهار و تابستان ۱۳۹۷، دوره ۱۱، شماره ۱، صفحه‌های: ۷۳-۸۴

# تأثیر تمرین هوازی و هوای آلوده به ذرات کربن سیاه بر بیان ژن‌های NF- $\kappa$ B و TNF- $\alpha$ بافت هیپوکامپ مغز موش‌های صحرائی نر

بتول رضایی سراجی<sup>۱</sup>، حمید آقاعلی نژاد<sup>۱\*</sup>، رضا قراخانلو<sup>۱</sup>، معصومه ابتکار<sup>۱</sup>، محمد فشی<sup>۲</sup>،

بهزاد پاکراد<sup>۱</sup>، اکرم کریمی اصل<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

<sup>۳</sup> دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

دریافت مقاله: ۹۵/۲/۶ اصلاح مقاله: ۹۵/۷/۱۵ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۰/۶

**هدف:** هدف از این پژوهش بررسی تأثیر تمرین هوازی و هوای آلوده به ذرات کربن سیاه بر بیان ژن‌های NF- $\kappa$ B و TNF- $\alpha$  هیپوکامپ مغز موش‌های صحرائی نر بود.

**روش‌ها:** بیست و چهار موش صحرائی نر ویستار (با میانگین توده بدنی  $279/29 \pm 26/97$  گرم) به‌طور تصادفی در چهار گروه: الف- بدون تمرین و بدون قرار گرفتن در معرض هوای آلوده به ذرات کربن سیاه؛ ب- تمرین هوازی؛ ج- قرار گرفتن در معرض ذرات؛ و د- تمرین و با قرار گرفتن در معرض ذرات کربن سیاه قرار گرفتند. برای قرار دادن حیوانات در معرض ذرات کربن سیاه با قطر کمتر از  $10$  میکرون از دستگاه تزریق ذرات و اتاچک استفاده شد. مدت تمرین هوازی با  $50$  درصد سرعت بیشینه هر گروه  $4$  هفته بود و  $24$  ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و قرارگیری در معرض ذرات کربن سیاه حیوانات قربانی شدند. با استفاده از روش Real time-Pcr بیان ژن NF- $\kappa$ B و TNF- $\alpha$  در بافت هیپوکامپ موش‌ها ارزیابی شد. برای تعیین معنادار بودن تفاوت بین گروه‌ها از تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی LSD استفاده شد.

**نتایج:** تفاوت معناداری بین گروه‌های الف و ب ( $P=0/001$ )، الف و د ( $P=0/003$ ) در مقدار TNF- $\alpha$  وجود داشت. تفاوت معناداری نیز بین گروه‌های الف و ب ( $P=0/008$ ) در مقدار NF- $\kappa$ B دیده شد.

**نتیجه‌گیری:** چهار هفته تمرین هوازی و هوای آلوده به ذرات کربن سیاه باعث تعدیل عوامل التهابی NF- $\kappa$ B و TNF- $\alpha$  می‌شود. به نظر می‌رسد این تغییرات در بخشی با کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های عصبی مغزی همراه باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین هوازی، ذرات معلق، التهاب، هیپوکامپ.

## مقدمه

آلودگی هوا عبارت است از وجود یک یا چند آلاینده در هوای آزاد به مقدار و مدتی که کیفیت هوا را به نحوی تغییر دهد که برای انسان و سایر موجودات زنده یا گیاهان و یا آثار و بناهای تاریخی زیانبار باشد. آلاینده‌های هوا به دو دسته اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. آلاینده‌های اولیه موادی هستند که از منابع آلاینده به‌طور مستقیم در مقادیر زیاد به هوای محیط وارد می‌شوند و باعث بروز اثرات سوء بهداشتی و مزاحمت در رفاه عمومی در مقیاس مکانی به نسبت بزرگ می‌شوند و به اصطلاح افراد زیادی را در یک منطقه وسیع تحت تأثیر قرار می‌دهند. برای این آلاینده‌ها استانداردهای ملی وضع شده است. این گروه از آلاینده‌ها شامل پنج آلاینده منواکسیدکربن<sup>۱</sup>، دی‌اکسیدنیترژن<sup>۲</sup>، ذرات معلق<sup>۳</sup> کوچک‌تر از ۲/۵ میکرون و کوچک‌تر از ۱۰ میکرون، دی‌اکسید گوگرد<sup>۴</sup> و سرب است. آلاینده‌های ثانویه به موادی گفته می‌شود که در اثر فعل و انفعالات موجود در هوای اطراف زمین به وجود می‌آیند و در این گروه می‌توان از اوزون نام برد. ذرات از لحاظ اندازه به دو دسته تقسیم می‌شوند: کوچک‌تر از ۲/۵ میکرون که ذرات ریز نامیده می‌شوند و بزرگ‌تر از ۲/۵ میکرون که ذرات درشت نامیده می‌شوند. ذرات معلق با قطر آیرودینامیکی کمتر از ۱۰ میکرومتر به دلیل راه‌یابی به مجاری تنفسی تحتانی به‌عنوان شاخص اصلی مواد معلق در هوا معرفی می‌شوند. بر اساس بررسی‌های همه‌گیرشناختی، ذرات معلق در مقایسه با اکسیدهای گوگرد و اکسیدهای ازت برای سلامتی انسان مخاطره‌آمیزتر است و مقدار ذرات معلق با قطر آیرودینامیکی کمتر از ۱۰ میکرومتر در تشدید بیماری‌های قلبی-ریوی، کاهش مقاومت دستگاه ایمنی بدن در برابر بیماری‌ها، از بین رفتن بافت ریه، آسم کودکان، مرگومیر زودرس، سرطان و بیماری‌های پیشرونده عصبی مانند آلزایمر نقش عمده‌ای دارند (۱) و (۲). به نظر می‌رسد یکی از عوامل اصلی در این رابطه،

التهاب است که به وسیله سایتوکاین‌های التهابی میانجی‌گری می‌شود. نشان داده شده که قرار گرفتن افراد سالم در معرض آلودگی هوا باعث گسترش التهاب از راه افزایش عوامل التهابی و تغییر در بیان سایتوکاین‌هایی مانند فاکتور نکروزی تومور آلفا<sup>۵</sup> (TNF- $\alpha$ ) می‌شود (۳). از طرف دیگر بیان سایتوکاین‌های ضد التهابی در هوای آلوده کاهش می‌یابد که خود زمینه‌ساز ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها است (۴). التهاب یکی از عوامل سببی در پاتولوژی بیماری‌های مزمن دستگاه عصبی مرکزی<sup>۶</sup> است. از آنجایی که عوامل محیطی مختلفی در التهاب عصبی نقش دارند و باعث اختلال در عملکرد دستگاه عصبی مرکزی می‌شوند، آلودگی هوا می‌تواند از شایع‌ترین منابع محیطی در بروز التهاب و استرس اکسایشی باشد. آلودگی هوا می‌تواند با انواعی از مسیرهای سلولی، مولکولی و التهابی بر دستگاه عصبی اثرگذار باشد و باعث آسیب ساختاری مغز شود یا منجر به زمینه‌ای برای ایجاد بیماری‌های نورولوژیکی شود. بررسی‌های همه‌گیرشناختی و مشاهده‌ای پیشنهاد کردند که قرارگرفتن مزمن در معرض آلاینده‌های هوا می‌تواند در ایجاد بیماری‌های پیشرونده عصبی حتی از سنین کودکی نقش داشته باشد (۵، ۶).

بررسی‌های مختلف نشان دادند ذرات معلق بسیار کوچک<sup>۷</sup> که حاوی فلزات هستند می‌توانند در پیاز بویایی و فضای زیرقشری<sup>۸</sup> رسوب کنند و باعث افزایش بیان پاسخ‌های التهابی شوند. ضایعات جسم سفید و پاتولوژی عروق در این مناطق، می‌تواند مبنای اثرات عملکردی و ساختاری مغز باشد. مواد آلوده‌کننده هوا از طریق مسیرهای مستقیم و غیرمستقیم بر دستگاه عصبی مرکزی اثر می‌گذارند. ذرات معلق کوچک<sup>۹</sup> و ذرات با اندازه نانو می‌توانند به سرعت جذب دستگاه گردش خون شوند که بر عروق اثرگذار هستند. ذرات با اندازه نانو از غشاء مویرگی آلوئول ریه عبور می‌کند و به راحتی وارد گردش

ایجاد شده توسط باکتری‌ها تولید شود. پیوند  $TNF-\alpha$  با برخی گیرنده‌های خود باعث فراخوانی پروتئین‌هایی به نام TRAF می‌شود که  $NF-\kappa B$  را فعال می‌کند و باعث تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی دیگر مانند  $IL-6$  می‌شود (۹ تا ۱۱). از آنجا که عروق خونی مغز گیرنده  $TNF-\alpha$  را بیان می‌کنند،  $TNF-\alpha$  می‌تواند سبب افزایش بیان ژن‌های واسطه‌ای التهاب در اندوتلیوم مویرگ‌های مغز شود و بنابراین التهاب سیستمیک می‌تواند یک مهاجم کلیدی به مغز باشد (۱۵-۱۲). میکروگلیا و آستروسیت‌های فعال شده نیز قابلیت تولید  $TNF-\alpha$  را دارا هستند. عملکرد  $TNF-\alpha$  توسط دو گیرنده ویژه میانجی‌گری می‌شود،  $P75$  ( $TNF-R2$ ) و  $P55$  ( $TNF-R1$ ). مسیرهای پایین‌دست شامل فعال شدن پروتئین کیناز C، تیروزین کیناز، پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (MAPK) و فسفوریلاز آدو<sup>۱۴</sup> است. این مسیرها با فعال‌سازی عواملی مثل  $NF-\kappa B$  دنبال می‌شود که سبب فعال‌سازی ژن‌های پیش‌برنده مولکول‌های چسبان و دیگر سایتوکاین‌ها می‌شود (۱۶).

اثرات مفید بالقوه ورزش منظم بر مغز در برخی بررسی‌ها سنجیده شده است. تاثیر ورزش بر مغز بسیار پیچیده است و شامل نروژن از راه عوامل نروتروفیک، افزایش مویرگ‌سازی، کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش تجزیه پروتئولیتیک از راه پروتئوزوم و نپرولیزین است (۷، ۱۷ تا ۱۹). با وجود اینکه آلودگی هوا و به‌ویژه ذرات با قطر کمتر از ۱۰ میکرون بیان سایتوکاین‌های التهابی را افزایش و بیان سایتوکاین‌های ضدالتهابی را کاهش می‌دهد، تمرین ورزشی تأثیرات معکوسی روی این سایتوکاین‌ها دارد به نحوی که از تمرین ورزشی به‌عنوان یک عامل ضدالتهابی یاد می‌شود (۲۰). با وجود این در مورد ورزش در هوای آلوده نتایج متناقضی وجود دارد. پاره‌ای پژوهش‌ها انجام تمرینات ورزشی در هوای آلوده را زبان‌بار می‌دانند (۲۱ تا ۲۳) و این در حالی است که پژوهش‌های دیگر آن را رویکرد مناسبی برای تعدیل

خون می‌شوند که توانایی ایجاد استرس اکسایشی در غشاء مویرگ‌ها یا اثرات پیش‌التهابی دارند. سایتوکاین‌های پیش‌التهابی تولید شده شامل  $TNF-\alpha$ ، اینترلوکین ۶<sup>۱۰</sup> ( $IL-6$ ) و اینترلوکین ۱-بتا<sup>۱۱</sup> ( $IL-1\beta$ ) است. این سایتوکاین‌ها یا به سد خونی مغز آسیب می‌رسانند و یا چاشنی راه‌اندازی مسیرهای سیگنالی هستند که منجر به فعال‌سازی نسخه‌برداری مسیرهای نسخه‌برداری فاکتور هسته‌ای-کاپا ب<sup>۱۲</sup> ( $NF-\kappa B$ ) می‌شوند. از طرفی سایتوکاین‌های موجود در گردش خون که در نتیجه التهاب سیستمیک ایجاد شده ناشی از آلودگی هوا در دیگر ارگان‌ها از جمله ریه افزایش می‌یابند، سلول‌های دستگاه ایمنی ذاتی محیطی را تحریک کرده، نورون‌های آوران محیطی را فعال کرده و یا از راه انتشار و انتقال فعال وارد مغز می‌شوند. التهاب مزمن ریه سبب التهاب مغز نیز می‌شود. زیرا در این شرایط افزایش سایتوکاین‌های در گردش مانند  $TNF-\alpha$  و  $IL-1\beta$  رخ می‌دهد.  $NF-\kappa B$  یک عامل نسخه‌برداری است که به شرایط اکسایشی بسیار حساس بوده و در چندین پاسخ ایمنی و التهاب درگیر است.  $NF-\kappa B$  با مهارکننده کاپا ب<sup>۱۳</sup> ( $I-\kappa B$ ) تشکیل کمپلکس می‌دهد.  $I-\kappa B$  یک پروتئین مهارکننده است. بنابراین این ترکیب به صورت غیرفعال در سیتوپلاسم وجود دارد. با تحریک سلول توسط استرس اکسایشی و عوامل التهابی مانند  $TNF-\alpha$ ،  $I-\kappa B$  فسفوریله و توسط پروتئوزوم تجزیه می‌شود. بنابراین می‌تواند به سوی هسته حرکت کند و سبب فعال‌سازی ژن پروتئین‌های التهابی یا ضدالتهابی شود (۷ و ۸).  $TNF-\alpha$  واسطه اصلی پاسخ التهابی حاد در برابر باکتری‌های گرم منفی و سایر میکروب‌های عفونت‌زا است و مسئول بسیاری از عوارض سیستمیک عفونت‌های شدید می‌باشد. منبع اصلی  $TNF-\alpha$  فاگوسیت‌های تک‌هسته‌ای فعال شده است. قوی‌ترین محرک تولید  $TNF-\alpha$  توسط ماکروفاژها، درگیر شدن TLR و سایر محصولات میکروبی است و مقادیر بالایی از این سایتوکاین ممکن است در جریان عفونت‌های

و بدون قرار گرفتن در معرض هوای آلوده به ذرات کربن سیاه؛ و د- آلودگی و تمرین (تمرین هوایی ۱۵ دقیقه پس از قرار گرفتن در معرض هوای آلوده به ذرات کربن سیاه) تقسیم شدند.

### پروتکل پژوهش

برای قرار گرفتن حیوانات در معرض ذرات کربن سیاه از دستگاه تزریق ذرات و اتاقک (فالونک) استفاده شد. دستگاه تزریق و اتاقک به نحوی بود که هر یک دقیقه یک بار هوای اتاقک عوض می‌شد و با ایجاد یک فشار منفی در اتاقک از خروج ذرات به فضای آزمایشگاه جلوگیری می‌شد. ذرات آلاینده با غلظت حدود ۵ میلی‌گرم در متر مکعب، دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۲۹٪ در شبیه‌سازی می‌شد. موش‌های گروه‌های کنترل-آلودگی و تمرین-آلودگی به مدت دو ساعت در روز، ۵ روز در هفته و به مدت ۴ هفته در معرض هوای آلوده به ذرات کربن سیاه قرار گرفتند. ذره آلاینده به کاررفته در این تحقیق کربن سیاه (N660) با قطر کمتر از ۱۰ میکرون بود که از شرکت دوده کربن ایران تهیه شد. شکل و قطر ذرات به ترتیب با روش تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ نوری<sup>۱۶</sup> و داست کانتر<sup>۱۷</sup> بررسی و تایید شد.

برنامه تمرین هوایی: در مرحله آشناسازی، موش‌ها ۳ روز در هفته، ۱۵ دقیقه در روز و با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه به مدت یک هفته روی چرخ‌گردان اجباری تمرین کردند. پس از آن، برای تعیین بار کار بیشینه حیوانات، آزمون فزاینده به شکل زیر انجام شد:

آزمون با سرعت ۶ متر بر دقیقه شروع شده و هر ۳ دقیقه ۳ متر بر دقیقه بر سرعت دستگاه افزوده می‌شد تا حیوان قادر به دویدن نباشد (سه بار جا ماندن و افتادن از دستگاه). با استفاده از این آزمون، بار کار بیشینه برای هر موش مشخص شد. از میانگین بار کار بیشینه هر گروه برای تعیین شدت تمرین گروه استفاده شد. برنامه تمرین اصلی

تأثیرات زیان‌بار آلودگی هوا دانسته‌اند (۲۴).

تحقیقاتی که تأثیر قرارگرفتن در معرض آلودگی هوا به هنگام ورزش را مورد بررسی قرار داده‌اند پیشنهاد کرده‌اند که افرادی که در هوای آلوده ورزش می‌کنند در معرض افزایش خطر بیماری‌های تنفسی و قلبی-عروقی قرار دارند. زیرا تمرین ورزشی میزان تنفس و تبادلات ریوی و تنفس آلاینده‌های سمی را افزایش می‌دهد (۲۳ و ۲۵). با این حال، این تحقیقات، سازوکارهای اثر تمرین هوایی که می‌تواند عوامل پیش‌التهابی ناشی از آلودگی هوا را تعدیل کند به صورت عمقی و در سطح گیرنده و ملکولی را بررسی نکرده یا تعداد این تحقیقات بسیار اندک است. همچنین پژوهشی پیدا نشد که تأثیر ورزش و هوای آلوده را بر عوامل التهابی و عوارض ناشی از التهاب در مغز را بررسی کند. بنابراین این سؤال پیش می‌آید که آیا انجام ۴ هفته تمرینات هوایی می‌تواند تأثیرات مفیدی روی TNF- $\alpha$  و NF- $\kappa$ B در هیپوکامپ موش‌های در معرض هوای آلوده به ذرات کربن سیاه داشته باشد؟ این پژوهش در نظر دارد این مسئله را بررسی کند.

### روش پژوهش

#### نمونه‌های پژوهش

بیست و چهار موش نر نژاد ویستار ۱۰ هفته‌ای از موسسه پاستور خریداری شدند. حیوانات در گروه‌های سه تایی در قفس‌های مخصوص در دمای اتاق ( $22 \pm 3/6$ ) درجه سانتی‌گراد) و طبق چرخه ۱۲ ساعت خواب و بیداری و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. تمام آزمایش‌های صورت‌گرفته بر اساس دستورعمل کار با حیوانات دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. موش‌ها پس از ۱۴ روز نگهداری و یک هفته آشنایی با نوارگردان و پروتکل تمرینی به صورت تصادفی به چهار گروه: الف- بدون تمرین و بدون قرار گرفتن در معرض هوای آلوده به ذرات کربن سیاه؛ ب- بدون تمرین و با قرار گرفتن در معرض هوای آلوده به ذرات کربن سیاه؛ ج- تمرین هوایی

eva green II انجام شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژنهای TNF- $\alpha$  و NF- $\kappa$ B و GAPDH در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکروژن<sup>۲۴</sup> کشور کره جنوبی انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، ضمن اینکه از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل: ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه- ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژنهای مورد نظر نیز با روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  اندازه گیری شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

ژن ها Genes	توالی پرایمر Primer sequence
TNF- $\alpha$	5'-TCTGCACTGCTGGAGACAT-3'For: 5 5'-AGTGCTGCATTATGGCCTG-3'Rev: 5
NF- $\kappa$ B	5'-GTGTCATCGAATCGCACCTG-3'For: 5 5'-GTTACCTCGAACTTGGCGA-3'Rev: 5
GAPDH	5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3'For: 5 5'-AGCCAGGATGCCCTTAGT-3'Rev: 5

### تحلیل آماری

تمامی داده‌ها براساس میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد توصیف شده‌اند. برای همسان بودن واریانس‌ها از آزمون Leven استفاده شد. برای تعیین معنادار بودن تفاوت بین گروه‌ها از تحلیل واریانس (ANOVA) دو طرفه<sup>۲۵</sup> و آزمون تعقیبی LSD<sup>۲۶</sup> استفاده شد. سطح معناداری نیز  $P \leq 0.05$  در نظر گرفته شد. تمامی بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد.

### نتایج

تمام حیوانات در گروه‌های تمرینی و آلودگی توانستند ۴ هفته تمرین هوازی و قرارگیری در معرض ذرات کربن سیاه کمتر از ۱۰ میکرون را به طور مداوم انجام دهند و به اتمام برسانند. اختلاف معناداری در

با گرم کردن ۱۰ دقیقه‌ای با سرعت ۶ متر بر دقیقه شروع شده و سپس تمرین اصلی با ویژگی‌های زیر اجرا شد: «دویدن با ۵۰ درصد بار کار بیشینه هر گروه، ۶۰ دقیقه در روز، ۵ روز در هفته و به مدت ۴ هفته (۲۴)».

### روش‌های آزمایشگاهی

موش‌های صحرایی ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و قرارگیری در معرض ذرات آلاینده با ترکیبی از کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به صورت زیرصفافی) و زایلازین (۳-۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) بیهوش شدند. بافت مغز بلافاصله روی یخ جدا و در نیتروژن مایع منجمد شد. نمونه‌های بافتی تا زمان اندازه‌گیری در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج RNA و سنتز cDNA: حدود ۵۰ میلی‌گرم

بافت هیپوکامپ به صورت جداگانه، برای استخراج کل RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در واکنش‌دهنده کیاژول<sup>۱۸</sup> هموژن شد. برای برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ گرم سانتریفوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه، ۱۲۰۰۰ گرم سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شد، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ گرم سانتریفوژ شد. ظرف حاوی RNA در اتانول شست‌وشو و در ۲۰ میکرولیتر آب بدون <sup>۱۹</sup>RNA حل شد. غلظت RNA سنجیده شد) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. سنتز cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم از RNA و با استفاده از پرایمر هگزامر رندوم<sup>۲۰</sup> و آنزیم رونویسی‌کننده معکوس<sup>۲۱</sup> انجام شد.

PCR - ریل تایم<sup>۲۲</sup>: برای اندازه‌گیری سطوح بیان از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix<sup>۲۳</sup>

معناداری بین گروه‌های کنترل و کنترل-آلودگی ( $P=0/001$ ) و کنترل و آلودگی-تمرین ( $P=0/003$ ) در مقدار TNF- $\alpha$  نشان داد. تعامل معناداری نیز بین تمرین و آلودگی دیده نشد ( $P=0/231$ ). بیان TNF- $\alpha$  در گروه آلودگی بیشتر از سایر گروه‌ها بود (شکل ۱).

توده بدن گروه‌ها، بین پیش و پس از مداخله در گروه کنترل و آلودگی مشاهده شد (جدول ۲). با توجه به همگنی واریانس‌های داده‌های TNF- $\alpha$  ( $P=0/123$ ) از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه همراه با آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. نتایج آنالیز واریانس دوطرفه تفاوت

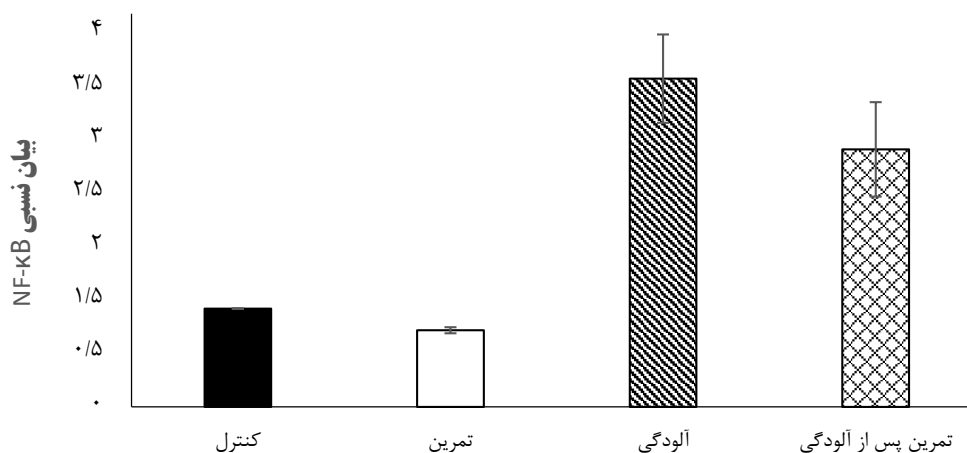
جدول ۲. توده بدن حیوانات گروه‌های تحقیق

گروه	فرایند	پیش از مداخله (گرم) میانگین $\pm$ انحراف معیار	پس از مداخله (گرم) میانگین $\pm$ انحراف معیار	تفاوت بین دو مداخله (گرم)	سطح معناداری $p \leq 0.05$
کنترل		۲۸۵/۸۳ $\pm$ ۲۵/۵۵	۳۲۴/۳۳ $\pm$ ۲۷/۱۲	۳۸/۵۰	* ۰/۰۴۵
آلودگی		۲۷۰/۵۰ $\pm$ ۲۷/۱۲	۳۱۱/۱۷ $\pm$ ۳۶/۶۶	۴۰/۶۷	* ۰/۰۲۳
تمرین		۲۷۹/۱۷ $\pm$ ۳۲/۵	۳۰۴/۳۳ $\pm$ ۴۲/۳۱	۲۵/۱۶	۰/۰۹۰
آلودگی+تمرین		۲۸۱/۶۷ $\pm$ ۲۲/۷۳	۳۱۵/۶۷ $\pm$ ۳۲/۲۳	۳۴	۰/۱۰۱

\* تفاوت معنادار در سطح  $p \leq 0.05$



شکل ۱. بیان نسبی ارزش‌های TNF- $\alpha$  در گروه‌های پژوهش



شکل ۲. بیان نسبی ارزش‌های NF-κB در گروه‌های پژوهش

$\alpha$  تاثیرگذار باشد زیرا ورزش دارای تاثیرات ضدالتهابی است. در این پژوهش ۴ هفته تمرین هوازی باعث کاهش TNF- $\alpha$  در بافت هیپوکامپ موش‌های گروه تمرین هوازی نسبت به گروه کنترل شد که نشان‌دهنده کاهش التهاب و تاثیرات ضد التهابی ورزش است. به نظر می‌رسد این تاثیر در بخشی می‌تواند با کاهش خطر ابتلا به بیماری‌ها همراه باشد (۳۰). این پژوهش نشان داد تمرین هوازی همراه با قرارگیری در معرض ذرات کربن سیاه باعث کاهش سطح TNF- $\alpha$  می‌شود. نیکول و همکاران پژوهشی روی موش‌های تراریخته مبتلا به آلزایمر انجام دادند. پس از ۳ هفته تمرین با چرخ گردان، میانجی‌های پیش‌التهابی هیپوکامپ این موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری کاهش یافت (۳۱). به نظر می‌رسد این نتیجه را می‌توان تاثیر مفید ورزش هوازی در هوای آلوده به ذرات عنوان کرد. تاثیر ورزش هوازی در هوای آلوده به ذرات کربن سیاه بر NF-KB بافت هیپوکامپ برای اولین بار در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تمرین هوازی در هوای آلوده به ذرات سیاه باعث کاهش بیان NF-KB می‌شود. به نظر می‌رسد این تغییرات ناشی از اثرات ضد التهابی تمرین باشد (۲ و ۳۰). در همین راستا فشی و همکاران نشان دادند تمرین هوازی در هوای آلوده به ذرات با تعدیل عوامل التهابی از جمله NF-KB در بافت ریه همراه است (۲). این پژوهش افزایش معنادار وزن بدن را در موش‌های در معرض ذرات کربن سیاه نشان داد که همسو با نتایج تحقیق زو و همکاران است.

زو و همکاران، بالا بودن ذرات آلاینده را عامل خطر برای توسعه مقاومت انسولین، چاقی و التهاب گزارش کردند (۳۲). بین افزایش وزن و چاقی و افزایش عوامل التهابی ارتباط وجود دارد و این در حالی است که کاهش وزن می‌تواند حتی مستقل از ورزش باعث کاهش نشانگرهای التهابی شود (۳۳ و ۳۴). پاره‌ای از تحقیقات نیز اثر اصلی ورزش بر کاهش عوامل التهابی و القای عوامل ضدالتهابی را به کاهش وزن ناشی از ورزش نسبت

با توجه به توزیع همگنی واریانس داده‌های NF-KB از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه همراه با آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. نتایج آزمون تفاوت معناداری را بین گروه‌های کنترل و کنترل-آلودگی (P=۰/۰۰۸) در مقدار NF-KB نشان داد. تعامل معناداری نیز بین تمرین و آلودگی دیده شد (P=۰/۰۴۱). بیان NF-KB در گروه آلودگی به میزان قابل توجهی بالاتر از سایر گروه‌ها بود. در این مورد گروه تمرین کمترین بیان NF-KB را نشان داد (شکل ۲).

### بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش، اثر ۴ هفته تمرین هوازی در هوای آلوده به ذرات کربن سیاه بر بیان ژن‌های TNF- $\alpha$  و NF-KB در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرائی نر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد ۴ هفته تمرین هوازی باعث تعدیل عوامل التهابی TNF- $\alpha$  و NF-KB در هوای آلوده به ذرات می‌شود. چندین پژوهش روی حیوانات و انسان‌ها گزارش کرده‌اند که قرارگیری در معرض ریزذرات با افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های گوناگون همراه است (۱۷، ۲۶ و ۲۷). در این زمینه به نظر می‌رسد القای میانجی‌های پیش‌التهابی عامل کلیدی در آسیب‌شناسی بیماری‌های التهابی باشد (۲۸). در این تحقیق بیان TNF- $\alpha$  به‌طور قابل توجهی در موش‌های در معرض ریزذرات کربن سیاه افزایش یافت که نشان‌دهنده پیشبرد التهاب در بافت هیپوکامپ موش‌های در معرض ذرات آلاینده است. سای و همکاران در پژوهشی روی جمعیت لوزان سوئیس که در معرض ذرات آلاینده هوا هستند افزایش قابل توجه سایتوکاین‌های پیش‌التهابی IL-1 $\beta$ ، IL-6 و TNF- $\alpha$  را گزارش کردند (۲۹).

کالدران و همکاران بیان کردند قرارگیری در معرض هوای آلوده باعث افزایش التهاب در مغز می‌شود که می‌تواند عامل خطری برای بیماری‌های پیشرونده عصبی مانند آلزایمر باشد (۲۵). ورزش می‌تواند بر سطوح TNF-

## پی‌نوشت‌ها

- 1 Carbon Monoxide
- 2 Nitrogen Dioxide
- 3 Particulate Matters
- 4 Sulfur Dioxide
- 5 Tumor Necrosis Factor alpha
- 6 Central Nervous System
- 7 ultrafine
- 8 subcortical
- 9 Fine
- 10 Interleukin-6
- 11 Interleukin-1 $\beta$
- 12 Nuclear Factor-  $\kappa$ B
- 13 Inhibitor -  $\kappa$ B
- 14 Phosphorylase -A2
- 15 بادسنج هات وایر دیتا لاگر مدل TES-1341 ساخت کشور تایوان
- 16 Acc.V- Spot magn. 25.0 KV 3.4. 5000x.
- 17 Grimm Aerosol Technique GmbH & Co. KG . Dorfstraße 9 -83404 Ainring (Germany)
- 18 QIAzol Lysis Reagent
- 19 RNAS-Free
- 20 Random hexamer primer
- 21 Transcriptase Reverse
- 22 Real time
- 23 Applied Biosystems, USA
- 24 Macrogen Inc, Seoul, Korea
- 25 Two Way ANOVA
- 26 Post Hoc LSD Test

داده‌اند (۳۴ و ۳۵). بر اساس یافته‌های این پژوهش، به نظر می‌رسد ورزش‌های هوازی می‌تواند به‌عنوان راهبردی در تقویت دستگاه ایمنی افراد ساکن در شهرهای بزرگ و صنعتی و دارای هوای آلوده به‌ویژه از نوع ذرات معلق باشد. بدیهی است نقش تمرین ورزشی تنها کاهش و تعدیل عوامل التهابی و زیان‌بار بوده و نمی‌تواند اثرات زیان‌بار زندگی در معرض آلاینده‌ها را به‌طور کامل حذف کند. بنابراین، ارزش نتایج موجود را می‌توان به لحاظ بالینی قابل توجه دانست، زیرا زندگی در هوای آلوده در مقایسه با زندگی در هوای سالم تأثیرات منفی بسیاری بر جای می‌گذارد و به نظر می‌رسد داشتن سبک زندگی فعال در شهرهای آلوده در مقایسه با سبک زندگی غیرفعال بتواند اثرات تعدیلی بر عوامل التهابی ایفا کند.

به‌طور خلاصه، این یافته‌ها نشان داد ۴ هفته تمرین هوازی در هوای آلوده به ذرات کربن سیاه باعث تعدیل عوامل التهابی TNF- $\alpha$  و NF- $\kappa$ B می‌شود. با وجود این، انجام پژوهش‌های بیشتر برای آشکار شدن سازوکارهای دقیق در این مداخلات ضروری است.

## منابع

1. Seinfeld JH, Pandis SN. Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change. John Wiley & Sons; 2016 Apr 4.
2. Fashi M, Alinejad HA, Mahabadi HA. The effect of aerobic exercise in ambient particulate matter on lung tissue inflammation and lung cancer. Iran J Cancer Prev. 2015; 8(3): e2333.
3. Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. Planta medica. 2004;70(02):93-103.
4. Plummer LE, Smiley-Jewell S, Pinkerton KE. Impact of air pollution on lung inflammation and the role of Toll-like receptors. International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research. 2012;4(1):43-57.
5. van Berlo D, Albrecht C, Knaapen AM, Cassee FR, Gerlofs-Nijland ME, Kooter IM, et al. Comparative evaluation of the effects of short-term inhalation exposure to diesel engine exhaust on rat lung and brain. Archives of toxicology. 2010;84(7):553-62.
6. Bihagi SW, Singh AP, Tiwari M. Supplementation of Convolvulus pluricaulis attenuates scopolamine-induced increased tau and Amyloid precursor protein (A $\beta$ PP) expression in rat brain. Indian journal of pharmacology. 2012;44(5):593.



7. Goto S, Naito H, Kaneko T, Chung HY, Radak Z. Hormetic effects of regular exercise in aging: correlation with oxidative stress. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2007;32(5):948-53.
8. Kinney PL. Interactions of Climate Change, Air Pollution, and Human Health. *Current environmental health reports*. 2018 Mar 1;5(1):179-86.
9. Cotman CW, Berchtold NC, Christie L-A. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in neurosciences*. 2007;30(9):464-72.
10. Morgan JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, et al. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biological psychiatry*. 2010;68(4): 368-76.
11. Shankardass K, McConnell R, Jerrett M, Milam J, Richardson J, Berhane K. Parental stress increases the effect of traffic-related air pollution on childhood asthma incidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(30):12406-11.
12. Bauer AK, Rondini EA, Hummel KA, Degraff LM, Walker C, Jedlicka AE, et al. Identification of candidate genes downstream of TLR4 signaling after ozone exposure in mice: a role for heat-shock protein 70. *Environmental health perspectives*. 2011;119(8):1091.
13. CALDERon-GARCIDUEnas L, Reed W, Maronpot RR, Henriquez-Roldán C, Delgado-Chavez R, CALDERon-GARCIDUEnas A, et al. Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicologic pathology*. 2004;32(6): 650-8.
14. Calderón-Garcidueñas L, Mora-Tiscareño A, Gómez-Garza G, Carrasco-Portugal MDC, Pérez-Guillé B, Flores-Murrieta FJ, et al. Effects of a cyclooxygenase-2 preferential inhibitor in young healthy dogs exposed to air pollution: a pilot study. *Toxicologic pathology*. 2009;37(5): 644-60.
15. Calderón-Garcidueñas L, D'Angiulli A, Kulesza RJ, Torres-Jardón R, Osnaya N, Romero L, et al. Air pollution is associated with brainstem auditory nuclei pathology and delayed brainstem auditory evoked potentials. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2011;29(4):365-75.
16. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology*. 2004;4(7):499.
17. Daigle CC, Chalupa DC, Gibb FR, Morrow PE, Oberdörster G, Utell MJ, Frampton MW. Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhalation toxicology*. 2003 1;15(6):539-52.
18. Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, Zigmond MJ. *Neurobiology of Exercise*. *Obesity*, 2006, 14 (3), 345-356.
19. Fonken LK, Xu X, Weil ZM, Chen G, Sun Q, Rajagopalan S, et al. Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology. *Molecular psychiatry*. 2011;16(10):987.
20. Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control. *Essays in biochemistry*. 2006;42:105-17.
21. Kargarfard M, Poursafa P, Rezanejad S, Mousavinasab F. Effects of exercise in polluted

- air on the aerobic power, serum lactate level and cell blood count of active individuals. *International journal of preventive medicine*. 2011;2(3):145.
22. Campbell ME, Li Q, Gingrich SE, Macfarlane RG, Cheng S. Should people be physically active outdoors on smog alert days?. *Canadian Journal of Public Health/Revue Canadienne de Sante'e Publique*. 2005, 1:24-8.
  23. Sharman JE. Clinicians prescribing exercise: is air pollution a hazard? *Medical journal of Australia*. 2005;182(12):606.
  24. Vieira RdP, Toledo AC, Silva LB, Almeida FM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, et al. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2012;44(7):1227-34.
  25. Calderón-Garcidueñas L, Macías-Parra M, Hoffmann HJ, Valencia-Salazar G, Henríquez-Roldán C, Osnaya N, et al. Immunotoxicity and environment: immunodysregulation and systemic inflammation in children. *Toxicologic pathology*. 2009;37(2):161-9.
  26. Kelly F, Fussell J. Air pollution and airway disease. *Clinical & Experimental Allergy*. 2011;41(8):1059-71.
  27. Rosenlund M, Forastiere F, Porta D, De Sario M, Badaloni C, Perucci CA. Traffic-related air pollution in relation to respiratory symptoms, allergic sensitisation and lung function in schoolchildren. *Thorax*. 2009;64(7):573-80.
  28. Gold MJ, Hiebert PR, Park HY, Stefanowicz D, Le A, Starkey MR, Deane A, Brown AC, Liu G, Horvat JC, Ibrahim ZA. Mucosal production of uric acid by airway epithelial cells contributes to particulate matter-induced allergic sensitization. *Mucosal immunology*. 2016 ;9(3):809.
  29. Tsai D-H, Amyai N, Marques-Vidal P, Wang J-L, Riediker M, Mooser V, et al. Effects of particulate matter on inflammatory markers in the general adult population. *Particle and fibre toxicology*. 2012;9(1):24.
  30. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(9):607.
  31. Nichol KE, Poon WW, Parachikova AI, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid. *Journal of neuroinflammation*. 2008;5(1):13.
  32. Xu X, Yavar Z, Verdin M, Ying Z, Mihai G, Kampfrath T, et al. Effect of early particulate air pollution exposure on obesity in mice: role of p47phox. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(12):2518-2527.
  33. Fisher G, Hyatt TC, Hunter GR, Oster RA, Desmond RA, Gower BA. Effect of diet with and without exercise training on markers of inflammation and fat distribution in overweight women. *Obesity*. 2011;19(6):1131-6.
  34. Pischon T, Hankinson SE, Hotamisligil GS, Rifai N, Rimm EB. Leisure-time physical activity and reduced plasma levels of obesity-related inflammatory markers. *Obesity*. 2003;11(9):1055-64.

35. Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation*. 2002;105(7):804-9.



Shahid Beheshti University

# Sport and Exercise Physiology

Spring & Summer 2018/ No.1/ Vol. 11/ Pages: 73-84

---

---

## Effects of aerobic training and black carbon particles exposure on gene expression of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$ of hippocampus brain tissue of male rats

Batool Rezaee Seraji<sup>1</sup>, Hamid Agha Alinejad<sup>1\*</sup>, Reza Gharakhanloo<sup>1</sup>, Masoomeh Ebtekar<sup>1</sup>,  
Mohamad Fashi<sup>2</sup>, Behzad Pakrad<sup>1</sup>, Akram Karimi Asl<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Physical Education and Sport Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Faculty of Physical Education & Sport Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Exercise Physiology, Zanjan University, Zanjan, Iran

Received: 25/4/2016

Revised: 6/10/2016

Accepted: 15/1/2017

**Purpose:** The purpose of this study was to investigate the effect of aerobic exercise and black carbon particles on gene expression of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  in rats.

**Methods:** Twenty-four male Wistar rats with an average body mass  $279.29 \pm 26.97$  g were randomly divided into 4 groups A: without exposure PM10 and aerobic exercise, B: aerobic training, C: exposure to PM10 carbon black (5 mg/m<sup>3</sup>; per rat), D: and aerobic exercise concomitantly with exposure to PM10 carbon black. Twenty-four hours after the last training session and exposure, the animals were sacrificed. Real time-Pcr technique was used. Two-way ANOVA and post hoc LSD was used to determine the significance of differences between groups.

**Results:** There was significant difference between groups A and B ( $P=0.001$ ) and B and D ( $P=0.003$ ) in the amount of TNF- $\alpha$ . Significant difference between A and B groups ( $P=0.008$ ) in the amount of NF- $\kappa$ B was observed.

**Conclusions:** four weeks of aerobic exercise and PM10 exposure lead to modify the inflammatory factors of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$ . It seems that these changes lead to reducing the risk of neurodegenerative diseases.

**Key words:** Aerobic exercise training, particulate matters, inflammation, hippocampus

---

\* Corresponding Author: Hamid Agha Alinejad. Tel: 09123279536. E-Mail: halinejad@modares.ac.ir