JSST Journal of Space Science and Technology

Vol. 15 / Issue 1 / 2022 / (No. 50)
Print ISSN: 2008-4560 / Online ISSN: 2423-4516
https://doi.org/10.30699/jsst.2022.1357

OPEN ACCESS

Pages: 41-49 / Research Paper / Received: 05 July 2021 / Revised: 22 August 2021 / Accepted: 01 September 2021

Journal Homepage: https://jsst.ias.ir

Evaluation of Changes in the Expression Level of Some Genes Involved in Decompression Sickness in the Pressure Changes

Ehsan Siami[1], Reza Mohammadi[2]* and Vajiheh Zarrinpour[3]

1. Ph.D. Student, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2. Assistant Professor, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Tehran, Iran

*Corresponding Author's E-mail: rezamohammadi@mut.ac.ir

Abstract

This study evaluates the expression level some genes that change by pressure changes in astronautics and divingdisorders in decompression sickness. This study was performed on 5 skilled divers and the expression level of TLR-2, HSP-72, IL-1b, NF-kB and MPO genes, which are responsible for proinflammatory conditions, as well as the expression level of astronaut index genes, ie DRD4 and BNIP3 were analyzed on native Iranian samples. Blood samples were taken from healthy divers and controls, their RNA was extracted and cDNA was synthesized. PCRreal-time reactions were performed to investigate changes in gene expression using specific primers. Student's t-test statistical analysis showed that the expression level of all genes except MPO and TLR-2 genes increased significantly after exposure to pressure changes and diving activities. These changes can be considered as an indicator for healthy people under stress in space climbing as well as diving.

Keywords: Gene expression, Astronautics, Decompression sickness, Pro-inflammatory, primer, Real-time PCR, Pressure changes

COPYRIGHTS
© 2022 by the authors. Published by Aerospace Research Institute. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

How to cite this article:
E. Siami, R. Mohammadi and V. Zarrinpour, "Evaluation of Changes in the Expression Level of Some Genes Involved in Decompression Sickness in the Pressure Changes," *Journal of Space Science and Technology*, Vol. 15, No 1 , pp. 41-49, 2022 (in Persian), https://doi.org/10.30699/jsst.2022.1357.

JSST
علوم و فناوری فضایی
دوره ۱۵ / شماره ۱ / ۱۴۰۱ / (پیاپی ۵۰)
شاپای چاپی: ۴۵۶۰-۲۰۰۸ / شاپای الکترونیکی: ۴۵۱۶-۲۴۲۳
https://doi.org/10.30699/jsst.2022.1357
OPEN ACCESS
ص. ص. ۴۹-۴۱ / مقاله علمی- پژوهشی / دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۴ / بازنگری: ۱۴۰۰/۰۵/۳۱ / پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۰
Journal Homepage: https://jsst.ias.ir

ارزیابی تغییرات بیان برخی ژن‌های دخیل در بیماری رفع فشار در مواجهه با تغییرات فشار

احسان صیامی[۱]، رضا محمدی[۲*] و وجیهه زرین‌پور[۳]

۱ ، ۳- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، مجتمع شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

*ایمیل نویسنده مخاطب: rezamohammadi@mut.ac.ir

چکیده

هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی بیان تعدادی از ژن‌ها به منظور ارزیابی اختلالات ناشی از تغییرات فشار در فضانوردی و غواصی در بیماری رفع فشار است. این تحقیق بر روی ۵ غواص ماهر انجام شد و سطح بیان ژن‌های TLR-2,HSP-72, IL-1b, NF-kB و MPO که مسئول شرایط پیش التهابی هستند و همچنین سطح بیان ژن‌های شاخص فضانوردی، یعنی DRD4 و BNIP3 بر روی نمونه‌های بومی ایرانی تجزیه و تحلیل شد. از افراد سالم غواص و گروه کنترل، نمونه خونی گرفته شد. RNA آنها استخراج و cDNA سنتز شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، به منظور بررسی تغییرات بیان ژن‌ها، واکنش‌های PCRreal-time انجام شد. آنالیزهای آماری student's t-test نشان داد که سطح بیان تمام ژن‌ها به جز ژن‌های MPO و TLR-2 پس از قرارگیری در تغییرات فشار و فعالیت‌های غواصی، افزایش چشمگیری داشته‌است. این تغییرات می‌تواند به عنوان شاخصی برای افراد سالم تحت استرس فشار در فضانوردی و همینطور در غواصی در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: بیان ژن، فضانوردی، بیماری رفع فشار، پیش التهابی، آغازگر، PCR real-time، تغییرات فشار

مقدمه

بیماری رفع فشار[۴] به دلیل آزاد شدن حباب‌های گازی در خون و در نتیجه کاهش سریع فشار محیط ایجاد می‌شود. این بیماری، در غواصان، در غوص عمیق و بازگشت به سطح آب و در فضانوردان و حیوانات آزمایشگاهی، در فضاپیما، پس از تحمل فشار بالای صعود و بازگشت به زمین گزارش شده‌است. این شرایط در افرادی که بیشتر در معرض تغییرات فشار محیطی هستند، رخ می‌دهد [۳-۱]. هواپیماهای تجاری هم، معمولاً دارای یک کابین تحت فشار هستند. خرابی سیستم این هواپیماها و یا سفر هوایی با هواپیماهای غیر تجاری، می‌تواند منجر به بیماری رفع فشار شود [۵، ۴].

در حین صعود به فضا در داخل فضاپیما و همینطور در مواقع غواصی عمیق، افزایش فشار محیط، موجب القای استرس اکسیداتیو می‌شود. هنگامی‌که فضانوردان به مدار مورد نظر می‌رسند یا به سطح زمین برمی‌گردند و همینطور هنگامی که غواصان به سطح آب صعود می‌کنند، معمولاً کاهش فشار باعث تولید حباب‌های گازی و بیماری رفع فشار می‌شود. بیماری رفع فشار منجر به ایجاد دامنه وسیعی از علائم مختلف، از جمله: دردهای عصبی شده که در نهایت باعث آسیب قلبی و مرگ می‌شوند [۷، ۶]. این بیماری با شرایط پاتوفیزیولوژیکی مختلفی همراه است و با استرس اکسیداتیو و فرآیندهای پیش التهابی رابطه مستقیم دارد. هنگامی که بدن با تغییرات مداوم فشار، مواجه می‌شود، حباب‌های گازهای بی‌اثر (گاز بی‌اثر، گازی است که معمولاً تمایلی به شرکت در واکنش‌های شیمیایی ندارد) درون عروق افزایش پیدا کرده و در مدت کوتاهی درون بافت‌ها به حالت فوق اشباع می‌رسند. در نتیجه این فرآیندها، پاسخ‌های التهابی در بدن ایجاد می‌شوند. حباب‌های گازها، باعث تولید و افزایش ذرات ریزسیار[۵] (MPs) می‌شوند [۸]. این ذرات، قطعات وزیکولی ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتری هستند که تحت شرایط

۱. دانشجوی دکتری
۲. استادیار
۳. استادیار

4. Decompression sickness

5. Circulating microparticles

COPYRIGHTS
© 2022 by the authors. Published by Aerospace Research Institute. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

استرس و یا آسیب، توسط سلول‌ها، آزاد می‌شوند و قادر به انتقال پپتیدها، پروتئین‌ها، ذرات لیپیدی، میکرو RNA، mRNA و DNA از یک سلول به سلول دیگر هستند [۹]. ذرات ریزسیار، نقش فیزیولوژیکی مهمی در فرآیند التهاب دارند. به این ترتیب که قادر به افزایش مولکول‌های کروی التهاب بوده و با نوتروفیل‌ها و تغییرات سلول‌های اندوتلیال در ارتباط هستند. این تغییرات باعث افزایش بیان برخی ژن‌ها می‌شوند [۹,۷]. همچنین این واکنشها توسط استرس اکسیداتیو ایجاد شده و نقش مهمی در حفظ هموستازی فیزیولوژیکی دارند. اگرچه هنگامی که استرس اکسیداتیو شدید شود، ممکن است، هموستازی مختل شده و بیماری رفع فشار به سرعت گسترش پیدا کند [۱۱,۱۰].

در طول غواصی در فشار زیاد، سیستم گردش خون، با افزایش جزئی فشار اکسیژن (PO2) تحت استرس، قرار گرفته و با توجه به اینکه در هنگام صعود به سطح آب، فشار کاهش میابد، حباب‌های گاز ایجاد می‌شوند. این عوامل، مهمترین نقش را در ایجاد استرس اکسیداتیو و ایجاد التهاب پس از غواصی، ایفا می‌کنند. در واقع PO2 استرس اکسیداتیو را تشدید کرده و التهاب را از طریق فاکتورهای رونویسی افزایش می‌دهد [۱۲]. شواهدی وجود دارد که نشان میدهند، غواصی شدید به همراه تغییرات فشار، میتوانند بیان ژن‌های مسئول التهاب و استرس اکسیداتیو را تغییر دهند. یکی از این موارد، مطالعه بر روی غواصانی است که بیش از دو ماه از غواصی آنها گذشته بود. محققان مشاهده کردند که سطوح اینترلوکین ۸[۶] و لیپوکالین[۷] به طرز چشمگیری افزایش یافتهاند [۱۳, ۱۲]. این نتایج، فعالسازی فاکتورهای پیش و پس از التهاب را نشان میدهند که از هم‌ایستایی گردش خون پشتیبانی میکنند. برخی از مطالعات حیوانی ثابت کرده‌اند که تلاش‌های مکرر برای غواصی شبیه‌سازی شده با فشار بالا، باعث کاهش بیماری‌ها در غواصی‌های بعدی می‌شوند.

در پژوهش دیگری که در فشار ۷۰۹ کیلو پاسکال[۸] و عمق ۶۰ متر بر روی چند موش انجام شده، ثابت شد که فشار زیاد، منجر به بیان برخی ژن‌های حساس به اکسیداسیون، در آئورت موش می‌شود [۱۵, ۱۴]. در فضا و نقاط مرتفع که فشار اتمسفر بسیار پائین است، نیز تغییرات بیان ژن‌ها متفاوت است. پژوهشگران با مطالعاتی‌که بر روی گیاه آرابیدوپسیز[۹] در فشار ۱۰ کیلوپاسکال (در مقایسه با فشار استانداردکه۱۰۱ کیلو پاسکال است) داشتند، ثابت کردند که ۲۰۰ ژن، تغییرات بیان چشمگیری داشته‌اند. اغلب این ژن‌ها در شرایط کاهش فشار، بیان چشمگیری داشته‌اند[۱۶]. در مطالعه دیگری که بر روی۲۰ موش در ایستگاه بین‌المللی فضایی، انجام شده، ثابت شد که ۶۰ ژن، در فشار و جاذبه بسیار کم فضا، نسبت به گروه کنترل، تغییرات بیانی قابل توجهی داشتند [۱۷]. در این مطالعه، ۷ ژن مرتبط و اثرگذار، در مسیرهای پیش التهابی، مرگ سلولی و آپوپتوز انتخاب شدند. از بین ژن‌های مسیرهای سیگنالی سنتز، اکسید نیتریک وواسطه‌های لیپیدی از دو ژن NF-kB و TLR-2 انتخاب شدند. اکسید نیتریک[۱۰] میتواند با آنیون سوپراکسید واکنش دهد و پراکسی نیتریت[۱۱] سمی تولید کند که این مولکول هم می‌تواند، عملکرد پروتئینها را تغییر دهد و هم به کشتن پاتوژنهای اگزوژن کمک کند [۱۸]. علاوه بر این، اکسید نیتریک، از طریق مهار بیان مولکولهای چسبنده، از چسبیدن نوتروفیل به اندوتلیوم، پس از غواصی، جلوگیری میکند.[۱۹]. انقباض عضلات اسکلتی، سیتوکین‌ها را آزاد کرده و با روشی شبیه هورمونها، اعمال اثرات غدد درونریز را در تولید انرژی تنظیم میکنند. به طور معمول، IL-6، اولین سیتوکینی است که در طول ورزش و به دنبال آن، یک پاسخ ضد التهابی سیستمیک در گردش خون آزاد میشود. سطح گردش سیتوکینهای ضد التهابی شناخته شده، مانند IL-1b و IL-10 نیز پس از ورزش افزایش میابد [۲۰].

تحقیقات مختلف نشان می‌دهند که برخی از افراد راحت‌تر دچار عوارض تغییرات فشار شده و در نتیجه مستعد بیماری رفع فشار هستند. واضح است که مطالعه ژنوم و درک فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک افراد در معرض تغییرات فشار، می‌توانند در شناسایی ژن‌های مسئول بیماری و همچنین استعداد ژنتیکی برخی از افراد سودمند باشند [۳]. این اولین پژوهشی است که در مورد ارتباط مستقیم تغییرات فشار با افزایش چشمگیر بیان‌برخی ژن‌های غواصان ایرانی، انجام شده است. این نتایج که می‌توان آن را به فضانوردان نیز تعمیم داد، درک ما را به پاسخ‌های فیزیولوژیکی بدن در شرایط فشار زیاد (هایپربار) و فشار کم (هایپو بار)افزایش می‌دهد.

مواد و روش‌ها

گروه‌های کنترل و مطالعه

گروه مورد مطالعه، شامل۵ مرد غواص و با تجربه بوکه ۱۰ تا ۱۵ سال سابقه غواصی داشتند.میانگین سنی آنها،۳۰ سال و میانگین وزن آنها، ۸۰ کیلوگرم بود. گروه کنترل، ۵ مرد غیرغواص تشکیل شد که از لحاظ سن، وزن و سایر ویژگی‌های فیزیکی، با گروه مطالعه برابر بودند.

نمونهگیری و استخراج RNA

نمونهگیری خون، از گروه‌های کنترل غیرغواص و همچنین غواصان حرفهای سالم، که هفته‌ای سه بار، در عمق ۱۰ متر غواصی می‌کنند،

6. Interleukin 8
7. Lipocalin
8. Pascal
9. Arabidopsis
10. Nitric oxide
11. Peroxynitrite

گرفته شد. برای استخراج فوری RNA، ۵ میلیلیتر خون وریدی از هر دو گروه، در تیوب‌های PAXgene گرفته شد (PreAnalytix, Hombrechtikon, Switzerland). با توجه به پروتکل شرکت سازنده، RNA با کیت QIAamp استخراج شد (شرکت کیاژن). جهت حذف قطعات DNA، نمونه‌های RNA با DNaseI در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. پس از غیرفعال‌شدن DNaseI براساس دستورالعمل کیت، مراحل آماده‌سازی انجام شد. نمونه خون، به لوله ضد انعقاد K3 EDTA منتقل و با استفاده از بافی کوت که شامل گلبولهای سفید و همچنین بافرهای EL ، RLT و RPE و ستون QIAamp هستند، مولکولهای RNA استخراج شد.

نمونه‌گیری و استخراج RNA

۱ میکروگرم از RNA هر کدام از گروهها، بمنظور ساخت cDNA با کیت First-strand cDNA synthesis Kit (Fermentas) و با استفاده از آغازگر[12]های تصادفی هگزامر، رونویسی معکوس شد. جهت بررسی میزان بیان ژن‌ها از روشReal-time PCR استفاده شد.

real-time RT-PCR و آنالیز داده‌ها

برای تأیید آغازگرهای ژنهای هدف، محصولات حاصل از رونویسی معکوس، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، تکثیر (جدول ۱) و تمام محصولات PCR با ژل آگارز الکتروفورز ۲٪ تجزیه و تحلیل شدند. تمام آغازگرها در مناطقی از ژن‌ها طراحی شدند که هیچ همولوژیی با سایر ژن‌های شناخته شده در بانک ژن، نداشته باشند. همچنین آنالیز، با نرم‌افزارهای Primer (Applied Biosystems) Express software v.3.0 ، Gene Runner software v.3.0 و Primer-BLAST from NCBI انجام شد. آغازگرها توسط شرکت Bioneer کره جنوبی ساخته شدند. در این مطالعه، بیان ژن‌های هدف، در گروه غواصان و گروه کنترل، نسبت به ژن خانه دار[13] Beta-2-Microglobulin با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، کمی‌سازی شدند. به منظور انجام Real-time PCR، برای هر واکنش، بطور جداگانه، مقدار ۱۰ µl مستر میکس 2X SYBR Green I master mix (Applied Biosystems)، ۱۰۰ نانو مول از هر آغازگر و ۱µl cDNA درون تیوب‌های ۲۰ میکرولیتری، استفاده شد.

واکنش‌های گرمایی با سیستم Applied Biosystems 7500 real-time PCR و با استفاده از برنامه زیر انجام شدند:

۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه و با ۴۵ چرخه انجام شدند. میزان بیان تمام نمونه‌ها، با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شدند. میانگین چرخه آستانه (mCT)، از سه تکرار در سه آزمایش مستقل بدست آمد و برای محاسبه تعداد رونوشت‌ها، از Real-Time PCR Software ۷۵۰۰ v2.0.1استفاده شد (Applied Biosystems).

مطالعه آماری

با استفاده از برنامه‌های آماری SPSS (SPSS software, v.19 Inc, USA)و Microsoft Excel 2016 (Microsoft corp.) مطالعات آماری انجام شد. مقادیر P-value <0.01 بعنوان مقادیر معنادار برای آنالیز student's t-test محاسبه شدند.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

آغازگر	ژن	طول قطعات تکثیری
Fw:5-AAACACTGTGAGCTTGAGATCTG-3 Rv: 5-CGAAGCCGACCACCATGT-3	NF-kB	۸۲
Fw:5-TGAACATGAAGAGTGTTTCA-3 Rv:5-CCAGCTCTGCTAACCAGGAC-3	MPO	۲۰۰
Fw:5-GGGTTGGAAGCACTGGACAAT-3 Rv: 5-TTCTTCCTTGGAGAGGCTGA-3	TLR-2	۱۴۸
Fw: 5-TTGCCTCTCTTTGTCTACTC-3 Rv: 5-GCACAGGTTGAAGATGGA-3	DRD4	۱۳۰
Fw:5-TCAGCATGAGTTACACGAGTGT-3 Rv:5-GACGTTGTCAGACTCTTCCAA-3	BNIP3	۱۲۶
Fw:5-GGACAGGATATGGAGCAACA-3 Rv: 5-GGCAGACTCAAATTCCAGCT-3	IL-1b	۱۵۰
Fw:5-CCGGCAAGGCCAACAAGATC-3 Rv: 5-CCTCCACGGCGCTCTTCATG-3	HSP-72	۱۳۸
Fw:5-TCTGCAGACACGTGCGTTACT-3 Rv: 5-ACCTCTCACGTGAACGTAC-3	β2M	۷۵

نتایج

نتایج به‌دست آمده در ادامه شرح داده می‌شود.

الکتروفورز استخراج RNA

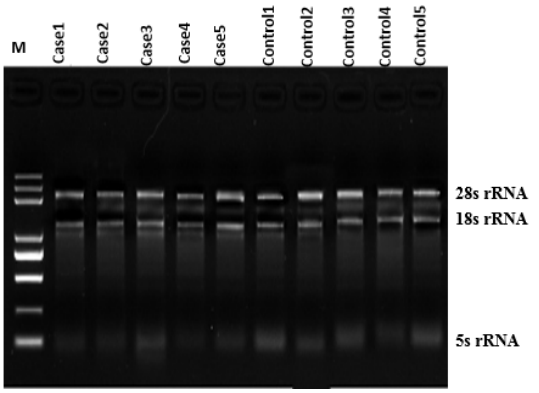
پس از استخراج RNA، به‌منظور تأیید صحت RNA مورد نظر، الکتروفورز انجام شد. در فرآیند الکتروفورز از مارکر 50bp استفاده شد. باند RNA کاملاً واضح دیده می‌شود که نشان دهندهٔ RNA28s و 18sRNA و RNAهایی با وزن مولکولی پایین است (شکل۱).

تأیید آغازگرهای سنتز شده

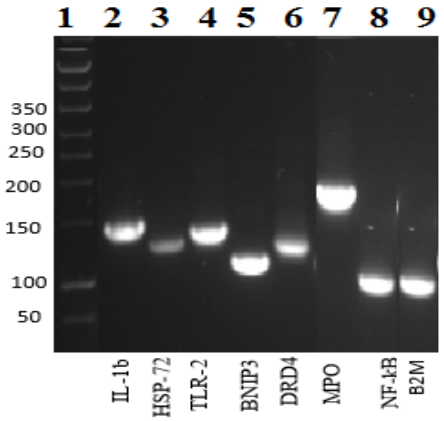
پس از انجام PCR، به‌منظور تأیید آغازگرهای سنتز شده، الکتروفورز انجام شد. در این مرحله از مارکر 50bp استفاده شد. آغازگرها، باند

12. Primer
13. House-keeping gene

مربوط به تکثیر cDNA را نشان دادند که در آن علاوه بر تأیید آغازگرهای طراحی شده، وجود RNA و تبدیل آن به cDNA تأیید شد (شکل ۲).



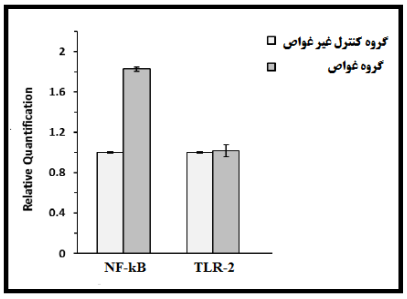
شکل ۱- RNAی استخراج شده با استفاده از کیت QIAamp RNA Blood Mini



شکل ۲- ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آگارز ۱ ٪

ارزیابی بیان ژن‌های مسیرهای سنتز NO و واسطه‌های لیپیدی

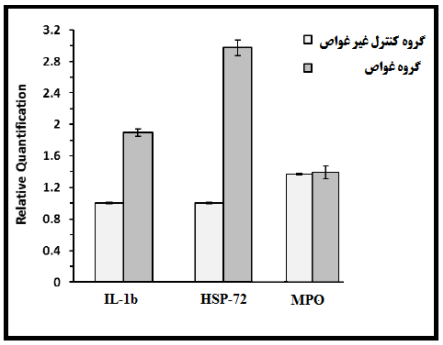
بیان ژن‌های مسیرهای سیگنالی سنتز NO و واسطه‌های لیپیدی، از جمله: NF-kB و TLR-2، در گروه غواصان و کنترل، نسبت به ژن *β2M* ، با تکنیک real-time RT-PCR ارزیابی شد. اختصاصیت real-time RT-PCR با ژل الکتروفورز ۲٪ تعیین و منجر به تولید یک محصول با طول مطلوب شد (جدول ۱). همچنین تجزیه و تحلیل منحنی ذوب در طول real-time RT-PCR، تکثیر اختصاصی را نشان داد. روش ΔΔCT، برای تعیین میزان کمی نسبی ژن‌ها، در مقایسه با ژن مرجع، استفاده شد. بیان ژن *β2M* (با CT تقریباً برابر) در زمان‌های مختلف، در افراد غواص و گروه کنترل، یکسان بود. بیان mRNA ژن *NF-kB* گروه غواص، ۱/۸ برابر بیشتر از گروه کنترل، افزایش داشت (t-test; $P < 0.01$). بیان ژن *TLR-2*، پس از غواصی در گروه غواصان و گروه کنترل، تغییرات چشمگیری نداشت (شکل ۳).



شکل ۳- سطح بیان نسبی ژن *NF-kB* و *TLR-2* درگروه کنترل غواص و غیرغواصی. تجزیه و تحلیل آزمون t اختلاف معنی‌داری را محاسبه کرد (P-value of <0.01). ما نتایج را به‌عنوان میانگین ± SEM در سه آزمایش مستقل بیان کرده‌ایم.

ارزیابی بیان ژن‌های مرتبط با سنتز سایتوکین نوتروفیل

بیان ژن‌های مرتبط با سنتز سایتوکین نوتروفیل، از جمله (IL-1b)، پروتئین شوک حرارتی (HSP-72) و میلوپروکسیداز (MPO) نسبت به ژن *β2M* با تکنیک real-time RT-PCR ارزیابی شد. بیان ژن *IL-1b*، تقریباً ۱/۹ برابر و بیان ژن *HSP-72* ۲/۹ برابر بیشتر از گروه کنترل، افزایش داشته است. بیان ژن میلو پروکسیداز، تغییر چندانی نسبت به گروه کنترل نداشته است (شکل ۴).



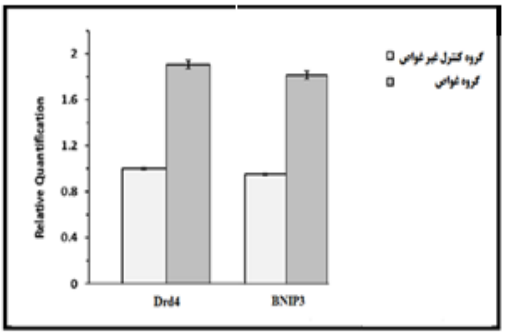
شکل ۴- سطح بیان نسبی ژن‌های *HSP-72*، *IL-1b* و *MPO* در گروه کنترل غواص و غیر غواصی. ما از ژن *β2M* به عنوان یک ژن مرجع برای نرمال سازی داده‌ها استفاده کردیم. تجزیه و تحلیل آزمون t اختلاف معنی داری را محاسبه کرد (P-value of <0.01). ما نتایج را به‌عنوان میانگین ±SEM در سه آزمایش مستقل بیان کرده‌ایم.

ارزیابی بیان ژن‌های مرتبط با بینایی، مسیرهای تنظیم RNA و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی[14]

بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای بینایی و مرگ برنامه‌ریزی شده، به ترتیب با ارزیابی دو ژن *BNIP3* و *Drd4*[15]، نسبت به ژن *β2M* با

14. Apoptosis
15. Dopamine Receptor D4

تکنیک real-time RT-PCR بررسی شد. قبلاً این دو ژن، در فضاپیما و در شرایط کاهش فشار بر روی موش‌ها ارزیابی شده بود [۱۷]. میزان بیان هر دوی این ژن‌ها، تقریباً مانند یکدیگر و به اندازه ۱/۸ برابر گروه کنترل بود که نشان از افزایش بیان چشمگیر این ژن‌ها پس از غواصی است. (شکل ۵).



شکل ۵- سطح بیان نسبی ژن‌های *Drd4* و *BNIP3* در گروه کنترل غواص و غیر غواصی. ما از ژن *β2M* به عنوان یک ژن مرجع برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده کردیم. تجزیه و تحلیل آزمون t اختلاف معنی‌داری را محاسبه کرد (P-value of <0.01). ما نتایج را به عنوان میانگین ±SEM در سه آزمایش مستقل بیان کرده‌ایم.

بحث

در این مطالعه، اثر فشار اعمال شده به بدن را در هنگام غواصی، به منظور بررسی بیماری رفع فشار که در موقعیت‌های گوناگون تغییرات فشار، رخ می‌دهد، بررسی کردیم. این شرایط مشابه شرایط فضانوردی نیز هست که در آن بدن تحت استرس تغییرات شدید فشار قرار دارد. برای این منظور، سطح رونویسی ۷ ژن را در غواصان و افراد غیر غواص اندازه‌گیری و آنها را با یکدیگر مقایسه کردیم. در این مطالعه، غواصان، تجربه غواصی حرفه‌ای در خلیج فارس، در عمق ۱۰ تا ۴۰ متر را داشتند. تحقیقات، نشان دهنده افزایش چشمگیر بیان برخی از ژن‌ها، در شرایط تغییرات فشار، در حین غواصی هستند. با توجه به تغییرات سطوح بیانی این ژن‌ها و همچنین انجام مطالعات تکمیلی در آینده و با استفاده از نتایج تمام این آزمایشات، می‌توان از آن، به عنوان نشانگر (مارکر) مطمئن، برای شناسائی افراد مقاوم در برابر تغییرات فشار و همینطور افراد مستعد به این بیماری، استفاده کرد که این موضوع، در فضانوردی نیز می‌تواند کمک‌کننده باشد.

یکی از راه‌های بررسی بیان ژن‌ها، بررسی تعداد رونوشت‌ها با استفاده از فناوری‌های با توان عملیاتی بالا، نظیر ریزآرایه[16] یا توان پائین، (مانند فناوری real-time PCR) است. نتایج حاصل از فناوری‌های با توان عملیاتی پائین، به عنوان استاندارد طلایی، برای تأیید نتایج حاصل از فناوری‌های توان بالا، در نظر گرفته می‌شوند. همینطور در تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده از real-time PCR و سایر مطالعات ترانسکریپتوم[17]، باید توجه داشت که بیان ژن‌ها و فعالیت‌های مربوط به سلول، به طور بالقوه و غیر مستقیم با اندازه‌گیری سطح رونویسی ژن‌ها، اندازه‌گیری و پیش‌بینی می‌شوند. همانطور که قبلاً ذکر شد، بیماری رفع فشار، در مواجهه با کاهش سریع فشار در ارتفاع زیاد، مانند: فضانوردی، حمل و نقل هوایی و یا در غواصی، ایجاد می‌شود که می‌تواند از طریق مکانیسم‌های مختلف رخ دهد. در ترانسکریپتوم‌های خون افراد در معرض تغییرات فشار، تغییرات مداوم مسیرهای آپوپتوز، التهاب و پاسخ‌های ایمنی مشاهده می‌شود. افزایش و کاهش فشار محیط، باعث ایجاد تغییرات بیولوژیک، افزایش بیان برخی ژن‌ها و در نهایت استرس‌های اکسیداتیو می‌شوند. در مطالعه‌ای، اثرات قرارگرفتن در فضا، به مدت ۱۳ روز، در محیط فضایی، روی کشتی شاتل آتلانتیس (STS-135)، نشان داد که شرایط پرواز در فضا، باعث ایجاد آسیب اکسیداتیو و آپوپتوز میتوکندری در شبکیه موش می‌شود [۲۱]. همچنین در مطالعات دیگری ثابت شد که در سفرهای فضایی، برخی ژن‌های مرتبط با فرآیندهای RNA، سوخت و ساز و مسیرهای نقل و انتقال، در پستانداران افزایش بیان چشمگیری داشته‌اند [۲۲]. تغییرات فشار در حین غواصی نیز منجر به استرس اکسیداتیو و افزایش بیان برخی از ژن‌ها می‌شود.

در این مطالعه، از بین ژن‌های مرتبط با مسیرهای بینایی، ژن *Drd4* را انتخاب کردیم. نتایج آزمایش‌ها، نشان‌دهندهٔ افزایش بیان چشمگیر این ژن، پس از غواصی است. همچنین مشاهده کردیم که میزان بیان ژن *Drd4* ، در گروه غواصان، دو برابر گروه کنترل بود. این مطلب نشان‌دهندهٔ الگوی رفتاری مشابه این ژن، در غواصان، نسبت به فضانوردان است. ژن *Drd4* ، پروتئین زیر واحد D4 گیرنده دوپامین را رمزگذاری می‌کند. پروتئین کد شده این ژن، یک گیرنده همراه پروتئین G[18] است که آنزیم آدنیلیل سیکلاز[19] را مهار می‌کند. جهش در این ژن، با انواع مختلف بیماری‌های رفتاری، از جمله: اختلال عملکرد سیستم عصبی خودمختار و بیش فعالی در ارتباط است. گیرنده‌های دوپامین، با متیلاسیون فسفولیپید به تحریک دوپامین پاسخ می‌دهند [۲۳].

Drd4 به شدت به استرس اکسیداتیو حساس است، در نتیجه، در شرایط تغییرات فشار، میزان بیان این ژن، دچار تغییرات چشمگیری می‌شود. در مطالعه دیگری که بر روی موش‌ها، در فضا،

16. Microarray

17. Transcriptome
18. G-protein-coupled receptor
19. Adenylyl cyclase

انجام شد، بیان افتراقی برخی از ژن‌ها، بررسی شد. در شرایط فضا، شبکیه موش‌ها دچار استرس اکسیداتیو شدید شد و میزان بیان ژن‌های *Drd4* و *BNIP3* در فضا، به شدت افزایش پیدا کرد. مشاهده کردیم که بیان ژن *BNIP3* پس از غواصی نیز بشدت افزایش یافته است. افزایش چشمگیر بیان این ژن، هم در فضا و هم پس از غواصی، ارتباط مستقیم، با استرس اکسیداتیو و قرارگیری در فشارهای مختلف را آشکار می‌سازد.

ژن *BNIP3*، پروتئین میتوکندریایی را کد می‌کند که حاوی دومین BH3 است و به عنوان یک فاکتور پیش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی،[20] عمل می‌کند. پروتئین رمزگذاری شده این ژن، با پروتئین‌های ضد آپوپتوز، از جمله: پروتئین E1B و Bcl2 در تعامل است. ژن *BNIP3* ، در تومورها، به‌واسطه متیلاسیون DNA خاموش می‌شود. این ژن، پس از ایسکمی حاد، در نارسایی مزمن قلب، پس از سکته قلبی، به طور قابل‌توجهی در بدن افزایش می‌یابد [۲۴]. *BNIP3*، نقش مهمی در از بین بردن پروتئین‌های تغییر شکل داده شده در سلول دارد. پروتئین‌های تغییر شکل داده شده، می‌توانند ناشی از استرس اکسیداتیو باشند. در مطالعات گذشته ثابت شده که در هنگام استرس اکسیداتیو و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، پروتئین BNIP3، از طریق تعامل با NH2- انتهایی سیستئین، به عنوان یک حسگر[21] اکسیداسیون، افزایش می‌یابد [۲۵].

در این مطالعه، همچنین با افزایش چشمگیر پروتئین شوک حرارتی (HSP-72)، در افراد غواص، مواجه بودیم. پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs)، نوعی پروتئین استرس گرمایی، در میان میکروب‌ها و پستانداران هستند. هنگامی که یک ارگانیسم در معرض استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرد یا دچار آسیب بافتی می‌شود، این پروتئین‌ها بیان می‌شوند. در شرایط بدون استرس، سطح بیان این پروتئین بسیار کم است اما در حالت استرس، میزان این پروتئین، برای محافظت از بدن، افزایش می‌یابد [۲۶]. پروتئین‌های شوک حرارتی، در فضا نیز، با تغییرات بیان همراه هستند. در مطالعات قبلی، گزارشاتی از افزایش بیان ژن‌های شوک حرارتی، *Hsp90aa1*، *Hsp90b1* و *Hspa4l* تحت شرایط ویژه فضاپیما منتشر شده‌اند. افزایش بیان این پروتئین‌ها، در فضا، می‌توانند منجر به تاشدگی بهتر پروتئین‌ها[22] شده و در نتیجه به عنوان محافظ در برابر استرس اکسیداتیو، عمل کنند [۲۷].

پروتئین HSP72، با مهار مسیر آپوپتوز SAPK/JNK در برخی از سلول‌های عصبی می‌تواند، از سایر مسیرهای طبیعی فیزیولوژیک محافظت کند. در واقع، این پروتئین، یک مهارکننده آپوپتوز محسوب می‌شود. در ورزش‌های شدید، پروتئین شوک حرارتی Hsp72، در بافت‌های مختلف بدن، از جمله انقباض عضله اسکلتی، ترشح می‌شود [۲۸]. افزایش دو برابری بیان این پروتئین، نیم ساعت پس از غواصی می‌تواند، نشان دهنده آزاد شدن HSP72 از نوتروفیل‌ها باشد. این مولکول، علاوه بر اینکه فعالیت چاپرونی[23] دارد، نقشی مهمی نیز در سیستم ایمنی، بر عهده دارد [۲۹]. HSP72، به محیط خارج سلولی آزاد شده و دارای قدرت اتصال به غشای سلول‌های دیگر برای تحریک تولید سیتوکین در سلول‌های ایمنی است [۳۰]. افزایش بیان ژن HSP72، همچنین، می‌تواند به افزایش بیان ژن IL-6 کمک کند [۳۱].

در این تحقیق، از بین ژن‌های مسیرهای سیگنالی سنتز نیتریک اکسید و واسطه‌های لیپیدی، دو ژن *TLR2* و *NF-kB* را انتخاب کردیم. میزان بیان *TLR2*، در بین افراد غواص و کنترل، تغییرات چشمگیری نداشت اما ژن *NF-kB* گروه غواص تقریباً ۱/۸ برابر، بیشتر از گروه کنترل، افزایش داشت. *NF-kB*، یک فاکتور رونویسی حساس به اکسیداسیون است که توسط گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن فعال می‌شود. این پروتئین بیان، چندین ژن مرتبط با التهاب، مانند اینترلوکین- ۶، ژن‌های متابولیسم ایکوزانوئیک[24] و چندین آنزیم، از جمله: نیتریک اکسید سنتاز[25] را تحریک می‌کند [۳۲]. در مطالعات گذشته، افزایش بیان برخی ژن‌ها، ازجمله: سایتوکین‌ها و پروتئین شوک حرارتی، *TNF-a*، *IL-8*، *HSP60* و *HSP70* و همچنین، افزایش سطح سرمی *IL-8* ، پس از غواصی، گزارش شده بود [۳۳]. مسیرهای سیگنالینگ یا پیام رسان داخل سلولی که با *HSP60/HSP70* و *TNF-a* از طریق *TNFR1* همسو با *NF-kB*، فعال می‌شوند، برای پاسخ‌های استرس سلولی، ضروری هستند. *NF-kB*، هنگامی که مهارکننده آن، یعنی I-kB توسط IKK تجزیه شود، به سرعت فعال می‌شود. معمولاً پس از غواصی، زیر واحدهای NF-kB، افزایش بیان محسوسی خواهند داشت. به همین ترتیب، بیان افتراقی کاسپازها یا غازگر و سایر ژن‌ها در مسیرهای سیگنالینگ NFR1، می‌توانند، القای سریع آپوپتوز را تسهیل کنند. بنابراین ژن‌ها و مسیرهای قابل توجه در ترانسکریپتوم‌های ثابت غواصان، وضعیت سلولی را در شرایط استرس‌زا نشان می‌دهند.

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که TLR4، ممکن است توسط استرس اکسیداتیو محیطی فعال شود [۳۴]. تحریک TLR ها باعث فعال شدن مسیر NF-kB می‌شود که ممکن است یک فرآیند مهم در تنظیم واسطه‌های التهابی، پس از غواصی باشد [۳۵]. بنابراین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن در نوتروفیل‌ها می‌توانند با افزایش بیان این ژن‌ها ارتباط داشته باشند.

نتایج حاضر، شواهدی از افزایش قابل توجه بیان ژن‌های کدکننده سیتوکین‌های ناشی از مواجهه با تغییرات مداوم فشار، هستند. در این مواقع اینترلوکین‌ها، افزایش بیان چشمگیری خواهند داشت. در این تحقیق، بیان ژن *IL-1b*، دو برابر بیشتر از

20. Pro-apoptotic factor
21. Sensor
22. Protein folding
23. Chaperone
24. Eicosanoic
25. INOS

گروه کنترل، افزایش داشته است. IL-1b، یک سیتوکین التهابی است که توسط برخی از سلول‌ها، از جمله: ماکروفاژها، سلول‌های NK، مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها بیان میشود. این سیتوکین، یک واسطه مهم در پاسخ التهابی است و در فعالیت‌های مختلف سلولی، از جمله: تکثیر سلولی، تمایز و آپوپتوز، نقش دارد. در سیستم عصبی مرکزی IL-1b، منجر به القای، دو ژن PTGS2 و COX-2 می‌شود که در افزایش التهاب، نقش اساسی دارند. همچنین در حبابک ریه‌های بیماران مبتلا به ویروس کرونا (COVID-19)، سطح بالایی از سیتوکین‌های پیش التهابی، مانند IL-1b، وجود دارند. در بیماران COVID-19 که دچار آسیب ریه شده‌اند، این آسیب، نتیجه پاسخ التهابی است که توسط سیتوکین‌هایی مانند IL-1b، ایجاد می‌شود [۳۶]. آبشار سیتوکین که در اثر تغییرات فشار، با موارد افزایش سطح گردش سیتوکین‌های ضدالتهابی شناخته‌شده و مهارکننده‌های آنها که در اثر عفونت رخ می‌دهند، متفاوت است. این آبشار سیتوکین، به عنوان یک واسطه، در ایجاد اثرات مفید سلامتی در ورزش عمل کرده و نقش مهمی در تعدیل التهاب ناشی از ورزش دارد. میلوپروکسیداز، یک پروتئین هِم‌دار است که عمدتاً در نوتروفیل‌ها یافت می‌شود. این پروتئین در گرانول‌های گرانولوسیت‌ها و مونوسیت‌ها سنتز و ذخیره می‌شود [۳۷]. شواهدی وجود دارد که نشان از اثرات میلوپراکسیداز در ضایعات سلولی و آسیب‌های اندوتلیال می‌دهد [۳۸]. در این مطالعه، تغییری در میزان این پروتئین، در بین افراد غواص و شاهد مشاهده نشد که این امر می‌تواند تأییدی بر عدم آسیب‌های سلولی در افراد غواص سالم، باشد. TLR ها، در شناسایی بسیاری از پاتوژن‌ها، از جمله: باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها نقش دارند. مولکول TLR2، با سایر مولکول‌های این خانواده، از جمله: TLR1 و TLR6 هترودیمرهایی را تشکیل می‌دهند که منجر به پاسخ‌های ایمنی ذاتی و ایمنی تطبیقی در برابر پاتوژن‌ها و عوامل تنش‌زا می‌شود [۳۹]. همچنین در این مطالعه تغییر چشمگیری از TLR2، در بین غواصان و افراد کنترل مشاهده نکردیم که با توجه به آنچه در مورد TLR ها و فعال‌شدن مسیر NF-kB، ذکر شد، به‌نظر می‌رسد، عدم تغییرات بیانی این پروتئین، در ایجاد هم‌ایستایی و ایجاد شرایط پایدار غواصان، نقش اساسی ایفا کند. اگرچه در مطالعات قبلی نیز، تغییر چشمگیری در بیان TLR2، مشاهده نشده بود [۴۰].

نتیجه‌گیری

غواصی در عمق زیاد و همینطور فضانوردی، ترکیبی از حالت‌های فشار زیاد، فشار کم و فعالیت‌های بدنی است که این عوامل منجر به بروز بیماری رفع فشار و پاسخ‌های التهابی نوتروفیل‌ها، افزایش بیان ژن‌هایی مانند *TLR*، *NF-kB*، *DRD4* و *BNIP3* و ژن‌های مربوط به مسیر سیگنالینگ و سنتز اسید نیتریک می‌شود. با ارزیابی مسیرهای فیزیولوژیک و بررسی بیان ژن‌های درگیر در فرآیندهای تغییرات فشار و التهابات ناشی از آن، می‌توان به نشانگرهای مناسب در جهت تشخیص افراد توانمند در این حوزه‌ها و همینطور افراد مستعد به بیماری‌های فضانوردی یا غواصی از جمله بیماری رفع فشار دست یافت.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافعی توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع

[1] P.P., Foster, and B.D. Butler, "Decompression to altitude: assumptions, experimental evidence, and future directions," *Journal of Applied Physiology*, Vol. 106, No 2, pp. 678-90, 2009, https://doi.org/10.1152/japplphysiol.91099.2008.

[2] J. Conkin, H.G. Sung, and A.H. Feiveson, "A latent class model to assess error rates in diagnosis of altitude decompression sickness," *Aviation, space, and environmental medicine*, vol.77, no.8, 2006, pp. 816-24.

[3] R.D. Vann, F.K. Butler, S.J. Mitchell, R.E. Moon "Decompression illness", *The Lancet*, vol. 377, no. 9760, pp.153-64, 2011, https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61085-9.

[4] S.L. Jersey, R.T. Baril, McCarty RD and Millhouse CM. "Severe neurological decompression sickness in a U-2 pilot," *Aviation, space, and environmental medicine*. vol. 81, no. 1, pp. 64-8, 2010, https://doi.org/10.3357/ASEM.2303.2010.

[5] S.I. Ranapurwala, N. Bird, P. Vaithiyanathan, P.J. Denoble, "Scuba diving injuries among Divers Alert Network members 2010-2011," *Diving Hyperb Med*, vol. 44, no. 2, pp. 79-85, 2014.

[6] S.R. Thom, M. Bennett, N.D. Banham, W. Chin, D.F. Blake, A.Rosen, N.W. Pollock, D. Madden, O. Barak, A. Marroni, C. Balestra, "Association of microparticles and neutrophil activation with decompression sickness," *Journal of Applied Physiology*, vol. 119, no. 5, pp. 427-34, 2015, doi: 10.1152/japplphysiol.00380.2015.

[7] E.A. Montcalm-Smith, R. McCarron, W. R. Porter, R. S. Lillo, J. T. Thomas, and C. R. Auker, "Acclimation to decompression sickness in rats," *Journal of Applied Physiology*, vol. 108, pp. 596-603, 2010, DOI: 10.1152/japplphysiol.00596.2009

[8] S. R. Thom, M. Yang, V. M. Bhopale, S. Huang, and T. N. Milovanova, "Microparticles initiate decompression-induced neutrophil activation and subsequent vascular injuries," *Journal ofApplied physiology*, vol. 110, pp. 340-351, 2011, DOI: 10.1152/japplphysiol.00811.2010

[9] N. S. Barteneva, E. Fasler-Kan, M. Bernimoulin, J. N. Stern, E. D. Ponomarev, L. Duckett, *et al.*, "Circulating microparticles: square the circle," *BMC cell biology*, vol. 14, pp. 1-21, 2013, DOI: 10.1186/1471-2121-14-23.

[10]E. Spisni, C. Marabotti, L. De Fazio, M. C. Valerii, E. Cavazza, S. Brambilla, *et al.*, "A comparative evaluation of two decompression procedures for technical diving using inflammatory responses: compartmental versus ratio deco," *Diving and hyperbaric medicine*, vol. 47, p. 9, 2017, DOI: 10.28920/dhm47.1.9-16

[11] S. R. Thom, "Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy," *Journal of applied physiology*, vol. 106, pp. 988-995, 2009, DOI: 10.1152/japplphysiol.91004.2008.

[12] L. A. Madden and G. Laden, "Gas bubbles may not be the underlying cause of decompression illness–The at-depth endothelial dysfunction hypothesis," *Medical hypotheses*, vol. 72, pp. 389-392, 2009, 10.1016/j.mehy.2008.11.022.

[13] A. Ersson, M. Walles, K. Ohlsson, and A. Ekholm, "Chronic hyperbaric exposure activates proinflammatory mediators in humans," *Journal of applied physiology,* vol. 92, pp. 2375-2380, 2002, DOI.10.1152/japplphysiol. 00705.2001.

[14] I. Eftedal, M. Ljubkovic, A. Flatberg, A. Jørgensen, A. O. Brubakk, and Z. Dujic, "Acute and potentially persistent effects of scuba diving on the blood transcriptome of experienced divers," *Physiological genomics,* vol. 45, pp. 965-972, 2013, https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00164.2012.

[15] I. Eftedal, A. Jørgensen, R. Røsbjørgen, A. Flatberg, and A. O. Brubakk, "Early genetic responses in rat vascular tissue after simulated diving," *Physiological genomics,* vol. 44, pp. 1201-1207, 2012, DOI: 10.1152/physiolgenomics.00073.2012.

[16]A.-L. Paul, A. C. Schuerger, M. P. Popp, J. T. Richards, M. S. Manak, and R. J. Ferl, "Hypobaric biology: Arabidopsis gene expression at low atmospheric pressure," *Plant Physiology,* vol. 134, pp. 215-223, 2004, doi: 10.1104/pp.103.032607.

[17]E. G. Overbey, W. A. da Silveira, S. Stanbouly ,N. C. Nishiyama, G. D. Roque-Torres, M. J. Pecaut, *et al.*, "Spaceflight influences gene expression, photoreceptor integrity, and oxidative stress-related damage in the murine retina," *Scientific reports,* vol. 9, pp. 1-12, 2019.

[18]C. K. Ferrari, P. Souto, E. L. França, and A. C. Honorio-França, "Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms," *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis,* vol. 59, pp. 441-448, 2011, DOI: 10.1007/s00005-011-0144-z

[19]J. Vinten-Johansen, Z. Q. Zhao, M. Nakamura, J. E. Jordan, R. S. Ronson, V. H. Thourani, *et al.*, "Nitric Oxide and the Vascular Endothelium in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury a," *Annals of the New York Academy of Sciences,* vol. 874, pp. 354-370, 1999.

[20]B.K. Pedersen, T. C. Akerstrom, A. R. Nielsen, and C. P. Fischer, "Role of myokines in exercise and metabolism," *Journal of applied physiology,* vol. 103, pp. 1093-1098, 2007.

[21]X. W. Mao, M. J. Pecaut, L. S. Stodieck, V. L. Ferguson, T. A. Bateman, M. Bouxsein, *et al.*, "Spaceflight environment induces mitochondrial oxidative damage in ocular tissue," *Radiation research,* vol. 180, pp. 340-350, 2013.

[22]T. J. Corydon, V. Mann, L. Slumstrup, S. Kopp, J. Sahana, A. L. Askou, *et al.*, "Reduced expression ofcytoskeletal and extracellular matrix genes in human adult retinal pigment epithelium cells exposed to simulated microgravity," *Cellular Physiology and Biochemistry,* vol. 40, pp. 1-17, 2016.

[23]R. Zhao, Y. Chen, W. Tan, M. Waly, A. Sharma, P. Stover, *et.al.*, "Relationship between dopamine-stimulated phospholipid methylation and the single-carbon folate pathway," *Journal of neurochemistry,* vol. 78, pp. 788-796, 2001.

[24]R. M. Graham, D. P. Frazier, J. W. Thompson, S. Haliko, H. Li, B. J. Wasserlauf, *et al.*, "A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia–acidosis," *Journal of Experimental Biology,* vol. 207, pp. 3189-3200, 2004.

[25]D. A. Kubli, M. N. Quinsay, C. Huang, Y. Lee, and A. B. Gustafsson, "Bnip3 functions as a mitochondrial sensor of oxidative stress during myocardial ischemia and reperfusion," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology,* vol. 295, pp. H2025-H2031, 2008.

[26]T. Yamashima, "Hsp70. 1 and related lysosomal factors for necrotic neuronal death,"*Journal of neurochemistry,* vol. 120, pp. 477-494, 2012.

[27]A. Ciechanover and Y. T. Kwon, "Protein quality control by molecular chaperones in neurodegeneration," *Frontiers in neuroscience,* vol. 11, p. 185, 2017.

[28]M. A. Febbraio, A. Steensberg, C. P .Fischer, C. Keller, N. Hiscock, and B. K. Pedersen, "IL-6 activates HSP72 gene expression in human skeletal muscle," *Biochemical and biophysical research communications,* vol. 296, pp. 1264-1266, 2002.

[29]P. L. Moseley, "Exercise, stress, and the immune conversation," *Exercise and sport sciences reviews,* vol. 28, pp. 128-132, 2000.

[30]R. Walsh, I. Koukoulas, A. Garnham, P. Moseley, M. Hargreaves, and M. A. Febbraio, "Exercise increases serum Hsp72 in humans," *Cell stress & chaperones,* vol. 6, p. 386, 2001.

[31]S. S. Welc, N. A. Phillips, J. Oca-Cossio, S. M. Wallet, D. L. Chen, and T. L. Clanton, "Hyperthermia increases interleukin-6 in mouse skeletal muscle," *American Journal of Physiology-Cell Physiology,* vol. 303, pp. C455-C466, 2012.

[32]M.-C. Gomez-Cabrera, E. Domenech, and J. Viña, "Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training," *Free radical biology and medicine,* vol. 44, pp. 126-131, 2008.

[33]J. H. Boyd, M. Divangahi, L. Yahiaoui, D. Gvozdic, S. Qureshi, and B. J. Petrof, "Toll-like receptors differentially regulate CC and CXC chemokines in skeletal muscle via NF-κB and calcineurin," *Infection and immunity,* vol. 74, pp. 6829-6838, 2006.

[34]H. Zbinden-Foncea, J.-M. Raymackers, L. Deldicque, P. Renard,and M. Francaux, "TLR2 and TLR4 activate p38 MAPK and JNK during endurance exercise in skeletal muscle," *Medicine and Science in Sports and Exercise,* vol. 44, pp. 1463-1472, 2012.

[35]A. Mardi, S. Meidaninikjeh, S. Nikfarjam, N. Majidi Zolbanin, and R. Jafari, "Interleukin-1 in COVID-19 Infection: Immunopathogenesis and Possible Therapeutic Perspective," *Viral immunology,* vol. 34, pp. 679-688, 2021.

[36]T. N. Pitanga, L. de Aragão França, V. C. J. Rocha, T. Meirelles, V. Matos Borges, M. S. Gonçalves, *et al.*, "Neutrophil-derived microparticles induce myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells," *BMC cell biology,* vol. 15, pp. 1-10, 2014.

[37]R. Tian, Y. Ding, Y.-Y. Peng, and N. Lu, "Inhibition of myeloperoxidase-and neutrophil-mediated hypochlorous acid formation in vitro and endothelial cell injury by (−)-epigallocatechin gallate," *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* vol. 65, pp. 3198-3203, 2017.

[38]F. Sipos, I. Fűri, M. Constantinovits, Z. Tulassay, and G. Műzes, "Contribution of TLR signaling to the pathogenesis of colitis-associated cancer in inflammatory bowel disease," *World journal of gastroenterology: WJG,* vol. 20, p. 12713, 2014.

[39]A. Sureda, J. M. Batle, X. Capó, M. Martorell, A. Córdova, J. A. Tur, *et al.*, "Scuba diving induces nitric oxide synthesis and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response in neutrophils," *Physiological Genomics,* vol. 46, pp. 647-654, 2014.

[40]A. Sureda, J.M. Batle, X, Capó, M. Martorell, A. Córdova, J.A. Tur, A. Pons, "Scuba diving induces nitric oxide synthesis and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response in neutrophils," *Physiological Genomics*, vol. 46, no.17, pp.647-54, 2014.