

# The effect of aerobic training along with melatonin consumption on caspase-1, NLRP3, and IL-1 $\beta$ gene expression related to pyroptosis pathway in the liver tissue of type 1 diabetes male rats

Yousef Falamarzi<sup>1</sup>, Meysam Shabaaninia<sup>1\*</sup>, Shirin Zilaei Bouri<sup>2</sup>, Farhad Daryanoosh<sup>3</sup>

1. Department of Physical Education and Sport Sciences, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran
2. Department of Physical Education and Sport Sciences, Masjed-Soleiman Branch, Islamic Azad University, Masjed-Soleiman, Iran
3. Department of Sport Sciences, School of Education and Psychology, Shiraz university, Shiraz, Iran

Corresponding author e-mail: shabaaninia@gmail.com

## Abstract

**Background and Objective:** The programmed cell death pyroptosis is modulated and regulated by inflammatory stimuli and multiple cellular pathways. On the other hand, there is an interaction between diabetes as an inflammatory disease and the pyroptosis pathway. Therefore, the purpose of the research was to investigate the effect of aerobic training along with melatonin consumption on the pyroptosis signaling pathway in the liver tissue of streptozotocin-induced type 1 diabetes rats.

**Materials and Methods** In this experimental study, 30 eight-week-old male Wistar rats weighing  $180 \pm 20$  grams were randomly selected and 24 of them were made diabetic by injecting streptozotocin solution to induce type 1 diabetes. Type 1 diabetes rats were divided into 4 groups including diabetes control (DC), diabetes melatonin (DMel), diabetes aerobic training (DEx), diabetes aerobic training+melatonin (DEx+Mel). A healthy control group (HC) was also considered. The aerobic exercise program lasted six weeks, five days a week, and each session lasted 60 minutes. Variables were measured through Real-Time PCR laboratory method. The data were analyzed through one-way analysis of variance and Tukey's post-hoc statistical tests in SPSS version 29 software. The significance level was considered  $P \leq 0.05$ .

**Results:** A significant decrease in caspase-1 and NLRP3 levels was observed following six weeks of aerobic training and melatonin administration ( $P=0.001$ ). Also IL-1  $\beta$  levels showed a significant decrease ( $P=0.002$ ).

**Conclusion:** Reducing these factors can be an important strategy and approach to modulate the pyroptosis pathway by reducing inflammation in the liver tissue of diabetic subjects.

**Keywords:** Aerobic Training, Caspase-1, Diabetes, Melatonin, NLRP3

**Received:** Nov 10, 2024

**Revised:** Jan 05, 2025

**Accepted:** Jan 25, 2025

**How to cite this article:** Falamarzi Y, Shabaaninia M, Zilaei Bouri Sh, Daryanoosh F. The effect of aerobic training along with melatonin consumption on caspase-1, NLRP3, and IL-1 $\beta$  gene expression related to pyroptosis pathway in the liver tissue of type 1 diabetes male rats. Daneshvar Medicine 2025; 32(6):14-28. doi: 10.22070/DANESHMED.2025.19769.1565

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

# تأثیر تمرین هوازی به همراه مصرف ملاتونین بر بیان ژن کاسپاز-۱، NLRP3 و IL-1 $\beta$ مرتبط با مسیر پیروپتوزیسی در بافت کبد موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی دیابتی نوع ۱

یوسف فلامرزی<sup>۱</sup>، میثم شعبانی‌نیا<sup>۱\*</sup>، شیرین زیلائی بوری<sup>۲</sup>، فرهاد دریانوش<sup>۳</sup>

۱. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران
۲. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد مسجد سلیمان، دانشگاه آزاد اسلامی، مسجد سلیمان، ایران
۳. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

\*نویسنده مسئول: میثم شعبانی‌نیا Email: shabaaninia@gmail.com

## چکیده

**مقدمه و هدف:** مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی پیروپتوزیسی توسط محرک‌های التهابی و مسیرهای سلولی متعددی تعدیل و تنظیم می‌شود. از طرفی بین دیابت به عنوان یک بیماری التهابی و مسیر پیروپتوزیسی تعامل وجود دارد؛ بنابراین هدف از انجام تحقیق بررسی تأثیر هشت هفته تمرین هوازی به همراه مصرف مکمل ملاتونین بر مسیر سیگنالینگ پیروپتوزیسی در بافت کبد موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی دیابتی نوع ۱ القاشده توسط استرپتوزتوسین می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش تجربی، تعداد ۳۰ سر موش سفید بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار هشت هفته‌ای با وزن  $180 \pm 20$  گرم به صورت تصادفی انتخاب و ۲۴ سر از آنها جهت القای دیابت نوع ۱ با تزریق محلول استرپتوزتوسین دیابتی شدند. موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی دیابتی نوع ۱ در ۴ گروه شامل کنترل دیابتی (DC)، ملاتونین دیابتی (DMel)، تمرین هوازی دیابتی (DEX)، تمرین هوازی+ملاتونین (DEX+Mel) تقسیم شدند. یک گروه کنترل سالم (HC) نیز در نظر گرفته شد. برنامه تمرین هوازی شامل شش هفته، پنج روز در هفته و هر جلسه به مدت ۶۰ دقیقه بود. متغیرها از طریق روش آزمایشگاهی Real-Time PCR اندازه‌گیری شدند. داده‌ها از طریق آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۹ تجزیه و تحلیل شدند. سطح معناداری  $P \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

**نتایج:** کاهش معنی‌داری در مقادیر کاسپاز-۱ و NLRP3 به دنبال شش هفته تمرین هوازی و مصرف ملاتونین مشاهده شد ( $P=0/001$ ). همچنین مقادیر IL-1 $\beta$  کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P=0/002$ ).

**نتیجه‌گیری:** کاهش این عوامل می‌تواند یک راهبرد و رویکرد مهم برای تعدیل مسیر پیروپتوز از طریق کاهش التهاب در بافت کبد آزمودنی‌های دیابتی باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین هوازی، کاسپاز-۱، دیابت، ملاتونین، NLRP3

وصول مقاله: ۱۴۰۳/۰۸/۲۰

اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۳/۱۰/۱۶

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۶

## مقدمه

دیابت شیرین یک بیماری مزمن متابولیک است که با افزایش سطح گلوکز خون مشخص می‌شود. دیابت آسیب جدی به قلب، چشم‌ها، کلیه‌ها، عروق خونی و اعصاب وارد می‌کند. کبد همچنین یکی از اعضای مرتبط با دیابت است، زیرا نقش مهمی در هموستاز گلوکز دارد. به عنوان مثال، دیابت به طور قابل توجهی با ایجاد و پیشرفت بیماری‌های کبد چرب مرتبط است (۱).

مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یک فرآیند بیولوژیکی اساسی است که برای رشد، توسعه و حفظ هموستاز در موجودات چند سلولی ضروری است (۲،۳). شش دسته اصلی از مرگ‌های سلولی برنامه‌ریزی شده شامل آپوپتوز، نکروپتوز، پیروپتوزیس<sup>۱</sup>، فروپتوز، اتوفاژی و افروسیتوزیس را شامل می‌شود (۴). در این میان، پیروپتوزیس، شکل جدیدی از مرگ سلولی التهابی می‌باشد که توسط محرک‌های التهابی آغاز می‌گردد. پیروپتوزیس به‌عنوان یک حوزه حیاتی مطالعه پدیدار شده است، اما مکانیسم‌های آن به‌طور کامل شناخته نشده و نیازمند بررسی دقیق‌تر است (۵).

پیروپتوزیس با ترشح سایتوکین‌های پیش‌التهابی مشخص می‌گردد که برای پاسخ ایمنی ذاتی در برابر محرک‌های عفونی و غیرعفونی یکپارچه هستند (۶،۷). پیروپتوزیس به عنوان یک جزء اساسی از سیستم ایمنی ذاتی، برای محافظت از بدن در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عوامل استرس‌زای خارجی از طریق فعال کردن کاسپاز-۱ و انتشار متعاقب سایتوکین‌های التهابی مانند  $IL-1\beta$  و  $IL-18$  شناخته می‌شود (۸). علاوه بر این، وزیکول‌های التهابی نقش مهمی در روند پیروپتوزیس دارند و ارتباط بین سیستم ایمنی و سلول‌ها را تسهیل می‌کند. فعال شدن وزیکول‌های التهابی در شرایط پاتولوژیک مختلفی از جمله بیماری کبد چرب متابولیک، فیروز کبدی، نقرس، بیماری

قلبی، دیابت و بیماری آلزایمر نقش دارد که بر لزوم تنظیم دقیق تاکید می‌کند (۹-۱۱).

یک پاسخ التهابی در پاسخ به آسیب‌های بافتی مانند آسیب‌های کبدی رخ می‌دهد. پروتئین دامنه پیرین خانواده گیرنده NOD شبه حاوی ۳ (NLRP3)<sup>۲</sup> حاوی دامنه‌های NACHT، غنی از لوسین تکرار شده (LRR)<sup>۳</sup> و پیرین (PYD)<sup>۴</sup> یک کمپلکس پروتئینی ماکرومولکولی با تنظیم دقیق است که آسیب را حس می‌کند و با فعال کردن کاسپاز-۱ پاسخ التهابی را تحریک و تقویت می‌کند (۱۲). شکافت و برش سایتوکین‌های پیش‌التهابی، مانند  $pro-IL-1\beta$  و  $pro-IL-18$ ، به اشکال بالغ آنها منجر به القای مرگ سلولی التهابی (پیروپتوز) می‌شود. نشان داده شده است که مهارکننده‌های التهاب NLRP3 و مسدودکننده‌های فعالیت  $IL-1\beta$  و  $IL-18$  باعث کاهش آسیب به بافت و بهبود التهاب و حفظ عملکرد اندام می‌شوند (۱۳،۱۴). اکنون مشهود است که التهاب NLRP3 به شدت در پاتوزن و پیشرفت دیابت نقش دارد. با این حال، مکانیسم‌های مولکولی برای فعال‌سازی التهاب NLRP3 هنوز مشخص نشده است. در تحقیقی نشان داده شد که دیابت به عنوان یک بیماری التهابی با انتشار NLRP3 التهابی،  $IL-1\beta$  و  $IL-18$  را تعدیل می‌کند. همچنین این محققان گزارش کردند مداخله‌های ورزشی یک روش پیشگیرانه و درمانی موثر برای کاهش عوارض دیابت از طریق تعدیل التهاب NLRP3 است (۱۵). در این راستا در تحقیقی سیستماتیک و متاآنالیز Ding و همکاران (۲۰۲۱) به بررسی تأثیر فعالیت ورزشی منظم بر التهاب و مسیر سیگنالینگ فعال‌سازی التهابی پرداختند. نتایج نشان داد که تمرینات ورزشی منظم می‌تواند به طور قابل توجهی سطوح  $IL-1\beta$  و  $IL-18$  را کاهش دهد. همچنین نشان دادند که تمرین هوازی موثرترین روش تمرینی است و شدت کم تا

<sup>2</sup> NOD-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3

<sup>3</sup> A Leucine-Rich Repeat

<sup>4</sup> Pyrin Domain

<sup>1</sup> Pyroptosis

ملاتونین، هدف محققان این مطالعه کشف این است که آیا و چگونه این مداخلات می‌توانند مسیر سیگنالینگ پیروپتوزیس را تعدیل کنند و آیا انجام تمرین هوازی و مصرف مکمل ملاتونین می‌تواند نشانگرهای التهابی مانند کاسپاز-۱، NLRP3، IL-1 $\beta$  را در کبد تنظیم کنند؛ بنابراین هدف انجام تحقیق حاضر بررسی تأثیر هشت هفته تمرین هوازی به همراه مصرف مکمل ملاتونین بر مسیر سیگنالینگ پیروپتوزیس در بافت کبد موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی نر دیابتی نوع ۱ القا شده توسط استرپتوزوسین می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود. جهت اجرای این تحقیق در ابتدا ۳۰ سر موش سفید بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با سن تقریبی هشت هفته‌ای از دانشکده علوم دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز خریداری و به محل آزمایشگاه فیزیولوژی ورزش این واحد دانشگاهی انتقال داده شد. موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی مورد آزمایش در طی مراحل پژوهش در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف به ابعاد طول ۱۵×۱۵×۳۰ سانتی‌متر ساخت شرکت رازی‌راد با چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، دمای محیطی ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت هوای ۳۵±۵ درصد و همچنین با تهویه مناسب نگهداری شدند. در تمام مدت پژوهش اصل اصول و رعایت موازین اخلاقی با حیوانات بر اساس دستورالعمل‌های کمیته ملی اخلاق در تحقیقات زیست پزشکی با شماره کد اخلاق IR.SSRC.REC.1403.037 انجام شد. غذای موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی این پژوهش، تولید شرکت خوراک دام به‌پرور کرج و حاوی مواد پروتئین خام، چربی خام، فیبر خام، خاکستر، مواد معدنی بود که بر اساس وزن‌کشی هر روز یک بار با ترازوی استاندارد ویژه و با توجه به جیره‌ی طبیعی ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در روز در هر قفس قرار داده شد. در تمام مراحل پژوهش، آب مورد نیاز حیوان به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در اختیار آنها قرار گرفت.

متوسط و شدت ترکیبی در مقایسه با شدت بالا برای کاهش IL-1 $\beta$  و IL-18 موثرتر است. این محققان بیان کردند تأثیر ورزش منظم بر مولکول‌های کلیدی درگیر در سیگنالینگ فعال‌سازی التهاب از جمله ASC، NLRP3 و کاسپاز-۱ مورد مطالعه قرار نگرفته است و نیاز به بررسی بیشتر دارد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ورزش منظم می‌تواند به طور موثری سطح سایتوکین‌های التهابی مرتبط با فعال‌سازی التهاب را کاهش دهد (۱۶).

ملاتونین یک ماده مصنوعی مبتنی بر گروه متوکسی است که عمدتاً در شب در شرایط نور/تاریکی طبیعی توسط غده صنوبری سنتز و ترشح می‌شود. ملاتونین یک آنتی‌اکسیدان طبیعی شناخته شده با فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف است (۱۷). ملاتونین اثرات متعددی از جمله تنظیم ریتم شبانه‌روزی و ایمنی دارد. از دیگر عملکردها تأثیر بر خواب، تاخیر در پیری از طریق اثرات ضد اکسیداسیون، آپوپتوز، فیبروز و اتوفاژی و محافظت در برابر میتوکندری و استرس شبکه آندوپلاسمی از عملکردهای مهم ملاتونین می‌باشد (۱۸). ملاتونین می‌تواند مسیرهای مولکولی مختلفی از جمله التهاب، تکثیر، آپوپتوز، متاستاز و اتوفاژی را تحت شرایط مختلف پاتوفیزیولوژیکی تنظیم کند. ملاتونین دارای اثرات محافظتی در برابر آسیب کبدی ناشی از داروها و مواد سمی است (۱۷). ملاتونین با مهار انتشار سایتوکین‌های التهابی، از جمله IL-1 $\beta$ ، IL-18، TNF- $\alpha$ ، پروتئین واکنشی C، NRF2 و IL-1 $\alpha$ ، فعالیت ضدالتهابی را اعمال می‌کند (۱۹). همچنین نشان داده شده است که ملاتونین فعالیت التهابی NLRP3 را از طریق مسیرهای مختلف سیگنالینگ درون سلولی کاهش می‌دهد (۲۰).

دیابت اغلب به دلیل التهاب مزمن و استرس سلولی منجر به عوارض کبدی می‌شود. تمرینات هوازی برای بهبود سلامت کلی متابولیک شناخته شده است، در حالی که ملاتونین دارای خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی است؛ بنابراین با بررسی اثرات ترکیبی تمرین هوازی و مکمل

**مرحله آشناسازی**

موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی با مدت زمان یک هفته با محیط آزمایشگاه سازگار شدند. سپس تمامی موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی پنج روز در هفته به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و با سرعت ۵-۱۰ متر در دقیقه بر روی نوارگردان دویدند و با نوارگردان و چگونگی دویدن بر آن آشنا شدند. موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی که قابلیت تمرین‌پذیری نداشتند، مشخص و از تحقیق کنار گذاشته شدند.

**روش القای دیابت نوع ۱**

پس از اتمام پروتکل آشناسازی، ۲۴ سر از ۳۰ سر موش سفید بزرگ آزمایشگاهی جهت القای دیابت به صورت تصادفی انتخاب شدند. پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، محلول استروپتوزوتوسین (STZ) (Sigma, St. Louis, MO) با دوز ۵۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حل‌شده در بافر سیترات ۰/۰۵ M با pH: ۴/۵ به صورت درون صفاقی تزریق شد (۲۱). جهت تزریق درون صفاقی از سرنگ انسولین استفاده گردید. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحی کوچک توسط لانسیت بر روی ورید دم، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) اندازه‌گیری و موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی که قند خون آن‌ها بالاتر از ۲۵۰ mg/dl باشد به‌عنوان دیابتی نوع ۱ در نظر گرفته شد (۲۱، ۲۲). برای اطمینان از عدم بازگشت قند خون در اوایل هر هفته تا پایان پروتکل تمرین و تزریق ملاتونین، نیز قند خون موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد و موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی که به هر دلیلی قند خون آنها کمتر از آستانه دیابت نوع ۱ بود از تحقیق خارج شدند (۲۲). به موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی غیردیابتی (۶ سر) شامل گروه سالم کنترل نیز

معادل حجمی بافر سیترات ۰/۰۵ M با pH: ۴/۵ به صورت درون صفاقی تزریق شد.

موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی دیابتی به طور تصادفی در چهار گروه و هر گروه شش سر شامل (۱) کنترل دیابتی (DC)، (۲) ملاتونین دیابتی (DMel)، (۳) تمرین هوازی دیابتی (DEX)، (۴) تمرین هوازی+ملاتونین (Dex+Mel) تقسیم شدند. یک گروه کنترل سالم (HC) شامل شش سر موش سفید بزرگ آزمایشگاهی نیز در نظر گرفته شد.

**پروتکل تمرین هوازی**

شدت تمرین بر اساس آزمون اندازه‌گیری حداکثر سرعت سنجیده شد. در ابتدا جهت اندازه‌گیری سرعت تمرین رت‌های گروه تمرینی از یک گروه پایلوت (چهار سر و مبتلا به دیابت نوع ۱) که یک هفته از برنامه تمرین اصلی جلوتر بودند، استفاده شد. آزمون اندازه‌گیری حداکثر سرعت با سرعت پنج متر در دقیقه شروع و هر سه دقیقه سرعت تدریجاً پنج متر در دقیقه افزایش یافت تا رت‌ها به خستگی (چسبیدن موش‌ها به انتهای تردمیل) برسند. سرعتی که در آن رت‌ها به خستگی رسیدند، به‌عنوان حداکثر سرعت در نظر گرفته شد (۲۳).

برنامه اصلی تمرین با استفاده از دستگاه تردمیل مخصوص حیوانات پنج روز در هفته و به مدت شش هفته بود. در ادامه هفته اول تمرین اصلی با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه (معادل ۴۰ درصد حداکثر سرعت) شروع شد. از هفته دوم تا چهارم به سرعت ۱۴ تا ۱۵ متر بر دقیقه (معادل ۵۰ تا ۵۵ درصد حداکثر سرعت) و از هفته پنجم تا هشتم به سرعت ۱۷ تا ۱۸ متر بر دقیقه (معادل ۶۰ درصد حداکثر سرعت) بر اساس حداکثر سرعت رسید. تمام جلسات تمرین در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت ۱۶ تا ۱۸ عصر برگزار شد (جدول ۱) (۲۴). زمان انجام تمرین بین ساعت ۸ تا ۱۲ هر روز انجام شد.

جدول ۱. پروتکل تمرین هوازی (۲۴)

مراحل تمرین مؤلفه تمرین	گرم کردن	بدنه اصلی تمرین	سرد کردن
شدت تمرین	با سرعت ۷ متر در دقیقه	هفته اول	کاهش پلکانی تا به ۷ متر بر دقیقه
مدت تمرین	۵ دقیقه	هفته دوم	۵ دقیقه
	۱۰ دقیقه	هفته سوم	۵ دقیقه
	۲۰ دقیقه	هفته چهارم	۵ دقیقه
	۳۰ دقیقه	هفته پنجم و ششم	۵ دقیقه
	۱۰ متر در دقیقه	با سرعت ۱۰-۱۴ متر در دقیقه	با سرعت ۱۷-۱۸ متر در دقیقه

### مصرف ملاتونین

دو هفته پس از القای دیابت نوع ۱، همراه با شروع پروتکل تمرین هوازی، به موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی گروه‌های ملاتونین دیابتی (DMel) و تمرین هوازی+ملاتونین (Dex+Mel)، ماده ملاتونین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) از شرکت سیگما آلدریج ساخت آمریکا به صورت درون صفاقی -حل شده در سالیان حاوی اتانول- به طور روزانه و به مدت شش هفته تزریق گردید (۲۵).

### روش بافت‌برداری

در مدت اجرای پروتکل، گروه کنترل هیچ‌گونه برنامه تمرینی نداشتند و در شرایط آزمایشگاهی در قفس‌های پلی‌کربنات نگهداری می‌شدند. همچنین موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی دیابتی نوع ۱ هیچ‌گونه درمانی با انسولین را در طول دوره پژوهش نداشتند. برای از بین بردن آثار حاد تمرین متغیرهای غیرقابل کنترل مانند استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه تمرینی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۳ تا ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن

بدن) بی‌هوش شدند. سپس بافت کبد از بدن موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی گرفته شد و سپس بلافاصله برای سنجش‌های بعدی با دمای ۸۰- فریز شد.

### روش آزمایشگاهی Real-Time PCR

برای بررسی بیان ژن کاسپاز-۱، NLRP3 و IL-1 $\beta$  در هر گروه بررسی بافت‌ها با تکنیک آزمایشگاهی Real-Time PCR استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد (جدول ۲) و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA به روش PCR تکثیرشده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت.

این تکنیک دارای ۴ مرحله اساسی می‌باشد:

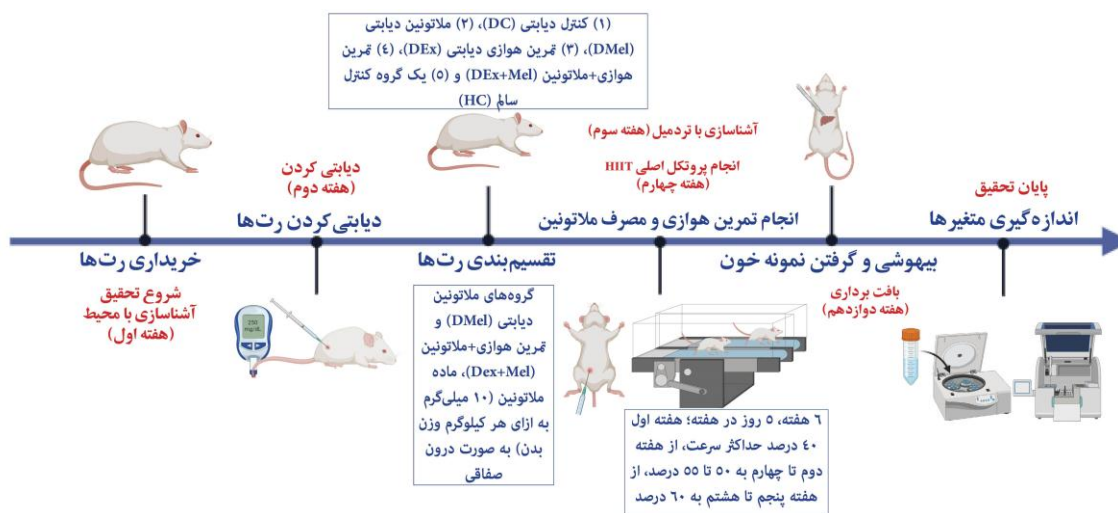
۱. RNA کل از سلول‌های جمع‌آوری شده در هر گروه استخراج گردید.
۲. با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس به cDNA تبدیل شد.
۳. cDNA حاصل جهت حذف DNA ژنومی با آنزیم DNase I تیمار شد.
۴. به روش آزمایشگاهی Real-Time PCR تکثیر گردید.

جدول ۲. توالی پرایمرهای NLRP3, Caspase-1, IL-18 و IL-1 $\beta$ 

ژن	توالی پرایمر	نقطه ذوب	سیکل
NLRP3	Fwd: TGTACTAGGCAAGGTTAGTGG	84	40
	Rev: GAGTGGATAGGTTTGTCTGG		
Caspase-1	Fwd: TGACAAGATCCTGAGGGCAA	82	30
	Rev: CCAGGTAGCAGTCTTCATTACA		
IL-1 $\beta$	Fwd: TGTGACTGGTGGGATGATGA	84	30
	Rev: GTTCTGTCTATTGAGGTGGAGA		
GAPDH	Fwd: GGATAGTGAGAGCAAGAGAGAGG	80	30
	Rev: ATGGTATTGGAGAGAAGGGAGGG		

## تجزیه و تحلیل آماری

نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون آماری شاپیروویلیک<sup>۱</sup> بررسی شد. با توجه به نرمال بودن داده‌ها، متغیرهای تحقیق حاضر از طریق آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه<sup>۲</sup> و تعقیبی توکی<sup>۳</sup> تجزیه و تحلیل شدند. بررسی داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۹ و گراف‌پد پریسم نسخه ۱۰/۲/۳ انجام گرفت. سطح معناداری  $P \leq 0/05$  در نظر گرفته شد. شکل ۱ در نرم‌افزار ایندیزاین نسخه ۲۰۲۴ طراحی شد.



شکل ۱. نمای شماتیک مراحل انجام پژوهش

<sup>1</sup> Shapiro-Wilk

<sup>2</sup> one-way ANOVA

<sup>3</sup> Tukey Post Hoc

## نتایج

آماری توصیفی و نتایج تحلیل واریانس متغیرهای کاسپاز-۱، NLRP3 و IL-1 $\beta$  در جدول ۳ گزارش شده است.

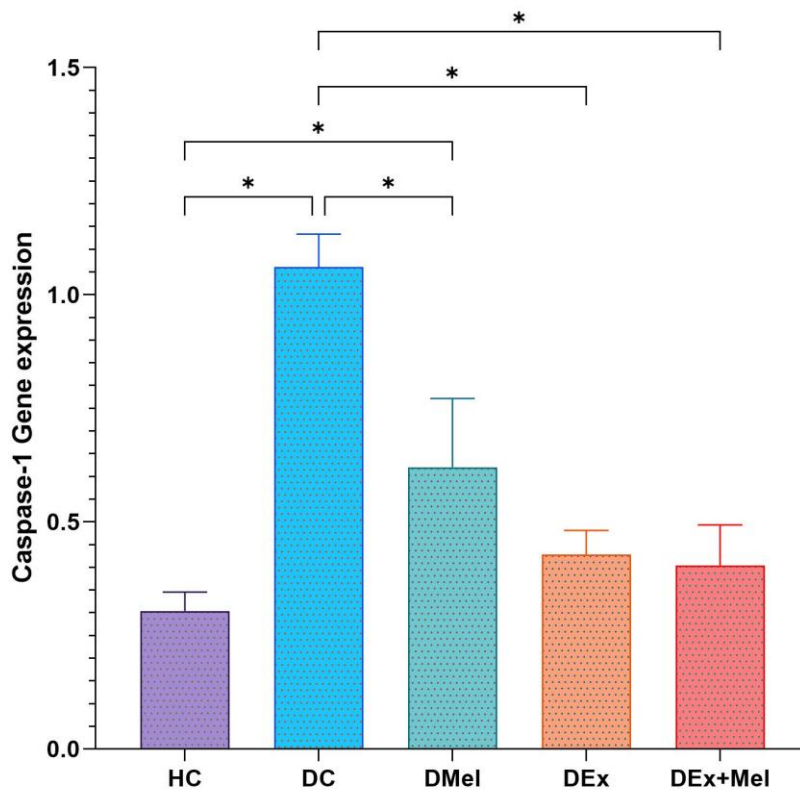
جدول ۳. نتایج توصیفی و تحلیل واریانس متغیرهای کاسپاز-۱، NLRP3 و IL-1 $\beta$

متغیر	گروه‌ها	میانگین	انحراف استاندارد	مقدار F	سطح معنی‌داری
کاسپاز-۱	HC	۰/۳۰	۰/۰۴	۳۳/۵۶	۰/۰۰۱
	DC	۱/۰۶	۰/۰۷		
	DMel	۰/۶۲	۰/۱۵		
	DEx	۰/۴۲	۰/۰۵		
	DEx+Mel	۰/۴۰	۰/۰۸		
NLRP3	HC	۰/۲۳	۰/۰۱	۳۱/۴۹	۰/۰۰۱
	DC	۱/۰۱	۰/۱۷		
	DMel	۰/۵۰	۰/۰۶		
	DEx	۰/۶۵	۰/۰۲		
	DEx+Mel	۰/۷۱	۰/۰۵		
IL-1 $\beta$	HC	۳/۱۵	۰/۱۴	۸/۹۲	۰/۰۰۲
	DC	۵/۲۲	۰/۲۲		
	DMel	۳/۲۰	۰/۵۸		
	DEx	۲/۲۳	۰/۵۷		
	DEx+Mel	۱/۹۷	۰/۴۱		

معنی‌داری وجود نداشت ( $P=۰/۹۹$ ) (نمودار ۱). نمودارهای ۱ و ۲ از طریق نرم‌افزار گراف‌پد پریسم نسخه ۱۰/۲/۳ طراحی شد.

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد تفاوت معنی‌داری در مقادیر کاسپاز-۱ ( $P=۰/۰۰۱$  و  $F=۳۳/۵۶$ ) وجود دارد (جدول ۲، نمودار ۱). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد مقادیر کاسپاز-۱ بین گروه‌های DC ( $P=۰/۰۰۱$ ) و DMel ( $P=۰/۰۱$ ) نسبت به گروه HC تفاوت معنی‌داری وجود دارد (نمودار ۱). با این وجود تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های DEx ( $P=۰/۴۷$ ) و DEx+Mel ( $P=۰/۶۵$ ) نسبت به گروه HC مشاهده نشد (نمودار ۱). از طرفی دیگر بین گروه‌های DMel ( $P=۰/۰۰۱$ )، DEx ( $P=۰/۰۰۱$ ) و DEx+Mel ( $P=۰/۰۰۱$ ) نسبت به گروه DC تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (نمودار ۱). در مقابل بین گروه‌های DEx ( $P=۰/۱۴$ ) و DEx+Mel ( $P=۰/۰۹$ ) نسبت به گروه DMel تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۱). همچنین بین گروه‌های DEx و DEx+Mel تفاوت



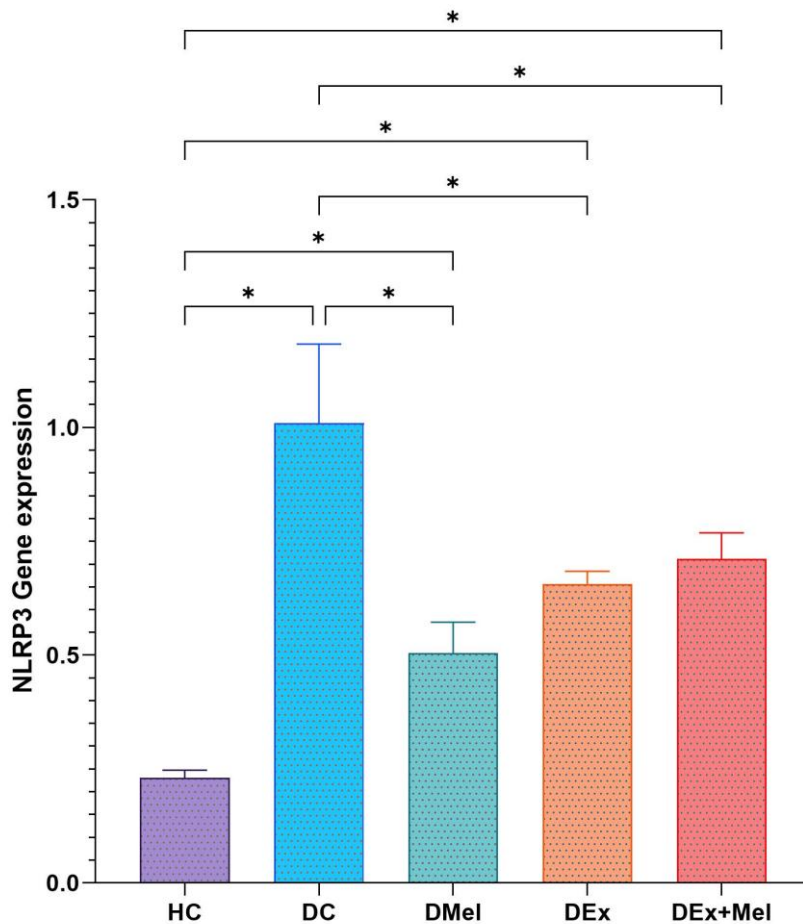


نمودار ۱. میانگین و انحراف استاندارد مقادیر کاسپاز-۱

(کنترل سالم (HC)، کنترل دیابتی (DC)، ملاتونین دیابتی (DMel)، تمرین هوازی دیابتی (DEx)، تمرین هوازی+ملاتونین (DEx+Mel)) (\* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین جفت‌گروه‌ها در سطح ۰/۰۵)

همچنین تفاوت معنی‌داری در مقادیر NLRP3 ( $P=0/001$ ) و ( $F=31/49$ ) مشاهده شد (جدول ۲، نمودار ۲). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد مقادیر NLRP3 بین گروه‌های DC ( $P=0/001$ )، DMel ( $P=0/02$ )، DEx ( $P=0/001$ ) و DEx+Mel ( $P=0/001$ ) نسبت به گروه HC تفاوت معنی‌داری وجود دارد (نمودار ۲). همچنین بین گروه‌های DMel و DEx ( $P=0/001$ ) و DEx+Mel و DEx ( $P=0/001$ ) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۲).

نسبت به گروه DC تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (نمودار ۲). در مقابل بین گروه‌های DEx ( $P=0/28$ ) و DEx+Mel ( $P=0/09$ ) نسبت به گروه DMel تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۲). همچنین بین گروه‌های DEx+Mel و DEx ( $P=0/93$ ) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (نمودار ۲).

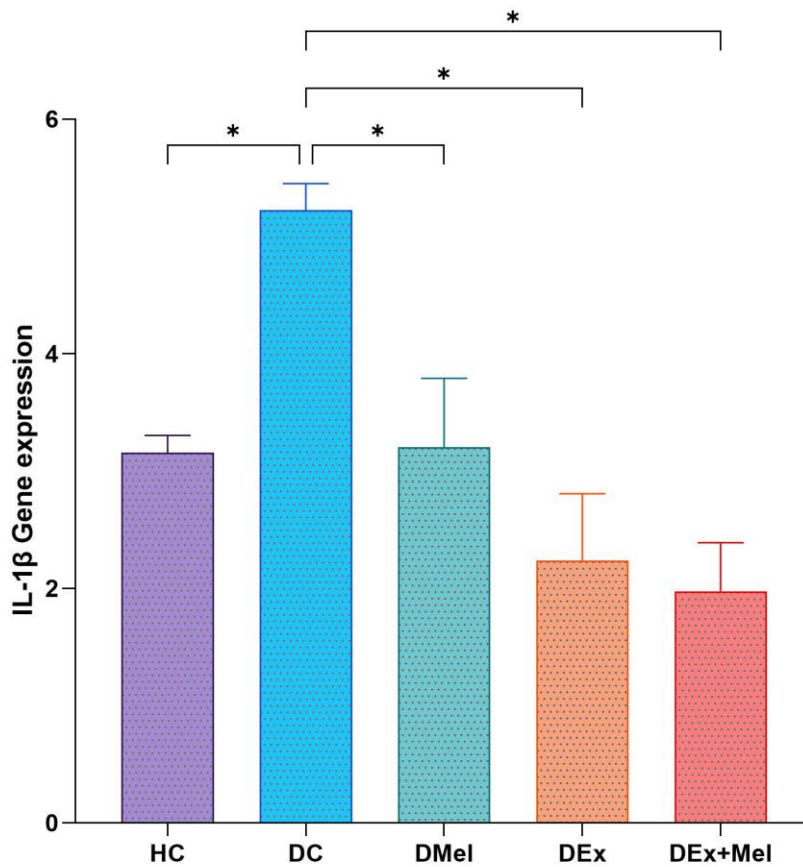


نمودار ۲. میانگین و انحراف استاندارد مقادیر NLRP3

(کنترل سالم (HC)، کنترل دیابتی (DC)، ملاتونین دیابتی (DMel)، تمرین هوازی دیابتی (DEx)، تمرین هوازی+ملاتونین (DEx+Mel)) (\* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین جفت‌گروه‌ها در سطح ۰/۰۵)

طرفی دیگر بین گروه‌های DMel ( $P=0/04$ )، DEx ( $P=0/002$ ) و DEx+Mel ( $P=0/002$ ) نسبت به گروه DC تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (نمودار ۳). در مقابل بین گروه‌های DEx ( $P=0/53$ ) و DEx+Mel ( $P=0/32$ ) نسبت به گروه DMel تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۳). همچنین بین گروه‌های DEx و DEx+Mel تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $P=0/99$ ) (نمودار ۳).

همچنین تفاوت معنی‌داری در مقادیر IL-1 $\beta$  ( $P=0/002$ ) و ( $F=8/92$ ) مشاهده شد (جدول ۲، نمودار ۳). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد مقادیر IL-1 $\beta$  بین گروه DC ( $P=0/001$ ) نسبت به گروه HC تفاوت معنی‌داری وجود دارد (نمودار ۳). با این وجود تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های DMel ( $P=0/99$ )، DEx ( $P=0/57$ ) و DEx+Mel ( $P=0/35$ ) نسبت به گروه HC مشاهده نشد (نمودار ۳). از

نمودار ۳. میانگین و انحراف استاندارد مقادیر IL-1 $\beta$ 

(کنترل سالم (HC)، کنترل دیابتی (DC)، ملاتونین دیابتی (DMel)، تمرین هوازی دیابتی (DEx)، تمرین هوازی+ملاتونین (DEx+Mel)) (\* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین جفت‌گروه‌ها در سطح ۰/۰۵)

## بحث

که فعال‌سازی کاسپاز-۱ و عوامل ترشحی دیگر مانند IL-1 $\beta$ ، IL-18 و NLRP3 می‌تواند برای التهاب و مسیرهای پیروپتوزیس در بافت کبد پیامدهای درمانی بالقوه‌ای را برای بررسی‌های آینده برجسته کند (۲۸،۲۷). در این راستا در تحقیقی Yang و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که محتوای IL-1 $\beta$ ، کاسپاز-۱ و NLRP3 به دنبال انجام تمرین هوازی در موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی کاهش می‌یابد. تمرین هوازی به مدت ۸ هفته، هر هفته ۵ جلسه، مدت زمان هر جلسه ۵۰ دقیقه با شدت ۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی روی تردمیل انجام شد. این محققان نشان دادند که اثر مهارتی تمرین ورزشی بر فعال‌سازی التهاب NLRP3 منجر به بهبود بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی می‌شود (۲۹). همچنین در تحقیقی مرووری سیستماتیک Ding و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که تمرین هوازی موثرترین

این تحقیق با هدف بررسی تأثیر هشت هفته تمرین هوازی به همراه مصرف مکمل ملاتونین بر مسیر سیگنالینگ پیروپتوزیس در بافت کبد موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی نر دیابتی ناشی از القای استرپتوزتوسین انجام شد. نتایج کاهش مقادیر کاسپاز-۱، NLRP3 و IL-1 $\beta$  را نشان داد.

پیروپتوزیس، شکل تازه شناسایی شده‌ای از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی همراه با التهاب است که خود را از سایر اشکال مرگ سلولی متمایز می‌کند. بررسی رابطه متقابل بین پیروپتوزیس و التهاب و سیگنال‌های خطر در بافت کبد می‌تواند یک رویکرد و راهبرد مهم برای سلامت سلول‌های کبدی از طریق تمرین‌های ورزشی باشد (۲۶،۵). تمرکز ویژه بر مکانیسم‌های مولکولی و پاتوفیزیولوژیکی اختلالات مختلف کبدی مهم است و نشان داده شده است

موثر می‌باشد و ترکیب مصرف ملاتونین و تمرین هوازی می‌تواند اثرات سودمندی بیشتری داشته باشد.

در تحقیقی دیگر Zhang و همکاران (۲۰۲۳) به بررسی تأثیر تمرین ورزشی مقاومتی بر NLRP3 همراه با مقاومت به انسولین و آسیب‌شناسی بافت کبد آزمودنی‌های انسانی پیش‌دیابتی پرداختند. تمرین مقاومتی به مدت ۶ ماه، پنج بار در هفته بود و آزمودنی‌ها با باند الاستیک با شدت ۶۰ تا ۷۰ درصد حداکثر ضربان قلب تمرین را انجام دادند. مقاومت به انسولین، آسیب کبدی و فعالیت التهابی کاسپاز-۱، NLRP3 و IL-1 $\beta$  در افراد پیش‌دیابتی بیشتر از گروه کنترل طبیعی بود. با این حال، مداخله ورزشی ۶ ماهه این روند را خنثی کرد، حساسیت به انسولین را به طور قابل توجهی بهبود بخشید، آسیب کبدی را کاهش داد و از فعال شدن بیش از حد التهاب کاسپاز-۱، NLRP3 و IL-1 $\beta$  در افراد پیش‌دیابتی جلوگیری کرد. علاوه بر این، همبستگی مثبت بین مقاومت به انسولین، آسیب شناسی کبد و التهاب کاسپاز-۱، NLRP3 و IL-1 $\beta$  نیز یافت شد. این محققان بر اساس نتایج خود گزارش کردند که تمرین ورزشی یک استراتژی موثر برای کاهش مقاومت به انسولین و آسیب کبدی در افراد پیش‌دیابتی است که احتمالاً با مهار فعالیت التهابی کاسپاز-۱، NLRP3 و IL-1 $\beta$  مرتبط است (۳۰). با وجود تفاوت در نوع تمرین که در تحقیق حاضر تمرین هوازی و در تحقیق Zhang و همکاران مقاومتی بود، میزان کاسپاز-۱، NLRP3 و IL-1 $\beta$  در هر دو تحقیق کاهش را نشان داد. نتایج تحقیق حاضر و Zhang و همکاران نشان می‌دهد تمرین‌های ورزشی می‌تواند در بهبود عوامل التهابی بسیار کارآمد و تأثیرگذار باشند؛ بنابراین می‌توان به تمرین‌های ورزشی بر اساس نوع، مدت زمان جلسات و دوره‌ها، شدت‌های کم تا زیاد و دیگر اصول تمرینات ورزشی به عنوان یک راهبرد مهم و موثر در کمک به روند درمان برای آزمودنی‌های دیابتی نگاه کرد.

در ارتباط با مصرف ملاتونین، در تحقیقی Yu و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که درمان ملاتونین به طور قابل توجهی باعث کاهش گلوکز خون، انسولین سرم، وزن بدن، وزن مرتبط با کبد، لیپیدهای سرم و آنزیم‌های کبدی در موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی می‌شود. نتایج تحقیق

روش تمرینی برای کاهش عوامل التهابی است و شدت کم تا متوسط و شدت ترکیبی در مقایسه با شدت بالا برای کاهش IL-1 $\beta$  موثرتر است. همچنین نشان دادند که تمرین ورزشی منظم می‌تواند به طور قابل توجهی سطوح IL-1 $\beta$  را کاهش دهد. این محققان بیان کردند تأثیر تمرینات ورزشی منظم بر مولکول‌های کلیدی درگیر در سیگنالینگ فعال‌سازی التهاب از جمله NLRP3، ASC و کاسپاز-۱ مورد مطالعه قرار نگرفته است و نیاز به بررسی بیشتر دارد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که تمرینات ورزشی منظم می‌تواند به طور موثری سطح سایتوکین‌های التهابی مرتبط با فعال‌سازی التهاب را کاهش دهد (۱۶). نتایج تحقیق Yang و همکاران و همچنین Ding و همکاران، در مقایسه با نتایج تحقیقات حاضر در یک راستا می‌باشد. در تحقیق‌های گزارش شده همراه با نتایج تحقیق حاضر ما شاهد کاهش میزان و محتوای عوامل التهابی یعنی IL-1 $\beta$ ، کاسپاز-۱ و NLRP3 به دنبال انجام تمرین هوازی هستیم. شایان ذکر است که در تحقیق حاضر میزان IL-1 $\beta$ ، کاسپاز-۱ و NLRP3 در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش قابل توجهی یافته است، اما می‌توان گفت که همچنان نسبت به گروه کنترل سالم در سطح بالایی قرار دارد. این افزایش را می‌توان به بیمار بودن آزمودنی‌ها تحقیق حاضر که مبتلا به دیابت بودند نسبت داد. با این وجود کاهش میزان IL-1 $\beta$  و IL-18، کاسپاز-۱ و NLRP3 در گروه‌های تمرینی و مصرف ملاتونین هم‌راستا با تحقیق مروری SUN و همکاران (۲۰۲۱) می‌باشد که نشان دادند دیابت به عنوان یک بیماری التهابی با انتشار NLRP3 التهابی IL-1 $\beta$  را تعدیل می‌کند (۱۵). در تحقیق حاضر ما مشاهده کردیم که ترکیب انجام تمرین هوازی به مدت شش هفته همراه با مصرف ملاتونین می‌تواند نسبت به انجام تمرین هوازی یا مصرف ملاتونین به تنهایی کاهش بیشتری را اعمال کند. با توجه به نتایج تحقیق حاضر و نتایج تحقیق‌های گزارش شده (۱۵، ۱۶، ۲۹) می‌توان نتیجه گرفت که مصرف ملاتونین یا انجام تمرین‌های هوازی به ویژه تمرینات ورزشی با شدت متوسط برای کنترل عوارض دیابت و عوامل التهابی برای بافت کبد در بیماران دیابتی یک رویکرد درمانی مفید و

تحقیق ارائه شده دارای محدودیت‌های است که باید در نظر گرفته شود. مدت زمان برنامه تمرین هوازی این مطالعه نسبتاً کوتاه مدت بود (شش هفته)، که ممکن است به طور کامل اثرات طولانی مدت تمرین هوازی و مصرف ملاتونین را بر مسیر پیروپتوزیس نشان ندهد. همچنین این مطالعه عوارض جانبی بالقوه یا سمیت مصرف طولانی مدت ملاتونین را بررسی نکرده است که پیشنهاد می‌شود محققان دیگر این امر را در نظر بگیرند. از طرفی این مطالعه تنها بر روی بافت کبد تمرکز کرد، بدون در نظر گرفتن سایر اندام‌هایی که ممکن است تحت تاثیر دیابت نوع ۱ و مداخلات مورد استفاده قرار گیرند. در نهایت پیشنهاد می‌شود محققان دیگر مسیرهای سلولی ملکولی مرتبط و متقاطع با مسیر پیروپتوزیس و دیگر عوامل مهم را به دنبال تمرینات ورزشی متفاوت در نظر بگیرند.

### نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر به دنبال انجام هشت هفته تمرین هوازی و مصرف ملاتونین در بافت کبد موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی دیابتی کاهش مقادیر کاسپاز-۱، NLRP3 و IL-1 $\beta$  را نشان داد. کاهش این عوامل می‌تواند یک راهبرد و رویکرد مهم برای تعدیل مسیر پیروپتوزیس از طریق کاهش التهاب در بافت کبد موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی دیابتی باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که انجام تمرین ورزشی هوازی همراه با مصرف ملاتونین نتایج سودمندتر و بهتری برای کاهش عوامل التهابی کاسپاز-۱، NLRP3 و IL-1 $\beta$  دارد و این کاهش نسبت به تمرین ورزشی هوازی و مصرف ملاتونین به صورت جداگانه قابل ملاحظه‌تر است؛ بنابراین انجام تمرین ورزشی هوازی می‌تواند یک مداخله درمانی مناسب برای بیماران دیابتی مصرف‌کننده ملاتونین باشد.

### تشکر و قدردانی

نتایج گزارش شده حاصل تلاش رساله‌ی دکتری نویسندگان این مقاله است. از همه‌ی افرادی که در انجام و جمع‌آوری این پژوهش ما را یاری کردند، کمال تشکر را داریم.

آنها نشان داد که ملاتونین فنوتیپ‌های بیماری کبد چرب غیرالکلی را از جمله تجمع چربی، استئاتوهپاتیت، فیروز و سطوح استرس اکسیداتیو کاهش می‌دهد. همچنین مشاهده شد ملاتونین به طور قابل توجهی غلظت IL-1 $\beta$  سرم را کاهش می‌دهد. در این مقاله نشان داده شد که سطوح NLRP3 نیز می‌تواند توسط ملاتونین در بافت‌های کبد معکوس شود. فعال‌سازی التهاب از طریق NLRP3 نیز سرکوب شد، که توسط پروتئین‌های تنظیم‌شده NLRP3، کاسپاز-۱ و IL-1 $\beta$  مشهود بود. این محققان بیان کردند ملاتونین می‌تواند با بهبود استئاتوز کبدی در موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی در برابر بیماری کبد چرب غیر الکلی محافظت کند و این عمل می‌تواند با تنظیم فعال‌سازی التهاب NLRP3 مرتبط باشد (۳۱). در تحقیق حاضر نشان داده شد که مصرف ملاتونین به صورت تنها یا ترکیب با تمرین ورزشی هوازی منجر به کاهش میزان NLRP3، کاسپاز-۱ و IL-1 $\beta$  نسبت به گروه کنترل می‌شود. این کاهش در گروه ترکیب ملاتونین با تمرین ورزشی هوازی قابل ملاحظه‌تر بود. با توجه به نتایج دو تحقیق می‌تواند اشاره کرد که مصرف ملاتونین برای کنترل عوارض دیابت مانند بهبود مقاومت به انسولین، تنظیم کلوز خون و تعدیل عوامل التهابی برای بافت کبد در بیماران دیابتی می‌تواند یک رویکرد درمانی باشد (۱۵،۱۶،۳۱). البته شایان ذکر است که ترکیب مصرف مکمل ملاتونین همراه با تمرینات ورزشی می‌تواند نتایج موثرتری را نشان دهد. در این راستا در تحقیقی Abou-Elnour و همکاران (۲۰۱۷) بررسی تأثیر ورزش شنا و/یا تجویز ملاتونین بر عملکرد کبد موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی با سندروم متابولیک پرداختند. ورزش شنا و/یا ملاتونین منجر به بهبود عملکرد کبد رت‌ها از طریق بهبود مقادیر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی شد و این محققان بیان کردند که هر دو تمرین ورزش شنا و تجویز ملاتونین ممکن است یک استراتژی جدید برای پیشگیری از سندرم متابولیک ارائه دهند (۳۲). نتایج تحقیق Abou-Elnour و همکاران نشان می‌دهد ترکیب مصرف ملاتونین و تمرین‌های ورزشی نسبت به هر کدام به تنهایی می‌تواند برای افراد با مشکلات سندرم متابولیک از جمله دیابت مفید باشد و این در راستای نتایج تحقیق حاضر است.

## ملاحظات اخلاقی

تمام مدت پژوهش اصل اصول و رعایت موازین اخلاقی با حیوانات بر اساس دستورالعمل‌های کمیته ملی اخلاق در تحقیقات زیست پزشکی با شماره کد اخلاق IR.SSRC.REC.1403.037 انجام شد.

## تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

## منابع

- Park J, Kwon H-J, Sohn W, Cho J-Y, Park SJ, Chang Y, et al. Risk of liver fibrosis in patients with prediabetes and diabetes mellitus. *PLoS One* 2022;17(6):e0269070.
- Sonnberger J, Kasper L, Lange T, Brunke S, Hube B. "We've got to get out" –Strategies of human pathogenic fungi to escape from phagocytes. *Molecular Microbiology* 2024;121(3):341-58.
- Bedoui S, Herold MJ, Strasser A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020;21(11):678-95.
- Lin L, Li H, Zheng Q, Hu J, Wu W. Research Progress on the Regulation of Autophagy and Apoptosis in Insects by Sterol Hormone 20-Hydroxyecdysone. *Insects* 2023;14(11):871.
- Zhu L, Tong H, Ren C, Chen K, Luo S, Wang Q, et al. Inflammation unleashed: The role of pyroptosis in chronic liver diseases. *International Immunopharmacology* 2024;141:113006.
- Mohseni A, Di Girolamo A, Cangiano R, Ascione M, di Marzo L, Mansour W. High-Grade Infection after Branched Endovascular Aortic Repair in Patient with Recent COVID-19 Hospitalization. *Diagnostics* 2024;14(2):205.
- Gaul S, Leszczynska A, Alegre F, Kaufmann B, Johnson CD, Adams LA, et al. Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis. *Journal of Hepatology* 2021;74(1):156-67.
- Fu J, Wu H. Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. *Annual Review of Immunology* 2023;4:301-16.
- Su YQ, Lin Y, Huang SJ, Lin YT, Ran J, Yan FF, et al. Pyroptosis is involved in maternal nicotine exposure-induced metabolic associated fatty liver disease progression in offspring mice. *Molecular Reproduction and Development* 2023; 91(8):e23719.
- Liu W, Peng J, Wu Y, Ye Z, Zong Z, Wu R, et al. Immune and inflammatory mechanisms and therapeutic targets of gout: An update. *International Immunopharmacology* 2023;121:110466.
- Tall AR, Bornfeldt KE. Inflammasomes and Atherosclerosis: a Mixed Picture. *Circulation Research* 2023;132(11):1505-20.
- Toldo S, Abbate A. The role of the NLRP3 inflammasome and pyroptosis in cardiovascular diseases. *Nature Reviews Cardiology* 2024;21(4):219-37.
- Wu C, Lu W, Zhang Y, Zhang G, Shi X, Hisada Y, et al. Inflammasome activation triggers blood clotting and host death through pyroptosis. *Immunity* 2019;50(6):1401-11.
- Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. *International Journal of Molecular Sciences* 2019;20(13):3328.
- Sun Y, Ding S. NLRP3 Inflammasome in Diabetic Cardiomyopathy and Exercise Intervention. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22(24):13228.
- Ding Y, Xu X. Effects of regular exercise on inflammasome activation-related inflammatory cytokine levels in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Sports Sciences* 2021;39(20):2338-52.
- Liu Q, Sun Y, Zhu Y, Qiao S, Cai J, Zhang Z. Melatonin relieves liver fibrosis induced by Txnrd3 knockdown and nickel exposure via IRE1/NF- $\kappa$ B/NLRP3 and PERK/TGF- $\beta$  1 axis activation. *Life Sciences* 2022;301:120622.
- Carrascal L, Nunez-Abades P, Ayala A, Cano M. Role of melatonin in the inflammatory process and its therapeutic potential. *Current Pharmaceutical Design* 2018;24(14):1563-88.
- Wen L, Wang M, Luo P, Meng X, Zhao M. Melatonin Exerts Cardioprotective Effects by Inhibiting NLRP3 Inflammasome-Induced Pyroptosis in Mice following Myocardial Infarction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021;2021(1):5387799.
- Arioz BI, Tarakcioglu E, Olcum M, Genc S. The Role of Melatonin on NLRP3 Inflammasome Activation in Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(7):1020.
- Yan J-e, Yuan W, Lou X, Zhu T. Streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia in rats is associated with upregulation of Toll-like receptor 4 expression. *Neuroscience Letters* 2012;526(1):54-8.
- Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart, Lung and Circulation*. 2003;12(1):44-50.
- Garcia D, Shaw RJ. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. *Molecular Cell* 2017;66(6):789-800.
- Chae C-H, Jung S-L, An S-H, Jung C-K, Nam S-N, Kim H-T. Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats.

- Journal of Physiology and Biochemistry 2011;67:235-41.
25. Zangiabadi N, Sheibani V, Asadi-Shekaari M, Shabani M, Jafari M, Asadi AR, et al. Effects of melatonin in prevention of neuropathy in STZ-induced diabetic rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 2011;6(2):59-67.
  26. Hu S, Wan X, Li X, Wang X. Aerobic exercise alleviates pyroptosis-related diseases by regulating NLRP3 inflammasome. *Frontiers in Physiology* 2022;13:965366.
  27. Huang Y, Xu W, Zhou R. NLRP3 inflammasome activation and cell death. *Cellular & Molecular Immunology* 2021;18(9):2114-27.
  28. Yang YM, Kim SY, Seki E, editors. Inflammation and liver cancer: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Seminars in liver disease* (Thieme Medical Publishers) 2019; 39(1): 26-42.
  29. Yang W, Liu L, Wei Y, Fang C, Liu S, Zhou F, et al. Exercise suppresses NLRP3 inflammasome activation in mice with diet-induced NASH: a plausible role of adropin. *Laboratory Investigation* 2021;101(3):369-80.
  30. Zhang T, Tian J, Fan J, Liu X, Wang R. Exercise training-attenuated insulin resistance and liver injury in elderly pre-diabetic patients correlates with NLRP3 inflammasome. *Frontiers in Immunology* 2023; 14:1082050.
  31. Yu Y, Chen D, Zhao Y, Zhu J, Dong X. Melatonin ameliorates hepatic steatosis by inhibiting NLRP3 inflammasome in db/db mice. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2021;35:20587384211036819.
  32. Abou-Elnour ES, Hanna GS, Amer GS, Salem HR, Abdel-Razek HA, Ewida SF. Effect of exercise and melatonin on fructose-induced hepatic dysfunction in a metabolic syndrome rat model. *Menoufia Medical Journal* 2017;30(1):286-96.