

Melatonin Reduces Inflammation in the Lung Tissue of Type 1 Diabetic Mice Through the ERK/NF- κ B Signaling Pathway

Jafar Rezaie¹ , Reza Abbasi², Afshin Rahbarghazi³, Mahdi Ahmadi^{4, 5*} 

¹Solid Tumor Research Center, Cellular and Molecular Medicine Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

²Department of Biology, Urmia University, Urmia, Iran

³Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴Tuberculosis and Lung Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁵Sarab Faculty of Medical Sciences, Sarab, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 12 Feb 2024

Revised: 7 May 2024

Accepted: 12 May 2024

ePublished: 28 Apr 2025

Keywords:

- Melatonin
- Diabetes
- Inflammation
- ERK/NF- κ B
- TNF- α

Abstract

Background. Diabetes is associated with inflammation. In this study, the effect of melatonin on the expression of inflammatory genes and the extracellular signal-related kinase/nuclear factor-kappaB (ERK/NF- κ B) signaling pathway was investigated in the lung tissue of type 1 diabetic mice.

Methods. Adult male mice weighing 25–30 g were randomly divided into 4 groups of 10, including control (C), control + melatonin (CM), diabetic (D), and diabetic + melatonin (DM). Streptozotocin (50 mg/kg) was used to induce diabetes. The tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) protein level in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was measured by the ELISA test, and the expression of *IL-1 β* , *ERK*, and *NF- κ B* genes was calculated using the real-time polymerase chain reaction technique.

Results. The findings showed that the concentration of the TNF- α protein in the BALF of groups D and DM was significantly higher than that in group C ($P < 0.001$). The amount of this protein in the DM group significantly decreased compared to the D group ($P < 0.05$). The expression levels of *ERK*, *IL-1 β* , and *NF- κ B* genes in the lung tissue of the D and DM groups increased significantly compared to the C and CM groups ($P < 0.001$). However, the expression levels of these genes in the DM group significantly decreased compared to the D group ($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.01$).

Conclusion. The results of the present study revealed that melatonin inhibited the expression of inflammatory markers and the ERK/NF- κ B signaling pathway in the lung tissue of diabetic mice.

Practical Implications. It seems that the induction of diabetes caused an increase in inflammation in the lung tissue of mice, and treatment with melatonin reduced inflammation.

How to cite this article: Rezaie J, Abbasi R, Rahbarghazi A, Ahmadi M. Melatonin Reduces Inflammation in the Lung Tissue of Type 1 Diabetic Mice Through the ERK/NF- κ B Signaling Pathway. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2025;47(2):144-154. doi: 10.34172/mj.025.33551. Persian.

Extended Abstract

Background

Diabetes mellitus (types 1 and 2) causes systemic inflammation in the lung tissue. Melatonin, a

neurohormone, shows anti-inflammatory and antioxidant effects. The extracellular signal-related kinase/nuclear factor-kappaB (ERK/NF- κ B)

*Corresponding author; Email: heysieattalab@gmail.com

© 2025 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

pathway is involved in inflammatory reactions. NF- κ B is a transcription factor that is inactive in the cytoplasm and is bound to an inhibitory protein. ERK is one of the factors that play a role in transmitting messages from the cell surface to the cell nucleus. This factor is phosphorylated in response to allergens and sends a message that leads to the separation of NF- κ B from the inhibitory factor and its transfer to the cell nucleus, causing inflammatory reactions. The activity of the ERK/NF- κ B pathway was increased in asthma, and its inhibition reduced airway inflammation. Therefore, the effect of melatonin on the expression of inflammatory genes and the ERK/NF- κ B signaling pathway was examined in the lung tissue of type 1 diabetic mice.

Animal Grouping

The 40 male mice (BALB/c) were divided into the control group (C), C group + melatonin (CM), the diabetic group (D), and the D group + melatonin (DM). To induce diabetes in diabetic groups, after 8 hours of fasting, streptozotocin (50 mg/kg) was administered as a single dose dissolved in 0.1 mmol sodium citrate buffer (pH=4.5) and injected into peritoneal. Three days after the streptozotocin injection, a blood sample of the tail vein was obtained, and blood sugar was determined using a digital glucometer. An animal with a glucose level higher than 250 mg/dL was considered diabetic. For the melatonin investigation, melatonin (3 mg/kg) was injected intraperitoneally twice a week for four weeks. Two weeks after the last injection, the animals were sacrificed by ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and their lung tissue was collected.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ELISA test and a rat tumor necrosis factor alpha (TNF- α) ELISA kit were used to determine the TNF- α protein level in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Absorbance was recorded after 30 minutes using a microplate reader (Biotek) at 450 nm.

Real-time Polymerase Chain Reaction for IL-1 β , ERK, and NF- κ B Genes

Then total RNA was extracted from homogenized lung tissue using a special kit (FABRK001, Favorgen). A commercial cDNA synthesis kit (A101161, ParTous) was utilized for cDNA

synthesis. The RT-PCR technique was performed using SYBR Green qualitative PCR Master Mix (YT2551, Yekta Tajhiz Azma). The ratio of the target and reference (β -actin) genes was considered as the gene expression change.

Statistical Analysis

The quantitative results obtained from the present study were expressed as means $\pm$ standard errors of the mean and were compared using a one-way analysis of variance and Tukey's supplementary test. SPSS 19 and GraphPad Prism 8 were employed to perform statistical calculations and draw graphs, respectively. The criterion for the significance of results in this design was $P < 0.05$.

Results

Examination of the Level of the TNF- α Protein in Bronchoalveolar Lavage Fluid

The results of the ELISA test demonstrated that the level of the TNF- α protein in the BALF of the D groups was significantly higher than that of the TNF- α protein in the BALF of the C group ($P < 0.001$). Treatment with melatonin in the DM group significantly reduced the amount of the TNF- α protein in the BALF compared to the D group ($P < 0.05$). In addition, the level of the TNF- α protein in the CM group did not show a significant difference compared to the C group ($P > 0.05$).

Investigation of IL-1 β Gene Expression in Lung Tissue

RT-PCR results revealed that IL-1 β gene expression in the lung tissue of the D and DM groups increased significantly compared to the C and CM groups ($P < 0.001$). Further, treatment with melatonin in the DM group significantly reduced IL-1 β gene expression in comparison to the D group ($P < 0.05$). There was no significant difference in IL-1 β gene expression between the C and CM groups ($P > 0.05$).

Examination of NF- κ B Gene Expression in Lung Tissue

Our results showed that the level of NF- κ B gene expression in the lung tissue of the D group was significantly increased compared to the C group ($P < 0.001$). Treatment with melatonin in the DM group significantly reduced the expression of this gene in comparison to the D group ($P < 0.05$). The level of NF- κ B gene expression in the CM group

compared to the C group represented no significant difference ($P>0.05$).

Investigation of ERK Gene Expression in Lung Tissue

According to the obtained results, the level of *ERK* gene expression in the lung tissue in the D groups was significantly increased compared to the C group ($P<0.001$). Treatment with melatonin in the DM group significantly reduced this ratio in comparison to the D group ($P<0.01$). The level of *ERK* gene expression in the CM group demonstrated

no significant difference compared to the C group ($P>0.05$).

Conclusion

The findings of the present study confirmed that melatonin reduces the expression of inflammatory genes in BALF and lung tissue of diabetic mice. Probably, melatonin decreases inflammation in the lung tissue of type 1 diabetic mice by suppressing the ERK/NF- κ B signaling pathway.

ملاتونین موجب کاهش التهاب در بافت ریه موش‌های سوری مبتلا به دیابت نوع ۱ از طریق مسیر سیگنالینگ ERK/ NF-κB می‌شود

جعفر رضایی^۱ ID، رضا عباسی^۲، افشین رهبر قاضی^۳، مهدی احمدی^۴ ID*

^۱ مرکز تحقیقات سالیید تومور، پژوهشکده پزشکی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
^۳ مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۴ مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۵ دانشکده علوم پزشکی سراب، سراب، ایران

چکیده

زمینه. بیماری دیابت با بروز التهاب همراه است. در این مطالعه اثر ملاتونین بر بیان ژن‌های التهابی و مسیر سیگنالینگ ERK/ NF-κB در بافت ریه موش‌های سوری مبتلا به دیابت نوع ۱ بررسی شد.
روش کار. موش‌های سوری نر بالغ با وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند: کنترل (C)، کنترل + ملاتونین (CM)، دیابتی (D) و دیابتی + ملاتونین (DM). برای القا دیابت از داروی استرپتوزوتوسین (۵۰ mg/kg) استفاده شد. سطح پروتئین TNF-α در مایع لواز برونش آلوتلار توسط تست الایزا و بیان ژن‌های IL-1β، ERK و NF-κB با استفاده از تکنیک real time PCR اندازه‌گیری شد.
یافته‌ها. یافته‌ها نشان داد که غلظت پروتئین TNF-α در مایع لواز برونش آلوتلار گروه‌های D و DM نسبت به گروه C به‌طور معنی‌داری افزایش داشت ($P<0/001$). میزان این پروتئین در گروه DM نسبت به گروه D به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/05$). میزان بیان ژن‌های ERK، IL-1β و NF-κB در بافت ریه گروه‌های D و DM نسبت به گروه C و گروه CM به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/001$ ، $P<0/01$ و $P<0/05$).
نتیجه‌گیری. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ملاتونین میزان بیان مارکرهای التهابی و مسیر سیگنالینگ ERK/NF-κB در بافت ریه موش‌های دیابتی را مهار کرد.
پیامدهای عملی. به نظر می‌رسد که القای دیابت باعث افزایش التهاب در بافت ریه موش سوری می‌شود که درمان با ملاتونین موجب کاهش التهاب می‌شود.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۳
اصلاح نهایی: ۱۴۰۳/۲/۱۸
پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۲۳
انتشار برخط: ۱۴۰۴/۲/۸

کلیدواژه‌ها:

- ملاتونین
- دیابت
- التهاب
- ERK/ NF-κB
- TNF-α

مقدمه

است که حدود ۵ تا ۱۰ درصد کل موارد ابتلا به دیابت را شامل می‌شود. در این بیماری تخریب سلول‌های بتا پانکراس باعث کمبود انسولین می‌شود که منجر به هایپرگلیسمی و تمایل به کتواسیدوز می‌شود.^۱ عامل اصلی تخریب سلول‌های بتای پانکراس در دیابت نوع یک، واکنش ایمنی نامناسب بدن است که منجر به بروز واکنش التهابی می‌شود.^۲ افزایش قند خون در این بیماران باعث بروز عوارض کلیوی، قلبی عروقی، مغزی و چشمی شدید شده و در نهایت منجر به مرگ می‌شود. وجود التهاب سیستمیک در بیماری دیابت،

دیابت در حقیقت اختلال سوخت و سازی (متابولیک) در بدن است. این بیماری با افزایش قند خون و دفع گلوکز در ادرار تشخیص داده می‌شود.^۱ در این بیماری توانایی تولید هورمون انسولین از بین می‌رود و یا سلول‌های بدن در برابر انسولین مقاوم می‌شوند. دیابت دو نوع می‌باشد که در نوع یک، تخریب سلول‌های بتای پانکراس منجر به نقص تولید انسولین می‌شود و در نوع دو، مقاومت پیش‌رونده سلول‌های بدن به انسولین مانع عملکرد طبیعی این هورمون می‌شود.^۲ درواقع دیابت نوع ۱ یک بیماری خود ایمنی

* نویسنده مسؤول؛ ایمیل: mahdi59866@gmail.com

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز 4.0 CC BY (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که این فاکتور در پاسخ به آلرژن فسفریله شده و باعث ارسال پیامی می‌شود که نهایتاً منجر به جداسازی NF- κ B از عامل مهاری، انتقال شکل فعال آن به هسته سلول و بروز واکنش‌های التهابی می‌شود.^{۱۲} بررسی‌ها نشان می‌دهد که فعالیت مسیر سیگنالینگ ERK/NF- κ B در بیماری آسم زیاد شده و مهار این مسیر باعث کاهش التهاب مجاری هوایی و بهبود علائم آسم می‌شود.^{۱۳، ۱۴} با توجه به اینکه ملاتونین اثرات آنتی-اکسیدانی و ضدالتهابی دارد و اثر آن بر مسیر سیگنالینگ ERK/NF- κ B در بافت ریه موش‌های سوری دیابتی بررسی نشده بود، لذا در این مطالعه ما اثر ملاتونین بر این مسیر و بیان ژن‌های التهابی در بافت ریه موش‌های سوری دیابتی را مطالعه کردیم.

روش کار

در این مطالعه از ۴۰ سر موش سوری نر بالغ با نژاد BALB/c در محدوده وزنی ۲۵ تا ۳۰ گرم استفاده شد. حیوانات از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تبریز خریداری و در قفس‌های حیوان خانه مرکز تحقیقات کاربردی - دارویی در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و با درجه حرارت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. حیوانات دسترسی آزادانه به آب و غذای کافی داشتند. این مطالعه در کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با کد اخلاق IR.TBZMED.VCR.REC.1398.297 تأیید شده است. تمامی آزمایشات بر اساس دستورالعمل کمیته کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد.

یک هفته بعد از سازش با محیط حیوانات به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی به شرح زیر تقسیم شدند: گروه کنترل (C) گروه کنترل + ملاتونین (DM)، گروه دیابتی (D) گروه دیابتی + ملاتونین (DM)، به‌منظور القا دیابت در گروه‌های دیابتی، بعد از ۸ ساعت ناشتایی، از داروی استریتوزوتوسین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌صورت تک‌دوز حل شده در ۰/۱ میلی‌مول بافر سدیم سیترات، $PH=4/5$ ، و تزریق داخل صفاقی استفاده شد. جهت تأیید دیابت، ۲۲ ساعت بعد از تزریق استریتوزوتوسین، با ایجاد یک جراحی کوچک توسط لانس در دم حیوانات، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار گرفته و سپس توسط دستگاه گلوکومتر (Norditalia Elettromedicali S.r.l., Italy) قند خون بالای ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی لیتر به‌عنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گرفته شد. همچنین میزان قند خون در ابتدا قبل از القا دیابت و دریافت ملاتونین کنترل شد. برای بررسی اثرات ملاتونین، مقدار ملاتونین به میزان ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت چهار هفته و هر هفته دو بار به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد.^{۱۵} برای حل کردن ملاتونین از حلال DMSO

همچنین بستر عروقی قابل‌توجه و مقادیر زیاد بافت کلاژن و الاستین در بافت ریه، پارانشیم ریه را مستعد آسیب در افزایش قند خون مزمن می‌کند.^۴ به نظر می‌رسد افزایش قند خون از طریق القاء واکنش‌های التهابی و استرس اکسیداتیو باعث بروز تغییرات پاتولوژیک در بافت ریه می‌شود.^۵ استرس اکسیداتیو به مفهوم به هم خوردن توازن بین گونه‌های فعال اکسیژن و سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن به نفع گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد است که عواملی همچون فعالیت بدنی شدید و طولانی‌مدت می‌تواند منجر به بروز آن شود. ضمناً استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث تسریع پدیده پیری و بروز بسیاری از بیماری‌های مختلف از قبیل سرطان و سندرم متابولیک شود.^۶ نتایج یک مطالعه دیگر نشان داد که بالا بودن سطح عوامل التهابی مثل CRP و TNF- α در سرم مبتلایان به دیابت می‌تواند باعث بروز واکنش‌های التهابی در بافت ریه و کاهش عملکرد ریه‌ها شود.^۷ مطالعات قبل اثرات ضد دیابتی مواد آنتی‌اکسیدان را گزارش کرده‌اند. این مواد با تنظیم متابولیسم گلوکز، بهبود ترشح انسولین و کاهش مقاومت به انسولین، بهبود عملکرد عروق و تنظیم سطح HbA1c و کاهش نشانگرهای استرس اکسیداتیو، وضعیت دیابت را بهبود می‌بخشند.^۸ ملاتونین نوروهومونی است که در مغز از اسیدآمینهی تریپتوفان توسط غده هیپوفیز ساخته می‌شود و اثرات ضدالتهابی، ضد پیری و آنتی‌اکسیدان آن در بافت‌های مختلف ثابت شده است.^۹ بر اساس مطالعات، ملاتونین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان توانا، به‌طور مستقیم با رادیکال‌های آزاد، ترکیب و به‌صورت یک محصول نهایی متابولیزه می‌شود. ملاتونین عوارض متعدد ناشی از شرایط استرس اکسیداتیو ازجمله آسیب‌های ریوی، کبدی، کلیوی، قلبی-عروقی و پانکراس را در حیوانات مبتلا به دیابت کاهش می‌دهد. همچنین، ملاتونین دارای اثرات ضدالتهابی است. به‌طوری‌که در طی واکنش‌های التهابی این ماده موجب کاهش و مهار تخریب بافت می‌شود. ملاتونین از طریق از بین بردن مستقیم رادیکال‌های آزاد سمی، موجب کاهش آسیب ماکرومولکول‌ها در تمام اندام‌ها می‌شود.^{۱۰} یکی از مسیرهای اصلی و مهم درگیر در ایجاد واکنش‌های التهابی در بافت ریه مسیر ERK/NF- κ B است.^{۱۱} NF- κ B (nuclear factor- κ B) یک فاکتور رونویسی است که در سیتوپلاسم سلول به شکل غیرفعال و متصل به یک پروتئین مهاری به نام I κ Bs وجود دارد که در پاسخ به عامل التهابی می‌تواند از پروتئین مهاری جدا شده و وارد هسته سلول شود و باعث افزایش بیان سایتوکاین‌های التهابی شود.^{۱۲} یکی از فاکتورهایی که در انتقال پیام از سطح سلول به هسته نقش دارد، ERK (Extracellular signal-regulated kinase) می‌باشد که عضوی از خانواده MAPKs (mitogen activated protein kinases) است.

به دست آمده از اسپکتروفتومتری با دستگاه Nano Drop (BioTek) استفاده شد. برای سنتز cDNA از کیت تجاری سنتز cDNA (A101161, ParTous) استفاده شد. بدین منظور برای تهیه cDNA بر اساس پروتکل شرکت سیناژن، ۱۰ میکرولیتر از محلول RNA را در ۶۵ درجه به مدت ۱۰-۵ دقیقه انکوبه و سپس مخلوطی شامل مواد ۳ میکرولیتر بافر (3X PCR)، راندوم پرایمر ۲/۰ میکروگرم، ۲۵ mM MgCl₂، ۱۰ mM dNTP و ۵/۰ میکرولیتر از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس به آن اضافه شد. محلول حاصله را ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده و سپس به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتیگراد انکوبه شد و سپس برای توقف واکنش، نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. cDNA حاصله جهت PCR مورد استفاده قرار گرفت و با در منفی ۲۰ درجه فریز شد. برای سنجش کمی میزان بیان ژن‌های موردنظر تکنیک Real-Time PCR با استفاده از SYBR Green qPCR Master Mix (YT2551, Yekta Tajhiz Azma) انجام گرفت. مقدار مساوی از نمونه‌های cDNA و پرایمرهای مربوطه در مخلوط آب و از SYBR Green qPCR Master Mix در حجم نهایی ۱۴ میکرولیتر وارد دستگاه real time PCR به منظور آنالیز داده‌های به دست آمده و برای مقایسه بیان ژن‌های هدف از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد و میزان بیان ژن‌های موردنظر در این مطالعه نسبت به ژن مرجع (Fold change) محاسبه و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نسبت ژن موردنظر و ژن مرجع (β -actin) به عنوان تغییرات بیان ژن در نظر گرفته شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج کمی به دست آمده از مطالعه حاضر، به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد از میانگین (Mean $\pm$ SEM) بیان شدند و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست تکمیلی Tukey مقایسه شدند. برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار SPSS ورژن ۱۹ و برای رسم نمودارها از نرم افزار GraphPad Prism 8 استفاده شد. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته شد.

استفاده شد. دو هفته بعد از آخرین تزریق (شش هفته بعد از القا دیابت) حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (100 mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بیهوش و بعد از باز کردن قفسه سینه آسان‌کشی شدند و بافت ریه آن‌ها جهت بررسی‌های لازم جمع‌آوری شد.

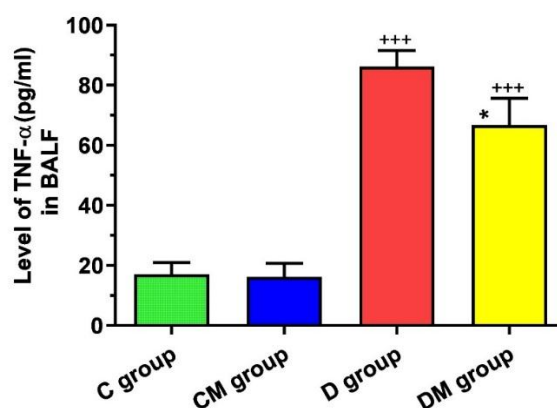
پس از برش و جمع‌آوری نمونه ریه‌ها، مایع برونش آلوئول بلافاصله با ۵ تزریق متوالی نیم میلی‌لیتری کلرید سدیم ۰/۹٪ توسط یک کاتتر متصل به هر نای جمع‌آوری و ذخیره شد.

برای تعیین سطح پروتئین TNF- α در مایع لاواژ برونش آلوئولار از تست الایزا و از کیت ELISA mice (CN: KPG-MTNFP; Iran) استفاده شد. به طور خلاصه، هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهی با ۱۰۰ میکرولیتر نمونه مایع لاواژ برونش آلوئولار از هر گروه انکوبه و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس محلول دور ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر محلول کار اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. محلول دور ریخته و دو بار در سالیین بافر فسفات (PBS) شسته شد. پس از شستشوی با PBS، ۱۰۰ میکرولیتر محلول کاری ABC به هر چاهک اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس، چاهک‌ها ۵ بار با PBS شسته شدند و ۹۰ میکرولیتر سوبسترای کروموزن ۱،۲،۴،۵-تترا متیل بنزن (TMB) در هر چاه ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. برای توقف واکنش، ۱۰۰ میکرولیتر محلول توقف به هر چاهک اضافه شد. مقدار جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میکروپلیت خوان (Biotek) و پس از ۳۰ دقیقه در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

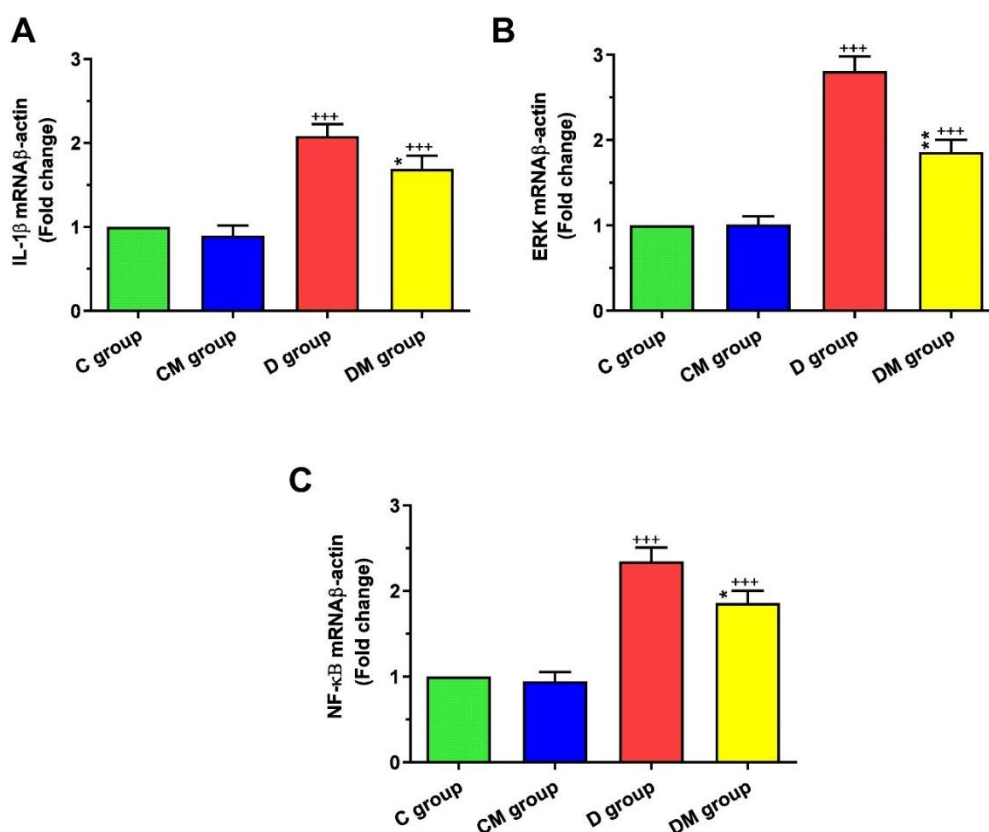
به طور خلاصه ریه چپ هر حیوان خارج و بعد از شستشو با نرمال سالیین بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده و در دمای ۸۰- درجه فریز شد. سپس RNA توتال از بافت ریه هموزن با استفاده از کیت مخصوص (FABRK001, Favorgen) استخراج گردید. بر اساس دستورالعمل کیت، هموزن بافت با استفاده از بافر مخصوص لیز شد و سپس به طور متوالی مراحل بعدی شستشو و استخراج RNA انجام شد. برای تعیین خلوص و کمیت RNA

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

Gene	Sequence
<i>IL-1β</i>	5'-TGGACCTTCCAGGATGAGGACA-3' 5'-GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG-3'
<i>ERK</i>	5'-AAG GTT AAC ATC CGG TCC AGC A-3' 5'-AAG CAA GGC TAA GCC GTA CC-3'
<i>NFκB</i>	5'-GCTGCCAAAGAAGGACACGACA-3' 5'-GGCAGGCTATTGCTCATCACAG-3'
<i>B-actin</i>	F: 5'- GGCTGTATTCCCTCCATCG -3' R: 5'- CCAGTTGGTAACAATGCCATGT -3'



نمودار ۱. اثر ملاتونین بر میزان پروتئین TNF-α در مایع لواز برونش آلوئولار موش‌های دیابتی. در هر گروه نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ برای ۸ حیوان آورده شده است. C: گروه کنترل. CM: گروه کنترل + ملاتونین. D: گروه دیابتی. DM: گروه دیابتی دریافت‌کننده ملاتونین. مقایسه گروه‌ها با استفاده از تست آماری One-Way ANOVA و تست تعقیبی Tukey انجام شده است. اختلاف آماری گروه‌های دیابتی با گروه کنترل: $P < 0.001$ و اختلاف آماری گروه دیابتی با گروه دیابتی دریافت‌کننده ملاتونین: $P < 0.05$ *



نمودار ۲. اثر ملاتونین بر بیان ژن IL-1β در بافت ریه موش‌های دیابتی. (A). اثر ملاتونین بر بیان ژن NF-κB در بافت ریه موش‌های دیابتی. (B). اثر ملاتونین بر بیان ژن ERK در بافت ریه موش‌های دیابتی. (C). در هر گروه نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ برای ۸ حیوان آورده شده است. C: گروه کنترل. CM: گروه کنترل + ملاتونین. D: گروه دیابتی. DM: گروه دیابتی دریافت‌کننده ملاتونین. مقایسه گروه‌ها با استفاده از تست آماری One-Way ANOVA و تست تعقیبی Tukey انجام شده است. اختلاف آماری گروه‌های دیابتی با گروه کنترل: $P < 0.001$ و اختلاف آماری گروه دیابتی با گروه دیابتی دریافت‌کننده ملاتونین: $P < 0.05$ *

یافته ها

نتایج تست الیزا نشان داد که میزان پروتئین TNF- α در مایع لاواژ برونش آلئولار گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش داشت ($P < 0/001$). درمان با ملاتونین در گروه دیابتی (گروه DM) میزان پروتئین TNF- α در مایع لاواژ برونش آلئولار را نسبت به گروه دیابتی (گروه D) به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0/05$). همچنین میزان پروتئین TNF- α در گروه CM نسبت به گروه C تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P > 0/05$) (نمودار ۱).

بررسی بیان ژن IL-1 β در بافت ریه

نتایج real time PCR نشان داد که میزان بیان ژن IL-1 β در بافت ریه گروه‌های دیابتی (D و DM) نسبت به گروه کنترل (C) و گروه CM به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/001$). همچنین درمان با ملاتونین در گروه دیابتی (گروه DM) به طور معنی‌داری میزان بیان ژن IL-1 β را نسبت به گروه دیابتی (گروه D) کاهش داد ($P < 0/05$). اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن IL-1 β بین گروه C و گروه CM وجود نداشت ($P > 0/05$) (نمودار ۲A).

بررسی بیان ژن NF- κ B در بافت ریه

نتایج ما نشان داد که میزان بیان ژن NF- κ B در بافت ریه گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش داشت ($P < 0/001$). درمان با ملاتونین در گروه دیابتی (گروه DM) میزان بیان این ژن را نسبت به گروه دیابتی (گروه D) به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0/05$). میزان بیان ژن NF- κ B در گروه CM نسبت به گروه C تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P > 0/05$) (نمودار ۲B).

بررسی بیان ژن ERK در بافت ریه

با توجه به نتایج به دست آمده، میزان بیان ژن ERK در بافت ریه در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش داشت ($P < 0/001$). تیمار با ملاتونین در گروه دیابتی (گروه DM) به طور معنی‌داری این نسبت را در مقایسه با گروه دیابتی (گروه D) کاهش داد ($P < 0/001$). میزان بیان ژن ERK در گروه CM نسبت به گروه C تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P > 0/05$) (نمودار ۲ C).

بحث

دیابت نوع یک، نوعی بیماری مزمن التهابی است که عمدتاً در دوران کودکی و اوایل بلوغ (سنین مدرسه) رخ می‌دهد.^{۱۵} این بیماری به علت تخریب گسترده سلول‌های ترشح‌کننده انسولین در پانکراس به دلیل واکنش ایمنی نامناسب بدن رخ می‌دهد و افراد مبتلا به آن در طول زندگی خود وابسته به دریافت انسولین می‌باشند.^{۱۶} روند فزاینده دیابت نوع یک، امروزه این بیماری را به یکی از چالش‌های مهم سیاست‌گذاران حوزه سلامت در جوامع بشری تبدیل کرده است. این بیماری علاوه بر تأثیر بر روی کیفیت زندگی بیماران،

هزینه‌های اقتصادی و اجتماعی هنگفتی را بر جوامع مختلف وارد می‌کند.^{۱۷} ملاتونین نورهورمونی است که در مغز از اسیدآمینو ترپتوفان توسط غده هیپوفیز ساخته می‌شود و اثرات ضدالتهابی، ضد پیری و آنتی‌اکسیدان آن در بافت‌های مختلف ثابت شده است. مکانیسم‌هایی که موجب التهاب در شرایط دیابت می‌شوند عبارت‌اند از شرایط هایپوکسی و مرگ سلولی بافت چربی، فعال شدن مسیرهای فاکتور هسته‌ای NF- κ B و JUN کیناز N ترمینال (JNK)، فعال شدن اینترلوکین IL-1 β و به کارگیری و فعال‌سازی سلول‌های ایمنی.^{۱۸} با توجه به اینکه مسیر ERK/NF- κ B در ایجاد التهاب نقش مهمی دارد و از طرفی پروتئین‌های TNF- α و IL-1 β در شرایط التهاب و استرس اکسیداتیو نقش مهمی بازی می‌کنند و به عنوان مارکر این شرایط هستند، لذا ما بر آن شدیم تا اثر ملاتونین (به عنوان ماده آنتی‌اکسیدان و ضد التهاب) بر میزان فعالیت مسیر سیگنالینگ ERK/NF- κ B و میزان بیان مارکرهای TNF- α و IL-1 β در بافت ریه موش‌های دیابتی القا شده با استرپتوزوتوسین بررسی کنیم. التهاب می‌تواند بر بافت ریه تأثیر منفی بگذارد و موجب تغییرات فیبروتیک شود. همچنین التهاب موجب زخم در بافت نازک پوشاننده کیسه‌های هوایی می‌شود و از میزان انعطاف‌پذیری کیسه‌ها را کاهش می‌دهد و آن‌ها مانند یک اسفنج خشک سفت می‌شوند.^{۱۸} برای مقایسه بهتر و دریافت اثر واقعی ملاتونین بر موش‌های دیابتی، ما یک گروه کنترل را با ملاتونین تیمار کردیم. ابتدا ما دریافتیم که میزان پروتئین TNF- α در مایع لاواژ برونش آلئولار موش‌های دیابتی افزایش یافت که نشان‌دهنده افزایش التهاب بود.^{۱۹} با این حال درمان با ملاتونین موجب کاهش معنی‌داری در میزان پروتئین TNF- α شد. این نتایج نشان داد که ملاتونین می‌تواند تولید میزان پروتئین TNF- α را کاهش دهد که ممکن است با کاهش التهاب همراه باشد.^{۲۰} پروتئین TNF- α یکی از مهم‌ترین واسطه‌ها در ایجاد التهاب و یکی از سیتوکین‌های درگیر در ایجاد واکنش فاز حاد در بدن انسان است. در ادامه برای بررسی بیشتر اثر ملاتونین بر میزان پاسخ التهابی در بافت ریه موش‌های دیابتی، میزان بیان ژن IL-1 β را اندازه‌گیری کردیم و مشخص شد که میزان بیان این فاکتور در نمونه شش موش‌های دیابتی افزایش داشت که نشان‌دهنده بروز التهاب بود.^{۲۱} درمان با ملاتونین موجب کاهش بیان این ژن در بافت ریه موش‌های دیابتی شد. یک مطالعه بر روی اثر ضدالتهابی ملاتونین بر بافت ریه آسمی نشان داده شد که تزریق دو دوز از ملاتونین می‌تواند باعث حفاظت از بافت ریه از طریق کاهش رهایش مدیاتورهای ضدالتهابی مثل اینترلوکین ۴، ۵ و ۱۳ گردد.^{۲۲} سیتوکین‌های التهابی مانند IL-1 β و TNF- α واکنش‌های التهابی قوی در پاسخ به یک محرک شروع می‌کنند.^{۲۳} بنابراین،

ضدالتهابی ملاتونین در مطالعه حاضر ممکن است ناشی از مهار بیان مارکرهای التهابی مانند IL-1 β و TNF- α باشد که به دنبال آن موجب مهار فعالیت مسیر سیگنالینگ ERK/NF- κ B در بافت ریه شده است. بر اساس مطالعات گذشته، ارتباط مهمی بین تنظیم بیان و فعالیت مسیر ERK/NF- κ B و مارکرهای التهابی مانند IL-1 β و TNF- α وجود دارد.^{۴۹} در یک مطالعه در شرایط دیابتی نوع ۱ مشخص شد که IL-1 β و TNF- α می‌تواند بر میزان فعالیت مسیر NF- κ B تأثیر بگذارند هرچند تأثیر فاکتور IL-1 β بیشتر از و TNF- α بود.^{۴۰} یافته‌های مطالعه حاضر از این نظر مهم هستند که به‌طور مکانیسمی نشان دادند که در بافت ریه موش‌های دیابتی نوع ۱، افزایش بیان فاکتورهای التهابی IL-1 β و TNF- α با افزایش فعالیت مسیر سیگنالینگ ERK/NF- κ B همراه بود و به دنبال تیمار با ملاتونین هرکدام از این فاکتورها به‌طور هم‌زمان کاهش یافتند. بنابراین کشف مکانیسم‌های درگیر در التهاب و آسیب ریه در افراد دیابتی می‌تواند در طراحی و کشف درمان‌های جایگزین و مکمل کمک‌کننده باشد. هرچند مطالعات بیشتری برای اثبات یافته‌های حاضر نیازمند است. بررسی مسیرهای التهابی دیگر، بررسی فعالیت سلول‌های ایمنی در بافت ریه و انجام آزمایشات کاهش و افزایش بیان این فاکتورها برای مطالعات بعدی پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که ملاتونین موجب کاهش بیان ژن‌های التهابی در مایع لاواژ برونش آلوئولار و مهار مسیر سیگنالینگ ERK/NF- κ B در بافت ریه موش‌های دیابتی می‌شود. احتمالاً ملاتونین با مهار فاکتورهای التهابی IL-1 β و TNF- α و در نهایت با مهار مسیر سیگنالینگ ERK/NF- κ B موجب کاهش التهاب در بافت ریه موش‌های دیابتی می‌شود.

قدردانی

این پژوهش با حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تبریز و مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شده است.

مشارکت پدیدآوران

جعفر رضایی تحلیل و تفسیر داده‌ها و ایده پردازی، رضا عباسی و افشین رهبرقاضی انجام پژوهش، جمع‌آوری داده‌ها و تهیه پیش‌نویس مقاله، مهدی احمدی طراحی اثر، نقد و بررسی و تأیید نسخه نهایی مقاله را بر عهده داشتند.

ملاتونین با کاهش بیان این فاکتورها موجب التیام در پاسخ‌های التهابی در ریه موش‌های دیابتی می‌شود. یکی از مسیرهای مهم در ایجاد واکنش‌های التهابی در بافت ریه مسیر ERK/NF- κ B است.^{۱۱} در این مطالعه ما دریافتیم که میزان بیان ژن NF- κ B در بافت ریه موش‌های دیابتی افزایش داشت که نشان‌دهنده شروع مسیر التهابی می‌باشد.^{۴۴} به دنبال تیمار با ملاتونین میزان بیان این ژن کاهش یافت. خانواده فاکتورهای رونویسی NF- κ B عمدتاً در پاسخ‌های ناشی از استرس، ایمنی و التهابی نقش دارند. بنابراین کاهش میزان بیان این ژن ممکن است با کاهش التهاب همراه باشد. به‌علاوه، نتایج نشان داد که میزان بیان ژن ERK در بافت ریه در گروه‌های دیابتی افزایش یافته بود که با تیمار ملاتونین این میزان کاهش یافت. مسیر سیگنالینگ ERK در تنظیم انواع فرایندهای زیستی از جمله فرآیند رشد، آپوپتوز و التهاب نقش دارد. در یک مطالعه گزارش شد که افزایش فعالیت مسیر سیگنالینگ ERK موجب افزایش پاسخ‌های التهابی در سلول‌های پوششی مسیرهای هوایی شد.^{۴۵} بررسی‌ها نشان می‌دهد که فعالیت مسیر سیگنالینگ ERK/NF- κ B در بیماری آسم زیاد شده و مهار این مسیر باعث کاهش التهاب مجاری هوایی و بهبود علائم آسم می‌شود.^{۱۲} در مطالعات قبلی نشان داده شده است که القا دیابت در رت‌ها با استرپتوزوتوسین با افزایش فعالیت مسیر سیگنالینگ ERK/NF- κ B باعث بروز کاردیومیوپاتی در حیوان می‌شود و کاهش فعالیت این مسیر از طریق کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو باعث بهبودی کاردیومیوپاتی در حیوان می‌شود.^{۴۶} به‌طورکلی مطالعه حاضر نشان داد که القای دیابت با استرپتوزوتوسین موجب افزایش بیان ژن‌های التهابی در مایع لاواژ برونش آلوئولار و بافت ریه شد. در ادامه بررسی نشان داد که میزان بیان سایر فاکتورهای التهابی مثل NF- κ B و ERK در بافت ریه افزایش یافت. به نظر می‌رسد که یک ارتباط مهمی بین فاکتورهای التهابی IL-1 β و TNF- α با مسیر سیگنالینگ ERK/NF- κ B وجود داشت که این فاکتورها در یک چرخه موجب القای مسیر التهاب در بافت ریه موش‌های دیابتی شدند.^{۴۷} تیمار با ملاتونین موجب کاهش بیان این ژن‌ها و فعالیت مسیر سیگنالینگ ERK/NF- κ B در بافت ریه موش‌های دیابتی شد که نشان‌دهنده نقش حفاظتی و آنتی‌اکسیدانی ملاتونین در مقابل التهاب ایجادشده می‌باشد. در مطالعات گذشته مشخص شد که ملاتونین از طریق کاهش و مهار بیان NF- κ B موجب کاهش التهاب در بافت ماهیچه قلب و سلول‌های ماکروفاژی می‌شود.^{۴۸} مطالعات و شواهد هم نشان دادند که ملاتونین موجب کاهش بیان فاکتورهای التهابی IL-1 β و TNF- α می‌شود و التهاب را کاهش می‌دهد.^{۴۰} بنابراین، با توجه به گزارشات قبلی، از نظر مکانیسمی اثر

منابع مالی

مربوط به حیوانات بر اساس اصول و ملاحظات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تبریز و کمیته منطقه‌ای اخلاق با کد IR.TBZMED.VCR.REC.1398.297 تأیید شده است.

این مطالعه توسط مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تأمین مالی شده است (شماره گزنت: ۶۴۱۴).

تعارض منافع

مؤلفان اظهار می‌کنند که منافع متقابلی از تألیف و انتشار این مقاله وجود ندارند.

دسترس‌پذیری داده‌ها

مجموعه داده‌ها در صورت درخواست معقول از نویسنده مسئول در دسترس است.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه توسط مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام گرفته است تمامی مداخلات

References

1. Sangi SM, Bawadekji A, Alotaibi NM, Aljlaud NA. Preventive and Curative Effects of Metformin, Nigella sativa, Punica granatum and Zingiber officinale on Male Reproductive Dysfunction in Diabetic Rats. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*. 2019;8(2):48-57.
2. Papatheodorou K, Banach M, Bekiari E, Rizzo M, Edmonds M. Complications of diabetes 2017. *Journal of diabetes research*. 2018;2018:3086167. doi: 10.1155/2018/3086167
3. Kahanovitz L, Sluss PM, Russell SJ. Type 1 diabetes—a clinical perspective. *Point of care*. 2017;16(1):37-40. doi: 10.1097/POC.000000000000125
4. Lecube A, Simó R, Pallayova M, Punjabi NM, López-Cano C, Turino C, et al. Pulmonary function and sleep breathing: two new targets for type 2 diabetes care. *Endocrine reviews*. 2017;38(6):550-73. doi: 10.1210/er.2017-00173
5. Samarghandian S, Borji A, Delkhosh MB, Samini F. Safranin treatment improves hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2013;16(2):352-62. doi: 10.18433/J3ZS3Q
6. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*. 2018;13:757-72. doi: 10.2147/CIA.S158513
7. Dennis RJ, Maldonado D, Rojas MX, Aschner P, Rondón M, Charry L, et al. Inadequate glucose control in type 2 diabetes is associated with impaired lung function and systemic inflammation: a cross-sectional study. *BMC Pulmonary medicine*. 2010;10:1-7. doi: 10.1186/1471-2466-10-38
8. Fatima MT, Bhat AA, Nisar S, Fakhro KA, Akil AS. The role of dietary antioxidants in type 2 diabetes and neurodegenerative disorders: An assessment of the benefit profile. *Heliyon*. 2023;9(1):12698. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e12698
9. Onk D, Onk OA, Erol HS, Özkaraca M, Çomaklı S, Ayazoğlu TA, et al. Effect of melatonin on antioxidant capacity, inflammation and apoptotic cell death in lung tissue of diabetic rats. *Acta chirurgica brasileira*. 2018;33:375-85. doi: 10.1590/s0102-865020180040000009
10. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;917(1):376-86. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05402.x
11. Zhou QL, Wang TY, Li M, Shang YX. Alleviating airway inflammation by inhibiting ERK-NF-κB signaling pathway by blocking Kv1. 3 channels. *International Immunopharmacology*. 2018;63:110-8. doi: 10.1016/j.intimp.2018.07.009
12. Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Aesif SW, Pantano C, Ather JL, Reynaert NL, et al. Nuclear factor κB, airway epithelium, and asthma: avenues for redox control. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2009;6(3):249-55. doi: 10.1513/pats.200806-054RM
13. Liu F, Xuan NX, Ying SM, Li W, Chen ZH, Shen HH. Herbal medicines for asthmatic inflammation: from basic researches to clinical applications. *Mediators of*

- Inflammation. 2016;2016(1):6943135. doi: 10.1155/2016/6943135
14. Rezaie J, Jahanghiri M, Heris RM, Hassannezhad S, Abdyazdani N, Rahbarghazi A, et al. Melatonin reduces lung injury in type 1 diabetic mice by the modulation of autophagy. *BMC Molecular and Cell Biology*. 2024;25(1):7. doi: 10.1186/s12860-024-00505-9
 15. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *The lancet*. 2014;383(9911):69-82. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60591-7
 16. Hedman C, Lindström T, Arnqvist H. Direct comparison of insulin lispro and aspart shows small differences in plasma insulin profiles after subcutaneous injection in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2001;24:1120-1. doi: 10.2337/diacare.24.6.1120
 17. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature reviews immunology*. 2011;11(2):98-107.
 18. Moldoveanu B, Otmishi P, Jani P, Walker J, Sarmiento X, Guardiola J, et al. Inflammatory mechanisms in the lung. *Journal of inflammation research*. 2008;2:1-11. doi: 10.2147/jir.S4385
 19. Babu KS, Davies DE, Holgate ST. Role of tumor necrosis factor alpha in asthma. *Immunology and Allergy Clinics*. 2004;24(4):583-97. doi: 10.1016/j.iac.2004.06.010
 20. Cho JH, Bhutani S, Kim CH, Irwin MR. Anti-inflammatory effects of melatonin: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Brain, behavior, and immunity*. 2021;93:245-53. doi: 10.1016/j.bbi.2021.01.034
 21. Whelan R, Kim C, Chen M, Leiter J, Grunstein MM, Hakonarson H. Role and regulation of interleukin-1 molecules in pro-asthmatic sensitised airway smooth muscle. *European Respiratory Journal*. 2004;24(4):559-67. doi: 10.1183/09031936.04.00133803
 22. Shin IS, Park JW, Shin NR, Jeon CM, Kwon OK, Kim JS, et al. Melatonin reduces airway inflammation in ovalbumin-induced asthma. *Immunobiology*. 2014;219(12):901-8. doi: 10.1016/j.imbio.2014.08.004
 23. Padrón-Morales J, García-Solaesa V, Isidoro-García M, Hernández-Hernández L, García-Sánchez A, Hincapié-López G, et al. Implications of cytokine genes in allergic asthma. *Allergologia et Immunopathologia*. 2014;42(6):603-8. doi: 10.1016/j.aller.2013.11.006
 24. Zhu L, Luo C, Ma C, Kong L, Huang Y, Yang W, et al. Inhibition of the NF-κB pathway and ERK-mediated mitochondrial apoptotic pathway takes part in the mitigative effect of betulinic acid on inflammation and oxidative stress in cyclophosphamide-triggered renal damage of mice. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2022;246:114150. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114150
 25. van 't Wout EF, Dickens JA, van Schadewijk A, Haq I, Kwok HF, Ordonez A, et al. Increased ERK signalling promotes inflammatory signalling in primary airway epithelial cells expressing Z α1-antitrypsin. *Human molecular genetics*. 2014;23(4):929-41. doi: 10.1093/hmg/ddt487
 26. Tang SG, Liu XY, Ye JM, Hu TT, Yang YY, Han T, et al. Isosteviol ameliorates diabetic cardiomyopathy in rats by inhibiting ERK and NF-κB signaling pathways. *Journal of Endocrinology*. 2018;238(1):47-60. doi: 10.1530/JOE-17-0681
 27. Park JE, Han JS. Improving the Effect of Ferulic Acid on Inflammation and Insulin Resistance by Regulating the JNK/ERK and NF-κB Pathways in TNF-α-Treated 3T3-L1 Adipocytes. *Nutrients*. 2024;16(2):294. doi: 10.3390/nu16020294
 28. Li SJ, Cheng WL, Kao YH, Chung CC, Trang NN, Chen YJ. Melatonin Inhibits NF-κB/CREB/Runx2 Signaling and Alleviates Aortic Valve Calcification. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;9:885293. doi: 10.3389/fcvm.2022.885293
 29. Rex J, Lutz A, Faletti LE, Albrecht U, Thomas M, Bode JG, et al. IL-1β and TNFα differentially influence NF-κB activity and FasL-induced apoptosis in primary murine hepatocytes during LPS-induced inflammation. *Frontiers in physiology*. 2019;10:117. doi: 10.3389/fphys.2019.00117
 30. Ortis F, Miani MI, Colli ML, Cunha DA, Gurzov EN, Allagnat F, et al. Differential usage of NF-κB activating signals by IL-1β and TNF-α in pancreatic beta cells. *FEBS letters*. 2012;586(7):984-9. doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.021