



The effect of different intensities of acute and chronic aerobic activity on the signaling pathway of the inflammasome NLRP3 complex and TLR4 and some inflammatory cytokines in young men

Iman Khakroo Abkenar^{1*}, Farhad Rahmani-nia², Giovanni Lombardi³

1. PhD of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Full Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Full Professor, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Laboratory of Experimental Biochemistry and Molecular Biology, via Riccardo Galeazzi, Milano, Italy.

Abstract

Background and Aim: The results of the studies showed that the intensity and volume of aerobic exercise activities can make different responses to the immune system. The purpose of this study was to investigate the acute and chronic effects of moderate and high intensity aerobic exercises on the signaling pathway of the inflammatory NLRP3 complex or TLR4 and some inflammatory cytokines in young men. **Materials and Methods:** A randomized sampling method was used in which 60 subjects were selected based on their research. They were randomly divided into two groups (40 subjects) with a mean age of 24.4 ± 0.4 years and a BMI of 23.3 ± 3.5 kg/m² and in the control group (20 persons) with a mean age of 22.8 ± 0.55 years and BMI of 23.0 ± 4.91 kg/m². The training protocol for the moderate group performed up to 50 - 70 and for the high group up to 70 - 90 percent of maximum heart rate respectively. Using real time-PCR method, the expression of NLRP3, TLR4 genes and using the Elisa method IL-1 β and IL-18 were measured. Also repeated measure ANOVA and the LSD post hoc- test were used to analyzing data at the significant level of $p < 0.05$. **Results:** The results showed that acute aerobic exercise with moderate intensity had no significant effect on the expression of NLRP3 ($p=0.20$), TLR4 ($p=0.80$) genes and serum levels of IL-1 β ($p=0.15$) and IL-18 ($p=0.25$) cytokines. While acute exercise with severity initiation of the activity of the inflammatory complex, with a significant increase in serum levels of IL-1 β , IL-18 and, and expression of NLRP3 and TLR4 genes ($p=0.01$). Also moderate chronic aerobic exercise also significantly reduced the expression of NLRP3, TLR4 genes and serum levels of IL-1 β , IL-18 cytokines ($p=0.001$). In the case of high chronic training, significant increases in expression of genes NLRP3, TLR4 and serum levels of IL-1 β , IL-18 cytokines were observed ($p=0.0001$). **Conclusion:** It can be concluded that endurance chronic aerobic activity with moderate intensity is effective in decreasing the expression of the inflammasome and inflammation while acute aerobic activity with some intensities had no effect.

Key words: Aerobic exercise, Infalammasome, Inflammation, TLR4 gene expression.



اثر شدت های مختلف فعالیت حاد و مزمن هوازی بر مسیر پیام رسان اینفلامازوم NLRP3، TLR4 و سطوح سایتوکاین های التهابی در مردان جوان

ایمان خاکرو آبکنار^{۱*}، فرهاد رحمانی نیا^۲، جیوانی لومباردی^۳

۱. دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲. استاد فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۳. استاد بیوشیمی بالینی، انستیتو ارتوپدیک گالاتزی، آزمایشگاه بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، میلان، ایتالیا.

چکیده

زمینه و هدف: نتایج مطالعات نشان می دهد که شدت و حجم فعالیت ورزشی هوازی بر سیستم ایمنی پاسخ های متفاوتی دارد. هدف تحقیق حاضر، بررسی اثر حاد و مزمن تمرینات هوازی با شدت متوسط و بالا بر مسیر پیام رسان اینفلامازوم NLRP3، گیرنده شبه گذرگاهی ۴ (TLR4) و سطوح سایتوکاین های التهابی در مردان جوان بود. **روش تحقیق:** تعداد ۶۰ نفر به طور تصادفی (بر اساس پیشینه تحقیق) به دو گروه تمرین (هر گروه ۲۰ نفر) و در گروه کنترل (۲۰ نفر) تقسیم شدند. پروتکل های تمرینی برای گروه تمرین متوسط از شدت ۵۰ درصد ضربان قلب بیشینه شروع و با افزایش تدریجی با شدت ۷۰ درصد ضربان قلب بیشینه به اتمام رسید. برای گروه با شدت بالا نیز تمرین با شدت ۷۰ درصد شروع و با شدت ۹۰ درصد ضربان قلب بیشینه به اتمام رسید. با استفاده از روش Real time-Pcr بیان ژن های NLRP3 و TLR4 و با روش الایزا سطوح سرمی IL-1 β و IL-18 اندازه گیری شد. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) با اندازه گیری مکرر و آزمون تعقیبی LSD استفاده شد و سطح معنی داری آزمون ها $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. **یافته ها:** نتایج نشان داد که تمرین حاد تک جلسه ای هوازی با شدت متوسط تاثیر معنی داری بر بیان ژن های TLR4 ($p = 0.080$) و NLRP3 ($p = 0.020$) و سطوح سرمی IL-1 β ($p = 0.015$) و IL-18 ($p = 0.025$) ندارد؛ در حالی که تمرین حاد با شدت بالا با افزایش معنی دار سطوح IL-1 β و IL-18 و بیان ژن های NLRP3 و TLR4 همراه است ($p < 0.01$). همچنین تمرینات مزمن هوازی با شدت متوسط باعث کاهش معنی دار بیان ژن های NLRP3 و TLR4 و سطوح IL-1 β و IL-18 شد ($p < 0.001$) و بر عکس، تمرین مزمن با شدت بالا، افزایش معنی دار در بیان ژن های TLR4 و NLRP3 و سطوح IL-1 β و IL-18 را به همراه داشت ($p < 0.0001$). **نتیجه گیری:** احتمالاً فعالیت مزمن هوازی با شدت متوسط می تواند در تنظیم کاهشی مسیر اینفلامازوم و التهاب موثر باشد، در صورتی که فعالیت حاد هوازی با شدت های مختلف، تاثیری بر کاهش مسیرهای التهابی ندارد.

واژه های کلیدی: فعالیت هوازی، اینفلامازوم، التهاب، ژن TLR4.

مقدمه

PAMPs را شروع می کنند. مشخص شده است التهاب با فراخوانی بیشتر TLR همراه است که باعث مراحل پس رخدادی و افزایش بیان سایتوکاین های التهابی مثل IL-18، IL-1 β و TNF- α از طریق مسیرهای سیگنالی وابسته و غیر وابسته^{۱۴} (MYD88) می شود و کلیه این عوامل سریالی، منجر به التهاب مزمن سیستمیک و افزایش ریسک پذیری بیماری های عفونی می گردند (تکدا^{۱۵} و دیگران، ۲۰۰۵).

یکی از مهم ترین سایتوکاین های پیش التهابی حاصل از مسیر ذکر شده، IL-1 β می باشد که به طور گسترده فرآیندهای التهابی را تحت تاثیر قرار می دهد و کنترل دقیق و تولید آن در سطوح رونویسی و پس از ترجمه مورد نیاز است. عملکرد اصلی IL-1 β همانند TNF- α ، عمل کردن به عنوان یک واسطه پاسخ التهابی میزبان در برابر عفونت ها و سایر محرک هاست. IL-1 β به همراه TNF- α در ایمنی ذاتی و التهاب شرکت می کند. IL-1 β همچنین پاسخ های التهابی را تنظیم کرده و در توسعه بازسازی^{۱۶} از طریق افزایش بیان متالوپروتئیناز ماتریکس دخالت می کند (میاو^{۱۷} و دیگران، ۲۰۰۶). مطالعات اخیر نشان از آن دارند که مجموعه دیگری از گیرنده های الگوی شناساگر وابسته به پاتوژن، گیرنده های NLRs^{۱۸} هستند که ممکن است نقش مهمی در تشخیص سیگنال های مرتبط و آغازگر پاسخ های التهابی داشته باشند. بر خلاف TLR ها، NLRs گیرنده های سیتوپلاسمایی هستند که عمده ترین نقش آن ها تشخیص اجزای میکروبی و یا سیگنال های پر خطر می باشد. پس از فعال سازی، برخی از پروتئین های NLR از جمله NLRP3، سبب فعال شدن کمپلکس اینفلامازوم می شود. که خود فعال شدن کاسپاز-۱^{۱۹} را در پی دارد؛ روندی که منجر به ترشح IL-1 β و IL-18 می شود (موری^{۲۰} و دیگران، ۲۰۱۱). از دیگر سایتوکاین های التهابی موثر در مسیر سیگنالینگ اینفلامازوم، IL-18 می باشد که به صورت پرو-پروتئین بدون وجود توالی پیام سنتز می شود؛ یعنی فعال سازی و آزادسازی آن توسط

ورزش و فعالیت بدنی دارای آثار مثبت و منفی بر سیستم ایمنی است. گزارش ها حاکی از آن است که تمرین ملایم و منظم، انتشار عفونت را کاهش می دهد؛ در حالی که تمرین بلند مدت شدید، یکی از دلایل سرکوب آبی تعداد زیادی از شاخص های سیستم ایمنی با توجه به شدت و مدت ورزش است (اسمیت^۱ و دیگران، ۲۰۱۲؛ موندا^۲ و دیگران، ۲۰۱۷). محققین معتقدند که ورزش به ویژه فعالیت بدنی شدید، باعث آسیب عضلانی شده و در آزاد کردن مواد گوناگون همانند پروتئین های درون سلولی و سایتوکاین ها نقش مؤثری دارد. فعالیت بدنی ممکن است باعث رخدادهایی همانند تولید رادیکال های آزاد لختگی^۳، آبشارهای انعقادی و نیز التهاب شود (اسلاتری^۴ و دیگران، ۲۰۱۵). در جریان التهاب، میانجی های مختلفی از جمله سایتوکاین های پیش التهابی، اینترلوکین یک بتا^۵ (IL-1 β)، عامل نکروزی تومور آلفا^۶ (TNF- α) و اینترلوکین-۱۸^۷ (IL-18) توسط سلول های دستگاه ایمنی آزاد می شوند و باعث تشدید پاسخ های ایمنی می گردند. شایان ذکر است که سایتوکاین ها آثار چندگانه و متفاوتی دارند، به طوری که معمولاً در حین فعالیت بدنی، آثار التهابی و در حین دوره ریکاوری، آثار ضدالتهابی دارند (پترسن^۸ و دیگران، ۲۰۰۵). مرحله اول تشخیص عامل بیماری زا در اندام موجود زنده و شروع پاسخ های التهابی، توسط گیرنده های بخصوصی آغاز می شود، به نام گیرنده های شناساگر الگوی وابسته به پاتوژن^۹ (PAMPs) که در سلول های ارگانیزم زنده دیده می شوند. این گیرنده ها به صورت درون سیتوزولی و خارج سیتوزولی بیان می شوند (ماوراکیس^{۱۰} و دیگران، ۲۰۱۵). یکی از مسیرهای پیام رسان موثر در التهاب، فعال شدن گیرنده شبه گذرگاهی^{۱۱} (TLR) است که پاسخی التهابی به حضور اسیدهای چرب اشباع می باشد (وار^{۱۲} و دیگران، ۲۰۱۴). TLR نوعی از گیرنده های الگوی شناساگر وابسته به پاتوژن^{۱۳} (DAMPs) هستند که سیگنال هایی در پاسخ به

1. Smith
2. Monda
3. Thrombus
4. Slattery
5. Interleukin 1 beta
6. Tumor necrosis factor alpha
7. Interleukin 18
8. Petersen
9. Pathogen-associated molecular pattern
10. Maverakis

11. Toll-like receptor
12. Vaure
13. Damage-associated molecular pattern
14. Independ MYD88 and non-independet MYD88
15. Takeda
16. Remodeling
17. Miao
18. NOD-like receptors
19. Caspase 1
20. Mori

کنترل داشت؛ اما بیان IL-1 β گروه هوازی و مقاومتی نسبت به گروه کنترل، کاهش نشان داد. ضمن آن که بیان اینفالامازوم در گروه تمرین هوازی افزایش و گروه تمرین مقاومتی، کاهش یافت. در مورد آثار تمرین حاد بر بیان TLR4، نتایج مبهم هستند. نتایج مطالعات ترا^۱ و دیگران (۲۰۱۲) نشان داد که یک جلسه تمرین برون‌گرا در زنان جوان، منجر به تنظیم افزایشی بیان TLR4 از طریق مسیر پایین دست آن، یعنی JNK^۱ می‌شود. از سوی دیگر، بو^{۱۱} و دیگران (۲۰۱۰) نشان داده‌اند که تمرین حاد با شدت بالا، منجر به کاهش بیان TLR4 از طریق تنظیم کاهشی مونوسیت‌ها و ماکروفاژها می‌شود. لانکستر^{۱۲} و دیگران (۲۰۰۵) نیز نشان داده‌اند که بیان و عملکرد TLR4 به دنبال یک وهله تمرین هوازی طولانی مدت (۱/۵ ساعت تمرین دوچرخه سواری مداوم با ۶۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی)، کاهش می‌یابد. مک فارلین^{۱۳} و دیگران (۲۰۰۶) هیچ تغییر معنی داری در بیان TLR4 سطح سلولی به دنبال یک وهله تمرین مقاومتی (سه نوبت، ۱۳ تکرار با ۸۰ درصد حداکثر یک تکرار بیشینه در ۹ گروه عضلانی) گزارش نکرده‌اند.

مطالعات بسیار محدودی در ارتباط با ورزش و اینفالامازوم در سطح جهانی انجام شده است. در همین رابطه، پنا^{۱۴} و دیگران (۲۰۱۷) تاثیر ۸ هفته تمرینات مقاومتی را در مردان سالخورده مورد مطالعه قرار داده و کاهش معنی دار عوامل دخیل در پیام‌دهی اینفالامازوم گروه تمرین را نسبت به گروه کنترل مشاهده کرده‌اند. این محققین همچنین کاهش بیان ژن NLRP3 و سطح سرمی پروتئین کاسپاز-۱ را گزارش نموده‌اند. نتایج کلی این مطالعه نشان از آن دارد که تمرین مزمن دراز مدت با شدت متوسط، یک عامل مهم در کاهش التهاب و سیگنالینگ اینفالامازوم می‌باشد و باعث تقویت بیشتر سیستم ایمنی می‌شود. از آنجا که کمپلکس اینفالامازوم یک یافته جدید در تحقیقات پاراکلینیکال است و نقش آن در انواع بیماری‌ها با سطوح مختلف متغیر و بسیار پر اهمیت می‌باشد و با توجه به این که پاسخ مسیر پیام‌رسان اینفالامازوم نسبت به میزان استرس و تنش سلولی متغیر است؛ می‌تواند در شدت‌های مختلف ورزشی

سیستئین پروتئاز کاسپاز-۱ کنترل می‌گردد. در واقع، کاسپاز-۱ مسئول پردازش و ترشح IL-18 و همچنین ترشح پروتئین‌های دیگری مثل IL-1B و فاکتور رشد فیبروبلاست-۲ از طریق یک مسیر غیر معمول در ترشح پروتئین است. در کل، کاسپاز-۱ برای فعالیت پاپتوزیس^۱ مورد نیاز است (سانسونتی^۲ و دیگران، ۲۰۰۰). تحقیقات بالینی نشان داده‌اند که سطوح بالای پلاسمایی IL-18 و IL-1 β با بیماری‌های نقرس، دیابت، آلزایمر و آترواسکلروزیس رابطه معنی داری دارند. از این رو، کاهش فعالیت اینفالامازوم ممکن است در جلوگیری از آسیب‌هایی که باعث پاسخ التهابی در بیماری‌های کلیوی، قلبی و ایسکمی می‌شوند؛ اثرات مفیدی داشته باشد. از سوی دیگر، ویژگی‌های تقویت کننده^۳ اینفالامازوم می‌تواند در افزایش ایمنی‌زایی مواد شیمی درمانی بکار رود و باعث تقویت اثرات واکسیناسیون و فراخوانی بیشتر سلول‌های حافظه ایمنولوژیکی و فعالیت بیشتر سیستم ایمنی اکتسابی گردد (لاست^۴ و دیگران، ۲۰۰۹). بنابراین نمی‌توان منحصراً کمپلکس اینفالامازوم را مخرب دانست و از آنجا که شدت و حجم فعالیت ورزشی هوازی می‌تواند پاسخ‌های متفاوتی بر سیستم ایمنی داشته باشد محققین حوزه ایمنولوژی ورزشی علاقه مند به مطالعه آثار فعالیت کوتاه مدت و بلند مدت تمرینات ورزشی با شدت‌های مختلف بر سیستم ایمنی می‌باشند. فرناندز^۵ و دیگران (۲۰۱۲) نشان داده‌اند که تمرین تک جلسه‌ای حاد باعث فعالیت التهابی بیشتر و فراخوانی TLR4 می‌شود، در صورتی که تمرین مزمن ۶ جلسه‌ای با شدت مشابه، از فعالیت التهابی کاسته و باعث تنظیم کاهشی TLR4 می‌گردد. گلیسون^۶ و دیگران (۲۰۰۶) اثر تمرین مزمن و حاد با شدت‌های مختلف بر TLR4 را مطالعه کرده‌اند، اما رابطه آن با اینفالامازوم و گیرنده‌های الگوی شناساگر وابسته به پاتوژن سیتوزولی، بررسی نشده است. مقایسه اثر مزمن تمرینات هوازی و مقاومتی، بر مسیر اینفالامازوم و سرامید^۷ در موش‌های ویستار در مطالعه ماردنه^۸ و دیگران (۲۰۱۶) نتایج ضد نقیضی به همراه داشته است؛ بدین صورت که بیان IL-18 بعد از اتمام دوره تمرینات هوازی و مقاومتی، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه

1. Paptosis
2. Sansonetti
3. Adjuvant
4. Lust
5. Fernandez
6. Gleeson
7. Ceramid

8. Mardene
9. Terra
10. JNK signaling pathway
11. Booth
12. Lancaster
13. Mcfarlin
14. Pena

آلرژیک تاثیر گذار بر دستگاه ایمنی نداشتند و پس از آگاهی از ماهیت تحقیق، رضایت کتبی خود را جهت شرکت در این مطالعه اعلام کردند. نمونه گیری به طور تصادفی از نمونه های در دسترس صورت گرفت و ۶۰ نفر از داوطلبان بر اساس پیشینه تحقیق، انتخاب شدند. وزن و قد آزمودنی ها در دو مرحله، پیش از شروع پروتکل تمرینی و پس از تمرین، اندازه گیری شد (کوالکانت^۱ و دیگران، ۲۰۱۷). همچنین از کالیپر هارپندن^۲ ساخت کشور انگلستان برای اندازه گیری ضخامت چربی زیرپوستی و به منظور برآورد درصد چربی، از روش سه نقطه ای (سه سربازو، شکم و فوق خاصره) و معادله جکسون و پولاک^۳ استفاده گردید (جکسون^۴ و دیگران، ۱۹۷۸) مشخصات فردی شرکت کنندگان در جدول ۱ نمایش داده شده است.

پاسخ های متفاوتی به همراه داشته باشد. بنابراین نیاز است مطالعاتی در مورد اثر حاد و مزمن فعالیت بدنی با شدت های مختلف، بر اینفلامازوم انجام گیرد. بر همین اساس، هدف مطالعه حاضر بررسی اثر شدت (متوسط و بالا) فعالیت حاد و مزمن هوازی بر مسیر سیگنالینگ کمپلکس اینفلامازوم NLRP3 و TLR4 و سطوح سایتوکاین های التهابی در مردان جوان می باشد.

روش تحقیق

تحقیق حاضر از نوع نیمه تجربی بود. نمونه های تحقیق از دانشجویان تربیت بدنی دانشگاه دانسک^۱ لهستان انتخاب شدند. کلیه آزمودنی ها با تایید پزشک، هیچ گونه پیشینه بیماری های قلبی-عروقی، دیابت، ابتلا به بیماری های عفونی و شرایط

جدول ۱. توصیف (میانگین \pm انحراف استاندارد) مشخصات فردی گروه های مورد مطالعه

گروه ها ویژگی ها	تمرین با شدت متوسط	تمرین با شدت بالا	کنترل
سن (سال)	۲۲/۸۰ \pm ۰/۳۰	۲۲/۰۴ \pm ۰/۹۱	۲۲/۸۰ \pm ۰/۵۵
قد (سانتی متر)	۱۷۵/۸۰ \pm ۲/۲۳	۱۷۷/۰۳ \pm ۱/۷۴	۱۷۹/۵۰ \pm ۲/۱۹
وزن (کیلوگرم)	۷۵/۵۴ \pm ۲/۰۶	۷۷/۴۳ \pm ۲/۷۵	۷۵/۳۰ \pm ۲/۱۳
چربی (درصد)	۱۹/۷۷ \pm ۵/۳۶	۱۹/۳۳ \pm ۴/۶۷	۱۸/۹۸ \pm ۶/۸۷
نمایه توده بدن (کیلوگرم / مترمربع)	۲۳/۸۰ \pm ۲/۶۵	۲۳/۹۸ \pm ۲/۷۶	۲۳ \pm ۴/۹۱

دو شدت متوسط و بالا طبق پروتکل بر روی ماشین ورزشی نوردیک تراک^۶ ساخت کشور آمریکا به اجرا در آوردند. در حین انجام فعالیت، ضربان قلب آزمودنی ها توسط ضربان سنج ورزشی مونارک^۷ ساخت کشور سوئد کنترل گردید. برنامه تمرین ورزشی حاد و مزمن ۳ روز پس از خونگیری اولیه آغاز شد. برنامه گروه مزمن شامل ۳ ماه (۱۲ هفته) تمرین هوازی بود؛ جلسه اول تمرینی برنامه تمرین حاد بود و بعد از اتمام

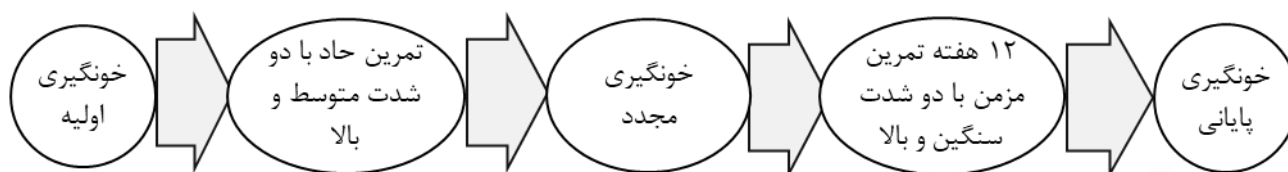
پروتکل های تمرینی: پس از انتخاب، آزمودنی ها به طور تصادفی به دو گروه تمرین و کنترل تقسیم شدند. در گروه تمرین ۴۰ آزمودنی شرکت داشتند که به طور تصادفی در دو زیر گروه تمرینی مجزا قرار گرفتند. گروه اول تمرین را با شدت متوسط و گروه دوم تمرینات را با شدت بالا اجرا کردند (هر گروه ۲۰ نفر)، اما گروه کنترل (۲۰ نفر) در هیچ برنامه تمرینی شرکت داده نشدند. بعد از جلسه آشناسازی، آزمودنی ها تمرینات ورزشی را با

1. Gdansk university
2. Cavalcante
3. Harpenden
4. Jackson & Pollock

5. Jackson
6. Nordic Track
7. Monark

انجام دادند. به مرور شدت تمرین به ۷۰ (در گروه متوسط) و ۹۰ (در گروه بالا) درصد حداکثر ضربان قلب رسید که در طول ۳۰ دقیقه به اجرا درآمد. شدت عملکرد در هر هفته برای رعایت اصل بار اضافی به میزان معین برای هر آزمودنی، افزایش یافت. مراحل اجرای تحقیق در شکل ۱ نشان داده شده است.

این، جلسه خونگیری انجام گردید. سپس تمرینات مزمین ادامه پیدا کرد و بین جلسات تمرینی، یک روز فاصله قرار داشت، به طوری که هر هفته مشتمل بر ۳ جلسه تمرین بود. در شروع هر جلسه تمرین، آزمودنی ها به مدت ۵ دقیقه به طور سبک خود را گرم کرده و بعد پروتکل تمرین با دو شدت ۵۰ (گروه با شدت متوسط) و ۷۰ (گروه با شدت بالا) درصد حداکثر ضربان قلب را



شکل ۱. مراحل شماتیک تمرینات به اجرا درآمده

HD42 BIO RAD الایزا طبق مراحل کاتولوگ استفاده شد و سپس در دستگاه الایزایدر^۴ بیو راد^۵ ساخت آمریکا با حساسیت در اندازه گیری معادل ۰/۰۶ نانوگرم/ میلی لیتر، صحت آزمایش مورد بررسی و سطوح سایتوکاين (IL-18 و IL-1B) اندازه گیری شد (نمزک^۶ و دیگران، ۲۰۰۱)

استخراج RNA و سنتز cDNA: در مرحله نخست، ۱۰۰۰ میکرولیتر از خون تام به میکروتیوب های RNaseDNase Free ریخته شد و ۱۰۰۰ میکرو لیتر نیز محلول بافری لیزکننده سلولی به هر میکروتیوب اضافه گردید و پس از مخلوط کردن، به مدت دو دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور/ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس لایه رویی برداشته شد تا زمانی که یک پلت سفید رنگ در داخل میکروتیوب ظاهر گردد. پس از این مرحله، به مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول جداساز RNX-plusTM Reagent به پلت اضافه شد و سپس بر اساس کاتالوگ این محلول، مراحل به ترتیب انجام شد که عبارتند از: (۱) حدود ۱۰ ثانیه ورتکس و قرار دادن در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه، (۲) اضافه کردن کلروفورم، (۳) میکس کردن به مدت ۱۰ الی ۱۵ ثانیه، (۴) قرار دادن بر روی یخ به مدت ۵ دقیقه، (۵) سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، (۶) برداشتن فاز رویی میکروتیوب و انتقال آن به یک میکروتیوب جدید RNaseDNase Free و اضافه کردن حجم

رویه های پیگیری شده مطابق استانداردهای اخلاقی اعلامیه هلسینکی^۱ صورت پذیرفت و توسط کمیته داخلی پژوهش دانشگاه دانسک مورد تأیید قرار گرفت (GD-EU2301). پس از ۳ روز از اتمام تمرینات، خونگیری مجدد از آزمودنی ها اخذ گردید (گلیسون و دیگران، ۲۰۰۶). پیش و پس از اتمام برنامه، نمونه خون در حالت ناشتا گرفته شد تا برای اندازه گیری سطح سرمی سایتوکاين ها مورد استفاده قرار گیرد. نمونه گیری اول از ساعت ۷ تا ۹ صبح بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی و ۲۴ ساعت قبل از شروع تمرینات انجام گرفت. نمونه گیری دوم ۳ روز پس از آخرین جلسه تمرین (به منظور حذف آثار آخرین جلسه تمرین) از آزمودنی ها و در شرایط زمانی و محیطی مشابه با اندازه گیری های اولیه، اخذ گردید. در هر مرحله ۱۰ میلی لیتر خون از ورید بازویی دست راست در ناحیه آرنج گرفته شد. بعد از این که خونگیری از ورید بازویی به عمل آمد، نمونه ها به لوله های سرمی و لوله های حاوی ماده ضد انعقاد^۲ (EDTA) انتقال یافتند. سپس نمونه های بدون ماده ضد انعقاد، برای اندازه گیری سطوح سرمی IL-18 و IL-1 β با سانتریفیوژ جداسازی شدند تا برای تجزیه و تحلیل بعدی مورد استفاده قرار گیرد. از خون تام با ماده آغشته به EDTA نیز برای استخراج RNA استفاده گردید. سنجش سطوح سرمی سایتوکاين های التهابی با استفاده از روش کمی الایزا لومینکس^۳ انجام شد. از کیت های M500KCAF0Y BIO RAD

1. Helsinki

2. Ethylenediaminetetra-acetic acid

3. ELISA- Luminex

4. Elisa reader

5. BIO RAD USA

6. Nemzek

نرم افزارهای OligoAnalyzer ارزیابی شدند. سپس برای تهیه پرایمرها، پودرهای لیوفیلیزه آنها از BIO RAD (USA) تهیه گردید. توالی پرایمرهای این سه ژن در جدول ۲ نشان داده شده است. برنامه دمایی مورد استفاده در Real-Time PCR شامل: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان نسبی بیان ژن های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه گیری شد. در نهایت، میانگین اعداد CT حاصل از دستگاه گرمایی نمونه های دابل کیت تغییرات در بیان ژن پیش و پس آزمون با در نظر گرفتن گروه کنترل به عنوان مبنا ارزیابی گردید. هنگامی که تغییرات در بیان ژن کمتر از ۱ بود، آنگاه کاهش بیان ژن هدف و اگر تغییرات در بیان ژن بیشتر از عدد ۱ بود، افزایش بیان ژن هدف در نظر گرفته شد. در پایان قبل از آنالیز داده ها منحنی ذوب (melting curve) به دست آمده، بررسی شد تا نقطه اوج مربوط به ژن های مورد نظر و فقدان پرایمر تایید شود. برای اطمینان از محصولات دستگاه گرمایی RT-PCR نمونه های بتا اکتین، NLRP3، TLR4 برای وجود DNA روی ژل آگارز^۵ با الکتروفورز به نمایش گذاشته شد و سپس به وسیله دستگاه ژلداک^۶ با اشعه فرابنفش تصویربرداری صورت گرفت.

برابری از ایزوپروپانول^۱، ۷ میکس کردن و قرار دادن بر روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه، ۸) سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه، ۹) حذف مایع رویی و اضافه کردن ۱۰۰۰ میکرو لیتر اتانول^۲ ۷۵ درصد، ورتکس پلت به مدت ۱۰ دقیقه و سانتریفیوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۰) حذف مایع رویی و خشک کردن پلت به مدت چندین دقیقه. ۱۱) میکس کردن پلت در ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر و قرار دادن در حمام گرم ۶۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه. به این ترتیب RNA استخراج گردید و برای سنجش میزان غلظت و خلوص آن از دستگاه Spectrophotometer (bio rad USA) NanoDrop ND-1000 استفاده گردید. سپس برای هر نمونه یک میکرو لیتر از RNA را به میکرو تیوب های مخصوص کیت سنتز cDNA اضافه گردید و با استفاده از دستگاه PCR (bio rad usa) بر اساس کاتالوگ کیت آن در چرخه دمایی مذکور cDNA ها ساخته شدند. (کاوازاکی^۳، ۱۹۹۰).

روش RT-PCR: واکنش ها بر مبنای استفاده از رنگ SYBR® Green انجام شد. برای ارزیابی توالی اختصاصی ژن بتا اکتین به عنوان ژن رفرانس / ژن خدمتکار به همراه سیکل دمایی آنها به صورت تکراری انجام گرفت. پرایمرهای اختصاصی ژن TLR4 و NLRP3 و همچنین بتا اکتین^۴ به عنوان رفرانس با استفاده از نرم افزار Genscript طراحی شد و با استفاده از

جدول ۲. مشخصات توالی پرایمرهای ژن های مورد استفاده

For: 5'- AATCCCTGCATAGAGGTTCTTCCCTAAT -3'tlr4
Rev: 5'- CTCAGATCTAGGTTCTTGGTTGAATAAG -3'
For: 5'-TGGACTTCGAGCAAGAGATG -3β-actin
Rev: 5'-GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'
For: 5'-ATGAAGATGGCAAGCA CCGG-3'NLRP3
Rev: 5'-CTACCAA GAAGGCTCAAAGACGAC-3'

1. Isopropanol
2. Etanol
3. Kawasaki

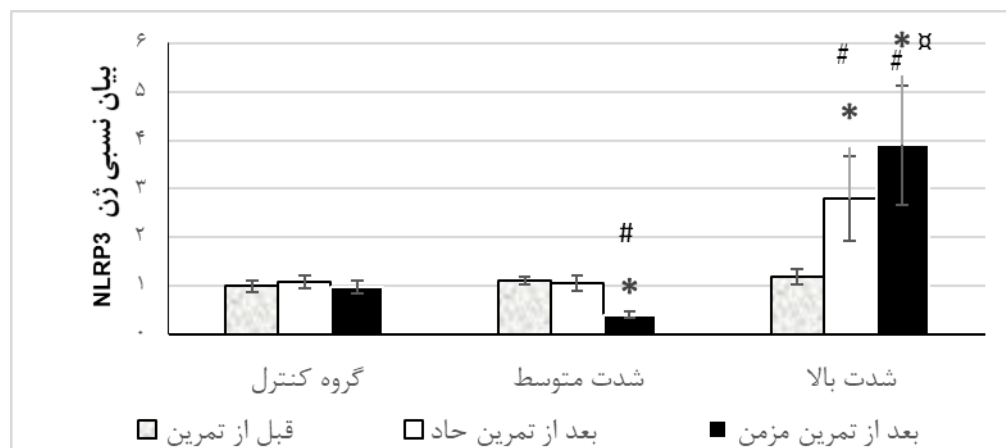
4. Beta-actin
5. Agarose gel
6. Gel documentation

روش های آماری: پس از تأیید توزیع طبیعی داده‌ها توسط آزمون کلموگروف-اسمیرنوف^۱ و تایید همگنی واریانس‌ها توسط آزمون لون^۲، برای بررسی اختلاف میانگین درون گروهی از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) با اندازه گیری مکرر و برای مقایسه زوجی گروه‌ها با یکدیگر، از آزمون تعقیبی LSD^۳ بهره‌برداری شد. تمام عملیات آماری تحقیق توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ به اجرا در آمدند و سطح معنی داری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج آزمون تحلیل واریانس با اندازه گیری مکرر بر اساس اختلاف میانگین پیش و پس آزمون به همراه آزمون تعقیبی LSD نشان داد که بیان ژن TLR4 ($p = 0/80$) و

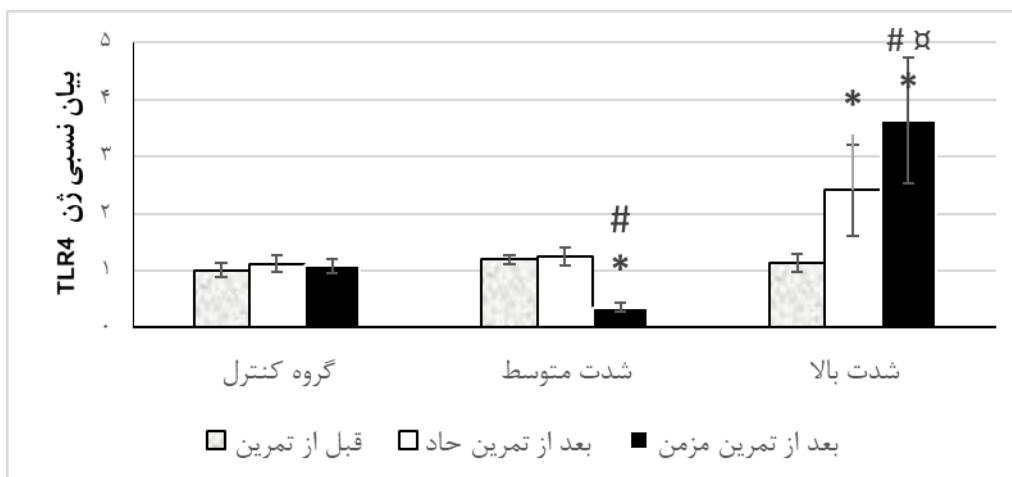
NLRP3 ($p = 0/20$) و سطوح سرمی IL-1 β ($p = 0/15$) و IL-18 پس از یک جلسه تمرین حاد هوازی با شدت متوسط نسبت به گروه کنترل، تغییر معنی داری ندارد (شکل ۱)؛ در صورتی که یک جلسه تمرین حاد هوازی با شدت بالا بیان ژن های TLR4 و NLRP3 و سطوح سرمی IL-1 β و IL-18 را به طور معنی‌داری ($p = 0/01$) افزایش داد (شکل ۲). همچنین پس از ۱۲ هفته تمرین مزمن هوازی با شدت متوسط، بیان ژن های TLR4 و NLRP3 و سطوح سرمی IL-1 β و IL-18 با کاهش معنی‌داری ($p = 0/001$) روبه رو شد (شکل ۳)؛ اما در همین مدت و تمرین مزمن با شدت بالا، بیان ژن های TLR4، NLRP3 و سطوح سرمی IL-1 β و IL-18 به طور معنی‌داری ($p = 0/0001$) افزایش یافتند (شکل ۴).



شکل ۱. مقایسه بیان ژن NLRP3 بین گروه‌های شرکت کننده در مراحل مختلف تحقیق.

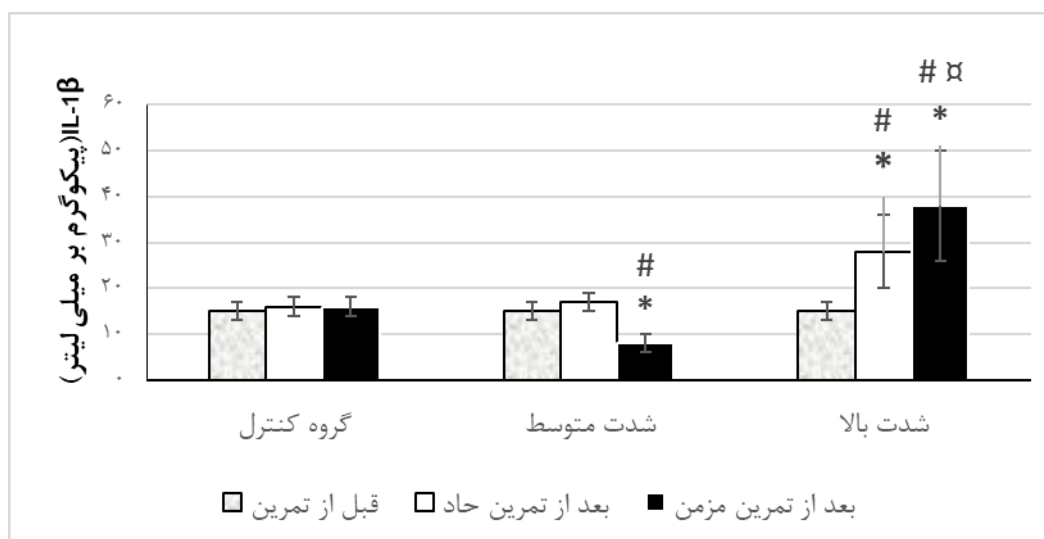
* نشانه تفاوت معنی دار با قبل از تمرین (حاد و مزمن)؛ # نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در مرحله متناظر؛ □ نشانه تفاوت معنی دار با گروه تمرین متوسط و گروه کنترل؛ سطح معنی داری در کلیه موارد $p < 0/05$ در نظر گرفته شده است.

1. Kolmogorov – Smirnov
2. Leven
3. Least significant difference



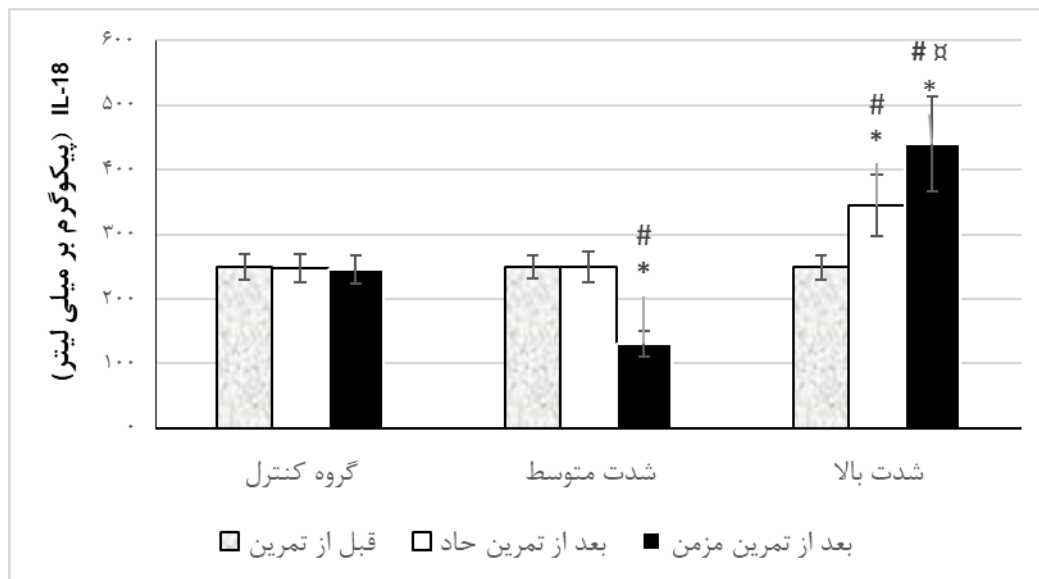
شکل ۲. مقایسه بیان ژن TLR4 بین گروه های شرکت کننده در مراحل مختلف تحقیق.

*نشانه تفاوت معنی دار با قبل از تمرین (حاد و مزمن)؛ # نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در مرحله متناظر؛ ✕ نشانه تفاوت معنی دار با گروه تمرین متوسط و گروه کنترل؛ سطح معنی داری در کلیه موارد $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است.



شکل ۳. مقایسه سطوح سرمی IL-1 β بین گروه های شرکت کننده در مراحل مختلف تحقیق.

*نشانه تفاوت معنی دار با قبل از تمرین (حاد و مزمن)؛ # نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در مرحله متناظر؛ ✕ نشانه تفاوت معنی دار با گروه تمرین متوسط و گروه کنترل؛ سطح معنی داری در کلیه موارد $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است.



شکل ۴. مقایسه سطوح سرمی IL-18 بین گروه های شرکت کننده در مراحل مختلف تحقیق.

*نشانه تفاوت معنی دار با قبل از تمرین (حاد و مزمن)؛ # نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در مرحله متناظر؛ † نشانه تفاوت معنی دار با گروه ه تمرین متوسط و گروه کنترل؛ سطح معنی داری در کلیه موارد $p < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

بحث

دیگران (۲۰۰۶) همسو با نتایج تحقیق حاضر نشان داده اند که تمرینات حاد هوازی با شدت بالا، سبب افزایش در بیان ژن TLR4 شده و باعث افزایش سطوح سرمی و نیز بیان ژن پروتئینی سایتوکاین های التهابی مثل CRP، IL-1 β ، IL-10، IL-6 و TNF- α می شوند. این نوع از فعالیت ورزشی می تواند باعث افزایش بیان سایتوکاین های التهابی و فراخوانی مسیره های التهابی از جمله کمپلکس اینفالامازوم شود، زیرا که اینفالامازوم یک واکنش گر التهابی درون سیتوزولی است و فعالیت حاد با شدت بالا، یکی از محرک های این مسیر است. به علاوه، مزیت این تحقیق سنجش مسیر اینفالامازوم بوده که در تحقیقات قبلی وجود نداشته است. مک فارلین و دیگران (۲۰۰۶) هیچ تغییری در بیان TLR4 سطح سلولی به دنبال یک وهله تمرین مقاومتی (۳ ست، ۱۰ تکرار با ۸۰ درصد حداکثر یک تکرار) گزارش نکرده اند. همچنین، مک فارلین و دیگران (۲۰۰۴) در تحقیقی دیگر گزارش کرده اند که ورزش مقاومتی حاد بر بیان TLR2 و TLR4

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین حاد هوازی با شدت متوسط تاثیر معنی داری بر بیان ژن های TLR4 و NLRP3 و سطوح سرمی سایتوکاین های IL-1 β و IL-18 ندارد و باعث فعال شدن مسیر پیام رسان اینفالامازوم نمی شود. در صورتی که تمرین حاد با شدت بالا، با افزایش معنی دار سطوح سرمی سایتوکاین های التهابی IL-18 و IL-1 β و بیان ژن های TLR4 و NLRP3 همراه است. به علاوه، تحقیق حاضر نشان داد که تمرینات هوازی مزمن ۱۲ هفته ای با شدت متوسط، باعث کاهش معنی دار بیان ژن های TLR4 و NLRP3 و سطوح سرمی سایتوکاین های التهابی IL-1 β و IL-18 می شود و بر عکس، تمرین هوازی مزمن ۱۲ هفته ای با شدت بالا، با افزایش معنی دار این شاخص ها همراه است. در مطالعاتی که به بررسی تاثیر تمرینات هوازی مزمن و حاد با شدت های مختلف بر مسیره های التهابی و پیام رسان اینفالامازوم پرداخته شده است، گلیسون و

ورزشی طولانی مدت با کاهش بیان گیرنده TLR4 در بافت های کبد، عضله و چربی همراه است و در نهایت، به بهبود وضعیت التهابی و مقاومت انسولین منجر می شود. به نظر می رسد که تمرینات ورزشی هوازی منجر به تعدیل TLR ها منجر می شوند. شایان ذکر است در مطالعه حاضر تمرین هوازی مزمن با شدت متوسط، به کاهش شایان توجه در بیان TLR4 منجر شد.

از سوی دیگر، گزارش ها نشان از آن دارند که ورزش مزمن با شدت بالا، خود عامل افزایش التهاب و خطر ابتلا به عفونت مجاری فوقانی تنفسی^۹ (URTI) می باشد. گلیسون و دیگران (۲۰۰۶) تاثیر مزمن ۸ هفته تمرین هوازی با شدت بالا را بر روی مردان بررسی کرده و افزایش بیان TLR4 و سایتوکاین های التهابی را مشاهده کرده اند. همچنین در دیگر مطالعات، فلین^{۱۰} و دیگران (۲۰۰۳) تاثیر دراز مدت (۱۰ هفته) برنامه مقاومتی با شدت متوسط را بر سطوح TLR4 در زنان میانسال بررسی کرده و کاهش معنی دار سطوح TLR4 را بدست آورده اند. استوارت^{۱۱} و دیگران (۲۰۰۵) اثر ۱۲ هفته تمرین مقاومتی و هوازی با شدت متوسط بر بیان TLR4 در مردان را مقایسه کرده و کاهش معنی دار این شاخص پس از تمرینات هوازی و مقاومتی را نشان داده اند. همچنین مقایسه بین گروهی نتایج، حاکی از تفاوت معنی دار تر فعالیت مزمن هوازی نسبت به فعالیت مقاومتی در کاهش فاکتورهای التهابی بود. مکفارلین و دیگران (۲۰۰۴) نیز تاثیر تمرینات مزمن هوازی با دو شدت بالا و متوسط را بر سطوح TLR4 در زنان سالمند مطالعه نموده و نشان داده اند که تمرین با شدت بالا، با افزایش بیان TLR4 و سایتوکاین های التهابی و بر عکس، تمرین با شدت متوسط، با کاهش معنی دار این عوامل همراه است. در تحقیق حاضر نیز تاثیر تمرین با شدت بالا و شدت متوسط، مشابه با گزارش های ذکر شده است. کوالکانت و دیگران (۲۰۱۷) در یک تحقیق مروری، نتایج تمام مطالعات انجام شده در ارتباط با فعالیت ورزشی و TLR4 را بررسی کرده و نشان داده اند که در ۴۰ درصد

مونوسیت های خون زنان مسن بی تاثیر است. به نظر می رسد تغییر بیان TLR4 پس از ورزش حاد، به روش تمرین و شرایط محیطی یا گروه های مورد مطالعه بستگی دارد. در تحقیق حاضر تمرین هوازی با شدت بالا به افزایش اندک در TLR4 منجر شد، تغییری که به لحاظ آماری معنی دار بود. دلیل پاسخ ایجاد شده در بیان ژن TLR4 به ورزش، احتمالاً به مدت و شدت تمرین هوازی ارتباط دارد (لی^۱، وو^۲ و دیگران، ۲۰۱۴). در مطالعه حاضر تمرین حاد هوازی با شدت متوسط تاثیر معنی داری در کاهش یا افزایش بیان ژن های TLR4 و NLRP3 و سطوح سرمی IL-1 β و IL-18 نداشت و اختلافی بین گروه تمرین و کنترل مشاهده نشد. اندک تحقیقات انجام شده نشان می دهند که تمرین حاد یا با کاهش مسیر پیام دهی TLR4 همراه است و یا تاثیر معنی داری بر این مسیر ندارد (روزا^۳ و دیگران، ۲۰۱۱؛ زبیدنفونسیا^۴ و دیگران، ۲۰۱۲). مایه^۵ و دیگران (۲۰۱۳) نشان داده اند که یک دوره تمرین بر روی نوآرگردان پس از ایسکمی مغز، به تنظیم کاهشی بیان TLR2، TLR4 و MYD88 در بافت مغز موش ها منجر شده و ریکآوری موش ها بهبود می یابد. این محققین شواهدی دال بر سازوکارهای شروع پاسخ های التهابی ارائه داده اند که برخی از مسیرهای پاسخ التهابی به ورزش شامل مسیر اسید آراشیدونیک/سیکلوآکسیژناز، مسیر عامل هسته ای کاپایی^۶ (NF- κ B) و مسیر TLR را شامل می شود. احتمالاً محرک های خارجی و داخلی از جمله ویروس ها و باکتری های عفونی، رادیکال های آزاد و سایتوکاین ها می توانند NF- κ B را فعال و انتقال آن را به هسته برای رونویسی میانجی های پیش التهابی مانند سایتوکاین ها و کموکاین ها، مولکول های چسبان و پروتئین کینازها را تسهیل کنند. فعال شدن NF- κ B و پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن، سبب تولید میانجی های پیش التهابی مانند IL-10، IL-16، IL-18، IL-1 β و چندین اینترفرون و نیتریک اکساید می شود (ما^۷ و دیگران، ۲۰۱۳). الیویرا^۸ و دیگران (۲۰۰۱) نشان داده اند که تمرینات

1. Lee

2. Wu

3. Rosa

4. Zbinden-Foncea

5. Maye

6. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

7. Ma

8. Oliveira

9. Upper respiratory tract infection

10. Flynn

11. Stewart

نیز سایتوکاین های پیش التهابی مثل IL-1 β و IL-18 نسبت داد (گردن^۱ و دیگران، ۲۰۱۸). ضمن آن که نتایج ناهمسوی مطالعات پیشین و تحقیق حاضر را می توان به محدودیت های مطالعه حاضر از قبیل عدم اطلاع دقیق از یکسان بودن سطح آمادگی جسمانی آزمودنی ها، تفاوت آزمودنی ها در تحمل و ادراک درد عضلانی، ویژگی های فیزیولوژیکی و روان شناختی آزمودنی ها، عادت و سازگاری آزمودنی ها نسبت به انجام تمرینات هوازی؛ نسبت داد.

نتیجه گیری: سازوکارهای دقیق در کاهش تنظیمی اینفالامازوم به فعالیت ورزشی مشخص نیست. نتایج این مطالعه نشان می دهد که برخی از شاخص های التهابی می توانند پس از تمرینات ورزشی، به ویژه فعالیت استقامتی کاهش یابند. در واقع، در بیشتر بیماری ها و شرایط التهابی، اینفالامازوم تنظیم افزایشی داشته و ورزش با شدت مناسب می تواند آن را کاهش دهد. در این مطالعه، پاسخ مسیر پیام رسان کمپلکس اینفالامازوم به فعالیت حاد و مزمن فعالیت هوازی با دو شدت متوسط و بالا نشان داده شد؛ با این حال پیشنهاد می شود مطالعاتی دیگر برای تعیین بهترین شدت و حجم فعالیت های ورزشی برای تنظیم کاهشی اینفالامازوم و التهاب، در آینده به اجرا درآید.

قدردانی و تشکر

نویسندگان این مقاله از مساعدت دانشگاه علوم ورزشی دانسک لهستان و انستیتو گالاتزی^۲ میلان ایتالیا برای جمع آوری اطلاعات و همچنین همکاری آزمودنی های پژوهش حاضر که با صبر و حوصله، محقق را در فرآیند پژوهش یاری رساندند، قدردانی می نمایند.

مطالعات، بیان TLR4 پس از تمرین حاد هوازی، با کاهش همراه بوده است؛ در صورتی که در ۴۰ درصد تحقیقات، افزایش بیان TLR4 مشاهده شده است. همچنین در ۲۵ درصد مطالعات، افزایش بیان TLR4 و در ۵۸ درصد آن ها، کاهش بیان TLR4 پس از تمرینات مزمن هوازی، گزارش شده است.

مطالعات بسیار محدودی در زمینه تاثیر فعالیت بدنی بر سیستم اینفالامازوم انجام شده است. در این راستا، پنا و دیگران (۲۰۱۷) تاثیر ۸ هفته تمرینات مقاومتی را مردان سالخورده مورد مطالعه قرار داده و کاهش معنی دار مسیر پیام دهی اینفالامازوم؛ کاهش بیان ژن NLRP3 و سطح سرمی پروتئین کاسپاز-۱ را گزارش کرده اند. مقایسه اثر مزمن تمرینات هوازی و مقاومتی بر مسیر اینفالامازوم و سرامید در موش های ویستار در مطالعه ماردنه و دیگران (۲۰۱۶) نتایج ضد نقیضی به همراه داشته است، به طوری که بیان IL-18 بعد از اتمام دوره تمرینات هوازی و مقاومتی، افزایش یافت؛ ولی میزان IL-1 β پس از هر دو تمرین کاهش پیدا کرد. این در حالی بود که بیان اینفالامازوم پس از تمرین هوازی افزایش و به دنبال تمرین مقاومتی، کاهش پیدا کرد. لی و دیگران (۲۰۱۶) نشان داده اند که تمرین حاد با شدت بالا، موجب افزایش استرس اکسیداتیو در میتوکندری شده و با افزایش بیان مسیر اینفالامازوم همراه است. آن ها افزایش بیان اینفالامازوم را به عنوان پاسخی دفاعی برای میتوفاژی میتوکندری های آسیب دیده ضروری دانستند (لی و دیگران، ۲۰۱۶). سازوکارهای احتمالی برای توضیح اثرات تمرینات هوازی بر سیستم اینفالامازوم و مسیر التهابی TLR4 را می توان به تقویت سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی، تنظیم منفی در بیان مسیره های التهابی از جمله پیام رسان اینفالامازوم و کاهش بیان ژن NLRP3 و TLR4 و

1. Gordon

2. IRCCS Galeazzi orthopedic institute

- Booth, S., Florida-James, G. D., McFarlin, B. K., Spielmann, G., O'Connor, D. P., & Simpson, R. J. (2010). The impact of acute strenuous exercise on TLR2, TLR4 and HLA. DR expression on human blood monocytes induced by autologous serum. *European Journal of Applied Physiology*, 110(6), 1259-1268.
- Cavalcante, P. A. M., Gregnani, M. F., Henrique, J. S., Omellas, F. H., & Araújo, R. C. (2017). Aerobic but not resistance exercise can induce inflammatory pathways via toll-like 2 and 4: a systematic review. *Sports Medicine-Open*, 3(1), 42.
- Fernandez-Gonzalo, R., De Paz, J. A., Rodriguez-Miguel, P., Cuevas, M. J., & González-Gallego, J. (2012). Effects of eccentric exercise on toll-like receptor 4 signaling pathway in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Applied Physiology*, 112(12), 2011-2018.
- Fernandez-Gonzalo, R., De Paz, J. A., Rodriguez-Miguel, P., Cuevas, M. J., & González-Gallego, J. (2014). TLR4-mediated blunting of inflammatory responses to eccentric exercise in young women. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1-11.
- Flynn, M. G., McFarlin, B. K., Phillips, M. D., Stewart, L. K., & Timmerman, K. L. (2003). Toll-like receptor 4 and CD14 mRNA expression are lower in resistive exercise-trained elderly women. *Journal of Applied Physiology*, 95(5), 1833-1842.
- Gleeson, M., McFarlin, B., & Flynn, M. (2006). Exercise and Toll-like receptors. *Exercise Immunology Review*, 12(1), 34-53.
- Jackson, A. S., & Pollock, M. L. (1978). Generalized equations for predicting body density of men. *British Journal of Nutrition*, 40(3), 497-504.
- Lancaster, G. I., Khan, Q., Drysdale, P., Wallace, F., Jeukendrup, A. E., Drayson, M. T., & Gleeson, M. (2005). The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *The Journal of Physiology*, 563(3), 945-955.
- Lee, W. J. (2011). IGF-I exerts an anti-inflammatory effect on skeletal muscle cells through down-regulation of TLR4 signaling. *Immune Network*, 11(4), 223-226.
- Li, H., Miao, W., Ma, J., Xu, Z., Bo, H., Li, J., Ji, L. L. (2016). Acute exercise-induced mitochondrial stress triggers an inflammatory response in the myocardium via NLRP3 inflammasome activation with mitophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-11.
- Lust, J. A., Lacy, M. Q., Zeldenrust, S. R., Dispenzieri, A., Gertz, M. A., Witzig, T. E., ... & Donovan, K. A. (2009). Induction of a chronic disease state in patients with smoldering or indolent multiple myeloma by targeting interleukin 1 β -induced interleukin 6 production and the myeloma proliferative component. *Mayo Clinic Proceedings*, 84(2), 114-122.
- Ma, Y., He, M., & Qiang, L. (2013). Exercise therapy downregulates the overexpression of TLR4, TLR2, MyD88 and NF- κ B after cerebral ischemia in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 3718-3733.
- Mardare, C., Krüger, K., Liebisch, G., Seimetz, M., Couturier, A., Ringseis, R., Mooren, F. C. (2016). Endurance and resistance training affect high fat diet-induced increase of ceramides, inflammasome expression, and systemic inflammation in mice. *Journal of Diabetes Research*, 2016(7), 23-444.
- Maverakis, E., Kim, K., Shimoda, M., Gershwin, M. E., Wilken, R., Raychaudhuri, S., Lebrilla, C. B. (2015). Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: a critical review. *Journal of Autoimmunity*, 57(3), 1-13.

- McFarlin, B. K., Flynn, M. G., Campbell, W. W., Craig, B. A., Robinson, J. P., Stewart, L. K., Coen, P. M. (2006). Physical activity status, but not age, influences inflammatory biomarkers and toll-like receptor 4. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 61(4), 388-393.
- McFarlin, B. K., Flynn, M. G., Campbell, W. W., Stewart, L. K., & Timmerman, K. L. (2004). TLR4 is lower in resistance-trained older women and related to inflammatory cytokines. *Medicine and science in Sports and Exercise*, 36(11), 1876-1883.
- Mejías-Peña, Y., Estébanez, B., Rodríguez-Miguel, P., Fernández-Gonzalo, R., Almar, M., de Paz, J. A., Cuevas, M. J. (2017). Impact of resistance training on the autophagy-inflammation-apoptosis crosstalk in elderly subjects. *Aging (Albany NY)*, 9(2), 408.
- Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I., & Aderem, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nature Immunology*, 7(6), 569.
- Monda, V., Villano, I., Messina, A., Valenzano, A., Esposito, T., Moscatelli, F., Monda, M. (2017). Exercise modifies the gut microbiota with positive health effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017(5), 33-131.
- Mori, M. A., Bezy, O., & Kahn, C. R. (2011). Metabolic syndrome: is Nlrp3 inflammasome a trigger or a target of insulin resistance? *Circulation Research*, 108(10), 1160-1162.
- Oliveira, A. G., Carvalho, B. M., Tobar, N., Ropelle, E. R., Pauli, J. R., Bagarolli, R. A., ... & Saud, M. J. (2011). Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 activation and improves insulin signaling in tissues of diet-induced obesity rats. *Diabetes*, 60(3), 784-796.
- Petersen, A. M. W., & Pedersen, B. K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*, 98(4), 1154-1162.
- Rosa, J. C., Lira, F. S., Eguchi, R., Pimentel, G. D., Venâncio, D. P., Cunha, C. A., ... & Oller do Nascimento, C. M. (2011). Exhaustive exercise increases inflammatory response via toll like receptor-4 and NF-KBp65 pathway in rat adipose tissue. *Journal of cellular physiology*, 226(6), 1604-1607.
- Sansonetti, P. J., Phalipon, A., Arondel, J., Thirumalai, K., Banerjee, S., Akira, S., ... & Zychlinsky, A. (2000). Caspase -1 activation of IL-1 β and IL-18 are essential for Shigella flexneri-induced inflammation. *Immunity*, 12(5), 581-590.
- Slattery, K., Bentley, D., & Coutts, A. J. (2015). The role of oxidative, inflammatory and neuroendocrinological systems during exercise stress in athletes: implications of antioxidant supplementation on physiological adaptation during intensified physical training. *Sports Medicine*, 45(4), 453-471.
- Smith, A. M. A., Patrick, K., Heywood, W., Pitts, M. K., Richters, J., Shelley, J. M., ... & Ryall, R. (2012). Body mass index, sexual difficulties and sexual satisfaction among people in regular heterosexual relationships: a population-based study. *Internal Medicine Journal*, 42(6), 641-651.
- Stewart, L. K., Flynn, M. G., Campbell, W. W., Craig, B. A., Robinson, J. P., McFarlin, B. K., ... & Talbert, E. (2005). Influence of exercise training and age on CD14+ cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4. *Brain, Behavior, and Immunity*, 19(5), 389-397.

Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), 1-14.

Terra, R., Silva, S. A. G. D., Pinto, V. S., & Dutra, P. M. L. (2012). Effect of exercise on immune system: response, adaptation and cell signaling. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 18(3), 208-214.

Wu, X. D., Zeng, K., Liu, W. L., Gao, Y. G., Gong, C. S., Zhang, C. X., & Chen, Y. Q. (2014). Effect of aerobic exercise on miRNA-TLR4 signaling in atherosclerosis. *International Journal of Sports Medicine*, 35(04), 344-350.

Zbinden-Foncea, H., Raymackers, J.-M., Deldicque, L., Renard, P., & Francaux, M. (2012). TLR2 and TLR4 activate p38 MAPK and JNK during endurance exercise in skeletal muscle. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 44(8), 1463-1472.