



# Effect of Combined Aerobic and Resistance Exercise Training on Joint Levels of Some Inflammatory Biomarkers in Aged Female Rats

Fatemeh Yazdani<sup>1</sup>, Najmeh Rezaeian<sup>2\*</sup>, Mehdi Khatibzadeh<sup>3</sup>

Receive 2025 May 17; Accepted 2026 January 19

## Abstract

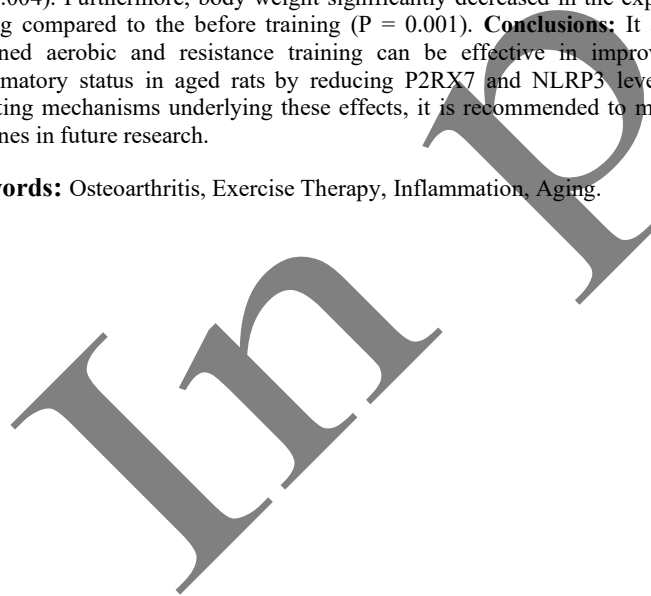
**Background & purpose:** Osteoarthritis (OA) is a multifactorial inflammatory disorder in which inflammatory biomarkers play a key pathogenic role. Given the anti-inflammatory effects of exercise training, the purpose of the present study was to investigate the effect of eight weeks of combined aerobic and resistance training on the levels of the P2X7 purinergic receptor (P2RX7) and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) in the synovial fluid and articular cartilage of aged female rats. **Methods:** Twenty-two Wistar rats (24–28 months, 262.5 ± 15.10 g) were randomly divided into two groups: experimental and control (n= 11 per group). Rats in the experimental group participated in eight weeks of combined aerobic (running on treadmill at an intensity of 40–60% of maximum velocity, 60 minutes per session, without treadmill incline) and resistance training (15 times of climbing on rodent ladder at intensity of 40-60 percentage of maximum workload with 1 minute of rest interval, 45 minutes per session), on alternating days and five days a week. All rats were dissected 48 hours after the last training session, and the measured variables were evaluated using appropriate laboratory methods. Data were analyzed using independent-sample and paired-sample t-tests, with a significance level set at P < 0.05. **Results:** Eight weeks of combined training led to significant reductions in the experimental group compared to the control group in the following measures: synovial fluid levels of P2RX7 (P = 0.037) and NLRP3 (P = 0.022), cartilage levels of NLRP3 (P = 0.025), and body weight (P = 0.004). Furthermore, body weight significantly decreased in the experimental group in the after training compared to the before training (P = 0.001). **Conclusions:** It appears that eight weeks of combined aerobic and resistance training can be effective in improving OA-related inflammatory status in aged rats by reducing P2RX7 and NLRP3 levels. However, to clarify the mediating mechanisms underlying these effects, it is recommended to measure related inflammatory cytokines in future research.

**Keywords:** Osteoarthritis, Exercise Therapy, Inflammation, Aging.



Scan this QR code to see the article at journal page or visit jahssp.azaruniv.ac.ir

- Msc in exercise physiology. Department of physical education, Boj.C., Islamic Azad University, Bojnourd, Iran.
- PhD in exercise physiology, Assistant professor, Department of physical education, Bojnourd .C., Islamic Azad University, Bojnourd, Iran. (\*Corresponding Author): [Rezaeian.n@gmail.com](mailto:Rezaeian.n@gmail.com)
- Assistant professor; Department of physical education, Farahangian University, P.O.Box 14665-889, Tehran, Iran. \*(corresponding author) [Rezaeian.n@gmail.com](mailto:Rezaeian.n@gmail.com)





Extended abstract

Background

Osteoarthritis (OA) is an age-related degenerative joint disease associated with physical pain, disability, and increased socio-economic costs (1). Cartilage, the joint's primary structural component, comprises chondrocytes. Instability in chondrocyte homeostasis leads to phenotypic changes and cell death (1). Consequently, cartilage degradation directly results from chondrocyte imbalance, causing breakdown of the extracellular matrix and release of pro-inflammatory factors (1), which influence OA initiation and progression. The P2X7 receptor (P2RX7), a member of the purinergic receptor family, is a non-selective cation channel gated by adenosine triphosphate (ATP) and is highly implicated in inflammation (2). It mediates Na+ and Ca2+ influx and K+ efflux, participates in various inflammatory reactions, and plays a significant role in different cell death mechanisms (3). P2X7-dependent signaling pathways facilitate cytokine release; for instance, K+ efflux is a crucial upstream event for activating the nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome (3). NLRP3 contributes to the pathogenesis of arthritic disorders by generating proinflammatory cytokines and degradative enzymes like Interleukin-1 beta (IL-1β), Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α), and Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3), which promote cartilage degeneration and synovial inflammation (4). Current OA management primarily involves analgesia and joint replacement for end-stage disease, overlooking early intervention. Advances in understanding OA pathogenesis and improved detection methods have shifted focus toward preventing and treating early OA (2). Given that mechanical load influences chondrocyte mechanical balance by regulating inflammation and thereby reduces OA symptoms, exercise training may play a pivotal role in preventing early OA onset and alleviating symptoms by modulating P2X7 and NLRP3. Therefore, this study investigated the effect of eight weeks of combined aerobic and resistance training on P2X7 and NLRP3 levels in the synovial fluid and cartilage of aged female rats.

Methodology

Twenty-two Wistar rats (24-28 months old, 262.5±15.10 g) were randomly divided into two groups of experimental and control (with 11 rats in each group). Rats in experimental group participated in eight weeks of combined aerobic (running on treadmill at intensity of 40-60 % of maximum intensity, 60 minutes per session, without treadmill incline) and resistance training (15 repetitions of climbing on rodent ladder at intensity of 40-60 % of maximum workload with 1 minute of rest interval, 45 minutes per session), on intermittent days and five days a week (5). All rats were dissected 48 hours after the last training session, and target indicators were evaluated using appropriate laboratory methods. Data were analyzed using independent and paired t-tests and Pearson's correlation test, with a significance level of P < 0.05.A

Results

Eight weeks of combined training resulted in significant decreases in the experimental group compared to the control group in synovial fluid levels of P2X7 (P=0.037) and NLRP3 (P=0.022). Cartilage levels of NLRP3 also decreased significantly (P=0.025), while no significant change was observed in cartilage P2X7 levels (P>0.05). Furthermore, body weight decreased significantly in the experimental group compared to the control group (P=0.004) and within the experimental group in the post-test compared to the pre-test (P=0.001).

Conclusion

This study is one of the first to investigate the effect of combined aerobic and resistance training on joint levels of P2X7 and NLRP3 in aging, demonstrating significant reductions in these markers following the training intervention. Our findings align with Li et al. (2021), who reported significant decreases in P2RX7 following moderate-intensity exercise training in aged rats. Activation of P2RX7, an inflammatory switch, mediates numerous downstream reactions, including the release of inflammatory factors (6). IL-1β, a proinflammatory cytokine activated by caspase-1 cleavage (7), not only induces apoptosis and cell death (8) but also stimulates the secretion of cartilage-degrading enzymes like MMP3 and MMP13. These enzymes degrade type II collagen and proteoglycans in the extracellular matrix, contributing to OA development and progression (9, 10). Besides P2X7, NLRP3 can also increase IL-1β levels by producing mature caspase (11, 12). Furthermore, crystal and uric acid accumulation in OA appear to activate the NLRP3 inflammasome (13), subsequently enhancing IL-1β release from monocytes and macrophages (14). Since P2X7 directly activates NLRP3 by facilitating K+ efflux and indirectly via MMPs, caspases, and increased IL-1β, the significant decrease in P2X7 levels following combined training in this study may contribute to reduced joint levels of NLRP3. In this regard, Chen et al. (2019) demonstrated that endurance training prevents excessive activation of the NLRP3 inflammasome pathway by reducing P2RX7 expression (15). Additionally, exercise training can mitigate inflammation and delay OA pathological changes by inhibiting nuclear factor kappa B (NF-κB) and NLRP3 (16). For instance, moderate-intensity periodic stretching exercises reduce cartilage and chondrocyte destruction in OA by inhibiting the TNF-α/NF-κB/NLRP3 signaling pathway (17). NF-κB is a downstream signaling target of the PI3K/Akt pathway, which inflammatory factors like TNF-α and IL-1β activate (18). Activated NF-κB promotes OA initiation and progression by increasing MMP gene expression (19). Recent studies have also shown that NF-κB is a prerequisite for NLRP3 inflammasome activation (20).





Article message

The results of this study indicate that eight weeks of combined aerobic and resistance training are associated with the modulation of local joint inflammation. However, this study did not measure joint levels of IL-1β, NF-κB, AMPK, and caspases post-training. Additionally, synovial membrane or articular cartilage samples were not collected for pathological examination. Therefore, it cannot be conclusively determined whether the reduction in synovial fluid P2X7 levels directly contributed to the decrease in NLRP3 and improvement in joint inflammatory conditions. To understand the precise role of P2X7 following exercise in modulating or exacerbating inflammation, extensive future studies measuring inflammatory markers involved in the P2RX7/NLRP3 signaling pathway in OA are necessary.

References

1. Man G, Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis—a complex process that involves the entire joint. Journal of medicine and life. 2014;7(1):37.
2. Li Z, Huang Z, Bai L. The P2X7 receptor in osteoarthritis. Frontiers in cell and developmental biology. 2021;9:628330.
3. Li Z, Huang Z, Zhang H, Lu J, Tian Y, Wei Y, Yang Y, Bai L. P2X7 receptor induces pyroptotic inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis via NF-κB/NLRP3 crosstalk. Oxidative medicine and cellular longevity. 2021;2021(1):8868361.
4. McAllister M, Chemaly M, Eakin AJ, Gibson DS, McGilligan VE. NLRP3 as a potentially novel biomarker for the management of osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage. 2018;26(5):612-9.
5. Sanches IC, Buzin M, Conti FF, Dias DdS, Santos CPd, Sirvente R, Salemi VMC, Llesuy S, Irigoyen MC, De Angelis K. Combined aerobic and resistance exercise training attenuates cardiac dysfunctions in a model of diabetes and menopause. PLoS One. 2018; 13(9):e0202731.
6. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. Physiological reviews. 2002;82(4):1013-67.
7. Wang Q, Zhuang D, Feng W, Ma B, Qin L, Jin L. Fraxetin inhibits interleukin-1β-induced apoptosis, inflammation, and matrix degradation in chondrocytes and protects rat cartilage in vivo. Saudi Pharmaceutical Journal. 2020;28(12):1499-506.
8. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. Immunity. 2013;38(2):209-23.
9. Piao S, Du W, Wei Y, Yang Y, Feng X, Bai L. Protectin DX attenuates IL-1β-induced inflammation via the AMPK/NF-κB pathway in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis progression in a rat model. International immunopharmacology. 2020;78:106043.
10. Lin Z, Miao J, Zhang T, He M, Zhou X, Zhang H, Gao y, Bai L. d-Mannose suppresses osteoarthritis development in vivo and delays IL-1β-induced degeneration in vitro by enhancing autophagy activated via the AMPK pathway. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2021;135:111199.
11. Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, et al. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. Cell. 2014;156(6):1193-206.
12. Brydges SD, Broderick L, McGeough MD, Pena CA, Mueller JL, Hoffman HM. Divergence of IL-1, IL-18, and cell death in NLRP3 inflammasomopathies. The Journal of clinical investigation. 2013;123(11):4695-705.
13. Busso N, So A. Microcrystals as DAMPs and their role in joint inflammation. Rheumatology. 2012;51(7):1154-60.
14. Corr EM, Cunningham CC, Helbert L, McCarthy GM, Dunne A. Osteoarthritis-associated basic calcium phosphate crystals activate membrane proximal kinases in human innate immune cells. Arthritis Research & Therapy. 2017;19:1-13.
15. Chen X, Li H, Wang K, Liang X, Wang W, Hu X, Huang Z, Wang. Aerobic exercise ameliorates myocardial inflammation, fibrosis and apoptosis in high-fat-diet rats by inhibiting P2X7 purinergic receptors. Frontiers in physiology. 2019;10:1286.
16. Liu HT, Pan SS. Late exercise preconditioning promotes autophagy against exhaustive exercise-induced myocardial injury through the activation of the AMPK-mTOR-Ulk1 pathway. BioMed research international. 2019;2019(1):5697380.
17. Yang Y, Wang Y, Kong Y, Zhang X, Zhang H, Feng X, Wang Z, Gao P, Yan M, Bai L, Li F. Moderate Mechanical Stimulation Protects Rats against Osteoarthritis through the Regulation of TRAIL via the NF-κB/NLRP3 Pathway. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020;2020(1):6196398.
18. Biemmi V, Milano G, Ciullo A, Cervio E, Burrello J, Dei Cas M, Paroni R, Tallone T, Moccetti T, Pedrazzini G, Longnus S, Vassalli G, Barile L. Inflammatory extracellular vesicles prompt heart dysfunction via TLR4-dependent NF-κB activation. Theranostics. 2020;10(6):2773.
19. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. Mediators of inflammation. 2014;2014(1):561459.
20. Wang C, Gao Y, Zhang Z, Chen C, Chi Q, Xu K, Yang L. Ursolic acid protects chondrocytes, exhibits anti-inflammatory properties via regulation of the NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway and ameliorates osteoarthritis. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020;130:110568





## اثر تمرینات ترکیبی استقامتی و مقاومتی بر سطوح مفصلی برخی شاخص‌های التهابی در موش‌های سالمند ماده

فاطمه یزدانی<sup>۱</sup>، نجمه رضائیان<sup>۲</sup>، مهدی خطیب زاده<sup>۳</sup>

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** استئوآرتروز (OA) یک بیماری پیچیده التهابی است و شاخص‌های التهابی نقشی کلیدی در پاتوژنز آن ایفا می‌کنند. با توجه به تاثیر ضدالتهابی تمرینات ورزشی، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی بر سطوح گیرنده پونیرژیک P2X7 (P2RX7) و پروتئین گیرنده شبه دامین الیگومر/اسیون نوکلئوتید ۳ (NLRP3) در مایع سینوویال و غضروف مفصلی موش‌های سالمند ماده بود. **روش پژوهش:** ۲۲ سر ماده نژاد ویستار (۲۸-۲۴ ماه، ۲۶۲/۵۰±۱۵/۱۰ گرم) به شیوه تصادفی در دو گروه تجربی و کنترل (۱۱ سر در هر گروه) تقسیم شدند. رت‌ها در گروه تجربی در هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی (دویدن روی تردمیل در شدت ۶۰-۴۰ درصد سرعت بیشینه، ۶۰ دقیقه در هر جلسه و بدون شیب تردمیل) و مقاومتی (۱۵ مرتبه بالا رفتن از نردبان ویژه چوندگان در شدت ۶۰-۴۰ درصد آزمون بار بیشینه با فواصل استراحت یک دقیقه‌ای، ۴۵ دقیقه در هر جلسه) در روزهای متناوب، پنج روز در هفته شرکت کردند. همه رت‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی تشریح شدند و شاخص‌های مورد بررسی با استفاده از روش آزمایشگاهی مناسب ارزیابی گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تی مستقل و زوجی در سطح معنی داری  $P < 0.05$  انجام شد. **یافته‌ها:** اجرای هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی با کاهش معنی‌دار سطوح P2RX7 ( $P = 0.037$ ) و NLRP3 ( $P = 0.022$ ) مایع سینوویال، NLRP3 غضروف مفصلی ( $P = 0.025$ ) و وزن بدن ( $P = 0.004$ ) در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل همراه بود. علاوه بر این، کاهش معنی‌دار وزن بدن در گروه تجربی در پس آزمون در مقایسه با پیش آزمون مشاهده شد ( $P = 0.001$ ). **نتیجه‌گیری:** چنین به نظر می‌رسد اجرای هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی از طریق کاهش P2RX7 و NLRP3 بتواند در بهبود وضعیت التهابی مرتبط با OA در موش‌های سالمند اثرگذار باشد. با این حال، جهت درک سازوکار میانجی اندازه‌گیری شاخص‌های التهابی مرتبط توصیه می‌شود.

با اسکن QR فوق می‌توانید جزئیات مقاله حاضر را در سایت [www.jahssp.azaruniv.ac.ir](http://www.jahssp.azaruniv.ac.ir) مشاهده کنید.

۱. کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران
۲. دکتری تخصصی فیزیولوژی ورزشی، استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران. (نویسنده مسئول): [Rezaecian.n@gmail.com](mailto:Rezaecian.n@gmail.com)
۳. گروه آموزش تربیت بدنی، دانشگاه فرهنگیان، صندوق پستی ۸۸۹-۱۴۶۶۵، تهران، ایران

واژه‌های کلیدی: استئوآرتروز، ورزش درمانی، التهاب، سالمندی



### مقدمه

هنگامی که ATP به P2X7 متصل می‌شود، گیرنده فعال شده و دروازه باز می‌شود و غشاء سلولی با ورود یون‌های کلسیم و سدیم و خروج یون پتاسیم به سرعت دپلاریزه می‌شود (۳۱). در صورتی که، گیرنده برای مدت زمان طولانی فعال بماند، P2X7 سبب تشکیل سوراخ در غشاء سلولی شده و بنابراین، به صدها مولکول اجازه عبور از غشاء سلولی را خواهد داد. از جمله، با ورود یون کلسیم از یک سو و همزمان افزایش نسبت AMP/ATP، پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) فعال می‌شود (۳۳، ۳۲) و با مهار مولکول هدف راپاماسین در پستانداران (mTOR)<sup>۱۳</sup>، اتوافازی<sup>۱۴</sup> پیش می‌رود (۳۴) و بنابراین، P2X7 بر التهاب و مرگ سلولی اثر تنظیمی خواهد داشت. از سوی دیگر، خروج یون پتاسیم یکی از عوامل فعال کننده اینفلامازوم پروتئین گیرنده شبه دامین الیگومریزاسیون نوکلئوتید ۳ (NLRP3) به حساب می‌آید (۳۵).

اینفلامازوم‌ها جزء اصلی پاسخ سیستم ایمنی ذاتی به پاتوژن‌ها می‌باشند که قادرند پروتئازهای کاسپاز و به طور ویژه کاسپاز-۱ را در پاسخ به عفونت یا محرک سمی فعال کنند (۳۶) و با هدف قرار دادن شاخص‌های پیش‌برنده التهاب هم‌چون پیش‌سازهای اینترلوکین-۱ بتا (IL-1β)<sup>۱۴</sup>، IL-18 و گاسدرمین D (GSDMD)<sup>۱۵</sup> (۳۶، ۳۷) در فرآیندهای پاتولوژی بیماری‌های مختلف التهابی نقش داشته باشند (۳۸). NLRP3 از جمله اینفلامازوم‌ها می‌باشد که به خانواده گیرنده‌های شبه دامین الیگومریزاسیون متصل به نوکلئوتید (NLR)<sup>۱۶</sup> تعلق دارد (۳۹). پروتئین NLRP3 شامل حوزه‌های مکرر غنی از لوسین (LRR)<sup>۱۷</sup> در انتهای کربوکسیل، یک حوزه پیرین (PYD)<sup>۱۸</sup> در انتهای آمینو و حوزه متصل به نوکلئوتید (NACTH)<sup>۱۹</sup> در حوزه مرکزی می‌باشد (۳۹). در حضور فعال کننده‌های سیستم ایمنی، ساختار داخلی NLRP3 باز می‌شود و PYD موجود در ساختار NLRP3 با PYD مستقر در پروتئین شبه لکه مرتبط با آپوپتوز (ASC)<sup>۲۰</sup> بر هم کنش می‌کند (۴۰). در ادامه، حوزه فراخوان کاسپاز (CARD)<sup>۲۱</sup> در ASC به CARD در پیش‌ساز کاسپاز-۱ متصل می‌شود تا اینفلامازوم NLRP3 را تشکیل دهد. آن‌گاه، اینفلامازوم NLRP3 کاسپاز بالغ را تولید می‌کند که پیش‌سازهای IL-1β و IL-18 را شکسته و به IL-1β و IL-18 تبدیل می‌کند (۱۱، ۱۲). علاوه بر این، به نظر می‌رسد تشکیل و تجمع کریستال‌هایی از قبیل کلسیم فسفات پایه (BCP)<sup>۲۲</sup>، بیماری رسوب کلسیم پیروفسفات (CPPD)<sup>۲۳</sup> و اسید اوره در OA نیز سبب فعال شدن اینفلامازوم NLRP3

آرتريت مفصل (OA) یکی از بیماری‌های مخرب مفصلی است و مشخصه بالینی آن شامل از بین رفتن غضروف مفصلی، التهاب پرده سینوئال، تصلب استخوان زیرغضروف و تشکیل استئوفیت<sup>۲</sup> می‌باشد (۲۱). اتیولوژی OA پیچیده و چندعاملی می‌باشد. از دیدگاه ماکروسکوپی، عواملی از قبیل سالمندی، نژاد و تروما بر سینوویوم و غضروف تاثیر دارند (۲۲). از دیدگاه میکروسکوپی، برهم خوردن تعادل متابولیسمی در سلول‌های مفصل سبب بیان ژنی مولکول‌های پیش‌برنده التهاب و تغییر در محیط ماتریکس غضروف مفصلی می‌شود (۲۳). بنابراین، شرایط التهابی کندروسیت‌ها و کاتابولیسم ماتریکس خارج سلولی به عنوان عاملی کلیدی در تعیین میزان تخریب غضروف در نظر گرفته می‌شود. گیرنده پورینریک P2X7 (P2RX7)<sup>۲</sup> یکی از تنظیم کننده‌های مهم بیماری‌های التهابی و دردناک می‌باشد (۲۴) که در وقوع و گسترش OA نقش دارد (۲).

P2X7 به خانواده پروتئین‌های گیرنده پورینریک تعلق دارد و یک کانال کاتیونی وابسته به آنوزین تری فسفات (ATP)<sup>۴</sup> است که در سلول‌های مختلف مانند سلول‌های ایمنی و استخوانی بیان می‌شود و منجر به بروز پاسخ‌های مختلف سلولی از قبیل افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)<sup>۵</sup> (۲۵، ۲۶)، آزاد شدن سایتوکاین‌های التهابی و آپوپتوز<sup>۷</sup> می‌شود. آپوپتوز نوعی مرگ برنامه ریزی شده سلولی تخریب کننده است، که برخلاف آپوپتوز که پاسخی غیرالتهابی و فیزیولوژیک می‌باشد، به شدت التهابی بوده و سازوکار دفاعی ایمنی ذاتی در پاسخ به عفونت‌های پاتوژن می‌باشد (۲۸). به بیان دیگر، آپوپتوز مانند خودکشی آرام و تمیز سلول است که برای حفظ نظم و سلامت بدن و بدون ایجاد التهاب انجام می‌شود. در حالی که، آپوپتوز مانند انفجاری کنترل شده است که سلول خود را فدا می‌کند تا با ایجاد پاسخ التهابی وسیع، سیستم ایمنی را از وجود مهاجم خطرناک مطلع کرده و پاسخی گسترده به راه بیندازد. آپوپتوز تحت تاثیر اینفلامازوم‌ها<sup>۸</sup> از قبیل پروتئین گیرنده شبه دامین الیگومریزاسیون نوکلئوتید ۳ (NLRP3)<sup>۹</sup> رخ می‌دهد و توسط کاسپاز-۱<sup>۱۰</sup> مورد هدف قرار می‌گیرد (۲۹، ۳۰). در واقع، فعال شدن P2X7 به عنوان یک سویچ کلیدی التهاب، واکنش‌های متعدد را در پایین دست، از قبیل آزاد شدن عوامل التهابی، تکثیر سلولی، مرگ سلولی و تغییرات فنوتیپی، به راه می‌اندازد (۶).

<sup>13</sup> Autophagy

<sup>14</sup> Interleukin-1 Beta (IL-1β)

<sup>15</sup> Gasdermin D (GSDMD)

<sup>16</sup> Nucleotide- Binding Oligomerization Domain-Like Receptors (NLRs)

<sup>17</sup> Leucine-Rich Repeat (LRR)

<sup>18</sup> Pyrin Domain (PYD)

<sup>19</sup> Nucleotide- Binding Domain (NACTH)

<sup>20</sup> Apoptosis- Associated Speck- Like Protein (ASC)

<sup>21</sup> Caspase Recruitment Domain (CARD)

<sup>22</sup> Basic Calcium Phosphate (BCP)

<sup>23</sup> Calcium Pyrophosphate Deposition Disease (CPPD)

<sup>1</sup> Sclerosis

<sup>2</sup> Osteophyte

<sup>3</sup> Purinergic Receptor P2X 7 (P2RX7)

<sup>4</sup> Adenosine TriPhosphate (ATP)

<sup>5</sup> Reactive Oxygen Species (ROS)

<sup>6</sup> Cytokine

<sup>7</sup> Pyroptosis

<sup>8</sup> Inflammasome

<sup>9</sup> Nucleotide Oligomerization Domain (NOD)- Like Receptor Protein 3 (NLRP3)

<sup>10</sup> Caspase 1

<sup>11</sup> AMP-Activated Protein Kinase (AMPK)

<sup>12</sup> Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)





منظم می‌باشد (۴۲)؛ تمرینات ترکیبی استقامتی و مقاومتی می‌تواند پروتکل تمرینی منتخب باشد. نظریه اینکه، زنان به دلیل یائسگی و کاهش فیزیولوژیک هورمون‌های جنسی در مقایسه با مردان بیشتر در معرض ابتلا به پوکی استخوان و بیماری‌های تخریب مفصل می‌باشند؛ آمودنی‌های مطالعه حاضر را موش‌های ماده سالمند تشکیل داد. بنابراین، مطالعه حاضر در صدد بررسی اثر تمرینات ترکیبی استقامتی و مقاومتی بر مقادیر مفصلی P2X7 و NLRP3 در موش‌های سالمند ماده بود.

### روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش

مطالعه حاضر از نوع تجربی - بنیادی با طرح پس آزمون بود که با هدف بررسی اثر هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی بر مقادیر مفصلی P2X7 و NLRP3 و وزن بدن در موش‌های سالمند ماده در دو گروه (یک گروه تجربی و یک گروه کنترل) انجام شد. نمونه آماری این مطالعه شامل ۲۲ سر رت ماده نژاد ویستار (۲۸-۲۴ ماه، ۱۰/۱۵±۲۶۲/۵۰ گرم) بود که از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تهیه و به آزمایشگاه تخصصی فیزیولوژی ورزشی این واحد دانشگاهی منتقل شدند. رت‌ها بر اساس خط مشی انجمن ایرانیان حمایت از حیوانات آزمایشگاهی (NIH-Publication) مورد استفاده برای اهداف علمی و آزمایشگاهی، نگهداری و به شیوه تصادفی در دو گروه تجربی و کنترل (۱۱ سر در هر گروه) تقسیم شدند.

### روش اجرای پژوهش

رت‌ها در اتاقی به ابعاد ۵ در ۱۰ متر در شرایط کنترل شده از لحاظ نور (۱۲) ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی؛ شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر)، دما (۲۳±۳ سانتی گراد) و رطوبت (۶۰-۳۰ درصد) نگهداری شدند. تعداد سه رت در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد ۲۰ در ۲۷ در ۴۳ سانتی‌متر به‌گونه‌ای نگهداری شدند که آزادانه به آب و غذای مخصوص جوندگان (تهیه شده از مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی) دسترسی داشته باشند. برای اطمینان از شرایط محیطی مناسب و حفظ رطوبت، دما و تهویه مناسب (برای تعدیل سطح آلودگی موجود در محل و کاهش بوی بد محیط ناشی از تجمع آمونیاک حاصل از ادرار حیوانات و کاهش احتمال بیماری‌های تنفسی در حیوانات) از دستگاه تهویه هوا و برای پایش تغییرات شبانه روزی دما و رطوبت از دماسنج و رطوبت سنج استفاده شد. همچنین، قفس‌های نگهداری حیوانات به صورت روزانه با آب و ماده شوینده شستشو داده شد. برای حفظ نظافت قفس‌ها و جمع آوری ادرار و مدفوع حیوانات از پوشال (تراشه چوب) استریل استفاده شد. در سراسر دوره تحقیق، جابه‌جایی رت‌ها توسط یک نفر انجام شد. علاوه بر این، همه رت‌ها به مدت حداقل دو

(۱۳) و متعاقباً افزایش آزاد شدن IL-1 $\beta$  از مونوسیت‌ها و ماکروفاژها می‌گردد (۱۴). ضمن اینکه، هنگامی که پیروپتوزیس در سلول اتفاق می‌افتد، سلول متورم شده و در نهایت پاره می‌شود و آزاد شدن خارج از کنترل بسیاری از سایتوکاین‌های پیش‌التهابی هم‌چون IL-1 $\beta$  رخ می‌دهد و منجر به مرگ سریع و غیرفعال سلول خواهد شد (۸). چراکه، IL-1 $\beta$  نه تنها با شکستن کاسپاز-۱ آن را فعال می‌کند و سبب شروع آپوپتوز می‌شود (۷)؛ بلکه، ترشح آنزیم‌های مخرب مفصل از قبیل متالوپروتئیناز ماتریکس (MMP) ۱-۳ و MMP-13 را تحریک کرده و منجر به تخریب کلاژن نوع دو و پروتئوگلیکان موجود در ماتریکس خارج سلولی می‌شود و بنابراین، شروع و گسترش OA را بیش تنظیم می‌کند (۹، ۱۰). از آنجاکه، مهار پاسخ‌های التهابی معمولاً گام اول درمان در بیماران مبتلا به OA می‌باشد؛ بنابراین، شاید بتوان از P2X7 و اینفلازوم NLRP3 به عنوان بیومارکرهای تشخیصی و درمانی برای OA استفاده نمود.

در کنار درمان‌های جراحی هم‌چون آرتروپلاستی، تجویز داروهای غیراستروئیدی ضد التهابی (NSAID) در بیماران مبتلا به OA ارجحیت دارد (۳۱). اگرچه، NSAID در کاهش درد همراه با OA اثربخش است؛ مصرف آن در طولانی‌مدت می‌تواند زیان‌بار باشد و دارای عوارض جانبی نیز هست (۲۰). بر اساس توصیه‌های انجمن بین‌المللی تحقیقات OA (OARSI) در سال ۲۰۱۴، توانبخشی به عنوان درمان اصلی برای OA در نظر گرفته شده و برای کلیه بیماران نیز توصیه می‌شود (۴۱). از آنجا که، بار مکانیکی به واسطه اثر تنظیمی بر التهاب، استرس شبکه آندوپلاسمی و اتوفازای بر تعادل مکانیکی کندروسیت‌ها و در نتیجه کاهش علائم OA تاثیر دارد؛ این احتمال وجود دارد که تمرینات ورزشی بتوانند به واسطه تاثیر بر P2X7 و NLRP3 در پیشگیری از وقوع زود هنگام و تخفیف علائم OA نقش داشته باشند. در تعداد محدودی از مطالعات اثر تمرینات ورزشی بر P2X7 و NLRP3 آن هم در شرایط OA مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله، لی و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند اجرای هشت هفته دویدن روی تردمیل با شدت متوسط در موش‌های سالم با وجود کاهش معنی‌دار NLRP3 با تغییر معنی‌دار بیان ژنی P2X7 همراه نبود. این در حالی بود که، بیان ژنی P2X7 طی این مدت در موش‌های غیرفعال مبتلا به OA افزایشی معنی‌دار داشت. از سوی دیگر، بیان ژنی P2X7 طی هفته‌های ۴-۲ افزایشی متوسط داشت ولی در هفته‌های انتهایی پروتکل تمرینی (هفته ۸-۶) بیان ژنی P2X7 بسیار زیاد شد و متعاقباً روند تخریب غضروف مفصلی سرعت گرفت (۳۳). لیو<sup>۴</sup> و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند اجرای تمرینات دویدن روی تردمیل با شدت متوسط در موش‌های مبتلا به OA مسیر پیام رسانی GSDMD/کاسپاز-۱/NLPR3/۱ را مهار می‌کند (۱۶).

از آنجاکه، توانبخشی در OA شامل تمرینات هوازی در خشکی و در آب، تمرینات قدرتی، مداخله‌های کنترل وزن (۴۱) و شرکت در فعالیت‌های بدنی

<sup>3</sup> OA Research Society International (OARSI)

<sup>4</sup> Liu P

<sup>1</sup> Matrix Metalloproteinase (MMP)

<sup>2</sup> Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs)





جهت تحریک موش‌ها به دویدن روی تردمیل و یا بالا رفتن از نردبان از شوک الکتریکی و یا محرومیت غذایی استفاده نشد و تنها در صورت لزوم انتهای دم موش‌ها لمس شد.

اجرای تمرینات ترکیبی در ساعت معینی از روز انجام گرفت. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی موش‌ها تشریح شدند و شاخص‌های مورد بررسی با استفاده از روش آزمایشگاهی مناسب مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌های آزمایشگاهی

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و پس از شش ساعت ناشتایی، ابتدا وزن کشی رت‌ها انجام شد. سپس، بر اساس ویرایش ۲۰۲۰ شیوه نامه<sup>۶</sup> انجمن پزشکی دامپزشکی آمریکا (AVMA)<sup>۴</sup>، رت‌ها با سه برابر دوز بیهوشی کتامین (شرکت آلفاسان هلند) (دوز نهایی ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (شرکت آلفاسان هلند) (دوز نهایی ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، دچار مرگ آسان شدند. مایع مفصلی با بیوپسی از مفصل زانو استخراج شد. سپس، مایع مستخرج شده به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰×g سانتریفیوژ (ساخت کشور آلمان، مدل سیگما ۱۰۱، هشت کاناله) گردید. سپس مایع رویی برای انجام تست جدا شد.

بافت غضروفی جدا شده از مفصل زانو ابتدا در محلول نمک فسفات با خاصیت بافری (PBS)<sup>۵</sup> شستشو داده شد تا خون اضافی خارج شود. سپس، بافت‌ها ریز خرد شده و در ۵ میلی لیتر PBS با هموژنایزر شیشه ای (شرکت فلاک<sup>۷</sup>، ایتالیا) روی یخ همگن شدند. سلول‌ها به وسیله سه بار انجماد (۲۰- درجه سانتیگراد) / ذوب (دمای اتاق) تجزیه<sup>۸</sup> شد و سپس، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰×g سانتریفیوژ گردید. هموژنات نهایی برای سنجش جمع آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

شاخص‌های مورد بررسی با استفاده از روش آزمایشگاهی مناسب مورد سنجش قرار گرفت. بدین ترتیب که، مقدار پروتئین P2RX7 در نمونه‌های به دست آمده توسط کیت شرکت لایف اسپان بیوساینس<sup>۹</sup> آمریکا با حساسیت ۴ پیکوگرم بر میلی لیتر به روش الایزای ساندویچ و به صورت سه بار تکرار انجام و در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد و در نهایت، میانگین داده‌ها برای تجزیه و تحلیل استفاده گردید. مقدار پروتئین NLRP3 نیز با استفاده از کیت شرکت آب کام<sup>۹</sup> آمریکا (ab277086) به روش الایزای ساندویچ و به صورت سه بار تکرار انجام و در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. سپس، میانگین داده‌ها برای تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفت. مقدار NLRP3 در مایع مفصلی به صورت پیکوگرم در میلی لیتر گزارش شد. برای استانداردسازی میزان NLRP3 اندازه‌گیری شده در کندورسیت‌ها و خشی کردن اثر متغیر مخدوشگر مقدار غضروف جدا شده در هر رت، نتایج الایزا به صورت پیکوگرم در هر میلی‌گرم غضروف گزارش شد.

هفته با شرایط زندگی در حیوان خانه و نحوه دویدن روی تردمیل و بالا رفتن از نردبان ویژه جوندگان آشنا شدند.

پروتکل تمرین

تمرین ترکیبی هوازی و مقاومتی در روزهای متناوب و در ساعت معینی از روز، پنج روز در هفته و به مدت هشت هفته انجام شد. ظرفیت هوازی و یک قدرت بیشینه برای تجویز تمرین و تعیین ظرفیت جسمانی و شدت فعالیت ورزشی، پنج روز بعد از آشناسازی با تجهیزات تعیین شد.

با توجه به عدم دسترسی به ابزار مستقیم مانند دستگاه تجزیه و تحلیل گازهای تنفسی، از روش غیرمستقیم جهت تعیین میانگین سرعت بیشینه موش‌ها استفاده شد (۳۵). بدین ترتیب که پس از ۵ دقیقه گرم کردن در شدت کم (که تقریباً معادل با هشت متر در دقیقه بر روی تردمیل مخصوص جوندگان بود)، آزمون ورزشی فزاینده تا مرز خستگی انجام شد (۴۳). این آزمون با سرعت ۱۰ متر در دقیقه شروع شد و به ازای هر سه دقیقه، سه متر بر سرعت آن افزوده گردید تا جایی که حیوانات دیگر قادر به دویدن نباشند. سپس میانگین سرعت بیشینه رت‌ها در گروه تمرینات هوازی برای طراحی برنامه تمرین محاسبه شد (۴۳).

جهت برآورد یک قدرت بیشینه در رت‌ها از آزمون حمل بار بیشینه<sup>۱</sup> استفاده شد. بدین ترتیب که در جلسه اول، رت‌ها از نردبان بالا می‌رفتند در حالی که وزنه‌ای معادل با ۷۵ درصد وزن شان به دم آن‌ها متصل شده بود. پس از اینکه رت‌ها توانستند یک بار از نردبان بالا بروند، وزنه‌ای ۳۰ گرمی به وزنه اولیه اضافه شد و مجدداً رت‌ها از نردبان بالا می‌رفتند. فرآیند اضافه کردن مرحله‌ای وزنه‌های ۳۰ گرمی تا جایی ادامه پیدا می‌کند که رت‌ها تنها قادر باشند سه مرتبه متوالی از نردبان بالا بروند و در اصطلاح به نقطه<sup>۲</sup> "شکست" رسیده باشند. وزنه‌ای که در این مرحله رت حمل می‌کند به عنوان بار بیشینه رت در نظر گرفته می‌شود (۴۴).

تمرینات هوازی شامل دویدن روی تردمیل (تردمیل پنج کاناله شرکت دانش سالار ایرانیان) در شدت کم تا متوسط (۶۰-۴۰ درصد سرعت بیشینه به دست آمده در آزمون دویدن بیشینه)، ۶۰ دقیقه در هر جلسه و بدون شیب تردمیل بود.

تمرینات مقاومتی به صورت بالا رفتن از نردبان ویژه جوندگان بود در حالی که یک وزنه به دم موش متصل شد؛ به طوری که وزنه شدتی معادل ۶۰-۴۰ درصد از نیروی به دست آمده در آزمون بار بیشینه را اعمال کند (شدت کم تا متوسط). مدت زمان هر جلسه حدود ۴۵ دقیقه شامل ۱۵ بار بالا رفتن از نردبان با فواصل استراحت یک دقیقه‌ای بین هر بار بالا رفتن بود (۵).

<sup>6</sup> Flac

<sup>7</sup> Lyse

<sup>8</sup> LifeSpanBioSciences

<sup>9</sup> ABcam

<sup>1</sup> Maximum Carrying Load Test

<sup>2</sup> Failure

<sup>3</sup> Guideline

<sup>4</sup> American Veterinary Medical Association (AVMA)

<sup>5</sup> Phosphate-Buffered Saline (PBF)





جدول ۲. ارتباط بین تغییرات P2X7R و NLRP3 با وزن در گروه های تحقیق  
Table 2. Correlation between changes in P2X7R and NLRP3 with weight in the study groups

وزن (گرم) Weight (gr)	متغیرها Variables	P Value	r Value
0.469	تجربی Experimental	ارزش P	ارزش r
0.348	تجربی Experimental	ارزش P	ارزش r
-0.013	کنترل Control	ارزش P	ارزش r
0.981	کنترل Control	ارزش P	ارزش r
0.109	تجربی Experimental	ارزش P	ارزش r
0.837	تجربی Experimental	ارزش P	ارزش r
0.099	کنترل Control	ارزش P	ارزش r
0.852	کنترل Control	ارزش P	ارزش r
0.649	تجربی Experimental	ارزش P	ارزش r
0.163	تجربی Experimental	ارزش P	ارزش r
0.307	کنترل Control	ارزش P	ارزش r
0.554	کنترل Control	ارزش P	ارزش r
0.148	تجربی Experimental	ارزش P	ارزش r
0.780	تجربی Experimental	ارزش P	ارزش r
0.572	کنترل Control	ارزش P	ارزش r
0.236	کنترل Control	ارزش P	ارزش r

### بحث

با توجه به بررسی های انجام شده، پژوهش حاضر از جمله اولین مطالعات انجام شده در بررسی اثر هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی بر مقادیر مفصلی P2X7 و NLRP3 در موش های سالمند ماده بود. بنابر نتایج مطالعه حاضر اجرای هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی با کاهش معنی دار سطوح P2X7 و NLRP3 مفصل در موش های سالمند ماده همراه بود.

آرتریت مفصلی (OA) منجر به ایجاد درد و ناتوانی بیماران شده و با افزایش هزینه های اجتماعی- اقتصادی همراه می باشد. به همین دلیل، شناسایی درمانی موثر برای OA با هدف بهبود سلامت عمومی در دنیا ضروری به نظر می رسد (۴۵). از آنجا که OA یک بیماری التهابی به حساب می آید و بسیاری مسیرهای سیگنالی التهابی در بروز و گسترش OA نقش دارند؛ P2X7 به عنوان یک سوئیچ کلیدی برای التهاب توجه بسیاری از محققان را به خود جلب نموده است.

P2X7 یک گیرنده پونپریژیک و کانال کاتیونی است که با توجه به غلظت ATP باز می شود. هنگامی که گیرنده به ATP متصل شود، کانال باز شده و ورود یون های سدیم و کلسیم و خروج یون پتاسیم سبب دپلاریزه شدن سریع غشا سلولی می گردد (۳۱). در صورتی که، گیرنده برای مدت زمانی طولانی فعال/باز بماند، P2X7 می تواند سبب ایجاد سوراخ در غشا شده و بنابراین، مولکول هایی با وزن مولکولی بیش از ۱۰۰ کیلودالتون هم اجازه عبور از غشا سلولی را خواهند یافت (۴۶). علاوه بر این، فعال شدن P2X7 به عنوان یک سوئیچ التهابی واکنش های متعدد از قبیل آزاد شدن عوامل التهابی را در پایین دست میانجی گری می کند (۶).  $IL-1\beta$  از جمله سایتوکاین های پیش

### تحلیل آماری

طبیعی بودن توزیع آماری داده ها با استفاده از شاپیرو ویلک بررسی شد. تفاوت بین گروهی برای سطوح مفصلی P2X7 و NLRP3 و وزن بدن با استفاده از آزمون تی مستقل ارزیابی شد. برای تعیین تغییرات درون گروهی وزن بدن در دو گروه از آزمون آماری تی همبسته استفاده گردید. از آزمون همبستگی پیرسون جهت بررسی ارتباط بین شاخص های مورد بررسی استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ انجام شد.

### یافته ها

میانگین و انحراف معیار سطوح مفصلی P2X7 و NLRP3 و وزن بدن به تفکیک گروه های تحقیق در جدول ۱ آورده شده است. بنابر نتایج آزمون تی مستقل اجرای هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی با کاهش معنی دار سطوح P2X7 مایع سینوویال (t=۲/۴۸۲، P=۰/۰۳۷) و NLRP3 مایع سینوویال (t=۲/۷۳۲، P=۰/۰۲۲) و غضروف مفصلی (t=۲/۶۵۵، P=۰/۰۲۵) و وزن بدن (t=۳/۷۸۲، P=۰/۰۰۴) در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل همراه بود. با این همه، تغییرات سطوح سطوح P2X7 غضروف مفصلی (t=۱/۱۵۶، P=۰/۱۵۰) بین دو گروه تجربی و کنترل تفاوتی معنی دار نداشت. بنابر نتایج آزمون تی زوجی اجرای هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی با کاهش معنی دار وزن بدن در گروه تجربی در پس آزمون در مقایسه با پیش آزمون همراه بود (t=۵/۱۲۵، P=۰/۰۰۱).

جدول ۱. میانگین ± انحراف معیار شاخص های مورد بررسی در گروه تجربی و کنترل در پیش- و پس آزمون  
Table 1. Standard deviation ± mean of the indices studied in the experimental and control groups in the pre- and post-test

کنترل Control (n=۱۱)	تجربی Experimental (n=۱۱)	گروه ها Groups	متغیرها Variables
8.76±0.33	8.48±0.30	پس آزمون Post-test	گیرنده پونپریژیک P2X7 غضروف (نانوگرم بر میلی لیتر) P2X7 Purinergic Receptor in Cartilage (ng/mL)
1.50±0.16	1.78±0.26	پس آزمون Post-test	گیرنده پونپریژیک P2X7R مایع سینوویال (نانوگرم بر میلی لیتر) P2X7 Purinergic Receptor in Synovial Fluid (ng/mL)
1419.28±65.61	1325.39±55.56	پس آزمون Post-test	پروتئین گیرنده شبه NLRP3 (NLRP3) غضروف (نانوگرم بر میلی لیتر) NOD-Like Receptor Protein-3 (NLRP3) in Cartilage (ng/mL)
225.56±12.78	207.44±9.89	پس آزمون Post-test	مایع سینوویال (نانوگرم بر میلی لیتر) NLRP3 in Synovial Fluid (ng/mL)
222.00±17.10	224.00±15.27	پیش آزمون Pre-test	وزن (گرم) Weight (gr)
232.00±12.45	22.83±18.70	پس آزمون Post-test	

بنابر نتایج آزمون همبستگی پیرسون بین تغییرات سطوح مفصلی P2X7 و NLRP3 پس از هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی با تغییرات وزن بدن در موش های سالمند ماده ارتباطی معنی دار وجود نداشت (P>۰/۰۵) (جدول ۲).





(۵۰). پس از فعالیت ورزشی، سطوح P2RX7 و فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده<sup>۱</sup> زنجیره<sup>۲</sup> سبک کاپا از لنفوسیت‌های بی‌فعال شده (NF-K $\beta$ ) با توجه به مدت زمان فعالیت ورزشی کاهش می‌یابد (۵۰). سطوح NLRP3 و کاسپاز-۱ پس از فعالیت ورزشی در آزمودنی‌های غیرفعال زیاد می‌شود و در مقابل، NLRP3 در افراد طبیعی یا ورزشکاران استقامتی کاهش می‌یابد (۵۰). بنابراین، چنین به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی با محوریت التهاب و P2RX7 در افراد کم‌تحرک به عنوان یک پیش‌برنده التهاب عمل می‌کند و در افرادی که ورزش می‌کنند دارای اثر ضدالتهابی می‌باشد. با این حال، آزمودنی‌های مطالعه حاضر را نمونه‌های انسانی تشکیل نمی‌دادند و بنابراین، نمی‌توان موش‌ها را از لحاظ میزان فعالیت سازمان یافته دسته بندی کرد. اما، چون علاوه بر گروه تمرینی، گروه کنترل نیز وجود داشت می‌توان گفت فعالیت بدنی سازمان یافته در قالب هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی در موش‌های مطالعه حاضر توانسته است سبب کاهش P2RX7 در مقایسه با گروه کنترل و بدون تمرین شود. اگرچه، در مطالعه حاضر سطوح IL-1 $\beta$ ، NF-K $\beta$  و کاسپاز-۱ به دنبال هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی اندازه‌گیری نشد؛ اجرای هشت هفته تمرینات ترکیبی استقامتی و مقاومتی با کاهش معنی‌دار سطوح NLRP3 در مایع سینوویال و غضروف مفصلی همراه بود. از آنجا که، P2X7 به طور مستقیم و به واسطه باز کردن کانال‌های پتاسیمی از یک سو، و از سوی دیگر، به طور غیر مستقیم و به واسطه فعال کردن MMPها و کاسپازها و افزایش سطوح IL-1 $\beta$  سبب فعال شدن NLRP3 می‌گردد؛ می‌توان نتیجه گرفت کاهش معنی‌دار P2X7 به دنبال تمرین در مطالعه حاضر شاید در کاهش سطوح مفصلی NLRP3 نقش داشته باشد. در همین راستا، چن<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۱۹) نیز نشان دادند اجرای ۱۲ هفته تمرینات استقامتی منظم با کاهش بیان P2RX7 از فعال‌سازی بیش از حد مسیر اینفلامازوم NLRP3 جلوگیری می‌کند (۱۵). علاوه بر این، تمرینات ورزشی قادرند با مهار NF-K $\beta$  و NLRP3 سبب کاهش التهاب و به تأخیر افتادن تغییرات پاتولوژیک در استئوآرتریت شود (۱۶). ضمن اینکه، تمرینات کشش دوره‌ای با شدت متوسط نیز با مهار مسیر پیام‌رسانی NF-K $\beta$ /NLRP3، فاکتور نکروز کندیل تومور آلفا (TNF- $\alpha$ )<sup>۴</sup> تخریب غضروف و کندروسیت‌ها را در شرایط OA کاهش می‌دهد (۱۷). NF-K $\beta$  و فسفواکتیواز کیناز-۳ (PI3K)<sup>۴</sup> پروتئین کیناز B (PKB) یا Akt<sup>۵</sup> مهمترین مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی هستند که در انواع عملکردهای زیستی مانند واکنش‌های التهابی نقش دارند (۲۰، ۵۱). فعال شدن مسیر PI3K/Akt سبب تولید MMP در کندروسیت‌ها می‌شود (۵۳، ۵۲). MMPها نیز در کنار دیگر عوامل کاتابولیک از قبیل سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2)<sup>۶</sup> و ADAMTS<sup>۷</sup> از جمله این شاخص‌های التهابی هستند که

التهابی است که به دنبال شکستن کاسپاز-۱ فعال شده (۷) و نه تنها منجر به آپوپتوز و مرگ غیرفعال و سریع سلولی می‌شود (۸)، بلکه ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده غضروف مانند MMP3 و MMP13 را تحریک کرده و سبب تجزیه کلژن نوع دو و پروتئوگلیکان‌های موجود در ماتریکس خارج سلولی می‌شود و بنابراین، به وقوع و یا وخامت OA کمک می‌کند (۹، ۱۰). ضمن این‌که، P2RX7 می‌تواند نسبت AMP به ATP را با افزایش ورود یون کلسیم به داخل سلول بالا ببرد (۳۳، ۳۲) و در نتیجه اتوفازی را با فعال کردن حس‌گر انرژی AMPK و مهار mTOR پیش‌برد (۳۴). وقوع اتوفازی می‌تواند با تجزیه و پاکسازی میتوکندری‌های آسیب دیده و کاهش تولید ROS ناشی از IL-1 $\beta$  مانع از ایجاد فنوتیپ شبه OA در کندروسیت‌ها شود (۴۷). البته، در مراحل اولیه فعال شدن P2RX7 شاهد وقوع اتوفازی خواهیم بود، اما لیزوزوم در مراحل پایانی فعالیت P2RX7 به عنوان یک پیام‌رسان بین AMPK و mTOR عمل می‌کند و بنابراین، تمامیت خود را از دست داده و نمی‌تواند با اتوفازوزوم بپیوندد. پس اتوفازولیزوزوم تشکیل نمی‌شود و متعاقباً مواد آسیب‌رسان مانند اجزای اینفلامازوم از بین نمی‌روند که منجر به آپوپتوز، پیروپتوز و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند (۴۸، ۴۹). بنابراین، با توجه به ارتباط بین P2RX7 و OA، انتظار می‌رود بتوان با تأثیر بر بیان ژنی و فعال شدن P2RX7 و در نتیجه تغییر در جریان یونی مربوطه در سرانجام اتوفازی و پیروپتوز سلولی و فرآیند OA تغییر ایجاد نمود. چراکه، تخریب غضروف هنگامی شدت می‌گیرد و OA وخیم می‌شود که تعادل کاتابولیکی کندروسیت برهم خورد. فعالیت بدنی و ورزش همواره به عنوان یکی از مداخلات درمانی موثر در پیشگیری و درمان OA توصیه می‌شود؛ با این‌همه، یافته‌ها در ارتباط با نقش P2RX7 در میانجی‌گری اثر بخشی ورزش بر OA اندک می‌باشند.

هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر، لی و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند فعالیت ورزشی با شدت متوسط و یا سطوح پایین ATP با سطح پایین فعالیت P2X7 همراه خواهد بود که بعضاً مطلوب هم هست (۳۳) و این سطح مطلوب از عملکرد P2X7 می‌تواند اتوفازی را از طریق مسیر پیام‌رسانی AMPK/mTOR پیش‌برد و ضمن مهار پیروپتوز از وقوع و گسترش OA جلوگیری کند (۳۳). در مقابل، بیش‌فعالی P2X7 به دنبال فعالیت ورزشی شدید و یا در حضور غلظت بالای ATP فعالیت mTOR را افزایش داده و اتوفازی را کم می‌کند (۳۳) البته، این آثار به اندازه کافی نیستند که با فعالیت گسترده اینفلامازوم NLRP3 مقابله کنند و بنابراین، احتمال وقوع پیروپتوز، مرگ سلولی و تخریب غضروفی وجود دارد (۳۳). با این‌همه، کماسی و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند P2X7 سطوح پلاسمایی IL-1 $\beta$  را پس از فعالیت ورزشی کاهش می‌دهد و این در حالی است که، برخلاف نتایج مطالعه حاضر، بیان ژنی P2X7 با افزایش مدت زمان فعالیت ورزشی زیاد می‌شود

<sup>4</sup> Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)

<sup>5</sup> Protein kinase B (PKB or Akt)

<sup>6</sup> Cyclooxygenase-2

<sup>۷</sup> مخفف دیس اینتگرین و متالوپروتئینازی که دارای حوزه ترومبوسپوندین می‌باشد.

<sup>1</sup> Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB)

<sup>2</sup> Chen

<sup>3</sup> Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )





تحریک P2RX7 سبب افزایش متابولیسم انرژی در موش‌ها می‌شود و بر آمادگی جسمانی تاثیرگذار است (۶۳). بنابراین، P2RX7 در ارتباط با ATP بسته به شرایط عملکردی دوگانه و متناقض دارد. به طوری که، در شرایط التهابی، افزایش ATP با فعال کردن P2RX7 و متعاقباً NLRP3 بر التهاب، اتوفازژی و پیروپتوز اثر دارد. و این در حالی است که، در شرایط کسر انرژی، کاهش ATP و افزایش نیاز به ATP ضمن فعال کردن P2RX7 بر متابولیسم و فرآیند تولید ATP اثرگذار است. در مطالعه حاضر، به دلیل شرایط التهابی در مفصل وجود دارد و بنابراین، قاعدتاً شرایط التهابی به دلیل افزایش ATP خارج سلولی سبب افزایش P2RX7 و التهاب شده است، بنابراین، کاهش P2RX7 مابع سینیویال به دنبال تمرینات ورزشی به بهبود شرایط التهابی مفصل کمک می‌کند. اما، برای درک بهتر عملکرد P2RX7 بهتر بود مقادیر سرمی و یا عضلانی P2RX7 نیز اندازه‌گیری شود که بتوان به درک بهتری از عملکرد متابولیکی P2RX7 نیز دست یافت. به ویژه اینکه، AMPK به عنوان یکی از مهم‌ترین حس‌گرهای انرژی و متابولیسم در عملکرد التهابی P2RX7 نیز نقش واسطه دارد. در همین راستا، لی<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند تمرینات ورزشی با شدت متوسط با تاثیر بر مسیر پیام‌رسانی P2RX7/AMPK/mTOR ضمن افزایش تجزیه NLRP3 موجب کاهش شدت استوآرتريت گردد (۳۳). البته، بهتر است به نقش ترکیب بدن بر التهاب نیز اشاره کرد، به‌ویژه اینکه، اجرای هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی با کاهش معنی‌دار وزن بدن در گروه تجربی در پس‌آزمون در مقایسه با پیش‌آزمون همراه بود. اضافه وزن و چاقی خطر ابتلا به OA را در هم در مفاصل متحمل وزن (زانو) و هم غیر متحمل وزن (دست) افزایش می‌دهد و احتمال بروز OA در افراد چاق دو برابر بیشتر از آزمودنی‌هایی با شاخص توده بدنی (BMI)<sup>۴</sup> کمتر از ۲۵ می‌باشد (۶۴). در واقع، اضافه وزن همراه با چاقی نه تنها با اعمال فشار مکانیکی بیشتر در مفاصل تحمل‌کننده وزن در پاتوژن التهابی و غیرالتهابی OA نقش دارد؛ بلکه، به واسطه ترشح آدیپوکاین‌های مترشح‌ه از بافت چربی در پاتوژن التهابی OA نیز سهیم می‌باشد (۶۴). یافت چربی به عنوان منبع ذخیره انرژی اضافه در بدن به شکل تری‌گلیسرید، نقشی مهم در تنظیم متابولیسم بدن ایفا می‌کند. با این حال، امروزه بافت چربی را به عنوان یک بافت ترشحی فعال می‌شناسند که به واسطه ترشح آدیپوکاین‌ها در تنظیم اعمال مختلف بدن از قبیل تولیدمثل، سیستم ایمنی، آنژیوژن، اشتها، انعقاد، حساسیت به انسولین و هموستاز التهاب نقش کلیدی دارد (۶۵). آدیپوکاین‌ها با توجه به عملکرد در دو دسته کلی پیش‌برنده التهاب و ضدالتهابی تقسیم می‌شوند. در این میان، TNF- $\alpha$  و IL-1 $\beta$  که پیش‌تر به نقش آن‌ها در بروز و گسترش OA اشاره شد، از جمله آدیپوکاین‌های پیش‌برنده التهاب به حساب می‌آیند که در شرایط چاقی و اضافه‌وزن نیز زیاد می‌شوند (۶۵). البته، علاوه بر افزایش محتوای بافت چربی، افزایش فشار

به واسطه مسیرهای پیام‌رسانی التهابی سبب تخریب غضروف مفصلی می‌شوند (۵۵، ۵۴). NF-K $\beta$  مسیر پیام‌رسانی هدف پایین دست برای مسیر PI3K/Akt می‌باشد که خود توسط عوامل التهابی از قبیل TNF- $\alpha$  و IL-1 $\beta$  فعال می‌شود (۱۸). NF-K $\beta$  فعال شده با افزایش بیان ژنی MMPها منجر به شروع و گسترش OA می‌گردد (۱۹). علاوه بر این، مطالعات اخیر نشان دادند NF-K $\beta$  پیش‌نیاز ضروری برای فعال کردن اینفلامازوم NLRP3 نیز به حساب می‌آید (۲۰). با این همه قضاوت قطعی در ارتباط با عملکرد التهابی یا ضدالتهابی P2RX7 نیاز به پژوهش‌های گسترده‌تر دارد. ضمن اینکه، غشاء سینیویال و یا غضروف مفصلی نیز نمونه برداری نگردد و تغییرات پاتولوژیک این دو نیز بررسی نشد و نمی‌توان گفت کاهش P2RX7 مابع سینیویال در بهبود شرایط التهابی مفصل نقش داشته است یا خیر. بنابراین، جهت درک عملکرد P2RX7 در کاهش یا افزایش التهاب به دنبال فعالیت‌های ورزشی انجام مطالعات گسترده با اندازه‌گیری شاخص‌های التهابی درگیر در سیگنال P2RX7/NLRP3 در OA ضروری است. با این همه، علاوه بر شاخص التهاب، عاملی که محققین را به سوی مثلث NLRP3/P2RX7/OA و فعالیت بدنی سوق می‌دهد، اهمیت وجود ATP خارج سلولی برای شروع برهم‌کنش‌های منتهی به فعال شدن P2RX7 و نهایتاً سازوکارهای اختلال‌گر می‌باشد. ATP ارز انرژی بدن است که نه تنها انرژی لازم برای همه اعمال سلول را تامین می‌کند، بلکه، به عنوان یک پیام‌رسان خارج سلولی در برقراری ارتباط بین سلولی در همه بافت‌ها نقش دارد (۵۶). به طوری که، ATP در جایگاه یک پیام‌رسان خارج سلولی در شرایط آسیب و آشفتگی سلول از مهم‌ترین الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب (DAMP)<sup>۱</sup> بوده که زودتر از دیگر پیام‌رسان‌های خارج سلولی آزاد شده می‌شود (۵۸، ۵۷). با توجه به نقش دوگانه ATP به عنوان یک DAMP و میانجی انرژی، هر گونه تغییر در غلظت خارج سلولی ATP در پاسخ به پاتوژن‌ها و یا آسیب ممکن است نه تنها به عنوان یک پیام هشدار عمل کند بلکه هدفی باشد که سنتز انرژی سلولی را در شرایطی فعال کند که تقاضای انرژی زیاد است. فعالیت بدنی و ورزش از جمله شرایطی است که بدن را در معرض کسر انرژی و افزایش تقاضای انرژی قرار می‌دهد و بنابراین، شاهد افزایش تولید ATP خواهیم بود. و نکته جالب اینجاست که P2RX7 قادر است با افزایش فسفریلاسیون اکسایشی و گلیکولیز موجبات افزایش سنتز ATP را فراهم کند (۶۰، ۵۹). بنابراین، هم‌چون شرایط التهابی، طی فعالیت بدنی نیز غلظت ATP خارج سلولی چندین برابر افزایش می‌یابد (۶۲، ۶۱) و ممکن است چنین به نظر برسد P2RX7 یک حس‌گر بیوانرژی است که به دستگاه داخل سلولی سنتز ATP این امکان را می‌دهد سطوح ATP خارج سلولی را حس کند و بنابراین، افزایش تقاضای انرژی را پاسخ دهد (برآورده کند). در همین راستا، جیاکوازو<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند

<sup>3</sup> Li Z

<sup>4</sup> Body Mass Index (BMI)

<sup>1</sup> Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs)

<sup>2</sup> Giacobuzzo G





- McAllister M, Chemaly M, Eakin AJ, Gibson DS, McGilligan VE. NLRP3 as a potentially novel biomarker for the management of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2018;26(5):612-9.
- Sanches IC, Buzin M, Conti FF, Dias DdS, Santos CPd, Sirvente R, Salemi VMC, Llesuy S, Irigoyen MC, De Angelis K. Combined aerobic and resistance exercise training attenuates cardiac dysfunctions in a model of diabetes and menopause. *PLoS One*. 2018; 13(9):e0202731.
- North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews*. 2002;82(4):1013-67.
- Wang Q, Zhuang D, Feng W, Ma B, Qin L, Jin L. Fraxetin inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced apoptosis, inflammation, and matrix degradation in chondrocytes and protects rat cartilage in vivo. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2020;28(12):1499-506.
- Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*. 2013;38(2):209-23.
- Piao S, Du W, Wei Y, Yang Y, Feng X, Bai L. Protectin DX attenuates IL-1 $\beta$ -induced inflammation via the AMPK/NF- $\kappa$ B pathway in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis progression in a rat model. *International immunopharmacology*. 2020;78:106043.
- Lin Z, Miao J, Zhang T, He M, Zhou X, Zhang H, Gao y, Bai L. d-Mannose suppresses osteoarthritis development in vivo and delays IL-1 $\beta$ -induced degeneration in vitro by enhancing autophagy activated via the AMPK pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;135:111199.
- Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, et al. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell*. 2014;156(6):1193-206.
- Brydges SD, Broderick L, McGeough MD, Pena CA, Mueller JL, Hoffman HM. Divergence of IL-1, IL-18, and cell death in NLRP3 inflammasomopathies. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(11):4695-705.
- Busso N, So A. Microcrystals as DAMPs and their role in joint inflammation. *Rheumatology*. 2012;51(7):1154-60.
- Corr EM, Cunningham CC, Helbert L, McCarthy GM, Dunne A. Osteoarthritis-associated basic calcium phosphate crystals

مکانیکی ناشی از اضافه وزن نیز با فعال کردن مسیرهای التهابی از قبیل NF- $\kappa$ B سبب افزایش شاخص‌های التهابی هم‌چون TNF- $\alpha$  و IL-1 $\beta$  می‌شود که در ادامه با فعال کردن آنزیم‌های کلیدی تخریب غضروف مفصلی مانند MMPها و آگروکانازها<sup>۱</sup> ضمن آپوپتوز کندروسیت‌ها و تخریب ماتریکس خارج سلولی سبب بروز OA می‌گردند (۶۷،۶۶). اگرچه، در مطالعه حاضر سطوح شاخص‌های یاد شده ارزیابی نگردید؛ این احتمال وجود دارد تمرینات ورزشی به واسطه کاهش وزن و متعاقباً تعدیل شرایط التهابی بدن در بهبود شرایط التهابی مفصل نقش داشته باشد. با این‌همه، بنابر نتایج آزمون همبستگی پیرسون بین تغییرات سطوح مفصلی P2RX7 و NLRP3 پس از هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی با تغییرات وزن بدن در موش‌های سالمند ماده ارتباطی معنی‌دار وجود نداشت.

### نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد اجرای هشت هفته تمرینات ترکیبی هوازی و مقاومتی با کاهش سطوح مفصلی P2X7 و NLRP3 در سالمندی همراه بود. با این‌حال، با توجه به عملکرد دوگانه P2X7 در التهاب و متابولیسم، جهت درک سازوکار و عملکرد دقیق P2X7 و چگونگی برهم‌کنش آن با NLRP3 انجام مطالعات بیشتر و اندازه‌گیری شاخص‌های واسط (که بعضاً در متن به آن‌ها اشاره شده است) در بافت‌های مختلف و بررسی جنبه‌های عملکردی بیماری، مانند میزان درد، دامنه حرکتی یا تحرک حیوانات و تغییرات هیستولوژیک و آسیب‌شناسی بافتی ضروری به نظر می‌رسد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد بجنورد می‌باشد. بدین‌وسیله، از همه عزیزانی که ما را در اجرای این تحقیق یاری رساندند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

### تضاد منافع

نویسندگان این مقاله، هیچ نفع متقابلی از انتشار آن ندارند.

### منابع

- Man G, Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis—a complex process that involves the entire joint. *Journal of medicine and life*. 2014;7(1):37.
- Li Z, Huang Z, Bai L. The P2X7 receptor in osteoarthritis. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021;9:628330.
- Li Z, Huang Z, Zhang H, Lu J, Tian Y, Wei Y, Yang Y, Bai L. P2X7 receptor induces pyroptotic inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis via NF- $\kappa$ B/NLRP3 crosstalk. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2021;2021(1):8868361.

<sup>1</sup> Aggrecanases





24. Jin R, Shen M, Yu L, Wang X, Lin X. Adipose-derived stem cells suppress inflammation induced by IL-1 $\beta$  through down-regulation of P2X7R mediated by miR-373 in chondrocytes of osteoarthritis. *Molecules and cells*. 2017;40(3):222-9.
25. Fontanils U, Seil M, Pochet S, El Ouailiti M, Garcia-Marcos M, Dehaye J-P, Marino A. Stimulation by P2X7 receptors of calcium-dependent production of reactive oxygen species (ROS) in rat submandibular glands. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2010;1800(11):1183-91.
26. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, Ojcius DM. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(5):2871-9.
27. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F. Purinergic modulation of interleukin-1 $\beta$  release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *Journal of Experimental Medicine*. 1997;185(3):579-82.
28. Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J. Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil Med Res*. 2015; 2:12.
29. An S, Hu H, Li Y, Hu Y. Pyroptosis plays a role in osteoarthritis. *Aging and disease*. 2020;11(5):1146.
30. Kesavardhana S, Malireddi RS, Kanneganti T-D. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis. *Annual review of immunology*. 2020;38(1):567-95.
31. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North R, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*. 1996;272(5262):735-8.
32. Chao CC, Huang CC, Lu DY, Wong KL, Chen YR, Cheng TH, Leung YM. Ca<sup>2+</sup> store depletion and endoplasmic reticulum stress are involved in P2X7 receptor-mediated neurotoxicity in differentiated NG108-15 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012;113(4):1377-85.
33. Li Z, Huang Z, Zhang H, Lu J, Tian Y, Piao S, Lin Z, Ba L. Moderate-intensity exercise alleviates pyroptosis by promoting autophagy in osteoarthritis via the P2X7/AMPK/mTOR axis. *Cell death discovery*. 2021;7(1):346.
34. Borges da Silva H, Beura LK, Wang H, Hanse EA, Gore R, Scott MC, Walsh DA, Block KE, Fonseca R, Yan Y, Hippen KL, Blazar BR, activate membrane proximal kinases in human innate immune cells. *Arthritis Research & Therapy*. 2017;19:1-13.
15. Chen X, Li H, Wang K, Liang X, Wang W, Hu X, Huang Z, Wang. Aerobic exercise ameliorates myocardial inflammation, fibrosis and apoptosis in high-fat-diet rats by inhibiting P2X7 purinergic receptors. *Frontiers in physiology*. 2019;10:1286.
16. Liu HT, Pan SS. Late exercise preconditioning promotes autophagy against exhaustive exercise-induced myocardial injury through the activation of the AMPK-mTOR-Ulk1 pathway. *BioMed research international*. 2019;2019(1):5697380.
17. Yang Y, Wang Y, Kong Y, Zhang X, Zhang H, Feng X, Wang Z, Gao P, Yan M, Bai L, Li F. Moderate Mechanical Stimulation Protects Rats against Osteoarthritis through the Regulation of TRAIL via the NF- $\kappa$ B/NLRP3 Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020(1):6196398.
18. Biemmi V, Milano G, Ciullo A, Cervio E, Burrello J, Dei Cas M, Paroni R, Tallone T, Moccetti T, Pedrazzini G, Longnus S, Vassalli G, Barile L. Inflammatory extracellular vesicles prompt heart dysfunction via TRL4-dependent NF- $\kappa$ B activation. *Theranostics*. 2020;10(6):2773.
19. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of inflammation*. 2014;2014(1):561459.
20. Wang C, Gao Y, Zhang Z, Chen C, Chi Q, Xu K, Yang L. Ursolic acid protects chondrocytes, exhibits anti-inflammatory properties via regulation of the NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome pathway and ameliorates osteoarthritis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;130:110568.
21. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(6):1697.
22. Loeser RF, Collins JA, Dieckman BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016;12(7):412-20.
23. Mobasheri A, Rayman MP, Gualillo O, Sellam J, Van Der Kraan P, Fearon U. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2017;13(5):302-11.



43. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2007;14(6):753-60.
44. Neto WK, Silva WDA, Ciena AP, Anaruma CA, Gama EF. Vertical climbing for rodent resistance training: a discussion about training parameters. *Int J Sports Sci*. 2016;6(1A):36-49.
45. Carr AJ, Robertsson O, Graves S, Price AJ, Arden NK, Judge A, Beard DJ. Knee replacement. *Lancet* 2012; 379:1331-40.
46. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO journal*. 2006;25(21):5071-82.
47. Sasaki H, Takayama K, Matsushita T, Ishida K, Kubo S, Matsumoto T, Fujita N, Oka S, Kurosaka M, Kuroda R. Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;64(6):1920-8.
48. Zheng T, Zhao C, Zhao B, Liu H, Wang S, Wang L, Liu P. Impairment of the autophagy-lysosomal pathway and activation of pyroptosis in macular corneal dystrophy. *Cell death discovery*. 2020;6(1):85.
49. Sekar P, Huang D-Y, Hsieh S-L, Chang S-F, Lin W-W. AMPK-dependent and independent actions of P2X7 in regulation of mitochondrial and lysosomal functions in microglia. *Cell Communication and Signaling*. 2018;16:1-15.
50. Comassi M, Santini E, Rossi C, Vitolo E, Seghieri M, Tocchini L, Franzoni F, Solini A. The level of physical training modulates cytokine levels through P2X7 receptor in healthy subjects. *European journal of clinical investigation*. 2018;48(2):e12880.
51. Xu XY, He XT, Wang J, Li X, Xia Y, Tan YZ, Chen FM. RETRACTED ARTICLE: role of the P2X7 receptor in inflammation-mediated changes in the osteogenesis of periodontal ligament stem cells. *Cell Death & Disease*. 2019;10(1):20.
52. Chen J, Crawford R, Xiao Y. Vertical inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway for the treatment of osteoarthritis. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(2):245-9.
53. Rigoglou S, Papavassiliou AG. The NF- $\kappa$ B signalling pathway in osteoarthritis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(11):2580-4.
- Masopust D, Kelekar A, Vulchanova L, Hogquist KA, Jameson SC. The purinergic receptor P2RX7 directs metabolic fitness of long-lived memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Nature*. 2018;559(7713):264-8.
35. Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death & Differentiation*. 2007;14(9):1583-9.
36. Wang L, Fu H, Nanayakkara G, Li Y, Shao Y, Johnson C, Cheng J, Yang WY, Yang F, Lavalley M, Xu Y, Cheng X, Xi H, Yi J, Yu J, Choi ET, Wang H, Yang X. Novel extracellular and nuclear caspase-1 and inflammasomes propagate inflammation and regulate gene expression: a comprehensive database mining study. *Journal of hematology & oncology*. 2016;9:1-18.
37. Próchnicki T, Vasconcelos MB, Robinson KS, Mangan MS, De Graaf D, Shkarina K, Lovotti M, Standke L, Kaiser R, Stahl R, Duthie FG, Rothe M, Antonova K, Jenster LM, Lau ZH, Rösing S, Mirza N, Gottschild C, Wachten D, Günther C, Kufer TA, Schmidt FI, Zhong FL, Latz E. Mitochondrial damage activates the NLRP10 inflammasome. *Nature immunology*. 2023;24(4):595-603.
38. Chen Y, Ye X, Escames G, Lei W, Zhang X, Li M, Jing T, Yao Y, Qiu ZH, Wang ZH, Acuña-Castroviejo D, Yang Y. The NLRP3 inflammasome: contributions to inflammation-related diseases. *Cellular & molecular biology letters*. 2023;28(1):51.
39. Xiao L, Magupalli VG, Wu H. Cryo-EM structures of the active NLRP3 inflammasome disc. *Nature*. 2023;613(7944):595-600.
40. Inoue M, Shinohara ML. Nlrp3 inflammasome and MS/EAE. *Autoimmune diseases*. 2013;2013(1):859145.
41. McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan M, Arden N, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra S, Hawker GA, Henrotin Y, Kwoh K, Hunter DJ, Kawaguchi H, Lohmander S, Rannou F, Roos EM, Underwood M. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2014;22(3):363-88.
42. Nguyen C, Lefèvre-Colau M-M, Poiraudou S, Rannou F. Rehabilitation (exercise and strength training) and osteoarthritis: A critical narrative review. *Annals of physical and rehabilitation medicine*. 2016;59(3):190-5.



- enhances whole body energy metabolism in mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019;13:390.
64. Nedunchezhiyan U, Varughese I, Sun AR, Wu X, Crawford R, Prasadam I. Obesity, Inflammation, and Immune System in Osteoarthritis. *Front Immunol*. 2022; 13:907750.
  65. Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Arch Med Res*. 2008; 39(8):715–28.
  66. Fang T, Zhou X, Jin M, Nie J, Li X. Molecular Mechanisms of Mechanical Load-Induced Osteoarthritis. *Int Orthop*. 2021; 45(5):1125–36.
  67. Zhu J, Zhu Y, Xiao W, Hu Y, Li Y. Instability and Excessive Mechanical Loading Mediate Subchondral Bone Changes to Induce Osteoarthritis. *Ann Transl Med*. 2020; 8(6):350.
  54. Oliviero F, Ramonda R, Scanu A, Galozzi P, Favero M, Punzi L. Levels of inflammatory cytokines and metalloproteinases are increased in knee synovial fluid of patients with concomitant erosive hand osteoarthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2020;38(4):800-.
  55. Gómez-Piña V, Martínez E, Fernández-Ruiz I, Del Fresno C, Soares-Schanoski A, Jurado T, Siliceo M, Toledano V, Fernandez-Palomares R, Garcia-Rio F, Arnalich F, Biswas SK, Lopez-Collazo E. Role of MMPs in orchestrating inflammatory response in human monocytes via a TREM-1-PI3K-NF-κB pathway. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;91(6):933-45.
  56. Burnstock G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Experimental physiology*. 2014;99(1):16-34.
  57. Bours M, Dagnelie PC, Giuliani AL, Wesselius A, Di Virgilio F. P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011;3(4):1443-56.
  58. Bours M, Swennen E, Di Virgilio F, Cronstein B, Dagnelie P. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;112(2):358-404.
  59. Adinolfi E, Callegari MG, Ferrari D, Bolognesi C, Minelli M, Wieckowski MR, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F. Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(7):3260-72.
  60. Amoroso F, Falzoni S, Adinolfi E, Ferrari D, Di Virgilio F. The P2X7 receptor is a key modulator of aerobic glycolysis. *Cell death & disease*. 2012;3(8):e370-e.
  61. Wilhelm K, Ganesan J, Müller T, Dürr C, Grimm M, Beilhack A, Krempel CD, Sorichter S, Gerlach UV, Juttner E, Zerweck A, Gartner F, Pellegatti P, Di Virgilio F, Ferrari D, Kambham N, Fisch P, Finke J, Idzko M., Zeiser R. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nature medicine*. 2010;16(12):1434-8.
  62. Forrester T. Release of adenosine triphosphate from active skeletal muscle. *J Physiol*. 1966;186(2):107p-9p.
  63. Giacobazzo G, Fabbrizio P, Apolloni S, Coccurello R, Volonté C. Stimulation of P2X7