

Effect of High-Intensity Interval Training and *Lactobacillus Rhamnosus* Probiotic Consumption on TLR4 and MYD88 Expression in Gut Tissue in Animal Model of Non-Alcoholic Fatty Liver

Masoumeh Mazinani ¹, Saeedeh Shadmehri ², Hossein Shirvani ³

1. M.Sc, Department of Physical Education and Sport Science Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre-rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5764-9562

2. Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Science Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre-rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran., (Corresponding Author), Tel: +98-21-55229351, Email: saeedehsh61@gmail.com. ORCID ID: 0000-0002-5000-4427

3. Associate Professor, Exercise Physiology Research Center, Life Style Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran ORCID ID: 0000-0002-0696-958X

ABSTRACT

Background and Aim: The liver is exposed to large amounts of toll-like receptor ligands due to increased bacterial growth and increased intestinal permeability in the patients with fatty liver disease. The aim of this study was to investigate the effect of high-intensity interval training and *Lactobacillus Rhamnosus* probiotic consumption on TLR4 and MYD88 expression in gut tissue in animal model of non-alcoholic fatty liver.

Materials and Methods: In this experimental study, 40 rats (weighing 200-250 gr) were selected and randomly divided into 5 groups including healthy control, fatty liver, fatty liver + HIIT, fatty liver + probiotic and fatty liver + HIIT + probiotic groups. In order to induce fatty liver, oral tetracycline 140 mg/kg/day in 2 ml of water in form of a solution was given to the rats by gavage for 7 days. HIIT exercise program performed on treadmill five sessions per week for 5 weeks. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey post hoc tests.

P < 0.05 was considered significant.

Results: The results showed that TLR4 gene expression was significantly lower in HIIT, probiotic and also HIIT + probiotic groups than in the fatty liver group (P=0.001). Also, the expression of the MYD88 gene in intestinal tissue was significantly lower in HIIT, probiotic and HIIT+ probiotic groups than that in the fatty liver group (P=0.001).

Conclusion: Expression of TLR4 and MYD88 genes in adipose tissue induced by fatty liver, can be reduced by HIIT and probiotic intake. Therefore, these interventions can be considered as a non-pharmacological strategy in the treatment of fatty liver.

Keywords: Exercise, Non-alcoholic fatty liver, Inflammation, Probiotic

Received: Oct 18, 2020

Accepted: Jan 11, 2021

How to cite the article: Masoumeh Mazinani, Saeedeh Shadmehri, Hossein Shirvani. Effect of high-intensity interval training and *Lactobacillus rhamnosus* probiotic consumption on TLR4 and MYD88 expression in gut tissue in animal model of non-alcoholic fatty liver. SJKU. 2021;25(3):13-24.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

تأثیر تمرینات تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس بر بیان ژن های TLR4 و MYD88 بافت روده در مدل حیوانی کبد چرب غیر الکلی

معصومه مزینانی^۱، سعیده شادمهری^۲، حسین شیروانی^۳

۱. کارشناسی ارشد، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. کد ارکید: ۹۵۶۲-۵۷۶۴-۰۰۰۰-۰۰۰۱-۰۰۰۰-۰۰۰۰
۲. استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، پست الکترونیک: saeedehsh61@gmail.com، تلفن ثابت: ۵۵۲۹۳۵۱-۰۲۱، کد ارکید: ۴۴۲۷-۵۰۰۰-۰۰۰۲-۰۰۰۰-۰۰۰۰-۰۰۰۰
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی، پژوهشکده سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران، کد ارکید: ۹۵۸-۰۶۹۶-۰۰۰۲-۰۰۰۰-X

چکیده

زمینه و هدف: کبد به علت افزایش رشد باکتری ها و افزایش نفوذپذیری روده در بیماری کبد چرب در معرض افزایش میزان زیادی از لیگاند های گیرنده های شبه Toll قرار می گیرد. هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر تمرینات تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس بر بیان ژن های TLR4 و MYD88 بافت روده در مدل حیوانی کبد چرب غیر الکلی بود.

مواد و روش ها: در این تحقیق تجربی، تعداد ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم انتخاب و به طور تصادفی در ۵ گروه شامل کنترل سالم، کبد چرب، کبد چرب+HIIT، کبد چرب+پروبیوتیک و کبد چرب+HIIT+پروبیوتیک قرار گرفتند. به منظور القای کبد چرب غیر الکلی در رت، داروی تتراسایکلین خوراکی با دوز ۱۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن (بصورت محلول در ۲ میلی لیتر آب) به مدت ۷ روز به رت ها با روش گاوآژ خورانده شد. برنامه تمرین HIIT پنج جلسه در هفته و به مدت ۵ هفته روی نوارگردان اجرا شد. داده ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی داری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: نتایج نشان داد بیان ژن TLR4 بافت روده در گروه HIIT، پروبیوتیک، HIIT- پروبیوتیک نسبت به گروه کبد چرب به طور معنی داری کمتر بود ($P = 0.001$). همچنین بیان ژن MyD88 بافت روده در گروه HIIT، پروبیوتیک و HIIT- پروبیوتیک نسبت به گروه کبد چرب به طور معنی داری کمتر بود ($P = 0.001$).

نتیجه گیری: به نظر می رسد تمرین تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک می تواند به کاهش بیان ژن TLR4 و MYD88 بافت روده ناشی از کبد چرب منجر شود. بنابراین این مداخلات می تواند به عنوان یک راهبرد غیردارویی در درمان کبد چرب مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: تمرین، کبد چرب غیر الکلی، التهاب، پروبیوتیک

وصول مقاله: ۹۸/۷/۲۷ اصلاحیه: ۹۹/۱۰/۱۱ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۲

مقدمه

بیماری کبد چرب غیر الکلی (Nonalcoholic NAFLD, fatty liver disease) متداول ترین بیماری مزمن کبدی در دنیا است که به عنوان تجمع چربی ها به ویژه تری گلیسیریدها در کبد تعریف می شود (۱). کبد چرب غیر الکلی طیف وسیعی از بیماری ها از استئاتوز (Steatosis) تا استئاتو هپاتیت (Steatohepatitis) غیر الکلی، سیروز (Cirrhosis) و کارسینومای (Carcinoma) کبدی را شامل می شود (۲). بی تحرکی و عادت غذایی نادرست مهم ترین عوامل خطرزای این بیماری هستند (۳). مدلی که بتواند پاتوژنز کبد چرب غیر الکلی را نشان دهد فرضیه دو ضربه ای است که این بیماری بر اثر بروز ضربه ای اول همانند ابتلا به مقاومت انسولینی، چاقی و دیس لیپیدمی ایجاد می شود و بر اثر ضربه های دوم همچون استرس اکسیداتیو، سایتوکین های پیش التهابی و توکسین های باکتریایی روده ای، سلول های کبدی را به سمت بروز التهاب، فیروز و مرگ سلولی پیش می برد (۴).

مطالعات نشان می دهد که کبد به علت افزایش رشد باکتریها و افزایش نفوذ پذیری روده در بیماری کبد چرب در معرض افزایش میزان زیادی از لیگاندهای گیرنده های شبه Toll (Toll receptor, TLR) گرفته است (۵،۶). TLRs یک گروه از پروتئین های گیرنده متصل به غشاء هستند که در پاسخ های ایمنی ذاتی مشارکت دارند (۷). سلول های اپیتلیال روده توانایی بیان چندین نوع TLR از جمله TLR4 را دارند (۸). این سلول ها به عنوان اولین سد دفاعی سیستم ایمنی مخاطی باید بتواند بین ارگانیسم های پاتوژن و غیر پاتوژن تمایز قائل شده و پاسخ مناسبی به این باکتری ها بدهد تا با ایجاد هموستازی در لومن روده از پاسخ های التهابی جلوگیری کند (۹). نقش گیرنده های TLR4 در ایجاد و ابقاء هموستازیس در لومن روده در مطالعات مختلف نشان داده شده است (۱۰-۱۲). در میان گیرنده های شبه تول، TLR4 به دلیل هدایت سیگنالی منحصر به فرد می باشد. این گیرنده قادر است مسیر سیگنالی

MyD88 را القا کند (۱۳). MyD88 اولین پروتئین ضروری در القاء پیام آبشاری TLR است و در بافت میلوئیدی یافت می شود. MyD88 نشان دهنده فعالیت تمایز میلوئیدی و ۸۸ تعداد ژن های القا کننده بیان پروتئین MyD88 است (۱۳). فعال سازی TLR4 سبب تولید IL-12p70 می شود که به طور قابل توجهی پاسخ های ایمنی سلولی و ایمنی هومورال را افزایش می دهد (۱۴). شناخت لیگاندها توسط TLR ها، فعالیت پروتئین های آداپتور مسیر وابسته به MyD88 یا مسیرهای سیگنالینگ پایین دست غیر وابسته به MyD88 (همچون TLR4) را تقویت کرده و باعث واکنش های التهابی می شود (۱۵).

فعالیت ورزشی از طریق اثرات ضد التهابی خود، نتایج سودمندی را در بیماریهای متابولیکی واسطه گری می کند (۱۶). جنبه های مختلفی از فعالیت ورزشی کوتاه مدت و بلند مدت وجود دارد که نشان می دهد تاثیر اصلی ضد التهاب ورزش ممکن است به دلیل تاثیرات روی فعال سازی مسیر TLR باشد (۱۷). تمرینات ورزشی می تواند سطوح در گردش لیگاندهای TLR (که در بیماری های متابولیک افزایش پیدا می کند) را کاهش دهد (۱۸). فعالیت ورزشی، همچنین می تواند بیان و فعال سازی TLR4 را در بافت های مختلف و انواع سلول ها کاهش دهد (۱۹).

از طرفی، برخی از گونه های خاص پروبیوتیک ها با اثر بر ترکیب فلور میکروبی روده و بهبود عملکرد آن، مانع از انتقال اندوتوکسین های باکتریایی به جریان خون شده و با کاهش لیپوبلی ساکاریدها و سایتوکین های پیش التهابی در گردش خون، موجب کاهش التهاب می گردند (۲۰). اثرات درمانی گزارش شده از این میکروارگانیسم ها شامل ایجاد تعادل در فلور میکروبی روده و ارتقاء سیستم ایمنی می باشد (۲۱). پیشنهاد شده است که پروبیوتیک ها در بهبود عوارض متابولیک NAFLD موثر می باشند (۲۲). پروبیوتیک ها عمدتاً پس از ورود به دستگاه گوارش در قسمت انتهایی روده باریک و کلون مستقر می شود (۲۳). این باکتری ها تاثیر مستقیم بر عملکرد و زندگی دیگر میکرو ارگانیسم ها

در روده داشته و عمدتاً سبب تقویت باکتری‌های مفید در روده می‌شوند. متابولیت‌های ناشی از پروبیوتیک‌ها توسط گیرنده‌هایی حساس در سلول ایمنی میزبان نظیر TLRها شناسایی شده و آبخاری در سلول، جهت تنظیم عملکرد ایمنی به راه می‌اندازند (۸).

درک چگونگی تاثیر ورزش بر سیگنالینگ ایمنی و سابقه‌ای که ایجاد می‌کند برای پزشکان بالینی مفید می‌باشد. اخیراً تمرینات اینتروال شدید (HIIT)، که شامل وهله‌های فعالیت ورزشی با شدت بسیار زیاد به همراه استراحت فعال با شدت پایین می‌باشد، مورد توجه محققین قرار گرفته است. این شیوه تمرینی از نظر زمانی، یک روش بسیار کارآمد بوده که موجب سازگاری متابولیکی می‌شود (۲۴). از آنجا که شاخص‌های ایمنی، التهابی تاثیر بسزایی در روند تشکیل بیماری کبد چرب غیرالکلی دارد و همچنین با توجه به اثرات احتمالی تمرینات ورزشی و مصرف پروبیوتیک در جلوگیری و کاهش سرعت پیشروی این بیماری و با توجه به این که بر اساس اطلاعات ما، تحقیقی در این زمینه یافت نشد، لذا به نظر می‌رسد این مطالعه می‌تواند دارای نتایجی باشد که برنامه‌های پیشگیری و درمان بیماری کبد چرب غیرالکلی را به گونه‌ای موثر و کارآمد تحت تاثیر قرار دهد. یافتن مکمل‌های غذایی که به بدن و از جمله بافت روده در مقابله با بیماری کبد چرب کمک نماید از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. بنابراین مطالعه حاضر قصد دارد به بررسی تاثیر تمرینات تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس بر بیان ژن های TLR4 و MYD88 بافت روده در مدل حیوانی کبد غیر الکلی بپردازد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع بنیادی و روش آن تجربی می‌باشد. تحقیق حاضر با تایید کمیته اخلاق در دانشگاه علوم پزشکی

بقیه اله (عج) با کد IR.BMSU.REC.1396.716 تایید و انجام شد. جامعه آماری پژوهش حاضر را موشهای صحرایی نر نژاد ویستار از انیستیتو پاستور تشکیل می‌دهند که از بین آنها ۴۰ سر رت نر ویستار در دامنه وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم به شیوه تصادفی جهت شرکت در مطالعه انتخاب شدند. در ادامه رت‌های نر ویستار مورد مطالعه به طور تصادفی به ۵ گروه هشت تایی شامل گروه کنترل سالم، کبد چرب (استاتوزیس)، کبد چرب (استاتوزیس) + تمرین HIIT، کبد چرب (استاتوزیس) + پروبیوتیک و گروه کبد چرب (استاتوزیس) + تمرین HIIT + پروبیوتیک دسته بندی شدند. رت‌ها در آزمایشگاه پژوهش دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله با درجه حرارت ۲۳-۲۰ درجه سانتی گراد و چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعت و در رطوبت نسبی ۵۰ درصد با آب و غذای استاندارد نگهداری شدند.

ایجاد مدل کبد چرب غیر الکلی:

داروی تتراسایکلین خوراکی با دوز ۱۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن (بصورت محلول در ۲ میلی لیتر آب) به مدت ۷ روز به رت‌ها با روش گاواژ خورانده شد. تایید کبد چرب (استاتوزیس) با اندازه گیری آنزیم های کبدی و رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین بود (۲۵) در مطالعه حاضر افزایش آنزیم های کبدی در گروه های کبد چرب مشاهده شد. بررسی در یک بازه زمانی مناسب، تشابهات عوارض در حیوانات با انسان ها و همچنین امکان کنترل شرایط آزمایش از مزیت های استفاده از این مدل ایجاد کبد چرب می باشد. برای تهیه سرم، نمونه های خونی در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور rpm 5000 به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سنجش آنزیم های کبدی شامل: AST و ALT به وسیله کیت های تشخیصی شرکت پارس آزمون و با استفاده از پروتکل های مربوطه انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱. سطوح سرمی آنزیم های کبدی در گروه های مختلف. در هر گروه مقادیر میانگین \pm انحراف معیار فعالیت آنزیمی از سنجش تعداد ۸ نمونه محاسبه شده است. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری آماری در نظر گرفته شده است.

گروه	کنترل سالم	کبد چرب	پروبیوتیک	HIIT	+ HIIT پروبیوتیک
AST (U/ml)	۱۱۳/۱۲ \pm ۴۵/۴۱	۳۴۱/۳۵ \pm ۱۰/۲۱*	۱۳۲/۱۷ \pm ۱۲/۶	۱۴۲/۱۹ \pm ۲۳/۱۵	۱۴۵/۲۰ \pm ۲۸/۱۲
ALT (U/ml)	۸۷/۹ \pm ۵۱/۴۵	۲۲۰/۲۷ \pm ۸۲/۸۰*	۹۳/۱۳ \pm ۵۵/۴۱	۹۵/۱۴ \pm ۱۶/۱۸	۹۲/۸ \pm ۸۱/۷۵

کشت باکتری و نحوه مصرف پروبیوتیک:

لاکتوباسیلوس رامنسوس GG (PTCC1637) به صورت لیوفلیزه در ویال های استاندارد از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (تهران، ایران) خریداری شد. باکتری ها در محیط کشت زیستی گویا، تهران، ایران (Man MRS Rogosa Sharp, غنی شده با L-سیستین HCL (-) cystein HCL culture medium) کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می شوند. جهت بررسی تاثیر مصرف پروبیوتیک ها گروه های مربوطه به مدت ۵ هفته و ۵ روز در هفته روزانه CFU/ml ۱۰^۹ از باکتری لاکتوباسیلوس رامنسوس GG به صورت گاواژ دریافت کردند (۲۶).

پروتکل تمرین تناوبی شدید:

در ابتدا رت ها به مدت یک هفته ۳ تا ۵ جلسه در هفته به منظور آشنایی با تمرین اصلی با سرعت ۷ تا ۱۰ متر بر دقیقه و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه روی تردمیل قرار گرفتند و وادار به فعالیت شدند، سپس برنامه تمرین تناوبی شدید (۵ جلسه در هفته) و به مدت ۵ هفته دویدن روی تردمیل و بر اساس اصول کلی HIIT اجرا شد (۲۶). در این پروتکل برنامه تمرین HIIT شامل مراحل گرم و سرد کردن به مدت ۴ تا ۸ دقیقه با شدت ۴۰ درصد حداکثر دویدن بود. پروتکل اجرای وهله های تمرینی در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲. برنامه تمرین تناوبی شدید

هفته	سرعت گرم کردن (متر بر دقیقه)	تعداد تناوب سریع	سرعت تناوب سریع (متر بر دقیقه)	تعداد تناوب آهسته	سرعت تناوب آهسته (متر بر دقیقه)
اول	۴	۵ تناوب ۲ دقیقه ای	۱۶-۲۰	۵ تناوب ۱ دقیقه ای	۱۰
دوم	۵	۵ تناوب ۲ دقیقه ای	۲۱-۲۵	۵ تناوب ۱ دقیقه ای	۱۱
سوم	۶	۵ تناوب ۲ دقیقه ای	۲۶-۳۰	۵ تناوب ۱ دقیقه ای	۱۲
چهارم	۷	۵ تناوب ۲ دقیقه ای	۳۱-۳۵	۵ تناوب ۱ دقیقه ای	۱۳
پنجم	۸	۵ تناوب ۲ دقیقه ای	۳۶-۴۰	۵ تناوب ۱ دقیقه ای	۱۴

نمونه گیری بافت و اندازه گیری متغیرهای آزمایشگاهی:

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی (۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتا)، رت های مورد مطالعه در هر گروه به واسطه تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین ۱۰ درصد و با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۲ درصد و با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند. سپس بافت روده رت ها نمونه

برداری شده و پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوب های ۱/۸ حاوی مایع RNA later™ (RNA Stabilization reagent 50 mL) با نسبت ۲۰ درصد غوطه ور گردیده و جهت انجام آزمایش های ژنتیک به آزمایشگاه انتقال داده شد. RNA total بافت روده پس از گذشت زمان گرمخانه گذاری (در حضور ۵٪ CO₂ و فشار

(Sequence Detection Systems. Foster City, CA) ABI Step One طبق پروتکل شرکت سازنده اندازه گیری انجام گرفت (۲۷). بیان ژن عوامل موردنظر از بافت احشایی پس از کمی سازی مقادیر بیان ژن با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تجزیه و تحلیل شد. در ضمن در این مطالعه از ژن GAPDH به عنوان ژن پایه و کنترل استفاد گردید. واکنش PCR با توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۳ ذکر شده است.

۹۵٪ اتمسفر) برای سنجش کمی میزان بیان ژن TLR4 و MYD88 با استفاده از کیت ستونی استخراج RNA استخراج شده و پس از آن با استفاده از کیت سنتز (Complementary DNA, CDNA) به CDNA تبدیل شده و در نهایت ژنهای یادشده برای quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) (Applied Biosystems) و PCR master mix (Applied Biosystems) و SYBR Green (Applied Biosystems) در دستگاه (Applied Biosystems) استفاده شد.

جدول ۳. توالی پرایمرهای مورد استفاده متغیرهای مورد مطالعه

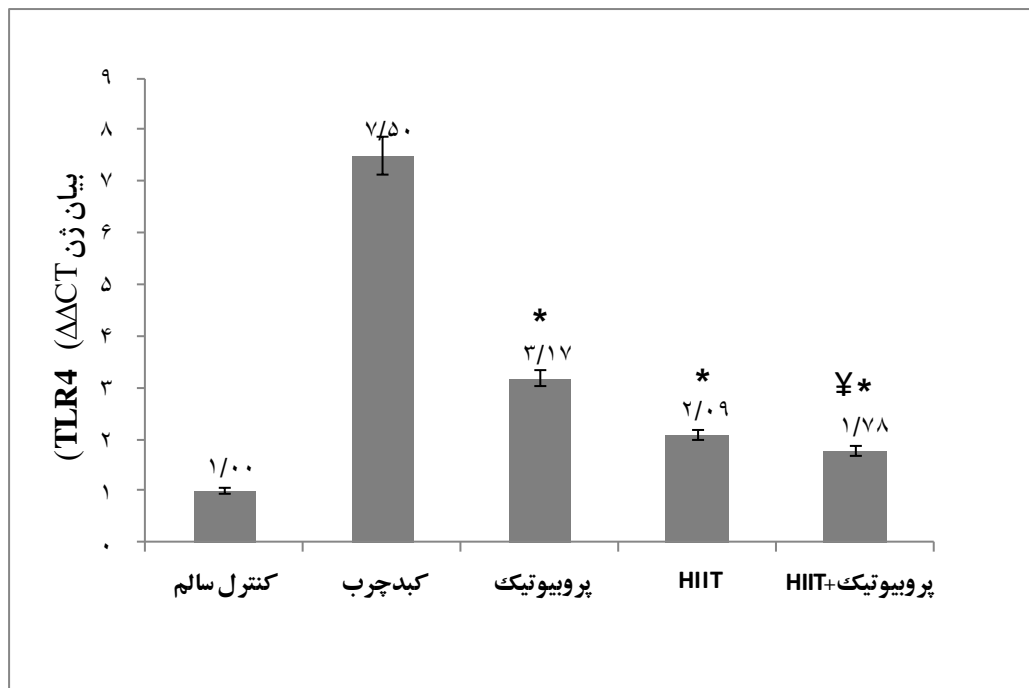
نام ژن	پرایمرها	توالی	طول amplicon
TLR4	Forward	TATCGGTGGTCAGTGTGCTT	104 bp
	Reverse	CTCGTTTCTCACCCAGTCCT	
MYD88	Forward	AAATTGTGTGTGTCGACCG	123 bp
	Reverse	AGAAACAACCACCACCATGC	
GAPDH	Forward	CAAGTTCAAGGGCACAGTCA	104 bp
	Reverse	CCCCATTGTGTTAGCGGG	

های مختلف تحقیق، تفاوت وجود دارد ($P=0/000$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بیان ژن TLR4 بافت روده در گروه HIIT، پروبیوتیک، HIIT + پروبیوتیک نسبت به گروه کبد چرب به طور معنی داری کمتر بود ($P=0/001$). همچنین بیان ژن TLR4 بافت روده در گروه HIIT + پروبیوتیک نسبت به گروه پروبیوتیک به طور معنی داری کمتر بود ($P=0/001$)، اما بیان ژن TLR4 بافت روده در گروه HIIT نسبت به گروه HIIT + پروبیوتیک تفاوت معنی داری وجود نداشت ($P=0/92$) (نمودار ۱).

تجزیه و تحلیل آماری: پس از اینکه نرمال بودن داده ها با آزمون شاپیرو ویلک تأیید شد، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه برای تغییرات بین گروهی و آزمون تعقیبی توکی برای بررسی تفاوت بین گروه ها استفاده شد. تمام عملیات آماری پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد و سطح معنی داری $P<0.05$ در نظر گرفته شده است.

یافته ها

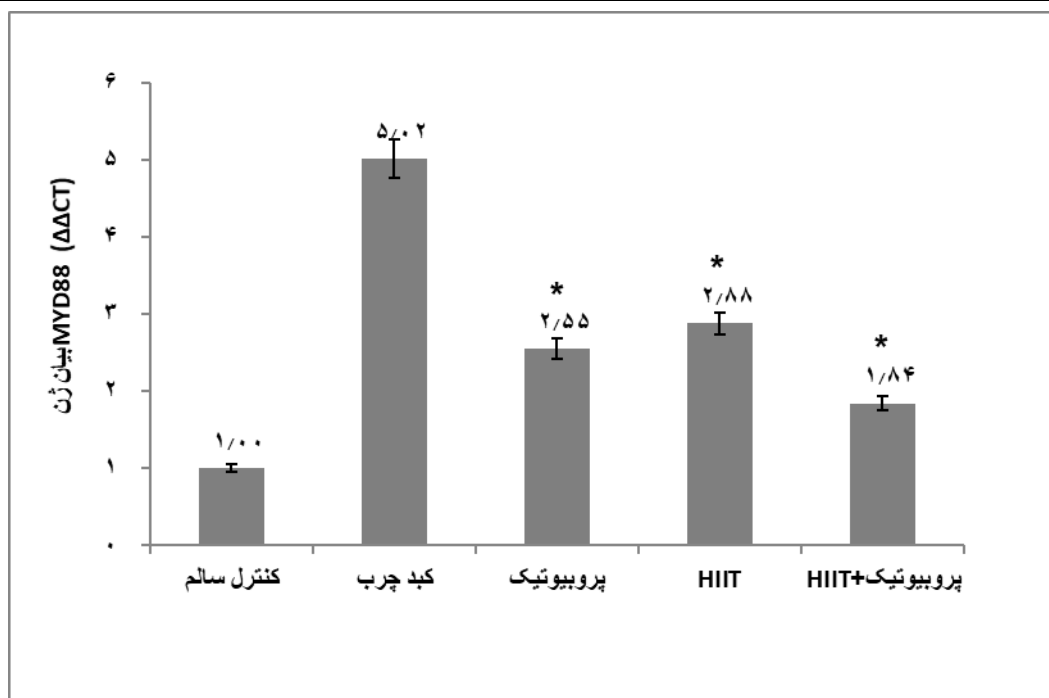
تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که بین میانگین بیان ژن TLR4 بافت روده در مدل حیوانی استئاتوزیس در گروه



نمودار ۱. میانگین تغییرات بیان ژن TLR4 بافت روده در گروه های مختلف؛ داده ها بر اساس نتایج GAPDH نرمالیزه شده است. کنترل سالم (۸ سر رت)، کبد چرب، پروبیوتیک (۸ سر رت)، HIIT؛ تمرین تناوبی با شدت بالا (۸ سر رت)، پروبیوتیک + HIIT؛ پروبیوتیک + تمرین تناوبی با شدت بالا (۸ سر رت). مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری آماری در نظر گرفته شده است. * نشان دهنده میزان $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کبد چرب؛ † نشان دهنده میزان $P < 0.05$ در مقایسه با گروه پروبیوتیک.

داری کمتر بود ($P=0/001$). بیان ژن MyD88 بافت روده در گروه پروبیوتیک، گروه HIIT و گروه HIIT + پروبیوتیک تفاوت معنی داری نداشت (نمودار ۲).

تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که بین میانگین بیان ژن MYD88 بافت روده در مدل حیوانی استئاتوزیس در گروه های مختلف تحقیق، تفاوت وجود دارد ($P=0/001$). بیان ژن MyD88 بافت روده در گروه HIIT، پروبیوتیک و HIIT + پروبیوتیک نسبت به گروه کبد چرب به طور معنی



نمودار ۲- میانگین بیان ژن MYD88 بافت روده در گروه های مختلف؛ داده ها بر اساس نتایج GAPDH نرمالیزه شده است. کنترل سالم (۸ سر رت)، کبد چرب، پروبیوتیک (۸ سر رت)، HIIT؛ تمرین تناوبی با شدت بالا (۸ سر رت)، پروبیوتیک + HIIT؛ پروبیوتیک + تمرین تناوبی با شدت بالا (۸ سر رت). * نشان دهنده میزان $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کبد چرب.

بحث

یافته های تحقیق حاضر نشان می دهد که کبد چرب با افزایش بیان ژن TLR4 و MYD88 همراه بود. تمرین تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک موجب کاهش بیان TLR4 و MYD88 در موش های با کبد چرب شد. برخی مطالعات اخیر نشان داده اند که تمرینات ورزشی بیان گیرنده های شبه تول و MYD88 را کاهش می دهند (۱۹، ۱۰، ۷)، که با یافته ها تحقیق حاضر همسو می باشند. فعالیت های ورزشی شدید باعث تغییرات اساسی در زیرگروه های منوسیت خون شده و بیان سطح سلولی گیرنده های آنها مثل TLR ها را تغییر می دهند. فعالیت ورزشی شدید ترجیحاً باعث فراخوانی منوسیت های پیش التهابی شده و نسبت منوسیت های پیش التهابی به منوسیت های کلاسیک را افزایش می دهد (۲۸). مکانیسم های فیزیولوژیکی دقیق این تغییرات هنوز شناخته نشده اند. با این حال، به نظر می رسد که فعالیت های ورزشی از طریق افزایش سطوح سایتوکین های ضد التهابی، پروتئین های

شوگ گرمایی و گلوکوکورتیکوئید می تواند منجر به مهار TLR4 گردد (۲۹). TLR4 به عنوان القاء کننده انتشار سایتوکین ها شناخته شده است (۱۵). به نظر می رسد که بیان TLR4 توسط سایتوکین های ضد التهابی IL-4 و IL-10 تعدیل می شود (۱۹). بنابراین ممکن است که افزایش بیان سایتوکین های ضد التهابی ناشی از تمرین عامل مهار TLR4 باشد. همچنین هورمون های استرس، همانند گلوکوکورتیکوئیدها نقش مهمی در تعدیل و تنظیم سیستم ایمنی مرتبط با ورزش ایفا می کنند (۳۰). کبد چرب باعث کاهش سطوح HSP ها می گردد (۱۵). کاهش سطوح HSP ها باعث افزایش فعال شدن سایتوکین های التهابی می شود (۳۱). فعالیت های ورزشی باعث افزایش سطح HSP و منجر به مهار فعال سازی P38MAPK می شود (۳۱). بنابراین به نظر می رسد که فعالیت های ورزشی از طریق افزایش سطوح پروتئین های شوگ گرمایی باعث مهار گیرنده TLR4 و کاهش سطوح سایتوکین های التهابی شود. سیگنالینگ

وابسته به MyD88 نیز برای تمام TLRها بجز TLR3 رایج است. این امر شامل مرحله اولیه فعالسازی κ B-NF از طریق مسیر کیناز مربوط به R-IL-IR IRAK است (۱۰). سیگنالینگ غیروابسته به MyD88 از طریق TRIF صورت گرفته و توسط TLR4 و TLR3 مورد استفاده قرار می گیرد. شناخت لیگاندها توسط TLRها، فعالیت پروتئینهای آداپتور مسیر وابسته به MyD88 یا مسیرهای سیگنالینگ پایین دست غیروابسته به MyD8 و TLR4 را تقویت کرده و باعث واکنش های التهابی می شود (۱۰). TLR4 به لیگاندهایی مانند پلی ساکارید چرب (LPS) واکنش نشان داده و پاسخ خود را از طریق تشکیل کمپلکسی با میلوئید افتراقی فاکتور ۲ (MD-2) آغاز می کند که باعث فعالسازی آبشارهای وابسته و غیر وابسته به MyD88 می گردد (۱۳). با این حال یافته های تحقیق حاضر با نتایج برخی مطالعات همخوان نمی باشد. Marta و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه ای به بررسی اثرات تمرین تناوبی شدید بر سطح بیان TLR4 در افراد با شاخص توده بدنی بالا پرداختند و به این نتیجه رسیدند که ۲ هفته تمرین تناوبی شدید (سه جلسه در هفته) باعث افزایش معنی دار بیان TLR4 در منوسیت های کلاسیک و پیش التهابی در مردان غیر فعال با شاخص توده بدنی بالا شده است. تناقض با یافته های فوق ممکن است به عواملی مانند کم بودن مدت تمرین در هر جلسه و یا دوره تمرینی مربوط باشد.

در تحقیق حاضر تمرین تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک به تعدیل بیان ژن های درگیر در سیستم ایمنی ذاتی بافت روده ناشی از کبد چرب منجر شد. تعدیل پاسخ ایمنی می-تواند به علت تاثیر این پروبیوتیکها روی ترشح بعضی سایتوکین ها و بیان ژن های دخیل در ایمنی ذاتی باشد. نوع اثر پروبیوتیک، به تولید متابولیت بیوشیمیایی آنها یا مولکولهای موجود بر سطح این میکروارگانیسم ها یا اجزای مترشحه از آنها بستگی دارد. بنابراین اثرات پروبیوتیکها را به محصولات حاصل از تخمیر میکروارگانیسم ها مانند پپتیدها و پلی ساکاریدهای خارج سلولی تولید شده در طی

تخمیر آنها و ترکیبات دیواره سلولی و پپتیدوگلیکان و هر بخشی از باکتری حتی DNA نسبت می دهند (۸). مکانیسم اثر بیوتیک ها از سه طریق ذکر شده است که شامل: ۱- تاثیرات آنتی میکروبی مستقیم ۲- تقویت تمامیت سد دفاعی مخاطی ۳- تغییرات مطلوب در سیستم ایمنی بدن می باشد (۲۰). از سوی دیگر مشخص شده که فلور میکروبی روده، تحت تاثیر رژیم غذایی است. نشان داده شده است که تجویز پروبیوتیکها از طریق دستکاری در فلور میکروبی روده التهاب درجه پایین روده ای را کاهش داده و تمامیت سد روده ای را ارتقا می بخشد. بر همین اساس نقش پروبیوتیکها در بهبود وضعیت متابولیک و ارتقای کاهش وزن توجیه می گردد (۳۲). متابولیت های ناشی از پروبیوتیکها توسط گیرنده هایی حساس در سلول ایمنی میزبان نظیر TLRها شناسایی شده و آبشاری در سلول، جهت تنظیم عملکرد ایمنی به راه می اندازند. بنابراین هم سلولهای اپیتلیال در روده و هم سلولهای سیستم ایمنی اطراف دستگاه گوارش عوامل هدف این سلولها هستند (۳۳). برخی مطالعات کاهش مسیر سیگنالینگ TLR4 و MyD88 را نشان داده اند که با یافته های تحقیق حاضر همخوان می باشند (۳۳-۳۵). در مطالعه ای که توسط فیماور و همکاران (۲۰۱۴) انجام گرفت، آنها سلول های Caco-2 را با لاکتوباسیلوس رامنوس تحت درمان قرار دادند و تاثیر آنرا روی مسیر سیگنالینگ TLR4 مورد بررسی قرار دادند. آنالیز حاصل از وسترن بلات نشان داد که لاکتوباسیلوس رامنوس فعالیت مسیرهای مختلف سیگنالینگ TLR4 را در سلول های Caco-2 سرکوب می کند (۳۳). کاستیلو و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان دادند درمان با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازایی به موش سالم، بیان ژن TLR4 را کاهش می دهد (۳۴). ژن TLR4 همانطور که گفته شد خانواده PRRها و مسیر سیگنالینگ MyD88 ژن های درگیر در سیستم ایمنی ذاتی می باشند و این بدین معناست که پروبیوتیک کارایی سیستم ایمنی ذاتی را تقویت می کند تا قدرت مقابله بدن بر علیه عامل عفونی وارد شده افزایش

یابد. در مجموع مطالعات به نقش مثبت تجویز پروبیوتیک در بهبود سیستم ایمنی تاکید دارند با این حال با توجه به مطالعات اندک انجام شده در این رابطه، تحقیق روی اثر فعالیت ورزشی و مصرف پروبیوتیک بر عوامل درگیر در سیستم ایمنی ذاتی بافت روده ناشی از کبد چرب نیاز به مطالعات بیشتری دارد. در مطالعه حاضر سطوح سایتوکین-های ضد التهابی، پروتئین های شوک گرمایی و گلوکوکورتیکوئید اندازه گیری نشده است که از جمله محدودیت های تحقیق حاضر می باشد. در نهایت، با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می شود که در تحقیقی مشابه تاثیر مهارکننده ها و تحریک کننده های بیان ژن TLR4 و MYD88 نیز مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج، بیماری کبد چرب غیرالکلی در رت ها با افزایش سطوح بیان ژن TLR4 و MYD88 بافت روده همراه است. تمرین تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک می-

تواند به کاهش بیان ژن TLR4 و MYD88 بافت روده ناشی از کبد چرب منجر شود. بنابراین به نظر می رسد تمرین تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک با قابلیت مقابله با عوامل التهابی می توانند به عنوان یک روش درمانی در شرایط بیماری کبد چرب غیرالکلی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق برگرفته از پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری می باشد که با همکاری آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج) انجام شد. بدینوسیله نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری و پرسنل مرکز حیوانات علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، اعلام می دارند.

منابع

- 1.Ferolla SM, Ferrari TC, Lima ML, Reis TO, Tavares-Jr WC, Couto OF, et al. Dietary patterns in Brazilian patients with nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. Clinics (Sao Paulo). 2013;68(1):11-7.
- 2.Martin-Dominguez V, Gonzalez-Casas R, MendozaJimenez-Ridruejo J, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Pathogenesis, diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. Rev Esp Enferm Dig. 2013;105(7):409-20.
- 3.Hashimoto E, Tokushige K. Prevalence, gender, ethnic variations, and prognosis of NASH. J Gastroenterol. 2011;46(1):63-9.
- 4.Oddy WH, Herbison CE, Jacoby P, Ambrosini GL, O'Sullivan TA, Ayonrinde OT, et al. The Western dietary pattern is prospectively associated with nonalcoholic fatty liver disease in adolescence. Am J Gastroenterol. 2013;108(5):778-85.
- 5.Bonora E, Targher G. Increased risk of cardiovascular disease and chronic kidney disease in NAFLD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012;9(7):372-81.
- 6.Kaser S, Ebenbichler C, Tilg H. Pharmacological and nonpharmacological treatment of nonalcoholic fatty liver disease. Int J Clin Pract. 2010;64(7):968-83.
- 7.Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, Ropelle ER, Pauli JR, Bagarolli RA, et al. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. Diabetes. 2011;60(3):784-96.

- 8.Nandakumar N, Pugazhendhi S, Ramakrishna B. Effects of enteropathogenic bacteria & lactobacilli on chemokine secretion & Toll like receptor gene expression in two human colonic epithelial cell lines. *Indian J Med Res.* 2009;130(2):170-8.
- 9.Child M, Leggate M, Gleeson M. Effects of two weeks of high-intensity interval training (HIIT) on monocyte TLR2 and TLR4 expression in high BMI sedentary men. *IJES.* 2013;6(1):81-90.
- 10.Ma Y, He M, Qiang L. Exercise therapy downregulates the overexpression of TLR4, TLR2, MyD88 and NF- κ B after cerebral ischemia in rats. *Int J Mol Sci.* 2013;14(2):3718-33.
- 11.Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol.* 2002;168:554-61.
- 12.Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001;413:732-8.
- 13.Larsson E, Tremaroli V, Lee YS, Koren O, Nookaew I, Fricker A, et al. Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut.* 2012;61(8):1124-1131.
- 14.Ve T, Williams SJ, Kobe B. Structure and function of Toll / interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains. *Apoptosis.* 2015;20:250-61.
- 15.Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;388:621-5.
- 16.Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* 2009;458:1191-5.
- 17.Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.
- 18.Jackson DC, Lau YF, Le T, Suhrbier A, Deliyannis G, Cheers C, et al. A totally synthetic vaccine of generic structure that targets Toll-like receptor 2 on dendritic cells and promotes antibody or cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101:15440-5.
- 19.Fernandez-Gonzalo R, De Paz JA, RodriguezMiguel P, Cuevas MJ, Gonzalez-Gallego J. TLR4- mediated blunting of inflammatory responses to eccentric exercise in young women. *Mediators Inflamm.* 2014;1-11.
- 20.Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, et al. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol.* 2001;166:2444- 50.
- 21.Pischon T, Hankinson SE, Hotamisligil GS, Rifai N, Rimm EB. Leisuretime physical activity and reduced plasma levels of obesityrelated inflammatory markers. *Obes Res.* 2003;11(9):1055-64.
- 22.Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation.* 2002;105(7):804-9.
- 23.Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 2007;13:460-9.
- 24.Batacan RB, Duncan MJ, Dalbo VJ, Tucker PS, Fenning AS. Effects of high-intensity interval training on cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. *Br J Sports Med.* 2017;51:494–503.
- 25.Shabana MB, Ibrahim HM, Khadre SE, Elemam MG. Influence of rifampicin and tetracycline administration on some biochemical and histological parameters in albino rats. *JOBAS.* 2012;65(5):299-308.

26. Kalaki-Jouybari F, Shanaki M, Delfan M, Gorgani-Firouzjae S, Khakdan S. High-intensity interval training (HIIT) alleviated NAFLD feature via miR-122 induction in liver of high-fat high-fructose diet induced diabetic rats. *Arch Physiol Biochem*. 2018;3:1-8.
27. Shafie A, Moradi F, Izadpanah E, Mokarizadeh A, Moloudi MR, Nikzaban M, et al. Neuroprotection of donepezil against morphine-induced apoptosis is mediated through Toll-like receptors. *Eur J Pharmacol*. 2015;764:292-297.
28. Carpenter KC, Strohacker K, Breslin WL, Lowder TW, Agha NH, McFarlin BK. Effects of exercise on weight loss and monocytes in obese mice. *Comp Med*. 2012;62(1):21-6.
29. Wu XD, Zeng K, Liu WL, Gao YG, Gong CS, Zhang CX, et al. Effect of aerobic exercise on miRNA-TLR4 signaling in atherosclerosis. *Int J Sports Med*. 2014;35(4):344-50.
30. Rosa JC, Lira FS, Eguchi R, Pimentel GD, Venancio DP, Cunha CA, et al. Exhaustive exercise increases inflammatory response via Toll like receptor-4 and NF-kappaBp65 pathway in rat adipose tissue. *J Cell Physiol*. 2011;226(6):1604-7.
31. Rodriguez-Miguel P, Fernandez-Gonzalo R, Almar M, Mejías Y, Rivas A, de Paz JA, Cuevas MJ, González-Gallego J. Role of Toll-like receptor 2 and 4 signaling pathways on the inflammatory response to resistance training in elderly subjects. *Age (Dordr)*. 2014;36(6):9734.
32. Ganguli K, Collado MC, Rautava J, Lu L, Satokari R, von Ossowski I, et al. Lactobacillus rhamnosus GG and its SpaC pilus adhesin modulate inflammatory responsiveness and TLR-related gene expression in the fetal human gut. *Pediatr Res*. 2015;77(4):528-35.
33. Finamore A, Roselli M, Imbinto A, Seeboth J, Oswald IP, Mengheri E. Lactobacillus amylovorus inhibits the TLR4 inflammatory signaling triggered by enterotoxigenic Escherichia coli via modulation of the negative regulators and involvement of TLR2 in intestinal Caco-2 cells and pig explants. *PLoS One*. 2014;9(4):e94891.
34. Castillo NA, Perdigon G, de Moreno de LeBlanc, A. Oral administration of a probiotic Lactobacillus modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol*. 2011;3(11):177-186.
35. Soltan Dallal MM, Moshiri M, Mirshafiey A, Douraghi M, Rezaie F, Gholami M. Evaluation of the effect of probiotic bacteria Lactobacillus acidophilus PTCC1643 and Lactobacillus casei PTCC 1608 on the TLR2 and TLR4 expression in HT29 cells infected with Salmonella enteritidis. *Tehran Univ Med J*. 2019;76(11):724-730.