

Research Paper

The Effects of High-intensity Interval Training and Probiotic Consumption on Interleukin-10 and Interferon-gamma Gene Expression of Gut Tissue in an Animal Model of Fatty Liver



Sharmin Rasheh¹ , *Mozhgan Ahmadi¹

1. Department of Physical Education and Sport Science, Faculty of Human Sciences, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre-rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.



Citation Rasheh Sh, Ahmadi M. [The Effects of High-intensity Interval Training and Probiotic Consumption on Interleukin-10 and Interferon-gamma Gene Expression of Gut Tissue in an Animal Model of Fatty Liver (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2021; 27(3):342-357. <https://doi.org/10.32598/hms.27.3.3067.2>

<https://doi.org/10.32598/hms.27.3.3067.2>



Received: 16 Nov 2019

Accepted: 01 Mar 2021

Available Online: 01 Jul 2021

Key words:

Fatty liver, High-Intensity Interval Training (HIIT), Probiotics, Interleukin-10, Interferon-gamma

ABSTRACT

Aims Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease, often reported in patients with inflammatory bowel disease. This study aimed to investigate the effects of High-Intensity Interval Training (HIIT) and probiotic use on the expression of interleukin-10 and interferon-gamma genes in intestinal tissue in an animal model of fatty liver.

Methods & Materials In this experimental study, 40 male Wistar rats (weighing 200-250 g) were selected. The study rats were randomly divided into 5 groups, including healthy control, fatty liver, fatty liver + HIIT, fatty liver + probiotic, and fatty liver + HIIT + Probiotics. Oral tetracycline was administered at a dose of 140 mg/kg of body weight (as a solution in 2 mL of water) for 7 days with fatty liver. HIIT was performed on tape 5 times a week for 5 weeks. The obtained data were analyzed using One-way Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test at the significant level of $P < 0.05$.

Findings The present research results suggested that the expression of interleukin-10 and interferon-gamma genes in the intestinal tissue of steatosis mice in the fatty liver group was significantly higher than in the healthy control group ($P = 0.001$). HIIT and probiotic use significantly reduced the expression of interleukin-10 and interferon-gamma genes in the intestinal tissue, compared to the fatty liver group ($P = 0.001$).

Conclusion According to the obtained data, HIIT and probiotic consumption can help modulate the expression of genes involved in the innate immune system of intestinal tissue caused by fatty liver.

Extended Abstract

1. Introduction

N

on-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is currently the most common chronic liver disease that occurs in all age groups; this condition affects 17%-46% of the general population. NAFLD

is a serious and growing clinical problem due to the prevalence of obesity and overweight [1, 2]. The first damage to the liver is the accumulation of fat in the liver cells (steatosis), i.e., associated with the development of inflammation, leading to cirrhosis [3]. NAFLD is detected in 33.6% of patients with inflammatory bowel disease, often in the absence of metabolic risk factors [4]. Besides, in patients with severe intestinal inflammation, often steatosis has been reported on ultrasound [5].

* Corresponding Author:

Mozhgan Ahmadi, PhD.

Address: Department of Physical Education and Sport Science, Faculty of Human Sciences, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre-rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Tel: +98 (912) 4476623

E-mail: mahmadi1376@gmail.com

Studies revealed that intestinal inflammation is associated with increased anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines in fatty liver disease [8-6]. Interleukin-10²(IL-10) is considered an anti-inflammatory cytokine that regulates inflammation in several organs and tissues under pathophysiological conditions [9]. IL-10 can significantly inhibit gene expression and the synthesis of proinflammatory cytokines [10]. IL-10, as a critical anti-inflammatory cytokine in immune responses, also presents a physiological effect on systemic inflammatory responses [11]. Furthermore, Interferon-Gamma (IFN- γ)³ exhibits anti-proliferative, immune, and pro-inflammatory activities; therefore, it is essential in immune-related mechanisms [12, 13]. IFN- γ also increases donor T cells and may be required for donor T cell differentiation. IFN- γ receptor is structurally related to the IL-10 receptor in the intestinal epithelium [14].

Limited pharmacotherapies have been proposed for fatty liver. Considering adverse effects, progressive weight gain and high cost, their continuous and regular use is not recommended. The standard treatment recommended for fatty liver consists of lifestyle modification, including diet modification and exercise [15]. Physical activity has been demonstrated to reduce the pathogenesis of NAFLD. Besides, aerobic exercise with and without weight loss reduces liver fat content and improves metabolic function in obese individuals, indicating the treatment or prevention of fatty liver disease [16]. Additionally, exercise, through its anti-inflammatory effects, plays beneficial roles in metabolic diseases [17]. There is conflicting information about the role of exercise in IL-10 as an inflammatory adipokine and its mechanism of action. In some studies, an increase in IL-10 levels has been reported after exercise [18, 19]; however, in some other studies, no significant change has been observed in IL-10 and IFN- γ levels after a training period [20-22].

Studies considered using probiotics in treating fatty liver [23, 24]. In a study by Endo et al. (2013) in rats, probiotic administration could significantly stop or slow the progression of fatty liver [25]. Probiotics are living microorganisms with beneficial effects on the host body by improving the body's microbial balance [26]. Among these beneficial effects on human health are the following: Provide an environment to prevent the growth of pathogens, strengthen the immune system, affect the flora of the intestinal tract, reduce and prevent intestinal tract infections, promote health, and regulate bowel movements. The mechanism of action of probiotics has been mentioned in 3 ways, including direct antimicrobial effects, strengthening the integrity of the mucosal defense barrier, and optimal changes in the immune system [28]. Numerous studies have reported the positive effects of exercise programs on the fatty liver; the type, intensity, and volume of exercise to recommend to

patients with fatty liver remain unaddressed. Most studies have used conventional training methods, such as low to medium-intensity continuous training [16]. Few studies have examined the effects of other training, like High-Intensity Interval Training (HIIT). HIIT seems to present more beneficial effects on fatty liver treatment, compared to moderate and low-intensity exercises [29]. Compared to moderate physical activity, NAFLD patients who participated in strenuous activity presented a lower prevalence of liver fibrosis examined by biopsy, indicating the crucial role of strenuous physical activity [16]. There exists a wide prevalence of the fatty liver disease. It has interactions with inflammatory indicators. Thus, it is important to pay attention to the role of lifestyle changes, especially new methods of physical activity, and identifying different aspects of the treatment mechanism for this disease. Accordingly, we could choose the most effective intervention in this respect. Therefore, the present study intended to investigate the effects of intense HIIT and probiotic use on the expression of interleukin-10 and interferon-gamma genes in intestinal tissue in an animal model of fatty liver.

2. Materials and Methods

This was a fundamental and experimental study. The statistical population of this study consisted of all male Wistar rats of Pasteur Institute; from which, 40 male Wistar rats in the weight range of 200-200 g were randomly selected to participate in the study. The selected male Wistar rats were randomly divided into 5 groups of 8 subjects, including the healthy control group, fatty liver (steatosis), fatty liver (steatosis) + HIIT exercise, fatty liver (steatosis) + probiotics, and fatty liver group (steatosis) + HIIT Exercise + Probiotics. The study rats were kept in the research laboratory of Baqiyatallah University of Medical Sciences at a temperature of 20-23°C and a 12:12 light-dark cycle and relative humidity of 50% with standard access to water and food.

Oral tetracycline at a dose of 140 mg/kg of body weight (dissolved in 2 mL of water) was fed to the examined rats by gavage for 7 days. The confirmation of fatty liver (steatosis) was established by measuring liver enzymes [30]. In the present study, an increase in liver enzymes was observed in the fatty liver groups. The advantages of using this model of fatty liver development include exploring the similarities of complications in animals with humans in a suitable time, as well as the possibility of controlling the test conditions. To prepare the serum, the obtained blood samples were centrifuged at 4°C and 5000 rpm for 10 minutes. Liver enzymes, including AST and ALT, were measured by Pars Azmoun diagnostic kits per the relevant protocols (Table 1).

Lactobacillus ramensis GG (PTCC1637) was obtained as lyophilized in standard vials from the Scientific and Industrial Research Organization of Iran (Tehran, Iran). Bacteria were cultured in MRS medium (Biogeya, Tehran, Iran), enriched with L-cysteine² HCL, and incubated for 24 hours in an incubator at 37°C. To evaluate the effects of probiotics, the relevant groups received 10⁹ CFU/mL of *Lactobacillus ramensis* GG by gavage daily for 5 weeks and 5 days a week (there was no difference between the sample rats respecting receiving this substance) [31].

Initially, the examined rats were placed on a treadmill for 5-10 minutes for 3 to 5 weekly sessions for one week to get acquainted with the main exercise at a speed of 7-10 m/min and were forced to exercise. Then, an intense intermittent exercise program (5 sessions per week) and running on a treadmill for 5 weeks was performed according to the general principles of HIIT [31]. In this protocol, the HIIT program included warm-up and cool-down steps for 4-8 minutes with a running intensity of 40% of maximum speed. The protocol for performing training sessions is outlined in Table 2.

Accordingly, 48 hours after the last training session (10-12 hours fasting), the study rats per group were intraperitoneally injected with a mixture of ketamine 10% at a dose of 50 mg/kg and xylazine 2% at a dose of 10 mg/kg. The end of the small intestinal tissue (ileum) of rats was then sampled; after washing in physiological serum, it was immersed in 1.8 microtubes, containing RNeasy lysis fluid with a ratio of 20% and transferred to the laboratory for genetic testing. The gene expression of the desired factors was measured from intestinal tissue by Real-time-PCR technique. After quantification, gene expression values were analyzed by the formula $2^{-\Delta\Delta ct}$. The PCR reaction was performed using (Applied Biosystems) PCR master mix and SYBR Green in the device (Applied Biosystems, Sequence Detection Systems, Foster City, CA) ABI Step One according to the manufacturer's protocol. The sequence of used primers is listed in Table 3.

After the normality of the data was established by the Shapiro-Wilk test, a One-way Analysis of Variance (ANOVA) was used for analyzing intergroup changes. Moreover, the Tukey post-hoc test was applied to examine the between-group differences. The obtained data were analyzed using SPSS at a significant level of $P < 0.05$.

3. Results

Data analysis indicated a difference concerning the mean expression of the IL-10 gene in intestinal tissue in the animal model of steatosis between different research groups ($P = 0.001$). The results of the Tukey post-hoc test suggested

that the expression of the IL-10 gene in intestinal tissue in the HIIT ($P = 0.001$), probiotic ($P = 0.036$), and HIIT - probiotic ($P = 0.001$) groups were significantly lower than that in the fatty liver group. Furthermore, the expression of the IL-10 gene in intestinal tissue in the HIIT-probiotic group was significantly lower than that in the probiotic group ($P = 0.041$); however, the expression of the IL-10 gene in intestinal tissue in the HIIT group, compared to the HIIT-probiotic group was not significantly different ($P = 0.934$) (Figure 1).

Data analysis indicated a difference between the mean expression of the IFN- γ gene in intestinal tissue in the animal model of steatosis between different research groups ($P = 0.001$). The Tukey's post-hoc test data revealed that the expression of the IFN- γ gene in intestinal tissue was significantly lower in HIIT ($P = 0.001$), probiotic ($P = 0.002$), and HIIT-probiotic ($P = 0.001$) groups, compared to the fatty liver group. There were no significant differences in the expression of the IFN- γ gene in intestinal tissue in HIIT, probiotic, and HIIT-probiotic groups ($P < 0.05$) (Figure 2).

4. Discussion

The present study results indicated that the expression of IL-10 and IFN- γ genes in the intestinal tissue of rats with steatosis in the fatty liver group was significantly higher than those in the other groups. Accordingly, fatty liver is associated with increased inflammation and high secretion of anti-inflammatory agents in intestinal tissue; it can increase the production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, such as IFN- γ and IL-10 in intestinal tissue. HIIT also reduced IFN- γ and IL-10 gene expression in the intestinal tissue of the explored rats with steatosis. These findings highlight the effectiveness of HIIT in regulating IFN- γ and IL-10 gene expression in the intestinal tissue of rats with steatosis, i.e., consistent with some previous studies [32]. HIIT may be a time-consuming approach to reduce liver fat. Accordingly, several studies in animals and humans revealed that HIIT reduces the fat content of the liver and helps treat patients with fatty liver [33, 34]. Kistler et al. (2011) argued that patients who performed HIIT experienced a greater effect on reducing the risk of NAFLD and liver fibrosis, compared to moderate-intensity [29]. In the present study, HIIT significantly impacted changes in inflammatory factors, such as IFN- γ and IL-10. Exercise directly reduces pro-inflammatory factors by declining the production of cytokines in adipose tissue, muscle, and mononuclear cells, and indirectly, by increasing insulin sensitivity, increasing endothelial function, and weight loss. However, these effects on intestinal tissue remain unclear. Jahromi et al. (2014) examined endurance training effects on serum levels of interferon-gamma and TNF- α in inactive men. They presented a significant decrease in IFN- γ in the

Table 1. The mean and standard deviation scores of the serum levels of liver enzymes in different study groups

Group Variable	Mean±SD				
	Healthy Control	Fatty Liver	Probiotic	HIIT	HIIT - Probiotics
AST (U/ml)	1.45±12.41	341.10±35.21*	132.12±17.6	14223±19.15	145.28±20.12
ALT (U/ml)	113.45±9.45	220.82±27.80*	93.55±142.23	95.16±14.18	92.81±8.75

The significant difference with the healthy control group at $P<0.05$.

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

training group [35]. Intense intermittent exercise seems to play a significant role in reducing inflammation in fatty liver samples. IL-10 can inhibit the production of multiple cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6 and reactive oxygen species [36]. According to molecular mechanisms, exercise, by negatively regulating the activity of NF- κ B factor, regulates IL-10 secretion by monocytes and T cells through the Th2 pathway [37]. Another possible mechanism for regulating IL-10 secretion following regular exercise is the balance between Th1 and Th2-secreted cytokines; regular exercise can increase the production of cytokines secreted by Th2 cells and regulate the relative decrease in cytokines secreted by Th1 cells. Ultimately, this process leads to the modulation of inflammatory cytokines, including IL-10 [36]. The anti-inflammatory effects of exercise also depend on the duration and intensity of exercise. Therefore, it is possible that the intensity of exercise in the present study could induce anti-inflammatory properties in the exercise groups, and alter IL-10 gene expression in this group. The intensity of exercise may be among the influential factors; however, due to the anti-inflammatory role of IL-10, the most vulnerable environment might affect its changes [36].

Contrary to the present study findings, Vahdat et al. (2018) stated that a 6-week periodic exercise significantly increased serum interleukin-10 levels in overweight men [38]. Chou et al. (2018) documented that 12 weeks

of low-intensity training provided no significant effect on IFN- γ levels in splenic tissue among rats [39]. Ranjbar et al. (2016) signified that after 8 weeks of periodic training, the serum levels of interleukin-10 did not significantly change in women with type 2 diabetes [21]. The differences in the results of the studies can be attributed to the type of training interventions (duration, intensity, & the training period). Dornels et al. (2016) stated that inflammatory responses depend on the intensity of exercise. Their results reflected that IL-10 levels were found in overweight subjects immediately and 30 minutes after two intense training methods in overweight and obese individuals [40]. According to the present study data, the inconsistency of research results concerning the effect of exercise on cytokines can be related to the study population (healthy, sick, obese, etc.), different exercise protocols respecting duration, intensity, and type of activity, as well as the sampling tissue (plasma, gene expression, fat tissue, nerve tissue, etc.).

The beneficial effects of probiotics were reported on reducing the degree of fatty liver and other biochemical indicators in improving fatty liver [41, 42]. The present study results also confirmed the beneficial effects of probiotics on intestinal tissue in NAFLD disease. Consistent with these results, Savchenyuk et al. (2014), in the rat model, indicated that administering various probiotics during the life of neonatal rats can significantly reduce the risk of fatty

Table 2. HIIT program

Week	Warm-up Speed (Meters Per Minute)	Fast Rotation Number	Fast Rotation Speed (Meters Per Minute)	Number of Slow Rotations	Slow Rotation Speed (Meters Per Minute)
First	4	5 2-minute intervals	16-20	5 1 minute intervals	10
Second	5	5 2-minute intervals	21-25	5 1 minute intervals	11
Third	6	5 2-minute intervals	26-30	5 1 minute intervals	12
Fourth	7	5 2-minute intervals	31-35	5 1 minute intervals	13
Fifth	8	5 2-minute intervals	36-40	5 1 minute intervals	14

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Table 3. The sequence of used primers for the studied variables

Amplicon Length	Sequence	Primers	Gene Name
104 bp	CTGCTCTTACTGGCTGGAGT TGGGAAGTGGGTGCAGTTAT	Forward Reverse	<i>IL-10</i>
123 bp	CCCACAGATCCAGCACAAAG TCTACCCAGAATCAGCACC	Forward Reverse	IFN range
104 bp	CAAGTTCAAGGGCACAGTCA CCCCATTGATGTTAGCGGG	Forward Reverse	<i>GAPDH</i>

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

liver and obesity [41]. In another study by Ritz et al. (2014) in a fatty liver model of rats, the effects of probiotic administration were evaluated for 8 weeks. This treatment eventually led to a reduction in inflammation and liver enzymes [42]. As mentioned in our study, the improvement in IFN- γ and IL-10 gene expression in the intestinal tissue of steatosis mice was evident at the end of the intervention in the probiotic group. However, future studies considering the probiotic effects on inflammation seem necessary. A study on a mouse model concluded that probiotic administration can positively impact fat profile, insulin resistance, weight, and hepatic steatosis [43]. The exact mechanism of these effects remains unknown. It has been suggested that the positive effects observed due to using probiotics are related to increased intestinal wall integrity, reduced hepatitis, and reduced effects of pathogenic bacteria involved in NAFLD by their excretion or inhibition and production of short-chain fatty acids as antimicrobial agents. These factors prevent the damage of liver cells and the release of their enzymatic content into the blood [44]. However, in several studies, the intake of probiotics presented no beneficial effects on liver tissue [45, 46].

A potential reason for the difference in findings related to the effects of probiotics on the metabolic status of patients with NAFLD is the difference in the type of probiotics and the applied dose. Moreover, not all probiotics provide the same effect; there may be major differences in the desired effect on health and the associated possible adverse effects. Additionally, the status of the host is critical in terms of how it provides the conditions for the relationship between probiotic factors and intrinsic factors of the body, including the intestinal microbial flora [42]. Furthermore, the collected findings indicated that severe periodic exercises with probiotic consumption were more beneficial than probiotic consumption alone. Accordingly, these results suggested that synergistic periodic exercises to probiotics can be useful for intestinal tissue in fatty liver samples and present better results.

Overall, studies emphasize the positive role of probiotics in improving the immune system. In the present study,

intense intermittent exercise and probiotic use led to the modulation of the expression of genes involved in the innate immune system of fatty liver-induced intestinal tissue. However, due to the limited related studies, research on the effects of exercise and probiotic consumption on the factors involved in the immune system of intestinal tissue caused by fatty liver requires further studies. In the present study, other levels of proinflammatory cytokines (e.g., TNF- α) and inflammatory factors (e.g., CRP & IL-6) were not measured, i.e., a limitation of the present study. To evaluate the effects of tetracycline, it is suggested that the sham group be considered in future studies. Furthermore, a suitable solution for future studies is to compare different types of probiotics with variable doses. Further studies are required to understand the molecular mechanisms of the anti-inflammatory effect of exercise and the tissue or area where the action occurs.

5. Conclusion

According to the obtained results, HIIT and probiotic consumption can modulate the expression of genes involved in the innate immune system of intestinal tissue caused by fatty liver. Therefore, HIIT and taking probiotics can probably help in the treatment of fatty liver.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This research was conducted following the approval of the Ethics Committee in Biomedical Research of the Institute of Physical Education and Sports Sciences (Code: IR.SSRC.REC.1399.069) and the Islamic Azad University, Imam Khomeini Memorial Branch in Rey. Also, all experiments were performed according to the policies of the Helsinki Convention.

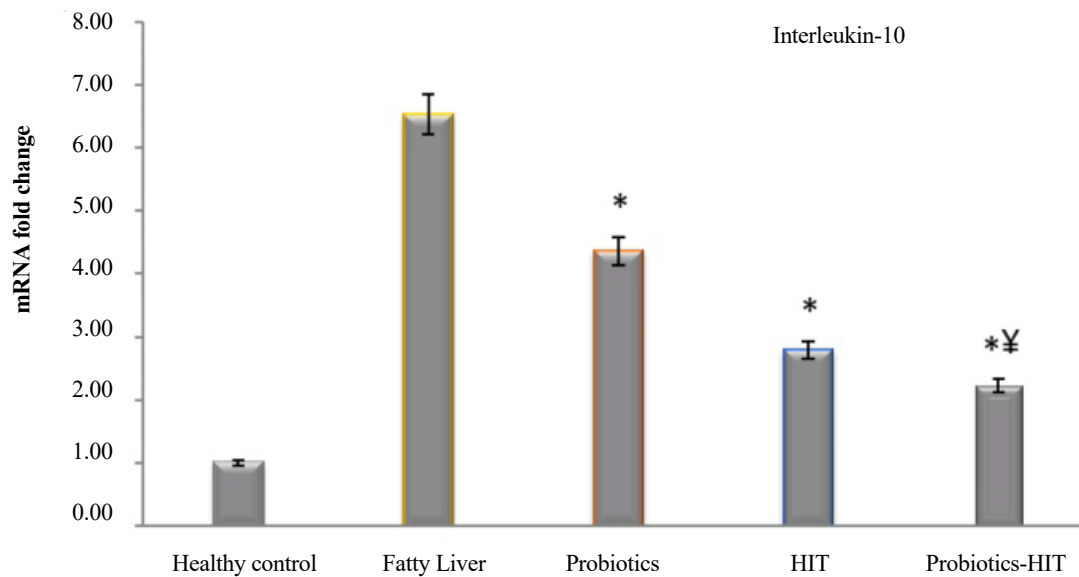
Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 1. Mean changes in *IL-10* gene expression in intestinal tissue in an animal model of steatosis in different research groups

*Significant difference with a fatty liver group; ¥ Significant difference with fatty liver + probiotic group ($P \leq 0.05$).

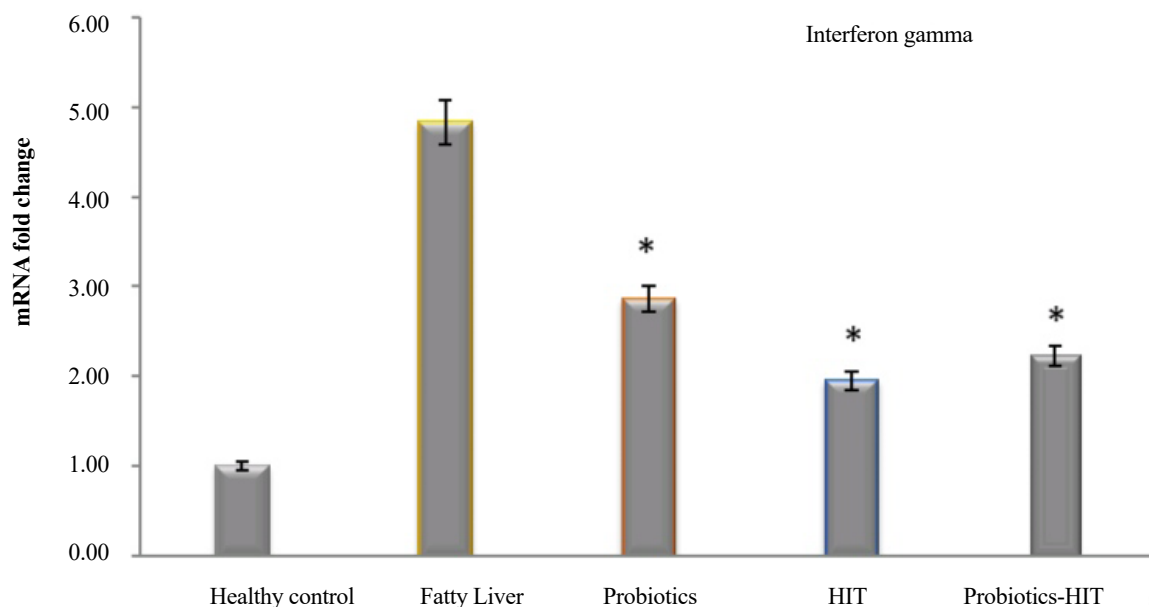
Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 2. The mean expression of *IFN-γ* gene in intestinal tissue in an animal model of steatosis between different study groups

*Significant difference with the fatty liver group ($P \leq 0.05$).

Funding

This research did not receive any grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

Authors' contributions

All authors equally contributed to preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

مقاله پژوهشی:

تأثیر تمرینات تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک بر بیان ژن اینترلوکین-۱۰ و اینترفرون گاما بافت روده در مدل حیوانی کبد چرب

شرمین رشه^۱، *مژگان احمدی^۱

۱. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۲۵ آبان ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۱۱ اسفند ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۱۰ تیر ۱۴۰۰

هدف: بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) شایع‌ترین بیماری مزمن کبدی است که اغلب در بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده گزارش می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر تمرینات تناوبی شدید (HIIT) و مصرف پروبیوتیک بر بیان ژن اینترلوکین ۱۰ و اینترفرون گامای بافت روده در مدل حیوانی کبد چرب بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی، تعداد ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار (۲۵۰ تا ۲۸۰ گرم) انتخاب و به‌طور تصادفی در پنج گروه شامل کنترل سالم، کبد چرب، کبد چرب + HIIT، کبد چرب + پروبیوتیک و کبد چرب + HIIT + پروبیوتیک قرار گرفتند. رت‌ها با تجویز داروی تتراسایکلین خوراکی با دوز ۱۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن (به‌صورت محلول در ۲ میلی‌لیتر آب) به مدت ۷ روز مبتلا به کبد چرب شدند. HIIT، پنج جلسه در هفته و به مدت پنج هفته روی نوارگردان اجرا شد. داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بیان ژن اینترلوکین ۱۰ و اینترفرون گاما بافت روده موش‌های مدل استئاتوزیس در گروه کبد چرب نسبت به گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P = 0.001$). تمرینات تناوبی شدید (HIIT) و مصرف پروبیوتیک منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن اینترلوکین ۱۰ و اینترفرون گاما بافت روده نسبت به گروه کبد چرب شد ($P = 0.001$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، مداخله تمرین تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک می‌تواند به تعدیل بیان ژن‌های درگیر در سیستم ایمنی ذاتی بافت روده ناشی از کبد چرب کمک کند.

کلیدواژه‌ها:

کبد چرب، تمرین تناوبی شدید،

پروبیوتیک، اینترلوکین ۱۰، اینترفرون گاما

مقدمه

بیماری کبد چرب غیرالکلی^۱ (NAFLD) در حال حاضر شایع‌ترین بیماری مزمن کبدی است که در تمام گروه‌های سنی و در ۱۷ تا ۴۶ درصد از جمعیت عمومی رخ می‌دهد. این بیماری به دلیل شیوع چاقی و اضافه وزن یک مشکل بالینی جدی و روبه‌رشد است [۱، ۲]. اولین مضرات کبدی تجمع چربی در سلول‌های کبدی (استئاتوز) است، این امر با توسعه التهاب همراه خواهد بود که منجر به سیروز می‌شود [۳]. بیماری کبد چرب غیرالکلی را می‌توان در ۳۳/۶ درصد از بیماران مبتلا به التهاب روده اغلب در غیاب فاکتورهای خطر متابولیک مشاهده کرد [۴]، در بیماران مبتلا به التهاب روده شدید اغلب استئاتوز در سونوگرافی گزارش شده است [۵].

مطالعات نشان می‌دهد که التهاب روده با افزایش سایتوکاین‌های ضدالتهابی و پیش‌التهابی در بیماری کبد چرب همراه است [۸-۶]. اینترلوکین-۱۰^۲ ($IL-10$) یک سایتوکاین ضدالتهابی در نظر گرفته می‌شود که التهاب را در چندین اندام و بافت در شرایط فیزیولوژیکی یا آسیب‌شناختی تنظیم می‌کند [۹]. $IL-10$ می‌تواند به‌طور معنی‌داری بیان ژن و سنتز سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را متوقف کند [۱۰]. $IL-10$ یکی از مهم‌ترین سایتوکاین‌های ضدالتهابی در پاسخ‌های ایمنی و دارای یک اثر فیزیولوژیک به پاسخ‌های التهاب سیستمیک است [۱۱]. از طرفی اینترفرون گاما^۳ ($IFN-\gamma$) فعالیت‌های ضد تکثیر، تنظیم ایمنی و پیش‌التهابی از خود نشان می‌دهد و بنابراین در مکانیسم‌های دفاعی مهم است [۱۲، ۱۳]. همچنین $IFN-\gamma$ سلول T کمک‌کننده را افزایش

2. Interleukin 10
3. Interferon gamma

1. Non-alcoholic fatty liver disease

* نویسنده مسئول:

دکتر مژگان احمدی

نشانی: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی.

تلفن: ۴۴۷۶۶۲۳ (۹۱۲) ۹۸+

پست الکترونیکی: mahmadi1376@gmail.com

می‌دهد و ممکن است برای تمایز سلول T کمک‌کننده لازم باشد. از لحاظ ساختاری گیرنده $IFN-\gamma$ با گیرنده $IL-10$ در اپیتلیوم روده ارتباط دارد [۱۴].

تاکنون درمان‌های دارویی محدودی برای کبد چرب پیشنهاد شده است که به دلیل عوارض جانبی، افزایش وزن پیش‌رونده و هزینه بالا، استفاده مداوم و منظم از آن‌ها توصیه نمی‌شود. درمان استاندارد پیشنهاد شده برای کبد چرب، تغییر سبک زندگی شامل اصلاح رژیم غذایی و فعالیت ورزشی است [۱۵]. نشان داده شده است که فعالیت بدنی منجر به کاهش پاتوژنز NAFLD می‌شود، تمرینات هوازی با و بدون کاهش وزن محتوای چربی کبدی را کاهش داده و عملکرد متابولیکی را در افراد چاق بهبود می‌بخشد که نشان‌دهنده روش درمانی یا پیشگیری‌کننده بیماری کبد چرب است [۱۶]. همچنین فعالیت ورزشی با اثرات ضدالتهابی خود، نتایج سودمندی را در بیماری‌های متابولیکی بر جا می‌گذارد [۱۷]. در ارتباط با نقش ورزش بر $IL-10$ به‌منزله یکی از آدیپوکین‌های التهابی و مکانیسم اثر آن، اطلاعات متناقضی وجود دارد. در برخی تحقیقات، افزایش سطوح $IL-10$ پس از فعالیت ورزشی گزارش شده است [۱۹، ۱۸]، در حالی که در برخی مطالعات دیگر، در سطوح $IL-10$ و $IFN-\gamma$ پس از یک دوره تمرین، تغییر معنی‌داری مشاهده نشد [۲۲-۲۰].

از طرفی، در مطالعات اخیر به استفاده از پروبیوتیک‌ها در درمان کبد چرب توجه شده است [۲۴، ۲۳]. در مطالعه اندو و همکاران روی رت‌ها، تجویز پروبیوتیک توانست پیشرفت کبد چرب را به‌طور قابل چشمگیری متوقف یا کند سازد [۲۵]. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با بهبود تعادل میکروبی بدن اثرات مفیدی بر بدن میزبان دارند [۲۶]. از جمله این آثار مفید بر سلامتی انسان می‌توان به فراهم کردن محیطی برای جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها، تقویت سیستم ایمنی، تأثیر بر فلور دستگاه روده‌ای، کاهش عفونت‌های مسیر روده‌ای و جلوگیری از آن، ارتقا حس تندرستی و تنظیم حرکات روده اشاره کرد [۲۷]. مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها به سه شکل مطرح شده است، شامل: ۱. تأثیرات آنتی میکروبی مستقیم؛ ۲. تقویت تمامیت سد دفاعی مخاطی؛ ۳. تغییرات مطلوب در سیستم ایمنی بدن [۲۸].

گرچه بسیاری از مطالعات تأثیر مثبت برنامه تمرینی بر کبد چرب را گزارش کرده‌اند ولی تاکنون نوع، شدت و حجم تمرینی برای توصیه به بیماران مبتلا به کبد چرب توسعه نیافته است. بیشتر مطالعات انجام‌شده از روش‌های تمرین سنتی مانند تمرینات تناوبی با شدت پایین تا متوسط استفاده کرده‌اند [۱۶] و مطالعات کمی تأثیر انواع دیگر تمرین مانند تمرینات تناوبی شدید را مد نظر داشته‌اند. به نظر می‌رسد تمرینات شدید در مقایسه با شدت‌های تمرینی متوسط و کم، اثرات سودمند بیشتری بر کبد چرب داشته باشند [۲۹]. بیماران NAFLD که در فعالیت شدید شرکت کردند، در مقایسه با کسانی که فعالیت

بدنی متوسط داشتند، شیوع فیبروز کبدی بررسی شده با بیوپسی کمتری بروز دادند که نشان‌دهنده اهمیت شدت فعالیت بدنی است [۱۶]. با توجه به شیوع گسترده بیماری کبد چرب و ارتباط متقابل این بیماری با شاخص‌های التهابی توجه به نقش تغییر سبک زندگی به‌ویژه روش‌های نوین فعالیت‌های بدنی در این تغییرات و نیز شناسایی جنبه‌های گوناگون سازوکار درمان این بیماری و همچنین انتخاب مؤثرترین نوع مداخله ضروری به نظر می‌رسد. از این رو مطالعه حاضر قصد دارد به بررسی تأثیر تمرینات تناوبی شدید^۴ (HIIT) و مصرف پروبیوتیک بر بیان ژن اینترلوکین ۱۰ و اینترفرون گاما بافت روده در مدل حیوانی کبد چرب بپردازد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع بنیادی و روش آن تجربی است. جامعه آماری آن همه رت‌های نر ویستار حیوان خانه انستیتو پاستور هستند که از بین آن‌ها ۴۰ سر رت نر ویستار در دامنه وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به‌شیوه تصادفی برای شرکت در مطالعه انتخاب شدند. در ادامه رت‌های نر ویستار مطالعه‌شده به‌طور تصادفی به پنج گروه هشت‌تایی شامل گروه کنترل سالم، کبد چرب (استئاتوزیس)، کبد چرب (استئاتوزیس) + تمرین HIIT، کبد چرب (استئاتوزیس) + پروبیوتیک و گروه کبد چرب (استئاتوزیس) + تمرین HIIT + پروبیوتیک دسته‌بندی شدند. رت‌ها در آزمایشگاه پژوهش دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله با درجه حرارت ۲۰ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی تاریکی ۱۲ ساعت و در رطوبت نسبی ۵۰ درصد با آب و غذای استاندارد نگهداری شدند.

ایجاد مدل کبد چرب

داروی تتراسایکلین خوراکی با دوز ۱۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن (به صورت محلول در ۲ میلی‌لیتر آب) به مدت ۷ روز با روش گاوآژ به رت‌ها خوراندند. تأیید کبد چرب (استئاتوزیس) با اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی بود [۳۰]. در مطالعه حاضر افزایش آنزیم‌های کبدی در گروه‌های کبد چرب مشاهده شد. بررسی در یک بازه زمانی مناسب، تشابه‌های عوارض در حیوانات با انسان‌ها و همچنین امکان کنترل شرایط آزمایش از مزیت‌های استفاده از این مدل ایجاد کبد چرب است. برای تهیه سرم، نمونه‌های خونی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سنجش آنزیم‌های کبدی شامل ALT و AST با کیت‌های تشخیصی شرکت پارس آزمون و با استفاده از پروتکل‌های مربوطه انجام شد (جدول شماره ۱).

4. High-Intensity Interval Training

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار سطوح سرمی آنزیم های کبدی در گروه های مختلف

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

* تفاوت معنی داری با گروه کنترل سالم در $P < 0.05$

فوق دانش

۲۰ درصد غوطه‌ور گردیده و برای انجام آزمایش‌های ژنتیک به آزمایشگاه انتقال داده شد. بیان ژن عوامل موردنظر از بافت روده با تکنیک Real time-PCR اندازه‌گیری و پس از کمی‌سازی مقادیر بیان ژن با فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ تجزیه و تحلیل شد. واکنش PCR با استفاده از PCR master (Applied Biosystems) SYBR Green و mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) Sequence Detection Systems. Step One طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در جدول شماره ۳ ذکر شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

پس از اینکه نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیروویلک تأیید شد، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه برای تغییرات بین گروهی و آزمون تعقیبی توکی برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد. تمام عملیات آماری پژوهش با استفاده از نرم‌افزار Spss نسخه ۲۳ انجام شد و سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بین میانگین بیان ژن IL-10 بافت روده در مدل حیوانی استئاتوزیس در گروه‌های متفاوت تحقیق تفاوت وجود دارد ($P=0.001$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بیان ژن IL-10 بافت روده در گروه HIIT ($P=0.001$)، در گروه پروبیوتیک ($P=0.036$) و در گروه HIIT - پروبیوتیک ($P=0.001$) نسبت به گروه کبد چرب به‌طور معنی‌داری کمتر بود. همچنین بیان ژن IL-10 بافت روده در گروه HIIT - پروبیوتیک نسبت به گروه پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P=0.041$)، اما بیان ژن IL-10 بافت روده در گروه HIIT نسبت به گروه HIIT - پروبیوتیک تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P=0.934$) (تصویر شماره ۱).

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بین میانگین بیان ژن IFN- γ بافت روده در مدل حیوانی استئاتوزیس در گروه‌های مختلف تحقیق تفاوت وجود دارد ($P=0.001$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بیان ژن IFN- γ بافت روده در گروه HIIT ($P=0.001$)، در گروه پروبیوتیک ($P=0.002$) و HIIT - پروبیوتیک ($P=0.001$) نسبت

کشت باکتری و نحوه مصرف پروبیوتیک

لاکتوباسیلوس رامنسوس (PTCC1637) GG به صورت لیوفلیزه در ویال‌های استاندارد از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران، ایران) خریداری شد. باکتری‌ها در محیط کشت MRS^۵ (زیستی گویا، تهران، ایران) غنی‌شده با L-سیستئین HCL^۶ کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه می‌شوند. برای بررسی تأثیر مصرف پروبیوتیک‌ها، گروه‌های مربوطه به مدت ۵ هفته و ۵ روز در هفته روزانه میزان ۱۰۹ CFU/ml از باکتری لاکتوباسیلوس رامنسوس GG به صورت گاوژ دریافت کردند (بین رت‌ها تفاوتی از نظر دریافت این ماده وجود نداشت) [۳۱].

پروتکل تمرین تناوبی شدید

در ابتدا رت‌ها به مدت یک هفته سه تا پنج جلسه در هفته برای 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 تمرینات تناوبی شدید (HIIT) اجرا شد [۳۱]. 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 وهله‌های تمرینی در جدول شماره ۲ آمده است.

نمونه‌گیری بافت و اندازه‌گیری متغیرهای آزمایشگاهی

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی (۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتا)، رت‌های مطالعه‌شده در هر گروه به واسطه تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین ۱۰ درصد و با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۲ درصد و با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند. سپس قسمت انتهایی بافت روده کوچک (ایلیوم) رت‌ها نمونه‌برداری شده و پس از شست‌وشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوب‌های ۱/۸ حاوی مایع RNAlater^{TM۷} با نسبت

- Man Rogosa Sharp
- L-cystein HCL culture medium
- RNA Stabilization reagent 50 mL

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 دقیقه‌ای	۱۶-۲۰	۵ تناوب ۱ دقیقه‌ای	۱۰
دوم	۵	۵ تناوب ۲ دقیقه‌ای	۲۱-۲۵	۵ تناوب ۱ دقیقه‌ای	۱۱
سوم	۶	۵ تناوب ۲ دقیقه‌ای	۲۶-۳۰	۵ تناوب ۱ دقیقه‌ای	۱۲
چهارم	۷	۵ تناوب ۲ دقیقه‌ای	۳۱-۳۵	۵ تناوب ۱ دقیقه‌ای	۱۳
پنجم	۸	۵ تناوب ۲ دقیقه‌ای	۳۶-۴۰	۵ تناوب ۱ دقیقه‌ای	۱۴

افتخار دانش

در مقایسه با کسانی که با شدت متوسط تمرین کرده بودند، اثرپذیری بیشتری بر کاهش خطر NAFLD و فیروز کبدی داشتند [۲۹]. در تحقیق حاضر نیز تمرینات با شدت زیاد اثر معناداری بر تغییرات عوامل التهابی همچون $IFN-\gamma$ و $IL-10$ داشت. تمرین ورزشی به‌طور مستقیم احتمالاً با کاهش تولید سایتوکین‌ها در بافت آدیپوز، عضله و سلول‌های تک‌هسته‌ای و به‌طور غیرمستقیم به وسیله افزایش حساسیت‌های انسولینی، افزایش عملکرد اندوتلیال و کاهش وزن بدن موجب کاهش عوامل پیش‌التهابی می‌شود. با این حال، این آثار در بافت روده هنوز مشخص نیست. جهرمی و همکاران به بررسی تمرینات استقامتی بر سطوح سرمی اینترفرون گاما و $TNF-\alpha$ در مردان غیرفعال پرداختند. نتایج آن‌ها حاکی از کاهش معنادار $IFN-\gamma$ در گروه تمرینی بود [۲۵]. به نظر می‌رسد تمرینات تناوبی شدید نقش به‌سزایی در کاهش التهاب در نمونه‌های با کبد چرب داشته باشد. $IL-10$ می‌تواند تولید سایتوکاین‌های متعدد از قبیل $IL-6$ ، $IL-1\beta$ ، $TNF-\alpha$ و گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر را مهار کند [۳۶]. با توجه به مکانیسم‌های مولکولی، تمرین ورزشی با تنظیم منفی فعالیت عامل $NF-\kappa B$ سبب تنظیم ترشح $IL-10$ به وسیله منوسیت‌ها و سلول‌های T از طریق مسیر $Th2$ می‌شود [۳۷]. مکانیسم احتمالی دیگر در تنظیم ترشح $IL-10$ متعاقب فعالیت ورزشی منظم، تعادل بین سایتوکین‌های ترشح‌شده از $Th1$ و $Th2$ است. فعالیت ورزشی منظم می‌تواند موجب تنظیم

به گروه کبد چرب به‌طور معنی‌داری کمتر است. بیان ژن $IFN-\gamma$ بافت روده در گروه‌های HIIT، پروبیوتیک و HIIT - پروبیوتیک تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$) (تصویر شماره ۲).

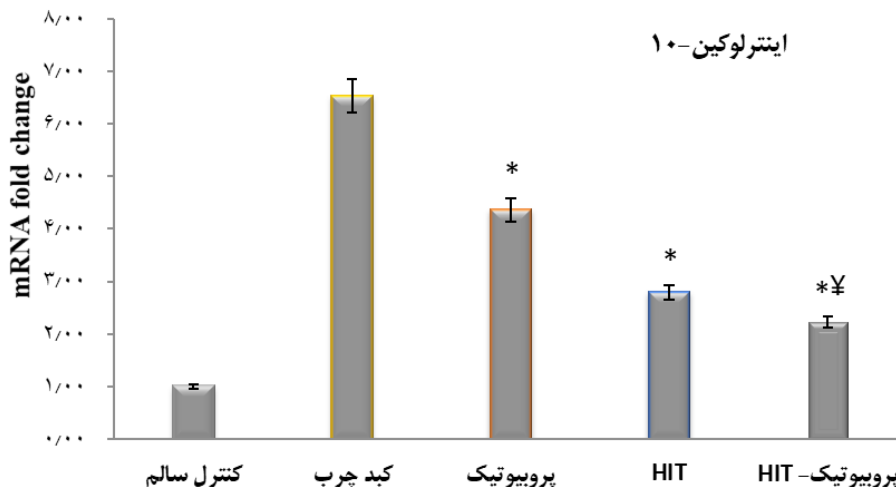
بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن $IL-10$ و $IFN-\gamma$ بافت روده رت‌های مبتلا به استئاتوزیس در گروه کبد چرب به‌طور معناداری از گروه‌های دیگر بیشتر است. این نتیجه نشان می‌دهد که کبد چرب با افزایش التهاب و ترشح زیاد عوامل ضدالتهابی در بافت روده همراه است که می‌تواند باعث افزایش تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی همچون $IFN-\gamma$ و $IL-10$ در بافت روده شود. همچنین تمرینات تناوبی شدید موجب کاهش بیان ژن $IFN-\gamma$ و $IL-10$ در بافت روده رت‌های مبتلا به استئاتوزیس شد. این یافته‌ها بیانگر اثربخشی تمرینات تناوبی شدید در تنظیم بیان ژن $IFN-\gamma$ و $IL-10$ در بافت روده رت‌های مبتلا به استئاتوزیس است که با برخی یافته‌های مطالعات قبلی همسو است [۳۲]. تمرینات با شدت زیاد ممکن است از لحاظ زمانی روشی کارآمدی برای کاهش چربی کبد باشد. بر همین اساس، چندین مطالعه در حیوانات و انسان‌ها نشان دادند که تمرین با شدت زیاد محتوای چربی کبدی را کاهش می‌دهد و به درمان بیماران با کبد چرب کمک می‌کند [۳۳، ۳۴]. کیستلر و همکاران نشان دادند بیمارانی که با شدت زیاد تمرین می‌کنند

جدول ۳. توالی پرایمرهای استفاده‌شده متغیرهای مطالعه

نام ژن	پرایمرها	توالی	طول Amplicon
$IL-10$	Forward Reverse	CTGCTCTTACTGGCTGGAGT TGGGAAGTGGGTGCAGTTAT	bp ۱۰۴
$IFN-gama$	Forward Reverse	CCCACAGATCCAGCACAAAG TCTACCCCAAGATCAGCACC	bp ۱۲۳
$GAPDH$	Forward Reverse	CAAGTTCAGGGGCACAGTCA CCCCATTTGATGTTAGCGGG	bp ۱۰۴

افتخار دانش

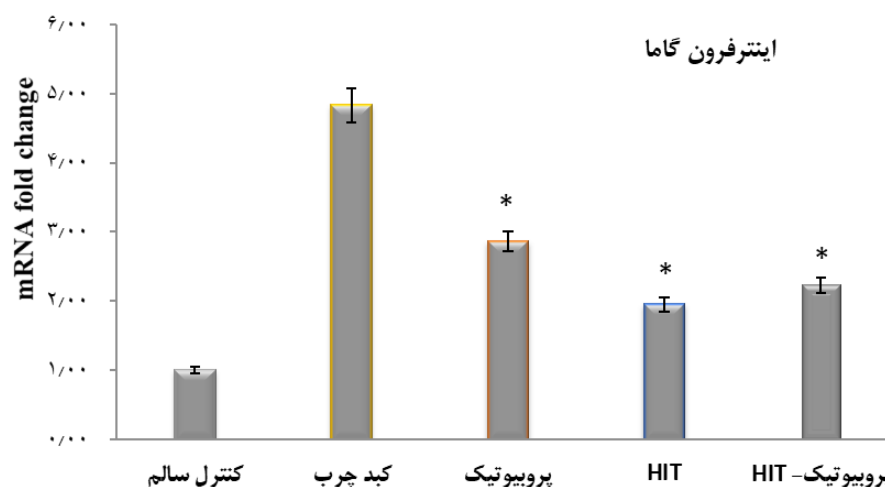


افق دانش

تصویر ۱. میانگین تغییرات بیان ژن *IL-10* بافت روده در مدل حیوانی استئاتوزیس در گروه‌های گوناگون
* تفاوت معنادار با گروه کبد چرب؛ ¥ تفاوت معنادار با گروه کبد چرب+پروبیوتیک ($P \leq 0.05$).

برخلاف نتایج پژوهش حاضر، وحدت و همکاران نشان دادند تمرینات تناوبی ۶ هفته‌ای، موجب افزایش معنی‌دار سطح اینترلوکین ۱۰ سرم در مردان دارای اضافه وزن شد [۳۸]. نتایج چو و همکاران حاکی از آن است که ۱۲ هفته تمرینات با شدت کم، بر سطح $IFN-\gamma$ بافت طحال در رت‌ها تأثیر معنی‌داری نداشت [۳۹]. همچنین نتایج رنجبر و همکاران نشان داد پس از ۸ هفته تمرین تناوبی سطوح سرمی اینترلوکین ۱۰ در زنان مبتلا به دیابت نوع دو تغییر معنی‌داری دیده نشد [۲۱]. به نظر می‌رسد تفاوت‌ها در نتایج مطالعات را می‌توان به نوع مداخلات تمرینی (مدت، شدت و طول دوره تمرین) نسبت داد. دورنلس و همکاران اظهار کردند که پاسخ‌های التهابی به شدت تمرین بستگی دارد.

افزایشی در تولید سایتوکین‌های ترشح‌شده از سلول‌های $Th2$ و تنظیم کاهشی نسبی در سایتوکین‌های ترشح‌شده از سلول‌های $Th1$ شود که در نهایت به تعدیل سایتوکین‌های التهابی از جمله *IL-10* منجر می‌شود [۳۶]. اثرات ضدالتهابی فعالیت ورزشی به مدت و شدت تمرین نیز بستگی دارد. بنابراین احتمال دارد شدت تمرینات در مطالعه حاضر به حدی باشد که بتواند خاصیت ضدالتهابی را در گروه‌های تمرین القا کند و بیان ژن *IL-10* را در این گروه تغییر دهد. شدت تمرین ممکن است یکی از عوامل تأثیرگذار باشد ولی به دلیل نقش ضدالتهابی *IL-10* به نظر می‌رسد که محیط در معرض آسیب بیشتر می‌تواند بر تغییرات آن تأثیر بگذارد [۳۶].



افق دانش

تصویر ۲. میانگین بیان ژن $IFN-\gamma$ بافت روده در مدل حیوانی استئاتوزیس در گروه‌های گوناگون
* تفاوت معنادار با گروه کبد چرب ($P \leq 0.05$).

پروبیوتیک به تنهایی مزایای بیشتری داشت و این نتایج نشان می دهد که هم افزایی تمرینات تناوبی شدید به مصرف پروبیوتیک می تواند برای بافت روده در نمونه های کبد چرب مفید باشد و نتایج بهتری به همراه داشته باشد.

در مجموع، مطالعات بر نقش مثبت تجویز پروبیوتیک در بهبود سیستم ایمنی تأکید می کنند. در تحقیق حاضر نیز تمرین تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک به تعدیل بیان ژن های درگیر در سیستم ایمنی ذاتی بافت روده ناشی از کبد چرب منجر شد. با این حال با توجه به مطالعات اندک انجام شده در این موضوع، تحقیق روی اثر فعالیت ورزشی و مصرف پروبیوتیک بر عوامل درگیر در سیستم ایمنی بافت روده ناشی از کبد چرب نیاز به مطالعات بیشتری دارد. در مطالعه حاضر سطوح دیگر سایتوکین های پیش التهابی (همچون $TNF-\alpha$) و عوامل التهابی (همچون CRP و $IL-6$) اندازه گیری نشده است که از جمله محدودیت های تحقیق حاضر بود.

برای ارزیابی اثرات تتراسیکلین پیشنهاد می شود که در مطالعات آینده گروه شم نیز در نظر گرفته شود. همچنین یک راهکار مناسب برای مطالعات آتی مقایسه انواع گوناگون پروبیوتیک ها با دوزهای متغیر است. مطالعات بیشتری برای شناخت مکانیسم های مولکولی اثر ضد التهابی تمرینات ورزشی و بافت یا محلی که این عمل در آن ایجاد می شود، نیاز است.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج، تمرین تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک می تواند به تعدیل بیان ژن های درگیر در سیستم ایمنی ذاتی بافت روده ناشی از کبد چرب منجر شود. بنابراین به نظر می رسد که تمرین تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک احتمالاً می تواند در درمان کبد چرب کمک کند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این تحقیق با تأیید کمیته اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی با کد IR.SSRC. REC.1399.069 و در دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری انجام شد. همچنین همه آزمایش ها بر اساس خط مشی های قرارداد هلسینکی اجرا شد.

حامی مالی

این تحقیق هیچ گونه کمک مالی از سازمان های تأمین مالی در بخش های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

نتایج آن ها نشان داد مقادیر $IL-10$ در هر دو بازه زمانی بلافاصله و ۳۰ دقیقه بعد از دو شیوه تمرینی شدید، در افراد دارای اضافه وزن و چاق یافت [۴۰]. با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می رسد ناهمسو بودن نتایج پژوهش ها در زمینه تأثیر فعالیت های ورزشی بر سایتوکاین ها می تواند به جامعه مطالعه (افراد سالم، بیمار، چاق و ...)، پروتکل های ورزشی گوناگون از نظر مدت زمان، شدت و نوع فعالیت و همچنین بافت نمونه گیری شده (پلاسما، بیان ژن، بافت چربی، بافت عصبی و ...) مربوط باشد.

از طرفی اثرات مفید پروبیوتیک ها بر کاهش درجه کبد چرب و دیگر شاخص های بیوشیمی در بیماری کبد چرب گزارش شده است [۴۱، ۴۲]. یافته های مطالعه حاضر نیز اثرات مفید پروبیوتیک ها را بر بافت روده در بیماری NAFLD تأیید می کند. هم راستا با این نتایج ساوچنیوک و همکاران نشان دادند که تجویز پروبیوتیک های گوناگون در طول زندگی رت های نوزاد می تواند خطر بروز کبد چرب و چاقی را به طور معنی داری کاهش دهد [۴۱]. در یک مطالعه دیگر ریتز و همکاران در مدل موش دچار کبد چرب، تأثیر تجویز پروبیوتیک به مدت ۸ هفته را ارزیابی کردند. این درمان در نهایت منجر به کاهش التهاب و آنزیم های کبدی شد [۴۲]. همانگونه که اشاره شد در مطالعه ما نیز بهبود بیان ژن $IFN-\gamma$ و $IL-10$ در بافت روده رت موش های مدل استئاتوزیس در انتهای مداخله در گروه پروبیوتیک بارز بود، با این حال انجام مطالعات آتی با در نظر گرفتن تأثیر پروبیوتیک بر فاکتورهای التهابی ضروری به نظر می رسد. در مطالعه ما روی مدل موش، نشان داده شد که تجویز پروبیوتیک می تواند تأثیر مطلوب بر پروفایل چربی، مقاومت به انسولین، وزن و استئاتوز کبدی داشته باشد [۴۳]. مکانیسم دقیق این اثرات هنوز مشخص نیست. پیشنهاد شده است اثرات مثبت مشاهده شده پس از مصرف پروبیوتیک های مرتبط با افزایش یکپارچگی دیواره روده، کاهش التهاب کبدی و کاهش اثر باکتری های پاتوژن دخیل در ایجاد NAFLD با خروج یا مهار آن ها و تولید اسیدهای چرب زنجیر کوتاه به منزله عوامل ضد میکروبی باشد که این عوامل مانع از آسیب سلول های کبدی و آزاد شدن محتوای آنزیمی آن ها به خون می شوند [۴۴]. با این حال، در تعدادی از مطالعات، دریافت پروبیوتیک ها اثرات مفیدی بر بافت کبدی به همراه نداشت [۴۵، ۴۶].

یکی از دلایل بالقوه تفاوت در یافته های مربوط به تأثیر پروبیوتیک ها بر وضعیت متابولیک بیماران دچار NAFLD می توان به تفاوت در نوع پروبیوتیک ها و دوز مصرفی اشاره کرد. پیشتر نشان داده شده است که تمامی پروبیوتیک ها تأثیر یکسانی نداشته و تفاوت های عمده ای چه از نظر تأثیر مطلوب بر سلامت و چه از نظر عوارض احتمالی مرتبط ممکن است وجود داشته باشد. علاوه بر این، وضعیت میزبان از این نظر که چگونه شرایطی برای ارتباط بین فاکتورهای پروبیوتیکی و فاکتورهای ذاتی بدن و از جمله فلور میکروبی روده فراهم سازد نیز در این زمینه دارای اهمیت است [۴۲]. همچنین یافته های مطالعه حاضر نشان می دهد که تمرینات تناوبی شدید به همراه مصرف پروبیوتیک نسبت به مصرف

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

References

- [1] Abd El-Kader SM, El-Den Ashmawy EM. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World Journal of Hepatology*. 2015; 7(6):846-58. [DOI:10.4254/wjh.v7.i6.846] [PMID]
- [2] Magri S, Paduano D, Chicco F, Cingolani A, Farris C, Delogu G, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in patients with inflammatory bowel disease: Beyond the natural history. *World Journal of Gastroenterology*. 2019; 25(37):5676-86. [DOI:10.3748/wjg.v25.i37.5676] [PMID]
- [3] Lalor PF, Faint J, Aarbodem Y, Hubscher SG, Adams DH. The role of cytokines and chemokines in the development of steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease*. 2007; 27(2):173-93. [DOI:10.1055/s-2007-979470] [PMID]
- [4] Principi M, Iannone A, Losurdo G, Mangia M, Shahini E, Albano F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in inflammatory bowel disease: Prevalence and risk factors. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2018; 24(7):1589-96. [DOI:10.1093/ibd/izy051] [PMID]
- [5] Sartini A, Gitto S, Bianchini M, Verga MC, Di Girolamo M, Bertani A, et al. Non-alcoholic fatty liver disease phenotypes in patients with inflammatory bowel disease. *Cell Death & Disease*. 2018; 9(2):87. [DOI:10.1038/s41419-017-0124-2] [PMID]
- [6] Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palù G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: New evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2007; 292(2):G518-25. [DOI:10.1152/ajpgi.00024.2006] [PMID]
- [7] Nicoletti A, Ponziani FR, Biolato M, Valenza V, Marrone G, Sganga G, et al. Intestinal permeability in the pathogenesis of liver damage: From non-alcoholic fatty liver disease to liver transplantation. *World Journal of Gastroenterology*. 2019; 25(33):4814-34. [DOI:10.3748/wjg.v25.i33.4814] [PMID]
- [8] du Plessis J, Korf H, van Pelt J, Windmolders P, Vander Elst I, Verrijken A, et al. Pro-inflammatory cytokines but not endotoxin-related parameters associate with disease severity in patients with NAFLD. *PLoS One*. 2016; 11(12):e0166048. [DOI:10.1371/journal.pone.0166048] [PMID]
- [9] Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual Review of Immunology*. 2011; 29:71-109. [DOI:10.1146/annurev-immunol-031210-101312] [PMID]
- [10] Kessler B, Rinchai D, Kewcharoenwong C, Nithichanon A, Biggart R, Hawrylowicz CM, et al. Interleukin 10 inhibits pro-inflammatory cytokine responses and killing of *Burkholderia pseudomallei*. *Scientific Reports*. 2017; 7:42791. [DOI:10.1038/srep42791] [PMID]
- [11] Schneider CP, Schwacha MG, Chaudry IH. The role of interleukin-10 in the regulation of the systemic inflammatory response following trauma-hemorrhage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2004; 1689(1):22-32. [DOI:10.1016/j.bbadis.2004.01.003] [PMID]
- [12] Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular Concepts*. 2018; 9(1):64-79. [DOI:10.1515/bmc-2018-0007] [PMID]
- [13] Bao Y, Liu X, Han C, Xu S, Xie B, Zhang Q, et al. Identification of IFN- γ -producing innate B cells. *Cell Research*. 2014; 24(2):161-76. [DOI:10.1038/cr.2013.155] [PMID]
- [14] Kominsky DJ, Campbell EL, Ehrentraut SF, Wilson KE, Kelly CJ, Glover LE, et al. IFN- γ -mediated induction of an apical IL-10 receptor on polarized intestinal epithelia. *Journal of Immunology*. 2014; 192(3):1267-76. [DOI:10.4049/jimmunol.1301757] [PMID]
- [15] Skrypnik D, Ratajczak M, Karolkiewicz J, Mądry E, Pupek-Musialik D, Hansdorfer-Korzon R, et al. Effects of endurance and endurance-strength exercise on biochemical parameters of liver function in women with abdominal obesity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016; 80:1-7. [DOI:10.1016/j.biopha.2016.02.017] [PMID]
- [16] Keating SE, Hackett DA, Parker HM, O'Connor HT, Gerofi JA, Sainsbury A, et al. Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. *Journal of Hepatology*. 2015; 63(1):174-82. [DOI:10.1016/j.jhep.2015.02.022] [PMID]
- [17] Lancaster GI, Febbraio MA. The immunomodulating role of exercise in metabolic disease. *Trends in Immunology*. 2014; 35(6):262-9. [DOI:10.1016/j.it.2014.02.008] [PMID]
- [18] Terink R, Bongers CCWG, Witkamp RF, Mensink M, Eijvogels TM, Klein Gunnewiek JMT, et al. Changes in cytokine levels after prolonged and repeated moderate intensity exercise in middle-aged men and women. *Translational Sports Medicine*. 2018; 1(3):110-9. [DOI:10.1002/tsm2.23] [PMID]
- [19] Behboudi L, Izadi M. [The effect of six weeks aerobic training on body composition and serum level of IL-10 in middle-aged obese females (Persian)]. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*. 2017; 20(8):51-60. [DOI:10.1002/tsm2.23] [PMID]
- [20] Shafieerad E, Isanejad A, Nasiri E. [The effects of 8 weeks of endurance exercise training on IL-10 level and body composition of sedentary overweight women (Persian)]. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport*. 2018; 6(11):49-57. [DOI:10.1002/tsm2.23] [PMID]
- [21] Ranjbar R, Habibi A, Abolfathi F, Nagafian N. [The effect of aerobic interval training on IL-6 and IL-10 serum concentration in women with type II diabetes (Persian)]. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2016; 19(7):36-45. <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-4331-fa.html>
- [22] Pasavand P, Hosseini SA, Farsi S. The effect of moderate and high intensity endurance trainings with genistein on TNF- α and IFN- γ in streptozotocin induced diabetic rats. *Iranian Journal of Diabetes and Obesity*. 2019; 11(1):46-55. <http://ijdo.ssu.ac.ir/article-1-466-en.html>
- [23] Famouri F, Shariat Z, Hashemipour M, Keikha M, Kelishadi R. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease in obese children and adolescents. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2017; 64(3):413-7. [DOI:10.1097/MPG.0000000000001422] [PMID]
- [24] Ma YY, Li L, Yu CH, Shen Z, Chen LH, Li YM. Effects of probiotics on non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*. 2013; 19(40):6911-8. [DOI:10.3748/wjg.v19.i40.6911] [PMID]
- [25] Endo H, Niioka M, Kobayashi N, Tanaka M, Watanabe T. Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: New insight into the probiotics for the gut-liver axis. *PLoS One*. 2013; 8(5):e63388. [DOI:10.1371/journal.pone.0063388] [PMID]
- [26] Anuradha S, Rajeshwari K. Probiotics in health and disease. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*. 2005; 6(1):67-72. <https://www.researchgate.net/publication/280054798>
- [27] Akpinar A, Akalin AS, Uysal HR. [Effect of probiotics on atopic dermatitis (Turkish)]. *Akademik Gıda*. 2013; 11(1):83-7. <https://dergipark.org.tr/en/pub/akademik-gida/issue/55794/763803>
- [28] Patel R, DuPont HL. New approaches for bacteriotherapy: Prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 2015; 60(Suppl 2):S108-21. [DOI:10.1093/cid/civ177] [PMID]
- [29] Kistler KD, Brunt EM, Clark JM, Diehl AM, Sallis JF, Schwimmer JB, et al. Physical activity recommendations, exercise intensity, and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 2011; 106(3):460-8. [DOI:10.1038/ajg.2010.488] [PMID]

- [30] Shabana MB, Ibrahim HM, Khadre SE, Elemam MG. Influence of rifampicin and tetracycline administration on some biochemical and histological parameters in albino rats. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 2012; 65(5):299-308. [DOI:10.1016/j.jobaz.2012.10.009] [PMID]
- [31] Kalaki-Jouybari F, Shanaki M, Delfan M, Gorgani-Firouzjoei 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. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2020; 126(3):242-9. [DOI:10.1080/13813455.2018.1510968] [PMID]
- [32] Barry JC, Simtchouk S, Durrer C, Jung ME, Mui AL, Little JP. Short-term exercise training reduces anti-inflammatory action of interleukin-10 in adults with obesity. *Cytokine*. 2018; 111:460-9. [DOI:10.1016/j.cyt.2018.05.035] [PMID]
- [33] Kapravelou G, Martínez R, Andrade AM, Nebot E, Camiletti-Moirón D, Aparicio VA, et al. Aerobic interval exercise improves parameters of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and other alterations of metabolic syndrome in obese Zucker rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2015; 40(12):1242-52. [DOI:10.1139/apnm-2015-0141] [PMID]
- [34] Hallsworth K, Thoma C, Hollingsworth KG, Cassidy S, Anstee QM, Day CP, et al. Modified high-intensity interval training reduces liver fat and improves cardiac function in non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Clinical Science*. 2015; 129(12):1097-105. [DOI:10.1042/CS20150308] [PMID]
- [35] Jahromi AS, Zar A, Ahmadi F, Krstrup P, Ebrahim K, Hovanloo F, et al. Effects of endurance training on the serum levels of tumour necrosis factor- α and interferon- γ in sedentary men. *Immune Network*. 2014; 14(5):255-9. [DOI:10.4110/in.2014.14.5.255] [PMID]
- [36] Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2005; 98(4):1154-62. [DOI:10.1152/jap-physiol.00164.2004] [PMID]
- [37] Nicklas BJ, You T, Pahor M. Behavioural treatments for chronic systemic inflammation: Effects of dietary weight loss and exercise training. *Canadian Medical Association Journal*. 2005; 172(9):1199-209. [DOI:10.1503/cmaj.1040769] [PMID]
- [38] Vahdat H, Mombini H, Eslami Farsani M, Ab Abzadeh Sh, Barzegar H. [Effect of High-Intensity Interval Training (HIIT) on the levels of Irisin and interleukin-10 in overweight men (Persian)]. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2018; 12(2):35-44. [DOI:10.29252/qums.12.2.35]
- [39] Choi EJ, Lee CJ, Park HH, So WY. Effect of 12-week low-intensity exercise on interleukin-2, interferon-gamma, and interleukin-4 cytokine production in rat spleens. *Journal of Mens Health*. 2018; 14(3):14-9. [DOI:10.22374/1875-6859.14.3.1]
- [40] Dorneles GP, Haddad DO, Fagundes VO, Vargas BK, Kloecker A, Romão PR, et al. High intensity interval exercise decreases IL-8 and enhances the immunomodulatory cytokine interleukin-10 in lean and overweight-obese individuals. *Cytokine*. 2016; 77:1-9. [DOI:10.1016/j.cyt.2015.10.003] [PMID]
- [41] Savcheniuk O, Kobylak N, Kondro M, Virchenko O, Falalyeyeva T, Berigova T. Short-term periodic consumption of multiprobiotic from childhood improves insulin sensitivity, prevents development of non-alcoholic fatty liver disease and adiposity in adult rats with glutamate-induced obesity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014; 14:247. [DOI:10.1186/1472-6882-14-247] [PMID]
- [42] Ritze Y, Bárdos G, Claus A, Ehrmann V, Bergheim I, Schwirtz A, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One*. 2014; 9(1):e80169. [DOI:10.1371/journal.pone.0080169] [PMID]
- [43] Ma X, Hua J, Li Z. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *Journal of Hepatology*. 2008; 49(5):821-30. [DOI:10.1016/j.jhep.2008.05.025] [PMID]
- [44] Kelishadi R, Farajian S, Mirlahi M. Probiotics as a novel treatment for non-alcoholic fatty liver disease; A systematic review on the current evidences. *Hepatitis Monthly*. 2013; 13(4):e7233. [DOI:10.5812/hepatmon.7233] [PMID]
- [45] Vajro P, Mandato C, Licenziati MR, Franzese A, Vitale DF, Lenta S, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2011; 52(6):740-3. [DOI:10.1097/MPG.0b013e31821f9b85] [PMID]
- [46] Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2003; 37(2):343-50. [DOI:10.1053/jhep.2003.50048] [PMID]