Journal of Sport Biosciences
University of Tehran Press
Online ISSN: 2676-4148

The Effect of Exercise Training and Probiotic Supplementation on TGF-β Gene Expression and Liver Factors in Male Rats with Cholestasis

Mitra Modirrousta[1], Khadijeh Irandoust[2]✉, Mohammad Nabiuni[3], Naheed Mojgani[4], Latifeh Karimzadeh Bardeei[5]

1. Department of Sport Science, Faculty of Social Science, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
E-mail: mitramodirr@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Sport Science, Faculty of Social Science, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. E-mail: irandoust@soc.ikiu.ac.ir
3. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
E-mail: nabiuni@khu.ac.ir
4. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Alborz, Iran. E-mail: n.mojgani@rvsri.ac.ir
5. Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
E-mail: Latifehkarimzadeh@khu.ac.ir

Article Info

Article type:
Research

Article history:
Received:
19 July 2025
Received in revised form:
16 August 2025
Accepted:
4 September 2025
Published online:
2 December 2025

Keywords:
Cholestasis,
Exercise Training,
Probiotic,
TGF-β.

ABSTRACT

Introduction: Cholestasis is one of the chronic liver diseases that is inseparably associated with an ecological imbalance in gut microbiota. Since exercise training is a potent mediator of lipolysis, it is an effective approach for preventing cholestasis-related damage. This study aimed to investigate the protective effects of combined exercise training and probiotic supplementation on the cholestatic liver.

Methods: In this experimental study, 30 male Wistar rats (230–250 g) were randomly assigned into five groups (n = 6): control, cholestasis, cholestasis with exercise training (three sessions per week), cholestasis with probiotic treatment (five sessions per week, 10^8 CFU/ml), and cholestasis subjected to both exercise training and probiotic treatment for a duration of three weeks. Liver tissue was collected to examine the number of hepatocytes and Kupffer cells, and to assess TGF-β gene expression; blood serum was also collected. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test at a significance level of $P < 0.05$.

Results: The results showed a significant decrease in the number of healthy hepatocytes and a significant increase in the number of Kupffer cells, blood TBili and ALP levels, as well as an increase in TGF-β gene expression in the cholestasis group compared to the control group ($P < 0.001$). Both exercise training and probiotic consumption, either alone or in combination, compensated for liver tissue damage and restored hepatocyte counts, decreased the number of Kupffer cells, and reduced levels of ALP, TBili, and TGF-β gene expression in the treatment groups ($P < 0.001$).

Conclusion: Probiotic consumption, either alone or combined with exercise training, by reducing the process of liver tissue damage, can be used as a therapeutic protocol in patients with cholestasis.

Cite this article: Modirrousta M., Irandoust K., Nabiuni M., Mojgani N., & Karimzadeh Bardeei L. The Effect of Exercise Training and Probiotic Supplementation on TGF-β Gene Expression and Liver Factors in Male Rats with Cholestasis. *Journal of Sport Biosciences*. 2025; 17 (3): 19-38.

DOI: http//doi.org/10.22059/JSB.2025.398988.1681.

Journal of Sport Biosciences by University of Tehran Press is licensed under CC BY-NC 4.0. | Web site: https://jsb.ut.ac.ir/ | Email: jsb@ut.ac.ir.

© The Author(s). Publisher: University of Tehran Press.

Journal of Sport Biosciences
University of Tehran Press
Online ISSN: 2676-4148

Extended Abstract

Introduction

Liver diseases are a significant global health issue and are among the leading causes of disability in adults. One such condition, cholestasis, is a progressive biliary disorder that leads to liver fibrosis by activating the TGF-β/Smad signaling pathway and inducing oxidative stress. Regular physical exercise has been shown to help alleviate cholestasis by enhancing bile flow, reducing oxidative damage, and strengthening the liver's antioxidant defense mechanisms. Additionally, emerging evidence suggests that both exercise and probiotic supplementation can positively influence liver metabolism, improve antioxidant capacity, and restore the balance of gut microbiota, which in turn helps reduce liver injury. Based on this evidence, the present study aimed to investigate the combined effects of exercise training and probiotic administration on TGF-β gene expression and liver biomarkers in a rat model of bile duct ligation (BDL)-induced cholestasis.

Methods

Thirty male Wistar rats, aged 12 weeks and weighing between 230 and 250 grams, were randomly divided into five groups: control, cholestasis, cholestasis + exercise, cholestasis + probiotic, and cholestasis + exercise + probiotic (synergistic). All groups were maintained under standard laboratory conditions. Cholestasis was induced using the standard bile duct ligation (BDL) method. A probiotic mixture containing *Lactobacillus rhamnosus*, *L. reuteri*, and *L. plantarum* (10^8 CFU/ml/day) was administered via gavage for three weeks. Aerobic training was conducted on a rodent treadmill for three weeks, with sessions lasting 10 to 30 minutes at a speed of 5 m/min, three days per week. Serum biochemical markers (total bilirubin and alkaline phosphatase) and hepatic TGF-β gene expression were analyzed, alongside histopathological examination using H&E staining. Quantitative real-time PCR was performed, and data were evaluated using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, considering $P < 0.05$ as statistically significant.

Results

Cholestasis led to a significant increase in serum total bilirubin (T.Bili), alkaline phosphatase (ALP), and transforming growth factor-beta (TGF-β) levels. This was accompanied by degeneration of hepatocytes and proliferation of Kupffer cells ($P<0.001$). Treatment with probiotics, exercise, and their combination significantly reduced these pathological changes compared to the untreated biliary duct ligation (BDL) group ($P<0.001$). The interventions with probiotics and the combination of probiotics and exercise demonstrated greater effectiveness in lowering TGF-β levels and improving hepatocellular integrity than exercise alone. Histological analysis confirmed that these treatments alleviated sinusoidal dilation, reduced the number of Kupffer cells, and restored the normal arrangement of hepatic cords. Overall, the combined administration of probiotics and exercise resulted in the most substantial hepatoprotective and anti-fibrotic effects, suggesting a promising therapeutic approach for managing cholestasis-induced liver injury.

Conclusion

This study demonstrated that both probiotic supplementation and exercise training—whether individually or in combination—can effectively reduce hepatic fibrosis caused by cholestasis. Cholestasis significantly increased Kupffer cell proliferation, serum total bilirubin (TBili), alkaline phosphatase (ALP), and transforming growth factor-beta (TGF-β) levels, while also impairing the integrity of hepatocytes. However, these pathological changes were notably reversed following treatment. The intervention combining probiotics and exercise showed the most significant hepatoprotective and anti-fibrotic effects, restoring liver architecture and improving biochemical balance. These findings suggest that probiotics, either alone or in conjunction with exercise, may serve as a safe and effective therapeutic strategy to prevent or reduce liver damage associated with cholestasis. Further molecular and clinical studies are needed to clarify the underlying mechanisms and to validate these effects in human subjects.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines: The current study was conducted in full compliance with ethical standards and received approval under the ethics code IR.QUMS.AEC.1403.005

Funding: No funding was obtained for this research.

Authors' contribution: All authors contributed to the study design and have read and approved the final manuscript.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments: We would like to express our gratitude to all colleagues and researchers who assisted us with this article.

علوم زیستی ورزشی
انتشارات دانشگاه تهران
شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۴۱۴۸

تأثیر تمرین ورزشی و مصرف پروبیوتیک بر بیان ژن TGF-β و برخی فاکتورهای کبدی در موش‌های صحرایی نر مبتلا به کلستاز

میترا مدیرروستا[۱]، خدیجه ایران‌دوست[۲]✉، محمد نبیونی[۳]، ناهید مژگانی[۴]، لطیفه کریم‌زاده باردئی[۵]

۱. گروه علوم ورزشی، دانشکدهٔ علوم اجتماعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.رایانامه: mitramodirr@gmail.com

۲. نویسندهٔ مسئول، گروه علوم ورزشی، دانشکدهٔ علوم اجتماعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران .رایانامه:irandoust@soc.ikiu.ac.ir

۳. گروه سلولی و مولکولی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: nabiuni@khu.ac.ir

۴. مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، البرز، ایران. رایانامه: n.mojgani@rvsri.ac.ir

۵. گروه علوم جانوری، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: Latifehkarimzadeh@khu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۲۹/ ۱۴۰۴/۰۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۵/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴/ ۱۴۰۴/۰۶

تاریخ انتشار: ۱۲ /۱۴۰۴/۰۹

کلیدواژه‌ها:

تمرین ورزشی،

پروبیوتیک،

کلستاز،

TGF-β.

چکیده

مقدمه: کلستاز یکی از بیماری‌های مزمن کبد است که به‌طور جدایی‌ناپذیری با عدم تعادل اکولوژیکی میکروبیوتای روده همراه است. از آنجا که تمرین ورزشی واسطهٔ قوی برای لیپولیز است، رویکرد مؤثری برای جلوگیری از آسیب‌های مرتبط با کلستاز است. هدف از این تحقیق بررسی آثار حفاظتی توأم تمرین ورزشی و مکمل پروبیوتیک بر کبد کلستاتیک بود.

روش پژوهش: در این تحقیق تجربی، ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار (۲۳۰ تا ۲۵۰ گرم) به‌طور تصادفی در پنج گروه (n=6) شامل کنترل، کلستاز، کلستاز با تمرین ورزشی سه جلسه در هفته، کلستاز با درمان پروبیوتیک پنج جلسه در هفته (10^8 CFU/ml) و کلستاز تحت تمرین ورزشی و درمان با پروبیوتیک به مدت سه هفته قرار گرفتند. بافت کبد برای بررسی تعداد سلول‌های هپاتوسیت و کوپفر، بررسی بیان ژن TGFβ و سرم خون برداشت شد. داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی سطح معناداری P<۰/۰۵ انجام تجزیه‌وتحلیل شد.

یافته‌ها: کاهش معنادار در تعداد هپاتوسیت‌های سالم و افزایش معنادار تعداد سلول‌های کوپفر، سطح TBili و ALP خون و همچنین افزایش بیان ژن TGFβ در گروه کلستاز نسبت به کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۱) که تمرین ورزشی و مصرف پروبیوتیک به‌تنهایی و یا هم‌افزایی موجب جبران ضایعات بافت کبد و تعداد هپاتوسیت‌ها، کاهش تعداد سلول‌های کوپفر و کاهش میزان TBili،ALP و بیان ژن TGFβ در گروه‌های تیماری شد (P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: مصرف پروبیوتیک همراه با تمرین ورزشی یا به‌تنهایی با کاهش روند آسیب بافت کبد می‌تواند به‌عنوان یک پروتکل درمانی در بیماران مبتلا به کلستاز استفاده شود.

استناد: مدیرروستا، میترا؛ ایراندوست، خدیجه؛ نبیونی، محمد؛ مژگانی، ناهید؛ و کریم‌زاده باردئی، لطیفه. تأثیر تمرین ورزشی و مصرف پروبیوتیک بر بیان ژن TGF-β و برخی فاکتورهای کبدی در موش‌های صحرایی نر مبتلا به کلستاز. نشریه *علوم زیستی ورزشی*.۱۴۰۴؛ (۳)۱۷، ۳۸-۱۹.

DOI: http//doi.org/10.22059/JSB.2025.398988.1681.

دسترسی به این نشریه علمی، رایگان است و حق مالکیت فکری خود را بر اساس لایسنس کریتیو کامنز (CC BY-NC 4.0) به نویسندگان واگذار کرده است.| آدرس نشریه: https://jsb.ut.ac.ir/ | ایمیل: jsb@ut.ac.ir

ناشر: انتشارات دانشگاه تهران. © نویسندگان.

مقدمه

بیماری‌های کبدی به‌عنوان دوازدهمین علت اصلی ناتوانی در میان افراد ۲۵ تا ۴۹ ساله رتبه‌بندی می‌شوند [۱]. امروزه با توجه به پیشرفت علم پزشکی، پیشگیری از فیبروز کبدی و بهبود آن به هدف دست‌یافتنی در درمان بیماری‌های مزمن کبدی تبدیل شده است [۲]. عدم تعادل بین مرگ و تکثیر سلول‌های کبدی و کلانژیوسیت، ظهور بیماری‌های کبدی و صفراوی پیش‌رونده نظیر کلستاز[1] است [۳]. کلستاز نوعی بیماری کبدی است که می‌تواند به‌علت اختلال در تولید صفرا یا انسداد مجاری صفراوی ایجاد شود [۴]. انواع مختلف کلستاز را می‌توان به دو دستهٔ داخل‌کبدی و خارج‌کبدی تقسیم کرد. کلستاز داخل‌کبدی با پیشرفت بیماری کبد الکلی، لنفوم، سل و هپاتیت ویروسی ایجاد می‌شود. همچنین می‌تواند در اواخر بارداری رخ دهد و به‌طور بالقوه عوارض شدیدی برای نوزاد ایجاد کند [۳]. از علت‌های کلستاز خارج‌کبدی، سنگ کیسهٔ صفرا، تنگ شدن مجرای صفراوی، سرطان مجرای صفراوی، سرطان و التهاب پانکراس را می‌توان نام برد [۵]. علائم بالینی کلستاز شامل زردی، خارش، خستگی، برادی کاردی، تغییر در عملکرد تنفس و نارسایی کلیوی است، همچنین موجب افزایش پروستاگلاندین‌ها، کلسترول، بیلی‌روبین[2] آلکالین فسفاتاز[3] و بالا رفتن سطح نمک‌های صفراوی در خون نیز شده که به دنبال آن می‌تواند بر بسیاری از سیستمهای بدن از جمله قلب و عروق، کلیه و سیستم ایمنی نیز تأثیر گذارد [۶ ، ۷]. تأثیرات اولیه کلستاز شامل افزایش غلظت صفرا در سرم و کاهش ترشح صفرا به داخل روده است که می‌تواند به بیماری سیستمیک منجر می‌شود و در نهایت پیشرفت بیماری به فیبروز کبدی، سیروز کبدی، انسفالوپاتی کبدی و ادم مغزی می‌انجامد [۶ ، ۷]. فیبروز کبدی، یک مرحلهٔ جدایی‌ناپذیر در توسعهٔ بیماری‌های مزمن کبد است و اغلب به سیروز کبدی منجر می‌شود. همچنین می‌تواند با HCC[4] و نارسایی کبدی همراه باشد. ایجاد آسیب کبدی سبب فعالیت HSC و سلول‌های کوپفر می‌شود. سلول‌های HSC[5] سلول‌های اصلی در روند فیبروژنز بافت کبد هستند [۸]. TGF-β[6] و خانوادهٔ پروتئین‌های Smad[7] نقش‌های کلیدی در توسعه و پیشرفت فیبروز کبدی دارند [۹]. در سلول‌های HSCs، TGF-β که به‌صورت پاراکرین و اتوکرین تولید می‌شود، می‌تواند به‌شدت سنتز کلاژن و سایر اجزای مکانیکی را تحریک کند. حضور ROS می‌تواند سبب فعال شدن مسیرهای سیگنال‌دهندهٔ TGF-β شود [۱۰]. سنتز و رسوب پروتئین‌های ECM[8] بافت چربی با تغییر در تعادل سیگنال‌های حفظ‌کننده و تخریب‌کنندهٔ TGF-β اعمال می‌شود [۱۱]. TGF-β همچنین سبب مهار سنتز گلوتاتیون در هپاتوسیت‌ها و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول می‌شود و با به هم خوردن تعادل بین پرواکسیدان – آنتی‌اکسیدان به نفع پراکسیدان‌ها، رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابند [۱۲]. به‌دلیل تأثیرات مفید بر تنظیم سوخت‌وساز، ورزش به‌عنوان راهبردی مؤثر در پیشگیری و درمان سندروم متابولیک تأیید شده است [۱۳]. تحقیقات نشان داده‌اند که ورزش منظم کیفیت کلی زندگی افراد مبتلا به بیماری‌های مزمن کبدی و پیوند کبد را بهبود می‌بخشد [۱۴]. همچنین تمرین ورزشی یک واسطهٔ قوی برای لیپولیز است، از تجمع چربی جلوگیری می‌کند و اندازهٔ سلول چربی را کاهش می‌دهد [۱۵]. تعدیل فعالیت TGF-β در سلول چربی به‌واسطهٔ فعالیت ورزشی نیز رویکرد مؤثری برای جلوگیری از اضافه وزن و بیماری‌های متابولیک مرتبط با آن است. TGF-β1 به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ کلیدی بازسازی ECM در بافت چربی شناخته شده است که با مسیر لیپوژنیک مرتبط است [۱۶]. ورزش همچنین موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش توان دفاعی می‌شود [۱۷]. گزارش شده است که ورزش علاوه بر وزن بدن و چربی کبد در مدل‌های حیوانی، تأثیرات عمیقی بر میکروبیوم

---

1. Cholestatic Liver Disease
2. Bilirubin (Bili)
3. Alkaline Phosphatase (ALP)
4. Hepatocellular Carcinoma (HCC)
5. Hepatic Stellate Cells (HSC)
6. Transforming Growth Factor Beta (TGF-β)
7. Suppressor of mothers against decapentaplegic (smad)
8. Extracellular Matrix (ECM)

روده در مطالعات انسانی دارد [۱۸]. تحقیقات نشان داده‌اند که بیماری‌زایی کلستاز به‌طور جدایی‌ناپذیری با عدم تعادل اکولوژیکی میکروبیوتای روده مرتبط است [۱۹]. استفاده از پروبیوتیک‌ها به کاهش سطح استئاتوز، لیپوژنز، استرس اکسیداتیو و التهاب در کبد، کاهش سطح بیومارکرهای مقاومت به انسولین، انتقال باکتری، نفوذپذیری روده و التهاب سیستمیک منجر می‌شود [۲۰، ۲۱]. باکتری‌های لاکتوباسیلوس[1]میکروبیوم همزیست هستند که در دستگاه گوارش انسان و دستگاه ادراری – تناسلی زنان یافت می‌شوند. آنها در کمک به محافظت از بیماری‌های مزمن مانند بیماری التهابی روده مفیدند [۲۲]. مشخص شده است که لاکتوباسیلوس رامنوسوس *GG*[2]به‌طور معناداری استرس اکسیداتیو کبدی و نکروز کبدی را کاهش می‌دهد [۲۳]. لاکتوباسیلوس پلانتاروم[3]سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد و به کاهش استرس اکسیداتیو در کبد کمک می‌کند [۲۴]. لاکتوباسیلوس روتری[4]قادر به چسبیدن به موکوس و اپیتلیوم روده‌ای است و می‌تواند به‌طور مستقیم بر ترکیب میکروبیوتای روده تأثیر بگذارد [۲۵]. با توجه به اختلال در عملکرد کبد به‌دنبال کلستاز، به‌نظر می‌رسد فعالیت‌های بدنی و مصرف پروبیوتیک تأثیر مفیدی بر بهبود عملکرد کبد در نمونه‌های آسیب‌های کبدی دارد. با وجود این سازوکارهای سلولی فعالیت ورزشی و پروبیوتیک در کلستاز به‌خوبی شناسایی نشده است. همچنین بر اساس شواهد به‌نظر می‌رسد جهت کاهش چربی بدنی و بهبود عملکرد کبدی انواع ورزش‌های هوازی انتخاب مناسبی باشد. تاکنون تحقیقی مبنی بر ارزیابی اثر همزمان پروبیوتیک و تمرین ورزشی بر کاهش بیان TGF-β به‌عنوان یک فاکتور قدرتمند فیبروژنیک در کلستاز کبدی ناشی از انسداد مجرای صفراوی نیز صورت نگرفته است. از این‌رو با توجه به اهمیت موضوع در زمینهٔ آثار جانبی کلستاز، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر تمرین ورزشی و مصرف پروبیوتیک بر بیان ژن TGF-β و برخی فاکتورهای کبدی به‌منظور بررسی اثر ضدفیبروزی در مدل تجربی انسداد مجاری صفراوی موش‌های صحرایی نر صورت گرفت.

روش‌شناسی پژوهش

در این تحقیق تجربی،۳۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar) ۱۲ هفته‌ای در محدودهٔ وزنی ۲۳۰–۲۵۰ گرم، از پژوهشگاه رویان کرج خریداری شده و به اتاق حیوانات دانشکدهٔ علوم زیستی دانشگاه خوارزمی کرج منتقل شد. حیوانات در قفس‌های پلی‌پروپیلن در شرایط آزمایشگاهی استاندارد تحت دوره‌های روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته، دما ۲±۲۳ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰–۴۰ درصد نگهداری شدند. حیوانات از خوراک استاندارد تغذیه شدند و به آنها اجازهٔ دسترسی آزادانه به آب و غذا داده شد. گروه‌ها به‌صورت تصادفی در پنج گروه شامل گروه اول کنترل، گروه دوم کلستاز، گروه سوم کلستاز و تمرین ورزشی، گروه چهارم کلستاز و پروبیوتیک و گروه پنجم کلستاز با پروبیوتیک و تمرین ورزشی (سینرژیک) قرار گرفتند. تمامی ملاحظات اخلاقی منطبق با معاهدهٔ هلسینکی و رعایت حقوق حیوانات در نظر گرفته شد و پس از تأیید در کمیتهٔ اخلاق کار پروژه شروع شد. (IR.QUMS.AEC.1403.005).

القای کلستاز

پس از یک هفته آشنایی رت‌ها با محیط آزمایشگاه، القای کلستاز کبدی با استفاده از جراحی (BDL)[5]بر اساس روش استاندارد یوچینامی[6] و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد [۲۶]. حیوانات با تزریق درون‌صفاقی مخلوط کتامین (۹۰ mg/kg b.w) و زایلزین (۱۰ mg/kgb.w) بی‌هوش شدند. یک برش سه سانتی‌متری در خط میانی شکم زده شده و پوست و عضله از هم باز شدند. پس از شناسایی مجرای مشترک

1. Lactobacillus
2. Lacticaseibacillus rhamnosus GG
3. Lactobacillus plantarum
4. Lactobacillus reuteri
5. Bile Duct Ligation (BDL)
6. Uchinami

صفراوی، با استفاده از نخ سیلک جذب‌نشدنی راند (۴–۰) در دو نقطه جداگانه با فاصلهٔ یک سانتی‌متر از هم گره زده شدند (گره اول زیر تقاطع مجرای کبدی و گره دوم پیش از ورودی مجرای پانکراسی) سپس مجرای بین دو گره قطع شد. سپس لایه‌های عضله جدار شکم با نخ قابل جذب کرومیک راند (۰–۴) و در لایهٔ پوست با نخ قابل جذب کرومیک کات (۰–۳) دوخته شدند. در انتها محل جراحی با دو سی‌سی محلول نرمال سالین ۱۰ درصد شست‌وشو داده شد. تا یک هفته پس از انجام عمل جراحی، تیره شدن رنگ ادرار و همچنین زرد شدن گوش‌ها نشان‌دهندهٔ موفقیت عمل جراحی کلستاز بود.

پروبیوتیک و نحوهٔ کشت

باکتری‌های پروبیوتیکی (BLA-B259، LRE-B16، LPL-B8) مورد استفاده در این تحقیق از شرکت دانش‌بنیان فناوری زیستی طبیعت‌گرا (بایوران) گلدشت کرج تأمین شدند. در این تحقیق، از محیط کشت MRS خریداری‌شده از شرکت شارلو اسپانیا به‌منظور کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک استفاده شد. سویه‌ها، در محیط کشت MRS براث در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی، کشت داده شدند. هر سه سویه‌های باکتری پروبیوتیکی (لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس روتری، لاکتوباسیلوس پلانتاروم) پس از کشت در محیط مایع، سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور در ده دقیقه) شده و رسوب باکتری پس از شست‌وشو در نرمال سالین با هم مخلوط شده و با استاندارد نیم مک فارلند به غلظت (1.5×10^8 CFU/ml) تنظیم شدند [۲۷]. یک هفته پس از تأیید القای کلستاز برای بررسی تأثیر مصرف پروبیوتیک‌ها، رت‌ها به مدت سه هفته و پنج روز در هفته روزانه میزان[1] 10^8 CFU/ml/day در ساعت ۱۲ تا ۲ بعدازظهر از مخلوط هر سه باکتری پروبیوتیک به‌صورت گاواژ دریافت کردند [۲۸].

پروتکل تمرین ورزشی

تمرین شامل دویدن روی نوار گردان جوندگان (تردمیل) مطابق پروتکل آورده شده است. ابتدا تمرین ورزشی برای کلستاز القایی با BDL به‌صورت پایلوت طبق پروتکل ورزشی تحقیق دوست‌دار روزبهانی و همکاران (۲۰۲۲) انجام شد [۲۹] . با توجه به اینکه این پژوهش اولین بررسی تمرین ورزشی بر بیماری کلستاز القایی از طریق جراحی بود، تمرین ورزشی اصلاح و تعدیل شد. تمامی رت‌ها یک هفته پیش از جراحی به‌منظور آشنایی با تردمیل سه جلسه در هفته به مدت پنج دقیقه و با سرعت پنج متر در دقیقه با شیب صفر روی تردمیل راه رفتند. یک هفته پس از جراحی و تأیید کلستاز، رت‌ها پروتکل تمرین هوازی به مدت سه هفته، سه روز در هفته ساعت ۱۰ تا ۱۲ صبح اجرا کردند (جدول ۱).

جدول ۱. پروتکل تمرین ورزشی

زمان فعالیت (هفته)	زمان دویدن (دقیقه)	سرعت دویدن (متر در دقیقه)
اول	۱۰	۵
دوم	۲۰	۵
سوم	۳۰	۵

[1]. Colony-Forming Unit (CFU)

۴۸ ساعت پس از آخرین تیمار، حیوانات پس از ۱۲ ساعت ناشتایی توسط کلروفرم کشته شدند. با برشی در وسط قفسهٔ سینه و با استفاده از سرنگ پنج‌میلی‌لیتری، از قلب خون‌گیری شد. نمونه‌ها جهت لخته شدن خون، در ۲۵۰۰ دور و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا سرم از خون جدا شود. قسمتی از بافت کبد در محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شده تا پس از انجام روش‌های متداول پردازش بافتی، از آن‌ها بلوک‌های پارافینی برای رنگ‌آمیزی بافت تهیه شود.

اندازه‌گیری سرم

اندازه‌گیری مقدار T.Bili و ALP در سرم بر اساس روش IFCC (فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) و با استفاده از کیت‌های مربوط (Delta.DP و Biorex fars ایران) انجام گرفت.

بافت‌شناسی

برای ارزیابی بافت‌شناسی، پس از تأیید مرگ حیوان بخشی از کبد برش و در ۴ درصد پارافرمالدهید–PBS فیکس شد. مراحل پاساژ بافتی شامل مراحل آب‌گیری با الکل‌های صعودی، شفاف‌سازی، آغشته‌سازی با پارافین، قالب‌گیری و برش‌گیری با میکروتوم به ضخامت ۱۰ میکرومتر بود. از مجموع برش‌های حاصل از هر نمونه، به‌طور تصادفی از هر پنج برش، یک برش انتخاب شد.

رنگ‌آمیزی

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین یکی از اصلی‌ترین روش‌های بافت‌شناسی است، هماتوکسیلین هسته‌های سلولی را آبی مایل به ارغوانی‌رنگ و ائوزین ماتریکس خارج‌سلولی و سیتوپلاسم را صورتی‌رنگ می‌کند. این رنگ‌آمیزی مورفولوژی و توزیع کلی سلول‌ها را نشان می‌دهد و نمایی کلی از ساختار نمونه بافت ارائه می‌دهد.

Real-time PCR

یکی از معتبرترین روش‌های اندازه‌گیری بیان کمی ژن است. در این تحقیق برای بررسی اثر کلستاز و آثار درمانی بر روی بیان ژن (TGF-β) از تکنیک Real-time PCR استفاده شد. استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA از بافت شرکت FAVORGEN تایوان (FavorPrep ™ Blood/Cultured Cell Total RNA Mini Kit) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. به‌منظور بررسی غلظت RNA استخراج‌شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد. نمونه‌هایی که نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر بزرگ‌تر از ۱/۸ داشتند، به‌عنوان نمونه‌های خالص RNA در نظر گرفته شدند. به‌منظور ارزیابی میزان بیان ژن‌ها، پس از استخراج RNA به کمک آنزیم Reverse Transcriptase یک مولکول DNA مکمل (CDNA) ساخته می‌شود. سنتز CDNA با استفاده از کیت Biotechrabbit آلمان و طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. از مسترمیکس SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) شرکت Takara ژاپن طبق دستورالعمل استفاده شد. برای طراحی پرایمر از نظر اختصاصی بودن برای ژن موردنظر از نرم‌افزار primer 3 و سایت NCBI استفاده شد (جدول ۲).

جدول۲. توالی پرایمرها

Primer name	'seq 3 '5	Product size	Exon junction
Rat-B2M-F	CGTCGTGCTTGCCATTCAG	88bp	YES
Rat-B2M-R	GCGTTGAGGAAGTTGGGC		
Rat-TGFB-F	GACATGAACCGACCCTTCCT	136bp	YES
Rat-TGFB-R	GCCGTACACAGCAGTTCTTC		

مواد لازم برای بررسی بیان ژن موردنظر در استریپ‌ها (میکروتیوب‌های مخصوص real-time PCR) ریخته شده و در دستگاه Real-time قرار داده شدند. پس از پایان واکنش آنالیز کمی داده‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ توسط دستگاه انجام گرفت. نتایج تمام ژن‌ها به ژن B2M به‌عنوان کنترل داخلی نرمالایز شده و سپس مقایسهٔ بین گروه‌ها انجام شد. میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالایز شده و بیان ژن‌های گروه سالم به‌عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

روش آماری

تمامی مراحل تحلیل آماری محاسبات با نرم‌افزار Graphpad Prism نسخهٔ ۱-۳-۱۰ و Image J انجام گرفت. نتایج به‌صورت میانگین انحراف معیار (Mean±SD) نشان داده شدند. پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها برای مقایسهٔ تفاوت معناداری بین گروه‌ها از تست آنالیز واریانس یکطرفه و تست تعقیبی Tukey استفاده شد. سطح معناداری P<۰/۰۰۱ در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش

بررسی میزان تغییرات آنزیم‌های کبدی بر اثر کلستاز

ALP و بیلی‌روبین توتال (TBili) از مهم‌ترین شاخصه‌های پاتولوژیک آسیب در کبد هستند. نتایج آنالیز آماری ANOVA افزایش معناداری در میزان TBili گروه BDL نسبت به گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۱)، درحالی‌که گروه‌های BDL تیمارشده سبب کاهش معناداری در میزان TBili نسبت به گروه BDL شدند (P<۰/۰۰۱). تفاوت معناداری در بین گروه‌های تیمار شده مشاهده نشد. همچنین افزایش معناداری در میزان ALP گروه BDL نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P<۰/۰۰۱)، درحالی‌که گروه‌های BDL تیمارشده سبب کاهش معناداری در میزان ALP نسبت به گروه BDL شدند (P<۰/۰۰۱). همچنین کاهش معناداری در میزان ALP گروه ورزش نسبت به پروبیوتیک و سینرژیک و نیز بین گروه پروبیوتیک با گروه سینرژیک مشاهده شد (P<۰/۰۰۱) (جدول‌های ۳،۴،۵ و نمودارهای ۱و۲).

جدول ۳. آمار توصیفی شاخص‌های کبدی در سرم خون،ALP (U/L) و TBili (mg/dl) برای پنج گروه تیمار شامل گروه کنترل، کلستاز (BDL)، تمرین ورزشی، مکمل پروبیوتیک و سینرژیک (n=6) (Mean±SD)

شاخص‌ها / گروه‌ها	ALP (U/L)	TBili (mg/dl)
کنترل	۳۹۳ ± ۵/۰۸۱	۰/۱۳۰۰۰ ± ۰/۰۱۴۱۴
BDL	۱۳۰۲ ± ۲/۸۲۴	۳/۰۰۰ ± ۰/۰۱۵۸۱

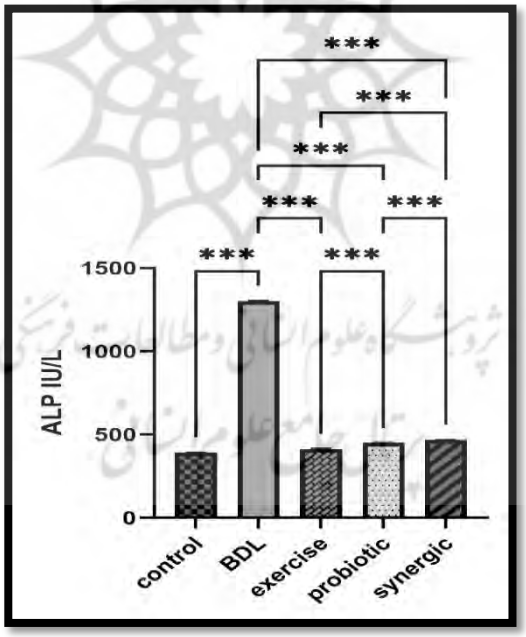
ورزش	۴۱۴/۲ ± ۳/۹۷۱	۰/۱۳۰۰۰ ± ۰/۰۵۶۵۷
پروبیوتیک	۴۵۰ ± ۲/۴۲۸	۰/۱۳۰۰۰ ± ۰/۰۲۸۳۱
سینرژیک	۴۶۹/۶ ± ۱/۴۱۷	۰/۱۵۲۰ ± ۰/۰۴۵۳۴

جدول ۴. نتایج تحلیل واریانس یکطرفهٔ ALP برای پنج گروه آزمایشی (n=6)

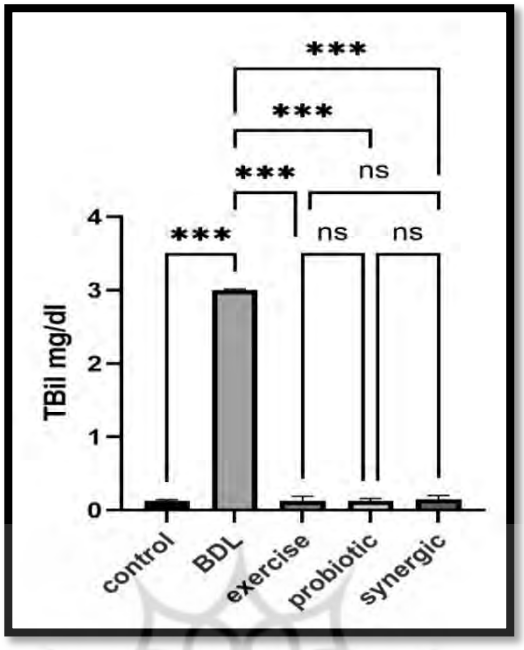
ANOVA (ALP)	جمع مجذورات	DF	میانگین مجذورات	F	معناداری
گروه‌ها	۳۶۵۸۱۳۶	۴	۹۱۴۵۳۴	۱۲۷۸۴۷	P<۰/۰۰۰۱
خطا	۱۷۸/۸	۲۵	۷/۱۵۳		

جدول ۵. نتایج تحلیل واریانس یکطرفهٔ TBili برای پنج گروه آزمایشی (n=6)

ANOVA (TBili)	جمع مجذورات	DF	میانگین مجذورات	F	معناداری
گروه‌ها	۳۹/۸۲	۴	۹/۸۴۸	۷۶۲۶	P< ۰/۰۰۰۱
خطا	۰/۰۳۲۲۸	۲۵	۰/۰۰۱۲۹۱		



نمودار ۱. سطح سرمی ALP در گروه کنترل، BDL و گروه‌های BDL تیمارشده با پروبیوتیک و ورزش و سینرژیک (n=6). افزایش معناداری در میزان ALP گروه BDL نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. درحالی‌که گروه‌های BDL تیمارشده سبب کاهش معناداری در میزان ALP نسبت به گروه BDL شدند. ***P<0.001 .(SD ± Mean)



نمودار ۲. سطح سرمی TBili در گروه کنترل، BDL و گروه‌های BDL تیمارشده با پروبیوتیک و ورزش و سینرژیک (n=6). افزایش معناداری در میزان TBili گروه BDL نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. درحالی‌که گروه‌های BDL تیمارشده سبب کاهش معناداری در میزان TBili نسبت به گروه BDL شدند. ***P<0.001, ns= non significant .(Mean±SD)

نتایج بیان ژن TGFβ با استفاده از آزمون Real Time PCR

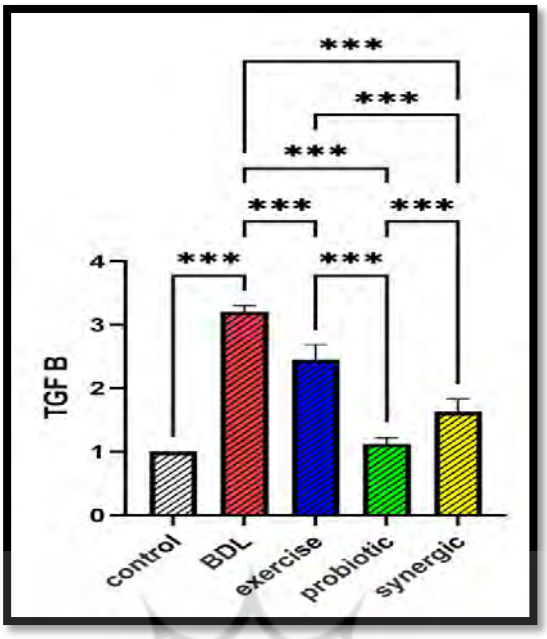
آنالیز آماری ANOVA افزایش معناداری در میزان TGFβ گروه BDL نسبت به گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۱). گروه‌های BDL تیمارشده سبب کاهش معناداری در میزان TGFβ نسبت به گروه BDL شدند (P<۰/۰۰۱). همچنین کاهش معناداری در میزان TGFβ گروه پروبیوتیک نسبت به ورزش و نیز بین گروه سینرژیک با گروه ورزش مشاهده شد (P<۰/۰۰۱) (جدول‌های ۶ و۷، نمودار ۳).

جدول ۶. آمار توصیفی بیان ژن TGFβ پنج گروه آزمایشی کنترل، کلستاز، تمرین ورزشی، مکمل پروبیوتیک و سینرژیک (n=6) (Mean±SD)

گروه‌ها	کنترل	BDL	ورزش	پروبیوتیک	سینرژیک
TGFβ	۱	۳/۲۰۹ ±۰/۰۹۷	۲/۴۶۰ ±۰/۲۲	۱/۱۳۲ ±۰/۰۹۲	۱/۶۲۹ ±۰/۲۰

جدول ۷. نتایج تحلیل واریانس یکطرفهٔ TGFβ برای پنج گروه آزمایشی (n=6)

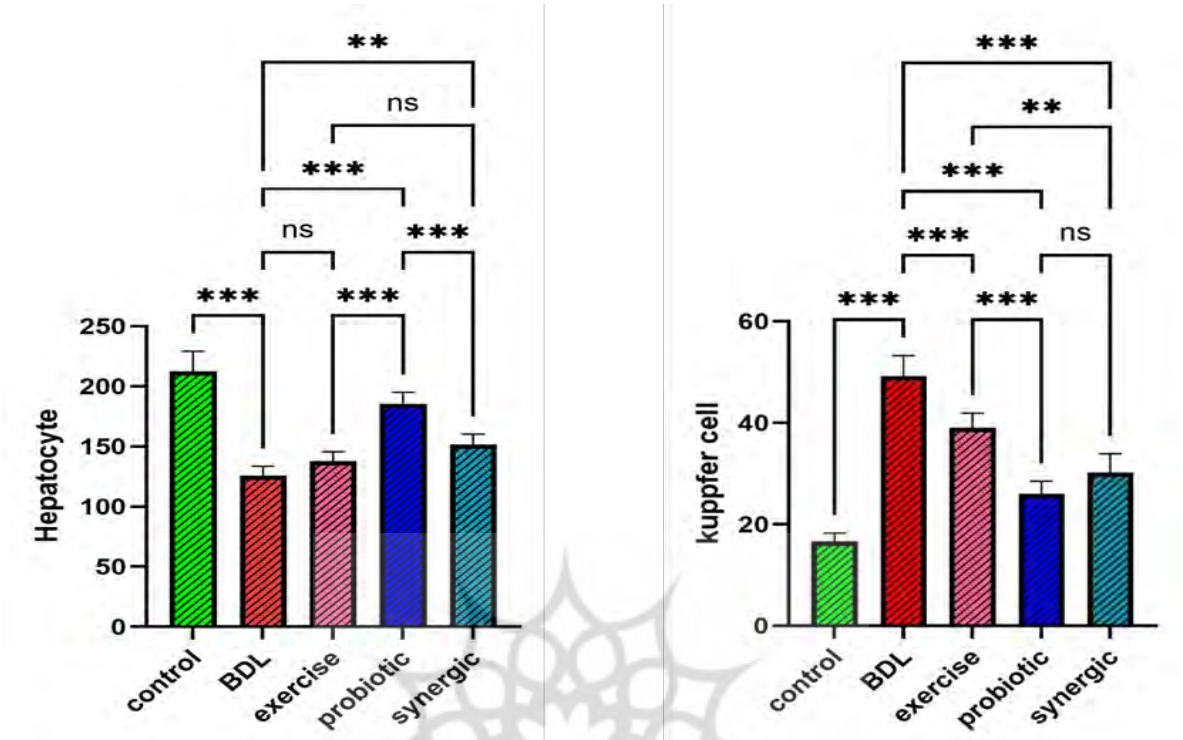
ANOVA (TGFβ)	جمع مجذورات	DF	میانگین مجذورات	F	معناداری
گروه‌ها	۲۱/۰۰	۴	۵/۲۵۰	۲۱۴/۱	P<۰/۰۰۰۱
خطا	۰/۶۱۳۲	۲۵	۰/۰۲۴۵۳		



نمودار ۳. نتایج بیان ژن TGFβ در بافت کبد فیبروتیک ناشی ازکلستاز گروه کنترل، BDL و گروه‌های BDL تیمارشده با پروبیوتیک، ورزش و سینرژیک. (n=6). افزایش معناداری در میزان TGFβ گروه BDL نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. گروه‌های تیمارشده سبب کاهش معناداری در میزان TGFβ نسبت به گروه BDL شدند .(Mean±SD), ***P<0.001

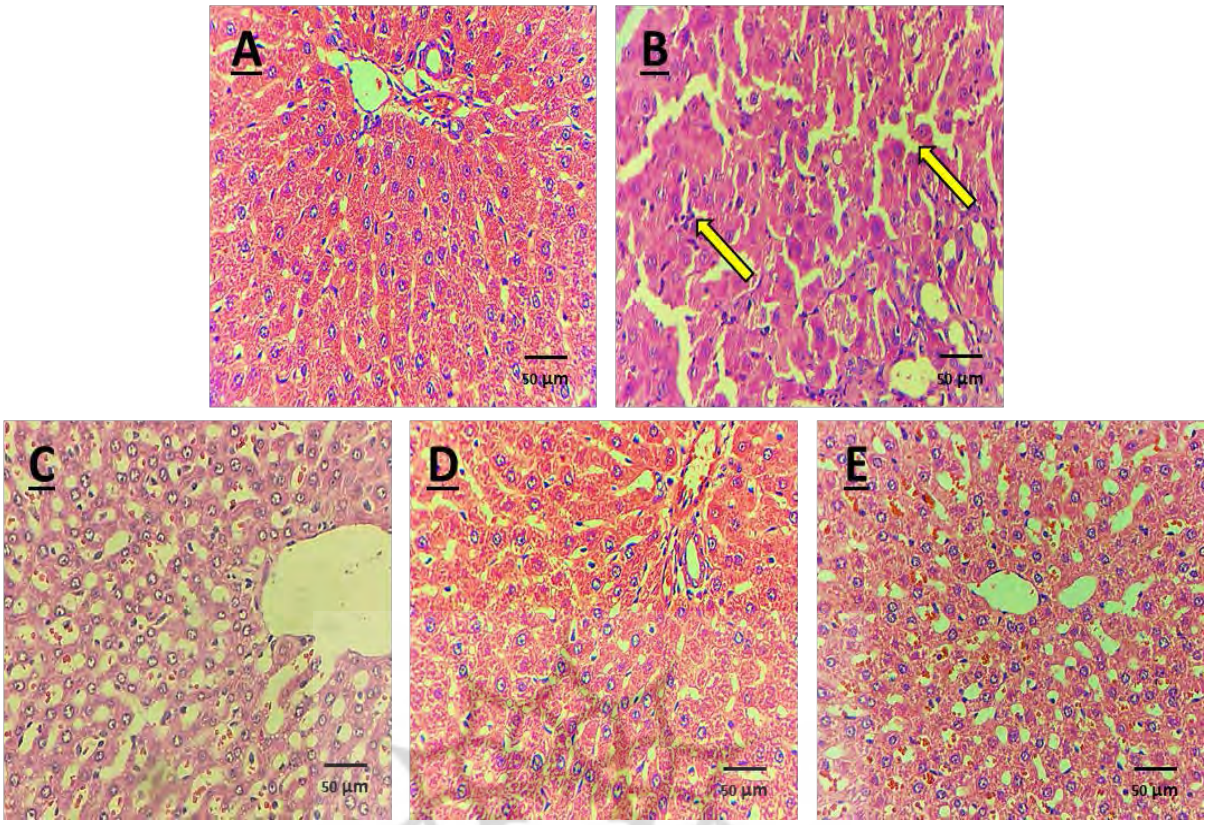
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی بر تغییرات بافتی گروه‌های موردبررسی

آسیب کبدی سبب ازبین‌رفتن هپاتوسیت‌ها و فعالیت HSCs و سلول‌های کوپفر می‌شود. در این تحقیق تعداد سلول‌های کوپفر و هپاتوسیت در اسلایدهای H&E شمارش شد. نتایج نشان داد که کلستاز به افزایش معنادار سلول‌های کوپفر و کاهش معنادار هپاتوسیت‌ها در کبد منجر شده (P<۰/۰۰۱)، درحالی‌که تیمار حیوانات با پروبیوتیک و سینرژیک به‌طور معناداری سبب کاهش سلول‌های کوپفر (P<۰/۰۰۱) و افزایش هپاتوسیت‌ها شده است (P< ۰/۰۱ و P<۰/۰۰۱). اما در تیمار ورزشی تفاوت معناداری در افزایش هپاتوسیت‌ها مشاهده نشد، درحالی‌که مقدار سلول‌های کوپفر کاهش معناداری را نشان داد (P<۰/۰۰۱) (نمودار ۴).



نمودار ۴. نتایج تعداد سلول‌های کوپفر و هپاتوسیت در اسلایدهای H&E در گروه کنترل، BDL و گروه‌های BDL تیمارشده با پروبیوتیک و ورزش و سینرژیک (n=6).افزایش معناداری در تعداد سلول‌های کوپفر گروه BDL، نشان‌دهندهٔ افزایش میزان التهاب بافت کبد، در این گروه نسبت به گروه کنترل است. کاهش معناداری در تعداد سلول‌های کوپفر در نمونه‌های تیمارشده نسبت به گروه BDL مشاهده شد. همچنین کاهش معناداری در تعداد هپاتوسیت‌های گروه نسبت BDL نسبت به کنترل مشاهده شد. درحالی‌که گروه‌های BDL تیمارشده با پروبیوتیک و سینرژیک سبب افزایش معناداری در میزان تعداد هپاتوسیت‌ها نسبت به گروه BDL شدند. (Mean±SD) ns=non ,P<0.01 ,P<0.001*** significant**

پس از برش‌گیری بافت کبد و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین مشخص شد در نمونه‌های گروه کنترل، بافت کبد با ساختار منظم و انسجام کامل همراه با ستون‌های منظم از سلول‌های هپاتوسیتی در اطراف وریدهای مرکز لوبولی قرار دارند. سلول‌های هپاتوسیت با هستهٔ روشن و سلول‌های کوپفر در بین فضاهای سینوزوئیدی با هسته‌های تیره و کشیده همراه با تعداد و پراکندگی مناسب قابل رؤیت هستند (شکل ۱،A). در نمونه‌های گروه کلستاز، بافت کبد با تغییراتی در نواحی مختلف همراه است. فضاهای سینوزوئیدی دارای اتساع و گسترش هستند. هپاتوسیت‌ها نیز درجاتی از تغییرات دژنراتیو را نشان می‌دهند. تعداد سلول‌های کوپفر زیاد و تعداد هپاتوسیت‌ها کاهش‌یافته است (شکل۱،B). در نمونه‌های کبد گروه‌های تیمار، اتساع فضای سینوزوئیدی و سلول‌های کوپفر کاهش‌یافته است، همچنین افزایش تعداد هپاتوسیت را نشان می‌دهند (شکل ۱، C,D,E)، در نتیجه مشخص شد هپاتوسیت‌ها در کبد گروه BDL دچار تغییراتی از جمله تورم سیتوپلاسم و تغییر در شکل و مکان هستهٔ آنها شدند و به‌هم‌ریختگی آرایش طناب‌های هپاتوسیتی و بزرگ شدن فضای سینوزوئیدها دیده شد که در نمونه‌های تیمارشده این اختلالات بافتی کاسته شد.



شکل ۱. برش بافتی کبد در اسلایدهای H&E در گروه کنترل، BDL و گروه‌های BDL تیمارشده با پروبیوتیک و ورزش و سینرژیک (n=6). A) کبد سالم: هپاتوسیت‌ها در حالت طبیعی‌اند و مرز بین آنها مشخص است و سینوزوئیدها قابل تشخیص هستند. B) کبد BDL: نشان‌دهندهٔ هپاتوسیت‌های دژنره شده و افزایش فضای سینوزوئید و سلول‌های کوپفر نسبت به گروه کنترل هستند. C) کبد تیمارشده با ورزش: سینوزوئیدها قابل‌تشخیص هستند و تعداد هپاتوسیت‌های آسیب‌دیده نسبت به گروه BDL کاهش‌یافته است. D) کبد تیمارشده با پروبیوتیک: کاهش فضای سینوزوئیدی، بهبود طناب‌های کبدی و افزایش هپاتوسیت‌ها قابل رؤیت است. E) کبد درمان‌شده با پروبیوتیک و ورزش: کاهش فضای سینوزوئید و افزایش میزان هپاتوسیت‌ها نسبت به BDL مشخص است. رنگ‌آمیزی H&E. بزرگ‌نمایی ۲۰۰x (scale bar = 50µm)

بحث و نتیجه‌گیری

از طریق اتصالات ورید پورت، کبد و میکروبیوم روده به‌صورت دوطرفه با یکدیگر تعامل دارند و دیسبیوز میکروبیوم روده ممکن است به مراحل اولیهٔ فیبروز کبدی کمک کند [۳۰]. فیبروز کبدی پاسخ به آسیب مزمن کبد است که در آن برخی از هپاتوسیت‌ها دچار آپوپتوز شده و از دست رفتن تدریجی عملکرد کبد رخ می‌دهد [۳۱]. HSC ها توسط عوامل رشد از جمله PDGF[1] و TGF-β، سایتوکاین‌های التهابی نظیر IL1-β، TNF-α، کموکاین‌ها و محصولات استرس اکسیداتیو فعال می‌شوند. سپس HSCهای فعال‌شده یک ECM در کبد تولید می‌کنند که با رسوب کلاژن، زمینهٔ پیشرفت فیبروز کبدی فراهم می‌شود [۳۲]. از طرفی دیگر ماکروفاژها با ترشح سیتوکین‌های مختلف، از جمله TGF-β1، VEGF[2] و آنژیوتانسین II، فیبروز را تسریع می‌کنند تا سلول‌های بافت محلی مانند HSC و میوفیبروبلاست‌ها را فعال کنند [۳۳]. سلول‌های کوپفر که در سینوزوئیدهای کبدی قرار دارند، اولین سلول‌های ایمنی‌اند که به آسیب کبدی پاسخ می‌دهند

[1]. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)

[2]. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

[۳۴]. سیگنال‌دهی TGF-β به‌عنوان مسیر اصلی فیبروژنیک در نظر گرفته می‌شود که فعال‌سازی HSC و ECM را تحریک می‌کند [۳۲]. سازوکار حیاتی در القای تشکیل ECM در طول فیبروز کبدی، مسیر TGF-β/Smad است [۳۲، ۳۵]. در مسیرهای TGF-β/ Smad، TGF-β به گیرنده نوع II متصل می‌شود سپس گیرنده نوع I را فسفریله کرده و Smad 2,3 را جذب و فسفریله می‌کند [۳۵] و سپس با Smad 4 یک کمپلکس تشکیل می‌دهد که به هسته منتقل می‌شود و رونویسی ژن هدف مانند کلاژن نوع I را تحریک می‌کند [۳۵، ۳۶] . I-Smad شامل Smad6 و Smad7 است که به کمپلکس TGF متصل می‌شوند و سیگنال‌دهی TGF-β1 را مهار یا تنظیم می‌کنند تا التهاب و فیبروز کبدی را بهبود بخشند. TGF-β ممکن است HSCs را از طریق مسیرهای غیر Smad و همچنین مسیر Smad تحریک کند، از جمله کیناز پروتئین فعال‌شده با میتوژن (MAPKs)، کیناز پروتئین تنظیم‌شده با خارج سلولی، کیناز N-terminal c-Jun (JNK) [۳۷]. همسو با تحقیق حاضر، تریودی[1] و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند پس از درمان با مداخلهٔ ترکیبی P. copri و L. murinus TGF-β1, و سطح نسبی Smad 2,3 به‌طور چشمگیری کاهش یافت و نشان داد مسیر سیگنال‌دهی TGF-β1/ Smad ممکن است از طریق مداخلهٔ باکتریایی مهار شود و بدین ترتیب به بهبود چشمگیر التهاب و فیبروز کبدی منجر شود [۳۸]. میکروبیوتای روده نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی بیماری کبد کلستاتیک ایفا می‌کند. به‌نظر می‌رسد که باکتری‌های روده‌ای از طریق افزایش ترشح اندوتوکسین‌ها قادر به تولید بیماری کبد فیبروتیک از طریق فعال‌سازی سلول‌های کوپفر، القای تولید TGF-β و متعاقب آن فعال‌سازی HSC ها هستند [۳۹]. LPS[2]بر سیستم ایمنی تأثیر می‌گذارد و Toll4 (TLR4) [3]را فعال می‌کند که یک گیرنده شناسایی الگو است که مقاومت در برابر عفونت‌های پاتوژن را فراهم می‌کند و ایمنی ذاتی و تطبیقی را پیوند می‌زند [۴۰]. گزارش شده است در سلول‌های اپیتلیالی صفراوی آسیب‌دیده و هپاتوسیت‌ها و سلول‌های التهابی نفوذی، افزایش LPS و TLR4 به‌طور مثبت با سطح ALP، بیلی‌روبین کل و γ–گلوتامیل ترانسفراز (GGT) مرتبط است. سطوح بالای LPS, TLR4 را فعال کرده و به آسیب کبدی کمک می‌کند [۲۱، ۴۱]. همسو با تحقیق حاضر وو[4] و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند لاکتوباسیلوس‌ها به‌طور قابل‌توجهی آسیب‌های کبدی را مهار می‌کنند که این امر با بهبود ساختار آسیب‌دیدهٔ کبد، کاهش سطوح ALT، AST،ALP و LDH و سرکوب اختلال عملکرد میتوکندری مشهود است. به‌طور کلی، باسیلوس‌ها آسیب‌های کبدی ناشی از استرس اکسیداتیو را از طریق بهینه‌سازی ترکیب، مسیرهای متابولیکی و تکثیر و ترشح پاتوژنیک میکروبیوتای روده کاهش می‌دهد [۴۲]. در یک مقالهٔ مروری اذعان شد ورزش با افزایش سوخت‌وساز هوازی و غیرهوازی همراه است که سبب افزایش ROS می‌شود. اثر بازدارندگی تمرین منظم حداقل در بخشی، ناشی از سازگاری به فشار اکسیداتیو است. فرایند سازگاری با تمرین علاوه بر سطوح ROS، با افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها برای بازسازی تخریب ناشی از اکسیداتیو مرتبط است. کاهش در آنزیم‌های کبدی ALP ,ALT ,AST، و همچنین کاهش بیلی‌روبین توتال و مستقیم نیز با این سازگاری‌ها مرتبط بوده و نشان‌دهندهٔ ترمیم بافت کبدی است [۴۳]. گردش انتروهپاتیک اسیدهای صفراوی به‌عنوان عامل مهمی در انواع مختلف کلستاز شناخته شده است. اسیدهای صفراوی توسط انواع مختلفی از گیرنده‌های هسته‌ای FXR [5]و غشایی TGR5[6]تنظیم می‌شوند. گیرندهٔ FXR به‌طور شایان توجهی در هپاتوسیت‌ها و روده‌ها بیان می‌شود و به‌عنوان حسگر اسیدهای صفراوی عمل می‌کند که جذب، متابولیسم و حمل‌ونقل اسیدهای صفراوی و میکروبیوتای روده را تنظیم می‌کند [۴۴]. TGR5(GPBAR-1) یک گیرندهٔ اسیدهای صفراوی است که به‌طور گسترده‌ای در انسان و حیوانات وجود دارد. این گیرنده به‌طور عمومی در سلول‌های کوپفر و سلول‌های اندوتلیالی سینوزوئید کبدی بیان می‌شود و می‌تواند توسط اسیدهای

[1]. Trivedi
[2]. Lipopolysaccharide (LPS)
[3]. Toll-like receptors (TLR)
[4]. Wu
[5]. Farnesoid X Receptor (FXR)
[6]. G-Protein-Coupled Bile Acid Receptor, Gpbar1 (TGR5)

صفراوی فعال شود [۴۵]. پروبیوتیک‌ها FXR روده‌ای را فعال کرده و بیان FGF15/FGF19[1] را القا می‌کنند. همسو با پژوهش حاضر لیو[2] و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند درمان با لاکتوباسیلوس رامنوسوسGG به‌طور چشمگیری التهاب، آسیب و فیبروز کبد را کاهش داد و به کاهش اسیدهای صفراوی کبدی در موش‌های BDL منجر شد. علاوه بر این، میکروبیوتای روده را تغییر داد که با افزایش دکونژوگاسیون اسیدهای صفراوی و افزایش دفع اسیدهای صفراوی در مدفوع و ادرار مرتبط بود [۲۸]. راکایووا و همکاران (۲۰۲۱) اثر ترکیبی هشت سویه پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس: اسیدوفیلوس، پلنتاروم، پاراکازئی، بلگاریکوس و بیفیدوباکتریوم: اینفانتیس، لانگوم، برویس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس) را بر پروفایل نورومتابولیک موش‌ها در بیماری مزمن کبد کلستاتیک بررسی کردند و نشان دادند تجویز این ترکیب سبب کاهش و تأخیر در پیشرفت بیماری شد [۴۶]. ناهمسو با تحقیق حاضر یک آزمایش کنترل‌شدهٔ تصادفی با دارونما در بیماران کلستاز با PSC نشان داد که در طول تجویز پروبیوتیک‌ها، هیچ تغییری در علائم PSC مانند خارش، خستگی و فراوانی مدفوع مشاهده نشد و هیچ فایده‌ای برای بیوشیمی کبد یا عملکرد کبد نداشت؛ تأثیرات به سویه و دوز وابسته‌اند و ممکن است آثار متفاوتی بر کلستاز ناشی از عوامل مختلف داشته باشند. تحقیقات بیشتری برای بررسی سازوکارهای مولکولی خاصی که پروبیوتیک‌ها از طریق آنها کلستاز را کاهش می‌دهند، لازم است تا این پدیده‌ها را توضیح دهد [۲۰].

اثر فعالیت بدنی بر گردش کبدی – صفراوی را می‌توان از طرق عواملی نظیر میکروبیوتای روده و گردش انتروهپاتیک اسیدهای صفراوی در نظر گرفت. رابطه‌ای بین هضم و جذب روده‌ای و وضعیت کاتابولیک ناشی از فعالیت بدنی وجود دارد [۴۷]. فعالیت بدنی ترکیب و تنوع باکتری‌های روده را تغییر می‌دهد [۴۸]. اسیدهای صفراوی با گیرندهٔ TGR5(GPBAR-1) در روده و در سلول‌های کوپفر تعامل دارند. TGR5(GPBAR-1) روده‌ای مسیرهای هورمونی آزادسازی پپتید YY و پپتیدهای شبیه گلوکاگون GLP-1 و GLP-2 را کنترل می‌کند و از طریق گیرنده‌های TGR5(GPBAR-1) بافتی واقع در سلول‌های بافت چربی و عضلهٔ اسکلتی بر اشتها، سوخت‌وساز گلوکز و انسولین تأثیر می‌گذارد [۴۹]. در کبد، فعال‌سازی TGR5(GPBAR-1) توسط اسیدهای صفراوی در گردش اثر ضدالتهابی را ترویج می‌کند. فعالیت بدنی ممکن است این اثر را میانجی‌گری کند [۵۰].

تأثیرات ضدالتهابی ورزش نه‌تنها از طریق کاهش چربی احشایی، بلکه از طریق القای یک زنجیرهٔ ضدالتهابی پس از هر دوره ورزش انجام می‌شود [۵۱]. در طول آسیب متابولیک کبد، لیپیدهای سمی می‌توانند فعال‌سازی HSC را از طریق سازوکارهای مستقیم و غیرمستقیم ترویج دهند. تجمع کلسترول و اسیدهای چرب آزادسازی لیگاندهای Hedgehog و وزیکول‌های خارج‌سلولی از هپاتوسیت‌ها منجر به می‌شود که به تکثیر HSC و تولید ECM می انجامد. علاوه بر این، هپاتوسیت‌های حاوی کلسترول توسط ماکروفاژهای مقیم کبد و ماکروفاژهای نفوذی بلعیده می‌شوند که به فعال‌سازی اینفلاماژوم، تولید سیتوکین‌های پروالتهابی و TGFβ منجر می‌شود که التهاب کبد، فعال‌سازی HSC و فیبروژنز را تداوم بیشتری می‌بخشد [۵۲]. نقش مرکزی در تغییرات متابولیک ناشی از ورزش بر عهدهٔ پروتئین فعال‌شدهٔ کیناز با آدنوزین مونوفسفات (AMPK) است. در کبد، AMPK سنتز لیپید را از طریق سرکوب SREBPF[3] یک فاکتور رونویسی کلیدی که ژن‌های لیپوژنتیک را فعال می‌کند، مهار می‌کند. فعال‌سازی AMPK به کاهش مالونیل CoA منجر می‌شود. ورزش فعالیت SCD-1 کبدی را کاهش می‌دهد که یک آنزیم محدودکننده در بیوسنتز چربی‌های اشباع‌شده است. فعالیت کاهش‌یافتهٔ SCD-1 لیپوژنز را کاهش می‌دهد، درحالی‌که اکسیداسیون اسیدهای چرب کبدی را افزایش می‌دهد [۵۳]. همچنین همسو با پژوهش حاضر دوان[5] و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند ورزش ترشح TGF-β1 و در نتیجه خطر پیشرفت و متاستاز HCC را کاهش می‌دهد و در نهایت پیش‌آگهی را بهبود می‌بخشد

1. Fibroblast Growth Factor (FGF)
2. Liu
3. Sterol regulatory element binding protein (SREBP)
4. Sickle Cell Disease (SCD)
5. Devan

[۵۴]. مون[1] و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که ورزش روی تردمیل به افزایش سطوح AMPK و ACC[2] فسفوریله‌شده در کبد موش‌ها منجر شد. این اثر می‌تواند توسط فاکتور مهارکنندهٔ مهاجرت ماکروفاژها، یک سیتوکین که تأثیرات متابولیکی آن به‌طور فزاینده‌ای شناخته می‌شود، میانجی‌گری شود [۵۵]. همسو با تحقیق ژانگ[3] و همکاران (۲۰۲۱) در مدل آسیب حاد کبدی، نشان داده شد ۶۰ دقیقه ورزش هوازی، پنج روز در هفته به مدت چهار هفته، به‌طور چشمگیری آسیب و التهاب کبد ناشی از ایسکمی و بازپرفیوژن را در موش‌ها کاهش می‌دهد. مشخص شد ورزش به‌طور خاص سلول‌های کبدی را به سمت فنوتیپ ضدالتهابی از طریق برنامه‌ریزی متابولیک هدایت می‌کند [۵۶]. علاوه بر این، دینیز[4] و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که دویدن روی تردمیل به مدت ۶۰ دقیقه در روز، پنج روز در هفته به مدت هشت هفته می‌تواند پیشرفت استئاتوز کبدی و التهاب ناشی از رژیم غذایی پرچرب را کاهش دهد. این بهبود از طریق فعال‌سازی مسیر سیگنال‌دهی AMPK و گیرنده‌های پروتئینی فعال‌شده با پروکسیم[5] (PPAR-α) و (PPAR-γ) به‌دست آمد [۵۷]. همچنین همسو با پژوهش حاضر اسپارک[6] و همکاران (۲۰۱۷) افزایش استرس اکسیداتو از طریق افزایش بیان ژن NADPH اکسیداز و کاهش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، بیان TGF-β1 را افزایش می‌دهد. انجام تمرینات استقامتی هوازی مانند تمرین دویدن شامل سه بار در هفته و به مدت‌های ۳۰ یا ۶۰ دقیقه تأثیرات درخور توجهی بر کاهش مقادیر MMP2 و TGF-β1 در رت‌های مبتلا به نفروپاتی داشته است [۵۸].

در این تحقیق به‌منظور دستیابی به راهکار درمانی برای بهبود و یا کاهش آسیب بافتی فیبروز کبد ناشی از کلستاز از پروبیوتیک و ورزش و سینرژیک (پروبیوتیک همراه تمرین ورزشی) استفاده شد. یافته‌های این پژوهش کاهش معناداری را در تعداد هپاتوسیت‌های سالم و افزایش معنادار تعداد سلول‌های کوپفر، سطح TBili و ALP خون و همچنین افزایش بیان ژن TGFβ در گروه کلستاز نسبت به کنترل نشان داد که تمرین ورزشی و مصرف پروبیوتیک به‌تنهایی یا هم‌افزایی موجب جبران ضایعات بافت کبد شامل افزایش پیوستگی طناب‌های کبدی، کاهش تعداد سلول‌های کوپفر و کاهش میزان TBili , ALP و همچنین کاهش بیان ژن TGFβ در همهٔ گروه‌های درمان شد که در این بین تأثیر درمان در گروه پروبیوتیک از سایر گروه‌ها بیشتر بود. فیبروز کبدی احتمال بیشتری برای معکوس شدن و بازگشت به ساختار طبیعی خود نسبت به سایر بافت‌ها دارد که ممکن است درمان فیبروز کبدی را آسان‌تر کند؛ بنابراین احتمالاً مصرف پروبیوتیک همراه با تمرین ورزشی یا به‌تنهایی با کاهش روند آسیب بافت کبد می‌تواند به‌عنوان یک پروتکل درمانی در بیماران مبتلا به کلستاز استفاده شود.

از محدودیت‌های پژوهش کمبود منابع به‌دلیل اولین بررسی اثر ورزش بر کلستاز ناشی از BDL و مقایسهٔ اثر درمان‌ها، همچنین کنترل شرایط سخت ناشی جراحی BDL بود، بنابراین برای کسب اطلاعات بیشتر در خصوص سازوکارها به تحقیقات بیشتر نیاز است. پیشنهاد می‌شود پژوهش‌هایی برای بررسی اثر انواع تمرین‌های ورزشی در مدل القای کلستاز از طریق BDL، بررسی اثر درمان‌ها در مدت زمانی متفاوت، بررسی اثر انواع دیگر پروبیوتیک‌ها در فیبروز بافتی ناشی از کلستاز و همچنین بررسی اثر پروبیوتیک و ورزش بر سایر بافت‌ها در بیماری کلستاز انجام پذیرد. به بیماران دارای کلستاز پیشنهاد می‌شود برای بهبود عملکرد کبد و جلوگیری از سرعت و شدت بیماری مکمل‌های پروبیوتیک مصرف کنند و به انجام تمرینات ورزشی بپردازند.

1. Moon
2. Anterior Cingulate Cortex (ACC)
3. Zhang
4. Diniz
5. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)
6. Sparks

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر مستخرج از پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی دانشکدهٔ علوم اجتماعی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین است که با هزینهٔ شخصی دانشجو انجام شده است. از تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، سپاسگزاریم.

References

[1]. Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose E, Kamath PS. Global burden of liver disease: 2023 update. Journal of hepatology. 2023;79(2):516-37. doi: 10.1016/j.jhep.2023.03.017.

[2].Czaja AJ. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. World journal of gastroenterology: WJG. 2014;20(10):2515. doi: 10.3748/wjg.v20.i10.2515.

[3].Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. Gastroenterology. 2010;139(5):1481-96. doi: 10.1053/j.gastro.2010.09.004

[4].Fawaz R, Baumann U, Ekong U, Fischler B, Hadzic N, Mack CL, et al. Guideline for the evaluation of cholestatic jaundice in infants: joint recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 2017;64(1):154-68. doi: 10.1097/MPG.0000000000001334

[5].Millonig G, Reimann FM, Friedrich S, Fonouni H, Mehrabi A, Büchler MW, et al. Extrahepatic cholestasis increases liver stiffness (FibroScan) irrespective of fibrosis. Hepatology. 2008;48(5):1718-23. doi: 10.1002/hep.22577

[6].Gupta K, Wang H, Amin SB. Parenteral nutrition–associated cholestasis in premature infants: role of macronutrients. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 2016;40(3):335-41. doi: 10.1177/0148607114555161.

[7].Hosseini N, Alaei H, Zarrindast MR, Nasehi M, Radahmadi M. Cholestasis progression effects on long-term memory in bile duct ligation rats. Advanced biomedical research. 2014;3(1):215. doi: 10.4103/2277-9175.143263.

[8].Karimi J, Mohammadalipour A, Sheikh N, Khodadadi I, Hashemnia M, Goudarzi F, et al. Protective effects of combined Losartan and Nilotinib on carbon tetrachloride (CCl4)-induced liver fibrosis in rats. Drug and chemical toxicology. 2020;43(5):468-78. doi: 10.1080/01480545.2018.1504960.

[9].Miyazono K. Regulation of TGF-beta family signaling by inhibitory Smads. The TGF-beta family. 2008:363-87.

[10].Morry J, Ngamcherdtrakul W, Yantasee W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. Redox biology. 2017;11:240-53. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.011

[11].Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF-β signaling in fibrosis. Growth factors. 2011;29(5):196-202. doi: 10.3109/08977194.2011.595714

[12].Mendel RR, Kruse T. Cell biology of molybdenum in plants and humans. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2012;1823(9):1568-79. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.007.

[13].Hashida R, Kawaguchi T, Bekki M, Omoto M, Matsuse H, Nago T, et al. Aerobic vs. resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. Journal of hepatology. 2017;66(1):142-52. doi: 10.1016/j.jhep.2016.08.023

[14].Choo YJ, Cho CW, Chang MC. Effects of supervised exercise on aerobic capacity and quality of

life in patients with chronic liver disease and patients who underwent liver transplantation: a systematic review and meta-analysis. International Journal of Rehabilitation Research. 2022;45(1):1-11. doi: 10.1097/MRR.0000000000000502.

[15].Kolnes KJ, Petersen MH, Lien-Iversen T, Højlund K, Jensen J. Effect of exercise training on fat loss—energetic perspectives and the role of improved adipose tissue function and body fat distribution. Frontiers in physiology. 2021;12:737709. doi: 10.3389/fphys.2021.737709

[16].Chen H-j, Yan X-y, Sun A, Zhang L, Zhang J, Yan Y-e. Adipose extracellular matrix deposition is an indicator of obesity and metabolic disorders. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2023;111:109159. doi: 10.1016/j.jnutbio.2022.109159.

[17].Feifei L, Wei L, Fei H, Weifang H, Fan Y, Jiabin W, et al. Effect of self-controlled exercise on antioxidant activity of red blood cells and functional recovery of limbs in patients with breast cancer after rehabilitation. Iranian Journal of Public Health. 2021;50(2):306. doi: 10.18502/ijph.v50i2.5345.

[18].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. Archives of physiology and biochemistry. 2020;126(3):242-9. doi: 10.1080/13813455.2018.1510968.

[19].Tang R, Wei Y, Li Y, Chen W, Chen H, Wang Q, et al. Gut microbial profile is altered in primary biliary cholangitis and partially restored after UDCA therapy. Gut. 2018;67(3):534-41. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313332

[20].Yu L, Liu Y, Wang S, Zhang Q, Zhao J, Zhang H, et al. Cholestasis: Exploring the triangular relationship of gut microbiota-bile acid-cholestasis and the potential probiotic strategies. Gut Microbes. 2023;15(1):2181930.

[21].Zhao J, Zhao S, Zhou G, Liang L, Guo X, Mao P, et al. Altered biliary epithelial cell and monocyte responses to lipopolysaccharide as a TLR ligand in patients with primary biliary cirrhosis. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2011;46(4):485-94. doi: 10.3109/00365521.2010.539624.

[22].DeMarco E, DePetrillo J, Qadeer F. Meropenem resistant Lactobacillus endocarditis in an immunocompetent patient. SAGE Open Medical Case Reports. 2023;11:2050313X231152709. doi: 10.1177/2050313X231152709.

[23].Saeedi BJ, Liu KH, Owens JA, Hunter-Chang S, Camacho MC, Eboka RU, et al. Gut-resident lactobacilli activate hepatic Nrf2 and protect against oxidative liver injury. Cell metabolism. 2020;31(5):956-68. e5. doi:10.1016/j.cmet.2020.03.006

[24].Kaźmierczak-Siedlecka K, Daca A, Folwarski M, Witkowski JM, Bryl E, Makarewicz W. The role of Lactobacillus plantarum 299v in supporting treatment of selected diseases. Central european journal of immunology. 2020;45(4):488-93. doi: 10.5114/ceji.2020.101515

[25].Hou C, Wang Q, Zeng X, Yang F, Zhang J, Liu H, et al. Complete genome sequence of Lactobacillus reuteri I5007, a probiotic strain isolated from healthy piglet. Journal of Biotechnology. 2014;179:63-4. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.03.019

[26].Uchinami H, Seki E, Brenner DA, D'Armiento J. Loss of MMP 13 attenuates murine hepatic injury and fibrosis during cholestasis. Hepatology. 2006;44(2):420-9. doi: 10.1002/hep.21268

[27].Wang YW, Wang WS, Wang LY, Bao YR, Lu JW, Lu Y, et al. Extracellular matrix remodeling effects of serum amyloid A1 in the human amnion: Implications for fetal membrane rupture. American journal of reproductive immunology. 2019;81(1):e13073. doi: 10.1111/aji.13073

[28].Liu Y, Chen K, Li F, Gu Z, Liu Q, He L, et al. Probiotic Lactobacillus rhamnosus GG prevents liver fibrosis through inhibiting hepatic bile acid synthesis and enhancing bile acid excretion in mice. Hepatology. 2020;71(6):2050-66. doi: 10.1002/hep.30975.

[29].Dostdar Roozbahani A, Riyahi Malayeri S, Ramezanpour Yousefdeh M, Kalhor A, Nassirinia SM. The effect of endurance training and probiotic supplementation on MMP9 gene expression in the liver tissue of steatosis rats. Medical Journal of Mashhad university of Medical Sciences. 2022;64(6):4361-8.

[30].Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. Gastroenterology. 2014;146(6):1513-24. doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.020

[31].Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. The Lancet. 2008;371(9615):838-51. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60383-9.

[32].Bedair Dewidar CM, Dooley S, Meindl-Beinker N. TGF-β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis—Updated 2019. Cells. 2019;8(11):1419. doi: 10.3390/cells8111419

[33].Sun YY, Li XF, Meng XM, Huang C, Zhang L, Li J. Macrophage phenotype in liver injury and repair. Scandinavian journal of immunology. 2017;85(3):166-74. doi: 10.1111/sji.12468

[34].Wen X, Jiao L, Tan H. MAPK/ERK pathway as a central regulator in vertebrate organ regeneration. International journal of molecular sciences. 2022;23(3):1464. doi: 10.3390/ijms23031464

[35].Perumal N, Perumal M, Halagowder D, Sivasithamparam N. Morin attenuates diethylnitrosamine-induced rat liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by co-ordinated regulation of Hippo/Yap and TGF-β1/Smad signaling. Biochimie. 2017;140:10-9. doi: 10.1016/j.biochi.2017.05.017

[36].Campana L, Iredale JP, editors. Regression of liver fibrosis. Seminars in liver disease; 2017: Thieme Medical Publishers. doi: 10.1055/s-0036-1597816

[37].Yu J, Hu Y, Gao Y, Li Q, Zeng Z, Li Y, et al. Kindlin-2 regulates hepatic stellate cells activation and liver fibrogenesis. Cell death discovery. 2018;4(1):93. doi: 10.1038/s41420-018-0095-9.

[38].Trivedi PJ, Bowlus CL, Yimam KK, Razavi H, Estes C. Epidemiology, natural history, and outcomes of primary sclerosing cholangitis: a systematic review of population-based studies. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2022;20(8):1687-700. e4. doi: 10.1016/j.cgh.2021.08.039

[39].Hakansson A, Molin G. Gut microbiota and inflammation. Nutrients. 2011;3(6):637-82. doi: 10.3390/nu3060637.

[40].Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. Cellular and molecular life sciences. 2021;78(4):1233-61. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y.

[41].Yu JH, Song SJ, Kim A, Choi Y, Seok JW, Kim HJ, et al. Suppression of PPARγ-mediated monoacylglycerol O-acyltransferase 1 expression ameliorates alcoholic hepatic steatosis. Scientific reports. 2016;6(1):29352.

[42].Wu Y, Wang B, Tang L, Zhou Y, Wang Q, Gong L, et al. Probiotic Bacillus alleviates oxidative stress-induced liver injury by modulating gut-liver axis in a rat model. Antioxidants. 2022;11(2):291. doi: 10.3390/antiox11020291. doi: 10.3390/antiox11020291.

[43].Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. Free Radical Biology and Medicine. 2008;44(2):153-9.

[44].Wan Y-JY, Sheng L. Regulation of bile acid receptor activity. Liver research. 2018;2(4):180-5. doi:10.1016/j.livres.2018.09.008

[45].Merlen G, Kahale N, Ursic-Bedoya J, Bidault-Jourdainne V, Simerabet H, Doignon I, et al. TGR5-dependent hepatoprotection through the regulation of biliary epithelium barrier function. Gut. 2020;69(1):146-57. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316975.

[46].Rackayová V, Flatt E, Braissant O, Grosse J, Capobianco D, Mastromarino P, et al. Probiotics

improve the neurometabolic profile of rats with chronic cholestatic liver disease. Scientific reports. 2021;11(1):2269. doi: 10.1038/s41598-021-81871-8

[47].Fändriks L. Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview. Journal of internal medicine. 2017;281(4):319-36. doi: 10.1111/joim.12584

[48].Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. Gut. 2014;63(12):1913-20. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306541.

[49].Di Ciaula A, Garruti G, Baccetto RL, Molina-Molina E, Bonfrate L, Portincasa P, et al. Bile acid physiology. Annals of hepatology. 2018;16(1):4-14. doi:10.5604/01.3001.0010.5493

[50].Queipo-Ortuño MI, Seoane LM, Murri M, Pardo M, Gomez-Zumaquero JM, Cardona F, et al. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. PloS one. 2013;8(5):e65465. doi: 10.1371/journal.pone.0065465

[51].Weinstein AA, Escheik C, Oe B, Price JK, Gerber LH, Younossi ZM. Perception of effort during activity in patients with chronic hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease. Pm&r. 2016;8(1):28-34. doi: 10.1016/j.pmrj.2015.06.001

[52].Povero D, Panera N, Eguchi A, Johnson CD, Papouchado BG, de Araujo Horcel L, et al. Lipid-induced hepatocyte-derived extracellular vesicles regulate hepatic stellate cells via microRNA targeting peroxisome proliferator-activated receptor-γ. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology. 2015;1(6):646-63. e4. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.07.007

[53].Cintra DE, Ropelle ER, Vitto MF, Luciano TF, Souza DR, Engelmann J, et al. RETRACTED: Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: The role of sterol regulatory element-binding protein-1c. Elsevier; 2012. doi: 10.1016/j.lfs.2012.08.002

[54].Devan AR, Pavithran K, Nair B, Murali M, Nath LR. Deciphering the role of transforming growth factor-beta 1 as a diagnostic-prognostic-therapeutic candidate against hepatocellular carcinoma. World Journal of Gastroenterology. 2022;28(36):5250. doi: 10.3748/wjg.v28.i36.5250

[55].Moon HY, Song P, Choi CS, Ryu SH, Suh P-G. Involvement of exercise-induced macrophage migration inhibitory factor in the prevention of fatty liver disease. The Journal of endocrinology. 2013;218(3):339. doi: 10.1530/JOE-13-0135.

[56].Zhang H, Chen T, Ren J, Xia Y, Onuma A, Wang Y, et al. Pre-operative exercise therapy triggers anti-inflammatory trained immunity of Kupffer cells through metabolic reprogramming. Nature metabolism. 2021;3(6):843-58. doi:10.1038/s42255-021-00402-x.

[57].Diniz TA, de Lima Junior EA, Teixeira AA, Biondo LA, da Rocha LAF, Valadão IC, et al. Aerobic training improves NAFLD markers and insulin resistance through AMPK-PPAR-α signaling in obese mice. Life sciences. 2021;266:118868. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118868

[58].Sparks LM. Exercise training response heterogeneity: physiological and molecular insights. Diabetologia. 2017;60(12):2329-36. doi: 10.1007/s00125-017-4461-6.