

## بررسی تأثیر مصرف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس جی جی و انجام تمرینات تناوبی شدید بر بیان ژن آپلین و گیرنده APJ بافت قلبی موش‌های صحرایی نر مبتلا به کبد چرب

سعید شاه محمدی<sup>۱</sup>، فرشاد غزالیان<sup>۲</sup>، حسین شیروانی<sup>۳</sup>، حسین عابد نطنزی<sup>۴</sup>

۱- نویسنده مسئول: فارغ التحصیل دکتری، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
پست الکترونیکی: dr.saeed.shahmohammadi.pv@gmail.com

۲- دانشیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی، پژوهشکده سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۹/۱۰

### چکیده

**سابقه و هدف:** با توجه به افزایش بروز بیماری کبد چرب و ارتباط آن با بیماری‌های قلبی و عروقی یکی از مسیرهای سیگنالینگ در این بین APELIN/APJ است. یکی از درمان‌های کبد چرب اصلاح سبک زندگی از طریق انجام تمرینات ورزشی و مصرف مکمل‌های پروبیوتیک می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این بررسی تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی نر با میانگین وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به طور تصادفی در ۵ گروه ۸ تایی شامل کنترل سالم، استئاتوزیس، تمرین+استئاتوزیس، پروبیوتیک+استئاتوزیس، تمرین+پروبیوتیک+استئاتوزیس قرار گرفتند. برای القای استئاتوز در موش‌ها از امولسیون پرچرب به میزان ۱۰ mg/kg، روزانه به صورت گاوآژ استفاده شد. گروه‌های استئاتوز به مدت ۵ هفته و ۵ روز در هفته روزانه  $10^8$  CFU/ml لیتر از باکتری لاکتوباسیلوس رامنسوس به صورت گاوآژ دریافت کردند. همچنین گروه‌های تمرین به مدت ۵ هفته به انجام تمرینات تناوبی شدید پرداختند. داده‌ها در سطح  $p \leq 0/05$  به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۲۸ به وسیله آزمون‌های پارامتریک آنوا یک راهه و تعقیبی بونفرونی و آزمون‌های ناپارامتریک کورسیکال والیس و تصحیح بونفرونی تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** بیان ژن‌های Apelin ( $p=0/016$ ) و APJ ( $p=0/001$ ) در گروه استئاتوزیس + تمرین + پروبیوتیک کاهش یافته است که می‌تواند نشان از اثر تمرین و مصرف مکمل پروبیوتیک باشد.

**نتیجه‌گیری:** مصرف پروبیوتیک به همراه انجام تمرینات تناوبی شدید می‌تواند از بیان مسیر APELIN/APJ در موش‌ها جلوگیری کند.

**واژگان کلیدی:** لاکتوباسیلوس جی جی، تمرین ورزشی، بیماری کبد چرب غیر الکلی، پروبیوتیک، ژن

### پیام‌های اصلی

- بیماری‌های شایع جوامع امروزی کبد چرب است که طیف گسترده‌ای از استئوهپاتیت تا سیروز کبدی را شامل می‌شود، که در صورت درمان نشدن می‌تواند منجر به برخی از بیماری‌های قلبی و در نهایت منجر به مرگ فرد می‌شود.
- کبد چرب از طریق برخی از مسیرهای سیگنالینگ از جمله APELIN/APJ می‌تواند باعث آسیب و فیروزه شدن قلب شود.
- گنجاندن پروبیوتیک‌ها در رژیم غذایی افراد به همراه انجام تمرینات تناوبی شدید، می‌تواند از طریق بهبود میکروبیوتای روده، کاهش استرس اکسیداتیو، کاهش التهاب، کاهش میزان چربی بدن و از طریق سیستم رنین-آنژیوتانسین از بیان این مسیر جلوگیری کرده و به بهبود افراد کمک کنند.

## ● مقدمه

بیماری کبد چرب غیر الکلی (NAFLD) (Non-alcoholic fatty liver disease) به دلیل شیوع بالای آن و خطر پیشرفت به سیروز کبدی و همچنین افزایش خطر ابتلا به نئوپلاسم‌های قلبی و عروقی می‌تواند برای سلامتی انسان خطرناک باشد. NAFLD طیف پاتولوژیک وسیعی از استئاتوز ساده تا استئاتوهپاتیت (Nonalcoholic steatohepatitis) NASH را با درجات مختلف فیروز و سیروز را شامل می‌شود. قوی ترین عامل پیش بینی کننده پیشرفت فیروز در NAFLD وجود استئاتوهپاتیت است (۱). NAFLD عمدتاً یک بیماری خاموش است یا تظاهرات بالینی ندارد یا بسیار کم است و معمولاً به عنوان یک یافته تصادفی با افزایش سطح آمینوترانسفرازها یا از طریق عکس برداری کبد چرب تشخیص داده می‌شود. با این حال، بخش قابل توجهی از بیماران NAFLD دارای سطوح غیر طبیعی آمینوترانسفرازها هستند که عمدتاً مقدار کمی از حد طبیعی بالاتر هستند (۲). علیرغم بحث مداوم در مورد رابطه علی بین NAFLD و (Cardiovascular disease) CVD، مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیکی ایجاد شده (که این دو را به هم مرتبط می‌کنند) شامل اختلال عملکرد اندوتلیال، تغییر متابولیسم لیپیدها، التهاب سیستمیک، تشکیل یا بی ثباتی پلاک، استرس اکسیداتیو و مقاومت به انسولین می‌باشد (۳).

سیستم Apelin/APJ به طور گسترده در سیستم قلبی و عروقی توزیع شده است و پیوندهای مکانیکی آن با هموستاز عروقی، رگ زایی، فشار خون سیستمیک، فشار خون ریوی، انفارکتوس میوکارد و نارسایی قلبی (Heart failure) (HF) به خوبی نشان داده شده است (۴). بلوغ عروق امری پیچیده است و به عمل آپلین وابسته است زیرا هر دو ایزوفرم آپلین ۱۳ و ۳۶ تجمع و تکثیر سلول‌های اندوتلیال را تقویت می‌کنند. سیستم آپلینرژیک نقش مهمی در عملکرد قلب دارد (۵). سیگنال دهی مسیر Apelin/APJ اثرات مفیدی در چندین اختلال قلبی و عروقی و متابولیک از جمله فشار خون بالا، نارسایی قلبی، فشار خون ریوی و چاقی دارد. شبیه سازی‌های امیدوارکننده ای از آپلین در حال توسعه هستند، اما هنوز چندین چالش باقی مانده است. یک محدودیت کلیدی در حال حاضر این است که دانش ما از اثرات وازوموتور آپلین در بسترهای عروقی خاص (مانند عروق کرونری، عروق مغزی و عروق کلیوی) محدود است. از آنجایی که آپلین ممکن است باعث اتساع عروق و انقباض عروق

شود، نیاز به افزایش درک ما از سیگنال دهی آپلین و نحوه ارتباط آن با این اثرات عملکردی متضاد وجود دارد (۶).

APJ یک گیرنده جفت شده با پروتئین G است که از هفت حوزه گذر غشایی با ۳۱ درصد همانندی با گیرنده آنژیوتانسین ۱ تشکیل شده است. به همین دلیل، در ابتدا آن را گیرنده شبه آنژیوتانسین ۱ می‌نامیدند. با این حال، نشان داده شده است که آنژیوتانسین II (AII) هیچ شباهتی به APJ ندارد. در واقع، فعال شدن APJ عروقی یک اثر ضد تنظیمی در برابر فعال شدن گیرنده آنژیوتانسین دو را نشان می‌دهد. ژن آپلین انسانی یک پروپپتید ۷۷ اسید آمینه ای را رمزگذاری می‌کند که می‌تواند به قطعات مختلف تقسیم شود. اندوپپتیدها باعث شکسته شدن پروپپتید به مولکولی با ۵۵ آمینواسید می‌شود، که به نوبه خود توسط آنزیم مبدل آنژیوتانسین II (angiotensin converting enzyme 2) (ACE2) تکه تکه می‌شود و ایزوفرم‌های فعال زیستی زیر را ایجاد می‌کند: آپلین ۳۶، آپلین ۱۷، آپلین ۱۳ و آپلین ۱۲. این خانواده از پپتیدهای آپلین در طیف گسترده‌ای از عملکردهای بیولوژیکی را در پستانداران از جمله سیستم عصبی، غدد درون ریز، قلبی عروقی و ایمنی نقش دارد (۷).

در حال حاضر درمان کبد چرب شامل اصلاح سبک زندگی مانند رژیم غذایی کم چرب، کاهش وزن و ورزش است. میکروبیوتای روده بخشی از محور روده-کبد را تشکیل می‌دهد و به عنوان یک هدف بالقوه برای درمان NAFLD عمل می‌کند. بنابراین، پروبیوتیک‌ها ممکن است نقش مکمل را در درمان کبد چرب غیر الکلی داشته باشند (۸). پروبیوتیک‌ها حاوی باکتری‌های مفیدی هستند که برای ایجاد تعادل طبیعی میکروبیوم روده طراحی شده‌اند. یک متآنالیز از کارآزمایی‌های بالینی نشان داد که درمان پروبیوتیک ممکن است در کاهش سطح کلسترول کل و کلسترول با چگالی کم (LDL low-density lipoprotein)، بهبود فشار خون و در تعدیل سایتوکاین‌های التهابی مؤثر باشد. بیفیدوباکتریوم‌ها و گونه‌های لاکتوباسیلوس به طور گسترده به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود و احتمالاً از مهم‌ترین گونه‌های پروبیوتیک باشد. لاکتوباسیل‌ها رایج‌ترین گونه‌های موجود در آماده‌سازی‌های پروبیوتیک هستند. در سال‌های اخیر افزایش استفاده از پروبیوتیک‌ها با هدف بازگرداندن تعادل میکروبیوتای روده به سطح طبیعی مشاهده شده است (۹).

می‌تواند با تأثیر بر روی سلول‌های بافتی قلب از طریق مسیر سیگنالینگ APELIN/APJ باعث ایجاد تغییراتی در آن‌ها و فیبروز گردد و عملکرد طبیعی قلب را از بین برده و در نهایت موجب مرگ شود، بنابراین انجام این مطالعه ضروری به نظر می‌رسد. حال این مطالعه تلاش دارد به این پرسش پاسخ دهد که آیا تمرینات تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس جی جی بر بیان مسیر APELIN/APJ تأثیر معنادار دارد یا خیر.

### • مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع تجربی و بنیادی است. ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزنی در حدود ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم در آزمایشگاه بیمارستان بقیه‌الله به عنوان نمونه پژوهش انتخاب و به کار گرفته شدند. این تحقیق به مدت پنج هفته و پنج روز در هفته انجام شد. موش‌ها به صورت تصادفی در هر یک از پنج گروه هشت سری به ترتیب شامل گروه یک (کنترل سالم)، گروه دو (استتاتوزیس)، گروه سه (استتاتوزیس + تمرین)، گروه چهار (استتاتوزیس + پروبیوتیک) و گروه پنج (استتاتوزیس + پروبیوتیک + تمرین) قرار گرفتند.

### القای استتاتوزیس

برای القای استتاتوزیس کبدی، از امولسیون پر چرب طبق روش ارائه شده توسط Zou و همکاران که ترکیبات آن در جدول زیر آمده است، استفاده شد. به طور خلاصه، موش‌های صحرایی گروه‌های ۲ تا ۵ امولسیون پرچرب را به میزان ۱۰ mg/kg، روزانه راس ساعت ۸ صبح به مدت ۶ هفته از طریق گاوژ قبل از شروع پروتکل تمرین و مصرف پروبیوتیک دریافت کردند و به موش‌های صحرایی گروه کنترل سالم نیز همزمان و به همان مقدار (۱۰ mg/kg) نرمال سالین به صورت گاوژ خوراندند شد (۱۵).

ترکیب امولسیون پرچرب جهت گاوژ به موش‌ها

مقدار مصرف	ترکیب
۴۰۰ گرم	روغن ذرت
۱۵۰ گرم	ساکاروز
۸۰ گرم	پودر کامل شیر
۱۰۰ گرم	کلسترول
۱۰ گرم	سدیم دی‌اکسی کولات
۳۶/۴ گرم	توئین ۸۰
۳۱/۱ گرم	پروپیلین گلیکول
۲/۵ گرم	مولتی ویتامین
۱۰ گرم	نمک
۱/۵ گرم	مواد معدنی مخلوط
۳۰۰ میلی‌لیتر	آب مقطر

تمرینات تناوبی شدید (High-intensity interval training) ممکن است به عنوان تمرینات ورزشی کوتاه تا طولانی مکرر تعریف شود که با شدت بین ۸۰ تا ۱۲۰ درصد حداکثر توان هوازی (مصرف اکسیژن یا ضربان قلب معادل) انجام می‌شود (۱۰). ورزش منظم یک اثر مزمن ضد التهابی دارد و نشانگرهای پلاسمایی التهاب را کاهش می‌دهد. HIIT بیشتر به اکسیداسیون کربوهیدرات‌ها متکی است تا تمرین استقامتی، که با یک پاسخ التهابی حاد ضعیف مرتبط است. اسناد متعددی نشان می‌دهد که فعالیت بدنی به عنوان یک عامل مهم در مدیریت و درمان کبد چرب غیر الکلی نقش دارد (۱۱). گزارش شده است که در مطالعات حیوانی ورزش بر وزن بدن و محتوای چربی کبد تأثیر گذار است، همچنین در برخی از مطالعات انسانی ورزش تأثیر زیادی بر میکروبیوم روده دارد. اثرات مصرف پروبیوتیک‌ها را می‌توان در سطح ترکیبی یا متابولیت‌های تولید شده توسط میکروبیوم روده تشخیص داد. با این حال، نقش دقیق میکروبیوم روده در کنترل با واسطه اثرات ورزش در افراد چاق هنوز تحت بررسی است (۱۲).

اخیراً، مطالعات اپیدمیولوژیک متعددی نشان داده‌اند که کبد چرب غیر الکلی با افزایش عوارض و مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی و عروقی مرتبط است. Paik و همکاران بیماری‌های قلبی و عروقی را به‌عنوان یکی از علل اصلی مرگ و میر در میان بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی پیشنهاد کرده‌اند (۱۳). رابطه بین کبد چرب غیر الکلی و خطر آریتمی قلبی توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است. در حال حاضر، بیشتر شواهد موجود بر ارتباط بین کبد چرب غیر الکلی و فیبریلاسیون دهلیزی (Atrial Fibrillation (AF)) متمرکز است (۱۴).

با توجه به این نکته که بیماری کبد چرب غیر الکلی با بیماری‌های قلبی و عروقی ارتباط دارد و تأثیرات مثبت و خوب فعالیت بدنی و پروبیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های ذکر شده و نقشی که مسیر APELIN/APJ در این بین دارد، هدف از این مطالعه ارتباط مصرف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس جی جی و انجام تمرینات تناوبی شدید در درمان بیماری کبد چرب غیر الکلی و بیماری‌های قلبی و عروقی از جمله فیبروز قلبی که در نتیجه کبد چرب غیر الکلی به وجود می‌آید است. توجه به مسیر سیگنالینگ APELIN/APJ و نقش آن در ایجاد فیبروز قلبی و همچنین تأثیرات تمرینات تناوبی شدید و مصرف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس در درمان بیماری‌های یاد شده می‌تواند جنبه‌ای جدید و نوآورانه داشته باشد. این مطالعه به دنبال ارتباط میان دو ارگان بدن یعنی کبد و قلب است، به این دلیل که اگر بیماری کبد چرب غیر الکلی درمان نشود

دمای مطلوب نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی حدود ۵۵٪ تا ۶۰٪ بود. چرخه روشنایی هر ۱۲ ساعت یکبار توسط تنظیم کننده نور محل نگهداری موش‌های صحرایی رعایت و انجام شد. تمامی اصول مراقبت و کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با بیانیه هلسینکی انجام گردید. این پژوهش دارای کد اخلاق به نشانی IR.IAU.SRB.REC.1401.120 می‌باشد.

### تأیید کبد چرب

موش‌های مورد مطالعه در هر گروه به واسطه تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین ۱۰ درصد و با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلوزین ۲ درصد و با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند و در پایان مطالعه برای بررسی میزان سطح آنزیم‌های کبدی شامل ALT، AST و ALP خون‌گیری از بطن چپ موش‌ها انجام شد و در لوله‌های مخصوص جمع‌آوری شدند. به منظور جداسازی سرم از نمونه خون‌های بدست آمده پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند که با استفاده از سمپلرهای ۲ سی سی جهت آزمایشات از محتویات دیگر لوله خارج شدند. سپس سرم بدست آمده برای اندازه‌گیری فاکتورهای ذکر شده به روش فنتمتریک با استفاده از کیت‌های تجاری پارس آزمون (با حساسیت ۲-۴ واحد بین‌المللی در لیتر) در محیط آزمایشگاه بررسی شدند. برای بررسی داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک جهت اطمینان از توزیع طبیعی داده‌ها استفاده شد که با توجه به این که از توزیع نرمال برخوردار نبودند از آزمون ناپارامتریک کروسکال-والیس و آزمون تصحیح بونفرونی استفاده شد. با توجه به بالا بودن سطح آنزیم‌ها در موش‌های صحرایی که امولوسیون پر چرب مصرف کرده بودند نسبت به موش‌های کنترل سالم، ایجاد استئاتوزیس تأیید گردید.

### کشت باکتری و نحوه مصرف پروبیوتیک (کشت باکتری لاکتوباسیلوس رامنسوس جی جی (Lactobacillus rhamnosus GG)

لاکتوباسیلوس رامنسوس جی جی (PTCC1637) به صورت لیوفلیزه در ویال‌های استاندارد از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران، ایران) خریداری شدند و به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفتند. باکتری‌ها در محیط کشت MRS (زیستی گويا، تهران، ایران) غنی شده با ال - سیستین هیدروکلراید کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. جهت بررسی تأثیر مصرف پروبیوتیک‌ها؛ گروه‌های ۴ و ۵ به مدت پنج هفته و پنج روز در هفته روزانه  $10^9$  CFU/ml از باکتری لاکتوباسیلوس رامنسوس جی جی به صورت گاوآژ به آن‌ها خوراندند (۱۶).

### پروتکل تمرین تناوبی شدید (HIIT)

پروتکل تمرینی موش‌ها مطابق روش Kalaki-Jouybari و همکاران انجام شد. موش‌های صحرایی به منظور آشنایی با تردمیل و فضای آزمایشگاه قبل از اجرای پروتکل تحقیق یک هفته به مدت ۵ روز و هر روز به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه و با سرعت ۵m/min تا ۱۰m/min به وسیله تردمیل خودکار ساخت شرکت دانش سالار ایرانیان به تمرین پرداختند. همچنین موش‌ها صحرایی در هفته اول سرعت گرم کردن و سرد کردن شان ۴m/min بود و در هفته پنجم به ۸m/min رسید. تمرین موش‌های صحرایی در روز اول هفته اول با پنج تناوب دو دقیقه ای سریع با سرعت ۱۶m/min و پنج تناوب یک دقیقه ای آهسته با سرعت ۱۰m/min شروع کردند و در روز آخر تمرینات هفته پنجم با پنج تناوب دو دقیقه ای سریع با سرعت ۴۰m/min و پنج تناوب یک دقیقه ای آهسته با سرعت ۱۴m/min تمرینات خود را به اتمام رساندند (۱۷).

### ملاحظات

موش‌ها به صورت نامحدود به آب و غذا دسترسی داشتند. آب در ظرف‌های ۵۰۰ میلی لیتری در قفس‌ها قرار داشت.

جدول ۱. سطح آنزیم‌های کبدی موش‌ها

گروه	کنترل	استئاتوزیس	استئاتوزیس+ تمرین	استئاتوزیس+ پروبیوتیک	استئاتوزیس+ تمرین+ پروبیوتیک	سطح معنی‌داری	سطح معنی‌داری
AST	۳±۱۲۰/۹۶	۲۵۰ ± ۱۴/۱۶	۱۴۶±۹/۴۱	۱۴۳/۳۷±۹/۵۴	۱۳۶/۱۲±۷/۱۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
ALT	۸۵/۱۲±۳/۵۳	۲۵۰±۱۱/۹۳	۹۵/۸۱±۶/۲۵	۹۵/۴۸±۳/۱۶	۹۳/۴۴±۲/۶۷		
ALP	۲۱۶/۱۲±۱۴/۱۱	۶۴۶/۱۲±۲۴/۰۲	۳۲۰/۶۲±۲۲/۹۷	۲۲۷±۱۰/۱۱	۲۰۰/۲۵±۲۲/۹۹		

## اندازه گیری بیان ژن APJ و APELIN

بافت قلب رت‌ها نمونه برداری شده و پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوب‌های ۱/۸ حاوی مایع RNAlater™ با نسبت ۲۰ درصد غوطه ور گردیده و جهت انجام آزمایش‌های مربوطه به آزمایشگاه انتقال داده شد. استخراج RNA با استفاده از Qiazol (کیت QIAGEN) با توجه به راهنمایی شرکت سازنده انجام شد. برای طراحی پرایمرها ابتدا توالی mRNA مربوط به ژن APJ و APELIN با استفاده از سایت NCBI استخراج شد. پرایمرها توسط نرم‌افزار کامپیوتری Allel ID ساخته شد و سپس هر پرایمر توسط نرم‌افزار BLAST جهت اطمینان از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲). پرایمرها توسط شرکت سیناژن ساخته شد و از ژن GAPDH به عنوان کنترل درون ژنی استفاده شد. هر واکنش PCR با استفاده از SYBR Green (master mix Applied Biosystems) و (Applied Biosystems, Sequence) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. ۴۰ سیکل برای هر دوره time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. برای تمامی ژن‌های مورد مطالعه نیز ژن رفرنس GAPDH جهت به دست آوردن دمای مناسب Anneling

گردایان دمایی انجام گردید. همچنین جهت بررسی efficiency پرایمرها، منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن (سری‌های رقیق شد DNA) رسم گردید. نمودار Melting نیز جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن مرجع تقریباً برابر بود. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول‌های  $\Delta\Delta CT$  و  $2^{\Delta\Delta CT}$  میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمال‌سازی شد.

## روش آماری

تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۸ و اکسل ۲۰۲۲ در سطح  $P \leq 0.05$  انجام شد. حجم نمونه با استفاده از مطالعات قبلی اندازه‌گیری شد (۱۸) و برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو ویلک استفاده گردید. از آنجا که داده‌ها مربوط به ژن APJ دارای توزیع نرمال و طبیعی نبودند، برای بررسی بین گروه‌ها از آزمون‌های ناپارامتریک کورسکال والیس و برای یافتن تفاوت‌ها از آزمون تصحیح بونفرونی استفاده شد. برای بررسی ژن Apelin چون داده‌ها از توزیع نرمال و طبیعی برخوردار بودند از آزمون آنووا یک راهه و برای بررسی بین گروه‌ها و برای یافتن تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد.

جدول ۲. الگوی ژن‌ها

ردیف	Genes name	Primer sequences	Accession number
۱	Rattus norvegicus APLN (apelin-13)	Forward: AGAAGGCAACATGCGCTACC Reverse: GGAGAGCCCTTCAATCCTGCTT	NM_031612.3
۲	Rattus norvegicus apelin receptor (APJ)	Forward: CCAGTGTCTTTTGCCTCACC Reverse: TTTTCCGGGATGTCAGTGGA	NM_031349.2
۳	Rattus norvegicus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Forward: CAAGTTCAACGGCACAGTCA Reverse: CCCCATTGATGTTAGCGGG	NM_017008.4

## • یافته‌ها

در این بخش به تجزیه و تحلیل داده‌ها و تغییرات بیان هر ژن در هر یک از گروه‌های مورد بررسی در پژوهش می‌پردازیم.

با توجه به عدم توزیع نرمال ژن APJ در گروه استئاتوزیس + پروبیوتیک، میزان بیان ژن APJ در گروه استئاتوزیس نسبت به گروه کنترل سالم افزایش معنادار داشته است و در گروه استئاتوزیس + پروبیوتیک با وجود کاهش معنی‌دار که داشته اما

بیشترین کاهش معنی‌دار در گروه استئاتوزیس + تمرین + پروبیوتیک مشاهده می‌شود که می‌تواند نشان از اثر تمرین تناوبی و مصرف مکمل پروبیوتیک باشد. در گروه استئاتوزیس + تمرین با وجود کاهش نسبت به گروه استئاتوزیس معنادار نشده است. بنابراین انجام ۵ هفته تمرین تناوبی شدید به همراه مصرف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس بر بیان ژن APJ تأثیر معنادار دارد و باعث کاهش مؤثر ژن APJ می‌شود ( $p=0/016$ ).

جدول ۳. داده‌ها و آزمون‌های ژن APJ

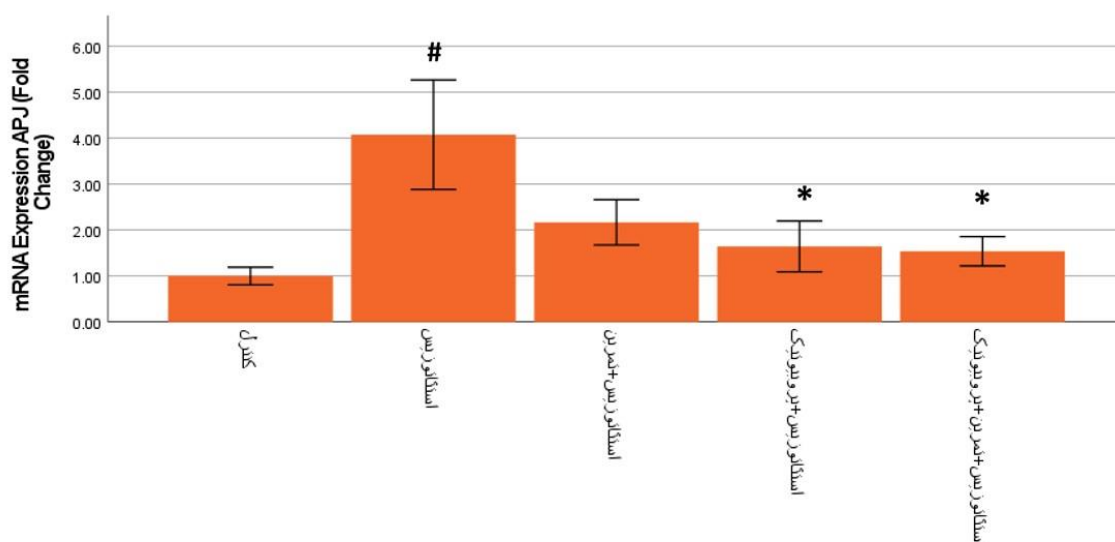
گروه	کنترل	استئاتوزیس	استئاتوزیس + تمرین	استئاتوزیس + پروبیوتیک	استئاتوزیس + تمرین + پروبیوتیک	سطح معنی‌داری	سطح معنی‌داری
mRNA expression APJ (fold change)	0.01/0.23	4.07 ± 1.42 <sup>#</sup>	2.16 ± 0.59	1.64 ± 0.66 <sup>*</sup>	1.53 ± 0.68 <sup>*</sup>	0.001	0.016

- \* به معنای تفاوت با گروه استئاتوزیس و # به معنای تفاوت با گروه کنترل سالم

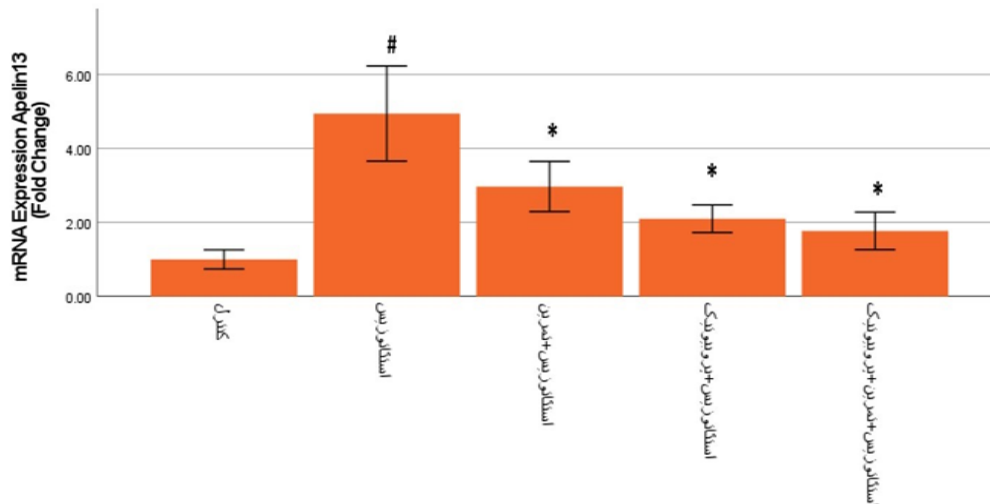
جدول ۴. داده‌ها و آزمون‌های ژن Apelin

گروه	کنترل	استئاتوزیس	استئاتوزیس + تمرین	استئاتوزیس + پروبیوتیک	استئاتوزیس + تمرین + پروبیوتیک	F	میزان اثر	سطح معنی‌داری	سطح معنی‌داری
mRNA expression Apelin-13 (fold change)	0.01/0.31	4.54 ± 1.94 <sup>#</sup>	2.97 ± 0.81 <sup>*</sup>	2.52 ± 0.45 <sup>*</sup>	1.77 ± 0.61 <sup>*</sup>	24.71	0.739	0.001	0.001

- \* به معنای تفاوت با گروه استئاتوزیس و # به معنای تفاوت با گروه کنترل سالم



نمودار ۱. بررسی میانگین بیان ژن APJ در هر گروه با آزمون کورسکال والیس ( $p=0/016$ )



نمودار ۲. بررسی میانگین بیان ژن Apelin در هر گروه با آزمون آنوا یک راهه ( $p=0/001$ )

مسیرهای پایین‌دستی NFκB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) وابسته است (۲۱). در مطالعه‌ای که آقای و همکاران بر روی اثر تعاملی تمرین هوازی و مکمل‌یاری ال کارنیتین بر آپلین بافت قلبی و مقاومت به انسولین موش‌های مبتلا به دیابت انجام دادند نشان داده شد که تمرین هوازی و مصرف ال کارنیتین، می‌تواند سبب افزایش آپلین بافت قلبی و کاهش مقاومت به انسولین شود (۲۲). این نتایج متناقض در نتایج می‌تواند ناشی از تفاوت در ویژگی‌های آزمودنی‌ها، پروتکل مکمل‌یاری و یا پروتکل تمرینات باشد. فعالیت بدنی، از جمله تمرینات هوازی و تمرینات مقاومتی، یکی از بهترین اصلاحات سبک زندگی است و ثابت شده است که از کبد چرب غیر الکلی پیشگیری یا حتی آن را معکوس می‌کند. از آنجا که عدم فعالیت بدنی با پیشرفت بیماری کبد چرب غیر الکلی مرتبط است، پیشنهاد می‌شود که فعالیت بدنی نه تنها به دلیل کاهش وزن، بلکه بیشتر از آن، به دلیل فواید متابولیک همراه با فعالیت بدنی مفید باشد. فعالیت بدنی باعث ایجاد تغییراتی در ترکیب میکروبیوتای روده در پاسخ به فعالیت بدنی می‌شود (۲۳). اثرات مفید پروبیوتیک‌ها بر کاهش درجه چربی کبد و دیگر شاخص‌های بیوشیمی در بیماری کبد چرب غیر الکلی گزارش شده است. یافته‌های مطالعات حاضر نیز اثرات مفید پروبیوتیک‌ها را بر بافت روده در بیماری کبد چرب غیر الکلی تأیید می‌کند. تجویز پروبیوتیک‌های گوناگون در طول زندگی رت‌های نوزاد می‌تواند خطر بروز کبد چرب و چاقی را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد (۲۴). تجویز پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس می‌تواند تا حدی از استرس اکسیداتیو و التهاب جلوگیری کند (۲۵). پژوهشگران تأیید کرده‌اند که مسیر Apelin/APJ در طیف وسیعی از عملکردهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی سیستم قلبی و عروقی نقش دارد.

با توجه به توزیع نرمال ژن Apelin13، میزان بیان آن در گروه استئاتوزیس نسبت به گروه کنترل سالم افزایش معنادار داشته است، اما میزان بیان ژن Apelin13 در گروه‌های استئاتوزیس + تمرین، استئاتوزیس + پروبیوتیک و استئاتوزیس + تمرین + پروبیوتیک نسبت به گروه استئاتوزیس کاهش معنی‌دار داشته است که بیشترین میزان کاهش برای گروه استئاتوزیس + تمرین + پروبیوتیک است که می‌تواند نشان از اثر تمرین تناوبی و مصرف مکمل پروبیوتیک باشد. بنابراین انجام ۵ هفته تمرین تناوبی شدید به همراه مصرف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس بر بیان ژن Apelin13 تأثیر معنی‌دار دارد و باعث کاهش مؤثر ژن آپلین می‌شود ( $p=0/001$ ). جدول و نمودارهای بالا حاکی از یافته‌های این پژوهش است.

## • بحث

بیشترین میزان کاهش بیان ژن Apelin و APJ برای گروه استئاتوزیس + تمرین + پروبیوتیک است که می‌تواند نشان از اثر تمرین و مصرف مکمل پروبیوتیک باشد و مداخله ما مؤثر بوده است.

همراستا با پژوهش حاضر در مطالعه Ason و همکاران که به بررسی شناسایی یک آگونیست APJ با اثرات طولانی پرداخته شد نشان داده شد که با تزریق یک آگونیست APJ بیان آن کاهش پیدا می‌کند (۱۹). در مطالعه‌ای که Sato و همکاران به بررسی اثرات مضر آنژیوتانسین II در قلب موش‌های مسن فاقد ژن آپلین پرداختند نشان داده شد که در شرایط آزمایشگاهی، آپلین بیان TGF-β ناشی از آنژیوتانسین II را در سلول‌های قلبی، همراه با کاهش هیپرتروفی، افزایش داده است (۲۰). در مطالعه Li و همکاران بر مسیر Apelin/APJ در موش‌های دیابتی نشان داده شد که اثرات آپلین بر سلول‌های اندوتلیال به APJ و

بررسی‌ها نشان داد که آپلین یک عامل حیاتی جدید در ایجاد آترواسکلروز (AS) است و در آن میزان بیان آپلین کاهش می‌یابد. در میان گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G، APJ نزدیک‌ترین همولوژی توالی را با گیرنده آنژیوتانسین II نوع ۱ (AT1) در حدود ۵۰ درصد را نشان می‌دهد. علاوه بر این، الگوهای مشابهی از بیان درون بافتی برای هر دو گیرنده مشهود است با این حال، آپلین اعمال مخالف آنژیوتانسین II بر روی تون عروق، فشار خون و هموستاز مایعات را واسطه‌گری می‌کند، که نشان دهنده نقش ضد تنظیمی آپلین در رابطه با سیستم رنین-آنژیوتانسین است. در واقع، شواهد روزافزون به تعامل مستقیم بین دو سیستم در هر دو سطح مولکولی و رونویسی اشاره دارد (۲۶). آپلین اثرات منقبض کننده عروقی آنژیوتانسین II را از طریق هر دو مسیر وابسته به اکسید نیتریک و مستقل از آن کاهش می‌دهد (۲۷). به طور خلاصه، ممکن است اثرات ضد تنظیم متقابل بین سیستم‌های Apeline/APJ و رنین-آنژیوتانسین وجود داشته باشد. با توجه به این که به نظر می‌رسد مسیر Apeline/APJ توسط آنژیوتانسین II مهار می‌شود، امکان هم افزایی درمانی را با ترکیب آگونست گیرنده APJ با مهار سیستم رنین آنژیوتانسین افزایش می‌دهد. این هترودمیرزاسیون هنوز تنها در شرایط آزمایشگاهی در تراکم بالای گیرنده‌ها مشاهده شده است و این ممکن است به طور دقیق وضعیت غیر آزمایشگاهی را در بافت‌های انسان منعکس نکند. از نظر عملکردی، تشکیل هتروداپمرها بر سیگنال دهی پایین دست تأثیر می‌گذارد و مستقل از آپلین است، اما توسط آنژیوتانسین II گسترش می‌یابد. بنابراین، علاوه بر سرکوب بیان آپلین و APJ، ممکن است قابل قبول باشد که با تحریک تشکیل هترودمیرها، آنژیوتانسین II تعداد گیرنده‌های APJ موجود برای فعال شدن توسط آپلین را محدود می‌کند (۲۸). اعمال دوگانه آپلین به حضور گیرنده‌های APJ در لایه‌های سلولی اندوتلیال و عضلات صاف دیواره عروق خونی نسبت داده می‌شود. عوامل وازواکتیو ممکن است مستقیماً روی سلول‌های عضله صاف عروقی برای ایجاد انقباض یا شل شدن رگ‌ها اثر بگذارد یا می‌تواند روی سلول‌های اندوتلیال رگ‌ها تأثیر بگذارد که می‌توانند موادی را ترشح کنند که واسطه اتساع عروق (مانند NO، پروستاگلندین) و همچنین انقباض عروق (مانند اندوتلین) هستند (۲۹). آپلین اثرات مستقیمی بر ایجاد پتانسیل عمل و انقباض در کاردیومیوسیت‌ها دارد و مکانیسم‌های دخیل در اثرات اینوتروپیک ممکن است با افزایش حساسیت میوفیلانمنت به کلسیم همراه باشد. قبل از درمان فیبروبلاست‌های قلبی با Apelin13 تولید کلاژن ناشی از آنژیوتانسین II و فعال شدن فاکتور رشد بافت همبند (CTGF) Connective tissue

(growth factor) و فاکتور رشد تبدیل کننده بتا TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) را مهار می‌کند. حفاظت با واسطه آپلین در برابر فیروز قلبی در درجه اول ناشی از تنظیم مستقیم بیان ژن بازدارنده فعال کننده پلاسمینوژن-۱ است که با مهار هم افزایی سیگنال دهی آنژیوتانسین II و افزایش تولید نیتریک اکساید همراه است. Apelin 13 می‌تواند انقباضات ناشی از آنژیوتانسین II را توسط یک مکانیسم وابسته به نیتریک اکساید در حلقه‌های ورید پورتال موش با اندوتلیوم طبیعی یا فاقد اندوتلیوم مهار کند. درمان قبلی فیبروبلاست‌های قلبی با Apelin13، تولید کلاژن ناشی از Ang II و فعال سازی فاکتور رشد بافت همبند (CTGF) و فاکتور رشد تبدیل کننده TGF- $\beta$  (RAS)  $\beta$  را مهار می‌کند (۳۰). سیستم رنین-آنژیوتانسین ((Renin-angiotensin system) و فاکتور رشد تبدیل کننده- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) نقش اساسی در ایجاد هیپرتروفی قلبی و نارسایی قلبی دارند (۳۱). سیگنال دهی گیرنده Apelin/APJ همچنین می‌تواند بیان ژن ACE-2 را افزایش دهد، که می‌تواند تبدیل آنژیوتانسین II به آنژیوتانسین 1-7 را برای تعدیل عملکردهای قلبی عروقی افزایش دهد. هدف قرار دادن سیستم آپلینریژیک فرصت‌های فوق العاده را برای درمان بیماری‌های قلبی عروقی فراهم می‌کند. (۳۲). فعالیت بدنی HIIT با کاهش استرس اکسیداتیو، کاهش رادیکال‌های آزاد، بهبود پروفایل لیپیدی، کاهش حساسیت به انسولین، کاهش آسیب به سلول‌های قلبی و کاهش فشار خون می‌شود. از طرف دیگر مصرف پروبیوتیک‌ها با کاهش سطح رادیکال‌های آزاد، کاهش التهاب، کاهش استرس اکسیداتیو و تولید مهار کننده ACE مانع از هترودمیرزاسیون AT1 با APJ می‌شود. در نتیجه مصرف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس جی جی به همراه تمرینات تناوبی شدید از بیان مسیر Apeline/APJ جلوگیری کرده و مانع از فیروز شدن سلول‌های قلبی می‌شود (۳۳). در نهایت می‌توان به این یافته رسید که مصرف هم زمان پروبیوتیک و انجام تمرینات HIIT می‌تواند از بروز پیامدهای منفی قلبی و عروقی از جمله فیروز قلب در نتیجه بیماری کبد چرب جلوگیری نماید.

محدودیت‌هایی نیز در مطالعه‌ی حاضر وجود داشت که از جمله می‌توان به عدم بررسی سایر ژن‌های درگیر در مسیر سیگنال دهی از جمله CTGF و عوامل التهاب قلبی مانند تروپونین و CRP و عکس برداری بافتی را نام برد. نتایج این تحقیق را می‌توان در صنعت داروسازی استفاده کرد. همچنین نتایج این مطالعه به فیزیولوژیست‌های ورزشی در شناخت این مسیر سیگنالینگ کمک می‌کند و به افراد جامعه و ورزشکاران در درمان بیماری‌های متابولیکی و قلبی کمک شایانی خواهد

میتلا به استئاتوزیس بعد از پنج هفته جلوگیری شد و بهبودی حاصل شد اما برای توصیه به کاربرد در انسان به بررسی و تحقیقات بیشتری نیاز است.

#### تعارض و منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که در این مطالعه هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

کرد. پیشنهاد می‌شود برای مطالعات بعدی از دوزهای متفاوت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنسوس و مدت زمان‌های کمتر تمرینات تناوبی شدید استفاده کرد.

#### نتیجه گیری

در نهایت با مصرف پروبیوتیک و انجام تمرینات تناوبی شدید از بیان ژن Apelin و APJ در بافت قلبی موش‌های

## References

- Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *Journal of hepatology*. 2017 Oct 1;67(4):829-46.
- Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med*. 2008 Oct 1;75(10):721-8.
- Stahl EP, Dhindsa DS, Lee SK, Sandesara PB, Chalasani NP, Sperling LS. Nonalcoholic fatty liver disease and the heart: JACC state-of-the-art review. *Journal of the American college of cardiology*. 2019 Mar 5;73(8):948-63.
- Alastalo TP, Li M, de Jesus Perez V, Pham D, Sawada H, Wang JK, Koskenvuo M, Wang L, Freeman BA, Chang HY, Rabinovitch M. Disruption of PPAR $\gamma$ / $\beta$ -catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. *The Journal of clinical investigation*. 2011 Aug 8;121(9).
- Sans-Rosello J, Casals G, Rossello X, de la Presa BG, Vila M, Duran-Cambra A, Morales-Ruiz M, Ferrero-Gregori A, Jimenez W, Sionis A. Prognostic value of plasma apelin concentrations at admission in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Clinical biochemistry*. 2017 Apr 1;50(6):279-84.
- Yang P, Maguire JJ, Davenport AP. Apelin, Elabela/Toddler, and biased agonists as novel therapeutic agents in the cardiovascular system. *Trends in pharmacological sciences*. 2015 Sep 1;36(9):560-7.
- Siddiquee K, Hampton J, Khan S, Zadory D, Gleaves L, Vaughan DE, Smith LH. Apelin protects against angiotensin II-induced cardiovascular fibrosis and decreases plasminogen activator inhibitor type-1 production. *Journal of hypertension*. 2011 Apr 1;29(4):724-31.
- Mohamad Nor MH, Ayob N, Mokhtar NM, Raja Ali RA, Tan GC, Wong Z, Shafiee NH, Wong YP, Mustangin M, Nawawi KN. The effect of probiotics (MCP $\text{\textcircled{R}}$  BCMC $\text{\textcircled{R}}$  strains) on hepatic steatosis, small intestinal mucosal immune function, and intestinal barrier in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2021 Sep 14;13(9):3192.
- Azad MA, Sarker M, Li T, Yin J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *BioMed research international*. 2018;2018(1):9478630.
- Viana RB, de Lira CA, Naves JP, Coswig VS, Del Vecchio FB, Ramirez-Campillo R, Vieira CA, Gentil P. Can we draw general conclusions from interval training studies?. *Sports Medicine*. 2018 Sep;48:2001-9.
- Krasnoff JB, Painter PL, Wallace JP, Bass NM, Merriman RB. Health-related fitness and physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2008 Apr;47(4):1158-66.
- Denou E, Marcinko K, Surette MG, Steinberg GR, Schertzer JD. High-intensity exercise training increases the diversity and metabolic capacity of the mouse distal gut microbiota during diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2016 Jun 1;310(11):E982-93.
- Paik JM, Henry L, De Avila L, Younossi E, Racila A, Younossi ZM. Mortality related to nonalcoholic fatty liver disease is increasing in the United States. *Hepatology Communications*. 2019 Nov;3(11):1459-71.
- Markus MR, Meffert PJ, Baumeister SE, Lieb W, Siewert U, Schipf S, Koch M, Kors JA, Felix SB, Dörr M, Targher G. Association between hepatic steatosis and serum liver enzyme levels with atrial fibrillation in the general population: The Study of Health in Pomerania (SHIP). *Atherosclerosis*. 2016 Feb 1;245:123-31.
- Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life sciences*. 2006 Aug 8;79(11):1100-7.
- Wang Y, Kirpich I, Liu Y, Ma Z, Barve S, McClain CJ, Feng W. Lactobacillus rhamnosus GG treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury. *The American journal of pathology*. 2011 Dec 1;179(6):2866-75.
- 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 May 26;126(3):242-9.
- Wang G, Jiao T, Xu Y, Li D, Si Q, Hao J, Zhao J, Zhang H, Chen W. Bifidobacterium adolescentis and Lactobacillus rhamnosus alleviate non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat, high-cholesterol diet through modulation of different gut microbiota-dependent pathways. *Food & function*. 2020;11(7):6115-27.
- Ason B, Chen Y, Guo Q, Hoagland KM, Chui RW, Fielden M, Sutherland W, Chen R, Zhang Y, Mihardja S, Ma X. Cardiovascular response to small-molecule APJ activation. *JCI insight*. 2020 Apr 23;5(8):e132898.
- Sato K, Marzioni M, Meng F, Francis H, Glaser S, Alpini G. Ductular reaction in liver diseases: pathological mechanisms and translational significances. *Hepatology*. 2019 Jan;69(1):420-30.
- Li B, Yin J, Chang J, Zhang J, Wang Y, Huang H, Wang W, Zeng X. Apelin/APJ relieve diabetic cardiomyopathy by reducing microvascular dysfunction. *Journal of Endocrinology*. 2021 Apr 1;249(1):1-8.

22. Aghaei, Sarhad, Behpour, Hosseinpour Delavar, Safikhani, Jalilvand. Interactive effect of aerobic exercise and L-carnitine supplementation on cardiac tissue apelin and insulin resistance in diabetic rats. *Journal of Isfahan Medical School*. 2019 Dec 22;37(549):1206-12. In Persian
23. Vallianou N, Stratigou T, Christodoulatos GS, Dalamaga M. Understanding the role of the gut microbiome and microbial metabolites in obesity and obesity-associated metabolic disorders: current evidence and perspectives. *Current obesity reports*. 2019 Sep 15;8:317-32.
24. Arellano-García L, Trepiana J, Martínez JA, Portillo MP, Milton-Laskibar I. Beneficial effects of viable and heat-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG administration on oxidative stress and inflammation in diet-induced NAFLD in rats. *Antioxidants*. 2023 Mar 14;12(3):717.
25. Savcheniuk O, Kobylak N, Kondro M, Virchenko O, Falalyeyeva T, Beregova 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 Dec;14:1-7.
26. Ashley E, Chun HJ, Quertermous T. Opposing cardiovascular roles for the angiotensin and apelin signaling pathways. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2006 Sep 26;41(5):778-81.
27. Gurzu B, Cristian Petrescu B, Costuleanu M, Petrescu G. Interactions between apelin and angiotensin II on rat portal vein. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2006 Dec;7(4):212-6.
28. Barnes GD, Alam S, Carter G, Pedersen CM, Lee KM, Hubbard TJ, Veitch S, Jeong H, White A, Cruden NL, Huson L. Sustained cardiovascular actions of APJ agonism during renin-angiotensin system activation and in patients with heart failure. *Circulation: Heart Failure*. 2013 May;6(3):482-91.
29. O'Carroll AM, Don AL, Lolait SJ. APJ receptor mRNA expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: regulation by stress and glucocorticoids. *Journal of neuroendocrinology*. 2003 Nov;15(11):1095-101.
30. Zhong JC, Zhang ZZ, Wang W, McKinnie SM, Vederas JC, Oudit GY. Targeting the apelin pathway as a novel therapeutic approach for cardiovascular diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2017 Aug 1;1863(8):1942-50.
31. Stephan R. TGF-1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardio-vasc Res*. 2007;63(3):423-32.
32. Mughal A, O'Rourke ST. Vascular effects of apelin: Mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacology & therapeutics*. 2018 Oct 1;190:139-47.
33. Houutu V, Boulund U, Grefhorst A, Soeters MR, Pinto-Sietsma SJ, Nieuwdorp M, Holleboom AG. The role of the gut microbiome and exercise in non-alcoholic fatty liver disease. *Therapeutic advances in gastroenterology*. 2020 Sep;13:1756284820941745.

## Investigating the effect of Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus* GG and High-intensity Interval Training on Apelin Gene Expression and APJ Receptor in Heart Tissues of Male Rats with Fatty Liver Disease

Shahmohammadi S<sup>1\*</sup>, Ghazalian F<sup>2</sup>, Shirvani H<sup>3</sup>, Abednatanzi H<sup>4</sup>

1- \*Corresponding author: PhD student, Department of Physical education, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Email: dr.saeed.shahmohammadi.pv@gmail.com

2- Assistant professor, Department of Physical education, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Assistant professor, Sports Physiology Research Center, Lifestyle Research Institute, Baqiatallah University of Medical Sciences (AJ), Tehran, Iran

4- Assistant professor, Department of Physical education, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received 2 Jun, 2024

Accepted 30 Nov, 2024

**Background and Objectives:** Occurrence of fatty liver disease-known as steatotic liver disease-is increasing, which is associated to cardiovascular diseases. One of the signaling pathways of this disease is APELIN/APJ. Of the treatment methods for fatty liver, modification of lifestyle through exercises and the use of probiotic supplements can be stated.

**Materials & Methods:** In this experimental study, 40 male rats with an average weight of 200–250 g were randomly divided into five groups of eight rats, including healthy control, steatosis, exercise and steatosis, probiotic and steatosis and exercise, probiotic and steatosis. To induce steatosis in rats, 10 mg/kg of high-fat emulsion were daily administrated to the rats using nasogastric or NG tubes. The steatosis groups received 10<sup>9</sup> CFU/ml *Lactobacillus rhamnosus* daily for 5 w (5 d/w) using NG tubes. In addition, the exercise groups did high-intensity interval trainings for 5 w. Data analysis was carried out at  $p \leq 0.05$  using SPSS v.28 and by parametric one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test, non-parametric Kruskal-Wallis test and Bonferroni Correction method.

**Results:** The expression of Apelin ( $p = 0.016$ ) and APJ ( $p = 0.001$ ) genes was decreased in the steatosis, exercise and probiotic group, which could affect exercises and use of probiotic supplements.

**Conclusion:** Receiving probiotics with high-intensity interval trainings can prevent expression of the APELIN/APJ pathway in rats.

**Keywords:** *Lactobacillus* GG, Exercise, Non-alcoholic fatty liver disease, Probiotics, Gene