مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۷، شماره۵، آذر و دی ۱۴۰۱(شماره پی در پی ۱۵۴)

بررسی تغییرات هیستولوژیک و بیان ژن‌های اینترلوکین ۸، ۱۲ و اینترفرون بتا در بافت کبدی به دنبال مصرف پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG* در رت‌های مدل استئاتوزیس

فاطمه رستم‌خانی *

گروه زیست شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۱/۰۵/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: مصرف پروبیوتیک قادر به تنظیم هموستاز سیستم گوارشی و کنترل بیماری‌های متابولیکی مرتبط با دستگاه گوارش می باشد. لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تغییرات هیستولوژیک و بیان ژن اینترلوکین ۱۲، ۸ و اینترفرون بتا بافت کبدی به دنبال مصرف ۵ هفته ای پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوسGG در رت‌های مدل استئاتوزیس بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۸ انجام شد، ۳۲ سر موش صحرایی نر ویستار با سن ۸ هفته و وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم وارد مطالعه شدند و به طور تصادفی به ٤ گروه(هر گروه ۸ سر)؛ کنترل(CON)، استئاتوزیس(ST)، پروبیوتیک(PRO) و استئاتوزیس+پروبیوتیک(ST+PRO) تقسیم شدند. رت‌ها با تزریق داخل صفاقی ۱٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تتراسایکلین(آنتی‌بیوتیکی که برای ایجاد استئاتوز شناخته شده) مدل شدند. مقدار $۱۰^{۷}$ واحد کلنی تشکیل دهنده(cfu) LGG برای گروه‌های پروبیوتیک به مدت ۵ هفته(۵ روز در هفته، به صورت گاواژ) در نظر گرفته شد. برای بررسی تغییرات هیستولوژی از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین استفاده شد. هم‌چنین تغییرات بیان ژنی IL-12، IL-8 و IFN-β از روش RT-PCr استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: هیستولوژی بافت کبد پس از مدل ST به دنبال مصرف ۵ هفته‌ای پروبیوتیک بهبود پیدا کرد. گروه ST افزایش معنی‌دار در بیان ژن IL-12، IL-8 و IFN-β را نشان داد($p<۰/۰۵$). در مقایسه با گروه ST نیز گروه‌های PRO و ST+PRO کاهش معنی‌دار در بیان ژن IL-12، IL-8 و IFN-β را نشان دادند($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد مصرف پروبیوتیک با تنظیم منفی برخی ریسک فاکتورهای سلولی قادر به بهبود سلولی و بافتی کبدی در افراد با مشکلات کبد چرب باشد. با این وجود نیاز به پژوهش‌های بیشتر به ویژه در نمونه انسانی است.

واژه‌های کلیدی: استئاتوزیس کبدی، پروبیوتیک، اینترلوکین، اینترفرون بتا

***نویسنده مسئول: فاطمه رستم‌خانی**، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، گروه زیست شناسی
Email: Shirinrostamkhani@yahoo.com

مقدمه

شیوع بیماری کبد چرب غیرالکلی(NAFLD)، که اخیراً به عنوان بیماری متابولیکی توصیف شده است، در جهان رو به افزایش می باشد(۳ـ۱). NAFLD طیفی از آسیب‌های استئاتوز تا استئاتوهپاتیت را در بر می‌گیرد که با التهاب لوبولار و ملتهب شدن سلول‌های کبدی مشخص می‌شود و می‌تواند با سیروز پیشرفت کند. استئاتوز کبدی با افزایش مرگ و میر در طول زمان همراه است، که بیشتر آنها به بیماری قلبی عروقی نسبت داده می شود(٤). هم‌چنین سیستم ایمنی نیز تحت تأثیر بیماری‌های کبدی قرار می گیرد(٥). نقش کبد به عنوان یک ارگان اصلی سیستم ایمنی ذاتی با عملکردهای تعدیل کننده ایمنی به طور فزآینده‌ای شناخته شده است. کبد حاوی یکی از بزرگترین جمعیت‌های ماکروفاژهای ساکن(سلول‌های کوپفر[KCs])، سلول‌های کشنده طبیعی(NK) و سلول‌های T کشنده طبیعی(NKT) است.

اینترلوکین ۱۲(IL-12) در ابتدا به دلیل توانایی آن در تحریک سلول‌های NK، عامل تحریک کننده سلول‌های کشنده طبیعی نامیده می‌شد، اما هم‌چنین مشخص شد که این فاکتور سلول‌های تنظیم کننده T و سلول‌های T را تحریک می‌کند(٦). IL-12 نقش اساسی در پاسخ‌های ایمنی محافظتی در برابر پاتوژن‌های داخل سلولی با هدایت کردن واکنش‌های Th1 را دارد(۷). پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهند که IL-12 درگیر در فرآیند هپاتوستاتوز است، زیرا بر تعادل محلی Th1/Th2 و فعال‌سازی و تنظیم سلول‌های NKT تأثیر می‌گذارد(۹ و ۸). هم‌چنین بیان شده که در شرایط آسیب کبدی هم‌چنین سیتوکین مرتبط با T-helper 1 مانند IL-12 و اینترفرون ۷ (IFN)، و سیتوکین‌های مرتبط با Th2 افزایش می‌یابند.

اینترلوکین۸ (IL-8)، که CXCL8 نیز نامیده می‌شود، برای اولین بار به وسیله یاشیما از مایع رویی سلول‌های تک هسته‌ای خون انسان خالص شد(۱۰). IL-8، یک سیتوکین التهابی، به وسیله انواع سلولی از جمله ماکروفاژها، سلول‌های کبدی و سلول‌های کوپفر تولید می‌شود و می‌تواند نوتروفیل‌ها را برای تجمع در محل التهاب جذب کند(۱۱). IL-8 یک کموکاین مؤثر است که در اشکال مختلف آسیب تجربی کبدی ناشی از LPS، TNF و عفونت‌های باکتریایی نقش دارد. در ALD، افزایش IL-8 در پلاسما و کبد به خوبی ثبت شده است و اعتقاد بر این است که IL-8 نقش مهمی در نفوذ نوتروفیل در کبد بازی می‌کند(۱۲). پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که IL-8 نه تنها واسطه انواع پاسخ‌های التهابی است، بلکه با اتصال به گیرنده CXCR1/2 در بیماری‌های مختلف کبدی نیز شرکت می‌کند(۱۳). یکی از متودهای درمانی برای کنترل تخریبات التهابات کبدی پروبیوتیک درمانی می‌باشد.

اخیراً یک استراتژی درمانی جدید با استفاده از پروبیوتیک‌ها پیشنهاد شده است. پروبیوتیک یک کشت میکروبی زنده یا فرآورده‌های لبنی کشت شده است که نقش اساسی در سلامت و بیماری ایفا می‌کند(١٤). میکروبیوتای روده انسان از ١٠١٤–١٠١٣ میکروارگانیسم تشکیل شده است که ژنوم جمعی آنها

حداقل ۱۰۰ برابر ژنوم انسان است که در مجموع ۱۰۰۰-۵۰۰ گونه را نشان می دهد(۱۵). میلی و همکاران اولین شواهدی را مبنی بر این که NAFLD در انسان با افزایش نفوذپذیری روده مرتبط است ارایه کردند و این ناهنجاری با افزایش شیوع رشد بیش از حد باکتری روده کوچک(SIBO) در این بیماران مرتبط است(۱۶). به نظر می‌رسد افزایش نفوذپذیری ناشی از اختلال در اتصالات محکم بین سلولی در روده ممکن است نقش مهمی در پاتوژنز NAFLD داشته باشد. لوگورسیا و همکاران نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها ممکن است آسیب کبدی NAFLD را کاهش دهند و ممکن است عملکرد کبد را بهبود بخشند(۱۷). پروبیوتیک‌ها می‌توانند از تکثیر باکتری‌های مضر جلوگیری کنند، رشد بیش از حد باکتری های روده کوچک را کاهش دهند، عملکرد سد معده و روده را بازیابی کنند و سیستم ایمنی را تعدیل کنند که همه اینها به بهبود NAFLD کمک می‌کنند(۱۹ و۱۸). پژوهشی در رابطه با تأثیرات کنترل التهابی پروبیوتیک در شرایط آسیب کبدی محدود می‌باشد، لذا هدف از مطالعه حاضر تعیین و بررسی تغییرات هیستولوژیک و بیان ژن اینترلوکین ۱۲، ۸ و اینترفرون بتا بافت کبدی به دنبال مصرف ۵ هفته این پروبیوتیک در رت‌های مدل استئاتوزیس می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۴۰۰ انجام شد، تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر ویستار با سن تقریبی هشت هفته از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و پس از انتقال موش‌های صحرایی به محیط آزمایشگاه، حیوانات در شرایط کنترل شده با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی(شروع روشنایی ٦ صبح و شروع خاموشی ٦ عصر)، دما(۳±۲۲ سانتی‌گراد) و رطوبت(حدود ٤٥ درصد) نگهداری شدند. تعداد ۵-۳ سر موش صحرایی در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری به گونه‌ای نگه‌داری شدند که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشته باشند. پروتکل های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پزشکی انجام شد(۲۰).

حیوانات به مدت ۲ هفته با محیط آزمایشگاه آشنا شده و سپس به صورت تصادفی به ٤ گروه مساوی شامل؛ کنترل(CON)، استئاتوزیس(ST)، پروبیوتیک(PRO) و استئاتوزیس + پروبیوتیک (ST+PRO) تقسیم شدند، هر گروه شامل ۸ سر حیوان بود.

القای استئاتوز کبدی طبق روش توسعه یافته قبلی انجام شد(۸). موش‌های گروه‌های ST سوسپانسیون تتراسایکلین هیدروکلراید(ویتامینی، LTD، اوکراین) را به صورت محلول در ۲ میلی‌لیتر آب روزانه با دوز ۱٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، که با وزن‌های روزانه تعیین شد، در طی ۷ روز دریافت کردند. این دوز منجر به اثر سمی ثابت تتراسایکلین هیدروکلراید بر بافت کبد در طول آزمایش می‌شود.

حیوانات گروه کنترل روزانه آب آشامیدنی دریافت کردند.

پروبیوتیک مطالعه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مطابق با دستورالعمل‌های PTCC کشت داده شد(۳٤). باکتری‌های MRS با سانتریفیوژ کردن و واحدهای کلنی‌فرمینگ که با رقیق‌سازی و رگه‌گذاری روی صفحات MRS آگار(Difco) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در طول شب شمارش شدند، برداشت شدند. LGG سپس سانتریفیوژ شد و مجدداً در رقت $۲/۵\times۱۰^{۷}$ فرم کلونی بر میلی‌لیتر در PBS و در ۱ میلی‌لیتر آماده و به صورت ۵ روز در هفته به مدت ۵ هفته به حیوانات گاواژ شد.

٤۸ ساعت پس از آخرین مداخله تمرینی تمامی رت‌ها به مدت ۱۰- ۸ ساعت ناشتا شده و برای قربانی شدن آماده شدند. بی‌هوشی با ترکیب کتامین[۱](۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین[۲] (۱۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) انجام شد، پس از بی‌هوشی کامل و تست درد و مطمئن شدن از عدم هوشیاری، خون‌گیری از بطن چپ قلب انجام گردید. سپس به سرعت بافت کبد حفره شکمی خارج شده و با شستشو بافر فسفات سالین، خون و مواد اضافی تمیز شد و بافت داخل میکروتویوب ۲ میلی‌لیتری کدگذاری شده قرار گرفت. میکروتیوب به داخل تانک ازت انتقال داده شد، سپس تا زمان آنالیزهای سلولی داخل فریزر ۸۰ـ سلسیوس نگه‌داری شدند. هم‌چنین برای آنالیز هیستولوژی مقداری از بافت کبد در فرماین ٤ درصد تثبیت شد.

بخش‌های کبدی برداشته و در فرمالین بافر ٤ درصد تثبیت شد. کبدهای تثبیت شده با فرمالین در پارافین جاسازی شدند، به ضخامت ۵ میکرومتر برش داده شدند و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی بر اساس معیارهای امتیازدهی به شرح زیر ارزیابی شد(۳٤): استئاتوز ۰:<۵ درصد؛ ۱: ۵ تا ۳۳ درصد؛ ۲: ۳٤-٦٦ درصد؛ ۳: > ٦٦درصد.

واکنش ریل تایم پی‌سی‌آر با استفاده از سایبرگرین و دستگاه استفون برای بررسی تغییرات بیان ژن(IL-12، IL-6 و IFN-β) در گروه‌های تحت مطالعه به روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ انجام شد. پرایمرهای ژن‌های انتخابی با استفاده از نرم‌افزار تنظیم ژنی طراحی شدند(جدول ۱). ژن گلسیرآلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز(GAPDH) به عنوان ژن کنترل داخلی انتخاب گردید.[۱۰]

در پژوهش حاضر برای تجزیه وتحلیل داده‌ها، از آمار توصیفی برای محاسبه شاخص‌های مرکزی و پراکندگی، برای توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک، آزمون آماری آنوا یک راهه برای بررسی تغییرات متغیرها در گروه‌های مختلف استفاده شد. برای بررسی اختلاف بین گروه‌های مختلف پژوهش نیز از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت.

1-Ketamine
2-Xylazine
3-Real-time PCR
4-SYBR Green PCR Master Mix
5-Stepone ABI System

جدول ۱: الگوی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

ژن ها	SEQUENCES (5´-3´)
اینترلوکین ۱۲	F: TGTTGTAGAGGTGGACTGGC R: ACAGTGATGGTCAGGGTCTT
اینترلوکین ۸	F: ACTGCACCCAAACCGAAGTC R: TGGGGACACCCTTTAGCATC
اینترفرون بتا	F: CTCCAGTTCCGACAAAGCAC R: TGAAGTCCGTCCTGTAGCTG
گلیسرید آلدهید ۳ فسفات	F: CAAGTTCAAGGGCACAGTCA R: CCCCATTTGATGTTAGCGGG

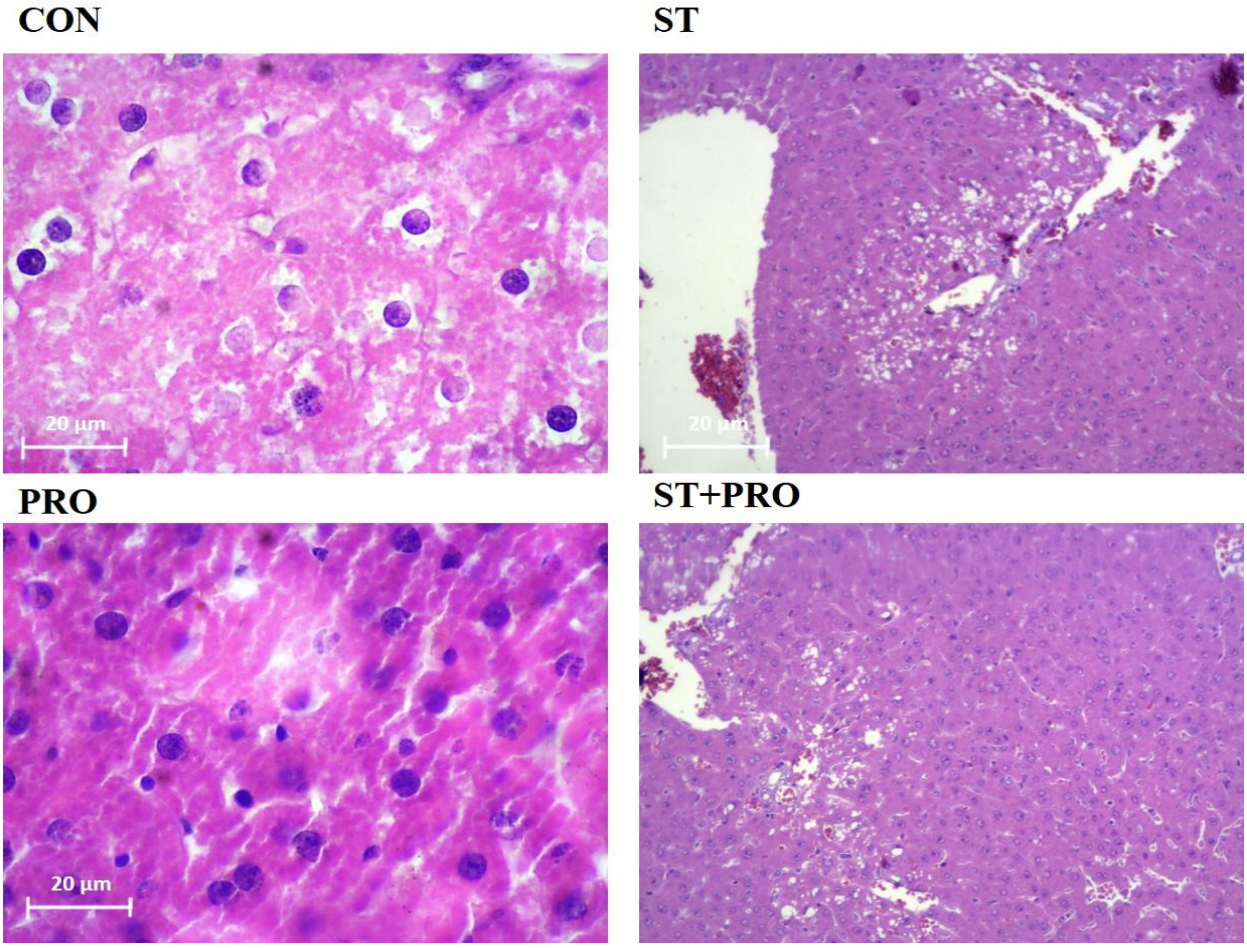
یافته‌ها

تغییرات هیستولوژی بافت کبد در شکل ۱ نشان داده شده است، همان‌طور که می‌توان دید گروه‌های کنترل سالم و گروه سالم پروبیوتیک انسجام بافتی منظم و مرتبی را دارند. این در حالی است که در گروه ST نفوذ سلول‌های چربی به بافت کبد مشخص می‌باشد. مصرف پروبیوتیک به مقدار اندک قادر به کنترل نفوذ چربی به بافت کبد شد(شکل ۱).

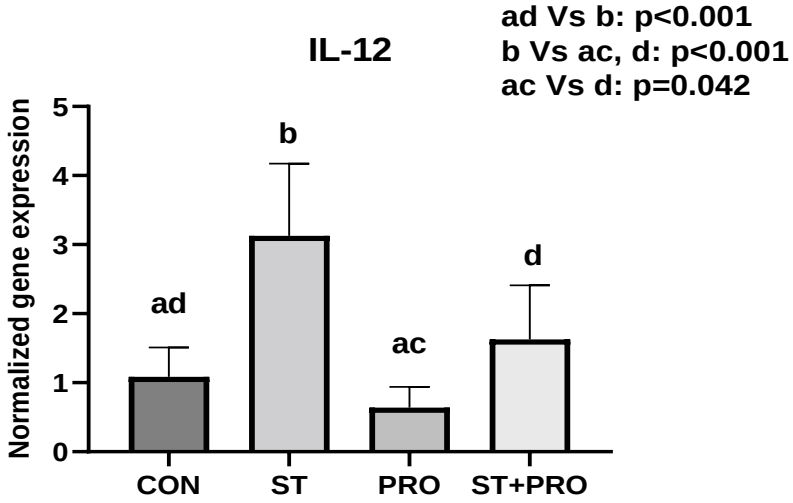
نتایج آزمون آماری آنوا نشان داد که بین گروه‌های مختلف تحقیق تفاوت معنی‌داری وجود دارد($p=۰/۰۰۱$ و $F=۱۸/۸۶$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که گروه ST افزایش معنی‌دار IL-12 را نسبت به گروه کنترل نشان داد($p<۰/۰۰۱$). در مقایسه با گروه ST نیز گروه‌های PRO و ST+PRO کاهش معنی‌دار بیان ژن IL-12 را در بافت کبد نشان دادند($p<۰/۰۰۱$)(نمودار ۱).

نتایج آزمون آماری آنوا نشان داد که بین گروه‌های مختلف تحقیق تفاوت معنی داری وجود دارد($p=۰/۰۰۱$ و $F=۲۱/۸۰$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که گروه ST افزایش معنی‌دار IL-8 را نسبت به گروه کنترل نشان داد($p<۰/۰۰۱$). در مقایسه با گروه ST نیز گروه های PRO و ST+PRO کاهش معنی‌دار بیان ژن IL-8 را در بافت کبد نشان دادند($p<۰/۰۰۱$)(نمودار ۲).

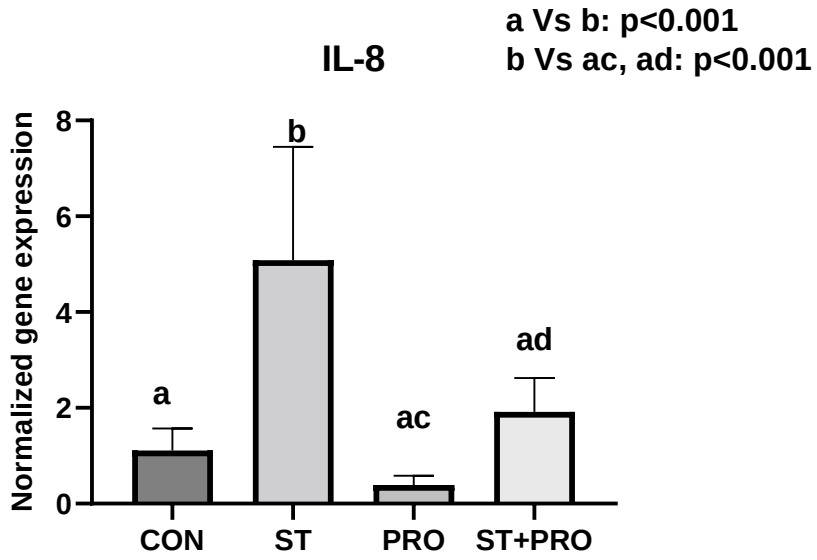
نتایج آزمون آماری آنوا نشان داد که بین گروه‌های مختلف تحقیق تفاوت معنی داری وجود دارد ($p=۰/۰۰۱$ و $F=٦٥/٦٤$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که گروه ST افزایش معنی‌دار IFN-β را نسبت به گروه کنترل نشان داد($p<۰/۰۰۱$). در مقایسه با گروه ST نیز گروه های PRO و ST+PRO کاهش معنی‌دار بیان ژن IFN-β را در بافت کبد نشان دادند($p<۰/۰۰۱$)(نمودار ۳).



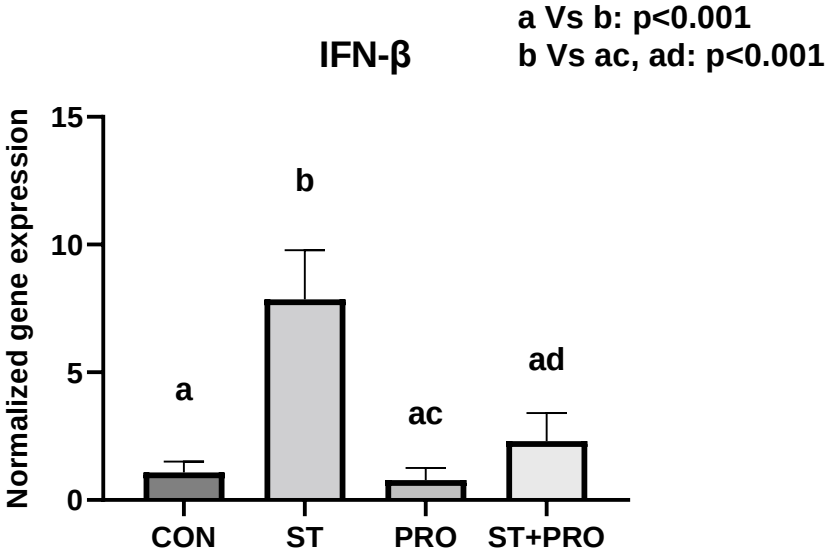
شکل ۱: تغییرات هیستولوژیک بافت کبد با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین(بزرگنمایی ۲۰ میکرومتر). نفوذ سلول‌های چربی در گروه‌های **ST** با رنگ سفید مشخص شده است. **CON**: گروه کنترل، **ST**: گروه استئاتوزیس، **PRO**: گروه پروبیوتیک، **ST+PRO**: گروه استئاتوزیس+پروبیوتیک.



نمودار ۱: تغییرات در بیان ژن IL-12 **در گروه‌های مختلف تحقیق. داده‌ها به صورت میانگین±انحراف استاندارد نشان داده اند.** CON: گروه کنترل، **ST**: گروه استئاتوزیس، **PRO**: گروه پروبیوتیک، **ST+PRO**: گروه استئاتوزیس+پروبیوتیک.



نمودار ۲: تغییرات در بیان ژن IL-8 **در گروه های مختلف تحقیق. داده‌ها به صورت میانگین±انحراف استاندارد نشان داده‌اند. CON**: گروه کنترل، **ST**: گروه استئاتوزیس، **PRO**: گروه پروبیوتیک، **ST+PRO**: گروه استئاتوزیس+پروبیوتیک.



نمودار ۳. تغییرات در بیان ژن IFN-β **در گروه های مختلف تحقیق. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نشان داده‌اند. CON**: گروه کنترل، **ST**: گروه استئاتوزیس، **PRO**: گروه پروبیوتیک، **ST+PRO**: گروه استئاتوزیس+پروبیوتیک.

بحث

شیوع بیماری‌های مختلف کبدی، که اخیراً به عنوان بیماری متابولیکی توصیف شده است، در جهان رو به افزایش می‌باشد(۳ـ۱). لذا هدف از مطالعه حاضر تعیین و بررسی تغییرات هیستولوژیک و بیان ژن اینترلوکین ۱۲، ۸ و اینترفرون بتا بافت کبدی به دنبال مصرف ۵ هفته این پروبیوتیک در رت‌های مدل استئاتوزیس می‌باشد.

بیماری‌های کبدی از جمله NAFLD به دلیل بار اپیدمیولوژیک آن یک موضوع مهم مرتبط با بهداشت عمومی است. شیوع انواع اختلالات کبدی و NAFLD ظاهراً متناسب با افزایش بروز چاقی در بزرگسالان و کودکان افزایش یافته است(۲۱). کبد چرب غیرالکلی با گسترش شرایط التهابی ارتباط نزدیکی با چاقی و مقاومت به انسولین دارد و اکنون به عنوان نشان دهنده تظاهرات کبدی سندرم متابولیک شناخته شده است. در حال حاضر هیچ دارویی برای درمان کبد چرب غیرالکلی ثبت نشده است. اگر چه مداخله در سبک زندگی اغلب مورد حمایت قرار می‌گیرد، اما حفظ آن دشوار است(۲۲). یکی از استراتژی‌های جدید درمانی برای بیماری‌های متابولیکی نیز استفاده از پروبیوتیک است، لذا در مطالعه حاضر تأثیرات ضدالتهابی پروبیوتیک را در شرایط استئاتوزیس مورد بررسی قرار می‌دهیم.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف پروبیوتیک در شرایط استاتوزیس کبدی قادر به کنترل تخریبات بافتی و تنظیم منفی در فاکتورهای التهابی IL-12، IL-8 و IFNβ است. هم‌سو با نتایج گروه ST بیان شده که باکتری‌های روده ممکن است با افزایش نفوذپذیری روده(۲۳)، باعث فعال‌سازی مستقیم سایتوکین‌های التهابی از طریق آزادسازی لیپوپلی‌ساکارید(LPS) و جذب اندوتوکسین‌ها در NAFLD شوند(۲٤). اندوتوکسین‌ها سلول‌های کوپفر را در کبد فعال می‌کنند و تولید TNF-α و IL-6 را افزایش می‌دهند، که به شروع فیبروز کبد کمک می‌کند(۲٦ و۲۵). علاوه بر این، یک مکانیسم پیچیده شامل؛ تجمع گسترده لیپید، التهاب سیستمیک، استرس اکسیداتیو و مقاومت به انسولین باعث سمیت سلولی و تشدید هپاتوپاتی می‌شود(۲۸ و ۲۷). لذا تغییرات افزایشی فاکتورهای IL-12، IL-8 و IFNβ در گروه ST نسبت به کنترل سالم دور از انتظار نیست. با این وجود مصرف پروبیوتیک به طور معنی‌دار این شاخص‌ها را کاهش داد. نشان داده شده است که پروبیوتیک‌ها عملکرد سلول‌های اپیتلیال را تقویت می‌کنند(۲۹) و باعث کاهش نفوذپذیری روده و اندوتوکسمی در بیماران مبتلا به بیماری کبدی می‌شوند(۳۰). در عین حال، پروبیوتیک‌ها هم‌چنین می‌توانند بر متابولیسم میزبان به روش‌های مختلفی تأثیر بگذارند، مانند تنظیم استخراج انرژی از مواد مغذی و تعدیل ژن‌های دخیل در متابولیسم سوبسترا(۳۱). هم‌سو با نتایج بافت‌شناسی نیز مشخص شده که تجویز پروبیوتیک به مدت چهار هفته در موش‌های ob/ob تحت رژیم غذایی پرچرب، رسوب چربی کبد را از نظر بافت‌شناسی بهبود می‌بخشد، محتوای اسیدهای چرب کل را کاهش می‌دهد و سطوح آمینو ترانسفراز پلاسما را با تنظیم پایین کیناز N ترمینال c-Jun کاهش می‌دهد(۳۲).

علاوه بر این، تجویز پروبیوتیک قادر به بهبود مقاومت به انسولین و استئاتوز کبدی در همان مدل موش بود. هم‌چنین سایر پژوهش‌ها اثرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضدفیبرو ژنتیکی این پروبیوتیک‌ها را در موش نشان داده‌اند. فاکتور IL-8 روی گیرنده‌های

CXCR1 و CXCR2 عمل می‌کند. هم‌چنین IL-8 باعث اختلال عملکرد سلولی و منجر به بیماری کبدی می‌شود(۳۳)، لذا تغییرات کاهشی این فاکتور با مصرف پروبیوتیک مفید به نظر می‌رسد. اثرات درمانی درمان پروبیوتیک در سایر بیماری‌های کبدی نظیر بیماری کبد الکلی(ALD) هم در بیماران و هم در مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است. اگرچه مکانیسم‌های دقیق پاتوژنز برخی بیماری‌های کبدی به طور کامل شناخته نشده است، اما اندوتوکسین مشتق شده از روده نقش مهمی در التهاب کبد ایفا می‌کند. پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که درمان با پروبیوتیک باعث کاهش اندوتوکسین در گردش ناشی از باکتری‌های گرم منفی روده در ALD می‌شود. در این رابطه وانگ و همکاران نشان دادند که درمان پروبیوتیک LGG التهاب کبدی ناشی از الکل را با کاهش تولید TNFα از طریق مهار فعال‌سازی اندوتوکسین با واسطه TLR4 و TLR5 کاهش می‌دهد(۳٤). در این مطالعه هر چند تغییرات فاکتورهای TNFα، TLR4 و TLR5، اما تنظیم منفی فاکتورهای IL-12، IL-8 و IFNβ نیز موید این مطلب بود که پروبیوتیک LGG می‌تواند نقش ضدالتهابی در بیماری کبدی داشته باشد.

در رابطه با تأثیرات ضدالتهابی پروبیوتیک در بافت‌ها و شرایط مختلف پژوهش‌های متعدد صورت گرفته است. از آنجایی که القای آسیب‌های کبدی منجر به تخریب متابولیسم بافت چرب می‌شود مدل مطالعه حاضر نیز در القای التهاب بافت چربی نیز مؤثر بوده که مصرف پروبیوتیک در کنترل این التهاب نقش قابل توجهی داشته است. در این رابطه بیان شده که پروبیوتیک در کاهش التهاب افراد چاق و دارای اضافه وزن نسبت به افراد عادی مؤثرتر می‌باشد. زیرا کاهش CRP بیشتر در افراد با BMI بالای ۲۵ نسبت به افراد با BMI پایین‌تر تأیید شده است(۳۵). هم‌چنین ارتباط مستقیم IL-8 و IL-10 با BMI تأیید شده است(۳۵)، لذا کنترل وزن و کاهش التهاب بافت چربی ناشی از مصرف پروبیوتیک در کنترل فاکتورهای التهابی مطالعه حاضر نیز مؤثر بوده است. در بیماری‌های التهابی نشان داده شده که مصرف پروبیوتیک می‌تواند نقش ضدالتهابی داشته باشد؛ در این رابطه بیان شده افزایش سطح IL-8 مخاطی در بیماران پوچیت پس از درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها کاهش یافت، اما فاکتورهای IFN-γ، TNF-α و IL-1β هرگز به سطح اولیه بازنگشت(۳٦). این در حالی بود که در مطالعه حاضر در مدل HS تمام فاکتورهای التهابی کاهش قابل توجه را نشان دادند که به نظر می‌رسد پروبیوتیک در شرایط آسیب کبدی با تعدیل سیستم ایمنی نقش ضد التهابی می‌تواند داشته باشد. به بیان دیگر استفاده از پروبیوتیک‌ها فرصتی برای کاهش پاتوبیولوژی انواع بیماری‌های گوارشی و متابولیکی، عمدتاً با تنظیم سیگنال‌های سلولی است که پاسخ‌های التهابی را هم به وسیله اپیتلیوم روده و هم به وسیله سلول‌های ایمنی تعدیل می‌کند. شواهد فزآینده نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها اثرات مضر سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را سرکوب می‌کنند و

هم‌چنین سیگنال‌دهی MAPK های مرتبط با مسیر استرس را برای بقای سلولی و حفظ یک سد اپیتلیال دست‌نخورده تعدیل می‌کنند(۳۷).

این مطالعه چندین محدودیت داشت که از جمله عدم بررسی مسیرهای سیگنالی نظیر؛ MAPK، عدم بررسی سایر فاکتورهای التهابی در بافت روده و عدم اندازه‌گیری بیان پروتئین با تکنیک‌های وسترن بلات و ایمونوهیستوشیمیایی بود که پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های آتی این موارد را در نظر بگیرند

نتیجه‌گیری

استراتژی‌های جدید درمانی نظیر استفاده از پروبیوتیک جدا از کنترل میکروبیوتای روده، قادر به تنظیم منفی فاکتورهای التهابی در بیماری کبدی استئاتوزیس می‌باشد، لذا می‌تواند به عنوان یک راهکار درمانی مورد توجه قرار گیرد. با این وجود بهتر است پژوهش‌های بیشتر در این زمینه به ویژه در نمونه انسانی صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پروژه تحقیقاتی با کد اخلاق IR.BMSU.REC.1396.632 می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری به اجرا در آمده است، بدین وسیله از آن واحد دانشگاهی، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

REFERENCES

1.Eslam M, Sanyal AJ, George J, Sanyal A, Neuschwander-Tetri B, Tiribelli C, et al. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. Gastroenterology 2020; 158(7): 1999-2014.
2.Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Hepatology 2004; 40(6): 1387-95.
3.Miao Z, Garske KM, Pan DZ, Koka A, Kaminska D, Männistö V, et al. Identification of 90 NAFLD GWAS loci and establishment of NAFLD PRS and causal role of NAFLD in coronary artery disease. Human Genetics and Genomics Advances 2022; 3(1): 100056.
4.Adams LA, Lymp JF, Sauver JS, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. Gastroenterology 2005; 129(1): 113-21.
5.Yuksel M, Demirbaş B, Mizikoğlu Ö, Tütüncü Y, Kanmaz T, Oğuzkurt L, et al. Examining the Hepatic Immune System in Children With Liver Disease With Fine Needle Aspiration. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 2022; 74(2): 200-7.
6.Kang BY, Kim E, Kim TS. Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells. Cellular Signalling 2005; 17(6): 665-73.
7.Haskó G, Szabó C. IL-12 as a therapeutic target for pharmacological modulation in immune-mediated and inflammatory diseases: regulation of T helper 1/T helper 2 responses. British Journal of Pharmacology 1999; 127(6): 1295-304.
8.Kaneda M, Kashiwamura SI, Ueda H, Sawada K, Sugihara A, Terada N, et al. Inflammatory liver steatosis caused by IL-12 and IL-18. Journal of Interferon & Cytokine Research 2003; 23(3): 155-62.
9.Scott MJ, Hoth JJ, Gardner SA, Peyton JC, Cheadle WG. Genetic background influences natural killer cell activation during bacterial peritonitis in mice, and is interleukin 12 and interleukin 18 independent. Cytokine 2004; 28(3): 124-36.
10.Huang YS, Wu JC, Chang FY, Lee SD. Interleukin-8 and alcoholic liver disease. Zhonghua yi xue za zhi= Chinese Medical Journal 1999; 62(7): 395-401.
11.Korneev KV, Atretkhany KSN, Drutskaya MS, Grivennikov SI, Kuprash DV, Nedospasov SA. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. Cytokine 2017; 89: 127-35.
12.McClain C, Barve S, Joshi-Barve S, Song Z, Deaciuc I, Chen T, et al. Dysregulated cytokine metabolism, altered hepatic methionine metabolism and proteasome dysfunction in alcoholic liver disease. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 2005; 29: 180S-8S.
13.Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. Theranostics 2017; 7(6): 1543.
14.Salminen S. Uniqueness of probiotic strains. Newsletter-International Dairy Federation 1996: 18.
15.Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science 2006; 312(5778): 1355-9.
16.Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2009; 49(6): 1877-87.
17.Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C, et al. Beneficial effects of a probiotic VSL# 3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. Journal of Clinical Gastroenterology 2005; 39(6): 540-3.
18.Macfarlane GT, Cummings JH. Probiotics, infection and immunity. Current Opinion in Infectious Diseases 2002; 15(5): 501-6.
19.Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. The lancet 2003; 361(9356): 512-9.
20.Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals: Canadian Council on Animal Care Ottawa; 1993.
21.Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. Journal of clinical Gastroenterology 2006; 40: S5-S10.
22.Rodríguez-Hernández H, Cervantes-Huerta M, Rodríguez-Moran M, Guerrero-Romero F. Decrease of aminotransferase levels in obese women is related to body weight reduction, irrespective of type of diet. Annals of Hepatology 2016; 10(4): 486-92.

23.Brun P, Castagliuolo I, Leo VD, 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-G25.
24.Szabo G, Bala S, Petrasek J, Gattu A. Gut-liver axis and sensing microbes. Digestive Diseases 2010; 28(6): 737-44.
25.Wigg A, Roberts-Thomson I, Dymock R, McCarthy P, Grose R, Cummins A. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor α in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. Gut 2001; 48(2): 206-11.
26.Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. Journal of Hepatology 2000; 32: 39-47.
27.Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. Nature 2012; 482(7384): 179-85.
28.Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. Hepatology 2010; 52(5): 1836-46.
29.Malasanos TH, Stacpoole PW. Biological effects of ω-3 fatty acids in diabetes mellitus. Diabetes Care 1991; 14(12): 1160-79.
30.Malaguarnera M, Gargante MP, Malaguarnera G, Salmeri M, Mastrojeni S, Rampello L, et al. Bifidobacterium combined with fructo-oligosaccharide versus lactulose in the treatment of patients with hepatic encephalopathy. European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2010; 22(2): 199-206.
31.Vanni E, Bugianesi E. The gut-liver axis in nonalcoholic fatty liver disease: Another pathway to insulin resistance? Wiley Online Library 2009; 27(1): 1790-2.
32.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.
33.Nagy LE. The role of innate immunity in alcoholic liver disease. Alcohol Research: Current Reviews 2015; 37(2): 237.
34.Wang Y, Liu Y, Kirpich I, Ma Z, Wang C, Zhang M, et al. Lactobacillus rhamnosus GG reduces hepatic TNFα production and inflammation in chronic alcohol-induced liver injury. The Journal of Nutritional Biochemistry 2013; 24(9): 1609-15.
35.Kazemi A, Soltani S, Ghorabi S, Keshtkar A, Daneshzad E, Nasri F, et al. Effect of probiotic and synbiotic supplementation on inflammatory markers in health and disease status: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. Clinical Nutrition 2020; 39(3): 789-819.
36.Ulisse S, Gionchetti P, D'Alò S, Russo FP, Pesce I, Ricci G, et al. Expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatment. The American Journal of Gastroenterology 2001; 96(9): 2691-9.
37.Vanderpool C, Yan F, Polk BD. Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. Inflammatory Bowel Diseases 2008; 14(11): 1585-96.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Investigating Histological Changes and Gene Expression of Interleukin-8, Interleukin-12, and Interferon Beta in Liver Tissue After Consumption of *Lactobacillus rhamnosus* GG Probiotic in Steatosis Model Rats

Rostamkhani F*

Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini(RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 16 Jul 2022 Accepted: 12 Sep 2022

Abstract:

Background & aim: Probiotic consumption can regulate the homeostasis of the digestive system and control metabolic diseases related to the digestive system. Therefore, the purpose of the present study was to determine and investigate histological changes and gene expression of interleukin 12, 8 and interferon beta in liver tissue after 5 weeks of consumption of *Lactobacillus rhamnosus* GG probiotic in steatosis model rats.

Methods: In the present experimental study conducted in 2018, 32 male Wistar rats aged 8 weeks and weighing 180 to 200 grams were included in the study and randomly divided into 4 groups (8 in each group); Control(CON), steatosis(ST), probiotic(PRO) and steatosis + probiotic(ST+PRO) were divided. Rats were modeled by intraperitoneal injection of 140 mg/kg of tetracycline (an antibiotic known to cause steatosis). The value of 107 colony forming units(cfu) of LGG was considered for probiotic groups for 5 weeks (5 days per week, by gavage). Hematoxylin and eosin staining was used to examine histological changes. Also, IL-12, IL-8 and IFN-β gene expression changes were used by RT-PCR method. The collected data were analyzed using one-way analysis of variance statistical software.

Results: Liver tissue histology improved after 5 weeks of probiotic consumption after ST model. ST group showed a significant increase in IL-12, IL-8 and IFN-β gene expression ($p<0.05$). Compared to the ST group, the PRO and ST+PRO groups showed a significant decrease in IL-12, IL-8 and IFN-β gene expression ($p<0.05$).

Conclusion: It appeared that the consumption of probiotics is able to improve the cellular and tissue of the liver in people with fatty liver problems by negatively regulating some cellular risk factors. However, further studies are required, especially in human samples.

Keywords: Hepatic Steatosis, Probiotic, Interleukin, Beta Interferon

***Corresponding author: Rostamkhani F,** Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini(RAH) Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Email: Shirinrostamkhani@yahoo.com

Please cite this article as follows: Rostamkhani F. Investigating Histological Changes and Gene Expression of Interleukin-8, Interleukin-12, and Interferon Beta in Liver Tissue After Consumption of *Lactobacillus rhamnosus* GG Probiotic in Steatosis Model Rats. Armaghane-danesh 2022; 27(5): 551-563.