



مقاله پژوهشی

بررسی اثر سویه‌های بومی پروبیوتیک بر بیومارکر مغزی آمیلوئید بتا در رت‌های آلزایمری شده نژاد ویستار

احسان اصغری جعفری، مریم قبه*، هانیه جعفری، پریچهره یغمایی*

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
*مسئولین مکاتبات: ghobeh@srbiau.ac.ir و yaghmaei_p@yahoo.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1951817.1360

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۶

چکیده

یکی از مهمترین علل پدیده فرسوده شدن جمعیت جهان، افزایش بیش از اندازه بیماری‌های نورودژنراتیو است که آلزایمر شایعترین آنها است که با تجمع خارج سلولی پلاک‌های آمیلوئید بتا ($A\beta$) در ناحیه هیپوکامپ مشخص می‌شود. پروبیوتیک‌ها موجودات ریززنده و فعال میکروسکوپی هستند که استفاده از این میکروارگانیسم‌ها به منظور حفظ و بهبود سلامت انسان بسیار مهم است. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر دو سویه پروبیوتیک *Bifidobacterium longum* و *Limosilactobacillus reuteri* بر بیان ژن $A\beta 42$ و نیز تعداد پلاک‌های آمیلوئیدی و نوروزن در مغز رت‌های آلزایمری بود. برای این منظور، ابتدا دو سویه پروبیوتیک از ماست سنتی جداسازی، خالص سازی و شناسایی شدند و سپس گروه‌های آزمایشی به این ترتیب دسته بندی شدند: تعداد ۳۰ سر موش نژاد ویستار به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل بدون جراحی و تیمار خاص بودند. سایر گروه‌ها تحت جراحی قرار گرفته و به آنها بتا آمیلوئید تزریق شد. به گروه شم آب (حلال پروبیوتیک) تزریق شد و دو گروه با دوز $2/5 \times 10^9$ CFU از دو سویه پروبیوتیک *Bifidobacterium longum* و *Limosilactobacillus reuteri* تیمار شدند. در نهایت میزان بیان ژن $A\beta 42$ توسط وسترن بلات و نیز تعداد پلاک‌های آمیلوئیدی و نورون‌ها در مغز رت‌های آلزایمری مورد بررسی قرار گرفتند. در موش‌های آلزایمری مرگ سلولی نورون‌ها به طور گسترده در هیپوکامپ رخ داد و تعداد پلاک‌های آمیلوئیدی نیز افزایش داشته‌اند ($p < 0/001$). همچنین بیان ژن $A\beta 42$ نیز در موش‌های آلزایمری افزایش داشته است. تیمار موش‌ها با پروبیوتیک‌ها تمامی موارد ذکر شده را به طور معناداری بهبود بخشید. دو سویه پروبیوتیک *Bifidobacterium longum* و *Limosilactobacillus reuteri* احتمالاً می‌تواند به عنوان یک ماده‌ی طبیعی مناسب در جهت درمان بیماری آلزایمر و کاهش علائم آن مورد استفاده قرارگیرد که این امر نیازمند انجام تحقیقات بیشتر می‌باشد.

کلمات کلیدی: آمیلوئید بتا، سویه بومی پروبیوتیک، وسترن بلات، پلاک‌های آمیلوئیدی، نوروزن.

مقدمه

بیماری آلزایمر دارای دو خصوصیت نوروپاتولوژیکی مهم است که یکی تجمع پلاک در قسمت خارج سلولی نورون‌ها بوده و دیگری تشکیل کلاف‌های نوروفیبریلاری در داخل نورون‌ها است که در اثر هیپرفسفریلاسیون پروتئین‌های تاو، ایجاد می‌شوند که در قسمت هیپوکامپ و سایر نواحی قشری دیده

پروبیوتیک‌ها در سطوح متعددی بر روی سیستم ایمنی تاثیر می‌گذارند که از جمله افزایش سطح سیتوکاین‌ها (۱۲) و ایمونوگلوبولین‌ها، افزایش تکثیر سلول‌های مونونوکلئاز (۱۸)، فعال کردن ماکروفاژها (۴۲)، تولید سیتوکاین‌های پیش التهابی مانند $TNF-\alpha$ و اینترلوکین ۶ را القا می‌کنند (۲۹).

Limosilactobacillus reuteri یک پروبیوتیک است که به دلیل اثرات مفید (۳۷، ۲۳) آن بر برخی بیماری‌های گوارشی، به خوبی شناخته شده است (۳۴). بیفیدوباکتری‌ها باکتری‌های بی‌هوازی گرم مثبت، دارای ژنوم غنی از GC هستند (۴۱). این میکروارگانیسم‌ها بخشی از میکروفلور طبیعی در روده بزرگ انسان و برخی حیوانات دیگر هستند (۴۹). برای داشتن خواص ارتقاء دهنده سلامت برای میزبان خود که شامل افزایش پاسخ ایمنی (۲۰)، مهار سرطان‌زایی (۶)، حفاظت از میزبان در برابر عفونت ویروسی (۱۶) و ممکن است تولید مواد ضد باکتری انجام دهند (۴۰).

نام پروبیوتیک به عنوان کربوهیدرات‌های زنجیره کوتاه که به وسیله آنزیم‌ها در سیستم گوارشی هضم نمی‌شوند، اطلاق می‌شود. یک پری بیوتیک باید باعث بهبود رشد بیفیدوباکتریوم‌ها و باکتری‌های اسیدلاکتیک شود (۳۹). بنابراین، مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر دو پروبیوتیک در موش‌های مدل آلزایمری و مقایسه نتایج با هر یک از موارد مجزا صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های پروبیوتیک در آزمایشگاه مولکولی از ماست سنتی جداسازی شده و توسط آزمون‌های تشخیصی اولیه (آزمون کاتالاز، آزمون همولیز، آزمون اکسیداز) و در نهایت توسط توالی‌یابی شناسایی شدند. در مطالعه حاضر، ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار

می‌شوند (۲۷). دیگر خصوصیات پاتوفیزیولوژیکی دخیل در بیماری آلزایمر عبارتند از اختلال عملکرد سیستم کولینرژیک، افزایش استرس اکسیداتیو (۲۸)، التهاب، مرگ سلول‌های عصبی، از دست رفتن سیناپس عصبی، آتروفی مغزی (۲۵)، کاهش هورمون‌های استروئیدی و سمیت عصبی ناشی از نوروترانسمیتر گلوتامات (۳۶). در این میان، پپتیدهای بتا آمیلوئیدی دارای نقش اساسی در پاتوژنز بیماری آلزایمر به عنوان جزء مهم تشکیل دهنده پلاک‌های پیری هستند و بنظر می‌رسد که تشکیل آنها شروع بیماری را رقم می‌زنند (۵۰).

اختلال در سیستم کولینرژیک جزو تغییرات زودرس عملکرد سیناپسی در بیماری آلزایمر محسوب می‌شود و احتمال دارد با افزایش میزان پپتید بتا آمیلوئید در مغز مرتبط باشد (۳۳).

گیرنده‌های پیش سیناپسی استیل کولین که پپتید بتا آمیلوئید با تمایل بسیار بالایی به این گیرنده‌ها متصل می‌شود، آزادی استیل کولین را در نورون‌های هیپوکامپ مغز با مشکل مواجه می‌کند (۱۱).

پروبیوتیک‌ها ریزنده‌هایی هستند (۱۹) که در صورت ورود تعداد کافی آن به روده، اثرات سلامت بخشی بر میزبان اعمال می‌کند (۲۲). مصرف برای اثربخش بودن غذا بر سلامتی باید حداقل 10^6-10^9 cfu/ml باشد (۴۵). اثرات سلامت بخش پروبیوتیک‌ها بر انسان شامل افزایش تحمل و هضم لاکتوز، اثر مثبت بر فلور میکروبی روده، کاهش pH روده، بهبود عملکرد روده، کاهش کلسترول، آمونیاک و دیگر ترکیبات سمی، تولید ویتامین‌های گروه B نظیر فولیک اسید، ترمیم و تجدید فلور طبیعی روده بعد از درمان با آنتی بیوتیک-ها، درمان و جلوگیری از اسهال حاد ایجاد شده به وسیله روتاویروس‌ها و تقویت سیستم ایمنی بدن است (۵).

با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از مؤسسه انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها در دمای حدود 20 ± 2 درجه سانتیگراد و رطوبت ۶۰-۵۰ درصد و سیکل نوری ۱۲ ساعته نگهداری شدند. بعد از یک هفته آشناسازی با محیط نگهداری، موش‌ها به طور تصادفی انتخاب شدند. برای القاء آلزایمر از آمیلوئید بتا ۴۲-۱ خریداری شده از شرکت سیگما-آلدریج آمریکا (Sigma-Aldrich, USA) استفاده شد که در آب مقطر دوبار استریل حل شده و به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده بود تا فیبریل‌های کامل شکل گیرد. جهت بیهوشی از تزریق درون صفاقی کتامین (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) استفاده شد و حیوانات درون دستگاه استریوتاکس قرار گرفتند. پس از تراشیدن موهای روی سر و ایجاد یک برش ساجیتال، درز برگما و لامبدا کاملاً مشخص شد. با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون مشخصات ناحیه CA1 هیپوکامپ با مختصات قدامی- خلفی ۳/۸ و طرفی ۲/۴ و پشتی ۲/۷ میلی‌متر علامت‌گذاری شد و سپس مجموعه به آرامی با مته سوراخ شد. برای تزریق آمیلوئید بتا به وسیله سرنگ همیلتون از طریق سوراخ‌های ایجاد شده درون مغز و با عمق محاسبه شده، به میزان ۲ میکرولیتر آمیلوئید بتا به صورت دوطرفه و به آرامی تزریق شد (۱۲). حیوانات به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند که شامل: ۱. گروه کنترل که فقط آب و غذای معمولی دریافت کردند، ۲. گروه آلزایمری که تحت جراحی آلزایمری قرار گرفتند و بتا آمیلوئید در داخل هیپوکامپ مغز تزریق شد. ۳. گروه شم که تحت جراحی آلزایمری قرار گرفتند و آب مقطر درون هیپوکامپ مغز تزریق شد. ۴. گروه تجربی (۱) : در این گروه حیوانات تحت عمل جراحی آلزایمری شدن با تزریق بتا آمیلوئید قرار گرفتند و سویه اول پروبیوتیک لاکتوباسیل

(*Limosilactobacillus reuteri*) را با دوز 10^9 CFU $\times 2/5$ به میزان ۰/۵ سی‌سی از طریق گاوژ به مدت یک ماه دریافت کردند. ۵. گروه تجربی (۲): در این گروه حیوانات تحت عمل جراحی آلزایمری شدن با تزریق بتا آمیلوئید قرار گرفتند و سویه دوم پروبیوتیک بیفیدوباکتر (*Bifidobacterium longum*) را با دوز 10^9 CFU $\times 2/5$ به میزان ۰/۵ سی‌سی از طریق گاوژ به مدت یک ماه دریافت کردند. تمام آزمایشات بر روی حیوانات مطابق با قوانین کمیته اخلاقی کار با حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام گرفته است.

به منظور بررسی بیان ژن A β 42 از تکنیک وسترن بلات و آنتی‌بادی HRP anti- β -Amyloid, 1-42 (SIG-39147) استفاده گردید. از ژن بتا اکتین به عنوان Housekeeping gene استفاده گردید. پس از مراحل تثبیت، آبگیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری مغز، با استفاده از میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۶ میکرون تهیه شد. نمونه‌ها روی لام قرار گرفتند و سپس با هماتوکسیلین-ئوزین برای مشاهده سلول‌های پیرامیدال ناحیه هیپوکامپ بافت مغز رنگ آمیزی شدند (۱۳). به منظور شمارش نوروں‌ها و پلاک‌ها از نرم‌افزار Image J استفاده شد.

در این تحقیق از نرم‌افزار اکسل استفاده شده و برای بررسی وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون واریانس ANOVA و TUKEY استفاده شد. داده‌ها به صورت $MEAN \pm SEM$ با سطوح معنی‌دار $p < 0/05$ ، $p < 0/01$ و $p < 0/001$ برای گروه‌ها در تمام مراحل در نظر گرفته شد.

نتایج

پس از جداسازی و تخلیص سویه‌های پروبیوتیک در آزمایشگاه مولکولی، دو سویه بر اساس توالی یابی در

حالی که در مقایسه با گروه کنترل منفی کاهش معناداری در سطح $p < 0/001$ مشاهده شد (شکل ۳). این موضوع نشان‌دهنده تاثیر مثبت دریافت پروبیوتیک‌های *Bifidobacterium longum* و *Limosilactobacillus reuteri* بر میزان نوروزنز در گروه‌های آلزایمری بوده است. در بررسی دیگر، تعداد پلاک‌های آمیلوئیدی در گروه‌های تجربی دریافت کننده دو پروبیوتیک در مقایسه با گروه‌های کنترل آلزایمری و شم در سطح $p < 0/001$ کاهش معناداری داشته است. در مقابل، نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری نشان داده شد ($p < 0/05$) (شکل ۴). این موضوع نشان دهنده عدم وجود پلاک‌های آمیلوئیدی در گروه سالم که آب و غذای معمولی دریافت می‌کردند می‌باشد.

Genbank با دارا بودن ۷۹ و ۷۲ درصد شباهت به ترتیب به عنوان دو سویه پروبیوتیک *Limosilactobacillus* و *Bifidobacterium longum reuteri* شناسایی شدند (شکل ۱). پس از پایان دوره تجربیات، نتایج حاصل از مطالعه وسترن بلات نشان داد که بیان ژن Aβ42 در گروه آلزایمر و شم افزایش داشته است. این در حالیست که تیمار گروه‌ها با پروبیوتیک‌های *Bifidobacterium longum* و نیز *Limosilactobacillus reuteri* موجب کاهش میزان بیان ژن Aβ42 شده‌اند (شکل ۲). یافته دیگر مطالعه حاضر نشان داد که میزان شمارش نوروها در گروه‌های درمانی دریافت کننده دو پروبیوتیک در مقایسه با گروه‌های کنترل آلزایمری و شم در سطح $p < 0/01$ افزایش معناداری یافته بود، در

A

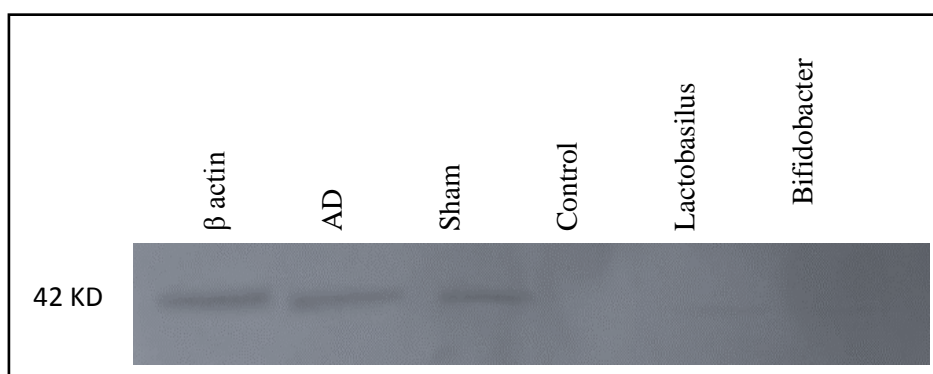
select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Dist		
Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
<input checked="" type="checkbox"/> Limosilactobacillus reuteri strain 1B chromosome, complete genome	Limosilac...	275	1208	77%	2e-69	72.65%
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus reuteri SD2112, complete genome	Lactobaci...	275	1246	77%	2e-69	72.65%
<input checked="" type="checkbox"/> Limosilactobacillus reuteri strain AN417 chromosome, complete geno...	Limosilac...	270	1239	77%	7e-68	72.35%
<input checked="" type="checkbox"/> Limosilactobacillus reuteri strain CNI-KCA2 chromosome	Limosilac...	270	545	77%	7e-68	72.35%
<input checked="" type="checkbox"/> Limosilactobacillus reuteri strain reuteri chromosome, complete geno...	Limosilac...	270	1243	77%	7e-68	72.35%
<input checked="" type="checkbox"/> Limosilactobacillus reuteri strain LL7 chromosome, complete genome	Limosilac...	270	1243	77%	7e-68	72.35%
<input checked="" type="checkbox"/> Limosilactobacillus reuteri strain YSJL-12 chromosome, complete ge...	Limosilac...	270	1239	77%	7e-68	72.35%
<input checked="" type="checkbox"/> Limosilactobacillus reuteri strain ATG-F4 chromosome, complete gen...	Limosilac...	270	1230	77%	7e-68	72.35%
<input checked="" type="checkbox"/> Limosilactobacillus reuteri strain WHH1689 chromosome, complete.g...	Limosilac...	270	1243	77%	7e-68	72.35%
<input checked="" type="checkbox"/> Limosilactobacillus reuteri strain ZLR003 chromosome, complete gen...	Limosilac...	270	1239	77%	7e-68	72.35%
<input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus reuteri, complete genome, strain ATCC 53608	Lactobaci...	270	1239	77%	7e-68	72.35%

B

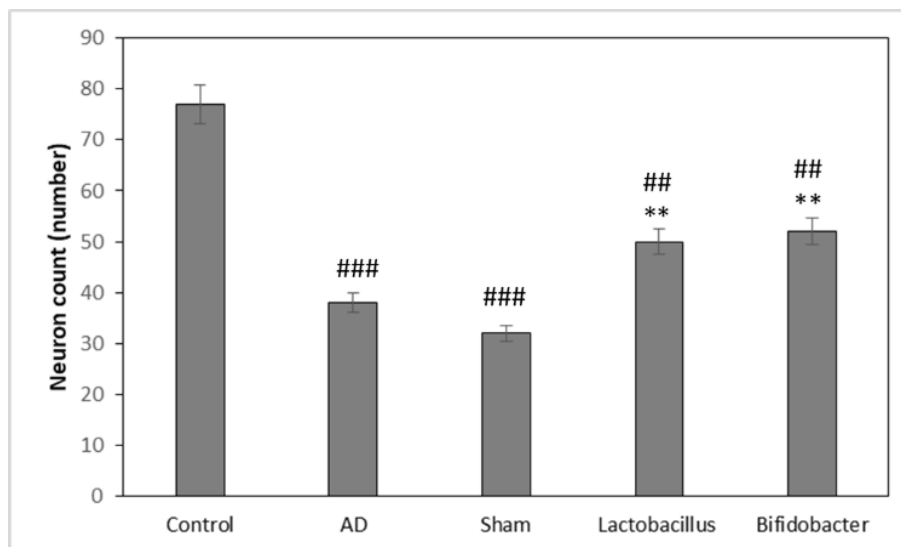
select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Dis		
Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3255 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3254 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3253 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3278 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3276 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3262 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3243 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3239 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3219 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3218 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3215 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3213 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%

شکل ۱- توالی یابی دو سویه پروبیوتیک (A) *Limosilactobacillus reuteri* و (B) *Bifidobacterium longum* در

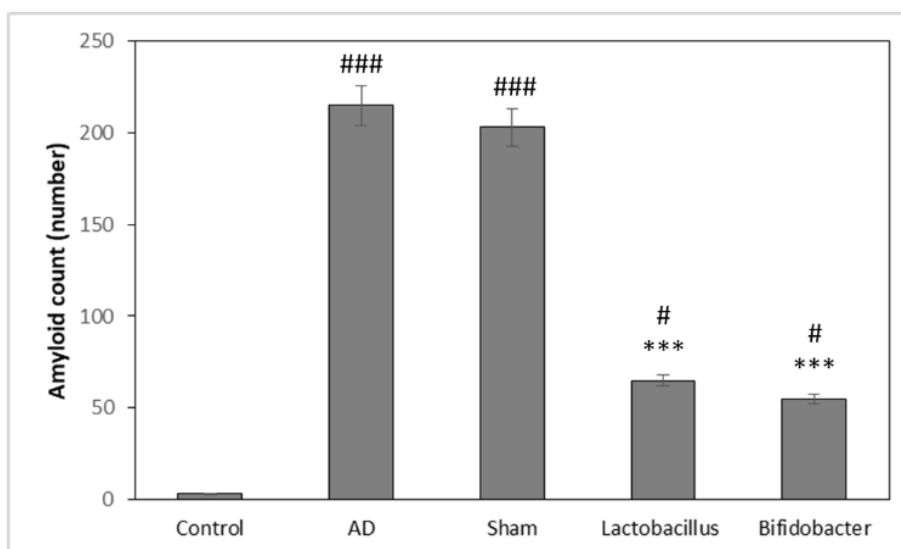
Genbank



شکل ۲- وسترن بلات به منظور بررسی بیان ژن Aβ42 در گروه‌های مختلف نمایش داده شده است.



شکل ۳- شمارش نورون‌ها در گروه‌های مختلف. * اختلاف معنی دار با گروه آلزایمری (AD) و # اختلاف معنی دار با گروه کنترل. (**: $p < 0/01$), (###: $p < 0/001$) و (##: $p < 0/01$).



شکل ۴- شمارش پلاک‌های آمیلوئیدی در گروه‌های مختلف. * اختلاف معنی دار با گروه آلزایمری (AD) و # اختلاف معنی دار با گروه کنترل. (***: $p < 0/001$), (###: $p < 0/001$) و (#: $p < 0/05$).

بحث

مطالعات نشان می‌دهد که یک دوز واحد AB1-42 می‌تواند منجر به تشکیل پلاک (۴) و کاهش قابل توجهی در حافظه و یادگیری شود. مصرف پروبیوتیک می‌تواند از اختلال یادگیری و اختلال حافظه در مدل موش آلزایمری، جلوگیری کند و باعث کاهش تعداد و اندازه پلاک‌ها گردد (۴۳). در این راستا پژوهش حاضر نشان داد که مصرف دو پروبیوتیک *Bifidobacterium longum* و *Limosilactobacillus reuteri* باعث کاهش تجمع بتا آمیلوئید در هیپوکامپ شده است. مطالعه مهرآبادی و همکاران نیز نشان داد که تجویز پروبیوتیک‌ها باعث کاهش تجمع بتا آمیلوئید در هیپوکامپ موش‌های آلزایمری شده است. در یک مدل آلزایمری موش، علاوه بر این، پروبیوتیک‌ها

مطالعات نشان می‌دهد که یک دوز واحد AB1-42 می‌تواند منجر به تشکیل پلاک (۴) و کاهش قابل توجهی در حافظه و یادگیری شود. مصرف پروبیوتیک می‌تواند از اختلال یادگیری و اختلال حافظه در مدل موش آلزایمری، جلوگیری کند و باعث کاهش تعداد و اندازه پلاک‌ها گردد (۴۳). در این راستا پژوهش حاضر نشان داد که مصرف دو پروبیوتیک

شوند. مشخص گشته است که بهبود استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی توسط پروبیوتیک‌ها می‌تواند باعث پاک شدن پلاک‌ها شوند و تعداد و اندازه آنها را کاهش دهند (۵۱).

در بررسی‌های حاصل از شمارش نوروها نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز نشان داد که دریافت پروبیوتیک‌ها توانسته‌اند به طور معناداری باعث نوروژایی گردد. چندین مطالعه دیگر ارتباط بین اختلال در میکروبیوم انسان و اختلالات نورودژنراتیو، به ویژه در آلزایمر را مورد بررسی قرار داده است. در حقیقت، یک پروبیوتیک وقتی ایجاد می‌شود، علائم آلزایمر را از طریق مکانیسم‌های مختلف بهبود می‌بخشد. این نتایج شامل تولید آنتی اکسیدان و متعاقب با آن، ختنی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در دستگاه گوارش، کاهش تنظیم التهاب ناشی از آبشار سیتوکین‌ها و تقویت عملکرد سد اپیتلیال می‌باشند (۵۲). همچنین، پروبیوتیک‌ها تحت تأثیر بیوشیمی مغز قرار می‌گیرند و سطح مولدهای عصبی یا انتقال دهنده‌های عصبی از جمله به عنوان فاکتور نوروتروفین مشتق شده از مغز (BDNF) (۸) اسید گاما-آمینوبوتیریک (GABA) (۷)، سروتونین و دوپامین (۳۵)، نوراپی نفرین، استیل کولین (۱۰)، اعصاب روده‌ای (۵۳)، محور HPA (۱) و سیستم ایمنی (۱۳) و غدد درون ریز را افزایش می‌دهند (۱۴). اختلال در نوروزن در هیپوکامپ از طریق افزایش بیان فاکتورهای pro-apoptotic و تولید استرس اکسیداتیو (۳۲)، کاهش می‌یابند. در این خصوص، مکمل پروبیوتیک باعث بهبود علائم مذکور گشته است (۲). به نظر می‌رسد که پروبیوتیک‌ها می‌توانند بر حافظه و تشکیل پلاک با تأثیر بر مکانیسم‌های آسیب‌شناختی در آلزایمر، مانند استرس اکسیداتیو، تأثیر بگذارند (۳۰). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌هایی مانند *L. fermentum*، *L. acidophilus* و *B. longum* مورد

التهاب عصبی و مارکرهای استرس اکسیداتیو در حیوانات مبتلا را کاهش می‌دهند. اطلاعات نشان داد که استفاده از مخلوط پروبیوتیک به مدت ۱۰ هفته، باعث بهبود و تاخیر در تلفیق حافظه فضایی مدل موش‌های آلزایمری شده است (۴۶). همچنین مکمل پروبیوتیک به طور قابل توجهی فضای وابسته به هیپوکامپ را بهبود می‌بخشد و در حافظه و انعطاف-پذیری سیناپسی در موش‌های صحرایی آلزایمری شده توسط بتا آمیلوئید نیز نقش دارد و همچنین به طور مطلوب، تعادل ضد اکسیدان و عوامل اکسید کننده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. روی هم رفته، شواهد حاضر، ارتباط بین پلاک‌های بتا-آمیلوئید و فعالیت سیناپسی را مشخص می‌کند (۴۴). به طور مداوم، نشان داد که پاکسازی پلاک‌های بتا-آمیلوئید یا جلوگیری از تشکیل آنها، از طریق انتقال سیناپسی در هیپوکامپ، می‌تواند مکانیسمی باشد که پروبیوتیک‌ها از آن استفاده می‌کنند (۲۱). از این رو، احتمال دیگر این است که پروبیوتیک‌ها، از طریق فشارهای استرس اکسیداتیو و نشانگرهای زیستی پیش التهابی آزاد شده از میکروگلیا فعال شده و فعالیت مدارهای عصبی را بهبود می‌بخشد. بنابراین، براساس شواهد ارائه شده به نظر می‌رسد یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌هایی که باکتری‌های مفید بر فعالیت مدارهای عصبی تأثیر می‌گذارند شیمی عصبی مغز است (۱۷).

همچنین، اسیدهای چرب زنجیره کوتاه تولید شده توسط پروبیوتیک‌های لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم، از جمله اسید بوتیریک و پروپیونیک اسید، به عنوان عوامل ضد التهابی عمل می‌کنند و باعث مهار فعال شدن NF-KB می‌شود. همچنین اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌ها در اندام‌های دورتر نیز مشاهده شده است و نشان می‌دهد که آنها نه تنها به صورت محلی عمل می‌کنند (۳۸)، بلکه می‌توانند منتقل به سیستم عصبی مرکزی توسط اعصاب آوران

تهران به انجام رسیده است. بدین وسیله از کمک و مساعدت این عزیزان تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Ait-Belgnaoui A., Durand H., Cartier C., Chaumlinaz G., Eutamene H., Ferrier L., 2012. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneurology endocrinology*, 37: 1885-1895.
2. Ait-Belgnaoui A., Colom A., Braniste V., Ramalho L., Marrot A., Cartier C., 2014. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 26: 510-520.
3. Akkasheh G., Kashani-Poor Z., Tajabadi-Ebrahimi M., Jafari P., Akbari H., Taghizadeh M., 2016. Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*, 32: 315-320.
4. Asadi F., Jamshidi A., Khodaghali F., Yans A., Azimi L., Faizi M., 2015. Reversal effects of crocin on amyloid β -induced memory deficit: Modification of autophagy or apoptosis markers. *Pharmacology and Biochemistry*, 13(9): 47-58.
5. Ásványi-Molnár N., Sipos-Kozma Z., Tóth Á., Ásványi B., Varga L., 2009. Development of functional dairy food enriched in spirulina (*Arthrospira platensis*). *Tejgazdaság*, 69(2):15-22.
6. Bandaru S., Rivenson A., 1993. Inhibitory Effect of *Bifidobacterium longum* on Colon, Mammary, and Liver Carcinogenesis Induced by 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a Food Mutagen. *Division of Nutritional carcinogenesis and experimental pathology and toxicology. American Health foundation. Valhalla*, 53: 17-193.

مطالعه قرار گرفته است (۴۷) به عنوان مثال، مصرف ماست حاوی *L. acidophilus* به مدت ۹ هفته (۴۸)، یا شیر حاوی *L. fermentum* به مدت ۳ هفته (۲۶)، نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو را کاهش داد. اگرچه مکانیسم دقیق اثرات پروبیوتیک‌ها بر استرس اکسیداتیو به طور کامل ثابت نشده است، اما شواهد زیادی نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها با کاهش تولید سیتوکین، استرس اکسیداتیو را بهبود می‌بخشند. استرس و التهاب اکسیداتیو با هم مرتبط هستند و رادیکال‌های آزاد می‌توانند با فعال کردن NF-k، باعث ترشح TNF شوند (۲۴). برخی مطالعات نشان داده‌اند (۳۱) که پروبیوتیک‌ها باعث افزایش فعالیت گلوتامات-سیستئین لیگاز و افزایش میزان سنتز گلوتامین می‌شوند (۹) و آنها همچنین می‌توانند تولید آنیون سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل را مسدود کنند (۱۵) و باعث کاهش محتوای پروکسیدان و تحریک و تقویت سیستم ایمنی بدن شوند (۳).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه افزایش تعداد نوروها و همچنین کاهش تعداد پلاک‌های آمیلوئیدی در گروه‌های درمانی نسبت به گروه‌های آلیزیمری شده دیده می‌شود. با توجه به گزارشاتی که بیان شد، می‌تواند با مهار فاکتورها و مسیرهای التهابی سبب بهبود رت آلیزیمری شوند. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند باعث کاهش رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش استرس اکسیداتیو شود که در نهایت می‌تواند منجر به بهبودی رت‌های آلیزیمری شود.

تقدیر و تشکر

این پژوهش، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بود و با حمایت‌های معنوی حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

- depression. *Neuroscience*, 1(70): 1179-1188.
15. Desbonnet L., Garrett L., Clarke G., Bienenstock J., Dinan T.G. 2008. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of Psychiatry Research*, (43): 164-174.
16. Dyffy LC., Zielezny MA., Roepenhoff-Talty M., 1994. Effectiveness of *Bifidobacterium bifidum* in mediating the clinical course of murine rotavirus diarrhea. *Pediatrics Research*, (35): 690-696.
17. Eftekharzadeh B., Ramin M., Khodaghohi F., Moradi S., Tabrizian K., Sharif R., 2012. Inhibition of PKA attenuates memory deficits induced by β -amyloid (1-42), and decreases oxidative stress and NF- κ B transcription factors. *Behavior Brain Research*, 226(1): 301-308.
18. Famularo G., Moretti S., Marcellini S., 1997. Stimulation of immunity by probiotics. In: Fuller R, ed. *Probiotics : Therapeutic and other beneficial effects*. London: *Chapman and Hall*, 13(3): 161.
19. Guarner F., Schaafsma G., 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39(3): 237-238.
20. Hisako Yasui H., Ohwaki M., 1991. Enhancement of Immune Response in Peyer's Patch Cells Cultured with *Bifidobacterium breve*. *Journal of Dairy Science*, 74: 1187-1195.
21. S. Hong V., Beja-Glasser B., Nfonoyim A., Frouin S., Li S., Ramakrishnan K., Merry Q., Shi A., Rosenthal B., Barres C., Lemere D., Selkoe B., 2016. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, 352: 712-716.
22. Joint F., 2001. WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Córdoba Argentina*, 8: 585-615.
7. Bercik P., Park AJ., Sinclair D., Khoshdel A Lu J., Huang X. 2011. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 23: 1132-1139.
8. Bravo J.A., Forsythe P., Chew M.V., Escaravage E., Savignac H., Dinan T.G. 2011. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10(8): 16050-16055.
9. Carvalho B., and Abdalla Saad M.J., 2013. Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance. *Mediators and Inflammation*, 98(6): 734.
10. Cryan JF., Dinan TG., 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 13: 701-712.
11. D'Andrea MR., Nagele RG., 2006. Targeting the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor to reduce amyloid accumulation in Alzheimer's disease pyramidal neurons. *Current Pharmacy Desisease*, 12(6): 677-84.
12. De Simone C., Ciardi A., Grassi A., 1992. Effect *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* on gut mucosa peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacology Immunotoxicology*, (14): 331-40.
13. Desbonnet L., Garrett L., Clarke G., Bienenstock J., Dinan TG., 2008. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: an assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of Psychiatry Research*, 43: 164-174.
14. Desbonnet L., Garrett L., Clarke G., Kiely B., Cryan JF., Dinan TG., 2010. Effects of the probiotic *Bifidobacteria infantis* in the maternal separation model of

- health and hypothalamic–pituitary–adrenal axis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in petrochemical workers. *Nutr. Neuroscience*, 19(9): 387-395.
32. Mohammadi HS., Goudarzi I., Lashkarbolouki T., Abrari K., Salmani ME., 2014. Chronic administration of quercetin prevents spatial learning and memory deficits provoked by chronic stress in rats. *Behavior and Brain Research*, 2(70): 196-205.
33. Nordberg A., 2001. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biology and Psychiatry*, 49(3): 200-210.
34. Ojetii V., Petruzzellol C., Minnecol A., Gnarral A., Gasbarrinll A., Franceschil F., 2017. Effect of *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938) on methane production in patients affected by functional constipation: a retrospective study. *Dermatology*, 21: 1702-1708.
35. O'Sullivan E., Barrett E., Grenham S., Fitzgerald P., Stanton C., Ross RP., 2011. BDNF expression in the hippocampus of maternally separated rats: does *Bifidobacterium breve* 6330 alter BDNF levels? *Beneficial of Microbes*, 2: 199-207.
36. Palop J., Mucke L., 2010. Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Neuroscience*, 13(7): 812-8.
37. Qinghui M., Vincent J., 2018. Tavella and Xin M. Luo . Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Frontiers of Microbiology*, 19(9): 757
38. Quigley E.M., 2010. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacology Research*, 61(3): 213-218.
39. Rezaee P., Kasra-Kermanshahi R., Katuli M., 2014. Prebiotics Decrease the Antibacterial Effect of Nano Silver and Nano TiO₂ Particles Against Probiotic Bacteria of Food. *Current Natural Food Science*, 10(2): 1-6.
23. Kubota M., Kobayashi N., Sugizaki T, Shimoda M., Kawahara M., 2020. Carnosine suppresses neuronal cell death and inflammation induced by 6-hydroxydopamine in an in vitro model of Parkinson's disease. *PLOS One*, 02(4): 0448
24. Li J., Wang C., Zhang J., Cai J., Cao Y., Sun X., 2010. Hydrogenrichsaline improves memory function in a rat model of amyloid-beta induced Alzheimer's disease by reduction of oxidative stress. *Brain Research*, 13(28): 152-161.
25. Lin M., Beal M., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 71(13): 787-795.
26. Mikelsaar M., Zilmer M., 2009. *Lactobacillus fermentum* ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 121(1): 1-27.
27. Masliah E., Mallory M., Hansen L., Richard D., Alford M., Terry R., 1994. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letter*, 174(1): 67-72.
28. Mesulam M., 2004. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learning and Memory*, 11(1): 43-49.
29. Miettinen M., Vupio-Varkila J., Varkila K., 1996. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun. ASM Journals of Infection and Immunity*, 64: 5403-5405.
30. Mohammadi A., Jazayeri S., Khosravi-Darani K., Solati Z., Mohammadpour N., Asemi Z., 2016. The effects of probiotics on mental health and hypothalamic–pituitary–adrenal axis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in petrochemical workers. *Nutr. Neuroscience*, 19(9): 387-395.
31. Solati Z., Mohammadpour N., Asemi Z. 2016. The effects of probiotics on mental

- Disease Model of Rats. *Iranian Biomedical Journal*, 24 (4): 220-228
47. Tapia-Arancibia L., Aliaga E., Silhol M., Arancibia S., 2008. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Research*, 59(1): 201-220.
48. Tapia-Arancibia L., Aliaga E., Silhol M., Arancibia S., 2008. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Research*, 59(1): 201-220.
49. Mitsuoka T., 1992. The Human Gastrointestinal Tract. The Lactic Acid Bacteria. *Springer*, 1(69):114.
50. Walsh D., Klyubin I., Fadeeva J., Rowan M., Selkoe D., 2002. Amyloid- β oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochemical Society Trans*, 30(4): 552-557.
51. Wang Y., Kasper L.H., 2014. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain and Behavioral Immunity*, 1(38): 1-12.
52. Wang Y., Wu Y., Wang Y., Xu H., Mei X., Yu D., 2017. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 1(9): 521.
53. WennLiu Y., HsienLiu W., ChenWu C., ChenJuan Y., ChenWu Y., PingTsai H., Wang S., ChiehTsai Y., 2016. Psychotropic effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 in early life-stressed and naïve adult mice. *Brain Research*, 16(15): 1-12.
40. Salam A., Anatoly Bezkorovainy I., 1993. Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt. *Journal of the science of food and agriculture*, 62(4): 351-354.
41. Sgorbati B., Biavati B., Palenzona D., 1986. Genus bifidobacterium. Bergey's manual of systematic bacteriology. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, 27(9): 306
42. Schiffrin EJ., Brassart D., Servin A., 1997. Immune modulating of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria : Criteria for strain selection. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66: 15-20.
43. Shariatpanahi M., Khodagholi F., Ashabi G., Khasraghi A., Azimi L., Abdollahi M. 2015. Ameliorating of memory impairment and apoptosis in amyloid β -injected rats via inhibition of nitric oxide synthase: possible participation of autophagy. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(3): 811-824.
44. Athari S., 2018. Lactobacilli and bifidobacteria ameliorate memory and learning deficits and oxidative stress in β -amyloid (1-42) injected rats. *Physiology, Nutrition and Metabolism*, 43(7): 718-726.
45. Sheehan V., Ross P., Fitzgerald G., 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovation of Food Science and Emerging Technology*, 8(2): 279-284.
46. Mehrabadi S., Sadr S., 2020. Assessment of Probiotics Mixture on Memory Function, Inflammation Markers, and Oxidative Stress in an Alzheimer's

Investigating the Effect of Local Probiotics Strains on β -Amyloid Brain Biomarker in Induced Alzheimer's-Disease Wistar Rats

Ehsan Asghari Jafari¹, Maryam Ghobeh^{1,*}, Hanieh Jafary¹, Parichehreh Yaghmaei^{1,*}

Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

One of the most important causes of global population decline is the overgrowth of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease characterized by the extracellular accumulation of amyloid beta ($A\beta$) plaques in the hippocampus. Probiotics are microscopic organisms that are important for maintaining and improving human health. This study aims at assessing the effect of two probiotic strains, including *Bifidobacterium longum* and *Limosilactobacillus reuteri* on $A\beta$ 42 gene expression, the count of amyloid plaques, and neurogenesis in the brain of Alzheimer's disease rat models. First, two probiotic strains were isolated, purified and identified from traditional yogurt, and the rats were grouped as follows: thirty male Wistar rats were randomly divided into 5 groups. The control group underwent any surgery with no special treatment. The other groups underwent surgery and after being injected by $A\beta$ 42, they were divided into the sham group receiving water (probiotics solvent) and the two experimental groups receiving 2.5×10^9 CFU of *Bifidobacterium longum* and *Limosilactobacillus reuteri* strains. Finally, $A\beta$ 42 gene expression, the count of amyloid plaques, and neurogenesis were assessed in the brain of Alzheimer's disease rat models. In the brain of induced Alzheimer's disease rats, neuron death occurred and the number of amyloid plaques increased significantly ($p < 0.001$). Also, $A\beta$ 42 gene expression was increased in their brains. Meanwhile, treatment with both probiotic strains notably improved all of these symptoms. Therefore, the use of both *Bifidobacterium longum* and *Limosilactobacillus reuteri* probiotic strains seem to be effective in the recovery and treatment of Alzheimer's disease which certainly requires more investigations.

Keywords: Amyloid beta, Native probiotic strain, Western blot, Amyloid plaques, Neurogenesis.