فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۱، زمستان ۱۴۰۰ ص. ۸-۱

**مقاله پژوهشی**

# بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بر بیان ژن‌های RAGE و TGFβ بافت کلیه موش‌های صحرایی دیابتی

**غزاله علیزاده[۱]، زهراکشتمند[۲*]**

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): zkeshtmand2001@gmail.com

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۰

## چکیده

نفروپاتی دیابتی یکی از عوارض شایع دیابت است که آسیب ومرگ و میر بیماران مبتلا به دیابت را افزایش می‌دهد. پروبیوتیک‌ها با توجه به عملکردشان می‌تواند به عنوان مکمل‌های غذایی به کنترل دیابت کمک کنند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات پرو بیوتیک‌های لاکتو باسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس بر میزان بیان ژن **RAGE** و **TGFβ** در بافت کلیه موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت بررسی گردید. در مطالعه تجربی ۳۵ موش صحرایی در ۵ گروه (**n=۷**) کنترل، دیابتی، سه گروه دیابتی دریافت کننده لاکتو باسیلوس کازئی، بیفیدوباکتریوم لاکتیس و مخلوط هر دو پروبیوتیک گروه‌بندی شدند. موش‌های دیابتی به صورت تک دوز داروی اسپرتوزتوسین را به صورت درون صفاقی دریافت کردندو گاواژپروبیوتیک‌ها ۳۵ روزانجام شد. بعد از دوره تیمار، سطح گلوکز و انسولین اندازه‌گیری و میزان تغییرات بیان **RAGE** و **TGFβ** در بافت کلیه نیز با روش ریل تایم مورد بررسی قرار گرفت. میزان گلوکز خون، سطح انسولین، میزان بیان ژن‌های **RAGE** و **TGFβ** در بافت کلیه موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت تیمار شده با پروبیوتیک‌ها در مقایسه با موش‌های مبتلا به دیابت تغییرات معنی‌داری را نشان داد. بر طبق نتایج مطالعه حاضر، احتمالا مصرف پروبیوتیک لاکتو باسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در شرایط دیابت یک روش تأثیرگذار بر کاهش بیان ژن **RAGE** و **TGFβ** در بافت کلیه موش‌های صحرایی دیابتی نوع یک می‌باشد.

**کلیدواژه‌ها:** دیابت،استرپتوزتوسین، پروبیوتیک،**TGFβ** ، **RAGE**.

## مقدمه

دیابت شایع‌ترین بیماری آندوکرین و از مهم‌ترین بیماری‌های متابولیک در انسان است. که به دلیل کاهش ترشح انسولین و یا مقاومت سلول‌های بدن در برابر انسولین ایجاد می‌شود [۱]. عوارض طولانی مدت این بیماری شامل رتینوپاتی، نفروپاتی، نوروپاتی و بیماری‌های قلبی-عروقی نمایان می‌شود [۲].

بسیاری از اختلالات متابولیکی و همودینامیکی در دیابت از افزایش قند خون ناشی می‌شود.از جمله این اختلالات می‌توان به تشکیل محصولات نهایی گلیکه شده اشاره کرد [۳].

با افزایش قند خون، گلوکز به صورت غیر آنزیمی با گروه آمین در پروتئین‌ها واکنش داده و در نهایت ساختارهای پیچیده‌ای به نام محصولات نهایی گلیکه شده پیشرفته به وجود می‌آیند [۴،۵]

AGEهایی که در گردش خون هستند با گیرنده خود در سطح سلول‌ها با نام گیرنده محصولات نهایی گلیکه RAGE میانکنش کرده و سبب اختلال در ویژگی‌های سلولی همانند افزایش بیان TGFβ می‌شوند [۶].

RAGE در تنظیم چندین فرایند سلولی مانند آپوپتوزیس، التهاب، تکثیر سلولی واتوفاژی که دارای اهمیت زیادی می‌باشند، نقش دارد [۷] .این ژن در حالت عادی به میزان کمی در اندوتلیوم، عضلات صاف، مزانژیوم و مونوسیتها بیان می‌شود، اما به با افزایش میزان محصولات نهائی گلیکه میزان بیان ژن RAGE افزایش یافته که منجر به افزایش وزن کلیه، حجم گلومرولی، بسط مزانژیوم و همچنین افزایش ترشح آلبومین ادراری می‌شود. از سویی TGFβ سبب القای ساخت بیشتر کلاژن نوع ۱ و ۴ شده و با جلوگیری از بیان پروتئوگلیکان‌ها موجب پلیمریزاسیون و افزایش بیش از حد ماتریکس خارج سلولی می‌گردد. تغییر بافت اپیتلیالی به مزانژیمال همراه با افزایش تعداد و حجم انواع سلول‌های گلومرولی و توبولی موجب ضخیم شدن غشای پایه توبولی وگلومرولی و بروز علائم بالینی نفروپاتی از جمله کاهش پاکسازی و افزایش میکروآلبومیناوری می‌شوند [۶،۷].

در فرایند دیابت افزایش گلوکز طولانی مدت می‌تواند منجر به تولید رادیکال‌های آزاد شود که این نشان دهنده اکسیداسیون گلوکز و گلیکوزیله شدن پروتئین می‌باشد این شرایط می‌تواند تعادل بین تولید رادیکال آزاد و مکانیسم دفاعی، سلول را مختل نمایدکه نتیجه آن تخریب تغییر در عملکرد و آسیب به سلول و بافت‌ها به ویژه پانکراس است [۸].

بسیاری از داروهای مورد استفاده در بیماری دیابت، علیرغم فواید غیر قابل انکار، دارای اثرات مخرب نیز می‌باشند به همین دلیل استفاده از درمان‌های جایگزین یا مکمل مورد توجه محققان قرار گرفته است [۹] و یا یافتن روش‌های جدید کم خطر اهمیت به سزایی در درمان این بیماری دارد [۱۰].

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده غیر بیماری‌زایی می‌باشند که دارای اثرات مفید در سلامت افراد می‌باشند که از راه ایجاد تعادل میکروبی در روده، اثرات مفید و سلامتی بخشی بر میزبان خود اعمال می‌کنند که این خود سبب شده است تمایل افراد به استفاده از پروبیوتیک‌ها در حال افزایش باشد. باکتری‌های مولد اسید لاکتیک، به ویژه لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها، به‌طور عادی جزیی از اکوسیستم دستگاه گوارش هستند که پروبیوتیک محسوب می‌شوند و جزو رایج‌ترین میکروارانیسم‌هایی هستند که در پژوهش‌ها استفاده می‌شوند [۱۱].

از اثرات مفید پروبیوتیک‌ها کمک به درمان عدم تحمل لاکتوز، اسهال، یبوست، آلرژی‌ها، بیماری‌های التهابی روده، سندروم تحریک‌پذیر، زخم معده، تحریک سیستم ایمنی و پیشگیری از بیماری‌های خود ایمن، کاهش کلسترول و خاصیت ضد سرطانی آن‌ها می‌باشد [۱۲].

تاکنون در چندین پژوهش حیوانی اثر پروبیوتیک‌ها در کاهش قند خون و به تاخیر انداختن بروز افزایش قند خون و مقاومت انسولینی در موش‌های دیابتی گزارش شده است.از آنجایی که پروبیوتیک‌ها نیز از میکروفلور بدن الهام گرفته شده اند از این رو به نظر می‌رسد که بتوان از آن‌ها برای پیش گیری و درمان دیابت بهره برد. اثری که پروبیوتیک‌ها بر سوخت وساز گلوکز می‌گذارند به احتمال زیاد ناشی از ویژگی‌های تعدیل ایمنی توسط آن‌ها می‌باشد [۱۳].

بنابراین به نظر می‌رسد پروبیوتیک‌ها علاوه بر افزایش سطح سلامت می‌توانند باعث کاهش قند خون در افراد دیابتی شوند و می‌توانند به عنوان مکمل درمان نقش کمک کنند داشته باشند و جایگزین تزریق انسولین و داروهای دیابتی شوند تا بتوانند مشکلات تزریق انسولین، هزینه‌های بالای درمان و اثرات جانبی داروها را از بین ببرند [۱۴].

با توجه به شیوع گسترده بیماری دیابت و مرگ و میر ناشی از آن و با توجه به اثراتی که پروبیوتیک‌ها بر سوخت و ساز گلوکز می‌گذارند، به نظر می‌رسد که این موجودات مفید باعث کاهش عوارض جانبی دیابت و آسیب‌های ایجاد شده در اندام‌های مختلف از جمله کلیه شود. لذا این مطالعه به منظور بررسی اثر

پروبیوتیک‌های لاکتو باسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس بر بافت کلیه، بیان ژن‌های RAGE و TGFβ در موش‌های صحرایی نر دیابتی پرداخته شده است.

## مواد و روش‌ها

### حیوان آزمایشگاه

به‌منظور انجام این مطالعه تجربی۳۵ سر موش صحرایی نژاد ویستار، هم سن با وزن تقریبی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم از مؤسسه تحقیقاتی انستیتو پاستور خریداری شدند. به منظور سازگار شدن با شرایط محیط، به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش در حیوان‌خانه، تحت شرایط آزمایشگاهی و در دمای۲±۲۰ و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی در قفس‌های استاندارد نگهداری شدند. در این پژوهش کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد اجرا قرار گرفت و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام شده است.

### گروه‌بندی حیوانات

موش‌ها به صورت تصادفی در ۵ گروه ۷ تایی کنترل موش‌هایی که فقط آب و مواد غذایی معمولی را دریافت می‌کردند، موش‌های **دیابتی** که تک دوز به مقدار ۶۰میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین به صورت درون صفاقی به آنها تزریق شد [۱۵]، موش‌های دیابتی که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی با دوز $10^9$ (واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر) به آن‌ها گاواژ گردید،موش‌های دیابتی که پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم لاکتیس با دوز $10^9$ (واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر) به آن‌ها گاواژ گردید و موش‌های دیابتی که مخلوطی از پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس با دوز $10^9$ (واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر) به آن‌ها گاواژ گردید. تقسیم شدند.مدت زمان گاواژ پروبیوتیک‌ها ۳۵ روز می‌باشد [۱۵].

### تزریق دارو و تعیین دوز

داروی استرپتوزوتوسین به صورت پودری از شرکت سیگما خریداری شد. القا دیابت نوع یک، با دوز۶۰ میلی‌گرم برکیلوگرم از داروی استرپتوزوتوسین به صورت تک دوز و تزریق درون صفاقی بر اساس وزن بدن حیوانات انجام شد. پس از گذشت ۵ الی ۷ روز عالئم دیابت مانند پرنوشی، پرادراری، کاهش وزن در حیوانات ظاهر گردید. جهت اطمینان بیش‌تر از دیابتی شدن، میزان گلوکز خون این حیوانات با گلوکومتر اندازه گیری شد. گلوکز خون بالاتراز۲۵۰ (میلی‌گرم در دسی لیتر) به عنوان معیار دیابتی شدن در نظر گرفته شد [۱۶].

### روش تهیه و آماده‌سازی پروبیوتیک

دو نوع پروبیوتیک لاکتو باسیلوس کازئی (IBRC_M10783) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (TG-57) از شرکت تک ژن و به صورت پودری تهیه گردید. برای تهیه محلول برای هر موش، ۰/۱ گرم از پروبیوتیک در ۹ سی‌سی آب مقطر حل شد [۱۵].

### تعیین سطح گلوکز خون:

گلوکز خون تمام موش‌ها در حالت ناشتا در ابتدای مطالعه قبل و بعد از تزریق در روزهای سوم، پنجم، هفتم و چهاردهم و بعد از دوره تیمار اندازه گیری شد. موش‌ها زمانی دیابتی شده ارزیابی می‌شدند که میزان قند خون ناشتا آن‌ها بیشتر از mg / dl ۲۵۰ بود.

برای آزمایش اندازه‌گیری سطح گلوکز خون از گلوکومتر استفاده شد. در این روش، قطره ای از خون با لانست زدن به دم حیوان مستقیماً بر روی نوار کاغذی گلوکومترمنتقل و بعد از چند ثانیه، دستگاه غلظت گلوکز خون را برحسب میلی‌گرم بر دسی لیتر نشان داد. برای ارزیابی دقت اندازه گیری با این روش، میزان گلوکز خون یک موش صحرایی نرمال ۳ مرتبه متوالی اندازه گیری شد [۱۷].

### اندازه گیری انسولین

پس از تیمار، موش‌های صحرایی با تزریق کتامین - زایلازین ۱% بیهوش و از قلب حیوانات با استفاده از سرنگ، خون‌گیری به عمل آمد. نمونه خون تهیه شده در دمای آزمایشگاه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم خون جهت اندازه گیری سطح انسولین مطابق با دستورالعمل کیت الایزا (Shanghai Crystal Day Biotech Co, Ltd, China) ارزیابی شد [۱۶].

**اندازه‌گیری تغییرات میزان بیان ژن‌های TGF-β و RAGE**

**بعد از** تشریح موش‌ها، کلیه‌ها خارج و پس از جدا کردن و شستشو جهت بررسی بیان ژن‌های TGF-β و RAGE در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای بررسی میزان بیان ژن، ابتدا استخراج RNA توسط محلول Plus-RNX شرکت سینا کلون انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز و نانودراپ تعیین شد. سنتز cDNA توسط کیت Fermentas انجام شد. سپس یک میکروگرم از cDNA سنتز شده وارد واکنش PCR time Real گردید که با کمک کیت سایبر گرین شرکت Takara انجام گرفت. پرایمرهای مورد نیاز جهت انجام واکنش توسط نرم افزار الیگو طراحی گردید که توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است. از β-actin به عنوان ژن رفرنس استفاده شدمقدار ΔCt از تفاضل میزان Ct ژن ***RAGE***، TGF - βو β-actin بدست آمد. سپس میزان ΔΔCt نسبت به گروه کنترل محاسبه شد برای بدست آوردن و نهایتا میزان تغیرات بیان ژن (Change Fold (از روش۲ -ΔΔct استفاده شد [۱۸].

**آنالیز آماری نتایج حاصل از Real Time PCR**

تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳، آزمون آماری واریانس یک طرفه و تست توکی انجام شد و سطح معنی‌دار (P< 0.05) در نظر گرفته شد همچنین نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون اسمیتو کولموگروف تعیین شد.

## یافته‌ها

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که، میزان گلوکز خون در موش‌های صحرایی دیابتی شده نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد (P<۰/۰۰۱). کاهش سطح گلوکز خون در مقایسه با گروه دیابتی در موش‌های صحرایی دیابتی تیمار شده با پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس نشان داده شد (جدول ۱).

اندازه گیری سطح انسولین در گروه‌های مختلف نشان داد که در گروه‌های دیابتی شده، سطح انسولین در مقایسه با گروه کنترل کاهش (P<۰/۰۰۱) و در گروه های دریافت‌کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه دیابتی افزایش معنا دار بود (P<۰/۰۱) (جدول ۱).

همچنین نتایج آماری بدست آمده از آنالیز آماری در تعیین میزان تغییرات بیان ژن RAGE و TGFβ ، افزایش معناداری بیان ژن‌ها را در موش‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل را نشان داد. در موش‌های دیابتی که در طول مدت پژوهش پروبیوتیک‌ها را دریافت کردند کاهش بیان ژن‌ها در مقایسه با گروه دیابتی مشاهده شد، و این کاهش معنادار در گروه دریافت‌کننده بیفیدیوم لاکتیس تشان داده شد (نمودار ۱،۲).

## بحث

مهم‌ترین مشخصه بیماری دیابت، هیپرگلیسمی می‌باشد. امروزه جهت کاهش گلوکز خون از داروهای مختلف شیمیایی و گیاهی استفاده می‌شود [۱۹].

در این مطالعه از پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس به دلیل عملکرد موثر در پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف استفاده شده است.

نتایج پژوهش حاضر، در موش‌های صحرایی دیابتی افزایش معنی‌داری در میزان گلوکز خون را نشان داد در حالی‌که درمان با پروبیوتیک‌ها کاهش را در میزان گلوکز سبب شد، اگرچه همچنان میزان آن نسبت به گروه کنترل بالا بود. این نتایج می‌تواند نشان از تاثیر مصرف پروبیوتیک‌ها بر هیپرگلیسمی ناشی از دیابت باشد.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که در افراد دیابتی، هیپرگلیسمی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو و با افزایش سایتوکین‌های التهابی، سبب ایجاد عوارض دیابت مانند رتینوپاتی، نفروپاتی، نوروپاتی و مشکلات قلبی عروقی می‌شود. رتینوپاتی دیابتی یک علت اصلی نابینایی می‌باشد که در نهایت منجر به مرحله از اختلالات پیشرفته می شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن، علاوه بر آسیب مستقیم به ماکرومولکول‌ها، میتوانند به عنوان مولکول‌های پیامبر عمل کرده و باعث فعال سازی تعدادی از مسیرهای سیگنالینگ حساس به استرس شوند که خود باعث آسیب سلولی جبران ناپذیری خواهد شد. یکی از این مسیرهای تحریک شده توسط استرس اکسیداتیو، فعالسازی مسیر β-TGFدر سلول می‌باشد [۲۰]. از طرف دیگر افزایش β-TGF خود سبب افزایش تولید رادیکال‌های مخرب شده و با کاهش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی یک سیکل معیوب ایجاد می‌کند [۲۱،۲۲].

جدول ۳-۴: توالی پرایمرهای ژن RAGE وTGFβ و ژن های مرجع GAPDH

| ژن | توالی آغازگرها | طول قطعه تکثیر شده |
|---|---|---|
| ***RAGE*** | Forward:`5 GGGCAGTGGGGAGTTTAGTC `3<br>Reverse:`5 ACGTCTTGTTATTTTGGGCATCG `3 | ۱۷۹ |
| ***TGFβ*** | Forward:`5 CAGGAAGAGCGAAGAGACATGT `3<br>Reverse1:`5 GAAGTCCCTCCCGGTTTTCC `3 | ۱۵۵ |
| *GAPDH* | Forward:`5 TCGGAGTCAACGGATTTG `3<br>Reverse:`5 CCTGGAAGATGGTGATGG `3 | ۲۱۹ |

جدول ۱. مقایسه سطح گلوکز (mg/dl) و انسولین (ug/l) در گروه‌های مختلف

| | کنترل | دیابتی شده | دیابتی شده+ دریافت کننده *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* | دیابتی شده+ دریافت کننده *لاکتوباسیلوس کازئی* | دیابتی شده+ دریافت کننده *بیفیدوباکتریوم لاکتیس+ لاکتوباسیلوس کازئی* |
|---|---|---|---|---|---|
| سطح گلوکزروز صفر | ۹۵/۲۱±۱/۷۰ | ۹۸/۷۶±۱/۳۶ | ۱۰۱/۵۴±۰/۹۸ | ۱۰۲/۴۱±۰/۷۸*** | ۱۰۱/۸۵±۰/۸۴ |
| سطح گلوکز روز۷ | ۱۰۰/۲۶±۱/۰۶ | ۳۲۵/۴۳±۳/۰۸*** | ۳۲۰/۵۴±۳/۱۲ | ۳۱۸/۹۲±۲/۸۷*** | ۳۶۵/۲۸±۳/۰۱*** |
| سطح گلوکز روز ۳۵ | ۹۹/۷۶±۱/۰۵*** | ۶۰۸/۲۷±۵/۷۳*** | ۲۴۵/۵۱±۲/۲۳***<br>### | ۲۶۱/۱۸±۲/۰۵***<br>### | ۳۰۴/۳۱±۳/۱۱***<br>### |
| سطح انسولین ((ug/l) | ۰/±۵۰/۱۳ | ۰/۰±۲۲/۱۳ | /۰±۴/۲۵ | ۰/۰±۳۸/۱۵ | ۰/±۲۹/۲۴ |

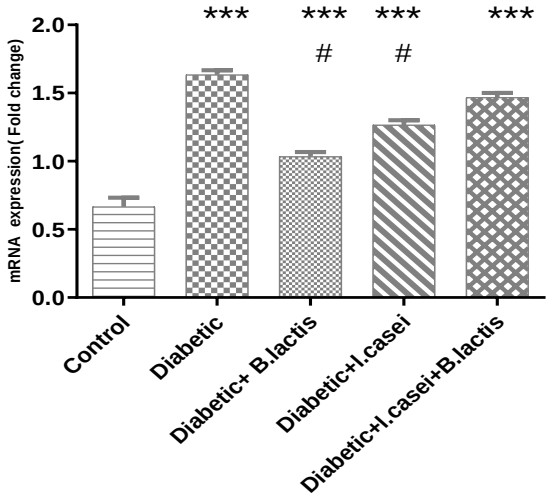
مقادیر بر اساس میانگین ± خطای معیار میانگین آورده شده است.

علامت * نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار۰/۰۵>P با گروه با گروه کنترل

علامت *** نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار۰/۰۰۱>P با گروه با گروه کنترل

علامت # نشان‌دهنده اختلاف معنی دار ۰/۰۵>P در مقایسه با گروه دیابتی.

علامت ### نشان‌دهنده اختلاف معنی دار۰/۰۰۱>P در مقایسه با گروه دیابتی

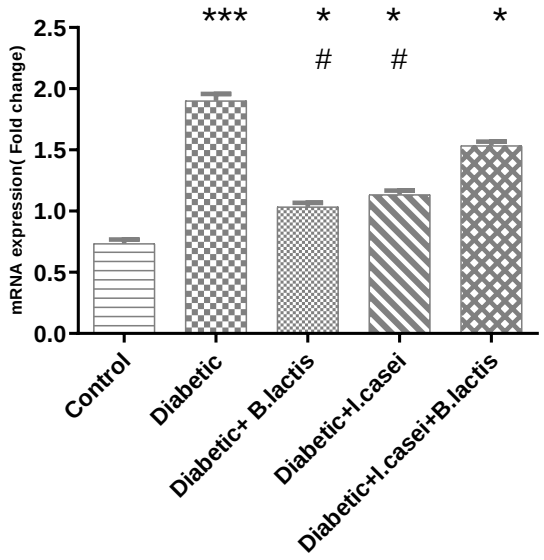



**نمودار۱. مقایسه میزان بیان ژن TGFβ درگروه های مختلف**

مقادیر بر اساس میانگین ± خطای معیار میانگین آورده شده است.

علامت *** نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار۰/۰۰۱>P با گروه با گروه کنترل

علامت ### نشان‌دهنده اختلاف معنی دار۰/۰۰۱>P در مقایسه با گروه دیابتی




**نمودار۲. مقایسه میزان بیان ژن RAGE درگروه های مختلف**

مقادیر بر اساس میانگین ± خطای معیار میانگین آورده شده است.

علامت * نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار$P<۰/۰۵$ با گروه با گروه کنترل

علامت *** نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار$P<۰/۰۰۱$ با گروه با گروه کنترل

علامت # نشان‌دهنده اختلاف معنی دار $P<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه دیابتی.

از آنجائی‌که علت اصلی آسیب بافتی در دیابت، هیپرگلیسمی و استرس اکسیداتیو ناشی از آن می‌باشد، به نظر می‌رسد، ترکیبی که خاصیت هیپوگلیسمیک و آنتی‌اکسیدانی داشته باشد، می‌تواند در تعدیل عوارض ناشی از دیابت مؤثر باشد. یکی از بهترین پیشنهادهای مورد استفاده برای این امر، میکروارگانیسم‌های زنده وفلور طبیعی می‌باشند که به دلیل عملکرد آن‌ها در مقایسه با داروهای سنتتیک و شیمیایی، استفاده از آن‌ها روز به روز رو به افزایش است.

درمطالعات مختلف نشان داده شده که AGEs نقشی اساسی در فرایندهای پاتوفیزیولوژی دارد که منجر به پیشرفت و ایجاد عوارض قلبی- عروقی در دیابتی‌ها می‌شود [۲۳،۲۴،۲۵].

دربیماری دیابت به دلیل افزایش گلوکز رادیکال های آزاد تولید می‌شود که این نشان دهنده اکسیداسیون گلوکز و گلیکوزیله شدن پروتئین می باشد

ناهنجاری‌هائی که در اثر واکنش محصولات نهائی گلیکه با گیرنده خود ایجاد می‌شوند با از بین بردن واکنش بین RAGE روند معکوسی را در پیش خواهند گرفت [۱۸] نشان داده شده است که غیر فعال کردن ژن RAGE در مدل‌های موشی مبتلا به نفروپاتی دیابتی به طرز چشمگیری باعث سرکوب در تغییرات کلیوی از جمله افزایش تعداد سلول‌های گلومرولی، افزایش مزانژیوم و افزایش آلبومین اوری در مقایسه با موش‌های طبیعی می‌گردد [۲۶].

Yu و همکاران نیز نقش AGE و گیرندهای RAGE را بر تنظیم مسیرهای پاتوژنز PKC, MAPK, ERK بررسی کرده و گزارش نمودند این گیرنده موجب فعالسازی مسیرهای آبشارهای سیگنالینگی پاتوژنز قلبی می‌شود [۲۷].

به کارگیری آنتی بادی علیه RAGEنیز سبب کاهش روند افزایش وزن کلیه، حجم گلومر ولی، بسط مزانژیوم و همچنین کاهش ترشح آلبومین ادراری می شود و در عین حال پاك سازی کراتینین و ضخامت غشاء پایه را به حالت طبیعی باز می‌گرداند [۲۸].

همچنین تحقیقات بر روی موش‌های دیابتی نوعTGFβ سبب نشان داده است که تجویز آنتی بادی علیه TGFβجلوگیری ازافزایش حجم بافت کلیه، ایجاد ماتریکس مزانژیالی، افزایش بیان فیبرونکتین و کلاژن و همچنین اختلال در عملکرد کلیوی خواهد شد [۱۱].

اگرچه بیان ژن RAGE در حالت عادی به میزان کمی در اندوتلیوم، عضلات صاف، مزانژیوم و مونوسیت‌ها بیان می‌شود [۱۳].

از این رو استفاده از ترکیباتی که بتوانند میزان بیان ژن‌های RAGE و TGFβ را کاهش دهند از شروع مکانیسم‌های نفروپاتی دیابتی جلوگیری به عمل می آورند.

بنابراین دراین تحقیق اثر پروبیوتیک‌های لاکتو باسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس بر بافت کلیه، بیان ژن‌های RAGE و TGFβ در موش‌های صحرایی نر دیابتی پرداخته شد.

پروبیوتیک‌ها مانند میکروفلور عمل کرده و متابولیسم بدن و سیستم ایمنی را تعدیل می‌کنند. تعدادی از مکانیسم‌های احتمالی مهم در خصوص اثرات مثبت پروبیوتیک‌ها در بهبود علائم دیابت شامل تغییر در گونه باکتریایی روده و کاهش گونه‌های باکتریایی گرم منفی و مضر و کاهش اندوتوکسین، افزایش ترشح انسولین و کاهش مقاومت به انسولین، بهبود عملکرد سلول‌های بتای پانکراس، کاهش تولید گلوکز کبدی، مهار برخی از مسیرهای التهابی و تولید سیتوکین‌های پیش التهابی، کمک به برقراری تعادل بین عوامل استرس اکسیداتیو و آنتی اکسیدان، اثر بر آنزیم‌ها و واسطه‌های دخیل در متابولیسم گلوکز و چربی خون، اثر بر بیان برخی از ژن‌های دخیل در متابولیسم قند وچربی خون می‌باشد [۲۹]. این احتمال وجود دارد که پروبیوتیک‌ها با توجه به فعالیت‌های متنوع خود بتوانند در درمان دیابت استفاده شوند.که به منظوربهبود اثر آن‌ها ترکیبی از گونه‌های مختلف باکتریایی می‌تواند مصرف شود [۲،۳۰]. نتایج در این تحقیق نشان داد پروبیوتیک‌ها باعث کاهش بیان ژن های RAGE و TGFβ در بافت کلیه شدند. که با گروه کنترل اختلاف معناداری داشتند.

## نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که، با تجویز پروبیوتیک‌های لاکتو باسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس می‌توان کاهش بیان ژن‌های RAGE و TGFβ نسبت به سایر تیمارهای دیابتی مشاهده کرد. همچنین با توجه به اثبات غیر سمی بودن پروبیوتیک‌های لاکتو باسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس خوراکی در مطالعه حاضر، می‌توان از آن‌ها با اطمینان بیشتری در اهداف درمانی دیابت استفاده کرد و به عنوان گزینه ای برای جلوگیری از پیشرفت دیابتی مورد بررسی قرار داد.

## سپاسگزاری:

این تحقیق در قالب پایان‌نامه دانشجوی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی در گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد تهران مرکزی انجام شد و از شرکت پروبیوتیک تک ژن تشکر و قدردانی می‌شود.

## تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

## منابع

[1] Wang X, Juan QF, He YW, Zhuang L, Fang YY, Wang YH.,Multiple effects of probiotics on different types of diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. Ann Pediatr Endocrinol Metab, 2017; 30(6): 611-622.

[2] Bezerra AN, Carvalho NS, Viana ACC, Morais SR. Effect of probiotics supplementation in diabetes mellitus: A systematic review. Revista HUPE , 2016; 15(2): 129-139.

[3] Yamagishi S-i, Imaizumi T. Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. Curr. Pharm. Des, 2005; 11(18): 2279-2299.

[4] Stitt AW. Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease,Br. J. Ophthalmol, 2001; 85(6): 746-753.

[5] Thallas-Bonke V, Lindschau C, Rizkalla B, Bach LA, Boner G, Meier M, et al. Attenuation of extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy by the advanced glycation end product cross-link breaker ALT- via a protein kinase C-α–dependent pathway. Diabetes, 2004; 53(11): 2921-2930.

[6] Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM,. Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. Circ, 2006; 114(6): 597-605.

[7] Xie J, Méndez JD, Méndez-Valenzuela V, Aguilar-Hernández MM. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). Cell Signal, 2013; 25(11): 2185-2197.

[8] Salimnejad R, Jalali M, Nikravesh M, Fazel A. Effect of Garlic Aqueous Extract on Markers of Oxidative Stress in Diabetic Rats Testes. JRUMS. 2014; 13 (4) :371-382.

[9] Hendijani F, Akbari V. Probiotic supplementation for management of cardiovascular risk factors in adults with type II diabetes: A systematic review and metaanalysis. Clin Nutr, 2018; 37(2): 532-541.

[10] Derosa G, Cicero AF, Gaddi A, Ragonesi PD, Fogari E, Bertone G, et al. 2Metabolic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with diabetes and metabolic syndrome treated with glimepiride: a twelve-month, multicenter, double-blind, randomized, controlled, parallel-group trial. Clin. Ther, 2004; 26(5): 744-54

[11] Homayouni Rad A. Therapeutical effects of functional probiotic, prebiotic and synbiotic foods. TUMS, 2008; 17-22.

[12] Harisa G, Taha E, Khalil A, Salem M. Oral administration of Lactobacillus acidophilus restores nitric oxide level in diabetic rats. Aust J Basic Appl Sci, 2009; 3(3): 2963-2969.

[13] Yao K, Zeng L, He Q, Wang W, Lei J, Zou X.Effect of probiotics on glucose and lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 12 randomized controlled trials. Med Sci Monit, 2017; 23: 3044-3053.

[14] Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. Pharmacol. Res, 2013; 69(1): 1-10.

[15] Abasi S,Keshtmand Z. The effect of probiotic bifidobacterium lactis and Lactobacillus casei on sperm maturation in streptozotocin-diabetic rats. ISMJ, 2020; 22(6): 392-401.

[16] Mohammadi J, Mirzaie A, Azizi A, Roozbehi A, Delaviz H. The effects of hydroalcoholic extract of Juglans regia leaf on histological changes of Langerhans islet in diabetic rats model. ISMJ, 2012; 15(4): 293-302.

[17] Jackson-Guilford J, Leander JD, Nisenbaum LK. The effect of streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus. Neurosci. Lett, 2000; 293(2): 91-94.

[18] Sadat Heidary S, Bahmani F, Bathaei SZ, Moshtaghi Kashanian G. Assessment of Myo inositol and Crocin Effects on RAGE and TGF.Gene Expression in the Kidney of Streptozotocin Induced Diabetic Rats. Avicenna J Clin Med, 2014; 21(2): 122-130.

[19] El-Demerdash F, Yousef MI, Abou El-Naga N. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. Food Chem. Toxicol, 2005; 43(1): 57-63.

[20] Krstić J, Trivanović D, Mojsilović S, Santibanez JF. Transforming growth factor-beta and oxidative stress interplay: implications in tumorigenesis and cancer progression. Oxid Med Cell Longev. 2015;2015:654594.

[21] Liu R-M, Pravia KG. Oxidative stress and glutathione in TGF-β-mediated fibrogenesis. Free Radical Biology and Medicine, 2010; 48(1): 1-15.

[22] Van Geest RJ, Klaassen I, Vogels IM, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Differential TGF-β signaling in retinal vascular cells: a role in diabetic retinopathy.IOVS, 2010; 51(4): 1857-1865.

[23] Choi E-Y, Kwon HM, Ahn C-W, Lee GT, Joung B, Hong BK, et al. Serum levels of advanced glycation end products are associated with in-stent restenosis in diabetic patients. Yonsei med .l, 2005; 46(1): 78-85.

[24] Hashim Z, Zarina S. Advanced glycation end products in diabetic and non-diabetic human subjects suffering from cataract. Age, 2011; 33(3): 377-384

[25] Naka Y, Bucciarelli LG, Wendt T, Lee LK, Rong LL, Ramasamy R, et al. RAGE axis: animal models and novel insights into the vascular complications of diabetes. Arterioscler. Thromb. Vasc, 2004; 24(8): 1342-1349.

[26] Karimi O, Pena AS. Probiotics: isolated bacteria strain or mixtures of different strains. Drugs Today, 2003; 39(8): 565.

[27] Yu L, Zhao Y, Xu S, Ding F, Jin C, Fu G, et al. Advanced glycation end product (AGE)-AGE receptor (RAGE) system upregulated connexin43 expression in rat cardiomyocytes via PKC and Erk MAPK pathways. Int. J. Mol. Sci, 2013; 14(2): 2242-2257

[28] Ward DT, Yau SK, Mee AP, Mawer EB, Miller CA,. Garland HO, et al. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. J. Am. Soc. Nephrol, 2001; 12(4): 779-790.

[29] Zheng HJ, Guo J, Jia Q, Huang YS, Huang WJ, Zhang W, et al. The effect of probiotic and synbiotic supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Pharmacol. Res. Commun, 2019;142: 303-313.

[30] Pena JA, Versalovic J. Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF-α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independentmechanism. Cell. Microbiol, 2003; 5(4): 277-285.

# The effect of Lactobacillus casei and Bifidobacterium lactis probiotics on expression of RAGE and TGFβ genes in kidney tissue of diabetic rats

**Ghazale alizadeh[1], Zahra Keshtmand [2*]**

[1] Master student, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* (Corresponding author): zkeshtmand2001@gmail.com

Received: December 2021 Accepted: February.2022

## Abstract
Diabetic nephropathy is one of the most common complications of diabetes that increases the mortality and mortality of patients with diabetes. Probiotics, due to their function, can help control diabetes as dietary supplements.. The aim of this study was to evaluate the effects of Lactobacillus casei and Bifidobacterium lactis probiotics on the expression of RAGE and TGFβ gene in the tissues of all diabetic rats. In this experimental study, 35 rats were grouped into 5 groups (n = 7) control, diabetic, and three diabetic groups receiving Lactobacillus casei, Bifidobacterium lactis and a mixture of both probiotics. Diabetic mice received a single dose of streptozotocin intraperitoneally, and probiotics were gavaged for 35 days. After the treatment period, glucose and insulin levels were measured and changes in RAGE and TGFβ expression in kidney tissue were measured by real-time method. Blood glucose, insulin levels, expression of RAGE and TGFβ genes in the tissues of all diabetic rats treated with probiotics showed significant changes compared with diabetic rats. According to the results of the present study, it is possible that the use of probiotics *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* in diabetic conditions is an effective method to reduce the expression of RAGE and TGFβ gene in the kidney tissue of type 1 diabetic rats.

**Keywords:** Diabetes, Streptozotocin, Probiotic, TGFβ, RAGE.