زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۲، صفحات ۱۰۴- ۹۵

مقاله پژوهشی

بررسی میزان بیان ژن و پروتئین Tau در سرم و بافت مغز رت‌های مدل آلزایمر نژاد ویستار تیمار شده با سویه‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتر*

سیده رویا حصارکی، مریم قبه*، پریچهره یغمایی، هانیه جعفری

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: ghobeh@srbiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۸

DOI: 10.22034/ascij.2023.1978298.1459

چکیده

بیماری آلزایمر یک نوع اختلال عملکرد مغزی است که منجر به تحلیل توانایی‌های ذهنی بیمار از جمله می‌گردد. تشکیل کلافه-های نوروفیبریلاری در داخل نورون‌ها که در اثر هیپرفسفریلاسیون پروتئین‌های تاو ایجاد می‌شوند از عوامل اصلی آلزایمر می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر، بررسی پروتئین Tau در بافت مغز و نیز سطح سرمی و بافت مغزی ژن کد کننده پروتئین تاو در رت‌های مدل آلزایمری نژاد ویستار تیمار شده با سویه‌های جدا شده پروبیوتیک جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتر تخلیص شده از ماست سنتی می‌باشد. در این پژوهش ۳۰ سر رت نر بالغ نژاد به طور تصادفی در ۵ گروه شش‌تایی به شرح زیر تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه موش‌های آلزایمری شده، گروه شم، گروه‌های تجربی اول و دوم که موش‌های آلزایمری شده به ترتیب سویه‌های پروبیوتیک *Limosilactobacillus reuteri* و *Bifidobacterium longum* جدا شده از ماست را با دوز $۱۰^{۹}$ CFU × ۲/۵ به مدت یک ماه دریافت نموده‌اند. میزان بیان ژن و پروتئین تاو با استفاده از روش‌های Real time PCR و هیستوپاتولوژی بررسی گردید. نتایج نشان داد که هر دو سویه به ویژه سویه *Bifidobacterium longum* توانستند بیان ژن پروتئین تاو را در بافت مغز و نیز در سرم خون نسبت به گروه آلزایمر کاهش دهند. همچنین هر دو سویه به ویژه سویه *Bifidibacterium longum* عملکرد خوبی بر مهار کلاف‌های نوروفیبریلاری تاو داشته است. بنابراین به نظر می‌رسد سویه‌های پروبیوتیک *Limosilactobacillu sreuetri* و *Bifidobacterium longum* موجود در ماست می‌توانند کاندیدهای مناسبی جهت کاهش بیان ژن و تجمعات پروتئین تاو در بیماری آلزایمر باشند.

کلمات کلیدی: آلزایمر، پروبیوتیک، ژن Tau، کلاف‌های نوروفیبریلاری تاو، هیستوپاتولوژی.

مقدمه

آلزایمر دارای خصوصیات پاتولوژیکی آتروفی مغزی و مرگ نورونی همراه با تجمعات کلاف‌های نوروفیبریلاری در نورون‌ها و تجمعات درون عروقی مغزی پلاک‌های آمیلوئیدی می‌باشد. یکی از دلایل مهم ایجاد زوال عقل در سنین بالا آلزایمر است و احتمال ابتلا به آن با افزایش سن ارتباط مستقیم دارد. بیماری آلزایمر معمولاً یک نقصان تدریجی در توانایی تفکر در طی یک دوره ۷ الی ۱۰ ساله ایجاد می‌کند تقریباً تمامی عمل‌کردهای مغزی مانند حافظه، حرکت، گفتار، قضاوت، رفتار، و تفکر غالباً تحت

تاثیر قرار می‌گیرد. آلزایمر بوسیله پلاک‌های آمیلوئیدی و الیاف در هم پیچیده نوروفیبریلاری در مغز مشخص می‌شود (۲۲). بیماری آلزایمر عمده‌ترین علت دمانس در افراد مسن است که تأثیر مشخصی بر روی مغز می‌گذارد. افراد مبتلا به دمانس عملکرد فکری- عقلی مختل شده دارند که در روابط شخصی یا فعالیت‌های عادی روزانه خود دچار مشکل می‌شوند. بیماری آلزایمر، بیماری غالب مربوط به سیستم عصبی و نیز چهارمین عامل مرگ و میر پس از بیماری‌های قلبی، سرطان و سکته در جوامع پیشرفته می‌باشد. با توجه به افزایش جامعه مسن، پیشبینی‌ها حاکی از افزایش این تعداد به حدود ۱۱ تا ۱۶ میلیون نفر در سال ۲۰۲۰ است (۱۴). لذا ضرورت دارد در مورد این بیماری و راه‌های بهبودی آن تحقیق شود. پروتئین‌های تاو پروتئین‌هایی هستند که ریزلوله‌ها را تثبیت می‌کنند. پروتئین تاو در نورون‌های دستگاه عصبی مرکزی به - فراوانی و در آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها به میزان کمتری یافت می‌شوند. پروتئین‌های تاوی که کارکرد خود را در تثبیت کردن ریزلوله‌ها از دست داده‌اند عامل اصلی بیماری‌های مرتبط به زوال عقل مانند آلزایمر و پارکینسون هستند. مقادیر بالای تاو که در CSF بیماران یافت می‌شود، ارتباط مستقیمی با افزایش تاو در لوب گیجگاهی مغز دارد که در پردازش حافظه نقش دارد. بنابراین میتوان از تاو در مایع مغزی نخاعی به عنوان یک ابزار تشخیصی استفاده کرد (۱۷). یکی از نشانه‌های ثبت شده‌ی آلزایمر، پلاک‌های چسبنده پروتئین آمیلوئید بتاست، که در اطراف سلول‌های عصبی تشکیل می‌شوند. اغلب دانشمندان بر این باورند که آمیلوئیدها مسئول فروپاشی پردازش اطلاعات و مرگ سلول‌ها هستند. با این حال، بیش از یک دهه است که محققان به پروتئین دیگری به نام تاو که در داخل سلول‌های مغز یافت می‌شود به عنوان عامل اصلی محتمل اشاره می‌نمایند. مطالعه‌ی جدیدی با تصویربرداری از مغز ۱۰ نفر با آلزایمر خفیف نشان داده است، رسوب تاو (نه آمیلوئید) به علائمی مانند از دست دادن حافظه و زوال عقل بسیار مرتبط است. اگر چه این شواهد به خودی خود نمی‌تواند بحث آمیلوئید-تاو را حل نماید، اما می‌تواند محققان را به تحقیقات جدید و بیشتر جهت درمان با هدفگیری تاو و ابزارهای تشخیصی بهتر راهنمایی کند (۲۰).

پروبیوتیک‌ها ریززنده‌هایی هستند که در صورت ورود تعداد کافی آن به روده، اثرات سلامت بخشی بر میزبان اعمال می‌کند (۸). پروبیوتیک‌ها در سطوح متعددی بر روی سیستم ایمنی تاثیر می‌گذارند که از جمله افزایش سطح سیتوکاین‌ها (۲۱) و فعال کردن ماکروفاژها (۱۶) می‌باشد. بنابراین، مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر سویه‌های پروبیوتیک *Limosilactobacillus reuteri* و *Bifidobacterium longum* جدا شده از ماست بر بیان ژن و پروتئین تاو در موش‌های مدل آلزایمری صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی پروبیوتیک‌ها: ۵ میلی‌لیتر از ماست سنتی به درون ۴۵ میلی ایتر از هر سه محیط ام.آر.اس براث (برای جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک)، ام.آر.اس براث حاوی آنتی‌بیوتیک ال سیستئین و ال موپیروسین (برای جداسازی بیفیدوباکتریوم)، ام.آر.اس براث حاوی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و کلیندامایسین (برای جداسازی *لاکتوباسیلوس*) منتقل شدند. سپس به مدت ۱ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند که در طی ۱ هفته گرما گذاری مجددا محیط کشت تازه افزوده گردید. نمونه‌ها پس از تکمیل دوره غنی‌سازی، با استفاده از سانتریفوژ با دور rpm ۴۰۰۰، جداشده و در حجم ۲ میلی‌لیتر از همان محیط کشت سوسپانسیون گردیدند. سپس

سریال رقت در بافر فسفات از سوسپانسیون‌های فوق تهیه شد و در محیط ام.آر.اس آگار کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت گرما گذاری، میکروارگانیسم‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی کلنی جداشده و در پلیت جدید کشت داده شدند. در ادامه، سویه‌های پروبیوتیک توسط آزمون‌های تشخیصی اولیه (آزمون کاتالاز، آزمون همولیز، آزمون اکسیداز) جداسازی و در نهایت توسط توالی‌یابی شناسایی شدند.

آماده‌سازی حیوانات: در مطالعه حاضر، ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از مؤسسه انسیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها در دمای حدود ۲±۲۰ درجه سانتیگراد و رطوبت ۶۰-۵۰ درصد و سیکل نوری ۱۲ ساعته نگهداری شدند. بعد از یک هفته آشناسازی با محیط نگهداری، موش-ها به طور تصادفی انتخاب شدند. برای القاء آلزایمر از آمیلویید بتا ۴۲-۱ خریداری شده از شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا (Sigma-Aldrich, USA) استفاده شد که در آب مقطر دو بار استریل حل شده و به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شده بود تا فیبیرل‌های 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 کاملا مشخص شد. با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون مشخصات ناحیه CA1 هیپوکامپ با مختصات قدامی- خلفی۳/۸ و طرفی ۲/۴ و پشتی ۲/۷ میلی متر علامت گذاری شد و سپس جمجمه 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 (۱ میلی-گرم/میلی‌لیتر) به صورت دوطرفه و به آرامی تزریق شد (۶، ۷). 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 CFU $۱۰^{۹}$ x ۲/۵ به میزان ۰/۵ سی سی از طریق گاواژ 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 CFU $۱۰^{۹}$ x ۲/۵ به میزان ۰/۵ سی سی از طریق گاواژ 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.

آزمون Real Time PCR: جهت تکثیر ناحیه ژن کد کننده پروتئین تاو از پرایمرهای دجنریت R ۶۳۰ و V ۶۱۶ تهیه شده از شرکت تکاپوزیست استفاده شد. به منظور ارزیابی میزان بیان ژن کد کننده پروتئین تاو از نرم افزار اکسل استفاده شد و برای بررسی وجود تفاوت معنی دار بین گروه‌ها از آزمون واریانس ANOVA و TUKEY استفاده شد. داده‌ها به صورت MEAN ± SEM با سطوح معنی دار $p < ۰/۰۵$ ، $p < ۰/۰۱$ و $\boldsymbol{p < ۰/۰۰۱}$ برای گروه‌ها در تمام مراحل در نظر گرفته شد.

هیستوپاتولوژی: پس از مراحل تثبیت، آبگیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری مغز، با استفاده از میکروتوم

برش‌هایی با ضخامت ٦ میکرون تهیه شد. نمونه‌ها روی لام قرار گرفتند و سپس با هماتوکسیلین-ائوزین برای مشاهده سلول‌های پیرامیدال ناحیه هیپوکامپ بافت مغز رنگ‌آمیزی شدند (١٦).

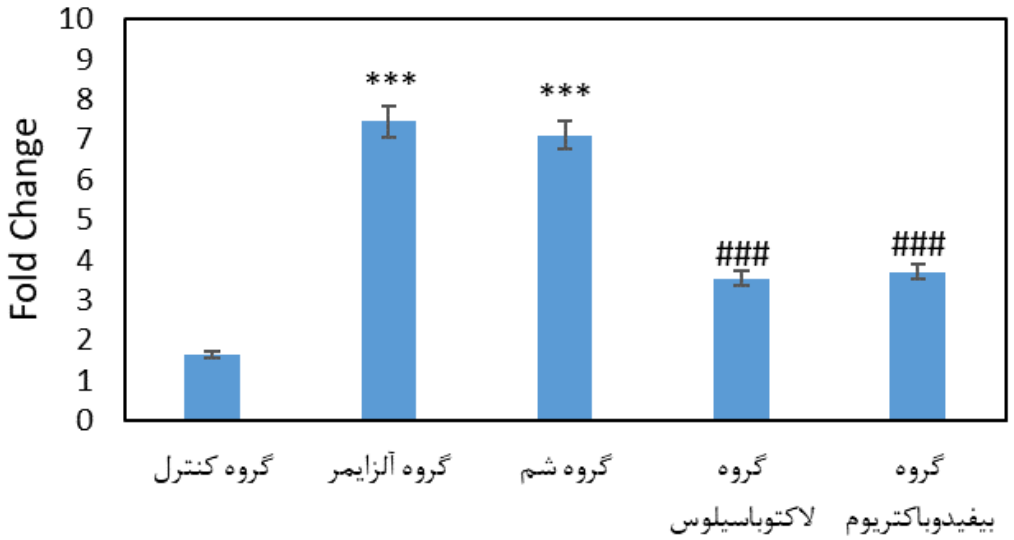
نتایج

پس از جداسازی و تخلیص سویه های پروبیوتیک از ماست سنتی در آزمایشگاه مولکولی، دو سویه بر اساس توالی‌یابی در Genbank با دارا بودن ۷۹ و ۷۲ درصد شباهت به ترتیب به عنوان دو سویه پروبیوتیک *Bifidobacterium longum* و *Limosilactobacillus reuteri* شناسایی شدند (شکل ۱). تغییرات بیان ژن تاو در سرم و بافت مغز رت‌های آلزایمری تیمار شده با دو سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتر* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن تاو در سرم خون نشان داد که میزان بیان ژن تاو در گروه‌های آلزایمری شده و شم نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معنی‌دار ($p < ۰/۰۰۱$) می‌باشد (شکل ۲). میزان بیان ژن تاو در گروه تیمار شده توسط دو سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتر* نسبت به گروه آلزایمری شده دارای کاهش معنی‌دار ($p < ۰/۰۰۱$) می‌باشد (شکل ۲). نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن تاو در بافت مغز نشان داد که میزان بیان ژن تاو در گروه‌های آلزایمری شده و شم نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معنی‌دار ($p < ۰/۰۰۱$) می‌باشد (شکل ۳). میزان بیان ژن تاو در گروه تیمار شده توسط دو سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتر* نسبت به گروه آلزایمری شده دارای کاهش معنی‌دار ($p < ۰/۰۰۱$) می‌باشد (شکل ۳). الگوی تغییرات بیان ژن تاو در رت‌های بیمار شده نشان می‌دهد که گروه تیمار شده با *بیفیدوباکتر* نسبت به گروه تیمار شده با *لاکتوباسیلوس* دارای اختلاف معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) می‌باشد (شکل ۳). در بررسی‌های حاصل از هیستوپاتولوژی، تعداد کلاف‌های نوروفیبریلاری پروتئین تاو در گروه رت‌های آلزایمری شده و نیز گروه شم در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشته است (شکل ٤). این در حالیست که پس از دریافت دو سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتر*، از تعداد کلاف‌های نوروفیبریلاری پروتئین تاو به طور چشمگیری در مقایسه با گروه آلزایمری شده کاسته شد (شکل ٤).

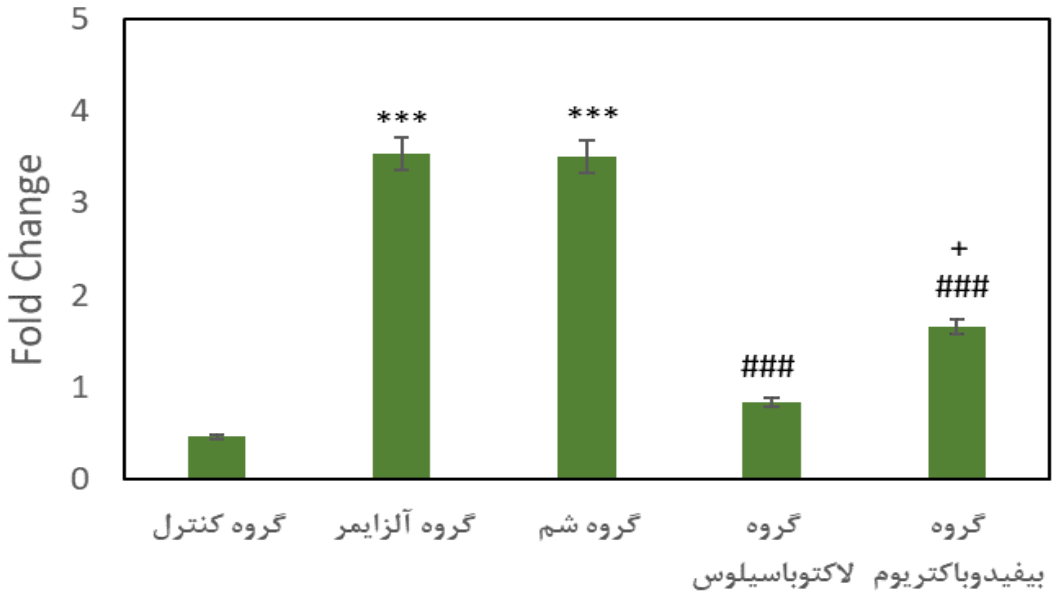
A	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
☑	Limosilactobacillus reuteri strain 1B chromosome, complete genome	Limosilac...	275	1208	77%	2e-69	72.65%
☑	Lactobacillus reuteri SD2112, complete genome	Lactobaci...	275	1246	77%	2e-69	72.65%
☑	Limosilactobacillus reuteri strain AN417 chromosome, complete geno...	Limosilac...	270	1239	77%	7e-68	72.35%
☑	Limosilactobacillus reuteri strain CNI-KCA2 chromosome	Limosilac...	270	545	77%	7e-68	72.35%
☑	Limosilactobacillus reuteri strain reuteri chromosome, complete geno...	Limosilac...	270	1243	77%	7e-68	72.35%
☑	Limosilactobacillus reuteri strain LL7 chromosome, complete genome	Limosilac...	270	1243	77%	7e-68	72.35%
☑	Limosilactobacillus reuteri strain YSJL-12 chromosome, complete ge...	Limosilac...	270	1239	77%	7e-68	72.35%

B	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
☑	Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3255 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
☑	Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3254 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
☑	Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3253 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
☑	Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3278 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
☑	Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3276 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
☑	Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3262 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
☑	Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3243 16S ribosomal ...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%

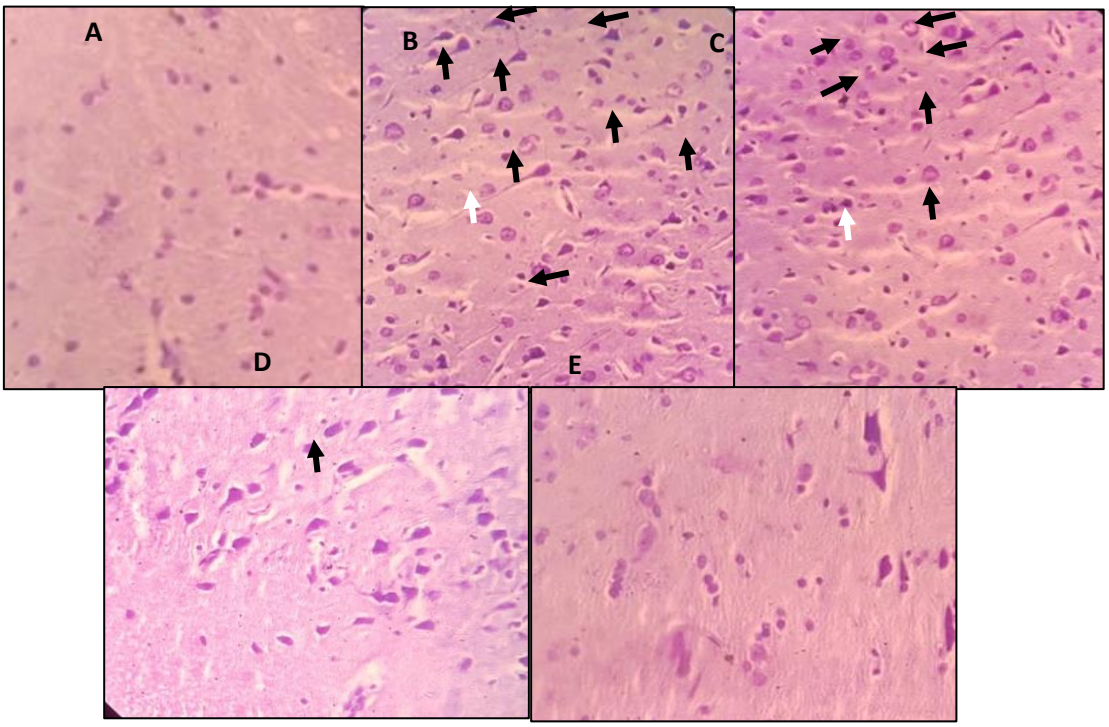
شکل ۱- توالی‌یابی دو سویه تخلیص شده پروبیوتیک *Limosilactobacillus reuteri* (A) و *Bifidobacterium longum* (B) در Genbank.



شکل ۲- میزان تغییرات بیان ژن tau در سرم خون گروه‌های مختلف. *** $p < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل، ### : $p < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه آلزایمر.



شکل ۳- میزان تغییرات بیان ژن tau در بافت خون گروه‌های مختلف. ***: $p < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه کنترل، ###: $p < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه آلزایمر، +: $p < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه *لاکتوباسیلوس*.



شکل ٤- فتومیکروگراف از بخش CA1 (Cortex Area1) از ناحیه هیپوکامپ بافت مغز با رنگ‌آمیزی H&E با بزرگنمایی (400×). **A** : گروه کنترل، **B**: گروه آلزایمری (تحت جراحی و دریافت آمیلوئید بتا)، **C**: گروه شم، **D**: گروه دریافت‌کننده *لاکتوباسیلوس*، **E**: گروه دریافت کننده *بیفیدوباکتر*. پیکان‌های مشکی کلاف‌های نوروفیبریلاری پروتئین تاو را نشان می‌دهند. پیکان‌های سفید تجمعات بتا آمیلوئید را نشان میدهند.

بحث

تحقیقات نشان می‌دهد که تولید واکنش‌پذیر گونه‌های اکسیژن و استرس اکسیداتیو به عنوان وسیله‌ای برای رسوب‌گذاری و تجمع آمیلوئید (Aβ) و نیز پروتئین تاو در آلزایمر عمل می‌کند (۱۰) و به دنبال آن از دست دادن سلول‌های عصبی در ناحیه هیپوکامپ مغز روی می‌دهد (۹). این در حالیست که مطالعات نشان می‌دهد یک میکروبیوم متعادل ناشی از پروبیوتیک قادر است علائم آلزایمر را از طریق مکانیسم‌های مختلف بهبود ببخشد. این مکانیسم‌ها شامل تولید آنتی اکسیدان و متعاقب آن خنثی‌سازی گونه‌های واکنش اکسیژن (ROS) در دستگاه گوارش و بهبود التهاب ناشی از سیتوکین‌ها و تقویت عملکرد سد اپیتلیال برای محافظت بالقوه از سیستم عصبی روده (ENS) از ترکیبات سمی می باشد (۱۹). از سوی دیگر شرایط استرس التهابی و اکسیداتیو ناشی از آلزایمر ممکن است با افزایش باکتری‌های گرم منفی یا کُلی فرم و کاهش نسبت پروبیوتیک‌ها به کلی فرم همراه باشد، که می‌تواند منجر به استرس عصبی و التهابی و اکسیداتیو از طریق فعال‌سازی میکروگلیا شود. تحقیقات نشان می‌دهد که یک رابطه معکوس بین تعداد کلی فرم و پروبیوتیک‌ها وجود دارد و نشان می‌دهد که مصرف پروبیوتیک‌ها می‌تواند تعداد کلی فرم را کاهش دهد (۱۲).

مطالعه‌ای که در سال۲۰۲۰ انجام شد نشان داد که پروبیوتیک‌ها نقشی موثر در بهبود حافظه در مدل آلزایمری موش صحرایی ایفا می‌کنند. علاوه بر این، پروبیوتیک‌ها باعث کاهش التهاب عصبی توسط کاهش التهاب و مارکرهای استرس اکسیداتیو در حیوانات مبتلا می‌شوند (۱۵).

یافته‌های مطالعه‌ای دیگر نیز نشان داده است که مصرف ۱۰ هفته‌ای پروبیوتیک‌ها در مدل آلزایمری موش‌ها اثرات مطلوبی بر کمبود حافظه، نشانگرهای استرس اکسیداتیو و پیش‌التهابی سیتوکین‌ها داشته است (۲۳).

همچنین مخلوط پروبیوتیک‌ها می‌تواند در درمان بیماری‌های تخریب عصبی و التهابی عصبی از طریق اثرات تعدیل سیستم ایمنی آنها مفید باشد.

پروبیوتیک‌های مختلف، مولکول‌های عصبی فعال مختلفی تولید می‌کنند که بطورمستقیم یا غیر مستقیم در سیگنالینگ CNS اثر دارند. مطالعات بسیاری توانایی پروبیوتیک‌ها در تولید انتقال دهنده‌های عصبی و تعدیل کننده‌های عصبی از جمله اسید گاما-آمینوبوتیریک (GABA)، نوراپی نفرین، سروتونین، دوپامین و استیل کولین را نشان داده است. همچنین نتایج مطالعات نشان می‌دهد که مکمل پروبیوتیک به طور قابل توجهی حافظه فضایی وابسته به هیپوکامپ و انعطاف پذیری سیناپسی در موش‌های صحرایی بتا آمیلوئید را بهبود می‌بخشد (۱۳).

همچنین مطالعات آتاری نیک آزم و همکاران (۱) و نیز کیوسی و همکاران (۱۱)، نشان داده است که پاکسازی پلاک‌های بتا-آمیلوئید یا پیشگیری از تشکیل آنها می‌تواند مکانیسم مورد اعمال توسط پروبیوتیک‌ها باشد. اثرات پروبیوتیک‌ها و به طور خاص گونه‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* بر عملکرد مغز، از جمله افسردگی، اضطراب و تغییر خلق و خو نیز به اثبات رسیده است (٤، ٥). در این خصوص، نشان داده شده است که مصرف مکمل پروبیوتیک به مدت ۸ هفته می‌تواند اختلال فعالیت سیناپسی و کمبود حافظه در موش‌های آلزایمری را بهبود بخشد (۳).

اگر چه مکانیسم‌های دقیق اثرات پروبیوتیک‌ها در حافظه و یادگیری را به طور کامل به اثبات نرسیده است، برخی مطالعات مکانیسم‌هایی از جمله تغییر هیپوتالاموس - فعالیت هیپوفیز – آدرنال را پیشنهاد کرده‌اند (۱۸).

برخی مطالعات دیگر نیز نشان داده اند که پروبیوتیک‌ها فعالیت گلوتامات سیستئین لیگاز و میزان سنتز گلوتاتیون را افزایش می‌دهند. آنها همچنین می‌توانند آنیون سوپراکسید و تولید رادیکال هیدروکسیل را مسدود و به این ترتیب تقویت سیستم ایمنی بدن را موجب شوند. در مقابل، اسیدهای چرب زنجیره کوتاه تولید شده توسط پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیل* و *بیفیدوباکتر* از جمله اسید بوتیریک و پروپیونیک اسید، به عنوان عوامل ضد التهابی عمل می‌کنند (۲).

در این پژوهش، سویه‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتر* توانستند بیان ژن Tau را سرم خون و بافت مغز و نیز میزان کلاف‌های نورفیبریلاری پروتئین تاو را در بافت مغز رت‌های مدل آلزایمر نژاد ویستار تیمار شده بهبود دهند و بنابراین به نظر می‌رسد این دو سویه پروبیوتیک ارزش مطالعات بیشتری را دارند.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که هر دو سویه به ویژه سویه‌ی *Bifidobacterium longum* می‌توانند بیان ژن پروتئین تاو را در بافت مغز و در سرم خون نسبت به گروه آلزایمر کاهش دهند. همچنین هر دو سویه به ویژه سویه *Bifidibacterium longum* عملکرد خوبی بر مهار کلاف‌های نوروفیبریلاری تاو داشته است. بنابراین بنظر می‌رسد سویه‌های پروبیوتیک *Limosilactobacillu sreuetri* و *Bifidobacterium longum* موجود در ماست می‌توانند کاندیدهای مناسبی جهت کاهش بیان ژن و تجمعات پروتئین تاو در بیماری آلزایمر باشند.

منابع

1. Athari Nikazm S., Djazayeri A., Safa M., Azami K., Ahmadvand B., Sabbaghziarani F., Vafa M. 2018. Lactobacilli and bifidobacteria ameliorate memory and learning deficits and oxidative stress in β-amyloid (1–42) injected rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 43(7):718-726.

2. Carvalho B.M., Saad M.J. 2013. Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance. *Mediators of inflammation*, 2013:986734.

3. Davari S., Talaei S. A., Alaei H. 2013. Probiotics treatment improves diabetes-induced impairment of synaptic activity and cognitive function: behavioral and electrophysiological proofs for microbiome–gut–brain axis. *Neuroscience*, 240:287-296.

4. 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 psychiatric research*, 43(2):164-174.

5. Desbonnet L., Garrett L., Clarke G., Kiely B., Cryan J. F., Dinan T. 2010. Effects of the probiotic Bifidobacterium infantis in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*, 170(4):1179-1188.

6. Eslimi Esfahani D., Oryan S., iNabiun M., Karimian Peiro M. 2017. The role of cholestasis in brain hippocampus trauma in male Wistar rat. *Nova Biologica Reperta*, 4(2):128-136.

7. Eslimi Esfehani D., Oryan S., Khosravi M., Valizadegan F. 2019. Effect of Fennel Extract on the Improvement of Memory Disorders in Beta Amyloid Alzheimer Model of Male Wistar Rats. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 27(1):1-12.

8. Hotel A.C.P., Cordoba A. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1):1-10.

9. Katsumoto A., Takeuchi H., Takahashi

K., Tanaka F. 2018. Microglia in Alzheimer's disease: risk factors and inflammation. *Frontiers in Neurology*, 9:978.

10. Kim G. H., Kim J. E., Rhie S. J., Yoon S. 2015. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology*, 24(4):325.

11. Kiousi D. E., Karapetsas A., Karolidou K., Panayiotidis M. I., Pappa A., Galanis A. 2019. Probiotics in extraintestinal diseases: current trends and new directions. *Nutrients*, 11(4):788.

12. Lye H. S., Kuan C. Y., Ewe J. A., Fung W. Y., Liong M. T. 2009. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *International journal of molecular sciences*, 10(9):3755-3775.

13. Mallikarjuna N., Praveen K., Yellamma K. 2016. Role of Lactobacillus plantarum MTCC1325 in membrane-bound transport ATPases system in Alzheimer's disease-induced rat brain. *BioImpacts:* BI, 6(4):203.

14. Mayeux R., Stern Y. 2012. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(8):a006239.

15. Mehrabadi S., Sadr S. S. 2020. Assessment of probiotics mixture on memory function, inflammation markers, and oxidative stress in an Alzheimer's disease model of rats. *Iranian biomedical journal*, 24(4):220.

16. Miettinen M., Vuopio-Varkila J., Varkila K. 1996. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infection and immunity*, 64(12): 5403-5405.

17. Mulak A., Bonaz B. 2015. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World journal of gastroenterology*: WJG, 21(37):10609.

18. O'Hagan C., Li J. V., Marchesi J. R., Plummer S., Garaiova I., Good M. A. 2017. Long-term multi-species Lactobacillus and Bifidobacterium dietary supplement enhances memory and changes regional brain metabolites in middle-aged rats. *Neurobiology of learning and memory*, 144:36-47.

19. Plaza-Díaz J., Ruiz-Ojeda F. J., Vilchez-Padial L. M., Gil A. 2017. Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. *Nutrients*, 9(6):555.

20. Reitz C., Brayne C., Mayeux R. 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 7(3):137-152.

21. Simone C. D., Ciardi A., Grassi A., Gardini S. L., Tzantzoglou S., Trinchieri V., Jirillo E. 1992. Effect of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus on gut mucosa and peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 14(1-2):331-340.

22. Weller J., Budson A. 2018. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. 7:F1000 Faculty Rev-1161.

23. Westfall S., Lomis N., Kahouli I., Dia S. Y., Singh S. P., Prakash S. 2017. Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cellular and molecular life sciences*, 74(20):3769-3787.

The Study of Tau Protein and Gene Expression in the Serum and Brain Tissue of Wistar Alzheimer's Model Rats Treated with Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacter* Strains

Seyedeh Roya Hesaraki, Maryam Ghobeh*, Parichehreh Yaghmaei, Hanieh Jafary

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

Abstract

Alzheimer's disease is a type of brain dysfunction in which the patient's mental abilities, including memory gradually decline. The formation of neurofibrillary tangles inside neurons caused by hyperphosphorylation of tau proteins is a major cause of dementia-related diseases such as Alzheimer's. The aim of this study was to study tau protein in the brain and tau gene expression in both the serum level and brain tissue of Wistar Alzheimer's rats treated with probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* purified from yogurt. In this study, 30 adult male Wistar rats were randomly divided into 5 groups (n = 6): The control group, the group of Alzheimer's-induced rats, the Sham group, and the two experimental groups in which the Alzheimer's-induced rats received the probiotic strains *Limosilactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium longum* at a dose of 2.5×10^9 CFU for one month, respectively. Tau gene expression and protein were analyzed by Real Time PCR and histopathology, respectively. The results of this study showed that both strains, especially *Bifidobacterium longum*, were able to reduce Tau gene expression in brain tissue and blood serum compared to Alzheimer's group. Also, both strains, especially *Bifidibacterium longum*, exhibited capability in inhibiting Tau neurofibrillary tangles. It seems that the probiotic strains *Limosilactobacillu sreuetri* and *Bifidobacterium longum* can be good candidates for reducing the Tau gene expression as well as Tau neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's, Probiotics, Tau Gene, Tau Neurofibrillary Tangles, Histopathology.