

مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه‌ای سطح سرمی و بافت مغزی $TNF-\alpha$ در رت‌های مدل آلزایمر نژاد ویستار تیمار شده با سویه‌های پروبیوتیک دو جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم

بهاره جمالزاده پشت مساری، مریم قبه*، پریچهره یغمایی، هانیه جعفری

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

*مسئول مکاتبات: ghobeh@srbiau.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2023.1966990.1421

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۱۲

چکیده

بیماری آلزایمر یک نوع اختلال عملکرد مغزی است که به تدریج توانایی‌های ذهنی بیمار تحلیل می‌رود. مطالعات متعدد نشان داده که مکانسیم‌های التهابی نیز در پاتوژنز بیماری آلزایمر نقش اساسی دارند. در این خصوص هدف قرار دادن فاکتور التهابی $TNF-\alpha$ می‌تواند در کنترل و درمان چنین بیماری‌هایی باشد. پروبیوتیک‌ها به عنوان موجودات زنده و فعال میکروسکوپی در حفظ و بهبود سلامت انسان به عنوان یک راهکار درمانی بسیار مهم همواره حائز اهمیت بوده‌اند. هدف از تحقیق حاضر، بررسی مقایسه‌ای سطح سرمی و بافت مغزی $TNF-\alpha$ و نیز تعداد پلاک‌های آمیلوئیدی و در رت‌های مدل آلزایمر نژاد ویستار تیمار شده با سویه‌های پروبیوتیک جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم می‌باشد. ابتدا ۳۰ سر موش نر نژاد ویستار به طور تصادفی به پنج 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 آلزایمری شده با دوز $10^9 \times 5/2$ CFU از دو سویه پروبیوتیک *Bifidobacterium longum* و *Limosilactobacillus reuteri* تیمار شدند. نتایج این بررسی نشان داد در موش‌های آلزایمری تعداد پلاک‌های آمیلوئیدی افزایش داشته‌اند ($p > 0/001$). همچنین میزان $TNF-\alpha$ نیز در موش‌های آلزایمری افزایش داشته است. هر دو سویه به ویژه سویه *Bifidobacterium longum* توانستند به طور معناداری ($p > 0/001$) میزان $TNF-\alpha$ را در بافت مغز و نیز در سرم خون نسبت به گروه آلزایمر کاهش دهند. همچنین هر دو سویه به ویژه سویه *Bifidobacterium longum* عملکرد خوبی بر مهار پلاک‌های آمیلوئیدی داشته است. بنابراین به نظر می‌رسد سویه‌های پروبیوتیک *Bifidobacterium longum* و *Limosilactobacillus reuteri* می‌توانند کاندیدهای مناسبی جهت کاهش میزان $TNF-\alpha$ و پلاک‌های آمیلوئیدی در بیماری آلزایمر باشند.

کلمات کلیدی: آمیلوئید بتا، آلزایمر، فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا، پروبیوتیک، پلاک‌های آمیلوئیدی.

مقدمه

آلزایمر، تجمع غیرطبیعی پروتئینی به نام آمیلوئید بتا به صورت پلاک‌های آمیلوئیدی در خارج سلول‌های عصبی سبب ایجاد اختلال در ارتباطات شبکه نورونی

آلزایمر شایع‌ترین شکل زوال عقل مرتبط با سن بوده و از جمله بیماری‌هایی است که شیوع آن در سراسر جهان به سرعت در حال افزایش است (۶). در بیماری

خودایمنی شود. بنابراین خنثی سازی آن و یا بلوکه کردن گیرنده‌های آن با استفاده از مهارکننده‌های آن می‌تواند یک استراتژی درمانی موثر در کنترل و درمان چنین بیماری‌هایی باشد. تولید بیش از حد این پروتئین ممکن است یکی از دلایل شکل‌گیری اختلالات حافظه در مغز این بیماران باشد (۶).

در بیماران مبتلا به آلزایمر در اثر تخریب نورون‌ها سطح فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا در مایع مغزی نخاعی افزایش می‌یابد. همچنین مشخص شده است استفاده از داروهای ضد التهاب سبب کاهش احتمال ابتلا و نیز کاهش روند پیشرفت بیماری آلزایمر می‌شود (۸). همچنین تحقیقات نشان داده یکی از دلایل بروز التهاب در مغز بیماران آلزایمری، تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی است که می‌تواند موجب بروز التهاب شود. بدین صورت که پلاک‌های آمیلوئیدی به داخل سلول منتقل شده و سبب شروع پاسخ‌های التهابی می‌شود (۱۵). بنابراین، مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر دو پروبیوتیک لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم بر سطح سرمی و مغزی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و نیز پلاک‌های آمیلوئیدی در موش‌های مدل آلزایمری 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 با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از مؤسسه انسیتو 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

و نیز تخریب نورون‌ها می‌شود (۶). پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به اندازه کافی، سبب بهبود سلامت میزبان می‌شوند (۲۰). به منظور بهبود اثر پروبیوتیک‌ها ترکیب مختلفی از گونه‌های باکتریایی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. شایع‌ترین نوع آنها، لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتری‌ها است (۳۳). این دو جنس باکتریایی، هیچ‌گونه توانایی ایجاد التهاب را ندارند و باکتری‌های اسید لاکتیکی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند زیرا سطح آنزیم‌های گلوکوتاتیون و SOD را بالا می‌برند که این مسئله از جمله علل انتخاب آنها به عنوان پروبیوتیک است (۱۶، ۲۷). *Limosilactobacillus reuteri* یک پروبیوتیک است که به دلیل اثرات مفید (۱۸، ۱۲) آن بر برخی بیماری‌های گوارشی، به خوبی شناخته شده است (۱۶).

بیفیدوباکتری‌ها باکتری‌های بی‌هوازی گرم مثبت، دارای ژنوم غنی از GC است (۲۱). این میکروارگانیسم‌ها بخشی از میکروفلور طبیعی در روده بزرگ انسان و برخی حیوانات دیگر هستند. برای داشتن خواص ارتقا دهنده سلامت برای میزبان خود که شامل افزایش پاسخ ایمنی (۱۰)، مهار سرطان‌زایی (۳)، حفاظت از میزبان در برابر عفونت ویروسی (۸) و ممکن است تولید مواد ضد باکتری انجام دهند (۲۰).

فاکتور نکروزدهنده‌ی تومور-آلفا ($\text{TNF-}\alpha$) یک سایتوکین پیش‌التهابی است که بطور عمده توسط ماکروفاژهای فعال شده تولید می‌شوند. بطورکلی این فاکتور، سیستم‌های کنترلی درگیر در تکثیر سلولی، تمایز زایی، التهاب، مرگ و تنظیم ایمنی را فعال می‌کند. اگرچه سطح طبیعی آن برای تنظیم پاسخ‌های ایمنی بسیار مهم است اما تداوم واکنش ایمنی که در اثر تولید نابجا و بیش از حد آن ایجاد می‌شود می‌تواند سبب بعضی از بیماری‌های التهابی یا

۵- گروه تجربی (۲): در این گروه حیوانات تحت عمل جراحی آلزایمری شدن با تزریق بتا آمیلوئید قرار گرفتند و سویه دوم پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم (*Bifidobacterium longum*) را با دوز 10^9 CFU \times ۲/۵ به میزان ۰/۵ سی‌سی 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.

به منظور بررسی میزان TNF- α از تکنیک الیزا و از کیت Bender Med Systeme BMS 4.223 استفاده گردید. پس از مراحل تثبیت، آگیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری مغز، با استفاده از میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۶ میکرون تهیه شد. نمونه‌ها روی لام قرار گرفتند و سپس با همتوکسیلین-ائوزین برای مشاهده سلول‌های پیرامیدال ناحیه هیپوکامپ بافت مغز رنگ-آمیزی شدند. به منظور شمارش نوروها و پلاک‌ها از نرم‌افزار Image J استفاده شد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار اکسل استفاده شده و برای بررسی وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون واریانس ANOVA و TUKEY استفاده شد. داده‌ها به صورت $MEAN \pm SEM$ برای گروه‌ها در تمام مراحل در نظر گرفته شد.

نتایج

پس از جداسازی و تخلیص سویه‌های پروبیوتیک در پژوهش‌های قبلی، دو سویه بر اساس توالی یابی 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).

نتایج حاصل از بررسی میزان TNF- α در سطح سرمی در گروه‌های مختلف آزمایشی مشخص نمود که

شدند. برای القاء آلزایمر از آمیلوئید بتا ۴۲-۱ خریداری شده از شرکت سیگما-آلدریج آمریکا استفاده شد که در آب مقطر دوبار استریل حل شده و به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شده بود تا فیبرل‌های کامل شکل گیرد. جهت بیهوشی از تزریق درون صفاقی کتامین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر 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 ICA هیپوکامپ با مختصات قدامی-خلفی ۳/۸ و طرفی ۲/۴ و پشتی ۲/۷ میلی متر 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.

حیوانات به ۵ گروه شش‌تایی 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 لاکتو باسیل (*Limosilactobacillus reuteri*) را با دوز 10^9 CFU \times ۲/۵ به میزان ۰/۵ سی‌سی از طریق گاواژ به مدت یک ماه دریافت کردند.

داشته است (شکل ۳). همچنین گروه *Lactobacillus* نسبت به گروه *control* دارای اختلاف معنادار $p < 0/05$ می‌باشد. این امر حاکی از آن است که در گروه‌های دریافت‌کننده *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* میزان $TNF-\alpha$ نسبت به گروه آلیزایمر هم در سطح سرمی و هم در بافت مغز کاهش معناداری ($p < 0/001$) داشته است. در بررسی دیگر، تعداد پلاک‌های آمیلوئیدی در گروه های تجربی دریافت‌کننده دو پروبیوتیک در مقایسه با گروه های کنترل آلیزایمری 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).

میزان $TNF-\alpha$ در گروه‌های آلیزایمر و شم نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف چشم گیر و معناداری $p < 0/001$ می‌باشند. این در حالیست که در گروه‌های دریافت‌کننده *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* میزان $TNF-\alpha$ نسبت به گروه آلیزایمر کاهش معناداری ($p < 0/001$) داشته است (شکل ۲).
نتایج حاصل از بررسی میزان $TNF-\alpha$ در بافت مغز در گروه‌های مختلف آزمایشی مشخص نمود که میزان $TNF-\alpha$ در گروه‌های آلیزایمر و شم نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری ($p < 0/001$) داشته است. این در حالیست که در گروه‌های دریافت‌کننده *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* میزان $TNF-\alpha$ نسبت به گروه آلیزایمر کاهش معناداری ($p < 0/001$)

A

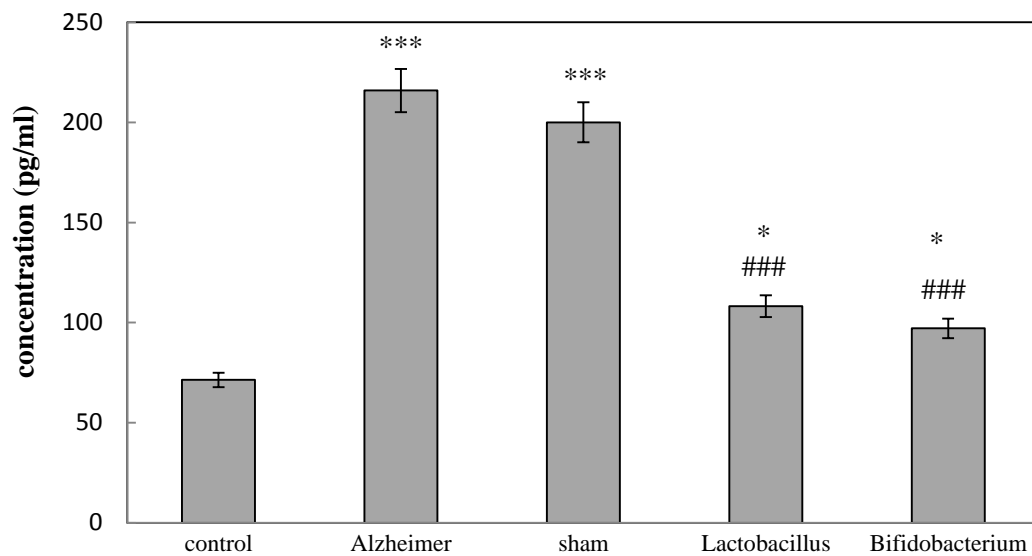
select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Dis		
Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
<input checked="" type="checkbox"/> Limosilactobacillus reuteri strain 1B chromosome complete genome	Limosilac...	275	1208	77%	2e-69	72.65%
<input checked="" type="checkbox"/> 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%

B

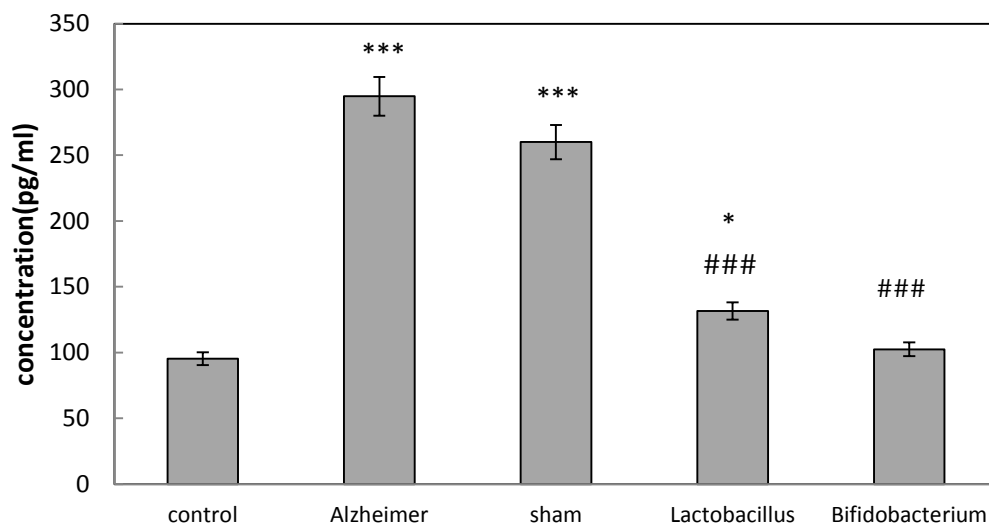
select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Dis		
Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
<input checked="" type="checkbox"/> Bifidobacterium longum subsp. suillum strain 3255 16S ribosomal...	Bifidobac...	1076	1076	79%	0.0	100.00%
<input checked="" type="checkbox"/>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

شکل ۱- توالی‌یابی دو سویه پروبیوتیک A: *Limosilactobacillus reuteri* و B: *Bifidobacterium longum* در

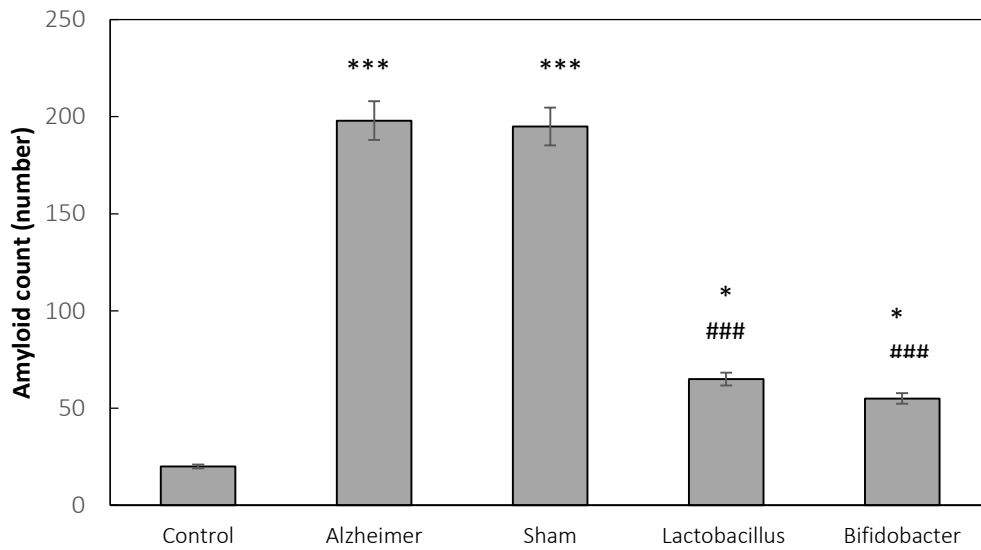
Genbank.



شکل ۲ - بررسی سطح $TNF-\alpha$ در سرم خون. * $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل، *** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل، # در مقایسه با گروه آلزایمر.



شکل ۳ - بررسی سطح $TNF-\alpha$ در بافت مغز. * $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل، *** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل، # در مقایسه با گروه آلزایمر.



شکل ۴- شمارش پلاک‌های آمیلوئیدی در گروه‌های مختلف. * $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل، *** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل، ### $p < 0/001$ در مقایسه با گروه آلزایمر.

بحث

نتایج ثابت کرد که انتخاب مخلوطی از لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها اثرات مثبت بر روی بیماری‌های عصبی از جمله آلزایمر دارد. تحقیقات دیگری نشان دادند که از میان پروبیوتیک‌ها، لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها خصوصاً سوش-هایی نظیر لانگوم و هلوتیکوس اثرپذیری بیشتری بر رفتارهای شناختی و حافظه و یادگیری دارند (۳۲، ۲۲). داوری و همکاران نتیجه گرفته‌اند که پروبیوتیک نقص حافظه فضایی، انتقال سیناپسی را در حیوانات دیابتی ترمیم کرده و ارتقا می‌بخشد (۹). ترکیب پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس هلوتیکوس و رامنوسوس (۳۴) یا لاکتوباسیلوس هلوتیکوس و بیفیدوباکتریوم لانگوم (۳) در حافظه غیرفضایی و ترکیب بیفیدوباکتریوم یوملاکتیس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و فرمنتوم یا لاکتوباسیلوس کارواتوس و پلانتاروم بر حافظه فضایی تاثیر می‌گذارد. پژوهش‌ها حاکی از آن است که لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها حافظه و یادگیری و استرس

بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مانند آلزایمر با سیگنال‌های پیش التهابی که $TNF-\alpha$ که در مغز ایجاد می‌کند در ارتباط هستند. تولید بیش از حد میکروگلیایی سیتوکین‌ها مانند $IL-1\beta$ ، $IL-6$ و از همه مهم‌تر $TNF-\alpha$ ، مرگ سریع سلول‌های عصبی را به همراه دارد (۱۷). از سوی دیگر تحقیقات، ارتباط بین اختلال در میکروبیوم انسان و نشانگرهای زیستی مختلف اختلالات نورودژنراتیو، به ویژه آلزایمر را اثبات کرده‌اند (۷، ۲۹).

اکبری و همکاران اثرات مفید مکمل پروبیوتیک بر نشانگرهای زیستی عملکرد شناختی استرس اکسیداتیو، التهاب و وضعیت متابولیک در بیماران مبتلا به آلزایمر را مورد سنجش قرار می‌داد، مشخص کردند که میکروبیوم نقشی برجسته در انتقال سیناپسی و کاهش فاکتورهای التهابی دارد که این مطلب همسو با نتایج تحقیق حاضر در توانایی پروبیوتیک‌های مورد تحقیق در کاهش میزان $TNF-\alpha$ می‌باشد (۱).

به نظر می‌رسد یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌هایی که پروبیوتیک‌های مفید بر فعالیت مدارهای عصبی تأثیر می‌گذارد، شیمی عصبی مغز است (۴، ۱۹).

همچنین گزارشات حاکی از آن است که پروبیوتیک‌ها با تأثیر بر سطوح مولدهای عصبی یا انتقال‌دهنده‌های عصبی از جمله BDNF، γ -آمینوبوتیریک اسید (GABA)، سروتونین و دوپامین، نوراپی نفرین، استیل کولین، واگ و اعصاب روده‌ای (۲۳)، محور HPA و سیستم ایمنی و غدد درون‌ریز (۱۱) موجب بهبود عملکرد مغز می‌گردد (۱۴). Gareau و همکاران نشان دادند حافظه کاری و غیرفضایی حیوانات فاقد میکروارگانیزم نیز در تست T Maze کاهش می‌یابد (۱۳). علاوه بر این، مطالعات حیوانی ثابت کرده‌اند که عفونت و التهاب حاد و مزمن دستگاه گوارش باعث تغییر بیوشیمی و رفتار سیستم عصبی مرکزی می‌شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌های *L. Fermentum*، *L. acidophilus* و *B. longum* نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۷). اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌ها در اندام‌های دورتر مشاهده شده است که نشان می‌دهد که آنها نه تنها به صورت محلی عمل می‌کنند بلکه می‌توانند توسط اعصاب آورنده واگ به سیستم عصبی مرکزی منتقل شوند. همچنین اثرات پروبیوتیک‌ها بر عملکرد مغز از جمله افسردگی، اضطراب و تغییر خلق و خو نشان داده شده است. به طور خاص گونه‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم می‌توانند اثرات چشم‌گیری بر سلامت روان داشته باشند (۲۶، ۳۸).

بنابراین نتایج نشان‌دهنده آن است که مصرف پروبیوتیک، دارای اثرات مثبت بر عملکرد شناختی در درجات خفیف بیماری آلزایمر بوده است (۱).

اکسیداتیو را در موش‌های صحرایی تزریق شده بهبود می‌بخشند. همچنین مصرف پروبیوتیک‌ها می‌تواند از اختلال یادگیری و حافظه جلوگیری کرده و تعداد و اندازه پلاک‌ها را در یک مدل موش صحرایی آلزایمری کاهش دهد که همراستا با نتایج حاصل در تحقیق حاضر می‌باشد (۵، ۲۱).

در مطالعات انسانی شواهدی مبنی بر نقش داشتن فلور میکروبی بر عملکرد سیستم عصبی مرکزی وجود دارد، مبنی بر این که مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها اثرات مفیدی بر سیستم عصبی مرکزی دارد (۲۴).

مشخص شده که بیفیدوباکتریوم تجمع اسیدهای چرب شامل آراشیدونیک و دوکوزا هگزانویک اسید را در مغز افزایش می‌دهد که نقش مهمی در فرآیندهای تکامل مغزی دارند و تجمع آن‌ها باعث بهبود فرآیند یادگیری و حافظه می‌شود (۲، ۳۹).

باکتری‌های روده نیز سبب تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر مانند بوتیرات، استات و پروپیونات از رژیم حاوی کربوهیدرات می‌شوند (۳۱) که با سلول‌های عصبی جهت تحریک سیستم عصبی سمپاتیک تعامل دارد. بوتیرات به عنوان مهارکننده آنزیم هیستون داستیلاز در فرآیند یادگیری و حافظه دخالت دارد (۳۵).

تحقیقات نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها می‌تواند در درمان بیماری‌های تخریب عصبی و التهابی عصبی از طریق اثرات تعدیل سیستم ایمنی مفید باشد. پروبیوتیک‌های مختلف، مولکول‌های عصبی فعال مختلفی تولید می‌کنند که مستقیم یا غیرمستقیم در سیگنالینگ CNS تأثیر دارند و اثرات مطلوبی بر کمبود حافظه، نشانگرهای استرس اکسیداتیو و پیش التهاب سیتوکین‌هایی نظیر TNF- α دارند که این مطلب همسو با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد (۲۵، ۴۰).

synaptic plasticity in an animal model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 376:112183.

5. Athari Nik Azm 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.

6. Backhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717):1915-1920.

7. Chelakkot C., Ghim J., Ryu S.H. 2018. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental and Molecular Medicine*, 50(8):1-9.

8. Cheng X., Shen Y., Li R. 2014. Targeting TNF: a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*, 19(11): 1822-1827.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. Farajzadeh D., Karimi-Gharigh S., Jalali-Kondori P., Dastmalchi S. 2019. Design and construction of a novel

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مصرف پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم مهار فاکتور التهابی TNF- α و کاهش پلاک‌های آمیلوئیدی را به همراه داشته است که این امر نیازمند مطالعه بیشتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بود و با حمایت های معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به انجام رسیده است. بدین وسیله از کمک و مساعدت این عزیزان تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1. Akbari E., Asemi Z., Daneshvar Kakhaki R., Bahmani F., Kouchaki E., Tamtaji O.R., Salami M. 2016. Effect of probiotic supplementation on cognitive function and metabolic status in Alzheimer's disease: a randomized, double-blind and controlled trial. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8: 256.
2. Akkasheh G., Kashani-Poor Z., Tajabadi-Ebrahimi M., Jafari P., Akbari H., Taghizadeh M., Esmailzadeh A. 2016. Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*, 32(3):315-320.
3. Arseneault-Bréard J., Rondeau I., Gilbert K., Girard S.A., Tompkins T.A., Godbout R., Rousseau G. 2012. Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *British Journal of Nutrition*, 107(12):1793-1799.
4. Asl Z.R., Sepehri G., Salami M. 2019. Probiotic treatment improves the impaired spatial cognitive performance and restores

21. Kuriyama K., Honma M., Koyama S., Kim Y. 2011. D-cycloserine facilitates procedural learning but not declarative learning in healthy humans: a randomized controlled trial of the effect of D-cycloserine and valproic acid on overnight properties in the performance of non-emotional memory tasks. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(4):505-509.
22. Lanctôt K.L., Herrmann N., Mazzotta P., Khan L.R., Ingber N. 2004. GABAergic function in Alzheimer's disease: evidence for dysfunction and potential as a therapeutic target for the treatment of behavioural and psychological symptoms of dementia. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 49(7):439-453.
23. Liu W.H., Chuang H.L., Huang Y.T., Wu C.C., Chou G.T., Wang S., Tsai Y.C. 2016. Alteration of behavior and monoamine levels attributable to *Lactobacillus plantarum* PS128 in germ-free mice. *Behavioural Brain Research*, 298: 202-209.
24. 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*, 6(4):203.
25. 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.
26. Mohammadi A.A., Jazayeri S., Khosravi-Darani K., Solati Z., Mohammadpour N., Asemi Z., Egtesadi S. 2016. The effects of probiotics on mental health and hypothalamic-pituitary-adrenal axis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in petrochemical workers. *Nutritional Neuroscience*, 19(9): 387-395.
27. Parker E.A., Roy T., D'Adamo C.R., Wieland L.S. 2018. Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of humanized single-chain variable-fragment antibody against the tumor necrosis factor alpha. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(1):308.
13. Gareau M.G., Wine E., Rodrigues D.M., Cho J.H., Whary M.T., Philpott D.J., Sherman P. M. 2011. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut*, 60(3):307-317.
14. Hadizadeh M., Hamidi G.A., Salami M. 2019. Probiotic supplementation improves the cognitive function and the anxiety-like behaviors in the stressed rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(5): 506.
15. Han S.H., Park J.C., Mook-Jung I. 2016. Amyloid β -interacting partners in Alzheimer's disease: from accomplices to possible therapeutic targets. *Progress in Neurobiology*, 137:17-38.
16. Kang D.W., Adams J.B., Gregory A.C., Borody T., Chittick L., Fasano A., Krajmalnik-Brown R. 2017. Microbiota transfer therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*, 5(1):1-16.
17. Katsumoto A., Takeuchi H., Takahashi K., Tanaka F. 2018. Microglia in Alzheimer's disease: risk factors and inflammation. *Frontiers in Neurology*, 9: 978.
18. 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.
19. Kiouisi 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.
20. Koboziev I., Webb C.R., Furr K.L., Grisham M.B. 2014. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 68:122-133.

35. Stefanko D.P., Barrett R. M., Ly A.R., Reolon G.K., Wood M.A. 2009. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(23):9447-9452.
36. Takemiya T., Suzuki K., Sugiura H., Yasuda S., Yamagata K., Kawakami Y., Maru E. 2003. Inducible brain COX-2 facilitates the recurrence of hippocampal seizures in mouse rapid kindling. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 71(3-4):205-216.
37. Tapia-Arancibia L., Aliaga E., Silhol M., Arancibia S. 2008. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Research Reviews*, 59(1): 201-220.
38. Tillisch K., Labus J., Kilpatrick L., Jiang Z., Stains J., Ebrat B., Mayer E.A. 2013. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology*, 144(7):1394-1401.
39. Wall R., Marques T.M., O'Sullivan O., Ross R.P., Shanahan F., Quigley E.M., Stanton C. 2012. Contrasting effects of *Bifidobacterium breve* NCIMB 702258 and *Bifidobacterium breve* DPC 6330 on the composition of murine brain fatty acids and gut microbiota. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(5):1278-1287.
40. 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.
- evidence from the Cochrane Collaboration. *Nutrition*, 45:125-134.
28. Pitsikas N., Bouladakis A. 2009. Pre-training administration of anesthetic ketamine differentially affects rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuropharmacology*, 57(1):1-7.
29. 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.
30. Reid C.A., Jackson G.D., Berkovic S. F., Petrou S. 2010. New therapeutic opportunities in epilepsy: a genetic perspective. *Pharmacology and Therapeutics*, 128(2):274-280.
31. Roy C. C., Kien C. L., Bouthillier L., Levy E. 2006. Short-chain fatty acids: ready for prime time. *Nutrition in Clinical Practice*, 21(4):351-366.
32. Savignac H.M., Tramullas M., Kiely B., Dinan T.G., Cryan J.F. 2015. Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain. *Behavioural Brain Research*, 287:59-72.
33. Schroeder B.O., Bäckhed F. 2016. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature medicine*, 22(10):1079-1089.
34. Smith C.J., Emge J.R., Berzins K., Lung L., Khamishon R., Shah P., Gareau M.G. 2014. Probiotics normalize the gut-brain-microbiota axis in immunodeficient mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307(8):G793-G802.

The Comparison Study of TNF- α Level in Serum and Brain Tissue in Wistar Alzheimer's Rats Treated with Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacter* Strains

Bahareh Jamalzadeh Posht Mesari, 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 that gradually weakens the patient's mental abilities. Numerous studies have shown that inflammatory mechanisms also play a key role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In this regard, targeting TNF- α using its inhibitors can be an effective therapeutic strategy in controlling and treating such diseases. The purpose of this study was a comparison study of TNF- α levels in blood serum and brain tissue in Wistar Alzheimer's rats treated with probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacter* strains by ELISA. The number of amyloid plaques was also counted. For this purpose, 30 adults male Wistar rats were randomly distributed to 5 groups as follows (n = 6): The control group included animals receiving normal water; the Alzheimer's group who underwent surgery and became Alzheimer's-induced by injection of beta-amyloid; Sham group who underwent surgery and was injected with water (beta-amyloid solvent); two experimental groups who underwent Alzheimer's surgery with beta-amyloid injection and each group received probiotic strains *Limosilactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium longum* separately at a dose of 2.5×10^9 CFU at 0.5 CC by gavage for one month. The results demonstrated that both strains, especially *Bifidobacterium longum*, were able to significantly ($p < 0.001$) reduce the amount of TNF- α in brain tissue and blood serum compared to the Alzheimer's group. Also, both strains, especially strain *Bifidobacterium longum*, showed notable capability of inhibiting amyloid plaques. Therefore, it seems that two probiotic strains *Limosilactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium longum* can be good candidates to reduce the level of TNF- α in both blood serum and brain tissue and also the number of amyloid plaques in Alzheimer's-induced rats.

Keywords: Amyloid beta, Alzheimer's Disease, Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α), Probiotics, Amyloid Plaques.

