نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۹، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۵، صفحات ۱- ۱۴

اثر لاکتوباسیلوس دلبروکی بر الگوی بیان ژن‌های *PP2CA* و *MTF1* در آسیب کبدی القاشده با کلرید قلع در رت‌ها

نرگس علیپور سقا[۱]، لیلا اسدپور[۲*] ، نجمه رنجی[۳]

گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۱- دانشجوی دکترا، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۲- دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۳- دانشجوی دکترا، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
*نویسنده مسئول: لیلا اسدپور، دکترای تخصصی میکروبیولوژی. - آدرس: رشت، پل تالشان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست شناسی
تلفن تماس: ۰۹۱۱۳۳۸۳۸۶۰ - پست الکترونیک: le.asadpour@iau.ac.ir

دریافت مقاله: ۰۵ تیر ۱۴۰۵، بازنگری: ۱۶ مرداد ۱۴۰۵، پذیرش نهایی: ۳۰ مرداد ۱۴۰۵

10.22034/NFVM.2026.588260.1320

چکیده

مطالعه حاضر، با هدف بررسی اثر بالقوه لاکتوباسیلوس دلبروکی (*Lactobacillus delbrueckii*) در برابر سمیت کبدی ناشی از کلرید قلع ($SnCl_2$) در رت‌ها، ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد و الگوی بیان ژن‌های زیرواحد کاتالیتیکی فسفاتاز پروتئینی ۲A (rPP2CA) و فاکتور رونویسی تنظیم‌کننده فلز-۱ (rMTF1) ، که در پاسخ‌های استرس سلولی و سم‌زدایی فلزات نقش دارند، تمرکز داشت. تعداد ۲۰ سر رت نر ویستار در چهار گروه شامل گروه کنترل، گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک، گروه دریافت‌کننده کلرید قلع و گروه دریافت‌کننده همزمان کلرید قلع و لاکتوباسیلوس دلبروکی تقسیم شدند. تیمارها به‌مدت چهار هفته به‌صورت خوراکی انجام شدند. سپس، بافت‌های کبدی از نظر هیستوپاتولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند و سطوح بیان ژن‌های rPP2CA و rMTF1 با استفاده از واکنش qRT-PCR اندازه‌گیری شد.

مواجهه با کلرید قلع با تغییرات بافت‌شناسی کبد شامل حضور سلول‌های التهابی، تغییرات سینوزوئیدی و تغییرات مورفولوژیک هپاتوسیت‌ها همراه بود. آنالیز بیان ژن نشان داد که کلرید قلع موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های rPP2CA و rMTF1نسبت به گروه کنترل شد ($P<0/01$) درگروه دریافت‌کننده همزمان لاکتوباسیلوس دلبروکی و کلرید قلع، تفاوت‌هایی در ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک کبد و کاهش معنی‌دار بیان هر دو ژن در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کلرید قلع مشاهده گردید ($P<0/01$). همچنین، تجویز پروبیوتیک به‌تنهایی باعث کاهش بیان این ژن‌ها نسبت به گروه کنترل شد ($P<0/01$). به‌طور کلی، لاکتوباسیلوس دلبروکی ممکن است از طریق تعدیل پاسخ‌های مرتبط با استرس سلولی در کاهش آسیب کبدی نقش داشته باشد، هرچند انجام مطالعات تکمیلی برای روشن شدن سازوکارهای دقیق این اثرات ضروری است.

واژگان کلیدی: *لاکتوباسیلوس دلبروکی؛ کلرید قلع؛ سمیت کبدی؛ rPP2CA ؛ rMTF1*

مقدمه

کبد اندامی حیاتی است که مسئول تنظیم متابولیسم، پردازش مواد مغذی و سم‌زدایی است. به‌دلیل موقعیت آناتومیکی راهبردی و فعالیت متابولیکی بالای آن، کبد به‌طور مداوم در معرض آلاینده‌های محیطی، داروها و مواد سمی جذب‌شده از دستگاه گوارش قرار دارد و همین امر آن را به‌ویژه مستعد آسیب می‌سازد (۱). در میان آلاینده‌های محیطی، فلزات سنگین به‌دلیل پایداری، قابلیت تجمع زیستی و سمیت زیستی، یکی از نگرانی‌های عمده سلامت عمومی محسوب می‌شوند. مواجهه با فلزات سنگین با استرس اکسیداتیو، التهاب، اختلال عملکرد سلولی و آسیب اندام‌ها، به‌ویژه کبد، که محل اصلی متابولیسم این ترکیبات است، ارتباط دارد (۱).

ترکیبات قلع به‌طور گسترده در صنایع تولیدی، بسته‌بندی مواد غذایی، فرآوری فلزات و صنایع شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در میان این ترکیبات، کلرید قلع *($SnCl_2$)* یکی از متداول‌ترین نمک‌های معدنی قلع است که در مدل‌های تجربی به‌عنوان القاکننده سمیت کبدی گزارش شده است (۲). شواهد نشان می‌دهند که کلرید قلع از طریق تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن *(Reactive Oxygen Species; ROS)* موجب اختلال در هموستاز سلولی می‌شود که در نتیجه آن استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی، اکسیداسیون پروتئین‌ها، اختلال عملکرد میتوکندری و آسیب *DNA* رخ می‌دهد (۳). این فرآیندهای پاتولوژیک، مسیرهای پیام‌رسانی التهابی و آپوپتوزی را فعال کرده و در نهایت به آسیب سلول‌های کبدی و اختلال در عملکرد کبد منجر می‌شوند (۴، ۵).

استرس اکسیداتیو به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی سمیت کبدی ناشی از فلزات سنگین شناخته می‌شود. تولید بیش از حد *ROS* ظرفیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد را تحت‌الشعاع قرار داده و مسیرهای پیام‌رسانی درون‌سلولی دخیل در بقا، تکثیر، آپوپتوز و التهاب سلولی را مختل می‌کند (۶). حفظ هموستاز پیام‌رسانی سلولی، به تعادل ظریفی میان پروتئین‌کینازها و پروتئین‌فسفاتازها وابسته است. در میان پروتئین‌فسفاتازها، فسفاتاز پروتئینی A۲ *(Protein Phosphatase 2A; PP2A)* یکی از مهم‌ترین فسفاتازهای سرین/ترئونین محسوب می‌شود که به‌صورت یک کمپلکس آنزیمی و شامل یک زیرواحد ساختاری *(A)*، یک زیرواحد کاتالیتیکی *(C)* و یک زیرواحد تنظیمی *(B)* است. *PP2A* به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ای کلیدی در مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به فسفریلاسیون نقش دارد که در حفظ هموستاز سلولی و پاسخ‌های استرسی عمل می‌کند (۱، ۶). این پروتئین فسفاتاز فرآیندهای متعددی از جمله پیشرفت چرخه سلولی، انتقال پیام، آپوپتوز، ترمیم *DNA* و پاسخ به استرس را تنظیم می‌کند (۷، ۸). تغییرات در بیان و فعالیت *PP2A* در چندین اختلال کبدی و همچنین در شرایط استرس اکسیداتیو گزارش شده است. تغییر در سطح رونوشت‌های *PP2A* می‌تواند بازتابی از پاسخ سلول‌ها به آسیب‌های سمی بوده و دیدگاه ارزشمندی درباره تغییرات مولکولی مرتبط با استرس در طی سمیت کبدی فراهم سازد (۵).

یکی دیگر از تنظیم‌کننده‌های مهم دفاع سلولی در برابر سمیت فلزات، فاکتور رونویسی تنظیم‌کننده فلز-۱ *(Metal Regulatory Transcription Factor-1; MTF1)* است. *MTF1* یک فاکتور رونویسی دارای ساختار انگشت‌روی *(zinc finger)* با درجه‌ی بالای حفاظت تکاملی است که بیان ژن‌های دخیل در هموستاز فلزات، دفاع آنتی‌اکسیدانی و سازگاری سلولی با استرس، به‌ویژه متالوتیونئین‌ها، را تنظیم می‌کند. مدل‌های تجربی فاقد *MTF1* عملکردی، حساسیت بیش‌تری به استرس اکسیداتیو و سمیت ناشی از فلزات نشان داده‌اند که اهمیت این فاکتور را در حفظ هموستاز فلزی کبد برجسته می‌سازد (۹).

در سال‌های اخیر، محور روده–کبد به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ای مهم در سلامت و بیماری‌های کبدی مورد توجه فزاینده‌ای قرار گرفته است. تغییر در ترکیب میکروبیوتای روده در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌های کبدی نقش دارد (۱۰، ۱۱). پروبیوتیک‌ها، به‌ویژه گونه‌های

لاکتوباسیلوس، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و محافظت‌کننده‌ی کبدی هستند و به‌عنوان تعدیل‌کننده‌های بالقوه سمیت فلزات سنگین مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۴-۱۱). علاوه‌بر این، پروبیوتیک‌ها می‌توانند بر بیان ژن‌های دخیل در پاسخ‌های استرس اکسیداتیو و مکانیسم‌های دفاعی سلولی تأثیر بگذارند و از این طریق در شرایط سمی، به حفاظت بافتی کمک کنند (۱۵). برخی مطالعات نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها ممکن است بر زیست‌فراهمی فلزات و پاسخ‌های استرس سلولی اثرگذار باشند، اگرچه سازوکارهای زیربنایی این اثرات هنوز به‌طور کامل روشن نشده است (۱۶، ۱۷).

لاکتوباسیلوس دلبروکی یک باکتری اسیدلاکتیک سودمند است که به‌طور گسترده در فرآورده‌های لبنی تخمیری و فرمولاسیون‌های پروبیوتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. افزون بر اهمیت تغذیه‌ای، گزارش شده است که این باکتری از طریق تعدیل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پاسخ‌های ایمنی، اثرات محافظتی در برابر استرس اکسیداتیو و التهاب اعمال می‌کند (۱۸).

با وجود شواهد فزاینده در حمایت از اثرات محافظت‌کننده کبدی پروبیوتیک‌ها، اطلاعات اندکی درباره تأثیر لاکتوباسیلوس دلبروکی بر ژن‌های دخیل در پیام‌رسانی استرس و پاسخ‌دهنده به فلزات در طی آسیب کبدی ناشی از فلزات سنگین وجود دارد. بیش‌تر مطالعات پیشین بر شاخص‌های بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک تمرکز داشته‌اند، در حالی که تأثیر مکمل‌یاری پروبیوتیکی بر بیان ژن‌های *PP2CA* و *MTF1* تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است. شناسایی تغییرات بیان این ژن‌ها می‌تواند بینش ارزشمندی درباره پاسخ‌های مولکولی مرتبط با تیمار پروبیوتیکی فراهم ساخته و به درک بهتر مسیرهای وابسته به استرس در سمیت کبدی کمک کند.

بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر لاکتوباسیلوس دلبروکی بر تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد و الگوی بیان ژن‌های *rPP2CA* و *rMTF1* در رت‌های در معرض کلرید قلع انجام شد. بررسی این تغییرات می‌تواند درک عمیق‌تری از پاسخ‌های مولکولی مرتبط با تیمار پروبیوتیکی فراهم کرده و به شناسایی مسیرهای احتمالی دخیل در محافظت در برابر آسیب کبدی ناشی از فلزات سنگین کمک نماید.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی: تعداد ۲۰ سر رت نر ویستار (با سن ۸ تا ۱۰ هفته و وزن ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم) از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (تهران، ایران) تهیه شدند. حیوانات در قفس‌های پلی‌کربناتی (۱۵×۱۵×۳۰ سانتی‌متر؛ پنج سر رت در هر قفس) و تحت شرایط استاندارد آزمایشگاهی شامل دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. رت‌ها با جیره استاندارد آزمایشگاهی حاوی ۱۲ درصد چربی، ۲۸ درصد پروتئین، ۵۷ درصد کربوهیدرات و ۳ درصد سایر مواد مغذی تغذیه شده و به آب آشامیدنی دسترسی آزاد داشتند. تمامی مراحل آزمایش مطابق با دستورالعمل مؤسسه ملی سلامت آمریکا (NIH) برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. همچنین، کلیه پروتکل‌های تجربی توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی با کد اخلاق IR.IAU.BEHBAHAN.۱۴۰۳.۱۲۲مورد تأیید قرار گرفت.

پروبیوتیک مورد مطالعه: سویه استاندارد *Lactobacillus delbrueckii* (PTCC ۱۷۴۳) از مرکز کلکسیون تیپ میکروارگانیسم‌های ایران تهیه شد. باکتری در محیط de Man–Rogosa–Sharpe (MRS) broth در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به‌مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط میکروآئروفیل در جار بی‌هوازی کشت داده شد. پس از رسیدن به فاز لگاریتمی رشد، سلول‌ها با سانتریفیوژ جمع‌آوری و دو بار با PBS استریل شستشو داده شدند. سپس در PBS استریل سوسپانسیون شدند تا غلظت نهایی 1×10^{9} واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی لیتر(CFU/mL) حاصل شود. غلظت باکتری با استفاده از

روش شمارش کلنی (plate count) روی محیط MRS agar تأیید شد. زنده‌مانی باکتری‌ها قبل از تجویز با شمارش واحد تشکیل‌دهنده کلنی ارزیابی گردید. سوسپانسیون پروبیوتیک به‌صورت تازه و روزانه تهیه و تا زمان مصرف (حداکثر ۲ ساعت) در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۹).

تهیه محلول کلرید قلع: کلرید قلع ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$) با خلوص ≥۹۹٪ از شرکت مرک آلمان تهیه شد. به‌منظور جلوگیری از هیدرولیز و اکسیداسیون یون‌های Sn^{2+}، مقدار مورد نیاز از $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ ابتدا در حجم کمی از محلول اسید کلریدریک ۰/۰۱ مولار حل شد. سپس، درست پیش از تجویز، محلول با نرمال سالین استریل رقیق گردید تا غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر از کلرید قلع بدست آید. pHمحلول نهایی در محدوده ۴/۵ تا ۵/۵ حفظ شد. محلول به‌صورت تازه و روزانه تهیه و بلافاصله مصرف شد. تمامی مراحل تهیه و نگهداری محلول در ظروف تیره، دور از نور انجام شد تا از اکسیداسیون یون‌های Sn^{2+} جلوگیری شود (۲۰).

روش تیمار رت‌ها: پس از یک هفته دوره سازگاری، حیوانات به‌صورت تصادفی در چهار گروه آزمایشی تقسیم شدند:

گروه I کنترل: رت‌هابه‌مدت چهار هفته، روزانه ۱ میلی لیتر محلول نرمال سالین را به‌صورت گاواژ خوراکی دریافت کردند.

گروه II پروبیوتیک: رت‌ها به‌مدت چهار هفته، روزانه ۱ میلی لیتر سوسپانسیون لاکتوباسیلوس دلبروکی با غلظت ۱×۱۰^{۹} واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی لیتر را از طریق گاواژ خوراکی دریافت کردند.

گروه III ($SnCl_2$): رت‌ها کلرید قلع را با دُز ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز و به‌صورت گاواژ خوراکی به‌مدت چهار هفته دریافت کردند (حجم مورد استفاده بر اساس وزن رت‌ها ۱-۰/۷۵ میلی لیتر بود).

گروه IV پروبیوتیک+$SnCl_2$: رت‌ها روزانه به‌طور همزمان کلرید قلع (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و لاکتوباسیلوس دلبروکی (با غلظت ۱×۱۰^{۹} واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی لیتر) را از طریق گاواژ خوراکی (۱ میلی لیتر پروبیوتیک +۱-۰/۷۵ میلی لیتر محلول کلرید قلع) و به‌مدت چهار هفته دریافت کردند.

در این مطالعه، محاسبه پیشینِ اندازه نمونه یا آنالیز توان آماری (a priori statistical power analysis) انجام نشد و تعداد نمونه‌ها در هر گروه با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی به‌منظور به حداقل رساندن استفاده از حیوانات آزمایشگاهی تعیین شد (۲۱، ۲۲). دُز کلرید قلع ($SnCl_2$) و رژیم تجویز پروبیوتیک بر اساس مطالعات تجربی منتشرشده پیشین در زمینه مواجهه خوراکی رت‌ها با کلرید قلع (۲۳، ۲۴) و نیز تجویز پروبیوتیک در مدل‌های جوندگان مبتلا به آسیب کبدی (۱۹، ۲۵) انتخاب شد و با اِعمال اصلاحات جزئی، متناسب با اهداف مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت.

نحوه توزیع در قفس‌ها و پایش رت‌ها: پیش از آغاز مراحل آزمایش، تمامی رت‌ها به‌منظور شناسایی انفرادی با استفاده از روش شماره‌گذاری گوش، علامت‌گذاری شدند. به‌منظور به حداقل رساندن سوگیری‌های ناشی از «اثر قفس»، از روش قرعه‌کشی دستی برای تصادفی‌سازی ساده استفاده گردید. رت‌ها به‌صورت گروه‌های ۵تایی در قفس‌های موجود توزیع شدند، به‌طوری که هر قفس شامل ترکیبی از حیواناتِ گروه‌های مختلف آزمایش بود. هیچ قفسی به‌طور اختصاصی به یک گروه تیمار خاص تعلق نیافت تا عوامل محیطی هر قفس، نتایج آزمایش و اثرات تیمارها را مخدوش نکند.

در طول دوره چهار هفته‌ای مطالعه، حیوانات به‌صورت روزانه از نظر وضعیت عمومی سلامت، مرگ‌ومیر، تغییرات رفتاری و علائم بالینی سمیت مورد پایش قرار گرفتند. وزن بدن حیوانات به‌صورت هفتگی اندازه‌گیری شد و میزان مصرف آب و غذا نیز به‌طور منظم ثبت گردید.

جمع‌آوری بافت کبد و ارزیابی هیستوپاتولوژیک: در پایان دوره‌ی تیمار، حیوانات به‌مدت یک شب (۱۲ تا ۱۴ ساعت) ناشتا نگه داشته شدند و دو روز پس از آخرین گاواژ،

معدوم‌سازی شدند. این فاصله زمانی به‌منظور کاهش اثرات حاد ناشی از آخرین تجویز، از جمله پاسخ‌های استرسی مرتبط با گاواژ و نوسانات کوتاه‌مدت در شاخص‌های مولکولی و بافتی، در نظر گرفته شد. بیهوشی با تزریق داخل صفاقی کتامین (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) القا شد. پس از بیهوشی، بافت‌های کبدی با دقت خارج شده و با محلول بافر فسفات سالین سرد (PBS) شستشو داده شدند. بخش‌هایی از بافت کبد که برای بررسی‌های هیستوپاتولوژیک در نظر گرفته شده بودند، بلافاصله در محلول فرمالین بافر خنثی ۱۰ درصد به‌مدت حداقل ۴۸ ساعت تثبیت شدند. سپس، نمونه‌ها از طریق غلظت‌های افزایشی اتانول (۷۰ تا ۱۰۰ درصد) آب‌گیری شده، در زایلن شفاف‌سازی گردیده و در پارافین قالب‌گیری شدند. برش‌هایی به ضخامت ۴ تا ۵ میکرومتر از بلوک‌های پارافینی با استفاده از میکروتوم چرخشی اتوماتیک تهیه شد. مقاطع بافتی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E)رنگ‌آمیزی و شماره‌گذاری شدند. سپس به‌وسیله میکروسکوپ نوری از نظر تغییرات هیستوپاتولوژیک شامل دژنراسیون هپاتوسیت‌ها، نفوذ سلول‌های التهابی، احتقان عروقی و تغییرات بافت، توسط یک آسیب‌شناس که از گروه‌بندی نمونه‌ها آگاهی نداشت، مورد بررسی قرار گرفتند. برای ارزیابی هیستوپاتولوژیک، از هر حیوان ۴ مقطع کبدی تهیه و حداقل ۸ میدان میکروسکوپی غیرهم‌پوشان از هر مقطع با بزرگنمایی‌های ۴۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ بررسی شد. میدان‌های بررسی‌شده به‌صورت تصادفی از نواحی قابل ارزیابی انتخاب شدند.

استخراج RNA و سنجش بیان ژن: به‌منظور انجام مطالعات مولکولی، نمونه‌های بافت کبد بلافاصله منجمد شده و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. RNA از بافت‌های کبدی هموژنیزه‌شده با استفاده از کیت GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx®، هلند) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد. غلظت و خلوص RNA استخراج‌شده با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید. سپس DNA مکمل (cDNA) از RNA خالص‌شده با استفاده از کیت PrimeScript™ RT Reagent Kit (TaKaRa، ژاپن) و بر اساس دستورالعمل سازنده سنتز شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های PP2CA، rMTF1 و GAPDH (جدول ۱) از مطالعات منتشرشده‌ی قبلی (۳، ۷) انتخاب و به‌منظور اعتبارسنجی آن‌ها، کارایی هر جفت آغازگر با استفاده از رقت‌های سریالی cDNA ارزیابی شد. سپس واکنش qRT-PCR با استفاده کیت SYBR Green chemistry (Ampliqon، دانمارک) در دستگاه ABI StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems، امریکا) انجام شد و سطوح بیان ژن‌های rPP2CA و rMTF1، پس از تایید کارایی آغازگرها، مورد ارزیابی قرار گرفت. برنامه تکثیر شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه بود. در پایان هر واکنش، آنالیز منحنی ذوب (Melting curve) به‌منظور تأیید اختصاصیت تکثیر انجام شد. ژن GAPDH به‌عنوان ژن مرجع (Housekeeping gene) برای نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه، هر گروه آزمایشی شامل پنج نمونه زیستی مستقل (n =۵)بود و تمامی واکنش‌های qRT-PCR برای هر نمونه در سه تکرار تکنیکی انجام شدند. به‌منظور اطمینان از صحت نتایج و جلوگیری از ایجاد سیگنال‌های کاذب ناشی از آلودگی‌های احتمالی، کنترل بدون الگو (No-template control) و کنترل بدون رونویسی معکوس (No-RT control) در تمامی واکنش‌های qRT-PCR در نظر گرفته شدند. میزان نسبی بیان ژن‌ها با استفاده از روش مقایسه‌ای ۲^-ΔΔCt محاسبه و به‌صورت تغییرات چندبرابری (Fold Change) نسبت به گروه کنترل

بیان شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن	توالی فوروارد	توالی ریورس	طول محصول
r-PP2CA	GACTATGTGGACAGAGGATATTAC	CAAGGCAGTGAGAGGAAGG	۲۲۲
r-MTF1	TTAGACGAAGCTTGGGCTGCAGG	CAATGTTTCTTGGCATGGGTGTG	۱۱۵
r-GAPDH	GCAAGTTCAACGGCACAGTCAAG	ACATACTCAGCACCAGCATCA CC	۱۲۴

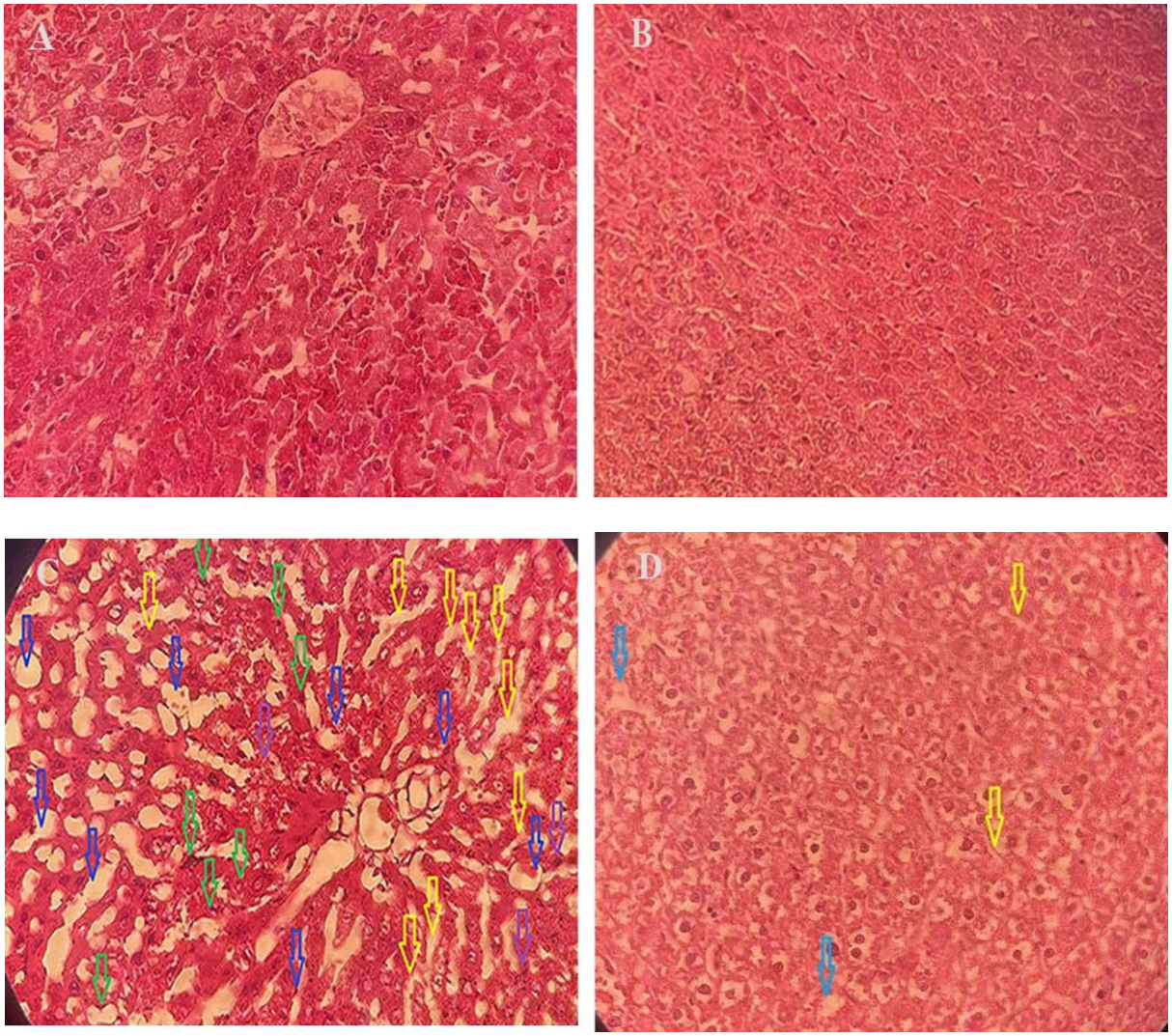
آنالیز آماری: آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prismنسخه ۱۰.۵.۰ (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) ارائه شدند. تفاوت‌ها بین گروه‌های آزمایشی با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و به‌دنبال آن آزمون (Tukey's multiple comparison post hoc test) بررسی شد. مقدار P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

ارزیابی وضعیت عمومی رت‌ها: در طول دوره آزمایش، هیچ موردی از مرگ‌ومیر یا علائم آشکار سمیت از جمله بی‌حالی، کاهش فعالیت، تغییرات رفتاری یا سایر نشانه‌های بالینی در هیچ‌یک از گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد. همچنین، تغییرات وزن بدن و وزن نسبی کبد بین گروه‌های مختلف، اختلاف آماری معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).

ارزیابی هیستوپاتولوژیک بافت کبد: تصاویر ارائه‌شده در شکل ۱، نماینده‌ای از تغییرات بافت‌شناسی مشاهده‌شده در هر گروه آزمایشی هستند. بررسی هیستوپاتولوژیک برش‌های کبدی گروه کنترل (شکل A۱) و گروه دریافت‌کننده لاکتوباسیلوس دلبروکی (شکل B۱) نشان داد که ساختار طبیعی کبد حفظ شده است؛ که با آرایش منظم طناب‌های کبدی، هپاتوسیت‌های سالم، ورید مرکزی طبیعی و فضاهای سینوزوئیدی منظم مشخص می‌شود. هیچ‌گونه نشانه‌ای از التهاب، احتقان یا دژنراسیون سلولی در این گروه‌ها مشاهده نشد. در مقابل، رت‌های مواجه‌شده با کلرید قلع تغییرات هیستوپاتولوژیک از جمله التهاب کبدی، اتساع سینوزوئیدها، آتروفی سلول‌های کبدی، واکوئولیزاسیون سیتوپلاسمی و احتقان عروقی نشان دادند (شکل C۱).

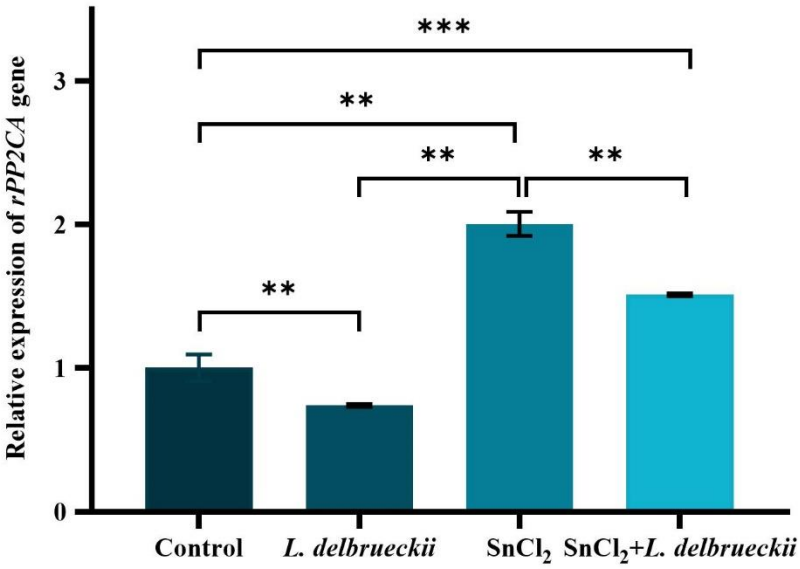
همزمانی تجویز لاکتوباسیلوس دلبروکی با کلرید قلع با تغییراتی در نمای بافت‌شناسی کبد همراه بود. در برش‌های کبدی گروه تیمار ترکیبی، برخی ویژگی‌های بافتی شامل حضور محدود سلول‌های التهابی، احتقان عروقی و تغییرات ساختاری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کلرید قلع مشاهده شد. همچنین، تغییراتی در میزان دژنراسیون هپاتوسیتی، اتساع سینوزوئیدی و واکوئولیزاسیون در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کلرید قلع مشاهده گردید (شکل D۱).



شکل ۱- بررسی هیستوپاتولوژیک برش‌های کبدی از گروه‌های آزمایشی (بزرگنمایی ۴۰×). A) گروه کنترل (بدون تیمار)؛ B) گروه دریافت‌کننده لاکتوباسیلوس دلبروکی ؛C) گروه دریافت‌کننده کلرید قلع؛ D) گروه دریافت‌کننده همزمان کلرید قلع و لاکتوباسیلوس دلبروکی. فلش آبی: واکوئولیزاسیون سیتوپلاسمی، فلش بنفش: آتروفی سلولی، فلش زرد: اتساع سینوزوئیدی، فلش سبز: التهاب.

اثر لاکتوباسیلوس دلبروکی بر بیان ژن rPP2CA:

آنالیز qRT-PCR تفاوت‌های معنی‌داری را در بیان ژن rPP2CAبین گروه‌های آزمایشی نشان داد (شکل ۲). رت‌های تیمار شده با لاکتوباسیلوس دلبروکی به‌تنهایی، در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌داری در بیان rPP2CA نشان دادند (۰/۰۱ ± ۰/۷۴ در مقابل ۰/۰۹ ± ۱/۰۰، P<۰/۰۱). تجویز $SnCl_2$ موجب افزایش معنی‌دار بیان rPP2CA شد و سطح آن تقریباً دو برابر گروه کنترل رسید (۰/۰۸ ± ۲/۰۰ در مقابل ۰/۰۹ ± ۱/۰۰، P<۰/۰۱). تجویز همزمان لاکتوباسیلوس دلبروکی با $SnCl_2$ افزایش القاشده توسط $SnCl_2$ در بیان rPP2CA را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. سطح بیان نسبی rPP2CA در گروه دریافت‌کننده ترکیبی (قلع+ لاکتوباسیلوس دلبروکی) به حدود ۰/۰۱ ± ۱/۵۰ کاهش یافت که در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی قلع، کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۱). با این حال، بیان *rPP2CA* در گروه تیمار ترکیبی همچنان به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل (P<۰/۰۱)و گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک به‌تنهایی (P<۰/۰۱) باقی‌ماند.

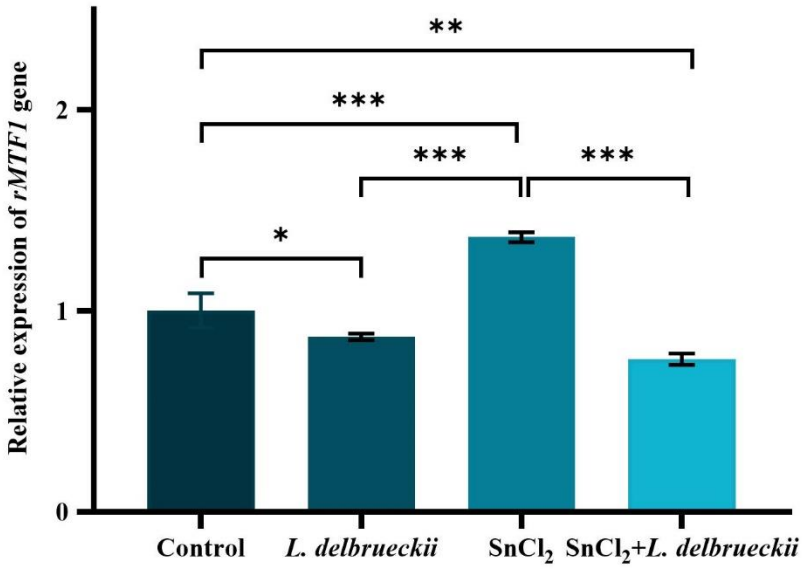


شکل ۲. تغییرات سطح بیان ژن rPP2CA در بافت کبدی چهار گروه از رت‌ها: (۱) گروه کنترل، (۲) گروه دریافت‌کننده لاکتوباسیلوس دلبروکی (*L. delbrueckii*)، (۳) گروه مواجه‌شده با کلرید قلع ($SnCl_2$) و (۴) گروه دریافت‌کننده همزمان کلرید قلع و لاکتوباسیلوس دلبروکی. هر گروه آزمایشی شامل پنج نمونه زیستی مستقل بود و تمامی واکنش‌ها برای هر نمونه در سه تکرار تکنیکی انجام شدند. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند (*P<۰/۰۰۱ ؛ **P<۰/۰۱).**

اثر لاکتوباسیلوس دلبروکی بر بیان ژن rMTF1:

سطوح بیان نسبی rMTF1 در گروه‌های آزمایشی در شکل ۳ ارائه شده است. آنالیز qRT-PCR نشان داد که مواجهه با کلرید قلع در مقایسه با گروه کنترل موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن rMTF1 شد (۰/۰۳ ± ۱/۳۷ در مقابل ۰/۰۸ ± ۱/۰۰، P<۰/۰۱) که نشان‌دهنده فعال شدن مسیرهای رونویسی پاسخ‌دهنده به فلزات در اثر استرس ناشی از فلزات سنگین است.

تجویز لاکتوباسیلوس دلبروکی به‌تنهایی باعث کاهش معنی‌دار بیان *MTF1* در مقایسه با گروه کنترل شد (۰/۰۲ ± ۰/۸۷ در مقابل ۰/۰۹ ± ۱/۰۰، P<۰/۰۵). علاوه‌بر این، تیمار همزمان با لاکتوباسیلوس دلبروکی افزایش القاشده توسط قلع در بیان rMTF1 را به‌طور قابل توجهی کاهش داد و سطح بیان را به ۰/۰۳ ± ۰/۷۶ رساند. این مقدار به‌طور معنی‌داری کم‌تر از گروه دریافت‌کننده قلع بود (P<۰/۰۱) و همچنین از گروه کنترل نیز پایین‌تر بود (P<۰/۰۵).



شکل ۳. تغییرات سطح بیان ژن rMTF1 در بافت کبدی چهار گروه از رت‌ها: (۱) گروه کنترل، (۲) گروه دریافت‌کننده لاکتوباسیلوس دلبروکی (*L. delbrueckii*)، (۳) گروه مواجه‌شده با کلرید قلع ($SnCl_2$) و (۴) گروه دریافت‌کننده همزمان کلرید قلع و لاکتوباسیلوس دلبروکی. هر گروه آزمایشی شامل پنج نمونه زیستی مستقل بود و تمامی واکنش‌ها برای هر نمونه در سه تکرار تکنیکی انجام شدند. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند (***P<۰/۰۰۱ ؛ **P<۰/۰۱، *P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر اثرات لاکتوباسیلوس دلبروکی بر تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد و الگوهای بیان ژن‌های rPP2CA وrMTF1 را در رت‌های مواجه‌شده با آسیب کبدی ناشی از کلرید قلع ($SnCl_2$) بررسی کرد. یافته‌ها نشان دادند که مواجهه با $SnCl_2$ با بروز تغییرات بافت‌شناسی کبد، از جمله حضور سلول‌های التهابی، تغییرات سینوزوئیدی، تغییرات مورفولوژیک هپاتوسیت‌ها و واکوئولیزاسیون سیتوپلاسمی همراه بود. در گروه دریافت‌کننده همزمان کلرید قلع و لاکتوباسیلوس دلبروکی، الگوی متفاوتی از تغییرات هیستوپاتولوژیک در مقایسه با گروه دریافت‌کننده $SnCl_2$ مشاهده شد که همراه با تغییر در الگوی بیان ژن‌های *rPP2CA* و rMTF1 بود. این یافته‌ها می‌تولند نشان‌دهنده‌ی نقش بالقوه‌ی این پروبیوتیک در تعدیل پاسخ‌های مرتبط با استرس سلولی باشد، اگرچه تأیید اثر محافظتی آن نیازمند ارزیابی‌های کمی و مطالعات تکمیلی است.

تغییرات هیستوپاتولوژیک مشاهده‌شده در گروه دریافت‌کننده $SnCl_2$ در مطالعه حاضر، با گزارش‌های پیشین در زمینه اثرات سمی ترکیبات فلزی هم‌خوانی دارد. مطالعات نشان داده اند تجمع یون‌های فلزی موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شده و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدها، اختلال عملکرد میتوکندری، آسیب DNA و فعال‌سازی مسیرهای پیش‌التهابی را به‌دنبال دارد (۲،۳). از آنجا که کبد اندام اصلی در متابولیسم و سم‌زدایی است، در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از عوامل محیطی حساسیت بالایی دارد. بنابراین مشاهده تغییراتی مانند دژنراسیون هپاتوسیتی و نفوذ سلول‌های التهابی در نمونه‌های کبدی می‌تولند با ایجاد شرایط اکسیداتیو و التهابی پس از مواجهه با قلع مرتبط باشد.

یکی از یافته‌های مهم این مطالعه افزایش معنی‌دار بیان ژن rPP2CA پس از تجویز $SnCl_2$ بود. PP2A یک فسفاتاز سرین/ترئونین بسیار محافظت‌شده است که در

فرآیندهای متعددی از جمله انتقال پیام، آپوپتوز، سازگاری با استرس و حفظ هموستاز سلولی نقش دارد (۱، ۶). PP2A به عنوان تنظیم‌کننده‌ی مرکزی شبکه‌های پیام‌رسانی وابسته به فسفریلاسیون عمل کرده و در کنترل پاسخ‌های سلولی به استرس اکسیداتیو و محرک‌های التهابی نقش دارد. مطالعات اخیر نیز بر نقش آن در تنظیم مسیرهای پاسخ به استرس و حفظ تعادل سیگنالینگ داخل سلولی در شرایط پاتولوژیک تأکید کرده‌اند. (۲۶، ۲۷).

افزایش بیان rPP2CA در گروه دریافت‌کننده قلع ممکن است یک پاسخ جبرانی سلولی برای محدود کردن فعال‌سازی بیش از حد مسیرهای مرتبط با استرس باشد. مطالعات پیشین گزارش کرده‌اند استرس اکسیداتیو می‌تواند دینامیک فسفریلاسیون را تغییر داده و مکانیسم‌های بازگرداننده هموستاز سلولی را فعال کند. بنابراین افزایش PP2A ممکن است بیانگر یک پاسخ تطبیقی به آسیب ناشی از فلزات و سیگنالینگ التهابی باشد (۲۸).

جالب توجه اینکه تجویز لاکتوباسیلوس دلبروکی بیان *rPP2CA*را هم در حیوانات سالم و هم در رت‌های مواجه‌شده با $SnCl_2$ به‌طور معنی‌داری کاهش داد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها می‌توانند استرس اکسیداتیو را کاهش داده، تولید سایتوکاین‌های التهابی را تنظیم کنند و تعادل ردوکس سلولی را بهبود بخشند، در نتیجه فعال‌سازی مسیرهای پاسخ‌دهنده به استرس را کاهش دهند (۹، ۱۸).

یافته مهم دیگر این مطالعه افزایش معنی‌دار بیان *rMTF1*پس از مواجهه با $SnCl_2$ بود. MTF1 یک فاکتور رونویسی حساس به فلز است که در تنظیم ژن‌های مرتبط با هموستاز فلزات، دفاع آنتی‌اکسیدانی و سازگاری سلولی با استرس فلزات سنگین نقش کلیدی دارد. فعال‌سازی MTF1موجب افزایش رونویسی متالوتیونئین‌ها و سایر پروتئین‌های محافظتی می‌شود که در سم‌زدایی فلزات نقش دارند (۷،۹). بنابراین افزایش بیان *rMTF1* می‌تواند نشان‌دهنده فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی درون‌زا در پاسخ به استرس ناشی از قلع باشد.

یکی از یافته‌های مطالعه حاضر، کاهش بیان ژن rMTF1در گروه دریافت‌کننده همزمان لاکتوباسیلوس دلبروکی و کلرید قلع به سطحی پایین‌تر از گروه کنترل بود. این یافته لزوماً به معنای اثر محافظتی مستقیم نیست و باید با احتیاط تفسیر شود. کاهش بیان rMTF1 ممکن است ناشی از کاهش پاسخ‌های استرسی وابسته به فلز، تعدیل مسیرهای رونویسی مرتبط با استرس، یا اثر مستقیم پروبیوتیک بر تنظیم بیان ژن باشد. از آنجا که در این مطالعه میزان تجمع قلع، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و بیان پروتئینی MTF1 مورد بررسی قرار نگرفت، تعیین سازوکار دقیق این تغییرات نیازمند مطالعات تکمیلی است. اگرچه، مطالعات قبلی نشان داده‌اند که گونه‌های لاکتوباسیلوس قادر به اتصال به فلزات سنگین در دستگاه گوارش و کاهش جذب آن‌ها هستند. همچنین پروبیوتیک‌ها می‌توانند از طریق تقویت سد روده‌ای و افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی، التهاب سیستمیک و استرس اکسیداتیو را کاهش دهند و در نتیجه فعال‌سازی مسیرهای وابسته به فلز را محدود کنند (۱۰، ۱۶). شواهد جدیدتر نیز نقش لاکتوباسیلوس‌ها را در محافظت در برابر آسیب کبدی ناشی از سموم از طریق محور روده–کبد تأیید می‌کنند (۲۵، ۲۹).

اثرات محافظت‌کننده‌ی کبدی مشاهده‌شده در این مطالعه ممکن است با مکانیسم‌های مرتبط با محور روده–کبد در ارتباط باشد، اگرچه ترکیب میکروبیوتای روده و عملکرد سد روده‌ای مورد بررسی قرار نگرفت. شواهد نشان می‌دهند که پروبیوتیک‌ها از طریق تعدیل محور روده–کبد و تقویت دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی اثرات مفیدی اعمال می‌کنند (۱۸). بهبود هموستاز میکروبی روده می‌تواند التهاب سیستمیک و استرس اکسیداتیو را کاهش دهد؛ دو عاملی که نقش مهمی در آسیب کبدی ناشی از فلزات سنگین دارند (۳۰،۳۱). در نتیجه، کاهش ضایعات کبدی و کاهش بیان ژن‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک

احتمالاً بازتابی از ترکیبی از اثرات آنتی‌اکسیدانی و تنظیم مسیرهای ارتباطی روده–کبد است (۲۵،۳۲).

نکته مهم اینکه یافته‌های مولکولی با تغییرات مشاهده‌شده در بررسی هیستوپاتولوژیک هم‌راستا بودند. مواجهه با کلرید قلع موجب ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد و افزایش بیان ژن‌های rPP2CA و rMTF1شد. از سوی دیگر، تفاوت در ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک در گروه دریافت‌کننده همزمان قلع و لاکتوباسیلوس دلبروکی با کاهش بیان هر دو ژن rPP2CA وrMTF1 همراه بود. این ارتباط نشان می‌دهد که تغییر در الگوی بیان ژن های مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به استرس می‌تواند در حفظ ساختار و عملکرد بافت کبد نقش داشته باشد. همراهی تغییرات بافتی با تغییر در بیان ژن‌های مورد مطالعه می‌تواند نشان‌دهنده وجود ارتباطی میان تجویز پروبیوتیک و پاسخ‌های سلولی مرتبط با استرس باشد. با این‌حال، به‌عنوان یک مطالعه مقدماتی، پژوهش حاضر محدودیت‌هایی دارد که باید مورد توجه قرار گیرند. در مطالعه حاضر گروه کنترل به‌جای محلول نرمال سالین-HCl مورد استفاده برای تهیه کلرید قلع، تنها نرمال سالین دریافت کرد. اگرچه محلول حامل دارای اسیدیته خفیف بود و در حجم کمی تجویز شد، بنابراین انتظار نمی‌رود به‌تنهایی اثر زیستی قابل توجهی داشته باشد، با این‌حال نمی‌توان تأثیر احتمالی آن را به‌طور کامل رد کرد. ازاین‌رو، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده از یک گروه کنترل دریافت‌کننده محلول نرمال سالین-HCl بدون کلرید قلع استفاده شود تا اثرات احتمالی حامل به‌طور کامل از اثرات کلرید قلع تفکیک گردد. همچنین در این مطالعه شاخص‌های عملکرد کبدی و نیز نشانگرهای استرس اکسیداتیو و التهاب مورد ارزیابی قرار نگرفتند؛ بنابراین، تفسیر سازوکارهای دقیق اثرات محافظتی لاکتوباسیلوس دلبروکی با احتیاط انجام می‌شود. میزان تجمع قلع در بافت کبد اندازه‌گیری نشد و در نتیجه، نقش احتمالی پروبیوتیک در کاهش جذب یا تجمع فلز قابل ارزیابی نبود. بررسی بیان ژن نیز در سطح رونوشت انجام شد و ارزیابی بیان پروتئین یا فعالیت عملکردی پروتئین‌ها صورت نگرفت.

همچنین پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، پایداری چندین ژن مرجع (مانند GAPDH، β-actin و HPRT1) با استفاده از الگوریتم‌های استاندارد بررسی شود تا مناسب‌ترین ژن یا ترکیبی از ژن‌های مرجع برای نرمال‌سازی داده‌های qRT-PCR در شرایطی مانند سمیت فلزی و استرس اکسیداتیو انتخاب شود. از دیگر محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به حجم نمونه نسبتاً کم و عدم انجام تحلیل توان آماری پیش از آغاز پژوهش اشاره کرد. از این‌رو، یافته‌های حاضر باید در چارچوب یک مطالعه مقدماتی تفسیر شوند و انجام مطالعات آینده با حجم نمونه بیش‌تر، ارزیابی شاخص‌های بیوشیمیایی، استرس اکسیداتیو، التهاب، تجمع فلز و بررسی‌های پروتئومیک برای تأیید سازوکارهای احتمالی ضروری است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از جناب آقای دکتر عیسی وفقی پاتولوژیست آزمایشگاه پاتوبیولوژی البرز، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

نگارندگان این مقاله اعلام می کنند که در رابطه با نگارش و چاپ مقاله هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. **Amin P, Awal S, Vigneron S, Roque S, Mechali F, Labbé JC, *et al.*** PP2A-B55: substrates and regulators in the control of cellular functions. Oncogene. 2022; 41(1):1-4.
2. **Günther V, Lindert U, Schaffner W.** The taste of heavy metals: gene regulation by MTF-1. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2012; 1823(9):1416-25.
3. **Wang Y, Wimmer U, Lichtlen P, Inderbitzin D, Stieger B, Meier PJ, *et al.*** Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) is essential for embryonic liver development and heavy metal detoxification in the adult liver. The FASEB journal. 2004; 18(10):1071-9.
4. **Schwabe RF, Brenner DA.** Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-α-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways**.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**.** 2006; 290:G583–G589.
5. **Reynhout S, Janssens V.** Physiologic functions of PP2A: Lessons from genetically modified mice. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2019; 1866(1):31-50.
6. **Fowle H, Zhao Z, Graña X.** PP2A holoenzymes, substrate specificity driving cellular functions and deregulation in cancer. Adv Cancer Res. 2019; 144:55-93.
7. **Rice LM, Donigan M, Yang M, Liu W, Pandya D, Joseph BK, *et al.*** Protein phosphatase 2A (PP2A) regulates low density lipoprotein uptake through regulating sterol response element-binding protein-2 (SREBP-2) DNA binding. J Biol Chem. 2014; 289(24):17268-79.
8. **Ivovič D, Kabelikova P, Jurkovičová D.** Unraveling the complexity: A comprehensive analysis of the PP2A in cancer and its potential for novel targeted therapies. Neoplasma. 2023; 70(4): 485-499.
9. **Lichtlen P, Schaffner W.** Putting its fingers on stressful situations: the heavy metal-regulatory transcription factor MTF-1. Bioessays. 2001; 23(11):1010-17. DOI: 10.1002/bies.1146.
10. **Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A.** Mechanisms of action of probiotics. Adv nutr. 2019; 10(suppl_1):S49-66. DOI: 10.1093/advances/nmy063.
11. **Kern L, Tofield A, Frame J, Elinav E.** Next-generation probiotics: an outlook into current applications and future developments. Nat Rev Microbiol. 2026; 8:1-20.
12. **Qi Y, Li L, Wei Y, Ma F.** PP2A as a potential therapeutic target for breast cancer: Current insights and future perspectives. Biomed Pharmacother. 2024; 173:116398.
13. **Şirin S.** Lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides mitigate the oxidative response via the NRF2-KEAP1 pathway in PC12 cells. Curr Issues Mol Bio. 2023; 45(10):8071-90.
14. **Zhang X, Xia Y, Ji F.** Lactobacillaceae in Acute and Chronic Liver Diseases: From Microbiota Modulation to Therapeutic Potential. Probiotics Antimicrob Proteins. 2026; 30:1-20.
15. **Markowiak P, Śliżewska K.** Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. Nutrients. 2017; 9(9):1021.
16. **Darbandi A, Navidifar T, Koupaei M, Afifirad R, Nezhad RA, Emamie A, *et al.*** The effect of the combination of probiotics and heavy metals from various aspects in humans: a systematic review of clinical trial studies. Health Sci Rep. 2025; 8(3):e70521.
17. **Rezazadegan M, Forootani B, Hoveyda Y, Rezazadegan N, Amani R.** Major heavy metals and human gut microbiota composition: a systematic review with nutritional approach. J Health Popul Nutr. 2025; 44(1):21-37.
18. **Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, *et al.*** Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11(8):506-14.
19. **Kim BK, Lee IO, Tan PL, Eor JY, Hwang JK, Kim SH.** Protective effect of *Lactobacillus fermentum* LA12 in an alcohol-induced rat model of alcoholic steatohepatitis. Korean J Food Sci Anim Resour. 2017; 37(6):931-39.
20. **(Younes M, Aggett P, Aguilar F, Crebelli R, Dusemund B, Filipič M, *et al*.** Re-evaluation of stannous chloride (E 512) as food additive. EFSA Journal. 2018;16(6):e05295.
21. **Festing MF, Altman DG.** Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. ILAR Journal. 2002;43(4):244-58.
22. **Langley G, Broadhead C, Bottrill K, Combes R, Ewbank R**. Accessing information on the reduction, refinement and replacement of animal experiments: Report and recommendations of a Focus on Alternatives Workshop. Altern Lab Anim. 1999;27(2):239-45.
23. **De Groot AP, Feron VJ, Til HP.** Short-term toxicity studies on some salts and oxides of tin in rats. Food Cosmet Toxicol. 1973;11(1):19-30.
24. **Yamaguchi M, Saito R, Okada S.** Dose-effect of inorganic tin on biochemical indices in rats. Toxicol. 1980;16(3):267-73.
25. **Saeedi BJ, Liu KH, Owens JA, Hunter-Chang S, Camacho MC, Eboka RU, *et al.*** Gut-resident lactobacilli activate hepatic Nrf2 and protect against oxidative liver injury. Cell Metab. 2020;31(5):956-68.
26. **Haanen III TJ, O'Connor CM, Narla G.** Biased holoenzyme assembly of protein phosphatase 2A (PP2A): From cancer to small molecules. J Biol Chem. 2022;298(12):102656.

27. **Johnson H, Narayan S, Sharma AK.** Altering phosphorylation in cancer through PP2A modifiers. Cancer Cell Int. 2024;24(1):11-28.
28. **Chen L, Guo P, Li W, Jiang X, Zhao Q, Li D, *et al.*** Protein phosphatase 2A regulates cytotoxicity and drug resistance by dephosphorylating AHR and MDR1. J Biol Chem. 2022;298(5):101918.
29. **Chen Y, Liu H, An T, Wu Q, Zhang H, Loor JJ, *et al.*** Lactobacillus intestinalis/Lactobacillus rhamnosus protects against AFB1-induced liver damage: involvement of intestinal mucosal barrier. One Health Adv. 2023;1(1):24-36. DOI: 10.1186/s44280-023-00023-x.
30. **Duan H, Yu L, Tian F, Zhai Q, Fan L, Chen W.** Gut microbiota: a target for heavy metal toxicity and a probiotic protective strategy. Sci Total Environ. 2020;742:140429.
31. **Hsu CL, Schnabl B.** The gut–liver axis and gut microbiota in health and liver disease. Nat Rev Microbiol. 2023 ;21(11):719-33. DOI: 10.1038/s41579-023-00904-3.
32. **Pabst O, Hornef MW, Schaap FG, Cerovic V, Clavel T, Bruns T.** Gut–liver axis: barriers and functional circuits. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2023;20(7):447-61.

New Findings in Veterinary Microbiology
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Quarterly - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 9, Issue 3, Autumn 2026, pages: 1-14

Effect of *Lactobacillus delbrueckii* on the Expression Pattern of PP2CA and MTF1 Genes in Tin Chloride-Induced Liver Injury in Rats

Narges Alipour Saqa[1], Leila Asadpour[2*], Najmeh Ranji[3]

1- PhD Student, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

2- Department of Biology, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran.

3- PhD Student, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

***Corresponding author**: Leila Asadpour, Associate Professor in Microbiology.
Address: Rasht, Pole taleshan, Rasht Branch Islamic azad University, Department of Biology.
Email: le.asadpour@iau.ac.ir, Phone: +989113383860
ORCID of corresponding author: 0000-0002-8437-0337

Receive: June 26, 2026; Revise: August 07, 2026; Accept: August 21, 2026

10.22034/NFVM.2026.588260.1320

Abstract

This study examined the potential protective effects of *Lactobacillus delbrueckii* against tin chloride ($SnCl_2$)-induced liver toxicity in rats, focusing on liver histology and the gene expression of Protein Phosphatase 2A catalytic subunit (PP2CA) and Metal Regulatory Transcription Factor-1 (MTF1), both of which are involved in cellular stress and metal detoxification responses. Twenty male Wistar rats were divided into four groups: control, probiotic-only, $SnCl_2$ -only, and $SnCl_2$ combined with *L. delbrueckii*. Treatments were administered orally for four weeks. Liver tissues were then analyzed histologically, and rPP2CA and rMTF1 expression levels were measured using qRT-PCR. Exposure to tin chloride was associated with histopathological changes in the liver, including the presence of inflammatory cells, sinusoidal alterations, and morphological changes in hepatocytes. Gene expression analysis revealed that tin chloride significantly increased the expression levels of rPP2CA and rMTF1 genes compared with the control group ($P < 0.01$). In the group receiving a combination of *L. delbrueckii* and tin chloride, differences in hepatic histopathological characteristics and a significant reduction in the expression of both genes were observed compared with the tin chloride-treated group ($P < 0.01$). Furthermore, administration of the probiotic alone resulted in decreased expression of these genes compared with the control group ($P < 0.01$). Overall, *L. delbrueckii* may play a role in reducing liver injury through the modulation of cellular stress-related responses; however, further studies are required to elucidate the precise mechanisms underlying these effects.

Keywords: *Lactobacillus delbrueckii; tin chloride; hepatotoxicity; rPP2CA; rMTF1*