



Università Politecnica delle Marche
Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente
Corso di Laurea in Scienze Biologiche

Modulazione del Microbiota intestinale e dei metaboliti butirrati da parte del *Clostridium butyricum*: effetti sull'infiammazione mediata dalla microglia nella malattia di Alzheimer

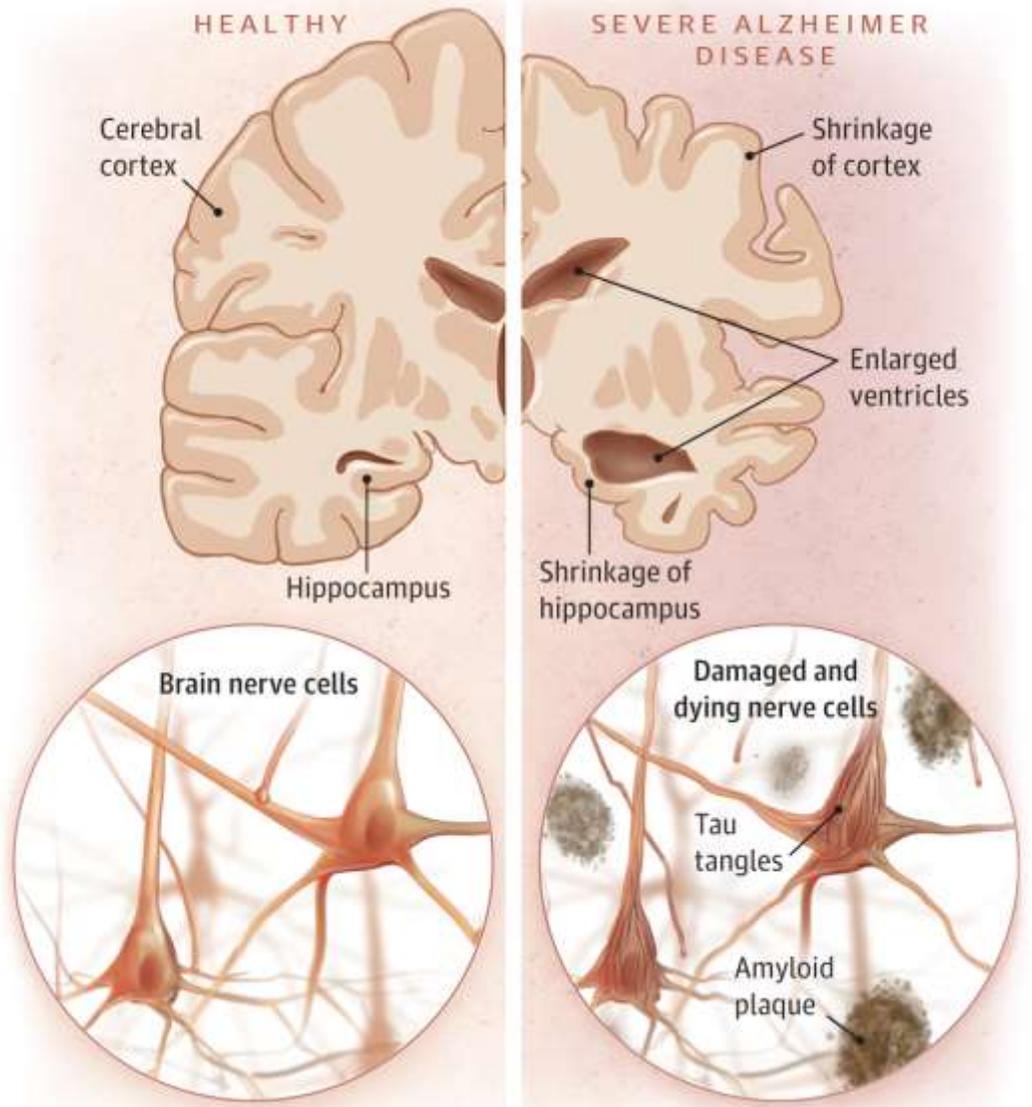
Effect of *Clostridium butyricum* against Microglia-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's Disease via Regulating Gut Microbiota and Metabolites Butyrate

Laureando :
Cinosi Ylenia

Relatore:
Dott. Maradonna Francesca

Sessione Autunnale
Anno Accademico 2019/20

Brain changes in Alzheimer disease

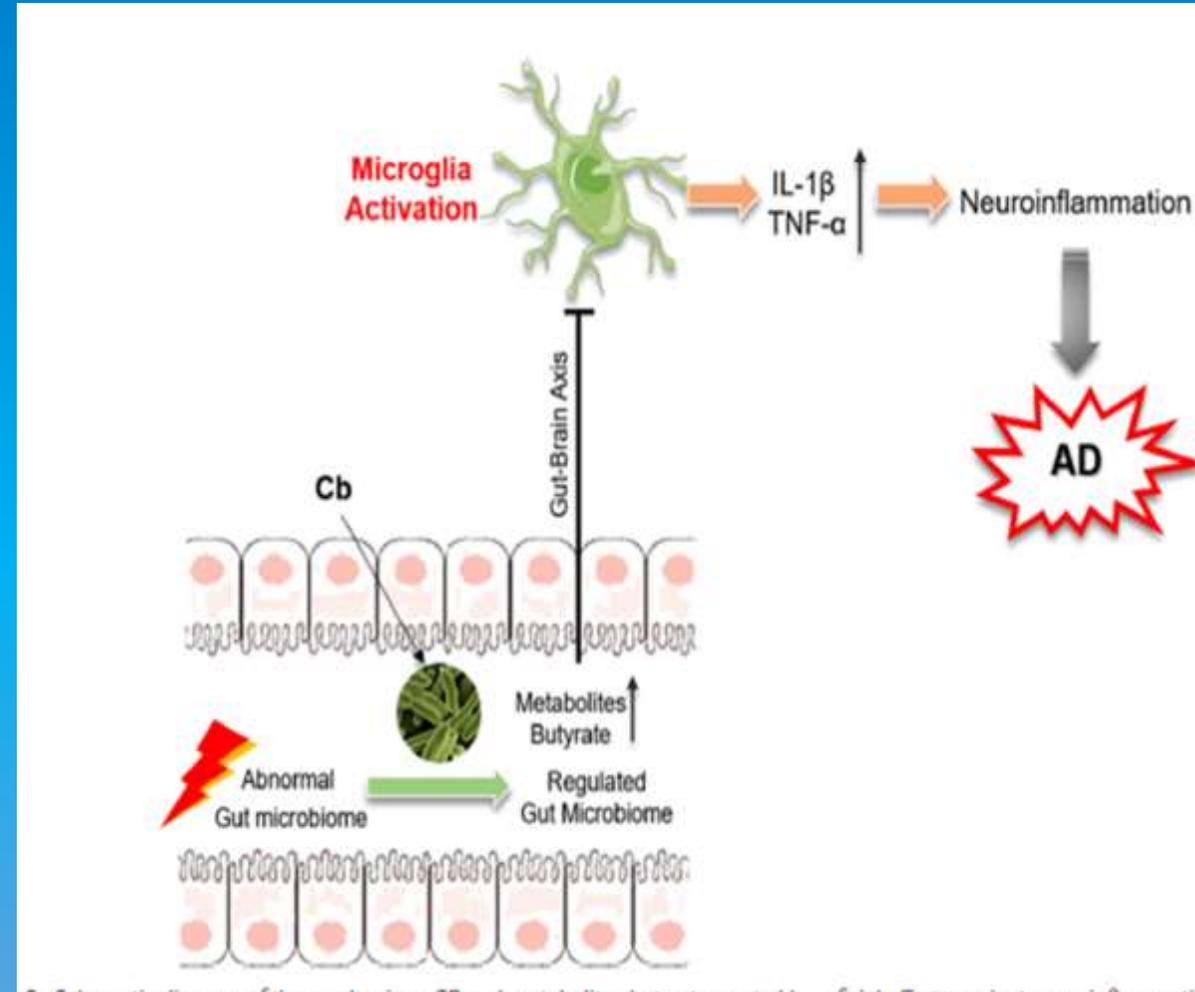


L'Alzheimer (AD) è la più frequente causa di demenza, ed è caratterizzata da depositi di beta amiloide (A) e neuro infiammazione.

Il microbiota intestinale (GM) svolge un ruolo fondamentale nell'asse intestino-cervello e nella formazione sistema immunitario nella prima infanzia. Un suo squilibrio (disbiosi) è spesso associato a varie patologie croniche e degenerative come sclerosi multipla e l'Alzheimer.

Scopo esperimento

Considerato che alterazioni del microbiota intestinale potrebbero essere coinvolte nella patogenesi del morbo di Alzheimer, lo scopo di questo studio è quello di andare a valutare il possibile effetto antinfiammatorio della somministrazione del *Clostridium butyricum* nella regolazione dell'asse intestino –cervello.



Effetto anti infiammatorio di CB

Materiale e Metodi

Topi wild type (C57BL/6 (WT): Controllo negativo, trattato con 200 ul di CMC-Na giornalieri

Topi transgenici APP/PS1:

- **Controllo:** trattato a livello intragastrico con 200 ul sodio carbossi metil-cellulosio (CMC-Na) giornalieri per 4 settimane
- **CB:** trattato con 200 ul di CB al giorno a livello intragastrico per 4 settimane (Controllo del CB)

Alla fine del trattamento a tutti i topi sono stati somministrati una serie di Test comportamentali : con il test Morris Water Maze e il test ORT per valutare un eventuale miglioramento delle capacità cognitive.

Valutazione comportamentale :

Test Morris Water Maze (MWM) :

- Piattaforma circolare con piattaforma sommersa
- Durata 5 giorni
- 6° giorno senza piattaforma



Test ORT (test di riconoscimento degli oggetti) :

- 5 giorni
- Indice di discriminazione $DI = (T_n - T_f) / (T_n + T_f)$



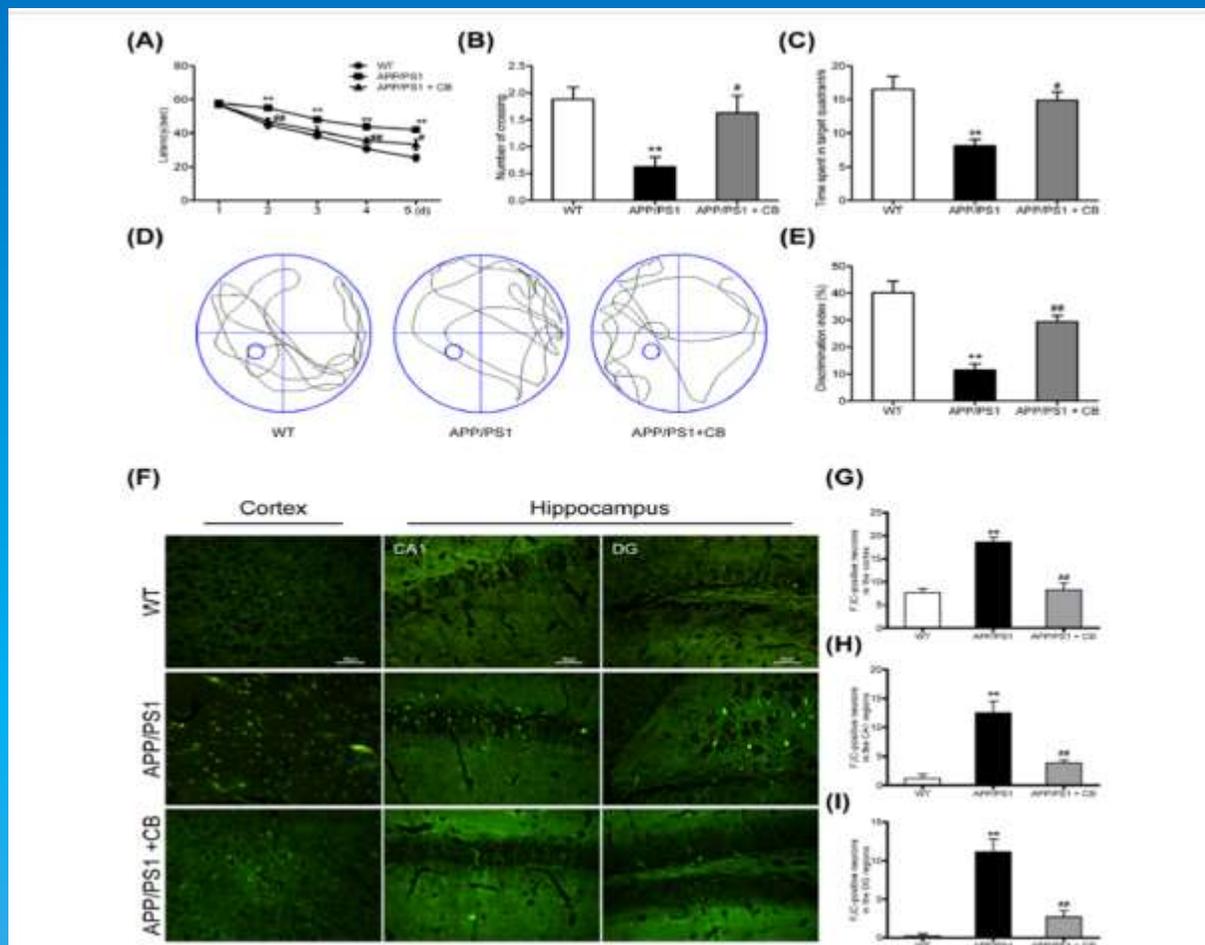
I topi sono stati poi sacrificati e sui diversi tessuti sono state effettuate le seguenti analisi:

- **Analisi istologiche :** nel cervello ed è stata effettuata la colorazione con Fluoro-Jade C (FJC) e rosso Congo .
- -Utilizzo della microscopia confocale a scansione laser per permettere visualizzazione di CD11b e valutare l'attivazione della microglia al livello del cervello.
- **Test ELISA nel cervello :**
 - A42 ($\mu\text{g mg}^{-1}$) :
 - IL1 : Interleuchine
 - TNF (pg mg^{-1}) : Fattore di necrosi tumorale



- **Analisi della composizione del microbiota fecale** : campioni fecali freschi (0,2-0,3 g per campione) sono stati raccolti dai topi. La regione V3 – V4 del gene 16S r RNA è stato amplificato utilizzando una piattaforma MiSeq 2500 Illumina . Analisi delle componenti principali (PCA) e analisi delle coordinate principali (PCoA) sono state analizzate.

Risultati:



C) Il tempo trascorso nel quadrante target. D) Il locus plot rappresentativo nel test del labirinto d'acqua di Morris. E) La discriminazione index nel test di riconoscimento degli oggetti. F) Le immagini sono rappresentative della colorazione FJC, ingrandimento 400 ×, barra della scala = 50 μm). G) Analisi quantitativa di Neuroni FJC-positivi nella corteccia. H) Analisi quantitativa dei neuroni FJC-positivi nelle regioni CA1. I) Analisi quantitativa dei neuroni FJC-positivi nelle regioni della DG.

MWM:

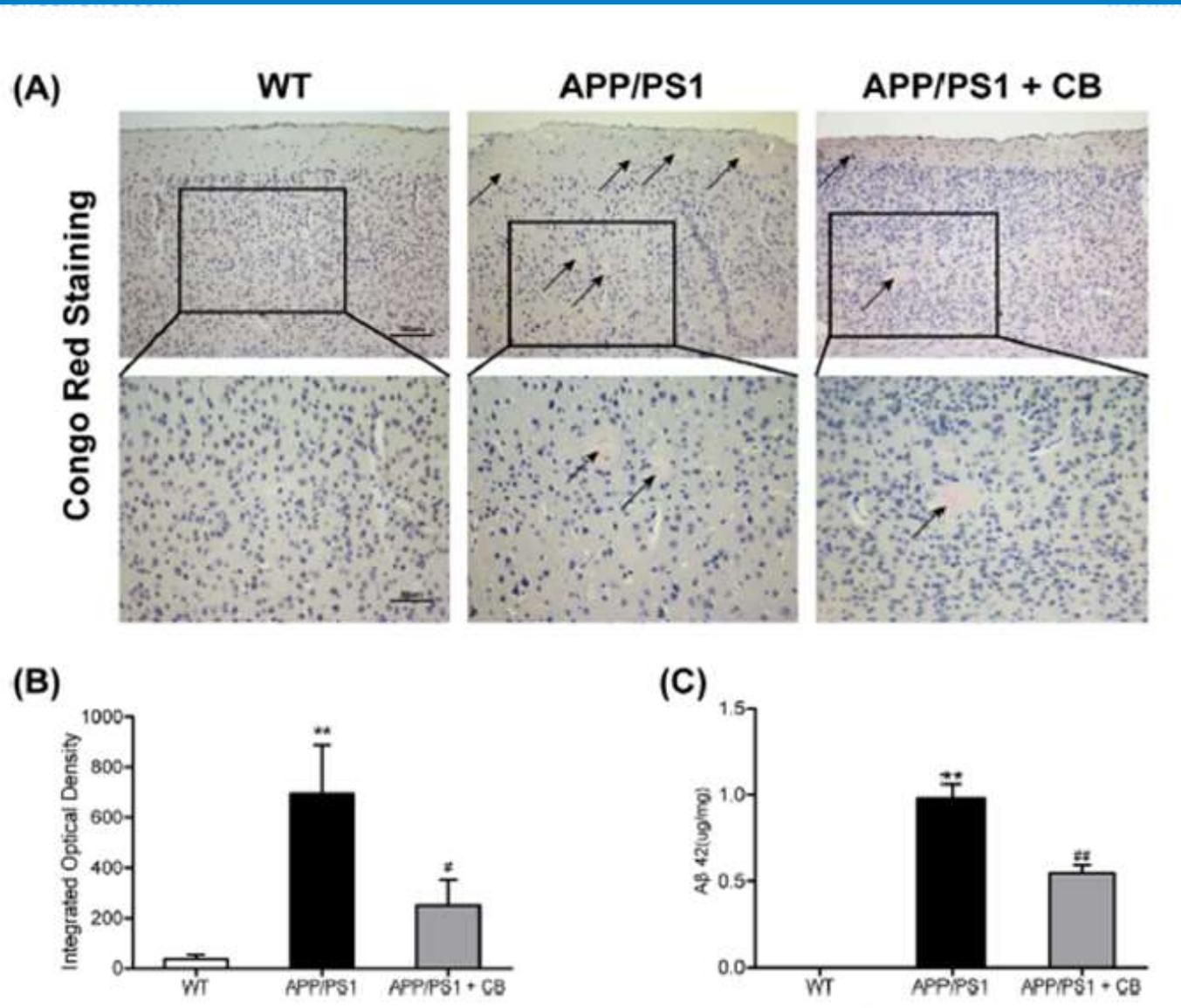
- CB ha migliorato i deficit cognitivi nei topi APP / PS1
- Nei giorni 2-5: latenza di fuga diminuita nei topi trattati con APP/PS1 (fig1A)
- 6° giorno: alto numero di topi trattati con CB che attraversa la piattaforma.(fig. 1B)
- Maggior tempo nel quadrante target

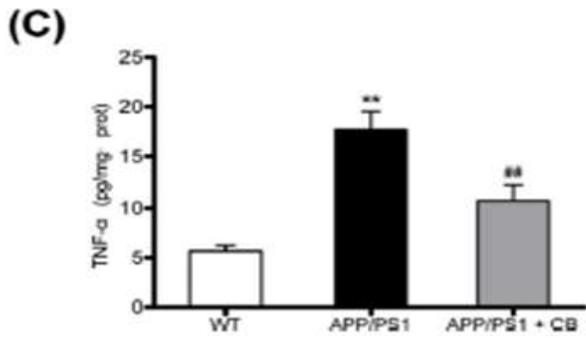
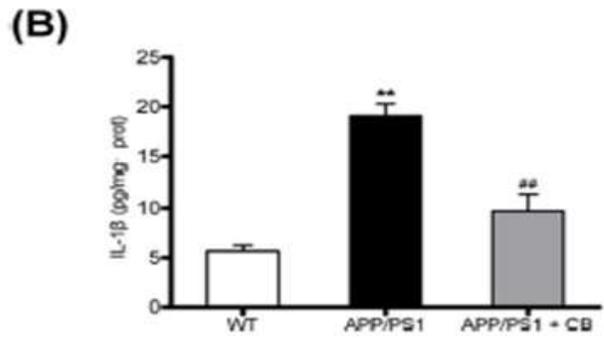
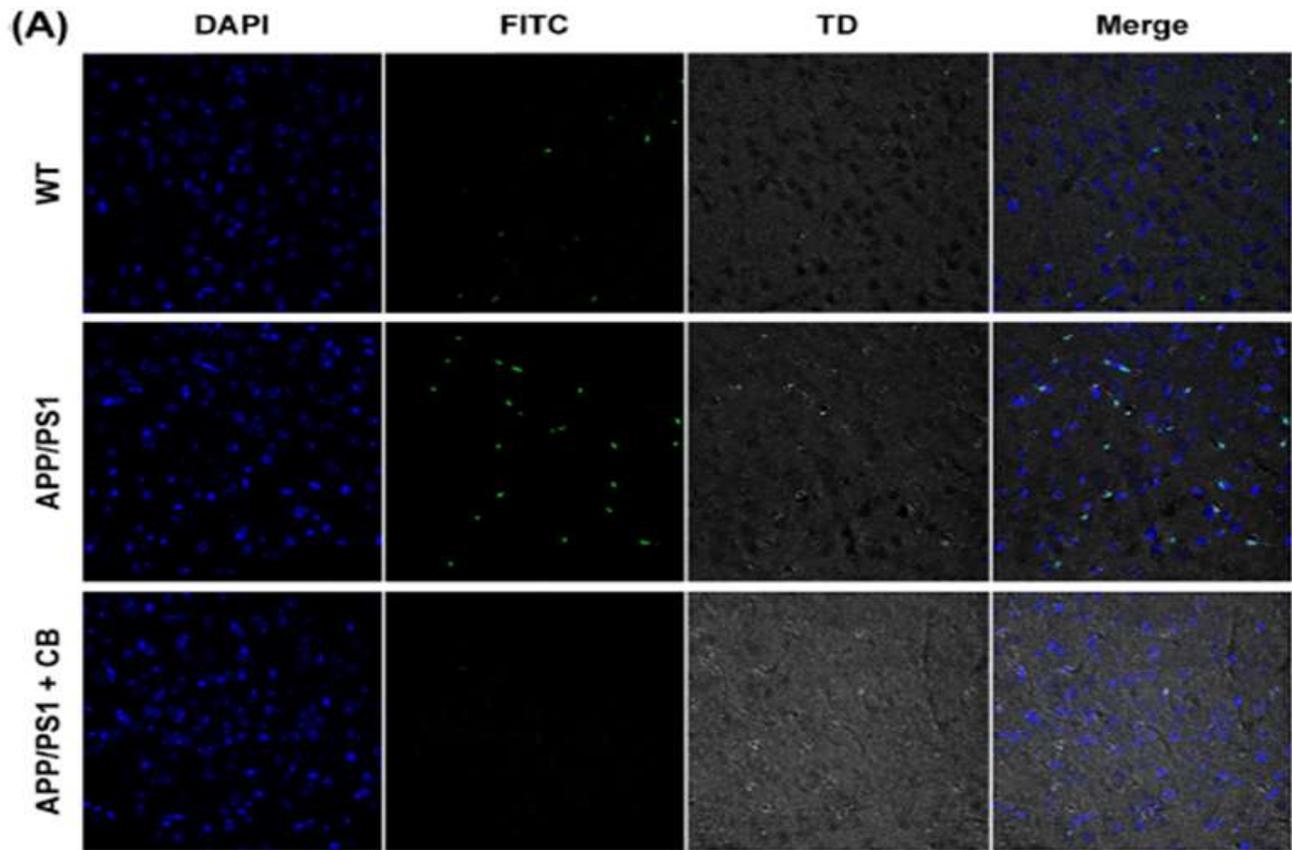
ORT:

- Riconoscimento degli oggetti nei topi trattati con CB

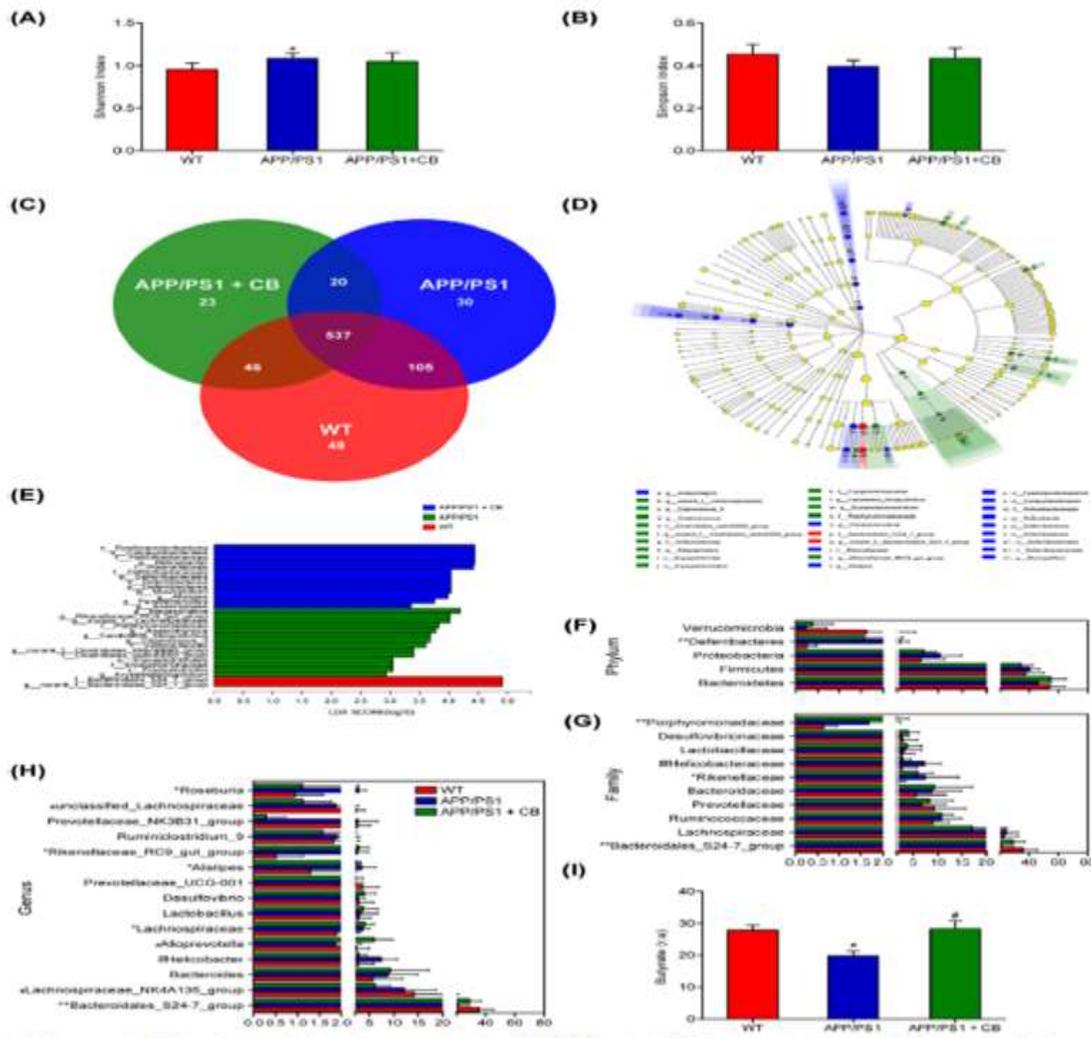
Risultati:

- Il trattamento con CB ha alleviato la deposizione di amiloide e A 42 nel cervello dei topi APP / PS1





- L'attivazione della microglia è stata soppressa dopo il trattamento con CB (Fig. 3 A).
- I livelli di IL-1 e TNF nei topi trattati sono diminuiti.



-Il trattamento con CB ha normalizzato l'anormale GM nei topi APP/PS1.

-Nessun cambiamento significativo di diversità nei topi APS/PS1 e quelli tratti con CB.

-Diminuzione di *Helicobacter* nei topi APP/PS1 non trattati.

A) l'indice di Shannon

B) l'indice di Simpson sono stati utilizzati per la stimola diversità alfa di GM.

C) Il diagramma di Venn illustra la sovrapposizione di OTU nel microbiota intestinale tra tre gruppi.

CONCLUSIONI :

Questo studio ha quindi chiarito che la somministrazione di CB :

- migliora i deficit cognitivi, agendo sull'attivazione della microglia , sulla neuro degenerazione e sulla deposizione di $A\beta$. Questo avviene attraverso il controllo della proliferazione anomala di GM e della produzione di metaboliti butirrati.

CB potrebbe essere un ottimo integratore alimentare probiotico in grado di inibire la neuro infiammazione in AD.