

The effect of probiotic supplementation on motor skills, biochemical factors and histological evaluation in a multiple sclerosis model of mouse

Zamani F¹, Salami M^{2*}, Soheili M³

1- Student Research Center of Physiology, Department of Physiology, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

2- Department of Physiology, Faculty of Medicine, Physiology Research Center, Institute for Basic Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

3- Department of Physiology, Faculty of Medicine, Physiology Research Center, Institute for Basic Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

Received: 2021/03/16 | Accepted: 2021/07/3

Abstract

Background: Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune, inflammatory, and demyelinating disease of the central nervous system (CNS) leading to some disorders including gait, balance, memory, cognition as well as pain and fatigue. This study aimed to evaluate the therapeutic effects of probiotics on behavioral disorders caused by disease and biomarkers of oxidative stress in mice fed with cuprizone.

Material and methods: In this study 45 male C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups: control group; control + probiotic group; cuprizone group and cuprizone + probiotic group. Treatment group were fed a diet containing 0.2% cuprizone to create an animal model of MS.

Results: The results of this study showed that in the motor behavior test, both healthy and MS groups receiving probiotics remained longer on the rota rod during some days of the experiment. However, probiotics could not reduce the oxidative indices in these animals.

Conclusion: Probiotic supplement can have a mild effect on improving motor phenomena and antioxidant indices in healthy or MS animals. However, to ensure that different doses of cuprizone and probiotics are needed, changes in the animal model and intervention are made.

Keywords: Multiple sclerosis, Probiotics, Oxidative stress, Staining

***Corresponding Author.**

Email: salami-m@kaums.ac.ir

Tel: 00989133612920

Fax: 00983155575057

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2021; Vol. 25, No 4, Pages 1031-1039

Please cite this article as: Zamani F, Salami M, Soheili M. The effect of probiotic supplementation on motor skills, biochemical factors and histological evaluation in a multiple sclerosis model of mouse. *Feyz* 2021; 25(4):1031-39.

بررسی اثر مکمل پروبیوتیک بر شاخص‌های حرکتی، بیوشیمیایی و بافتی در مدل حیوانی مالتیپل اسکلروزیس

فاطمه زمانی^۱، محمود سلامی^{۲*}، مسعود سهیلی^۳

خلاصه

سابقه و هدف: مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری خودایمنی و التهابی سیستم عصبی مرکزی است که به دلیل از بین رفتن میلین ایجاد می‌شود. از جمله علائم این بیماری؛ اختلال در راه رفتن، تعادل، حافظه، درد و خستگی است. این پژوهش با هدف بررسی اثرات درمانی پروبیوتیک‌ها بر اختلالات رفتاری ناشی از این بیماری و بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در موش‌های تغذیه‌شده با کوپریزون انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه روی موش سوری نر ۴۵ روزه نژاد C57BL/6 صورت گرفت که به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه CON، گروه CON+pro، گروه CPZ و گروه CPZ+pro. دو گروه دریافت‌کننده برای ایجاد مدل حیوانی MS به مدت ۶ هفته با غذای حاوی کوپریزون ۰/۲٪ تغذیه شدند. مکمل پروبیوتیک به مدت ۶ هفته گاوژ شد. موش‌ها در گروه کنترل نرمال با آب آشامیدنی تیمار شدند. از هفته سوم تا ششم به جهت ارزیابی حیوانات تست رفتاری - حرکتی rotarod انجام شد. سپس خون‌گیری جهت اندازه‌گیری میزان SOD، TAC و GPX صورت گرفت. همچنین جسم پینه‌ای مغز حیوانات به منظور مشاهده نواحی دمیلبناسیون خارج گردید و با رنگ لوکسالفست بلو (LFB) رنگ‌آمیزی شد.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد که در آزمون رفتاری - حرکتی هر دو گروه سالم و MS دریافت‌کننده پروبیوتیک نسبت به دیگر گروه‌ها در برخی از روزهای آزمایش مدت زمان بیشتری بر روی میله چرخان روتارود باقی ماندند. به‌رحال پروبیوتیک نتوانست اثر اکسیداتیو در این حیوانات را کاهش دهد.

نتیجه‌گیری: مکمل پروبیوتیک می‌تواند در حیوانات سالم و یا دارای MS اثر ملایمی در بهبود پدیده‌های حرکتی داشته باشد. با این حال، جهت اطمینان نیاز است تا با دوزهای متفاوتی از کوپریزون و پروبیوتیک، تغییراتی در مدل حیوانی و مداخله صورت گرفته، انجام پذیرد.

واژگان کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، پروبیوتیک، استرس اکسیداتیو، رنگ‌آمیزی میلین

دو ماهنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و پنجم، شماره ۴، مهر - آبان ۱۴۰۰، صفحات ۱۰۳۹-۱۰۳۱

مقدمه

یافته‌ها حاکی از آن است که در بیماران مبتلا به MS آسیب‌های گسترده‌ای در ماده خاکستری سیستم عصبی وجود دارد و باعث بروز اختلالات عصبی برگشت‌ناپذیری مثل نقص در حافظه و یادگیری و سرعت پردازش می‌شود [۲]. امروزه می‌توان با ایجاد مدل‌های حیوانی به بررسی آسیب‌های شناختی و ارتباط آن‌ها با آسیب بافتی و چگونگی درمان آن‌ها پرداخت [۳]. در سه دهه اخیر از کوپریزون برای القای مدل حیوانی MS جهت دمیلینه‌شدن اعصاب مرکزی در موش‌های سوری نژاد C57 بسیار استفاده شده است [۴]. کوپریزون یک عامل شلات‌کننده (ختشی‌کننده) مس است و اثر سمی ناشی از آن باعث مهار آنزیم‌های وابسته به مس در چرخه تنفس سلولی میتوکندری می‌شود. این مهار آنزیمی با ایجاد استرس اکسیداتیو منجر به آسیب و مرگ الیگودندروسیت‌ها شده، متعاقب آن، التهاب اعصاب و آکسون‌ها رخ می‌دهد که این عوامل نقش حیاتی در ناتوانی بیماران مبتلا به MS دارند [۵]. یکی از مهم‌ترین علل پاتوفیزیولوژی MS آسیب سلول‌های عصبی ناشی از استرس اکسیداتیو است. استرس اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و ظرفیت مکانیسم‌های آنتی‌اکسیداتیو ایجاد می‌شود [۶]. سیستم عصبی مرکزی (CNS) نسبت

مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری عصبی مزمن است که در درجه اول غلاف میلینی در سیستم عصبی مرکزی (CNS) را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این بیماری ناشی از یک اختلال خودایمنی در سیستم عصبی مرکزی است که به دنبال محرک محیطی در افراد مستعد ژنتیکی بروز می‌یابد. یکی از علائم اصلی این بیماری، خستگی است که در دو سوم افراد مبتلا وجود دارد. از دیگر علائم شایع این بیماری می‌توان به اسپاسم عضلانی، لرزش، درد و اختلال در حافظه اشاره کرد [۱].

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی پزشکی، گروه فیزیولوژی، واحد کاشان، دانشگاه علوم پزشکی، کاشان، ایران

۲. استاد، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، ایران، کاشان

۳. استادیار، گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، ایران، کاشان

* نشانی نویسنده مسؤله: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی،

تلفن: ۰۹۱۳۳۶۱۲۹۲۰ | دورنویس: ۰۳۱۵۵۵۷۵۰۵۷

پست الکترونیک: salami-m@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶ | تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۴/۱۲

نگهداری، آب و مواد غذایی به اندازه کافی و بدون هیچ گونه محدودیتی در دسترس همه حیوانات بود. دمای محیط 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد و رطوبت آن 55 ± 5 درصد تنظیم و سیکل‌های شبانه‌روزی تاریکی - روشنایی به صورت ۱۲ ساعته حفظ می‌شد. لازم به ذکر است که پروتکل آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق به تأیید کمیته نگهداری و استفاده از حیوانات دانشگاه علوم پزشکی کاشان رسید (IR.KAUMS.MEDNT.REC.1398.077). یک هفته پس از عادت کردن موش‌ها به محیط، حیوانات به‌طور تصادفی به چهار گروه آزمایشی تقسیم‌بندی شدند:

۱- گروه کنترل (CON): حیواناتی که به مدت ۶ هفته آب آشامیدنی را به صورت گاوژ دریافت کردند (n=7).

۲- گروه کنترل + پروبیوتیک (CON+Pro): حیواناتی که به مدت ۶ هفته پروبیوتیک را به صورت گاوژ دریافت کردند (n=7).

۳- گروه کوپریزون (CPZ): حیواناتی که به مدت ۶ هفته غذای حاوی کوپریزون ۰/۲٪ دریافت کردند (n=11).

۴- گروه کوپریزون + پروبیوتیک (CPZ+Pro): حیواناتی که به مدت ۶ هفته غذای حاوی کوپریزون ۰/۲٪ و پروبیوتیک به صورت گاوژ دریافت کردند (n=11).

روش ایجاد مدل MS

برای ایجاد مدل حیوانی طبق پروتکل استاندارد، ابتدا غذای مخصوص جوندگان به شکل پودری درآمد و تحت فشار سرد با کوپریزون ۰/۲٪ مخلوط شد [۱۵]. این کار توسط شرکت رویان اصفهان انجام گردید. براساس تحقیقات انجام شده دوز استاندارد با حداقل سمیت، استفاده از کوپریزون ۰/۲٪ به مدت ۶ هفته است [۱۵]. حیوانات به مدت ۶ هفته مخلوط پروبیوتیک شامل باکتری‌های *infantis Bifidobacterium* و *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus reuteri* را دریافت کردند. مقدار ۰/۵ گرم از پروبیوتیک با ۱ میلی‌لیتر آب آشامیدنی به‌عنوان حلال (حاوی تعداد 5×10^8 باکتری از هر سویه) ترکیب گردید و روزانه در ساعات معینی هنگام ظهر، به حیوانات گروه‌های کنترل + پروبیوتیک و کوپریزون + پروبیوتیک گاوژ شد.

تست رفتاری: تست روتارود (Rotarod)

این تست برای ارزیابی تعادل و هماهنگی بین اندام‌های حرکتی استفاده می‌شود. این دستگاه از یک میله افقی به قطر ۳ سانتی‌متر به‌عنوان گردونه تشکیل شده که سرعت چرخش آن ۴۵-۵ دور در دقیقه (rpm) است. حیوان روی این میله چرخان قرار داده شده، در این حالت با جلو و عقب رفتن باید خود را بر روی میله نگه داشته، سقوط نکند.

به رادیکال‌های آزاد بسیار آسیب‌پذیر است، تا جایی که افزایش تولید ROS باعث نقص در عملکرد پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA در آن می‌شود. این اختلالات منجر به آسیب بافتی و تخریب عملکرد سلول‌ها شده، در نهایت به مرگ سلولی می‌انجامد [۷]. از این رو ختنی‌سازی استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد، یک راه مؤثر برای محافظت از سلول‌های عصبی به شمار می‌رود [۸]. ارگانسیم‌های میکروبی موجود در دستگاه گوارش با اعمال اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی، نقش مهمی در تنظیم سیستم ایمنی بدن میزبان ایفا می‌کنند [۹]. یافته‌های موجود از بررسی مدل‌های حیوانی نشان از دخالت مستقیم برخی از میکروب‌های روده در بروز بیماری‌های خودایمنی دارد [۱۰]. محور مغز - روده - میکروبیوتا یک سیستم ارتباطی دوطرفه است و در حقیقت تعامل بین میکروب‌های گوارشی و میزبان بر تعیین پاسخ سیستم ایمنی اثرگذار است [۱۱]. پروبیوتیک‌ها میکروارگانسیم‌های زنده‌ای هستند که مصرف کافی آن‌ها سبب نمایان شدن اثرات سلامت‌بخش در بدن میزبان می‌شود (FAO/WHO 2002). آن‌ها مستقیماً با ایجاد تعادل میکروبی و اثر بر تعداد و تنوع میکروبیوتای روده، توانایی آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی به بدن میزبان می‌دهند و با جلوگیری و یا تأخیر در فرآیند اکسیداسیون سلولی از بدن در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند [۱۲]. مطالعات انجام شده بر روی لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها که از رایج‌ترین پروبیوتیک‌ها هستند، نشان‌دهنده خواص سلامت‌بخش آن‌ها در زمینه بهبود عملکرد سیستم ایمنی و کاهش التهاب است [۱۳]. لاکتوباسیلوس کازئی یک سویه پروبیوتیک است که اثرات مثبت آن در سیستم ایمنی، عملکرد روده و پاسخ در برابر عفونت‌ها گزارش شده است [۱۴]. این در حالی است که مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها روی ویژگی‌های مختلف بیماری MS هنوز مشخص نیست و نیاز به بررسی بیشتری دارد. از این رو هدف از انجام این مطالعه، بررسی نقش مخلوط پروبیوتیک، شامل باکتری‌های *infantis Bifidobacterium*، *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus reuteri* بر توانایی حرکتی در موش‌های سوری تغذیه‌شده با کوپریزون بود.

مواد و روش‌ها

این مقاله با شماره ۹۸۱۲۳ و کد اخلاقی IR.KAUMS.MEDNT.REC.1398.077 مورد تأیید می‌باشد. در این پژوهش تجربی ۴۵ رأس موش سوری نر نژاد C57BL/6 با وزن ۲۲-۱۸ گرم از مؤسسه رازی کرج خریداری شد و پس از انتقال، به‌طور گروهی در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند. در طول مدت

سنجش آنزیمی و سنجش غلظت شرکت (Navandsalamat Iran) استفاده شد.

آنالیز آماری

پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶ انجام گرفت. قبل از انجام آزمون آماری، داده‌ها از نظر نرمال بودن با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شدند. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد میانگین بیان شد و برای داده‌های پارامتریک از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه و متعاقب آن تست LSD، جهت مقایسه گروه‌های کنترل و آزمایش استفاده گردید و سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از تست روتارود

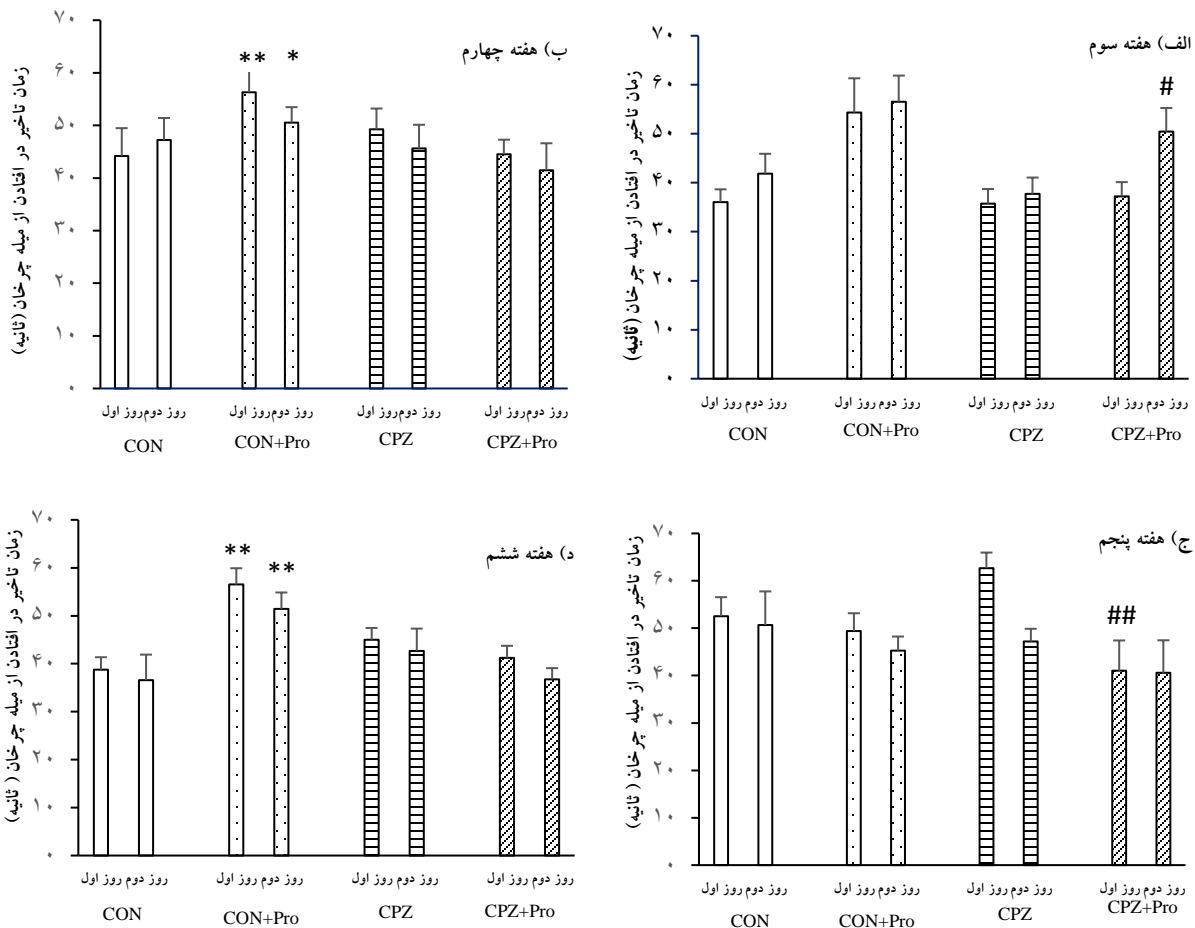
نتایج حاصل از بررسی اثرات کوپریزون بر رفتار حیوانات در تست روتارود طی هفته‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز آماری واریانس دوطرفه نشان داد که حیوانات گروه CON+Pro نسبت به حیوانات گروه CON در هر دو روز از هفته سوم، به طور معنی‌داری مدت زمان بیشتری توانستند بر روی میله چرخان بمانند ($P < 0/009$ و $P < 0/033$ - نمودار الف). در روز دوم از هفته سوم، حیوانات گروه CPZ+Pro به طور معنی‌داری نسبت به حیوانات گروه CPZ در افتادن از میله چرخان تأخیر طولانی‌تری داشتند ($0/048 < P$ - نمودار الف). در هفته چهارم مطالعه، هیچ تفاوت معنی‌داری بین نتایج گروه‌های مختلف وجود نداشت. در روز اول از هفته پنجم، حیوانات گروه CPZ نسبت به حیوانات گروه CPZ+Pro به طور معنی‌داری توانستند مدت زمان بیشتری بر روی میله چرخان بمانند ($P < 0/001$ - نمودار ج). حیوانات گروه CON+Pro در هر دو روز از هفته ششم، نسبت به حیوانات گروه CON به طور معنی‌داری مدت زمان بیشتری تعادل خود را بر روی میله چرخان حفظ کردند ($P < 0/001$ و $P < 0/005$).

سرعت و شتاب دستگاه روتارود قابل تنظیم است. موش‌های سوری پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه به حال خود رها شدند تا به محیط عادت کنند. شتاب میله ابتدا ۵ دور در دقیقه تنظیم شد و به تدریج طی ۱۲۰ ثانیه به ۴۵ دور در دقیقه افزایش یافت. آزمایش به مدت ۵ دقیقه با شتاب مشابه ادامه داشت و تأخیر در سقوط از میله ثبت شد. هر موش به میزان دو روز و هر روز سه نوبت با فواصل ۳۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت میانگین هر روز در نظر گرفته شد [۱۶]. رنگ‌آمیزی میلین

به جهت بررسی نواحی دمی‌لیناسیون در جسم پینه‌ای حیوانات آزمایش شده، از رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین (Luxol fast blue (LFB) استفاده شد. به همین منظور در روزهای بیستم، سی‌ام و چهلم از ایجاد مدل حیوانی، رنگ‌آمیزی انجام گرفت. در روزهای مذکور پس از انجام تست‌های رفتاری، از هر گروه تعداد ۵ حیوان به طور تصادفی به منظور رنگ‌آمیزی میلین انتخاب شدند. با استفاده از گاز CO، اتانازی برای حیوانات هر گروه، با قرار دادن آن‌ها در محفظه انجام گرفت و بلافاصله سر آن‌ها به وسیله دستگاه گیوتین مخصوص جوندگان جدا شد. مغز از مجموعه خارج و به منظور بهتر فیکس شدن، بافت‌ها در ظرف مخصوص نمونه حاوی فرمالین ۴٪ غوطه‌ور شدند. بعد از طی ۴۸-۲۴ ساعت پس از آب‌گیری در دستگاه Tissue processor، بلوک‌های پارافینی تهیه گردید. پس از مقطع‌گیری به قطر ۵ میکرون با استفاده از دستگاه میکروتوم و قرارگیری مقاطع بر روی لام، رنگ‌آمیزی با استفاده از دستورالعمل انجام شد. از هر نمونه تعداد ۱۲ برش توسط میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۴۰ ارزیابی شد [۱۷].

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی

در زمان جداسازی سر موش‌ها، خون هر حیوان جمع‌آوری شد. ۳۰ دقیقه پس از خون‌گیری، نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه درون دستگاه سانتریفوژ با ۳۰۰۰ RCF قرار گرفت و از سرم خون تهیه شده برای سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی به کار گرفته شد [۱۸]. در خصوص فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX و سطح سرمی TAC از کیت‌های

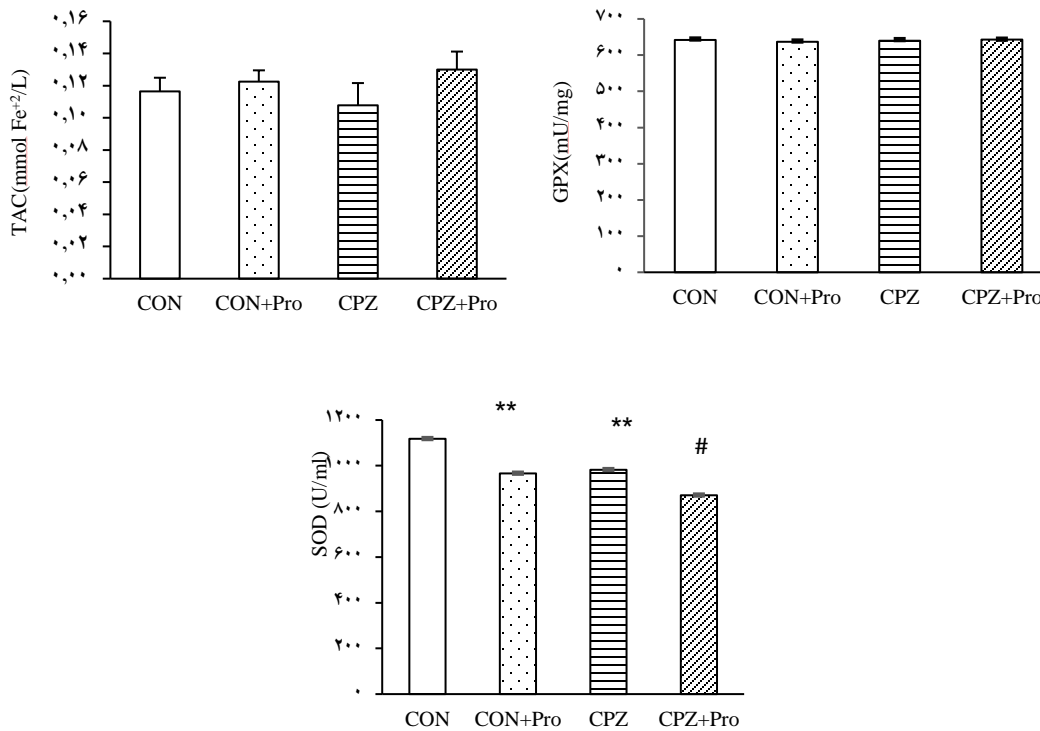


شکل شماره ۱- مقایسه میانگین \pm خطای استاندارد میانگین در تست روتارود طی دو روز متوالی در هفته‌های مختلف. الف) اختلاف در هر دو روز بین گروه CON+Pro و CON معنی دار است. اختلاف در روز دوم بین گروه‌های CPZ و CPZ+Pro معنی دار است. ج) اختلاف در روز اول بین گروه‌های CPZ و CPZ+Pro معنی دار است. د) اختلاف در هر دو روز بین گروه‌های CON و CON+Pro معنی دار است. $P < 0.01$ ** اختلاف بین گروه‌های CON و CON+Pro. $##$ $P < 0.01$ اختلاف بین گروه‌های CPZ و CPZ+Pro. $\#$ $P < 0.05$ اختلاف بین گروه‌های CPZ و CPZ+Pro.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی

گروه CON+Pro آنزیم SOD نسبت به گروه CON نیز کاهش معناداری داشت ($P < 0.002$). در بررسی فعالیت آنزیم GPX و TAC تغییر معنی‌داری مشاهده نشد.

فعالیت آنزیم SOD در گروه CPZ نسبت به گروه CON کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.01$). در گروه CPZ+Pro سطح سرمی SOD نسبت به گروه CPZ کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.03$). در

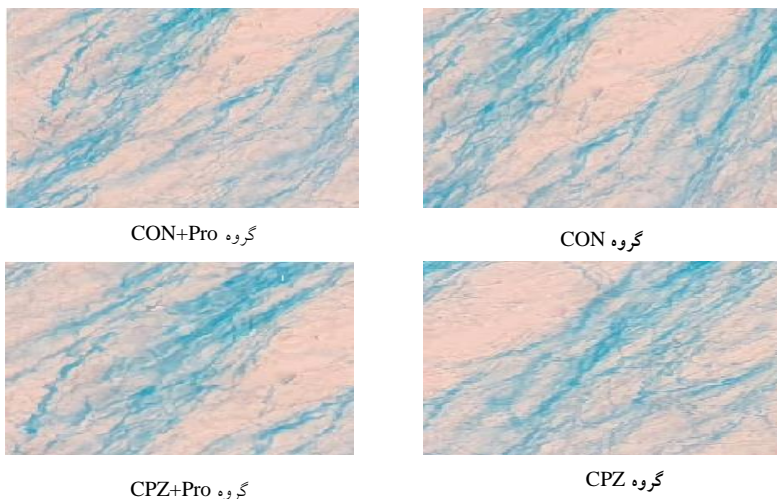


شکل شماره ۲- مقایسه سطح سرمی فاکتورهای بیوشیمیایی در گروه‌های مختلف. ** ($P < 0.01$) اختلاف بین گروه CON و CPZ و بین گروه CON و CON+Pro معنی‌دار است. # ($P < 0.05$) اختلاف بین گروه CPZ و CPZ+Pro معنی‌دار است.

جسم پینه‌ای برای بررسی میزان دمیلیناسیون استفاده کرده‌اند. در مطالعه حاضر برش‌های جسم پینه‌ای با رنگ آمیزی لوکسال فست‌بلو نشان داد که در گروه CON جسم پینه‌ای دارای نمایی طبیعی و تراکم میلین نرمال بوده و رنگ آمیزی بافت مغزی در گروه‌های مختلف تفاوت معناداری با گروه CON نداشته است.

نتایج حاصل از رنگ آمیزی

در بیماری‌های مرتبط با دمیلیناسیون مرکزی، برای بررسی‌های بافت‌شناسی از جسم پینه‌ای استفاده می‌شود؛ زیرا بزرگ‌ترین tract عصبی در CNS است که در جریان بیماری‌زایی MS آسیب می‌بیند. مطالعات متعددی پیرامون دمیلیناسیون در مدل حیوانی کوپریزون، از



شکل شماره ۳- رنگ آمیزی میلین با لوکسال فست‌بلو

مصرف ترکیب پروبیوتیکی در موش‌های سالم پس از سه هفته و در موش‌های تغذیه‌شده با CPZ پس از پنج هفته موجب بهبود فعالیت حرکتی شد. به نظر می‌رسد با توجه به مدولاسیون میکروبیوتای روده، درمان با پروبیوتیک ممکن است علائم ناشی از بیماری را با تعادل در پاسخ‌های ایمنی بهبود بخشد. میکروبیوتای روده برای تکامل سیستم ایمنی بدن مورد نیاز است [۲۶]. مطالعات انجام‌شده بر روی MS نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها می‌توانند در کاهش سایتوکاین‌های التهابی در بیماران مبتلا به آن مفید باشند [۲۷]. مکمل‌های پروبیوتیکی با ایجاد تعادل بین پاسخ‌های التهابی و ضدالتهابی، موجب بهبود علائم بیماری می‌شوند. تحقیقات انجام‌شده نشان داده‌اند که مصرف پروبیوتیک‌ها از طریق بهبود عملکرد سد روده‌ای و جلوگیری از آزادسازی عوامل پیش‌التهابی، با تأخیر در تحریک سیستم ایمنی میزبان، علائم بیماری را بهبود می‌بخشند [۲۸]. اکبری و همکاران در بررسی که بر روی بیماران مبتلا به آلزایمر انجام دادند، مشخص کردند که مکمل پروبیوتیکی حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و لاکتوباسیلوس فرمنتوم برای ۱۲ هفته هیچ اثری بر میزان TAC و GPX نداشته است [۲۹]. نتایج ما نیز نشان دادند که ترکیبات پروبیوتیکی استفاده‌شده برای مدت ۶ هفته باعث کاهش سطح سرمی آنزیم SOD در هر دو گروه موش‌های بیمار و سالم شد، اما تأثیری بر سطح سرمی TAC و GPX نداشت. در واقع استرس اکسیداتیو ناشی از بروز عدم تعادل بین فاکتورهای اکسیدان و آنتی‌اکسیدان به سمت افزایش عوامل اکسیدان است که منجر به آسیب سلولی می‌شود. در مطالعه‌ای که پیرامون اثر پروبیوتیک‌ها بر استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی انجام شده، این‌گونه گزارش کرده‌اند که پروبیوتیک‌ها از طریق کاهش آسیب‌های التهابی و افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز، استرس اکسیداتیو را مهار می‌کنند [۳۰]. در مطالعه کوچکی و همکاران گزارش شده که مصرف کپسول پروبیوتیک در بیماران مبتلا به MS به مدت ۱۲ هفته، بر سطح سرمی TAC بی‌اثر بوده است [۳۱]. در مدل حیوانی کوپریزون به دنبال بروز آسیب اکسیداتیو ایجادشده، آپاپتوز الیگودندروسیت‌ها و در نهایت دمی‌لیناسیون رخ می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تغذیه با CPZ به مدت ۶ هفته باعث کاهش سطح سرمی آنزیم SOD در گروه موش‌های بیمار شد. مطالعات کاشانی و همکاران نیز نشان می‌دهد تغذیه موش‌های سوری با کوپریزون به مدت مشابه، منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر SOD می‌شود [۳۳، ۳۲]. شواهد جدید نشان می‌دهد

در این مطالعه اثر مکمل پروبیوتیکی روی شاخص‌های حرکتی، بیوشیمیایی و بافتی در مدل حیوانی مالتیپل اسکلروزیس مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه حاضر روی موش‌های C57BL/6 انجام شد، زیرا این سویه از موش سوری از نظر زمینه ژنتیکی نسبت به عوامل مؤثر بر دمی‌لیناسیون، حساس هستند. فرآیند نوروپاتولوژیک مشاهده‌شده در طول تغذیه با CPZ، با تغییرات ایجادشده در سیستم عصبی ارتباط مستقیم دارد. طبق مطالعات انجام شده، حیوانات تغذیه شده با کوپریزون دارای مشخصات رفتاری وابسته به زمان هستند. بنابراین تغییرات رفتاری گسترده از بیش‌فعالی تا اختلال حرکتی را به دنبال تغییر در دوره‌های التهاب، تخریب میلین و توسعه آکسونی غیرطبیعی، نشان می‌دهند [۱۹]. در مطالعات حیوانی می‌توان با استفاده از ابزارهای رفتاری مانند روتارود نقص در عملکرد حرکتی را بررسی کرد [۲۰]. روتارود یکی از پر کاربردترین ابزارها برای اندازه‌گیری نقص حرکتی و تعادلی در موش‌های تغذیه شده با CPZ است [۲۱]. در مطالعات مدل حیوانی CPZ، تعدادی از نتایج، کاهش زمان ماندن بر روی میله چرخان را در گروه کوپریزون گزارش داده‌اند [۹] و برخی از گزارش‌ها نیز حاکی از عدم تغییر در گروه بیمار است [۲۲]. در مطالعه حاضر نیز نتایج متناقضی به دست آمد، به طوری که میزان فعالیت حرکتی حیوانات گروه CPZ در آزمون روتارود، نسبت به گروه CON تفاوت معناداری نداشت و در گروه CPZ+Pro سه هفته پس از شروع مدل و در گروه CON+Pro در هفته سوم و ششم، مدت زمان ماندن بر روی میله چرخان به ترتیب بیشتر از گروه‌های CPZ و CON بود. طبق گزارشات منتشرشده از تحقیقات، این نتایج متناقض را می‌توان ناشی از تفاوت در شدت دمی‌لیناسیون در بین مطالعات مختلف حتی با دوز و مدت مصرف یکسانی از کوپریزون، دانست [۲۳]. صالحی‌پور و همکاران نیز گزارش کرده‌اند که اثر پروبیوتیک‌ها بر تشدید یا مهار علائم عصبی در مدل‌های حیوانی MS، متناقض است و شرایط محیطی متفاوت و رژیم‌های غذایی مختلف می‌توانند نتایج مطالعات را تحت تأثیر قرار دهند. در مطالعه‌های دیگر Baken و همکاران نشان دادند که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی موجب تشدید علائم عصبی در موش‌های مدل حیوانی مالتیپل اسکلروزیس می‌شود. اما Kobayashi و همکاران عکس این نتیجه را گزارش کردند [۲۴، ۲۵]. مرشدی و همکاران نشان دادند که مصرف پروبیوتیک‌ها در مدل حیوانی EAE می‌تواند اثر مثبتی بر مارکری التهابی ایمنی بگذارد، همچنین شدت، پیشرفت و شروع بیماری را به تأخیر بیندازد [۱۳]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که

بهبود بخشید. از این رو مکمل‌های پروبیوتیکی می‌توانند به‌عنوان یک استراتژی جدید درمانی برای بهبود و کنترل شدت بیماری‌های اتوایمیون مانند MS مدنظر قرار گیرند. با این حال، مطالعات بیشتری برای بررسی و تأیید پتانسیل‌های درمانی باکتری‌های پروبیوتیک در درمان بیماران مبتلا به MS ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی و پایان‌نامه کارشناسی ارشد است که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی کاشان اجرا شده است. بدین‌وسیله نویسندگان از تمام کسانی که در گردآوری این پژوهش همکاری و مساعدت نموده‌اند، کمال تشکر را دارند.

References

[1] Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature genetics*. 2013;45(11):1353.

[2] DeLuca GC, Yates RL, Beale H, Morrow SA. Cognitive impairment in multiple sclerosis: clinical, radiologic and pathologic insights. *Brain Pathology*. 2015;25(1):79-98.

[3] Aharoni R, Schottlender N, Bar-Lev DD, Eilam R, Sela M, Tsoory M, et al. Cognitive impairment in an animal model of multiple sclerosis and its amelioration by glatiramer acetate. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-15.

[4] Hakki SS, Dundar N, Kayis SA, Hakki EE, Hamurcu M, Kerimoglu U, et al. Boron enhances strength and alters mineral composition of bone in rabbits fed a high energy diet. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2013;27(2):148-53.

[5] Kim ES. Optical mouse. *Google Patents*; 2009.

[6] Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Bajenaru O, Carra A, et al. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISE study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2009;374(9700):1503-11.

[7] Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox biology*. 2018;15:490-503.

[8] Gonsette R. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *Journal of the neurological sciences*. 2008;274(1-2):48-53.

که اصلاح میکروبیوتای روده یک پنجره جدید برای درمان بیماری‌های خودایمیونی مانند MS ایجاد می‌کند. با این حال، مطالعات بیشتری برای بررسی و تأیید پتانسیل‌های درمانی باکتری‌های پروبیوتیک در درمان بیماران مبتلا به MS ضروری است.

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت که درمان با پروبیوتیک در موش‌های بیمار، باعث بهبود فعالیت حرکتی و سطح سرمی آنزیم SOD شد. از طرفی نیز بر سطح سرمی TAC و GPX نیز بی‌اثر بوده است. به نظر می‌رسد که درمان با پروبیوتیک‌ها با توجه به مدولاسیون میکروبیوتای روده، می‌تواند علائم ناشی از بیماری را با تعدیل در پاسخ‌های ایمنی

[9] Hashemi R, Morshedi M, Jafarabadi MA, Altafi D, Hosseini-Asl SS, Rafie-Arefhosseini S. Anti-inflammatory effects of dietary vitamin D3 in patients with multiple sclerosis. *Neurology genetics*. 2018;4(6).

[10] Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, Takahashi H, Masunaga Y, Hachimura S, et al. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *The Journal of Immunology*. 2002;168(1):57-64.

[11] Mestre H, Hablitz LM, Xavier AL, Feng W, Zou W, Pu T, et al. Aquaporin-4-dependent glymphatic solute transport in the rodent brain. *Elife*. 2018;7:e40070.

[12] Ferrario C, Taverniti V, Milani C, Fiore W, Laureati M, De Noni I, et al. Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *The Journal of nutrition*. 2014;144(11):1787-96.

[13] Morshedi M, Hashemi R, Moazzen S, Sahebkar A, Hosseini E-S. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of probiotics in multiple sclerosis: a systematic review. *Journal of neuroinflammation*. 2019;16(1):1-11.

[14] Kato J-y, Matsuoka M, Polyak K, Massague J, Sherr CJ. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell*. 1994;79(3):487-96.

[15] Hochstrasser T, Exner GL, Nyamoya S, Schmitz C, Kipp M. Cuprizone-containing pellets are less potent to induce consistent demyelination in the corpus callosum of C57BL/6 mice. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2017;61(4):617-24.

- [16] van den Berg R, Laman JD, van Meurs M, Hintzen RQ, Hoogenraad CC. Rotarod motor performance and advanced spinal cord lesion image analysis refine assessment of neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience methods*. 2016;262:66-76.
- [17] Margolis G, Pickett JP. New applications of the Luxol fast blue myelin stain. Laboratory investigation; *a journal of technical methods and pathology*. 1956;5(6):459-74.
- [18] Namjoo A, Kargar A, Heidarian E, Ashje A, Malki S. The toxicity effect of methyl mercury chloride on newborn rat: Enzymatic, histology change and mercury accumulation. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*. 2012;14(2):101-11.
- [19] Yu Q, Hui R, Park J, Huang Y, Kusnecov AW, Dreyfus CF, et al. Strain differences in cuprizone induced demyelination. *Cell & bioscience*. 2017;7(1):1-11.
- [20] Hibbits N, Pannu R, Wu TJ, Armstrong RC. Cuprizone demyelination of the corpus callosum in mice correlates with altered social interaction and impaired bilateral sensorimotor coordination. *ASN neuro*. 2009;1(3):AN20090032.
- [21] Camara-Lemarroy CR, Metz L, Meddings JB, Sharkey KA, Wee Yong V. The intestinal barrier in multiple sclerosis: implications for pathophysiology and therapeutics. *Brain*. 2018;141(7):1900-16.
- [22] Bölcskei K, Kriszta G, Sághy É, Payrits M, Sipos É, Vranesics A, et al. Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice. *J neuroimmunology*. 2018;320:1-10.
- [23] Shi Y-D, Cheng Y-H, Chen Y-F, Zhang K, Zeng J-B, Wang M. Morphology, rheological and crystallization behavior in thermoplastic polyurethane toughed poly (L-lactide) with stereocomplex crystallites. *Polymer Testing*. 2017;62:1-12.
- [24] Baken KA, Ezendam J, Gremmer ER, De Klerk A, Pennings JL, Mathee B, et al. Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus casei* Shirota: immune function, autoimmunity and gene expression. *Int j food microbiology*. 2006;112(1):8-18.
- [25] Ezendam J, van Loveren H. *Lactobacillus casei* Shirota administered during lactation increases the duration of autoimmunity in rats and enhances lung inflammation in mice. *British J Nutrition*. 2008;99(1):83-90.
- [26] Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature reviews immunology*. 2016;16(6):341-52.
- [27] Mehrabadi S, Sadr SS. Assessment of Probiotics Mixture on Memory Function, Inflammation Markers, and Oxidative Stress in an Alzheimer's Disease Model of Rats. *Iranian biomedical journal*. 2020;24(4):220.
- [28] Mehrabadi S. Interaction between gut microbiota dysbiosis and multiple sclerosis. *International journal of medical investigation*. 2019;8(3):21-8.
- [29] Akbari E, Asemi Z, Daneshvar Kakhaki R, Bahmani F, Kouchaki E, Tamtaji OR, et al. 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*. 2016;8:256.
- [30] D'Souza A, Fordjour L, Ahmad A, Cai C, Kumar D, Valencia G, et al. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on messenger RNA expression of caveolin-1, NOS, and genes regulating oxidative stress in the terminal ileum of formula-fed neonatal rats. *Pediatric research*. 2010;67(5):526-31.
- [31] Kouchaki E, Tamtaji OR, Salami M, Bahmani F, Kakhaki RD, Akbari E, et al. Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical nutrition*. 2017;36(5):1245-9.
- [32] Kashani IR, Chavoshi H, Pasbakhsh P, Hassani M, Omidi A, Mahmoudi R, et al. Protective effects of erythropoietin against cuprizone-induced oxidative stress and demyelination in the mouse corpus callosum. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2017;20(8):886.
- [33] Kashani IR, Rajabi Z, Akbari M, Hassanzadeh G, Mohseni A, Eramsadati MK, et al. Protective effects of melatonin against mitochondrial injury in a mouse model of multiple sclerosis. *Experimental Brain Res*. 2014;232(9):2835-46.