بررسی تغییرات سطح سرمی Fe^{+2} و ویتامین D_3 به دنبال مصرف پروبیوتیک‌ها در دمیلیناسیون ناشی از اتیدیوم بروماید هیپوکمپ موش صحرایی

سمیه سلیمان زاده مقدم: دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران. so.soleymanzadeh@yahoo.com
زهره خدایی: استادیار تغذیه، مرکز تحقیقات مکمل های غذایی و پروبیوتیک، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران. zkhodaii@yahoo.com
آذر سبکبار: دانشیار قارچ شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران.sabokbar@kiau.ac.ir
***مهدی گودرزوند:** استادیار فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی- فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران (*نویسنده مسئول). m118medical@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها در پیشگیری و درمان بیماری‌های سیستم ایمنی، از طریق افزایش جذب فاکتورهای محافظتی، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. از این رو هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر باکتری‌های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲۹۹ وی و بیفیدوباکتریا بی ۹۴) بر سطح سرمی Fe+2، ویتامین D3، به دنبال دمیلیناسیون ناشی از اتیدیوم بروماید در هیپوکمپ موش‌های صحرایی بود.

روش کار: در این تحقیق تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم در ۴ گروه ۱۰ تایی شامل کنترل (سالین)، آسیب با اتیدیوم بروماید، گروه‌های درمانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲۹۹ وی و پروبیوتیک بیفیدوباکتریابی۹۴ قرار گرفتند. در گروه آسیب و درمان جهت القا دمیلیناسیون از تزریق مستقیم و تک دوز ۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید در هیپوکمپ موش‌ها استفاده شد همچنین در گروه کنترل از سالین به عنوان حلال اتیدیوم بروماید به همان میزان استفاده شد. پس از القا دمیلیناسیون در گروه‌های درمانی، به میزان ۱۰۸×۱/۵ باکتری پروبیوتیک به مدت ۲۸ روز به صورت گاواژ تجویز شد.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان داد که میزان آهن در گروه درمان با لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲۹۹ وی و میزان ویتامینD_3 سرم در هر دو گروه درمان افزایش نشان داد. همچنین میزان آهن در گروه درمان با بیفید وباکتریا بی ۹۴ کاهش نشان داد، هرچند که این افزایش و کاهش معنی دار نبود.

نتیجه گیری: پروبیوتیک‌ها برای پیشگیری و درمان بیماری‌ها و از جمله بیماری شایع ام اس (MS) به کار می‌روند. در مطالعات قبلی نقش موثر Fe^{+2}، ویتامینD_3 در بهبود بیماری MS گزارش شده است. علیرغم اینکه یافته های معنی داری در این تحقیق حاصل نشد، اما این یافته ها مطالعات قبلی در رابطه با توصیه مصرف پروبیوتیک را تا اندازه‌ای مورد تایید قرار داد. شاید دلیل چنین یافته ای تفاوت در نوع، تعداد و مدت زمان مصرف پروبیوتیک در مقایسه با سایر مطالعات باشد.

کلیدواژه‌ها: پروبیوتیک، دمیلیناسیون، اتیدیوم بروماید، Fe+2، ویتامینD3

مقدمه

بیماری MS (Multiple sclerosis) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عصبی در انسان است که با فراوانی قابل توجهی در اوایل بزرگسالی بروز می‌کند، به طوری که این بیماری در زنان دو تا سه برابر مردان بروز می‌کند (۲ و۱). در این بیماری، میلین و سلول‌های سازنده میلین آسیب می‌بینند. ایمونولوژیست‌ها MS را به عنوان یک بیماری خود ایمنی در نظرمی گیرند که در آن لنفوسیت‌های T اختصاصی برای آنتی ژن های میلین یک واکنش التهابی به راه می اندازند که نهایتاً منجر به دمیلینه شدن و به دنبال آن آسیب آکسونی می‌شود. به واسطه سلول‌های T است که این بیماری به عنوان یک بیماری خود ایمن شناخته شده و اولین بار این اطلاعات از مطالعات مدل‌های حیوانی به دست آمده است (۴ و۳). از آنجا که هیپوکمپ یکی از مهم‌ترین بخش‌های سیستم عصبی مرکزی است و به بیماری‌های نورولوژیک بسیار حساس و آسیب‌پذیر است، از این رو، جایگاهی برای صدمات اکسیداتیو محسوب می‌شود. هیپوکمپ دارای قابلیت بازسازی عصبی بالایی نیز می‌باشد. وجود مکانیسم‌های دژنراسیون و رژنراسیون عصبی در هیپوکمپ، مطالعه‌ی مکانیسم‌های دخیل در فرایندهای تخریب و بازسازی عصبی را امکان پذیر می‌سازد (۵)؛ بنابراین آسیب‌شناسی هیپوکمپ نقش مهمی در

بررسی‌های مربوط به این بیماری ایفا می‌کند (۶). امروزه روش های مختلف در جهت پیشگیری و یا درمان MS وجود دارند و در سال های اخیر پروبیوتیک ها مورد توجه بسیاری از دانشمندان و همچنین مصرف کنندگان قرار گرفته است. به طوری که استفاده از باکتری های انسانی در پیشگیری و درمان بیماری‌ها و از جمله بیماری شایع MS تأیید شده است (۲). پروبیوتیک میکروفلورطبیعی روده ای است که نقش تغذیه ای آن در سلامت انسان مشخص گردیده است. این میکروفلور با پوشاندن سطح اپی تلیال روده، مانعی جهت هجوم باکتری‌های پاتوژن گردیده و مانع بروز التهابات و تحریکات سیستم ایمنی می‌گردد. التهابات و تحریکات بالای سیستم ایمنی که توسط باکتری‌های پاتوژن ممکن است رخ دهد، توسط میکروفلور طبیعی انسان برطرف می‌شود (۷). هم چنین مصرف پروبیوتیک باعث تغییراتی در پاسخ های ایمنی بدن در برابر بیماری ها می شوند (۱). شایع ترین باکتری هایی که در تحقیقات پروبیوتیکی استفاده می‌شود لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریا هستند (۸ و۷). مطالعات مختلف نشان داده است مصرف پروبیوتیک ها می‌تواند درتغییرات سرمی فاکتورهای مختلف خونی از جمله آهن، کلسیم، منیزیوم ویتامین د، ویتامین ای، کلسترول و ... موثر باشد، به طوریکه برخی از این فاکتورها و تغییرات آن ها رابطه مستقیمی با بیماری ام اس دارد (۱۲-۹). همچنین تحقیق گودرزوند و همکاران نقش آنتی آپوپتوتیک ویتامین های E و D3 را در هیپوکمپ موش صحرایی به دنبال دمیلیناسیون ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید (EB) مشخص نمود (۱۲)؛ بنابراین هدف از انجام این مطالعه بررسی نقش مصرف پروبیوتیک ها در تغییرات برخی فاکتورهایی است که به نظر می رسد در طی ایجاد بیماری MS دچار تغییر می گردد.

روش کار

در این پژوهش از مدل حیوانی دمیلیناسیون موضعی با استفاده از تزریق اتیدیوم بروماید در ژیروس دندانه‌دار هیپوکمپ استفاده شد. موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به تعداد ۴۰ موش به وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم، تهیه شده از انستیتو پاستور ایران بودند که با رعایت اصول اخلاقی در محیط مناسب از نظر شرایط نگهداری (۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) در حیوان‌خانه قرارگرفتند.

موش ها پس از وزن کشی و آماده کردن وسایل جراحی با تزریق داخل صفاقی کلرال هیدرات ۸۰mg/Kg بیهوش شدند. پس از اطمینان از بیهوشی کامل موش‌ها، سر حیوانات در دستگاه استریوتاکسی جهت مشخص نمودن مختصات هسته آکومبنس ثابت گردید. سپس محورهای دستگاه استریوتاکسی درسه جهت فضایی تنظیم و حیوان در دستگاه استریوتاکسی قرارگرفت. موهای پشت سر حیوان با یک قیچی، کوتاه و پوست ناحیه سر توسط پنبه آغشته به الکل ۷۰٪ تمیز و سپس یک برش طولی ۱/۵ سانتیمتری در پوست جمجمه (ازحد فاصل دو چشم تا برآمدگی استخوان پس سری) با استفاده از تیغ بیستوری ایجاد گردید. عضلات و بافت های روی جمجمه کاملاً برداشته و سطح استخوان تمیز و خشک گردید تا محل درزها (برگما، لامبدا و ساجیتال) نمایان گردد. مختصات ژیروس دندانه دار بر اساس نقشه توپوگرافی اطلس پاکسینوس و واتسون نسبت به برگما عیین و علامت‌گذاری شد. سپس سوراخی به قطر ۱/۵mm توسط مته دندانپزشکی در آن نقطه از جمجمه ایجاد گردیده و پرده سخت شامه با نوک سوزن برداشته می‌شود. سپس یک نوبت تزریق مستقیم ۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ درصد در سالین ۰/۹ درصد با استفاده از سرنگ همیلتون در ژیروس دندانه دار هیپوکمپ با سرعت یک میکرولیتر در دقیقه، القا شد. جهت اطمینان از فراهم نمودن زمان لازم برای انتشار اتیدیوم بروماید سوزن تزریق برای مدت حدود ۵-۴ دقیقه دیگر در محل نگه داشته شد. پس از تزریق، محل را با بتادین شستشو داده و پوست سر بخیه شد. در گروه کنترل (سالین) حجم برابری از نرمال سالین به میزان ۳ میکرولیتر در هیپوکمپ موش صحرایی تزریق شد.

سپس موش‌ها را در قفسی تمیز قرار گرفتند تا

دوران بهبودی پس از جراحی را طی کند. این حیوانات که در گروه‌های کنترل، آسیب با اتیدیوم بروماید (جهت ایجاد دمیلیناسیون به صورت۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ درصد در سالین ۰/۹ درصد به عنوان حلال اتیدیوم بروماید) و درمان قرار گرفته اند تا سه روز در شرایط پس از جراحی در اتاق حیوانات بصورت تمیز نگهداری شدند. گروه درمان شامل دو زیرگروه دریافت‌کننده پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۲۹۹ وی و بیفیدوباکتریا بی۹۴ برای ۲۸ روز (روزانه یک‌بار به صورت گاواژ) بود. تعداد حیوانات هرگروه ۱۰ درنظر گرفته شد (n=۱۰). گروه‌ها و نحوه دریافت مواد به صورت تزریقی و خوراکی نشان داده شده است (جدول۱). لازم به ذکر است که گروه کنترل نسبت به گروه آسیب (اتیدیوم برماید) سنجیده شده و گروه آسیب، خود نیز به عنوان گروه کنترل نسبت به گروه‌های درمانی (۱ و ۲) در نظر گرفته شده است: دریافت، عدم دریافت.

پیش از جراحی استریوتاکسی هر پنج موش در یک قفس، ولی پس از آن به طور انفرادی نگهداری شدند. حیوانات در طی آزمایشات به طور آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. طول دوره نوری ۱۲ ساعت (۷ بامداد تا ۷ شب)، رطوبت و دمای اتاق (۲۵ ± ۲° C) ثابت بود.

باکتری‌های پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بیفیدوباکتریابی ۹۴ (از کلکسیون باکتری و قارچ‌های صنعتی ایران نماینده شرکت DSM) خریداری شدند. باکتری‌ها ابتدا کشت داده شده و بعد از تأیید خلوص باکتری در محیط MRS broth در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت۲۴ تا ۴۸ ساعت به صورت بی هوازی در حجم ۵۰۰ میلی لیتر رشد داده شدند، سپس باکتری‌ها به وسیله سانتریفیوژ از محیط جداسازی شده و با PBS شستشو داده و مجدداً سانتریفیوژ شدند تا باکتری‌ها ته‌نشین شوند. آنگاه باکتری‌ها در نرمالین سالین به صورت محلول درآمدند. با استفاده از استاندارد نیم‌مک فارلند باکتری به تعداد cfu/ml ۱/۵×۱۰۸ رقیق سازی شد. در روز قبل از شروع آزمایش میزان باکتری آماده شده برای ۷ روز به تعداد ۲۰ نمونه آماده سازی شد و در صبح روز آزمایش در اختیار آزمایشگر قرار گرفت. روند آماده سازی باکتری برای ۷ روز، ۴ مرتبه تکرار شد و به صورت خوراکی (گاواژ) به حیوانات داده شد.

پس از دمیلینه شدن هیپوکمپ حیوانات و مصرف ۲۸ روزه پروبیوتیک، سطح سرمی Fe^{+2} و ویتامین D3 با روش نمونه‌گیری خون و به کارگیری کیت پیشتاز طب مورد ارزیابی قرار گرفت.

هم چنین به منظور بررسی و مقایسه گروه‌های مورد مطالعه از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید.

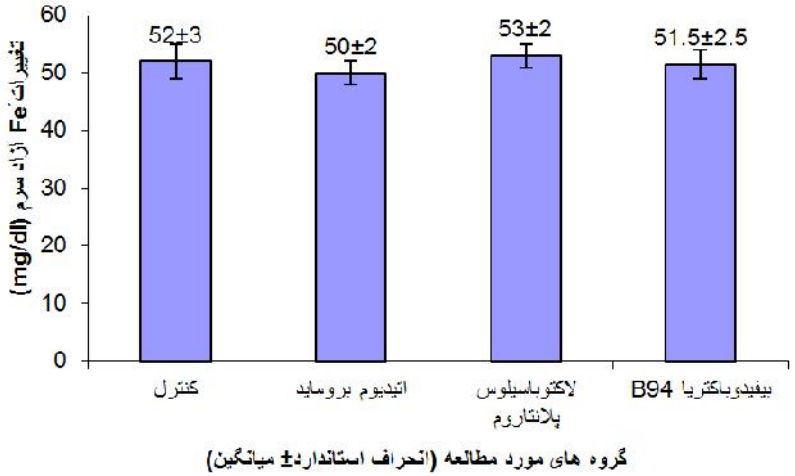
یافته‌ها

پس از طی شدن دوره تجربی میزان پارامترهای مورد نظر (آهن و ویتامین D3) در گروههای کنترل و تجربی اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج آنها بیان می‌شود.

گروه درمانی با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم نسبت به گروه کنترل و آسیب با اتیدیوم برماید مقایسه شدند. میانگین و انحراف معیار آهن آزاد سرم خون گروه‌های مورد مطالعه، مقایسه شد. هم چنین اثر آسیب دمیلینه کننده ناشی از اتیدیوم بروماید (به عنوانی مدلی از دمیلیناسیون بیماری MS) بر آهن آزاد سرم خون و اثر تجویز لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر آهن سرم خون در گروه اتیدیوم بروماید نشان داده شد (شکل۱).

همانطورکه شکل ۱ نشان می‌دهد میزان آهن آزاد سرم خون در گروه اتیدیوم بروماید(۲±۵۰) (انحراف استاندارد±میانگین) نسبت به گروه کنترل (۳±۵۲) (انحراف استاندارد±میانگین) کاهش و پس از تجویز لاکتوباسیلوس پلانتاروم میزان آن (۲±۵۳) (انحراف استاندارد±میانگین) افزایش یافت (این کاهش و افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است).

در مقایسه گروه درمانی با پروبیوتیک بیفیدوباکتریا بی۹۴، با گروه کنترل و اتیدیوم بروماید نیز، میانگین و انحراف معیار آهن آزاد سرم خون گروه‌های مورد مطالعه، مورد بررسی قرار گرفتند. اثر آسیب اتیدیوم بروماید بر آهن آزاد



شکل ۱- بررسی اثر تجویز پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بیفیدوباکتریا بی۹۴ بر میزان آهن آزاد سرم خون در گروه‌های کنترل، آسیب با اتیدیوم بروماید و درمان

شکل ۲- بررسی و مقایسه تجویز پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بیفیدوباکتریا بی ۹۴ بر میزان آهن آزاد سرم خون در گروه‌های درمانی

سرم خون و اثر تجویز بیفیدوباکتریا بی۹۴ بر آهن سرم خون در گروه اتیدیوم بروماید نیز نشان داده شد (شکل۱).

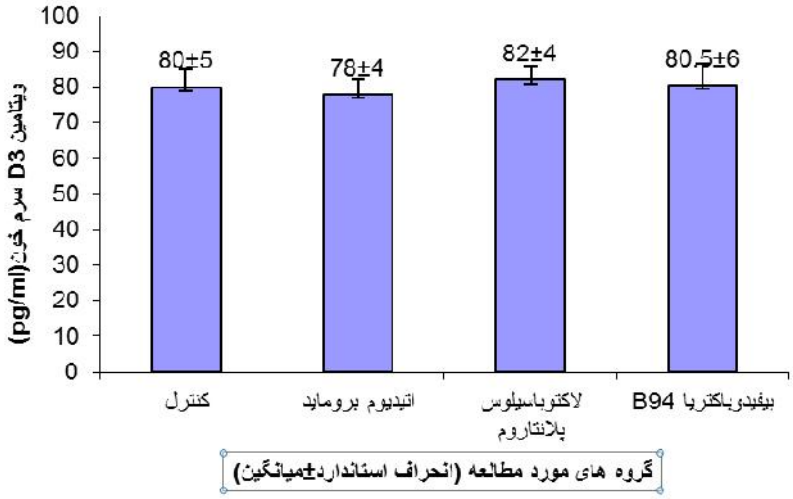
همانطورکه شکل۱ نشان می‌دهد میزان آهن آزاد سرم خون در گروه اتیدیوم بروماید (۲±۵۰ (انحراف استاندارد ± میانگین)) نسبت به گروه کنترل (۳±۵۲) (انحراف استاندارد±میانگین) کاهش و پس از تجویز بیفیدوباکتریا بی۹۴ میزان آن (۵/۲±۵۱/۵) (انحراف استاندارد±میانگین) نسبت به گروه اتیدیوم بروماید افزایش یافت؛ اما با این تجویز میزان ویتامین ذکر شده به گروه کنترل نرسید. قابل ذکر است که این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

اثر تجویز دو گروه درمانی با لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بیفیدوباکتریا بی ۹۴ بر آهن آزاد سرم خون در گروه آسیب با اتیدیوم بروماید نشان داده شد (شکل۲).

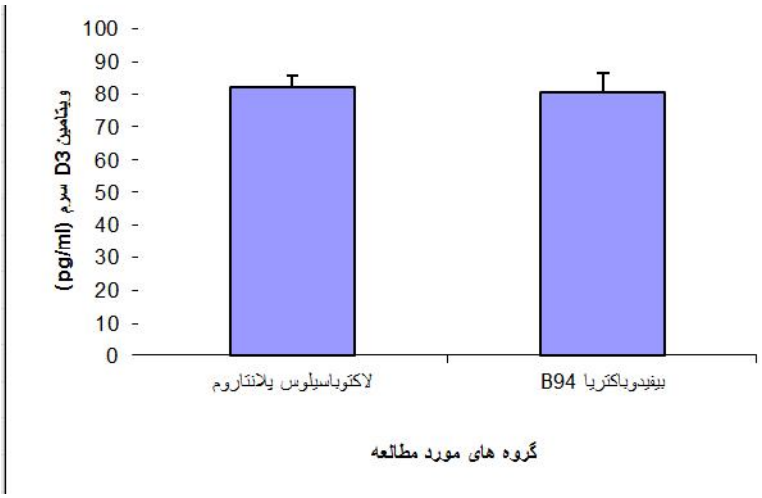
همانطور که شکل ۲ نشان می‌دهد میزان افزایش آهن آزاد سرم خون در گروه لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۲±۵۳) (انحراف استاندارد±میانگین) کمی بیشتر از گروه بیفیدوباکتریا بی ۹۴ (۵/۲±۵۱/۵) (انحراف استاندارد±میانگین) می‌باشد.

میانگین و انحراف معیار ویتامین D_3 سرم خون گروه‌های مورد مطالعه، مقایسه شدند. هم چنین اثر آسیب دمیلینه کننده ناشی از اتیدیوم بروماید بر ویتامین D_3 سرم خون و اثر تجویز لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر ویتامین D_3 سرم خون در گروه اتیدیوم بروماید نشان داده شد (شکل۳).

طبق شکل ۳ میزان ویتامین D_3 سرم خون در



شکل ۳- بررسی اثر تجویز پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بیفیدوباکتریا بی ۹۴ بر میزان ویتامین D3 سرم خون در گروه‌های کنترل، آسیب با اتیدیوم بروماید و درمان



شکل ۴- بررسی و مقایسه تجویز پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بیفیدوباکتریا بی ۹۴ بر میزان ویتامین D3 سرم خون در گروه‌های درمانی

گروه اتیدیوم بروماید (۴±۷۸) (انحراف استاندارد±میانگین) نسبت به گروه کنترل (۵±۸۰) (انحراف استاندارد±میانگین) کاهش و پس از تجویز لاکتوباسیلوس پلانتاروم میزان آن (۴±۸۲) افزایش یافت؛ اما این کاهش و افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

در ارتباط با میزان ویتامین D_3 سرم خون گروه‌های مورد مطالعه نیز، مقایسه ای انجام شد. اثر آسیب ناشی از اتیدیوم بروماید بر ویتامین D_3 سرم خون و اثر تجویز بیفیدوباکتریا بی۹۴ بر این ویتامین در گروه اتیدیوم بروماید با گروه کنترل مقایسه شد (شکل۳).

همان طور که شکل ۳ نشان می‌دهد میزان ویتامین D3 سرم خون در گروه اتیدیوم بروماید (۴±۷۸) (انحراف استاندارد±میانگین) نسبت به گروه کنترل (۵±۸۰) (انحراف استاندارد±میانگین) کاهش و پس از تجویز بیفیدوباکتریا بی۹۴ میزان آن (۶±۸۰/۵) (انحراف استاندارد±میانگین) افزایش یافت؛ اما این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

اثر تجویز لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بیفیدوباکتریا بی ۹۴ بر ویتامین D_3 سرم خون در

جدول ۱- نحوه دریافت مواد توسط گروه‌ها

مواد دریافتی / گروه‌ها	سالین	EB	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (درمان۱)	*بیفیدوباکتریا بی۹۴* (درمان۲)
کنترل(سالین)	+	-	-	-
آسیب با (EB)	-	+	-	-
درمان۱	-	+	+	-
درمان۲	-	+	-	+

گروه اتیدیوم بروماید را نشان داده شد (شکل۴).

همان طور که شکل۴ نشان می‌دهد میزان افزایش ویتامین D_3 سرم خون در گروه لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۴±۸۲) (انحراف استاندارد±میانگین) کمی بیشتر از گروه بیفیدوباکتریا بی ۹۴ (۶±۸۰/۵) (انحراف استاندارد±میانگین) می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد میزان آهن آزاد سرم خون در گروه درمان با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم نسبت به گروه‌های آسیب و کنترل کمی افزایش یافت، اگرچه این افزایش معنی‌دار نبود. در صورتی که مطالعه آنتنوویچ در سال ۲۰۰۵ در استفاده از نوعی پروبیوتیک در گوسفندان، حاکی از افزایش معنی دار سطح سرمی آهن بود (۱۰). به نظر می‌رسد اگرچه افزایش در هر دو مطالعه وجود داشت اما عدم انطباق نتایج می‌تواند مربوط به نوع و تعداد پروبیوتیک، مدل حیوانی و یا دوره تجربی باشد به طوری که نتایج وی پس از ۱۹ و ۳۵ روز انجام شد، اما نتایج مطالعه حاضر پس از مدت کوتاه‌تری (۲۸ روز) به دست آمد. در مطالعه ای دیگر که توسط رنزبورگ در سال ۲۰۰۶ انجام گرفت، مقایسه ای میان میزان سرمی آهن و فریتین در زنان مبتلا به MS با گروه کنترل (افراد سالم) صورت گرفت، نتیجه آن شد که سطح سرمی آهن و فریتین در مبتلایان به این بیماری به طور معناداری پایین تر از گروه کنترل بود (۱۳). اگرچه نتایج مطالعه حاضر، نتایج این مطالعه را تایید نمی کند، اما به نظر می رسد یافته های این مطالعه با مطالعه ذکر شده در خصوص کاهش سطح سرمی آهن در گروه آسیب با اتیدیوم بروماید تا حدی هم سو باشد.

با توجه به اهمیت آهن در فرآیند ساخت میلین و بیوسنتز کلسترول و لیپید که هر دو از اجزای اصلی میلین به شمار می‌روند، کمبود آهن می‌تواند با کاهش سلول‌های الیگودندروسیتی میلین ساز فرآیند میلیناسیون را تضعیف نماید (۱۴). شواهد نشان می‌دهد بسیاری از بیماران مبتلا به MS دچار کم‌خونی ناشی از فقر آهن می‌باشند و مطالعات در این خصوص نشان می‌دهد مکمل‌های آهن می‌تواند برای آنها مفید باشد (۱۳)؛ بنابراین یافته‌های مطالعه حاضر نیز تاحدی گواه آن است که سطح سرمی آهن طی دمیلینه شدن کمی کاهش می‌یابد.

در مطالعه پیش رو پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم در گروه درمان توانسته کاهش میزان آهن را پس از آسیب با اتیدیوم بروماید کمی جبران کند و افزایش جزئی نسبت به گروه کنترل نیز نشان دهد. هم چنین سطح سرمی آهن به طور جزئی افزایش بیشتری در گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم نسبت به گروه دریافت کننده پروبیوتیک بیفیدوباکتریا بی۹۴ داشت. نتایج مطالعه ای در این راستا حاکی از افزایش جذب مواد معدنی از جمله آهن به دنبال استفاده از دو گونه لاکتوباسیلوس (اسیدوفیلوس و کازئی) بر روی مرغ‌های یکروزه می‌باشد، به طوری که استفاده از این پروبیوتیک ها، افزایش جذب آهن را در پی داشته است (۹). قابل ذکر است که در مطالعه لاپارا و همکاران در سال ۲۰۰۹ که در آمریکا انجام گرفت، این نتیجه حاصل شد که گونه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، عوامل محدود کننده جذب آهن را بیشتر از گونه بیفیدوباکتر اینفانتیس کاهش می دهد (۱۵). در نتیجه باعث افزایش در دسترس بودن آهن می گردد؛ بنابراین شاید بتوان گفت در نتایج بدست آمده نوع پروبیوتیک مورد

استفاده نیز باید مورد توجه قرار گیرد.

نتایج این مطالعه نشان داد میزان ویتامینD_3 سرم خون در اثر مصرف لاکتوباسیلوس پلانتاروم در گروه درمان نسبت به گروه کنترل و اتیدیوم بروماید افزایش یافت، اگرچه این افزایش معنی‌دار نبود.

با توجه به اینکه نتایج برخی مطالعات (۱۶ و۱۲)، به نقش مثبت ویتامین D_3 در بهبود رت‌های دمیلینه شده اشاره می‌کند و همچنین مطالعه هیل و همکاران نیزحاکی از افزایش مارکر ویتامین D در مردان و زنان مصرف کننده پروبیوتیک لاکتوباسیلوس سالواریوس می‌باشد (۱۱)، بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به یافته های مطالعات ذکر شده، استفاده از پروبیوتیک می‌تواند در افزایش فاکتورهای بهبود دهنده فرآیند رمیلیناسیون و از آن جمله ویتامین D_3 موثر باشد. اگرچه یافته های مطالعه ما ضمن افزایش جزئی ویتامین D_3 گروه درمان چنین نتایجی را به طور کامل تایید نمی کند.

هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد کاهش میزان ویتامین D_3 در گروه درمان با پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس پلانتاروم و بیفیدوباکتریا بی۹۴) نسبت به گروه اتیدیوم بروماید و کنترل تا اندازه بسیار کمی جبران شد. شاید دلیل افزایش جزئی باز هم مربوط به مدل دمیلیناسیون با اتیدیوم بروماید باشد که آپوپتوز وسیعی را در محل آسیب و اطراف آن ایجاد می‌کند. همچنین تعداد پروبیوتیک و استفاده از پروبیوتیک‌های ترکیبی و مدت زمان مصرف، فاکتورهایی هستند که نیاز به مطالعات بیشتری دارند. همچنین مطالعه‌ای در خصوص اثر ضد آپوپتوزی پروبیوتیک‌ها با توجه به منابع الکترونیکی در دسترس یافت نشد تا بتوان نتایج بدست آمده در این تحقیق را به چالش کشید. نتایج برخی مطالعات روی بیماران مبتلا به MS در این خصوص نشان می‌دهد دوز بالای ویتامین D برای این بیماران ایمن محسوب می‌شود، به طوری که اندازه‌گیری فاکتورهای ایمنی گروه کنترل و گروه با دوز بالای مصرف اختلاف معنی‌داری با هم نداشت (۱۸ و۱۷) و چنانچه با دید فراتری این ویتامین جهت بهبود روند دمیلیناسیون مورد بررسی قرار گیرد، نگرانی از افزایش و یا افزایش جزئی دوز ویتامین D تا حدودی حل شود. با توجه به مشاهدات اپیدمیولوژیکی حاصل از مطالعات انسانی و مدل‌های حیوانی، ارتباط مستقیمی بین سطح پایین سرم خونی ویتامین D و افزایش در شاخص‌های مرتبط به بیماری MS وجود دارد و در این میان استفاده از مکمل‌های پروبیوتیکی همراه با ویتامین‌های دیگر از جمله ویتامین D_3 (که امروزه در کشورهای توسعه یافته به صورت شربت یا محلول در بازار عرضه می‌شود) جهت پیشگیری از این بیماری توصیه می‌شود (۲۰ و۱۹). به نظر می‌رسد با توجه به اثر حفاظت عصبی ویتامین D_3 در بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی و کاهش علائم در مدل حیوانی MS (۱۲) استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند راهکار موثری جهت بالابردن سطح سرمی ویتامین D_3 حتی به طور جزئی به عنوان یک عامل حفاظت عصبی در مقابل پاسخ-های آپوپتوتیک سیستم ایمنی باشد.

نتایج مطالعه حاضر اگرچه افزایش جزئی میزان آهن و ویتامین D_3 را در استفاده از هر دو نوع پروبیوتیک نشان داد اما به نظر می‌رسد اثر افزایشی پارامترهای مورد بررسی (آهن و ویتامین D_3) در مورد پروبییوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم نسبت به بیفیدوباکتریا بی ۹۴ کمی بیشتر بود.

در این مطالعه نتایج محکمی از اینکه پروبیوتیک بتواند نقش موثری در بهبود دمیلیناسیون ناشی از MS داشته باشد حاصل نشد؛ اما با توجه به جمع بندی نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات دیگری در این خصوص، شاید ارتباط مستقیمی بین مصرف پروبیوتیک و بهبود دمیلیناسیون ناشی از MS نتوان یافت، ولی امید است با مطالعات بیشتری در این زمینه بتوان گفت که استفاده از پروبیوتیک‌ها جهت افزایش حفاظت عصبی و کاهش علائم این بیماری بتواند موثر باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انجام شد بنابراین نویسندگان این مقاله از همکاری این واحد دانشگاهی بدین‌وسیله تقدیر و

تشکر به عمل می‌آورد.

منابع

1. Liu Y, Rao MS. Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them. Biol Cell. 2004;96 (4): 279-90.
2. Verkhratsky A, Butt A. Glial Neurobiolog: A Textbook. England, John Wiley and Sons. 2007.
3. Noseworthy JH. Multiple sclerosis. N Engl J Med. 2000;343: 938-52.
4. Baker D, Jackson SJ. Models of multiple sclerosis. ACNR. 2007;6: 10-12.
5. Simpson ER. Role of aromataze in sex steroid action, Journal of Molecular Endocrinology. 2000; 25:149-156.
6. Geurts JJ, Bö L, Roosendaal SD, Hazes T, Daniëls R, Barkhof F, et al. Extensive Hippocampal Demyelination in Multiple Sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol. 2007;66 (9): 819-827.
7. Drisko JA, Giles CK, Bischoff BJ. Probiotics in Health Maintenece and Disease Prevention, alternative medicine review. 2003; 8(2):143-155.
8. Nourbakhsh S, a text book of Role of probiotics in control of diseases. Ayooghi public, 1nd ed. 2012; 23-29. (Persian)
9. Hosseini Mansoub N. Comparison of Effects of Using Yogurt and Probiotic on Performance and Serum Composition of Broiler Chickens Annals of Biological Research. 2011;2 (3):121-125.
10. Antunovi Z, Peranda M, Liker B, et al. Influence of Feeding the Probiotic Pioneer PDFM to Growing Lambs on Performances and Blood Composition. Acta Veterinaria (Beograd). 2005;55 (4): 287-300.
11. Hill T R, Brennan L, O'Connor A, et al. Effect of probiotic and vitamin D supplementation on markers of vitamin D status and bone turnover in healthy adults Cashman1. 2 Proceedings of the Nutrition Society. 2009;68 (OCE): E114.
12. Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, et al. Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. Cellular and Molecular Neurobiology. 2010;30: 289-299.
13. Van Rensburg SJ , Kotze MJ , Hon D, et al. Iron and the folate-vitamin B12-methylation pathway in multiple sclerosis. 2006;21: 117-133.
14. Van Toorn R, Schoeman JF, Solomons R, et al. Iron Status in Children with Recurrent Episodes of Tumefactive Cerebral Demyelination, J Child Neurol. 2010;25(11):1401-1407.
15. Laparra JM, Glahn RP, Miller DD. Assessing Potential Effects of Inulin and Probiotic Bacteria on Fe Availability from Common Beans (Phaseolus vulgaris L.) to Caco-2 Cells. Journal of Food Science. 2009;74 (2): 40-46.
16. Keirstead H. Stem cells for the treatment of myelin loss. Trends Neurosci. 2005;28: 677-683.
17. Burton JM, Kimball S, Vieth R, et al. A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. Neurology J. 2010;74(23): 1852-1859.
18. Samantha M, Kimball K, Melanie R, et al. Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis1,2,3. American Society for Clinical Nutrition; 2007.
19. Nicole Marie, Summerday A, Sherrill J, et al. Vitamin D and Multiple Sclerosis: Review of a Possible Association. Journal of Pharmacy Practice. 2013;25: 75.
20. Munger KL, Ascherio A. Prevention and treatment of MS: studying the effects of vitamin D. Multiple Sclerosis Journal. 2011;17(12): 1405-1411.

Evaluating the effect of probiotics on serum Fe^{+2} and vitamin D^3 following ethidium bromide - induced demyelination in hippocampus of rat

Somayeh Soleymanzadeh Moghadam, MSc Student, Department of Biology, Karaj branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. so.soleymanzadeh@yahoo.com
Zohreh Khodae, Assistant Professor Dietary, Dietary supplements and probiotic research center, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran. zkhodaii@yahoo.com
Azar Sabokbar, Associate Professor Mycology, Department of microbiology, Karaj branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. sabokbar@kiau.ac.ir
***Mahdi Goudarzvand**, Assistant Professor of Physiology, Department of Physiology-Pharmacology, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran (*Corresponding author). m118medical@yahoo.com

Abstract

Background: Recently, using probiotics for preventing and treating the immune system diseases via increasing the absorption of protective factors has attracted the attention of researchers. The aim of the present study was to evaluate the effect of probiotic bacteria, Lactobacillus plantarum 299v and Bifidobacteria B94, on serum Fe^{+2} and vitamin $_{D3}$ levels following ethidium bromide - induced demyelination of rat hippocampus.

Methods: In this study, 40 male Wistar rats were divided into four groups, including control, damaged with ethidium bromide, lactobacillus plantarum 299v, and bifidobacterium B94 treatment groups. In damage and treatment groups, a single dose of 3 µl ethidium bromide was directly injected for inducing demyelination in the hippocampus of rats. Also, in control group, the same amount of saline was used. After the induction of demyelination in treatment groups, 1/5×108 probiotic bacteria were administered by gavage for 28 days.

Results: Results showed increased levels of Fe^{+2} in the treatment group with lactobacillus plantarum and that of vitamin D_3 in both treatment groups. The level of serum $Fe^{+}2$ in the treatment group with Bifidobacteria B94 decreased, although this increase and decrease were not significant.

Conclusion: Although the findings in this study were not significant, but, somehow were in agreement with the findings of previous studies that suggested effects of probiotics. Perhaps the reason for such result is a difference in the type, number and duration of probiotics use compared with other studies.

Keywords: Probiotics, Demyelination, Ethidium bromide, $Fe^{+}2$, Vitamin D_3.