

Original Paper

## Effect of *Lactobacillus paracasei* probiotic in Parkinson's male rats

Kimia Khandestan, M.Sc Student in Microbiology, Department of Biology, Islamic Azad University, Central Tehran branch, Tehran, Iran.

ORCID 0000-0002-3423-3473

\*Bahareh Pakpour (Ph.D), Corresponding Author, Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Central Tehran branch, Tehran, Iran.  
E-mail: b\_pakpour@yahoo.com

ORCID 0000-0001-6352-036X

Maryam Tajabadi Ebrahimi (Ph.D), Associate Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Central Tehran branch, Tehran, Iran.

ORCID 0000-0003-2780-3447

---

### Abstract

**Background and Objective:** Parkinson's disease is a neurological disorder caused by the loss of dopaminergic neurons in pars compacta of substantial nigra. The most important symptoms of this disease include slow motion, lack of movement, tremor and imbalance. This study was done to determine the effect of probiotic *Lactobacillus paracasei* on motor disorders caused by injection of 6-hydroxy dopamine in Parkinson's model in male rats.

**Methods:** In this experimental study, 48 male rats were randomly allocated into six groups. To create an animal model of Parkinson's disease, a black body component in male rats was injected 6-hydroxy dopamine (6-OHDA) (0.5 mg/kg) unilaterally by stereotaxic apparatus. After 3 weeks of recovery, to evaluation of degradation rate, animals were received apomorphine, intraperitoneally. In the first experiment, rats were randomly divided into Sham and Parkinson's (injured) groups, the Sham group were received only water and food, and the injured group received 6-hydroxy-dopamine. In the second experiment, male rats were divided into 4 groups of 8 rats, each of the 4 groups was injected 6-hydroxy-dopamine and 21 days later, they were tested for assay of apomorphine. The results were recorded, then for 28 days, the first group was taken as control. The second group of saline, the third group of milk, the fourth group of milk and probiotic were gavaged. At the end of day 28, once again, each group was subjected to rotation of apomorphine test and the rotations were recorded.

**Results:** The behavioral analysis of saline, milk, milk plus probiotics were indicated that the group receiving probiotic *Lactobacillus paracasei* plus milk was significantly less apomorphine rotation test than the saline group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** It seems that probiotic *Lactobacillus paracasei* can reduces Parkinson's disease symptoms.

**Keywords:** Parkinson Disease, *Lactobacillus paracasei*, Probiotics, Rat

---

Received 1 Jan 2020

Revised 9 Jun 2020

Accepted 15 Jun 2020

Cite this article as: Khandestan K, Pakpour B, Tajabadi Ebrahimi M. [Effect of *Lactobacillus paracasei* probiotic in Parkinson's male rats]. J Gorgan Univ Med Sci. 2020 Autumn; 22(3): 65-72. [Article in Persian]

## اثر مصرف خوراکی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازی بر موش‌های صحرایی نر: مدل حیوانی بیماری پارکینسون

ORCID 0000-0002-3423-3473

کیمیا خندستان، دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

ORCID 0000-0001-6352-036X

\* دکتر بهاره پاکپور، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

ORCID 0000-0003-2780-3447

دکتر مریم تاج‌آبادی ابراهیمی، دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** بیماری پارکینسون یک اختلال عصبی است که به علت از بین رفتن نورون‌های دوپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه ایجاد می‌شود. مهم‌ترین علائم این بیماری شامل کندی حرکت، عدم حرکت، لرزش و عدم تعادل است. این مطالعه به منظور تعیین اثر مصرف خوراکی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازی بر موش‌های صحرایی نر در مدل حیوانی بیماری پارکینسون انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی از ۴۸ راس موش صحرایی نر در ۶ گروه استفاده شد. برای ایجاد مدل حیوانی بیماری پارکینسون، بخش متراکم جسم سیاه در حیوانات با تزریق ۶ هیدروکسی دوپامین (OHDA-6) (۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش) به‌طور یک‌طرفه توسط دستگاه استریوتاکس تخریب شد. پس از ۳ هفته ریکاوری موش‌ها به منظور ارزیابی میزان تخریب، موش‌های صحرایی به صورت درون صفاقی آپومورفین دریافت کردند. تست چرخشی آپومورفین به منظور سنجش پارکینسون انجام گردید. در آزمایش اول موش‌های صحرایی به‌صورت تصادفی به دو گروه Sham و گروه پارکینسونی شده (آسیب‌دیده) تقسیم شدند. گروه Sham فقط آب و غذا و گروه آسیب‌دیده ۶ هیدروکسی دوپامین دریافت کردند. در آزمایش دوم موش‌های صحرایی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند، هر ۴ گروه تحت تاثیر ۶-هیدروکسی دوپامین قرار گرفتند و ۲۱ روز بعد تحت آزمایش سنجش آپومورفین قرار گرفتند و نتایج ثبت گردید. سپس به مدت ۲۸ روز گروه اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و تحت تیمار قرار نگرفت. گروه دوم سالیین، گروه سوم شیر و گروه چهارم شیر به همراه پروبیوتیک به صورت گاوآژ دریافت کردند. در انتهای روز ۲۸ دوباره هر گروه تحت آزمون چرخش آپومورفین قرار گرفتند و میزان چرخش‌ها ثبت شدند.

**یافته‌ها:** آزمون‌های رفتاری به ترتیب در گروه‌های سالیین، شیر، شیر + پروبیوتیک نشان داد که گروه دریافت‌کننده شیر همراه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازی به صورت معنی‌داری چرخش آپومورفین کمتری نسبت به گروه دریافت‌کننده سالیین داشتند ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازی منجر به بهبود بیماری پارکینسون می‌شود.

**کلید واژه‌ها:** بیماری پارکینسون، لاکتوباسیلوس پاراکازی، پروبیوتیک‌ها، موش صحرایی

\* نویسنده مسؤل: دکتر بهاره پاکپور، پست الکترونیکی b\_pakpour@yahoo.com

نشانی اول: تهران، بلوار اشرفی اصفهانی، بلوار امام حسن (ع)، مجتمع دانشگاهی آیت اله رفسنجانی، گروه زیست‌شناسی، نشانی دوم: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

وصول مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۱۱، اصلاح نهایی: ۱۳۹۹/۳/۲۰، پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۳/۲۶

### مقدمه

(۱). سخت شدن عضلات، برادی کینزیا، آکینزیا، تعادل بد یا ضعیف، ارتعاش و لرزش دست و پا در حالت استراحت از علائم بیماری پارکینسون هستند. بر طبق مطالعاتی که درباره پروبیوتیک صورت گرفته؛ مشخص شده پروبیوتیک می‌تواند باعث افزایش نوروترانسمیترهایی در مغز شود و با تاثیر مستقیمی که بر مغز می‌گذارد؛ می‌تواند نوروترانسمیتری مانند دوپامین را افزایش دهد در نتیجه از بروز بیماری‌هایی مانند پارکینسون جلوگیری می‌کند و یا باعث بهبود عوارض و علائم این بیماری می‌شود (۲).

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی میکروبی زنده‌ای هستند که از

بیماری پارکینسون از گروه بیماری‌های تحلیل‌برنده دستگاه خارجی هرمی است که در آن یاخته‌های جسم سیاه واقع در مغز میانی به تدریج از بین رفته و دوپامین که توسط آنها ساخته می‌شود؛ کاهش می‌یابد. بیماری پارکینسون به انواع مختلف تقسیم‌بندی می‌شود. در بررسی آسیب‌شناختی، جسم سیاه رنگدانه خود را از دست می‌دهد و درون سلول‌های آن ذراتی به نام Lewy bodies مشاهده می‌گردد. نشانه پاتولوژیکی پارکینسون آسیب‌های وخیم و پیشرونده در نورون‌های دوپامینرژیک و بیشتر در جسم سیاه است

طریق بهبود توازن فلور میکروبی روده اثرات مفیدی بر روی سلامت مصرف کننده دارند. این گروه از باکتری‌ها در قسمت‌های مختلف بدن به ویژه دهان و دستگاه گوارش و دستگاه ادراری تناسلی نقش مهمی در بازدارندگی عفونت‌ها دارند (۳). پروبیوتیک‌ها با تولید موادی مثل اسیدلاکتیک، باکتریوسین و پراکسید هیدروژن می‌توانند از بروز بسیاری از بیماری‌ها جلوگیری کنند.

معیارهای انتخاب سویه‌های پروبیوتیک‌ها شامل عدم بیماری‌زایی و عدم توانایی تولید سم زنده و فعال ماندن در دستگاه گوارش به معنی مقاومت در برابر تولید اسید معده و نمک‌های صفرای، همچنین توانایی اتصال به سلول‌های مخاط روده کولون و توانایی تثبیت فلور باکتریایی روده و مقاومت و زنده ماندن در فرایند تولید است (۴).

متداول‌ترین گونه‌های مورد استفاده در محصولات پروبیوتیک مربوط به گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند که شامل نژادهای خاصی از جنس‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم می‌شود (۵). میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک بر اساس منشاء به سه دسته انسانی، حیوانی و محیطی تقسیم می‌شوند. اگرچه جوامع باکتریایی به طرز وسیعی میان افراد مختلف متفاوت است و تصور غالب بر این است که ترکیب دقیق این جوامع در بدن تا حدودی توسط ژنتیک تعیین می‌شود (۶).

لاکتوباسیلوس‌ها، گرم مثبت، منظم و طویل هستند. به طوری که طول آنها به ۱۰ میکرون می‌رسد. باکتری‌های این جنس بدون هاگ بوده و عمدتاً غیر متحرک، پلی مرفیک، بی‌هوازی و اختیاری هستند. بهترین pH برای رشد لاکتوباسیل ۵ تا ۶/۵ است. لاکتوباسیل‌ها در شرایط بی‌هوازی یا حداقل اکسیژن، رشد دارند. برای مثال در بزاق دهان، واژن، آب سبزیجات و لبنیات وجود دارند. لاکتوباسیل‌ها باکتری‌های تخمیرکننده بوده و بیشتر محصولات آنها اسیدلاکتیک است. همچنین دارای خاصیت پروبیوتیکی بوده و اغلب در درمان عفونت استفاده می‌شوند. مثلاً در درمان اسهال ماست مصرف می‌کنند که ماست پر از اسیدلاکتیک است و باکتری‌های بیماری‌زا را از بین می‌برد. تحقیقات نشان می‌دهد که این باکتری‌ها حتی می‌توانند بر روی مغز نیز اثر گذاشته و شیمی مغز را تغییر داده و سبب حالت و رفتار شوند. مدارک روز افزونی دال بر وجود میان‌کنش بین میکروبیوتای روده و سیستم عصبی مرکزی است که تحت عنوان محور میکروبیوم-روده-مغز شناخته می‌شود (۷).

محور روده‌ای - مغزی باعث ایجاد یک رابطه دوطرفه مابین مغز و روده است. دوطرفه بودن این رابطه به معنی اثر روده بر مغز و همچنین تاثیر مغز بر کارکرد دستگاه گوارش است. محور روده‌ای - مغزی توسط اعصاب واگ از مغز به دستگاه گوارش و سایر ارگان‌ها متصل می‌شود. اعصاب واگ مسؤول ارسال پیام به

ارگان‌های مختلف و همچنین دریافت پیام از سایر ارگان‌ها مانند روده است. مطالعات نشان داده که عصب واگ از مهم‌ترین راه‌های برقراری ارتباط میکروب‌های روده به مغز است (۸). محققین در مدل حیوانی ثابت کرده‌اند که استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس باعث کاهش استرس و افسردگی نسبت به موش‌هایی که پروبیوتیک دریافت نکرده‌اند؛ شده است. به علاوه موش‌های دریافت کننده پروبیوتیک میزان کمتری از هورمون‌های کورتیکواستروئید وابسته به میزان استرس تولید کرده‌اند. همچنین در آنها میزان بیان ژن رسپتورهای نوروترانسمیترهای گابای بیشتری در مغز دیده شده که نشان‌دهنده توانایی پروبیوتیک‌ها در اثرگذاری مستقیم در مغز عنوان شده است (۹).

تعدادی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها قادر به تولید مقادیر قابل توجهی گابا هستند که از بین باکتری‌ها، باکتری‌های اسیدلاکتیک به خصوص لاکتوباسیلوس پاراکازی مورد توجه است. زیرا از نظر فیزیولوژیکی خاص و به طور کلی ایمن است. این باکتری به طور مطلوب در دمای بین ۳۷-۱۰ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند (۱۰).

از آنجایی که بیماری پارکینسون یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در افراد مسن طی سال‌های اخیر است و تاکنون درمان قطعی برای این بیماری شناخته نشده و داروهای تجویز شده به مبتلایان فقط تا اندازه‌ای علائم بیماری را به تاخیر می‌اندازند؛ لذا در تحقیق حاضر از پروبیوتیک‌ها که به نظر می‌رسد؛ ارتباط بسیار خوبی بین سیستم گوارشی و سیستم عصبی برقرار می‌کنند (۱۰)؛ استفاده شد تا اثرات آن به خصوص در بیماری پارکینسون مشخص شود. هدف از تحقیق حاضر بررسی نقش پروبیوتیک‌ها در درمان بیماری پارکینسون با استفاده از پروبیوتیک بومی ایران بود.

### روش بررسی

در این مطالعه تجربی از ۴۸ سر موش صحرایی نر با وزن تقریبی ۲۰۰-۱۸۰ گرم تهیه شده از انستیتو پاستور ایران در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی در سال ۱۳۹۷ استفاده شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران (IR.IAU.TMU.REC.1398.092) قرار گرفت.

حیوانات بعد از انتقال به حیوانخانه تحقیقاتی در قفس‌های ۵تایی با دوره شبانه روزی طبیعی (۱۲ ساعت روشنایی - تاریکی) و در دمای ۲۳ الی ۲۸ درجه سانتی‌گراد با آب و غذای کافی نگهداری شدند. قفس موش‌ها هر سه روز یکبار تمیز شد. به مدت سه هفته به موش‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوانخانه قبل از جراحی وفق دهند و در این مدت وزن موش‌ها به اندازه موردنظر یعنی بین ۲۵۰-۲۲۰ رسید. در طول سه هفته هر روز حیوانات Handling شدند تا در هنگام آزمایش استرس ناشی از گرفتن و کار

مخصوص، درون فریزر (دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد) شدند. بالاترین و غلیظترین دوز به عنوان دوز مادر تهیه و دوزهای رقیق‌تر از آن ساخته شد. داروهای ۶- هیدروکسی دوپامین و آپومورفین ساخت شرکت sigma (آمریکا) و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازی از شرکت تک ژن (با کد ثبت TD3) تهیه شدند. معیارهای انتخاب سویه‌های پروبیوتیک‌ها شامل عدم بیماری‌زایی و عدم توانایی تولید سم زنده و فعال ماندن در دستگاه گوارش به معنی مقاومت در برابر تولید اسید معده و نمک‌های صفاوی، همچنین توانایی اتصال به سلول‌های مخاط روده کولون و توانایی تثبیت فلور باکتریایی روده و مقاومت و زنده ماندن در فرایند تولید بودند که توسط شرکت تک ژن تایید و انجام شدند.

**جراحی:** موش‌های صحرایی توسط تزریق کتامین هیدروکلراید (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (شرکت ALFASAN) به علاوه زایلین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (شرکت ALFASAN) بیهوش شدند. برای جلوگیری از سفتی عضلات در هنگام بیهوشی زایلین با کتامین به ترتیب با نسبت ۲ به ۸ قبل از تزریق مخلوط شد. بعد از بیهوشی حیوان، موهای روی سر از فاصله بین دو چشم تا دو گوش چیده شد و حیوان در دستگاه استریوتاکسی قرار گرفت. در این وضعیت میله‌های گوسی در فرورفتگی مربوط به صندوق صماخی و دندان‌های پیشین در داخل سوراخ میله دندانی جاسازی شدند. با پنبه آغشته به الکل آن محل ضدعفونی شد و توسط تیغ جراحی استریل یک برش از فاصله بین چشم‌ها تا گوش‌ها در قسمت وسط در امتداد شیار ساجیتال میانی حجمه داده شد. بعد از برش با کنار زدن پوست سر به وسیله پنبه و الکل سفید تمام چربی‌هایی که بین پوست و استخوان حجمه بود؛ کاملاً برداشته شد و پس از خشک شدن کامل سطح حجمه دو نقطه براگما و لامدا (محل تقاطع درز تاجی و درز سهمی) و خط وسط آن کاملاً مشخص شد و با استفاده از اطللس Paxinos و همکاران (۱۱)، مختصات ماده سیاه (AP: -5/3، ML: 1/7، DV: 7/2) مشخص شد. با استفاده از جدول و نشان‌دار کردن مکانی که کانول باید در آن قرار گیرد و با استفاده از مته به دقت این مکان سوراخ گردید. بعد از این کار با استفاده از دستگاه استریوتاکسی یک کانول ۲۲ گیج به طول ۱/۲ میلی‌متر در داخل سوراخی که قبلاً توسط مته ۰/۷ ایجاد شده بود؛ قرار گرفت.

**تزریق درون مغزی دارو:** به دلیل این که مدت زمان تزریق حدود ۱۰ دقیقه بود و نگهداری موش در حالت طبیعی برای تزریق مشکل بود؛ لذا ترجیح دادیم تزریق دارو را بلافاصله بعد از کانول‌گذاری و همان زمانی که موش بیهوش بود؛ انجام دهیم. برای تزریق دارو از کانول ۲۷ گیج دندانی‌شکی به طول ۱/۳ میلی‌متر استفاده شد که یک میلی‌متر باید بزرگ‌تر از کانول راهنما باشد و

با آنها وجود نداشته باشد. هر حیوان فقط یکبار استفاده شد و در هر گروه ۸ حیوان قرار داده شد. تمام آزمایش‌ها در طول روز انجام شد. موش‌های صحرایی در ۶ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه‌بندی حیوانات در زیر شرح داده شده است.

در گروه سالم اول و گروه دریافت‌کننده ۶- هیدروکسی دوپامین، تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین برای القا پارکینسون مورد آزمایش قرار گرفت.

گروه سالم اول: حیوانات این گروه هیچ تزریقی را دریافت نکردند و جراحی نشدند و پس از گذشت سه هفته از ابتدای مطالعه، تست چرخش آپومورفین گرفته شد.

گروه دریافت‌کننده ۶- هیدروکسی دوپامین: حیوانات این گروه ۶- هیدروکسی دوپامین را به صورت تزریق در درون ماده سیاه دریافت کردند. سه هفته پس از تزریق، تست چرخش آپومورفین گرفته شد.

در گروه‌های سالم دوم، تجربی اول، تجربی دوم و تجربی سوم، اثر تیمار پروبیوتیک بر القا پارکینسون توسط ۶- هیدروکسی دوپامین ارزیابی شد.

گروه سالم دوم: حیوانات این گروه هیچ تزریق درون مغزی را دریافت نکردند و به ترتیب پس از گذشت سه هفته و هفت هفته از ابتدای مطالعه، تست چرخشی آپومورفین از آنها گرفته شد.

گروه تجربی اول (پارکینسون): حیوانات این گروه جراحی شدند و ۶- هیدروکسی دوپامین را به صورت تزریق درون مغزی دریافت کردند. پس از سه هفته تست چرخشی آپومورفین از آنها گرفته شد. سپس به مدت یک ماه سالیان را به صورت گاوژ دریافت کردند و پس از گذشت هفت هفته تست چرخشی آپومورفین از آنها گرفته شد.

گروه تجربی دوم (شیر): حیوانات این گروه جراحی شدند و ۶- هیدروکسی دوپامین را به صورت تزریق درون مغزی دریافت کردند. پس از سه هفته تست چرخشی آپومورفین از آنها گرفته شد. سپس به مدت یک ماه شیر را به صورت گاوژ دریافت کردند و پس از گذشت هفت هفته تست چرخشی آپومورفین از آنها گرفته شد.

گروه تجربی سوم (پروبیوتیک): حیوانات این گروه جراحی شدند و ۶- هیدروکسی دوپامین را به صورت تزریق درون مغزی دریافت کردند. پس از سه هفته تست چرخشی آپومورفین از آنها گرفته شد. سپس به مدت یک ماه شیر و پروبیوتیک را به صورت گاوژ دریافت کردند و پس از گذشت هفت هفته تست چرخشی آپومورفین از آنها گرفته شد.

**طرز تهیه محلول‌های دارویی:** همه داروهای مصرفی در سالیان حل شده بودند و بعد از حل شدن، دور از نور و در ظروف

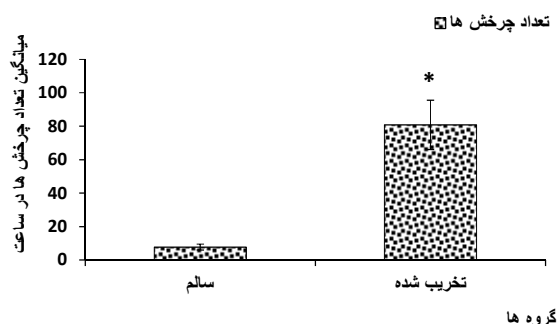
۳۸ سانتی متر قرار داده شدند و به آنها ۱۵ دقیقه به منظور سازش با محیط، زمان داده شد. سپس آپومورفین هیدروکلراید ۰/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به موش‌ها تزریق شد و یک دقیقه پس از آن تعداد چرخش‌ها به طرف محل تزریق سم (عدد منفی) و یا خلاف آن (عدد مثبت) به مدت یک ساعت در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای ثبت گردید. در پایان تعداد چرخش‌های سمت آسیب دیده از سمت مخالف تفریق شد که بیانگر تعداد چرخش خالص به سمت مخالف بود. چرخش بیشتر نشان‌دهنده شدت ضایعه و از دست دادن سلول‌های دوپامینرژیک بود.

**تجزیه و تحلیل آماری:** داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-22 و آزمون آماری تحلیل واریانس و تست Tukey در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

### یافته‌ها

نتایج حاصل از تست چرخش ناشی از آپومورفین گروه سالم اول و گروه دریافت کننده ۶-هیدروکسی دوپامین نشان داد که سه هفته بعد از ایجاد آسیب، بین گروه ضایعه دیده نسبت به گروه سالم در میانگین تعداد چرخش‌ها اختلاف آماری معنی داری وجود دارد ( $P < 0/001$ ). به طوری که گروه آسیب دیده بعد از تزریق داخل صفاقی آپومورفین، رفتار چرخشی بیشتری را از خود نشان دادند و تزریق ۶-هیدروکسی دوپامین منجر به القا پارکینسون در سه هفته پس از تزریق شد (نمودار یک).

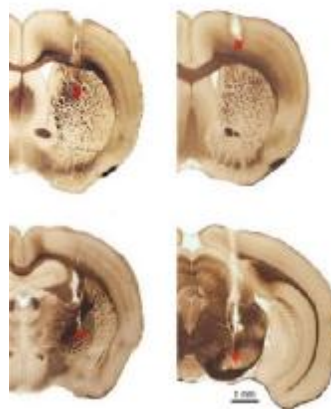
نتایج میانگین تعداد چرخش‌ها پس از تزریق آپومورفین نشان داد که در گروه تجربی دوم، کاهش آماری معنی داری در تعداد چرخش‌ها در هفته هفتم بعد از آسیب نسبت به هفته سوم مشاهده شد ( $P < 0/01$ ). همچنین در گروه تجربی سوم نیز کاهش آماری معنی داری در تعداد چرخش‌ها در هفته هفتم بعد از آسیب نسبت به هفته سوم مشاهده گردید ( $P < 0/001$ ).



نمودار ۱: میانگین تعداد چرخش‌ها (ساعت) در دو گروه سالم و تخریب شده با تزریق ۶-هیدروکسی دوپامین (پارکینسون القا شده) در موش‌های صحرایی نر  
داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد نشان داده شده است.  
\*  $P < 0/001$  در مقایسه با گروه سالم

دقیقاً به ناحیه جسم سیاه برسد؛ ولی به آن آسیب نرساند. سرسوزن ۲۷ گیج دندانپزشکی را داخل کانول ۲۲ قرار دادیم. سپس تزریق به وسیله کت دان تیوب و سرنگ ۵ میکرولیتری همیلتون انجام شد. تزریق به آرامی انجام شد تا دارو کم کم وارد جسم سیاه شده و از کانول بیرون نیاید و به درستی جذب هسته سیاه شود. پس از تزریق مقداری پودر پنی‌سیلین برای جلوگیری از عفونت در محل بریدگی ریخته شد و پس از آن به وسیله نخ بخیه سر موش‌ها بسته شد.

**برش بافتی:** پس از انجام آزمایش‌های لازم و تست نهایی برای اطمینان از درست بودن محل جراحی، پس از بیهوشی حیوانات با کلروفورم، قربانی شدند. با تزریق رنگ متیلن بلو ۱ درصد (۵/۵ میکرولیتر) به درون کانول، مغز از درون جمجمه بیرون آورده شد. به منظور جلوگیری از فاسد شدن و همچنین به منظور سفت شدن بافت‌ها به مدت یک هفته درون فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت و بعد از آن برش عرضی به قطر ۰/۵ میلی متر داده شد. سپس با اطلس Paxinos و همکاران (۱۱) مقایسه گردید (شکل یک).



شکل ۱: برش عرضی از بافت مغز موش صحرایی نر (۱۱)

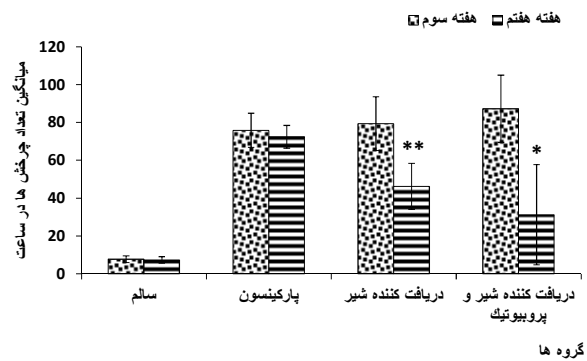
**گاواژ کردن:** برای هر بار گاواژ کردن گروه دریافت کننده پروبیوتیک به همراه شیر، ابتدا برای هر موش میزان  $30 \times 10^9$  cfu از پروبیوتیک (۱۲) را درون فالکون حاوی یک میلی لیتر شیر ریختیم و خوب هم زده شد و سپس گاواژ انجام شد.

**تست چرخش آپومورفین:** چنانچه تزریق سم ۶-هیدروکسی دوپامین سبب تخریب گسترده نورونی در دسته میانی مغز قدامی گردید؛ دو تا چهار هفته پس از جراحی، حیوانات در قبال تزریق آپومورفین (آگونیست گیرنده‌های دوپامینرژیک) چرخش‌های پی‌درپی به سمت مقابل محل تزریق نشان دادند. تعداد این چرخش‌ها در واحد زمان معیاری از شدت تخریب نورونی در دسته میانی مغز قدامی بود (۱۳). برای اجرای این آزمون ابتدا موش‌ها در داخل یک استوانه پلاستیکی و شفاف با قطر ۲۸ سانتی متر و ارتفاع

آلزایمر و پارکینسون نقش دارد. تغییر ساختار سیستم استیل کولین در اختلالات شناختی عصبی اصلی مثل پارکینسون نیز حضور دارد. شواهد زیادی مبنی بر نقص در گیرنده‌های استیل کولین در بروز علائم پاتولوژیک بیماران پارکینسونی وجود دارد (۱۹). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که تراکم گیرنده‌های موسکاربینی نوع یک در بیماران مبتلا به پارکینسون تغییر می‌کند. بر طبق مطالعه زرین دست و همکاران میزان پروتئین MI در قشر جلوی مغز کاهش می‌یابد که این امر با شدت زوال شناختی در ارتباط بوده و شدت بروز بیماری پارکینسون را افزایش می‌دهد (۱۹). پروبیوتیک‌ها در سطح مکانیسم‌های مولکولی در انتقال سیناپسی نقش ایفا می‌کنند. مطالعات نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها در تولید نوروترانسمیترها از جمله استیل کولین نقش موثر داشته و احتمالاً از این طریق توانسته در کاهش بروز علائم بیماری پارکینسون مفید واقع شوند (۲۰).

نوروترانسمیترهایی از جمله گابا را می‌توان نام برد که در اکثر سیناپس‌های مغز وجود دارند (۲۱). نقش گابا در تمایز مهاجرت و مرگ نورون‌ها و شکل‌گیری نواحی مختلف مغز مشخص شده است و می‌توان گفت که نقص در گابا نقش مهمی در ایجاد بیماری پارکینسون ایفا می‌کند (۲۲). طی تحقیقات انجام شده پروبیوتیک‌ها علاوه بر این که میزان کمتری از هورمون‌های کورتیکواستروئید وابسته به میزان استرس تولید کردند؛ نقش آنها در افزایش بیان ژن‌های تولید کننده گابا در مغز نیز مشخص شده است که نشان‌دهنده توانایی پروبیوتیک در اثرگذاری مستقیم در مغز عنوان شده است (۲۲). احتمالاً در مطالعه حاضر نیز پروبیوتیک‌ها با افزایش گابا باعث بهبود حافظه فضایی شده و به دنبال آن بهبود بیماری پارکینسون گشته است.

در مورد نقش دوپامین در حافظه و یادگیری شواهد فارماکولوژیکی وجود دارد (۲۳). هر دو گیرنده دوپامینی D1 و D2 در فرآیندهای مختلف حافظه و یادگیری نقش دارند (۲۴). گیرنده‌های دوپامینی موجب افزایش شناخت غیرفعال و بهبود کارایی شناختی در موش می‌شوند (۲۵). در این زمینه Le Heron و همکاران نشان دادند که با تخریب نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه، از طریق دو مکانیسم کمپلکس I میتوکندری و ایجاد استرس اکسیداتیو، می‌توان ورودی‌های دوپامینی هیپوکامپ را حذف و حیوان مدل پارکینسونی با اختلال حافظه را به وجود آورد (۲۶). بنابراین آزاد کردن دوپامین در این منطقه نقش مهمی را در افزایش سیناپس‌های بین نورونی و تقویت حافظه ایفاء می‌کند (۲۷). اهمیت این مساله به حدی است که از آن به عنوان سیستم‌های حافظه استریاتال و هیپوکامپ نام برده شده و تعداد زیادی از گیرنده‌های دوپامینی در این مناطق شناسایی شده‌اند و حتی با تزریق آگونیست و آنتاگونیست‌های دوپامینی در این مناطق تقویت و یا



نمودار ۲: میانگین تعداد چرخش‌ها (ساعت) در گروه سالم، گروه پارکینسون القا شده با تزریق ۶-هیدروکسی دوپامین، گروه دریافت کننده شیر و گروه دریافت کننده شیر توام با پروبیوتیک در موش‌های صحرایی نر داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد نشان داده شده است. \*  $P < 0.001$ ، \*\*  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه سالم

## بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازی توانست سبب افزایش نوروترانسمیتر دوپامین در نواحی مختلف مغز از جمله در جسم سیاه مغز گردد.

با توجه به مطالعات انجام شده در گذشته تزریق یک طرفه ۶-هیدروکسی دوپامین به درون جسم سیاه مغز موش صحرایی تخریب فوری و کامل نورون‌های دوپامینرژیک ایجاد می‌شود (۱۴) که با نتایج مطالعه حاضر همسو است. همچنین نتایج مطالعه ما نشان داد که مصرف یک ماهه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازی منجر به بهبود علائم پارکینسون در موش‌های صحرایی می‌گردد.

غلظت آهن آزاد در عقده‌های قاعده‌ای بیماران مبتلا به بیماری پارکینسون افزایش می‌یابد. آهن آزاد کاتالیزور واکنش تولید رادیکال‌های آزاد است و در پراکسیداسیون لیپید و نورودژنراسیون نقش دارد (۱۵). تحقیقات نشان داده که پروبیوتیک‌ها با کاهش تولید ROS از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های تولید کننده رادیکال آزاد موجب تنظیم سطح آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شوند (۱۶). در واقع پروبیوتیک‌ها این عمل را از طریق تولید اسید بوتریک انجام می‌دهند و با تنظیم تعادل رادیکال‌های آزاد بافت و اندام آسیب دیده بدن را ترمیم می‌کنند. از این رو موش‌های صحرایی تحت رژیم پروبیوتیک، بهبود علائم پارکینسون را نشان داده‌اند (۱۷).

استیل کولین یک انتقال دهنده عصبی است و در بسیاری از سیناپس‌های سراسر دستگاه عصبی حضور دارد. معمولاً این انتقال دهنده عصبی اثر تحریک کننده دارد؛ اما می‌تواند اثر بازدارندگی نیز داشته باشد که به نوع مولکول گیرنده در غشای نورون گیرنده وابسته است (۱۸). استیل کولین مخصوصاً در ناحیه‌ای از مغز به نام هیپوکامپ زیاد دیده می‌شود. هیپوکامپ در تشکیل خاطرات جدید نقش مهمی دارد. این انتقال دهنده در بیماری

### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازی به صورت خوراکی، سبب بهبود سلول‌های آسیب دیده عصبی می‌شوند. به طوری که چرخش‌ها به سمت مقابل ناحیه تخریب شده کاهش نشان داد که تایید کننده اثر درمانی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازی در مقابل سمیت عصبی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۱۰۱۳۰۵۴۸۹۶۲۰۱۳) خانم کیمیا خندستان برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز بود. بدین وسیله از همه افرادی که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند؛ از جمله کارشناسان آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز تشکر می‌نمایم.

### References

1. Avenali M, Tassorelli C, De Icco R, Perrotta A, Serrao M, Fresia M, et al. Pain processing in atypical Parkinsonisms and Parkinson disease: A comparative neurophysiological study. *Clin Neurophysiol.* 2017 Oct; 128(10): 1978-84. DOI: 10.1016/j.clinph.2017.06.257
2. Umbrello G, Esposito S. Microbiota and neurologic diseases: potential effects of probiotics. *J Transl Med.* 2016; 14: 298. DOI: 10.1186/s12967-016-1058-7
3. Araya AV, Atwater I, Navia MA, Jeffs S. Evaluation of insulin resistance in two kinds of South American camelids: llamas and alpacas. *Comp Med.* 2000 Oct; 50(5): 490-94.
4. Jafari E, Vahedi H, Merat S, Momtahan S, Riahi A. Therapeutic effects, tolerability and safety of a multi-strain probiotic in Iranian adults with irritable bowel syndrome and bloating. *Arch Iran Med.* 2014 Jul; 17(7): 466-70.
5. Jafari M, Mortazavian AM, Hosseini H, Safaei F, Mousavi Khaneghah A, Sant'Ana AS. Probiotic *Bacillus*: Fate during sausage processing and storage and influence of different culturing conditions on recovery of their spores. *Food Research International.* 2017 May; 95L 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.001>
6. Salehizadeh M, Modarressi MH, Mousavi SN, Ebrahimi MT. Effects of probiotic lactic acid bacteria on growth performance, carcass characteristics, hematological indices, humoral immunity, and IGF-I gene expression in broiler chicken. *Trop Anim Health Prod.* 2019; 51(8): 2279-86. DOI: 10.1007/s11250-019-01935-w
7. Noohi N, Ebrahimpour G, Rohani M, Talebi M, Pourshafie MR. Evaluation of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of strains of *Pediococcus* species isolated from broiler chickens. *Br Poult Sci.* 2016 Jun; 57(3): 317-23. DOI: 10.1080/00071668.2016.1169247
8. Sarkar A, Lehto SM, Harty S, Dinan TG, Cryan JF, Burnet PWJ. Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria-Gut-Brain Signals. *Trends Neurosci.* 2016 Nov; 39(11): 763-81. DOI: 10.1016/j.tins.2016.09.002
9. Amara AA, Shibl A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharm J.* 2015 Apr; 23(2): 107-14. DOI: 10.1016/j.jsps.2013.07.001

اختلال حافظه ایجاد شده است (۲۸). از آنجایی که طی مطالعات گذشته (۲۹ و ۳۰) نشان داده شده که پروبیوتیک‌ها در تولید نوروترانسمیترها از جمله سروتونین و دوپامین نقش عمده‌ای دارند؛ احتمالاً در مطالعه حاضر نیز پروبیوتیک با افزایش دوپامین باعث بهبود حافظه فضایی و به دنبال آن بهبود بیماری پارکینسون شده است. بدین ترتیب اثر درمانی در مبتلا شدن موش‌های صحرایی تحت درمان با پروبیوتیک به بیماری پارکینسون داشته است. لازم به ذکر است با توجه به پرهزینه بودن مطالعات مولکولی به خصوص در زمینه بیان پروتئین‌ها و نوروترانسمیترها با روش وسترن بلات دانشجو قادر به انجام این تست‌ها نبود؛ اما می‌تواند به عنوان یک پیشنهاد بسیار مهم برای تایید نهایی این مطالعه انجام شود. در پایان پیشنهاد می‌شود موارد ذکر شده از جمله نقش پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پاراکازی در افزایش دوپامین مغز که محتمل‌ترین پیشنهاد در بهبود پارکینسون است؛ با استفاده از آزمایشات سلولی مولکولی بررسی شود.

10. Wang HX, Wang YP. Gut Microbiota-brain Axis. *Chin Med J (Engl).* 2016 Oct; 129(19): 2373-80. DOI: 10.4103/0366-6999.190667
11. Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods.* 1980 Dec; 3(2): 129-49. DOI: 10.1016/0165-0270(80)90021-7
12. Bاده‌نووش B, Karamali M, Zarrati M, Jamilian M, Bahmani F, Tajabadi-Ebrahimi M, et al. The effects of probiotic supplementation on biomarkers of inflammation, oxidative stress and pregnancy outcomes in gestational diabetes: randomized controlled trial. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018 May; 31(9): 1128-36. DOI: 10.1080/14767058.2017.1310193
13. Fujita M, Nishino H, Kumazaki M, Shimada S, Tohyama M, Nishimura T. Expression of dopamine transporter mRNA and its binding site in fetal nigral cells transplanted into the striatum of 6-OHDA lesioned rat. *Molecular Brain Research.* 1996 Jul; 39(1-2): 127-36. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(96\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0169-328X(96)00018-6)
14. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 1968 Dec; 5(1): 107-110. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7)
15. Puelles L, Verney C. Early neuromeric distribution of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in human embryos. *J Comp Neurol.* 1998 May; 394(3): 283-308. DOI: 10.1002/(sici)1096-9861(19980511)394:3<283::aid-cne2>3.0.co;2-y
16. Jaksevic M, Aaby K, Borge GIA, Jeppsson B, Ahméd S, Molin G. Antioxidative protection of dietary bilberry, chokeberry and *Lactobacillus plantarum* HEAL19 in mice subjected to intestinal oxidative stress by ischemia-reperfusion *BMC Complement Altern Med.* 2011; 11: 8. DOI: 10.1186/1472-6882-11-8
17. Kaizu H, Sasaki M, Nakajima H, Suzuki Y. Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *J Dairy Sci.* 1993 Sep; 76(9): 2493-99. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77584-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77584-0)
18. Pakpour B, Ahmadi S, Nayer-Nouri T, Oryan S, Zarrindast MR. Inhibitory avoidance memory deficit induced by scopolamine: interaction with glutamatergic system in the nucleus accumbens. *Behavioural Pharmacology.* 2010 Dec; 21(8): 719-26. DOI: 10.1097/fbp.0b013e328333fa785

19. Zarrindast MR, Ownegh V, Rezayof A, Ownegh F. The involvement of dorsal hippocampus in dextromethorphan-induced state-dependent learning in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2014 Jan; 116: 90-95. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.015>
20. Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011 Jan; 17(1): 10-15. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2010.08.003
21. Zarrindast MR, Farahvash H. Effects of GABA-ergic drugs on penile erection induced by apomorphine in rats. *Psychopharmacology*. 1994 Jun; 115(1-2): 249-53.
22. Mulak A, Bonaz B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol*. 2015 Oct; 21(37): 10609-20. DOI: 10.3748/wjg.v21.i37.10609
23. Zarrindast MR, Khakpai F. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Arch Iran Med*. 2015; 18(9): 591-603.
24. Piri M, Rostampour M, Nasehi M, Zarrindast MR. Blockade of the dorsal hippocampal dopamine D1 receptors inhibits the scopolamine-induced state-dependent learning in rats. *Neuroscience*. 2013 Nov; 252: 460-67. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.003>
25. Nasehi M, Hajian M, Ebrahimi-Ghiri M, Zarrindast MR. Role of the basolateral amygdala dopamine receptors in arachidonylcyclopropylamide-induced fear learning deficits. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016 Jan; 233(2): 213-24. DOI: 10.1007/s00213-015-4096-6
26. Le Heron C, Kolling N, Plant O, Kienast A, Janska R, Siang Ang Y, et al. Dopamine Modulates Dynamic Decision-Making during Foraging. *J Neurosci*. 2020; 40(27): 5273-82. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2586-19.2020
27. Haddad D, Nakamura K. Understanding the susceptibility of dopamine neurons to mitochondrial stressors in Parkinson's disease. *FEBS Lett*. 2015 Dec; 589(24): 3702-13. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.10.021
28. Burke WJ. Beating a dead horse: dopamine and Parkinson disease. *Neurology*. 2008; 70(22): 2087. DOI: 10.1212/01.wnl.0000315886.20986.94
29. Yakushev IY, Dupont E, Buchholz HG, Tillmanns J, Debus F, Cumming P, et al. In vivo imaging of dopamine receptors in a model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2010 Mar; 51(3): 415-22. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2009.02272.x
30. Roghani M, Behzadi G. Neuroprotective effect of vitamin E on the early model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. *Brain Res*. 2001 Feb; 892(1): 211-17. DOI: 10.1016/s0006-8993(00)03296-0