

## بررسی اثر لاکتوباسیلوس برویس، بومی ایران، بر یادگیری شرطی احترازی غیر فعال در رت نر تحت شرایط استرس مزمن

اسمعیل مختاری فراهانی<sup>۱</sup>، حمید رضا مهاجرانی<sup>۲</sup>، سیما نصری<sup>۳</sup>، پروانه جعفری<sup>۲</sup>، مریم تاج آبادی ابراهیمی<sup>۴</sup>، نفیسه مقصودی<sup>۵</sup>، سعید طهماسبی<sup>۶</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، دانشکده علوم پایه، استادیار گروه میکروبیولوژی، اراک، ایران. P-jafari@iau.arak.ac.ir

۳- استادیار، رشته زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران.

۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، دانشکده علوم پایه، استادیار گروه زیست شناسی، تهران، ایران.

۵- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، تهران، ایران.

۶- دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، مسئول آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی، اراک، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۱۵

### چکیده

زمینه و هدف: پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی و دارویی تهیه شده از میکروارگانیسم‌های زنده می‌باشند که با بهبود تعادل میکروبی روده، اثرات مفیدی بر روی میزبان (انسان یا حیوان) اعمال می‌کنند. تحقیقات نشان داده که مواد غذایی از طریق اعصاب واگ می‌توانند بر روی مغز و هورمون‌های عصبی تاثیر بگذارند. از این رو این احتمال وجود دارد که پروبیوتیک‌ها بتوانند با تنظیم فعالیت بخش‌هایی مختلف مغز، بر بهبود کارکرد آن موثر باشند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر، لاکتوباسیلوس برویس، پروبیوتیک بومی جدا شده از لبنیات سنتی ایران بر یادگیری شرطی احترازی غیر فعال موش صحرایی است.

روش کار: در این تحقیق تجربی ۲۴ موش صحرایی نر نژاد ویستار در سن چهار هفتگی به وزن تقریبی ۹۵ تا ۱۱۸ گرم به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. که دو گروه به عنوان کنترل با استرس و بدون استرس و دو گروه دیگر به عنوان دریافت کننده پروبیوتیک با استرس و بدون استرس در نظر گرفته شدند. گاوژ موش‌ها، ۱ ml بافر PBS حاوی  $10^9$  cfu/ml لاکتوباسیلوس برویس به مدت یک ماه صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصله نشان داد که در گروه‌های کنترل، استرس به طرز معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) یادگیری را کاهش و مدت زمان حضور در اتاق تاریک (TDC) را افزایش می‌دهد. در گروه‌های دریافت کننده پروبیوتیک حتی در شرایط استرس نیز یادگیری اختلاف معنی داری با گروه کنترل بدون استرس نداشت.

نتیجه گیری: یافته‌های این تحقیق نشانگر اثر افزایشی لاکتوباسیلوس برویس پروبیوتیک بومی جدا شده از دوغ ترخینه، در یادگیری شرطی احترازی غیر فعال در موش صحرایی نر نژاد ویستار، تحت شرایط استرس می‌باشد. این امر نشان دهنده اثر بهبود دهنده پروبیوتیک‌های خوراکی بر حافظه و یادگیری است.

واژه‌های کلیدی: یادگیری شرطی احترازی غیر فعال، پروبیوتیک، استرس، گاوژ.

### مقدمه

تحلیل مغزی و بدی عملکرد مغز مخصوصاً در ناحیه پره‌فروتال و هیپوکامپ وجود دارد و حتی ممکن است این امر باعث کاهش مهارت‌های حرکتی و شناختی و اختلالات حافظه و یادگیری سالخورده‌گان شود (۱۶). بعد از سن ۶۵ سالگی روند پیری، کاهش حافظه و یادگیری در مغز شروع شده و اختلالاتی در حافظه سه

توان یادگیری و قدرت حافظه از ویژگی‌های بارز انسان است و برای ادامه حیات و گذران زندگی عادی و پیشرفت‌های علمی او ضرورتی اجتناب ناپذیر می‌باشد. با توجه به این که تعداد افراد سالخورده در بسیاری از کشورهای جهان در حال افزایش است (۲۶)، دیده شده است که در تمامی افراد مخصوصاً افراد مسن

حافظه را در مغز مورد مطالعه قرار داد کارل لشلی بود. لشلی گمان می‌کرد که مکان‌های مربوط به حافظه به صورت پراکنده در سرتاسر مغز وجود دارند. ولی امروزه روشن شده‌است که مثلاً نواحی مشخصی از قشر مغز در کارکردهای معین نقش منحصر به فردی دارند و یا این که محل حافظه و یادگیری فقط قشر مغز نیست و تعدادی از ساختارهای زیر قشری نیز در آن نقش مهمی دارند (۱۲). استرس واژه‌ای است که امروزه به میزان زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرد و به همان نسبت نیز ارائه تعریف دقیقی از آن دشوار است. استرس می‌تواند اثرات منفی شدیدی بر جسم و روان موجود باقی بگذارد. در دهه ۱۹۲۰ و ۱۹۳۰ این واژه در زیست‌شناسی و فیزیولوژی برای بیان فشار ذهنی ناشی از اتفاقات ناخوشایند و عوامل مخرب محیطی به کار گرفته شد که سبب بیماری می‌گردید. والنر کانوندنر سال ۱۹۲۶ از آن برای تشریح عوامل خارجی به هم زنده هموستازی بهره برد (۲۴، ۱۸، ۱۷، ۵). هموستازی مفهوم مرکزی ایده استرس می‌باشد. در زیست‌شناسی بیشتر فرآیندهای بیوشیمیایی سعی در حفظ ثبات حالت پایداری دارند که در شرایط ایده‌آل وجود دارد. عوامل محیطی، محرک‌های داخلی یا خارجی، به طور مداوم هموستازی را مختل می‌کنند. این گونه عوامل بر هم زنده هموستازی را می‌توان تحت عنوان استرس تفسیر نمود. عوامل تهدید کننده حیات همانند گرسنگی طولانی مدت می‌توانند به شدت هموستازی را مختل نمایند. از سوی دیگر تلاش یک موجود در برگرداندن شرایط به حالت هموستازی را نیز می‌توان استرس نامید. دانشمندان عصب شناس کنونی از جمله بروس مک‌اوین و جپ کول‌هاوس معتقدند که استرس باید به شرایطی محدود شود که یک عامل محیطی بیش از توان تنظیمی طبیعی یک موجود افزایش یابد (۱۹، ۱۸). تحقیقات نشان داده که اضطراب، افسردگی، فشار

بعدی و فضایی ایجاد می‌شود (۱). با عنایت به این که با بالا رفتن سن سلول‌ها شروع به دژنره شدن می‌کنند (۱۲). در این صورت توانایی یادگیری و قدرت حافظه کاهش می‌یابد (۲). علاوه بر این انواع متفاوتی از شرایط بیمار گونه می‌تواند فرآیندهای یادگیری و حافظه را تغییر دهند. برخی از این شرایط از مشکلات ژنتیکی، سبک‌های زندگی (سوء تغذیه و یا اعتیاد) یا بیماری‌های تحلیل عصبی ناشی می‌شوند. یکی از مشکلات جامعه بشری این است که روند افزایش سن با بیماری آلزایمر ارتباط دارد، در بیماران آلزایمری فقدان حافظه ممکن است با درجاتی از سردرگمی، افسردگی، بی‌قراری، توهمات، هذیان‌ها و اختلال در رفتار خوردن و خوابیدن باشد (۱۳). از این رو محققین بی‌شماری سال‌هاست که تحقیقات خود را بر اساس حافظه و یادگیری طراحی کرده‌اند، آن‌ها در جستجوی راهی برای آگاهی از دلایل حافظه و یادگیری بوده و در پی آن به دنبال کشف مکانیسم‌های یادگیری و حافظه می‌باشند. یادگیری و حافظه فقط مختص انسان نیست به همین دلیل پژوهشگران در تلاش برای یافتن جاندارانی با سیستم عصبی ساده‌تر بودند تا نحوه شکل‌گیری رده‌های عصبی را کشف کنند، آن‌ها از یک حلزون دریایی بزرگ به نام آپلیزیا به دلیل سادگی مدارهای عصبی استفاده نمودند (۱۴). شناسایی نقاطی از مغز که در ارتباط با یادگیری، حافظه و فراموشی است سال‌ها فکر دانشمندان را به خود مشغول کرده بود. حافظه و یادگیری مستلزم بعضی تغییرات نسبتاً پایدار در ساختار سیستم عصبی می‌باشند. حافظه ایجاد تغییرات در ساختمان نورون‌ها، مثلاً ایجاد سیناپس‌ها یا دندریت‌های جدید و یا تغییر در آزاد شدن انتقال‌دهنده‌های عصبی و در نهایت شاید ایجاد تغییراتی در الگوی فعالیت الکتریکی موجود در مدارهای عصبی باشد (۱۵). یکی از نخستین دانشمندانی که

روانی یا استرس و اشتغالات فکری می‌توانند به حافظه آسیب وارد نمایند که شدت آن به میزان و شدت ناراحتی روانی فرد متناسب است. استرس تاثیرات عمیقی روی یادگیری و حافظه بر جای گذاشته و از یادگیری کامل ممانعت می‌نماید. در زمان یادآوری از حافظه نیز استرس و اضطراب به عنوان عامل مداخله‌گر مانع بازیابی مطالب یاد گرفته می‌شود. بر اساس تحقیقات محققان در دانشگاه کالیفرنیا مشخص شده استرس کوتاه مدت (تنها چند ساعت) نیز می‌تواند به ارتباط سلول‌های مغزی در مناطق یادگیری و حافظه آسیب بزند (۷). به هنگام استرس ارتباط عصبی مغز در ناحیه هیپوکامپ کاهش یافته و سبب کاهش حافظه کوتاه مدت می‌شود. هم چنین به اثبات رسیده که استرس شدید نیز (چندین هفته تا چند ماه) به ارتباط سلول‌ها در مناطق یادگیری و حافظه در مغز آسیب می‌زند (۲۰). در دنیای کنونی با پیشرفت علم و تکنولوژی، استرس‌های گوناگون نیز افزایش یافته است به طوری که اجتناب از اثرات مخرب آن امکان پذیر نیست. یافتن راهی به منظور کاهش این اثرات می‌تواند از آسیب و صدمات حاصله از استرس به ویژه بر روی فرآیند یادگیری و حافظه می‌تواند گامی بزرگ در جهت بهبود سلامت جامعه باشد. یکی از جدیدترین راه‌کارهای ارائه شده در این زمینه استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌باشد (۹، ۱۱). بسیاری از پژوهش‌ها نشان داده‌اند که بعضی از ترکیبات غذایی در سلامتی مغز افراد موثرند و مطالعات فراوانی این را در طی سال‌های گذشته اثبات کرده است (۲۲). پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی از میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با بهبود تعادل میکروبی روده، اثرات مفیدی را بر روی میزان اعمال می‌کنند و باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن می‌شوند (۲۵). لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم جنس‌های بسیار متداول به عنوان

پروبیوتیک هستند و لازم به ذکر است که سوش‌های مختلف باکتریایی، کارایی متفاوتی نیز دارند (۱۰). براوو همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که موش سوری دریافت کننده پروبیوتیک علائم رفتاری اضطرابی کمتری را نشان می‌دهد. نتایج آن‌ها نشان داد که علائم افسردگی هنگام استرس شنا در موش‌ها کاهش می‌یابد و در نهایت آن‌ها دریافتند که موش دریافت کننده پروبیوتیک دارای سطح پایین‌تری از هورمون‌های استرس در خون می‌باشند (۴). در تحقیقی که توسط بنتو همکارانش در سال ۲۰۰۷ با استفاده از شیر حاوی پروبیوتیک در مقایسه صورت گرفته مشخص شد که بر خلاف انتظار، عملکرد شناختی مغز در مصرف کنندگان پروبیوتیک، اندکی کاهش پیدا نموده بود (۳). دیوید کامفیلد و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که مقادیر، انواع مختلف پروبیوتیک می‌تواند اثرات متفاوتی بر سطح گابا آمینو بوتریک اسید (GABA) مغز بگذارند (۶). اطلاعات پیش‌درمانی (پری کلینیکی) در مورد فورمولاسیون (لاکتوباسیلوس R0052 و بیفیدوباکتریوم R0175) توسط میشل مسعودی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان‌گر آن است که هیچ نوع اختلالات یادگیری و حافظه یا اعتیاد و غیره به عنوان عوارض جانبی بر اثر مصرف این ترکیب ایجاد نمی‌شود (۲۳). تحقیقات صورت گرفته نشان دهنده کاهش میزان استرس، آسیب ناشی از آن توسط پروبیوتیک‌ها می‌باشد. از این رو در این تحقیق تاثیر یک پروبیوتیک بومی ایران بر پایه لاکتوباسیلوس برویس بر یادگیری شرطی احترازی غیر فعال در شرایط استرس مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### گروه بندی رت‌های مورد آزمایش

در این تحقیق ۲۴ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۹۵ تا ۱۱۸ گرم و سن چهار هفته به صورت

برای ایجاد استرس از دستگاه نگهدارنده (Restrainer) استفاده شد برای ایجاد استرس مزمن موش‌ها به مدت ۱ ماه روزانه ۱۵ دقیقه در دستگاه قرار گرفتند.

#### سنجش حافظه

آزمون یادگیری اجتنابی غیرفعال توسط دستگاه شاتل باکس صورت گرفت. این آزمون شامل مراحل زیر بود:

##### ۱- مرحله آشنایی

به منظور آشنایی یا عادت حیوان با محیط هر موش به مدت ۳۰ دقیقه قبل از آزمون در محیط آزمایشگاه قرار گرفت. در مرحله سازش ابتدا حیوان در محیط روشن دستگاه قرار گرفت و بعد از ۳۰ ثانیه در گیوتینی باز شده و مدت زمانی که طول کشید تا وارد اتاق تاریک شود ثبت شد. پس از ورود کامل در بسته و حیوان از دستگاه برداشته و به قفس منتقل شد.

##### ۲- مرحله اکتساب (آموزش)

این مرحله ۳۰ دقیقه پس از مرحله سازش صورت گرفت بدین صورت که حیوان در محیط روشن دستگاه قرار گرفت و بعد از ۳۰ ثانیه در گیوتینی باز شده، مدت زمانی که طول کشید تا موش وارد اتاق تاریک شود ثبت گردید. پس از ورود در بسته و حیوان به مدت ۵ ثانیه شوک الکتریکی دریافت نمود (50HZ, 1.5MA). ۲۰ ثانیه پس از شوک حیوان از دستگاه خارج و به قفس منتقل شد. ۲ دقیقه بعد این مرحله مجدداً تکرار شد و در صورت ورود به اتاق تاریک، حیوان مجدداً شوک دریافت می‌نمود. در غیر این صورت پس از ۱۲۰s حیوان از دستگاه خارجو به قفس منتقل شد. برای اطمینان از نتایج حاصله این آزمایش‌ها حداکثر سه بار تکرار صورت پذیرفت.

##### ۳- مرحله به خاطر آوری (آزمون)

تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. گروه‌ها عبارت بودند از گروه ۱ به عنوان کنترل بدون استرس، گروه ۲ کنترل با استرس، گروه ۳ دریافت کننده پروبیوتیک بدون استرس و گروه ۴ دریافت کننده پروبیوتیک با استرس می‌باشند. موش‌ها به صورت آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند و به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش دوره سازگاری را طی کردند.

#### آماده سازی پروبیوتیک

در این تحقیق از لاکتوباسیلوس برویس که توسط دکتر ابراهیمی و همکاران از ترخینه جدا شده بود، استفاده گردید. این باکتری بعد از تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و تعیین ژنوتیپ در Gene Bank با کد رهگیری GQ412732 ثبت شده است. برای گاوآژ، ابتدا باکتری بر روی محیط MRS Broth کشت و در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴h گرماگذاری شد. پس از اتمام دوره‌ی رشد ابتدا جذب نوری محیط کشت در ۶۰۰ nm تعیین و سری رقت از کشت باکتری تهیه و با استفاده از روش کشت سطحی، تعداد باکتری‌های زنده موجود در محیط کشت تعیین گردید. هدف از این بخش، گاوآژ تعداد معین و ثابتی از باکتری‌ها در کل دوره آزمایش بود. در طی دوره ۳۰ روزه آزمایش هر روز کشت تازه باکتری تهیه و پس از تعیین جذب نوری، محیط کشت با دور ۶۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و ۳ بار شستشوی رسوب سلولی حاصله با بافر فسفات صورت گرفت. رسوب حاصله در ۰/۱ml بافر فسفات با غلظت ۱۰<sup>۹</sup>cfu/ml سوسپانسون شد. موش‌های گروه دریافت کننده باکتری به صورت روزانه با این سوسپانسون باکتریایی گاوآژ شدند در حالی که گروه کنترل همان مقدار بافر فسفات را به صورت دارونما دریافت نمودند.

#### ایجاد استرس در موش‌ها

در این تحقیق داده‌ها با استفاده از نرم افزار prism مورد بررسی آماری قرار گرفتند. جهت مقایسه داده‌های گروه آزمایشی از روش مربع کای و نیز آنالیز واریانس یک طرفه استفاده و سطح معنی داری به صورت ( $P < 0/05$ ) در نظر گرفته شد.

### نتایج

نتایج آزمون یادگیری و بررسی تاثیر لاکتوباسیلوس برویس، بر یادگیری شرطی احترازی غیر فعال در موش صحرایی نر نژاد ویستار تحت شرایط استرس مزمن در طی روز اول بعد از آموزش در رابطه با میزان تأخیر اولیه در ورود به اتاق تاریک و مدت زمان ماندن در اتاق تاریک بدین شرح می‌باشد:

**اثر استرس بر تأخیر ورود به اتاق تاریک در روز آزمون**

نتایج نشان داد که در گروه کنترل با استرس از نظر زمان تأخیر ورود به اتاق تاریک کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بدون استرس وجود داشت ( $P < 0/05$ ) (نمودار ۱).

یک روز پس از مرحله اکتساب، آزمون به خاطر آوری صورت گرفت. به این ترتیب که حیوان در محیط روشن دستگاه قرار گرفتو بعد از ۳۰s در گیوتینی باز ومدت زمانی که طول می‌کشید تا موش وارد اتاق تاریک شود ثبت گردید. در این مرحله حیوان هیچ گونه شوک الکتریکی دریافت نمی‌نمود و تعداد دفعات ورود حیوان به اتاق تاریک و زمان سپری شده در اتاق تاریک ثبت شد. این مرحله وقتی به اتمام می‌رسید که حیوان به مدت ۳۰۰ ثانیه در دستگاه قرار گرفته باشد (۲۷).

### پارامترهای مورد مطالعه

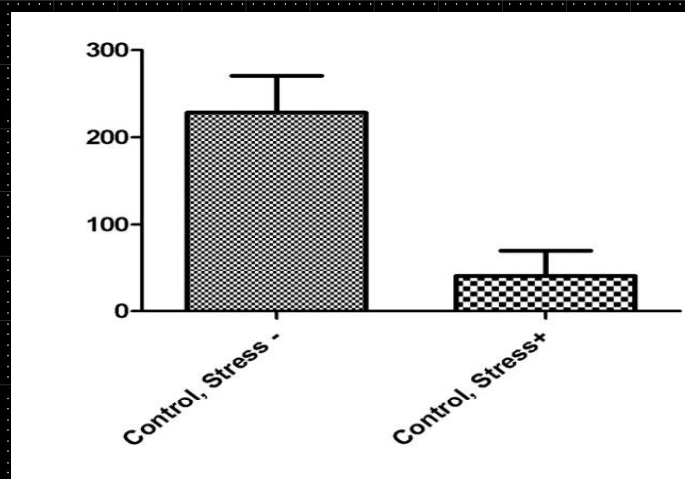
جهت افزایش دقت در بررسی اثر باکتری بر یادگیری شرطی احترازی غیر فعال در موش صحرایی نر نژاد ویستار ۲ عامل زیر اندازه گیری شد:

۱- زمان احتراز ورود به بخش تاریک (STL Step Through Latency)

۲- زمان اقامت در اتاق تاریک (TDC Time in dark

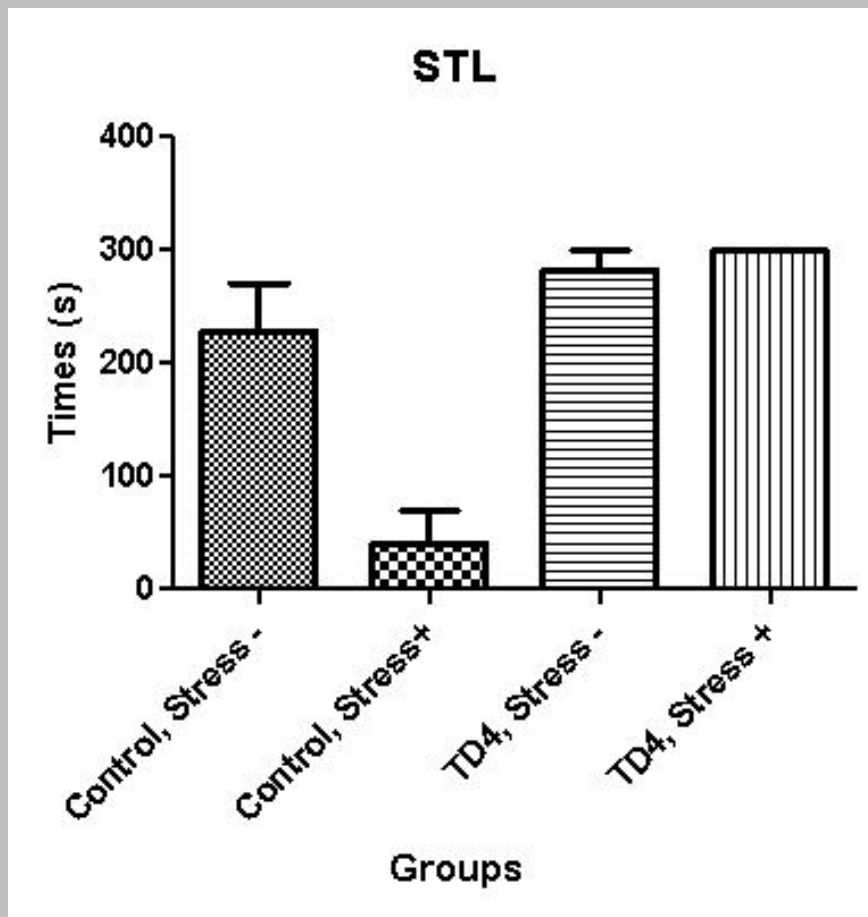
(compartment

تحلیل آماری



افزایش از نظر آماری معنی‌داری نبود، ولی بین گروه کنترل با استرس و گروه دریافت‌کننده باکتری با استرس (۰/۱ ml با غلظت  $10^9$  cfu/ml) از نظر آماری افزایش معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/001$ ) (نمودار ۲).

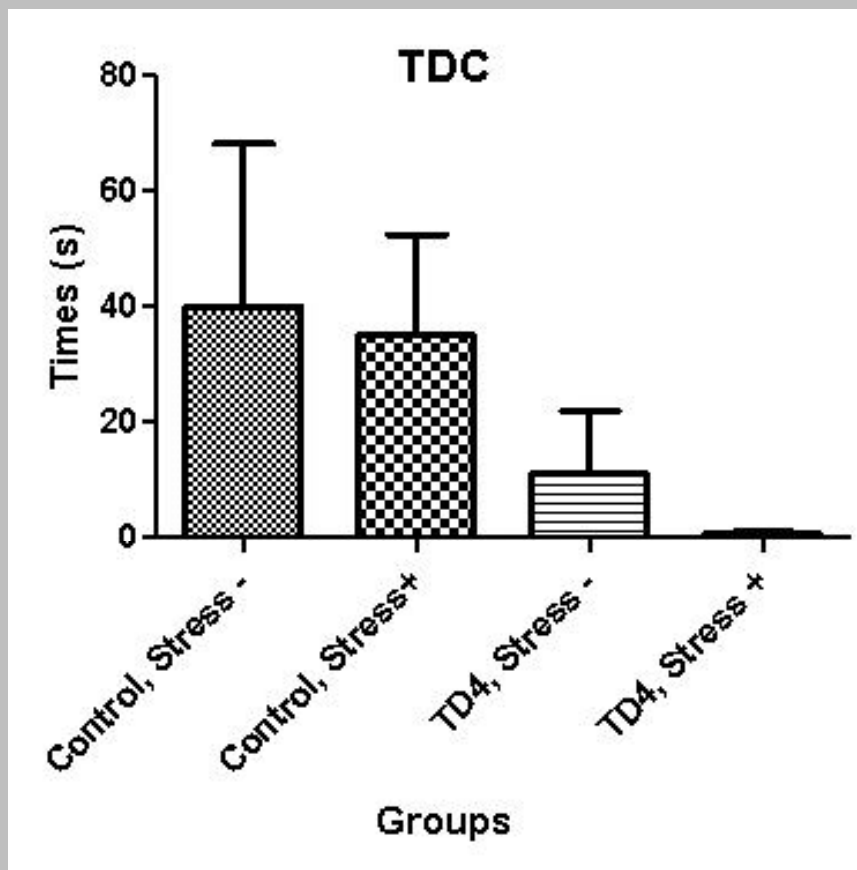
**اثر لاکتوباسیلوس برویس بر تأخیر ورود به اتاق تاریک در روز آزمون**  
 نتایج نشان داد که از نظر زمان تأخیر ورود به اتاق تاریک در گروه دریافت‌کننده باکتری بدون استرس (۰/۱ ml با غلظت  $10^9$  cfu/ml) در مقایسه با گروه کنترل بدون استرس افزایشی مشاهده شد اما این



نمودار ۲-مقایسه تأخیر اولیه در ورود به اتاق تاریک بین گروه کنترل بدون استرس و گروه دریافت‌کننده باکتری بدون استرس (۰/۱ ml با غلظت  $10^9$  cfu/ml) و همچنین بین گروه کنترل با استرس و گروه دریافت‌کننده باکتری با استرس (۰/۱ ml با غلظت  $10^9$  cfu/ml)

نظر آماری معنی‌داری نبود، ولی بین گروه کنترل با استرس و گروه دریافت‌کننده باکتری با استرس (۰/۱ ml با غلظت  $10^9$  cfu/ml) از نظر آماری کاهش معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/05$ ) (نمودار ۳).

**اثر لاکتوباسیلوس برویس بر زمان سپری شده در اتاق تاریک در روز آزمون**  
 نتایج نشان داد که از نظر زمان سپری شده در اتاق تاریک در گروه دریافت‌کننده باکتری بدون استرس (۰/۱ ml با غلظت  $10^9$  cfu/ml) در مقایسه با گروه کنترل بدون استرس کاهش مشاهده شد اما این کاهش



نمودار ۳- مقایسه زمان سپری شده در اتاق تاریک بین گروه کنترل بدون استرس و گروه دریافت کننده باکتری بدون استرس (ml) ۰/۱ با غلظت  $10^8$  cfu/ml و همچنین بین گروه کنترل با استرس و گروه دریافت کننده باکتری با استرس (ml) ۰/۱ با غلظت  $10^8$  cfu/ml.

### بحث و نتیجه گیری

پروبیوتیک مقدار GABA در موش تغییر می‌یابد. افزایش و کاهش بیش از حد GABA در مغز به ترتیب سبب افسردگی و اضطراب می‌شود. تحقیقات نشان داد که مصرف مزمن لاکتوباسیلوس رامنوسوس (JB-1) موجب تغییراتی در بیان mRNA مربوط به  $GABA_{b1b}$  در نواحی مختلف مغز می‌شود. بدین ترتیب که در نواحی قشری یعنی cingulate و prelimbic میزان بیان mRNA افزایش می‌یابد و بر عکس بیان آن در هیپوکامپ، آمیگدال، لوکوس سرولئوس کاهش می‌دهد در مورد  $GABA_A$  بیان mRNA در قشر پیش پیشانی و آمیگدال کاهش یافته ولی در هیپوکامپ افزایش می‌یابد (۴). می‌توان نتیجه گرفت که مصرف لاکتوباسیلوس رامنوسوس JB-1 باعث کاهش

براو و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که موش سوری دریافت کننده پروبیوتیک علائم رفتاری اضطرابی را در مقایسه با موش گروه کنترل کمتر بروز می‌دهد. آن‌ها همچنین مشخص کرده‌اند که این موش در هنگامی که در آب قرار داده می‌شود علائم رفتاری افسردگی را کمتر نشان می‌دهد. آن‌ها دریافتند که موش دریافت کننده پروبیوتیک دارای سطح پایین‌تری از هورمون‌های استرس در خون می‌باشد. از آنجایی که اضطراب و افسردگی باعث قابلیت‌های شناختی افراد می‌گردد می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مصرف پروبیوتیک از طریق کاهش اضطراب و افسردگی به طور غیر مستقیم باعث بهبود یادگیری و حافظه می‌شود. هم چنین براو و همکارانش نشان دادند با دریافت

باکتری‌های اسید لاکتیک افزایش می‌یابد. این امر نشان می‌دهد که عدم توازن میکروفلور دستگاه گوارش با اختلالات عصب شناختشیدیدتر همانند عصبانیت، کاهش حافظه، فراموشی و گیجی همراه می‌شود. توجه احتمالی این ارتباط می‌تواند اثر سیتوکین‌های پیش التهابی بر دستگاه عصبی مرکزی باشد. بیان شده که اثر پروبیوتیک‌ها بر سیتوکین‌های التهابی و استرس اکسیداتیو می‌تواند منجر به افزایش در عامل نوروتروفیک مشتق شده از مغز (BDNF Brain Drived Neurotrophic Factor) باشد (۶). مطالعات دسبونت و همکاران نشان داد که ۱۴ روز درمان با پروبیوتیک از نوع بیفیدوباکتریوم اینفانتیس باعث کاهش معنا دار در سیتوکین‌های پیش التهابی شده و در نهایت افزایش تولید تریپتوفان به عنوان پیش ساز سروتونین را موجب می‌گردد، این ترکیب‌ها شاخص‌های مناسبی جهت تعیین میزان ضد افسردگی بوده و می‌توان نتیجه گرفت که پروبیوتیک‌ها می‌توانند به عنوان یک درمان جنبی اختلال افسردگی شدید به کار روند (۸). مطالعه بنتون و همکارانش به عنوان یکی از معدود مطالعات مداخله‌ای مزمن بوده که به طور مستقیم اثرات پروبیوتیک‌ها را مورد بررسی قرار داده‌است، ولی نشان داد که پس از ۲۰ روز دریافت پروبیوتیک حافظه مفهومی افراد کاهش معنا داری را در مقایسه با کنترل داشته‌است (۳).

GABA در تقابل گلوتامات و آسپاراتات که میانجی‌های عصبی تحریکی مغز هستند موجب ایجاد فرآیندی به نام تضعیف بلند مدت (Length time) LTD debilitation می‌شود این در حالی است که شواهد نشان می‌دهد که LTD با ایجاد یک تعادل با تقویت بلند مدت (Length time) LTP (Potentiation) موجب ایجاد حافظه بلند مدت می‌گردد (۱۴). دزهای مختلف پروبیوتیک می‌تواند اثرات متفاوتی بر سطح GABA مغز بگذارند، بنابراین

بیان mRNA مربوط به گیرنده  $GABA_{b1b}$  شده است که می‌تواند در نهایت موجب تحریک مغز و بهبود یادگیری حافظه گردد. لاکتوباسیلوس رامنوسوس JB-1 موجود در جیره غذایی حیوانات موجب افزایش حافظه برای یک محرک ناخوشایند می‌شود. این یافته‌ها با نتایج تحقیقات گذشته، حیوانات فاقد گیرنده  $GABA_{b1b}$ ، مطابقت دارند. گیرنده  $GABA_{b1b}$  نقشی حیاتی در تکوین فرآیندهای شناختی هم‌چون ترس ایفا می‌کند. یافته‌ها نشان می‌دهد که سویه‌های باکتریایی خاص موجب تقویت عملکرد حافظه در موش‌های سوری مبتلا به عفونت می‌گردند. این امر در مورد توانایی‌های شناختی انسان، بیشتر صادق است. تحقیقات نشان می‌دهد که در موش سوری فاقد گیرنده  $GABA_{b1b}$  مصرف لاکتوباسیلوس رامنوسوس JB-1 می‌تواند ترس آموخته شده را موجب گردد. رفتاری که وابسته به قشر پری لیمبیک می‌باشد در این بخش زیر واحد گیرنده به میزان بیشتری سنتر گردد. کاهش بیان زیر واحد گیرنده GABA القاء شده توسط لاکتوباسیلوس بیان‌گر آن است که این باکتری یک اثر مثبت و مفید در اعمال شناختی در طی وضعیت‌های پر استرس دارد (۴). بر اساس نظریه‌های مرتبط با تقویت و تضعیف بلند مدت مشخص شده که یادگیری حاصل تعامل این دو پدیده است با توجه به این که گیرنده  $GABA_A$  در مدل‌های مختلف یادگیری نقش تعیین کننده‌ای دارد بنابراین هر گونه تغییر در بیان mRNA مربوط به  $GABA_A$  می‌تواند منجر به تغییر در میزان یادگیری حافظه شود (۱۴). تحقیق‌های دیوید کامفیلد و همکارانش در سال ۲۰۱۱ بیان می‌دارد که، باکتری‌های لوله گوارش می‌توانند با دستگاه عصبی مرکزی ارتباط برقرار کنند. مطالعات انجام شده بر روی جمعیت‌های مبتلا به سندرم خستگی مزمن و فیبرومیالجیا نشان داده که تمرکز بیفیدوباکتریوم در آن‌ها بر عکس



(۲۳). مطالعات لی و همکارانش نشانگر اثر مفید پروبیوتیک‌ها در جلوگیری از کاهش حافظه ناشی از استرس می‌باشد که یک تغییر جبرانی در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-غدد فوق کلیه (HPA) دارد. در ضمن این اثر با افزایش BDNF و بیان C-fos هم زمان می‌باشد. موش‌های سوری فاقد میکروفلور طبیعی، فاقد حافظه بوده که بیانگر نقش میکروفلور طبیعی در سیستم عصبی مرکزی به خصوص حافظه می‌باشد (۲۱). نتایج ما نشان داد که موش‌هایی که پروبیوتیک دریافت نموده بودند در شرایط استرس حافظه آن‌ها تخریب نشده بود که این امر با نتایج به-دست آمده از مطالعات لی، میشل مسعودی، دسبونت، دیوید کامفیلد و براو مطابقت می‌کرد. نتایج این تحقیق بیانگر اثر مثبت تغذیه با پروبیوتیک بر یادگیری شرطی احترازی غیر فعال هم در شرایط عادی و هم تحت استرس می‌باشد. با در نظر داشتن نادر بودن مطالعات انجام شده در مورد اثرات شناختی پروبیوتیک لازم است در آینده مطالعه‌های بیشتری جهت بررسی این یافته در قالب مدل‌های دیگر سنجش یادگیری و حافظه و نیز در سویه‌های دیگر صورت گیرد.

امکان دارد که غلظت GABA بر اثر دزهای خاصی از پروبیوتیک بیش از حد افزایش یا کاهش یابد که در هر صورت تعادل LTD و LTP به هم می‌خورد این امر در نهایت موجب کاهش یادگیری و حافظه بلند مدت می‌شود (۴). میشل مسعودی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در تحقیقی بر روی فرمولاسیون لاکتوباسیلوس R0052 و بیفیدوباکتریوم R0175 نشان دادند که هیچ نوع اختلالات یادگیری و حافظه یا اعتیاد و غیره به عنوان عوارض جانبی بر اثر مصرف این ترکیب ایجاد نمی‌شود. در تحقیقی دیگر بیان نمودند که تغییراتی در نوروپپتیدها و میانجی‌های عصبی مغز بر اثر استفاده از پروبیوتیک حاصل می‌شود علاوه بر افزایش فاکتور رشد عصبی مشتق از مغز BDNF، باعث افزایش اپی‌نفرین و سروتونین در قشر مغز و هیپوکامپ موش سوری جایی که مرکز تبدیل حافظه کوتاه مدت به بلند مدت است، نیز می‌گردد. هم‌چنین این مواد باعث یک افزایش تعداد گیرنده‌ها (N-Methyl-D-Aspartate) در هیپوکامپ می‌شوند. به طور جالب توجهی تغییرات معکوس مغزی در حیوانات در پی استرس و نیز ایجاد رفتار شبه افسردگی ایجاد می‌شود که مهارت‌های حافظه‌ای را کاهش می‌دهد

## منابع

1. Aboukhatwa, M., Dosanjh, L., Luo, Y. (2010). Antidepressants are a rational complementary therapy for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 5(10); 1-17.
2. Assunção, M. (2011). Chronic green tea consumption prevents age-related changes in rat hippocampal formation. *Neurobiology of aging*, 32(4); 707-717.
3. Benton, D., Williams, C., Brown, A. (2006). Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. *European journal of clinical nutrition*, 61(3); 355-361.
4. Bravo, J.A. (2011). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38); 16050-16055.
5. Cannon, W.B. (1926). Physiological regulation of normal states: some tentative postulates concerning biological homeostatics. *Jubilee volume for Charles Richet*, ; 91-93.
6. Camfield, D.A. (2011). Dairy constituents and neurocognitive health in ageing. *British Journal of Nutrition*, 106(2); 159.
7. Denver, R.J. (2009). Structural and functional evolution of vertebrate neuroendocrine stress systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163(1); 1-16.
8. Desbonnet, L. (2008). The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of

- potential antidepressant properties in the rat. *Journal of psychiatric research*, 43(2); 164-174.
9. Elenkov, I.J., Chrousos, G.P. (2002). Stress hormones, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966(1); 290-303.
10. Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, 66 (5); 365.
11. Glaser, R. (1999). Stress-related changes in proinflammatory cytokine production in wounds. *Archives of General Psychiatry*, 56(5); 450.
12. Griffiths-Jones, S. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*, 36(suppl 1); D154-D158.
13. Gupta, G.L., Rana, A. (2007). *Withania somnifera* (Ashwagandha): a review. *Pharma cognosy Reviews*, 1(1); 129.
14. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (2000). *Principles of neural science*. Vol. 4. McGraw-Hill New York.
15. Kandel, E.R., Schwartz, J.H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science*, 218(4571); 433-443.
16. Kaur, T. (2008). Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain and cognition*, 67(1); 25-30.
17. Keil, R.M.K. (2004). Coping and stress: a conceptual analysis. *Journal of advanced nursing*, 45(6); 659-665.
18. Koolhaas, J. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*,
19. Korte, S.M. (2005). The darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(1); 3-38.
7. Denver, R.J. (2009). Structural and functional evolution of vertebrate neuroendocrine stress systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163(1); 1-16.
20. Lachance, J.P., Page, E. (1953). Hormonal factors influencing fat deposition in the interscapular brown adipose tissue of the white rat. *Endocrinology*, 52(1); 57.
21. Lee, Y.Y., Chua, A.S.B. (2011). Influence of gut microbes on the brain-gut axis (Gut 2011; 60: 307-317). *Journal of neurogastroenterology and motility*, 17(4); 427-429.
22. Mandel, S. (2004). Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *J. neurochemistry*, 88(6); 1555-1569.
23. Messaoudi, M. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition*, 105(5); 755-764.
24. Selye, H. (1956). The stress of life.
25. Talebi, A. (2008). Effects of a multi-strain probiotic (PrimaLac) on performance and antibody responses to Newcastle disease virus and infectious bursal disease virus vaccination in broiler chickens. *Avian Pathology*, 37(5); 509-512.
26. Unno, K. (2007). Daily consumption of green tea catechin delays memory regression in aged mice. *Biogerontology*, 8(2); 89-95.
27. Veng, L.M., Mesches, M.H., Browning, M.D. (2003). Age-related working memory impairment is correlated with increases in the L-type calcium channel protein  $\alpha_1D$  (Ca<sub>v</sub>1.3) in area CA1 of the hippocampus and both are ameliorated by chronic nimodipine treatment. *Molecular brain research*, 110(2); 193-202.

