ترمیم فراموشی القا شده با اتانول توسط باکتری *Basilus subtilis* پروبیوتیک بومی ایران در رت‌های نر نژاد ویستار

امیرحسین حدیدی[۱]، پریچهر یغمایی[۱*]، بهاره پاکپور[۲]

۱ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

۲ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: yaghmaei_p@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱۷

چکیده

در بسیاری از یافته‌های دانشمندان مشخص شده است که اتانول منجر به القاء فراموشی و یا تخریب حافظه بدست آمده می‌شود. 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. هدف این مطالعه بررسی تاثیر، *باسیلوس سوبتسلیس*، پروبیوتیک بومی جدا شده از مرغداری‌های اراک بر یادگیری احترازی غیرفعال موش صحرایی بود. در این تحقیق از ۹۶ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. برای القاء فراموشی از اتانول به صورت تزریق درون صفاقی قبل از آزمون استفاده شد و همچنین گاواژ موش‌ها، ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات (PBS) حاوی 10^9 cfu/ml به تنهایی یا همراه با *باسیلوس سوبتیلیس* به مدت ۸ هفته، صورت گرفت. آزمون رفتاری با استفاده از دستگاه یادگیری احترازی غیر فعال انجام شد. نتایج ما مشخص کرد که تزریق درون صفاقی قبل از آزمون اتانول (۱ میلی‌گرم بر رت یا ۰/۳ سی‌سی به ازای هر ۱۰۰ گرم رت)، منجر به فراموشی می‌شود. در حالیکه این فراموشی در گروه مصرف کننده پروبیوتیک (*باسیلوس سوبتیلیس*) بازگردانده می‌شود. یافته‌های این تحقیق نشان‌گر اثر افزایشی *باسیلوس سوبتیلیس* (B.S) پروبیوتیک بومی جدا شده از مرغداری-های اراک، در یادگیری شرطی احترازی غیرفعال در موش صحرایی نر نژاد ویستاری می‌باشد که تزریق زیرجلدی از اتانول را دریافت کردند. این امر نشان دهنده اثر بهبودبخش پروبیوتیک‌های خوراکی بر حافظه و یادگیری است.

کلمات کلیدی: فراموشی، باسیلوس سوبتیلیس، اتانول، رت

مقدمه

از زمان سقراط که اعتقاد داشت انسان دارای دانش ذاتی نسبت به دنیا می‌باشد یادگیری و حافظه در محافل فلسفی بصورت نظری مورد بحث بوده است. در قرن نوزدهم Herman Ebbinghaus روانشناس آلمانی اولین کسی بود که مطالعه تجربی حافظه را با یادگیری کلمات بررسی کرد و نشان داد که حافظه ها طول عمر متفاوت داشته و تکرار آن سبب دوام بیشتر حافظه می‌شود. سپس در اوائل قرن بیستم ویلیام جیمز حافظه‌های کوتاه مدت و بلند مدت را معرفی کرد. در اواسط قرن بیستم بارتلت مطرح کرد که به خاطرآوری، فراخوانی ساده اطلاعات نیست، بلکه روندی خلاق و سازنده است. قابل قبول‌ترین فرضیه در مورد حافظه‌ها، ذخیره شدن آنها بواسطه تقویت ارتباطات بین نورونی است که اولین بار توسط رامون کاخال در ۱۹۱۱ مطرح و سپس در سال ۱۹۴۹ توسط Hebb رسماً ارائه گشت [۱۱]. این فرضیه مستقیماً نمی‌تواند مورد تجربه و بررسی قرار گیرد زیرا یک تک سیناپس را نمی‌توان در حالت رفتاری ایزوله نمود هرچند در دهه هفتاد Bliss و همکارانش مدلی آزمایشگاهی از پلاستیسیتی سیناپسی

(یعنی LTP) را ارائه دادند که به نظر می‌رسد گام موثری در ثبت از سیناپس‌ها بوده است [۲۲]. افزایش یا کاهش میزان نوروترانسمیترها و یا فعال یا مسدود کردن گیرنده های مربوطه، نشان داده است که مکانیسم‌های دیگری هم می‌توانند فرآیند یادگیری و حافظه را تغییر دهند. ممکن است وجود یک شبکه که از سیستم‌های متفاوت نوروترانسمیتری تشکیل شده است، نقش مهمی در یادگیری و پردازش حافظه داشته باشد. یادگیری اجتنابی مهاری مدل step-down روشی است که برای مطالعه یادگیری و حافظه در موش‌های کوچک به کار می‌رود [۱۵].

هیپوکامپ بخشی از سیستم لیمبیک است که مسئول حافظه دور است و پیش‌مغز را از آزموده‌های گذشته ما آگاه می‌کند. این سیستم خاطرات گذشته را به شکل کوتاه و یا دراز مدت حفظ می‌کند. تحقیقات اخیر دانشمندان در یک گروه زنان سالخورده نشان می‌دهد بعضی هدایایی را که سال‌ها پیش از شوهرانشان دریافت کرده‌اند و در آن احساسات عاطفی دخیل است در صورت به یادآوری این خاطرات فعالیت هیپوکامپوس تشدید می‌شود. این ناحیه از مغز جزء اولین نواحی مغز است که در بیماری آلزایمر آسیب می‌بیند. در یادگیری اجتنابی مهاری، که نوعی حافظه دراز مدت می‌باشد، ساختارهایی نظیر هیپوکامپ پشتی و ناحیه جانبی استریاتوم نقش دارند [۱۳، ۱۴]. بعد از سن ۶۵ سالگی روند پیری، کاهش حافظه و یادگیری در مغز شروع شده و اختلالاتی در حافظه سه بعدی و فضایی ایجاد می‌شود [۲]. با عنایت به اینکه با بالا رفتن سن سلول‌ها شروع به دژنره شدن می‌کنند [۱۰]. در این صورت توانایی یادگیری و قدرت حافظه کاهش می‌یابد [۳]. با این مقدمه می توان گفت که مسیرهای نورونی متعددی در شکل گیری حافظه و به یادآوری آن دخالت دارند که این مسیرها توسط میانجی‌های عصبی مختلفی کنترل می‌شوند، یکی از این میانجی‌های عصبی که ما در این تحقیق به آن می‌پردازیم اتانول است. فاکتورهای متعددی مشخص کرده‌اند که اتانول اثر تخریبی بر حافظه و جریان‌های یادگیری در حیوانات آزمایشگاهی دارد [۳۳]. مطالعات بسیار زیادی مشخص کرده اند که اتانول به صورت مستقیم یا غیرمستقیم و از طریق میانجی‌های عصبی مختلف از جمله استیل کولین، دوپامین، پپتیدهای اوپیوئیدی و میانجی‌های عصبی آمینو اسیدی اثرات خود را اعمال می‌کند [۴، ۸، ۲۵، ۳۱].

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی از میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با بهبود تعادل میکروبی روده، اثرات مفیدی را بر روی میزبان اعمال می‌کنند و باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن می‌شوند.

لاکتوباسیلوس و *بیفیدوباکتریوم* جنس‌های بسیار متداول به عنوان پروبیوتیک هستند و لازم به ذکر است که سوش‌های مختلف باکتریایی، کارایی متفاوتی نیز دارند [۹].

تحقیقات صورت گرفته نشان دهنده کاهش میزان استرس، آسیب ناشی از آن توسط پروبیوتیک‌ها می‌باشد. از این رو در این تحقیق تأثیر یک پروبیوتیک بومی ایران بر پایه *باسیلوس سوبتیلیس* بر یادگیری شرطی احترازی غیر فعال مورد بررسی قرار گرفت. حافظه می‌تواند به وسیله تغییر رفتار حیوانات اندازه‌گیری شود که بر اثر تزریق داروها فرایندهایی را نشان می‌دهند [۱]. مطالعات فارماکولوژیک برای بررسی حافظه با این فرضیه و امید انجام می‌شوند که یافته‌های رفتاری همراه با دانش نحوه اثر داروها به مشخص شدن اساس نوروبیولوژی حافظه کمک می‌کنند. این مطالعات معمولا شامل آموزش دادن حیوانات آزمایشگاهی (مانند موش رت) در یک روش ساده یادگیری و تست کردن آنها یک یا چند روز بعد است.

مواد و روش کار

در آزمایش‌ها از موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن تقریبی ۲۵۰–۲۰۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه می‌شد استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوان‌خانه تحقیقاتی منتقل شده، در هر قفس ۵ سر موش قرار داده و آب و غذای کافی در

اختیار موش‌ها قرار می‌گرفت و هر سه روز یکبار قفس موش‌ها تمیز می‌شد. دمای در حیوانخانه بین ۳ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد متغیر بود. قبل از شروع آزمایش به مدت یک هفته به موش‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوانخانه تطبیق دهند. در طول یک هفته به منظور جلوگیری از تنش کار، هر روز حیوان‌ها Handling می‌شدند. هر حیوان فقط یک بار استفاده شده و در گروه هشت‌تایی قرار داده می‌شد. همه آزمایش‌ها در طول روز انجام می شد.

دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری (غیرفعال) مدل Step-Through، جعبه‌ایست که به وسیله دیواره‌ای به دو قسمت با اندازه یکسان (با ابعاد ۲۰×۲۰×۳۰ سانتی‌متر) تقسیم می‌شود. درون دیواره بین دو قسمت درب کشویی به ابعاد ۹× ۷ سانتی متر تعبیه شده است که می‌توان در موقع لزوم آن را باز کرد. این دستگاه دارای بخش سفید رنگی می‌باشد که کف و دیواره‌های آن از جنس پلکسی‌گلاس غیرشفاف ساخته شده، فاقد هر گونه سقف بوده و توسط نور غیر مستقیم فلورسنت آفتابی روشن می‌شود. بخش دیگر دستگاه سیاه رنگ است در کف دارای میله‌های فولادی با فاصله یک سانتی‌متر بوده، که این میله‌ها توسط سیم رابطی به دستگاه تحریک کننده متصل می‌شوند و به این طریق عمل انتقال شوک الکتریکی به حیوانات مورد آزمایش را ممکن می‌سازند. تمامی آزمایش‌های در اتاق نسبتاً تاریک و بدون سر و صدا انجام شد.

آماده‌سازی پروبیوتیک: در این تحقیق از *باسیلوس سوبتیلیس* جدا شده توسط دکتر جعفری و همکاران از مرغداری‌های اراک جدا شده بود. این باکتری بعد از تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و تعیین ژنوتیپ در Gene Bank با کد رهگیری JQ61819 ثبت شده است. برای گاواژ، ابتدا باکتری بر روی محیط نوترین کشت و در انکوباتور شیکردار دار در دمای $37\ ^{o}C$ به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. پس از اتمام دوره‌ی رشد ابتدا جذب نوری محیط کشت در nm ۶۰۰ تعیین و سری رقت از کشت باکتری تهیه شد. با استفاده از روش کشت سطحی (Spread culture)، تعداد باکتری‌های زنده موجود در محیط کشت تعیین شد. هدف از این بخش، گاواژ تعداد معین و ثابتی از باکتری‌ها در کل دوره آزمایش بود. در طی دوره ۴۸ روزه آزمایش، هر روز کشت تازه باکتری تهیه و پس از تعیین جذب نوری، محیط کشت با دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار سانتریفوژ شد و بعد از ۳ بار شستشو با بافر فسفات رسوب سلولی حاصل گردید. رسوب حاصله در ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات با غلظت 10^{9}cfu/ml سوسپانسون شد. موش‌های گروه دریافت‌کننده باکتری به صورت روزانه با این سوسپانسون باکتریایی گاواژ شدند در حالی که گروه کنترل همان مقدار بافر فسفات را به صورت دارونما دریافت نمود.

داروها: داروی مورد استفاده در این تحقیق عبارت بود از اتانول ۴۹ درصد که در سرم فیزیولوژیک استریل ۰/۹ درصد استریل حل شده و سپس به صورت درون صفاقی به موش‌ها تزریق شد. همچنین باکتری تهیه شده به روش بالا هر روز به مدت یک ماه به موش‌ها گاواژ می‌شد.

آزمون‌های رفتاری: روش اجتنابی مهاری برای بررسی حافظه در موش‌های صحرایی در دو روز متوالی هم انجام می‌شود. روز اول یا روز آموزش (training day) شامل آموزش دادن حیوان‌ها در دستگاه بوده، روز دوم یا روز آزمون (testing day) میزان حافظه حیوان‌های آموزش دیده بررسی می‌شود.

مرحله آموزش: در روش اجتنابی مهاری مدل Step-through، هر حیوان به آرامی در بخش روشن دستگاه قرار می‌گیرد، به مدت ۵ ثانیه به آن اجازه داده می‌شود به منظور آشنایی با محیط در این قسمت بماند. سپس به حیوان اجازه

داده می‌شود وارد قسمت سیاه دستگاه شود بلافاصله بعد از ورود حیوان به خانه سیاه درب کشویی بسته شده و حیوان از دستگاه خارج شده و به آرامی به قفس برگردانده می-شود. موش‌هایی که در این مرحله بیشتر از ۱۲۰ ثانیه در ورود به بخش تاریک تاخیر داشته باشند حذف می‌شدند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه این حیوان دوباره به بخش سفید دستگاه منتقل شده و بعد از ۵ ثانیه درب کشویی باز می‌شد تا حیوان وارد بخش تاریک شود. با ورود حیوان به بخش تاریک، درب کشویی پشت سرحیوان بسته شده، حیوان تحریک الکتریکی با شدت یک میلی آمپر و به مدت ۳ ثانیه، که توسط دستگاه تحریک کننده به میله‌های فولادی کف بخش تاریک منتقل می‌شود، را دریافت می‌کرد. ۲۰ ثانیه پس از پایان تحریک حیوان از دستگاه خارج شده، به قفس مربوطه منتقل می‌شود. پس از گذشت ۲ دقیقه مرحله دوم آموزش روی حیوان شوک گرفته انجام شده در این مرحله نیز موش مانند دفعات قبل به خانه سفید دستگاه منتقل شده و درب کشویی باز شده و میزان تاخیر ورودش به بخش تاریک دستگاه ثبت می گردد. تاخیر ۱۲۰ ثانیه‌ای در ورود به بخش سیاه دستگاه که به عنوان یادگیری موفق برای حیوان ثبت می‌گردد. در صورت تأخیر کمتر از۱۲۰ ثانیه در ورود به بخش تاریک پس از ورود درب کشویی دستگاه پشت سرش بسته شده، حیوان برای بار دوم شوک دریافت می‌کند. پس از خارج کردن حیوان از دستگاه و سپری شدن ۲ دقیقه حافظه حیوان همانند دوره قبل دوباره مورد امتحان قرار می‌گیرد. در صورت کسب یادگیری موفق حیوان از دستگاه خارج شده، تزریق بعد از آموزش را دریافت می-کند. حداکثر آموزش برای هر موش سه بار در نظر گرفته شد.

مرحله آزمون یا بررسی حافظه: در جلسه آزمون که ۲۴ ساعت پس از مرحله آموزش انجام می‌شود در جلسه آزمون تحریک الکتریکی اعمال نمی‌شود. برای بررسی حافظه، هر موش پس از دریافت تزریق قبل از آزمون (الکل اتانول ۴۹ درصد)، همانند روز اول، در بخش روشن دستگاه قرار گرفته، درب کشویی بعد از ۵ ثانیه باز شده، زمان تاخیر حیوان در ورود به بخش تاریک دستگاه به عنوان معیاری برای بررسی میزان حافظه در نظر گرفته می‌شود. بیشترین مقدار تاخیر برای ورود به بخش تاریک که به عنوان حافظه کامل شناخته می‌شود ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می‌شود.

پارامترهای مورد مطالعه: جهت افزایش دقت در بررسی اثر باکتری بر یادگیری شرطی احترازی غیرفعال در موش صحرایی نر نژاد ویستار ۲ عامل زیر اندازه‌گیری شد:

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

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

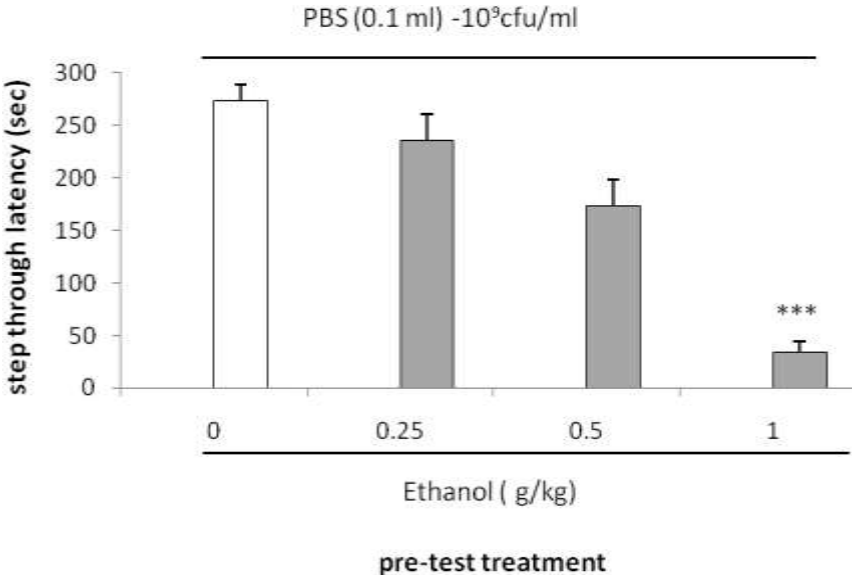
تجزیه و تحلیل آماری: در همه آزمایش های توضیح داده شده میزان تاخیر ورود حیوان به خانه سیاه (STD) در روز آزمون و همچنین باقی ماندن در اتاق تاریک به عنوان ملاک حافظه در نظر گرفته شده، نمره هر گروه به صورت میانگین و انحراف معیار استاندارد (Mean ± SEM) ثبت می-گردید. هم چنین تعداد آموزش هر حیوان نیز در روز آموزش نیز ثبت گردید. به منظور تعیین وجود اختلاف معنادار بین گروه‌ها آزمایش، از آزمون آنالیزواریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey و همچنین Indipendent T-Test استفاده گردید. اختلاف در سطح $P<0.05$ به عنوان تفاوت معنا دار در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد .

نتایج

تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده: نتایج آزمون یادگیری یعنی اطلاعات بدست آمده که شامل زمان‌های ثبت شده در میزان تأخیر اولیه در ورود به اتاق تاریک در مرحله

به خاطرآوری و همچنین مدت زمان سپری شده در اتاق تاریک می‌باشد، ثبت گردید.

آزمایش اول: نتایج تزریق قبل از آزمون اتانول بر روی حافظه اجتنابی مهاری در موش‌های صحرایی ویستار. در این آزمایش برای بررسی تأثیر اتانول بر روی حافظه از چهار گروه حیوان استفاده شد. حیوانات ۳۰ دقیقه قبل از آزمون مقادیر مختلف اتانول (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند در ضمن به مدت ۸ هفته، ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات با غلظت 10^9cfu/ml را هر روز دریافت کردند. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که تزریق قبل از آزمون اتانول (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم یا ۰/۳ سی‌سی به ازای هر ۱۰۰ گرم رت) به تنهایی باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌گردد ($P <$ ۰/۰۰۱) (نمودار ۱).



نمودار ۱ـ آثار تزریق قبل از آزمون اتانول بر حافظه اجتنابی مهاری. ۰/۰۰۱ > P*** در مقایسه با گروه سالین می‌باشد.

آزمایش دوم: اثر باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* بر تأخیر ورود به اتاق تاریک در روز آزمون. در این آزمایش از چهار گروه حیوان استفاده شد.

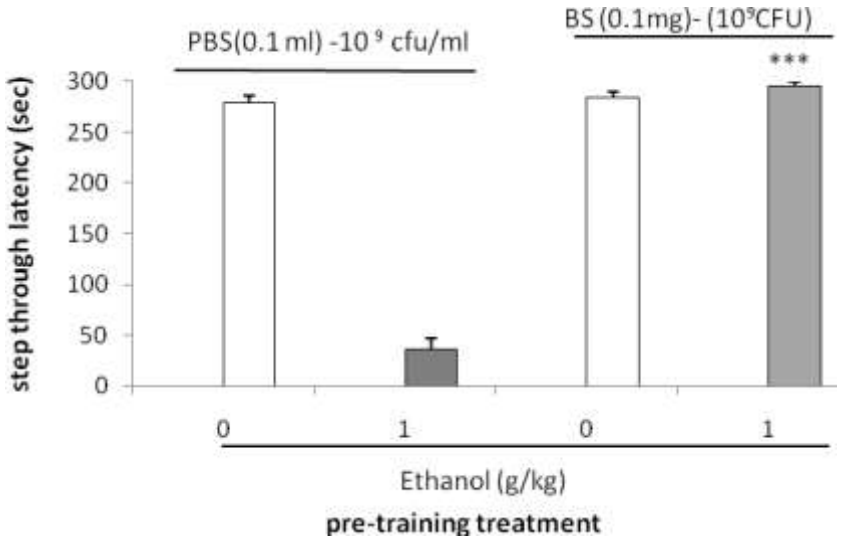
گروه اول به مدت ۸ هفته، ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات با غلظت 10^9cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق درون صفاقی سالین را ۳۰ دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

گروه دوم به مدت ۸ هفته، ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات با غلظت 10^9 cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق درون صفاقی اتانول (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را ۳۰ دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

گروه سوم به مدت ۸ هفته، ۰/۱ میلی‌لیتر باکتری با غلظت 10^9cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق درون صفاقی سالین را ۳۰ دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

گروه چهارم به مدت ۸ هفته، ۰/۱ میلی‌لیتر باکتری با غلظت 10^9 cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق درون صفاقی اتانول (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را ۳۰ دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

نتایج نشان می‌دهد که گروه دریافت‌کننده باکتری به تنهایی (گروه سوم) در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالین و بافر به تنهایی افزایش معنی‌داری را در تأخیر برای ورود به اتاق تاریک نشان نمی‌دهد. همچنین گروه دریافت کننده اتانول و باکتری (گروه چهارم) در مقایسه با گروه دریافت‌کننده اتانول به تنهایی (گروه دوم) افزایش معنی‌داری را در تأخیر برای ورود به اتاق تاریک نشان می‌دهد ($P < ۰/۰۰۱$) (نمودار ۲).



نمودار ۲ـ مقایسه تأخیر اولیه در ورود به اتاق تاریک بین گروه کنترل بدون اتانول و گروه دریافت‌کننده باکتری (۰/۱ml با غلظت 10^9cfu/ml) بدون اتانول و همچنین مقایسه تأخیر اولیه در ورود به اتاق تاریک بین گروه دریافت‌کننده اتانول و گروه دریافت‌کننده باکتری (۰/۱ml با غلظت 10^9cfu/ml) همراه با اتانول. ۰/۰۰۱ >P*** در مقایسه با گروه سالین می‌باشد.

آزمایش سوم: اثرباکتری *باسیلوس سوبتیلیس* بر زمان سپری شده در اتاق تاریک در روز آزمون. در این آزمایش از چهار گروه حیوان استفاده شد.

گروه اول به مدت یک ماه ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات با غلظت 10^9cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق درون صفاقی سالین را ۳۰ دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

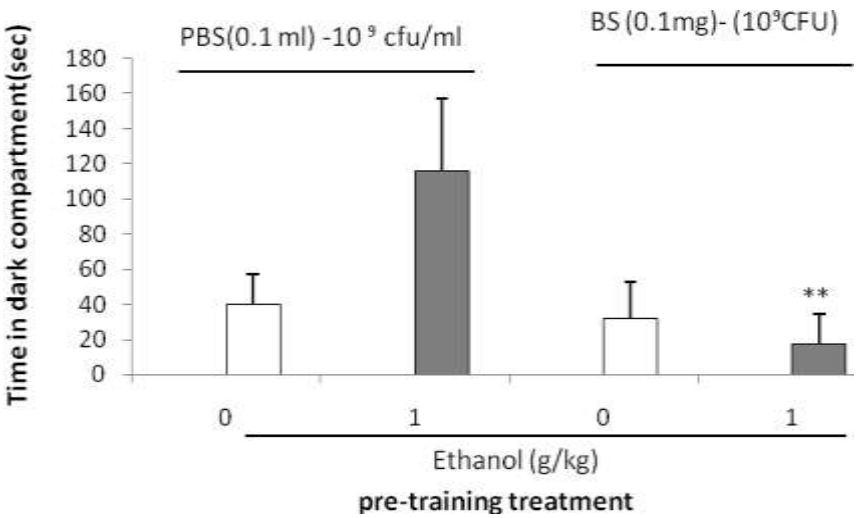
گروه دوم به مدت یک ماه ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات با غلظت 10^9cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق درون صفاقی اتانول (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را ۳۰ دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

گروه سوم به مدت یک ماه ۰/۱ میلی‌لیتر باکتری با غلظت 10^9cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق درون صفاقی سالین را ۳۰ دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

گروه چهارم به مدت یک ماه ۰/۱ میلی‌لیتر باکتری با غلظت 10^9cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این

گروه تزریق درون صفاقی اتانول (۱میلی‌گرم بر کیلوگرم) را ۳۰ دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند.

نتایج نشان می‌دهد که گروه دریافت کننده باکتری به تنهایی (گروه سوم) در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین و بافر به تنهایی (گروه اول) کاهش معنی‌داری را در زمان سپری شده در اتاق تاریک نشان نمی‌دهد. همچنین گروه دریافت کننده اتانول و باکتری (گروه چهارم) در مقایسه با گروه دریافت کننده اتانول به تنهایی (گروه دوم) کاهش معنی-داری را در زمان باقی ماندن در اتاق تاریک نشان می‌دهد ($P < ۰/۰۱$) (نمودار ۳).



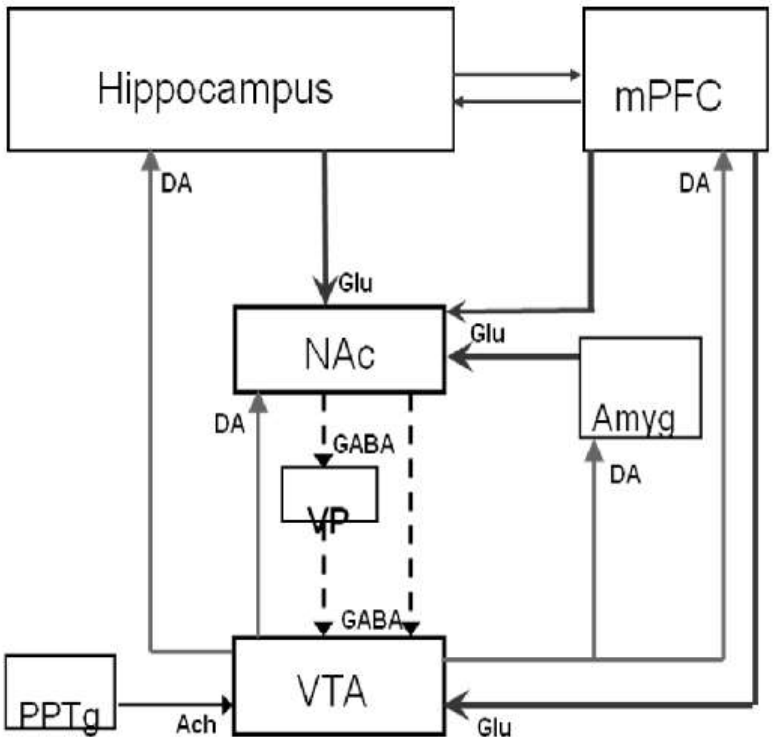
نمودار ۳ـ مقایسه زمان باقی ماندن در اتاق تاریک بین گروه کنترل بدون اتانول و گروه دریافت‌کننده باکتری (۰/۱ml میلی‌لیتر با غلظت $۱۰^{۹}$cfu/ml) بدون اتانول و همچنین مقایسه زمان باقی ماندن در اتاق تاریک بین گروه دریافت‌کننده اتانول و گروه دریافت‌کننده باکتری (۰/۱ml میلی‌لیتر با غلظت $۱۰^{۹}$cfu/ml) همراه با اتانول . ۰/۰۰۱ >P*** در مقایسه با گروه سالین می‌باشد.

بحث

در یادگیری اجتنابی مهاری که نوعی حافظه دراز مدت می-باشد، ساختارهایی نظیر هیپوکامپ پشتی و ناحیه جانبی استریاتوم نقش دارند [۱۳، ۱۴]. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق قبل از آموزش اتانول باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شود. نتایج ما همسو با مطالعاتی می‌باشند که نشان می‌دهند تزریق پس یا پیش از آموزش اتانول باعث تخریب حافظه در مدل‌های مختلف یادگیری از جمله یادگیری اجتنابی مهاری می‌شود [۲۷، ۳۰، ۳۵]. به خوبی مشخص شده است که اتانول باعث تخریب حافظه و یادگیری در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود [۷، ۲۷، ۳۰، ۳۴]. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که تزریق پس از آموزش اتانول باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شود [۱۹]. اتانول جزء موادی می‌باشد که مورد سوء مصرف قرار می‌گیرد و مصرف اتانول به واسطه فعال شدن سیستم دوپامینی مزولیمبیک تقویت می‌گردد [۱۶]. مطالعات نشان می‌دهد که اتانول به واسطه افزایش رهایش گلوتامات و فعال نمودن گیرنده‌های NMDA باعث تحریک گیرنده های GABA و القاء فراموشی می‌شود [۲۴].

براو و همکارنش 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 یافتند که موش دریافت‌کننده پروبیوتیک دارای سطح پایین‌تری از هورمون‌های استرس در خون می‌باشد. از آنجایی که اضطراب و افسردگی باعث قابلیت-های شناختی افراد می‌گردد می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مصرف پروبیوتیک از طریق کاهش اضطراب و افسردگی به طور غیرمستقیم باعث بهبود یادگیری و حافظه می‌شود [۶]. همچنین براو و همکارانش نشان دادند با دریافت پروبیوتیک مقدار GABA در موش تغییر می‌یابد. افزایش و کاهش بیش از حد GABA در مغز به ترتیب سبب افسردگی و اضطراب می‌شود [۶]. 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 cingulated و prelimbic میزان بیان mRNA افزایش می‌یابد و بر عکس بیان آن در هیپوکامپ، آمیگدال، لوکوس‌سرولئوس کاهش می‌دهد در مورد $GABA_A$ بیان mRNA در قشر پیش پیشانی و آمیگدال کاهش یافته ولی در هیپوکامپ افزایش می‌یابد [۶]. 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 [۶]. GABA در تقابل گلوتامات و آسپارتات که میانجی‌های عصبی تحریکی مغز هستند موجب ایجاد فرایندی به نام تضعیف بلندمدت (LTD) می‌شود این در حالی است که شواهد نشان می‌دهد که LTD با ایجاد یک تعادل با تقویت بلند مدت (LTP) موجب ایجاد حافظه بلندمدت می‌شود [۱۸]. دوزهای مختلف پروبیوتیک می‌تواند اثرات متفاوتی بر سطح GABA مغز بگذارند، بنابراین امکان دارد که غلظت GABA بر اثر دوزهای 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 [۶]. گاماآمینوبوتیریک اسید (گابا) اصلی‌ترین ناقل عصبی مهاری در مغز می‌باشد که اثرات خود را از طریق سه گیرنده مهاری مختلف گابا-A ، گابا-B و گابا-C اعمال می‌نماید [۵].گیرنده‌های گابا-A و گابا-C جزءگیرنده‌هایی می‌باشند که با کانال وابسته به لیگاند کلر جفت شده‌اند، در حالیکه گیرنده گابا-B از طریق پروتئین‌های G عمل می‌نماید [۵، ۲۳]. مطالعات آزمایشگاهی و کلینیکی نشان می‌دهند که گیرنده‌های گابا می‌تواند یادگیری و حافظه را تحت تاثیر قرار دهد [۲۶]. 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 ... 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 می‌شود. جایی که مرکز تبدیل حافظه کوتاه مدت به بلندمدت است [۲۱]. سروتونین (5-HT) یک نوروترانسمیتر با ساختار اسید آمینه‌ای است که نقش بسیار مهمی در پدیده‌های فیزیولوژیک از جمله خواب، درد، اشتها، فعالیت‌های جنسی و حافظه دارد [۳۲]. مطالعات نوروشیمیایی مشخص کرده که کاهش سروتونین در بیماری آلزایمر مشاهده می‌شود [۲۰]. نقش سروتونین به واسطه عملکرد انواع مختلف گیرنده‌های آن صورت می‌گیرد که این گیرنده‌ها به چهار گروه تقسیم می‌شوند این چهار گروه شامل 5-HT1 ، 5-HT2، 5-HT3، 5-HT4 و 5-HT5

می‌باشد و البته گیرنده‌های 5-HT6، 5-HT7 و 5-HT8 نیز مشخص شده‌اند [۱۲]. لسیمن و گریس در سال ۲۰۰۵ عملکرد لوپ بین هیپوکامپ و VTA را که در تنظیم حافظه طولانی‌مدت نقش دارد مشخص کردند. مسیر بالارو لوپ هیپوکامپ–VTA شامل نورون‌های دوپامینرژیکی است که از VTA به هیپوکامپ می‌رود و مسیر پایین رو شامل هسته اکومبنس و پالیدوم جانبی است (VP) (شکل ۱). سپس از هسته اکومبنس و VP خروجی‌های گابا ارژیک خارج شده که به VTA باز گردانده می‌شوند بنابر این می‌تواند کنترل مهاری بر جایگاه‌های هدف خود داشته باشد. هسته اکومبنس همچنین ورودی‌های دوپامینرژیکی را از VTA دریافت می‌کند همچنین ورودی‌های گلوتاماترژیک بسیاری را از medial Prefrontal Cortex (mPFC) و تالاموس و هیپوکامپ و آمیگدال دریافت می‌کند [۱۷].



شکل ۱ـ دیاگرام شماتیک مسیرهای عصبی مرتبط کننده چند هسته سیستم لیمبیک که در حافظه اجتنابی مهاری دخالت دارند [۱۷].

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق قبل از آزمون اتانول باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شود. نتایج ما همسو با مطالعاتی می‌باشند که نشان می‌دهند تزریق پس یا پیش از آموزش اتانول باعث تخریب حافظه در مدل‌های مختلف یادگیری از جمله یادگیری اجتنابی مهاری می‌شود [۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰]. همچنین نتایج ما نشان می‌دهد که تزریق یک ماهه *باسیلوس سوبتیلیس* به حیواناتی که در روز آزمون اتانول دریافت می‌کنند باعث بهبود حافظه

تخریب شده با اتانول می‌شود. با توجه به گزارشات ارائه شده قبلی و نتایج بدست آمده در تحقیق اخیر و با توجه به شکل ۱ می‌توان اینطور نتیجه‌گیری کرد که اتانول با تحریک سیستم گلوتاماترژیکی و به علت برداشتن اثر مهاری گلوتامات از روی سیستم گاباارژیک، این سیستم فعال شده و منجر به القاء فراموشی می‌شود. اما پروبیوتیک‌ها با توجه به نتایج بدست آمده منجر به فعال کردن سیستم سروتونینی و مهار کردن سیستم گاباارژیک می‌شوند لذا می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که پروبیوتیک‌ها با تحریک سیستم سروتونرژیکی منجر به القاء حافظه می‌شوند. همچنین می‌توانند با تغییر در بیان ژن گیرنده‌های گاباارژیکی باعث مهار مستقیم سیستم گاباارژیک شده و منجر به تقویت بیش از انتظار حافظه شوند.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق بیانگر اثر مثبت تغذیه با پروبیوتیک بر یادگیری شرطی احترازی غیرفعال 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.

تشکر و قدردانی

از خانم دکتر جعفری، جناب آقای دکتر مرتضی پیری و آقای دکتر مجید نوائیان و تمام کسانی که در انجام این کار ما را یاری کردند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1- Abel T., K.M. Lattal (2001), Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion of Neurobiology*, 11(2): 180-187.

2- Aboukhatwa M., L. Dosanjh, Y. Luo (2010), Antidepressants are a rational complementary therapy for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 5:10.

3- Assuncao M., M.J. Santos-Marques, F. Carvalho, N.V. Lukoyanov, J.P. Andrade (2011), Chronic green tea consumption prevents age-related changes in rat hippocampal formation. *Neurobiology of Aging*, 32(4): 707-717.

4- Boehm S.L., L. Peden, A.W. Jennings, N. Kojima, R.A. Y.A. Harris, Blednov (2004), Over-expression of the fyn-kinase gene reduces hypnotic sensitivity to ethanol in mice. *Neuroscience Letter*, 372(1-2): 6-11.

5- Bormann J. (2000), The 'ABC' of GABA receptors. *Trends of Pharmacological Society*, 21(1):16-19.

6- Bravo J.A., P. Forsythe, M.V. Chew, E. Escaravage, H.M. Savignac, T.G. Dinan (2011), Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceeding of Natural Academy of Science*, USA. 108(38): 16050-16055.

7- Duffy S.N., K.J. Craddock, T. Abel, P.V. Nguyen (2001), Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn and Memory*, 8(1): 26-34.

8- Fadda F., Z.L. Rossetti (1998), Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Progressive Neurobiology*, 56(4): 385-431.

9- Fuller R. (1989), Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5): 365-378.

10- Griffiths-Jones S., H.K. Saini, S. van Dongen, A.J. Enright (2008), miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue): D154-158.

11- Holscher C. (1999), Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond. *Journal of Neuroscience Research*, 58(1): 62-75.

12- Hoyer D., D.E. Clarke, J.R. Fozard, P.R. Hartig, G.R. Martin, E.J. Mylecharane (1994), International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Review*, 46(2): 157-203.

13- Izquierdo I., L.R. Bevilaqua, J.I. Rossato, J.S. Bonini, W.C. Da Silva, J.H. Medina (2006), The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings. *Neurotoxical Research*, 10(2): 113-121.

14- Izquierdo I., L.R. Bevilaqua, J.I. Rossato, J.S. Bonini, J.H. Medina, M. Cammarota (2006), Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends of Neuroscience*, 29(9): 496-505.

15- Kameyama T., T. Nabeshima, T. Kozawa (1986), Step-down-type passive avoidance- and escape-learning method. Suitability for experimental amnesia models. *Journal of Pharmacological Methods*, 16(1): 39-52.

16- Larsson A., J.A. Engel (2004), Neurochemical and behavioral studies on ethanol and nicotine interactions. *Neuroscience and Biobehavior Review*, 27(8):713-720.

17- Lisman J.E., A.A. Grace (2005), The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*, 46(5): 703-713.

18- Lu Y.M., I.M. Mansuy, E.R. Kandel, J. Roder (2000), Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP. *Neuron*, 26(1): 197-205.

19- Mahmoudi M., M.R. Zarrindast (2002), Effect of intracerebroventricular injection of GABA receptor agents on morphine-induced antinociception in the formalin test. *Journal of Psychopharmacology*, 16(1): 85-91.

20- Mann D.M., P.O. Yates (1983), Serotonin nerve cells in Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgury and Psychiatry*, 46(1): 96.

21- Messaoudi M., R. Lalonde, N. Violle, H. Javelot, D. Desor, A. Nejdi (), 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.

22- Murphy K.P., T.V. Bliss (1999), Photolytically released nitric oxide produces a delayed but persistent suppression of LTP in area CA1 of the rat hippocampal slice. *Journal of Physiology*, 515 (Pt 2): 453-462.

23- Olsen R.W., W. Sieghart (2009), GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56(1):141-148.

24- Piri M., Zarrindast M.R. (2011), Nitric oxide in the ventral tegmental area is involved in retrieval of inhibitory avoidance memory by nicotine. *Neuroscience*, 175: 154-161.

25- Prediger R.D., L.C. Batista, R.N. Takahashi (2004), Adenosine A1 receptors modulate the anxiolytic-like effect of ethanol in the elevated plus-maze in mice. *European Journal of Pharmacology*, 499(1-2):147-54.

26- Reis H.J., C. Guatimosim, M. Paquet, M. Santos, F.M. Ribeiro, A. Kummer (2009), Neuro-transmitters in the central nervous system & their implication in learning and memory processes. *Current Medical Chemistry*, 16(7): 796-840.

27- Rezayof A., S. Alijanpour, M.R. Zarrindast, Y. Rassouli (2008), Ethanol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors. *Neurobiology, Learn and Memory*, 89(4): 441-447.

28- Rezayof A., T. Motevasseli, Y. Rassouli, M.R. Zarrindast (2007), Dorsal hippocampal dopamine receptors are involved in mediating ethanol state-dependent memory. *Life Science*, 80(4): 285-292.

29- Rezayof A., K. Sharifi, M.R. Zarrindast, Y. Rassouli (2008), Modulation of ethanol state-dependent learning by dorsal hippocampal NMDA receptors in mice. *Alcohol*, 42(8): 667-674.

30- Rezayof A., Z. Shirazi-Zand, M.R. Zarrindast, T. Nayer-Nouri (), Nicotine improves ethanol-induced memory impairment: the role of dorsal hippocampal NMDA receptors. *Life Science*, 86(7-8): 260-266.

31- Ron D. (2004), Signaling cascades regulating NMDA receptor sensitivity to ethanol. *Neuroscientist*, 10(4): 325-336.

32- Roth B.L. (1994), Multiple serotonin receptors: clinical and experimental aspects. *Annual Clinical Psychiatry*, 6(2): 67-78.

33- Silvers J.M., Tokunaga S., Berry R.B., White A.M., Matthews D.B. (2003), Impairments in spatial learning and memory: ethanol, allopregnanolone, and the hippocampus. *Brain Research and Brain Research Review*, 43(3): 275-284.

34- Zarrindast M.R., M. Noorbakhshnia, F. Motamedi, A. Haeri-Rohani, A. Rezayof (2006), Effect of the GABAergic system on memory formation and state-dependent learning induced by morphine in rats. *Pharmacology*, 76(2): 93-100.

35- Zarrindast M.R., A. Rezayof (2004), Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *European Journal of Pharmacology*, 497(2): 197-204.