ترمیم فراموشی القا شده با اتانول توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، پروبیوتیک بومی ایران، در رت‌های نر نژاد ویستار

افسانه رحیمی احمدی، بهاره پاکپور*، مریم تاج آبادی ابراهیمی

گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: b_pakpour@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۵

چکیده

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 این مطالعه بررسی تاثیر، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، پروبیوتیک بومی جدا شده از لبنیات سنتی ایران بر یادگیری احترازی غیر فعال موش صحرایی بود. در این تحقیق از ٥٦ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. برای القاء فراموشی از اتانول به صورت تزریق زیرجلدی بعد از آزمون استفاده شد و همچنین گاواژ موش‌ها با ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات (PBS) حاوی 10^9 cfu/ml به تنهایی یا همراه با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به مدت یک ماه صورت گرفت. آزمون رفتاری با استفاده از دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال انجام شد. نتایج ما مشخص کرد که تزریق زیرجلدی بعد از آزمون اتانول (۱ mg/rat) منجر به فراموشی می شود. این فراموشی در گروه مصرف کننده پروبیوتیک بازگردانده می‌شود. یافته‌های این تحقیق نشان‌گر اثر افزایشی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* پروبیوتیک بومی جدا شده از دوغ ترخینه، در یادگیری شرطی احترازی غیرفعال در موش صحرایی نر نژاد ویستار می‌باشد که تزریق زیرجلدی از اتانول را دریافت کردند. این امر نشان‌دهنده اثر بهبوددهنده پروبیوتیک‌های خوراکی بر حافظه و یادگیری است.

کلمات کلیدی: اتانول،رت، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، فراموشی

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 هرمان ابینگهاوس روانشناس آلمانی اولین کسی بود که مطالعه تجربی حافظه را با یادگیری کلمات بررسی‌کرد و نشان داد که حافظه‌ها 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. مقبول‌ترین فرضیه

بیولوژیک 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 رسما ارائه شد (۱۶). این فرضیه مستقیما نمی‌تواند مورد تجربه و بررسی قرار گیرد زیرا یک تک سیناپس را نمی‌توان در حالت رفتاری ایزوله نمود هرچند در دهه هفتاد بلیس و همکارانش مدلی آزمایشگاهی از پلاستیسیتی سیناپسی (یعنی LTP) را ارائه دادند که به نظر می‌رسد گام موثری در ثبت از سیناپس‌ها بوده است (۲۹). افزایش یا کاهش میزان نوروترانسمیترها و یا مسدود کردن گیرنده‌های 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 (۲۰).

هیپوکامپ بخشی از سیستم لیمبیک است که مسئول حافظه دور است و پیش‌مغزرا 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 می شود. این ناحیه از مغز جزء اولین نواحی مغزاست که در آلزایمرآسیب می‌بیند. در یادگیری اجتنابی مهاری که نوعی حافظه دراز مدت می‌باشد، ساختارهایی نظیر هیپوکامپ پشتی و ناحیه جانبی استریاتوم نقش دارند (۱۸، ۱۹). بعد از سن ٦٥ 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 (١٤). در این صورت توانایی یادگیری و قدرت حافظه کاهش می‌یابد (۳). با این مقدمه می‌توان گفت که مسیرهای نورونی متعددی در شکل‌گیری حافظه و به یاد آوری 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 (٤١). مطالعات بسیار زیادی مشخص کرده‌اند که اتانول به صورت مستقیم یا غیر مستقیم و از طریق میانجی‌های عصبی مختلف از جمله استیل کولین ، دوپامین، پپتیدهای اوپیوئیدی و میانجی‌های عصبی آمینواسیدی اثرات خود را اعمال می‌کند (٤، ۱۰، ۳۲، ۳۹).

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 (۱۲).

تحقیقات صورت گرفته نشان‌دهنده کاهش میزان استرس،آسیب ناشی از آن توسط پروبیوتیک‌ها می‌باشد. از این رو در این تحقیق تاثیر یک پروبیوتیک بومی ایران بر پایه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بر یادگیری شرطی احترازی غیر فعال مورد بررسی قرار گرفت. حافظه می‌تواند به وسیله تغییر رفتار حیوانات اندازه گیری شود که بر اثر تزریق داروها فرایند هایی 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 معمولاً شامل آموزش دادن حیوانات آزمایشگاهی (مانند 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 ۳۰۰-۲۰۰ گرم که از پژوهشگاه رویان 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 سانتی-گراد متغیر بود. قبل از شروع آزمایش به مدت یک هفته به موش ها 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 هشت تایی قرار داده می‌شد. همه آزمایش‌ها در طول روز انجام می‌شد.

دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری (غیرفعال)، مدل Step-Through، جعبه ایست 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 سانتی‌متر 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 پلکسی گلاس غیرشفاف ساخته شده، فاقد هر گونه سقف بوده و توسط نور غیرمستقیم 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 آزمایش‌ها در اتاق نسبتاً تاریک و بدون سر و صدا انجام شد.

آماده‌سازی پروبیوتیک: در این تحقیق از *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* سویه T20جدا شده توسط دکتر ابراهیمی و همکاران از ترخینه دوغ کرمانشاه جدا شده بود. این باکتری بعد از تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و تعیین ژنوتیپ در GeneBank با کد رهگیری IBRC-M10782ثبت شده است. برای گاواژ، ابتدا باکتری بر روی محیطMRSAGAR کشت و در انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ °C به مدت 24h گرماگذاری شد. پس از اتمام دوره‌ی رشد ابتدا جذب نوری محیط کشت در ۶۰۰ nm 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 کار، گاواژ 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 12000rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و ۳ بار شستشوی رسوب سلولی حاصله با بافر فسفات صورت گرفت. رسوب حاصله در ۰/1ml 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 نمودند.

داروها: داروی مورد استفاده در این تحقیق عبارت بود از اتانول ٤٩ درصد که در سرم فیزیولوژی استریل ۰/۹ درصد استریل حل شد و به صورت زیر جلدی

(SubCortical) (SC) به موش‌ها تزریق شد و 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 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 می‌شود. 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 می‌گردد. تاخیر ۱۲۰ ثانیه‌ای در ورود به بخش سیاه دستگاه که به عنوان یادگیری موفق برای حیوان ثبت می‌گردد، حیوان از دستگاه خارج شده، بلافاصله تزریق پس از آموزش (post-training) را دریافت می‌کند. در صورت تاخیر کمتر از۱۲۰ ثانیه در ورود به بخش تاریک پس از ورود درب کشویی دستگاه بسته 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 می‌کند. حداکثر آموزش برای هر موش سه بار در نظر گرفته شد.

مرحله آزمون یا بررسی حافظه: در جلسه آزمون که ۲٤ ساعت پس از مرحله آموزش انجام می‌شود در جلسه آزمون شوک الکتریکی اعمال نمی‌شود. برای بررسی حافظه، هر موش پس از دریافت تزریق بعد از آزمون الکل اتانول ٤۹ 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 می شود ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می‌شود.

پارامترهای مورد مطالعه: جهت افزایش دقت در بررسی اثر باکتری بر یادگیری شرطی احترازی غیر فعال در موش صحرایی نر نژاد ویستار دو عامل زیراندازه‌گیری شد:

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

۲-زمان اقامت در اتاق تاریک (TDC) (Time in Dark Compartment)

نتایج

در همه آزمایش‌های توضیح داده شده میزان تاخیر ورود حیوان به خانه سیاه (STD) در روز آزمون و همچنین باقی‌ماندن در اتاق تاریک به عنوان ملاک حافظه در نظر گرفته شده، نمره هر گروه به صورت میانگین و انحراف معیار استاندارد (Mean ± SEM) ثبت می‌گردید. هم چنین تعداد آموزش هر حیوان نیز در روز آموزش نیز ثبت گردید. به منظور تعیین وجود اختلاف معنادار بین گروه‌ها آزمایش، از روش تحلیل واریانس (ANOVA) یکطرفه و آزمون توکی و همچنین Indipendent T-Test استفاده گردید. اختلاف در سطح $p <$ ۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم افزارSPSS و رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

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 بعد 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 ۵ دقیقه بعد از آزمون مقادیر مختلف اتانول (۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و صفر گرم برکیلوگرم) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند. در ضمن به مدت یک ماه ۰/۱ ml بافر فسفات با غلظت 10^9 cfu/ml را هر روز دریافت کردند.

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که تزریق بعد از آزمون اتانول (۱ و ۰/۵ گرم بر کیلوگرم) باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌گردد [$p<$۰/۰۰۱، $F(3/28)=11/16$] [$p <$ ۰/۰۵، $F(3/28)=11/16$] (نمودار ۱).

آزمایش دوم: اثر *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* برتأخیر ورود به 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 10^9 cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی سالین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را ۵ دقیقه بعد از آزمون دریافت کردند.

گروه دوم به مدت یک ماه ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات با غلظت 10^9 cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی اتانول (۱ گرم بر کیلوگرم) را ۵ دقیقه بعد از آزمون دریافت کردند.

گروه سوم به مدت یک ماه ۰/۱ میلی‌لیتر باکتری با غلظت 10^9 cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی سالین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را ۵ دقیقه بعد از آزمون دریافت کردند.

گروه چهارم به مدت یک ماه ۰/۱ میلی‌لیتر باکتری با غلظت 10^9 cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی اتانول (۱ گرم بر کیلوگرم) را ۵ دقیقه بعد 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 افزایش معنی‌داری را در تاخیر 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 تاخیر برای ورود به اتاق تاریک نشان می‌دهد (p<۰/۰۰۱، ۱۸/۸۸= F(۳/۲۸)) (نمودار ۲).

آزمایش سوم: اثر *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بر زمان سپری شده در اتاق تاریک در روز آزمون. در این آزمایش از چهار گروه حیوان استفاده شد.

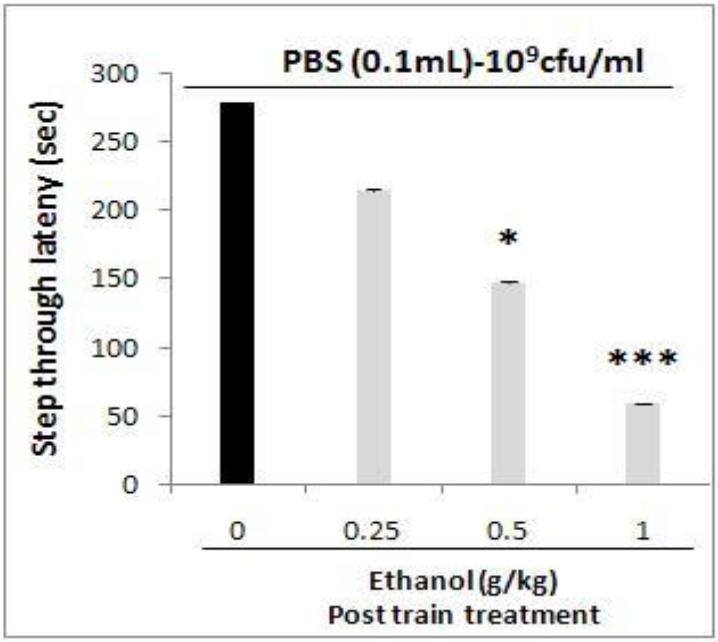
گروه اول به مدت یک ماه ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات با غلظت 10^9 cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی سالین (۱میلی گرم بر میلی لیتر) را ۵دقیقه بعد از آزمون دریافت کردند.

گروه دوم به مدت یک ماه ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات با غلظت 10^9 cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی اتانول (۱ گرم بر کیلوگرم) را ۵ دقیقه بعد از آزمون دریافت کردند.

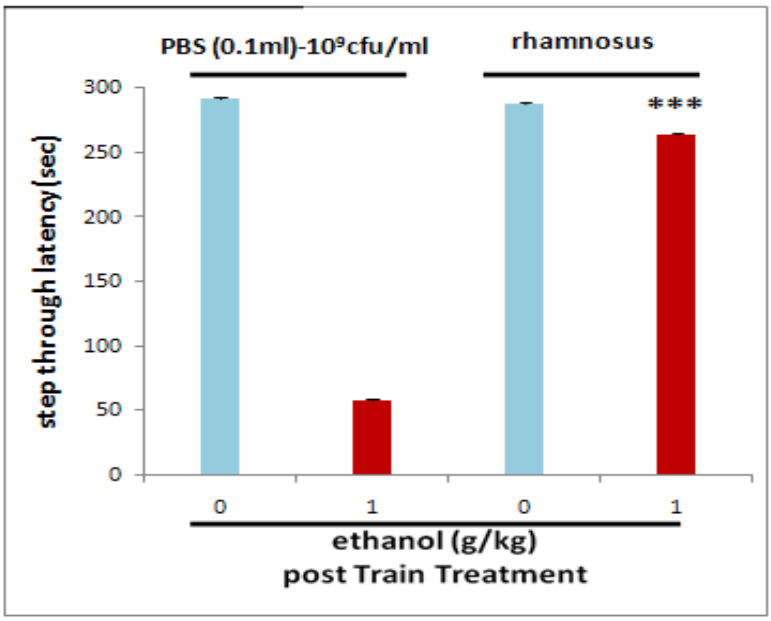
گروه سوم به مدت یک ماه ۰/۱ میلی‌لیتر باکتری با غلظت 10^9 cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی سالین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را ۵ دقیقه بعداز آزمون دریافت کردند.

گروه چهارم به مدت یک ماه ۰/۱ میلی‌لیتر باکتری با غلظت 10^9 cfu/ml را هر روز به صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی اتانول (۱ گرم بر کیلوگرم) را ۵ دقیقه بعداز آزمون دریافت کردند.

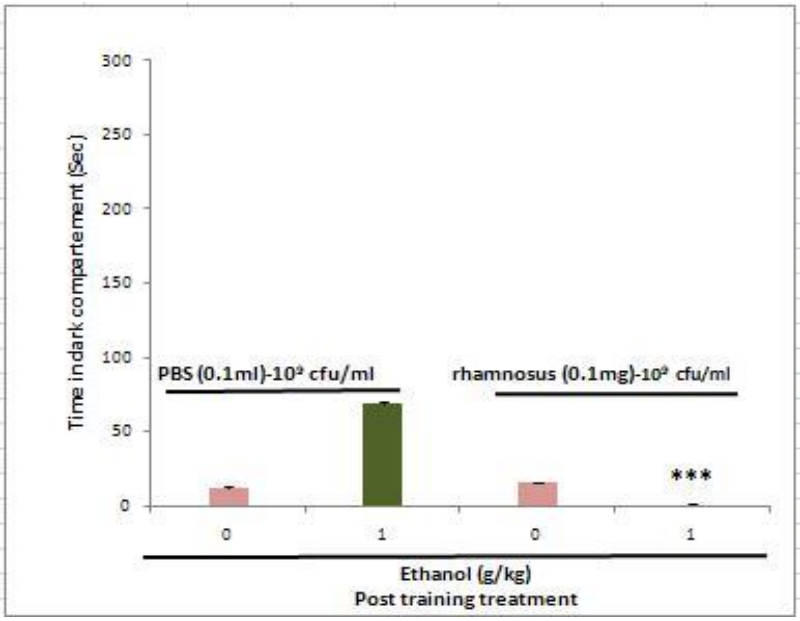
نتایج نشان می‌دهد که گروه دریافت کننده باکتری به تنهایی (گروه سوم) در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین و بافر به تنهایی (گروه اول) کاهش معنی‌داری را در زمان سپری شده در اتاق تاریک نشان نمی‌دهد.همچنین گروه دریافت کننده اتانول و باکتری (گروه چهارم) در مقایسه با گروه دریافت کننده اتانول به تنهایی (گروه دوم) کاهش معنی‌داری را در زمان باقی‌ماندن در اتاق تاریک نشان می‌دهد (۰/۰۰۱ >F(3,28) =9.78, P) (نمودار ۳).



نمودار ۱-آثار تزریق بعداز آموزش اتانول بر حافظه اجتنابی مهاری. ۰/۰۰۱> *p*** و ۰/۰۵ >*p* *در مقایسه با گروه سالین می‌باشد .



نمودار ۲- مقایسه تأخیر اولیه در ورود به اتاق تاریک بین گروه کنترل بدون اتانول و گروه دریافت کننده باکتری (۰/۱ ml با غلظت 10^9 cfu/ml) بدون اتانول و همچنین مقایسه تأخیر اولیه در ورود به اتاق تاریک بین گروه دریافت کننده اتانول و گروه دریافت کننده باکتری(۰/۱ ml با غلظت 10^9 cfu/ml) همراه با اتانول. ***p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه سالین می باشد .



نمودار ۳- مقایسه زمان باقی ماندن در اتاق تاریک بین گروه کنترل بدون اتانول و گروه دریافت کننده باکتری (۰/۱ ml با غلظت 10^9 cfu/ml) بدون اتانول و همچنین مقایسه زمان باقی ماندن در اتاق تاریک بین گروه دریافت کننده اتانول و گروه دریافت کننده باکتری (۰/۱ ml با غلظت 10^9 cfu/ml) همراه با اتانول. داده‌ها به صورت میانه ± چارک نشان داده شده است. ***p <۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه سالین می‌باشد.

بحث

در یادگیری اجتنابی مهاری، که نوعی حافظه دراز مدت می‌باشد، ساختارهایی نظیر هیپوکامپیشتی و ناحیه جانبی استریاتوم نقش دارند (۱۸، ۱۹). نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق بعد 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 (۳٤، ۳۷، ٤۳).

به خوبی مشخص شده است که اتانول باعث تخریب حافظه و یادگیری در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود (۹، ۳٤، ۳۷، ٤۲). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که تزریق پس از آموزش اتانول باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌شود (۲٦). اتانول جزء موادی می‌باشد که مورد سوء مصرف قرار می‌گیرد و مصرف اتانول به واسطه فعال شدن سیستم دوپامینی مزولیمبیک تکرار و تقویت می‌گرد (۲۱).

مطالعات نشان می‌دهد که اتانول به واسطه افزایش رهایش گلوتامات و فعال نمودن گیرنده‌های NMDA باعث تحریک گیرنده‌های GABA و القاء فراموشی می‌شود (۳۱).

مشخص نیست که چگونه سویه‌های مختلف میکروب بر عملکرد مغز اثر می گذارند، اما حالت‌هایی مانند اضطراب و افسردگی، در تفاوت در تولید متابولیت توسط باکتری‌های روده است. تفاوت در تولید متابولیت باکتری به وسیله باکتری روده، حضور پلی-ساکارید در دیواره سلولی باکتری، تعاملات ساختاری و فیزیکی مستقیم و فعالیت سیستم ایمنی به احتمال زیاد مشارکت دارند.

به علاوه میکروارگانیسم‌های ویژه مانند *لاکتوباسیلوس* spp قادر است نیترات را به اکسید نیتریک تغییردهد، که یک تنظیم کننده قوی در هر دو سیستم ایمنی و عصبی می‌باشد. در حالی که میکروارگانیسم‌های دیگر می‌توانند آمینواسیدهای عصبی مانند گابا، تولید کنند (۱۱).

عصب واگ (عصب اصلی بخش پاراسمپاتیکی سیستم عصبی خودکار) به میزان زیادی در سیگنال‌دهی دوجهته بین سیستم‌های گوارشی و عصبی درگیر است. یک مطالعه‌ی اختصاصی توسط براو و همکارانش نشان داد که تعدیل پروبیوتیک میکروبیوتای شکمی باعث تغییرات رفتاری و شیمی عصبی موش می‌شود (٦).

باکتری‌های پروبیوتیک قادر به تولید مواد عصبی مانند گابا و 5-HT و دوپامین هستند که تاثیر در عملکرد محور میکروبیوم- روده- مغز دارند (۸، ۲٤، ۲۵).

این باکتری‌ها داروی ضد درد و ضد افسردگی دارند. فعالیتی که می‌تواند بر این محور و همچنین سیستم سروتونرژیک اثر بگذارد (۷).

براو و همکارنش در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که موش سوری دریافت‌کننده 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 دریافت کننده پروبیوتیک دارای سطح پایین تری 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 غیرمستقیم باعث بهبود یادگیری و حافظه می‌شود (٦).

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. تحقیقات نشان‌داد 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 سینگولیت و پری لیمبیک 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 پیش‌پیشانی و آمیگدال کاهش یافته ولی در هیپوکامپ افزایش می‌یابد (٦).

کاهش بیان زیر واحد گیرنده GABA القاء شده توسط *لاکتوباسیلوس* بیانگر آن است که این باکتری یک اثر مثبت و مفید در اعمال شناختی بخصوص حافظه در طی وضعیت‌های پر استرس دارد (٦).

GABA در تقابل گلوتامات و آسپارتات که میانجی‌های عصبی تحریکی مغز هستند موجب ایجاد فرایندی به نام تضعیف بلند مدت (LTD) می‌شود این در حالی است که شواهد نشان می‌دهد که که LTDبا ایجاد یک تعادل با تقویت بلند مدت (LTP) موجب ایجاد حافظه بلند مدت می‌شود (۲۳).

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 (٦).

گاما آمینو بوتیریک 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 (۳۵). مطالعات آزمایشگاهی و کلینیکی نشان می‌دهند که گیرنده‌های گابا می‌تواند یادگیری و حافظه را تحت تاثیر قرار دهد (۳۳).

لیزمنو گریسدر سال ۲۰۰۵ عملکرد لوپ بین هیپوکامپ و VTA (Ventral Tegmental Area) 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 (۲۲).

با توجه به نتایج به دست آمده ،پروبیوتیک ها با کاهش میزان بیان گابا منجر به افزایش حافظه می‌شوند (٦).

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 نمی-شود. 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 بلند مدت است (۲۸).

سروتونین (5-HT) یک نوروترانسمیتر با ساختار اسید آمینه ای است که نقش بسیار مهمی در پدیده-های فیزیولوژیک از جمله خواب، درد، اشتها، فعالیت‌های جنسی و حافظه دارد (٤٠). مطالعات نوروشیمیایی مشخص کرده که کاهش سروتونین در بیماری آلزایمر مشاهده می‌شود (۲۷). نقش سروتونین به واسطه عملکرد انواع مختلف گیرنده‌های آن صورت می‌گیرد که این گیرنده‌ها به چهار گروه تقسیم می‌شوند این پنج 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 (۱۷). جداسازی نقش سروتونین در اختلالات شناختی و حافظه می‌تواند درمان‌های بهتر را ارائه دهد و در درک ما از یادگیری و حافظه بینش جدیدی به و جود آورد (۱۵).

استفاده از ابزارهای دارویی و ژنتیک در مطالعات حیوانی یادگیری و حافظه نشان می‌دهد که نقش بالقوه مهمی برای گیرنده 5-HT7 در فرایندهای شناختی وجود دارد (۳۸).

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق بعد 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 (۳٤، ۳۵، ۳٦، ۳۷). همچنین نتایج ما نشان می‌دهد که تزریق یک ماهه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* 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 مطالعات قبل (۲۲) می‌توان اینطور نتیجه گیری کرد که اتانول با تحریک سیستم گلوتاماترژیکی و به علت برداشتن اثر مهاری گلوتامات از روی سیستم گابا ارژیک، 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 گابا ارژیک می‌شوند که در نهایت منجر به القاء حافظه می‌شوند. همچنین می‌توانند با تغییر در بیان ژن گیرنده‌های گابا ارژیکی باعث مهار مستقیم سیستم گابا ارژیک 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.

منابع

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

2. Aboukhatwa M., Dosanjh L., Luo Y., 2010. Antidepressants are a rational complementary therapy for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 5:10-15.

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

13. Grenham S., Clarke G., Cryan J., Dinan T.G., 2011. Brain – gut - microbe communication in health and disease. *Frontiers in Physiology*. 2,94-100.

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

15. Haider S.,Khaliq S.,Ahmed S.P., Haleem D.J., 2006. Long-term tryptophan administration enhances cognitive performance and increases 5HT metabolism in the hippocampus of female rats. *Amino Acids*. 31,381-425.

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

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

18. Izquierdo I., Bevilaqua L.R., Rossato J.I., Bonini J.S., Da Silva W.C., Medina J.H., 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.

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

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

21. Larsson A., Engel J.A., 2004. Neurochemical and behavioral studies on

4. Boehm S.L., Peden L., Jennings A.W., Kojima N., Harris R.A. Blednov Y.A., 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., Forsythe P., Chew M.V., Escaravage E., Savignac H.M., Dinan T.G. 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. Desbonnet L., Garrett L., clarke G., Bienenstok J., DinanT.G., 2008. The probiotic Bifidobacteria infantis: An assessment of potetial antidepressant properties in the rat. *Journal of Psychiatric Research*. 43: 164-74.

8. Dinan T.G., Stanton C., Cryan J.F., 2013. Psychobiotics:a novel class of psychotropic. *Biological Psychiatry*, 74: 720-6.

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

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

11. Forsythe P., Sudo N., Dinan T.,Taylor V.H., Bienenstock J., 2010. Mood and gutfeelings. *Brain, Behavior*, and *Immunity*. 24, 9-16.

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

hippocampal slice. *Journal of Physiology*, 515 (Pt 2): 453-462.

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

31. 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.

32. Prediger R.D., Batista L.C., Takahashi R.N., 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): 147-154.

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

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

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

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

37. Rezayof A., Shirazi-Zand Z., Zarrindast M.R., Nayer-Nouri T., 2010. Nicotine improves ethanol-induced memory impairment: the role of dorsal hippocampal NMDA receptors. *Life Science*, 86(7-8): 260-266.

ethanol and nicotine interactions. *Neuroscience and Biobehavior Review*, 27(8): 713-720.

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

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

24. Lyte M., 2011. Probiotics funection mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: microbial endocrinology in the design and use of propbiotics. *Bio essays*, 33:574-81.

25.Lyte M., 2013. Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis:how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior. *PLOS Pathog*, 9:e1003726.

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

27. Mann D.M., Yates P.O., 1983. Serotonin nerve cells in Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgury and Psychiatry*, 46(1): 96-105.

28. Messaoudi M., Lalonde R., Violle N., Javelot H., Desor D., Nejdi A., 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.

29. Murphy K.P., Bliss T.V., 1999. Photolytically released nitric oxide produces a delayed but persistent suppression of LTP in area CA1 of the rat

hippocampus. *Brain Research and Brain Research Review*, 43(3): 275-284.

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

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

38. Roberts A.J., Hedlund P.B., 2012. The 5-HT7 receptor in learning and memory. *Hippocampus*. 22,762-771.

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

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

41. 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