ترمیم فراموشی القا شده با اتانول توسط *لاکتوباسیلوس برویس*، پروبیوتیک بومی ایران، در رت های نر نژاد ویستار

بهاره پاکپور[۱]، امیرحسین حدیدی[۲]، مجید نواییان[۳]، پروانه جعفری[۴]، بهرام قبادنیا[۵]، بتول محمدی[۶]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران، ایران
b_pakpour@yahoo.com
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر ری، تهران، ایران
۴. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، تهران، ایران
۵. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران
۶. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۲۵

چکیده

در بسیاری از مطالعات مشخص‌شده است که اتانول در تمام مدل‌های آزمون حافظه ازجمله حافظه اجتنابی مهاری منجر به فراموشی می‌شود. پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی و دارویی تهیه‌شده از میکروارگانیسم‌های زنده می‌باشند که با بهبود تعادل میکروبی روده، اثرات مفیدی بر روی میزبان (انسان یا حیوان) اعمال می‌کنند. هدف این مطالعه بررسی تأثیر *لاکتوباسیلوس برویس*، پروبیوتیک بومی جداشده از لبنیات سنتی ایران بر یادگیری احترازی غیرفعال موش صحرایی بود. در این تحقیق از ۹۶ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۵۰ gr استفاده شد. برای القاء فراموشی از اتانول به‌صورت تزریق زیر جلدی قبل از آزمون استفاده شد و همچنین گاواژ موش‌ها، ۰/۱ ml بافر فسفات حاوی به‌تنهایی یا همراه با *لاکتوباسیلوس برویس*[1] به مدت یک ماه صورت گرفت. آزمون رفتاری با استفاده از دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال انجام شد. نتایج این تحقیق مشخص کرد که تزریق زیر جلدی قبل از آزمون اتانول منجر به فراموشی می‌شود. این فراموشی در گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک بازگردانده می‌شود. یافته‌های این تحقیق نشانگر اثر افزایشی *لاکتوباسیلوس برویس* پروبیوتیک بومی جداشده از دوغ ترخینه، در یادگیری شرطی احترازی غیرفعال در موش صحرایی نر نژاد ویستار می‌باشد که تزریق زیر جلدی از اتانول را دریافت کردند. این امر نشان‌دهنده اثر بهبوددهنده پروبیوتیک‌های خوراکی بر حافظه و یادگیری است.

واژه‌های کلیدی: فراموشی، پروبیوتیک، اتانول، رت

[1] *Lactobacillus brevis*

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

طی دو دهه گذشته، موضوع اختلالات شناختی توجه بسیاری را به خود معطوف کرده است. به‌خوبی مشخص‌شده است که اتانول باعث تخریب حافظه و یادگیری در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود. در تجربیات تحقیق دیگر که در آن روش یادگیری اجتنابی به‌کاربرده شده است، بر اثر تزریق پس از آموزش اتانول حافظه تخریب‌شده است. افزایش یا کاهش میزان نوروترانسمیترها و یا فعال یا مسدود کردن گیرنده‌های مربوطه، نشان داده است که مکانیسم‌های دیگری هم فرآیند یادگیری و حافظه را تغییر دهند. ممکن است وجود یک شبکه که از سیستم‌های متفاوت نوروترانسمیتری تشکیل‌شده است، نقش مهمی در یادگیری و پردازش حافظه داشته باشد. یادگیری اجتنابی مهاری مدل روشی است که برای مطالعه یادگیری و حافظه در موش‌های کوچک به کار می‌رود. هیپوکامپ بخشی از مغز مهره‌داران است که نقش مهمی در تثبیت اطلاعات حافظه کوتاه‌مدت در حافظه بلندمدت و مکان‌یابی فضایی دارد. انسان و دیگر پستانداران یک هیپوکامپ در هر نیمه مغز خود دارند هیپوکمپوس از دو شاخ منحنی‌وار تشکیل‌شده است که به بادامه مغز ختم می‌شوند. هیپوکامپ از بخش‌های مهم مغز پستانداران است. بعد از سن ۶۵ سالگی روند پیری، کاهش حافظه و یادگیری در مغز شروع‌شده و اختلالاتی در حافظه سه‌بعدی و فضایی ایجاد می‌شود با عنایت به اینکه با بالا رفتن سن سلول‌ها شروع به دژنره شدن می‌کنند، در این صورت توانایی یادگیری و قدرت حافظه کاهش می‌یابد. علاوه بر این انواع متفاوتی از شرایط بیمارگونه می‌تواند فرایندهای یادگیری و حافظه را تغییر دهند. برخی از این شرایط از مشکلات ژنتیکی، سبک‌های زندگی (سوءتغذیه 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. بسیاری از پژوهش‌ها نشان داده‌اند که بعضی از ترکیبات غذایی در سلامتی مغز افراد مؤثرند و مطالعات فراوانی این را در طی سال‌های گذشته اثبات کرده است. 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*[1] جنس‌های بسیار متداول به‌عنوان پروبیوتیک هستند و لازم به ذکر است که سوش‌های مختلف باکتریایی، کارایی متفاوتی نیز دارند. حافظه می‌تواند به‌وسیله تغییر رفتار حیوانات اندازه‌گیری شود که بر اثر تزریق داروها فرایندهایی را نشان می‌دهند. 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 موش رت) در یک روش ساده یادگیری و آزمون کردن آن‌ها یک یا چند روز بعد است.

مواد و روش‌ها

در آزمایش‌ها از موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن تقریبی gr ۲۵۰-۲۰۰ که از انستیتو پاستور ایران تهیه می‌شد استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوان خانه تحقیقاتی منتقل‌شده، 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. دما در حیوان خانه بین $^{\circ}$C ۳ ±۲۲ متغیر بود. قبل از شروع آزمایش به مدت یک هفته به موش‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوان خانه تطبیق دهند. در طول یک هفته به‌منظور جلوگیری از تنش کار، هر روز حیوان‌ها تیمار می‌شدند. هر حیوان فقط یک‌بار استفاده‌شده و در گروه هشت‌تایی قرار داده می‌شد. همه آزمایش‌ها در طول روز انجام می‌شد. دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری (غیرفعال)، مدل، از جعبه ایست که

[1] *Lactobacillus and Bifidobacterium*

www.SID.ir

به‌وسیله دیواره‌ای به دو قسمت با اندازه یکسان تقسیم می‌شود. درون دیواره بین دو قسمت درب کشویی به ابعاد $7\times9\ cm^2$ تعبیه‌شده است که می‌توان در موقع لزوم آن را باز کرد. این دستگاه دارای بخش سفیدرنگی می‌باشد که کف و دیواره‌های آن از جنس پلکسی‌گلاس غیر شفاف ساخته‌شده، فاقد هرگونه سقف بوده و توسط نور غیرمستقیم فلورسنت آفتابی روشن می‌شود. بخش دیگر دستگاه سیاه‌رنگ است در کف دارای میله‌های فولادی با فاصله ۱ cm بوده که این میله‌ها توسط سیم رابطی به دستگاه تحریک‌کننده متصل می‌شوند و به این طریق عمل انتقال الکتریکی به حیوانات مورد آزمایش را ممکن می‌سازند. تمامی آزمایش‌ها در اتاق نسبتاً تاریک و بدون سروصدا انجام شد.

آماده‌سازی پروبیوتیک

در این تحقیق از *لاکتوباسیلوس برویس*[1] جداشده توسط دکتر تفویضی و همکاران(۱۳۹۲) از ترخینه جداشده بود(۱). این باکتری بعد از تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و تعیین ژنوتیپ با کد ره‌گیری ثبت‌شده است. برای گاواژ، ابتدا باکتری بر روی محیط کشت و در انکوباتور دار در دمای $37\ ^\circ C$ به مدت ۲۴ h 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، 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 ۳۰ روزه آزمایش هر روز کشت تازه باکتری تهیه و پس از تعیین جذب نوری، محیط کشت با دور به مدت min ۱۵ سانتریفوژ شد و ۳ بار شست‌وشوی رسوب سلولی حاصله با بافر فسفات صورت گرفت. رسوب حاصله در ml ۰/۱ بافر فسفات سوسپانسیون شد. موش‌های گروه دریافت‌کننده باکتری به‌صورت روزانه با این سوسپانسیون باکتریایی گاواژ شدند درحالی‌که گروه کنترل همان مقدار بافر فسفات را به‌صورت دارونما دریافت نمودند.

[1] *Lactobacillus brevis*

داروها

داروی مورداستفاده در این تحقیق عبارت بود از اتانول که در سرم فیزیولوژیک استریل ۰/۹ ٪ استریل حل گردیدند و به‌صورت زیر جلدی به موش‌ها تزریق شد. همچنین باکتری تهیه‌شده 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 شامل آموزش دادن حیوان‌ها در دستگاه بوده، روز دوم یا روز آزمون میزان حافظه حیوان‌های آموزش‌دیده بررسی می‌شود.

مرحله آموزش

در روش اجتنابی مهاری مدل، هر حیوان به‌آرامی در بخش روشن دستگاه قرار می‌گیرد، به مدت s ۵ به آن اجازه داده می‌شود به‌منظور 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 بسته‌شده و حیوان از دستگاه خارج‌شده و به‌آرامی به قفس برگردانده می‌شود.

موش‌هایی که در این مرحله بیشتر از s ۱۲۰ در ورود به بخش تاریک تأخیر داشته باشند حذف می‌شوند. پس از گذشت min ۳۰ این حیوان دوباره به بخش سفید دستگاه منتقل‌شده و بعد از s ۵ درب کشویی باز می‌شد تا حیوان وارد بخش تاریک شود. با ورود حیوان به بخش تاریک، درب کشویی پشت سر حیوان بسته‌شده، حیوان تحریک الکتریکی با شدت یک میلی‌آمپر و به مدت s ۳ که توسط دستگاه تحریک‌کننده به میله‌های فولادی کف بخش تاریک منتقل می‌شود را دریافت می‌کرد. s ۲۰ پس از پایان تحریک حیوان از دستگاه خارج‌شده، به قفس مربوطه منتقل می‌شود. پس از گذشت min ۲ مرحله دوم آموزش روی

Archive of SID

www.SID.ir

حیوان شوک گرفته انجام‌شده در این مرحله نیز موش مانند دفعات قبل به خانه سفید دستگاه منتقل‌شده و درب کشویی بازشده و میزان تأخیر ورودش به بخش تاریک دستگاه ثبت می‌گردد. تأخیر ۱۲۰ s در ورود به بخش سیاه دستگاه که به‌عنوان یادگیری موفق برای حیوان ثبت می‌گردد، حیوان از دستگاه خارج‌شده، بلافاصله تزریق پس از آموزش را دریافت می‌کند. در صورت تأخیر کمتر از ۱۲۰ s در ورود به بخش تاریک پس از ورود درب کشویی دستگاه پشت سرش بسته‌شده، حیوان برای بار دوم شوک دریافت می‌کند. پس از خارج کردن حیوان از دستگاه و سپری شدن ۲ min حافظه حیوان همانند دوره قبل دوباره مورد امتحان قرار می‌گیرد. در صورت کسب یادگیری موفق حیوان از دستگاه خارج‌شده، 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 ۲۴ h 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، همانند روز اول، در بخش روشن دستگاه قرارگرفته، درب کشویی بعد از ۵ s بازشده، زمان تأخیر حیوان در ورود به بخش تاریک دستگاه به‌عنوان معیاری برای بررسی میزان حافظه در نظر گرفته می‌شود. بیشترین مقدار تأخیر برای ورود به بخش تاریک که به‌عنوان حافظه کامل شناخته می‌شود، به میزان ۳۰۰ s در نظر گرفته می‌شود.

پارامترهای موردمطالعه

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

۲-زمان اقامت در اتاق تاریک

نتایج

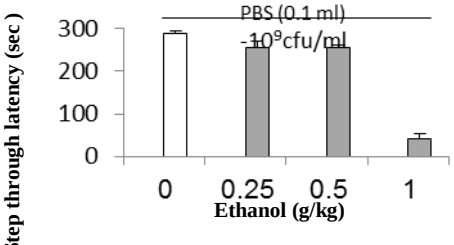
در همه آزمایش‌های توضیح داده‌شده میزان تأخیر ورود حیوان به خانه سیاه در روز آزمون و همچنین باقی ماندن در اتاق تاریک به‌عنوان ملاک حافظه در نظر گرفته‌شده، نمره هر گروه به‌صورت میانگین و انحراف معیار استاندارد ثبت می‌گردید. همچنین تعداد آموزش هر حیوان نیز در روز آموزش نیز ثبت گردید. به‌منظور تعیین وجود اختلاف معنادار بین گروه‌ها آزمایش، از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی استفاده گردید. اختلاف در سطح به‌عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات آماری و رسم نمودارها از نرم‌افزار استفاده شد.

تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام‌شده

نتایج آزمون یادگیری یعنی اطلاعات به‌دست‌آمده که شامل زمان‌های ثبت‌شده در میزان تأخیر اولیه در ورود به اتاق تاریک در مرحله به خاطر آوری و همچنین مدت‌زمان سپری‌شده 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 min قبل از آزمون مقادیر مختلف اتانول را به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند در ضمن به مدت یک ماه ۰/۱ ml بافر فسفات با غلظت cfu/ml ۲×۱۰^{۹} را هر روز دریافت کردند. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که تزریق قبل از آزمون اتانول (gr/Kg ۱) به‌تنهایی باعث تخریب حافظه اجتنابی مهاری می‌گردد (شکل ۱).



شکل ۱- آثار تزریق قبل از آموزش اتانول بر حافظه اجتنابی مهاری. داده‌ها به‌صورت میانه ± چارک نشان داده‌شده است. ۰/۰۰۱ >P* در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.**

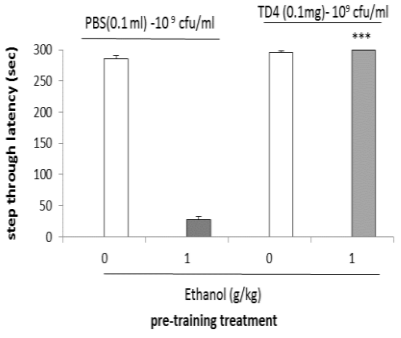
Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش دوم: اثر لاکتوباسیلوس برویس بر تأخیر ورود به اتاق تاریک در روز آزمون

گروه اول به مدت یک ماه ۰/۱ ml بافر فسفات با غلظت ۲×۱۰^{۹}cfu/ml را هر روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی سالین را ۳۰ min قبل از آزمون دریافت کردند. گروه دوم به مدت یک ماه ۰/۱ ml بافر فسفات با غلظت را هر روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی اتانول (۱ gr/Kg) را ۳۰ min قبل از آزمون دریافت کردند. گروه سوم به مدت یک ماه ۰/۱ ml باکتری با غلظت را هر روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی سالین را ۳۰ min قبل از آزمون دریافت کردند. گروه چهارم به مدت یک ماه به میزان ۰/۱ ml باکتری با غلظت cfu/ml ۲×۱۰^{۹} را هر روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی (۱ gr/Kg) اتانول را ۳۰ min قبل از آزمون دریافت کردند.

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



شکل ۲- مقایسه تأخیر اولیه در ورود به اتاق تاریک بین گروه کنترل بدون اتانول و گروه دریافت‌کننده باکتری بدون اتانول و همچنین مقایسه تأخیر اولیه در ورود به اتاق تاریک بین گروه دریافت‌کننده اتانول و گروه دریافت‌کننده باکتری (همراه با اتانول. داده‌ها به‌صورت میانه ± چارک نشان داده‌شده است. ۰/۰۰۱ >P* در مقایسه با گروه سالین می‌باشد.**

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

گروه اول به مدت یک ماه ۰/۱ ml بافر فسفات با غلظت ۲×۱۰^{۹} cfu/ml را هر روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی سالین را ۳۰ min قبل از آزمون دریافت کردند.

گروه دوم به مدت یک ماه ۰/۱ ml بافر فسفات با غلظت ۲×۱۰^{۹}cfu/ml را هر روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی اتانول (۱gr/Kg)را به مدت ۳۰ min قبل از آزمون دریافت کردند.

گروه سوم به مدت یک ماه ۰/۱ ml باکتری با غلظت cfu/ml ۲×۱۰^{۹} را هر روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند. این گروه تزریق زیر جلدی سالین را ۳۰ min قبل از آزمون دریافت کردند.

گروه چهارم به مدت یک ماه ۱ ml/ ۰ باکتری با غلظت ۲×۱۰^{۹}cfu/ml را هر روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند، این گروه تزریق زیر جلدی اتانول (۱ gr/Kg)را ۳۰ min قبل از آزمون دریافت کردند.

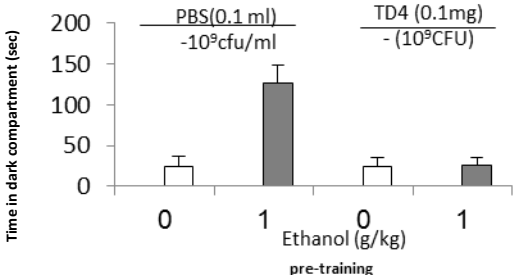
نتایج نشان می‌دهد که گروه دریافت‌کننده باکتری به‌تنهایی (گروه سوم) در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالین و بافر به‌تنهایی (گروه اول) کاهش معنی‌داری را در زمان سپری‌شده در اتاق تاریک نشان نمی‌دهد. همچنین گروه دریافت‌کننده اتانول و باکتری (گروه چهارم) در مقایسه با گروه دریافت‌کننده اتانول به‌تنهایی (گروه دوم) کاهش معنی‌داری را در زمان باقی ماندن در اتاق تاریک نشان می‌دهد ($P < ۰/۰۱$) (شکل ۳).

بحث

نتایج به‌دست‌آمده 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 ازجمله یادگیری اجتنابی مهاری می‌شود(۲-

Archive of SID
www.SID.ir

۶). هم ترکیبات الکلی و هم غیر الکلی ممکن است منجر به تخریب کامل و یا نسبی حافظه شود (۷).



شکل ۳- مقایسه زمان باقی ماندن در اتاق تاریک بین گروه کنترل بدون اتانول و گروه دریافت‌کننده باکتری بدون اتانول و همچنین مقایسه زمان باقی ماندن در اتاق تاریک بین گروه دریافت‌کننده اتانول و گروه دریافت‌کننده باکتری همراه با اتانول. داده‌ها به‌صورت میانه ± چارک نشان داده‌شده است. ۰/۰۰۱ >P* در مقایسه با گروه سالین می‌باشد.**

تخریب حافظه به‌واسطه اتانول می‌تواند نشانگر آسیب در تمامی سطوح حافظه اکتسابی، تحلیلی و یا به یادآوری حافظه ایجاد کند. تأثیری که اتانول در شکل‌گیری دارد ممکن است به علت تخریب نوروفیزیولوژیکی هیپوکامپ باشد(۸, ۹). به‌عنوان مثال استفاده از دوز بالای اتانول از LTP هیپوکامپ جلوگیری می‌کند و در یادگیری فضایی که وابسته به عملکرد هیپوکامپ[1] است اختلال ایجاد می‌کند (۷, ۱۰, ۱۱).

کوستا[2] و همکارانش گفته‌اند که تاثیر حاد اتانول روی گیرنده NMDA عمل می‌کند (۱۰). همچنین نتایج ما نشان می‌دهد که تزریق یک‌ماهه *باسیلوس سوبتیلیس*[3] به حیواناتی که در روز آزمون اتانول دریافت می‌کنند باعث بهبود حافظه تخریب‌شده با اتانول می‌شود. براو[4] و همکارانش (۲۰۱۱) نشان دادند که موش سوری دریافت‌کننده پروبیوتیک علائم رفتاری اضطرابی را در مقایسه با موش گروه کنترل کمتر بروز می‌دهد (۱۲). آن‌ها دریافتند که موش دریافت‌کننده پروبیوتیک دارای سطح پایین‌تری از هورمون‌های استرس در خون می‌باشد. ازآنجایی‌که اضطراب و افسردگی باعث قابلیت‌های شناختی افراد می‌گردد می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مصرف پروبیوتیک از طریق کاهش اضطراب و افسردگی به‌طور غیرمستقیم باعث بهبود یادگیری و حافظه می‌شود. به دنبال تحقیقات ما براو و همکارانش نشان دادند با دریافت پروبیوتیک مقدار گاما-آمینو-بوتیریک اسید[5] (GABA) در موش تغییر می‌یابد(۱۳). افزایش و کاهش بیش‌ازحد 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 سین‌گولیت[6] و پری‌لیمبیک[7] میزان بیان mRNA افزایش می‌یابد و برعکس بیان آن در هیپوکامپ، آمیگدال[8]، لوکوس‌سرولئوس[9] کاهش می‌دهد در مورد $GABA_A$ بیان mRNA در قشر پیش پیشانی و آمیگدال کاهش‌یافته ولی در هیپوکامپ افزایش می‌یابد (۱۴). گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) اصلی‌ترین ناقل عصبی مهاری در مغز می‌باشد که اثرات خود را از طریق سه گیرنده مهاری مختلف گابا ـ A، گابا ـ B و گابا ـ C اعمال می‌نماید (۱۵). گیرنده‌های گابا ـ A و گابا ـ C جزء گیرنده‌هایی می‌باشند که با کانال وابسته به لیگاند کلر جفت شده‌اند، درحالی‌که گیرنده گابا ـ B از طریق پروتئین‌های G عمل می‌نماید (۱۶, ۱۷). مطالعات آزمایشگاهی و کلینیکی نشان می‌دهند که گیرنده‌های گابا می‌تواند یادگیری و حافظه را تحت تاثیر قرار دهد (۱۸). اکثر مطالعات پیشین نشان داده‌اند که آگونیست گیرنده‌های گابائرژیک باعث تخریب حافظه، درحالی‌که آنتاگونیست‌های آن‌ها باعث تسهیل ذخیره و به یادآوری حافظه احترازی غیرفعال می‌شود (۱۹, ۲۰). به‌عنوان نمونه نشان داده‌شده است که وقتی آگونیست‌های GABA به داخل بطن‌های جانبی، بخش قاعده‌ای مغز جلویی، هیپوکامپ و آمیگدال تزریق می‌شود، باعث تخریب حافظه می‌گردد (۱۰, ۱۱, ۲۱, ۲۲). مطالعات پیشین همچنین پیشنهاد نموده‌اند که گیرنده‌های گابا ـ A یعنی

[1] Hippocampus
[2] Costa
[3] *Bacillus subtilis*
[4] Bravo

[5] γ-Amino butyric acid
[6] Cingulated
[7] Prelimbic
[8] Amygdalæ
[9] Locus seruleus

Archive of SID
www.SID.ir

موسیمول در یادگیری وابسته به وضعیت دخیل می‌باشند و می‌توانند یادگیری وابسته به وضعیت ایجاد نمایند (۴). یادگیری وابسته به وضعیت پدیده‌ای است که در آن به یادآوری اطلاعات تازه کسب‌شده تنها در شرایطی صورت می‌گیرد که فرد از لحاظ حسی و فیزیولوژیک در همان شرایطی قرار گیرد که اطلاعات در همان شرایط کد شده است (۲۳). مطالعات آشکار نموده است که داروهایی نظیر کانابینوئیدها[1]، اپیوئیدها[2]، لیتیم[3] و هیستامین[4] نیز قادر به ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت می‌باشند(۲۴,۱۰-۲۶). تحقیق‌های دیوید کامفیلد[5] و همکارانش (۲۰۱۱) بیان می‌دارد که باکتری‌های لوله گوارش می‌توانند با دستگاه عصبی مرکزی ارتباط برقرار کنند (۲۷). مطالعات انجام‌شده بر روی جمعیت‌های مبتلا به سندرم خستگی مزمن و فیبرومیالجیا نشان داده که تمرکز *بیفیدوباکتریوم* در آن‌ها برعکس باکتری‌های اسیدلاکتیک افزایش می‌یابد. این امر نشان می‌دهد که عدم توازن میکروفلور دستگاه گوارش با اختلالات عصب‌شناختی شدیدتر همانند عصبانیت، کاهش حافظه، فراموشی و گیجی همراه شود. توجیه احتمالی این ارتباط می‌تواند اثر سیتوکین‌های پیش التهابی بر دستگاه عصبی مرکزی باشد. بیان‌شده که اثر پروبیوتیک‌ها بر سیتوکین‌های التهابی و استرس اکسیداتیو می‌توانند منجر به افزایش در عامل نوروتروفیک مشتق شده از مغز (BDNF) باشد (۲۷). فرانچینی[6] و همکارانش (۲۰۱۴) در تحقیقی بر روی فرمولاسیون لاکتوباسیلوس R۰۰۵۲ و بیفیدوباکتریوم R۰۷۵ نشان دادند که هیچ نوع اختلالات یادگیری و حافظه یا اعتیاد و ... به‌عنوان عوارض جانبی بر اثر مصرف این ترکیب ایجاد نمی‌شود (۲۸). 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 وهیپوکامپ موش سوری می‌شود. جایی که مرکز تبدیل حافظه کوتاه‌مدت به بلندمدت است. همچنین این مواد باعث یک افزایش تعداد گیرنده‌ها NMDA در هیپوکامپ می‌شوند. به‌طور جالب‌توجهی تغییرات معکوس مغزی در حیوانات در پی استرس و نیز ایجاد رفتار شبه افسردگی ایجاد می‌شود که مهارت‌های حافظه‌ای را کاهش می‌دهد (۲۹). سروتونین (۵-HT) یک نوروترانسمیتر با ساختار اسیدآمینه‌ای است که نقش بسیار مهمی در پدیده‌های فیزیولوژیک ازجمله خواب، درد، اشتها، فعالیت‌های جنسی و حافظه دارد (۴). مطالعات نوروشیمیایی مشخص کرده که کاهش سروتونین در بیماری آلزایمر مشاهده می‌شود (۳۰-۳۲). نقش سروتونین به‌واسطه عملکرد انواع مختلف گیرنده‌های آن صورت می‌گیرد که این گیرنده‌ها به چهار گروه تقسیم می‌شوند این چهار گروه شامل ۵-HT۱، ۵-HT۲، ۵-HT۳، ۵-HT۴ و ۵-HT۵ می‌باشد و البته گیرنده‌های ۵-HT۶، ۵-HT۷ و ۵-HT۸ نیز مشخص‌شده‌اند (۳۳).

لیزمن[7] و گریس[8] (۲۰۰۵) عملکرد لوپ بین هیپوکامپ و VTA را که در تنظیم حافظه طولانی‌مدت نقش دارد مشخص کردند (۳۴). مسیر بالارو لوپ هیپوکامپ – VTA شامل نورون‌های دوپامینرژیکی است که از VTA به هیپوکامپ می‌رود و مسیر پایین‌رو شامل هسته اکومبنس و پالیدوم جانبی است (VP) (شکل ۱) (۳۵). سپس از هسته اکومبنس و VP خروجی‌های گابا ارژیک[9] خارج‌شده که به VTA بازگردانده می‌شوند بنابراین می‌تواند کنترل مهاری بر جایگاه‌های هدف خود داشته باشد (۳۴).

هسته اکومبنس[10] همچنین ورودی‌های دوپامینرژیکی[11] را از VTA دریافت می‌کند همچنین ورودی‌های گلوتاماترژیک

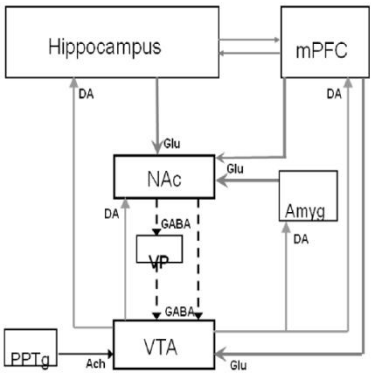
[1] Cannabinoid
[2] Opioid
[3] Lithium
[4] Histamine
[5] Camfield
[6] Franchini

[7] Lisman
[8] Grace
[9] GABAergic
[10] Accumbens nucleus
[11] Dopaminergic

Archive of SID

www.SID.ir

بسیاری را از medial prefrontal cortex (mPFC) و تالاموس و هیپوکامپ و آمیگدال دریافت می‌کند. با توجه به گزارش‌ها ارائه‌شده قبلی و نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق اخیر و با توجه به شکل ۱ می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که اتانول منجر به مهار سیستم گلوتاماترژیکی می‌شود و درنتیجه به علت برداشتن اثر مهاری گلوتامات از روی سیستم گابا ارژیک، این سیستم فعال‌شده و منجر به القاء فراموشی می‌شود؛ اما پروبیوتیک‌ها با توجه به نتایج به‌دست‌آمده منجر به فعال کردن سیستم سروتونرژیک و مهار کردن سیستم گابا ارژیک می‌شوند لذا می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که پروبیوتیک‌ها با تحریک سیستم سروتونرژیک 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.



شکل ۱- دیاگرام شماتیک مسیرهای عصبی مرتبط کننده چند هسته سیستم لیمبیک که در حافظه اجتنابی مهاری دخالت دارند (۳۹).

تشکر و قدردانی

با تشکر از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی به دلیل حمایت مالی از این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی با عنوان " اثر ACPA در هیپوکامپ پشتی بر روی یادگیری وابسته به وضعیت القا شده با موسیمول در موشهای صحرایی نر بالغ"

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

۱. تفویضی ف, تاج آبادی ابراهیمی م. شناسایی مولکولی لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک جداشده از غذای سنتی ترخینه و دوغ ترخینه بر اساس توالی۱۶ .rDNA Sعلوم غذایی و تغذیه. ۱۳۹۲;۱۱:. ص ۱۲-۱۸.

2. Rezayof A, Alijanpour S, Zarrindast M-R, Rassouli Y. Ethanol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors. Neurobiology of learning and memory. 2008;89(4):441: p. 36-49.
3. Rezayof A, Motevasseli T, Rassouli Y, Zarrindast M-R. Dorsal hippocampal dopamine receptors are involved in mediating ethanol state-dependent memory. Life sciences. 2007;80(4): p. 285-297.
4. Rezayof A, Sharifi K, Zarrindast M-R, Rassouli Y. Modulation of ethanol state-dependent learning by dorsal hippocampal NMDA receptors in mice. Alcohol. 2008;42(8):667: p. 26-48
5. Rezayof A, Shirazi-Zand Z, Zarrindast M-R, Nayer-Nouri T. Nicotine improves ethanol-induced memory impairment: the role of dorsal hippocampal NMDA receptors. Life sciences. 2010;86(7): : p. 260-278.
6. Rezayof A, Zare-Chahoki A, Zarrindast M-R, Rassouli Y. Inhibition of dorsal hippocampal nitric oxide synthesis potentiates ethanol-induced state-dependent memory in mice. Behavioural brain research. 2010;209(2) : p. 189-199.
7. Silvers JM, Tokunaga S, Berry RB, White AM, Matthews DB. Impairments in spatial learning and memory: ethanol, allopregnanolone, and the hippocampus. Brain Research Reviews. 2003;43(3) : p. 275-290.
8. Ciamei A, Cestari V, Castellano C. Strain-dependent interactions between MK-801 and cocaine on retention of C57BL/6 and DBA/2 mice tested in a one-trial inhibitory avoidance task: involvement of dopaminergic mechanisms. Neurobiology of learning and memory. 2000;73(2): : p. 188-195.
9. Mondadori C, Weiskrantz L, Buerki H, Petschke F, Fagg G. NMDA receptor antagonists can enhance or impair learning performance in animals. Experimental Brain Research. 1989;75(3) : p. 449-462.
10. Costa ET, Ferreira VM, Valenzuela CF. Evidence that nitric oxide regulates the acute effects of ethanol on rat N-methyl-D-aspartate receptors in vitro. Neuroscience letters. 2003;343(1) : p. 41-53.
11. Tsutamoto T, Tsutsui T, Maeda K, Hayashi M, Wada A, Ohnishi M, Fujii M, Ishii C. Effects of Long-Acting Calcium Channel Antagonists on Neurohumoral Factors: Comparison of Nifedipine Coat-Core with Amlodipine. Journal of cardiovascular pharmacology. 2003: p. 230-247
12. Bravo JA, Julio-Pieper M, Forsythe P, Kunze W, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF. Communication between gastrointestinal bacteria and the nervous system. Current opinion in pharmacology. 2012;12(6) : p. 667-684.
13. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF. 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. 2011;108(38) : p. 320-348.
14. Bormann J. The 'ABC'of GABA receptors. Trends in Pharmacological Sciences. 2000;21(1) : p. 16-32.
15. Assunção M, Santos-Marques MJ, Carvalho F, Lukoyanov NV, Andrade JP. Chronic green tea consumption prevents age-related changes in rat hippocampal formation. Neurobiology of aging. 2011;32(4) : p. 24-49.
16. Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MB. Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. Journal of neurochemistry. 2004;88(6) : p. 1555-1570.
17. Talebi A, Amirzadeh B, Mokhtari B, Gahri H. 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. 2008;37(5) : p. 509-523.
18. Abel T, Lattal KM. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. Current opinion in neurobiology. 2001;11(2) : p. 180-197.
19. Matthews DB, Silvers JR. The use of acute ethanol administration as a tool to investigate multiple memory systems. Neurobiology of learning and memory. 2004;82(3) : p. 299-306.
20. White AM. What happened? Alcohol, memory blackouts, and the brain. Alcohol Research and Health. 2003;27(2) : p. 186-194.
21. Fujii S, Yamazaki Y, Sugihara T, Wakabayashi I. Acute and chronic ethanol exposure differentially affect induction of hippocampal LTP. Brain research. 2008;1211: p. 113-124.
22. WHITE AM, Swartzwelder HS. Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol effects. Annals of the New York Academy of Sciences. 2004;1021(1) : p. 206-212.
23. Aboukhatwa M, Dosanjh L, Luo Y. Antidepressants are a rational complementary therapy for the treatment of Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2010; : p. 5-23 (10).
24. Zarrindast M-R, Rezayof A. Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions

Archive of SID

www.SID.ir

with dopamine receptors. European journal of pharmacology. 2004;497(2) : p. 197-208.
25. Zarrindast M, Madadi F, Ahmadi S. Repeated administrations of dopamine receptor agents affect lithium-induced state-dependent learning in mice. Journal of Psychopharmacology. 2009;23(6) : p. 645-654.
26. Zarrindast M-R, Fazli-Tabaei S, Khalilzadeh A, Farahmanfar M, Yahyavi S-H. Cross state-dependent retrieval between histamine and lithium. Physiology & behavior. 2005;86(1) : p. 154-168.
27. Camfield DA, Owen L, Scholey AB, Pipingas A, Stough C. Dairy constituents and neurocognitive health in ageing. British journal of nutrition. 2011;106(02) : p. 159-168
28. Franchini P, Fruciano C, Frickey T, Jones JC, Meyer A. The gut microbial community of midas cichlid fish in repeatedly evolved limnetic–benthic species pairs. PLoS One. 2014;9:e95027.
29. Reis HJ, Guatimosim C, Paquet M, Santos M, Ribeiro FM, Kummer A, Schenatto G, Salgado JV, Vieira LB, Teixeira AL. Neuro-transmitters in the central nervous system & their implication in learning and memory processes. Current medicinal chemistry.2009;16(7): p. 796-814.
30. Mahmoudi M, Zarrindast M-R. Effect of intracerebroventricular injection of GABA receptor agents on morphine-induced antinociception in the formalin test. Journal of Psychopharmacology. 2002;16(1) : p. 85-99.
31. Rassouli Y, Rezayof A, Zarrindast M-R. Role of the central amygdala GABA-A receptors in morphine state-dependent memory. Life sciences. 2010;86(23): p. 887-894.
32. Zarrindast M-R, Noorbakhshnia M, Motamedi F, Haeri-Rohani A, Rezayof A. Effect of the GABAergic system on memory formation and state-dependent learning induced by morphine in rats. Pharmacology. 2006;76(2) : p. 93-106
33. Zarrindast M-R, Ahmadi S, Haeri-Rohani A, Rezayof A, Jafari M-R, Jafari-Sabet M. GABA A receptors in the basolateral amygdala are involved in mediating morphine reward. Brain research. 2004;1006(1) : p. 49-56.
34. Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. Neuron. 2005;46(5) : p. 703-711.
35. Shulz DE, Sosnik R, Ego V, Haidarliu S, Ahissar E. A neuronal analogue of state-dependent learning. Nature. 2000;403(6769) : p. 549-562.

Archive of SID

www.SID.ir

Repair ethanol induced amnesia with Iranian *lactobacillus brevis* in Rats

Bahareh Pakpour[1], Amir Hosein Hadidi[2], Majid Navaeian[3], Parvaneh Jafari[4], Bahram Ghobadnia[5], Batool Mohammadi[6]

1- Department of Biology, Central Tehran branch Islamic, Azad University,Tehran, Iran
b_pakpour@yahoo.com
2- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Department of Biology, Shahr-e-rey branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4- Department of Microbiology, Arak branch, Islamic Azad University, Arak, Iran
5- Department of Biology, Central Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
6- Department of Biology, Central Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received:1393/10/24
Accepted:1394/03/25

Abstract:

Animal studies show that ethanol exerts amnesic effects in different models of memory such as inhibitory avoidance.Probiotics are food supplements and pharmaceutical substances prepared from living microorganisms that with enhancement of microbial equilibrium of intestinal microbiota,insert useful effects on the host (human/animal. The aim of this study was examination of TD4, the native Iranianprobiotic isolated from Traditional dairy product on the rat passive avoidance. In this study use as 96 male wistar rats with 200-250 grams weight range. For induced amnesia used as ethanol and for one mount administrated with1×10^{9} cfu/ml of with or without probiotic bacteria.The step-through passive avoidance used in the present study to examine long-term memory in male Wistar rats. Results indicate that post-training sub cortical (SC) administration of etanol (1 mg/kg) induce amnesia. This amnesia was reversed in probiotic receiving groups. Results of this study showed that the lactobacillus brevisisolated fromTarkhineh dough, enhance the on passive avoidance learning of male Wistar rats that resiveetanol. Our data demonstrate the positive effect of this probeotic on learning and memory.

Key words: Amnesia, probiotic, etanol, Rat.

Archive of SID

www.SID.ir