تنظیم پاسخ استرسی توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LX-۱۰۸ در رت نر نژاد ویستار تحت استرس بی‌حرکتی مزمن

مژگان خسروبیگی[۱]، **پروانه جعفری**[۲]، عباس اخوان سپهی[۳]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، اراک، ایران

p-jafari@iau -arak.ac.ir

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۲۹

Archive of SID

چکیده

یکی از مهم‌ترین مشکلات بشر در کشورهای پیشرفته، استرس و نقش آن در افزایش علائم انواع بیماری‌ها است. با شناخت عملکرد میکروفلور در کنترل فرایندهای مغزی، به نظر می‌رسد که شاید بتوان از پروبیوتیک‌ها برای کنترل و بهبود عملکرد واکنش‌های مغزی ازجمله کنترل استرس بهره برد. ازاین‌رو در این پژوهش، تأثیر باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LX-۱۰۸[۱] بر کنترل ترشح میزان هورمون آدرنوکورتیکوتروپین در رت نر نژاد ویستار، تحت شرایط استرسی بی‌حرکتی مزمن موردمطالعه قرار گرفت. برای انجام این تحقیق ۲۴ رت صحرایی نر نژاد ویستار به وزن تقریبی ۲۰۰gr- ۱۸۰ به‌صورت تصادفی به سه گروه تقسیم شدند شامل: گروه کنترل منفی، کنترل مثبت (دریافت‌کننده استرس بی‌حرکتی مزمن) و گروه تجربی (دریافت‌کننده ml ۱ سوسپانسیون خوراکی پروبیوتیک تحت شرایط استرس). وزن رت‌ها هر هفته اندازه‌گیری شد و پس از ۳ هفته، حیوانات توسط اتر بی‌هوش و خون‌گیری مستقیم از قلب آن‌ها به عمل آمد. پس از جداسازی سرم خون، غلظت هورمون آدرنوکورتیکوتروپین با کیت اختصاصی و با روش الایزا تعیین شد. همچنین با نمونه‌گیری از مدفوع، الگوی میکروفلور روده نیز تعیین گشت. نتایج حاصله از این تحقیق نشان داد که مصرف پروبیوتیک LX-۱۰۸ می‌تواند از افزایش هورمون آدرنوکورتیکوتروپین القاشده با استرس بی‌حرکتی مزمن ممانعت نماید. همچنین این پروبیوتیک می‌تواند تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک روده را افزایش داده و از افزایش تعداد انتروباکترهای القاء شونده با استرس ممانعت می کند. از سوی دیگر این پروبیوتیک از کاهش وزن شدید ایجاد با استرس نیز ممانعت می‌نماید. باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LX-۱۰۸ و محصولات تولیدی با آن می‌توانند پس از انجام آزمون‌های کلینیکی به‌عنوان عوامل مؤثر در کاهش استرس و اثرات مخرب آن به کار گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: استرس، پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LX-۱۰۸، میکروفلور و آدرنوکورتیکوتروپین

[1] *Lactobacillus rhamnosus* LX-108

www.SID.ir

مقدمه

تاکنون تعریف دقیقی از استرس ارائه نشده ولی درمجموع استرس هر عامل و شرایطی است که عملکرد طبیعی بدن را مختل می‌سازد. هموستاز مفهوم مرکزی ایده استرس است . بدین معنی که بیشتر فرایندهای بیوشیمیایی سعی در حفظ ثبات و پایداری شرایط ایده‌آل بدن دارند که همان هموستاز است. عوامل محیطی و محرک‌های داخلی یا خارجی، به‌طور مداوم هموستاز را مختل می‌کنند. حتی امکان دارد محرک درواقع وجود خارجی نداشته و تنها ذهنی باشد (۱, ۲). پاسخ به استرس به نحوی است که موجود را برای موقعیت جنگ و یا فرار آماده می‌سازد. محرک‌ها با تأثیر بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال [1]، عملکرد سیستم عصبی خودکار و سیستم ترشح اندوکرین را تغییر می‌دهند (۳, ۴). استرس باعث ترشح هورمون‌هایی استرسی ازجمله کات کول آمین از بخش مرکزی غده فوق کلیوی، گلووکورتیکوئیدها از بخش قشری غده فوق کلیه و آدرنوکورتیکوتروپین [2] از هیپوفیز قدامی می‌شود (۵, ۶). تغییر در ترشح این هورمون‌ها ، تغییرات فیزیولوژیک عمده‌ای را در بدن موجب شده ازجمله اختلال در متابولیسم پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها ایجاد می‌شود. انقباض عروقی، کاهش جریان خون و کاهش اکسیژن‌رسانی به بعضی از اندام‌ها مثل اندام‌های گوارشی و زایشی ایجادشده در عوض خون‌رسانی به عضلات افزایش می‌یابد. با استرس ضربان قلب و برون ده قلب بالا رفته و از فعالیت سیستم ایمنی کاسته می‌شود. تمامی این شرایط در طولانی‌مدت می‌تواند به ایجاد و تشدید بیماری‌ها ازجمله بیماری‌های عصبی منجر شود (۳, ۷, ۸). در دنیای کنونی با پیشرفت علم و فنّاوری، استرس‌های گوناگون نیز افزایش‌یافته است به‌نحوی‌که اجتناب از اثرات مخرب آن امکان‌پذیر نیست. یافتن راهی به‌منظور کاهش اثرات و صدمات حاصله از استرس می‌تواند گامی بزرگ در جهت بهبود سلامت جامعه باشد. با پیشرفت دانش ما از میکروفلور، نقش بارز این میکروارگانیسم‌ها در کنترل فعالیت‌های مغزی به‌ویژه به هنگام استرس مشخص گردیده است (۹). محور معده-مغز محور جدیدی است که بر ارتباط مستقیم فعالیت‌های مغزی و میکروفلور روده اشاره دارد. بیان‌شده که سلول‌های انتروکرومافین در تنظیم محور هیپوتالاموس-هیپوفیز - آدرنال توسط میکروفلور نقش دارند. این سلول‌ها تحت تأثیر میکروفلور روده بوده و می‌توانند واسطه‌های نوروآندوکرینی آزاد کنند که عصب‌های آوران را فعال می‌کند (۴, ۱۰ -۱۲). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده، مشخص و به تعداد کافی هستند که از میکروفلور روده الهام گرفته‌شده‌اند و در صورت مصرف به میزان کافی، اثرات سودمند خود را اعمال می‌کنند. ازاین‌رو به نظر می‌رسد با بهره‌گیری از این محصولات نوین بتوان میزان استرس و هورمون‌های استرسی را در شرایط استرس مزمن کنترل نمود (۱۰, ۱۳-۱۵).

پروبیوتیک‌ها عمدتاً از خانواده *لاکتوباسیلوس‌ها* و *بیفیدوباکتریوم*، هستند که با استقرار در محیط روده، تعادل میکروبی را بهبود بخشیده و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های غیرمفید و بیماری‌زا می‌شوند (۱۵-۱۷). هدف این پژوهش بررسی تأثیر *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LX-۱۰۸ بر ترشح هورمون آدرنوکورتیکوتروپین در رت صحرایی نر نژاد ویستار در شرایط استرس بی‌حرکتی مزمن بود. از سوی دیگر با تعیین الگوی میکروفلور سعی گردید که ارتباطی بین الگوی میکروفلور در شرایط استرس و استفاده از پروبیوتیک پیدا شود.

مواد و روش‌ها

تهیه، نگهداری و گروه‌بندی رت‌ها

در این مطالعه تعداد ۲۴ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار به وزن تقریبی gr ۲۰۰ - ۱۸۰ و میانگین سنی ۶ هفته، از دانشکده علوم پزشکی بقیه‌الله تهران خریداری‌شده و به حیوان خانه

[1] HPA
[2] Adrenocorticotropic Hormone (ACTH)

www.SID.ir
Archive of SID

دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک منتقل شدند. حیوانات در دمای ۲۲±۲°C و رطوبت ۱۰±۵۰٪ با شرایط نوری ۱۲ h روشنایی و ۱۲ h تاریکی نگه‌داری شدند (۱۸-۲۰). آب و غذای استاندارد تهیه‌شده از شرکت به‌پرور کرج به‌طور آزادانه و به میزان نامحدود در اختیار رت‌ها قرار گرفت. پس از طی دوره سازگاری ۱۰ روزه، رت‌ها به‌صورت تصادفی به ۳ گروه ۸ تایی به ترتیب زیر تقسیم شدند:

- گروه کنترل منفی بدون دریافت استرس و پروبیوتیک که روزانه با ۱ ml بافر فسفات با pH: ۷/۲ گاواژ شدند.

- گروه کنترل مثبت که روزانه به مدت ۱۵ min تحت استرس بی‌حرکتی مزمن (CRS) قرارگرفته و با ۱ ml بافر فسفات گاواژ شدند.

- گروه تجربی که روزانه به مدت ۱۵ min تحت استرس بی‌حرکتی مزمن قرارگرفته و همچنین با ۱ ml از سوسپانسیون پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LX-*۱۰۸* در بافر فسفات به میزان $۱۰^{۹}$ cfu/ml، گاواژ شدند.

جهت القای استرس بی‌حرکتی از مهارکننده‌های مخصوص از جنس ماکرولون شفاف که متناسب با اندازه‌ی رت‌ها استفاده شد به‌نحوی‌که رت‌های صحرایی درون آن قابلیت حرکت را تا حد ممکن از دست می‌دادند. رت‌های صحرایی در ساعت مشخصی از روز به مدت ۱۵ min درون این مهارکننده‌ها قرار داده شد و تا حد امکان از تأثیر عوامل استرس‌زای دیگر مانند سروصدا و تغییرات نوری و یا تغییرات دمایی جلوگیری به عمل آمد.

تهیه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LX-۱۰۸

پودر لیوفیلیزه باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*LX-۱۰۸ با خصوصیات پروبیوتیکی اثبات‌شده از شرکت تک ژن زیست تهیه شد. سپس باکتری در محیط کشت ام آر اس براث تلقیح و به مدت ۴۸ h در دمای ۳۷ °C در اتمسفر حاوی ۵٪ گاز دی‌اکسید کربن، گرما گذاری شد. برای اطمینان از خالص بودن باکتری، کشت در محیط ام آر اس آگار[1] صورت گرفت و پلیت در همان شرایط قبل گرما گذاری گردید. پس از بازبینی کلنی‌های حاصله و اطمینان از خالص بودن نمونه لیوفیلیزه، رنگ‌آمیزی گرم و آزمون کاتالاز بر روی باکتری انجام شد. درنهایت با کشت مجدد سویه در محیط ام آر اس براث[2] و افزودن ۲۵٪ v/v از گلیسرول استریل، نگهداری سویه تهیه‌شده در دمای ۲۰ °C- صورت پذیرفت.

به جهت تعیین تعداد باکتری‌های زنده در هر میلی‌لیتر از محیط کشت، محیط ام آر اس با ۱۰٪ v/v از پیش‌کشت یک‌شبه باکتری تلقیح و در همان شرایط قبل به مدت ۲۴ h گرما گذاری شد. پس از اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۲۰ nm، زنجیره رقت از سوسپانسیون باکتری در بافر نمکی فسفات با pH معادل ۷/۲ تهیه و کشت باکتری به‌صورت کشت آمیخته در محیط ام آر اس آگار انجام شد. پس از گذشت ۴۸ h تعداد باکتری‌های زنده موجود در سوسپانسیون باکتری با جذب نوری مشخص تعیین گردید.

به جهت تهیه سوسپانسیون پروبیوتیک برای گاواژ روزانه رت‌ها، ابتدا کشت یک‌شبه باکتری در محیط ام آر اس تا رسیدن به جذب نوری مشخص ادامه یافت. سپس سلول ها با استفاده از سانتریفوژ با دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۲۰min جدا شدند. پس از دو بار شستشو با بافر نمکی فسفات، پلت سلول‌ها مجدداً در همان حجم بافر سوسپانسیون شدند تا غلظت cfu/ml ۲×۱۰^{۹} حاصل شود.

گاواژ دهانی رت‌های گروه تجربی با استفاده از سوسپانسیون فوق به مدت ۲۱ روز ادامه یافت درحالی‌که دو گروه کنترل تنها با ۱ ml از بافر نمکی فسفات به جهت یکسان‌سازی شرایط گاواژ شدند.

[1] MRS agar
[2] MRS broth

Archive of SID
www.SID.ir

تغییرات وزنی و تعیین الگوی میکروفلور رت‌ها

در ابتدای هر هفته وزن رت‌ها در گروه‌های مختلف با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۱ gr اندازه‌گیری و ثبت شد. برای تعیین تأثیر پروبیوتیک و استرس بر ترکیب میکروفلور روده، در پایان هفته‌های اول و سوم، مدفوع رت‌ها جمع‌آوری و در بافر فسفات سوسپانسیون شد. به جهت شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک پس از تهیه زنجیره رقت از سوسپانسیون، کشت آمیخته زنجیره‌های رقت در محیط کشت ام آر اس آگار صورت گرفت. طبق استاندارد بین‌المللی ۱۰۱۵۴ و با کشت آمیخته در محیط YGC ، شمارش تعداد کپک‌ها و مخمرهای مدفوعی انجام پذیرفت. برای شمارش انتروباکتریاسه‌ها طبق استانداردهای ۱-۱۲۴۶۱ و ۲-۲۴۶۱ کشت زنجیره رقت به روش MPN صورت گرفت.

تعیین میزان ترشح هورمون آدرنوکورتیکوتروپین

در پایان دوره ۲۱ روزه آزمون و پس از ۱۲ h گرسنگی، رت‌ها با اتر بی‌هوش شده و خون‌گیری مستقیم از قلب صورت گرفت. خون جمع‌آوری‌شده، به لوله‌های آزمایش استریل کدگذاری شده منتقل و سرم خونی با سانتریفوژ جدا شد. تعیین غلظت هورمون آدرنوکورتیکوتروپین سرمی به روش الایزا و با استفاده از کیت هورمون آدرنوکورتیکوتروپین مخصوص رت، خریداری‌شده از شرکت Eastbiopham، انجام پذیرفت.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

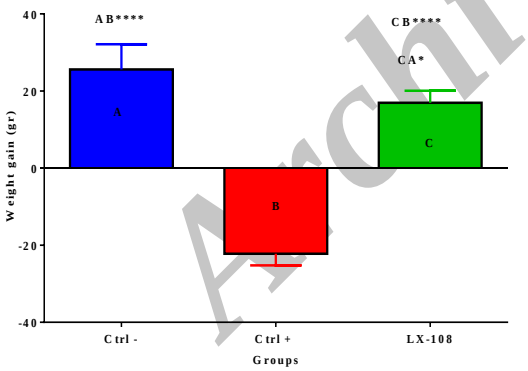
برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری با نام Graph pad prism ۶ و آزمون‌های آماری ANOVA و t-test بهره برده شد. سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

با کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LX-۱۰۸ در محیط ام آر اس آگار مشخص گردید که پودر لیوفیلیزه تهیه‌شده از شرکت تک ژن خالص بوده و تنها یک باکتری در آن وجود دارد. سپس با آزمون‌های بیوشیمیایی دیگر همانند واکنش گرم، آزمون کاتالاز و اکسیداز مشخص شد که باکتری مذکور باسیل گرم مثبت کاتالاز و اکسیداز منفی می‌باشد. کشت یک‌شبه باکتری در محیط ام آر اس براث با غلظت ۲×۱۰^{۹} cfu/ml برای گاواژ روزانه رت‌ها بهره برده شد.

تغییرات وزنی رت‌ها

نتایج حاصله از بررسی وزن رت‌ها نشان داد که استرس با ایجاد اختلالات متابولیسم ، سبب کاهش معنی‌دار وزن در گروه کنترل مثبت در مقایسه با گروه کنترل منفی می‌شود (P<۰/۰۰۰۱). وزن رت‌ها در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل مثبت، افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۰۰۱) این امر نشان می‌دهد با وجود شرایط استرس، مصرف پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LX-۱۰۸ به‌صورت روزانه تا حدودی زیادی از کاهش شدید وزن ممانعت به عمل می آورد. البته لازم به ذکر است که باوجود اثرات مفید پروبیوتیک مذکور در ممانعت از کاهش وزن، در گروه تجربی وزن رت‌ها از گروه کنترل منفی کمتر بود (P=۰/۰۲۸۴) (جدول ۱ و شکل ۱).



شکل ۱- افزایش وزن رت‌ها در گروه‌های کنترل منفی، مثبت و تجربی

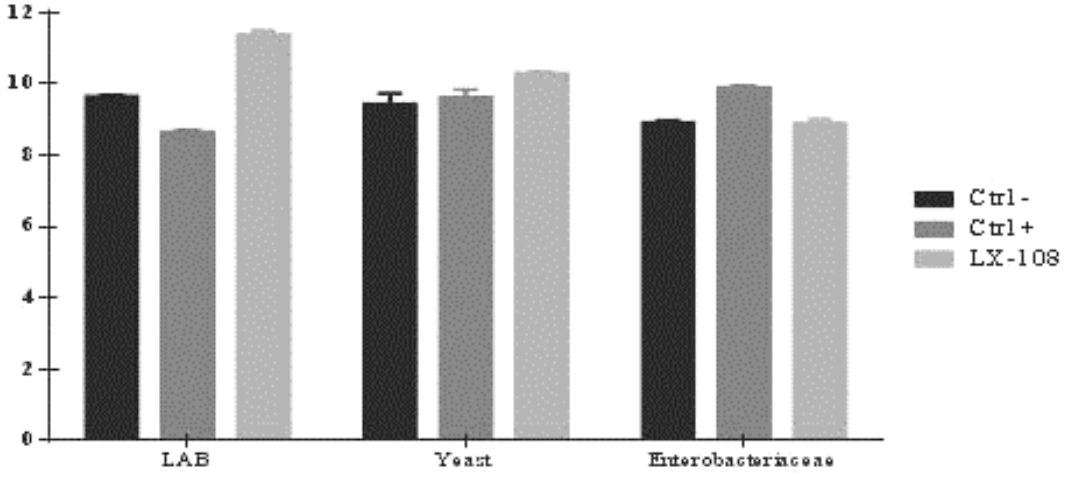
تعیین الگوی میکروفلور

لگاریتم تعداد و انحراف معیار باکتری‌های اسیدلاکتیک، مخمر و انتروباکتریاسه‌ها در جدول ۱ نمایش داده‌شده است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهند، استرس با بر هم زدن تعادل میکروبی بوده در پایان هفته سوم، سبب گردیده که تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل

www.SID.ir
Archive of SID

منفی، به‌طور معنی‌داری کاهش یابد (P<۰/۰۰۰۱). همان‌طور که انتظار می‌رفت گاواژ روزانه پروبیوتیک LX-۱۰۸، سبب افزایش معنی‌داری باکتری‌های اسیدلاکتیک در این گروه نسبت به گروه کنترل منفی (P=۰/۰۲۸۴) و کنترل مثبت شده است (P<۰/۰۰۰۱) (شکل ۲). با بررسی تعداد مخمرهای مدفوعی نشان داده شد که اختلاف معنی‌داری بین تعداد این میکروارگانیسم‌ها در گروه کنترل مثبت با کنترل منفی و تجربی وجود ندارد (به ترتیب P=۰/۵۴۷۳ و P=۰/۰۵۵۰). به‌عبارت‌دیگر استرس تأثیری بر این دسته از میکروارگانیسم‌های میکروفلور نداشته است؛ اما در گروه تجربی، مصرف پروبیوتیک سبب گشته که تعداد مخمرها نسبت به گروه کنترل منفی افزایش پیدا نماید (P=۰/۰۴۹۹). مخمرها میکروارگانیسم‌های مفید دستگاه گوارش می‌باشند که حتی خود می‌توانند به‌عنوان پروبیوتیک نیز مورداستفاده قرار بگیرند. این گروه از میکروارگانیسم می‌توانند اثرات تغذیه‌ای مفیدی نیز در پی داشته باشند (شکل ۲).

نتایج حاصله از بررسی انتروباکتریاسه در مدفوع رت‌ها در گروه‌های مختلف نشان داد که استرس سبب می‌شود که تعداد این دسته از میکروارگانیسم‌ها به‌صورت معنی‌داری در گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی افزایش یابد که این امر نشان‌دهنده به هم خوردن الگوی طبیعی میکروفلور و افزایش احتمال ابتلا به بیماری است (P=۰/۰۰۵۴)؛ اما مصرف پروبیوتیک LX-۱۰۸توانسته با اصلاح الگوی میکروفلور از تعداد این باکتری‌ها کم نماید بدین‌صورت که تعداد آن‌ها در گروه تجربی به‌صورت معنی‌داری از گروه کنترل مثبت کمتر بود (P=۰/۰۰۹۶) ولی اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل منفی نداشت (P=۰/۷۴۷۱). می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً پروبیوتیک کاربردی با تغییر شرایط روده و تولید باکتریوسین از گسترش انتروباکتریاسه‌ها ممانعت نموده است (شکل ۲).



شکل ۲- لگاریتم تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک، مخمر و انتروباکتریاسه موجود در مدفوع ۳ گروه کنترل منفی، مثبت و LX-۱۰۸

جدول ۱- تغییرات وزن، میزان هورمون آدرنوکورتیکوتروپین و الگوی میکروفلور در رت‌های گروه‌های کنترل مثبت، منفی و تجربی

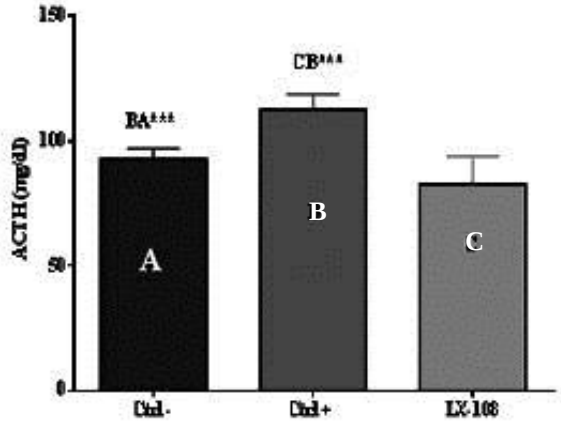
گروه‌ها	افزایش وزن (gr)	ACTH (mg/dl)	لگاریتم تعداد میکروفلور مدفوعی		
			باکتری اسیدلاکتیک	مخمر	انتروباکتریاسه
کنترل منفی	۲۵/۶۰ ± ۲/۹۲۶^{a}	۹۲/۷۱ ± ۲/۰۷۰^{a}	۹/۶۴۸ ± ۰/۰۲۴۴^{a}	۹/۴۴۵ ± ۰/۲۰۴۴^{ab}	۸/۹۲۰ ± ۰/۰۵۱۶^{a}
کنترل مثبت	۲۲/۲۰ ± ۱/۳۵۶^{b}	۱۱۲/۵۰ ± ۲/۷۲۰^{b}	۸/۶۶۱± ۰/۰۳۷۸^{b}	۹/۶۲۸± ۰/۱۵۰۵^{a}	۹/۸۹۴± ۰/۰۳۹۹^{b}
LX-۱۰۸	۱۶/۹۵± ۱/۳۹۵^{c}	۸۲/۶۸ ± ۴/۹۲۳^{a}	۱۱/۳۷± ۰/۰۷۳۰^{c}	۱۰/۲۹± ۰/۰۳۳^{b}	۸/۸۸۱± ۰/۰۹۱۹^{a}

گروه‌هایی که حرف مشترک ندارند نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف در بین نتایج می باشد

www.SID.ir

غلظت هورمون آدرنوکورتیکوتروپین سرمی

تعیین غلظت هورمون آدرنوکورتیکوتروپین به روش الایزا و با استفاده از کیت هورمون آدرنوکورتیکوتروپین مخصوص رت، خریداری‌شده از شرکت Eastbiopham، انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که به‌کارگیری استرس بی‌حرکتی مزمن به مدت ۱۵ min در روز سبب گشته که میزان سطح هورمون آدرنوکورتیکوتروپین سرمی در رت‌های گروه کنترل مثبت در مقایسه با گروه کنترل منفی، به‌صورت معنی‌داری افزایش یابد (P=۰/۰۰۰۹) با استفاده از پروبیوتیک LX-۱۰۸ حتی با به‌کارگیری استرس بی‌حرکتی مزمن، سطح هورمون آدرنوکورتیکوتروپین کاهش‌یافته (P=۰/۰۰۰۷) و تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل ندارد (P=۰/۱۳۱۵) (شکل ۳).



شکل ۳- میزان هورمون آدرنوکورتیکوتروپین سرمی در گروه‌های کنترل منفی، مثبت و تجربی

بحث

روده انسان حاوی تقریباً ۱۰۰ تریلیون باکتری زنده است؛ که این باکتری‌ها شامل دو دسته مفید و مضر (دارای پتانسیل بیماری‌زایی (می‌باشند و مجموعاً میکروفلور بومی روده را تشکیل می‌دهند. این جامعه میکروبی شدیداً تحت تأثیر رژیم غذایی و شرایط محیطی میزبان قرار دارد. بعضی از عوامل خارجی می‌توانند محیط لوله گوارش را تحت تأثیر قرار دهند که در این میان، تنش و استرس، مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر روی دستگاه گوارش و عملکرد آن است. در دهه‌های اخیر مطالعات زیادی درزمینه‌ی ارتباط بین سیستم عصبی و دستگاه گوارشی صورت گرفته است. نتایج به‌دست‌آمده در دهه‌های اخیر همگی دال بر وجود میانکنش بین میکروبیوتای روده، روده و سیستم عصبی مرکزی است که تحت عنوان محور میکروبیوم-رود-مغز شناخته می‌شود (۲۱, ۲۲). ارتباطات بین میکروبیوتا و مغز در میزبان، از طریق مکانیسم‌های متعدد، با افزایش نفوذپذیری روده از طریق تحریک مستقیم سلول‌های میزبان در آستر روده، ازجمله واکنش سلول‌های اپی‌تلیال و سیگنال دهی باواسطه گیرنده رخ می‌دهد (۲۳). سلول‌های انتروکرومافین که به‌طور غیرمتراکم در غشای مخاطی معده وجود دارند، مبدل‌های دو طرفه‌ی مهمی هستند که در تنظیم ارتباط بین روده و سیستم عصبی میزبان نقش دارند. اعتقاد بر این است که سلول‌های انتروکرومافین تحت تأثیر میکروفلور بوده و می‌توانند واسطه‌های نوروآندوکرین آزاد کنند که عصب‌های آوران را فعال می‌کنند (۲۴).

عصب واگ رابط بین مغز و روده بوده و عصب آوران سلول‌های انتروکرومافین می‌باشد که مسیری مستقیم را برای سیگنال دهی این سلول‌ها به مدارهای عصبی فراهم می‌کند که ممکن است نقش مهمی در، پاسخ‌های استرسی، پاسخ‌های سیستم ایمنی، کنترل احساسات و دیگر عملکردهای هموستاتیک داشته باشد (۲۴, ۲۵). با توجه به مطالب بیان‌شده می‌توان به نقش میکروبیوتای روده و تأثیر آن در استرس و واکنش‌های هورمونی پی برد. امروزه مشخص گردیده است که ایجاد تعادل بهینه در جمعیت میکروبی مسیر گوارشی با تغذیه مناسب و سلامت مرتبط است (۲۶, ۲۷). فرآورده‌های پروبیوتیکی عملکرد مغز را در حال استراحت و در پاسخگویی به امور مهیج و احساسی اصلاح می‌کنند. باکتری‌های روده سیگنال‌هایی به مغز می‌فرستند که باگذشت زمان بسته به رژیم تغییر می‌کند. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها می‌توانند واکنش‌ها استرسی را تعدیل کنند. مطالعات بر روی حیوانات نشان داده که باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند در تعدیل سیستم ایمنی، واکنش نوروآندوکرینی و نوروشیمیایی در

www.SID.ir

طی استرس نقش داشته باشند (۲۸). به‌ویژه تحقیقات نشان داده که عدم وجود باکتری‌های هم‌زیست در دستگاه گوارش موش ، منجر به تشدید واکنش محور هیپوتالاموس-هیپوفیز- آدرنال به استرس می‌گردد (۲۹). بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داده که استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند سبب بهبود حالات روحی شده و اضطراب را در بیماران کاهش دهد. به‌عبارت‌دیگر پروبیوتیک‌ها می‌توانند بر حالت احساسی مؤثر باشند و تیمار با پروبیوتیک‌ها می‌تواند اثرات قابل‌اندازه‌گیری استرس را کم نماید (۱۲, ۲۷).

در پژوهش حاضر، اثر دریافت خوراکی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* LX-۱۰۸ بومی ایران، بر کنترل اثرات مخرب استرس بی‌حرکتی مزمن در رت نر نژاد ویستار موردبررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که به‌کارگیری استرس سبب می‌گردد که رت‌ها به‌صورت معنی‌داری، بالغ بر ۱۸۷٪، وزن خود را از دست بدهند. این امر ناشی از تخریب میکروفلور طبیعی است. نقش بارز میکروفلور در بهبود تغذیه کاملاً ثابت‌شده است و هرگونه آسیب به آن می‌تواند با اختلالات تغذیه‌ای ازجمله کاهش وزن مرتبط باشد. مصرف پروبیوتیک LX-۱۰۸ توانسته از این افت چشمگیر وزن ممانعت کند. پروبیوتیک به کار گرفته می‌تواند با بهبود الگوی میکروفلور اثر خود را اعمال نماید که در طی آزمون صورت گرفته به اثبات رسید. باکتری‌های اسیدلاکتیک از مهم‌ترین باکتری‌های میکروفلور انسانی هستند که ضامن سلامت روده و با بهبود روند تغذیه و ممانعت از باکتری‌های بیماری‌زا، اثرات سلامت بخش خود را اعمال می‌کنند (۱۵-۱۷). همان‌طور که در نتایج نشان داده شد استرس با بر هم زدن توازن میکروفلور، ۱۱٪ کاهش در تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک را سبب شد. تعداد این باکتری‌های می‌تواند ضامن سلامت روده در این گروه و بهبود تغذیه باشد. نتایج حاصله از این تحقیق نشان داد که در شرایط استرسی به کار گرفته، تعداد مخمرها در روده رت‌ها تغییر بارزی پیدا نمی‌نماید به‌نحوی‌که در گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک، تنها ۶/۸۷٪ در افزایش این دسته از میکروارگانیسم‌ها مشاهده شد. مخمرها از دسته یوکاریوت‌ها بوده و استفاده از آن‌ها به‌عنوان پروبیوتیک نیز در دنیا رواج دارد. انتروباکتریاسه از باکتری‌های بی‌هوازی روده‌ای بوده که تعداد محدودی از آن‌ها تحت عنوان میکروفلور نیز شناخته می‌شوند اما افزایش تعداد آن‌ها تخت شرایط خاص می‌تواند با بر هم زدن توازن روده به رشد عوامل بیماری‌زا کمک نموده و اثرات مخربی در پی داشته باشد (۱۵-۱۷). به نظر می‌رسد که استرس نیز با بر هم زدن فیزیولوژی دستگاه گوارش، افزایش ۱۰/۹۲ ٪ در تعداد این باکتری‌ها را در گروه کنترل مثبت موجب گردد. استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک بر پایه اسیدلاکتیک در این آزمایش علاوه بر کاهش میزان استرس که می‌تواند به‌نوبه خود به بهبود فیزیولوژی دستگاه گوارش کمک می‌نماید و با کاهش pH اسید در منطقه روده از توسعه انتروباکتریاسه‌ها ممانعت می‌نماید.

انتروباکتریاسه‌ها باکتری‌هایی نوتروفیل بوده که در pH خنثی رشد کرده و در pH اسیدی از بین می‌روند. ازاین‌رو به نظر می‌رسد استفاده این دسته از پروبیوتیک‌ها می‌تواند با بهبود الگوی میکروفلور، سلامت موجود را ارتقا بخشد. از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که استرس بی‌حرکتی مزمن که همراه با افزایش هورمون آدرنوکورتیکوتروپین همراه است می‌تواند به بر هم زدن هموستازی در الگوی میکروفلور روده و توسعه انتروباکتریاسه از یک‌سو و کاهش باکتری‌های اسیدلاکتیک از سوی دیگر شود. استفاده از پروبیوتیک LX-۱۰۸ با کاهش ۲۷٪ در میزان هورمون آدرنوکورتیکوتروپین در بهبود الگوی میکروفلور و کاهش تعداد باکتری‌های روده‌ای و افزایش باکتری‌های اسیدلاکتیک منجر شود. پایه‌های مولکولی این تأثیر به‌درستی مشخص نشده و نیاز به آزمون‌های گسترده برای شناسایی آن وجود دارد.

تقریباً هر نوع استرس چه عصبی و چه فیزیکی منجر به یک افزایش فوری در ترشح هورمون آدرنوکورتیکوتروپین توسط هیپوفیز قدامی و آثار مخرب مربوط به آن در بدن می‌گردد. تا به

Archive of SID

www.SID.ir

امروز تحقیقان فراوانی در خصوص ارتباط گونه‌های مختلف پروبیوتیک‌ها و استرس‌های القایی توسط محرک‌های مختلف، صورت گرفته است. روزبه‌روز دامنه‌ی این تحقیقات گسترده‌تر شده و ادامه دارد. تحقیقات صورت گرفته نشان‌دهنده کاهش میزان استرس و آسیب ناشی از آن توسط پروبیوتیک‌ها است (۳۰). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، باکتری پروبیوتیک بومی ایران، می‌تواند بر میزان ترشح هورمون استرسی، تغییرات وزنی و بهبود الگوی میکروفلور روده، در صورت وجود استرس مؤثر باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Gonlachanvit S, Rhee J, Sun W, Chey W. Effect of acute acoustic stress on anorectal function and sensation in healthy humans1. Neurogastroenterology & Motility. 2005;17(2) :p 222-238.
2. Bradesi S, Eutamene H, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats. Neurogastroenterology & Motility. 2002;14(1) :p 75-100.
3. Holsboer F, Ising M. Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. Annual review of psychology. 2010;61:81.
4. Frodl T, O'Keane V. How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans. Neurobiology of disease. 2013;52(4) :p 24-32.
5. Aguilera G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. Frontiers in neuroendocrinology. 1994;15(4) :p 321-330.
6. Kalsbeek A, Van der Spek R, Lei J, Endert E, Buijs R, Fliers E. Circadian rhythms in the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. Molecular and cellular endocrinology. 2012;349(1) :p 20-32.
7. Epel ES, McEwen B, Seeman T, Matthews K, Castellazzo G, Brownell KD, Bell J, Ickovics JR. Stress and body shape: stress-induced cortisol secretion is consistently greater among women with central fat. Psychosomatic medicine. 2000;62(5) :p 623-630.
8. McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. European journal of pharmacology. 2008;583(2) :p 174-182.
9. Saulnier DM, Ringel Y ,Heyman MB, Foster JA, Bercik P, Shulman RJ, Versalovic J, Verdu EF, Dinan TG, Hecht G. The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. Gut microbes. 2013;4(1) :p 17-25.
10. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, Bruewer M. Probiotic mixture VSL# 3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. American journal of physiology-Gastrointestinal and liver physiology. 2012(5) :p 28-39.
11. Jones A, Godfrey KM, Wood P, Osmond C, Goulden P, Phillips DI. Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2006;91(5) :p 1868-1879.
12. Gilbert K, Gire R, Rousseau G. Probiotics and Gut-Brain Axis: promising area in well-being. Agro Food Ind Hi Tech. 2013;24(3) :p 1214-1222.
13. Patterson J, Burkholder K. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poultry science. 2003;82(4) :p 627-635.
14. Yan F, Polk D. Probiotics and immune health. Current opinion in gastroenterology. 2011;27(6) :p 496-502.
15. Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen JE, Stuer-Lauridsen B, Eskesen D. The Science behind the Probiotic Strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12®. Microorganisms. 2014;2(2) :p 92-110.
16. Holzapfel WH, Schillinger U. Introduction to pre-and probiotics. Food Research International. 2002;35(2) :p 109-120.
17. Birollo G, Reinheimer J, Vinderola C. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. Food Research International. 2000;33(9) :p 799-810.
18. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y, Shido O. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. The Journal of nutrition. 2006;136(4) :p 1043-1062.
19. Li Q, Zhao H, Zhang Z, Liu Z, Pei X, Wang J, Cai M, Li Y. Long-term administration of green tea catechins prevents age-related spatial learning and memory decline in C57BL/6 J mice by regulating hippocampal cyclic amp-response element binding protein signaling cascade. Neuroscience. 2009;159(4) :p 1208-1219.
20. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Hara Y, Shido O. Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by Aβ 1–40 in rats. The Journal of nutritional biochemistry. 2008;19(9) :p 619-632.
21. Marik PE, Zaloga GP. Adrenal insufficiency in the critically ill: a new look at an old problem. CHEST Journal. 2002;122(5) :p 1784-1799.
22. Barouei J, Moussavi M, Hodgson DM. Effect of maternal probiotic intervention on HPA axis, immunity and gut microbiota in a rat model of irritable bowel syndrome. 2012;3(4) :p 121-127.
23. Foster JA, Neufeld K-AM. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. Trends in neurosciences. 2013;36(5) :p 305-312.

Archive of SID

www.SID.ir

24. Gareau MG, Jury J, MacQueen G, Sherman PM, Perdue MH. Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. Gut. 2007;56(11) :p 1522-1535.
25. Roth B, Robbins D. Mindfulness-based stress reduction and health-related quality of life: Findings from a bilingual inner-city patient population. Psychosomatic medicine. 2004;66(1) :p 113-118.
26. Sohail M, Ijaz A, Yousaf M, Ashraf K, Zaneb H, Aleem M, Rehman H. Alleviation of cyclic heat stress in broilers by dietary supplementation of mannan-oligosaccharide and Lactobacillus-based probiotic: Dynamics of cortisol, thyroid hormones, cholesterol, C-reactive protein, and humoral immunity. Poultry science. 2010;89(9) :p 1934-1945.
27. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. The Lancet. 2003;361(9356) :p 512-519.
28. Verdu EF, Bercik P, Verma-Gandhu M, Huang X-X, Blennerhassett P, Jackson W, Mao Y, Wang L, Rochat F, Collins SM. Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. Gut. 2006;55(2) :p 182-202.
29. Bonaz BL, Bernstein CN. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2013;144(1) :p 36-48.
30. Diop L, Guillou S, Durand H. Probiotic food supplement reduces stress-induced gastrointestinal symptoms in volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. Nutrition Research. 2008;28(1) :p 1-12.

Archive of SID

www.SID.ir

Control of stress responses by *Lactobacillus rhamnosus* LX-108 in male wistar rats under restraint stress condition

Mojgan Khosrobeigi[1], **Parvaneh Jafari**[2], and Abbas Akhavan Sepahi[3]
1- Department of microbiology, Science and Research branch , Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Department of microbiology, Arak branch, Islamic Azad University, Arak, Iran,
p-jafari@iau-arak.ac.ir
3- Department of microbiology, NorthTehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Accepted:1394/03/29
Received:1393/12/24

Abstract

Stress and its role in amplifying symptoms of disease, is one of the most important problem of mankind in developed counties. By identification of the roles of microflora in brains function, it seems that probiotics could be used for control and ameliorating of brain responses such as stress. So in this study, the effect of *Lactobacillus rhamnosus* LX-108, in ACTH secretion level was investigated in male wistar rats under chronic restraint stress (CRS). In this research 24 male wistar rats weighing 180- 200 gr randomly divided in to 3 groups: Negative control, Positive control (received CRS), and trail group (orally gavaged with 1 ml of probiotic suspension and received CRS). Rat's weight was measured every week and animals were anesthetized with ether after three weeks, and blood samples were obtained directly from their hearts. ACTH concentrations of sera were measured by ELISA method with special kit. Indeed microflora profile was identified in fecal samples. Our results showed that administration of LX-108 can inhibit the induction of ACTH under CRS condition. Besides this probiotic resulted in increasing of intestinal Lactic acid bacteria and decreasing the Enterobacteriaceae level which induced in CRS condition. Fortunately administering of this probiotic inhibit weight loss induced in CRS condition. After clinical trials, *Lactobacillus rhamnosus* LX-108 and its probiotic products can be used for controlling of stress and its distracutive effects.

Key words: Stress, Probiotict, *Lactobacillus rhamnosus* LX-108, Microfloram, Adrenocorticotropin hormones

Archive of SID

www.SID.ir