

Effect of probiotic prophylaxis of *Lactobacillus fermentum* on neuronal density of hippocampus in CA3, CA2, and CA1 regions in rats with Alzheimer's disease

Elnaz Moghaddam, Maryam Tehranipour*, Mahbube Nakhaei Moghaddam

Department of biology ,Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

(Received: 2020/07/1

Accepted: 2020/08/25)

Abstract

Background: Decreased volume of the hippocampus causes disorders in memory and learning. One of the reasons for the change in the volume of the hippocampus is a change in the number of neurons. Probiotics are living microorganisms whose adequate consumption causes the health effects of the host to appear. Due to the various uses of probiotics and their beneficial effects on the body, they are expected to be able to improve these disorders in cases such as Alzheimer's disease, in which a person's memory and learning are impaired. So, the present study was conducted to investigate the effect of probiotic prophylaxis of *Lactobacillus fermentum* on neuronal density of hippocampus in CA3, CA2, and CA1 regions in rats with Alzheimer's disease.

Materials and Methods: In the current experimental study, 30 Wistar rats weighing 250-200 g were randomly divided into five groups (control, Alzheimer, 3 treatment groups). In order to induce Streptozotocin Alzheimer, 5 mg/kg doses of streptozotocin (volume of 5 microliters) was injected at each lateral ventricle of the brain. In the treatment groups, *Lactobacillus probiotic fermentum* was also injected by the dosage of 7-10, 6-10, and 8-10 ML/CFU simultaneous with STZ intraperitoneal injection in 21 days. In the current study, the shuttle box was used to investigate the behavior and to avoid passive learning. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to analyze the data resulted from analysis of variance with repetitive measures and to analyze the memory. Data were analyzed using minitab statistical software running Post hoc and ANOVA at a significance level of $P < 0.05$. The curves were drawn using Excel software.

Findings: A significant decrease was found in the neuronal density of the control group against Alzheimer's group (STZ) ($P < 0.001$), and the comparison between treatment groups (10-6, 10-7, 8-8) and Alzheimer's group (STZ) showed a significant increase ($P < 0.001$).

Conclusion: It seems that probiotics, with their antioxidant and anti-inflammatory effects, have prevented the development of neuronal lesions and implemented improvement mechanisms. Our study shows that probiotic *Lactobacillus fermentum* at dilution of 6-10 has a neurogenic effect and may be used to improve memory and learning.

Keywords: Neuronal density; Hippocampus; Probiotic; Alzheimer

* Corresponding author: Maryam Tehranipour

Email: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

بررسی اثر پیشگیری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس فرمنتوم *Lactobacillus fermentum* بر دانسیته نورونی هیپوکامپ در نواحی CA3, CA2, CA1 در رت های آرایمری

الناز مقدم، مریم طهرانی پور*، محبوبه نخعی مقدم

گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۴/۲۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۳/۱۱

چکیده:

سابقه و هدف: کاهش حجم هیپوکامپ اختلالاتی را در حافظه و یادگیری ایجاد می نماید، یکی از دلایل تغییر حجم هیپوکامپ تغییر در تعداد نورون های آن است. پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که مصرف کافی آن ها سبب غایبان شدن اثرات سلامت بخش در بدن میزبان می شود. با توجه به مصارف متعدد پروبیوتیک ها و اثرات مفید آن ها بر بدن انتظار می رود بتوانند در مواردی مانند بیماری آرایمر که حافظه و یادگیری فرد دچار اختلال می شود، این اختلالات را بهبود بخشند و هدف این تحقیق تعیین تاثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس فرمنتوم *Lactobacillus fermentum* بر دانسیته نورونی نواحی مختلف هیپوکامپ در رت های آرایمری است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ابتدا ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم انتخاب و رت های تهیه شده به طور تصادفی به ۵ گروه (کنترل، آرایمر، ۳ گروه تیمار) تقسیم شدند. جهت القای آرایمر استرپتوزوتوسین با دوز ۵ mg/kg با حجم ۵ میکرولیتر در هر بطن جانبی مغز به روش استریوتاکسی تزریق شد. در گروه های تیمار همزمان با تزریق STZ به مدت ۲۱ روز به صورت داخل صفاقی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس فرمنتوم با دوز 10^{-6} ، 10^{-7} ، 10^{-8} CFU/ML تزریق شد. بعد از گذشت یک ماه از اولین تزریق حیوانات بیهوش و مغز به آرامی از جمجمه خارج گردید. پس از مراحل پاساژ بافتی برش های سریال ۷ میکرونی با رنگ هماتوکسین و انوزین رنگ آمیزی شدند. سپس از مناطق مختلف هیپوکامپ عکسبرداری شد و توسط روش های استریولوژی و متد دایسکتور، دانسیته نورونی مناطق مختلف هیپوکامپ در گروه های مختلف ارزیابی و با گروه کنترل مقایسه شد. داده ها به کمک نرم افزار آماری minitab و آزمون post hoc و Anova آنالیز شدند و سطح معنی داری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد. منحنی ها به کمک نرم افزار Excel رسم شدند.

یافته ها: در دانسیته نورونی گروه های کنترل (سام) با گروه آرایمری (ZTS) کاهش معنی داری مشاهده می شود ($P < 0.001$)، همچنین مقایسه گروه های تیمار (10^{-6} و 10^{-7}) با گروه آرایمری (ZTS) نیز افزایش معنی داری را نشان می دهد ($P < 0.001$).

نتیجه گیری: به نظر می رسد که پروبیوتیک با داشتن اثرات آنتی اکسیدانی و اثرات ضد التهابی باعث جلوگیری از پیشرفت ضایعات نورونی شده و مکانیسم های بهبود را نیز راه اندازی کرده است. این مطالعه نشان می دهد که پروبیوتیک *Lactobacillus fermentum* در رت 10^{-6} دارای اثر نورون زایی است و احتمالاً از آن می توان برای بهبود حافظه و یادگیری استفاده نمود.

واژگان کلیدی: دانسیته نورونی، هیپوکامپ، پروبیوتیک، آرایمر.

۱۹۶۰ مطالعه های آلمن نورونزیس را در بالغان نشان داد (۱). فرآیند نورونزیس در دو ناحیه از مغز قدامی پستانداران بالغ شامل ناحیه ساب و نتریکولار و ژيروس دندانان ای هیپوکامپ در گونه های مختلف شامل جوندگان، پریماتها و انسان رخ می دهد (۲). در سال ۱۹۹۸، اریکسون و همکاران با کالبد شکافی بافت مغز انسان

مقدمه
در روند تکامل مغز گونه های مختلف، در برخی از نواحی مغز فرآیند ایجاد نورون تایید شده است. این فرآیند به نام نورونزیس شناخته می شود. نخستین بار در سال

نویسنده مسئول: دکتر مریم طهرانی پور

پست الکترونیک: maryam_tehrani pour@mshdiau.ac.ir

روش القا آلزایمر به شیوه جراحی:

حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی کتامین 80 mg/kg و زایلین 15 mg/kg بیهوش شدند. سپس سر حیوان در دستگاه استریوتاکس ثابت شد و ایجاد شکاف طولی در بخش خلفی سر، جمجمه نمایان گردید سپس کانول های مخصوص تزریق در داخل بطن های طرفی در موقعیت 0.8 عقب برگما، $\pm 1/5$ در طرفین شکاف ساجیتال، $2/5$ میلی متر پائین تر از سطح جمجمه قرار داده شدند (۱۸). بعد از جراحی استریوتاکس و کانول گذاری، همزمان تزریق داخل صفاقی گروه های تیمار به مدت یک ماه انجام شد (۲۱-۲۲-۲۳).

در این مطالعه حیوانات به طور تصادفی به ۵ گروه (کنترل، آلزایمر، ۳ گروه تیمار) تقسیم شدند. جهت القای آلزایمر استریوتوتومسین با دوز 5 mg/kg با حجم ۵ میکرولیتر در هر بطن جانبی مغز به روش استریوتاکسی تزریق می شود. در گروه های تیمار همزمان با تزریق STZ به مدت ۲۱ روز به صورت داخل صفاقی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس فرمنتوم با دوز 10^6 ، 10^7 و 10^8 CFU/ML تزریق می شود.

بعد از گذشت بیست و یک روز از اولین تزریق حیوانات با کتامین و زایلین به نسبت وزن بدن ۱۵ و ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش گردیدند. برای نفوذ بهتر فیکساتور به مغز قبل از تشریح به کمک متد پرفیوژن تا حدی بافت های بدن فیکس می شوند. پس از اتمام پرفیوژن مغز به آرامی از جمجمه خارج شده و در فرمالین نمکی ۱۰ درصد قرار داده می شود و پس از طی مراحل پاساژ باقی از مغز برشهای سائیتال سریال ۷ میکرونی تهیه شده و با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شد (۲۴). ناحیه هیپوکامپ و مناطق CA1، CA2، CA3 شناسایی شد.

از مناطق مختلف هیپوکامپ عکسبرداری شد. در حدود ۴۰۰ برش شمارش انجام شد و از دو برش متوالی عکس های جداگانه تهیه شد و با حفظ شماره و ترتیب برای مطالعات بعدی قرار داده شدند. بزرگنمایی میکروسکوپی $10 \times 4 \times 5 = 200$ بود. برای شمارش نورونی از روش نمونه برداری تصادفی استفاده شد و برای شمارش ذرات یعنی نورون ها از روش دایسکتور و متد استریولوژی استفاده می گردد. برای آنالیز داده های خام نیاز به متغیرهایی مانند $\sum Q$ ، میانگین،

Vdisector و ... است که این متغیرها چنین تعریف می شوند

$\sum Q$: مجموع نورون های شمارش شده در یک نمونه

$\sum \text{frame}$: مجموع دفعات نمونه برداری شده

Vdisector حجم چهارچوب نمونه برداری که برابر است با A

$\text{frame} \times H = \text{Vdisector}$

A مساحت چهارچوب نمونه برداری

H:فاصله بین دو برش یا ضخامت هر برش

حاصل تقسیم مجموع نورون های شمارش شده در یک نمونه بر مجموع دفعات نمونه برداری شده

برای بررسی داده ها با استفاده از برنامه های آماری مانند t-test نیاز به پارامتر دیگری به نام NV (Numerical density) یا دانسیته تعداد است. این پارامتر از فرمول زیر محاسبه می گردد.

$$NV = \sum Q / (\sum \text{frame} \times \text{Vdisector})$$

در این تحقیق چهارچوب نمونه برداری بر روی صفحه مانیتور $1/5 \times 1/15$ است که برای به دست آوردن اندازه واقعی این مساحت به میکرون (μ) بر روی نمونه از لام میکرومتری استفاده شد. داده ها به کمک نرم افزار آماری minitab و آزمون t-test و Anova آنالیز شدند و سطح معنی داری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد. متحنی ها به کمک نرم افزار Excel رسم شدند.

یافته ها

اندازه گیری دانسیته نورونی هیپوکامپ با استفاده از متد دایسکتور: نتایج حاصل از بررسی اثر پروبیوتیک Lactobacillus fermentum بر بیماری آلزایمر در هیپوکامپ، به صورت شمارش نورونی در جدول (۱-۱) ارائه گردیده است. در این ارزیابی به کمک تکنیک دایسکتور دانسیته نورونی نورون های هیپوکامپ محاسبه و در بین گروه های مختلف بررسی و مقایسه شد. اعداد موجود در جدول،

راه، مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که نورون های جدید در هیپوکامپ انسان ساخته شده است که مربوط به منطقه ای از مغز است که در یادگیری نقش دارد (۳-۴). هیپوکامپ بخشی از سیستم لیمبیک بوده که به علت ساختار نعل اسبی شکل آن به این نام نامیده شده است (۵). هیپوکامپ دارای بخشهای CA1، CA2، CA3 و سوپیکولوم و شکنج دندانیه ای است که ارتباطات متعدد اما به طور عمده غیرمستقیم با بیشتر بخش های قشر مغز و نیز با تشکیلات قاعده ای سیستم لیمبیک یعنی آمیگدال، هیپوتالاموس، سیتوم و اجسام پستانی دارد (۶-۷). کاهش حجم هیپوکامپ اختلالاتی را در حافظه و یادگیری ایجاد می نماید، یکی از دلایل تغییر حجم هیپوکامپ تغییر در تعداد نورون های آن است (۸). همچنین هیپوکامپ در کدگذاری توالی های مکانی، وقایع حافظه ضمنی و ارتباط بین آنها نقش بسزایی دارد تقریباً تمام اطلاعات حسی به وسیله ی نورون های هیپوکامپ برنامه ریزی می شوند (۹).

بیماری آلزایمر یک بیماری شایع نورونراتیو پیش رونده است که منجر به زوال عقل و تباهی سلول های مغزی به خصوص در نواحی مرتبط با یادگیری و حافظه مانند هیپوکامپ می شود (۱۰). مکانیسم های پیچیده ای در فرآیند یادگیری و حافظه نقش دارند که در نهایت منجر به تغییرات بیوشیمیایی ریخت شناسی و فیزیولوژیک در سطح سیناپسی و شبکه های عصبی می گردد. امروزه استفاده از مواد طبیعی مانند عصاره گیاهی و یا پروبیوتیک ها جهت بهبود بخشیدن به این اختلالات شایع است. پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که مصرف کافی آن ها سبب نمایان شدن اثرات سلامت بخش در بدن میزبان می شود (۱۱-۱۲).

فلور روده انسان حاوی انواع مختلفی از باکتری ها است. معمول ترین میکروارگانیسم های پروبیوتیک به سه گروه باکتری، قارچ و مخمرها تقسیم می شوند. بعضی از این میکروارگانیسم ها سویه های انتخابی باکتری های Lactobacillus هستند، اکثر باکتری های Lactobacillus بی خطر تشخیص داده شده اند (۱۳-۱۴). باکتری های پروبیوتیک دارای اثرات ضد موتازنسیته و ضد سرطان زا هستند، و دارای توانایی تحریک سیستم ایمنی بدون ایجاد التهاب می باشند. همچنین پروبیوتیک ها می توانند به عنوان درمان کمکی در بیماری های گوارشی استفاده شوند (۱۷-۱۶-۱۵).

با توجه به مصارف متعدد پروبیوتیک ها و اثرات مفید آن ها بر بدن انتظار می رود بتوانند در مواردی مانند بیماری آلزایمر که حافظه و یادگیری فرد دچار اختلال می شود، این اختلالات را بهبود بخشند و بر این اساس این تحقیق پایه ریزی شد. هدف از این تحقیق بررسی اثر محافظتی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس فرمنتوم Lactobacillus fermentum بر دانسیته نورونی هیپوکامپ در نواحی CA1، CA2، CA3 در رت های آلزایمری می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی ۳۰ راس موش نر نژاد ویستار سه ماهه با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم از سرم سازی رازی مشهد تهیه و به اتاق حیوانات دانشکده علوم دانشگاه آزاد واحد مشهد منتقل شدند. حیوانات در اتاقی با دمای 22 ± 2 با سیکل ۱۲ ساعته تاریکی و روشنایی و آب و غذای آزادانه نگهداری شدند. همه آزمایشات رفتاری بین ساعت ۸ صبح تا ۴ عصر انجام شد. همه آزمایشات بر طبق دستورالعمل های کمیته اخلاقی برای استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

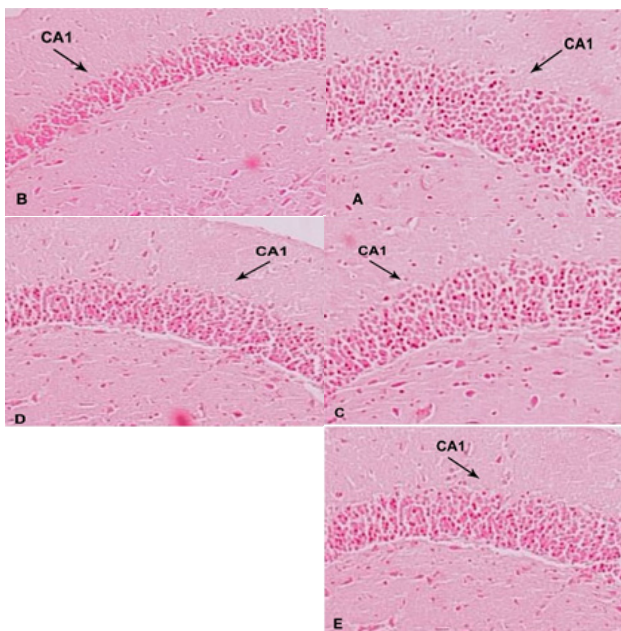
آماده سازی سوسپانسیون لاکتوباسیلوس فرمنتوم:

ابتدا باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم در محیط کشت MRS برات به مدت ۱۶-۲۴ ساعت در دمای 37°C و در شرایط میکروانروفیل (در حضور 0.05 گاز CO_2) و در آنکوباتور شیکر دار کشت داده شد. پس از مدت زمان لازم کدورت یکنواخت در سطح محیط کشت ظاهر شد و 5 mL از محیط کشت حاوی باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم با دوز ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل سه مرتبه با بافر PBS (بافر نمکی) شستشو داده که در نهایت به صورت سوسپانسیون در آمد (۲۰-۱۹-۱۸).

جدول ۱- میزان تراکم نورونی در مناطق مختلف هیپوکامپ گروه های مطالعه

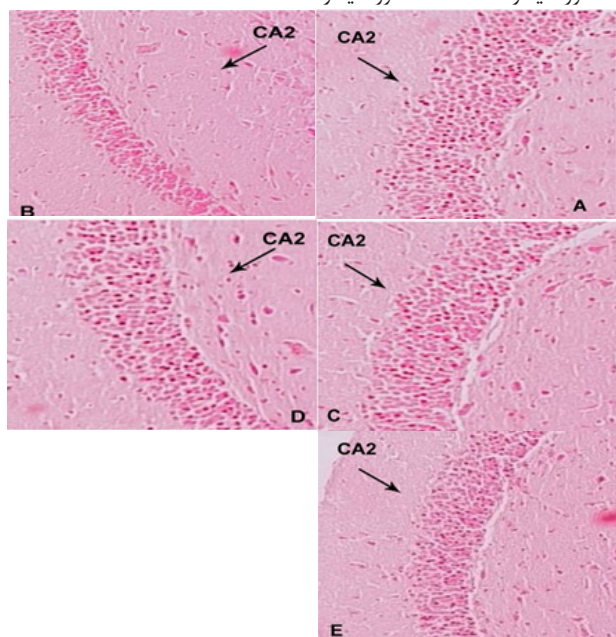
گروه ها	کنترل	آلزایمر	STZ+۱۰ ^۶	STZ+۱۰ ^۷	STZ+۱۰ ^۸
CA1	۱۴۶۵۰ ± ۴۳۳	۱۳۴۴۷ ± ۵۶۱	۱۵۵۵/۸ ± ۵/۱۴	۱۴۹۸/۸ ± ۲۳/۰	۱۵۳۴/۸ ± ۱۷۰
CA2	۱۵۳۳/۸ ± ۱۲/۹	۱۳۵۱/۸ ± ۵/۹۰	۱۵۰۰/۰ ± ۱۲/۱	۱۵۰۴/۰ ± ۱۵/۱	۱۴۸۸/۷ ± ۱۴/۷
CA3	۱۴۸۳/۰ ± ۱۳/۰	۱۳۴۹/۳ ± ۱۲/۰	۱۵۰۶/۳ ± ۱۹/۵	۱۵۲۳/۲ ± ۱۳/۵	۱۵۰۰/۲ ± ۱۳/۶

در شکل های شماره ۱ و ۲ در عکس های مربوط به گروه های تیمار در نواحی مختلف مشخص شد که تاثیر پروبیوتیک در بهبود وضعیت هیستومورفولوژیک بافت هیپوکامپ در مقایسه با گروه کنترل چشمگیر است افزایش و ترمیم نورون ها و وقوع پدیده نورونز قابل مشاهده است می تواند گواهی بر اثر ترمیمی این پروبیوتیک و نقش مثبت آن در بهبود بیماری آلزایمر در نورون های هیپوکامپ باشد.



شکل ۱- نمایش سطح مقطع ناحیه CA1 در گروه های مختلف

A: گروه کنترل
B: گروه آلزایمر
C: گروه تیمار ۱۰^۶
D: گروه تیمار ۱۰^۷
E: گروه تیمار ۱۰^۸



شکل ۲- نمایش سطح مقطع ناحیه CA2 در گروه های مختلف

A: گروه کنترل
B: گروه آلزایمر
C: گروه تیمار ۱۰^۶
D: گروه تیمار ۱۰^۷
E: گروه تیمار ۱۰^۸

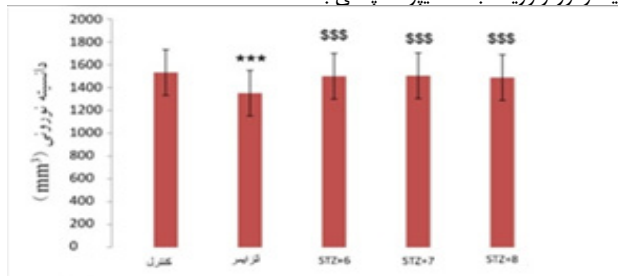
میانگین و انحراف معیار، مقادیر دانسیته نورونی یا فاکتور (Numerical Density) (ND) را در هیپوکامپ نیمه راست (R) و نیمه چپ (L) گروه های مختلف نشان می دهد.

نتایج نشان می دهد بین دانسیته نورونی گروه کنترل (سالم) با گروه آلزایمری (STZ) کاهش معنی داری مشاهده می شود (P<۰/۰۰۱)، همچنین مقایسه گروه های تیمار (۱۰^{-۶}، ۱۰^{-۷} و ۱۰^{-۸}) با گروه آلزایمری (STZ) نیز افزایش معنی داری را نشان می دهد (P<۰/۰۰۱).

نتایج نشان می دهد که دانسیته نورونی در ناحیه CA2 در گروه های تیمار (۱۰^{-۶} و ۱۰^{-۷}) در مقایسه با گروه آلزایمری (STZ) نیز افزایش معنی داری را نشان می دهد (P<۰/۰۰۱).

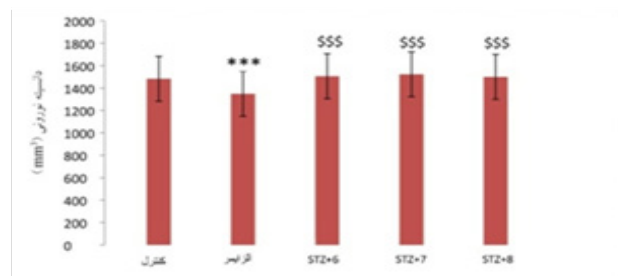
در نمودار ۲ مشخص شد که در ناحیه CA3 نیز دانسیته نورونی در گروه های تیمار (۱۰^{-۶} و ۱۰^{-۷} و ۱۰^{-۸}) نسبت به گروه آلزایمری (STZ) نیز افزایش معنی داری را نشان می دهد (P<۰/۰۰۱).

در شکل های شماره ۱ و ۲ در عکس های مربوط به گروه آلزایمری در نواحی مختلف مشخص شد که هیستومورفولوژیک بافت هیپوکامپ در گروه کنترل نرمال می باشد در گروه آلزایمری کاهش سایز، فشردگی و جمع شدن هر یک از نورونها در اثر ابتلا به آلزایمر در شکل مشهود است همچنین پراکندگی نورونها نسبت به یکدیگر و برهم ریختن شرایط طبیعی بافت پس از القای بیماری آلزایمر در شکل به وضوح قابل ملاحظه می باشد این شرایط نشانگر تاثیر منفی این بیماری بر وضعیت هیستومورفولوژیک بافت هیپوکامپ می باشد



نمودار ۱- میزان دانسیته نورونی ناحیه CA2 هیپوکامپ در گروه های مختلف *** اختلاف معنادار را نشان می دهد (P>۰/۰۰۱). (مقایسه گروه کنترل با گروه آلزایمری است)

\$\$\$ اختلاف معنا دار را نشان می دهد (P>۰/۰۰۱). (مقایسه گروه های تیمار با گروه آلزایمری است)



نمودار ۲- میزان دانسیته نورونی ناحیه CA3 هیپوکامپ در گروه های مختلف *** اختلاف معنادار را نشان می دهد (P>۰/۰۰۱). (مقایسه گروه کنترل با گروه آلزایمری است)

\$\$\$ اختلاف معنا دار را نشان می دهد (P>۰/۰۰۱). (مقایسه گروه های تیمار با گروه آلزایمری است)

کرد. این مطالعات نشان داد روند نورون زایی محدود به زمان خاصی نبوده و از قبل از تولد، آغاز رشد و در زمان بلوغ رشد و در زمان بلوغ همچنان می تواند ادامه پیدا کند. نورونز، توانایی بخش های از مغز بالغ به منظور حفظ قابلیت ارتقای رشد و تولید نورون ها می باشد (۲۸).

در طول قرن بیستم، دانشمندان مغز و اعصاب توافق داشتند که ساختار مغز پس از یک دوره بحرانی مربوط به رشد در دوران کودکی، نسبتاً تغییر ناپذیر است. امروزه این باور توسط یافته هایی که نشان می دهد بسیاری از جنبه های مغز حتی در دوران بزرگسالی هم انعطاف پذیر باقی می ماند، به چالش کشیده شده است. بر اساس تحقیقات اخیر روند نورونز به طور محدود در بعضی از نواحی مغز به اثبات رسیده است از جمله نواحی که وقوع نورونز در آن ثابت شده هیپوکامپ است که در آن سلول های اجدادی عصبی موجود در ناحیه ساب و نتریکولار تمایز یافته، مهاجرت نموده و ارتباطات جدید ایجاد می نمایند (۲۹).

نورونز امید برای افراد مبتلا به اختلالات از جمله پارکینسون، هانتینگتون و آلزایمر می باشد. یکی از اهداف اصلی محققان کشف داروهایی است برای تحریک مناطقی از مغز که به وسیله جایگزینی سلول ها ترمیم خود به خودی را انجام می دهند. تعدادی از مطالعات در این زمینه نشان دادند که آکسون های مغز توانایی رشد مجدد را بعد از درجانی از صدمات دارند (۳۰).

برای اینکه سلول های جدید مغزی توسعه پیدا کنند سلول های بنیادی عصبی چند ظرفیتی در مغز تقسیم شده و به نورون ها یا سلول های گلیال جدید تبدیل می شوند. برای بالغ شدن این سلول ها از سلول های چند ظرفیتی جدا می شوند و این نورون ها با نورون های فعال ارتباط برقرار می کنند و بیش از یک ماه طول می کشد تا نورون های جدید قادر به ارسال و دریافت پیام های جدید شوند، که این نشان می دهد نورونز یک فرآیند کاملاً کنترل شده است. نورونز توسط فاکتور های رشد کنترل می شود که این فاکتورها می توانند تکامل سلول های جدید را رهبری کنند. فاکتور های رشد دیگری از جمله فاکتور نوروتروفیک نیز سلول را زنده نگه می دارند (۳۱).

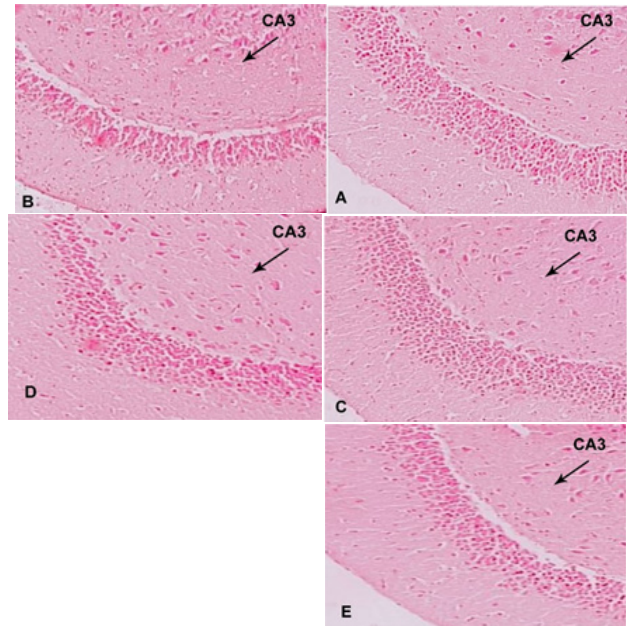
گونه های اکسیژن فعال می توانند در مغز با اسیدهای چرب اشباع نشده واکنش داده و پراکسیداسیون لیپید ها را افزایش دهند. آنتی اکسیدان ها سبب کاهش در پراکسیداسیون لیپید ها شده و از این طریق سبب کاهش اثرات مخرب رادیکال های آزاد در کاهش پلاستیسیته سیناپسی و تقویت طولانی مدت هیپوکامپ می شوند (۳۲).

سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در حالت طبیعی در تعادل با سرعت تولید رادیکال ها فعال می باشد و این امر در حفظ هموستاز بدن مهم است و در انجام فعالیت های فیزیولوژیک مثل التیام زخم ها، دفاع در مقابل میکروارگانیسم ها و غیره نقش دارد. در طی تکامل، ارگانیسم ها خود را با یک سیستم آنتی اکسیدانی تجهیز کرده اند، اگر تولید رادیکال های اکسیژن به هر دلیلی بیشتر شود یا ظرفیت آنتی اکسیدانی کاهش یابد نتیجه آن به صورت استرس اکسیداتیو که در واقع به هم خوردن تعادل بین این دو عامل است بروز می کند (۳۳).

فلاونوئید اثرات نوروپروتکتیو داشته و موجب حفاظت از نورون ها در برابر آسیب ناشی از نوروتوکسین ها و عوامل التهابی زای سیستم عصبی شده همچنین دارای توانایی بالقوه در بهبود حافظه و یادگیری و عملکرد های شناختی و نورونز در هیپوکامپ و مهار آپوپتوزیس ناشی از گونه های نوروتوکسیک می شوند. (۳۴). در بیماران مبتلا به آلزایمر مناطق خاصی از مغز دچار التهاب شده و تجویز داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی باعث ممانعت از پیشرفت کاهش حافظه در بیماران مبتلا به آلزایمر می گردد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که اثر پروبیوتیک در بهبود حافظه ناشی از اثر ضد التهابی آن است (۲۵).

داوری و همکاران در سال ۱۳۹۱ بیان کردند مکمل های پروبیوتیک، باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی می شوند. و باعث بهبود روند یادگیری و حافظه فضایی موش صحرایی دیابتی می شود (۳۵).

طی مطالعه ای که توسط آگاهی و همکاران بر روی مصرف پروبیوتیک انجام



شکل ۳- نمایش سطح مقطع ناحیه CA3 در گروه های مختلف

A: گروه کنترل
B: گروه آلزایمر
C: گروه تیمار ۱۰^۶
D: گروه تیمار ۱۰^۷
E: گروه تیمار ۱۰^۸

بحث

برای دانسیته نورونی نتایج نشان می دهد که در گروه آلزایمر (STZ) در تمام نواحی کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در حالی که در گروه های تیمار دانسیته نورونی در نواحی مختلف افزایش معنی داری نسبت به گروه آلزایمر نشان داد.

نتایج بافتی نشان داد که در گروه آلزایمر (STZ) کاهش چگالی نورونی، کاهش قطر نواحی هیپوکامپ، مشاهده عدم انسجام سلولی و فضای خالی دیده می شود و در گروه های تیمار (۱۰^۶-۷، ۱۰^۷-۸ و ۱۰^۸-۸) این تغییرات تقریباً بهبود یافته و بافت به شکل بافت نرمال نزدیک شده است.

نتایج نمودار ها نشان می دهد بین دانسیته نورونی گروه کنترل (سالم) با گروه آلزایمر (STZ) کاهش معنی داری مشاهده می شود، همچنین مقایسه گروه های تیمار (۱۰^۶-۷، ۱۰^۷-۸ و ۱۰^۸-۸) با گروه آلزایمر (STZ) نیز افزایش معنی داری را نشان می دهد.

پروبیوتیک در مسیر بهبود حافظه مکانیسم های مرتبط با پروتئین کیناز را فعال می کند. پروتئین کیناز A با تاثیر مستقیم بر وزیکول ها و پایانه های عصبی و همچنین وارد شدن به هسته سلولی و فعال کردن مسیر سیگنالینگ CREB و آغاز آبخاری بیان ژن های دیگر در تشکیل حافظه بلند مدت، باعث تولید پروتئین هایی می گردد که سبب افزایش میزان نوروترانسمیترهای آزاد شده در سیناپس ها گشته و ارتباطات سیناپسی را افزایش می دهد. پروبیوتیک باعث افزایش چشم گیر قابلیت های یادگیری به ویژه تقویت و نگهداری حافظه می شود و می تواند دارای تاثیر مثبت بر روند تکامل مغز و شکل گیری مناسب درخت های دندریتی، آکسون ها و برقراری ارتباطات صحیح بین آنها باشد (۲۶).

بر اساس تحقیقات جدید می تواند در معالجه بیماری آلزایمر موثر باشد، اثر پروبیوتیک در مناطق حساس یادگیری به خصوص هیپوکامپ را تحت تاثیر قرار می دهد و به واسطه تغییراتی در قابلیت هدایت سیناپسی و تشکیل شبکه های سیناپسی جدید و افزایش توان سیناپسی با تاثیر بر هیپوکامپ، موجب افزایش انتقال پیام ها و تقویت حافظه می گردد (۲۷).

در روند تکامل مغز در گونه های مختلف، وجود فرآیند نورون زایی در برخی از نواحی مغزی به اثبات رسیده است. این فرآیند به نام نورونز شناخته می شود. نخستین بار در سال ۱۹۶۰ مطالعات آلمن، وقوع نورونز را در بالغین ثابت

نتیجه‌گیری

بیه نظر میرسد که دانسیته نورونی در مناطق مختلف هیپوکامپ در گروه های تیمار نسبت به گروه آلیزیمری افزایش معنی داری داشته است، افزایش دانسیته نورونی در تیمار ۷-۱۰-۸ و ۱۰-۸ بیانگر روند ترمیم و بهبودی در این گروه هاست و به معنای اثر مثبت پروبیوتیک ها در جهت ترمیم نورون های آسیب دیده در آلیزیمر است احتمالاً پروبیوتیک با داشتن اثرات آنتی اکسیدانی (۲۷) و اثرات ضد التهابی (۲۵) باعث جلوگیری پیشرفت ضایعات نورونی شده و مکانیسم های بهبود را نیز راه اندازی کرده است. در گروه های تیمار شده، پروبیوتیک ۶-۱۰ دانسیته نورونی نسبت به گروه کنترل نیز افزایش یافته است این داده نشان می دهد در تعداد نورون ها در هیپوکامپ این نمونه ها بیشتر از نمونه های کنترل شده است این نتیجه بیانگر پدیده نوروژنز است، بنابراین می توان نتیجه گرفت که پروبیوتیک *Lactobacillus fermentum* در رقت ۶-۱۰ دارای اثر نورون زایی است و احتمالاً می تواند در بهبود و روند درمان بیماری آلیزیمر، موثر باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد بود. بدین وسیله از همه همکاران گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مدیریت گروه و ریاست محترم دانشکده علوم، بخاطر همکاری های بی دریغشان تشکر و قدردانی می‌شود.

شده است نشان داده شد، دارای اثرات مثبت بر عملکرد شناختی در درجات خفیف بیماری آلیزیمر بوده است (۲۷).

در نتایج حاصل از مطالعات بنیادی و همکاران، نشان داده شده است که مصرف پروبیوتیک ها سبب کاهش خطر ابتلا به سرطان، تقویت سیستم ایمنی و مبارزه با عوامل سرطان زا می گردد (۳۶).

در نتایج حاصل از مطالعات بنیادی و همکاران نشان داده شده است که جداسازی و تکثیر پروبیوتیک های *Lactobacillus* با کاربرد فراوان در تولید با اهداف درمانی می باشد (۳۷).

وجدانی در سال ۱۳۸۲ درباره پروبیوتیک ها و مکانیسم اثر آن ها در پیشگیری و درمان بیماری های انسان تحقیق کرد و فواید بالقوه استفاده از پروبیوتیک ها در درمان بیماری های مختلف می توان به برخی موارد اشاره کرد: هزینه به نسبت کم، این واقعیت که پروبیوتیک ها میزان بروز مقاومت آنتی بیوتیکی را افزایش نمی دهند، ایمنی آن ها و مکانیسم های متعددی که پروبیوتیک ها از طریق آن پاتوژن ها را مهار کرده و شانس مقاومت در برابر پروبیوتیک ها را کاهش می دهد (۳۸).

سلطان دلان و همکاران در سال ۱۳۹۱ درباره بررسی اثر پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus casei* بر رفتار سولول های توموری کولورکتال مطالعه کردند و در تحقیق آن ها اثبات شد که استفاده از پروبیوتیک *Lactobacillus* باعث کاهش تکثیر سلول های توموری کولورکتال در مراحل اولیه سرطانی می‌شود (۳۹).

نصیری اصل در سال ۱۳۹۴ درباره اثرات پروبیوتیک ترکیبی *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus helveticus* ۰۰۵۲ بر فرآیندهای التهاب، آپوپتوز و حافظه در رت های القا شده با لیپولی ساکارید مطالعه کرد و در تحقیق وی اثبات شد که ایجاد تغییرات هدفمند در ترکیب باکتری های گوارشی با مصرف پروبیوتیک ها از طریق تاثیر بر مکانیسم های مولکولی در فرآیندهای التهاب، آپوپتوز و حافظه مغزی بتواند منجر به شناسایی رژیم های غذایی و کشف اهداف درمانی جدید و موثر در پیشگیری و یا بهبود علائمی مشابه با علائم آلیزیمر گردد (۴۰).

منابع:

- Scholey A., Tildesley N.T.J., Ballard C., Wesnes K., Tasker A., Perry E.K., Kennedy D.O. An extract of *Salvia* (sage) with anticholinesterase properties improves memory and attention in healthy older volunteers. *Psychopharmacology*. 2008;198:127-139. doi: 10.1007/s00213-008-1101-3.
- Ahmed S.M. Saleh, Qing Zhang, Jing Chen, Qun Shen. Millet Grains: Nutritional Quality, Processing, and Potential Health Benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013. 281-295
- Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical physiology*. 3 rd. Philadelphia: Saunders 2006, 643- 645.
- Turner P.V., Brabb T., Pekow C., Vasbinder M.A. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2011;50:600-613.
- Colombo D., Serino S., Tuena C., Pedroli E., Dakanalis A., Ciproso P., Riva G. Egocentric and allocentric spatial reference frames in aging: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2017;80:605-621. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.07.012.
- Jackson C, McCabe B, Nicol A, Brown M, Horn G. Dynamic of memory trace: effects of sleep on consolidation. *J Curr Biol* 2008, 18(6): 393-400.
- Barinaga M. *Neurobiology. How cannabinoids work in the brain.* Science 2001, 291(5513): 2530 2531.

8. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical physiology*. 3rd. Philadelphia: Saunders 2006, 5-643.

9. Kesner RP, Hunsaker MR, Ziegler W. The role of the dorsal CA1 and ventral CA1 in memory for the temporal order of a sequence of odors. *Neurobiology of Learning and Memory* 2010, 6: 93-111.

10. Rai S, Kamat PK, Nath C, Shukla R. A Study on Neuroinflammation and Nmda Receptor Function in Stz (Icv) Induced Memory Impaired Rats. *J Neuroimmunol*. 2013, 254(1-2): 1-9.

11. Sanges M, Valente G, Rea M, Della Gatta R, De Franchis G, Sollazzo R, et al. Probiotics in spondyloarthritis associated with ulcerative colitis: a pilot study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2009, 13(3): 233-4.

12. Wildt S, Nordgaard I, Hansen U, Brockmann E, Rumessen JJ. A randomised double-blind placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 for maintenance of remission in ulcerative colitis. *J Crohns Colitis*, 2011, 5(2):115-21.

13. Kim JY, Kwon JH, Ahn SH, Lee SI, Han YS, Choi YO, et al. Effect of probiotic mix (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*) in the primary prevention of eczema: a double-blind, randomized, placebocontrolled trial. *Pediatr Allergy Immunol*; 21(2 Pt 2): e386-93.

14. Garthe A., Kempermann G. An old test for new neurons: Refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis. *Front. Mol. Neurosci.*

- 2013;7:63. doi: 10.3389/fnins.2013.00063.
15. Burns AJ, Rowland IR. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2000, 1(1): 13-24.
 16. Irianto A, Austin B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 2002, 25(6): 333-42.
 17. Di Domenico F, Barone E, Perluigi M, Butterfield DA. Strategy to reduce free radical species in Alzheimer disease: an update of selected antioxidants. *Expert Rev Neurother*. 2015, 15(1): 19-40.
 18. Gül H, Özcelik S, Sagdic O and Certel M. Sourdough bread production with lactobacilli and *S.cerevisiae* isolated from sourdoughs. 2005. *Process Biochemistry*, 40: 691-697.
 19. Nandhini L, Rajasekar T, Sakthivel M, Deivasigamani B. Isolation of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria From Different Soil Samples. *Asian J Biochemical Pharma Res*; 2011, 4(1): 280-290.
 20. Rashid S, Hassanshahian M. Screening, Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from a Traditional Dairy Product of Sabzevar, Iran. *Int J Enteric Pathog*; 2014, 2(4): 1-5. [In Persian]
 21. Ahmed T, Enam SA, Gilani AH. Curcuminoids enhance memory in an amyloid-infused rat model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2010, 169: 1296-1306.
 22. Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Yousuf S, Ahmad M, Ansari MA, et al. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behavioural Brain Research*. 2006, 171(1): 9-16.
 23. Zhang J, Ke K-F, Liu Z, Qiu Y-H, Peng Y-P, Th17 cell-mediated neuroinflammation is involved in neurodegeneration of A β 1-42-induced Alzheimer's disease model rats. *PLoS One* 8, 2013, 757-786.
 24. Zarghami M, Farzin D, Bagheri K. Evaluation of the antidepressant effects of Rosa Damasca L. essential oil in mice. *Mazandaran Medical J*, 2001, 33: 28-33.
 25. Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. 2000, 83(3): F186-F192.
 26. Flavell SW, Greenberg ME. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. 2008. *Neuroscience*. 31:563-90.
 27. Agahi. A, Hamidi. Q, Salami. M, Naqipour, Daneshvar Kakha-ki. R, Soheili. M, The effect of probiotic supplements on cognitive function in patients with primary and secondary Alzheimer's disease, *scientific-research journal of Arak University*, 2017, 29 (12):2-3.
 28. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135: 1127-1128 10.1126/science. 1962.135.3509.1127
 29. Thakurela S. Kumar Suhu S. Garding A. Vijay K. Dynamics and function of distal regulatory elements during neurogenesis and neuroplasticity. *GENOME RESEARCH*. 2015. Dio: 10-1101/gr190926.115.
 30. Kempermann G, Kuhn H.G, Gage F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. 1997. *Nature*. 386: 493-495.
 31. Gage F. Brain repair yourself. *Scientific American*. 2003, 289(3): 87-95.
 32. Serrano F, Klann E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev*. 2004, 3: 43-431.
 33. Boadi WY, Lyere P, Adunyah SE. In vitro exposure to quercetin and genistein alters lipid peroxides and prevents the loss of glutathione in human progenitor mononuclear (U937) cells. *J Appl Toxicol*. 2005, 25(1): 82-88.
 34. Kalt W, Blumberg JB, McDonald JE, Vinqvist-Tymchuk MR, Fillmore SA, Graf BA, O'Leary JM, Milbury PE. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J Agric Food Chem*. 2008, 56(3): 705-12.
 35. Davari S, Talayi A, Soltani M, Alayi H, Salami M. the effect of co-prescribing different lactobacillus probiotics and Bifidobacterium lactase on memory learning and oxidative stress factors in diabetic rats. *Medical school* 2012, 9(7): 532-536.
 36. Bonyadi. F, Tokmechi. A, Moheb Alian. H, A Review of Probiotics and Their Role in Preventing Cancer, *Mazandaran School of Medical Sciences*. 2014, 24 (112): 128-129.
 37. Bonyadi.M, Ostad Rahimi. M, Nahayi. M. Dibavar. M, Mirzayi. F, Frequency of Lactobacillus strains in the food of Eastern Azarbaijan cities, *Laboratory Sciences*, 2011, 4(2): 38-39, 2011.
 38. Vejdani. R, Zaali, Probiotics and their impact mechanism in the prevention and treatment of human diseases, *Research journal of medical school*, 2003, 27 (4): 320-322.
 39. Soltan Delan. M, Salehipour. Z, Atapour Mashhadi. H, Raoufian. R, Rajabi. Z, The effects of probiotic Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus caesium on the behavior of colorectal tumor cells, 70 (4): 220-222.
 40. Nasiriasl M. Naserpour T. Effects of Probiotic (combination of Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) on inflammation, apoptosis and memory processes in LPS- induced rats. 2015.