



تابستان ۱۴۰۰

شهر: مشهد

دبیرستان استعداد های درخشان دوره دوم شهید هاشمی نژاد ۱  
ناحیه ۴

راهنمایان: محمد وحیدی اربابی و عرفان نجف زاده

## رابطه میکروبیوتا روده با حافظه و اضطراب : تأثیرات آنتی بیوتیک و پروبیوتیک

پژوهشگران: سینا صادقی، ارشیا احمد زاده خرازی، علیرضا آل حیدر، محمد حقی، محمد مهدی مروی

الله ارحم

# رابطه میکروبیوتا روده با حافظه و اضطراب : تأثیرات آنتی بیوتیک و پروبیوتیک

تقدیم به

پدران و مادران عزیز و مهربانمان

## چکیده

هدف پژوهش کشف ارتباط بین میکروبیوتا روده و حافظه فضایی بلند مدت و اضطراب بوده است. در کارآزمایی ۲۰ موش از نژاد Balb/c به چهار گروه: ۱.کنترل ۲.آنتی بیوتیک ۳.پروبیوتیک با دوز پایین ۴.پروبیوتیک با دوز بالا، تقسیم شدند. ابتدا تمامی گروه‌ها به جز گروه کنترل، با مخلوط آنتی بیوتیک مورد گوازه دهانی قرار گرفتند. در انتهای دوره آنتی بیوتیک، با تست های رفتاری، حافظه و اضطراب مورد سنجش قرار گرفتند؛ سپس گروه های پروبیوتیک، مخلوط پروبیوتیک با دوز معین را دریافت کردند. با پایان دوره پروبیوتیک حافظه و اضطراب این گروه‌ها نیز مورد سنجش قرار گرفتند. در نهایت، نتایج برآمده از تست ها، حاکی از افزایش معنادار اضطراب در گروه های پروبیوتیک بود، همچنین تفاوت معناداری در حافظه فضایی چهار گروه مذکور مشاهده نشد.

## واژگان کلیدی فارسی

میکروبیوتا روده، محور HPA، حافظه فضایی، اضطراب، عصب واگوس، آنتی بیوتیک، پروبیوتیک، ماز آبی موریس، ماز پلاس معلق

## واژگان کلیدی انگلیسی

gut microbiota, HPA axis, spatial memory, anxiety, vagus nerve, antibiotic, probiotic, Morris Water Maze(MWM), Elevated Plus Maze

# فهرست مطالب

۱	مقدمه
۲	بیان مساله
۲	پیشینه تحقیق
۱۳	اهداف
۱۳	فرضیه ها
۱۳	روش کار
۲۰	نتایج
۲۲	تحلیل نتایج
۲۴	فرضیه هایی جدید بر اساس نتایج
۲۴	اهمیّت و کاربرد پژوهش
۲۵	راهکار های نوین: شبیه سازی میکروبیوتا روده
۳۱	سپاس و تشکر
۳۲	منابع
۳۷	پیوست ها و تاییدیه ها

## مقدمه

میکروبیوتا مجموعه‌ای از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، آرکی‌ها و ویروس‌ها است. این میکرووارگانیسم‌ها در ارگان‌های مختلف بدن که با محیط خارج در ارتباط هستند از جمله سطوح و لایه‌های عمقی پوست، دهان، ریه و به خصوص در روده انسان زندگی می‌کنند. تعداد آن‌ها به ده تریلیون می‌رسد. این جمعیت میکروبی که بخش مهمی از آن از نسلی به نسل دیگر منتقل می‌شود در حفظ سلامتی انسان نقش کلیدی دارد. بهم خوردن تعادل آن‌ها با ایجاد بیماری‌های مختلفی مانند دیابت، چاقی، انواع آلرژی‌ها و انواع سرطان‌ها مرتبط است. همچنین مطالعات نشان می‌دهد که باکتری‌های همزیست انسان با تاثیر بر توسعه و عملکرد مغز انسان بر رفتارهای مختلف اجتماعی، عاطفی، عصبی و اضطراب در انسان تاثیرگذار هستند. پروژه‌های مختلف میکروبیوم انسانی که در حال انجام هستند نشان می‌دهند که میکروبیوتا در تکامل سیستم ایمنی، مقابله با میکروب‌های پاتوژن، متابولیسم پایه بدن، هضم سوبستراهای غیرقابل استفاده، تولید ویتامین‌ها، تنظیم ترشح هورمون‌ها و به طور کلی در حفظ بقاء انسان نقش مهمی دارند. نظر براینکه میکروبیوم هر انسانی در هر منطقه و کشوری متفاوت و منحصر به فرد است و تأثیر مستقیمی بر روند بیماری‌ها و نوع درمان آن‌ها دارد، مطالعه بر میکروبیوم افراد کشور و سرمایه گذاری در این حوزه، اهمیت بهسزایی دارد. [پژوهشکده ایمونولوژی و بیماری‌های عفونی] طبق تحقیقات اخیر روابطی میان میکروبیوتا روده جانوران با سیستم عصبی مرکزی (CNS) آن‌ها یافت شده است که می‌توان به ارتباط آن با محور HPA (هیپوپotalamus-هیپوفیز-آدرنال) اشاره کرد. یکی از شیوه‌های این ارتباط، ترشح ترکیبات فعال نورونی مانند متابولیت‌ها و نوروترنسمیتر‌ها توسط باکتری‌ها می‌باشد. [۱] بنابراین تشخیص عوامل بر هم زننده تعادل میکروبیوتا روده و پیشگیری از آن‌ها اهمیت به سزایی دارد. در این پژوهش، تلاش شده است با ایجاد تغییراتی در جمعیت باکتری‌های میکروبیوتا روده تعدادی موش، به تأثیرات احتمالی این تغییرات بر روی حافظه فضایی و اضطراب پی‌برده شود. برای ایجاد تغییرات بر روی میکروبیوتا روده موش‌ها، ابتدا یک دوره مصرفی از مخلوط چهار آنتی‌بیوتیک درنظر گرفته شد. پس از گذراندن این دوره، دوره مصرفی جدیدی از مخلوط دو پروبیوتیک صورت گرفت. در روز‌های پایانی هر دوره مصرفی، تست‌های ماز آبی موریس و ماز پلاس، به ترتیب برای ارزیابی حافظه فضایی و اضطراب از موش‌ها گرفته شده‌اند. این تست‌ها از معروف‌ترین تست‌های رفتاری در حوزه علوم اعصاب شناختی محسوب می‌شوند و در تحقیقات علمی معتبر برای بررسی فاکتورهای شناختی مذکور در جوندگان، از آن‌ها استفاده شده است. با توجه به ظریف و تخصصی بودن علم میکروبیولوژی، بررسی دقیق ترکیب میکروبیوتا روده به راحتی ممکن نیست و نیازمند تجهیزات و فناوری‌های پیشرفته‌ای می‌باشد که تنها در کشورهای خاصی در دسترس است. بنابراین یکی از چالش‌های مهم در این‌گونه پژوهش‌ها، ارزیابی

مناسب و دقیق ترکیب میکروبیوتا روده است. در حوزه علوم اعصاب نیز تهیه و نگهداری تست های رفتاری مانند ماز آبی موریس نسبتاً هزینه بر و دشوار می باشد. به همین دلیل به پژوهشگران توصیه می شود که پیش از آغاز پژوهش خود، امکانات و تجهیزات مورد نیاز خود را به دقت برآورده کنند تا در میانه پژوهش با مشکل مواجه نشوند. در پایان از آقایان محمد وحیدی اربابی و عرفان نجف زاده تشکر می کنیم که برای به ثمر رسیدن این پژوهش کمک های بسیاری به ما کردند.

## بیان مسئله

از آشناترین عوامل بر هم زننده تعادل میکروبیوتا، مصرف آنتی بیوتیک ها را می توان نام برد.<sup>[۲]</sup> میکروبیوتا روده نامتعادل سلامتی یک فرد را به خطر می اندازد و مشکلات متعدد گوارشی یا حتی رفتاری و شناختی را برای او ایجاد می کند.<sup>[۳]</sup> بنابراین یک میکروبیوتا روده نامتوازن نیازمند درمان است و با توجه به تحقیقات یکی از راه های پیشگیری و درمان آن مصرف پروبیوتیک ها می باشد.<sup>[۳]</sup> درنتیجه با توجه به اهمیت بالای میکروبیوتا روده بر سلامتی انسان و همچنین گسترش و افزایش روز افزون استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها علی رغم تأثیرات مخرب آنها بر روی میکروبیوتا روده، این پرسش مطرح می شود:

مصرف پروبیوتیک پس از یک دوره آنتی بیوتیک، به منظور اصلاح وضعیت میکروبیوتا روده چه تأثیری می تواند بر روی فاکتور های شناختی حافظه فضایی و اضطراب بگذارد؟

## پیشینه تحقیق

بر طبق تحقیقات سنگواره ای و تحقیقات بر روی فسیل ها مشخص شد که اولین باکتری ها تقریباً چهار میلیارد سال پیش بر روی زمین به وجود آمدند، در آن زمان اتمسفر زمین تشکیل نشده بود. میلیون ها سال بعد، سیانوباكتری ها پا به عرصه وجود گذاشتند و لایه اوزون و اتمسفر زمین شکل گرفت که این اتفاق سرآغازی بر تکامل موجودات وابسته به اکسیژن بود. طی تکامل باکتری ها و ایجاد اتمسفر زمین و به وجود آمدن موجودات زنده، آرام آرام بدن موجودات زنده پرسلوی با باکتری ها هم زیست شد؛ و تریلیارد ها باکتری و میکروب که با ما درون بدنمان زندگی می کنند مثالی بر این موضوع هستند.

بدن اکثر موجودات زنده با تعداد زیادی از میکروب ها احاطه شده است. شناخت ما از رابطه بین موجودات زنده و میکروارگانیسم هایی که در داخل بدنمان حضور دارند، در سال های گذشته به طور چشم گیری افزایش

یافته است. ابتدا دانشمندان توانستند رابطه میکروب های ساکن در دهان، روده ها، نواحی تناسلی و پوست) و هضم غذا و گوارش در موجودات زنده را کشف کنند. سپس به رابطه بین میکروبیوم و سیستم ایمنی موجودات زنده پی برند. امروزه دانشمندان با استفاده از میکروبیوم سعی در افزایش قدرت سیستم ایمنی در جانداران دارند.

در حقیقت ما انسان ها نیز "superorganism" هایی هستیم که توسط "microorganism" هایی که در داخل بدن ما زندگی می کنند اداره می شویم! همان طور که گفته شد اكتشافات زیادی درباره میکروبیوم صورت گرفته است. امروزه دانشمندان به این حقیقت دست یافته اند که میکروبیوم با سیستم عصبی ما در ارتباط بوده و درباره این موضوع تحقیقات گسترده تری در حال انجام است.

به نظر می رسد که رشد میکروبیوم از زمان تولد آغاز می شود، اگرچه تعدادی از مطالعات با تشخیص میکروب ها در بافت هایی نظیر جفت این موضوع را به چالش کشیده اند. جالب است که نوع زایمان نیز بر ترکیب میکروبیوم مؤثر است و روده نوزادانی که از طریق سزارین به دنیا آمدند در مقابل روده نوزادانی که با زایمان طبیعی به دنیا آمدند به دلیل عدم عبور از کانال زایمان، دیرتر کلونیزه می شود. هنگامی که نوزاد به دنیا می آید از آن پس از طریق شیر مادر میکروب های زیادی به بدنش وارد می شوند؛ به همین خاطر یکی از معایب استفاده از شیر خشک انتقال نیافتن میکروب های مادر به فرزند است. به طور کلی پس از تولّد، شیر مادر و محیط دو عامل اصلی موثر بر ترکیب میکروبیوتا در نوزادان است.

در اوایل نوزادی، ترکیب میکروبیوتا تنوع کمتری دارد و غالباً شامل *proteobacteria* و *actinobacteria* می باشد. در طی اولین سال زندگی، تنوع میکروبی افزایش می یابد و ترکیب میکروبیوتا به سمت یک ترکیب مشخص گرایش می یابد؛ اما به دنبال وقوع بیماری ها، مصرف آنتی بیوتیک ها و تغییر در رژیم غذایی، ترکیب میکروبیوتای دستگاه گوارش تغییر می کند.

میکروبیوم هر جاندار با جاندار دیگر تفاوت دارد که علت های متعددی دارد؛ همچنین عوامل مختلفی وجود دارند که بر روی ترکیب میکروبیوم روده اثر می گذارند. این عوامل عبارتند از:

**رژیم غذایی:** به عنوان مثال میکروبیوم روده حیوانات گوشت خوار با حیوانات گیاه خوار مثل گاو و سگ متفاوت است که یکی از علت های اصلی آن تفاوت در رژیم غذایی آن هاست. این عامل برای انسان ها نیز مؤثّر است؛ مثلاً میکروبیوم روده یک فرد ژاپنی به سبب رژیم غذایی خاص خودش با میکروبیوم روده یک فرد ایرانی کاملاً تفاوت دارد.

**ژنوتیپ میزبان:** دنای انسانی (DNA) با تولید پروتئین هایی خاص، موجب ایجاد کنش ها و واکنش هایی بر

روی میکروبیوم می شود.

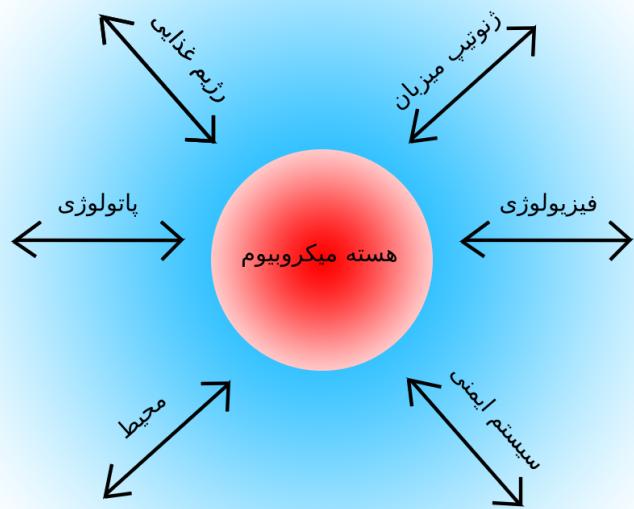
**فیزیولوژی:** میکروبیوم با بافت ها و اندام های مختلف بدن در ارتباط است. به عنوان مثال میکروبیوتا روده انسان با محور HPA در ارتباط است و روی آن تاثیر می گذارد.

**سیستم ایمنی:** در روده انسان ترکیبی از باکتری های مفید و مضر وجود دارد؛ اگر ترکیب باکتری های روده، توازن و تعادل سالیمی داشته باشند، از عفونت و تجمع باکتری های مضر جلوگیری می شود و درنتیجه سبب تقویت سیستم ایمنی می شود. امروزه در مرغداری ها، زمانی که جوجه ها سر از تخم بیرون می آورند؛ روی آنها پروبیوتیک اسپری می شود. زیرا جوجه ها در لحظه تولد سیستم ایمنی ضعیفی دارند و ترکیب میکروبی روده آنها توازن لازم برای مقابله با رشد باکتری های مضر را ندارد.

**محیط:** جانورانی که در خشکی زندگی می کنند نسبت به جانورانی که در آب زندگی می کنند به دلیل شرایط متفاوت رشد باکتری ها، دما و فاکتور های متعدد دیگر، میکروبیوم متفاوتی دارند.

**پاتولوژی:** به طور مثال کسانی که به زخم معده مبتلا می شوند؛ باکتری های ساکن در روده های آن ها، وارد خون می شوند و از آنجایی که بعضی از باکتری های روده بیماری زا هستند؛ بیماری های مختلفی را ایجاد می کنند. این امکان هم وجود دارد که یک بیماری گوارشی، ایمنی یا عصبی که دستگاه گوارش را درگیر می کند؛ باعث تغییر جمعیت میکروبیوم شود. همچنین منشاء بعضی از بیماری ها، میکروبیوم می باشد. بیماری قانقاریا از این دسته از بیماری ها محسوب می شود. فردی که دچار قانقاریا می شود به سبب ایجاد زخم عمیق بر روی بدن، راه عبور به نقاط عمیق تر را برای باکتری های اسپروفیتی ساکن پوست باز می کند. ورود این باکتری ها به نقاط عمیق تر موجب عفونت می شود و در نهایت اندامی که دچار عفونت شده خشک شده و می افتد.

البته بین این عوامل و میکروبیوم رابطه ای دو سویه برقرار است.<sup>[۴]</sup>



تصویر ۱ : عوامل مؤثر بر میکروبیوتا روده

### ارتباط بین میکروبیوتا روده با مغز

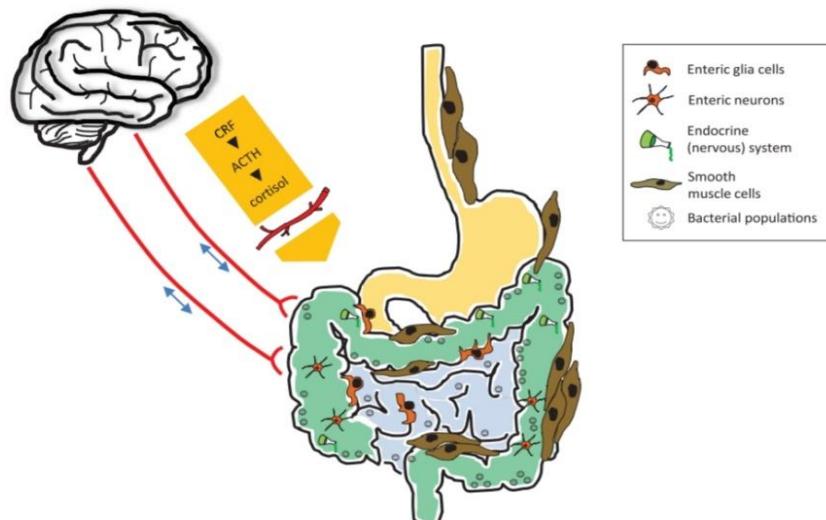
طبق تحقیقات اخیر میلیارد ها میکروبی که در روده ساکن هستند می توانند نقشی اساسی در حمایت از تشکیل سلول های عصبی جدید در مغز بزرگسالان داشته باشند، همچنین این احتمال وجود دارد که از کاهش حافظه در سنین پیری جلوگیری کرده و به ترمیم و تجدید سلول های عصبی پس از آسیب کمک کنند.<sup>[۵]</sup>

میکروبیوتا روده در بیماری های شناختی مانند اوتیسم نیز تاثیرگذار است. اوتیسم از جمله بیماری هایی است که با میکروبیوتای تغییر یافته روده مرتبط است. به طوری که جمعیت باکتری های *Veillonellaceae* در روده کودکان مبتلا به اوتیسم نسبت به افراد سالم، کمتر است.<sup>[۶]</sup>

از نمونه های دیگر ارتباط میکروبیوتا بر دستگاه عصبی می توان به تأثیر متابولیت ها بر روی نورون ها اشاره کرد؛ این متابولیت ها زنجیره های سبک و کوچک اسید های چرب هستند که توسط باکتری ها تولید می شوند و موجب فعال شدن نورون ها می شوند.<sup>[۷]</sup>

## ارتباط میکروبیوم با محور HPA

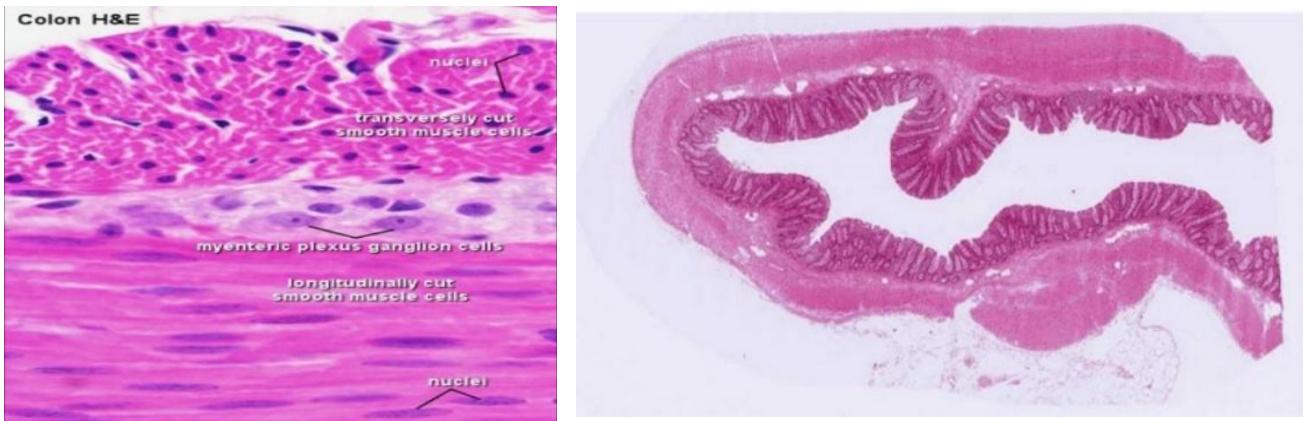
مخفف HPA است. (هیپotalاموس-هیپوفیز-آدرنال) این سه بخش با ترشح هورمون هایی در شرایط مختلف مانند شرایط استرس زا، بر روی یکدیگر تاثیر می گذارند. اما اجزا این محور فقط از یکدیگر تاثیر نمی گیرند بلکه ثابت شده است که با بخش های دیگری نیز در ارتباط هستند؛ یکی از این بخش هایی که احتمال داده می شود با محور HPA در ارتباط باشد گروهی از میکروب ها هستند که در روده ما قرار دارند و "Gut microbiota" نامیده می شوند. میکروبیوتای روده احتمالاً می تواند از طریق محور هیپotalاموس-هیپوفیز-آدرنال، ترشح هورمون ها را کنترل و روی فعالیت سلول های ایمنی اثر بگذارد. طبق تحقیقات، کلونیزاسیون *Bifidobacterium infantis* در روده، مشکلات مربوط به رفتار و استرس را بهبود می بخشد. برخی از اثرات میکروبیوتا روده در مغز از طریق محور HPA صورت می گیرد که می تواند موجب تغییر رفتار میزبان شود. در تصویر (۲) ارتباط شیمیایی و هورمونی دستگاه عصبی با میکروبیوتای روده را مشاهده می کنید. همان طور که در شکل اشاره شده است؛ هیپotalاموس یک ماده شیمیایی به نام CRF ترشح می کند و موجب می شود که هیپوفیز به ترشح ACTH تحیریک شود. ACTH روی غدد فوق کلیوی تاثیر می گذارد و غدد فوق کلیوی ترشح کورتیزول را آغاز می کنند که باعث اثرگذاری بر دستگاه گوارش و میکروبیوم روده می شوند.<sup>[۱]</sup>



تصویر ۲: ارتباط میکروبیوم با محور HPA

## چگونگی ارتباط دستگاه عصبی با میکروبیوتا روده

در تصاویر ۳.۱ و ۳.۲، برشی از بافت روده بزرگ را می‌بینید. روده بزرگ مانند قسمت‌های دیگر لوله گوارش از بیرون به سمت داخل از بافت‌های پیوندی، ماهیچه‌ای، زیر مخاط و مخاط تشکیل شده است.



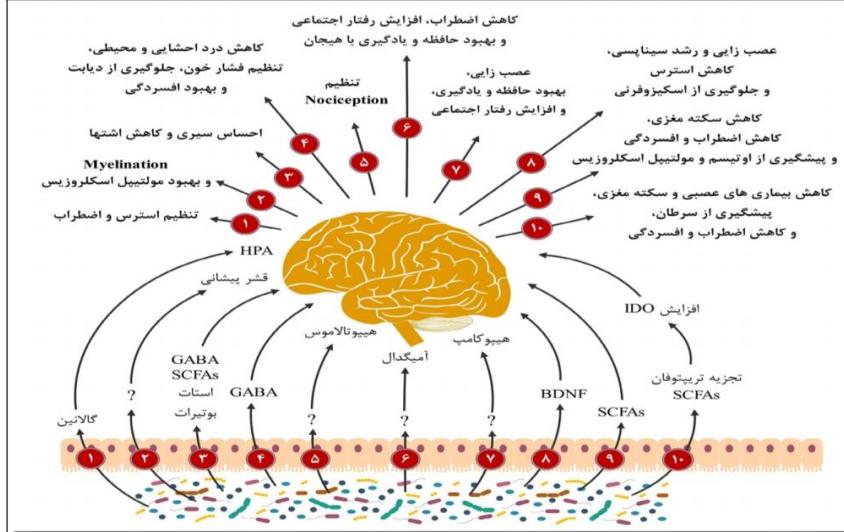
به ترتیب تصاویر ۳.۱ و ۳.۲

بافت عصبی در بافت زیرمخاط باعث ترشح مواد به داخل لوله گوارش می‌شود. میکروب‌ها با این بافت عصبی در ارتباط هستند. یکی از این ارتباطات از طریق ترشح مواد شیمیایی صورت می‌گیرد.

علاوه بر این میکروبیوتا روده با هیپوکامپ، آمیگدال، هیپوپalamوس و قشر پیشانی مغز نیز در ارتباط است اما این که از چه طریقی این ارتباط وجود دارد هنوز به قطعیت نرسیده است. [۷]

همچنین گروهی از میکروب‌های روده می‌توانند موجب تولید هورمون‌ها یا پپتیدهای روده ای مانند ارکسین، گالانین، گرلین، گاسترین و لپتین شوند. [۸]

میکروبیوتای روده از طریق سیستم عصبی روده ای بر سیستم عصبی مرکزی تاثیر می‌گذارد. با توجه به شباهت سیستم عصبی روده ای به سیستم عصبی مرکزی از نظر خودمختار بودن، سیستم عصبی روده ای به عنوان مغز دوم شناخته شده است. [۹] تصویر (۴) به طور کامل تری به ارتباط میکروبیوتا روده با سیستم عصبی پرداخته است.



تصویر ۴

## تأثیرات آنتی بیوتیک و پروبیوتیک

آنتی بیوتیک ها و پروبیوتیک ها، دارو هایی هستند که به سرعت بر روی میکروبیوتا روده تاثیر می گذارند. امروزه استفاده از این دارو ها در دوره زمانی کوتاه مدت برای بررسی اثرگذاری میکروبیوتا روده بر رفتار جانوران و فاکتور های شناختی، یک روش معتبر محسوب می شود.<sup>[۲]</sup>

آنتی بیوتیک ها یکی از مهم ترین عوامل برهم زننده تعادل میکروبیوتا روده (Dysbiosis) محسوب می شوند. به همین دلیل توجه دانشمندان به این مسأله جذب شده است که عدم تعادل فلور میکروبی روده ناشی از آنتی بیوتیک چه تاثیراتی بر روی مغز و رفتار های شناختی می گذارد؟ عده ای از پژوهشگران به این نتیجه رسیده اند که dysbiosis ناشی از آنتی بیوتیک تأثیری بر روی حافظه فضایی ندارد.<sup>[۲]</sup> همچنین در تحقیق دیگر بر روی موش هایی با رژیم غذایی چرب، عدم توازن ایجاد شده در میکروبیوتا روده به وسیله آنتی بیوتیک، موجب کاهش نشانه های افسردگی و اضطراب شده است.<sup>[۱۰]</sup>

پروبیوتیک ها دارو هایی شامل باکتری هایی هستند که احتمال می رود در میکروبیوتا روده نقش مفیدی داشته باشند و موجب تعادل و سلامت آن شوند. پروبیوتیک ها به عنوان یکی از عوامل تغییر دهنده میکروبیوتا روده مورد بررسی پژوهشگران علاقه مند به این حوزه قرار گرفته است. پروبیوتیک ها می توانند از طریق ایجاد تغییرات بر روی سیگنالینگ سیستم ایمنی به مغز بر کار کرد آن تأثیر بگذارند.<sup>[۱]</sup> با این حال در پژوهشی، محققین به این نتیجه رسیده اند که مصرف پروبیوتیک ها برای مدل رت های آلزایمری بر حافظه فضایی آنها تأثیری ندارد.<sup>[۱۱]</sup>

## بakterی های مؤثر بر سیستم عصبی مرکزی

دسته ای از بakterی های ساکن در روده با ترشح انتقال دهنده های عصبی بر دستگاه عصبی تاثیر می گذارند که جدول (۱)، یک فرم کلی از انتقال دهنده های عصبی و بakterی هایی که در ترشح آنان نقش دارند را نشان می دهد. [۱۲]

Neurotransmitter	Bacteria Strain
Dopamine	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus mycoides</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>
Acetylcholine	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Histamine	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus mail</i> <i>Lactococcus lactis subsp.cremoris</i> <i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
Serotonin	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis subsp.cremoris</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>

Neurotransmitter	Bacteria Strain
Norepinephrine	Escherichia coli Bacillus subtilis Bacillus mycoides
GABA	Lactobacillus delbrueckii subsp Lactobacillus rhamnosus Lactobacillus reuteri Lactobacillus plantarum Lactobacillus paracasei FRI Lactobacillus buchneri Lactobacillus brevis Bifidobacterium adolescentis Bifidobacterium angulatum Bifidobacterium dentium Bifidobacterium infantis Bulgaricus Streptococcus thermophilus

جدول ۱: باکتری ها و انتقال دهنده های عصبی ترشح شده توسط آن ها [۱۲][۱۳]

هر کدام از این انتقال دهنده ها وظایفی را در بدن انسان ایفا می کند و بر بخش های مختلف دستگاه عصبی مرکزی و محیطی تاثیر می گذارند . جزئیات مربوط به هر کدام از این انتقال دهنده های عصبی در جدول (۲) ذکر شده است.

انتقال دهنده عصبی	توضیحات
Dopamine	<p>دوپامین که معمولاً به عنوان انتقال دهنده عصبی احساسِ خوب شناخته می‌شود، در پاداش و انگیزه نقش دارد.<sup>[۱۴]</sup> انواع مختلفی از داروهای اعتیادآور سطح دوپامین را در مغز افزایش می‌دهند. این پیام رسان شیمیایی نقش مهمی در هماهنگی حرکات بدن نیز دارد. به طور مثال بیماری پارکینسون که یک بیماری degenerative است، منجر به لرزش و اختلالات حرکتی می‌شود. این بیماری به دلیل از بین رفتن نورون‌های تولید کننده دوپامین در مغز ایجاد می‌شود.</p>
Acetylcholine	<p>این تنها انتقال دهنده عصبی در نوع خود است. در هر دو سیستم عصبی مرکزی و محیطی یافت می‌شود و انتقال دهنده عصبی اصلی مرتبط با نورون‌های حرکتی است.<sup>[۱۵]</sup> به طوری که در حرکات ماهیچه‌ها و همچنین حافظه و یادگیری نقش دارد.</p>
Histamine	<p>این ترکیب آلی به عنوان یک انتقال دهنده عصبی در مغز و نخاع عمل می‌کند.<sup>[۱۶]</sup> این ترکیب در واکنش‌های آлерژیک نقش دارد و به عنوان بخشی از پاسخ سیستم ایمنی به عوامل بیماری زا تولید می‌شود.</p>

انتقال دهنده عصبی	توضیحات
Serotonin	<p>سروتونین که یک هورمون و انتقال دهنده عصبی است، نقش مهمی در تنظیم و تعدیل خلق و خو، خواب، اضطراب، تمایلات جنسی و اشتها دارد. به طور مثال مهارکننده‌های انتخابی بازجذب سروتونین (SSRIs) نوعی داروی ضد افسردگی هستند که معمولاً برای درمان افسردگی، اضطراب، اختلال و حملات پانیک تجویز می‌شوند. SSRI‌ها با مسدود کردن بازجذب سروتونین در مغز، سطح سروتونین را متعادل می‌کنند، که می‌تواند به بهبود خلق و خو و کاهش احساس اضطراب کمک کند. [۱۷]</p>
Norepinephrine	<p>این ماده شیمیایی به طور طبیعی یک انتقال دهنده عصبی است که نقش مهمی در هوشیاری ایفا می‌کند و در واکنش ستیز و گریز بدن نقش دارد. نقش آن کمک به آماده سازی بدن و مغز برای انجام اقدامات در موقع خطر یا استرس است. سطح این انتقال دهنده عصبی معمولاً در هنگام خواب پایین ترین و در زمان استرس بالاترین حد است.</p>
GABA	<p>این آمینواسید طبیعی پیام‌سان شیمیایی و بازدارنده اصلی بدن می‌باشد. GABA در بینایی، کنترل حرکتی و تنظیم اضطراب نقش دارد. بنزودیازپین‌ها، که برای درمان و بهبود اضطراب استفاده می‌شوند و GABA با افزایش کارایی انتقال دهنده‌های عصبی موجب افزایش احساس آرامش و آسودگی می‌شوند.</p>

جدول ۲ : انتقال دهنده‌های عصبی [۱۸]

## اهداف

**هدف کلی :** شناخت و بررسی تعامل میکروبیوتا روده با سیستم عصبی مرکزی با درنظر گرفتن دو دوره مصرفی آنتی بیوتیک و پروبیوتیک به صورت متوالی.

### اهداف جزئی:

۱. بررسی تأثیر مخلوط آنتی بیوتیک در کاهش جمعیت باکتری های ساکن روده موش، بر روی حافظه فضایی و اضطراب.
۲. کاهش دادن جمعیت باکتری های طبیعی ساکن در روده موش با مخلوط آنتی بیوتیک، سپس جایگزین کردن آن جمعیت، با باکتری های پروبیوتیکی و درنهایت بررسی تأثیرات آن ها بر روی حافظه فضایی و اضطراب.

## فرضیه ها

- مصرف یک دوره از مخلوط چهار آنتی بیوتیک با بر هم زدن تعادل میکروبیوتا روده، موجب افزایش اضطراب در موش ها می شود.
- مصرف یک دوره از مخلوط دو پروبیوتیک پس از یک دوره آنتی بیوتیک، میکروبیوتا روده را احیا می کند و موجب کلونیزه شدن روده با باکتری های پروبیوتیکی می شود. سپس تقویت حافظه فضایی موش ها تقویت می شود و اضطراب آن ها نیز کاهش می یابد.

## روش کار

طبق نظارت مسئول آزمایشگاه ابتدا بیست موش BALB/c، در چهار گروه کنترل، آنتی بیوتیک و دو گروه پروبیوتیک تقسیم شدند. سپس ۱۱ روز مخلوط چهار آنتی بیوتیک آموکسی سیلین، ونکومایسین، جنتامایسین و سیپروفلاکسوسین به موش های گروه آنتی بیوتیک و دو گروه پروبیوتیک گواژ دهانی شد؛ همچنین به گروه کنترل به همین مدت، محلول نرمال سالین گواژ شده است. از روز دوازدهم به بعد تست های ماز آبی موریس و ماز پلاس معلق (Elevated plus) برای بررسی حافظه فضایی و اضطراب از گروه های کنترل و آنتی بیوتیک گرفته شد. از روز دوازدهم دیگر به گروه پروبیوتیک، مخلوط آنتی بیوتیک داده نشد و دوره پروبیوتیک برای آن

ها از این روز آغاز شد و مخلوط دو پروبیوتیک، شامل پروبیوتیک هایی با نام های تجاری Biofem و Comflor، به مدت ۱۴ روز به دو گروه پروبیوتیک با دوز بالا (High dose) و گروه پروبیوتیک با دوز پایین (Low dose) گاواز شد. درنهایت در روز های پایانی آزمایش از گروه های پروبیوتیک نیز تست های رفتاری ماز موریس و ماز پلاس گرفته شد. لازم به ذکر است که دو مورد از موش ها، به دلیل استرس ناشی از جا به جایی به محیط جدید و منزوی بودن، دچار بیماری غیرمسرى شدند و در روز های ابتدایی جانشان را از دست دادند.

## نوع موش ها

نژاد موش ها BALB/C نر بوده است. موش های نر از این جهت انتخاب شده اند که موش های ماده دارای چرخه ای جنسی هستند که سبب تغییرات هورمونی قابل توجه و تاثیرگذاری آن ها بر روی حافظه فضایی و اضطراب می شود. درنتیجه درصورت استفاده از موش های ماده خطا های شدیدی در آزمایش ایجاد می شود.

## شرایط نگهداری

موش ها در دمای بین ۲۰ تا ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری می شدند. برای تنظیم ریتم شبانه روزی موش ها نور اتاق توسط یک تایمر ساعتی در بازه های ۱۲ ساعته تنظیم می شد به طوری که بازه روشنایی از ۶ صبح تا ۱۸ عصر و بازه تاریکی از ساعت ۱۸ تا ۶ صبح بوده است. لازم به ذکر است که از ورود هرگونه نور از محیط خارج از محل نگهداری موش ها جلوگیری شده است.

## نحوه مصرف مخلوط آنتی بیوتیک و پروبیوتیک

بهترین روش برای به کارگیری این آنتی بیوتیک و پروبیوتیک بر فلور میکروبی بدن بر پایه مخلوط در آب است. به همین دلیل در این تحقیق دارو ها به صورت سوسپانسیون و با تکنیک گاواز دهانی به موش ها داده شده است. موش ها می بایست در ساعت مشخصی از روز و با دوزی معین دارو ها را دریافت می کردند. بنابراین روش های دیگری مانند مخلوط کردن دارو ها در آب یا خوراک موش ها، مناسب نبودند. زیرا دارو ها مخلوط سوسپانسیون هستند و پس از مدتی ته نشین می شوند، به علاوه اگر دارو ها در آب موش ها مخلوط می شدند، در زمان معینی مورد مصرف موش ها قرار نمی گرفتند. شیوه های دیگر تزریق نیز به دلیل تکرر نوبت های تزریق موجب آسیب دیدن بدن موش ها می شود. همچنین در این روش ها، دارو ها به میکروبیوتا روده نمی رسند. ولی در گاواز دهانی، دارو ها در مدت زمان مشخص، با دوز معین و با آسیب کمتر، به میکروبیوتا روده موش می رسند و بر روی آن اثر می گذارند.

## ایجاد تغییرات در میکروبیوتا روده با دوره های آنتی بیوتیک و پروبیوتیک

آنٹی بیوتیک ها و پروبیوتیک ها، دارو هایی هستند که به سرعت بر روی میکروبیوتا روده تاثیر می گذارند.

امروزه استفاده از این دارو ها در دوره زمانی کوتاه مدت برای بررسی اثرگذاری میکروبیوتا روده بر رفتار جانوران و فاکتور های شناختی، یک روش معابر محسوب می شود.<sup>[۲]</sup>

دوز پrobiootik	probiootik	آنتی بیوتیک	تعداد موش ها	گروه
✗	✗	✗	۴	گروه کنترل
✗	✗	✓	۴	گروه آنتی بیوتیک
Low dose	✓	✓	۵	گروه پrobiootik لو دوز
High dose	✓	✓	۵	گروه پrobiootik های دوز

جدول ۳: گروه های آزمایش

### آنتی بیوتیک ها

آنتی بیوتیک ها، دسته‌ی دارویی مهمی هستند که علیه عفونت های باکتریایی در بدن جانوران مبارزه می‌کنند و باکتری ها را از بین می‌برند یا از رشد و تکثیرشان جلوگیری می‌کنند. جمعیّت و تنوع میکروبیوتای روده تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله آنتی بیوتیک ها، تغییر می‌کند؛ مطابق با هدف این پژوهش آنتی بیوتیک هایی برای مصرف موش ها انتخاب شدند که جمعیّت باکتریایی مؤثر در فعالیّت های شناختی را کاهش دهند. این آنتی بیوتیک ها به همراه سرده باکتریایی مورد هدف در جدول<sup>(۴)</sup> قابل مشاهده اند.

Bacteria genus	Antibiotics
Escherichia	Enrofloxacin(Ciprofloxacin)
Streptococcus	Vancomycin
Bacillus	Gentamicin
Lactobacillus and Bifidobacterium	Amoxicillin

جدول ۴ : سرده باکتری ها و آنتی بیوتیک گزینش شده برای هر کدام [۱۹][۲۰][۲۱][۲۲][۲۳][۲۴][۲۵][۲۶]

هر آنتی بیوتیک تنها بر روی دسته‌ای از باکتری ها مؤثر و بر دیگر گروه ها کم اثر یا بی تأثیر است. در نتیجه برای کاهش اکثر جمعیّت باکتریایی ساکن در روده، می‌بایست از مخلوطی شامل چند آنتی بیوتیک استفاده شود.

با در نظر گرفتن اصول کلینیکال و وزن موش‌ها، برای هر آنتی بیوتیک دوز مشخصی در نظر گرفته شده که در جدول (۵) مشخص شده است. لازم به ذکر است که حجم مصرفی روزانه مخلوط برای موش‌ها، ۰.۳ میلی لیتر بوده است.

Antibiotics	Dosage	Amount in mixture
Amoxicillin	1.5 mg/ml	0.15 mg
Gentamicin	0.0125 mg/ml	0.025 mg
Vancomycin	1.5 mg/ml	0.15 mg
Ciprofloxacin	1.5 mg/ml	0.15 mg

جدول ۵: دوز‌های مشخص شده برای آنتی بیوتیک‌ها

درنهایت باید به این نکته توجه کرد که آنتی بیوتیک‌ها به گونه‌ای انتخاب و تهیه شده‌اند که با یکدیگر تداخل جدی نداشته باشند و عوارض آن‌ها نیز کم باشد تا میزان خطای آزمایش کاهش یابد.

## پروبیوتیک‌ها

پس از این که با استفاده از مخلوط آنتی بیوتیک جمعیت باکتریایی ساکن در روده هر سه گروه کاهش پیدا کرد؛ حال باید به سرعت جایگزینی برای جمعیت باکتریایی از دست رفته میکروبیوتا موش‌ها تعیین شود؛ اگر این کار به سرعت صورت نگیرد امکان دارد باکتری‌های بیماری زا جای آن‌ها را پر کنند. بنابراین در این پژوهش از داروهای پروبیوتیکی حاوی باکتری‌های دخیل در تعامل بین میکروبیوتا روده و مغز و باکتری‌های ترشح کننده نوروتئنسمیتر‌های خاصی مانند گابا و سروتونین استفاده شده است. نام تجاری دو داروی پروبیوتیکی به کار گرفته شده، Comflor و Biofem می‌باشد.

در جدول (۶) گونه‌های موجود در دو داروی پروبیوتیکی استفاده شده، نوشته شده است.

پروبیوتیک‌ها به دو گروه از چهار گروه از موش‌ها داده شده است. به این دو گروه با دو دوز مختلف دارو داده شده تا جمعیت باکتری‌های پروبیوتیکی به دو نسبت متفاوت افزایش یابد؛ به یکی از گروه‌ها دوز کمتر و به گروه دیگر دوز بیشتری از پروبیوتیک داده شده است. پس از دوره مصرفی پروبیوتیک، از این دو گروه نیز تست‌های اضطراب و حافظه فضایی گرفته شده است.

Probiotic	Amount	Bacteria
Comflor	$4.5 \times 10^{11}$ CFU per 200mg capsule	Lactobacillus plantarum Lactobacillus casei Lactobacillus acidophilus Lactobacillus bulgaricus Bifidobacterium longum Bifidobacterium breve Bifidobacterium Infantis Streptococcus thermophilus
Biofem	$10^9$ CFU per capsule	Lactobacillus Rhamnosus Lactobacillus Reuteri

جدول ۶: مشخصات داروهای پروبیوتیک

دوزهای پروبیوتیک در جدول (۷) نمایش داده شده اند. غلظت هر دو داروی پروبیوتیکی در هر نوع دوز یکسان است. حجم مصرفی مخلوط روزانه پروبیوتیک برای موشها ۰.۲ میلی لیتر بوده است.

لازم به ذکر است که دوز پروبیوتیک‌ها، با توجه به قواعد کلینیکال به گونه‌ای انتخاب شده که عوارض جانبی آن‌ها کم باشد تا آزمایش دچار خطای قابل توجهی نگردد.

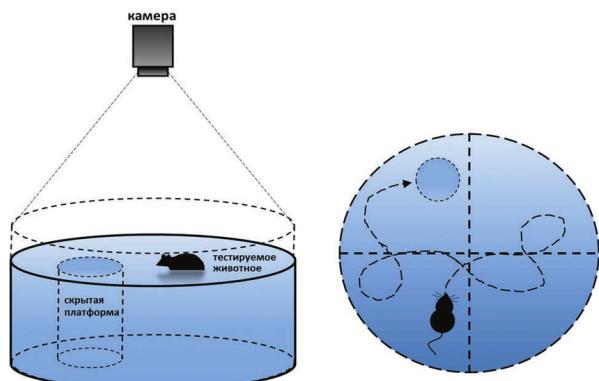
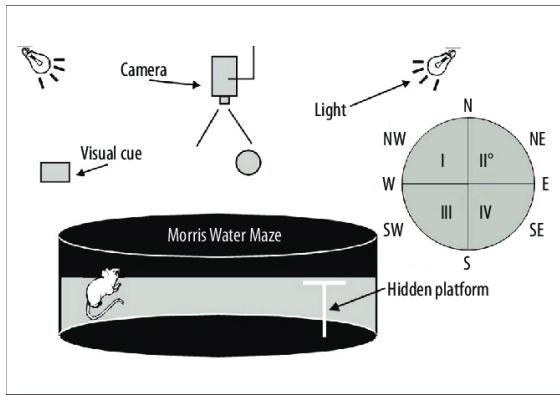
Probiotic Group	Dosage
High dose	0.6 mg/ml
Low dose	0.2 mg/ml

جدول ۷: دوزهای مشخص شده برای پروبیوتیک‌ها

### فاکتورهای شناختی و انجام تست‌های حافظه و اضطراب

فاکتورهای شناختی انتخاب شده، حافظه از نوع حافظه بلند مدت فضایی و اضطراب می‌باشند و تست‌های منتخب، تست‌های ماز آبی موریس و ماز پلاس معلق (Elevated Plus maze) هستند. در پایان دوره های آنتی‌بیوتیک و پروبیوتیک از تمامی موش‌ها، تست‌های ماز آبی موریس و الیتید پلاس گرفته شده است. درباره تست موریس لازم به ذکر است که این تست یکی از آشناترین تست‌ها در حوزه علوم اعصاب شناختی

است که به منظور ارزیابی حافظه فضایی در جوندگان انجام می شود. به علاوه این آزمون اثرات بهبود بخشی حافظه و یا فراموشی آور دارو ها و همچنین اثرات دستکاری های ژنتیکی وابسته به عملکرد هیپوکامپ را به خوبی نشان می دهد. همچنین برخلاف ماز هایی مانند هشت بازو و ۷، این تست نیازی به گذراندن دوره گرسنگی برای موش ها ندارد.<sup>[۲۷]</sup> زیرا دوره گرسنگی می تواند ترکیب میکروبیوتا روده را تغییر دهد و در آزمایش خطأ ایجاد کند.



به ترتیب تصاویر ۵.۱ و ۵.۲ : ماز آبی موریس

تست ماز پلاس معلق(Elevated Plus) نیز مهم ترین کاربرد آن در بررسی تاثیر داروها بر اضطراب است.  
[۲۸] از این رو برای بررسی فاکتور اضطراب در موش ها از این تست استفاده شده است.

## برنامه و جدول زمانی آزمایش

### خلاصه

۱. آماده سازی موش ها و تجهیزات
۲. عادت کردن موش ها به محیط و آزمایشگر(Adaptation)
۳. دوره آنتی بیوتیک
۴. گرفتن تست از موش های گروه های آنتی بیوتیک و کنترل
۵. دوره پروبیوتیک
۶. گرفتن تست از موش های گروه های پروبیوتیک
۷. تحلیل دادهها(تست آماری One-way ANOVA, fixed factor)

## تهیه تجهیزات و آماده سازی موش ها

### تجهیزات

تجهیزات لازم شامل قفس ها و ملزومات آن ها، لوازم گاواظ مانند نیدل مخصوص و همچنین تست های ماز آبی موریس و Elevated plus maze می شوند.

### دوره آنتی بیوتیک

مخلوط آنتی بیوتیک ها به مدت ۲۳ روز(با احتساب روز های تست)، به موش های آنتی بیوتیک و پروبیوتیک گاواظ شدن. در روز های پایانی این دوره تست های شناختی از گروه های کنترل و آنتی بیوتیک گرفته شدند.

### دوره پروبیوتیک

پس از دوره آنتی بیوتیک، گروه های مشخص شده برای پروبیوتیک به دو دسته Low dose و High dose تقسیم شده و پروبیوتیک ها، به مدت ۲۰ روز(با احتساب روز های تست) به آن ها گاواظ دهانی شد. همچنین در روز های پایانی این دوره، تست های موریس و پلاس از گروه های پروبیوتیک نیز گرفته شد.

روز های آزمایش									گروه آزمایش	شرح کار
۳۱-۳۲	۳۰	۲۵-۲۹	۲۴	۲۲-۲۳	۱۷-۲۱	۱۲-۱۶	۱-۱۱			
								آ	گاواظ آنتی بیوتیک	
								پ		
								ک	گاواظ نرمال سالین	
								پ	گاواظ پروبیوتیک	
								آ	ترین(Train) و تست موریس	
								ک		
								پ	ترین(Train) و تست پلاس	
								آ		
								ک		
								پ		

جدول ۸: برنامه و زمان هر مرحله از آزمایش.(گروه ها، آ: آنتی بیوتیک، پ: پروبیوتیک ها، ک: کنترل)

## نتایج

در انتهای دوره آنتی بیوتیک، تغییر مدفع موش های گروه آنتی بیوتیک به حالت **Diarrhea** مشاهد شد که برخلاف آن ها، موش های گروه کنترل، مدفعی نرمال داشتند. همچنین بازگشت مدفع گروه های پروبیوتیک به حالت نرمال در هفته پایانی قابل مشاهده بود. نمودار ها و نتایج آماری حاصل از آنالیز تست ماز آبی موریس هرچهار گروه نشان می دهد که تمام موش ها به طور میانگین مدت زمان مشابه را در ناحیه ای از ماز که سکو پیش از روز پروب(بدون سکو) در آن قرار داشته سپری کرده اند. اما درباره تست پلاس سر موش های گروه های پروبیوتیک، به طور میانگین مدت زمان کمتری را نسبت به گروه های دیگر در بازو های باز ماز سپری کرده بودند، این مدت زمان برای گروه های آنتی بیوتیک و کنترل مشابه و همچنین تفاوت معناداری بین دو گروه پروبیوتیک در این مدت زمان وجود نداشت. نمودار ماز موریس در تصویر ۶ و نمودار های ماز پلاس در تصاویر ۱ و ۷.۲ نشان داده شده اند.

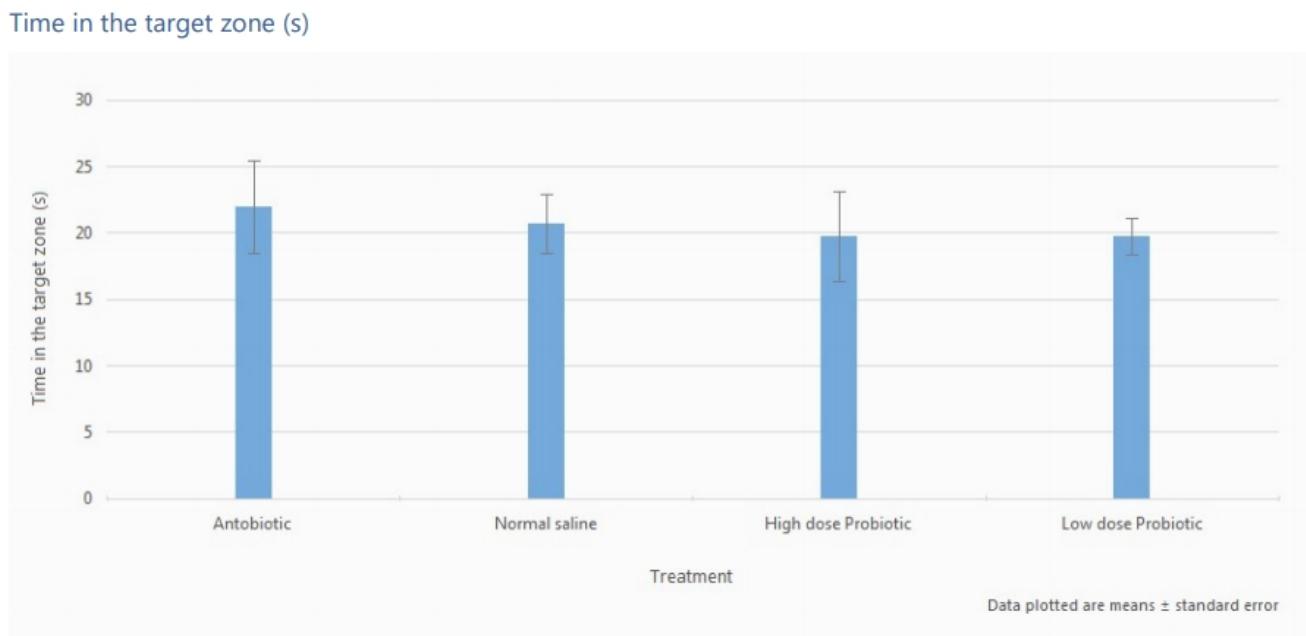


Figure 2. Time in the target zone. The data analysed has been limited in the following way: Treatment = Antibiotic, Normal saline, High dose Probiotic or Low dose Probiotic and Trial = Trial 1.

**تصویر ۶ : نمودار مربوط به ماز آبی موریس**

Time the animal's head was in the closearms zone (s)

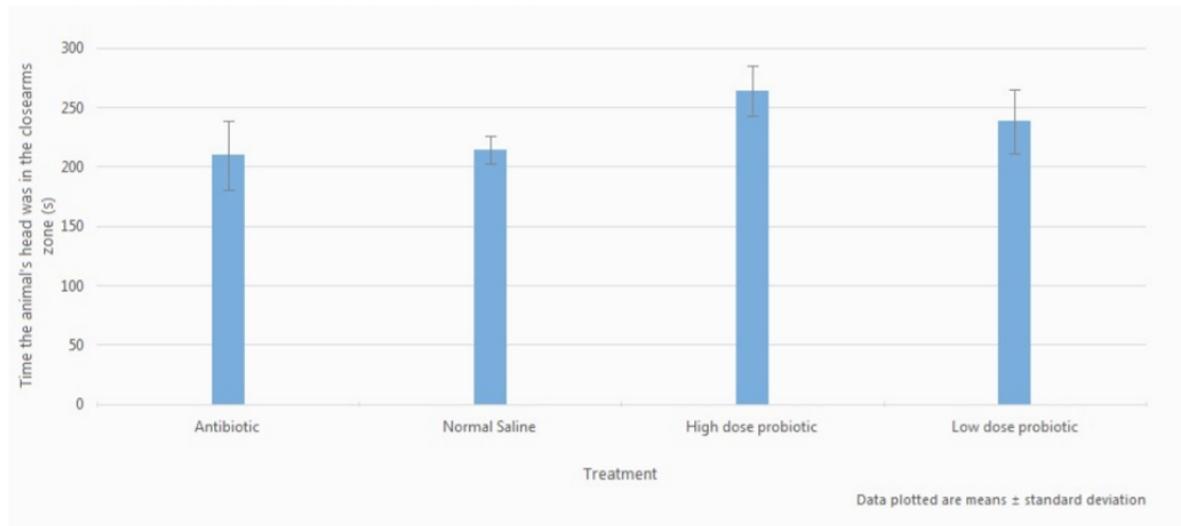


Figure 18. Time the animal's head was in the closearms zone. The data analysed has been limited in the following way: Treatment = Antibiotic, Normal Saline, High dose probiotic or Low dose probiotic and Trial = Trial 1.

تصویر ۷.۱ : نمودار ماز پلاس، زمانی که سر موش ها در بازو های بسته سپری کرده اند.(به ثانیه)

Time the animal's head was in the openarms zone (s)

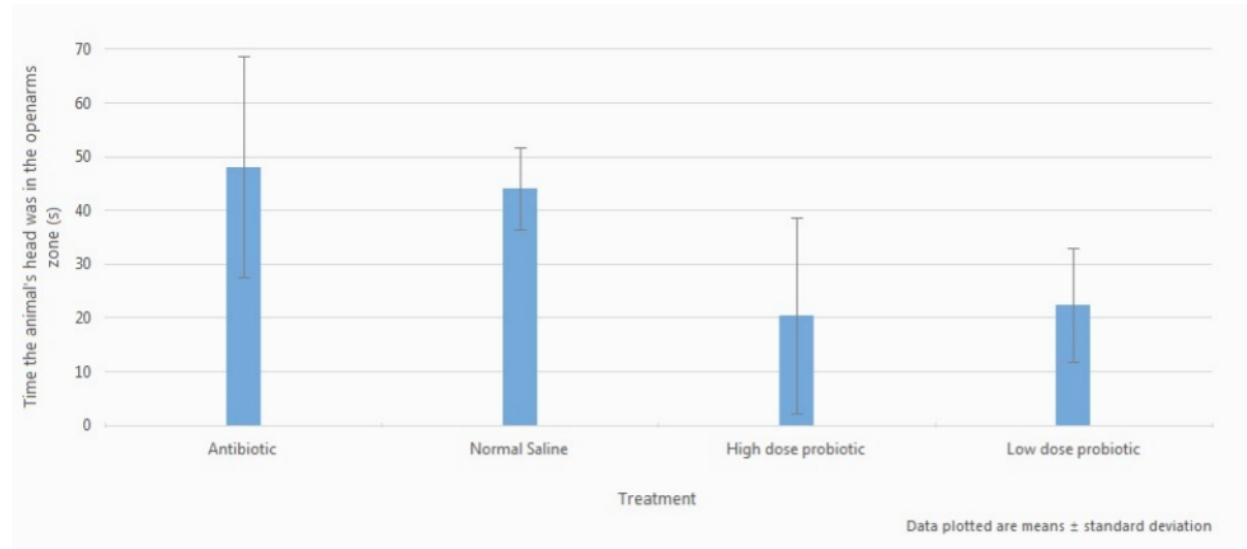


Figure 14. Time the animal's head was in the openarms zone. The data analysed has been limited in the following way: Treatment = Antibiotic, Normal Saline, High dose probiotic or Low dose probiotic and Trial = Trial 1.

تصویر ۷.۲ : نمودار ماز پلاس، زمانی که سر موش ها در بازو های باز سپری کرده اند.(به ثانیه)

## تحلیل نتایج

با توجه به یافته های مذکور می توان نتیجه گرفت که تفاوت معنی داری در حافظه فضایی بلند مدت با مصرف آنتی بیوتیک در موش ها مشاهده نمی شود. همچنین برخلاف فرضیه های مطرح شده، مصرف آنتی بیوتیک تاثیر معنی داری بر روی اضطراب ندارد.

مصرف پروبیوتیک پس از یک دوره آنتی بیوتیک، موجب افزایش اضطراب می شود. به علاوه، طبق نتایج به دست آمده مصرف پروبیوتیک پس از یک دوره آنتی بیوتیک تاثیر مشخصی بر روی حافظه بلند مدت فضایی ندارد.

لازم به ذکر است برای تحلیل کمی داده ها از تست One-way ANOVA, fixed factors استفاده شده است.  $p\_value$  در تمامی مقایسه ها برای فاکتور اضطراب، کمتر از ۰.۰۵ بوده است. جزئیات تحلیل آماری تست ها در تصاویر زیر قابل مشاهده است.

### Time in the target zone (s)

Treatment	N	Mean	SE (note 1)	Data (notes 2, 3)
Antibiotic	4	21.90	±3.46	26.2 (1.2), 20.8 (1.3), 12.6 (1.4), 28.0 (1.5)
Normal saline	4	20.63	±2.22	14.8 (2.1), 21.3 (2.2), 20.8 (2.3), 25.6 (2.4)
High dose Probiotic	5	19.70	±3.36	18.1 (3.1), 20.6 (3.2), 13.8 (3.3), 32.1 (3.4), 13.9 (3.5)
Low dose Probiotic	5	19.70	±1.34	17.8 (4.1), 22.6 (4.2), 23.0 (4.3), 18.9 (4.4), 16.2 (4.5)

ANOVA (note 4) :  $F_{(3,14)} = 0.1418$   $p = 0.933$

#### Notes:

1. SE = Standard error.
2. The data analysed has been limited in the following way: Treatment = Antibiotic, Normal saline, High dose Probiotic or Low dose Probiotic and Trial = Trial 1.
3. The numbers in parentheses next to the data values are animal numbers - you can click these to access the animal's details report.
4. One-way ANOVA, fixed factor.

تصویر ۸ : داده های مربوط به تست موریس: مدت زمانی که موش در منطقه ای از ماز که سگو حضور داشته سپری گرده است.

### Time the animal's head was in the closearms zone (s)

Treatment	N	Mean	SD (note 1)	Data (notes 2, 3)
Antibiotic	4	209.15	±29.09	210.0 (1.2), 246.1 (1.3), 205.4 (1.4), 175.1 (1.5)
Normal Saline	4	213.70	±11.57	230.7 (2.1), 205.5 (2.2), 211.1 (2.3), 207.5 (2.4)
High dose probiotic	5	263.32	±20.89	268.7 (3.1), 239.4 (3.2), 243.8 (3.3), 277.9 (3.4), 286.8 (3.5)
Low dose probiotic	5	237.78	±27.25	199.7 (4.1), 259.8 (4.2), 267.9 (4.3), 234.6 (4.4), 226.9 (4.5)

ANOVA (notes 4, 5) :  $F_{(3,14)} = 5.1651$  p = **0.013**

Notes:

1. SD = Standard deviation.
2. The data analysed has been limited in the following way: Treatment = Antibiotic, Normal Saline, High dose probiotic or Low dose probiotic and Trial = Trial 1.
3. The numbers in parentheses next to the data values are animal numbers - you can click these to access the animal's details report.
4. One-way ANOVA, fixed factor.
5.  $p \leq 0.05$  is highlighted in red.

تصویر ۹.۱ : داده‌های مربوط به تست پلاس: مدت زمانی که سر موش در بازوی بسته ماز سپری کرده است.

### Time the animal's head was in the openarms zone (s)

Treatment	N	Mean	SD (note 1)	Data (notes 2, 3)
Antibiotic	4	48.05	±20.64	55.2 (1.2), 22.0 (1.3), 43.9 (1.4), 71.1 (1.5)
Normal Saline	4	43.97	±7.61	34.9 (2.1), 49.8 (2.2), 40.5 (2.3), 50.7 (2.4)
High dose probiotic	5	20.38	±18.17	23.4 (3.1), 49.6 (3.2), 18.0 (3.3), 7.3 (3.4), 3.6 (3.5)
Low dose probiotic	5	22.34	±10.55	40.3 (4.1), 15.0 (4.2), 14.6 (4.3), 22.4 (4.4), 19.4 (4.5)

ANOVA (notes 4, 5) :  $F_{(3,14)} = 3.9791$  p = **0.030**

Notes:

1. SD = Standard deviation.
2. The data analysed has been limited in the following way: Treatment = Antibiotic, Normal Saline, High dose probiotic or Low dose probiotic and Trial = Trial 1.
3. The numbers in parentheses next to the data values are animal numbers - you can click these to access the animal's details report.
4. One-way ANOVA, fixed factor.
5.  $p \leq 0.05$  is highlighted in red.

تصویر ۹.۲ : داده‌های مربوط به تست پلاس: مدت زمانی که سر موش ها در بازوی های باز ماز سپری کرده اند.

## فرضیه هایی جدید بر اساس نتایج

افزایش اضطراب در موش ها می تواند در پی این باشد که با کاهش جمعیت باکتریایی و آسیب به میکروبیوتا روده توسط مخلوط آنتی بیوتیک، نفوذپذیری روده افزایش پیدا می کند [۷] و پروبیوتیک ها وارد لایه های عمیق تر دیواره روده می شوند. یا به طریق دیگری، با ایجاد عفونت و التهاب، نفوذپذیری روده را افزایش می دهد؛ بنابراین با افزایش نفوذپذیری آسیب بیشتری به میکروبیوتا روده وارد می شود که در پی آن اضطراب در موش افزایش می یابد. [۷] البته می توان درستی یا نادرستی فرضیه مطرح شده را با انجام آزمایش های میکروبیولوژی مخصوص بر روی همه موش های چهار گروه و بررسی بافت اپیتلیال روده به منظور سنجش سد روده ای (نفوذ پذیری روده) تعیین کرد.

## اهمیّت و کاربرد پژوهش

کشف ارتباط میکروبیوتا روده با دیگر ارگان های بدن، یکی از قطعه های مهم پازل شناخت بیشتر انسان محسوب می شود. با توجه به تحقیقاتی که پیش از این درباره ارتباط میکرووارگانیسم ها با مغز و فاکتور های شناختی صورت گرفته است، دانشمندان به این نتیجه رسیده اند که می توان میکروبیوتا روده را به عنوان مغز دوم انسان معرفی کرد. [۹] چه بسا میکروبیوتا روده کلیدی برای صندوقچه بسیاری از راز های بدن انسان باشد. بنابراین پژوهش های بیشتر در این حوزه به ما نوید فناوری ها و شیوه های نوینی را برای بهبود و تسکین اختلالات مغزی و شناختی می دهنند. همچنین با افزایش آگاهی پزشکان، متخصصان و مردم در این باره، از بروز بیماری های اعصاب شناختی مربوط به عدم توازن میکروبیوتا روده (Dysbiosis) پیشگیری می شود و شاهد افزایش سلامت روان اعضای جامعه خواهیم بود. به خصوص که در دوره هایی مانند پاندمی کرونا اهمیّت این بیماری ها به دلیل در معرض آسیب بودن سلامت روان بیشتر می شود. از این رو سرمایه گذاری در این زمینه بسیار حائز اهمیّت می باشد چرا که چه در بلند مدت و چه در کوتاه مدت نتیجه مفید آن به مردم خواهد رسید که موجب پیشرفت و ترقی جوامع مختلف انسانی می شود. در حقیقت به همین دلیل است که در کمال شگفتی جایزه های نوبل پزشکی ۲۰۱۴ و ۲۰۲۱ به طرح هایی در حوزه علوم اعصاب تعلق گرفتند. [۲۹][۳۰]

همانطور که امروزه مشاهده می شود، بسیاری از تحقیقات و پژوهش ها پیش زمینه ای بسیار مفید برای اختراعات شده اند، به طوری که مرز بین اکتشاف و اختراع روز به روز کمتر می شود. به طور مثال تحقیقات جان اکیف (John O'Keefe) در حوزه حافظه فضایی که موجب شد او برنده جایزه نوبل پزشکی ۲۰۱۴ شود [۲۹]، برای اختراع و تولید دارو هایی برای بهبود آزاییر و پروتکل های جدید بسیار کلیدی و مفید می باشد. [۳۱] بنابراین تمام شواهد مطرح شده نشان دهنده کاربردی بودن و اهمیّت بالای این پژوهش است. در نهایت می توان

اهمیت پژوهش را به طور موردی بیان کرد:

۱. شناخت بیشتر تعامل بین میکروبیوتا روده و مغز در جهت استفاده کاربردی در پیشگیری، تسکین و درمان بیماری ها.
۲. اصلاح تصور اشتباه علمی رایج مبنی بر استفاده از پروبیوتیک بعد از یک دوره مصرفی پروبیوتیک با توجه به نتایج به دست آمده.
۳. ایجاد افق های جدید برای درمان بیماری های شناختی مرتبط با میکروبیوتا روده و کمک به اصلاح باور مرسوم همواره مفید بودن پروبیوتیک ها به این علت که مطابق با این پژوهش در شرایطی می توانند مضر باشند و آسیب های شناختی ایجاد کنند.
۴. مصرف آنتی بیوتیک و پروبیوتیک در میان مردم بسیار مرسوم است به طوری که امروزه یکی از مشکلات جامعه مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها می باشد.<sup>[۳۲]</sup> به علاوه، شناخته شدن پروبیوتیک ها به عنوان دارو های بی خطر و تقویتی، موجب مصرف خودسرانه آن ها توسط مردم می شود. از این رو بررسی تأثیرات این دارو ها بر روی میکروبیوتا روده و ارتباط آن با فاکتور های شناختی اهمیت به سزاگی دارد.

## راهکار های نوین: شبیه سازی میکروبیوتا روده، روشی جدید برای درک بهتر باکتری های روده

برای هر شبیه سازی، نیاز به یک روش داریم. همچنین هر شبیه سازی برای هدف خاصی طراحی می شود و نمی تواند اهداف دیگری را پوشش دهد. به عنوان مثال، متدهای مختلف شبیه سازی جمعیت باکتری ها متفاوت از متدهای شبیه سازی ارتباط بین باکتری ها است و هر کدام معادلات جداگانه و مخصوص به خود را می طلبند. شبیه سازی که در اینجا مدنظر ما می باشد، شبیه سازی تصویری است که هدف از آن، دادن جلوه ای بصیری به کنش و واکنش های بین باکتری های روده و سلول های دیواره روده است. برای دست یافتن به این هدف، مدل مورد نظر ما مدل اتوماتای سلولی می باشد. اتوماتای سلولی مدلی از ریاضیات گسسته است که در مباحثی چون نظریه محاسبه پذیری، ریاضیات، فیزیک، سامانه های انطباقی پیچیده، زیست شناسی نظری و ریز ساختارها مورد مطالعه قرار گرفته است. اتوماتای سلولی با نام هایی مانند فضاهای سلولی، اتوماتای مفروش سازی، ساختارهای همگن، ساختارهای سلولی و ساختارهای مفروش سازی نیز بیان می گردد.<sup>[۳۳]</sup>

## مواد و روش ها:

قدم های کلیدی برای رسیدن به شبیه سازی بصری میکروبیوتا روده:

۱. دسته بندی باکتری ها و سلول ها و مشخص کردن رفتار های آن ها
۲. در نظر گرفتن متغیر های تاثیرگذار در تغییرات و واکنش های میکروبیوتا روده
۳. پیاده سازی الگوریتم شبیه سازی، بر پایه الگوریتم اصلی اتوماتای سلولی.
۴. یافتن طرح های مناسب برای معادل سازی الگوهای اتوماتا با دسته بندی باکتری ها و سلول ها.
۵. طرح ریزی چینش مناسب برای حالت اولیه اتوماتا، مطابق با شرایط زیستی واقعی.

باکتری های تاثیرگذار در این شبیه سازی به طور کلی به سه دسته باکتری های مضر، باکتری های بی ضرر، باکتری های مفید(پروبیوتیک ها) تقسیم بندی می شوند. لیست دقیق آن ها را می توانید در جدول (۹) مشاهده کنید.

#	باکتری	نفوذپذیری و اثرات ایمنی
۱	Clostridial sp	بازگردانی سروتونین خون و افزایش نفوذ پذیری روده
۲	Lactobacillus	کاهش نفوذپذیری روده با تنظیم مجدد پروتئین های غشایی که در حفظ اتصالات بین سلول های اپیتلیال مهم هستند و تولید مخاط را افزایش می دهند
۳	Escherichia coli	مشابه لاکتوباسیلوس
۴	Bifidobacterium	مشابه لاکتوباسیلوس

#	باکتری	نفوذپذیری و اثرات ایمنی
۵	Normal bacteria	فاکتورهای تغذیه ای برای لایه های مخاطی و اپیتلیال ، تکثیر سلول های Crypt و پرزها را افزایش می دهد.
۶	Spore-forming bacteria	بازگردانی سروتونین خون و colon در شرایط خاص
۷	Lactobacillus reuteri	تبديل هیستیدین به هیستامین
۸	Bifidobacterium infantis	افزایش غلظت تریپتوفان پیش ماده سروتونین در پلاسمما
۹	Campylobacter jejuni	افزایش اضطراب
۱۰	Bifidobacterium longum	ضد اضطراب اما به واگ دست نخورده نیز نیاز دارد
۱۱	Lactobacillus rhamnosus	پروبیوتیک ضد اضطراب

جدول ۹ : شرح مشخصات و گروه بندی باکتری ها [۷]

همچنین از مواد ترشّحی باکتری ها که تاثیر به سزایی در سیستم عصبی دارند، لیپوساکارید ها و اسید های چرب کوتاه زنجیر را می توان نام برد. [۷] (جدول ۱۰)

الگوریتم نرم افرا، همان الگوریتم بازی زندگی کانوی و Highlife می باشد، با این تفاوت که در این شبیه سازی، سلول ها رنگ آمیزی می شوند که نشان دهنده وجود جمعیتی از سلول های خاص مطابق با رنگشان می باشد. رنگ آمیزی هر سلول بر اساس همسایه های راسی آن تعیین می شود، بدین صورت که رنگی انتخاب می شود که تعداد همسایه های آن با همان رنگ بیشترین باشد.

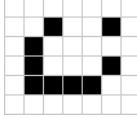
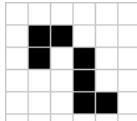
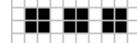
برای ترشّح مواد، در صورتی که هر خانه شطرنجی ای، ۳ سلول زنده همسایه داشته باشد و سلول زنده ای قصد تصرف آن را نداشته باشد، آن خانه به عنوان ماده ترشّحی مورد نظر تعیین می شود و در دور های بعدی به سمت راست صفحه (به سمت عمق دیواره روده) حرکت می کند. در صورتی که چیزی مانع حرکت آن به سمت راست صفحه شود، ماده ترشّحی حذف می شود و گویا از طریق مدفوع از بدن خارج شده است.

#	متاپولیت	توضیحات
۱	لیپو ساکارید ها (LPS) یا پپتید های neuro-active	گیرنده های خاصی را در سلول های اپیتلیال، نورون های روده، نورون های آوران حسی در ستون فقرات و نورون های مغزی را فعال می کنند و بر روی فعالیت سیستم عصبی مرکزی و روده ای تاثیر می گذارند. همچنین پس از یک بیماری حاد، تغییرات خلق و خوی را موجب می شوند. دیده شده است که لیپو ساکارید ها می توانند موجب افسردگی و اضطراب در مدل های حیوانی شوند.
۲	اسید های چرب کوتاه زنجیر می توانند با اتصال به گیرنده هایی پروتئینی، به عنوان مولکول های سیگنالینگ عمل کنند. این مولکول ها می توانند نفوذپذیری روده را افزایش دهند و سیستم ایمنی و سیستم عصبی سمپاتیک را درگیر کنند و با عبور از سد خونی مغز بر روی خلق و خو تاثیر بگذارند	اسید های چرب کوتاه زنجیر (SCFAs)

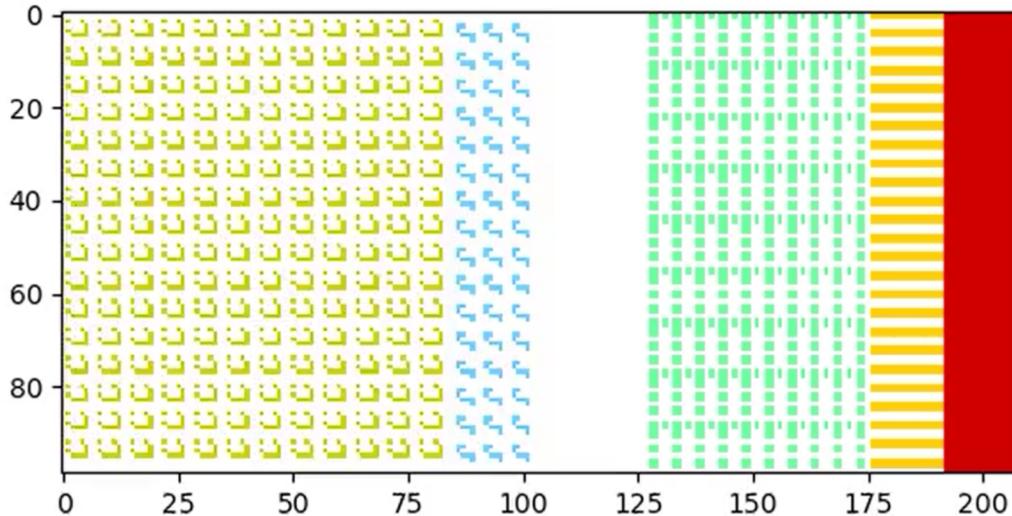
[۷] جدول ۱۰ : متابولیت های ترشحی باکتری ها

برای تعیین الگوهای هر جمعیّت سلولی نیز، باید به رفتار مخصوص به آن جمعیّت دقت کرد و الگویی را انتخاب کرد که در اتوماتا، رفتاری مشابه به آن جمعیّت سلولی را از خود نشان می دهد.(جدول ۱۱)

برای چینش اولیه الگوهای نیز، باید به لایه های مختلف دیواره روده و درون روده توجه کرد. طبق مطالعات صورت گرفته، برای لومن(lumen) می توان نسبت ۶، برای لایه مخاط (mucus) می توان نسبت ۵ و برای لایه زیر مخاط (submucosa) نسبت ۲ واحد را در نظر می گیریم.[۳۵][۳۶][۳۷] درنهایت وابسته میزان قدرت پردازشی هر کامپیوتر می توان طول و عرضی را تعیین کرد و شبیه ساز مطابق با نسبت های ذکر شده ضخامت لایه ها را تعیین می کند و الگوهای مورد نظر را در صفحه می چیند.(تصویر ۱۰)

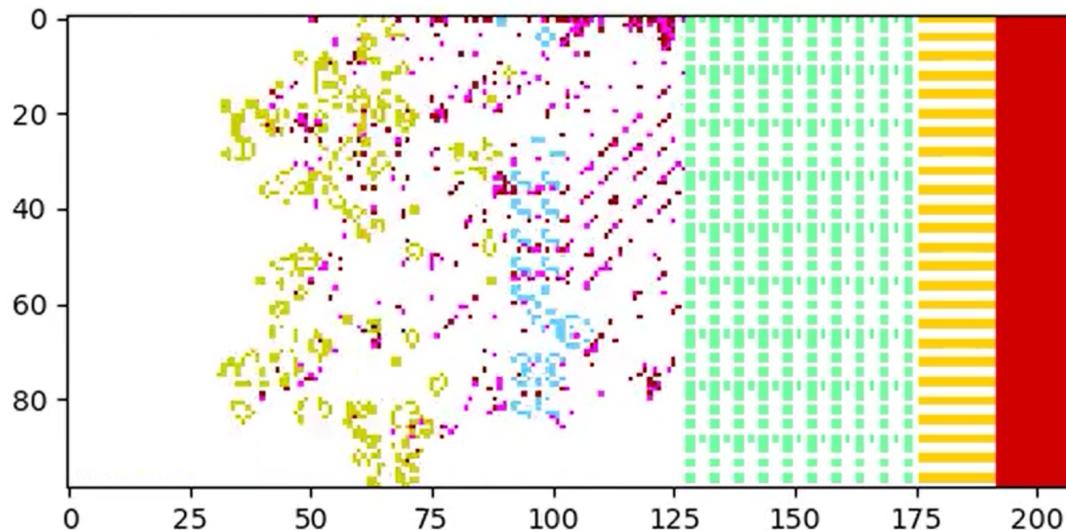
#	الگو	سلول معادل	شرح	تصویر
۱	Lightweight spaceship (LWSS)	باکتری مضر	کوچکترین سفینه قائم و دومین سفینه فضایی رایج بعد از گلایدر	
۲	Eater 1	فلور میکروبی طبیعی روده	قلاب ماهی یا همان eater اولین الگوی eater ای است که کشف شده است. این الگو به طور مستقل در سال ۱۹۷۱ به عنوان کوچک ترین still life نامتقارن، توسط تعدادی از علاقه مندان به بازی زندگی یافت شده است.	
۳	Tri-block	دیواره روده	الگو block Tri-block از سه الگو pseudo still life تشکیل شده و در دسته life ها قرار می گیرد.	

جدول ۱۱: الگوهای سلولی [۳۴]

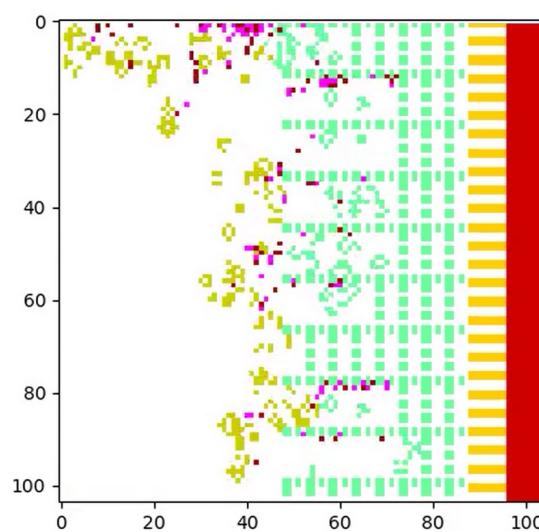


تصویر ۱۰

در پایان با تولید این برنامه شبیه سازی می توان به دیدی بهتر از فعل و انفعالات میکروبیوتا روده رسید. سورس(SOURCE) و فایل های این برنامه در سرویس گیت هاب(GitHub) بالینک <https://github.com/sinasadeghi83/MicrobiotaToBrainSimulation> در دسترس است.



تصویر ۱۱ : (بنفس و صورتی: متابولیت ها، زرد خردلی: باکتری های مهاجم، آبی: فلور میکروبی طبیعی روده، سبز: سلول های اپیتلیال، زرد: سلول های عصبی، قرمز: جریان خون)



تصویر ۱۲

## بحث ونتیجه گیری :

دنیای ما نامتناهی است اما اتوماتای سلولی اغلب بر روی شبکه متناهی شبیه‌سازی می‌شود تا یک شبکه نامتناهی. بدین ترتیب در حالت دو بعدی، جهان باید به صورت چهارگوش باشد به جای یک صفحه نامتناهی. مشکل مشاهده شده در مورد شبکه‌های محدود این است که چگونه سلول‌ها را در گوشه‌ها مدیریت نماییم. نحوه مدیریت آن‌ها بر روی مقادیر همه سلول‌ها در شبکه تاثیرگذار خواهد بود. این می‌تواند بدین صورت مدیریت شود که گوشه‌ها چپ و راست چهارگوش را به یکدیگر متصل نموده و یک تیوب ایجاد نماییم، سپس بالا و پایین گوشه‌های تیوب را به یکدیگر متصل نموده و یک چنبره ایجاد نماییم. فضاهای مربوط به سایر ابعاد به شیوه‌ای مشابه مدیریت می‌شوند. پس مشکل حدود مرزی در همسایه‌ها رفع می‌شود.<sup>[۳۳]</sup>

البته این که شبیه سازی میکروبیوتا با اتوماتای سلولی با واقعیت همخوانی دارد، جای بحث دارد. چنان که می‌توان نمونه‌هایی را در طبیعت مشاهده کرد که از اتوماتای سلولی مشخصی پیروی می‌کنند. به طور مثال معادلات دیفرانسیلی توسط تورینگ به منظور توضیح نحوه ایجاد هاشور و خط‌ها در حیوانات معرفی شدند با الگوهای اتوماتای سلولی همخوانی داشند.<sup>[۳۴]</sup>

به هر حال به جز روش‌های پیچیده ریاضی، می‌توان با به کارگیری راه‌های ساده تری مانند اتوماتا سلولی به همراه کمی خلاقیت، فعل و انفعالات سلول‌ها و باکتری‌ها را به تصویر درآورد. البته هدف از این نوع شبیه سازی در واقع درک بهتر رفتار‌های میکروبیوتا روده بوده است. توجه داشته باشید که این روش برای ارزیابی‌های دقیق و غیرقابل پیش‌بینی، کاربردی نمی‌باشد.

## سپاس و تشکر

با تشکر بسیار از آقایان محمد وحیدی اربابی، حسینی، عرفان نجف زاده و شهریار خطیبی که برای به ثمر رسیدن این پژوهش کمک‌های بسیاری کردند. همچنین از کمک‌های جناب دکتر پیتر هولزر، دکتر امانت، دکتر نوروزی، دکتر محبتی، دکتر حسینی، دکتر علی سلباف، دکتر بهرام فرهادی مقدم، دکتر عباسیان، آقای مسعود هاشمی عربی، سرکار خانم دکتر فریماه بهشتی و سرکار خانم دکتر فرخی نیز سپاسگزاریم. از مدیران، معاونین و مسئولین دبیرستان استعداد‌های درخشان شهید هاشمی نژاد ۱ دوره دوم مشهد، از جمله آقایان مجید محمودی، سید جواد عابدی شهری، محمدمهدی سر بلند، دکتر مؤمنی، لعل موسوی و علوی کمال تشکر و قدردانی را داریم. از دوست گرامیمان مهدیار رودی نیز سپاسگزاریم زیرا که بدون کمک‌های ایشان، به ثمر رسیدن این پژوهش امکان‌پذیر نبود.

1. Relationship between the gut microbiome and brain function / M Hasan Mohajeri , Giorgio La Fata , Robert E Steinert , Peter Weber / Nutr Rev / 2018 Jul 1
2. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication / Esther E.Fröhlich, Aitak Farzi, Raphaela Mayerhofer, Florian Reichmann, Angela Jačan, Bernhard Wagner, Erwin Zinser, Natalie Bordag, Christoph Magnes, Eleonore Fröhlich, Karl Kashofer, Gregor Gorkiewiczfgh, Peter Holzer / Elsiver / August 2016
3. Gut Microbiota: A Modulator of Brain Plasticity and Cognitive Function in Ageing / Katherine Leung and Sandrine Thuret / Healthcare (Basel) / 2015 Dec
4. The Human Microbiome Project / Peter J. Turnbaugh, Ruth E. Ley, Micah Hamady, Claire M. Fraser-Liggett, Rob Knight & Jeffrey I. Gordon / NATURE|Vol 449 / 18 October 2007
5. Gut Microbe Secreted Molecule Linked to Formation of New Nerve Cells in Adult Brain / - / Singhealth / June 28, 2021
6. Reduced incidence of Prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children / Dae-Wook Kang , Jin Gyoong Park, Zehra Esra Ilhan, Garrick Wallstrom, Joshua Labaer, James B

7. Modulatory Effects of Gut Microbiota on the Central Nervous System: How Gut Could Play a Role in Neuropsychiatric Health and Diseases / Shadi S Yarandi, Daniel A Peterson, Glen J Treisman, Timothy H Moran, and Pankaj J Pasricha / *J Neurogastroenterol Motil* / 2016 Apr
8. The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiol Stress* / Rea K, Dinan TG, Cryan JF / *Neurobiol Stress* / 2016
9. Gut Feelings—the "Second Brain" in Our Gastrointestinal Systems / Justin Sonnenburg, Erica Sonnenburg / *Scientific American* / May 1, 2015
10. Gut microbiota modulate neurobehavior through changes in brain insulin sensitivity and metabolism / Marion Soto, Clémence Herzog, Julian A. Pacheco, Shiho Fujisaka, Kevin Bullock, Clary B. Clish, C. Ronald Kahn / *Immediate Communication* / 18 June 2018
11. The Effects of Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains on Memory and Learning Behavior, Long-Term Potentiation (LTP), and Some Biochemical Parameters in  $\beta$ -Amyloid-Induced Rat's Model of Alzheimer's Disease / Zahra Rezaeiasl, Mahmoud Salami, Gholamreza Sepehri / *Prev Nutr Food Sci.* / 2019

12. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota / Philip Strandwitz / Brain Res / 2018 Aug 15
13. The Gut Microbiome and the Brain / Leo Galland / J Med Food / 2014 Dec
14. Dopaminergic reward system: a short integrative review / Oscar Arias-Carrión, María Stamelou, Eric Murillo-Rodríguez, Manuel Menéndez-González, Ernst Pöppel / Int Arch Med / 2010 Oct 6
15. Acetylcholine / National Center for Biotechnology Information / PubChem Database
16. Histamine in Neurotransmission and Brain Diseases / Saara Nuutinen, Pertti Panula / Histamine in Inflammation / 2010
17. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression / Paul R. Albert Faranak Vahid-Ansari, Christine Luckhart / Front. Behav. Neurosci. / 06 June 2014
18. The Role of Neurotransmitters / Kendra Cherry / verywellmind / November 24, 2020
19. Antibiotic Resistance and Plasmid DNA Contents of Streptococcus thermophilus Strains Isolated from Turkish Yoghurts / Belma Aslim, Yavuz Beyatlı / Turk J Vet Anim Sci / 16.08.2001

20. Antimicrobial susceptibility patterns of *E. coli* from clinical sources in northeast Ethiopia / M Kibret and B Abera /Afr Health Sci / 2011 Aug
21. In vitro susceptibility of *Bacillus* spp. to selected antimicrobial agents / D J Weber, S M Saviteer, W A Rutala, and C A Thomann / Antimicrob Agents Chemother / 1988 May
22. Antimicrobial Susceptibility of *Bacillus* Strains Isolated from Primary Starters for African Traditional Bread Production and Characterization of the Bacitracin Operon and Bacitracin Biosynthesis / David B. Adimpong, Kim I. Sørensen, Line Thorsen, Birgitte Stuer-Lauridsen, Warda S. Abdelgadir, Dennis S. Nielsen, Patrick M. F. Derkx, and Lene Jespersen / Appl Environ Microbiol / 2012 Nov
23. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products / Koenraad Van Hoorde, Liesbeth Masco, Evie De Brandt, Jean Swings / Journal of Antimicrobial Chemotherapy / August 2006
24. Antimicrobial Susceptibility of *Bacillus* Strains Isolated from Primary Starters for African Traditional Bread Production and Characterization of the Bacitracin Operon and Bacitracin Biosynthesis / David B. Adimpong, Kim I. Sørensen, Line Thorsen, Birgitte Stuer-Lauridsen, Warda S. Abdelgadir, Dennis S. Nielsen, Patrick M. F. Derkx, and Lene Jespersen / Appl Environ Microbiol / 2012 Nov
25. Susceptibility testing of *Bacillus* species / J. M. Andrews, R. Wise / Antimicrobial Chemotherapy / June 2002
26. Antibiotic Resistance-Susceptibility Profiles of *Streptococcus*

thermophilus Isolated from Raw Milk and Genome Analysis of the Genetic Basis of Acquired Resistances / Ana B. Flórez and Baltasar Mayo / Front Microbiol / 2017

27. Morris Water Maze Experiment / Joseph Nunez / J Vis Exp / 2008
28. Elevated Plus Maze for Mice / Munekazu Komada, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa / J Vis Exp / 2008
29. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2014 / The Nobel Assembly at Karolinska Institutet / 2014-10-06
30. Press release: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2021 / The Nobel Assembly at Karolinska Institutet / 2021-10-04
31. Medicine Nobel Prize goes for work on cells that form brain's GPS system / Ben Brumfield / CNN / November 6, 2014
32. Antibiotic overuse: a key driver of antimicrobial resistance / Laura J Shallcross, Dame Sally C Davies / Br J Gen Pract / 2014 Dec
33. Cellular automaton / Farsi Wikipedia
34. LifeWiki - Conway's Game of Life / [www.conwaylife.com](http://www.conwaylife.com)
35. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions / Q. Aziz,J. Doré,A. Emmanuel,F. Guarner,E. M. M. Quigley, / Neurogastroenterology & Motility / 20 December 2012
36. Specialized Cells of the GI System / Southern Illinois University / histology.siu.edu/erg/gicells.htm
37. Gastrointestinal Medicine / Pathway Medicine / [www.pathwaymedicine.org/gi-tract-histology](http://www.pathwaymedicine.org/gi-tract-histology)

## پیوست ها و تاییدیه ها

\_\_\_\_\_ تاریخ  
 \_\_\_\_\_ شماره  
 \_\_\_\_\_ پیوست

بسمه تعالیٰ



با احترام به استحضار هیئت داوری جشنواره جوان خوارزمی می رسانند:

**دانشکده پرستی**

گواهی می شود که آقایان ارشاد احمدزاده خرازی و سینا صادقی فعالیت های  
 پژوهشی خود را با صحت، صداقت، دقیقت و نوآوری، در مرکز علمی و تحقیقاتی دانش  
 آموزی علوم اعصاب شناختی دبیرستان شهید هاشمی نژاد ۱ دوره دوم مشهد انجام داده  
 اند و پژوهش ایشان از نظر اصول آزمایشگاهی، کار با حیوانات، طراحی آزمایش، کاربرد  
 فنی و علمی و حل مسئله مورد تایید اینجانب مسعود هاشمی عربی کارشناسی ارشد  
 رشته بیوشیمی بالینی می باشد.

با تشکر

مسعود هاشمی عربی

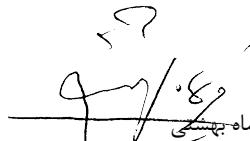
کارشناس آزمایشگاه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه هنر هنری مشهد

مشهد: میدان آزادی  
 پردیس دانشگاه

## بسمه تعالی

هیئت داوری جشنواره جوان خوارزمی با سلام و احترام

گواهی می شود که آقایان ارشیا احمدزاده خرآزی و سینا صادقی فعالیت های پژوهشی خود را با صحّت، صداقت، دقّت و نوآوری، در مرکز علمی و تحقیقاتی دانش آموزی علوم اعصاب شناختی دبیرستان شهید هاشمی نژاد ۱ دوم مشهد زیر نظر اینجانب و راهنمایان مورد تایید، انجام داده اند و پژوهش ایشان از نظر اصول آزمایشگاهی، کار با حیوانات، طرّاحی آزمایش، کاربرد فنّی و علمی و حل مسئله مورد تایید اینجانب می باشد.



با تشکر دکتر فریماه بهشتی  
استادیار دانشگاه علوم پزشکی تربیت حیدریه

۹





