

## تاثیر تجویز توام پروبیوتیک‌های لاکتوباسیل‌های مختلف و بیفیدوباکتریوم لاکتیس بر یادگیری، حافظه و فاکتورهای استرس اکسیداتیو در موش صحرایی دیابتی

### چکیده

سعیده داوری<sup>۱</sup>

سید علیرضا طلائی<sup>۲</sup>

منصوره سلطانی<sup>۲</sup>

حجت‌الله علائی<sup>۱</sup>

محمود سلامی<sup>۲\*</sup>

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۶/۲۰

**زمینه و هدف:** دیابت قندی بر پارامترهای متابولیک که منعکس کننده سطح شاخص‌های پلازما هستند تأثیر می‌گذارد. این بیماری از طریق عوامل استرس اکسیداتیو بر عملکردهای سیستم عصبی از جمله یادگیری و حافظه اثر می‌گذارد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها اثرات آنتی‌اکسیدانی دارند. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر پروبیوتیک‌ها بر یادگیری و حافظه فضایی و فاکتورهای استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی دیابتی طراحی شد.

**روش بررسی:** این تحقیق تجربی در ۴۰ رأس موش صحرایی نر که به‌طور تصادفی به چهار گروه ۱۰ تایی سالم - کنترل؛ کنترل غیردیابتی (CO)، سالم - پروبیوتیک؛ کنترل غیردیابتی دریافت‌کننده پروبیوتیک (CP)، دیابت - کنترل؛ کنترل دیابتی (DC) و دیابت - پروبیوتیک؛ کنترل دیابتی دریافت‌کننده پروبیوتیک (DP) تقسیم شدند، انجام شد. مکمل پروبیوتیک شامل باکتری‌های لاکتوباسیلوس فرمنتوم و اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس با  $10^{10}$  CFU برای هر باکتری، همراه با آب آشامیدنی، هر ۱۲ ساعت، به مدت هشت هفته تجویز شد. یادگیری و حافظه فضایی توسط ماز آبی موریس و انسولین و فاکتورهای استرس اکسیداتیو (۸- هیدروکسی ۲- داکسی گوانوزین؛ 8-OHdG و سوپراکسید دیسموتاز؛ SOD) با کیت‌های آزمایشگاهی ارزیابی شدند. **یافته‌ها:** دریافت مخلوط پروبیوتیک‌ها اختلال ایجاد شده در روند یادگیری ( $P=0/008$ ) و میزان تثبیت حافظه فضایی ( $P=0/01$ ) موش‌های صحرایی دیابتی را بهبود داد. همچنین باعث افزایش انسولین ( $P<0/001$ )، افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ( $P=0/007$ )، کاهش قندخون ( $P=0/006$ )، و کاهش فاکتور 8-OHdG ( $P<0/001$ ) سرم آن‌ها شد.

**نتیجه‌گیری:** مکمل‌های پروبیوتیک، سطح انسولین و گلوکز سرم را در بیماری دیابت به سطح نرمال نزدیک کرده و باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند. درمان با پروبیوتیک باعث بهبود روند یادگیری و حافظه فضایی موش صحرایی دیابتی می‌شود. ارتباط بین پدیده‌های متابولیک و عملکردهای رفتاری نیاز به بررسی بیشتر دارد.

**کلمات کلیدی:** دیابت قندی، پروبیوتیک، یادگیری و حافظه فضایی، استرس اکسیداتیو، موش صحرایی.

\* نویسنده مسئول: کاشان، بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

تلفن: ۰۳۶۱-۵۵۷۸۰۱۰

E-mail: salami-m@kaums.ac.ir

### مقدمه

مقاومت به انسولین وجود دارد.<sup>۱</sup> سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی با افزایش بیش از حد قند خون که منجر به افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد می‌شود، متوقف گردیده<sup>۲</sup> و به اصطلاح "استرس اکسیداتیو" ایجاد می‌شود. در واقع استرس اکسیداتیو عدم تعادل بین فاکتورهای اکسیدان و آنتی‌اکسیدان به سمت افزایش عوامل اکسیدان است که

دیابت شیرین (Diabetes mellitus) یک بیماری مزمن متابولیک است. در نوع یک آن به علت تخریب سلول‌های بتای پانکراس انسولین وجود نداشته یا بسیار کم ترشح می‌شود و در نوع دو

بیفیدوباکتریوم‌ها است.<sup>۲۵</sup> پروبیوتیک‌ها از طریق کاهش آسیب‌های التهابی و افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز، استرس اکسیداتیو را مهار می‌کنند.<sup>۱۸</sup> با توجه به این که یکی از عوارض شناخته شده دیابت در دیابت ایجاد اختلال در حافظه و یادگیری به علت افزایش بار اکسیدان بدن است و این که اثرات آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌ها در مطالعات متعدد به اثبات رسیده است، مطالعه حاضر تلاشی در جهت بررسی اثر مخلوطی از سه نوع پروبیوتیک به‌عنوان کنترل‌کننده‌های فاکتورهای استرس اکسیداتیو بر روند یادگیری و حافظه در موش‌های صحرایی دیابتی است.

## روش بررسی

حیوانات و تجویز پروبیوتیک: این مطالعه به‌روش تجربی بر روی ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان انجام شد که به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: ۱- کنترل (CO)؛ تغذیه شده با غذای استاندارد حیوانات آزمایشگاهی، ۲- کنترل- پروبیوتیک (CP)؛ تغذیه شده با پروبیوتیک همراه با آب آشامیدنی (هر ۱۲ ساعت، یک گرم برای هر موش)، ۳- دیابت- کنترل (DC)؛ تغذیه شده با غذای استاندارد و ۴- دیابت- پروبیوتیک (DP)؛ تغذیه شده با پروبیوتیک همراه با آب آشامیدنی (هر ۱۲ ساعت، یک گرم برای هر موش). در هر قفس یک سر حیوان نگهداری می‌شد و حیوانات از نظر دسترسی به آب و مواد غذایی آزاد بودند. درجه‌ی حرارت محل نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰-۵۰٪ و سیکل روشنایی ۱۲ ساعته (شروع از هفت صبح) بود.

حیوانات مورد مطالعه مکمل پروبیوتیک مخلوطی از سه باکتری لاکتوباسیل/اسیدوفیلوس (ATCC 4356)، لاکتوباسیل فرمنتوم (ATCC 9338) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (DSM 10140) به نسبت مساوی (۳۳۴ میلی‌گرم از هر سوش) با  $10^{11}$ ~CFU Colony Forming Unit برای هر باکتری همراه با آب آشامیدنی، هر ۱۲ ساعت (دو بار در روز) به‌مدت ۵۶ روز (هشت هفته) دریافت کردند. دریافت پروبیوتیک از روز بعد از القای دیابت آغاز شد. سوش‌های پروبیوتیک مورد استفاده با فرمولاسیون محلول در آب از شرکت زیست تخمیر (تهران، ایران)

منجر به آسیب سلولی می‌شود.<sup>۳</sup> استرس اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از آن باعث بروز انواع مختلفی از فرایندهای پاتولوژیک در بیماری‌های مختلف از جمله دیابت، می‌باشد.<sup>۴</sup> یکی از عوارض ثابت شده دیابت که معمولاً در درازمدت در انسان و حیوانات آزمایشگاهی دیده می‌شود،<sup>۵</sup> ایجاد اختلال در یادگیری، حافظه فضایی و پردازش اطلاعات پیچیده است.<sup>۶،۷</sup> که در هر دو نوع دیابت گزارش شده است.<sup>۸،۹</sup>

چندین بیومارکر برای سنجش استرس اکسیداتیو پیشنهاد شده که یکی از آن‌ها تعیین سطح ۸- هیدروکسی ۲- داکسی گوانوزین (8-OHdG) است که ثابت شده میزان آن در سرم یا ادرار بیماران دیابتی در نتیجه استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد.<sup>۱۰</sup> گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی (Reactive Oxygen Species, ROS) به گوانین موجود در ساختار DNA حمله کرده و آن را به فرم 8-OHdG تبدیل می‌کنند که می‌تواند به جای سیتوزین به تیمیدین متصل شود؛ براین اساس سطح 8-OHdG به‌عنوان بیومارکر جهش‌زایی ناشی از استرس اکسیداتیو و به‌عنوان حساس‌ترین و مفیدترین مارکر آسیب اکسیداتیو DNA در نظر گرفته می‌شود.<sup>۱۱،۱۲</sup>

بر اساس یافته‌های تحقیقات مختلف وجود سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase, SOD) در محیط‌های داخل و خارج سلولی برای پیشگیری و مقابله با بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو از جمله دیابت بسیار مهم است.<sup>۱۳،۱۴</sup> بنابراین سنجش فعالیت SOD یک فاکتور مهم به‌منظور تعیین قابلیت‌های آنتی‌اکسیدانی یک سیستم بیولوژیکی محسوب می‌شود. بهبود موش‌های صحرایی دیابتی با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها این نظریه را تأیید می‌کند که استرس اکسیداتیو یک فاکتور مهم در توسعه و بروز عوارض عصبی ناشی از دیابت است.<sup>۱۵،۱۶</sup>

آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل برخی ویتامین‌ها، تعدادی از عناصر کم‌یاب<sup>۱۷</sup> و پروبیوتیک‌ها<sup>۱۸،۱۹</sup> هستند. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به‌میزان مناسب مصرف شوند نتایج مفیدی برای سلامت میزبان در پی خواهند داشت.<sup>۲۰</sup> این میکروارگانیسم‌ها در دامنه وسیعی از بیماری‌ها مانند عفونت‌ها، آلرژی‌ها و بیماری‌های التهابی استفاده می‌شوند<sup>۲۱،۲۲</sup> که به‌منظور بهبود اثر آن‌ها ترکیبی از گونه‌های مختلف باکتریایی می‌تواند مصرف شود.<sup>۲۳،۲۴</sup> انتخاب شایع مخلوطی از لاکتوباسیلوس‌ها و

خریداری شد. لازم به ذکر است که پروتکل آزمایش‌های انجام‌شده در این تحقیق به تأیید کمیته نگه‌داری و استفاده از حیوانات دانشگاه‌های علوم پزشکی کاشان و اصفهان رسید.

القای دیابت: دیابت القا شده توسط استرپتوزوسین به‌عنوان یک مدل مقرون به صرفه و پرکاربرد در تحقیقات پیشنهاد می‌شود که در اغلب گونه‌های جونندگان قابل استفاده است.<sup>۲۶</sup> برای القای دیابت، ۶۵ میلی‌گرم استرپتوزوسین (Sigma-Aldrich, USA) (محلول در بافر سیترات ۰/۱ مولار، pH=۴/۵) به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (تک دوز) به‌صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد. پنج روز بعد از تزریق، در صورتی که سطح قند خون بیش از ۲۰۰ میلی‌گرم در هر دسی‌لیتر بود، موش‌ها دیابتی تلقی می‌شدند.<sup>۷</sup> سطح قند خون حیوانات در انتهای مطالعه اندازه‌گیری می‌شد.

لازم به ذکر است که هم‌علایم فضایی موجود در محل آزمایش و هم موقعیت سکو در یکی از چهار قسمت ماز، در طول آزمایشات ثابت بود. در هر صورت اگر در مدت ۶۰ ثانیه موش نمی‌توانست سکو را پیدا کند، آزمایش‌کننده حیوان را به آرامی به سوی سکو هدایت می‌کرد تا این‌که موش سکو را یافته و برای ۱۵ ثانیه روی آن قرار گیرد؛ این پدیده معمولاً در اولین جلسات آزمایش اتفاق می‌افتد. پس از گذشت این زمان، حیوان از سکو برداشته شده و بعد از خشک شدن با یک حوله به قفس خود برگردانده می‌شد. پس از ۱۰ دقیقه آزمایش مجدداً تکرار می‌گردید؛ با این تفاوت که محل رها شدن موش در ماز نسبت به مرحله قبل متفاوت بود. هر موش چهار جلسه روزانه با فاصله ۱۰ دقیقه‌ای را تجربه می‌کرد. در مجموع این مرحله از آزمایش به‌مدت سه روز طول کشید که طی آن ۱۲ جلسه آزمایش روی حیوانات انجام گردید.<sup>۲۷</sup> داده‌های مربوط به مدت زمان سپری‌شده در ماز توسط حیوان به‌منظور یافتن سکوی پنهان استخراج و آنالیز شدند.

الف- مرحله یادگیری یا آموزش: طی این مرحله، حیوان از یکی از قطب‌های چهارگانه ماز در حالی که روی آن به طرف دیواره ماز بود، در آب رها می‌شد. (لازم به ذکر است که انتخاب ناحیه شروع آزمایش به‌طور تصادفی بوده و به‌وسیله برنامه نرم‌افزاری پیشنهاد می‌گردید) با توجه به اندازه ماز و نوع حیوان (موش صحرایی)

ب- مرحله بازخوانی یا پروب (Probe trial): مرحله پروب در روز چهارم انجام گردید. در این مرحله (با توجه به این‌که حیوان محل سکوی پنهان را می‌داند) سکو از ماز برداشته شده و آزمایش انجام می‌شد. در این مرحله از آزمایش این نکته مورد توجه قرار گرفت که موش در حین آزمایش (که قاعداً قادر به یافتن سکو نیست) بیش‌ترین وقت خود را در کدام‌یک از قسمت‌های چهارگانه ماز گذرانده است. به‌عنوان مثال، اگر بیش‌ترین زمان مربوط به قسمتی بود که قبلاً سکو در آن بوده است، روشن می‌شد که حیوان بر اساس

ماز آبی موریس: سنجش یادگیری و تثبیت حافظه فضایی توسط ماز آبی موریس به‌طور گسترده در تحقیقات انجام می‌شود که یک تانک آب با قطر ۱۵۰ و عمق ۷۰ cm است که تا ارتفاع ۵۰ سانتی‌متری آن از آب پر می‌شود. ماز به‌طور فرضی به چهار ربع مساوی شمالی، جنوبی، شرقی و غربی تقسیم شده و یک سکوی نجات در وسط یکی از این چهار ربع قرار می‌گیرد؛ به‌طوری که حدود ۱/۵ cm زیر سطح آب واقع می‌شود و از بیرون قابل دیدن نیست. حرارت آب در آن حدود ۲۷-۲۵ °C تنظیم می‌شود. ماز در اتاقی قرار می‌گیرد که در آن علایم فضایی مختلفی وجود دارد که در طول آزمایشات ثابت بوده و برای حیوان در ماز قابل دیدن است. این مجموعه از طریق یک دوربین ردیاب که در ارتفاع ۱۸۰ سانتی‌متری و در بالای مرکز ماز آبی قرار گرفته است، مونیتور شده و از طریق اتصال به کامپیوتر اطلاعات مربوط به آزمایش در حال انجام، ذخیره می‌گردد. جهت انجام، ثبت و آنالیز بعدی داده‌های حاصل از آزمایش از نرم‌افزار اختصاصی "ردیاب دو، ویرایش یک" که توانایی پذیرش تنظیمات مختلف برای آزمایشات مختلف در ماز آبی را دارد، استفاده شد.

مراحل انجام آزمایش:

الف- مرحله یادگیری یا آموزش: طی این مرحله، حیوان از یکی از قطب‌های چهارگانه ماز در حالی که روی آن به طرف دیواره ماز بود، در آب رها می‌شد. (لازم به ذکر است که انتخاب ناحیه شروع آزمایش به‌طور تصادفی بوده و به‌وسیله برنامه نرم‌افزاری پیشنهاد می‌گردید) با توجه به اندازه ماز و نوع حیوان (موش صحرایی)

یافتن سکو می‌کردند. نتایج مقایسه بین گروهی نیز نشان می‌دهد که اختلاف بین روند یادگیری در گروه‌های مختلف آزمایش معنی‌دار است ( $P < 0/0001$ ;  $F_{3, 156} = 37/623$ ). همان‌طور که در نمودار ۱ مشخص شده است القای دیابت باعث افزایش مدت زمان یادگیری در موش‌ها شده ( $P < 0/0001$ ) و مصرف مکمل پروبیوتیک‌ها منجر به کاهش زمان سپری‌شده برای یافتن سکوی هدف در موش‌های دیابتی گردیده است (اختلاف بین گروه‌های DC و DP;  $P = 0/008$ ). جالب اینجاست که با مقایسه بین روند یادگیری گروه‌های CO و DP مشخص می‌شود که این اختلاف معنی‌دار نیست ( $P = 0/373$ ). همچنین، در موش‌های سالم نیز استفاده از پروبیوتیک باعث بهبود روند یادگیری شد ( $P < 0/0001$ ).

مرحله بازخوانی (پروپ): در این مرحله مدت زمانی که حیوانات مورد مطالعه در ربع دارای سکو در مرحله قبل گذراندند، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مقایسه بین گروه‌ها با آزمون آنالیز واریانس بیان‌گر این مطلب است که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایش شده وجود دارد ( $P < 0/0001$ ;  $F_{3, 39} = 9/069$ ). با توجه به نتایج آزمون تعقیبی Bonferroni می‌توان دریافت که موش‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل زمان کم‌تری را در ربع دارای سکو گذراندند ( $P < 0/0001$ )، همان‌گونه که در نمودار ۲ نشان داده شده است بعد از تجویز پروبیوتیک زمان سپری‌شده در ربع دارای سکو توسط موش‌های دیابتی افزایش یافت ( $P = 0/01$ ) و این افزایش به حدی بود که اختلاف معنی‌داری بین گروه دیابت- پروبیوتیک و گروه سالم- کنترل مشاهده نشد ( $P = 0/613$ ).

اثر پروبیوتیک بر قند خون و انسولین: قند خون موش‌ها در روز آخر آزمایش توسط گلوکومتر سنجیده شد. طبق انتظار القای دیابت باعث افزایش بیش از پنج برابر قند خون در موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های سالم ( $520/6 \pm 28/15$  در برابر  $96/8 \pm 3/3$  میلی‌گرم در دسی‌لیتر) شد ( $P < 0/0001$ ; DC, CO). اگرچه دریافت پروبیوتیک میزان قند خون را در موش‌های دیابتی کاهش داد ( $P = 0/006$ ; DC, DP)، اما اختلاف بین گروه دیابت- پروبیوتیک با گروه سالم- کنترل همچنان معنی‌دار باقی ماند ( $P < 0/0001$ ; DP, CO).

نتایج حاصل از سنجش انسولین سرم نیز به این صورت بود (جدول ۱): القای دیابت باعث نصف شدن میزان انسولین سرم در موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های سالم ( $3/26 \pm 0/14$  در برابر

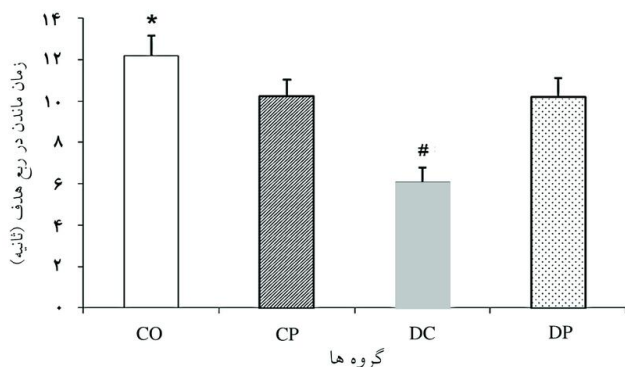
علایم بینایی- فضایی خارج از ماز سکو را پیدا می‌کرده است و نه به‌طور اتفاقی و یا به‌دلیل دیدن سکو در زیر آب. لازم به ذکر است که در این مرحله از آزمایش هر جلسه ۶۰ ثانیه طول کشید و به‌دلیل عدم وجود سکو پس از پایان مدت، موش از ماز برداشته می‌شد. این مرحله از آزمایش برای هر موش یک بار انجام گردید و مدت زمان سپری‌شده در ربع صحیح ماز (که در مرحله قبل واجد سکو بود) معیار میزان یادگیری و یادآوری قرار گرفت.

سنجش انسولین و بیومارکرهای استرس اکسیداتیو: سطح انسولین، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و میزان فاکتور تخریب DNA (8-OHdG) در سرم خون در روز آخر آزمایش با استفاده از کیت‌های تجاری (Cayman Chemical, USA) و با روش ELISA ارزیابی شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: نتایج به‌دست آمده از آزمایشات مرحله یادگیری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویراست ۲۰ و با روش آماری Repeated measures ANOVA مقایسه گردیدند. برای نشان دادن ساده‌تر و درک بهتر رفتار حیوانات در دو گروه مورد آزمایش، میانگین رفتار حیوانات طی چهار جلسه روزانه در شکل‌ها به‌صورت یک نقطه نمایش داده شده است. همچنین، داده‌های مربوط به مرحله پروپ و نتایج حاصل از سنجش وزن، قند خون، انسولین و بیومارکرهای استرس اکسیداتیو (SOD, 8-OHdG) با استفاده از آماره Two-way ANOVA و پس از آزمون Bonferroni مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.  $P < 0/05$  معنی‌دار تلقی شد.

## یافته‌ها

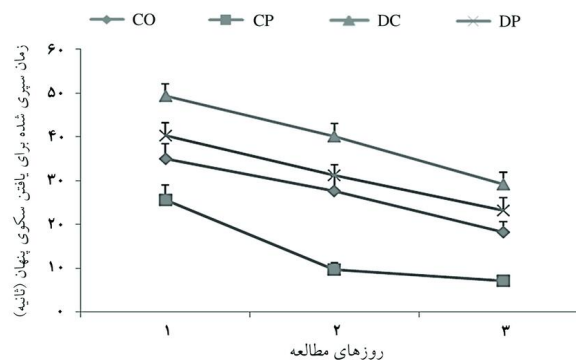
مرحله یادگیری: با مطالعه داده‌های جمع‌آوری شده از مجموع سه روز آموزش حیوانات در ماز آبی موریس و با توجه به معنی‌دار نبودن آزمون کرویت موخلی (Mauchly's test of sphericity),  $P = 0/249$ ) نتایج آزمون Sphericity Assumed نشان داد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین مدت زمان سپری‌شده برای یافتن سکو در روزهای مختلف در همه گروه‌ها وجود دارد ( $P < 0/0001$ ;  $F_{2, 312} = 48/005$ ). یعنی، همان‌گونه که در نمودار ۱ نشان داده شده است، هم‌زمان با پیشرفت روزانه مراحل یادگیری، حیوانات هر دو گروه (سالم و دیابتی) محل سکوی پنهان را آموخته و مدت زمان کم‌تری را صرف



نمودار- ۲: مدت زمانی که موش‌های گروه‌های آزمایش در مرحله بازخوانی اطلاعات آموخته شده برای یافتن سکوی پنهان (برداشته شده) صرف کردند. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف میانگین استاندارد نمایش داده شده است.

\* اختلاف بین DC, CO ( $P < 0.0001$ ) # اختلاف بین DC, DP ( $P = 0.01$ )

CO: Control, CP: Control Probiotic, DC: Diabetic Control, DP: Diabetic Probiotic



نمودار- ۱: زمان لازم جهت یافتن سکوی پنهان در حیوانات (در روزهای مختلف آزمایش). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف میانگین استاندارد حاصل از مجموع جلسات انجام شده طی یک روز نمایش داده شد. روند بهبود یادگیری در هر چهار گروه نمایان است. دیابت باعث اختلال در روند یادگیری حیوانات شد و اختلاف بین گروه‌های CO و DC معنی‌دار بود ( $P < 0.0001$ ). دریافت پروبیوتیک باعث بهبود روند یادگیری دیابتی شد. اختلاف بین گروه‌های DC و DP معنی‌دار بود ( $P = 0.008$ ) و در گروه‌های CO و DP معنی‌دار نیست ( $P = 0.373$ ).

CO: Control, CP: Control Probiotic, DC: Diabetic Control, DP: Diabetic Probiotic

( $P = 0.007$ ), اما اختلاف بین گروه دیابت- پروبیوتیک با

گروه سالم- کنترل هم‌چنان معنی‌دار باقی ماند ( $P = 0.034$ , DP, CO).

اثر پروبیوتیک بر میزان فاکتور تخریب DNA (8-OHdG): القای

دیابت موجب افزایشی معنی‌دار در میزان فاکتور تخریب (8-OHdG)

DNA در گروه دیابت- کنترل نسبت به گروه سالم- کنترل شد

( $P < 0.0001$ , DC, CO). دریافت پروبیوتیک میزان این فاکتور را

در سرم موش‌های دیابتی به‌طور معنی‌داری کاهش داد

( $P < 0.0001$ , DC, DP)، اما اختلاف بین گروه دیابت- پروبیوتیک با

گروه سالم- کنترل هم‌چنان معنی‌دار باقی ماند ( $P = 0.001$ , DP, CO).

نمودار- ۳ و نمودار- ۴ به ترتیب اثر پروبیوتیک بر میزان فعالیت آنزیم

SOD و سطح فاکتور 8-OHdG در خون را نشان می‌دهد.

$7/25 \pm 0/22$  نانوگرم در میلی‌لیتر) شد ( $P < 0.0001$ , DC, CO). دریافت

پروبیوتیک میزان انسولین سرم را در موش‌های دیابتی افزایش داد

( $P < 0.0001$ , DC, DP)، اما اختلاف بین گروه دیابت- پروبیوتیک با

گروه سالم- کنترل هم‌چنان معنی‌دار باقی ماند ( $P < 0.0001$ , DP, CO).

اثر پروبیوتیک بر فاکتورهای استرس اکسیداتیو: اثر پروبیوتیک بر

میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD): بعد از القای دیابت

مشاهده شد که میزان فعالیت آنزیم SOD در گروه دیابت- کنترل

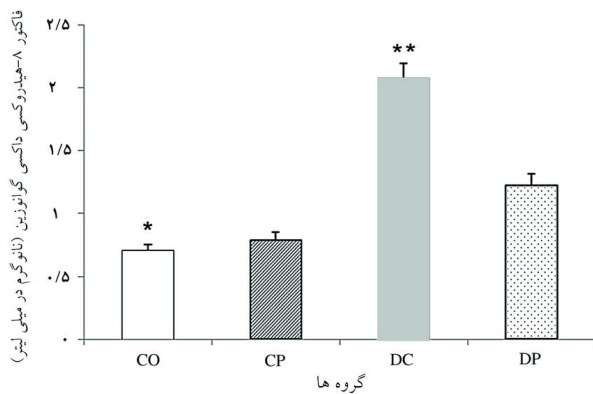
نسبت به گروه سالم- کنترل کاهش معنی‌داری پیدا کرد

( $P < 0.0001$ , DC, CO). دریافت پروبیوتیک میزان فعالیت آنزیم

SOD سرم را در موش‌های دیابتی به‌طور معنی‌داری افزایش داد

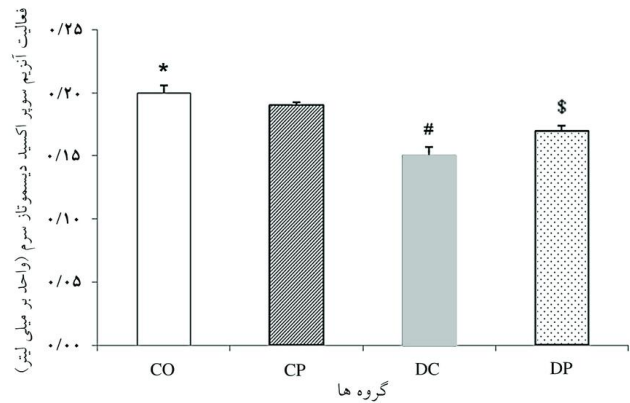
جدول- ۱: میزان قند خون و انسولین سرم در روز انتهایی آزمایش

گروه‌های آزمایش			فاکتورهای مورد بررسی
دیابت- پروبیوتیک	دیابت- کنترل	کنترل- پروبیوتیک	کنترل- سالم
$41.0/1 \pm 33/44$	$52.0/6 \pm 28/15$	$10.1/6 \pm 2/87$	$96/8 \pm 3/3$
			قند خون (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)
$5/88 \pm 0/19$	$3/26 \pm 0/14$	$6/81 \pm 0/18$	$7/25 \pm 0/22$
			انسولین سرم (نانوگرم در میلی‌لیتر)



نمودار-۴: میزان فاکتور تخریب DNA (8-OHdG) در سرم موش‌ها (نانوگرم در میلی لیتر) در روز آخر آزمایش در گروه‌های مختلف. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد نمایش داده شده است. \* اختلاف بین CO، DC، # اختلاف بین DC، DP ( $P < 0.001$ ) و \* اختلاف بین CO، DP ( $P = 0.001$ ) \*\* اختلاف بین CO، DC ( $P < 0.001$ ) و \* اختلاف بین DC، DP ( $P < 0.001$ )

CO: Control, CP: Control Probiotic, DC: Diabetic Control, DP: Diabetic Probiotic



نمودار-۳: میزان فعالیت آنزیم SOD سرم موش‌ها (واحد در میلی لیتر) در روز آخر آزمایش در گروه‌های مختلف. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد نمایش داده شده است. \* اختلاف بین CO، DC، # اختلاف بین DC، DP ( $P < 0.001$ ) و \$ اختلاف بین CO، DP ( $P = 0.034$ )

CO: Control, CP: Control Probiotic, DC: Diabetic Control, DP: Diabetic Probiotic

## بحث

بر اساس یافته‌های محققان، استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت، منجر به ایجاد مکانیسم‌های تخریبی هم‌چون اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها و متعاقب آن نقص در متابولیسم انرژی و گلوکز در مغز، تخریب DNA و آسیب به سلول‌های بدن از جمله نورون‌ها و در نتیجه بروز اختلال در عملکرد سیستم عصبی محیطی و مرکزی می‌شود.<sup>۲۸،۲۹</sup> در مطالعات انجام شده بر روی انسان‌ها و حیوانات آزمایشگاهی دیابتیک وجود اختلال در روند یادگیری، تثبیت حافظه و اعمال شناختی به اثبات رسیده است.<sup>۳۰،۳۱</sup> ما نیز در این مطالعه به نتیجه مشابه دست یافتیم. طبق اطلاعاتی که در قسمت یافته‌ها ذکر کردیم اختلال در روند یادگیری و حافظه موش‌های دیابتی واضح بود. تخریب DNA از مهم‌ترین مکانیسم‌های فعال شده توسط استرس اکسیداتیو است که باعث افزایش سطح فاکتور 8-OHdG در خون و ارادر می‌شود.<sup>۳۱،۳۲</sup> داده‌های حاصل از بررسی ما نیز افزایش معنی‌داری در میزان این فاکتور در سرم موش‌های دیابتی نسبت به گروه سالم را نشان داد.

طبق بررسی انجام شده، تاکنون مطالعه‌ای درباره اثر پروبیوتیک بر روند یادگیری و تثبیت حافظه فضایی در موش‌های مبتلا به دیابت صورت نگرفته، اما در مطالعات انسانی شواهدی مبنی بر نقش داشتن فلور میکروبی روده بر عملکرد سیستم عصبی مرکزی وجود دارد که

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از مخلوط پروبیوتیک‌ها، باعث بهبود روند یادگیری فضایی موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود؛ بدین معنی که موش‌های دیابتی دریافت‌کننده پروبیوتیک نسبت به موش‌های دیابتی کنترل که پروبیوتیک دریافت نکردند به‌منظور یافتن سکوی پنهان زمان کم‌تری را در ماز سپری کردند. هم‌چنین، پروبیوتیک بر روند یادگیری حیوانات گروه کنترل تاثیر گذاشت و باعث بهبود عملکرد موش‌ها شد. به‌علاوه، پروبیوتیک در روند تثبیت حافظه موش‌های صحرایی مؤثر بود و موش‌های گروه دیابت- پروبیوتیک عملکرد بهتری نسبت به گروه دیابت- کنترل از خود نشان دادند. هم‌چنین، داده‌های حاصل نشان داد که مصرف پروبیوتیک در موش‌های دیابتی از کاهش وزن ناشی از دیابت به‌خوبی جلوگیری می‌کند؛ به‌طوری که اختلاف معنی‌داری بین گروه CO و DP وجود نداشت. نتایج این مطالعه بیان داشت که پروبیوتیک از کاهش انسولین و افزایش قند خون ناشی از دیابت جلوگیری کرد، اما نه به‌طور کامل؛ به‌گونه‌ای که اختلاف بین گروه‌های DP و DC معنی‌دار شد، اما در عین حال اختلاف بین گروه‌های DP و CO معنی‌دار باقی ماند. نتایج به‌دست آمده از سنجش فاکتورهای استرس اکسیداتیو نیز بیان‌گر این بود که پروبیوتیک می‌تواند کاهش فعالیت آنزیم SOD و افزایش میزان فاکتور تخریب DNA (8-OHdG) ناشی از دیابت را بهبود بخشد.



سرعت کاهش انسولین، افزایش سطح گلوکز خون و نیز میزان هموگلوبین گلیکوزیله را پایین می‌آورند. به علاوه، پروبیوتیک‌ها به‌طور معنی‌داری آسیب اکسیداتیو ایجاد شده توسط استرپتوزوسین را در بافت پانکراس از طریق مهار پراکسیداسیون لیپیدی و تشکیل نیتریک اکساید، کاهش، و مقدار آنتی‌اکسیدان‌ها از قبیل گلوتاتیون، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهند.<sup>۳۹،۴۰</sup> با توجه به مطالب عنوان شده، مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کند که مصرف پروبیوتیک‌ها ممکن است باعث تاخیر در بروز اختلال یادگیری و حافظه و یا بهبود آن از طریق افزایش ترشح انسولین، کاهش قند خون و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در بیماری دیابت شوند.

**سپاسگزاری:** این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مشترک تحت عنوان "بررسی اثر مخلوط پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس بر القای LTP در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوسین" مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به کد ۳۹۰۴۹۱ و دانشگاه علوم پزشکی کاشان به کد ۹۰۲۰ در سال ۱۳۹۰ می‌باشد، که با حمایت مشترک معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان اجرا شده است. نویسندگان مقاله، از اعضا و کارکنان محترم مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، به دلیل همکاری‌های بی‌دریغ ایشان، و نیز از جناب آقای دکتر محمدرضا فاضلی - رئیس مرکز فناوری‌های دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران - به دلیل ارائه راهنمایی‌های ارزشمند، کمال تشکر و قدردانی را به‌عمل می‌آورند.

بیان می‌کند مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها و تعادل جمعیت میکروبی دستگاه گوارش اثرات مفیدی بر خلق و خوی و پریشانی روانی دارد.<sup>۳۳</sup> تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌ها در پیشگیری از تخریب نورون‌ها و اختلال اعمال شناختی در دیابت مؤثر هستند و تجویز ویتامین E و ملاتونین از اختلال یادگیری و حافظه ناشی از دیابت جلوگیری می‌کند،<sup>۳۴</sup> همچنین یافته‌های Zhang نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌ها و دوزهای پایین SOD و کاتالاز در حفاظت از بروز نقایص اعمال شناختی ناشی از استرس اکسیداتیو در سیستم عصبی مؤثر هستند.<sup>۳۵</sup>

تاثیر آنتی‌اکسیدانی لاکتوباسیلوس فرمنتوم به‌عنوان یکی از سوش‌های مصرفی در مکمل‌ها بسیار خوب گزارش شده است.<sup>۱۹،۳۶</sup> همچنین نتایج مطالعات صورت گرفته در مورد اثر پروبیوتیک‌ها بر استرس اکسیداتیو نشان می‌دهد که مصرف پروبیوتیک در حیوانات مبتلا به پانکراتیت حاد باعث افزایش بیوسنتز گلوتاتیون و کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود.<sup>۳۷</sup> به علاوه، انواعی از پروبیوتیک‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما، کبد و روده را افزایش داده<sup>۳۸</sup> و نیز باعث افزایش بیان ژن SOD می‌شوند.<sup>۱۸</sup> نتایج مطالعه حاضر نیز افزایش میزان فعالیت آنزیم SOD را در گروه موش‌های دیابتی مصرف‌کننده پروبیوتیک نشان داد.

Yadav، نشان داد که تجویز خوراکی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی پیشرفت دیابت ایجاد شده توسط استرپتوزوسین در موش‌ها را به تاخیر می‌اندازد.<sup>۳۹</sup> بنابراین عدم تحمل گلوکز، هیپرگلیسمی و دیس‌لیپیدمی دیرتر در این موش‌ها بروز کرده و استرس اکسیداتیو در آن‌ها کاهش می‌یابد. پروبیوتیک‌ها

## References

1. Song Y, Wang J, Li X-k, Cai L. Zinc and the diabetic heart. *Biometals* 2005;18(4):325-32.
2. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003;52(1):1-8.
3. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;82(2):291-5.
4. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* 2000;28(9):1387-404.
5. Grzeda E, Wiśniewska RJ. Differentiations of the effect of NMDA on the spatial learning of rats with 4 and 12 week diabetes mellitus. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2008;68(3):398-406.
6. Liang XC, Guo SS, Hagino N. Current status of clinical and experimental researches on cognitive impairment in diabetes. *Chin J Integr Med* 2006;12(1):68-74.
7. Malone JI, Hanna S, Saporta S, Mervis RF, Park CR, Chong L, et al. Hyperglycemia not hypoglycemia alters neuronal dendrites and impairs spatial memory. *Pediatr Diabetes* 2008;9(6):531-9.
8. Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006;5(1):64-74. Review. Erratum in: *Lancet Neurol* 2006;5(2):113.
9. Cukierman T, Gerstein HC, Williamson JD. Cognitive decline and dementia in diabetes: Systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia* 2005;48(12):2460-9.

10. Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radic Biol Med* 2002;33(7):875-85.
11. Ock CY, Kim EH, Choi DJ, Lee HJ, Hahm KB, Chung MH. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2012;18(4):302-8.
12. Tuzgen S, Hanimoglu H, Tanriverdi T, Kacira T, Sanus GZ, Atukeren P, et al. Relationship between DNA damage and total antioxidant capacity in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007;19(3):177-81.
13. Atli T, Keven K, Avci A, Kutlay S, Turkcapan N, Varli M, et al. Oxidative stress and antioxidant status in elderly diabetes mellitus and glucose intolerance patients. *Arch Gerontol Geriatr* 2004;39(3):269-75.
14. Zis P, Dickinson M, Shende S, Walker Z, Strydom A. Oxidative Stress and Memory Decline in Adults with Down Syndrome: Longitudinal Study. *J Alzheimers Dis* 2012.
15. Cameron NE, Cotter MA. Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45(2-3):137-46.
16. Karasu C, Dewhurst M, Stevens EJ, Tomlinson DR. Effects of anti-oxidant treatment on sciatic nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats; comparison with essential fatty acids. *Diabetologia* 1995;38(2):129-34.
17. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 2005;4(1):5.
18. D'Souza A, Fordjour L, Ahmad A, Cai C, Kumar D, Valencia G, et al. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on messenger RNA expression of caveolin-1, NOS, and genes regulating oxidative stress in the terminal ileum of formula-fed neonatal rats. *Pediatr Res* 2010;67(5):526-31.
19. Songisepp E, Kals J, Kullisaar T, Mandar R, Hutt P, Zilmer M, et al. Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. *Nutr J* 2005;4(22):141-6.
20. FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. [Internet] 2001 [cited 2012 Sep]; Available from: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/index.html)
21. Isolauri E, Salminen S; Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report. Probiotics: use in allergic disorders: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report. *J Clin Gastroenterol* 2008;42 Suppl 2:S91-6.
22. Rogers NJ, Mousa SA. The shortcomings of clinical trials assessing the efficacy of probiotics in irritable bowel syndrome. *J Altern Complement Med* 2012;18(2):112-9.
23. Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2 Suppl):399S-405S.
24. Peña JA, Versalovic J. Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol* 2003;5(4):277-85.
25. Karimi O, Pena AS. Probiotics: Isolated bacteria strain or mixtures of different strains? Two different approaches in the use of probiotics as therapeutics. *Drugs Today (Barc)* 2003;39(8):565-97.
26. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim* 2011;45(3):131-40.
27. Taghizadeh M, Djazayeri A, Salami M, Eshraghian MR, Zavareh SA. Vitamin-D-free regimen intensifies the spatial learning deficit in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* 2011;121(1):16-24.
28. de la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol* 2008;2(6):1101-13.
29. Moreira PI, Santos MS, Seica R, Oliveira CR. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. *J Neurol Sci* 2007;257(1-2):206-14.
30. Jiang LY, Tang SS, Wang XY, Liu LP, Long Y, Hu M, et al. PPARγ agonist pioglitazone reverses memory impairment and biochemical changes in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurosci Ther* 2012;18(8):659-66.
31. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2011;164(6):899-904.
32. Manda K, Ueno M, Anzai K. Memory impairment, oxidative damage and apoptosis induced by space radiation: ameliorative potential of alpha-lipoic acid. *Behav Brain Res* 2008;187(2):387-95.
33. Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, Javelot H, Desor D, Nejd A, et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in rats and human subjects. *Br J Nutr* 2011;105(5):755-64.
34. Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 2006;537(1-3):106-10.
35. Zhang R, Lu H, Tian S, Yin J, Chen Q, Ma L, et al. Protective effects of pre-germinated brown rice diet on low levels of Pb-induced learning and memory deficits in developing rat. *Chem Biol Interact* 2010;184(3):484-91.
36. Mikelsaar M, Zilmer M. Lactobacillus fermentum ME-3 - an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb Ecol Health Dis* 2009;21(1):1-27.
37. Lutgendorff F, Trulsson LM, van Minnen LP, Rijkers GT, Timmerman HM, Franzen LE, et al. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295(5):G1111-21.
38. Uskova MA, Kravchenko LV. Antioxidant properties of lactic acid bacteria--probiotic and yogurt strains. *Vopr Pitan* 2009;78(2):18-23.
39. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Oral administration of dahi containing probiotic Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Dairy Res* 2008;75(2):189-95.
40. Yadav H, Jain S, Sinha PR. The effect of probiotic dahi containing Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei on gastropathic consequences in diabetic rats. *J Med Food* 2008;11(1):62-8.



## The effect of co-administration of lactobacillus probiotics and bifidobacterium on spatial memory and learning in diabetic rats

### Abstract

Received: July 16, 2012 Accepted: September 10, 2012

Saeideh Davari M.Sc.<sup>1</sup>  
Sayyed Alireza Talaei M.Sc.<sup>2</sup>  
Mansoureh Soltani B.Sc.<sup>2</sup>  
Hojatollah Alaei Ph.D.<sup>1</sup>  
Mahmoud Salami Ph.D.<sup>2\*</sup>

1- Department of Physiology,  
Faculty of Medicine, Isfahan  
University of Medical Sciences,  
Isfahan, Iran.

2- Physiology Research Center,  
Kashan University of Medical  
Sciences, Kashan, Iran.

\* Corresponding author: Physiology  
Research Center, Kashan University of  
Medical Sciences, Qotbe Ravandi Blvd.,  
Kashan, Iran.  
Tel: +98-361-5578010  
E-mail: salami-m@kaums.ac.ir

**Background:** Diabetes mellitus affects numerous intracellular metabolic processes, which are reflected by changes in the concentration of some plasma constituents. Particularly, the disease may indirectly undermine some functions of the nervous system including learning and memory through altering oxidative stress status. On the other hand, probiotics can enhance the antioxidant capacity. This study was designed to evaluate the effects of probiotics on spatial memory, maze learning and indices of oxidative stress in diabetic rats.

**Methods:** In this experimental study, 40 male Wistar rats were randomly allocated to 4 groups (n=10 for each): Control (CO), Control probiotic (CP), Control diabetic (DC), and Diabetic probiotic (DP). The probiotic supplement, including *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium lactis* (334 mg of each with a CFU of  $\sim 10^{10}$ ), was administered through drinking water every 12 hours for 8 weeks. Using morris water maze (MWM), spatial learning and memory were evaluated. Serum insulin and oxidative stress indices, including superoxide dismutase (SOD) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), were measured by standard laboratory kits.

**Results:** Oral administration of probiotics improved impairment of spatial learning (P=0.008) and consolidated memory (P=0.01) in the rats. Moreover, probiotic treatment increased serum insulin (P<0.0001) and serum superoxide dismutase activity (P=0.007) while it decreased their blood glucose (P=0.006) and 8-OHdG (P<0.0001).

**Conclusion:** Probiotic supplementation reversed the serum concentrations of insulin and glucose along with an increase in antioxidant capacity in diabetic rats. It also improved spatial learning and memory in the animals. Relevancy of the metabolic changes and behavioral functions need to be further studied.

**Keywords:** diabetes mellitus, maze learning, oxidative stress, probiotics, rat, spatial memory.