University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Original Article

J Vet Res, Volume 79, Number 4, 2024, 249-263

Effect of Probiotic Mixture on the Gut-Brain Axis and Immune Response in Male Wistar Rats Infected with *Salmonella typhimurium*

Layla Rad[1]✉, Zahra Keshtmand[2]✉, Seyyedeh Masumeh Mirnurollahi[2]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Central Tehran Branch, Islamic Azad Univercity, Tehran, Iran*
[2] *Departmant of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad Univercity, Tehran, Iran*

Received: *29 June 2024*, ***Accepted:*** *9 September 2024*

10.22059/JVR.2024.377525.3442

Abstract

BACKGROUND: *Salmonella typhimurium* is one of the most important causative agents of gastrointestinal diseases in humans and animals. Probiotics can inhibit pathogens by producing antimicrobial compounds.

OBJECTIVES: The aim of this study was to investigate the effect of a probiotic mixture (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, and *Lactobacillus brevis*) on the gut-brain axis of male Sprague-Dawley rats infected with *S. typhimurium*.

METHODS: In this study, 21 adult male Wistar rats with an average weight of 220-250 g were randomly divided into three groups: the control group receiving daily water and food, the second group (infected) receiving *S. typhimurium* (10^9 CFU/ml), and the third group (treatment) receiving the probiotic mixture along with *S. typhimurium* infection.

RESULTS: The findings showed a significant increase in cortisol levels and some inflammatory factors in the infected group, while a significant decrease in these factors was observed in the treatment group. Additionally, serotonin levels increased in the treatment group. The results indicated that serotonin and dopamine levels increased, while cortisol concentration decreased in the treatment group compared to the infected group ($P<0.05$). Moreover, significant changes were observed in the levels of malondialdehyde, total antioxidant capacity, and the expression of IL6, TNFα, NLRP genes, and inducible damages in brain and gut tissues in the treatment group compared to the infected group ($P<0.05$).

CONCLUSIONS: These findings suggest that probiotics can have significant positive effects on reducing inflammation and improving immune response against *S. typhimurium* infection. Finally, this study demonstrates that the probiotic mixture could be an effective complementary treatment for reducing bacterial infection-related complications.

Keywords: Complementary treatment, Immune response, Inflammation, Probiotic, *Salmonella typhimurium*

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).
Publisher: University of Tehran Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Zahra Keshtmand, Tel/Fax: +9821-44237075

How to cite this article:

Rad L, Keshtmand Z, Mirnurollahi SM. Effect of Probiotic Mixture on the Gut-Brain Axis and Immune Response in Male Wistar Rats Infected with *Salmonella typhimurium*. J Vet Res, 2024; 79(4): 249-263.
doi: 10.22059/jvr.2024.377525.3442

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. From left to right: EMB culture medium, XLD culture medium, TSI biochemical test, and Simons Citrate biochemical test.

Figure 2. Comparison of different brain tissue sections in experimental groups: (A) Control, (B) Infected - infected with *Salmonella typhimurium*, (C) Treatment group - infected with *Salmonella* + probiotic mixture, stained with hematoxylin-eosin at 400x magnification.

Figure 3. Comparison of different intestinal tissue sections in experimental groups: (A) Control group, (B) Infected group (infected with *Salmonella typhimurium)*, and (C) Treatment group with probiotic mixture, stained with hematoxylin-eosin at 400x magnification.

Figure 4. Comparison of cortisol (A), serotonin (B), and dopamine (C) levels in different groups of male rats. Results are presented as mean ± standard deviation.

Figure 5. Serotonin levels in different groups of male rats. Results are presented as mean ± standard deviation. ***P*<0.01: compared to the control group, ##*P*<0.001: compared to the infected group. ST: *Salmonella typhimurium*.

Figure 6. Comparison of total antioxidant capacity (TCA) values and malondialdehyde (MDA) levels in the brain and intestine of experimental groups of male rats. Results are presented as mean ± standard deviation.

Figure 7. Comparison of TNFα, IL-6, and NLRP gene expression in the brain (A & C) and intestinal (B & D) tissues in different groups of male rats. Results are presented as mean ± standard deviation.

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۶۱۹۰-۲۲۵۱
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

دوره ۷۹، شماره ۴، ۱۴۰۳، ۲۶۳-۲۴۹

تأثیر مخلوط پروبیوتیک بر محور مغز ـ روده‌ای و پاسخ ایمنی در موش‌های صحرایی نر آلوده به *سالمونلا تیفی‌موریوم*

لیلا راد[۱]، زهرا کشتمند[۲]، سیده‌معصومه میرنورالهی[۲]

[۱] *دانش آموخته واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*
[۲] *گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

تاریخ دریافت: ۹ تیرماه ۱۴۰۳ ، **تاریخ پذیرش:** ۱۹ شهریور ماه ۱۴۰۳

10.22059/jvr.2024.377525.3442

چکیده

زمینه مطالعه: *سالمونلا تیفی‌موریوم* یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده بیماری‌های گوارشی در انسان و حیوانات می‌باشد. پروبیوتیک‌ها به‌واسطه تولید ترکیبات ضدمیکروبی می‌توانند باعث مهار پاتوژن‌ها شوند.

هدف: بررسی تأثیر مخلوط پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس برویس*) بر محور مغز ـ روده‌ای موش‌های صحرایی نر آلوده به *سالمونلا تیفی‌موریوم*.

روش‌کار: در مطالعه حاضر، ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزن (۲۲۰-۲۵۰ گرم) به‌صورت تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: گروه کنترل که آب و مواد غذایی روزانه می‌گرفت، گروه دوم (بیمار) که موش‌های آن *سالمونلا تیفی‌موریوم* (10^9 در میلی‌لیتر) را دریافت کردند و گروه سوم (تیمار) که موش‌ها هم‌زمان با آلوده شدن به *سالمونلا تیفی‌موریوم* (10^9 کلنی در میلی‌لیتر) مخلوط پروبیوتیک (10^9 کلنی در میلی‌لیتر) را هم دریافت کردند.

نتایج: گروه بیمار افزایش معنی‌داری در سطح کورتیزول و برخی از فاکتورهای التهابی نشان دادند، درحالی‌که در گروه تیمار، کاهش معنی‌داری در این فاکتورها مشاهده شد. همچنین سطح سروتونین در گروه تیمار افزایش یافت. نتایج حاصل نشان داد در گروه تیمار، سطح سرمی سروتونین و دوپامین افزایش یافته و غلظت سرمی کورتیزول نسبت به گروه بیمار کاهش یافته است ($P<0/05$). همچنین سطح مالون‌دی‌آلدهید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و بیان ژن‌های IL6، TNFα و NLRP و آسیب‌های القایی در بافت‌های مغز و روده در گروه تیمار نسبت به گروه بیمار، تغییرات معنی‌داری را نشان دادند ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج نشان داد استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند اثرات مثبت قابل‌توجهی بر کاهش التهاب و بهبود پاسخ ایمنی در برابر عفونت *سالمونلا تیفی‌موریوم* داشته باشد. همچنین مخلوط پروبیوتیک می‌تواند به‌عنوان یک درمان مکمل مؤثر برای کاهش عوارض عفونت باکتریایی استفاده شود.

کلمات کلیدی: التهاب، پاسخ ایمنی، پروبیوتیک، *سالمونلا*، درمان مکمل

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: *زهرا کشتمند، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

مقدمه

عفونت باکتریایی یکی از تهدیدات اصلی برای انسان و حیوانات است که سالانه باعث افزایش نگرانی‌های زیادی در حوزه بهداشت عمومی، سلامت و درمان‌های پزشکی می‌شود. بسیاری از باکتری‌های مهاجم می‌توانند به عفونت‌های سیستمیک و عوارض جدی منجر شوند. در سال‌های اخیر، شواهدی نشان داده‌اند عوارض عفونت‌های باکتریایی و تظاهرات عصبی مرتبط با آن‌ها در حال افزایش است. این عفونت‌ها می‌توانند سیستم‌های انتقال‌دهنده عصبی و مرکزی را فعال کنند و باعث اختلال عملکرد مغز، اختلالات رفتاری و بیماری‌های روانی شوند. به‌عنوان‌مثال، عفونت با *کمپیلوباکتر ژژونی*، *سیتروباکتر رودنتیوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا* می‌تواند باعث ایجاد رفتارهای اضطرابی، اختلال حافظه، افزایش نفوذپذیری مغز و التهاب شود. در سال‌های اخیر، عفونت‌های ناشی از باکتری *سالمونلا* که پاتوژن دستگاه

گوارش است، به یک نگرانی جدی بهداشتی در بسیاری از کشورها تبدیل شده است. دام‌ها و محصولات دامی اصلی‌ترین منبع غذایی عفونت سالمونلایی می‌باشند، به‌طوری‌که این بیماری ازطریق موادی مانند گوشت، تخم مرغ و دیگر محصولات طیور آلوده به انسان منتقل می‌شود (۱). سالمونلا می‌تواند به داخل سلول‌های اپیتلیال یا فاگوسیت‌های تک‌هسته‌ای ضعیف‌شده نفوذ کند و در برابر مکانیسم‌های دفاعی بدن مقاومت نشان دهد (۲).

شایع‌ترین عفونت سالمونلایی در انسان، گاستروانتریت است که توسط *سالمونلا تیفی‌موریوم* ایجاد می‌شود. تب روده‌ای، عفونت‌های خارج روده‌ای و عفونت ماکروفاژهای سیستم رتیکولواندوتلیال از دیگر عوارض بالینی سالمونلوزیس می‌باشند. طولانی بودن دوره بیماری و مقاومت زودهنگام سویه‌های *سالمونلا* به آنتی‌بیوتیک‌ها، کنترل و درمان آن را دشوار می‌سازد. بنابراین استفاده از روش‌های جایگزین برای مقابله با این بیماری و جلوگیری از رشد و تکثیر باکتری ضروری است. با افزایش سویه‌های مقاوم *سالمونلا* به آنتی‌بیوتیک و تأثیر منفی آنتی‌بیوتیک‌ها بر فلور طبیعی روده، استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌دلیل خواص ضدباکتریایی آن‌ها در مقابل *سالمونلا* و سایر باکتری‌های بیماری‌زا و همچنین به‌عنوان یکی از روش‌های جدید و جایگزین برای پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی، ازجمله عفونت‌های دستگاه گوارش، مورد توجه قرار گرفته است (۳).

در سال‌های اخیر، محققین توجه زیادی به غذاهای فراسودمند با ترکیبات زیستی، مانند پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و پست‌بیوتیک‌ها داشته‌اند. این ترکیبات می‌توانند عملکرد سیستم گوارشی و ایمنی را ازطریق اصلاح ترکیب میکروبیوتای روده و توسعه متابولیت‌های مشتق‌شده بهبود بخشند که به‌نوبه‌خود به بهبود روش‌های درمانی معمول و کاهش اثرات نامطلوب آن‌ها منجر می‌شود. پروبیوتیک‌ها می‌توانند سیستم ایمنی بدن را تقویت کنند و سیستم آنتی‌اکسیدانی را با تولید اجزای میکروبی و متابولیت‌ها بهبود بخشند. همچنین ازطریق حفظ تعادل میکروبی روده، نقش مهمی در افزایش توان دفاعی میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کنند (۴-۷). توانایی پروبیوتیک‌ها در ارتقای سلامت به‌دلیل اثرات مفید متعددی است که این میکروارگانیسم‌ها بر میزبان دارند، ازجمله بهبود متابولیسم لاکتوز و هضم غذا، تولید پپتیدهای ضدمیکروبی و کنترل عفونت‌های روده، افزایش تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه و سنتز مواد ضروری، مانند ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه. پروبیوتیک‌ها نه‌تنها از کلونیزه شدن پاتوژن‌ها جلوگیری می‌کنند، بلکه باعث افزایش مهار مستقیم آن‌ها نیز می‌شوند، بنابراین در کاهش مدت‌زمان التهاب و اثرات هیستوپاتولوژیکی نیز اهمیت دارند (۸).

پروبیوتیک‌ها به‌دلیل توانایی‌شان در بهینه‌سازی میکروبیوتای روده و کاهش سایتوکین‌های التهابی و استرس اکسیداتیو در کاهش اضطراب و مشکلات عصبی نقش دارند. مطالعات نشان داده‌اند پروبیوتیک‌ها می‌توانند اختلالات عملکرد عصبی را معکوس کنند و بنابراین اصطلاح روان‌بیوتیک‌ها برای پروبیوتیک‌هایی به کار می‌رود که در صورت مصرف در مقادیر کافی، تأثیر مثبتی بر سلامت روان دارند (۸). به‌عنوان‌مثال، تجویز *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* علائم اضطراب و افسردگی را در موش‌ها کاهش داده است. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* اختلالات شناختی را بهبود داده و سطوح کاهش‌یافته انتقال‌دهنده‌های عصبی را در موش‌ها در طول استرس مزمن کاهش داده است (۹). *لاکتوباسیلوس کازئی* نیز رفتار شبه‌افسردگی را در موش‌های مبتلا به استرس خفیف بهبود بخشیده است (۱۰). گزارش شده است پروبیوتیک‌ها عملکرد دستگاه عصبی مرکزی را عمدتاً با تغییر ترکیب و متابولیسم میکروبیوتای روده هدایت می‌کنند. اجزای میکروبی و متابولیت‌ها از سد خونی مغز عبور می‌کنند تا عملکرد مغز و سطوح انتقال‌دهنده‌های عصبی را تعدیل کنند. باتوجه‌به ارتباط دوطرفه بین دستگاه عصبی مرکزی و دستگاه گوارش، این ارتباط به‌عنوان محور روده ـ مغز شناخته می‌شود که شامل سیستم عصبی مرکزی، غدد درون‌ریز، سیستم عصبی خودمختار و میکروبیوتای روده است (۱۱). شواهد رو به رشد نشان می‌دهد تعدیل میکروبیوتای روده می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی مؤثر برای حفظ رشد عصبی و عملکردهای مغز و درمان اختلالات روانی پیشنهاد شود. این محور ممکن است در درمان بیماری‌ها، به‌ویژه بیماری‌های عصبی، اهمیت زیادی داشته باشد (۱۲). ازآنجایی‌که القای استرس اکسیداتیو پیامدی از عفونت سالمونلوزیس است و بدن با ورود باکتری‌ها واسطه‌های فعال اکسیژن را افزایش می‌دهد و استرس اکسیداتیو را تجربه می‌کند، تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن یکی از مؤثرترین راه‌ها برای مقابله با این مشکل است (۱۳). بنابراین باتوجه‌به عملکرد پروبیوتیک‌ها در کاهش التهاب، تنظیم سیستم آنتیاکسیدانی و تقویت سیستم ایمنی، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ترکیبی از پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس برویس* بر بافت مغز و روده موش‌های صحرایی نر آلوده به *سالمونلا*

تیفی‌موریوم بود. مطالعه حاضر برای اولین‌بار تأثیر این مخلوط پروبیوتیک‌ها را بر محور مغز ـ روده، فاکتورهای التهابی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطوح سرمی انتقال‌دهنده‌های عصبی در موش‌های آلوده به *سالمونلا* بررسی می‌کند.

مواد و روش کار

روش انجام مطالعه و شرایط نگهداری حیوانات: در مطالعه حاضر، ۲۱ موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن متوسط ۲۵۰-۲۰۰ گرم تهیه شد. حیوانات به‌صورت آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند و در اتاق مخصوص حیوانات با شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ درصد نگهداری شدند. یک هفته بعد از سازگاری موش‌ها با محیط جدید، آزمایش‌ها شروع شد. در تمام مراحل، اصول اخلاقی با کد ثبتی IR.IAU.CTB.REC.1402.040 در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی رعایت گردید.

تیماربندی: موش‌ها به‌صورت تصادفی به ۳ گروه ۷تایی تقسیم شدند. گروه اول: به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد و دریافت کننده آب و مواد غذایی به‌صورت روزانه بود. گروه دوم: دریافت‌کننده باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* با غلظت $۱۰^{۹}$ کلنی در میلی‌لیتر بود. گروه سوم: علاوه بر دریافت باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* با همان غلظت، مخلوط پروبیوتیک شامل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس برویس* با غلظت $۱۰^{۹}$ کلنی در میلی‌لیتر را نیز دریافت کرد.

تهیه باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*: به‌منظور آلوده کردن موش‌های صحرایی نر به سویه *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATTCC14028)، این باکتری با استفاده از محیط MRS براث فعال شد. برای اطمینان بیشتر از سویه باکتری (تعدادی تست تأییدی، رنگ‌آمیزی و آزمایش‌های بیوشیمیایی) انجام شد. جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، باکتری در محیط با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۸۸ ساعت کشت و سپس کدورت سوسپانسیون میکروبی به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر تنظیم شد. موش‌ها با رعایت پروتکل‌های بهداشتی و ایمنی، طی ۳ روز متوالی و هر روز با یک میلی‌لیتر با غلظت $۱۰^{۹}$ کلنی در میلی‌لیتر از سوسپانسیون *سالمونلا* به‌صورت خوراکی، با استفاده از لوله گاواژ به باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* آلوده شدند.

کشت باکتری *سالمونلا* و آزمایش‌های تأییدی: سوش *سالمونلا تیفی موریوم* در محیط کشت مک‌کانکی آگار (MacConkey agar) کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت با انتقال به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلونی‌های باکتریایی ازنظر میکروسکوپی و ماکروسکوپی و بیوشیمیایی بررسی شدند. جهت انجام آزمایش‌های تأییدی *سالمونلا* از گالری ایمویک (IMVIC) استفاده شد.

روش آماده‌سازی و تجویز پروبیوتیک، فرایند بیهوشی و نمونه‌گیری: برای بررسی تأثیر مخلوط پروبیوتیک شامل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس برویس* بر موش‌ها، آزمایشی به‌مدت ۳۰ روز انجام شد. مخلوط پروبیوتیک با غلظت $۱۰^{۹}$ کلنی در میلی‌لیتر از شرکت تک‌ژن زیست تهیه گردید. ۱ گرم از این ترکیب پروبیوتیک در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر حل و با استفاده از شیکر به‌صورت سوسپانسیون درآمد. هر روز به‌مدت ۳۰ روز، ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به روش گاواژ به هرکدام از موش‌ها خورانده شد. ۳۵ روز پس از اولین اندازه‌گیری وزن و گاواژ، موش‌ها با استفاده از کتامین ـ زایلازین ۱ درصد بیهوش شدند. سپس خون‌گیری مستقیم از قلب انجام شد و بافت‌های مغز و روده جهت مطالعات هیستولوژیکی، فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن‌ها جدا شد. تمام دستکاری‌ها و مراحل آزمایش با رعایت اصول کمیته اخلاقی نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

خون‌گیری و سنجش فاکتورهای خونی: پس از بیهوشی موش‌ها و اندازه‌گیری وزن آن‌ها، بلافاصله خون‌گیری از قلب حیوانات با استفاده از سرنگ انجام شد. نمونه‌های خونی در دمای آزمایشگاه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم خون جدا گردید. سپس غلظت کورتیزول، دوپامین و سروتونین در بافت مغز و روده با استفاده از کیت‌های بیوشیمیایی شرکت ADit و دستگاه اتوآنالایزر هیتاچی اندازه‌گیری شد.

بافت‌شناسی مغز و روده: بافت‌های مغز و روده جداسازی‌شده از موش‌ها ابتدا با استفاده از سرم فیزیولوژی شست‌وشو داده شد و نمونه‌های بافتی جهت مطالعات آسیب‌شناسی با محلول فرمالین سالین ۱۰ درصد (۱۰۰ سی‌سی فرمالین + ۸/۵ گرم کلرید سدیم + ۹۰۰ سی‌سی آب مقطر) به‌مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت نگهداری و تثبیت شدند. بعد از مرحله تثبیت‌سازی، مراحل مختلف پاساژ شامل

آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشتگی با پارافین انجام شد. سپس نمونه‌ها قالب‌گیری شدند و با استفاده از میکروتوم دورانی برش‌هایی با ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر تهیه گردید. نمونه‌ها با استفاده از روش هماتوکسیلین ـ ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. درنهایت با استفاده از میکروسکوپ نوری بافت‌ها ازنظر ساختار بافت‌شناسی در گروه‌های مختلف آزمایشی بررسی و مقایسه گردیدند. مقاطع آسیب‌شناسی بافت‌های مغز و روده به‌صورت کیفی و براساس درجه‌بندی شدت آسیب بررسی شدند. شدت آسیب به‌صورت عدم وجود تغییرات هیستولوژیک (درجه صفر)، تغییرات هیستولوژیک جزئی (درجه ۱ تغییرات هیستولوژیک متوسط (درجه ۲) و تغییرات هیستولوژیک شدید (درجه ۳) ارزیابی گردید. تصاویر مناسب با استفاده از دوربینی که روی میکروسکوپ نصب شده بود گرفته شد. تصاویر در فضای نرم‌افزار ImageJ مشاهده و سپس با گروه شاهد مقایسه و تحلیل شدند.

فاکتورهای بیوشیمیایی بافت‌های مغز و روده (فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC)): برای سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) از کیت‌های بیوشیمیایی شرکت Naxifer و دستگاه اتوآنالایزر هیتاچی استفاده شد. بافت‌های مغز و روده استخراج و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس آزمایشات مربوطه انجام شد. از هر نمونه بافتی حدود ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم وزن شده و ۱۰ برابر وزن آن Buffer Lysing اضافه شد. نمونه با هموژنایزر شیشه‌ای هموژن و در ۱۰۰۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی جداشده به‌عنوان نمونه استفاده شد. ابتدا ۵ میکرولیتر از نمونه / استاندارد آماده‌شده در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد (هر نمونه ۲ بار تکرار و میانگین گرفته شد). سپس ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کار آماده‌شده به همه خانه‌ها اضافه شد. جذب نوری نمونه‌ها پس از ۵ دقیقه در طول موج ۵۹۳ نانومتر (بین ۵۷۰ تا ۶۳۰) خوانده شد. استاندارد موجود در کیت (۱۰ میلی‌مولار) موقع استفاده با نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر دیونیزه رقیق شد (۱ میلی‌لیتر از استاندارد با ۹ میلی‌لیتر آب مقطر) تا غلظت ۱ میلی‌مول از استاندارد حاصل گردید. سپس رقت‌های مختلف برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد.

سنجش میزان مالون‌دی‌آلدهید: غلظت مالون‌دی‌آلدهید بافت‌های مغز و روده براساس پروتکل کیت‌های خریداری‌شده انجام شد. کیت سنجش مالون‌دی‌آلدهید از شرکت نوند سلامت برند (Zellbio-GmbH) خریداری شد. جهت سنجش این متابولیت، ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده و ۳ میکرولیتر هیدروکسی تولوئن بوتیله (BHT) به ۱۰ میلی‌گرم از بافت موردنظر اضافه و سپس هموژن گردید. برای حذف مواد نامحلول، سوسپانسیون به‌دست‌آمده به‌مدت ۳ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و از مایع رویی به‌عنوان نمونه استفاده گردید. آماده‌سازی محلول کار براساس دستورالعمل کیت‌های خریداری‌شده انجام شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه استاندارد با ۸۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های آزمایش مخلوط و درون بن ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه درون ظرف حاوی آب یخ قرار داده شدند تا سریع سرد شوند. نمونه‌ها با دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و سپس ۲۵۰ میکرولیتر از مایع رویی به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه انتقال داده شد. جذب مایع رویی در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت گردید.

بررسی بیان ژن‌های التهابی NLRP، IL-۶ و TNFα: بیان ژن‌ها با روش Real-time PCR که برای کمیت‌سنجی نسبی استفاده می‌شود، بررسی شد. این روش، تغییرات در بیان ژن را نسبت به یک ژن استاندارد که به‌عنوان کنترل داخلی استفاده می‌شود، ارزیابی می‌کند. ژن استاندارد معمولاً یک ژن خانه‌دار، مانند GAPDH است. برای استخراج RNA، ابتدا ۵۰ تا ۷۰ میلی‌گرم از نمونه‌ها در میکروتیوب‌های استریل قرار داده شد و ۵۰۰ میکرولیتر محلول BME به هر نمونه اضافه شد. سپس مخلوط به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و همگن شد. پس از سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه، مایع رویی به ستون استریل منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد اضافه شد. پس از انکوباسیون روی یخ، نمونه‌ها دوباره سانتریفیوژ و محلول‌های شست‌وشو اضافه شدند. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان ژن‌ها با واکنش Real-time PCR ارزیابی گردید. داده‌های خام به‌صورت Ct از دستگاه استخراج گردیدند و میزان بیان ژن با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و استفاده از نرم‌افزار Rest محاسبه شد. قبل از انجام واکنش PCR، غلظت‌های cDNA با نانودراپ اندازه‌گیری و یکسان‌سازی شدند. در مطالعه حاضر از Master Mix (Amplicon, Denmark) و cDNA سنتزشده با پرایمرهای ژن‌های مختلف (جدول ۱) حاصل از RNA استخراج‌شده از سلول‌ها، در دو واکنش مجزا و به‌صورت duplicate استفاده شد. سنتز cDNA از RNA استخراج‌شده طبق پروتکل کیت پارس طوس انجام شد. به هر نمونه، بافر و آنزیم‌های مربوطه اضافه و در دمای مناسب انکوبه گردید. پس از مراحل انکوباسیون و افزودن مواد لازم، واکنش سنتز cDNA در ترموسایکلر انجام شد. برای ارزیابی کاهش یا افزایش بیان ژن هدف، بیان آن با ژن کنترل داخلی (GAPDH) مقایسه شد. توالی ژن‌ها از سایت NCBI به دست آمد و پرایمرهای اختصاصی با برنامه Primer Express طراحی و بررسی شدند.

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن‌های موردبررسی در مطالعه حاضر.

نام ژن	توالی پرایمر
GAPDH	Forward: 5'-AAGATCCTGACCGAGCGTGG-3 Reverse: 5'-CAGCACTGTGTTGGCATAGAGG-3
IL-6	Reverse: 5' -GCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3 Forward: 5'-TGATGGATGCTTCCAAACTG -3
TNF-α	Reverse: 5'-GAGCATTGGAAGTTGGGG TA-3 Forward: 5' -ACTGAACTTCGGGGTGATTG -3
NLRP	Reverse: 5'-GAGCATTGGAAGTTGGGG TA-3 Reverse: 5'-CAGCACTGTGTTGGCATAGAGG-3

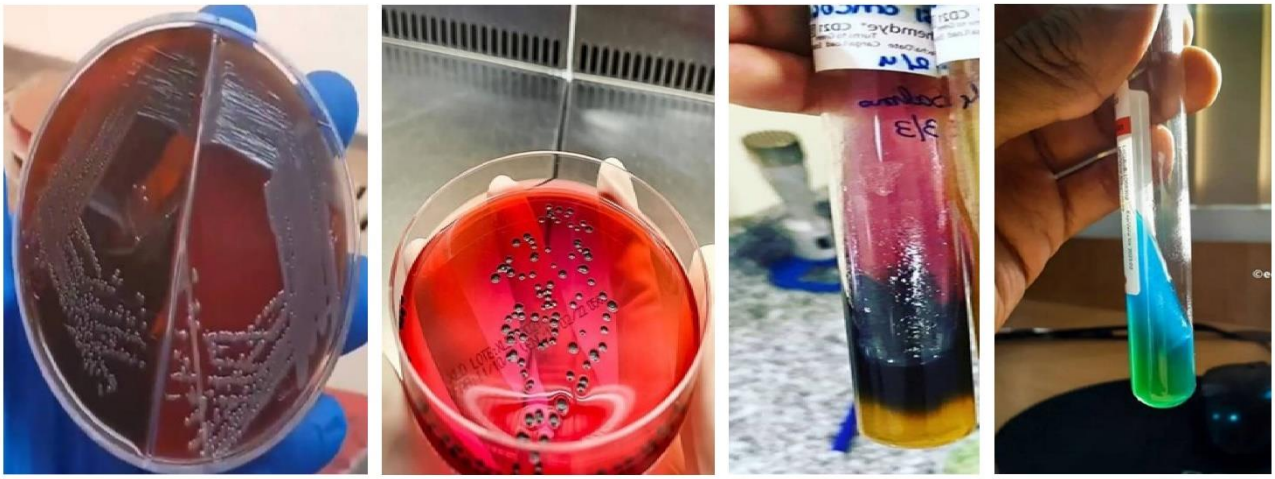
تحلیل آماری: محاسبات آماری مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) بررسی و تفاوت بیان ژن‌های هدف بین نمونه‌های کنترل و تیمارشده با آزمون توکی تحلیل گردید. توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنف (Kolmogorov-Smirnov) بررسی شد ($P<۰/۰۵$). نتایج نهایی براساس میانگین و انحراف‌معیار و تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌ها ($P<۰/۰۵$) گزارش شدند.

نتایج

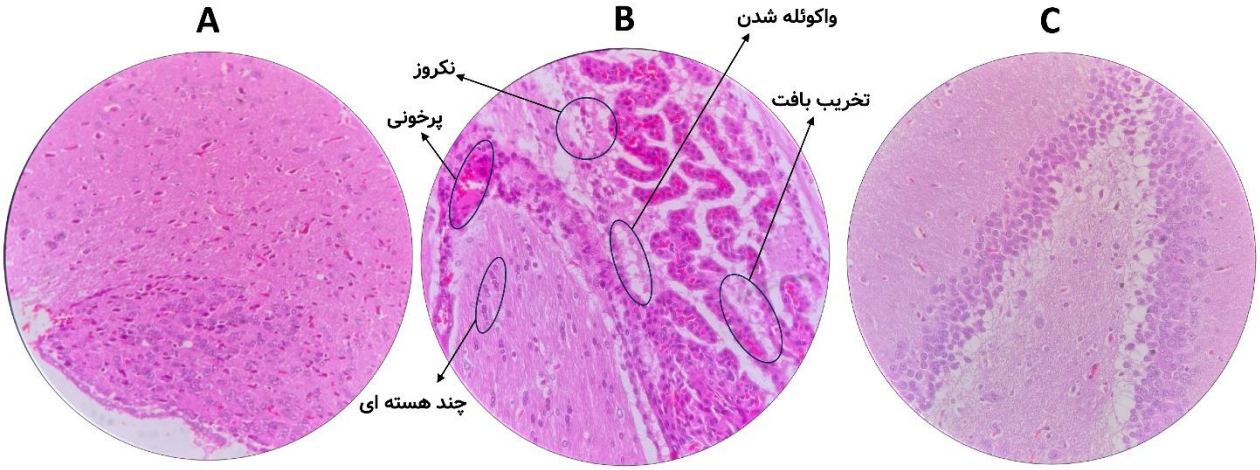
تأییدیه باکتری *سالمونلا*: نتایج تست‌های تأییدی در تصویر ۱ نشان داده شده است. باکتری بر روی محیط TSI agar که یک محیط نارنجی‌رنگ است در قسمت پایین به رنگ زرد و به‌علت تولید سولفید هیدروژن (H_2S) به رنگ سیاه دیده شد. قسمت بالا نارنجی تا قرمز رنگ بود که نشان‌دهنده تخمیر گلوکز و عدم توانایی مصرف لاکتوز در این باکتری بود. در محیط سیمون سیترات آگار که یک محیط افتراقی جامد و مورب است، محیط در ابتدای کار سبز رنگ بود که پس از کشت باکتری و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محیط به رنگ آبی تغییر کرد که نشان‌دهنده استفاده باکتری از سیترات به‌عنوان منبع کربن بود. یکی دیگر از محیط‌های گالری ایمویک محیط اوره بود که در این باکتری محیط نیز به رنگ صورتی دیده شد. باکتری در محیط کشت گزیلولیزین دزوکسی کولات آگار (XLD) کلنی‌ها، به شکل صورتی تا قرمز رنگ با مرکز سیاه دیده شد. در تصویر ۱ تست‌های تأییدی باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* نشان داده شده است. تست کاتالاز و اکسیداز باکتری *سالمونلا* نیز منفی بود.

هیستوپاتولوژی بافت مغز و روده: مقاطعی از بافت مغز موش صحرایی است که با استفاده از رنگ‌های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی‌شده در تصویر ۲ نشان داده شده است. بررسی تصاویر مربوط به بافت مغز در گروه بیمار (B)، نشان می‌دهد پدیده‌هایی ازجمله پرخونی، چندهسته‌ای شدن، واکوئله شدن و نکروز بافت در مقایسه با گروه کنترل (A) مشاهده می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده در گروه تیمار (C) نشان می‌دهد در این گروه، انسجام بافت‌ها بیشتر شده و تعداد سلول‌های چندهسته‌ای، پرخونی و واکوئله شدن کاهش یافته است. این نتایج نشان‌دهنده بهبود نسبی در وضعیت بافت در مقایسه با گروه بیمار با باکتری است.

تصویر ۳ وضعیت بافت‌شناسی روده موش‌ها را نشان می‌دهد. بررسی تصاویر مربوط به گروه آلوده به باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* (B) نشان داد در این گروه، چهار لایه بافت روده شامل مخاط، زیرمخاط، لایه عضلانی و لایه سروزی تخریب شده و عدم انسجام و پارگی در بخش اپیتلیوم که عمل جذب را برعهده دارند، در ناحیه پرزها بیشتر مشاهده شد. همچنین پرخونی، تجمع سلول‌های التهابی لنفوسیت، واکوئله شدن و نکروز بافت روده در مقایسه با گروه کنترل (A) بیشتر مشاهده شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده در گروه آلوده به باکتری همراه با پروبیوتیک (C)، انسجام بافت‌ها بیشتر شده و تجمع سلول‌های التهابی، تخریب پرزها، واکوئله‌ها و نکروز بافت نیز در مقایسه با گروه بیمار کاهش یافته است.



تصویر ۱. به‌ترتیب از چپ به راست: محیط کشت EMB، محیط کشت XLD تست بیوشیمیایی TSI و تست بیوشیمیایی Simons Citrate.



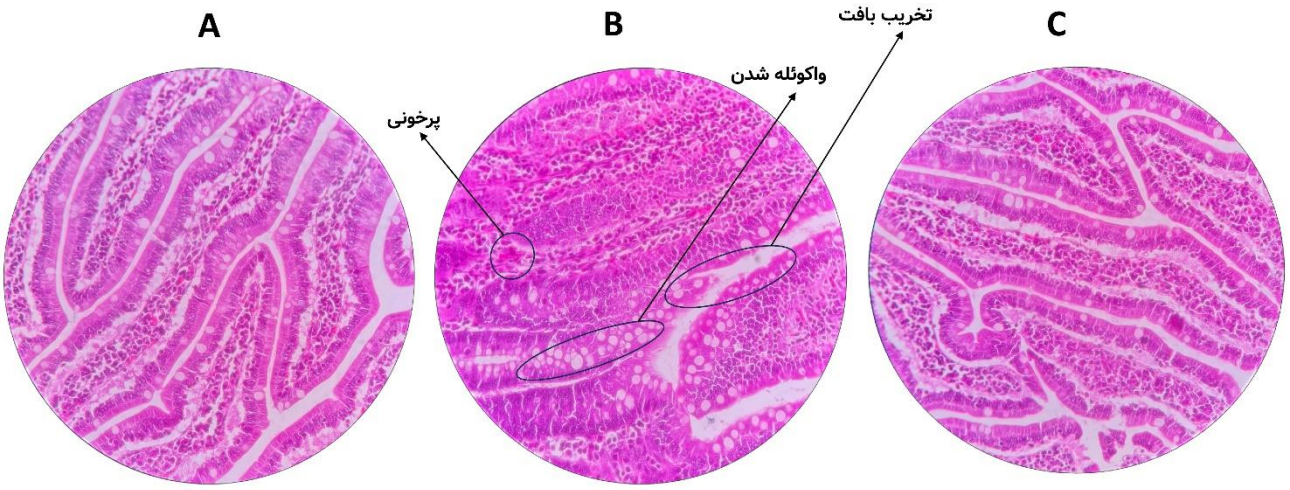
تصویر ۲. مقایسه بخش‌های مختلف بافت مغز در گروه‌های آزمایش: (A) کنترل، (B) بیمار ـ آلوده به باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*، (C) گروه تیمار ـ آلوده به *سالمونلا* + مخلوط پروبیوتیک. با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ـ ائوزین با بزرگ‌نمایی×۴۰۰.

فاکتورهای بیوشیمیایی خون: مقایسه غلظت کورتیزول و دوپامین گروه‌های مختلف آزمایشی در تصویر ۴ ارائه شده است. در مقایسه با گروه کنترل، میزان غلظت هورمون استرس کورتیزول در گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* افزایش معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۱$) (تصویر ۴)، درحالی‌که میزان این هورمون در گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۰۱$). همچنین در گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک، در مقایسه با گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم*، کاهش معنی‌داری دیده شد ($P<۰/۰۰۱$). میزان دوپامین در گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* (بیمار) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). در گروه درمانی که *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک دریافت کرده بود، نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$). همچنین در مقایسه با گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* (بیمار)، گروه درمانی که *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک دریافت کرده بود، افزایش معنی‌داری در میزان دوپامین نشان داد ($P<۰/۰۰۱$).

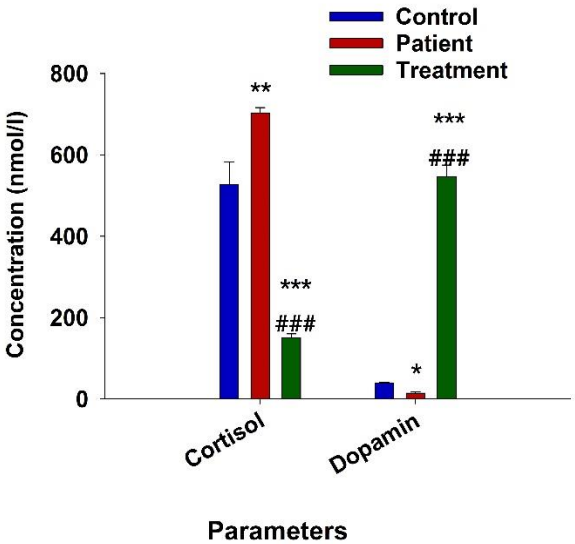
باتوجه‌به تصویر ۵ که مربوط به اندازه‌گیری میزان سروتونین در خون است، در گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* (بیمار)، در مقایسه با گروه کنترل، تغییر معنی‌داری در میزان سروتونین مشاهده نشد (بیماری احتمالاً بر روی غلظت سروتونین تأثیری ندارد)، اما در گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک (درمان)، نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری در میزان

سروتونین مشاهده شد ($P<۰/۰۱$). همچنین در مقایسه با گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* (بیمار)، در گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک (درمان)، افزایش معنی‌داری دیده شد ($P<۰/۰۱$).

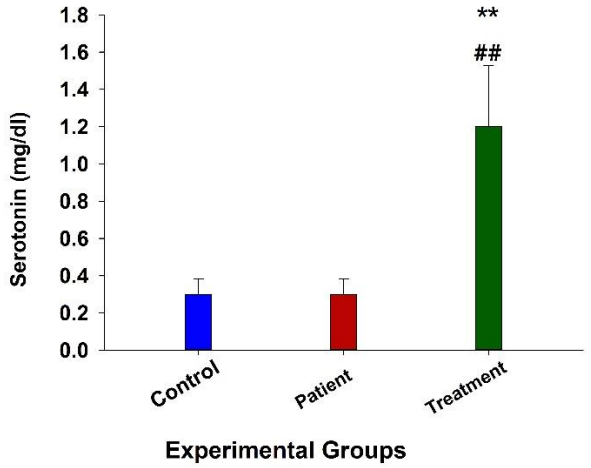
فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان مالون‌دی‌آلدهید در مغز و روده: تصویر ۶ میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و همچنین غلظت مالون‌دی‌آلدهید را در مغز و روده گروه‌های آزمایشی نشان می‌دهد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) مغز در گروهی که *سالمونلا تیفی‌موریوم* دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل کاهش قابل‌توجهی نشان داد ($P<۰/۰۱$). در مقابل، گروهی که ترکیب پروبیوتیک همراه با *سالمونلا تیفی‌موریوم* دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان دادند ($P<۰/۰۱$). علاوه‌براین گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با پروبیوتیک نیز نسبت به گروه دریافت‌کننده تنها *سالمونلا تیفی‌موریوم*، افزایش قابل‌توجهی در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام داشتند ($P<۰/۰۱$).



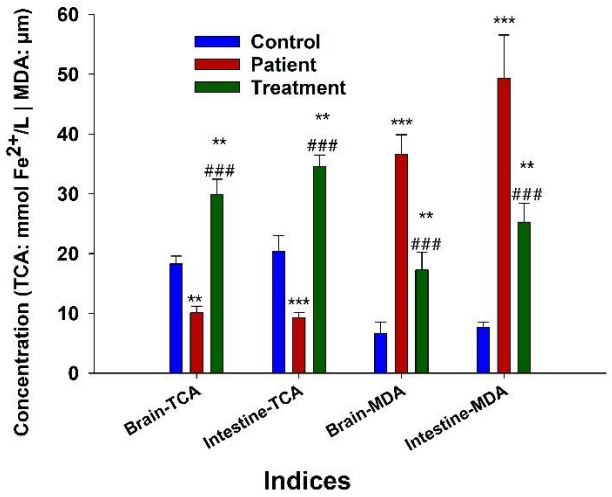
تصویر ۳. مقایسه بخش‌های مختلف بافت روده در گروه‌های آزمایش. (A) کنترل، (B) بیمار ـ آلوده به باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*، (C) گروه تیمار با مخلوط پروبیوتیک و با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ـ ائوزین با بزرگ‌نمایی×۴۰۰.



تصویر ۴. مقایسه میزان غلظت کورتیزول و دوپامین در گروه‌های مختلف موش‌های صحرایی نر. نتایج براساس میانگین±انحراف‌معیار. ($P<۰/۰۱$): در مقایسه با گروه کنترل (**)، $P<۰/۰۰۱$: در مقایسه با گروه کنترل (***)، $P<۰/۰۰۱$: در مقایسه با گروه بیمار (###). ST: *سالمونلا تیفی‌موریوم*.



تصویر ۵. غلظت سروتونین خون در گروه‌های مختلف موش‌های صحرایی نر. نتایج براساس میانگین±انحراف‌معیار. $P<۰/۰۱$: مقایسه با گروه کنترل (**) و ($P<۰/۰۰۱$) مقایسه با گروه بیمار (##) ST: *سالمونلا تیفی‌موریوم*.



تصویر ۶. مقایسه مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TCA) و غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) در مغز و روده گروه‌های آزمایشی موش‌های صحرایی نر. نتایج براساس میانگین±انحراف‌معیار. ($P<۰/۰۱$): در مقایسه با گروه کنترل (**)، $P<۰/۰۰۱$: در مقایسه با گروه کنترل (***)، $P<۰/۰۰۱$: در مقایسه با گروه بیمار (###). ST: *سالمونلا تیفی‌موریوم*.

همچنین نتایج نشان داد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در بافت روده گروهی که *سالمونلا تیفی‌موریوم* دریافت کرده‌اند، در مقایسه با گروه کنترل به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت ($P<۰/۰۰۱$). در گروهی که ترکیب *سالمونلا تیفی‌موریوم* و مخلوط پروبیوتیک دریافت کردند نیز نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۱$). ازسوی‌دیگر در گروهی که *سالمونلا تیفی‌موریوم* و مخلوط پروبیوتیک دریافت کرده‌اند، در مقایسه با گروهی که تنها *سالمونلا تیفی‌موریوم* دریافت کرده‌اند، کاهش معنی‌داری دیده شد ($P<۰/۰۰۱$). این نتایج نشان داد مخلوط پروبیوتیک تأثیر مثبتی در کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی افزایش‌یافته ناشی از عفونت *سالمونلا تیفی‌موریوم* دارد.

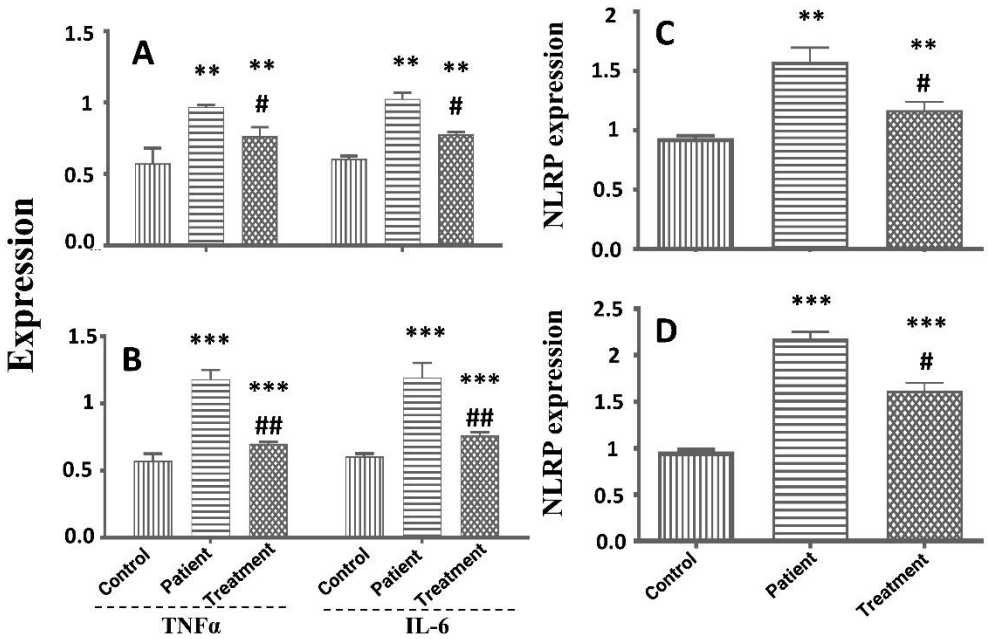
نتایج نشان داد پراکسیداسیون لیپیدی در بافت مغز گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P<۰/۰۰۱$). همچنین در گروهی که *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک دریافت کردند، در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۱$). ازسوی‌دیگر در گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک در مقایسه با گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم*، کاهش معنی‌داری دیده شد ($P<۰/۰۰۱$). این نتایج نشان‌دهنده تأثیر مثبت مخلوط پروبیوتیک در کاهش پراکسیداسیون لیپیدی افزایش‌یافته ناشی از عفونت *سالمونلا تیفی‌موریوم* است. همچنین نتایج

نشان داد پراکسیداسیون لیپیدی روده‌ای در گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P<۰/۰۰۱$). در گروهی که *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک دریافت کردند، نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$). ازسوی‌دیگر در گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک در مقایسه با گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم*، کاهش معنی‌داری دیده شد ($P<۰/۰۱$). این نتایج نشان‌دهنده تأثیر مثبت مخلوط پروبیوتیک در کاهش پراکسیداسیون لیپیدی افزایش‌یافته ناشی از عفونت *سالمونلا تیفی‌موریوم* است.

بیان ژن: مقایسه میزان بیان ژن‌های التهابی TNFα، IL-6 و NLRP در بافت مغز (تصویر ۷-A و ۷-C) گروه‌های موردآزمایش نشان داد گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری در بیان این ژن‌ها داشت ($P<۰/۰۰۱$= TNFα و IL-6) ($P<۰/۰۱$= NLRP). همچنین در گروهی که *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک دریافت کردند، نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$= TNFα و IL-6) ($P<۰/۰۱$= NLRP).

ازسوی‌دیگر، در گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک، در مقایسه با گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم*، کاهش معنی‌داری در بیان این ژن‌ها دیده شد ($P<۰/۰۱$= TNFα و IL-6) ($P<۰/۰۵$= NLRP). این نتایج نشان‌دهنده تأثیر مثبت مخلوط پروبیوتیک در کاهش بیان ژن‌های التهابی ناشی از عفونت *سالمونلا تیفی‌موریوم* است.

مقایسه نتایج بیان ژن‌های التهابی TNFα و IL-6 در بافت روده در گروه‌های مختلف نشان داد گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۰۱$) (تصویر ۷-B). همچنین، در گروهی که *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک دریافت کرده بودند، نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$). ازسوی‌دیگر در گروهی که هم‌زمان با *سالمونلا تیفی‌موریوم*، مخلوط پروبیوتیک دریافت کرده بودند، کاهش معنی‌داری در بیان این ژن‌ها نسبت به گروهی که تنها *سالمونلا تیفی‌موریوم* دریافت کرده بودند، مشاهده شد ($P<۰/۰۱$). همچنین مقایسه میزان بیان ژن NLRP در بافت روده نشان داد (تصویر ۷-D) گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* افزایش معنی‌داری در بیان این ژن نسبت به گروه کنترل داشت ($P<۰/۰۰۱$). در گروهی که *سالمونلا تیفی‌موریوم* همراه با مخلوط پروبیوتیک را دریافت کرده بودند، افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$). به‌علاوه در این گروه، کاهش معنی‌داری در بیان ژن NLRP نسبت به گروهی که تنها *سالمونلا تیفی‌موریوم* دریافت کرده بودند، مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). این نتایج نشان داد مخلوط پروبیوتیک توانایی کاهش بیان ژن‌های التهابی TNFα، IL-6 و NLRP ناشی از عفونت *سالمونلا تیفی‌موریوم* را دارد.



تصویر ۷. مقایسه بیان ژن‌های TNFα، IL-6 و NLRP در بافت مغز (A & C) و بافت روده (B & D) در گروه‌های مختلف موش صحرایی نر. نتایج براساس میانگین±انحراف‌معیار. ($P<۰/۰۱$): در مقایسه با گروه کنترل (**)، $P<۰/۰۰۱$: در مقایسه با گروه کنترل (***)، $P<۰/۰۰۱$: در مقایسه با گروه بیمار (###). ST: *سالمونلا تیفی‌موریوم*.

بحث

یکی از متداول‌ترین علل مرگ‌ومیر در کشورهای درحال‌توسعه و کشورهای توسعه‌یافته، عفونت‌های باکتریایی است که مشکلات بزرگی را برای صنایع غذایی و سلامت و بهداشت انسان‌ها ایجاد می‌کند. در سال‌های اخیر، مسمومیت‌های گوارشی ناشی از *سالمونلا* به‌صورت وسیع مشاهده شده است. مقاومت به فاگوسیت‌ها، داشتن غشای خارجی مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، تکثیر در دستگاه گوارش و حمل این باکتری توسط میزبان به‌مدت طولانی، از عوامل شیوع و بیماری‌زایی *سالمونلا* به شمار می‌رود. راه اصلی انتقال بیماری سالمونلا ازطریق گوارش است و ناقلین باکتری را ازطریق ترشحات بدن و مدفوع دفع می‌کنند. ازطرفی، مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، بیماری‌ها و عفونت‌های گوارشی ناشی از این باکتری می‌تواند موجب تغییر در فراوانی باکتری‌های مفید و برهم خوردن تعادل این جوامع میکروبی ساکن دستگاه گوارش که نقش مهمی در ارتباط بین مغز و روده دارند، شود و سلامتی فرد را تحت تأثیر قرار دهد. در این راستا، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی تأثیر مخلوط پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس برویس*) بر محور مغز ـ روده‌ای موش‌های صحرایی نر آلوده به *سالمونلا تیفی‌موریوم* انجام شد. نتایج حاصل از بررسی پاتولوژیکی بافت مغز گروهی که باکتری دریافت کرده بودند، نشان داد باکتری سبب کاهش حجم هیپوکامپ و بروز ناهنجاری‌های کاورنوس یا غارمانند در ساختار عروق خونی مغز می‌شود، دسته‌ای از عروق خونی با دیواره نازک مشاهده شد که نشان‌دهنده ورود عفونت به جریان خون و نشت خون به بافت مغزی و مرگ جمعیت خاصی از سلول‌های مغزی بود. در بافت روده باریک، گروه دریافت‌کننده باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*، خون‌ریزی در سطوح سروزی و مخاطی مشاهده شد و تعداد سلول‌های ترشح‌کننده مخاط، کاهش محسوسی نشان دادند. در قسمت اپیتلیوم روده باریک که عمل جذب را بر عهده دارد، تخریب و عدم پیوستگی مشاهده شد. پارگی در لایه‌های عضلانی و ناحیه ریز پرزهای روده کوچک و کاهش ارتفاع هر پرز نسبت به عمق هر غده لایبر کوهن از دیگر نتایج بررسی پاتولوژیکی بافت روده باریک این گروه بود. ازطرفی، در روده باریک گروه درمان با مخلوط پروبیوتیک، نتایج بیانگر بافت روده منسجم با لایه‌های مختلف قابل‌تفکیک از هم بود.

پس از انجام سنجش فاکتورهای خونی، شامل سروتونین، دوپامین و کورتیزول، مشاهده شد در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل، تیتر کورتیزول به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. همچنین تیتر سروتونین و دوپامین نیز در گروه درمان نسبت به گروهی که باکتری را دریافت کرده بودند، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* به‌طور معنی‌داری باعث کاهش میزان آنزیم‌های ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) نسبت به نمونه کنترل در بافت مغز و بافت روده باریک می‌شود. همچنین بعد از انجام سنجش پراکسیداسیون لیپیدی (MAD) در بافت مغز و روده، مشخص شد تیتر این آنزیم در گروه دریافت‌کننده *سالمونلا تیفی‌موریوم* نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته است. ازسوی‌دیگر، افزایش معنی‌دار در بیان ژن‌های TNFα، IL6 و NLRP در بافت مغز و روده باریک گروه دریافت‌کننده باکتری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. همچنین بیان ژن NLRP در گروه تیمار نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌داری داشت. درنتیجه مکان لوکالیزاسیون اصلی باکتری *سالمونلا* در روده‌ها قرار دارد و درحقیقت موجب تهاجم ماکروفاژهای مخاطی می‌شود. این باکتری در روده باریک، کولون، غدد لنفاوی و کیسه صفرا جایگزین می‌شود و با تولید انتروتوکسین، سیتوتوکسین بیماری ایجاد می‌کند.

در مطالعه‌ای که Haghighi و همکاران در سال ۲۰۲۲ بر روی یک گروه اسب انجام داده‌اند، نشان داده شد باکتری انتروکولیت *سالمونلا* باعث تغییرات هیستولوژیکی در بافت روده باریک این حیوانات می‌شود. ازسوی‌دیگر، در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۲۱، تأثیر ترکیبی اسپورهای برخی از باسیلوس‌ها بر عفونت سالمونلایی بررسی شده است و نتایج نشان داد استفاده از این باسیلوس‌ها (*سوبتیلیس* و *کواگولنس*) می‌تواند ورود پاتوژن‌ها ازطریق دهان را کاهش دهد و با حفظ میکروفلور روده، بدن را برای مقابله با باکتری *سالمونلا* آماده کند. در مطالعه دیگری که Wan و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام داده‌اند نشان داده شد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، به‌ویژه متابولیت‌های آن، به‌طور مؤثری از عفونت *سالمونلا تیفی‌موریوم* در موش‌ها جلوگیری و آسیب‌های مغزی و التهاب عصبی را کنترل می‌کند. این مطالعه نشان داد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باعث کاهش سطوح اینترلوکین‌های IL-6 و IL-1β و افزایش IL-10 و IL-4 می‌شود (۱۴). در مطالعه Wotzka و همکاران در سال ۲۰۱۷ که برروی *سالمونلا تیفی موریوم* تمرکز داشت، نشان داد که التهاب ناشی از این باکتری می‌تواند انتقال پلاسمیدها و فاژها را تسریع و انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی را تقویت کند. همچنین ظهور پاتوبیونت‌ها و پاتوژن‌ها را با حدت افزایش‌یافته تسهیل می‌کند (۱۵) و این نتایج با نتایج مطالعات قبلی همسو است.

در مطالعه Fatemi و همکاران در سال ۲۰۱۹، اثر *لاکتوباسیلوس کازئی* بر روی فاکتورهای هماتولوژیک در رت‌های آلوده به *سالمونلا تیفی‌موریوم* بررسی شد و نتایج این مطالعه نشان داد *لاکتوباسیلوس کازئی* قادر به مقابله با *سالمونلا تیفی‌موریوم* بوده و بدون اثر مخربی بر فاکتورهای هیستولوژیک و هماتولوژیک تا حدودی از پیشرفت بیماری جلوگیری می‌کند (۱۶). در مطالعه‌ای که Ehrhardt و همکاران در سال ۲۰۲۲ انجام داده‌اند، عفونت روده‌ای *سالمونلا* در موش‌ها بررسی شدند. نتایج نشان داده‌اند *سالمونلا* به‌طور مؤثر سکوم و کولون موش را کلونیزه کرده و در آنجا التهاب ایجاد می‌کند که به کولیت منجر می‌شود. با مصرف آنتی‌بیوتیک قبل از عفونت با *سالمونلا*، مقاومت کلونیزاسیون روده با کاهش میکروبیوتای روده برطرف شد (۱۷). Nazari و همکاران در سال ۲۰۱۷ گزارش کرده‌اند آلودگی سالمونلایی در شتر آلوده سبب تخریب بافت روده باریک و بخش‌های مختلف دستگاه گوارش می‌شود (۱۸). باتوجه‌به بررسی نتایج و مقایسه آمار مطالعات انجام‌شده در این زمینه با نتایج و آمار مطالعه حاضر، مشخص شد مطالعه حاضر با مطالعات گذشته همخوانی دارد.

پروبیوتیک‌ها به‌عنوان میکروارگانیسم‌های زنده، نقش مهمی در حفظ سلامت روده و ایجاد تعادل در جمعیت باکتری‌های مفید و مضر دارند. این تعادل به نفع افزایش جمعیت باکتری‌های مفید در روده تغییر می‌کند و ازطریق تأثیر بر محور مغز ـ روده، اثرات سلامت‌بخش خود را در بدن القا می‌کند. باکتری‌های پروبیوتیک ازطریق تعامل با سلول‌های اپیتلیال روده و گیرنده‌های TLR و سلول‌های ایمنی، سیگنال‌هایی به سایر سلول‌های ایمنی ارسال می‌کنند که با افزایش سلول‌های ایمونوگلوبولین روده، برونش و غدد پستانی باعث می‌شوند سلول‌های T فعال شوند. به‌ویژه، پروبیوتیک‌ها سلول‌های T تنظیمی را فعال می‌کنند که به آزادی IL-10 منجر می‌شود. همچنین با افزایش موسین، پروتئین‌های اتصال محکم و سلول‌های گابلت یا جامی و پانت، سد روده تقویت می‌شوند. مکانیسم‌های پیشنهادی پروبیوتیک‌ها شامل تعدیل میکروبیوتای روده با حفظ تعادل و سرکوب رشد باکتری‌های بیماری‌زای بالقوه در روده است. علاوه‌براین، دُز پروبیوتیک مصرف‌شده نقش مهمی در تراکم میکروارگانیسم‌های موجود در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش دارد. پروبیوتیک‌ها همچنین قادر به تصحیح اختلالات میکروبیوتای روده پس از درمان آنتی‌بیوتیکی می‌باشند. آن‌ها با سلول‌های اپیتلیال روده تعامل دارند و بر بیان عوامل رونویسی درگیر در متابولیسم سلولی تأثیر می‌گذارند و درنتیجه عملکرد آن را بهبود می‌بخشند. همچنین اثرات پروبیوتیک‌ها شامل بهبود التهاب مخاطی با بازگرداندن یکپارچگی اپیتلیال، ساختارهای کریپت و اندازه پرز و تقویت سلامت سیستم ایمنی در بیماری نیز می‌شود (۱۹).

Mulaw و همکاران در سال ۲۰۲۲ در مطالعه‌ای اثر سویه‌های پروبیوتیک بالقوه (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*) بر روی موش‌ها در برابر *سالمونلا تیفی‌موریوم* را بررسی و مشاهده کرده‌اند ترکیبی از این سویه‌های پروبیوتیک بالقوه قادر به محافظت از موش‌ها در برابر عفونت *سالمونلا تیفی‌موریوم* است. این نتایج نشان می‌دهند این سویه‌های پروبیوتیک بالقوه می‌توانند به‌عنوان فرهنگ پروبیوتیک برای تولید محصولات تخمیری عملکردی استفاده شوند (۲۰). Wieërs و همکاران در سال ۲۰۲۲ در مطالعاتی نشان داده‌اند پروبیوتیک‌ها می‌توانند در جلوگیری از کلونیزاسیون میکروبیوتای روده با باکتری‌های مقاوم به چند دارو در طول درمان با داروهای آنتی‌بیوتیکی مؤثر باشند (۲۱). Rode و همکاران در سال ۲۰۱۸ در یک مطالعه نشان داده‌اند پروبیوتیک *L. plantarum* می‌تواند محور روده ـ مغز را تحریک و به‌طور بالقوه رشد و عملکرد مغز را تقویت کند (۲۲). Milner و همکاران در سال ۲۰۲۱، اثر پروبیوتیک‌ها در پیشگیری و درمان بیماری‌های گوارشی را بررسی کرده‌اند و نشان دادند می‌توان از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان درمان کمکی در این بیماری‌ها استفاده کرد (۲۳). Dias و همکاران در سال ۲۰۲۳ مطالعه‌ای را انجام داده‌اند که براساس آن پروبیوتیک‌ها اثرات مثبتی در پیشگیری از انواع مختلف عفونت‌های باکتریایی دارند. آن‌ها به‌دلیل تعامل با مکانیسم‌های مختلف سیستم ایمنی، موفق به محافظت از بدن در برابر این نوع عفونت‌ها شدند (۲۴). در مطالعه دیگری که Shadnoush و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام داده‌اند، مشاهده شد مصرف پروبیوتیک‌ها ازطریق رژیم غذایی می‌تواند بهبود آسیب‌های گوارشی را تسریع و ترمیم کند (۲۵). در مطالعاتی که Yeşilova و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام داده‌اند، به اثرات مثبت مخلوط پروبیوتیک‌ها بر شاخص‌های التهابی بیماران مبتلا به سرطان کولون پرداخته‌اند و نتایج نشان داد سطح سرمی IL- 6 این بیماران با مصرف مخلوط پروبیوتیک کاهش یافت (۲۶).

در مطالعه Horvat و همکاران در سال ۲۰۲۳، نشان داده شد پروبیوتیک‌ها چگونه می‌توانند بهبود علائم سندرم روده تحریک‌پذیر را تسهیل کنند (۲۷). همچنین Ghadaksaz و همکاران در سال ۲۰۲۲، مکانیسم‌هایی را بررسی کرده‌اند که باکتری‌های پروبیوتیک برای از بین بردن و تخریب سموم میکروبی، مانند مایکوتوکسین‌ها و سموم جلبکی به بافت میزبان و سیستم ایمنی آسیب می‌رساند و باعث عفونت‌های موضعی و سیستمیک می‌شود (۲۸).

نتایج مطالعه حاضر همسو با نتایج تحقیقات پیشین است. در مطالعه حاضر، تأثیر مخلوطی از پروبیوتیک‌ها بر محور مغز ـ روده‌ای موش‌های صحرایی نر آلوده به *سالمونلا تیفی‌موریوم* بررسی شد. احتمالاً در مطالعه حاضر نیز پروبیوتیک‌ها باتوجه‌به نقش حفاظتی بر روی سلول‌های اپیتلیوم، اثر آنتاگونیستی در برابر پاتوژن‌ها، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تقویت سیستم ایمنی، یک پیش‌آگاهی شده و سیستم ایمنی را در حالت آماده‌باش قرار داده است. بنابراین با ورود باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* به روده موش‌های صحرایی نر، مکانیسم‌های احتمالی در بدن حیوان فعال شده و سطح ایمونوگلوبولین‌های مخاطی، سایتوکاین‌ها و فعالیت سلول‌های طبیعی کشنده افزایش یافته و ماکروفاژها فعال شده و تحریک ایمنی در برابر باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* افزایش یافته است. همچنین آسیب‌های احتمالی مغزی و روده‌ای ناشی از باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌داری داشته‌اند. بررسی‌ها نشان داده است استفاده از چند پروبیوتیک باعث تأثیر بیشتر در پاسخ ایمنی نیز می‌شود.

نتیجه‌گیری نهایی: با در نظر گرفتن بررسی‌های انجام‌شده و نتایج حاصل از مطالعات، احتمالات اثرات سلامت‌بخش مخلوط پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس برویس*) در آسیب‌های القایی بر بافت مغز و روده موش‌های صحرایی نر آلوده به *سالمونلا تیفی‌موریوم* به‌دلیل عملکردهای مختلف آن‌ها، همچون بهبود و تقویت سیستم ایمنی، بهبود عملکرد مغز، مهار پاتوژن‌ها، ترکیبات مضر و رادیکال‌های آزاد، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و تأثیر بر فاکتورهای التهابی، واضح است. به‌علاوه، ممکن است به‌عنوان یک درمان احتمالی برای کاهش عوارض جانبی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات مضر همراه با سایر درمان‌های رایج بیماری‌های گوارشی استفاده شود. باتوجه‌به تأثیرات درمانی متفاوت باکتری‌های مختلف پروبیوتیک، لازم است سویه‌ها و دُز مؤثر در درمان هر بیماری، مدت‌زمان لازم برای اثرگذاری و مکانیسم عمل گونه‌ها و سویه‌های مختلف پروبیوتیک مشخص شود. بنابراین به مطالعات بیشتر درمورد مکانیسم‌های بالقوه، اثربخشی و نحوه انتقال پروبیوتیک‌ها در عفونت‌های گوارشی و سالمونلایی نیاز است. مطالعه حاضر آسیب‌های القایی باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* بر محور مغز ـ روده و درمان با استفاده از مخلوط پروبیوتیک را بحث و بررسی کرده است.

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاران آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Thomas KM, de Glanville WA, Barker GC, Benschop J, Buza JJ, Cleaveland S, et al. Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* in African food animals and meat: A systematic review and meta-analysis. Int J Food Microbiol. 2020;315:10.8382. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108382 PMID: 31710971

2. Chandra K, Roy Chowdhury A, Chatterjee R, Chakravortty D. GH18 family glycoside hydrolase Chitinase A of *Salmonella* enhances virulence by facilitating invasion and modulating host immune responses. PLoS Pathog. 2022;18(4):e1010407. doi: 10.1371/journal.ppat.1010407 PMID: 35482710

3. Vij S, Thakur R, Rishi P. Reverse engineering approach: a step towards a new era of vaccinology with special reference to *Salmonella*. Expert Rev Vaccines. 2022;21(12):1763-85. doi: 10.1080/14760584.2022.2148661 PMID: 36408592

4. Chaudhuri D, Roy Chowdhury A, Biswas B, Chakravortty D. *Salmonella Typhimurium* infection leads to colonization of the mouse brain and is not completely cured with antibiotics. Front Microbiol. 2018;9:351274. doi: 10.1080/14760584.2022.2148661 PMID: 30072981

5. Ebrahimi H, Rahimi S, Khaki P. The effect of organic acid, probiotic and Echinacea purpurea usage on gastrointestinal microflora and immune system of broiler chickens. J Vet Res. 2015;70(3):293-9. doi: 10.22059/JVR.2015.55273

6. Moghadam A, Karimi Torshizi M, Rahimi S, Karimi Torshizi M. Effect of hatchery probiotic administration methods on performance, and immune response in broiler chickens. J Vet Res. 2010;65(1): 91-96.

7. Rahimi S, Rahimi S, Zahraei Salehi T. The effect of egg derived specific antibody and probiotic on prevention of *salmonella* enteritidis infection in broiler chickens. J Vet Res. 2008;63(2):133-9.

8. Rutsch A, Kantsjö JB, Ronchi F. The gut-brain axis: how microbiota and host inflammasome influence brain physiology and pathology. Front Immunol. 2020;11:604179. doi: 10.3389/fimmu.2020.604179 PMID: 33362788

9. Lavebratt C, Yang LL, Giacobini M, Forsell Y, Schalling M, Partonen T, et al. Early exposure to antibiotic drugs and risk for psychiatric disorders: a population-based study. Transl Psychiatry. 2019;9(1):317. doi: 10.1038/s41398-019-0653-9 PMID: 31772217

10. Arneth BM. Gut–brain axis biochemical signalling from the gastrointestinal tract to the central nervous system: gut dysbiosis and altered brain function. Postgrad Med J. 2018;94(1114):446-52. doi: 10.1136/postgradmedj-2017-135424 PMID: 30026389

11. Bermúdez-Humarán LG, Salinas E, Ortiz GG, Ramirez-Jirano LJ, Morales JA, Bitzer-Quintero OK. From probiotics to psychobiotics: live beneficial bacteria which act on the brain-gut axis. Nutrients. 2019;11(4):890. doi: 10.3390/nu11040890 PMID: 31010014

12. Romo-Araiza A, Gutiérrez-Salmeán G, Galván EJ, Hernández-Frausto M, Herrera-López G, Romo-Parra H, et al. Probiotics and prebiotics as a therapeutic strategy to improve memory in a model of middle-aged rats. Front Aging Neurosci. 2018;10:416. doi: 10.3389/fnagi.2018.00416 PMID: 30618722

13. Gu F, Wu Y, Liu Y, Dou M, Jiang Y, Liang H. Lactobacillus casei improves depression-like behavior in chronic unpredictable mild stress-induced rats by the BDNF-TrkB signal pathway and the intestinal microbiota. Food Funct. 2020;11(7):6148-57. doi: 10.1039/d0fo00373e PMID: 32578646

14. Wan M, Ding L, Wang D, Han J, Gao P. Serotonin: a potent immune cell modulator in autoimmune diseases. Front Immunol. 2020;11:186. doi: 10.3389/fimmu.2020.00186 PMID: 32117308

15. Wotzka SY, Nguyen BD, Hardt W-D. Salmonella Typhimurium diarrhea reveals basic principles of enteropathogen infection and disease-promoted DNA exchange. Cell Host Microbe. 2017;21(4):443-54. doi: 10.1016/j.chom.2017.03.009 PMID: 28407482

16. Fatemi M, Ghandehari F, Kheirkhah A. Effect of Lactobacillus Casei on Hematological and Histopathological Factors in Rats Infected with *Salmonella typhimurium*. J Ilam Uni Med Sci. 2019;27(1):64-74. doi: 10.29252/sjimu.27.1.64

17. Ehrhardt K, Grassl GA. Mouse model to study Salmonella-induced colitis. Bacterial Virulence: Methods and Protocols: Springer; 2022; 2427:201-213. doi: 10.1007/978-1-0716-1971-117 PMID: 35619036

18. Nazari Mm, Rahimi E, Shakeriyan A. Salmonella contamination of camel meat in various stages of destruction in isfahan and chaharmahal va bakhtiari. Int J Food Microbiol. 2017;4(2):29-36.

19. Maldonado Galdeano C, Cazorla SI, Lemme Dumit JM, Vélez E, Perdigón G. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. Ann Nutr Metab. 2019;74(2):115-24. doi: 10.1159/000496426 PMID: 30673668

20. Mulaw G, Muleta D, Tesfaye A, Sisay T. Protective effect of potential probiotic strains from fermented ethiopian food against *Salmonella Typhimurium* DT104 in mice. Int J Microbiol. 2020;2020:1-8. doi: 10.1155/2020/7523629 PMID: 32351574

21. Wieërs G, Verbelen V, Van Den Driessche M, Melnik E, Vanheule G, Marot J-C, et al. Do probiotics during in-hospital antibiotic treatment prevent colonization of gut microbiota with multi-drug-resistant bacteria? A randomized placebo-controlled trial comparing *Saccharomyces* to a mixture of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Saccharomyces*. Front Public Health. 2021;8:578089. doi: 10.3389/fpubh.2020.578089 PMID: 33763399

22. Rode J, Edebol Carlman HM, König J, Hutchinson AN, Thunberg P, Persson J, et al. Multi-strain probiotic mixture affects brain morphology and resting state brain function in healthy subjects: an RCT. Cells. 2022;11(18):2922. doi: 10.3390/cells11182922 PMID: 36139496

23. Milner E, Stevens B, An M, Lam V, Ainsworth M, Dihle P, et al. Utilizing probiotics for the prevention and treatment of gastrointestinal diseases. Front Microbiol. 2021;12:689958. . doi: 10.3389/fmicb.2021.689958 PMID: 34434175

24. Dias TG, Rodrigues LdS, Farias JR, Pereira ALF, Ferreira AGN, Neto MS, et al. Immunomodulatory Activity of Probiotics in Models of Bacterial Infections. Probiotics Antimicrob Proteins. 2023:1-13. doi: 10.1155/2018/8063647 PMID: 37191780

25. Shadnoush M, Nazari M, Hajianfar H, Faghfoori Z. Effects of probiotic yogurt consumption on intestinal permeability in inflammatory bowel disease: a double-blind randomized clinical trial. J Semnan Uni Med Sci. 2021; 23(2): 211-217. doi: 10.52547/koomesh.23.2.211

26. Lavekar AS, Raje DV, Manohar T, Lavekar AA. Role of probiotics in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. Euroasian J Hepatogastroenterol. 2017;7(2):130. doi: 10.5005/jp-journals-10018-1233 PMID: 29201794

27. Horvat IB, Gobin I, Kresović A, Hauser G. How can probiotic improve irritable bowel syndrome symptoms? World J Gastrointest Surg. 2021;13(9):9-23. doi: 10.4240/wjgs.v13.i9.923 PMID: 34621470

28. Ghadaksaz A, Nodoushan SM, Sedighian H, Behzadi E, Fooladi AAI. Evaluation of the role of probiotics as a new strategy to eliminate microbial toxins: A review. Probiotics Antimicrob Proteins. 2022;14(2):224-37. doi: 10.1007/s12602-021-09893-2 PMID: 35031968