CC BY

DOR 20.1001.1.17354226.1400.16.4.6.5

Original paper

Protective effect of mixture of *Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei and Lactobacillus holoticus* on small intestinal tissue of male poisoned rats lead acetate

Alireza Barzin Oshtologh, Zahra Keshtmand*, Hamid Reza Samadikhah

Departmant of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad Univercity, Tehran, Iran
***Corresponding author:** Tel: +989187340515, E-mail: zkeshtmand2001@gmail.com

Received: 8/6/2022 Accepted:8/27/2022

Abstract

One of the most important polluters of the environment is lead acetate. Probiotics are live microbes that are safe, useful and have antioxidant activity for the host. The aim of this research is to investigate the effect of a mixture of native Iranian probiotics (*Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei and Lactobacillus heloticus*) on changes in the small intestine tissue of male rats exposed to lead acetate. In this experimental study, 21 male Wistar rats weighing 200-250 grams were randomly divided into three groups: intact, treated with lead acetate (10 mg/kg) and treated with lead acetate (10 mg/kg) + native Iranian probiotic mixture (10^9 CFU mg/ml) were divided. After five weeks of treatment, the rats were completely anesthetized and the small intestine tissue was collected. After their fixation and processing, 5 micrometer tissue sections were prepared and E&H staining was done. Data were compared with SPSS software, one-way analysis of variance and Tukey's test. Examining the morphological changes of small intestine tissue (inflammation, thickness of muscle layer, height of villi and wound) in the treatment group with probiotics compared to the lead acetate group showed a decrease in tissue damage. According to the findings of this research, the use of a mixture of native Iranian probiotics (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus heloticus*) can have a positive effect on reducing lead acetate-induced damage in the small intestine tissue.

Keywords: Probiotics, Lead acetate, Small intestinal tissue, Rats

مقاله تحقیقی

اثر حفاظتی مخلوط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بر آسیب القایی استات سرب در بافت روده کوچک موش‌های صحرایی نر

علیرضا برزین اشتلق، زهرا کشتمند*، حمیدرضا صمدی خواه

گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
*مسئول مکاتبات: تلفن همراه: ۰۹۱۸۷۳۴۰۵۱۵، پست الکترونیکی: zkeshtmand2001@gmail.com
محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۵/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۳

چکیده

یکی از مهمترین آلوده کننده‌های محیط زیست، استات سرب است.پروبیوتیک‌ها میکروب‌های مفید زنـده ای هـستند که برای میزبان بی خطر، مطمئن و دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی می باشند.هدف از این تحقیق بررسی تاثیر مخلوط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بر تغییرات بافت روده باریک موش‌های صحرایی نر در معرض استات سرب می‌باشد. در این مطالعه تجربی، تعداد۲۱سر موش صحرایی نر با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از نژاد ویستار به شکل تصادفی به سه گروه: intact، تیمار با استات سرب (۱۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) و تیمار با استات سرب(۱۰میلی‌گرم بر کیلوگرم)+ مخلوط پروبیوتیک بومی ایرانی ($CFU10^{9}$ mg/ml) تقسیم شدند. پس از پنج هفته تیمار، موش‌ها کامل بیهوش شده و بافت روده باریک جمع آوری گردید. پس از مراحل فیکساسیون و پردازش آنها، مقاطع بافتی ۵ میکرومتری تهیه و رنگ آمیزی E&H انجام شد. داده‌ها با نرم افزارSPSS ،آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی مورد مقایسه قرار گرفت. بررسی تغییرات مورفولوژیکی بافت روده باریک (التهاب، ضخامت لایه ماهیچه ای، ارتفاع پرز و زخم) در گروه تیمار با پروبیوتیک‌ها در مقایسه با گروه استات سرب کاهش آسیب بافتی را نشان داد. با توجه به یافته‌های این پژوهش استفاده از مخلوط پروبیوتیک‌های بومی ایرانی(*لاکتوباسیلوس رامنوسوس*،*لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*)می‌تواند اثرمثبتی بر کاهش آسیب‌های القایی استات سرب در بافت روده باریک شود.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، استات سرب، بافت روده‌باریک، موش‌های صحرایی

مقدمه

سرب یکی از مهم‌ترین عناصر سنگین و سمی است که از طریق خوردن آب، غذا و از راه تنفس وارد بدن می‌شود. از آنجایی که میزان سرب در هوا، آب و غذا رو به افزایش است، در آینده‌ای نه چندان دور عوارض مسمومیت توسط سرب، امری کاملا محتمل و قابل پیش‌بینی است (۱). به محض بلعیـدن، این فلز با بیومولکول‌های بدن مانند پروتئین‌ها و آنزیم‌ها به شکل ترکیبات بیوتوکسیک پایدار در می‌آید. در نتیجه ساختار آنها، تغییـر کـرده و فعل و انفعالات زیستی آنها با مشکل مواجه می‌شود (۲). اثرات سمی سرب ممکن است در سیستم اعصاب مرکزی و محیطی، خون، کلیه، قلب و عروق، غدد درون‌ریز، سیستم ایمنی، لوله گوارش، دستگاه تولیدمثل و استخوان ایجاد شود (۴،۳).

در فرآیند هضم و جذب، یون سرب از طریق سیستم انتقال فلزات دوظرفیتی همراه با آهن و کلسیم به سلول‌های اپیتلیال روده کوچک وارد می‌شود. این سیستم انتقالی در غشاء گلبول‌های‌قرمز، سلول‌های کبدی و سلول‌های لوله

پراکسیمال نفرون‌ها هم وجود دارد. در صورت کمبود آهن در رژیم غذایی جذب سرب از طریق این سیستم افزایش‌می‌یابد. با این حال این سیستم تنها مسیر جذب سرب نیست، زیرا در محیط کشت سلول‌هایی که فاقد این سیستم هستند باز هم سرب را جذب می‌کنند (۵).

سرب پس از جذب سلولی چه از طریق دستگاه گوارش و چه از طریق سیستم تنفسی وارد خون می‌شود و ۹۹ ٪آن به پروتئین‌های موجود در گلبول‌های قرمز متصل‌شده و سپس بین اندام‌های مختلف توزیع می‌شود (۵). سرب جذب شده ابتدا در کبد کونژوگه شده و سپس به کلیه منتقل می‌شود و مقداری سرب هم در ادرار ترشح می‌شود. در واقع راه اصلی دفع سرب از بدن ادرار است. باقیمانده سرب در بدن بر اندام-های مختلف اثر گذاشته و تأثیرات زیادی در فعالیت‌های فیزیولوژیک در سطح مولکولی، سلولی و درون سلولی دارد که نتایج حاصل از این تغییرات مورفولوژیک می‌تواند حتی بعد از کاهش سطح سرب هم باقی بماند (۶).

اعتقاد بر این است که این عنصر پیوند محکمی را با ماکرومولکول‌های اجزای درون سلولی تشکیل می‌دهد مسمومیت با سرب، به دلیل تمایل سرب به پروتئین‌ها و ظرفیت آن در تحریک کانال‌های کلسیم و آهن رخ می‌دهد (۷). شبیه دیگر فلزات سرطان زا، سرب از طریق القای استرس اکسیداتیو به ترکیبات سلولی آسیب می‌زند (۸).

سرب با اشتراک گذاری الکترون و ایجاد پیوند کوالانس با گروه‌های سولفیدهیدریل موجود در آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی سبب کاهش سطوح کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و تولید گونه‌های اکسیژن آزاد در سلول شده، این دو مکانیسم توسط سرب در بافت‌های مختلف، همزمان با هم رخ داده و باعث افزایش میزان گونه‌های اکسیژن آزاد و افت پتانسیل آنتی‌اکسیدانی سلولی و القاء آسیب در بافت‌ها می‌شود (۹).

سرب از طریق افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها می‌تواند باعث آسیب بافتی مزمن شود. به نظر می‌رسد پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش رادیکال‌های آزاد از طریق بر هم خوردن یا کاهش جریان خون دیواره لوله گوارش موجب کاهش حرکات آن و ایجاد آسیب در بخش‌های مختلف از جمله ساختار و عملکرد روده باریک شود (۱۰).

امروزه پرداختن به راهکارهای درمانی جدیدتر و یا استفاده از روش‌های پیشگیری مناسب‌تر امری مهم به نظر می‌رسد. با توجه به پیشرفت علم بیوتکنولوژی در دنیای امروز، محققین به استفاده از متابولیت‌های طبیعی بازدارنده توجه بسیار زیادی نشان داده‌اند، بنابراین علاقه‌مندی شدیدی در جایگزینی از این مواد و استفاده از روش‌های دوستدار محیط زیست به وجود آمده است، که یکی از این ترکیبات پروبیوتیک‌ها هستند که ذهن محققان را به خود معطوف کرده است (۱۱).

اخیراً توسط سازمان بهداشت جهانی تعریف پروبیوتیک تصحیح شده است و در حال حاضر تحت عنوان میکروارگانیسم‌های زنده‌ای که اگر به میزان کافی مصرف شوند برای میزبان خود فوایدی را به همراه داشته، تعریف می‌شود. این تعریف مستلزم آن است که واژهٔ پروبیوتیک تنها برای میکروب‌های زنده‌ای که اثر مثبت دارند استفاده شود (۱۲). پروبیوتیک‌ها از طریق بهبود تعادل میکروبی روده اثرات سودمندی بر میزبان دارند به طوری که مطالعات صورت گرفته در چند دهه اخیر نشان داده است که استفاده از پروبیوتیک‌ها به حفظ سلامت و قدرت بدن، مبارزه با بیماری‌های روده ای و سایر بیماری‌ها کمک می‌کنند (۱۳،۱۴).

از جمله مکانیسم‌هایی که پروبیوتیک‌ها از طریق آنها در صورت مصرف به میزان لازم اثرات سلامت زایی موثری برای میزبان خواهند داشت و می‌توانند حتی در پیشگیری از برخی بیماری‌ها اثرگذار باشد می‌توان به، تولید ترکیبات مهارکننده، رقابت برای جایگاه‌های اتصال، رقابت برای مواد غذایی، از بین بردن گیرنده‌های سموم، تقویت سیستم ایمنی و مهار آپوپتوز، توانایی تولید و افزایش سطح متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی، افزایش و تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان‌ها در میزبان، کاهش تولید ROS از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های تولیدکننده رادیکال‌های آزاد و تنظیم برخی مسیرهای سیگنالینگ اشاره کرد (۱۵،۱۶).

این موجودات زنده مفید با افزایش سطح سیتوکاین‌ها و ایمونوگلوبولین‌ها، افزایش تکثیر سلول‌های مونونوکلئاز، فعال‌کردن ماکروفاژها، افزایش فعالیت سلول‌های طبیعی کشنده، تعدیل خود ایمنی و تحریک ایمنی در برابر

باکتری‌های بیماری‌زا و پروتوزوآها سبب تقویت سیستم ایمنی می‌شوند (۱۷).

بررسی اثر پروبیوتیک کلوستات روی برخی از شاخص-های رشد، خونی و بافت روده ماهی قزل‌آلا نشان داد که پروبیوتیک در متعادل کردن فلور میکروبی میزبان نقش مهم و تأثیرگذاری داشته است (۱۸).

Ramos و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که افزودن پروبیوتیک‌ها در رژیم غذایی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) منجر به تغییر تعداد سلول‌های جامی شکل روده باریک ، عملکرد جذب و گوارش مواد غذایی خواهد شد (۱۹).

Soltandallal و همـــــکاران فعالیت *الکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *الکتوباسیلوس روتری* علیه باکتری‌های بیماریزای عفونت روده ای موش کوچک آزمایشگاهی انجام دادند و پس از ارزیابی به دو روش In Vivo و In vitro نشان دادند که این دو باکتری دارای اثر ضد میکروبی بوده و می-توان از آنها در پیشگیری و درمان بیماری‌های گوارشی استفاده نمود (۲۰).

Madsen و همکاران نیز تاثیر مستقیم ترکیبات پروبیوتیکی بر عملکرد اپی تلیالی روده انسان را گزارش دادند (۲۱).

اخیراً پتانسیل اتصال این باکتری‌ها به فلزات سنگین و حذف آنها از محیط نیز مورد توجه واقع‌شده است. سطح باکتری‌های پروبیوتیک همچون سایر باکتری‌های گرم مثبت از یک لایه‌ی ضخیم پپتیدوگلیکان، تیکوئیک اسید، پروتئین-ها و پلی ساکاریدها تشکیل‌شده است که حاوی انواع مختلف گروه‌های منفی کربوکسیل، هیدروکسیل و فسفات می‌باشند و ظرفیت بالایی برای اتصال به یون‌های کاتیونی از جمله سرب دارند. بنابراین محققان معتقدند که این باکتری‌ها می-توانند گزینه‌ی مناسبی برای حذف بیولوژیک فلزات سنگین باشند (۴).

با توجه به اهمیت امروزه‌ی منابع طبیعی موثر در درمان و از سویی عملکرد پروبیوتیک‌ها، می‌توان در جهت کشف ترکیبات جدید زیستی فعال در این حیطه گام موثری برداشت. از آنجایی که تاکنون اثر حفاظتی مخلوط پروبیوتیک بومی بر آسیب‌های القایی فلزات سنگین مانند سرب انجام نشده از این رو هدف از این مطالعه بررسی تأثیر مخلوط پروبیوتیک‌های بومی ایرانی(*لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*) بر آسیب‌های القایی استات سرب در بافت روده باریک موش‌های صحرایی نر می‌باشد.

مواد و روش ها

حیوانات

تعداد ۲۱ سر موش صحرایی نر سالم بالغ نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از شرکت انستیتو پاستور ایران تهیه شد و به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط، در شرایط کنترل شده ،۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی با درجه حرارت ۳ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد نگهداری شدند. کف قفس‌ها به وسیله خاک اره پوشیده شد تا محیط مناسبی برای موش‌ها آماده گردد و برای حفظ بهداشت قفس‌ها هر سه روز یک بار تمیز شدند و آب مواد غذایی به مقدار کافی و روزانه در اختیار حیوانات قرار داده شد. آزمایشات در بازه‌ی زمانی مشخصی از روز و منطبق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد و در کلیه روش‌ها، تمامی ملاحظات اخلاقی کار با حیوانات رعایت شد (کد اخلاق: IR.IAU.CTB.REC.1400.026).

تهیه استات سرب

استات سرب جهت القاء آسیب در بافت روده کوچک با کد ۱۰۷۳۷۵ ساخت آلفاایسر آلمان از شرکت آزمیران تهیه شد.

تهیه مخلوط پروبیوتیک ها

مخلوط پروبیوتیک‌ها شامل باکتری‌های *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (IBRC-M11322)، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* TG-35) و *لاکتوباسیلوس کازئی* (IBC-M10784) به صورت پودر و با غلظت 10^{10} CFU/ml از شرکت تک‌ژن زیست تهیه گردید. یک گرم از مخلوط پروبیوتیک‌های بومی ایرانی در ۹ سی‌سی آب مقطر حل شده و به هر موش گروه سوم، به مدت ۳۵ روز متوالی در بازه زمانی ساعت ۹ تا ۱۱ صبح یک

سی‌سی از محلول آماده شده گاواژ شد (۱۵). استات سرب به صورت درون صفاقی و تک دوز به گروه‌های دوم و سوم تزریق شد (۲۳).

گروه بندی حیوانات آزمایش

موش‌های صحرایی نر به ۳ گروه ۷ تایی به صورت تصادفی تقسیم شدند. گروه‌ها عبارتند از :

گروه intact: بدون تیمار.

گروه کنترل منفی: دریافت کننده استات سرب به صورت داخل صفاقی و تک دوز (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) (۲۲).

گروه تجربی: موش‌های دریافت‌کننده استات‌سرب و مخلوط پروبیوتیک با غلظت ۱درصد (10^9 CFU/ml) به مدت ۳۵ روز گاواژ شدند.

بررسی هیستولوژیکی بافت روده کوچک

بعد از ۳۵ روز و با رعایت اصول کمیته اخلاقی نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تهران مرکزی، پس از بیهوشی موش‌های صحرایی با کتامین زایلارین (۵۵mg/kg) از هر موش سه نمونه از قسمت‌های مختلف روده باریک (دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم) برداشته شده و با فرمالین ۱۰ درصد فیکس و پس از مراحل آبگیری و تهیه بلوک، برش-های بافتی با ضحامت ۵ میکرونی جهت بررسی هیستوپاتولوژیکی یافت روده کوچک با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین آماده شد. به ازای هر موش ده مقطع با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۴). پارامترهای مورد بررسی شامل سلول‌های التهابی، ارتفاع طول پرز، ضخامت لایه عضلانی و ایجاد زخم در بافت روده باریک نمره دهی شد. برای حالت بدون تغییر نمره صفر تا یک، تغییر اندک نمره یک تا دو، تغییر متوسط نمره دو تا سه، تغییر شدید نمره ۳ تا ۴ در نظر گرفته شد (۲۵).

نمره دهی تغییرات پرزها: برای حالت طبیعی نمره صفر تا یک، کوتاه شدن کم پرزها نمره یک تا دو، کوتاه شدن متوسط پرزها نمره دو تا سه، کوتاه شدن شدید پرزها نمره ۳ تا ۴، برای تغییرات التهاب: برای حالت طبیعی نمره صفر تا یک، ورود موضعی سلول‌های التهابی نمره یک تا دو، وجود التهاب در غشا پایه نمره دو تا سه، وجود التهاب شدید در غشاء پایه نمره ۳ تا ۴، تغییرات ضخامت لایه عضلانی: برای حالت طبیعی نمره صفر تا یک، کاهش کم ضخامت لایه عضلانی نمره یک تا دو، متوسط ضخامت لایه عضلانی نمره دو تا سه، کاهش شدید ضخامت لایه عضلانی نمره ۳ تا ۴ و برای بررسی زخم: برای حالت طبیعی نمره صفر تا یک، ایجاد زخم در اپیتلیوم نمره یک تا دو، ایجاد زخم در لایه مخاطی نمره دو تا سه، ایجاد زخم در لایه عضلانی نمره ۳ تا ۴ در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌های گروه‌ها از آزمون کالموگروف-اسمیرنوف استفاده شد ($P>0/05$). تحلیل داده‌های به دست آمده از این تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۳ و آزمون آماری واریانس یک طرفه و روش آماری تست توکی محاسبه گردید. اطلاعات به صورت میانگین ± خطای انحراف معیار و $P<0/05$ معناداردر نظر گرفته شد.

نتایج

در بررسی لایه‌های مختلف بافت روده باریک (دئودنوم ژژنوم و ایلئوم) ضخامت لایه عضلانی، نفوذ سلول‌های التهاب به لایه مخاطی و عضلانی، کاهش ارتفاع پرزها و ایجاد زخم در لایه‌های مختلف مورد بررسی قرارگرفت (جدول ۱). در بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی بافت روده باریک در گروه intact، آسیبی مشاهده نشد (شکل ۱).

بررسی تصاویر در گروه دریافت کننده استات سرب آسیب در لایه‌های مختلف را نشان داد. کاهش ضخامت لایه عضلانی و ارتفاع پرزها ، نفوذ سلول‌های التهابی نوتروفیل و لنفوسیت به لایه های مختلف، نکروزی شدن بافت و خونریزی در مقایسه با گروه intact به صورت معناداری مشاهده شد ($P <0/001$)(شکل ۲).

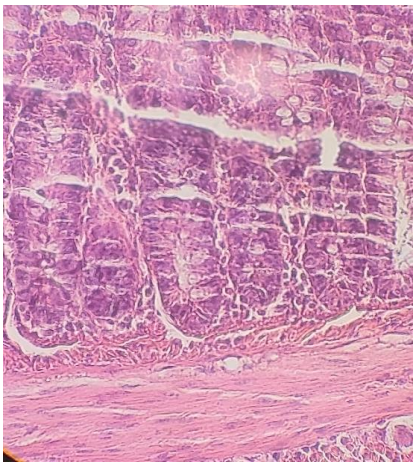
تصاویر بافت روده در گروه تیمار با مخلوط پروبیوتیک-ها انسجام و نظم بیشتر و کاهش آسیب در لایه‌های مختلف را در مقایسه با گروه دریافت کننده استات سرب نشان داد (شکل ۳).

جدول ۱ - مقایسه پارامترهای بافتی روده باریک در گروه‌های مختلف.
Table 1. Comparison of tissue parameters of the small intestine in different groups.

Pb(10mg/kg)+mix probiotic(10^9cfu/ml)	Pb(10mg/kg)	Control	parameters
2.15±0.17***##	3.24±0.15***	0.45±0.11	inflammation
2.09±0.08***#	3.81±0.23***	0.33±0.10	height of villi
2.05±0.05***#	3.12±0.19***	0.27 ± 0.07	wound
2.03±0.21***##	3.52±0.16***	0.45±0.09	thickness of muscle layer

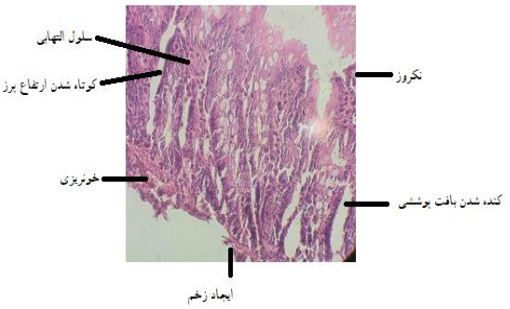
نتایج بر اساس میانگین ± انحراف معیار، ***:۰/۰۰۱> P در مقایسه با گروه intact ، #:۰/۰۵>Pدر مقایسه با گروه کنترل منفی، ##:۰/۰۱> P در مقایسه با گروه کنترل منفی.

Results based on mean ± standard deviation, ***: P <0.001 compared to the intact group, # : P <0.050 compared to the Negative control group, ##: P <0.01 compared to the negative control group



شکل ۱ - تصاویر میکروسکوپی ساختار طبیعی روده باریک موش صحرایی در گروه intact (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی X۴۰۰).

Figure 1 - Microscopic images of the normal structure of the small intestine of rats in the intact group (hematoxylin-eosin staining, X400 magnification).



شکل ۲ - تصاویر میکروسکوپی روده باریک موش صحرایی گروه دریافت کننده استات سرب. کوتاه شدن شدید پرزهای روده، نفوذ سلول‌های التهابی، خونریزی، نکروز سلول‌های پوششی و جدا شدن آن‌ها و زخم در مخاط قابل مشاهده است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی X۴۰۰).

Figure 2 - Microscopic images of the small intestine of rats receiving lead acetate. The severe shortening of the intestinal villi, the infiltration of inflammatory cells,bleeding, the necrosis of the lining cells and their separation, and the wound in the mucosa can be seen (hematoxylin-eosin staining, magnification X400).

شکل ۳ -تصاویر میکروسکوپی روده باریک موش صحرایی گروه تیمار شده با مخلوط پروبیوتیک بومی ایرانی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی X۴۰۰).

Figure 3. Microscopic images of the small intestine of rats in the group treated with a native Iranian probiotic mixture. (hematoxylin-eosin staining, X400 magnification).

بحث

یکی از مشهورترین فلزات سنگین سمی، سرب می‌باشد. مطالعات دهه اخیر نشان می‌دهد تجمع سرب در بدن حتی

به مقدار کم باعث مسمومیت شده و اثرات سوء زیادی بر ساختارهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بدن دارد (۲،۴).

مطالعات و بررسی تأثیر عناصر سنگین بر موجودات زنده در دهه‌های اخیر به شدت افزایش یافته است. مطالعه پستانداران کوچک به خصوص جوندگان نشان داده است که آنها قادر به جمع آوری طیف وسیعی از آلاینده‌ها در بدن خود می‌باشند (۲۶).

علاوه براین، الگوی توزیع عناصرسنگین دراندام‌های مختلف جوندگان‌شبیه‌انسان‌است. در پژوهش‌های‌زیادی‌از جوندگان‌برای کنترل آلودگی محیط زیست و همچنین برای ارزیابی خطر قرار گرفتن در معرض عناصر سنگین برای مردم ساکن در یک منطقه آلوده استفاده شده است (۲۷).

در این تحقیق اثر حفاظتی مخلوط پروبیوتیک‌های بومی ایرانی (*لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس*) بر علیه استات سرب به‌عنوان یک ماده شیمیایی آسیب‌رسان بر بافت‌های بدن از جمله بافت روده باریک بررسی شد (۲۸).

داده‌ها حاکی از آن است که استات سرب دارای اثرات تخریبی بر بافت روده باریک می‌باشد. یکی از مکانیسم‌های دخیل در آثار سمی سرب در بدن جانوران تغییراتی است که در خواص بیوفیزیک غشاء سلول اعمال می‌کند و به این ترتیب باعث بروز استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۹).

سرب موجب تخریب بافت‌های بدن و همچنین آزاد شدن رادیکال آزاد از بافت‌های آسیب دیده شده و از طریق اختلال در مسیر آپوپتوز و ایجادپراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع موجب اختلال در فعالیت بیولوژیکی سلول‌ها و در نتیجه سبب وقفه در سنتزپروتئین، اختلال در متابولیسم لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه و آسیب در اندام‌ها و بافت‌ها می‌شود (۳۰).

نتایج بررسی بافت روده ای در گروه موش‌های آلوده شده با استات سرب بی نظمی، خونریزی و ایجاد تخریب در هر چهار لایه بافت روده باریک را نشان داد، همچنین نفوذ سلول‌های التهابی نوتروفیل و لنفوسیت به لایه های مختلف و نکروز در لایه مخاطی در مقایسه با گروه intact بیشتر نشان داده شد. نتایج بررسی بافت روده باریک در گروه دریافت کننده مخلوط پروبیوتیک، کاهش آسیب در بخش‌های مختلف را در مقایسه با گروه دریافت کننده استات سرب را نشان داد.

مکانیسم‌های احتمالی موثر پروبیوتیک‌ها بر بافت‌های مختلف از طریق تولید مواد آنتی‌بیوتیکی، مهار رشد پاتوژن‌ها، تغییر متابولیسم میکروبی، کاهش pH در روده و تحریک سیستم ایمنی بدن است (۱۵،۱۶).

Ahmadi و همکاران در تحقیق خود اثر مثبت *الکتوباسیلوس فرمنتوم* بر فاکتورهای هماتولوژیک و هیستوپاتولوژیک در رت‌های آلوده با *شیگال دیسانتری* جهت پیشگیری از آسیب‌های بافتی و مهار روند بیماریزایی از پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل درمانی را گزارش دادند (۳۱).

نتایج حاصل از بررسی اثر پروبیوتیک کلوستات (*Bacillussubtilis*) بر برخی از شاخص‌های رشد، خونی و بافت روده ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) توسط Mohammadi و همکاران نشان داد که استفاده خوراکی از پروبیوتیک *B.subtilis* اثرات سودمند و مثبت بر پارامترهای رشد، خونی و همچنین بافت روده ماهی قزل آلای رنگین کمان دارد (۳۲).

Pavlova و همکاران (۲۰۱۶) اثر *لاکتوباسیلوس*‌های مختلف بر بافت روده کوچک را بررسی کردند، نتایج تحقیق نشان داد که استفاده از مخلوط پروبیوتیکی و آنتی بیوتیک می‌توانند به عنوان اساس مطالعات کاربردی به منظور اثبات تاثیر مفید بر محدود سازی جذب سموم و بهبود خروج مواد درونی‌زاد و زنوبیوتیک‌ها موقع تجویز ترکیبی از داکسی سایکلین و گونه‌های *لاکتوباسیلوس* برای جانوران مختلف از جمله طیور مورد استفاده قرار گیرند (۳۳).

Newaj-Fyzul و همکاران در ۲۰۱۴ نشان دادند که رژیم حاوی پروبیوتیک‌ها معمولاً با افزایش هضم و جذب غذا از طریق ترشح آنزیم‌های خارج سلولی، تعادل در فلور میکروبی روده و همچنین افزایش تجزیه مواد آلی موجب بهبود عملکرد رشد در آبزیان می‌شوند. باسیلوس‌ها عمدتاً با بهبود آنزیم‌های هضمی از جمله لیپاز، آمیلاز و پروتئاز و همچنین سنتز اسیدهای چرب و ویتامین‌ها در روده موجب افزایش هضم غذا و افزایش رشد در ماهیان می‌شوند (۳۴).

پژوهش حاضر نیز در راستای نتایج پژوهش‌های پیشین می‌باشد.

احتمالا در این تحقیق نیز پروبیوتیک‌ها با توجه به فعالیت آنتی اکسیدانی؛ موجب کاهش استرس اکسیداتیو در بافت‌ها و بهبود آنتی اکسیدان‌های بافتی در اندام‌های مختلف شده و به دام انداختن رادیکال‌های آزاد باعث کاهش آسیب-های ایجاد شده در گروه دریافت کننده استات سرب می-شوند. همچنین یکدیگر از مهمترین ویژگی‌های پروبیوتیک‌ها تقویت سیستم ایمنی می‌باشد. به‌نظر می‌رسد حضور آنها در بدن باعث تحمیل یک پیش‌آگاهی به بدن شده و سیستم ایمنی را در حالت آماده‌باش قرارداده است و بنابراین احتمالا به محض ورود سرب در بدن از تحریک شدید سیستم ایمنی ممانعت می کند. از طرف دیگر مهم‌ترین مکانیسم توکسیسیتی فلزات سنگین در بدن القاء استرس اکسیداتیو است. باتوجه به‌اینکه پروبیوتیک‌ها دارای خاصیت آنتی-اکسیدانی بالایی هستند، احتمال می‌رود حضور *مخلوط پروبیوتیک های بومی* در بدن مانع افزایش بیش‌از حد رادیکال‌های فعال اکسیژن تحت اثر سرب در بدن شده و بنابراین مانع افزایش التهاب شده است (۳۵).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان‌داد که استفاده از مخلوط پروبیوتیک‌های بومی ایرانی(*Lactobacillus casei bacteria* ،*Lactobacillus rhamnosus Bacteria* و *Lactobacillus helveticus*) سبب کاهش آثار سوء سرب بر بافت روده باریک می‌شود. تعدیل نتایج بدست آمده در گروه آلوده با سرب که بامخلوط پروبیوتیک بومی تیمار شده بودند نشان می‌دهد که این باکتری‌ها احتمالاً در سیستم گوارشی به سرب اتصال یافته و با مکانیسمی مشابه حذف سرب از محیط خاکی و آبی، پتانسیل حذف سرب از بدن را داشته است و بدین ترتیب تا حدودی به بهبود علائم منفی ناشی از حضور سرب کمک کرده است. با توجه به این که درصد این تاثیرگذاری به عوامل مختلف شامل: مرحله تولد، تولید مثل، سن، نژاد حیوان، مدت زمان و میزان مصرف بستگی دارد، شاید اگر حیوانات مدت بیشتری تحت پیش تیمار و تیمار این باکتری قرارداده می‌شدند، نتایج مربوط به گروه تیمار شده با به سطح گروه کنترل نزدیک‌تر می‌شد. بنابراین برای تأیید این نتایج آزمایشات تکمیلی و بررسی مسیرهای مولکولی نیاز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه‌دانشجویی‌درمقطع کارشناسی ارشد با کد پایان‌نامه ۱۰۱۲۹۳۳۶۹۸۳۸۱۹۲۱۴۰۰۱۶۲۴۳۱۳۷می‌باشد که در گروه زیست دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی انجام شد.

عدم تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که تعارض در منافع وجود ندارد.

منابع مورد استفاده

1. Anjum, M.R., and Reddy, P.S. (2015). Recovery of lead-induced suppressed reproduction in male rats by testosterone. *Andrologia*, 47(5): 560-567.
2. Tirima, S., Bartrem, C., von Lindern, I., von Braun, M., Lind, D., Anka, S.M., and Abdullahi A. (2018). Food contamination as a pathway for lead exposure in children during the 2010-2013 lead poisoning epidemic in Zamfara, Nigeria. *Journal of Environmental Sciences,* 67: 260-272.
3. Mirazi, N., Shahbazi, L., and Nasri, S. (2016). Study of pelargonium graveolens l.hydroethanolic leaves extract on spermatogenesis in male rats induced with lead acetate. *The Journal of Urmia University of Medical Sciences*, 26(11): 1001-1009.
4. Bytolahi, F., Fatemi, M., and Ghandehari, F. (2019). Effect of Lactobacillus rhamnosus on the lead-induced hematotoxicity in adult *rats. Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(2): 119-129.
5. Garmabi, B., Jafarisani, M., and Khastar, H. (2019). Improvement of renal oxidative stress and function in lead acetate induced renal toxicity in rats followed by ascorbic acid consumption. *Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences,* 14(2): 33-37.

6. Eman, A., El-Ghffar A. and El-Aal A. (2018). Ameliorating effect of L-Cysteine on lead acetate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in male mice. *Progress in Nutrition,* 20(2): 79-89.
7. Ayoubi, A., Vaizadeh, R., Omidi, A., and Abolfazli, M.D. (2014). Protective effect of acid ascorbic (C vitamin in) lead acetate exposed diabetic male rats. Evaluation of blood biochemical parameters and testicular histopathology. *Istanbul Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 41(1): 84-91.
8. Andjelkovic, M., Djordjevic, A.B., Antonijevic, E., Antonijevic, B., Stanic, M., Kotur-Stevuljevic, J., and Spasojevic-Kalimanovska, V. (2019). Toxic effect of acute cadmium and Lead exposure in rat blood, liver, and kidney. *International Journal of Environmental Research* and *Public Health*, 16(274): 1-21.
9. BaSalamah, M.A., Abdelghany, A.H., El-Boshy, M., Ahmad, J., Idris, S., and Refaat, B. (2018). Vitamin D alleviates lead induced renal and testicular injuries by immunomodulatory and antioxidant mechanisms in rats. *Scientific reports,* 8: 4853.
10. Reddy, Y.S., Srivalliputturu, S.B., and Bharatraj, D.K. (20180.The effect of lead (Pb) exposure and iron (Fe) deficiency on intestinal lactobacilli, E. coli and yeast: A study in experimental rats. *Journal* of *Occupational Health,* 60(6): 475-484.
11. Sel, İ., Hisar, O., Yilma, S., and Yigit, M. (2016). Effects of different probiotic bacteria on growth, body composition, immune response and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sublethal water temperature. *Marine Science* and *Technology Bulletin*, 4: 21–28.
12. Taheri, S., and Khomeiri, M. (2019). Psychobiotics and brain-gut microbial axis. *Iran Journal Medicine Microbiology*, 13 (1) :1-112.
13. Li, H. Y., Zhou, D. D.,Gan, R. Y., Huang, S. Y., Zhao, C. N., Shang, A., Xu, X. Y., and Li, H. B. (2021). Effects and mechanisms of probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics on metabolic diseases targeting gut microbiota: a narrative review. *Nutrients*, 13(3211): 1-22.
14. Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F.J., Gil-Campos, M., and Gil A. (2020). Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition,* 11(4): 549-566.
15. Pate, l.R., and DuPont, H.L. (2015). New approaches for bacterio therapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60 (2): 108-121.
16. Brdaric, E., Sokovi, C .,Baji ,C.S., Đokic, J., Đur, di C.S., Ruas-Madiedo P., and Stevanovic, M. (2021). Protective effect of an exopolysaccharide produced by *Lactiplantibacillus plantarum* BGAN8 against Cadmium-Induced toxicity in Caco-2 cells. *Frontiers in* Microbiology, 12(759378): 1-12.
17. Monadi Al-Enazi, A.M., Virk, P., Hindi, A., Awad, A.M ., and Elobeid, M. (2020).Protective effect of probiotic bacteria and its nanoformulation against cadmium-induced oxidative stress in male Wistar rat. *Journal of King Saud University Science,*32(7): 3045-3051.
18. Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L. and Lin, W.Y. (2010). Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper Epinephelus coioides. . *Fish Shellfish Immunol*ogy, 29(5): 803-809.
19. Ramos, M.A., Batista, S., Pires, M.A., Silva, A.P., Pereira, L.F., and Saavedra, M.J. (2017). Dietary probiotic supplementation improves growth and the intestinal morphology of Nile tilapia. *Animal*, 11: 1259–1269.
20. Soltandallal, M.M., Keshtvarz, M., Zamani, S., and Shirazi, L. (2016). Evaluation of anti-microbial activity of *Lactobacillus acidophillus* and *Lactobacillus ruteri* against entero pathoges by In vitro and In vivo methods. *Journal of Gorgan University Medcine Science,* 18: 45-52.
21. Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., Mckaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C.H, Doyle, J., Jewell, L., and De Simone, C., (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology,* 121: 580-591.
22. Hassan, A. A., and Jassim, H.M.(2010).Effect of treating lactating rats with lead acetate and its interaction with vitamin E or C on neurobehavior, development and some biochemical parameters in their pups Iraqi. *Journal of Veterinary Sciences,* 24(1): 45-52.
23. Abasi, S., and Keshtmand, Z. (2020).The effect of probiotic *bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus casei* on sperm maturation in streptozotocin-diabetic rats. *Iranian South Medical Journal*, 22(6): 392-401.
24. Alizadeh, Gh., and Keshtmand, Z .(2021). The effect of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on kidney tissue in streptozotocin-diabetic rats. *Applied Microbiology In Food Industries*, 7(4): 21-49.
25. Gulgun, M., Erdem, O., Oztas, E., Kesik, V., Balamtekin, N., Vurucu, S., Kul, M., Kismet, E., and Vedat, K. (2010).Proanthocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress. *Experiment Toxicology Pathology,* 62(2): 109-115.

26. Cobbina, S.J., Chen, Y., Zhou, Z., Wu, X., Feng, W., Wang, W., Li, Q., Zhao, T., Mao, G., and Wu, X. (2015). Interaction of four low dose toxic metals with essential metals in brain, liver and kidneys of mice on sub-chronic exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39: 280-291.
27. Yeganeh, Shali S., Rahimi, G.H., Jahanban, L., Moradi, S., and Ebrahimi, E. (2018). Investigation of heavy metals accumulation in different tissues of laboratory rat. *Iranian Journal of Research in Environmental Health*, 4(2): 94-103.
28. Arian, S., Kaboosi, H., Heshmatipour, Z., Khazaei –Koohpar, Z., and Peyravii-Ghadikolaii, F. (2019). Molecular analysis of seven *Lactobacillus* strains isolated from human origin in West of Mazandaran. *Iran Journal of Medical Microbiology*, 13 (1): 56-68.
29. Guli, M., Winarsih, S., Barlianto, W., Illiandri, O., and Sumarno, S.P. (2021). Mechanism of *Lactobacillus reuteri* probiotic in increasing intestinal mucosal immune system.open access macedonian. *Journal of Medical Sciences*, 30(9): 784-93.
30. Mishra, S., and Acharya, S.A. (2021). Brief overview on probiotics: the health friendly microbes. *Biomedical & Pharmacology Journal*; 14(4), 1869-1880.
31. Ahmadi, F., Ghandehari, F., and Tajedin, N. 2019. Effect of *Lactobacillus fermentum* on Hemathological and Histopathological Factors in Rats Infected by Shigella dysenteriae. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 25(9): 103-114.
32. Mohammadi, M., Pourmozaffar, S., and Gozari, M. (2019). Evaluation of the effect of Clustat probiotic (*Bacillus subtilis*) on some growth and hematological factor as well as intestine tissue of the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Journal of Animal Physiology and Development,* 13(14): 85-96.
33. Pavlova, I., Milanova, A.,Danova, S., and Fink-Gremmels, J. (2016). Enrofloxacin and probiotic lactobacilli influence PepT1 and LEAP-2 mRNA expression in poultry. *Probiotics and antimicrobial proteins*, (4): 215-220.
34. Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A.H. and Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431: 1–11.
35. Tang, S., Liu, J., Xu, C., Shang, D., Chen, H., and Zhang, G. (2021). Effects of probiotics on the improvement and regulation of intestinal barrier dysfunction and immune imbalance in intra-abdominal infections. *International journal of functional nutrition*, 2(12): 1-8.