Iranian Journal of Biological Sciences.2023; 18(1):21-33

Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Histopathological Effect of Mixed Probiotic (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus heloticus*)on Copper Sulfate Induced Lesions in the Lung Tissue of Male Rats

Hosna sadat Kashfi[1], Zahra Keshtmand[2*], Ramin Mohammadi Aloucheh[2]

1 . M.Sc of student, Departmant of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad Univercity, Tehran, Iran

2 . Assistant of professor, Departmant of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad Univercity, Tehran, Iran

Place of research: Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Info

Article History:

Recived 04.25.2023
Revised 06.14.2023
Accepted 07.01.2023
Online 07.02.2023

KeyWords:
Probiotics
Copper sulfate
Lung tissue
Rats

***Corresponding author:**
E-mail address

hosna.sadat.kashfi@gmail.com
*zkeshtmand2001@gmail.com
r.mohamadi@iauctb.ac.ir

Abstract

Introduction: Heavy metals can have adverse effects on humans due to their toxic nature. One of the most important strategies to adjust the microbiota balance and improve the health status is the use of probiotics as beneficial live microorganisms.

Aim: The purpose of this research is to investigate the effect of probiotic mixture of *Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei* and *Lactobacillus heloticus* on the induced effects of copper sulfate in the lung tissue of male rats.

Materials and methods: In this experimental study, 21 male Wistar rats were divided into 3 groups of 7: control, receiving copper sulfate and copper sulfate + probiotic mixture. Copper sulfate (200 mg/kg) three days in a row and probiotics (109 CFU/Ml) were gavage to the rats for 35 days. The samples were photographed and studied by hematoxylin-eosin staining and light microscopy.

Results: Examining the morphological changes of the lung tissue in the probiotic treatment group showed a reduction in the tissue damage compared to the copper sulfate group.

Conclusion: According to the findings of this research, probiotics can probably be used as a new strategy in a wide range of medicinal products. The goals of prevention or improvement of treatment methods were used.

Cite this article: Kashfi H.S, Keshtmand Z.*, Mohammadi Aloucheh R. Histopathological Effect of Mixed Probiotic (*Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei* and *Lactobacillus heloticus)* on Copper Sulfate Induced Lesions in theLung Tissue of Male Rats. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(3):21-33

doi 10.30495/ZISTI.2023.1984731.1161 DOR 20.1001.1.17354226.1402.18.1.2.9

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X
This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

دانش زیستی ایران . سال۱۴۰۲ . دوره ۱۸ . شماره ۱

مقاله تحقیقی

دانش زیستی ایران

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

تاثیر هیستوپاتولوژیک مخلوط پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*) برآسیب های القایی سولفات مس در بافت ریه موش های صحرایی نر

حسنا سادات کشفی[۱] ، زهرا کشتمند*[۲]،رامین محمدی آلوچه[۲]

۱ دانشجوی کارشناسی ارشد،گروه زیست شناسي، واحد تهران مرکزي، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران

۲ استادیار،گروه زیست شناسي، واحد تهران مرکزي، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران

محل انجام تحقیق :گروه زیست شناسي، واحد تهران مرکزي، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۲/۰۲/۰۵

بازنگری ۱۴۰۲/۰۳/۲۴

پذیرش ۱۴۰۲/۰۴/۱۰

نمایه ۱۴۰۲/۰۴/۱۱

کلمات کلیدی

پروبیو تیک

سولفات مس

بافت ریه

موش های صحرایی

* نویسنده مسؤل

hosna.sadat.kashfi@gmail.com

*zkeshtmand2001@gmail.com

r.mohamadi@iauctb.ac.ir

چکیده

مقدمه: فلزات سنگین به دلیل ماهیت سمی خود می تواند اثرات نامطلوبی برای انسان داشته باشند، یکی از از مهمترین راهبردها برای تعدیل توازن میکروبیوتا و بهبود وضعیت سلامت استفاده از پروبیوتیک ها با عنوان میکروارگانیسم های زنده مفید می باشد.

هدف: هدف از این تحقیق بررسی تاثیر مخلوط پرو بیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بر آسیب های القایی سولفات مس در بافت ریه موش های صحرایی نر می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ،۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به ۳گروه ۷ تایی: کنترل، دریافت کننده سولفات مس، سولفات مس+ مخلوط پروبیوتیک تقسیم شدند. سولفات مس (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) سه روزمتوالی و پرو بیوتیک (10^9 cfu/ml) به مدت ۳۵ روز به موش ها گاواژ شدند. بعد از پایان آزمایش، موش های صحرایی بیهوش شده، سپس از ریه مقاطع بافتی تهیه، نمونه‌ها با هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند و توسط میکروسکوپ نوری عکسبرداری و مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج: بررسی تغییرات مورفولوژیکی بافت ریه در گروه تیمار با پرو بیوتیک کاهش آسیب بافتی را در مقایسه با گروه سولفات مس نشان داد.

نتیجه گیری: با توجه به یافته های این پژوهش احتمالا پرو بیوتیک ها را می توان به عنوان کاربردی نوین در طیف وسیعی از محصولات دارویی جهت اهداف پیشگیری یا بهبود روش های درمانی به کار گرفت.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : کشفی ح.س.، کشتمند ز*. ، محمدی آلوچه ر. تاثیر هیستوپاتولوژیک مخلوط پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*) برآسیب های القایی سولفات مس در بافت ریه موش های صحرایی نر. مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۲ ؛ ۱۸ (۱):۲۱-۳۳

DOR 20.1001.1.17354226.1402.18.1.2.9

doi 10.30495/ZISTI.2023.1984731.1161

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا **شاپا چاپی:** ۱۷۳۵-۴۲۲۶ **شاپا الکترونیکی:** ۲۷۱۷-۴۵۹X **نویسندگان:** © حق مؤلف

مقدمه:

پیشرفت تمدن بشری و توسعه فناوری و ازدیاد روز افزون جمعیت، دنیا را با مشکل آلودگی هوا، آب و زمین رو به رو کرده است که زندگی ساکنان کره زمین را تهدید می‌کند. آلاینده‌ها عوارض خطرناکی بر سلامت موجودات زنده دارند و اثر مخرب بر اندام‌ها گذاشته و باعث بسیاری از بیماری‌ها می شوند (۱).

فلزات سنگین دارای قابلیت تجمع زیستی در بافت‌های موجودات می‌باشند و اغلب با اثر زیستی در طی زنجیره‌های غذایی موجود در اکوسیستم‌ها در سلامت و تولید مثل انسان‌ها و سایر موجودات زنده مداخله می‌نمایند. از میان فلزات سنگین، مس می‌تواند با غلظت‌های متفاوت اثرات سو بر سلامت داشته باشد (۲).

مس به عنوان یک عنصر اساسی در حفظ عملکرد موجودات زنده ضروری است. جانداران در طول کل زندگی خود در معرض مس و مشتقات صنعتی آن از طریق مواد غذایی یا آلودگی‌های زیست محیطی قرار می‌گیرند (۳). اگرچه مقادیر کم غلظت مس براي برقراري شرايط متعادل فیزیولوژیکی ضروري است، اما نتایج مطالعات متعدد اثبات می‌کند غلظت بیش از حد یا ناکافی این عنصر باعث ایجاد سمیت و ایجاد اثرات جبران ناپذیر خواهد شد. مس از آن دسته از عناصری است که وزن اتمی بالایی دارد و می‌تواند با افزایش استرس اکسیداتیو به بافت‌های موجودات زنده آسیب بزند (٤). علاوه براین، با اثر بر بعضی پروتئین‌ها و بیان برخی ژن‌ها، باعث از بین رفتن پروتئین‌های انتقالی و یا حتی مرگ سلول می‌گردد (۲).

سولفات مس یکی از آلاینده‌های رایج مورد استفاده در فرآیندهای صنعتی و کشاورزی است که منجر به آلودگی بالقوه خاک و سمیت زیست محیطی می شود. در دهه‌های اخیر، قرار گرفتن در معرض مس یا اثرات سمی ناشی از اضافه بودن مس (به عنوان مثال، بیماری ویلسون و بیماری‌های عصبی) مسائل بهداشت عمومی قابل توجهی را ایجاد کرده است (۵). آسیب اکسیداتیو یکی از مشخصه‌های مسمومیت ناشی از در معرض مس قرار گرفتن است که می‌تواند اختلال عملکرد میتوکندری و آپوپتوز سلولی را القاء کند. شبکه اندوپلاسمی یک اندامک مهم است که در ذخیره کلسیم، سنتز پروتئین‌ها و سم زدایی نقش حیاتی دارد، آپوپتوز ناشی از استرس شبکه اندوپلاسمی که در معرض سولفات مس قرار گرفته است در بافت کبد تشخیص داده شده و باعث آسیب DNA می‌شود (٦).

ریه اولین بافتی است که با آلاینده‌ها در تماس است. ریه‌ها به دلیل مساحت زیاد و فاصله انتشار کم بین هوا و خون، عمدتاً تحت تأثیر آلاینده‌هایی مانند فلزات قرار می‌گیرند. به طور کلی سلول‌های ریه به سرعت به مواد شیمیایی مختلف برای غلبه بر اختلالات فیزیولوژیکی یا آسیب بافت پاسخ می‌دهند و مواد شیمیایی ممکن است تأثیر منفی بر عملکرد کلی ریه داشته باشند. همینطور ریه به همراه کلیه و روده مسئول دفع و حفظ هومئوستاز مایعات بدن است که به عنوان یک مسیر دفعی برای متابولیت‌های بیگانه عمل می‌کنند (۷).

با توجه به افزایش روزافزون آلاینده ها و در معرض بودن انسان، شناسایی و معرفی ترکیباتی که خطر القاء آسیب این ترکیبات بر بافت ها را کاهش دهد، مورد توجه محققان قرار گرفته است.

امروزه از پروبیوتیک ها به عنوان ریزموجودات زنده بی خطر مفید یاد می کنند. افزایش ایمنی بدن، مقاومت در برابر عفونت، تولید اسیدهای آلی، ویتامین ها و مواد مغذی، کاهش واکنش های آلرژیک و فعالیت آنتی اکسیدانی از جمله اثرات پروبیوتیک ها است(۸). پروبیوتیک ها باعث تحریک سیستم ایمنی سیستماتیک و مخاطی میزبان می شوند و همچنین توانایی حذف عوامل سرطان زا و رادیکال های آزاد را دارند (۹).

میکروارگانیسم های فلور دستگاه گوارش با فلزات و دیگر آلاینده هایی که از طریق تغذیه وارد بدن می شوند واکنش می دهند (۱۰). باکتری های گرم مثبت به خصوص گونه های باسیلوس به علت مقادیر زیاد پپتیدوگلیکان در دیواره سلولی قابلیت جذب بالایی برای فلزات سنگین دارند و برای اتصال کاتیون ها مناسب هستند. تعداد زیادی از پژوهش ها نشان داده اند که

سویه های متفاوتی از باکتری های لاکتیک اسید، تحمل و تمایل زیادی برای جذب فلزات سنگین در آب و محیط کشت دارند (۱۱).

در سال های اخیر حذف زیستی با استفاده از گونه های باکتریایی برای محافظت زیستی و کاهش اثرات سوء فلزات سنگین و دیگر آلاینده ها از بدن انسان مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین، پروبیوتیک ها ارگانیسم های مطلوبی می باشند که به عنوان یک ابزار مناسب در مقابل جذب و مسمومیت احتمالی با فلزات سنگین قابل استفاده هستند (۱۲). با توجه به نتایج بررسی تاثیر پروبیوتیک-ها در درمان و پیشگیری انواع بیماری ها به نظر می رسد که به‌عنوان یک تعدیل بخش امیدوارکننده و مطمئن به عنوان جایگزین در کنار درمان هاي قدیمی مورد توجه قرار می گیرند. ضمن آن که سولفات مس یکی از مهم ترین آلاینده‌هاي زیست محیطی است که قادر به تولید رادیکال هاي آزاد و به دنبال آن ایجاد استرس اکسیداتیو می باشد. بنابراین، بررسي تأثیرات ترکیباتی که بتواند آسیب های القایی این عناصر را کاهش دهد، دارای اهمیت بوده، از این رو هدف از این مطالعه بررسی تاثیر مخلوط پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بر آسیب های القایی سولفات مس در ریه موش صحرایی نر می باشد.

مواد و روش ها:

حیوانات

در این مطالعه تحقیقاتی از نوع تجربی، تعداد ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰-۲۲۰ گرم از دانشگاه شهید بهشتی تهیه شد. موش ها در اتاق حیوانات در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با درجه حرارت ۳ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ درصد بدون محدودیت در دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند. یک هفته پیش از شروع آزمایشات موش ها به منظور سازش با محیط آزمایشگاه به حیوان خانه دانشکدة علوم پایة دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی منتقل و پس از نگهداری حیوانات و سازش با شرایط محیط جدید، تمامی آزمایش ها انجام شد. آزمایشات در بازة زمانی مشخصی از روز و منطبق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد .مطالعه حاضر با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی تهران مرکزی با کد IR.IAU.CTB.REC ۱۴۰۱,۰۳۳ انجام گرفته است و سعی شده که تمام موازین اخلاقی کار با حیوان مورد توجه باشد و الزامات معاهده هلسینکی رعایت گردد.

گروه بندی حیوانات

۲۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ با محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم که در شرایط ذکر شده نگهداری شدند و به طور تصادفی در ۳ گروه هفت تایی تقسیم شد ند :

۱) گروه کنترل (سالم): موش های این گروه فقط آب و غذای پلیت شده را به صورت روزانه دریافت کردند.

۲) گروه دوم: موش هایی که جهت القاء آسیب، سولفات مس (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن) دریافت کردند (۱۳).

۳) گروه سوم: موش هایی که دریافت کننده سولفات مس (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن)+مخلوط پروبیوتیک بومی (*لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*) بودند.

مواد شیمیایی

یک گرم پروبیوتیک در ۹ سي سي آب مقطر حل گردید و برای ترکیب بهتر محلول پروبیوتیک و آب مقطر، از شیکر استفاده و به هر موش به مدت ۳۵ روز ۱ سی سی مخلوط پروبیوتیک (10^9 cfu/ml) گاواژ شد (۱۴).

به منظور آلوده نمودن نمونه های مورد آزمایش با سولفات مس، این ماده شیمیایی با کد ۱۰۲۷۹۰ از شرکت

آزمیران خریداری شد.
مخلوط پروبیوتیک‌های بومی ایران شامل باکتری‌های *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (IBRC-M۱۱۳۲۲)، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (TG-۳۵) و *لاکتوباسیلوس کازئی* (IBC-M۱۰۷۸٤) به صورت پودر و با غلظت cfu/Ml ۱۰۱۰ از شرکت تک‌ژن زیست تهیه شد.

نمونه گیری

بعد از گذشت ۳۵ روز از شروع آزمایش و با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تهران مرکزی (۱٤۰۱,۰۳۳.IR.IAU.CTB.REC)، پس از بیهوشی حیوانات توسط کتامین- زایلازین ۱٪ (۱۰ میلی گرم زایلازین ۱۰۰۰میلی گرم کتامین) در پایان دوره آزمایش، بافت ریه خارج و پس از شستشو در نرمال سالین برای انجام آزمایشات هیستوپاتولوژي در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و پس ازمراحل پاساژ بافتی جهت تهیه لام ها از نمونه بافتی بلوك هاي پارافیني تهیه و پس از برش زدن توسط میکروتوم با ضخامت ۵ میکرون با هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزي شد.جهت ارزیابي هیستوپاتولوژی از هر گروه هفت لام تهیه شده (از هر حیوان یک لام) و در هر لام پنج فیلد بررسي شد. براي مطالعه لام هاي تهیه شده، از میکروسکوپ نوري نیکون (ECLIPSE E۲۰۰ ، ساخت کشور ژاپن) استفاده شد (۱۵).

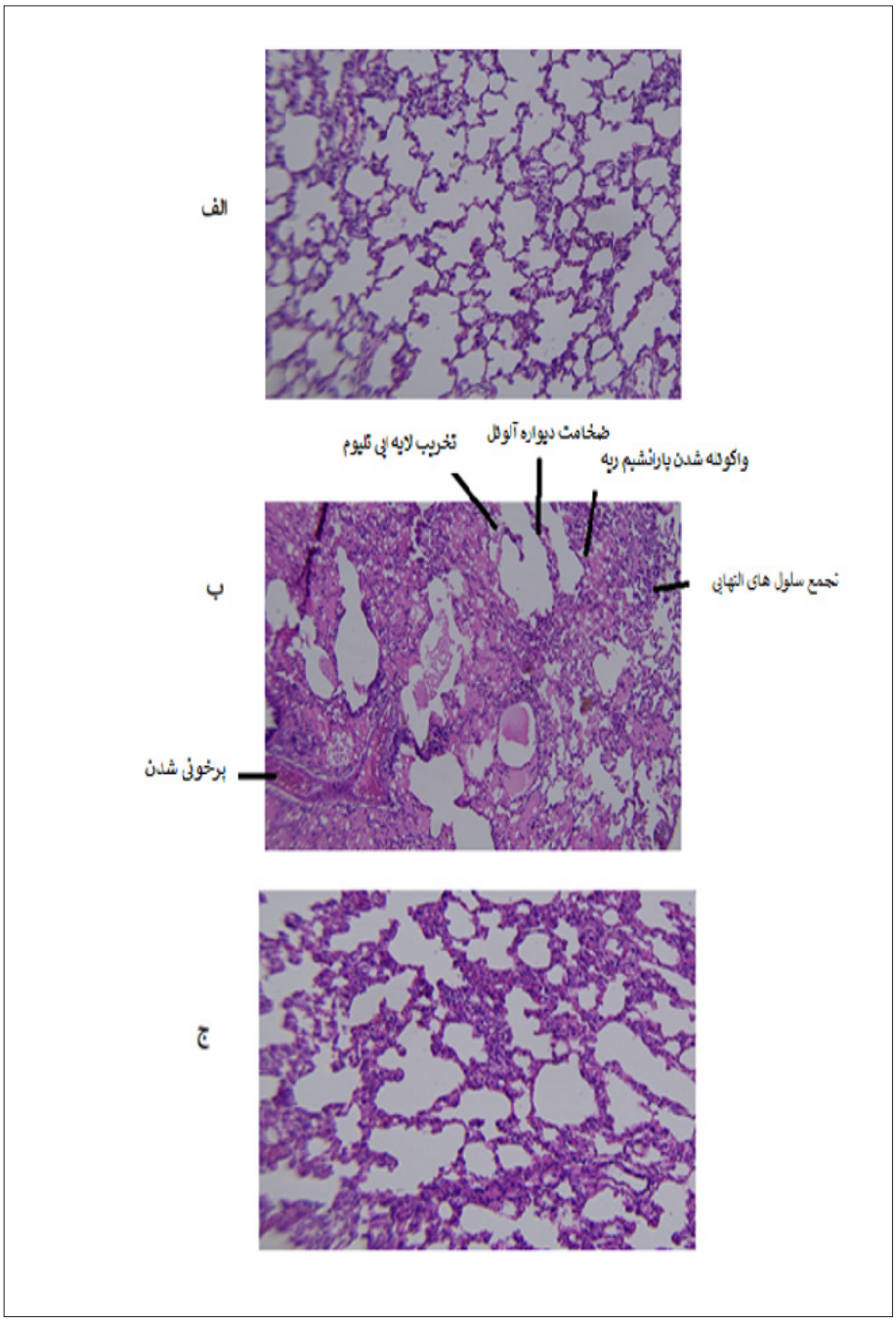
به منظور ارزیابي شاخص هاي میکروسکوپی (هیستوپاتولوژي) گروه ها با هم مقایسه شدند. در این خصوص ضخامت دیواره آلوئل، تخریب اپیتلیوم، خونریزی، واکوئله شدن و تعداد سلول های التهابی به عنوان شاخص در نظر گرفته شد. بر این اساس میزاني از بافت که این شاخصه ها را نشان داد، از عدد ۰ تا ٤ ارزش گذاري شد و در نهایت عدد از صفر تا یک نرمال، از یک تا دو خفیف، از دو تا سه متوسط و از سه تا چهار شدید در نظر گرفته شد. نمرات ضایعه به دنبال سیستم نمره ضایعه طراحی شده توسط رابرت (۱٦) و گیبسون-کورلی و همکاران به دست آمد (۱۷).

آنالیز آماری

ابتدا طبیعي بودن توزیع داده هاي خام از طریق آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسي و تأیید شد(p> ۰/۰۵). براي بررسي تفاوت هاي بین گروهي از آنالیز واریانس یك طرفه و آزمون تعقیبي توکي استفاده و سطح معناداري نیز p ≤ ۰/۰۵ درنظر گرفته شد. نتایج در هر مورد به صورت میانگین ±انحراف معیار گزارش شد. سویه های متفاوتی از باکتری های لاکتیک اسید، تحمل و تمایل زیادی برای جذب فلزات سنگین در آب و محیط کشت دارند (۱۱).

نتایج:

بررسی فاکتورهای مختلف بافت ریه براساس شدت درجه آسیب (نرمال = صفر تا یک، خفیف = یک تا دو، متوسط = دو تا سه و شدید = سه تا چهار) انجام شد (جدول ۱). در رابطه با نتایج هیستوپاتولوژیک، میزان آسیب های بافت ریه از قبیل پرخونی، واکوئله شدن، تعداد سلول های التهاب و ضخامت دیواره آلوئل و نظم و انسجام در کل بافت ریه در گروه های مختلف ارزیابی شد (شکل ۱).
در نمونه های گروه کنترل، به لحاظ بافت شناسی بافت ریه دارای ویژگی های نرمال بود برونشیول های ریوی دارای دیواره مشخص با اپیتلیوم کامال طبیعی و سالم بوده و تغییر خاصی در دیواره آنها پدیدار نیست سلول های دیواره آلوئولی شکل منسجم و تعداد و اندازه نرمال دارند و تجمع خون یا سلول های التهابی دیده بافت دیده نمی شود. بافت دارای فضای منظم و اندازه و انسجام طبیعی می باشد. در گروه دریافت کننده سولفات مس ضخیم شدن دیواره آلوئول ها و ایجاد فضاهای وسیع، بی نظمی در نحوه قرار گیری سلول های دیواره آلوئول ، افزایش تجمع سلول های التهابی لنفوستی و واکوئله شدن پارانشیم ریه نشان داده شد. در گروه دریافت کننده سولفات مس و پروبیوتیک در بخش های مختلف بافت در مقایسه با گروه دریافت کننده سولفات مس اثربخشی مثبت در جهت بهبودی نسبی مشاهده شد.



شکل ۱ - مقایسه میکروسکوپی هیستویاتولوژی بافت ریه در گروه های مختلف. الف) گروه کنترل، ب) گروه دریافت کننده سولفات مس ،ج) گروه درمان با مخلوط پروبیوتیک(رنگ آمیزی هماتوکسیلین_ائوزین، بزرگنمایی۴۰۰).

جدول ۱ - معیارهای ارزیابی بافت ریه در گروه¬های مختلف

recipient of copper sulfate + probiotic mixture (10^9cfu/Ml)	recipient of copper sulfate (200 mg/kg)	control group	Criterion
^{bc} 2.42±0.41	^{b}4.31±0.05	0.22±0.13	Alveolar wall thickness
^{bc} 1.71±0.16	^{b}3.12±0.04	0.26±0.06	Destruction of the epithelium
^{ac} 1.2±0.04	^{b}2.38±0.03	0.56±0.16	Bleeding in lung tissue
1.65±0.13	^{b}3.98±0.05	0.24±0.07	becoming vacuolated
^{bc} 2.32±0.24	^{b} 4.81±0.06	0.19±0.05	Accumulation of inflammatory cells
^{bc} 2.23±0.22	^{b} 4.71±0.03	0.24±0.02	order and coherence in the whole context

نتایج بر اساس میانگین±خطای انحراف معیارتعیین شد.a P≤0.05 مقایسه با گروه کنترل، b P≤0.0001 مقایسه با گروه کنترل، c: P≤0.05 مقایسه با گروه دریافت کننده سولفات مس. عدد از ۰-۱ نرمال، ۱-۲ خفیف، ۲-۳ متوسط و۳-٤ شدید در نظر گرفته شد.

بحث:

مس به عنوان یک عنصر اساسی در حفظ عملکرد موجودات زنده ضروري است. حیوانات در طول کل زندگی خود در معرض مس و مشتقات صنعتی آن از طریق مواد غذایی یا آلودگی هاي زیست محیطی قرار می گیرند (۱۸). در تحقیقات انجام شده تظاهرات بالینی مرتبط با مسمومیت مس در قسمت هاي مختلف بدن شامل کبد، کلیه، طحال، ریه و روده مشاهده شده است (۱۹).جذب مس از طریق دستگاه گوارش تحت تأثیر تعدادي از ترکیبات نظیر اکسیدها، هیدروکسیدها، سیترات ها و سولفات ها انجام می شود (۱۸). سولفات مس متداول ترین نمک مس می باشد؛ با این حال، دیگر نمک هاي مس شامل کربنات، سیانید، اکسید و سولفید نیز وجود دارند (۲۰). قرار گرفتن در معرض آلاینده هاي زیست محیطی باعث ایجاد اثرات مخرب پاتوفیزیولوژي و ایجاد آسیب در بافت هاي مختلف می شود. جذب بیش از حد مس باعث ایجاد افزایش گونه هاي اکسیژن آزاد شده ودر نهایت منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو می شود (۲۱).

در این پژوهش اثر درمانی مخلوط پروبیوتیک هاي *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* بر آسیب هاي القایی سولفات مس بر فاکتورهاي مورفولوژیکی در بافت ریه ارزیابی شد. تجمع بافت همبند و فیبروبلاست ها در فضاي آلوئولي و ضخیم شدن دیواره آلوئول ها، تخریب گسترده و شدید آلوئول ها و ایجاد فضاهاي وسیع، تجمع فیبروبلاست ها و واکوئله شدن در بعضي مناطق ریه گروه دریافت کننده مس گزارش شد، در حالی که آسیب هاي القایی مس در بافت ریه در گروه دریافت کننده مخلوط پروبیوتیک بومی در مقایسه با گروه دریافت کننده مس بهبود معنی داري را نشان داد.

در هنگام بروز بیماري هاي التهابي ریه، گونه هاي اکسیژن آزاد به خون راه یافته و سبب اکسیداسیون چربي هاي غیراشباع مي شوند. بخشي از اکسیدان هاي تولید شده در ریه از غشاء عبور کرده وارد جریان خون شده و باعث اکسیداسیون چربي هاي غیراشباع و ایجاد آسیب در بافت ها از جمله ریه می-شوند (٤). علاوه براین عنصر یاد شده با اثر بر بعضی پروتئین‌ها، بیان برخی ژن‌ها، باعث از بین رفتن پروتئین‌هاي انتقالی هم

چون Na+ /K+ ATPase و یا حتی مرگ سلول می‌گردند (۲۲).

استرس اکسیداتیو زمانی اتفاق می‌افتد که تعادل حیاتی بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها به دلیل کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها یا تجمع بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن یا هر دو، مختل شود که منجر به آسیب می‌شود (۲۳). فلزات سنگین در بافت‌های موجودات زنده تجمع می کنند و اغلب با اثر زیستی در طی زنجیره‌های غذایی موجود در اکوسیستم‌ها در سلامت و تولید مثل انسان‌ها و سایر موجودات زنده مداخله می‌نمایند. ماندگاری فلزها در محیط و زنجیره غذایی زیاد می باشد، که موجب تداوم مسمومیت های ناشی از آنها می شود (۲).

تحقیقات گذشته نشان داده اند سولفات مس از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو و ایجاد پراکسیداسیون چربی و کاهش میزان آنتی اکسیدان هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز سبب آسیب سلولی شده است. از آنجایی که رادیکال های آزاد سبب آسیب رساندن به غشاء فسفولیپیدی میتوکندری ها و از بین رفتن آن می شوند و پروتئین های بین غشای سلولی مثل سیتوکروم C آزاد می شوند که این خود، سبب فعال شدن کاسپازها و تجمع کروماتین هسته و آسیب به DNA سلول ها و آپوپتوزیس می شود (۲٤).

بررسی ها نشان داده است آسیب های سلولی ناشی از عوامل مختلف با تولید رادیکال های آزاد، سبب فعال کردن تعدادی از مولکولهای پیشبرنده مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) می شوند (۲۵).

Wang و همکاران (۲۰۲۰) بررسی اثرات مخلوطی از فلزات سنگین (کبالت، کاربید، تیتانیوم، تانتالیوم، سرب وآلومینیوم) را در بافت های مختلف موش بررسی کردند، نتایج تحقیق آنها بیان داشت که در بررسی هیستوپاتولوژیک، قرار گرفتن در معرض مخلوط فلزات سنگین منجر به تجمع در اندام ها اختلال در سیستم گردش خون، سیستم تولید مثل و عملکرد کبد می شود (۲٦).

Azad و همکاران (۲۰۲۰) نشان می دهد که چگونه برخی از سویه های باسیلوس قادرند با طیفی از فلزات سمی واکنش دهند. نشان داد شد که سویه B. cereusBF۲ دارای خاصیت تجمع زیستی فوق‌العاده و خواص متحمل به فلز است و به وضوح می‌توان آن را در مورد اهداف زیست پالایی استفاده کرد (۲۷).

مطالعات گذشته نشان داده است که آلایندهای مختلف می توانند سبب افزایش سطوح آنزیم هایی مثل گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوکز-٦-فسفات دهیدروژناز و گلوتاتیون-اس-ترانسفراز گردد و از این طریق سبب آسیب اکسیداتیو شود (۲٤،۲٦،۲۸).

بررسی ها نشان داده است آسیب های سلولی ناشی از استرس ها و مواد شیمیایی و داروها با تولید رادیکال های آزاد، سبب فعال کردن کاسپازها می گردد، کاسپازها از فعال کننده های مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) هستند (۲۹).

Li و همکاران (۲۰۲۱) گزارش دادند که سولفات مس سبب آسیب بافتی و مرگ سلولی در بافت های مختلف می گردد، عواملی همچون افزایش تولید گونه های اکسیژن واکنش پذیر و به دنبال آن استرس اکسیداتیو ناشی از تولید ROS را، در القاء اثر سمی این ماده، در بافت ها مختلف دخیل می دانند. بین تولید ROS داخل سلول و مرگ برنامه ریزی شده یا آپوپتوز که به دنبال در معرض قرار گرفتن سولفات مس رخ می دهد ارتباط مستقیم وجود دارد. در حالت طبیعی ROS توسط آنزیم های آنتی اکسیدانی داخل بافت‌ها خنثی می گردد. به دنبال مواجهه با سولفات مس عملکرد میتوکندری در سلول ها مختل شده و تولید ROS افزایش می یابد. عدم تعادل بین ROS و سیستم آنتی اکسیدانتی داخلی سبب بروز استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی می شود (۳۰).

باکتری های پروبیوتیک در این پژوهش در گروه دریافت کننده مخلوط پروبیوتیک های بومی ایرانی در مقایسه با گروه دریافت کننده سولفات مس، کاهش آسیب را نشان دادند، که احتمالا به دلیل عملکرد آنتی اکسیدانی و اثرات مفید در ارتقاء سلامتی پروبیوتیک ها می باشد.

Le Noci و همکاران (۲۰۱۸) بررسی اثر پروبیوتیک های مختلف بر متاستاز ریوی را بررسی کردند، نتایج پژوهش

آنها نشـــان داد *Lactobacillus rhamnosus* به شدت باعث افزایش ایمنـــی در برابر متاســـتازهای ریه B16 می شـــود. علاوه بر ایـــن، پروبیوتیک ها فعالیت شـــیمی درمانی را در برابر متاســـتازهای پیشرفته B16 بهبود می بخشـــند (۳۱).

Artanti و همـــکاران (۲۰۲۱) در پژوهـــش خـــود با عنوان مصرف مکمـــل پروبیوتیکـــی *Lactobacillus acidophilus* La-14 بـــه عنوان تعدیـــل کننده ایمنی برای حفظ سیســـتم تنفســـی گـــزارش دادند که کـــه تجویـــز پروبیوتیک ها می تواند سیســـتم ایمنـــی را تحریک و تعدیـــل کند (۳۲).

Keshtmand و همکاران (۲۰۲۱) نشـــان داده شد که مخلوط پروبیوتیک هـــای بومی ایرانی *لاکتوباســـیلوس رامنوســـوس، لاکتوباســـیلوس کازئـــی و لاکتوباســـیلوس هلوتیکـــوس*، می تواند ســـبب بهبود آســـیب هـــای القایی اســـتات سرب در بافت ریه شـــود (۳۳).

Golkar همـــکاران (۲۰۲۱) ســـنجش محتوای هیدروکســـی پرولیـــن و ارزیابی بافت شناســـی در ۲۵ مـــوش صحرایی به پنج گروه تقســـیم شـــدند. جالـــب اینکه، تجزیـــه و تحلیل نتایج نشـــان داد که هر ســـه فرمول حاوی پســـت بیوتیک بـــه طور قابـــل توجهـــی بهبود زخـــم را تسریع مـــی کنند. ایـــن آزمایـــش نشـــان می دهـــد کـــه فرمولاســـیون حاوی پســـت‌بیوتیک‌ها را می‌توان به‌عنوان نامـــزدی امیدوارکننده بـــرای رویکردهای ترمیـــم زخم درنظـــر گرفت (۳۴).

در پژوهش انجام شـــده توســـط Veissi و همکاران (۲۰۱۴) که اثـــر دریافت ماســـت پروبیوتیک بر فاکتورهـــای التهابی در بیماران مبتلا به دیابت را بررســـی کردنـــد، نتایج تحقیق آنها نشـــان داد کـــه پروبیوتیک بصورت معنی داری ســـطح سرمـــی TNF آلفـــا را در انتهای ۸ هفتـــه مداخله با مخلوط پروبیوتیک هـــا بصورت معنی داری کاهـــش می دهد (۳۵).

در مطالعـــه Keshtmand و همـــکاران (۲۰۲۰)بـــر اثرات بهبود دهنـــده پروبیوتیک های *لاکتوباســـیلوس کواگولانز و لاکتوباســـیلوس کازئی* بر ســـمیت بیضه ناشـــی از CCl_4 بر اســـاس آنالیزهای بیوشـــیمیایی، بافت شناســـی و مولکولی در مـــوش صحرایـــی نشـــان داد هـــر دو پروبیوتیـــک اثر بهبودبخشـــی دارند (۳۶).

مکانیســـم های متعـــدد و مختلفـــی بـــرای عملکـــرد پروبیوتیک هـــا در جهـــت پیشـــگیری و درمـــان و کاهش آســـیب پیشـــنهاد شـــده اســـت از جملـــه آنکـــه ویژگی ســـاختاری پروبیوتیک هـــا بـــه گونه ای اســـت کـــه خود توســـط آنزیم هاي هضمی دســـتگاه گوارش تجریه نشـــده و اســـیدهاي چـــرب فـــرار تولیـــد می کنند. ایـــن ترکیبات ســـبب افزایش باکتری هـــای لاکتیکی و اثـــرات ضدمیکروبی می شـــوند (۳۷).

پژوهش هـــای مختلف گـــزارش داده اند کـــه پروبیوتیک ها بـــه دلیـــل اتصـــال بـــه فلـــزات ســـنگین دارای خاصیت ســـم زدایی نیز می‌باشـــند. این میکروارگانیســـم ها در زمان مواجهه با فلزات ســـنگین بـــه دلیل توانایی قـــوی آنها برای اتصال، تحمل یا ســـم زدایـــی فلزات ســـنگین، تحمل بالا به شرایـــط اســـیدی معده و صفـــرا و باقی ماندن در دســـتگاه گـــوارش، توانایی چســـبیدن و اتصـــال در روده می‌باشـــد، همچنین به عنوان یک آنتی اکســـیدان قوی و دارای پاســـخ تنظیمـــی ایمنی قوی نیـــز عمل می‌کننـــد (۳۸). همچنین از طریـــق اتصال یون های فلـــزی به دیواره ســـلولی باکتری ها و به دنبـــال آن تجمع در داخـــل باکتری از طریـــق عبور از غشای ســـلولی ســـبب تجمع زیســـتی آلاینده ها می شوند (۳۹).

پروبیوتیک ها شـــکل های ســـمی مواد را تغییـــر داده و به شـــکل هایی با خاصیت ســـمیت کمـــتر تغییـــر می دهند. همچنیـــن برخی اســـیدهای آلی‌های تولید شـــده توســـط میکروبیوت‌هـــای روده، جـــذب متابولیت هـــای فلـــزات ســـنگین را سرعت می بخشـــند (۴۰).

نتیجه گیری:

پروبیوتیک ها دارای فعالیت های زیستی از جمله فعالیت تعدیل کنندگی سیستم ایمنی، ضد میکروبی، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، به دام اندازنده فلزات سنگین و ضد تکثیر سلولی بوده و می توانند در تعدیل عملکرد سیستم ایمنی، بهبود روش-های درمانی نقش موثري ایفا کنند، بنابراین پروبیوتک ها را می توان به عنوان راهبردي نوین در طیف وسیعی از محصولات دارویی جهت اهداف پیشگیري یا بهبود روش هاي درمانی و همچنین در محصولات غذایی جهت کاهش آسیب های القایی به کار گرفته شوند. بنابراین احتمالا تهیه مواد خوراکی و یا مکمل های حاوی این ارگانیسم ها درمنازل و صنعت می تواند گزینه های مطلوبی برای میلیون ها انسان در سراسر دنیا باشد که روزانه به صورت ناخواسته درمعرض فلزات سنگین قرار می گیرند و تغییر عمل برای یافتن مداخلاتی که این پیامدها را هدف قرار می دهد، مورد نیاز است. اگرچه لازم است در آینده، مطالعات متمرکز بیشتری بر رابطه بین آلودگی محیطی، میکروبیوتای روده و سلامت انسان انجام شود.

تقدیر و تشکر:

نویسندگان از شرکت پروبیوتیک تک ژن تشکر و قدردانی می کنند.

مصوبات و کمیته پژوهشی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه دانشجوي ارشد رشته بیوتکنولوژي میکروبي با کد پایان نامه ۱۰۱۳۲۹۰۳۳۶۹۸۳۸۱۹۲۴۰۱۵۱۶۲ در گروه زیست‌شناسي دانشگاه آزاد تهران مرکزي انجام شد و دارای مجوز کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی تهران مرکزی با کد IR.IAU.CTB.۱۴۰۱,۰۳۳.REC می باشد.

تعارض منافع:

نویسندگان این مقاله عنوان می کنند که هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Liu, D., Li, Z., Zhu, Y., Li, Z., &Kumar, R. Recycled chitosan nanofibril as an effective Cu (II), Pb (II) and Cd (II) ionic chelating agent, adsorption &desorption performance. Carbohydrate Polymers, 2014, 111,469-476.

doi: 10.1016/j.carbpol.2014.04.018.

2. Shokouhian Ghahfarokhi, B., Safari, R., Imanpoor, M. R., &Jafar Nodeh, A. Effects of different doses of CuSo4 on the expression of vitellogenin in females Zebrafish (Danio rerio). Journal of Animal Environment, 2020, 12(4),557-560.

doi: 10.22034/aej.2020.132244.

3. Jannatifar, R., piroozmanesh, H., & naserpoor, L. Investigation of the effects of copper sulfate on sperm quality parameters, DNA fragmentation rate &testicular tissue of adult rats of wistar breed. Journal of Animal Physiology and Development, 2020, 13(4), 13-24.

4. Ammar, O., Houas, Z., &Mehdi, M. The association between iron, calcium, & oxidative stress in seminal plasma &sperm quality. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 14097-14105.

doi: 10.1007/s11356-019-04575-7.

5. Husain, N., &Mahmood, R. Copper (II) generates ROS & RNS, impairs antioxidant system &damages membrane and DNA in human blood cells. Environmental Science &Pollution Research, 2019, 26, 20654-20668.

doi: 10.1007/s11356-019-05345-1.

6.Dai, C., Liu, Q., Li, D., Sharma, G., Xiong, J., &Xiao, X. Molecular insights of copper sulfate exposure-induced nephrotoxicity, involvement of oxidative and endoplasmic reticulum stress pathways. Biomolecules, 2020, 10(7), 1010.

doi: 10.3390/biom10071010.

7. Kadammattil, A. V., Sajankila, S. P., Prabhu, S., Rao, B. N., &Rao, B. S. S. Systemic toxicity & teratogenicity of copper oxide nanoparticles and copper sulfate. Journal of Nanoscience & Nanotechnology, 2018, 18(4),2394-2404.

doi: 10.1166/jnn.2018.14542.

8. Kober, M. M., &Bowe, W. P. The effect of probiotics on immune regulation, acne, and photoaging. International Journal of Women's Dermatology, 2015, 1(2), 85-89.

doi: 10.1016/j.ijwd.2015.02.001.

9.Molska, M., & Reguła, J. Potential mechanisms of probiotics action in the prevention &treatment of colorectal cancer. Nutrients, 2019, 11(10), 2453.

doi: 10.3390/nu11102453.

10. Średnicka, P., Juszczuk-Kubiak, E., Wójcicki, M., Akimowicz, M., &Roszko, M. Probiotics as a biological detoxification tool of food chemical contamination: A review. Food and Chemical Toxicology, 2021, 153, 112306.

doi: 10.1016/j.fct.2021.112306.

11. Feng, P., Ye, Z., Kakade, A., Virk, A. K., Li, X., & Liu, P. A review on gut remediation of selected environmental contaminants, possible roles of probiotics and gut microbiota. Nutrients, 2018, 11(1), 22.

doi: 10.3390/nu11010022.

12. Keulers, L., Dehghani, A., Knippels, L., Garssen, J., Papadopoulos, N., Folkerts, G., Braber, S.,&van Bergenhenegouwen, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics to prevent or combat air pollution consequences. The gut-lung axis. Environmental Pollution, 2022, 302: 119066.

doi: 10.1016/j.envpol.2022.119066.

13. Barzin oshtologh, A. R., Keshtmand, Z., & Samadikhah, H. R. Effect of protective of a mixture of native Iranian probiotics (Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei and Lactobacillus holoticus) on the damage of rat male small intestinal tissue caused by lead acetate. Iranian Journal of Biological Sciences, 2022, 16(4), 71-80.

14. Abasi, S., & Keshtmand, Z. The effect of probiotic Bifidobacterium lactis & Lactobacillus casei on sperm maturation in streptozotocin-diabetic rats. Iranian South Medical Journal, 2020, 22(6), 392-401.

doi: 10.29252/ismj.22.6.392.

15. Musavei Haghighe, A., Keshtmand., Z & Samadikhah ,H.R. Protective effect of Iranian native probiotic mixtures (Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei &Lactobacillus holoticus) on induced lesions of lead acetate in lung tissue of male rats. Journal of Applied Microbiology in Food Industry, 2022, 8 (2), 9-18.

16. Klopfleisch, R. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology-a systematic review. BMC Veterinary Research, 2013, 9, 1-15.

doi: 10.1186/1746-6148-9-123.

17. Gibson-Corley, K.N., Olivier ,A.K .,& Meyerholz, D.K. Principles for valid histopathologic scoring in research. Veterinary Pathology, 2013 ,50(6),1007-1015.

doi: 10.1177/0300985813485099.

18. Mehri, A. Trace elements in human nutrition (II)–an update. International Journal of Preventive Medicine, 2020, 3(11),2.

doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM_48_19.

19. Naozuka, J. Elemental enrichment of foods, Essentiality &toxicity. Nutrition and Food Science International Journal, 2018, 4(3), 80-84

doi: 0.19081/NFSIJ.2018.04.555640.

20. Al-Fartusie, F. S., & Mohssan, S. N. Essential trace elements &their vital roles in human body. Indian Journal of Advances in Chemical Science, 2017, 5(3), 127-136.

doi: 10.22607/IJACS.2017.503003.

21. Ribas-Maynou, J., & Yeste, M. Oxidative stress in male infertility, causes, effects in assisted reproductive techniques, &protective support of antioxidants. Biology, 2020, 9(4), 77.

doi: 10.3390/biology9040077.

22. Wang, T., Cheng, Y., Chen, X., Liu, Z., &Long, X. Effects of small peptides, probiotics, prebiotics, &synbiotics on growth performance, digestive enzymes, & oxidative stress in orange-spotted grouper, Epinephelus coioides, juveniles reared in artificial seawater. Chinese Journal of Oceanology & Limnology, 2017, 35(1), 89-97.

doi: 10.1007/s00343-016-5130-1.

23. Mesquita, A. F., Marques, S. M., Marques, J. C., Gonçalves, F. J., &Gonçalves, A. M. Copper sulphate impact on the antioxidant defense system of the marine bivalves Cerastoderma edule & Scrobicularia plana. Scientific Reports, 2019, 9(1), 16458.

DOI: 10.1038/s41598-019-52925-9.

24. Liu, H., Guo, H., Jian, Z., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. Copper induces oxidative stress & apoptosis in the mouse liver. Oxidative Medicine &Cellular Longevity, 2020, 1359164.

doi: 10.1155/2020/1359164.

25. Dashtbanei, S., & Keshtmand Z. A mixture of multi-strain probiotics (Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus helveticus, & Lactobacillus casei) had anti-inflammatory, anti-apoptotic, & anti-oxidative effects in oxidative injuries induced by cadmium in small intestine & lung. Probiotics Antimicrob Proteins, 2023, 15(2), 226-238.

doi:10.1007/s12602-022-09946-0.

26. Wang, Y., Tang, Y., Li, Z., Hua, Q., Wang, L., Song, X., Zou, B., Ding, M., Zhao, J., & Tang, C. Joint toxicity of a multi-heavy metal mixture & chemoprevention in Sprague dawley rats. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(4), 1451. **doi:10.3390/ijerph17041451.**

27. Al Azad, S., Farjana, M., Mazumder, B., Abdullah-Al-Mamun, M., &Haque, A. I. Molecular identification of a Bacillus cereus strain from Murrah buffalo milk showed in vitro bioremediation properties on selective heavy metals. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, 2020,7(1), 62.

doi:10.5455/javar. 2020.g394.

28. Wei, Q., Luo, Q., Liu, H., Chen, L., Cui, H., Fang, J., &Zhao, L. The mitochondrial pathway is involved in sodium fluoride (NaF)-induced renal apoptosis in mice. Toxicology Research, 2018,7(5), 792-808.

doi: 10.1039/c8tx00130h.

29. Cui, W., Li, M., Peng, X., Deng, J., &Cui, H. Effects of dietary high copper on antioxidative function &observation of pathologic lesion in spleen of chick. Chinese Veterinary Science, 2009,39(4),338-343.

30. Li, Y., Chen, H., Liao, J., Chen, K., Javed, M. T., Qiao, N., Zeng, Q., Liu, B., Yi, J., Tang, Z., & Li, Y. Long-term copper exposure promotes apoptosis &autophagy by inducing oxidative stress in pig testis. Environmental Science and Ollution Research International, 2021, 28(39), 55140–55153.

doi: 10.1007/s11356-021-14853-y

31. Le Noci, V., Guglielmetti, S., Arioli, S., Camisaschi, C., Bianchi, F., Sommariva, M., Storti ,C., Triulzi ,T., Castelli, C., Balsari ,A., Tagliabue, E.,&Sfondrini, L. Modulation of pulmonary microbiota by antibiotic or probiotic aerosol therapy, a strategy to promote immunosurveillance against lung metastases. Cell Reports, 2018, 24(13), 3528-3538.

doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.090

32. Artanti, D., Sari, Y. E. S., Azizah, F., Puwaningsih, N. V., Rohmayani, V., &Nasrullah, D. Effect of giving probiotic supplement Lactobacillus Acidophilus La-14 as an immunomodulator to maintain a respiratory system in Mus musculus. Iranian Journal of Microbiology, 2021, 13(3), 381.

doi: 10.18502/ijm.v13i3.6401

33.Keshtmand, Z., &Samadikhah, H. Protective effect of Iranian native probiotic mixtures (Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei &Lactobacillus holoticus) on induced lesions of lead acetate in lung tissue of male

rats. Journal of Applied Microbiology in Food Industry, 2022, 8(2), 9-18.

34. Golkar, N., Ashoori, Y., Heidari, R., Omidifar, N., Abootalebi, S. N., Mohkam, M., &Gholami, A. A novel effective formulation of bioactive compounds for wound healing, preparation, in vivo characterization, &comparison of various postbiotics cold creams in a rat model. Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine, 2021, 8577116.

doi: 10.1155/2021/8577116

35. Veissi, M., Haidari, F., & Shahbazian, H. Effects of probiotic yogurt consumption on cardiovascular disease risk factors in subjects with type 2 diabetes. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, 2015,22(6), 1631-1643.

36. Keshtmand, Z., Akbaribazm, M., Bagheri, Y., &Oliaei, R. The ameliorative effects of Lactobacillus coagulans & Lactobacillus casei probiotics on CCl4-induced testicular toxicity based on biochemical, histological &molecular analyses in rat. Andrologia, 2021, 53(1), e13908.

doi: 10.1111/and.13908

37. Chichlowski, M., Croom, W. J., Edens, F. W., McBride, B. W., Qiu, R., Chiang, C. C., Daniel, L.R., Havenstein, G.B., & Koci, M.D. Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, PrimaLac, and salinomycin. Poultry Science, 2007, 86(6), 1121-1132. **doi: 10.1093/ps/86.6.1121.**

38. Balíková, K., Vojtková, H., Duborská, E., Kim, H., Matúš, P., &Urík, M. Role of exopolysaccharides of pseudomonas in heavy metal removal and other remediation strategies. Polymers, 2022, 14(20), 4253.

doi: 10.3390/polym14204253.

39. Ontañon, O. M., Fernandez, M., Agostini, E., &González, P. S. Identification of the main mechanisms involved in the tolerance &bioremediation of Cr (VI) by Bacillus sp. SFC 500-1E. Environmental Science & Pollution Research, 2018, 25, 16111-16120.

doi: 10.1007/s11356-018-1764-1

40. Gupta, P., Diwan, B. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal, a review on biosynthesis, mechanism &remediation strategies. Biotechnology Reports, 2017, 13, 58-71.

doi: 10.1016/j.btre.2016.12.006.