نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره نوزدهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۴۰۲،
پیاپی ۴۶ :۶۹-۵۶

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله پژوهشی

مطالعه هیستوپاتولوژیک اثرات محافظ کنندگی مخلوط پروبیوتیک در مقابل آسیبهای القایی سولفات مس در بافت روده باریک موشهای صحرایی نر

سمانه صیادی[۱]، زهرا کشتمند*[۲]، سیده معصومه میرنوراللهی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشدزیست فناوری ،گروه زیست شناسی ،واحدتهران مرکزی،دانشگاه آزاداسلامی،تهران،ایران

۲- استادیار ،گروه زیست شناسی،واحدتهران مرکزی،دانشگاه آزاداسلامی،تهران،ایران

۳- استادیار،گروه زیست شناسی،واحدتهران مرکزی،دانشگاه آزاداسلامی،تهران،ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۸

چکیده

سموم مختلف محیطی به ویژه فلزات سنگین در خاک، آب و هوا اثرات سمی بر انسان، حیوان وگیاه دارند. این عناصر سمی در محیط گسترده هستند و باعث ایجاد اختلالات مختلف در سیستم‌های بیولوژیکی می شوند. اخیرا استراتژی‌های متعددی برای کاهش آلودگی فلزات سنگین به کار گرفته شده است. هدف از این تحقیق بررسی تاثیر مخلوط پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس) بر آسیبهای القایی سولفات مس در بافت روده باریک موش های صحرایی نر می باشد.در این مطالعه تجربی،۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به ۳ گروه۷ تایی: کنترل، دریافت کننده سولفات مس، سولفات مس+ مخلوط پروبیوتیک تقسیم شدند. سولفات مس(۲۰۰میلی گرم بر کیلوگرم) و پروبیوتیک(10^9 CFU /Ml) به مدت ۳۵ روز به موش ها گاواژ شد. درپایان آزمایش، موش های صحرایی یوتانایزشده، سپس از روده باریک مقاطع بافتی تهیه، نمونه ها به روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری عکس‌برداری و مورد مطالعه قرار گرفتند.بررسی تغییرات مورفولوژیک بافت روده باریک در گروه تیمار با پروبیوتیک کاهش آسیب بافتی (تعداد سلول های تکروزه،سلول های التهابی، پرخونی، تغییر در اندازه پرزها و ضخامت لایه عضلانی)را در مقایسه با گروه سولفات مس نشان داد. از این مطالعه نتیجه گیری شد که احتمالا پروبیوتیک‌ها را می‌توان به عنوان کاربردی نوین در طیف وسیعی از محصولات دارویی جهت اهداف پیشگیری یا بهبود روش های درمانی به کار گرفت.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، سولفات مس، بافت روده باریک، موش صحرایی

*نویسنده مسئول : زهرا کشتمند

آدرس: گروه زیست شناسی ، واحد تهران مرکزی ، دانشگاه ازاد اسلامی ،تهران ،ایران

پست الکترونیکی : zkeshtmand2001@gmail.com

مقدمه

امروزه آلودگی به یکی از چالش های اصلی مدیریتی کشورها تبدیل شده است؛ به گونه ای که کشورها علاوه بر سیاست ها و اقدامات درون مرزهای خود، سامان دهی آلودگی را در حوزه بین المللی نیز دنبال می کنند (Arya ,.et al 2021). وجود عوامل محیطی نظیر آلودگی محیط زیستی، فلزات سنگین و غیره بر اندام¬های مختلف اثرات مخربی دارد. در برخی از مطالعات، فلزات سنگین را به عنوان آلاینده های زیست محیطی معرفی می کنند (Pulliero et al., 2021).

زمانی که انسان غذا یا آب آلوده به فلزات سنگین را مصرف می کند این فلزات سنگین، محیط اسیدی معده را اسیدی تر کرده، علاوه بر این فلزات سنگین به حالت های اکسیداتیو متعدد خود اکسید می شوند، که این رادیکال ها می توانند در بیوسیستم به مولکول های مختلف مانند پروتئین ها و آنزیم‌ها به ویژه گروه های عاملی تیو، گروه SH سیستئین و گروهSCH3 متیونین متصل شوند (Tagliazucchi et al .,2019). همچنین، رادیکال های آزاد به غشای لیپیدی حمله کرده و باعث آسیب مولکول های لیپید می شوند. مطالعات نشان داده است سولفات مس از طریق پراکسیداسیون لیپیدی در تشکیل گونه¬های فعال اکسیژن شرکت داشته و از این طریق سبب القا آسیب در سلول ها و بافت های مختلف می شود (Martinez-Villaluenga et al .,2017).

فلزات سنگین با هدف قرار دادن پروتئین های مسئول آپوپتوز، تنظیم چرخه سلولی وDNA، متیلاسیون، ترمیم DNA، اختلال در رشد سلولی و تمایز، سبب القا آسیب در بافت های مختلف می‌شوند (; Rin et al .,1995 Crans et al., 2004). همچنین برخی از فلزات سنگین از طریق کاهش انتقال دهنده‌های عصبی یا تجمع در میتوکندری باعث ایجاد سمیت عصبی شده و سنتز ATP را مختل می کنند (Jaishankar .,et al 2014).

سولفات مس یکی از مهم ترین آلاینده های محیطی است که توانایی تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو و اثرگذاری بر مسیر آپوپتوز، توانایی القای سمیت ژنتیکی و آسیب به DNA سلولی را دارد (Erfanizadeh et al., 2021).

موجودات زنده در طول زندگی خود در معرض مس و مشتقات صنعتی آن از طریق مواد غذایی یا آلودگی های زیست محیطی قرار می گیرند. تظاهرات بالینی مرتبط با مسمومیت مس در قسمت های مختلف بدن شامل کبد، کلیه، طحال، ریه و روده مشاهده شده است (Domingo & Rovira 2020). جذب مس از طریق دستگاه گوارش تحت تأثیر تعدادی از ترکیبات نظیراکسیدها، هیدروکسیدها، سیترات‌ها و سولفات‌ها انجام می شود. سولفات مس متداول ترین نمک مس می باشد؛ با این حال، دیگر نمک های مس شامل کربنات، سیانید، اکسید و سولفید نیز وجود دارند (Piroozmanesh., 2020). استراتژی‌های مرسوم مورد استفاده برای سم‌زدایی یا پاک‌سازی فلزات سنگین معمولا هزینه زیادی دارند و عوارض جانبی متفاوتی بر سلامتی دارند (Tarekegn et al .,2020).

یکی از روش‌های نوظهور و ارزان، استفاده از پروبیوتیک‌ها جهت حذف فلزات سنگین به روش بیوشیمیایی است(Rajkumar .,et al 2010 , Huang .,et al 2013). پروبیوتیک ها باکتری های غیر بیماری زا، غیر سمی و تخمیری هستند که در بسیاری از محصولات مختلف مانند غذاها، داروها و مکمل‌های غذایی یافت می‌شوند، از جمله آنها لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم، رایج‌ترین پروبیوتیک‌ها هستند (Vogel .,et al 2018). سویه‌های مختلف پروبیوتیکی که در

روده وجود دارند با وعده‌های غذایی مکمل شده و ترکیب میکروبی مضر را تغییر می دهند (Silbergeld et al., 2000 ; Milatovic et al., 2017). سویه‌های لاکتوباسیلوس پروبیوتیک ها قادر به اتصال با فلزات سنگین هستند و برای سم زدایی فلزات مفید هستند (Larsen .,et al 2013). امروزه پروبیوتیک‌ها به عنوان یک نسل امیدوارکننده برای کاهش سمیت فلزات سنگین در نظر گرفته می‌شوند (Oyarzun et a.,l 2022). علاوه بر این، ارتباط متقابل بین قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین و میکروبیوتای روده قبلا تایید شده بود. قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین، متابولیسم میکروبیوتای روده و عملکرد آنها را تغییر می¬دهند (George et al., 2021). از سوی دیگر، میکروبیوتای روده جذب و متابولیسم فلزات سنگین را اصلاح می کنند (Coryell et al., 2018).

علاوه بر اصلاح، به عنوان یک مانع فیزیکی عمل کرده و میزان استرس اکسیداتیو، فعالیت آنزیم های سم زدا، بیان پروتئین و تعدیلpH را نیز تنظیم می کنند (Fan et al .,2021 ; Singh et al .,2022).

با توجه به اینکه سولفات مس یکی از مهم ترین آلاینده های زیست محیطی است که قادر به تولید رادیکال های آزاد و به دنبال آن ایجاد استرس اکسیداتیو می باشد از این رو، احتمالا استفاده از محرک های ایمنی نظیر پروبیوتیک ها در جهت کاهش آسیب القایی سولفات مس در بافت های مختلف ضروری به نظر می رسد. از این رو، هدف از این مطالعه بررسی تاثیر مخلوط پروبیوتیک های (لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس) بر آسیب های القایی سولفات مس در بافت روده باریک موش صحرایی نر می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تحقیقاتی از نوع تجربی، تعداد ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از دانشگاه شهید بهشتی تهیه و یک هفته پیش از شروع آزمایشات موش ها به منظور سازش با محیط آزمایشگاه به حیوان خانه‌ی دانشکده‌ی علوم پایه‌ی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی منتقل و پس از نگهداری حیوانات و سازش با شرایط محیط جدید تمامی آزمایش ها انجام شد. موش ها در شرایط کنترل با سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته، با درجه حرارت ۳ ± ۲۲ سانتی گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد بدون محدودیت در دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند. آزمایشات در بازه ی زمانی مشخصی ساعت ۹ تا ۱۲ ظهر و منطبق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد و در کلیه روش ها، اصول اخلاقی مورد تایید دانشکده ی علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی رعایت گردید (**IR.IAU.CTB.REC.1401.032**).

گروه بندی حیوانات

۲۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) که در شرایط ذکر شده نگهداری شدند، به طور تصادفی در ۳ گروه هفت تایی تقسیم شدند.

گروه ۱: موش های این گروه فقط آب و غذای پلیت شده را به صورت روزانه دریافت کردند و به منظور تحمیل استرس گاواژ، موش-های صحرایی این گروه به صورت یک روز در میان با آب مقطر نیز گاواژ شدند.

گروه ۲: موش هایی که جهت القا آسیب، سولفات مس (۲۰۰میلی گرم بازای هر کیلوگرم وزن) دریافت کردند (**Fatemi et al., 2021**).

گروه ۳: موش هایی که دریافت کننده سولفات مس + مخلوط پروبیوتیک بومی(لاکتوباسیلوس رامنوسوس،

لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس) بودند.

سولفات مس به میزان ۲۰۰میلی گرم بر کیلوگرم و مخلوط پروبیوتیک ها با غلظت 10^9 **cfu/ml** از طریق گاواژ به موش ها داده شد.

تهیه غلظت پروبیوتیک

یک گرم پروبیوتیک در ۹ سی سی آب مقطر حل گردید و به هر موش از این محلول، ۱سی سی مخلوط پروبیوتیک با غلظت (10^9 **cfu/ml**) به مدت ۳۵ روز گاواژ شد (**Dashtbanei et al .,2023**).

تهیه سولفات مس

به منظور آلوده نمودن نمونه های مورد آزمایش با سولفات مس (**Cu SO4.5H2O**)، این ماده شیمیایی با کد ۱۰۲۷۹۰ از شرکت آزمیران خریداری شد.

تهیه مخلوط پروبیوتیک‌های بومی ایران

مخلوط پروبیوتیک‌های بومی ایران شامل باکتری‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس(**IBRC-M11322**)، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس (**TG-35**) و لاکتوباسیلوس کازئی (**IBC-M10784**) به صورت پودر و با **log 1010** از شرکت تک‌ژن زیست تهیه شد.

نمونه گیری

پس از یک دوره تیمار ۳۵ روزه با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تهران مرکزی (**IR.IAU.CTB.REC.1401.032**)، حیوانات توسط کتامین زایلازین۱٪ (۱۰ میلی گرم زایلازین ۱۰۰۰میلی گرم کتامین) یوتانایز شده ، بافت روده باریک خارج و در نرمال سالین شستشو داده شد.

جهت تثبیت بافت مذکور، نمونه هایی از بخش های مختلف بافت روده باریک(بخش های دوازدهه ، تهی روده و دراز روده) در فرمالین بافر خنثی ۱۰ ٪ قرار گرفته و به مدت ۷۲ ساعت داخل ظرف نگهداری شدند. پس از پارافین دهی و آب‌گیری، نمونه ها به وسیله پ دستگاه پردازش گر بافت، آب‌گیری و قالب¬های پارافینی تهیه شدند. با استفاده از دستگاه میکروتوم از نمونه‌ها، مقاطع بافتی به ضخامت پنج میکرومتر تهیه و برش های بافتی آماده شده با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شد (**Dashtbanei et al., 2023**).

برای بررسی لام ها و اندازه گیری طول، عرض و عمق پرز، ، ضخامت لایه ماهیچه تعداد سلول های التهابی و نکروزی در بافت روده باریک از عدسی چشمی مجهز به خط کش اندازه گیری با مقیاس میکرومتر مخصوص میکروسکوپ‌های ژاپنی (**Olympus**) استفاده شد (**Dashtbanei et al .,2023**).با توجه به اینکه از هر نمونه اخذ شده از هر قسمت روده(دوازدهه، تهی روده، دراز روده)، سه برش ایجاد شد، هر کدام از پارامترهای ذکر شده در هر برش، از چندین محل اندازه گیری شدند و سپس اعداد میانگین برش های مختلف هر نمونه به عنوان عدد نهایی، در نظر گرفته شد.

تحلیل داده‌ها:

طبیعی بودن توزیع داده های به دست آمده با آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد ($P > ۰/۰۵$¬).

برای آنالیز از واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده و سطح معناداری نیز $P \geq ۰/۰۵$ در نظر گرفته و نتایج در هر مورد به صورت میانگین ±انحراف معیار گزارش شد.

ملاحظات اخلاقی:

مطالعه حاضر با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی تهران مرکزی انجام گرفته است و سعی شده که تمام موازین اخلاقی کار با حیوان مورد توجه باشد و الزامات معاهده هلسینکی رعایت گردد (**IR.IAU.CTB.REC.1401.032**).

نتایج

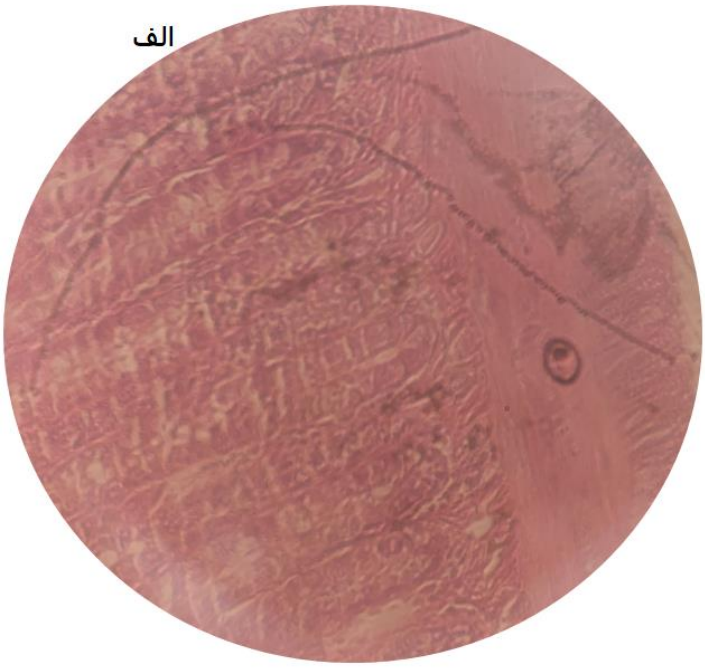
طبق جدول۱ بررسی تصاویر مربوط به گروه دریافت کننده سولفات مس(200mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل کاهش عرض ، ارتفاع و عمق پرز و ضخامت لایه عضلانی در قسمت‌های مختلف روده باریک (دئودنوم ، ژژنوم و ایلئوم) ، افزایش سلول های التهابی و نکروز در بافت روده باریک (شکل۱) گزارش شد.

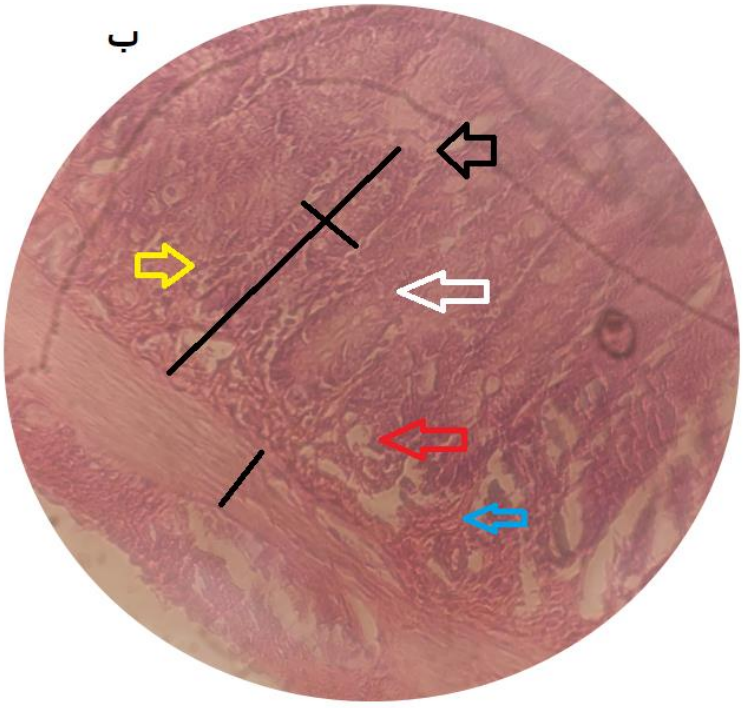
در گروه سولفات مس(200mg/kg)+ مخلوط پروبیوتیک 10^9 (cfu/ml) در مقایسه با گروه کنترل بهبودی در آسیب های ایجاد شده به صورت معنا دار در مقایسه با گروه دریافت کننده سولفات مس(200mg/kg) نشان داده شد.

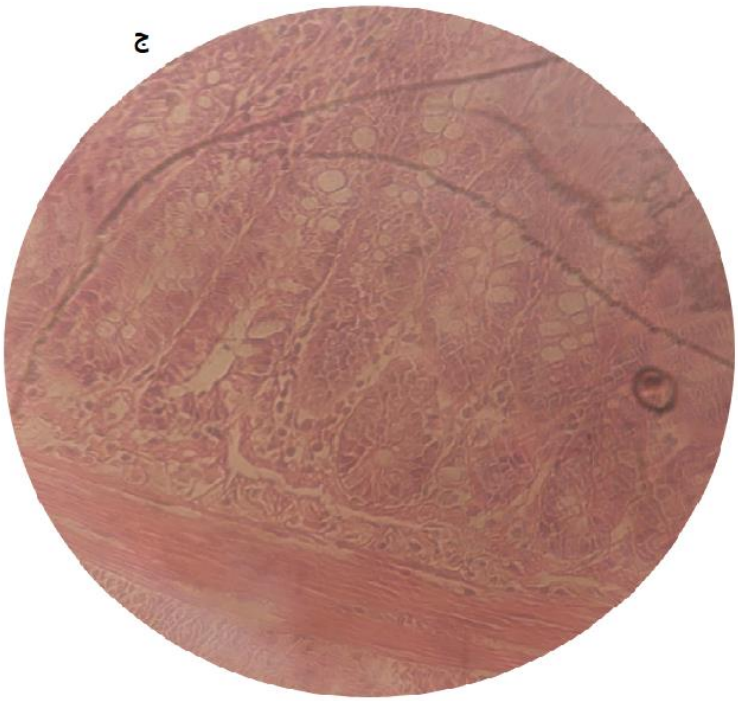
جدول ۱. مقایسه پارامترهای هیستومورفومتری (میکرومتر) در گروه‌های آزمایش

پارامترها	قسمت روده باریک	گروه کنترل	گروه سولفات مس (۲۰۰mg/kg)	دریافت کننده سولفات مس (۲۰۰mg/kg)+ مخلوط پروبیوتیک (10^9 CFU/Ml)
طول پرز (µm)	دئودنوم	۳۷۶/۴۳ ± ۱۵/۳۱	^{a}۲۸۶/۱۱ ± ۱۳/۲۴	^{ad}۳۱۲/۲۳ ± ۱۱/۵۶
	ژژنوم	۳۴۳/۵۳ ± ۹/۶۴	^{a}۲۴۷/۲۶ ± ۱۲/۰۵	^{a}۲۶۰/۶۵ ± ۲/۶۷
	ایلئوم	۱۸۹/۳۱ ± ۴/۱۱	^{a}۱۲۳/۸۳ ± ۶/۰۵	^{ad}۱۶۶/۳۲ ± ۲/۴۸
عمق پرز(µm)	دئودنوم	۸۸/۲ ± ۹/۱۹	^{b}۴۰/۲ ± ۳/۱۶	^{ad}۷۳/۵۳ ± ۳/۵۲
	ژژنوم	۸۶/۴۱ ± ۳/۴۱	^{b}۴۲/۲ ± ۸/۰۱	$^{d\,a}$۶۹/۹۱ ± ۵/۳۹
	ایلئوم	۷۱/۱۳ ± ۴/۳۰	^{a}۵۶/۰۱ ± ۴/۷۴	$^{d\,a}$۶۷/۰ ± ۴/۰۲
عرض پرز(µm)	دئودنوم	۷۸/۳۷ ± ۳/۲۱	^{a}۵۱/۱۶ ± ۶/۱۴	^{a}۶۸/۴۸ ± ۴/۷۳
	ژژنوم	۸۱/۱۶ ± ۲/۸۷	^{a}۶۸/۳۸ ± ۶/۰۹	^{a}۷۵/۵۴ ± ۴/۱۵
	ایلئوم	۹۱/۵۳ ± ۲/۲۳	^{a}۷۴/۰۶ ± ۳/۵۱	^{a}۸۲/۸۹ ± ۴/۶۷
ضخامت لایه عضلانی (µm)	دئودنوم	۷۹/۴۳ ± ۵/۲۸	^{a}۵۶/۱۷ ± ۳/۱۹	^{a}۶۹/۱۴ ± ۲/۸۹
	ژژنوم	۶۵/۱۶ ± ۴/۳۴	^{a}۳۸/۵۱ ± ۲/۴۱	$^{d\,a}$۴۵/۱۶ ± ۵/۷۸
	ایلئوم	۵۵/۱۱ ± ۲/۴۵	^{a}۳۱/۶۶ ± ۱/۳۸	$^{d\,a}$۴۳/۰۴ ± ۱/۲۴
تعداد سلول‌های التهابی لنفوسیتی	روده باریک	۱/۰۳ ± ۰/۲۳	^{c}۶/۱۱ ± ۱/۰۲	^{a}۲/۴۶ ± ۰/۴۱
تعداد سلول‌های نکروزه	روده باریک	۰/۸۷ ± ۰/۰۱	^{b}۴/۲۳ ± ۰/۰۲	$^{e\,a}$۲/۴۶ ± ۰/۴۱

نتایج براساس میانگین±خطای انحراف معیار، a: P ۰/۰۵> مقایسه با گروه کنترل، b: P ۰/۰۱> مقایسه با گروه کنترل، c: P ۰/۰۰۱> مقایسه با گروه کنترل، d: P ۰/۰۵> مقایسه با گروه دریافت کننده سولفات مس، e: P ۰/۰۱> مقایسه با گروه دریافت کننده سولفات مس


الف


ب



شکل ۱. مقطع میکروسکوپی بافت روده باریک در گروههای آزمایش . الف) گروه کنترل، ب) گروه دریافت کننده سولفات مس ، ج) گروه دریافت کننده سولفات مس و مخلوط پروبیوتیک.با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (بزرگنمایی ٤٠٠). در گروه دریافت‌کننده آلاینده سولفات مس آسیب بافتی از جمله افزایش تعداد سلول‌های التهابی به ویژه لنفوسیت‌ها(فلش زرد رتک)، واکوئله شدن(فلش قرمز)، نکروزی شدن بافت(فلش سفید)، پر خونی شدن (فلش آبی)، تخریب بافت اپی تلیوم (فلش مشکی) و تغییر در طول و عرض پرزها و ضخانت لایه عضلاتی(خط مشکی) کاملا قابل رویت است.

بحث

مشکل آلودگی محیط زیست در نتیجه صنعتی شدن سریع جوامع شامل آلاینده های آب و مواد غذایی، تعادل اکولوژیکی را در محیط زیست مختل کرده و اثرات سمی را بر موجودات زنده وارد کرده است (Sayqal et al .,2021).

اگر چه به طور طبیعی حضور برخی از فلزات به منظور انجام فعالیت های بیولوژیکی موجودات زنده ضروری هستند اما انتشار آلاینده ها از منابع مختلف منجر به

افزایش غلظت عناصر در سطوح خطرناک در محیط زیست برای موجودات زنده شده است (Dai ,.et al 2020). فلزات سنگین ترکیبات غیرقابل تجزیه‌ای هستند که در اشکال آلی و معدنی متعددی باقی می مانند. برخی از فلزات سنگین مانند آهن، مس و روی عناصر کمیاب ضروری هستند، اما برخی دیگر مانند کادمیوم، سرب، جیوه حتی به مقدار اندک اثرات سمی را القا می کنند. تجمع فلزات سنگین در اندام‌های انسان تأثیر نامطلوبی بر سلامت انسان دارد. ماهیت تجزیه ناپذیر فلزات سنگین بر طول عمر و در دسترس بودن آنها در خاک تأثیر می گذارد و سبب جهش زایی، القا سرطان و آسیب در اندام ها می شود و یا در محیط ما باقی می مانند(Jeyakumar et al .,2023).

در تحقیق حاضر اثر مخلوط پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازائی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس) بر آسیب های القایی سولفات مس در بافت روده باریک موشهای صحرایی نر نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت.

در این پژوهش در گروه دریافت کننده سولفات مس، تغییرات مورفولوژیک در بافت روده باریک مشاهده شد. نتایج بررسی در گروه موش‌های آلوده شده با سولفات مس تغییر در طول، عرض و عمق پرز ، ضخامت لایه ماهیچه، تعداد سلول های التهابی و نکروزه شدن بافت روده باریک در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری نشان داده شد. مطالعات مختلف انجام شده نیز افزایش تخریب در بافت روده باریک درحضور فلزات سنگین را گزارش داده‌اند (Salaret al .,2022 ;Barzin et al .,2022).

در پژوهش انجام شده توسط Shaloui و همکاران در سال ۲۰۲۱ با بررسی اثر سولفات مس بر روده ماهی قرمز آسیبهای بافتی همچون التهاب و نفوذ فراوان سلولهای آماسی به شکل آنتریت حاد به همراه پرخونی در بافت روده مشاهده گردید (Shaloui et al .,2021). در مطالعات آسیب شناسی تحقیق حاضر نیز مشاهده گردید که سولفات مس بطور معنی داری باعث آسیب به بافت روده باریک می شود.

بررسی بافت روده باریک در گروه دریافت کننده مخلوط پروبیوتیک، کاهش آسیب در بخش های مختلف روده باریک را در مقایسه با گروه دریافت کننده سولفات مس نشان داد. مطالعات برون‌تنی و درون‌تنی نشان داده‌اند که میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می توانند به آلاینده های شیمیایی مختلف و فلزات سنگین متصل شوند و یا آنها را متابولیزه کنند (Feng et al., 2019).

تایید شده است که مکمل های پروبیوتیک خوراکی می‌توانند اثرات منفی قرار گرفتن در معرض آلاینده‌های مواد غذایی را با تعدیل ترکیب میکرو فلور روده کاهش دهند (Abdel-Megeed et al., 2021). در پژوهش انجام شده توسط Judkins و همکاران نشان داده شد که مکمل ماست با لاکتوباسیلوس رامنوسوس(L. rhamnosus GR-1) غلظت فلزات سنگین را در زنان باردار کاهش داد (Judkins et al., 2020).

گزارش شده است که لاکتوباسیلوس با تغییر عملکرد و ساختار جامعه میکروبی روده، سمیت فلزات سنگین را کاهش می‌دهد (Capurso .,et al 2019).

در پژوهش Zhai و همکاران در سال ۲۰۱۹در موش‌های در معرض سرب مصرف پروبیوتیک Lactobacillus. plantarum CCFM8661 گزارش داده شد که این سویه ها از طریق افزایش جذب فلزات سنگین روده ای و از طریق تحریک پریستالیس روده

باعث کاهش جذب آن ها در روده و افزایش دفع از طریق مدفوع می شوند (Zhai et al., 2019).

پروبیوتیک ها به دلیل ویژگی ساختمانی خود توسط آنزیم های هضمی دستگاه گوارش هیدرولیز نشده و در روده کور تحت تأثیر آنزیم-های باکتریایی هیدرولیز و تخمیر نمی شوند و در نهایت تولید اسیدهای چرب فرار می نماید. این اسیدهای چرب فرار منجر به کاهش pH و با تبدیل به فرم یونیزه در داخل سلول های باکتری های بیماری زا اثرات ضد میکروبی خود را اعمال می نمایند و از این طریق منجر به کاهش رشد پاتوژن ها و افزایش شمار باکتری های تولیدکننده لاکتات می شوند (Chichlowski et al ,.2007).

از طرف دیگر منجر به تحریک پاسخ های ایمنی و افزایش مقاومت در مقابل عوامل بیماری زا می گردند و از این طریق اثرات محرک رشد خود را اعمال می نماید(Milatovic et al ,.2017).

مکانیسم‌های احتمالی موثر دیگر پروبیوتیک¬ها بر بافت¬های مختلف از طریق تولید مواد آنتی بیوتیکی، مهار رشد پاتوژن¬ها، تغییر متابولیسم میکروبی، کاهش pH در روده و تحریک سیستم ایمنی بدن است (Patel et al ,.2015).

لاکتوباسیل ها توانایی زنده ماندن و اتصال به بافت اپیتلیوم روده را دارند و با اثر مثبت روی غشای مخاطی مجرای گوارشی سبب افزایش عملکرد حیوان می‌شوند. گزارش های متعددی در مطابقت با این نتایج ارائه شده است (Jung et al., 2008).

مطالعات متعدد در شرایط آزمایشگاهی نشان داده است که پروبیوتیک ها به عنوان کاندید اتصال فلزات سنگین دارای خاصیت سم زدایی نیز می‌باشند. چسبیدن قوی به مخاط روده، قابلیت آنتی اکسیدانی قوی و تنظیم کننده ایمنی، تحمل مایعات گوارشی و سرکوب رشد پاتوژن، همچنین توانایی افزایش دفع فلزات سنگین برخی سویه ها در مدفوع از جمله عملکردهای پروبیوتیک ها در برابر فلزات سنگین می باشد. برخی از سویه های پروبیوتیک از طریق افزایش سنتز اسید صفراوی کبدی وافزایش دفع اسیدهای صفراوی در مدفوع سبب کاهش سطح آلاینده ها در بدن می شوند.مشخص شده است که سویه های پروبیوتیک نقش مهمی در تعدیل سیستم ایمنی میزبان نیز دارند. وجود این میکروارگانیسم‌ها در روده باعث می‌شود که تحمل ایمنی نسبت به آنتی‌ژن‌های محیطی حفظ شود و همچنین از آلرژی‌ها و واکنش‌های خود تهاجمی جلوگیری می‌کند (Njoku et al ,.2020).

پژوهش های انجام شده پیشنهاد داده اند، احتمالا نقش بالقوه سویه های پروبیوتیک در بهبود اثرات سمی فلزات سنگین به دلیل توانایی قوی آن ها برای اتصال، تحمل یا سم زدایی فلزات سنگین، تحمل بالا به شرایط اسیدی معده و صفرا و باقی ماندن در دستگاه گوارش، توانایی چسبیدن و اتصال در روده می باشد، همچنین به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی و دارای پاسخ تنظیمی ایمنی قوی نیز عمل می‌کنند (Ayangbenro et al ,.2017 ; Balíková et al., 2022).

از سویی مکانیسم پیشنهادی دیگر برای عملکرد پروبیوتیک جهت سم زدایی فلزات سنگین از طریق اتصال یون های فلزی به دیواره سلولی باکتری ها و به دنبال آن تجمع در داخل باکتری از طریق عبور از غشای سلولی است که به عنوان تجمع زیستی تعریف می‌شود (Ontañon et al ,.2018). علاوه بر این، باکتری های پروبیوتیک شکل های سمی تر را تغییر داده و به شکل هایی با خاصیت سمیت کمتر تغییر می دهند (Gupta et al ,.2016). همچنین برخی اسیدهای تولید شده توسط میکروبیوت‌های روده،

جذب متابولیت های فلزات سنگین را تسریع می کنند (Orji et al ,.2021).

گزارش داده شده است که پروبیوتیک ها با کاهش استرس اکسیداتیو، افزایش عملکرد سد روده ، مهار چسبندگی پاتوژن باعث کاهش سموم باکتریایی، سنتز مواد ضد باکتریایی (باکتریوسین ها، آنتی بیوتیک ها) و همچنین ویتامین ها می شوند علاوه بر این، متابولیت های پروبیوتیک نقش مهمی در حفظ هوموستاز روده و ارتقای سلامت روده ایفا می کنند به نظر می‌رسد بسیاری از این پاسخ‌ها ناشی از تحریک پروبیوتیک از طریق مسیرهای سیگنال‌دهی داخل سلولی خاص در سلول های اپیتلیال است. به عنوان مثال، مطالعات نشان داده اند که اسیدهای چرب اشباع فعال متابولیکی، مانند اسیدهای استیک، بوتیریک تولید شده توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس CRL 1014 در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی که منابع انرژی متابولیکی را برای سلول های اپی تلیال کولون انسان فراهم می کنند، دخیل هستند (Markowiak-Kopeć et al ,.2020).

نتیجه گیری:

در این مطالعه اثربخشی مخلوط پروبیوتیک(لاکتوباسیلوس کازائی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس) بر آسیب‌های القایی الاینده سولفات مس در بافت روده باریک نشان داده شده است.

پروبیوتیک ها در مطالعات متعددی برای بهبود سلامت انسان، گیاه و حیوان مورد بررسی قرار گرفته‌اند و سویه‌های مختلف آن‌ها دارای خواص ضد التهابی و ضد حساسیت هستند. علاوه بر این اثربخشی مثبت و موثری را در برابر انواع بیماری ها، حذف زیستی سموم و فلزات و دفع آن‌ها از بدن را نشان داده‌اند. بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از پروبیوتیک‌ها ممکن است. رویکرد خوبی برای مقابله با کاهش آسیب های القایی فلزات سنگین در انواع مختلف بافت ها باشد و می‌تواند یک کاندیدای امیدوارکننده برای زیست پالایی و حذف آلاینده های مختلف زیستی در بدن باشند.از این رو مصرف پروبیوتیک ها یک راه ساده و موثر برای کاهش میزان آلاینده های جذب شده می‌باشد.

با صنعتی شدن جوامع، قرار گرفتن انسان در معرض آلاینده ها، بیشتر افزایش یافته، بنابراین دانش در مورد فعل و انفعالات متقابل بین آلاینده‌ها و پروبیوتیک‌ها و تأثیر آن‌ها بر میکروبیوم روده و مسیرهای متابولیک در تخمین خطر واقعی سلامت مرتبط با قرار گرفتن در معرض این ترکیبات بسیار مهم است. از آنجایی که توانایی حذف و به دام انداختن آلایندها توسط برخی از پروبیوتیک‌ها امکان پذیر است از این رو شناسایی و معرفی این سویه های پروبیوتیک نیازمند مطالعات بیشتر و دقیق تر می‌باشد.

سپاس و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه دانشجوی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی با کد پایان‌نامه ۱۰۱۷۲۹۲۳۳۶۹۸۳۸۱۹۲۲۰۱۰۱۶۲۶۱۰۰۴۸ در گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد تهران مرکزی انجام شد و از شرکت پروبیوتیک تک ژن تشکر و قدردانی می شود.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

منابع

1. Abdel-Megeed R. M. 2021. Probiotics: a Promising Generation of Heavy Metal Detoxification. *Biol Trace Elem Res*., **199**(6), 2406–2413. DOI: 10.1007/s12011-020-02350-1 PMID: 32821997
2. Aryal, A., Harmon, A. & Dugas, T. 2021. Particulate matter air pollutants and cardiovascular disease: Strategies for intervention. Pharmacol Ther, **223**, 107890. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107890. PMID: 33992684
3. Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. 2017. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *Int J Environ Res Public Health*.,**14**(1), 94. DOI: 10.3390/ijerph14010094 PMID: 28106848
4. Balíková, K., Vojtková, H., Duborská, E., Kim, H., Matúš, P., & Urík, M. 2022. Role of Exopolysaccharides of Pseudomonas in Heavy Metal Removal and Other Remediation Strategies. *Polymers*, **14**(20), 4253. DOI: 10.3390/polym14204253 PMID: 36297831
5. Barzin A.R., Keshtmand Z. & Smadilkhah H.R. 2022. Protective effect of mixture of Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei and Lactobacillus helveticus on small intestinal tissue of male poisoned rats lead acetate. *Iranian Journal of Biological Sciences*, **16**, 71-80. (In Persian)
6. Capurso L. 2019. Thirty Years of Lactobacillus rhamnosus GG: A Review. *J Clin Gastroenterol.*, 53 Suppl 1, S1–S41. DOI: 10.1097/MCG.0000000000001170 PMID: 30741841
7. 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. 2007. Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, PrimaLac, and salinomycin. *Poult Sci*, **86**(6), 1121–1132. DOI:10.1093/ps/86.6.1121 PMID: 17495082
8. Coryell, M., McalpinE, M., Pinkham, N., Mcdermott, T. & Walk, S. 2018. The gut microbiome is required for full protection against acute arsenic toxicity in mouse models. *Nat Commun* ,**9**, 5424. DOI: 10.1038/s41467-018-07803-9
9. Crans, D. C., Smee, J. J., Gaidamauskas, E., & Yang, L. 2004. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem. Rev*., **104**(2), 849-902. DOI: 10.1021/cr020607t
10. Dai, C., Liu, Q., Li, D., Sharma, G., Xiong, J., & Xiao, X. 2020. Molecular Insights of Copper Sulfate Exposure-Induced Nephrotoxicity: Involvement of Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress Pathways. *Biomolecules*, **10**(7), 1010. DOI: 10.3390/biom10071010 PMID: 32650488
11. Dashtbanei, S., & Keshtmand, Z. 2023. A Mixture of Multi-Strain Probiotics (Lactobacillus Rhamnosus, Lactobacillus Helveticus, and Lactobacillus Casei) had Anti-Inflammatory, Anti-Apoptotic, and Anti-Oxidative Effects in Oxidative Injuries Induced by Cadmium in Small Intestine and Lung. *Probiotics Antimicrob Proteins.*, **15**(2), 226–238. DOI: 10.1007/s12602-022-09946-0 PMID: 35819625
12. Domingo, J. L., & Rovira, J. 2020. Effects of air pollutants on the transmission and severity of respiratory viral infections. *Environ.*

Res., **187**, 109650. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109650

13. Erfanizadeh, M., Noorafshan, A., Naseh, M., & Karbalay-Doust, S. 2021. The effects of copper sulfate on the structure and function of the rat cerebellum: A stereological and behavioral study. *IBRO Neuroscience Reports*, **11**, 119-127. DOI: 10.1016/j.ibneur.2021.09.001

14. Fan, Y., & Pedersen, O. 2021. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol*., **19**(1), 55–71. DOI: 10.1038/s41579-020-0433-9

15. Fatemi, I., Hassanshahi, Z., Eslammanesh, T., SADEGHI, M., SALARI Sedigh, S. & Hakimizadeh, E. 2021. Microscopic evaluation of the effect of copper sulfate on soft and hard oral tissues in male rats. *Journal of Jiroft University of Medical Sciences*, **7**, 525-531. (In Persian)

16. Feng, P., Ye, Z., Kakade, A., Virk, A. K., Li, X., & Liu, P. 2018. A Review on Gut Remediation of Selected Environmental Contaminants: Possible Roles of Probiotics and Gut Microbiota. *Nutrients*, **11**(1), 22. DOI: 10.3390/nu11010022 PMID: 30577661

17. George, F., Mahieux, S., Daniel, C., Titécat, M., Beauval, N., Houcke, I., Neut, C., Allorge, D., Borges, F., Jan, G., Foligné, B., & Garat, A. 2021. Assessment of Pb(II), Cd(II), and Al(III) Removal Capacity of Bacteria from Food and Gut Ecological Niches: Insights into Biodiversity to Limit Intestinal Biodisponibility of Toxic Metals. *Microorganisms*, **9**(2), 456. DOI: 10.3390/microorganisms9020456 PMID: 33671764

18. Gupta, P., & Diwan, B. 2016. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies, *Biotechnol Rep (Amst).*, **13**, 58–71. DOI: 10.1016/j.btre.2016.12.006 PMID: 28352564

19. Huang, L., Xie, J., Lv, B. Y., Shi, X. F., Li, G. Q., Liang, F. L., & Lian, J. Y. 2013. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by Acinetobacter beijerinckii ZRS. Mar. *Pollut. Bull*., **76**(1-2), 325–332. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.03.037 PMID: 24070455

20. Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol*., **7**(2), 60-72. DOI: 10.2478/intox-2014-0009

21. Jeyakumar,P.,Debnath,C., Vijayaraghavan, R., & Muthuraj, M. 2023. Trends in bioremediation of heavy metal contaminations. *Environ. Eng. Res*. ,**28**(4). DOI: 10.4491/eer.2021.631

22. Judkins, T. C., Archer, D. L., Kramer, D. C., & Solch, R. J. 2020. Probiotics, Nutrition, and the Small Intestine. *Curr Gastroenterol Rep*., **22**(1), 2. DOI: 10.1007/s11894-019-0740-3 PMID: 31930437

23. Jung, S. J., Houde, R., Baurhoo, B., Zhao, X., & Lee, B. H. 2008. Effects of galacto-oligosaccharides and a Bifidobacteria lactis-based probiotic strain on the growth performance and fecal microflora of broiler chickens. *Poult Sci*, **87**(9), 1694–1699. DOI: 10.3382/ps.2007-00489 PMID: 18753434

Res Int., **25**(16), 16111–16120. DOI: 10.1007/s11356-018-1764-1 PMID: 29594905

30. Orji, O. U., Awoke, J. N., Aja, P. M., Aloke, C., Obasi, O. D., Alum, E. U., Udu-Ibiam, O. E., & Oka, G. O. 2021. Halotolerant and metalotolerant bacteria strains with heavy metals biorestoration possibilities isolated from Uburu Salt Lake, Southeastern, Nigeria. *Heliyon*, **7**(7), e07512. DOI:10.1016/j.heliyon.2021.e07512 PMID: 34355076

31. Oyarzun, I., Le Nevé, B., Yañez, F., Xie, Z., Pichaud, M., Serrano-Gómez, G., Roca, J., Veiga, P., Azpiroz, F., Tap, J., & Manichanh, C. 2022. Human gut metatranscriptome changes induced by a fermented milk product are associated with improved tolerance to a flatulogenic diet. *CSBJ*, **20**, 1632–1641. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.04.001 PMCID: PMC9014321

32. Patel, R., & DuPont, H. L. 2015. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clin Infect Dis*., 60 Suppl 2(Suppl 2), S108–S121. DOI:10.1093/cid/civ177 PMID: 25922396

33. Pirozmanesh, H., Janatifar, R., & Naserpour, L. 2020. The Effects of Copper Sulfate on Sperm Quality Parameters, DNA Fragmentation Rate and Testicular Tissue of Adult Wistar Rats. *J animal physiology and development (quarterly journal of biological sciences)*, **13**(4), 13-24. (In Persian)22. Je

34. Pulliero, A., TraversI, D., Franchitti, E., Barchitta, M., Izzotti, A. & AGODI, A. 2021. The Interaction among Microbiota, Epigenetic Regulation, and Air Pollutants in

24. Larsen, N., Vogensen, F. K., Gøbel, R. J., Michaelsen, K. F., Forssten, S. D., Lahtinen, S. J., & Jakobsen, M. 2013. Effect of Lactobacillus salivarius Ls-33 on fecal microbiota in obese adolescents. *Clin Nutr*., **32**(6),935–940. DOI: 10.1016/j.clnu.2013.02.007

25. Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E., & Frias, J. 2017. Bioactive peptides in fermented foods: Production and evidence for health effects. *In Fermented foods in health and disease prevention Academic Press*. pp. 23-47. DOI:10.1016/B978-0-12-802309-9.00002-9

26. Markowiak-Kopeć, P., & Śliżewska, K. 2020. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients*, **12**(4), 1107. DOI: 10.3390/nu12041107 PMID: 32316181

27. Milatovic, D, Gupta, RC, Yin, Z, Zaja-Milatovic, S & Aschner, M 2017, Manganese. *in Reproductive and Developmental Toxicology*. Elsevier, pp. 567-581. DOI:10.1016/B978-0-12-804239-7.00032-9

28. Njoku, K. L., Akinyede, O. R. & OBIDI, O. F. 2020. Microbial Remediation of Heavy Metals Contaminated Media by Bacillus megaterium and Rhizopus stolonifer. *Scientific African*, **10**, e00545. DOI: 10.1016/j.sciaf.2020.e00545

29. Ontañon, O. M., Fernandez, M., Agostini, E., & González, P. S. 2018. Identification of the main mechanisms involved in the tolerance and bioremediation of Cr(VI) by Bacillus sp. SFC 500-1E. *Environ Sci Pollut*

carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *Am J Ind Med*., **38**(3), 316–323. DOI:10.1002/10970274(200009)38:3< 316::aid-ajim11>3.0.co;2-p

41. Singh, S., Sharma, P., Pal, N., Kumawat, M., Shubham, S., Sarma, D. K., Tiwari, R. R., Kumar, M., & Nagpal, R. 2022. Impact of Environmental Pollutants on Gut Microbiome and Mental Health via the Gut-Brain Axis. *Microorganisms*, **10**(7), 1457. DOI: 10.3390/microorganisms10071457 PMID: 35889175
42. Tagliazucchi, D., MARTINI, S. & SOLIERI, L. 2019. Bioprospecting for Bioactive Peptide Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Food. *Fermentation*, **5**(4), 96. DOI:10.3390/fermentation5040096
43. Tarekegn, M., Zewdu, F., & Ishetu, A. 2020. Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. *Cogent food agric*., **6**(1), 1783174. DOI:10.1080/23311932.2020.1783174
44. Vogel, M., Fischer, S., Maffert, A., Hübner, R., Scheinost, A. C., Franzen, C., & Steudtner, R. 2018. Biotransformation and detoxification of selenite by microbial biogenesis of selenium-sulfur nanoparticles. *J. Hazard. Mater*.,**344**, 749–757. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.03445
45. Zhai, Q., Liu, Y., Wang, C., Qu, D., Zhao, J., Zhang, H., Tian, F. & Chen, W. 2019. Lactobacillus plantarum CCFM8661 modulates bile acid enterohepatic circulation and increases lead excretion in mice. *Food & Func*., **10**, 1455-1464. DOI:10.1039/C8FO02554A

Disease Prevention. *J Pers Med*, **12**(1)**,** 14. DOI: 10.3390/jpm12010014. PMID: 350553303.

35. Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N., & Freitas, H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol*., **28**(3),142–149. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.12.002
36. Rin, K., KawaguchI, K., Yamanaka, K., Tezuka, M., Oku, N., & Okada, S. 1995. DNA-strand breaks induced by dimethylarsinic acid, a metabolite of inorganic arsenics, are strongly enhanced by superoxide anion radicals. *Biol. Pharm. Bull*, **18**(1), 45-48. DOI: 10.1248/bpb.18.45
37. Salar, S. & Keshtmand, Z. 2022. Effect of a Mixture of Native Iranian Probiotics on Biochemical Factors and Kidney Tissue of Male Rats Exposed to Cadmium Chloride. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, **30**(8),1531-5140. (In Persian)
38. Sayqal, A., & Ahmed, O. B. 2021. Advances in Heavy Metal Bioremediation: An Overview. *Appl Bionics Biomech*. ,**2021**, 1609149. DOI: 10.1155/2021/1609149 PMID: 34804199
39. Shaloui, F., Shadakhtah, M. & Arab Markadeh, M. 2021. Effect of dietary copper sulfate replacement with copper oxide nanoparticles on digestive enzymes activity and intestinal histopathology in Gold fish (Carassius auratus). *Journal of Aquaculture Development*, **15**, 115-128. (In Persian)
40. Silbergeld, E. K., Waalkes, M., & Rice, J. M. 2000. Lead as a

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 19, Issue 1,
Spring & Summer 2023

Histopathological study of the protective effects of probiotic mixture against copper sulfate-induced damage in the small intestine tissue of male rats

Samaneh Sayadi[1] , Zahra Keshtmand[2]*, Seyyedeh Masoumeh Mirnourallahi [3]

1. Master student of Biotechnology, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 21 April 2023 *Accepted: 19 September 2023*

Abstract

Various environmental toxins, especially heavy metals in the soil, water and air, have toxic effects on humans, animals and plants. These toxic elements are widespread in the environment and cause various disorders in biological systems. Recently, several strategies have been applied to reduce heavy metal pollution. The purpose of this research is to investigate the effect of the probiotic mixture of Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus casei and Lactobacillus heloticus on copper sulfate-induced damage in the small intestine tissue of male rats. In this experimental study, 21 adult male Wistar rats were divided in 3 as : control, recipient of copper sulfate,copper sulfate + probiotic mixture.Copper sulfate (200mg/kg) and probiotics (10^9 CFU/Ml) were gavaged to rat for 35 days. At the end of the experiment, the rats were euthanized, then tissue sections were prepared from the small intestine, the samples were stained with hematoxylin-eosin method and photographed and studied by a light microscope. Investigating the morphological changes of the small intestine tissue in the treatment group with probiotics to reduce damage. tissue (the number of necrotic cells, inflammatory cells, hyperemia, changes in the size of the villi and the thickness of the muscle layer) compared to the copper sulfate group. It was concluded from this study that, probiotics can probably be used as a new application in a wide range of medicinal products for the purposes of prevention or improvement of treatment methods.

Keywords: probiotics, copper sulfate, small intestine tissue, rat

**Corresponding author,s: Zahra Keshtmand,*
Address: Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: zkeshtmand2001@gmail.com