

بررسی تاثیر لاکتوباسیلوس کازئی TD₂ پروبیوتیک بومی ایران بر میزان ترشح هورمون کورتیکوسترون در رت نر نژاد ویستار تحت شرایط استرس بی حرکتی مزمن

زهرا سلطانی^۱، پروانه جعفری^۲، حمیدرضا آزادگان قمی^۳

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات اراک، کارشناسی ارشد گروه علوم پایه، اراک، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، استادیار گروه علوم پایه، اراک، ایران. P-jafari@iau.arak.ac.ir

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، دانشکده علوم پایه، استادیار گروه میکروبیولوژی، اراک، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱۵

چکیده

زمینه وهدف: استرس باعث افزایش ترشح کورتیزول از غده‌ی فوق کلیوی می‌شود. این هورمون در استرس‌های طولانی مدت، آسیب شدیدی به بدن زده و زمینه ساز ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد. پروبیوتیک‌ها احتمالاً می‌توانند در کاهش اثرات مخرب استرس موثر باشند. هدف از این تحقیق بررسی تاثیر لاکتوباسیلوس کازئی TD₂ بر میزان کورتیکوسترون در رت نر تحت شرایط استرس بی حرکتی مزمن است.

روش کار: برای انجام این تحقیق ۴۰ سر موش رت نر نژاد ویستار با سن و وزن تقریبی یکسان ۱۳۰-۱۱۰ gr انتخاب شد. پس از ۲ هفته دوره سازگاری، رت‌ها به طور تصادفی در چهار گروه دهنه‌دایی شامل ۲ گروه کنترل منفی (به مدت ۲۱ روز با ۱ ml بافر فسفات)، کنترل مثبت علاوه بر گاوآژ روزانه با بافر، هر روز به مدت ۱۵ دقیقه بی حرکتی مزمن، و ۲ گروه آزمون ۱ (با گاوآژ هر روز پروبیوتیک)، آزمون ۲ (علاوه بر پروبیوتیک، استرس نیز دریافت می‌کرد) تقسیم شدند. پس از طی شدن دوره آزمون، رت‌ها با اتر بیهوش و سپس خونگیری از قلب آن‌ها به عمل آمد. میزان هورمون با استفاده کیت اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج حاصله از این آزمون و مقایسه ۲ گروه کنترل منفی و مثبت نشان داد که استرس سبب افزایش معنی‌دار میزان هورمون نیز هم‌چنین، مشخص گردید که دریافت پروبیوتیک در گروه آزمون ۲ دریافت کننده استرس، سبب کاهش معنی‌دار غلظت هورمون تا نسبت به گروه کنترل مثبت می‌گردد. بررسی نشان داد که در این گروه میزان هورمون تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل منفی نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج این آزمون نشان می‌دهد که مصرف لاکتوباسیلوس کازئی TD₂ می‌تواند از اثرات منفی استرس‌های مزمن کاسته و سطوح کورتیکوسترون خون را به مقادیر قابل توجهی کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، استرس، هورمون کورتیکوسترون، لاکتوباسیلوس کازئی.

مقدمه

گلوکز) در مناطق مورد نیاز از بدن همانند مغز و ماهیچه است تا بدن را برای موقعیت جنگ-گریز آماده سازد. در چنین موقعیتی هورمون‌های استرسی سبب افزایش ضربان قلب و افزایش فشار خون شده و هم‌چنین سیستم ایمنی را نیز سرکوب می‌نماید. این امر در بازه‌های زمانی کوتاه مدت خطرناک نیست ولی در استرس‌های مزمن، سیستم ایمنی بدن به شدت تضعیف شده و خطر ابتلا به انواع بیماری‌ها نیز تشدید می‌یابد. افزایش طولانی مدت این

پاسخ‌های فیزیولوژیکی القا شونده با استرس سبب ایجاد عوارض زیادی در بدن می‌شود به عنوان مثال استرس فیزیولوژیک حتی در مدت زمان کوتاه باعث تحریک بخش قشری فوق کلیه و در نتیجه تولید بیش از اندازه گلوکوکورتیکوئیدها به خصوص کورتیکوسترون می‌شود (۱۶، ۱۰). کورتیزول یا کورتیکوسترون از غده فوق کلیه در طی استرس آزاد و عمل آن پراکنش مجدد انرژی

سوء ناشی از استرس بکاهند. امروزه اثرات سودمند پروبیوتیک‌ها در موارد مختلف هم‌چون تعدیل بیماری‌های روده- معدی مانند سندرم روده تحریک پذیر (Irritable Bowel Disease: IBD)، کاهش چربی خون، کلسترول خون و افزایش مقاومت به انواع بیماری‌ها به اثبات رسیده است. بنابراین این احتمال وجود دارد که این میکروارگانیسم‌های مفید بتوانند در کنترل استرس نیز موثر باشند (۸، ۹، ۱۴).

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق ابتدا ۴۰ رت نر نژاد ویستار با ۴ هفته سن و وزن تقریبی یکسان ۱۱۰-۱۳۰ گرم از دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، مرکز علوم حیوانات آزمایشگاهی، خریداری و در قفس‌های استاندارد در دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. رت‌ها به مدت دو هفته سازگاری را در این شرایط طی کرده و در طی این مدت دسترسی آزاد به آب و مواد غذایی استاندارد داشتند. پس از طی شدن دوره سازگاری رت‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه ده تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

کنترل منفی: دریافت روزانه ۱ ml از بافر PBS با pH ۷/۲
کنترل مثبت: دریافت روزانه ۱ ml از بافر PBS به همراه استرس بی حرکتی مزمن (Chronic Restraint Stress (CRS)) روزانه.

آزمون ۱: دریافت روزانه ۱ ml از بافر PBS حاوی 2×10^9 cfu/ml از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD₂ به صورت گاواژ.

آزمون ۲: دریافت روزانه ۱ ml از بافر PBS حاوی 10^9 cfu/ml از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD₂ به همراه استرس روزانه. لازم به ذکر است که رت‌ها در ابتدا و انتهای آزمون با استفاده از ترازو با دقت

هورمون‌ها باعث می‌شود جاندار از حالت طبیعی به دور بماند زیرا سیستم‌های متابولیک مربوط به استفاده از پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها به حد چشمگیری مختل می‌شوند. غلظت بالای کورتیکوسترون هم‌چنین باعث افزایش غلظت هورمون‌های تیروئیدی یعنی T₃, T₄ و پرکاری غده تیروئید نیز می‌شود که در نهایت اختلالات متابولیک حادی را موجب می‌گردد (۱۵، ۱۶). عوامل متعددی چندی سبب ایجاد استرس در موجود می‌گردد که می‌تواند فیزیکی، شیمیایی و یا حتی ذهنی باشد. اما آنچه به اثبات رسیده نقش میکروفلور طبیعی موجود در ایجاد و یا کاهش استرس است. از این رو به تازگی محوری جدید به نام محور معدی-مغز مطرح شده که بیان می‌دارد تمام فعالیت‌های مغزی از جمله استرس می‌تواند تحت تاثیر میکروفلور روده موجود تغییر کند و برعکس. تحقیقات نشان داده که در موجودات فاقد میکروفلور خطر ابتلا به بیماری بالاتر بوده و هم‌چنین این موجودات رفتارهای عصبی و استرسی شدیدتری را نیز به نمایش می‌گذارند (۷). با توجه به حاد بودن مشکلات ناشی از استرس، شاهد به کارگیری انواع داروها برای حفظ تعادل بدن در شرایط استرس هستیم. این داروهای شیمیایی علاوه بر صرفه هزینه زیادی دارای عواض جانبی متعددی نیز هستند. از این رو جایگزین کردن یک روش درمانی و یا حتی پیشگیری جدید می‌تواند کمک زیادی به حفظ سلامت فرد نماید. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های مفیدی هستند که از میکروفلور طبیعی میزبان الهام گرفته شده‌اند. بنا به تعریف پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده، مشخص و به تعداد کافی هستند که در صورت مصرف سبب ارتقای سطح سلامت مصرف کننده می‌شوند (۱۱، ۵، ۱). این میکروارگانیسم‌ها عملکردی همانند میکروفلور دارند از این رو به نظر می‌رسد شاید پروبیوتیک‌ها بتوانند همانند میکروفلور با تعدیل محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال، از اثرات

پس از ۲۱ روز، رت‌های موجود در تمامی گروه‌ها با اتر بیهوش شده و بلافاصله خونگیری از قلب آن‌ها به عمل آمد. در حدود ۵ ml خون گرفته شده از هر رت در لوله سانتریفوژ کدگذاری شده ریخته شد. لوله‌ها در rpm ۵۰۰۰ در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و سرم آن‌ها جدا گردید. سرم‌های جدا شده در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و در اسرع وقت به جهت تعیین میزان هورمون و قند خون مورد بررسی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری کورتیکوسترون از کیت مونوبایند و برای اندازه‌گیری میزان قند خون از کیت پارس آزمون استفاده شد.

روش اندازه‌گیری میزان هورمون کورتیکوسترون با کیت مونوبایند

الف- آماده‌سازی

برای آماده‌سازی، کیت یک ساعت قبل از شروع سنجش در دمای اتاق قرار داده شد (۲۷-۲۰ درجه سانتی‌گراد) و کلیه آمپول‌ها (به ویژه استانداردها) به آرامی چندین بار هم‌زده شد تا اختلاط به خوبی صورت گیرد. سپس محلول شستشو تهیه شد. جهت آماده‌سازی محلول شستشو، محتویات یک آمپول (۲۰ ml) با آب مقطر رقیق شد تا حجم کلی به ۱۰۰۰ ml رسید (نسبت ۱ به ۵۰) و به خوبی مخلوط شد. در مرحله بعد، آماده‌سازی سویسترا صورت پذیرفت. برای این منظور به حجم‌های مساوی از محلول A و B موجود در کیت مخلوط و ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. مرحله‌ی بعدی آماده‌سازی محلول آنزیم کونزوگه بود. جهت آماده‌سازی آنزیم ۷۰۰ ml از کونزوگه غلیظ را به ویال بافر کونزوگه استروئیدی اضافه شد.

ب- سنجش کورتیکوسترون

برای سنجش میزان هورمون، ابتدا ۲۵ µl از نمونه استاندارد و کنترل در داخل چاهک‌ها ریخته شد. سپس ۵۰ µl از محلول کونزوگه آماده شده به همه چاهک‌ها اضافه شد. پلیت برای ۲۰-۳۰ ثانیه به آرامی روی سطح

gr ۰/۰۱ توزین شدند تا میزان افزایش وزن‌ها در گروه‌های مختلف تعیین شود.

تهیه باکتری پروبیوتیک

لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD₂ به صورت پودر لیوفیلیزه از شرکت تک ژن تهیه شد. در مرحله بعد باکتری در محیط کشت MRS Broth کشت و به مدت ۴۸ h ساعت در انکوباتور حاوی ۱۰٪ گاز دی‌اکسید کربن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس به جهت تهیه استوک گلیسرول، هم حجم باکتری گلیسرول استریل به محیط مایع افزوده و پس از اختلاط کامل در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تهیه کشت تازه از باکتری، روزانه ۲۰۰ ml از محیط کشت MRS Broth تهیه و با ۲٪ از کشت تازه یک شبه باکتری تلقیح و در شرایط قبل گرماگذاری شد. پس از طی شدن دوره رشدی، با اسپکتروفتومتر میزان جذب نوری نمونه‌ها در ۶۰۰ nm تعیین شد. سپس با استفاده از روش کشت سطحی و تعیین سریال رقت، تعداد باکتری‌های موجود در هر ۱ ml از محیط کشت تعیین گشت. برای گاوآژ کردن رت‌ها، هر روز کشت تازه باکتری تهیه و تا رسیدن به جذب نوری تعیین شده از قبل، گرماگذاری شد. سپس با استفاده از سانتریفوژ با دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سلول‌های باکتری از فاز مایع جدا شدند. پس از ۳ بار شستشو با بافر PBS سلول‌ها مجدداً در همان بافر سوسپانسیون شدند تا غلظت 2×10^9 cfu/ml حاصل شود. از این سوسپانسیون برای گاوآژ روزانه رت‌ها (دریافت خوراکی پروبیوتیک) بهره برده شد.

ایجاد استرس در رت‌ها

برای ایجاد استرس بی‌حرکتی مزمن، رت‌ها روزانه در ساعت مشخص به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه نگهدارنده قرار داده شدند. لازم به ذکر است که رت‌های گروه آزمون ۲ پس از دریافت پروبیوتیک در دستگاه نگهدارنده قرار داده می‌شدند.

خونگیری از رت‌ها

۵۰ µl از سرم درون یک لوله اپندورف ریخته شد. در لوله‌ای دیگر ۵۰ µl از محلول استاندارد ریخته و سپس به محتویات هر ۲ لوله ۲۰ µl معرف گلوکز افزوده شد. برای بلانک از لوله حاوی معرف استفاده گردید. هر سه لوله به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ یا ۲۰ درجه سانتی‌گراد دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس جذب نوری نمونه‌ها آزمون و استاندارد در مقابل بلانک در ۵۰۰ nm خوانده شد.

تحلیل آماری

برای تفسیر داده‌ها و اطلاعات حاصله از نرم افزار Graphpad Prism 5 و آزمون‌های آماری t-test و Anova یکطرفه بهره برده شد.

نتایج

همان‌طور که ذکر شد در طی این تحقیق ۴۰ رت نر نژاد ویستار در ۴ گروه به صورت تصادفی تقسیم بندی شدند. پس از ۲۱ روز آزمون میزان هورمون کورتیکوسترون، قند خون و میزان افزایش وزن رت‌ها تعیین شد (جدول ۱).

میز تکان داده شدند تا محلول کونژوگه به خوبی با سرم مخلوط شود. سپس سطح چاهک‌ها با چسب پلیت پوشانده شدند تا در حین گرماگذاری محتویات داخل چاهک‌ها تبخیر نگردد. پلیت‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری شدند. سپس محتویات داخل پلیت تخلیه شد و با ۳۵۰ µl از محلول شستشوی رقیق شده ۳ بار شستشوی چاهک‌ها صورت گرفت. در مرحله بعد ۱۰۰ µl از محلول سوسترا به همه چاهک‌ها اضافه و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در محیط تاریک گرماگذاری شد. در انتها ۵۰ µl از محلول متوقف کننده به چاهک‌ها افزوده و پلیت برای ۱۵-۲۰ ثانیه به آرامی روی سطح میز تکان داده شد تا واکنش متوقف گردد. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ nm (یا ۶۵۰ nm) خوانده شد. لازم به ذکر است که جذب نوری حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از افزودن متوقف کننده تعیین شد.

روش اندازه‌گیری میزان قند خون با کیت پارس آزمون جهت تعیین میزان قند خون از سرم بدون همولیز یا پلاسمای هیپارینه‌دار استفاده شد. برای انجام آزمون ابتدا

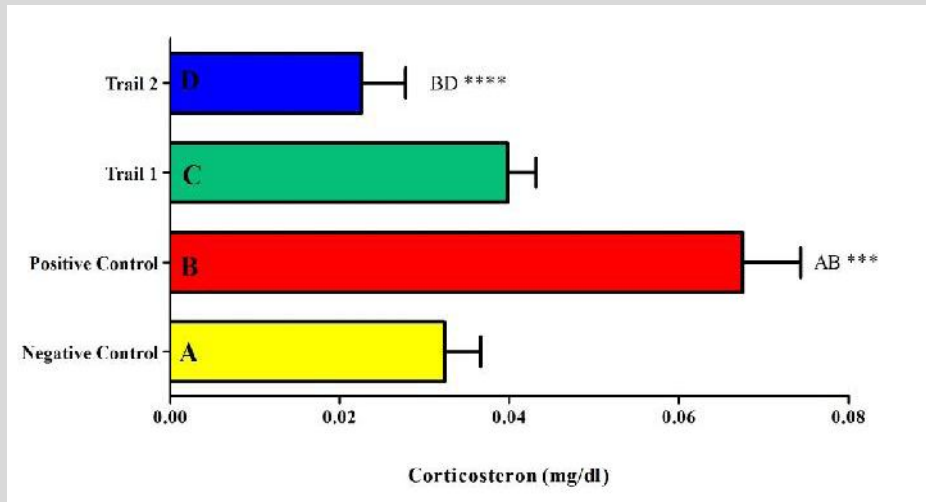
جدول ۱- میزان هورمون کورتیزول، قند خون و افزایش وزن‌ها گروه‌های مختلف از رت‌ها

گروه‌ها	هورمون کورتیکوسترون (mg/dl)	افزایش وزن (gr)	گلوکز سرم (mg/dl)
کنترل منفی (بدون استرس)	۰/۰۳۲۴±۰/۰۰۴۱۹۳	۱۶۵/۰±۰/۳۹۴۴	۷۷/۲۴±۱/۲۹۷
کنترل مثبت (با استرس)	۰/۰۶۷۵±۰/۰۰۶۸۸۴	۱۵۸/۸±۰/۴۱۶۳	۷۶/۱۹±۱/۸۲۸
آزمون ۱ (با پروبیوتیک)	۰/۰۳۹۸±۰/۰۰۳۳۵۹	۱۷۰/۹±۰/۵۰۴۴	۷۵/۰۱±۲/۱۲۶
آزمون ۲ (با استرس و پروبیوتیک)	۰/۰۲۲۶±۰/۰۰۵۱۴۳	۱۶۹/۳±۰/۴۴۱۰	۷۰/۱۸±۰/۸۱۷۲

کنترل منفی نداشت (P value=۰/۱۸۵۳). در شرایط استرسی، پروبیوتیک مصرفی توانسته بود از ترشح کورتیکوسترون ممانعت نماید به نحوی که میزان ترشح این هورمون در گروه آزمون ۲ تفاوت معنی داری با گروه کنترل مثبت داشت (P value<۰/۰۰۰۱). بررسی بیشتر نتایج نشان داد که در این گروه آزمون، میزان سطح هورمون به میزان طبیعی رسیده و تفاوت معنی داری با گروه کنترل منفی نداشت (P value=۰/۱۵۷۰).

تغییرات سطح هورمون کورتیکوسترون

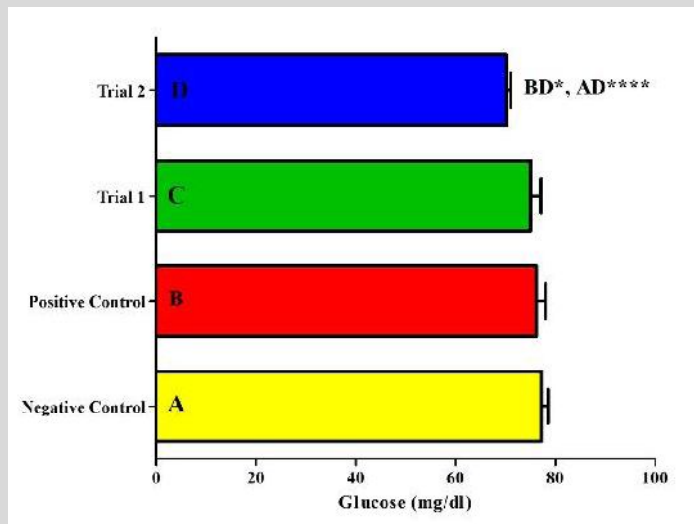
نتایج حاصل از این آزمون (نمودار ۱) نشان داد که استرس به صورت معنی داری سبب افزایش میزان هورمون کورتیکوسترون در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی شده بود (P value=۰/۰۰۰۴). در حالی که مصرف پروبیوتیک در گروه آزمون ۱ بدون استرس تاثیری بر میزان ترشح این هورمون نداشته به نحوی که مقدار این هورمون تفاوت معنی داری با گروه



نمودار ۱- مقایسه تغییرات سطح هورمون کورتیکوسترون در رت‌های گروه‌های مختلف

برابر بود (P Value=۰/۴۰۶۰). اما در گروه آزمون ۲ که تحت شرایط استرسی پروبیوتیک دریافت کرده بود میزان قند خون نسبت به گروه‌های کنترل به صورت معنی‌داری کمتر مشاهده شد (P Value=۰/۰۱۷۰).

سطح گلوکز سرمی خون
همان طور که در نمودار ۲ دیده می‌شود میزان گلوکز سرمی در دو گروه کنترل مثبت و منفی تفاوت معنی‌داری ندارد (P Value=۰/۶۷۱۸). هم‌چنین مصرف پروبیوتیک نیز به تنهایی تاثیری بر میزان گلوکز نداشته به نحوی که سطوح آن در گروه کنترل منفی و آزمون ۱



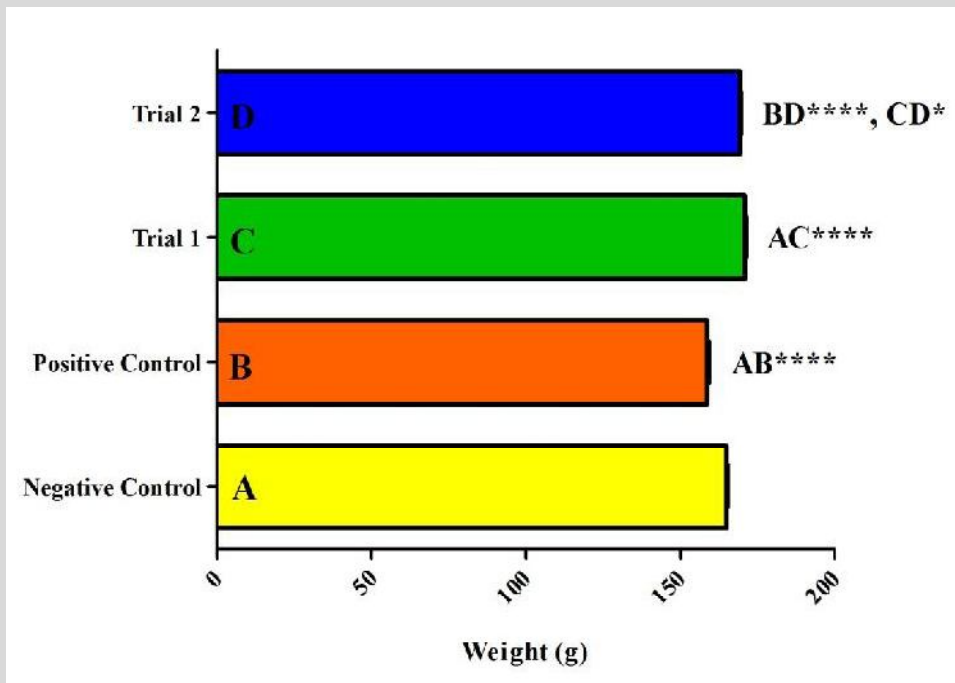
نمودار ۲- سطوح گلوکز سرمی در رت‌های گروه‌های مختلف

پروبیوتیک سبب افزایش وزن رت‌ها در گروه آزمون ۱ نسبت به کنترل منفی شده بود (P Value<۰/۰۰۰۱).

نتایج حاصله نشان داد که استرس سبب کاهش معنی‌دار وزن رت‌ها در گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی می‌شود (P Value<۰/۰۰۰۱). هم‌چنین مصرف

شرایط استرس نیز مصرف پروبیوتیک از کاهش وزن

شدید رت‌ها ممانعت به عمل آورده بود ($P < 0.0001$) ولی به واسطه استرس وزن گیری رت‌ها همانند گروه کنترل منفی بدون استرس نبود ($P = 0.334$) (Value).



نمودار ۳- مقایسه تغییرات افزایش وزن رت‌های گروه‌های مختلف

کارنویلورابرتو سولپیزینو) آزمایشاتی را مبنی بر تاثیر پروبیوتیک بر روی کورتیکوسترون در ماهی‌ها انجام دادند و مشاهده کردند در ماهیان تغذیه شده با باکتری‌های اسیدلاکتیک، سطوح کورتیزول کاهش می‌یابد (۴). در سال ۲۰۱۰ یک تیم فرانسوی پی بردند که ترکیبی از دو نوع پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم می‌تواند بر روی افسردگی و استرس تاثیر بگذارد (۱۰). مایکل مسودی و همکارانش نشان دادند که پروبیوتیک می‌تواند بر روی استرس در موش و هم-چنین انسان تاثیر بگذارد. از دیگر محققانی که در سال ۲۰۰۸ بر روی تاثیر پروبیوتیک بر روی موش تحت شرایط استرس تحقیق کرده‌اند می‌توان به نیکلاس ویول و هرو ژاولت نیز اشاره کرد (۶). در سال ۲۰۱۱ دانشمندی به نام براوو نشان داد که با مصرف لاکتوباسیلوس به هنگام استرس، هورمون‌های استرسی (مثل

بحث و نتیجه گیری

هر نوع استرس، چه فیزیکی و چه عصبی موجب افزایش در مقدار ترشح گلوکوکورتیکوئیدها به خصوص کورتیکوسترون می‌شود. این هورمون موجب فراخوانی اسیدهای آمینه و چربی‌ها از ذخایر سلولی شده و این مواد را بلافاصله برای انرژی و سنتز سایر ترکیبات مورد نیاز از جمله گلوکز، در اختیار سلول‌ها قرار می‌دهد. بنابراین کورتیکوسترون باعث کاهش پروتئین‌ها و اسیدهای چرب و افزایش گلوکز در بدن می‌شود که این اثرات با طولانی شدن استرس باعث مضراتی مانند کاهش وزن و افزایش قند خون و یا حتی دیابت فوق کلیوی در جاندار می‌شود. تاکنون تحقیقات محدودی در زمینه اثر پروبیوتیک بر روی هورمون کورتیزول یا کورتیکوسترون در سال‌های اخیر صورت گرفته است. در سال ۲۰۰۶ تعدادی از محققان (الیانا

می‌رسد این باکتری سویه مناسبی برای افزایش وزن و بهبود ضریب تبدیل غذایی در حیوانات است به نحوی که می‌تواند راندمان تولید را افزایش دهد. از سوی دیگر این باکتری یک پروبیوتیک بومی ایران است که توسط تاج آبادی و همکاران از ترخینه جدا شده و خصوصیات پروبیوتیکی آن در آزمون‌های صورت گرفته، اثبات شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مصرف این باکتری علاوه بر ارتقای سطح ایمنی و افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، با کاهش اثرات مخرب استرس می‌تواند در افرادی درگیر استرس‌های مزمن به کار گرفته شود. از این رو پس از انجام آزمون‌های بالینی می‌توان مصرف این باکتری را به عنوان یک فراورده فراسودمند پیشنهاد نمود.

کورتیکوسترون) در موش‌ها کاهش می‌یابد (۱۳، ۲). طبق تحقیقات اخیر کرک در ایرلند ثابت شده پروبیوتیک‌هایی مانند لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر روی عملکرد مغز در موش تاثیر می‌گذارند و حضور این باکتری‌ها در روده، رفتار مناسب به استرس را ایجاد کرده و با تنظیم گیرنده‌های استرس در مغز، سطوح کورتیکوسترون را کاهش می‌دهند (۳). نتایج حاصله از این تحقیق نیز نشان داد مصرف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD₂ تنها در صورت وجود استرس می‌تواند بر میزان ترشح هورمون استرسی موثر باشد. این سویه با کاهش میزان کورتیکوسترون در شرایط استرس و رساندن به حد طبیعی، می‌تواند از اثرات سوء آن مانند افزایش قند خون بکاهد. همچنین مشاهده شد که این سویه می‌تواند از کاهش وزن شدید حیوان در شرایط استرسی ممانعت کرده و حتی در حیوانات بدون استرس نیز سبب افزایش وزن گردد. از این رو به نظر

منابع

1. Bhadoria, P., Mahapatra, S. (2011). Prospects, technological aspects and limitations probiotics a worldwide review. *Eur J Food Res Rev*, 1(2); 23-42.
2. Bravo, J.A. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38); 16050-16055.
3. Brown, J., Bosak, J. (1986). An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. *Thrombosis research*, 43(3); 303-311.
4. Carnevali, O. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, 258(1); 430-438.
5. Clancy, R. (2003). Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 38(1); 9-12.
6. Diop, L., Guillou, S., Durand, H. (2008). Probiotic food supplement reduces stress-induced gastrointestinal symptoms in volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Nutrition Research*, 28(1); 1-5.
7. Eutamene, H., Bueno, L. (2007). Role of probiotics in correcting abnormalities of colonic flora induced by stress. *Gut*, 56(11); 1495-1497.
8. Isolauri, E. (2000). Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical & Experimental Allergy*, 30(11); 1605-1610.
9. Kajander, K. (2007). Effects of multispecies probiotic supplementation on intestinal microbiota in irritable bowel syndrome. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26(3); 463-473.
10. Khalfa, S. (2003). Effects of relaxing music on salivary cortisol level after psychological stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 999(1); 374-376.
11. Malago, J.J., Koninkxr, J. F. J. G., Marinsek, L. (2011). *Probiotic Bacteria and Enteric Infections*. Springer science+ Business Media B.V, doi 10.1007/978-94-007-0386-5.
12. Miller, D. B., O'Callaghan, J. P. (2002). Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism*, 51; 5-10.
13. Patterson, J., Burkholder, K. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry science*, 82(4); 627-631.

14. Pelto, L. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clinical and Experimental Allergy*, 28(12); 1474-1479.

15. Taylor, Sh., Burkland, L., Eisenberger, N. (2008). Neural bases of moderation of cortisol stress response by psychosocial resources. *Journal of Personality and Social Psychology*, 95(1); 197-217.

16. Troman, G., Woods, P. (2001). *Primary teachers' stress*: Routledge/Falmer London.

