اثر حذف میکروفلور طبیعی روده بر استعداد ابتلا به تشنج در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار

سعید طهماسبی[۱]، *شهربانوعریان[۲]، حمیدرضا مهاجرانی[۳]، ندا اکبری[۳]، *محمدرضاپالیزوان[۴]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.
۴. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، اراک، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۸ بهمن ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۱۱ مرداد ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۱ مرداد ۱۳۹۹

چکیده

زمینه و هدف صرع یک اختلال شایع مغزی است. عملکرد مغز می‌تواند تحت تأثیر میکروفلور طبیعی روده باشد. میکروفلورطبیعی روده نقش اساسی در تعدیل پاسخ‌های ایمنی، تولید متابولیت‌های ضروری و میانجی‌های عصبی ایفا می‌کند. این توانایی‌ها می‌تواند با حذف میکروفلور، به واسطه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها مختل‌شود. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر حذف میکروفلور طبیعی روده بر استعداد ابتلا به تشنج و تعدیل رفتار تشنجی با مصرف پروبیوتیک‌های جایگزین در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار است.

مواد و روش‌ها این مطالعه روی ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد. حیوانات به چهار گروه تقسیم‌بندی شدند: گروه کنترل، گروه آنتی‌بیوتیک، گروه‌پروبیوتیک و گروه آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک. جهت حذف میکروفلور، آنتی‌بیوتیک‌ها به مدت سه هفته و جهت جایگزینی میکروفلور، پروبیوتیک‌ها به مدت چهارهفته تجویز شد. ایجاد تشنج با تزریق درون‌صفاقی پنتیلن‌تترازول انجام شد. بررسی میکروفلوردر محیط MRS Agar و با روش پورپلیت صورت گرفت. اطلاعات به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزارگراف پد نسخه ۸ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت ($P<0/05$).

ملاحظات اخلاقی این پژوهش در کمیته اخلاقی دانشگاه علوم‌پزشکی اراک با کد IR.ARAKMU.REC.1395.176 تصویب شده است.

یافته‌ها مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها موجب کاهش در تعداد باکتری‌های روده شد ($P<0/0001$). همچنین باعث افزایش شدت و پایداری مراحل تشنج ($P<0/05$) وکاهش تأخیر زمان شروع تشنج ($P<0/05$) در مقایسه با گروه کنترل شد. مصرف پروبیوتیک با تعدیل میکروفلور روده ($P<0/0001$) شدت تشنج را کاهش و تأخیر زمانی شروع تشنج را افزایش داد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری حذف میکروفلور باعث استعداد ابتلا به تشنج شده واین عارضه با مصرف پروبیوتیک قابل جبران است.

کلیدواژه‌ها:
میکروفلور، پروبیوتیک، تشنج، موش صحرایی

مقدمه

صرع دومین اختلال شایع عصبی بعد از سکته مغزی است که امروزه بیش از ۶۵ میلیون نفر در سرتاسر دنیا به آن مبتلا هستند [۱]. صرع درواقع اختلالی در عملکرد نورون‌های مغز است که به صورت رفتارهای تشنجی دوره‌ای و غیرقابل پیش‌بینی در فرد بروز پیدا می‌کند [۲]. شواهد بسیاری مبنی بر ارتباط بین صرع با میانجی‌های عصبی [۳]، استرس اکسیداتیو [۴] و التهاب [۵] وجود دارد. امروزه در ۷۰ درصد موارد با درمان‌های استاندارد می‌توان حملات تشنجی را کنترل کرد، ولی در حدود ۳۰ درصد بیماران دچار عود تشنج یا عوارض دارویی می‌شوند [۱]. از این رو با توجه به شیوع بالای بیماری و مشکلات ناشی از آن انجام هر مطالعه‌ای جهت درمان و یا کاهش عوارض ضروری به نظر می‌رسد.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند عملکرد مغز تحت تأثیر میکروبیوتای روده است [۶]. میکروبیوتای روده ترکیب گسترده‌ای از گونه‌های مختلف میکروبی است که در مجاری گوارشی مستقر هستند. این میکروب‌ها فیزیولوژی طبیعی بدن را تحت تأثیر قرار داده و قادرند حساسیت میزبان به بیماری‌ها را تغییر دهند [۷]. محور میکروبیوتا روده مغز یک ارتباط دوطرفه از طریق سیستم ایمنی، عصبی، اندوکرین و متابولیک دارد [۸]. همچنین نقش اساسی در تعدیل نفوذپذیری روده در راستای تغییر پاسخ‌های ایمنی، تولید متابولیت‌های ضروری و میانجی‌های عصبی است [۹]. این تغییرات متعاقباً می‌تواند تمام مسیرهای دخیل در

* نویسنده مسئول:
شهربانوعریان
نشانی: تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی جانوری.
تلفن: ۸۶۰۷۲۷۰۹ (۲۱) ۹۸+
پست الکترونیکی: sh-oryan@khu.ac.ir

محمدرضاپالیزوان
نشانی: اراک، دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی.
تلفن: ۳۴۱۷۵۳۵۰۲ (۰۸۶) ۹۸+
پست الکترونیکی: palizvan@arakmu.ac.ir

تحریک‌پذیری نورونی و التهابی را تحت تأثیر قرار دهد [۱۰].

تعدادی از گونه‌های باکتریایی موجود در فلور طبیعی روده، به طور بالقوه مضر محسوب می‌شوند که علت این مسئله توانایی آن‌ها در تولید سموم، توانایی تهاجم مخاطی یا فعال‌سازی کارسینوژن‌ها و ایجاد پاسخ‌های التهابی است، اما امروزه با تجویز پروبیوتیک‌ها در نوزادان و بزرگسالان موجب تغییر در پروفایل میکروبی و نهایتاً فعالیت‌های متابولیکی روده می‌شوند [۱۱]. این باکتری‌ها که عمدتاً از منابع انسانی هستند، به عنوان باکتری‌های غیر بیماری‌زا محسوب می‌شوند. از ویژگی‌های آن‌ها در ارتباط با سیستم عصبی می‌توان به تغییر تون گابائرژیک [۱۲]، کاهش پیش‌فاکتورهای التهابی، افزایش فاکتورهای ضدالتهابی [۱۳] و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد [۱۴].

اثبات شده است که پروبیوتیک‌ها این عمل را از طریق افزایش مقاومت در برابر کلونیزاسیون پاتوژن‌های روده‌ای و حذف رقابتی آن‌ها انجام می‌دهند [۱۵]. از مهم‌ترین و گسترده‌ترین باکتری‌های مفید جداشده از روده می‌توان به خانواده لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها اشاره کرد که به دلیل عدم ارائه پلی‌ساکارید در دیواره خود، قابلیت تحریک سیستم ایمنی را ندارند [۱۶]. تاکنون بیشتر مطالعات ضدالتهابی در خصوص پروبیوتیک‌ها با استفاده از گونه‌های لاکتوباسیل و بیفیدوباکتریوم‌ها صورت گرفته است [۱۷]. یکی از دلایل استفاده این باکتری‌ها دخالت آن در بهبود التهاب‌ها، به‌ویژه التهاب روده است [۱۸].

بیفیدوباکتریوم‌ها، میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی وگرم مثبت هستند که عمدتاً در کولن افراد بالغ و کودکان سکونت دارند. بیش از ۹۰ درصد باکتری‌های جداشده از مدفوع اطفالی که پس از تولد با شیر مادر تغذیه شده‌اند [۱۹] و همچنین ۳ تا ۵ درصد میکروفلور طبیعی روده افراد بالغ را بیفیدوباکتری‌ها تشکیل می‌دهند [۲۰]. بدین ترتیب بیفیدوباکتریوم‌ها بدون شک یکی از باکتری‌های دائمی و ثابت میکروفلور طبیعی روده انسان هستند [۲۱]. ادعا شده است که چندین اثر سودمند، به خاطر حضور آن‌ها در کولن است [۲۲]. این توانایی‌های مطلوب برای محافظت از میزبان و مقاومت در برابر جایگزینی نامطلوب و ناخواسته پاتوژن‌ها می‌تواند با حذف میکروفلور طبیعی به واسطه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها مختل شود [۲۳-۲۵]. به عبارت دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر داشتن عوارض جانبی شناخته‌شده که به شکل مستقیم اثر می‌گذارد، همچنین می‌توانند به طور غیرمستقیم از طریق حذف و اختلال در میکروفلور طبیعی روده، به‌ویژه لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها، حساسیت میزبان به بیماری‌ها را دستخوش تغییر کنند. این موضوع ضرورت بررسی‌های بیشتر در خصوص برخی بیماری‌های مقاوم به درمان همانند صرع را نشان می‌دهد. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر حذف فلور طبیعی روده بر استعداد ابتلا به تشنج ناشی از پنتیلن‌تترازول و همچنین تعدیل حملات تشنجی با مصرف پروبیوتیک‌ها (لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها) به عنوان جایگزین میکروفلور طبیعی روده در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت تجربی روی ۳۲ موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰گرم انجام شد. موش‌ها از مؤسسه انستیتو رازی تهران تهیه شدند و در شرایط استاندارد (دمای کنترل‌شده ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه تاریکی روشنایی ۱۲ساعته) نگهداری شدند. حیوانات به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم‌بندی شدند: گروه کنترل، گروه آنتی‌بیوتیک، گروه‌پروبیوتیک و گروه آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک.

تهیه پروبیوتیک

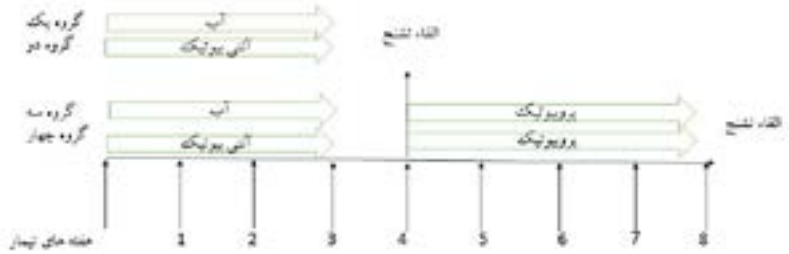
پروبیوتیک‌های‌مورداستفاده‌مخلوطی‌ازسه‌سویه‌لاکتوباسیل‌کازئی، لاکتوباسیل‌اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم‌بیفیدوم بود از مؤسسه تک‌ژن با نام تجاری پروویتا تهیه شده بود.

تیمارها

با توجه به اهمیت و نقش لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها در جمعیت میکروفلور طبیعی روده، نوع آنتی‌بیوتیک‌ها و محیط کشت‌های انتخابی بر اساس این گونه‌ها انتخاب شد. گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌بیوتیک به جهت حذف فلور طبیعی روده (لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها) با سه آنتی‌بیوتیک نئومایسین، آمپی‌سیلین، مترونیدازول [۲۶، ۲۷] با دُز یک گرم در یک لیتر آب آشامیدنی که به صورت یک روز درمیان تعویض می‌شد، به مدت سه هفته تیمار شدند (گروه‌های ۲ و ۴). گروه‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک (گروه‌های ۳ و ۴)، پروبیوتیک‌ها را با دُز یک گرم (به نسبت ۳۳۳ میلی‌گرم از هر سوش) در یک لیتر آب آشامیدنی (CFU= تعداد باکتری‌های قابل زیست در مقدار نمونه) که به صورت دوازده ساعت یک‌بار تعویض می‌شد به مدت چهار هفته دریافت‌کردند. ملاک مصرف پروبیوتیک‌ها، حجم آب مصرفی در نظر گرفته شد که این حجم با اندازه‌گیری حجم آب باقی‌مانده پس از ۲۴ ساعت و کسر آن از کل حجم ظرف محاسبه می‌شد. گروه کنترل هیچ‌گونه تیماری نداشت. تمامی گروه‌ها پس از اتمام زمان تیمار جهت ایجاد تشنج، تک دُز ۴۵ میلی‌گرم برکیلوگرم پنتیلن‌تترازول را به صورت درون‌صفاقی دریافت کردند (تصویر شماره ۱).

تعیین تعداد کلنی لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها

همانند مطالعات قبلی برای اطمینان از عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها در حذف پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم، همچنین جایگزینی آن‌ها با تیمار پروبیوتیکی (لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم)، شمارش باکتری‌های موجود در مدفوع بعد از اتمام مدت‌زمان تیمار آنتی‌بیوتیک و نیز پس از تجویز



تصویر ۱. نمودار زمانی تیمار آنتی‌بیوتیک و پروبیوتیک و سپس القای تشنج، (یک هفته فاصله بین اتمام تیمار آنتی‌بیوتیک و تزریق پنتیلن‌تترازول جهت حذف اثرات مستقیم آنتی‌بیوتیک‌ها بر تشنج در نظرگرفته شد).

پروبیوتیک، از محیط کشت MRS Agar و روش پورپلیت استفاده شد [۲۷]. در این روش ابتدا یک گرم مدفوع توزین شده سپس در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل توسط شیکر به‌خوبی هوژنیزه شد. سپس تا رقت، عمل رقت‌سازی صورت گرفت و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت استریل ریخته شد و به آن ۱۳ تا ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MRS Agar با دمای ۴۵ تا ۴۷ درجه سانتی‌گراد اضافه شد و به صورت عدد ۸ لاتین به‌خوبی مخلوط شد. سپس پلیت‌ها ۷۲ ساعت در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷ سانتی‌گراد اینکوبه شدند. تعداد کلنی‌ها در پلیت‌های قابل شمارش (بین ۳۰ تا ۳۰۰کلنی)، شمارش شد و در ضریب رقت، ضرب شد تا تعداد باکتری در گرم مدفوع به دست آید.

بررسی رفتار تشنجی

پاسخ‌های تشنجی حیوان بر اساس تحقیقات قبلی به شکل زیر مورد بررسی قرارگرفت[۲۸]:

مرحله صفر= عدم پاسخ، مرحله اول: انقباض عضلات صورت و گوش‌ها؛ مرحله دوم: موج انقباضی بدن؛ مرحله سوم: پرش‌های میوکلونیک و ایستادن روی دو پا؛ مرحله چهارم: افتادن به پهلو؛ مرحله پنجم: افتادن به پشت و حملات عمومی تونیک و کلونیک. در این روش تأخیر زمانی بین تزریق پنتیلن‌تترازول و شروع مرحله دوم تشنج Stage Two Latency، همچنین تأخیر زمانی بین تزریق پنتیلن‌تترازول و شروع مرحله پنجم Stage Five Latency و مدت‌زمانی که حیوانات در مرحله پنج تشنج به سر می‌برند Stage Five Duration و حداکثر مرحله تشنج Seizure Stage به عنوان شاخص‌های مهم در رفتار تشنجی اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

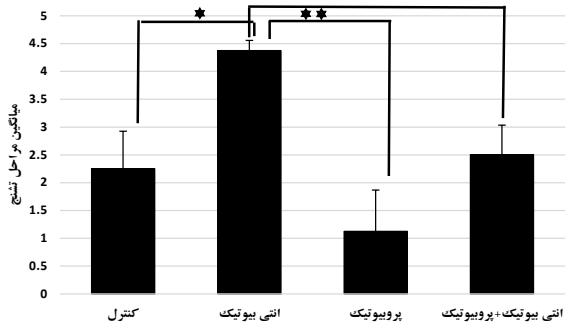
برای مقایسه میانگین و انحراف معیار استاندارد مراحل تشنج در گروه‌های مختلف از آزمون کروسکال‌والیس، برای مقایسه میانگین و انحراف معیار استاندارد تأخیر زمانی رسیدن به مراحل دو و پنج تشنج و مدت‌زمان پایداری مرحله پنج تشنج از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی و برای مقایسه میانگین و انحراف معیار استاندارد تعداد کلنی باکتری‌ها از آزمون من‌ویتنی استفاده شد. برای انجام تمامی آزمون‌ها از نرم‌افزار گراف‌پد نسخه ۸ استفاده شد. سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. در این مطالعه ملاحظات اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1395.176 مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم‌پزشکی اراک، رعایت شد.

یافته‌ها

مقایسه میانگین مراحل تشنج پس از تزریق دُز ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پنتیلن‌تترازول به صورت داخل‌صفاقی در گروه‌های تیماری مختلف نشان داد تیمار سه‌هفته‌ای موش‌های صحرایی توسط آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، نئومایسین و مترونیدازول در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار آنتی‌بیوتیک) میانگین مراحل تشنج را به شکل معنی‌داری افزایش داده است P<۰/۰۵ (تصویر شماره ۲).

میانگین مراحل تشنج درگروه تیمارشده با آنتی‌بیوتیک که متعاقباً به مدت چهار هفته پروبیوتیک دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه تیمار آنتی‌بیوتیک کاهش معنی‌داری نشان‌داد (P<۰/۰۱) (تصویر شماره ۲). میانگین مراحل تشنج گروه تیماری پروبیوتیک در مقایسه با گروه تیماری آنتی‌بیوتیک کاهش معنی‌داری نشان‌داد (P<۰/۰۱) (تصویر شماره ۲).

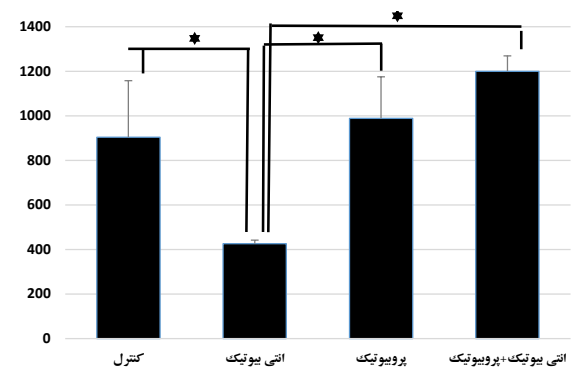
میانگین زمان تأخیر شروع مرحله دوم تشنج در گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۳). همچنین میانگین زمان تأخیر برای شروع مرحله دوم تشنج در گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه تیماری آنتی‌بیوتیک (P<۰/۰۱) و آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک (P<۰/۰۵) افزایش معنی‌داری نشان داد (تصویر شماره ۳). مقایسه زمان تأخیر شروع مرحله پنجم تشنج در گروه تیمار آنتی‌بیوتیک در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان‌داد (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۴). همچنین این زمان در گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک (P<۰/۰۵) و گروه تیماری آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک در مقایسه با گروه آنتی‌بیوتیک افزایش معنی‌داری نشان‌داد (P<۰/۰۵) (تصویر شماره



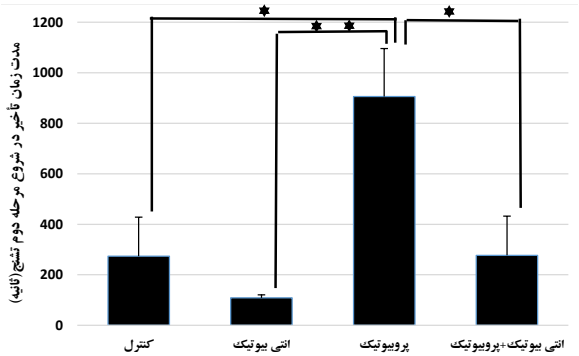
تصویر ۲. اثر تیمارآنتی‌بیوتیک و پروبیوتیک بر مراحل تشنج، در تمامی گروه‌ها n=۸ است.

۴). میانگین زمان پایداری مرحله پنجم تشنج در گروه تیمارشده با آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل (۰/۰۵) و گروه آنتی‌بیوتیک (P<۰/۰۱) کاهش معنی‌داری نشان‌داد (تصویر شماره ۵)، همچنین زمان مذکور در گروه تیماری پروبیوتیک در مقایسه با گروه تیماری آنتی‌بیوتیک کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۵). مقایسه میانگین تعداد کلنی باکتری‌ها در مدفوع گروه تیمارشده با آنتی‌بیوتیک (تصویر شماره B-۶) در مقایسه با گروه کنترل (تصویر شماره C-۶) کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۰۱)، همچنین مقایسه میانگین تعداد کلنی باکتری‌ها در مدفوع گروه تیمار شده با آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک (تصویر شماره A-۶) در مقایسه با گروه آنتی‌بیوتیک (تصویر شماره B-۶) افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۰۱).

مقایسه میانگین و انحراف معیار استاندارد مراحل تشنج در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون کروسکال‌والیس نشان داد گروه تیمارشده با آنتی‌بیوتیک در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری در مراحل تشنج داشته است (P<۰/۰۵). همچنین گروه تیماری آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک (P<۰/۰۱) و گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک (P<۰/۰۱) در مقایسه با گروه تیمارشده



تصویر ۴. اثر تیمارآنتی‌بیوتیک و پروبیوتیک بر تأخیر شروع مرحله پنج تشنج، در تمامی گروه‌ها n=۸ است.

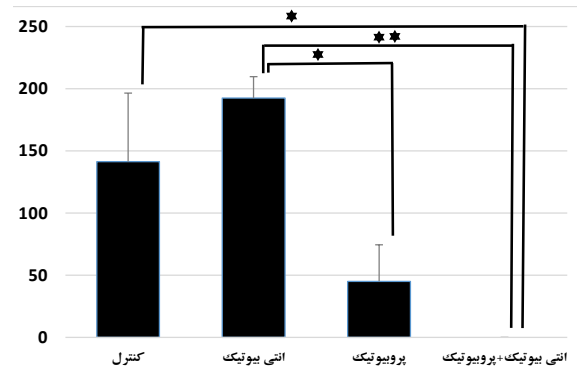


تصویر ۳. اثر تیمارآنتی‌بیوتیک و پروبیوتیک بر تأخیر شروع مرحله دو تشنج، در تمامی گروه‌ها n=۸ است.

با آنتی‌بیوتیک کاهش معنی‌داری در مراحل تشنج داشته است.

مقایسه میانگین به علاوه انحراف معیار استاندارد زمان تأخیر برای شروع مرحله دو تشنج در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی نشان داد زمان تأخیر شروع مرحله دوم تشنج در گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری داشته است (P<۰/۰۵). همچنین زمان تأخیر شروع مرحله دوم تشنج در گروه تیمار پروبیوتیک در مقایسه با گروه‌های آنتی‌بیوتیک (P<۰/۰۱) و گروه تیماری آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

مقایسه میانگین و انحراف معیار استاندارد زمان تأخیر برای شروع مرحله پنج تشنج در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و پس‌آزمون توکی نشان داد زمان تأخیر شروع مرحله پنجم تشنج در گروه تیمار با آنتی‌بیوتیک در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار داشته است (P<۰/۰۵). این زمان در گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک (P<۰/۰۵) و گروه تیماری آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک (P<۰/۰۵) در مقایسه با گروه تیمار



تصویر ۵. اثر تیمارآنتی بیوتیک و پروبیوتیک بر پایداری مرحله پنج تشنج، در تمامی گروه‌ها n=۸ است.

A B C

تصویر ۶. اثر آنتی‌بیوتیک و مکمل پروبیوتیک بر فلور طبیعی روده، در تمامی گروه‌ها n=۸ است

آنتی‌بیوتیک افزایش معنی‌داری نشان داده است.

مقایسه میانگین و انحراف معیار استاندارد زمان پایداری مرحله پنج تشنج در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی نشان داد زمان توقف در مرحله پنجم در گروه تیمارشده با آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۵) و همچنین در مقایسه با گروه آنتی‌بیوتیک کاهش معنی‌داری نشان داده است (P<۰/۰۵). زمان توقف در مرحله پنجم در گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه تیمارشده با آنتی‌بیوتیک کاهش معنی‌داری نشان داده است (P<۰/۰۵).

مقایسه میانگین تعداد کلنی باکتری رشد پیداکرده در محیط MRS Agar با استفاده از آزمون من‌ویتنی نشان داد گروه تیمارشده با آنتی‌بیوتیک (تصویر شماره ۶-B)، ۲۳۰ Cfu/gr، در مقایسه با گروه کنترل (تصویر شماره ۶-C)، ۲۱۰*۱۰^۷ ufC/rg کاهش معنی‌داری در تعداد کلنی باکتری داشته‌است (P<۰/۰۰۰۱). همچنین مقایسه میانگین تعداد کلنی باکتری‌ها رشد پیداکرده در محیط MRS Agar نشان داد گروه تیمارشده با آنتی‌بیوتیک+پروبیوتیک (تصویر شماره ۶-A) ۲۷*۱۰^۷ ufC/rg، در مقایسه با گروه تیمارشده با آنتی‌بیوتیک (تصویر شماره ۶-B) افزایش معنی‌داری در تعداد کلنی باکتری داشته است (P<۰/۰۰۰۱).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها موجب کاهش باکتری‌های مفید روده از جمله لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها می‌شود؛ به گونه‌ای که شمارش کلنی باکتری‌ها در گروه مصرف‌کننده آنتی‌بیوتیک در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد. همچنین تیمار آنتی‌بیوتیک باعث افزایش شدت حملات تشنج و نیزکاهش زمان لازم برای شروع حملات تشنجی در مدل تشنج ناشی از پنتیلن‌تترازول شد؛ به طوری که بین گروه‌های تیمارشده با آنتی‌بیوتیک و کنترل اختلاف معنی‌داری در پارامترهای موردمطالعه رفتار تشنجی، مشاهده شد. در مقابل مصرف مکمل پروبیوتیک موجب افزایش معنی‌داری در تعداد باکتری‌های مفید روده (لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها)، به‌ویژه در گروه تیمارشده با آنتی‌بیوتیک شد و به همین ترتیب مصرف پروبیوتیک توانست از یکسو رفتار تشنجی را درحالت طبیعی تعدیل کند و از سوی دیگر با جبران باکتری‌های ازدست‌رفته به واسطه مصرف آنتی‌بیوتیک، باعث کاهش رفتار تشنجی، به معنی کاهش شدت حملات تشنجی، افزایش زمان‌های تأخیر در شروع مراحل تشنج و کاهش مدت‌زمان پایداری تشنج شود.

بر اساس یافته‌های محققان، مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها تعادل میکروفلور طبیعی روده را دچار اختلال می‌کند [۲۹، ۳۰]. چه در مطالعات انسانی و چه حیوانی نشان داده شده جمعیت باکتری‌های مفید روده، به‌ویژه لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها در اثر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابند [۲۷، ۲۹]. طبق اطلاعاتی که در قسمت یافته‌ها درج شده است ما نیز در این بررسی به نتایج مشابهی دست یافتیم. نتایج ما بیانگر کاهش قابل ملاحظه باکتری‌های روده‌ای (لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها) در اثر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها بود.

مقایسه شمارش کلنی باکتری‌ها در مدفوع موش‌های صحرایی نشان داد مصرف مکمل پروبیوتیک که مخلوطی از گونه‌های لاکتوباسیل و بیفیدوباکتریوم است، می‌تواند جمعیت فلور طبیعی روده را که به علت تیمار آنتی‌بیوتیکی از دست رفته، بازگرداند. دیگران نیز همسو با این پژوهش نتایج یکسانی را گزارش کردند. به طور مثال آلوری و همکارانش در سال ۲۰۰۰ در مدل حیوانی نشان دادند تیمار جوندگان با باسیلوس کازئی موجود در دوغ، قادر است میکروبیوتای روده را برگرداند [۳۱]. علاوه بر این پلومر و همکارانش در سال ۲۰۰۵ اثبات کردند مصرف مکمل پروبیوتیک در بیماران تیمارشده با آنتی‌بیوتیک می‌تواند جبران‌کننده باکتری‌های حذف‌شده از روده باشد [۲۷].

تاکنون بسیاری از مطالعات شواهدی را مبنی بر نقش فلور طبیعی روده در عملکرد سیستم عصبی مرکزی ارائه کرده‌اند

[۳۲-۳۴]. در میان آن‌ها برخی یافته‌ها درباره نقش میکروبیوم روده در صرع و حملات تشنجی هستند [۳۵]. در این راستا، نتایج ما نشان داد حذف یا کاهش تعداد باکتری‌های روده به‌ویژه لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها استعداد ابتلا به تشنج را افزایش می‌دهد. بدین صورت که حذف یا کاهش فلور طبیعی روده به واسطه مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها از یکسو موجب افزایش فازهای تشنج و از سوی دیگر باعث کاهش مدت‌زمان تأخیر برای رسیدن به مراحل تشنج در گروه مصرف‌کننده آنتی‌بیوتیک در مقایسه با گروه کنترل شده بود که هر دو سری نتایج، بیانگر حذف اثرات مفید فلور طبیعی روده متعاقب حذف این باکتری‌هاست. به عبارت دیگر میزبان از اثرات مفید فلور طبیعی روده همانند دخالت در تعدیل میانجی‌های عصبی [۳۶] و خواص ضدالتهابی [۳۷] محروم شده است. بدین مفهوم که نقص فلور طبیعی روده، خود می‌تواند دلیلی بر ایجاد بیماری یا تشدید آن باشد.

بررسی‌های قبلی نیز تغییر فلور طبیعی روده را در بیماران صرعی بیان داشته‌اند [۳۸، ۳۹]. به عنوان مثال مدل ماتوس و همکارانش در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که استرس مزمن از طریق تغییر پروفایل میکروبی روده می‌تواند صرع‌زایی را در مدل حیوانی تسهیل کند [۴۰]. زی و همکارانش در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که رژیم غذایی کتوژنیک موجب تغییر میکروبیوم روده در کودکان صرعی مقاوم به درمان می‌شود [۴۱]. یافته‌های مطالعه حاضر به طور مشابه نشان داد که مصرف مکمل پروبیوتیکی توانسته است با تغییر در جمعیت باکتری‌های روه، حملات تشنجی را دستخوش تغییر کند.

امروزه پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده که ترکیبات و فعالیت میکروبیوتای روده را تحت تأثیر قرار می‌دهند، پذیرفته شده‌اند [۴۲]. مقایسه پارامترهای رفتار تشنجی در گروه‌های مختلف نشان داد مصرف مکمل پروبیوتیک رفتار تشنجی را چه در حالت طبیعی و چه در مورد مصرف آنتی‌بیوتیک تعدیل کرده است؛ بدین ترتیب که مراحل تشنج در گروه‌های مصرف‌کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل و تیمار آنتی‌بیوتیک کاهش معنی‌داری نشان داد. همچنین این مکمل موجب افزایش زمان تأخیر در شروع مراحل تشنج در گروه های ذکرشده نیز شد. دیگران نیز تغییر رفتار تشنجی در مقابل تغییر میکروفلور را اثبات کرده‌اند [۳۰]. ژانگ و همکارانش ۲۰۱۸ نشان‌دادند رژیم غذایی با تغییر فلور طبیعی روده در بچه‌های مقاوم به درمان می‌تواند شاخص‌های رفتار تشنجی را کاهش دهد [۴۳]. باقری و همکارانش کاهش حملات کیندلینگ ناشی از پنتیلن تترازول را در اثر مصرف پروبیوتیک گزارش کردند و آن را به بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی توسط پروبیوتیک‌ها نسبت دادند [۴۴]. پژوهش‌ها، نتایج حاصل را به کاهش عوامل التهابی، افزایش تون گابائرژیک و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی که از اثرات مفید پروبیوتیک‌هاست، نسبت داده‌اند [۴۵-۴۷]. مجموع نتایج ذکرشده به همراه یافته‌های حاضر پیشنهاد می‌کند که تغییر میکروفلور طبیعی روده به دلایل مختلف، همانند مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در مطالعه حاضر، موجب استعداد ابتلا به تشنج می‌شود. همچنین به طور جالب توجهی مطالعه ما نشان داد مصرف پروبیوتیک‌ها با ترمیم جمعیت باکتری‌های روده، تعدیل حملات تشنجی را در پی داشته است.

نتیجه‌گیری

با مطالعه شواهد موجود، به نظر می‌رسد حذف فلور طبیعی روده موجب استعداد ابتلا به تشنج می‌شود و مصرف پروبیوتیک‌ها می‌تواند با تغییر پروفایل میکروبی روده از ابتلای افراد به تشنج و صرع جلوگیری کند و یا آن را تخفیف دهد. بررسی اثر حذف فلور طبیعی روده بر بیماری‌های دیگر به‌ویژه بیماری‌های عصب‌شناختی و مقاوم به درمان، همچنین بررسی اثر گونه‌های مختلف پروبیوتیک به عنوان مکمل درمان پیشنهاد می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1395.176 توسط کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم‌پزشکی اراک به تصویب رسیده است.

حامی مالی

دانشگاه آزاد اسلامی به لحاظ مالی از این پژوهش با کد ۹۴۱۲ حمایت کرده و همچنین این پژوهش مستخرج از پایان نامه دکتری نویسنده اول در گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در نگارش این مقاله مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارضی در منافع اعلام نکردند.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران به خاطر حمایت مالی تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

[1] Thurman DJ, Ettore B, Charles E, Berg AT, Buchhalter JR, Ding D, et al. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. Epilepsia. 2011; 52(Suppl. 7):2-26. [DOI:10.1111/j.1528-1167.2011.03121.x] [PMID]

[2] Holmes GL. The long-term effects of seizures on the developing brain: clinical and laboratory issues. Brain and Dev, 1991; 13(6):393-409. [DOI:10.1016/S0387-7604(12)80037-4]

[3] Bradford H. Glutamate, GABA and epilepsy. Prog Neurobiol. 1995; 47(6):477-511. [DOI:10.1016/0301-0082(95)00030-5]

[4] Aguiar CCT, Almeida AB, Araújo PVP, de Abreu RNDC, Chaves EMC, Macêdo DS, et al. Oxidative stress and epilepsy: literature review. Oxidative medicine and cellular longevity, 2012; 2012:795259. [DOI:10.1155/2012/795259] [PMID] [PMCID]

[5] Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: Experimental and clinical evidence. Epilepsia. 2005; 46(11):1724-43. [DOI:10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x] [PMID]

[6] Galland L. The gut microbiome and the brain. J Med Food. 2014; 17(12):1261-72. [DOI:10.1089/jmf.2014.7000] [PMID] [PMCID]

[7] Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 2012; 489(7415):220-30. [DOI:10.1038/nature11550] [PMID] [PMCID]

[8] De Caro C, Iannone LF, Citraro R, Striano P, De Sarro G, Constanti A, et al. Can we 'seize'the gut microbiota to treat epilepsy? Neurosci Biobehav Rev. 2019; 107:750-64. [DOI:10.1016/j.neubiorev.2019.10.002] [PMID]

[9] Cryan JF, O'mahony S. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. Neurogastroenterol Motil. 2011; 23(3):187-92. [DOI:10.1111/j.1365-2982.2010.01664.x] [PMID]

[10] Wu J, Zhang Y, Yang H, Rao Y, Miao J, Lu X. Intestinal microbiota as an alternative therapeutic target for epilepsy. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2016; 2016:9032809. [DOI:10.1155/2016/9032809] [PMID] [PMCID]

[11] Delzenne NM, Neyrinck AM, Bäckhed F, Cani PD. Targeting gut microbiota in obesity: Effects of prebiotics and probiotics. Nat Rev Endocrinol. 2011; 7(11):639-46. [DOI:10.1038/nrendo.2011.126] [PMID]

[12] Dhakal R, Bajpai VK, and Baek KH. Production of GABA (γ-aminobutyric acid) by microorganisms: A review. Braz J Microbiol. 2012; 43(4):1230-41. [DOI:10.1590/S1517-83822012000400001] [PMID] [PMCID]

[13] Roselli M, Pieper R, Rogel-Gaillard C, de Vries H, Bailey M, Smidt H, et al. Immunomodulating effects of probiotics for microbiota modulation, gut health and disease resistance in pigs. Anim Feed Sci Technol. 2017; 233:104-19. [DOI:10.1016/j.anifeedsci.2017.07.011]

[14] Mazloom Z, Yousefinejad A, Dabbaghmanesh MH. Effect of probiotics on lipid profile, glycemic control, insulin action, oxidative stress, and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes: A clinical trial. Iran J Med Sci. 2013; 38(1):38-43. [PMID] [PMCID]

[15] Cha BK, Jung SM, Choi CH, Song ID, Lee HW, Kim HJ, et al. The effect of a multispecies probiotic mixture on the symptoms and fecal microbiota in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Clin Gastroenterol. 2012; 46(3):220-27. [DOI:10.1097/MCG.0b013e31823712b1] [PMID]

[16] Sansonetti PJ, Medzhitov R. Learning tolerance while fighting ignorance. Cell, 2009. 138(3):416-20. [DOI:10.1016/j.cell.2009.07.024] [PMID]

[17] Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. Bifidobacteria as probiotic agents-physiological effects and clinical benefits. Aliment Pharmacol Ther. 2005; 22(6):495-12. [DOI:10.1111/j.1365-2036.2005.02615.x] [PMID]

[18] Riedel CU, Foata F, Philippe D, Adolfsson O, Eikmanns BJ, Blum S, et al. Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-κB activation. World J Gastroenterol. 2006; 12(23):3729-35. [DOI:10.3748/wjg.v12.i23.3729] [PMID] [PMCID]

[19] Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raang GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2000; 30(1):61-7. [DOI:10.1097/00005176-200001000-00019] [PMID]

[20] Harmsen HJ, Raangs GC, He T, Degener JE, Welling GW. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(6):2982-90. [DOI:10.1128/AEM.68.6.2982-2990.2002] [PMID] [PMCID]

[21] Dinan TG, Stilling, Roman M, Stanton C, Cryan JF. Collective unconscious: how gut microbes shape human behavior. J Psychiatr Res. 2015; 63:1-9. [DOI:10.1016/j.jpsychires.2015.02.021] [PMID]

[22] O'Mahony L, McCarthy j, Kelly P, Hurley G, Luo F, Chen K, et al. Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. Gastroenterology. 2005; 128:541-51. [DOI:10.1053/j.gastro.2004.11.050] [PMID]

[23] Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methé BA, Zavadil J, Li K, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. Nature; 2012; 488(7413):621-6. [DOI:10.1038/nature11400] [PMID] [PMCID]

[24] Blaser MJ. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. Science. 2016; 352(6285):544-5. [DOI:10.1126/science.aad9358] [PMID] [PMCID]

[25] Sullivan Å, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. Lancet Infect Dis. 2001; 1(2):101-14. [DOI:10.1016/S1473-3099(01)00066-4] [PMID]

[26] Zhou J, Pillidge C, Gopal P, Gill HS. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. Int J Food Microbiol. 2005; 98(2):211-7. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.011] [PMID]

[27] Plummer SF, Garaiova I, Sarvotham T, Cottrell SL, Scouiller SL, Weaver MA, et al. Effects of probiotics on the composition of the intestinal microbiota following antibiotic therapy. Int J Antimicrob Agents. 2005; 26(1):69-74. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2005.04.004] [PMID]

[28] Davoudi M, Shojaei A, Palizvan MR, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J. Comparison between standard protocol and a novel window protocol for induction of pentylenetetrazol kindled seizures in the rat. Epilepsy Res. 2013; 106(1-2):54-63. [DOI:10.1016/j.eplepsyres.2013.03.016] [PMID]

[29] Narayanan R, Raghavan KT. Antibiotic susceptibility profile of lactic acid bacteria with probiotic potential isolated from humans.Biomed J Sci Tech Res. 2019; 17(4):12964-6. [DOI:10.26717/BJSTR.2019.17.003033]

[30] Ferrer M, Méndez-García C, Rojo D, Barbas C, Moya A. Antibiotic use and microbiome function. Biochem Pharmacol. 2017; 134:114-26. [DOI:10.1016/j.bcp.2016.09.007] [PMID]

[31] Allori C, Agüero G, de Ruiz Holgado AP, de Nader OM, Perdigon G. Gut mucosa morphology and microflora changes in malnourished mice after renutrition with milk and administration of Lactobacillus casei. J Food Prot. 2000; 63(1):83-90. [DOI:10.4315/0362-028X-63.1.83] [PMID]

[32] Beilharz J, Kaakoush N, Maniam J, Morris MJ. Cafeteria diet and probiotic therapy: cross talk among memory, neuroplasticity, serotonin receptors and gut microbiota in the rat. Mol psychiatry. 2018; 23(2):351-61. [DOI:10.1038/mp.2017.38] [PMID]

[33] Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. Gastroenterology. 2011; 141(2):599-609. e3. [DOI:10.1053/j.gastro.2011.04.052] [PMID]

[34] Borre YE, O'Keeffe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and neurodevelopmental windows: Implications for brain disorders. Trends Mol Med. 2014; 20(9):509-18. [DOI:10.1016/j.molmed.2014.05.002] [PMID]

[35] Lum GR, Olson CA, and Hsiao EY. Emerging roles for the intestinal microbiome in epilepsy. Neurobiol Dis. 2020; 135:104576. [DOI:10.1016/j.nbd.2019.104576] [PMID]

[36] Foster JA, Neufeld KAM. Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. Trends Neurosci. 2013; 36(5):305-12. [DOI:10.1016/j.tins.2013.01.005] [PMID]

[37] MacFabe DF, Cain NE, Boon F, Ossenkopp KP, Cain DP. Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. Behav Brain Res. 2011; 217(1):47-54. [DOI:10.1016/j.bbr.2010.10.005] [PMID]

[38] Lindefeldt M, Eng A, Darban H, Bjerkner A, Zetterström ZK, Allander T, et al. The ketogenic diet influences taxonomic and functional composition of the gut microbiota in children with severe epilepsy. NPJ Biofilms Microbiomes. 2019; 5(1):1-13. [DOI:10.1038/s41522-018-0073-2] [PMID] [PMCID]

[39] Peng A, Qiu X, Lai W, Li W, Zhang L, Zhu X, et al. Altered composition of the gut microbiome in patients with drug-resistant epilepsy. Epilepsy Res. 2018; 147:102-7. [DOI:10.1016/j.eplepsyres.2018.09.013] [PMID]

[40] Medel-Matus JS, Shin D, Dorfman E, Sankar R, Mazarati A. Facilitation of kindling epileptogenesis by chronic stress may be mediated by intestinal microbiome. Epilepsia Open. 2018; 3(2):290-4. [DOI:10.1002/epi4.12114] [PMID] [PMCID]

[41] Xie G, Zhou Q, Qiu CZ, Dai WK, Wang HP, Li YH, et al. Ketogenic diet poses a significant effect on imbalanced gut microbiota in infants with refractory epilepsy. World J Gastroenterol. 2017; 23(33):6164-71. [DOI:10.3748/wjg.v23.i33.6164] [PMID] [PMCID]

[42] Galdeano CM, de Moreno de LeBlanc A, Vinderola G, Bonet ME, Perdigón G. Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. Clin Vaccine Immunol. 2007; 14(5):485-92. [DOI:10.1128/CVI.00406-06] [PMID] [PMCID]

[43] Zhang Y, Zhou S, Zhou Y, Yu L, Zhang L, Wang Y. Altered gut microbiome composition in children with refractory epilepsy after ketogenic diet. Epilepsy Res. 2018; 145:163-8. [DOI:10.1016/j.eplepsyres.2018.06.015] [PMID]

[44] Bagheri S, Heydari A, Alinaghipour A, Salami M. Effect of probiotic supplementation on seizure activity and cognitive performance in PTZ-induced chemical kindling. Epilepsy Behav. 2019; 95:43-50. [DOI:10.1016/j.yebeh.2019.03.038] [PMID]

[45] Asemi Z, Zare Z, Shakeri H, Sabihi SS, Esmaillzadeh A. Effect of multispecies probiotic supplements on metabolic profiles, hs-CRP, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. Ann Nutr Metab. 2013; 63(1-2):1-9. [DOI:10.1159/000349922] [PMID]

[46] Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. Proc Natl Acad Sci USA. 2011; 108(38):16050-5. [DOI:10.1073/pnas.1102999108] [PMID] [PMCID]

[47] Cui HH, Chen CL, Wang JD, Yang YJ, Cun Y, Wu JB, et al. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. World J Gastroenterol. 2004; 10(10):1521-5. [DOI:10.3748/wjg.v10.i10.1521] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank