



## Antioxidant effects of nanochitosan-coated probiotic mixture in brain tissue of rats exposed to Aluminum chloride

Aigin Kavooosi<sup>1</sup>, Zahra Keshtmand<sup>1\*</sup>

1. Department of Biology, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received Date:2025.07.06 Accepted Date:2025.8.23

### Abstract

Aluminum is a toxic metal that is widely distributed in the environment and widely used in daily life. Probiotics, with their activity in the intestine, can produce compounds that trap and absorb pollutants. The aim of this study was to investigate the effects of nanochitosan carrying a probiotic mixture on the antioxidant level of brain tissue in male rats exposed to aluminum chloride. In this experimental study, 28 adult male Wistar rats were divided into 4 groups of 7: control, receiving aluminum chloride (100mg/kg), nanochitosan (1ml), aluminum chloride + nanochitosan carrier of probiotic mixture ( $10^9$ CFU/ml). Infection induction and probiotic mixture intake were performed by gavage. After the end of the treatment period and dissection of the animals, brain tissue was extracted to measure some oxidative stress indices in different groups. Data analysis was performed in different groups using SPSS software and one-way variance statistical test, and  $P < 0.05$  was considered significant. The results of this study showed that in the group receiving aluminum chloride, a significant increase in malondialdehyde and a decrease in superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and total antioxidant capacity was shown compared to the control group ( $P < 0.05$ ), while in the group treated with probiotic-carrying nanochitosan, a significant decrease in malondialdehyde and an increase in superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and total antioxidant capacity was shown. Compared to the infected group, it was shown ( $P < 0.05$ ). According to the findings of this study, nanochitosan carrying the probiotic mixture can probably be used as one of the effective compounds and supplements to modulate the damage caused by the aluminum chloride pollutant due to its antioxidant effects.

**Keywords:** Oxidative Stress, Brain Tissue, Probiotics, Aluminum Chloride, Rat, Nanochitosan

\* Zahra.keshtmand@iau.ac.ir

## EXTENDED ABSTRACT

**Introduction:** One of the issues that can seriously endanger human life and other living organisms today is heavy metals, which induce damage in various tissues by targeting adhesion molecules and programmed cell death pathways. Aluminum is widely distributed in the environment and is a toxic metal whose toxicity increases the formation of reactive oxygen species and the occurrence of oxidative stress, and ultimately damage to macromolecules and tissues of the body. Considering the effect of heavy metals on the health of living organisms, studies and investigations in this field have recently increased sharply. Probiotics are bacteria that, if administered in sufficient quantities, have beneficial effects on the host. Among the effects of probiotic bacteria, antagonistic effects against pathogens, competition for nutrients, bacteriocin production, microbial effects, elimination of foreign agents, strengthening the immune system, and enhancing the antioxidant system can be mentioned. Given the lack of a suitable method for removing heavy metals from food and the potential of lactic acid bacteria to bind to heavy metals, the aim of this study was to investigate the effect of a probiotic mixture coated in nanochitosan on the levels of some oxidative stress factors in the brain tissue of male rats exposed to aluminum chloride.

**Material and methods:** In this experimental study, 28 adult male Wistar rats were divided into 4 groups of 7: control, receiving aluminum chloride (100mg/kg), nanochitosan (1ml), aluminum chloride + nanochitosan carrier of probiotic mixture ( $10^9$ CFU/ml). Infection induction and receiving probiotic mixture were performed by gavage. After the end of the treatment period and dissection of the animals, brain tissue was extracted to measure some oxidative stress indices in different groups. Data analysis was performed in different groups with SPSS software and one-way variance statistical test and  $P < 0.05$  was considered significant.

**Result:** The findings of this study showed that in the group receiving aluminum chloride, there was a significant increase in malondialdehyde and a decrease in superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and total antioxidant capacity compared to the control group ( $P < 0.001$ ), while in the group treated with probiotic-carrying nanochitosan, there was a decrease in malondialdehyde and an increase in superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and total antioxidant capacity compared to the infected group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results of this study showed that the consumption of a probiotic mixture (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, and *Lactobacillus brevis*) had a protective effect on the levels of oxidative stress indices in the brain tissue of male rats exposed to aluminum chloride. In this study, changes in the levels of oxidative stress indicators in brain tissue were observed in the group receiving aluminum chloride. The results of the study showed a significant decrease in superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and total antioxidant capacity in the group of mice infected with aluminum chloride, and an increase in malondialdehyde in brain tissue compared to the control group. In another part of this study, the effect of nanochitosan carrying the probiotic mixture on the level of oxidative stress indicators was examined. In the group of mice infected with aluminum chloride, an increase in superoxide dismutase, catalase, and total antioxidant capacity and a decrease in malondialdehyde in brain tissue were significantly observed compared to the infected group. In the presence of pollutants, the balance of the antioxidant system is disrupted and the free radicals produced exceed the amount of antioxidants present in the body, which are inhibited. The presence of these compounds in the body causes damage to membrane biomolecules and transporter A, inactivates enzymes and damages DNA. The probiotic mixture used in this study also probably reduces the production of oxygen free radicals and the resulting oxidative stress. By reducing lipid peroxidation, it lowers the level of plasma malondialdehyde, thereby increasing the total antioxidant capacity in the intervention groups. Various mechanisms have been proposed for the effect of probiotics on the absorption of biological contaminants, including that probiotics can produce enzymes and metabolites that help detoxify and reduce the toxic effects of heavy metals. Some bacteria can convert heavy metals into non-absorbable or harmless forms. Probiotics can bind heavy metals to their cell surfaces through surface adsorption. They also have the ability to form biofilms, which are adherent microbial communities that form on various surfaces. They can help retain and accumulate heavy metals in a specific location and prevent their release, and lactic acid bacteria can reduce the pH of the environment, which may lead to increased solubility and availability of some heavy metals. According to the present study, it can be said that probiotic consumption improves antioxidant status and reduces oxidative stress in mice infected with pollutants. The potential for immune system modulation by probiotics has proposed a new therapeutic strategy to combat inflammatory and infectious conditions, and it is hoped that probiotics can be used to reduce cellular damage and organ dysfunction, treat infectious diseases, chronic diseases such as inflammatory diseases, and other diseases.

.

.



## اثرات آنتی اکسیدانی مخلوط پروبیوتیک پوشش داده شده با نانوکیتوزان در بافت مغز موش صحرائی در معرض کلرید آلومینیوم

آیگین کاوسی<sup>۱</sup>، زهرا کشتمند<sup>۱\*</sup>

۱. گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۰۱

### چکیده

آلومینیوم فلزی سمی که به طور گسترده در محیط زیست پخش شده و به طور گسترده‌ای در زندگی روزمره استفاده می‌شود. پروبیوتیک‌ها با فعالیت خود در روده، می‌توانند تولیدکننده ترکیبات به دام اندازنده و جذب کننده آلاینده باشند. هدف از این تحقیق بررسی اثرات نانوکیتوزان حامل مخلوط پروبیوتیک بر سطح آنتی اکسیدان بافت مغز درموش‌های صحرائی نر در معرض کلرید آلومینیوم می‌باشد. در این مطالعه تجربی، ۲۸ سرموش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار به ۴ گروه ۷ تایی: کنترل، دریافت کننده کلرید آلومینیوم (۱۰۰ mg/kg)، نانوکیتوزان (۱ ml)، کلرید آلومینیوم + نانوکیتوزان حامل مخلوط پروبیوتیک (۱۰<sup>۹</sup> CFU/ml) تقسیم بندی شدند. القا آلودگی و دریافت مخلوط پروبیوتیک با روش گاوآژ انجام شد. بعد از پایان دوره تیمار و تشریح حیوانات، بافت مغز جهت سنجش برخی از شاخص‌های استرس اکسیداتیو در گروه‌های مختلف استخراج شد. آنالیز داده‌ها در گروه‌های مختلف با نرم افزار SPSS و آزمون آماری واریانس یکطرفه انجام و  $P < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد در گروه دریافت کننده کلرید آلومینیوم افزایش مالون دی آلدئید و کاهش سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز و ظرفیت کامل آنتی اکسیدان در مقابسه با گروه کنترل به صورت معنی دار نشان داده شد ( $P < 0/05$ ). در حالیکه در گروه تیمار شده با نانوکیتوزان حامل پروبیوتیک کاهش مالون دی آلدئید و افزایش سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز و ظرفیت کامل آنتی اکسیدان در مقایسه با گروه آلوده نشان داده شد ( $P < 0/05$ ). با توجه به یافته‌های این پژوهش احتمالاً، نانوکیتوزان حامل مخلوط پروبیوتیک به دلیل اثرات آنتی اکسیدانی می‌تواند به عنوان یکی از ترکیبات و مکمل‌های موثر در جهت تعدیل آسیب‌های ناشی از آلاینده کلرید آلومینیوم استفاده شود.

**کلید واژه‌ها:** استرس اکسیداتیو، بافت مغز، پروبیوتیک، کلرید آلومینیوم، موش صحرائی، نانوکیتوزان

\* Zahra.keshtmand@iau.ac.ir

دشتمانی و کشتمند در تحقیق خود در سال ۲۰۲۰ اثرات آنتی اکسیدانی مصرف مخلوط پروبیوتیک های لاکتوباسیلوسی را در موش های صحرایی در معرض کلرید کادمیوم را گزارش دادند(۸).

#### مقدمه

در دو دهه گذشته تحقیقات روی نانوذرات کیتوزان گسترش یافته و برای کاربردهای دارویی مختلف مورد توجه قرار گرفته است. کیتوزان یک پلیمر داستیله شده طبیعی پلی-کاتیونی است که از واحدهای N-استیل D-گلوکز آمین و D-گلوکز آمین تشکیل شده است که به دلیل دارا بودن ویژگی های خاص زیست تخریب پذیر، غیرسمی، چسبندگی مخاطی ذاتی و توانایی تعدیل یکپارچگی اتصالات سخت اپیتلیال به طور برگشت پذیر خواص آنتی باکتریال، ضد حساسیت، ضد میکروب، کاهش دهنده التهاب و درد، آنتی اکسیدان، منعقد کننده خون، کاهش دهنده کلسترول، روش های آماده سازی ساده و ملایم مورد توجه قرار گرفته و به موجب آن می تواند کاربردهای زیادی در صنعت و به ویژه انتقال دارو داشته باشد(۱۱، ۱۰). این ذرات می توانند به صورت میکروکپسول، میکروسفر و نانوذرات تولید شوند. یکی از روش تولید نانوذرات کیتوزان، ژلاسیون یونی است که به علت ساده بودن، عدم استفاده از حلال آلی و حرارت بالا، بیشتر استفاده می شود. این روش بر پایه میانکشی الکترواستاتیک بین گروه های آمین آزاد کیتوزان و گروه های پلی آنیون مثل تری پلی فسفات است و باعث تشکیل هیدروژلی از میکروذرات یا نانوذرات می شود که می توانند برای کپسوله شدن و یا رهایش کنترل شده داروها و ترکیبات مختلف مورد استفاده قرار گیرند(۱۳، ۱۲).

در سال ۲۰۲۵ ابراهیمی و همکاران اثرات آنتی اکسیدانی کیتوزان حامل مخلوط پروبیوتیک را در موش های مبتلا به کولیت را نشان دادند(۱۱).

با توجه به اینکه کلرید آلومینیوم 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(۱۴). از این رو، احتمالاً استفاده از ترکیبات طبیعی با خاصیت آنتی اکسیدانی

یکی از مسائلی که امروزه به طور جدی می تواند زیست انسان و سایر موجودات زنده را به خطر بیندازند فلزات سنگین می باشند(۱)، که با هدف قرار دادن مولکول های زیستی و مسیرهای مرگ سلولی برنامه ریزی شده، سبب القا آسیب در بافت های مختلف می شوند (۲). آلومینیوم به طور گسترده در محیط زیست پخش شده و به طور گسترده ای در زندگی روزمره استفاده می شود و جز فلزات سنگین بشمار می آید و بعد از اکسیژن و سیلیکون فراوان ترین عنصر می باشد، که حدود ۸ درصد از پوسته زمین را تشکیل می دهد. بنابراین انسان به آسانی در معرض آلومینیوم قرار می گیرد(۳). آلومینیوم فلزی سمی است که القا مسمومیت آن سبب افزایش تشکیل گونه های واکنشگر اکسیژن و وقوع استرس اکسیداتیو و نهایتاً آسیب به ماکرومولکول ها و بافت های بدن می شود(۴). با توجه به تاثیر فلزات سنگین بر سلامتی موجودات زنده، اخیراً مطالعات و بررسی در این زمینه به شدت افزایش یافته است(۵، ۶).

از سویی امروزه، مصرف کنندگان به طور فزاینده ای علاقه مند به حفظ سلامت و حتی درمان بیماری ها از طریق غذا و مکمل های غذایی هستند. استفاده از رویکردهای مبتنی بر شواهد برای بهبود رژیم غذایی و سبک زندگی روندی است که همچنان رو به رشد است و یکی از مهمترین روش های ارتقای سلامت، بهبود عملکرد رشد و کنترل عوامل پاتوژن استفاده از پروبیوتیک ها می باشد. پروبیوتیک ها باکتری هایی هستند اگر در مقادیر کافی تجویز شوند، دارای اثرات سودمند برای میزبان هستند(۷). از جمله اثرات باکتری های پروبیوتیکی می توان به داشتن اثرات آنتاگونیستی نسبت به عوامل بیماریزا، رقابت برای مواد غذایی، تولید باکتریوسین، اثرات میکروبی، حذف عوامل خارجی، تقویت سیستم ایمنی و ارتقای سیستم آنتی اکسیدانی اشاره کرد(۸، ۹).

به عنوان عامل حفاظتی در بافت‌های مختلف ضروری به نظر می‌رسد و در سال‌های اخیر نقش پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیزم‌های زنده‌ای که اگر به مقدار کافی مصرف شوند، برای میزبان مفید هستند مورد توجه قرار گرفته است که ممکن است به دلیل عملکرد عالی پروبیوتیک‌ها در پیشگیری و کاهش بیماری‌ها و همچنین تمایل روزافزون مردم به درمان‌های طبیعی باشد (۱۵). از این رو با توجه به نبود یک روش مناسب در حذف فلزات سنگین از مواد غذایی و پتانسیل باکتری‌های اسید لاکتیک در اتصال به فلزات سنگین هدف از این مطالعه بررسی اثر مخلوط پروبیوتیک پوشش داده شده در نانوکیتوزان بر سطح برخی فاکتورهای استرس اکسیداتیو بافت مغز موش‌های صحرایی در معرض کلرید آلومینیوم می‌باشد.

#### مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از دانشگاه شهید بهشتی تهیه پیش از شروع آزمایش به مدت هفت روز، موش‌ها جهت سازش با محیط آزمایشگاه به حیوان‌خانه‌ی دانشکده‌ی علوم پایه‌ی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی منتقل و سپس تمامی آزمایش‌ها انجام شد. موش‌ها در شرایط کنترل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، با درجه حرارت  $22 \pm 3$  سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد بدون محدودیت در دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند. آزمایش‌ها در بازه‌ی زمانی مشخصی ساعت ۹ تا ۱۲ ظهر و منطبق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد و در کلیه روش‌ها، اصول اخلاقی مورد تایید دانشکده‌ی علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی رعایت گردید (IR.IAU.CTB.REC.1403.222).

#### گروه‌بندی حیوانات

۲۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ (۲۵۰-۲۰۰ گرم)، به طور تصادفی در ۴ گروه هفت تایی تقسیم شدند.

گروه ۱، کنترل: موش‌هایی که فقط آب و غذای پلیت شده را به صورت روزانه دریافت کردند و به منظور القا استرس گاوآژ، موش‌های صحرایی این گروه نیز صورت یک روز در میان با آب مقطر نیز گاوآژ شدند.

گروه ۲: موش‌هایی که جهت القا آسیب، کلرید آلومینیوم (۱۰۰ mg/kg) دریافت کردند (۱۶).

گروه ۳: موش‌های دریافت نانوکیتوزان (۱ میلی لیتر) (۱۷).

گروه ۴: موش‌هایی که کلرید آلومینیوم + نانوکیتوزان حامل مخلوط پروبیوتیک ( $10^9$  CFU/ml) دریافت کردند (۱۷).

کلرید آلومینیوم (۱۰۰ mg/kg) و نانوکیتوزان حامل مخلوط پروبیوتیک ( $10^9$  CFU/ml) از طریق گاوآژ به موش‌ها داده شد.

#### تهیه کیتوزان، کلرید آلومینیوم، پروبیوتیک

کیتوزان با بالاترین خلوص از شرکت سیگما آلدریج خریداری شد و به منظور آلوده نمودن نمونه‌های مورد آزمایش با کلرید آلومینیوم ( $AlCl_3$ )، این ماده شیمیایی با کد ۱۰۱۰۸۴ از شرکت طب آریا کوشا تهیه شد. همچنین، مخلوط پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس پلانتراروم، لاکتوباسیلوس پاراکازئی و لاکتوباسیلوس برویس) به صورت پودری با  $10^{11}$  CFU log از شرکت تک ژن خریداری و جهت تهیه غلظت  $10^9$  CFU/ml، یک گرم از مخلوط پروبیوتیک در ۹ سی سی آب مقطر حل شد (۱۷).

#### تهیه نانوکیتوزان‌های حاوی پروبیوتیک

۲ گرم پودر کیتوزان در ۱۰۰ میلی لیتر محلول اسید استیک (۱٪ V/V) به مدت ۲ ساعت حل شد. برای رقیق کردن محلول تهیه شده ۵۰ میلی لیتر محلول کلرید سدیم (۳ گرم در لیتر) به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانترفیوژ شد... با استفاده از فیلترها، کیتوزان نامحلول جداسازی و ۰/۵ گرم تری پلی فسفات سدیم در ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل شد تا محلولی یکنواخت به دست آید. جهت از بین بردن ناخالصی‌ها مجدد محلول‌ها در دور

مذکور، ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده اضافه و هموزن گردید سپس محلول حاصله در ۱۲۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و از مایع رویی به منظور سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز استفاده شد. بدین صورت که ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های بافت مغز که غلظت سوپراکسید دیسموتاز در آنها مجهول بود به تمامی چاهک های میکروتیتر پلیت اضافه گردید. به چاهک های کنترل، ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شد. در مرحله بعد، ۲۰۰ میکرولیتر از معرف ۱ و سپس ۵۰ میکرولیتر از معرف ۲ به کلیه چاهک ها اضافه شد. پس از پنج دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و به دور از نور، جذب نوری نمونه ها با استفاده از الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد (۲۰).

#### اندازه گیری گلوکاتینون پراکسیداز (GPX)

جهت سنجش گلوکاتینون احیا شده ۰/۱ میلی لیتر از مایع رویی بافت ۰/۳ میلی لیتر از ۰/۲ مولار تریس بافر pH=۸/۲ و ۰/۰۲ میلی لیتر DNTB باغلظت ۰/۰۱ مولار در لوله آزمایش مخلوط گردید و به این مخلوط ۱/۵۸ میلی لیتر متانول مطلق تا حجم ۲ میلی لیتر اضافه شد. یک واکنشگر خالی بدون نمونه و یک نمونه خالی بدون DTNB نیز به شیوه ای مشابه آماده شد. لوله‌های آزمایش هر ۵ دقیقه تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه ساکن شدند و سپس لوله‌ها در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب نوری در طول موج ۴۱۲ نانومتر سنجیده شدند (۲۱).

#### اندازه گیری ظرفیت تام آنتی اکسیدان سرم (TAC)

مقداری از بافت مغز را با یک میلی لیتر محلول بافر فسفات سدیم به همراه ۱۰۰ میلی گرم گلدوس داخل میکروتیوپ اضافه شده و به مدت ۲ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و به مدت ۲ دقیقه داخل ظرف یخ قرار داده شد. در ادامه نیز، محلول حاصل به مدت ۸ دقیقه با ۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ و از محلول بالایی به دست آمده، جهت اندازه گیری جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر استفاده شد (۲۲).

#### اندازه گیری کاتالاز (CAT)

۱۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب کیتوزان سه بار با آب مقطر شسته و محصول در آون با دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت خشک و برای آنالیز مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰ میلی لیتر محلول پروبیوتیک را به محلول کیتوسان اضافه و هم زده شد تا مخلوط یکنواختی ایجاد شود. محلول TPP را به آرامی به مخلوط کیتوسان- پروبیوتیک اضافه شود. حین افزودن، مخلوط به آرامی هم زده شد تا از تشکیل نانوذرات یکنواخت اطمینان حاصل شود برای تنظیم pH محلول ها، ۰/۵ مولار هیدروکسید سدیم اضافه گردید. دما را در حدود ۲۵ درجه سانتی گراد نگه دارید. پس از تشکیل نانوذرات، مخلوط را برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید (در ۵۰۰۰ دور در دقیقه). نانوذرات که در ته لوله رسوب می کنند، جمع آوری و جهت حذف ناخالصی ها با آب دیونیزه شستشو شد. نانوذرات شسته شده را در یک محیط گرم (حداکثر ۴۰ درجه سانتیگراد) برای چند ساعت خشک کنید تا رطوبت اضافی از بین برود (۱۸).

#### اندازه گیری اندازه نانو ذرات و پتانسیل زتا

اندازه گیری اندازه نانو ذرات و پتانسیل زتا با استفاده از دستگاه DLS و پتانسیل زتا مدل Zetasizer Nano ساخت شرکت Malvern کشور انگلستان انجام شد (۱۹).

#### نمونه گیری

پس از تیمار حیوانات به مدت ۳۵ روز، حیوانات توسط کتامین- زایلازین ۱٪ با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تهران مرکزی، آسان کشی شدند و بافت مغز گروه‌های مختلف جهت سنجش مارکرهای آنتی اکسیدانی- اکسیدانی استخراج و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

#### اندازه گیری سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

به منظور سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت مغز، از کیت الیزا (Iran.,Co Salamat Navand) استفاده شد. تمامی محتویات کیت الیزا و نمونه‌ها در دمای اتاق قرار داده شد. به ازای ۱۰۰ میلی گرم از بافت‌های

برای آنالیز داده‌های حاصل از این تحقیق، از واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی با سطح معناداری  $P < 0/05$  استفاده شد. گزارش نتایج بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار و طبیعی بودن توزیع داده‌های به دست آمده با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد ( $P > 0/05$ ).

#### یافته‌ها

اندازه ی ذرات و ریخت شناسی نمونه‌های نانوکیتوزان و نانوکیتوزان حامل مخلوط پروبیوتیک در شکل الف و ب به ترتیب نشان داده شده است. میانگین اندازه ی نانوذرات کیتوزان بدون پروبیوتیک حدود ۹۰ نانومتر (شکل الف) و میانگین اندازه نانوذرات کیتوزان حاوی پروبیوتیک حدود ۱۵۰-۲۰۰ نانومتر بود (شکل ب).

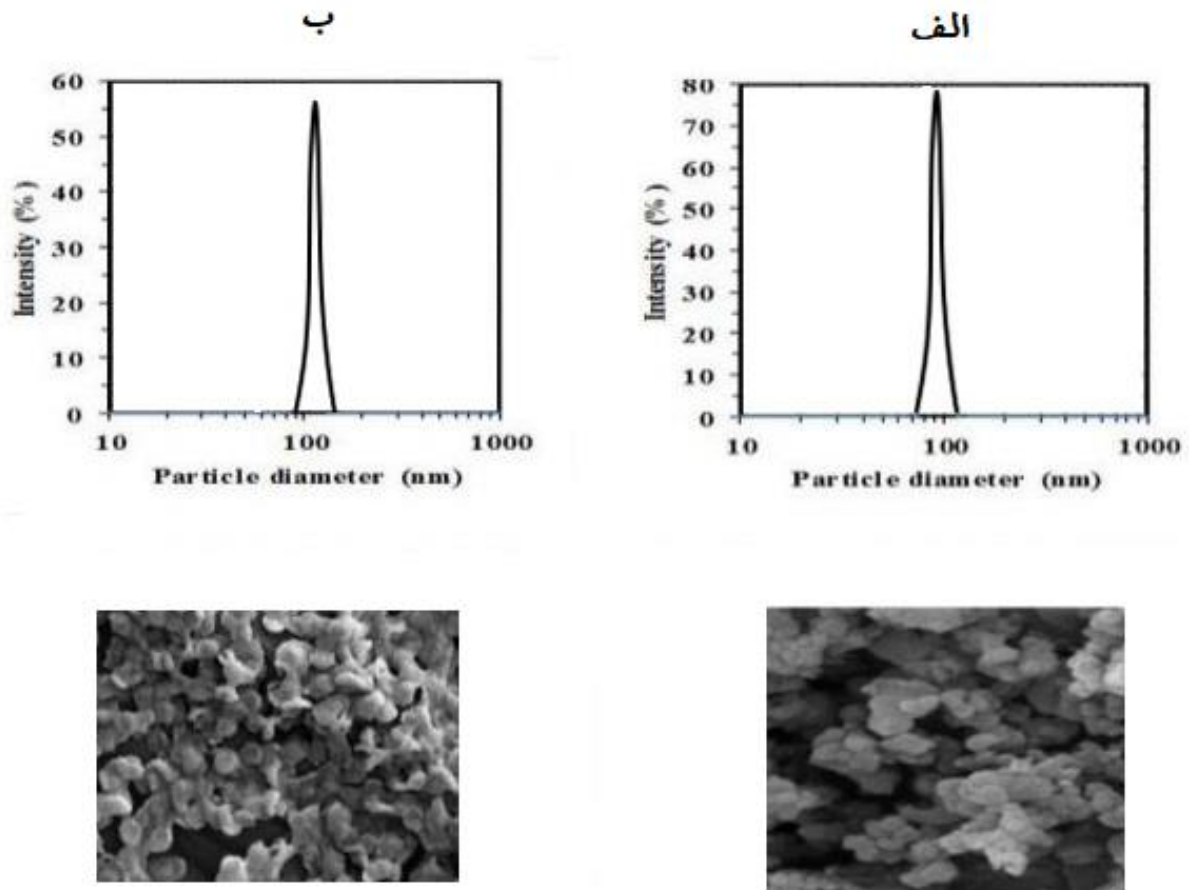
نمودار توزیع بار سطحی نانوذرات کیتوزان نانوذرات کیتوزان حامل مخلوط پروبیوتیک را با استفاده از آزمون پتانسیل زتا در شکل ۲ الف و ب نشان داده شده است، مقدار بار سطحی نانوذرات کیتوزان،  $+20/5$  میلی ولت به دست آمده است که پایداری به نسبت خوب ذرات کلوئیدی را نشان می‌دهد (شکل الف) و بار سطحی نانوذرات کیتوزان حامل پروبیوتیک نیز  $+45/53$  میلی ولت گزارش شد. که نشان از پایداری ذرات کلوئیدی حامل پروبیوتیک دارد (شکل ب).

جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، به حجم معینی از عصاره بافتی اتانول مطلق اضافه و به مدت نیم ساعت در یخ انکوبه گردید. سپس به آن تریتون X-100 ۱٪ باغلظت نهایی ۱٪ اضافه شد. واکنش با اضافه کردن  $0/05$  میلی لیتر  $H_2O_2$  ۳۰ میلی مولار به نمونه بافتی در بافر فسفات پتاسیم  $50$  میلی مولار با  $pH = 7$  شروع شد. سپس جهت اندازه گیری سطح فعالیت آنزیم جذب محلول تهیه شده در طی ۳ دقیقه در طول موج  $240$  نانومتر قرائت شد (۲۳).

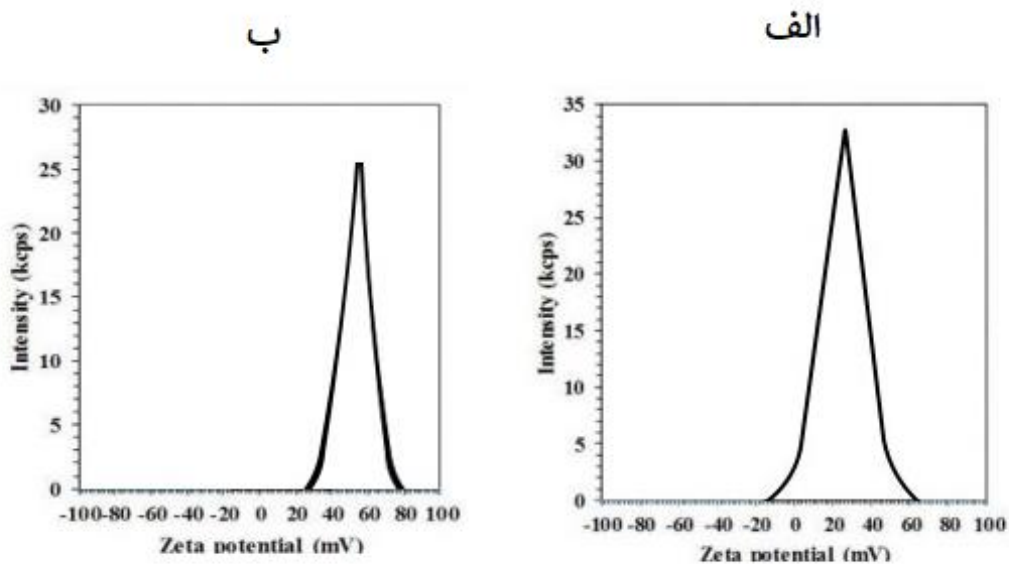
#### اندازه گیری مالون دی آلدئید (MDA)

اندازه گیری سطح MDA بافت مغز ، با روش اسپکتروفوتومتری انجام گردید. در این روش با ارزیابی مواد واکنشی تیوباربتوریک اسید (TBARS; Thiobarbituric Acid- Reactive Substances) می توان آسیب وارد شده به لیپیدها را در حضور مقادیر بالای ROS اندازه گیری نمود. پراکسیداسیون لیپید بر اساس روش لاپنا با استفاده از اسید فسفوریک ۱ درصد و تیوباربتوریک اسید (TBA)  $0/6$  درصد اندازه گیری می شود. رنگ صورتی تولید شده ناشی از واکنش TBA با MDA در طول موج  $532$  نانومتر اندازه گیری شد (۲۴).

#### تحلیل داده‌ها



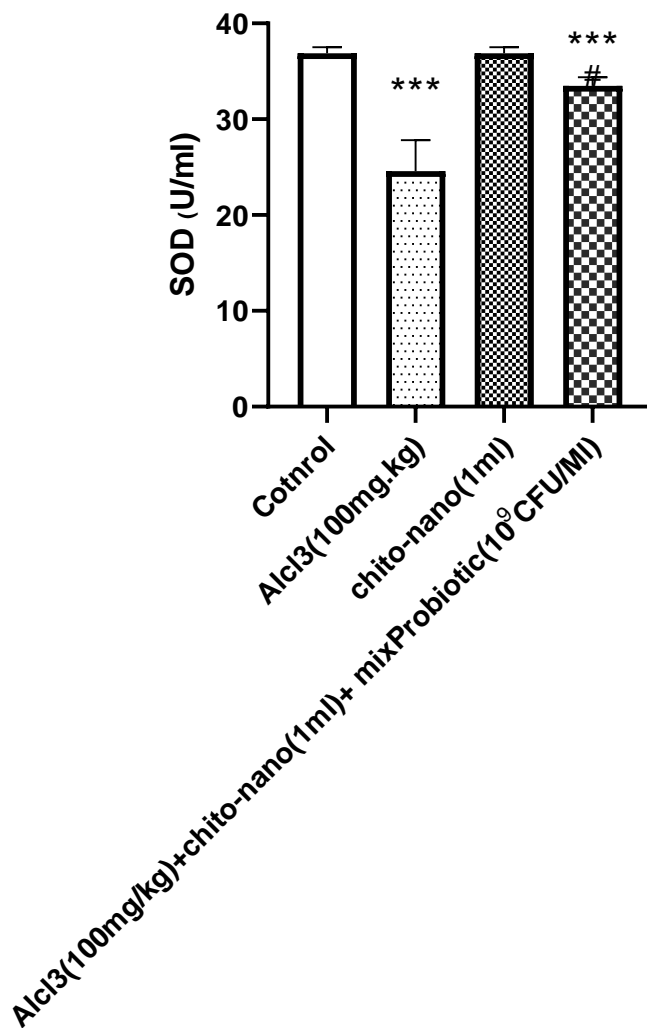
شکل ۱. نمودار اندازه ذرات و ریخت‌شناسی نمونه‌ها: الف نانوذرات کیتوزان با متوسط اندازه ۹۰ نانومتر، ب: نانوکیتوزان حامل پروبیوتیک با متوسط اندازه ۷۵ نانومتر



شکل ۲. نمودار پتانسیل زتا نمونه‌ها، الف: پتانسیل زتای نانوکیتوزان (۲۰/۵+)، ب: پتانسیل زتای نانوکیتوزان حامل پروبیوتیک (۴۵/۵۳+ میلی‌ولت)

کلرید آلومینیوم نیز قابل مشاهده است ( $P < 0/05$ ) (نمودار ۴). همچنین، افزایش معنادار مالون دی آلدهید در گروه‌های دریافت کننده کلرید آلومینیوم و تیمار شده با نانوکیتوزان حامل پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل و در گروه تیمار، کاهش سطح مالون دی آلدهید بافت مغز در مقایسه با گروه آلوده نشان داده شده است ( $P < 0/05$ ) (نمودار ۵).

کاهش سطح سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آنتی اکسیدان تام و گلوتاتیون پراکسیداز در بافت مغز گروه‌های دریافت کننده کلرید آلومینیوم و تیمار شده با نانوکیتوزان حامل پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل به صورت معناداری نشان داده شده است ( $P < 0/001$ ). در حالیکه افزایش معنادار آنها در گروه تیمار شده در مقایسه با گروه دریافت کننده

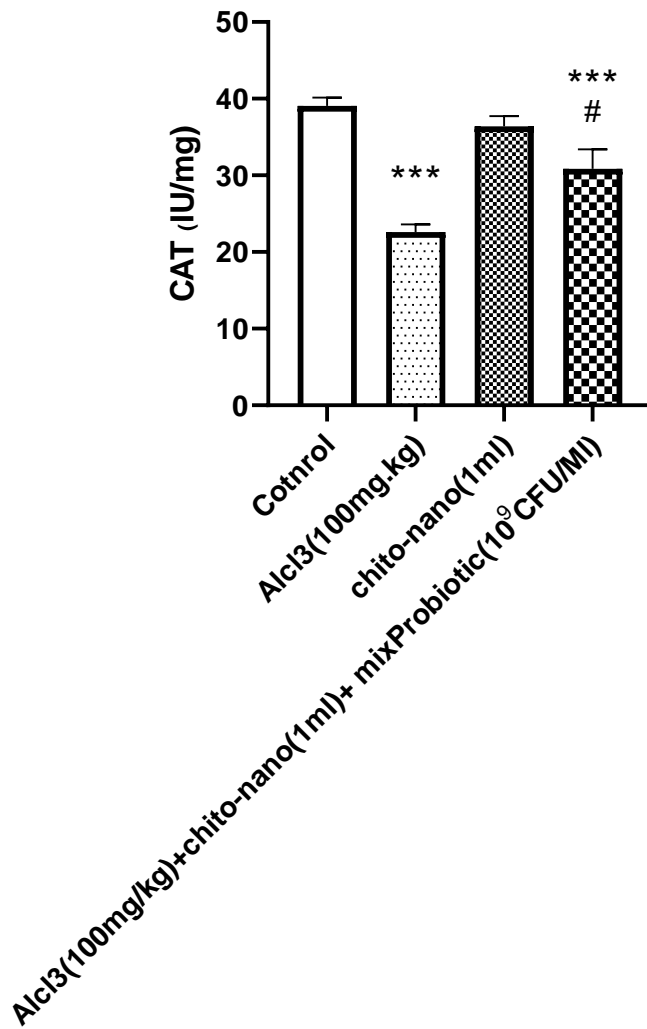


نمودار ۱. مقایسه سطح سوپراکسید دیسموتاز بافت مغز در گروه‌های مختلف آزمایش

نتایج بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار

مقایسه با گروه کنترل:  $P < 0/001$  \*\*\*

$P < 0/05$  # مقایسه با گروه دریافت کننده کلرید آلومینیوم

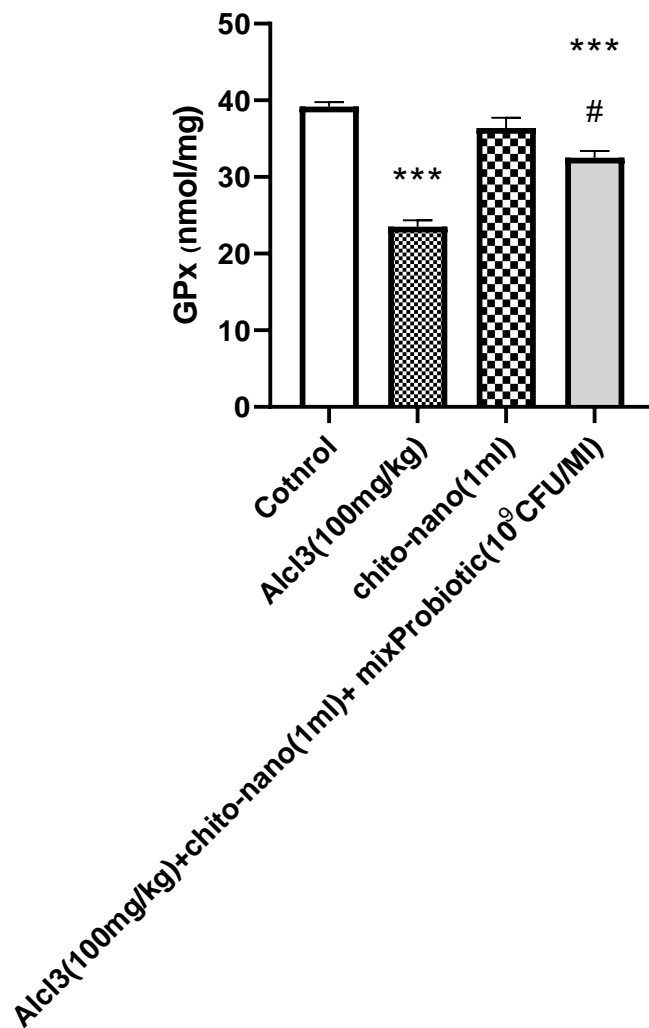


نمودار ۲. مقایسه سطح کاتالاز بافت مغز در گروه‌های مختلف آزمایش

نتایج براساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار

مقایسه با گروه کنترل  $P < 0.001$ \*\*\*

مقایسه با گروه دریافت کننده کلرید آلومینیوم  $P < 0.05$ #

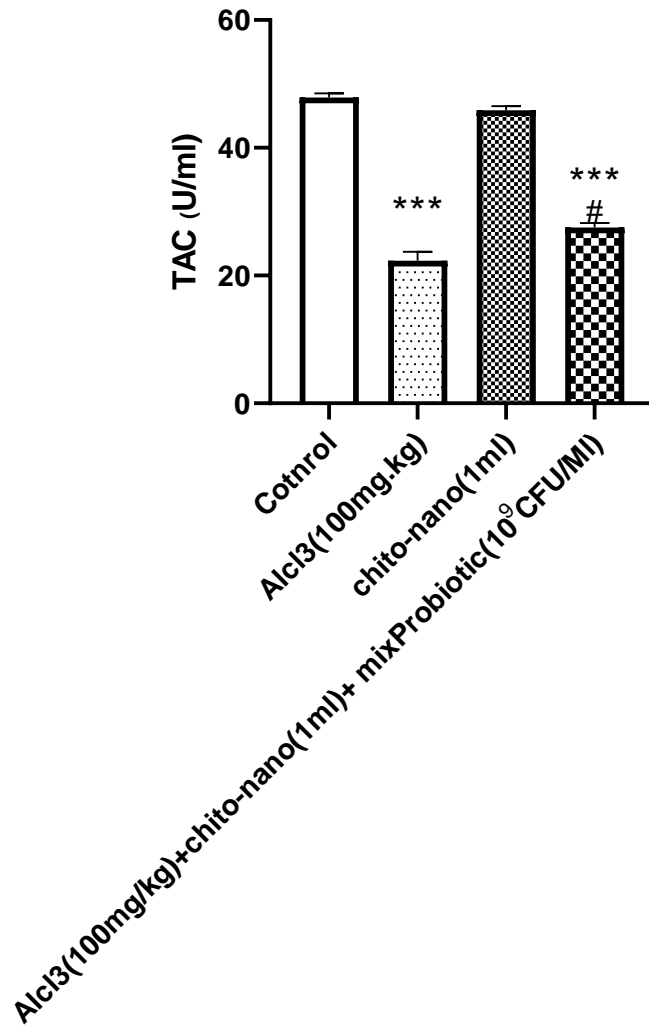


نمودار ۳. مقایسه سطح گلوکاتایون پراکسیداز مغز در گروه‌های مختلف آزمایش

نتایج بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار

\*\*\* $P < 0.001$ : مقایسه با گروه کنترل

# $P < 0.05$  مقایسه با گروه دریافت کننده کلرید آلومینیوم

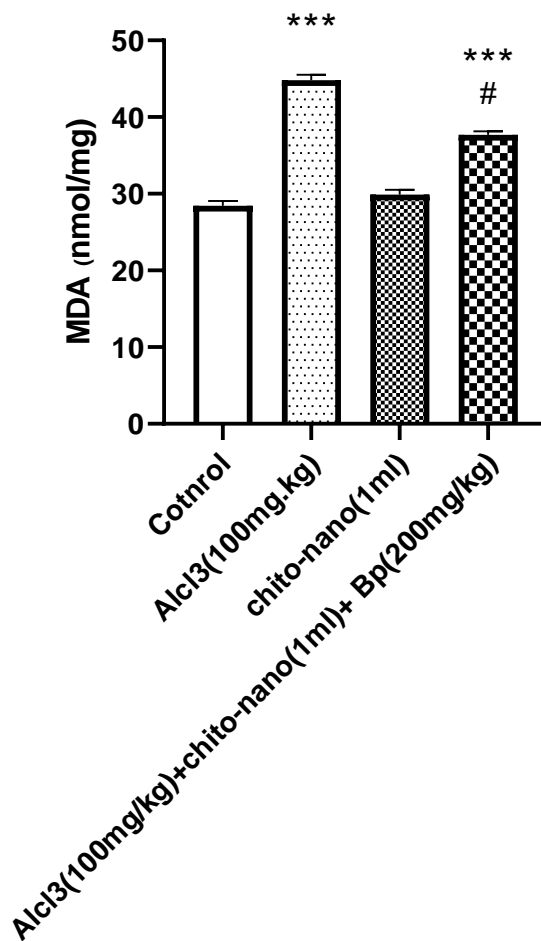


نمودار ۴. مقایسه سطح ظرفیت کامل آنتی اکسیدان بافت مغز در گروه‌های مختلف آزمایش

نتایج براساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار

\*\*\* $P < 0.001$ : مقایسه با گروه کنترل

# $P < 0.05$  مقایسه با گروه دریافت کننده کلرید آلومینیوم



نمودار ۵. مقایسه سطح مالون دی آلدئید بافت مغز در گروه‌های مختلف آزمایش

نتایج بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار

\*\*\* $P < 0.001$ : مقایسه با گروه کنترل

# $P < 0.05$  مقایسه با گروه دریافت کننده کلرید آلومینیوم

#### بحث:

اکوسیستم آبی می‌شوند. فلزات سنگین پایدار و از نظر زیستی تجزیه ناپذیرند و تمایل به تجمع و ایجاد اثرات زیانبار در موجودات زنده هستند (۲۵). حضور برخی از فلزات به منظور انجام فعالیت‌های بیولوژیکی موجودات زنده ضروری است اما انتشار آلاینده‌ها از منابع مختلف منجر به افزایش غلظت عناصر در سطوح خطرناک در محیط زیست برای موجودات

فلزات سنگین انتشار گسترده در محیط دارند و در نتیجه باعث آلودگی آب، خاک و محیط زیست شده و نهایتاً سلامت انسان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. این فلزات به طرق مختلف از جمله فعالیت‌های خانگی، صنعتی و کشاورزی وارد

در حضور آلاینده ها، تعادل سیستم آنتی اکسیدانی بر هم خورده و رادیکال های آزاد تولید شده بیش از مقدار آنتی اکسیدان های موجود در بدن است که مهار می شود. حضور این ترکیبات در بدن باعث آسیب به مولکول های زیستی غشا و انتقال دهنده A شده، آنزیم ها را غیرفعال ساخته و به DNA آسیب میزند (۳۱،۳۲).

در بخش دیگری از این پژوهش تاثیر نانوکیتوزان حامل مخلوط پروبیوتیک بر سطح شاخص های استرس اکسیدانیو مورد بررسی قرار گرفت که، در گروه موش های آلوده شده با کلرید آلومینیوم افزایش سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و ظرفیت کامل آنتی اکسیدان و کاهش مالون دی آلدیید بافت مغز را مقایسه با گروه آلوده به طور معنادار مشاهده شد. تقی زاده و همکاران در سال ۲۰۱۸، در بررسی تاثیر لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی بر وضعیت آنتی اکسیدانی موش های دیابتی شده با استرپتوزتوسین نشان دادند که تجویز باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و اسیدوفیلوس منجر به کاهش معنادار در سطح سرمی مالون دی آلدیید و افزایش معنادار در سطح سرمی توتال آنتی اکسیدان و سطح آنزیم های کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز گلوبول های قرمز در گروه تیمار شده با لاکتوباسیلوس کازئی و اسیدوفیلوس نسبت به گروه دیابتی شد (۳۳).

ویو و همکاران در سال ۲۰۲۴ در بررسی تاثیر مصرف پروبیوتیک باسیلا بر محور روده - کبد موش های تحت استرس نشان دادند که مصرف پروبیوتیک سبب افزایش سطح سوپراکسید دسموتاز، توتال آنتی اکسیدان و سطح کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز و کاهش مالون دی آلدیید شد (۳۴).

حسینیانی و همکاران در بررسی مصرف پروبیوتیک های بیفیدوبیواکتریوم و لاکتوباسیلوس کازئی در آسیب القایی موش های دریافت کننده کاپریزون، افزایش سطح سوپراکسید دسموتاز و سطح آنزیم های کاتالاز و کاهش مالون دی آلدیید گزارش داده شد (۳۵).

امروزه تحقیق در زمینه تولید فرآورده های پروبیوتیک به علت خواص تغذیه ای و درمانی روند رو به رشدی را

زنده شده است (۲۶). تجمع فلزات سنگین در اندام های انسان تأثیر نامطلوبی بر سلامت انسان دارد و ماهیت تجزیه ناپذیری فلزات سنگین باعث مسمومیت، تغییرات رفتاری، تاثیر بر متابولیسم هوزی و ایجاد اختلال در چرخه احیا با تولید گونه های واکنش پذیر اکسیژن یا رادیکال های آزاد، ایجاد تنش اکسیداتیو، آسیب به DNA و بافت ها می شوند (۲۷). در تحقیق حاضر اثر آنتی اکسیدانی مخلوط پروبیوتیک پوشش داده شده با نانوکیتوزان بر سطح شاخص های استرس اکسیداتیو بافت مغز موش های صحرایی نر نژاد ویستار آلوده به کلرید آلومینیوم بررسی شد.

نتایج به دست آمده در این پژوهش در گروه موش های آلوده شده با کلرید آلومینیوم، کاهش سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و ظرفیت کامل آنتی اکسیدان و افزایش مالون دی آلدیید بافت مغز در مقایسه با گروه کنترل به طور معنادار نشان داده شد.

پریمما و همکاران در سال ۲۰۲۲ در بررسی اثرات محافظت - کننده دانه رازبانه بر موش های الزایمری شده با کلرید - آلومینیوم گزارش دادند که در موش های مدل آلزایمری، تغییرات معنادار در سطح شاخص های استرس اکسیداتیو موش ها شد (۲۸).

زب و همکاران در سال ۲۰۲۴ در موش های دریافت کننده کلراید آلومینیوم کاهش سطح کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز و افزایش مالون دی آلدیید را گزارش دادند (۲۹)، که نتایج حاصل از این تحقیق نیز همسو با مطالعات پیشین بود.

فلزات سنگینی که در بافت تجمع می یابند، همگی از نظر پتانسیل اکسیداسیون - احیا فعال محسوب می شوند که این امر موجب عدم تعادل بین تولید گونه های فعال اکسیژن و خنثی - سازی آنها است. بنابراین این دسته از ماهیان تحت تاثیر تنش اکسیداتیو قرار دارند. این عدم تعادل می تواند منجر به آسیب بافت ها و اجزای سلولی گردد که به نوبه خود موجب القای مکانیسم های دفاع آنتی اکسیدانی می شود (۳۰).

پروبیوتیک در جهت حفظ همئوستازی و تنظیم عملکرد بافت‌ها می‌باشد (۴۴، ۴۳).

### نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مصرف مخلوط پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس پلانناروم، لاکتوباسیلوس پاراکازنی و لاکتوباسیلوس برویس) بر سطح شاخص‌های استرس اکسیداتیو بافت مغز موش‌های صحرایی نر در معرض کلرید آلومینیوم، احتمالاً با کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو اثر حفاظتی داشته و از این طریق باعث افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های مداخله می‌گردد. بنابراین پتانسیل تعدیل سیستم ایمنی توسط پروبیوتیک‌ها، استراتژی درمانی جدیدی را برای مقابله با شرایط التهابی، عفونی و آسیب‌ها مطرح کرده است و امید است که بتوان در درمان آسیب‌های ناشی از بیماری‌های عفونی، مزمن و سایر بیماری‌ها از پروبیوتیک‌ها استفاده کرد. اگرچه تفاوت در سویه پروبیوتیک، مدت زمان و دوز مصرف، روش تجویز، نوع فلز سنگین، مدت مواجهه با فلزدر پژوهش‌های آینده باید مورد توجه قرارگیرد و شاخص‌های مختلف، روش‌های آزمایشگاهی دقیق‌تر و بیشتر نیز ارزیابی شود.

### سپاس و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران مجتمع آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی و شرکت تک ژن تشکر می‌نمایند.

### تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

دنبال می‌کند و تلاش برای قرار دادن پروبیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل در رژیم غذایی روزانه افراد صورت می‌گیرد (۳۶).

مطالعات نشان داده است که پروبیوتیک‌ها، به ویژه باکتری‌های اسید لاکتیک، به روش‌های مختلفی قادر به حذف یا کاهش غلظت فلزات سنگین از محیط‌های اکولوژیکی هستند (۳۷) که از جمله مکانیسم‌های احتمالی اثر پروبیوتیک‌ها در جذب آلاینده‌های زیستی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند آنزیم‌ها و متابولیت‌هایی تولید کنند که به سم‌زدایی و کاهش اثرات سمی فلزات سنگین کمک می‌کنند و با تقویت سیستم ایمنی می‌توانند به کاهش آسیب‌های ناشی از سموم کمک کنند. برخی از باکتری‌ها می‌توانند فلزات سنگین را به فرم‌های غیر قابل جذب یا بی‌خطر تبدیل کنند. این فرآیند به نام تثبیت تعریف می‌شود و می‌تواند شامل کاهش حالت اکسیداسیون فلز باشد، همچنین، فلزات سنگین را از طریق جذب سطحی به سطح سلول‌های خود متصل کنند. باکتری‌ها با استفاده از ساختارهای ویژه در دیواره سلولی خود، مانند پپتین‌ها و پلی ساکاریدها، می‌توانند فلزات را به خود جذب می‌کنند و توانایی تشکیل بیوفیلم که جوامع میکروبی چسبنده‌ای هستند که روی سطوح مختلف تشکیل شوند. را دارند که می‌تواند به حفظ و تجمع فلزات سنگین در یک مکان خاص و جلوگیری از انتشار آن‌ها کمک کنند. برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند باعث کاهش pH محیط سبب افزایش حلالیت و قابلیت دسترسی برخی فلزات سنگین شوند که این تغییر در pH می‌تواند به تغییر بار الکتریکی سطح سلول‌های باکتری و در نتیجه افزایش جذب فلزات سنگین کمک کند (۳۸، ۳۹).

نعادل میکروبی (۴۰)، عملکرد آنتی‌اکسیدانی، تقویت سیستم ایمنی (۴۱)، رقابت با ترکیبات بیگانه جهت اتصال به سطح اپی تلپال روده (۴۲) از جمله مکانیسم‌های دیگر پروبیوتیک‌ها جهت حذف عوامل بیگانه از دیگر ویژگی‌های عملکردی

- 1.Briffa J, Sinagra E, Blundell R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*. 2020;6(9):e04691.
- 2.Korotkov SM. Mitochondrial Oxidative Stress Is the General Reason for Apoptosis Induced by Different-Valence Heavy Metals in Cells and Mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(19):14459.
- 3.Al-Hazmi MA, Rawi SM, Hamza RZ. Biochemical, histological, and neuro-physiological effects of long-term aluminum chloride exposure in rats. *Metabolic Brain Disease*. 2021;36(3):429-436.
- 4.Rahman A, Banu Z. Impact of Aluminium Chloride (AlCl<sub>3</sub>) on Brain Function: A Review of Neurotoxic Mechanisms and Implications for Alzheimer's Disease. *Trends in Pharmaceutical Sciences*. 2024;10(4):355-366.
- 5.Elmosry EM, Al-Ghafari AB, Al Doghaither HA, Alrowaili MG, Khired ZA, Toraih EA, Fawzy MS, Shehata SA. Vitamin D Alleviates Heavy Metal-Induced Cytotoxic Effects on Human Bone Osteoblasts Via the Induction of Bioenergetic Disruption, Oxidative Stress, and Apoptosis. *Biological Trace Element Research*. 2025;203(4):2420-2434.
- 6.Mukhi S, Manjrekar PA, Srikantiah RM, Harish S, Kotian H, Rao YL, Sherly A. Evaluation of the cognitive, physiological, and biomarker effects of heavy metal exposure in Wistar rats. *Veterinary World*. 2024;17(8):1855-1863.
- 7.Vijayaram S, Razafindralambo H, Sun YZ, Piccione G, Multisanti CR, Faggio C. Synergistic interaction of nanoparticles and probiotic delivery: A review. *Journal of Fish Diseases*. 2024;47(5):e13916.
- 8.Dashtbani S, Keshtmand Z. 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 and antimicrobial proteins*. 2023;15(2):226-238.
- 9.Mazziotta C, Tognon M, Martini F, Torreggiani E, Rotondo JC. Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. *Cells*. 2023;12(1):184.
- 10.Hassanen EI, Ahmed LI, Fahim KM, Shehata MG, Badr AN. Chitosan nanoparticle encapsulation increased the prophylactic efficacy of Lactobacillus plantarum RM1 against AFM1-induced hepatorenal toxicity in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2023;30(59):123925-123938.
- 11.Ibrahim D, Khater SI, Sherkawy HS, Elgamal A, Hasan AA, Muhammed AA, Farag MF, Eissa SA, Ismail TA, Eissa HM, Eskandrani AA. Protective Role of Nano-encapsulated Bifidobacterium breve, Bacillus coagulans, and Lactobacillus plantarum in Colitis Model: Insights Toward Propagation of Short-Chain Fatty Acids and Reduction of Exaggerated Inflammatory and Oxidative Response. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2025 ; 3:1-26.
- 12.Hassan FA, Abd El-Maged MH, El-Halim HA, Ramadan GS. Effect of dietary chitosan, nano-chitosan supplementation and different japanese quail lines on growth performance, plasma constituents, carcass characteristics, antioxidant status and intestinal microflora population. *Journal of Animal Health and Production* 2021;9(2):119-131.
- 16.Hindawy RF, Manawy SM, Nafea OE, Abdelhameed AA, Hendawi FF. Moringa oleifera leaves ethanolic extract counteracts cortical neurodegeneration induced by aluminum chloride in rats. *oxicology Rsearch* .2024;13(2):tfac028.
- 17.Uyanga VA, Ejeromedoghene O, Lambo MT, Alowakennu M, Alli YA, Ere-Richard AA, Min L, Zhao J, Wang X, Jiao H, Onagbesan OM. Chitosan and chitosan-based composites as beneficial compounds for animal health: Impact on gastrointestinal functions and biocarrier application. *Journal of Functional Foods*. 2023;104:105520.
18. Derakhshan-sefidi M , Bakhshi B, Rasekhi A . Vibriocidal efficacy of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus cell-free supernatants encapsulated in chitosan nanoparticles against multi-drug resistant Vibrio cholerae O1 El Tor. *BMC Infectious Diseases*, 2024, 24.1: 905.
- 19.Gunasangkar G, Ravi AK, Arumugam VA, Muthukrishnan S. Preparation, characterization, and anticancer efficacy of chitosan, chitosan encapsulated piperine and probiotics (Lactobacillus plantarum (MTCC-1407), and Lactobacillus rhamnosus (MTCC-1423) nanoparticles. *BioNanoScience*. 2022;12(2):527-539.

20. Sheweita SA, Alian DME, Haroun M, Nounou MI, Patel A, El-Khordagui L. Chitosan Nanoparticles Alleviated the Adverse Effects of Sildenafil on the Oxidative Stress Markers and Antioxidant Enzyme Activities in Rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2023;2023:9944985.
21. AL-baqami N M.; Hamza, R. Z. Synergistic antioxidant capacities of vanillin and chitosan nanoparticles against reactive oxygen species, hepatotoxicity, and genotoxicity induced by aging in male Wistar rats. *Human & Experimental Toxicology*.2021;40(1): 183-202.
22. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology* .2001;54(5):356–361.
23. Şükran YA, Arzu G, Behzad M, Ebru KS. Effects of vitamin D and common nettle (*Urtica dioica*) extract administration on Mn-SOD and Catalase (CAT) secretion in the colon tissues of rats with experimentally induced Crohn's disease. *Biotechnic and Histochemistry*. 2025; 100.1: 1-7.
24. Abd El-Hameed AM, Yousef AI, Abd El-Twab SM, El-Shahawy AAG, Abdel-Moneim A. Hepatoprotective Effects of Polydatin-Loaded Chitosan Nanoparticles in Diabetic Rats: Modulation of Glucose Metabolism, Oxidative Stress, and Inflammation Biomarkers. *Biochemistry (Mosc)*. 2021;86(2):179-189.
25. Jomova K, Alomar SY, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Heavy metals: toxicity and human health effects. *Archives of toxicology*. 2025;99(1):153-209.
26. Mitra S, Chakraborty AJ, Tareq AM, Emran TB, Nainu F, Khusro A, Idris AM, Khandaker MU, Osman H, Alhumaydhi FA, Simal-Gandara J. Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University-Science*. 2022;34(3):101865.
27. Munir N, Jahangeer M, Bouyahya A, El Omari N, Ghchime R, Balahbib A, Aboulaghras S, Mahmood Z, Akram M, Ali Shah SM, Mikolaychik IN. Heavy metal contamination of natural foods is a serious health issue: A review. *Sustainability*. 2021;14(1):161.
28. Prema A, Justin Thenmozhi A, Manivasagam T, Mohamed Essa M, Guillemin GJ. Fenugreek Seed Powder Attenuated Aluminum Chloride-Induced Tau Pathology, Oxidative Stress, and Inflammation in a Rat Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*.2017;60(s1):S209-S220.
29. Zeb Z, Sharif A, Akhtar B, Shahnaz. 3-Acetyl coumarin alleviate neuroinflammatory responses and oxidative stress in aluminum chloride-induced Alzheimer's disease rat model. *Inflammopharmacology*. 2024;32(2):1371-1386.
30. Porru S, Esplugues A, Llop S, Delgado-Saborit JM. The effects of heavy metal exposure on brain and gut microbiota: A systematic review of animal studies. *Environmental Pollution*. 2024 ; 8:123732.
31. Dehdari Ebrahimi N, Parsa S, Nozari F, Shahlaee MA, Maktabi A, Sayadi M, Sadeghi A, Azarpira N. Protective effects of melatonin against the toxic effects of environmental pollutants and heavy metals on testicular tissue: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Frontiers in endocrinology*. 2023;14:1119553.
32. Ahmadi M, Kalinin I, Tomchuk V. Removal of heavy metals using sorbents and biochemical indexes in rats. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*. 2023;14(4):9-22.
33. Tagizadeh Af, Zargari F, Dehnad AR, Habibi P, Aderi R. The effect of probiotic *Lactobacillus* on serum antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rats. *Razi Journal Of Medical Sciences* . 2018;25(166 ):92-99.
34. Wu Y, Wang B, Tang L, Zhou Y, Wang Q, Gong L, Ni J, Li W. Probiotic *Bacillus* Alleviates Oxidative Stress-Induced Liver Injury by Modulating Gut-Liver Axis in a Rat Model. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(2):291.
35. Hasaniani N, Ghasemi-Kasman M, Halaji M, Rostami-Mansoor S. *Bifidobacterium breve* Probiotic Compared to *Lactobacillus casei* Causes a Better Reduction in Demyelination and Oxidative Stress in Cuprizone-Induced Demyelination Model of Rat. *Molecular Neurobiology*.2024;61(1):498-509.
36. Ansari F, Lee CC, Rashidimehr A, Eskandari S, Ashaolu TJ, Mirzakhani E, Pourjafar H, Jafari SM. The role of probiotics in improving food safety; detoxification of heavy metals and chemicals. *Toxin reviews*. 2024;43(1):63-91.
37. Bist P, Choudhary S. Impact of heavy metal toxicity on the gut microbiota and its relationship

with metabolites and future probiotics strategy: a review. *Biological Trace Element Research*. 2022;200(12):5328-5350.

38. Elsaid EI, Bayomi MA, Amer IH, Asker A. Exploitation of Probiotic a *Lactobacillus rhamnosus* Strain for Removal of Heavy Metal Residues from Milk. *Zagazig Veterinary Journal*. 2023;51(4):344-354.

39. Ghosh S, Sarkar B, Kaushik A, Mostafavi E. Nanobiotechnological prospects of probiotic microflora: Synthesis, mechanism, and applications. *Science of the Total Environment*. 2022;838:156212.

40. Bowen WA, Honglong ZH, Jun YA. Bidirectional interaction between heavy metals and intestinal microorganisms. *Journal of Environmental and Occupational Medicine*. 2023;40(10):1207-1211.

41. Abdel-Megeed RM. Probiotics: a promising generation of heavy metal detoxification. *Biological trace element research*. 2021;199(6):2406-2413.

42. Nowak, Adriana, Anna Paliwoda, and Janusz Błasiak. "Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives." *Critical reviews in food science and nutrition* . 2019;59(21):3456-3467.

43. Sanders ME, Hill C. The microbiome: An actor or stage for the beneficial action of probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics? *Cell Host Microbe*. 2025;33(6):777-789.

44. Cazzaniga M, Cardinali M, Di Pierro F, Zonzini GB, Palazzi CM, Gregoret A, Zerbinati N, Guasti L, Bertuccioli A. The Potential Role of Probiotics, Especially Butyrate Producers, in the Management of Gastrointestinal Mucositis Induced by Oncologic Chemo-Radiotherapy. *International Journal of Molecular*. 2024;25(4):2306. e05206.