



اثرات مخلوط لاکتوباسیلوسی پروبیوتیک بر بافت بیضه آلوده به باکتری اشیرشیاکلی در موش صحرائی نر

سعید صدقی^۱، زهرا کشتمند*^۱، معصومه میرنوراللهی^۱

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۲

چکیده

پروبیوتیک‌ها بسته به سویه، دارای خواص متعددی هستند. برخی از پروبیوتیک‌ها به دلیل تعامل بین مخاط روده و سلول‌های موجود در سیستم ایمنی، نقش مهمی در جلوگیری از عفونت و متعادل کردن سیستم ایمنی دارند. این مطالعه با هدف بررسی خواص مخلوط پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس) بر بافت بیضه آلوده به باکتری اشیرشیاکلی در موش‌های صحرائی نر نژاد ویستار می‌باشد. در این مطالعه تجربی، ۲۱ سر موش صحرائی (۲۲۰-۲۰۰ گرم) در سه گروه شامل گروه کنترل، آلوده به باکتری اشیرشیاکلی ($10^8 CFU/ml$) و مدل آلوده + دریافت کننده پروبیوتیک (CFU/ml) (10^9) تقسیم بندی شدند. القا الودگی سه روز متوالی و دریافت پروبیوتیک به مدت ۳۵ روز با روش گاواژ انجام شد. در پایان هفته پنجم، موش‌ها به آسانی کشته شدند و مطالعات هیستولوژیکی و ارزیابی اسپرماتوژنز بر روی نمونه‌های بافت بیضه انجام شد. آنالیز داده‌ها در گروه‌های مختلف با نرم افزار SPSS و آزمون آماری واریانس یک طرفه انجام و $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری اشیرشیاکلی موجب ایجاد تغییرات ساختاری و عملکردی نظیر تغییر شکل لوله‌های اسپرم ساز، فضای لومن، ضخامت لایه سلولی اسپرم ساز و اختلالات اسپرماتوژنز در بافت بیضه گردید. تیمار موش‌های آلوده به باکتری با مخلوط پروبیوتیک باعث تغییرات معنادار و بهبودی نسبی بافت بیضه در مقایسه با گروه آلوده به باکتری می‌شود. بر اساس نتایج به دست آمده مخلوط پروبیوتیک با توجه به عملکرد آنتی اکسیدانی احتمالاً قادرند آسیب القایی عفونت باکتری اشیرشیاکلی در بافت بیضه را به طور معنی داری محافظت نمایند.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، اشیرشیاکلی، بیضه، موش صحرائی

* zkeshtmand2001@gmail.com

مقدمه

تقویت سیستم ایمنی فرد دارای اهمیت هستند از این رو امروزه از این ترکیبات به عنوان منابع دارای قابلیت پیشگیری و درمانی یاد می‌کنند (۱۳، ۲۵).

در بین باکتری‌های عفونت‌زا در دستگاه ادراری باکتری اشرشیاکلی شایع‌ترین میکروارگانسمی می‌باشد که باعث عفونت می‌گردد، بطوری که این باکتری عامل بیش از ۱۲٪ از موارد عفونت دستگاه ادراری می‌باشد و در حدود ۷۵ درصد از عفونت‌های مجرای ادراری در مردان توسط این باکتری ایجاد می‌شود که سبب ایجاد مشکلات متعدد برای بیماران و تاثیر بر سیستم باروری افراد می‌شود (۱۴، ۲۸). حتی برخی مطالعات، باکتری اشرشیاکلی را عامل بروز ناباروری در مردان گزارش نموده‌اند، نتایج مطالعه دیگری نیز نشان داده است که با افزایش سن افراد ارتباط باکتری اشرشیاکلی با کیفیت اسپرم اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (۱۸). بعضی از مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک در مردان نابارور با عفونت مایع منی (باکتریواسپرمی) ارتباط دارد. عفونت به طور مستقیم موجب کاهش غیرطبیعی تعداد اسپرماتوزوئید مایع منی، کاهش تحرک و تغییرات مورفولوژی در اسپرم (می-شود و در نتیجه قدرت باروری را کاهش می‌دهد. همچنین به طور غیر مستقیم می‌تواند موجب عفونت، آسیب به بیضه، التهاب و در پی آن تحریک سیستم ایمنی بر علیه آنتی‌ژن‌های خودی همراه با لکوسیتواسپرمی شود که همه این عوامل می‌توانند مرد را دچار معضل ناباروری کنند (۲۶).

نتایج مطالعات نشان داده است که طیف وسیعی از باکتری‌ها با درجات مختلف، در ایجاد ناباروری مردان نقش دارند و در حال حاضر موثرترین راه درمان استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد که جهت درمان بیماری‌های عفونی کاربرد مهمی دارد (۷).

هزینه‌های فزاینده‌ی درمان آنتی‌بیوتیکی، ظهور باکتری‌های چند مقاومتی و از همه مهم‌تر نارضایتی پزشکان و بیماران از گزینه‌های درمانی موجود برای عفونت‌های ادراری مکرر سبب گردیده تا خواهان راه‌حل‌های پزشکی پیشرفته و جایگزین باشند. تاکنون هیچ ابزار مناسب برای

عفونت ادراری از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی بعد از عفونت در دستگاه تنفس است. با توجه به ارتباط دستگاه ادراری-تناسلی در مردان، بروز عفونت در سیستم ادراری می‌تواند سبب ایجاد اختلال در سیستم تولید مثل و در نهایت ناباروری شود که یکی از معضلات مهم جوامع بشری است که درصد قابل توجهی از زوج‌ها در سراسر جهان با آن روبرو هستند (۳۰). شیوع ناباروری در مناطق مختلف متفاوت است و در ایجاد آن عوامل متعددی نقش دارند که باعث نقص در عملکرد تولیدمثل در مردان و زنان می‌شود که یکی از دلایل مهم آن عوامل عفونی باکتریایی می‌باشد (۱۷). مهم‌ترین عوامل پاتوژن در این دستگاه اشرشیاکلی^۱، به میزان ۵۵-۷۲٪ و استافیلوکوکوس ساپروفیتوکوس^۲ به میزان ۵٪ می‌باشند (۲۱).

افزایش روزافزون مصرف داروهای شیمیایی و در برخی موارد آنتی‌بیوتیک‌ها بر علیه عوامل عفونی باکتریایی و از سویی مقاومت در نهایت عوارض جانبی جبران‌ناپذیر، توجه به شناسایی و معرفی عوامل جدید به منظور مقابله با این موضوع به عنوان یک مسئله ضروری است (۲۴).

امروزه، تحقیقات به سمتی سوق داده شده است که راه‌حل جایگزین بجای درمان بوسیله آنتی‌بیوتیک‌های یافت شود. از این رو بسیاری از تحقیقات به سمت استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی و حتی بومی منطقه معطوف شده است. با توجه به مطالعات انجام شده در مورد مکانیسم و عملکرد پروبیوتیک‌ها و محصولا متابولیتی آن‌ها یکی از گزینه‌های مورد توجه پژوهشگران این ترکیبات می‌باشند (۳۲).

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانسم‌های زنده‌ای هستند اثرات مفیدی بر سلامت میزبان دارند. این باکتری‌ها جزئی از فلور طبیعی دستگاه گوارش بوده و به عنوان ترکیبات بی‌خطر در طیف وسیعی از مواد خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. هم پروبیوتیک‌ها و هم متابولیت‌های آن‌ها با عنوان پست-بیوتیک با اثرات ضد میکروبی و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی با ایجاد تغییر در سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی میزبان در

² *Staphylococcus saprophyticus*

¹ *Escherichia coli*

نگهداری سد مخاطی، مقاومت در برابر کولونیزاسیون و غیر-فعال کردن توکسین‌های باکتریایی و فاکتورهای ویروالاس است (۲۲).

انتخاب گونه‌های پروبیوتیک عمدتاً بر پایه سابقه تاریخی استفاده از آن‌ها برای مدت بدون داشتن عوارض جانبی مضر صورت می‌گیرد. سایر معیارهای مطرح نیز عبارتند از: شامل مقاومت و زنده ماندن در پروسه تکنولوژیک ساخت، زنده و فعال ماندن در دستگاه گوارش، توانایی اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده، توانایی آنتی‌گونیزه کردن پاتوژن‌ها از طریق تولید ترکیبات ضد باکتری و حذف رقابتی آن‌ها با کاهش pH داخل کولون، توانایی تثبیت فلورباکتریایی روده می‌باشد (۲۲، ۳۳). به طور کلی، به‌نظر می‌رسد پروبیوتیک به‌عنوان یک تنظیم‌کننده درمانی امیدوارکننده و مطمئن هستند؛ با این وجود برای استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان درمان جایگزین در کنار درمان‌های قدیمی به مطالعات گسترده‌تری نیاز است (۴).

بنابراین با توجه به شیوع عفونت‌های ادراری-تناسلی و از سویی کارایی پروبیوتیک‌ها و پست‌بیوتیک‌ها در این تحقیق تاثیر مخلوط پروبیوتیک و پست‌بیوتیک بومی ایرانی (لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس) بر آسیب ایجاد شده توسط باکتری اشرشیاکلی در بافت کلیه و بیضه بررسی خواهد شد.

مواد و روش کار:

در مطالعه تجربی حاضر، تعداد ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از دانشگاه شهید بهشتی تهیه و پس از انتقال به حیوانخانه‌ی دانشکده‌ی علوم پایه‌ی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، پیش از شروع آزمایشات به منظور سازش با محیط آزمایشگاه به مدت یک هفته نگهداری شدند. موش‌ها در حیوانخانه در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، با درجه حرارت 22 ± 3 سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد بدون محدودیت در دسترسی به آب و غذا)

پیشگیری موفق از عفونت‌های ادراری مکرر دردناک و ناتوان‌کننده یافت نشده است. حتی اگر درمان آنتی‌بیوتیکی خوراکی به عنوان یک گزینه درمانی برای مدت زمان طولانی استفاده شوند، به دلیل ایجاد مقاومت باکتریایی تنها تا حدودی موفق هستند (۲۷).

از زمان ظهور درمان آنتی‌بیوتیکی حدود پنج قرن پیش، یک رابطه خطی بین استفاده آنتی‌بیوتیکی و کاهش در باکتری‌های پاتوژنیک به عنوان امر متعارف پزشکی تبدیل شده است؛ اما با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، فلور باکتریایی مفید میزبان نیز از بین می‌رود و باکتری‌های پاتوژنیک به طور گزینشی قادرند تا در سطوح داخلی و خارجی بیش از حد رشد کنند. فلور باکتریایی بی‌خطر برای عملکرد بدن حیاتی هستند و رشد بیش از حد میکروارگانیسم‌های پاتوژنیک منجر به بیماری می‌شود؛ بنابراین این مفهوم حمایت‌کننده این موضوع می‌باشد که فلور طبیعی بدن انسان با میکروارگانیسم‌های زنده دارای یک اثر مفید بر سلامتی انسان می‌باشد که می‌تواند به عنوان یک استراتژی مهم پزشکی و یک جایگزین امیدوارکننده، برای پیشگیری و درمان عفونت‌های دستگاه ادراری مکرر و عفونت‌های دستگاه ادراری بدون عارضه باشند (۲۳، ۱).

پروبیوتیک‌ها، میکروب‌های زنده بی‌خطر مفید و پرکاربردی هستند، که در میزبان از طریق جایگزینی یا کولونیزاسیون، فلور میکروبی روده سلامت میزبان را بهبود می‌بخشند و باعث اعمال اثرات مفید بر سلامتی میزبان می‌شوند اکثر پروبیوتیک‌ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور میکروبی روده انسان بوده و در آنجا زندگی همسفرگی بی‌ضرری دارند (۱۶).

باور موجود در مورد اثرات مفید پروبیوتیک‌ها، بر پایه این واقعیت است که فلور میکروبی روده نقش محافظت‌کننده‌ای در برابر بیماری‌های مختلف از خود نشان می‌دهد؛ بنابراین اثر اصلی پروبیوتیک‌ها با تثبیت فلور میکروبی روده مشخص می‌شود (۲۰). مکانیسم عمل پروبیوتیک‌ها شامل

باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* (PTCC 1330) جهت آلوده کردن موش های صحرائی از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شد.

تهیه مخلوط پروبیوتیک های بومی ایران

مخلوط پروبیوتیک های بومی ایران شامل باکتری های لاکتوباسیلوس (IBRC-M11322) رامنوسوس، لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (TG-35) و لاکتوباسیلوس کازئی (IBC-M10784) به صورت پودر و با $\log 10^1$ از شرکت تک ژن زیست تهیه شد.

روش کشت باکتری

سوش اشرشیاکلی تهیه شده بعد از انتقال به آزمایشگاه روی محیط کشت مک کانکی آگار و انوزین متیلن بلو یک پاساژ داده شد. پس از گرمخانه گذاری در 37°C درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت کلونی های حاصل از کشت از نظر میکروسکوپی و ماکروسکوپی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. سپس تعداد 5 کلونی لاکتوز مثبت و 2 کلونی لاکتوز منفی از روی محیط اینوزین متیلن بلو انتخاب کرده و هر کدام جداگانه بر روی TSI^1 ، سیمون سترات و MR^2 VP کشت داده شد. سپس این سه محیط به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37°C درجه قرار می گیرد و پس از 24 ساعت نتایج کشت بررسی شد. پس از تایید، باکتری درون محیط مایع³ TSB در دمای 37°C درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت درون انکوباتور کشت داده شد. بعد از 24 ساعت که تعداد باکتری ها افزایش پیدا کرد، محیط TSB در مدت 15-20 دقیقه با دور 2000 سانتریفیوژ و رسوبات سه بار با PBS^4 شست شو داده شد. در مرحله آخر رسوبات در 0/5 میلی لیتر PBS حل شده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 630 نانومتر جذب نور اندازه گیری شد. با توجه به جذب $OD_{630} = 0/5$ نانومتر هر لوله حاوی 1×10^8 CFU/ml باکتری است. محلول باکتری در آمپول 2 میلی لیتری ریخته شد و طی سه روز متوالی، یک سی سی به هر موش خوراند شد (33).

و آزمایشات در بازه زمانی مشخصی ساعت 9 تا 12 ظهر و منطبق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. در کلیه روش ها، اصول اخلاقی مورد تایید دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی رعایت گردید (IR.IAU.CTB.REC.1401.091).

گروه بندی حیوانات

21 سر موش صحرائی نر نژاد ویستار بالغ (200 تا 250 گرم) که در شرایط ذکر شده نگهداری شدند، به طور تصادفی در 3 گروه هفت تایی تقسیم شدند.

21 موش صحرائی نر به صورت تصادفی به سه گروه هفت تایی تقسیم شدند.

گروه ها عبارتند از:

گروه کنترل: دریافت کننده آب و مواد غذایی به صورت روزانه

گروه دوم: موش های دریافت کننده اشرشیاکلی (CFU/ml) 10^8 (33).

گروه سوم: موش های دریافت کننده اشرشیاکلی (CFU/ml) 10^8 + مخلوط پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس) (CFU/ml) 10^9 (4).

باکتری اشرشیاکلی با غلظت (CFU/ml) 10^8 و مخلوط پروبیوتیک ها با غلظت 10^9 cfu/MI از طریق گاواژ به موش ها داده شد.

تهیه غلظت پروبیوتیک

یک گرم پروبیوتیک در 9 سی سی آب مقطر حل گردید و به هر موش از این محلول، 1 سی سی مخلوط پروبیوتیک با غلظت (cfu/MI) 10^9 به مدت 35 روز گاواژ شد (4).

تهیه باکتری اشرشیاکلی

³ Tryptic Soy Broth

⁴ Phosphate Buffer Solution

¹ Triple sugar Iron

² Methyl red, Voges-Proskauer

یافته‌ها:

نتایج هیستوپاتولوژی:

وزن و حجم بیضه در گروه‌های مختلف اندازه گیری شد نتایج نشان داد که در گروه آلوده به باکتری وزن و حجم در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنادار و در گروه دریافت کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه آلوده افزایش مشاهده شد. نتایج بررسی‌های هیستولوژیک قطر لوله‌های اسپرمساز و ضخامت لایه سلولی اسپرم ساز در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل کاهش و فضای لومن افزایش معنی داری پیدا کرده است. در گروه تیمار بهبودی به صورت معنا دار گزارش داده شد (شکل ۱، جدول شماره ۱) تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت و اسپرماتید در گروه آلوده به باکتری نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معنادار می‌باشد، در حالی که در گروه دریافت کننده مخلوط پروبیوتیک بهبودی نسبی و معناداری در مقایسه با گروه آلوده به عفونت مشاهده شد (جدول ۱).

نمونه گیری

پس از یک دوره تیمار ۳۵ روزه با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تهران مرکزی (IR.IAU.CTB.REC.1401.091)، حیوانات با تزریق درون صفاقی کتامین- زایلازین ۱٪ (۱۰ میلی‌گرم زایلازین ۱۰۰۰ میلی‌گرم کتامین) آسان کشی شده و بیضه سمت راست جهت بررسی بافتی استخراج شد. سپس جهت مراحل آماده سازی بافت، نمونه‌ها در داخل محلول فرمالین ۱۰٪ نمکی با pH خنثی قرار داده شدند تا کاملاً ثابت شوند. نمونه‌ها طی مراحل آبیگری، شفاف کردن بافت و آغشتگی بافت به پارافین پاساژ داده شدند. در مرحله بعد، قالب گیری نمونه‌ها با پارافین، تهیه برش‌های ۵ میکرونی، چسباندن و رنگ آمیزی با هماتوکسیلین اتوزین صورت پذیرفت (۲).

تحلیل داده‌ها:

برای آنالیز داده‌ها از آزمون واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی استفاده و سطح معناداری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته و نتایج در هر مورد به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. همچنین از آزمون آماری کلموگروف - اسمیرنوف، نیز برای تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد ($P > 0/05$).

ملاحظات اخلاقی:

مطالعه حاضر با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی تهران مرکزی انجام گرفته است و سعی شده که تمام موازین اخلاقی کار با حیوان مورد توجه باشد و الزامات معاهده هلسینکی رعایت گردد (IR.IAU.CTB.REC.1401.091).

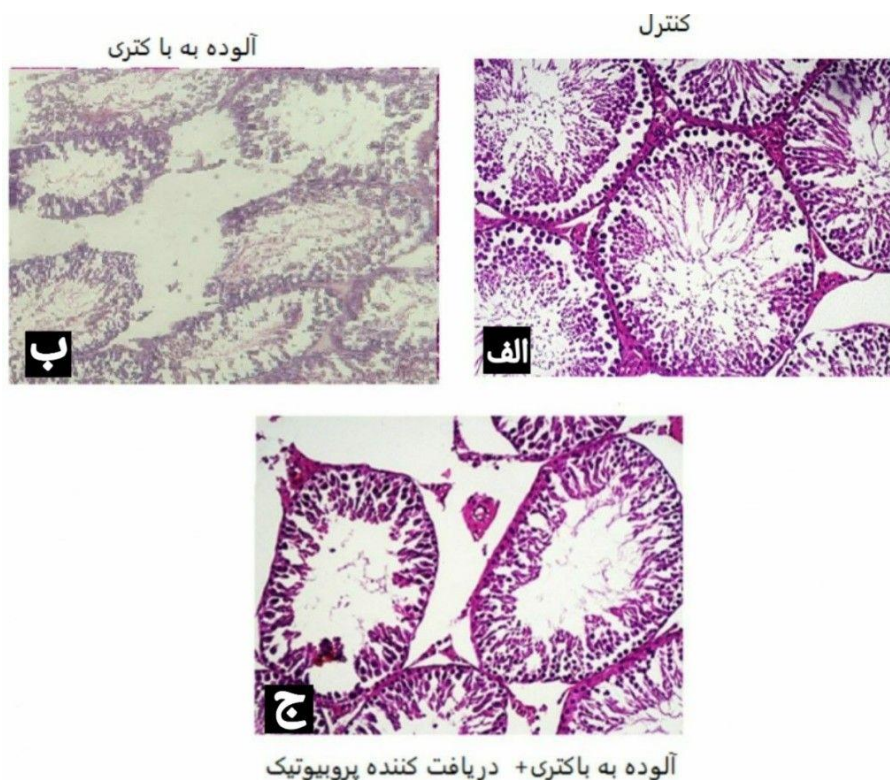
جدول ۱. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت و اسپرماتید در گروه آلوده به باکتری نسبت به گروه کنترل

	وزن بیضه	حجم بیضه	قطر لوله ای سمنیفر (um)	قطر لومن (u)	ضخامت لایه سلولی (u)
کنترل	۱/۴۵±۰/۰۵۱	۱/۹۵±۰/۰۷۹	۲۴۳/۲۷±۶/۲۴	۵۱۰/۲±۱۵/۲	۲۹۶±۷/۹
آلوده به باکتری /شرشیاکلی	۱/۲۰±۰/۰۷۶	۱/۳۵±۰/۱۲	۱/۶۹±۷/۳۱	۶۶۷/۶±۱۲/۶	۱۴۹/۴±۵/۶

	***	***	***	***	***
آلوده به باکتری+دریافت کننده پروبیوتیک (10 ⁹ Cfu/ml)	۱/۳۲±۰/۵۴	۱/۵۸±۰/۰۴۶	۲۱۴/۰۵±۴/۳۸	۵۳۲±۱۰/۸۶	۲۴۴/۳±۸/۷
	*	***	***	*	**
			#	##	#

جدول ۲. اسپرما توژنز

آلوده+دریافت کننده پروبیوتیک	آلوده به باکتری اشرشیاکلی	کنترل	
۷۲/۷۲±۳/۰۹	۶۱/۲۸±۳/۱۱	۸۱/۱۴±۰/۳	اسپرما توژنی (تعداد)
*	**		
#			
۶۰/۳۸±۳/۸۰	۵۷/۲۳±۴/۵۶	۶۶/۴۳±۲/۳۹	اسپرما توسیت (تعداد)
*	**		
#			
۱۱۷±۱/۵۸	۱۰۳/۲۳±۳/۹۵	۱۲۸/۵۸±۱/۴۹	اسپرما تید (تعداد)
**	**		
#			



شکل ۱. مقایسه تغییرات میکروسکوپی بافت بیضه در گروه های مختلف. الف: گروه کنترل، ب: گروه دریافت کننده اشرشیاکلی، ج: گروه دریافت کننده اشرشیاکلی + پروبیوتیک (رنگ آمیزی هماتوکسیلین انوزین، با بزرگنمایی ۴۰۰)

بحث:

از آنجایی که عفونت‌های باکتریایی یکی از عوامل مهم مرگ و میر در محیط‌های بالینی هستند، تأثیر آن‌ها با ظهور اپیدمی گونه‌های مقاوم افزایش یافته است. به علاوه، درمان‌های آنتی‌بیوتیکی می‌توانند میکروب‌های مفید را از بین برده و منجر به ماندگاری سویه‌های مقاوم شوند همچنین باکتری می‌تواند وارد گردش خون شود و موجب بروز سیتی سمی گردد که در این صورت درصد مرگ و میر بالاست. اکثر سویه‌های *اشرشیاکلی* اگر در قسمت‌هایی از بدن نظیر دستگاه ادراری، کیسه صفرا، دستگاه تنفس و غیره وارد شوند به تنهایی یا به کمک سایر باکتری‌ها ایجاد عفونت می‌نماید (۱۲).

در این مطالعه تاثیر مخلوط پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس کازئی* ، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*) بر آسیب القایی توسط *اشرشیاکلی* بر بافت بیضه موش صحرایی نر و استار بررسی شد.

در گروه موش‌های آلوده با *اشرشیاکلی* آسیب بافت بیضه در بخش‌های مختلف قطر لوله‌های سمینفر، فضای لومن، ضخامت لایه سلولی اسپرم‌ساز و تعداد سلولهای دخالت‌کننده در فرایند اسپرماتوزنر به صورت معنادار نشان داده شد. مرینو و همکاران نیز در سال ۱۹۹۵ مایه منی مردانی را که به دلیل ناباروری به درمانگاه آندرولوژی مراجعه کرده بودند مورد آزمایش میکروبی قرار دادند، نتایج نشان داد در بین باکتری‌های هوازی، *اشرشیاکلی* ۹٪ بوده است این محققین در مقاله خود تاکید داشتند وجود باکتری در منی، اثر نامطلوب مستقیم بر روی کیفیت اسپرم داشته و احتمال سوق بیمار به آزواسپرمی را پیش بینی می‌کند.

نتایج مطالعه‌ای نشان داد که در ایجاد عفونت مایه منی مردان بیشترین شیوع مربوط به گونه *استافیلوکوکوس* و *اشرشیاکلی* بوده است، این باکتری‌ها از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده ناباروری در مردان به شمار می‌آیند که این نتایج با یافته‌های مطالعه هلمز و همکاران همخوانی داشت. آنها گزارش کردند *اشرشیاکلی* یکی از مهم‌ترین عفونت‌های علامت‌دار و یا

بدون علامت دستگاه ادراری-تناسلی بوده و می‌تواند پارامترهای اسپرم مانند تحرک و متابولیسم را تغییر دهد، همچنین نشان دادند وجود *اشرشیاکلی* موجب مرگ ۱۵٪ اسپرم‌ها در شرایط خارج از بدن می‌شود (۲۸).

آسیب فراساختاری ناشی از باکتری *اشرشیاکلی* بر روی اسپرماتوزوا با روش‌های مختلف میکروسکوپ الکترونیک مشخص شده است (۲۵). اتصال باکتری به ساختار سطحی اسپرماتوزوا توسط مولکول‌های چسبیده نوع ۱ موجب تغییر ساختار و آسیب به لایه پلاسمایی در اسپرم انسان می‌شود که این آسیب به قسمت آکروزوم اسپرم نیز وارد خواهد شد. آسیب در قسمت آکروزوم قسمت میانی و دم اسپرم موجب کاهش تحرک شدید اسپرم و عدم توانایی در باروری خواهد شد. عفونت‌های باکتری‌هایی باعث به هم چسبیدن اسپرم (*آگلوتیناسیون*) می‌شود، که این امر می‌تواند باعث بی تحرکی اسپرم‌ها گردد. میزان بی تحرکی به تجمع باکتری‌ها در مایع منی بستگی دارد. یکی از باکتری‌هایی که ایجاد *آگلوتیناسیون* می‌نماید باکتری *اشرشیاکلی* می‌باشد (۲۱). همچنین ایجاد التهاب حاد اپیدیم بر اثر عفونت باکتریایی، در بیشتر موارد باعث مختل شدن فرایند اسپرماتوزنر می‌شود که در اکثر موارد با تجویز صحیح آنتی‌بیوتیک بهبود یافته است.

نتایج مطالعه پژوهشگران نشان داد باکتری *اشرشیاکلی* منجر به تولد اپیدیم در موش صحرایی می‌گردد و در ۲۰٪ موارد عفونت از طریق سیستم لنفاوی به بیضه گسترش می‌یابد. سلول‌های زایگر نیز در ۵۰٪ درصد موارد در روز دوم مطالعه تخریب گردیدند و پس از چند ماه نیز بازیابی نگردید. به نظر می‌رسد تاثیر توکسین‌های باکتریایی و با توقف ناگهانی جریان مایعات به لوله‌های اسپرم‌ساز باعث ایجاد آسیب‌های مذکور در بیضه می‌گردد (۴). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که باکتری *اشرشیاکلی* موجب از هم گسیختگی شدید و آتروفی دژنراسیون در لوله‌های اسپرم‌ساز می‌شود که مطابق با نتایج مطالعات پیشین می‌باشد.

یافته‌های قبلی قویاً نشان می‌دهد که مصرف پروبیوتیک‌ها جنبه‌های کلیدی همزیستی میکروبی را تقلید می‌کند و تناسب تولیدمثلی را در میزبان پستانداران افزایش می‌دهد (۱۰).

فعالیت‌های ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها شامل: تولید باکتریوسین/دفنسین، مهار رقابتی با باکتری‌های بیماری‌زا، مهار چسبندگی یا جابجایی باکتری‌ها، و کاهش pH مجرا است. باکتری‌های پروبیوتیک همچنین می‌توانند عملکرد سد روده را با افزایش تولید مخاط افزایش دهند. مهار رشد پاتوژن‌ها یکی از مستقیم‌ترین و مهم‌ترین راه‌های عمل پروبیوتیک‌ها علیه پاتوژن‌ها است و ضروری‌ترین ویژگی سویه‌های پروبیوتیک محسوب می‌شود. تصور می‌شود که مهار رشد توسط پروبیوتیک‌ها عمدتاً از طریق کاهش pH به سطحی که برای بیشتر پاتوژن‌ها مناسب نیست رخ می‌دهد. گونه‌های لاکتوباسیلوس توانایی تنظیم مثبت فاکتورهای ضد میکروبی میزبان را دارند که احتمالاً مربوط به اسید لاکتیک تولید شده، pH پایین و ترکیبات ضد میکروبی است (۵).

محیط اسیدی و القای استرس در غشای خارجی همه عواملی هستند که به طور بالقوه بر بقای *ETEC* تأثیر می‌گذارند (۹). پروبیوتیک‌ها همچنین با تولید انواع مواد میکروبی کش، مانند باکتریوسین‌ها و میکروسین‌ها، که اثرات باکتری‌کشی یا باکتریواستاتیکی دارند، با پاتوژن‌ها مبارزه می‌کنند. لاکتوباسیلوس می‌تواند مواد ضد میکروبی وسیع‌الطیف مانند اسیدهای آلی خارج سلولی، پراکسید هیدروژن و ترکیبات شبه باکتریوسین تولید کند که در برابر پاتوژن‌های گرم مثبت و گرم منفی عمل می‌کنند (۳).

نشان داده شده است که چندین پروبیوتیک رشد پاتوژن را با یک یا هر دو مکانیسم مهار می‌کنند. پروبیوتیک‌ها همچنین ممکن است توانایی کاهش یا جلوگیری از کلونیزاسیون پاتوژن در روده حیوان را با مهار چسبندگی پاتوژن به روشی خاص و وابسته به غلظت داشته باشند.

اجزای مهمی از سیستم ایمنی ذاتی شامل پپتیدهای دفاعی هستند که عمدتاً توسط سلول‌های اپیتلیال روده و فاگوسیت‌ها

پژوهش‌ها نشان داده است که اشرشیاکلی می‌تواند با تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد، سمی کردن سلول، استرس اکسیداتیو واسطه و همچنین پراکسیداسیون لیپیدی باعث افزایش سطح MDA بافتی شود. همچنین این باکتری با ایجاد عفونت می‌تواند باعث تجمع گونه‌های فعال اکسیژن شود (۱۱).

فلاح و همکاران در سال ۱۳۹۶ در تحقیقات خود نشان دادند که باکتری اشرشیاکلی به طور مشخص بر میزان بازوری و بافت بیضه اثر نامطلوب داشته و می‌تواند باعث کاهش ناباروری شود (۳).

اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک از طریق دو مکانیسم ایجاد بیماری می‌کند. اولین فرایند اتصال باکتری به اپیتلیوم روده باریک از طریق چسبندها است که این کار جهت آزادسازی انتروتوکسین از باکتری لازم است. فرایند دوم آزادسازی انتروتوکسین است که این سموم با افزایش سنتز نوکلئوتید حلقوی باعث ایجاد اسهال در میزبان می‌شود و در نتیجه با از دست دادن الکترولیت در میزبان همراه است (۳۴).

در بخش دیگر این مطالعه بافت بیضه موش‌های آلوده دریافت‌کننده مخلوط پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس) در مقایسه با گروه اشرشیاکلی بهبودی نسبی را نشان دادند.

در تحقیقاتی که *Marteau* و همکارانش در سال ۲۰۰۲ انجام دادند مشخص شد که پروبیوتیک‌ها فلور روده و سیستم ایمنی را متعادل می‌کنند و برای موازنه‌ی فعالیت‌های دستگاه گوارش، مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین اگر پروبیوتیک اصلاح ژنتیکی شده باشد، این تأثیر چندین برابر است (۱۹).

اثرات پروبیوتیک‌ها بر موجودات زنده و فواید سلامتی آنها در چندین مطالعه مورد تأکید قرار گرفته است. پژوهش‌ها نشان داده است موثرترین پروبیوتیک‌ها در برابر سویه‌های *E. coli* باکتری‌های اسید لاکتیک و بیفیدوباکتری‌ها هستند (۳).

در دستگاه گوارش تولید می‌شوند که نقش مهمی در حذف پاتوژن دارند.

پروبیوتیک‌ها ممکن است سیستم ایمنی میزبان را تعدیل کنند، روی سایر میکروارگانیسم‌ها مستقیماً تأثیر بگذارند یا بر روی محصولات میکروبی، محصولات میزبان یا اجزای غذا تأثیر بگذارند. اینکه یک پروبیوتیک خاص چه نوع اثری را اجرا می‌کند به خواص متابولیکی آن، مولکول‌های موجود در سطح آن یا اجزای ترشح شده بستگی دارد. حتی بخش‌های جدایی‌ناپذیر سلول باکتری مانند DNA یا پپتیدوگلیکان آن ممکن است برای اثربخشی پروبیوتیک آن مهم باشد. ترکیب فردی چنین خواصی در یک سویه پروبیوتیک خاص، عملکرد خاص پروبیوتیک آن و در نتیجه کاربرد موثر آن برای پیشگیری و یا درمان یک بیماری خاص را تعیین می‌کند.

رقابت برای مواد مغذی ممکن است یکی از مکانیسم‌های مقاومت کلونیزاسیون پاتوژن‌ها در روده انسان باشد. هنگامی که باکتری‌های تقویت‌کننده سلامت در روده وجود دارند، از مواد مغذی بیشتری استفاده می‌کنند و مواد مغذی کمتری برای باکتری‌های بیماری‌زا باقی می‌گذارند، که ممکن است از گرسنگی رنج ببرند و زنده نمانند. حذف رقابتی به دو صورت صورت می‌گیرد. ابتدا با مصرف مواد مغذی و منبع انرژی که پاتوژن‌ها به آن نیاز دارند، پاتوژن‌ها را مهار می‌کند و در نتیجه از تکثیر و رشد آن‌ها در محیط روده جلوگیری می‌کند. دوم تولید چندین اسید آلی و اسیدهای چرب فرار، که منجر به کاهش pH روده به کمتر از حد ضروری برای باکتری‌های بیماری‌زا مثل *S. salmone* و *S. typhimurium* می‌شود (۶).

آهن یکی از مواد مغذی ضروری برای اکثر باکتری‌ها است، اغلب در مقادیر محدود موجود است با این حال، لاکتوباسیل‌ها به آهن نیاز ندارند و از این رو نسبت به سایر باکتری‌های نیاز به آهن (بیماری‌زا) برتری دارند. علاوه بر این، برخی پروبیوتیک‌هایی مانند *L. acidophilus* و *L. delbrueckii* هیدروکسید آهن را در سطح سلولی خود متصل می‌کنند و

آن را در دسترس میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا قرار نمی‌دهند. بنابراین، باکتری‌های پروبیوتیک محیط فیزیکی را به گونه‌ای تغییر می‌دهند که باکتری‌های بیماری‌زا نمی‌توانند زنده بمانند. سویه‌های پروبیوتیک *L. paracasei* و *L. rhamnosus* با مکانیسمی که شامل رقابت، حذف و جایجایی است، اثرات بازدارنده‌ای بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های *S. typhimurium* و *S. typhimurium* دارند.

از این رو باکتری‌های پروبیوتیک اثرات مفید خود را اعمال کرده و سیستم ایمنی میزبان را در برابر آنتی‌ژن‌های مضر بالقوه از طریق فعال شدن لنفوسیت‌ها و تولید آنتی‌بادی تعدیل می‌کنند (۳۱).

پروبیوتیک‌ها همچنین می‌توانند گیرنده‌های سم را تغییر دهند و آسیب‌شناسی ناشی از سم را مسدود کنند و از طریق این مکانیسم‌ها احتمالاً سبب بهبودی در آسیب‌القایی پاتوژن‌ها از جمله باکتری‌های *S. typhimurium* شوند.

نتیجه‌گیری:

در راستای نتایج به دست آمده و بررسی‌های انجام شده در این مطالعه اثرات حفاظتی مخلوط پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس) در آسیب‌های القا شده‌ی *S. typhimurium* در بافت بیضه موش‌های صحرایی‌نر احتمالاً مربوط به فعالیت‌های مختلف از جمله عملکرد آنتی‌اکسیدانتی، مهار کردن ترکیبات سمی، به دام انداختن رادیکال‌های آزاد، تأثیر بر فاکتورهای التهابی و سیستم ایمنی و گمان می‌رود که با بررسی‌های بیشتر بتوان از این میکروارگانیسم‌های موثر و مفید به عنوان کاندید‌های مناسب و یا مکمل‌ها در پیشگیری و یا کاهش عوارض جانبی میکروارگانیسم‌های مضر استفاده نمود اگر چه نوع پروبیوتیک‌ها، مقدار مصرفی آن‌ها و مدت باید با دقت بیشتر و مطالعات مختلف بررسی شود.

سپاس و قدردانی:

این تحقیق در قالب پایان نامه دانشجوی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی با کد پایان نامه ۱۰۱۰۲۹۵۳۳۶۹۸۳۸۱۹۲۳۰۱۵۱۶۲۶۳۴۶۳۴ در گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد تهران مرکزی انجام شد و از شرکت پروبیوتیک تک ژن تشکر و قدردانی می‌شود.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

1. Adámková V. 2019. The role of new antibiotics in intra-abdominal infections in the era of multi-resistant bacteria. *Rozhl Chir.* 98;145-151.
2. Al-Sa'aidi J. A. A. Al-Khuzai A. L. D. Al-Zobaydi N. F. H. 2009. Effect of alcoholic extract of *Nigella sativa* on fertility in male rats." *Iraqi J Vet.* 123-128.
3. Azizi F, Habibi Najafi MB, Edalatian Dovom MR. 2017. The biodiversity of *Lactobacillus* spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. *Amb Express.*;7:1-0.[In Persian]
4. Barzin oshtologh, A., Keshtmand, Z., & Samadikhah, H. R. 2022 . Effect of protective of a mixture of native Iranian probiotics (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus holoticus*) on the Damage of Rat male Small Intestinal tissue Caused by lead acetate. *Iranian Journal of Biological Sciences* 16: 71-80. .[In Persian]
5. Benavides AB, Ulcuango M, Yépez L, Tenea GN .2016. Assessment of the in vitro bioactive properties of lactic acid bacteria isolated from native ecological niches of Ecuador. *Revista argentina de microbiología.* 1;48(3):236-44.
6. Bibi Z, Ashraf K, Shehzadi A, Rehman A, Bukhari DA. 2023. Evaluation of isolated probiotics on the efficacy of immune system in male and female Wistar rats. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 1;31(6):1036-46.
7. Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA and Dicks LMT.2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol.* 49; 23-28.
8. Coutton, C., Fissore, R.A., Palermo, G.D., Stouffs, K., Toure, A. 2016. Male Infertility: Genetics, Mechanism, and Therapies. *Bio. Res. Inter.* 20(1); 55-67.
9. Delley M, Bruttin A, Richard M, Affolter M, Rezzonico E, Brück WM .2015. In vitro activity of commercial probiotic *Lactobacillus* strains against uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters.* 1;362(13).
10. Dunand E, Burns P, Binetti A, Bergamini C, Peralta G, Forzani L, et al. 2019. Postbiotics produced at laboratory and industrial level as potential functional food ingredients with the capacity to protect mice against *Salmonella* infection . *J appl microbio.* 127(1);219-229.
11. Elbaz H., Hamed M., Abdelhamid F., . Abdalla O.2020. Effect of cefepime on hematological, immunological and oxidant/antioxidant parameters in rats experimentally infected with *E. coli* ATCC 25922, *Mansoura Veterinary Medical Journal* 21 . 36–45
12. Gutiérrez S., Martínez-Blanco H., . Rodríguez-Aparici L.Bo, Ferrero M.A.2016. Effect of fermented broth from lactic acid bacteria on pathogenic bacteria proliferation, *Journal of Dairy Science* 99 . 2654–2665.
13. Karban A.2021. Effect of Probiotics on Inflammatory Bowel Diseases. *J Inflamm Bowel Dis Disorder.*6 :e108.
14. Kaur, K., Prabha, V. 2014. Spermagglutinating *Escherichia Coli* and Its Role in Infertility: In Vivo Study. *Microb Pathog.* 69(10); 7033-7038.
15. Komijani M, Shaykh-Baygloo N, Ghasemi S M, Azad F.2018. A systematic review on the role of infectious agents in female and male infertility. *Stud Med Sci.*29 (4) ;295-304.
16. La Fata G, Weber P and Mohajeri MH.2018. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 10;11-21.
17. Marrs CF, Zhang L, Faxman B.2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* pathotypes. *FEMS Microbiol Lett* ; 252(2): 183-190.
18. Moretti, E., Capitani, S., Figura, N., Pammolli, A., Federico, M.G., Giannerini, V., Collodel, G. 2009. The Presence of Bacteria Species in Semen and Sperm Quality. *J Assist Reprod Genet.* 26(1); 47-56.
19. Marteau P., Seksik P., Jian R.2002. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective, *British Journal of Nutrition* 88 .s51-s57.
20. Miller LE, Lehtoranta L and Lehtinen MJ.2019. Short-term probiotic supplementation

enhances cellular immune function in healthy elderly: Systematic review and meta-analysis of controlled studies. *Nutr Res* .64; 1-8.

21. Namjoo A, Sadri S M, Rafeian M, Ashrafi K, Shahin Fard N, Ansari samani R et al . 2013.Comparing the Effects of Nigella Sativa Extract and Gentamicin in Treatment of Urinary Tract Infection Caused by Ecoli. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 22 (3);22-29.

22. Niksolat M, minaieian S, khodabandelou N, zandieh Z. 2017.The effect of probiotics in the prevention of urinary trac infections in elderly patients hospitalized in intensive care units. *RJMS*.24 (156);32-41

23. Paone P and Cani PD.2020.Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy partners. *Gut*. 69; 2232-2243.

24. Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EMM, Sanders ME, Shamir R, Swann JR, Szajewska H and Vinderola G.2021. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 18: 649-667.

25. Sakanaka M, Gotoh A, Yoshida K, Odamaki T, Koguchi H, Xiao JZ, Kitaoka M and Katayama T.2019. Varied Pathways of Infant Gut Associated Bifidobacterium to Assimilate Human Milk Oligosaccharides: Prevalence of the Gene Set and Its Correlation with Bifidobacteria Rich Microbiota Formation. *Nutri*.12; 71.

26. Souho T, Benlemlih M, Bennani B. Human papillomavirus infection and fertility alteration: asystematic review. *PloS one* 2015;10(5): e0126936. Ruggeri M, Cannas S, Cubeddu M, Molicotti P, Piras GL, Dessole S, et al.2016. Bacterial agents as a cause of infertility in humans. *New Microbiol*.39(3); 206.

27. Suez J, Zmora N, Zilberman Schapira G, Mor U, Dori Bachash M, Bashiardes S, Zur M, Regev

Lehavi D, Ben Zeev Brik R, Federici S, et al.2018. Post Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell*. 174;1406-1423.

28. Tao Z, Hu FQ, Li CF, Zhang T, Cao BZ and Cui LQ.2017. Effect of ulinastatin, a human urinary protease inhibitor, on heat- stroke-induced apoptosis and inflammatory responses in rats. *Exp Ther Med* .13; 335-341.

29. Thomas M .Hooton.2015. nosocomial urinary tract infection principles and practice of infectious diseases canada Kristine Feeher Mandell,Douglas,andBennetts. eighth edition .3334-3346.

30. Wagner H, Cheng JW, Ko EY.2018.Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab Journal of Urology*,16(1); 35-43.

31. Wang L, Sun H, Gao H, Xia Y, Zan L, Zhao C. 2023.A meta-analysis on the effects of probiotics on the performance of pre-weaning dairy calves. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 4;14(1):3.

32. Zarinfar N, Valikhani M, Sadeghi B, Soufian M, Akbari M. 2017. Prophylactic Effect of Probiotic Capsule(Lactocare) on Urinary Tract Infection of Cateterized Intensive Care Unit Patients. *J Arak Uni Med Sci*.19 (11) ;47-56.

33. Zhao T., Doyle M.P., Harmon B.G., Brown C.A., Mueller P.E., A.H. 1998. Parks, Reduction of carriage of enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria, *Journal of clinical microbiology* 36 .641–647.

34. Zhang Y., Tan P., Zhao Y., Ma X. 2022. Enterotoxigenic Escherichia coli: Intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota, *Gut Microbes* 14 .2055943.

Effects of Lactobacillus probiotic mixture on testicular tissue infected with *Escherichia coli* bacteria in male rats

Saeid Sedghi¹, **Zahra Keshtmand***¹, Seyyede Masoume Mirnorollahi¹

¹ Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Probiotics have been shown to possess several properties, depending on the strain. Some probiotics have important roles in preventing infection and balancing the immune system due to the interaction between the intestinal mucosa and cells in the immune system. This study aimed to examine the properties of the properties of probiotic and postbiotic mixture (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus heloticus*) on kidney tissue and testis infected with *Escherichia coli* bacteria in male Wistar rats. In this experimental study, 21 rats (200-220g) were divided into three groups, including the control group, infected with Schistosomiasis bacteria (108 CFU/ml) and the infected model + receiving probiotics (109 CFU/ml). Infection was induced for three consecutive days and probiotics were administered for 35 days by gavage method. At the end of the fifth week, the mice were easily killed and histological studies and evaluation of spermatogenesis were performed on the testicular tissue samples. Data analysis in different groups was done with SPSS software and one-way variance statistical test and $p < 0.05$ was considered significant. The results of this study showed that *Escherichia coli* bacteria caused structural and functional changes such as changes in the shape of spermatogenic tubes, lumen space, thickness of the spermatogenic cell layer and spermatogenesis disorders in testicular tissue. Treatment of mice infected with bacteria with probiotic mixture causes significant changes and relative recovery of testicular tissue compared to the group infected with bacteria. Based on the obtained results, the probiotic mixture, due to its antioxidant function, is probably able to significantly protect the induced damage of *Escherichia coli* infection in the testicular tissue.

Key words: probiotic, *Escherichia coli*, testis, rat

* zkeshtmand2001@gmail.com