

Research Paper

The Effect of Intestinal Natural Micro Flora Removal on Susceptibility to Have Seizure in Male Wistar Rats



Saeed Tahmasebi¹, *Sharbanoo Oryan², Hamid Reza Mohajerani³, Neda Akbari³, *Mohammad Reza Palizvan⁴

1. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Animal Biology, Faculty of Biological Science, University of Kharazmi, Tehran, Iran.
3. Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.
4. Department of Physiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.



Citation: Tahmasebi S, Oryan S, Mohajerani HR, Akbari N, Palizvan MR. [The Effect of Intestinal Natural Micro Flora Removal on Susceptibility to Have Seizure in Male Wistar Rats (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2020; 23(3):326-337. <https://doi.org/10.32598/JAMS.23.3.6110.1>

 <https://doi.org/10.32598/JAMS.23.3.6110.1>



Article Info:

Received: 07 Feb 2020

Accepted: 06 Jun 2020

Available Online: 01 Aug 2020

Key words:

Microflora, Probiotics, Seizure, Rat

ABSTRACT

Background and Aim Epilepsy is a common brain disorder. Brain function can be affected by the intestinal microflora. The intestinal microflora have a major role in modulating immune responses, producing essential metabolites and mediating neurotransmitters. Antibiotics can affect and reduce these roles and functions by eliminating the intestinal microflora. The aim of this study was to investigate the effect of intestinal natural micro flora removal on seizure susceptibility and seizure behavior modification with the use of probiotics in male Wistar rats.

Methods & Materials This study was performed on 32 male Wistar rats with weight range 200-250 gr. The animals were randomly divided into four groups: 1. Control group; 2. Antibiotic group; 3. Probiotic group and 4. Antibiotic + probiotic group. To remove the microflora, antibiotics (neomycin, ampicillin, and metronidazole) for three weeks and for replacement of microflora, probiotics (Lactobacilli casei, Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum) for four weeks were administered. Seizures were performed by intraperitoneal injection of pentylentrazole. The microflora was examined by the MRS Agar medium and the Pure Plate method. The data were statistically analyzed in Graph Pad Prism V. 8.

Ethical Considerations This study was approved by the Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences (Code: IR.ARAKMU.REC.1395.176).

Results The use of antibiotics lead to decrease the number of intestinal bacteria ($P < 0.0001$), increased the severity and stability of seizure stages ($P < 0.05$) and decreased the time delay of seizure onset ($P < 0.05$) compared to the control group. Probiotic consumption by modifying the intestinal microflora ($P < 0.0001$) reduced the severity of seizure and increased the time delay of seizure onset ($P < 0.05$).

Conclusion Elimination of microflora has the potential to induce seizures, which can be compensated by administration of probiotics.

* Corresponding Author:

Sharbanoo Oryan, PhD.

Address: Department of Animal Biology, Faculty of Biological Science, University of Kharazmi, Tehran, Iran.

Tel: +98 (21) 80633368

E-mail: sh-oryan@khu.ac.ir

Mohammad reza Palizvan, PhD.

Address: Department of Physiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Tel: +98 (86) 34173502

E-mail: dr.palizvan@arakmu.ac.ir

Extended Abstract

1. Introduction

Epilepsy is a common neurological disorder after a stroke. The disease is characterized by dysfunction of brain neurons, which manifests in the form of periodic and unpredictable seizure [1]. Researches have shown that brain function is affected by intestinal microbiota [6]. The natural gut flora play role by altering immune responses, producing essential metabolites and neurotransmitters [9]. These changes can subsequently effect on all pathways involved in neuronal stimulation and inflammation [10]. Elimination of the intestinal natural micro flora by the use of antibiotics will remove their beneficial effects [23-25]. The aim of this study was to investigate the effect of intestinal natural micro flora removal on seizure susceptibility and seizure behavior modification with the use of probiotics in male Wistar rats.

2. Materials and Methods

This study was performed on 32 male Wistar rats with weight range 200-250 gr. The mice were prepared from the Razi Institute of Tehran. Animals were maintained under controlled temperature ($22\pm 2^\circ\text{C}$) and a 12:12-h light: dark cycle. The animals were randomly divided into four groups: (1) Control group, (2) Antibiotic group, (3) Probiotic group and (4) Antibiotic + probiotic group. To remove the micro flora, antibiotics (neomycin, ampicillin and metronidazole) for three weeks and for replacement of micro flora, probiotics (*Lactobacilli casei*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*) for four weeks were administered [26, 27]. Seizures were performed by intraperitoneal injection of pentylene tetrazole (45 mg/kg). The time between injection of pentylene tetrazole and the start of the second also fifth stage of seizures, the length of time the animals are in stage five seizure and Maximum seizure stage, measured as an important indicator of seizure behavior [28]. The micro flora was examined by the MRS Agar medium and the Pure Plate method [27]. The data were statistically analyzed in Graph Pad Prism v. 8.

3. Results

The results of this study showed that the use of antibiotics lead to decrease the number of intestinal bacteria ($P<0.0001$), increased the severity and stability of seizure stages ($P<0.05$) and decreased the time delay of seizure onset ($P<0.05$) compared to the control group. Probiotic consumption by modifying the intestinal micro flora

($P<0.0001$) reduced the severity of seizure and increased the time delay of seizure onset ($P<0.05$).

4. Discussion

The results of the present study showed that the use of antibiotics reduces the beneficial bacteria in the gut, including lactobacillus and bifidobacteria. Similarly, other colleagues achieved these results [26, 29]. Antibiotic treatment also increased the severity of seizures and reduced the time required for seizures to occur in the seizure model caused by pentylene tetrazole. This means that removing the natural intestinal flora can subsequently eliminate the effects of beneficial bacteria. For example, Jesus-Servando et al. showed that chronic stress can facilitate epilepsy in an animal model by altering the gut microbial profile [40]. Xie et al. reported that ketogenic diets alter intestinal microbiome in resistant epileptic children [41].

Comparison of bacterial colony counts in rat feces showed that taking probiotic supplements, a mixture of lactobacillus and bifidobacteria, could restore the population of natural intestinal flora lost due to antibiotic treatment. Allori et al. in the animal and Plummer et al. in the human model proved that taking probiotic supplements could restore the bacteria removed from the gut [27, 31]. Comparison of seizure behavior parameters in different groups showed that the use of probiotic supplementation moderated the seizure behavior. Similar to the present study, Bagheri and her colleagues reported a reduction in pentylene tetrazole-induced Kindling attacks due to probiotic use [44].

5. Conclusion

It seems that elimination of micro flora has the potential to induce seizures, which can be compensated by administration of probiotics.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study with Ethics Code IR.ARAKMU.REC.1395.176 was approved by the Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences.

Funding

This article was supported by Islamic Azad University of Tehran, Science and Research Branch, (Code: 9412) and extracted from the PhD. dissertation of the first author Department of Biology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University.

Authors' contributions

All authors contributed in preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Islamic Azad University of Tehran, Science and Research Branch for financial support.

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

سعید طهماسبی^۱، شهربانو عریان^۲، حمیدرضا مهاجرانی^۳، ندا اکبری^۴، محمدرضا پالیزوان^۴

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه زیست‌شناسی 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 علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۸ بهمن ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۱۱ مرداد ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۱۱ مرداد ۱۳۹۹

زمینه و هدف: صرع یک اختلال شایع مغزی است. عملکرد مغز می‌تواند تحت تأثیر میکروفلور طبیعی روده باشد. میکروفلور طبیعی 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 مختل شود. 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، گروه پروبیوتیک و گروه آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک. جهت حذف میکروفلور، آنتی‌بیوتیک‌ها به مدت سه هفته و جهت جایگزینی میکروفلور، پروبیوتیک‌ها به مدت چهار هفته تجویز شد. ایجاد تشنج با تزریق درون صفاقی پنتیلین‌تترازول انجام شد. بررسی میکروفلور در محیط MRS Agar و با روش پورلیت صورت گرفت. اطلاعات به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار گراف 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 علوم پزشکی 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 ($P < 0.05$) و کاهش 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 و این عارضه با مصرف پروبیوتیک قابل جبران است.

کلیدواژه‌ها:

میکروفلور، پروبیوتیک، تشنج، موش صحرایی

بالای بیماری و مشکلات ناشی از آن انجام هر مطالعه‌ای جهت درمان و یا کاهش عوارض ضروری به نظر می‌رسد.

مقدمه

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

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 در واقع 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

* نویسنده مسئول:

شهربانو عریان

نشانی: تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی جانوری.

تلفن: +۹۸ (۲۱) ۸۶۰۷۲۷۰۹

پست الکترونیکی: sh-oryan@khu.ac.ir

محمدرضا پالیزوان

نشانی: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی.

تلفن: +۹۸ (۰۸۶) ۳۴۱۷۵۳۵۰۲

پست الکترونیکی: palizvan@arakmu.ac.ir



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

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 ۲۵۰ گرم انجام شد. موش‌ها از مؤسسه انستیتو رازی تهران تهیه شدند و در شرایط استاندارد (دمای کنترل شده 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و چرخه تاریکی روشنایی ۱۲ ساعته) نگهداری شدند. حیوانات به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم‌بندی شدند: گروه کنترل، گروه آنتی‌بیوتیک، گروه پروبیوتیک و گروه آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک.

تهیه پروبیوتیک

پروبیوتیک‌های مورد استفاده مخلوطی از سه سویه لاکتوباسیل کازئی، لاکتوباسیل اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم 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 دوز یک گرم در یک لیتر آب آشامیدنی که به صورت یک روز در میان تعویض می‌شد، به مدت سه هفته تیمار شدند (گروه‌های ۲ و ۴). گروه‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک (گروه‌های ۳ و ۴)، پروبیوتیک‌ها را با دوز 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 دریافت کردند. 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 دوز ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پنتیلن‌تترازول را به صورت درون‌صفافی 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

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 گابائریک [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 جدا شده 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، میکروارگانیزم‌های بی‌هوازی و گرم مثبت هستند که عمدتاً در کولن افراد بالغ و کودکان سکونت دارند. بیش از ۹۰ درصد باکتری‌های جدا شده 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 بیفیدوباکتریومها 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 شناخته شده که به شکل مستقیم اثر می‌گذارد، همچنین می‌توانند به‌طور 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



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

انحراف معیار استاندارد تعداد کلنی باکتری‌ها از آزمون من‌ویتنی استفاده شد. برای انجام تمامی آزمون‌ها از نرم‌افزار گراف‌پد نسخه ۸ استفاده شد. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ 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 علوم پزشکی اراک، رعایت شد.

یافته‌ها

مقایسه میانگین مراحل تشنج پس از تزریق دز ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پنتیلین تترازول به صورت داخل صفاقی در گروه‌های تیماری مختلف نشان داد تیمار سه‌هفته‌ای موش‌های صحرایی توسط آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، نفومایسین و مترونیدازول در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار آنتی‌بیوتیک) میانگین مراحل تشنج را به شکل معنی‌داری افزایش داده است $P < 0.05$ (تصویر شماره ۲).

میانگین مراحل تشنج در گروه تیمار شده با آنتی‌بیوتیک که متعاقباً به مدت چهار هفته پروبیوتیک دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه تیمار آنتی‌بیوتیک کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.01$) (تصویر شماره ۲). میانگین مراحل تشنج گروه تیماری پروبیوتیک در مقایسه با گروه تیماری آنتی‌بیوتیک کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.01$) (تصویر شماره ۲).

میانگین زمان تأخیر شروع مرحله دوم تشنج در گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$) (تصویر شماره ۳). همچنین میانگین زمان تأخیر برای شروع مرحله دوم تشنج در گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه تیماری آنتی‌بیوتیک ($P < 0.01$) و آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک ($P < 0.05$) 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 نشان داد ($P < 0.05$) (تصویر شماره ۴). همچنین این زمان در گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک ($P < 0.05$) و گروه تیماری آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک در مقایسه با گروه آنتی‌بیوتیک افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$) (تصویر شماره ۴).

پروبیوتیک، از محیط کشت MRS Agar و روش پورپلیت استفاده شد [۲۷]. در این روش ابتدا یک گرم مدفوع توزین شده سپس ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل توسط شیکر به‌خوبی هوزنیزه 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 بی‌هوایی در دمای ۳۷ سانتی‌گراد اینکوبه شدند. تعداد کلنی‌ها در پلیت‌های قابل شمارش (بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی)، شمارش شد و در ضریب رقت، ضرب شد تا تعداد باکتری در گرم مدفوع به دست آید.

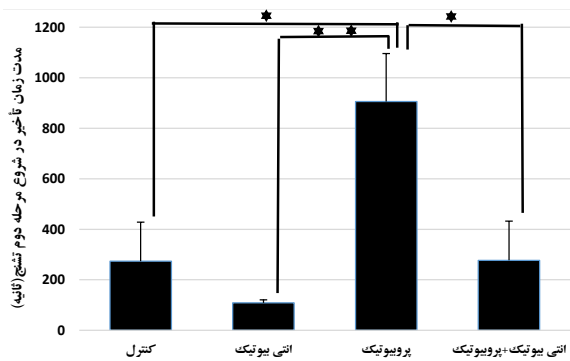
بررسی رفتار تشنجی

پاسخ‌های تشنجی حیوان بر اساس تحقیقات قبلی به شکل زیر مورد بررسی قرار گرفت [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 پنتیلین تترازول و شروع مرحله دوم تشنج Stage Two Latency، همچنین تأخیر زمانی بین تزریق پنتیلین تترازول و شروع مرحله پنجم Stage Five Latency و مدت زمانی 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 مدت زمان پایداری مرحله پنج تشنج از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی و برای مقایسه میانگین و

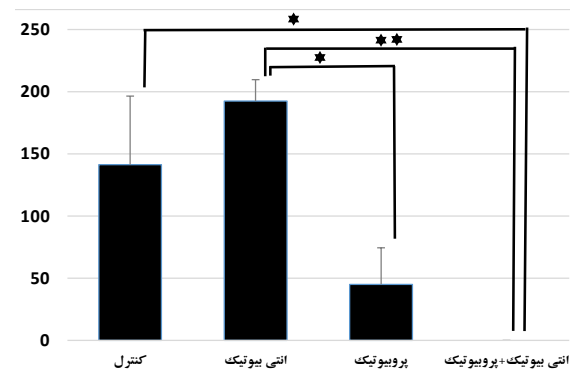


تصویر ۳. اثر تیمار آنتی بیوتیک و پروبیوتیک بر تأخیر شروع مرحله دو تشنج، در تمامی گروه‌ها $n=8$ است.

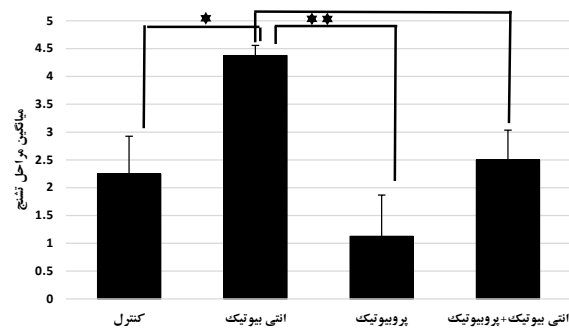
با آنتی بیوتیک کاهش معنی داری در مراحل تشنج داشته است.

مقایسه میانگین به علاوه انحراف معیار استاندارد زمان تأخیر برای شروع مرحله دو تشنج در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون توکی نشان داد زمان تأخیر شروع مرحله دوم تشنج در گروه مصرف کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی داری داشته است ($P < 0.05$). همچنین زمان تأخیر شروع مرحله دوم تشنج در گروه تیمار پروبیوتیک در مقایسه با گروه‌های آنتی بیوتیک ($P < 0.01$) و گروه تیماری آنتی بیوتیک + پروبیوتیک افزایش معنی داری نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

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 پس آزمون توکی نشان داد زمان تأخیر شروع مرحله پنجم تشنج در گروه تیمار با آنتی بیوتیک در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی دار داشته است ($P < 0.05$). این زمان در گروه مصرف کننده پروبیوتیک ($P < 0.05$) و گروه تیماری آنتی بیوتیک + پروبیوتیک ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه تیمار



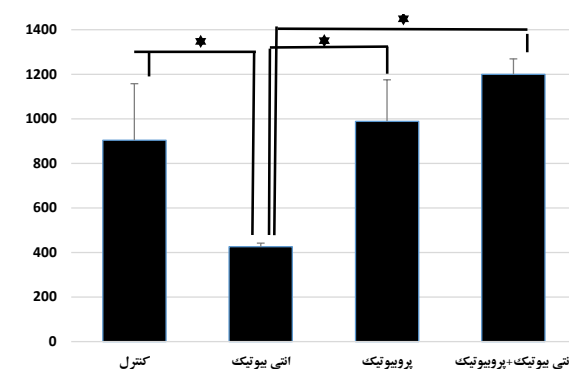
تصویر ۵. اثر تیمار آنتی بیوتیک و پروبیوتیک بر پایداری مرحله پنج تشنج، در تمامی گروه‌ها $n=8$ است.



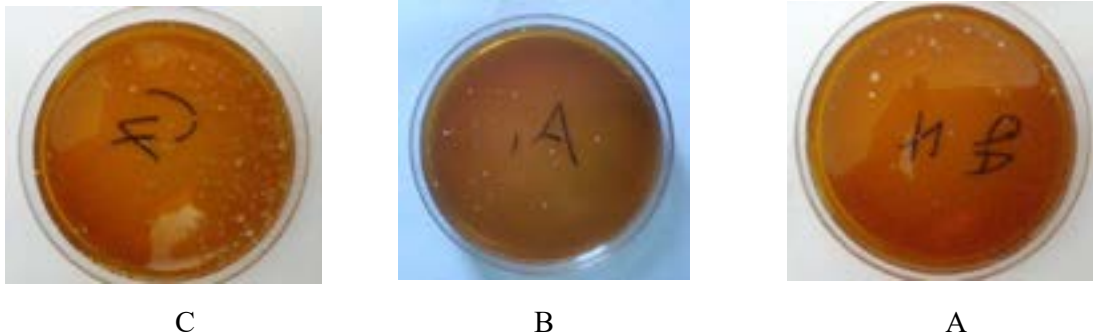
تصویر ۲. اثر تیمار آنتی بیوتیک و پروبیوتیک بر مراحل تشنج، در تمامی گروه‌ها $n=8$ است.

میانگین زمان پایداری مرحله پنجم تشنج در گروه تیمار شده با آنتی بیوتیک + پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل ($0.05/0$) و گروه آنتی بیوتیک ($P < 0.01$) کاهش معنی داری نشان داد (تصویر شماره ۵)، همچنین زمان مذکور در گروه تیماری پروبیوتیک در مقایسه با گروه تیماری آنتی بیوتیک کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0.05/0$). مقایسه میانگین تعداد کلنی باکتری‌ها در مدفوع گروه تیمار شده با آنتی بیوتیک (تصویر شماره ۶-B) در مقایسه با گروه کنترل (تصویر شماره ۶-C) کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0.0001$)، همچنین مقایسه میانگین تعداد کلنی باکتری‌ها در مدفوع گروه تیمار شده با آنتی بیوتیک + پروبیوتیک (تصویر شماره ۶-A) در مقایسه با گروه آنتی بیوتیک (تصویر شماره ۶-B) افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0.0001$).

مقایسه میانگین و انحراف معیار استاندارد مراحل تشنج در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون کروسکال والیس نشان داد گروه تیمار شده با آنتی بیوتیک در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری در مراحل تشنج داشته است ($P < 0.05$). همچنین گروه تیماری آنتی بیوتیک + پروبیوتیک ($P < 0.01$) و گروه مصرف کننده پروبیوتیک ($P < 0.01$) در مقایسه با گروه تیمار شده



تصویر ۴. اثر تیمار آنتی بیوتیک و پروبیوتیک بر تأخیر شروع مرحله پنج تشنج، در تمامی گروه‌ها $n=8$ است.



تصویر ۶. اثر آنتی‌بیوتیک و مکمل پروبیوتیک بر فلور طبیعی روده، در تمامی گروه‌ها $P=8$ است



مشاهده شد. در مقابل مصرف مکمل پروبیوتیک موجب افزایش معنی‌داری در تعداد باکتری‌های مفید روده (لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها)، به‌ویژه در گروه تیمار شده با آنتی‌بیوتیک شد و به همین ترتیب مصرف پروبیوتیک توانست از یکسو رفتار تشنجی را در حالت 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 تیمار شده 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

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 تیمار شده با آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل ($P < 0/05$) و همچنین در مقایسه با گروه آنتی‌بیوتیک کاهش معنی‌داری نشان داده است ($P < 0/05$). زمان توقف در مرحله پنجم در گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه تیمار شده با آنتی‌بیوتیک کاهش معنی‌داری نشان داده است ($P < 0/05$).

مقایسه میانگین تعداد کلنی باکتری رشد پیدا کرده در محیط MRS Agar با استفاده از آزمون من‌ویتنی نشان داد گروه تیمار شده با آنتی‌بیوتیک (تصویر شماره ۶-B)، در مقایسه با گروه کنترل (تصویر شماره ۶-C)، 210×10^7 ufc/rg کاهش معنی‌داری در تعداد کلنی باکتری داشته‌است ($P < 0/0001$). همچنین مقایسه میانگین تعداد کلنی باکتری‌ها رشد پیدا کرده در محیط MRS Agar نشان داد گروه تیمار شده با آنتی‌بیوتیک + پروبیوتیک (تصویر شماره ۶-A) 27×10^7 ufc/rg، در مقایسه با گروه تیمار شده با آنتی‌بیوتیک (تصویر شماره ۶-B) افزایش معنی‌داری در تعداد کلنی باکتری داشته است ($P < 0/0001$).

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 نیز کاهش زمان لازم برای شروع حملات تشنجی در مدل تشنج ناشی از پنتیلن‌تترازول شد؛ به طوری که بین گروه‌های تیمار شده با آنتی‌بیوتیک و کنترل اختلاف معنی‌داری در پارامترهای مورد مطالعه رفتار تشنجی،



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 علوم پزشکی 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 زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات است.

مشارکت‌نویسندگان

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.

[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 میزان 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 روده، حملات تشنجی را دستخوش تغییر کند.

امروزه پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیزم‌های 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 گروه‌های ذکرشده نیز شد. دیگران نیز تغییر رفتار تشنجی در مقابل تغییر میکروفلور را اثبات کرده‌اند [۳۰]. ژانگ و همکارانش ۲۰۱۸ نشان دادند 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 پنتیلین 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 گابا‌ترژیک و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی که از اثرات مفید پروبیوتیک‌هاست، نسبت داده‌اند [۴۵-۴۷]. مجموع نتایج ذکرشده به همراه یافته‌های حاضر پیشنهاد می‌کند که

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 JJ, 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.anifeeds.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- κ B 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'Keefe 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, Alinaghpour 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, Esmailzadeh A. Effect of multi-species 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
