

The effect of *Faecalibacterium* on the gastrointestinal microbiota pattern and inflammatory responses in a fentanyl-dependent rat model

Kianoosh Ferdosnejad¹, Parvaneh Maghami¹, Mohammad-Reza Zarrindast², Seyed Davar Siadat^{3,4}

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

² Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Microbiology Research Center (MRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

⁴ Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background: The current public health crisis resulting from opioid use disorder has been exacerbated by the increasing prevalence of synthetic opioids, particularly fentanyl, leading to a rise in overdose cases. To mitigate the harmful effects of fentanyl abuse, the identification of new biological markers and therapeutic strategies is essential.

Materials and methods: The present study investigated the effect of fecal bacteria on controlling the consequences of fentanyl abuse in the composition of the gastrointestinal microbiota and related inflammatory responses in a rat model using absolute and relative Real-time PCR techniques.

Results: In the fentanyl-treated group, the frequency of *Clostridium* ($P=0.69$) and *Bacteroides* ($P=0.04$) increased, while the frequency of *Faecalibacterium* ($P=0.149$) and *Lactobacillus* ($P=0.44$) decreased. *Faecalibacterium* gavage significantly increased the frequency of *Faecalibacterium* ($P=0.0074$) and *Lactobacillus* ($P=0.165$), while reducing the frequency of *Clostridium* ($P=0.166$) and *Bacteroides* ($P=0.013$). Elevated levels of gastrointestinal inflammatory cytokines, such as *IL-1 β* ($P=0.01$), *TNF- α* ($P=0.083$), and *IL-6* ($P=0.17$) in the fentanyl-dependent group, confirm the presence of gastrointestinal inflammation in response to opioid exposure. Control of gastrointestinal inflammation was observed as a result of *Faecalibacterium* gavage ($P=0.0004$).

Conclusion: This study demonstrated the relationship between fentanyl abuse, gut bacteria, and inflammation. Changes in specific bacterial species may lead to increased gastrointestinal inflammation, and modifying the gut microbiota population may offer operative strategies to more effectively control the fentanyl abuse, as well as other opioids.

Keywords: *Faecalibacterium*, Synthetic opioid, Fentanyl, Microbiota, Inflammation.

Cited as: Ferdosnejad K, Maghami P, Zarrindast MR, Siadat SD. The effect of *Faecalibacterium* on the gastrointestinal microbiota pattern and inflammatory responses in a fentanyl-dependent rat model. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2025; 35(2): 119-128.

Correspondence to: Seyed Davar Siadat

Tel: +982164112823

E-mail: d.siadat@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-6892-5603

Received: 30 Dec 2024; **Accepted:** 10 Mar 2025

تأثیر فکالی باکتریوم بر الگوی میکروبیوتای دستگاه گوارش و پاسخ‌های التهابی
در مدل موش بزرگ آزمایشگاهی وابسته به فنتانیلکیانوش فردوس نژاد^۱، پروانه مقامی^۱، محمدرضا زرین دست^۲، سید داور سیادت^{۳،۴}^۱ گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران^۲ دپارتمان فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران^۳ مرکز تحقیقات میکروبیولوژی (MRC)، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران^۴ بخش مایکوباکتریولوژی و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بحران فعلی سلامت عمومی ناشی از اختلال مصرف اپیوئید با افزایش شیوع مصرف اپیوئیدهای سنتتیک، به ویژه فنتانیل، تشدید شده است، که منجر به افزایش موارد اوردوز می‌شود. برای کاهش تأثیرات مضر سوءمصرف فنتانیل، شناسایی نشانگرهای بیولوژیک جدید و راهبردهای درمانی ضروری است.

روش بررسی: مطالعه حاضر به بررسی اثر فکالی باکتریوم بر کنترل عواقب ناشی از سوءمصرف فنتانیل در ترکیب جمعیت میکروبیوتای دستگاه گوارش و پاسخ‌های التهابی مرتبط در یک مدل موش صحرایی با استفاده از تکنیک‌های *Real-time PCR* مطلق و نسبی پرداخت.

یافته‌ها: در گروه تیمار شده با فنتانیل، فراوانی کلسترییدیوم ($P=0/69$) و باکترئیدس ($P=0/04$) افزایش و فراوانی فکالی باکتریوم ($P=0/149$) و لاکتوباسیلوس ($P=0/44$) کاهش یافت. گواژ فکالی باکتریوم باعث افزایش معنی‌دار فراوانی فکالی باکتریوم ($P=0/074$) و لاکتوباسیلوس ($P=0/165$) و کاهش فراوانی کلسترییدیوم ($P=0/166$) و باکترئیدس ($P=0/13$) شد. سطوح بالای سیتوکین‌های التهابی دستگاه گوارش، مانند $IL-1\beta$ ($P=0/01$)، $TNF-\alpha$ ($P=0/083$) و $IL-6$ ($P=0/17$) در گروه وابسته به فنتانیل، وجود التهاب دستگاه گوارش را در پاسخ به قرارگیری در معرض اپیوئید تأیید کرد. کنترل التهاب دستگاه گوارش در نتیجه گواژ فکالی باکتریوم مشاهده شد ($P=0/004$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه رابطه بین سوءمصرف فنتانیل، باکتری‌های دستگاه گوارش و التهاب را نشان داد. تغییرات در گونه‌های خاص باکتری ممکن است به افزایش التهاب دستگاه گوارش منجر شود و با اصلاح جمعیت میکروبیوتای دستگاه گوارش می‌توان استراتژی‌های کارآمدی را برای کنترل موثرتر اثرات ناشی از سوءمصرف فنتانیل و همچنین سایر اپیوئیدها را پیشنهاد کرد.

واژگان کلیدی: فکالی باکتریوم، اپیوئید سنتتیک، فنتانیل، میکروبیوتا، التهاب.

مقدمه

اعتیاد به مواد مخدر یکی از عوامل مهم مرگ و میر قابل اجتناب در سطح جهانی است. امروزه، یکی از بحران‌های قابل توجه مرتبط با سوءمصرف مواد مخدر در سراسر جهان به

وسيله فنتانيل به عنوان يك اپيوئيد كاملاً سنتتیک مطرح است (۱). اثرات مخرب فنتانيل از ۵۰ تا ۱۰۰ برابر انواع اپيوئيدهای تجویزی مانند مرفین متغیر است (۲). با وجود اینکه چندین اپيوئيد سنتتیک دیگر نیز وجود دارد، از سال ۲۰۱۶، اکثر موارد اوردوز مرتبط با اپيوئيدهای سنتتیک شامل فنتانيل بوده است (۱). با وجود نقش این اپيوئيد سنتتیک در اپیدمی، فنتانيل هنوز یکی از پرکاربردترین مسکن‌ها در عرصه پزشکی است و معمولاً برای مدیریت دردهای شدید تجویز

آدرس نویسنده مسئول: تهران، خیابان جمهوری، خیابان دوازدهم فروردین، انستیتو پاستور ایران، سید

داور سیادت (email: d.siadat@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-6892-5603

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰

می‌شود، به ویژه زمانی که سایر مسکن‌ها ناکام بوده‌اند (۳). توجه و تأکید بر روند رو به رشد مرگ و میرهای مرتبط با سوءمصرف انواع اپیوئیدها حائز اهمیت بسیاری است، چراکه افزایش اخیر عمدتاً ناشی از مصرف فنتانیل گزارش شده است (۴). در این راستا، بررسی مکانیسم‌های مرتبط با اثرات ناشی از سوءمصرف و اعتیاد به فنتانیل، از اهمیت بالایی برخوردار است (۵). یافته‌های تحقیقات نشان داده‌اند که فنتانیل یک ماده به شدت اعتیادآور است که وابستگی جسمی و روانی را سریع القا می‌کند (۶). این اثرات، آسیب‌پذیری نسبت به سوءمصرف آن را افزایش می‌دهد. سندرم وابستگی شامل نشانه‌های شناختی، رفتاری و فیزیولوژیکی ناشی از مصرف مکرر مواد است که معمولاً با تمایل شدید به مصرف دارو، دشواری در تنظیم مصرف آن و استفاده مداوم با وجود عواقب منفی و مخرب مشخص می‌شود (۷). تعریف رویکردهای درمان اعتیاد، با وجود نیاز فوری به مداخلات جدید و مؤثرتر برای مبارزه با اعتیاد به فنتانیل، با چالش‌های قابل توجهی مواجه است (۸).

بدن انسان از طریق تعامل با گیرنده‌های مختلف اپیوئیدی، که به ویژه در سیستم عصبی دستگاه گوارش شایع هستند، تحت تأثیر اپیوئیدها قرار می‌گیرد (۹). این گیرنده‌ها شامل گیرنده اپیوئید دلتا (DOP)، گیرنده نوکسی‌سپتین/اورفانین (NOP)، گیرنده اپیوئید کاپا (KOP) و گیرنده اپیوئید مو (MOP) هستند (۱۰). گیرنده‌های مختلف اپیوئیدی می‌توانند توسط فنتانیل به عنوان یک لیگاند اپیوئید خارجی تحریک شوند (۳). این گیرنده‌ها در انواع مختلف سلول‌ها، از جمله سلول‌های سیستم عصبی دستگاه گوارش (ENS) و سلول‌های سیستم ایمنی بیان می‌شوند (۱۱). بنابراین، سیستم‌های گوارشی و ایمنی تحت تأثیر سوءمصرف فنتانیل تا حدود زیادی دچار اختلال در عملکرد می‌شوند. علاوه بر این، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد میکروبیوتای دستگاه گوارش، به طور فعال در فرآیندهای میزبانی در دستگاه گوارش و سیستم ایمنی نقش دارد. در حال حاضر، به طور گسترده‌ای پذیرفته شده است که میکروبیوتای دستگاه گوارش نقشی حیاتی در حفظ سلامتی و پیشگیری از بیماری‌ها دارد، به طوری که اختلال در ترکیب نرمال جمعیت میکروبیوتا یا دیسبیوز ناشی از تغییرات در ترکیب آن، ممکن است به اختلالات و پیشرفت بیماری‌های مختلف منجر شود (۱۲). میکروبیوتای دستگاه گوارش با تنظیم یکپارچگی سد گوارشی، متابولیسم مواد غذایی، جلوگیری از کلونیزاسیون پاتوژن‌ها، تنظیم متابولیسم و هماهنگی پاسخ‌های سیستم ایمنی

نقش‌های مفیدی ایفا می‌کنند (۱۳، ۱۴). جالب اینجاست که مطالعات نشان داده‌اند که بین میکروبیوتای گوارشی و سوءمصرف اپیوئیدها یک تعامل متقابل وجود دارد که توسط عوامل سیستم ایمنی میانجی‌گری می‌شود (۱۲).

فنتانیل که به عنوان یک اپیوئید در نظر گرفته می‌شود، مسیرهای سیستم ایمنی و متابولیسمی مختلفی را تحریک می‌کند و ممکن است بر ضخامت غشای مخاطی، حرکات روده‌ای و یکپارچگی سلول‌های اپیتلیال تأثیر بگذارد (۱۵). ارتباط بین سوءمصرف اپیوئید و برخی اختلالات گوارشی توسط چندین مطالعه تحقیقاتی تأیید شده است (۱۶، ۱۷). بنابراین، ممکن است مصرف فنتانیل منجر به تغییرات در جمعیت میکروبیوتای دستگاه گوارشی شود. با این حال، ماهیت دقیق و اهمیت تغییرات در میکروبیوتای دستگاه گوارش در زمینه اختلالات گوارشی مرتبط با سوءمصرف فنتانیل هنوز روشن نیست. از این رو، هدف اصلی این تحقیق، ارزیابی تأثیر فکالی‌باکتریوم بر اصلاح جمعیت میکروبیوتای دستگاه گوارش و کنترل اثرات ناشی از سوءمصرف فنتانیل و مسیرهای التهابی در دستگاه گوارش است، تا درک جامع‌تری از پدیده‌های مذکور ارائه شود.

مواد و روشها

آماده‌سازی باکتری

سویه فکالی‌باکتریوم پرسنیتیژی (A2-165) از بخش سل و تحقیقات ریوی انسیتو پاستور ایران تهیه شد. باکتری در شرایط استاندارد کشت داده شد تا برای مطالعه فاز حیوانی آماده شود. کشت فکالی‌باکتریوم در محیط BHI agar به مدت ۴-۷ روز با انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی (۸۰ درصد N₂، ۱۰ درصد H₂ و ۱۰ درصد CO₂) صورت گرفت، تا کلنی‌های مربوطه در سطح محیط ظاهر گردند. در ضمن به صورت متوالی کشت‌های بی‌هوازی با عدم رشد در شرایط هوازی هم مورد تأیید قرار گرفتند. تأیید خلوص کشت با رنگ‌آمیزی گرم و تست PCR انجام گرفت. در ادامه، باکتری مذکور به صورت متوالی کشت داده شد تا در فاز لگاریتمی رشد (OD₆₀₀ برابر ۱ ~) برای آماده‌سازی غلظت مورد نیاز باکتری (CFU ۱۰^۹) بر اساس روش مک‌فارلند برای گاوژ در فاز حیوانی مطالعه تهیه گردد.

حیوانات آزمایشگاهی

چهل سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن بین ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم از موسسه پاستور ایران تهیه و در

قفس‌های پلکسی‌گلاس قرار داده شدند. حداکثر ظرفیت هر قفس چهار سر موش بود. موش‌ها به آب و غذا دسترسی نامحدود داشتند و قفس‌ها در شرایطی با چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 55 ± 5 درصد تنظیم شده بود (۱۸). روش‌های انجام آزمایش توسط کمیته تحقیق و اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (IR TUMS.AEC.1402.115) تأیید شد و مطابق با دستورالعمل‌های موجود در راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مؤسسات ملی بهداشت انجام شد.

ایجاد مدل موش بزرگ آزمایشگاهی وابسته به فنتانیل

آزمایش‌ها با فنتانیل تهیه شده از شرکت تحقیقاتی و مهندسی توفیق دارو در تهران، ایران انجام شد. پس از یک دوره سازگاری یک هفته‌ای، موش‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه شامل یک گروه تحت درمان با فنتانیل با گاوآژ فکالی باکتریوم، یک گروه تحت درمان با فنتانیل بدون گاوآژ فکالی باکتریوم، یک گروه کنترل با گاوآژ فکالی باکتریوم و گروه دیگر به‌عنوان کنترل بدون گاوآژ فکالی باکتریوم، تقسیم شدند. هر گروه متشکل از ۱۰ سر موش بود. طراحی آزمایش به منظور ارزیابی تأثیر فکالی باکتریوم و تجویز فنتانیل بر ترکیب جمعیت میکروبیوتا و پاسخ‌های التهابی در موش‌ها انجام گرفت. فنتانیل در محلول سالین استریل حل شده و از طریق تزریق داخل صفاقی به گروه‌های وابسته به فنتانیل برای یک دوره متوالی ۱۰ روزه ارائه گردید. برنامه دوزبندی شامل افزایش تدریجی ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم در روز به ازای هر کیلوگرم وزن بدن هر موش بود. گروه‌های کنترل هم مقادیر معادل سالین را از طریق تزریق داخل صفاقی به صورت روزانه در همان مدت، دریافت کردند (۱۹).

جمع‌آوری نمونه‌های مدفوع و استخراج DNA

نمونه‌های مدفوع از گروه‌های وابسته به فنتانیل و کنترل در میکروتیوپ‌هایی برای استخراج DNA جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها بلافاصله روی یخ منجمد شده و سپس در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند تا پردازش‌های بعدی انجام شود. استخراج DNA از مدفوع با استفاده از کیت کیاژن (QIAamp) استخراج DNA Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA, USA) انجام شد. طبق دستورالعمل شرکت تولیدکننده، ۰٫۲ گرم از نمونه‌های مدفوع برای استخراج DNA استفاده شد. الکتروفورز ژل به همراه خوانش غلظت با نانودراپ (Nanodrop ND-1000; Technologies) برای ارزیابی کیفیت و غلظت DNA استخراج‌شده به کار رفت. تمام نمونه‌های DNA به‌دست آمده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند (۲۰).

انجام Real-time PCR مطلق برای شناسایی فراوانی میکروبیوتا

Real-time PCR مطلق برای کمی‌سازی فراوانی گونه‌های باکتریایی مختلف در نمونه‌های مدفوع استفاده شد. انتخاب باکتری‌ها مثل لاکتوباسیلوس، فکالی باکتریوم، باکترئیدس و کلسترییدیوم بر اساس اطلاعات موجود در پایگاه‌های داده میکروبیوتامانتند Microbiomology (<http://db.microbiomology.org/browse>) و Disbiome (<https://disbiome.ugent.be/>) و همچنین مطالعات قبلی انجام شد. خصوصیات پرایمرهای هر ارگانیزم برای ژن SrRNA 16 در جدول ۱ مشخص شده است. تکنیک Real-time PCR مطلق با استفاده از دستگاه Roche LightCycler® 96 (Roche, Switzerland) انجام شد. هر واکنش شامل حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر متشکل از ۸ میکرولیتر آب مقطر، ۱۰ میکرولیتر ماستر میکس سایر گرین (تاکارا، ژاپن)، ۰٫۵ میکرولیتر پرایمرهای فوروارد و ریورس و ۱ میکرولیتر DNA الگو بود. فرآیند تکثیر شامل ۴۰ چرخه دناتوراسیون، آنیلینگ و اکستنشن بود. مرحله دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، به‌دنبال آن آنیلینگ در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و اکستنشن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. فراوانی باکتریایی از طریق تهیه رقت‌های ۱۰ برابری از استخراج‌های DNA از سویه‌های استاندارد Escherichia coli و محاسبه غلظت‌های DNA برای هر باکتری از نمونه‌های مدفوع با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد (۲۱).

جدول ۱. خصوصیات پرایمرهای 16S rRNA اختصاصی استفاده شده برای شناسایی جمعیت میکروبیوتا با استفاده از تکنیک Real-time PCR مطلق

اندازه آمپلیکون (bp)	توالی پرایمر	باکتری
۲۴۸	F- GGAGGAAGAAGGTCTTCGG R- AATTCGCCCTACCTCTGCACT	فکالی باکتریوم
۳۴۱	F- AGCAGTAGGGAATCTTCCA R- CACCGCTACACATGGAG	لاکتوباسیلوس
۱۱۷	F- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R- GTCATCGTGCACACAGAATTGCTG	باکترئیدس
۱۵۷	F- TTGAGCGATTACTTCGGTAAAGA R- CCATCCTGTACTGGCTCACT	کلسترییدیوم

شناسایی سیتوکین‌های التهابی با تجزیه و تحلیل Real-time PCR

برای شناسایی سطح بیان سیتوکین‌های التهابی (TNF- α ، IL-1 β و IL-6) در دستگاه گوارش، موش‌های بیهوش شده سر

یافته‌ها

تأثیر فکالی‌باکتریوم بر ترکیب میکروبیوتای دستگاه گوارش در سوءمصرف فنتانیل

برای تعیین ارتباط بین تغییرات الگوی میکروبیوتای دستگاه گوارش در سطح جنس (لاکتوباسیلوس، فکالی‌باکتریوم، باکترئیدس و کلسترییدیوم) با سوءمصرف فنتانیل، از تکنیک Real-time PCR مطلق استفاده شد. فراوانی باکتری‌های مقایسه شده در گروه‌های وابسته به فنتانیل و کنترل (همراه و بدون گاوژ فکالی‌باکتریوم) در جدول ۳ و شکل ۱ ارائه شده است. نتایج نشان دادند که فراوانی کلسترییدیوم ($P=0/69$) و باکترئیدس ($P=0/04$) در گروه کنترل وابسته به فنتانیل افزایش یافته است. در مقابل، کاهش فراوانی فکالی‌باکتریوم ($P=0/149$) و لاکتوباسیلوس ($P=0/44$) در گروه کنترل وابسته به فنتانیل مشاهده شد. با گاوژ فکالی‌باکتریوم در مدل موش وابسته به فنتانیل، فراوانی جنس‌های فکالی‌باکتریوم ($P=0/074$) و لاکتوباسیلوس ($P=0/165$) افزایش یافته و کاهش فراوانی کلسترییدیوم ($P=0/166$) و باکترئیدس ($P=0/13$) مشاهده شد.

تأثیر سوءمصرف فنتانیل بر واکنش‌های التهابی دستگاه گوارش

دستگاه گوارش موش‌ها برای بررسی سطح بیان ژن‌های IL-1 β ، TNF- α و IL-6 با استفاده از تکنیک Real-time PCR نسبی مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت بیان ژن‌های TNF- α ، IL-1 β و IL-6 در گروه وابسته به فنتانیل در مقایسه با گروه کنترل سالم و گروه وابسته به فنتانیل با گاوژ فکالی‌باکتریوم در مقایسه با گروه وابسته به فنتانیل بدون گاوژ فکالی‌باکتریوم در شکل ۲ به نمایش گذاشته شده است. در مقایسه با گروه کنترل سالین، موش‌های وابسته به فنتانیل سطوح بالاتری از بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی IL-1 β ($P=0/01$)، TNF- α ($P=0/083$) و IL-6 ($P=0/17$) را نشان دادند. گاوژ فکالی‌باکتریوم در موش‌های وابسته به فنتانیل در مقایسه با گاوژ این باکتری در گروه کنترل سالین باعث کاهش معنی‌داری در بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی IL-1 β ($P=0/01$)، TNF- α ($P=0/047$) و IL-6 ($P=0/02$) شد.

بریده شده و با افزودن سالین نرمال بافت روده هموزن شد. استخراج RNA از ۲۰ تا ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های هموزن شده دستگاه گوارش با استفاده از تریزول (Thermo Fisher Scientific, Inc.) انجام شد. سپس برای تولید DNA مکمل (cDNA) با استفاده از نمونه‌های RNA استخراج شده، یک واکنش ترانسکریپشن معکوس (RT) انجام شد. تجزیه و تحلیل Real-time PCR نسبی برای ارزیابی سطح بیان TNF- α ، IL-1 β و IL-6 در دستگاه گوارش موش‌ها با استفاده از cDNA به دست آمده، انجام شد (۲۲). پرایمرهای PCR با استفاده از نرم‌افزار آنالیز پرایمر اولیگو نسخه ۷،۶۰ (Molecular Biology Insights, Inc., Colorado Springs, CO) طراحی شده و در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲. خصوصیات پرایمرهای ژن‌های TNF- α ، IL-1 β و IL-6 برای شناسایی فاکتورهای التهابی با استفاده از تکنیک Real-time PCR نسبی

اندازه آمپلیکون (bp)	توالی پرایمر	ژن
۲۷۱	F- AAATGGGCTCCCTTCATCAGTTC R- TCTGCTGGTGGTTTGCTACGAC	TNF- α
۲۷۶	F- CACCTCTCAAGCAGAGCACAG R- GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	IL-1 β
۱۶۸	F- TCCTACCCCAACTCCAATGCTC R- TTGGATGGTCTTGGTCCCTAGCC	IL-6
۴۵۳	F- TGGTATCGTGAAGGACTCATGAC R- ATGCCAGTGAGCTTCCCCTCAGC	gapdh

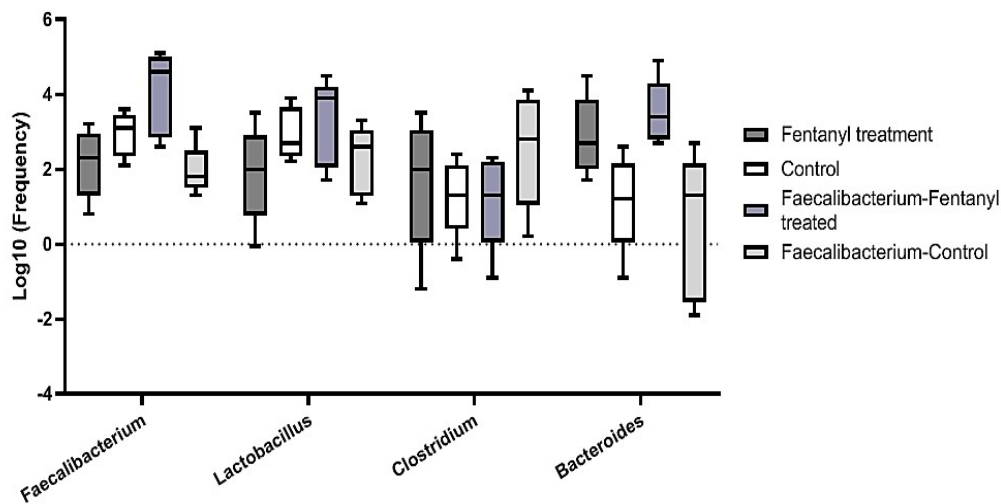
بررسی آماری

برای کمی‌سازی فراوانی جمعیت میکروبیوتا در نمونه‌های مدفوع، یک سری رقیق‌سازی استاندارد از یک نمونه استاندارد برای هر بار واکنش Real-time PCR مطلق ضروری بود. چرخه‌ای که در آن فلورسانس نمونه از یک آستانه از پیش تعیین شده عبور کرد به عنوان Cq علامت‌گذاری شد و به عنوان منحنی استاندارد مشخص شد. نمونه‌ها با تکرار دوتایی در چاهک‌ها ریخته شدند و میانگین آن‌ها برای تحلیل داده‌ها استفاده شد. برای تصویرسازی نتایج داده‌ها، تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و GraphPad Prism v.6 نسخه ۲۶ انجام شد. نتایج به صورت Median \pm Interquartile Rang بیان شد و معنی‌داری آماری با P -value کمتر از ۰/۰۵ تعیین شد.

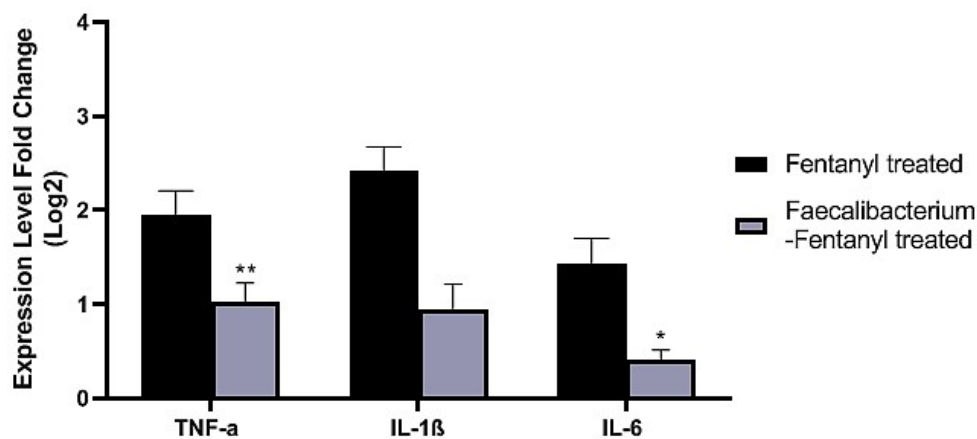
جدول ۳. مقادیر (Median±Interquartile Rang) باکتری‌های مقایسه شده در گروه‌های وابسته به فنتانیل و کنترل (همراه و بدون گاواژ فکالی باکتریوم)

<i>P-value</i>	گروه کنترل بدون گاواژ فکالی باکتریوم	گروه وابسته به فنتانیل بدون گاواژ فکالی باکتریوم	گروه کنترل با گاواژ فکالی باکتریوم	گروه وابسته به فنتانیل با گاواژ فکالی باکتریوم	باکتری
۰/۱۸۷۴۴۳	۳۸۵۵/۱۸±۱۲۵۸/۹۲۵	۱۵۷۸/۵۸۳±۱۹۹/۵۲۶۲	۱۲۳۸/۹۷۲±۶۳/۰۹۵۷۳	۱۲۵۴۹۴/۴±۳۹۸۱/۷۲	فکالی باکتریوم CFU** (×10 ⁵)
۰/۳۵۰۸۷۸	۷۷۸۴/۷۹۳±۵۰۱/۱۸۷۲	۳۱۶۱/۴۰۷± ۱۰۰	۱۹۸۲/۹۵۹±۳۹۸/۱۰۷۲	۳۱۵۷۲/۶۶±۷۹۴۳/۲۸۲	لاکتوباسیلوس CFU** (×10 ³)
۰/۳۰۸۵۶۲	۲۵۰/۷۹۰±۱۹/۹۵۳۶۵	۳۱۶۲/۲۱۵± ۱۰۰	۱۲۵۸۷/۶۷±۶۳/۰۹۵۷۳	۱۹۹/۴۰۰± ۱۹/۹۵۲۶۲	کلستریدیوم CFU** (×10 ⁵)
۰/۳۱۲۵۸۹	۳۹۷/۹۸۱±۱۵/۸۴۸۹۳	۳۱۵۷۲/۶۶±۵۰۱/۱۸۷۲	۵۰۱/۱۷۴±۲۹/۹۵۲۶۲	۷۸۹۳۱/۶۳±۲۵۱/۸۸۶	باکترئیدس CFU** (×10 ⁵)

** Colony-forming unit



شکل ۱. فراوانی باکتری‌های مورد بررسی (فکالی باکتریوم، لاکتوباسیلوس، کلستریدیوم و باکترئیدس) در گروه‌های وابسته به فنتانیل بدون گاواژ فکالی باکتریوم، وابسته به فنتانیل با گاواژ فکالی باکتریوم، کنترل بدون گاواژ فکالی باکتریوم و کنترل با گاواژ فکالی باکتریوم



شکل ۲. تفاوت بیان ژن‌های *TNF-α*، *IL-1β* و *IL-6* در گروه وابسته به فنتانیل در مقایسه با گروه کنترل سالم و گروه وابسته به فنتانیل با گاواژ فکالی باکتریوم در مقایسه با گروه وابسته به فنتانیل بدون گاواژ فکالی باکتریوم؛ $P < ۰/۰۱$.

بحث

یافته‌های مطالعه حاضر تغییراتی در ترکیب میکروبیوتای دستگاه گوارش و واکنش‌های التهابی در روده‌ها پس از سوءمصرف فنتانیل در مدل موش بزرگ آزمایشگاهی وابسته به فنتانیل در مقایسه با گروه کنترل را نشان داد. فراوانی بالاتر کلاستریدیوم ($P=0/69$) و باکترئیدس ($P=0/04$) و فراوانی کمتر فکالی‌باکتریوم ($P=0/149$) و لاکتوباسیلوس ($P=0/44$) در گروه وابسته به فنتانیل مشاهده شد. علاوه بر این، گاوژ فکالی‌باکتریوم در ارتباط با افزایش فراوانی فکالی‌باکتریوم ($P=0/074$) و لاکتوباسیلوس ($P=0/165$) در گروه وابسته به فنتانیل است. از طرفی، افزایش بیان سیتوکاین‌های التهابی به ویژه IL-1 β ($P=0/01$)، TNF- α ($P=0/083$) و IL-6 ($P=0/17$) در گروه وابسته به فنتانیل، شواهد بیشتری از التهاب دستگاه گوارش در پاسخ به مواجهه با اپیوئیدها را فراهم می‌آورد. گاوژ فکالی‌باکتریوم به طور معنی داری بیان این سیتوکاین‌های التهابی (IL-1 β) ($P=0/01$)، TNF- α ($P=0/047$) و IL-6 ($P=0/02$) را در گروه وابسته به فنتانیل کاهش داده است. این نتایج با مطالعات قبلی حیوانی و انسانی که تغییرات مشابهی در ترکیب میکروبیوتای دستگاه گوارش و واکنش‌های التهابی پس از مصرف اپیوئیدها را نشان داده‌اند، هم‌راستا است (۲۳-۲۵). تغییرات مشاهده شده در ترکیب میکروبیوتای دستگاه گوارش، به‌ویژه افزایش کلاستریدیوم و باکترئیدس و کاهش فکالی‌باکتریوم و لاکتوباسیلوس، می‌تواند به اختلال در پاسخ‌های سیستم ایمنی و فرآیندهای التهابی در دستگاه گوارش کمک کند (۲۶). در مقابل به نظر می‌رسد اصلاح ترکیب جمعیت میکروبیوتا در مدل موش وابسته به فنتانیل بسته به تجویز فکالی‌باکتریوم از طریق گاوژ تغییر می‌کند. در حالی که نتایج مشخصی از مطالعات در مورد این موضوع به تفصیل ذکر نشده است، ولی دیده شده است که فراوانی فکالی‌باکتریوم اثرات مفیدی بر سلامت دستگاه گوارش دارد و ممکن است با تعدیل میکروبیوتای دستگاه گوارش بر شدت وابستگی به مواد اپیوئیدی تأثیر بگذارد (۲۷). بنابراین، در مدل موشی وابسته به فنتانیل، قابل قبول است که گاوژ فکالی‌باکتریوم می‌تواند منجر به افزایش فراوانی این ارگانیزم شود که به طور بالقوه برخی از اثرات منفی مرتبط با وابستگی به مواد اپیوئیدی را کاهش می‌دهد.

گونه‌های فکالی‌باکتریوم و لاکتوباسیلوس، به‌عنوان تقویت‌کننده‌های سطح سلول‌های T کمکی و کاهش‌دهنده‌های التهاب شناخته شده‌اند (۲۸، ۲۹).

لاکتوباسیلوس رامنوسوس به عنوان یک باکتری تولیدکننده بوتیرات، نقش مهمی در القای التهاب دارد (۳۰). بوتیرات، یک اسید چرب زنجیره کوتاه است که اثرات حفاظتی در برابر واکنش‌های التهابی دارد و برای سلامت دستگاه گوارش ضروری است (۳۱). افراد مبتلا به سوءمصرف اپیوئیدها سطوح پایین‌تری از فکالی‌باکتریوم را در ترکیب میکروبیوتای دستگاه گوارش خود دارند که با افزایش التهاب در بدن مرتبط است (۳۲). این عدم تعادل در باکتری‌های دستگاه گوارش ممکن است به التهاب مزمن مشاهده شده در سوءمصرف فنتانیل کمک کند و منجر به عوارض مختلف سلامتی گردد. مطالعاتی نیز کاهش گونه‌های لاکتوباسیلوس را در سوءمصرف اپیوئیدها نشان داده‌اند (۹). لاکتوباسیلوس‌ها به خاطر خواص ضد التهابی و توانایی تنظیم پاسخ‌های سیستم ایمنی شناخته شده است (۳۳). بنابراین، کاهش فراوانی لاکتوباسیلوس در موارد سوءمصرف فنتانیل ممکن است، منجر به افزایش پاسخ‌های التهابی از طریق تنظیم تولید سیتوکین‌ها و حفظ یکپارچگی سد دستگاه گوارش شود. این دیسبوز ممکن است عوارض منفی ناشی از سوءمصرف فنتانیل بر بدن را تشدید کند و اهمیت حفظ یک جمعیت میکروبیوتای دستگاه گوارش سالم را در افراد با سابقه سوءمصرف مواد تأکید کند. گاوژ با فکالی‌باکتریوم مستقیماً این باکتری‌های مفید را وارد دستگاه گوارش می‌کند که منجر به افزایش جمعیت آن‌ها می‌شود (۳۴). به طور مشابه، فراوانی لاکتوباسیلوس در مدل موش وابسته به فنتانیل به دنبال گاوژ فکالی‌باکتریوم افزایش یافته است. این تغییرات به دلیل اثرات مثبت بالقوه پروبیوتیک‌هایی مانند فکالی‌باکتریوم بر میکروبیوتای دستگاه گوارش است که می‌تواند به طور غیرمستقیم از رشد سویه‌های مفید لاکتوباسیلوس حمایت کرده و سلامت دستگاه گوارش را در طول وابستگی به مواد افیونی بهبود بخشد.

در مقابل، فراوانی بیشتر کلاستریدیوم در سوءمصرف‌کنندگان مواد اپیوئیدی به واکنش‌های التهابی افزایش‌یافته ناشی از تولید توکسین مرتبط شده است (۳۵). علاوه بر این، کلاستریدیوم توانایی افزایش تکثیر سایر باکتری‌های مضر را نیز دارد که در نتیجه پاسخ‌های التهابی را تشدید می‌کند (۳۶). بنابراین، این روند می‌تواند به یک سیستم ایمنی نامتعادل و التهاب پایدار منجر شود که ممکن است، عوارض منفی ناشی از سوءمصرف فنتانیل بر بدن را تشدید کند. از طرفی، تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که فراوانی باکترئیدس در افراد درگیر با سوءمصرف اپیوئید افزایش یافته است (۳۷). این باکتری خاص قادر به تولید توکسین‌هایی است که می‌تواند با

فعال‌سازی مسیر NF- κ B واکنش‌های التهابی را آغاز کند (۳۸). مسیر NF- κ B نقش مهمی در تنظیم واکنش‌های سیستم ایمنی و التهابی دارد. بنابراین، ارتباط بین فراوانی باکتریوئیدس و واکنش‌های التهابی در سوءمصرف فنتانیل می‌تواند به طور قابل توجهی به بروز عوارض مضر برای سلامتی منجر شود. از طرفی، می‌توان انتظار داشت که اثر گاوژ فکالی باکتریوم بر فراوانی کلاستریدیوم و باکتریوئیدس در مدل موش وابسته به فنتانیل منجر به کاهش جمعیت این ارگانیسم‌ها به دلیل مدولاسیون مثبت میکروبیوتای دستگاه گوارش شود. با این حال، پاسخ‌های فردی ممکن است بر اساس شرایط آزمایشی و ترکیب کلی میکروبیوتا متفاوت باشد (۳۹). تحقیقات بیشتری برای درک جامع‌تر و بهتر مکانیسم‌هایی که زیرساخت این ارتباطات را می‌سازند و ارزیابی مداخلات درمانی بالقوه برای تنظیم التهاب در موارد سوءمصرف فنتانیل ضروری است. به طور کلی، ارتباط بین ترکیب جمعیت میکروبیوتا و واکنش‌های التهابی، بر اهمیت حفظ تعادل سالم جمعیت میکروبیوتای دستگاه گوارش برای سلامت کلی و عملکرد سیستم ایمنی در دستگاه گوارش تأکید می‌کند.

درک مکانیسم‌های دقیق از طریق تغییر در ترکیب میکروبیوتای دستگاه گوارش که منجر به التهاب دستگاه گوارش پس از مصرف مواد اپیوئیدی می‌شود، می‌تواند بینش‌های جدیدی در پاتوژنز اختلالات گوارشی مرتبط با اپیوئیدها را ارائه دهد و راهکاری احتمالی برای استراتژی‌های درمانی نوآورانه برای مدیریت اعتیاد به اپیوئید باشد (۴۰). تحقیقات دیگری برای مطالعه مکانیسم‌های بنیادی که ترکیب جمعیت میکروبیوتای دستگاه گوارش بر واکنش‌های التهابی در زمینه مصرف اپیوئیدها تأثیر می‌گذارد، با هدف اصلی طراحی اقدامات هدفمند برای کاهش مشکلات گوارشی ناشی از اپیوئیدها ضروری است. انجام مطالعاتی با ترکیبی از روش‌های مولکولی و ایمونولوژیکی و بررسی ترکیب بیشتری از جمعیت‌های میکروبیوتا در گروه‌های بزرگ‌تر حیوانات آزمایشگاهی می‌تواند در جهت تایید نتایج کارآمدتر باشد. به طور کلی، مطالعه حاضر به دانش کنونی افزوده و تعامل پیچیده بین مصرف پروبیوتیک، سوءمصرف فنتانیل، تغییرات در ترکیب میکروبیوتای دستگاه گوارش و التهاب دستگاه گوارش را برجسته می‌کند. این یافته‌ها به ضرورت توجه به

تأثیر مصرف اپیوئیدها بر سلامت دستگاه گوارش و واکنش‌های ایمنی تأکید می‌کند، زیرا اختلالات در این حوزه‌ها ممکن است به آغاز التهاب سیستمیک در افراد وابسته به اپیوئید کمک کند. لازم است تحقیقات آتی به بررسی تأثیرات مستقیم فنتانیل بر جمعیت‌های خاص باکتریایی دستگاه گوارش و مسیرهای التهابی تمرکز کنند و همچنین استراتژی‌های بالقوه برای تنظیم میکروبیوتای دستگاه گوارش و پاسخ‌های سیستم ایمنی در زمینه اعتیاد به اپیوئیدها را بررسی کنند. با روشن کردن مکانیسم‌های زیرساختی که تغییرات در سلامت دستگاه گوارش ناشی از اپیوئیدها را پیش می‌برد، می‌توان رویکردهای متناسبی برای پیشگیری یا کاهش التهاب و در نتیجه عوارض گوارشی مرتبط با مصرف طولانی‌مدت اپیوئیدها را طراحی کرد. این استراتژی جامع، پتانسیل بهبود سلامت کلی و نتایج درمانی افراد در حال مبارزه با اعتیاد به اپیوئیدها را می‌تواند داشته باشد.

مطالعه حاضر بینش‌هایی درباره تعامل پیچیده بین مصرف پروبیوتیک فکالی باکتریوم، سوءمصرف فنتانیل، ترکیب میکروبیوتای دستگاه گوارش و التهاب را ارائه می‌دهد. تغییرات مشاهده شده در میکروبیوتای دستگاه گوارش، به‌ویژه در سطح جنس‌های خاص باکتریایی مانند کلاستریدیوم و باکتریوئیدس، نشان‌دهنده یک ارتباط ممکن با واکنش‌های التهابی افزایش‌یافته در دستگاه گوارش متعاقب سوءمصرف مواد اپیوئیدی است. استفاده از پروبیوتیک‌هایی مانند فکالی باکتریوم با ایجاد تعادل در جمعیت میکروبیوتای دستگاه گوارش می‌تواند به طور کارآمدی التهابات دستگاه گوارش و در نتیجه عوارض ناشی از سوءمصرف مواد اپیوئیدی را کاهش دهد. تحقیقات بیشتری برای درک جامع مکانیسم‌های این ارتباطات و بررسی استراتژی‌های درمانی بالقوه با هدف بازگرداندن تعادل میکروبیوتای دستگاه گوارش در افراد وابسته به اپیوئیدها ضروری است. با مشخص کردن نقش میکروبیوتای دستگاه گوارش در التهاب ناشی از اپیوئیدها، امکان شناسایی اهداف جدید برای درمان و بهبود نتایج برای افرادی که درگیر اختلال مصرف اپیوئید هستند، وجود دارد. به طور کلی، نتایج این مطالعه به شواهد در حال گسترش از اهمیت سلامت دستگاه گوارش در زمینه اعتیاد به اپیوئیدها، افزوده شده و ضرورت ایجاد یک رویکرد جامع برای رسیدگی به مشکلات دستگاه گوارش در این گروه را تأکید می‌کند.

REFERENCES

1. Stanley TH. The fentanyl story. *J Pain* 2014;15:1215-26.
2. Comer SD, Cahill CM. Fentanyl: Receptor pharmacology, abuse potential, and implications for treatment. *Neurosci Biobehav Rev* 2019;106:49-57.
3. Karunarathna I. Fentanyl: clinical applications and pharmacological considerations. *Uva Clinical Lab*. Retrieved from Fentanyl: clinical applications and pharmacological considerations, 2024. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Indunil-Karunarathna/publication/380270478_Fentanyl_Clinical_Applications_and_Pharmacological_Considerations/links/6633808d7091b94e93ea9108/Fentanyl-Clinical-Applications-and-Pharmacological-Considerations.pdf.
4. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). Key substance use and mental health indicators in the United States :results from the 2019 National Survey on Drug Use and Health. 2020. Available from: <https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/reports/rpt29393/2019NSDUHFFRPDFWHTML/2019NSDUHFFRPDFW090120.pdf>
5. Han Y, Cao L, Yuan K, Shi J, Yan W, Lu L. Unique pharmacology, brain dysfunction, and therapeutic advancements for fentanyl misuse and abuse. *Neurosci Bull* 2022;38:1365-8.
6. Gold MS, Melker RJ, Dennis DM, Morey TE, Bajpai LK, Pomm R, et al. Fentanyl abuse and dependence: further evidence for second hand exposure hypothesis. *J Addict Dis* 2006;25:15-21
7. Towers EB, Setaro B, Lynch WJ. Sex-and dose-dependent differences in the development of an addiction-like phenotype following extended-access fentanyl self-administration. *Front Pharmacol* 2022;13:841873.
8. Kuczyńska K, Grzonkowski P, Kacprzak Ł, Zawilska JB. Abuse of fentanyl: An emerging problem to face. *Forensic Sci Int* 2018;289:207-14.
9. Rueda-Ruzafa L, Cruz F, Cardona D, Hone AJ, Molina-Torres G, Sánchez-Labraca N, et al. Opioid system influences gut-brain axis: dysbiosis and related alterations. *Pharmacol Res* 2020;159:104928.
10. Che T, Roth BL. Molecular basis of opioid receptor signaling. *Cell* 2023;186:5203-19.
11. García-Domínguez M. Enkephalins and pain modulation: mechanisms of action and therapeutic perspectives. *Biomolecules* 2024;14:926.
12. Jalodia R, Abu YF, Oppenheimer MR, Herlihy B, Meng J, Chupikova I, et al. Opioid use, gut dysbiosis, inflammation, and the nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 2022:1-18.
13. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology: World J Gastroenterol* 2015;21:8787-803.
14. McCallum G, Tropini C. The gut microbiota and its biogeography. *Nat Rev Microbiol* 2024;22:105-18.
15. Muchhala KH, Kallurkar PS, Kang M, Koseli E, Poklis JL, Xu Q, et al. The role of morphine-and fentanyl-induced impairment of intestinal epithelial antibacterial activity in dysbiosis and its impact on the microbiota-gut-brain axis. *FASEB J* 2024;38:e23603.
16. Wang F, Meng J, Zhang L, Johnson T, Chen C, Roy S. Morphine induces changes in the gut microbiome and metabolome in a morphine dependence model. *Sci Rep* 2018;8:3596.
17. Szigethy E, Knisely M, Drossman D. Opioid misuse in gastroenterology and non-opioid management of abdominal pain. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;15:168-80.
18. Tavares ALdF, Reginato A, Neves M, Pradal Lda, Leal TSdS, Ribeiro LdFC, et al. Analysis of wistar rats submitted to a gout model, treated with double cryotherapy protocol. *Ther Hypothermia Temp Manag* 2022;12:30-7.
19. Rêgo DdsB, Silva CS, Mello LEA, Leslie ATFS. Early life nociceptive stimulus and fentanyl exposure increase hippocampal neurogenesis and anxiety but do not affect spatial learning and memory. *Front Neurosci* 2022;16:988096.
20. Jones J, Reinke SN, Ali A, Palmer DJ, Christophersen CT. Fecal sample collection methods and time of day impact microbiome composition and short chain fatty acid concentrations. *Sci Rep* 2021;11:13964.
21. Karakaş EU, Pektaş AN, Şeyda B. Selection and Validation of Potential Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Analysis in *Blattica Dubia* (Serville, 1838)(Blattidae, Blaberidae). *Cumhuriyet Science Journal* 2022; 43: 176-82.
22. Sayed IM, Inouye K, Das S, Alexander LC. Isolation of RNA from the Murine Colonic Tissue and qRT-PCR for Inflammatory Cytokines. *Bio Protoc* 2023;13:e4634.

23. Xie B, Wang Y, Lu Y, Wang M, Hui R, Yu H, et al. A novel intervention of molecular hydrogen on the unbalance of the gut microbiome in opioid addiction: Experimental and human studies. *Biomed Pharmacother* 2024;178:117273.
24. He Q, Zhang Y, Ma Y, Deng X, Zhang H, Zhang Y, et al. *Lactobacillus Rhamnosus* Reshapes Gut Microbes and Modulates L-kynurenine Metabolism to Decrease Susceptibility to Heroin Addiction in Mice. *Research Square* [Preprint] 2024.
25. Wang H, Luo J, Chen X, Hu H, Li S, Zhang Y, et al. Clinical observation of the effects of oral opioid on inflammatory cytokines and gut microbiota in patients with moderate to severe cancer pain: a Retrospective Cohort Study. *Pain Ther* 2022;11:667-81.
26. Al Bander Z, Nitert MD, Mousa A, Naderpoor N. The gut microbiota and inflammation: an overview. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:7618.
27. Thomas KR, Watt J, Wu CMJ, Akinrinoye A, Amjad S, Colvin L, et al. Pain and opioid-induced gut microbial dysbiosis. *Biomedicines* 2022;10:1815.
28. Mohebalı N, Weigel M, Hain T, Sütel M, Bull J, Kreikemeyer B, et al. *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides faecis* and *Roseburia intestinalis* attenuate clinical symptoms of experimental colitis by regulating Treg/Th17 cell balance and intestinal barrier integrity. *Biomed Pharmacother* 2023;167:115568.
29. Cervantes-Barragan L, Chai JN, Tianero MD, Di Luccia B, Ahern PP, Merriman J, et al. *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4+ CD8 $\alpha\alpha$ + T cells. *Science* 2017;357:806-10.
30. Jhun J, Cho K-H, Lee D-H, Kwon JY, Woo JS, Kim J, et al. Oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* ameliorates the progression of osteoarthritis by inhibiting joint pain and inflammation. *Cells* 2021;10:1057.
31. Liu H, Wang J, He T, Becker S, Zhang G, Li D, et al. Butyrate: a double-edged sword for health? *Adv Nutr* 2018;9:21-9.
32. Leylabadlo HE, Ghotaslou R, Feizabadi MM, Farajnia S, Moaddab SY, Ganbarov K, et al. The critical role of *Faecalibacterium prausnitzii* in human health: An overview. *Microb Pathog* 2020;149:104344.
33. Oh NS, Joung JY, Lee JY, Kim Y. Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasserı* 4M13 isolated from infant feces. *PloS One* 2018;13:e0192021.
34. Hu W, Gao W, Liu Z, Fang Z, Wang H, Zhao J, et al. Specific strains of *faecalibacterium prausnitzii* ameliorate nonalcoholic fatty liver disease in mice in association with gut microbiota regulation. *Nutrients* 2022;14:2945.
35. Ma Y, Sannino D, Linden JR, Haigh S, Zhao B, Grigg JB, et al. Epsilon toxin-producing *Clostridium perfringens* colonize the multiple sclerosis gut microbiome overcoming CNS immune privilege. *J Clin Invest* 2023;133:e163239.
36. Cao W, Zheng C, Xu X, Jin R, Huang F, Shi M, et al. *Clostridium butyricum* potentially improves inflammation and immunity through alteration of the microbiota and metabolism of gastric cancer patients after gastrectomy. *Front Immunol* 2022;13:1076245.
37. Zádori ZS, Király K, Al-Khrasani M, Gyires K. Interactions between NSAIDs, opioids and the gut microbiota-future perspectives in the management of inflammation and pain. *Pharmacol Ther* 2023;241:108327.
38. Lee C-G, Hwang S, Gwon S-Y, Park C, Jo M, Hong J-E, et al. *Bacteroides fragilis* toxin induces intestinal epithelial cell secretion of interleukin-8 by the e-Cadherin/ β -Catenin/NF- κ B dependent pathway. *Biomedicines* 2022;10:827.
39. Boyko N, Costigliola V, Golubnitschaja O. Microbiome in the Framework of Predictive, Preventive and Personalised Medicine. In: Boyko N, Golubnitschaja O, eds. *Microbiome in 3P Medicine Strategies*. *Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine*. Berlin: Springer; 2023. p.1-8.
40. Ren M, Lotfipour S. The role of the gut microbiome in opioid use. *Behav Pharmacol* 2020;31:113-21.