Archive of SID

مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان ۱۳۸۹، دوره دوم، شماره پنجم، صفحه ۳۴-۲۹

مطالعه اثرات حفاظتی پروبیوتیک ساکارومایسز بولاردی در جلوگیری از اسهال سالمونلایی در موش صحرایی

الهام صالحی[۱]، مجید مروتی شریف آباد[۱]

۱- عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شوشتر، گروه دامپزشکی، شوشتر،ایران.

نویسنده مسؤول: دکتر الهام صالحی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر ، گروه دامپزشکی،شوشتر،ایران. e.salehi@iau-shoushtar.ac.ir

دریافت: ۸۸/۱۲/۲۷ پذیرش: ۸۹/۳/۲

چکیده

زمینه و هدف: سالمونلوز یکی از بیماریهای عفونی در تمام گونه‌های حیوانات است که توسط گونه‌های مختلف سالمونلا ایجاد می شود و تظاهر بالینی آن به صورت اسهال یا سپتسمی می باشد. بسیاری از تحقیقات اخیر نشان می دهد که برخی پروبیوتیکها مانند ساکارومایسز بولاردی می‌توانند از بروز تغییرات پاتولوژیک باکتری سالمونلا در شرایط زنده و داخل بدن موجود زنده جلوگیری نمایند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات حفاظتی ساکارومایسز بولاردی بر ضایعات ناشی از سالمونلا در روده موش صحرایی می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تعداد ۳۰ عدد موش صحرایی نر به سه گروه A,B,C تقسیم شدند. موش های صحرایی گروه B و C هر کدام به ترتیب ۱ سی سی محلول حاوی $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ cfu/ml مخمر ساکارومایسز بولاردی به مدت ۵ روز به صورت دهانی دریافت کردند. در حالیکه حیوانات گروه A فقط ۱ سی سی سالین نرمال به عنوان گروه کنترل دریافت نمودند. به همه موش های صحرایی در روز پنجم یک میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی حاوی $۱۰^{۷}$ **cfu/ml** باکتری سالمونلا تیفی موریوم به صورت دهانی تجویز شد. در روز دهم بعد از تجویز باکتری، تمامی موش های صحرایی یوتانایز شدند. نمونه‌های بافتی مناسب از روده آنها تهیه و جهت ثبوت بافت در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شده و جهت تهیه مقاطع بافتی مناسب به آزمایشگاه ارسال گردید. همچنین نتایج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژیک روده با استفاده از آزمون آماری fisher exact test به طور توصیفی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان داد در موش های صحرایی گروه کنترل تقریبا در روز دوم اسهال مشاهده شد اما در موش های صحرایی که مخمر دریافت کرده بودند چنین تغییری مشاهده نشد. همچنین در گروه کنترل در روده تجمع سلولهای آماسی در ناحیه مخاطی و زیر مخاطی روده همراه با افزایش ترشح موکوس قابل رویت می باشد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به نظر میرسد ساکارومایسز بولاردی در پیشگیری از ضایعات سالمونلایی دارای نقش محافظتی می باشد.

واژه های کلیدی: روده، هیستوپاتولوژی، ساکارومایسز بولاردی، سالمونلا تیفی موریوم

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سالمونلاها باسیل های گرم منفی و متحرکند که هوازی و بی‌هوازی اختیاری‌اند.گفته می‌شود سالمونلاها در برخی گونه‌ها در بدو ورود، وارد پلاکهای پایر لوزه‌ها می‌شوند اما در سایر گونه‌ها، روده‌ها محل لوکالیزاسیون اصلی باکتری می‌باشد و در حقیقت ماکروفاژهای مخاطی را مورد تهاجم قرار می‌دهد. این باکتری در روده باریک، کولون، ندولهای لنفاوی و کیسه صفرا جایگزین می‌شود و از طریق تولید انتروتوکسین، سیتوتوکسین و اندوتوکسین تولید بیماری می‌نماید(۱). سالمونلاهای مهاجم اثر سلول کشی روی سلولهای اپیتلیال دارند و باعث از هم گسیختگی این سلولها می‌شوند و یک پاسخ سلولی را در لامیناپروپریا القاء می‌نمایند و بعد از آن یک غشاء کاذب دیفتریک در سطح مخاط شکل می‌گیرد. ماکروفاژهای مخاطی ارگانیزم را در سیتوپلاسم خود نگه می‌دارند. در مخاط و زیر مخاط واسکولیت و پری واسکولیت و تروموبوز مشاهده می‌شود(۲). از جمله راههایی که برای کنترل بیماری مطرح است استفاده از پروبیوتیک ها نظیر ساکارومایسز بولاردی است که در دو دهه اخیر توجه زیادی را به خود جلب نموده است. اطلاعات فارماکوکینتیکی نشان می دهد که ساکارومایسزبولاردی بعد از مصرف به یک حالت پایدار رسیده و بعد از قطع دارو نیز از طریق مدفوع دفع شده و هیچگونه باقیمانده دارویی در بدن ندارد . این مخمر دارای اثر آنتاگونیستی علیه ارگانیسم های بیماریزا نظیر ایکولای انتروپاتوژنیک بوده و تا ۵۰ درصد باکتری های داخل سلولی را نیز می‌کاهد. علاوه بر این مطالعات نشان می دهد که مخمر اثر حفاظتی روی سلولهای اپیتلیوم داشته و سطح ایمونوگلوبولین های مخاطی را افزایش می دهد(۳،۴). با توجه به این که در کشور ما سالمونلوز یکی از مشکلات دامداران می باشد و خصوصا در بدو تولد و زمان رشد خسارات زیادی را به بار می آورد. در این تحقیق در نظر است که اثرات پیشگیری کننده ساکارومایسز بولاردی بر ضایعات احتمالی ایجاد شده توسط سالمونلا تیفی موریوم مورد بررسی قرار گیرد تا خواص ساکارومایسز در پیشگیری از ضایعات روده‌ای ناشی از سالمونلا تیفی موریم مشخص گردد. امید است در صورت موفقیت‌آمیز بودن این طرح راهی برای جلوگیری از ضایعات ناشی از باکتریهای گوارشی پیشنهاد شود و نیز گامی در جهت آشنایی بیشتر با پروبیوتیک ها برداشته شود.

روش بررسی

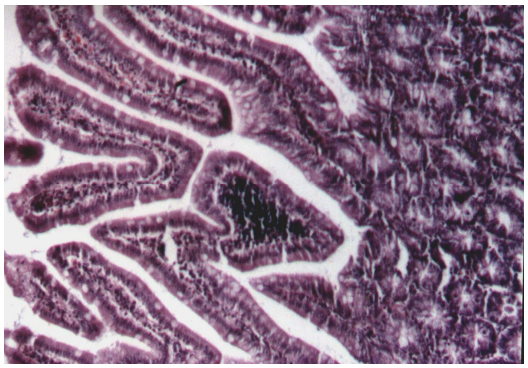
نمونه های مورد استفاده در این مطالعه شامل ۳۰ موش صحرایی نر بودند. گروه A به عنوان گروه کنترل و گروه‌های B وC دریافت کننده ساکارو مایسز بولاردی در نظر گرفته شدند. به موش های گروه B 10^7 cfu/ml و به موش های گروه C 10^8 cfu/ml مخمر خورانده شد. این مخمر در کیسه های ۲۵۰ میلی‌گرمی به صورت تجاری در بازارهای دارویی اروپا ارائه گردیده است. یک کیسه از مخمر در ۲۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل گردید و سپس در محیط سابارو دکستروز آگار به صورت انبوه کشت داده شد. برای رشد کامل به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. برای تهیه سوسپانسیون به میزان ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل به پلیت ها اضافه گردید و پس از حل کردن کامل، شیرابه حاصل داخل یک ارلن جمع آوری شد. به کمک لام نئوبار تعداد مخمر در هر میلی لیتر از این شیرابه غلیظ شمارش شد. تعداد مخمر در هر میلی لیتر معادل 10^8 cfu/ml عدد بود و چون در این تحقیق نیاز به دوزهای 10^7 cfu/mlو 10^8 cfu/ml مخمر داشتیم با رقیق سازی قسمتی از سوسپانسیون تعداد 10^7 fu/ml مخمر نیز تهیه گردید. همانطور که گفته شد سوسپانسیون به گونه‌ای تهیه شده بود که هر میلی لیتر آن حاوی این مقدار مخمر بود. لذا به هر موش در گروه آزمایشB وC ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون مذکور خورانده شد و به موش های گروه شاهد A هم یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی خورانده شد. با این روش عمل تلقیح مخمر به مدت ۵ روز انجام شد. در روز پنجم موش های تمام گروه ها علاوه بر مخمر با یک دوز حاوی 10^7 cfu/ml باکتری سالمونلا تیفی موریوم مواجه شدند. در روز دهم بعد ازخوراندن باکتری موش ها یوتانایز شدند. سپس مورد کالبد گشایی قرار گرفتند. در هر موش قسمتی از دئودنوم، ایلئوم، ژژونوم، سکوم و رکتوم برداشت شد و مدفوع آن تخلیه گردید و داخل فرمالین بافر۱۰درصد قرار گرفت و برای تهیه مقاطع بافتی و بررسی ضایعات پاتولوژیک به آزمایشگاه هیستوپاتولوژی انتقال داده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

یافته ها

نتایج این مطالعه نشان داد در موش های صحرایی گروه کنترل تقریبا در روز دوم اسهال مشاهده شد اما در موش های صحرایی که مخمر دریافت کرده بودند چنین تغییری مشاهده نشد. همچنین بررسی های میکروسکوپیک روده‌ها نیز نشان داد که در گروه کنترل در روده‌ها تجمع سلول های آماسی در ناحیه مخاطی و زیر مخاطی روده همراه با افزایش ترشح موکوس قابل رویت می باشد(جداول۱،۲و شکل۱).



شکل۱. افزایش فعالیت غدد موکوسی روده همراه با افزایش تعداد لوکوسیت ها در مخاط، زیر مخاط و غدد روده (رنگ آمیزی H&E ، 132X)

جدول ۱. موارد مشاهده شده ضایعات روده ای در گروه کنترل (A)و گروههای آزمایش (BوC)

روده	افزایش تعداد لوکوسیت در مخاط و زیر مخاط		
	A	B	C
۱	-	-	-
۲	+	-	-
۳	+	-	-
۴	+	-	-
۵	-	-	-
۶	+	+	-
۷	-	-	-
۸	+	-	-
۹	+	-	-
۱۰	+	+	-

جدول ۲. مقایسه تعداد موارد مشاهده شده ضایعات روده ای در گروه های کنترل و آزمایش

نام ضایعه	گروه	تعداد موارد مشاهده
افزایش لکوسیت ها در مخاط و زیر مخاط روده	A	۷
	B	۲
	C	۰

سپس این داده ها بر اساس روش آماری fisher exact test به صورت توصیفی مورد ارزیابی آماری قرار گرفت،که نتایج آن در جدول (۳) آمده است.

جدول۳. مقایسه ضایعات روده گروه های مختلف براساس تست آماری fisher exact test

نام ضایعه	گروه	P
افزایش لکوسیت ها در مخاط و زیر مخاط روده	A-B	۰/۰۱۱
	A-C	۰/۰۱۱
	B-C	./ ۳

بر اساس این تست یافته ها با $P<0/05$ معنادار ویافته ها با $P>0/05$ غیر معنادار تلقی می شوند. بر اساس جدول فوق، افزایش لکوسیت ها در مخاط و زیر مخاط روده بین گروه AوB و همچنین بین گروه A و C معنادار می باشد. ولی بین گروه BوC معنادار نمی باشد.

بحث

در مطالعه حاضر تجویز خوراکی مخمر ساکاروماسیز بولاردی به عنوان یک پروبیوتیک به تعداد 10^7 cfu/ml و 10^8 cfu/ml عدد توانست از استقرار و سیطره باکتری سالمونلا پس از عفونت تجربی به مقدار زیادی جلوگیری نماید. همچنین از بروز عفونت کلینیکی نیز کاست. در مورد مکانیسم عمل مخمر ساکارومایسز بولاردی در جلوگیری از عفونت سالمونلایی نظریات مختلفی بیان شده است. از جمله برخی محققین معتقدند که این مخمر به گیرنده‌های مانوز می چسبد. با توجه به اینکه باکتری سالمونلا تیفی موریوم بر ای ایجاد بیماری و تکثیر در روده به گیرنده‌های مانوز نیاز دارد پس مخمر بر سر

www.SID.ir

Archive of SID

گیرنده‌های مانوز به رقابت با باکتری پرداخته و از اتصال باکتری به این گیرنده‌ها و در نتیجه کلونیزه شدن باکتری می کاهد(۶،۷،۵).

رودریگوس و همکاران نشان دادند که ساکارومایسز بولاردی در برابر آلودگی تجربی موش با سالمونلا تیفی موریوم به طریقه خوراکی نقش محافظتی ایفا می‌نماید. وی معتقد بود که این حفاظت به دلیل کاهش جمعیت باکتریایی روده نبوده، بلکه مخمر در حقیقت از اتصال باکتری به جایگاه های هدف خود جلوگیری به عمل می‌آورد(۸،۹).

مک کولاف نیز در سال ۱۹۹۸ نقش حفاظتی مخمر را چنین توجیه کرد که در حقیقت این مخمر به عنوان آنتاگونیستی در برابر ترکیبات تولیدی حاصل از باکتری عمل می نماید و در نتیجه در مهار یا مرگ باکتری ایفای نقش می کند(۱۰).

برونت در سال ۱۹۹۴ بیان کرد که دلیل اصلی حفاظت مخمر فوق رقابت این مخمر با باکتری سالمونلا برای چسبیدن به سلول هدف و یا استفاده از منابع غذایی است(۱۱).

کیرولو در سال ۲۰۰۲ بیان کرد که این مخمر باعث تقویت ایمنی میزبان می گردد(۱۲).سوجیولتیس درسال ۲۰۰۶ نشان داد که این مخمر با تولید فاکتور محلول ضد التهابی قادر است از بیان ژن سالمونلا که سبب التهاب روده و فرایند اسهال می شود جلوگیری نماید(۱۳). همچنین گالیانو در سال۲۰۱۱معتقد است مکانیسم مستقیم عملکرد مخمرهای خانواده ساکارومایسز تاثیر بر روی سیستم ایمنی میزبان از طریق مهار سیگنالهای باکتری برای چسبیدن به سلولهای اپیتلیال روده می باشدو در نتیجه قادرند از فرایند التهابی روده به شدت بکاهند (۱۴). در سال ۱۹۹۸ براندو نشان داد که در حقیقت این مخمر باعث مهار فعالیت توکسین های ناشی از باکتری می گردد(۱۵). در مورد علائم بالینی، همچنان که در بخش نتایج ذکر شد در گروه کنترل تمامی موش های صحرایی دو روز بعد از دریافت باکتری دچار اسهال شدند اما در گروه آزمایش چنین یافته‌ای مشاهده نشد که این خود موید اثرات محافظتی مخمر در جلوگیری از عفونت سالمونلایی می باشد. چنانکه کریستین در سال ۱۹۹۸ نشان داد ساکارومایسزبولاردی در پیشگیری و درمان سندرم های اسهال وابسته به مصرف آنتی‌بیوتیک می‌تواند بسیار مفید باشد(۳).

چاپوی نیز درسال ۱۹۸۵ بیان کرد که ساکارومایسز بولاردی در درمان گاستروانتریت حاد نوزادان نقش بسیار مهمی دارد(۱۶).

همچنین تجربه حاضر نشان داد که مخمر در جلوگیری از ضایعات روده می‌تواند مفید واقع شود، به نحوی که تجمع سلولهای آماسی در مخاط و زیر مخاط روده‌ها در گروه کنترل به طور معناداری بیشتر از گروههای آزمایش بود. .همچنین نتایج نشان می دهد که احتمالا 10^7 cfu/ml مخمر با 10^8 cfu/ml مخمر در جلوگیری از ضایعات پاتولوژیک اختلاف چندانی ندارند. به عبارت جامعتر 10^7 cfu/ml مخمر نیز قادر به محافظت از بافت روده بوده است واما اینکه حداقل مقدار محافظت کننده مخمر چه میزان می باشد نیاز به بررسی های بیشتری دارد. همچنین آلدمیر وهمکاران در سال ۲۰۰۲ گروهی موش های صحرایی را به صورت تجربی به باکتری گوارشی آلوده کردند و گروهی را به عنوان شاهد اتخاذ کردند و به هر دو گروه ساکارو مایسز خوراندند و دریافتند که در گروه آزمایش به طور معناداری میزان باکتری های گوارشی انتقال یافته به روده باریک،کبد و طحال کاهش یافته است(۱۷).

پرت فیلهو وهمکاران در تعدادی موش های صحرایی با داروی سیکلوفسفامید تضعیف ایمنی ایجاد کردند و متعاقبا به گروهی از آنها قارچ ساکارومایسز خوراندند. سپس به تمامی آنها باکتری سالمونلا تجویز کردند. میزان ضایعات تولیدی در کبد، ایلئوم و ژژونوم گروهی که از قارچ تغذیه کرده بودند به مراتب نسبت به گروهی که از قارچ تغذیه نکرده بودند کمتر بوده است(۱۸).

باتزوبرناسکونی در سال ۱۹۹۳ طی تحقیقی به این نتیجه رسیدند ساکارومایسز بولاردی از ایجاد ضایعات تیپیک (واضح و مشخص)که در اثر کلرا توکسین در روده ایجاد می شود جلوگیری به عمل می آورد و نشان دادند در ناحیه سکوم موش های صحرایی که تحت تاثیر کلراتوکسین همراه با ساکارومایسز بولاردی قرار گرفته بودند هیچگونه ضایعه پاتولوژیک تولید نگردید(۱۹).

درتحقیق دیگری که توسط ریگوتیر و همکارانش انجام شد ضایعات حاصل از انتاموبا هیستولیتیکا مورد بررسی قرار گرفت. این پروتوزوآ، کولیت بینابینی در روده ۱۲ موش های صحرایی و کولیت همراه با زخم در کولون ایجاد کرده بود. همچنین باعث افزایش ضخامت سکوم و افزایش ترشح موکوس در ناحیه سکوم شده بود اما در اثر استفاده از مخمر ساکارومایسز قبل از مواجه حیوان با پروتوزوآ جز یک مورد افزایش ضخامت سکوم و یک مورد کولیت بینابینی مورد دیگری مشاهده نگردید(۲۰).

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق وتحقیقات دیگر، تاثیر مخمر در جلوگیری از اسهال وضایعات روده‌ای محرز است،

www.SID.ir

Archive of SID

که احتمالا دلیل اصلی این اثر حفاظتی مربوط به نقش مخمر در تحریک سیستم ایمنی است.

چنانکه فولر معتقد است که ساکارومایسز بولاردی با عامل بیماری زا همراه شده و سیستم ایمنی را با قدرت بیشتری تحریک می کند و در حقیقت به عنوان یک ادجوانت عمل می نماید که در این رابطه می توان به گلوکان اشاره نمود، که نوعی پلی گلیکان در دیواره سلولی ساکارومایسز بولاردی است و فعالیت وتزاید ماکروفاژها را افزایش می دهد و البته نظریاتی هم در مورد افزایش نوتروفیل ها در اثر گلوکان وجود دارد(۲۱). باتز و کیسر نیز در سال ۱۹۹۹ پی بردند که بعد از خوراندن ساکارومایسز بولاردی به گروهی موش های صحرایی افزایشی در میزان ترشح IgA و همچنین گیرنده های ایمونوگلوبولین های پلی مریک در مایع روده و ناحیه مخاطی روده قابل مشاهده است(۲۲).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به نظر میرسد ساکارومایسز بولاردی در پیشگیری از ضایعات سالمونلایی دارای نقش محافظتی می باشد و می تواند از خسارات وارده جلوگیری نماید.

References

1- Sharma SN, Idlakha SC. *Text Book of Veterinary Microbiology*. First Ed. Vilkas publishing house; 1997; pp: 379-382.
2- William C. Thomson. *Special Veterinary Pathology*. 2nd Ed. Mosby Company; 1995; pp: 450-456.
3- Chiristine MS. *Prevention of antibiotic associated diarrhea by Saccharomyces boulardii*.Gastrology.1998; 96:981-988.
4- Czerucka D,Piche T. *Review article: yeast as probiotics-Saccharomyces boulardii.Aliment Pharmacol* Ther.2007;26:767-778.
5- GershainL J. *Immunnology and Immunopathology of Domestic Animal*. 2nd Ed. Mosby Company; 1995; pp: 564-566.
6- Macfarland LV, Surawics CM, Elmer GW. *Multivariant analysis of the biothraputic agent Saccharomyces boulardii for the prevention of antibiotic associated diarrhea.* American Journal of Epidemiology.1993; 148:587- 592.
7- Flaviano S.Martins,Guillaume Dalmasso. *Interaction of Saccharomyces boulardii* with Salmonella enteric serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. Journal of Plos one.2010;5:1-12
8- Rodrigues AC, Nardi RM. *Effect of Saccharomyces boulardii against experimental oral infection with salmonella typhimurium and shigella flexneri in conventional and gnotobiotic mice.* J APPL Bacterial.1996; 81:251-256.
9- Martins FS, Rodrigues ACP. *Saccharomyces cerevisiae strain 905 reduces the translocation of salmonella enteric serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice.* J Med Microbiol.2007;56:352-359.
10- MacCullough MJ. *Species identification and virolence attributes of Saccharomyces boulardii*. Journal of Clinical Microbiology.1998; 36:2613-2617.
11- Bronet M, Bergogne E. *Bacterial growth in entermination value of the addition of Saccharomyces boulardii*. SCI Aliments.1994; 20:63-73.
12- Kirollov DA, Peronova NB. *Modifying action of Saccharomyces boulardii on the biological properties of enterobacteria.* Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol. 2002; 4:57-59.
13- Sougioltzis S,Simeonidis S. *Saccharomyces boulardii produces a soluble anti-inflamatory factor that inhibits Nf-KB-media IL-8 gene expression.* Biochem Biophys Res Commun .2006; 343:69-76.
14- Galliano Zanello, Mustapha Berri. *Saccharomyces cerevisiae modulates immune gene expressions and inhibits ETEC-Mediated ERK1/2 and p38 signaling pathways in intestinal epithelial cells.* Journal of PLoS One. 2011; 6(4): 173-85.
15- Brandao RL, Castro IM. *Intracellular signal triggered by cholera toxin in Saccharomyces boulardii and Saccharomyces cerevisiae.* Applied and Environmental Microbiology.1998; 64:564-568.
16- Chapoy P. *Treatment of acute infantile diarrhea:controlled trial of Saccharomyces boulardii*. Annales de pediatrie.1985; 32:561-563.
17- Aldemir M. *Effect of octreotide acetate and Saccharomyces buolardii on bacterial translocation in an intestinal loop obstraction model of rats*. Tohoku J Exp Med. 2002; 198:1-9.
18- Peret Filho M. *Dose effect of oral Saccharomyces boulardii treatment on morbidity and mortality in immunosuppressed mice*. J Med Microbial. 1998; 47:111-116.
19- Buts JP, Bernasconi P. *Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of Saccharomyces buolardii.* Pediatric Journal.1993; 20:192-196.
20- Rigothier Mc, Maccario J. *Effects of Saccharomyces boulardii yeast on trophozoites of entamoeba histolytica invitro and cecal amibiasis in the young rat*. Hum comp.1989; 65:51-60.
21- Fuller R. *Probiotics in human medicine*. Gut Journal. 1991; 32:439-442.
22- Buts JP, Dekeyser N . *Saccharomyces boulardii upgrade cellular adaptation after proximal enterectomy in rats*. International Journal of Immunopharmacology. 1999; 45(1):89-96.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir