تأثیر فراورده‌های تجاری حاوی مخلوط سویه‌های پروبیوتیک بر کاهش میزان بیسفنول‌آ

سوگند سلوکی[*1]، محمدرضا فاضلی [۲]

[۱]گروه داروسازی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران

[۲]گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

Archive of SID

چکیده

بیسفنول‌آ یک ترکیب صنعتی مهم مورد استفاده در تولید پلی‌کربنات‌ها، رزین‌های اپوکسی و کاغذهای حرارتی در بسیاری از کارخانه‌های تولیدی مواد شیمیایی در سراسر جهان است. مواجهه با این ترکیب از منابع مختلفی نظیر غذاهای بسته‌بندی شده یا نوشیدنی‌ها امکان‌پذیر است. در سال‌های اخیر ورود این ماده شیمیایی خطرناک به زنجیره‌ی غذایی موجودات زنده به طور چشمگیری افزایش یافته که تبعات جبران‌ناپذیری را بر سلامت انسان‌ها به همراه داشته است. از طرفی، امروزه القای باکتری‌های سودمند یکی از راه‌حل‌های مفید برای نرمال کردن شرایط زیستی و افزایش سطح سلامت بدن است. این راه‌حل از طریق انتقال مکملی از سلول‌های باکتریایی زیست پذیر به داخل بدن میزبان امکان‌پذیر است که به این نوع از میکروب‌ها، پروبیوتیک گویند. البته ترکیب سویه‌های سازگار پروبیوتیکی از گونه‌های مختلف می‌تواند همکاری و همزیستی میان باکتری‌ها را تقویت کند و باعث افزایش اثربخشی درمان شود. در این مطالعه اثر برخی از فرمولاسیون‌های تجاری حاوی باکتری‌های پروبیوتیک موجود در بازار دارویی ایران بر کاهش میزان بیسفنول‌آ بررسی شده است. برای این منظور مقدار بیسفنول‌آ در محیط حاوی فراورده‌های پروبیوتیک در بازه زمانی ۲۴ ساعته توسط کیت الایزا اندازه‌گیری شد. از نتایج به‌دست‌آمده در این بررسی می‌توان نتیجه گرفت که فرآورده‌های حاوی پروبیوتیک بر کاهش میزان بیسفنول‌آ به طور چشمگیری مؤثر بوده‌اند. چهارچوب آزمایش به گونه‌ای تنظیم گردید که با مقایسه و تحلیل نتایج حاصل، کارآمدترین سویه‌ها را در کاهش میزان بیسفنول‌آ تعیین نماید. این نتایج، کاهش معناداری را در مقدار بیسفنول‌آ در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. تقریباً در تمام نمونه‌های مورد آزمایش در طی یک ساعت اول تا ۸۰ درصد از بیسفنول‌آ کاهش یافته بود. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان امید داشت که استفاده منظم از مکمل‌های پروبیوتیک در تعدیل و کاهش اثرات مضر بیسفنول‌آ اثربخش باشد.

کلید واژگان: بیسفنول‌آ، زیست پالایی، سم‌شناسی مخلوط سویه‌های پروبیوتیکی.

* sogandsolooki@gmail.com

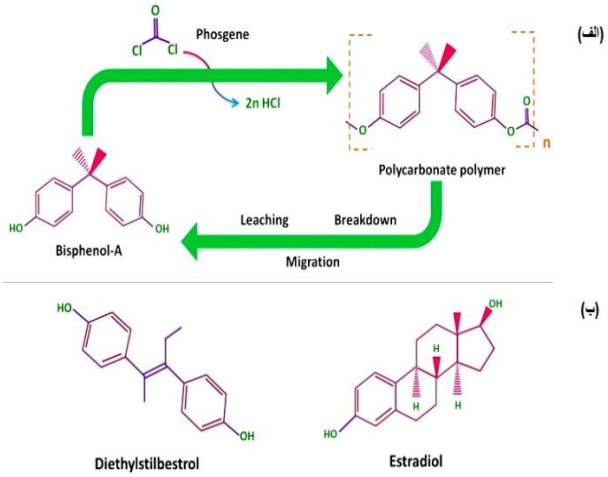
www.SID.ir

مقدمه

بیسفنول‌ها ترکیبات شیمیایی هستند که از دو گروه هیدروکسی فنیل عملکردی تشکیل شده‌اند و بیشتر آن‌ها بر پایه دو متیل متان می‌باشند. بیسفنول‌آ[1] محبوب‌ترین نماینده این گروه است که به BPA معروف است. بیسفنول‌آ یک ماده شیمیایی صنعتی است که در حال حاضر به‌عنوان یک آلاینده زیست‌محیطی توجه زیادی را به خود اختصاص داده است. بیسفنول‌آ به‌عنوان یک مونومر کلیدی در ساخت پلی‌کربنات‌ها، اپوکسی رزین‌ها و ظروف آشامیدنی، تجهیزات پزشکی و ورزشی به طور وسیعی استفاده می‌شود. از این رو مقادیر قابل توجهی از این ترکیب در منابع آبی و فاضلاب‌ها اندازه‌گیری و گزارش شده است (۱-۴). بیسفنول آ دارای قابلیت مهاجرت[2] از ساختار پلاستیک‌ها به مواد در تماس با آن‌ها ازجمله نوشیدنی‌ها و غذاها است (شکل ۱-الف). میزان مهاجرت آن به عواملی نظیر مدت‌زمان تماس و دما بستگی دارد (۵). همچنین، بیسفنول‌آ به‌عنوان یک ماده شیمیایی شبه استروژنی امکان اختلال در عملکرد غدد درون‌ریز را دارد و می‌تواند عملکرد بعضی از هورمون‌های زیستی را تقلید کرده و روی اندام‌ها و سیستم‌های درونی اثرات منفی القاء نماید (شکل ۱-ب).

حضور این ماده در فاضلاب شهری، پساب‌های صنعتی و ورود به اکوسیستم‌های آبی تأثیر زیان‌باری بر موجودات آبزی می‌گذارد. مواجهه با ژنوتوکسین‌های محیطی نظیر بیسفنول‌آ ممکن است به طور مستقیم در ژن‌ها و بیان آن‌ها و یا غیرمستقیم بر فراوانی ژنی اثر بگذارد.

قرار گرفتن موجودات آبزی در معرض آلاینده‌های



شکل ۱. الف: ترکیب بیسفنول‌آ و فسژن برای تولید محصولات پلیمری[3] و سیکل معیوب انباشت و مهاجرت آن در طبیعت در اثر تجزیه مواد پلاستیکی پلیمری؛ ب: شباهت ساختاری بیسفنول‌آ به هورمون‌های استروژنی که منجر به اختلالات ژنتیکی می‌گردد.

ژنوتوکسیک، سلامت زنجیره غذایی انسان را به مخاطره می‌اندازد. چنین تهدیدات اکولوژیکی ممکن است منجر به جهش‌های قابل توارث و آسیب به تنوع ژنتیکی (درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای) شده و در طولانی‌مدت اثرات معنی‌داری بر بقای جمعیت‌های طبیعی داشته باشد (۶). حتی مواجهه با مقادیر بسیار کم این ترکیب سمی، رشد غیرطبیعی در بسیاری از موجودات زنده را به همراه داشته است (۷-۹). جدول (۱) برخی از عوارض جانبی گزارش‌شده در مطالعات حیوانی را نشان می‌دهد.

تاکنون روش‌های متعددی همچون استفاده از جاذب‌های کربنی (۱۱)، درمان‌های الکتروشیمیایی (۱۲) و واکنش‌های اکسیداتیو (۱۳) به‌منظور حذف بیسفنول‌آ از محیط‌های آبی بررسی شده‌اند.

با وجود اینکه هر یک از فرآیندهای پیشنهادی فوق تا حدودی در کاهش سطح بیسفنول‌آ مؤثر بوده‌اند، روش‌های

[1] Bisphenol-a (BPA)

[2] Migration

[3] Polycarbonate polymers synthesis

Archive of SID
www.SID.ir

ارگانیک و کاربردی‌تری مورد نیاز است. یکی از ارزان‌ترین راه‌حل‌های ممکن جهت حل مشکل آلودگی فنول‌ها، زیست پالایی با استفاده از سلول‌های میکروبی است. بسیاری از مطالعات انجام گرفته در زمینه‌ی کاهش فنول، استفاده از محیط‌های کشت میکروبی را برای این منظور گزارش کرده‌اند (۱۴). از باکتری‌ها می‌توان به‌عنوان کاتالیزورهای زیستی، در تجزیه‌ی بیولوژیک بیسفنول‌آ بهره گرفت (۱۵). پروبیوتیک‌ها به عنوان ابزاری در جهت اصلاح زیستی شناخته شده‌اند. این نکته باعث می‌شود که آن‌ها را گزینه‌ای در حذف آلاینده‌های زیست‌محیطی دانست. امروزه پروبیوتیک‌ها در تولید محصولات لبنی به طور وسیعی مورد استفاده قرارگرفته‌اند. همچنین به علت اثرات مفید آن‌ها بر سلامت انسان روز به روز بر محبوبیتشان افزوده شده است. توانایی اتصال به مواد سرطان‌زای موجود در غذا از قبیل آمین‌های هتروسیکلیک (۱۶)، بنزو (آ) پیرین و آفلاتوکسین B1 در گونه‌هایی از قبیل بیفیدوباکتریوم و باکتری‌های اسیدلاکتیک، گزارش‌شده است (۱۷). لذا انتظار می‌رود که پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش به بیسفنول‌آ متصل شده و با مهار جذب روده‌ای آن، از انسان در برابر اثرات نامطلوب این ترکیب شیمیایی سمی محافظت کنند.

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی، سنجش و مقایسه اثر مخلوط سویه‌های مختلف پروبیوتیکی در تخریب و سم‌زدایی بیسفنول‌آ طراحی شده است. برای این منظور از فراورده‌های تجاری پروبیوتیک موجود در بازار ایران استفاده گردید. مقدار بیسفنول‌آ موجود در محیط آزمایش با استفاده از آزمون الایزا در طول ۲۴h اندازه‌گیری شد. سپس نتیجه به‌دست‌آمده توسط پارامترهای آماری موردبررسی قرار گرفت.

جدول ۱. تأثیرات مخرب و زیان‌بار BPA بر سلامتی موجودات زنده (۱۰)

سال مطالعه	تأثیرات گزارش‌شده	دز (µg/kg/day)
۲۰۰۵	تغییرات دائمی در دستگاه تناسلی	۰/۰۲۵
۲۰۰۵	تغییر در بافت پستان و حساس کردن سلول‌ها به هورمون‌ها و مواد سرطان‌زا	۰/۰۲۵
۲۰۰۹	تأثیرات مخرب طولانی‌مدت بر تولیدمثل و ایجاد سرطان	۱
۱۹۹۷	افزایش ۳۰ درصدی وزن پروستات	۲
۲۰۰۲	کاهش وزن بدن، کاهش فاصله‌ی آنوژنیتال، ایجاد بلوغ زودرس و تحریک جنسی طولانی‌تر	۲
۲۰۰۴	کاهش تستسترون در بیضه	۲/۴
۲۰۰۷	افزایش احتمال ابتلا به سرطان در سلول‌های پستان	۲/۵
۲۰۰۶	حساسیت بیشتر سلول‌های پروستات به هورمون‌ها و سرطان	۱۰
۲۰۰۲	کاهش رفتارهای مادرانه	۱۰
۲۰۰۳	دگرگونی تفاوت‌های جنسی طبیعی در ساختار مغز و رفتار	۳۰
۲۰۰۸	ایجاد اثرات عصبی نامطلوب در پستانداران	۵۰
۲۰۰۹	اختلال در فرایند تخمک‌گذاری	۵۰
۲۰۱۲	افزایش فعالیت‌های حرکتی ناخودآگاه	۶۰
۲۰۱۴	بیش فعالی و اختلال در حافظه کوتاه‌مدت	۶۱
۲۰۱۵	افزایش احتمال ابتلا به دیابت نوع ۲	۶۷

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

مشخصات مکمل‌ها: فراورده‌ی تجاری پروبیوتیکی موردبررسی در این پژوهش به نام‌های "*کی دی لاکت، کی دی لاکت زینک، فمی لاکت، لاکتوکر، ژری لاکت، لاکتوفم*" از شرکت زیست تخمیر تهیه شده‌اند. این فرآورده‌ها حاوی میزان نسبتاً بالایی از باکتری‌های مفیدند و برای گروه‌های سنی خاص طراحی شده‌اند. توضیحات لازم در مورد سویه و مواد تشکیل‌دهنده هر کپسول ۵۰۰ mg در جدول ۲ ارائه شده است.

پودر بیسفنول‌آ: بیسفنول‌آ با خلوص ۹۹ درصد از شرکت سیگما آلدریچ[1] خریداری شده و دارای وزن مولکولی ۲۲۸/۲۹ g/mol و حلالیت در آب ۳۰۰ mg/l است.

کیت الایزا مخصوص اندازه‌گیری بیسفنول‌آ: کیت‌های رقابتی[2] جهت اندازه‌گیری مقدار بیسفنول‌آ در نمونه‌های زیستی از شرکت دیتروئید R&D آمریکا تهیه گردیده است. هر کیت شامل یک صفحه‌ی ۹۶ چاهکه، یک عدد ویال حاوی استاندارد بیسفنول‌آ، یک عدد ویال حاوی بیسفنول‌آ متصل به آنزیم HRP[3] و بافرهای مورد استفاده در نمونه‌ها و محلول‌های رقیق‌کننده و محلول شستشو است. بر این اساس، رقابت بین بیسفنول‌آ اپی‌توپ و بیسفنول‌آ متصل به HRP که جهت تعیین تعداد جایگاه‌های اتصال آنتی‌بادی anti-BPA در کف چاهک‌ها پوشانده شده[4] صورت می‌گیرد؛ بنابراین مقدار بیسفنول‌آ کونژوگه که توانایی اتصال به همه‌ی چاهک‌ها را دارد به طور معکوسی با غلظت بیسفنول‌آ آزاد در محیط متناسب است. سپس مقدار کونژوگه‌ای که به هر چاهک متصل شده است با اندازه‌گیری رنگ به‌دست‌آمده در زمان اضافه شدن TMB[5] اندازه‌گیری می‌شود. واکنش‌های TMB با HRP در چاهک‌ها اتفاق می‌افتد. با اضافه کردن اسید سولفوریک، محصول آبی‌رنگ به یک محصول زردرنگ تبدیل و در طول موج ۴۵۰ nm خوانده می‌شود (۱۸). این کیت توانایی تعیین بیسفنول‌آ با غلظت‌های بیشتر از ۱۰ pg/ml در ادرار، سرم، پلاسما، سلول و بافت، غذای روزانه‌ی انسان و حیوان، آب و پساب را دارد.

روش کار و آماده‌سازی نمونه:

۱- ابتدا ۱۰۰۰ ml سرم فیزیولوژی را به دمای ۳۷ °C رسانده شد.

سپس مقدار ۵×۱۰^{۵} pg/ml از بیسفنول‌آ در ۱۰۰۰ ml سرم فیزیولوژی حل شد. این مقدار با توجه به محدوده‌ی خوانش منحنی استاندارد کیت و LC50 بیسفنول[6] در محیط آبی حاوی باکتری (۱۰) و چندین برابر دز ورودی روزانه یک انسان بالغ (۱۹) انتخاب شده تا اثرگذاری فراورده‌های پروبیوتیک در مواجهه با بیسفنول‌آ سنجیده شود.

۱- پیش از اضافه نمودن باکتری‌ها به محیط آزمایش، بخشی از سرم فیزیولوژی حاوی بیسفنول‌آ به‌عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد.

بعد از آن ۱۰۰ ml سرم فیزیولوژی حاوی سم را در ۶ ارلن ۲۵۰ ml الی کوت کرده و ۶ فراورده پروبیوتیکی به نام‌های *کی دی لاکت، کی دی لاکت زینک، فم لاکت، لاکتوکر، ژری لاکت، لاکتوفم* را به هر یک از ارلن‌ها اضافه شد.

[1] Sigma Aldrich

[2] Competitive

[3] Horseradish peroxidase

[4] Coated

[5] Tetra methyl benzadine

[6] BPA LC50 = 54.5 mg/l

www.SID.ir

Archive of SID

۱- سپس در زمان‌های ۰، ۱۵، ۳۰ min، ۱ h، ۶ h و ۲۴ h از محیط نمونه‌برداری کرده و درون میکروتیوب ریخته شد.

۲- میکروتیوب‌های حاوی نمونه را در سانتریفوژ با دور ۳ الی ۴ هزار به مدت ۱۵ الی ۲۰ min قرار گرفت، طوری که دیواره سلولی باکتری‌ها آسیبی نبیند. سپس حدود ۴۰۰ µl از سوپرناتانت به‌دست‌آمده را برداشته و داخل میکروتیوب‌های جدیدی ریخته شد (مواد ته‌نشین شده که همان سلول‌های پروبیوتیک است، دور ریخته می‌شود).

نمونه‌های به‌دست‌آمده تا قبل از استفاده از کیت در فریزر نگه‌داری شد.

۳- **رسم منحنی استاندارد:** مراحل آماده‌سازی با توجه به دستورالعمل تولیدکننده کیت الایزا انجام شد. هر کیت شامل ۳ چاهک بلانک (B_L)، ۳ چاهک باقابلیت اتصال خیلی زیاد (B0) و ۶ نقطه منحنی استاندارد (S_1-S_6) بود. همچنین به‌منظور افزایش صحت آزمایش و انجام یک تحلیل دقیق آماری تمامی استانداردها و نمونه‌ها به‌صورت سه بار تکرار به چاهک‌ها ریخته شدند. سپس درصد B/B_0 در مقابل

جدول ۲. مشخصات مکمل‌های مورد استفاده

مکمل	گروه سنی	سویه‌های پروبیوتیک*								
		لاکتوباسیلوس کازئی	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*	*لاکتوباسیلوس رامنوز*	*لاکتوباسیلوس بولگاریوس*	*لاکتوباسیلوس پلنتاروم*	*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*	*لاکتوباسیلوس گاسری*	*بیفیدوباکتریوم برو*	*بیفیدوباکتریوم لانگوم*	*بیفیدوباکتریوم اینفنتیس*	*استرپتوکوکوس ترموفیلوس*
فمی لاکت	**همه اعضای خانواده**	۷×۱۰^{۹}	۲×۱۰^{۹}	$۱/۵\times۱۰^{۹}$	۲×۱۰^{۸}	_	_	_	۲×۱۰^{۱۰}	۷×۱۰^{۹}	_	$۱/۵\times۱۰^{۱۰}$
ژری لاکت	**سالمندان**	۳×۱۰^{۹}	۳×۱۰^{۱۰}	۷×۱۰^{۹}	۵×۱۰^{۸}	_	_	_	۲×۱۰^{۱۰}	۱×۱۰^{۹}	_	۲×۱۰^{۸}
کیدی لاکت	**کودکان**	۳×۱۰^{۱۰}	۲×۱۰^{۱۰}	۳×۱۰^{۱۰}	۲×۱۰^{۹}	_	_	_	۲×۱۰^{۱۰}	_	۵×۱۰^{۱۰}	۲×۱۰^{۹}
کیدی لاکت زینک**	**کودکان**	۳×۱۰^{۱۰}	۲×۱۰^{۱۰}	۳×۱۰^{۱۰}	۲×۱۰^{۹}	_	_	_	۲×۱۰^{۱۰}	_	۵×۱۰^{۱۰}	۲×۱۰^{۹}
لاکتوکر	**افزایش سطح ایمنی**	۳×۱۰^{۹}	۳×۱۰^{۱۰}	۷×۱۰^{۹}	۵×۱۰^{۸}	_	_	_	۲×۱۰^{۱۰}	۱×۱۰^{۹}	_	۳×۱۰^{۸}
لاکتوفم	**خانم‌ها**	_	۵×۱۰^{۱۰}	_	_	$۱/۵\times۱۰^{۱۰}$	۷×۱۰^{۹}	۲×۱۰^{۱۰}	_	_	_	_

*برآورد تعداد باکتری‌های زنده در یک دز مکمل بر مبنای واحد تشکیل‌دهنده کلونی (CFU) گزارش‌شده است.

**فرمولاسیون این فراورده‌ی سین‌بیوتیک حاوی mg ۵ زینک سولفات برای گروه سنی خردسالان است.

***سایر ترکیبات FOS :به‌عنوان پریبیوتیک، لاکتوز، استئارات منیزیم، تالک.

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت BPA با استفاده از نتایج استانداردها در مقیاس لوگاریتمی رسم شد. رسم منحنی استاندارد توسط نرم‌افزار اکسل و برازش منحنی[1] با دقت R^2=۰/۹۸۹ انجام گرفت.

آنالیز دادگان: تمامی اندازه‌گیری‌ها به‌صورت ۳ بار تکرار انجام و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار اعلام گردید. برای مقایسه‌ی اختلاف نتایج حاصل از گروه‌های مختلف با یکدیگر و با گروه کنترل از آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر[2] در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد. همچنین، نرمال بودن توزیع متغیرها توسط آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد.

نتایج

پس از محاسبه‌ی درصد B/B_0، مقادیر به‌دست‌آمده با منحنی استاندارد تقاطع داده شد تا مقدار بیسفنول‌آ موجود در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در مورد هر فراورده‌ی پروبیوتیکی به دست آید. حال با داشتن مقدار بیسفنول‌آ در زمان‌های مختلف به‌راحتی می‌توان روند تغییرات حاصل‌شده در بازه زمانی ۲۴h را رسم نمود. روند تغییرات در شکل ۲ نشان داده‌شده است. به‌روشنی مشخص گردید که فراورده‌های پروبیوتیکی تأثیر چشمگیری در کاهش بیسفنول‌آ محیط داشته‌اند. بیشترین تغییرات توسط فراورده *لاکتوکر* ایجاد شد که حاوی بالاترین دز باکتری بود و کمترین تغییرات متعلق به *کیدی لاکت زینک* بود. درصد کاهش بیسفنول‌آ در زمان‌های مختلف در شکل ۳ نشان داده‌شده است. همان طور که مشخص است، باکتری‌ها تا یک ساعت اول بیشترین فعالیت را داشته‌اند. در این میان، p6، p2 و p5 عملکرد سریع‌تری داشته و در فواصل زمانی ۱۵ تا ۳۰ min به ترتیب ۴۵/۲، ۵۳/۵ و ۶۱/۹ درصد از غلظت بیسفنول‌آ را کاهش داده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

ارزیابی آماری و اعتبار سنجی نتایج

تمامی فعالیت‌های پژوهشی که با ثبت داده همراه هستند نیازمند بررسی و تحلیل‌های آماری به‌منظور اعتبار سنجی و تعیین صحت و دقت اندازه‌گیری می‌باشند. بدین منظور در این پژوهش سعی گردیده است تا با تکرار سه‌باره‌ی اندازه‌گیری‌ها در چاهک‌های نمونه و استاندارد، از وقوع خطا تا حد امکان اجتناب شود. با میانگین‌گیری از نتایج به‌دست‌آمده سعی نمودیم تا انحراف معیار را کاهش داده و از وقوع دادگان پرت جلوگیری نماییم. همچنین برای کنترل نتایج کیت یک چاهک کنترل در نظر گرفته شد و مقدار مشخصی بیسفنول‌آ به آن وارد گردید که مقدار تعیین‌شده توسط دستگاه با آن مطابقت داشت.

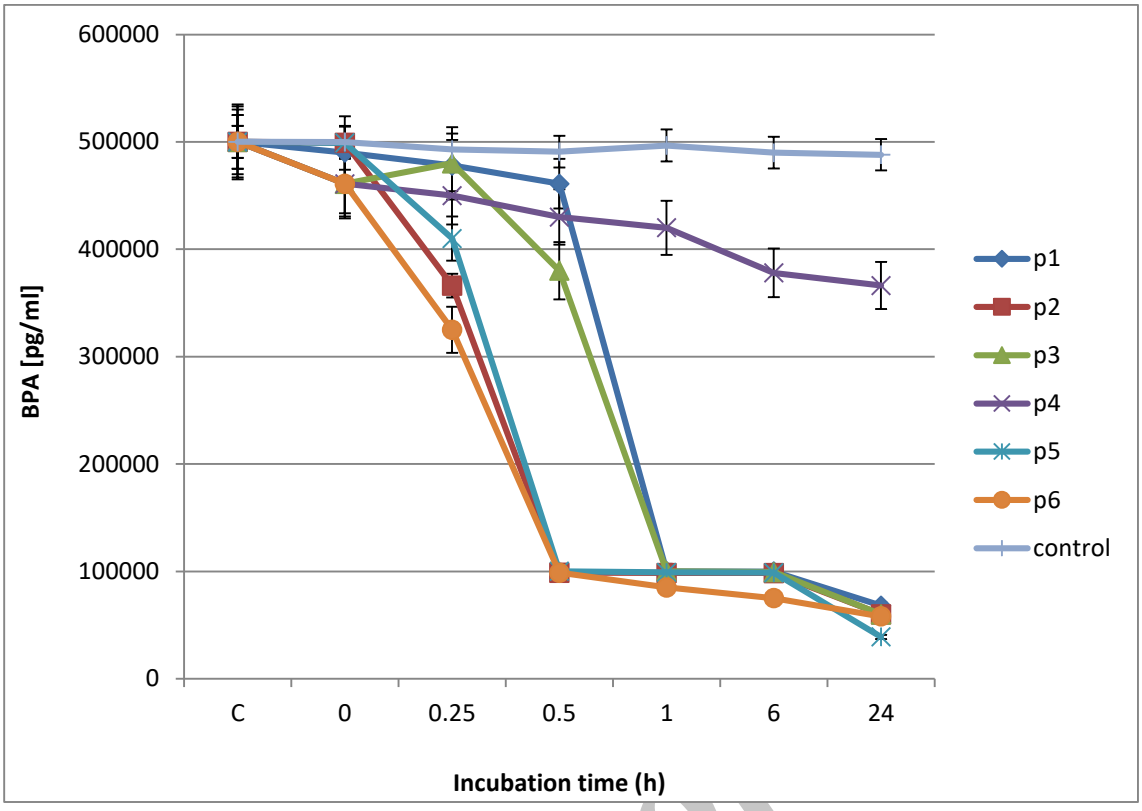
همچنین انتخاب سرم فیزیولوژی به‌عنوان محیط پایه، سبب افزایش تعمیم‌پذیری نتایج به سایر محیط‌ها گردید. به‌منظور ارزیابی‌های تکمیلی در خصوص صحت نتایج به‌دست‌آمده، نمونه‌ی ۲۴ ساعته قوی‌ترین و ضعیف‌ترین فراورده‌ها در جذب BPA از محیط که به ترتیب *لاکتوکر* و *کیدی لاکت زینک* بوده‌اند، به روش پورپلیت شمارش کلونی باکتری شدند. با این کار علاوه بر ارزیابی نتایج حاصل از کیت الایزا توانستیم در ارتباط بازمان و میزان مناسب تجدید دز پروبیوتیک‌ها برای حصول بهترین

[1] Curve fitting

[2] Repeated ANOVA test

Archive of SID

www.SID.ir



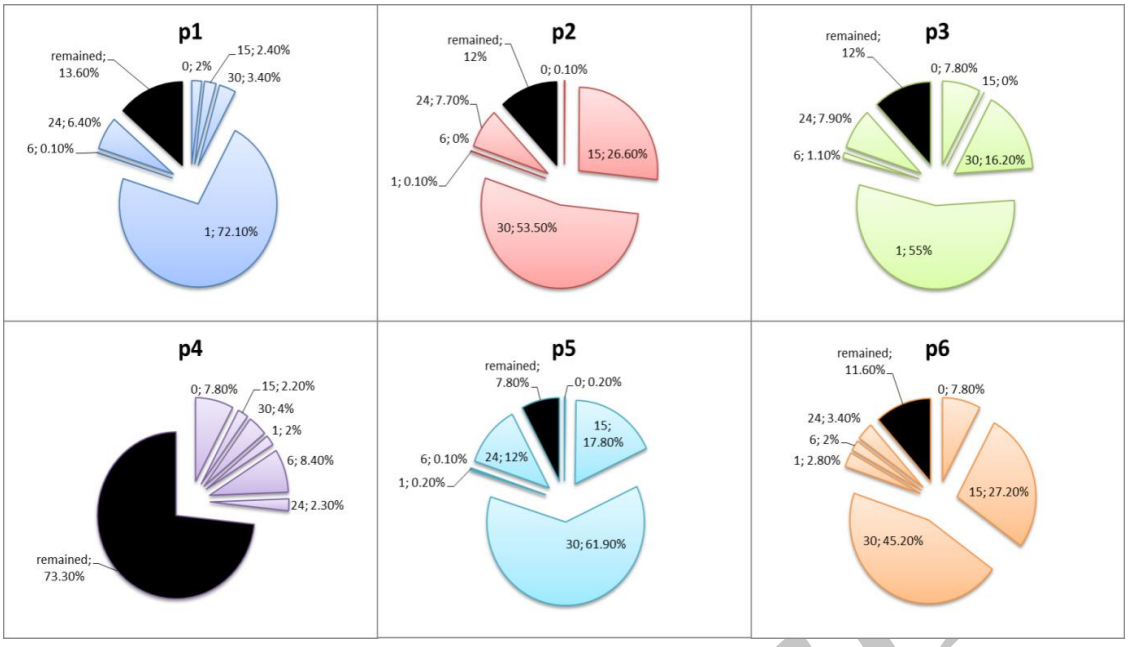
شکل۲. نمودار روند کاهش غلظت بیسفنول آ در طول h ۲٤. حرف C به نمونه‌ی کنترل پیش از اضافه شدن مکمل‌ها به محیط اشاره دارد (فمی لاکت=p1، ژری لاکت=p2، کیدی لاکت=p3، کیدی لاکت زینک=p4، لاکتوکر=p5، لاکتوفم=p6).

اثربخشی نیز اظهارنظر شود که در این خصوص پیشنهاد می‌شود برای بهبود اثر *کیدی لاکت زینک*، دز مصرفی آن دو برابر و یا زمان تجدید دز به نصف (۱۲ h) کاهش یابد. درنهایت همان‌طور که انتظار می‌رفت BPA بر روی کیدی لاکت زینک اثر کمتری داشته و ازاین‌رو جمعیت آن به‌مراتب بیشتر از لاکتوکر بود. این امر نیز خود تأییدی بر نتایج حاصل از کیت الایزا است.

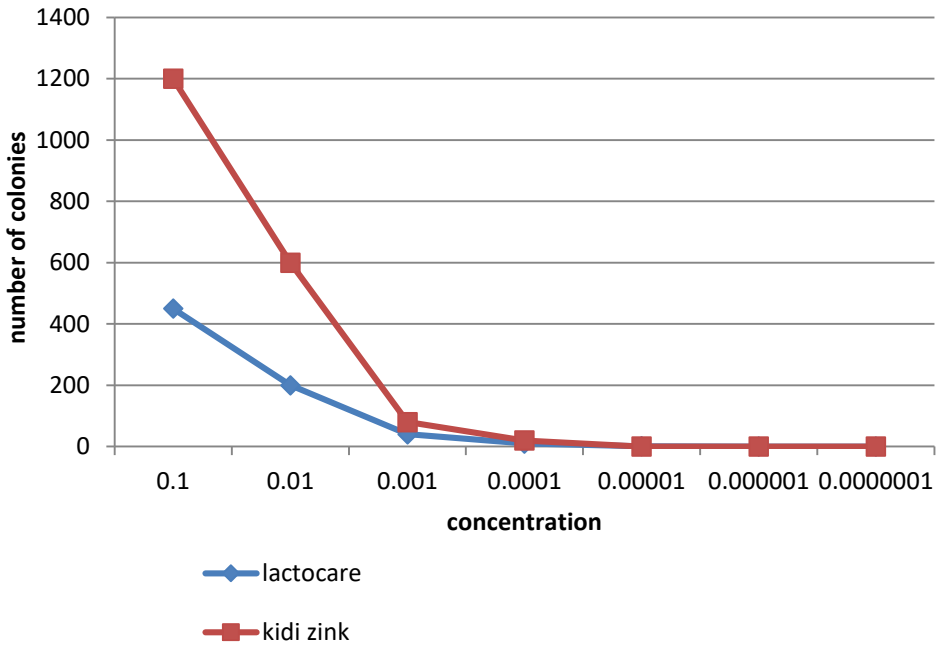
بازه تغییرات غلظتی BPA محیط در طول تیمار ۲۴ ساعته در شکل ۵ نشان داده‌شده است. میانه که در شکل با خطوط قرمزرنگ مشخص‌شده، می‌تواند به‌عنوان یک معیار خوب برای مقایسه‌ی سرعت و میزان اثرگذاری فراورده‌ها در زیست پالایی BPA مورداستفاده قرار گیرد. میانه‌های پایین‌تر (p2، p5 و p6) سرعت عکس‌العمل بیشتری داشته‌اند و در همان ۳۰ دقیقه‌ی اول حدود ۸۰ درصد کاهش ایجاد نموده‌اند. نکته قابل‌توجه دیگری در مورد p6 وجود دارد. برخلاف سایر مکمل‌ها، p6 شامل سویه‌های بیفیدوباکتریوم نبود. به نظر می‌رسد که استفاده از سویه‌های لاکتوباسیلوس به‌تنهایی قادر به ایجاد عملکرد مطلوب بوده است.

Archive of SID

www.SID.ir



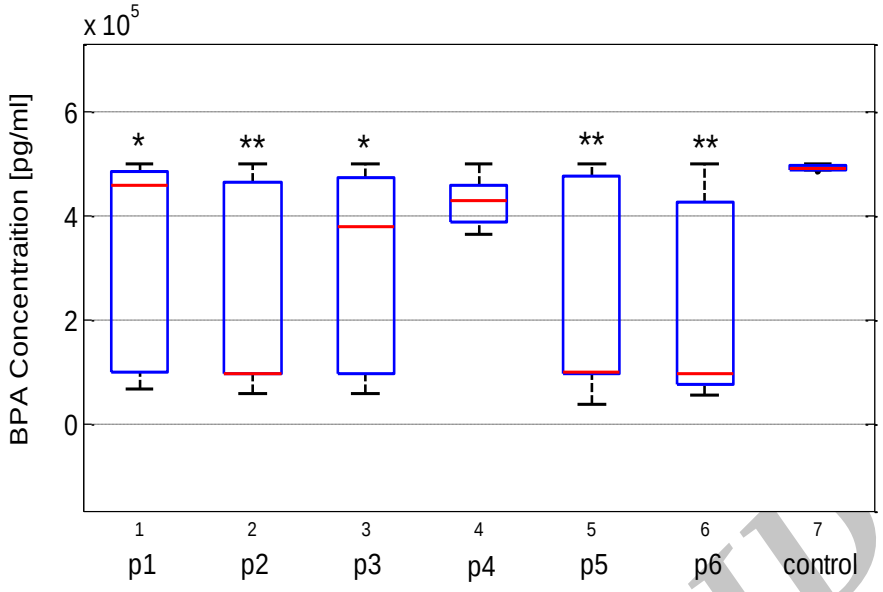
شکل ۳. درصد کاهش[1] بیسفنول آ در زمان‌های مختلف (میزان BPA باقیمانده در محیط پس از ۲٤ h بارنگ مشکی مشخص‌شده است).



شکل ٤. نمودار شمارش کلونی با استفاده از روش پورپلیت (لاکتوکر: cfu/ml ۱۱*۱۰[۳] و کیدی لاکت زینک: cfu/ml ۸*۱۰[٤]).

[1] Degradation

www.SID.ir



شکل ۵. بازه‌ی تغییرات غلظتی BPA محیط در طول تیمار ۲٤ ساعته با ٦ فراورده‌ی پروبیوتیک. اختلاف بین گروه‌های باکتریایی و گروه کنترل توسط آزمون واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر بررسی گردید. تمامی فراورده‌ها (به‌جز p4)، اختلاف معناداری با گروه کنترل ایجاد نمودند. ۰/۰۵> p*, ۰/۰۱> p, N=۷.**

جدول ۳. نرخ اتصال بیسفنول آ در طول ۲٤h

فرآورده	نرخ اتصال٪					
	۰h	۰/۲۵h	۰/۵h	۱h	٦h	۲٤h
P1	۱/۹۸ ± ۰/۳۶^{aA}	۳/۰۲ ± ۰/۳۵^{aB}	۶/۰۷ ± ۰/۱۷^{aC}	۷۹/۸۵ ± ۰/۸۰^{aD}	۷۹/۶۲ ± ۰/۸۵^{aD}	۸۶/۰۶ ± ۰/۵۵^{aE}
P2	۰/۱۴ ± ۰/۴۹^{aA}	۲۵/۷۰ ± ۰/۵۸^{bB}	۷۹/۸۶ ± ۰/۹۶^{bC}	۸۰/۱۸ ± ۰/۵۲^{aC}	۷۹/۹۱ ± ۰/۴۲^{aC}	۸۷/۷۰ ± ۰/۴۴^{aD}
P3	۷/۷۸ ± ۰/۷۸^{bA}	۲/۶۱ ± ۰/۵۵^{aB}	۲۲/۵۷ ± ۰/۵۳^{cC}	۷۹/۸۵ ± ۰/۸۰^{aD}	۷۹/۷۳ ± ۰/۰۵^{aD}	۸۵/۶۷ ± ۰/۴۹^{aE}
P4	۷/۷۸ ± ۰/۸۰^{bA}	۸/۷۰ ± ۰/۲۱^{cA}	۱۲/۳۸ ± ۰/۷۹^{dB}	۱۵/۴۲ ± ۰/۴۸^{bB}	۲۲/۸۴ ± ۰/۱۴^{bC}	۲۴/۹۶ ± ۰/۱۰^{bC}
P5	۰/۱۸ ± ۰/۴۱^{aA}	۱۶/۸۱ ± ۰/۷۴^{dB}	۷۹/۶۲ ± ۰/۸۱^{eC}	۸۰/۰۵ ± ۰/۸۴^{aC}	۷۹/۸۳ ± ۰/۲۶^{aC}	۹۲/۰۰ ± ۰/۸۲^{cD}
P6	۷/۷۸ ± ۰/۲۶^{bA}	۳۴/۰۶ ± ۰/۲۶^{eB}	۷۹/۸۶ ± ۰/۹۶^{eC}	۸۲/۸۸ ± ۰/۳۶^{aD}	۸۴/۶۹ ± ۰/۰۷^{cD}	۸۸/۱۱ ± ۰/۴۷^{dE}

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند.

در ستون‌های یکسان، میانگین‌های با حروف لاتین متفاوت (a-f) اختلاف معناداری دارند. (p<۰/۰۵)

در سطرهای یکسان، میانگین‌های با حروف لاتین بزرگ (A-E) اختلاف معناداری دارند. (p<۰/۰۵)

Archive of SID

www.SID.ir

توانایی اتصال بیسفنول‌آ به دیواره سلولی باکتری‌ها

نرخ اتصال[1] بیسفنول‌آ به دیواره سلولی باکتری‌ها که در جدول (۳) مشخص گردیده، توسط فرمول زیر محاسبه‌شده است:

رابطه (۱) $$BR = (1 - C/C_0) \times 100$$

در این فرمول BR نرخ اتصال بیسفنول‌آ، C غلظت بیسفنول‌آ موجود در سوپرناتانت و C_0 غلظت بیسفنول‌آ موجود در نمونه کنترل است. همان‌طور که اشاره شد p2، p5 و p6 بیش‌ترین نرخ اتصال را داشته و نزدیک به ۹۰ درصد بیسفنول‌آ را پس از ۲۴ h حذف نموده‌اند.

باکتری‌های مورداستفاده در این مطالعه که طی فرایند خشک‌کردن با اسپری[2] تولیدشده بودند در سرم فیزیولوژی با pH اسیدی قرار گرفتند. خشک‌کردن با اسپری و اسیدی بودن محیط هر دو از عواملی هستند که می‌توانند بخش قابل‌توجهی از باکتری‌ها را غیرفعال کرده و یا حتی از بین ببرند. بااین‌وجود، توانایی بالای فرآورده‌ها در حذف BPA ثابت می‌نماید که زنده‌بودن باکتری‌ها یک پیش‌شرط الزام‌آور در اتصال به BPA نیست.

ساختار دیواره سلولی باکتری‌های اسیدلاکتیک در میزان موفقیت آن‌ها در برقراری ارتباط با ترکیبات آب‌گریزی نظیر BPA اثرگذار است. همچنین، برخی از شرایط جانبی آزمایش نظیر غلظت اولیه باکتری‌های موجود در هر فرآورده و مدت‌زمان گرماگذاری بر توانایی اتصال مؤثر بوده‌اند، به‌گونه‌ای که با افزایش سطح و زمان تماس باکتری‌ها با BPA احتمال جذب سطحی آن به دیواره سلول‌ها افزایش‌یافته است. در میان شش فرآورده مورد آزمایش، بیش‌ترین سطح جذب BPA (۹۲ درصد) در p5 مشاهده شد که بیش‌ترین غلظت اولیه باکتری را داشت. باوجوداینکه ترکیب سویه‌های مورداستفاده در p1، p2 و p5 یکسان بود (به مواد و روش‌ها مراجعه شود)، نرخ اتصال آن‌ها با توجه به دز باکتری از ۹۲ به ۸۶ درصد تغییر نمود. افزایش زمان گرماگذاری از ۱۵ min به ۲۴ h نرخ اتصال را به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای در تمام گروه‌ها افزایش داد. این افزایش، روند پیوسته و پایداری را تا آخرین لحظه‌ی تیمار طی نمود؛ بنابراین، می‌توان انتظار داشت که استفاده منظم از ترکیب سویه‌های پروبیوتیک تأثیر پایداری را در راستای دفع ورودی روزانه‌ی BPA از بدن داشته باشد. غنی‌سازی فرآورده‌های پروبیوتیک با زینک سولفات بر توانایی اتصال آن‌ها اثر منفی داشته است. به نظر می‌رسد چنین موادی می‌توانند در فرایند اتصال اختلال ایجاد نمایند.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مطالعه حاضر اثر ترکیب سویه‌های پروبیوتیک بر کاهش سمیت بیسفنول‌آ محیطی را نشان می‌دهد. تاکنون اثر مثبت *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بریو*[3] در موش‌های در تماس با بیسفنول‌آ گزارش‌شده است (۲۰). بااین‌وجود مطالعه حاضر همکاری و تعامل سویه‌های پروبیوتیکی مورداستفاده در فرآورده‌های پروبیوتیکی را تأیید می‌کند. تأثیر متقابل باکتری‌های پروبیوتیکی در مواجهه با بیسفنول‌آ در شرایط آزمایشگاهی به‌عنوان یک گام غربالگری اولیه برای شناسایی ترکیباتی که باهم تعامل داشته و اثر یکدیگر را تقویت می‌کنند بررسی شدند. در این راستا طیف گسترده‌ی از گونه‌های باکتریایی

[1] Binding rate

[2] Spray-drying

[3] *Bifidobacterium breve*

www.SID.ir

Archive of SID

شامل: *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس رامنوز*، *لاکتوباسیلوس بولگاریوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس گاسری*، *بیفیدوباکتریوم بریو*، *بیفیدوباکتریوم لانگوم*، *بیفیدوباکتریوم اینفنتیس*، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* بررسی شدند. نمونه‌برداری‌ها در بازه‌ی زمانی ۲۴ h انجام گرفت. تقریباً در همه‌ی محیط‌های آزمایش به‌طور میانگین در یک ساعت اول حدود ۸۰ درصد از بیسفنول‌آ کاهش یافت و در ۲۴ h به ۸۵ درصد رسید که نشان از تأثیر قابل‌توجه این فراورده‌بر زیست پالایی BPA دارد. پارامترهای مهمی نظیر نوع سویه‌ها، تعداد گونه‌ها و دز هرگونه موردتوجه و ارزیابی قرار گرفت. با مقایسه نتایج و فرمولاسیون و دز مکمل‌ها مشخص گردید که دز پروبیوتیک‌ها و زمان انکوباسیون نسبت به سایر پارامترها از اهمیت بیشتری برخوردارند. این تحقیق به معرفی یک ابزار درمانی کمکی برای بهبود سطح ایمنی زیستی در برابر بیسفنول‌آ پرداخت. با توجه به چنین نتایجی انتظار می‌رود که پروبیوتیک‌ها بر کاهش سایر آلاینده‌های زیست‌محیطی نیز تأثیرات مثبتی داشته باشند. در این راستا بررسی‌های بیشتر بالینی و کلینیکی در خصوص منافع و قابلیت‌های پروبیوتیک‌ها در مورد سایر آلاینده‌ها پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

با تشکر و قدردانی از شرکت زیست تخمیر و آزمایشگاه پروبیوتیک دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران که امکانات انجام این پژوهش را فراهم نمودند.

منابع

1. Peller JR, Mezyk SP, Cooper WJ. Bisphenol A reactions with hydroxyl radicals: diverse pathways determined between deionized water and tertiary treated wastewater solutions. Research on Chemical Intermediates. 2009 Jan 1;35(1):21-34.

2. Kuch HM, Ballschmiter K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC−(NCI)− MS in the picogram per liter range. Environmental science & technology. 2001 Aug 1;35(15):3201-6.

3. Fromme H, Küchler T, Otto T, Pilz K, Müller J, Wenzel A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. Water research. 2002 Mar 31;36(6):1429-38.

4. Suzuki T, Nakagawa Y, Takano I, Yaguchi K, Yasuda K. Environmental fate of bisphenol A and its biological metabolites in river water and their xeno-estrogenic activity. Environmental science & technology. 2004 Apr 15;38(8):2389-96.

5. Ragavan KV, Rastogi NK, Thakur MS. Sensors and biosensors for analysis of bisphenol-A. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2013 Dec 31;52:248-60.

6. Bannister R, Beresford N, May D, Routledge EJ, Jobling S, Rand-Weaver M. Novel estrogen receptor-related transcripts in Marisa cornuarietis; a freshwater snail with reported sensitivity to estrogenic chemicals. Environmental science & technology. 2007 Apr 1;41(7):2643-50.

7. Vandenberg LN, Maffini MV, Wadia PR, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. Endocrinology. 2007 Jan;148(1):116-27.

8. Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T, Fushiki S. Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. Neuroscience letters. 2007 Jun 13;420(2):100-5.

9. Schecter A, Malik N, Haffner D, Smith S, Harris TR, Paepke O, Birnbaum L. Bisphenol a (BPA) in US food. Environmental science & technology. 2010 Nov 1;44(24):9425-30.

10. Seachrist DD, Bonk KW, Ho SM, Prins GS, Soto AM, Keri RA. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. Reproductive Toxicology. 2016 Jan 31;59:167-82.

11. Bautista-Toledo I, Ferro-Garcia MA, Rivera-Utrilla J, Moreno-Castilla C, Vegas Fernandez FJ. Bisphenol A removal from water by activated carbon. Effects of carbon characteristics

Archive of SID

www.SID.ir

and solution chemistry. Environmental science & technology. 2005 Aug 15;39(16):6246-50.

12. Gözmen B, Oturan MA, Oturan N, Erbatur O. Indirect electrochemical treatment of bisphenol A in water via electrochemically generated Fenton's reagent. Environmental science & technology. 2003 Aug 15;37(16):3716-23.

13. Nomiyama K, Tanizaki T, Koga T, Arizono K, Shinohara R. Oxidative degradation of BPA using TiO2 in water, and transition of estrogenic activity in the degradation pathways. Archives of environmental contamination and toxicology. 2007 Jan 1;52(1):8-15.

14. Fouda A, Khalil AM, El-Sheikh HH, Abdel-Rhaman EM, Hashem AH. Biodegradation and detoxification of bisphenol-A by filamentous fungi screened from nature. J. Adv. Biol. Biotechnol. 2015;2:123-32.

15. Zhang W, Yin K, Chen L. Bacteria-mediated bisphenol A degradation. Applied microbiology and biotechnology. 2013 Jul 1;97(13):5681-9.

16. Preethi S, Sandhya K, Lebonah DE, Prasad CV, Sreedevi B, Chandrasekhar K, Kumari JP. Toxicity of bisphenol a on humans: a review. International Letters of Natural Sciences. 2014;22.

17. Haskard C, Binnion C, Ahokas J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. Chemico-biological interactions. 2000 Aug 15;128(1):39-49.

18. BPA Elisa kit Cat#BPA1/BPA11/BPA21/BPA101. Detroit R&D, Inc. https://www.detroitrandd.com. Published January 2015.

19. Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, Gray LE, Hayward SW, Lees PS, McIntyre BS, Portier KM, Schnorr TM, Selevan SG, Vandenbergh JG. NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology. 2008 Jun 1;83(3):157-395.

20. Oishi K, Yokoi W, Yoshida Y, Masahiko IT, Sawada H. Effect of probiotics, *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus casei*, on bisphenol A exposure in rats. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2008 Jun 23;72(6):1409-15.

Archive of SID

www.SID.ir

The effect of commercial probiotic formulations on reduction of Bisphenol-A *in-vitro*

Sogand Solouki[*1], Mohammad Reza Fazeli[2]

[1]Department of Pharmacology and Toxicology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[2]Department of Food and Drug Control, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Bisphenol-A (BPA) is an industrially important compound used in the production of polycarbonates, epoxy resins and thermal papers in many chemical manufacturing plants throughout the world. So, this dangerous chemical toxin may be taken up via the diet and have adverse effects on human health. On the other hand, inducing beneficial bacteria is an effective way to improve the biosafety and health level. The induction process can be done by supplements containing large amounts of probiotics. Combination of compatible probiotic strains from different species may improve synergistic relation among bacteria and increase the effectiveness of treatment. In this study we try to investigate and quantify the effect of commercial probiotic formulations exist in Iran pharmaceutical market on reduction of bisphenol A. For this purpose, the amount of environmental BPA was measured during a 24-hour treatment with the mixture of probiotic strains. Our results showed a significant drop in BPA concentration compared with the toxicity of the control group. The experimental framework was arranged in a way to determine the most efficient strains. Almost all groups could reduce about 80% of BPA in the first hour. Also, these results suggest that regular usage of probiotic supplementation with special mixture of strains can suppress the harmful effects of BPA.

Key words: Bisphenol-A, Mixture of probiotic strains, Bioremediation, Toxicology.

Archive of SID

* sogandsolooki@gmail.com

www.SID.ir