فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی27، جلد 7، شماره 4، پائیز 93، صفحه 71 تا 77

بررسی تأثیر دیواره سلولی *Saccharomyces cerevisiae AT-50* بر رشد کوکسی-های کوآگولاز مثبت جدا شده از پوست سالم انگشت پا در بیماران دیابتی

آزاده توفیقی[1]، محمد حسین آرش اسدی راد[1]
1-استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران. azadeh_t392@yahoo.com

تاریخ دریافت: 93/7/2 تاریخ پذیرش:93/8/10

چکیده

مقدمه و هدف: دیابت شیرین (Diabetes Mellitus)، از شایع ترین بیماری های اندوکرینی است. متعادل ساختن میکروفلور بومی و کاهش بیماریزاهای فرصت طلب سطح پوست می تواند در پیشگیری و یا کاهش ایجاد زخم های پوستی نقش مؤثری داشته باشد. هدف ازتحقیق حاضر بررسی اثر پریبیوتیکی دیواره سلولی جدایه *ساکارومایسس سرویزیه* AT-50 بر مهار رشد کوکسی های گرم مثبت کاتالاز مثبت جدا شده از پوست سالم بین انگشتان پا در افراد دیابتی بود.

روش کار: نمونه برداری از پوست سالم بین انگشتان پا در 53 مورد بیمار دیابتی و 50 مورد بیمار غیر دیابتی انجام و سویه های کوکسی گرم مثبت کاتالاز مثبت جداسازی شدند. دیواره سلولی سویه *ساکارومایسس سرویزیه* AT-50 با استفاده از سونیکاتور تهیه و اثر پریبیوتیکی 1/5 و 3 درصد آن برجدایه های کوآگولاز مثبت با استفاده از روش چاهک مورد بررسی و قطر هاله های عدم رشد بر حسب میلی متر محاسبه و به عنوان اثر مهار کنندگی مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که نسبت کل باکتری‌های بی هوازی به هوازی جدا شده از پوست سالم بین انگشتان پا در نمونه های دیابتی و غیر دیابتی به ترتیب 1/44 و 1/24 و نسبت کل باکتری های هوازی و بی هوازی جدا شده از نمونه های دیابتی به نمونه های سالم به ترتیب حدود 1/55 و 1/81 بود. هم چنین تعداد کوکسی های گرم مثبت کوآگولاز مثبت جدا شده از پوست سالم نمونه های دیابتی به میزان 75٪ بیشتراز نمونه های کنترل بود.

نتیجه گیری: سطح پوست سالم افراد مبتلا به دیابت بدون در نظر گرفتن سن و جنس نسبت به پوست سالم افراد غیر دیابتی از شرایط مناسب تری جهت رشد میکروب ها به ویژه کوکسی های کوآگولاز مثبت برخوردار است. اثر مهار کنندگی پریبیوتیک دیواره سلولی جدایه بومی AT-50 *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط *in vitro* وابسته به دوز بوده و مقاومتی ذاتی در جدایه های پوست سالم افراد دیابتی نسبت به اثر مهارکنندگی پریبیوتیک مورد استفاده دیده می شود.

واژه های کلیدی: دیابت، پوست سالم، کوآگولاز، پریبیوتیک.

مقدمه

دیابت شیرین (Diabetes Mellitus)، یکی از شایع-ترین بیماری های اندوکرینی است و در 90 درصد موارد از نوع غیر وابسته به انسولین(نوع II) می باشد(7). بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در حال حاضر 382 میلیون نفر و تا سال 2035 تعداد مبتلایان به 592 میلیون نفر خواهد رسید(22). دیابت با هایپرگلیسمی همراه است و در اثر نقص در ترشح(نوع I) یا اختلال در عملکرد انسولین و یا هر دو(نوع II) ایجاد می شود(7). این بیماری می تواند عامل مشکلات فراوانی از جمله بروز تظاهرات و زخم های پوستی منجر به قطع عضو باشد. معمولاً علائم پوستی بعد از بروز دیابت ظاهر می-شوند ولی ممکن است در برخی موارد حتی از سال ها قبل از تشخیص دیابت به وجود آمده باشند(12). میزان عفونت درماتوفیتی ناخن و انگشتان پا در بیماران دیابتی حدود 2/77 برابر افراد غیر دیابتی تخمین زده شده است(10). ماسراسیون و شکاف های پوستی می توانند به عنوان محلی برای ورود باکتری های عامل عفونت باشد(7). نتیجه کشت سطحی از زخم های دیابتی به پاتوژن های متعددی از جمله کوکسی های گرم مثبت و منفی و عوامل بی هوازی اشاره دارد، بر اساس همایش

www.SID.ir

انجمن دیابت امریکا، یکی از راه های درمان استاندارد زخم های دیابتی استفاده از آنتی بیوتیک هاست که این امر خود می تواند احتمال ایجاد سویه های میکروبی مقاوم به آنتی بیوتیک را افزایش دهد(18). پربیوتیک ها (Prebiotic) عوامل غیر زنده ای هستند که معمولاً به صورت تجاری در صنایع مختلفی مانند دامپروری، آبزی‌پروری وغیره جهت افزایش مقاومت نسبت به بیماری ها و ارتقا سلامتی به کار می رود(3). دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* به عنوان یک پربیوتیک حاوی ترکیبات محرک سیستم ایمنی، بتا گلوکان ها، اسیدهای نوکلئیک و اولیگوساکاریدهایی مانند مانان است(19). با توجه به پیدایش روزافزون موارد میکروبی مقاوم به آنتی بیوتیک در دنیا، در تحقیق حاضر اثر پربیوتیکی دیواره سلولی جدایه *ساکارومایسس سرویزیه* AT-50 برروی رشد گونه های کاتالاز مثبت استافیلوکوکوس جدا شده از پوست سالم بین انگشتان پای افراد دیابتی صورت گرفت.

مواد و روش ها

نمونه برداری

نمونه برداری با کمک سواب استریل و از پوست سالم بین انگشتان پا در 53 مورد بیمار دیابتی و 50 مورد بیمار غیر دیابتی(نمونه کنترل) مراجعه کننده به بیمارستان ولیعصر زنجان، در نیمه اول سال 1392 بدون در نظر گرفتن سن و جنس و به صورت کاملاً تصادفی صورت گرفت.

جداسازی گونه های کاتالاز مثبت

بلافاصله پس از نمونه برداری نمونه ها تحت شرایط استریل جهت جداسازی سویه های کاتالاز مثبت استافیلوکوکوس به آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه ازاد اسلامی واحد زنجان منتقل و مورد آزمایش قرار گرفتند. به این منظور ابتدا از محیط کشت Brain Heart Infusion Broth (BHIB) به عنوان محیط غنی کننده و سپس از Blood Agar جهت جداسازی سویه های مولد همولیز بتا استفاده شد. از کلنی های دارای همولیز بتا رنگ آمیزی گرم انجام شد سپس نمونه های کوکسی گرم مثبت تحت آزمون کوآگولاز قرار گرفتند (21).

استخراج دیواره سلولی سویه ساکارومایسس سرویزیه AT-50

مخمر ساکارومایسس سرویزیه بومی AT-50 (Tofighi) جهت انجام تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا جهت کشت انبوه از محیط کشت Potato Dextrose Broth استفاده شد. به مدت 48 ساعت در دمای 35 درجه سانتی گراد با 150 rpm کشت داده شد. جداسازی فاز جامد از مایع با استفاده از سانتریفیوژ و در 3000 rpm انجام گرفت. فاز جامد در سه مرحله به وسیله سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد(20). سوسپانسیون مخمرها در بافر فسفات سدیم سرد 0/1 مولار(pH =7/2) تهیه و با استفاده ازسونیکاتور با دامنه 60٪ به مدت 2 دقیقه شکسته شدند(4). سانتریفیوژ در 5000 rpm به مدت 1 دقیقه به منظور جداسازی فاز جامد(دیواره سلولی) از فاز مایع(عصاره سیتوپلاسمی) انجام شد. رسوبات حاوی دیواره سلولی طی سه مرتبه به واسطه آب مقطر استریل شستشو داده شد و در دمای 20- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (1).

اثر پربیوتیکی دیواره سلولی ساکارومایسس سرویزیه برجدایه های کوآگولاز مثبت در *in vitro*

جدایه های کوآگولاز مثبت در محیط BHIB به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد کشت شدند. جهت استاندارد نمودن غلظت تلقیح، از نیم مک فارلند استفاده شد. به این ترتیب حدود $1/5\times10^8$ CFU/mL از سویه کوآگولاز مثبت استافیلوکوکوس بر روی محیط کشت Nutrient Agar (NA) به صورت یکنواخت کشت داده شد سپس در چهار گوشه پلیت با فواصل مشخص، چهار چاهک تعبیه گردید. در سه چاهک غلظت های 1/5 و 3 درصد از دیواره سلولی استخراج شده و در چاهک چهارم آب مقطر استریل به عنوان

Archive of SID

www.SID.ir

شاهد(هر یک به میزان 1 میلی لیتر) ریخته شد. پلیت ها به مدت یک شبانه روز در دمای 37 درجه سانتی گراد نگه داری شدند و در پایان قطر هاله های عدم رشد اندازه گیری شد.

اثر پریبیوتیکی دیواره سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* بر زنده مانی جدایه ها

نمونه برداری از منطقه هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها با استفاده از سواب استریل صورت گرفت. نمونه ها در محیط NA به صورت خطی کشت و به مدت یک شبانه روز در دمای 37 درجه سانتی گراد نگه داری شدند.

نتایج

نتایج حاصل از نمونه برداری از پوست سالم بین انگشتان پا در 53 مورد بیمار دیابتی مراجعه کننده به بیمارستان ولیعصر زنجان و 50 مورد غیر دیابتی بدون در نظر گرفتن سن و جنس درنیمه اول سال 1392 در جدول 1 نشان داده شده است.

جدول 1- تعداد کل باکتری های هوازی و بی هوازی جدا شده از نمونه های بالینی افراد دیابتی و غیر دیابتی و نسبت آن ها

نمونه ها	کل باکتری های هوازی CFU/mL	کل باکتری های بی هوازی CFU/mL	کل باکتری های بی هوازی / هوازی
دیابتی	2/64 ±0/61	3/8 ±0/11	1/44
کنترل	1/7 ±0/03	2/1 ±0/21	1/24

همان‌گونه که در جدول 1 مشاهده می شود تعداد کل باکتری های هوازی و بی هوازی جدا شده از پوست سالم بین انگشتان پا در نمونه های دیابتی با نمونه های کنترل(غیر دیابتی) از نظر آماری دارای تفاوت معنی-داری بوده است($P< 0/05$). هم چنین، تعداد کل باکتری‌های بی هوازی در تمام نمونه های دیابتی و غیر دیابتی(کنترل) بیشتر از تعداد کل باکتری های هوازی بوده است. از کل باکتری های جدا شده از نمونه های پوست سالم نمونه های دیابتی و کنترل به ترتیب 7 و 4 جدایه کوکسی گرم مثبت کوآگولاز مثبت شناسایی شد. تأثیرسوسپانسیون 1/5 و 3 درصدی دیواره سلولی جدایه *ساکارومایسس سرویزیه* AT-50 بر جدایه-های کوکسی کوآگولاز مثبت با استفاده از اندازه گیری قطر هاله های عدم رشد تعیین گردید. نتایج نشان داد که تحت شرایط یکسان، نمونه های کوآگولاز مثبت جدا شده از پوست سالم بین انگشتان پا درافراد غیر دیابتی(کنترل) نسبت به نمونه های دیابتی، به غلظت‌های پریبیوتیک دیواره سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* سویه AT-50 حساس تر بوده است. ازسویی دیگر، درتمام موارد، میانگین قطر هاله عدم رشد با افزایش غلظت پریبیوتیک مورد آزمایش، بیشتر شده است و این امر نشان می دهد که تأثیر مهار کنندگی پریبیوتیک دیواره سلولی *ساکارومایسس* مورد استفاده، برجدایه های کوآگولاز مثبت، وابسته به دوز بوده است.(جدول2).

جدول 2- اثر غلظت 1/5 و 3 درصدی پریبیوتیک دیواره سلولی ساکارومایسس سرویزیه بر قطر هاله عدم رشد AT-50 بر نمونه های کوآگولاز مثبت جدا شده از پوست سالم بین انگشتان پا در افراد دیابتی و غیر دیابتی (کنترل)

بیماران دیابتی		بیماران غیر دیابتی (کنترل)	
غلظت 1/5%	غلظت 3%	غلظت 1/5%	غلظت 3%
26/4±5/24	**43/28±6/69**	**40±2/3**	**51±4/8**

*نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه های کنترل

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه گیری

افزایش چشم گیر بیماران مبتلا به عفونت های مزمن با ضعف سیستم ایمنی در جوامع بشری، موارد میکروبی مقاوم به آنتی بیوتیک و پیش بینی افزایش شیوع آن ها در سال های آتی باعث شد تا تلاش های فراوانی جهت شناسایی عوامل تعدیل کننده سیستم ایمنی انجام گیرد(2). در حال حاضر 382 میلیون مورد مبتلا به دیابت در کل دنیا گزارش شده است و با چنین روند افزایشی، تا سال 2035 این رقم به حدود 592 میلیون نفر خواهد رسید یا به عبارتی دیگر از هر ده نفر یک نفرمبتلا به دیابت خواهند بود. علاوه بر آن 316 میلیون نفر دیگر هم در حال حاضر تهدید به دیابت نوع 2 می باشند و انتظار افزایش این تعداد به 500 میلیون نفر طی یک نسل آینده وجود دارد(21). تحقیقات نشان داده است که ترکیبات دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* می تواند به عنوان تعدیل کننده سیستم ایمنی، عامل از بین برنده سلول های بدخیم، منبع تغذیه ای مناسب جهت فلور نرمال و نیز از بین برنده پاتوژن ها عمل نمایند(2). *ساکارومایسس سرویزیه* مخمری است که امروزه به عنوان الگوی تحقیقاتی در زمینه های مختلف پژوهشی مورد استفاده قرار می گیرد. دیواره سلولی مخمر حدود 30-15٪ وزن خشک سلول و 50-25٪ حجم سلول را تشکیل می دهد(14) و شامل سه لایه اصلی و چهار ماکرومولکول مانوپروتئین(40-35٪)، بتا گلوکان محلول و نامحلول در قلیا(50-45٪) و کیتین است که توسط پیوندهای کوولان به هم متصل شده اند(17، 5). هم چنین می توان آنزیم ها، نوکلئوتیدهای آزاد، ویتامین‌های گروه B و آمینو اسیدها را در مقادیری مناسب جهت رشد باکتری های بومی مانند لاکتوباسیل ها، بیفیدوباکتر وغیره به وفور یافت(11). پربیوتیک ها اساساً شامل عوامل غیر زنده ای هستند که به واسطه داشتن ویژگی-های متعددی از جمله عوامل مهار کننده رشد پاتوژن ها، تحریک رشد فلور بومی وغیره در صنایع مختلف کاربرد فراوان دارند. گیبسون و همکارانش در سال 2004 طی آزمایشاتی اعلام کردند که یک پربیوتیک باید دارای قابلیت هایی باشد که از آن جمله می توان به مقاوم سازی فلور میکروبی درگیر در سلامتی انسان اشاره کرد. امروزه با شناخت پربیوتیک ها و عملکرد آن ها در حفظ سلامت و اهمیت آن ها در پیشگیری از بیماری ها، از میکروارگانیزم ها و محصولات آن ها در صنایع مختلف به منظور ارتقای سطح سلامت استفاده می شود(19، 3). مطالعات متعددی بر روی اثر پربیوتیکی دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر افزایش سلامت و رشد آبزیان، طیور با تاثیر مثبت و غیر مستقیم بر میکروب های روده ای گزارش شده است. پربیوتیک های تجاری متعددی نیز با این هدف تهیه شده است(16). در سال 2003 کیم و همکاران تأثیر عصاره سیتوپلاسمی و دیواره باکتری های پروبیوتیک را بر مهار سلول های ناخواسته و سرطانی مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که عصاره سیتوپلاسمی باعث مهار رشد سلول های K562 شده بود در حالی که دیواره سلولی استخراج شده از آن ها چنین تأثیری نداشت(13). در مقایسه با باکتری ها، مخمرهای پروبیوتیک در مهار سلول های پاتوژن، ناخواسته و سرطانی قوی تر عمل می کنند. طی تحقیقی بنیادی و همکاران اثر دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی *ساکارومایسس سرویزیه* را بر سلول های رده K562 مورد بررسی قرار دادند و مهار رشد وابسته به دوز را در آن ها به اثبات رساندند(6). در تحقیق حاضر نیز خاصیت ضد میکروبی دیواره سلولی جدایه AT-50 *ساکارومایسس سرویزیه* وابسته به دوز بوده و با افزایش دوز، درصد مهار رشد در نمونه های جدا شده از بیماران دیابتی و غیر دیابتی نیز به طور معنی داری افزایش یافته است($P<0/05$)(جدول 2). با این وجود میانگین تأثیر مهاری غلظت های 1/5 و 3 درصد پروبیوتیک دیواره

Archive of SID

www.SID.ir

سلولی جدایه *ساکارومایسس سرویزیه* AT-50 بر کوکسی های کوآگولاز مثبت جدا شده از پوست سالم انگشتان پا در نمونه های دیابتی کمتر از غیر دیابتی بود که این امر خود مقاومت ذاتی سویه های میکروبی کوآگولاز مثبت جدا شده از نمونه های دیابتی را نسبت به نمونه های غیر دیابتی نشان می دهد. کورتمن و همکاران در سال 2009 نشان دادند که میکروفلور نرمال موجود در پوست سالم می تواند در برابر میکروب های محیطی، گسترش عفونت و تجمع پاتوژن های فرصت طلب و به دنبال آن پایداری پوست سالم نقش محافظتی داشته باشند (15). گونتکاروا و همکاران نیز در سال 2010 گزارش کردند که فلور طبیعی زخم های مزمن در مقایسه با پوست سالم، از تنوع محدودی برخوردار است. به نظر می رسد که محیط اطراف زخم مزمن کلید افزایش، گسترش و تجمع میکروب های بیماری زای فرصت طلب است. همچنین درصد میکروب های بومی بی هوازی نسبت به هوازی ها بیشتر است (9). گومز و همکاران نیز در تحقیقی گزارش کردند که ترکیب میکروفلور طبیعی با شرایطی مانند آلرژی ها، بیماری هایی مانند دیابت، سرطان، التهاب ها در ارتباط است و تقویت میکروفلور می تواند توانایی سلول ها را در افزایش پاسخ به سیستم ایمنی، ترشح مواد محافظت کننده در راستای بهبود دیابت افزایش دهد. هم‌چنین تغییر در ترکیب فلور طبیعی می تواند در ایجاد و میزان التهاب نقش داشته باشد (8). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نسبت کل باکتری های بی هوازی به هوازی جدا شده از پوست سالم بین انگشتان پا در نمونه های دیابتی و غیر دیابتی به ترتیب 1/44 و 1/24 و نسبت کل باکتری های هوازی و بی هوازی جدا شده از نمونه های دیابتی به نمونه های سالم به ترتیب حدود 1/55 و 1/81 بوده است. در این میان تعداد کوکسی های کوآگولاز مثبت پوست سالم نمونه های دیابتی به میزان 75٪ بیشتر از نمونه های غیر دیابتی (کنترل) بود. خاصیت ضد میکروبی پربیوتیک دیواره سلولی مخمر AT-50 ساکارومایسس وابسته به دوز بود و با افزایش دوز، خاصیت بازدارندگی نیز افزایش می یافت. با این وجود مقاومتی ذاتی در کوکسی های کوآگولاز مثبت جدا شده از پوست افراد دیابتی در پاسخ به تأثیر ضد میکروبی پربیوتیک دیواره سلولی مشاهده شد. این نتیجه خود نشان می دهد که پوست سالم افراد دیابتی به واسطه شرایط فیزیکو شیمیایی، اکولوژیکی و ضعف سیستم ایمنی موجود در سطح پوست، محل مناسب تری برای رشد و تکثیر باکتری های پاتوژن به ویژه کوکسی های کوآگولاز مثبت می باشد. میانجی‌گری عوامل پربیوتیک ها و پروبیوتیک ها به خصوص اثر مهار کنندگی جدایه بومی AT-50 *ساکارومایسس سرویزیه* می توانند مدیریت شرایط بالینی را تسهیل سازند به گونه ای که از ایجاد و یا پیشروی زخم های مزمن مانند زخم های دیابتی نقش مهار کنندگی و پیشگیری کنندگی داشته باشد و بتوان از آن ها به عنوان بالا برنده سیستم ایمنی و هم‌چنین به جایگزینی مناسب برای آنتی بیوتیک ها به کار برد. با در نظر داشتن نادر بودن تحقیقات در زمینه اثر پربیوتیکی دیواره سلولی مخمر ها به ویژه بر پوست افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی لازم است در آینده مطالعات بیشتری جهت بررسی جنبه ها ی محافظتی پربیوتیک ها و ماندگاری اثر آن ها بر پوست و میکروفلور آن صورت گیرد.

قدردانی

این پژوهش با کمک و حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان و از طرح تحقیقاتی درون دانشگاهی شماره 3763 انجام شده است. نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین محترم بیمارستان ولیعصر زنجان و همکاران محترم آزمایشگاه

Archive of SID

www.SID.ir

تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی زنجان که در پیشبرد این طرح مساعدت نموده اند، ابراز می دارند.

منابع

1-بنیادی، ف.، نجاتی، و.، توکمه چی، ا.، حسن زاده، ش.، ریکی، م. 1392. ارزیابی اثرات آپوپتوتیک دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی استخراج شده از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر رده سرطانی K562. مجله ارمغان دانش دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، 18(9):699-710.

2-شکری، ح.، اسدی، ف.، خسروی، ع. 1385. استخراج و تخلیص بتاگلوکان از دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* و تاثیر آن بر فعالیت فاگوسیتوز و ترشح TNFα در موش های BALB/c. مجله پزشکی کوثر، 11 (3):251-259.

3-صفابخش، م.، متین فر، ع.، زمینی، ع. 1392. تأثیر پروبیوتیک دیواره سلولی مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) بر شاخص میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش فیل ماهیان انگشت قد پرورشی (*Huso huso*). مجله زیست شناسی دریا دانشگاه ازاد اسلامی واحد اهواز، 17: 87-96 .

1.Agrawal, PB., Pandi, AB. (2003). Isolation of alphaglucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*, Cell disruption and adsorption. Biochem Ene J, 15; 37-45.

2.Aguilar- Uscanga, B., Francois, JM. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Appl Microbiol, 37; 268-274.

3.Bonyadi, F., Tukmechi, A., Nejati, V. (2012). Comparative study on the effect of obtained cell wall and cytoplasmic fraction from S*accharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* on K562 cell line. Pharm Sci, 18; 69-78.

4.Ferringer, T., Miller, OF. (2002). Cutaneus manifestations of diabetes mellitus. Dermatol Clin, 20; 483-92.

5. Gomes, AC., Bueno, AA., Machado Souza, RG., Mota, JF. (2014). Gut microbiota, Probiotics and diabetes. Nutrition Journal, 13; 60.

6.Gontcharova, V., Youn, E., Sun, Y., Wolcottr, D., Dowd, SE. (2010). A comparison of bacterial composition in diabetic ulcers and contralateral intact skin. The Open Microbiology Journal, 4; 8-19.

7.Gupta, AK., Koonikov, N., Macdonald, P. (1998). Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetics: a multicenter survey. Br J Dermatol, 139; 665-71.

8.Hoseinifar, SH., Mirvaghefi, A., Mojazi Amiri, B., Khoshbavar Rostami, H., Merrifield, DL. (2011). Effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*). Juvenile Aquaculture Nutrition, 17; 498-504.

9.Jobbour, SA., Miller, JL. (2000). Endocrinopathies and the skin. Int J Dermatol, 39; 88-99.

10. Kim, J., Woo, HJ., Kim, YS., Kim, KH., Lee, HJ. (2003). Cell cycle deregulation induced by cytoplasmic of *Lactobacillus lactis* spp. in SNUC2A, a colon cancer cell line. Nutr Cancer, 46; 197-201.

11. Klis, FM., Mol, P., Helingwerf, K. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol, 26; 239-256.

12. Kurtmann, J. (2009). Pre- and Probiotics for human skin. J Dermatol Sci, 54;1-5.

13. Ring, E., Olsen Regifstad, TO., Dalmo, RA., Amlund, H., Hemre, GI. Bake, AM. (2010). Prebiotics in aquaculture: a review. Aquaculture Nutrition, 16;117-136.

14. Sener, G., Ecsioglu-Demiraop, E., Cetiner, M., Ercan Yegen, BC. (2006). Beta glucan ameliorates methotrexate induced oxidative organinjury via its antioxidant and immunomo dulatory effects. Europ J Pharmacol, 542;170-178.

15. Smith, K. (1997). Ulcerating necrobiosis lipoidica resolving in response to cyclos Porin-A. Dermatol Online J, 3;2.

16. Tatti, R., Abolghasemi, SJ., Tatina, M., Nasre Tajan, M. (2012). Influence of prebiotic immune wall on growth performance, body composition and immune physiological variables in juvenile great sturgeon, *Huso huso*. Annals of Biological Research, 3(9); 4435-4441.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Tuchmechi, A., Rahmati Andani, HR., Sheikhzadeh, N. (2011). Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, Onco rhynchus mykiss. Fish shellfish Immune, 30: 923-8.

18. Westran, RP., Struthers, JK. (2003). Clinical bacteriology. Manson Publishing, 45-54.

Archive of SID

www.SID.ir