DOI: 10.22092/vj.2017.108593.1246
شماره ۱۱۸ بهار ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

# مطالعه اثرات *Lactobacillus paracasei* بر آسیبهای کبدی ناشی از اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک در همستر

• **الهام صالحی (نویسنده مسئول)**
استادیار،گروه دامپزشکی، آموزشکده دامپزشکی،
دانشگاه اردکان، اردکان، ایران
• **مجید مروتی‌شریف‌آباد**
استادیار، گروه دامپزشکی، آموزشکده دامپزشکی،
دانشگاه اردکان، اردکان، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۹-۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶-۰۸-۰۶
Email: esalehi@ardakan.ac.ir

## چکیده

بیماری اسهال هنوز به عنوان یکی از بزرگ‌ترین مشکلات سلامتی در کشورهای مختلف جهان مطرح می‌باشد. در کشورهای در حال توسعه اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک از عوامل مهم اسهال در بچه‌ها و مهم‌ترین عامل اسهال مسافران می‌باشد. کلونیزاسیون اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک در روده انسان و حیوان و مهاجرت باکتری به کبد می‌تواند عوارضی را برای این ارگان ایجاد نماید (۲). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی توسط میزبان مصرف می‌شوند در سلامتی میزبان دارای اثرات مفیدی می‌باشند (۷). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که برخی پروبیوتیک‌ها مانند *Lactobacillus paracasei* می‌توانند از رشد باکتری‌های انتروپاتوژنیک مانند *Escherichia coli* Enteropathogenic در شرایط آزمایشگاه جلوگیری نمایند. همچنین با کمک این پروبیوتیک‌ها می‌توان از بروز ضایعات پاتولوژیک باکتری‌ها در شرایط زنده و داخل بدن موجودات زنده نیز جلوگیری کرد (۱۵و۸). هدف از این مطالعه بررسی کاربرد *Lactobacillus paracasei* به عنوان یک ارگانیسم پروبیوتیکی برای کاهش ضایعات ناشی از Enteropathogenic *Escherichia coli* در کبد همستر می‌باشد. به این منظور ۳۰ سر همستر نر به سه گروه تقسیم شدند. حیوانات گروه ۲ و ۳ هر کدام به مدت ۷ روز به ترتیب ۱ سی‌سی محلول حاوی $10^7$ و $10^8$ مخمر *Lactobacillus paracasei* را به صورت دهانی دریافت نمودند. در حالی‌که حیوانات گروه اول به عنوان گروه کنترل فقط ۱ سی سی سالین نرمال دریافت نمودند. به همه حیوانات در روز هفتم یک میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی حاوی $10^8$ باکتری Enteropathogenic *Escherichia coli* خورانده شد. در روز چهاردهم بعد از تلقیح باکتری، تمامی حیوانات به روش انسانی معدوم شدند. نمونه‌های بافتی مناسب از کبد آن‌ها تهیه و جهت ثبوت، در فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شد و به منظور تهیه مقاطع بافتی مناسب به آزمایشگاه هیستوپاتولوژی دانشگاه اردکان ارسال گردید. در پایان، نتایج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژیک کبد با استفاده از آزمون آماری Fisher exact test به طور توصیفی مورد بررسی قرار گرفت. در کبد ۸ همستر در گروه کنترل پرخونی و نکروز کانونی مشاهده گردید. این در حالی بود که در دو گروه ۲ و ۳ هیچ ضایعه پاتولوژیک مشخصی در کبد رویت نگردید. نتایج مطالعه حاضر بیان می‌کند که لاکتوباسیلوس پاراکازئی دارای اثرات حفاظتی ناشی از ضایعات اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک در بدن همستر می‌باشد.

کلمات کلیدی: کبد، هیستوپاتولوژی، لاکتوباسیلوس پاراکازئی، اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک، همستر

Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 108-115

**The study of *Lactobacillus paracasei* effects on liver lesions caused by Enteropathogenic *Escherichia coli* in hamster**

*By: Salehi, E., (Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Veterinary, Ardakan University, Ardakan, Iran. and Morovatisharifabad, M., Assistant Professor, Department of Veterinary, Ardakan University, Ardakan, Iran.*
Email: esalehi@ardakan.ac.ir

**Received: 2016-12-20** **Accepted: 2017-10-28**

Diarrheal disease is still one of the biggest health problems in different parts of the world. In developing countries, Enteropathogenic *Escherichia coli* not only is the main causes of diarrhea in children ,but also the most important factor for traveler's diarrhea. EPEC bacteria (*Escherichia coli*) colonize human and animal gastrointestinal canals and migrate to the liver which can cause complications in these organs. Probiotics are live microorganisms when used are helpful for the host's health. Recent studies show that some probiotics such as *Lactobacillus paracasei* can prevent the growth of EPEC in vitro. Also with the help of probiotics, pathological lesions of bacteria can be also avoided *in vivo*. This study was conducted to investigate the protective effects of *Lactobacillus paracasei* on liver pathologic lesions of Enteropathogenic *Escherichia coli* in hamster. Thirty male hamsters were divided into three group (1,2,3). Hamsters in group 2 and 3 received 1 ml of saline contained $10^7$ and $10^8$ CFU of *Lactobacillus paracasei* orally for 7 days. Respectively animals in group 1 (as control) received only 1 ml normal saline.on day seven all animals were challenged orally with $10^8$ Enteropathogenic *Escherichia coli* on day 14, firstly all Hamsters challenged with the bacterium, then all animals were euthanized specimens of liver were fixed in 10% buffered formalin solution for histological examinations and translated to the histopathologic laboratory of Ardakan University. the result of liver histopathologic examinations was investigated by Fisher exact test and showed areas of focal necrosis and congestion in 8 control Hamsters compared with Hamsters in experiment groups that didn't show any marked pathological changes in the liver. The result of this study indicates that *Lactobacillus paracasei* has a protective effect on Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in hamsters and histological examination confirms this results.

**Key words:** Liver, Histopathology, *Lactobacillus paracasei*, Enteropathogenic *Escherichia coli*, Hamster

## مقدمه

یکی از قسمت‌های آسیب‌پذیر بدن نسبت به عوامل بیماری‌زا دستگاه گوارش می‌باشد و از عوامل شایع بیماری‌زا در این اندام می‌توان به باکتری اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک اشاره کردکه به دنبال استقرار سبب اسهال مسافرتی و اسهال در کودکان و بالغین می‌شود (۱۰). این باکتری از طریق مصرف میوه، سبزیجات، آب و مواد غذایی آلوده وارد بدن می‌شود و با استفاده از فاکتورهای بیماری‌زا در روده کوچک استقرار می‌یابد. اولین مرحله ایجاد عفونت در دستگاه گوارش کلونیزاسیون در آن می‌باشد. گاستروانتریت ناشی از آن به دو شکل حاد یا اسهال مداوم همراه با سوء جذب ثانویه می‌باشد (۲۶ و ۲۴). مکانیزم بیماری‌زایی این باکتری ایجاد ضایعه در مخاط روده است که این ضایعه‌ها به واسطه تخریب میکروویلی ناشی از چسبیدن باکتری به سلول‌های اپیتلیوم روده‌ای و دیگر اجزا تشکیل‌دهنده اسکلت سلولی در محل اتصال باکتری به مخاط روده مشخص می‌شود (۹). اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک درکشورهای در حال توسعه در کودکان زیر ۲ سال سبب اسهال می‌شود و بندرت در بالغین اسهال ایجاد می‌کند، ولی بر عکس در کشورهای توسعه‌یافته در بالغین ایجاد اسهال می‌کند. هم چنین این باکتری از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده اسهال مسافرین می‌باشد(۱۲). به علاوه این باکتری از طریق جریان خون باب به کبد منتقل می‌شود و در کیسه صفرا جایگزین می‌شود. همچنین بصورت سپتیسمی خصوصاً در انسان‌ها و حیوانات جوان به بافت‌های مختلف منجمله کبد راه می‌یابد و ضایعاتی را نیز در آنجا تولید می‌نماید.گر چه این ضایعات اختصاصی نیستند ولی به هرحال درعفونت Enteropathogenic *Escherichia coli* درکبد دیده می‌شوندکه شامل نکروزهای کانونی کوچك یا همان ندول‌های پاراتیفوئیدی‌اند. به دنبال آن تجمع سلول‌های التهابی هیستوسیت‌ها و ماکروفاژها دیده می‌شود که در ارتباط با نکروز کبدی و یا مستقل از نکروز کبدی رخ می‌دهند. سلول‌های کوپفر کبدی کاملاً برجسته و مشخص شده و سینوزئیدهای کبدی تعداد زیادی لوکوسیت را در بر می‌گیرند (۲۴). به علاوه هپاتیت حاد و التهاب کیسه صفرا از عوارض دیگر باکتری هستند(۲۶) از جمله راه‌هایی که برای کنترل بیماری

مطرح است استفاده از پروبیوتیک‌ها است که در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب نموده است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده می‌باشند که به صورت سلول‌های خشک شده و یا به همراه محصولات تخمیری مصرف می‌شوند و با مکانیسم‌های متعدد از جمله تولید مواد و اسیدهای آلی، فعال‌نمودن سیستم ایمنی بدن (کمپلمان و سیستم بیگانه خواری)، رقابت بر سر مواد غذایی با عامل پاتوژن و اشغال گیرنده سلول میزبان باعث مهار رشد و تکثیر عوامل بیماری‌زا در آن محل از بدن می‌شوند (۶و۳). محاسن استفاده از این عوامل ارزانی، فراوانی، خطر کم و در بعضی موارد تحریک سریع سیستم ایمنی میزبان در مقایسه با واکسن‌ها می‌باشد و مصرف پروبیوتیک‌ها نقش مهمی در بازدارندگی از عفونت در قسمت‌های مختلف بدن از جمله دهان، دستگاه گوارش، دستگاه ادراری، تناسلی و دستگاه تنفسی فوقانی دارند. از این عوامل می‌توان هم در درمان و هم در پیشگیری از بیماری‌های عفونی استفاده کرد (۱۵و۷). با توجه به این که در کشور ما آلودگی به اشریشیا کلی یکی از مشکلات دامداران می‌باشد، هدف از این مطالعه بررسی اثرات پیشگیری کننده لاکتوباسیلوس پاراکازئی از ضایعات احتمالی ایجاد شده توسط اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک در پیشگیری از ضایعات کبدی در مدل همستر بود.

## مواد و روش کار

### تهیه سویه‌های باکتری

*Lactobacillus paracasei* (PB_LP58) از شرکت PROBIOWAY بصورت پودر لیوفیلیزه در داخل لوله تهیه و با ۱۰ سی‌سی بافر فسفات (Phosphate buffered Saline) مخلوط گردید و سپس در داخل محیط مایع MRS (deMaN ROGOSA and SHARPE broth) و در شرایط بی‌هوازی و در مجاورت ۵ درصد گاز دی اکسیدکربن به مدت۴۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید .

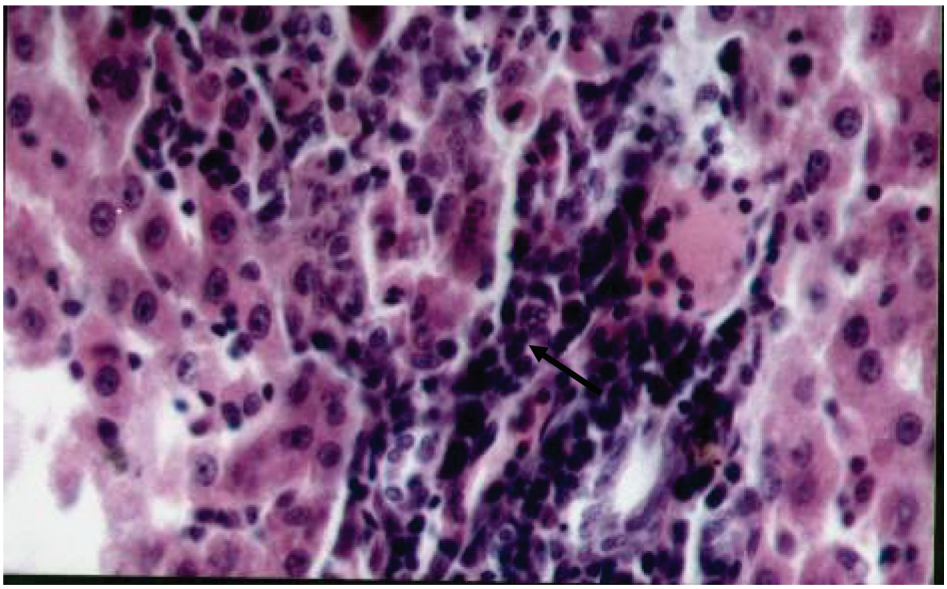
سویه *Escherichia coli* Enteropathogenic PTCC ۱۲۶۹ از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و بر روی محیط مک کانکی و ائوزین متیلن بلو (EMB) کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کلنی‌های آن از نظر میکروسکوپی و ماکروسکوپی بررسی و با تست‌های بیوشیمیایی تایید شدند.

### انتخاب همستر

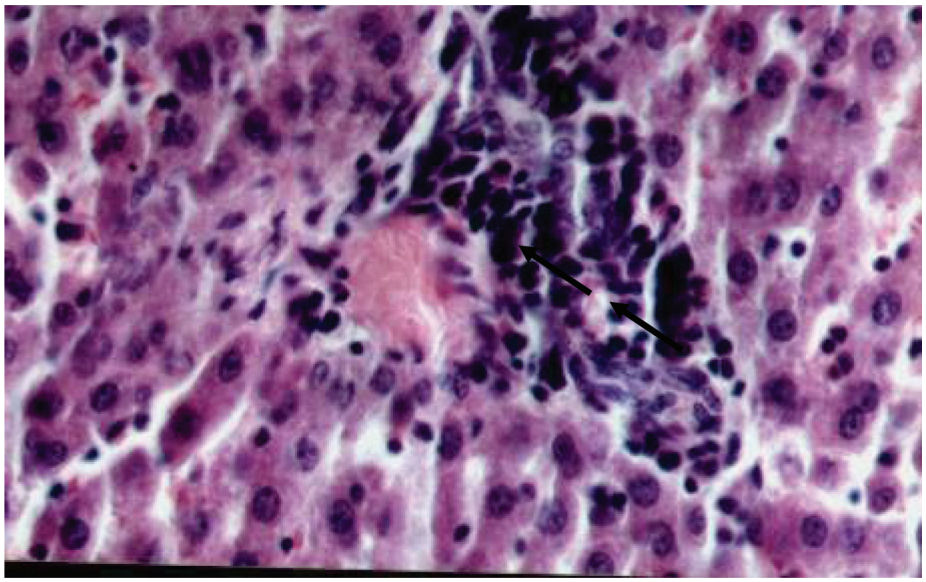
تعداد ۳۰ همستر نر با میانگین وزنی ۱۰±۱۲۰ گرم و سن حدود ۸ هفته از مرکز پرورش همستر در یزد خریداری و پس از انتقال به لانه حیوانات دانشگاه اردکان هریک در قفسی جدا گانه قرار داده شدند. قبل از انجام آزمایشات، به مدت دو هفته به آن‌ها غذا وآب استریل اتوکلاو شده به همراه آنتی بیوتیک پنی سیلین به غلظت ۴/. گرم در لیتر داده شد.

### آماده‌سازی *Lactobacillus paracasei* جهت تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی

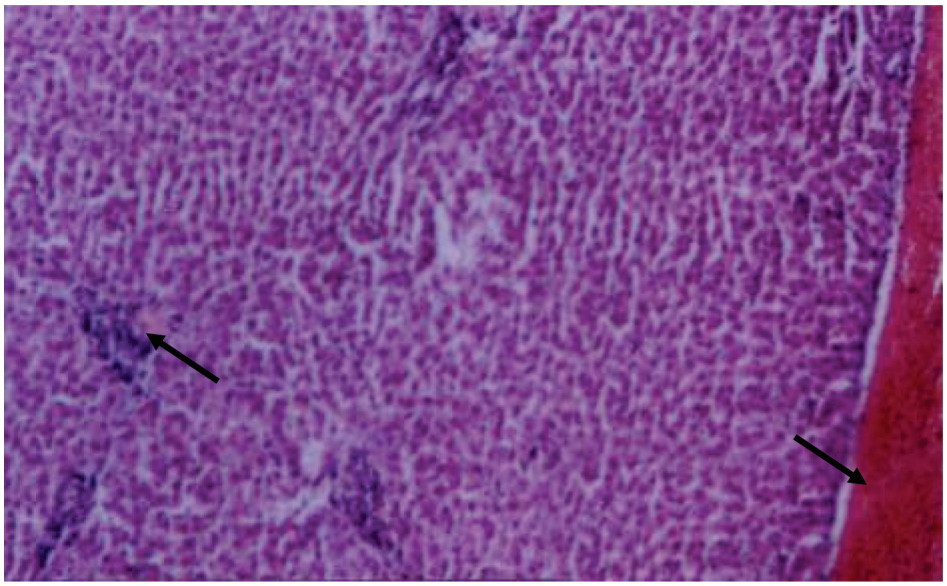
بعداز اینکه ۱ سی سی سوسپانسیون *Lactobacillus paracasei* در۱۰ سی‌سی از محیط MRS براث کشت داده شدو گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ساعت، محیط کشت مایع به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد و سپس رسوبات



**شکل ۱- نکروز کانونی کبد همراه با تجمع سلولهای آماسی در فضای پورتال وناحیه نکروزه (رنگ آمیزی H&E ،480X )**



شکل ۲- تجمع سلولهای آماسی تك هستهای در فضای پورتال همراه با افزایش این سلولها در سینوزوئیدهای کبدی (رنگ آمیزی H&E، 480X )



شکل ۳ - تجمع سلول‌های آماسی در فضای پورتال کبد(پیکان) همراه با پر خونی کبد (رنگ آمیزی H&E، 120X)

سه بار با PBS شستشو و در ۰/۵میلی لیتر PBS سوسپانسیون تهیه شد. پس از تنظیم کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر معادل ۰/۵ =OD (حدود $۱ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml) سوسپانسیون برای خوراندن به حیوانات مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برای تهیه دوز $۱۰^{۷}$ قسمتی از سوسپانسیون ۱۰ برابر رقیق‌سازی شد.

### آماده‌سازی باکتری پاتوژن (اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک)

بعد ازکشت اشریشیا کلی روی محیط تریپتیک سوی براث (TSB) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۱۲ساعت گرماگذاری می‌شود که در این مدت تعداد باکتری‌ها افزایش می‌یابد. سپس محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) در مدت ۲۰-۱۵ دقیقه با دور دو هزار سانتریفوژ و رسوبات سه بار با بافر فسفات شستشو داده می‌شود. در مرحله آخر رسوبات در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات حل شدند و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۳۰ نانومتر جذب نور اندازه‌گیری شد. با توجه به جذب ۰/۵= OD در طول موج ۶۳۰ نانومتر لوله حاوی $۱ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ ml توده باکتریال می‌باشد. این محلول برای خوراندن به همستر آماده شد.(۲۷)

### خوراندن باکتری و پروبیوتیک به حیوانات

تعداد ۳۰ همستر به سه گروه ۱، ۲ و۳ تقسیم شدند.گروه ۱ به عنوان گروه کنترل وگروه‌های ۲ و۳ دریافت کننده *Lactobacillus paracasei* بودند. به هر همستردر گروه‌های آزمایشی ۲ و۳، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی *Lactobacillus paracasei* خورانده شد که برای گروه دوم حاوی $۱۰^{۷}$ و برای گروه سوم حاوی $۱۰^{۸}$ باکتری بود. به همسترهای گروه شاهد هم یك میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی خورانده شد. تلقیح سوسپانسیون به همسترها با استفاده از پیپت و به صورت دهانی به مدت ۷ روز انجام شد. در روز هفتم همسترهای تمام گروه‌ها علاوه بر باکتری *Lactobacillus paracasei* یك دوز حاوی $۱۰^{۸}$ عدد باکتری Enteropathogenic *Escherichia coli* را نیز دریافت کردند. در روز چهاردهم بعد از مواجه باکتری، تمام حیوانات با روش بیهوشی و تزریق سولفات منیزیم ۵ درصد در قلب معدوم شدند و مورد کالبدگشایی قرار گرفتند. تمام کبد از هر همستر برداشته شد و داخل فرمالین بافر۱۰ درصد قرار گرفت و برای تهیه مقاطع بافتی و بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیك به آزمایشگاه هیستوپاتولوژی دانشگاه اردکان انتقال داده شد.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای بررسی نتایج هیستولوژیک و مقایسه گروه‌های آزمایش از آزمون ناپارامتری خی دو (فیشر) استفاده گردید. در تمامی موارد ۰/۰۵ > p سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

پس از دریافت باکتری پاتوژن تلفاتی در گروههای دوم و سوم مشاهده نشد. اما در گروه اول دو عدد از همسترها (یکی یك روز بعد و دیگری در روز دوم بعد از مواجه) تلف گردیدند. در همسترهایی که Enteropathogenic *Escherichia coli* دریافت کرده بودند تقریبا در روز دوم اسهال مشاهده شد. اما درگروه کنترل اسهال مشاهده نشد. همچنان که قبلا اشاره شد ایجاد ندول‌های تیفوئیدی در کبد از جمله مهم‌ترین ضایعات Enteropathogenic *Escherichia coli* در این عضو بود که در اکثر مقاطع بافتی تهیه شده درگروه اول این ندول‌ها قابل مشاهده است. (شکل‌های ۲ و ۱). نتایج حاصل از مشاهده بافتی نشان داد که میزان ضایعات وارده به کبد در گروه اول بسیار بیشتر از گروه‌های دوم و سوم است. بر اساس این تصاویر در مناطق نکروز کانونی، سلول‌های کبدی از بین رفته‌اند و تجمع سلول‌های آماسی در ناحیه نکروزه قابل مشاهده است. از جمله ضایعات دیگر مشاهده شده در کبد، پرخونی کبد بود (شکل ۳). بر اساس جدول، تجمع سلول‌های آماسی در فضای پورتال در گروه اول ۸ مورد، در گروه دوم ۴ مورد و درگروه سوم ۳ موردگزارش گردید. همچنین نکروز کانونی کبد در گروه اول ۸ مورد، در گروه دوم

**جدول۱- مقایسه ضایعات کبدی مشاهده شده در گروه‌های کنترل و آزمایش براساس تست آماری Fisher exact test**

| گروه | تعداد موارد مشاهده | نام ضایعه | گروه | P |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۸ | نکروز کانونی کبد | اول - دوم | ۰،۰۱۲ |
| ۲ | ۰ | | اول - سوم | ۰،۰۱۲ |
| ۳ | ۰ | | دوم - سوم | ۰،۳ |
| ۱ | ۸ | تجمع سلولهای آماسی در فضای پورتال کبد | اول - دوم | ۰،۰۳۰ |
| ۲ | ۴ | | اول - سوم | ۰،۰۳۷ |
| ۳ | ۳ | | دوم - سوم | ۰/۹ |

و سوم صفر مورد گزارش گردید. سپس این داده‌ها بر اساس روش آماری Fisher exact test به صورت توصیفی مورد ارزیابی آماری قرار گرفت، که نتایج آن در جدول ۱ آمده است. بر اساس جدول فوق، نکروز کانونی کبد بین گروه اول و دوم و همچنین بین گروه اول و سوم معنادار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$). تجمع سلول‌های آماسی در فضای پورتال کبد بین گروه اول و دوم معنادار و همچنین بین گروه اول وسوم معنادار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$) ولی تجمع سلول‌های آماسی در فضای پورتال کبد و نکروز کانونی کبد بین گروه‌های سوم و دوم غیرمعنادار می‌باشد ($p > ۰/۰۵$).

## بحث

*Escherichia coli* Enteropathogenic عامل بیماری اسهال نوزادان و کودکان به صورت تک‌گیر و همه‌گیر در کشورهای در حال توسعه بوده و از قدیمی‌ترین پاتوتیپ‌های شناسایی شده *Escherichia coli* می‌باشد. *Escherichia coli* Enteropathogenic در روده کوچک تکثیریافته و باعث اسهال حاد و غیرخونی می‌شود. این ارگانیسم از طریق اتصال به دیواره روده باعث بهم‌ریختگی ساختار سلول‌های اپیتلیال روده و منجر به ایجاد ضایعات هیستوپاتولوژیک در سطح روده می‌شود که با این عمل پدیده جذب و دفع روده مختل می‌گردد (۱۷). در مطالعه حاضر تجویز خوراکی *Lactobacillus paracasei* به عنوان يك پروبیوتیك توانست از استقرار باکتری *Escherichia coli* Enteropathogenic در کبد همستر جلوگیری نماید. برخی محققین معتقدندکه مهار رقابتی جایگاه‌های اتصال باکتریایی بر روی سطوح اپی تلیال روده، یکی از مکانیسم‌های اثربخشی پروبیوتیك‌ها است (۱۱). Rodrigues و Nardi در سال ۱۹۹۶ نشان دادندکه پروبیوتیک Saccharomayces در برابر آلودگی تجربی موش با Shigella به طریقه خوراکی نقش محافظتی ایفا می‌نماید. آن‌ها معتقدبودند که این حفاظت به دلیل کاهش جمعیت باکتریایی روده نبوده، بلکه مخمر در حقیقت از اتصال باکتری به جایگاه‌های هدف خود جلوگیری به عمل می‌آورد (۲۳). همچنین McCullough نیز درسال ۱۹۹۸نقش حفاظتی مخمرها را چنین توجیه کرد که در حقیقت مخمرها، به عنوان آنتاگونیستی در برابر ترکیبات تولیدی حاصل از باکتری پاتوژن عمل می‌نمایند و در نتیجه در مهار یا مرگ باکتری ایفای نقش می‌کنند (۱۶). Kirillov در سال ۲۰۰۲ بیان کرد که مخمر Saccharomyces باعث تقویت ایمنی میزبان می‌گردد (۱۱). امروزه این مسئله پذیرفته شده است که بسیاری از پاتوژن‌های رودهای برای استقرار در روده و ایجاد بیماری باید بتوانند به دیواره روده متصل شوند. با توجه به این مسئله، تعدادی از گونه‌های پروبیوتیکی بدلیل توانایی اتصالشان به سلول‌های اپی تلیال انتخاب شدند. از آن جمله Quan و همکاران در مطالعه‌ای بیان کردند *Lactobacillus rhamnosus* با رقابت برسر جایگاه اتصال، تولید ترکیبات ضد میکروبی و تقویت ایمنی میزبان می‌تواند ضایعات ناشی از آلودگی با *Escherichia coli* Enteropathogenic را کاهش دهد (۲۲). Nguyen و همکارانش در مطالعه‌ای آزمایشگاهی (in vitro) نشان دادند که *Lactobacillus casei* نفوذپذیری روده در مواجه با *Escherichia coli* Enteropathogenic را کاهش می‌دهد و در حقیقت این پروبیوتیک در دوز موثر خود (۱۰^۸) می‌تواند از افزایش نفوذ پاراسلولار *Escherichia coli* Enteropathogenic جلوگیری نماید.

وی معتقد بود این پروبیوتیک بر سر جایگاه اتصال باکتری با عامل پاتوژن رقابت نمی‌کند (۱۸). در مطالعه دیگری پیشنهاد شده است که پروبیوتیك *Lactobacillus casei* حتمالا با افزایش موسین‌های رودهای ازاتصال Enterotoxigenic *Escherichia coli* با پتانسیل بیماری‌زایی به جدار روده جلوگیری می‌کند (۱۹). همچنین مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که *Lactobacillus casei*، در مقایسه با Enteropathogenic *Escherichia coli* برای جذب گلوکز مونومر موجود در سیالیک اسیدوان- استیل گلوکز آمین کولون کارآمدتر است (۲۰و۱۳).

مطالعات همچنین نشان می‌دهند که پروبیوتیک‌ها در سطوح مختلفی بر روی سیستم ایمنی تاثیر می‌گذارند که از جمله می‌توان افزایش سطح سیتوکاین‌ها و ایمونوگلوبولین‌ها، افزایش تکثیر سلول‌های مونونوکلئاز، فعال‌کردن ماکروفاژها، افزایش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی Natural killer، تعدیل خود ایمنی و تحریك ایمنی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا و پروتوزوآها را نام برد (۸و۳). Quan و همکاران نشان دادند در موش‌های سوری که قبلا تحت رژیم پروبیوتیکی با *Lactobacillus rhamnosus* قرار داشتند تیتر آنتی‌بادی ایمونوگلوبولین A روده‌ای و همچنین فعالیت فاگوسیتی گلبول‌های سفید خون آن‌ها پس از مواجهه با *Escherichia coli* به شدت افزایش یافت (۲۲). در مطالعه دیگری نشان داده شد که سلول‌های باکتریایی، تکثیر سلول‌های ایمنی را افزایش می‌دهند و تولید سیتوکاین‌های پیش التهابی مانند عامل نکروز توموری آلفا TNF-α و اینترلوکین ۶ را القا می‌کنند (۱۴). برعکس، پروبیوتیك‌ها سرکوب تکثیر لنفوسیت‌ها و تولید سیتوکاین‌ها توسط سلول‌های T را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۲۱ ). در مطالعه‌ای نشان داده شده که لاکتوباسیل‌ها و Bifidobacterium در تحریک تولید اینترلوکین ۱۰ موثرند. و به این ترتیب پاسخ‌های التهابی را تضعیف می‌کنند (۲۷). در این پژوهش در گروه کنترل علاوه بر اینکه دو عدد از همسترها بعد از دریافت باکتری تلف شدند، تمامی آن‌ها دو روز بعد از دریافت باکتری دچار اسهال شدند. اما در گروه آزمایش چنین یافتهای مشاهده نشد که این موید اثرات محافظتی *Lactobacillus casei* در جلوگیری از عفونت Enterotoxigenic *Escherichia coli* می‌باشد. Pedon در سال ۲۰۰۰ نشان داد *Lactobacillus casei* در پیشگیری و درمان سندرم‌های اسهال وابسته به مصرف آنتی‌بیوتیك می‌تواند بسیار مفید باشد (۱۹). همچنین تحقیق حاضر نشان داد که *Lactobacillus casei* در جلوگیری از ضایعات کبدی می‌تواند مفید واقع شود زیرا نکروزکانونی کبد و تجمع سلول‌های آماسی در فضای پورتال کبد در گروه کنترل به طور معناداری بیشتر از گروه‌های آزمایش بود. با توجه به تحقیقات محققین مختلف در مورد مکانیزم‌های گوناگون دفاعی پروبیوتیک‌ها چنین یافته‌هایی دور از انتظار نمی‌باشد. Aldemir در سال ۲۰۰۲ گروهی رت را به صورت تجربی به باکتریSalmonella آلوده کرد و گروهی را به عنوان شاهد اتخاذ کرد و به هر دو گروه مخمر Saccharomyces خوراندو دریافت که میزان باکتری‌های گوارشی انتقال یافته به روده باریك،کبد و طحال در گروه آزمایش به طور معناداری کاهش یافت (۱). Peret Filho پس از تضعیف ایمنی با داروی سیکلوفسفامید در تعدادی رت، متعاقبا به گروهی از آن‌ها مخمر خوراند و سپس به تمامی آن‌ها Enterotoxigenic *Escherichia coli* تجویز کرد. میزان ضایعات تولیدی در کبد گروهی که

از مخمر تغذیه کرده بودند به مراتب کمتر از گروهی بود که از مخمر تغذیه نکرده بودند (۲۱). در مورد حضور سلول‌های آماسی در فضای پورتال کبد در یکی دو مورد از همسترهای گروه آزمایش در این پژوهش، می‌توان گفت که این حضور احتمالا ناشی از وجود *Lactobacillus casei* باشد. زیرا Bernet و همکاران در سال ۱۹۹۴ طی تحقیقی به ۱۵۵ نفر از انسان هایی که داوطلبانه برای انجام آزمایش انتخاب شده بودند به مدت ۷ روز (هر روز) بصورت خوراکی ۱ گرم *Lactobacillus acidophilus* دادند. نتایج بررسی سلول‌های خونی، افزایش قابل توجهی را در تعداد میانگین اریتروسیت‌ها، هموگلوبین، لوکوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، سلول‌های چند هسته‌ای و فاگوسیت‌های تك‌هسته‌ای را در ۲۶ نفر مشخص کرد که نشانه يك فرايند التهابی بود (۴). از سوی دیگر برخی محققین معتقدند که این پروبیوتیک قادر به راه یافتن به خون می‌باشد (۱۵). به عبارت جامع‌تر با توجه به این که درکبد این همسترها هیچ‌گونه ضایعه پاتولوژيك ديگری مشاهده نگردید، می‌توان گفت احتمالا حضور سلول‌های آماسی به دلیل نقش پروبیوتیک در تحریك سیستم ایمنی و ایجاد فرایندهای التهابی بوده است. از سوی دیگر احتمال وجود عفونت‌های دیگر به غیر از باکتری Enteropathogenic *Escherichia coli* در کبدکه به طور همزمان روی داده نیز بعید نمی‌باشد. در پژوهش حاضر مقایسه نتایج هیستوپاتولوژيك گروه‌های آزمایش دوم و سوم اختلاف معناداری را بین دو گروه نشان نداد و این یافته حاکی از این است که احتمالا ۱۰۸ *Lactobacillus paracasei* با ۱۰۷ *Lactobacillus paracasei* در جلوگیری از ضایعات پاتولوژيك اختلاف چندانی ندارند. به عبارت جامعتر ۱۰۷ *Lactobacillus paracasei* نیز قادر به محافظت از سلول‌های کبدی بوده است. اما تعیین حداقل مقدار محافظت‌کننده پروبیوتیک نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و سایر تحقیقات، تاثیر *Lactobacillus paracasei* در جلوگیری از ضایعات کبدی احتمالا به دلیل اثر حفاظتی و نقش آن در تحریك سیستم ایمنی است. چنانکه Bengmark معتقد است *Lactobacillus casei* با عامل بیماری‌زا همراه شده و سیستم ایمنی را با قدرت بیشتری تحریك می‌کند و در حقیقت به عنوان يك ادجوانت عمل می‌نماید و فعالیت وتزاید ماکروفاژها را افزایش می‌دهد (۳). Perdigon در سال ۱۹۹۰ نشان داد *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus acidophilus* با افزایش ترشح IgA و همچنین گیرنده‌های ایمونوگلوبولین‌های پلی‌مریك در مایع روده و ناحیه مخاطی روده سبب کنترل عفونت‌های روده‌ای می‌شوند. پروبیوتیک‌ها با تخریب و متلاشی کردن ساختار باکتری‌های مضر چون Salmonella و *Escherichia coli* سبب آزاد شدن و جذب آنتی ژن‌های این باکتری‌ها شده و از این طریق سبب تحریک سیستم ایمنی بدن می‌شوند، همچنین با تولید اسیدهای آلی شرایط دستگاه گوارش را برای رشد و تکثیر کلی باسیل‌ها فراهم می‌کنند(۲۰). از آنجا که در صورت بروز اسهال، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، تنها راه درمان محسوب می‌شود، استفاده نابجا و فراوان از آنتی‌بیوتیک‌ها نه تنها منجر به بروز عوارض جانبی در بیمار می‌شود؛ بلکه موجب ظهور سویه‌های باکتریایی با مقاومت‌های دارویی چندگانه نیز می‌شود (۵ و ۲).

## نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازیی در پیشگیری از ضایعات ناشی از اشریشیا کلی انتروپاتوژنیك اثرات مفیدی دارد ($P>0/05$). بر این اساس پیشنهاد می‌گردد اثرات درمانی آن در مورد عوامل عفونی دیگر نیز در تحقیقات بعدی مورد ارزیابی قرار گیرد تا در صورت موفقیت آمیز بودن راهی برای جلوگیری از خسارات وارده پیشنهاد گردد، شاید گامی در جهت آشنایی بیشتر با پروبیوتیك‌ها برداشته شود.

## منابع مورد استفاده


1.Aldemir, M.(2002). Effect of octreotide acetate and *Saccharomayces buolardii* on bacterial translocation in an intestinal loop obstraction model of rats. *Tohoku Journal of Experimental Medicine.* 198:1-9.

2. Alikhani, M., Hashemi, S., Aslani, M., Farajnia, S. (2013). Prevalence and antibiotic resistance patterns of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adolescents and adults in Hamedan, Western Iran. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 5(1):42-47.

3. Bengmark, S. (1995). Ecological control of the gastrointestinal tract, the role of probiotic flora. *Gut*. 42(1): 2-7.

4. Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin , A.L. (1994). *Lactobacillus acidophillus* LA1 binds tocultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*. 35(4): 483-489.

5.Chiristine, M.S.(1998). Prevention of antibiotic associated diarrhea by *Saccharomayces boulardii. Gastrology*. 96:981-988.

6. De Roos, N.K., Katan, M.B. (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71(2):405-411.

7. Fuller, R. (1380). Probiotics and application in animal and poultry nutrition, First edition, Noorbakhsh publication, pp, 47-50.(in persian).

8.Gary, W.E., Christina, M.S., Lynne, V.M. (1996). Biothrapeutic agents. *The Journal of the American Medical Association.* 275(11): 870-876.

9. Gedek,B.R. (1999). Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and *Salmonella typhimurium* mutant DT 104 O to the surface of *Saccharomayces boulardii*. Mycoses. 42: 261-264.

10. Kalantar, E., Soheili, F., Salimi, H., Soltan Dallal, M. (2011). Frequency, antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Escherichia coli* pathotypes obtained from children with acute diarrhea. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 4(1):23-28.

11. Kirillov, D.A., Peronova, N.B. (2002). Modifying action of *Saccharomayces boulardii* on the biological properties of enterobacteria, Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii,immunobiologii.

4:57-59.

12. Kosanen, P.J., Salminen ,S., Saxelin, M. et al. (1990) .prevention of travelers' diarrhea by lactobacillus GG. *Annals of Medicine*. 22: 53-56.

13. Kruis, W., Schutz ,E., Fric, P., et al. (1997). Double blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* 11: 853-858.

14.Leslie, C.O. (1998). Enterobacteriaceae. In: Albert ,B. Max, S. Topleys Willsons Microbiology and Microbial Infections: Oxford University Inc, NewYork: USA, pp, 514-699.

15. Macfarlane, S., Macfarlane, G., Cummings, J.T. (2006). Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. Alimentary pharmacology & therapeutics. 24(5): 701-719.

16. McCullough, M.J, (1998). Species identification and virolence attributes of *Saccharomayces boulardii. Journal of Clinical Microbiology.* 36:2613-2617 .

17. Nguyen,R.N., Taylor, L.S., Tauschek, M., Robins-Browne, R.M. (2006). Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. Emerging Infectious Diseases. 12(4): 597-603.

18- Parasol, N., Freitas, M., Theroux.( 2005). *Lactobacillus casei* DN-114001 inhibit the increase in paracellular permeability of Enteropathogenic *Escherichia coli* infected T84 cell, *Research in Microbiology*. 156:256-262.

19. Pedone, C.A., Bernabeu, A.O., Postaire, E.R., Bouley, C.F., Reinert, P. (2000).Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *International Journal of Clinical Practice*. 54(9):568-571.

20. Perdigon, G.1., Nader de Macias, M.E., Alvarez, S., Oliver, G., Pesce de Ruiz Holgado, A.A. (1990). Prevention of gastrointestinal infection using immonobiological method with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophillus. Journal of Dairy Research.* 57:255-264.

21. Peret-Filho, M. (1998). Dose effect of oral *Saccharomayces boulardii* treatment on morbidity and mortality in immunosuppressed mice. *Journal of Medical Microbiology*. 47:111-116.

22. Quan, shu., Harsharnjit, S.Gill. (2002). Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 against *Escherichia coli* infection in mice. *FEMS immunology and medical Microbiology* .34:59-64.

23. Rodrigues, A.C.,Nardi, R.M. (1996). Effect of *S. boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology.* 81:251-256

24. Thomas,C., Ronald, D. (1997). Veterinary Pathology, first. ed, Williams and Wilkings, pp, 227-240.

25. Tong, Zhao., Michael, P. Doyle., Barry, G. Harmon., Cathy, A. Brown., P. O. Eric, Mueller., Andrew, H. Parks. (1998). Reduction of Carriage of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle by Inoculation with Probiotic. *Journal of Clinical Microbiology.* 36(3): 641-647.

26. William, C. (1995). Thomson's Special Veterinary Pathology, 2nd edition, Mosby, pp, 257-268.

27. Yamazaki,S., Kamimura, H., Momose, H., Kawashima, T., Ueda, K. (1982). The protective effect on bifidobacterium monoassociation against lethal activity of *E. coli*. Bifidobacteria and Microflora. 1: 55-60.