

اثر لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر روی فاکتورهای هماتولوژیک و هیستوپاتولوژیک در رت های آلوده با شیگلا دیسانتری

فرشته احمدی^۱، فرشته قندهاری^{۱*}، ناهید تاج الدین^۲

(۱) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
(۲) گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱

چکیده

مقدمه: شیگلوزیس، عفونت روده ای حاصل از یکی از گونه های باسیل شیگلا می باشد. اخیراً ثابت شده است که پروبیوتیک ها به واسطه تولید ترکیبات مهارکننده، قادر به مهار پاتوژن ها می باشند. هدف از این پژوهش بررسی اثرات مهار لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر علیه عفونت حاصل از شیگلا دیسانتری در شرایط *In vivo* بود.

مواد و روش ها: ۳۲ سر موش صحرایی در ۴ گروه تقسیم بندی شدند. A: کنترل، B: آلوده با شیگلا دیسانتری ($1/5 \times 10^8$ cfu/ml)، C: تیمار با لاکتوباسیلوس فرمنتوم، D: آلوده با شیگلا دیسانتری و تیمار با لاکتوباسیلوس فرمنتوم. پس از اتمام دوره تیمار، حیوانات بیهوش و به منظور اندازه گیری فاکتورهای خونی، بررسی های هیستوپاتولوژیک و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس فرمنتوم، نمونه های خون و بافت مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها توسط نرم افزار SPSS و آزمون آماری ANOVA-DUNKAN آنالیز شد ($P \leq 0.05$).

یافته های پژوهش: تعداد گلبول قرمز و اندیکس های خونی در هیچ یک از گروه های آزمایشی تغییر معنی داری را نسبت به گروه A نشان نداد. میزان سایز پلاکت ($P \leq 0.01$)، مونوسیت ($P \leq 0.05$) و بازوفیل ($P \leq 0.01$) در گروه B به طور معناداری نسبت به گروه A افزایش یافت. نسبت وزن روده به کل بدن در گروه های B ($P \leq 0.001$) و D ($P \leq 0.01$) به نسبت گروه A کاهش معنی دار نشان داد. مطالعات هیستوپاتولوژیک نشانگر تخریب سطح اپی تلیوم روده در گروه B بود، در حالی که در گروه D بافت روده تقریباً نرمال به نظر می رسید. هم چنین میانگین تعداد کلنی باکتری شیگلا دیسانتری در روده گروه تیمار کاهش معنی داری ($P \leq 0.001$) را نسبت به گروه آلوده نشان داد.

بحث و نتیجه گیری: لاکتوباسیلوس فرمنتوم بدون ایجاد تغییر در فاکتورهای هماتولوژیک قادر به مقابله با باکتری شیگلا دیسانتری بوده و می تواند تا حدودی از پیشرفت بیماری جلوگیری می کند.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، شیگلا دیسانتری، لاکتوباسیلوس فرمنتوم

* نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

Email: Ghandehari@iaufala.ac.ir

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

رشد میکروب های پاتوژن توجه بسیار زیادی نشان داده اند. پروبیوتیک ها از جمله ترکیباتی هستند که ذهن محققان را به خود مشغول است.

پروبیوتیک ها ارگانسیم های مفیدی هستند که به عنوان غذا یا مکمل های غذایی مورد استفاده قرار می گیرند و از طریق بهبود تعادل میکروبی روده تاثیرات سودمندی بر میزبان دارند به طوری که مطالعات صورت گرفته در چند دهه اخیر نشان داده است که استفاده از پروبیوتیک ها به حفظ سلامت و قدرت بدن، مبارزه با بیماری های روده ای و سایر بیماری ها کمک می کند (۸،۹). اصطلاح پروبیوتیک که ریشه لاتین-یونانی دارد، به معنی برای زندگی است و سازمان جهانی بهداشت، این اصطلاح را به میکروارگانسیم های زنده ای اطلاق می کند که در صورت مصرف به میزان لازم اثرات سلامت زایی موثری برای میزبان خود دارند (۹).

از جمله مکانیسم هایی که این پروبیوتیک ها با داشتن آن می توانند تاثیر سودمند خود را در درمان و پیشگیری بیماری ها از جمله بیماری های اسهالی نشان دهند می توان به تولید ترکیبات مهارکننده، رقابت برای جایگاه های اتصال، رقابت برای مواد غذایی، از بین بردن گیرنده های سموم، تقویت سیستم ایمنی و مهار آپوپتوز اشاره نمود (۱۰،۱۱).

پروبیوتیک هایی که بیش از همه در زمینه های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته اند، باکتری های تولیدکننده اسید لاکتیک شامل گونه های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتیریا است (۱۱). لاکتوباسیلوس ها پراکندگی وسیعی در طبیعت دارند و بخش عمده ای از فلور طبیعی دهان، معده، روده کوچک و بزرگ را در انسان و سایر حیوانات خون گرم تشکیل می دهند و گونه های مختلفی از جمله لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس فرمنتوم و... را شامل می شود.

گزارشاتی دال بر استفاده از پروبیوتیک ها برای درمان بیماری های گوارشی وجود دارد. از جمله این که دری و همکاران (۱۳۸۹)، نشان دادند که سویه های لاکتوباسیلوس برای درمان اسهال و سایر بیماری های گوارشی مناسب هستند و می توان از این باکتری ها در

شیگلا میکروارگانسیم گرم منفی غیر متحرکی است که چهار سوش سرولوژیک متفاوت دارد. شیگلا شایع ترین علت اسهال خونی باکتریایی است که سالانه باعث مرگ نیم میلیون کودک زیر پنج سال می شود. انتقال گونه های شیگلا از راه مدفوعی دهانی می باشد و از طریق آب و غذای آلوده وارد بدن انسان می شوند (۱،۳).

باکتری شیگلا در محیط اسیدی معده زنده مانده و بعد از ورود به روده بزرگ، در روده استقرار و منجر به عفونت می شود. باکتری بعد از رسیدن به مخاط روده، از سد سلول های اپی تلیال روده عبور کرده و با القاء مرگ سلولی که با علامت پیش التهابی همراه است، ماکروفاژها را تخریب و با فرار از مرگ در فاگوزوم ها، در سیتوپلاسم سلول های اپی تلیال روده تکثیر می یابد. این اتفاق در نهایت موجب نکرور غشاء مخاطی، زخم های سطحی، خونریزی و در نتیجه اسهال خونی می شود (۵-۲). این بیماری با دردهای شدید شکمی، تب، مدفوع حاوی خون و موکوس شناخته می شود. این باکتری ها بسیار عفونی می باشند به طوری که حتی ده عدد میکروب شیگلا می تواند باعث بیماری شیگلوزیس شود (۳۶).

شیگلوزیس عفونت روده ای ناشی از یکی از گونه های باسیل شیگلا است و عمدتاً یک بیماری اندمیک است که ۹۹ درصد موارد آن در دنیای در حال توسعه و بالاترین شیوع در محروم ترین مناطق، جایی که بهداشت فردی و عمومی در زیر حد استاندارد است رخ می دهد (۲). درمان زودرس شیگلوزیس با آنتی بیوتیک مناسب سبب تسریع بهبودی، توقف دفع ارگانسیم در مدفوع و کاهش انتشار عفونت می شود اما آن چه در این میان مطرح است مقاومت های دارویی چندگانه است که در این باکتری ها توسط پلاسمیدها ایجاد شده و موجب انتشار عفونت های مقاوم می شود. در نتیجه پرداختن به راهکارهای درمانی جدیدتر و یا استفاده از روش های پیشگیری مناسب تر امری مهم به نظر می رسد (۷).

با توجه به پیشرفت علم بیوتکنولوژی در دنیای امروز، محققین به استفاده از متابولیت های طبیعی بازدارنده

تیمار شدند و به منظور تحمیل استرس گاواژ، رت های این گروه به صورت یک روز در میان تنها با آب مقطر گاواژ شدند. گروه B: رت های آلوده با باکتری شیگلا دیسانتری خریداری شده از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های صنعتی ایران (PTCC1188). رت های گروه B در پایان هفته دوم آزمون با ۱cc از باکتری شیگلا دیسانتری به غلظت $1/5 \times 10^8$ CFU/ml (به صورت درون گوارشی) آلوده شدند. گروه C: رت های تیمار با باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم خریداری شده از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های صنعتی ایران (PTCC1744). گروه D: رت های آلوده با باکتری شیگلا دیسانتری و تیمار شده با باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم. گروه C و D از ابتدای آزمون به صورت یک روز در میان تحت گاواژ ۱cc لاکتوباسیلوس فرمنتوم به غلظت $1/5 \times 10^8$ CFU/ml قرار گرفتند و در پایان D علاوه بر گاواژ با لاکتوباسیلوس فرمنتوم، در پایان هفته دوم با ۱cc از باکتری شیگلا دیسانتری به غلظت $1/5 \times 10^8$ CFU/ml نیز آلوده شدند.

اندازه گیری اندیکس های خون و شمارش گلبول ها: در پایان دوره آزمون رت ها توسط ماده بی هوش کننده، بی هوش کننده، بی هوش و خونگیری مستقیماً از قلب انجام گرفت. پس از خونگیری، ۲cc خون به لوله های CBC حاوی ماده ضد انعقاد اضافه و بر روی دستگاه روتیتور قرار داده شد و در پایان تعداد سلول های خونی و اندیکس های مربوطه در نمونه ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مقایسه وزن بدن و نسبت وزن روده به وزن بدن: بعد از خونگیری از رت ها، وزن تمامی گروه های آزمایشی یادداشت شد؛ سپس شکم آن ها باز شده و روده به طور کامل جداسازی و شستشو گردید و پس از توزین، محاسبه نسبت وزن روده به وزن بدن انجام شد.

تهیه لام های میکروسکوپی از بافت روده: بعد از خونگیری از رت ها، وزن تمامی گروه های آزمایشی یادداشت شد و سپس روده به طور کامل جداسازی و با بافر فسفات (pH=۷/۴) شستشو گردید؛ سپس بافت روده از هر رت جداسازی و پس از توزین به منظور فیکساسیون به محلول فرمالین ۱۰ درصد انتقال یافت. پس از انجام مراحل آگیری، شفاف سازی و

محصولات لبنی به منظور پیشگیری و درمان استفاده کرد (۸). سلطان دلال و همکاران (۱۳۹۵)، ارزیابی فعالیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری علیه باکتری های انتروپاتوژن را انجام دادند و پس از ارزیابی به دو روش In Vivo و In Vitro نشان دادند که این دو باکتری دارای اثر پیشگیری کننده بر باکتری های بیماری زای روده ای هستند (۷). در پژوهشی، شیرازی و همکاران (۱۳۹۰)، فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر چندین باکتری بیماری زای خانواده انتروباکتریاسه را گزارش کردند (۱۲).

مادسن و همکاران (۲۰۰۱)، تاثیر مستقیم ترکیبات پروبیوتیکی بر عملکرد سد اپی تلیالی روده انسان را بررسی کردند (۱۳).

با توجه به بیماری زایی سویه های باکتریایی در ناحیه گوارش و معده و اغلب نداشتن درمان قطعی و هم چنین اثرات نامناسب آنتی بیوتیک ها بر سلامت انسان، از جمله به هم زدن فلور طبیعی بدن و مقاوم بودن اکثر سویه های باکتریایی پاتوژن به آنتی بیوتیک ها، جستجوی راه های از بین بردن ارگانیسم های یاد شده اهمیت زیادی دارد. بنا بر این با توجه به اهمیت باکتری های اسید لاکتیک در از بین بردن باکتری های پاتوژن، بی خطر بودن، تهیه ارزان و آسان و مفید بودن آن ها در حفظ سلامت میزبان، هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر حفاظتی لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر عفونت حاصل از شیگلا دیسانتری در نظر گرفته شده است.

مواد و روش ها

تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (15 ± 20 g) از مرکز نگهداری از حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان خریداری و به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط، در شرایط کنترل شده ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی، درجه حرارت (22 ± 3) درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی (50 ± 5) درصدی شدند. سپس رت ها در ۴ گروه A, B, C, D به ترتیب زیر تقسیم بندی شدند.

گروه A: رت های کنترل تزریقی؛ رت های گروه کنترل تزریقی به مدت ۲۸ روز تنها با آب و غذای تمیز

معنی داری افزایش نشان می دهد (جدول شماره ۱).

نتایج حاصل از مقایسه وزن بدن و نسبت وزن روده به وزن بدن نشان داد با وجود کاهش مختصر در وزن بدن رت های آلوده با شیگلا دیسانتری این کاهش معنی دار نیست و وزن سایر گروه ها نیز نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری نشان نمی دهد (نمودار شماره ۱). نسبت وزن روده به کل بدن در رت های آلوده با شیگلا دیسانتری به طور معنی داری ($P \leq 0.001$) کاهش یافته است و در گروه آلوده با شیگلا دیسانتری که با لاکتوباسیلوس فرمنتوم تیمار شده بود در سطح پایین تری ($P \leq 0.01$) نسبت به گروه آلوده با شیگلا دیسانتری کاهش مشاهده شد (نمودار شماره ۲). نتایج حاصل از شمارش باکتری شیگلا دیسانتری در بافت روده نشان داد میانگین تعداد کلنی های باکتری شیگلا دیسانتری در گروه رت های عفونی با شیگلا دیسانتری و تیمار با لاکتوباسیلوس فرمنتوم به طور معناداری ($P \leq 0.0001$) نسبت به گروه رت های آلوده با شیگلا دیسانتری کاهش نشان می دهد (نمودار شماره ۳). بررسی با میکروسکوپ نوری در روده موش های صحرایی گروه کنترل نشان از سالم بودن پرزهای اطراف لومن مرکزی روده که با فشردگی نرمال مشخص شده اند دارد (شکل شماره A ۱) در حالی که در گروه آلوده با شیگلا دیسانتری نسبت به گروه کنترل، تخریب شدید پرزهای روده مشاهده می شود که با فلش مشخص شده است (شکل شماره B ۱).

در گروه آلوده با شیگلا دیسانتری و تیمار شده با لاکتوباسیلوس فرمنتوم در مقایسه با گروه کنترل، ظاهر بافت تقریباً حالتی بین شکل شماره ۱ و شکل شماره ۲ دارد؛ به این معنا که ظاهراً تخریب پرزهای روده دیده می شود اما با شدتی کمتر از گروه آلوده با شیگلا دیسانتری (شکل شماره C ۱).

آغشته سازی قالب های پارافینی از بافت تهیه گردید و اسلایدهای ۵ میکرومتری از نمونه ها تهیه و به روش هماتوکسیلین-اُوزین رنگ آمیزی گردید. در نهایت به کمک میکروسکوپ نوری مدل (Olympus/3H-Z) ساخت ژاپن از نظر تغییرات هیستوپاتولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت.

سنجش تعداد باکتری در بافت روده: یک میلی گرم از بافت روده رت های هر گروه به دقت جداسازی و در سرم فیزیولوژی شستشو و سپس با اضافه نمودن یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی با کمک دستگاه هموژنایزر، هموژنیزه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه هموژنیزه به محیط سالمونلا-شیگلا آگار انتقال و به روش پورپلیت کشت داده شد. نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و پس از این مدت تعداد کلنی باکتری ها شمارش گردید.

آنالیز آماری: داده های حاصل از پژوهش به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ تحت آنالیز آماری one way-ANOVA قرار گرفت و نمودارها از طریق $Mean \pm SD$ (میانگین \pm انحراف معیار) به کمک Excel ترسیم گردید.

یافته های پژوهش

نتایج حاصل از بررسی تغییرات پارامترهای هماتولوژیک در گروه های آزمایشی نشان داد هیچ گونه تغییر معنی داری در تعداد گلبول های قرمز و اندیکس های آن بین گروه های آزمایشی نسبت به گروه کنترل مشاهده نمی شود. هم چنین تغییری در تعداد پلاکت ها و حجم متوسط پلاکت ها دیده نشد در حالی که سائز پلاکت ها در گروه آلوده با شیگلا دیسانتری به طور معنی داری افزایش یافته است. همان طور که مشاهده می شود از بین گلبول های سفید فقط در گروه آلوده با شیگلا دیسانتری تعداد بازوفیل ها و مونوسیت ها به طور

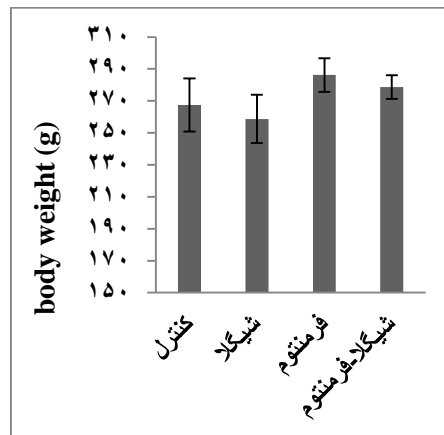
جدول شماره ۱. مقایسه میانگین پارامترهای خونی

پارامترهای خونی گروه ها	WBC ($\mu/10^6L$)	Neu ($\mu/10^6L$)	Lym ($\mu/10^6L$)	Mon ($\mu/10^6L$)	Eos ($\mu/10^6L$)	Bas ($\mu/10^6L$)	RBC ($\mu/10^6L$)	HGB ($\mu/10^6L$)
A	9/1±79/84	1/0±81/26	8/1±19/08	0/0±24/07	0/0±09/06	0/0±01/004	8/0±76/58	14/0±74/92
B	12/1±97/91	1/0±92/56	10/1±11/67	0/0±81/59*	0/0±12/08	0/0±04/02**	9/1±01/1	14/1±75/65
C	11/2±11/99	1/0±8/82	8/1±7/6	0/0±55/24	0/0±08/02	0/0±01/01	9/0±3/7	15/1±26/03
D	10/2±21/81	1/0±61/42	8/1±54/69	0/0±54/39	0/0±1/08	0/0±01	9/0±2/7	15/1±5/14

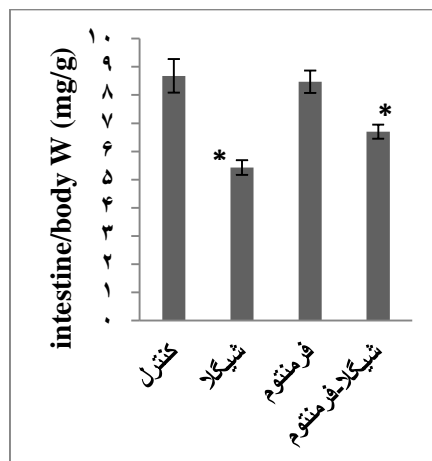
پارامترهای خونی گروه ها	HCT ($\mu/10^6L$)	MCV ($\mu/10^6L$)	MCH ($\mu/10^6L$)	MCHC ($\mu/10^6L$)	RDWcv ($\mu/10^6L$)	PLT ($\mu/10^6L$)	MPV ($\mu/10^6L$)	PDW ($\mu/10^6L$)
A	49/2±69/48	57/1±04/74	16/0±59/65	29/0±45/5	17/1±46/27	8/20±86/13	8/0±05/22	8/0±44/4
B	51/5±02/8	56/1±71/1	16/0±41/52	28/0±92/9	19/1±1/62	8/193±46/51	8/0±39/38	9/0±26/76**
C	52/3±15/47	56/2±26/73	16/0±46/88	29/0±27/3	17/1±64/27	9/55±129/13	8/0±1/26	8/0±89/29
D	51/3±67/74	56/1±21/4	16/0±84/5	29/0±46/85	17/0±67/82	8/86±156/66	8/0±11/2	8/0±61/31

داده ها بر اساس Mean±SD بیان شده است و سطح معنی دار به شکل (*P≤0.05), (**P≤0.01), (***)P≤0.001 در نظر گرفته شده است.

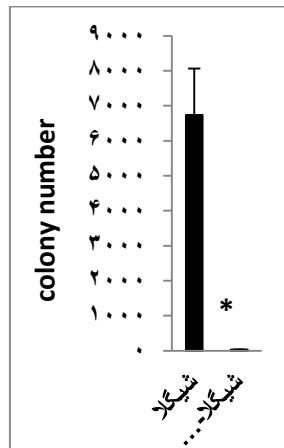
گروه کنترل=A، گروه آلوده با شیگلا دیسانتری=B، گروه تیمار با لاکتوباسیلوس فرمنتوم=C، گروه آلوده با شیگلا دیسانتری و تیمار با لاکتوباسیلوس فرمنتوم=D



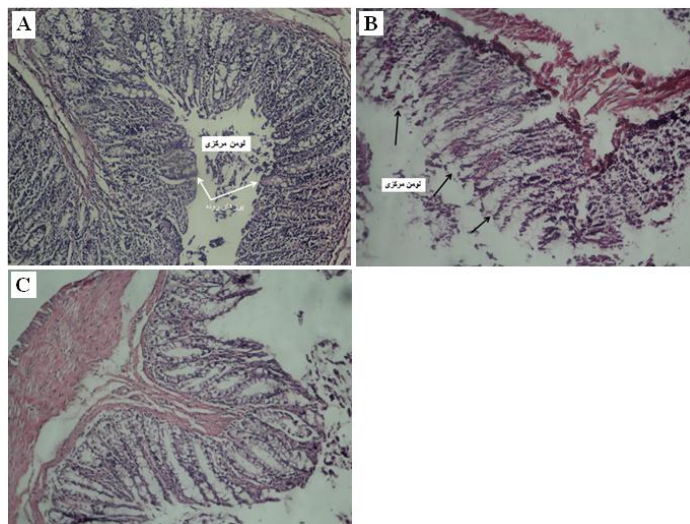
نمودار شماره ۱. مقایسه میانگین وزن بدن در گروه های مورد آزمایش. نمودار بر اساس Mean±SD ترسیم شده است و سطح معنی دار به شکل (*P≤0.05), (**P≤0.01), (***)P≤0.001 در نظر گرفته شده است.



نمودار شماره ۲. مقایسه میانگین وزن روده در گروه های مورد آزمایش. نمودار بر اساس Mean±SD ترسیم شده است و سطح معنی دار به شکل (*P≤0.05), (**P≤0.01), (***)P≤0.001 در نظر گرفته شده است.



نمودار شماره ۳. مقایسه میانگین تعداد کلنی گروه های مورد آزمایش. نمودار بر اساس $Mean \pm SD$ ترسیم شده است و سطح معنی دار به شکل ($P \leq 0.05$), ($P \leq 0.01$), ($P \leq 0.001$) در نظر گرفته شده است.



شکل شماره ۱. A: برش طولی از روده گروه کنترل (بزرگ نمایی $40 \times$). بخشی از پرزهای روده با ظاهری نرمال. هیچ گونه مرگ سلولی دیده نمی شود. B: برش طولی از روده گروه آلوده با شیکلا دیسانتری (بزرگ نمایی $40 \times$). فلش ها نشانگر تخریب سطح پرزهای روده می باشد. C: برش طولی از روده گروه آلوده با شیکلا دیسانتری و تیمار شده با لاکتوباسیلوس فرمنتوم (بزرگ نمایی $40 \times$)

بحث و نتیجه گیری

با توجه به این که درمان زودرس شیگلوزیس با آنتی بیوتیک مناسب سبب تسریع بهبودی، توقف دفع ارگانیسم در مدفوع و کاهش انتشار عفونت می شود اما مهم ترین مسئله ای که موفقیت داروهای ضد میکروبی را تهدید می کند پیشرفت و تشدید مقاومت ارگانیسم ها است. در این پژوهش برای نخستین بار اثر حفاظتی لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر عفونت ایجاد شده توسط شیکلا دیسانتری مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته ها نشان داد که لاکتوباسیلوس فرمنتوم احتمالاً به

دلیل رقابت با پاتوژن ها در اتصال به سلول های اپی تلیال روده قادر است باکتری شیکلا دیسانتری را مهار نموده و هم چنین با مهار عفونت از اثرات سوء شیکلا دیسانتری بر فاکتورهای هماتولوژیک نیز جلوگیری می کند.

ارزیابی حاصل از بررسی میانگین تعداد گلبول های قرمز و اندیکس های خونی بین گروه های آزمایشی بیانگر عدم تغییر معنی دار این فاکتور ها نسبت به گروه کنترل بود. این امر احتمالاً بیانگر آن است که عفونت های شیکلایی عمدتاً محدود به دستگاه گوارش

شود. با توجه به این موضوع که مونسیت ها بزرگترین سلول در جریان خون محیطی محسوب می شوند و در پاسخ های دفاعی اولیه از جمله در فاگوسیتوز شرکت دارند. پس در تایید مطالعات اخیر می توان گفت که در صورت بروز آسیب بافتی، مونسیت ها افزایش می یابند و از طریق پدیده ای به نام دیپدز از خون به بافت مهاجرت می کنند و به صورت سلول های درشتی به نام ماکروفاژها در می آیند (۱۸). هاتاوی و همکاران (۲۰۰۲) نیز هم چنین به بررسی این مسئله پرداختند که تعداد مونسیت ها در طول سطوح اولیه شیگلوزیس افزایش یافته و به سمت محل های التهابی مهاجرت می کنند که نهایتاً منجر به مرگ شیگلا فلکسری می شوند (۱۹).

عفونت شیگلایی از جمله عفونت هایی است که با مرگ ماکروفاژها و علامت پیش التهابی همراه است و از آن جایی که بازوفیل ها نقش مهمی در واکنش های التهابی برعهده دارند، می توان افزایش معنی دار بازوفیل ها را در پژوهش حاضر توجیه نمود. از طرف دیگر عفونت با شیگلا در بافت روده، باعث تخریب سلول های اپی تلیال روده شده و زخم و التهاب در بافت ایجاد می کند؛ بنا بر این میزان بازوفیل ترشح شده نیز افزایش پیدا خواهد کرد. این نتیجه با نتایج یوشیموتو و همکاران (۱۹۹۹) هم خوانی داشت (۲۰).

هم چنین در گروه لاکتوباسیلوس فرمنتوم و گروه آلوده با شیگلا دیسانتری و تیمار با لاکتوباسیلوس فرمنتوم با وجود تغییرات مختصر در پارامترهای خونی در مقایسه با گروه کنترل، این تغییرات از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد. مطالعات گذشته ثابت کرده اند که اکثر پروبیوتیک ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری های اصلی فلور میکروبی روده هستند و در آن جا زندگی همسفرگی بی ضرری دارند، پس میزان بیگانگی آن ها برای بدن به اندازه ای ناچیز است که توجه سیستم ایمنی بدن را به خود جلب نمی کند، بنا بر این بروز تغییرات مختصر در پارامترهای خونی در این مطالعه قابل توجیه می باشد (۱۱). عدم تغییر فاکتورها در گروه آلوده با شیگلا دیسانتری و تیمار با لاکتوباسیلوس فرمنتوم نیز بیانگر آن است که احتمالاً لاکتوباسیل توانسته اثرات مضر شیگلا دیسانتری بر پارامترهای خونی را متعادل کند.

هستند در نتیجه قادر به تغییر فاکتورهای مذکور نمی باشد. البته مطالعات گذشته نشان داده است که در صورت طولانی شدن دوره تیمار با باکتری شیگلا دیسانتری، توکسین باکتری از سد سلول های اپی تلیال روده عبور کرده و وارد خون می شود که در این صورت می تواند فاکتورهای خونی را تحت تاثیر خود قرار دهد (۱۴). بنا بر این به نظر می رسد عدم تغییر در فاکتورهای مذکور در تحقیق حاضر به دلیل کوتاه بودن مدت دوره آزمون می باشد. تروت و همکاران (۱۹۹۳) نیز هم چنین به بررسی باکتری شیگلا در بزرگسالان پرداختند و اعلام کردند که عفونت های شیگلایی محدود به دستگاه گوارش می باشد و گزارش های بسیار کمی از جداسازی شیگلا از خون وجود دارد که اغلب آن ها از کودکان، نوزادان و افرادی است که سوء تغذیه دارند (۱۵).

میزان سائز پلاکت ها، مونسیت ها و بازوفیل ها در گروه آلوده با شیگلا دیسانتری به طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته که این افزایش در PDW به میزان ($P \leq 0.01$)، در مونسیت ها به میزان ($P \leq 0.05$) و در بازوفیل ها ($P \leq 0.01$) است. در تحقیق حاضر تفاوت معنی داری در تعداد پلاکت ها و حجم متوسط پلاکت ها در گروه های آزمایشی نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد در حالی که PDW در گروه آلوده با شیگلا دیسانتری به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. احتمالاً علت افزایش معنی دار PDW اثر تخریبی شیگلا بر بافت روده است که نهایتاً منجر به خونریزی و خارج شدن سلول های خونی از داخل رگ می شود. با توجه به این موضوع که پلاکت ها در امر انعقاد خون از اهمیت بالایی برخوردار هستند و با تأثیر از مطالعات اخیر که نشان داده اند مغز استخوان در مواقعی که تعداد پلاکت ها کاهش می یابند پلاکت های درشت تری را تولید و وارد جریان خون محیطی می کند. بنا بر این شاید این موضوع توجیه کننده افزایش PDW در این تحقیق باشد (۱۶). این نتیجه با نتایج دباغ نیکو خصلت و همکاران (۱۳۹۰) هم خوانی داشت (۱۷).

در تحقیق کنونی از میان گلبول های سفید تنها افزایش در تعداد مونسیت ها و بازوفیل ها در گروه آلوده با شیگلا دیسانتری نسبت به گروه کنترل مشاهده می

شیگلا دیسانتری و تیمار با لاکتوباسیلوس فرمتوم نسبت به گروه کنترل، تخریب پرزهای روده با شدت کمتری نسبت به گروه آلوده با شیگلا دیسانتری دیده می شود زیرا پروبیوتیک ها قادر به پیشگیری از تخریب سلول های اپی تلیال هستند و اثر ترمیمی بر بافت روده بر جای می گذارند (۲۴،۲۵). یان و پولک (۲۰۰۲)، از باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG به عنوان یک مدل از ارگانسیم های پروبیوتیک استفاده کردند و بر این باور بودند که یک مکانیسم ارتباطی جدید بین میکروارگانسیم های پروبیوتیک و اپی تلیال روده وجود دارد که باعث افزایش بقاء سلول های روده ای می شود.

ارزیابی حاصل از بررسی میانگین تعداد کلنی های باکتری شیگلا دیسانتری در گروه های آزمایشی گویای این مطلب است که میانگین تعداد باکتری رشد یافته در گروه آلوده با شیگلا دیسانتری و تیمار با لاکتوباسیلوس فرمتوم نسبت به گروه آلوده با شیگلا دیسانتری کاهش نشان می دهد ($P \leq 0.001$). رحیمی و همکاران گزارش دادند که پیروی از یک رژیم غذایی میکروبی باعث مهار رشد باکتری های پاتوژن در دستگاه گوارشی می شود. با توجه به این که در مطالعه بالا اثر مفید پروبیوتیک ها بر دستگاه گوارش مورد تایید قرار گرفته است بنا بر این می توان پیشنهاد کرد که لاکتوباسیلوس فرمتوم باعث کاهش میزان رشد باکتری شیگلا دیسانتری شده و احتمالاً این تاثیر به دلیل تقویت سیستم ایمنی بدن توسط پروبیوتیک ها می باشد (۲۶،۲۷).

در مجموع می توان عنوان کرد که باکتری لاکتوباسیلوس فرمتوم بدون ایجاد تغییر در فاکتورهای هماتولوژیک قادر به مقابله با باکتری شیگلا دیسانتری بوده و قادر است که تا حدودی از پیشرفت بیماری جلوگیری کند. بنا بر این پیشنهاد می گردد که در طی عفونت های شیگلایی جهت پیشگیری از آسیب های بافتی و مهار روند بیماری زایی از پروبیوتیک ها به عنوان مکمل درمانی استفاده شود.

سپاسگزاری

از تمامی اساتید، پژوهشگران و همکاران محترم در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، که

ارزیابی حاصل از بررسی میانگین وزن بین گروه های آزمایشی نشان دهنده این مطلب است که نسبت به گروه کنترل، باکتری شیگلا دیسانتری باعث کاهش معنی داری در وزن بدن نشده است. احتمالاً تاثیر کوتاه مدت شیگلا دیسانتری بر بدن رت ها منجر به کاهش قابل توجه در وزن آن ها نشده است. هم چنین در گروه لاکتوباسیلوس فرمتوم و گروه آلوده با شیگلا دیسانتری و تیمار با لاکتوباسیلوس فرمتوم با وجود تغییرات مختصر در میانگین وزن بدن گروه های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل، این تغییرات از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد که این نتایج تاییدکننده یافته های مطالعه خاک سفیدی و رحیمی است که نشان دادند پروبیوتیک بیوپلوس ۲ تأثیر معنی داری بر میانگین وزن ندارد (۲۱،۲۲).

در حالی که نسبت وزن روده به کل بدن در گروه های آلوده به شیگلا دیسانتری به میزان ($P \leq 0.001$) و در گروه آلوده با شیگلا دیسانتری و تیمار با لاکتوباسیلوس فرمتوم نسبت به گروه کنترل میزان ($P \leq 0.01$) بوده است. این نتایج گویای این مسئله است که باکتری شیگلا دیسانتری با اثر تخریبی خود بر بافت روده باعث از بین رفتن پرزها و بافت روده می شود که این نتایج تاییدکننده یافته های بررسی های پیشین است. این امر در گروه آلوده به شیگلا دیسانتری مشهودتر از گروه آلوده با شیگلا دیسانتری و تیمار با لاکتوباسیلوس فرمتوم می باشد پس به نظر می رسد که لاکتوباسیلوس فرمتوم با اثر درمانی خود باعث مهار باکتری شیگلا دیسانتری و ترمیم بافت روده شده است (۲،۲۳).

به منظور تایید اثر تخریبی شیگلا دیسانتری بر بافت روده در ادامه تحقیق بافت روده از لحاظ هیستوپاتولوژیک بین گروه های آزمایشی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی با میکروسکوپ نوری در موش های صحرایی نشان داد که در گروه آلوده با شیگلا دیسانتری نسبت به گروه کنترل تخریب شدید پرزهای روده و سلول های اپی تلیال مشاهده می شود که علت آن تهاجم باکتری شیگلا دیسانتری به بافت روده است که با اثر تخریبی خود، باعث از بین رفتن سلول های اپی تلیال روده می شود در حالی که در گروه آلوده با

در به نتیجه رسیدن این تحقیق تلاش فراوان کردند، تشکر و سپاسگزار می شود.

References

1. Ayazi P. [Prevalence of clinical symptoms and laboratory findings and antimicrobial sensitivity of Shigella in children]. J Qazvin Uni Med Sci 2001; 4:46-50. (Persian)
2. Brooks GF, Carroll KC. Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology 26th ed. Sunders Publication.2013; P. 285-302.
- 3.Soltandallal MM, Rahimiforushani A, Aminharati F, Ohadianmoghadam S, Nikmanesh B, Rastegarlar A. [Investigation the Shigella serotypes invasive cells isolated from patients with diarrhea in HEp-2 cell culture]. J Shahrekord Uni Med Sci 2014; 15:100-108. (Persian)
- 4.Schroeder GN, Hilbi H. Molecular pathogenesis of Shigella spp. controlling host cell signaling invasion and death by type III secretion. CMR 2008; 21:134-56. doi:10.1128/CMR.00032-07.
- 5.Honari H, Baranvand M, Arefpour MA, Hashemzadeh MS, Pourhakak H, Minaei ME, et al. [Comparison of antibody titers against the single mixed fused and recombinant proteins StxB IpaD and StxB-IpaD]. Sci J Ilam Uni Med Sci 2014; 22:87-95. (Persian)
6. Eghtedardost M, Saadati M, Nazariyan Sh, Zare M, Malaee F, Heyat M. [Identification of ipaB gene in Shigella and cloning of this gene in vector positive pET22b and determination of antibiotic sensitivity of Shigella strains]. IJIDTM 2011;15:55-61. (Persian)
- 7.Soltandallal MM, Keshtvarz M, Zamani S, Shirazi L. [Evaluation of anti-microbial activity of Lactobacillus acidophillus and Lactobacillus ruteri against entero pathoges by In vitro and In vivo methods]. J Gorgan Uni Med Sci 2016; 18:45-52. (Persian)
- 8.Dorri K, Hemayatkhahjahromi V, Namdar N, Kargarjahromi H. [Inhibitory effect of Lactobacillus strains isolated from the feces of children on the pathogenic bacteria of the intestines and stomach]. JMW 2011; 3:229-37. (Persian)
- 9.Rabbanikhorasgani M, Mansouritehrani H. [Overview of recombinant probiotics]. G3M 2013; 11:3326-37. (Persian)
- 10.Morseli P. [The role of probiotics in health]. Aja Uni Med Sci 2008; 3:21-27. (Persian)
- 11.Vejdani R, Zali MR. [Probiotics and their mechanism of action in the prevention and treatment of human diseases]. Res Med 2003; 27:319-30. (Persian)
12. Shirazi L, Rahnama M, Soltandallal MM. [Evaluation of the antimicrobial activity of Lactobacillus reuteri and Lactobacillus acidophilus on several pathogenic bacteria Enterobacteriaceae family]. Mic Biotech J Islam Azad Uni 2011; 3:29-34. (Persian)
- 13.Madsen K, Cornish A, Soper P, Mckaigney C, Jijon H, Yachimec CH, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. Gastroenterology 2001; 121:580-91. doi:10.1053/gast.2001.27224.
- 14.Olad GhR, Tavalae M, Mohammadhassan Z, Ebrahimi F, Salimian J, Nazarean Sh, et al. [Shigella dysentery stxA mutant R170L-A231D-G234E gene design and optimization of recombinant protein expression and purification]. J Shahrekord Uni Med Sci 2011; 13:93-102. (Persian)
- 15.Trevett AJ, Ogunbanjo BO, Naraqi S, Igo JD. Shigella bacteraemia in adults. PMJ 1993; 69:466-08.
- 16.Guclu E, Durmaz Y, Karabay O. Effect of severe sepsis on platelet count and their indices. AJOL 2013; 13:333-08. doi: 10.4314/has.v13i2.19.
- 17.Dabaghnikokheslat S, Amirsasan R, Sarisaraf V, Ahmadizad S, Mohamadvalilo F. [Contrast effect of daytime and aerobic exercise on blood coagulation variables and indexes of platelet of untrained young men]. JAEP 2011; 7:89-103. (Persian)
- 18.Montazeri F, Rahgozar S, Ghaedi K. [Molecules and signaling pathways in the process of migration of leukocytes across the endothelial cells]. G3M 2010; 8:2043-53. (Persian)
- 19.Hathaway LJ, Griffin GE, Sansonetti PhJ, Edgeworth JD. Human monocytes kill Shigella flexneri but then die by apoptosis

- associated with suppression of proinflammatory cytokine production. *Infect Immun* 2002; 70:3833-42. doi: 10.1128/IAI.70.7.3833-3842.2002.
20. Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira Sh, et al. IL-18, although anti-allergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *PNAS* 1999; 96:13962-66.
21. Vejdani R, Zali MR. [Probiotics and their mechanism of action in the prevention and treatment of human diseases]. *Res Med* 2003; 27:319-330. (Persian)
22. Murry AC, JR AH, Buhr RJ. Effect of botanical probiotic containing Lactobacilli on growth performance and populations of bacteria in the ceca, cloaca, and carcass rinse of broiler chickens. *International J Poultry Sci* 2006; 5:344-350. doi: 10.3923/ijps.2006.344.350.
23. Khaksefidi A, Rahimi Sh. [The effect of different levels of probiotic on blood factors, yield and carcass characteristics of broiler chickens under acute heat stress]. *JAST* 2005; 18:149-158. (Persian)
24. Dickson EM, Riggio MP, Macpherson L. A novel species specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*. *JMM* 2005; 54:299-303. doi: 10.1099/jmm.0.45770-0.
25. Zhang Z, Jin L, Champion G, Seydel KB, Stanley SL. Shigella infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model role for neutrophils in containing bacterial dissemination in human intestine. *IAI* 2001; 69:3240-47. doi: 10.1128/IAI.69.5.3240-3247.2001.
26. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, et al. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *AJP* 2009; 296:1140-09. doi: 10.1152/ajpgi.90534.2008.
27. Thomas CM, Versalovic J. Probiotics host communication modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes* 2010; 1:148-163. doi: 10.4161/gmic.1.3.11712.
28. Rahimi S, Grimes JL, Fletcher O, Oviedo E, Sheldon BW. Effect of a direct fed microbial Primalac on structure and ultrastructure of small intestine in Turkey poults. *PSJ* 2009; 88:491-503. doi: 10.3382/ps.2008-00272.

Effect of *Lactobacillus fermentum* on Hemathological and Histopathological Factors in Rats Infected by *Shigella dysenteriae*

Ahmadi F¹, Ghandehari F^{1*}, Tajedin N²

(Received: May 2, 2017)

Accepted: August 23, 2017)

Abstract

Introduction: Shigellosis is an intestinal infection caused by *Shigella* bacteria. Recently, it has been reported that probiotics inhibit pathogens by producing inhibitory compounds. The aim of this study was to investigate the inhibitory effects of *Lactobacillus fermentum* against infections caused by *Shigella dysenteriae* in term of in vivo.

Materials & Methods: This study was conducted on 32 male rats divided into 4 groups. The first group (A) was the control group, the second group (B) included rats infected with *Shigella dysenteriae* (1.5×10^8 cfu/ml), the third group (C) entailed rats treated with *Lactobacillus fermentum*, and the fourth group (D) were those rats contaminated with *Shigella dysenteriae* and treated with *Lactobacillus fermentum*. After the treatment period, animals were anesthetized and their blood and tissue samples were assessed to measure blood factors, histopathological investigations, and antimicrobial activity of *Lactobacillus fermentum*. Data were analyzed using SPSS statistical test through ANOVA-DUNKAN. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Findings: There was no significant change with regard to the number of red blood cells and blood index in the experimental groups in comparison with the control group (A). Moreover, there was a significant increase in the size of platelets ($P \leq 0.01$), monocytes ($P \leq 0.05$), and basophils ($P \leq 0.01$) in group B, compared to group A. The intestinal weight to body weight ratio in groups B ($P \leq 0.001$) and D ($P \leq 0.01$) was significantly lower than group A. The obtained results of histopathological investigations indicated that there was destruction in intestinal epithelium in group B, while intestinal tissues in group D almost seemed normal. The number of *Shigella dysenteriae* colonies in the intestines of the treatment group decreased significantly ($P \leq 0.001$), compared to the infected groups.

Discussion & Conclusions: *Lactobacillus fermentum* could cope with *Shigella dysenteriae* bacteria without causing any change in hematological parameters. Moreover, *Lactobacillus fermentum* can prevent such diseases to some extent.

Keywords: Probiotics, *Shigella dysenteriae*, *Lactobacillus fermentum*

1. Dept of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Esfahan, Iran

2. Dept of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Esfahan, Iran

* Correspondin author Email: Ghandehari@iaufala.ac.ir