تأثیر باکتری آمونیفیلوس اگزالاتیکوس DIM بر کاهش خطر هیپراگزالاریا ناشی از اگزالات آمونیوم در رت نژاد ویستار

اقدس محسنی ماسوله[۱]، آرمان رستم زاد[۱]، محمود نارکی[۲]، گیتی امتیازی[۳]، نورخدا صادقی فرد[۴*]

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲) مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

۳) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۴) مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۷ **تاریخ پذیرش: ۹٤/۲/۲۹**

چکیده

مقدمه: بیماری سنگ کلیه یک مشکل جهانی است و ابتلاء به آن در سال های اخیر به طور قابل توجهی افزایش یافته است. هیپراگزالاریا یکی از مهم ترین فاکتورهای تشکیل سنگ های اگزالات کلسیمی است که توسط سطح بالای اگزالات در ادرار مشخص می گردد. حدود ۸۰ درصد سنگ های کلیوی اگزالاتی هستند، یکی از راه های دفع این ماده از بدن انسان تجزیه توسط میکروارگانیسم های دستگاه گوارش، همانند اگزالوباکتر فورمیژنز، لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتر می باشد. هنوز سویه کارآمدی که دارای همه ویژگی های یک پروبیوتیک ایده‌ال جهت تجزیه اگزالات در بدن موجود زنده باشد یافت نشده است. در این پژوهش برای نخستین بار تاثیر باکتری اگزالوتروف اختصاصی آمونیفیلوس اگزالاتیکوس DIM بر کاهش خطر هیپراگزالاریا بررسی شده است.

مواد و روش ها: جهت القای هیپراگزالاریا، اگزالات آمونیوم ۳ درصد به رژیم غذایی رت ها افزوده شد. ۱۲ سر رت نر از نژاد ویستار به طور تصادفی انتخاب و به سه گروه مساوی تقسیم شدند. رت های گروه شاهد که در طول مدت پژوهش رژیم غذایی معمول دریافت کردند. گروه کنترل منفی که به رژیم غذایی آن ها اگزالات آمونیوم افزوده شد و گروه کنترل مثبت که علاوه بر اگزالات آمونیوم باکتری آمونیفیلوس اگزالاتیکوس DIM را به میزان 2×10^{9}CFU دریافت کردند. جهت اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی ادرار در روزهای(۵-، ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، و ۲۰) رت ها به قفس های متابولیک انتقال و نمونه ادراری ۲۴ ساعته آن ها جمع آوری شد. حجم و اسیدیته ادرار محاسبه و سپس میزان اگزالات ادرار با کیت محاسبه شد. نتایج با آزمون آماری مقایسه چندتایی Post hoc تحلیل شدند.

یافته های پژوهش: آنالیز بیوشیمیایی نمونه ادراری بیانگر کاهش معنی دار میزان ترشح اگزالات ادراری در گروه کنترل مثبت در مراحل ۳، ۵ و ۶ نمونه گیری بود، هم چنین هیچ نوع علائم بالینی در رت های مورد مطالعه مشاهده نشد.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به تاثیر مثبت باکتری آمونیفیلوس اگزالاتیکوس DIM در کاهش میزان اگزالات ادراری و کاهش خطر هیپراگزالاریا، این باکتری کاندید خوبی برای جلوگیری از تشکیل سنگ کلیه اگزالات کلسیم به شمار می رود و امید است در صورت مثبت بودن بررسی های آسیب شناسی، بتوان از این باکتری جهت کاهش خطر ابتلاء به این بیماری در انسان استفاده کرد.

واژه های کلیدی: آمونیفیلوس، اگزالات، سنگ کلیه، رت

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

Email: aghdas.mohseni@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-05]

مقدمه

بیماری سنگ های دستگاه ادراری، سومین بیماری شایع دستگاه ادراری و از قدیمی ترین بیماری های بشر است. سنگ کلیه یک مشکل جهانی است و ابتلاء به آن در سال های اخیر به طور قابل توجهی افزایش یافته است(۳-۱). بالاترین تعداد مبتلایان به سنگ های دستگاه ادراری در کشورهای خاورمیانه و جنوب شرقی آسیا می باشند که به همین دلیل این نواحی به عنوان کمربند سنگ شناخته شده اند(۴). نتایج یک تحقیق ملی که اخیراً اعلام شده است نشان می دهد که میزان بروز سنگ کلیه در ایران ۴/۲ در هر هزار نفر است. مناطقی که در حاشیه غربی ایران به سمت جنوب غربی قرار دارند مانند ایلام و کرمانشاه، کردستان، همدان و لرستان بیشترین مناطقی هستند که افراد ساکن در آن به بیماری سنگ ساز مبتلا می شوند. سنگ شکنی برون اندامی درمان اولیه انتخابی در اکثر سنگ های کلیه است که دارای عوارض متعدد می باشد و یکی از این عوارض، آریتمی قلبی است. سنگ های ادراری به دلیل تحمیل هزینه های مالی و اقتصادی زیاد به جامعه قابل توجه هستند(۵). جلوگیری از عود مجدد سنگ های ادراری یکی از بزرگ ترین چالش های اورولوژی مدرن است(۶). سنگ های مجاری ادراری در جنس مذکر شایع تر از مونث بوده بدین صورت که مردان ۴ برابر بیشتر از زنان مبتلا به سنگ ادراری می شوند(۷) و بدون توجه به محل ایجاد آن از املاح کلسیم، اگزالات، فسفات، اسید اوریک، سیستئین، استروویت و نوع نادر گزانتین تشکیل شده است که ترکیب اگزالات کلسیم شایع ترین نوع آن می باشد(۸). بیماری هیپراگزالاریا یکی از مهم ترین فاکتورهای تشکیل سنگ های اگزالات کلسیمی است که توسط سطح بالای اگزالات در ادرار مشخص می گردد(۹). اگزالیک اسید یک اسید دی کربوکسیلیک بسیار سمی با فرمول($H_2C_2O_4$) می باشد. اگزالات، نمک آن و یکی از اجزای شیمیایی تشکیل دهنده غذاها به ویژه با منشاء گیاهی می باشد و هم چنین به عنوان محصول نهایی متابولیسم ترکیباتی نظیر آسکوربات، گلی اکسالات و گلایسین به شمار می رود(۱۰). روش های درمانی رایج برای هیپراگزالاریای اولیه و رژیم های غذایی برای بیماران مبتلا به هیپراگزالاریای ثانویه همیشه موفقیت آمیز نیست و منجر به کاهش کافی ترشح اگزالات ادراری نمی گردد. بنا بر این واضح است که روش های درمانی جدید مورد نیاز است. درمان با باکتری های تجزیه کننده اگزالات می تواند روش درمانی جدید در بیماران مبتلا به انواع هیپراگزالاریا و هم چنین پیشگیری از تشکیل سنگ کلیه باشد(۱۱). تاکنون اکثر تحقیقات بر روی باکتری اگزالوتروف اختصاصی اگزالوباکترفورمیژنز متمرکز شده است. این باکتری به دلیل نقشی که در تنظیم و حذف اگزالیک اسید در انسان و حیوانات دارد مورد توجه است، اما از آن جا که کشت این باکتری بی هوازی مشکل پسند دشوار و نیازمند شرایط خاص است، تحقیقات روی نقش این باکتری در هموستازی اگزالات را محدود می کند. نگرش دیگر، استفاده از باکتری های اگزالوتروف عمومی بەویژه لاکتوباسیلوس ها و بیفیدوباکتریوم ها است. اما از آن جا که تا کنون استفاده از این باکتری ها به عنوان پروبیوتیک در کاهش میزان اگزالات رضایت بخش نبوده و نتایج حاصل از مطالعات انجام شده متغیر بوده و معنی دار نیست، نیاز به جست و جوی یک باکتری جدید به عنوان پروبیوتیک ضروری است. بدین منظور باید از بهترین گونه های باکتریایی تجزیه کننده اگزالات استفاده شود و به علاوه باکتری مورد نظر ویژگی های یک پروبیوتیک مناسب همانند توانایی رشد یا فعالیت در روده و هم چنین اختصاصی بودن برای تجزیه اگزالات را داشته باشد(۱۲). رژیم غذایی حاوی اگزالات نقش اصلی را در ایجاد سطح اگزالات ادرار و هیپراگزالاریا که مهم ترین فاکتور خطر در تشکیل سنگ کلیه است را ایفا می کند(۱۳،۱۴). در سال ۱۳۸۹ یک سویه اگزالوتروف اجباری جداسازی گردید این سویه از لحاظ توالی یابی 16S rRNA، ۹۷ درصد قرابت ژنتیکی با باکتری آمونیفیلوس اگزالاتیکوس را نشان داد. اما سویه جدا شده تفاوت های زیادی با این گونه نشان می دهد. آمونیفیلوس اگزالاتیکوس DIM باکتری میله ای شکل گرم مثبت، دارای اسپور و هوازی است که می تواند در شرایط بی هوازی نیز رشد کند و پس از ۶۰ ساعت قادر است ۱۰۰ درصد اگزالات

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-05]

(۱۰۰ میلی مولار) موجود در محیط را تجزیه کند. هم چنین آنزیم های تجزیه کننده اگزالات در این باکتری مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که در شرایط آزمایشگاه قادر به تجزیه ۷۲/۳۰ درصد اگزالات(۰/۵ میلی مولار) می باشد(۱۲). با توجه به سهم بالای اگزالات در تشکیل سنگ های ادراری و معایب کاربرد سایر باکتری های اگزالوتروف، در این پژوهش برای نخستین بار تاثیر باکتری اگزالوتروف اختصاصی آمونیفیلوس اگزالاتیکوس DIM جهت کاهش خطر هیپراگزالاریا ناشی از اگزالات آمونیوم ۳ درصد در رت ویستار مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این که باکتری در شرایط هوازی قابل کشت بوده و به طور اختصاصی از اگزالات به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می کند، امید است در صورت بیماری زا نبودن بتوان جهت کاهش خطر هیپراگزالاریا و جلوگیری از تشکیل سنگ کلیه اگزالات کلسیم از آن استفاده نمود.

مواد و روش ها

در این پژوهش ۱۲ سر رت نر از نژاد ویستار با وزن متوسط ۲۵۰ گرم انتخاب و یک هفته پیش از شروع آزمایش تحت شرایط عاری از عوامل استرس زا و بیماری زا در حیوان خانه با دمای متوسط ۲۵ درجه سانتی گراد و با سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. رت ها در سه گروه چهار تایی تقسیم بندی شده، در دستیابی به آب و غذا آزاد بوده و علائم بالینی آن ها به طور روزانه کنترل گردید. هم چنین ثبت وزن آن ها طی دو نوبت(ابتدا و انتهای آزمایش) صورت گرفت. طول مدت پژوهش ۲۵ روز بود. جهت القای هیپراگزالاریا ابتدا پلت به صورت پودر درآمده سپس اگزالات آمونیوم ۳ درصد به آن افزوده و دوباره به شکل گلوله های بیسکوییتی درآمد(۶،۱۲).

سویه باکتری مورد مطالعه: باکتری Ammoniphilus oxalaticus DIM به عنوان سویه جدیدی از آمونیفیلوس با کد HQ398365.1 ثبت و اختصاصا در اختیار این پژوهش قرار داده شد. برای تهیه سوسپانسیون باکتری آن را در محیط اختصاصی(Osteogenic medium (OM2 که حاوی ۱۵ گرم در لیتر اگزالاتآمونیوم بود کشت داده و به مدت ۶۰ ساعت در انکوباتور و در دمای ۲۸ سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید(۱۲). پس از آن محیط مایع حاوی باکتری به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ rpm، سانتریفیوژ شد. عمل شست و شوی باکتری سه بار و توسط سرم فیزیولوژی انجام شد و این باکتری ها با استفاده از گاواژ در دستگاه گوارش رت ها تلقیح شدند. میزان باکتری تلقیحی به رت ها برابر ۲×۱۰^{۹}cfu بود که سنجش آن توسط اسپکتروفتومتر صورت گرفت. تلقیح باکتری در تمامی مراحل تحقیق ۲ بار در روز و به یک میزان صورت گرفت و از هیچ پوششی جهت محافظت باکتری برابر شرایط اسیدی معده استفاده نشد.

سنجش تاثیر باکتری بر کاهش ترشح اگزالات ادراری در رت: نحوه گروه بندی رت های مورد مطالعه به شرح جدول ذیل می باشد(جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱. گروه بندی رت های تیمار با اگزالات آمونیوم

	۵ روز قبل از شروع آزمایش(۵-)	در طول مدت آزمایش(۲۰روز)
گروه ۱(شاهد)	رژیم غذایی معمول	رژیم غذایی معمول+۱ میلی لیتر سالین
گروه ۲(کنترل منفی)	رژیم غذایی حاوی اگزالات آمونیوم ۳٪	رژیم غذایی حاوی اگزالات آمونیوم ۳٪+۱ میلی لیتر سالین
گروه ۳(کنترل مثبت)	رژیم غذایی حاوی اگزالات آمونیوم ۳٪	رژیم غذایی حاوی اگزالات آمونیوم ۳٪+ ۲×۱۰^{۹}cfu باکتری

علت مصرف اگزالات ۵ روز قبل از شروع آزمایش، مشابه سازی شرایط روده رت ها به روده افراد مبتلا به هیپراگزالاریا و سنگ کلیه می باشد(۱۵). در گروه های مورد بررسی پنج روز قبل از شروع تلقیح باکتری(۵-) و هم چنین طی روزهای(۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰) در واقع ۶ مرحله نمونه گیری رت ها به قفس های متابولیک انتقال یافتند و نمونه های ادراری ۲۴ ساعته آن ها جمع آوری شد. حجم و اسیدیته ادرار محاسبه و میزان اگزالات نمونه های ادراری با استفاده از کیت های شرکت درمان کاو محاسبه شد.

محاسبات آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده ها از برنامه نرم افزاری SPSS vol.16 و تست post Hoc

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-05]

استفاده گردید. اختلاف بین گروه ها در سطح معنی داری $P<0.05$ تعیین شد.

یافته پژوهش

تعیین تاثیر باکتری بر کاهش ترشح اگزالات ادراری: در نمودار شماره ۱ میزان اگزالات ادراری ۲۴ ساعته رت ها بر حسب میکرومول به طور روزانه نمایش داده شده است. جدول شماره ۲ نیز بیانگر آنالیز آماری نتایج با نرم افزار SPSS و آنالیز واریانس تست Post hoc(مقایسه چندتایی بین گروه ها) می باشد. همان طور که مشاهده می شود در نخستین مرحله نمونه گیری(روز ۵-) تفاوت معنی داری در میزان اگزالات ادراری گروه ها دیده نشد. در دومین مرحله نمونه گیری(روز ۰) افزایش معنی دار در سطح کمتر از ۰/۰۵ درصد در میزان اگزالات گروه کنترل منفی و کنترل مثبت نسبت به گروه شاهد دیده شد، بنا بر این میزان اگزالات افزایش یافته و شرایط روده رت های گروه ۲ و ۳ مشابه افراد مبتلا به هیپراگزالاریا شده، در نتیجه شرایط جهت فعالیت باکتری نیز فراهم شده است. از این روز تزریق باکتری به رت های گروه کنترل مثبت آغاز شد. در سومین مرحله(روز ۵ ام) افزایش معنی دار اگزالات در سطح کمتر از ۰/۰۵ درصد در گروه کنترل منفی نسبت به شاهد و کنترل مثبت مشاهده شد در حالی که تفاوت معنی دار میان گروه شاهد و کنترل مثبت وجود نداشت و این به معنای تاثیر معنی دار باکتری بر کاهش ترشح اگزالات بوده است. در مرحله چهارم(روز ۱۰ ام)، میزان اگزالات گروه های کنترل منفی و کنترل مثبت افزایش یافت. در واقع در گروه کنترل مثبت به دلیل عدم توانایی باکتری در کاهش اگزالات، میزان متوسط اگزالات ادراری به دلیل مصرف اگزالات آمونیوم موجود در رژیم غذایی افزایش یافته و مشابه با گروه کنترل منفی می باشد. در مرحله پنجم نمونه گیری(روز ۱۵ام) افزایش معنی دار در اگزالات گروه کنترل منفی نسبت به شاهد در سطح کمتر از ۰/۰۵ درصد مشاهده شد و تفاوت معنی داری میان گروه های شاهد وکنترل مثبت مشاهده نشد. مطابق نمودار باکتری به میزان زیادی اگزالات ادراری را کاهش داده اما این کاهش معنی دار نبوده است. در مرحله ۶ (روز ۲۰ ام) همانند مرحله سوم، افزایش معنی دار اگزالات در سطح کمتر از ۰/۰۵ درصد در گروه کنترل منفی نسبت به گروه شاهد و کنترل مثبت مشاهده شد در حالی که تفاوت معنی دار میان دو گروه اخیر ذکر شده وجود نداشت و این به معنای تاثیر معنی دار باکتری بر کاهش ترشح اگزالات ادراری بوده است.

اسیدیته و حجم ادرار: در مورد فاکتور حجم، مطابق با نمودار شماره ۲ مشخص شد که حجم نمونه ادراری در گروه شاهد ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. در گروه کنترل منفی نیز ابتدا افزایش، سپس کاهش و مجدداً در مراحل نهایی افزایش یافت، میزان افزایش حجم ادرار در این گروه نسبت به دو گروه دیگر بالاتر بود. در گروه کنترل مثبت نیز نتایج متغیر بوده و به طور متناوب افزایش و کاهش یافت. نمودار شماره ۳ نیز بیانگر میزان متوسط اسیدیته ادراری در سه گروه مورد مطالعه می باشد. تجزیه و تحلیل داده ها با تست Post hoc نشان داد در مراحل ۱ و ۲ نمونه گیری تفاوت معنی دار در اسیدیته گروه ها وجود نداشت. در مرحله ۳، ۵ و ۶ نمونه گیری تفاوت میزان اسیدیته بین گروه شاهد و کنترل مثبت معنی دار نبود اما در گروه کنترل منفی نسبت به شاهد کاهش معنی دار در سطح کمتر از ۰/۰۵ درصد نشا ن داد. در واقع به دلیل بالا بودن میزان اگزالات در گروه کنترل منفی اسیدیته کاهش یافته اما در گروه کنترل مثبت به دلیل عملکرد باکتری این کاهش معنی دار نبود. در مرحله ۴ علاوه بر وجود کاهش معنی دار در سطح کمتر از ۰/۰۵ درصد در گروه کنترل منفی نسبت به شاهد این حالت برای گروه کنترل مثبت نیز مشاهده شد.

علائم بالینی و وزن بدن رت ها در گروه های تیمار با اگزالات آمونیوم: در طول مدت آزمایش هیچ گونه علائم بالینی شامل تغییر در وضع ظاهری، تغییییر در رنگ پوست، تغییر در فعالیت و مرگ در رت های مورد بررسی دیده نشد. هم چنین وزن رت ها در دو نوبت(آغاز و پایان آزمایش) ثبت شد. نتایج حاصل در جدول شماره ۳ بر حسب گرم نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل مقادیر میزان متوسط وزن رت ها با نرم افزارآماری SPSS vol.16 و آنالیز واریانس و تست Post Hoc نیز نشان داد که تغییر معناداری در مقایسه

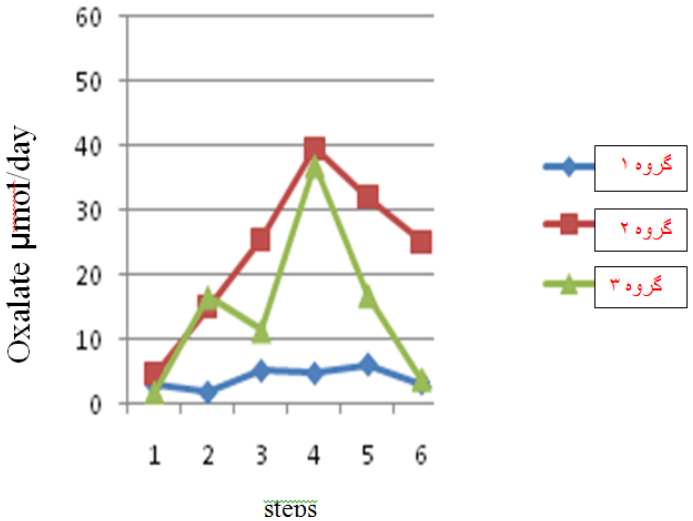
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-05]

وزن رت ها در ابتدا و انتهای مدت پژوهش وجود نداشت.

جدول شماره ۲. آنالیز میزان متوسط اگزالات ادراری ۲۴ ساعته گروه های تیمار با اگزالات

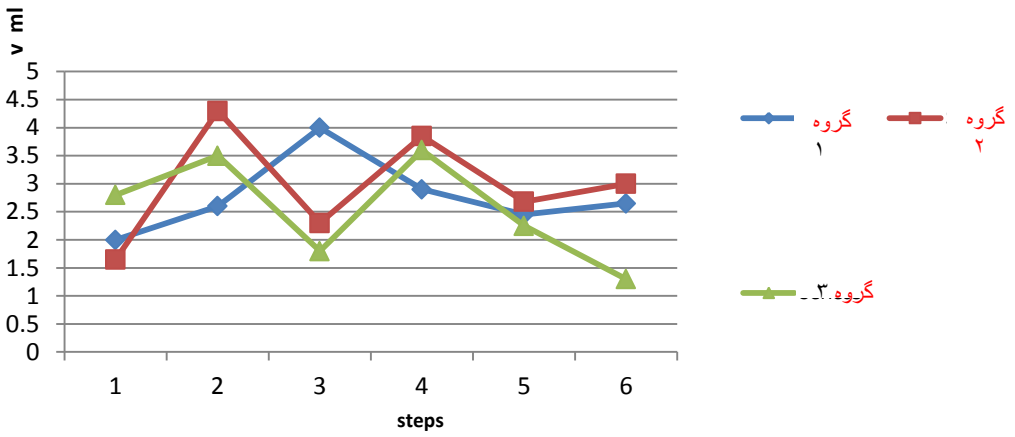
	(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	sig
step1	1.00	00.2	-1.69250	1.09354	.156
		3.00	1.06250	1.09354	.357
	2.00	1.00	1.69250	1.09354	.156
		3.00	2.75500*	1.09354	.153
step2	1.00	2.00	-13.10750*	4.59205	.019
		3.00	-14.76750*	4.59205	.011
	2.00	1.00	13.10750*	4.59205	.019
		3.00	-1.66000	4.59205	.726
step3	1.00	2.00	-20.34250*	5.03689	.003
		3.00	-6.22500	5.03689	.248
	2.00	1.00	20.34250*	5.03689	.003
		3.00	14.11750*	5.03689	.021
step4	1.00	2.00	-34.77250	15.90734	.060
		3.00	-33.13167	17.18189	.090
	2.00	1.00	34.77250	15.90734	.060
		3.00	1.64083	17.18189	.926
step5	1.00	2.00	-25.98000*	8.39328	.013
		3.00	-10.82000	8.39328	.229
	2.00	1.00	25.98000*	8.39328	.013
		3.00	15.16000	8.39328	.104
step6	1.00	2.00	-21.97000*	4.79725	.001
		3.00	-.71750	4.79725	.884
	2.00	1.00	21.97000*	4.79725	.001
		3.00	21.25250*	4.79725	.002

*sig < 0.05 با استفاده از تست Post hoc

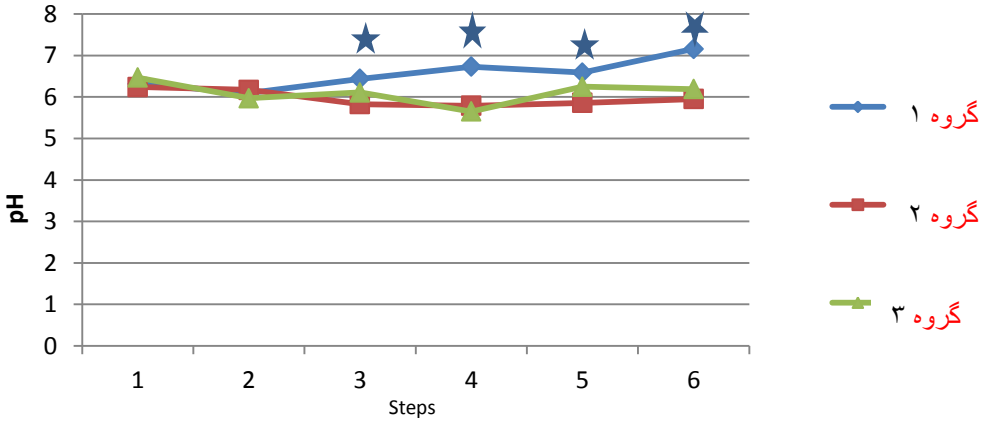


نمودار شماره ۱. میانگین اگزالات ادراری ۲۴ ساعته گروه ها

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-05]



نمودار شماره ۲. میانگین حجم ادراری ۲٤ ساعته گروه ها



نمودار شماره ۳. میانگین اسیدیته ادراری گروه ها

3,5,6: P<0.05% بین گروه ۲,۱، با استفاده از تست Post hoc

4: P<0.05% بین گروه ۲ ,۱ و ۳,۱ با استفاده از تست Post hoc

جدول شماره ۳. میزان متوسط وزن رت های تیمار با اگزالات آمونیوم بر حسب گرم

	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳
آغاز	۲۷۶/۲۵	۲۴۷	۲۷۴
پایان	۳۰۵	۲۶۹	۲۹۰

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-05]

بحث و نتیجه گیری

سطح بالای اگزالات در انسان می تواند تاثیر مضری داشته باشد. این ماده می تواند عامل برخی از بیماری ها مانند هیپراگزالاریا، نقص‌کلیوی، سنگ های ادراری اگزالات‌کلسیم و کاردیومیوپاتی باشد(۱۴،۱۷). سنگ های ادراری به دلیل تحمیل هزینه های مالی و اقتصادی زیاد به جامعه قابل توجه هستند. شناسایی انواع مختلف سنگ های ادراری به شناخت روش های درمانی طبی بیشتری منجر گردیده که غالب این درمان ها با شکست مواجه می گردد. اگر چه اکنون نمی توان تمام سنگ های ادراری را درمان طبی نمود اما ۵۰ درصد بیماران تنها با درمان طبی قابل کنترل یا درمان می باشند(۴). تحقیقات در افراد سالم نشان می دهد که بیش از ۵۰ درصد اگزالات ادراری از رژیم غذایی حاوی اگزالات منشاء می گیرد(۱۳). انسان ها فاقد آنزیم های لازم برای متابولیزه کردن اگزالات هستند، بنا بر این این ترکیب بالقوه سمی در بدن انسان به سه طریق دفع می گردد. ۱) ممکن است در روده جذب شده و در ادرار دفع شود. ۲) اگزالات در روده می تواند با کلسیم ترکیب شود و اگزالات کلسیم نامحلول را تشکیل دهد که از طریق مدفوع دفع می شود. ۳) اگزالات ممکن است توسط میکروارگانیسم های موجود در دستگاه گوارش(GIT) تجزیه گردد(۱۶). در درمان باکتریایی، تاکنون اکثر تحقیقات بر روی باکتری اگزالوتروف اختصاصی اگزالوباکتر فورمیژنز و پروبیوتیک ها به عنوان اگزالوتروف عمومی متمرکز شده است. اما از آن جا که کشت اگزالوباکتر فورمیژنز که یک باکتری بی هوازی است، دشوار و نیازمند شرایط خاص است، تحقیقات روی نقش این باکتری در هموستازی اگزالات را محدود می کند(۱۸). استفاده از باکتری های اگزالوتروف عمومی به ویژه لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم به عنوان پروبیوتیک در کاهش میزان اگزالات رضایت بخش نبوده و نتایج حاصل از مطالعات انجام شده متغیر بوده و معنی دار نیست(۱۹). بنا بر این نیاز به جست و جوی یک باکتری جدید با خاصیت تجزیه کنندگی بالای اگزالات و رفع نواقص موجود و البته با شرط بیماری زا نبودن خود باکتری وجود دارد. باکتری آمونیفیلوس اگزالاتیکوس DIM که در سال ۱۳۸۹ توسط نارکی جداسازی گردید، یک باکتری محیطی است که توانایی بالایی در تجزیه اگزالات در آزمایشگاه را دارا است. این سویه از لحاظ توالی یابی 16S rRNA، ۹۷ درصد قرابت ژنتیکی با باکتری آمونیفیلوس اگزالاتیکوس را نشان داد. اما تفاوت های زیادی با این گونه نشان می دهد. آمونیفیلوس اگزالاتیکوس DIM بهترین رشد را در غلظت ۲ گرم در لیتر کلرورآمونیوم نشان داد و حتی غلظت های بالاتر از ۶ گرم در لیتر باعث مهار رشد گردید. این ویژگی می تواند یک مزیت نسبت به گونه های آمونیفیلوس باشد که بتوان از این باکتری جهت تجزیه اگزالات در بدن موجود زنده کاهش اگزالات استفاده کرد(۱۲). در این پژوهش برای اولین بار در دنیا کاربرد این باکتری مورد بررسی قرار گرفت و هنوز نمی توان آن را به عنوان یک پروبیوتیک مطرح کرد. در واقع در این پژوهش تنها گام اولیه تاثیر باکتری برداشته شد که مشخص شود آیا بدون نیاز به سیستم های پیچیده جهت تکثیر باکتری همانند اگزالوباکتر فورمیجنز و یا پروبیوتیک ها که کارایی ضعیف داشتند باکتری مورد استفاده قادر به کاهش ترشح اگزالات ادراری بوده است؟ همان گونه که مشاهده شد پس از بالا رفتن میزان اگزالات در گروه های ۲ و ۳، شرایط جهت فعالیت باکتری فراهم شد و در مرحله سوم نمونه گیری کاهش معنی دار ترشح اگزالات ادراری مشاهده گردید. در مرحله چهارم باکتری تاثیری بر کاهش ترشح اگزالات نداشت، با توجه به این که آمونیفیلوس اگزالاتیکوس DIM یک باکتری محیطی است در این تحقیق بدون توجه به استقرار یا عدم استقرار آن در سیستم گوارشی، تنها تاثیر آن بر کاهش ترشح اگزالات ادراری مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که حتی ممکن است باکتری توانایی استقرار در روده رت را نداشته و تنها هنگام عبور از روده، اگزالات موجود را مصرف و منجر به کاهش ترشح اگزالات ادراری گردد، بنا بر این ممکن است در این مرحله بخش عظیمی از باکتری ها به دلیل خاصیت اسیدی معده از بین رفته و یا این که به دلیل عملکرد سایر میکروارگانیسم های موجود در روده و رقابت آن ها با آمونیفیلوس در این مرحله باکتری تاثیری بر کاهش ترشح اگزالات ادراری

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-05]

نداشته است. در مرحله پنجم، میزان اگزالات ادراری گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی معنی دار نبود و با توجه به عدم تفاوت معنی دار میان گروه شاهد و کنترل مثبت می توان گفت بار دیگر باکتری توانمند شده و منجر به کاهش زیادی در ترشح اکزالات در گروه کنترل مثبت گردیده است. در مرحه ششم نیز فعالیت باکتری بیشتر شده و کاهش معنی داری در میزان اگزالات ادراری گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی مشاهده شد. در این بررسی میزان متوسط حجم ادراری ۲۴ ساعته ارتباط معنی داری با فعالیت باکتری نداشت. میزان اسیدیته نمونه های ادراری در گروه کنترل منفی نسبت به شاهد به دلیل افزایش میزان اگزالات تفاوت معنی دار نشان داده و کمتر بود، اما در گروه کنترل مثبت به دلیل مصرف اگزالات توسط باکتری اسیدیته ادرار افزایش یافته و مشابه گروه شاهد بود. یافته های ما در این مطالعه آشکارا بیانگر کاهش سطح میزان اگزالات ادراری ناشی از اگزالات آمونیوم ۳ درصد توسط آمونیفیلوس اگزالاتیکوس DIM بود بنا بر این باکتری مذکور می تواند جهت کنترل هیپراگزالاریا و پیشگیری از تشکیل سنگ کلیه اگزالات کلسیم نیز به کار رود. طی پژوهش انجام شده هیچ گونه علائم بالینی در رت هایی که باکتری به آن ها تزریق شده بود، مشاهده نگردید و مقایسه میزان وزن آن ها در ابتدا و انتهای آزمایش تفاوت معنی داری نشان نداد، این مطلب نشان می دهد مصرف باکتری در رت ها تنش ایجاد نکرده، منجر به کاهش وزن در گروه کنترل مثبت نشده است و وزن رت ها در سه گروه مورد بررسی در طول مدت پژوهش به طور معمول افزایش یافته است. اما از آن جا که هدف نهایی از این مطالعه کاربرد باکتری مورد استفاده در افراد مبتلا به هیپراگزالاریا و سنگ کلیه می باشد نیاز است بررسی های آسیب شناسی در سطوح وسیعی انجام گیرد. باکتری در این مرحله بدون پوشش استفاده شد. در این پژوهش هدف این نبوده که باکتری حتماً در سیستم گوارشی زنده بماند و اطمینانی هم وجود نداشت. در مورد زمان و نحوه مصرف باکتری، تزریق باکتری به رت ها دو بار در روز انجام شد. از هیچ پوششی جهت محافظت باکتری برابر شرایط اسیدی معده استفاده نشد. با توجه به این که باکتری قادر به کاهش اگزالات ادراری می باشد امید است بتوان با مکانیسم های پوشش دهی کارایی آن را افزایش داد، در این صورت میزان باکتری مصرفی نیز کاهش می یابد.

در تطابق با نتایج پژوهش حاضر Ferraz و همکاران(۲۰۰۹) تاثیر لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس بر روی را بر کاهش اگزالات ادراری در افراد مبتلا به سنگ بررسی کردند. با مصرف باکتری ها این میزان به ۲۵ تا ۵۰ درصد کاهش یافت(۲۰) هم چنین Leisk و همکاران(۲۰۰۵) نیز تاثیر مخلوطی از لاکتوباسیلوس ها را بر کاهش اگزالات ادراری در افراد مبتلا به هیپراگزالاریای روده ای مورد بررسی قرار دادند. از مخلوط لاکتوباسیل ها به همراه بیفیدوباکتر به میزان 10^{11} cfu جهت بررسی تغییرات میزان اگزالات ادراری استفاده شد. نتایج بیانگر کاهش معنی دار در میزان متوسط اگزالات ادراری بود به طوری که ترشح اگزالات پس از مصرف باکتری در ماه نخست ۱۹درصد کاهش یافت، در ماه دوم ۲۴ درصد و در دوره شست و شو ۲۰ درصد کاهش میزان اگزالات ادراری را به همراه داشت(۲۱). sidhu و همکاران(۲۰۰۱) نیز به رژیم غذایی رت های جنس نر از نژاد ویستار اگزالات آمونیوم یک درصد جهت القای هیپراگزالاریا افزودند و مقادیر cfu (10^{3}، 10^{5}، 10^{7}، و 10^{9}) از اگزالوباکتر فورمیژنز را به آن ها تزریق کردند. پس از دو روز کاهش معنی داری در میزان اگزالات ادراری رت ها مشاهده شد که این کاهش وابسته به مقدار باکتری بود. به طوری که میزان این کاهش در دوز 10^{7} و 10^{9} بیشتر بود(۱۵). Okombo و همکاران(۲۰۱۰) در پژوهشی دیگر از یک پروبیوتک با نام تجاری VSL≠3 که شامل میکروارگانیسم های خشک و منجمد شده استرپتوکوکوس ترموفیلوس، سه سویه از بیفیدوباکتریوم و چهار سویه از از لاکتوباسیلوس ها بود، استفاده کردند، در همه افراد میزان اگزالات پس از مصرف پروبیوتیک از ۳۰/۸ درصد به ۱۱/۶ درصد در طول مدت مصرف پروبیوتیک و ۱۱/۵ درصد در دوره شست و شو رسید(۱۰). بنا بر آن چه در این پژوهش بدان دست یافتیم آمونیفیلوس اگزالاتیکوس DIM قادر به

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-05]

کاهش ترشح اگزالات ادراری بوده و کاندیدای مناسبی جهت پیشگیری از سنگ کلیه به شمار می رود. البته جهت کاربرد آن در نمونه های انسانی لازم است بررسی های آسیب شناسی بافتی در سطوح وسیع انجام پذیرد. هم چنین می توان ژن تجزیه کننده اگزالات در این باکتری را شناسایی و آن را در یک باکتری سالم که رشد خوبی دارد، کلون نمود.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی ایلام انجام گردید، در این جا لازم است از حمایت های مالی آقای دکتر مروت طاهری کلانی معاون تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی ایلام و آقای دکتر فرید عزیزی جلیلیان مدیر امور تحقیقات دانشگاه قدردانی نماییم. هم چنین از کلیه کارشناسان شاغل در مرکز تحقیقات میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایلام که در انجام این پروژه تمام امکانات را فراهم نمودند صمیمانه قدردانی می شود.

References

1.Tanagho EA, McAninch JW. Smiths general urology.16th ed. New York, NY: McGraw-Hill 2004;256- 291.

2.Murat D, Alper O, Emin O. Kidney stones and ceftriaxone. EMJ Urol 2015; 3:68-74.

3.Favazza T, Midha M, Martin J, Grob B M. Factors influencing bladder stone formation in patients with spinal cord injury. J Spinal Cord Med 2004; 27:252-4.

4.Rodgers A, Barbour L, Pougnet B, Lombard C, Ryall R. Urinary element concentrations in kidney stone formers and normal controls: the week-end effect. J Trace Elem Electrolytes Health Dis1994;8:87-91.

5.Garabed E. Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism. History urol Ith 2004; 2: 177.

6.Kwak C, Jeong BC, Ku JH, Kim HH, Lee JJ, Huh CS, et al. Prevention of nephrolithiasis by Lactobacillus in stone-forming rats a preliminary study. Urol Res2006; 34:265-70.

7.Heilberg I, Schor S. Renal stone disease causes, evalution and medical treatment. Div Nephrol2006; 50:823-31.

8.VanDervoort K, Wiesen J, Frank R. Urolithiasis in pediatric patients: a single center study of incidence, clinicalpresentation and outcome.Urol Res2007;177:2300.

9.Duncan SH, Richardson AJ, Kaul P, Holmes RP, Allison MJ, Stewart CS. Oxalobacter formigenes and its potential role in human health. Appl EnvironMicrob2002;68:3841–7.

10.Okombo J, Liebman m. Probiotic-induced reduction of gastrointestinal oxalate absorption in healthy subjects. Urol Res 2010; 38:169-178.

11.Hoppe B, Beck BB, Milline DS. The primary hyperoxalurias. Kidney Int 2009; 75:1264–71.

12.Hoppe B, Dittlich K, Fehrenbach H, Plum G, Beck BB. Reduction of plasma oxalate levels by oral application of Oxalobacter formigenes in 2 patients with infantile oxalosis. Am J Kidney Dis2011;58:453-5.

13.Holmes RP,Goodman HO, Assimos DG. Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. Kidney Int2001;59:270–6.

14.Hoppe B, Beck BB, Milliner DS. The primary hyperoxalurias. Kidney Int 2009;75:1264–71.

15. Sidhu H, Allison MJ, Chow JM, Clark A, Peck AB. Rapid reversal of hyperoxaluria in a rat model after probiotic administration of Oxalobacter formigenes. J Urol 2001;166:1487–91.

16.Campieri C, Bertuzzi V, Swennen E, Mateeuzzi, D, Stefoni S, Pirovano F, et al. Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration. Kidney Int 2001; 60: 1097–105.

17.Mulay SR, Kulkarni OP, RupanagudiKV. Calcium oxalate crystals inducerenal inflammation by NLRP3-mediatedIL-1β secretion. J Clin Invest 2013;123:236-46.

18.Siva S, Barrack ER, Reddy GPV,Thamilselvan V, Thamilselvan S, Menon M, et al. A critical analysis of the role of gut Oxalobacter formigenes in oxalate stone disease. BJU Int 2008;103:18–21.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-05]

19.Abratt V. R, Reid S. J.Oxalate-Degrading Bacteria of the Human Gut as Probiotics in the Management of Kidney Stone Disease. Advances in Applied Microbiology 2010; 72:63-87.
20.Ferraz RBN, Marques NC, Froeder L, Menon VB, Siliao PR, Baxmann A, et al. Effects of Lactobacillus casei and Bifidobacterium breve on urinaryoxalate excretion in nephrolithiasis patients.Urol Res2009;37:95–100.
21.Lieske JC, Goldfarb DS, De Simone C, Regnier C. Use of a probiotic to decrease enteric hyperoxaluria. Kidney Int2005; 68:1244–9.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-05]

Effect of Ammoniphilus oxalaticus DIM Bacterium on Reducing the Risk of Hyperixaluria Induced by Ammonium Oxalate in Wistar Rat

Mohsenimasoleh A[1], Rostamzad A[1], Naraki M[2], Emyiazi G[3], Sadeghifard N[4]*

(Received: June 28, 2014 Accepted: June 28, 2015)

Abstract

Introduction: The renal stone is a global health problem and nowadays, it has a high prevalence around the world. Hyperoxaluria is one of the most important factors for calcium oxalate stone formation that is characterized with high level of oxalate excretion in urine. It is estimated that about 80% of renal stones have an oxalate origin, and one way for preventing renal stones in human body is its degradation by gastrointestinal bacterial such as oxalobacter formigenes, lactobacillus and bifidobacter. There are many reports using probiotics to preven renal stones. Up to now, no bacterium that is proficient in body oxalate degradation as probiotic has been recommended, In this survey for the first, time we evaluating the effects of specific oxalotroph bacteria Ammoniphilus oxalaticus DIM in reductionof the hyperoxaluria risk.

Materials & methods: We induced exogenous hyperixaluria by adding ammonium oxalate 3%in rat diet. 12 male Wistar rat were randomly divided into three groups. Rats in the control group received the usual diet during the study. Negative controls were added to the diet of ammonium oxalate and ammonium oxalate in addition to the positive control bacteria levels were $2\times1o^{9}$ cfu. Measurement of urinary biochemical factors on (-5, 0, 5, 10, 15, and 20) rats were transferred to metabolic cages and 24-hour urine samples were collected. The volume and acidity of the urine were measured and urinary oxalate levels were calculated by the kit. The results were analyzed by Post hoc multiple comparison test.

Findings: Biochemical results showed the significantly reducing rate of urinary oxalate excretion at the positive control group in 3, 5 and 6th stages of sampeling. We didn't observe any clinical symptoms between the examined rats.

Discussion & Conclusions: Regarding positive effect of Ammoniphilus oxalaticus DIM in reducing the rate of urine oxalate excretion and risk of hyperoxaluria, it would be a good candidate for prevention of kidney stones with calcium oxalate kidney stone and it is hoped that in case of positive pathological studies, these bacteria could be used to reduce the risk of disease in humans

Keywords: Ammoniphilus, oxalate, Kidney stone, Rat

1.Dept of Biology, Faculty of Science, Ilam University, Ilam, Iran
2.Medicinal Plant Research Center, Yasouj University, Yasouj, Iran
3.Dept of Biology, Faculty of Science, Esfahan University, Esfahan, Iran
4.Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
** Correspondin author Email: aghdas.mohseni@yahoo.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-12-05]