CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Repository of Research and Investigative Information

مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل

دوره بیستم، شمارهٔ ۱۲، آذر ۱۳۹۷، صفحه ۲۰-۱۳

مقایسه اثر باکتری‌های استارتر ماست و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بر فعالیت سلول‌های مونونوکلئار خون محیطی بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو

عبدالکریم شیخی (PhD)[۱]، زینب احمدی (MSc)[۲*]، مرتضی اسکری (PhD)[۳]

۱-گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی نور دانش، واحد میمه، اصفهان، ایران

۳- گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، مؤسسه آموزش عالی نور دانش، واحد میمه، اصفهان، ایران

دریافت: ۹۶/۱۲/۱۲، اصلاح: ۹۷/۶/۱۴، پذیرش: ۹۷/۷/۳

خلاصه

سابقه و هدف: کولیت اولسراتیو، بیماری التهابی روده است که روده بزرگ و راست‌روده را درگیر می‌کند.از آنجائیکه بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو، سطوح بالایی از سایتوکاین‌های پیش التهابی و ضد التهابی ترشح می‌کنند، هدف از این مطالعه مقایسه اثر باکتری‌های استارتر ماست و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بر فعالیت سلول‌های مونونوکلئار خون محیطی بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی‌آزمایشگاهی روی ۱۰ بیمار مبتلا به کولیت اولسراتیو شهرهای دزفول، اندیمشک و شوش در دو گروه آزمایش و یک گروه کنترل انجام شد. گروه‌های آزمایش، شامل کشت مشترک سلول‌های مونونوکلئار و باکتری مورد نظر در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت و کنترل نیز شامل سلول‌های مونونوکلئار بیمار در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت بودند. متغیر IL10 و IL1β توسط الایزا مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

یافته ها: در رقت ۰/۱ و زمان ۴۸ ساعت ترشح IL1β توسط سلول‌های مونونوکلئار تحریک شده با بولگاریکوس ۹۴۰/۴±۲۴۹/۶۱ در مقایسه با استارتر ۶۶۹/۱۲±۱۸۱/۱۱ (P=۰/۰۰۴) و در ۷۲ ساعت توسط بولگاریکوس ۷۹۶/۳±۲۱۳/۳۴ در مقایسه با استارتر ۴۶۴/۲۵±۱۲۸/۴۱ (P=۰/۰۰۰)، در رقت ۰/۰۱ و زمان ۴۸ ساعت نیز توسط بولگاریکوس ۷۴۷/۵±۱۹۸/۵۴ در مقایسه با استارتر ۵۲۹/۲۵±۱۶۳/۸۲ (P=۰/۰۰۵) و در ۷۲ ساعت توسط بولگاریکوس ۶۱۷/۴±۱۹۲/۵ در مقایسه با استارتر ۴۰۸/۶۲±۱۳۴/۷۸ (P=۰/۰۰۴) دارای افزایش معنی‌داری بود. در میزان ترشح سایتوکاین‌ها در هر دو رقت و هر دو زمان بین هر یک از گروه‌های آزمایش با کنترل نیز افزایش معنی‌داری مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در مقایسه با استارتر با ترشح IL1β موجب التهاب می‌گردد. بنابراین استارتر نقش بهتری در کاهش التهاب دارد.

واژه‌های کلیدی: کولیت اولسراتیو، استارتر، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس.

مقدمه

کولیت اولسراتیو یک بیماری التهابی مزمن و عود کننده روده بزرگ است که مشخصه آن اختلال در پاسخ ایمنی مخاطی، عدم تعادل در سنتز، ترشح سایتوکاین‌ها و بهبود نیافتن التهاب در نتیجه آسیب مخاطی است (۱). این بیماری به نظر می رسد، به خاطر شکست تولرانس سیستم ایمنی نسبت به آنتی‌ژن‌های درون روده، شامل میکروب‌های فلور نرمال و مواد غذایی باشد. منبع اصلی میکروب‌های فلور نرمال، لبنیاتی مانند ماست است که با استفاده از پروبیوتیک‌ها تهیه می شود (۳و۲). مطالعات نشان داده که گونه‌های مختلف میکروب، دارای اثرات متفاوتی روی سیستم ایمنی مخاطی شامل، لنفوسیت‌های T تنظیم کننده (T regulatory) و لنفوسیت‌های T اثرگذار (Effector T-cell) می‌باشند (۶-۴). در واقع، تفاوت میان سویه‌ها، از طریق میزان ترشح سایتوکاین‌ها در کشت مشترک باکتری‌های پروبیوتیک با سلول‌های مونونوکلئار خون محیطی (PBMC) نشان داده می‌شود (۷). Rana و همکاران نشان دادند که بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو، سطوح بالایی از سایتوکاین‌های پیش التهابی و ضد التهابی ترشح می‌کنند. این شواهد نشان می‌دهد، عدم تعادل بین سایتوکاین‌های پیش التهابی و ضد التهابی نقش مهمی در پاتوژنز این بیماری دارد (۸). مطالعات Javed و همکاران نشان داد که باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک باعث بهبود بیماری‌های التهابی روده می‌شود (۹). طبق مطالعه Zeuthen و همکارانش، گونه‌های پروبیوتیکی نظیر باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک سبب تولید IL10 و در نتیجه مهار لنفوسیت T اثرگذار (TH1) و به دنبال آن مهار سایتوکاین‌های التهابی می‌شوند (۱۰). مطالعه‌ای که توسط Donkor و همکارانش

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد زینب احمدی دانشجوی رشته میکروبیولوژی موسسه آموزش عالی نور دانش، واحد میمه می باشد.

* مسئول مقاله: زینب احمدی

آدرس: اصفهان، میمه، بلوار دانش، مؤسسه آموزش عالی نور دانش. تلفن: ۰۳۱-۴۵۴۲۷۶۰۰

E-mail: Zeynab.ahmadi20@gmail.com

بر روی پروبیوتیک‌ها انجام شد، نشان داد که تعامل پروبیوتیک‌ها با سلول‌های ایمنی بدن و ترشح سایتوکاین‌ها، باعث اثرات ایمنی بر روی سلول‌های اثر گذار محلی می‌شود. همچنین باعث ایجاد تمایز سلولی TH17 و لنفوسیت‌های T تنظیمی نیز می‌گردد (۱۱).

مطالعات انجام شده توسط Elizabet و همکارانش نشان داد که استفاده از پروبیوتیک‌ها روی بیماران معده‌ای-روده‌ای، باعث تولید سایتوکاین‌های ضد التهابی و پیش التهابی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی این بیماران و همچنین باعث کاهش پاسخ‌های استرسی در آن‌ها می‌گردد (۱۲). با توجه به شیوع بالای بیماری کولیت اولسراتیو در کشورهای توسعه یافته و اثراتی که پروبیوتیک‌ها می‌توانند روی درمان این بیماری داشته باشند، لذا این مطالعه به منظور بررسی مقایسه اثر باکتری‌های استارتر ماست و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بر فعالیت سلول‌های مونونوکلئار خون محیطی بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو انجام شد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی دزفول با کد DUR-10، انجام گرفت.

نحوه انتخاب نمونه‌ها و گروه‌بندی آنها: تعداد ۱۰ بیمار مبتلا به کولیت اولسراتیو مراجعه کننده به کلینیک‌های شهرستان‌های دزفول، اندیمشک و شوش انتخاب شدند. طی مصاحبه‌ای، اطلاعات تمامی افراد شامل سن، مدت زمان ابتلاء به بیماری، علائم و نحوه تشخیص بیماری، نوع و دوز داروهای مصرفی، جمع آوری شد. بیماران با علائمی مانند استفراغ و اسهال (بیش از دو بار در روز)، یبوست، وجود خون در مدفوع و وجود زخم در روده بزرگ یا راست روده (با روش تشخیصی کولونوسکوپی)، وارد مطالعه شدند و در صورت داشتن علائمی مانند خونریزی شدید روده، سرطان، بیماری قلبی و تنفسی، آنمی، سن زیر ۱۵ سال و بالای ۶۰ سال و بیمارانی که راضی به شرکت در این پژوهش نبودند، از مطالعه خارج شدند. حجم نمونه با استفاده از معادل برآورد حجم نمونه Fleiss (۱۳) و با در نظر گرفتن توان آزمون ۰/۸، α=۰/۰۵ و تغییرات میانگین ۵ واحد، ۸/۸۱ نفر بدست آمد که با احتیاط بیشتر از بین افراد مبتلا به کولیت اولسراتیو داوطلب، تعداد ۱۰ نفر انتخاب شد. این تعداد، بین گروه‌های آزمایش و کنترل مشترک بود. نمونه‌گیری با کسب رضایت آگاهانه از بیماران انجام گرفت. گروه‌های مطالعه شامل دو گروه آزمایش و یک گروه کنترل بودند.

گروه آزمایش اول شامل کشت مشترک (۱۵و۱۴) سلول‌های مونونوکلئار ۱۰ بیمار و باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت و گروه آزمایش دوم نیز شامل کشت مشترک سلول‌های مونونوکلئار همان ۱۰ بیمار و باکتری استارتر در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت بودند. گروه کنترل نیز شامل سلول‌های مونونوکلئار بیماران و فاقد سوسپانسیون میکروبی، در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت بود.

جداسازی سلول‌های مونونوکلئار: از هر بیمار به میزان ۵ml خون گرفته شد و درون لوله آزمایشی که حاوی ۲ سی‌سی هپارین بود، اضافه گردید و سپس به اندازه دو برابر مقدار خون به آن PBS اضافه شد و به خوبی هموژن گردید. سپس ۵ml از مخلوط هموژن خون و PBS به ۳ml محلول فایکول اضافه و با دور ۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد؛ که بر حسب چگالی از بالا به پایین چهار فاز جداگانه شامل پلاسما، بافی‌کوت (شامل سلول‌های مونونوکلئار)، فایکول و گلبول قرمز تشکیل شد. بعد از جداسازی سلول‌های مونونوکلئار، ۵ml به آن RPMI۱۶۴۰ اضافه و به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس به رسوب تشکیل شده ۳ml، محیط کشت CM10 (حاوی RPMI۱۶۴۰ غنی شده با سرم جنین گوساله (FCS ۱۰٪) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین استرپتومایسین) اضافه گردید؛ و به مدت یک دقیقه روی شیکر قرار داده شد. در نهایت سلول‌ها با استفاده از لام هموسایتومتر در زیر میکروسکوپ اینورت شمارش شدند(۱۸-۱۶).

تهیه ماست گاومیش: جهت تهیه ماست، باکتری‌ها شامل لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (با نام تجاری LBY27 از شرکت کریستین هانسن دانمارک) و استارتر (با نام تجاری YCX11 از شرکت کریستین هانسن دانمارک)، به شیری که از قبل جوشیده و استریل شده بود و به دمای ۴۵°C رسیده بود، بطور جداگانه اضافه شدند و به مدت سه تا چهار ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند. این مراحل تا کشت پنجم باکتری‌ها تکرار شد.

کشت و استخراج باکتری‌ها از ماست: در این مرحله جهت استخراج باکتری‌ها از ماست، آب رویی تشکیل شده روی ماست برداشته و درون لوله فالکون ریخته شد؛ و بعد از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه، محلول رویی برداشته و به محیط کشت MRS broth اضافه گردید. لوله‌های آزمایش جهت رشد و رسوب باکتری‌ها، به همراه گاز پک، درون جار بی‌هوازی و سپس درون انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شدند. بعد از سانتریفیوژ، رسوب آن سه بار با PBS شسته شد و با استفاده از اسپکتروفوتومتر میزان OD اندازه گیری شد (در طول موج ۵۹۸ نانومتر، جذب معادل ۰/۹۸ است و درون محلول 10^9 باکتری وجود دارد.) (۱۹) سپس باکتری‌ها به مدت یک شب زیر نور uv قرار گرفته و کشته شدند و درون اپندورف ریخته و جهت نگهداری در فریزر در دمای ۷۰°C- قرار داده شدند.

کشت مشترک باکتری‌ها و سلول‌های مونونوکلئار: در این مرحله دو رقت ۰/۱ و ۰/۰۱ از سوسپانسیون میکروبی تهیه شد (برای تهیه رقت ۰/۰۱ نیز ۱۸۰ لاندا بافر PBS به ۲۰ لاندا از رقت ۰/۱ اضافه شد.) دو چاهک از میکروپلیت به حجم ۲۲۰ لاندا (۲۰۰ لاندا از سلول و ۲۰ لاندا از سوسپانسیون میکروبی با رقت ۰/۰۱ و دو چاهک دیگر با رقت ۰/۱) پر شدند. سپس میکروپلیت در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪ کربن دی‌اکسید به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. بعد از خروج از انکوباتور یک ستون از چاهک‌های میکروپلیت درون اپندورف ریخته شد، نام باکتری و مدت زمان نیز بر روی آن مشخص گردید و در فریزر در دمای ۸۰°C- قرار داده شد؛ و بار دیگر میکروپلیت به مدت ۷۲ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. سپس سطح سایتوکاین‌های IL10 و IL1β برای هر یک از گروه‌های آزمایش در هر دو رقت و هر دو زمان و همچنین گروه کنترل، توسط کیت‌های تجاری الایزا شرکت (systems,UK R&D) و الایزا ریدر مدل ۳۲۰۰ stat fax از شرکت *Awareness* آمریکا اندازه‌گیری شد.

روش سنجش کیت‌ها ساندویچ الایزا بود؛ و نتایج بر حسب پیکوگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. مقدار نرمال IL10 برابر با ۳/۹ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و مقدار نرمال IL1β برابر با ۰/۰۶۳ پیکوگرم بر میلی‌لیتر بود.

تجزیه و تحلیل آماری: اطلاعات مربوطه با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ و نمودارها نیز توسط برنامه EXCEL رسم شدند. ابتدا از آزمون کولوموگروف اسمیرونوف جهت تعیین طبیعی بودن توزیع متغیرهای موجود در پژوهش استفاده

شد. سپس از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها استفاده گردید. جهت نشان دادن تفاوت معنی‌دار آماری بین دو گروه آزمایش و بدون در نظر گرفتن کنترل از آزمون تعقیبی LSD و بین هر یک از گروه‌های آزمایش با کنترل از آزمون تعقیبی Dunnett T3 استفاده شد. داده‌ها بصورت Mean±SD ارائه شدند و $p<۰/۰۵$ معنی دار درنظر گرفته شد.

یافته ها

در مجموع ۱۰ نفر وارد مطالعه شدند که از این میان ۶ نفر مرد (۶۰٪) و ۴ نفر زن (۴۰٪) بودند. میانگین سنی افراد ۱۳/۷۷±۳۳/۸ (۱۷ تا ۴۵) سال بود؛ که این میزان در زنان ۱۰/۶۳±۲۹/۲۵ و در مردان ۸/۲۵±۳۶/۸۳ سال محاسبه گردید. نتایج حاصل، افزایش معنی‌داری را در میزان ترشح IL10 توسط بولگاریکوس، در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، نسبت به کنترل نشان داد. ($p<۰/۰۵$) (جدول ۱). همچنین افزایش معنی‌داری در میزان ترشح IL10 توسط استارتر در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، نسبت به کنترل مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۲). در رابطه با میزان ترشح IL1β توسط بولگاریکوس، در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۳). همچنین افزایش معنی‌داری در میزان ترشح این سایتوکاین توسط استارتر، در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، نسبت به کنترل مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$) (جدول ۴). در رابطه با میزان ترشح IL10 بین دو گروه آزمایش در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$) (جدول ۵). اما مقایسه بین دو گروه آزمایش در رابطه با میزان ترشح IL1β نشان داد. لاکتوباسیلوس بولگاریکوس نسبت به استارتر باعث افزایش معنی‌داری در میزان ترشح این سایتوکاین در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت شد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۶).

جدول ۱. شاخص‌های میانگین میزان ترشح IL10 توسط بولگاریکوس و کنترل در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت

متغیر	زمان(ساعت)	گروه	Mean±SD	P-value
IL10-0/1	۴۸	کنترل	۲۷/۸۴±۲۰/۰۲	۰/۰۱۵*
		ل.بولگاریکوس	۲۵۲/۴±۱۹۳/۹۳	
IL10-0/1	۷۲	کنترل	۴۱/۵۳±۲۱/۰۵	۰/۰۰۶*
		ل.بولگاریکوس	۳۴۶/۴۹±۲۲۶/۲۴	
IL10-0/01	۴۸	کنترل	۲۷/۸۴±۲۰/۰۲	۰/۰۰۴*
		ل.بولگاریکوس	۳۸۱/۱۷±۲۲۴/۲۹	
IL10-0/01	۷۲	کنترل	۴۱/۵۳±۲۱/۰۵	۰/۰۰۲*
		ل.بولگاریکوس	۵۴۹/۱۶±۳۲۸/۲۹	

جدول ۲. شاخص‌های میانگین میزان ترشح IL10 توسط استارتر و کنترل در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت

متغیر	زمان(ساعت)	گروه	Mean±SD	P-value
IL10-0/1	۴۸	کنترل	۲۷/۸۴±۲۰/۰۲	۰/۰۱۲*
		استارتر	۲۲۲/۵±۱۳۳/۳۱	
IL10-0/1	۷۲	کنترل	۴۱/۵۳±۲۱/۰۵	۰/۰۰۰**
		استارتر	۴۳۳±۱۴۰/۹۷	
IL10-0/01	۴۸	کنترل	۲۷/۸۴±۲۰/۰۲	۰/۰۰۱*
		استارتر	۳۶۳/۸۷±۱۴۸/۴۱	
IL10-0/01	۷۲	کنترل	۴۱/۵۳±۲۱/۰۵	۰/۰۰۰**
		استارتر	۵۲۷/۲۵±۱۷۰/۶۱	

جدول ۳. شاخص‌های میانگین میزان ترشح IL1β توسط بولگاریکوس و کنترل در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت

متغیر	زمان(ساعت)	گروه	Mean±SD	P-value
IL1β -0/1	۴۸	کنترل	۵۶/۳±۲۷/۴۷	۰/۰۰۰**
		ل.بولگاریکوس	۹۴۰/۴±۲۴۹/۶۱	
IL1β -0/1	۷۲	کنترل	۷۶±۲۵/۹۷	۰/۰۰۰**
		ل.بولگاریکوس	۴۹۶/۳±۲۱۳/۳۴	
IL1β -0/01	۴۸	کنترل	۵۶/۳±۲۷/۴۷	۰/۰۰۰**
		ل.بولگاریکوس	۷۴۵/۵±۱۹۸/۵۴	
IL1β -0/01	۷۲	کنترل	۷۶±۲۵/۹۷	۰/۰۰۰**
		ل.بولگاریکوس	۶۱۷/۴±۱۹۲/۵	

جدول ۴. شاخص‌های میانگین میزان ترشح IL1β توسط استارتر و کنترل در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت

متغیر	زمان	گروه	Mean±SD	P-value
IL1β -0/1	۴۸ساعت	کنترل	۵۶/۳±۲۷/۴۷	۰/۰۰۰**
		استارتر	۶۶۹/۱۲±۱۸۱/۱۱	
IL1β -0/1	۷۲ ساعت	کنترل	۷۶±۲۵/۹۷	۰/۰۰۰**
		استارتر	۴۶۴/۲۵±۱۲۸/۴۱	
IL1β -0/01	۴۸ ساعت	کنترل	۵۶/۳±۲۷/۴۷	۰/۰۰۰**
		استارتر	۵۲۹/۲۵±۱۶۳/۸۲	
IL1β -0/01	۷۲ ساعت	کنترل	۷۶±۲۵/۹۷	۰/۰۰۱*
		استارتر	۴۰۸/۶۲±۱۳۴/۷۸	

جدول ۵. شاخص‌های میانگین میزان ترشح IL10 توسط دو گروه آزمایش در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت

متغیر	زمان	گروه	Mean±SD	P-value
IL10-0/1	۴۸ساعت	ل.بولگاریکوس	۲۵۲/۴±۱۹۳/۹۳	۰/۶۴۸
		استارتر	۲۲۲/۵±۱۳۳/۳۱	
IL10-0/1	۷۲ ساعت	ل.بولگاریکوس	۳۶۴/۴۹±۲۲۶/۲۴	۰/۲۵۲
		استارتر	۴۳۳±۱۴۰/۹۷	
IL10-0/01	۴۸ ساعت	ل.بولگاریکوس	۳۸۱/۱۷±۲۲۴/۲۹	۰/۸۲۹
		استارتر	۳۶۳/۸۷±۱۴۸/۴۱	
IL10-0/01	۷۲ ساعت	ل.بولگاریکوس	۵۴۹/۱۶±۳۲۸/۲۹	۰/۸۳۳
		استارتر	۵۲۷/۲۵±۱۷۰/۶۱	

جدول ۶. شاخص‌های میانگین میزان ترشح IL1β توسط دو گروه ازمایش در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت

متغیر	زمان	گروه	Mean± SD	P-value
IL1β -0/1	۴۸ساعت	ل.بولگاریکوس	۹۴۰/۴±۲۴۹/۶۱	۰/۰۰۴*
		استارتر	۶۶۹/۱۲±۱۸۱/۱۱	
IL1β -0/1	۷۲ ساعت	ل.بولگاریکوس	۷۹۶/۳±۲۱۳/۳۴	۰/۰۰۰**
		استارتر	۴۶۴/۲۵±۱۲۸/۴۱	
IL1β -0/01	۴۸ ساعت	ل.بولگاریکوس	۷۴۷/۵±۱۹۸/۵۴	۰/۰۰۵*
		استارتر	۵۲۹/۲۵±۱۶۳/۸۲	
IL1β -0/01	۷۲ ساعت	ل.بولگاریکوس	۶۱۷/۴±۱۹۲/۵	۰/۰۰۴*
		استارتر	۴۰۸/۶۲±۱۳۴/۷۸	

بحث و نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد، هر دو گروه آزمایش در رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ و زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت باعث افزایش معنی‌داری در میزان ترشح IL10 و IL1β نسبت به کنترل شدند. همچنین استارتر به دلیل اینکه به میزان کمتری سایتوکاین التهابی IL1β را ترشح کرد، نسبت به لاکتوباسیلوس بولگاریکوس نقش بهتری در کاهش التهاب دارد. نتایج این مطالعه با نتایج Elmadfa و همکاران که نشان داد، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، موجب ترشح سایتوکاین‌های ضد التهابی و همچنین IL10 می‌شود، اختلاف دارد(۲۰).

پژوهش Tomonori و همکاران نشان داد، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، موجب ترشح سایتوکاین‌های التهابی (IL17 و IFN-γ) می‌شود که با نتایج این پژوهش همسو است. (۲۱) طبق مطالعات Carmen و همکاران، استارتر باعث افزایش IL10 نسبت به INF-α و IL10 نسبت به IL17 در بافت روده شده و شدت التهاب را کاهش می‌دهد. (۲۲) نتایج این مطالعه با نتایج پژوهش ما نیز همسو می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Chapman و همکاران انجام شد، نشان داده شد مخلوط‌های پروبیوتیک در برابر طیف وسیعی از نقاط التهابی دارای اثربخشی بیشتری نسبت به سویه های تکی هستند(۲۳). این نتایج با یافته‌های حاصل از این پژوهش همسو است. نتایج مطالعات Moreno نشان داد ماست حاوی باکتری‌های استارتر باعث کاهش سایتوکاین‌های التهابی مانند اینترلوکین ۱۲ و ۱۷ می‌شود (۲۴)؛ که با یافته‌های حاصل از این پژوهش نیز همسو می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Meyer و همکارانش انجام شد، نشان داده شد ماست استارتر موجب افزایش سایتوکاین التهابی (TNFα و IL1β) می‌شود. (۲۵) این مطالعه با نتایج حاصل از این پژوهش اختلاف دارد. Hong و همکارانش، نشان دادند سویه

تکی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس منجر به ترشح بالای سایتوکاین‌های التهابی (IL1β و TNFα) می‌شود. این مقدار ترشح تا ۲۴ ساعت ثابت و بعد از آن کاهش می‌یابد (۲۶). این پژوهش، با یافته‌های مطالعه ما نیز همسو است. نکته مهمی که در تمام یافته‌های حاصل از این پژوهش وجود داشت، کاهش ترشح IL1β در زمان ۷۲ ساعت نسبت به ۴۸ ساعت بود که می‌تواند به علت تاثیر IL10 باشد که اثر مهاری روی IL1β در زمان ۷۲ ساعت ایجاد کرده است. بطور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که باکتری‌های استارتر با ترشح سایتوکاین ضد التهابی (IL10) نسبت به سویه تکی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، نقش بهتری در درمان التهاب ناشی از بیماری کولیت اولسراتیو دارد. این نتیجه بدست آمده شاید به علت اثر استرپتوکوکوس ترموفیلوس در مخلوط دو باکتری است. به همین منظور پیشنهاد می‌شود اثر استرپتوکوکوس ترموفیلوس روی سلول‌های مونونوکلئار خون محیطی بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو نیز مورد بررسی قرار گیرد. همچنین استفاده از آنتی‌بادی ضد IL10 و تاثیر آن روی میزان ترشح IL1β در زمان ۷۲ ساعت نیز از دیگر پیشنهادات می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از قسمت آزمایشگاه تحقیقاتی ایمونولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی دزفول جهت حمایت از این تحقیق و همچنین از همکاری پرسنل دانشگاه تقدیر و تشکر می‌گردد.

Comparison of the Effect of Yoghurt Starter Bacteria and Lactobacillous Bulgaricus on Peripheral Blood Mononuclear Cells Activity of Ulcerative Colitis Patients

A. Sheikhi (PhD)[1], Z. Ahmadi (MSc)*[2], M. Askari (PhD)[3]

1.Dpartment of Immunology, Faculty of Medicine, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, I.R.Iran
2.Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Nour Danesh Institute of Higher Education, Meymeh Branch, Isfahan, I.R.Iran
3. Department of Microbiology and Immunology, Nour Danesh Institute of Higher Education, Meymeh Branch, Isfahan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(12); Dec 2018; PP: 13-20
Received: Mar 3th 2018, Revised: Sep 5th 2018, Accepted: Sep 25th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Ulcerative colitis is an inflammatory bowel disease and involving colon and rectum. Since patients with ulcerative colitis have high levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, the aim of this study was to compare the effects of starter bacteria of yogurt and lactobacillus boulagaricus on the activity of peripheral blood mononuclear cells in patients with ulcerative colitis.

METHODS: This experimental-laboratory study was performed on 10 ulcerative colitis patients in Dezful, Andimeshk and Shoosh in two experimental groups and a control group. Experimental groups included co-culture of PBMC and intended bacteria in dilutions of 0.1 and 0.01 and at 48 and 72 hours, and control group including PBMC of the patient at 48 and 72 hours. Variables IL-10 and IL-1β) were measured by ELISA.

FINDINGS: There was a significant increase in the secretion of IL1β at dilution of 0.1 and 48 hours by PBMC stimulated with bulgaricus 940.4±249.61 in comparison with the starter 669.12±181.11 (p=0.004) and in 72 hours by bulgaricus 796.3±213.34 in comparison with the starter 464.25±128.41 (p=0.000), In dilution of 0.01 and 48 hours by bulgaricus 747.5±198.54 in comparison with starter 529.25±163.82 (p=0.005) and in 72 hours by bulgaricus 617.4±192.5 in comparison with starter 408.62±134.78 (P=0.004). Also, there was a significant increase in the secretion of cytokines in both dilution and both times between of the experimental groups and control.

CONCLUSION: The results of the study showed that Lactobacillus bulgaricus causes inflammation in comparison with the starter by IL1β secretion. Starter bacteria has a better role in reducing inflammation.

KEY WORDS: *Ulcerative Colitis, Starter, Lactobacillous Bulgaricus*.

Please cite this article as follows:
Sheikhi A, Ahmadi Z, Askari M. Comparison of the Effect of Yoghurt Starter Bacteria and Lactobacillous Bulgaricus on Peripheral Blood Mononuclear Cells Activity of Ulcerative Colitis Patients. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(12):13-20.

***Corresponding Author: Z. Ahmadi (MSc)**
Address: Nour Danesh Institute of Higher Education, Danesh blv., Meymeh, Isfahan, I.R.Iran
Tel:+98 31 45427600
E-mail: Zeynab.ahmadi20@gmail.com

References

1.Schirbel A, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. J Dig Dis. 2010;11(5):266-76.

2.Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diver sity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. Gut. 2008;57(11):1605-15.

3.Meydani SN, Ha WK. Immunologic effects of yogurt. Am J Clin Nutr. 2000;71(4):861-72.

4.Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. Gastroenterology. 2004;126(6):1620-33

5.Campieri M, Gionchetti P. Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative?. Gastroenterology. 1999;116(5):1246-9.

6.Sharifi M, Moridnia A, Mortazavi D, Salehi M, Bagheri M, Sheikhi A. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. Med Oncol. 2017;34(11):183.

7.Niers LE, Timmerman HM, Rijkers GT, van Bleek GM, van Uden NO, Knol EF, et al. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which downregulate T helper type 2 cytokines. Clin Exp Allergy. 2005;35(11):1481-9.

8.Rana SV, Sharma S, Kaur J, Prasad KK, Sinha SK, Kochhar R, et al. Relationship of cytokines, oxidative stress and GI motility with bacterial overgrowth in ulcerative colitis patients. J Crohns Colitis. 2014;8(8):859-65.

9.Javed NH, Alsahly MB, Khubchandani J. oral feeding of probiotic bifidobacterium infantis: colonic morphological changes in rat model of TNBS-induced colitis. Sci Cairo. 2016; 2016: Article ID:9572596.

10.Zeuthen L, Christensen H, Frokiaer H. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria. Clin Vaccine Immunol. 2006;13(3):365-75.

11.Donkor ON, Ravikumar M, Proudfoot O, Day SL, Apostolopoulos V, Paukovics G, et al. Cytokine profile and induction of T helper type 17 and regulatory T cells by human peripheral mononuclear cells after microbial exposure. Clin Exp Immunol. 2012;167(2):282-95.

12.Verna EC, Lucak S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? Therap Adv Gastroenterol. 2010; 3(5):307-19.

13.Bartlet JE, Kotrlik JW, Higgins CC. Determining appropriate sample size in survey research appropriate sample size in survey research. Inform Technol Learn Perform J. 2001;19(1):43-50.

14.Sheikhi A, Shakerian M, Giti H, Baghaeifar M, Jafarzadeh A, Ghaed V, et al. Probiotic Yogurt Culture Bifidobacterium Animalis Subsp. Lactis BB-12 and Lactobacillus Acidophilus LA-5 Modulate the Cytokine Secretion by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Ulcerative Colitis. Drug Res (Stuttg). 2016;66(6):300-5.

15.Sheikhi A, Giti H, Heibor MR, Jafarzadeh A, Shakerian M, Baharifar N, et al. Lactobacilus Delbrueckii subsp. Bulgaricus Modulates the Secretion of Th1/Th2 and Treg Cell-Related Cytokines by PBMCs from Patients with Atopic Dermatitis. Drug Res (Stuttg). 2017;67(12):724-9.

16.Sheikhi A, Jalali M, Gholamian M, Jafarzadeh A, Jannati S, Mousavifar N. Elimination of apoptotic spermatozoa by magnetic-activated cell sorting improves the fertilization rate of couples treated with ICSI procedure. Andrology. 2013; 1(6):845-9.

17.Sheikhi A, Saadati K, Salmani R, Yahaghi N, Sheikhi A, Siemens DR. In vitro modulation of natural killer activity of human peripheral blood mononuclear cells against prostate tumor cell line. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2011; 33(4):700-8.

18.Sheikhi AK, Tayade C, Paffaro VA, Croy BA. Are natural killer cells distributed in relationship to nerve fibers in the pregnant mouse uterus? Pak J Biol Sci. 2007;10(17):2885-9.

19.Foligne B, Nutten S, Grangette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, et al. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. World J Gastroenterol. 2007;13(2):236-43.
20.Elmadfa I, Klein P, Meyer AL. Immune-stimulating effects of lactic acid bacteria in vivo and in vitro. Proc Nutr Soc. 2010;69(3):416-20.
21.Kamiya T, Watanabe Y, Makino S, Kano H, Tsuji NM. Improvement of intestinal immune cell function by lactic acid bacteria for dairy products. Microorganisms. Microorganisms. 2016;5(1). pii: E1.
22.del Carmen S, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Bermudez-Humaran L, de LeBlanc AD, LeBlanc JG. Selection of anti-inflammatory lactic acid bacteria from a pool of yoghurt starter cultures. Blucher Food Sci Proc. 2014;1(1):429-30.
23.Chapman CMC, Gibson GR, Rowland I. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains?. Eur J Nutr. 2011; 50(1):1-17.
24.de Moreno de LeBlanc A, Chaves S, Perdig G. Effect of yoghurt on the cytokine profile using a murine model of intestinal inflammation. Eur J Inflam. 2009:7(2):97-109.
25.Meyer AL, Elmadfa I, Herbacek I, Micksche M. Herbacek, M. Micksche. Probiotic, as well as conventional yogurt, can enhance the stimulated production of proinflammatory cytokines. J Hum Nutr Diet. 2007;20(6):590-8.
26.Hong YF, Lee YD, Park JY, Jeon B, Jagdish D, Jang S, et al. Immune regulatory effect of newly isolated lactobacillus delbrueckii from indian traditional yogurt. J Microbiol Biotechnol. 2015;25(8):1321-3.