بسم الله الرحمن الرحیم

این پایان نامه را به عنوان یادگاری از بهترین دوران زندگیم تقدیم میکنم به:

پدر، مادر، خواهر و برادران عزیزم

و با آرزوی سلامتیشان

با تشکر از:

راهنمایی استاد ارجمندم جناب آقای **پروفسور رضا حیدری**

راهنمایی و کمک های بی دریغ استاد بزرگوارم جناب آقای **دکتر امیر توکه چی**

اساتید محترم داور جناب آقای **پروفسور صمد زارع** و جناب آقای **دکتر وحید نجاتی**

کارشناسان محترم آزمایشگاه بیوشیمی و میکروبیولوژی خانم فرنادو خانم روحی

دوستان خوبم در دانشکده علوم و پژوهشکده آرتمیا و آبزیان

و کلیه عزیزانی که در تمامی مراحل انجام و تدوین این پایان نامه مرا یاری نمودند.

بیان سیدی

بهمن ۱۳۹۱

دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در گرایش فیزیولوژی جانوری

مقایسه تأثیر پروبیوتیک‌های *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus paracasei* با پری‌بیوتیک رافتیلوز بر پروفایل بیوشیمیایی خون رت

اساتید راهنما:

دکتر رضا حیدری

دکتر امیر توکمه‌چی

نگارنده:

بیان سیدی

بهمن ۱۳۹۱

حق چاپ مطالب این پایان نامه برای دانشگاه ارومیه محفوظ است

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده ..... ه

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه ۱
۱-۲ تاریخچه و تعریف پروبیوتیک ۴
۱-۳ فلور میکروبی طبیعی بدن انسان ۴
۱-۴ نقش فلور مستقر ۴
۱-۵ فلور طبیعی دستگاه گوارش ۵
۱-۶ تغییر فلور روده در طول عمر ۶
۱-۷ معیارهای انتخاب پروبیوتیک‌ها ۷
۱-۸ *لاکتوباسیلوس*‌ها ۸
۱-۹ فواید پروبیوتیک‌ها ۹
۱-۱۰ مکانیسم عمل پروبیوتیک‌ها ۹
۱-۱۱ پری‌بیوتیک‌ها ۱۱
۱-۱۲ دسته بندی پری‌بیوتیک‌ها ۱۳
۱-۱۳ تهیه پری‌بیوتیک‌ها ۱۳
۱-۱۴ مهمترین پری‌بیوتیک‌ها ۱۳
۱-۱۵ کلیاتی در مورد آنزیم‌های کبدی سرم ۱۵
۱-۱۵-۱ ترانسفرازها (ترانس آمینازها) ۱۵
۱-۱۵-۲ آلکالین فسفاتاز ۱۶
۱-۱۶ لیپیدهای پلاسما ۱۸
۱-۱۶-۱ کلسترول ۱۸
۱-۱۶-۲ تری‌گلیسرید ۱۹
۱-۱۷ پروتئین‌های پلاسما ۲۰
۱-۱۸ گلوکز ۲۱
۱-۱۹ کراتینین ۲۲
۱-۲۰ اسیداوریک ۲۲

فصل دوم: مواد و روش کار

۲-۱ مواد و تجهیزات مورد نیاز ۲۴

۲-۲ تهیه مواد و روش کار ۲۵
۲-۲-۱ تهیه و کشت پروبیوتیک‌ها ۲۵
۲-۲-۲ تهیه پری‌بیوتیک ۲۵
۲-۲-۳ تهیه حیوانات و شرایط آزمایش ۲۵
۲-۲-۴ گروه‌های تحت تیمار ۲۶
۲-۳ نمونه برداری ۲۷
۲-۳-۱ پروفایل بیوشیمیایی خون ۲۷
۲-۳-۲ آزمایشات تعین فلور میکروبی دستگاه گوارش ۳۰
۲-۴ تجزیه و تحلیل آماری ۳۰

فصل سوم: نتایج

۳-۱ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر شاخص‌های رشد ۳۲
۳-۲ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت آنزیم ALAT سرم ۳۳
۳-۳ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت آنزیم ASAT سرم ۳۴
۳-۴ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت آنزیم ALPH سرم ۳۵
۳-۵ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت کلسترول سرم ۳۶
۳-۶ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت تری‌گلیسرید سرم ۳۷
۳-۷ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت پروتئین کل سرم ۳۸
۳-۸ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت گلوکز سرم ۳۹
۳-۹ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت کراتینین سرم ۴۰
۳-۱۰ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت اسید اوریک سرم ۴۱
۳-۱۱ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر فلور باکتریایی روده ۴۲

فصل چهارم: بحث

بحث و نتیجه‌گیری ۴۳
پیشنهادات ۵۲
منابع **۵۳**
ضمائم ۶۰

فهرست جداول، نمودارها و تصاویر

عنوان **صفحه**

جداول

۱-۲ آنالیز تقریبی غذای استاندارد مورد استفاده برای تغذیه موش‌ها ۲۶
۱-۳ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر شاخص‌های رشد ۳۲
۲-۳ نتایج شمارش باکتریایی (CFU/gr) محتویات روده در محیط کشت MRS آگار در طول دوره مطالعه ۴۲
تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت آنزیم ALAT (U/l) سرم ۶۰
تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت آنزیم ASAT (U/l) سرم ۶۰
تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت آنزیم ALPH (U/l) سرم ۶۱
تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت کلسترول (mg/dl) سرم ۶۱
تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت تری‌گلیسرید (mg/dl) سرم ۶۲
تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت پروتئین کل (g/dl) سرم ۶۲
تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت گلوکز (mg/dl) سرم ۶۳
تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت کراتینین (mg/dl) سرم ۶۳
تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت اسید اوریک (mg/dl) سرم ۶۴

نمودارها

۱-۳ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت آنزیم ALAT (U/l) سرم ۳۳
۲-۳ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت آنزیم ASAT (U/l) سرم ۳۴
۳-۳ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت آنزیم ALPH (U/l) سرم ۳۵
۴-۳ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت کلسترول (mg/dl) سرم ۳۶
۵-۳ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت تری‌گلیسرید (mg/dl) سرم ۳۷
۶-۳ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت پروتئین کل (g/dl) سرم ۳۸
۷-۳ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت گلوکز (mg/dl) سرم ۳۹
۸-۳ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت کراتینین (mg/dl) سرم ۴۰
۹-۳ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت اسید اوریک (mg/dl) سرم ۴۱

تصاویر

۱-۱ ساختار شیمیایی اینولین ۱۵
۱-۲ نحوه گاواژ کردن رت‌ها در این مطالعه ۲۸
۲-۲ نحوه خون‌گیری از قلب رت در روزهای صفر، ۳۰ و ۴۵ مطالعه ۲۸
۳-۲ نحوه جدا کردن سرم رت‌ها جهت سنجش فاکتورهای خونی ۲۹
۴-۲ نحوه سنجش فاکتورهای خونی در این مطالعه طبق دستور کیت‌های مصرفی ۲۹
۵-۲ دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده در این مطالعه ۳۰
۶-۲ تهیه رقت سریال از محتویات روده رت‌ها در روزهای صفر، ۳۰ و ۴۵ مطالعه ۳۱

۷-۲ رشد *لاکتوباسیلوس*های روده رت‌ها در محیط کشت MRS آگار در این مطالعه..... ۳۱
۱-۴ مهار پیرووات کربوکسیلاز توسط مالونیل کوآنزیم آ و سوکسینیل کوآنزیم آ، مهار هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآنزیم آ توسط پروپیونات ۴۹

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات تغذیه‌ای پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* جدا شده از روده ماهی کپور معمولی با پری‌بیوتیک رافتیلوز بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون رت بود.

برای این منظور تعداد ۵۶ سر رت نر آلبینو نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۵±۱۷۵ گرم از مؤسسه پاستور تهران خریداری و تحت شرایط معمول آزمایشگاهی (۲۵-۲۲ درجه سانتیگراد و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند و در طول شبانه روز به طور مداوم به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند. پس از سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، حیوانات به صورت تصادفی در چهار گروه هر کدام با سه تکرار تقسیم شدند طوریکه در هر تکرار تعداد چهار سر رت قرار داشت. گروه اول به عنوان شاهد با سرم فیزیولوژی استریل (غذای بدون پروبیوتیک و پری‌بیوتیک) تغذیه شدند. گروه دوم با ترکیب مساوی از *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (5×10^{8} CFU/ml)، گروه سوم با پری‌بیوتیک رافتیلوز (۵٪ W/V) و گروه چهارم با مخلوط پروبیوتیک‌ها و رافتیلوز به عنوان سین‌بیوتیک (ترکیب مساوی از *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (5×10^{8} CFU/ml) و پری‌بیوتیک رافتیلوز (۵٪ W/V))، به مقدار ۱/۵میلی‌لیتر به مدت ۳۰ روز و روزانه یکبار گاواژ شدند سپس به مدت ۱۵ روز تغذیه عادی داشتند بدون اینکه پروبیوتیک یا پری‌بیوتیکی گاواژ گردد.

در این مطالعه شاخص‌های رشد در روزهای صفر و ۳۰، فاکتورهای بیوشیمیایی خون (آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارتات آمینو ترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، کلسترول، تری‌گلیسرید، پروتئین کل، گلوکز، کراتینین و اسید اوریک) و فلور باکتریایی روده در روزهای صفر، ۳۰ و ۴۵ مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم رت‌ها نشان داد که هر یک از فاکتورها تحت تأثیر پروبیوتیک‌ها و رافتیلوز به طور مستقل تغییر می‌کنند و مصرف پروبیوتیک با پری‌بیوتیک به صورت سین‌بیوتیک می‌تواند رشد رت را افزایش دهد. در روز ۳۰ مقادیر ASAT، ALPH، کلسترول، تری‌گلیسرید، گلوکز، کراتینین و اسیداوریک در گروه‌های تیمار شده با پروبیوتیک‌ها و رافتیلوز تفاوت آماری معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با گروه کنترل نداشت. میزان ALAT در گروه پروبیوتیک به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بیشتر از سایر گروه‌ها بود. میزان پروتئین کل در گروه پروبیوتیک به طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) از گروه کنترل و پری‌بیوتیک

بیشتر بود اما اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۵) با گروه سین‌بیوتیک نداشت. در روز ۴۵ با قطع مصرف پروبیوتیک‌ها وپری‌بیوتیک اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۵) در فاکتورهای بیوشیمیایی خون بین گروه‌ها مشاهده نشد.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان گفت که افزودن پروبییوتیک‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* جدا شده از روده ماهی کپور معمولی با افزایش پروتئین کل سرم می‌تواند سیستم ایمنی را بهبود دهد اما مقدار آنزیم ALAT سرم را افزایش می‌دهد. جهت حصول نتایج بهتر انجام مطالعات بیشتر ضروری است.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، پروفایل بیوشیمیایی خون، رت

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

شروع زندگی در همه موجودات با روده نسبتاً سالمی آغاز می‌شود. عواملی مانند عادات غذایی نامنظم، استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها، استرس، آلودگی محیطی و غیره، ترکیب و فعالیت متابولیکی فلور دستگاه گوارش را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بنابراین سبب عدم تعادل فلور دستگاه گوارش می‌شوند و با افزایش میکروارگانیسم‌های مخرب در برابر میکروارگانیسم‌های مفید موجودات را مستعد بیماری می‌سازند (President IAP, 2008). پروبیوتیک‌ها[1] میکروارگانیسم‌های زنده و مشخصی هستند که در صورت مصرف در انسان یا حیوان، با اثر بر فلور میکروبی بدن اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان دارند. اکثر پروبیوتیک‌ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور میکروبی روده انسان بوده و در آنجا زندگی همسفرگی بی ضرری دارند. باور موجود، در مورد اثرات مفید پروبیوتیک‌ها بر پایه این واقعیت قرار دارد که فلور میکروبی روده نقش محافظت کننده‌ای در برابر بیماری‌های مختلف از خود نشان می‌دهد. اثر اصلی پروبیوتیک‌ها با تثبیت فلور میکروبی روده مشخص می‌شود (وجدانی و زالی، ۱۳۸۲). مصرف دائم پروبیوتیک‌ها در کاهش میزان بروز بیماری‌های مختلف موثر است که این تأثیر در جمعیت‌های دارای خطر بالا (مانند کودکان بستری در بیمارستان، کودکانی که شیر مادر مصرف نمی‌کنند یا در شرایط محروم به سر می برند) بارزتر است. فرآورده‌های پروبیوتیکی در بازار تجاری به اشکال قرص، کپسول، پودر، ماست‌های غنی شده، شیر و پنیر به فروش می‌رسند. اغلب پروبیوتیک‌هایی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند ایمن هستند و در هزاران نفر از افرادی که تاکنون مصرف این فرآورده‌ها را گزارش کرده‌اند، هیچ گونه عارضه جانبی آشکاری از خود نشان نداده‌اند (Saaveda, 2001). پری‌بیوتیک‌ها[2] ترکیبات غذایی غیرقابل هضمی هستند که با تحریک انتخابی رشد و فعالیت یک یا تعداد کمی از باکتری‌های روده بزرگ اثرات مفیدی بر میزبان دارند و می‌توانند سلامتی میزبان را بهبود بخشند (Gibson & Roberfroid, 1995). پری‌بیوتیک‌ها با کاهش باکتری‌های بیماری‌زای روده، تحریک سیستم ایمنی و تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی از معده، پانکراس و موکوس روده، سبب افزایش در هضم و جذب مواد مغذی می‌شوند (Huang *et al.*, 2005). ترکیب پروبیوتیک و پری‌بیوتیک که سین‌بیوتیک[3] نامیده می‌شود می‌تواند اثر سینرژیستی[4] در افزایش رشد باکتری‌های مفید کولون و نیز بقا و رشد سویه‌های پروبیوتیک که به تازگی شده‌اند داشته باشد (Schrezenmeir & de Verse, 2001). مزایای اصلی سین‌بیوتیک مانند مقاومت به آلودگی باکتریایی دستگاه

1. Probiotic
2. Prebiotic
3. Synbiotic
4. Synergistic

گوارش، فعالیت آنتی‌میکروبی و بهبود سیستم ایمنی منجر به گسترش محصولات سین‌بیوتیک شده است (Saminathan *et al.*, 2011). به کارگیری پروبیوتیک‌ها در پیشگیری از بیماری‌ها و بهبود وضعیت سلامتی انسان و دام پیشینه‌ای چندین هزار ساله دارد (Fuller, 1989). امروزه تحقیق در زمینه تولید فرآورده‌های پروبیوتیک به علت خواص تغذیه‌ای و درمانی روند رو به رشدی را دنبال می‌کند و تلاش برای قرار دادن پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها به عنوان مکمل در رژیم غذایی روزانه افراد صورت می‌گیرد.

خون به عنوان یک بافت سیال، یکی از مهمترین مایعات بیولوژیک بدن بوده که تحت تأثیر حالات مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک ترکیبات آن دستخوش نوسان و تغییر می‌گردد لذا چگونگی تغییرات آن می‌تواند در شناسایی بیماری‌ها و تعیین سلامت افراد مفید باشد (اکرمی و همکاران، ۱۳۹۰).

این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات تغذیه‌ای پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس کازئی*[1] و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*[2] جدا شده از روده ماهی کپور معمولی به همراه پری‌بیوتیک رافتیلوز[3] بر پروفایل بیوشمیایی خون رت انجام شد.

1. *Lactobacillus casei*
2. *Lactobacillus paracasei*
3. Raftilose

۲-۱ تاریخچه و تعریف پروبیوتیک

تاریخچه استفاده از میکروارگانیسم‌های زنده در غذا به ویژه باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک[1] به منظور حفظ و بهبود سلامت انسان بسیار طولانی است. ۷۶ سال قبل از میلاد مسیح، مورخ رومی استفاده از فرآورده‌های تخمیری شیر را به منظور درمان گاستروآنتریت[2] توصیه نمود (Schrezenmeir & de Verse, 2001). از زمان پیدایش عصر میکروب شناسی، تعدادی از محققین مانند Carr، Tisser و Metchinkoff این اثرات مفید را به تعادل فلور میکروبی روده نسبت دادند. فرضیه پروبیوتیک‌ها در اوایل سال‌های ۱۹۰۰ شکل گرفت، زمانی که برنده جایزه نوبل Eli Metchincoff این فرضیه را مطرح کرد که مصرف ماست حاوی *لاکتوباسیلوس*[3] منجر به کاهش باکتری‌های تولید کننده سم در روده شده و در نتیجه باعث افزایش طول عمر میزبان می‌شود. اولین مطالعات بالینی پروبیوتیک‌ها در دهه ۱۹۳۰ در مورد اثر بخشی بر یبوست انجام شد. از آن به بعد تعداد مطالعات به طور دائم افزایش یافته و بسیاری از این مطالعات در اروپا و آسیا انجام شد (وجدانی و زالی، ۱۳۸۲).

واژه پروبیوتیک به معنای برای زندگی، از واژه یونانی پروبیوس[4] مشتق شده است. این واژه اولین بار در سال ۱۹۶۵ توسط Lilly و Stillwell به منظور توضیح مواد ترشحی یک میکروارگانیسم که رشد میکروارگانیسم دیگر را تحریک می‌کند، استفاده شد و بنابراین متضاد واژه آنتی‌بیوتیک[5] است (Lilly & Stiwell, 1965). Parker (۱۹۷۴) اولین فردی بود که واژه پروبیوتیک را در مفهومی که امروزه استفاده می‌شود به کار برد. وی پروبیوتیک‌ها را به عنوان ارگانیسم‌ها و موادی که در برقراری تعادل میکروبی روده مؤثر هستند، تعریف کرد اما این تعریف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها را هم شامل می‌شود. Fuller (۱۹۸۹) پروبیوتیک‌ها را به صورت مکمل‌های غذایی میکروبی زنده تعریف کرد که از طریق بهبود تعادل میکروبی روده اثرات مفیدی بر میزبان دارند. Schrezenmeir و de Vrese (۲۰۰۸) پروبیوتیک‌ها را فرآورده‌ها یا محصولاتی حاوی میکروارگانیسم‌های زنده مشخصی تعریف نمودند که اگر به تعداد کافی مصرف شوند با تغییر میکروفلور روده اثرات مفیدی بر میزبان دارند. طبق تعریف سازمان

1. Lactic acid bacteria
2. Gastroenteritis
3. *Lactobacillus*
4. Probios
5. Antibiotic

بهداشت جهانی (WHO[1])، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به مقدار کافی اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان دارند (Ranganathan *et al.*, 2010).

۱-۳ فلور میکروبی طبیعی بدن انسان

اصطلاح فلور میکروبی طبیعی به جمعیتی از میکروارگانیسم‌ها گفته می‌شود که روی پوست و مخاط افراد سالم زندگی می‌کنند. پوست و غشاهای مخاطی دارای میکروارگانیسم‌های زیادی هستند که می‌توان آن‌ها را در دو گروه تقسیم کرد: الف) فلور مستقر[2]: شامل میکروارگانیسم‌های نسبتاً ثابتی که در یک سن خاص در محل خاصی یافت می‌شوند و در صورت پاکسازی، فوراً جایگزین می‌شوند. ب) فلور موقت[3]: شامل میکروارگانیسم‌های غیر بیماری‌زا یا بالقوه بیماری‌زایی است که روی پوست و غشاهای مخاطی ساعت‌ها، روزها و هفته‌ها باقی می‌مانند، از محیط کسب می‌شوند و بیماری ایجاد نمی‌کنند و به طور دائمی روی این سطوح نمی‌مانند. تا زمانی که فلور مستقر طبیعی دست نخورده باقی مانده است، اعضای فلور موقت اهمیت کمی دارند. البته در صورت تخریب فلور مستقر، میکروارگانیسم‌های گذرا می‌توانند کولونیزه[4] (مستقر) شوند، تکثیر پیدا کنند و بیماری ایجاد نمایند (بروکس و همکاران، ۱۳۸۷).

۱-۴ نقش فلور مستقر

میکروارگانیسم‌هایی که به طور مداوم در سطوح بدن مستقر هستند، همسفره می‌باشند. رشد و گسترش آن‌ها در یک منطقه به عوامل فیزیولوژیک، دما، رطوبت و وجود مواد غذایی خاص و مواد مهار کننده بستگی دارد. وجود آنها برای زندگی ضروری نیست چرا که حیوانات در "غیاب فلور میکروبی" هم می‌توانند به راحتی زندگی کنند. با این حال فلور مستقر در مناطقی خاص، نقش مشخصی در حفظ سلامت و عملکرد طبیعی ایفا می‌نمایند (بروکس و همکاران، ۱۳۸۷).

بعضی از اعضای فلور میکروبی مستقر در روده‌ها ویتامین K می‌سازند و به جذب مواد غذایی کمک می‌کنند. میکروب‌های فلور مستقر در پوست و غشاهای مخاطی می‌توانند از استقرار باکتری‌های بیماری‌زا و بیماری احتمالی ناشی از آن‌ها جلوگیری به عمل

1. World Health Organization
2. Resident flora
3. Transient flora
4. Colonize

آورند. در این فرآیند ممکن است رقابت برای گیرنده‌ها یا محل‌های اتصال موجود بر سلول‌های میزبان، رقابت برای مواد غذایی، مهار دو طرفه توسط فرآورده‌های متابولیک یا سمی، مهار دو طرفه توسط آنتی‌بیوتیک‌ها یا باکتریوسین‌ها یا مکانیسم‌های دیگر نقش داشته باشد (بروکس و همکاران، ۱۳۸۷).

کم شدن فلور میکروبی طبیعی مشخصاً یک خلأ موضعی ایجاد می‌کند که توسط ارگانیسم‌هایی که در محیط وجود دارند یا توسط فلور میکروبی مناطق دیگر بدن جایگزین می‌گردد. این ارگانیسم‌ها ممکن است فرصت طلب باشند و گاهی بیماری‌زا شوند (بروکس و همکاران، ۱۳۸۷).

۵-۱ فلور طبیعی دستگاه گوارش

دستگاه گوارش انسان زیستگاه پیچیده‌ای از میکروارگانیسم‌ها است که در طول تکامل انسان و میکروب‌ها در دستگاه گوارش انسان ساکن شده‌اند. بیش از ۴۰۰ گونه باکتری در دستگاه گوارش انسان وجود دارد. ترکیب و تعداد میکروارگانیسم‌ها از بینی و دهان تا کولون و مقعد متفاوت است (مرتضویان و سهراب‌وندی، ۱۳۸۵).

در بالغین سالم، در مری میکروارگانیسم‌هایی وجود دارد که از بزاق و غذا کسب شده‌اند (بروکس و همکاران، ۱۳۸۷). اکثر این باکتری‌ها به طور موقت مستقر شده و به طور دایم در آنجا حضور ندارند (مورای، ۱۳۸۹). اسیدیته معده سبب شده است تا تراکم باکتری‌ها $۱۰^{۱}$-$۱۰^{۲}$ در هر گرم از محتویات معده باشد. هر چه pH محتویات روده قلیایی‌تر می‌شود، فلور موجود تدریجاً بیشتر افزایش می‌یابد. طوری که تراکم باکتری‌ها در دوازدهه افراد بالغ $۱۰^{۳}$-$۱۰^{۴}$ CFU/g، در ژژنوم و ایلئوم $۱۰^{۵}$-$۱۰^{۸}$ CFU/g و در سکوم و کولون عرضی $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۱۰}$ CFU/g است. در کولون سیگموئید و رکتوم در حدود $۱۰^{۱۱}$ باکتری در هر گرم ار محتویات روده وجود دارد که ۳۰-۱۰٪ از وزن توده مدفوع را تشکیل می‌دهند (بروکس و همکاران، ۱۳۸۷).

از آنجا که معده دارای اسید هیدروکلریک و پپسینوژن می‌باشد، تنها ارگانیسم‌هایی در معده باقی می‌مانند که بتوانند اسید را تحمل کنند مانند باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک (*لاکتوباسیل*‌ها و گونه‌های *استرپتوکوک*[1]) و *هلیکوباکتر پیلوری*[2] (عامل گاستریت و زخم معده) (مورای، ۱۳۸۹).

1. *Streptococcus*
2. *Helicobacter pylori*

در روده کوچک گونه‌هایی مانند *لاکتوباسیلوس*، *استرپتوکوکوس*، *انتروباکتریاسه*[1]، *باکتروئیدس*[2]، *بیفیدوباکتریوم*[3] و *فوزوباکتریوم*[4] در روده بزرگ، *باکتروئیدس*، *بیفیدوباکتریوم*، *استرپتوکوکوس*، *فوزوباکتریوم*، *انتروباکتریاسه*، *کلستریدیوم*[5]، *ویلونلا*[6]، *لاکتوباسیلوس*، *پروتئوس*[7]، *استافیلوکوکوس*[8]، *سودوموناس*[9]، مخمرها[10] و پروتوزوآ[11] تشکیل دهنده فلور میکروبی هستند (بروکس (بروکس و همکاران، ۱۳۸۷).

باکتری‌های روده‌ای بسته به اثرات سلامت بخش در بدن انسان به سه دسته مفید، مضر و بی‌اثر طبقه‌بندی می‌شوند. *بیفیدوباکتریوم*ها و *لاکتوباسیلوس*ها جزء باکتری‌های مفید به شمار می‌روند. باکتری‌های مضر (*کلستردیوم*، *باکتروئیدس*، *هلیکوباکتر* و *کامپیلوباکتر*[12]) ضمن مصرف اجزای مفید غذا، موادی مانند آمین‌ها، ایندول[13]، سولفید هیدروژن و اسید فنیک[14] تولید کرده، موجب مشکلات اساسی برای روده می‌شوند (کوشکی و خسروی، ۱۳۸۷).

۶-۱ تغییر فلور روده در طول عمر

درباره فلور روده در آغاز تولد و تغییرات آن در طول زمان رشد مطالعات زیادی انجام شده است. روده یک نوزاد هنگام تولد استریل بوده و فاقد فلور میکروبی می‌باشد اما به زودی پرگنه سازی انواع باکتری‌ها در این محیط آغاز می‌شود. وقتی نوزاد شروع به شیر نوشی می‌کند، نخستین فلورای تشکیل شده در روده مربوط به باکتری‌های بومی دهان او (*استرپتوکوکوس*) و فلور پوست مادر در ناحیه پستان (*استافیلوکوکوس*) است. طی یک یا دو روز پس از تولد نوزاد، باکتری‌های *کلی‌فرم*[15]، *انتروکوکوس*، *کلستردیوم* و *لاکتوباسیلوس* در مدفوع نمایان می‌شوند. پس از سه تا چهار روز *بیفیدوباکتریوم*ها ظاهر می‌شوند که تقریباً در روز پنجم گونه غالب روده را تشکیل می‌دهند. تعداد *کلی‌فرم*ها و دیگر باکتری‌ها در پاسخ به افزایش *بیفیدوباکتریوم*ها کاهش می‌یابد.

1. *Enterobacteriaceae*
2. *Bacteroides*
3. *Bifidobacterium*
4. *Fusobacterium*
5. *Clostridium*
6. *Veillonella*
7. *Proteus*
8. *Staphylococcus*
9. *Pseudomonas*
10. Yeast
11. Protozoa
12. *Campylobacter*
13. Indole
14. Phenic acid
15. *Coliform*

به طور معمول در نوزادانی که از شیر مادر تغذیه می‌کنند، طی نخستین هفته از زندگی، جمعیت *بیفیدوباکتریوم*‌ها به CFU/g $۱۰^{۱۰}$–$۱۰^{۱۱}$، یعنی ۲۵٪ کل باکتری‌های روده‌ای و شمار *لاکتوباسیلوس*‌ها به $۱۰^{۷}$ سلول زنده در هر گرم از مدفوع می‌رسد. مقدار *کلی‌فرم* و *انتروکوکوس*[1] به کمتر از یک درصد جمعیت میکروبی روده تقلیل یافته و معمولاً باکتری‌های *باکتروئیدس*، *کلوستریدوم* *کلوستریدوم* و سایر باکتری‌ها به طور تقریبی حذف می‌شوند. جمعیت *بیفیدوباکتریوم*‌ها در نوزادانی که از شیر مادر تغذیه نمی‌شوند به طور عادی کمتر از افراد تغذیه شده با شیر مادر است. از این رو نوزادان شیرخوار از مادر به دلیل وجود مواد ضد میکروبی تولید شده توسط *بیفیدوباکتریوم*‌ها در برابر ابتلا به انواع عفونت‌ها مقاوم‌تر هستند. به مرور زمان با قطع شیر مادر، رشد و افزایش سن تغییرات تدریجی در تعداد میکروب‌های روده اتفاق می‌افتد. جمعیت *بیفیدوباکتریوم*‌ها به تدریج کاهش می‌یابد، طوریکه در روده فرد بالغ از نظر فراوانی در رتبه سوم قرار می‌گیرد. رتبه اول و دوم را به ترتیب *باکتروئید*‌ها (۸۶٪ کل جمعیت میکروبی روده) و *یوباکتریوم*‌ها[2] تشکیل می‌دهند. با افزایش سن از نوزادی تا بلوغ تعداد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* همگام با *بیفیدوباکتریا*‌ها به شدت کاهش می‌یابد. فلور میکروبی روده در فرد بالغ به ثبات می‌رسد ولی دوباره در میانسالی و سنین پیری دستخوش تغییراتی شده و تعداد *بیفیدوباکتریوم*‌ها به شدت کاهش می‌یابد. یک حادثه مهیج تعداد *بیفیدوباکتریوم*‌ها را کاهش داده و با افزایش *کلستردیوم پرفرنژانس*[3] سبب اسهال در سنین بالا می‌شود (کوشکی و خسروی، ۱۳۸۷).

ترکیب پیچیده فلور میکروبی ارتباط مستقیمی با سلامت بشر دارد و در فرد بالغ و سالم از نوعی توازن طبیعی برخوردار است. هرگونه اختلال در این توازن، تغییراتی را در فلور میکروبی روده باعث می‌شود که به تدریج منجر به چیره شدن میکروارگانیسم‌های مضر در روده و ایجاد بیماری می‌شود. تغییرات در فلور روده تنها به دلیل افزایش سن نیست بلکه می‌تواند ناشی از عواملی مانند استرس، رژیم غذایی، مصرف دارو، آلودگی باکتریایی، تابش‌های رادیواکتیو، یبوست و غیره باشد (کوشکی و خسروی، ۱۳۸۷).

۱-۷ معیارهای انتخاب پروبیوتیک‌ها

انتخاب گونه‌های پروبیوتیک عمدتاً بر پایه سابقه تاریخی استفاده از آن‌ها برای مدت‌های طولانی بدون داشتن عوارض جانبی مضر صورت می‌گیرد. سایر معیارهای مطرح برای استفاده از گونه‌های باکتریایی مناسب عبارتند از:

1. *Enterococcus*
2. *Eubacterium*
3. *Clostridium perfringens*

۱. مقاومت و زنده ماندن در فرآیند ساخت.

۲. زنده و فعال ماندن در دستگاه گوارش که به معنای مقاومت در برابر اسید معده و اسیدهای صفراوی است.

۳. توانایی اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده.

۴. توانایی تثبیت فلور باکتریایی روده.

۵. توانایی آنتاگونیزه[1] کردن پاتوژن‌ها از طریق تولید ترکیبات ضد باکتری، حذف رقابتی آن‌ها یا کاهش pH کولون.

از جنبه عملی، فرآورده‌های پروبیوتیکی باید عمر مناسب داشته باشند، در زمان مصرف حاوی تعداد زیادی سلول زنده بوده و غیر بیماری‌زا و غیر سمی نیز باشند. پروبیوتیکی که بیش از همه در زمینه‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است، باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک شامل جنس‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* است. این دو جنس باکتریایی، هیچگونه توانایی ایجاد التهاب را ندارند و این مسئله از علل انتخاب آنها به عنوان پروبیوتیک است (وجدانی و زالی، ۱۳۸۲).

۱-۸ *لاکتوباسیلوس*ها

*لاکتوباسیلوس*ها گروهی از باکتری‌های اسید لاکتیک هستند، گرم مثبت، میله‌ای شکل، بدون اسپور، کاتالاز منفی، اکسیداز منفی، معمولاً بدون حرکت بوده و قادر به احیای نیترات نیستند. *لاکتوباسیلوس*ها با داشتن بیش از ۱۰۰ گونه بزرگترین جنس باکتری‌های اسید لاکتیک به شمار می‌روند. اعضای این جنس در طبیعت، در زیستگاه‌های مختلف غنی از کربوهیدرات با پروتئین نظیر گیاهان و غذاهای فاسد یافت می‌شوند. علاوه بر این تعداد زیادی از این‌ها فلور طبیعی دستگاه گوارش و مجاری تناسلی انسان و دام‌ها به شمار می‌روند. به دلیل قدمت زیاد استفاده از آنها در تخمیر مواد غذایی و صنعت مواد غذایی و فقدان بیماری‌زایی آن‌ها عموماً به عنوان ارگانیسم‌های ایمن شناخته می‌شوند (Mishra & Prasad, 2005).

۱-۹ فواید پروبیوتیک‌ها

اثرات مفید پروبیوتیک‌ها ممکن است به طور مستقیم با مشاهده در جوامع انسانی، با آزمایش در حیوانات یا مشاهده در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده باشد. بدیهی است که شیوه نخست از سایر شیوه‌ها معتبرتر است. این اثرات ممکن است ناشی از فعالیت و حضور

1. Antagonize

سلول‌های زنده آن‌ها در دستگاه گوارش، حضور سلول‌های مرده یا حتی تکه‌های دیواره سلولی و بخش‌های سیتوپلاسم، متابولیت‌های ترشح شده آن‌ها در دستگاه گوارش و یا تمامی موارد یاد شده باشد. حفظ و افزایش پروبیوتیک‌ها در بخش‌های مختلف بدن به ویژه روده به منظور افزایش اثرات سودمند آن‌ها به سه روش امکان پذیر است: دریافت تعداد زیادی از سلول‌های زنده آنها به صورت خوراکی یا استعمال موضعی، پرهیز از مجاورت با عواملی که جمعیت این باکتری‌ها را در بدن کاهش می‌دهند (مانند رژیم غذایی ناسالم، تابش رادیواکتیو، تنش، بیماری‌ها و مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها) و مصرف مواد پری‌بیوتیک با رژیم غذایی (مرتضویان و سهراب‌وندی، ۱۳۸۵). اثرات مفید پروبیوتیک‌ها شامل: خاصیت ضد جهشی و ضد سرطانی (Mishra & Prasad, 2005)، افزایش پاسخ ایمنی (Blum *et al*., 2002)، کنترل اسهال (de Vrese & Marteau, 2007)، بهبود عدم تحمل لاکتوز (Andersson *et al*., 2001)، جلوگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی (با کاهش لیپیدها و کلسترول سرم) (Ooi & Liong, 2010)، بهبود یبوست (Tannock, 2003)، پیشگیری از ابتلا به آلرژی (Ouwehand, 2007)، کاهش فشار خون (Yeo & Liong, 2010).

۱۰-۱ مکانیسم عمل پروبیوتیک‌ها

مکانیسم‌های زیادی برای توجیه توانایی پروبیوتیک‌ها جهت حفاظت از میزبان در برابر بیماری‌های گوارشی وجود دارد از جمله:

۱. تولید ترکیبات مهار کننده: ترکیبات مهار کننده شامل اسیدهای آلی نظیر استات، پروپیونات و بوتیرات، H_2O_2 و ترکیبات باکتریوسن است. این مواد نه تنها تعداد سلول‌های زنده پاتوژن را کم می‌کنند، بلکه ممکن است متابولیسم باکتری‌ها یا تولید سموم توسط آنها را نیز تحت تاثیر قرار دهند.

۲. رقابت برای جایگاه‌های اتصال: مهار رقابتی جایگاه‌های اتصال باکتریایی بر روی سطوح اپیتلیال روده، یک مکانیسم دیگر اثر بخشی پروبیوتیک‌ها است. امروزه این مسئله پذیرفته شده است که بسیاری از عوامل بیماری‌زای روده‌ای برای استقرار در روده و ایجاد بیماری باید بتوانند به دیواره روده متصل شوند. با توجه به این مسئله، تعدادی از گونه‌های پروبیوتیکی به دلیل توانایی