تاثیر مصرف باکتری پروبیوتیک بر کاهش سنگ اگزالات کلسیم کلیوی در رت های آزمایشگاهی

رضا کیخا[۱]،حامد طاهری[۱]، علی نویدیان[۲]، مهدی زند حقیقی[۲] ، مریم اسلامی[۲]، روحی افکاری[۲]

۱.مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
۲. مرکز تحقیقات ارتقاء سلامت دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
*نشانی برای مکاتبه: rezakeikha77@gmail.com

چکیده

چکیده: هیپراگزالوریا یکی از مهمترین فاکتورهای اصلی در تشکیل سنگ‌های اگزالات کلسیم کلیوی است. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر مصرف باکتری‌های پروبیوتیک بر کاهش اگزالات ادراری و تشکیل سنگ کلیه می‌باشد. در این مطالعه از رت‌های نر ویستار ۲۵۰ گرمی (در گروه‌های ۶تایی) استفاده گردید. ابتدا به منظور سنگ سازی در بافت کلیه رت‌ها، اگزالات آمونیوم به همراه آب آشامیدنی به آن‌ها خورانده شد و سپس باکتری‌های پروبیوتیک در طی یک دوره ۳۰ روزه بصورت گاواژ (دوبار در روز) به رت ها خورانده شد. در روزهای ۰، ۷،۱۴، ۲۱ ،۲۸ نمونه سرم و ادرار ۲۴ ساعته رت ها جمع آوری و به منظور آنالیز به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از پایان دوره، بافت کلیه آنها خارج و جهت ارزیابی وجود کریستال‌های اگزالات کلسیم، به آزمایشگاه پاتولوژی منتقل گردید. نتایج نشان داد در طول دوره درمان، در گروه کنترل منفی (دریافت کننده اگزالات آمونیوم) پارامترهای ادراری (اگزالات، کلسیم و کراتینین) بجز سیترات در سطح بالایی قرار دارند در حالیکه در گروه‌های مصرف کننده پروبیوتیک پارامترهای ادراری ذکر شده به سطح نرمال رسیدند و در پایان دوره در این گروه سطح سیترات ادراری افزایش یافت. همچنین بطور چشمگیری رسوبات اگزالات کلسیم کاهش یافته و ترمیم بافت کلیوی مشاهده گردید. از نتایج این مطالعه می‌توان چنین استنباط کرد که مصرف پروبیوتیک میتواند سبب تجزیه و دفع سنگ‌های کلیوی شود. همچنین مصرف پروبیوتیک سبب بهبودی و ترمیم بافت آسیب دیده از تجمع اگزالات کلسیم نیز می-شود. می توان اظهار داشت که استفاده از پروبیوتیک می‌تواند راه درمان جدیدی برای کاهش و یا دفع سنگ‌های اگزالات کلسیمی باشد.

کلمات کلیدی: هیپراگزالوریا، رت نر ویستار، باکتری پروبیوتیک، سنگ کلیوی اگزالات کلسیم، بافت کلیوی

مقدمه

تشکیل سنگ های ادراری را سومین بیماری شایع در دستگاه ادراری- تناسلی می دانند که با وجود داشتن سابقه دیرین در جامعه پزشکی، هنوز به عنوان یک بیماری مزمن به شمار می رود[۱]. تشکیل شن یا سنگ کلیه بیشتر به دلیل عدم تعادل در مصرف غذاهای غنی از اگزالات، کلسیم و فرآورده های گوشتی می‌باشد و از طرفی زمینه ارثی و عدم بیان یکسری آنزیم های ضروری و لازم در روند تجزیه اگزالات غذایی، در ظهور این بیماری بی اثر نیست. سنگ تشکیل شده در بخش های کالیکس فوقانی و تحتانی، گاهی از محل خود جدا شده و وارد لگنچه و از آنجا وارد حالب ها و مثانه می شود که می تواند در آن محل تشکیل سنگ مثانه دهد [۲, ۳]. امروزه برای خارج کردن سنگ از بخش های مختلف دستگاه ادراری روش های پیشرفته سنگ شکنی خارج شکمی[۱]، سنگ شکنی داخل شکمی[۲] و خروج سنگ تجزیه شده از راه ادرار[۳] وجود دارد که بسیار پرهزینه است. گاهی تجمع کریستال های اگزالات کلسیم یا آمونیوم در دستگاه ادراری می تواند سبب التهاب لگنچه و بافت کلیه نیز شود که همراه با درد و خونریزی می باشد. همچنین وجود سنگ کلیه زمینه ساز خیلی از بیماری های کلیوی از جمله اختلال در عملکرد کلیه، تخریب بافت کلیه و نهایتا سبب نارسایی حاد و یا مزمن کلیه در افراد می شود که همگی موارد، فرد را مستعد به از دست دادن کلیه و پیوند مجدد کلیه می کند[۴, ۵]. شایع ترین سنگ های ادراری

[1] ESWL=Extracorporeal ShockWave Lithotripsy
[2] TUL=Trans Ureteral Lithotripsy
[3] PCNL= Percutaneous Nephro Lithotomy

شامل سنگ های اگزالات کلسیم (به میزان ۸۰ درصد) و فسفات کلسیم (۱۸٪) است که در بیماران مبتلا به هیپراگزالوریا[۴] (افزایش اگزالات ادراری)، به فراوانی دیده می شود. میزان شیوع سنگ کلیه در افراد ۱۰ الی ۱۵ درصد می باشد[۶, ۷]. در کشور ما آمار افراد مبتلا به سنگ کلیه نسبتا بالاست و از هر ۸ نفر یک نفر به سنگ کلیه مبتلا می باشد. بروز سنگ کلیه در مردان ۲ تا ۳ برابر زنان می باشد و در سفید پوستان نسبت به سیاه پوستان بیشتر دیده می شود[۸]. اگزالات موجود در سنگ های کلیوی یک ترکیب توکسیک قوی است که تجمع آن در بافت های مختلف (از قبیل کلیه و کبد) سبب اختلال و نارسایی بافت می شود. مقدار طبیعی دفع آن از راه ادرار ۰/۲ مول در ۲۴ ساعت است. دفع مقادیر بیشتر سبب افزایش اگزالات ادراری و نهایتاً تشکیل سنگ های اگزالات کلسیمی می شود[۹, ۱۰].

هیپراگزالوریا به دلیل تولید اندوژنی اگزالات و جذب بیش از حد اگزالات روده ای ایجاد می شود که یک ریسک فاکتور اصلی در تشکیل سنگ های اگزالات کلسیمی است. افزایش اگزالات ادراری به دو صورت هیپراگزالوریای روده ای[۵] و هیپراگزالوریای غذایی[۶] دیده می شود. در هیپراگزالوریای روده ای عدم جذب اگزالات درون غذا (به هر دلیلی از جمله بیماری های مربوط به روده کوچک، افزایش باکتری های پاتوژن روده و یا کاهش باکتری های تجزیه کننده اگزالات) اتفاق می افتد در نتیجه غلظت اگزالات آزاد در روده افزایش یافته که با جذب اگزالات به ادرار، سبب افزایش اگزالات ادراری می شود. اما در هیپراگزالوریای غذایی، با مصرف زیاد غذای غنی از اگزالات (از جمله شکلات، اسفناج، کرفس، چای سیاه، آجیل و قهوه) در روز، جذب اگزالات از روده به ادرار افزایش یافته که منجر به بالا رفتن سطح غلظت اگزالات در ادرار می شود [۷, ۱۱].

بررسی های آزمایشگاهی نشان می دهد که بیشتر پستانداران قادر به تجزیه اگزالات نبوده و بدین ترتیب با دفع آن از راه ادرار و ایجاد رسوب کریستال های اگزالات (به همراه دیگر املاح در ادرار از جمله کلسیم، یون آمونیوم و یا فسفات) سبب تشکیل سنگ در مجاری ادراری از جمله کلیه ها می گردد [۱۲]. امروزه مشخص گردیده که باکتری های تجزیه کننده اگزالات که در دستگاه گوارش قرار دارند سبب متعادل سازی و تجزیه آن می شوند . طی بررسی های انجام شده بر کولون حیوانات نشخوارکننده (که غذای غنی از اگزالات مصرف کرده بودند) گزارش شد که باکتری *اگزالوباکتر* فورمی ژنز[۷] قادر است اگزالات را به ترکیبات ساده تر تجزیه کرده و بدین ترتیب از افزایش اگزالات ادراری جلوگیری می گردد[۱۳]. تحقیقات گسترده روی باکتری های دستگاه گوارش نشان می دهد که باکتری های پروبیوتیک (از جمله لاکتوباسیلوس) نیز قدرت تجزیه کنندگی اگزالات بالایی دارند. باکتری های تجزیه کننده اگزالات طی مسیرهای آنزیمی خاص، اگزالات را تبدیل به فورمات و دی اکسیدکربن می کنند. در این مسیر دو آنزیم اگزالیل کوآنزیم A دکربوکسیلاز[۸] و فورمیل کوآنزیم A ترانسفراز[۹] نقش کلیدی ایفا می کنند[۱۴, ۱۵].

پژوهش های گسترده روی باکتری های پروبیوتیک (از جمله *لاکتوباسیلوس* ها) نشان می دهد این باکتری ها به طور معناداری سبب کاهش اگزالات ادراری در افراد مبتلا به هیپراگزالوریا می شوند [۱۶]. در پژوهشی به رژیم غذایی رت های آزمایشگاهی، باکتری های پروبیوتیک اضافه کردند، پس از دو روز، کاهش معناداری در میزان اگزالات ادراری رت ها مشاهده شد [۱۷, ۱۸]. در مطالعه ای دیگر با اضافه کردن باکتری های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* به غذای افراد داوطلب مبتلا به سنگ کلیه، کاهش سطح اگزالات ادراری ۳۰درصد را مشاهده کردند[۱۹, ۲۰]. پروبیوتیک[۱۰]ها ارگانیسم های زنده ای هستند که با تعدیل فلور میکروبی روده، اثرات مفیدی بر روی سلامت میزبان اعمال می کنند. آنها عموما از منابع انسانی بوده و غیر بیماری محسوب می شوند [۲۱, ۲۲]. پروبیوتیک هایی که بیش از همه در زمینه های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته اند شامل باکتریهای تولیدکننده اسید لاکتیک از قبیل گونه های *لاکتوباسیلوس* و بیفیدو باکتریها هستند[۲۳, ۲۴] . مکانیسم های اثر پروبیوتیک ها کاملا شناخته شده نیست ولی به تولید ترکیبات مهار کننده باکتریهای روده، مسدود کردن جایگاه های اتصال باکتریها، رقابت برای جذب مواد غذایی و تقویت سیستم ایمنی را از جمله مهمترین این مکانیسم ها دانسته اند[۲۵]. از اینرو هدف از این مطالعه بررسی تاثیر مصرف باکتری های پروبیوتیک بر کاهش و دفع سنگ اگزالات کلسیم کلیوی می باشد.

روش کار

در این پژوهش از ۷ سویه استاندارد و دو سویه جدید (تایید و ثبت شده توسط نویسنده این مقاله در سایت بین المللی NCBI

[4] Hyperoxaluria
[5] Enteric hyperoxaluria.
[6] Dietary hyperoxaluria
[7] Oxalobacter formigenes
[8] Oxalyl-CoA decarboxylase
[9] Formyl-CoA transferase
[10] Probiotic

[۱۱]، که قدرت بالایی در تجزیه اگزالات دارند (L. paracasei AKPL-IR (JF461540.1), L. paracasei AKKL-IR (JF461539.1).) استفاده گردید.

۱-تهیه سوش استاندارد و کشت باکتری‌های پروبیوتیک

مورد مطالعه: به منظور ارزیابی تأثیر باکتری های پروبیوتیک بر کاهش اگزالات ادراری در این پژوهش از سوش استانداردهای زیر (خریداری شده از مرکز کلکسیون باکتری های استاندارد ایران) استفاده شد.

Lactobacillus.plantarum PTCC 1745
Lactobacillus acidophilus PTCC 1643
Lactobacillus.Casei PTCC1608
Lactobacillus Delbruki PTCC1737
Bifidobacterium Bifidum PTCC 1644
Bifidobacterium animalis subsp. lactis PTCC 1736
Streptococcus salivarius subsp. thermophilus PTCC 1738

نمونه ویال حاوی سوش استاندارد پس از خریداری از مرکز[۱۲]IROST، به آزمایشگاه منتقل و تا شروع آزمایش در دمای یخچال نگهداری شدند. از محیط کشتMRS Agar برای کشت لاکتوباسیلوس ها و بیفیدیوباکترها، و از محیط کشت M17 agar برای رشد استرپتوکوکوس ترموفیلوس استفاده گردید. ابتدا سویه های استاندارد لاکتوباسیلوس و بیفیدیوباکتر خریداری شده از مرکز IROST ، به محیط کشت MRS مایع انتقال و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، در محیط کشت MRS جامد کشت شدند. به منظور ایجاد شرایط کم هوازی برای لاکتوباسیلوس(۵٪ CO_2) و شرایط بی هوازی برای بیفیدیوباکتر (۱۰٪ CO2) از دستگاه انکوباتور-CO_2دار استفاده گردید که به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند، سپس با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل تا ده برابر رقیق شده و از هر رقت ۱میلی لیتر در محیط کشت MRS agar کشت شدند. پلیت ها به دستگاه انکوباتور-CO2 دار (شرایط کم هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۴۸-۷۲ساعت) منتقل شدند. سپس کلنی های قابل شمارش (۳۰۰-۳۰ کلنی) مورد استفاده و شمارش قرار گرفتند.

۲-انتخاب موش های مناسب: در این آزمایش ۱۸راس موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی علوم پزشکی زاهدان تهیه گردید. به منظور سازگاری، به مدت دو هفته قبل از آزمایش حیوانات مورد مطالعه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۶۰-۴۰ درصد نگهداری شدند.حیوانات بطور مساوی دسترسی کافی به آب وغذای معمولی روزانه (پلت ،غذای حیوانات آزمایشگاهی، تهیه شده از موسسه رازی،تهران) را داشتند.

۳-اندازه گیری وزن موش ها: به منظور بررسی میزان تغییرات وزنی گروه ها، تمامی موش‌ها در ابتدا و هر هفته تا انتهای پژوهش با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شدند.

۴-آماده سازی حیوانات مبتلا به سنگ کلیه و نحوه انجام آزمایش : به منظور القای هیپراگزالوریا و سنگ ساز شدن بافت کلیه در رت های مورد آزمایش، از اگزالات آمونیوم ۳٪ (شرکت مرک آلمان) و کلرید آمونیوم استفاده شد[۱۴] برای اطمینان از سنگ ساز شدن (پس از ۳-۵ روز) بطور تصادفی رت با استفاده از کتامین/ زایلازین بیهوش [۲۶] و بافت کلیه آن خارج گردید و به منظور بررسی به آزمایشگاه پاتولوژی انتقال داده شد. همچنین نمونه سرم و ادرار ۲۴ساعته آنها با قفسه متابولیک جمع آوری و مورد آنالیز بیوشیمایی قرار گرفتند. با توجه به نتایج اعلام شده از آزمایشگاه، رت هایی با هیپراگزالوریا و وجود کریستال های اگزالات کلسیم در کلیه ها، بعنوان رت های سنگ ساز در نظر گرفته شد.

۵-گروه های مورد مطالعه: رت های مورد مطالعه به طور تصادفی تقسیم بندی و به گروه های کنترل منفی سنگ ساز (گروه بیمار)، گروه کنترل مثبت (گروه سالم)، گروه های دریافت کننده پروبیوتیک تقسیم شدند. در هر گروه به منظور جلوگیری از دست رفتن احتمالی موش ها در حین مطالعه، ۲ موش اضافه در نظر گرفته شد.

گروه کنترل سالم (گروه شاهد): در طی پژوهش آب وغذای روزانه (بدون اگزالات آمونیوم۳٪) دریافت کردند.

گروه کنترل منفی (گروه بیمار): سالین و اگزالات آمونیوم ۳٪ در طول پژوهش دریافت کرده و روزانه با آب مقطر گاواژ شدند، این گروه هیچ درمان دیگری دریافت نکردند.

گروه پیشگیری (گروه مداخله): در این گروه رت ها علاوه بر اگزالات آمونیوم ۳٪ (به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) در غذای روزانه، طبق برنامه، باکتری های پروبیوتیک به هرگروه جداگانه گاواژ گردید.

۶-آماده سازی رت ها برای بیهوشی و جراحی: با تزریق ترکیب معمول زایلازین (شرکت آلفاسان، کشورهلند) و کتامین

11 *National Center for Biotechnology Information*

12 Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST)

(شرکت روتکس مدیکا، کشور آلمان) بیهوشی انجام شد. برای پیش بیهوشی زایلازین با دوز ۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن بصورت داخل صفاقی و باسرنگ انسولین تزریق شد.برای القای بیهوشی،تزریق کتامین با دوز ۹۵میلی گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی صورت گرفت و به منظور نگهداری بیهوشی به تناوب و در صورت نیاز، با دوز ۷۵ میلی گرم/کیلوگرم به صورت عضلانی ادامه یافت.

۷-نحوه خوراندن باکتری های پروبیوتیک به رت ها: در این مرحله کوکتلی (مخلوطی) از باکتریها (کدورت[۱۰^۱۱]) با استفاده از آب آشامیدنی به رت ها بصورت گاواژ خورانده شدند باکتری-های پروبیوتیک ۲ بار در روز و به یک میزان (۱سی سی) به گروه های مورد مطالعه خورانده شدند و از هیچ پوششی جهت محافظت باکتری برابر شرایط اسیدی معده استفاده نشد .شایان ذکر است که تیمار کردن رت ها در یک دوره یک ماهه صورت گرفت. در گروه موش های مورد بررسی در مرحله جمع آوری ادرار ۲۴ ساعت، رت ها به قفسه متابولیک انتقال یافته و نمونه آنها جمع آوری گردید.

نتایج

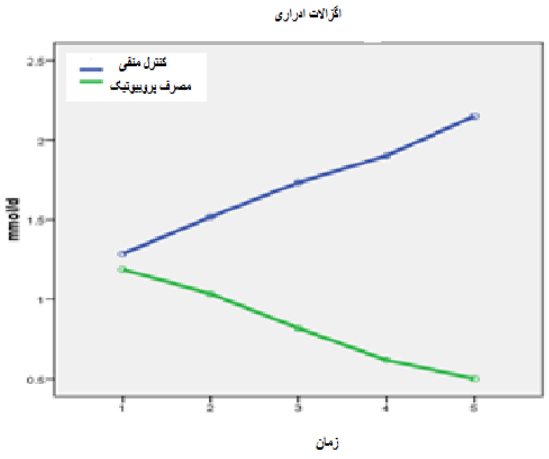
جمع آوری نمونه های ادرار از تمامی رت های مورد مطالعه، روز۷، ۰، ۱۴، ۲۱ و۲۸ با استفاده از قفس های متابولیک انجام گردید (شکل۱).نمونه ادرار تمامی موش های مورد مطالعه به آزمایشگاه پاتولوژی دکتر دبیری در شهرستان زاهدان انتقال داده شد و با کیت های اختصاصی، سطح کلسیم، اگزالات و کراتینین در ادرار ۲۴ساعته مورد ارزیابی قرار گرفت. نهایتا به جهت بررسی وجود یا عدم وجود کریستال های اگزالات کلسیم در بافت کلیوی، به آزمایشگاه بافت شناسی منتقل گردید. آمار توصیفی این پژوهش با استفاده از نرم افزار Excel &SPSS با استفاده از آزمون کای دو، آزمون دقیق فیشر و آزمون آنالیز واریانس(ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سطح معنادار P-value< %5 در نظر گرفته شده است. به منظور بررسی میزان تغییرات وزنی گروه ها، تمامی گروه ها در روزهای مورد مطالعه با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شدند.

شکل *۱* - نحوه جمع آوری نمونه ادرار ۲۴ ساعته با قفس متابولیک

همانطور که در شکل مشاهده می گردد نحوه جمع آوری نمونه ادرار ۲۴ساعته از تمامی رت های مورد مطالعه با استفاده از قفس متابولیک انجام شده است.

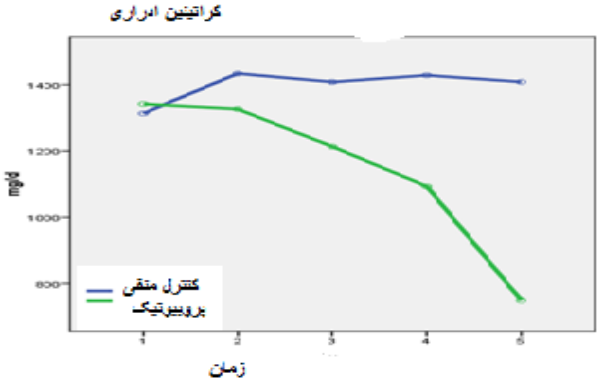
شکل۲- میانگین وانحراف معیار تغییرات وزن روز ۲۸نسبت به روزصفر

همانطور که مشاهده می شود تفاوت معنی داری از لحاظ وزن موش ها مشاهده شده است(p=0.001). نتایج نشان داد که در همه گروه ها با مصرف باکتری های پروبیوتیک وزن رت ها در روز ۲۸ نسبت به روز صفر افزایش یافته است(شکل۲).



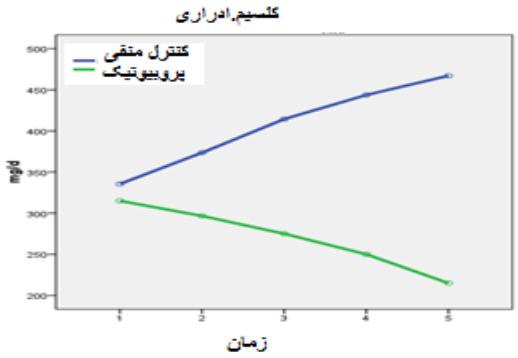
شکل۳- میانگین اگزالات دراری بین دو گروه مصرف کننده پروبیوتیک و کنترل منفی

همچنین مقدار اگزالات ادراری (بین ۰/۲-۰/۶ mmol/24h) ارزیابی گردید که در پایان دوره، در گروه کنترل سالم تغییری در سطح اگزالات ادراری مشاهده نشده است اما در گروه کنترل منفی سطح اگزالات ادراری همچنان بالای ۰/۶ میلی مول نشان داده شد. میانگین اگزالات ادراری بین دوگروه کنترل مثبت و منفی اختلاف معنی دار داشت($p<0.001$).میانگین اگزالات ادراری بین دو گروه مصرف کننده پروبیوتیک وکنترل منفی اختلاف معنی دار داشت($p<0.001$). روند تاثیر مصرف پروبیوتیک برکاهش اگزالات ادراری با گذشت زمان بیشتر شده است و این روند بین دو گروه تفاوت معنی دار داشت ($p<0.001$)(شکل۳).



شکل۴-میانگین کراتینین ادراری بین دو گروه مصرف کننده پروبیوتیک و کنترل منفی

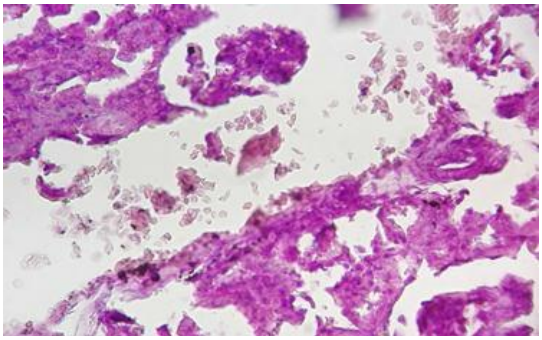
مقدار کراتینین ادراری در پایان دوره، در گروه کنترل سالم تغییری مشاهده نشده است اما در گروه کنترل منفی سطح کراتینین ادراری همچنان بالای ۱۲۰۰ میلی گرم نشان داده شد. در روزهای ۰ و ۷ دوره به ترتیب ۱۰۰درصد و ۹۴/۴۴ درصد رت ها کراتینین ادراری بالای ۱۲۰۰ را نشان دادند در حالیکه در پایان دوره هیچ کدام از رت های تحت درمان (با پروبیوتیک) کراتینین ادراری بالای۱۲۰۰ میلی گرم نشان ندادند. در روز۲۸ دوره ۷۹/۱۶ درصد کراتینین ادراری کمتر از ۸۰۰ میلی گرم را نشان دادند همچنین در این مطالعه، میانگین کراتینین ادراری بین دو گروه مصرف کننده پروبیوتیک و کنترل منفی اختلاف معنی دار داشت ($p<0.001$). روند تاثیر مصرف پروبیوتیک بر کاهش کراتینین ادراری با گذشت زمان بیشتر شده است و این روند بین دو گروه تفاوت معنی دار داشت($p<0.001$). (شکل۴)



شکل۵-میانگین کلسیم ادراری بین دو گروه مصرف کننده پروبیوتیک و کنترل منفی

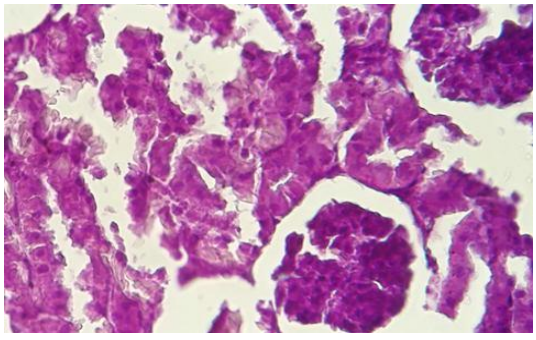
در ایـن مطالعـه همچنـین بـا بررسـی مقـدار کلسـیم ادراری (۱۰۰-۲۵۰ mg/24h)، مشاهده گردید که در گروه کنترل سالم تغییری در سطح کلسـیم ادراری مشـاهده نشـده اسـت امـا در گروه کنترل منفی سطح کلسـیم ادراری همچنـان بـالای ۲۵۰ میلـی گـرم نشـان داده شـد. در روزهـای ۰ و ۷ دوره بـه ترتیب۱۰۰درصد و ۹۳/۰۵ درصد رت ها کلسیم ادراری بـالای ۲۵۰ میلی گرم نشان دادند در حالیکه در پایان دوره هیچ کدام از رت هـای تحـت درمـان (بـا پروبیوتیـک) کلسـیم ادراری بـالای۲۵۰ میلـی گـرم را نشـان ندادنـد. در روز۲۸ دوره، ۸۰/۵۵درصد کلسـیم ادراری کمتـر از ۱۰۰ میلـی گـرم نشـان دادند. میانگین کلسـیم ادراری بـین دو گـروه کنتـرل مثبـت و منفی اخـتلاف معنـی دار داشـت($p<0.001$). میـانگین کلسـیم ادراری بین دو گروه مصرف کننده پروبیوتیک و کنتـرل منفـی اختلاف معنی دار داشت ($p<0.001$).روند تاثیرمصرف پروبیوتیک بر کاهش کلسیم ادراری با گذشت زمان بیشتر شده اسـت و ایـن رونـد بـین دو گـروه تفـاوت معنـی دار داشت($p<0.001$). (شکل۵).

پس از آنالیز ادراری از نظـر تغییـرات سـطح اگزالات،کلسـیم و کراتینین ادراری،بافت کلیوی رت های مورد مطالعه بـه منظـور بررسی کاهش سنگ اگزالات کلسیم کلیـوی و تغییـرات بافـت کلیوی، به آزمایشگاه بافت شناسی منتقل گردید. بررسـی هـای بافت شناسی و پاتولوژی گزارش دادنـد کـه بـه دلیـل تجمـع و وجود سنگ های اگزالات کلسیم منجر به تخریب بافت کلیـوی در گروه رت های مصرف کننده اگـزالات آمونیـوم(گروه کنتـرل منفی) شده است در حالیکه در گـروه مصـرف کننـده بـاکتری های پروبیوتیک دفع سنگ های اگزالات کلسـیم اتفـاق افتـاده است و در پایان دوره کاهش آسیب بافتی و ترمیم بافت کلیـوی دیده شد(شکل۶و۷).



شکل ۶- برش بافت کلیه در گروه کنترل منفی

همانطور که در شکل ۶-مشاهده می شود با مصرف اگزالات آمونیوم تحلیل بافتی رخ داده است.



شکل ۷-برش بافت کلیه در گروه مصرف کننده پروبیوتیک

همانطور در شکل ۷، مشاهده می شود در گروه مصرف کننده پروبیوتیک در طی یک ماه ترمیم و بهبود بافت کلیوی مشاهده می گردد.

بحث

بیماری تشکیل سنگ های کلیوی، از قدیمی ترین بیماری های بشر است. این بیماری یک مشکل جهانی بوده که شیوع آن در نقاط مختلف دنیا ۱۰-۱۵٪ (در آمریکا ۸ ٪، ژاپن ۷٪، کره ۴٪ و آلمان ۵٪) و در ایران ۵ تا ۸ درصد گزارش شده است [۸, ۲۷, ۲۸]. در طی یک مطالعه کهورت در ایران، براساس محل جغرافیایی شیوع سنگ کلیه در نقاط مختلف متفاوت گزارش شد بطوریکه بیشترین فراوانی تشکیل سنگ کلیه در نواحی جنوب شرقی و شهرهای جنوبی به ترتیب ۹/۶ درصد و ۸/۵ درصد و کمترین فراوانی در استان های شمالی ۴/۱ درصد بود[۲, ۲۹]. عواملی از جمله نوع رژیم غذایی افراد، عدم مصرف مایعات، مصرف بالای نمک، عفونت دستگاه ادراری، مصرف بالای آنتی بیوتیک و ژنتیک را بعنوان مهمترین عوامل مؤثر بر شیوع سنگ کلیه در ایران گزارش داده اند. در بررسی های نیک پی(سال ۲۰۱۶) شیوع سنگ اگزالات کلسیمی ۶۱/۲۵ درصد و سنگ هایی با ترکیبات اگزالات آمونیوم و فسفات کلسیمی را ۳۱/۲۵ درصد در ایران ذکر شده است[۲۴, ۳۰].

امروزه عود سنگ های کلیوی را مهم ترین مشکل در مسیر درمان این بیماری می دانند. نتایج بررسی ها حاکی از رابطه مستقیم بین عود تشکیل سنگ در دستگاه ادراری و نوع غذای مصرفی (غذای غنی از اگزالات) و نیز مصرف انواع آنتی بیوتیک ها در مقیاس وسیع می باشد چرا که بسیاری از آنتی بیوتیک های رایج مصرفی سبب کاهش باکتری های پروبیوتیک (تجزیه کننده اگزالات) دستگاه گوارش می شوند که افزایش اگزالات ادراری در پی خواهد داشت [۱۹, ۳۱, ۳۲] .

با بررسی باکتری های دستگاه گوارش حیوانات نشخوارکننده، باکتری تجزیه کننده اگزالات به نام *اگزالوباکترفورمی ژنز* را شناسایی کردند که قادر به تجزیه اگزالات به مواد ساده می باشد و از این طریق انرژی و ماده ی کربنی مورد نیاز خود را فراهم می کنند [۳۳]. با مطالعه *اگزالوباکترها*، دو آنزیم اگزالیل کوآنزیم A دکربوکسیلاز و فورمیل کوآنزیم A ترانسفراز را شناسایی گردید که در تجزیه اگزالات به دی اکسید کربن و فورمات نقش مهمی دارند[۳۴]. اخیراً تحقیقات صورت گرفته در ارتباط با تأثیر پروبیوتیک بر کاهش اگزالات ادراری، استفاده از کپسول اگزودراپ می باشد.این کپسول حاوی ترکیب های متفاوت و غلظت های مختلفی از باکتری های پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس ها، بیفیدیوباکترها و استرپتوکوکوس ترموفیلوس*) است که در طی بررسی تأثیر درمانی آنها بر کاهش اگزالات ادراری، نتایج متفاوت و مؤثری گزارش شده است[۱۴, ۳۸-۳۵]. با بررسی تأثیر۴ گرم پودر (حاوی مخلوطی از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس،لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس برویس، بیفیدیوباکتراینفنتیس، استرپتوکوکوس ترموفیلوس* با کدورت^{11}۱۰×۴) به مدت ۳۰ و۶۰ روز بروی ۶ فرد مبتلا به سنگ اگزالات کلسیم، به ترتیب کاهش۴۰٪ و۵۰٪ در سطح اگزالات ادراری افراد مشاهده کردند [۱۴, ۳۹].

در مطالعه حاضر نیز با مصرف باکتری های پروبیوتیک کاهش معناداری در سطح اگزالات ادراری و کلسیم ادراری مشاهده گردید که با مطالعه دیگر پژوهشگران همخوانی دارد. همچنین با بررسی دوره ای وزن بدنی و وزن بافت کلیوی رت های مورد مطالعه، مشاهده گردید که مصرف پروبیوتیک سبب کاهش التهاب و عوارض کلیوی می گردد و با افزایش سطح ایمنی و ترمیم بافت کلیوی در پایان دوره درمان، وزن بدنی و وزن بافت کلیوی رت های مورد مطالعه به سطح نرمال رسیده است. در مطالعه ای مخلوطی از ۸ نوع باکتری (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس برویس، بیفیدیوباکتراینفنتیس، استرپتوکوکوس ترموفیلوس، بیفیدیوباکتر لانگوم، لاکتوباسیلوس دلبروکئی*[13]*، لاکتوباسیلوس پاراکزیی* با کدورت ^{11}۱۰×۸ CFU/ml) به روی ۱۱ فرد مبتلا به سنگ کلیه طی ۴ هفته مورد بررسی قرار داد که سطح اگزالات ادراری به میزان ۳۳درصد کاهش یافت[۳۴, ۴۰].

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که مصرف باکتری های پروبیوتیک بعنوان یک مکمل غذایی، می تواند سبب کاهش اگزالات ادراری و در پی آن، سبب کاهش رسوب اگزالات کلسیم در بافت کلیوی گردد. با توجه به اینکه دو سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از دستگاه گوارش انسان که قدرت بالایی در تجزیه اگزالات دارند در این پژوهش نیز به همراه دیگر سویه های پروبیوتیک ، منجر به کاهش التهاب های کلیوی و ترمیم بافت کلیوی آسیب دیده شده است، این نیاز را میطلبد که در این راستا به تحقیق و بررسی بیشتری پرداخته شود که با تشخیص و جداسازی سویه های جدید پروبیوتیک در تجزیه اگزالات، بتوان از این راهکار جدید، بعنوان مکمل دارویی در ترمیم و بهبودی بافت کلیوی آسیب دیده نیز استفاده کرد.

[13] *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی با کد ۸۴۳۵ می باشد که در مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری علوم پزشکی زاهدان تصویب و انجام شده است .همچنین از تمامی کسانی که در نگارش این مقاله یاری رسانده اند تشکر می نماییم.

تعارض منافع

هیچگونه تضاد منافعی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آنها ارسال شده است.

REFERENCE

۱. Aziz, K., et al., Metataxonomic analysis of microbiota from Pakistani dromedary camelids milk and characterization of a newly isolated Lactobacillus fermentum strain with probiotic and bio-yogurt starter traits. Folia Microbiol (Praha), 2021. **66**(3): p.۴۲۸-۴۱۱ .

۲. Ferraro, P.M., et al., Antibiotic Use and Risk of Incident Kidney Stones in Female Nurses. Am J Kidney Dis, 2019. **74**(6): p. 736-741.

۳. Aleebrahim, A. and I. Nabipour, Ethnopharmacology of Medicinal Plants in the Kangan-Asaluyeh Area. ISMJ, 2 ;(۵)۲۱ .۰۱۸p. 409-428.

۴. Wiederkehr, M.R. and O.W. Moe, Uric Acid Nephrolithiasis: A Systemic Metabolic Disorder. Clin Rev Bone Miner Metab, 2011. **9**(3-4): p. 207-217.

۵. Ly, S., et al., Cutaneous Oxalosis Due to Primary Hyperoxaluria. Am J Dermatopathol.۲۰۲۲ , ;(۱۲)۴۴p. 981-983.

۶. Kaushik, J., et al., Delving into the Antiurolithiatic Potential of Tribulus terrestris Extract Through –In Vivo Efficacy and Preclinical Safety Investigations in Wistar Rats. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 15969.

۷. Chamberlain, C.A., M. Hatch, and T.J. Garrett, Metabolomic profiling of oxalate-degrading probiotic Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus gasseri. PLoS One, 2019. **14**(9): p. e0222393.

۸. Johri, N., et al., An update and practical guide to renal stone management. Nephron Clin Pract, 2010. **116**(3): p. c159-71.

۹. Daudon, M. and P. Jungers, Stone composition and morphology: a window on etiology, in Urolithiasis. 2012, Springer. p. 113-140.

۱۰. Liu, Y., et al., Lactiplantibacillus plantarum Reduced Renal Calcium Oxalate Stones by Regulating Arginine Metabolism in Gut Microbiota. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 743097.

۱۱. ., بررسی منابع ریسک گیاهان دارویی زراعی استان کرمانشاه (مورد مطالعه: گیاه دارویی نعناع فلفلی). پژوهشet alکوشکی, های ترویج و آموزش کشاورزی, ۲۰۲۰. ۱۳(۱).

۱۲. Younessi-Hamzekhanlu, M., et al., Ethnopharmacological study of medicinal plants from Khoy city of West Azerbaijan-Iran. 2020.

۱۳. Yang, L., et al., The influence of gut microbiota on the rheological characterization of soy hull polysaccharide and mucin interactions. RSC Adv, 2020. **10**(5): p. 2830-2840.

.۱۴ Campieri, C., et al., Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration. Kidney Int, 2001. **60**(3): p. 1097-105.

.۱۵ Senn, V., et al., Microbial Colonization From the Fetus to Early Childhood-A Comprehensive Review. Front Cell Infect Microbiol, 2020. **10**: p. 573735.

.۱۶ Qian, Z., et al., Antibacterial Activity of Lactobacillus Strains Isolated from Mongolian Yogurt against Gardnerella vaginalis. Biomed Res Int, 2020. **2020**: p. 3548618.

.۱۷ Parte, A.C., et al., List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. Int J Syst Evol Microbiol, 2020. **70**(11): p. 5607-5612.

.۱۸ Assimos, D.G., Re: Metabolomic Profiling of Oxalate-Degrading Probiotic Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus gasseri. J Urol, 2020. **203**(2): p. 247-248.

.۱۹ Afkari, R., et al., Simultaneous use of oxalate-degrading bacteria and herbal extract to reduce the urinary oxalate in a rat model: A new strategy .Int Braz J Urol, 2019. **45**(6): p. 1249-1259.

.۲۰ Gupta, S. and S. Kanwar, Phyto-molecules for Kidney Stones Treatment and Management. Biochem. Anal. Biochem., 2018. **7**: p. 362.

.۲۱ Neuhaus, T.J., et al., Urinary oxalate excretion in urolithiasis and nephrocalcinosis. Arch Dis Child, 2000. **82**(4): p. 322-6.

.۲۲ Batagello, C.A., M. Monga, and A.W. Miller, Calcium Oxalate Urolithiasis: A Case of Missing Microbes? J Endourol, 2018. **32**(11): p. 995-1005.

.۲۳ von Unruh, G.E., et al., Reference range for gastrointestinal oxalate absorption measured with a standardized [13C2]oxalate absorption test. J Urol, 2003. **169**(2): p. 687-90.

.۲۴ Abouloifa, H., et al., The prebiotics (Fructo-oligosaccharides and Xylo-oligosaccharides) modulate the probiotic properties of Lactiplantibacillus and Levilactobacillus strains isolated from traditional fermented olive. World J Microbiol Biotechnol, 2020. **36**(12): p. 185.

.۲۵ Al, K.F., et al., Oxalate-Degrading Bacillus subtilis Mitigates Urolithiasis in a Drosophila melanogaster Model. mSphere, 2020. **5**(5.)

.۲۶ عیدی, et al) تاثیر عصاره هیدروالکلی کاکل ذرت Zea mays L. بر جلوگیری از تشکیل سنگ های کلیوی اگزالات .) کلسیمی در موش های آزمایشگاهی. دانش زیستی ایران. ۴(۲): p. 51-57.

.۲۷ Lieske, J.C.J.A.o.T.M., Probiotics for prevention of urinary stones. 2016, 2016. **5**(2): p. 3.

.۲۸ Meiouet, F., S. El Kabbaj, and M. Daudon, Pediatric urolithiasis in Morocco: Composition of 432 urinary calculi analyzed by infrared spectroscopy. Prog Urol, 2019. **29**(3): p. 173-182.

.۲۹ Bahmani, M., et al., Identification of medicinal plants for the treatment of kidney and urinary stones. J Renal Inj Prev, 2016. **5**(3): p. 129-33.

.۳۰ Ticinesi, A., A. Nouvenne, and T. Meschi, Gut microbiome and kidney stone disease: not just an Oxalobacter story. Kidney Int, 2019 :(۱)۹۶ .p. 25-27.

.۳۱ Kaushik, J., et al., Response surface methodology based extraction of Tribulus terrestris leads to an upsurge of antilithiatic potential by inhibition of calcium oxalate crystallization processes. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0183218.

.۳۲ Akbari, F., et al., Protective Effect of Sankol Herbal Product on Kidney Stone in Balb/C

Mice. 2019. **29**(180): p. 1-7.

۳۳. Sinclair, A., et al., Lactobacillus probiotics in the prevention of diarrhea associated with Clostridium difficile: a systematic review and Bayesian hierarchical meta-analysis. CMAJ Open, 2016. **4**(4): p. E706-E718.

۳۴. Zhang, Z., et al., Roles and applications of probiotic Lactobacillus strains. Appl Microbiol Biotechnol, 2018. **102**(19): p. 8135-8143.

۳۵. Kwak, C., et al., Urinary oxalate levels and the enteric bacterium Oxalobacter formigenes in patients with calcium oxalate urolithiasis. Eur Urol, 2003. **44**(4): p. 475-81.

۳۶. Sasikumar, P., et al., Recombinant Lactobacillus plantarum expressing and secreting heterologous oxalate decarboxylase prevents renal calcium oxalate stone deposition in experimental rats. J Biomed Sci, 2014. **21**(1): p. 86.

۳۷. Goldfarb, D.S., F. Modersitzki, and J.R. Asplin, A randomized, controlled trial of lactic acid bacteria for idiopathic hyperoxaluria. Clin J Am Soc Nephrol, 2007. **2**(4): p. 745-9.

۳۸. Afkari, R., et al., Reducing urinary oxalate by simultaneous using Sankol herbal drop with oxalate-degrading bacteria. Iran J Microbiol, 2019. **11**(6): p. 460-467.

۳۹. Zhao, C., et al., Oxalate-Degrading Enzyme Recombined Lactic Acid Bacteria Strains Reduce Hyperoxaluria. Urology, 2018. **113**: p. 253 e1-253 e7.

۴۰. Okombo, J. and M. Liebman, Probiotic-induced reduction of gastrointestinal oxalate absorption in healthy subjects. Urol Res, 2010. **38**(3): p. 169-78.