

## بررسی اثر محافظت بخش تجویز لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در کاهش شدت عفونت ناشی از کاندیدا آلبیکنس در مدل موش BALB/c

فاطمه حجاری طاهری<sup>۱</sup>، محمدحسین یزدی<sup>۲</sup>، دکتر مهدی مهدوی<sup>۳</sup>، دکتر محمدعلی شکرگزار<sup>۴</sup>،  
دکتر منصور بیات<sup>۵</sup>، دکتر محسن ابوالحسنی<sup>۶\*</sup>

تاریخ دریافت: 1391/06/22 تاریخ پذیرش: 1391/09/25

### چکیده

**پیش زمینه و هدف:** کاندیدیازیس یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های قارچی فرصت طلب در انسان می‌باشد. پروبیوتیک‌ها باکتری‌های مفید هستند و مطالعات متعددی نشان داده است که اثرات ایمونومدولاتوری وسیعی در طیفی از بیماری‌ها دارند. در این پژوهش اثر محافظت بخش تجویز لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در کاهش شدت عفونت ناشی از کاندیدا آلبیکنس در مدل موش BALB/c مورد بررسی قرار می‌گیرند.

**مواد و روش کار:** تجویز روزانه پروبیوتیک‌ها ( $2/4 \times 10^8$  باکتری) در موش‌های Balb/c به مدت یکماه از طریق دهان صورت گرفت و سپس موش‌ها توسط  $2 \times 10^6$  سلول کاندیدا آلبیکنس از طریق دم آلوده شدند. موش‌های آلوده دوباره به مدت ۲ هفته روزانه پروبیوتیک داده شد و پس از کشتن موش‌ها، سلول‌های طحال جدا و در حضور مایتوزن فیتوهمگلوتینین کشت داده شدند. در محیط کشت سلول، میزان سایتوکاین‌های IL-4، IL-12، TGF- $\beta$  و IFN- $\gamma$  توسط ELISA مورد سنجش قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان می‌دهند که تنها در گروه دریافت کننده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس میزان IL-4 و IL-12 افزایش داشته در حالیکه میزان TGF- $\beta$  در کلیه موش‌های عفونی افزایش پیدا نمود. نتایج همچنین نشان می‌دهند که با دوزهای به کار رفته، پروبیوتیک‌ها توانایی افزایش تکثیر سلول‌های لنفوسیتی و افزایش بقای موش‌ها را ندارند.

**بحث و نتیجه گیری:** یافته‌ها نشان می‌دهند که در مدل موشی با دوزهای به کار رفته پروبیوتیک‌ها به عنوان یک عامل پیشگیری کننده موثر هستند ولی از نظر ایمونولوژیک برای درمان از کارایی لازم جهت مقابله با عفونت کاندیدا آلبیکنس برخوردار نمی‌باشند.

**کلید واژگان:** پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، کاندیدا آلبیکنس

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره هفتم، ص ۷۹۱-۷۸۴، ویژه‌نامه اسفند ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه هیبریدوما، بخش ایمونولوژی، خیابان پاستور، تهران ۱۳۱۶۴. تلفن و فکس: ۶۶۴۹۲۵۹۶

Email: mabolhassani@yahoo.com

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد سلولی ملکولی، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه هیبریدوما، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، حصارک، تهران

<sup>۲</sup> دانشجوی دکترا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده دارو سازی

<sup>۳</sup> استادیار ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران، بخش ویروس شناسی

<sup>۴</sup> دانشیار بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، بخش بانک سلولی

<sup>۵</sup> دانشیار قارچ شناسی، دانشکده علوم دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، حصارک، تهران

<sup>۶</sup> استاد ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه هیبریدوما، بخش ایمونولوژی

## مقدمه

کاندیدا آلبیکنس عضوی از فلور نرمال بسیاری از پستانداران می‌باشد (۱). نقص در سیستم ایمنی ممکن است مادرزادی یا اکتسابی باشد که منجر به رشد بیش از اندازه جمعیت کاندیدا آلبیکنس در مجاری گوارشی شده و کاندیدیازیس مخاطی و یا سیستمیک ایجاد می‌نماید (۲، ۳). به دلیل افزایش درمان‌های سرکوب کننده سیستم ایمنی در انواع سرطان‌ها عفونت‌های ناشی از کاندیدا آلبیکنس افزایش قابل توجهی داشته (۴). در ایالات متحده آمریکا گونه کاندیدا چهارمین علت عفونت‌های بیمارستانی بوده و حدود ۲۵ تا ۵۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی را در بخش مراقبت‌های ویژه و ۸ تا ۱۵ درصد کل عفونت‌های بیمارستانی را تشکیل می‌دهد (۵).

مطالعات بیشماری کارآمدی پروبیوتیک‌ها را در پیشگیری و درمان عفونت‌های کاندیدا آلبیکنس بررسی کرده‌اند (۶-۹) و مطالعات روی حیوانات آزمایشگاهی نیز مفید بودن پروبیوتیک‌ها را در پیشگیری از کاندیدیازیس نشان داده‌اند (۷).

پروبیوتیک‌ها در حقیقت باکتری‌های مفید دستگاه گوارش هستند که با ایجاد تعادل بین سیستم ایمنی و دستگاه گوارش اثرات سودمندی بر سلامت میزبان دارند (۱۰). بنا بر تعریف سازمان بهداشت جهانی پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف کافی آن‌ها بر سلامت میزبان اثرات سودمندی دارد (۱۱). این میکروارگانیسم‌ها خواص ایمنومودولاتوری داشته و روی سیستم ایمنی اثرات تحریک‌کنندگی و تقویت‌کنندگی بر جا می‌گذارند (۱۲). لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکترها شایع‌ترین پروبیوتیک‌های مورد استفاده در صنایع لبنی می‌باشند. مطالعات گذشته نشان می‌دهند که نژادهای مختلف لاکتوباسیلوس‌ها در افزایش بقا و کاهش استقرار کاندیدا آلبیکنس تاثیر به سزایی دارد (۱۳، ۱۴). در این مطالعه اثر محافظت بخش تجویز لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در کاهش شدت عفونت ناشی از کاندیدا آلبیکنس در مدل موش BALB/c مورد بررسی قرار می‌گیرد.

## مواد و روش کار

حیوانات آزمایشگاهی: تعداد ۴۰ سر موش BALB/c (۶ تا ۸ هفته‌ای ماده) از انستیتو پاستور ایران تهیه و در شرایط استاندارد نگهداری حیوانات آزمایشگاهی (۱۲/۱۲) روشنایی تاریکی، آب و غذا در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

میکروارگانیسم: نژاد کاندیدا آلبیکنس از بخش فارچ شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در شرایط استریل در محیط سابرودکستروز آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸

ساعت کشت داده شد. برای حصول اطمینان از سوش مورد نظر، آزمایشات افتراقی نظیر کشت در محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰ (سیگما، آلمان) و کشت در سرم انجام گردید.

گروه‌ها و روش تجویز پروبیوتیک: دو نژاد استاندارد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC4356 و لاکتوباسیلوس کازئی زیر گونه کازئی ATCC29292 از کلکسیون فارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و بیماریزای ایران خریداری و در محیط MRS-agar شرکت Merck آلمان به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. برای به دست آوردن رقت مناسب تجویز، کلنی‌های رشد کرده را در ۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به صورت سوسپانسیون درآورده و سپس یک میکرولیتر آنرا را به لوله بعدی که حاوی ۹۹۹ میکرولیتر PBS بود انتقال دادیم و به این ترتیب سوسپانسیون اصلی را  $10^3$  بار رقیق نمودیم. این عمل را دوباره تکرار کرده و رقت  $10^3$  را  $10^4$  و  $10^5$  بار رقیق‌تر نمودیم و سپس  $10^6$  میکرولیتر آنرا (رقت  $10^6$ ) را روی محیط آگار ریخته و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت دادیم. تعداد کلنی‌های رشد کرده ۲۴۰ عدد بود که معادل  $2/4 \times 10^8$  باکتری در نظر گرفته شد. روزانه نیم میلی لیتر از این محلول با استفاده از سوزن مخصوص گاواژ به موش‌ها خوراندند، به جز گروه کنترل که به میزان مساوی PBS دریافت کردند.

در این مطالعه، چهار گروه ۱۰ تایی موش انتخاب شدند. سی روز قبل از تزریق کاندیدا آلبیکنس، به گروه اول لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، به گروه دوم لاکتوباسیلوس کازئی، و به گروه‌های سوم و چهارم به عنوان کنترل PBS تزریق گردید. سه روز بعد از تزریق کاندیدا آلبیکنس به موش‌های گروه اول، دوم و سوم، به موش‌های گروه اول و دوم به مدت ۷ روز پروبیوتیک داده شد و پس از یک روز وقفه دو باره ۷ روز پروبیوتیک به آن‌ها داده شد. گروه‌های سوم و چهارم فقط PBS دریافت نمودند.

عفونی نمودن موش‌ها با کاندیدا آلبیکنس و تهیه لام پاتولوژیک احشای موش‌های آلوده: مخمر کشت داده شده در PBS به صورت سوسپانسیون درآورده شد و پس از دو بار شستشو با PBS توسط لام نئوبار شمارش گردید. سپس رقت مورد نظر تهیه شد و  $2 \times 10^6$  سلول در حجم ۲۰۰ میکرولیتر به صورت درون رگی از طریق دم تزریق گردید (۱۵). هفت روز پس از تزریق، دو موش از هر گروه نخاعی شده و احشا آن‌ها (طحال و کلیه) از نظر عفونت کاندیدا آلبیکنس مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین از هر عضوی یک نمونه در فرمالین ۱۰ درصد فیکس گردید و برای تشخیص پاتولوژیک به آزمایشگاه پاتولوژی انستیتو پاستور ایران ارسال شد و وجود مخمر هم در طحال و هم در کلیه مورد تأیید قرار گرفت.

کاندیدیازیس نگهداری کرده و روزانه مرگ ومیر آنها را ثبت نمودیم.

آنالیز آماری: به منظور کم بودن حجم نمونه، داده‌ها با روش Non-parametric و با آنالیز Mann Whitney با نرم افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ آنالیز گردید. حدود اطمینان ۹۵٪ و عدد P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

عفونی نمودن موش‌ها: هفت روز پس از تزریق وریدی مخمر، کشت بافت‌های طحال و کلیه از نظر عفونت به کاندیدا مثبت بود (نمودار یک A و B) و لام‌های پاتولوژیک نیز حضور مخمر را اثبات کردند (C و D).

بررسی تکثیر لئفوسیت‌های طحال در حضور PHA: پس از تحریک لئفوسیت‌ها با PHA، تکثیر سلول‌های طحال توسط تست MTT مشخص گردید. همانطور که نمودار ۲ نشان می‌دهد پروبیوتیک‌ها با مقدار به کار رفته و مدت زمان تجویز قادر به افزایش تکثیر در هیچ‌یک از گروه‌های مورد آزمایش نبودند. بررسی سطح سایتوکاین‌های IL-4، IL-12 FN- $\gamma$  و TGF- $\beta$  در سوپرناتانت کشت لئفوسیت‌های طحال:

برای تعیین نقش لاکتوباسیل‌ها در الگوی تولید سایتوکاین‌ها در موش‌های مبتلا به عفونت سیستمیک کاندیدا آلبیکنس سلول‌های طحال در حضور PHA به مدت ۷۲ ساعت تحریک شده و پس از آن مقدار تولید سایتوکاین‌های مذکور با تست الایزا سنجیده شد. همانطور که در نمودار ۳A دیده می‌شود، در موش‌های گیرنده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس میزان IL-12 به طور معناداری افزایش نشان می‌دهد. در هر سه گروه موش‌های مبتلا به عفونت کاندیدا میزان IL-4 افزایش داشت ولی این افزایش تنها در گروه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس معنادار بود (نمودار ۳B). در تمامی گروه‌های مبتلا به عفونت کاندیدا با مقایسه با گروه کنترل میزان TGF- $\beta$  افزایش معناداری نشان داد (نمودار ۳C) و میزان IFN- $\gamma$  در هیچ‌یک از گروه‌ها اختلاف معنی داری نشان نداد (نمودار ۳D).

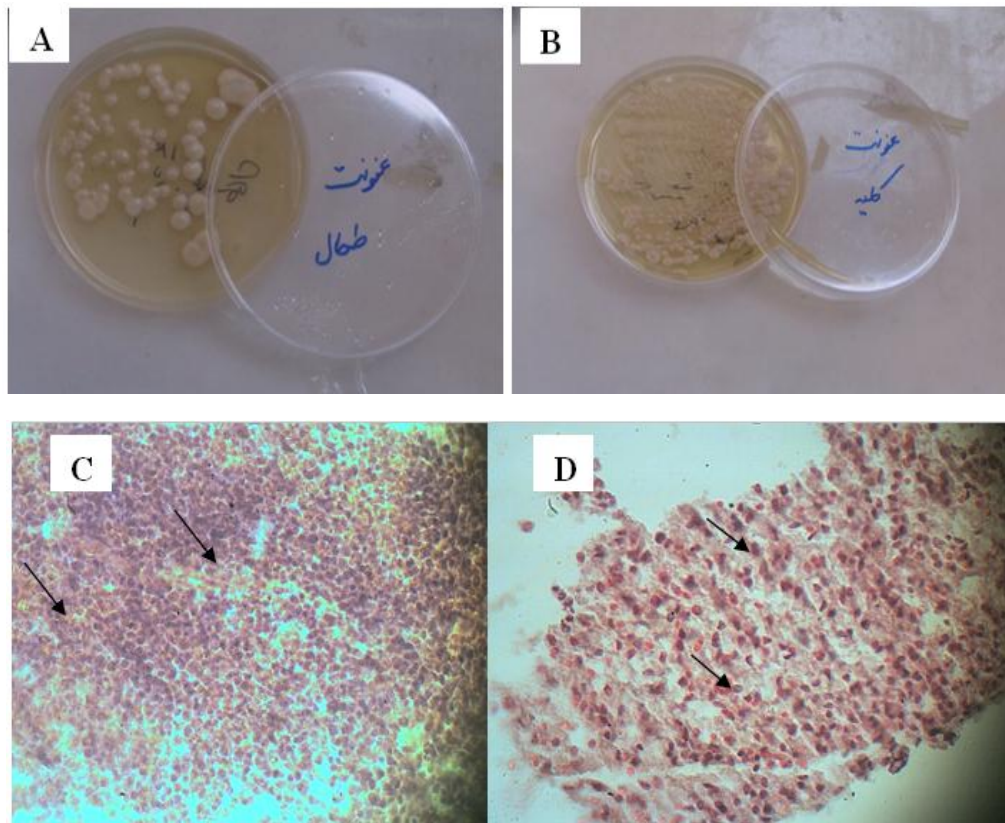
بررسی طول عمر موش‌ها: نتایج بررسی طول عمر نشان داد که موش‌های که پروبیوتیک دریافت کرده بودند تفاوت معنی داری از نظر طول عمر نسبت به موش‌های که فقط کاندیدا دریافت نموده بودند نداشتند.

تهیه کشت سلول‌های طحال: ۱۴ روز بعد از تزریق کاندیدا آلبیکنس، از هر گروه ۴ موش را نخاعی کرده و تحت شرایط استریل طحال را خارج کرده و از آن سوسپانسیون سلولی تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه و دردمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور  $300 \times g$  سانتریفیوژ شد. به رسوب سلولی ۵ میلی لیتر بافر لیزکننده سلول‌های قرمز خون (RBC) اضافه شد و پس از ۵ دقیقه با اضافه نمودن PBS سرد سلول‌ها از شوک لیز خارج و طبق روش قبل سانتریفیوژ شدند. سپس سلول‌ها در محیط RPMI (سیگما، آلمان) شمارش شدند و پس از افزودن سرم جنینی گوساله (سیگما، آلمان)،  $5 \times 10^6$  سلول در میلی لیتر تهیه شد و به هر خانه پلیت ۲۴ خانه‌ای ۲ میلی لیتر از آن که حاوی  $1 \times 10^7$  سلول بود تقسیم گردید و با ۵ میکروگرم در میلی لیتر فیتوهمگلونیتین (PHA) به مدت ۶۰ ساعت تحریک شدند.

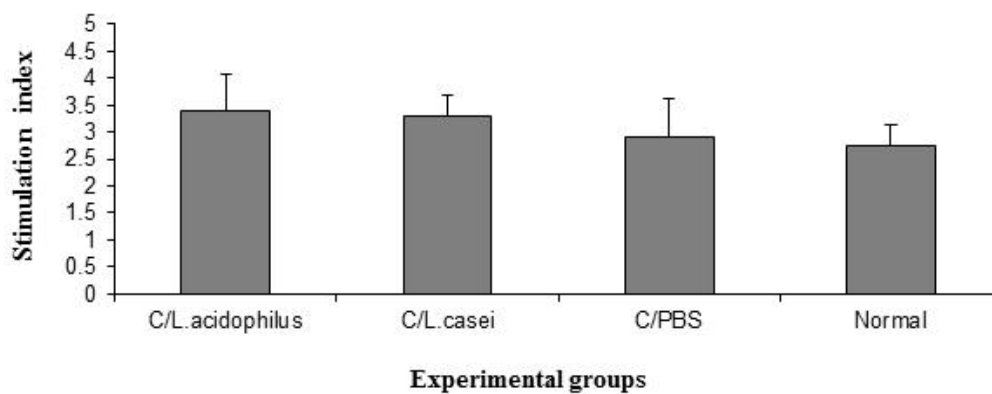
بررسی تکثیر سلول‌های ایمنی طحال پس از تحریک با PHA 3-4,5 dimethylthiazol-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT): پس از تهیه کشت سلول طحال سوسپانسیون به میزان یک میلیون سلول در میلی لیتر تهیه شد و در دیش‌های ۹۶ خانه‌ای مسطح ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته و سپس ۵ میکروگرم در میلی لیتر PHA اضافه شد و حجم نهایی چاهک‌ها را با محیط RPMI کامل به ۲۰۰ میکرو لیتر رساندیم. دیش‌ها را به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه و در مجاورت با  $CO_2$  کشت دادیم. پس از ۷۲ ساعت، به هر چاهک ۲۵ میکرولیتر ماده MTT اضافه کرده و ۴ ساعت دیگر آنرا کشت دادیم، پس از این مدت به همه چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر ماده دای متیل سولفوکساید (DMSO) (سیگما، آلمان) اضافه شد و جذب آنرا در طول موج ۵۷۰ nm اندازه گرفتیم و اندیکس تحریکی سلول‌های تحریک شده به تحریک نشده محاسبه شد (۱۶).

بررسی میزان IL-4، IFN- $\gamma$ ، TGF- $\beta$  و سوپرناتانت کشت طحال: مایع رویی کشت سلول‌های طحال پس از ۶۰ ساعت جمع‌آوری شدند و میزان تولید سایتوکاین‌های مذکور با روش ELISA و با استفاده از کیت سنجش سایتوکاین کمپانی R&D System (Minneapolis, Mn, USA) مورد بررسی قرار گرفتند.

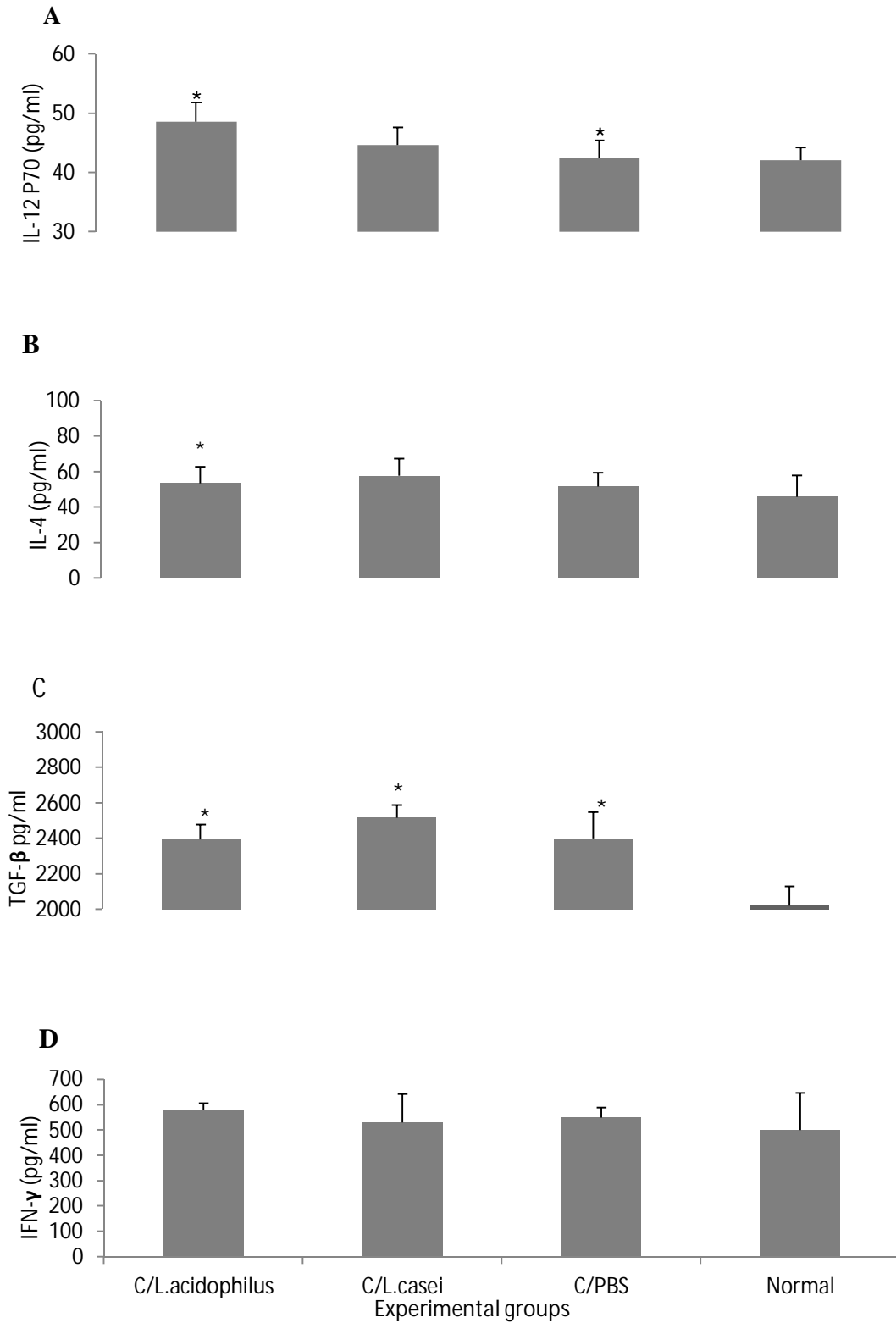
بررسی طول عمر موش‌ها: تعداد ۴ موش از هر گروه را بعد از پایان دوره تجویز پروبیوتیک تا روز مرگ طبیعی در اثر عفونت



**نمودار شماره (۱):** بررسی عفونت کاندیدا آلبیکنس در بافت کلیه و طحال موش آلوده. ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمر (۱۰۶×۲ سلول) به ورید دم موش تزریق گردید و ۷ روز پس از تزریق، بافت کلیه و طحال کشت داده شد (A و B). همچنین لام پاتولوژیک برای تأیید عفونت کاندیدا آلبیکنس تهیه گردید (C لام کلیه و D لام طحال). فلش وجود کاندیدا را نشان می‌دهد.



**نمودار شماره (۲):** بررسی تکثیر لنفوسیت‌های طحال پس از تحریک با PHA. سلول‌های طحال را در دیش ۹۶ خانه‌ای مسطح با ۵ میکروگرم در میلی لیتر PHA تحریک نموده و پس از ۷۲ ساعت کشت در دمای ۳۷ درجه، میزان تکثیر سلولی با روش MTT در طول موج 570 nm اندازه گرفته شد (C معرف عفونت کاندیدا می‌باشد). در این آزمایش میزان تکثیر سلولی در گروه‌های مختلف تفاوت معنی داری با هم نداشتند.



**نمودار شماره (۳):** بررسی میزان سایتوکاین های  $TGF-\beta$ , IL-4, IL-12 FN- $\gamma$  در سوپرناتانت کشت لنفوسیت های طحال موش BALB/c. سلول های طحال با ۵ میکروگرم در میلی لیتر PHA تحریک شدند و پس از ۷۲ ساعت کشت در دمای ۳۷ درجه، میزان سایتوکاین های مذکور با ELISA اندازه گیری شد. \* افزایش معنی دار میزان IL-12, IL-4 و  $TGF-\beta$  را در گروه های مختلف نشان می دهد.

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه یافته‌ها نشان می‌دهند که از میان دو سوش لاکتوباسیلوس، تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌تواند موجب تحریک ترشح IL-12 در لنفوسیت‌های طحال موش‌های مبتلا به عفونت سیستمیک کاندیدا آلبیکنس گردد. IL-12 از جمله سایتوکاینهائی است که بیشتر توسط سلول‌های عرضه کننده آنتیژن مانند ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک ترشح می‌شود و یکی از عوامل دخیل در تقویت پاسخ ایمنی سلولی می‌باشد که نقش عمده‌ای در تمایز سلول‌های لنفوسیتی Th0 به سمت Th1 ایفا می‌کند (۱۷). از طرفی IL-12 می‌تواند به فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (سلول‌های NK) نیز کمک کند و در واقع به عنوان یک عامل تحریک کننده برای این سلول‌ها مطرح باشد (۱۸). از آنجا که سلول‌های کشنده طبیعی اولین خط دفاعی بدن در مقابله با عفونت و تومور می‌باشند لذا تقویت آن‌ها می‌تواند منجر به پیش آگهی بهتر در بیماران گردد. برخی مطالعات انجام شده روی لاکتوباسیلوس‌ها به خصوص یک سوش خاص از لاکتوباسیلوس کارژی شیروتا نیز نشان دهنده افزایش میزان IL-12 در تجویز این گونه از پروبیوتیک در مدل موشی و به تبع آن تقویت عملکرد سلول‌های کشنده طبیعی می‌باشد (۱۹). با توجه به اختصاصی بودن الگوی القای سایتوکاینی توسط لاکتوباسیلوس‌ها می‌توانیم لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تجویز شده در این مطالعه را نیز به عنوان یک تحریک کننده تولید سایتوکاین IL-12 معرفی کنیم.

IFN- $\gamma$  توسط سلول‌های کشنده طبیعی، سلول‌های Th1 و دندریتیک ترشح می‌شوند و دارای خواص تنظیم کننده ایمنی، ضد ویروسی و ضد توموری می‌باشد. در مورد عملکرد این سایتوکاین می‌توان گفت که در واقع IFN- $\gamma$  مهم‌ترین سایتوکاین مربوط به سلول‌های Th1 است که موجب تقویت عملکرد عرضه توسط ماکروفاژها و همچنین مانند IL-12 موجب تقویت عملکرد سلول‌های کشنده طبیعی می‌شوند (۲۰). IFN- $\gamma$  در سرکوب فعالیت سلول‌های Th2 و افزایش بیان مارکرهای سطحی اتصال برای مهاجرت لنفوسیت‌ها نیز نقش دارد. IL-4 سایتوکاین تنظیمی است و با فعالسازی لنفوسیت‌های Th2 ارتباط داشته و نقش مهمی در کنترل رشد و تعدیل پاسخ ایمنی بازی می‌کند. این سایتوکاین عملکرد آنتاگونیستی نسبت به IFN- $\gamma$  دارد و به نظر می‌رسد دارای خصوصیت ضد التهابی باشد. نتایج ما در اندازه گیری IFN- $\gamma$  افزایش معناداری را در هیچیک از گروه‌های مورد آزمایش نشان نداد و در مورد IL-4 افزایش معناداری را در گروه موش‌های عفونی دریافت کننده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

مشاهده کردیم که دلیلی دیگر بر ناتوان بودن پروبیوتیک‌ها در شرایط حاد می‌باشد.

در این مطالعه میزان TGF- $\beta$  نیز که از جمله سایتوکاین‌های مربوط به Th2 است در گروه گیرنده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کارژی نسبت به گروه کنترل در موش‌های مبتلا به عفونت افزایش داشت که با توجه به نقش این سایتوکاین در سرکوب سیستم ایمنی و القا تولرانس یا تحمل ایمونولوژیک می‌توان به بدتر شدن پیش آگهی در موش‌های مبتلا به عفونت اشاره کرد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، مطالعات متعدد دیگری نشان‌دهنده نقش حفاظتی پروبیوتیک‌ها در کاهش رشد کاندیدا آلبیکنس می‌باشد. این تضاد به دلیل محدودیت‌های است که در این مطالعه با آن مواجه شدیم. کاندیدایزیس یک بیماری بسیار خطرناک می‌باشد که به داروهای موجود مقاومت نشان می‌دهد و اخیراً کاربرد پروبیوتیک‌ها امیدوار کننده هستند. در مطالعه اخیر، برای ایجاد عفونت سیستمیک نیاز به تزریق زیاد کاندیدا بود که حیوان نمی‌تواند بیش از دو هفته زنده بماند. در نتیجه ما نمی‌توانیم اثر بخشی پروبیوتیک‌ها را با دوز خوراکی در کوتاه مدت ببینیم و امکان زنده ماندن موش‌ها نیز تحت این شرایط امکان پذیر نمی‌باشد. مطالعات دیگر یا در *in vitro* صورت گرفته و یا اینکه عفونت از راه خوراکی بوده که عفونت سیستمیک بر خلاف مطالعه ما ایجاد نشده. این مطالعات نشان‌دادند که تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به موش حاوی تومور پستان باعث افزایش IL-12 و کاهش TGF- $\beta$  در کشت طحال می‌شود و در نتیجه اندازه تومور کاهش میابد (۲۱). همچنین، پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و رامنوسوس (*rhamnosus*) استقرار کاندیدا آلبیکنس را در موکوس دهانی موش ایمونوسپرس DBA/2 کاهش می‌دهند (۲۲) و هشت نژاد لاکتوباسیلوس تجاری از رشد کاندیدا آلبیکنس جلوگیری کرده و مانع رشد موتان استرپتوکوکسی دهانی می‌شوند (۲۳). پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس روتری (*reuteri* RC-14) و رامنوسوس (*rhamnosus* GR-1) به عنوان ادجوانت در درمان زنان آلوده به کاندیدای دستگاه تناسلی بکار می‌روند و مطالعه اخیر *in vitro* نشان می‌دهد که ایندو پروبیوتیک به تنهایی یا ترکیبی باعث کاهش آلودگی کاندیدا آلبیکنس لاین سلولی اپیتلیال دستگاه تناسلی زنان (VK2/E6E7) می‌شوند. این کاهش رشد به دلیل افزایش ترشح IL-8 و IP-10 توسط لاین سلولی می‌باشد (۲۴).

مطالعه اخیر دیگر نشان می‌دهد که افزودن لاکتوباسیلوس کارژی (CRL 431) به رژیم غذایی موش باعث مقاومت آن‌ها در

می‌کند، مانع تشکیل هایفه شده و چسبندگی کاندیدا و تشکیل بیوفیلم را کاهش می‌دهد (۲۶).

گرچه پروبیوتیک‌ها به عنوان یک عامل پیشگیری کننده در بسیاری از بیماری‌ها نقش دارند اما از قدرت کافی برای مقابله با شرایط حاد و سختی چون عفونت سیستمیک کاندیدیازیس برخوردار نیستند و بهتر است از آن‌ها به عنوان یک عامل پیشگیری کننده استفاده شود تا عامل درمانی. بررسی اثر دو پروبیوتیک بر میزان تکثیر سلول‌های ایمنی در طحال موش‌های گیرنده پروبیوتیک‌های مذکور هیچگونه افزایشی را نشان نداد. همچنین، این دو پروبیوتیک تاثیری در افزایش طول عمر موش‌های آلوده به کاندیدا آلبیکنس را نیز نداشتند که به دلیل عفونت سیستمیک و عدم فرصت مناسب برای اثر بخشی پروبیوتیک‌ها می‌باشد.

برابر عفونت کاندیدا آلبوکنس می‌شود (۲۵). موش‌های که تغذیه نامناسب داشتند وقتی به غذای آن‌ها پروبیوتیک اضافه شود طول عمر و مقاومت آن‌ها علیه عفونت کاندیدا، که از طریق صفاق صورت گرفته بود، با مقایسه با گروه تغذیه نامناسب و یا مناسب افزایش پیدا می‌کند و میزان  $IL-6$  و  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$  نیز در خون آن‌ها افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد لاکتوباسیلوس کارژی باعث تقویت سیستم ایمنی می‌گردد (۲۵).

اثر محافظت بخشی پروبیوتیک‌ها نه تنها به دلیل افزایش سایتوکاین است بلکه به دلیل ترشح بعضی از فاکتورهای مفید مانند فنیل اتانل، اسید کاپروئیک، اسید کاپریلیک و اسید کاپریک می‌باشد (۲۶). اخیراً گزارش شده که پروبیوتیک ساکارومیسس بولاردی (*boulardii*) با ترشح اسید کاپریک فاکتور ویرولاتس کاندیدا آلبوکنس را کاهش می‌دهد، از رشد قارچ جلوگیری

## References:

- Odds F.C. Ecology and epidemiology of Candida. 1979, Baltimore: University Park Press.
- Epstein J.B, Truelove K, Izutzu L. Oral candidiasis: pathogenesis and host defense. Rev. Infect Dis 1984; 6: 96-106.
- Meunier-Carpentier F, Kiehn TE, Armstrong D. Fungemia in the immunocompromised host. Am. J. Med 1981; 71: 363-370.
- Pagano L, Mele L, Fianchi L, Melillo L, Martino B, D'Antonio D, et al. Chronic disseminated candidiasis in patients with hematologic malignancies. Clinical features and outcome of 29 episodes. Haematologica 2002; 87(5): 535-41.
- Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in the United States hospitals: three years analysis. Clinical Infectious Disease 1999; 29: 239-244.
- Berg R, Bernasconi P, Fowler D, Gautreaux M. Inhibition of Candida albicans translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of Saccharomyces boulardii. J Infect Dis 1993; 168: 1314-1318.
- De Petrino SF, Maria E, De Jorrat, Meson O, Perdign G. Protective ability of certain lactic acid bacteria against an infection with Candida albicans in a mouse immunosuppression model by corticoid. Food Agric Immunol 1995; 7: 365-373.
- Hilton E, Isenberg HD, Alperstein P, France K, Borenstein MT. Ingestion of yogurt containing Lactobacillus acidophilus as prophylaxis for candidal vaginitis. Ann Intern Med 1992; 116: 353-357.
- Satonaka K, Ohashi K, Nohmi T, Yamamoto T, Abe S, Uchida K et al. Prophylactic effect of Enterococcus faecalis FK-23 preparation on experimental candidiasis in mice. Microbiol Immunol 1996; 40: 217-222.
- Drisko JA, Giles CK, Bischoff BJ. Probiotics in Health Maintenance and Disease Prevention. Alternative Medicine Review 2003; 8: 144-157.
- FAO/WHO Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Cordoba Argentina 2001; 19-20.
- Perdigón G, Fuller R, Raya R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. Curr Issues Intest Microbiol 2001; 2(1): 27-42.
- Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Farmer J, Roberts L et al. Biotherapeutic effects

- of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun* 1997; 65(10): 4165-72.
14. Wagner RD, Warner T, Pierson C, Roberts L, Farmer J, Dohnalek M et al. Biotherapeutic effects of *Bifidobacterium* spp. on orogastric and systemic candidiasis in immunodeficient mice. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15(4): 265-70.
  15. Elahi S, Pang G, Ashman R, Clancy R. Enhanced clearance of *Candida albicans* from the oral cavities of mice following oral administration of *Lactobacillus acidophilus*. *Clin Exp Immunol* 2005; 141(1): 29-36.
  16. Kirjavainen PV, El-Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright PF. The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 26(2): 131-5.
  17. Trinchieri, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 1994; 84(12): 4008-27.
  18. Shida K, Suzuki T, Kiyoshima-Shibata J, Shimada S, Nanno M. Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokines and augment natural killer cell activity. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13(9): 997-1003.
  19. Takeda K, Suzuki T, Shimada SI, Shida K, Nanno M, Okumura K. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin Exp Immunol* 2006; 146(1): 109-15.
  20. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 189-220.
  21. Yazdi MH, Soltan Dallal MM, Hassan ZM, Holakuyee M, Agha Amiri S, Abolhassani M et al. Oral administration of *Lactobacillus acidophilus* induces IL-12 production in spleen cell culture of BALB/c mice bearing transplanted breast tumour. *Br J Nutr* 2010; 104(2): 227-32.
  22. Matsubara V, Silva E, Paula C, Ishikawa K, Nakamae A. Treatment with probiotics in experimental oral colonization by *Candida albicans* in murine model (DBA/2). *Oral Dis*. 2011 Oct 11. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01868.x. (Epub ahead of print)
  23. Hasslöf P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Growth inhibition of oral mutants streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli-an in vitro study. *BMC Oral Health*. 2010;10: 18.
  24. Martinez RC, Seney SL, Summers KL, Nomizo A, De Martinis EC, Reid G. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 on the ability of *Candida albicans* to infect cells and induce inflammation. *Microbiol Immunol*. 2009;53(9): 487-95.
  25. Villena J, Salva S, Agüero G, Alvarez S. Immunomodulatory and protective effect of probiotic *Lactobacillus casei* against *Candida albicans* infection in malnourished mice. *Microbiol Immunol*. 2011 55(6): 434-45.
  26. Murzyn A, Krasowska A, Stefanowicz P, Dziadkowiec D, Łukaszewicz M. Capric acid secreted by *S. boulardii* inhibits *C. albicans* filamentous growth, adhesion and biofilm formation. *PLoS One*. 2010; 5(8): e12050.