



## تأثیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی بهبود گاستریت معده ناشی از عفونت هلیکوباکتر

### پیلوری در مدل موشی C57BL/6

بهنوش عسگری<sup>۱</sup>، فاطمه کرمانیان<sup>۲</sup>، فرزاد خلیلی<sup>۳</sup>، زهرا روحانی نوجه ده سادات<sup>۴</sup>، سمیه یسلپانی فرد<sup>۵\*</sup>

۱- گروه میکروبیشناسی - دانشکده پزشکی - کمیته تحقیقات دانشجویی - دانشگاه علوم پزشکی البرز - کرج - ایران.

۲- گروه آناتومی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی البرز - کرج - ایران.

۳- گروه داخلی - بیمارستان شهید باهنر - دانشگاه علوم پزشکی البرز - کرج - ایران.

۴- تکنیسین بیهوشی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی البرز - کرج - ایران.

۵- گروه میکروبیشناسی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی البرز - کرج - ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۱۰

#### چکیده

**مقدمه:** هلیکوباکتر پیلوری (*H. Pylori*) یک پاتوژن گوارشی انسان است که دارای توانایی منحصر به فرد در کلونیزاسیون مخاط معده است و بیش از نیمی از جمعیت جهان را آلوده می‌کند. *H. pylori* منجر به گاستریت مزمن می‌شود و نقش آن در ایجاد بیماری زخم معده - سرطان معده و لنفوم‌های معده محسوب می‌شود. این باکتری عفونت‌های بسیار زیادی ایجاد می‌کند لذا افراد زیادی در سطح جهان آلوده به هلیکوباکتر پیلوری هستند. بدین منظور مطالعات زیادی در زمینه‌ی پیشگیری و درمان عفونت هلیکوباکتر پیلوری و بیماری‌های مرتبط با آن انجام می‌شود، که برای بررسی رژیم‌های دارویی مختلف از جمله پروبیوتیک‌ها وجود یک مدل حیوانی ضروری می‌باشد. در حال حاضر رژیم‌های درمانی متعددی برای درمان هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد و از آنجایی که مقاومت نسبت به ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها علیه سوش هلیکوباکتر پیلوری در کشورهای در حال توسعه مثل ایران بسیار زیاد است در این مطالعه از پروبیوتیک‌ها و داروهای غیرآنتی‌بیوتیکی برای کاهش التهاب و عفونت استفاده کرده زیرا امروزه نقش پروبیوتیک‌ها برای کاهش عفونت‌های معده‌ای به‌عنوان مسیر کمکی در کنار داروهای دیگر به اثبات رسیده است.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق موش‌های مورد مطالعه ۴ هفته بعد از آخرین القای عفونت با سویه استاندارد هلیکوباکتر پیلوری (ATCC ۴۳۵۰۴) و تلاش‌های مکرر آلوده شدند و در نهایت این سویه در معده موش‌ها C57BL/6 کلونیزه شد و این کلونیزاسیون با روش PCR نیز مورد تأیید قرار گرفت. بعد از القای عفونت، موش‌ها جهت روش درمانی طراحی شده گروه‌بندی شدند و در هر گروه ۱۰ حیوان مورد بررسی قرار گرفت. ۱۴ روز بعد از پایان درمان پاسخ به درمان از طریق آزمایش تعیین آنتی ژن مدفوعی هلیکوباکتر پیلوری (*h.pylori*) stool Ag و هستیوپاتولوژی (رنگ‌آمیزی بافت گیمسا و H&E) مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** یافته‌های حاصل از این بررسی نشان داد که در گروه‌های آلوده به عفونت بعد از درمان با لاکتوباسیلوس پلانتاروم کاهش التهاب و بهبودی حاصل شد و میزان ریشه‌کنی عفونت هلیکوباکتر پیلوری در گروه درمانی طراحی شده بعد از بررسی بافتی منجر به کاهش التهاب شد. در گروه کنترل نیز عفونت و التهاب بعد از درمان به‌طور چشمگیری کاهش یافت.

**نتیجه‌گیری:** برای کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی از پروبیوتیک‌ها از جمله لاکتوباسیلوس پلانتاروم برای بهبودی گاستریت معده ناشی از هلیکوباکتر پیلوری استفاده شد.

**واژه‌های کلیدی:** هلیکوباکتر پیلوری، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، گاستریت معده، هستیولوژی، C57BL/6.

\*نویسنده مسئول: کرج، میدان نبوت، انتهای بوعلی غربی، دپارتمان میکروبیشناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، تلفن: ۰۹۱۲۸۹۲۹۵۴۵، نمابر: ۰۴-۳۲۵۵۸۹۲۰  
Email: Syaslianifard@gmail.com

**ارجاع:** عسگری بهنوش، کرمانیان فاطمه، خلیلی فرزاد، روحانی نوجه ده سادات زهرا، یسلپانی فرد سمیه. تأثیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی بهبود گاستریت معده ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری در مدل موشی C57BL/6. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۷؛ ۱۳(۲): ۱۵-۲۱.

## مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی و مارپیچی است که عفونت حاصل از این باکتری، انتشار جهانی دارد و در تمام گروه‌های سنی وجود دارد. در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، شیوع در بالغین حدود ۸۵ درصد است. جداسازی و کشت این باکتری اولین بار توسط وارن و مارشال در سال ۱۹۸۳ انجام شد (۱). در سال ۱۹۹۴ سازمان بهداشت جهانی هلیکوباکتر پیلوری را به‌عنوان کارسینوژن نوع یک معرفی کرد (۲). عفونت *H.pylori* منجر به بیماری‌های گوارشی شدید از جمله التهاب معده، زخم‌های معده، آدنوکارسینومای معده و لنفومای معده‌ای سلول‌های B می‌شود (۳ و ۴). در حال حاضر رژیم‌های درمانی متنوع و حاوی ترکیبات آنتی‌میکروبیال متعددی برای درمان هلیکوباکترپیلوری مطرح هستند که از میان آنها (رژیم سه دارویی) شامل یک مهارکننده پمپ پروتون یا بیسموت و دو آنتی‌بیوتیک که معمولاً مترونیدازول، آموکسی‌سیلین، تتراسایکلین یا کلاریترومایسین است به‌کار می‌روند (۵). شواهد موجود نشان می‌دهد که در اکثر مواقع میزان ریشه‌کنی باکتری به کمک درمان‌های دوگانه و سه‌گانه به مدت ۲ هفته در صورت حساسیت باکتری مذکور به آنتی‌بیوتیک‌ها حدود ۸۵-۹۰٪ گزارش شده است. به‌طور عمده به‌دلیل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین وجود عوارض جانبی حاصل از آنتی‌بیوتیک‌ها (مانند تهوع، استفراغ، اسهال، بیوست، تب، سردرد و غیره) که، اگرچه به‌طور کلی خفیف، ممکن است منجر به ضعف بیمار و قطع درمان گردد (۶). لذا در این بررسی راه‌های درمانی متفاوت از جمله درمان‌های غیرآنتی‌بیوتیکی شامل درمان به کمک لاکتوباسیل‌ها به تنهایی یا به همراه داروهای غیرآنتی‌بیوتیکی دیگر را مورد بررسی قرار داده تا به‌دنبال آن مؤثرترین روش برای درمان و کاهش عفونت ایجاد شده توسط این باکتری را بیابیم. از طرفی برای مطالعات در زمینه رژیم‌های دارویی و فرآیندهای ایمن‌سازی مؤثر علیه این میکروارگانیسم وجود مدل‌های حیوانی موردنیاز است.

امروزه نقش پروبیوتیک‌ها در کنترل کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری در معده به‌عنوان یک مسیر الترناتیو مورد توجه دانشمندان جهان قرار گرفته است. براساس آزمایشات انجام شده پروبیوتیک‌ها با داشتن اسیدهای آلی و باکتریوسین‌ها که دارای خواص ضد میکروبی هستند می‌توانند از رشد هلیکوباکتر پیلوری ممانعت به‌عمل آورند. یکی از مهمترین گروه‌های باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس‌ها هستند. مطالعات انجام گرفته بر روی پروبیوتیک‌ها حاکی از آن است که آنها می‌توانند از توسعه بیماری جلوگیری به‌عمل آورند.

پروبیوتیک‌ها معمولاً میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که تأثیرات مفیدی از جمله جلوگیری از استقرار و رشد باکتری‌های پاتوژن را سبب می‌شوند (۷). استفاده از پروبیوتیک‌ها از طریق خوراکی به‌عنوان

میکروارگانیسم‌هایی که با عوامل میکروبی بیماری‌زا مقابله می‌کنند فرد را در برابر عوامل پاتوژن مصون می‌کند و می‌تواند کنار روش‌های درمانی مختلف مفید واقع شوند. مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها در درمان اختلالات معده روده‌ای از قبیل زخم‌های گوارشی و سرطان کولون در مطالعات گذشته سودمند بوده است. پروبیوتیک‌ها باعث بهبود در کولیت‌های تولید زخم شده و همچنین از ایجاد زخم‌های گوارشی به‌واسطه هلیکوباکتر پیلوری ممانعت به‌عمل می‌آورند (۸-۱۰). علاوه بر این، شواهد افزایشی وجود دارد که نشان می‌دهد *L. plantarum* دارای فعالیت ضد هلیکوباکتر است و اثرات تعدیل‌کننده‌ای بر سیستم ایمنی دارد. قابل ذکر است که *L. plantarum* تحمل‌کننده ی اسید و محیط صفراوی است، و حین عبور از دستگاه گوارش می‌تواند زنده بماند و در انسان و حیوانات ایمن است. شواهد بسیاری از توانایی پروبیوتیک‌ها در درمان و افزایش اثربخشی درمان به کمک آنها در عفونت‌های ناشی از *H.pylori* و کاهش عوارض جانبی توسط آنها وجود دارد و در چندین مطالعه اثرات درمانی سودمند توسط این باکتری‌ها به اثبات رسیده است. در مطالعات اخیر گزارش گردیده است که برخی گونه‌های لاکتوباسیلوس شامل *L.gasseri* chen و *L.plantarum* قادر به مهار اتصال هلیکوباکتر پیلوری به سلول‌های اپی‌تلیال معده هستند (۱۱ و ۱۲). مهم‌ترین مکانیسم‌هایی که این باکتری‌ها به‌وسیله آن می‌توانند موجب ارتقای سلامت انسان شوند با تولید اسیدهای آلی، پراکسیدها و باکتریوسیدها است و برای اشغال جایگاه‌های اتصال روی موکوس با باکتری‌های بیماری‌زا و مضر روده‌ای رقابت می‌کنند (۱۳).

## مواد و روش‌ها

گروه‌هایی از ۳۰ موش نر نژاد C57BL/6 که از انستیتو رازی کرج به حیوان‌خانه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز منتقل شدند. حیوانات در قفس‌های کوچک حاوی آب و غذای اتوکلاو شده نگهداری شدند. شرایط نگهداری حیوانات در حیوان‌خانه در دمای ۲۲-۲۵ درجه سانتی‌گراد، تنظیم نور ۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی، آب و غذای استاندارد بود.

سویه استاندارد هلیکوباکتر پیلوری (ATCC۴۳۵۰۴) که از کشور انگلیس برای ما تهیه شد بعد از آماده‌سازی سویه استاندارد آن را در محیط‌های کشت بروسلا آگار حاوی خون گوسفندی و محیط *Tripticase soy agar* کشت دادیم و تحت شرایط میکروایروفل به مدت ۵-۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. بعد از این مدت کلنی‌های شفاف و کروی هلیکوباکتر پیلوری با رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های اوره‌از، کاتالاز و اکسیداز شناسایی شدند. علاوه بر این سویه ATCC43504 ما بعد از استخراج DNA با QIA AMP با DNA KIT با PCR تأیید شد.

تشخیص التهاب مزمن که دال بر عفونت هلیکوباکتریپیلوری است را می دهد. در این روش یک برش طولی از بافت معده انجام گرفت و در فرمالین ۱۰٪ تثبیت شد و در پارافین ذخیره گردید. نمونه های بافت جهت تهیه لامها به آزمایشگاه پاتولوژی فرستاده شدند. لامها با رنگ های هماتوکسیلین و ائوزین و گیمسا رنگ آمیزی شدند. بررسی تغییرات سلول های اپیتلیال معده در گروه های کنترل و آلوده بعد از ایجاد عفونت و التهاب صورت گرفت. بافت معده سالم دارای سلول های استوانه ای با ترشح موکوس، لامینا پروپریای پیوسته و کانال های بین سلولی واضح و سالم است. در حالی که بعد از ایجاد التهاب و عفونت این سلول ها ادم داشته و تورم سلول، ظهور واکوئل چربی در سلول، شل شدن اتصالات سلولی و تجمع کروماتین مشاهده گردید.

سویه ی استاندارد لاکتوباسیلوس پلاتناروم که از انستیتو پاستور تهران تهیه گردید را روی محیط کشت MRS برده و تحت شرایط میکروائروفیل به همراه گاز پک نوع C به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه کردیم. بعد از آن پلیت های رشد یافته را داخل محلول PBS حل کرده و تحت دوز ۱۰۹ CFU/ml به حیوانات حدود 1cc به مدت یک هفته جهت درمان تلقیح گردید.

بعد از تأیید گاستریت و التهاب در حیوانات با سنجش بافت شناسی و اندازه گیری آزمون الایزا درمان دو هفته ای را آغاز کردیم. ۳ گروه درمانی شامل:

گروه اول: بدون تجویز بیسموت+امپرازول و تلقیح لاکتوباسیلوس پلاتناروم

گروه دوم: تجویز بیسموت+امپرازول به مدت ۷ روز هفته اول+کلاریترومایسین ۷ روز هفته دوم

گروه سوم: تجویز بیسموت+امپرازول به مدت ۷ روز هفته اول+لاکتوباسیلوس پلاتناروم به مدت ۷ روز هفته دوم

مجموع این داروها در PBS حل شدند و به صورت سوسپانسیون در حجم های ۱-۰/۵ میلی لیتری به حیوانات خوراندند شدند.

### نتایج

دو هفته بعد از درمان مدفوع تازه تعدادی از حیوانات در هر گروه جمع آوری گردید و آزمایش تعیین آنتی ژن مدفوعی انجام شد و نتایج حاصل با نتایج قبل از درمان مقایسه شد به این صورت که بعد از درمان کاهش عفونت در گروه درمانی طراحی شده مشاهده گردید.

موش ها در ۳ گروه ۱۰ تایی در قفس های جداگانه تقسیم شدند. از پلیت های رشد یافته حاوی هلیکوباکتر پیلوری با PBS سوسپانسیون درست کرده و با دوزهای ۱۰۸-۱۰۱۰ CFU/ml به مدت دو ماه (یک بار در روز) با لوله های پلی اتیلنی به درون معده موش ها تلقیح کردیم به هر حیوان ۱cc خوراندیم. چهار، هشت و دوازده هفته بعد از القای عفونت به ترتیب از گروه های موش کنترل و الوده به h.pylori آزمون آنتی ژن مدفوعی (h.pylori stool Ag) به عمل آمد. به این صورت که در این فواصل زمانی از آخرین روز تلقیح تا ایجاد شدن عفونت این آزمون برای گزارش اولیه موارد مثبت صورت گرفت (جدول ۱).



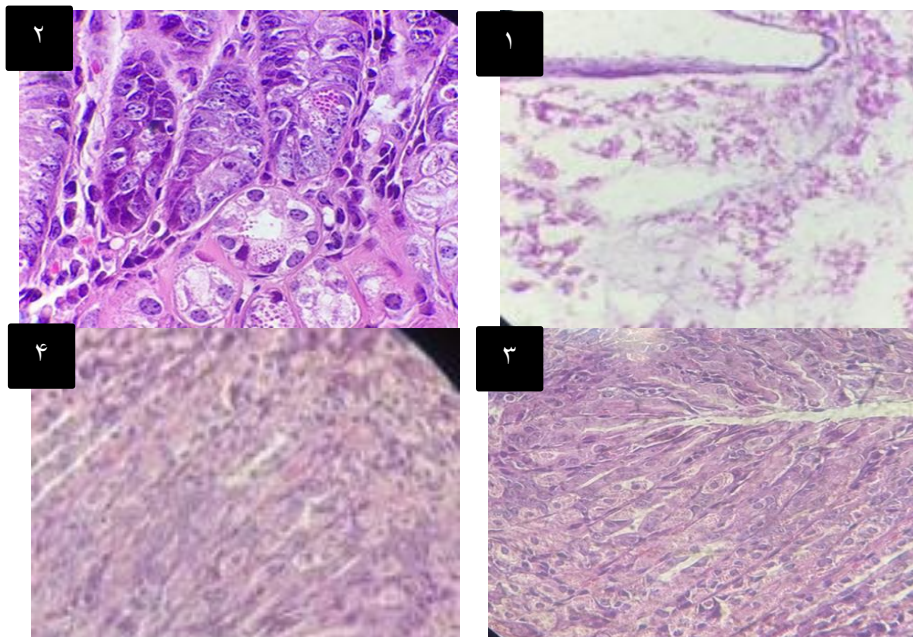
شکل ۱- موش C57BL/6 آلوده شده با h.pylori

بعد از تأیید ایجاد عفونت اولیه در هفته چهارم توسط آزمون تعیین آنتی ژن مدفوعی تعدادی از حیوانات به روش بیهوشی کشته شده و بعد از جراحی ناحیه شکم باز شده و چندین بیوپسی از تنه و پیلور معده موش های کنترل و آلوده برای سنجش بافت شناسی تهیه گردید و به همین ترتیب در هفته های هشتم و دوازدهم آزمون الایزا به همین صورت انجام و نتایج مورد بررسی قرار گرفت. در هفته های هشتم و دوازدهم نیز هر بار تعدادی موش کنترل و آلوده کشته شد و از لحاظ بافت شناسی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

هلیکوباکتر پیلوری را می توان با رنگ آمیزی استاندارد هماتوکسیلین ائوزین و گیمسا شناسایی نمود. در زیر میکروسکوپ رنگ آمیزی H&E ارگانسیم قرمز رنگ به شکل مارپیچی و به صورت محصور شده در سلول های اپیتلیال و در پوشش های موکوسی معده دیده می شود. از مهم ترین فواید آزمایش بافت شناسی این است که به ما امکان

جدول ۱- تیتراهای حاصل از آزمایش تعیین آنتی ژن مدفوعی قبل و بعد از درمان

گروه های طبقه بندی شده قبل و بعد از درمان	موش شماره ۱	موش شماره ۲	موش شماره ۳	موش شماره ۴	موش شماره ۵	موش شماره ۶	موش شماره ۷
نتایج الایزا بعد از ایجاد عفونت (التهاب)	۰/۲۲۵	۰/۲۳۰	۰/۵۲۵	۰/۸۵۲	۱/۱۰۱	۱/۰۱۱	۱/۰۱۲
نتایج الایزا بعد از درمان با (کلاریترومایسین)	۰/۰۵۲	۰/۰۶۲	۰/۰۴۵	۰/۰۳۲	۰/۰۲۲	۰/۰۰	۰/۰۰
نتایج الایزا بعد از درمان با (لاکتوباسیلوس پلاتناروم)	۰/۰۵۰	۰/۰۵۲	۰/۰۵۹	۰/۰۴۵	۰/۰۱۲	۰/۰۰	۰/۰۰



شکل ۱- اپی تلیوم معده موش بعد از دو ماه آلودگی با هلیکوباکتر پیلوری بزرگنمایی ۱۰۰+ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انوزین.  
 شکل ۲- اپی تلیوم طبیعی معده موش را قبل از آلودگی نشان می دهد با بزرگنمایی ۱۰۰+ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین انوزین.  
 شکل ۳ و ۴: اپی تلیوم معده موش بعد از درمان را با بزرگنمایی ۱۰۰+ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین انوزین نشان می دهد.

## بحث

امروزه هلیکوباکتر پیلوری به عنوان عاملی برای ایجاد عفونت و زخم معده مطرح شده است. براساس مطالعات صورت گرفته اکثر مردم جهان به این عفونت مبتلا هستند. شاخص های ویرولانسی متعددی از جمله شکل مارپیچی باکتری، شاخص های چسبندگی و آنزیم اوره آز در ایجاد بیماری توسط این باکتری نقش دارند، در نتیجه تشخیص و درمان این باکتری به دلیل عفونت زود بودن ضروری است. در سال های اخیر درمان های متعددی جهت ریشه کن کردن این پاتوژن گوارشی صورت گرفته که بیشتر شامل درمان های آنتی بیوتیکی بوده که به دلیل سطح بالای مقاومت های دارویی ریشه کن کردن هلیکوباکتر پیلوری کاهش یافته است. بنابراین در حال حاضر ریشه کن کردن این پاتوژن انسانی در جهان مورد توجه است. البته امروزه نقش پروبیوتیک ها برای درمان و پیشگیری از عفونت هلیکوباکتر پیلوری بسیار مورد توجه قرار گرفته است. لذا در این تحقیق سعی بر استفاده از پروبیوتیک ها برای بهبود زخم معده و کاهش عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری شده است.

پروبیوتیک ها به طور خاص شامل دو گونه *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* می شوند (۷). مطالعات صورت گرفته بر روی پروبیوتیک ها حاکی از آن است که آنها می توانند مانع ایجاد بیماری شوند. براساس آزمایشات انجام شده برخی از گونه های پروبیوتیک با رهاسازی باکتریوسین ها یا اسیدهای آلی و یا کاهش قدرت چسبندگی

به سلول های اپیتلیال از رشد هلیکوباکتر پیلوری جلوگیری می کنند. دو نوع اصلی از موادی که رشد هلیکوباکتر پیلوری را توسط باکتری های اسیدلاکتیک کاهش می دهد اسیدهای چرب زنجیره کوتاه و باکتریوسین ها هستند. اسیدهای چرب زنجیره کوتاه شامل: فرمیک، استیک، پروپیونیک، بوتیریک و اسیدهای لاکتیک هستند که توسط پروبیوتیک ها در طی متابولیسم کربوهیدرات ها آزاد می شوند (۱۴) و (۱۵).

اهمیت تولید اگزوپلی ساکارید توسط سویه های پروبیوتیک در بررسی های گذشته به اثبات رسیده زیرا اگزوپلی ساکارید باعث اتصال میکروارگانیسم به دیواره روده می شود (۱۶) و همچنین دارای خواص ضد زخم های گوارشی، کاهش کلسترول و محرک ایمنی نیز می باشد (۱۷ و ۱۸). مطالعاتی که تاکنون جهت درمان گاستریت و عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری در این زمینه استفاده شده است شامل درمان های آنتی بیوتیکی یک مهارکننده پمپ پروتون یا بیسموت و دو آنتی بیوتیک که معمولاً مترونیدازول، آموکسی سیلین، تتراسایکلین یا کلاریترومایسین بوده است (۵). که نتایج حاصل از این بررسی ها نشان می دهد که در اکثر مواقع میزان ریشه کنی باکتری به کمک درمان سه گانه در صورت حساسیت باکتری مذکور به آنتی بیوتیک ها حدود ۸۵-۹۰٪ گزارش شده است. این در حالی است که در مواقع مقاومت دارویی این میزان کاهش می یابد. قابل ذکر است که علاوه بر مقاومت دارویی در درمان های سه گانه و چهارگانه نواقص بسیاری نیز وجود دارد. این



(H&E) قرمز پر رنگ و در رنگ آمیزی گیمسا ابی پررنگ هستند. لامینا پروپریا شکسته و نامنظم می‌شود و مجاری غدد نامنظم است. درمان به کمک بیسموت امپرازول به همراه لاکتوباسیلوس پلانتروم به مدت دو هفته انجام شد و بعد از کشتن حیوانات و تهیه اسلایدهای بافت‌شناسی بررسی روند بهبود زخم و التهاب و همچنین بررسی تغییرات سلول‌های اپی‌تلیال معده موش مورد مطالعه قرار گرفت. مشاهده شد که روش درمانی فوق‌الذکر قادر به بهبود زخم معده و کاهش عفونت ناشی از H.PYLORI شده است و روند بازسازی سلول‌های اپی‌تلیال نیز بررسی شد و التهابی که در گروه‌های طراحی شده قبل از درمان در دوره آلودگی شاهد آن بودیم به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافته بود.

### تشکر و قدردانی

در انتها از دانشگاه علوم پزشکی البرز و تمامی همکارانی که ما را در این پژوهش یاری نمودند صمیمانه قدردانی و تشکر می‌نماییم.

### References

- Hunt R, Xiao SD, Megraud F, Leon-Barua R, Bazzoli F, van der Merwe S, et al. Helicobacter pylori in developing countries. *J Gastrointest Liver Dis* 2011;20:299-304.
- Owens SR, Smith LB. Molecular aspects of H. pylori-related MALT lymphoma. *Pathology research international* 2011;2011.
- Javani S, Mehryari A. The Role of probiotics in the treatment and prevention of H. pylori Infection. *EBNESINA* 2007;9:24-8.
- Santos AM, Lopes T, Oleastro M, Gato IV, Floch P, Benejat L, et al. Curcumin inhibits gastric inflammation induced by Helicobacter pylori infection in a mouse model. *Nutrients* 2015;7:306-20. doi: 10.3390/nu7010306
- Gene E, Calvet X, Azagra R, Gisbert JP. Triple vs. quadruple therapy for treating Helicobacter pylori infection: a meta-analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1137-43.
- Wang Y-h, Huang Y. Effect of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum supplementation to standard triple therapy on Helicobacter pylori eradication and dynamic changes in intestinal flora. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014;30:847-53.
- Patel A, Shah N, Prajapati J. Clinical application of probiotics in the treatment of Helicobacter pylori infection-a brief review. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2014;47:429-37.
- Weizman Z. Effect of probiotic infant formulas on protection from infection in child care centers. *BioGaia* 2008;42:1-12.
- Demirer S, Aydinoglu S, Aslim B, Kepenekci I, Sengül N, Evirgen O, et al. Effects of probiotics on radiation-induced intestinal injury in rats. *Nutrition* 2006;22:179-86. doi: 10.1016/j.nut.2005.08.003
- Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Scis* 2000;45:1462-4.
- Chen X, Liu XM, Tian F, Zhang Q, Zhang HP, Zhang H, et al. Antagonistic activities of lactobacilli against Helicobacter pylori growth and infection in human gastric epithelial cells. *J Food Sci* 2012;77:M9-14. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02498.x
- Hsieh PS, Tsai YC, Chen YC, Teh SF, Ou CM, King VA. Eradication of helicobacter pylori infection by the probiotic strains lactobacillus johnsonii MH-68 and L. salivarius ssp. salicinius AP-32. *Helicobacter* 2012;17:466-77. doi: 10.1111/j.1523-5378.2012.00992.x

نواقص عبارتند از: مصرف مقدار بسیار زیاد دارو، عوارض جانبی آزاردهنده داروها که در ۳۰٪ موارد خود را بروز می‌دهد، تیرگی زبان و مدفوع در اثر مصرف بیسموت، تهوع و اسهال استفراغ ناشی از آنتی بیوتیک‌ها و عوارض گوارشی با مترونیدازول را نام برد (۱۹). باتوجه به نواقص این درمان‌ها و اثبات هلیکوباکتر پیلوری در ایجاد زخم معده امروزه نقش پروبیوتیک‌ها در کنترل کلونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری در معده به‌عنوان یک مسیر الترناتیو مورد توجه دانشمندان جهان قرار گرفته است. استفاده از پروبیوتیک‌ها باعث کاهش عفونت ناشی از هلیکوباکتر شده و عوارض جانبی حاصل از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای دیگر را کاهش می‌دهند.

در مطالعات صورت گرفته توسط محققین در سال‌های گذشته درمان زخم معده ناشی از هلیکوباکتر پیلوری بیشتر به‌واسطه آنتی‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها همراه با آن برای کاهش عوارض جانبی و عفونت بوده است ولی درمانی به‌واسطه پروبیوتیک در کنار داروهای نظیر بیسموت و امپرازول بدون استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها صورت نگرفته است. باتوجه به نیاز مردم جهان برای ریشه‌کن کردن عفونت معده و بهبود زخم معده ناشی از هلیکوباکتر پیلوری ما در این بررسی از لاکتوباسیلوس پلانتروم به همراه بیسموت و امپرازول استفاده کردیم. نکته قابل توجه در رابطه با استفاده از پروبیوتیک‌ها مکانیزم‌هایی است که به‌واسطه آن، این اثرات درمانی پروبیوتیک‌ها اعمال می‌شود. سویه‌های زنده پروبیوتیک مقاومت سلول‌های اپیتلیالی را افزایش می‌دهند و همچنین متابولیت‌های پروبیوتیک‌ها رگ‌زایی را القاء می‌کنند و باعث انباشت پروتئولیکان‌ها شده و زخم معده را ترمیم می‌کنند. از مکانیزم‌های مهم و دخیل در ترمیم زخم می‌توان به کاهش نسبت مرگ سلولی به تکثیر سلولی در مخاط معده اشاره کرد. بر طبق آزمایشات انجام شده برخی از گونه‌های لاکتوباسیل با تولید اسیدهای آلی و باکتریوسین‌ها که خواص ضدالتهابی دارند از اتصال هلیکوباکتر پیلوری به سلول‌های اپیتلیال معده ممانعت به‌عمل می‌آورند. پروبیوتیک‌ها قادر به تحریک سیستم ایمنی و تقویت پاسخ ایمنی بدن هستند. این ویژگی در مورد باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و کازیبی صدق می‌کند. در تحقیق ما مدل حیوانی استفاده شده مدل موشی C57BL/6 بود. بعد از آلوده کردن حیوانات با سویه استاندارد ATCC43504 هلیکوباکتر پیلوری و اطمینان از ایجاد شدن گاستریت و تأیید آن به کمک روش‌های الایزا در آزمایش تعیین آنتی‌ژن مدفوعی و مطالعات بافت‌شناسی با رنگ‌آمیزی بافتی گیمسا و H&E با کشتن تعدادی حیوان از گروه‌های کنترل و آلوده بررسی تغییرات سلول‌های اپی‌تلیال معده موش صورت گرفت. به این صورت که بافت معده سالم دارای سلول‌های استوانه‌ای شکل با ترشح موکوس، لامینا پروپریای پیوسته، کانال‌های بین سلولی واضح و سالم است. ولی بافت بیمار که در التهاب این سلول‌ها ادم داشته و در رنگ‌آمیزی

13. Kabak B, Brandon EF, Var I, Blokland M, Sips AJ. Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin B1 and ochratoxin A using an in vitro digestion model under fed conditions. *J Environ Sci Health B* 2009;44:472-80. doi: [10.1080/03601230902935154](https://doi.org/10.1080/03601230902935154)
14. Zambon C-F, Basso D, Navaglia F, Mazza S, Razetti M, Fogar P, et al. Non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: simplified <sup>13</sup>C-urea breath test, stool antigen testing, or DNA PCR in human feces in a clinical laboratory setting? *Clin Biochem* 2004;37:261-7. doi: [10.1016/j.clinbiochem.2003.12.004](https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.12.004)
15. Hamilton-Miller J. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International journal of antimicrobial agents* 2003;22:360-6.
16. Schiraldi C, Valli V, Molinaro A, Carteni M, De Rosa M. Exopolysaccharides production in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* exploiting microfiltration. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2006;33:384-90.
17. Kaur IP, Garg A, Geetha T, Agrawal R. Entrapment of probiotic bacteria within alginate-HPMC floating beads, their survival and effectiveness against ethanol induced ulcers in rats. *International Journal of Probiotics And Prebiotics* 2007;2:141-8.
18. Nakajima H, Suzuki Y, Hirota T. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *J Food Sci* 1992;57:1327-9.
19. Larry Jameson J, Anthony S. Fauci, editors. *Principles of internal medicine*. 14th ed. New York: Mc GRAW Hill;1998.p.1602-4.



## Effect of *L. Plantarum* on Improvement Process of Gastric Inflammation of *H. Pylori* Infection in Animal Model C57BL/6

Behnoush Asgari (M.A.)<sup>1</sup>, Fatemeh Kermanian ( Ph.D.)<sup>2</sup>, Farzad Khalili (Ph.D.)<sup>3</sup>, Zahra Rohani Nojede Sadat (B.A.)<sup>4</sup>, Somaye Yaslianifard (Ph.D.)<sup>5\*</sup>

1- Dept. of Microbiology, Student Research Committee, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

2- Dept. of Anatomy, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

3- Dept. of Gastroenterology, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

4- Student in Medical School, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

5- Dept. of Microbiology, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

Received: 6 February 2018, Accepted: 30 April 2018

### Abstract:

**Introduction:** *Helicobacter pylori* has become accepted as an important human pathogen for the development of gastritis since it was first reported by marshal and warren in 1983. About half of the world human population is infected by *H. pylori*. Current standard therapies against *H. pylori* are based on the use of one proton pump inhibitor plus two or more antibiotics. The efficacy of this treatments has been decreased, mainly due to the increase of antibiotic resistance but also to side effects. So we tried to follow other therapies. The role of probiotics in the treatment of gastrointestinal infections has increased during recent decades. One of the most important groups of probiotics is lactic acid bacteria. The aim of this study was to analyse the efficacy of *Lactobacillus plantarum* on gastric ulcer induced by *helicobacter pylori* (ATCC43504).

**Methods:** In this experiment, the mice were randomly divided into three experimental groups (ten mice in each group). Mice were inoculated with *h.pylori* suspension ( $5 \times 10^{10}$ cfus/ml) in PBS by gavage twice daily for three consecutive days. Four weeks after the last inoculation we confirmed the infection by determination of *h.pylori* stool Ag (ELISA) and histopathological examination. One mouse from each group sacrificed and the tissues removed. The groups were subjected to different therapies as stated, 1: without Bismuth (Bi) and Omeprazole (Om) prescription, 2: Bi, Om and Clarithromycin (Cl) and 3: Bi, Om plus 1cc of suspension of  $10^9$ CFU/ml of *L. plantarum*. After 2 weeks, the stool was analyzed for Ag and the mice were sacrificed for evaluation of histopathologic changes.

**Results:** Treatment with *L. plantarum* group provided Zero titer of stool Ag and was associated with improved gastric inflammation in all subjects, similar to the clarithromycin group

**Conclusion:** *L. plantarum* probiotics provides similar results as clarithromycin in terms of improvement of *H. pylori* infection and gastritis in C57BL/6 Mice model, without its cons of antibiotic resistance.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus plantarum*, Gastric ulcer, Histopathology, C57BL/6.

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: S. yaslianifard, Email: Syaslianifard@gmail.com

**Citation:** Asgari B, Kermanian F, Khalili F, Rohani Nojede ZS, Yaslianifard S. Effect of *L. plantarum* on improvement process of gastric inflammation of *h.pylori* infection in animal model C57BL/6. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2018;13(2):15-21.