مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هجدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲، صفحات ۵۹-۵۱

اثر پروبیوتیک‌های بومی ایران بر هیدرولیز گلیادین گندم با هدف کاهش علائم بیماری سلیاک

فاطمه زنده‌بودی[۱]، میترا ملائی پروری[۲]، سید امیر محمد مرتضویان[۳]، سارا سهراب‌وندی[۴]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲ - گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران، تهران، ایران

۳- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. پست الکترونیکی: mortazv@sbmu.ac.ir

۴- استاد گروه تحقیقات علوم وصنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: بیماری سلیاک یک بیماری خود ایمنی است که در اثر عدم تحمل به پروتئین گلوتن در انسان رخ می‌دهد. تحقیقات نشان داده است که پروبیوتیک‌ها از طریق تنظیم فرآیندهای التهابی و هیدرولیز پپتیدها در روده کوچک قادر به ایجاد سلامت در افراد مبتلا به سلیاک هستند. پژوهش حاضر با هدف بررسی توانایی ترکیب پروبیوتیک‌های بومی (یک سویه *لاکتوباسیلوس* و سه سویه *بیفیدوباکتری*) به همراه پاراپروبیوتیک‌های آن‌ها در هیدرولز پپتیدهای گلوتن انجام شد.

مواد و روش‌ها: مخلوط پروتئین گلیادین و پپتیدهای آن قبل و بعد از تیمار با پروبیوتیک‌ها در حضور و عدم حضور پاراپروبیوتیک‌ها با استفاده از روش‌های الکتروفورز SDS-PAGE و ELISA مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج آزمایشات نشان داد که آنزیم‌های گوارشی انسان به تنهایی قادر به هیدرولیز پپتیدهای گلیادین نیستند و گلیادین هیدرولیز شده با آنزیم‌های معده به خوبی به وسیله پروبیوتیک‌ها در حضور پاراپروبیوتیک‌ها هیدرولیز شد و اجزای مولکولی حاصل این تجزیه، پپتیدهای با وزن مولکولی بسیار پایین بودند که اثر سمی بر روده بیماران سلیاکی ندارند.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که مخلوط پروبیوتیک‌های بومی ایران در حضور پاراپروبیوتیک‌ها ممکن است دارای نقش محافظت‌کنندگی در بیماران سلیاکی ایفا کنند.

واژگان کلیدی: پاراپروبیوتیک، پروبیوتیک‌ها، گلوتن گندم ، بیماری سلیاک، هیدرولیز گلیادین

• مقدمه

گلیادین اصلی‌ترین ترکیب در گلوتن است که شامل پرولامین‌های تولید شده توسط گیاهان خانواده تریتیکوم (*Triticum*) است. بیماری سلیاک یک بیماری خودایمنی است که ناشی از فعال شدن T-cell مستقر در مخاط دستگاه گوارش است و گلیادین عامل اصلی تخریب روده‌ای در این بیماری می‌باشد (۱). این بیماری به صورت ژنتیکی در افراد مستعد وجود دارد و پس از در معرض قرار گرفتن این افراد در برابر گلوتن، علائم التهابی آن ایجاد می‌شود. پپتیدهای گلیادین به صورت بسیار جزئی توسط آنزیم‌های دستگاه گوارش تجزیه می‌شوند و اپیتوپ‌هایی را ایجاد می‌کنند که دارای اثرات سمی و ایمونوژنیک هستند. این اپیتوپ‌ها حاوی باقیمانده‌های پرولین و گلوتامین هستند که نسبت به پروتئازهای معده، روده و پانکراس مقاوم هستند. این فرآیند موجب هضم ناقص گلوتن می‌شود که در نتیجه پپتیدهای ایمونوژنیک را تولید می‌کنند (۲).

این بیماری از زمان‌های قدیم وجود داشته و آرتائوس پزشک مصر باستان در نیمه قرن دوم قبل از میلاد، کلمه‌ای یونانی Koiliakos (به معنی آسیب روده‌ها) را برای توصیف این بیماری به‌کار برد. در گذشته تصور بر آن بوده است که این بیماری بسیار نادر است ولی تحقیقات انجام شده در دهه‌های

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2023-12-10]

اخیر نشان‌دهنده‌ی شیوع این بیماری در جوامع جهانی است؛ به گونه‌ای که امروزه الگوی شیوع سلیاک در نقاط مختلف جهان به همراه جزئیات، کامل‌تر از گذشته مشخص شده است. ایران نیز از این امر مستثنی نبوده و طی سال‌های اخیر تحقیقات متعددی در مورد شناخت بیماری و راه‌های کنترل آن صورت گرفته است (۳). همان‌طور که گفته شد عامل اصلی بروز علائم این بیماری مصرف غذاهای حاوی گلیادین موجود در گلوتن غلات می‌باشد. به طور کلی حدود ۰/۶ تا ۱٪ از مردم جهان به این بیماری مبتلا می‌باشند و از آن رنج می‌برند. این بیماری در کشورهای در حال توسعه، به ویژه در مناطقی که غذای غالب مردم از گندم و فراورده‌های آن باشد یک بیماری در حال رشد است. به طور کلی جمعیت افراد مبتلا به این بیماری در حال افزایش بوده که از علل آن می‌توان به تغییر رژیم‌های غذایی، تغییر روش‌های تولید و آماده‌سازی گندم، افزایش آگاهی مردم نسبت به بیماری و یا ترکیبی از همه‌ی عوامل ذکر شده اشاره کرد (۴). در حال حاضر تنها روش درمانی برای این بیماران استفاده مداوم از محصولات عاری از گلوتن می‌باشد. با این حال ممکن است به دلیل آلودگی متقابل (Cross contamination) در حین فرآوری یا پخت، گلوتن به میزان بسیار کم در بسیاری از محصولات غذایی وجود داشته باشد که این خود یک تهدید جدی برای سلامت افراد مبتلا به سلیاک به شمار می‌رود. علاوه براین بسیاری از مبتلایان به این بیماری، حتی در زمان رعایت رژیم غذایی عاری از گلوتن نیز دارای علائم بیماری هستند. تلاش‌های فراوانی در زمینه تولید دارو و ترکیبات غذایی برای کاهش عدم تحمل سیستم گوارشی این افراد نسبت به غلات در حال انجام می‌باشد (۵). تحقیقات نشان داده است که در بیماران سلیاکی جمعیت و تنوع میکروبیوتای روده از تعادل خارج شده است. به گونه‌ای که آنالیز مدفوع افراد دارای بیماری سلیاک فعال و خاموش نشان داده است که جمعیت گونه‌های *باکتروئیدها* بالاست و بر خلاف حالت طبیعی بدن انسان، جمعیت *بیفیدوباکترها* در مدفوع دچار کاهش شدید می‌شود (۱۰-۶). طبق تحقیقات صورت گرفته میکروبیوتای روده کوچک قادرند از ورود گلیادین و پپتیدهای آن به داخل مخاط روده جلوگیری نمایند و یا فعالیت سیستم ایمنی بدن را کاهش دهند و یا اینکه با اتصال به گلوتن و یا تجزیه‌ی آن در روده کوچک میزان پپتیدهای گلیادین را در روده کاهش دهند (۱۲، ۱۱).

میکروبیوتای روده کوچک موجب عملکرد مناسب نفوذپذیری روده کوچک و حفظ پیوستگی در دیواره آن می‌شوند. در نتیجه عدم تعادل میکروبی در روده می‌تواند یکی از عوامل بیماری سلیاک باشد. بازگردانی میکروبیوتای روده در این بیماران می‌تواند به بهبود بیماری و کاهش علائم آن کمک فراوانی نماید. تغذیه بیماران با مکمل‌های پروبیوتیک یک روش مؤثر درمانی است؛ زیرا این میکروب‌های مفید دارای خاصیت ضدالتهابی و تنظیم کننده‌ی دستگاه ایمنی هستند. مطالعه روی کودکان تحت درمان با پروبیوتیک‌ها نشان داده است که مصرف پروبیوتیک‌ها موجب کاهش سیتوکین‌های التهابی، بازگردانی فلور طبیعی روده کوچک و تنظیم پاسخ‌های دستگاه ایمنی شده است (۱۴، ۱۳). Orlando و همکاران اثر باکتری *Lactobacillus Rhamnosus* را بر کاهش نفوذپذیری مخاط روده موش بررسی کردند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که این باکتری قادر به افزایش استحکام لایه مخاطی روده می‌باشد و از آسیب پپتیدهای تجزیه شده حاصل از گلیادین به روده جلوگیری می‌کند. این پدیده با کاهش برخورد این پپتیدها با مخاط روده صورت می‌گیرد (۱۵).

از سال ۲۰۰۴، بسیاری از پژوهش‌های علمی خواص عملکردی و سلامتی‌بخشی پروبیوتیک‌های غیر زنده را نیز به اثبات رساندند. مطالعات علمی نشان داده شده است که حضور سلول‌های غیر زنده پروبیوتیک‌ها در محیط کشت سلول‌های زنده آن‌ها موجب افزایش عملکرد این باکتری‌ها می‌شود. براین اساس در سال ۲۰۱۱، Tavernitti و Guglielmetti واژه پاراپروبیوتیک را برای مشخص کردن سلول‌های غیرزنده و اجزای سلولی باکتری‌هایی بکار بردند که قادر به ایجاد سلامتی در میزبان بود (۱۶). در واقع پاراپروبیوتیک‌ها یا پروبیوتیک‌های غیر فعال عبارتند از سلول‌های میکروبی غیر زنده (سالم یا تخریب شده) یا عصاره خام سلولی که زمانی که به میزان کافی مصرف شود موجب بهبود وضعیت میزبان می‌شود (۱۷). پژوهش پروری و همکاران (۲۰۲۱)، استفاده از پاراپروبیوتیک در کنار استارتر ماست، موجب افزایش زنده مانی باکتری‌های آغازگر و افزایش قدرت تخمیر و کیفیت محصول نهایی شد (۱۸). بنابراین می‌توان جهت افزایش قدرت پروبیوتیک‌ها در کاهش علائم بیماری سلیاک و تجزیه کامل گلیادین از پاراپروبیوتیک‌ها، به عنوان یک محرک رشد و یک پریبیویک استفاده نمود. در پژوهش حاضر اثر استفاده از پروبیوتیک‌های بومی در کنار پاراپروبیوتیک‌های آن در هضم پپتیدهای گلیادین و درنتیجه معرفی آن به عنوان یک مکمل غذایی برای بیماران سلیاکی در زمان مصرف مواد غذایی حاوی گلوتن است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2023-12-10]

• مواد و روش‌ها

مواد اولیه

آرد گندم تهیه شده از فروشگاه‌های محلی، پروبیوتیک‌های بومی (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *بیفیدوباکتریوم لانگوم*) لیوفیلیز شده تهیه شده از شرکت تک ژن (تهران، ایران)، آنزیم‌های پپسین و تریپسین گاوی (مرک- سیگما آلدریچ، آلمان)، سایر ترکیبات شیمیایی و شناساگرها دارای درجه آزمایشگاهی (مرک-سیگما، آلمان) بودند.

استخراج گلیادین گندم

گلیادین از آرد گندم طبق روش لینگ فورد (Lindford) و همکاران استخراج شد. در ابتدا جهت جداسازی پروتئین‌های محلول در نمک، ۲۰ گرم از آرد با ۶۰ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم (۱ مولار) مخلوط شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق روی مخزن مغناطیسی هم زده شد. پروتئین‌های محلول در نمک با استفاده از دو بار سانتریفیوژ (۴۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه) جداسازی شد. رسوب حاصل در ۵۰ میلی‌لیتر محلول اتانول (۷۰ درصد) مخلوط شد و مخلوط حاصله به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سپس محلول سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت حاصله پس از سانتیریفیوژ که حاوی گلیادین بود جداسازی، تغلیظ و در خشک کن انجمادی خشک شد (۱۹).

تهیه پاراپروبیوتیک‌ها

پاراپروبیوتیک‌ها از مخلوط باکتری‌های پروبیوتیک لیوفیلیزه شده و از روش حرارتی تهیه و استفاده شد. مخلوط پروبیوتیک‌ها در غلظت 10^9 CFU/ml در آب مقطر در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد (به مدت ۱۰ دقیقه) غیر فعال شد و سپس با استفاده از حمام یخ دمای آن با سرعت پایین آورده شد و تا قبل از انجام آنالیزهای بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت. جهت اطمینان از اثر حرارت بر غیرفعال‌سازی باکتری های، از محیط کشت MRS آگار استفاده شد و پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی و بی هوازی هیچ سلولی بر روی محیط رشد نکرد (۱۸).

هضم پروتئازی گلیادین

گلیادین (۶۰ میلی گرم) در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول بافر سدیم استات (۵۰ میلی مولار) حل شد. سپس ۳ میلی گرم پپسین به مخلوط اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۷۱ میلی گرم سدیم هیپوفسفات به مخلوط گرماخانه گذاری شده اضافه شد و pH محلول با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم روی pH=۷ تنظیم شد. ۲ میلی گرم تریپسین اضافه شد و مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار نگهداری شد. در انتها برای توقف فعالیت‌های آنزیمی مخلوط در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت‌دهی شد و مخلوط حاوی گلیادین هضم شده توسط آنزیم‌های معده لیوفیلیز شد. پودر لیوفیلیز شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (۲۰، ۱۹).

تجزیه گلیادین خام و هضم شده با استفاده از پروبیوتیک‌ها در حضور و عدم حضور پاراپروبیوتیک‌ها

جهت بررسی اثر پروبیوتیک‌ها بر هضم گلیادین خام و گلیادین هضم شده، طبق جدول ۱ محلول‌های حاوی هر دو گلیادین به صورت جداگانه در حضور مخلوط پروبیوتیک (2×10^9CFU) با یا بدون پاراپروبیوتیک‌ها (2×10^9 CFU سلول غیر فعال شده) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط بی‌هوازی تحت هم‌زدن مداوم به مدت یک شبانه‌روز گرمخانه‌گذاری شد. پس از گرمخانه‌گذاری سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ از محیط کشت حاوی گلیادین جداسازی شد (۲۰).

جدول ۱. تیمارهای مورد استفاده جهت بررسی اثر پروبیوتیک‌ها و پاراپروبیوتیک‌ها بر گلیادین

تیمار	گلیادین	گلیادین هضم شده با پروتئاز معده	پروبیوتیک	پاراپروبیوتیک
۱	+*	–**	–	–
۲	–	+	–	–
۳	+	–	+	–
۴	–	+	+	
۵	+	–	+	+
۶	–	+	+	+

* وجود دارد، ** وجود ندارد

آزمون ایمونولوژیک گلیادین

۰/۵ میلی‌لیتر از هر یک از تیمارها به صورت متوالی به ترتیب با استفاده از فیلترهای با منافذ ۳۰ و ۳ کیلودالتون فیلتر شدند. قبل از انجام آزمون ELISA، گلیادین و پپتیدهای حاصل از تجزیه آن با استفاده از محلول ۶۰٪ اتانول از محلول فیلتر شده جداسازی شدند. سپس همه نمونه‌ها بوسیله روش آزمون ELISA رقابتی (Competitive ELISA) مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی میزان تفکیک و تجزیه پپتیدها با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2023-12-10]

۳۰ میکروگرم از هر یک از تیمارها بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز جداسازی شدند. از رنگ کوماسی بلو برای رنگ‌آمیزی باندها استفاده شد. جهت چگالی سنجی باندها از نرم‌افزار Image J استفاده شد.

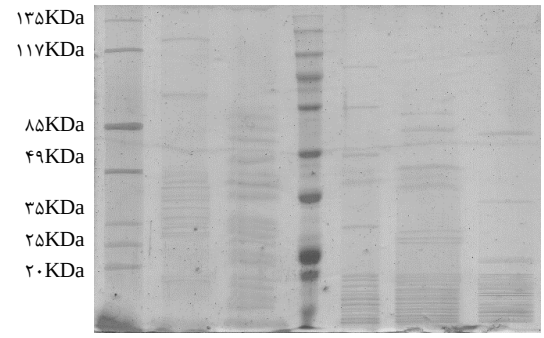
تجزیه و تحلیل آماری

هر یک از تیمارها حداقل در سه بار تکرار تولید و مورد آزمون قرار گرفتند. جهت بررسی اختلاف آماری و محاسبه P-value از آزمون t-Student جفت نشده استفاده شد.

• یافته‌ها

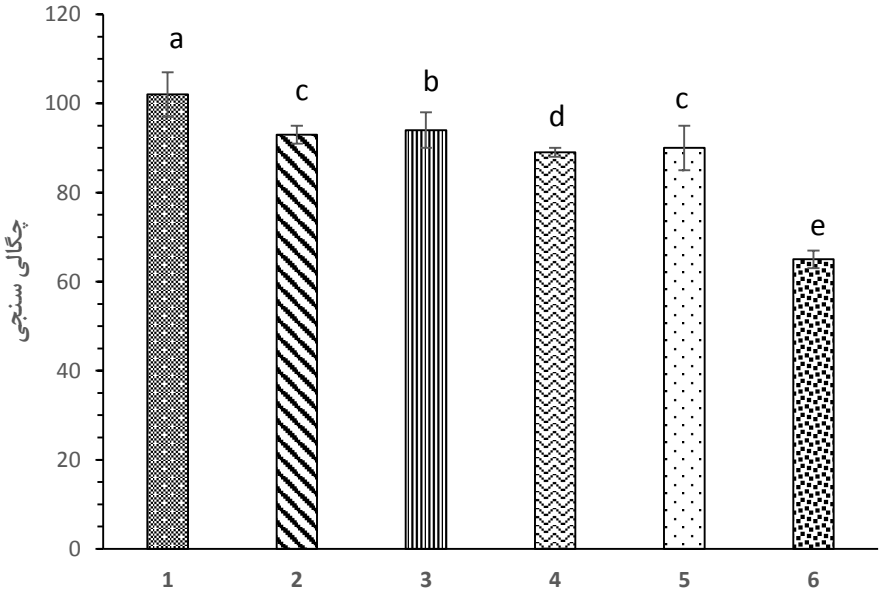
بررسی فعالیت پروتئولیتیکی پروبیوتیک‌ها در حضور و عدم حضور پاراپروبیوتیک‌ها با استفاده از ژل الکتروفورز

در شکل ۱ ژل الکتروفورز جداسازی شده نمونه‌های مختلف توسط SDS-PAGE نشان داده شده است که شامل گلیادین (باند ۱)، گلیادین هضم شده (باند ۲)، گلیادین + پروبیوتیک (باند ۳)، گلیادین هضم شده+ پروبیوتیک (باند ۴)، گلیادین + پروبیوتیک+پاراپروبیوتیک (باند ۵) و گلیادین هضم شده +پروبیوتیک+ پاراپروبیوتیک (باند ۶) است. همانطور که در شکل مشخص است گلیادین خام و هیدرولیز نشده دارای ۴ باند غالب است که محدود وزن مولکولی آن بین ۳۵ تا ۷۵ کیلو دالتون می‌باشد، با این حال گلیادین هضم شده با پروتئازهای گاوی دارای باندهایی با وزن مولکولی پایین‌تر از ۳۵ کیلودالتون را نشان داد. اما، باندهای پروتئینی بعد از تیمار با پروبیوتیک‌های زنده دارای وزن مولکولی پایین‌تری بودند. حضور پاراپروبیوتیک‌ها در کنار پروبیوتیک‌ها موجب ایجاد باندهای با وزن مولکولی پایین‌تری نسبت به سایر تیمارها شد. آنالیز چگالی سنجی هر یک از باندها در شکل ۲ نشان داده شد است. براساس شکل ۲، با هضم پروتئازی و هم‌چنین تیمار با پروبیوتیک‌ها و حضور پاراپروبیوتیک‌ها در کنار پروبیوتیک‌ها موجب کاهش شدت هر یک از باندها شد.



شکل ۱. آنالیز گلیادین بوسیله روش SDS-PAGE (ژل سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید الکتروفورز)

(۱) گلیادین خام، (۲) گلیادین هضم شده با پروتئاز، (۳) گلیادین خام+پروبیوتیک، (۴) گلیادین هضم شده با پروتئاز+پروبیوتیک، (۵) گلیادین خام+پروبیوتیک+پاراپروبیوتیک، (۶) گلیادین هضم شده با پروتئاز+پروبیوتیک+پاراپروبیوتیک.



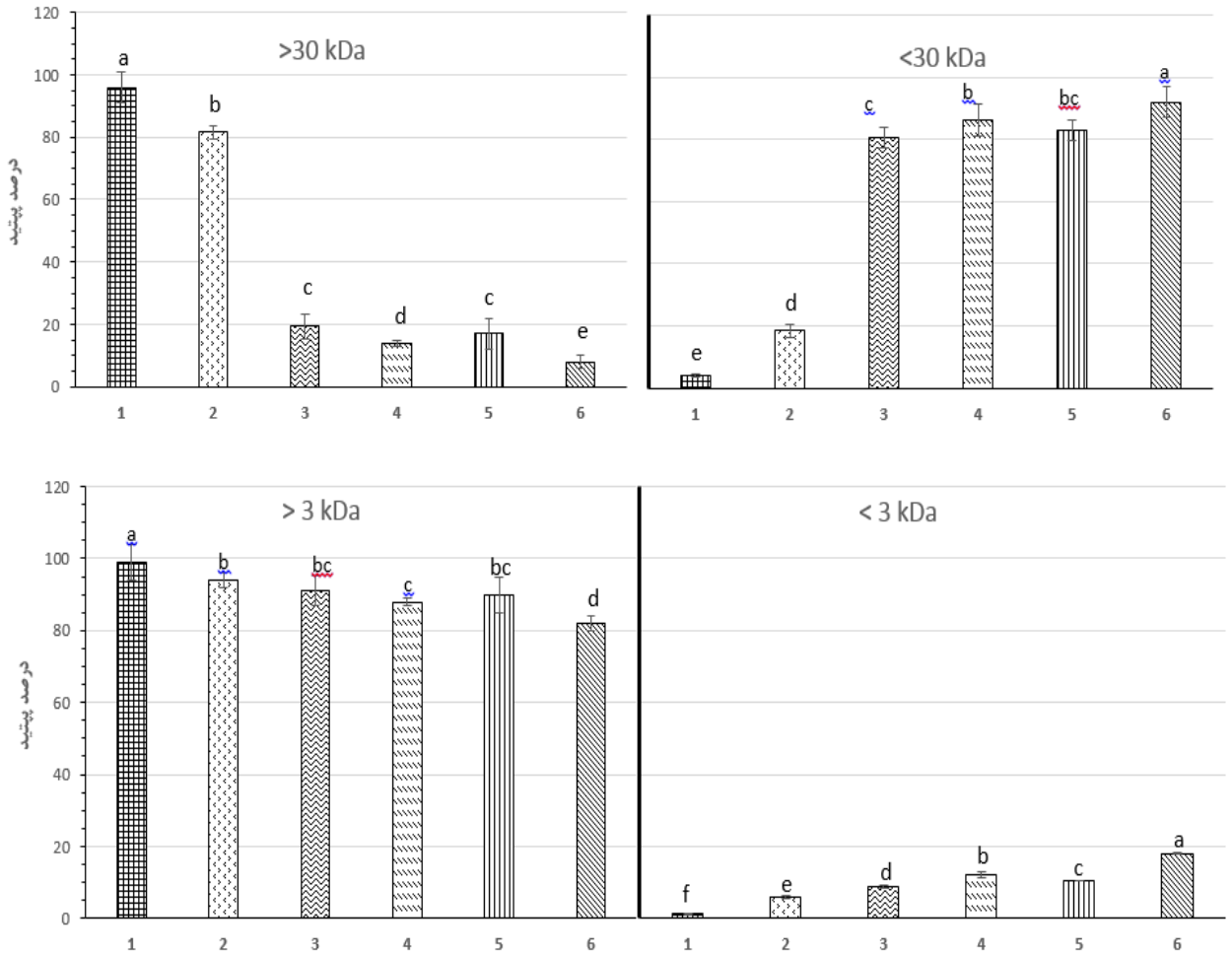
شکل ۲. چگالی سنجی باندهای پپتیدها در ژل الکتروفورز در وزن مولکولی ۵۰ کیلودالتون و پایین‌تر از آن با استفاده از نرم افزار Image J.

(۱) گلیادین خام، (۲) گلیادین هضم شده با پروتئاز، (۳) گلیادین خام+پروبیوتیک، (۴) گلیادین هضم شده با پروتئاز+پروبیوتیک، (۵) گلیادین خام+پروبیوتیک+پاراپروبیوتیک، (۶) گلیادین هضم شده با پروتئاز+پروبیوتیک+پاراپروبیوتیک. حروف کوچک مختلف نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار است ($p<0.05$).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2023-12-10]

بررسی فعالیت پروتئولیتیکی پروبیوتیک‌ها در حضور و عدم حضور پاراپروبیوتیک‌ها با استفاده از ELISA

طبق روش ذکر شده هر یک از نمونه‌ها تحت تفکیک جزیی مولکولی متوالی با استفاده از فیلترهای غشایی قرار گرفتند. این کار با استفاده از دو نوع فیلتر غشایی با منافذ ۳۰ و ۳ کیلودالتون انجام شد. همانطور که در شکل ۳ براساس نتایج حاصل از ELISA نشان داده شده است؛ به ترتیب ۴ و ۱۸ درصد از نمونه‌ی گلیادین خالص و گلیادین هضم شده با پروتئازهای گاوی قادر به عبور از فیلتر غشایی با منافذ ۳۰ کیلو دالتون بودند، این درحالی است که بیش از ۸۰ درصد از هر یک از نمونه‌های تیمارشده با پروبیوتیک در حضور و عدم حضور پاراپروبیوتیک‌ها قادر به عبور از این فیلتر بودند و در ماده تروا شده یافت شدند. علاوه براین، تفکیک بیشتر با فیلتر غشایی ۳ کیلو دالتون نشان داد که بیش از ۱۲٪ از پپتیدهای گلیادین هضم شده با پروبیوتیک و بیش از ۱۸ درصد از پپتیدهای گلیادین هضم شده با پروبیوتیک در حضور پاراپروبیوتیک‌ها دارای وزن مولکولی پایین‌تری از ۳ کیلودالتون بودند.



شکل ۳. تفکیک مولکولی گلیادین با استفاده از فیلتراسیون متوالی با فیلتر غشایی با قطر منافذ ۳۰ و ۳ کیلودالتون و درصد پپتیدهای اندازه‌گیری شده با استفاده از ELISA

گلیادین ▦ ، گلیادین هضم شده با پروتئاز ⬚ ، گلیادین +پروبیوتیک ▨ ، گلیادین هضم شده با پروتئاز+پروبیوتیک ⬚ ، گلیادین+پروبیوتیک+پاراپروبیوتیک ▥
گلیادین هضم شده با پروتئاز+پروبیوتیک+پاراپروبیوتیک ▧

حروف کوچک مختلف نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2023-12-10]

• بحث

فلور میکروبی روده کوچک یک اکوسیستم پیچیده است که در آن هزاران گونه‌ی باکتری زندگی می‌کند و هر کدام دارای نقش کلیدی در سلامتی میزبان هستند. فلور میکروبی روده کوچک دارای عملکردهای مختلفی نظیر بلوغ دستگاه گوارش، ثبات و بهبود عملکرد مخاط دستگاه ایمنی و کمک به هضم مواد غذایی است. گونه‌های باکتریایی ممکن است آنزیم‌هایی تولید و ترشح کنند که با آنزیم‌های تولید شده در بدن انسان متفاوت باشند؛ که برای هضم بهتر پلی‌مرهای پیچیده نظیر کربوهیدرات‌ها به ویژه فیبرها و پروتئین‌ها لازم و مطلوب باشند. این باکتری‌ها جهت بهبود عملکرد به یکسری مواد و ریز مغذی‌هایی نیاز دارند که عموما به پریبیوتیک معروف هستند (۲۱). تحقیقات نشان داده است که متابولیت‌های درون سلولی همین باکتری‌ها نیز موجب بهبود عملکرد آن‌ها می‌شود و قدرت تخمیر و هیدرولیزی پروبیوتیک‌ها در حضور متابولیت‌های درون سلولی باکتری‌های غیرفعال شده خود افزایش می‌یابد. در سال‌های اخیر استفاده از سلول‌های غیر فعال شده پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل‌هایی جهت تنظیم تعادل فلور میکروبی دستگاه گوارش پیشنهاد شده است. سلول‌های غیر فعال‌شده پروبیوتیک، پاراپروبیوتیک نام دارد (۲۲).

علت استفاده از پروبیوتیک‌ها در درمان بیماران مبتلا به سلیاک به دلیل از بین رفتن تعادل فلور میکروبی در روده کوچک این بیماران است و هم چنین نقش مهم این باکتری‌های مفید در تجزیه و حذف ترکیبات سمی، بهبود عملکرد نفوذناپذیری دستگاه گوارش به برخی ترکیبات و تنظیم پاسخ‌های دستگاه ایمنی ذاتی و اکتسابی از جمله علل استفاده از این باکتری‌هاست (۲۰). هم چنین علت استفاده از پاراپروبیوتیک‌ها در کنار پروبیوتیک‌ها در درمان بیماری سلیاک توانایی این سلول‌های غیرفعال شده مفید در بهبود عملکرد پروبیوتیک‌ها، تنظیم دستگاه ایمنی ذاتی و کاهش پاسخ‌های التهابی و بهبود تعادل میکروبی در روده کوچک است (۲۳). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که مخلوط باکتری‌های بومی ایران قادر به هیدرولیز اجزای گلیادینی تولید شده توسط پروتئاز گاوی و تبدیل به پپتیدهای کوچک‌تر هستند. نتایج این پژوهش آشکار ساخت که تیمار گلیادین هضم شده با پروبیوتیک‌ها در حضور و عدم حضور پاراپروبیوتیک‌ها موجب کاهش معنی‌دار وزن مولکولی باقیمانده‌های گلیادینی می‌شوند و به ویژه در تیمار حاوی پاراپروبیوتیک‌ها باقیمانده‌های گلیادینی به میزان بیشتری نسبت به سایر تیمارها به ابعاد مولکولی کوچک‌تر تبدیل شدند. این نتایج براساس آزمون‌های مختلف نظیر SDS-PAGE و ELISA انجام و ارائه گردید. میزان پپتیدهای با وزن مولکولی پایین‌تر از ۳ کیلودالتون در نمونه‌ی حاوی پاراپروبیوتیک بسیار بیشتر از سایر تیمارها بود که نشان‌دهنده‌ی این پدیده است که علی‌رغم غیر فعال و غیر زنده بودن پاراپروبیوتیک‌ها، متابولیت‌های دیواره سلولی و درون سلولی آن‌ها به بهبود عملکرد و رشد پروبیوتیک‌ها کمک کرده است و قدرت پروتئولیز پروبیوتیک‌ها در حضور پاراپروبیوتیک‌ها به میزان محسوسی افزایش یافته است. در تحقیق برندو و همکاران (۲۰۲۱)، استفاده از پاراپروبیوتیک‌های *L. casei* غیرفعال‌شده با فراصوت موجب بهبود عملکرد دستگاه گوارش موش‌های آزمایشگاهی شد. این محققان علت این امر را توانایی پاراپروبیوتیک‌ها در تنظیم عملکرد میکروبیوتای دستگاه گوارش ذکر کرده‌اند (۲۴). براساس پژوهش ناکامورا و همکاران (۲۰۱۲)، افزودن پاراپروبیوتیک‌ها موجب افزایش ۲ تا ۵ برابری بیان گیرنده ایمونوگلوبولین پلیمری mRNA شد که این پدیده یکی از مکانیزم‌های اصلی احتمالی در بهبود عملکرد دستگاه گوارش نیز بشمار می‌رود (۲۵).

در برخی پژوهش‌های پیشین نیز فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های پروبیوتیک به اثبات رسیده است. در پژوهش پایل و همکاران (۲۰۰۵)، استفاده از بیفیدیوباکترها نظیر *B. bifidum*، *B. longum* و *B. animalis* در زمان هضم روده‌ای گلیادین موجب تولید اجزای کوچکتر از آن شدند به گونه‌ای که دارای وزن مولکولی پایین‌تر نسبت به نمونه‌های تیمارنشده با پروبیوتیک‌ها بودند (۲۶)، که مشابه با نتایج پژوهش حاضر بود. هم‌چنین در پژوهش شاکری وهمکاران (۲۰۱۴)، اثر حضور سلول‌های غیرفعال‌شده *B. animalis* و *L. acidophilus* بر فعالیت‌های پروتئولیتیکی باکتری‌های پروبیوتیک ماست بررسی شده است. افزودن سلول‌های غیرفعال‌شده این دو باکتری موجب افزایش رشد و افزایش قدرت پروتئولیتیکی پروبیوتیک‌های زنده شد (۲۷). جهت تجزیه پپتیدهای حاصل از هضم پروتئازی معده، به ۵ نوع پپتیداز در روده نیاز است تا بتواند به طور کامل پپتیدازهای گلوتنی ایمنی‌زا را تجزیه نماید و پاسخ‌های التهابی آن را در بیماران سلیاکی رفع کند (۲۹، ۲۸). استفاده از ترکیب مختلف از پروبیوتیک‌ها نظیر پژوهش حاضر امری ضروری برای دستیابی به این مهم است، زیرا یک گونه یا یک سویه پروبیوتیک قادر نیست که همه‌ی آنزیم تجزیه کننده پپتیدهای گلوتن را به طور کامل تولید کند. قابل ذکر است که پاراپروبیوتیک‌ها علاوه بر افزایش عملکرد پروتئولیتیکی از راه ایجاد لایه‌ی پوشاننده سطحی پروتئینی از ایجاد التهابات و پاسخ‌های آلرژیک جلوگیری می‌کنند. قسمت پروتئینی دیواره پروبیوتیک‌ها به سطح سلول‌های مخاطی متصل می‌شود و با

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2023-12-10]

ایجاد بیوفیلم از چسبیدن آلرژن‌های غذایی جلوگیری می‌کنند و در نتیجه از شروع التهاب در بدن فرد میزبان جلوگیری می‌کنند (۳۰).

قابل ذکر است که در پژوهش حاضر از چهار نوع باکتری پروبیوتیک شامل یک سویه لاکتوباسیلوس (*L. acidophilus*) و سه سویه بیفیدوباکتر (*B. bifidum, B. lactis* و*B. longum*) استفاده شد که تجمع گونه‌ها و سویه‌های مختلف می‌تواند سبب هم افزایی و بهبود عملکرد این باکتری‌های سلامتی‌بخش شود و موجب افزایش توانایی پروتئازی در تجزیه پپتیدهای گلیادین گردد.

در تحقیق حاضر از پاراپروبیوتیک‌ها در کنار پروبیوتیک‌ها استفاده شد که موجب بهبود عملکرد و افزایش خاصیت پروتئازی پروبیوتیک‌ها گردید؛ به گونه‌ای که قادر به تجزیه بیشتر پپتیدهای گلیادین و تولید پپتیدهای با وزن مولکولی بسیار پایین شد. تاکنون پژوهشی در این زمینه صورت نگرفته است، اما استفاده از پاراپروبیوتیک‌ها در کنار پروبیوتیک‌ها در پژوهش پروری و همکاران (۲۰۲۰)، در ماست موجب افزایش قدرت تخمیر و زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها و افزایش متابولیت‌های تولیدی پروبیوتیک‌ها در ماست پروبیوتیک شده است (۱۸). به نظر می‌رسد ترکیبات مغذی موجود در سلول غیرفعال شده پروبیوتیک‌ها خود به عنوان یک پریبیوتیک عمل می‌کند و هم چنین از پروبیوتیک‌ها در برابر عوامل نامطلوب محافظت کرده به گونه‌ای که موجب افزایش زنده‌مانی آن می‌شود. علاوه براین اثرات سلامتی بخش پاراپروبیوتیک‌ها به تنهایی نیز بر میکروبیوتای روده و سلامت دستگاه گوارش به اثبات رسیده است. به گونه‌ای که مصرف آنها در افراد بیمار مبتلا به نقص سیستم ایمنی و افراد مبتلا به بیماری‌های گوارشی موجب تنظیم دستگاه ایمنی و بهبود عملکرد دستگاه گوارش و حفظ تعادل فلور میکروبی آن شده است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که مکمل پروبیوتیکی-پاراپروبیوتیک تحقیق حاضر به عنوان یک مکمل سلامتی بخش است که هر یک از اجزای آن به صورت جداگانه و ترکیب با هم قادر به کاهش مشکلات بیماران مبتلا به سلیاک خواهد بود.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پروبیوتیک‌ها در کنار پاراپروبیوتیک‌ها قادر به کاهش سمیت گلیادین برای بیماران سلیاکی خواهند بود که این ویژگی با اثر بر پپتیدهای گلیادین در اثر تولید آنزیم‌های پپتیداز صورت گرفته است، بنابراین از اثر مخرب پپتیدهای گلیادین بر سلول‌های مخاطی روده جلوگیری می‌کنند. هم چنین نتایج تحقیق حاضر نشان از توانایی فراوان پروبیوتیک‌های بومی به ویژه مخلوط آنها در کاهش سمیت گلیادین را نشان داد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، با توجه به حساس بودن بیماران سلیاک نیاز است که در آینده مطالعات آزمایشگاهی و بالینی در سطح وسیع‌تری جهت تولید مکمل‌ها و شناسایی سویه‌های مطلوب پروبیوتیک‌های مؤثر در تجزیه کامل گلیادین انجام شود.

References

1. Green PH, Cellier C. Celiac disease. New england journal of medicine. 2007;357(17):1731-43.
2. Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. Science. 2002;297(5590):2275-9.
3. Malekzadeh R, Shakeri R. Celiac disease in Iran. Tehran University Medical Journal. 2008;65(2):1-11.
4. Tavakkoli A, Green PH. Probiotic Therapy for Celiac Disease. Journal of Clinical Gastroenterology. 2013;47(2):101-3.
5. Sainsbury A, Sanders DS, Ford AC. Prevalence of irritable bowel syndrome–type symptoms in patients with celiac disease: a meta-analysis. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2013;11(4):359-65. e1.
6. Wacklin P, Laurikka P, Lindfors K, Collin P, Salmi T, Lähdeaho M-L, et al. Altered duodenal microbiota composition in celiac disease patients suffering from persistent symptoms on a long-term gluten-free diet. Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG. 2014;109(12):1933-41.
7. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. Journal of clinical pathology. 2009;62(3):264-9.
8. Di Cagno R, Rizzello CG, Gagliardi F, Ricciuti P, Ndagijimana M, Francavilla R, et al. Different fecal microbiotas and volatile organic compounds in treated and untreated children with celiac disease. Applied and environmental microbiology. 2009;75(12):3963-71.
9. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalances in faecal and duodenal Bifidobacterium species composition in active and non-active coeliac disease. BMC microbiology. 2008;8(1):1-9.
10. Di Cagno R, De Angelis M, De Pasquale I, Ndagijimana M, Vernocchi P, Ricciuti P, et al. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. BMC microbiology. 2011;11(1):1-21.
11. Olivares M, Castillejo G, Varea V, Sanz Y. Double-blind, randomised, placebo-controlled intervention trial to evaluate the effects of Bifidobacterium longum CECT 7347 in children with newly diagnosed coeliac disease. British journal of nutrition. 2014;112(1):30-40.
12. Klemenak M, Dolinšek J, Langerholc T, Di Gioia D, Mičetić-Turk D. Administration of Bifidobacterium breve Decreases the Production of TNF-α in Children with

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2023-12-10]

Celiac Disease. Digestive diseases and sciences. 2015;60(11):3386-92.

13. Francavilla R, Piccolo M, Francavilla A, Polimeno L, Semeraro F, Cristofori F, et al. Clinical and microbiological effect of a multispecies probiotic supplementation in celiac patients with persistent IBS-type symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. Journal of clinical gastroenterology. 2019;53(3):e117.

14. Laparra JM, Sanz Y. Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. Journal of cellular biochemistry. 2010;109(4):801-7.

15. Orlando A, Linsalata M, Bianco G, Notarnicola M, D'Attoma B, Scavo MP, et al. Lactobacillus rhamnosus GG Protects the Epithelial Barrier of Wistar Rats from the Pepsin-Trypsin-Digested Gliadin (PTG)-Induced Enteropathy. Nutrients. 2018;10(11).

16. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). Genes & nutrition. 2011;6(3):261-74.

17. Barros CP, Guimaraes JT, Esmerino EA, Duarte MCK, Silva MC, Silva R, et al. Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. 2020;32:1-8.

18. Molaee Parvarei M, Fazeli MR, Mortazavian AM, Nezhad SS, Mortazavi SA, Golabchifar AA, et al. Comparative effects of probiotic and paraprobiotic addition on microbiological, biochemical and physical properties of yogurt. Food research international. 2021;140:110030.

19. Lindfors K, Blomqvist T, Juuti-Uusitalo K, Stenman S, Venäläinen J, Mäki M, et al. Live probiotic Bifidobacterium lactis bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. Clinical & Experimental Immunology. 2008;152(3):552-8.

20. Giorgi A, Cerrone R, Capobianco D, Filardo S, Mancini P, Zanni F, et al. A probiotic preparation hydrolyzes gliadin and protects intestinal cells from the toxicity of pro-inflammatory peptides. Nutrients. 2020;12(2):495.

21. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. Cell. 2014;157(1):121-41.

22. Zendeboodi F, Ejtahed H-S, Gholian MM, Mortazavian AM, Sohrabvandi S, Khorshidian N, et al. Beneficial Effects of Inactive and Non-Viable Probiotics on Health. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2021;30(193):125-39.

23. Cuevas-González PF, Liceaga AM, Aguilar-Toalá JE. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. Food Research International. 2020;136:109502.

24. Brandão LR, de Brito Alves JL, da Costa WKA, Ferreira GdAH, de Oliveira MP, da Cruz AG, et al. Live and ultrasound-inactivated Lacticaseibacillus casei modulate the intestinal microbiota and improve biochemical and cardiovascular parameters in male rats fed a high-fat diet. Food & Function. 2021;12(12):5287-300.

25. Nakamura Y, Terahara M, Iwamoto T, Yamada K, Asano M, Kakuta S, et al. Upregulation of Polymeric Immunoglobulin Receptor Expression by the Heat-Inactivated Potential Probiotic Bifidobacterium bifidum OLB6378 in a Mouse Intestinal Explant Model. Scandinavian journal of immunology. 2012;75(2):176-83.

26. Pyle GG, Paaso B, Anderson BE, Allen DD, Marti T, Li Q, et al. Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2005;3(7):687-94.

27. Shakerian M, Hadi Razavi S, Khodaiyan F, Ziai SA, Saeid Yarmand M, Moayedi A. Effect of different levels of fat and inulin on the microbial growth and metabolites in probiotic yogurt containing nonviable bacteria. International journal of food science & technology. 2014;49(1):261-8.

28. De Angelis M, Cassone A, Rizzello CG, Gagliardi F, Minervini F, Calasso M, et al. Mechanism of degradation of immunogenic gluten epitopes from Triticum turgidum L. var. durum by sourdough lactobacilli and fungal proteases. Applied and Environmental Microbiology. 2010;76(2):508-18.

29. Francavilla R, De Angelis M, Rizzello CG, Cavallo N, Dal Bello F, Gobbetti M. Selected probiotic lactobacilli have the capacity to hydrolyze gluten peptides during simulated gastrointestinal digestion. Applied and environmental microbiology. 2017;83(14):e00376-17.

30. Shigwedha N. More than a few LAB alleviate common allergies: Impact of paraprobiotics in comparison to probiotical live cells. Journal of Biosciences and Medicines. 2014;2(03):56.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2023-12-10]

Effects of native Iranian Probiotics on Hydrolysis of Wheat Gliadin with the Aim of Decreasing Celiac Disease Symptoms

Zendeboodi F[1], Molaei Parvari M[2], Mortazavian AM[3], Sohrabvandi S[4]

1- Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Food Science and Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

2- Department of Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*3- *Corresponding author: Prof, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Food Science and Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences*

4- Prof, Department of Food Technology Research, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology/National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received 6 Feb, 2023 **Accepted 15 May, 2023**

Background and Objectives: Celiac disease is an autoimmune illness that occurs due to the body intolerance to gluten protein in humans. Research have shown that probiotics can promote health in people with celiac disease through regulating inflammatory processes and hydrolyzing peptides in the small intestine. The present study was carried out to investigate ability of a mixture of native Iranian probiotics (one strain of *Lactobacillus* spp. and three strains of bifidobacteria) with their paraprobiotic cells in hydrolysis of gluten peptides.

Materials & Methods: Gliadin protein mixture and its peptides before and after treatment with probiotics in presence and absence of paraprobiotics were analyzed using sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: Results of the experiments showed that human digestive enzymes could not hydrolyze gliadin peptides and gastric hydrolyzed gliadin was well decomposed by the probiotics in presence of paraprobiotics. Moreover, low-molecular weight components achieved with no toxic effects in celiac patients.

Conclusion: Results of the current study revealed that the mixture of native Iranian probiotics in presence of their paraprobiotics might play protective roles in celiac patients.

Keywords: Viable and non-viable probiotic cells, Wheat gluten, Celiac disease, Gliadin hydrolysis

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2023-12-10]