



شناسایی مولکولی لاکتوباسیلوس‌های تجزیه‌کننده اگزالات

در بیماران دارای سنگ اگزالات کلسیم

محمد کارگر^{۱*}، روحی افکاری^۱، رضا اینالو^۲، مهدی کارگر^۳، صادق قربانی‌دالینی^۴

^۱ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

^۲ گروه اورولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم

^۳ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، گروه میکروبیولوژی

^۴ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان

چکیده

زمینه: مصرف بیش از حد غذاهای غنی از اگزالات زمینه‌ساز تشکیل سنگ اگزالات کلسیم کلیوی است. هدف از این پژوهش ارزیابی و جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالات در افراد مبتلا به سنگ اگزالات کلسیم کلیوی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت مقطعی - توصیفی بر روی نمونه‌های مدفوع و ادرار ۱۰۰ فرد سالم و ۱۰۰ فرد مبتلا به سنگ کلیه در بیمارستان شهید مطهری شهرستان جهرم انجام گردید. باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالات پس از غنی‌سازی و کشت در محیط اختصاصی با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و روش مولکولی 16S rRNA تعیین هویت گردیدند. همچنین وجود ژن‌های مؤثر بر تجزیه اگزالات، *oxc* و *frc* در باکتری‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در ۸۰ درصد از افراد سالم و در ۴۸ درصد از افراد مبتلا به سنگ کلیه لاکتوباسیلوس جداسازی گردید. در ۶۰ مورد (۸۸/۴۶ درصد) از لاکتوباسیلوس‌های جدا شده، ژن *oxc* و در ۱۴ مورد (۱۰/۹۴ درصد) ژن *frc* شناسایی شد. همچنین میزان اگزالات ادراری در افراد مبتلا به سنگ کلیه اختلاف معنی‌داری با افراد سالم داشت. اما لاکتوباسیلوس‌های تجزیه‌کننده اگزالات افراد سالم بیشتر از افراد مبتلا به سنگ کلیه بود. **نتیجه‌گیری:** چون یکی از دلایل افزایش اگزالات ادراری و افزایش سنگ اگزالات کلسیم کلیوی کاهش تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالات است، بنابراین استفاده از این باکتری‌ها به منظور کاهش سنگ کلیه پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالات، لاکتوباسیلوس‌ها، اگزالات کلسیم، سنگ کلیه

دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۲ - پذیرش مقاله: ۹۰/۳/۲۲

*جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی

مقدمه

عوامل ژنتیکی، اختلالات متابولیکی (سنتز بیش از حد اگزالات)، تنوع غذایی و فاکتورهای محیطی از مهم‌ترین عوامل ایجاد سنگ کلیه محسوب می‌شوند. با این که نقش دقیق و مکانیسم تأثیر عوامل یاد شده به درستی شناسایی نشده است، اما ۶۰ تا ۸۰ درصد از سنگ‌های کلیه در انسان در اثر اگزالات کلسیم ایجاد می‌شود (۱ و ۲). اگزالات در بدن انسان از دو راه اندوژنی (در طی سنتز از اسیدآسکوربیک) و اگزوژنی (مصرف غذای غنی از اگزالات) افزایش می‌یابد (۳ و ۴).

بین مصرف غذای اگزالاتی و تشکیل سنگ اگزالات کلسیم ارتباط مستقیمی وجود دارد. قبلاً این اعتقاد وجود داشت که مصرف غذاهای اگزالاتی تنها به میزان ۱۰ درصد موجب افزایش اگزالات ادراری می‌گردد. اما پژوهش‌های هولمز (Holmes) و ماسی (Massey) نشان داد که مصرف غذاهای غنی از اگزالات می‌تواند سطح اگزالات ادراری را بین ۲۴ تا ۵۳ درصد افزایش دهد (۵ و ۶). بیشترین میزان جذب اگزالات غذایی در روده کوچک و کولون انجام می‌شود و مصرف غذاهای غنی از اگزالات ۱۰ تا ۲۰ برابر افزایش اگزالات ادراری را به دنبال دارد (۷).

به‌طور کلی، دفع بیش از ۳۰۰ تا ۵۰۰ میکرومول در روز اگزالات ادراری منجر به بروز پدیده افزایش اگزالات ادراری (هیپراگزالوریا) و زمینه‌ساز تخریب بافت‌های کلیوی، نارسایی حاد کلیوی و تشکیل کریستال‌های اگزالاتی در بخش‌های مجاری ادراری می‌باشد (۸ و ۹). آلیسون (Alison) و دوسون (Dowson) برای اولین بار با بررسی دستگاه گوارش نشخوارکنندگان و نوع غذای مصرفی آن‌ها نقش

باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالات در دستگاه گوارش را پیشنهاد نمودند (۱۰). همچنین ویسه (Weese) و روسیو (Rousseau) نقش ژن‌های مؤثر در تجزیه اگزالات، *oxc* (کد کننده آنزیم‌های اگزالیل کوآنزیم آ دکربوکسیلاز^۱) و *frc* (کد کننده و فورمیل کوآنزیم آ ترانسفراز^۲) در کاهش اگزالات ادراری را نشان دادند (۱۱).

گلدفارب (Goldfarb) و همکاران با مطالعه افراد مبتلا به هیپراگزالوریا نشان دادند که یک دوره درمان ۴ هفته‌ای با پروبیوتیک‌های حاوی *اگزالوباکتر* (*oxadrop*) می‌تواند موجب کاهش معنی‌دار اگزالات ادراری از ۵۹/۱ میلی‌گرم به ۵۵/۴ میلی‌گرم گردد (۱۲). کافمن (Kaufman) و همکاران با مقایسه‌ی ۲۴۷ فرد بزرگسال مبتلا به تکرر تشکیل سنگ اگزالات کلسیم ادراری و ۲۵۹ فرد سالم نشان دادند که استقرار *اگزالوباکتر فورمی* ژنر^۳ می‌تواند خطر تشکیل سنگ کلیه را ۷۰ درصد کاهش دهد (۱۳).

لوانیکا (Lewanika) و همکاران با بررسی *لاکتوباسیلوس‌های* گوارشی نشان دادند که وجود مجموعه‌های ژنی حاوی ژن‌های کلیدی مؤثر بر تجزیه اگزالات در ژنوم باکتری‌های یاد شده می‌تواند شرایط لازم برای کاهش سطح اگزالات ادراری را فراهم آورد (۱۴). هدف از این پژوهش، شناسایی و تعیین هویت مولکولی *لاکتوباسیلوس‌های* تجزیه‌کننده اگزالات و ارزیابی نقش ژن‌های *oxc* و *frc* در کاهش تشکیل سنگ اگزالات کلسیم کلیه می‌باشد.

¹ Oxalyl-CoADecarboxylase

² Formyl-CoATransferase

³ Oxalobacter Formigenes

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

این پژوهش به صورت مقطعی توصیفی بر روی ۲۰۰ فرد مراجعه‌کننده به بخش اورولوژی بیمارستان شهید مطهری شهرستان جهرم در سال‌های ۱۳۸۷ تا ۱۳۸۸ انجام شد. تمامی افراد مورد پژوهش توسط متخصص اورولوژی معاینه شده و پس از کسب موافقت کمیته اخلاقی دانشگاه و تعهدات بالینی و با ذکر رعایت تعهدات اخلاقی و تکمیل پرسشنامه مورد مطالعه قرار گرفتند. در پرسشنامه تنظیمی اطلاعات دموگرافیک و بالینی افراد مورد پژوهش مانند: سابقه بیماری و دیالیز، نوع غذای مصرفی و سابقه تشکیل سنگ، تکمیل و ثبت گردید. پس از سونوگرافی از مجاری ادراری بر اساس نظر پزشک متخصص افراد مورد پژوهش به دو گروه سالم (۱۰۰ نفر) و بیمار (۱۰۰ نفر) تقسیم‌بندی شدند.

اندازه‌گیری اگزالات ادراری

در تمامی افراد مورد پژوهش، اگزالات ادراری پس از جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته با استفاده از کیت آنزیمی اندازه‌گیری اگزالات (شرکت درمان کاوه، اصفهان، ۲۰۰۵)، اندازه‌گیری شد.

شناسایی و تعیین هویت مقدماتی باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالات

نمونه مدفوع تمام افراد مورد مطالعه پس از جمع‌آوری، به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم منتقل گردید. برای جداسازی لاکتوباسیلوس‌های تجزیه‌کننده اگزالات نمونه‌های مدفوع در محیط کشت مایع M.R.S (شرکت Merck) و محیط سنتزی B، دارای ۴ میلی‌مول اگزالات آمونیوم به مدت ۳ روز نگهداری و غنی‌سازی شد. سپس از محیط یاد شده به محیط کشت‌های جامد

MRS و B دارای pH ۵/۵ تا ۶، منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۳ روز به ترتیب در شرایط میکروآیروفیلیک و بی‌هوازی گرم‌خانه‌گذاری گردیدند. سپس کلنی‌های احتمالی لاکتوباسیلوس در محیط‌های جامد انتخابی Rogosa agar (شرکت Merck) و Tomato Juice agar (شرکت Merck) خالص‌سازی و به مدت سه روز در شرایط میکروآیروفیلیک در حرارت ۳۷ درجه گرم‌خانه‌گذاری شد. در نهایت کلنی‌های احتمالی بر اساس مورفولوژی، رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز، تست کاتالاز، تخمیر قندهای گلوکز، مانوز، فروکتوز، آرابینوز، زایلوز و تست‌های بیوشیمیایی مطابق جداول کتاب برگگی (۲۰۰۵) تعیین هویت مقدماتی شدند (۱۵). برای انجام تخمیر قندها، ابتدا محیط پایه M.R.S (حاوی ۹ گرم NaCl، ۳ گرم پیتون، ۰/۱ گرم فلفل رد و ۱ لیتر آب مقطر) تهیه و پس از ۱۵ دقیقه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، سپس قندهای مورد نظر را جداگانه با روش پالایش (فیلتراسیون) استریل و به میزان ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) به محیط پایه افزوده شد.

تعیین هویت مولکولی لاکتوباسیلوس‌های تجزیه‌کننده اگزالات

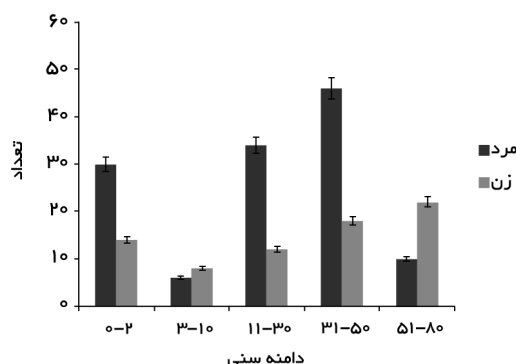
در ابتدا لاکتوباسیلوس‌های احتمالی در محیط MRS مایع غنی‌سازی و سپس به وسیله کیت استخراج DNPTM ساخت شرکت سیناژن جداسازی DNA انجام شد. برای تعیین هویت لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از پرایمرهای یونیورسال Bac1/Bac2 پیشنهاد شده به وسیله کومار (Kumar) و برای شناسایی ژن‌های تجزیه‌کننده اگزالات از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *oxc* و *frc* پیشنهاد شده به وسیله آلرمن (Alermann) و توروینی (Turoni)

آنالیز آماری

داده‌های این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA) ویرایش ۱۱/۵ و آزمون‌های مربع کای، دقیق فیشر و آنالیز واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقدار عدد P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این پژوهش، با استفاده از علایم بالینی و آزمون سونوگرافی ۱۰۰ فرد سالم و ۱۰۰ فرد بیمار دارای سابقه سنگ کلیه شناسایی گردیدند. از افراد مورد بررسی ۶۲ نفر مرد (۶۲ درصد) و ۳۸ نفر زن (۳۸ درصد) سابقه تشکیل سنگ داشتند. تمامی افراد مورد بررسی به ۶ گروه سنی ۰-۲، ۳-۱۰، ۱۱-۳۰، ۳۱-۵۰ و ۵۱-۸۰ سال تقسیم‌بندی شدند (نمودار ۱).



نمودار ۱) فراوانی مطلق و نسبت (درصد) جمعیت مورد پژوهش بر اساس جنسیت و گروه سنی

با استفاده از آزمون آماری ANOVA مشخص شد که سنگ سازی کلیوی با سن و جنسیت افراد بیمار مورد پژوهش ارتباط معنی‌داری دارد ($P=0/012$). در افراد مورد بررسی سنگ‌سازی کلیوی در مردان در گروه‌های سنی پایین‌تر و در زنان در دامنه سنی بالاتر مشاهده شد (نمودار ۲).

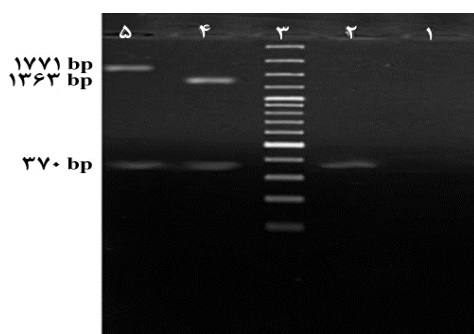
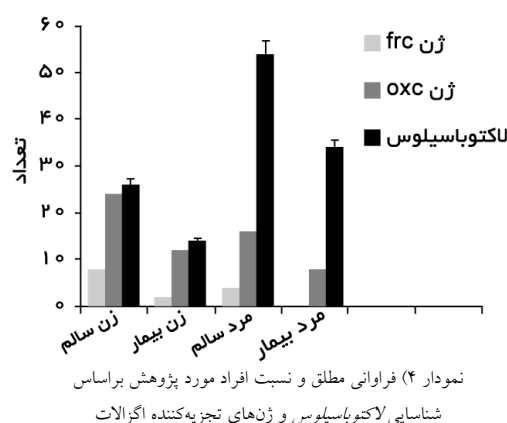
(جدول ۱) استفاده شد (۱۶). از باکتری‌های لاکتوباسیلوس /سیدوفیلوس ۱۶۴۳ PTCC و لاکتوباسیلوس کازئی ۱۶۰۸ PTCC به عنوان کنترل مثبت و از باکتری /شریشیا کلی ۱۳۹۹ PTCC و سالمونلا پاراتیفی ۱۶۲۴ BRTCC به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول ۱) پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

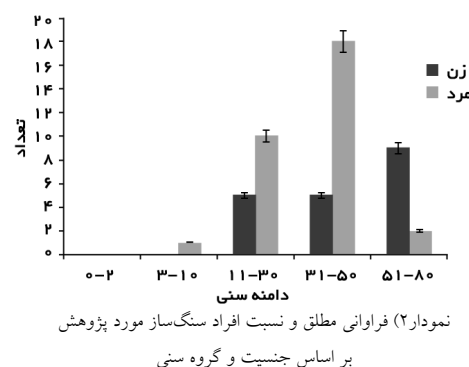
ژن	پرایمر	آمپلیکون (bp)
16S rRNA	F: 5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3' R: 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'	۳۷۰
oxc	F: 5'-CTTGAAATGCAAGATGAAAGCA-3' R: 5'-CTTCAGTCATTATTATTCTCC-3'	۱۷۷۱
frc	F: 5'-GGAGAATAAATAATGACTGAAGA-3' R: 5'-CGGTAAAAATAATTATTCACC-3'	۱۳۶۳

برای انجام روش PCR، از دستگاه ترموسایکلر (Techne) با شرایط: حرارت 94°C به مدت ۱ دقیقه (Hot start) 94°C به مدت ۱ دقیقه (Denaturation)، به صورت 72°C به مدت ۱ دقیقه (Annealing)، به صورت گرادینت کاهشی $0/1^{\circ}\text{C/s}$ از ۶۰ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد و مرحله گسترش نهایی 72°C (Extention) و به مدت ۱ دقیقه استفاده شد. برای این منظور ۲/۵ میکرو لیتر بافر $10\times$ ، ۱ میکروگرم DNA الگو، ۱ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول مخلوط dNTPs، ۱/۵ میلی‌مول MgCl_2 و ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase با ۱۶/۷ میکرو لیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس محصولات PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با استفاده از نور UV مورد ارزیابی قرار گرفت.

با آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) مشخص شد که بین تشکیل سنگ کلیه و افزایش اگزالات ادراری در افراد بیمار ارتباط معنی‌داری ($P=0$) وجود دارد. با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی در ۱۲۸ نفر (۶۴ درصد) لاکتوباسیلوس شناسایی گردید. تکثیر قطعه ۳۷۰ جفت بازی ژن *16 SrRNA* نشان‌دهنده وجود لاکتوباسیلوس‌ها و تکثیر قطعات ۱۷۷۱ و ۱۳۶۳ جفت بازی به ترتیب نشان‌دهنده ژن‌های *oxc* و *frc* بود (شکل ۱). از لاکتوباسیلوس‌های جدا شده در ۶۰ مورد (۸۷/۴۶ درصد) ژن *oxc* و در ۱۴ مورد (۸۷/۲۱ درصد) ژن *frc* شناسایی گردید. نتایج نشان داد که در افراد بیمار میزان جداسازی لاکتوباسیلوس‌های تجزیه‌کننده اگزالات کمتر از افراد سالم می‌باشد ($p=0/002$) (نمودار ۴).

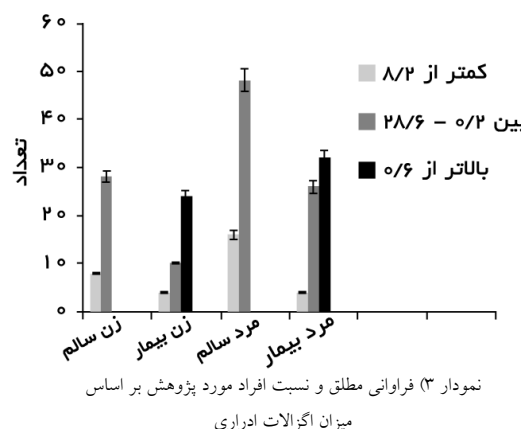


شکل ۱: محصول الکتروفورز ژن‌های لاکتوباسیلوس‌های تجزیه‌کننده اگزالات. قطعات ۳۷۰ جفت بازی مربوط به ژن *16 SrRNA* و قطعات ۱۷۷۱ و ۱۳۶۳ جفت بازی به ترتیب مربوط به ژن‌های *frc* (ستون ۴) و *oxc* (ستون ۵) می‌باشد. ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت و ستون ۳: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی است.



نتایج نشان داد که ۴۶ نفر (۶۵/۷۱ درصد) از افراد بیمار و ۲۴ نفر (۳۴/۲۹ درصد) از افراد سالم غذای اگزالاتی (مانند اسفناج، چای، قهوه و گوجه‌فرنگی) و ۵۴ نفر (۶۱/۳۶ درصد) از افراد بیمار و ۳۴ نفر (۳۸/۶۴ درصد) از افراد سالم لبنیات مصرف نموده بودند. با استفاده از آزمون دقیق فیشر مشخص شد که بین مصرف غذاهای اگزالاتی، لبنیات و تشکیل سنگ کلیه ارتباط معنی‌داری وجود دارد (در هر دو مورد $P=0$). در گروه سالم، به ترتیب در زنان و مردان صفر درصد و ۶ نفر (۳ درصد) و در گروه افراد بیمار، در زنان ۲۶ نفر (۶۸/۵۰ درصد) و در مردان ۴۶ نفر (۷۴/۲۰ درصد) سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک داشتند.

همچنین نتایج نشان داد که میزان دفع اگزالات ادراری بیش از ۰/۶ میلی‌مول در روز در افراد بیمار نسبت به افراد سالم بیشتر صورت می‌گیرد (نمودار ۳).



نمونه‌های مدفوعی ۶۳ بیمار دارای سنگ اگزالات کلسیم، نشان دادند که کمبود باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالاتی مانند *اگزالوباکتر فورمی ژنز* عامل افزایش سطح اگزالات ادراری و در نتیجه تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیمی است (۱). همچنین دیانا (Diana) و همکاران با بررسی افراد دارای سابقه سنگ کلیوی نشان دادند که تغییر رژیم غذایی و افزایش مصرف غذاهای اگزالاتی موجب ازدیاد دفع اگزالات ادراری به ۷۱ درصد می‌شود و به این ترتیب نتیجه‌گیری کردند که کمبود باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالات می‌تواند دلیل اصلی ایجاد سنگ کلیه باشند (۱۹).

پژوهش‌های کامپیری (Campieri) و همکاران بر روی افراد مبتلا به هیپراگزالوریا نشان داد که اضافه شدن *لاکتوباسیلوس‌های لیوفلیزه* شده به رژیم غذایی افراد یاد شده موجب کاهش سطح اگزالات ادراری می‌گردد (۲۱). پژوهش‌های تورونی (Turroni) و همکاران نشان دادند که گذشته از باکتری بی‌هوازی *اگزالوباکتر فورمی ژنز*، *لاکتوباسیلوس‌ها* نیز توانایی تجزیه اگزالات را دارند (۱۶).

پژوهش‌های ویسه (Weese) و روسیو (Rousseau) نشان داد که ژن‌های *oxc* و *frc* در هر دو گروه باکتری‌های یاد شده نقش کلیدی در تجزیه اگزالات را دارند (۱۱). تویوتا (Toyota) و همکاران نشان دادند که باکتری‌های گوارشی به‌ویژه *شریشیاکلی* نیز مانند *اگزالوباکتر فورمی ژنز* به دلیل داشتن ژن‌های *oxc* و *frc* توانایی تجزیه اگزالات را دارند (۲۲). بارانگو (Barrangou) و همکاران ویژگی پروبیوتیکی و ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مؤثر در تجزیه اگزالات *oxc* و *frc* را در باکتری *بیفیدوباکتریوم اینمالیس* زیر گونه *لاکتیس* و نقش مؤثر آن‌ها در کاهش معنی‌دار اگزالات ادراری را به اثبات رسانیدند و استفاده از



شکل ۲) محیط کشت Tomato Juice agar حاوی ۵٪ درصد اگزالات آمونیوم، (الف) کشت خالص یکی از *لاکتوباسیلوس‌های* تجزیه‌کننده اگزالات، (ب) کشت خالص *لاکتوباسیلوس‌هایی* که قادر به تجزیه اگزالات نیستند.

بحث

به‌طور کلی ۲ تا ۳ درصد از مردم دنیا مبتلا به سنگ‌های ادراری هستند (۱۷). در برخی از کشورهای دنیا مانند کره، شیوع این بیماری ۶۰ درصد است، اما در اروپا شیوع آن بین ۱ تا ۵ نفر از هر ۱۰۰۰۰۰ کودک می‌باشد (۱۸).

هسه (Hesse) و همکاران تأثیر مصرف مداوم غذای اگزالاتی را بر افزایش اگزالات ادراری و تشکیل رسوبات اگزالات کلسیم را به اثبات رسانیدند (۱۹). نتایج ما نیز در این پژوهش نشان می‌دهد که مصرف غذاهای اگزالاتی به‌ویژه اسفناج، چای و گوجه‌فرنگی در افراد بیمار اختلاف معنی‌داری نسبت به افراد سالم دارد. پژوهش‌های انجام شده توسط دوسون (Dowson) و همکاران نشان داد که در گروهی از انسان‌ها و حیوانات با وجود سابقه مصرف غذای اگزالاتی سطح اگزالات ادراری و یا سرمی افزایش نمی‌یابد. محققین یاد شده دلیل این مسأله را فعالیت تجزیه‌کنندگی باکتری‌های فلور گوارشی ذکر نموده‌اند (۱۰).

هاتچ (Hatch) و همکاران با ارزیابی بخش‌های دستگاه گوارش نشان دادند که جذب اگزالات در معده، روده کوچک و به میزان قابل توجهی در کولون انجام می‌شود (۲۰). همچنین کومار (Kumar) و همکاران با بررسی

راه‌های متفاوت متابولیسمی در باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالات (به‌عنوان نمونه داشتن هم زمان ژن‌های *frc* و *oxc*)، می‌تواند تجزیه بیشتر اگزالات را نیز به‌دنبال داشته باشد. نتایج ما در این پژوهش نیز تأییدکننده این مسأله بود.

ما نیز در این پژوهش برای اولین بار در ایران، نقش باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالات را در کاهش ابتلا به سنگ‌های اگزالات کلسیم مورد ارزیابی قرار دادیم. نتایج پژوهش‌های ما نشان داد که، رژیم غذایی غنی از اگزالات عامل اصلی ابتلا به سنگ‌های اگزالاتی می‌باشد. همچنین بین باکتری‌های تجزیه‌کننده اگزالات و کاهش ابتلا به سنگ کلیه در افراد مورد پژوهش ارتباط معنی‌داری وجود داشت.

به‌همین دلیل بررسی‌های جامع‌تری در سایر مناطق کشور و بر روی اقوام مختلف پیشنهاد می‌گردد. اهمیت این موضوع از نظر درمانی استفاده از لاکتوباسیلوس‌های تجزیه‌کننده اگزالات به‌عنوان پروبیوتیک است. همچنین آگاهی دادن به افراد پرخطر می‌تواند نقش مهمی را در تصحیح رژیم غذایی و پیشگیری از ابتلای به سنگ کلیه داشته باشد. ما در این پژوهش برای جداسازی باکتری *اگزالات‌ولباکتر فورمی‌ژنز* از محیط اختصاصی B و گرم‌خانه‌گذاری در شرایط بی‌هوازی واجد Gas pak استفاده نمودیم، اما در هیچ‌کدام از نمونه‌های مدفوع مورد بررسی موفق به جداسازی باکتری یاد شده نشدیم، شاید دلیل این مسأله حساسیت شدید این باکتری به اکسیژن و فراهم نشدن شرایط صد در صد بی‌هوازی به‌خاطر نبود محفظه‌های بی‌هوازی واجد دستکش‌های مخصوص باشد. استفاده از پروبیوتیک‌های واجد لاکتوباسیلوس به‌ویژه در مواد غذایی لبنی مانند ماست و پنیر در بیشتر کشورهای دنیا از جمله اخیراً در ایران متداول شده است. به‌همین دلیل اضافه کردن لاکتوباسیلوس‌های واجد

باکتری‌های پروبیوتیک تجزیه‌کننده اگزالات را در درمان هیپراگزالاتوریا پیشنهاد نمودند (۲۳). پژوهش‌های محققین یاد شده می‌تواند این فرضیه را مطرح سازد که امکان ارتباط بین مصرف مواد غذایی اقوام مختلف و میزان ابتلا به سنگ کلیه وجود دارد.

کامپیری و همکاران و بندازولی (Bendazzoli) و همکاران از pH ۶ تا ۷ و غلظت‌های مختلف اگزالات آمونیوم به‌منظور ارزیابی تجزیه اگزالات در محیط کشت استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که در غلظت پایین اگزالات آمونیوم رشد و تجزیه اگزالات انجام نمی‌شود، اما افزایش غلظت اگزالات محیط کشت موجب رشد کمتر و انجام نشدن تجزیه اگزالات گردید (۲۱ و ۲۵).

آزکارات پریل (Azcarate-Peril) و همکاران با بررسی ژن‌های *oxc* و *frc* در لاکتوباسیلوس‌ها نشان دادند که بیان این ژن‌ها به pH و تغییر غلظت اگزالات آمونیوم محیط بستگی دارد، به‌طوری که در pH ۵/۴ تا ۵/۵ در حضور و یا عدم حضور اگزالات بیان ژن‌های یاد شده صورت می‌گیرد، اما در pH ۸/۶ بیان شان کاهش می‌یابد که دلیل این مسأله می‌تواند جهش‌پذیری و حساسیت بیشتر ژن *frc* باشد (۲۴). همچنین Debo و همکاران با بررسی ژن *frc* ۵۳ موتاسیون مؤثر بر کاهش بیان آنزیم مولد آن را شناسایی نمودند (۲۶). این مسأله می‌تواند دلیلی بر شناسایی متفاوت ژن‌های تجزیه‌کننده اگزالات باشد. با توجه به‌اینکه ما در این پژوهش تجزیه اگزالات را در دامنه pH ۵/۵ تا ۶ مورد ارزیابی قرار دادیم، این احتمال وجود دارد که تجزیه اگزالات با تغییرات pH تأثیر متفاوتی بر بیان ژن داشته باشد. همچنین با اینکه داشتن تنها یکی از ژن‌های تجزیه اگزالات می‌تواند موجب تجزیه اگزالات گردد، اما بدیهی است که

سپاس و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی این پژوهش اعلام می‌دارند.

ژن‌های تجزیه‌کننده اگزالات به ترکیب پروبیوتیک‌های متداول و ارزیابی برهم کنش‌های میکروبی آن‌ها می‌تواند در آینده یک زمینه کاربردی جدید محسوب شود. انجام پایش مستمر و گسترده در تمامی فصول سال در سایر مناطق کشور و بررسی نقش باکتری‌های پروبیوتیک در پیشگیری از ابتلای به سنگ کلیه می‌تواند تأیید کننده نتایج این پژوهش باشد.

References:

1. Kumar R, Mukherjee M, Bhandari M, et al. Role of *Oxalobacter formigenes* in calcium oxalate stone disease: A study from North India. *Eur Urol* 2002; 41: 318-22.
2. Tiselius HG. Epidemiology and medical management of stone disease. *BJU Int* 2003; 91: 758-67.
3. Park S, Pearle MS. Pathophysiology and management of Calcium stones. *Urol Clin North Am* 2007; 34: 323-34.
4. Erickson SB, Cooper K, Broadus AE, et al. Oxalate absorption and postprandial urine supersaturation in an experimental human model of absorptive hypercalciuria. *Clin Sci (Lond)* 1984; 67: 131-8.
5. Holmes RP, Goodman HO, Assimos DG. Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. *Kidney Int* 2001; 59: 270-6.
6. Massey LK. Food oxalate: factors affecting measurement, Biological variation, and Bioavailability. *J Am Diet Assoc* 2007; 107: 1191-4.
7. Khan SR, Hackett RL. Role of organic matrix in urinary stone formation: an ultrastructural study of crystal matrix interface of calcium oxalate monohydrate stones. *J Urol* 1993; 150: 239-45.
8. Jonassen JA, Cao LC, Honeyman T, et al. Mechanisms mediating oxalate-induced alterations in renal cell functions. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2003; 13: 55-72.
9. Scheid CR, Cao LC, Honeyman T, et al. How elevated oxalate can promote kidney stone disease: Changes at the surface and in the cytosol of renal cells that promote crystal adherence and growth. *Front Biosci* 2004; 9: 797-808.
10. Allison MJ, Dawson KA, Mayberry WR, et al. *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: Oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. *Arch Microbiol* 1985; 141: 1-7.
11. Weese JS, Rousseau J, Weese HE. Variation in shedding of *Oxalobacter formigenes* in feces of healthy dog. *Vet Microbiol* 2009; 139: 421-4.
12. Goldfarb DS, Modersitzki F, Aslin JR. A randomized, controlled Trial of lactic acid bacteria for idiopathic Hyperoxaluria. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 745-9.
13. Kaufman DW, Kelly JP, Curhan GC, et al. *Oxalobacter formigenes* may reduce the risk of calcium oxalate kidney stones. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1197-203.
14. Lewanika TR, Reid SJ, Abratt VR, et al. *Lactobacillus gasser* Gasser AM63(T) degrades oxalate in a multistage continuous culture simulator of the human colonic microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; 61: 110-20.
15. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Berge's manual systematic bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer; 2005.
16. Turroni S, Vitali B, Bendazzoli C, et al. Oxalate consumption by lactobacilli: evaluation of oxalyl-CoA decarboxylase and formyl-CoA transferase activity in *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Microbiol* 2007; 103: 1600-9.
17. Neuhaus TJ, Belzer T, Blau N, et al. Urinary oxalate excretion in urolithiasis and nephrocalcinosis. *Arch Dis Child* 2000; 82: 322-6.
18. Kim H, Jo MK, Kwak C, et al. Prevalence and epidemiologic characteristics of urolithiasis in Seoul, Korea. *Urology* 2002; 59: 517-21.
19. Zimmermann DJ, Hesse A, von Unruh GE. Influence of a high-oxalate diet on intestinal oxalate absorption. *World J Urol* 2005; 23:

- 324-9.
20. Hatch M, Freel RW. Intestinal transport of on obdurate anion: oxalate. *Urol Res* 2005; 33: 1-16.
21. Campieri C, Campieri M, Bertuzzi V, et al. Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration *Kidney Int* 2001; 60: 1097-105.
22. Toyota CG, Berthold CL, Gruez A, et al. Differential substrate specificity and kinetic behavior of *Escherichia coli* Yfdw and *Oxalobacter formigenes* formyl coenzyme A Transferase. *J Bacteriol* 2008; 190: 2556-64.
23. Barrangou R, Briczinki EP, Traeger LL, et al. Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and B1-04. *J Bacteriol* 2009; 191: 4144-51.
24. Azcarate-Peril MA, Bruno-Barcena JM, Hassan HM, et al. Transcriptional and Functional Analysis of Oxalyl-Coenzyme A (CoA) Decarboxylase and Formyl-CoA Transferase Genes from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 1891-9.
25. Bendazzoli C, Turrone S, Gotti R, et al. Determination of oxalyl-coenzyme A decarboxylase activity in *Oxalobacter formigenes* and *Lactobacillus acidophilus* by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 854: 350-6.
26. Kong D, Chen Z, Ye Z, et al. Cloning and identification of *frc* gene from *Oxalobacter formigenes*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med* 2007; 27: 190-2.

Original Article

Molecular identification of oxalate-degrading lactobacillus in patients with calcium oxalate urolithiasis

M. Kargar ^{1*}, R. Afkari ¹, R. Inallo ², M. Kargar ³, S. Ghorbani-Dalini ⁴

¹Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, IRAN

²Department of Orology, Jahrom University of Medical Sciences, Fars, IRAN

³Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, IRAN

⁴Department of Microbiology, Jahrom Branch, Young Researcher's Club, Islamic Azad University, Jahrom, IRAN

(Received 22 Jan, 2011 Accepted 12 Jun, 2011)

Abstract

Background: Excessive use of diets with high level of oxalate causes an increase in urinary oxalate and leads to the formation of oxalate calcium stone. The aim of this study was evaluation and isolation of an oxalate-degrading bacterium in patients with kidney calcium oxalate stone.

Materials and Methods: This cross sectional-descriptive study was carried out on stool and urine samples of 100 healthy individuals and 100 patients with calcium oxalate stone disease in Motahari hospital of Jahrom. The Oxalate-degrading bacteria enriched and cultured in specific medium and were identified by using biochemical tests and 16S rRNA molecular method. Moreover, the presence of *oxc* and *frc* genes in isolated bacteria was detected.

Results: Lactobacilli were isolated from 80% of healthy individuals and 48% of patients with calcium oxalate stone disease. In 60(46.88%) cases of lactobacilli, *oxc* gene and 14 (10.94%) cases, *frc* genes were identified. There was a significant difference between level of urinary oxalate in patients with kidney stone and healthy individuals. But, oxalate – degrading lactobacilli colonization were significantly higher in healthy individuals in comparison with patients with kidney stone.

Conclusion: Since the reduction of oxalate- degrading bacteria is one of the reasons of hyperoxaluria and urolithiasis, using these bacteria is recommended for reducing kidney stones.

Keywords: oxalate-degrading bacteria, lactobacilli, calcium oxalate, kidney stone

*Address for correspondence: Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, IRAN; E-mail: mkargar@jia.ac.ir