

## تولید دوغ غنی شده با ویتامین D3 و ویتامین C و بررسی اثر آن بر باکتری کلستریدیوم دیفیسل با امکان بهره گیری از آن در تولید دوغ کوچ نشینان ایران

فاروق مولائی هسجین - دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

مریم عطایی\* - استادیار گروه دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

حسن حامدی - استادیار گروه دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

سیدامیر علی انوار - استادیار گروه دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۸ شهریور ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: ۰۵ آذر ۱۴۰۳

### چکیده

**مقدمه:** عفونت‌های معده-روده‌ای یکی از چالش‌های بهداشتی مهم در سراسر جهان به شمار می‌روند. یکی از اصلی‌ترین عوامل این عفونت‌ها، باکتری کلستریدیوم دیفیسیل است که می‌تواند باعث مشکلات جدی مانند کولیت، التهاب روده و اسهال شدید شود. روش‌های درمانی متداول شامل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها است که با مشکلاتی همچون مقاومت باکتریایی و عوارض جانبی مواجه هستند. بنابراین، نیاز به راهکارهای جدید و مؤثر برای مقابله با این عفونت‌ها احساس می‌شود.

**هدف پژوهش:** هدف پژوهش حاضر، بررسی تأثیر نانوامولسیون‌های حاوی ویتامین C و D3 بر رشد باکتری کلستریدیوم دیفیسیل پرداخته است. این تحقیق با هدف بررسی توانایی مهار رشد باکتری کلستریدیوم دیفیسیل و بهبود وضعیت سلامت روده‌ای از طریق استفاده از نانوامولسیون‌های حاوی ویتامین C و D3 انجام شد.

**روش‌شناسی تحقیق:** برای بررسی اثرات نانوامولسیون بر رشد باکتری، موش‌های سوری به سه گروه تقسیم شدند: گروه شاهد که فقط سوسپانسیون باکتری دریافت کردند، گروه اول که دوغ خالی به همراه باکتری دریافت کردند و گروه دوم که دوغ حاوی نانوامولسیون ویتامین C و D3 به همراه باکتری دریافت کردند. پس از ۱۴ روز، نمونه‌های مدفوع از تمامی گروه‌ها جمع‌آوری و بر روی محیط کشت اختصاصی CCFA کشت داده شد. نانوامولسیون‌ها با استفاده از تکنیک‌های مختلف از جمله Dynamic Light Scattering (DLS) و تعیین پتانسیل زتا مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**یافته‌ها و بحث:** نتایج نشان داد که نانوامولسیون حاوی ویتامین C و D3 توانایی مهار رشد باکتری کلستریدیوم دیفیسیل را دارد، به طوری که گروه دوم کمترین تعداد کلونی باکتری را نشان داد. تحلیل هیستوپاتولوژیک روده موش‌ها نیز نشان داد که نانوامولسیون ویتامینی می‌تواند تغییرات معنی‌داری در ساختار بافتی روده ایجاد کند. در گروه درمان، کاهش تراکم لایه‌های زیرمخاط و توزیع یکنواخت سلول‌های گابلت و لنفوسیت در لایه‌های مخاطی مشاهده شد که می‌تواند بهبود وضعیت التهابی روده و کاهش فعالیت التهابی را نشان دهد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نانوامولسیون ویتامین C و D3 می‌تواند به عنوان یک مولفه مؤثر در تغییرات ساختاری و التهابی روده عمل کند.

**نتیجه گیری:** نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌کند که نانوامولسیون‌های حاوی ویتامین C و D3 می‌توانند به عنوان یک راهکار جدید و مؤثر در کنترل و پیشگیری از عفونت‌های معده-روده‌ای و بهبود وضعیت سلامت روده‌ای مورد استفاده قرار گیرند. به علاوه، این تحقیق می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات بیشتری در زمینه استفاده از نانوامولسیون‌ها و ترکیبات طبیعی در درمان بیماری‌های روده‌ای و عفونی باشد.

**کلیدواژه‌ها:** کلستریدیوم دیفیسیل، نانوامولسیون، ویتامین C، ویتامین D3، دوغ غنی شده.

عفونت‌های معده-روده‌ای یکی از مشکلات جدی بهداشتی در سراسر جهان است. باکتری کلوستریدیوم دیفیسیل به عنوان یکی از عوامل اصلی این عفونت‌ها شناخته شده است و می‌تواند به مشکلات حادی مانند کولیت، التهاب روده و اسهال شدید منجر شود. روش‌های درمانی رایج شامل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد که اغلب با مشکلاتی همچون مقاومت باکتریایی و عوارض جانبی همراه است. در این راستا، استفاده از ترکیبات طبیعی و نانومولسیون‌ها به عنوان راهکارهای جدید و مؤثر در مقابله با عفونت‌های باکتریایی مورد توجه قرار گرفته‌اند. انگیزه اصلی از انتخاب این موضوع، یافتن راهکارهای جدید و مؤثر برای مقابله با عفونت‌های معده-روده‌ای و بهبود وضعیت سلامت روده‌ای است. با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی ویتامین C و D3، بررسی تأثیر نانومولسیون‌های حاوی این ویتامین‌ها بر رشد باکتری کلوستریدیوم دیفیسیل و ساختار بافتی روده می‌تواند به توسعه روش‌های درمانی جدید و کارآمد منجر شود. هدف اصلی این پژوهش، بررسی تأثیر نانومولسیون حاوی ویتامین C و D3 بر رشد باکتری کلوستریدیوم دیفیسیل و ساختار بافتی روده موش‌های سوری است. این پژوهش به دنبال یافتن راهکارهای جدید و مؤثر در کنترل و پیشگیری از عفونت‌های معده-روده‌ای و بهبود وضعیت سلامت روده‌ای است.

پرسش اصلی این تحقیق این است که آیا نانومولسیون حاوی ویتامین C و D3 می‌تواند رشد باکتری کلوستریدیوم دیفیسیل را مهار کند و تأثیری بر ساختار بافتی روده داشته باشد؟

فرضیه اصلی: نانومولسیون حاوی ویتامین C و D3 می‌تواند به طور مؤثر رشد باکتری کلوستریدیوم دیفیسیل را مهار کند و تغییرات مثبتی در ساختار بافتی روده ایجاد کند.

روش‌شناسی: این تحقیق از روش‌های آزمایشگاهی و تحلیلی استفاده می‌کند. نانومولسیون‌های حاوی ویتامین C و D3 تهیه شده و ویژگی‌های فیزیکی آن‌ها از طریق تکنیک‌های DLS و زتا پتانسیل مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس نانومولسیون به دوغ اضافه شده و تأثیر آن بر رشد باکتری و ساختار بافتی روده موش‌های سوری بررسی شد.

متغیرهای مستقل شامل نانومولسیون حاوی ویتامین C و D3 و متغیرهای وابسته شامل رشد باکتری کلوستریدیوم دیفیسیل و تغییرات ساختاری در بافت روده می‌باشد که موش‌های سوری به عنوان جامعه آماری مورد بررسی قرار گرفته است.

نتایج این تحقیق نشان داد که نانومولسیون حاوی ویتامین C و D3 می‌تواند به طور مؤثر رشد باکتری کلوستریدیوم دیفیسیل را مهار کند. همچنین، تحلیل‌های هیستوپاتولوژیک نشان داد که نانومولسیون می‌تواند تغییرات معنی‌داری در ساختار بافتی روده ایجاد کند، از جمله کاهش تراکم لایه‌های زیرمخاط و توزیع یکنواخت‌تر سلول‌های گابلت و لنفوسیت در لایه‌های مخاطی.

این پژوهش نشان داد که نانومولسیون‌های حاوی ویتامین C و D3 می‌توانند به عنوان یک راهکار جدید و مؤثر در کنترل و پیشگیری از عفونت‌های معده-روده‌ای و بهبود وضعیت سلامت روده‌ای مورد استفاده قرار گیرند. یافته‌های این تحقیق می‌تواند پایه‌ای برای تحقیقات بیشتر و توسعه روش‌های جدید در درمان و پیشگیری از بیماری‌های روده‌ای باشد.

سرطان روده بزرگ (کولورکتال) به عنوان سومین نوع شایع سرطان در جهان شناخته می‌شود، که سالانه بیش از یک میلیون نفر از جمعیت جهان به این بیماری مبتلا می‌شوند و بیش از ۵۰۰ هزار نفر از آن‌ها جان خود را از دست می‌دهند (Hoseini et al., 2015; Ferlay et al., 2022). بیماری التهابی روده یا التهاب مزمن دستگاه گوارش نیازمند درمان تخصصی از سوی متخصصان گوارش است. درمان این بیماری با داروهای پرهزینه و دارای عوارض جانبی همراه است (Baumgart & Sandborn, 2007; Molodecky et al., 2012).

استفاده از فناوری‌های نانو مولسیون برای افزودن ویتامین‌های اضافی به دوغ، به عنوان یک روش نوین، می‌تواند در پیشگیری و حتی درمان سرطان روده بزرگ به همراه الگوی تغذیه‌ای مناسب برای بیماران موثر باشد (Salvia-Trujillo et al., 2017). ویتامین‌های D3 و C به عنوان مهم‌ترین ویتامین‌ها با خواص ضد سرطانی، می‌توانند در مهار رشد سرطان روده بزرگ تأثیرگذار باشند (Feldman et al., 2014). باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش، به‌ویژه در روده کوچک و کولون، تأثیر زیادی بر سلامت افراد دارند. این باکتری‌ها در جذب و هضم غذا و تأثیر بر سلامت روحی و سیستم ایمنی نقش دارند. حفظ تعادل مناسب باکتری‌های مختلف برای سلامت روده ضروری است و

می‌تواند از عفونت و التهاب پیشگیری کند. در بیماران دچار التهاب روده، باکتری‌ها ممکن است به نحوه‌ای ناهموار و غیرطبیعی وجود داشته باشند، که ممکن است باعث شدت علائم و مشکلات متعددی شود (Thursby & Juge, 2017).

مطالعات اواخر دهه ۷۰ میلادی نشان دادند که *Clostridioides difficile* عاملی در ایجاد "کولیت با غشای کاذب" در انسان است. در این بیماری، التهاب و باقیمانده‌های سلولی در ناحیه گوارش ظاهر شده و ظاهراً به صورت غشای کاذب ایجاد می‌شود. گزارش‌ها نشان می‌دهند که ۹۵٪ از موارد کولیت با غشای کاذب با *Clostridioides difficile* ارتباط دارند و با توجه به افزایش مشکلات این باکتری، به عنوان یک چالش جهانی در نظام سلامت مطرح شده است (Sartelli et al., 2021). درمان عفونت‌های بیمارستانی ناشی از این باکتری بسیار هزینه‌بر است و عوامل مختلفی از جمله مصرف آنتی‌بیوتیک، سن، بستری شدن در بیمارستان، ابتلا به بیماری‌های کولون مانند بیماری التهابی روده یا سرطان کولورکتال، بیماری‌های ناتوان‌کننده، جراحی شکمی، سابقه ابتلا به عفونت‌های بیمارستانی *Clostridioides difficile*، و زندگی طولانی‌مدت در خانه سالمندان، در شیوع عفونت بیمارستانی این باکتری تأثیرگذارند. از دیگر عوامل خطر اثبات شده در این شیوع، سن بالای ۶۵ سال و مصرف همزمان چندین آنتی‌بیوتیک به همراه افزایش طول مدت درمان آنتی‌بیوتیکی است. بازگشت عفونت پس از درمان هم ممکن است به خصوص در افراد حساس اتفاق بیفتد (Ajami et al., 2018).

در واقع، واژه "دوغ" از واژه فارسی "دوشیدن" گرفته شده و به معنای ماده‌ای حاصل از دوشیدن است. دوغ نوشیدنی لبنی است که از ماست تهیه می‌شود. در ابتدا، هندی‌ها این نوشیدنی را به نام "لاسی" تهیه کردند که دو طعم متفاوت داشت: شور و شیرین. برای تهیه دوغ شور، ادویه‌جات از جمله فلفل اضافه می‌شد. از طرف دیگر، دوغ شیرین با ترکیب دوغ و گلاب، انبه یا لیمو تهیه می‌شد. امروزه، در برخی کشورها از جمله ایران و ترکیه، از این نوشیدنی استفاده می‌شود.

دوغ یک فرآورده شیر تخمیری است که از ترکیب ماست، آب قابل نوشیدن و نمک خوراکی قبل از تیمار حرارتی و تخمیر حاصل می‌شود. از ریزسازواره‌های سنتی مورد استفاده برای تولید دوغ، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی بولگاریکوس هستند. از سال ۲۰۰۲ میلادی به بعد، در ایالات متحده آمریکا معمول شد که از دوغ‌های شیرین (مشابه لاسی شیرین) استفاده شود. مردم آمریکا این فرآورده لبنی را نوشیدنی ماست می‌نامند.

### تکنولوژی تولید دوغ

دوغ از شیر گاو، گوسفند، بز، و ترکیب مخلوطی از این مواد تولید می‌شود. عموماً دوغ تا حد زیادی از شیر گاو تهیه می‌شود. در صنعت تولید دوغ، دو روش عمده برای تهیه آن وجود دارد. اولین روش، اضافه کردن آب به ماست است، در حالی که دومین روش از طریق افزودن استارتر به شیر انجام می‌شود. استارتر از پیش با آب رقیق شده و از نظر چربی و مواد جامد استاندارد شده است. در هر دو روش تولید دوغ، تفاوت اساسی در ترکیبات اصلی محصول نهایی وجود ندارد، با این حال، در دوغ حاصل از رقیق کردن ماست نسبت به دوغ حاصل از شیر رقیق کردن، مقدار استالیدی کمتر است.

در طول مدت نگهداری دوغ، ممکن است ضایعاتی مانند آلودگی به کپک و مخمر ایجاد شود که باعث کاهش کیفیت و مدت ماندگاری دوغ می‌شوند. آبی که به دوغ اضافه می‌شود باید به عنوان آب شرب مورد استفاده قرار گیرد و باید بدون آلودگی باشد (کمیته ملی صنایع غذایی، ۱۳۹۱).

### ارزش غذایی دوغ

دوغ یک نوشیدنی لبنی مناسب است که می‌تواند جایگزین مناسبی برای نوشابه در سبد غذایی تمام مردم ایران باشد. این نوشیدنی سالم و مفید است و تأمین‌کننده حدود یک چهارم نیاز روزانه به کلسیم است. همچنین، دوغ حاوی ویتامین‌های B<sub>2</sub>، B<sub>۱۲</sub>، و B<sub>۶</sub> است و دقیقاً برعکس نوشابه، به بهبود سلامت استخوان‌ها کمک می‌کند. طبق آخرین آمارها، تولید سالانه دوغ در ایران به حدود ۱۲۰۰۰۰ تن می‌رسد (Chen et al., 2023).

### عیوب فیزیکی دوغ

یکی از مشکلات مهمی که ممکن است در فرآورده‌های لبنی به وجود آید، مشکل ناپایداری و دوفاز شدن آن است. می‌دانیم که شیر دارای حدود ۸۷ درصد آب است، و پس از فرآوری، در محصولات لبنی مانند ماست و دوغ، بخشی از این آب در محصول حفظ می‌شود. پروتئین‌ها در این مواد مانند اسفنجی عمل می‌کنند و رطوبت را در خود نگه می‌دارند. در برخی موارد، این آب از پروتئین جدا شده و در بالای محصول قرار

می‌گیرد، که ممکن است شامل ویتامین، لاکتوز، مواد معدنی، و پروتئین‌های سرمی باشد. به طور کلی، آبی که در فرآورده‌های لبنی آزاد می‌شود، ارزش غذایی را کاهش نمی‌دهد، اما ممکن است تأثیرات منفی بر روی ویژگی‌های مصرف‌کننده داشته باشد (De Bont et al., 2002). جهت جلوگیری از دوفاز شدن دوغ، باید درجه حرارت گرم‌خانه‌گذاری و میزان اسیدیته به دقت تنظیم شود. به عنوان مثال، اگر دمای فرآیند حدود ۴۵ درجه سانتیگراد باشد، در pH بین ۶.۵ و ۶.۴ لخته نباید هم‌زده شود. اگر دما کاهش یابد تا ۳۷ درجه سانتیگراد در pH بالاتر، می‌توان لخته را بدون جدا شدن آب به هم‌زد. به طور کلی، اسیدیته برای دوفاز شدن دوغ باید در محدوده بحرانی ۰/۶۰ تا ۰/۷۵ باشد. از هم‌زدن شدید و طولانی دوغ ممکن است میزان دوفاز شدن با تزریق هوا افزایش یابد. در بسته‌ها یا ظروفی که به طور کامل پُر نشده‌اند و فضای بازی دارند، هوا در محصول نفوذ کرده و ممکن است دوفاز شدن را افزایش دهد (Salminen et al., 1998).

### ویتامین D3 و ویتامین C: خصوصیات و نیازهای سلامتی

ویتامین D (Vitamin D یا کلکسی‌فرول) یک ویتامین چربی‌ذوب ضروری است که برای حفظ سلامت استخوان، تنظیم سطوح کلسیم خونی و پیشگیری از کمبود آن در ارتباط با چندین بیماری و وضعیت ضروری است. VitD3 به عملکرد اعضا و عوامل پاتوژن برخی بیماری‌ها و وضعیت‌ها ارتباط دارد، از جمله فیزیولوژی عضلات (Wyatt et al., 2024)، برخی از انواع سرطان (Abo-Zaid et al., 2023)، دیابت (Taderegew et al., 2023)، ام اس چندگانه (López-Muñoz et al., 2023) و بیماری‌های قلبی عروقی (Mattumpuram et al., 2024) به علاوه موارد دیگر. کلکسی‌فرول یا VitD3 در پوست از ۷-دهیدروکلس‌ترول تولید می‌شود و همچنین ممکن است از طریق تابش فرابنفش بر روی لانولین سنتز شود. ارگوکلسی‌فرول یا VitD2 از تابش فرابنفش روی ارگوسترول مخمر به‌دست می‌آید. در کبد، VitD3 توسط آنزیم VitD-25-هیدروکسیلاز به شکل پخش‌شونده‌اش، (OH)D3۲۵، متابولیزه می‌شود. شکل هورمونی یا فعال آن در کلیه تولید می‌شود، جایی که شکل پخش‌شونده به ۱، (OH)2D۲۵ (توسط آنزیم (OH)D-1α۲۵-هیدروکسیلاز فعال می‌شود. بسیاری از عوامل تنظیم‌کننده فعال‌سازی VitD3 وجود دارند، اما مهم‌ترین آنها شامل سطوح کلسیم (Ca)، فسفر (P) و هورمون پاراتیروئید (PTH) می‌شوند (Rojas-Carabali et al., 2024).

کمبود ویتامین D3 (Vitamin D3) در بیماران مبتلا به چاقی نسبت به افراد با وزن نرمال بالاتر است. در تجزیه و تحلیل اخیر، مشخص شد که سطوح VitD3 در افراد مبتلا به چاقی ۳۵٪ بیشتر از افراد با میانگین BMI (شاخص توده بدنی) بود. این امر ممکن است به دلیل کاهش سنتز کبدی (OH)D3۲۵ به علت سیتوکین‌های ضد التهابی، کاهش تابش نور خورشید و گرفتار شدن VitD3 در بافت چربی باشد. عوامل دیگری که ممکن است بر سطوح VitD3 در گردش خون تأثیر بگذارند، شامل میزان چربی در بدن، جنسیت و تابش نور خورشید هستند. در یک مطالعه اخیر با مشارکت ۳۷۰ نفر بزرگترین ۱۸ تا ۵۵ سال در برزیل، نشان دادند که تقریباً ۸۰٪ از شرکت‌کنندگان سطوح (OH)D3۲۵ خود را در یا پایین‌تر از سطح مرزی ۳۰ نانوگرم در میلی‌لیتر داشتند. مدل رگرسیون خطی چندمتغیره نشان داد که عواملی مانند سن ( $P=0.02$ ;  $\beta=-0.076$ ) BMI ( $P=0.01$ ;  $\beta=-0.213$ ) HDL ( $P<0.001$ ;  $\beta=-0.104$ )، گلوکز خون ( $\beta=0.108$ )؛ ( $P=0.02$ ) و کاهش تابش نور خورشید ( $P<0.001$ ;  $\beta=-2.593$ ) همگی به عنوان عوامل پیش‌بینی‌کننده سطوح کم VitD3 مطرح شده‌اند. در مطالعه دیگر، نشان دادند که در گروه مبتلا به کمبود VitD3، درصد متغیر چربی بدنی به طور قابل توجهی بالاتر از گروه دارای کافی VitD3 بود ( $P<0.05$ ;  $r=-0.26$ ). آنها نتیجه گرفتند که این ارتباط ممکن است تحت تأثیر عوامل متابولیکی باشد (Lucchetta et al., 2022).

### نانوامولسیون‌ها

نانوامولسیون‌ها سیستم‌هایی هستند که دارای اندازه ذرات در بازه ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر هستند. این نوع امولسیون‌ها به دلیل اندازه کوچک ذرات درون آنها و خصوصیات خاصی که دارند، مانند پایداری سینتیکی، مقاومت در برابر رسوب و شفافیت (یا نیمه شفافیت)، تمایل به جدا شدن به فازهای مختلف و ایجاد خامه ندارند. به عبارت دیگر، نانوامولسیون‌ها سامانه‌های پایدار از نظر سینتیکی هستند. تفاوت مهم بین نانوامولسیون‌ها و امولسیون‌های معمولی در اندازه ذرات آنها است. در نانوامولسیون‌ها، ذرات به اندازه نانومتر (بین ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر) وجود دارند، در حالی که در امولسیون‌های معمولی اندازه ذرات بزرگتر است. این اندازه کوچک باعث می‌شود که نانوامولسیون‌ها به صورت شفاف یا نیمه شفاف دیده شوند و از خصوصیات منحصر به فردی برخوردار باشند (Dawit Moges et al., 2020).

### کاربرد نانو امولسیون‌ها در صنایع غذایی

استفاده از نانو امولسیون‌ها در صنایع مختلف به دلیل مزایای بسیاری که در مقایسه با امولسیون‌های معمول دارند، از جمله صنایع غذایی، نوشیدنی‌ها و داروسازی، به رشد چشمگیری انجامیده است. نانو امولسیون‌ها توانایی بسته‌بندی مواد چربی‌دوست را با فراهمی زیستی بالا تا حدی افزایش می‌دهند.

از جمله کاربردهای مهم نانو امولسیون‌ها، افزایش حلالیت مواد چربی‌دوست مانند کاروتنوئیدها، فیتواسترولها، اسیدهای چرب امگا-۳، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و مواد دیگر می‌باشد. این ویژگی به مواد غذایی مانند آبهای طعم‌دار، شیر و نوشابه‌ها اجازه می‌دهد که به ویتامین‌ها، مواد معدنی و ترکیبات دیگر اضافه شوند تا میزان تغذیه و ارزش غذایی محصولات افزایش یابد.

### روش‌های تولید نانو امولسیون‌ها

دو روش عمده برای تولید نانو امولسیون عبارتند از (Naseema et al., 2021):

۱. امولسیون سازی با انرژی پایین: در این روش، از انرژی کمتری برای تولید نانو امولسیون استفاده می‌شود، و معمولاً به کمک تجهیزات مکانیکی انجام می‌شود. این روش مناسب برای موادی است که حساسیت زیادی به افتاق ندارند.

۲. امولسیون سازی با انرژی بالا: در این روش، از انرژی بالا مانند امواج فشرده صوتی (ultrasonication) یا تکنیک‌های پیش‌رانهای مکانیکی دیگر برای تولید نانو امولسیون استفاده می‌شود. این روش می‌تواند به ایجاد نانو امولسیون‌ها با ویژگی‌های مطلوب کمک کند، اما ممکن است نیاز به تجهیزات پیشرفته‌تر و انرژی بیشتری داشته باشد.

مزایا و معایب روش‌های کم انرژی و پر انرژی برای تولید امولسیون‌ها به شرح زیر هستند (Safaya & Rotliwala, 2020)

– مزایای روش‌های کم انرژی:

۱. سادگی و ارزانی: روش‌های کم انرژی عمدتاً از تکنیک‌های مخلوط کردن ساده استفاده می‌کنند و این کارها بدون نیاز به تجهیزات پیچیده صورت می‌گیرد. این امر می‌تواند مزیت اقتصادی داشته باشد.

۲. لزوم مقادیر کمتر از سورفکتانت: روش‌های کم انرژی به عنوان نقطه قوت خود نیاز به مقادیر کمتر از سورفکتانت دارند.

۳. مناسب برای تولید امولسیون‌های کمیاب: این روش‌ها به خوبی برای تولید امولسیون‌های کمیاب یا تحت شرایط سخت‌تر کاربرد دارند.

– معایب روش‌های کم انرژی:

۱. کاربرد صنعتی محدود: روش‌های کم انرژی معمولاً مناسب برای مقیاس کاربری آزمایشگاهی هستند و مشکلاتی را در تولید صنعتی ممکن است ایجاد کنند.

۲. توزیع اندازه نانو ذرات محدودتر: توانایی روش‌های کم انرژی در کنترل دقیق توزیع اندازه نانو ذرات محدودتر است.

– مزایای روش‌های پر انرژی:

۱. کنترل دقیق توزیع اندازه ذرات: روش‌های پر انرژی معمولاً امکان کنترل دقیق تر توزیع اندازه ذرات را فراهم می‌کنند.

۲. کاربرد صنعتی گسترده‌تر: این روش‌ها برای تولید صنعتی بهتر و بزرگتر مناسب هستند.

۳. نیاز به غلظت پایین امولسیفایر: در روش‌های پر انرژی نیاز به غلظت کمتری از امولسیفایر و سورفکتانت وجود دارد.

– معایب روش‌های پر انرژی:

۱. پیچیدگی و هزینه بالا: استفاده از تجهیزات پیچیده و انرژی زیاد در این روش‌ها هزینه بالایی را ایجاد می‌کند.

۲. نیاز به تخصص تکنیکی: عملیات پر انرژی نیازمند تخصص فنی و نیروی انسانی مهارت‌دار است.

۳. احتمال دسته‌بندی بیش از حد ذرات: برخی روش‌های پر انرژی ممکن است به دسته‌بندی زیاد ذرات و کاهش یکنواختی منجر شوند.

۴. مصرف انرژی بیشتر: این روش‌ها بیشترین مقدار انرژی را مصرف می‌کنند که می‌تواند مسائل محیطی مربوط به مصرف انرژی ایجاد کند.

### باکتری کلستریدیوم دیفیسیل

بیماری عفونت کلستریدیوم دیفیسیل به علت حضور باکتری با همین نام، یک باکتری گرم مثبت و دارای اسپور، به وجود می‌آید. (Cairns et al., 2012) اصطلاح اسهال مرتبط با مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها برای اولین بار در دهه ۱۹۵۰ مطرح شد و در سال ۱۹۷۸ تأیید شد که کلستریدیوم دیفیسیل به عنوان عامل اصلی و شایع‌ترین عامل این بیماری شناخته می‌شود. برآوردهای انجام‌شده نشان می‌دهد که بین ۱۵ تا ۲۵

درصد موارد اسهال مرتبط با مصرف آنتی‌بیوتیک به کلستریدیوم دیفیسیل منسوب می‌شود (Bartlett, 1994). استفاده از واژه "دیفیسیل" در نام این میکروارگانیسم به دلیل دشواری در جداسازی و کشت آن در محیط‌های آزمایشگاهی استفاده شده است. همچنانکه کلستریدیوم دیفیسیل همچنان یک موضوع چالش‌برانگیز است زیرا نه تنها شیوع آن در حال افزایش است، بلکه همچنین منجر به بیماری‌های شدید و تهدیدکننده زندگی می‌شود و مدیریت و درمان آن مشکل است (Shields et al., 2015).

کلستریدیوم دیفیسیل دو توکسین به نام‌های TcdA و TcdB تولید می‌کند (Taylor et al., 1981). این دو توکسین با ایجاد اختلال در ساختار سلولی سلول‌های اپیتلیال، منجر به التهاب حاد و آسیب به بافت می‌شوند. این توکسین‌ها منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوز و پاسخ التهابی سلول‌های تحت تأثیر قرار می‌دهند. این وضعیت منجر به بروز عفونت کلستریدیوم دیفیسیل به عنوان یک بیماری مرتبط با روده و توکسین‌ها می‌شود که نمایانمات از بی‌علامت گرفته تا اسهال‌های خفیف از یک سو و کولیت غشای کاذب و مگاکولون توکسیک و حتی مرگ از سوی دیگر را ایجاد می‌کند (Shields et al., 2015).

در واقع، توکسین‌های A و B به عنوان گلوکوزیل ترانسفرا عمل می‌کنند و باعث فعال شدن آنزیم‌های Rho GTPase می‌شوند. این دسته از آنزیم‌ها با ایجاد درهم‌ریختگی در اسکلت سلولی کولونوسیت‌ها باعث مرگ این سلول‌ها می‌شوند. (Jank et al., n.d).

## روش پژوهش

این تحقیق از روش‌های آزمایشگاهی و تحلیلی استفاده می‌کند. نانومولسیون‌های حاوی ویتامین C و D3 تهیه شده و ویژگی‌های فیزیکی آن‌ها از طریق تکنیک‌های DLS و زتا پتانسیل مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس نانومولسیون به دوغ اضافه شده و تأثیر آن بر رشد باکتری و ساختار بافتی روده موش‌های سوری بررسی شد.

متغیرهای مستقل شامل نانومولسیون حاوی ویتامین C و D3 و متغیرهای وابسته شامل رشد باکتری کلستریدیوم دیفیسیل و تغییرات ساختاری در بافت روده می‌باشد که موش‌های سوری به عنوان جامعه آماری مورد بررسی قرار گرفته است.

## روش تهیه دوغ غنی شده

برای تهیه دوغ غنی شده، ابتدا ۱۵ میلی لیتر دوغ معمولی بدون هیچ افزودنی تهیه شد. سپس به این دوغ، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نانومولسیون تهیه شده اضافه شد. این نانومولسیون حاوی ویتامین‌های C و D3 بود که برای افزایش محتوای مغذی دوغ به کار رفت. سپس مخلوط به مدت ۵ دقیقه در حمام الترا سونیک به منظور همگن‌سازی و افزایش مخلوط‌پذیری ترکیبات، تحت فرآیند اولتراسونیکاسیون قرار گرفت. در انتها، دوغ حاصل در داخل یخچال نگهداری شد تا از نظر نگهداری و بهداشتی تضمین شود. در مرحله بعدی، قبل از استفاده از دوغ غنی شده برای موش‌ها، آن را از یخچال خارج کرده و به دمای اتاق برسانید تا دمای آن با محیط زندگی موش‌ها هماهنگ شود و احتمال ایجاد تناوبات دمایی ناخواسته کاهش یابد. این مراقبت از دمای دوغ غنی شده قبل از مصرف، به اطمینان از سلامت و راحتی موش‌ها کمک می‌کند و می‌تواند تأثیر مستقیمی بر سلامت و عملکرد آنها داشته باشد.

## نحوه آماده سازی باکتری کلستریدیوم دیفیسیل

در این پروژه، ابتدا جهت تهیه باکتری *Clostridium difficile*، یک سوسپانسیون از این باکتری از دانشکده باکتری‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران به دست آمد. این سوسپانسیون حاوی باکتری‌های خامه‌ای از *Clostridium difficile* بود که مورد استفاده در آزمایشات بعدی قرار گرفت. برای ایجاد شرایط محیطی مناسب برای رشد باکتری، ابتدا این سوسپانسیون را بر روی محیط کشت BHI (Brain Heart Infusion) کاشته و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با محیط CO2 داخل جار بی‌هوای قرار داده شد. محیط کشت BHI یک محیط غنی شده است که شرایط ایده‌آل برای رشد و تمديد باکتری‌ها فراهم می‌کند، و محیط CO2 داخل جار بی‌هوای برای فراهم آوردن شرایط تنفس مناسب برای باکتری‌ها به کار گرفته شد.

در مرحله بعد، کلنی‌های بدست آمده از محیط کشت BHI را بر روی محیط کشت اختصاصی باکتری CCFA کاشته و دوباره به انکوباتور با محیط CO2 داخلی منتقل شد. محیط کشت CCFA به‌طور خاص برای جداسازی و تمایز باکتری‌های *Clostridium difficile* طراحی شده است و شرایط مورد نیاز برای رشد این باکتری را فراهم می‌کند.

پس از گذشت ۴۸ ساعت، مشاهده شد که باکتری‌ها روی محیط کشت CCFA رشد کرده‌اند. این باکتری‌ها سپس برای القای عفونت در موش‌ها به منظور ادامه پروژه استفاده شدند.

همچنین، جهت تایید شناسایی باکتری مورد نظر *Clostridium difficile*، از روش رنگ‌آمیزی گرم نیز استفاده شد. این روش با استفاده از مواد شیمیایی خاص بر روی باکتری‌ها، واکنش‌هایی را ایجاد می‌کند که به تایید هویت و شناسایی باکتری *Clostridium difficile* کمک می‌کند.

در این پروژه، موش‌های سوری به شکل گروه‌هایی از سه موش در هر گروه، طبق جدول ۱ مشخصی دسته‌بندی شده‌اند.

جدول ۱. مشخصات نمونه‌های مورد بررسی و آزمایش

تیمار	نوع تیماردهی
۱	گروه شاهد (فقط باکتری)
۲	گروه اول (باکتری + دوغ خالی)
۳	گروه دوم (باکتری + دوغ حاوی نانومولسیون)

در فرآیند انجام این پروژه، از تکنیک گاوژ برای انتقال سوسپانسیون حاوی باکتری و دوغ به موش‌ها استفاده شده است. این تکنیک متضمن مهار حیوان است تا از این طریق بتوان مواد مورد نیاز به آن‌ها تزریق کرد. برای مهار موش، ناحیه پوست شانه‌ها با استفاده از انگشتان شست و میانی به طور محکم گرفته می‌شود. این کار باعث می‌شود دست‌ها به طرفین کشیده شده و از فشار دادن لوله گاوژ توسط موش جلوگیری شود. سر حیوان در جای خود نگه‌داشته می‌شود و به آرامی به عقب کشیده می‌شود تا یک خط مستقیم از طریق گردن و مری ایجاد شود.

در ادامه، لوله‌ی گاوژ به آرامی در امتداد کام فوقانی تا رسیدن به مری حرکت می‌کند و باید به راحتی وارد مری شود. در صورتی که مقاومتی از سمت حیوان وجود داشته باشد، سوزن نباید با زور وارد شود و باید مراقبت شود تا مری پاره نشود. پس از تایید قرارگیری مناسب، مواد مورد نیاز با استفاده از سرنگی که به انتهای لوله متصل است، تزریق می‌شوند. لوله نباید چرخانده شود تا نوک آن مری را پاره نکند. پس از تزریق، لوله به آرامی و با همان زاویه‌ی داخل شدن، خارج می‌شود.

پس از اتمام عمل گاوژ، حیوان به قفس برگردانده می‌شود (شکل ۵-۳) و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه تحت نظر قرار می‌گیرد تا هیچ علائمی از سختی در تنفس یا پریشانی در حیوان مشاهده نشود. این مرحله از اطمینان حاصل شده است که موش‌ها به درستی از تزریق مواد وارد شده در اطراف گردن آن‌ها بهره‌مند شده‌اند و هیچ آسیبی به آن‌ها وارد نشده است.

در این تحقیق، ما از روش‌های متنوعی برای بررسی تأثیرات باکتری کلستریدیوم دیفیسیل بر روی سیستم گوارش انسان استفاده کردیم. این شامل استفاده از روش‌های آزمون و نحوه‌ی آماده‌سازی نمونه‌ها، تکنیک‌های کشت، میکروسکوپی، و مولکولی بود. این روش‌ها به ما اجازه می‌دهند تا به شکل جامع‌تری از تأثیرات باکتری کلستریدیوم دیفیسیل بر روی بیولوژی میزبان پرداخته شد.

با استفاده از تکنیک‌های کشت، ما باکتری‌ها را از منابع معتبر جدا کرده و سوسپانسیون‌های مختلفی از آنها تهیه کردیم. سپس، از این سوسپانسیون‌ها برای تزریق به موش‌های آزمایشگاهی استفاده شد تا تأثیرات باکتری را بر روی بیولوژی میزبان بررسی کرد. همچنین، از روش‌های میکروسکوپی برای بررسی ساختار و رفتار باکتری‌ها در داخل بدن میزبان استفاده شد. و در نهایت، از روش‌های مولکولی برای تحلیل ژنتیکی باکتری‌ها و شناسایی ژن‌های مرتبط با این عفونت‌ها استفاده کردیم.

به طور کلی، استفاده از این تکنیک‌ها و روش‌ها به ما امکان مطالعه دقیق‌تر و جامع‌تری از تأثیرات و عواقب عفونت‌های باکتریایی کلستریدیوم دیفیسیل را می‌دهد و این می‌تواند بهبود مراقبت‌های پزشکی و توسعه‌ی راه‌های درمانی مؤثرتر این نوع عفونت‌ها را به همراه داشته باشد.

## یافته‌ها و بحث

در این بخش از تحقیق، به بررسی نتایج حاصل از تحقیقات در زمینه تولید دوغ غنی‌شده با ویتامین D3 و ویتامین C و اثر آن بر باکتری کلاستریدیوم دیفیسیل پرداخته شده است. در طول این تحقیق، فرآیند تولید دوغ غنی‌شده با این ویتامین‌ها مورد بررسی و به دقت مستند شده است. سپس، نمونه‌های تولید شده مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند تا اثر آن‌ها بر رشد و شکل‌گیری باکتری کلاستریدیوم دیفیسیل مورد بررسی قرار گیرد.

### نتایج بررسی روش Dynamic light scattering

این تست از دستگاه DLS NanoDS بهره‌برداری نموده است. نتایج به‌دست‌آمده از این تجزیه و تحلیل نشان می‌دهد که اندازه میانگین نانوذرات موجود در دوغ غنی‌شده با ویتامین D3 و ویتامین C حدوداً ۲۸۶ نانومتر است. بررسی اندازه نانوذرات نشان می‌دهد که این ذرات در بازه اندازه از ۶۵ نانومتر تا ۵۰۰ نانومتر قرار دارند. بیشینه تعداد نانوذرات در این نمونه در اندازه حدود ۱۵۰ نانومتر ظاهر شده است. این اطلاعات نشان می‌دهد که نانوذرات با اندازه‌های مختلفی در دوغ تولیدی ما وجود دارند و این واریانس اندازه می‌تواند بر تفاوت‌ها در تعاملات با باکتری‌ها تأثیر بگذارد. اهمیت این نتایج در ارتباط با تحقیقات در زمینه تأثیر ویتامین D3 و ویتامین C بر باکتری کلاستریدیوم دیفیسیل آشکار می‌شود. نتایج تست (DLS (Dynamic Light Scattering) که برای اندازه‌گیری اندازه و توزیع ذرات در مایعات استفاده می‌شود، ما را به یک فهم عمیق‌تر از ویژگی‌های نانوذرات در نمونه‌های دوغ غنی‌شده با ویتامین D3 و ویتامین C هدایت می‌کند. در اینجا تفسیر نتایج حاصل از شکل ۱-۴ اشاره شده است:

اندازه متوسط نانوذرات:

متوسط اندازه نانوذرات حدود ۲۸۶ نانومتر است. این اندازه می‌تواند توسط نور لیزری اندازه‌گیری شود و نشان می‌دهد که نمونه‌های دوغ غنی‌شده با ویتامین D3 و ویتامین C شامل ذرات نوساز با تنوعی اندک در اندازه هستند.

-توزیع اندازه ذرات:

با توجه به توزیع ذرات، نانوذرات با اندازه‌های مختلف، از ۶۵ نانومتر تا ۵۰۰ نانومتر، در نمونه‌های تولید شده وجود دارند. این نشان می‌دهد که فرآیند تولید دوغ غنی‌شده با ویتامین D3 و ویتامین C ممکن است به تولید ذرات با اندازه‌های مختلف منجر شود.

-پیک اندازه ذرات:

پیک ایجاد شده در حدود ۱۵۰ نانومتر نشان می‌دهد که این اندازه حاوی بیشترین تعداد ذرات است. این ممکن است به ما کمک کند تا به طور دقیق‌تر بفهمیم که کدام اندازه ذرات بیشترین تأثیر را بر رشد باکتری کلاستریدیوم دیفیسیل دارد.

با توجه به داده‌های ارائه شده، اینجا توضیح و تفسیر هر یک از موارد ارائه شده است:

-قطر هیدروپویک: ۲۸۶٫۹ نانومتر

قطر هیدروپویک به متوسط قطر ذرات در محلول اشاره دارد. این مقدار نشان‌دهنده اندازه ذرات موجود در محلول است و می‌تواند برای ارزیابی اندازه و توزیع ذرات مفید باشد.

-تقاطع: ۰٫۸۶۰۵

تقاطع g12 یکی از پارامترهای مهم در مورد تعاملات بین ذرات است که اطلاعاتی ارائه می‌دهد در مورد شکل و تراکم محلول.

-چگالی نوری فیلتر: ۱٫۸۴۶۷

چگالی نوری فیلتر نشان‌دهنده مقدار جذب نور توسط فیلتر استفاده شده در تنظیمات اندازه‌گیری است. این مقدار می‌تواند بر دقت اندازه‌گیری تأثیر داشته باشد.

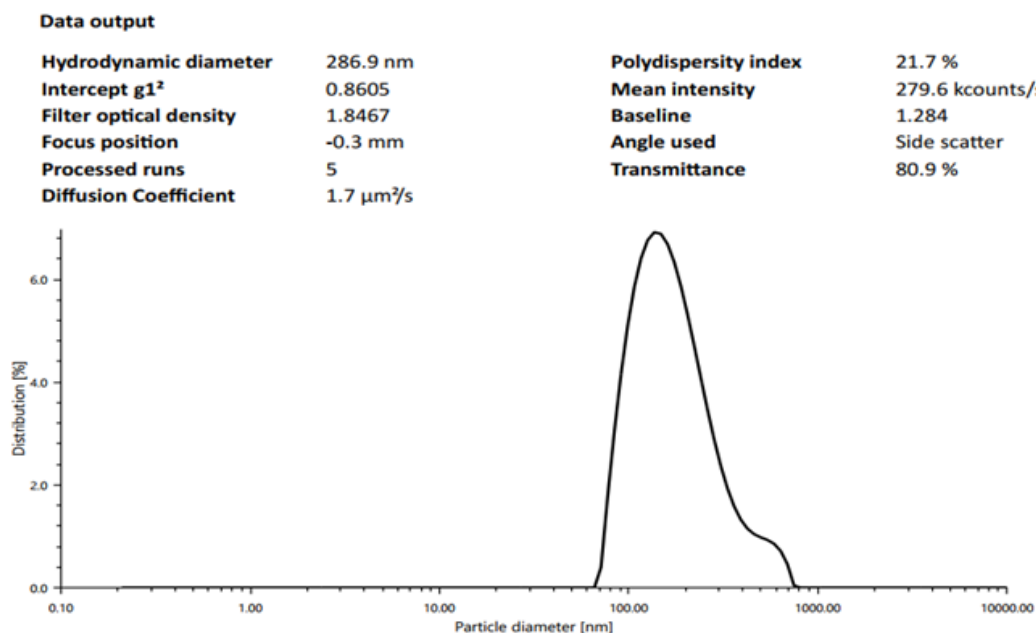
-موقعیت فوکوس: ۰٫۳ میلی‌متر

موقعیت فوکوس نشان‌دهنده موقعیت فوکوس دستگاه در حین انجام اندازه‌گیری است. مقادیر مثبت و منفی نشان‌دهنده جابجایی فوکوس به سمت بالا و پایین است.

-تعداد تست‌های پردازش شده: ۵

این نشان‌دهنده تعداد تست‌ها یا اندازه‌گیری‌هایی است که برای بدست آوردن داده‌های گزارش شده پردازش شده‌اند.

-ضریب پخش:  $1/7$  میکرومتر مربع بر ثانیه  
 ضریب پخش نشان دهنده سرعت پخش ذرات در محلول است و اطلاعاتی ارائه می دهد درباره حرکت و پراکندگی ذرات در محلول.  
 -شاخص چندجمله ای:  $21.7\%$   
 شاخص چندجمله ای (PDI) نشان دهنده گستردگی توزیع اندازه ذرات است. مقادیر بالاتر از  $20\%$  به عدم یکنواختی در اندازه ذرات اشاره دارد.  
 -میانگین شدت نور:  $279.6$  کیلو شماره در ثانیه  
 میانگین شدت نور نشان دهنده میانگین شدت نور پراکنده شده در طول اندازه گیری است. این اطلاعات می تواند در مورد غلظت و اندازه ذرات در محلول اطلاعات مفیدی ارائه دهد.  
 -مبنای خط:  $1/284$   
 مبنای خط معیاری است که به تعیین کیفیت اندازه گیری کمک می کند. این مقدار می تواند برای تنظیمات و روش های اندازه گیری بهینه استفاده شود.  
 -زاویه استفاده شده: پراکندگی جانبی  
 زاویه استفاده شده نشان دهنده زاویه ای است که از نمونه برای اندازه گیری پراکندگی استفاده شده است. در این مورد، زاویه پراکندگی جانبی استفاده شده است.



شکل ۱. نتایج بررسی Dynamic light scattering

### نتایج بررسی زتا پتانسیل (Zeta Potential)

بررسی پتانسیل زتا در مورد نانوذرات موجود در دوغ غنی شده با ویتامین D3 و ویتامین C نشان می دهد که میانگین بار الکتریکی سطحی ذرات حدود  $3/2$  میلی ولت است که نزدیک به صفر است. این نتیجه نشان می دهد که ذرات در محیط مایعاتی که مورد مطالعه قرار گرفته اند، به طور کلی در میدان الکتریکی ثابت و پایدار باقی می مانند. این به این معناست که نیروهای الکترواستاتیکی به اندازه کافی برای جلوگیری از ته نشینی ذرات و ایجاد پایداری آنها در محیط وجود دارد.

نتایج بررسی در شکل ۲-۴ نشان داده شده است که تفسیر آن به شرح ذیل می باشد:

-میانگین پتانسیل زتا:  $2,3$  میلی وات

میانگین پتانسیل زتا نشان‌دهنده میزان متوسط پتانسیل الکتریکی در صفحه برش ذرات در محلول است. مقدار منفی پتانسیل زتا به وجود بار منفی در سطح ذرات اشاره دارد. در این مورد، مقدار منفی نشان می‌دهد که ذرات دارای تمایلی به دوری از یکدیگر هستند، که می‌تواند به پایداری محلول کمک کند.

-مقدار قله توزیع: ۰٫۶ میلی‌وات

این مقدار نشان‌دهنده قله توزیع پتانسیل زتا است. این مقدار اطلاعاتی ارائه می‌دهد درباره میزان رایج‌ترین مقدار پتانسیل زتا در سیستم است. مقدار کمتر قله نشان می‌دهد که توزیع پتانسیل‌های زتا در میان ذرات به طور محدودتری است.

-تعداد تست‌های پردازش شده: ۱۰۰

این نشان‌دهنده تعداد تست‌ها یا اندازه‌گیری‌هایی است که برای بدست آوردن داده‌های گزارش شده پردازش شده‌اند. در این مورد، به نظر می‌رسد که ۱۰۰ اندازه‌گیری پردازش شده است.

-ولتاژ تنظیم شده: ۲۰۰/۰ ولت

ولتاژ تنظیم شده ولتاژی است که در هنگام اندازه‌گیری پتانسیل زتا به سیستم وارد می‌شود. این ولتاژ نقش مهمی در تعیین حرکت الکتروفورتیک ذرات و، در نتیجه، پتانسیل زتا ایفا می‌کند.

-میانگین شدت نور: ۷۰۸/۰ کیلوشماره در ثانیه

میانگین شدت نور نشان‌دهنده میانگین شدت نور پراکنده شده در طول فرآیند اندازه‌گیری است. این اطلاعات درباره غلظت و اندازه ذرات در محلول اطلاعاتی فراهم می‌کند.

-حرکت الکتروفورتیک: ۰/۱۸۰۸ میکرون\*سانتیمتر/ولت\*ثانیه

حرکت الکتروفورتیک معیاری است از سرعت ذرات شارژی تحت تأثیر یک میدان الکتریکی. این مقدار برعکس پتانسیل زتا است. بزرگترین مقدار حرکت الکتروفورتیک منجر به مقدار بزرگتری از پتانسیل زتا خواهد شد.

-چگالی نوری فیلتر: ۳/۲۰۷۷

چگالی نوری فیلتر معیاری است از جذب نور توسط فیلتر استفاده شده در تنظیمات اندازه‌گیری. این مقدار می‌تواند بر دقت و قابلیت اطمینان اندازه‌گیری تأثیر بگذارد.

-هدایت: ۰/۰۷۲ میکرومومن/سانتیمتر

هدایت به قدرت یک محلول در انتقال جریان الکتریکی اشاره دارد. این توسط حضور یون‌ها در محلول تأثیر می‌گیرد و می‌تواند بر مقدار پتانسیل زتا تأثیرگذار باشد.

-انحراف معیار: ۰/۵ میلی‌وات

انحراف معیار نشان‌دهنده پراکندگی یا متغیر بودن مقادیر پتانسیل زتا در اطراف میانگین است. این اطلاعات درباره دقت اندازه‌گیری‌ها اطلاعاتی فراهم می‌کند.

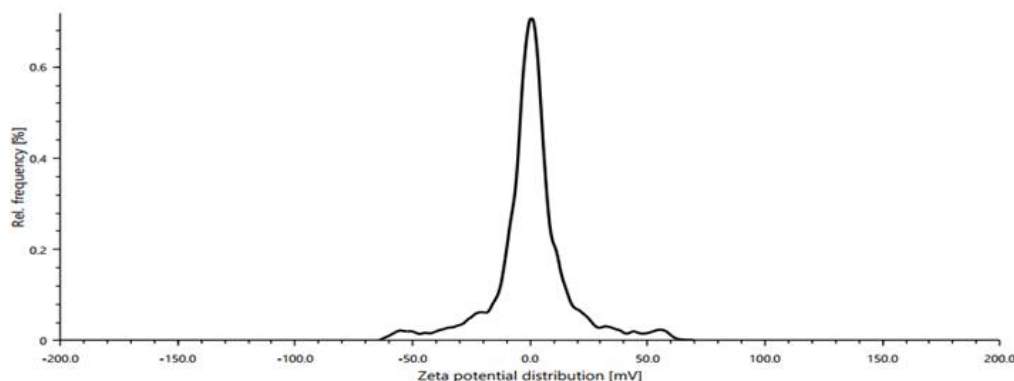
-نفوذ: ۳۱/۵٪

نفوذ مقداری از نور که از یک نمونه عبور می‌کند را اندازه‌گیری می‌کند. اغلب برای ارزیابی شفافیت یا تیرگی یک محلول استفاده می‌شود. در اینجا، مقدار نفوذ ۳۱/۵٪ نشان می‌دهد که تقریباً یک سوم نور وارد نمونه می‌شود.

این پارامترها به طور جمعی اطلاعات مهمی درباره ویژگی‌های الکتریکی، پایداری و رفتار ذرات در محلول ارائه می‌دهند.

## Data output

Mean zeta potential	-2.3 mV	Electrophoretic mobility	-0.1808 $\mu\text{m}^2\text{cm/Vs}$
Distribution peak value	0.6 mV	Filter optical density	3.2077
Processed runs	100	Conductivity	0.072 mS/cm
Adjusted voltage	200.0 V	+/- Standard deviation	0.5 mV
Mean intensity	708.0 kcounts/s	Transmittance	31.5 %



شکل ۲. نتایج بررسی زتا پتانسیل

**نتایج بررسی پایداری**

نتایج بررسی ها نشان می دهد که دوغ به عنوان یک محیط کلونیدی طبیعی می تواند برای حفظ پایداری نانوامولسیون ها استفاده شود، به ویژه اگر این نانوامولسیون ها برای انتقال مواد موثر به بدن انسان مورد استفاده قرار گیرند. در این مطالعه، با اضافه کردن نانوامولسیون به دوغ و نگهداری در طولانی مدت (تا ۳۰ روز)، هیچ نشانه ای از افت کیفیت یا پایداری نانوامولسیون در محیط دوغ مشاهده نشده است.

**نتایج بررسی رشد کپک**

این یک نتیجه مهم است که نشان می دهد استفاده از نانوامولسیون در دوغ تجاری مورد بررسی، هیچ تأثیر منفی ای بر کیفیت و سلامت محصول نداشته است. این نتیجه به عنوان یک نکته قابل توجه برای صنایع غذایی است که از فناوری های نانو استفاده می کنند. با توجه به اینکه دوغ تجاری شامل افزودنی ها و نگهدارنده های مختلف است، از جمله افزودنی هایی که ممکن است در برخی موارد با نانوامولسیون تعامل داشته باشند، اما در این مطالعه هیچ نشانه ای از تأثیر منفی یا افت کیفیت دوغ به دلیل وجود نانوامولسیون مشاهده نشده است.

**نتایج بررسی تایید القای باکتری به موش سوری**

نتایج نشان می دهد که هیچگونه کپکی و یا قارچی در نمونه های مدفوع مشاهده نشده است، که این امر نشان می دهد که محیط کشت و شرایط نگهداری و پرورش مناسب بوده اند. از طرفی، حضور نانوامولسیون نیز به نظر می رسد تأثیر منفی بر کیفیت نهایی دوغ نداشته است، که این موضوع نشان می دهد که نانوامولسیون در محیط دوغ به طور کلی ایمن و قابل قبول بوده است.

**بررسی نتایج کشت مدفوع و رنگ آمیزی گرم**

گروه شاهد در واقع یک گروه کنترل بود که فقط سوسپانسیون باکتری را از ابتدا دریافت کرده بودند و هیچ دوغ یا نانوامولسیونی به آن ها تجویز نشده بود. این گروه شاهد معمولاً برای مقایسه با گروه های تجربی و ارزیابی اثر تجویزات دارویی یا سایر عوامل درمانی استفاده می شود. در اینجا، حضور باکتری در نمونه های مدفوع این گروه نشان می دهد که سوسپانسیون باکتری که به موش ها تجویز شده بود، موجب القای باکتری کلوستریدیوم دیفیسیل در روده های آن ها شده است.

گروه اول در واقع گروهی است که دوغ خالی را به همراه باکتری کلاستریدیوم دیفیسیل دریافت کرده بودند نتایج این تجربه نشان داد که دوغ خالی چندان تاثیری در مهار رشد باکتری کلاستریدیوم دیفیسیل در روده‌های موش‌ها نداشته است.

گروه دوم که دوغ غنی شده با نانوامولسیون ویتامین C/D3 را به همراه سوسپانسیون باکتری کلاستریدیوم دیفیسیل دریافت کرده بودند، نشان داد که وجود این ویتامین‌ها بصورت نانوامولسیون در دوغ باعث مهار رشد باکتری‌های کلاستریدیوم دیفیسیل می‌شود این نتایج مهم به دلیل اینکه نشان می‌دهند که نانوامولسیون ویتامین C/D3 که به دوغ اضافه شده است، توانایی مهاری بر رشد باکتری‌های کلاستریدیوم دیفیسیل را داراست. این ممکن است به دلیل اثرات ضدباکتریایی یا جلوگیری از اتصال و رشد باکتری‌ها به غشاء روده‌ای باشد که توسط این ویتامین‌ها فراهم می‌شود. از این رو، مصرف دوغ غنی شده با نانوامولسیون ویتامین C/D3 می‌تواند به عنوان یک راهکار جدید و مؤثر در کنترل و پیشگیری از ابتلا به عفونت‌های مرتبط با باکتری‌های کلاستریدیوم دیفیسیل در نظر گرفته شود.

بر اساس نتایج به دست آمده، مشخص شد که پس از گذشت ۱۴ روز، همچنان حضور باکتری مورد تایید، یعنی باکتری کلاستریدیوم دیفیسیل، در همه گروه‌ها حاضر است. اما نکته مهم این است که مقدار کلونی‌های این باکتری در گروه کنترل بیشترین مقدار را داشته و در گروه درمان (که دوغ غنی شده با نانوامولسیون ویتامین C/D3 را دریافت کرده بودند) کمترین مقدار را داشته است.

این نتایج نشان می‌دهند که مصرف دوغ غنی شده با نانوامولسیون ویتامین C/D3 ممکن است به عنوان یک روش مؤثر برای کاهش رشد و تکثیر باکتری کلاستریدیوم دیفیسیل در روده‌ها مورد استفاده قرار گیرد. این ممکن است به دلیل ویژگی‌های ضد باکتریایی یا مهارکننده رشد و تکثیر باکتری‌ها از جمله اثرات مثبت ویتامین C/D3 باشد که به صورت نانوامولسیون به دوغ اضافه شده است.

از این رو، می‌توان نتیجه گرفت که دوغ غنی شده با نانوامولسیون ویتامین C/D3 می‌تواند به عنوان یک راهکار مؤثر در کاهش ابتلا به عفونت‌های مرتبط با باکتری‌های کلاستریدیوم دیفیسیل مورد استفاده قرار گیرد.

### نتایج بررسی رنگ آمیزی H&E

در این توصیف، فرآیند حاصل از بررسی هیستوپاتولوژیک بافت روده‌ها در یک تحقیق علمی توضیح داده شده است. برای انجام این بررسی، از روش‌های استاندارد هیستوپاتولوژیک استفاده شده است. در تجزیه و تحلیل هیستوپاتولوژیک، برای اعتبارسنجی نتایج، نیاز به مقایسه با نمونه‌های کنترلی است. این نمونه‌ها به عنوان کنترل‌های منفی، مثبت و خنثی شناخته می‌شوند. به طور کلی، این نتایج نشان می‌دهند که نانوامولسیون حاوی ویتامین C/D3 ممکن است بهبودهایی در ساختار بافتی روده ایجاد کند، اما نیاز به مطالعات بیشتری برای تأیید و تفسیر دقیق‌تر این اثرات وجود دارد.

### نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از نانوامولسیون حاوی ویتامین C و D3 می‌تواند تأثیرات مثبتی بر رشد باکتری کلاستریدیوم دیفیسیل و ساختار بافتی روده داشته باشد. نتایج حاصل از تحلیل هیستوپاتولوژیک نشان داد که این نانوامولسیون منجر به کاهش تراکم لایه‌های زیرمخاط و توزیع یکنواخت‌تر سلول‌های گابلت و لنفوسیت در لایه‌های مخاطی روده می‌شود. این تغییرات می‌تواند بهبودی در وضعیت التهابی روده و کاهش فعالیت التهابی را به دنبال داشته باشد.

علاوه بر این، نتایج نشان دادند که نانوامولسیون حاوی ویتامین C و D3 می‌تواند تأثیرات مهاری بر رشد باکتری کلاستریدیوم دیفیسیل داشته باشد. این اثر مهاری می‌تواند به عنوان یک راهکار جدید در کنترل و پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری مورد استفاده قرار گیرد. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که نانوامولسیون حاوی ویتامین C و D3 می‌تواند به عنوان یک مولفه مؤثر در بهبود وضعیت ساختاری و التهابی روده عمل کند. این تغییرات می‌تواند بهبودی در وضعیت روده و کاهش عوارض التهابی مرتبط با بیماری‌های روده‌ای را به همراه داشته باشد. به علاوه، نتایج حاصل از این تحقیق می‌توانند پایه‌ای برای تحقیقات بیشتر و توسعه روش‌های جدید در درمان و پیشگیری از بیماری‌های روده‌ای باشند.

### پیشنهادهای برای تحقیقات آتی

- بررسی تأثیرات طولانی مدت و ایمنی: پیشنهاد می‌شود که تحقیقاتی انجام شود تا تأثیرات طولانی مدت و ایمنی استفاده از نانوامولسیون حاوی ویتامین C و D3 در مداوا و پیشگیری از عفونت‌های معده-روده‌ای مورد بررسی قرار گیرد. این اطلاعات می‌توانند کمک کنند تا از امنیت و کارآمدی این روش در طولانی مدت مطمئن شویم.
- ارزیابی اثرات مخرب و مزیت‌های نانوامولسیون: پژوهش‌هایی می‌توانند انجام شود تا اثرات مخرب و مزیت‌های نانوامولسیون در مقایسه با روش‌های درمانی سنتی برای عفونت‌های ناشی از کلوستریدیوم دیفیسیل ارزیابی شود. این اطلاعات می‌توانند در تصمیم‌گیری‌های پزشکی و توسعه درمان‌های موثرتر کمک کنند.
- بررسی مکانیسم‌های عملکرد نانوامولسیون: مطالعات بیشتری می‌تواند انجام شود تا مکانیسم‌های دقیق عملکرد نانوامولسیون حاوی ویتامین C و D3 بر روی باکتری‌های مخرب معده-روده‌ای مورد بررسی و شناسایی قرار گیرد. این اطلاعات می‌توانند در طراحی داروها و درمان‌های نوین برای عفونت‌های معده-روده‌ای مؤثر باشند و نقشی مهم در پیشرفت پزشکی داشته باشند.
- ارتباط با روش‌های درمانی سنتی: مقایسه اثرات مخرب و مزایای نانوامولسیون با روش‌های درمانی سنتی می‌تواند موجب شناخت بهتری از این روش جدید شود. این تحقیقات می‌توانند در تصمیم‌گیری‌های پزشکی و استفاده از این روش جدید توسط پزشکان و محققان تأثیرگذار باشند.
- شناخت مکانیسم‌های عملکرد: بررسی مکانیسم‌های دقیق عملکرد نانوامولسیون و نحوه تأثیر آن بر رشد باکتری کلوستریدیوم دیفیسیل می‌تواند به شناخت بهتر از عملکرد این ماده و توسعه درمان‌های موثرتر برای کنترل عفونت‌های معده-روده‌ای کمک کند. این تحقیقات می‌توانند به طراحی و توسعه داروهای جدید برای مبارزه با این نوع عفونت‌ها منجر شوند و تأثیرات مهمی در حوزه پزشکی و بهبود سلامت داشته باشند.

### سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای در رشته دامپزشکی بوده که در گروه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات توسط نویسنده اول زیر نظر استادان راهنما و مشاور تدوین شده است.

### منابع

- کمیته ملی صنایع غذایی. (۱۳۹۱). آب آشامیدنی - ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی (صلاحیه شماره ۱) شماره استاندارد. 1053
- Abo-Zaid, M. A., Hamdi, H. A., & Elashmawy, N. F. (2023). Vitamin D and Immunity: A comprehensive review of its impact on autoimmunity, allergy suppression, antimicrobial defense, and cancer inhibition. *The Egyptian Journal of Immunology*, 30(4), 47–66. <https://doi.org/10.55133/eji.300406>
- Ajami, N. J., Cope, J. L., Wong, M. C., Petrosino, J. F., & Chesnel, L. (2018). Impact of oral fidaxomicin administration on the intestinal microbiota and susceptibility to clostridium difficile colonization in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(5), 17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02112-17>
- Bartlett, J. G. (1994). Clostridium difficile: History of Its Role as an Enteric Pathogen and the Current State of Knowledge About the Organism. *Clinical Infectious Diseases*, 18(Supplement\_4), S265–S272. [https://doi.org/10.1093/CLINIDS/18.SUPPLEMENT\\_4.S265](https://doi.org/10.1093/CLINIDS/18.SUPPLEMENT_4.S265)
- Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*, 369(9573), 1641–1657. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60751-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60751-X)
- Cairns, M. D., Stabler, R. A., Shetty, N., & Wren, B. W. (2012). The continually evolving Clostridium difficile species. <http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fmb.12.73>, 7(8), 945–957. <https://doi.org/10.2217/FMB.12.73>
- Chen, L., Bagnicka, E., Chen, H., & Shu, G. (2023). Health potential of fermented goat dairy products: composition comparison with fermented cow milk, probiotics selection, health benefits and mechanisms. *Food and Function*, 14(8), 3423–3436. <https://doi.org/10.1039/d3fo00413a>
- Dawit Moges, F., Patel, P., Parashar, S. K. S., & Das, B. (2020). Mechanistic insights into diverse nano-based strategies for aquaculture enhancement: A holistic review. *Aquaculture*, 519, 734770. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734770>

- De Bont, P. W., Van Kempen, G. M. P., & Vreeker, R. (2002). Phase separation in milk protein and amylopectin mixtures. *Food Hydrocolloids*, 16(2), 127–138. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00070-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00070-4)
- Feldman, D., Krishnan, A. V., Swami, S., Giovannucci, E., & Feldman, B. J. (2014). The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nature Reviews Cancer* 2014 14:5, 14(5), 342–357. <https://doi.org/10.1038/nrc3691>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/IJC.29210>
- Hoseini, B., Rahmatinejad, Z., Goshayeshi, L., Bergquist, R., Golabpour, A., Ghaffarzadegan, K., Rahmatinejad, F., Darrudi, R., & Eslami, S. (2022). Colorectal Cancer in North-Eastern Iran: a retrospective, comparative study of early-onset and late-onset cases based on data from the Iranian hereditary colorectal cancer registry. *BMC Cancer*, 22(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12885-021-09132-5/TABLES/2>
- Jank, T., Giesemann, T., Glycobiology, K. A., & 2007, undefined. (n.d.). Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. *Academic.Oup.ComT Jank, T Giesemann, K AktoriesGlycobiology, 2007•academic.Oup.Com*. Retrieved October 18, 2023, from <https://academic.oup.com/glycob/article-abstract/17/4/15R/603227>
- Lucchetta, R. C., Lemos, I. H., Gini, A. L. R., Cavicchioli, S. D. A., Forgerini, M., Varallo, F. R., De Nadai, M. N., Fernandez-Llimos, F., & Mastroianni, P. D. C. (2022). Deficiency and Insufficiency of Vitamin D in Women of Childbearing Age: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, 44(4), 409–424. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1742409>
- Mattumpuram, J., Maniya, M. T., Faruqui, S. K., Ahmed, A., Jaiswal, V., & Harshakumar, S. P. (2024). Cardiovascular and Cerebrovascular Outcomes With Vitamin D Supplementation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Current Problems in Cardiology*, 49(1), 102119. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2023.102119>
- Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W., & Kaplan, G. G. (2012). Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology*, 142(1), 46-54.e42. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2011.10.001>
- Naseema, A., Kovooru, L., Behera, A. K., Kumar, K. P. P., & Srivastava, P. (2021). A critical review of synthesis procedures, applications and future potential of nanoemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 287, 102318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102318>
- Rojas-Carabali, W., Pineda-Sierra, J. S., Cifuentes-González, C., Morales, M. S., Muñoz-Vargas, P. T., Peña-Pulgar, L. F., Fonseca-Mora, M. A., Cruz, D. L., Putera, I., Sobrin, L., Agrawal, R., & de-la-Torre, A. (2024). Vitamin D deficiency and non-infectious uveitis: A systematic review and Meta-analysis. *Autoimmunity Reviews*, 23(2), 103497. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2023.103497>
- Safaya, M., & Rotliwala, Y. C. (2020). Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique. *Materials Today: Proceedings*, 27, 454–459. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.11.267>
- Salminen, S., Ouwehand, A. C., & Isolauri, E. (1998). Clinical Applications of Probiotic Bacteria. *International Dairy Journal*, 8(5–6), 563–572. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00077-6)
- Salvia-Trujillo, L., Soliva-Fortuny, R., Rojas-Graü, M. A., McClements, D. J., & Martín-Belloso, O. (2017). Edible Nanoemulsions as Carriers of Active Ingredients: A Review. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Food-030216-025908>, 8, 439–466. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-030216-025908>
- Sartelli, M., Ansaloni, L., Biffi, W. A., Coccolini, F., De Simone, B., Leppaniemi, A., Kluger, Y., Tolonen, M., Moore, E. E., & Catena, F. (2021). World society of emergency surgery-american association for the surgery of trauma guidelines for management of clostridioides (*Clostridium*) *difficile* infection in surgical patients: An executive summary. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 91(2), 422–426. <https://doi.org/10.1097/TA.00000000000003196>
- Shields, K., Araujo-Castillo, R. V., Theethira, T. G., Alonso, C. D., & Kelly, C. P. (2015). Recurrent *Clostridium difficile* infection: From colonization to cure. *Anaerobe*, 34, 59–73. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2015.04.012>
- Taderegew, M. M., Woldeamanuel, G. G., Wondie, A., Getawey, A., Abegaz, A. N., & Adane, F. (2023). Vitamin D deficiency and its associated factors among patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, 13(10), e075607. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2023-075607>
- Taylor, N. S., Thorne, G. M., & Bartlett, J. G. (1981). Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 34(3), 1036–1043. <https://doi.org/10.1128/IAI.34.3.1036-1043.1981>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>

Wyatt, P. B., Reiter, C. R., Satalich, J. R., O'Neill, C. N., Edge, C., Cyrus, J. W., O'Connell, R. S., & Vap, A. R. (2024). Effects of Vitamin D Supplementation in Elite Athletes: A Systematic Review. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 12(1). <https://doi.org/10.1177/23259671231220371>