

# تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم سویه Ktbs2 بر ظرفیت اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی تام سرم، اندیس استرس اکسیداتیو و برخی پارامترهای بیوشیمیایی در موش‌های صحرایی دیابتی

سحر مسلمی<sup>۱</sup>، مهرنوش پارسایی‌مهر<sup>۲</sup>، محمود احمدی‌همدانی<sup>۳\*</sup>، اشکان جبلی‌جوان<sup>۴</sup> و ملیکا معزی‌فر<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته‌ی دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

<sup>۲</sup> استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

<sup>۳</sup> استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

<sup>۵</sup> دانش‌آموخته‌ی فیزیولوژی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۲۰

## چکیده

این مطالعه به منظور بررسی تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از پنیر سنتی سمنان بر وضعیت اکسیدانی و آنتی-اکسیدانی تام سرم، اندیس استرس اکسیداتیو و برخی پارامترهای بیوشیمیایی سرم در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین، انجام شد. در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به چهار گروه (شش رت در هر گروه) شامل گروه سالم، دیابتی تیمار نشده، سالم پروبیوتیکی و گروه دیابتی تیمار شده با ۱ سی‌سی سوسپانسیون لاکتوباسیلوس پلانتاروم با دوز  $10^8$  CFU/ml توزیع شدند. جداسازی و شناسایی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم از پنیر سنتی سمنان پس از کشت نمونه‌ی پنیر در محیط mMRS و جدا کردن کلونی تک و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی اختصاصی شناسایی لاکتوباسیل‌ها، انجام شد و پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و تعیین توالی ژنوم srRNA ۱۶ سویه ktbs2 شناسایی گردید. دیابت در ۱۲ سر موش صحرایی از گروه دیابتی تیمار نشده و دیابتی تیمار شده با از طریق تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (۶۵mg/kg) القا شد. به موش‌های صحرایی گروه‌های سالم پروبیوتیکی و دیابتی تیمار شده با پروبیوتیک روزانه از روز ششم به مدت ۲۱ روز از طریق گاواژ پروبیوتیک تجویز شد. قند خون ناشتا در روزهای صفر (قند خون اولیه)، روز ششم (۵ روز پس از القاء دیابت) و ۲۱ روز پس از آن (قند خون نهایی)، پروفایل چربی، پارامترهای اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی تام سرم و اندیس استرس اکسیداتیو در انتهای دوره‌ی آزمایش اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد تجویز سوسپانسیون لاکتوباسیلوس پلانتاروم به موش‌های صحرایی دیابتی شده به طور معنی‌داری باعث کاهش قندخون ناشتا، تری‌گلیسیرید، شرایط اکسیدانی تام و اندیس استرس اکسیداتیو نسبت به گروه دیابتی تیمار نشده گردید نتایج مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار نشان داد که لاکتوباسیلوس پلانتاروم سویه ktbs2 جدا شده از پنیر سنتی سمنان توانایی کاهش هیپرگلیسمی، دیس لیپیدمی و استرس اکسیداتیو را در موش‌های صحرایی دیابتی شده داشت.

**کلمات کلیدی:** دیابت، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، گلوکز خون، پروفایل لیپیدی، استرس اکسیداتیو

\* نویسنده مسئول: محمود احمدی‌همدانی، استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

E-mail: ahmadi.hamedani@semnan.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

## مقدمه

به عوارض ناشی از این بیماری، یافتن روش‌های درمانی یا پیش‌گیرانه در مورد این بیماری سال‌هاست که مورد توجه محققین می‌باشد. یکی از جنبه‌های مورد توجه، تحقیق پیرامون اثرات ضد دیابتی پروبیوتیک‌ها است (Wang et al, 2017). تا کنون در چندین مطالعه تأثیر پروبیوتیک‌های مختلف در کاهش قند خون و مقاومت انسولینی در موش‌های دیابتی شده، گزارش شده است (Harisa et al, 2009, Yadav et al, 2007).

به نظر می‌رسد برخی از گونه‌های اختصاصی پروبیوتیک‌ها، با بهبود ترکیب فلور میکروبی روده موجب کاهش التهاب و ممانعت از تخریب سلول‌های بتا پانکراس می‌شوند و از سوی دیگر با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، می‌توانند افزایش قند خون را کنترل نمایند. این مطالعه با توجه به نبود پژوهش در زمینه تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانناروم موجود در پنیر سنتی سمنان، برای نخستین بار به منظور بررسی تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانناروم بر وضعیت اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی تام سرم و اندیس استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین صورت گرفت.

## مواد و روش کار

## آماده‌سازی پروبیوتیک

در این مطالعه، باکتری لاکتوباسیلوس پلانناروم از پنیر سنتی سمنان در گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان جداسازی شد. شناسایی باکتری لاکتوباسیلوس پلانناروم بدین صورت انجام گرفت که بعد از کشت نمونه‌ی پنیر در محیط mMRS و جدا کردن کلونی تک، آزمایش‌های بیوشیمیایی اختصاصی لاکتوباسیل‌ها انجام شد و پس از انجام مراحل استخراج DNA از پرگنه‌های مورد مطالعه، به منظور تقویت ناحیه‌ی کد کننده 16s rRNA (۱۵۰۰bp) واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. واکنش PCR در دستگاه PCR Thermal Cycler (Bioer

دیابت ملیتوس یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز می‌باشد که در آن به علت اختلالی که در متابولیسم گلوکز رخ می‌دهد، سطح گلوکز خون افزایش می‌یابد. علت اختلال در روند متابولیسم گلوکز، نارسایی در ترشح انسولین، نقص در کارکرد انسولین یا هر دو علت می‌باشد (Mihailovic et al, 2017). بر اساس اعلام سازمان بین‌المللی دیابت و سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۰ حدود ۲۵۰ میلیون نفر مبتلا به دیابت بودند که این میزان در دو دهه‌ی اخیر به میزان دو برابر افزایش خواهد یافت (Tecilazich & Veves, 2018). پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به میزان مناسب مصرف شوند نتایج مفیدی برای سلامت میزبان در پی خواهند داشت. پروبیوتیک‌ها از طریق کاهش آسیب‌های التهابی و افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند: سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز استرس-اکسیداتیو را مهار می‌کنند (Kumar et al, 2017). استرس اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از آن باعث بروز انواع مختلفی از فرایندهای پاتولوژیک در بیماری‌های مختلف از جمله دیابت می‌شود (Leal lopes et al, 2015). صدمات اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن از عوامل بسیار مهم و مؤثر در اتیولوژی عوارض ناشی از بیماری دیابت محسوب می‌شوند. بنابراین تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در این بیماران می‌تواند تا حدودی مانع از ایجاد و پیشرفت عوارض این بیماری گردد. از آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی می‌توان به برخی ویتامین‌ها، عناصر کمیاب و پروبیوتیک‌ها اشاره نمود (Kumar et al, 2017). با توجه به اثرات مفید پروبیوتیک‌ها و توانایی آن‌ها در پایین آوردن میزان گلوکز، تأثیر آن‌ها در درمان بیماری دیابت نیز دور از انتظار نیست (Mihailovic et al, 2017). در بین پروبیوتیک‌ها، لاکتوباسیلوس‌ها از توجه بیشتری برخوردارند (Harisa et al, 2009). با توجه به افزایش روزافزون تعداد مبتلایان به دیابت در جهان و اهمیت توجه

ساعت و درجه‌ی حرارت  $2 \pm 20$  درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ توزیع شدند، این گروه‌ها شامل:

گروه اول: کنترل سالم شامل رت‌های سالمی که هیچ کار درمانی بر روی آن‌ها تا پایان مطالعه صورت نپذیرفت و به عنوان کنترل بوده و فقط آب و غذای معمولی خود را به مدت سه هفته دریافت کردند.

گروه دوم: گروه دیابتی تیمار نشده، حیوانات این گروه با داروی استرپتوزوسین دیابتی شده و در طی دوره تیمار، آب و غذای خود را دریافت کردند.

گروه سوم: سالم تیمار شده با پروبیوتیک، موش‌های سالمی که روزانه پروبیوتیک را از طریق گاواژ به مدت سه هفته دریافت کردند.

گروه چهارم: دیابتی تیمار شده با پروبیوتیک، موش‌های دیابتی هستند که روزانه پروبیوتیک را از طریق گاواژ به مدت سه هفته دریافت کردند.

#### القاء دیابت

برای القاء دیابت، موش‌های صحرایی گروه‌های کنترل دیابت و دیابت - پروبیوتیک به مدت ۱۲ ساعت گرسنه نگه داشته شدند و پس از این زمان محلول تازه تهیه شده استرپتوزوسین (Sigma-Aldrich, USA) (محلول در بافر سترات ۰/۱ مولار، pH=4.5) به میزان ۶۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد. پس از گذشت پنج روز از تزریق استرپتوزوسین (روز ششم)، سطح قند خون ناشتا موش - های صحرایی توسط دستگاه گلوکومتر (Accua-Check-Germany) اندازه‌گیری شد و موش‌های صحرایی که قند خون ناشتای آن‌ها به بیش از ۲۰۰ میلی‌گرم در هر دسی‌لیتر رسید، دیابتی در نظر گرفته شدند.

صورت گرفت. پرایمرهای یونیورسال مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به منظور تقویت کل توالی ژن 16s rDNA عبارت بودند از 5'-F= AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG-3' و R= 5'-AAGGAGGTGA/TTCCAA/GCC-3' (Partoei et al, 2015). تعیین توالی محصولات PCR توسط شرکت تکاپوزیست انجام گردید. سپس به جستجوی شباهت توالی ژن 16s rRNA در اطلاعات موجود در National Centre for Biotechnology Information (NCBI) homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) با استفاده از Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) پرداختیم و بر اساس نتایج، گونه‌ی ایزوله با سویه‌ی لاکتوباسیلوس پلانتروم سویه‌ی ktbs2 همخوانی داشته است.

#### تهیه دوز تلقیح

جهت تهیه‌ی دز تلقیح جدایه لاکتوباسیلوس پلانتروم به محیط آبگوشت MRS منتقل و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس از کشت آبگوشت MRS رقت تهیه کرده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج 600 نانومتر، رقتی که OD آن معادل ۰/۱ باشد را مشخص کرده ضمناً محتویات این لوله تحت شمارش باکتریایی به روش کشت پورپلیت قرار گرفت تا لوله حاوی تقریباً  $10^8$  باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص شود (Misaghi et al, 2017).

#### پروتکل انجام آزمایش

برای انجام این مطالعه ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۲۰۰-۱۸۰ گرمی) از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی آموزشکده دامپزشکی شهیرزاد دانشگاه سمنان تهیه شدند و به صورت کاملاً تصادفی به چهار گروه، در هر گروه شش رت با دسترسی آزاد به رژیم غذایی استاندارد (پلت استاندارد) و آب و سیکل نوردهی ۱۲

## تجزیه و تحلیل آماری

پس از تعیین نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی در نرم‌افزار آماری SPSS داده‌ها تحلیل شدند.

## نتایج

تأثیر دریافت لاکتوباسیلوس پلانناروم بر وضعیت گلوکز سرمی رت‌ها

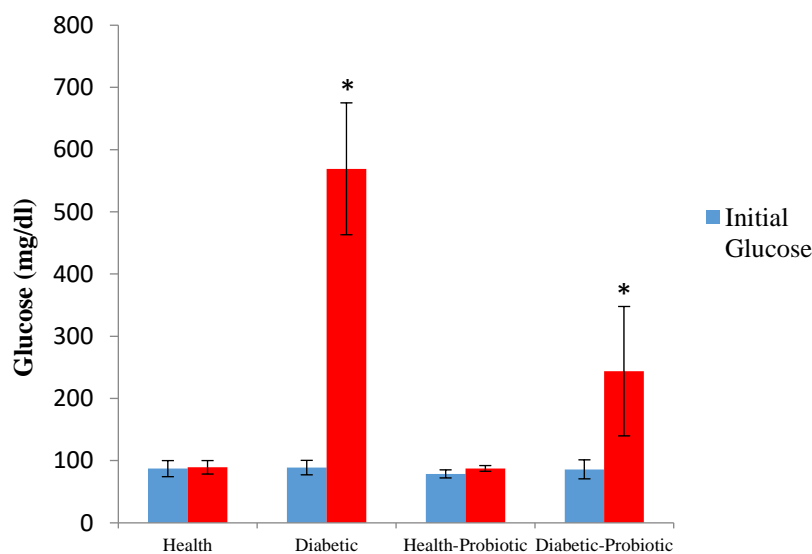
در Fig 1 مقایسه‌ی میانگین  $\pm$  انحراف معیار غلظت قند خون ناشتا اولیه و نهایی هر گروه مشخص شده است. اطلاعات این نمودار نشان می‌دهد که تجویز استرپتوزوتوسین منجر به افزایش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) غلظت نهایی قند خون ناشتا نسبت به غلظت اولیه‌ی آن در موش‌های صحرایی گروه دوم و چهارم گردیده است که با تجویز پروبیوتیک، میزان این افزایش در گروه چهارم نسبت به گروه دوم کم‌تر بوده است.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی و پارامترهای اکسیدانی و آنتی اکسیدانی تام سرم

سنجش گلوکز، کلسترول، تری گلیسرید، LDL و HDL کلسترول، ظرفیت آنتی اکسیدانی و آنتی اکسیدانی تام سرم قند خون ناشتا پنج روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین (روز ششم) و ۲۱ روز پس از انجام مطالعه توسط دستگاه گلوکومتر اندازه‌گیری شد و سپس به موش‌های گروه‌های سوم و چهارم پروبیوتیک تجویز شد. سنجش کلسترول، HDL، LDL، تری گلیسرید سرم با کیت‌های مخصوص شرکت زیست‌شیمی و توسط دستگاه اتوآنالایزر (Mindray-H120, China) صورت گرفت. ظرفیت آنتی اکسیدانی و اکسیدانی تام سرم به ترتیب توسط روش Erel (۲۰۰۴) و Erel (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد. کلیه‌ی مراحل انجام این تحقیق به تأیید کمیته‌ی اخلاق دانشکده‌ی دامپزشکی رسیده است.

اندیس استرس اکسیداتیو

درصد وضعیت اکسیدانی تام سرم به وضعیت آنتی-اکسیدانی تام سرم به صورت اندیس استرس اکسیداتیو بیان می‌شود (Dokuyucu et al, 2016).



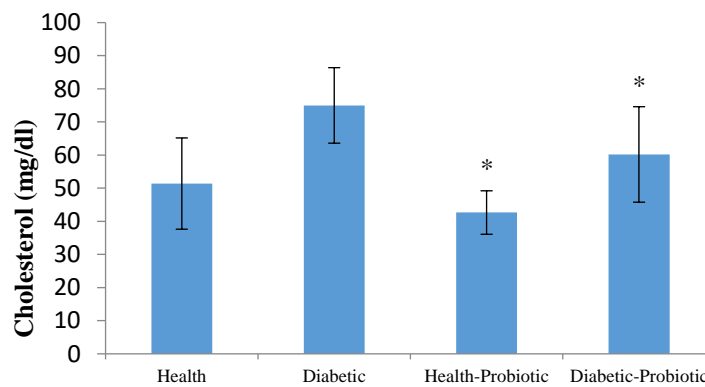
**Fig 1: Mean initial and final serum glucose Concentrations (mg/dl) between different groups**

\* indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ) between primary and final blood sugar between groups

(Fig 5). نکته‌ی قابل توجه کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) غلظت کلسترول تام، تری‌گلیسرید و HDL کلسترول در گروه سالم-پروبیوتیک نسبت به گروه سالم بود که نشان می‌دهد تجویز پروبیوتیک به موش‌های سالم باعث کاهش این پارامترها گردیده است (Fig 2, 3 and 5). همچنین غلظت کلسترول تام، تری‌گلیسرید، LDL و HDL کلسترول پس از تجویز پروبیوتیک در موش‌های صحرایی دیابتی شده نسبت به موش‌های دیابتی که پروبیوتیک دریافت نکرده بودند کاهش پیدا کرد که این کاهش در غلظت تری‌گلیسرید معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) (Fig 3).

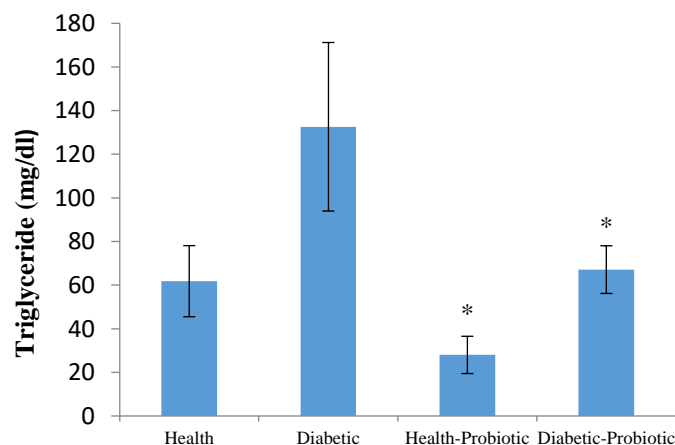
تأثیر دریافت لاکتوباسیلوس پلانترام بر پروفایل چربی سرمی در رت‌ها

نتایج حاصل از دریافت خوراکی لاکتوباسیلوس پلانترام بر غلظت کلسترول تام، تری‌گلیسرید، LDL و HDL کلسترول به ترتیب در Fig 2, 3, 4 and 5 نشان داده شده است. نتایج نشان داد غلظت کلسترول تام، تری‌گلیسرید و LDL در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم افزایش یافتند که در مورد غلظت کلسترول تام و تری‌گلیسرید افزایش معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) (Fig 2 and 3)، اما غلظت HDL کلسترول در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم کاهش یافت



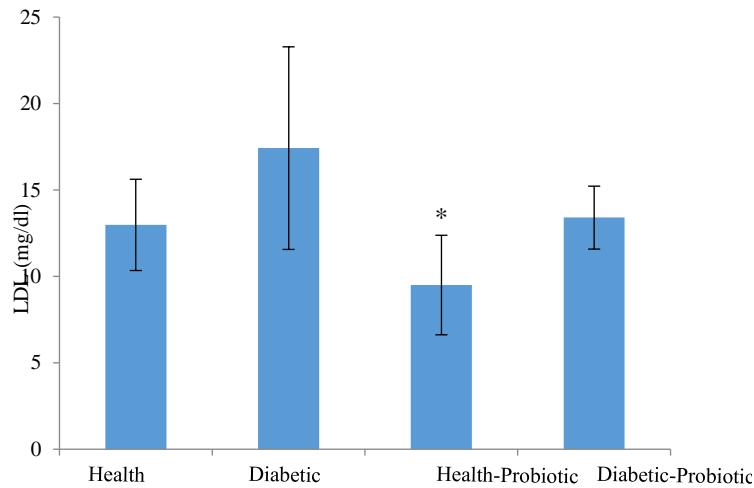
**Fig 2: Mean cholesterol concentrations (mg/dl) between different groups**

\*Indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups with other groups



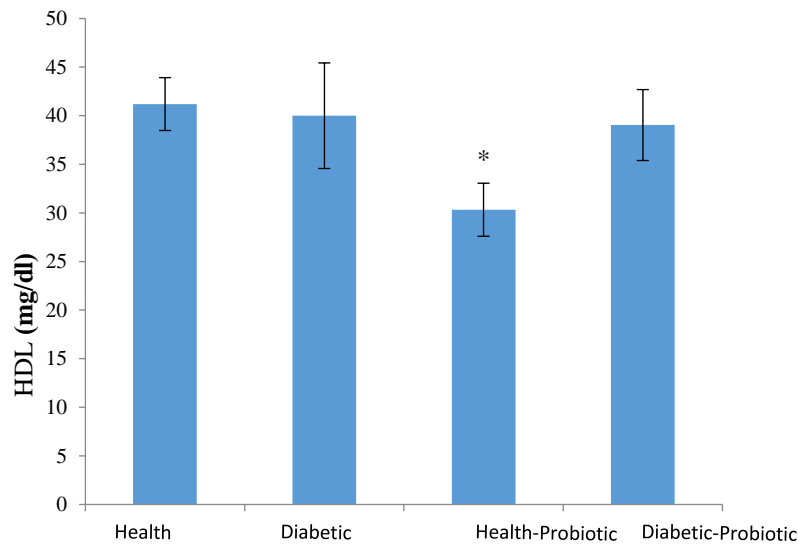
**Fig 3: Mean triglyceride concentrations (mg/dl) between different groups**

\*Indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups with other groups



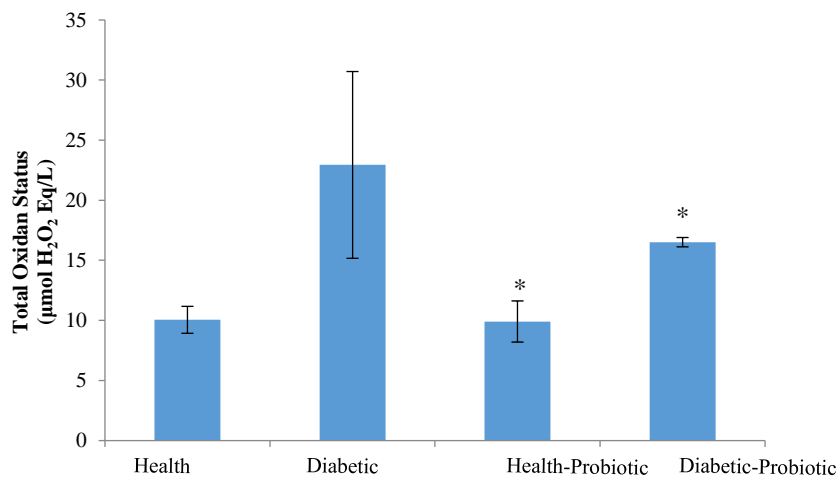
**Fig 4: Mean LDL concentrations (mg/dl) between different groups**

\*Indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups with other groups



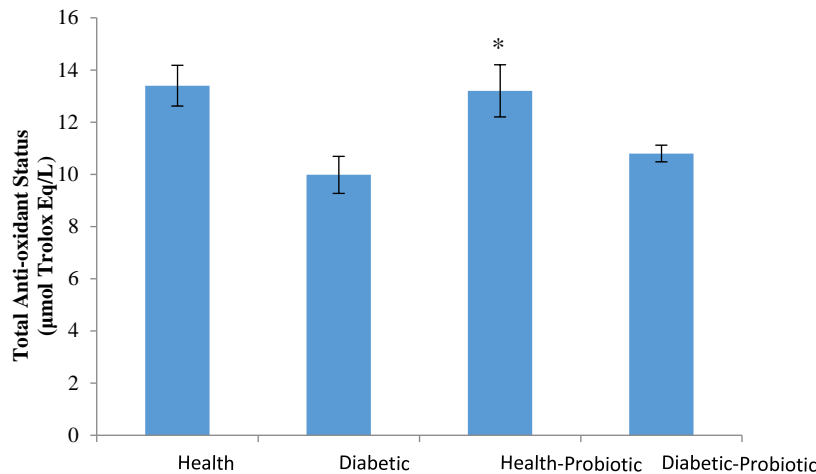
**Fig 5: Mean HDL concentrations (mg/dl) between different groups**

\*Indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups with other groups



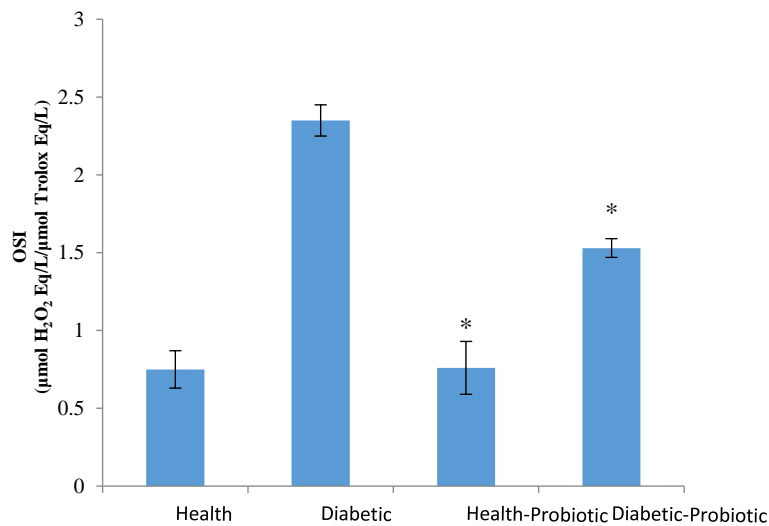
**Fig 6: Mean total oxidant status (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Eq/L) between different groups**

\*Indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups with other groups



**Fig 7: Mean total anti-oxidant status (µmol Trolox Eq/L) between different groups**

\*Indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups with other groups



**Fig 8: Mean oxidative stress index (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Eq/L/µmol Trolox Eq/L) between different groups**

\*Indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups with other groups

پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانترام (گروه چهارم) با گروه-های سالم و سالم-پروبیوتیک مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). همچنین کاهش مشخصی در وضعیت اکسیدانی تام سرم در موش‌های صحرایی دیابتی شده و دریافت کننده پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانترام نسبت به موش‌های صحرایی دیابتی شده بدون دریافت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانترام مشاهده گردید. نکته قابل توجه کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) وضعیت تام اکسیدانی تام سرم موش‌های

تأثیر دریافت لاکتوباسیلوس پلانترام بر وضعیت اکسیدانی نتایج حاصل از دریافت خوراکی لاکتوباسیلوس پلانترام بر پارامترهای اکسیدانی تام سرم در Fig 6 نشان داده شده است.

افزایش معنی‌داری در شرایط اکسیدانی تام سرم در موش‌های صحرایی دیابتی شده بدون تجویز پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانترام (گروه دوم) و پس از تجویز

دیابت کمپلکسی از اختلالات متابولیک است که به وسیله هیپرگلیسمی متمایز می‌شود و در نتیجه آن تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) افزایش می‌یابد. استرس اکسیداتیو حاصل (عدم تعادل بین تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و دفاع آنتی‌اکسیدانی) می‌تواند نقش کلیدی در بیماری‌زایی دیابت بازی کند (Bonnefont-Rousselot, 2002). دیابت القاء شده توسط استرپتوزوتوسین مدل کاملاً شناخته شده‌ای است که شرایط دیابت را شبیه‌سازی می‌نماید و جهت ارزیابی عوارض دیابت مفید است. در مطالعه‌ی حاضر همان گونه که انتظار می‌رفت استرپتوزوتوسین شرایطی از دیابت که با هیپرگلیسمی متمایز می‌شود را القاء نمود. نشان داده شده است که اثرات ایجاد دیابت توسط استرپتوزوتوسین حداقل بخشی به تولید بیش از حد گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن مربوط می‌شود که منجر به مسمومیت سلول‌های پانکراسی شده و سنتز و آزادسازی انسولین را کاهش می‌دهند (Szkudelski, 2001). توانایی گونه‌های لاکتوباسیلوس در کاهش سطح گلوکز خون را می‌توان به تحریک جزائر لانگرهانس، بهبود حساسیت محیطی به باقی‌مانده‌ی انسولین، مهار آلفا گلوکوزیداز و یا خواص آنتی‌اکسیدانی قدرتمند آن مربوط دانست (Kim et al, 2012; Bejar et al, 2014; Chen et al, 2013; Yadav et al, 2007). اثرات ضد دیابتی پروبیوتیک داهی (dahi) حاوی لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*) را بر موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط جیره‌ی غنی از فروکتوز بررسی نمودند و نشان دادند که پروبیوتیک باعث کاهش سطح قند خون و تحمل گلوکز می‌شود. در مطالعه‌ی دیگری که بر روی موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین صورت گرفت نشان داده شد که سطح قند خون به طور معنی‌داری در اثر مصرف این پروبیوتیک کاهش پیدا کرد. آن‌ها این اثر را به بازسازی سیستم آنتی‌اکسیدانی با پروبیوتیک و کاهش تخریب سلول‌های بتا جزائر لانگرهانس منوط دانستند

صحرایی سالم دریافت‌کننده‌ی پروبیوتیک نسبت به گروه سالم بود که نشان می‌دهد تجویز پروبیوتیک به موش‌های سالم باعث کاهش شرایط اکسیدانی تام سرم گردیده است (Fig 6).

#### تأثیر دریافت لاکتوباسیلوس پلانناروم بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم

نتایج حاصل از دریافت خوراکی لاکتوباسیلوس پلانناروم بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم در Fig 7 نشان داده شده است. کاهش معنی‌داری در شرایط آنتی‌اکسیدانی تام سرم در موش‌های صحرایی دیابتی شده بدون تجویز پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانناروم (گروه دوم) و پس از تجویز پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانناروم (گروه چهارم) با گروه-های سالم و سالم-پروبیوتیک مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). همچنین وضعیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم موش‌های صحرایی سالم دریافت‌کننده‌ی پروبیوتیک نسبت به موش-های صحرایی سالم افزایش یافت که نشان می‌دهد تجویز پروبیوتیک به موش‌های سالم باعث افزایش شرایط آنتی-اکسیدانی تام سرم گردیده است (Fig 7).

#### تأثیر دریافت لاکتوباسیلوس پلانناروم بر اندیس استرس اکسیداتیو

نتایج حاصل از دریافت خوراکی لاکتوباسیلوس پلانناروم بر اندیس استرس اکسیداتیو در Fig 8 نشان داده شده است. القاء دیابت در گروه دیابتی (گروه دوم) به طور معنی‌داری منجر به افزایش اندیس استرس اکسیداتیو در مقایسه با گروه سالم و سالم-پروبیوتیک شد. با تجویز پروبیوتیک در موش‌های صحرایی دیابتی شده اندیس استرس اکسیداتیو نسبت به گروه دیابتی به طور معنی‌داری کاهش یافت. افزایش معنی‌دار استرس اکسیداتیو در گروه دیابت-پروبیوتیک نسبت به گروه سالم-پروبیوتیک مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ) (Fig 8).

#### بحث



پروفایل چربی (تری‌گلیسرید و LDL) رت‌های دیابتی پرداختند و نشان دادند که کاهش معنی‌دار در این دو پارامتر را بازگشت مشخص فعالیت لیپاز پانکراسی دانستند که منجر به کاهش هیدرولیز تری‌گلیسرید به مونوگلیسرید و اسیدهای چرب می‌شود و تا حدودی علت مغایرت این دو مطالعه را می‌توان در استفاده از دز بیش‌تر این باکتری  $9 \times 10^8$  cfu/ml در مطالعه‌ی مذکور و طولانی‌تر بودن مدت زمان تیمار در آن مطالعه که چهار هفته بوده است بیان نمود. Li و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز اثر دلیل کاهندگی لاکتوباسیلوس پلاتنارم بر پروفایل لیپیدی را کاهش متابولیسم چربی، اسید استیک و افزایش سطح اسید بوتیریک در مدفوع دانستند. علت کاهندگی چربی خون ناشی از استفاده از پروبیوتیک‌ها جذب کلسترول در روده‌ی باریک، دکونژوگه شدن نمک‌های صفراوی که به عنوان پیش‌ساز ساخت کلسترول مورد استفاده قرار گیرند و نیز از آن‌ها در ساخت اجزای غشا مانند آگروپلی ساکاریدها استفاده می‌کنند بیان شده است. در دیابت نوع یک نشان داده شده است که تخریب سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس از پراکسیداسیون چربی غشاء این سلول‌ها ناشی می‌شود و در نتیجه تولید انسولین دچار نقص می‌شود (Mahdavi & Joukar, 2014) دلیل اصلی غیرطبیعی بودن غلظت لیپیدهای سرم در رت‌های دیابتی، افزایش جابجایی اسیدهای چرب آزاد از بافت‌های چربی محیطی (به دلیل این که انسولین لیپاز حساس به هورمون را مهار می‌کند) می‌باشد. اسیدهای چرب مازاد در سرم رت‌های دیابتی به فسفولیپیدها و کلسترول در کبد تبدیل می‌شوند. این دو ماده به همراه تری‌گلیسرید مازاد در کبد ممکن است به شکل لیپوپروتئین‌ها به خون دفع شوند (Ashraf et al, 2013).

اتو اکسیداسیون گلوکز در دیابت ملیتوس مقادیر زیادی رادیکال‌های آزاد اکسیژن را تولید می‌کند. این رادیکال‌های آزاد اکسیژن مسئول تخریب اکسیداتیو لیپیدهای اشباع نشده هستند. در مطالعه‌ی حاضر افزایش معنی‌داری در شرایط اکسیداتیو تام سرم در موش‌های صحرایی دیابتی

(Yadav et al. 2008). Harisa و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس باعث کاهش رادیکال‌های آزاد و گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن می‌شود. این ترکیبات واکنش‌پذیر باعث اختلال در سوپره‌های نیتریک اکساید موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود. نیتریک اکساید مهم‌ترین مدیاتور در ترشح هورمون‌ها و تحریک سیستم ایمنی محسوب می‌شود. به عبارت دیگر، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس منجر به کاهش قند خون و متعادل کردن نیتریک اکساید در موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلکوسان می‌شود (Harisa et al, 2009). Matsuzaki و همکاران در سال ۱۹۹۷ اثبات کردند که لاکتوباسیلوس کازنی در موش‌هایی که به طور ژنتیکی مبتلا به دیابت تیپ ۲ بودند باعث کاهش قند خون می‌شود. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که قند خون در موش‌های صحرایی دیابتی شده کاهش معنی‌داری را در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه کنترل دیابتی پس از مصرف پروبیوتیک برای ۲۱ روز گردید.

در این مطالعه غلظت لیپیدها، شامل کلسترول تام و تری‌گلیسرید به طور معنی‌دار افزایش و LDL و HDL کلسترول در موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه سالم به ترتیب افزایش و کاهش یافتند. مکانیسم‌های متعددی برای کاهش کلسترول توسط پروبیوتیک‌ها پیشنهاد شده است. محتمل است میزان لاکتوباسیل‌ها در روده افزایش می‌یابد، تقاضا برای گلوکز بالا می‌رود و در نتیجه منجر به کاهش آزادسازی گلوکز در سرم می‌شود (Yadav et al, 2008; Laleye et al, 2008). به علاوه، به خاطر این که پروبیوتیک‌ها صفات آنتی‌اکسیدانی دارند آن‌ها مانع تخریب سلول‌های بتا لانگرهانس می‌شوند و در نتیجه باعث می‌شوند تا گلوکز سرم کاهش یابد (Harisa et al, 2009). در این مطالعه کاهش در غلظت سرمی کلسترول، LDL و تری‌گلیسرید در گروه دیابتی درمان شده با پروبیوتیک نسبت به گروه دیابتی مشاهده شد که با مطالعه‌ی انجام شده توسط Bejar و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشابهت داشت که به بررسی مصرف لاکتوباسیلوس پلاتنارم بر

موش‌های سرمی دیابتی شده توسط Hasieh و همکاران، در سال ۲۰۱۱ نشان داد که سطح سرمی گلوکز کاهش و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش می‌یابد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم، توانایی سیستم دفاع آنتی-اکسیدانی غیرآنزیمی را نشان می‌دهد. در این پژوهش اندیس استرس اکسیداتیو در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم افزایش معنی‌داری را نشان داد که پس از تجویز لاکتوباسیلوس پلانناروم این اندیس نسبت به گروه دیابتی کاهش معنی‌داری پیدا کرد.

گزارشات متعددی در مورد استفاده از پنیر به عنوان حامل پروبیوتیک‌ها شده است. در بیش‌تر این گزارش‌ها از بیفیدوباکتریوم به عنوان پروبیوتیک در پنیر استفاده شده است. با این حال گزارش نسبتاً کمی درباره‌ی استفاده از لاکتوباسیلوس به عنوان مواد افزودنی پنیر پروبیوتیک وجود دارد (Widyastuti & Febrisiantosa, 2014). از آن‌جا که سویه‌های بومی باکتری‌های اسید لاکتیک دارای خصوصیات سازگاری با شرایط همان منطقه می‌باشند و در تهیه‌ی انواع فرآورده‌های تخمیری دارای پتانسیل مشخصی هستند و دارای اثر ضد میکروبی نیز می‌باشند، لذا شناسایی و جداسازی سویه‌های بومی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس هر منطقه، نقش بسیار مفیدی را در صنعت غذایی و سلامت افراد بازی می‌کند.

پروبیوتیک به کار رفته در این مطالعه احتمالاً با کاهش سطح سرمی گلوکز در موش‌های دیابتی باعث کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از آن گردیده است. از سوی دیگر پروبیوتیک تجویز شده در این مطالعه با تقویت ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی ممکن است نقش مؤثری را در کاهش سطح گلوکز خون موش-های صحرایی دیابتی شده ایفا نموده باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس پلانناروم هیپرگلیسمی، دیس لیپیدمی و استرس اکسیداتیو را در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین کاهش می‌دهد.

شده (گروه دوم) با گروه‌های سالم مشاهده گردید. تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس پلانناروم منجر به کاهش پارامترهای اکسیدانی تام، در رت‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل دیابت شد. هایپرگلیسمی می‌تواند باعث کاهش سطح آنزیم گلوکوتیون پراکسیداز از طریق افزایش کوفاکتور ضروری آنزیم NADH اکسیداز (یکی از آنزیم‌های مسؤول در استرس اکسیداتیو) گردد (Razmpoosh et al, 2016). آنتی‌اکسیدان به عنوان ماده‌ای تعریف می‌شود که وقتی در غلظت کم در مقایسه با مواد اولیه قابل اکسید شدن (پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و DNA) وجود دارد، به طور معنی‌داری اکسیداسیون آن مواد اولیه را به تأخیر اندازد یا متوقف سازد. عملکرد اصلی آنتی‌اکسیدان‌ها حمایت بدن در برابر اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد آسیب‌رسان است (Marques et al, 2014) رادیکال‌های آزاد ممکن است در سلول‌ها و بافت‌هایی با منشأ داخلی (مثل التهاب، بیماری یا متابولیسم) یا منابع خارجی (اشعه تراپی، آلودگی هوا، غذا، دارو) و یا متعاقب کاهش ظرفیت حمایتی تولید شوند. در هر صورت، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌تواند منشأ آسیب اکسیداتیو باشد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام، اندازه‌گیری میزان رادیکال‌های آزاد پاک شده توسط محلولی آزمایشی است که جهت ارزیابی ظرفیت آنتی-اکسیدانی نمونه‌های بیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bartosz et al, 2010; Pinchuk et al, 2012). القاء دیابت در موش‌های صحرایی باعث کاهش معنی‌دار وضعیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم نسبت به گروه سالم و گروه سالم دریافت‌کننده‌ی پروبیوتیک گردید. در این مطالعه‌ی تجویز لاکتوباسیلوس پلانناروم به موش‌های دیابتی باعث افزایش سطح آنتی‌اکسیدانی تام سرم نسبت به موش‌های دیابتی درمان نشده گردید هرچند که این افزایش معنی‌دار نبود. این نتایج با یافته‌های Davari و همکاران در سال ۲۰۱۳ که به بررسی اثر تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس‌های اسیدوفیلوس و فرمنتوس در موش‌های صحرایی هم‌خوانی داشت. بررسی اثر خوراکی لاکتوباسیلوس رئوتری بر

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه سمنان، برای حمایت مالی از این کار تشکر می‌کنند.

## تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می‌کنند که در رابطه با انتشار مقاله‌ی ارائه شده به طور کامل از اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافی تجاری در این راستا وجود ندارد و نویسندگان در قبال ارائه‌ی اثر خود وجهی دریافت ننموده‌اند.

## منابع مالی

این مطالعه توسط پژوهانه‌ی اعطائی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه سمنان به شماره قرارداد ۱۳۹۸/۰۷/۰۶۱۱۳۰ به انجام رسیده است.

## منابع

- Ashraf, H., Heidari, R., Nejadi, V., & Ilkhanipoor, M. (2013). Aqueous extract of *Berberis integerrima* root improves renal dysfunction in streptozotocin induced diabetic rats. *Avicenna Journal of phytomedicine* 3(1): 82.
- Bartosz, G. (2010). Non-enzymatic antioxidant capacity assays: limitations of use in biomedicine. *Free radical research* 44(7): 711-720.
- Bejar, W., Hamden, K., Salah, R.B., & Chouayekh, H. (2013). *Lactobacillus plantarum* TN627 significantly reduces complications of alloxan-induced diabetes in rats. *Anaerobe* 24: 4-11.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2002). Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 5(5): 561-568.
- Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., ... & Chen, W. (2014). Antidiabetic effect of *Lactobacillus casei* CCFM0412 on mice with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Nutrition* 30(9): 1061-1068.
- Davari, S., Talaei, S., & Alaei, H. (2013). Probiotics treatment improves diabetes-induced impairment of synaptic activity and cognitive function: behavioral and electrophysiological proofs for microbiome-gut-brain axis. *Neuroscience* 240: 287-296.
- Dokuyucu, R., Gozukara, K.H., Ozcan, O., Sefil, N.K., Nacar, A., Dokuyucu, A., & Inci, M. (2016). The effect of *Bongardia Chrysozonum* on prostate tissue in a rat model of STZ-induced diabetes. *SpringerPlus* 5(1): 1322.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry* 37(4): 277-285.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry* 38(12): 1103-1111.
- Harisa, G.I., Taha, E.I., Khalil, A.F., & Salem, M.M. (2009). Oral administration of *Lactobacillus acidophilus* restores nitric oxide level in diabetic rats. *Australian Journal of Basic Applied Sciences* 3(3): 2963-9.
- Hsieh, H.M., Wu, W.M., & Hu, M.L. (2011). Genistein attenuates D-galactose-induced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B binding activity in neuronal PC12 cells. *Life sciences* 88(1-2): 82-88.
- Kim, S.T., Kim, H.B., Lee, K.H., Choi, Y.R., Kim, H.J., Shin, I.S., ... & Joo, S.S. (2012). Steam-dried ginseng berry fermented with *Lactobacillus plantarum* controls the increase of blood glucose and body weight in type 2 obese diabetic db/db mice. *Journal of agricultural and food chemistry* 60(21): 5438-5445.
- Kumar, N., Tomar, S.K., Thakur, K., & Singh, A.K. (2017). The ameliorative effects of probiotic *Lactobacillus fermentum* strain RS-2 on alloxan induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods* 28: 275-284.

- Laleye, S.A., Igbakin, A.P., & Akinyanju, J.A. (2008). Antidiabetic effect of Nono (a Nigerian fermented milk) on alloxan-induced diabetic rats. *American Journal of Food Technology* 3(6): 394-98.
- Leal-Lopes, C., Velloso, F.J., Campopiano, J.C., Sogayar, M.C., & Correa, R.G. (2015). Roles of commensal microbiota in pancreas homeostasis and pancreatic pathologies. *Journal of diabetes research*, Article ID 284680.
- Li, C., Ding, Q., Nie, S. P., Zhang, Y.S., Xiong, T., & Xie, M.Y. (2014). Carrot juice fermented with *Lactobacillus plantarum* NCU116 ameliorates type 2 diabetes in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(49): 11884-11891.
- Mahdavi, N., Joukar, S., Najafipour, H., & Asadi-Shekaari, M. (2016). The promising effect of barberry (Zereshk) extract against experimental pulmonary microvascular remodeling and hypertension: A comparison with sildenafil. *Pharmaceutical Biology* 54(3): 509-515.
- Marques, S.S., Magalhães, L.M., Tóth, I.V., & Segundo, M.A. (2014). Insights on antioxidant assays for biological samples based on the reduction of copper complexes—The importance of analytical conditions. *International journal of molecular sciences* 15(7): 11387-11402.
- Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S., & Yokokura, T. (1997). Antidiabetic effects of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-Ay mice. *Endocrine journal* 44(3): 357-365.
- Mihailović, M., Živković, M., Jovanović, J.A., Tolinački, M., Sinadinović, M., Rajić, J., ... & Vidaković, M. (2017). Oral administration of probiotic *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 attenuates diabetes-induced liver and kidney damage in rats. *Journal of Functional Foods* 38: 427-437.
- Misaghi, A., Parsaeimehr, M., Akhondzadeh, A., Gandomi, H., & Azizkhani, M. (2017). The inhibitory effects of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from yoghurt on the growth and enterotoxin A gene expression of *S. aureus*. *Iranian Journal of Veterinary Medicine* 11(2): 191-201.
- Partovi, R., Gandomi, H., Akhondzadeh Basti, A., Noori, N., Nikbakht Borujeni, G., & Kargozari, M. (2015). Microbiological and Chemical Properties of S iahmazgi Cheese, an Iranian Artisanal Cheese: Isolation and Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Processing and Preservation* 39(6): 871-880.
- Pinchuk, I., Shoval, H., Dotan, Y., & Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and physics of lipids* 165(6): 638-647.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research* 50(6): 537-546.
- Tecilazich, F., & Veves, A. (2018). Role of peripheral neuropathy in the development of foot ulceration and impaired wound healing in diabetes mellitus. In *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome* (pp. 95-104). Academic Press.
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., ... & Li, W. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients* 9(5): 521.
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., ... & Li, W. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients* 9(5): 521.
- Yadav, H., Jain, S., & Sinha, P.R. (2007). Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition* 23(1): 62-68.
- Yadav, H., Jain, S., & Sinha, P.R. (2008). Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. *The Journal of dairy research* 75(2): 189.

## Effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* ktbs2 on serum total oxidant and antioxidant, oxidative stress index and some biochemical parameters in induced diabetic rats

Sahar Mosallami<sup>1</sup>, Mahnoosh Parsaeimehr<sup>2</sup>, Mahmood Ahmadi-hamedani<sup>3\*</sup>,  
Ashkan Jebelli Javan<sup>4</sup> and Melika Moezifar<sup>5</sup>

<sup>1</sup> DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

<sup>2</sup> Assistan Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Smnan, Iran

<sup>3</sup> Assistan Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Smnan, Iran

<sup>4</sup> Associated Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Smnan, Iran

<sup>5</sup> PhD Graduated of Veterinary Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 11.03.2019

Accepted: 14.09.2019

### Abstract

This study aimed to investigate the effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional Semnan cheese on serum total oxidant and antioxidant status, oxidative stress index and some biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. Twenty-four male Wistar rats were randomly divided into four groups (six rats in each group) including; negative control, positive control (diabetic control), probiotic control and diabetic rats received *Lactobacillus plantarum* suspension at a dose of  $10^8$  CFU / ml by gavage. *Lactobacillus plantarum* bacteria identification was performed by mMRS culture and isolation of single colonies and the use of specific biochemical tests and molecular identification of lactobacilli based on the amplification of 16s rRNA gen using polymerase chain reaction (PCR). Hyperglycemia was induced in 12 male rats by intraperitoneal injection of streptozotocin (65mg/kg) (diabetic untreated, and diabetic-probiotic groups). The healthy and diabetic rats treated by probiotic in groups 3 and 4 received probiotic on the 6<sup>th</sup> day of the study (five days after STZ injection). Fasting blood sugar (FBS) was monitored on days 0 (primary blood glucose), 6 and 21 of the experiment, and serum lipid profile and total oxidant, and antioxidant parameters and oxidative stress index of the rats were measured at the end of the experiment. The results of this study showed that *Lactobacillus plantarum* suspension at a dose of  $10^8$  CFU / ml doses in treated diabetic rats significantly decreased ( $P<0.05$ ) fasting blood glucose, triglyceride, total oxidant parameter and the oxidative stress index compared to the control group. For the first, the results of this study indicated that probiotic *lactobacillus plantarum* isolated from Semnan traditional cheese had the potential to reduce hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats.

**Key words:** Diabetes, *Lactobacillus.plantarum*, Blood glucose, lipid profile, oxidative stress

---

\* **Corresponding Author:** Mahmood Ahmadi-hamedani, Assistan Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Smnan, Iran, E-mail: ahmadi.hamedani@semnan.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).