15(1) 323-330, Spring 2023

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effect of probiotics produced from yogurt and pure lactobacilli with and without oleic acid on blood and enzymatic parameters of healthy and diabetic male rats

Mokhtar Fathi [1*], Shahriar Saeidian [2], Mina Hasanzadeh [2]

[1]*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Payam Noor University, Tehran, Iran*
[2]*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Payam Noor University, Tehran, Iran*

Key Words
Diabetic
Lactobacillus
Lipid parameters
Liver enzymes
Probiotics

Abstract

Introduction: Considering the importance of blood lipid factors on diabetes and cardiovascular health, the main purpose of this research was to investigate the effect of four types of probiotic compounds on lipid and enzyme factors in diabetic rats.

Materials and Methods: In this experiment, 50 male Wistar rats were randomly divided into ten groups (5 series). Ten Experimental groups included: (healthy control), healthy recipient of mixed bacteria isolated from Yogurt, healthy recipient of pure lactobacilli bacteria, healthy recipient of mixed bacteria isolated from yogurt plus oleic acid, healthy recipient of pure lactobacilli bacteria plus oleic acid, diabetic control, diabetic recipient of mixed bacteria isolated from yogurt , Diabetic receiving pure lactobacilli, diabetic receiving mixed bacteria isolated from yogurt plus oleic acid, and diabetic receiving pure lactobacilli plus oleic acid.

Results: The results showed that in healthy mice, all experimental treatments significantly increased serum glucose, cholesterol and triglycerides and decreased LDL. In healthy mice, the probiotic *Lactobacillus* significantly reduced the serum HDL. In diabetic rats, supplementation of all experimental treatments significantly reduced blood glucose, cholesterol, LDL and HDL. In this group, the greatest effect of reducing serum glucose, cholesterol and LDL was related to probiotic treatment produced from yogurt plus oleic acid. In both healthy and diabetic groups, experimental treatments significantly increased serum levels of liver enzymes (ALT, AST, ALP and CK). The greatest effect of increasing the serum activity of liver enzymes in the diabetic group was related to the treatment of lactobacillus plus oleic acid.

Conclusion: The results of this study showed that the greatest effect of probiotics in reducing serum levels of liver enzymes and reducing serum lipid parameters was related to a mixture of probiotic bacteria and this effect was greater in diabetic mice than healthy mice.

* Corresponding Author's email: mokhtarfathi@pnu.ac.ir
Received: 22 November 2021; Reviewed: 26 December 2022; Revised: 26 February 2022; Accepted: 29 March 2022
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.309788.2658

مقاله پژوهشی

تاثیر پروبیوتیک تولیدی از ماست و لاکتوباسیلوی خالص با و بدون اسیداولئیک بر فراسنجه‌های خونی و آنزیمی رت‌های نر سالم و دیابتی

مختار فتحی[1]، شهریار سعیدیان[2]، مینا حسن‌زاده[2]*

[1] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

[2] گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

کلمات کلیدی

آنزیم‌های کبدی
پروبیوتیک
دیابت
لاکتوباسیلوس
فراسنجه‌های لیپیدی

چکیده

مقدمه: با توجه به اهمیت فاکتورهای چربی خون بر دیابت و سلامت قلب و عروق، هدف اصلی از اجرای این تحقیق بررسی تاثیر چهار نوع ترکیب پروبیوتیک بر فاکتورهای لیپیدی و آنزیمی در موش‌های دیابتی بود.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش ۵۰ سر رت نر از نژاد ویستار به‌صورت کاملاً تصادفی به ده گروه پنج سری تقسیم شدند. ده گروه آزمایشی شامل: ۱-(سالم کنترل)، ۲-سالم دریافت‌کننده باکتری‌های مخلوط جداسازی شده از ماست، ۳-سالم دریافت‌کننده باکتری خالص لاکتوباسیل، ٤-سالم دریافت‌کننده باکتری‌های مخلوط جداسازی شده از ماست و اسیداولئیک، ٥-سالم دریافت‌کننده باکتری خالص لاکتوباسیل و اسیداولئیک، ٦-دیابتی کنترل، ۷-دیابتی دریافت‌کننده باکتری‌های مخلوط جداسازی شده از ماست، ۸-دیابتی دریافت‌کننده باکتری خالص لاکتوباسیل، ۹-دیابتی دریافت‌کننده باکتری‌های مخلوط جداسازی شده از ماست و اسیداولئیک، ۱۰- دیابتی دریافت‌کننده باکتری خالص لاکتوباسیل و اسیداولئیک.

نتایج: نتایج نشان داد انواع پروبیوتیک‌ها سبب افزایش گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید خون و کاهش LDL سرم موش‌های سالم شد. هم‌چنین پروبیوتیک لاکتوباسیلوس سبب کاهش HDL سرم موش‌های سالم شد. در گروه موش‌های دیابتی مکمل‌سازی انواع پروبیوتیک‌ها سبب کاهش گلوکز، کلسترول، LDL و HDL سرم موش‌ها شد. در این گروه بیش‌ترین تاثیر کاهشی گلوکز، کلسترول و LDL سرم مربوط به پروبیوتیک تولید شده از ماست و اسید اولئیک بود. در هر دو گروه سالم و دیابتی، انواع پروبیوتیک سبب افزایش سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی (ALT، AST، ALP و CK) شد. بیش‌ترین تاثیر افزایشی فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی در گروه دیابتی مربوط به تیمار لاکتوباسیلوس به‌علاوه اسید اولئیک بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد بیش‌ترین تاثیر پروبیوتیک‌ها در کاهش سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی و کاهش فراسنجه‌های لیپیدی سرم مربوط به مخلوطی از باکتری‌های پروبیوتیک است و این تاثیر در موش‌های دیابتی بیش‌تر از موش‌های سالم بود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mokhtarfathi@pnu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱ آذر ۱۴۰۰؛ تاریخ داوری: ۵ دی ۱۴۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۷ اسفند ۱۴۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۹ فروردین ۱۴۰۱

(DOI): 10.22034/AEJ.2021.309788.2658

مقدمه

دیابت نوع ۲ یک اختلال متابولیکی است که عمدتاً با تخریب پیش‌رونده عملکرد سلول‌های بتا پانکراس و مقاومت به انسولین، منجر به افزایش مزمن غلظت گلوکز خون می‌شود (۱۳). این بیماری، در اثر افزایش قند خون به‌علت کمبود ترشح انسولین و مقاومت انسولینی ایجاد می‌شود (۱). در ایران حدود ۲۰ درصد از جمعیت بزرگسال به شکل مبتلا یا مستعد (شیوع ۷ درصد دیابت آشکار و ۱۳ درصد دیابت پنهان)، مبتلا به این بیماری می‌باشند (۱۴). میزان شیوع این بیماری در جمعیت جوان ایران ۸ درصد است (۱۵). پیش‌بینی گردیده که آمار میزان شیوع دیابت، در سال ۲۰۳۰ به ۳۶۶ میلیون نفر در جهان خواهد رسید (۷). تعداد افراد دیابتی به‌علت رشد جمعیت، پیر شدن جمعیت کشورها، شهرشینی و صنعتی شدن، بالا رفتن شیوع چاقی و بی‌تحرکی جسمانی به‌سرعت در حال ازدیاد می‌باشد (۱). در طول اکسیداسیون خود به‌خودی قندها در بالارفتن قند خون، گونه‌های واکنشگر اکسیژن و فراورده‌های نهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته تولید می‌گردند که موجب قرار گرفتن بدن در شرایط استرس اکسیداتیو و التهاب می‌شوند و باعث ایجاد مقاومت به انسولین می‌گردند. مقاومت به انسولین در ایجاد دیابت نوع ۲ و بیماری‌های قلبی-عروقی مرتبط با آن نقش اساسی دارد (۷). بیماری‌های قلبی-عروقی از دلایل عمده مرگ و میر در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ است. در افراد دیابتی، خطر نسبی ابتلا به این بیماری‌ها ۲ تا ۴ برابر بیش‌تر از افراد سالم می‌باشد (۱۶). بیماری دیابت یک عامل قوی برای بیماری کرونر قلبی می‌باشد که خود دلیل اصلی مرگ و میر در بیماران دیابتی است. بیماران دیابتی نوع ۲ که سابقه سکته قلبی ندارند، به‌میزان مشابه با افراد غیردیابتی دارای سابقه سکته قلبی، در معرض خطر این عارضه هستند. در بیماران دیابتی فاکتورهایی مانند چاقی، بالا بودن فشار خون، مصرف سیگار، بالا بودن تری‌گلیسرید بالا بودن لیپوپروتئین با دانسیته پایین و کاهش لیپوپروتئین با چگالی بالا موجب افزایش خطر ابتلا به سکته قلبی می‌گردد (۱۷). بررسی اهمیت پروبیوتیک‌ها در درمان دیابت نوع ۲ از موضوعات جذاب و مورد توجه محققین می‌باشد. مطالعات مختلف به نقش پروبیوتیک‌ها در کاهش سطح گلوکز خون در بیماران با دیابت نوع ۲ اشاره کرده‌اند. تاکنون در چندین پژوهش حیوانی اثر پروبیوتیک‌ها در کاهش گلوکز خون و به تاخیر انداختن مشکلات و عوارض دیابت در موش‌های دیابتی گزارش شده است (۱، ۱۱، ۱۳). تاثیرات سودمند پروبیوتیک‌ها روی سطوح گلوکز پلاسما ممکن است در نتیجه تغییر میکروبی دستگاه گوارش، اصلاح عدم تعادل میکروفلور روده‌ای از طریق افزایش باکتری‌های گرم مثبت، بهبود عملکرد سد دفاعی روده‌ای و اثرات تنظیم‌کننده ایمنی آن‌ها باشد. پروبیوتیک‌ها می‌توانند سطوح اندوتوکسین‌های داخل روده‌ای را کاهش دهند و باعث بهبود عملکرد سد مخاطی روده شوند و از این طریق غلظت لیپوپلی ساکاریدها و سیتوکین‌های پیش‌التهابی را در گردش خون کاهش دهند و با کاهش التهاب، مقاومت به انسولین را کاهش دهند (۸). علاوه بر این پیشنهاد می‌شود که پروبیوتیک‌ها به‌عنوان تقویت‌کننده میکروفلورای روده با افزایش ایمنی و حفاظت از جزایرلانگرهانس سبب کمک به حفظ تولید انسولین در میزبان می‌شود (۱۶). بنابراین با توجه به اهمیت فاکتورهای چربی خون بر دیابت و سلامت قلب و عروق، هدف اصلی از اجرای این تحقیق بررسی تاثیر چهار نوع ترکیب پروبیوتیک بر فاکتورهای لیپیدی و آنزیمی در موش‌های دیابتی بود.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این آزمایش ۵۰ سر رت نر از نژاد ویستار (wistar) (در یک محدوده وزن و سنی) در حیوان‌خانه کلینیک دامپزشکی دانشگاه ایلام در قفس‌های استاندارد با دمای محیطی ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگه‌داری شدند. پیش از شروع آزمایشات، حیوانات به‌مدت ۲ هفته جهت سازگاری با محیط در شرایط ذکر شده و با دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد قرار داده شدند. غذای رایج رت‌ها طبق فرمول از شرکت بهپرور تهیه گردید. پس از گذشت زمان سازگاری با محیط، موش‌ها به‌صورت کاملاً تصادفی به دو گروه (۲۵ سری) تقسیم شدند. یک گروه ۲۵ سری توسط آلوکسان دیابت القا گردید. بر طبق دستورالعمل شرکت تولیدکننده آلوکسان، دیابت نوع ۲ از طریق تزریق درون صفاقی ۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از این ماده، طی دو دوره به فاصله زمانی ۴۸ ساعت القا گردید. بعد از گذشت ۷ روز از تزریق دوم، گلوکز خون با دستگاه گلوکومتر اندازه‌گیری شد و سطح گلوکز بالاتر از ۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌عنوان معیار دیابت در نظر گرفته شد. سپس هر دو گروه به‌صورت جداگانه به ۵ زیر گروه (۵ سری) به‌شرح تقسیم‌بندی شدند: گروه سالم شامل: (سالم کنترل) دریافت‌کننده روزانه ۱ میلی‌لیتر آب مقطر، سالم دریافت‌کننده باکتری‌های مخلوط جداسازی شده از ماست، سالم دریافت‌کننده باکتری خالص لاکتوباسیل، سالم دریافت‌کننده باکتری‌های مخلوط جداسازی شده از ماست به علاوه اسیداولئیک، سالم دریافت‌کننده باکتری خالص لاکتوباسیل به‌علاوه اسیداولئیک. گروه دیابتی شامل: (دیابتی کنترل) دریافت‌کننده روزانه ۱ میلی‌لیتر آب مقطر، دیابتی دریافت‌کننده باکتری‌های مخلوط جداسازی شده از ماست، دیابتی دریافت‌کننده باکتری خالص لاکتوباسیل، دیابتی دریافت‌کننده باکتری‌های مخلوط

جداسازی شده از ماست به‌علاوه اسیداولئیک، دیابتی دریافت‌کننده باکتری خالص لاکتوباسیل به‌علاوه اسیداولئیک.

آماده‌سازی پروبیوتیک‌های مورد استفاده، در آزمایشگاه میکروب‌شناسی واقع در ساختمان آزمایشگاه مرکزی دانشگاه ایلام صورت گرفت. پس از ۴ هفته گاواژ پروبیوتیک (باکتری لاکتوباسیل و باکتری‌های مخلوط جداسازی شده از ماست)، در شرایط بی‌هوشی از قلب رت‌ها خونگیری به‌عمل آمد و نمونه‌ها در لوله‌های حاوی مواد ضدانعقاد (لوله ونوجکت حاوی EDTA) ریخته شد. نمونه‌های خون در اسرع وقت جهت جداسازی سرم از پلاسما سانتریفیوژ و سرم جداشده در یخچال معمولی (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. طی مرحله نهایی در آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام، فاکتورهای خونی شامل گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول تام، ALT، AST، ALP، CK، LDL و HDL توسط کیت آزمایشگاهی پارس آزمون سنجیده شدند. در تمامی گروه‌های مورد مطالعه به‌منظور ایجاد شرایط تغذیه‌ای با چربی بالا، علاوه بر جیره آماده تهیه شده، کلسترول به صورت روزانه گاواژ گردید. ۴ گروه از رت‌های مورد بررسی در این پژوهش علاوه بر جیره غذایی معمول و کلسترول، ۱ میلی‌لیتر اسید اولئیک نیز دریافت نمودند.

روش تهیه باکتری از ماست: ماست پروبیوتیک با میزان چربی ۳ درصد از شرکت زرین غزال دایتی (آپادا) تهیه شد. محصول مورد نظر حاوی لاکتوباسیل، استرپتوکوکوس ترموفیلوس (استارترهای سنتی ماست) و نیز بفیدیوباکتریوم بیفیدوم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (استارتر پروبیوتیک) بود. در شرایط کاملاً استریل، پس از هموژنیزاسیون و رقت‌سازی، با rpm ۷۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از ماده‌رویی به لوله‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط ام آر اس مایع (MRS (Man Rogosa and Sharpe) Broth) استریل افزوده و جهت ایجاد شرایط بی‌هوازی در جار بی‌هوازی حاوی گاز پک نوع A (Anaerobic) و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کشت یک شبه باکتری‌های موجود در ماست به محیط ام آر اس آگار (MRS Agar) انتقال و تحت شرایط بی‌هوازی در جار حاوی گاز پک نوع A به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماخانه‌گذاری گردید. نهایتاً به‌منظور تأیید باکتری‌های لاکتوباسیلوس و بفیدیوباکتریوم موجود در ماست، آزمایشات تشخیصی انجام شد. تست‌های تشخیصی به‌منظور تأیید نهایی و جداسازی استارترهای پروبیوتیکی موجود در ماست پس از رشد کلنی‌ها، تعدادی از آن‌ها انتخاب تست‌های رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و تست اکسیداز مورد بررسی قرار گرفتند (۹). به‌منظور نگه‌داری طولانی مدت از کلنی‌های جداسازی شده، محیط گلیسرول استوک برای آن‌ها تهیه شد. بدین‌صورت که ابتدا آن‌ها را در محیط کشت MRS Broth کشت داده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ سانتی‌گراد در جار بی‌هوازی حاوی گاز پک نوع A انکوبه شدند. پس از گذشت یک روز محیط کشت باکتری‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و محلول رویی که حاوی محیط کشت بدون باکتری بود دور ریخته شد و به رسوب باقی‌مانده (باکتری) محلول گلیسرول (merck) که با نسبت ۵ به ۴۵ تهیه شده بود، اضافه گردید و در یخچال ۲۰- نگه‌داری گردید. لاکتوباسیل خالص هم به‌صورت پودر لئوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شد. در مرحله بعد طبق دستورالعمل مرکز فروش، باکتری در محیط MRS Broth کشت و به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شد. روزانه ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS Broth تهیه و در دو لوله بزرگ (۲۵ میلی‌لیتر) ریخته شد. در یک لوله حاوی محیط کشت، ۲ درصد از کشت یک شبه باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و در لوله دیگر ۲ درصد از کشت تازه یک شبه از مخلوط باکتری‌های جداشده از ماست تلقیح شد. ۲۴ ساعت بعد از کشت دادن توسط دستگاه سانتریفیوژ در rpm ۵۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه باکتری‌ها به صورت رسوب از محیط کشت جدا شدند. سپس باکتری رسوب داده شده در آب مقطر استریل حل و شیکر صورت گرفت. نهایتاً جهت تهیه غلظت نیم مک‌فارلند توسط دستگاه اسپکتوفتومتری، جذب نوری سنجیده شد.

نمونه‌گیری: بعد از گذشت ۴ هفته از دوره درمانی، رت‌ها در تمامی گروه‌ها به‌صورت استنشاقی در محفظه حاوی کلروفرم کاملاً بی‌هوش شده و بلافاصله خونگیری مستقیم از قلب آن‌ها به‌عمل آمد. از هر رت حدود ۵ میلی‌لیتر خون گرفته شد و نمونه‌های خون در لوله ونوجکت حاوی EDTA ریخته شد. لوله‌ها در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم آن‌ها جدا گردید. سرم‌های جدا شده در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در اسرع وقت میزان تری‌گلیسرید، کلسترول، ALT، AST، ALP، CK، LDL و HDL به‌وسیله دستگاه اتوآنالیزور BT1500 ساخت کشور ایتالیا مورد بررسی قرار گرفت. گلوکز بلافاصله پس از جداسازی سرم اندازه‌گیری شد. پس از ثبت و مرتب‌سازی داده‌ها در برنامه اکسل، برای اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کلموگروف- اسمیرنوف انجام شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 2000 و رویه GLM انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. داده‌های حاصل از این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و براساس مدل آماری زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند: $Yij= \mu + Tj + \varepsilon ij$

Yij= مقدار هر یک از مشاهدات، μ= میانگین جامعه، Tj= اثر جامعه و εij= خطای آزمایشی.

نتایج

تاثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های لیپیدی و گلوکز خون موش‌های سالم: نتایج حاصل از تاثیر تیمارهای آزمایشی مختلف بر فراسنجه‌های لیپیدی شامل کلسترول تام، تری‌گلیسیرید، لیپوپروتئین با دانسیته پایین (LDL)، لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL) و گلوکز خون در موش‌های سالم در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که در گروه موش‌های سالم، تجویز هر چهار نوع پروبیوتیک شامل مخلوطی از باکتری‌های ماست با و بدون اولئیک اسید و لاکتوباسیلوس خالص با و بدون اولئیک اسید به‌طور معنی‌داری سبب افزایش گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسیرید و کاهش LDL خون شد ($p<۰/۰۵$) اما در مورد فراسنجه HDL، اثرات گروه‌های پروبیوتیک متفاوت بود به‌طوری‌که گروه پروبیوتیک مخلوطی از باکتری‌های ماست هم به تنهایی و هم به‌همراه اولئیک اسید تاثیر معنی‌داری افزایشی و گروه لاکتوباسیلوس خالص هم تنهایی و هم با اولئیک اسید تاثیر معنی‌دار کاهشی بر HDL سرم موش‌های سالم داشت ($P<۰/۰۵$).

تاثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های لیپیدی و گلوکز خون موش‌های دیابتی: نتایج حاصل از تاثیر تیمارهای آزمایشی مختلف بر فراسنجه‌های لیپیدی شامل کلسترول تام، تری‌گلیسیرید، لیپوپروتئین با دانسیته پایین (LDL)، لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL) و گلوکز خون در موش‌های دیابتی در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که در گروه موش‌های دیابتی، تجویز هر چهار نوع پروبیوتیک شامل مخلوطی از باکتری‌های ماست با و بدون اولئیک اسید و لاکتوباسیلوس خالص با و بدون اولئیک اسید به‌طور معنی‌داری سبب کاهش گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسیرید و LDL سرم موش‌ها شد ($P<۰/۰۵$). اما در مورد فراسنجه HDL، به‌جز تیمار لاکتوباسیلوس خالص، همه گروه‌های دیگر سبب کاهش معنی‌دار HDL سرم موش‌ها شد.

تاثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی: نتایج حاصل از تاثیر تیمارهای آزمایشی مختلف بر فراسنجه‌های فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی شامل ALT، AST، ALP و CK در موش‌های سالم و دیابتی در جداول ۳ و ۴ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که در هر دو گروه موش‌های سالم و دیابتی، تجویز هر چهار نوع پروبیوتیک شامل مخلوطی از باکتری‌های ماست با و بدون اولئیک اسید و لاکتوباسیلوس خالص با و بدون اولئیک اسید به‌طور معنی‌داری سبب افزایش فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی شد ($P<۰/۰۵$).

جدول۱: تاثیر تیمارهای آزمایشی مختلف بر فراسنجه‌های لیپیدی و گلوکز خون موش‌های سالم (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)

فاکتورهای مورد بررسی	گلوکز	کلسترول	تری گلیسیرید	LDL	HDL
سالم-کنترل	۱۰۱/۴^{f}	۱۰۷/۴^{e}	۸۱/۴^{d}	۷۹/۲^{d}	۴۹/۴^{ab}
سالم- باکتری‌های مخلوط جدا شده از ماست	۱۲۹/۱^{e}	۱۳۳/۷^{d}	۱۰۳/۴^{c}	۶۵/۶^{e}	۵۴/۷^{a}
سالم- لاکتوباسیلوس خالص	۱۳۸/۱^{e}	۱۲۹/۴^{d}	۹۱/۱^{cd}	۵۵/۵^{e}	۳۲/۶^{cd}
سالم- باکتری‌های مخلوط جدا شده از ماست+ اسید اولئیک	۱۲۹/۶^{e}	۱۲۶/۵^{d}	۹۹/۹^{c}	۵۵/۳^{e}	۵۰/۵^{ab}
سالم- لاکتوباسیلوس خالص+ اسید اولئیک	۱۳۳/۶^{e}	۱۲۲/۷^{d}	۱۰۲/۱^{c}	۴۰/۴^{f}	۳۰/۱^{d}
SEM	۱۰	۱۱	۱۰	۱۲	۸
pValue	۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱

جدول۲: تاثیر تیمارهای آزمایشی مختلف بر فراسنجه‌های لیپیدی و گلوکز خون موش‌های دیابتی (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)

فاکتورهای مورد بررسی	گلوکز	کلسترول	تری گلیسیرید	LDL	HDL
دیابتی- کنترل	۳۷۴/۲^{a}	۳۰۲/۶^{a}	۲۵۹/۶^{a}	۱۲۲/۱^{a}	۴۲/۴^{bc}
دیابتی- باکتری‌های مخلوط جدا شده از ماست	۱۸۵/۳^{d}	۱۷۹/۳^{bc}	۱۲۰/۴^{b}	۱۰۳/۵^{b}	۳۲/۶^{cd}
دیابتی- لاکتوباسیلوس خالص	۲۴۶/۴^{b}	۱۹۲/۱^{b}	۱۲۷/۷^{b}	۱۰۸/۶^{b}	۴۴/۴^{ab}
دیابتی- باکتری‌های مخلوط جدا شده از ماست+ اسید اولئیک	۱۸۱/۶^{d}	۱۷۳/۳^{c}	۱۳۴/۶^{b}	۸۹/۶^{c}	۳۳/۳^{cd}
دیابتی- لاکتوباسیلوس خالص+ اسید اولئیک	۲۰۸/۸^{c}	۱۸۳/۴^{bc}	۱۳۴/۶^{b}	۱۰۲/۱^{b}	۳۱/۶^{cd}
SEM	۲۱	۳۰	۳۵	۱۹	۸
pValue	۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱

جدول۳: تاثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی (ALT،AST،ALP و CK) در موش‌های سالم

فاکتورهای مورد بررسی	AST	ALT	ALP	CK
سالم-کنترل	۹۶/۱^{f}	۸/۴^{h}	۱۴۳/۳^{f}	۱۸/۸^{h}
سالم- باکتری‌های مخلوط جدا شده از ماست	۱۳۴/۴^{e}	۱۱/۳^{gh}	۱۶۳/۸^{e}	۲۹/۷^{g}
سالم- لاکتوباسیلوس خالص	۱۵۸/۳^{d}	۲۰/۹^{ef}	۱۸۰/۳^{d}	۴۰/۲^{f}
سالم- باکتری‌های مخلوط جدا شده از ماست+ اسید اولئیک	۱۳۱/۶^{e}	۱۳/۴^{fg}	۱۶۳/۴^{e}	۴۲/۷^{ef}
سالم- لاکتوباسیلوس خالص+ اسید اولئیک	۱۵۶/۱^{d}	۲۰/۵^{ef}	۱۶۱/۶^{e}	۵۲/۴^{e}
SEM	۱۷	۴	۱۴	۱۴
PValue	۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱

جدول۴: تاثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی (ALT،AST،ALP و CK) در موش‌های دیابتی

فاکتورهای مورد بررسی	AST	ALT	ALP	CK
دیابتی- کنترل	۲۱۸/۶^{c}	۲۳/۲^{e}	۲۳۸/۹^{c}	۴۱/۳^{f}
دیابتی- باکتری‌های مخلوط جدا شده از ماست	۲۵۸/۳^{b}	۳۲/۵^{d}	۲۳۸/۳^{c}	۶۳/۶^{d}
دیابتی- لاکتوباسیلوس خالص	۲۸۰/۶^{a}	۴۱/۴^{c}	۲۹۶/۳^{ab}	۸۳/۶^{c}
دیابتی- باکتری‌های مخلوط جدا شده از ماست+ اسید اولئیک	۲۵۴/۲^{b}	۵۵/۵^{b}	۲۸۳/۳^{b}	۱۰۱/۶^{b}
دیابتی- لاکتوباسیلوس خالص+ اسید اولئیک	۲۸۱/۶^{a}	۷۴/۱^{a}	۳۰۲/۶^{a}	۱۱۵/۲^{a}
SEM	۲۸	۸	۱۴	۱۲
PValue	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز باکتری‌های پروبیوتیک در موش‌های دیابتی موجب کاهش سطح سرمی قند خون گردید ولی هنوز هم میزان قند خون با حد نرمال فاصله زیادی داشته و بسیار بالاتر از میزان طبیعی (کنترل سالم) بود. اما در گروه‌هایی که مخلوط باکتری‌های پروبیوتیک دریافت کرده بودند، کاهش بیش‌تری در میزان قندخون نسبت به گروه کنترل دیابتی دیده شد. این نتیجه این احتمال را تقویت می‌کند که تأثیر مخلوط باکتری‌های پروبیوتیک بر عوارض دیابت، بیش‌تر از اثر باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به تنهایی می‌باشد. هم‌چنین در گروه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به‌علاوه اولئیک اسید دریافت کرده بودند میزان قند خون نسبت به گروهی که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به تنهایی دریافت کرده بودند کاهش بیش‌تری داشت. این نتیجه در مورد مقایسه دو گروه مخلوط باکتری پروبیوتیک با اولئیک اسید و مخلوط باکتری تنها نیز صدق می‌کند که نشان‌دهنده نقش مثبت اولئیک اسید در این نتایج می‌باشد. تأثیر مثبت باکتری‌های پروبیوتیک ازجمله لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، در کاهش و کنترل قندخون و دیگر علائم بیماری دیابت، در مطالعات پیشین نیز گزارش شده‌است (۴). هم‌چنین Omidi و همکاران، تأثیر آب هویج پروبیوتیکه شده با باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را بر موش‌های صحرایی دیابتی شده مورد ارزیابی قرار دادند و مشاهده کردند که موش‌های دیابتی تحت تیمار با آب هویج پروبیوتیکی میزان گلوکز خون کاهش معنی‌داری را نشان‌داد (۲). در یک مطالعه دیگر Tabuchi و همکاران، گزارش کردند تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس GG به‌مدت ۹ هفته به رت‌های دیابتی، به‌طور قابل توجهی میزان گلوکز خون را کاهش داد (۲۷). هم‌چنین در یک تحقیق کارآزمایی بالینی بر روی بیماران دیابتی، اثر دریافت مکمل پروبیوتیک مخلوطی از لاکتوباسیلوس‌ها بر سطوح گلوکز، مقاومت انسولینی و شاخص‌های التهابی مورد سنجش قرار گرفت و مشاهده گردید که دریافت کپسول حاوی باکتری‌های پروبیوتیک موجب کاهش معنی‌دار سطح گلوکز خون و مقاومت انسولینی گردید (۱). بسیاری از محققین دلیل کاهش قند خون در اثر فعالیت پروبوتیک‌ها را، احتمالاً، افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده باریک می‌دانند. زیرا که افزایش تجمع این باکتری‌ها می‌تواند باعث افزایش تقاضای گلوکز برای مصرف این باکتری‌ها به‌عنوان تأمین‌کننده انرژی در متابولیسم آن‌ها باشد. در نتیجه شاهد کاهش میزان گلوکز رهاشده در سرم و ارگان‌های مختلف خواهیم بود (۶). هم‌چنین این باکتری‌ها از طریق افزایش باکتری‌های گرم مثبت روده، بهبود عملکرد سد دفاعی در روده و تنظیم سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی بدن، روی سطوح گلوکز خون تأثیرات مفیدی را نشان دهند. از طرف دیگر پروبیوتیک‌ها با کاهش میزان اندوتوکسین‌های روده‌ای، باعث بهبود

وضعیت مخاطی روده و در پی آن کاهش عوامل التهابی در خون و در نهایت مقاومت به انسولین در سلول‌ها و بافت‌های بدن می‌گردد (۱). در این مطالعه نیز همراستا با دیگر مطالعات، کاهش معنی‌دار در سطوح گلوکز خون مشاهده گردید که با نتایج به‌دست آمده در مطالعه Omidi و همکاران (۲)، Tabuchi و همکاران (۲۷)، Ahmadian و همکاران (۱) و بسیاری محققین دیگر در این رابطه هم‌خوانی کامل دارد. سنجش میزان پروفایل لیپیدی خون در موش‌های صحرایی زیرگروه‌های مختلف مورد آزمایش نشان داد که میزان سرمی فاکتورهای چربی شامل کلسترول، تری‌گلیسیرید و LDL در رت‌های دیابتی (گروه کنترل دیابتی) نسبت به رت‌های سالم (گروه کنترل سالم) به طور معنی‌داری افزایش یافته بود اما میزان HDL در این گروه دچار کاهش غیرمعنی‌داری شده بود. تحقیقات گسترده در مورد دیابت در گذشته نشان می‌دهد که دیابت نوع ۲ در بدن، علاوه بر افزایش قند خون، باعث افزایش کلسترول، تری‌گلیسرید، VLDL, LDL نیز می‌شود (۶). این هماهنگی در افزایش قندخون و فاکتورهای چربی در مطالعه حاضر نیز تکرار گردید، اما تیمار با باکتری‌های پروبیوتیک موجب گردید که فاکتورهای چربی خون در رت‌های دیابتی شده به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل دیابتی، کاهش معنی‌داری را نشان دهد که این کاهش همانند آن‌چه که در مورد میزان گلوکز مشاهده شد، در مورد گروه‌هایی که باکتری‌های مخلوط پروبیوتیک و اولئیک اسید دریافت کرده بودند بیش‌تر بود. نتیجه مطالعه‌ای با هدف بررسی اثرات کفیر (مواد غذایی تخمیر شده با انواع باکتری‌ها و مخمر) بر فاکتورهای چربی و قندخون، در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین، نشان‌دهنده بهبود آشکار وضعیت گلوکز و چربی، در خون موش‌های دریافت‌کننده کفیر پروبیوتیکی، در مقایسه با گروه کنترل بود (۱۲). نتایج تحقیق دیگری با هدف اثر باکتری لاکتوباسیلوس کازیی بر روی میزان کلسترول سرم در موش صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین نشان داد که لاکتوباسیلوس کازیی توانست سطح سرمی کلسترول خون را به شکل معنی‌داری کاهش دهد (۳). در تحقیقی گزارش کردند که پروبیوتیک باسیلوس سوبتیلیس به‌طور قابل ملاحظه‌ای سبب کاهش کلسترول و LDL و افزایش HDL ولی بی‌تاثیر بر تری‌گلیسیرید خون جوجه‌های گوشتی بود (۸). مکانیسم‌های مختلفی را برای کاهش کلسترول خون توسط پروبوتیک‌ها مطرح می‌شود به نظر می‌رسد یکی از این مکانیسم‌ها از طریق اثر آن‌ها بر مسیرهای کلسترول- استرها و دیگر انتقال‌دهنده‌های لیپوپروتئینی است یک احتمال دیگر دکونژوگه شدن اسیدهای صفراوی توسط آنزیم‌های هیدرولاز مترشحه از پروبیوتیک‌ها و توقف سیکل روده‌ای-کبدی اسیدهای صفراوی است که منجر به نامحلول شدن و غیرقابل جذب شدن آن‌ها و درنتیجه دفع بیش‌تر اسیدهای صفراوی از بدن می‌گردد که حاصل آن کاهش کلسترول خون می‌باشد (۱۹، ۲۵). بررسی‌ها نشان داده باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌توانند اسیدهای گلیکوکولیک و تائروکولیک در شرایط بی‌هوازی را دکنژوگه نمایند. لذا پروبیوتیک‌ها با داشتن توانایی کاهش راندمان اسیدهای صفراوی در شیرابه هضمی به نوبه خود باعث کاهش میزان هضم و جذب چربی گشته و در نتیجه این فرآیند، غلظت لیپیدهای خون را کاهش می‌دهند (۲۰). یافته‌های حاصل از این مطالعه نیز همانند مطالعات پیشین، کاهش در سطوح چربی‌های خون در نتیجه تأثیر پروبیوتیک‌ها و اولئیک اسید نشان داد که با گزارشات سایر محققان هم راستا بود (۳، ۱۲، ۱۴، ۲۰، ۲۵). سنجش اثرات هم‌زمان مصرف پروبیوتیک با اسیداولئیک (یک نوع اسیدچرب اشباع نشده) که نتایج تأثیر مضاعف پروبیوتیک‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده اسیداولیک را نشان داد. درواقع گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده اسیداولیک پاسخ مناسب‌تری نسبت به تغییرات فاکتورهای خونی ازجمله گلوکز و پروفایل لیپیدی نشان دادند. اسید اولئیک با کاهش مقاومت به انسولین و افزایش ورود گلوکز به درون سلول‌ها، سبب مقابله با ناهنجاری‌های متابولیسم قند و چربی در دیابت نوع ۲ می‌شوند. افزایش مصرف اسیدچرب اشباع نشده (MUFA: Monounsaturated Fatty Acid) سبب بهبود عملکرد انسولین و کاهش سطح گلوکز و تری‌گلیسرید خون در افراد دیابتی می‌شود. پاسخ افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ به سبب مقاومت به انسولین نسبت به MUFA مثبت می‌باشد. آنزیم لیپوپروتئین لیپاز، مسئول پاک‌سازی خون از تری‌گلیسرید، یک آنزیم حساس به انسولین است و در پاسخ به دریافت MUFA و متعاقب آن، بهبود مقاومت به انسولین، سبب کاهش سطح تری‌گلیسرید خون می‌شود (۲۲، ۲۳). مصرف MUFA سبب افزایش ورود تری‌گلیسرید به خون می‌شود و از این طریق سریعاً از خون پاک‌سازی می‌شوند. اهمیت کاهش سطح تری‌گلیسرید به‌علت ممانعت از اتصال مونوسیت‌ها به سلول‌های اندوتلیال می‌شوند که در دیابت بسیار حائز اهمیت است. دیگر مکانیسم دخیل در تأثیر اسیدچرب اشباع نشده در فراسنجه‌ها، گیرنده‌های هورمونی PPARs و اثر آن‌ها بر تنظیم ژنی است. ایزوفرم‌های PPARs نه تنها نقش مرکزی در هموستاز چربی ایفامی‌کنند، بلکه در تنظیم هموستاز گلوکز نیز نقش دارند که اسیدهای چرب اشباع نشده ازجمله فعال‌کنندگان این ایزوفرم‌ها هستند (۲۴). اندازه‌گیری سطوح آنزیم‌های آمینوترانسفراز کبدی در خون، یکی از راه‌های پی بردن به سلامت یا اختلال کبد، می‌باشد. ارزیابی آنزیم‌های کبدی برای تشخیص میزان کارایی یا صدمه وارده به کبد، یک روش با دقت بالا و رایج است. آسیب‌های وارده به کبد از هر نوع و با هر سطحی چه حاد یا مزمن، باعث بالا رفتن میزان سرمی این آمینوترانسفرازها می‌شود. با توجه به این‌که جایگاه آنزیم‌های ALT و AST در درون سلول، سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها می‌باشد، در

آسیب‌های شدید کبدی مانند هپاتیت، سیروز کبدی و ایسکمی، که منجر به نابودی سلول می‌شود، میزان آن‌ها در خون به‌سرعت بالا می‌رود. آنزیم ALT به این دلیل که تنها در سلول‌های کبدی موجود است، ارزش تشخیصی بیش‌تری در آسیب‌ها و صدمات وارده به کبدی را دارد (۵، ۲۹). هایپرگلیسمی ناشی از بیماری دیابت از هر نوعی که باشد، با مکانیسم‌های متعددی مانند: اتواکسیداسیون گلوکز، گلیکوزیلاسون آنزیم‌های اکسیداتیو و افزایش رادیکال‌های آزاد در میتوکندری، باعث پراکسیداسیون شدید لیپیدی در غشاء سلول و دیگر اندامک‌های داخل سلول می‌گردد، که خود این عامل موجب پیشرفت بیش‌تر عوارض بیماری دیابت می‌شود. تحقیقات گذشته تأیید می‌کند که به‌دنبال دریافت طولانی‌مدت جیره پرکالری و افزایش قند خون و به تبع آن، افزایش وزن و چاقی، میزان گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS: Reactive oxygen species) و استرس اکسیداتیو در بدن افزایش می‌یابد تولید رادیکال آزاد در سلول و واکنش آن با برخی اجزای سلولی مانند غشاء و نیز اسیدهای چرب غیراشباع موجود در سلول، موجب ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی و تولید ترکیبات خطرناک دیگری شده که باعث تجزیه فسفولیپیدهای موجود در شبکه آندوپلاسمی در سلول و آزاد شدن آنزیم‌هایی می‌شود که منجر به مرگ سلولی می‌گردد (۲۱، ۲۶). نتیجه نهایی فرآیند فوق، آزاد شدن آمینوترانسفرازهای کبدی وآلکالین فسفاتاز و بالا رفتن میزان آن‌ها در خون می‌باشد که بالا بودن مقدار آن‌ها در موش‌های گروه دیابتی، نشان‌دهنده ایجاد آسیب شدید بافتی در کبد حیوانات این گروه است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد القای دیابت در موش‌های صحرایی سبب القای تنش اکسیداتیو شده و هم‌زمان سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی بالا رفت. هم‌چنین تجویز پروبیوتیک باکتری‌های مخلوط مانند انواعی از لاکتوباسیل‌ها، لاکتوباسیل پلانتاروم و بیفیدو باکترها به‌مدت ۲۱ روز موجب کاهش فاکتورهای چربی و هم‌چنین شاخص‌های استرس اکسیداتیو گردید. حدس بر این است که پروبیوتیک‌ها دارای قابلیت‌ها و عملکرد آنتی‌اکسیدانی در بدن هستند این باکتری‌ها با مکانیسم‌هایی مانند: افزایش بیان ژن برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هم‌چون سوپراکسیددیسموتاز، بیوسنتز آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و بالا بردن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پلاسما، کبد و روده، باعث افزایش قدرت سیستم دفاع ضداکسایشی در بدن و مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند (۱۰، ۱۸، ۲۸). بنابراین در مطالعه حاضر، از نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی می‌توان این‌گونه استنباط نمود که هایپرگلیسمی ناشی از دیابت در رت‌های دیابتی شده، موجب تولید رادیکال‌های آزاد و تولید استرس اکسیداتیو در داخل بدن این حیوانات و درنتیجه تولید محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی مانند مالون دی آلدهید شده، که این امر موجب ایجاد آسیب شدید در بافت کبد و آزاد شدن آنزیم‌های کبدی در خون شده است. اما با تجویز باکتری‌های پروبیوتیک، به‌دلیل نقش و عملکرد این باکتری‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد و کنترل استرس اکسیداتیو در بدن، و نیز ارگان کبد، موجب ترمیم آسیب بافتی ناشی از دیابت در کبد و کاهش میزان آنزیم‌های کبدی گردید. بررسی کلی در مطالعه حاضر نشان داد که القای تجربی دیابت موجب افزایش معنی‌دار قند خون، کلسترول، تری‌گلیسیرید و LDL، ولیکن کاهش غیر معنی‌دار HDL سرم در موش‌های صحرایی گروه دیابتی گردید. هم‌چنین در موش‌های صحرایی دیابتی، میزان آنزیم‌های کبدی به‌صورت معنی‌داری، نسبت به رت‌های سالم دچار افزایش شده بودند. اما از سویی دیگر، مصرف باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و مخلوط باکتری‌های پروبیوتیک به‌علاوه اولئیک اسید در موش‌های صحرایی دیابتی، توانست موجب کاهش و بهبودی قابل توجه سطوح گلوکز، فاکتورهای چربی خون و آنزیم‌های کبدی گردد، که این روند بهبودی، در گروه‌هایی که مخلوط باکتری‌های پروبیوتیک و اولئیک اسید دریافت کرده بودند، بهتر از گروه‌های دریافت‌کننده تنها باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود. هرچند که در برخی از این فاکتورها هنوز هم تا حد طبیعی فاصله زیادی وجود داشت. لذا مصرف خوراکی باکتری‌های پروبیوتیک و اولئیک اسید، می‌تواند موجب بهبودی عوارض ناشی از دیابت و اثرات سوء آن بر کبد و دیگر ارگان‌ها گردد و تا حد زیادی به درمان دیابت در این بیماران کمک نماید.

منابع

1. **Ahmadian, F., Ejtahed, H.S., Javadi, M., Razmpoosh, E., Mirmiran, P. and Azizir, F., 2017.** The Effects of Probiotic Supplementation on Glycemic Control, Insulin Resistance and Inflammatory Biomarkers of Type 2 Diabetic Patients. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 19(2): 72-83. (In Persian)
2. **Omidi, B., Fazeli, M.R., Amozegar, M.A. and Mortazavi, P., 2011.** Antidiabetic effect of probioticated persian yellow carrot juice with *Lactobacillus acidophilus*. Journal of Comparative Pathology. 8(1): 395-402. (In Persian)
3. **Badkoube Hezave, H., Jafari, P. and Akbari, N., 2015.** *Lactobacillus casei* strain TD2 effect on reducing cholesterol in streptozotocin-induced diabetic male Wistar rats. Journal of Applied Microbiology in Food Industry. 2(2): 21-26. (In Persian)
4. **Bazjoo, A. and Jafari, P., 2016.** Effect of cumin extract and *Bacillus subtilis* JQ61819 on reducing blood sugar and improving lipid profile in diabetic rats. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 6(22): 83-90. (In Persian)
5. **Bayat, A., Heydaribeni, M., Feizi, A., Iraj, B., Ghiasvand, R., Askari, Gh., 2014.** The Effect of Pumpkin and Probiotic Yogurt Consumption Separately or/and Simultaneously on Type II Diabetes. Journal of Isfahan Medical School. 32(238): 580-589. (In Persian)

6. **Tohidi, M., Kalantar Hormazi, M., Adinehpour, A., Dabbaghmanesh, M.H., Siadatan, J. and Ranjbar Omrani, Gh., 2008.** Investigating the prevalence of overweight and obesity in adults in Shiraz city in 2007, Iranian Journal of Diabetes and Lipid, special issue of risk factors for diabetes and cardiovascular diseases. 43-48. (In Persian)

7. **Sarmast Ghahfarokhi, E., Mobini Dehkordi, M. and Beheshtimaal, K., 2012.** Isolation and evaluation of lactic acid production content in native *Lactobacillus* of Chaharmahal va Bakhtiari province isolated from dairy products. Biological Journal of Microorganism. 1(3): 41-52. (In Persian)

8. **Joya, M., Ashayerizadeh, O. and Dastar, B., 2020.** Effect of microalgae *Spirulina* and *Bacillus subtilis* on carcass characteristics, intestinal morphology and blood parameters of broiler chickens. Journal of Animal Environment. 12(1): 87-94. (In Persian)

9. **Ghasempour, Z., Alizadeh, M. and Rezazad, M., 2010.** Optimization of probiotic yogurt production containing Zedo gum. Food Processing and Preservation Journal. 2(3): 57-70. (In Persian)

10. **Mosallami, S., Parsaeimehr, M., Ahmadi Hamedani, M., Jebelli Javan, A. and Moezifar, M., 2020.** Effect of probiotic *Lactobacillus* plantarum ktbs2 on serum total oxidant and antioxidant, oxidative stress index and some biochemical parameters in induced diabetic rats. Iranian Veterinary Journal. 16(3): 94-105. (In Persian)

11. **ADAD., 2009.** iagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 32: 62-67.

12. **Alsayadi, M., Al Jawfi, Y., Belarbi, M., Soualem-Mami, Z., Merzouk, H., Chaban Sari, D., Sabri, F. and Ghalim, M., 2014.** Evaluation of Anti-Hyperglycemic and Anti-Hyperlipidemic Activities of Water Kefir as Probiotic on Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. Journal of Diabetes Mellitus. 4: 85-95.

13. **Barrons, R., Pharm, D. and Tassone, D., 2008.** Use of Lactobacillus Probiotics for Bacterial Genitourinary Infections in Women: A Review. Clinical Therapeutics. 30(3).

14. **Bhushan, J. and CHachra, S., 2010.** Probiotics- their role in prevention of dental caries. J Oral Health Com Dent. 4(3): 78-82.

15. B**romberg, R., Moreno, I., Zaganini, C.L. and Delboni, R.R., 2004.** Isolation of bacteriocinproducing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. Braz J Microbiol. 35(1-2): 137-144.

16. **Cappochino, G. and Sherman, N., 1987.** Microbiology: A laboratory manual. Rockland community college state, University of New York, The Benjamin.

17. **Chen, P., Qiuxiang, Z., Dang, H., Xiaoming, L., Fengwei, T., Jianxin, Z., Yongquan, C., Zhang, H. and Chen, W., 2014.** Antidiabetic effect of Lactobacillus casei CCFM0412 on mice with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin. Contents lists available at ScienceDirect. 30: 1061-1068.

18. **D'Souza, A., Fordjour, L., Ahmad, A., Cai, C., Kumar, D. and Valencia, G., 2010.** Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on messenger RNA expression of caveolin-1, NOS, and genes regulating oxidative stress in the terminal ileum of formula-fed neonatal rats. Pediatr Res. 67(5): 526-531.

19. **Gilliland, S., Nelson, C. and Maxwell, C., 1985**. Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 49(2): 377-389.

20. **Guyton, A.C. and Hall, J.E., 2011**. Textbook of Medical Physiology. 10thed., WB. Saunders Company, Philadelphia. 799-972.

21. **Kim, M.J., Park, M., Jeong, M.K., Yeo, J., Cho, W. I., Chang, P.S. and Lee, J., 2010**. Radical scavenging activity and anti-obesity effects in 3T3-L1 preadipocyte differentiation of Ssuk (*Artemisia princeps* Pamp.) extract. Food Science and Biotechnology. 19(2): 535-540.

22. **Laleye, S.A., Igbakin, A.P. and Akinyanju, J.A., 2008**. Antidiabetic Effect of Nono (A Nigerian Fermented Milk) on Alloxan – Induced Diabetic Rats. j. foodtech. 3(6): 394-398.

23. **Lilly, D.M. and Stillwell, R.H., 1965**. Probiotics; Growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 147: 747-748.

24. **Lo, P.R., Yu, R.C., Chou, C.C. and Huang, E.C., 2004**. Determinations of the Antimutagenic Activities of Several Probiotic Bifidobacteria Under Acidic and Bile Conditions Against Benzo[a] Pyrene by a Modified Ames Test. Int J Food Microbiol. 93(2): 249-257.

25. **Ooi, L.G. and Liong, M.T., 2000.** Cholesterol lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. Journal of molecular sciences. 11(6): 2499-2507.

26. **Sies, H.**, **1997**. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 82(2): 291-295.

27. **Tabuchi, M., Ozaki, M., Tamura, A., Yamada, N., Ishida, T., Hosoda, M. and Hosono, M., 2003**. A. Antidiabetic Effect of *Lactobacillus* GG in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. JSBA. 67(6): 1421-1424.

28. **Uskova, M.A and Kravchenko, L.V., 2009**. Antioxidant properties of lactic acid bacteria--probiotic and yogurt strains. Vopr Pitan. 78(2): 18-23. (In Russian).

29. **Yap, C.Y. and AW, T.C., 2010.** Liver Function Tests. Proceedings Of Singapore Helth Care. 19(1): 80-85.