

تأثیر مصرف شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس بر آسیب شناسی بافتی و شاخص‌های سرمی آسیب بافت کبد در رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

علی قربانی رنجبری (DVM)*، روزیتا بهادری (MD)، رخساره مریدی (MD)

۱-پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون

دریافت: ۹۳/۵/۲۸ اصلاح: ۹۳/۷/۲ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۵

خلاصه

سابقه و هدف: بیماری دیابت به عنوان یکی از عوامل اصلی شیوع اختلالات کبدی شناخته شده است. لذا هدف از مطالعه حاضر ارزیابی آسیب کبد در دیابت ملیتوس و بررسی اثرات محافظتی شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین می‌باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی، ۶۰ سرموش ناشتا مبتلا به تریپتیک اکسید (TCA) درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس تقسیم شدند. پس از گذشت ۶۰ روز از آزمایش نمونه خون ناشتا مستقیم از قلب رت‌ها جهت آزمایش سطوح سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلkalین فسفاتاز (ALP)، آلبومین و بیلی رویین تام اخذ گردید. برای آسیب شناسی بافت کبد نیز برش‌های رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوزین، طبق روش‌های معمول تهیه مقاطع هیستوپاتولوژی تهیه گردید.

یافته‌ها: موش‌های صحرایی دیابتی افزایش معنی دار شاخص‌های سرمی آسیب بافت کبد را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند ($p \leq 0.05$). در حالی که در گروه دیابتی تیمار شده با شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس، این شاخص‌های در مقایسه با گروه دیابتی به طور معنی داری کاهش نشان داد ($p \leq 0.05$). کمترین میزان ALT و AST در گروه دیابتی تیمار شده با ۲۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس به ترتیب برابر با ۷.۸ ± ۰.۵ و ۲۰.۵ ± ۳.۴ میلیونی است. همچنان که در گروه دیابتی تیمار شده با ۲۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس به ترتیب برابر با ۱۶.۸ ± ۱.۹ و ۲۰.۵ ± ۳.۴ مشخص گردید. یافته های آسیب شناسی کبد در توافق با نتایج بیوشیمیابی سرم نشانگر بهبود ساختار بافت آسیب دیده کبد در موش‌های دیابتی بود.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس دارای اثرات محافظتی از بافت کبد در دیابت القاء شده با استرپتوزوتوسین می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: دیابت، کبد، لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس، آنزیم‌های کبدی، استرپتوزوتوسین.

مقدمه

غیر الکلی، سیروز، کارسینومای سلول‌های کبدی و نارسایی حاد کبدی را در بر دارد (۱). افزایش خفیف ترانس آمینازها اغلب در بیماران دیابتی تیپ دو وجود دارد. علاوه بر آن، برای کنترل عوارض کبدی دیابت اقداماتی نظیر همودیالیز یا فوتوكوآگولاسیون شبکیه موجود نمی‌باشد. بنابراین، با وجود اینکه عوارض کبدی دیابت کمتر معمول می‌باشد، ولی می‌توان آنرا در کنار عوارضی همچون گلومروپاتی، رتینوپاتی و نفروپاتی قرار داد. آزمایشات سالانه برای مشخص شدن بیماری کبد می‌تواند به وسیله آنالیزهای بیوشیمیابی ساده مثل آلانین آمینوترانسفراز انجام شود (۲). استرس اکسیداتیو به تازگی به عنوان یکی از سازکارهای دخیل در دیابت ملیتوس و عوارض ناشی از آن مطرح شده است (۳).

فاکتورهای ژنتیکی متفاوتی منجر به دیابت نوع یک و دیابت ملیتوس نوع دو می‌گردند. با این حال هر کدام از آنها مستعد بروز عوارضی مانند نفروپاتی، رتینوپاتی اعصاب محیطی و افزایش فشار خون هستند (۴). بیماری دیابت به عنوان یکی از عوامل اصلی شیوع اختلالات کبدی در ایالت متحده آمریکا محسوب می‌شود. بسیاری از تحقیقات نشان می‌دهند که بیماری کبد یکی از علل مهم مرگ و میر در دیابت تیپ دو می‌باشد (۵). از این رو شیوع بالای بیماری‌های کبدی در بیماران دیابتی و نیز بروز دیابت در بیماران کبدی گزارش شده است. به نظر می‌رسد که بروز بیماری‌های کبدی بیشتر در دیابت نوع دو اتفاق می‌افتد که عوارضی همچون غیر طبیعی بودن آنزیم‌های کبدی، کبد چرب

* مسئول مقاله: دکتر علی قربانی رنجبری

E-mail:dr_alighorbani87@yahoo.com

آدرس: شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، پژوهشگران جوان و نخبگان. تلفن: ۰۷۱-۴۲۴۳۹۲۱

پیتیداز (GGT) شد(۲۷). با توجه به اثرات مفید پروپویوتیک‌ها و توانایی آنها در پایین آوردن میزان آنزیم‌های کبدی و میزان گلوكز، تاثیر شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر بهبود وضعیت کبد در دیابت دور از انتظار نیست. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات محافظتی شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسمین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی بر روی ۶۰ سر موش رت نر با وزن تغیری ۱۹۰-۲۲۰ گرم، نژاد ویستار که به طور تصادفی به ۶ گروه ۱۰ عددی گروه شاهد سالم، گروه دیابتی، گروه سالم تیمار با ۲۰ و ۱۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، گروه دیابتی تیمار با ۲۰ و ۱۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، تقسیم شدند، انجام گردید.

جهت تولید شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در گروه‌های تیمار، طبق روش مک فارلاند لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به تعدادی تلقیح می‌شود که روزانه به طور میانگین در رت‌های تیمار شده با ۱۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس 10^5 CFU باکتری توسط هریک از رت‌ها مصرف می‌شود و در گروه‌های ۲۰ درصد به میزان 10^{12} CFU باکتری توسط هر یک از رت‌ها مصرف می‌شود (۲۸). موشها برای سازگاری با محیط جدید، قبل از شروع مطالعه به مدت یک هفته در قفس‌های مخصوص در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با شرایط ۱۲ ساعت روشناختی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. همچنین رت‌های همه گروه‌ها به مدت ۶۰ روز به همراه آب ۲۵ درصد شیر دریافت نمودند.

برای دیابتی کردن موش‌ها، استرپتوزوتوسمین (ساخت شرکت سیگما) با تک دوز ۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی تزریق شد. بعد از ۱۸ ساعت حیوانات ناشتا با سطح گلوكز خون بیشتر از ($16/5 \text{ mmol/L}$) دیابتی در نظر گرفته شده و در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند(۲۹). از زمان شروع آزمایش، موش‌های تیمار به مدت ۶۰ روز شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را به میزان ۱۰ و ۲۰ درصد آب مصرف نمودند، پس از گذشت ۶۰ روز از آزمایش نمونه خون ناشتا مستقیم از قلب رت‌ها اخذ گردید و برای ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس ساتریفوژ شده (ساتریفوژ مدل EBA21 ساخت هتیش Hettich آلمان) و سرم آن جداسازی شد. بیومارکرهای سرمی فعالیت کبد شامل ALP، AST، ALT، آلبومین (۳۰-۳۳) با استفاده از کیت‌های تجاری موجود (کیت پارس آزمون) اندازه گیری شدند.

پس از آسان کشی موش‌ها توسط دوز بالای ماده بیوهشی (کتامین)، کبد موش‌ها خارج و نمونه گیری بافتی انجام و پس از پایین‌سازی در فرمالین با فر ۱۰ درصد و قالب گیری در پارافین برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و مقاطع هیستوپاتولوژیک با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوزین تهیه گردید. از میکروسکوپ نوری NIKON مدل ECLIPSE E200 و SPSS نتایج داده‌ها با استفاده از نرم افزار ۱۷ Duncan، Sheffe، Tukey) آزمونهای آماری Anova Test شامل معنی دار در نظر گرفته شد.

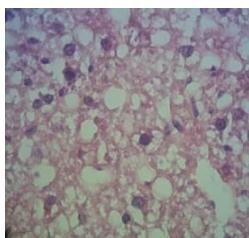
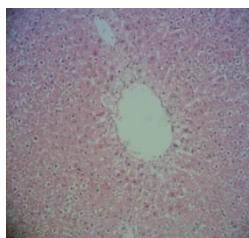
رادیکال‌های آزاد به طور مستمر در بدن در نتیجه فرآیندهای طبیعی متابولیک و تعامل با محرك‌های محیطی تولید می‌شوند. در شرایط فیزیولوژیک، طیف وسیعی از دفاع آنتی اکسیدانی علیه اثرات مضر ناشی از فراورده‌های رادیکالهای آزاد در بدن موجود زنده وجود دارد(۶).

استرس اکسیداتیو از عدم تعادل بین تولید گونه‌های باز فعال اکسیژن (ROS) و عوامل آنتی اکسیدان که سبب پاکسازی و حذف ROS هستند، ایجاد می‌شود. به عنوان مثال افزایش تولید ROS یا کاهش عوامل آنتی اکسیدان و یا تغییرات هر دوی آنها می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو گردد. در دیابت، گلیکاپیون پروتئینی و اتوکسیداسیون گلوكز می‌تواند رادیکال‌های آزاد تولید کند که به نوبه خود باعث کاتالیز پراکسیداسیون لیپیدی می‌شوند(۷،۸). به علاوه، در دیابت بروز اختلالات سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی اعم از تغییر در آنزیم‌های آنتی اکسیدان (۹) اختلال در متابولیسم گلوتاتیون (۱۰)، و کاهش سطوح اسید اسکوربیک نشان داده شده است(۱۱ و ۱۲).

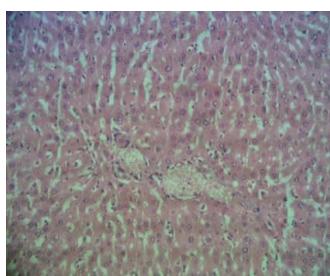
تا به حال، افزایش استرس اکسیداتیو در محیط زنده به وضوح نشان داده نشده است. با این وجود، چندین مطالعه بر روی انسان و مدل‌های حیوانی که روش Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) استفاده شده، افزایش پراکسیداسیون لیپید در غشا و لپوپروتئین را در دیابت نشان داده است(۱۳-۱۸). Feillet-Coudray و همکارانش وضعیت آنتی اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی بافت کبد را در دیابت تجربی مورد مطالعه قرار داده اند (۱۹). در مطالعه‌ای دیگر، نشان داده شده است که، عوامل ضد دیابتی می‌تواند سطوح بیومارکرهای سرمی کبد را کاهش دهند(۲۰). اما این عوامل می‌توانند اثرات جانبی شدیدی به همراه داشته باشند(۲۱). در سال‌های اخیر میل به استفاده از باکتری‌های مفیدی به نام پروپویوتیک‌ها به عنوان یک رژیم کمکی در صنایع غذایی روش رشد بوده است(۲۲). پس از مصرف مقدار کافی از پروپویوتیک‌ها، اعمال اثرات مفیدی بر روی جمعیت میکروبی طبیعی گوارش مشاهده می‌شود. رایج ترین باکتری‌های پروپویوتیک شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم است(۲۳).

بر پایه مطالعات گوناگون حیوانی و انسانی، پروپویوتیک‌ها در سطوح چندگانه در تنظیم کاهش میانجی‌های التهابی اندوزن عمل می‌کنند. مهمترین مسیر‌ها عبارت از: تنظیم سیستم ایمنی، تعديل فلور روده، بهبود اتصالات محکم دیواره روده، کاهش نفوذ پذیری عوامل بیماری زا به گردش خون بدن و فعالیت ضد فیرورزی و ضد التهابی است(۲۴). در حال حاضر درمان داروبی قطعی برای کبد چرب غیر الکلی (NAFID) وجود ندارد. اثر بخشی پروپویوتیک‌ها در چند مدل NASH/NAFLD تجربی گزارش شده است.

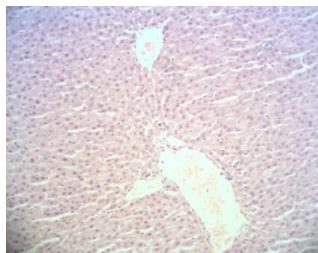
در مطالعه‌ای بر روی موش‌های ob/ob تحت رژیم با چربی بالا مشاهده شد که دستکاری فلور روده این مدل تجربی بر بیماری کبد چرب ناشی از چاقی اثر می‌گذارد. در واقع پروپویوتیک VSH# ۳ باعث بهبود هیستولوژی کبد، کاهش چربی تام کبد و کاهش سطوح سرمی آلانین آمینوransferاز (ALT) می‌شود(۲۵). در پژوهش دیگری، پروپویوتیک VSH# ۳ توانست پرو فایل لیپیدی را اصلاح و التهاب، آسیب اکسیداتیو و سطوح بافتی-TNF را کاهش دهد(۲۶). تاکنون مطالعات محدودی اثر پروپویوتیک در درمان NAFID در انسان را بررسی کرده‌اند. در پژوهشی، مصرف روزانه مکمل پروپویوتیک به مدت سه ماه باعث کاهش سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی (ALT، AST و گاما گلوتامیل ترانس



شکل ۲. نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرایی متعلق به گروه دیابتی. تغییر چربی هیاتوستیت در نواحی مرکز لبوی کبد به صورت ماکرو ویزیکول های انباشته از چربی مشاهده می شود (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آلوzin بزرگ نمایی $\times 40$ و $\times 100$)



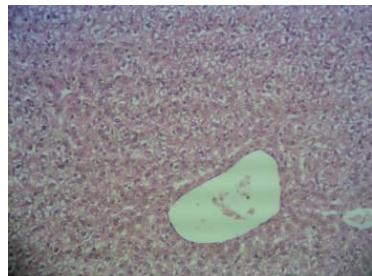
شکل ۳. نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرایی متعلق به گروه دیابتی دریافت کننده ۱۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس. ساختار بافت کبد کاملاً سالم می باشد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آلوzin بزرگ نمایی $\times 40$)



شکل ۴. نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرایی متعلق به گروه دیابتی دریافت کننده ۲۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس. ساختار بافت کبد کاملاً سالم می باشد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آلوzin بزرگ نمایی $\times 40$)

یافته ها

مقادیر سرمی AST، ALP و بیلی روین تام در گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری داشت ($P \leq 0.05$). پارامتر های ذکر شده در گروه های تیمار دیابتی به طور معنی داری در مقایسه با گروه دیابتی کاهش یافته بود ($P \leq 0.05$) و کمترین میزان آنزیم های کبدی (ALP, ALT) در گروه دیابتی دریافت کننده ۲۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس (AST) در گروه دیابتی دریافت کننده ۲۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به دیگر گروه های دیابتی به ترتیب برابر با $78 \pm 6/5$ و $168 \pm 1/9$ و $20.5 \pm 3/4$ مشاهده گردید ($P \leq 0.05$) (جدول ۱). سطح سرمی آلبومین در گروه دیابتی به طور معنی داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بود و این پارامتر در گروه دیابتی تیمار شده با ۲۰ و ۱۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مقایسه با گروه دیابتی به طور معنی داری افزایش یافته بود ($P \leq 0.05$). تیمار با ۲۰ و ۱۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در گروه سالم هیچ گونه تغییر معنی داری در مقایسه با گروه شاهد ایجاد نکرد هرچند باعث کاهش جزئی آنزیم های کبدی (ALP, ALT) و بیلی روین تام شد. در آسیب شناسی بافتی کبد از گروه شاهد، بافت کبد کاملاً سالم و طبیعی بود (شکل ۱). در گروه سالم تیمار با ۲۰ و ۱۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در بافت کبد هیچ گونه تغییر پاتولوژیکی خاصی ایجاد نشده بود. اما در گروه دیابتی تغییر چربی کاملاً مشخص در نواحی مرکز لبوی ایجاد شده بود (شکل ۲). در بافت کبد گروه های دیابتی تحت درمان با ۲۰ و ۱۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس هیچ گونه تغییر پاتولوژیکی خاصی مشاهده نگردید (شکل ۳ و ۴).



شکل ۱. نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرایی متعلق به گروه شاهد. ساختار بافت کبد کاملاً سالم می باشد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آلوzin بزرگ نمایی $\times 40$)

جدول ۱. مقایسه تأثیر شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر شاخص های سرمی آسیب بافت کبد در موش های صحرایی مورد مطالعه

گروه های مورد پژوهش	(U/L) AST Mean±SD	(U/L) ALP Mean±SD	(U/L) ALT Mean±SD	بیلی روین تام Mean±SD	(g/dl) Albumin Mean±SD
گروه شاهد سالم	$160 \pm 3/2$	$190 \pm 3/5$	$76 \pm 2/4$	0.82 ± 0.04	$4/38 \pm 0.32$
گروه دیابتی	$220 \pm 2/7$	$275 \pm 3/2$	$148 \pm 5/4$	$1/16 \pm 0.06$	$3/12 \pm 0.25$
گروه سالم تیمار با ۱۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	$154 \pm 3/2$	$20.5 \pm 5/4$	$78 \pm 1/2$	0.8 ± 0.07	$4/3 \pm 0.4$
گروه سالم تیمار با ۲۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	$148 \pm 5/2$	$20.1 \pm 2/3$	$75 \pm 2/3$	0.79 ± 0.07	$4/3 \pm 0.56$
گروه دیابتی تیمار با ۱۰ درصد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	$170 \pm 3/6^*$	$219 \pm 4/3^*$	$79 \pm 3/1^*$	$0.86 \pm 0.05^*$	$4/15 \pm 0.3^*$
اسیدوفیلوس	$168 \pm 1/9^*$	$20.5 \pm 3/4^*$	$78 \pm 6/5^*$	$0.84 \pm 0.02^*$	$4/29 \pm 0.35^*$

-هر یک از مقادیر نشان دهنده خطای میار میانگین \pm میانگین غلط پلاسمایی AST, ALT, ALP

-هر یک از مقادیر نشان دهنده خطای میار میانگین \pm میانگین غلط پلاسمایی آلبومین (g/dl)

-هر یک از مقادیر نشان دهنده خطای میار میانگین \pm میانگین غلط پلاسمایی آلبومین (Mg/dl)

علامت * نشان دهنده اختلاف معنادار ($P \leq 0.05$) بین گروه های دیابتی تیمار شده باشیر حاوی لاکتوباسیلوس و گروه کنترل دیابتی

سرمی ALT سرم می شود (۲۵) که تمامی مطالعات ذکر شده نتایج حاصل را تایید می نماید. بررسی هیستولوژی یافته کبد، نشان دهنده بروز تغییر چربی در قسمت های مرکز لبیوی کبد در موش های دیابتی است. Rammesh و همکاران در سال ۲۰۰۷ تأثیر مثبت محافظت از سلولهای کبدی در موش دیابتی تجربی توسط استرپتوزوتوسین را گزارش کردند که نتایج حاضر با یافته های ایشان مطابقت دارد (۳۵). در مطالعه ما طی مصرف شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در موش های صحرایی دیابتی هیچگونه تغییر چربی قابل ملاحظه ای مشاهده نشد که این پدیده اثر محافظتی شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را در برابر عوارض کبدی دیابت نشان می دهد همچنین، یافته های پاتولوژی در این مطالعه با نتایج بیوشیمیابی به دست آمده تطابق دارد. در مجموع، در مطالعه حاضر مشخص شد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با کاهش بیومارکرهای سرمی آسیب کبد و نیز کاهش آسیب بافتی عملکرد این ارگان را در موش های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بهبود می بخشد. نتایج این مطالعه نشان داد شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای اثرات محافظت از بافت کبد در دیابت القاء شده با استرپتوزوتوسین می باشد. از آنجا که مکانیسم این عمل به خوبی مشخص نشده است انجام مطالعات بیشتر بخصوص ارزیابی تغییرات TNF- α و مکانیسم محافظتی شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس پیشنهاد می گردد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از بخش پژوهشی و ریاست بیمارستان شهید بهشتی شیراز و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، آقای دکتر محمد حسین مرحمتی زاده جهت همکاری تشکر و قدردانی می گردد.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، کاهش قابل ملاحظه سطح آلبومین سرمی و افزایش شاخص های آسیب های کبدی (AST و ALP) نشانگر آسیب سلول های های کبدی در دیابت تجربی می باشد. این نتیجه با یافته های Rammesh و همکاران در سال ۲۰۰۷ مطابقت دارد (۳۵). افراد مبتلا به دیابت تیپ ۲ از ناهنجاری مارکرهای کبدی بیشتری نسبت به افراد بدون دیابت بر خوردار هستند (۲۰) که این یافته نیز با نتایج ما همخوانی دارد. یافته های حاضر همچنین نشان داد که مصرف روزانه شیر حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به طور قابل ملاحظه ای وضعیت بیوشیمیابی و هیستوپاتولوژی کبد موش های دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین را بهبود می بخشد. اختلال در یکپارچگی غشاء پلاسمایی سلولهای کبدی باعث می شود، آنزیم هایی که به طور طبیعی در داخل سیتوزول قرار دارند، وارد جریان خون شوند که بهترین شاخص برای مطالعه وضعیت کبدی است (۳۶). استرپتوزوتوسین علاوه بر اثرات مخرب و سمی بر سلول های بنای لوزالمعده بر سایر اندام ها مانند کبد اثر تخریبی دارد همچنین به واسطه استرس اکسیداتیو آثار مخربی بر کبد می گذارد؛ لذا کاهش میزان آلبومین در گروه های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین قابل توجیه است (۳۷و۳۸). این کاهش دلالت بر این دارد که کبد قادر بر سنتر این فاکتور ها نیست (۳۷).

اکثر مطالعات حیوانی که اثر پروپیوتیک ها در NAFID مورد بررسی قرار دادند، گزارش کرده اند که پروپیوتیک ها می توانند باعث اصلاح شاخص های مرتبط با NAFID و شاخص های التهابی مانند فعالیت NF-KB و TNF- α شوند (۳۸و۳۹). همچنین مطالعه Li و همکاران اثر پروپیوتیک VSL#3 را در مدل های تجربی کبد چرب ایجاد شده در اثر رژیم غذایی غنی از TNF- α مشابه آنتی بادی ضد TNF- α VSL#3 گزارش کردند که مشابه آنتی بادی ضد TNF- α باعث بهبود هیستولوژی کبدی، کاهش مقادیر اسید چرب تام کبدی و سطوح

The Study of Milk Containing Lactobacillus Acidophilus on Histological and Serum Markers of Liver Tissue Injury in Streptozotoc-3

A. Ghorbani Ranjbari (DVM)*¹, R. Bahadori (MD)¹, R. Moridi (MD)¹

1. Young Researchers and Elite Club, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(6); Jun 2015; PP: 19-25

Received: Aug 19th 2014, Revised: Sep 24th 2014, Accepted: Feb 4th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Diabetes is known as one the leading causes of hepatic disorders. The aim of this study was to assess the liver damage in diabetes mellitus and the protective effect of milk containing Lactobacillus acidophilus (LA) in rats with diabetes induced by streptozotocin.

METHODS: In this experimental study, 60 male Wistar rats were randomly divided into 6 groups including: control diabetic, normal treated with 10 and 20% milk containing LA, and diabetic rats treated with 10 and 20 percent of milk containing LA. After 60 days fasting, blood samples were obtained directly from cardiac puncture and serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin, and albumin were tested. Histopathology of liver sections stained with H & E histological sectioning was prepared according to conventional methods.

FINDINGS: In diabetic rats, increase in serum liver enzymes, showed significant damage compared to the control group ($p \leq 0/05$). While in the diabetic group treated with milk containing LA, these indicators when compared to diabetic group was significantly lower ($p \leq 0.05$). The lowest level of ALT, AST and ALP in diabetic rats treated with 20% milk containing LA was 78 ± 6.5 , 205 ± 3.4 and 168 ± 1.9 , respectively. Histopathologic findings were in agreement with the results of serum biochemical markers confirmed the repair of hepatic damage in the diabetic rats after intervention.

CONCLUSION: This study showed that milk containing LA has a protective effect on the liver of rats with streptozotocin-induced diabetes.

KEY WORDS: Diabetes, Hepatic, Lactobacillus Acidophilus, Liver enzymes, Streptozotocin.

Please cite this article as follows:

Ghorbani Ranjbari A, Bahadori R, Moridi R. The Study of Milk Containing Lactobacillus Acidophilus on Histological and Serum Markers of Liver Tissue Injury in Streptozotoc-3. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(6):19-25.

* Corresponding Author; A. Ghorbani Ranjbari(DVM)

Address: Young Researchers and Elite Club, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, I.R.Iran

Tel: +98 71 42243921

E-mail: dr.alighorbani87@yahoo.com

References

- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27(5):1047-53.
- Tsai S, Shameli A, Santamaria P. CD8+ T cells in type 1 diabetes. *Adv Immunol.* 2008;100:79-124.
- de Marco R, Locatelli F, Zoppini G, Veralato G, Bonora E, Muggeo M. Cause-specific mortality in type 2 diabetes: The Verona Diabetes Stuyb. *Diabetes Care.* 1999;22(5):756-61.
- Tolman KG, Fonseca V, Dalpiaz A, Tan MH. Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. *Diabetes Care.* 2007;30(3):734-43.
- Atthyros VG, Mikhailidis DP, Didangelos TP, Giouleme OI, Liberopoulos EN, Karagiannis A, et al. Effect of multifactorial treatment on nonalcoholic fatty liver disease in metabolic syndrome: a randomised study. *Curr Med Res Opin.* 2006;22(5):873-83.
- Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine (2nd ed.), Clarendon Press Oxford 1989.
- Baynes JW. Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. *Diabetes.* 1991;40(4):405-12.
- Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee L. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;173(3):932-9.
- Strain JJ. Disturbances of micronutrient and antioxidant status in diabetes. *Proc Nutr Soc* 1991; 50:591.
- McLennan SV, Heffernan S, Wright L, Rae C, Fisher E, Yue DK, et al. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes.* 1991; 40: 344-348.
- Jennings PE, Chirico S, Jones AF, Lunec J, Barnett AH. Vitamin C metabolites and microangiopathy in diabetes mellitus. *Diab Res.* 1987;6(3):151-4.
- Young IS, Torney JJ, Trimble ER. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Rad Biol Med.* 1992;13(1):41-6.
- Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebel P, et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med.* 1995;98:469-75.
- Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *J Clin Sci(Lond).* 1998;94(6):623-32.
- MacRury SM, Gordon D, Wilson R, Bradley H, Gemmell CG, Paterson JR, et al. A comparison of different methods of assessing free radical diabetes and peripheral vascular disease. *Diabet Med.* 1993;10(4):331-5.
- Niskanen LK, Salonen JT, Nyssonnen K, Uusitupa MI. Plasma lipid peroxidation and hyperglycemia: a connection through hyperinsulinaemia?. *Diabet Med.* 1995;12(9):802-8.
- Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci(Lond).* 1996;90(4):255-60.
- Velazquez B, Winocour PH, Kesteven P, Alberti KGMM, Lakeer MF. Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes. *Diabet Med.* 1991;8(8):752-8.
- Feillet-Coudray C, Rock E, Coudry C, Grzelkowska K, Azias-Braesco V, Dardevet D, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. *Clin Chim Acta.* 1999;284(1):31-43.
- Harris EH. Elevated liver function tests type 2 diabetes. *Clin Diabetes.* 2005;23(3):115-9.
- Akhtar MS, Iqbal J. Evaluation of the hypoglycemic effect of achyranthes aspera in normal and alloxan diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol.* 1991;31(1):49-57.
- Ferdowsifard M, Fazeli M, Samadi N, Jamalifar H. The stability of fermented and Non-fermented probiotic milk produced by three species of Autochthonous Lactobacillus. *J Food Technol Nutr.* 2011;8(4):13-20.
- Ershidat OTM, Mazahreh AS. Probiotics bacteria in fermented dairy products. *Pakistan J Nutr.* 2009;8(7):1107-13.

24. Iacono A, Raso GM, Canani RB, Calignano A, Meli R. Probiotics as an emerging therapeutic strategy to treat NAFLD: focus on molecular and biochemical mechanisms. *J Nutr Biochem.* 2011;22(8):699-711.
25. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2003;37(2):343-50.
26. Esposito E, Iacon A, Bianco G, Autore G, Cuzzocrea S, Vajro P, et al. Probiotics Reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J Nutr.* 2009;139(5):905-11.
27. Aller R, De Luis DA, Izaola O, Conde R, Gonzalez Sagrado M, Primo D, et al. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(9):1090-5.
28. Tabuchi M, Ozaki M, Tamura A, Yamada N, Ishida T, Hosoda M, et al. Antidiabetic effect of *Lactobacillus GG* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67(6):1421-4.
29. Eddouks M, Maghrani M, Michel JB. Hypoglycaemic effect of *Triticum repens* P. Beauv. In normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2005; 102(2): 228-32.
30. Kind PR, King EJ. Estimation of plasma phosphates by determination of hydrolyzed phenol with antipyrin. *J Clin Pathol.* 1954;7(4):322-6.
31. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
32. Malloy HT, Evelyn KA. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J Biol Chem.* 1937; 119(2):481-90.
33. Reitman S, Frankel S. A Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol.* 1957;28(1):56-63.
34. Norusis MJ. SPSS for windows: base system user's guide release 6.0. 1st ed. Chicago:SPSS Inc. 1993.p.281-90.
35. Remmesh B, Viswanathan P, Pugalendi KV. Protective effect of Umbelliferone on membranous fatty acid composition in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2007;566(1-3):231-9.
36. Drotman R, Lawhan G. Serum enzymes are indications of chemical induced liver damage. *Drug Chem Toxicol.* 1978;1(2): 163-71.
37. Oyedemi SO, Bradly G, Afolayan AJ. Benefcial effect of aqueous stem bark extract of *strychnos henningsii* Gilg in Streptozotocin-nicotinamid induced type 1 diabetic Wistar rats. *Int J Pharm.* 2011;7(7):773-81.
38. Kume E, Fujimura H, Matsuki N, Ito M, Aruga C, Toriumi W, et al. Hepatic changes in the acute phase of streptozotocin induced diabetes in mice. *Exp Toxic Pathol.* 2004;55(6):467-80.
39. Nardone G, Compare D, Liguori E, Di Mauro V, Rocco A, Barone M, et al. Protective effects of *Lactobacillus paracasei* F19 in a rat model of oxidative and metabolic hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299(3):G669-76.
40. Ma X, Hua J, Li Z. Probiotics improve high fat diet induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J Hepatol.* 2008;49(5):821-30.