

## ارزیابی اثرات تغذیه‌ای پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی به همراه پری‌بیوتیک رافتیلوز بر رشد و آنزیم‌های کبدی موش

بیان سیدی: کارشناس ارشد زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. bayan.seyedi@gmail.com

دکتر رضا هیدری: استاد و متخصص بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. r.heidari@mail.urmia.ac.ir

\*دکتر امیر توکمه‌چی: استادیار و متخصص میکروبیولوژی، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرمیا و آزیان، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (\*مؤلف مسئول).

a.tukmachi@urmia.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۷/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۵/۱۴

### چکیده

**زمینه و هدف:** هدف از بررسی حاضر ارزیابی اثرات تغذیه‌ای دو پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی (ل. کازئی) و لاکتوباسیلوس پاراکازئی (ل. پاراکازئی) با پری‌بیوتیک رافتیلوز بر رشد و مقدار آنزیم‌های کبدی (ALT، ALP، AST) سرم موش بود.

**روش کار:** این مطالعه از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده و برای این منظور ۴۸ سر موش نر ویستار (با میانگین وزنی  $175 \pm 25$  گرم) به طور تصادفی در چهار گروه آزمایشی هر کدام با سه تکرار تقسیم شدند. گروه اول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و گروه دوم تا چهارم به ترتیب با ترکیب مساوی از ل. کازئی و ل. پاراکازئی ( $5 \times 10^8$  واحد تشکیل دهنده پرگنه در هر میلی لیتر)، رافتیلوز (۵٪ غذای مصرفی) و مخلوط پروبیوتیک‌ها با رافتیلوز به عنوان سین‌بیوتیک در همان مقادیر به مدت ۴ هفته و روزانه یک بار گاوژ شدند. سپس به مدت ۲ هفته دیگر تغذیه عادی داشتند. برای سنجش شاخص‌های رشد نمونه برداری در روزهای صفر و ۳۰ و برای اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی نمونه برداری در روزهای ۳۰ و ۴۵ انجام شد. داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه به کمک نرم افزار SPSS تحلیل شد.

**یافته‌ها:** نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که تغذیه با لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی به همراه رافتیلوز به طور معنی داری در سطح  $p < 0.05$  شاخص‌های رشد موش را تغییر نداد. همچنین نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های کبدی تحت تاثیر پروبیوتیک‌ها و رافتیلوز به طور مستقل تغییر می‌کند و مقدار آنزیم ALT در موش‌هایی گاوژ شده با پروبیوتیک‌ها در روز ۳۰ مطالعه به طور معنی داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشت ( $p = 0.032$ ). مقادیر دو آنزیم ALP و AST در گروه‌های مورد مطالعه هیچگونه اختلاف آماری معنی داری ( $p < 0.05$ ) نشان نداد.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که افزودن لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی به همراه رافتیلوز به عنوان پروبیوتیک تاثیری بر رشد موش نداشته اما می‌تواند سطح آنزیم ALT تحت تاثیر پروبیوتیک‌ها افزایش پیدا کند. لازم به ذکر است که جهت کسب نتایج بهتر انجام مطالعات بیشتر پیرامون تغذیه با پروبیوتیک و پری‌بیوتیک در موش ضروری می‌باشد.

**کلیدواژه‌ها:** موش، پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، رشد، آنزیم‌های کبدی.

### مقدمه

شروع زندگی در همه موجودات با روده نسبتاً سالمی آغاز می‌شود. عواملی مانند عادات غذایی نامنظم، استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها، استرس، آلودگی محیطی و غیره، ترکیب و فعالیت متابولیکی فلور دستگاه گوارش را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بنابراین سبب عدم تعادل فلور دستگاه گوارش می‌شوند و با افزایش میکروارگانیسم‌های مخرب در برابر ارگانیسم‌های مفید موجودات را مستعد بیماری می‌سازند (۱).

به کارگیری پروبیوتیک‌ها در پیشگیری از بیماری‌ها و بهبود وضعیت سلامتی انسان و دام پیشینه‌ای چندین هزار ساله دارد. پروبیوتیک‌ها یا مواد حیات بخش در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها یا

ترکیبات پادزیست قرار می‌گیرند (۲). امروزه تحقیق در زمینه تولید فرآورده‌های پروبیوتیک به علت خواص تغذیه‌ای و درمانی روند رو به رشدی را دنبال می‌کند و تلاش برای قرار دادن پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها به عنوان مکمل در رژیم غذایی روزانه افراد صورت می‌گیرد.

پروبیوتیک به صورت "مکمل غذایی میکروبی زنده" تعریف شده است و در صورت مصرف در انسان یا حیوان، با اثر بر تعادل فلور میکروبی روده اثرات مفیدی بر سلامتی می‌زبان دارد (۲). اثرات مفید پروبیوتیک‌ها عبارتند از: کنترل اسهال (۳)، کاهش عدم تحمل لاکتوز (۴)، مهار رشد عوامل بیماری‌زای روده (۵)، جلوگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی با کاهش لیپیدها و کلسترول سرم

از سن، جنس، دوره های جنسی، تغذیه، فعالیت بدنی و غیره را نشان می دهند (۱۹). Rahman و همکاران (۱۹) نشان دادند که سطوح آنزیم های کبدی سرم تحت تاثیر پروبیوتیک تغییر می کند. Ziaei و همکاران (۲۰) نیز گزارش کردند که پروبیوتیک و پری بیوتیک غلظت آنزیم های کبدی را تغییر می دهند.

بر اساس موارد ذکر شده هدف از تحقیق حاضر ارزیابی اثرات تغذیه ای پروبیوتیک های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی به همراه پری بیوتیک رافتیلوز بر رشد و آنزیم های کبدی موش بود.

### روش کار

این مطالعه از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده و از دی ماه ۱۳۹۰ تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۱ در گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه طی مراحل زیر انجام شد.

### تهیه و کشت پروبیوتیک ها

باکتری های مورد استفاده در این بررسی از آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده آرمیا و آزیان، دانشگاه ارومیه تهیه شدند (۲۱). جهت آماده سازی سوسپانسیون باکتری های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی، هر کدام از باکتری ها به طور جداگانه در محیط آب گوشت (MRS) (De Man, Rogosa and Sharpe) به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ سانتی گراد و شرایط بی هوازی (در حضور پنج درصد گاز CO<sub>2</sub>) و در انکوباتور شیکردار کشت داده شدند. پس از رشد، نمونه ها با دور ۲۵۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ سانتی گراد سانتریفیوژ شده و رسوب حاصله سه مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شده و در نهایت به صورت سوسپانسیون درآمد. سپس به کمک لوله های استاندارد مک فارلند غلظت آن ها در سرم فیزیولوژی استریل تنظیم شد. همچنین جهت اطمینان از صحت تراکم باکتری ها شمارش به روش زنده (Viable Count) نیز انجام گرفت.

(۶)، افزایش پاسخ ایمنی (۷)، فعالیت ضد سرطانی (۸) و کاهش علائم آلرژی (۹). پری بیوتیک ها ترکیبات غذایی غیرقابل هضمی هستند که با تحریک انتخابی رشد و فعالیت یک یا تعداد کمی از باکتری های روده بزرگ اثرات مفیدی بر میزبان دارند و می توانند سلامتی میزبان را بهبود دهند (۱۰). پری بیوتیک ها با کاهش باکتری های بیماری زای روده، تحریک سیستم ایمنی و تحریک ترشح آنزیم های گوارشی از معده، پانکراس و موکوس روده، سبب افزایش در هضم و جذب مواد مغذی می شوند (۱۱).

ترکیب پروبیوتیک و پری بیوتیک که سین بیوتیک نامیده می شود می تواند اثر سینرژیستی در افزایش رشد باکتری های مفید کولون و نیز بقا و رشد سویه های پروبیوتیک که به تازگی اضافه شده اند، داشته باشد (۱۲). مزایای اصلی سین بیوتیک مانند مقاومت به آلودگی باکتریایی دستگاه گوارش، فعالیت آنتی میکروبی و بهبود سیستم ایمنی منجر به گسترش محصولات سین بیوتیک شده است (۱۳). اثرات پروبیوتیک، پری بیوتیک و سین بیوتیک بر آنزیم های سرم و عملکرد رشد در موارد متعددی خصوصاً در ماکیان گزارش شده است. Gruzauskas و همکاران (۱۴) نشان دادند که پروبیوتیک و پری بیوتیک به طور شاخصی سلامت عمومی ماکیان را ارتقاء می بخشند.

Vahdatpour و همکاران (۱۵) و Hassaan و همکاران (۱۶) گزارش کردند که غلظت طبیعی آنزیم های سرم توسط عوامل غیرطبیعی تغییر می کند. فعالیت آنزیم های کبدی سرم (ALP، ALT و AST) برای ارزیابی عملکرد کبد مورد استفاده قرار می گیرد و افزایش در فعالیت آن ها مربوط به نابودی هپاتوسیت ها یا آسیب کبدی صرف نظر از علت آن است (۱۷). Scoll و همکاران (۱۸) گزارش کردند که ALT، AST، LDH و GGT معمولاً زمانی در سرم ظاهر می شوند که آسیب کبد و بافت ماهیچه به علت استرس فراوان ایجاد شود. اگرچه دلایل مختلفی برای تغییر غلظت و فعالیت آنزیم های خون وجود دارد، بسیاری از آنزیم ها تغییرات فیزیولوژیک مهم ناشی

گروه دوم با ترکیب مساوی از لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی ( $5 \times 10^8$  CFU/ml)، گروه سوم با پری بیوتیک رافتیلوز (۵٪ غذای مصرفی) و گروه چهارم با مخلوط پروبیوتیک ها و رافتیلوز به عنوان سین بیوتیک با همان مقادیر (۱/۵ میلی لیتر) به مدت چهار هفته و روزانه یک بار گاوژ شدند. سپس به مدت دو هفته تغذیه عادی داشتند بدون اینکه پروبیوتیک یا پری بیوتیکی گاوژ شوند.

### نمونه برداری

در ابتدا به منظور زیست سنجی در روزهای صفر و ۳۰ موش ها با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۱ گرم وزن شدند و شاخص های رشد نظیر وزن نهایی، وزن به دست آمده، فاکتور وضعیت (Condition Factor) و نرخ رشد ویژه (Specific Growth Rate) محاسبه شد (۲۳). برای محاسبه فاکتور وضعیت و نرخ رشد ویژه از روابط زیر استفاده گردید:

$$100 \times [3 \text{ (طول نهایی)} \div \text{وزن نهایی}] = \text{فاکتور وضعیت}$$

$$\text{طول دوره} \div (\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی}) \text{ لگاریتم} \times 100 = \text{نرخ رشد ویژه}$$

در نهایت به منظور سنجش آنزیم های کبدی خون گیری در روزهای ۳۰ و ۴۵ مطالعه انجام شد. موش ها ۱۲ ساعت قبل از خون گیری قطع غذا شدند. پس از بی هوشی با اتر با استفاده از سرنگ ۵ میلی لیتری از قلب حیوان خون گیری شد. نمونه های خون یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شده و بعد از تشکیل لخته با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سرم آن ها جدا شد. غلظت آنزیم های کبدی آلانین آمینو ترانسفراز (Alanine Aminotransferase-ALT)، آسپارژین آمینو ترانسفراز (Aspartate -AST -Aminotransferase) و آلکالین فسفاتاز (ALP -Alkaline Phosphatase) موجود در نمونه های سرم با کیت های آزمایشگاهی شرکت پارس آزمون و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Camspec M330, UK) تعیین شد.

### تهیه پری بیوتیک

پری بیوتیک مورد استفاده در این آزمایش رافتیلوز (پی - ۹۵ - Raftilose P95) نام داشته که به صورت فروکتان های خطی (۱→۲)-β با درجه پلی مریزاسیون ۸-۲ درصد می باشد. مقدار فروکتان های تضمین شده توسط کارخانه ۹۵٪ و شامل گلوکز، فروکتوز و ساکارز بود. این پری بیوتیک از شرکت اورافتی (Orafti - بلژیک) خریداری شد. Tze در سال ۲۰۰۶ نشان داد که رافتیلوز دارای خاصیت پری بیوتیکی است (۲۲). جهت تهیه رافتیلوز ۵٪، مقدار ۵ گرم پودر رافتیلوز در ۱۰۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل شد.

### تهیه حیوانات و طراحی آزمایش

در این تحقیق تعداد ۴۸ سر موش نر آلبینو نژاد ویستار با میانگین وزنی  $175 \pm 25$  گرم از مؤسسه پاستور تهران خریداری و تحت شرایط معمول آزمایشگاهی (۲۵-۲۲ درجه سانتی گراد و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند و در طول شبانه روز به طور مداوم به آب و غذای استاندارد (جدول ۱) دسترسی داشتند. پس از سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، حیوانات به طور تصادفی در چهار گروه هر کدام با سه تکرار تقسیم شدند، طوری که در هر تکرار تعداد چهار سر موش قرار داشت. گروه اول به عنوان شاهد با سرم فیزیولوژی استریل (غذای بدون پروبیوتیک و پری بیوتیک) تغذیه شدند.

جدول ۱. آنالیز تقریبی غذای استاندارد مورد استفاده در این مطالعه جهت تغذیه موش ها.

ردیف	جزء	مقدار
۱	انرژی خالص	۱۰۰۰-۱۲۰۰ Cal/kg
۲	پروتئین خام	کالری بر کیلوگرم ۱۳-۱۴ درصد
۳	کلیسم	۰/۱-۱ درصد
۴	فسفر	۰/۴-۰/۵ درصد
۵	فیبر خام	۱۰-۱۲ درصد
۶	ماده خشک	۸۸ درصد

### تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از محاسبه شاخص‌های رشد و آنزیم‌های کبدی گروه‌های مورد مطالعه از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One Way Analysis of -ANOVA (Variance)، نرم افزار SPSS (نسخه ۱۸) و آزمون توکی (Tukey's Test) (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

تأثیر جیره‌های آزمایشی بر شاخص‌های رشد در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که شاخص‌های رشد (وزن نهایی، وزن به دست آمده، فاکتور وضعیت و نرخ رشد ویژه) در موش‌های گاوژ شده با مخلوط پروبیوتیک و پری‌بیوتیک (سین‌بیوتیک) نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  نداشت. همچنین شاخص‌های رشد در موش‌های گاوژ شده با پروبیوتیک بیشتر از پری‌بیوتیک و گروه شاهد بود. جدول ۳ تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت آنزیم‌های کبدی موش را نشان می‌دهد. بر این اساس

در روز ۳۰ مقدار آنزیم AST در گروه‌های تیمار شده با پروبیوتیک و پری‌بیوتیک در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت، اما در گروه سین‌بیوتیک نسبت به گروه شاهد کاهش پیدا کرد. در روز ۴۵ نیز مقدار این آنزیم در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه شاهد کاهش پیدا کرد که این کاهش در گروه پروبیوتیک بیشتر از سایر گروه‌ها بود. همچنین مقدار این آنزیم در گروه سین‌بیوتیک کمتر از گروه شاهد گزارش گردید. در روز ۴۵ هم اختلاف آماری معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) در غلظت آنزیم AST بین گروه‌ها دیده نشد.

در روزهای ۳۰ و ۴۵ غلظت آنزیم ALT در گروه‌های تیمار شده با پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک بیشتر از شاهد بود. مقدار افزایش این آنزیم در روز ۳۰ در تیمار پروبیوتیک بیشتر از سایرین بوده و اختلاف آماری معنی‌داری ( $p = 0.032$ ) با همه گروه‌ها داشت. این افزایش غلظت در روز ۴۵ هم در گروه پروبیوتیک بیشتر از بقیه تیمارها بود ولی اختلاف آماری معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) بین گروه‌ها مشاهده نشد.

نتایج مربوط به مقدار آنزیم ALP سرم نشان داد که مقدار آنزیم در روزهای ۳۰ و ۴۵ در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه شاهد کاهش پیدا کرد. در

جدول ۲. نتایج حاصل از تأثیر تغذیه‌ای پروبیوتیک و پری‌بیوتیک بر شاخص‌های رشد موش در طول مطالعه

تیمارها	وزن اولیه (گرم)	وزن روز ۳۰ (گرم)	وزن نهایی (گرم)	وزن به دست آمده (%)	فاکتور وضعیت (%)	نرخ رشد ویژه (%)
پروبیوتیک	175 ± 24 <sup>a</sup>	265 ± 32 <sup>a</sup>	90 ± 40 <sup>a</sup>	55 ± 28 <sup>a</sup>	1/35 ± 0/09 <sup>a</sup>	3/24 ± 1 <sup>a</sup>
پری‌بیوتیک	176 ± 23 <sup>a</sup>	257 ± 29 <sup>a</sup>	81 ± 26 <sup>a</sup>	48 ± 19 <sup>a</sup>	1/29 ± 0/07 <sup>a</sup>	3/24 ± 0/99 <sup>a</sup>
سین‌بیوتیک	169 ± 23 <sup>a</sup>	267 ± 34 <sup>a</sup>	98 ± 31 <sup>a</sup>	62 ± 21 <sup>a</sup>	1/35 ± 0/09 <sup>a</sup>	3/24 ± 1/1 <sup>a</sup>
شاهد	180 ± 21 <sup>a</sup>	256 ± 20 <sup>a</sup>	76 ± 28 <sup>a</sup>	44 ± 20 <sup>a</sup>	1/29 ± 0/08 <sup>a</sup>	3/24 ± 1/3 <sup>a</sup>

\* داده‌ها به صورت Mean ± S.D. نشان داده شده‌اند (n=6).

\* حروف غیر یکسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ( $p < 0.05$ ) می‌باشد.

جدول ۳. تأثیر جیره‌های آزمایشی بر غلظت (U/l) آنزیم‌های کبدی سرم موش گزارش شده است

تیمارها	ALT		AST		ALP	
	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۳۰	روز ۴۵
پروبیوتیک	25/19 ± 2/46 <sup>a</sup>	21/53 ± 6/67 <sup>a</sup>	199/29 ± 15/47 <sup>a</sup>	161/18 ± 48/22 <sup>a</sup>	122/29 ± 30/59 <sup>a</sup>	108/51 ± 25/09 <sup>a</sup>
پری‌بیوتیک	15/44 ± 2/63 <sup>b</sup>	16/75 ± 3/01 <sup>a</sup>	203/95 ± 83/37 <sup>a</sup>	181/42 ± 35/77 <sup>a</sup>	126/70 ± 35/33 <sup>a</sup>	116/23 ± 38/52 <sup>a</sup>
سین‌بیوتیک	17/13 ± 2/83 <sup>b</sup>	16/96 ± 3/45 <sup>a</sup>	164/75 ± 6/68 <sup>a</sup>	165/25 ± 25/90 <sup>a</sup>	135/97 ± 10/41 <sup>a</sup>	105/37 ± 18/01 <sup>a</sup>
شاهد	14/48 ± 3/45 <sup>b</sup>	16/70 ± 3/08 <sup>a</sup>	198/10 ± 32/35 <sup>a</sup>	187/58 ± 21/83 <sup>a</sup>	147/99 ± 47/74 <sup>a</sup>	132/99 ± 22/52 <sup>a</sup>

\* داده‌ها به صورت Mean ± S.D. نشان داده شده‌اند (n=6).

\* حروف غیر یکسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ( $p < 0.05$ ) می‌باشد.

مثبت بر افزایش وزن بدن در مقایسه با گروه شاهد دارد. این ممکن است به دلیل همکاری پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها و به دنبال آن عمل تخمیر پری بیوتیک‌ها توسط باکتری‌های لاکتیک اسید در مسیر معده‌ای-روده‌ای و تولید برخی اسیدها توسط این گروه از باکتری‌ها باشد که pH مسیر ذکر شده را بیشتر کاهش دهد (۸). کاهش pH در کنترل جمعیت باکتری‌های پاتوژن موثر است. در جریان آلودگی به این باکتری‌های بیماری‌زا جمعیت لنفوسیت‌ها نیز برای از بین بردن آن‌ها افزایش یافته و به دنبال التهاب، ضخامت لایه ماهیچه‌ای افزایش می‌یابد (۲۶).

نتایج مربوط به غلظت آنزیم‌های کبدی نشان داد که فعالیت آن‌ها تحت تأثیر پروبیوتیک‌ها و رافتیلوز به طور جداگانه تغییر می‌کند. تغذیه با پروبیوتیک، پری بیوتیک و سین بیوتیک غلظت آنزیم ALT را در مقایسه با شاهد افزایش می‌دهد که این افزایش در گروه پروبیوتیک نسبت به سایر گروه‌ها معنی دار ( $p < 0/05$ ) بود. در آزمایش انجام شده توسط Vahdatpour و همکاران (۳۱) تغذیه با پروبیوتیک پروتکسین (Protexin)، پری بیوتیک فرماکتو (Fermacto) و سین بیوتیک (پروتکسین + فرماکتو) در بلدرچین ژاپنی، سبب کاهش غلظت آنزیم ALT در مقایسه با گروه کنترل شد که این کاهش در گروه‌های سین بیوتیک و پروبیوتیک نسبت به شاهد معنی دار ( $p < 0/05$ ) بود. همچنین Ziaie و همکاران (۲۰) نشان دادند که غلظت آنزیم ALT در جوجه‌های تغذیه شده با پروبیوتیک پروتکسین و پری بیوتیک ایمنوال (Immnwall) کاهش معنی داری ( $p < 0/05$ ) نسبت به گروه شاهد داشت.

با توجه به اینکه افزایش غلظت این آنزیم می‌تواند نشانه آسیب کبدی و بافت ماهیچه‌ای باشد اما بررسی‌های هیستوپاتولوژیک این بافت‌ها هیچ گونه عارضه‌ای را مشخص نکرد. در ضمن در بررسی منابع علمی دلیل قانع کننده‌ای برای افزایش این آنزیم پیدا نشد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مقدار آنزیم AST سرم در گروه پروبیوتیک و پری بیوتیک نسبت به شاهد کاهش یافت، اما در گروه سین بیوتیک نسبت به

روز ۳۰ بیشترین کاهش در مقدار آنزیم مربوط به گروه پروبیوتیک و در روز ۴۵ مربوط به گروه سین بیوتیک بود. و هیچگونه اختلاف آماری معنی دار در سطح  $p < 0/05$  مشاهده نشد.

### بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که مصرف پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی به همراه پری بیوتیک رافتیلوز نمی‌تواند شاخص‌های رشد موش را به صورت معنی داری افزایش دهد. در توافق با نتایج به دست آمده، Cakir و همکاران (۲۴) بهبود معنی داری را در افزایش وزن بدن بلدرچین ژاپنی در اثر اضافه کردن مکمل سین بیوتیک (بایومین ایمبو-Biomin IMBO) مشاهده نکردند. این محققین علت را در وجود شرایط غیر طبیعی و پر تنش در طی دوره پرورش گزارش کردند و اظهار داشتند که در این شرایط میزان تأثیرگذاری این مکمل‌ها حداقل می‌باشد.

همچنین گزارش شده که استفاده از پروبیوتیک و پری بیوتیک در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی تأثیر قابل توجهی بر عملکرد رشد آن‌ها ندارد (۲۹-۲۶). از طرفی Ashayerizade و همکاران (۲۹) مشاهده کردند که ضریب رشد و نرخ رشد ویژه در جوجه‌های تغذیه شده با پری بیوتیک و سین بیوتیک در ابتدا و کل دوره تغذیه بیشتر از گروه‌های کنترل و تغذیه شده با پروبیوتیک و آنتی بیوتیک بود. مغایرت تحقیقات گزارش شده می‌تواند ناشی از تفاوت نوع پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها، شرایط محیطی و مدیریت در آزمایش‌های مختلف باشد. در ضمن این پژوهشگران از پروبیوتیک‌های *Lactobacillus* و *Bifidobacterium bifidum, acidophilus* و *Entrvococcus faecium* با نام تجاری Primalac و از پری بیوتیک گلوکان (مستخرج از دیواره سلولی مخمر *Saccharomyces cerevisiae*) با نام تجاری Biolex-MB 40 در مطالعه خود استفاده کردند (۳۰).

یافته‌های به دست آمده نشان می‌دهند که مصرف سین بیوتیک همانند آنتی بیوتیک یک اثر

این دلیل است که آن‌ها با ایجاد تعادل روده ای و افزایش در قابلیت هضم مواد مغذی و افزایش پاسخ ایمنی موجب کاهش تنش های ناشی از ترکیبات ضد مغذی موجود در خوراک، کاهش توکسین های روده ای و شرایط محیطی و بیماری ها بر کبد شده و بنابراین با افزایش در کارکردهای آن ها سطح سرمی این آنزیم ها کاهش می یابد (۳۶).

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می توان نتیجه گرفت که افزودن پروبیوتیک های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازئی جدا شده از روده ماهی کپور معمولی به جیره غذایی رت های سالم، تاثیری معنی داری بر شاخص های رشد موش ندارد. همچنین مقادیر آنزیم های کبدی می توانند در اثر تغذیه با پروبیوتیک و پریبیوتیک تغییر یابد. بر اساس نتایج بدست آمده مشخص شد که در بین آنزیم های کبدی اندازه گیری شده فقط میزان آنزیم ALT سرم در اثر تغذیه با پروبیوتیک ها افزایش می یابد.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از پژوهشکده آرتمیا و آبریان و دانشکده علوم دانشگاه ارومیه به خاطر حمایت های مالی ابراز می دارند.

### منابع

1. Cakir S, Midilli M, Erol H, Simsek N, Cinar M, Altintas A, et al. Use of combined probiotic-prebiotic, organic acid and avilamycin in diets of Japanese quails. *Revue De Med Vet.* 2008;159:565-9.
2. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J App Bacteriol.* 1987;66:365-78.
3. Reddy NR, Roth SM, Eigel WN, Pierson MD. Food and food ingredients for prevention of diarrhea diseases in children in developing countries. *J Food Protec.* 1998;51:66-75.
4. Fonden R, Mogensan G, Tanaka R, Salminen S. Effect of culture containing dairy products on intestinal micro flora, human nutrition and health-current knowledge and future perspectives. *Inter*

شاهد افزایش نشان داد ولی اختلاف آماری معنی داری ( $p < 0/05$ ) در غلظت این آنزیم بین گروه ها دیده نشد.

در این مطالعه مقدار آنزیم ALP در گروه های تیمار شده نسبت به گروه شاهد کاهش پیدا کرد اما اختلاف آماری معنی داری ( $p < 0/05$ ) بین گروه ها دیده نشد. در روز ۳۰ بیشترین کاهش در مقدار آنزیم مربوط به گروه پروبیوتیک و در روز ۴۵ مربوط به گروه سین بیوتیک بود. Brenes و همکاران (۳۲) گزارش کردند که کاهش فسفر قابل دسترس جیره باعث افزایش غلظت ALP سرم می گردد. مقدار این آنزیم در آسیب های کبدی بالا می رود و سبب کاهش در ترشح صفرا می گردد (۲۰).

در آزمایش انجام شده توسط Rishi و همکاران (۳۳) مقدار AST و ALT در سرم موش های تغذیه شده با پروبیوتیک و سین بیوتیک مشابه گروه کنترل بود، اما در گروه تغذیه شده با پروبیوتیک اینولین مقدار AST افزایش معنی داری نشان داد ( $p < 0/05$ ) که ممکن است ناشی از پاسخ غیر اختصاصی میزبان به اینولین باشد. علت افزایش AST در مقایسه با ALT ناشی از این واقعیت است که AST به طور طبیعی در بافت های مختلفی یافت می شود و سطح سرمی آن بلافاصله به هنگام ایجاد آسیب در هر کدام از این بافت ها افزایش می یابد (۳۳).

Yalcinkaya و همکاران (۳۴) گزارش کردند که تغذیه با الیگوساکارید مانان میزان ALT ( $p < 0/05$ ) و ( $p < 0/01$ ) را به طور قابل توجهی در سرم جوجه های گوشتی کاهش می دهد. نتایج Rahman و همکاران (۱۹) نشان داد پروبیوتیک در خوراک جوجه های گوشتی منجر به کاهش غلظت آنزیم های AST، ALT و ALP سرم در مقایسه با شاهد شد ( $p < 0/05$ ). همچنین پروبیوتیک ها با کاهش در فعالیت آنزیم اوره آز باکتریایی، جذب روده ای آمونیاک و سموم و کاهش تنش های اکسیداتیو ناشی از جذب آمونیاک موجب شده تا عملکرد کبد بهبود یابد (۳۵). احتمالاً کاهش سطح سرمی آنزیم های کبد در جیره های حاوی جایگزین های آنتی بیوتیک به

Ebrahimnezhad Y, Maherysis N, Riyazi SR, Vahdatpour S. Effect of corticosterone intake as stress-alternative hormone on broiler chickens: Performance and blood parameters. *Asian J Anim Vet Adv*. 2009;4:16-21.

16. Hassan SF, Elsalmony AE, Fathi MM. Relationship between triiodothyronine (T3) and Insulin-like growth factor (IGF1) hormones in Egyptian local chickens during growth period. *Egyptian Poultry Sci*. 2008;28:251-63.

17. Fatemi F, Allameh A, Dadkhah A, Forouzandeh M, Kazemnejad S, Sharifi R. Changes in hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity and expression of its class-P during prenatal and postnatal period in rats treated with aflatoxin B1. *Arch Toxicol*. 2006;80:572-79.

18. Scoll PF, McCoy L, Kensler TW, Groopman JD. Quantitative analysis and chronic dosimetry of the aflatoxin B1 plasma albumin adduct Lys-AFB1 in rats by isotope dilution mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*. 2009;19(1):44-9.

19. Rahman MM, Islam MN, Islam MW, Kabir SML, Kamruzzaman SM. Effects of probiotics supplementation on growth performance and certain haemato-biochemical parameters in broiler chickens. *Bangladesh J Vet Med*. 2004;2(1):39-43.

20. Ziaei H, Karimi Torshizi MA, Bashtani M, naemipour H, Zeinali A. Efficiency evaluation of antibiotic growth promoter's alternatives on immune response and some blood metabolites in broiler chickens. *J Agri Sci Nat Resour*. 2009;16(2):1-13.

21. Tze LM. In-vivo and in-vitro cholesterol removal by Lactobacilli and Bifidobacteria. A thesis submitted for degree of Doctor of Philosophy, School of Molecular Science, Victoria University, Australia; 2006. 111-124.

22. Rahmati Andani HR, Tukmechi A, Meshkiniy S, Ebrahimi H. Afzaeshe moghavemate mahi ghezalalay rangin Kaman dar barabar ofonat ba Aeromonas hydrophyla & Yersinia ruckeri ba estefade

Dairy Federation Bull. 2000;352:4-30.

5. Bhatia SJ, Kochar N, Abraham P. Lactobacillus acidophilus inhibits growth of Compylobacter in vitro. *J Clin Microbiol*; 1989. 27: 2328-2330.

6. Wallowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Amer J Clin Nut*; 1999. 73: 451-455.

7. Kimura K, McCartney AL, McConnel MA, Tannock GW. Analysis of fecal population of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to predominant strains. *Appl Environ Microbiol*; 1997. 63: 3394-3398.

8. Fuller R, Gibson GR. Modification of intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scan J Gastroenterol*; 1997. 222, 28-31.

9. Ouwehand AC. Antiallergic effects of probiotics. *J Nut*; 2007. 137: 794-797.

10. Gibson GR, Roberfroid, MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nut*; 1995. 125: 1401-1412.

11. Huang RL, Yin YL, Wu GY, Zhang YG, Li LL, Li MX et al. Effects of dietary oligochitosan supplementation on ileal digestibility of nutrients and performance in broiler. *Poultry Sci*; 2005. 84: 1383-1388.

12. Schrezenmeir J, De verse M. Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching a definition. *Ame J Clin Nut*; 2001. 73: 361-364.

13. Saminathan M, Siew, CC, Kalavathy R, Abdullah N, Ho YW. Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of Lactobacillus strains used as a probiotic for chickens. *African J Microbiol Res*; 2010. 5(1): 57-64.

14. Gruzauskas R, Semaskaite A, Zdunczyk Z, Juskiwicz J, Raceviciute-Stupeliene A, Sasyte V. Growth performance and digestive processes in broiler chickens fed diets supplemented with xylanase and fructooligosaccharides. 16th European Symposium on Poultry Nutrition. 2007.

15. Vahdatpour T, Nazeradl K,

31. Vahdatpour T, Nikpiran H, Babazadeh D, Vahdatpour S, Jafargholipour MA. Effect of Protexin, Fermaco and combination of them on blood enzymes and performance of Japanese quails (*Coturnix Japonica*). *Annals of Biological Research*. 2011; 2(3):283-91.

32. Brenes A, Viveros A, Arija I, Centeno C, Pizarro M, Bravo C. The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Anim Feed Sci Technol*. 2003;110: 201-19.

33. Rishi P, Mavi S, Bharrhan SK, Shukla G, Tewari R. Protective efficacy of probiotic alone or in conjunction with a prebiotic in *Salmonella*-induced liver damage. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009; 69:222-30.

34. Yalcinkaya I, Gungor, T, Balsann M, Edrem E. Mannan oligosaccharides (MOS) from *Saccharomyces cerevisiae* in broiler: Effect on performance and blood biochemistry. *Turkish J Vet Anim Sci*. 2008;32:43-8.

35. Yeo J, Kim KI. Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. *Poultry Sci*. 1998;76:381-5.

36. Afshar Mazandaran N, Rajab A. Probiotic and their uses in animal and poultry nutrition. 2nd ed. Tehran: Norbakhsh; 2002. Persian.

az *Lactobacillus* joda shode az rode kapor mamoli. *Iranian J Vet*. 2010;7(2): 26-35. Persian.

23. Tukmechi A, Rahmati Andani HR, Meshkiny S, Sheikhzadeh N. Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol*. 2011;30:923-8.

24. President IAP. Probiotics – The health friendly gut bacteria. *Indian Ped*. 2008;45:953-4.

25. Jamroz D, Wiliczekiewicz A, Orda J, Wertelecki T, Skorupinska J. Response of broiler chickens to the diets supplemented with feeding antibiotic or mannan-oligosaccharides. *Elect J Polish Agri Uni Series Anim Husband*. 2004;7(2):1-6.

26. Gunal M, Yayli G, Kaya O, Karahan N, Sulak O. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broiler. *Inter J Poultry Sci*. 2006;5:149-55.

27. Zhang AW, Lee BD, Lee SK, Lee KW, An GH, Song KB, et al. Effect of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poultry Sci*. 2005;84:1015-21.

28. Willis WL, Isikhuemhen OS, Ibrahim A. Performance assessment of broiler chickens given mushroom extract alone or in combination with probiotic. *Poultry Sci*. 2007;86:1856-60.

29. Ashayerizadeh A, Dabiri N, Mirzadeh KH, Ghorbani MR. Effect of dietary inclusion of several biological feed additives on growth response of broiler chickens. *J Cell Anim Biol*. 2011;5(4):61-5.

30. Ashayerizadeh A, Dabiri N, Mirzadeh KH, Ghorbani MR. Effect of dietary supplementation of probiotic and prebiotic on growth indices and serum biochemical parameters of broiler chickens. *J Cell Anim Biol*. 2011;5(8):152-6.

## Dietary effect of *L. casei* and *L. paracasei* as probiotic bacteria with Raftilose as prebiotic on the growth and liver enzymes in rat

**Bayan Seyedi**, MSc. Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.  
bayan.seyedi@gmail.com

**Reza Heidary**, PhD. Professor of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran. r.heidari@mail.urmia.ac.ir

**Amir Tukmechi**, PhD. Assistant Professor of Microbiology, Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran (\*Corresponding author).  
a.tukmachi@urmia.ac.ir

### Abstract

**Background:** The goal of this study was to evaluate the effect of two probiotics (*Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei*) with a prebiotic (Raftilose) on the growth and liver enzyme (ALP, ALT and AST) in rat.

**Methods:** In this laboratory experimental study forty eight male rats ( $175 \pm 25$  g) were randomly divided into four experimental groups each with triplicate. One group was selected as control and three groups were fed with probiotics ( $5 \times 10^8$  CFU/ml), prebiotic (5% of the diet) and a mixture of probiotics with prebiotic with the same concentrations, respectively. The animals were fed with probiotic and prebiotic for 4 weeks and trial was continued for two weeks later without receiving any additives. Sampling was scheduled at days of 0 and 30 for biometry and days of 30 and 45 for liver enzyme assay. Data were analyzed using one-way ANOVA by SPSS software.

**Results:** *Lactobacillus casei* and *L. paracasei* with Raftilose statistically had no effect on the rat growth ( $p < 0.05$ ). Also, results indicated that liver enzyme activity could alter independently. The amount of ALT was higher in the animal that received probiotics ( $p = 0.032$ ) than the control group at the day of 30. The level of ALP and AST not showed any statistical differences ( $p < 0.05$ ) between the groups.

**Conclusions:** It should be concluded that addition of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* with Raftilose as a prebiotic did not affect the rat growth, but the level of ALT could increase with the probiotics. Further study should be done for obtain the best results on feeding with probiotic and prebiotic in rat.

**Keywords:** Rat, Probiotic, Prebiotic, Growth, Liver enzyme.