

## تأثیر انتروکوک‌های جدا شده از پنیر محلی بر روی چربی‌ها و سایتوکاین‌های سرم در موش

دکتر جلال صولتی<sup>۱</sup>، دکتر آذر سبکبار<sup>۲</sup>، دکتر جلیل وند یوسفی<sup>۲</sup>، نسرين کلخورانی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>نویسنده مسئول: استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران E-mail: solati@kiaou.ac.ir

<sup>۲</sup>استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

<sup>۳</sup>دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** مطالعات نشان داده است که باکتری‌های پروبیوتیک نقش مفیدی در سلامت جانوران ایفاء می‌کنند. باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند باعث جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها در دستگاه گوارش، بهبود مصرف چربی‌ها و تقویت سیستم ایمنی شوند. در تحقیق حاضر گونه‌های انتروکوکوس از نمونه پنیر محلی ایران جداسازی گردیده و فعالیت پروبیوتیکی آنها مانند اثر بر سطح چربی‌ها، گلوکز و سایتوکاین‌های (IL-6, IL-10, IL-2) بررسی گردید.

**روش کار:** نمونه پنیر محلی از استان اردبیل تهیه گردید. انتروکوک‌های موجود در پنیر محلی بواسطه محیط کشت‌های انتخابی جداسازی گردیده و با استفاده از تست‌های تخمیر قند شناسایی شدند. اثرات بازدارندگی انتروکوک‌های جداسازی شده بر روش کشت چاهکی بر روی سودوموناس اثرورینوزا و پاتوژن‌های دستگاه گوارش شامل شیگلا دیسانتری، اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم بررسی گردید. برای مطالعه اثرات پروبیوتیکی انتروکوک‌های جداسازی شده در جانوران زنده، موش‌های سوری نژاد NMRI به گروه‌های مختلف تقسیم شده و به مدت دو هفته دوزهای مختلف انتروکوک‌های جداسازی شده را در رقت‌های معادل کدورت‌های ۲ ( $6 \times 10^8$  CFU/mL)، ۳ ( $9 \times 10^8$  CFU/mL) و ۴ ( $12 \times 10^8$  CFU/mL) مک فارلند به حجم ۱ میلی لیتر به ازای هر موش بصورت دهانی (گاوژ) دریافت کردند. پس از دو هفته تیمار مداوم سطح کلسترول، تری‌گلیسیرید، LDL و HDL به روش طیف سنجی و با استفاده از اسپکتروفتومتر و سطح اینترلوکین‌های ۲، ۴ و ۱۰ سرم به روش الیزا اندازه گیری شد.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تیمار با گونه فاسیوم باعث کاهش سطح کلسترول خون و افزایش سطح اینترلوکین ۱۰ در سرم موش‌ها می‌گردد اما اثر معنی‌داری بر سطح گلوکز، تری‌گلیسیریدها و اینترلوکین‌های ۲ و ۴ ندارد ( $p < 0.05$ ). تیمار با گونه فکالیس تغییر معنی‌داری در سطح، گلوکز و چربی‌های خون بوجود نمی‌آورد ولی باعث افزایش معنی‌داری در سطح اینترلوکین‌های ۴ و ۱۰ سرم می‌شود ( $p < 0.05$ ). نتایج بدست آمده همچنین نشان می‌دهد که هیچکدام از گونه‌های مذکور اثر معنی‌داری بر روی رشد پاتوژن‌های روده نداشتند.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه بیانگر آن است که تیمار مداوم با گونه فاسیوم باعث کاهش کلسترول سرم در موش‌ها می‌شود. همچنین تیمار مداوم با هر دو گونه می‌تواند با تأثیر بر الگوی سایتوکائنی، فعالیت سیستم ایمنی را تغییر دهد.

**کلمات کلیدی:** انتروکوک؛ پروبیوتیک؛ چربی‌ها؛ سایتوکاین‌ها

دریافت: ۸۹/۷/۱۳ پذیرش: ۸۹/۱۰/۷

لطفاً به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Solati J, Sabokbar A, Vand Yousefi J, Kalkhorani N. Effects of enterococci isolated from traditional cheese on lipids and cytokines levels of serum in mice. J Ardabil Univ Med Sci. 2010; 10(4): 319-329. (Full text in Persian)

\* این مقاله بر گرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم نسرين کلخورانی، دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج می باشد.

**مقدمه**

در دهه اخیر شاهد تغییرات چشمگیری در درک نقش غذاها در ارتقاء سطح سلامت انسان می‌باشیم. تحقیقات علمی از بررسی نقش غذا بعنوان منبع انرژی و نقش ساختمانی در بدن به بررسی فعالیت بیولوژیکی غذاها در ارگان‌های مختلف تغییر جهت داده است [۱، ۲].

پروبیوتیک‌ها موجودات زنده‌ای هستند که در مواد غذایی زندگی می‌کنند و برای سلامت انسان مفید هستند. این موجودات زنده بطور طبیعی در مواد غذایی تخمیر شده (مثل ماست، شیر و پنیرهای تخمیر شده و غیره) وجود دارند و خواص مفید فراوانی برای انسان دارند و مخصوصاً در دستگاه گوارش اثرات مفیدی را اعمال می‌کنند [۱، ۳].

تحقیقات قبلی نشان‌دهنده وجود میکروارگانیسم‌های با فعالیت پروبیوتیکی در لبنیات مناطق مختلف دنیا می‌باشد. اثرات مفید پروبیوتیک‌های موجود در مواد غذایی در مطالعات مختلفی به اثبات رسیده است. مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان داده است که مصرف غذاهای حاوی پروبیوتیک‌های فعال سبب کاهش خطر ابتلا به سرطان، بهبود سلامت قلب، تحریک سیستم ایمنی، کاهش علائم یائسگی، بهبود سلامت دستگاه‌های گوارش و ادراری، بروز اثرات ضدالتهابی، ضد میکروبی و ضد ویروسی می‌شود [۴-۶].

معمولترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به سه گروه باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تقسیم می‌شوند. از بین گروه‌های فوق امروزه توجه بیشتری به باکتری‌ها، در جهت شناسایی و تولید محصولات پروبیوتیک می‌شود. مطالعات قبلی فعالیت پروبیوتیک برخی از باکتری‌های موجود در لبنیات مانند سویه‌های انتخابی باکتری‌های لاکتوباسیلوس<sup>۱</sup>، بیفیدوباکتریوم<sup>۲</sup> و انتروکوک<sup>۳</sup> را نشان داده است [۷، ۸].

انتروکوک‌ها بخشی از فلور طبیعی محصولات لبنی تخمیری هستند. وجود گونه‌های مختلف این باکتری‌ها در پنیر باعث بوجود آمدن بو و طعم خاص در نمونه‌های پنیر محلی مناطق مختلف می‌شود [۹-۱۱]. با این وجود غلظت بالای این باکتری‌ها در بدن ممکن است باعث ایجاد عفونت و بیماری گردد [۱۰، ۱۲].

گرچه بیشتر مطالعات در خصوص باکتری‌های پروبیوتیک بر روی لاکتوباسیل‌ها متمرکز شده است اما مطالعات نشان داده است که انتروکوک‌ها می‌توانند بعنوان یک باکتری پروبیوتیک مورد توجه قرار گیرند [۱۳، ۱۴]. انتروکوک‌ها چندین نوع باکتریوسین<sup>۴</sup> تولید می‌کنند که این امر مانع رشد پاتوژنها در روده می‌شود [۱۰، ۱۵، ۱۶]. همچنین در برخی از گزارش‌ها به اثرات انتروکوک‌ها بر روی سیستم ایمنی بدن اشاره شده است [۱۷، ۱۸].

با در نظر گرفتن این مسئله که انتروکوک‌ها بخشی از باکتری‌های موجود در پنیر هستند و با توجه به شناسایی انتروکوک‌ها در نمونه‌های پنیر کشورهای دیگر، احتمال حضور انتروکوک‌ها در پنیر محلی ایران نیز بالا است و احتمال دارد این باکتری‌ها فعالیت‌های پروبیوتیک مفیدی برای جانوران داشته باشند. در این تحقیق سعی شده است حضور انتروکوک‌های در پنیر محلی استان اردبیل و فعالیت پروبیوتیکی آنها در جانوران بررسی گردد.

**روش کار****جمع آوری نمونه‌ها**

ده نمونه پنیر محلی از استان اردبیل (از محصولات تولیدی توسط عشایر مستقر در دامنه سبلان) جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

<sup>3</sup> Enterococci<sup>4</sup> Bacteriocin<sup>1</sup> Lactobacillus<sup>2</sup> Bifidobacterium

### آماده سازی نمونه ها

نمونه‌های پنیر بافت سخت دارند و به راحتی با محیط کشت مخلوط نمی‌شوند، از اینرو ابتدا ۱۰ گرم از هر نمونه پنیر در شرایط استریل وزن کردیم و داخل هاون‌های از قبل استریل شده حاوی ۴۰-۳۰ گرم ماسه ریخته شدند. سپس ۹۰ میلی‌لیتر آب حاوی سیترات سدیم ۲٪ به هاون اضافه کرده و پنیرها را له کردیم و با کمک سیترات سدیم ۲٪ رقت‌های متفاوت تا ۱۰<sup>-۶</sup> تهیه شد [۲۱-۱۹].

### کشت و جدا سازی

رقت‌های مختلف از نمونه‌ها تهیه شده و به مقدار ۱/۰ میلی‌لیتر در محیط کشت KF-Streptococcus agar و یا MRS agar در شرایط استریل با کمک اسپاتول دریگالسکی کشت داده و به شکل هموژن در سطح آگار پخش گردید. سپس محیط‌های کشت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و کلنی‌های مشکوک به آنتروکوک بر مبنای ویژگی‌های کلنی تست کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم انتخاب شدند و در محیط بلاد آگار مجدداً کشت داده شدند و جنس آنتروکوک توسط تست‌های توانایی رشد در دمای ۴۵ - ۱۰ درجه سانتی‌گراد، رشد در حضور ۵/۶٪ نمک و رشد در حضور ۴۰٪ نمک‌های صفراوی و هیدرولیز بایل اسکولین شناسایی شدند. نهایتاً آنتروکوک‌های جدا شده بر مبنای تست‌های تخمیر قند در سطح گونه شناسایی شدند [۲۱، ۲۲].

در طی مراحل خالص‌سازی جهت مهار مخمرهای موجود در محیط از نیستاتین استفاده شد (۵۰ U/ml).

### بررسی اثر آنتاگونیستی آنتروکوک‌های جدا شده علیه باکتری‌های بیماری‌زای روده در

#### شرایط آزمایشگاهی

پنج سویه از آنتروکوک جدا شده برای بررسی اثر آنتاگونیستی انتخاب شدند، تعداد ۵-۴ کلنی یکدست از کشت ۲۴ ساعته‌ی هر کدام از سویه‌ها، در محیط

برین هارت اینفیوژن آگار (BHI)<sup>۱</sup> تلقیح گردید و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا به کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند برسد. سپس سطح محیط با افزودن پارافین استریل پوشانده شد و به مدت ۴ روز (زمان لازم برای تولید مواد ضد میکروبی) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. در مرحله بعد پارافین را خارج کرده و محیط کشت به لوله استریل جدید انتقال یافت و به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی جهت مطالعات بعدی در لوله‌های جدید انتقال یافت.

جهت مطالعه اثر بازدارندگی از ۴ سویه استاندارد پاتوژن دستگاه گوارش شامل شیکلا دیسانتری (PTCC1188)<sup>۲</sup>، سودوموناس ائروژینوزا (PTCC1430)، اشیشیاکلی (PTCC1399)، سالمونلا تیفی‌موریوم (ATCC 1596)<sup>۳</sup> استفاده شد و در محیط کشت BHI کشت دادیم. بدین منظور ۵-۴ کلنی یکدست از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری به ۳ میلی‌لیتر محیط نوترینت برات اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور به مدت ۱-۲ ساعت قرار داده شد تا به کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند برسد.

از سوسپانسیون باکتری پاتوژن با سواب سرپنبه‌ای استریل به محیط کشت مولر هینتون آگار به طور یکنواخت تلقیح شد. بعد با کمک پانچ استریل چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر در محیط حفر کرده و از محلول رویی حاصل از کشت آنتروکوک‌های جدا شده در مرحله قبل به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در داخل چاهک‌ها ریخته شد و پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد [۲۳، ۲۴].

<sup>1</sup> Brain Heart Infusion Agar

<sup>2</sup> Persian Type Culture Collection

<sup>3</sup> American Type Culture Collection

اساس تغییر رنگ با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری اینترلوکین‌ها از روش الیزای (BioSource International, USA) استفاده شد.

#### آنالیز آماری

نتایج بدست با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز گردید و آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه جهت بررسی تفاوت بین گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

#### یافته‌ها

نتایج نشان‌دهنده حضور و رشد کلنی‌های انتروکوک‌ها در نمونه پنیر محلی اردبیل می‌باشد. طبق نتایج بدست آمده از شناسایی روی ۱۱ باکتری انتروکوک جدا شده، ۶ ایزوله متعلق به گونه فکالیس و ۵ ایزوله متعلق به گونه فاسیوم بود.

#### اثرات آنتاگونیستی انتروکوک‌های جدا شده علیه

##### باکتری‌های بیماری‌زای روده

نتایج حاصله از تحقیق حاضر نشان داد که محلول رویی بدست آمده از کشت انتروکوک‌های جداسازی شده هیچگونه اثر بازدارندگی بر روی باکتری‌های مورد آزمایش نداشت.

#### اثرات نمونه باکتری‌های جداسازی شده بر روی

##### چربی‌های سرم

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد تیمار با غلظت‌های مختلف انتروکوکوس فکالیس تأثیر معنی‌داری بر سطح کلسترول سرم نداشت. با این حال کدورت‌های ۳ و ۴ مک‌فارلند انتروکوکوس فاسیوم سطح کلسترول تام و کدورت مک‌فارلند ۴ سطح LDL سرم موش‌ها را بطور معنی‌داری کاهش داد ( $p < 0.05$ ) (جدول ۱).

تیمار با غلظت‌های مختلف انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم تغییر معنی‌داری در سطح تری‌گلیسریدها و HDL سرم بوجود نیاورد ( $p < 0.05$ ) (جدول ۱).

از هر باکتری پاتوژن و گونه‌های انتروکوک ۵ پلیت تهیه شد و آزمایش ۳ بار برای هر گونه تکرار شد.

#### بررسی اثرات باکتری‌های جدا سازی شده بر روی

##### چربی‌ها، گلوکز و سایتوکاین‌های سرم موش

موش‌های نر نوزاد نژاد NMRI با وزن بین  $28 \pm 3$  گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و به گروه‌های مختلف به ترتیب زیر تقسیم شدند.

گروه کنترل: این گروه فقط آب مقطر دریافت کردند

گروه دریافت‌کننده گونه‌ی انتروکوکوس فکالیس معادل کدورت ۲ مک‌فارلند ( $6 \times 10^8$  CFU/mL)

گروه دریافت‌کننده گونه انتروکوکوس فکالیس معادل کدورت ۳ مک‌فارلند ( $9 \times 10^8$  CFU/mL)

گروه دریافت‌کننده گونه انتروکوکوس فکالیس معادل کدورت ۴ مک‌فارلند ( $12 \times 10^8$  CFU/mL)

گروه دریافت‌کننده گونه انتروکوکوس فاسیوم معادل کدورت ۲ مک‌فارلند ( $6 \times 10^8$  CFU/mL)

گروه دریافت‌کننده گونه انتروکوکوس فاسیوم معادل کدورت ۳ مک‌فارلند ( $9 \times 10^8$  CFU/mL)

گروه دریافت‌کننده گونه انتروکوکوس فاسیوم معادل کدورت ۴ مک‌فارلند ( $12 \times 10^8$  CFU/mL)

غلظت‌های مختلف استاندارد مک‌فارلند در حجم ۱ میلی‌لیتر به ازای هر موش تیمار شدند. گروه‌ها به مدت دو هفته هر روز یک بار باکتری را بصورت گاوژ دریافت کردند.

بعد از ۱۴ روز تیمار مداوم پس از بیهوشی توسط اتر از تمام موش‌ها خونگیری از قسمت گوشه چشم به نحوی که در سینوس اوربیتال ایجاد گسیختگی گردد با استفاده از لوله هماتوکریت انجام شد و نمونه‌های خون بلافاصله درون سانتریفوژ قرار داده شد و سرم آن جدا شد. نمونه‌های سرم حاصله برای اندازه‌گیری فاکتورهای سرمی استفاده شدند.

جهت اندازه‌گیری سطح کلسترول، LDL، HDL، تری‌گلیسریدها از کیت‌های آنزیماتیک ساخت شرکت پارس ژن استفاده گردید و غلظت‌ها بر

## اثرات انتروکوک‌های جداسازی شده بر سطح

## اینترلوکین های سرم

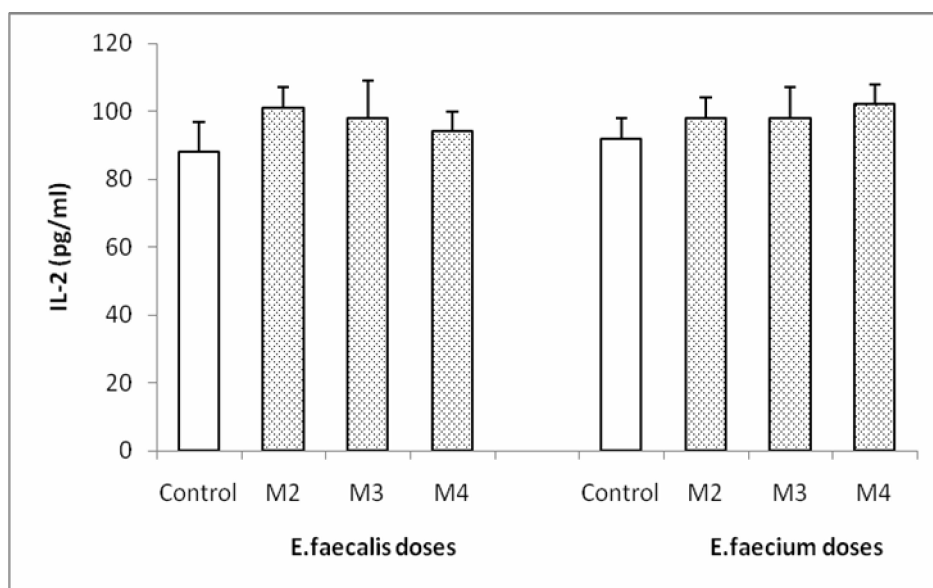
آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد که تیمار مداوم با انتروکوکوس فکالیس باعث افزایش معنی‌دار در غلظت اینترلوکین‌های ۶ و ۱۰ خون می‌شود ولی اثر معنی‌داری بر سطح اینترلوکین ۲ نداشت. تیمار مداوم با غلظت‌های مختلف انتروکوکوس فاسیوم باعث افزایش معنی‌دار در غلظت اینترلوکین ۱۰ خون شد ولی اثر معنی‌داری بر سطح اینترلوکین‌های ۶ و ۲ نداشت ( $p < 0.05$ ) (نمودارهای ۱، ۲ و ۳).

## بحث

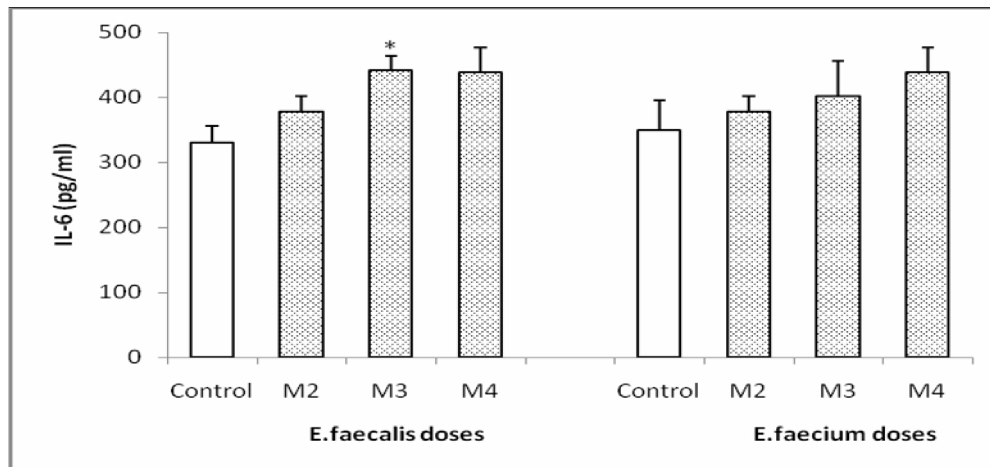
نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده وجود گونه‌های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم در پنیر محلی اردبیل می‌باشد. نتایج حاصله نشان داد که گونه‌های انتروکوکوس فاسیوم اثری بر روی سطح کلوز و تری‌گلیسریدهای خون ندارد و اما باعث کاهش معنی‌داری در سطح کلسترول تام و LDL خون می‌شود. گونه انتروکوکوس فکالیس تغییر معنی‌داری در سطح فاکتورهای بالا بوجود نیاورده

جدول ۱. اثر دوزهای مختلف انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم بر سطح چربی های خون

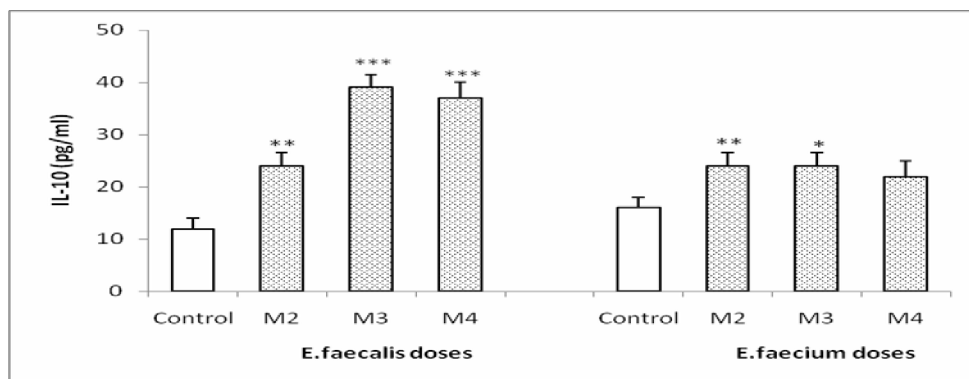
LDL	HDL	کلسترول تام	تری گلیسرید	کنترل
۳۸/۳ ± ۱/۸	۴۴ ± ۲/۱	۱۱۰/۳ ± ۴/۳	۹۴ ± ۷/۱	کنترل
۳۶/۲ ± ۲/۴	۴۰/۳ ± ۳/۲	۱۰۲/۵ ± ۶/۳	۹۰/۵ ± ۶/۱	مک فارلند ۲
۳۱/۶ ± ۲/۱	۳۹ ± ۴/۶	۸۱/۱ ± ۶/۴	۸۸/۶ ± ۵	مک فارلند ۳
۲۶/۴ ± ۱/۹	۴۶/۷ ± ۵/۲	۸۰/۶ ± ۵/۲	۸۱/۱ ± ۶/۴	مک فارلند ۴
۳۸/۱ ± ۲/۱	۴۱/۳ ± ۲/۸	۱۰۸/۵ ± ۸/۳	۸۰/۶ ± ۵/۲	مک فارلند ۲
۳۸/۴ ± ۲/۲	۴۲ ± ۴/۱	۱۰۲/۱ ± ۷/۲	۸۹/۶ ± ۶/۶	مک فارلند ۳
۲۶/۳ ± ۱/۸	۴۴/۷ ± ۳/۲	۱۰۴/۶ ± ۶/۳	۹۲/۲ ± ۴/۹	مک فارلند ۴



نمودار ۱. اثر تیمار دوزهای مختلف انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم بر سطح اینترلوکین ۲ سرم بر حسب pg/ml. در مقایسه با گروه کنترل که فقط آب دریافت کرده‌اند.



نمودار ۲. اثر تیمار دوز های مختلف انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم بر سطح اینترلوکین ۶ سرم بر حسب pg/ml در مقایسه با گروه کنترل که فقط آب دریافت کرده اند.  $p < 0.05$  \* اختلاف از گروه کنترل را نشان می دهد



نمودار ۳. اثر تیمار دوز های مختلف انتروکوکوس فکالیس و فاسیوم بر سطح اینترلوکین ۱۰ سرم بر حسب pg/ml در مقایسه با گروه کنترل که فقط آب دریافت کرده اند.  $P < 0.5$  \*،  $P < 0.01$  \*\* و  $P < 0.001$  \*\*\* اختلاف از گروه کنترل را نشان می دهد.

از طرف دیگر چندین مقاله در خصوص اثر باکتریهای پروبیوتیک مشابه بر کاهش کلسترول خون چاپ شده است. مطالعات تیوت<sup>۲</sup> و همکاران، پیرا<sup>۳</sup> و همکاران و ناگوین<sup>۴</sup> نقش لاکتوباسیل های پروبیوتیک موجود در لبنیات را در کاهش کلسترول خون نشان داده است [۲۱-۲۶]. همچنین تحقیقات کلایور<sup>۵</sup> و همکارانش نقش بیفیدوباکتریهای پروبیوتیک را نیز در کاهش کلسترول خون آشکار ساخته است [۲۲].

<sup>2</sup> Toit

<sup>3</sup> Pereira

<sup>4</sup> Nguyen

<sup>5</sup> Klaver

است. برخی از گزارش های قبلی نیز نشان دهنده اثرات مفید پروبیوتیک ها در کاهش کلسترول خون می باشد. اگر چه مطالعات زیادی در خصوص اثرات انتروکوک ها بر روی متابولیسم چربی ها صورت نگرفته است با این حال برخی از مقالات نشان دهنده اثرات انتروکوک ها در متابولیسم کلسترول می باشد. مطالعات دفنگ<sup>۱</sup> و همکاران نشان می دهد انتروکوک های جداسازی شده از روده خوک می توانند سطح کلسترول را در محیط کشت کاهش دهد [۲۵].

<sup>1</sup> De-feng

مکانیسم فوق و بواسطه مسیر غیرمستقیم باعث کاهش کلسترول سرم شوند. با این حال مطالعات بیشتری جهت شناسایی مکانیسم عمل این باکتری‌ها لازم است.

از طرف دیگر نتایج تحقیق حاضر همچنین نشان می‌دهد که دوزهای مختلف گونه آنتروکوکوس فاسیوم نیز در غلظت‌های مک فارلند ۲ و ۳ اثری معنی‌داری بر اینترلوکین ۱۰ دارد و بر روی اینترلوکین‌های دیگر اثری نداشته است. نتایج ما نشان دهنده این است که گونه آنتروکوکوس فکالیس باعث افزایش معنی‌داری در سطح اینترلوکین‌های ۶ و ۱۰ می‌شود.

نتایج حاضر نشان‌دهنده آن است که هر دو گونه آنتروکوکوس خصوصاً گونه فکالیس اثر مؤثری بر روی سطح اینترلوکین ۱۰ داشته است ولی اثرات آنها بر اینترلوکین‌های ۲ و ۶ بسیار محدود بوده است بطوری که فقط گونه فکالیس با کدورت معادل ۳ مک فارلند توانسته است سطح اینترلوکین ۶ را افزایش دهد.

نظر بر اینکه اینترلوکین ۲ مربوط به لنفوسیت‌های  $Th_1$  و اینترلوکین‌های ۶ و ۱۰ مربوط  $Th_2$  هستند، می‌توان نتیجه گرفت آنتروکوک‌های جدا شده از پنیر محلی ایران باعث افزایش تعداد لنفوسیت‌های  $Th_2$  شود. اثرات پروبیوتیک‌ها از جمله آنتروکوک‌های پروبیوتیک بر روی سیستم ایمنی بدن در مقالات متعددی گزارش شده است. تحقیقات کارک<sup>۳</sup> نقش آنتروکوک‌های پروبیوتیک را در تکوین و تقویت سیستم ایمنی خوک و مطالعات بنیاکوب<sup>۴</sup> نقش آنتروکوک‌های اضافه شده به غذا را در تقویت سیستم ایمنی در سگ آشکار ساخته است [۱۸، ۱۷].

مطالعات مایر<sup>۵</sup> نشان داد که زنانی که بمدت دو هفته مداوم از ماست حاوی باکتری‌های پروبیوتیک

مطالعات نشان داده که باکتری‌ها می‌توانند کلسترول را از محیط کشت برداشت کنند و با توجه به این خاصیت باکتری‌ها در سال‌های اخیر توجه زیادی به اثرات‌کاهندگی باکتری‌های پروبیوتیک بر روی کلسترول خون صورت گرفته است [۲۹، ۲۸].

باکتری‌های پروبیوتیک از دو مسیر مستقیم و غیرمستقیم کلسترول سرمی را کاهش می‌دهند [۲۹، ۲۷]. در مسیر مستقیم پروبیوتیک‌ها باعث مهار سنتز فاکتورهای هیپوکلسترومیک مانند کلسیم هیدروکسی متیل گلوکاترات و اسید اوریک شده و در نتیجه باعث کاهش جذب کلسترول در روده می‌شود و همچنین با جذب کلسترول در طی رشد و وارد ساختن آن در سیتوپلاسم باکتری کلسترول محیط را کاهش می‌دهند. کلسترول با ورود به سیتوپلاسم و یا اتصال به باکتری کمتر در دسترس قرار گرفته و کمتر توسط سیستم گوارشی جذب و وارد خون می‌شود. تجزیه مولکول کلسترول و استفاده از آن در فرآیندهای متابولیکی یکی دیگر از مکانیسم‌های پروبیوتیک‌ها در کاهش چربی‌های خون می‌باشد [۳۱، ۳۰، ۲۸].

در مسیر غیرمستقیم احتمال می‌رود که باکتری‌های پروبیوتیک برای کاهش سطح کلسترول محیط تولید اسیدهای صفراوی بکنند. تولید اسیدهای صفراوی در نتیجه فعالیت آنزیم هیدرولیز کننده نمک‌های صفراوی<sup>۱</sup> موجود در باکتری‌ها می‌باشد. این اسیدهای صفراوی تولید شده توسط آنزیم باکتریایی می‌توانند کلسترول‌های آزاد را از محیط برداشت کنند [۳۱، ۲۲].

فرانز<sup>۲</sup> و همکاران نشان دادند که آنتروکوک‌ها فعالیت آنزیمی هیدرولیزکننده نمک‌های صفراوی دارند [۳۴]. بنابراین احتمال می‌رود آنتروکوک‌های جداسازی شده از نمونه پنیر محلی اردبیل نیز با

<sup>3</sup> Scharek

<sup>4</sup> Benyacoub

<sup>5</sup> Meyer

<sup>1</sup> Bile salt hydrolase

<sup>2</sup> Franz

تعداد انواع سلول‌های T در بدن می‌شود [۲۶،۲۵]. مطالعات همچنین آشکار ساخته‌اند که پروبیوتیک‌ها می‌توانند آپوپتوزیس را در لنفوسیت‌ها به تأخیر بیندازند و از این طریق نیز باعث افزایش سطح لنفوسیت‌ها در خون شوند [۲۷].

### نتیجه گیری

تحقیق حاضر نشان می‌دهد که پنیر محلی اردبیل حاوی انتروکوکوس‌هایی می‌باشد که فعالیت پروبیوتیک مؤثری بر روی کلسترول خون و سیستم ایمنی بدن دارند. با توجه به نتایج بدست آمده بنظر می‌رسد مصرف پنیر محلی که در فلور طبیعی آن پروبیوتیک‌هایی مانند انتروکوک‌ها حضور دارند، می‌تواند در کنترل کلسترول خون و تقویت سیستم ایمنی بدن مفید واقع گردد.

استفاده کرده‌اند تعداد لنفوسیت‌های T در خون آنها بیشتر از کنترل بود [۲۴]. مطالعه‌ای نشان می‌دهد که تیمار با لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک باعث افزایش لنفوسیت‌های T می‌شود [۲۵].

با این حال مکانیسم دقیق اثر انتروکوک‌ها بر سیستم ایمنی بدن و اثرات تمایزی آنها بر لنفوسیت‌ها و سایتوکاین‌های مختلف هنوز بخوبی شناخته نشده است.

یکی از مکانیسم‌های عمل احتمالی این است که دیواره سلولی پروبیوتیک‌ها دارای ترکیبات محرک بر سیستم ایمنی بدن مانند پپتیدوگلیکان‌ها می‌باشد که باعث افزایش فعالیت سلول‌های مرتبط با سیستم ایمنی در دیواره روده می‌شوند. سلول‌های دندرتی بیان‌کننده آنتی‌ژن یکی از سلول‌های مهم در جدار روده هستند که به حضور پروبیوتیک‌ها جواب داده و با افزایش بیان سایتوکاین‌ها در نهایت باعث افزایش

### References

- 1- Fuller R. Probiotics in human medicine. Gut. 1991 Apr; 32(2):439-45
- 2- Molin G. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. Am J Clin Nutr. 2001 Feb; 73(2): 380-85.
- 3- Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol. 1989 May; 66(5):365-78.
- 4- Goktepe I, Juneja V, Ahmedna M. Probiotics in food safety and human health. J Clin Gastroenterol. 2010 Sep; 44 Suppl 1: 49-53.
- 5- Shah N. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. J Dairy Sci. 2000 May; 83 (4): 894-907.
- 6- Gardiner G, Ross R, Wallace J, Scanlan F, Jagers P, Fitzgerald G, et al. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. J Agric Food Chem. 1999 Dec; 47 (2): 4907-16.
- 7- Saavedra L, Taranto M, Sesma F, de Valdez G. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. Int J Food Microbiol. 2003 Dec; 88(2): 241-5.
- 8- Gelsomino R, Vancanneyt M, Condon S, Swings J, Cogan T. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. Int J Food Microbiol. 2001 Dec; 71(2-3): 177-88.
- 9- Safdar A, Bryan C, Stinson S, Saunders D. Prosthetic valve endocarditis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: treatment with chloramphenicol plus minocycline. Clin Infect Dis. 2002 Jun; 34(11): 61-3.
- 10- Ennahar S, Deschamps N. Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. J Appl Microbiol. 2000 Mar; 88(3): 449-57.



- 11- Alvarado C, Garcia-Almendárez B, Martin S, Regalado C. Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan Mexican-style cheese. *Curr Microbiol.* 2005 Aug; 51(2): 110-5.
- 12- Scharek L, Guth J, Reiter K, Weyrauch K, Taras D. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Vet Immun Immunopathol.* 2005 May; 105(1-2): 151-61.
- 13- Benyacoub J, Czarnecki-Maulden G, Cavadini C, Sauthier T, Anderson R, Schiffrin E, Von der WT. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *J Nutr.* 2003 Apr; 133: 1158-64.
- 14- Efthymiou C, Baccash P, Labombardi V, Epstein D. Improved isolation and differentiation of enterococci in cheese. *Appl Microbiol.* 1974 Sep; 28(3): 417-22.
- 15- Maisnier-patin S, Forni E, Richard J. Purification, partial characterisation and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *Int J Food Microbiol.* 1996 Jul; 30(3): 255-70.
- 16- Drago L, Gismondo M, Lombardi A, Haën C, Gozzini L. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiol Lett.* 1997 Dec; 153:455-63.
- 17- Fooks L, Gibson G. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol Ecol.* 2002 Jan; 39(1):67-75.
- 18- De-feng C, Gui-mei Y, Lin J, Wei-li M, Li-wei F, et al. Cholesterol lowering by enterococcus isolated from the swine gut. *J Beij Univ Agri.* 2009 Apr; 21(1): 123-8.
- 19- Du Toit M, Franz C, Dicks L, Schillinger U, Haberer P, Warlies B, et al. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *Int J Food Microbiol.* 1998 Mar; 40(1-2): 93-104.
- 20- Pereira D, McCartney A, Gibson G. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Aug; 69(8): 43-47.
- 21- Nguyen T, Kang J, Lee M. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int J Food Microbiol.* 2007 Dec; 113:358-61.
- 22- Klaver F, Van der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Apr; 59(4): 1120-8.
- 23- Franz C, Specht I, Haberer P, Holzapfel W. Bile salt hydrolase activity of enterococci isolated from food: screening and quantitative determination. *J Food Prot.* 2001 May; 64(5):725-9.
- 24- Meyer A, Micksche M, Herbacek I, Elmadfa I. Daily intake of probiotic as well as conventional yogurt has a stimulating effect on cellular immunity in young healthy women. *Ann Nutr Metab.* 2006 Jun; 50(3): 282-9.
- 25- Smits H, Engering A, Van der Kleij D, de Jong E, Schipper K, van Capel T, et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *Allergy J Clin Immunol.* 2005 May; 115(6): 1260-7.
- 26- Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina W, Ruthel G, Demmin G, Warfield K, et al. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Nati Acad Sci U S A.* 2005 Feb; 102(8): 2880-5.
- 27- Carol M, Borrueal N, Antolin M, Llopis M, Casellas F, Guarner F, et al. Modulation of apoptosis in intestinal lymphocytes by a probiotic bacteria in Crohn's disease. *J Leukoc Biol.* 2006 May; 79(5): 917-22.

- 28- Mohan B, Kadirvel R, Bhaskaran M, Natarajan A. Effect of probiotic supplementation on serum/yolk cholesterol and on egg shell thickness in layers. *Br Poult Sci.* 1995 Dec; 36: 799-803.
- 29- Agerholm-Larsen L, Bell M, Grunwald G, Astrup A. The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *Eur J clin Nutr.* 2000 Nov; 54(11): 856-60.
- 30- Agerholm-Larsen L, Raben A, Haulrik N, Hansen A, Manders M, Astrup A. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *Eur J clin Nutr.* 2000 Apr; 54: 88-97.
- 31- Nicole MR, Martijn BK. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr.* 2000 Feb; 71(2): 405-411.

## Effects of Enterococci Isolated From Iranian Traditional Cheese on Lipids and Cytokines Levels of Serum in Mice

Solati J<sup>1</sup>, PhD; Sabokbar A<sup>2</sup>, PhD; Vand Yousefi J<sup>2</sup>, PhD; Kalkhorani N<sup>3</sup>, MSc

<sup>1</sup> Corresponding Author: Assistant Prof. of animal physiology, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran. E-mail: solati@kiaau.ac.ir

<sup>2</sup> Assistant Prof. of Microbiology, Dept. of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran.

<sup>3</sup> MSc Student of Microbiology, Dept. of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran.

### ABSTRACT

**Background & Objectives:** Previous studies demonstrated that selected probiotic bacteria elicit beneficial effects in animals. Probiotic bacteria inhibit pathogens growth in the gut, improve lipid metabolism and activate immune system of animals. In the present study Enterococcus spp were isolated from Iranian traditional cheese and their effects on intestine pathogens (*Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*) growth, serum lipids level and activation of immune systems in mice were studied.

**Methods:** Iranian cheese samples were collected from Ardabil province. Enterococci spp were isolated using selective culture mediums and identified using API kites. Inhibitory effects of isolated Enterococci on growth of *Pseudomonas aeruginosa* and intestine pathogens (*Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*) were tested using agar well method. In order to study probiotic activities of isolated bacteria in live animals, NMRI mice were divided into different groups and Enterococci was administrated orally (1 ML/mouse) with doses equal to 2 ( $6 \times 10^8$  cfu/ml) 3 ( $9 \times 10^8$  cfu/ml) and 4 ( $12 \times 10^8$  cfu/ml) MacFarland standard for 2 weeks. After two weeks continues treatment, blood samples were collected from retroorbital sinus and serum levels of cholesterol, triglycerides, LDL and HDL measured using enzymatic method. Interleukins (IL-2, IL-6 and IL-10) levels were measured using ELISA kites.

**Results:** Results of this study demonstrated that treatment with faecium species decreases serum cholesterol and increases serum IL-10 level, while it has not showed significant effects on serum levels of glucose, triglycerides, IL-2 and IL-6 ( $p < 0.05$ ). Administration of faecalis species have no significant effects on lipid levels of serum ( $p < 0.05$ ). Moreover, results revealed that treatment with faecalis species increased IL-6 and IL-10 ( $p < 0.05$ ). None of the species affected pathogens growth significantly ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results obtained from current study demonstrate that continues treatment with both species can affect immune functions of animal by altering the cytokines profile and treatment with faecium species decreases serum level of cholesterol.

**Key words:** Entrococci, Lipids, Cytokines