

## بررسی اثر لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD2 بومی ایران بر میزان قند خون در رت نر نژاد ویستار دیابتی

حمید بادکوبه<sup>۱</sup>، پروانه جعفری<sup>۲</sup>، ندا اکبری<sup>۲</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اراک، کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، اراک، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی اراک، استادیار گروه میکروبیولوژی، اراک، ایران. P-jafari@iauarak.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۱۵

### چکیده

زمینه و هدف: دیابت افزایش مزمن قند خون است که به دلیل عدم ترشح انسولین و یا عدم توانایی سلول‌ها در استفاده از انسولین روی می‌دهد. در این بیماری به واسطه مشکلات زیاد درمان‌های شیمیایی، یافتن روش‌های نوین درمانی با اثرات جانبی کمتر حائز اهمیت است. پروبیوتیک‌ها نیز دارای فعالیت متنوع زیستی از جمله فعالیت ضد دیابت می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD2 بر شاخص قند خون در موش دیابتی نر بود.

روش کار: برای انجام این آزمایش از ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد که به چهار گروه: دو گروه کنترل شامل گروه سالم، گروه دیابت، و به دو گروه آزمون شامل گروه سالم دریافت کننده پروبیوتیک و گروه دیابتی دریافت کننده پروبیوتیک تقسیم شدند. دیابتی کردن رت‌ها با تزریق درون صفاقی ۶۰ mg/kg استرپتوزوسین صورت پذیرفت. به رت‌های گروه آزمون به مدت ۲۱ روز لاکتوباسیلوس کازئی TD2 به میزان  $10^8$  cfu/ml به صورت گاوژ درون معده داده شد. در نهایت پس از خونگیری، میزان گلوکز خون رت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که لاکتوباسیلوس کازئی TD2 به طور معنی‌داری ( $p < 0.001$ ) سبب کاهش قند خون در موش‌های دیابتی شده، ولی تغییر معنی دار قند خون در موش‌های کنترل سالم دریافت کننده پروبیوتیک را موجب نگردید. نتیجه گیری: نتایج حاصل پیشنهاد می‌کنند که لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD2 در پیشگیری از افزایش قند سرم در موش‌های دیابتی، مفید و موثر باشند.

واژه‌های کلیدی: دیابت، پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس کازئی

### مقدمه

رتینوپاتی و سکته مغزی و قلبی و نقص عضو منجر شود (۹). امروزه روش‌های متعدد درمانی برای این بیماری به کار گرفته می‌شود که همراه عوارض جانبی گوناگون است. از این رو یافتن روش‌های نوین برای پیشگیری و درمان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و مشخصی هستند که اگر به میزان کافی مورد مصرف قرار گیرند می‌توانند اثرات سلامت‌زایی برای میزان داشته باشند (۶). باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک، به ویژه لاکتوباسیلوس‌ها به طور عادی جزء اکوسیستم دستگاه گوارش محسوب می‌شوند. اثرات بالقوه اثبات شده

دیابت ملیتوس (melitus) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های متابولیکی شایع در سطح جهان است. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی حدود ۱۷۱ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به این بیماری هستند که پیش بینی شده تا سال ۲۰۳۰ این تعداد به ۳۶۶ میلیون نفر افزایش می‌یابد (۱۲). هر نوع اختلال در عملکرد سلول‌های بتا پانکراس باعث بروز هیپرگلیسمی می‌گردد که در صورت مداخله سیستم ایمنی در بروز این اختلالات، دیابت نوع ۱ و در صورت بروز مقاومت گیرنده سلول‌ها به انسولین، دیابت نوع ۲ نامیده می‌شود (۳). این بیماری می‌تواند به مشکلاتی نظیر نفروپاتی، نوروپاتی،

اندازه گیری و رت‌هایی با قند خون بیش از ۲۰۰ mg/dl به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند.

#### تهیه پروبیوتیک

لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD2 جدا شده از ترخینه از شرکت تک ژن به صورت پودر لیوفیلیزه تهیه گردید. سپس باکتری در محیط MRS براث کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری، به منظور اطمینان از خالص بودن، باکتری در محیط MRS آگار کشت و در نهایت با رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز و اکسیداز، اطمینان حاصل شد که باکتری مذکور باسیل گرم مثبت از جنس لاکتوباسیل می‌باشد. به جهت گاوژ کردن رت‌ها ابتدا باکتری در حجم ۵ لیتر در محیط کشت MRS براث کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در انکوباتور حاوی ۱۰٪ دی‌اکسیدکربن، سلول‌ها با سانتریفوژ با دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه جدا و ۳ بار با بافر فسفات شستشو داده شدند. در نهایت رسوب سلولی به پودر شیر خشک چربی گرفته شده مخلوط و در دستگاه فریز درایو خشک و در نهایت با تهیه سریال رقت، میزان باکتری زنده در هر گرم از محصول خشک حاصله تعیین گردید. روزانه پودر حاصله در بافر فسفات با pH برابر ۷/۲ سوسپانسیون گردید تا از غلظت  $10^9$  cfu/ml از باکتری حاصل شد. رت‌ها به مدت ۲۱ روز با ۱ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری به صورت درون معدی گاوژ شدند. لازم به ذکر است که به رت‌هایی که پروبیوتیک نمی‌گرفتند نیز هر روزانه با ۱ از میلی لیتر بافر فسفات گاوژ شدند.

#### اندازه گیری وزن و قند خون

به منظور بررسی میزان تغییرات وزنی گروه‌ها، تمامی رت‌ها در ابتدا و انتهای آزمون با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شدند. در انتهای دوره آزمون یعنی پس از تمام ۲۱ روز، رت‌ها بعد از ۱۲ ساعت

میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک شامل کمک به هضم لاکتوز در روده، اسهال، یبوست، کاهش کلسترول، اثر مهاری سرطان کولون، تقویت سیستم ایمنی، تحریک رشد میکروفلور روده باریک، پیشگیری از واکنش‌های ازدیاد حساسیت و جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها در روده می‌باشد (۱۱، ۱۰). با توجه به اثرات مفید پروبیوتیک‌ها و شیوع روز افزون دیابت و پژوهش‌های نادر در این موضوع، این پژوهش با هدف تاثیر لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD2 در کاهش قند خون در رت‌های دیابتی صورت گرفت تا بتوان اثر و استفاده از پروبیوتیک‌ها در درمان دیابت را مشخص نمود.

#### مواد و روش‌ها

##### نگهداری حیوانات و گروه‌بندی آن‌ها

در این آزمایش ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد آلبینو ویستار با محدوده وزنی ۱۸۰-۲۵۰ گرم از انستیتو پاستور تهیه گردید. حیوانات برای سازگاری به مدت ۲ هفته قبل از آزمایش حیوانات مورد مطالعه در دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی گراد با شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. سپس رت‌ها به چهار گروه شامل گروه کنترل منفی سالم، گروه کنترل مثبت دیابتی، و دو گروه آزمون سالم دریافت کننده پروبیوتیک و گروه دیابتی دریافت کننده پروبیوتیک تقسیم گردیدند.

##### آماده سازی حیوانات دیابتی و نحوه انجام آزمایش

برای ایجاد دیابت از ماده استرپتوزتوسین با نام تجاری زوناسر خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا استفاده شد. دوز داروی به کار برده شده برای دیابتی کردن ۶۰ mg/kg از وزن بدن بود. دارو پس از حل کردن در سدیم کلراید ۰/۹٪ به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. برای اطمینان از دیابتی شدن، قند خون موش‌ها با استفاده از دستگاه گلوکومتر استار

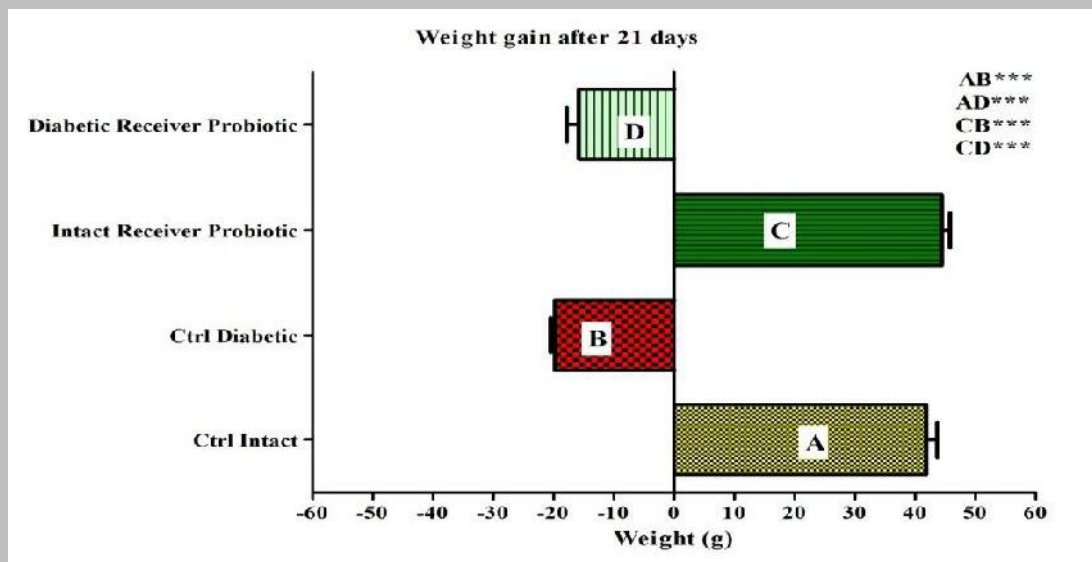
### نتایج

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که رت‌های دیابتی به صورت معنی‌داری نسبت گروه‌های سالم دچار کاهش وزن شده‌اند ( $P < 0/0001$ ). مصرف پروبیوتیک در گروه سالم دریافت‌کننده پروبیوتیک سبب تغییر معنی‌داری در وزن موش نسبت به گروه کنترل سالم نداشته است ( $P < 0/2872$ ) (نمودار ۱).

محرومیت از غذا، با قرارگیری داخل دیسکاتور با استفاده از اتر بیهوش و خون‌گیری از قلب حیوانات صورت گرفت. سپس سرم خون نمونه‌ها جدا و با استفاده از کیت تشخیصی قند خون پارس آزمون با دستگاه اتوآنالیزور آلفا کلاسیک یو، میزان قند خون اندازه‌گیری شد.

### تحلیل آماری

تمامی داده‌ها از نظر آماری با استفاده از نرم افزار ANOVA و GraphPad Prism 5 و t-test و آزمون‌های ANOVA یکطرفه تجزیه و تحلیل شدند.

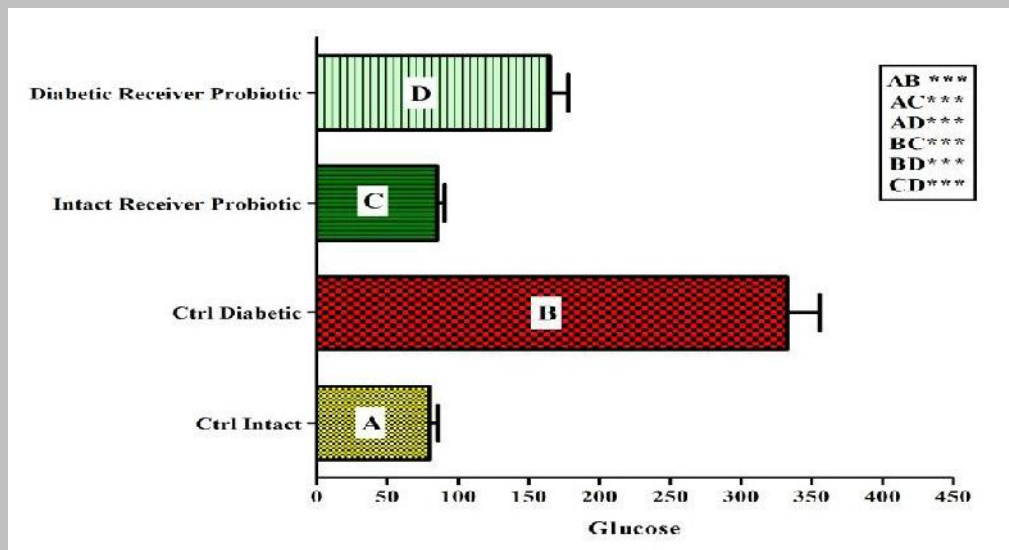


نمودار ۱- مقایسه میانگین وزن رت‌های گروه‌های مختلف

کنترل دیابتی به صورت معنی‌داری کاهش یافته بود ( $P < 0/0001$ ). اما این میزان به صورت معنی‌داری بیشتر از قند خون رت‌های سالم بود ( $P = 0/0002$ ). لازم به ذکر است که در گروه سالم دریافت‌کننده پروبیوتیک، تغییر معنی‌داری در میزان قند خون نسبت به گروه سالم مشاهده نشد ( $P < 0/5258$ ) (نمودار ۲).

### میزان قند خون

در نتایج به دست آمده در روز ۲۱ مشخص گردید که میزان قند خون در رت‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ( $P < 0/0001$ ). در رت‌های دیابتی تیمار شده با پروبیوتیک، بهبود علائم دیابت شامل پرنوشی و پرادراری به خوبی مشخص گردید. تحلیل قند خون نیز نشان داد که در این گروه قند خون نسبت به گروه



نمودار ۲- مقایسه میانگین قند خون در رت‌های گروه‌های مختلف

### بحث و نتیجه‌گیری

در سال ۲۰۰۷ یاداو و همکارانش اثر ضد دیابت محصول پروبیوتیکی Dahi حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و اسیدوفیلوس را بر رت‌های دیابتی شده با فروکتوز بررسی کردند و نشان دادند که پروبیوتیک به کار گرفته سبب کاهش قند خون و عدم تحمل گلوکز می‌شود (۱۳). هم‌چنین آنان در پژوهشی دیگر بر رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوسین نشان دادند که میزان قند خون به طور معنی داری با این پروبیوتیک کاهش می‌یابد که علت این امر را به تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی توسط پروبیوتیک‌ها و در نتیجه کاهش تخریب سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس نسبت دادند (۱۴). در سال ۲۰۰۷ لالی و همکارانش نشان دادند که محصول نانو حاوی لاکتوباسیلوس سبب کاهش قند خون در موش‌های دیابتی شده با الوکسان می‌گردد (۵). در سال ۲۰۰۹ هاریسا و همکارانش نشان دادند که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس سبب کاهش رادیکال‌های آزاد و گونه‌های واکنش‌گرهای اکسیژن می‌شود. این ترکیبات واکنش‌گر باعث اختلال در سطح اسید

نیتریک در رت‌های دیابتی می‌گردد. اکسید نیتریک واسطه مهم در ترشح هورمون‌ها و تحریک سیستم ایمنی است. به عبارت دیگر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس سبب کاهش قند خون و تعدیل اکسید نیتریک در رت‌های دیابتی شده با آلوکسان گردیده است (۴). در سال ۱۹۹۷ ماتزوکی و همکارانش نشان دادند که لاکتوباسیلوس کازئی در موش‌های KK-AY که به صورت ژنتیکی مبتلا به دیابت نوع ۲ بودند سبب کاهش قند خون گردید (۸). در این مطالعه تاثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی سویه TD2 بر قند خون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان قند خون در رت‌هایی دیابتی پس از ۲۱ روز مصرف پروبیوتیک نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش معنی داری داشت اما نسبت به گروه‌های کنترل سالم و سالم دریافت کننده پروبیوتیک میزان قند خون بالا بود. این نشان دهنده آن بود که این سویه پروبیوتیک به طور کامل باعث درمان دیابت نمی‌شود اما می‌توان به عنوان درمان کنترل کننده استفاده شود. مکانیسم‌های متفاوتی برای کاهش کلسترول توسط پروبیوتیک‌ها پیشنهاد

به طور کلی پروبیوتیک‌ها با تاثیرات مفید در درمان التهاب حاد معده- روده، اسهال، یبوست، سندروم روده تحریک پذیر، سرطان کلورکتال و غیره مورد توجه قرار گرفته‌اند. پروبیوتیک‌ها به عنوان یک مکمل غذایی بوده ولی می‌توان از آن در صنعت دارویی به عنوان داروهای کمکی با عوارض جانبی اندک، جهت کاهش قند خون استفاده نمود. نتایج این تحقیق نیز نشان دهنده کارایی لاکتوباسیلوس کازئی TD2 به جهت کنترل قند خون در رت‌های دیابتی بود. هم‌چنین نتایج نشان داد که این پروبیوتیک در رت‌های سالم سبب کاهش قند خون نمی‌شود که این امر از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. از این رو به نظر می‌رسد محصولات تهیه شده از این پروبیوتیک می‌تواند به عنوان یک مکمل دارویی مناسب برای کنترل قند خون مورد توجه قرار گیرد. البته لازم به ذکر است که تعیین مکانیسم دقیق و تعیین میزان دوز مناسب مصرف این پروبیوتیک، نیازمند پژوهش‌های کلینیکی بیشتر می‌باشد.

شده است. احتمالاً با افزایش لاکتوباسیل در روده باریک میزان تقاضا برای گلوکز نیز زیاد و در نتیجه باعث کاهش میزان غلظت گلوکز رها شده در سرم و اندام‌های مختلف حیوان می‌شود (۱۳، ۵). هم‌چنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌ها مانع از تخریب سلول‌های بتا لانگرهانس و در نتیجه کاهش گلوکز سرم می‌شوند (۴). ترکیب میکروفلور روده در تعیین میزان التهاب که در دیابت نقش دارند موثر است بدین صورت که وقتی تعادل در میکروفلور روده از بین می‌رود نسبت باکتری‌های گرم مثبت به گرم منفی در روده کاهش می‌یابد در نتیجه میزان جذب لیپوبلی ساکاریدها و سایر مولکول‌های پیش التهابی و انتقال آن‌ها به گردش خون افزایش می‌یابد و همین موضوع باعث افزایش ترشح سیتوکین‌ها، فعالیت ماکروفاژها و بروز التهاب در بدن می‌شود. سیتوکین‌های التهابی باعث اختلال در عملکرد گیرنده‌های انسولین و در نتیجه باعث مقاومت به انسولین می‌گردد، هم‌چنین با القای آپوپتوز سلول‌های بتا پانکراس باعث کاهش ترشح انسولین توسط این سلول‌ها می‌شود (۷، ۲، ۱).

## منابع

1. Bäckhed, F. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44); 15718-15723.
2. Cani, P. D. (2007). Selective increases of *Bifidobacteria* in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 50(11); 2374-2383.
3. Farvid, M. (2006). The impact of vitamin C and E, magnesium and Zinc on glycemic control and insulin resistance in type II diabetic patients. *Tehran University Medical Journal*, 64(10); 67-75.
4. Harisa, G. (2009). Oral administration of *Lactobacillus acidophilus* restores nitric oxide level in diabetic rats. *Aust J Basic and Appl Sci*, 3; 2963-2969.
5. Laleye, S. (2008). Antidiabetic effect of nono (a nigerian fermented milk) on alloxan-induced diabetic rats. *American Journal of Food Technology*, 3; 394-398.
6. Lin, W.-H. (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, 13(3); 107-113.
7. Lye, H.-S. (2009). The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *International journal of molecular sciences*, 10(9); 3755-3775.
8. Matsuzaki, T. (1997). Antidiabetic effects of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-Ay mice. *Endocrine journal*, 44(3); 357.
9. Mahan, L. K., Escott-Stump, S. (2004). *Krause's food, nutrition, & diet therapy*.

10. McCartney, A. L. (1996). Molecular analysis of the composition of the *Bifidobacterial* and *Lactobacillus* microflora of humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12); 4608-4613.

11. Olson, D., Aryana, K. (2008). An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. *LWT-Food Science and Technology*, 41(5); 911-918.

12. Wild, S. (2004). Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and

projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5); 1047-1053.

13. Yadav, H. (2007). Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*, 23(1); 62-68.

14. Yadav, H. (2008). Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of Dairy Research*, 75(2); 189.

