تاثیر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس روتری* جدا شده از محصولات لبنی بر مدل رت-های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

الهام امینیان[1]، الهام معظمیان[2]*، محمدامین عدالت منش[3]

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز، دانشگاه ازاد اسلامی، شیراز، ایران.

۲. گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز، دانشگاه ازاد اسلامی ، شیراز، ایران.

۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز، دانشگاه ازاد اسلامی، شیراز، ایران.

***نویسنده مسئول:** *elhammoazamian@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۰

چکیده

با توجه به شیوع روز افزون دیابت نوع۲، پژوهش کنونی با هدف تاثیر لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از محصولات لبنی بر قندخون در رت‌های دیابتی شده انجام شد. جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها از محصولات لبنی با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی انجام شد. در این پژوهش تیمار بر روی ۴۹ راس رت نر ویستار با سـن تقریبـا ۶ تا ۸ هفته ای انجام شد. رت‌ها در ۷ گروه ۷ تایی تقسیم بندی شدند . که در گروه مداخله از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* استفاده شد. در پایان ۴ هفته تغییرات وزنی و قند خون رت‌ها نسبت به گروه کنترل مثبت و کنترل منفی بررسی و اندازه گیری شد. تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ، آزمون کای‌دو یا آزمون دقیق فیشر برای مقایسهٔ متغیرها انجام گردید. نتایج نشان داد در طی یک ماه که رت‌ها تحت تاثیر باکتری‌های لاکتوباسیلوس بودند حداکثر وزن در هفته چهارم و کمترین وزن در هفته اول پژوهش را داشتند. در گروه‌هایی که مصرف همزمانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم و روتری* را داشتند کاهش معناداری در سطح قند خون مشاهده گردید. مطالعه حاضر نشان داد که مداخله لاکتوباسیلوس‌ها بدون تغییر رژیم غذایی و یا اعمال رژیم غذایی خاص در رت‌ها، می تواند باعث کاهش معنادار قند خون در گروه مصرف کننده باکتری شود. با توجه به اثر باکتری های مورد مطالعه در کاهش قند خون می توان ادعا کرد که لاکتوباسیلوس‌ها بعنوان راه درمان کمکی در بیماران مبتلا به دیابت نوع۲ می‌توان با انجام مطالعات بیشتر پیشنهاد نمود.

کلید واژه ها: لاکتوباسیلوس، محصولات لبنی، تغییرات وزنی، قند خون، دیابت نوع۲.

مقدمه

دیابت به عنوان یکی از شایعترین بیماری‌ها در سرتاسر جهان محسوب می‌شود. این بیماری یک نوع اختلال در سوخت و ساز بدن است. دخالت سیستم ایمنی باعث بروز دیابت نوع یک می‌شود و تخریب سلول‌های بتای پانکراس سبب عدم ترشح انسولین و یا ترشح انسولین به میزان بسیار کم در دیابت نوع ۲ یا دیابت شیرین می‌شود. امروزه از روش‌های متعددی همچون استفاده از داروهای شیمیایی و هورمونی برای درمان این بیماری استفاده می‌گردد، که این درمان‌ها دارای عوارض زیادی هستند. به همین دلیل استفاده از روش-های درمانی جدید با عوارض جانبی کم بسیار مهم می-باشد (David et al., 2014; Bril et al., 2013) پروبیوتیک‌ها گروهی از میکروارگانیسم‌ها هستند که آثار سودمندی بر سلامت میزبان خود دارند. این باکتری‌ها به عنوان فلورمیکروبی به طور طبیعی در روده حضور دارند و همچنین جزءغذاهای فراسودمند محسوب می‌شوند (Bahmani et al., 2019; Herich et al., 2012) پروبیوتیک‌ها اثرات سودمندی همچون پیشگیری یا کنترل اسهال، یبوست، کاهش التهاب، عدم تحمل لاکتوز، سندرم روده تحریک‌پذیر، تحریک سیستم ایمنی و دیابت شیرین را برای میزبان خود به

ارمغان می آورند (Davari et al., 2010; Wu 2014).

از مهمترین باکتری‌های پروبیوتیک شناخته شده لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم ها می باشند. تأثیر لاکتوباسیلوس ها بر سوخت و ساز گلوکز به دلیل خاصیت کاهش ایمنی توسط این میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (Sharma et al., 2012).

آسمی و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر ماست غنی شده با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* را بر انسولین خون و مقاوت انسولینی بررسی نمودند. که باعث افزایش معناداری در سطوح انسولین خون و وزن افراد شد (Asemi et al., 2013). کنی و همکاران گزارش نمودند که بیفیدوباکترها و لاکتوباسیلوس‌ها سبب افزایش تحمل گلوکز شده و در گروهی از رت‌ها سطح گلوکز خون کاهش معناداری یافته است (Cani et al., 2015).

مکانیسم اثر پروبیوتیک بر شاخص قند خون به طور واضح مشخص نیست، در مطالعه‌ای اثر پروبیوتیک را در رت‌هایی که با دریافت رژیم غنی از فروکتوز به دیابت نوع دو مبتلا شده بودند را به مدت ۸ هفته بررسی کرده‌اند. در بررسی آنها مصرف پروبیوتیک، منجر به تأخیر آشکار در شروع عدم تحمل گلوکز، هیپرگلیسمی، هیپرانسولینمی، نسبت به گروه شاهد شده است (Yadav et al., 2007). با این حال مکانیسم آن هنوز جای بحث بسیاری، به خصوص در مطالعات انسانی دارد. اثرات هایپوکلسترولمی لاکتوباسیلوس‌ها در مطالعات مختلف نشان داده شده است(Ejtahed et al., 2011; Asemi et al., 2013).

احتمالا دکانژوگه شدن نمک‌های صفراوی و کاهش جذب کلسترول توسط باکتری‌ها را مکانیزم اصلی کاهش کلسترول توسط *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* می باشد (Yadav et al., 2008).

بنابراین گمان می‌رود لاکتوباسیلوس ها می‌توانند باعث بهبود دیابت در بیماران دیابتی گردند و به عنوان یک مکمل برای درمان این بیماران به کار برده شوند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از محصولات لبنی بر روند کاهش قند خون در رت‌های دیابتی شده می باشد.

روش‌کار

جمع آوری نمونه و جداسازی باکتری

در این مطالعه آزمایشگاهی پس از نمونه‌برداری از ۵۰ محصول لبنی سنتی استان فارس (شامل ماست، پنیر، سرشیر، دوغ، کشک و شیر) درون ظروف کاملاً استریل و نمونه‌ها در مجاورت یخ و در کمتر از ۱۰ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. سویه استاندارد لاکتوباسیلوس روتری از مرکز کلکسیون میکروبی تهران با کد PTCC 1058 تهیه گردید. محیط کشت اختصاصی برای باکتری‌های لاکتوباسیلوس محیط MRS است که از شرکت (کیولب، کانادا) تهیه و برای جداسازی سویه-های باکتری کشت آمیخته در این محیط انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت، در دمای $37\ ^0C$ در شرایط میکروآئروفیل درون کندل جار در انکوباتور قرار گرفتند. با توجه به این‌که فرآورده‌های لبنی دارای طیف وسیعی از میکروب‌ها هستند، غربال این باکتری‌ها به صورت تک‌تک بسیار زمان‌بر است. بنابراین، به منظور حذف باکتری‌های غیرپروبیوتیکی محیط اسیدی گردید. سپس ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت استفاده شده در مرحله قبل را به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و به رسوبات حاوی میکروب ۲۰ میلی لیتر محلول بافر نمک فسفات اسیدی PBS با pH ۲/۵ اضافه گردید. در مرحله بعد گرمخانه‌گذاری در دمای 37^oC و در شرایط میکروائروفیل به مدت ۲ ساعت انجام شد. پس از ۱۵ دقیقه سوسپانسیون را با دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ و سلول‌ها از محلول جداسازی شدند. در این مرحله بعد از ۲ باز شستشو و سانترفیوژ رسوب با بافر نمک فسفات خنثی،

سلول‌ها به محیط MRS آگار منتقل شد و در کندل جار به مدت ۷۲ ساعت در گرمخانه قرار گرفتند، کلنی-هایی که رشد کردند به وسیله ۲ تا ۳ بار کشت خطی خالص شدند و رنگ آمیزی گرم انجام شد (Yi et al., 2019).

آزمایشات بیوشیمیایی

تشخیص سویه‌های باکتریایی خالص شده از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی و تست‌های رایجی مانند کاتالاز، اکسیداز، SIM، سیترات، ایندول و همچنین از نظر تولید H_2S، سولفور و تریپتوفاناز صورت گرفت. به علاوه آزمون‌های بیوشیمیایی مانند تخمیر قندهای مختلف شامل گلوکز، مانوز، اینوزیتول، سوربیتول، ساکارز، آرابینوز، آمیلوز و رامنوز از طریق کیت API20E انجام شد (Xie et al., 2017).

شناسایی مولکولی

بدین منظور استخراج DNA با استفاده از کیت (یکتا تجهیز آزما- ایران) بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. برای شناسایی دقیق تر و جهت تکثیر از پرایمرهای اختصاصی لاکتوباسیلوس و تکثیر ژن 16S rDNA استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad-USA) انجام گرفت. تمام اجزا واکنش از شرکت یکتا تجهیز آزما خریداری گردید. مخلوط واکنش شامل: ۲۵ ماکرولیتر Master Mix (شامل بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، کلرید منیزیم dNTP ، آنزیم Taq DNA پلی مراز) ۳ ماکرولیتر DNA، ۲ ماکرولیتر پرایمر رفت FLB190 (5′- AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG -3′)، ۲ ماکرولیتر پرایمر برگشت RLB190 (5′- CGG TAT TAG CATG TTT CC -3′) با غلظت ۱۰ پیکومول و ۱۸ ماکرولیتر آب می باشد (Soltani Kordsholi et al., 2019). در این تکنیک برای آغاز فرایند پلیمریزاسیون دستگاه ترمال سیکلر به مدت ۱ دقیقه بر روی دمای ۹۴ درجه سلسیوس تنظیم گردید و متعاقباً ۳۵ سیکل PCR به صورت ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس برای مدت ۱ دقیقه اجرا گردید. در نهایت به مدت ۴ دقیقه نیز عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. سپس جهت اطمینان از تکثیر ژن 16SrDNA، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱درصد، حاوی بافر TBE 1X به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ انجام شد. در نهایت جهت مشاهده نتایج ژل از دستگاه UV Transilluminator-USA استفاده گردید (Moazamian et al., 2018; Yadav et al., 2007).

توالی یابی و سکانس DNA

با توجه به باندهای ایجاد شده بروی ژل آگارز و مقایسه با کنترل مثبت، DNA نمونه های انتخاب شده برای توالی یابی به شرکت توپاژن ارسال گردید. نتیجه سکانس باتوالی های موجود دربانک ژن در سایت NCBI با برنامهNucleotide BLAST آنالیز گردید.

آماده سازی حیوانات دیابتی و نحوه انجام آزمایش

این تحقیق در حیوان خانه دانشگاه اسلامی واحد شیراز با رعایت اصول اخلاق در پژوهش صورت پذیرفت. در ابتدا ۴۹ رت نر نژاد ویستار با سن ۶ تا ۸ هفته و وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۵۰ گرم از محل انستیتو رازی خریداری شد و در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. همه رت ها در شرایط یکسان ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به صورت متناوب، دمای 25 ± 2^0C در شرایط تغذیه‌ای یکسان نگهداری شدند. آب و غذای استاندارد به صورت آزاد در اختیار رت ها قرار گرفت و رت ها در مدت زمان ۲ هفته به شرایط جدید سازگاری پیدا کردند. پس از این دوره مطالعه بر روی رت ها انجام شد (Yadav et al ., 2008). کد کمیته اخلاق اخذ شده از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز ۱۶۳۳۰۵۰۷۹۵۱۰۰۶ می باشد.

رتها به چهار گروه اصلی تقسیم شدند:

۱- کنترل مثبت: رت دیابتی شده بدون درمان (گروه G)

۲- کنترل منفی: رت سالم با مصرف هر دو لاکتوباسیلوس (پلانتاروم و روتری) (گروهF)

۳- کنترل منفی رت سالم بدون مصرف لاکتوباسیلوس (گروهE)

۴-گروه تیمار: که شامل سه گروه مختلف می باشد (گروه A،B و

گروه A: رت‌های دیابتی شده که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دریافت نمودند.

گروهB: رت‌های دیابتی شده که *لاکتوباسیلوس روتری* دریافت نمودند.

گروهD: رت‌های دیابتی شده که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس روتری* دریافت نمودند (Choi et al., 2014).

نحوه دیابتی کردن رت‌ها

به منظور دیابتی کردن رت‌ها از استرپتوزتوسین (ساخت شرکت سیگما، آمریکا) استفاده شد. استرپتوزتوسین را در سدیم کلرید دو با دوز ۴۰ میلی-گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به صورت تزریق درون صفاقی به رت ها تزریق شد، پس از ۴۸ ساعت علائم دیابت مانند نوشیدن مایعات به مقدار زیاد، کاهش وزن و افزایش حجم ادرار در رت‌ها پدیدار شد. جهت تأیید دیابتی شدن رت از دستگاه گلوکومتر استفاده شد و رت‌هایی با قند خون $200\,^{ml}/_{dl}$ به عنوان رت‌های دیابتی در نظر گرفته شدند (Yadava et al., 2016).

کشت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و روتری جهت گاواژ به رت‌ها

ابتدا خالص بودن لاکتوباسیلوس‌ها از طریق کشت در محیط *MRS*، تست اکسیداز، کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم تأیید شد. به منظور گاواژ کردن باکتری‌ها، کشت باکتری با حجم ۵۰ میلی‌لیتر در محیط *MRS* براث انجام شد. سپس در انکوباتور، ۴۸ ساعت گرمخانه-گذاری شد و جداسازی سلول‌ها توسط ۱۵ دقیقه سانترفیوژ با دور ۶۰۰۰ *rpm* صورت گرفت.

در مرحله بعد ۳ مرتبه شستشو بافر فسفات انجام شد. به منظور اندازه‌گیری باکتری‌های زنده تهیه سریال رقت انجام شد، و محلول حاصله در بافر فسفات به صورت روزانه سوسپانسیون شد. رت‌ها به مدت ۲۸ روز به وسیله لاکتوباسیلوس ها با غلظت $5\times 10^8 cfu/ml$ تیمار شدند و رت‌هایی که باکتری دریافت نمی‌کردند هر روز با ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات گاواژ گردیدند. در طی مدت آزمایش رت‌ها هر هفته وزن‌کشی شدند تا تغییرات وزنی آنها بررسی شود. پس از انجام این مراحل با خون‌گیری از قلب رت‌ها قند خون مجدداً اندازه‌گیری شد (Yadava et al., 2016).

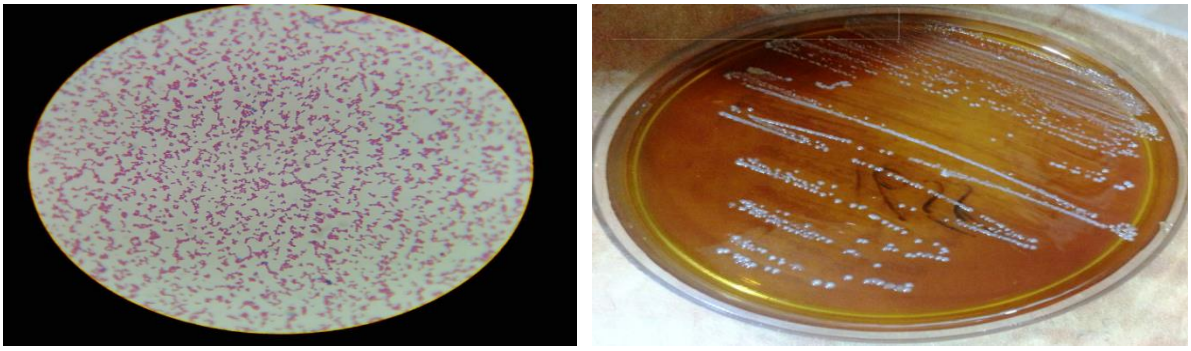
آنالیز اماری

داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۱۷(شرکت SPSS، شیکاگو، ایلینوی، ایالات متحدهٔ آمریکا) تجزیه و تحلیل شدند. آزمون کای‌دو و آزمون دقیق فیشر و ANOVa برای مقایسهٔ متغیرها و آزمون واریانس یک طرفه تدارک دیده شد و ارزش احتمال (P value) ۰/۰۵ به لحاظ آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیلوس*

مرفولوژی کلنی باکتری های *لاکتوباسیلوس* دارای اندازه های مختلف بسیار کوچک، کوچک و متوسط هستند. کلنی این باکتری ها کروی شکل، سفیدرنگ، نرم، صاف، صیقلی، مات و برخی خشک و ناصاف هستند. لاکتوباسیلوس‌ها، باسیل‌های جفت جفت و دوتایی کوتاه با زمینه بنفش مشاهده شد (شکل ۱).

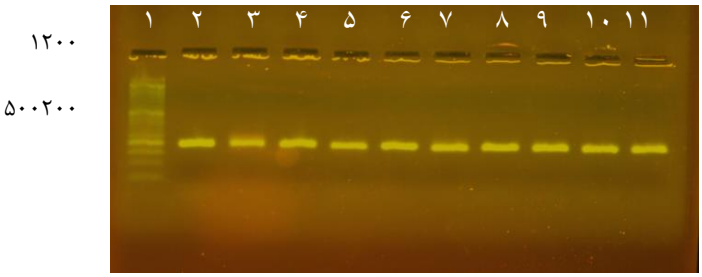


شکل۱. سمت راست: کلنی *لاکتوباسیلوس* روتری، سمت چپ: رنگ امیزی گرم لاکتوباسیلوس با بزرگنمایی ۱۰۰×

نتایج شناسایی با استفاده از تست های بیوشیمیایی برای تایید و شناسایی ایزوله های لاکتوباسیلوس‌ها تست کاتالاز، اکسیداز و سیترات انجام شد که نتایج منفی بود. حرکت باکتری پس از تلقیح و انکوباسیون SIM مورد بررسی قرار گرفت. این باکتری فاقد حرکت بوده و قادر به تولید H2S و آنزیم تریپتوفاناز نمی باشد و در نتیجه توانایی تولید اندول را ندارد که با معرف کواکس مشخص گردید پس از اضافه کردن معرف کواکس بر روی محیط و تشکیل حلقه زرد و همچنین عدم رشد باکتری در اطراف خط تلقیح نشانه منفی بودن تست است. نتایج تخمیر قندهای مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: نتایج تخمیر قندها

باکتری	گلوکز	مانوز	اینوزیتول	سوربیتول	رامنوز	ساکاروز	آمیلوز	آرابینوز
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	+	+	−	+	−	+	−	+
لاکتوباسیلوس روتری	+	+	−	+	−	+	+	+



شکل ۲: نتایج الکتروفورز محصول PCR. ستون ۱: مارکر ۵۰جفت بازی سیناژن، ستون۲: کنترل مثبت *لاکتوباسیلوس روتری*، ستون های ۳-۱۱: ایزوله های *لاکتوباسیلوس*.

نتایج شناسایی مولکولی

باند محصول واکنش ایزوله های لاکتوباسیلوس ۱۹۰ جفت باز می باشد. نتایج شناسایی مولکولی ایزوله های لاکتوباسیلوس‌ها در شکل ۲ آورده شده است.

نتایج تعیین توالی

بعد از انجام PCR، محصول واکنش تعیین توالی و BLAST گردید. نتایج BLAST ۹۹درصد تشابه را با باکتری لاکتوباسیلوس روتری و ۹۷درصد تشابه با لاکتوباسیلوس پلانتاروم سویه *KCC*-30 نشان داد. نتایج نشان داد از ۱۶ایزوله لاکتوباسیلوس، ۴ ایزوله *ل.*

روتری و ۷ ایزوله ل. *پلانتاروم* شناسایی از ماست های سنتی جداسازی شد.

نتایج اندازه گیری وزن رت‌های مورد پژوهش

نتایج نشان داد در تمامی گروه ها در هفته ی آخر، وزن رت ها افزایش یافته و بیشترین تغییرات وزنی در گروه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و کمترین تغییرات وزنی در گروه کنترل منفی بدون مصرف لاکتوباسیلوس مشاهده گردید (جدول ۲).

جدول۲. میانگین و انحراف استاندارد وزن رت به گرم در تمام گروه ها در هفته های مورد مطالعه

وزن گروه ها	وزن اولیه	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم
A	7/07	184/00±6/37	9/83	11/20110	11/92
	170/00± 20/20	19/31	196/00± 21/71		219/25± 21/25
B	177/50± 7/50	186/25± 178/75± 2/50	194/25± 3/82	201/00± 195/75± 25/07	208/75± 10/89
D	171/25± 6/68	163/00± 9/09	185/00± 7/61	184/50± 14/47	201/00± 7/13
E	161/00± 7/58	165/75± 8/95	168/00± 8/95	173/50± 4/79	182/25± 5/56
F	164/75± 15/54	14/88	176/25± 12/39	193/75± 3/30	208/25± 15/08
G	162/50±	171/50±	179/75±	187/00± 12/30	195/75±

نتایج اندازه گیری مقدار قند خون رت‌های مورد پژوهش

در جدول ۳ مقدار قند خون در بین گروه های مورد نظر با آزمون تحلیل واریانس یکطرفه بررسی شده است. چون این مقدار سطح معنی داری در سطح ۵ درصد برابر با ۰/۰۰۱ می باشد و کمتر از ۰/۰۵ می باشد بنابراین مقدار قند خون در بین گروه ها اختلاف معنی داری وجود دارد.

جدول ۳: میانگین و انحراف استاندارد مقدار قند خون در بین گروه های مورد پژوهش

مقدار قند خون در بین گروه ها	Mean±SD
© مقدار قند خون در گروه A	185/40± 12/21
©مقدار قند خون در گروه B	186/60± 21/19
©مقدار قند خون در گروه D	184/00± 22/90
(b) مقدار قند خون در گروه E	83/25± 8/77
(b)مقدار قند خون در گروه F	92/25± 7/13
(a) مقدار قند خون در گروه G	272/75± 45/50

با توجه به نتایج مشاهده شده در جدول 3، گروهی که هر دو باکتری (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *روتری*) را مصرف نموده اند بیشترین تاثیر را بر کاهش قندخون داشته است. بعد از گروه تیمار با دو باکتری به ترتیب کاهش درگروه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و گروه *لاکتوباسیلوس روتری* مشاهده گردید.

بحث

طبق آمار ارائه شده توسط سازمان جهانی بهداشت دیابت، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد در جهان است و سالانه باعث مرگ ۴ میلیون نفر می‌شود. بنابراین، تحقیق بر روی داروهای ضد دیابت جدید با عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای موجود بسیار مهم است. پروبیوتیک‌ها، گروه مهمی از باکتری‌ها هستند که تأثیر بسزایی بر روی کاهش میزان قند خون دارند، زیرا پروبیوتیک‌ها با جلوگیری از تخریب پانکراس و تقویت آن می‌توانند جلوی کاهش ترشح انسولین را گرفته و باعث کاهش میزان قند خون شوند. یوون و همکارانش در سال ۲۰۰۹ به منظور بررسی تفاوت دوزهای مصرفی باکتری‌ها بر شاخص قند خون انجام دادند، مشاهده شد که کاهش معنادار قند خون ناشتا، هموگلوبینن گلیکوزیله و قند خون ۲ ساعته تنها در گروهی که بالاترین دوز باکتری *لاکتوباسیلوس گاسری* (10^{10} CFU در روز در هر رت) را به مدت ۱۲ هفته دریافت کرده بود، نسبت به دیگر گروه‌های دریافت کننده دوزهای روزانه 10^{7}، 10^{8}، 10^{9} CFU در هر رت، به دست آمد (Yun et al., 2009).

اندرسون و همکاران در سال ۲۰۱۰، با مداخله روزانه یک کپسول از باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در دوز روزانه 10^{10} CFU و در ۴۵ فرد بزرگسال دیابتی، دریافتند که بعد از ۴ هفته دوره مداخله میزان انسولین خون و سطح حساسیت انسولینی افراد دریافت کننده پروبیوتیک نسبت به دارونما به طور معناداری افزایش یافته، درحالی که تغییر معناداری در سطوح قند خون ناشتا، قند خون ۲ ساعته و مقاومت انسولینی مشاهده نشد (Andreasen et al., 2010). لوو و همکاران سال ۲۰۱۰، به بررسی اثر مداخله دوز یکسانی (10^{9} CFU) از باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* به مدت ۴ هفته پرداختند و توانستند کاهش معناداری در سطح قند خون و نیز هموگلوبین گلیوزیله رت‌های دیابتی گزارش نمایند (Lu et al., 2010).

کلادو و همکارانش در سال ۲۰۱۱ انجام دادند، گزارش شد که مداخله ۴۰ گرم *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به ازای کیلوگرم وزن بدن رت‌ها به مدت ۲۰ هفته، باعث کاهش معناداری در گلوکز خون ناشتا و انسولین خون ۲ ساعت آنها شده، در حالی که تاثیر معناداری در سطوح قند خون ۲ ساعته و انسولین ناشتای آنها ندارد (Collado et al., 2011).

بیجار و همکاران سال ۲۰۱۳ به بررسی اثر باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در دوز روزانه 1×10^{9} CFU بر سطوح قند خون ناشتا، و قند خون ۲ ساعته در رت‌های دیابتی پرداختند و کاهش معناداری را در هر دو شاخص بعد از ۴ هفته دوره مداخله، گزارش نمودند (Bejar et al., 2013). تومارو و همکاران سال ۲۰۱۴ نیز در تحقیقی نشان دادند که اعمال دوز بالایی از *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (10^{10} CFU)، تنها ۱۱ روز بعد از شروع مداخله باعث کاهش معنادار سطح قند خون رت‌های دیابتی و هایپرکلسترولمی شد که این اثر در انتهای ۸ هفته مداخله آنها نیز باقی ماند و حتی در انتهای این دوره، سطح قند خون ناشتای رت‌های دیابتی نیز کاهش معناداری نشان داد. با این وجود آنها تغییرات معناداری در سطوح انسولین خون، مقاومت انسولینی و نیز هموگلوبین گلیکوزیله گزارش ننمودند (Tomaro et al., 2014). سان و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی و مقایسه بیماران دیابتی که تحت درمان با ماست های غنی شده از پروبیوتیک و گروه دیابتی تحت درمان با دارو، مشاهده کردند که در هر دو گروه کاهش سطح قند خون ناشتا مشاهده می شود ولی در گروهی که مصرف ماست پروبیوتیکی داشتند کاهش قند خون خون ثبات بیشتری داشت و پایدارتر باشد (Sun et al., 2016). مزیدی و همکاران در سال ۲۰۱۷ با بررسی تعداد ۸۲ فرد مبتلا به عوارض افزایش

دیابت و خوراندن باکتری های پروبیوتیک به صورت روزانه به مدت ۲ ماه ، کاهش معناداری در سطح قند خون، فاکتورهای التهابی مشاهده کردند و ارتباط معناداری بین مصرف پروبیوتیک و کاهش عوارض دیابت را در افراد گزارش دادند (Mazidi et al., 2017).

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که مصرف لاکتوباسیلوس سبب کاهش سطح قندخون در رت‌های مورد مطالعه شده است که با نتایج مطالعات ذکر شده هماهنگ می باشد. اما همه نتایج مطالعات پیشین دال بر این نیست که مصرف لاکتوباسیلوس ها سبب کاهش قندخون می شود. نتایج حاصله از اندازه‌گیری وزن رت-ها بیانگر این موضوع بود که رت‌های تیمار شده با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* پس از دوره مشخص افزایش وزن داشتند، همچنین افزایش وزن در گروه کنترل مثبت و گروه تیمار شده با *لاکتوباسیلوس روتری* مشاهده شد. پروبیوتیک‌ها با بهبود سلامت روده مرتبط هستند و التهابات وابسته به دستگاه‌های مختلف بدن را کاهش داده موجب بهبود عملکرد دستگاه گوارش و اصلاح عملکرد سیستم ایمنی می شوند که این فعالیتها در بدست اوردن وزن و یا از دست دادن وزن موثر است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌دهنده این مطالب بود که سطح قند خون در گروه‌های دیابتی تیمار شده با *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* کاهش چشم‌گیری داشتند و علائم دیابت در این گروه‌ها کاهش پیدا کرد. به طور کلی مطالعه حاضر بیان نمود که مداخله مکمل غذایی حاوی مخلوط خالصی از *لاکتوباسیلوس روتری* و *پلانتاروم* به مدت ۴ هفته می تواند منجر به کاهش قند خون ناشتا در رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ شود.

نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر تأثیر چشم‌گیر استفاده از مکمل‌های حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر روی سطح قند خون رت‌های تیمار شده می باشد. بنابراین، گمان می‌رود استفاده از مکمل‌های حاوی لاکتوباسیلوس می‌تواند به عنوان یک درمان مکمل برای کنترل دیابت استفاده شود. با این وجود مشخص کردن مکانیسم عملکرد لاکتوباسیلوس‌ها و همچنین بررسی میزان دوز دریافتی مناسب مستلزم تحقیقات و پژوهش‌های بیشتر در این زمینه می‌باشد.

منابع

1. Andreasen, A.S., Larsen, N., Pedersen-Skovsgaard, T. 2013. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. Br. J. Nutr. 104: 1831–1838.
2. Asemi, Z., Samimi, M., Tabassi, Z., Naghibi Rad, M., Rahimi Foroushani, A., Khorammian, H., Esmaillzadeh, A. 2013. Effect of daily consumption of probiotic yoghurt on insulin resistance in pregnant women: a randomized controlled trial. Eur J Clin Nutr. 67(1): 71-4.
3. Bahmani, S., Azarpira, N., Moazamian, E. 2019. Anti-colon cancer activity of Bifidobacterium metabolites on colon cancer cell line SW742. Turk J Gastroenterol. 30(9): 835-842.
4. Bejar, W., Hamden, K., Ben, R., Chouayekh, H. 2013. *Lactobacillus plantarum* TN627 significantly reduces complications of alloxan-induced diabetes in rats. Anaerobe. 24, 4-11.
5. Bril V., Perkins S., BruceT., Toth M., Cory F. 2013. Neuropathy. Can. J. Diabetes. 37: 142–144.
6. Cani, P. D., Van Hul, M. 2015. Novel opportunities for next-generation probiotics targeting metabolic syndrome. Curr Opin Biotechnol. 32: 21-27.
7. Choi, H .J., Yu J., Choi, H., An, J.H., Kim, S.W., Park, K.S. 2011. Vitamin K2 supplementation improves insulin sensitivity via osteocalcin metabolism: a placebo-controlled trial. Diabetes Care. 34(9): e147.
8. Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S. 2011. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to

human intestinal mucus. Food Res Inter. 40 (5): 629-636.
9. David, G., Gardner, A,. Dolores, S. 2014. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology, Ninth EditionMcGraw-Hill. PP 628.
10. Davari, S., Talaei, S.A., Soltani, M. 2012. The effect of co-administration of *lactobacillus probiotics* and *bifidobacterium on* spatial memory and learning in diabetic rats. Tehran Uni. Med. J. 70(9): 531-539.
11. Ejtahed, H.S., Mohtadi-Nia J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M. 2011. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. J. Dairy Sci. 94(7): 3288–3294.
12. Herich, R., Levkut, M. 2012. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. Vet Med-Czech. 47: 169–180.
13. Moazamian, E., Bahador, N., Azarpira, N., Rasouli, M. 2018. *Anti-cancer Parasporin Toxins of New Bacillus thuringiensis* Against Human Colon (HCT-116) and Blood (CCRF-CEM) Cancer Cell Lines. Curr Microbiol. 75(8): 1090-1098.
14. Sharma, M., Mukul, D., Gubitz, L., Gordon, J. 2012. Management of Stroke in Diabetes. Can. J. Diabetes. 37: 124–125.
15. Soltani Kordsholi, M.H., Moazamian, E., Kalani, Mehdi. 2019. The Effect of Lactobacillus Reuteri Cell Wall and Cytoplasmic Extract on the Stimulation of IL-4 and IFN γ Cytokines Production. BJM. 8(31): 71-80.
16. Sun, J., Buys, N.J. 2016. Glucose and glycaemic factor-lowering effects of probiotics on diabetes: a meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. Br J Nutr. 115(7): 1167-77.
17. Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Malhotra, M., Jones, M., Labbe, A., Rodes, L.
2014. Effect of orally administered L. fermentum NCIMB 5221 on markers of metabolic syndrome: an in vivo analysis using ZDF rats. Appl Microbiol Biotechnol. 98(1): 115-126.
18. Wu, X., Ma, C., Han, L., Nawaz, M. 2010. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. Curr Microbiol. 61: 69–78.
19. Xie, F., Zhang, F., Zhou, K., Zhao, Y., Zhao, Q., Sun, H. 2017. Isolation, identification and fermentation optimization of lactic acid bacteria for aquaculture water purification. Wei Sheng Wu Xue Bao. 4;57(2): 304-14.
20. Yadav, H., Jain, S., Sinha, P. 2007. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei in high fructose fed rats. Nutrition. 23(1), 62-68.
21. Yadav, H., Lee, J.H., Lloyd, J., Walter, P., Rane, S.G. 2008. Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. J Biol Chem. 288: 25088-25097.
22. Yadav, R., Puniya, A.K., Shukla, P. 2016. Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an Indigenous Fermented Beverage Raabadi. Front Microbiol. 7: 168-178.
23. Yi, R., Tan, F., Liao, W., Wang, Q., Mu, J., Zhou, X., Yang, Z., Zhao, X. 2019. Isolation and Identification of *Lactobacillus plantarum* HFY05 from Natural Fermented Yak Yogurt and Its Effect on Alcoholic Liver Injury in Mice. Microorganisms. 5;7(11). pii: E530.
24. Yun, S.I., Park, H., Kang, J.H. 2009. Effect of *Lactobacillus gasseri BNR17* on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. J Appl Microbiol. 107(5): 1681-1686.

Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus ruteri* isolated from dairy products in streptozotocin-induced diabetic rat models

Aminian E[1], Moazamian E[2*], Edalatmanesh MA[3]

1. Graduated of Microbiology MSc, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

2. Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

3. Department of Physiology, Faculty of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

***Corresponding author:** *elhammoazamian@gmail.com*

Received: 9 February 2020 Accepted: 9 May 2020

Abstract

Based on the increasing prevalence of type 2 diabetes, the present study aimed to investigate the effect of *Lactobacillus* isolated from dairy products on blood glucose in diabetic rats. Isolation and characterization of *Lactobacillus* from dairy products were performed using biochemical and molecular tests. In this study, treatment was performed on 49 male Wistar rats with a mean age of approximately 6 to 8 weeks. Rats were divided into 7 groups of 7 each. In the intervention group, *Lactobacillus ruteri* and *Lactobacillus plantarum* were used. At the end of 4 weeks, weight changes and blood glucose levels of the rats were compared to the positive and negative controls. Statistical analysis was performed using SPSS software, chi-square test, or Fisher's exact test for comparison of variables. The results showed that during one month the mice were exposed to *Lactobacillus* bacteria had the highest weight in the fourth week and the lowest weight in the first week of the study. A significant decrease in blood glucose level was observed in the groups consuming *L. plantarum* and *L. ruteri*. The present study showed that intervention of Lactobacillus without altering diet or specific diet in rats can significantly decrease blood sugar in the bacterial group. Considering the effect of the studied bacteria on blood glucose reduction, it can be claimed that *Lactobacillus* can be suggested as an adjunctive treatment in patients with type 2 diabetes.

Keywords: *Lactobacillus*, Dairy products, Weight changes, Blood sugar, Type 2 diabetes.