



مقاله پژوهشی

تغییرات بافتی و فعالیت ضد دیابتی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر سلول‌های بتا لوزالمعده در موش صحرایی دیابتی شده توسط آلوکسان

الیه علی‌پناهی^۱، صبا طاهری^{۲*}، میترا طباطبایی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۸/۱۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۰۶

چکیده

زمینه و هدف: بیماری دیابت یک بیماری مزمن است که در آن تولید یا عملکرد انسولین دچار اشکال می‌شود. این هورمون توسط سلول‌های بتای لوزالمعده ترشح می‌گردد و عمل اصلی آن پایین آوردن قند خون است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که باعث تقویت و تعادل در فلور میکروبی روده شده و اثرات مفیدی را در سلامتی میزبان به همراه دارند.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ۳۲ موش در ۴ گروه تقسیم شدند: گروه اول (کنترل غیر دیابتی)، گروه دوم (کنترل دیابتی)، گروه سوم (دیابتی تحت تیمار با لاکتوباسیلوس پلانتاروم)، گروه چهارم (دیابتی تحت تیمار با گلی‌بن‌کلامید). بعد از خون‌گیری و جدا کردن سرم، مقدار گلوکز و انسولین سرم به ترتیب با استفاده از کیت آنزیمی و با روش الایزا اندازه‌گیری شد. همچنین برش‌هایی از پانکراس تهیه و میانگین قطر جزایر لانگرهانس مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاکی از کاهش معنی‌داری در میزان گلوکز در گروه تیمار با لاکتوباسیلوس پلانتاروم در مقایسه با گروه کنترل دیابتی، بود ($P < 0.05$) که این اثر مشابه داروی گلی بن کلامید است. علاوه بر این در گروه تیمار شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم، میزان انسولین تغییر معنی‌داری نسبت به گروه دیابتی نشان نداد. همچنین بررسی‌های بافت‌شناسی پانکراس نشان داد که این باکتری در روند بهبودی بافت پانکراس نیز تأثیر دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از آن است که لاکتوباسیلوس پلانتاروم دارای اثرات مثبت در کنترل قند خون در موش‌های دیابتی شده توسط آلوکسان بوده و شاید بتوانند از آن به‌عنوان مکمل‌های دارویی مناسب برای کنترل قند خون مورد توجه قرار گیرند.

کلمات کلیدی: دیابت، پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، پانکراس، آلوکسان

مقدمه

بیماری دیابت یک بیماری مزمن است که در آن تولید یا عملکرد انسولین و یا هر دو آن‌ها دچار اشکال می‌شود. انسولین هورمونی است که توسط سلول‌های درون لوزالمعده به نام «سلول‌های بتا» به داخل خون ترشح می‌گردد و عمل اصلی آن پایین آوردن قند خون و فعال کردن سیستم ذخیره‌سازی مواد غذایی مختلف در بافت‌های بدن است (۱)؛ بنابراین در صورت

بیماری دیابت یک بیماری مزمن است که در آن تولید یا عملکرد انسولین و یا هر دو آن‌ها دچار اشکال می‌شود. انسولین هورمونی است که توسط سلول‌های درون لوزالمعده به نام «سلول‌های بتا» به داخل خون ترشح می‌گردد و عمل اصلی آن پایین آوردن قند خون و فعال کردن سیستم ذخیره‌سازی مواد غذایی مختلف در بافت‌های بدن است (۱)؛ بنابراین در صورت

انسولین ماده اصلی ترشحی سلول‌های بتا است سلول‌های بتا ظرفیت بالایی برای ذخیره انسولین دارند، یک سلول بتا دارای ۱۳۰۰۰ گرانول و ۲۰ پیکوگرم انسولین است. مکانیسم ذخیره‌سازی انسولین در گرانول و آزادسازی آن‌ها پیچیده است، انسولین تازه سنتز شده ترجیحاً به‌صورت گرانول‌های جدید،

*نویسنده مسئول: صبا طاهری، گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی،
Email: sabataheri@yahoo.com
اسلامشهر، ایران
0000-0001-7596-614X <https://orcid.org/>

لاکتو باسیلوس‌ها از مهم‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک بوده و لاکتوباسیلوس پلانٹاروم (*Lactobacillus plantarum*) به‌عنوان یک نوع از این باکتری‌ها خواص درمانی بسیار زیادی دارد (۱۱). این باکتری در گیاهان و روده جانوران از جمله انسان وجود دارد. این باکتری خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارد و می‌تواند مانع رشد باکتری‌های تولیدکننده گاز در روده و کاهش علائم بیماری روده تحریک‌پذیر شود. همچنین مشخص شده است که این باکتری با تولید برخی فاکتورهای اثرگذار بر سیستم عصبی می‌تواند افسردگی را بهبود بخشد (۱۲).

روش‌های متعددی برای درمان دیابت پیشنهاد شده که یکی از آن‌ها استفاده از انسولین است که به‌منظور کنترل قند خون همه مبتلایان به دیابت نوع یک و برخی از مبتلایان به دیابت نوع دو استفاده می‌شود. همچنین از داروهای خوراکی به‌عنوان پایین آورنده قند خون استفاده می‌شود. این قرص‌ها با تحریک سلول‌های تولیدکننده انسولین در لوزالمعده و یا کاهش مقاومت بدن نسبت به انسولین، سطح قند خون را کنترل می‌کنند که شامل گلی‌بن‌کلامید، متفورمین، آکاربوز، پیوگلیتازون و رپاگلینید می‌باشند (۱۳، ۱۴).

امروزه با توجه به اثرات مفید پروبیوتیک‌ها و توانایی آن‌ها در پایین آوردن میزان گلوکز، تأثیر آن‌ها در درمان بیماری دیابت نیز دور از انتظار نیست. از این‌رو جهت کاهش اثرات جانبی داروها، استفاده از پروبیوتیک‌ها جهت پیشگیری و درمان این بیماری مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق نیز اثر لاکتوباسیلوس پلانٹاروم بر میزان گلوکز خون و سطح سرمی انسولین و همچنین اثرات آن بر بافت پانکراس در موش‌های دیابتی شده توسط آلوکسان بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری حیوانات: موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (تهیه‌شده از دانشکده فارماکولوژی دانشگاه تهران) با وزن تقریبی ۱۸۰-۲۴۰ گرم خریداری شدند، حیوانات در حیوان خانه‌ی دانشگاه آزاد واحد تهران مرکز در شرایط دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. لازم به ذکر است که در این پژوهش استفاده از حیوانات آزمایشگاهی بر اساس دستورالعمل بین‌المللی بوده است. همچنین در تمام مراحل

جهت ترشح به‌صورت اگزوسیتوز، سریع‌تر به سمت سطح سلول حرکت می‌کند و با انتقال قند موجود در خون به داخل سلول‌ها باعث کاهش قند خون می‌شود (۲).

یکی از انواع دیابت، دیابت نوع یک است که قبلاً به نام دیابت وابسته به انسولین شناخته می‌شد یک بیماری خود ایمن است که در آن سلول‌های ایمنی بدن علیه سلول‌های خودی سازنده انسولین در لوزالمعده واکنش نشان داده و با ترشح پادتن‌های خودی آن‌ها را نابود می‌سازند و در نتیجه بدن قادر به ساختن انسولین نیست. مبتلایان به این نوع دیابت باید همیشه انسولین را به‌صورت تزریقات روزانه بکار ببرند (۳).

دیابت نوع دو حدود ۹۵-۹۰ درصد مبتلایان را تشکیل می‌دهد. در این نوع دیابت مقاومت نسبت به انسولین وجود دارد که سبب می‌شود بدن به انسولین بیشتری جهت کاهش قند خون نیاز داشته باشد. مبتلایان به این نوع دیابت اضافه‌وزن دارند و چاق هستند (۴، ۵).

پروبیوتیک‌ها، باکتری‌های مفیدی هستند که در دستگاه گوارش انسان زندگی می‌کنند و از طریق منابع غذایی، مانند محصولات لبنی که حاوی پروبیوتیک هستند نظیر دوغ کفیر، ماست و پنیرهای حاوی پروبیوتیک نیز وارد بدن می‌شوند. پروبیوتیک‌ها به‌عنوان عاملی برای پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماری‌های عفونی و سرطانی شناخته شده‌اند (۶). باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک، به‌ویژه لاکتوباسیلوس‌ها به‌طور عادی جزء اکوسیستم دستگاه گوارش محسوب می‌شوند. اثرات بالقوه و اثبات شده میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک شامل کمک به هضم لاکتوز در روده، اسهال، یبوست، کاهش کلسترول، اثر مهاری سرطان، تقویت سیستم ایمنی، تحریک رشد میکروفلور روده باریک، پیشگیری از واکنش‌های ازدیاد حساسیت و جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها در روده است (۷). از جمله اثرات مفید دیگر پروبیوتیک‌ها می‌توان بر میزان قند خون، چربی‌های خون و فشارخون اشاره کرد و حتی تحقیقات امروز در حال بررسی اثر پروبیوتیک‌ها برای درمان چاقی، اضافه‌وزن و حتی درمان افسردگی و اختلالات خلق‌و‌خو است (۸، ۹). درباره اثر پروبیوتیک‌ها بر میزان قند خون، به نظر می‌رسد که پروبیوتیک‌ها با تقویت سلول‌های بتای پانکراس که انسولین ترشح می‌کنند، از تخریب بافت پانکراس جلوگیری کرده و در نتیجه مانع کاهش ترشح انسولین و افزایش میزان قند خون می‌شوند (۱۰).



گروه دریافت‌کننده گلی‌بن‌کلامید: این گروه توسط آلوکسان دیابتی شدند و تحت تیمار به‌صورت روزانه با گلی‌بن‌کلامید به غلظت ۶۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفتند.

گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک: این گروه توسط آلوکسان دیابتی شدند و تحت تیمار به‌صورت روزانه با پروبیوتیک به میزان ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری قرار گرفتند.

جمع‌آوری نمونه‌های خونی: در این پژوهش خون‌گیری، از سینوس اوربیتال^۱ گوشه داخل چشم و در سه نوبت صورت پذیرفت: قبل از تزریق آلوکسان (نوبت اول)، دو هفته بعد از تزریق آلوکسان و شروع تیمار (نوبت دوم)، چهار هفته بعد از تزریق آلوکسان و شروع تیمار (نوبت سوم).

۱۶ ساعت قبل از انجام هر آزمایش مواد غذایی از دسترس حیوانات خارج گردید (۲۱). پس از انجام هر خون‌گیری، نمونه‌های خون به مدت ۴۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری و سپس به‌منظور تهیه سرم با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند (۱۸).

بررسی میزان هورمون انسولین به روش الایزا: مطابق دستورالعمل کیت تشخیصی انسولین (تهیه‌شده از شرکت پارسیان زیست) ۲۰ میکرولیتر سرم موش‌های مورد آزمایش را داخل چاهک‌های ۹۸ خانه‌ای ریخته و ۲۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف استاندارد نیز به چاهک‌های دیگر اضافه شد. سپس به تمام چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم کونژوگه اضافه نموده و پس از نیم ساعت انکوباسیون چاهک‌ها را شستشو داده و ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌زا به تمام چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ده دقیقه در تاریکی قرار گرفت. در پایان با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده، جذب نوری (OD) چاهک‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نموده و با توجه به نمودار استاندارد، غلظت تمام نمونه‌ها محاسبه گردید.

اندازه‌گیری گلوکز خون به روش گلوکز اکسیداز: ۱۰ میکرولیتر سرم موش‌های مورد آزمایش را داخل لوله ریخته و به لوله‌های بلانک و استاندارد نیز به ترتیب ۱۰ میکرولیتر آب مقطر و محلول استاندارد اضافه شد. سپس به تمام لوله‌ها یک سی‌سی معرف داخل کیت گلوکز (تهیه‌شده از شرکت پارس آزمون) اضافه

آزمایش، قوانین و مقررات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است.

تهیه محلول دارویی: جهت ایجاد دیابت در موش‌ها از پودر آلوکسان منو هیدرات (تولید کارخانه سیگما) با غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مخلوط با سالین و به‌صورت ۳ روز متوالی از طریق تزریق درون صفاقی انجام پذیرفت (۱۵، ۱۶) حیوانات بعد از ۷۲ ساعت از نظر دیابت بررسی شدند (۱۷). موش‌هایی که قند خون ناشتای بیش از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر داشتند برای ادامه آزمایش انتخاب شدند (۱۸). جهت گروه دریافت‌کننده گلی‌بن‌کلامید (تولید کارخانه سیگما) موش‌ها دیابتی شده و بعد از تأیید دیابت آن‌ها به مدت یک ماه تحت تیمار دارویی توسط داروی گلی‌بن‌کلامید و به غلظت ۶۰۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش قرار گرفتند. این دارو به‌صورت درون صفاقی و به‌صورت روزانه به مدت ۳۰ روز به حیوانات تزریق شد (۱۹، ۲۰).

گاوژ کردن لاکتوباسیلوس پلانتاروم: بعد از تهیه لاکتوباسیلوس پلانتاروم با مشخصه ATCC 8014 (تهیه‌شده از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران) باکتری در محیط کشت MRS Broth (تولید کارخانه مرک) به حجم ۲۰ میلی‌لیتر کشت داده شد و در انکوباتور CO₂ دار به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. پس از رشد، باکتری‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند سپس از پلت باکتری، توسط سرم فیزیولوژی سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند با حدود 10^8 CFU/ml × ۱/۵ باکتری است تهیه گردید و در نهایت روزانه ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون با استفاده از نیدل مخصوص به‌صورت گاوژ درون معده به مدت ۳۰ روز به گروه آزمون داده شد.

گروه‌های مورد مطالعه: موش‌ها به‌صورت تصادفی در ۴ گروه زیر طبقه‌بندی شدند و در هر گروه ۸ سر موش مورد آزمایش قرار گرفتند.

گروه کنترل غیر دیابتی: که دیابتی نشدند و در طول دوره تیمار معادل حجم گروه‌های دیگر آب مقطر به‌صورت گاوژ دریافت کردند.

گروه کنترل دیابتی: این گروه توسط آلوکسان دیابتی شدند و به مدت ۳۰ روز آب و غذای معمولی مصرف نمودند.

¹ Orbital Sinus

بررسی‌های آماری: تمامی داده‌ها از نظر آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ و آزمون آماری واریانس یک‌طرفه ANOVA مورد بررسی قرار گرفتند. اطلاعات به صورت میانگین $\pm$ خطای انحراف معیار میانگین ($\text{mean} \pm \text{S.E.M}$) ارائه گردید. معیار استنتاج آماری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد و نمودار از طریق اکسل رسم گردید.

نتایج

بررسی میزان قند خون در گروه‌های مختلف: میزان قند خون گروه‌های مختلف در طول دوره تیمار باهم مقایسه شده است. مقایسه مقدار گلوکز خون بین گروه‌های مختلف در نوبت اول (قبل از تزریق آلوکسان و شروع تیمار) حاکی از عدم تغییر در مقدار گلوکز است و در رنج نرمال قرار دارند. در نوبت دوم و سوم مقایسه گروه دریافت‌کننده گلی‌بن‌کلامید با گروه کنترل دیابتی حاکی از کاهش معنی‌دار میزان گلوکز دارد

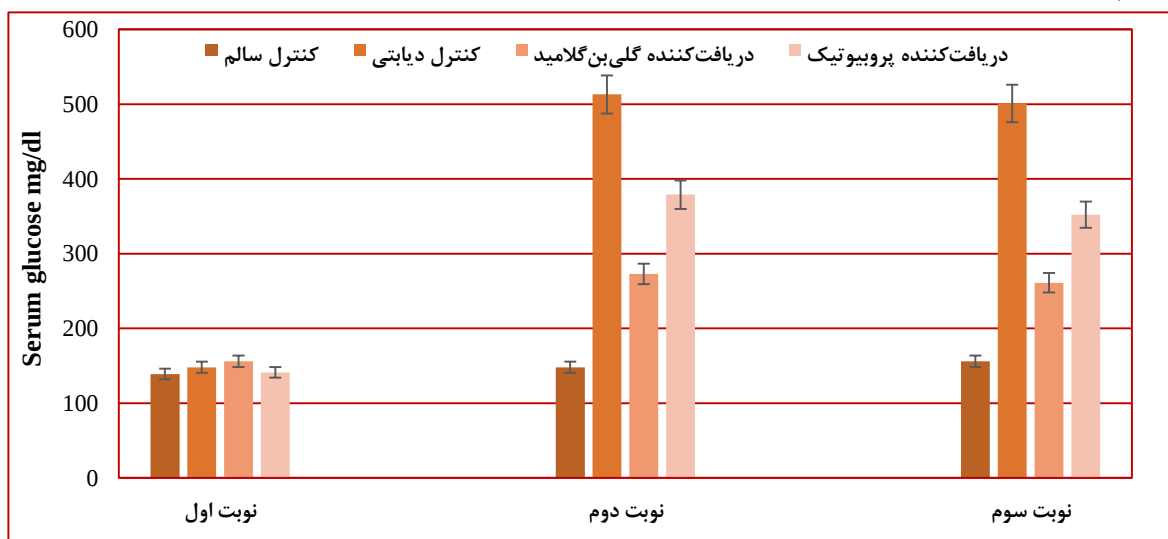
نموده و به مدت ده دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در انتها جذب نوری (OD) نمونه‌ها را در طول موج ۵۴۶ نانومتر قرائت نموده و با توجه به غلظت استاندارد، غلظت تمام نمونه‌ها محاسبه گردید.

مطالعات بافت‌شناسی پانکراس: پس از پایان دوره ۳۰ روزه آزمایش، موش‌ها توسط کلروفرم کشته شدند. سپس پانکراس موش‌ها جدا شد و در محلول بافر فرمالین ۱۰٪ تثبیت گردید تا پس از انجام روش‌های متداول پردازش بافتی از آن‌ها بلوک‌های پارافینی تهیه شود. سپس برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر توسط میکروتوم تهیه گردید. لام‌های تهیه‌شده توسط رنگ هماتوکسیلین - انئوزین، رنگ‌آمیزی شدند در نهایت جهت بررسی و مشاهده لام‌های تهیه‌شده از مقاطع مختلف بافت پانکراس، نمونه‌های گروه کنترل با نمونه‌های گروه تجربی مقایسه شدند. سپس توسط میکروسکوپ نوری دوربین‌دار متصل به کامپیوتر، از مقاطع تهیه‌شده عکس گرفته شد (۱۸).

جدول ۱- مقایسه میانگین قند خون در گروه‌های مختلف (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

گروه‌های آزمایشی	نوبت اول	نوبت دوم	نوبت سوم
کنترل سالم	۱۳۹ $\pm$ ۱۲	۱۴۸ $\pm$ ۵۲	۱۵۶ $\pm$ ۲۳
کنترل دیابتی	۱۴۸ $\pm$ ۵۲	۵۱۳ $\pm$ ۱۹	۵۰۱ $\pm$ ۲۴
دریافت‌کننده گلی‌بن‌کلامید	۱۵۶ $\pm$ ۸	* ۲۷۳ $\pm$ ۲۹	* ۲۶۱ $\pm$ ۳۰
دریافت‌کننده پروبیوتیک	۱۴۱ $\pm$ ۹	* ۳۷۹ $\pm$ ۴۳	* ۳۵۲ $\pm$ ۵۰

علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه دریافت‌کننده گلی‌بن‌کلامید و گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک با گروه کنترل دیابتی است ($P < 0.05$).

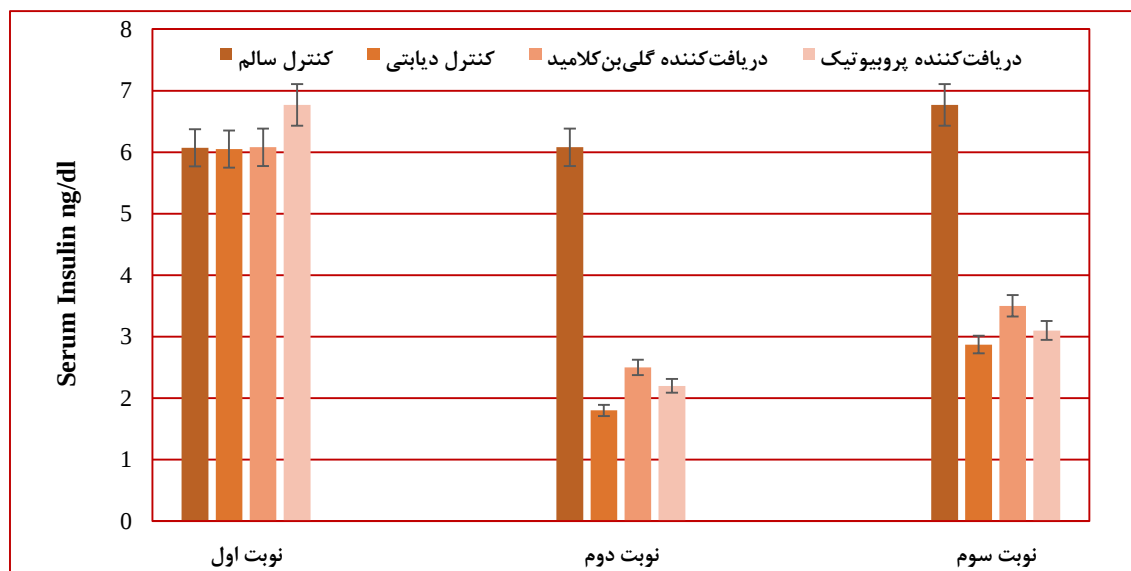


نمودار ۱- مقایسه میزان قند خون گروه‌های مختلف در موش‌های نر (میانگین $\pm$ انحراف معیار). علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه

($P < 0.05$) که کاملاً منطقی به نظر می‌رسد. همچنین مقایسه گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک با گروه کنترل دیابتی در نوبت دوم و سوم نیز نشان از کاهش معنی‌دار میزان گلوکز دارد.

جدول ۲- مقایسه سطح انسولین خون در گروه‌های مختلف (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

گروه‌های آزمایشی	نوبت اول	نوبت دوم	نوبت سوم
کنترل سالم	$6/07 \pm 0/59$	$6/08 \pm 0/59$	$6/77 \pm 0/52$
کنترل دیابتی	$6/05 \pm 0/57$	$1/8 \pm 0/65$	$2/87 \pm 0/64$
دریافت‌کننده گلی‌بن‌کلامید	$6/08 \pm 0/87$	$2/5 \pm 0/63$	$3/5 \pm 0/74$
دریافت‌کننده پروبیوتیک	$6/77 \pm 0/52$	$2/2 \pm 0/73$	$3/1 \pm 0/97$



نمودار ۲- مقایسه سطح انسولین خون در گروه‌های مختلف در موش‌های نر (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

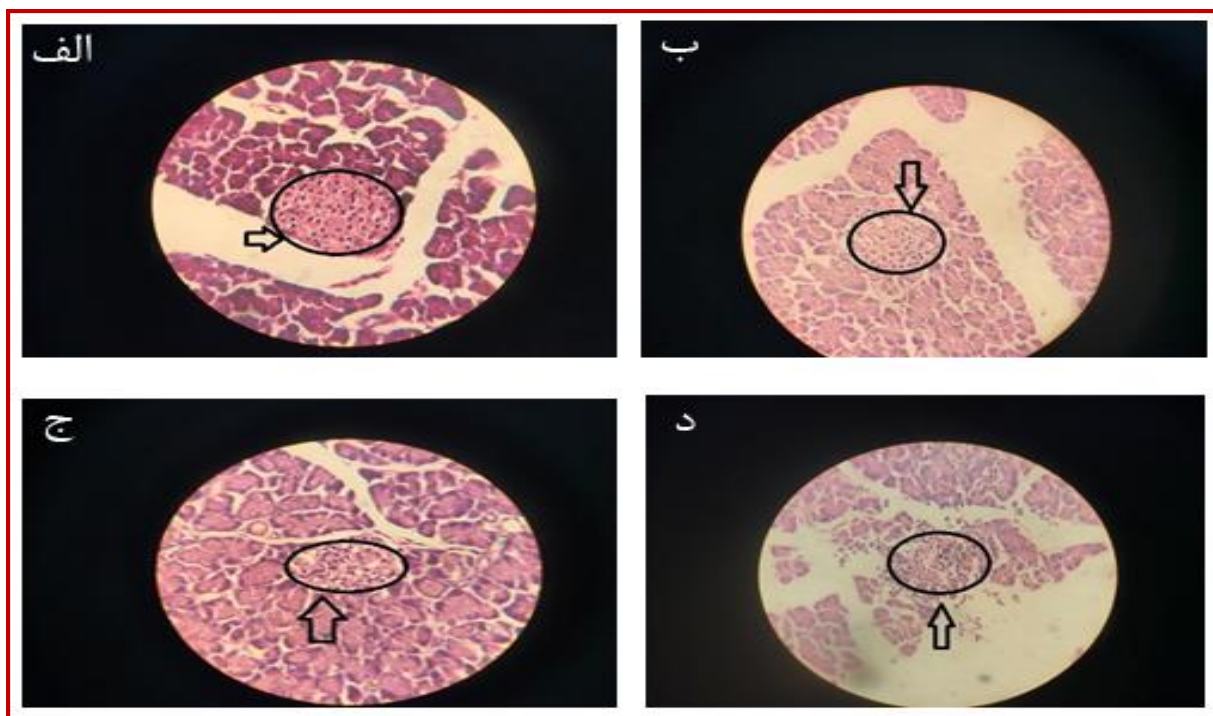
نتایج مربوط به مطالعه بافتی پانکراس: در گروه سالم جزایر لانگرهانس کاملاً سالم، آسینی‌های ترشحی پانکراس سالم و نکروز دیده نشد (شکل ۱- الف). در برش‌های تهیه‌شده از موش‌های دیابتی بیشتر جزایر کوچک و به‌ندرت دارای سائز متوسط بودند دانسیته سیتوپلاسم سلول‌های جزایر لانگرهانس کاهش‌یافته، واکوئل‌های سیتوپلاسمی و نکروز مشاهده می‌شود (شکل ۱- ب). در گروه دریافت‌کننده گلی‌بن‌کلامید، کاهش دانسیته سیتوپلاسمی سلول‌های جزایر لانگرهانس و واکوئل‌های سیتوپلاسمی مشاهده می‌شود. رشته‌های همبندی فراوان و فیبروز جزایر قابل‌مشاهده است (شکل ۱- ج).

($P < 0.05$) که نشان می‌دهد این پروبیوتیک توانسته میزان گلوکز را در موش‌های دیابتی کاهش دهد (جدول ۱ و نمودار ۱).

بررسی میزان انسولین خون در گروه‌های مختلف: میزان انسولین خون گروه‌های مختلف در طول دوره تیمار باهم مقایسه شده است. مقایسه مقدار انسولین خون بین گروه‌های مختلف در نوبت اول (قبل از تزریق آلوکسان و شروع تیمار) حاکی از عدم‌تغییر در مقدار انسولین است و در رنج نرمال قرار دارند. در نوبت دوم و سوم مقایسه گروه دریافت‌کننده گلی‌بن‌کلامید با گروه کنترل دیابتی هیچ اختلاف معنی‌دار در میزان انسولین نداشت. همچنین مقایسه گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک با گروه

با فروکتوز بررسی کردند و نشان دادند که پروبیوتیک به کار گرفته سبب کاهش قند خون و عدم تحمل گلوکز می شود (۲۳). همچنین در پژوهش دیگر آنان، میزان قند خون به طور

در گروه دریافت کننده پروبیوتیک کاهش دانسیته سیتوپلاسم، واکوئولاسیون اندک جزایر لانگرهانس و نکروز به صورت اندک مشاهده شد (شکل ۱-د).



شکل ۱- رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر. الف) جزایر لانگرهانس در گروه سالم ب) جزایر لانگرهانس در گروه دیابتی ج) جزایر لانگرهانس در گروه دریافت کننده گلی بن کلامید د) جزایر لانگرهانس در گروه دریافت کننده پروبیوتیک

بحث

معنی داری با این پروبیوتیک کاهش یافت که علت این امر را به تقویت سیستم آنتی اکسیدانی توسط پروبیوتیک ها و در نتیجه کاهش تخریب سلول های بتای جزایر نسبت دادند (۲۴). در سال ۲۰۰۷ لالی و همکاران نشان دادند که محصول نانو حاوی لاکتوباسیلوس سبب کاهش قند خون در موش های دیابتی شده با آلوکسان می گردد (۱۸). در سال ۲۰۰۹ هاریسا و همکاران نشان دادند که لاکتوباسیلوس/سیدوفیلوس سبب کاهش رادیکال های آزاد و گونه های واکنشگرهای اکسیژن می شود. این ترکیبات واکنشگر باعث اختلال در سطح اکسید نیتریک در رت های دیابتی می گردد. اسید نیتریک واسطه مهم در ترشح هورمون ها و تحریک سیستم ایمنی است. به عبارت دیگر لاکتوباسیلوس/سیدوفیلوس سبب کاهش قند خون و تعدیل اکسید نیتریک در رت های دیابتی شده با آلوکسان گردیده است (۲۵).

در سال ۱۹۹۷ ماتزوکی و همکاران نشان دادند که

دیابت به یک بیماری جدی در قرن ۲۱ تبدیل شده است و تعداد زیادی از انسان ها در سراسر دنیا به آن مبتلا می باشند. متأسفانه در کشور ما نیز در سال های گذشته تعداد افراد مبتلا به این بیماری ازدیاد یافته و پیش بینی می شود این روند در سال های آینده نیز افزایش یابد. از این رو لازم است تا تحقیقات گسترده ای در این زمینه انجام شود. عواملی مانند تغذیه ناصحیح، کاهش کیفی مواد غذایی، چاقی، ازدیاد وزن، بی تحرکی، استعمال دخانیات، مصرف بی رویه نوشیدنی های حاوی الکل و آلودگی هوا شانس ابتلا به این بیماری را افزایش می دهند و از طرف دیگر تشخیص دیر هنگام این بیماری روند درمان و بهبود را سخت تر می کند (۲۲).

تجربیات و تحقیقاتی که در گذشته صورت گرفته بیانگر اثرات مفید پروبیوتیک ها بر روی دیابت است. طی مطالعه یاداو و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر ضد دیابت محصول پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس کازی و/سیدوفیلوس را بر رت های دیابتی شده

به عبارت دیگر لاکتوباسیلوس پلانتاروم سبب کاهش قند خون و تعدیل اکسید نیتریک در رت‌های دیابتی با آلوکسان گردیده است.

احتمالات دیگر بر این است که با افزایش لاکتوباسیلوس‌ها 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. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروبیوتیک‌ها مانع از تخریب سلول‌های بتا لانگرهانس و در نتیجه کاهش گلوکز سرم می‌شود. ترکیب میکرو فلور روده در تعیین میزان التهاب که در دیابت نقش دارد مؤثر است بدین صورت که وقتی تعادل در میکرو فلور روده از بین می‌رود نسبت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در روده کاهش می‌یابد در نتیجه میزان جذب لیپوپولی ساکاریدها و سایر مولکول‌های پیش‌التهابی و انتقال آن‌ها به گردش خون افزایش می‌یابد و همین موضوع باعث افزایش ترشح سایتوکاین، فعالیت ماکروفاژ و بروز التهاب در بدن می‌شود. سایتوکاین‌های التهابی باعث اختلال در عملکرد گیرنده‌های انسولین و در نتیجه باعث مقاومت به انسولین می‌گردد، القای آپوپتوز سلول‌های بتا پانکراس باعث کاهش ترشح انسولین توسط این سلول‌ها می‌شود به‌طور کلی با تأثیرات مفید در درمان التهاب معده و روده مورد توجه قرار می‌گیرد (۲۸، ۲۹).

نتیجه‌گیری

امروزه روش‌های متعدد درمانی برای درمان دیابت به کار گرفته می‌شود که عوارض جانبی گوناگونی به همراه دارد، از این رو یافتن روش‌های نوین برای پیشگیری و درمان بسیار مورد توجه قرار گرفته است و یکی از این روش‌ها استفاده از پروبیوتیک‌ها را می‌توان اشاره کرد و با توجه به این که پروبیوتیک‌ها دارای فعالیت متنوع زیستی از جمله فعالیت ضد دیابتی می‌باشند لذا امید است با استفاده از سویه‌های مختلف این باکتری‌ها، نتایج مفیدی از امکان بهره‌گیری بهینه از پروبیوتیک‌ها در محصولات غذایی و درمانی برای بیماران دیابتی حاصل شود. در مجموع نتایج این تحقیق نیز نشان‌دهنده اثرات مثبت لاکتوباسیلوس پلانتاروم به جهت کنترل قند خون در رت‌های دیابتی بود. از این رو به نظر می‌رسد محصولات تهیه شده از این پروبیوتیک و سویه‌های دیگر شاید بتوانند به عنوان مکمل‌های دارویی مناسب برای کنترل قند خون مورد توجه قرار گیرند.

لاکتوباسیلوس کازی در موش‌ها که به صورت ژنتیکی مبتلا به دیابت نوع دو بودند سبب کاهش قند خون گردید (۲۰). در سال ۱۳۹۲ حمید بادکوبه و همکاران نشان دادند که لاکتوباسیلوس کازی در موش‌ها که به صورت القایی مبتلا به دیابت نوع دو شده بودند سبب کاهش قند خون گردید (۲۶ و ۲۷). در مطالعات ما نیز نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری حاکی از آن است که در گروهی که لاکتوباسیلوس پلانتاروم را دریافت کردند در مقایسه با گروه کنترل دیابتی، کاهش معنی‌داری در میزان گلوکز وجود دارد که نشان می‌دهد این پروبیوتیک توانسته میزان گلوکز را در موش‌های دیابتی کاهش دهد که این موضوع با یافته‌های ذکر شده هم‌خوانی دارد.

فاکتور دیگری که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت سطح انسولین موجود در سرم خون بود که در گروه تحت تیمار با پروبیوتیک اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل شاهد دیابتی مشاهده نشد ولی لازم به ذکر است که میزان انسولین خون افزایش یافته است که بیانگر تأثیر مثبت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی افزایش ترشح انسولین سرم است. نتایج این یافته‌ها با نتایج wacim bejar و همکاران در سال ۲۰۱۳ و Eunjung Lee و همکاران در سال ۲۰۱۸ که بر سویه دیگری از لاکتوباسیلوس پلانتاروم تحقیق کرده بودند هم‌خوانی دارد، آن‌ها نیز نشان دادند که استفاده از این سویه در موش‌های دیابتی میزان انسولین سرم خون را تا حدی افزایش می‌دهد و باعث کاهش میزان گلوکز می‌شود.

در بررسی‌های بافت‌شناسی پانکراس و جزایر لانگرهانس تغییرات معنی‌دار در گروه دیابتی نسبت به گروه شاهد دیابتی دیده می‌شود و روند رو به ترمیم در اجزای پانکراس مشاهده شد. در واقع مطالعات نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها باعث تنظیم میکروفلور روده‌ای و کاهش رادیکال‌های آزاد و ترمیم پانکراس می‌شود.

درواقع آلوکسان یک آنالوگ گلوکز سمی است که باعث افزایش رادیکال‌های آزاد در سلول‌های بتا تولیدکننده انسولین پانکراس می‌شود؛ بنابراین به این سلول‌ها آسیب می‌رساند و باعث کاهش ترشح انسولین می‌شود در واقع لاکتوباسیلوس پلانتاروم سبب کاهش رادیکال‌های آزاد و گونه‌های واکنش‌گرهای اکسیژن می‌شود، این ترکیبات واکنش‌گر باعث اختلال در سطح اکسید نیتریک در رت‌های دیابتی می‌گردد. اکسید نیتریک واسطه مهم در ترشح هورمون‌ها و تحریک سیستم ایمنی بدن است

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد با شماره ثبت ۲۳۵۶/۴۵ در رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز بوده است. بدین وسیله از زحمات صمیمانه همه عزیزانی که ما را در انجام این مطالعه یاری رساندند سپاسگزاریم.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1. Kiencke S, Handschin R, von DR, Muser J, Brunner-Larocca HP, Schumann J, et al. Pre-clinical diabetic cardiomyopathy: prevalence, screening, and outcome. *Eur J Heart Fail*. 2010;12(9):951-7.
2. Straub SG, Sharp GW. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002;18(6):451-63.
3. Aanstoot HJ, Anderson BJ, Daneman D, Danne T, Donaghue K, Kaufman F, et al. The global burden of youth diabetes: perspectives and potential. *Pediatr Diabetes*. 2007;8 (8):1-44.
4. Pasquel FJ, Umpierrez GE. Hyperosmolar hyperglycemic state: a historic review of the clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Diabetes Care*. 2014;37(11):3124-31.
5. Tao Z, Shi A, Zhao J. Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell Biochem Biophys*. 2015;73(1):181-5.
6. Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB, et al. Market potential for probiotics. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2):476S-83S.
7. Olson DW, Aryana KJ. An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. *LWT- Food Science and Technology*. 2008;41(5):911-8.
8. Sanders ME. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J Nutr*. 2000;130(2):384S-90S.
9. Wang H, Lee IS, Braun C, Enck P. Effect of Probiotics on Central Nervous System Functions in Animals and Humans: A Systematic Review. *J Neurogastroenterol Motil*. 2016;22(4):589-605.
10. Panwar H, Rashmi HM, Batish VK, Grover S. Probiotics as potential biotherapeutics in the management of type 2 diabetes - prospects and perspectives. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013;29(2):103-12.
11. Bested AC, Logan AC, Selhub EM. Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances: Part II - contemporary contextual research. *Gut Pathog*. 2013;5(1):3.
12. Bejar W, Hamden K, Ben SR, Chouayekh H. *Lactobacillus plantarum* TN627 significantly reduces complications of alloxan-induced diabetes in rats. *Anaerobe*. 2013;24:4-11.
13. Brem H, Balledux J, Bloom T, Kerstein MD, Hollier L. Healing of diabetic foot ulcers and pressure ulcers with human skin equivalent: a new paradigm in wound healing. *Arch Surg*. 2000;135(6):627-34.
14. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centred approach. Update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*. 2015;58(3):429-42.
15. Ugbenyen AM, Odetola AA. Hypoglycemic potential of young leave methanolic extract of *Magnifera indica* in alloxan induced diabetic rat. *Pakistan J Nutr*. 2009; 8(3): 239-41.
16. Asgary S, Parkhideh S, Solhpour A, Madani H, Mahzouni P, Rahimi P. Effect of ethanolic extract of *Juglans regia* L. on blood sugar in diabetes-induced Rats. *J Med Food* 2008; 11(3): 533-8.
17. Rajagopal K, Sasikala K. Antihyperglycaemic and antihyperlipidaemic effects of *Nymphaea stellata* in alloxan-induced diabetic rats. *Singapore Med J* 2008; 49(2): 137-41.
18. Quanhong L1, Caili F, Yukui R, Guanghui H, Tongyi C. Effects of protein-bound polysaccharide isolated from pumpkin on insulin in diabetic rats. *Plant Foods Human Nutr* 2005; 60(1): 13-6.
19. Viana GS, Medeiros AC, Lacerda AM, Leal LK, Vale TG, Matos FJ. Hypoglycemic and antilipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BMC Pharmacol* 2004; 4: (9): 1-17.
20. Saravanan R, Pari L. Antihyperlipidemic and antiperoxidative effect of Diasulin, a polyherbal formulation in alloxan induced hyperglycemic rats. *BMC Complement Altern Med*. 2005; 5: 14: 1-8
21. Kumar CPS, rulselvan P, umar DS, ubramanian SP. Anti-Diabetic activity of fruits of *Terminalia chebula* on streptozotocin induced diabetic rats. *J health Sci*. 2006; 52(3): 283-91.
22. Larejani B, Zahedi F. Epidemiology of diabetes mellitus in Iran. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*. 2001;1(1):1-8.
23. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and



- Lactobacillus casei in high fructose fed rats. *Nutrition*. 2007;23(1):62-8.
24. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Dairy Res*. 2008;75(2):189-95
25. Laleye S, Igbakin AP, Akinyanju JA. Antidiabetic Effect of Nono (A Nigerian Fermented Milk) on Alloxan-Induced Diabetic Rats. *American Journal of Food Technology*. 2008;3(6):394-8.
26. Harisa G, Taha E, Khalil AF, Salem MM. Oral Administration of *Lactobacillus acidophilus* restores nitric oxide level in diabetic rats. *Australian Journal of Basic and Applied*. 2009;3(3):2963-9.
27. Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T. Antidiabetic effects of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-Ay mice. *Endocr J*. 1997;44(3):357-65.
28. Badkoubeh H, Jafar P, Akbari A. The effect of native TD2 strain of *Lactobacillus caesium* on blood glucose in diabetic Wistar rats. *Journal of Physiology and Animal Development*. 2013;22(3):1-6 [In Persian].
29. Lee E, Jung SR, Lee SY, Lee NK, Paik HD, Lim SI. *Lactobacillus plantarum* Strain Ln4 Attenuates Diet-Induced Obesity, Insulin Resistance, and Changes in Hepatic mRNA Levels Associated with Glucose and Lipid Metabolism. *Nutrients*. 2018;10(5): 1-15.



Original Article

Tissue Changes and Anti-Diabetic Activity of *Lactobacillus Plantarum* on Pancreatic Beta Cells in Alloxan-Induced Diabetic Rats

Alipanahi E¹, Taheri S^{2*}, Tabatabaei M¹

1. Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshar, Iran

Received: 28 Jul 2019

Accepted: 05 Nov 2019

Abstract

Background & Objective: Diabetes is a chronic disease in which the production or function of insulin is impaired. This hormone is secreted by pancreatic beta cells and its main function is to lower blood glucose. Probiotics are living microorganisms that strengthen and balance the intestinal microbial flora and have beneficial effects on host health.

Materials & Methods: In this study, 32 mice were divided into four groups: the first group (non-diabetic control), the second group (diabetic control), the third group (diabetic mice treated with *Lactobacillus Plantarum*), and the fourth group (diabetic mice treated with glibenclamide). After blood sampling and serum isolation, serum glucose, and insulin levels were measured using enzymatic kit and ELISA, respectively. Also, sections of the pancreas were prepared and the average diameter of the Langerhans Islands was examined.

Results: The results showed a significant decrease in glucose levels in the treatment group with *Lactobacillus Plantarum* compared with the diabetic control group ($P < 0.05$), which is similar to glibenclamide. Moreover, in the group treated with *Lactobacillus Plantarum*, insulin levels did not change significantly compared to the diabetic group. Pancreatic histological examination also showed that this probiotic also affected the improvement of pancreatic tissue.

Conclusion: The results suggest that *Lactobacillus Plantarum* has positive effects on the control of blood glucose in diabetic mice with Alloxane and may be used as a drug supplement to control blood glucose.

Keywords: Diabetes, Probiotics, *Lactobacillus Plantarum*, Pancreas, Alloxan

*Corresponding Author: Taheri Saba, Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshar, Iran

Email: sabataheri@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0001-7596-614X>