

تأثیر شیر سویای غنی شده با امگا-3 و تخمیر شده با بیفیدوباکتریوم لاکتیس بر قند خون،

وزن بدن و پروفایل لیپیدی در موش‌های صحرایی دیابتی

محسن محمدی سرتنگ¹، سید محمد مظلومی²، نادر تنیده³، عباس رضائیان زاده⁴

- 1- دانشجوی دکتری علوم تغذیه، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران
- 2- نویسنده مسئول: استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، مرکز تحقیقات و دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران
پست الکترونیکی: mazloomi@sums.ac.ir
- 3- استادیار گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات تکنولوژی ترانس ژنیک و سلول‌های بنیادی، دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران
- 4- دانشیار گروه اپیدمیولوژی و مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

تاریخ دریافت: 92/11/20

تاریخ پذیرش: 93/3/21

چکیده

سابقه و هدف: دیابت ملیتوس یک اختلال شایع اندوکراین است که به وسیله کمبود یا مقاومت به انسولین مشخص می‌شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر شیر سویای غنی شده با امگا-3 و تخمیر شده با بیفیدوباکتریوم لاکتیس بر قند خون، وزن بدن و پروفایل لیپیدی در موش‌های صحرایی دیابتی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی دیابتی شده به 4 گروه تقسیم شدند. یک گروه نیز به عنوان کنترل سالم در نظر گرفته شد. در طول مدت مداخله، گروه‌های کنترل سالم و کنترل دیابتی، روزانه 1 میلی‌لیتر آب مقطر و گروه‌های دیابتی، 1 میلی‌لیتر از هریک از محصولات شیرسویا، شیرسویای پروبیوتیک و شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 از طریق گاواژ دریافت نمودند. قند خون و وزن بدن به صورت هفتگی و پروفایل لیپیدی در انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در مقایسه 3 گروه تحت درمان با گروه کنترل دیابتی، دریافت هر 3 محصول توانست سطح قند خون، تری‌گلیسرید و کلسترول تام را به طور معنی‌داری کاهش دهد ($P < 0/05$)، که بیشترین کاهش برای گروه دریافت کننده شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 بود. در پایان مطالعه، میزان وزن بدن در هر 3 گروه تحت درمان نسبت به گروه کنترل دیابتی به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$)، که میزان افزایش در گروه دریافت کننده شیر سویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 نسبت به 2 گروه دیگر بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: به طور کلی ترکیب شیرسویا، پروبیوتیک‌ها و امگا-3، احتمالاً در کاهش عوارض مرتبط با دیابت مؤثر می‌باشد.

واژگان کلیدی: شیرسویا، پروبیوتیک، امگا-3، موش‌های صحرایی دیابتی

• مقدمه

ناکارآمدی و عوارض درمان با داروها از یک سو و اثر بخش بودن برخی از مواد طبیعی از سوی دیگر، منجر به توجه و گرایش به محصولات سویا به عنوان محصولات غذایی هیپوگلیسمیک و هیپولیپیدمیک گردیده است، هرچند تحقیقات اخیر اثرات ایزوفلاوون‌های سویا را در پیشگیری از بیماری‌های مزمن از جمله دیابت ملیتوس نشان داده اند (1)، اما برخی مطالعات نیز نتایج متناقضی را نشان داده‌اند (2، 3). ایزوفلاوون‌ها ممکن است اثرات ضد دیابتی خود را از طریق گیرنده‌های استروژنی اعمال کنند. گیرنده

دیابت شیرین یک اختلال شایع آندوکراین در بسیاری از کشورهاست که با تغییرات نامطلوب در سطح گلوکز خون و پروفایل لیپیدی همراه است. افزایش مزمن قند خون در این بیماری موجب نارسایی عضوهای مختلف به خصوص چشم‌ها، کلیه‌ها، اعصاب و قلب و عروق می‌گردد. علی‌رغم وجود پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه تولید داروهای آنتی‌دیابتیک مختلف، دیابت و عوارض آن، همچنان به عنوان یک مشکل بهداشتی عمده باقی مانده است (1).

بررسی اثرات شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 در موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو بود.

• مواد و روش‌ها

روش تهیه شیرسویا: شیرسویا به روش Hou و همکاران (6)، تولید شد. بدین ترتیب که پس از خیساندن لوبیای سویا به مدت یک شب در آب مقطر، آب آن دور ریخته شد و با 10 برابر وزن خود با آب مقطر ترکیب شد و به مدت 3 دقیقه با استفاده از مخلوط‌کن مخلوط شد. برای تهیه شیر سویا، مخلوط حاصل از یک پارچه دو لایه ای کاملاً تمیز عبور داده شد و در ظرف جداگانه‌ای نگهداری شد.

روش تهیه شیرسویای پروبیوتیک و شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3: به این منظور، شیرسویای تهیه شده به سه بخش مساوی تقسیم شد. سپس همه ی نمونه‌ها در 121 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه استریل و تا 37 درجه سانتی‌گراد سرد گردید و به یک نمونه از شیرسویا، 1 گرم در لیتر امگا-3

(SERVA, Feinbiochemica Heidelberg Newyork USA) افزوده شد. در ادامه به یک نمونه از شیرسویای بدون امگا-3 و همین طور به یک نمونه شیرسویای حاوی امگا-3 مقدار 0/1 گرم در لیتر بیفیدوباکتریوم لاکتیس اضافه شد. سپس گرمخانه‌گذاری دو نمونه‌ای که باکتری به آنها تلقیح شده بود تا رسیدن pH نمونه‌ها به 4/7 در 37 درجه ی سانتی‌گراد انجام شد. پس از آن نمونه‌ها از گرمخانه خارج و در یخچال نگهداری شدند. نمونه‌های شیرسویای تخمیر شده هر 1 هفته یک بار، تحت شرایط کاملاً بهداشتی تولید شدند.

حیوانات آزمایشگاهی: در ابتدا 65 سر موش صحرایی نر نژاد Sprague- Dawley با میانگین وزن اولیه 240-260 گرم از خانه حیوانات شیراز خریداری شدند. کلیه موش‌های صحرایی در مدت 2 هفته (دوره تطابق) و 4 هفته (دوره آزمایش) در قفسه‌هایی مجهز به جایگاه ویژه آب و غذا موجود در خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز نگهداری شدند. قفسه‌ها در اتاقی با دمای $22 \pm 2^\circ\text{C}$ و رطوبت $5 \pm 55\%$ در صد و سیکل 12 ساعته ی روشنایی و تاریکی قرار داشتند. در طول مطالعه حیوانات به آب و غذا بصورت آزاد دسترسی داشتند. غذای استاندارد رایج موش‌های صحرایی طبق فرمول زیر از شرکت بهپرور تهیه گردید:

آلفای استروژن نقش مهمی در بیوسنتز و ترشح انسولین و همین طور بقای سلول‌های بتای پانکراس دارد (4).

اگرچه شیر سویا دارای میزان زیاد پروتئین با کیفیت و میزان کم اسیدهای چرب اشباع و فاقد کلسترول می‌باشد و به دلیل نداشتن لاکتوز یک مکمل تغذیه ای مناسب برای افراد با عدم تحمل لاکتوز در نظر گرفته می‌شود (5)، اما مصرف آن به واسطه طعم نامطلوب و وجود اولیگوساکاریدهایی چون رافینوز و استاکیوز که اغلب منجر به نفخ و ناراحتی معده می‌شوند دارای محدودیت‌هایی است. یک راه برای غلبه بر این مشکل و بهبود قابلیت پذیرش آن نزد مصرف کنندگان، انجام فرآیند تخمیر بر روی محصول می‌باشد (6). تخمیر سویا منجر به تغییرات ساختاری در پروتئین‌ها و فیتواستروژن‌ها می‌شود که این مسئله به اثرات مفید آن بر روی متابولیسم گلوکز بیشتر کمک می‌کند. بنابراین اثرات شیرسویا در کاهش خطر و پیشرفت مقاومت به انسولین و دیابت نوع 2 با تخمیر افزایش می‌یابد (7). نتایج مطالعات نشان داده است که شیرسویای تخمیر شده، ترکیب لیپوپروتئین‌ها در حیوانات تغذیه شده با رژیم غنی از کلسترول را تحت تأثیر قرار می‌دهد و مصرف آن باعث کاهش تجمع تری‌گلیسرید و کاهش کلسترول تام در کبد در شرایط استرس اکسیداتیو می‌شود (8).

مکمل‌یاری با اسید چرب امگا-3 در کنترل گلیسمیک بیماری دیابت، توجه زیادی را به خود جلب کرده است و ممکن است در کاهش برخی عوارض دیابت مؤثر باشد. از طرف دیگر، این اسیدهای چرب به علت داشتن پیوندهای دوگانه خود در معرض اکسید شدن قرار دارند و بنابراین، ممکن است موجب افزایش استرس اکسیداتیو شوند (9). مطالعات انسانی و حیوانی، نتایج متناقضی در مورد اثر مکمل‌یاری با روغن ماهی و اسیدهای چرب امگا-3 بر وضع اکسیدان - آنتی اکسیدان و گلیسمیک نشان داده اند (11)، (10).

با توجه به ضدو نقیض بودن نتایج مطالعات، و لزوم تحقیقات بیشتر در خصوص شیرسویای پروبیوتیک به عنوان یک محصول حاوی مقادیر بالای آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر در کاهش عوارض و پیشرفت دیابت و امگا-3 به عنوان ماده‌ای مؤثر بر پروفایل لیپیدی و همچنین اهمیت توسعه تحقیقات در زمینه تولید و فراوری غذاهای فراویژه مؤثر در پیشگیری یا درمان بیماری‌ها در کشورمان، هدف از انجام این مطالعه

خانه حیوانات وزن می‌شدند. اندازه گیری قند خون موش‌ها نیز به صورت هفتگی توسط دستگاه گلوکومتر انجام شد.

خونگیری و اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی: در روز 29 آزمایش و در حالت ناشتا و پس از بیهوشی کامل از طریق تزریق کتامین (45-60 میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن)، و دیازپام (2/5 میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن)، خونگیری از قلب آنها انجام شد و نمونه‌های خون جهت جداسازی سرم، با دور 3500 به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم‌های جدا شده تا زمان انجام آزمایشات در فریزر -80 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری قند و چربی‌های خون (کلسترول تام، تری‌گلیسرید، LDL-کلسترول و HDL-کلسترول) به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر انجام شد.

آنالیز آماری: داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت. برای مقایسه میانگین قند خون و وزن بدن بین گروه‌ها که در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شد از آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر (ANOVA with repeated measure) و برای مقایسه میانگین سایر پارامترها بین گروه‌ها که در انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد که در صورت معنی‌دار بودن نتایج بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی Duncan استفاده شد. اختلاف آماری با $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

• یافته‌ها

نتایج آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر نشان داد که از هفته اول تا آخر در طول زمان قند خون در موش‌های صحرایی تغییر معنی‌داری کرده است، اما روند تغییر کاهش قند خون در موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف با رژیم‌های داده شده متفاوت بود ($P < 0/001$) (جدول 1). 7 روز بعد از تزریق استرپتوزوتوسین-نیکوتین آمید، سطح قند خون در موش‌های صحرایی نسبت به گروه کنترل سالم به طور معنی‌داری ($P < 0/001$) افزایش یافت (جدول 1). در انتهای مطالعه، میزان افزایش قند خون در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم 197 درصد بیشتر بود ($P < 0/001$) (جدول 1). طبق نتایج جدول 1، درمان موش‌های دیابتی با هر 3 محصول (شیرسویا، شیرسویای پروبیوتیک و شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3) در روزهای 7، 14، 21 و 28 دوره بعد درمان توانست سطح قند خون را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل دیابتی

اجزاء	درصد
پروتئین	19/5-20/5
چربی	3/5-4/5
فیبر	4-4/5
خاکستر	حد اکثر 10
کلسیم	0/95-1
فسفر	0/65-0/7
نمک	0/50-0/55
رطوبت	حد اکثر 10
لیزین	1/15
متیونین	0/33
ترئونین	0/72
تریپتوفان	0/25
انرژی	16/16-17

دیابتی کردن موش‌ها: دیابت نوع دو از طریق تزریق درون صفاقی 65 میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن استرپتوزوتوسین (Sigma, USA)، 15 دقیقه بعد از تزریق 110 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم نیکوتین آمید (Merck, Germany) القاء گردید. نمونه‌های خون از انتهای دم موش‌های صحرایی به دست آمد. بعد از گذشت 7 روز از تزریق، گلوکز خون پایدار با استفاده از دستگاه گلوکومتر (Accu-chek Active Roche, Germany) اندازه‌گیری شد و سطح گلوکز بالاتر از 150 میلی گرم در دسی‌لیتر به عنوان معیار دیابت در نظر گرفته شد (12).

طراحی آزمایش: پس از القاء موفقیت آمیز دیابت در گروه‌های مورد نظر، یک دوره 4 هفته ای مداخله ای آغاز شد که در طول این دوره، موش‌های صحرایی در گروه‌های 13 سری بدین صورت گروه بندی شدند: گروه 1 (کنترل سالم) دریافت کننده روزانه 1 میلی لیتر آب مقطر به همراه رژیم غذایی معمولی، گروه 2 (کنترل دیابتی) دریافت کننده روزانه 1 میلی لیتر آب مقطر به همراه رژیم غذایی معمولی، گروه 3 (گروه دیابتی) دریافت کننده روزانه 1 میلی لیتر شیرسویا به همراه رژیم غذایی معمولی، گروه 4 (گروه دیابتی) دریافت کننده روزانه 1 میلی لیتر شیرسویای پروبیوتیک به همراه رژیم غذایی معمولی و گروه 5 (گروه دیابتی) دریافت کننده روزانه 1 میلی لیتر شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 به همراه رژیم غذایی معمولی. محصولات به مدت 4 هفته و از طریق گاواژ به حیوانات داده شد.

اندازه‌گیری وزن و قند خون موش‌های صحرایی: موش‌ها به صورت هفتگی توسط ترازوی دیجیتال موجود در

($P<0/001$) (جدول 2)، از طرفی روند تغییر وزن در موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف با رژیم‌های داده شده متفاوت بود ($P<0/001$) (جدول 2). درمان موش‌های دیابتی 7 روز بعد از درمان نتوانست هیچ تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل دیابتی نشان دهد، ولی میزان افزایش وزن در روزهای 14، 21 و 28 در هر 3 گروه تحت درمان افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل دیابتی نشان داد ($P<0/05$). البته میزان وزن‌گیری در انتهای مطالعه در گروه دریافت کننده شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 نسبت به 2 گروه دیگر بیشتر بود (جدول 2).

کاهش دهد ($P<0/05$)، که بیشترین کاهش به ترتیب 47/2 درصد برای گروه دریافت کننده ی شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3، 39/3 درصد برای گروه دریافت کننده شیرسویای پروبیوتیک و 35/8 درصد برای گروه دریافت کننده ی شیرسویا بود. از نظر مقایسه بین 3 گروه تحت درمان برای کاهش قند خون به جز روز 21 که قند خون در گروه دریافت کننده ی شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 نسبت به گروه دریافت کننده ی شیرسویا به طور معنی‌داری کمتر بود ($P<0/05$)، در بقیه روزها تفاوت معنی‌داری بین این 3 گروه مشاهده نشد (جدول 1). نتایج آنالیز واریانس با اندازه گیری‌های مکرر نشان داد که از هفته اول تا آخر وزن موش‌های صحرایی تغییر کرده است

جدول 1. میزان قند خون بر حسب میلی گرم در دسی لیتر (میانگین $\pm$ انحراف معیار) موش‌های صحرایی گروه‌های کنترل و دیابتی طی دوره آزمایش به مدت 28 روز

گروه	قبل مداخله	بعد مداخله				p.value		
		روز 7	روز 14	روز 21	روز 28	روز	گروه	روز* گروه
NC	114/08 $\pm$ 2/90 ^a	110/75 $\pm$ 4/26 ^a	111/00 $\pm$ 5/30 ^a	103/3 $\pm$ 5/46 ^a	133/33 $\pm$ 3/17 ^a	>0/05	0/001>	0/001>
DC	162/58 $\pm$ 15/04 ^b	127/17 $\pm$ 83/17 ^b	39/14 $\pm$ 206/92 ^b	222/42 $\pm$ 43/94 ^b	223/75 $\pm$ 67/92 ^b			
SM	153/45 $\pm$ 5/69 ^b	149/73 $\pm$ 4/40 ^c	144/18 $\pm$ 8/32 ^c	145/55 $\pm$ 11/94 ^c	143/64 $\pm$ 14/50 ^c			
FSM	156/15 $\pm$ 7/42 ^b	153/08 $\pm$ 6/13 ^c	141/46 $\pm$ 8/02 ^c	134/38 $\pm$ 14/63 ^{dc}	133/92 $\pm$ 18/80 ^{ac}			
FSM+omega3	160/45 $\pm$ 4/56 ^b	157/27 $\pm$ 4/22 ^c	136/91 $\pm$ 9/84 ^c	127/09 $\pm$ 4/18 ^{ad}	120/36 $\pm$ 9/86 ^{ac}			

حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار بودن نتایج ($P<0/05$) را پس از آزمون آنالیز واریانس با اندازه گیری‌های مکرر نشان می‌دهد. NC: گروه کنترل سالم، DC: گروه کنترل دیابتی، SM: گروه دیابتی دریافت کننده شیر سویا، FSM: گروه دیابتی دریافت کننده شیر سویای پروبیوتیک، FSM+omega3: گروه دیابتی دریافت کننده شیر سویای پروبیوتیک غنی شده با امگا3

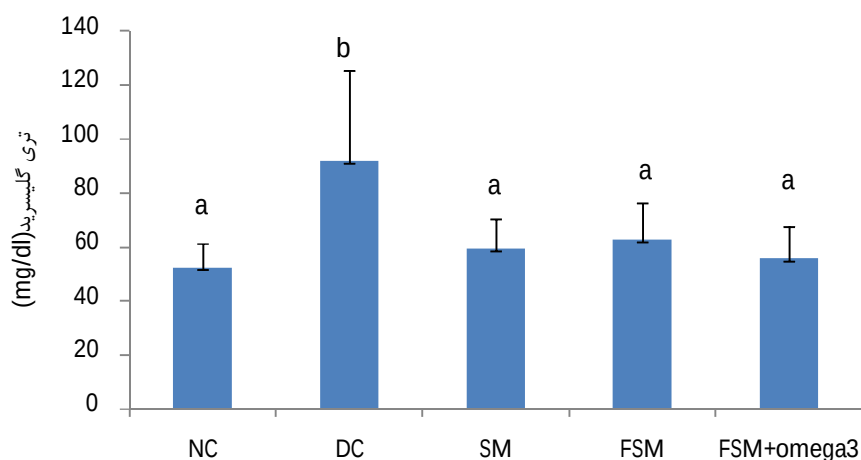
جدول 2. میزان وزن بر حسب گرم (میانگین $\pm$ انحراف معیار) موش‌های صحرایی گروه‌های کنترل و دیابتی طی دوره آزمایش به مدت 28 روز

گروه	قبل مداخله	بعد مداخله				p.value		
		روز 7	روز 14	روز 21	روز 28	روز	گروه	روز* گروه
NC	253/25 $\pm$ 23/35	270/08 $\pm$ 19/70 ^a	270/83 $\pm$ 21/87 ^a	284/50 $\pm$ 22/65 ^a	299/67 $\pm$ 23/09 ^a	>0/001	0/001>	0/001>
DC	245/67 $\pm$ 19/49	243/67 $\pm$ 20/27 ^b	240/50 $\pm$ 20/92 ^b	238/92 $\pm$ 21/06 ^b	236/42 $\pm$ 21/19 ^b			
SM	243/45 $\pm$ 17/14	255/09 $\pm$ 17/26 ^{ab}	265/55 $\pm$ 17/73 ^a	273/22 $\pm$ 19/58 ^a	285/18 $\pm$ 19/45 ^a			
FSM	250/54 $\pm$ 21/97	259/08 $\pm$ 24/92 ^{ab}	272/23 $\pm$ 25/94 ^a	283/62 $\pm$ 26/69 ^a	295/15 $\pm$ 27/22 ^a			
FSM+omega3	246/00 $\pm$ 19/45	256/36 $\pm$ 19/64 ^{ab}	269/00 $\pm$ 18/94 ^a	276/73 $\pm$ 21/05 ^a	298/45 $\pm$ 21/84 ^a			

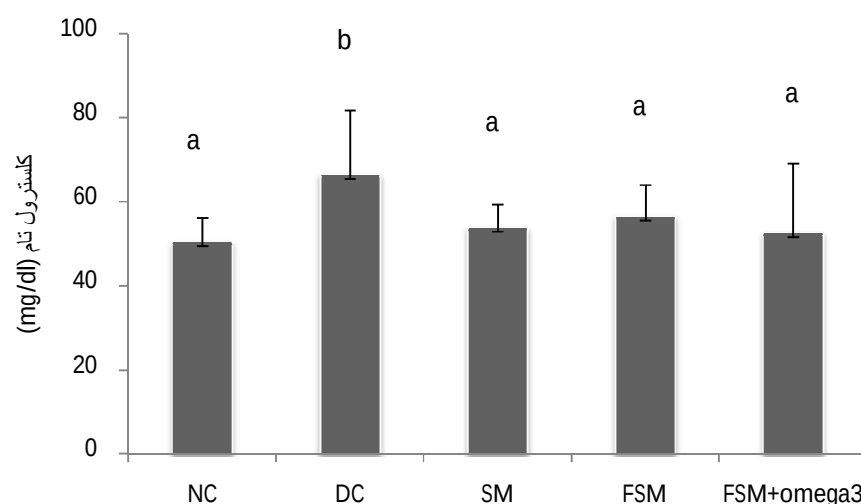
حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار بودن نتایج ($P<0/05$) را بین گروه‌ها پس از آزمون آنالیز واریانس با اندازه گیری‌های مکرر نشان می‌دهد. NC: گروه کنترل سالم، DC: گروه کنترل دیابتی، SM: گروه دیابتی دریافت کننده شیر سویا، FSM: گروه دیابتی دریافت کننده شیر سویای پروبیوتیک، FSM+omega3: گروه دیابتی دریافت کننده شیر سویای پروبیوتیک غنی شده با امگا3

گروه‌های دیگر بیشتر بود (کاهش 20/8 درصدی برای کلسترول تام و 39/3 درصد برای تری‌گلیسرید). میزان کاهش تری‌گلیسرید در گروه مصرف کننده شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 در مقایسه با گروه مصرف کننده شیرسویا و مصرف کننده شیرسویای پروبیوتیک به ترتیب 6/2 و 11/2 درصد کمتر بود. از نظر LDL-C و HDL-C بین هیچ کدام از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

طبق نمودارهای 1 و 2، میزان تری‌گلیسرید و کلسترول تام گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل سالم نشان دادند ($P < 0/05$), در حالی که پارامترهای HDL-C و LDL-C بین این دو گروه از نظر آماری معنی‌دار نبود. تری‌گلیسرید و کلسترول تام در هر 3 گروه تحت درمان نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($P < 0/05$), که این کاهش در گروه دیابتی مصرف کننده شیر سویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 نسبت به



نمودار 2. میانگین تری‌گلیسرید خون گروه‌های مورد بررسی در انتهای دوره ی آزمایش. مقادیر بیانگر میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت معنی‌دار بودن نتایج ($P < 0/05$) را بین گروه‌ها پس از آزمون تعقیبی (دانکن) آنالیز واریانس یک طرفه نشان می‌دهد. NC: گروه کنترل سالم، DC: گروه کنترل دیابتی، SM: گروه دیابتی دریافت کننده ی شیر سویا، FSM: گروه دیابتی دریافت کننده ی شیر سویای پروبیوتیک، FSM+omega3: گروه دیابتی دریافت کننده ی شیر سویای پروبیوتیک غنی شده با امگا3



نمودار 3. میانگین کلسترول تام خون گروه‌های مورد بررسی در انتهای دوره ی آزمایش. مقادیر بیانگر میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت معنی‌دار بودن نتایج ($P < 0/05$) را بین گروه‌ها پس از آزمون تعقیبی (دانکن) آنالیز واریانس یک طرفه نشان می‌دهد. NC: گروه کنترل سالم، DC: گروه کنترل دیابتی، SM: گروه دیابتی دریافت کننده ی شیر سویا، FSM: گروه دیابتی دریافت کننده ی شیر سویای پروبیوتیک، FSM+omega3: گروه دیابتی دریافت کننده ی شیر سویای پروبیوتیک غنی شده با امگا3

• بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد، بعد از 28 روز درمان، قند خون گروه دیابتی دریافت کننده شیر سویا نسبت به گروه کنترل دیابتی به طور معنی داری کمتر بود. نتایج این مطالعه با نتایج سایر مطالعات که به بررسی سویا و ایزوفلاوون‌های آن بر روی قند خون در موش‌های دیابتی پرداخته‌اند (15-13) همخوانی دارد. اثرات هیپوگلیسمیک ایزوفلاوون‌ها از طریق مکانیسم‌های احتمالی شامل فعال شدن گیرنده‌های PPAR گاما، منع پیام‌رسانی SREBP-1 (17، 16) و همچنین تقویت ترشحی الگوی سلول‌های بتا تا حدی به وسیله ی فعال کردن مسیر پیام‌رسانی cAMP/protein kinase می‌باشد (18). از طرفی در این مطالعه میزان کاهش قند خون در گروه دریافت کننده شیرسویای پروبیوتیک نسبت به شیرسویا بیشتر بود. مطالعات زیادی اثرات شیرسویای تخمیر شده را بر روی متابولیسم گلوکز بررسی کرده‌اند (20، 19). فرآیند تخمیر تغییرات ساختاری و عملکردی در سویا را به همراه دارد که نتیجه ی آن تولید ترکیبات متنوع پپتیدی و آمینواسیدی با اثرات فیزیولوژیک مفید می‌باشد (3). نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه Hung و همکاران (2009)، که در آن شیرسویای تخمیر شده نسبت به شیرسویا، فعالیت مهار کنندگی بیشتری در مقابل آنزیم‌های آلفا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز داشت، همخوانی دارد (7). همچنین بعد از تخمیر، ایزوفلاوون‌های گلیکوزیده به ایزوفلاوون‌های آگلیکون تبدیل می‌شوند که این ایزوفلاوون‌ها فعالیت فیزیولوژیکی بیشتری نسبت به نوع گلیکوزیده دارند و سطح سرمی آن‌ها سریع‌تر افزایش می‌یابد (19). بنابراین اثرات بیشتر شیرسویای تخمیر شده، احتمالاً با افزایش ایزوفلاوون‌های آگلیکون ارتباط مستقیم دارد. به نظر می‌رسد کاهش بیشتر قند خون در گروه دیابتی دریافت کننده شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 نسبت به دو گروه دیگر، مربوط به اسیدهای چرب امگا-3 باشد. هرچند نتایج تحقیقات گذشته در مورد اثرات مفید اسیدهای چرب امگا-3 بر روی قند خون متناقض می‌باشد، اما در برخی مطالعات (22، 21)، اثرات مفید مصرف این اسیدهای چرب بر روی قند خون نشان داده شده است، که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد. این فرضیه که افزایش دریافت اسیدهای چرب امگا-3 ممکن است خطر دیابت را کاهش دهد در موش‌ها آزمایش و نشان داده شده است که مکمل یاری با روغن ماهی در موش‌های دیابتی شده از افزایش قند

خون جلوگیری می‌کند (23). طبق نظریه Anderson اسیدهای چرب امگا-3 باعث بهبود حساسیت به انسولین می‌شود (24). از سوی دیگر Kasim معتقد است که این ترکیبات ترشح انسولین را در پاسخ به غذا کم کرده و تولید گلوکز در کبد را افزایش می‌دهند (25). در مجموع می‌توان گفت که تناقض در نتایج مطالعات مختلف در خصوص اثر مصرف اسیدهای چرب امگا-3 بر قند خون ممکن است به دلیل اختلاف در دوز مصرفی روغن ماهی، افزایش دریافت کالری در نتیجه مصرف چربی اضافی و استفاده از داروهای هیپوگلیسمیک باشد.

میزان وزن گروه کنترل دیابتی در پایان مطالعه نسبت به گروه کنترل سالم 21 درصد کاهش یافت کاهش وزن در موش‌های صحرایی دیابتی در مطالعات گذشته نیز نشان داده شده است که احتمالاً به دلیل دهیدراسیون و کاتابولیسم پروتئین‌ها و از دست دادن چربی بدنی به علت افزایش واکنش‌های کاتابولیکی است (26). نتایج مطالعه ی حاضر نشان داد بعد از 28 روز درمان، وزن در هر 3 گروه تحت درمان نسبت به گروه کنترل دیابتی به طور معنی داری افزایش یافت. هرچند مکانیسم دقیق این که چگونه این محصولات منجر به افزایش وزن شده‌اند معلوم نیست، اما به نظر می‌رسد ایزوفلاوون‌های شیرسویا باعث بهبود کلی متابولیسم در موش‌های دیابتی شوند و از این طریق باعث وزن‌گیری شوند. از طرفی پروتئین سویا باعث تأمین پروتئین مورد نیاز برای رشد کافی و وزن‌گیری موش‌های صحرایی می‌شود (1). هرچند وزن‌گیری طبیعی موش‌های صحرایی نیز می‌تواند دلیل احتمالی افزایش وزن حیوانات بوده و نقش این محصولات را در افزایش وزن کمرنگ کند. میزان افزایش وزن در گروه دریافت کننده ی شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 حتی از گروه کنترل سالم نیز بیشتر بود. هرچند مطالعات Kasim (25)، نشان داده که در اثر مصرف اسیدهای چرب امگا-3 ممکن است وزن افزایش یابد و دلیل احتمالی افزایش وزن را افزایش دریافت کالری در نتیجه مصرف چربی‌های حاوی مکمل‌های روغن ماهی می‌داند اما احتمالاً دلیل این افزایش وزن را در این گروه نمی‌توان به دریافت امگا-3 نسبت داد، چرا که دریافت 1 گرم در لیتر توسط حیوانات نمی‌تواند نقش چندانی در این افزایش وزن داشته باشد.

با در نظر گرفتن سطوح HDL-C، هر چند افزایش معنی داری در هر 3 گروه تحت درمان نسبت به گروه کنترل دیابتی مشاهده نشد، اما این افزایش در گروه دریافت کننده شیرسویای پروبیوتیک نسبت به 2 گروه دیگر بیشتر بود. این نتایج با مطالعه Rossi و همکاران (2000)، که در آن شیرسویای پروبیوتیک باعث افزایش HDL-C شد مطابقت دارد (32). اثرات ایزوفلاون ها بر روی سطوح HDL-C نامشخص است. در بعضی از مطالعات همچون نتایج این مطالعه، مصرف سویا باعث افزایش سطح HDL-C شد (33)، اما در بعضی مطالعات نیز کاهش سطح HDL-C به میزان کمی یا عدم تغییر در سطح آن مشاهده گردید (34). افزایش بیشتر سطح HDL-C در گروه دریافت کننده شیرسویای پروبیوتیک را می توان به این امر نسبت داد که ایزوفلاون ها در شیرسویای تخمیر شده سریعتر جذب شده و سطوح سرمی بیشتری دارند (32). البته عدم تفاوت معنی داری در سطوح HDL-C و LDL-C در این مطالعه را می توان این گونه توجیه کرد که احتمالاً برای تأثیر ایزوفلاون ها روی این فاکتورها، به مدت زمان بیشتری از مداخله نیاز می باشد.

به طور خلاصه مطالعه حاضر نشان داد که احتمالاً شیرسویا برای کاهش خطر و شروع دیابت و کاهش عوارض مرتبط با دیابت مؤثر می باشد. اجزای موجود در شیرسویا از جمله، پروتئین سویا، پپتیدها و به خصوص ایزوفلاون های موجود در آن مسئول اثرات مشاهده شده می باشند. تأثیر مثبت و بیشتر شیرسویای پروبیوتیک بر بعضی متغیرها نشان می دهد که کارایی شیرسویا با تخمیر افزایش می یابد، چرا که تخمیر با تغییرات ساختاری و شیمیایی در شیرسویا همراه بوده و سطح سرمی و سرعت جذب ایزوفلاون های آگلیکون را به نسبت بیشتری افزایش می دهد. همچنین افزودن اسیدهای چرب امگا-3 می تواند اثرات مشاهده شده را تقویت کند. به طور کلی ترکیب شیرسویا، پروبیوتیک ها و امگا-3، احتمالاً در کاهش عوارض مرتبط با دیابت مؤثر می باشد.

سپاسگزاری: این مقاله از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه علوم پزشکی شیراز به شماره 6074-91 استخراج گردیده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به دلیل تأمین اعتبار و همین طور از همکاری صمیمانه خانه حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

در این مطالعه سطوح تری گلیسرید و کلسترول تام در موش های صحرایی دیابتی نسبت به موش های سالم به طور قابل توجهی بیشتر بود. نتایج تحقیقات قبلی نشان می دهد که دیابت القاء شده توسط استرپتوزوتوسین در موش صحرایی، با تغییرات بارز در سطوح لیپیدهای پلاسما همراه است. به علاوه شواهد تحقیقاتی متعددی مبنی بر این موضوع یافت می شود که در موش های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین، هیپرگلیسمی به همراه افزایش سطح تری گلیسرید و کلسترول رخ می دهد (27).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در هر 3 گروه تحت درمان، سطوح تری گلیسرید و کلسترول تام نسبت به گروه کنترل دیابتی به طور معنی داری کمتر می باشد. میزان کاهش تری گلیسرید در گروه دریافت کننده شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 نسبت به 2 گروه دیگر بیشتر بود.

اثرات هیپوکلسترولمیک شیرسویا و شیرسویای پروبیوتیک در مطالعه ما با نتایج مطالعه Kikuchi-Hayakawa و همکاران (1998)، که نشان داد شیرسویای پروبیوتیک ساخت کلسترول را در موش های صحرایی متوقف می کند همخوانی دارد (8).

اثرات کاهش دهنده لیپیدها و ضد آتروژنیک پروتئین سویا در مطالعات گذشته گزارش شده است. به نظر می رسد نه فقط پروتئین سویا بلکه ایزوفلاون های شیر سویا در مکانیسم های کاهش دهنده لیپیدهای پلاسما شرکت دارند (28، 2). از دیگر مکانیسم های احتمالی می توان به کاهش نسبت انسولین به گلوکاگون، که باعث کاهش بیان SREBP-1 و متعاقب آن، کاهش بیان ژن های لیپوژنیک می شود، افزایش بیان SREBP-2، توسط ایزوفلاون ها و در نتیجه افزایش کلیرانس کلسترول و افزایش فعالیت گیرنده های PPAR که منجر به برداشت اسیدهای چرب پلاسما می شود، اشاره کرد (29، 30).

اثرات مفید بیشتر شیرسویای پروبیوتیک غنی شده با امگا-3 در کاهش تری گلیسرید در مطالعه ی ما احتمالاً مربوط به اثرات اسیدهای چرب امگا-3 می باشد. نتایج این مطالعه با نتایج دیگر مطالعات که نشان داد اسیدهای چرب امگا-3 باعث کاهش تری گلیسرید پلاسما می شود همخوانی دارد. احتمالاً کاهش لیپوژن کبدی در اثر اسیدهای چرب امگا-3 دلیل این امر می باشد (31).

• References

1. Shim JY, Kim KO, Seo BH, Lee HS. Soybean isoflavone extract improves glucose tolerance and raises the survival rate in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Res Pract*. 2007 Winter;1(4):266-72. PubMed PMID: 20368949. Pubmed Central PMCID: 2849033.
2. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med*. 1995;333(5):276-82.
3. Kwon DY, Daily JW, Kim HJ, Park S. Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes *Nutr Res*. 2010;30(1):1-13.
4. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998 Oct;139(10):4252-63. PubMed PMID: 9751507.
- 5-Vij S, Hati S, Yadav D. Biofunctionality of Probiotic Soy Yoghurt. *Food Nutr Sci*. 2011;2(5):502-9.
- 6-Hou J-W, Yu R-C, Chou C-C. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Res International*. 2000; 33(5):393-7.
7. Ju HE, Han JS. Hypoglycemic effect of fermented soymilk added with bokbunja (*Rubus coreanus Miquel*) in diabetic mice. *Food Sci and Biotechnol*. 2010;19(4):1041-6.
8. Kikuchi-Hayakawa H, Onodera N, Matsubara S, Yasuda E, Chonan O, Takahashi R, et al. Effects of soy milk and bifidobacterium fermented soy milk on lipid metabolism in aged ovariectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 1998 Sep;62(9):1688-92. PubMed PMID: 9805369.
9. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*. 1991;54(3):438-63.
- 10-Higdon JV, Liu J, Du S-H, Morrow JD, Ames BN, Wander RC. Supplementation of postmenopausal women with fish oil rich in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is not associated with greater in vivo lipid peroxidation compared with oils rich in oleate and linoleate as assessed by plasma malondialdehyde and F2-isoprostanes. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(3):714-22.
11. Song JH, Miyazawa T. Enhanced level of n-3 fatty acid in membrane phospholipids induces lipid peroxidation in rats fed dietary docosahexaenoic acid oil. *Atherosclerosis*. 2001;155(1):9-18.
12. Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, et al. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. 1998;47(2):224-9.
13. Lu M-P, Wang R, Song X, Chibbar R, Wang X, Wu L, et al. Dietary soy isoflavones increase insulin secretion and prevent the development of diabetic cataracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr res*. 2008;28(7):464-71.
14. Nordentoft I, Jeppesen PB, Hong J, Abudula R, Hermansen K. Increased insulin sensitivity and changes in the expression profile of key insulin regulatory genes and beta cell transcription factors in diabetic KKAY-mice after feeding with a soy bean protein rich diet high in isoflavone content. *J Agric Food Chem*. 2008;56(12):4377-85.
15. Noriega-López L, Tovar AR, Gonzalez-Granillo M, Hernández-Pando R, Escalante B, Santillán-Doherty P, et al. Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acid pattern and isoflavones. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20657-66.
16. Jhala US, Canettieri G, Screatton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, et al. cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev*. 2003 Jul 1;17(13):1575-80. PubMed PMID: 12842910. Pubmed Central PMCID: 196130.
- 17-Davis J, Iqbal MJ, Steinle J, Oitker J, Higginbotham DA, Peterson RG, et al. Soy protein influences the development of the metabolic syndrome in male obese ZDFxSHHF rats. *Horm Metab Res*. 2005 May;37(5):316-25. PubMed PMID: 15971156.
- 18-Veloso RV, Latorraca MQ, Arantes VC, Reis MAB, Ferreira F, Boscherio AC, et al. Soybean diet improves insulin secretion through activation of cAMP/PKA pathway in rats. *J Nutr Biochem*. 2008 Nov;19(11):778-84. PubMed PMID: WOS:000260443200009. English.
19. Kawakami Y, Tsurugasaki W, Nakamura S, Osada K. Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol. *J Nutr Biochem*. 2005;16(4):205-12.
20. Kwon DY, Jang JS, Hong SM, Lee JE, Sung SR, Park HR, et al. Long-term consumption of fermented soybean-derived Chungkookjang enhances insulinotropic action unlike soybeans in 90% pancreatectomized diabetic rats. *Eur J Nutr*. 2007 Feb;46(1):44-52. PubMed PMID: 17200876.
21. Storlien L, Kriketos A, Calvert G, Baur L, Jenkins A. Fatty acids, triglycerides and syndromes of insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1997;57(4-5):379.

22. Krishna MI, Das U. Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by polyunsaturated fatty acids. *Nutrition*. 2001;17(2):126.
23. Linn T, Noke M, Woehrle M, Kloer HU, Hammes HP, Litzlbauer D, et al. Fish Oil-Enriched Diet and Reduction of Low-Dose Streptozocin-Induced Hyperglycemia: Inhibition of Macrophage Activation. *Diabetes*. 1989;38(11):1402-11.
24. Anderson KM. Nutritional management of diabetes mellitus in infants and young children. *J pediatric & perinatal nutr.* 1987 Fall-Winter;1(2):83-90. PubMed PMID: 3443929.
25. Kasim SE. Dietary marine fish oils and insulin action in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;683(1):250-7.
26. Hakim ZS, Patel BK, Goyal RK. Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J Physiol Pharmacol*. 1997;41:353-60.
27. Yanardağ R, Bolkent Ş, Özsoy-Saçan Ö, Karabulut-Bulan Ö. The effects of chard (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) extract on the kidney tissue, serum urea and creatinine levels of diabetic rats. *Phytother Res*. 2002;16(8):758-61.
28. Carroll K. Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein. *J Am Diet Assoc*. 1991;91(7):820.
29. Potter SM. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr*. 1995 Mar;125(3 Suppl):606S-11S. PubMed PMID: 7884541.
30. Torres N, Torre-Villalvazo I, Tovar AR. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J Nutr Biochem* 2006;17(6):365-73
31. Sirtori C, Galli C. N-3 fatty acids and diabetes. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2002;56(8):397-406.
32. Rossi EA, Vendramini RC, Carlos IZ, Ueiji IS, Squinzari MM, Silva Jr SI, et al. Effects of a novel fermented soy product on the serum lipids of hypercholesterolemic rabbits. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2000;74(3):213-6.
33. Cheik NC, Rossi EA, Guerra RL, Tenorio NM, Oller do Nascimento CM, Viana FP, et al. Effects of a ferment soy product on the adipocyte area reduction and dyslipidemia control in hypercholesterolemic adult male rats. *Lipids Health Dis*. 2008;7:50. PubMed PMID: 19087298. Pubmed Central PMCID: 2628905.
34. Fukushima M, Nakano M. The effect of a probiotic on faecal and liver lipid classes in rats. *Br J Nutr*. 1995;73(5):701-10.

The effects of omega-3 fatty acid-fortified soymilk fermented with *bifidobacterium lactis*, on the body weight, blood glucose and lipid profile of diabetic rats

Mohammadi Sartang M¹, Mazloomi M^{*2}, Tanideh N³, Rezaian Zadeh A⁴

- 1- PhD Student in Nutrition Sciences, Dept. of Nutrition, School of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
- 2- *Corresponding author: Assistant Prof, Dept. of Food Hygiene and Quality Control, School and Research Center of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, E-mail: mazloomi@sums.ac.ir
- 3- Assistant Prof, Dept. of Pharmacology, Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
- 4- Associate Prof, Dept. of Epidemiology and Research Center for Health Sciences, School of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received 9 Feb, 2014

Accepted 11 Jun, 2014

Background and objective: Type-2 diabetes is a prevalent metabolic disorder characterized by both insulin deficiency and peripheral insulin resistance. This study was undertaken to determine the effects of omega-3 fatty acid-fortified soymilk fermented with *bifidobacterium lactis* on the body weight, blood glucose and lipid profile of diabetic rats.

Materials and methods: Diabetic rats were divided into four groups (one being diabetic control); a fifth group was added as a normal control. The two control groups (normal control and diabetic control) received, by tube-feeding, 1 mL/day of distilled water, while the three diabetic groups received 1 mL/day of soymilk (SM), fermented soymilk (FSM) and fermented soymilk fortified with omega-3 fatty acids (FSM+omega-3). Body weight and blood glucose were monitored weekly and the lipid profile was measured at the end of the 28-day period.

Results: As compared with the diabetic group, administration of SM, FSM and FSM+omega-3 for 28 days led to statistically significant ($p < 0.05$) reductions in blood glucose, total cholesterol and triglyceride concentrations, with the maximum reduction in the FSM+omega-3 fatty acid group. In addition, as compared to the diabetic group, body weight in the 3 treated groups receiving the SM, FSM and FSM+omega-3 fatty acids increased significantly ($p < 0.05$), the maximum weight gain being in the FSM+omega-3 fatty acid group.

Conclusion: The findings suggest that fermented soy milk fortified with omega-3 fatty acids may be beneficial in preventing or delaying the progression of type-2 diabetes.

Keywords: Soymilk, Probiotic, Omega-3 fatty acids, Diabetic rats