

بررسی لیپوپروتئین‌های شیر و سرم شیر مادر

دکتر شهناز خاقانی - گروه بیوشیمی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر بیژن فرزاسی - گروه بیوشیمی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر حسن محمدیها - گروه بیوشیمی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر لادن حسینی گوهری - گروه بیوشیمی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تهران

A Survey of Human Milk and Whey Lipoproteins ABSTRACT

In this research 20 specimen from human whole milk and whey were studied with respect to lipoproteins, cholesterol and triglycerides, 2-8 months after parturition. The whey was separated by means of ultracentrifugation. Also the 24 hour diet history was recorded.

The average lipoprotein components in normal human milk were, chylomicron $16.19\% \pm 11.98\%$, beta lipoprotein $36.71\% \pm 9.33\%$, pre beta-lipoprotein $8.61\% \pm 3.03\%$ and alpha lipoprotein $38.49\% \pm 9.97\%$.

These components were also measured in whey and the results were as follows: chylomicron $6.91\% \pm 1.55\%$, beta lipoprotein $47.32\% \pm 10.5\%$, pre beta lipoprotein $11.48\% \pm 4.4\%$ and alpha lipoprotein $33.87\% \pm 7.84\%$. The percent average of the total lipoprotein content and its free forms were estimated in human milk. The average percent chylomicron content was $6.48\% \pm 1.43\%$, beta lipoprotein $33.85\% \pm 13.1\%$, pre beta lipoprotein $12.88\% \pm 2.78\%$ and alpha lipoprotein was $47.25\% \pm 10.63\%$.

The average ratio of alpha to beta lipoprotein (HDL/LDL) in human milk was found to be 1.10 ± 0.51 .

Thus, we conclude that breast-feeding can be considered as a potential preventive factor against future cardiovascular diseases.

خلاصه

تعداد ۲۰ نمونه شیر مادر و فراکسیون سرم شیر مادر از نظر لیپوپروتئین‌ها، کلسترول و تری‌گلیسرید در ۲ تا ۸ ماه بعد از زایمان مورد بررسی قرار گرفتند. سرم شیر با استفاده از اولتراسانتریفور جدا گردید. خاطره غذایی ۲۴ ساعته مادران نیز ثبت شد.

میانگین درصد لیپوپروتئین‌ها در شیر مادران شامل شیلومیکرون $16.19 \pm 11.98\%$ ، بتالیپوپروتئین $36.71 \pm 9.33\%$ ، پربتالیپوپروتئین $8.61 \pm 3.03\%$ و آلفالیپوپروتئین $38.49 \pm 9.97\%$ بود.

میانگین درصد لیپوپروتئین‌ها در سرم مادران شامل شیلومیکرون $6.91 \pm 1.55\%$ ، بتالیپوپروتئین $47.32 \pm 10.5\%$ ، پربتالیپوپروتئین $11.48 \pm 4.4\%$ و آلفالیپوپروتئین $33.87 \pm 7.84\%$ بود. میانگین درصد لیپوپروتئین‌های کل و آزاد در نمونه‌های شیر مادران شامل شیلومیکرون $6.48 \pm 1.43\%$ ، بتالیپوپروتئین $33.85 \pm 13.1\%$ ، پربتالیپوپروتئین $12.88 \pm 2.78\%$ و آلفالیپوپروتئین $47.25 \pm 10.63\%$ بود.

میانگین نسبت آلفا لیپوپروتئین به بتالیپوپروتئین

(HDL/LDL) در نمونه‌های شیر مادران 1.10 ± 0.51 بود. بنابراین نتایج بدست آمده می‌توان گفت که تغذیه با شیر مادر احتمالاً می‌تواند در آینده عامل پیش‌گیری از ابتلاء به بیماریهای قلب و عروق باشد.

مقدمه

مطالعات اخیر ترکیب پیچیده و رقابت‌ناپذیر شیر انسان را برای تامین نیازهای نوزاد تأیید نموده و نشان داده است که شیر انسان دارای بیش از صد ترکیب شیمیائی مختلف با نسبت‌های خاص و کاملاً متفاوت از شیر سایر پستانداران می‌باشد (۱).

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که شیر کم‌چرب دارای فاکتور کاهش دهنده کلسترول می‌باشد (۲). تجربیات نشان می‌دهد که دادن شیر کامل و یا شیر کم‌چرب به موش موجب کاهش کلسترول سرم و کاهش میزان فعالیت آنزیم تنظیم‌کننده سنتز کلسترول یعنی هیدروکسی متیل گلو تاریل کوانزیم آردوکتاز می‌گردد.

بنابراین مطالعات می‌توان گفت که شیر و فرآورده‌های شیری دارای اثر هیپوکلسترولمیک در انسان و حیوانات می‌باشد ولی

شامل لیستی از غذاها یا گروه‌های غذایی می‌باشد و فرد پاسخ‌دهنده در مقابل سؤالات فرم پیشنهادی آماده، پاسخهای مناسب را می‌دهد.

علاوه بر این روش ممکنست ۲۴ ساعت خاطره غذایی برای جمع‌آوری اطلاعات در مورد الگوی مصرفی افراد باشد و شامل ثبت خاطره ۲۴ ساعت مصرف غذایی افراد مورد مطالعه است (۹). سپس اطلاعات حاصله را طبق جدول RDA (Recommended Dietary Allowances) تجزیه می‌کنیم که براساس گروه‌بندی غذایی هر یک از مواد غذایی خورده شده می‌باشد و میزان کربوهیدرات، پروتئین و لیپید و کالری هر یک از مواد غذایی مصرفی مشخص می‌گردد (۴) و بالاخره می‌توانیم میزان کربوهیدرات، پروتئین، لیپید و کالری مصرفی در ۲۴ ساعت قبل را محاسبه نمائیم.

در این مقاله برای تهیه ۲۴ ساعت خاطره غذایی به تمام مادران مورد مطالعه آموزش لازم در تهیه غذا و مصرف آن داده شده بود تا به آسانی بتواند آمادگی پاسخ در مورد ترکیبات غذا را داشته باشند و سپس بعد از ۳ بار تکرار خاطره غذایی، تاریخچه ۲۴ ساعت خاطره غذایی از آنها گرفته شد و نتایج طبق جداول RDA مورد بررسی قرار گرفت (۴).

۳- جدا کردن لیپوپروتئین‌های شیر مادر

الف - ابتدا شیر کامل را به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰g سانتیفرز کرده و لایه چربی را جدا می‌کنیم. سپس نمونه‌ها را تا زمان آنالیز در ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم.

ب - به شیر کم‌چرب ماده پتاسیم بروماید اضافه می‌کنیم تا دانسیته آن به طریق زیر به ۱/۲۵ گرم در هر میلی‌لیتر برسد. در لوله‌های آزمایش با حجم ۱۲ میلی‌لیتر محتوی شیر کم‌چرب ماده پتاسیم بروماید جامد را (دانسیته ۱/۲۵ گرم در هر میلی‌لیتر) روی نمونه‌های شیر اضافه می‌کنیم. تنظیم دانسیته شیر به این ترتیب می‌باشد که از نسبت وزن شیر به حجم شیر، دانسیته شیر را با اضافه کردن پتاسیم بروماید به میزان ۱/۲۵ گرم در هر میلی‌لیتر می‌رسانیم. پ - سپس نمونه شیر را در درجه حرارت ۱۷ درجه سانتی‌گراد با روتور ۴۰-SW به مدت ۴۰ ساعت در ۱۸۹۰۰۰xg اولتراسانتریفوز می‌کنیم.

ج - بعد از اولتراسانتریفوز مایع زلال را که غنی از لیپوپروتئین است به دقت به وسیله پیپت پاستور جدا می‌کنیم و در کیسه دیالیز آماده شده ریخته و برعلیه محلول بافر که شامل کلرورسدیم ۰/۱۵ مول در هر لیتر تریس=۱ میلی‌مول و EDTA = ۰/۱۱ گرم در صد با pH برابر ۷/۴ است دیالیز می‌کنیم. در حجم نهائی لیپوپروتئین‌های شیر و لیپوپروتئین‌های آزاد شیر با همان بافر به حجم اولیه می‌رسانیم.

مکانیسم و طبیعت فاکتورهای هیپوکلسترولمیک شیر کاملاً روشن نشده است. به دلیل این که عمل جوشاندن و بی‌چربی کردن شیر اثر هیپوکلسترولمیک آن را کاهش می‌دهد، تصور می‌گردد که این فاکتور یک کمپلکس لیپید-پروتئین احتمالاً شبیه مولکولهای لیپوپروتئین باشد که شکل فعال این فاکتور در شیر انسان می‌بایستی همانند ایمنوگلوبولین‌ها و کلسترول شیر از طریق سلولهای روده جذب گردد و مسئول کاهش کلسترول آئورتیک در نوزاد باشد (۲).

به دلیل این که در تمام مطالعات انجام شده و در شرف انجام هیچگونه اشاره‌ای به ماهیت و میزان این فاکتور نشده بود بنابراین در این مطالعه لیپوپروتئین‌های شیر و فراکسیون سرم شیر (whey) از نمونه‌های جمع‌آوری شده از ۲۰ خانم شیرده جهت تحقیق میزان لیپوپروتئین‌های آزاد شیر مادران و سرم شیر آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه این بررسی به ما اجازه خواهد داد تا در مطالعات بعدی رابطه هر یک از لیپوپروتئین‌ها و رشد نوزاد را بتوانیم مورد بررسی قرار دهیم تا مشخص کنیم چه نوع تغذیه‌ای برای مادر مناسب است که بتواند میزان لیپوپروتئین‌ها را در سطح مناسب برای رشد نوزاد فراهم سازد.

روشها

۱- نحوه جمع‌آوری نمونه‌ها

نمونه‌های شیر ۲۰ خانم شیرده شاغل بطور تصادفی جمع‌آوری شد. آموزش لازم به خانمها داده شد که چگونه در ظروف نمونه‌گیری داده شده به آنان در حالت ناشتا و قبل از تغذیه نوزاد نمونه را جمع‌آوری کنند. برای تهیه شیر کم‌چرب، شیر تازه دوشیده شده را در ۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفرز کرده و بعد از جدا کردن لایه چربی، شیر کم‌چربی را تا زمان آنالیز در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمودیم.

برای تهیه فراکسیون سرم شیر، شیر تازه دوشیده در ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۸۹۰۰۰g به مدت یک ساعت اولتراسانتریفوز شد و بعد از جدا کردن لایه چربی، مایع زلال به وسیله پیپت پاستور جدا گردید و در ویال‌های تمیز ریخته شده و تا زمان آنالیز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۳).

۲- تهیه تاریخچه ۲۴ ساعت خاطره غذایی

تاریخچه ۲۴ ساعت خاطره غذایی یکی از آسانترین روشها برای جمع‌آوری اطلاعات غذای افراد است و شامل اطلاعات حاصله در مورد غذا و مایعات مصرفی یک روز قبل یعنی برای ۲۴ ساعت قبل است که براساس اطلاعات در مورد مصرف غذای روزانه است و از طریق مصاحبه با فرد بدست می‌آید و مهارت مصاحبه کننده می‌تواند موجب دقت در کسب اطلاعات باشد. بسیاری از انستیتوهای تحقیقاتی یک فرم پیشنهادی از سؤالات را دارند که دارای جای خالی برای ثبت اطلاعات می‌باشد و در چارچوب غذای مصرفی در ۲۴ ساعت گذشته می‌باشد. این فرم

سیستم آزمایشگاهی ملنا (CAT, No.3180) با استفاده از پلیت‌های آماده آگارز استفاده شد. مقدار ۷۵ میکرولیتر نمونه (شیر و سرم شیر) را در جایگاه نمونه‌گذاری طبق روش روئین در دستگاه قرار می‌دهیم. باند‌های رنگ شده جهت تعیین مقدار در طول موج ۵۲۵ نانومتر اسکن شدند (۶).

نتایج

جدول شماره ۱ میانگین میزان کربوهیدرات، پروتئین و لیپید غذایی مادران را نشان می‌دهد. جدول شماره ۲ میانگین میزان کلسیوم و تری‌گلیسرید شیر و سرم شیر مادران را نشان می‌دهد. جدول شماره ۳ میانگین میزان درصد لیپوپروتئین‌های نمونه‌های شیر و سرم شیر مادران را نشان می‌دهد و جدول شماره ۴ میزان درصد لیپوپروتئین‌های کل آزاد شیر مادر را نشان می‌دهد و جدول شماره ۵ میانگین میزان نسبت آلفالیپوپروتئین به بتالیپوپروتئین در نمونه‌های شیر مادران را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱ میانگین میزان کربوهیدرات، پروتئین و چربی

غذای مادران* در ماه ۲-۸ شیردهی برحسب گرم در روز

کربوهیدرات	۷۶۸/۸۲±۱۲۲/۶۹ ^{##}
پروتئین	۶/۸۷±۲۲/۹۱
لیپید	۵۷/۴۳±۲۷/۷۴

* n=۲۰

میانگین و انحراف معیار

جدول شماره ۲- میانگین میزان کلسیوم و تری‌گلیسرید شیر و سرم شیر مادر

نمونه ۲۰-n	شیر مادر	سرم شیر مادر
کلسیوم (mg/dl)	۶۰/۹۸±۴۷/۵۶	۳۷/۲۲±۳۵/۴۱
تری‌گلیسرید* (mg/dl)	۱۷۷/۵۵±۱۳۷/۳	۱۲۸/۵±۱۰۷/۸

* به دلیل آنکه تری‌گلیسرید شیر بستگی به میزان لیپید شیر دارد و با توجه به اینکه لیپید شیر قبلاً جهت آزمایش جدا شده است و میزان لیپید جدا شده، متفاوت می‌باشد. نتایج انحراف معیار بالاتر را نشان می‌دهد.

۴- اندازه‌گیری کلسیوم شیر و سرم شیر

کلسیوم نمونه‌های شیر چربی گرفته و سرم شیر به روش لیرمن برشماره اندازه‌گیری شد (۵).

۵- اندازه‌گیری تری‌گلیسرید شیر و سرم شیر

تری‌گلیسرید نمونه‌های شیر چربی گرفته و سرم شیر به روش آنزیمی کالریمتریک اندازه‌گیری شد (۵).

۶- الکتروفورز

پلور کلی برای جدا کردن لیپوپروتئین‌ها از روش‌های متعددی مثل اولتراسانترایفوز، کروماتوگرافی نازک لایه، روش‌های ایمونوبلوژیکی و الکتروفورز استفاده می‌گردد. از نظر آزمایشگاهی معمولاً لیپوپروتئین‌ها را به دو طریق طبقه‌بندی می‌نمایند (۶).

۱- براساس وزن مخصوص به طریق اولتراسانترایفوز صورت می‌گیرد که هرچه درصد لیپید لیپوپروتئین‌ها بیشتر باشد سبکتر هستند و به ترتیب عبارتند از: شیلو میکرون، لیپوپروتئین با وزن مخصوص خیلی پائین (VLDL)، لیپوپروتئین با وزن مخصوص حدواسط (IDL)، لیپوپروتئین‌ها با وزن مخصوص پائین (LDL) و بالاخره لیپوپروتئین با وزن مخصوص بالا (HDL) که ممکنست به صورت HDL₂ و HDL₁ باشد.

۲- براساس جمع چربی بار آبیروتئین‌های لیپوپروتئین‌ها و به طریق الکتروفورز در محیط آگارز (pH=۸/۶) است که برحسب حرکت الکتروفورتیک از کاتد به آند چهار باند دیده می‌شود که عبارتند از شیلو میکرون (اگر وجود داشته باشد)، بتالیپوپروتئین (LDL)، پره بتالیپوپروتئین (VLDL) و آلفالیپوپروتئین (HDL). بستهبندی است که اگر بقایای شیلو میکرون (Remnant chylomicron) وجود داشته باشد، از نظر وزن مخصوص با VLDL مطابقت دارد و از نظر حرکت الکتروفورتیک در ناحیه پورینا و بتالیپوپروتئین‌ها قرار می‌گیرد. در این تحقیق از روش اخیر استفاده شد (۷).

پس‌دین ترتیب براساس جمع چربی بار آبیروتئین‌های لیپوپروتئین‌ها به طریق الکتروفورز در محیط آگارز (pH=۸/۶) برحسب حرکت الکتروفورتیک از کاتد به آندالیپوپروتئین‌های شیر انسان و سرم شیر آن مطالعه شد.

در این روش از دستگاه کاپییر تری الکتروفورز REP Lipo-30

جدول شماره ۳- میانگین میزان درصد لیپوپروتئین‌های نمونه‌های شیر و سرم شیر مادر

نمونه ۲۰-n	شیر مادر	شیلو میکرون (%)	بتالیپوپروتئین (LDL) (%)	پره بتالیپوپروتئین (VLDL) (%)	آلفالیپوپروتئین (HDL) (%)
شیر مادر	۱۶/۱۹±۱۱/۹۸	۳۶/۷۱±۹/۳۳	۸/۶۱±۳/۰۳	۱۱/۴۸±۴/۴	۷۸/۲۹±۹/۹۷
سرم شیر مادر	۶/۹۱±۱/۵۵	۴۷/۳۲±۱۰/۵			۳۳/۸۷±۷/۸۴

جدول شماره 4- میزان درصد لیپوپروتئین‌های کل و آزاد شیر مادران

شیر مادر n=20	شیلو میکرون (%)	LDL (%)	VLDL (%)	HDL (%)
	6/28±1/23	23/85±13/11	17/88±7/8	47/2±10/63

بحث

مطالعات انجام شده در مراجع نشان می‌دهند که شیر کم‌چرب دارای اثر کاهش دهندهٔ کلسترول می‌باشد؛ ولی مکانیسم طبیعت فاکتورهای هیپوکلسترولمیک شیر روشن نشده است (۱). در شیر مادر فاکتورهای فعال هیپوکلسترولمیک، همانند اینترلوکین‌ها توسط سلولهای روده جذب می‌شوند و مسئول کاهش کلسترول آتریتیک نوزاد می‌باشند (۲).

جوشاندن و نی چربی کردن شیر اثر هیپوکلسترولمیک آن را کاهش می‌دهد و می‌توان گفت که این فاکتورهای فعال ممکن است یک کمپلکس لیپید - پروتئین شبیه مولکولهای لیپوپروتئین باشد (۸). در بررسی حاضر با توجه به اینکه هیچکدام از مراجع اشاره‌ای به ماهیت و میزان فاکتور هیپوکلسترولمیک ننموده بودند، شیر مادر از نظر ترکیبات بیوشیمیایی از جمله لیپوپروتئین‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی نشان می‌دهد که شیر مادر دارای لیپوپروتئین است و برای بررسی لیپوپروتئین‌ها می‌توان از نمونه‌های شیر و با سرم شیر استفاده کرد که تکنیک آماده‌سازی آن توضیح داده شد. بررسی طرح الکتروفورزیک لیپوپروتئین‌های کل و آزاد شیر مادر نشان می‌دهد که میزان آگالیپوپروتئین (HDL) در شیر مادر بالاست و با توجه به اینکه HDL کلسترول فاکتور ضد خطر برای بیماری قلبی است؛ لذا تقاضای نوزاد با شیر مادر می‌تواند به عنوان عامل پیشگیری‌کننده از ابتلا به بیماریهای قلبی و عروقی درآینده باشد.

منابع

- 1- Renner E.(1989). *Micronutrients in milk and milk based food products*. Elsevier Applied science, p:178-180.
- 2- Myung-Sook Park, et al. (1988) Human metabolism by fetal rabbit aorta in organ culture. *A.J. Clin. Nutr.* 48, p:963-9.
- 3- Donoran Sh.M. and Lehmerdal Bo. (1989). *Isolation of non protein nitrogen fraction from human milk*. *Am. J. Clin. Nutr.* 50, p:53-7.
- 4- Recommended dietary allowances revised. (1980). Food and nutrition. National Academy Research council, Washington, D.C.
- 5- Tietz, N. (1994): *Fundamentals of clinical chemistry*; Philadelphia, W.B. Saunders Co. p: 849-855, 874-875, 876-877.

جدول شماره 5- میانگین میزان نسبت آگالیپوپروتئین به بتالیپوپروتئین (HDL/LDL) در نمونه‌های شیر مادران

شیر مادر	HDL/LDL
n=20	7/10±0/51

رگرسون میان کلسترول شیر مادر با LDL (r=0/17) و با VLDL (r=0/02) همبستگی معکوس داشت و با شیلو میکرون همبستگی نشان نداد (r=0).

رگرسون میان تری‌گلیسیرید شیر مادر با LDL (r=0/29) همبستگی مثبت داشت و با شیلو میکرون (r=0/1) و LDL (r=0/1) همبستگی معکوس نشان داد.

رگرسون میان چربی غذا یا لیپوپروتئین‌های VLDL (r=0/15)، LDL (r=0/1) و HDL (r=0/23) همبستگی مثبت داشت و با شیلو میکرون (r=0/3) و با شیلو میکرون (r=0/3) همبستگی معکوس داشت.

رگرسون میان کربوهیدرات غذا یا شیلو میکرون (r=0/11)، LDL (r=0/06) و VLDL (r=0/06) همبستگی معکوس داشت و با HDL (r=0/22) همبستگی مثبت داشت.

رگرسون میان چربی غذا با نسبت HDL/LDL (r=0/19) همبستگی معکوس داشت و رگرسون میان پروتئین غذا با نسبت HDL/LDL (r=0/11) همبستگی مثبت داشت.

- 6- Sonnenwirth, A and Jarett, L.(1980) *Grad wolt's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*. The C.V. Mosby company. p:275-277.
- 7- Houst - Muller, A.J. (1969). *Agarose gel electrophoresis of lipoproteins. A Clinical screening text*, Koninklijke van Gorcum and Comp the Netherlands, p:5.
- 8- Rowrow, J.E (1981). *The effect of skim milk, yoghurt, and full cream milk on human serum lipids*. *Am.J.Clin. Nutr.* 34:351-356.
- 9- Zeman, F.J. and Ney, D.M. (1988). *Applications of clinical Nutrition*. prentice hall. p:31-3.