

## فراوانی جمعیت بیفیدوباکتریوم لانگوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در روده مبتلایان به چاقی مفرط قبل و بعد از جراحی معده

کیمیا گلستان فر<sup>۱</sup>، لعیا تکبیری اسگوی<sup>۲\*</sup>، الهام سیاسی تربتی<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. استادیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

\*نویسنده مسئول: [l\\_takbiri@iaui-tnb.ac.ir](mailto:l_takbiri@iaui-tnb.ac.ir)

### چکیده

چاقی یک بیماری مزمن چند عاملی مرتبط با ژنتیک می باشد. مطالعات نشان داده اند در افراد چاق، کمیت و به احتمال بالا، کیفیت جمعیت باکتری های میکروبیوتای روده با افراد سالم متفاوت است. جهت بررسی بیشتر، در مطالعه حاضر جمعیت دو گونه بیفیدوباکتریوم لانگوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم قبل و بعد از عمل جراحی باریاتریک، به یکی از دو روش بای پس یا اسلیو مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۳۰ فرد مبتلا به چاقی مفرط با شاخص توده بدنی ۳۰ و بالاتر که کاندید جراحی باریاتریک با یکی از دو روش بای پس یا اسلیو بودند، همراه با ۱۸ فرد سالم بعنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های مدفوع پس از جمع آوری، با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA مورد بررسی قرار گرفتند. پس از اطمینان از خلوص DNA استخراج شده، با استفاده از روش Real-time PCR جمعیت دو باکتری فوق در نمونه های بیماران (قبل و بعد از جراحی) و نمونه های سالم در گروه کنترل تعیین گردید. در مطالعه حاضر میانگین جمعیت دو باکتری بیفیدوباکتریوم لانگوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در افراد مورد بررسی، قبل و بعد از انجام عمل باریاتریک در گروه کنترل از دو گروه دیگر (بای پس و اسلیو) به میزان قابل توجهی بیشتر بود ( $P < .05$ ). در صورتی که میانگین این باکتری در افراد مورد بررسی بعد از انجام عمل باریاتریک در گروه اسلیو از گروه بای پس بیشتر بود ( $P < .05$ ). همچنین میزان باکتری بیفیدوباکتریوم لانگوم قبل و بعد از عمل جراحی در گروه اسلیو از گروه بای پس بیشتر بود ( $P < .05$ ). بطور کلی بعد از انجام عمل باریاتریک به هر دو روش بای پس و اسلیو، میانگین باکتری های بیفیدوباکتریوم لانگوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم نسبت به قبل از عمل کاهش یافت و این کاهش در گروه تحت عمل بای پس محسوس تر بود ( $P < .05$ ).

با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می رسد کاهش وزن بواسطه جراحی می تواند در تغییر میزان باکتری های موجود در میکروبیوتای روده تاثیر بسزایی داشته باشد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که بیماری چاقی با فراوانی باکتری های فلور میکروبی روده مرتبط می باشد.

واژه های کلیدی: چاقی مفرط، جراحی معده، بیفیدوباکتریوم لانگوم، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم.

## مقدمه

چاقی وضعیت پزشکی است که طی آن بافت چربی بیش از حد طبیعی در بدن فرد انباشته می‌شود. این امر می‌تواند باعث پسرفت شاخص‌های سلامتی، از جمله کاهش میانگین طول عمر و یا کاهش کیفیت زندگی گردد. شایع‌ترین روش برای تخمین چاقی استفاده از شاخص توده بدن<sup>۱</sup> (BMI) است. شاخصی که با تقسیم کردن وزن شخص بر حسب کیلوگرم بر توان دوم قد وی بر حسب متر به دست می‌آید. طبق تعریف هنگامی که شاخص توده بدن بالاتر از ۳۰، آن فرد چاق محسوب می‌شود<sup>۱</sup>. مرض چاقی بیشتر به وسیله ترکیب بیش از اندازه انرژی غذایی ورودی، تحرکات بدنی کم و استعداد ژنتیکی، ایجاد می‌شود. هرچند اندک مواردی در ابتدا به وسیله ژن، اختلالات غده درون‌ریز، داروها یا امراض روانی ایجاد می‌شود<sup>۲</sup>.

جراحی باریاتریک یک گزینه درمانی برای افراد مبتلا به چاقی مفرط است که موفق به کاهش وزن توسط سایر روش‌ها نظیر رژیم‌های کاهش وزن، افزایش فعالیت بدنی و درمان‌های دارویی نشده‌اند. جراحی‌های کاهش وزن را می‌توان به سه دسته کلی تقسیم کرد، جراحی محدودکننده حجم معده که با ایجاد تغییرات در معده سبب کاهش حجم معده می‌گردند. در این روش، فرد در هر بار غذا خوردن احساس سیری زودتری نسبت به قبل دارد و حجم معده سریع‌تر پر می‌شود. روش کوچک کردن معده با حلقه تنظیم شونده به روش لاپاروسکوپی روش گاستروکتومی اسلیو، تا کردن معده، بالون معده از جمله این روش‌ها هستند. دسته دوم جراحی کاهش‌دهنده جذب غذا که در این روش، تغییراتی در روده کوچک صورت گرفته که باعث می‌گردد بدن فرد، کالری و مواد مغذی کمتری از مواد غذایی و نوشیدنی‌ها جذب کند. این گروه شامل روش جراحی تغییر مسیر صفرا و پانکراس که

این تغییر مسیر با جابجایی اثنی عشر می‌باشد. دسته سوم اعمال جراحی ترکیبی که از دو حالت قبل باهم استفاده می‌شود و روش بای پس معده در این گروه قرار می‌گیرد. در ایران روش حلقه گذاری قابل تنظیم معده، روش گاستروکتومی اسلیو و روش بای پس معده بیشتر از سایر روش‌ها رایج می‌باشد<sup>۳</sup>. در روش جراحی اسلیو یا اسلیو معده به دلیل برداشتن قسمتی از معده که مواد اشتهازا تولید می‌کند، بیمار بعد از جراحی چاقی به مدت چندین ماه بی‌اشتها می‌شود و لاغری و کاهش وزن بیشتری را تجربه می‌کند، ولی پس از این که اشتها بهتر شده چون کاهش چشم‌گیری در حجم معده صورت گرفته است، بیمار با مصرف مقدار کم غذا احساس سیری می‌کند و در نتیجه کالری مصرفی کاهش یافته و کاهش وزن و کاهش سایز بروز می‌کند و تا ۲ سال بعد از جراحی چاقی ادامه می‌یابد. در این روش بیمار پس از ۶ ماه در حدود نصف اضافه وزن خود را از دست داده و ظرف ۲ سال به وزن نرمال و ایده آل خود خواهد رسید<sup>۴</sup>. باکتری‌های روده جز مهمی از اکوسیستم میکروبی در دستگاه گوارش انسان هستند و نقش مهمی در سلامت انسان مانند تامین مواد مغذی ضروری، سنتز ویتامین K، کمک به هضم سلولز و عملکرد عصب روده بازی می‌کنند بزرگترین میکروبیوم بدن انسان، میکروبیوم دستگاه گوارش تحتانی و بطور خاص روده بزرگ می‌باشد که محل اصلی باکتری‌ها در بدن است بطوری که ۲۰٪ مدفوع انسان حاوی باکتری‌ها می‌باشد. براساس تعریف FAO/WHO پروبیوتیک‌ها<sup>۵</sup> به عنوان میکروارگانیسم‌های مفیدی هستند که وقتی به میزان مناسب تجویز شوند به نفع سلامت میزبان خواهند بود<sup>۵</sup>. فلور میکروبی روده همه انسان‌ها، یک سری وظایف اصلی و اساسی را به انجام می‌رساند اما در عملکردهای تخصصی متفاوت هستند. چنان که برخی از جوامع نسبت به برخی

<sup>3</sup> Food and Agriculture Organization

<sup>4</sup> Probiotic

<sup>1</sup> Body mass index

<sup>2</sup> World Health Organization

کاهش وزن پرداخته است. و بیان کرده است که امروزه، میکروبیوم‌های روده به عنوان یک عضو میکروبی در انسان شناخته می‌شوند. بنابراین با بهبود استراتژی‌های دستکاری میکروبیوم‌های روده می‌توان باعث کنترل بیماری‌های متابولیک شد (۱۱). پروفایل‌های میکروبی روده انسان منعکس کننده همکاری متابولیکی میان فیلوتیپ‌های مختلف باکتریایی می‌باشد. هیچ جنسی نمی‌تواند تمامی سوبستراها را تجزیه کند؛ برای مثال تمام اسیدهای چرب زنجیره کوتاه (SCFAs) توسط یک جنس باکتری تولید نمی‌شود. SCFAs نقش مهمی در تنظیم متابولیسم انرژی، ایمنی و گسترش بافت چربی دارند. فلور میکروبی روده همه انسان‌ها یک سری وظایف اصلی و اساسی را به انجام می‌رساند اما در عملکردهای تخصصی متفاوت هستند. چنان که برخی از جوامع نسبت به برخی دیگر با بیماری‌های انسان، دیابت و چاقی بیشتر دیده می‌شود (۹).

در مطالعه ای این نتایج حاکی از آن است که، پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم لانگوم، متابولیسم روده را از طریق تغییر در جامعه میکروبی روده تغییر می‌دهد. در این مطالعه افزایش معنا دار سطح پیمالات مدفوع را به عنوان یک ماده پیش ساز بیوتین و بوتیرات و همچنین افزایش قابل توجه سطح بیوتین را در مدفوع تحت تاثیر مکمل بیفیدوباکتریوم لانگوم مشاهده کردند. و این یافته‌ها اثر بیفیدوباکتریوم لانگوم را روی متابولیسم روده از طریق تعامل با جامعه میکروبی به وضوح نشان داد (۱۰). در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که نسبت باکتریوئیدس در افراد چاق در مقایسه با افراد لاغر کاهش یافته است و نسبت آنها با کاهش وزن در رژیم غذایی کم کالری، افزایش می‌یابد. یافته‌های آنها نشان داد که چاقی یک جزء میکروبی دارد، که ممکن است کاربردهای درمانی بالقوه داشته باشد (۱۲). شواهد حاکی از آن است که میکروبیوتای روده انسان در اولین سال زندگی او بنا نهاده می‌شود. نشان داده شده است که در افراد چاق تعداد

دیگر در بیماری‌های انسان، مانند دیابت و چاقی بیشتر دیده می‌شوند (۶). تعیین کامل ترکیب میکروبیوم انسان و ارتباط آن با سلامتی و بیماری میزبان یکی از چالش‌های اصلی در قرن ۲۱ می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهند که میکروبیوتا یک عامل محیطی در کنترل وزن بدن و تعادل انرژی می‌باشد. بسیاری از میکروبیوم‌های روده دارای روابط همزیستی با میزبان خود هستند و با مشارکت هم در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی از جمله فعالیت‌های شبکه سیستم ایمنی میزبان عمل می‌کنند. در فلور باکتریایی روده انسان بیش از ۹۰ درصد از گونه‌ها، متعلق به شاخه فرمیکوتس و باکتریوتس، و سپس شاخه اکتینوباکتریا و پروتئوباکتریومی باشد. ترکیب کلی میکروبیوم روده از فردی به فرد دیگر متغیر است، اما مجموعه ای از گونه‌ها در افراد مختلف حفظ شده است و در بین جمعیت مشترک می‌باشد و ممکن است برای عملکرد حیاتی خاصی از دستگاه گوارش ضروری باشند (۷). بیفیدوباکتریوم یک جنس از باکتری‌های غیر پاتوژن، بی‌هوازی اجباری، گرم مثبت، غیر متحرک، کاتالاز مثبت و فاقد اسپور و کپسول است که از لحاظ مورفولوژی دارای اشکال گوناگون به صورت باسیل‌های شاخه‌شاخه ظاهر می‌شوند. گونه‌های متعلق به جنس بیفیدوباکتریوم تولیدکننده اسیدلاکتیک هستند که بخش بزرگی از میکروفلور روده انسان و دیگر جانوران را تشکیل می‌دهند. گونه‌های بیفیدوباکتریوم، پروبیوتیک غالب در میکروبیوتای روده هستند و خواص درمانی آنها شامل حفظ تعادل بین باکتری روده و میزبان و نگهداشتن متابولیسم میزبان در حد نرمال می‌باشد (۸).

اثر پروبیوتیک روی میکروبیوم‌های روده بستگی به سویه میکروبیوم دارد و می‌تواند باعث کاهش وزن شود. کاهش وزن نیز همراه با تغییر در میکروبیوم‌های روده است. که می‌تواند متابولیسم بدن را تغییر دهند. این تحقیق به مرور اثرات میکروبیوم‌های روده روی تنظیم وزن و توانایی بالقوه آنها برای

بعد از انجام مرحله نمونه‌گیری حدود ۲۰۰ میکروگرم مدفوع جدا و در میکروتیوب ۲ میلی لیتری قرار داده شد. در صورت استفاده از نمونه فریز شده باید از ذوب شدن آن تا مرحله دوم یعنی افزودن بافر به نمونه جلوگیری نمود تا از تجزیه شدن DNA پیشگیری شود. ژنوم تمامی نمونه‌های مدفوع بیماران با استفاده از کیت اختصاصی استخراج DNA از مدفوع (QIAamp®) DNA Stool mini kit تهیه شده از شرکت کیاژن طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد و تا زمان انجام آزمایش های استخراج شده در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

### روش کار Real-Time PCR

ابتدا محاسبات مقدار محتوای هر واکنش انجام شد سپس مسترمیکس، محلول کاری پرایمر و پروب و نمونه‌های DNA بیماران از فریزر خارج و هم دمای محیط شدند. و مخلوط واکنش به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر طبق مقادیری که در جدول ۳-۵ ذکر گردید، بدست آمد. مخلوط واکنش در میکروتیوب‌های استریل ۰/۲ میکرولیتری برچسب گذاری شده، تقسیم شد. لازم به ذکر است که برای هر واکنش Real-Time PCR (در مورد هر نمونه بیمار و برای هر ژن باکتریایی مورد نظر) دو مخلوط واکنش آماده سازی شد تا هر آزمایش به صورت دو گانه انجام شود و خطاهای آزمایش حذف شود. پس از تهیه مخلوط واکنش یک مرحله اسپین سریع انجام شد تا کل محتوای میکروتیوب ته نشین و میکس شود. هر کدام از میکروتیوب‌ها را با یک پنبه برای عدم وجود کمترین کدورت پاک کرده و در نهایت داخل دستگاه قرار داده شد. برنامه زمانی و دمایی انجام واکنش Real-Time PCR در جدول ۱ ارائه شده است. قابل توجه است که برای کنترل صحت واکنش و پی بردن به آلودگی احتمالی در هر بار انجام تست از یک کنترل منفی استفاده گردید که شامل همه اجزای واکنش Real-Time PCR به غیر از DNA الگو بود. هر Real-Time PCR شامل ۳۵-۴۰ چرخه حرارتی است. این

باکتری‌های باکترئوئیدس ساکن در محیط روده کمتر و باکتریهای فرمیکوتس بیشتر است. این در حالی است که این ترکیب در افراد لاغر معکوس می‌باشد. از آنجایی که روش‌های درمان چاقی می‌تواند به دلیل تغییر اکوسیستم روده، در تغییر فلور نرمال نقش داشته باشد، بررسی فلور نرمال این افراد قبل و بعد از جراحی و پیگیری وزن بیماران می‌تواند ارتباط نقش تغییر فلور نرمال را در افزایش وزن این بیماران روشن کند و پیش بینی راهی برای جلوگیری از جراحی مجدد بیمار باشد، در مطالعه حاضر دو باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم لانگوم بعنوان نمونه‌ای از باکتری‌های حائز اهمیت موجود در فلور روده مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش کار

#### نمونه گیری

نمونه مدفوع از افراد واجد شرایط، زن و مرد، مراجعه کننده به بیمارستان حضرت رسول اکرم تهران صورت گرفت. در این مطالعه تعداد ۱۵۵ نفر از لحاظ معیارهای موجود در مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت از بین این افراد ۳۰ فرد مبتلا به چاقی تحت درمان و کاندید برای جراحی و ۱۸ فرد سالم به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. در مرحله بعد هر دو گروه شرکت کننده (گروه مبتلا به چاقی و گروه سالم) برای مدت ۳ ماه از مصرف هرگونه آنتی بیوتیک، پروبیوتیک و پری بیوتیک‌ها، انواع مکمل‌های غذایی موثر بر میکروبیوم روده و هر نوع داروی مختل کننده سیستم گوارشی منع شدند. پس از طی این دوره، نمونه برداری و جمع آوری نمونه‌های مدفوع به صورت دوره ای و در طی سه نوبت با فواصل ۱، ۳، و ۶ ماه بعد از عمل جراحی در گروه هدف و همچنین در گروه کنترل انجام شد. این مدت زمان برای فواصل نمونه گیری در گروه هدف و گروه کنترل به منظور نشان دادن روند تغییرات میکروبی روده در گروه مورد مطالعه و همچنین ثبات جمعیت میکروبی در گروه کنترل بوده است.

#### استخراج DNA

جمله نوع آنزیم مورد استفاده، غلظت یون‌های دو ظرفیتی و دزوکسی نوکلئوتیدها و درجه حرارت ذوب شدن پرایمرها بستگی دارد.

چرخه‌ها نیز به طور معمول دارای ۲-۳ درجه حرارت مشخص می‌باشند که معمولا از سیکل‌های حرارتی دو مرحله ای استفاده می‌کنند. درجه حرارت‌هایی که استفاده می‌شوند و مدت زمان‌هایی که رعایت می‌گردند به عوامل متعددی از

جدول ۱- ترکیب واکنش Real-Time PCR

اجزا	میزان	غلظت نهایی
Premix Ex Taq (probe qPCR) mastermix	۱۲ μl	۱X
Primer Forward(10pmol/ μl)	۰/۵ μ	۲۵۰-۸۰nM
Primer Reverse(10pmol/ μl)	۰/۵ μ	۲۵۰-۸۰nm
TaqMan probe	۰/۵ μ	
Template DNA(2-10ng)	۱ μ	/۱۰-۰۱ng/ μl
PCR-grade Water	۵/۵ μ	-
Total	۲۰ μl	

جدول ۲- برنامه انجام واکنش Real-Time PCR

برنامه	دما	زمان	سیکل
مرحله آغاز	۹۵ °C	۳۰ Sec	۱
واسرشت شدن	۹۵ °C	۵ Sec	۳۵
اتصال	۶۰ °C	۳۰ Sec	
طویل شدن			

بایستی تمامی منحنی‌های تکثیر در یک آزمایش (منحنی‌های مربوط به واکنش‌های جداگانه) را در فاز تصاعدی قطع کند. در نتیجه برای تمامی واکنش‌ها یک خط آستانه انتخاب می‌شود. در واقع حد آستانه نشان دهنده میزانی از محصول است که در آن همه نمونه‌ها به صورت لگاریتمی تکثیر می‌شوند.

### منحنی تکثیر و تعیین حد آستانه

آستانه تشخیص فلورسانس<sup>۱</sup> وسط دستگاه با پایان فاز ۱ و آغاز فاز ۲ (فاز لگاریتمی که آمپلیفیکاسیون قابل تشخیص و نور فلورسانس افزایش تصاعدی دارد) شروع می‌شود. بنابراین حد آستانه (Threshold) خطی موازی محور Xها است که

<sup>۱</sup> Threshold Detection Florescence



USA)، نرم افزار Minitab نسخه ۱۶,۲,۰ و نرم افزار Excel 2010 انجام شد. مقدار  $P < 0.05$  به عنوان یک مقدار معنی دار از لحاظ آماری در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان و ثبت شد. نتایج نهایی qPCR به صورت گرافیکی توسط نمودارهای Box و Whisker ارائه شد.

### نتایج

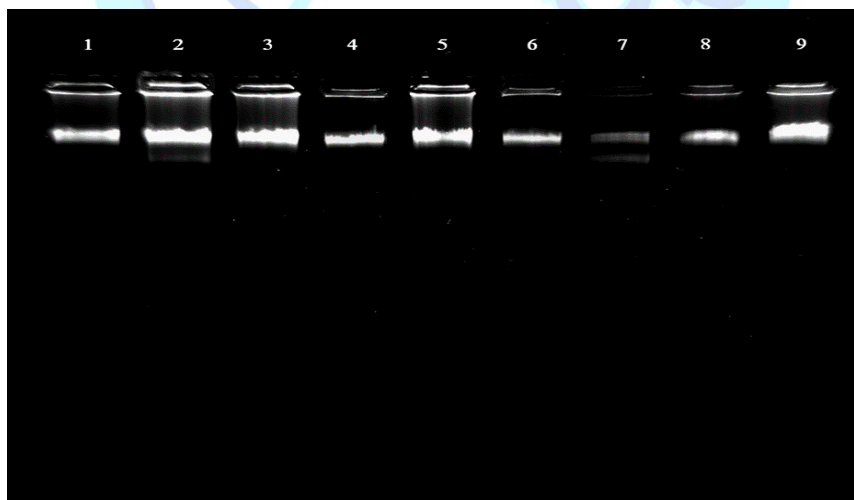
#### نتایج کیفی و کمی استخراج ژنوم باکتری

در طی انجام این مطالعه از کیت استخراج DNA جهت تخلیص ژنوم باکتری استفاده گردید. جهت تعیین غلظت و اطمینان از کیفیت DNA تخلیص شده  $5 \mu\text{l}$  از DNA به همراه  $2 \mu\text{l}$  از بافر بارگزاری بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید (شکل ۱) که نمونه‌ها غلظت و کیفیت مناسبی را در ژل نشان دادند.

برای مطمئن بودن از اینکه نقطه آستانه را به درستی انتخاب کرده ایم، می‌توان آن جایی را که نمودار از فاز زمینه خارج شده و شروع به بالا آمدن می‌کند را به عنوان آستانه در نظر گرفت. سیکلی را که در آن خط آستانه منحنی‌های PCR را قطع می‌کند سیکل آستانه (Ct) یا سیکل آستانه می‌گوییم. اندازه گیری کمی مقدار ژن‌ها نیز در سیکلهایی از واکنش PCR که در فاز تصاعدی قرار دارند (یعنی سیکل آستانه) انجام می‌پذیرد. نرم افزار دستگاه Real-time PCR به صورت اتوماتیک سیکل آستانه را برای استفاده کننده بعد از انجام واکنش PCR مشخص می‌کند. البته خود کاربر هم می‌تواند سیکل آستانه مناسب را برای همه واکنش‌های PCR تعیین کند.

#### آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰,۰ (SPSS Inc. Chicago, IL, )

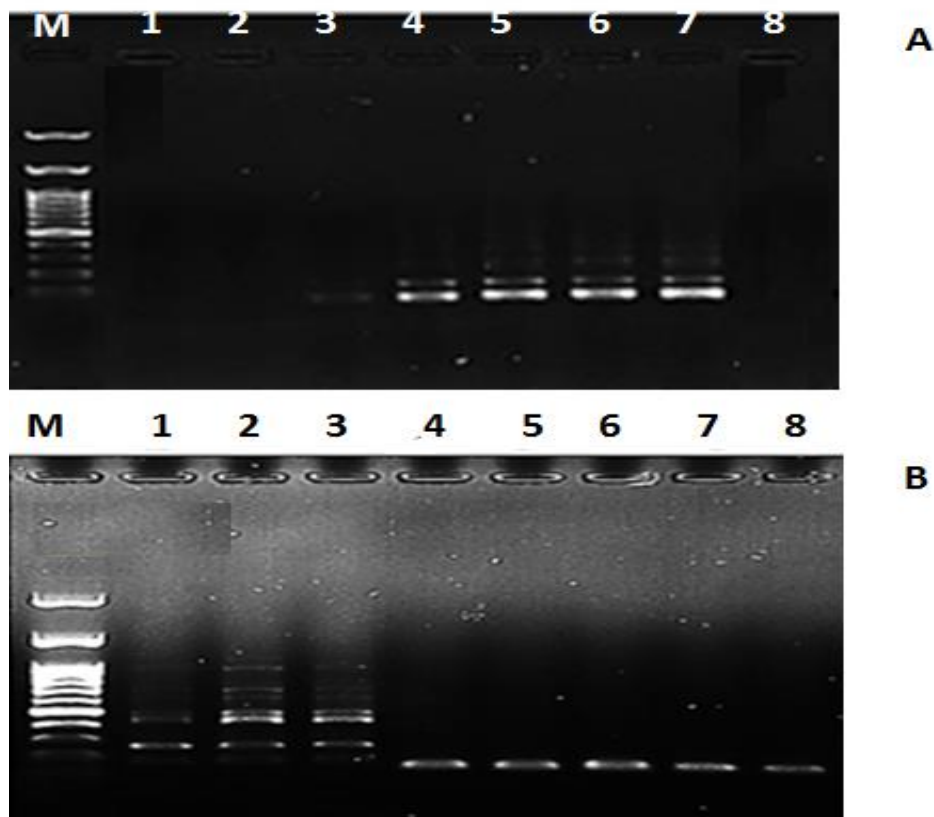


شکل ۱- الکتروفورز DNA استخراج شده توسط کیت. نمونه‌های ۱-۹ شامل ژنوم سویه‌هایی است که با استفاده از کیت تخلیص DNA استخراج گردیده است.

دمایی و تعیین دمای مناسب برای هر یک از پرایمرها در مورد هر باکتری تعیین شد (شکل ۲).

#### نتایج انجام واکنش PCR

بهینه سازی تکنیک PCR با تکثیر توالی S rRNA باکتری‌های مورد هدف با استفاده از گرادیان

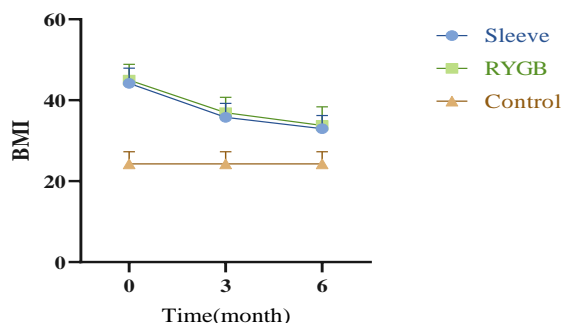


شکل ۲- نتایج تست تعیین کارایی پرایمرهای (A) بیفیدوباکتریوم بیفیدوم  $200\text{ bp}$ ، (B) بیفیدوباکتریوم لانگوم  $185\text{ bp}$ . مارکر ( $100\text{ bp}$ )، چاهک‌های شماره‌ی ۱ الی ۸ گرادیان دمایی از دمایی  $55$  الی  $65$  درجه سلسیوس

### شاخص توده بدنی BMI

نتایج آزمون تحلیل واریانس نشان داد که شاخص توده بدنی بیماران در سه زمان اندازه گیری شده بین سه گروه از نظر آماری متفاوت می‌باشد. بطوریکه گروه بای پس در ابتدای مطالعه دارای بیشترین میانگین شاخص توده بدنی  $44/99$  با انحراف معیار  $3/87$  بود ( $P < .001$ ). این شاخص در دو گروه اسلیو و بای پس در طی ماه‌های مورد بررسی تقریباً به یک نسبت مشابه کاهش یافت (جدول ۳). همچنین بر اساس نتایج حاصل از آزمون توکی میانگین شاخص توده بدنی دو گروه بای پس و اسلیو تفاوت آماری معنی داری با گروه کنترل داشت (جدول ۴ و نمودار ۱).

.000	کنترل		
.645	بای	اسلیو	
.000	کنترل	پس	
.830	بای	اسلیو	BMI6
	پس		
.000	کنترل		
.830	بای	اسلیو	
.000	کنترل	پس	



نمودار ۱- نتایج آزمون توکی برای مقایسات دو تایی میانگین شاخص توده بدنی بیماران

### تعیین اختصاصیت واکنش Real-time PCR با استفاده از بررسی منحنی ذوب

منحنی تکثیر ژن ۱۶SrRNA مربوط به باکتری‌ها بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم لانگوم در افراد شرکت‌کننده در مطالعه با استفاده از واکنش TaqMan Real-time Qpcr در نمودار ۲ و ۳ نشان داده شده است.

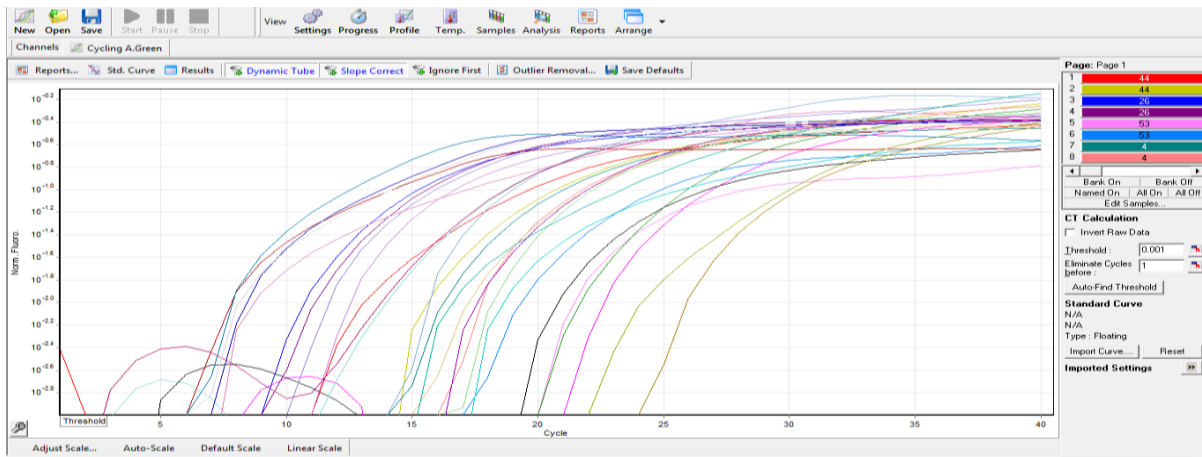
جدول ۳- مقایسه میانگین BMI بیماران بین گروه‌های مورد

مطالعه				
P-value	انحراف معیار	میانگین	N	
	3.73	44.17	14	اسلیو
<.001	3.87	44.99	16	بای پس
	3.00	24.28	18	کنترل
	3.44	35.79	14	اسلیو
<.001	3.81	36.92	16	بای پس
	3.00	24.28	18	کنترل
	3.25	32.99	14	اسلیو
<.599	4.59	33.77	16	بای پس
	3.00	24.28	18	کنترل

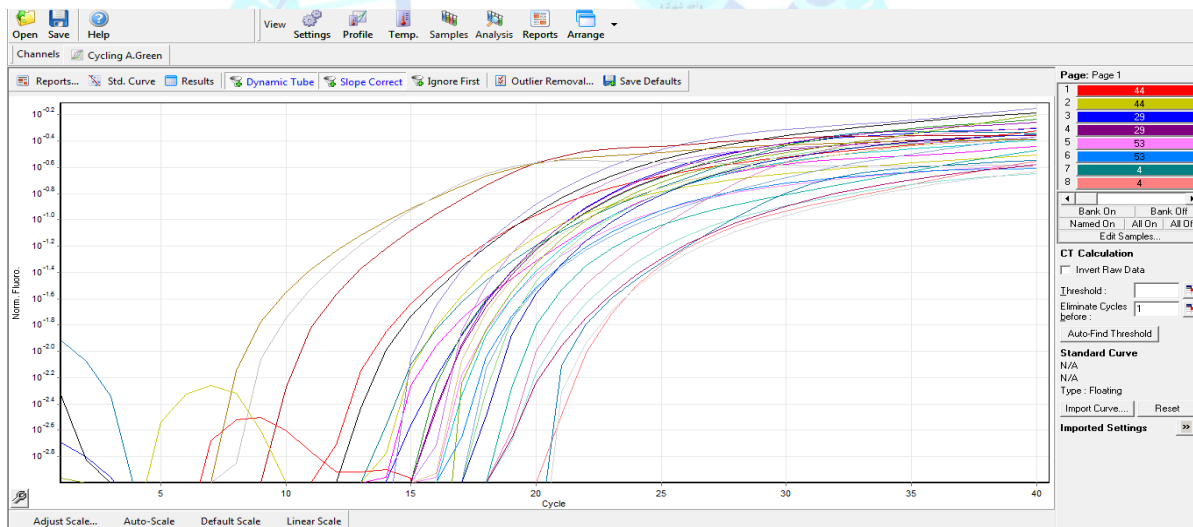
جدول ۴- نتایج آزمون توکی برای مقایسات دو تایی میانگین شاخص توده بدنی بیماران

Sig.	(J) گروه	(I) گروه	متغیر وابسته
.800	بای پس	اسلیو	BMI0
.000	کنترل		
.800	اسلیو	بای پس	
.000	کنترل		
.645	بای پس	اسلیو	BMI3





نمودار ۲- منحنی تکثیر ژن ۱۶SrRNA مربوط به بیفیدوباکتریوم بیفیدوم افراد شرکت کننده در مطالعه با استفاده از واکنش TaqMan Real-time Qpcr



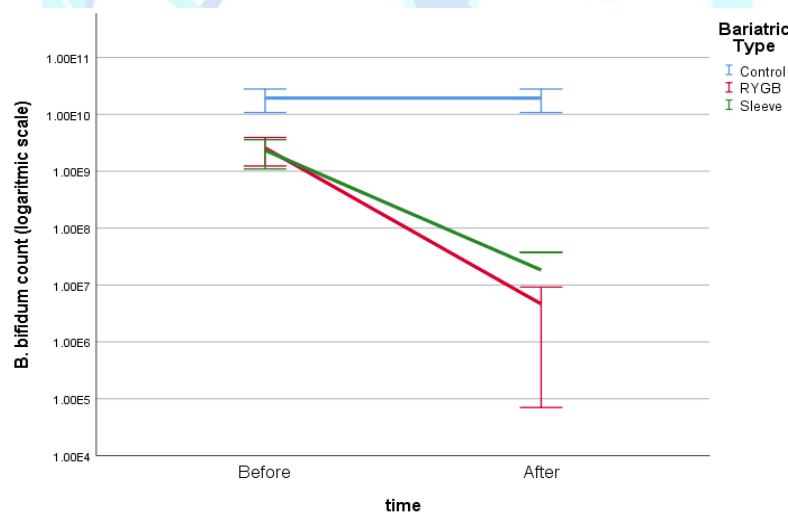
نمودار ۳- منحنی تکثیر ژن ۱۶SrRNA مربوط به گونه بیفیدوباکتریوم لانگوم افراد شرکت کننده در مطالعه با استفاده از واکنش TaqMan Real-time Qpcr

باریاتریک در گروه اسلیو از گروه بای پس بیشتر بود. بر اساس نتایج حاصل از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس این اختلاف مشاهده شده بین گروهها مورد مطالعه از نظر آماری معنی دار بود ( $P < .05$ ). بطور کلی بعد از انجام عمل باریاتریک به هر دو روش اسلیو و بای پس میانگین باکتری بیفیدو باکتریوم بیفیدوم نسبت به قبل از عمل کاهش یافت و این کاهش در گروه بای پس محسوس تر بود.

همانگونه که در جدول ۵ و نمودار ۴ نشان داده شده است، میانگین بیفیدو باکتریوم بیفیدوم در افراد مورد بررسی قبل و بعد از انجام عمل باریاتریک در گروه کنترل از دو گروه دیگر (اسلیو و بای پس) به میزان قابل توجهی بیشتر بود. همچنین میزان این باکتری قبل از عمل جراحی در گروه بای پس از گروه اسلیو بیشتر بود. در صورتی که میانگین بیفیدو باکتریوم بیفیدوم در افراد مورد بررسی بعد از انجام عمل

جدول ۵- مقایسه میانگین بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بین گروه‌های مورد مطالعه در قبل و بعد از عمل جراحی

		بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	میان	انحراف معیار	P-value
قبل	کنترل		15848931924.00	17243545152.87	.000
	نوع چاقی	بای پس	1954496343.50	2315602526.61	
		اسلیو	1584829237.00	2327200135.22	
بعد	کنترل		15848931924.00	17243545152.87	.000
	نوع چاقی	بای پس	1072262.50	7908269.01	
		اسلیو	8326458.50	36368229.59	



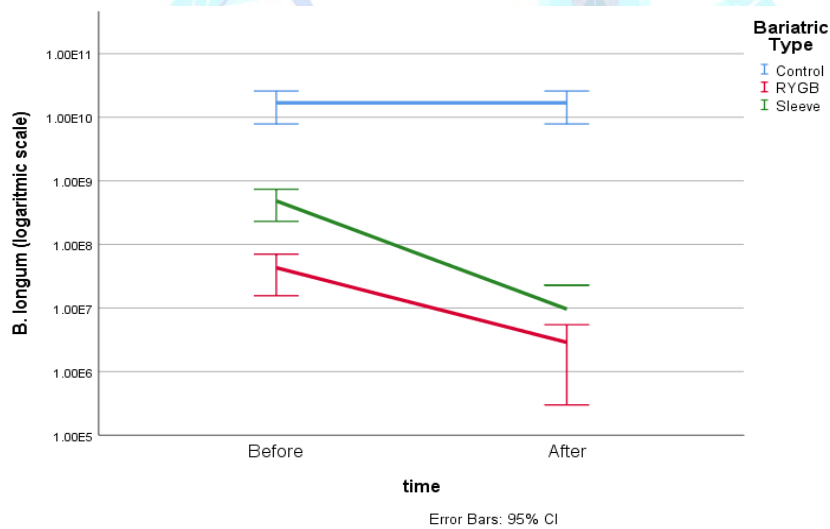
نمودار ۴- مقایسه میانگین بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بین گروه‌های مورد مطالعه در قبل و بعد از عمل جراحی

ناپارامتری کروسکال والیس اختلاف میانگین بیفیدوباکتریوم لانگوم بین گروه‌ها مورد مطالعه قبل و بعد از عمل جراحی از نظر آماری معنی دار بود ( $P < .05$ ). به طور کلی بعد از انجام عمل باریاتریک به هر دو روش اسلیو و بای پس میانگین باکتری بیفیدوباکتریوم لانگوم نسبت به قبل از عمل کاهش یافت و این کاهش در گروه بای پس محسوس تر بود.

همانگونه که در جدول ۶ و نمودار ۵ نشان داده شده است، میانگین بیفیدوباکتریوم لانگوم در افراد مورد بررسی قبل و بعد از انجام عمل باریاتریک در گروه کنترل از دو گروه دیگر (اسلیو و بای پس) به میزان قابل توجهی بیشتر بود. همچنین میزان این باکتری قبل و بعد از عمل جراحی در گروه اسلیو از گروه بای پس بیشتر بود. بر اساس نتایج اصل از آزمون

جدول ۶- مقایسه میانگین بیفیدوباکتریوم لانگوم بین گروه‌های مورد مطالعه در قبل و بعد از عمل جراحی

		انحراف معیار	میانگین	بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	P-value
قبل	کنترل	17858236569.09	11350860378.50		.000
	بای پس	38809504.34	5754395.50	نوع چاقی	
	اسلیو	409520930.54	63095725.00		
بعد	کنترل	17858236569.09	11350860378.50		.000
	بای پس	38809504.34	5754395.50	نوع چاقی	
	اسلیو	409520930.54	63095725.00		



نمودار ۵- مقایسه میانگین بیفیدوباکتریوم لانگوم بین گروه‌های مورد مطالعه در قبل و بعد از عمل جراحی

گونه بیفیدوباکتریوم به صورت معناداری قبل و بعد از جراحی تغییر وجود دارد. همچنین این نتایج دال بر این نکته بود که جمعیت باکتری‌های مورد مطالعه بعد از جراحی اختلاف معناداری با گروه سالم داشته اند. یافته‌های مطالعات جدید بر پایه تکنیک‌های متاژنومیک مانند توالی یابی ژن 16S rRNA، فلورسنت هیبریداسیون درجا و Real Time PCR ارتباط بین ترکیب میکروبیوتای روده با چاقی را نشان داده اند. گزارش شده است که میکروارگانسیم‌های روده جذب مونوساکارید از مجاری دستگاه گوارش را افزایش می‌دهد و به میزان دستور افزایش

## بحث

این مطالعه روی ۳۰ فرد مبتلا به چاقی مفرط در دو گروه ( افرادی که تحت جراحی اسلیو و بای پس قرار گرفته اند) قبل و بعد از جراحی در مدت زمان ۱ و ۳ و ۶ ماه بعد از جراحی انجام شد. همچنین برای مقایسه میزان تغییرات ترکیب جمعیت میکروبی، گروه کنترل شامل ۱۸ فرد سالم انتخاب شد. در مطالعه حاضر دو باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم لانگوم بعنوان نمونه ای از باکتری‌های حائز اهمیت موجود در فلور روده مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه نشان داده شد که در میزان جمعیت میکروبی هر دو

7765 ترمیم کرد. برای انجام این کار، موش‌های نر بالغ از نوع وحشی C57BL-6 با رژیم غذایی استاندارد یا پرچرب (HFD)، مکمل یا بدون مکمل بیفیدوباکتریوم سودو باکتریوم (CECT 7765 (109CFU/day) به مدت ۱۴ هفته تغذیه شدند. HFD با هموستاز طبیعی استخوان تداخل دارد که منجر به افزایش از دست دادن استخوان می‌شود. در موش‌های چاق، بیفیدوباکتریوم پسودو باکتریوم CECT 7765 از دست دادن توده استخوانی را کاهش داد و با کاهش تحلیل استخوان و افزایش تشکیل استخوان، BMD را افزایش داد (۱۵). در مطالعه‌ای که توسط M Million و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی مدفوع ۶۸ فرد چاق و ۴۷ گروه کنترل انجام شد که باکتری‌های فیرومیکبوتس، باکتریوئیدتس، متانوبراویباکتر اسمیسی<sup>۲</sup>، لاکتوباسیلوس لاکتیس، بیفیدوباکتریوم، را مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نشان داد که چاقی با افزایش خطرات سلامتی با تغییر در میکروبیوتای روده باکتریایی همراه است و عمدتاً میزان باکترئیدها کاهش می‌یابد همچنین جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم ممکن است نقش مهمی در تنظیم وزن به عنوان یک اثر ضد چاقی در مدل‌های تجربی و انسانها داشته باشد. و نشان داد برخی از گونه‌های بیفیدوباکتریوم یا لاکتوباسیلوس با وزن طبیعی و برخی دیگر با چاقی همراه بودند. این مطالعه نشان دهنده وجود یک رابطه متقابل احتمالی بین برخی از انواع پروبیوتیک است، که برای مصرف انسان در جای دیگری به بازار عرضه شده است و گونه‌ی بیفیدوباکتریوم را با چاقی در انسان مرتبط می‌کند که با مطالعه حاضر هم خوانی دارد (۱۶). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Jean-Pierre Furet همکاران در سال ۲۰۱۰ روی میکروبیوتای روده از نمونه‌های مدفوع با استفاده از روش PCR کمی بر ۱۳ فرد کنترل بدون چربی و در ۳۰ فرد چاق (با هفت دیابتی نوع ۲) پس از بای پس مورد بررسی قرار گرفت و نشان دادند که جراحی‌های

تولید تری گلیسیرید در کبد را می‌دهند. این پدیده با توسعه مقاومت به انسولین مرتبط است. با این حال، چندین فاکتور دیگر مانند استعداد ژنتیکی، استرس روانی و عفونت نیز ممکن است در ابتلا به چاقی نقش داشته باشند. اولین خط درمان برای درمان چاقی بدنی، بالا بردن میزان سوخت و ساز بدن در کنار کاهش کالری دریافتی در افراد می‌باشد. ولی متاسفانه در برخی از افراد این امر محقق نمی‌شود و تاثیرات ناشی از این درمان، کوتاه مدت بوده و تمامی افراد توانایی باقی ماندن در این روش درمانی برای رسیدن به وزن مناسب را ندارند. در نتیجه درمان‌های جایگزین مثل مداخله با جراحی‌های باریاتریک توانسته است با تغییر فیزیولوژیکی و متابولیکی ایجاد شده، باعث ایجاد تاثیر طولانی مدت و کاهش بیماری‌هایی از جمله دیابت تیپ دو و بیماری‌های مرتبط شود. این جراحی به طور معمول برای افرادی که شاخص توده بدنی بالای ۴۰ دارند و یا افرادی با شاخص توده بدنی بالای ۳۵ و بیماری زمینه‌ای خطرناک برای سلامتی فرد، در نظر گرفته می‌شود (۱۳). از آنجایی که جراحی‌های باریاتریک می‌تواند به دلیل تغییر اکوسیستم روده، در تغییر فلور نرمال نقش داشته باشد، بررسی فلور نرمال این افراد قبل و بعد از جراحی و پیگیری وزن بیماران می‌تواند ارتباط نقش تغییر فلور نرمال را در افزایش وزن این بیماران روشن کند و پیش بینی راهی برای جلوگیری از جراحی مجدد بیمار باشد، از آنجایی که جراحی باریاتریک تنها راه درمان بیماران مبتلا به چاقی مرضی می‌باشد، بالا بردن کارایی این خط درمان برای تمامی بیماران از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۴).

در یک مطالعه حیوانی که توسط M. Leonor و همکارانش در سال ۲۰۲۰ انجام شد، این مطالعه نقش چاقی ناشی از رژیم غذایی را در تغییرات در سلامت استخوان و متابولیسم را بررسی کرده است و اینکه آیا می‌توان این تغییرات را با تجویز خوراکی بیفیدوباکتریوم سودو باکتریوم CECT<sup>۱</sup>

<sup>2</sup>*Methanobrevibacter smithi*

<sup>1</sup>*Bifidobacterium pseudocatenulatum*

باریاتریک بر روی افراد مبتلا به چاقی مفرط می‌تواند باعث تغییر در فلور نرمال روده شود این تغییر با افزایش و کاهش برخی باکتری‌ها نشان داده شده است که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در این مطالعه نشان داده شد که جمعیت باکتریوئیدتس، پروتلا افزایش داشته است و همچنین جمعیت در بیفیدوباکتریوم، لاکتوباسیلوس پدیوکوکوس کاهش یافته است این نتایج نشان می‌دهد که اجزای میکروبیوم روده غالب به سرعت در شرایطی مانند گرسنگی ناشی از بای پس سازگار می‌شوند در حالی که گونه فکالیباکتریوم پروتسنیتزی به طور مستقیم با کاهش حالت التهابی درجه پایین در چاقی و دیابت مستقل از مصرف کالری ارتباط دارد (۱۷). در مطالعه ای که توسط Hyang Mi An و همکارانش در سال ۲۰۱۱ انجام شد، هدف بررسی اثرات ضد چاقی و کاهش چربی بیفیدوباکتریوم بود. این مطالعه بر روی ۳۶ موش نر نژاد Sprague-Dawley با رژیم غذایی پرچرب انجام شد و پس از ۷ هفته، وزن بدن، اندام و چربی، مصرف غذا، سطح سرمی خون، شمارش لاکتوباسیلوس مدفوع و فعالیت‌های مضر آنزیم اندازه گیری شد. این داده‌ها نشان می‌دهد که گونه‌های بیفیدوباکتریوم اثرات مفیدی بر ضد چاقی دارد و با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۸).

### نتیجه گیری

در مطالعه حاضر جمعیت میکروبی دو باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم لانگوم در افراد دچار چاقی مفرط نسبت به افراد سالم به میزان چشمگیری کمتر بود. همچنین در افراد دچار چاقی مفرط جمعیت این دو باکتری بعد از عمل به طور معناداری کاهش یافت. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد کاهش وزن بواسطه جراحی می‌تواند در تغییر کمیت باکتری‌های موجود در میکروبیوتای روده موثر باشد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که بیماری چاقی با فراوانی باکتری‌های فلور میکروبی روده مرتبط باشد.

## منابع

1. Al-Isa, A. (1997a). Changes in body mass index (BMI) and prevalence of obesity among Kuwaitis 1980–1994. *International journal of obesity*, 21(12), 1093-1099.
2. Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404(6778), 635-643.
3. Zhao, L., & Fei, N. (2015). Obesity animal model and methods for making and using thereof: Google Patents.
4. Rosen, D., Dakin, G., & Pomp, A. (2009). Sleeve gastrectomy. *Minerva chirurgica*, 64(3), 285-295.
5. Hoy-Schulz, Y. E., Jannat, K., Roberts, T., Zaidi, S. H., Unicomb, L., Luby, S., & Parsonnet, J. (2016). Safety and acceptability of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* 35624 in Bangladeshi infants: a phase I randomized clinical trial. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 44.
6. Delzenne, N. M., & Cani, P. D. (2011). Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Annual review of nutrition*, 31, 15-31.
7. Diamant, M., Blaak, E., & De Vos, W. (2011). Do nutrient–gut–microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obesity reviews*, 12(4), 272-281.
8. Everard, A., & Cani, P. D. (2013). Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 27(1), 73-83.
9. Nozari, N. J. G. (2018). Role of Gut Microbiota on Weight Regulation. 23(1), 7-17.
10. Hartstra, A. V., Bouter, K. E., Bäckhed, F., & Nieuwdorp, M. (2015). Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes care*, 38(1), 159-165.
11. Sugahara, H., Odamaki, T., Fukuda, S., Kato, T., Xiao, J.-z., Abe, F., . . . Ohno, H. (2015a). Probiotic *Bifidobacterium longum* alters gut luminal metabolism through modification of the gut microbial community. *Scientific reports*, 5.
12. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. J. n. (2006). Human gut microbes associated with obesity. 444(7122), 1022-1023.
13. Pajekci, D., de Oliveira, L. C., Sabino, E. C., de Souza-Basqueira, M., Dantas, A. C. B., Nunes, G. C., Santo, M. A. (2019). Changes in the intestinal microbiota of superobese patients after bariatric surgery. *Clinics*, 74.
14. Ulker, I., & Yildiran, H. (2018). The effects of bariatric surgery on gut microbiota in patients with obesity: a review of the literature. *Bioscience of microbiota, food and health*, 18-018.
15. Santoro, M., Masciullo, M., Bonvissuto, D., Bianchi, M. L. E., Michetti, F., & Silvestri, G. (2013). Alternative splicing of human insulin receptor gene (INSR) in type I and type II skeletal muscle fibers of patients with myotonic dystrophy type 1 and type 2. *Molecular and cellular biochemistry*, 380(1), 259-265.
16. Million, M., Maraninchi, M., Henry, M., Armougom, F., Richet, H., Carrieri, P., . . . Raoult, D. (2012). Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *International journal of obesity*, 36(6), 817-825.
17. Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., . . . Corthier, G. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16731-16736.



18. An, H. M., Park, S. Y., Lee, D. K., Kim, J. R., Cha, M. K., Lee, S. W., . . . Ha, N. J. (2011). Antiobesity and lipid-lowering

effects of Bifidobacterium spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids in health and disease*, 10(1), 1-8.



## Population frequency of *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium bifidum* in the intestine of obese patients before and after gastric surgery

Kimia Golstanfar<sup>1</sup>, Laya Takbiri Osgoei<sup>2\*</sup>, Elham Siasi Torbati<sup>2</sup>

1. Ph.D Student, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

\*Corresponding author: [l\\_takbiri@iau-tnb.ac.ir](mailto:l_takbiri@iau-tnb.ac.ir)

### Abstract

**Introduction:** Obesity is a chronic multifactorial disease related to genetics. Studies have shown that in obese people the quantity and quality of the intestinal microbiota population differs from that of healthy individuals. For further clarification in the present study, the populations of *Bifidobacterium langum* and *Bifidobacterium bifidum* were examined before and after bariatric surgery (either RYGB or Sleeve).

**Material and Methods:** In this study, 30 obese individuals who were candidates for bariatric surgery using either RYGB or Sleeve participated in the examination along with 18 healthy controls. After collection, fecal samples were extracted using a special kit. After ensuring the concentration and purity of the extracted DNA using real-time PCR method, the population of the above two bacteria in patient samples (before and after surgery) and healthy control samples were determined.

**Results:** In the present study, the mean populations of *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium bifidum* in the subjects before and after bariatric surgery in the control group were significantly higher than the other two groups (RYGB and Sleeve) ( $P < .05$ ). In the RYGB group, the mean population of *Bifidobacterium bifidum* before bariatric surgery was higher than the Sleeve group. However, the mean population of this bacterium in the subjects after bariatric surgery in the Sleeve group was higher than the RYGB group ( $P < .05$ ). Also, the population of *Bifidobacterium longum* before and after surgery in Sleeve group was higher than RYGB group ( $P < .05$ ). In general, after bariatric surgery with both RYGB and Sleeve methods, the mean population of *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium langom* decreased compared to before surgery and this decrease was more noticeable in RYGB group ( $P < .05$ ).

**Conclusion:** According to the results, it seems that weight loss through surgery can be effective in changing the quantity of bacteria in the intestinal microbiota. Therefore, it is possible that obesity is associated with an abundance of bacteria in the gut microbial flora.

**Keywords:** Obesity, gastric surgery, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*.