Journal of Microbial World
Volume 15, No. 2, September 2022

Original Article

The effect of *Sargassum muticum* hot water and ethanolic extracts on intestinal microbiota in obese male rats

Vahideh Zarrin[1], Mohammreza Taherizadeh[2], Nader Tanideh[3], Tahereh Talaei-Khozani[4]

[1]PhD candidate, Department of Marine Biology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran. [2]Associate Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
[3]Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Shiraz Universityof Medical Sciences, shiraz, Iran.
[4]Professor, Department of Anatomical sciences, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Intestinal microbiota plays a key role in the overall function of the host, including host metabolism and obesity. In addition, due to their high fiber content, seaweed can regulate the intestinal microbial flora by stimulating the growth of beneficial bacteria and inhibiting the growth of harmful species. The aim of this study was to evaluate the effect of *Sargassum muticum* on the intestinal microbial flora in obese rats.

Materials & Methods: Rats were fed with hot water (HW) and ethanolic(E) extracts of *Sargassum muticum* for 8 weeks, then intestinal microorganisms were analyzed through 16S) rRNA sequencing in all groups.

Results: The distribution ratio of intestinal microorganisms showed that *Bacteroides* and *Firmicutes* are the dominant phyla in the intestine of rats. Analysis of microorganisms showed that obesity-related bacteria decreased and slimming-related genus increased in all treated groups. *Clostridium* was the predominant genus with pathogenic potential and *Lactobacillus* was the predominant genus in the lactic acid group. In addition, seaweed-extracts-feeding obese mice had weight loss and reduced food intake compared with the obese control group.

Conclusion: Our results show that the consumption of *Sargassum muticum* seaweed in the daily diet can balance the intestinal microbiota and also due to its high fiber, these seaweeds can cause weight loss in mice.

Key Word: *Sargassum muticum,* intestinal microbiota, Obesity, 16SrRNA.

Received: 7 February 2022 Revised: 5 June 2022 Accepted: 31 July 2022

Correspondence to: Tahereh Talaei-Khozani
Tel: +98 7132304372
E-mail: Stalaeit@sums.ac.ir
Journal of Microbial World 2022, 15(2): 134-146
DOI:10.30495/jmw.2022.1953186.2016

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال پانزدهم شماره دوم (پیاپی ۵۱) تابستان ۱۴۰۱
صفحات ۱۴۶-۱۳۴

Original Article

تاثیر عصاره‌های آبی و اتانولی جلبک قهوه‌ای Sargassum muticum برفلور میکروبی روده در موش‌های صحرایی نر چاق

وحیده زرین[۱]، محمدرضا طاهری زاده[۲]، نادر تنیده[۳]، طاهره طلایی خوزایی[۴*]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی دریا، دانشگاه هرمزگان، دانشکده علوم و فنون دریایی، بندرعباس، ایران. [۲]دانشیار، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران. [۳]استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، شیراز، ایران. [۴]استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، شیراز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: بر اساس مطالعات جدید، میکروبیوتای روده نقش کلیدی در عملکرد کلی میزبان از جمله متابولیسم آن دارد و یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده چاقی می‌باشد. همچنین، جلبک‌های دریایی به علت داشتن فیبر بالا می‌توانند با تحریک رشد باکتری‌های مفید و مهار رشد گونه‌های مضر، فلور میکروبی روده را تنظیم کنند. هدف از این مطالعه، بررسی اثرجلبک دریایی Sargassum muticum بر فلور میکروبی روده در موش‌های صحرایی چاق بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه عصاره‌های اتانولی و آبی جلبک به مدت ۸ هفته به موش‌های چاق داده شد و سپس میکروارگانیسم‌های روده از طریق توالی یابی 16S rRNA در همه گروه‌ها تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها: نسبت توزیع میکروارگانیسم‌های روده‌ای نشان داد که Bacteroides و Firmicutes به‌عنوان شاخه‌های غالب در روده موش‌ها بودند. تجزیه و تحلیل میکروارگانیسم‌ها نشان داد که باکتری‌های مرتبط با چاقی کاهش یافته و جنس‌های مرتبط با لاغری در گروه‌هایی که عصاره جلبکی دریافت کردند در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. Clostridium جنس غالب با پتانسیل بیماری‌زایی و Lactobacillus جنس غالب در گروه لاکتیک اسید بودند. علاوه‌براین، تغذیه موش‌های چاق با عصاره‌های جلبک دریایی باعث کاهش وزن و کاهش میل به غذا در مقایسه با گروه کنترل چاق گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد مصرف جلبک دریایی قهوه‌ای Sargassum muticum در رژیم غذایی روزانه می‌تواند میکروبیوتای روده را متعادل کند و همچنین به دلیل داشتن فیبر بالا سبب کاهش وزن گردد.

واژگان کلیدی: Sargassum muticum، میکروبیوتای روده، چاقی، 16SrRNA.

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸ ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۳/۱۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۵/۹

مقدمه

موجودات دریایی، به‌ویژه جلبک‌های قهوه‌ای به عنوان مکمل‌های غذایی با خاصیت پروبیوتیک و ضدچاقی می‌باشند. اجزای جلبک دریایی تأثیر بالقوه مثبتی بر بسیاری از بیماری‌ها از جمله فشار خون بالا، سرطان، دیابت نوع ۲، چاقی و سایر اختلالات دارند. پاتوژنز این اختلالات با سلامت میکروبیوتای روده مرتبط است (۱). بر اساس مطالعات اخیر مشخص شده است که باکتری‌های موجود در میکروبیوتای روده نقش کلیدی

*) آدرس برای مکاتبه: گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، شیراز، ایران.
تلفن: ۰۷۱۳۲۳۰۴۳۷۲ پست الکترونیک: talaeit@sums.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

در عملکرد کلی بدن میزبان از جمله سوخت و ساز دارند. میکروبیوتای روده در بین افراد از نظر ترکیب بسیار متفاوت است و فاکتورهای متعددی از جمله رژیم غذایی، سن و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند بر نگهداری و شکل‌دهی میکروبیوتای روده و در نتیجه وضعیت سلامتی میزبان تأثیر بگذارند (۲). همچنین میکروبیوتای روده بیماران مبتلا به سندرم متابولیک از جمله چاقی (۳)، بیماری قلبی (۳)، سرطان کولورکتال (٤)، بیماری التهابی روده (٦) و دیابت (٥) با افراد سالم تفاوت دارد. برخی از مطالعات نشان می‌دهد که مصرف مواد پروبیوتیک و فیبرهای غذایی می‌توانند به طور مفیدی ترکیب میکروبیوم روده را در مدت زمان کوتاهی تغییر دهد. اخیراً توجه زیادی به نقش میکروارگانیسم‌های روده و عملکرد آن‌ها در ایجاد چاقی و بیماری‌های متابولیک شده است، به طوری که نشان داده شده است که میکروبیوتای روده، یکی از عوامل اصلی چاقی می‌باشد. همچنین آنالیز متاژنومیک و بیوشیمیایی میکروفلور روده در افراد چاق و لاغر نشان داده شده است که باکتری‌های روده در افراد چاق ظرفیت بیشتری برای برداشت انرژی از رژیم غذایی دارند، در نتیجه افزایش قابل توجه بیشتری درچربی بدن، می‌تواند به دلیل تفاوت در باکتری‌های روده در افراد چاق نسبت به افراد لاغر باشد. از سوی دیگر، پلی ساکاریدهای جلبک‌های قهوه‌ای به علت داشتن فعالیت پری بیوتیکی می‌توانند با تحریک رشد باکتری‌های مفید و مهار رشد باکتری‌های مضر، میکروبیوم روده را به سمت نرمال تنظیم کرده و از بیماری‌های روده بزرگ جلوگیری کنند، به‌علاوه آن‌ها پتانسیل تغییر ترکیب میکروبیوتای روده را دارند (۸و۹) . آن‌ها به سختی توسط آنزیم‌های بدن انسان تجزیه می‌شوند، تقریباً بدون تغییر در دهان، معده و روده کوچک باقی می‌مانند. پلی ساکاریدها در روده بزرگ، اثرات زیست فعالی مفیدی را بر عملکرد روده و میکروبیوتا اعمال می‌کنند (۱۰). بیش از ۹۰ درصد میکروارگانیسم‌های روده معمولا از خانواده Firmicutes و Bacteroidetes می‌باشند و شکل‌گیری میکروبیوتای خاص از فردی به فرد دیگر متفاوت است. گونه‌های غالب در میکروبیوتای روده بزرگ بیشتر در نتیجه رژیم غذایی تشکیل می‌شود، اما می توانند تحت تاثیر عوامل دیگر نیز قرار گیرند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد انسان‌ها بسته به نسبت این دو شاخه باکتری‌ها در روده بزرگ، تیپ‌های بدنی چاق یا لاغر را نشان می‌دهند. افزایش نسبت Firmicutes باعث چاقی می‌شود، در حالی که افزایش نسبت Bacteroidetes فرد را لاغر می‌کند (۱۱و۱۲). شانگ (Shang) و همکاران در سال ۲۰۱٦ دریافتند که پلی ساکاریدهای جلبک‌های قهوه‌ای می‌توانند میکروبیوتای روده را تعدیل کنند، این ترکیبات با افزایش رشد باکتری‌های مفید (Bacteroidetes) و کاهش رشد باکتری‌های مضر (Firmicutes) می‌توانند فلور میکروبی روده بزرگ را تغییر دهند (٦).

با توجه به خواص و ویژگی‌های جلبک‌های قهوه‌ای و اثرات آن‌ها بر چاقی، برآن شدیم تا در این مطالعه، عصاره آبی و اتانولی از گونه *Sargassum muticum* را که یکی از مهمترین گونه‌های جلبک قهوه‌ای خلیج فارس می‌باشد تهیه نموده و تاثیر آن را بر فلور میکروبی روده در موش‌های چاق شده با رژیم غذایی پرچرب بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌برداری و شناسایی گونه: نمونه‌های *Sargassum muticum* جلبک دریایی در اواخر زمستان ۱۳۹۷ در هنگام جزر، از سواحل جزیره قشم، جمع‌آوری گردید. بعد از نمونه‌برداری، جلبک‌ها با آب دریا شسته شده و از شن و ماسه و جانداران اپی‌فیت کاملا پاک‌سازی و سپس درون جعبه یونولیتی حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه جلبک‌ها مجددا، با آب معمولی و نهایتا با آب مقطر شسته شده و سپس به منظور خشک شدن روی پارچه تمیزی در سایه قرار داده شدند. پس از خشک شدن، با آسیاب برقی پودر شدند. تعدادی از نمونه‌های جمع‌آوری و برای شناسایی گونه، در فرمالین ۳ درصد فیکس و نگهداری شدند. شناسایی گونه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر (١٤) اطلس و چک لیست ماکروجلبک‌های دریایی ایران (١٥و١٦)، جستجو در پایگاه علمی ثبت جلبک‌ها (www.Algaebase.org) و

همچنین بر اساس ویژگی‌های ریخت شناسی تا سطح جنس و گونه انجام شد.

ب) عصاره‌گیری نمونه‌ها: ۲ نوع استخراج با استفاده از حلال آب و اتانول ۷۰٪ و حلال آب مقطر انجام شد. در همه این روش‌ها با استفاده از روش خیساندن، ۳۰ گرم پودر جلبک‌های قهوه‌ای به طور جداگانه در۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آب و اتانول ۷۰ ٪ و آب مقطر ریخته شد؛ و به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و در تاریکی با همزن مغناطیسی با دور rpm ۲۰۰ عصاره‌گیری شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۴۰۰۰ در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند و محلول رویی آن‌ها جمع‌آوری گردید. سپس همه نمونه‌ها، تحت فشار و در شرایط خلا در دمای ۴۰ درجه سلسیوس روتاری شدند تا به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسند. در نهایت همه عصاره‌ها فریز – درایر شده و تا انجام آزمایشات در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (۷و۸).

ج) آزمایشات حیوانی: تعداد ٦۰ رت نر نژاد Wistar با وزن میانگین ۲۰۰-۱۸۰ گرم از حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری و سپس به آزمایشگاه حیوانات انتقال داده شد. مطالعه‌ی حاضر با رعایت دستورالعمل اخلاق حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. رت‌ها به مدت ۱ هفته در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز برای سازگار شدن با محیط جدید، بدون هیچ‌گونه اعمال مداخله‌ای در قفس‌های ویژه که از قبل ضدعفونی شده بود، نگهداری شدند. حیوانات مورد آزمایش در این مطالعه، در طی دوره دو هفته‌ای آشنایی با محیط جدید در قالب گروه‌های ۵ سر رت در هر قفس پلی‌کربنات شفاف قرار گرفته و در دمای محیطی با ۲٤-۲۲ درجه سلسیوس و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲ :۱۲ ساعت و رطوبت هوای ٦۰-۵۵ درجه سلسیوس نگهداری شده و در طول این مدت از غذای استاندارد تغذیه شدند. به طور کلی رت‌ها روزانه به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن به ۱۰ گرم غذا نیاز دارند، اما در این مطالعه رت‌ها به صورت آزادانه به غذا دسترسی داشتند. همچنین رت‌ها، روزانه به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن به ۱۰ تا ۱۲ میلی‌لیتر آب نیاز داشتند.

در این مطالعه آب مورد نیاز هر حیوان به صورت آزاد در بطری‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در اختیار آن‌ها قرار داده شد. از آنجا که رت‌های آزمایشگاهی به بیماری‌های تنفسی بسیار حساس هستند، از این رو تهویه مناسب برای جلوگیری از تجمع آمونیاک حاصل از ادرار حیوانات در محل نگهداری قرار داده شد و قفس ها هر ٤ روز یک بار تمیز گردید. کلیه حیوانات از شروع آزمایش در شرایط تغذیه‌ای، نوری و دمایی یکسانی قرار گرفتند پس از دوره‌ی سازگاری، رت‌ها وزن کشی شده و به مدت ۱ ماه به آن‌ها غذای پرچرب داده شد تا چاق شوند.

غذای پرچرب بر اساس روش زو (Zou) و همکاران در سال ۲۰۰٦ تهیه گردید (جدول ۱) (۹). به همه رت‌ها به جز گروه کنترل نرمال در دوره‌ی چاق شدن، روزانه mg/kg ۱۰ از غذای پرچرب به روش گاواژ داده شد. پس از دوره‌ی چاق شدن، برای انجام ۸ هفته آزمایش تقسیم شدند.

در مدت زمان انجام آزمایش، روزانه به همه حیوانات به جز گروه‌های کنترل دوز مشخصی از عصاره‌های تهیه شده به روش گاواژ خورانده شد.

جدول ۱: ترکیب سازنده غذای پرچرب برای تغذیه موش.

مواد	دوز
Corn oil	400g
Sucrose	150g
Milk powder	80g
Cholesterol	100 g
Sodium dioxide	10g
Tween	34/4g
Propylene glycol	31/1
Multivitamin	2/5g
Salt	10g
Mineral Mix	1/5g
Distilled water	300ml

د) گروه‌های مورد مطالعه: با در نظر گرفتن مطالعات انجام شده (۱۰و۱۱) و همچنین انجام مطالعه پایلوت، دوزهای ۱۰۰ و mg/kg ۲۰۰ را برای عصاره‌های آبی و دوزهای mg/kg ۲۵۰ و ۵۰۰ برای عصاره‌های اتانولی انتخاب شدند. برای ارزیابی اثرات عصاره‌های مختلف در طی ۸ هفته آزمایش، رت‌ها به ۲ گروه کنترل و ٤ گروه تیمار تقسیم شدند. گروه‌های مورد مطالعه شامل: ۱) گروه کنترل سالم، ۲) گروه کنترل چاق،

۳) گروه دریافت کننده عصاره آبی *Sargassum muticum* با غلظت ۱۰۰mg/kg، ٤) گروه دریافت کننده عصاره آبی *Sargassum muticum* با غلظت ۲۰۰mg/kg، ٥) گروه دریافت کننده عصاره اتانولی *Sargassum muticum* با غلظت ۲۵۰mg/kg، ٦) گروه دریافت کننده عصاره اتانولی *Sargassum muticum* با غلظت ۵۰۰mg/kg.

تمامی حیوانات در طول دوره آزمایشی ۸ هفته‌ای، روزانه به کمک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شده و وزن آن‌ها یادداشت گردید. همچنین میزان مصرف مواد غذایی به صورت هفتگی اندازه‌گیری شد. در پایان مطالعه، حیوانات به کمک گاز CO2 کشته شدند. خونگیری از قلب رت‌ها انجام و نمونه برداری از مدفوع حیوانات در هر گروه انجام شد. یادآور می‌شود حیوانات آخرین دوز عصاره‌ها را ٢٤ تا ٣٦ ساعت قبل ازنمونه‌برداری دریافت نمودند (۱۲).

ه) *اندازه‌گیری شاخص‌های سرم خون:* پس از کشتن رت‌ها، نمونه‌های خونی از طریق قلب انجام شد. برای این کار، حیوانات به مدت ۱۲-۱۰ ساعت در حالت ناشتا نگه داشته شدند. سپس به میزان ۵ میلی‌لیتر نمونه خون از آن‌ها گرفته شد. برای جداسازی سرم، هر نمونه خون به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. سپس نمونه‌ها با کمک سمپلر جمع‌آوری و در میکروتیوب‌های استیل قرار گرفته و تا زمان اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی در فریزرهای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای تعیین میزان سرمی آنزیم‌های کبدی از کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون (P.L:97203232) استفاده شد (۱۳).

و) *شناسایی میکروارگانیسم‌های مدفوع:* برای شناسایی باکتری‌های مدفوع از محیط کشت‌های نوترینت براث، نوترینت آگار، بلاد آگار و مک کانکی آگار استفاده و پس از رنگ‌آمیزی گرم، شکل باکتری‌ها و واکنش گرم آن‌ها مطالعه شد. همچنین، فعالیت کاتالازی و اکسیدازی، تولید اندول، تست اوره، تست Triple Sugar Iron agar، تست سیترات و حرکت باکتری بررسی گردید.

ز) *آنالیز باکتری‌ها با روش مولکولی:* استخراج DNA در این مطالعه، DNA به روش Boiling (جوشاندن) استخراج گردید. در ابتدا باکتری‌های خالص شده بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند. سپس یک تا سه کلنی از باکتری به داخل میکروتیوب ۰/۵ سی‌سی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر منتقل شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۹ درجه سلسیوس در بن‌ماری قرار داده شدند. پس از آن میکروتیوب‌ها به مدت ٦ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. محلول رویی که حاوی DNA الگو می‌باشد را به میکروتیوپ جدید انتقال داده شد و رسوب دور ریخته شد. جهت اطمینان از خلوص و غلظت DNA استخراجی، از دستگاه نانودراپ استفاده شد و نمونه‌هایی با غلظت ۷۰٪ و خلوص ۱/۸ تا ۲/۲ جهت انجام PCR انتخاب شدند (١٤).

ناحیه V1–V3 از ژن 16SrRNA با استفاده از پرایمرهای V1-9F (5′-CCTAT CCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGACGAGTTTG A TCMTGG CTCAG-3′) و V3-541R (5′-CCATCTCATCCCTGC GTGTCTCCGACTCAG-barcode-ACWTTACCGCGGCTGC TGG-3′) (Polymerase Chain Reaction) تکثیر گردید (۱۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ژن 16SrRNA مطابق برنامه زیر انجام شد. دمای واسرشت اولیه ۹۵ درجه سلسیوس و به مدت ۵ دقیقه بود. سپس ۳۵ چرخه شامل یک دقیقه دمای ۹۵ درجه سلسیوس، یک دقیقه دمای ۵۰ درجه سلسیوس و ۹۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. در نهایت برای تکمیل سنتز DNA، دمای واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس نگه داشته شد. درستی انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن 16S rDNA، با الکتروفورز ژل آگاروز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برماید تأیید گردید. برای تعیین توالی ژن 16S rDNA، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کمک کیت تخلیص GeneJetPCR (Thermo Scientific, Lithuania) خالص‌سازی گردید. سپس توالی ژن توسط شرکت ماکروژن (Macrogen) کره جنوبی تعیین شد. نتایج توالی نوکلئوتیدها مجدداً به کمک نرم‌افزار Chromas Pro BioEdit(7/1/7) با یکدیگر هم‌تراز شدند. برای شناسایی باکتری‌ها، میزان تشابه توالی‌های تکثیر

شده ژن 16S rRNA از باکتری‌ها به کمک BLAST در پایگاه داده‌های NCBI با توالی‌های ثبت شده مورد مقایسه قرار گرفت. علاوه‌بر این، برای شناسایی تاکسونومی این باکتری‌ها با استفاده از توالی 16S rDNA، تعدادی از توالی‌های نزدیک به هر یک از باکتری‌های مورد نظر نیز از NCBI استخراج گردید و طبقه‌بندی آن‌ها بر اساس the top five BLASTN hits در پایگاه داده EzTaxon-e اختصاص داده شد (۱۳). توالی‌هایی که در جستجوهای BLASTN در پایگاه داده EzTaxon-e مطابقت نداشتند حذف شدند.

شباهت گونه‌های کاندید با گونه‌های ثبت شده با استفاده از روش مایرز و میلر محاسبه شد. برای مقایسه گروه‌ها و رسم نمودارها از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۱ برای ویندوز) و GraphPad Prism (نسخه ۸.۳.٤) استفاده شد. حجم مواد لازم در انجام PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۲: حجم لازم از مواد مورد نیاز برای انجام PCR.

مواد PCR	مقدار
Primer F	۱ µL
Primer R	۱ µL
PCR Master Mix (2X)	۱۰ µL
DDW	۱۲ µL
DNA template	۲ µL
TOTAL VOLUME	۲۵ µL

ح) آنالیز آماری: بررسی و آنالیز داده‌ها با نرم افزار SPSS (نسخه ۲۱ برای ویندوز) انجام شد و داده‌ها توسط تست‌های آماری Two Way-ANOVA و One Way-ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. P-value کمتر از ۰/۰۰۵ درصد به عنوان داده‌های معنی‌دار در نظر گرفته شدند. نمودارها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism (نسخه ۸.۳.٤) رسم شد و با استفاده از BLAST، محصولات PCR آنالیز گردید. کلیه آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار گردید.

یافته‌ها

الف) جداسازی باکتری‌های مدفوع: نتایج کشت نمونه‌های مدفوع و شمارش کلنی‌ها نشان داد که باکتری Firmicutes بیشترین فراوانی را در مدفوع گروه کنترل چاق و Bacteroides بیشترین فراوانی در مدفوع گروه‌های کنترل نرمال و تیماریافته بودند.

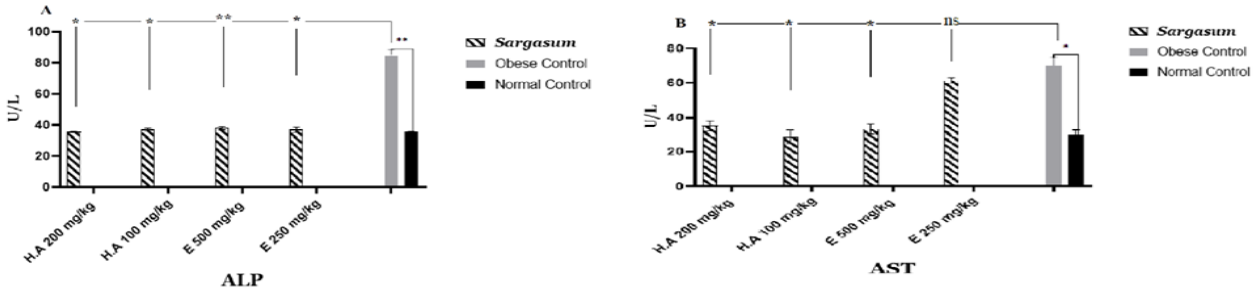
همچنین در گروه‌های تیماریافته با عصاره‌های آبی و اتانولی، باکتری Escherichia همانندگروه کنترل نرمال مشاهده نشد، در حالی که این باکتری در گروه کنترل چاق حضور داشت. Clostridium باکتری غالب در مدفوع همه گروه‌ها بود.

ب) تاثیر عصاره‌های جلبکی بر شاخص‌های سرم خونی: در این مطالعه تأثیر عصاره‌های اتانولی و آبی جلبک دریایی را بر سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی ALP و AST مورد بررسی قرار گرفت.

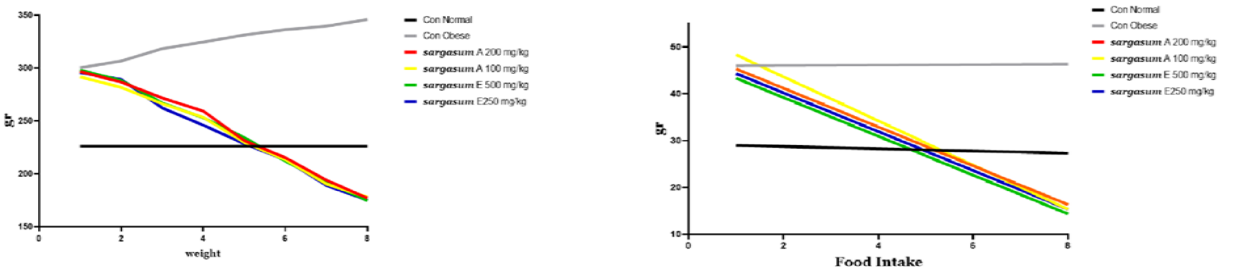
هر دو دوز عصاره‌های اتانولی و آبی جلبک دریایی *Sargassum muticum* به‌طور معنی داری سبب کاهش سطح سرمی آنزیم ALP در مقایسه با گروه کنترل چاق شدند به طوری که میزان این آنزیم تا حد گروه کنترل کاهش یافت. اگرچه مصرف عصاره های جلبک *Sargassum muticum* صرف نظر از نوع عصاره و غلظت، به میزان قابل توجهی سطح سرمی آنزیم AST را کاهش داد اما عصاره اتانولی جلبک در غلظت ۲۵۰ mg/kg توانایی کاهش این آنزیم را تا حد نرمال را نداشت (P=0.01) (شکل ۱).

وزن بدن و میزان مصرف مواد غذایی همه موش‌های صحرایی که در این مطالعه قرار گرفتند به صورت هفتگی اندازه‌گیری شد. به طور کلی، مصرف همه عصاره‌های جلبک دریایی به مدت ۸ هفته باعث کاهش قابل توجه وزن بدن حیوانات، کاهش مصرف مواد غذایی و همچنین کاهش انرژی دریافتی در همه گروه‌ها گردید.

همه گروه‌ها پس از ۵-٦ هفته مصرف عصاره‌های جلبکی به وزن گروه کنترل نرمال رسیدند. همچنین میزان مصرف مواد غذایی همه رت‌های چاق که روزانه یکی از انواع عصاره‌ها را دریافت می‌کردند پس از مدت زمان ۵-٦ هفته به سطح گروه نرمال رسید (شکل ۲).

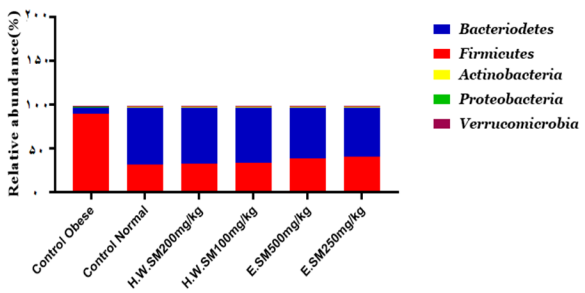


شکل ۱: تأثیر عصاره‌های اتانولی و آبی *Sargassum muticum* بر سطح سرم ALP و AST. مقادیر با میانگین SEM ± بیان شده‌اند. H.W (عصاره آب گرم) و E (عصاره اتانولی).



شکل ۲: اثرعصاره‌های آبی و اتانولی *Sargassum muticum* بر تغییرات وزن بدن در موش‌های صحرایی.

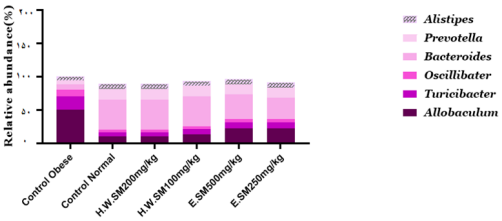
ج) آنالیز میکروبیوتای روده حیوانات: به منظور آنالیز میکروارگانیسم‌های روده حیوانات تیمارشده با عصاره‌های مختلف جلبک قهوه‌ای، از تکثیر ژن 16SRNA استفاده گردید. ۱۸ نمونه از مدفوع موش‌های صحرایی (از هر گروه ۳ رت) مورد بررسی قرار گرفت. نسبت توزیع میکروارگانیسم‌های روده نشان داد که Bacteroides و Firmicutes به عنوان باکتری‌های غالب در مدفوع موش‌ها در همه گروه‌ها می‌باشند و تقریباً ۹۶ درصد از توالی‌های خوانده شده در همه گروه‌ها را تشکیل می‌دهند. کاهش Firmicutes و افزایش Bacteroidetes در مدفوع موش‌ها در تمام گروه‌هایی که عصاره‌های جلبکی را دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل چاق مشاهده گردید. در مدفوع گروه کنترل چاق میزان باکتری Firmicutes، ۸۹٪ بود در حالی که درصد این باکتری در مدفوع حیوانات تیمارشده با عصاره‌ها به ۴۰-۳۲ درصد در گروه‌های مختلف کاهش یافت. درمقابل، درصد باکتری Bacteroidetes در مدفوع گروه کنترل چاق ۷ درصد بود که این مقدار در گروه‌های تیمارشده به ۶۴-۵۶ درصد افزایش یافت (شکل ٤) ($P<0.01$). بنابراین تغذیه حیوانات با عصاره‌های جلبک دریایی *Sargassum muticum* سبب کاهش نسبت Firmicutes/Bacteroidetes در روده شد.



شکل ۳: توزیع میکروبیوتای روده موش‌های تغذیه شده با عصاره‌های آبی و اتانولی *Sargassum muticum* در مقایسه با گروه کنترل.

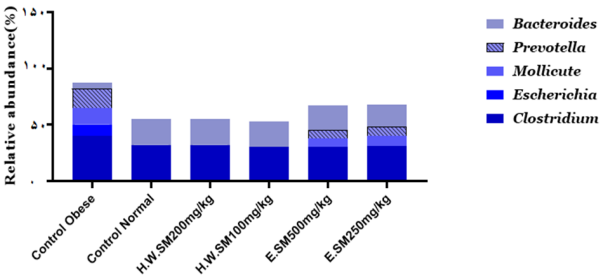
جنس‌های مرتبط با چاقی شامل Allobaculum ، Turicibacter و Oscillibacter بود که با فراوانی بالا در مدفوع موش‌های گروه کنترل چاق مشاهده گردید. اما فراوانی این باکتری‌ها در گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ها نسبت به گروه کنترل چاق به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود. Allobaculum فراوان‌ترین جنس باکتری‌های مرتبط با چاقی بود که در گروه‌هایی که عصاره آبی *Sargassum muticum* را بدون در نظر گرفتن دوز عصاره دریافت کرده بودند، به سطح گروه کنترل نرمال رسید.

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که جنس‌های Bacteroides، Prevotella و Alistipes که از جمله باکتری‌های مرتبط با لاغری شناخته شده بودند، در گروه کنترل چاق با فراوانی کمتری مشاهده شدند. توزیع این جنس‌ها در گروه‌هایی که عصاره‌های جلبکی دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل چاق، افزایش معنی‌داری نشان دادند. جنس Bacteroides و Prevotella جنس‌های غالب باکتری در مدفوع حیوانات تیمارشده بودند به طوری که جنس Bacteroides به میزان ۸ برابر و جنس Prevotella به میزان ٤ برابر در مدفوع گروه‌های تیمارشده نسبت به گروه کنترل چاق افزایش نشان دادند (شکل ٤).



شکل ٤ : توزیع باکتری‌های مرتبط با چاقی و لاغری در روده موش‌های تغذیه شده با عصاره‌های آبی و اتانولی *Sargassum muticum* در مقایسه با گروه کنترل (P<0.05).

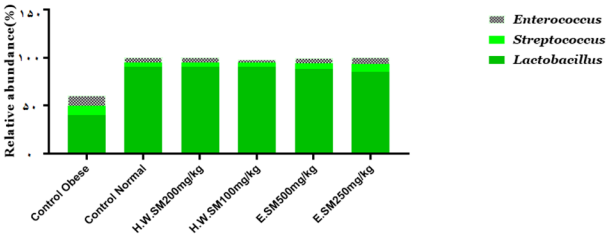
همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است، باکتری‌های پاتوژن موجود شامل Bacteroides، Clostridium، Escherichia، Mollicute و Prevotella بودند که در همه گروه‌ها مشاهده گردیدند. هر دو دوز عصاره‌های آبی جلبک توانستند به طور معنی‌داری فراوانی باکتری‌های پاتوژن را در روده حیوانات کاهش دهند. فراوانی نسبی جنس‌های بیماری‌زا در تمام گروه‌های تیمارشده در مقایسه با گروه کنترل چاق به طور قابل توجهی کمتر بود. باکتری Escherichia در گروه‌های تیمار یافته با عصاره‌های آبی وجود نداشت و در گروه‌های تیمار یافته با عصاره‌های اتانولی به میزان بسیاری کاهش نشان داد. همچنین Clostridium جنس غالب این گروه بود که در همه گروه‌ها مشاهده گردید به طوری که فراوانی آن در گروه‌های تیمار یافته به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<0.05) (شکل ۵).



شکل ۵ : توزیع باکتری‌های پاتوژن در روده موش‌های تغذیه شده با عصاره‌های آبی و اتانولی *Sargassum muticum* در مقایسه با گروه کنترل (P<0.05).

نتایج آنالیز میکروارگانیسم‌ها نشان داد، تمام عصاره‌ها توانستند به طور قابل توجهی سطح میکروارگانیسم‌های اسید لاکتیک را در مقایسه با گروه کنترل چاق افزایش دهند. باکتری‌های اسید لاکتیک به دلیل خواص پروبیوتیکی که سبب مهار جنس‌های بیماری‌زا می‌شوند و همچنین ایمنی بدن را افزایش می‌دهند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند.

Enterococcus, Lactobacillus Streptococcus از جنس‌های اسید لاکتیک بودند که در همه گروه‌ها مشاهده شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که Lactobacillus گونه غالب در گروه‌های تیمار شده بود. عصاره‌های آبی و الکی منجر به افزایش ۹۰ درصدی فراوانی Lactobacillus شدند (شکل٦).



شکل ٦: توزیع باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده موش‌های تغذیه شده با عصاره‌های آبی و اتانولی *Sargassum muticum* در مقایسه با گروه کنترل (P<0.05).

بحث

این مطالعه نشان داد که درمان موش‌های چاق با عصاره‌های آبی و اتانولی *Sargassum muticum* منجر به کاهش Firmicutes و افزایش فراوانی Bacteroidetes در فلور

میکروبی روده موش‌ها شد. Firmicutes و Bacteroidetes دو جنس اصلی میکروارگانیسم‌های روده‌ای هستند که می‌توانند بر چاقی تأثیر بگذارند. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش سطح Firmicutes در روده منجر به چاقی می‌گردد، در حالی که افزایش سطح Bacteroidetes درکاهش وزن موثر است (۱۴). داده‌های ما با گزارش‌های قبلی که نشان می‌دهند وعده‌های غذایی جلبک‌های قهوه‌ای سبب کاهش نسبت Firmicutes/Bacteroidetes در روده می‌گردد مطابقت دارد.

بر اساس مطالعات گذشته مشخص شده است که میکروارگانیسم‌های روده نقش مهمی در چاقی و اختلالات متابولیک ایفا می‌کنند (۱۷). همچنین توزیع میکروارگانیسم‌های روده می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار گیرد. علاوه‌براین، یافته‌های اخیر نشان داده‌اند که فیبرهای غذایی توانایی تغییر میکروارگانیسم‌های روده را در مدت کوتاهی دارند و در نتیجه چاقی و افزایش وزن را بهبود می‌بخشند (۱۸و۱۹). از سوی دیگر، جلبک‌های دریایی منبع فیبرهای غذایی فراوان هستند و آلژینات‌ها که از اجزای جلبک دریایی هستند در کاهش اشتها نقش دارند (۲۰). نتایج ما نشان داد که عصاره اتانولی و آبی *Sargassum muticum* در تغییر میکروارگانیسم روده در موش‌های چاق مؤثر است. با این حال، ما دریافتیم که عصاره‌های آبی جلبک دریایی مذکور از خلیج فارس به ترتیب در کاهش و افزایش فراوانی نسبی جنس‌های مرتبط با چاقی و جنس‌های مرتبط با لاغری کارآمدتر بودند.

Allobaculum و Turicibacter جنس‌هایی هستند که متعلق به کلاس Erysipelotrichi می‌باشند و مشخص شده است که در افراد چاق افزایش می‌یابند (۱۹). مطالعات قبلی نشان داده اند که Oscillibacter درموش‌های چاق تغذیه شده با رژیم‌های غذایی پرچرب افزایش یافته و سبب ایجاد التهاب‌های خفیف شده و بر مسیر انسولین نیز تأثیر می‌گذارند(۱۲و۱۵). کیم (Kim) و همکاران در سال ۲۰۱۸ دریافتند که تغذیه موش‌های چاق با جلبک قهوه‌ای *Laminaria japonica* سبب کاهش فراوانی این باکتری‌ها در مدفوع موش‌ها می‌شود (۱۵). مطالعه ما نیز نشان داد که همه گروه‌های تیمار شده با عصاره‌های جلبکی فراوانی نسبی جنس‌های مرتبط با چاقی را در مدفوع موش‌ها کاهش دادند. جنس Allobaculum و Turicibacter بیشترین کاهش را نشان دادند. ما همچنین نشان دادیم که عصاره‌های آبی نسبت به سایر عصاره‌های جلبک دریایی خلیج فارس در کاهش فراوانی جنس‌های مرتبط با چاقی مؤثرتر بود.

هر دو جنس Prevotella و Bacteroides توانایی هیدرولیز کردن سلولز را نشان داده‌اند و با فراوانی زیاد در مدفوع کودکان آفریقایی گزارش شده‌اند که عمدتاً در مقایسه با کودکان اروپایی که رژیم غذایی پرچرب و پرکالری مصرف می‌کنند، از رژیم غذایی گیاهی معمولی استفاده می‌کنند (۲۰). همچنین مطالعات نشان می‌دهد موش‌هایی با فراوانی بیشتر باکتری Prevotella در روده، کاهش تجمع چربی را نشان دادند (۱۸). به‌علاوه، Alistipese متعلق به شاخه Bacteroidetes می‌باشد که گزارش شده است با کاهش وزن موش صحرایی میزان این باکتری در روده آن‌ها افزایش می‌یابد (۲۱). داده‌های ما نیز تایید می‌کند، افزایش باکتری‌های Prevotella و Bacteroides در روده حیوانات تیمار شده با عصاره‌های آبی و اتانولی *Sargassum muticum* مشاهده گردید.

چاقی نه تنها با رشد غیر طبیعی سلول‌های چربی همراه است، بلکه سبب ایجاد التهاب‌های خفیف نیز در بدن فرد می‌شود. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای روده در افراد چاق، یکی از علل اصلی التهاب‌های خفیف هستند (۲۱). همچنین نشان داده شده است که میکروب‌های بیماری‌زای روده بر پاسخ های ایمنی و وضعیت متابولیک در میزبان تأثیر می‌گذارند. التهاب‌های خفیف مسیرهای سیگنالینگ متابولیکی را تحت تاثیر قرار می‌دهندو در نتیجه سبب چاقی می‌شوند (۲۳). میکروبیوتای بیماری‌زای روده همچنین با رژیم‌های غذایی پرچرب افزایش می‌یابد و منجر به التهاب می‌شود. علاوه بر این، التهاب در بافت چربی نقش مهمی در ایجاد چاقی دارد. تعداد زیادی کموکاین و سیتوکین ترشح شده از بافت چربی از عوامل اصلی التهاب سیستمیک در چاقی هستند (۲۴). اندوتوکسین‌های ترشح شده توسط

باکتری‌های بیماری‌زا می‌توانند باعث ایجاد التهاب و چاقی شوند (۲۵). در مطالعه‌ی ما، همه حیوانات تیمارشده با عصاره‌های آبی و اتانولی جلبک دریایی خلیج فارس کاهش قابل توجهی در جنس‌های باکتریایی دارای پتانسیل بیماری‌زایی نشان دادند، با این حال هر دو دوز عصاره‌های آبی اثر بهتری بر کاهش باکتری‌های پاتوژن نشان دادند.

درمان‌های موش‌های چاق شده با رژیم غذایی پرچرب، بوسیله جلبک‌ها باعث افزایش تکثیر باکتری‌های اسید لاکتیک روده به ویژه Lactobacillus می‌گردد. نتایج ما نشان داد که هم عصاره آبی و هم عصاره اتانولی جلبک مورد مطالعه از خلیج فارس دارای قدرت پروبیوتیک هستند. به خوبی شناخته شده است که باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند با کاهش pH از رشد میکروب‌های بیماری‌زا در روده جلوگیری می‌کنند. مطابق با نتایج ما، کیم (Kim) و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که *Laminaria japonica* دارای اثر پروبیوتیک و ضدچاقی با کاهش قابل توجه سطح باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش سطح باکتری اسید لاکتیک درروده موش‌های صحرایی چاق می‌باشد (۱۵). باکتری‌های اسید لاکتیکی روده دارای عملکردهای فیزیولوژیکی متنوعی از جمله تعدیل سیستم ایمنی و کاهش کلسترول و چربی خون می باشند (۲۲و۲۳).

فیبر غذایی موجود در جلبک‌های دریایی منجر به کاهش جذب درشت مغذی‌ها به دلیل ویسکوزیته بالا ناشی از محتوای فیبر و همچنین نمک صفراوی متصل می‌شود که ممکن است سطح کلسترول را در موش‌های هیپرلیپیدمی کاهش دهد. فیبرهای غذایی همچنین اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه (SCFAs) را از طریق تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی در روده بزرگ تولید می‌کنند (۲۴و۲۵). یافته‌های اخیر نشان داده است که چاقی بهترین پیش بینی کننده کبد چرب است. افزایش سطوح ALP و AST به عنوان حساس‌ترین شاخص‌های بیوشیمیایی، نشان دهنده وجود استئاتوز کبدی یا کبد چرب است (۲۶). تمام عصاره‌های تهیه شده از *Sargassum muticum* باعث کاهش سطح آنزیم‌های کبدی، AST و ALP شدند. نتایج ما مطابق با مطالعاتی است که گزارش داده اند عصاره اتانولی *Sargassum binderi* به مدت ۱۴ روز با غلظت ۲۰۰ mg/kg منجر به افزایش جزئی در غلظت آنزیم‌های کبدی از جمله ALT و AST در مقایسه با موش‌های صحرایی در گروه کنترل شده است. در مقابل، همان مطالعه نشان داد که آنزیم ALT با تغذیه موش‌های چاق با عصاره آبی *S. binderi* در مقایسه با موش‌های گروه کنترل نرمال کاهش می‌یابد (۲۷).

نتایج ما نشان داد که هر دو عصاره اتانولی و آبی، توانایی نرمال کردن آنزیم‌های کبدی را در موش‌های چاق دارند. اگرچه عصاره اتانولی با دوز ۲۵۰ mg/ml در کاهش آنزیم کبدی AST چندان موثر نبود.

علاوه‌براین، عصاره‌های آبی و اتانولی جلبک قهوه‌ای مورد مطالعه از خلیج فارس اثرات مفیدی بر کاهش وزن و میزان دریافت غذا در موش‌های چاق نشان دادند. این نتیجه مشابه گزارش‌های قبلی در مورد اثرات عصاره *S.polycystum*، یا فوکوگزانتین بر کاهش وزن و دریافت غذا در مدل چاق حیوانی بود (۲۸و۲۹). یکی از دلایل پیشنهادی برای کاهش وزن و کاهش مصرف غذا، وجود فیبر بالا و محتوای چربی کم در جلبک دریایی قهوه‌ای است (۳۰).

نتیجه‌گیری

به طور کلی مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌ها باعث کاهش وزن در موش می‌گردند. علاوه بر کاهش وزن، عصاره‌ها سطح آنزیم‌های کبدی را نیز در موش‌ها کاهش دادند. همچنین، نسبت Fimicutes به Bacteroidetes و جنس‌های دارای پتانسیل بیماری‌زا در روده حیوانات کاهش یافت، در حالی که عصاره‌ها توانستند جنس‌های باکتریایی مرتبط با لاغری را افزایش می‌دهند. بهترین عصاره‌ای که توانایی نرمال کردن همه معیارها را نشان داد عصاره‌های آبی بودند. از آنجایی که مطالعه آزمایشگاهی در مدل‌های حیوانی انجام شد، به نظر می‌رسد که می‌توان مطالعات in vivo را با بررسی چندین جلبک دریایی دیگر و مقایسه آن‌ها باهم به انسان نیز تعمیم داد، با این حال بررسی‌های بیشتری در این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل بخشی از رساله دکتری زیست شناسی دریا در دانشگاه هرمزگان می‌باشد که با حمایت این دانشگاه و دانشگاه علوم پزشکی شیراز اجرا شد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی تمامی نکات اخلاقی شامل سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

Reference

1. Shannon E, Conlon M, Hayes M. Seaweed components as potential modulators of the gut microbiota. Marine Drugs. 2021;19(7):358.
2. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. BMC microbiology. 2009;9(1):1-6.
3. Tang WW, Hazen SL. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. The Journal of clinical investigation. 2014;124(10):4204-11.
4. Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. The ISME journal. 2012;6(2):320-9.
5. Li J, Li R, Li N, Zheng F, Dai Y, Ge Y, et al. Mechanism of antidiabetic and synergistic effects of ginseng polysaccharide and ginsenoside Rb1 on diabetic rat model. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2018;158:451-60.
6. Shang Q, Shan X, Cai C, Hao J, Li G, Yu G. Dietary fucoidan modulates the gut microbiota in mice by increasing the abundance of Lactobacillus and Ruminococcaceae. Food & Function. 2016;7(7):3224-32.
7. Aminina NM, Karaulova EP, Vishnevskaya TI, Yakush EV, Kim Y-K, Nam K-H, et al. Characteristics of polyphenolic content in brown algae of the Pacific Coast of Russia. Molecules. 2020;25(17):3909.
8. Zahra R, Mehrnaz M, Farzaneh V, Kohzad S. Antioxidant activity of extract from a brown alga, Sargassum boveanum. African journal of Biotechnology. 2007;6(24).

9. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, et al. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Life sciences. 2006;79(11):1100-7.

10. Jang WS, Choung SY. Antiobesity effects of the ethanol extract of Laminaria japonica Areshoung in high-fat-diet-induced obese rat. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013;2013.

11. Hu X, Li Y, Li C, Fu Y, Cai F, Chen Q, et al. Combination of fucoxanthin and conjugated linoleic acid attenuates body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced obese rats. Archives of biochemistry and biophysics. 2012;519(1):59-65.

12. Hossein KJ, Leila KJ, koukhdan Ebrahim T, Nazanin SJ, Farzad P, Elham R. The effect of pomegranate juice extract on hormonal changes of female Wistar rats caused by polycystic ovarian syndrome. Biomedical and Pharmacology Journal. 2015;8(2):971-7.

13. Seyedalipour, B., Arefifar, A., Khanbabaee, R., & Hoseini, S. M. (2015). Toxicity investigating of silver nanoparticles on ALT, AST, ALP and histopathological changes in NMRI mice. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 25(124), 183-193.

14. Rahmani-Moghadam E, Talaei-Khozani T, Zarrin V, Vojdani Z. Thymoquinone loading into hydroxyapatite/alginate scaffolds accelerated the osteogenic differentiation of the mesenchymal stem cells. BioMedical Engineering OnLine. 2021;20(1):1-20.

15. Kim J-Y, Kwon YM, Kim I-S, Kim J-A, Yu D-Y, Adhikari B, et al. Effects of the brown seaweed Laminaria japonica supplementation on serum concentrations of IgG, triglycerides, and cholesterol, and intestinal microbiota composition in rats. Frontiers in Nutrition. 2018;5:23.

16. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int J Syst Evol Microbiol. 2012;62(Pt 3):716-21.

17. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. Cell Host Microbe. 2008;3(4): 213-23.

18. Neyrinck AM, Possemiers S, Druart C, Van de Wiele T, De Backer F, Cani PD, et al. Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, Roseburia and Bacteroides/Prevotella in diet-induced obese mice. PloS one. 2011;6(6):e20944.

19. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(33):14691-6.

20. Chater PI, Wilcox MD, Houghton D, Pearson JP. The role of seaweed bioactives in the control of digestion: implications for obesity treatments. Food Funct. 2015;6(11):3420-7.

21. Everard A, Geurts L, Caesar R, Van Hul M, Matamoros S, Duparc T, et al. Intestinal epithelial MyD88 is a sensor switching host metabolism towards obesity according to nutritional status. Nature communications. 2014;5(1):1-12.

22. Settanni L, Corsetti A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. Int J Food Microbiol. 2008;121(2):123-38.

23. Park YH, Kim JG, Shin YW, Kim HS, Kim YJ, Chun T, et al. Effects of Lactobacillus acidophilus 43121 and a mixture of Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum on the serum cholesterol level and fecal sterol excretion in hypercholesterolemia-induced pigs. Biosci Biotechnol Biochem. 2008;72(2):595-600.

24. Wang W, Onnagawa M, Yoshie Y, Suzuki T. Binding of bile salts to soluble and insoluble dietary fibers of seaweeds. Fisheries science. 2001;67(6):1169-73.

25. Yang J, Martínez I, Walter J, Keshavarzian A, Rose DJ. In vitro characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. Anaerobe. 2013;23:74-81.

26. Stranges S, Dorn JM, Muti P, Freudenheim JL, Farinaro E, Russell M, et al. Body fat distribution, relative weight, and liver enzyme levels: A population-based study. Hepatology. 2004;39(3):754-63.

27. Hira K, Tariq RM, Sultana V, Ara J, Ehteshamul-Haque S. Effect of seaweeds occurring at Karachi coast on mosquito larvae and liver function in rats. Pak J Pharm Sci. 2017;30(2): 387-91.

28. Seo Y-J, Lee K, Song J-H, Chei S, Lee B-Y. Ishige okamurae extract suppresses obesity and hepatic steatosis in high fat diet-induced obese mice. Nutrients. 2018;10(11):1802.

29. Beppu F, Hosokawa M, Yim MJ, Shinoda T, Miyashita K. Down-regulation of hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 expression by fucoxanthin via leptin signaling in diabetic/obese KK -A(y) mice. Lipids. 2013;48(5):449-55.

30. Matanjun P, Mohamed S, Muhammad K, Mustapha NM. Comparison of cardiovascular protective effects of tropical seaweeds, Kappaphycus alvarezii, Caulerpa lentillifera, and Sargassum polycystum, on high-cholesterol/high-fat diet in rats. J Med Food. 2010;13(4): 792-800.