مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۴۷/هفته اول مهر ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۱۲

# آیا بیفیدو باکتریوم از میکرو فلورای روده‌ای در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد غیر مبتلا کمیت متفاوتی را در بیماران ایرانی نشان می‌دهد؟

مرضیه ناظمی[۱]، دکتر مسعود امینی[۲]، دکتر رسول صالحی[۳]

**مقاله پژوهشی**

## چکیده

**مقدمه:** امروزه عوامل ایجاد دیابت نوع ۲ و چاقی را نمی‌توان تنها به تغییرات ژنوم، عادات بد غذایی و یا کاهش فعالیت فیزیکی در زندگی روزمره نسبت داد. از عوامل مؤثر دیگر می‌توان میکروفلور روده‌ای را نام برد که نقش مهم‌تری برای حفظ سلامت انسان دارد. هدف از این مطالعه بررسی کمی بیفیدوباکتریوم از باکترهای روده‌ای در اشخاص مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با افراد سالم بود.

**روش‌ها:** در این مطالعه‌ی مورد- شاهدی ۴۰ فرد بالغ بررسی شدند که ۲۰ نفر از آنان مبتلا به دیابت نوع ۲ بودند. بین افراد بیمار و شاهد از نظر سن، جنس و شاخص توده‌ی بدن تطبیق صورت گرفت. بعد از جمع‌آوری نمونه‌ی مدفوع از افراد بیمار و سالم و استخراج DNA از نمونه‌ها، کشت و استخراج DNA از سوش استاندارد بیفیدوباکتریوم به عنوان شاهد مثبت انجام شد. پس از آن مراحل کلون در پلاسمید pTZ57 R/T و استخراج پلاسمید صورت گرفت. سپس بررسی کمی بیفیدوباکتریوم با استفاده از تکنیک مولکولی Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) و پرایمر اختصاصی بیفیدوباکتریوم و بهره‌گیری از منحنی استاندارد انجام شد. برای مقایسه‌ی تعداد بیفیدوباکتریوم در دو گروه سالم و بیمار آنالیز آماری انجام گرفت.

**یافته‌ها:** هر چند نتایج حاصل‌شده نشان داد که میانگین تعداد باکتری در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ با فراد سالم متفاوت بود، اما آزمون Student-t (P = ۰/۰۹) و همچنین آزمون غیر پارامتری Mann-Whitney (P = ۰/۱۰) بین دو گروه اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده با استفاده از تکنیک Real-time PCR نشان داد که تغییرات تعداد بیفیدوباکتریوم در بیماری دیابت نوع ۲ در بیماران ایرانی تأثیری ندارد.

**واژگان کلیدی:** دیابت توع ۲، میکروفلورای روده‌ای، بیفیدوباکتریوم، Real-time PCR

**ارجاع:** ناظمی مرضیه، امینی مسعود، صالحی رسول. **آیا بیفیدو باکتریوم از میکرو فلورای روده‌ای در افراد مبتلا به دیابت توع ۲ و افراد غیر مبتلا کمیت متفاوتی را در بیماران ایرانی نشان می‌دهد؟.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۴۷): ۱۲۲۵-۱۲۱۶

## مقدمه

دیابت و چاقی دو بیماری متابولیک محسوب می‌شوند که دارای مشخصه‌ی عمومی، مقاومت به انسولین و التهاب با درجه‌ی پایین هستند (۱). چاقی افزایش غیر عادی ذخیره‌ی چربی در بافت‌ها است که نتیجه‌ای از عدم تعادل بین انرژی جذب‌شده و مصرفی است. این وضعیت اثرات زیادی بر روی متابولیک بدن و ایجاد بیماری‌های مزمن مانند

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۲- استاد، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
**نویسنده‌ی مسؤول:** مرضیه ناظمی
Email: nazemi.mn@gmail.com

بیماری های قلبی- عروقی، سرطان، ورم مفاصل، فشار خون، بالا رفتن لیپید خون و دیابت نوع ۲ می‌گذارد (۲). چاقی با کمی التهاب همراه است و التهاب خطر مقاومت به انسولین و نوع ۲ دیابت را افزایش می‌دهد (۳). نقش دیابت‌زایی چاقی توسط بسیاری از مطالعات مقطعی و ممتد مورد تأیید قرار گرفته است و اثبات شده است که کاهش وزن با کاهش شیوع دیابت همراه است (۵-۴). تغذیه به شیوه‌ی غربی، چربی و کربوهیدرات بالا و فیبر پایین مستعدکننده‌ی چاقی می‌باشد و ارتباط تنگاتنگ با دیابت نوع ۲ دارد (۶). علاوه بر چاقی عوامل دیگری مانند فشارهای روانی، عفونت‌ها، استعدادهای ژنتیکی، کاهش فعالیت جسمانی، افزایش سن و میکروفلورای روده‌ای به بروز دیابت کمک می‌کند. اهمیت میکروفلورای روده‌ای تا آن حد است که امروزه به عنوان عضو میکروبی، مورد بررسی قرار می‌گیرند (۶، ۴). امروزه پذیرفته شده است که وضعیت میکروارگانیسم‌های روده‌ای با تغییر وزن بدن تغییر می‌کند (۹-۷). التهاب مزمن موجود در دیابت و چاقی به وسیله چندین واسطه از جمله TNF-α (Tumor necrosis factor alpha) و اینترلوکین‌ها به وجود می‌آید (۱). فعالیت TNF-α و سایر عوامل التهابی با مقاومت به انسولین و دیابت نوع ۲ در ارتباط است. بلوکه کردن مسیرهای ایجاد عوامل التهابی می‌تواند نشانه‌های مقاومت به انسولین را کاهش دهد (۳).

لیپوپلی‌ساکارید نیز تحریک‌کننده‌ی قوی پاسخ‌های التهابی است و باعث ایجاد مقاومت انسولین در اشخاص چاق و مبتلا به دیابت می‌شود. لیپوپلی‌ساکارید در روده به وسیله‌ی مرگ باکتری‌های گرم منفی تولید می‌شود و از روده به وسیله‌ی مکانیسم‌هایی جذب مویرگ‌های روده‌ای می‌شود. حذف گیرنده‌ی لیپوپلی‌ساکارید پلاسما باعث افزایش وزن، بالا رفتن قند خون و التهاب می‌گردد. حذف گیرنده‌ی لیپوپلی‌ساکارید در موش باعث حساسیت بالا به انسولین، مقاومت به انسولین، چاقی و دیابت می‌شود (۹).

راه دیگر ایجاد التهاب‌های مزمن وابسته به میکروب‌های روده‌ای، بوتیرات است. در دو گروه تولیدکننده‌ی بوتیرات، گروه‌هایی از روزیبوریا شامل یوباکتریوم رکتال و فسالی‌باکتریوم پراسنیتیز از شاخه فیرمی‌کوتس را می‌توان نام برد (۷). دستگاه گوارش از جمله روده‌ی انسان، پناهگاهی برای میکروب‌های مختلف و متنوع می‌باشد. باکتری‌های مدفوع بین ۵۰۰-۴۰۰ نوع می‌باشد که ۳۰ الی ۴۰ گونه از آن در هر شخصی منحصر به فرد است. همچنین بر پایه‌ی روش‌های مولکولی مشخص شده است که ترکیب میکروب‌های روده‌ای حداقل $10^{14}$ از ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ گونه مختلف است که غالب آن‌ها بی‌هوازی و بیشتر از ۱۰۰ برابر ژنوم انسان می‌باشند که آن را متاژنوم (Metagenome) می‌نامند (۱۰، ۶). مطالعات مولکولی در سال‌های اخیر مشخص نموده‌اند که میکروب‌های روده‌ای افراد بالغ به وسیله‌ی شاخه‌ای از باکتری‌ها به نام باکتروییید و فیرمی‌کوتس غالب شده‌اند و تعداد کمی از ارکئاها تشکیل شده است. اثبات شده است که اکثر باکتری‌های مدفوعی متعلق به جنس‌هایی از قبیل رومینوکوکوس، فوزوباکتریوم، بیفیدوباکتریوم، پیتواسپریتوکوکوس، باکتروییدها، یوباکتریوم و کلستریدیوم است (۱۱). باکتری‌های لاکتیک اسید، شامل دو گروه از باکتری‌ها به نام‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم می‌باشند که به خوبی شناخته

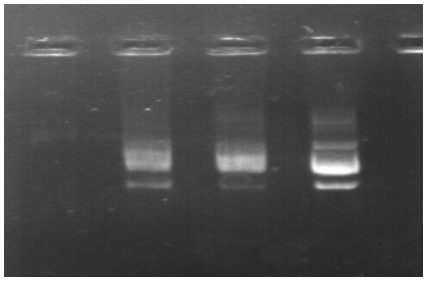
شده‌اند و به عنوان باکتری‌های مفید برای دستگاه گوارش محسوب می‌شوند. در افراد بالغ ۲۹ گونه متعلق به جنس بیفیدوباکتریوم گزارش شده است. مقدار نهایی بیفیدوباکتریوم از $۷/۹۴ \times ۱۰^{۴}$ تا $۲/۵۱ \times ۱۰^{۱۳}$ CFU (Colony forming units) با میانگین $۱/۵۸ \times ۱۰^{۱۰}$ در مدفوع است که بایش از ۱۰ درصد از میکروب‌های روده‌ای مدفوعی افراد بالغ را شامل می‌شود (۱۲). بیشترین فراوانی بیفیدوباکتریوم در روده‌ی کودکان می‌باشد و بالای ۹۱ درصد میکروب‌های روده‌ای بچه‌هایی که از شیر مادر تغذیه می‌کنند را تشکیل می‌دهد (۱۳). بیشتر مطالعات صورت‌گرفته به ارتباط بین میکروب‌های روده‌ای اشخاص چاق و مقایسه‌ی آن با اشخاص لاغر پرداخته‌اند و دیابت نوع ۲ به صورت حاشیه‌ای در نظر گرفته شده است. در صورتی که مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی کمی بیفیدوباکتریوم از میکروفلورای روده‌ای در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ و مقایسه‌ی آن با افراد سالم انجام گرفت.

## روش‌ها

جهت انجام تکنیک Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) برای بررسی کمی بیفیدوباکتریوم‌ها در دو گروه بیمار و سالم، DNA استخراج‌شده از مقدار مشخصی از مدفوع مورد استفاده قرار گرفت. ۲۰ فرد مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۲۰ فرد غیر مبتلا به دیابت نوع ۲ جمعیت مورد مطالعه‌ی ما را تشکیل دادند. بیماری مبتلایان به دیابت نوع ۲، از نظر کلینیکی در مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان مورد تأیید قرار گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در ظرف‌های ویژه و دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. افراد شاهد از افرادی انتخاب شدند که مبتلا به دیابت نوع ۲ نبودند و از نظر پارامترهایی مثل سن و جنس با بیماران تطبیق داشتند. همچنین در خانواده‌ی آن‌ها سابقه‌ی ابتلا به دیابت وجود نداشت.

استخراج DNA از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده‌ی افراد سالم و بیمار با استفاده از کیت Stool QIAamp DNA کیاژن (Cat.no:51504) و طبق پروتکل درج شده در آن انجام شد. کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از تکنیک PCR و الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد مورد تأیید قرار گرفت. در نهایت OD (Optical density) آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. با توجه به غلظت به دست‌آمده میزان DNA مورد استفاده برای هر شخص در مرحله‌ی Real-time PCR تعیین شد.

برای تهیه‌ی منحنی استاندارد، سوش استاندارد بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیر گونه‌ی لاکتیس از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد و با استفاده از محیط مایع اختصاصی کشت داده شد. استخراج DNA از سوش استاندارد با استفاده از کیت QIAamp DNA Mini کیاژن (Cat.no51106) انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از تکنیک PCR مورد تأیید قرار گرفت. برای داشتن کپی نامبر مشخص و معلوم، کلونینک در پلاسمید PTZ57 R/T با استفاده از کیت PCR cloning و طبق پروتکل کیت انجام شد. در نهایت استخراج پلاسمید با استفاده از کیت فرمنتاز و بر اساس دستورالعمل آن صورت گرفت و با استفاده از الکتروفورز با ژل ۱/۵ درصد مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱).



**شکل ۱. الکترو فورز پلاسمید استخراج‌شده**

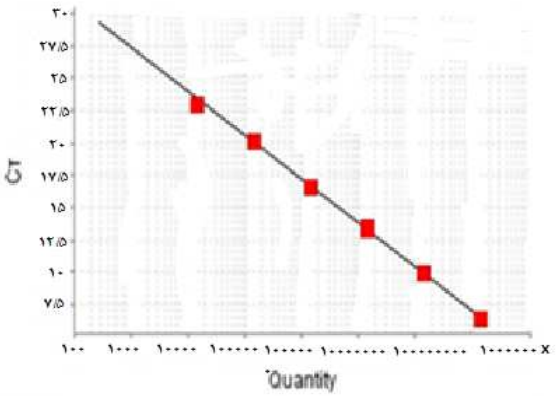
تکنیک Real-time PCR با استفاده از کیت کیاژن QuantiFast SYBR Green PCR (Cat.no:204054) و پرایمرهای درج شده در جدول ۱ و پروتکل موجود انجام شد. تعداد بیفیدوباکتریوم موجود در ۲۰ شخص مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۲۰ نفر شاهد محاسبه شد.

PCR با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از ۶ رقت مختلف پلاسمید با رقت ۰/۱ انجام گرفت (شکل ۲).

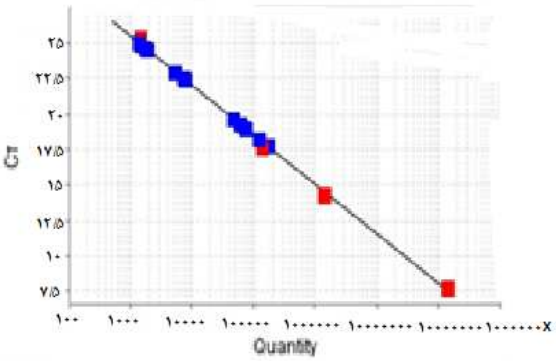
برای محاسبه‌ی کمی باکتری نامبرده DNA استخراج‌شده از نمونه‌ی اشخاص بیمار و سالم در کنار آن قرار داده شد (شکل ۳).

برای تهیه‌ی Master PCR (۲۰ میکرولیتر)، از ۱۰ میکرولیتر SYBR Green PCR، ۷ میکرولیتر RNase-free water و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمرها استفاده شد و باقیمانده از حجم کل، DNA استخراج شده در نظر گرفته شد.

برنامه‌ی دمایی PCR به این صورت تنظیم گردید: دناتوره‌ی اولیه ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۵ دقیقه یک سیکل، دناتوره‌ی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمرها و گسترش ۶۰ درجه‌ی سانتی گراد ۱ دقیقه و تعداد چرخه‌ی ۴۰ سیکل.




**شکل ۲. منحنی استاندارد تهیه‌شده از ۶ رقت مختلف پلاسمید با رقت ۰/۱**




**شکل ۳. سنجش نمونه‌ها با منحنی استاندارد. نقاط قرمز، DNA کنترل داخلی (پلاسمید) و نقاط آبی DNA نمونه‌ها هستند**

**جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR و PCR**

| طول محصول PCR | توالی | پرایمر | هدف |
|---|---|---|---|
| ۱۲۶ | GCGTGCTTAACACATGCAAGTC | BifF | بیفیدوباکتریوم |
| | CACCCGTTTCCAGGAGCTATT | BifR | |
| ۴۶۶ | TCCTACGGGAGGCAGCAGT | UnivF | همه‌ی باکتری‌ها |
| | GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT | UnivR | |

## یافته‌ها

در این تحقیق برای تعیین کمی بیفیدوباکتریوم، نمونه ی مدفوع افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم جمع‌آوری شد. محاسبه‌ی $\log_{10}$ CFU $g^{-1}$ بیفیدوباکتریوم برای هر نمونه با استفاده از تکنیک Real-time PCR انجام شد (شکل ۴).

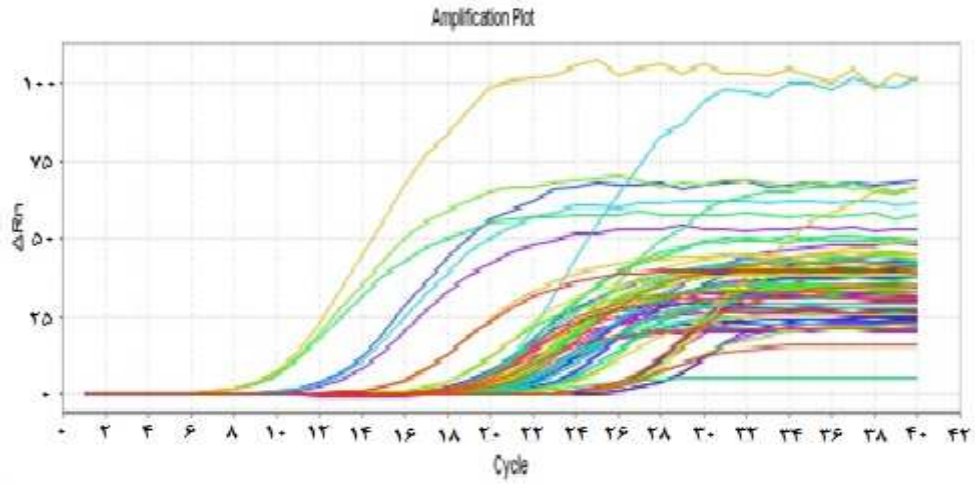
در نهایت نتایج به دست آمده با نرم افزار آماری SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تحلیل قرار گرفت. دراین مطالعه از دو گروه ۲۰ نفری استفاده شد. در گروه بیمار ۱۱ نفر (۵۵ درصد) مرد و ۹ نفر (۴۵ درصد) زن و در گروه سالم ۱۲ نفر (۶۰ درصد) مرد و ۸ نفر (۴۰ درصد) زن بودند.آزمون $\chi^2$ نشان داد که توزیع جنس در دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت (P = ۰/۷۵). به عبارتی دو گروه از نظر جنس همسان بودند.

میانگین سن در افراد مبتلا به دیابت ۹/۰۱ ± ۵۰/۷ سال و در گروه سالم ۱۰/۴ ± ۵۱/۳ سال بود. آزمون Student-t نشان داد که میانگین سن، بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت (P = ۰/۴۲). به عبارتی دو گروه از نظر سن همسان بودند. شاخص توده‌ی بدنی (Body mass index یا BMI) در گروه بیمار و سالم به ترتیب ۲/۶۱ ± ۲۴/۳۲ و ۳/۰۸ ± ۲۳/۶۲ کیلوگرم بر متر مربع بود و دو گروه از نظر BMI نیز همسان بودند (P = ۰/۲۲).

میانگین تعداد باکتری در افراد مبتلا به دیابت ۱۰۲۴۰۱ ± ۹۰۱۵۹ و در افراد سالم ۶۴۵۲۶ ± ۵۳۷۳۹ CFU بود. و اگر چه تعداد این باکتری در افراد مبتلا به دیابت بیشتر بود اما این اختلاف معنی‌دار نبود (P = ۰/۰۹) . همچنین آزمون ناپارامتری Mann-Whitney نشان داد که بین دو گروه اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (P = ۰/۱).

## بحث

در این مطالعه این فرضیه که میکروب‌های روده‌ای در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ با افراد سالم متفاوت است، در نظر گرفته شد. در این مطالعه ۲۰ نفر سالم به عنوان شاهد و ۲۰ نفر مبتلا به دیابت نوع ۲ که از نظر سن، جنس و BMI با یکدیگر منطبق بودند، بررسی شدند. نتایج نشان داد که رابطه‌ی معنی داری بین تعداد بیفیدوباکتریوم و دیابت نوع ۲ وجود نداشت.




شکل ۴. نمودار تکثیر پلاسمید و نمونه‌ها

امروزه ارتباط میکروب های روده ای با بسیاری از بیماری‌های متابولیک به صورت جدی مطرح شده است. تحقیقات انجام شده از جنبه‌های مختلف ارتباط بین میکروفلورای روده ای با بیماری‌های متابولیک را مورد سنجش قرار داده‌اند. این تحقیقات نتایج متناقض داشته‌اند. گروهی ارتباط معنی‌داری بین میکروب های روده‌ای و بیماری‌های متابولیک قایل بوده‌اند و گروهی رابطه‌ی معنی‌داری را نشان نداده‌اند. نتیجه‌ی حاصل از تحقیق حاضر از نظریه گروه دوم یعنی عدم وجود رابطه‌ی معنی‌دار حمایت می‌کند.

بیفیدوباکتریوم به عنوان یکی از فراوان‌ترین باکتری‌ها در روده‌ی پستانداران و به عنوان پروبیوتیک محسوب می‌شود. نشان داده شده است که استفاده از بیفیدوباکتریوم به طور مثبت و مشخصی با بهبود مقاومت گلوکز، گلوکز تحریک کننده، ترشح انسولین و نرمالیزه کردن التهاب در ارتباط است و باعث کاهش اندوتوکسیما و سیتوکینین‌های پیش التهاب در بافت‌های چرب می‌گردد (۲). امروزه تحقیقات فراوانی بر روی پروبیوتیک‌ها به منظور پیشگیری و درمان چاقی، اضافه وزن و بیماری‌های مزمن انجام گرفته است (۱۴). طی تحقیقی نشان داده شد که میکروب‌های روده‌ای انسان در هموستاز گلوکز نقش دارند و پروبیوتیک‌ها همراه با ویتامین D برای جلوگیری از دیابت در اشخاص در معرض این بیماری مؤثر هستند و می‌توان برای مدیریت بیماری از آن ها استفاده نمود (۱۵). بررسی تأثیر رژیم غذایی ویژه بر روی اشخاص مبتلا به دیابت چاق و افراد شاهد لاغر افزایش تنوع باکتریایی در نوع ۲ دیابت را نشان داد، در حالی که افراد شاهد لاغر بدون تغییر بودند. همچنین در اشخاص چاق نسبت فیرمی‌کوتس به باکترویدها کمتر بود و ارتباط با کاهش BMI مشاهده شد. طی همان تحقیق نشان داده شد که در اشخاص مبتلا به دیابت نوع ۲ نسبت فیرمی‌کوتس به باکترویدها افزایش پیدا کرد و به ویژه در تعداد بیفیدوباکتریوم افزایش چشمگیری مشاهده شد. با این همه اختلاف مشاهده شده در تعداد باکتری، ارتباط فراوانی گروه‌های معین و متنوع باکتری‌های مؤثر در مکانیسم التهاب در دیابت نوع ۲ و چاقی یا پیشرفت بیماری‌های متابولیک، آشکار نشده است و نیاز به مطالعه‌ی بیشتری دارد (۱۵). در مطالعه‌ای دیگر تأثیر لاکتوباسیلوس ریوتری بر کاهش مقاومت انسولین موش مشاهده شد و این امکان وجود دارد که برای درمان دیابت نوع ۲ قابل استفاده باشد (۱۶).

تحقیقات بر پایه 16S rRNA بر روی اشخاص چاق و لاغر کاهش نسبت فیرمی‌کوتس به باکترویدها و نیز ارتباط این نسبت در اشخاص چاق با کاهش وزن را نشان داده است (۷). طی تحقیقی مشابه مشاهده شد که تعداد بیفیدوباکتریوم در کودکان با وزن طبیعی نسبت به گروه دارای اضافه وزن بیشتر بود و تعداد استافیلوکوکوس ارئوس درکودکان با وزن غیر عادی نسبت به وزن طبیعی بیشتر بود (۱۷). رژیم غذایی تحریک‌کننده‌ی چاقی در جونده‌ها به طور ویژه‌ای باعث کاهش تعداد بیفیدوباکتریوم، باکترویدها، گروه‌های یوباکتریوم رکتال، کلستریدیوم و کوکوایدها می شود. در این بین بیفیدوباکتریوم‌ها به طور ویژه‌ای کاهش پیدا کرده‌اند (۱۸).

تحقیق بر روی کودکان در حدود ۷ سالگی نشان داد که افراد با وزن طبیعی دارای بیفیدوباکتریوم بیشتری نسبت به اشخاص دارای اضافه وزن هستند. همچنین در زنان معمولی، تعداد بیفیدوباکتریوم نسبت

به افراد دارای اضافه وزن و همچنین زنان با وزن کمتر در طول بارداری، بیشتر می‌باشد (۱۸). گزارش‌هایی مشخص کرده‌اند که کاهش وزن می‌تواند با کاهش بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم و بیفیدوباکتریوم بریوی و افزایش بیفیدوباکتریوم کاتینولاتیو، همراه باشد. به علاوه افزایش لاکتوباسیلوس گاسری، مانع افزایش گلوکز خون می‌شود و علایم دیابت در موش برطرف می‌گردد (۱۸). در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲، باکتری لاکت باسیلوس اسیدوفیلوس روی مقاومت به انسولین مؤثر است ولی بر روی پاسخ‌های التهابی اثری ندارد و نیز اثر حفاظتی بر روی ساختار و عملکرد لوزالمعده به عنوان محرک دیابت نوع ۲ در موش دارد (۱۹). این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که تغییرات میکروب های روده ای به واسطه‌ی رژیم غذایی پر چرب و به دنبال آن افزایش اندوتوکسیما باعث توسعه‌ی چاقی و دیابت می‌شود (۲۰، ۴). با انجام این تحقیقات و آزمایشات مشابه، این پیشنهاد ارایه شد که وجود و تعداد میکروب های روده ای از جمله بیفیدوباکتریوم در ایجاد مقاومت به انسولین و ایجاد دیابت تیپ ۲ نقش دارد (۲۱). تحقیقی نشان داد که میکروب‌های روده‌ای در موش‌های مستعد به بیماری دیابت نسبت به موش‌هایی که در آن ها دیابت نوع ۲ توسعه پیدا کرده متفاوت است (۲۲). تغییر میکروب‌های روده‌ای از طریق آنتی‌بیوتیک اگزاتتراسایکلین در دو مدل موش مختلف، بهبود قند خون، مقاومت گلوکز دهانی و علایم دیابت را نشان داد. این نتایج نشان داد که میکروب‌های روده‌ای یک عامل شرکت‌کننده در مقاومت انسولین بدن هستند و تأثیری در چاقی موش ندارد (۲۳). استفاده از پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تعدادی از موش‌های مستعد به دیابت نوع ۲ نشان داد که با وجود این‌که مقدار بیفیدو باکتریوم و لاکتوباسیلوس کاهش یافته و میزان انتروباکتر و استافیلوکوکوس و بدون تغییر مانده ولی میزان گلوکز خون تغییری مشاهده نشد. این نتیجه عدم تأثیر تعدادی از باکتری‌های میکروفلور روده‌ای را در تنظیم قند خون و بروز دیابت نشان می‌دهد (۱۹). مقدار باکتری‌ها در روده ی کوچک اشخاص با اضافه وزن نسبت به افراد لاغر بیشتر بوده است. در صورتی که در افراد متمایل به کاهش وزن و اشخاص گروه شاهد با وزن ثابت هیچ اختلافی در سطح باکترویدها مشاهده نشد که نشان‌دهنده‌ی عدم تأثیر این باکتری بر کاهش وزن می‌باشد (۲۴). طی بررسی انجام‌شده باکترویدها در افراد با وزن کمتر افزایش یافته‌اند، در حالی که باکتری فیرمی‌کوتس بدون تغییر باقی ماند که نشان‌دهنده‌ی عدم تغییر تعدادی از باکتری‌ها در گروه‌های سالم و بیمار می‌باشد (۱۹). تأیر پروبیوتیک باکتریایی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس NCFMبر روی پاسخ‌های التهابی حساسیت انسولین بر روی اشخاص با نوع ۲ دیابت نشان داد که این تغییر هیچ تأثیری بر روی نشانگرها و پاسخ‌های التهابی و حساسیت انسولین ندارد (۲۵). طی تحقیق دیگری با استفاده از تکنیک فیش در بررسی باکتری‌های مدفوعی بالا بودن فیرمی‌کوتس و کاهش باکترویید مورد تأیید قرار نگرفت (۴).تحقیقات فوق عدم تأثیر باکتری بر بیماری دیابت را نشان دادند که مطابق با نتیجه‌ی حاصل در این مقاله می‌باشد.

Yun و همکاران تأثیر لاکتو باسیلوس گاسری را بر روی گلوکز خون و وزن بدن مدل موش دیابت نوع ۲ بررسی و نتیجه گرفتند که افزایش این باکتری

بر روی وزن بدن اثری ندارد ولی قادر به کاهش قند خون می‌باشد (۲۶). این یافته نشان‌دهنده‌ی عدم تأثیر این باکتری بر درمان چاقی به عنوان عامل اصلی ایجاد دیابت می‌باشد. در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲، در تعداد زیر گروه‌های باکتروییدولگاتوس، کلستریدیوم لپتوم و جنس‌های بیفیدوباکتریوم، اختلاف قابل توجهی نسبت به افراد سالم مشاهده نشد (۲۷). عدم تفاوت بین تعداد بیفیدوباکتریوم در افراد سالم و افراد مبتلا به دیابت مطابق با نتیجه‌ی این مقاله می‌باشد.

طی یک مطالعه‌ی جدید با تغییر دادن میکروب های روده ای اثری در شروع و بهبود حساسیت انسولین مشاهده نشد که عدم تأثیر میکروب‌های روده‌ای در درمان بیماری‌های متابولیک را نشان می‌دهد (۲۸). البته ترکیب میکروب‌های روده‌ای هنوز جای بررسی دارد و دلایل علمی بیشتری برای اطمینان از ارتباط و یا عدم ارتباط بین ترکیب میکروفلورای روده‌ای و بیماری‌های متابولیک لازم است. با استفاده از تحقیقات گسترده تر می‌توان به رابطه‌ی تغییر میکروب‌های روده‌ای به منظور کنترل بیماری‌های متابولیک مانند چاقی و دیابت نوع ۲ پرداخت.

## تشکر و قدردانی

مؤلفین، از همکاری صمیمانه‌ی مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان که در جهت انجام این تحقیق کمال همکاری را مبذول داشتند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## References

1. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. PLoS One 2010; 5(2): e9085.
2. An HM, Park SY, Lee dK, Kim JR, Cha MK, Lee SW, et al. Antiobesity and lipid-lowering effects of Bifidobacterium spp. in high fat diet-induced obese rats. Lipids Health Dis 2011; 10: 116.
3. Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NM, Magness S, et al. High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. PLoS One 2010; 5(8): e12191.
4. Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. Diabetologia 2010; 53(4): 606-13.
5. Shahshan T, Karimi J. Prevention of type 2 diabetes mellitus. Chaharbagh Publication: Isfahan, Iran: 2002. p. 56-98.
6. Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. Pathol Biol (Paris) 2008; 56(5): 305-9.
7. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccah D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients. PLoS One 2009; 4(9): e7125.
8. Pataky Z, Bobbioni-Harsch E, Hadengue A, Carpentier A, Golay A. Gut microbiota, responsible for our body weight?. Rev Med Suisse 2009; 5(196): 662-4, 666.
9. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes 2007; 56(7): 1761-72.
10. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. Mayo Clin Proc 2008; 83(4): 460-9.
11. Huys G, D'Haene K, Danielsen M, Matto J, Egervarn M, Vandamme P. Phenotypic and molecular assessment of antimicrobial resistance in Lactobacillus paracasei strains of food origin. J Food Prot 2008; 71(2): 339-44.

**12.** Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. Appl Environ Microbiol 2000; 66(5): 2263-6.
**13.** Stsepetova JE. The characterisation of intestinal lactic acid bacteria using bacteriological, biochemical and molecular approaches [Thesis]. Tartu, Estonia: University of Tartu; 2011. p. 234-51.
**14.** Power SE, O'Toole PW, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF. Intestinal microbiota, diet and health. Br J Nutr 2013; 12: 1-16. [Epub ahead of print]
**15.** Barengolts E. Vitamin D and Prebiotics May Benefit the Intestinal Microbacteria and Improve Glucose Homeostasis in Prediabetes and Type 2 Diabetes. Endocr Pract 2013; 1-40.
**16.** Kootte RS, Vrieze A, Holleman F, Dallinga-Thie GM, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. Diabetes Obes Metab 2012; 14(2): 112-20.
**17.** Kalliomaki M, Collado MC, Salminen S, Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. Am J Clin Nutr 2008; 87(3): 534-8.
**18.** Cani PD, Delzenne NM. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. Curr Opin Pharmacol 2009; 9(6): 737-43.
**19.** Wang X, Wen Sh, Li H, Yuan J. Effect of Lactobacillus acidophilus on the prevention and treatment of type II diabetes in mice. Chinese Journal of Microecology 2010; 22(12): 1069-73.
**20.** Vilsboll T, Holst JJ. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. Diabetologia 2004; 47(3): 357-66.
**21.** Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. Diabetologia 2007; 50(11): 2374-83.
**22.** Mai V, Draganov PV. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. World J Gastroenterol 2009; 15(1): 81-5.
**23.** Membrez M, Blancher F, Jaquet M, Bibiloni R, Cani PD, Burcelin RG, et al. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. FASEB J 2008; 22(7): 2416-26.
**24.** Ley RE. Obesity and the human microbiome. Curr Opin Gastroenterol 2010; 26(1): 5-11.
**25.** Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RM, Moller K, Svendsen KD, et al. Effects of Lactobacillus acidophilus NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. Br J Nutr 2010; 104(12): 1831-8.
**26.** Yun SI, Park HO, Kang JH. Effect of Lactobacillus gasseri BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. J Appl Microbiol 2009; 107(5): 1681-6.
**27.** Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. Curr Microbiol 2010; 61(1): 69-78.
**28.** Weickert MO, Arafat AM, Blaut M, Alpert C, Becker N, Leupelt V, et al. Changes in dominant groups of the gut microbiota do not explain cereal-fiber induced improvement of whole-body insulin sensitivity. Nutr Metab (Lond) 2011; 8: 90.

**Journal of Isfahan Medical School** Received: 05.06.2013

**Vol. 31, No. 247, 1st Week, October 2013** Accepted: 03.09.2013

# Difference in Quantities of Bifidobacteria from the Intestinal Microflora of Individuals with Type 2 Diabetes and Healthy Individuals from Iran

Marzieh Nazemi MSc[1], Masoud Amini MD[2], Rasoul Salehi PhD[3]

**Original Article**

## Abstract

**Background:** Obesity and Diabetes are two metabolic diseases that are dependent on genetic and various environmental factors. Today, obesity and type 2 diabetes cannot just be attributed to genome changes, bad eating habits, or physical activity reduction. Gut microflora is another effective factor that has an important role in health. Recently, numerous experiments have been done to investigate the relation between metabolic diseases and bacterial populations in the gut. The purpose of this study is to assess the bifidobacteria of the intestinal microbiota in people with type 2 diabetes and compare with healthy persons.

**Methods:** In this study, 40 male and female adults, 20 of whom were diagnosed with type 2 diabetes, were studied. For this study, age, gender, and body-mass index (BMI) are matched in diabetic and healthy persons. After fecal sample collection from diabetic and healthy persons, and extraction of DNA from samples, culture and extraction of DNA from standard bifidobacteria were done as a positive control. After that, cloning in PTZ57 R/T plasmid and extraction cloning plasmid was done. For quantitative investigation of bifidobacteria, Real-time PCR molecular technique was done by using special primer of bifidobacterium and standard curve. To study the number of bifidobacteria in people with type 2 diabetes and compare with healthy persons, statistical analysis was done.

**Findings:** Average number of bacteria in people with type 2 diabetes is more than in healthy persons, but Student's independent t-test (P = 0.09) and Mann-Whitney test (P = 0.1) indicate that there are no meaningful differences between them.

**Conclusion:** Quantitative calculation with Real-time PCR indicates that the number of bifidobacteria is not effective in Iranian type 2 diabetes patients.

**Keywords:** Type 2 diabetes, Gut microflora, Bifidobacterium, Real-time PCR, Obesity

**Citation:** Nazemi M, Amini M, Salehi R. **Difference in Quantities of Bifidobacteria from the Intestinal Microflora of Individuals with Type 2 Diabetes and Healthy Individuals from Iran.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(247): 1216-25

1- Faculty Member, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2- Professor, Endocrinology and Metabolism Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
**Corresponding Author:** Marzieh Nazemi MSc, Email: nazemi.mn@gmail.com