Internal Medicine Today
Gonabad University of Medical Sciences
July 2022. Vol 28. Issue 3

Research Paper

Comparison of the Lactobacillus and Bifidobacterium Population in Fecal Microbiome of Celiac Disease Patients on Gluten-Free Diet With Healthy Subjects

Mona Soheilian-Khorzoghi[1], Mohammad Rostami-Nejad[2], Azam Haddadi[1], Abbas Yadegar[3], *Hossein Dabiri[4]

1. Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
2. Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran,Iran.
3. Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran,Iran.
4. Department of Microbiology, Faculty of Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Soheilian-Khorzoghi M, Rostami-Nejad R, Haddadi A, Yadegar A, Dabiri H. [Comparison of the Lactobacillus and Bifidobacterium Population in Fecal Microbiome of Celiac Disease Patients on Gluten-Free Diet With Healthy Subjects (Persian)]. Internal Medicine Today 2022; 28(3):382-397. https://doi.org/10.32598/hms.28.3.3755.1

https://doi.org/10.32598/hms.28.3.3755.1

CC BY NC

Received: 18 Apr 2022
Accepted: 22 May 2022
Available Online: 01 Jul 2022

Key words:
Celiac disease, Gastrointestinal microbiome, Dysbiosis, Diet gluten-free

ABSTRACT

Aims Celiac disease (CD) is a chronic autoimmune disease triggered by gluten and other environmental factors, such as intestinal microbiota in genetically predisposed persons. This study aimed to evaluate the composition of the target gut microbiota population in patients with CD and to compare it with healthy individuals.

Methods & Materials In this case-control study, Bifidobacterium and Lactobacillus were evaluated in the fecal samples of 20 celiac patients on a gluten-free diet (GFD) with 20 healthy individuals referred to the Celiac Disease Department, Tehran, Iran, from August 2019 to February 2020. Microbial DNA extracted from fecal samples was evaluated by specific primer pairs using the real-time-polymerase chain reaction (PCR) technique. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics version 21.

Findings The results of the demographic information of participants regarding the gender and the mean age as well as the Marsh classification showed no statistically significant difference between the two groups (P>0.05). The comparison of intestinal microbiota between the two study groups revealed that the rate of Bifidobacterium spp. and Lactobacillus spp. was significantly lower in celiac patients compared to the control group.

Conclusion The results of this study confirmed the dysbiosis in celiac patients compared to healthy subjects. In addition, changes in the gut microbiome may contribute to the pathogenesis of the CD.

* ***Corresponding Author:***
Hossein Dabiri, PHD.
Address: Department of Microbiology, Faculty of Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98 (912) 2839824
E-mail: hdabiri@sbmu.ac.ir

English Version

Introduction

Celiac disease (CD) is a chronic autoimmune disease triggered by gluten and other environmental factors, such as intestinal microbiota in genetically predisposed persons. Gluten consumption is the main cause of clinical signs and symptoms of celiac disease. When susceptible people are exposed to gluten, the tissue transglutaminase enzyme leads to changes in this protein, and as a result, an inflammatory reaction is created due to the interaction between the immune system and the tissue of the small intestine, and this reaction in the intestinal mucosa causes atrophy of the intestinal villi, crypt hyperplasia, increased number of lymphocytes in the lamina propria, and malabsorption syndrome. Currently, eliminating gluten from the diet is the only available treatment for celiac disease [2]. A gluten-free diet leads to improvement in the clinical signs and symptoms of celiac disease, small intestinal mucosal damage, and intestinal epithelial integrity [3]. The prevalence of celiac disease is increasing every year and the basic mechanism of this disorder is not fully understood. Celiac disease usually appears in early childhood after exposure to gluten; however, the number of people with celiac disease who experience this disease in early and late adulthood is also increasing [4]. For this reason, other environmental factors can also play a role in the spread of this disease [5]. Among these environmental factors, we can mention the short duration of breastfeeding, intestinal infections, and changes in the digestive microbiota [6]. Gastrointestinal microbiota includes a large number of microbial species and the number of its genes is 150 times that of the host's genome, and it has a vital role in human health and is involved in crucial functions of the host, such as body metabolism and physiology [7]. Few studies have been conducted regarding the role of digestive microbiota in celiac disease; however, the change in digestive microbiota-dysbiosis is a critical environmental factor in the pathogenesis of the celiac disease [8]. Digestive microbiota is vital in the maturation of immunity in the body and homeostasis in the intestine. The dysbiosis in the gastrointestinal microbiota may affect intestinal homeostasis and thus lead to an immune response to food antigens, such as gluten [9]. Most studies show that dysbiosis occurs in the digestive microbiota of people with celiac disease with active disease in the form of a significant decrease in the population of beneficial gram-positive bacteria, such as Bifidobacterium and Lactobacillus in duodenal and stool samples. This reduction provides suitable conditions for the colonization of pathogenic gram-negative bacteria in the mucosal surfaces of celiac patients [10]. Also, the results of studies conducted on a sample of twelve celiac patients show that the Bifidobacterium population has decreased in these patients [1]. The presence of the Bifidobacteria family in the digestive tract leads to beneficial effects on a person's health, including creating resistance in the host against pathogens [11]. In addition, studies conducted in children with celiac disease show a decrease in the ratio of Lactobacillus and Bifidobacterium to Bacteroides [12]. Different strains of Lactobacillus species exert more inductive effects than suppressive effects on both the innate and acquired immune systems of the body. Lactobacillus casei strains lead to an increase in both local and systemic T cell-mediated responses to gluten [13]. Considering the importance of intestinal microbiota in the pathogenesis of celiac disease and the imbalance in the intestinal microbiota of people with this disease, the present study was conducted to investigate the balance of two beneficial microbes, Lactobacillus and Bifidobacterium, in the stool samples of patients with celiac disease compared to healthy individuals.

Materials and Methods

Study population and sampling

This is a case-control study from August 2018 to February 2018 on 20 people with the celiac disease under a gluten-free diet as a case group and 20 healthy people as a control group who were referred to the celiac clinic of the Digestive and Liver Diseases Research Center of Shahid Beheshti University of Medical Sciences. This study was approved with the ethics code IR.SBMU.RIGLD.REC.1395.114 of the Ethics Committee of the Digestive and Liver Diseases Research Center of Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Health Services and with the registration code IRCT20171225038063N1 of the Iranian Clinical Trial Registration Center (IRCT). After obtaining approvals, all participants in this study were informed about the objectives of this research project. Before entering the study, all patients with celiac disease had antibodies against tissue transglutaminase (t-TG) and endomysial antibody (EMA) in their blood serum, and their disease diagnosed by histology according to Marsh classification (Marsh I-III) was also confirmed [14]. The inclusion criteria included having a gluten-free diet for at least 6 months before entering the study. Before the study, the consent form was completed and approved by each participant. The inclusion criteria included pregnant women with celiac disease, people with gastrointestinal diseases, such as Crohn's ulcerative colitis, ulcerative colitis, or ulcerative colitis, people with short bowel syn-

drome, people who have consumed alcoholic beverages, or people addicted to illegal drugs, people with a history of mouth and stomach surgery, people with cancer or positive HIV, people with a history of taking steroid drugs 4 weeks before the study, antibiotics, and non-steroidal anti-inflammatory drugs, and people with clinically abnormal levels of urea, electrolytes, creatinine, or liver serum. Demographic information of the participants, including age, sex, and pathology result of the patients was prepared and recorded based on the Marsh classification as well as a questionnaire. Before the study (day zero) and during the study, stool samples from both patient and control groups were collected in special plastic containers and kept at -80°C until analysis.

Extraction and measurement of DNA concentration

Bacterial DNA was extracted from the stool samples of the study subjects by the FavorPrepTM Stool DNA Isolation Mini Kit (Favorgen® Biotech Corp., Pingtung, Taiwan) according to the instructions mentioned in this kit. Briefly, 200 mg of feces was placed in a sterile tube, containing 300 µL of SDE1 buffer and 20 µL of proteinase K (10 mg/mL), and the rest of the protocol was performed according to the kit manufacturer's instructions. After DNA extraction, its purity and concentration were measured by measuring the absorbance ratio of A260/A280 nm by NanoDrop®ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). If the absorption ratio of 260 to 280 is between 1.7 and 2, the DNA has sufficient purity to perform a polymerase chain reaction [15]. The extracted DNA was stored at -80°C. Two bacterial candidates, Lactobacillus and Bifidobacterium, were investigated.

Analysis of intestinal microbiota by real-time polymerase chain reaction (PCR) technique

The real-time polymerase chain reaction (PCR) technique was used to identify and measure the number of copies of the 16S rRNA gene related to Bifidobacterium species and to determine the number of this bacterium in the intestinal microbiota, specific Bifid-F primers with the oligonucleotide sequence -GGGATGCTGGTGTGGAAGAG-3'5 and Bifid-R with the oligonucleotide sequence 5'-TGCTCGCGTCCACTATCCAG-3' was used. For Lactobacillus species, specific primers Lacto-F with the oligonucleotide sequence 5'-TGGATGCCTTGGCACTAG-3' and Lacto-R with the oligonucleotide sequence 5´-AAATCTCCGGATCAAAGCTTAC-3´ was used. The number of reaction components, including 10 µL of BioFACT™ 2X Real-Time PCR Master Mix (For SYBR Green I, BIOFACT, South Korea) and 10 nM of each reverse primer and 2 µL of extracted DNA were calculated. Real-time PCR program for each replication as an initial denaturation temperature of 95°C for 15 min, 40 cycles with an initial denaturation at 95°C for 20 s, annealing of primers at 56°C for 30 s, elongation at 72°C for 20 s, followed by the melting curve step according to the device instructions was performed. After performing the polymerase chain reaction, the temperature range of 52°C to 95°C was considered to determine the melting temperature and consecutive readings with a temperature gradient (Ramp) of 0.5°C. Melting curve analysis was performed to confirm the specificity of amplification. Primer concentrations and thermocycler programs were optimized for each specific polymerase chain reaction. Standard curve to determine the number of copies of the Swedberg 16 ribosomal RNA gene of each of the candidate bacteria by producing a 10-fold dilution series from 101 to 1010 copies of the Swedberg 16 ribosomal RNA gene in each reaction using Escherichia coli strain DNA BL21 (Escherichia coli BL21 strain) was performed. The number of 16S rRNA gene copies in the group of candidate bacteria in stool samples was determined by comparing the cycling threshold (CT) values of the samples with standard curves. All reactions were performed in triplicate.

Statistical analysis was performed using SPSS statistical software version 21 (Armonk, NY: IBM Corp). Differences in demographic criteria between the study groups were evaluated using the Pearson chi-square test for categorical variables. Two different groups were compared by t test. The obtained results were expressed as mean ± standard deviation (SD). In all cases, the significance level of the tests is less than 0.05. All analyzes were assessed for gut microbiota abundance based on a threshold cycle number.

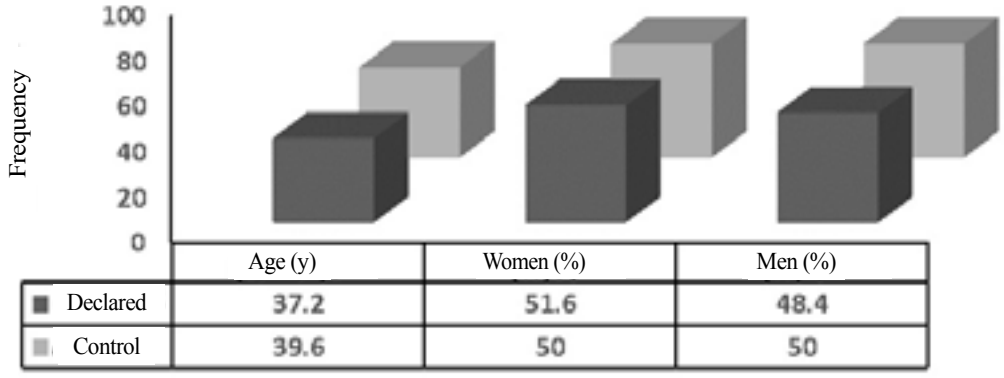
Results

Demographic information in two groups of celiac patients under gluten-free and healthy diets was fully studied and statistically analyzed with related probability values (P value). Enumeration of intestinal microbiota in 20 people with celiac disease, including 9 men and 11 women, who were on a gluten-free diet (GFD) before entering the study and during the study as a case group, as well as 20 healthy people without celiac disease, including 10 men and 10 women, were examined as a control group in terms of composition. No statistically significant difference was observed in terms of gender and the average age of people in the two studied groups (P>0.05) (Figure 1). As shown in Figure 2, in terms of pathology results, most people with celiac disease were placed in Marsh group 3 (18 people). The results of the study showed no significant difference between the case group and control group

in terms of Marsh classification (P>0.05). The number of target bacteria in fecal samples in both case and control groups was measured by the threshold cycle and shown as mean ± standard deviation in Table 1. The results of this study show that the threshold cycle of Bifidobacterium and lactobacillus bacteria in people with celiac disease is significantly higher compared to the healthy group (P<0.05). Since the threshold cycle has an inverse relationship with the count rate, as a result, the count rate of these two useful bacteria in celiac patients is significantly lower compared to healthy people (P<0.05).

Discussion

Recent evidence regarding celiac disease has shown that innate immunity is vital in triggering the immune response through the stimulation of the acquired immune response and mucosal damage. The connection of intestinal microbiota with the intestinal mucosal wall is done through the same receptors that can activate innate immunity. Therefore, changes in gut microbiota may lead to the activation of this inflammatory pathway [16]. Beneficial species of the intestinal microbiota are reduced in patients with celiac disease, and on the other hand, pathogenic species are potentially increased compared to healthy people. In these patients, although dysbiosis in the intestinal microbiota is decreased after a GFD, it is not eliminated. Therefore, the intestinal microbiota plays a crucial role in the pathogenesis of the celiac disease [17-19]. On the other hand, fewer studies have investigated the number and composition of intestinal microbiota and its role in the pathogenesis of the celiac disease, as well as comparing the composition of intestinal microbiota in people with celiac disease compared to people without this disease. Therefore, in the current study, the composition of specific intestinal microbiota, including Bifidobacterium and Lactobacillus, was investigated in patients with celiac disease compared to healthy individuals, and it was shown that the population of intestinal microbiota in celiac patients is significantly different compared to healthy individuals so that sick people have a lower amount of beneficial intestinal bacteria Bifidobacterium and Lactobacillus than healthy people. The diversity of intestinal microbiota in people with celiac disease compared to healthy people has been investigated in various studies that confirm the results of the present study [10, 20]. Golfetto et al. agreed with the results of the present study regarding the low level of Bifidobacterium and dysbiosis in the intestinal microbiota in patients with celiac disease, even despite following a GFD, which supports the pathological process of the disease [21]. Similar to the present study is the study of Moraes et al. who reported the difference in the microbial profile between children with celiac disease and the control group and showed that celiac patients have a lower amount of Lactobacillus and Bifidobacterium compared to healthy individuals. Studies have shown that Bifidobacterium and Lactobacillus, which are also part of probiotics, can play a role in the digestion or change of gluten polypeptides. On the other hand, some bacterial species belonging to the genera Lactobacillus and Bifidobacterium have a protective role on epithelial cells against the damage caused by gliadin [22]. Collado et al. in a study identified specific intestinal bacteria related to celiac disease in the diagnosis and post-treatment with GFD in stool samples of children with untreated celiac disease and under GFD. Biopsy samples of untreated celiac patients under GFD and stool samples and biopsies of healthy children as a control group were examined to compare the two groups and real-time PCR was used to measure intestinal bacteria. The results of this study show the difference between the number of some intestinal microbiota, such as Bacteroidetes and Clostridium leptum in children with celiac disease compared to the control group regardless of the stage of the disease, as well as the difference in the number of E.coli. and showed Staphylococcus in untreated celiac children compared to the control group. Also, in this study, a lower amount of Bifidobacterium was reported in the feces of both groups of patients and biopsies of untreated individuals compared to the control group [10]. In another similar study, Sanz et al. analyzed the fecal microbiota count in the population of children with celiac disease compared to age-matched controls by a polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis and reported a significant increase in the stool microbiota population in patients with celiac disease compared to healthy individuals. On the other hand, they observed the specific presence of Lactobacillus curvatus species in celiac patients and Lactobacillus casei as a characteristic bacterial species in the healthy group. Also, the number of Bifidobacterium species in the celiac group was significantly lower than in the healthy group [21]. Nistal et al. conducted a study to investigate the difference in intestinal microbiota in adults with celiac disease and healthy individuals. Using the techniques of gradient genetic electrophoresis and gas-liquid chromatography of short-chain fatty acids, the microbial communities were measured in stool samples of untreated celiac patients, celiac patients treated with GFD, and healthy population and they observed a decrease in the diversity of Lactobacillus and Bifidobacterium species in treated celiac patients. Also, the treated celiac group showed a significantly higher amount of Bifidobacterium bifidum than healthy adults. The overall results of this study showed the difference in the fecal microbiota of



	Age (y)	Women (%)	Men (%)
Declared	37.2	51.6	48.4
Control	39.6	50	50

Figure 1. Demographic Information of Participants

Internal Medicine Today

untreated celiac patients compared to healthy people. Consistent with the present study, Nistal et al. showed that although the GFD in celiac patients partially restores the digestive microbiota to a normal state, the diversity of Lactobacillus and Bifidobacterium decreases significantly [23]. In another similar study conducted by Nylund et al. on patients with celiac disease and gluten-sensitive people without celiac disease under a GFD and healthy people consuming oats, the composition of fecal microbiota in the studied groups was investigated and the results showed that although the frequency of Bifidobacterium in healthy adults tended to be higher compared to celiac patients and the non-celiac gluten-sensitive group, it did not show a significant difference in terms of diversity in the microbial composition in the studied groups [33]. Also, Di Biase et al. compared the composition of the digestive microbiota in the stool samples of twelve children with celiac disease at the beginning of the disease with the healthy group. The results of this study are also similar to the current study, the difference in the digestive microbiota in children showed celiac disease at the beginning of the disease compared to the healthy group. A decrease in the abundance of beneficial bacteria, such as Bacteroides/Prevotella and Akkermansia was observed in stool samples of celiac disease patients compared to the healthy group [34]. In addition, some other studies also confirm the results of the present study and prove that two beneficial bacteria, Bifidobacterium and Lactobacillus, can play a protective role in patients with celiac disease against the inflammatory response and mucosal damage caused by gliadin peptides. They also explain the therapeutic roles of these probiotics [18-24]. Reducing the number of beneficial bacteria, such as Lactobacillus and Bifidobacterium in patients with celiac disease leads to an increase in opportunistic pathogens in patients with celiac disease and eventually leads to a defect in the immune system of these patients [26]. According to previous studies, the intestinal microbiota in patients with celiac disease is not completely restored despite following a GFD [10] and the amount of some useful digestive bacteria, such as Bifidobacterium in people with celiac disease is still significantly lower than in healthy people despite this type of diet. The results of most studies conducted in the field of investigating the diversity of the intestinal microbiota of celiac patients under a GFD and comparing it with healthy people all over the world show the diversity

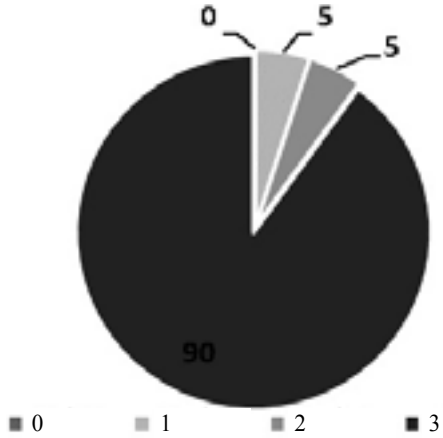


Figure 2. Pathology Results of Patients Based on Marsh Classification

Internal Medicine Today

Table 1. Intestinal microbiota counts based on the threshold cycle (CT) in the two study groups **(n=20)**

Variables	mean±SD		P
	Patients With Celiac	Healthy People	
Bifidobacterium	22.2±6.8	12.1±5.1	0.001*
Lactobacillus	24.5±5.8	11.9±3.2	<0.001*

and a different number of the intestinal microbiota of these patients and healthy people. [27]. All these results confirm the results of the present study. In the current study, the target population was middle-aged patients and healthy people in an urban society with an average and normal diet. Compared to the group of healthy people, these people had an imbalance in the number of natural probiotics of flora. The amount of Lactobacillus and Bifidobacterium excreted in these people is less than in the healthy group, which is a reflection of the condition of the intestinal flora of these people, which is caused by the poor condition of the microbial flora and the lack of probiotic bacteria in the digestive system of these people. On the other hand, some studies showed no difference between the intestinal microbiota of patients with the celiac disease under a GFD and the control group and declared that the intestinal microbiota does not seem to play a role in the pathogenesis of the celiac disease [31]. On the other hand, having this type of diet in these patients, based on the results of previous studies, only leads to the improvement of a part of the intestinal microbiota [32], but the reasons are not known. However, factors such as the genetics of a patient with celiac disease, despite a GFD, can most likely affect the composition of the intestinal microbiota [33]. On the other hand, gluten has a prebiotic-like function, and removing this protein from a GFD can also create a different intestinal microbiota in these patients compared to healthy people [34]. Therefore, it can be said that modifying the nutritional system with the approach of strengthening the probiotic system of the digestive system and regulating their reliability and viability can moderate the complications of celiac disease, which is a kind of defect in the gene system with epigenetic stimuli. Physiologically, according to the atrophy of the intestinal villi in this disease, perhaps the defect in maintaining the balance of the natural microbial flora can be considered as one of the complications caused by this disease, in another approach, this factor can be considered as the cause of the exacerbation of this disease. According to other effective environmental and biological factors, this series of factors is the occurrence of nutritional poverty and deficiencies in the natural levels of micronutrients. Factors in the present study, the intestinal microbiota and the decrease in the amount of Bifidobacterium and Lactobacillus were different between the two studied groups and decreased in the group with celiac disease, but according to the sample size reported, this difference between the microbiota cannot be determined with certainty. Rohedei reported that the studies on healthy and celiac patients need to have a larger sample size. As shown in the findings section, the results of two Pearson chi-square tests for categorical variables and t test for numerical variables, which were performed to determine the integrity between the two groups of cases and controls in the statistical analysis of demographic data, show that the two studied groups have no significant differences in terms of demographic data. This problem is the strength of the present study in the sense that these results have confirmed the integration between the two studied groups and the two groups can be easily compared and examined. The present study had limitations. First, this study was conducted in a small sample size and a single center in Tehran City, Iran. Another limitation of the present study was the limited duration of the study and patient selection.

Conclusion

The present study, consistent with other studies, shows the phenomenon of imbalance of intestinal microbiota in patients with celiac disease compared to healthy people. As a result, it can be said that examining stool microbiota can be a good indicator of intestinal microbiota imbalance in celiac patients and can be used to monitor microbiota restoration during a gluten-free diet. The metabolic data along with the assessment of the intestinal microbiota of patients can help doctors evaluate the role of intestinal microbiota in the pathogenesis of celiac disease and also further investigations.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

Following the principles of research ethics, the researchers followed all ethical codes related to research on human samples and obtained the necessary permits from the competent authorities from the Ethics Committee of the Digestive and Liver Diseases Research Center of Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Health Services (Ethical Code: IR.SBMU.RIGLD.REC.1395.114). Also, registration code IRCT20171225038063N1 of the Iran Clinical Trial Registration Center (IRCT) was obtained.

Funding

This research received financial support from the Digestive and Liver Diseases Research Center of Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Health Services.

Authors' contributions

All authors equally contributed to preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors of this article are grateful for the unwavering support of the vice president of research and the colleagues of the Research Institute of Gastrointestinal and Liver Diseases of Shahid Beheshti University of Medical Sciences and the respected officials of the Islamic Azad University, Karaj branch.

طب داخلی روز
فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی کشاورز

مقاله پژوهشی

مقایسه جمعیت لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم در میکروبیوم مدفوعی افراد مبتلا به بیماری سلیاک تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن با افراد سالم

مونا سهیلیان خورذوقی[1]، محمد رستمی‌نژاد[2]، اعظم حدادی[1]، عباس یادگار[3]، *حسین دبیری[4]

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذا، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۴. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Soheilian-Khorzoghi M, Rostami-Nejad R, Haddadi A, Yadegar A, Dabiri H. [Comparison of the Lactobacillus and Bifidobacterium Population in Fecal Microbiome of Celiac Disease Patients on Gluten-Free Diet With Healthy Subjects (Persian)]. Internal Medicine Today 2022; 28(3):382-397. https://doi.org/10.32598/hms.28.3.3755.1

https://doi.org/10.32598/hms.28.3.3755.1

تاریخ دریافت: ۲۹ فروردین ۱۴۰۱
تاریخ پذیرش: ۰۱ خرداد ۱۴۰۱
تاریخ انتشار: ۱۰ تیر ۱۴۰۱

چکیده

اهداف بیماری سلیاک نوعی بیماری خودایمنی مزمن می‌باشد که در اثر گلوتن و سایر عوامل محیطی مانند میکروبیوتای روده‌ای در افراد مستعد ازنظر ژنتیکی ایجاد می‌شود. این مطالعه با هدف ارزیابی ترکیب و میزان شمارش جمعیت میکروبیوتای روده‌ای هدف در بیماران سلیاکی و مقایسه آن با افراد سالم انجام شد.

مواد و روش‌ها در مطالعه آزمایش-کنترل حاضر، ۲ باکتری بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس درنمونه مدفوع ۲۰ بیمار سلیاکی تحت‌رژیم غذایی فاقد گلوتن با ۲۰ فرد سالم مراجعه‌کننده به درمانگاه سلیاک تهران-ایران، بین مرداد تا بهمن سال ۱۳۹۸ بررسی شد. DNA باکتریایی استخراج‌شده از نمونه مدفوع توسط جفت آغازگرهای اختصاصی و با تکنیک ریل تایم پی‌سی‌آر، موردسنجش و ارزیابی قرار گرفت. تجزیه‌وتحلیل آماری با نسخه ۲۱ نرم‌افزار SPSS انجام شد.

یافته‌ها نتایج حاصل از بررسی مشخصات جمعیت‌شناختی در ۲ گروه مورد مطالعه ازنظر جنسیتی، میانگین سنی و طبقه‌بندی مارش اختلاف معناداری نداشته است (P>۰/۰۵). ازطرفی مقایسه میکروبیوتای روده‌ای نشان می‌دهد که میزان باکتری‌های مفید بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس در بیماران سلیاکی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری کمتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری نتایج حاصل از این مطالعه پدیده ناتراز شدن میکروبیوتای روده در بیماران سلیاکی را در مقایسه با افراد سالم تأیید کرد. به‌علاوه، تغییر در میکروبیوتای روده ممکن است در روند بیماری‌زایی بیماری سلیاک نقش داشته باشد.

کلیدواژه‌ها:
بیماری سلیاک، میکروبیوتای گوارشی، ناتراز شدن، رژیم فاقد گلوتن

* نویسنده مسئول:
حسین دبیری
نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده علوم پزشکی، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۲۸۳۹۸۲۴ (۹۱۲) ۹۸+
پست الکترونیکی: hdabiri@sbmu.ac.ir

مقدمه

بیماری سلیاک نوعی بیماری خودایمنی مزمن دائمی در روده کوچک است که در اثر مصرف پروتئین گلوتن و درنتیجه عدم‌تحمل این آنتی‌ژن غذایی در افراد مستعد ازنظر ژنتیکی رخ می‌دهد [۱]. مصرف گلوتن مسئول اصلی بروز علائم و نشانه‌های بالینی در بیماری سلیاک می‌باشد. در هنگام مواجهه افراد مستعد با گلوتن، آنزیم ترنس گلوتامیناز بافتی منجر به تغییر در این پروتئین می‌شود. درنتیجه یک واکنش التهابی در اثر میان‌کنش بین سیستم ایمنی و بافت روده کوچک ایجاد می‌شود که این واکنش در مخاط روده، عامل ایجاد آتروفی پرزهای روده، کریپت هایپر پلازیا، افزایش تعداد لنفوسیت‌ها در لامینا پروپریا و سندرم سوءجذب می‌باشد. در حال حاضر حذف گلوتن از رژیم غذایی، تنها درمان موجود در بیماری سلیاک است [۲]. رژیم غذایی بدون گلوتن منجر به بهبودی در علائم و نشانه‌های بالینی بیماری سلیاک، آسیب مخاطی روده کوچک و یکپارچگی اپیتلیال روده می‌شود [۳].

شیوع بیماری سلیاک هر ساله رو به افزایش است و مکانیسم اساسی این اختلال به‌طور کامل شناخته نشده است. معمولاً بیماری سلیاک در اوایل دوران کودکی پس از درمعرض قرار گرفتن فرد با گلوتن ظاهر می‌شود؛ بااین‌حال، تعداد افراد مبتلا به بیماری سلیاک که این بیماری را در اوایل و اواخر دوران بزرگسالی تجربه می‌کنند نیز در حال افزایش می‌باشند [۴]. به همین دلیل، فاکتورهای محیطی دیگری نیز می‌توانند در گسترش این بیماری نقش داشته باشند [۵]. از این فاکتورهای محیطی می‌توان مدت‌زمان کوتاه شیردهی، عفونت‌های روده و تغییرات در میکروبیوتای گوارشی را نام برد [۶]. میکروبیوتای گوارشی شامل تعداد بسیار زیادی از گونه‌های میکروبی می‌باشد و تعداد ژن‌های آن ۱۵۰ برابر ژن‌های ژنوم میزبان است و دارای نقش بسیار مهمی در سلامتی انسان می‌باشد و در عملکردهای مهم میزبان مانند سوخت‌وساز بدن و فیزیولوژیک آن دخالت دارد [۷].

در رابطه با نقش میکروبیوتای گوارشی در بیماری سلیاک مطالعات اندکی انجام شده است؛ بااین‌حال، نشان داده شده است که تغییر در میکروبیوتای گوارشی-ناتراز[1] شدن یک فاکتور محیطی مهم در بیماری‌زایی یا پاتوژنز بیماری سلیاک می‌باشد [۸]. میکروبیوتای گوارشی در ایجاد بلوغ ایمنی در بدن و حالت هموستازیس در روده نقش بسیار مهمی دارد. ناتراز شدن در میکروبیوتای گوارشی ممکن است بر هموستازیس روده تأثیر بگذارد و درنتیجه منجر به پاسخ ایمنی بدن به آنتی‌ژن‌های غذایی مانند گلوتن شود [۹]. اغلب مطالعات نشان می‌دهند که ناتراز شدن در میکروبیوتای گوارشی افراد مبتلا به بیماری سلیاک با بیماری فعال به‌صورت کاهش قابل‌توجهی در جمعیت باکتری‌های گرم مثبت مفید مانند بیفیدوباکتریوم[2] و لاکتوباسیلوس[3] در نمونه‌های اثنی‌عشر و مدفوع رخ می‌دهد؛ این کاهش، شرایط مناسبی را جهت کلونیزاسیون باکتری‌های گرم منفی بیماری‌زا در سطوح مخاطی در بیماران سلیاکی فراهم می‌سازد [۱۰].

همچنین نتایج حاصل از مطالعاتی که بر روی نمونه اثنی‌عشر بیماران سلیاکی صورت گرفته است، نشان می‌دهد که جمعیت بیفیدوباکتریوم در این بیماران کاهش پیدا کرده است [۱]. حضور خانواده بیفیدوباکتریا[4] در مجاری گوارشی منجر به اثرات مفیدی در سلامتی فرد ازجمله ایجاد مقاومت در میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شود [۱۱]. علاوه‌براین، مطالعاتی که در کودکان مبتلا به سلیاک انجام شده است، کاهش نسبت لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم به باکتریوئیدس[5] را نیز نشان می‌دهد [۱۲]. سویه‌های مختلفی از گونه‌های لاکتوباسیلوس اثرات القایی بیشتری نسبت به اثرات سرکوبگر، بر هر ۲ سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی بدن اعمال می‌کند. سویه‌هایی از لاکتوباسیلوس کازئی[6] منجر به افزایش هر ۲ پاسخ موضعی و سیستمیک با واسطه سلول‌های تی[7] به گلوتن می‌شوند [۱۳].

باتوجه‌به اهمیت میکروبیوتای روده‌ای در بیماری‌زایی بیماری سلیاک و ناتراز شدن در میکروبیوتای روده‌ای افراد مبتلا به این بیماری، مطالعه حاضر با هدف بررسی تراز ۲ میکروب مفید لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم در نمونه مدفوعی بیماران مبتلا به سلیاک نسبت به افراد سالم انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایش-کنترل از مرداد ۱۳۹۸ تا بهمن ۱۳۹۸ بر روی ۲۰ فرد مبتلا به بیماری سلیاک تحت‌رژیم غذایی فاقد گلوتن به‌عنوان گروه آزمایش و ۲۰ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل مراجعه‌کننده به درمانگاه سلیاک مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی انجام شد. کلیه شرکت‌کنندگان در این مطالعه در جریان اهداف این طرح تحقیقاتی قرار گرفته‌اند. تمام بیماران مبتلا به سلیاک شرکت‌کننده قبل از ورود به مطالعه دارای آنتی‌بادی‌های ضدترانس گلوتامیناز بافتی و اندومیزیوم در سرم خون بودند. همچنین بیماری آن‌ها توسط بافت‌شناسی براساس طبقه‌بندی مارش نیز مورد تأیید قرار گرفت [۱۴].

1. Dysbiosis

2. Bifidobacterium
3. Lactobacillus
4. Bifidobacteria
5. Bacteroides
6.Lactobacillus Casei
7. T Cell

از شرایط دیگر جهت ورود به مطالعه می‌توان به داشتن حداقل ۶ ماه رژیم فاقد گلوتن قبل از ورود به مطالعه اشاره کرد. پیش از شروع، فرم رضایت‌نامه توسط هریک از شرکت‌کنندگان تکمیل و تأیید شده بود. شرایط خروج از مطالعه موارد زیر بوده است: زنان باردار مبتلا به سلیاک، افراد دارای بیماری‌های گوارشی مانند کرون وکولیت زخمی یا کولیت اولسروز یا پس-روده آماس زخمی، افرادی دارای سندرم روده کوتاه، افرادی که مصرف مشروبات الکلی داشته‌اند و یا افرادی که وابستگی به مواد مخدر غیرقانونی داشته‌اند، افرادی که سابقه عمل جراحی دهان و معده داشته‌اند، افراد دارای سرطان و یا ازنظر ویروس اچ آی وی مثبت باشند، افرادی که ۴ هفته قبل از مطالعه سابقه مصرف داروهای استروئیدی، آنتی‌بیوتیک و داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی داشته‌اند و افرادی که ازنظر بالینی ناهنجاری در میزان اوره، الکترولیت، کراتینین یا کبد سرم داشته‌اند.

اطلاعات جمعیت‌شناختی افراد شرکت‌کننده شامل سن، جنس و نتیجه پاتولوژی بیماران براساس طبقه‌بندی مارش و نیز پرسش‌نامه تنظیم و ثبت شد. قبل از شروع (روز صفر) و در طول مطالعه نمونه مدفوع از ۲ گروه بیماران و کنترل درون ظروف پلاستیکی مخصوص دریافت و جمع‌آوری شد و تا زمان تحلیل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج و اندازه‌گیری غلظت DNA

دی‌ان‌ای باکتریایی نمونه‌های مدفوع افراد مورد مطالعه، توسط کیت استخراج دی‌ان‌ای از مدفوع و مطابق با دستورالعمل گفته‌شده در این کیت استخراج شد. به‌طور خلاصه، ۲۰۰ میلی‌گرم از مدفوع در یک تیوپ استریل، حاوی ۳۰۰ میکرولیتر از بافر SDE1 و ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قرار گرفت و بقیه پروتکل نیز مطابق توضیحات سازنده کیت انجام شد. بعد از استخراج دی‌ان‌ای، خلوص و غلظت آن با اندازه‌گیری نسبت جذب A۲۸۰/A۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ ترمو آمریکا اندازه‌گیری شد. درصورتی‌که نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۷ تا ۲ باشد، دی‌ان‌ای از خلوص کافی برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برخوردار می‌باشد [۱۵]. دی‌ان‌ای استخراج شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. ۲ کاندید باکتریایی ، لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه‌وتحلیل میکروبیوتای روده‌ای توسط تکنیک ریل تایم پی سی آر[8]

جهت انجام تکنیک ریل تایم پی‌سی‌آر برای شناسایی و سنجش تعداد کپی‌های ژن آر ان ای ریبوزومی ۱۶ سوودبرگ (16S rRNA gene) مربوط به گونه‌های بیفیدوباکتریوم و تعیین تعداد این باکتری در میکروبیوتای روده از آغازگرهای (پرایمر) اختصاصی Bifid-F با توالی الیگونوکلئوتیدی-´5´-GGGATGCTGGTGTGGAAGAG-3 و Bifid-R با توالی الیگونوکلئوتیدی ´5´-TGCTCGCGTCCACTATCCAG-3 و برای گونه‌های لاکتوباسیلوس نیز از پرایمرهای اختصاصی Lacto-F با توالی الیگونوکلئوتیدی ´5´-TGGATGCCTTGGCACTAG-3 و Lacto-R با توالی الیگونوکلئوتیدی -5´-AAATCTCCGGAT CAAAGCTTAC-3´ [۱۶] استفاده شد. از دستگاه ترموسایکلر روتورژن-کیو کیاژن و سایبر گرین مستر میکس استفاده شد و تکثیر دی‌ان‌ای در حجم نهایی۲۰ میکرولیتر انجام شد. مقدار اجزای واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس و ۱۰ نانومولار از هریک از آغازگرهای رفت و برگشت و ۲ میکرولیتر از دی‌ان‌ای استخراج‌شده محاسبه شد.

برنامه ریل تایم پی‌سی‌آر برای هر تکثیر به‌صورت دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل با برنامه: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، اتصال آغازگرها با دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه بود که با مرحله منحنی ذوب[9] باتوجه‌به دستورالعمل دستگاه دنبال شد. بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بازه دمایی ۵۲ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور تعیین دمای ذوب و خوانش متوالی با گرادیان دمایی[10] ۰/۵ درجه سانتی‌گراد لحاظ شد.

تجزیه‌وتحلیل منحنی ذوب جهت تأیید ویژگی کثیر انجام شد. غلظت آغازگرها و برنامه‌های ترموسایکلر برای هریک از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز خاص بهینه‌سازی شد. منحنی استاندارد برای تعیین تعداد کپی ژن آرای ریبوزومی ۱۶ سوودبرگ هرکدام از باکتری‌های کاندید با تولید یک سری رقیق ۱۰ برابر از ۱۰۱ تا ۱۰۱۰ نسخه ژن آرای ریبوزومی ۱۶ سوودبرگ در هر واکنش با استفاده از دی‌ان‌ای سویه اشریشیا کلی[11] انجام شد. تعداد نسخه ژن 16S rRNA در گروه از باکتری‌های کاندید در نمونه‌های مدفوع با مقایسه مقادیر سیکل آستانه[12] نمونه‌ها با منحنی‌های استاندارد تعیین شد. تمام واکنش‌ها با ۳ تکرار مجزا گرفت.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از نسخه ۲۱ نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. تفاوت در معیارهای جمعیت‌شناختی بین گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون کای‌اسکوئر پیرسون برای متغیرهای دسته‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسه بین ۲ گروه مختلف توسط آزمون تی انجام شد. نتایج به‌دست آمده

8. Real time PCR

9. Melting Curve
10. Ramp
11. Escherichia coli BL21 strain (BL21)
12. Cycling Threshold (CT)

به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار بیان شد. در تمام موارد، سطح معناداری آزمون‌ها کمتر از ۵ درصد گرفته شده است. تمام تجزیه‌وتحلیل‌ها برای فراوانی میکروبیوتای روده براساس تعداد سیکل آستانه ارزیابی شد.

یافته‌ها

مشخصات جمعیت‌شناختی در ۲ گروه بیماران مبتلا به سلیاک تحت‌رژیم غذایی فاقد گلوتن و سالم با مقدار احتمال P مرتبط به‌طور کامل مطالعه و تحلیل آماری شدند. شمارش میکروبیوتای روده‌ای در ۲۰ فرد مبتلا به بیماری سلیاک شامل ۹ مرد و ۱۱ زن که قبل از ورود به مطالعه و همچنین در طول مطالعه تحت‌رژیم درمانی فاقد گلوتن قرار داشتند، به‌عنوان گروه آزمایش و نیز ۲۰ فرد سالم فاقد سلیاک شامل ۱۰ مرد و ۱۰ زن به‌عنوان گروه کنترل ازنظر ترکیب مورد بررسی قرار گرفتند. ازنظر جنسیتی و میانگین سنی افراد در ۲ گروه مورد مطالعه از لحاظ آماری اختلاف معناداری نشان ندادند (P>۰/۰۵). (تصویر شماره ۱).

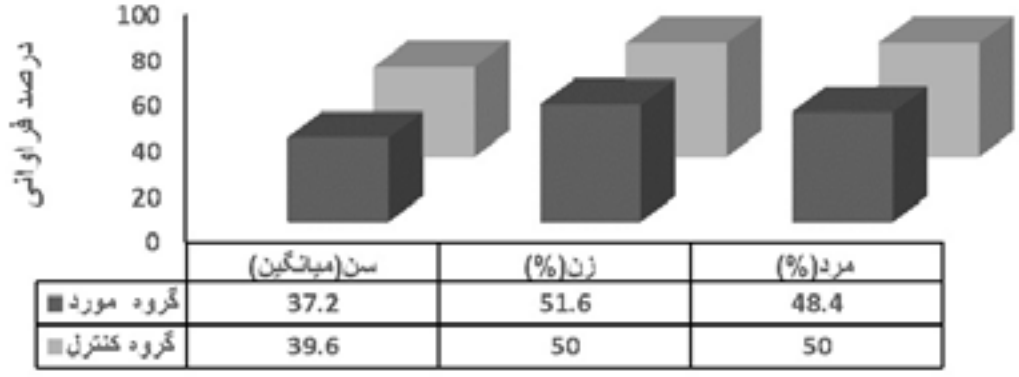
همان‌طورکه در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است ازنظر نتایج پاتولوژی اکثر افراد مبتلا به بیماری سلیاک در گروه مارش ۳ (۱۸نفر) قرار گرفتند. نتایج مطالعه نشان داد که ۲ گروه آزمایش و کنترل ازنظر طبقه‌بندی مارش اختلاف معناداری وجود ندارد (P>۰/۰۵). میزان شمارش باکتری‌های مورد هدف در نمونه‌های مدفوعی در ۲ گروه آزمایش و کنترل توسط سیکل آستانه سنجیده و به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که سیکل آستانه میزان باکتری‌های بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس در افراد مبتلا به سلیاک در مقایسه با گروه سالم به‌طور معناداری بالاتر می‌باشد (P<۰/۰۵). ازآنجایی‌که سیکل آستانه با میزان شمارش نسبت عکس دارد، میزان شمارش این ۲ باکتری مفید مورد بررسی در بیماران سلیاکی در مقایسه با افراد سالم به‌طور معناداری کمتر می‌باشد (P<۰/۰۵).

بحث

شواهد اخیر در رابطه با بیماری سلیاک نشان داده است که ایمنی ذاتی در تحریک پاسخ ایمنی ازطریق تحریک پاسخ ایمنی اکتسابی و آسیب مخاطی نقش بسیار مهمی دارد. اتصال میکروبیوتای روده‌ای با دیواره مخاط روده ازطریق همان گیرنده‌هایی انجام می‌شود که ایمنی ذاتی را می‌توانند فعال کنند. بنابراین، تغییر در میکروبیوتای روده ممکن است به فعال شدن این مسیر التهابی منجر شود [۱۷]. درواقع، گونه‌های مفید میکروبیوتای روده در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک کاهش یافته و از طرفی گونه‌های بیماری‌زا به‌طور بالقوه نسبت به افراد سالم افزایش پیدا می‌کنند. در این بیماران اگرچه بعد از رژیم غذایی فاقد گلوتن، ناترازی[13] در میکروبیوتای روده‌ای کاهش می‌یابد، اما به‌طورکامل از بین نمی‌رود. بنابراین، میکروبیوتای روده‌ای نقش حائز اهمیتی را در پاتوژنز یا بیماری‌زایی بیماری سلیاک دارد [۱۸-۲۰].

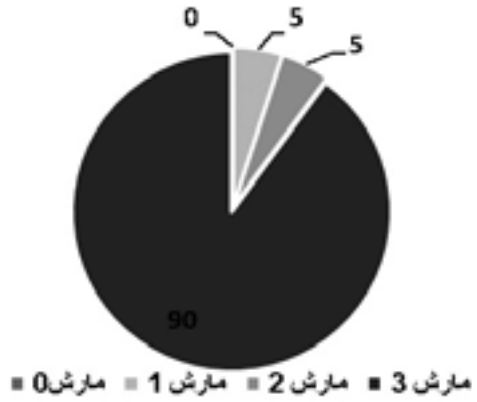
ازطرفی مطالعات کمتری تعداد و ترکیب میکروبیوتای روده‌ای و نقش آن در پاتوژنز بیماری سلیاک و همچنین مقایسه ترکیب میکروبیوتای روده‌ای در افراد مبتلا به بیماری سلیاک درمقایسه با افراد فاقد این بیماری را مورد بررسی قرار داده‌اند. بنابراین در مطالعه حاضر ترکیب میکروبیوتای روده‌ای مشخص ازجمله بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس در بیماران مبتلا به سلیاک در مقایسه با افراد سالم مورد بررسی قرار گرفته است و نشان داده شد که جمعیت میکروبیوتای روده‌ای در بیماران سلیاکی، تفاوت‌های معناداری را در مقایسه با افراد سالم دارند؛ بدین‌گونه که افراد بیمار میزان کمتری از باکتری‌های روده‌ای مفید بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس را نسبت به افراد سالم دارند. بررسی تنوع میکروبیوتای روده‌ای در افراد مبتلا به بیماری سلیاک در مقایسه با افراد سالم در مطالعات گوناگونی انجام شده است که نتایج حاصل از مطالعه حاضر را نیز تأیید می‌کنند [۱۰، ۲۱].

13. Dysbiosis



	سن(میانگین)	زن(%)	مرد(%)
گروه مورد	37.2	51.6	48.4
گروه کنترل	39.6	50	50

تصویر ۱. مشخصات جمعیت‌شناختی در دو گروه موردمطالعه



تصویر ۲. نتیجه پاتولوژی بیماران براساس طبقه‌بندی مارش

طب داخلی روز

گلفتو و همکاران نظر موافقی با نتایج حاصل از مطالعه حاضر در جهت پایین بودن میزان بیفیدوباکتریوم و ناترازی در میکروبیوتای روده‌ای در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک حتی با وجود رعایت رژیم غذایی فاقد گلوتن ارائه کردند که این واقعیت حمایت‌کننده روند پاتولوژیک بیماری سلیاک می‌باشد [۲۲]. مشابه پژوهش حاضر، مطالعه مورایس و همکاران می‌باشد که تفاوت در پروفایل میکروبی بین کودکان مبتلا به بیماری سلیاک و گروه کنترل را گزارش کردند و نشان دادند که بیماران سلیاکی میزان کمتری از لاکتوباسیل و بیفیدوباکتریوم را در مقایسه با افراد سالم دارند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس که جزء پروبیوتیک‌ها نیز می‌باشند، می‌توانند در هضم یا تغییر پلی‌پپتیدهای گلوتن نقش داشته باشند. ازطرفی برخی از گونه‌های باکتریایی متعلق به جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم نقش حفاظتی بر روی سلول‌های اپیتلیال در برابر آسیب‌های ناشی از گلیادین دارند [۲۳].

کولادو و همکاران در مطالعه‌ای مشابه با مطالعه حاضر با هدف شناسایی باکتری‌های روده اختصاصی مرتبط با بیماری سلیاک در تشخیص و پس از درمان با رژیم فاقد گلوتن، نمونه مدفوع کودکان مبتلا به سلیاک درمان‌نشده و تحت‌رژیم فاقد گلوتن، نمونه بیوپسی بیماران مبتلا به سلیاک درمان‌نشده و تحت‌رژیم فاقد گلوتن و نمونه مدفوع و بیوپسی کودکان سالم به‌عنوان گروه کنترل را برای مقایسه بین ۲ گروه مورد بررسی قرار دادند و از روش ریل تایم پی‌سی‌آر برای اندازه‌گیری باکتری‌های روده استفاده کردند. نتایج حاصل از این مطالعه تفاوت بین تعداد برخی از میکروبیوتای روده‌ای مانند باکتریوئیدس و کلستریدیوم لپتوم[14] را بین کودکان مبتلا به سلیاک نسبت به گروه کنترل صرف‌نظر از مرحله بیماری و همچنین تفاوت در تعداد کولای[15] و استافیلوکوکوس[16] را درکودکان مبتلا به سلیاک درمان‌نشده در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. همچنین در این مطالعه، میزان کمتری از بیفیدوباکتریوم در مدفوع هر ۲ گروه از بیماران و بیوپسی افراد درمان‌نشده در مقایسه با گروه کنترل نیز گزارش شد [۱۰].

در مطالعه مشابه دیگری که توسط سانز و همکاران انجام شد، میزان شمارش میکروبیوتای مدفوعی در جمعیت کودکان مبتلا به بیماری سلیاک نسبت به کنترل‌های همسان با سن توسط تکنیک زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز ژل گرادیان دناتوره مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت و افزایش معناداری را در جمعیت میکروبیوتای مدفوع در بیماران مبتلا به سلیاک نسبت به افراد سالم گزارش کردند. از طرفی در بیماران مبتلا به سلیاک حضور اختصاصی گونه‌های لاکتوباسیلوس کورواتوس[17] و در گروه سالم

14. Clostridium leptum
15. E.coli
16. Staphylococcus
17. Lactobacillus Curvatus

جدول ۱. میزان شمارش میکروبیوتای روده‌ای براساس سیکل آستانه در ۲ گروه مورد مطالعه (n=۲۰)

متغیرها	میانگین±انحراف‌معیار		P
	افراد مبتلا به بیماری سلیاک	افراد سالم	
بیفیدوباکتریوم	۲۲/۲±۶/۸	۱۲/۱±۵/۱	۰/۰۰۱*
لاکتوباسیلوس	۲۴/۵±۵/۸	۱۱/۹±۳/۲	<۰/۰۰۱*

طب داخلی روز

حضور لاکتوباسیلوس کازئی به‌عنوان گونه باکتری مشخصه این گروه را نیز مشاهده کردند. همچنین میزان شمارش گونه بیفیدو باکتریوم به‌طور قابل‌توجهی در گروه دارای سلیاک نسبت به گروه سالم کمتر بود [۲۲].

نیستال و همکاران مطالعه‌ای مشابه با مطالعه حاضر با هدف بررسی تفاوت در میکروبیوتای روده در بزرگسالان مبتلا به سلیاک و افراد سالم انجام دادند و توسط تکنیک‌های الکتروفورز ژنتیکی شیب و کروماتوگرافی مایع گازی از اسیدهای چرب زنجیره کوتاه، جوامع میکروبی را در نمونه‌های مدفوع بیماران مبتلا به سلیاک درمان‌نشده، بیماران سلیاکی تحت‌درمان با رژیم فاقد گلوتن و جمعیت سالم سنجیدند و کاهش در تنوع گونه‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم را در بیماران سلیاکی تحت درمان، مشاهده کردند. همچنین گروه سلیاکی تحت‌درمان نسبت به بزرگسالان سالم به‌طور معناداری میزان بیشتری از حضور بیفیدوباکتریوم بیفیدوم[18] را نشان داد. نتایج کلی حاصل از این مطالعه تفاوت در میکروبیوتای مدفوعی بیماران سلیاکی درمان‌نشده نسبت به افراد سالم را نشان داد. نیستال و همکاران نیز با نظر موافقی با مطالعه حاضر نشان دادند که رژیم غذایی فاقد گلوتن در بیماران سلیاکی اگرچه تا حدی میکروبیوتای گوارشی را در این بیماران به حالت طبیعی برمی‌گرداند، اما باوجوداین در این بیماران تنوع لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم به میزان قابل‌توجهی کاهش می‌یابد [۲۴].

در مطالعه مشابه دیگری که در سال ۲۰۲۰ توسط نایلوند و همکاران بر روی بیماران مبتلا به سلیاک و افراد حساس به گلوتن فاقد سلیاک تحت رژیم غذایی فاقد گلوتن و افراد سالم مصرف‌کننده جوی دوسر انجام شد، ترکیب میکروبیوتای مدفوعی در گروه‌های مورد مطالعه بررسی شد و نتایج حاصل نشان داد که اگرچه در بزرگسالان سالم فراوانی بیفیدوباکتریوم در مقایسه با بیماران سلیاکی و گروه حساس به گلوتن فاقد سلیاک به سمت بالاتری گرایش داشت، اما اختلاف معناداری ازنظر گوناگونی در ترکیب میکروبی در گروه‌های مورد مطالعه نشان نداد [۲۵].

در مطالعه دی بیاس و همکاران ترکیب میکروبیوتای گوارشی را در نمونه‌های مدفوع و ۱۲ کودکان مبتلا به سلیاک در شروع بیماری با گروه سالم مقایسه کردند. نتایج کلی حاصل از این مطالعه نیز مشابه با مطالعه حاضر تفاوت در میکروبیوتای گوارشی در کودکان مبتلا به سلیاک را در شروع بیماری در مقایسه با گروه سالم نشان داد. کاهش در فراوانی باکتری‌های مفیدی مانند باکتروئیدس/پریووتلا[19] و آکرمانسیا[20] در نمونه مدفوع بیماران مبتلا به سلیاک در مقایسه با گروه سالم نیز مشاهده شد [۲۶]. علاوه‌براین، برخی مطالعات دیگر نیز نتایج مطالعه حاضر را تأیید کردند و ثابت می‌کند که ۲ باکتری مفید بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس می‌توانند در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک نقش محافظتی را در برابر پاسخ التهابی و آسیب مخاطی ناشی از پپتیدهای گلیادین داشته باشند. همچنین نقش‌های درمانی این پروبیوتیک‌ها را نیز توضیح می‌دهند [۱۹-۲۵]. کاهش میزان باکتری‌های مفید مانند لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم در بیماران دارای سلیاک منجر به افزایش پاتوژن‌های فرصت‌طلب در بیماران دارای سلیاک و درنهایت منجر به نقص سیستم ایمنی این بیماران می‌شود [۲۷].

براساس مطالعات پیشین، میکروبیوتای روده‌ای در بیماران مبتلا به بیماری سلیاک با وجود رعایت رژیم غذایی فاقد گلوتن به‌طور کامل ترمیم نمی‌شود [۱۰] و میزان برخی از باکتری‌های مفید گوارشی مانند بیفیدوباکتریوم در افراد دارای سلیاک با وجود این نوع رژیم باز هم نسبت به افراد سالم به‌طور معناداری کمتر می‌باشد. اگرچه نتایج حاصل از اکثریت مطالعات صورت‌گرفته درزمینه بررسی تنوع میکروبیوتای روده‌ای بیماران دارای سلیاک تحت رژیم فاقد گلوتن و مقایسه آن با افراد سالم در سرتاسر جهان، تنوع و شمارش متفاوت میکروبیوتای روده‌ای این بیماران با افراد سالم را نشان می‌دهند [۲۸]. این نتایج همگی مؤید نتایج بررسی کنونی می‌باشد. در بررسی کنونی جامعه هدف بیماران و افراد سالم میانسال در جامعه شهری و با رژیم غذایی میانه و معمول بوده‌اند. این افراد در بررسی و در مقایسه با گروه افراد سالم دارای ناترازی در میزان پروبیوتیک‌های طبیعی فلور بوده‌اند. میزان لاکتوباسیلوس و بیفیدیدیوباکتریوم دفع‌شده در این افراد کمتر از گروه سالم می‌باشد که بازتابی از وضعیت فلور روده‌ای این افراد است که ناشی از وضعیت ناتراز فلور میکربی و فقر باکتری‌های پروبیوتیک در سیستم گوارشی این افراد می‌باشد. درمقابل، مطالعاتی هم بودند که هیچ تفاوتی را بین میکروبیوتای روده‌ای بیماران دارای سلیاک تحت‌رژیم فاقد گلوتن و گروه کنترل نشان نداند و اعلام کردند که به نظر می‌رسد میکروبیوتای روده‌ای نقشی در پاتوژنز بیماری سلیاک ندارد [۲۹]. از طرفی داشتن این نوع رژیم غذایی در این بیماران، براساس نتایج مطالعات پیشین تنها منجر به بهبود بخشی از میکروبیوتای روده‌ای می‌شود [۳۰] که دلایل آن نیز به‌طور قطعی مشخص نمی‌باشد، اما عواملی مانند ژنتیک بیمار مبتلا به سلیاک با وجود رژیم غذایی فاقد گلوتن به احتمال زیاد می‌تواند بر ترکیب میکروبیوتای روده اثرگذار باشد [۳۱]. از طرفی گلوتن دارای یک عملکرد پربیوتیک مانند است که حذف این پروتئین از رژیم فاقد گلوتن نیز می‌تواند در ایجاد یک میکروبیوتای روده متفاوت در این بیماران در مقایسه با افراد سالم شود [۳۲]. بنابراین، درمجموع می‌توان بیان کرد که با اصلاح سیستم تغذیه‌ای با رویکرد تقویت سیستم پروبیوتیک سیستم گوارشی و تنظیم پایایی و زیستایی آن‌ها بتوان عوارض بیماری سلیاک را که به نوعی نقص در سیستم ژنی با محرک‌های اپی ژنیک است، تعدیل کرد.

18. Bifidobacterium Bifidum
19. Bacteroides/Prevotella
20. Akkermansia

ازنظر فیزیولوژیک باتوجه‌به آتروفی پرزهای روده‌ای در این بیماری، شاید نقص در حفظ تراز فلور میکربی طبیعی را بتوان علاوه‌بر آنکه از عوارض ناشی از این بیماری دانست، در رویکردی دیگر خود این عامل را مسبب تشدید این بیماری قلمداد کرد. باتوجه‌به سایر عوامل محیطی و زیستی مؤثر این سلسله از عوامل را بروز شرایط فقر تغذیه‌ای و نقص در سطوح طبیعی ریزمغذی‌ها دانست [۱۶، ۳۳، ۳۴]. عوامل در مطالعه حاضر، میکروبیوتای روده‌ای و کاهش در میزان باکتری‌های مفید بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس بین ۲ گروه مورد مطالعه متفاوت و در گروه دارای عارضه سلیاک کاهش یافته است. باتوجه‌به حجم نمونه گزارش‌شده، با قاطعیت نمی‌توان این تفاوت بین میکروبیوتای روده‌ای افراد مبتلا به سلیاک و سالم را گزارش کرد و نیاز به انجام مطالعه در حجم نمونه‌های بزرگ‌تر می‌باشد.

همان‌گونه که در بخش یافته‌ها نشان داده شد، نتایج حاصل از ۲ آزمون کای‌اسکوئر پیرسون برای متغیرهای دسته‌ای و آزمون تی برای متغیرهای عددی که به‌منظور تعیین یکپارچگی بین ۲ گروه آزمایش و کنترل در تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های جمعیت‌شناختی انجام شد، نشان داد که ۲ گروه مورد مطالعه ازنظر داده‌های جمعیت‌شناختی با هم اختلاف معناداری ندارند. این مسئله نقطه قوت مطالعه حاضر می‌باشد؛ زیرا این نتایج یکپارچگی بین ۲ گروه مورد مطالعه را تأیید و ۲ گروه را به‌راحتی قابل مقایسه و بررسی کرده است.

مطالعه حاضر دارای محدودیت‌هایی بود. اولاً این مطالعه در حجم نمونه کمی و در یک مرکز واحد در تهران، ایران انجام شده است.

محدودیت دیگر مطالعه حاضر مدت‌زمان محدود مطالعه و انتخاب بیمار بود.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر هم‌سو با سایر مطالعات، پدیده ناترازشدن میکروبیوتای روده در بیماران مبتلا به سلیاک نسبت به افراد سالم را نشان می‌دهد. درنتیجه می‌توان گفت، بررسی میکروبیوتای مدفوع می‌تواند نشان‌گر خوبی از پدیده ناترازشدن میکروبیوتای روده در بیماران مبتلا به سلیاک باشد و می‌تواند برای نظارت بر ترمیم میکروبیوتا در طی رژیم فاقد گلوتن مورداستفاده قرار گیرد؛ به‌طوری‌که داده‌های مربوط به متابولیک همراه با ارزیابی میکروبیوتای روده بیماران می‌تواند به پزشکان در ارزیابی نقش میکروبیوتای روده‌ای در روند بیماری‌زایی یا پاتوژنزیس بیماری سلیاک و همچنین بررسی‌های بیشتر کمک کند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

پیروی از اصول اخلاق پژوهش پژوهشگران همه کدهای اخلاقی مربوط به تحقیقات بر روی نمونه‌های انسانی رعایت شده و مجوزهای لازم را از مراجع صاحب صلاحیت دریافت شده است. این مطالعه با کد اخلاق IR.SBMU.RIGLD.REC.1395.114 کمیته اخلاق مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی و با کد ثبت IRCT20171225038063N1 مرکز ثبت کارآزمایی بالینی ایران (IRCT) به تصویب رسید.

حامی مالی

این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی و همکاران پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی و مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج به دلیل حمایت‌های بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

[1] Nadal I, Donant E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. Journal of Medical Microbiology. 2007; 56(Pt 12):1669-74. [DOI:10.1099/jmm.0.47410-0] [PMID]

[2] Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. Lancet. 2009; 373(9673):1480-93. [DOI:10.1016/S0140-6736(09)60254-3] [PMID]

[3] Kaukinen K, Lindfors K, Collin P, Koskinen O, Mäki M. Coeliac disease-a diagnostic and therapeutic challenge. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2010; 48(9):1205-16. [DOI:10.1515/cclm.2010.241] [PMID]

[4] Catassi C, Kryszak D, Bhatti B, Sturgeon C, Helzlsouer K, Clipp SL, et al. Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. Annals of Medicine. 2010; 42(7):530-8. [DOI:10.3109/07853890.2010.514285] [PMID]

[5] Sanz Y, De Pama G, Laparra M. Unraveling the ties between celiac disease and intestinal microbiota. International Reviews of Immunology. 2011; 30(4):207-18. [DOI:10.3109/08830185.2011.599084] [PMID]

[6] Ghosh S. Advances in our understanding of the pathogenesis of celiac disease. Canadian Journal of Gastroenterology . 2011; 25(4):186. [DOI:10.1155/2011/684230] [PMID] [PMCID]

[7] Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. Lancet. 2003; 361(9356):512-9. [DOI:10.1016/S0140-6736(03)12489-0] [PMID]

[8] Cristofori F, Indrio F, Miniello VL, De Angelis M, Francavilla R. Probiotics in celiac disease. Nutrients. 2018; 10(12):1824. [DOI:10.3390/nu10121824] [PMID] [PMCID]

[9] Nakayama J, Kobayashi T, Tanaka S, Korenori Y, Tateyama A, Sakamoto N, et al. Aberrant structures of fecal bacterial community in allergic infants profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2011; 63(3):397-406. [DOI:10.1111/j.1574-695X.2011.00872.x] [PMID]

[10] Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. Journal of Clinical Pathology. 2009; 62(3):264-9. [DOI:10.1136/jcp.2008.061366] [PMID]

[11] Davis CD, Milner JA. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2009; 20(10):743-52. [DOI:10.1016/j.jnutbio.2009.06.001] [PMID] [PMCID]

[12] Ou G, Hedberg M, Horstedt P, Baranov V, Forsberg G, Drobni M,et al. Proximal small intestinal microbiota and identification of rod-shaped bacteria associated with childhood celiac disease. The American Journal of Gastroenterology. 2009; 104(12):3058-67. [DOI:10.1038/ajg.2009.524] [PMID]

[13] Sanders ME. Impact of probiotics on colonizing microbiota of the gut. Journal of Clinical Gastroenterology. 2011; 45(S):S115-9. [DOI:10.1097/MCG.0b013e318227414a] [PMID]

[14] Marsh MN, Johnson MW, Rostami K. Mucosal histopathology in celiac disease: A rebuttal of Oberhuber's sub-division of Marsh III. Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench. 2015; 8(2):99-109. [PMID]

[15] Chen H, Rangasamy M, Tan SY, Wang H, Siegfried BD. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. PLoS One. 2010; 5(8):e11963. [DOI:10.1371/journal.pone.0011963] [PMID] [PMCID]

[16] Wang IK, Lai HC, Yu CJ, Liang CC, Chang CT, Kuo HL, et al. Real-time PCR analysis of the intestinal microbiotas in peritoneal dialysis patients. Applied and Environmental Microbiology. 2012; 78(4):1107-12. [DOI:10.1128/AEM.05605-11] [PMID] [PMCID]

[17] Marasco G, Di Biase AR, Schiumerini R, Eusebi LH, Iughetti L, Ravaioli F, et al. Gut microbiota and celiac disease. Digestive Diseases and Sciences. 2016; 61(6):1461-72. [DOI:10.1007/s10620-015-4020-2] [PMID]

[18] Aureli P, Capurso L, Castellazzi AM, Clerici M, Giovannini M, Morelli L, et al. Probiotics and health: An evidence-based review. Pharmacological Research. 2011; 63(5):366-76. [DOI:10.1016/j.phrs.2011.02.006] [PMID]

[19] Harnett J, Myers SP, Rolfe M. Probiotics and the microbiome in celiac disease: A randomised controlled trial. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016; 2016:9048574. [DOI:10.1155/2016/9048574] [PMID] [PMCID]

[20] Grover S, Rashmi HM, Srivastava AK, Batish VK. Probiotics for human health -new innovations and emerging trends. Gut Pathogens. 2012; 4(1):15. [DOI:10.1186/1757-4749-4-15] [PMID] [PMCID

[21] Sanz Y, Sanchez E, Marzotto M, Calabuig M, Torriani S, Dellaglio F. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2007; 51(3):562-8. [DOI:10.1111/j.1574-695X.2007.00337.x] [PMID]

[22] Golfetto L, Duarte de Senna F, Hermes J, Beserra BTS, Franca F, Martinello F. Lower bifidobacteria counts in adult patients with celiac disease on a gluten-free diet. Arquivos de Gastroenterologia. 2014; 51(2):139-43. [DOI:10.1590/S0004-28032014000200013] [PMID]

[23] Moraes LF, Grzeskowiak LM, Teixeira TF, Gouveia Peluzio M. Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. Clinical Microbiology Reviews. 2014; 27(3):482-9. [DOI:10.1128/CMR.00106-13] [PMID] [PMCID]

[24] Nistal E, Caminero A, Vivas S, Ruiz de Morales JM, Saenz de Miera LE, Rodriguez-Aparicio LB, et al. Differences in faecal bacteria populations and faecal bacteria metabolism in healthy adults and celiac disease patients. Biochimie. 2012; 94(8):1724-9. [DOI:10.1016/j.biochi.2012.03.025] [PMID]

[25] Abdullah GA, Jamalludeen NM, Mansour AA. The role of probiotics in celiac disease and their potential effect on immunological and clinical markers of the disease. International Journal of Scientific & Engineering Research. 2017; 8(9):1347-73. [Link]

[26] Di Biase AR, Marasco G, Ravaioli F, Dajti E, Colecchia L, Righi B, et al. Gut microbiota signatures and clinical manifestations in celiac disease children at onset: A pilot study. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2021; 36(2):446-54. [DOI:10.1111/jgh.15183] [PMID]

[27] Sanchez E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Intestinal Staphylococcus spp. and virulent features associated with coeliac disease. Journal of Clinical Pathology. 2012; 65(9):830-4. [DOI:10.1136/jclinpath-2012-200759] [PMID]

[28] Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalances in faecal and duodenal Bifidobacterium species composition in active and non-active coeliac disease. BMC Microbiology. 2008; 8:232. [DOI:10.1186/1471-2180-8-232] [PMID] [PMCID]

[29] De Meij TG, Budding AE, Grasman ME, Kneepkens CM, Savelkoul PH, Mearin ML. Composition and diversity of the duodenal mucosa-associated microbiome in children with untreated coeliac disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2013; 48(5):530-6. [DOI: 10.3109/00365521.2013.775666] [PMID]

[30] Schippa S, Iebba V, Barbato M, Di Nardo G, Totino V, Checchi MP, et al. A distinctive 'microbial signature' in celiac pediatric patients. BMC Microbiology. 2010; 10:175. [DOI:10.1186/1471-2180-10-175] [PMID] [PMCID]

[31] Olivares M, Neef A, Castillejo G, Palma GD, Varea V, Capilla A, et al. The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. Gut. 2015; 64(3):406-17. [DOI:10.1136/gutjnl-2014-306931] [PMID]

[32] De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. The British Journal of Nutrition. 2009; 102(8):1154-60. [DOI:10.1017/S0007114509371767] [PMID]

[33] Nylund L, Hakkola S, Lahti L, Salminen S, Kalliomäki M, Yang B, et al. Diet, perceived intestinal well-being and compositions of fecal microbiota and short chain fatty acids in oat-using subjects with celiac disease or gluten sensitivity. Nutrients. 2020; 12(9):2570. [DOI:10.3390/nu12092570] [PMID] [PMCID]

[34] Chander AM, Yadav H, Jain S, Bhadada SK, Dhawan DK. Cross-talk between gluten, intestinal microbiota and intestinal mucosa in Celiac disease: Recent advances and basis of autoimmunity. Frontiers in Microbiology. 2018; 9:2597. [DOI:10.3389/fmicb.2018.02597] [PMID] [PMCID]