Relationship between the milk bacterial phyla and the amount of dietary macronutrients and micronutrients intake in lactating mothers with high body mass index compared to the normal: a case-control study

Shahla Karami[1], Seyedeh Neda Mousavi[2*], Reza Shapouri[1], Siamak Heidarzadeh[3], Davoud Afshar[3]

1. Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
2. Department of Nutrition, School of Public Health, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
3. Department of Microbiology and Virology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding author e-mail: neda.mousavi@zums.ac.ir

Abstract

Objective: In the present study, the amount of the four main phyla in obese lactating mothers and mothers with a normal body mass index was evaluated and their relationship with the amount of macro- and micronutrient's intake was investigated.

Materials and Methods: 30 mothers with high BMI (greater-equal to 23 kg/m^2) and 30 mothers with normal BMI (between 18.5-24.9 kg/m^2) who were in the fourth month of breastfeeding were selected from the health centers of Zanjan city. The milk sample was collected under completely sterile conditions. Bacterial DNA was extracted and amplification of 16S rRNA gene was done by qPCR method using universal bacterial primers. Dietary information was collected using a food frequency questionnaire (FFQ) and validated by a three-day food diary.

Results: Adjusting for all parameters, mothers with a normal body mass index had 1.41 times more *Actinobacteria* gene in milk (p=0.04). The amount of iron and vitamin C intake showed a significant negative relationship with the *Actinobacteria* and *Firmicutes* population in milk, respectively (OR=-2.3, p=0.04, OR=-0.96, p=0.02). Also, the amount of dietary cholesterol showed a significant relationship with the *Bacteroidetes* population (OR=0.81, p=0.04).

Conclusion: *Actinobacteria* gene presence, as a beneficial phylum, was higher in lactating mothers with normal than the high body mass index. Dietary Iron and vitamin C were inversely related to the *Actinobacteria* and *Firmicutes* population.

Keywords: Bacterial phylum, Breast milk, Body mass index

Received: Jun 04, 2024 **Revised:** Jul 12, 2024 **Accepted:** Jul 27, 2024

How to cite this article: Karami Sh, Mousavi N, Shapouri R, Heidarzadeh S, Afshar D. Relationship between the milk bacterial phyla and the amount of dietary macronutrients and micronutrients intake in lactating mothers with high body mass index compared to the normal: a case-control study. Daneshvar Medicine 2024; 32(3):12-23. doi:10.22070/DANESHMED.2024.19227.1505

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

ارتباط میزان فیلوم باکتریایی شیر با میزان درشت مغذی ها و ریزمغذی های دریافتی در رژیم غذایی مادران شیرده با شاخص توده بدنی بالا در مقایسه با طبیعی: یک مطالعه مورد–شاهدی

شهلا کرمی[۱]، سیده ندا موسوی[۲*]، رضا شاپوری[۱]، سیامک حیدرزاده[۳]، داوود افشار[۳]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۲. گروه تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۳. گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

*نویسنده مسئول: سیده ندا موسوی **Email: neda.mousavi@zums.ac.ir**

چکیده

هدف: در مطالعه حاضر میزان چهارفیلوم اصلی در شیرمادران با شاخص توده بدنی (BMI) بالا و مادران با BMI طبیعی ارزیابی شده و ارتباط آنها با میزان درشت و ریز مغذی های دریافتی در رژیم غذایی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: ۳۰ مادر با **BMI** بالا (بزرگتر-مساوی **۳۰kg/m²**) و ۳۰ مادر با **BMI** طبیعی (بین **kg/m²** ۱۸/۵-۲۴/۹) که در ماه چهارم شیردهی بودند از مراکز بهداشتی شهرزنجان انتخاب شدند. نمونه شیر در شرایط کاملا استریل جمع آوری شد. **DNA** ی باکتریایی استخراج شده و تکثیر ژن **16S rRNA** به روش **qPCR** و با استفاده از پرایمرهای **Universal** باکتریایی انجام شد. اطلاعات غذایی با استفاده از پرسشنامه بسامدخوراک (**FFQ**) جمع آوری شده و با ثبت خوراک ۳ روزه معتبر شد.

نتایج: با تعدیل اثر همه فاکتورهای مورد بررسی، مادران با **BMI** طبیعی ۱/۴۱ برابر ژن اکتینوباکتریای بیشتری در شیر خود داشتند (**p=۰/۰۴**). میزان آهن و ویتامین **C** دریافتی در رژیم غذایی مادر ارتباط منفی معنی داری با جمعیت اکتینوباکتریا و فرمی کوتس (به ترتیب) در شیر نشان داد (**p=۰/۰۴**، **OR= -۲/۳** و **p=۰/۰۲**، **OR= -۰/۹۶**). همچنین میزان کلسترول دریافتی در رژیم غذایی مادر ارتباط معنی دار با جمعیت باکتریوئیدتس نشان داد (**p=۰/۰۴**، **OR=۰/۸۱**).

نتیجه‌گیری: حضور ژن اکتینوباکتریا به عنوان فیلوم مفید، در شیرمادران با **BMI** طبیعی بالاتر از مادران با **BMI** بالا بود. آهن و ویتامین **C** دریافتی در رژیم غذایی مادر ارتباط معکوس با میزان اکتینوباکتریا و فرمی کوتس داشت.

واژه های کلیدی: فیلوم باکتریایی، شیرمادر، شاخص توده بدنی

وصول مقاله: ۱۴۰۳/۰۳/۱۶
اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۳/۰۴/۲۲
پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۶

مقدمه

بر اساس گایدلاین های انجمن اطفال امریکا، تغذیه انحصاری با شیرمادر به مدت ٦ ماه برای تمامی نوزادان متولد شده در دنیا توصیه می شود (١). شیرمادر منبع غنی از نوترینت ها و ترکیبات بیواکتیو شامل پروتئین آنتی میکروبیال لاکتوفرین و لیزوزیم و همچنین مجموعه ای از اولیگوساکاریدها به عنوان منبع پره بیوتیک می باشد (٣،٢). امروزه این قضیه به اثبات رسیده است که شیر مادر محتوی تقریبا 10^{6} باکتری در هر میلی لیتر می باشد که نقش بسیار مهمی در کلونیزاسیون روده نوزاد پس از تولد دارد (٤-٦). ترکیب میکروبیوتای روده نوزاد تعیین کننده بلوغ روده و همچنین سیستم ایمنی نوزاد می باشد. بدون شک تقابلات بین سلولهای ایمنی مادر، آنتی بادی ها و آنتی ژن های غذایی و همچنین متابولیت های ناشی از میکروبیوم مادر، بازیگران کلیدی در آماده سازی ایمنی نوزاد در دنیای بیرون هستند. دیس بیوز فیلوم با بروز بسیاری از بیماریهای حاد و همچنین بیماری های مزمن شامل اسهال، عفونت های تنفسی، آسم، اختلالات التهابی روده، چاقی و سندروم متابولیک ارتباط دارد (٨،٧). مطالعه ای نشان داده است که میکروارگانیزم های اصلی موجود در شیرمادر متعلق به فیلوم فرمی کوتس، پروتئوباکتریا و اکتینوباکتریا بوده و تعادل میکروبیوبیال شیرمادر ١٠٠ روز اول پس از تولد نقش بسیار مهمی در وضعیت سلامتی نوزاد در سنین بزرگسالی دارد (٩).

علی رغم تغییر فیلوم شیر در ماههای مختلف شیردهی، تنها تعداد کمی از مطالعات مقطعی اثر شاخص توده بدنی (BMI) مادر و روش زایمان را بر ترکیب فیلوم شیر مورد بررسی قرار داده اند که این نمونه های شیر از یک هفته تا ٦ ماه پس از زایمان جمع آوری شده اند و نتایج ضد و نقیضی داشته اند (١٢-١٠). با توجه به اینکه شیوع چاقی و بیماریهای متابولیک دوران بارداری در دنیا رو به افزایش است (١٣)، BMI مادر قبل از بارداری و افزایش وزن زیاد در دوران بارداری بر جمعیت فیلوم شیر مادران و در نتیجه تغییر محیط روده ی نوزاد اثرگذار است (١٤). مطالعه ای نشان داده است که ترکیب میکروبیوتای شیرمادرانی که چاق بوده اند، بسته به جنس نوزاد متفاوت بوده است. همچنین شیرمادران مبتلا به دیابت بارداری تنوع بیشتری در مقایسه با مادران سالم داشته است. جمعیت استافیلوکوکوس، پروتلا، کورینه باکتریوم و انئروکوکوس ها در شیر مادران چاق و مبتلا به دیابت بارداری در مقایسه با مادران سالم و با وزن نرمال بیشتر بوده است (١٥). بطور کلی مطالعات در زمینه فیلوم شیرمادر و ارتباط آن با وقایع دوران بارداری بسیار محدود و جدید هستند. بنابر بررسی های صورت گرفته تاکنون مطالعه ای به ارزیابی مقایسه ای فیلوم شیرمادر ٤ ماه پس از زایمان در مادرانی که BMI طبیعی دارند (BMI بین ٢٤/٩-١٨/٥ کیلوگرم بر مترمربع) با افرادی که در محدوده چاقی هستند (BMI بزرگتر-مساوی ٣٠ کیلوگرم بر مترمربع) در ایران نپرداخته است. رژیم غذایی و نوع مواد غذایی مصرفی نیز از عوامل تاثیرگذار بر فیلوم شیر هستند که در مطالعات محدودی که صورت گرفته است این عامل به عنوان عامل مؤثر در نظر گرفته نشده است. همچنین وزن مادر قبل از بارداری و میزان وزن گیری در دوران بارداری از عوامل مؤثر بر تغییرات فیلوم شیر مادر هستند که اثر این عامل نیز در مطالعه حاضر در نظر گرفته خواهد شد. بنابراین در مطالعه حاضر بر آن شدیم که میزان چهار فیلوم غالب باکتریایی (فرمی کوتس، باکتریوئیدتس، اکتینوباکتریا و پروتئوباکتریا) را در شیرمادران با BMI طبیعی با مادرانی که BMI بالا دارند، با در نظر گرفتن دریافت های غذایی، وزن مادر قبل از بارداری و میزان وزن گیری دوران بارداری، مورد مقایسه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مورد-شاهدی بوده و نمونه های شرکت کننده، مادران در دوران شیردهی در دامنه سنی ۱۸-۴۰ سال که درماه چهارم شیردهی قرار داشتند بود. تمامی مراحل این مطالعه مطابق با راهنماهای بین المللی مطالعات انسانی بوده است. مراحل مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد زنجان تأیید شد (IR.IAU.Z.REC.1401.068). برای نمونه گیری از روش خوشه ای استفاده شد تا ساکنان تمامی مناطق شهر در این مطالعه شرکت داده شوند. نمونه ها از مراکز بهداشتی شهری جمع آوری شدند. ۶۰ مادر-فرزند پس از کسب رضایت آگاهانه به صورت شفاهی و کتبی وارد مطالعه شدند. مادران با نژاد ایرانی که فرزندانشان را به صورت انحصاری با شیرخود تغذیه می کردند و زایمان تک قلوی ترم (کامل) داشتند در این مطالعه شرکت داده شدند. شرکت کنندگان سیگاری نبوده، هیچ نوع مخدری مصرف نمی کرده و الکل یا هر نوع دارویی نیز مصرف نمی کردند. شرکت کنندگان بر اساس BMI فعلی به دو گروه با BMI بالا (BMI بزرگتر-مساوی ۳۰ کیلوگرم بر مترمربع) و طبیعی (BMI بین ۲۴/۹-۱۸/۵ کیلوگرم بر مترمربع) به صورت تصادفی تقسیم شدند. BMI از تقسیم وزن (کیلوگرم) بر مجذور قد (متر) محاسبه شد. افرادی که مکمل/محصول پروبیوتیک، پره بیوتیک، سین بیوتیک یا داروی آنتی بیوتیک، حداقل در طی ۲ ماه اخیر مصرف کرده بودند از مطالعه خارج شدند. افراد مبتلا به هرگونه بیماری مزمن شامل دیابت نوع ۱ و ۲، قلبی، کلیوی، کبدی، اختلالات سیستم ایمنی، تیروئیدی و روانی از مطالعه خارج شدند. هرگونه اختلال گوارشی شامل تهوع، استفراغ، اسهال، یبوست، بیماریهای سوء جذب و التهابی مانند سلیاک و بیماریهای التهابی روده و یا مصرف هر گونه داروی گوارشی از معیارهای خروج در مطالعه حاضر بود. همچنین مادرانی که در دوره بارداری به فشارخون یا دیابت بارداری مبتلا شدند وارد مطالعه نشدند. نوزادان کم وزن (کمتر از ۲,۵ کیلوگرم) و با وزن بالا (بیش از ٤ کیلوگرم) در هنگام تولد از این مطالعه خارج شدند. نمونه های شیر در مراکز بهداشتی پس از شستن و ضدعفونی کردن کامل دست ها و همچنین ضدعفونی نوک سینه و محیط اطراف با کارهگزیدین ۲٪ در فالکون های استریل ۵ میلی لیتری از هر دو سینه ی مادر جمع آوری شد. قبل از استخراج DNA، همه نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شده و در فریزر ۷۵- درجه سانتیگراد تا زمان آنالیز نهایی نگهداری شدند.

اطلاعات دموگرافیک، غذایی و آنتروپومتریک شرکت کنندگان

اطلاعات دموگرافیک شرکت کنندگان شامل سن مادر، سطح تحصیلات، تعداد زایمان و جنسیت فرزندان متولد شده ثبت شد. وزن فعلی مادران با استفاده از یک ترازوی کالیبر شده با دقت ۱۰۰ گرم با کمترین میزان لباس، بدون کفش در حالت ایستاده که دست ها به صورت مستقیم در پهلو قرارگرفته باشد و قد آنها با متر غیرقابل ارتجاع با دقت ۰/۵ سانتیمتر در حالت ایستاده که پاشنه، باسن، کتف و سر به دیوار چسبیده باشد توسط فرد مهارت دیده اندازه گیری شد. پرسشنامه بسامدخوراک ۱۶۹ آیتمی برای همه شرکت کنندگان تکمیل شد و اطلاعات این پرسشنامه با ثبت خوراک ۳ روزه (۲ روز معمول و یک روز تعطیل) معتبر شد. اطلاعات غذایی جمع آوری شده وارد نرم افزار N4 (Nutritionist 4)شده و به گرم در روز تبدیل شد.

استخراج DNA و وکنش زنجیره ای پلیمراز

۲۰۰ میکرولیتر از نمونه شیر، ۲۰۰ میکرولیتر بافر و ٤۰ میکرولیتر پروتئینازK به میکروتیوب ۱,۵ میلی لیتری جهت سانتریفیوژ اضافه شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانولول افزوده و محلول به خوبی مخلوط شد و نمونه ها با سرعت ۸۰۰۰rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از خالص سازی وارد لوله جمع آوری شد. ۵۰۰ میکرولیتر بافر مهارکننده به محلول رویی اضافه شده و با سرعت ۸۰۰۰rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. مرحله آخر با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر بافر، دوبار تکرار شد. به منظور استخراج DNA، لوله های فیلتردار به میکروتیوب سانتریفیوژ ۱,۵ میلی لیتری استریل وارد شد و ۲۰۰ میکرولیتر از بافررقیق کننده اضافه شده و به مدت ۱ دقیقه با سرعت rpm ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. کیفیت DNA از طریق تهیه تصویر بر روی ژل آگارز۱٪ و کمیت آن از طریق دستگاه نانودراپ ارزیابی شد. DNAی استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

تکثیر ژن 16S rRNA به روش (Quantitative Polymerase Chain Reaction) qPCR و با استفاده از پرایمرهای Universal باکتریایی انجام شد. با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز، یک قطعه خاصی از DNA با استفاده از پرایمر در لوله آزمایش به میزان زیادی تکثیر و جدا شد و کیفیت DNA تکثیر شده بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ارزیابی میزان بیان ژن از سایبرگرین مستر میکس به عنوان ماده فلورسانس استفاده شد و نمودارهای تکثیر با استفاده از دستگاه (Applied Biosystems, California, USA ABI) تهیه شد. در این نمودارها چندین منطقه وجود دارد. خط پایه، سیکل های ابتدایی PCR بوده که در آن ها تغییر کمی در سیگنال فلورسانس وجود داشت. منطقه آستانه یا Threshold جایی که سیگنال فلورسانس دریافتی افزایش قابل ملاحظه ای نسبت به سیگنال پایین نشان داده و برای تعیین مقدار Ct به کار رفت. میزان آستانه در بالای خط پایه و در پایین ترین قسمت ناحیه رشد لگاریتمی منحنی آمپلی فیکاسیون تنظیم شد(Ct آستانه سیکلی است که در آن، فلورسانس آستانه را قطع می کند). توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱، نشان داده شده است. تمامی اجزای واکنش از شرکت فرمنتاز خریداری شد. مخلوط هرواکنش شامل ۱۰ میکرولیتر بافر سایبرگرین مسترمیکس (Amplicon Co., Denmark)، ٤ میکرولیتر از نمونه DNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر فوروارد و ریورس، ۵ میکرولیتر آب عاری از RNAase و DNAase تهیه شده و از 16S rRNA به عنوان کنترل داخلی در هر واکنش استفاده شد. در یک چاهک نیز کنترل منفی حاوی همه پرایمرها و مواد بیان شده به استثنای DNA الگو استفاده شد. نمودارهای ذوب به منظور بررسی باندهای غیراختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت. چرخه تکثیر با دوبار تکرار انجام شد و شامل ٤۰ سیکل سه مرحله ای: ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸-٦۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. پس از به دست آوردن Ct مربوط به هر فیلوم باکتریایی، نتایج با Ct کنترل داخلی یعنی 16SrRNA مقایسه شد و دلتا سی تی هر نمونه محاسبه شد.

$$\Delta CT = CT_{\text{فیلوم}} - CT_{16srRNA}$$

به منظور محاسبه fold change تغییرات فیلوم در نمونه های مادران با BMI بالا در مقایسه با طبیعی از فرمول $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{بالا BMI}} - \Delta CT_{\text{طبیعی BMI}}$ استفاده شد و در نهایت با استفاده از $2^{-\Delta\Delta CT}$ میزان تغییرات بیان ژن محاسبه شد (۱٦).

جدول ۱. پرایمرهای فوروارد و ریورس مورد استفاده برای شناسایی فیلوم های باکتریایی غالب شیرمادر

نام فیلوم	سکانس پرایمر (۵' به ۳')	رفرنس
فرمی کوتس	**F: GGAGYATGTGGTTTAATTCGA** **R: AGCTGACGACAACCARGCAC**	(۱۵)
باکتریوئیدتس	**F: GCATCATGAGTCCGCATGTTC** **R: TCCATACCCGACTTTATTCCTT**	(۱۷)
اکتینوباکتریا	**F: TACGGCCGCAAGGCTA** **R: TARTCCCCACCTTCCTCCG**	(۱۸)
پروتئوباکتریا	**F: CATGACGTTACCCGCAGAAGAA** **R: CTCTACGAGACTCAAGCTTGC**	(۱۹)

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تحلیل داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۸ استفاده شد. متغیرهای کمی به صورت میانگین (انحراف معیار) و متغیرهای کیفی به صورت فراوانی (درصد) توصیف شد. در صورت نرمال بودن متغیر پاسخ جهت مقایسه بین دو گروه از آزمون تی-مستقل و درصورتی که نرمال بودن رد شود از آزمون من-ویتنی استفاده شد. برای بررسی ارتباط بین متغیر پاسخ و متغیرهای کمی دیگر از آزمون همبستگی استفاده شد. سطح معنی داری کوچکتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

متغیرهای زمینه ای شرکت کنندگان در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. ۵۰٪ از شرکت کنندگان در هر گروه زایمان سزارین و ۵۰٪ زایمان طبیعی داشتند. در گروه مادران با شاخص توده بدنی طبیعی ٦٦/٧٪ (۲۰ نفر) از نوزادان پسر و ۳۳/۳٪ (۱۰ نفر) دختر بودند. در مادران با شاخص توده بدنی بالا ٤٣/٣٪ (۱۳ نفر) از نوزادان پسر و ٥٦/٧٪ (۱۷ نفر) دختر بودند. همانطور که در جدول شماره ۲ مشاهده می شود تفاوت معنی داری بین سن و سطح تحصیلات شرکت کنندگان در دو گروه وجود نداشت.

جدول ۲. متغیرهای زمینه ای مورد بررسی در دوگروه مادران با BMI طبیعی و بالا

متغیر	گروه	BMI طبیعی (تعداد=۳۰) خطای معیار±میانگین	BMI بالا (تعداد=۳۰) خطای معیار±میانگین	معنی داری†
سن، سال		۳۰/۰۱±۱/۰۲	۳۲/۰۳±۱/۲	۰/۲
وزن فعلی، کیلوگرم		٦٣/٧±١/٤	۷۹/۱±۱/۹	<۰/۰۰۱
وزن پیش از بارداری، کیلوگرم		٦١/٤±١/٤	۷۳/۱±۲/۰۵	<۰/۰۰۱
افزایش وزن بارداری، کیلوگرم		۹/۷٦±۰/٤٥	۱۱±۰/۷۱	۰/۱۵
شاخص توده بدن، کیلوگرم بر مترمربع		٢٤/١±٠/٤٣	۳۱/۰۱±۰/۷	<۰/۰۰۱
تحصیلات				
زیردیپلم		٤ (٪۱۳/۳)	۱۱ (٪۳٦/۷)	
دیپلم		١٢ (٪٤٠)	۹ (٪۳۰)	۰/۰۷
دانشگاهی		١٤ (٪٤٦/٧)	۱۰ (٪۳۳/۳)	

† آنالیز شده توسط آزمون تی-مستقل

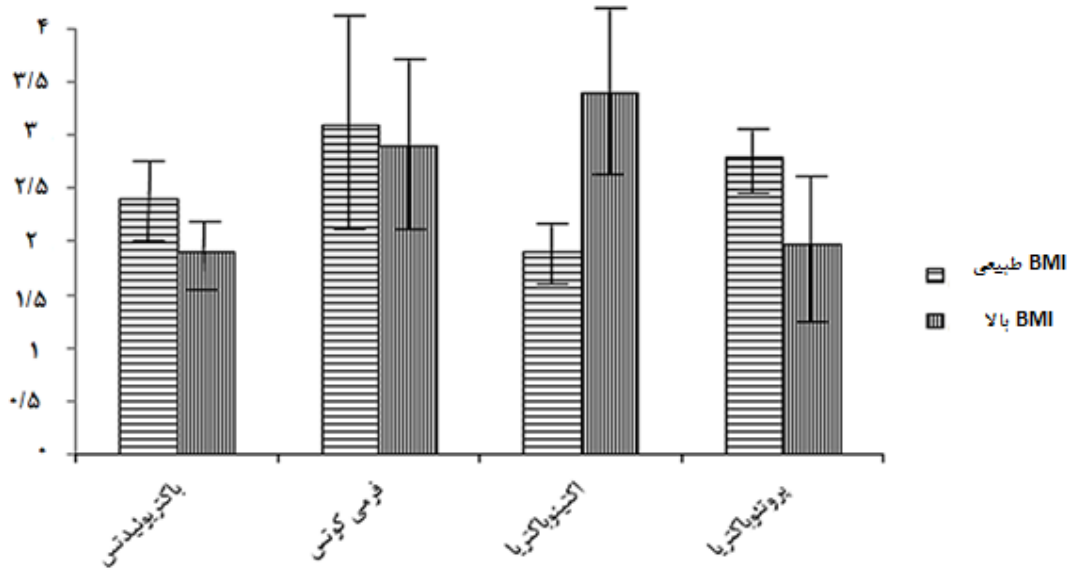
جدول شماره ۳، دریافت درشت مغذی ها و ریزمغذی های روزانه ی شرکت کنندگان را در دو گروه نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود میزان انرژی دریافتی روزانه در مادران با **BMI** طبیعی بیشتر از مادران **BMI** بالا بود (**p**=۰/۰۲). مادران با **BMI** بالا کربوهیدرات (**p**=۰/۰۱) و فیبر (**p**=۰/۰۱) کمتری در رژیم غذایی روزانه در مقایسه با مادران با **BMI** طبیعی مصرف می کردند. همچنین مادرانی که **BMI** طبیعی داشتند میزان بیشتری اسیدهای چرب تک غیراشباع در رژیم غذایی روزانه در مقایسه با مادران **BMI** بالا مصرف می کردند (**p**=۰/۰۰۹). از نظر سایر ویتامین ها و املاح معدنی تفاوت معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد.

جدول۳. آنالیز دریافت غذایی روزانه در دوگروه مادران با BMI طبیعی و بالا

دریافت در روز گروه	BMI طبیعی (تعداد=۳۰)	BMI بالا (تعداد=۳۰)	معنی داری†
	خطای معیار±میانگین	خطای معیار±میانگین	
انرژی، کیلوکالری	۲۸۹۰/۸±۹۸/۵	۲٤٦۳/۲±۱٤۲/۲	۰/۰۲
درشت مغذی ها			
کربوهیدرات، گرم	۳٦۸/۸±۱۱/	۳۰۵/۹±۲۰/۷	۰/۰۱
فیبر کل، گرم	۵۷/٤±۲/٦	٤٤/۲±٤/۲	۰/۰۱
فیبرمحلول، گرم	۰/٦±۰/۰۵	۳/٦±۲/۲	۰/۱۸
فیبرنامحلول، گرم	۲/۵±۰/۲۳	۲/۲±۰/۲۷	۰/٤
فروکتوز، گرم	۱۷/۱±۱/۹٤	۱٦/۵±۱/۰۵	۰/۷۸
ساکارز، گرم	۱۸/۲±۲/۰۷	۲۰/۹±۲/۲	۰/۳۷
پروتئین، گرم	۱۰٦/۳±٤/٦	۲۳۰/۷±۹۹/۲	۰/۲
چربی، گرم	۱۱٦/۱±٦/۲	۱۱۲/۵±۱۳/٤	۰/۸
اسیدچرب تک غیراشباع، گرم	۳۵/۸۷±۱/۸۵	۲۸/۸±۱/۸۵	۰/۰۰۹
اسیدچرب چند غیراشباع، گرم	۱۸/۵±۱/۵	۱٦/٤±۱/۱	۰/۲۷
اسیدچرب اشباع، گرم	۳۷/۷±۲/۳	٤۳/۱±۹/۹	۰/٦
کلسترول، میلیگرم	۳٤۱/۰٤±۲۳/۳	۳۲۳/۵±۲۵/۷	۰/٦۲
ویتامین های محلول در چربی و آب			
A، میکروگرم	۷۷۷/۸±۸۵/۱	۸۷۲/۵±۱۲۳	۰/۵۳
D، میکروگرم	۲/۸±۰/۵۵	۳/۵±۰/۵٦	۰/۳٦
E، میلیگرم	۱۲±۰/۹٦	۱۳±۱/۳۹	۰/۵٤
B1، میلیگرم	۲/۲±۰/۰۸	۲/۳±۰/۱٦	۰/۸
B2، میلیگرم	۲/۳±۰/۱۲	۲/۵±۰/۱۲	۰/۳٦
B3، میلیگرم	۲۵/۸±۱/٦۵	۲۵/۲±۱/۸	۰/۸۱
B6، میلیگرم	۲/۹±۰/۷٦	۲/۸±۰/٦	۰/۹۷
B9، میکروگرم	٦۷٤±۳۵/۲	۷۱٦/۸±٤۳/٤	۰/٤۵
B12، میکروگرم	۲۷/۹±۲۲/۱	۳۲/۲±۲۵/٦	۰/۹
C، میلیگرم	۳٦۵/٦±۲٤٦/۱	۲۵٦/۱±۱۵۰/۱	۰/۷۱
مواد معدنی			
کلسیم، میلیگرم	۱۱۷٦±۷۹/۵	۱۲۱٤/۲±۷۸/٤	۰/۷۳
منیزیم، میلیگرم	۳۸۷/٤±۱۸/۸	٤۳۷/٦±۲۲/٦	۰/۰۹
آهن، میلیگرم	۳۹/۷±۲۰/۱	۵۰±۳۱/۳	۰/۷٦
روی، میلیگرم	۲٤/۳±۱۱/۹	۲۵/٦±۱۲/۳	۰/۹٤
مس، میکروگرم	۲/۳±۰/۲۹	۲/٤±۰/۳٤	۰/۷۲
منگنز، میکروگرم	۵/٦±۰/۳	٦/۱±۰/٤٤	۰/۳۳
سلنیم، میکروگرم	۱۰۵٦±۵/٦	۱۰۷۷/۷±٦/۲	۰/۸

† آنالیز شده توسط آزمون تی-مستقل

جمعیت باکتریوئیدتس، فرمی کوتس، اکتینوباکتریا و پروتئوباکتریا در شیر مادران در دو گروه مادران با BMI بالا و طبیعی در نمودار ۱ نشان داده شده است. بر اساس آنالیز آماری تفاوت معنی داری بین دو گروه از نظر هیچیک از فیلوم های مورد بررسی مشاهده نشد.



نمودار ۱. جمعیت فیلوم های مورد بررسی در شیرمادران در دو گروه مورد مطالعه

نتایج آزمون Correlation دوطرفه نشان داد که در مادران با BMI طبیعی، بین میزان فیبرمحلول دریافتی با جمعیت پروتئوباکتریا همبستگی معکوس وجود دارد (r=-۰/۳۶ ،p= ۰/۰٤). همبستگی مستقیم معنی داری بین میزان فیبر دریافتی با اکتینوباکتریای شیرمادران مشاهده شد (p=۰/۰۳، r=۰/۳۹). همچنین بین میزان انرژی دریافتی روزانه (p=۰/۰۰٦، r=۰/۵)، کل چربی، کربوهیدرات و پروتئین دریافتی در رژیم غذایی با جمعیت فرمی کوتس شیر همبستگی مستقیم معنی دار مشاهده شد (p=۰/۰۰٤، r=۰/۵۱، p=۰/۰٤، r=۰/۳۵ و p=۰/۰٤، r=۰/۳٦). بین کلسیم و ویتامین B2 دریافتی روزانه با جمعیت فرمی کوتس شیر همبستگی مستقیم و معنی داری مشاهده شد (p=۰/۰۲، r=۰/٤۲ و p=۰/۰٤، r=۰/۳٦). همچنین نتایج نشان داد که در مادران با BMI بالا، همبستگی معنی داری بین میزان فیبر غیرمحلول مصرفی با جمعیت اکتینوباکتریا در شیر وجود دارد (p=۰/۰۰۱، r=۰/۵۷). همبستگی منفی بین جمعیت فرمی کوتس با میزان فولات (p=۰/۰٤، r=-۰/۳۲) و منگنز (p=۰/۰٤، r=-۰/۳۲) دریافتی در رژیم غذایی مادران مشاهده شد. بین جمعیت اکتینوباکتریا با ویتامین B1 (p<۰/۰۰۱، r=۰/٦۲)، B6 (p<۰/۰۰۱، r=۰/۷٤)، B12 (p<۰/۰۰۱، r=۰/۷۵)، سلنیم (p=۰/۰۲، r=۰/٤۱)، روی (p<۰/۰۰۱، r=۰/۷۵) و مس (p<۰/۰۰۱، r=۰/٦۸) دریافتی در رژیم غذایی مادران نیز همبستگی مستقیم مشاهده شد.

در مادرانی که BMI بالا داشتند، همبستگی مستقیم معنی داری بین میزان آهن (p<۰/۰۰۱، r=۰/۷۵)، ویتامین C (p<۰/۰۰۱، r=۰/۷۵) و ویتامین A (p=۰/۰۰۱، r=۰/۵٦) دریافتی در رژیم غذایی با جمعیت اکتینوباکتریای شیر مشاهده شد.

با تعدیل اثر همه فاکتورهای مورد بررسی، وزن فعلی مادر اثر معنی داری بر جمعیت اکتینوباکتریای شیر نشان داد. به گونه ای که مادران با شاخص توده بدنی نرمال ۱/٤۱ برابر

اکتینوباکتریای بیشتری در شیر داشتند (p=۰/۰٤، ۰/۰،۰۰۱/٦٦= ۹۵٪ فاصله اطمینان). همچنین با تعدیل اثر همه عوامل مورد بررسی، از میان همه درشت مغذی ها و ریزمغذی های دریافتی در رژیم غذایی مادر، آهن اثر منفی معنی داری بر جمعیت اکتینوباکتریا در شیر نشان داد (p=۰/۰٤، ۰/۰۳-،۲/٤٥-=۹۵٪ فاصله اطمینان، OR=-۲/۳). همچنین میزان کلسترول دریافتی در رژیم غذایی مادر اثر معنی دار بر جمعیت باکتریوئیدتس شیر نشان داد (P=۰/۰٤، ۰/۰۲۸، ۰/۰۰۱= ۹۵٪ فاصله اطمینان، OR=۰/۸۱). ویتامین C دریافتی در رژیم غذایی اثر معنی دار منفی (P=۰/۰۲، ۰/۰۱۲-، ۰/۱٦-=۹۵٪ فاصله اطمینان، OR=-۰/۹٦) و میزان ساکارز (P=۰/۰٤، ۱/۲، ۰/۰۲=۹۵٪ فاصله اطمینان، OR= ۱/٤٦) دریافتی اثر معنی دار مثبت بر جمعیت فرمی کوتس نشان داد.

بحث

مطالعه حاضر اولین مطالعه ای است که در ایران به ارزیابی مقایسه ای میزان بیان ژن فیلوم های غالب شیر مادر شامل باکتریوئیدتس، فرمی کوتس، اکتینوباکتریا و پروتئوباکتریا و ارتباط این فیلوم ها با دریافت غذایی در مادران با BMI طبیعی در مقایسه با مادران با BMI بالا که در ماه چهارم شیردهی هستند پرداخته است. علی رغم تصورات اولیه در زمینه استریل بودن شیرمادر، امروزه شیرمادر به عنوان منبع غنی از ریزمغذی ها، ایمونوگلبولین ها، باکتری ها و بسیاری از ترکیبات دیگر، که فواید زیادی برای سلامتی نوزاد دارد، در نظر گرفته می شود. باکتری های موجود در شیر مادر، به عنوان اولین منبع غذایی نوزاد، تعیین کننده ترکیب میکروبیوم روده نوزاد بوده که می تواند نقش بسیار مهمی در وضعیت سلامت/بیماری نوزاد ایفا کند. میکروبیوتای روده در دوره های اولیه زندگی شکل می گیرد که تحت تأثیر عوامل داخلی مانند روش زایمان، نحوه تغذیه نوزاد (شیرمادر/شیرخشک)، دوره از شیرگیری و عوامل محیطی مانند مصرف آنتی بیوتیک، وزن، میزان فعالیت بدنی و رژیم غذایی قرار می گیرد. روش زایمان مادر، وزن مادر و نوع رژیم غذایی او از مهمترین عوامل مؤثر بر ترکیب فیلوم شیر در دوران شیردهی هستند (۲۰). نیمی از مادران شرکت کننده در مطالعه حاضر در هر گروه مورد بررسی زایمان به روش سزارین و نیمی زایمان به روش طبیعی داشته اند. همه ی شرکت کنندگان ساکن و اهل شهرزنجان بوده و تقریبا می توان گفت ژنتیک و نژاد یکسانی داشتند. همه شرکت کنندگان از شیر خودشان به صورت انحصاری برای تغذیه نوزاد استفاده می کردند. نتایج جالب به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که جمعیت این فیلوم ها در شیر مادران با BMI بالا با مادران با شاخص توده بدنی طبیعی تفاوت معنی داری ندارد ولی با دریافت غذایی مادران ارتباط معنی دار نشان داد. از طرف دیگر با تعدیل اثر همه فاکتورهای مورد بررسی، وزن مادران اثر معنی داری بر میزان اکتینوباکتریای شیر نشان داد. مادران با شاخص توده بدنی طبیعی ۱/٤ برابر اکتینوباکتریای بیشتری در شیرخود در مقایسه با مادران با BMI بالا داشتند. آهن دریافتی در رژیم غذایی مادران اثر کاهشی بر جمعیت اکتینوباکتریا نشان داد و ۲/۳ برابر جمعیت این فیلوم را کاهش داد. افزایش میزان کلسترول دریافتی در رژیم غذایی مادر جمعیت باکتریوئیدتس را در شیر افزایش داد درحالیکه ویتامین C میزان این فیلوم را در شیر کاهش داد. باکتریوئیدتس و فرمی کوتس ها به عنوان فیلوم غالب باکتریایی موجود در روده و شیر انسان هستند. باکتریوئیدتس در برگیرنده ی خانواده اسفینگوباکتریاسه، باکتریوئیدسها ،پرووتلاسه و تانرلاسه هستند که این باکتریها در صورت حضور در روده فواید زیادی برای سلامتی دارند اما انتقال آنها به بافت های دیگر می تواند منجر به پاتوژن شدن آنها شود (۲۱). در انتقال باکتریوئیدتس به مناطق دیگر، غیر از روده، عوامل مختلفی می توانند اثرگذار باشند که عبارتند از اختلال در سیستم ایمنی، روده ی نشت پذیر (از بین رفتن یکپارچگی روده)، آسیب های ناشی از جراحی و مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک ها (۲۲). جمعیت باکتریوئیدتس ها و انواع گونه های مربوط به آن در جمعیت های مختلف بسته به نوع رژیم غذایی متفاوت است به گونه ای که در روده ژاپنی ها بیشتر از هندی ها می باشد که دلیل آن مصرف مواد غذایی با پایه گوشت بالا در رژیم غذایی ژاپنی ها بوده است در حالیکه هندی ها مواد غذایی گیاهی بیشتری در رژیم غذایی خود مصرف می کردند (۲۳). فرمی کوتس باکتری های گرم مثبت با دیواره سخت هستند که دربرگیرنده دو

دسته اصلی خانواده باکتریایی شامل کلستریدیوم کوکوئیدها و کلستریدیوم لپتوم می باشد. مطالعات نشان داده اند جمعیت این فیلوم باکتریایی با افزایش سن و در شرایط بیماری کاهش می یابد (۲۵،۲٤). کلستریدیوم ها نقش بسیار مهمی در تخمیر کربوهیدرات ها در روده دارند (۲٦) و محصول نهایی حاصل از این تخمیر، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر شامل استات، پروپیونات و بوتیرات می باشد که بازیگران مهمی در متابولیسم گلوکز و چربی در بدن هستند. به علاوه بوتیرات سوخت اصلی سلولهای کولون را تأمین کرده و بطور کلی اثرات ضدالتهابی و تنظیم کننده سیستم ایمنی دارند (۲٦). در مطالعه حاضر ارتباط معنی دار و قوی بین میزان انرژی دریافتی روزانه، کل چربی، کربوهیدرات و پروتئین،کلسیم و ویتامین B2 دریافتی روزانه با جمعیت فرمی کوتس شیر مادران با شاخص توده بدنی طبیعی مشاهده شد در حالیکه این ارتباط در مادران با BMI بالا مشاهده نشد.

پروتئوباکترها فیلوم هایی هستند که خانواده انتروباکتریاسه، دسولفوویبروناسه و هلیکوباکتریاسه را در برمیگیرند که همه ی گونه های آن از پاتوژن ها بوده و شامل ای کلای، شیگلا، هلیکوباکتر و دسولفوویبریو می باشند. همانطور که در مطالعه حاضر مشاهده می شود بین میزان فیبرمحلول دریافتی با جمعیت پروتئوباکتریا در شیرمادران با شاخص توده بدنی طبیعی ارتباط معکوس وجود داشت (۲۷). بنابراین می توان گفت افرادی که فیبرمحلول بیشتری در رژیم غذایی روزانه مصرف می کنند میزان پروتئوباکتریایی کمتری در شیر خود دارند و بنابراین جمعیت پاتوژن کمتری به نوزاد خود منتقل می کنند. اکتینوباکتریا مجموعه ای از باکتری های گرم مثبت بوده که در تنظیم هموستاز روده نقش دارند (۲۸). یکی از مهمترین گونه های متعلق به فیلوم اکتینوباکتریا، بیفیدوباکتریاسه و کوریوباکتریاسه هستند که در بدن نقش پروبیوتیک داشته و فواید زیادی برای سلامتی دارند و تحت تأثیر ژنتیک، محیط، رژیم غذایی، سبک زندگی و فیزیولوژی روده قرار می گیرند. بنابراین افزایش جمعیت فیلوم اکتینوباکتریا می‌تواند فواید زیادی برای سلامتی داشته باشد (۳۰،۲۹). در مطالعه حاضر بالابودن وزن مادران اثر کاهشی بر جمعیت این فیلوم در شیرنشان داد. همچنین افزایش مصرف آهن در رژیم غذایی نیز اثر منفی بر آن داشت.

مطالعه حاضر یک مطالعه مشاهده ای بر روی جمعیت ایران که در منطقه کوهستانی زندگی می کنند بوده است. مشابه با سایر مطالعات، مطالعه حاضر محدودیت های دارد. طراحی مطالعه حاضر نمی تواند رابطه علی-معلولی را مشخص کند. نتایج این مطالعه قابل تعمیم به سایر مناطق ایران نیست به این دلیل که نژاد، محیط جغرافیایی و مواد غذایی مصرفی می تواند بر نتایج اثرگذار باشد. بیان ژن تنها در سطح فیلوم ارزیابی شد و تغییرات باکتریایی در سطح گونه و جنس می تواند تکمیل کننده نتایج مطالعه حاضر باشد. بعلاوه توصیه می شود که در مطالعات آینده، نمونه مدفوع نوزادان نیز جمع آوری شود تا ارتباط بین فیلوم شیرمادر با فیلوم روده نوزادان به طور دقیقتری تعیین شود. طراحی مطالعات کارآزمایی بالینی با استفاده از رژیم های غذایی یا مکمل ها به منظور تغییر در فیلوم شیرمادر برای مطالعات آینده توصیه می شود. از آنجایی که اثرات تغییر در فیلوم روده نوزاد ماندگار است، پیگیری این نوزادان در سنین کودکی و بررسی ارتباط این فیلوم با روند رشد کودکان و شاخص های آنتروپومتریک توصیه می‌شود. به طورکلی، رژیم غذایی مادر در دوران بارداری و شیردهی اثرات ماندگاری بر متابولیسم نسل بعد برجا می‌گذارد. حتی رعایت یک رژیم غذایی مناسب پس از دوره از شیرگیری نمی تواند اثرات مخرب رژیم های غذایی دوران بارداری و شیردهی را از بین ببرد.

نتیجه گیری

مادران با شاخص توده بدنی طبیعی اکتینوباکتریای بیشتری در شیرخود در مقایسه با مادران با BMI بالا داشتند که این فیلوم دربرگیرنده باکتری های مفید مانند بیفیدوباکتریوم می باشد. آهن دریافتی در رژیم غذایی مادران اثر کاهشی بر جمعیت اکتینوباکتریا نشان داد. افزایش میزان کلسترول دریافتی در رژیم غذایی مادر جمعیت باکتریوئیدتس را در شیر افزایش داد درحالیکه ویتامین C میزان این فیلوم را در شیر کاهش داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمامی مادران باردار و پرسنل محترم مراکز بهداشتی شهر زنجان کمال سپاس را دارند. آزمایشات استخراج DNA و ارزیابی بیان ژن در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی زنجان انجام شد که از پرسنل محترم آزمایشگاه برای همکاری کمال سپاس را داریم.

ملاحظات اخلاقی

مراحل مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد زنجان تأیید شد (IR.IAU.Z.REC.1401.068).

عدم تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی از نظر مادی و معنوی ندارند.

منابع

1. Hanson M, Aagaard-Hansen J. Developmental Origins of Health and Disease: Towards a combined bio-social life-course perspective. Acta Pediatrica 2021; 110: 2306-2309.
2. Carroll X, Liang X, Zhang W, Zhang W, Liu G, Turner N, et al. Socioeconomic, environmental and lifestyle factors associated with gestational diabetes mellitus: a matched case-control study in Beijing, China. Scientific Reports 2018; 8:8103−8110.
3. Chiefari E, Arcidiacono B, Foti D, Brunetti A. Gestational diabetes mellitus: an updated overview. Journal of Endocrinological Investigation 2017;40:899−909.
4. Chatzakis C, Eleftheriades A, Demertzidou E, Dinas K, Vlahos N, Sotiriadis A, Eleftheriades M. Pregnancy outcomes in the different phenotypes of gestational diabetes mellitus based on the oral glucose tolerance test. A systematic review and meta-analysis. Diabetes Research and Clinical Practice 2023;204:110913.
5. Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR, de Leiva A, Dunger DB, Hadden DR, et al. Summary and recommendations of the fifth international workshop-conference on gestational diabetes mellitus. Diabetes Care 2007;30(Supplement 2):S251−S260.
6. Wei JLX, Gao J. Insulin secretion and tolerance of women with different gestational glucose regulation one year postpartum. International Journal of Clinical and Experimental Medicine 2015;8: 6384−6387.
7. Sheiner E. Gestational Diabetes Mellitus: Long-Term Consequences for the Mother and Child Grand Challenge: How to Move on Towards Secondary Prevention?. Frontiers in Clinical Diabetes and Healthcare 2020;1:546256.
8. Damm P, Houshmand-Oeregaard A, Kelstrup L, Lauenborg J, Mathiesen ER, Clausen TD. Gestational diabetes mellitus and long-term consequences for mother and offspring: a view from Denmark. Diabetologia 2016;59:1396−1399.
9. Agha-Jaffar R, Oliver N, Johnston D, Robinson S. Gestational diabetes mellitus: does an effective prevention strategy exist? Endocrinology 2016;12:533-546.
10. Eyupoglu ND, Caliskan Guzelce E, Acikgoz A, Uyanik E, Bjørndal B, Berge RK, et al. Circulating gut microbiota metabolite trimethylamine N-oxide and oral contraceptive use in polycystic ovary syndrome. Clinical Endocrinology (Oxford) 2019;91:810−815.
11. Zhou L , Xiao X , Zhang Q , Zheng J , Li M , Wang X , et al. Gut microbiota might be a crucial factor in deciphering the metabolic benefits of perinatal genistein consumption in dams and adult female offspring. Food and Function 2019;10:4505.
12. Simpson SSL, Bowe J. Placental peptides regulating islet adaptation to pregnancy: clinical potential in gestational diabetes mellitus. Current Opinion in Pharmacology 2018;43:59−65.
13. Kalra SGY, Kumar A. Prevention of gestational diabetes mellitus (GDM). Journal of the Pakistan Medical Association 2016;66(9 Suppl 1):S107-S109.
14. DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ, Robaczewska A, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. Proceedings of the National Academy of Sciences 2015;112:11060-11065.
15. Vaiserman A, Romanenko M, Piven L, Moseiko V, Lushchak O, Kryzhanovska N, et al. Differences in the gut Firmicutes to Bacteroidetes ratio across age groups in healthy Ukrainian population. BMC Microbiology 2020;20:221.
16. Liu C, Song Y, McTeague M, Vu AW, Wexler H, Finegold SM. Rapid identification of the species of the Bacteroides fragilis group by multiplex PCR assays using group- and species-

specific primers. FEMS Microbiology Letters 2003;222:9-16.
17. Notarbartolo V, Giuffrè M, Montante C, Corsello G, Carta M. Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 2022; 25(3):194-210.
18. Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. Environmental Microbiology 2003 ;5:828-841.
19. Blackwood CB, Oaks A, Buyer JS. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. Applied Environmental Microbiology 2005;71:6193-6198.
20. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Donato Miggiano G, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. Microorganisms 2019;7(1):14.
21. Dridi L, Altamura F, Gonzalez E, Lui O, Kubinski R, Pidgeon R, et al. Identifying glycan consumers in human gut microbiota samples using metabolic labeling coupled with fluorescence-activated cell sorting. Nature Communications 2023; 14:662.
22. Archambaud C, Derre-Bobillot A, Lapaque N, Rigottier-Gois L, Serror P. Intestinal translocation of enterococci requires a threshold level of enterococcal overgrowth in the lumen. Scientific Reports 2019;9(1):8926.
23. Pareek S, Kurakawa T, Das B, Motooka D, Nakaya S, Rongsen-Chandola T. Comparison of Japanese and Indian intestinal microbiota shows diet-dependent interaction between bacteria and fungi. NPJ Biofilms Microbiomes 2019;5:37.
24. Zeng H., Umar S., Rust B., Lazarova D., Bordonaro M. Secondary bile acids and short chain fatty acids in the colon: a focus on colonic microbiome, cell proliferation, inflammation, and cancer. International Journal of Molecular Sciences 2019;20**.**
25. Santhanam S, Alvarado D.M, Ciorba M.A. Therapeutic targeting of inflammation and tryptophan metabolism in colon and gastrointestinal cancer. Translational Research 2016;167:67−79.
26. Kaur A, Chen T, Green S.J, Mutlu E, Martin B.R, Rumpagaporn P, et al. Physical Inaccessibility of a Resistant Starch Shifts Mouse Gut Microbiota to Butyrogenic Firmicutes. Molecular Nutrition and Food Research 2019; 63: e1801012.
27. Murata Ch , Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Villatoro F, García-Torres I, Enríquez-Flores, S, Mora I, et al. Delivery mode-associated gut microbiota in the first 3 months of life in a country with high obesity rates: A descriptive study. Medicine 2020; 99: e22442.
28. Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, Gibiino G, Cennamo V, Gasbarrini A. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. Digestive and Liver Disease 2018;50(5):421-428.
29. Lai S, Yan Y, Pu Y, Lin Sh, Qiu J, Jiang B, et al. Enterotypes of the human gut mycobiome. Microbiome 2023; 11, 179.
30. Zhang P. Influence of Foods and Nutrition on the Gut Microbiome and Implications for Intestinal Health. International Journal of Molecular Sciences 2022;23(17):9588.