

## بررسی بافتی، مولکولی و باکتریایی نمونه های بیماران مبتلا به بیماری های التهابی روده از بیمارستان بقیه الله (عج) تهران

نجمه نجف زاده<sup>1</sup>، شهلا محمدگنجی<sup>2</sup>، رضا بهروزی<sup>2</sup>، صدیقه مهربان<sup>1</sup>

1- دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، تهران. ایران.  
2- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران. ایران. shahlang@yahoo.com

تاریخ دریافت: 93/6/29 تاریخ پذیرش: 93/8/10

### چکیده

مقدمه و هدف: یکی از علل عفونت های داخل بدن، آلودگی با باکتری *E.coli* واجد ژن *pks* است. این ژن، باعث القا فسفوریلاسیون هیستون H2AX در انتروسیت های موش می شود. در سلول هایی که در معرض توکسین می باشند، افزایش قابل توجهی در فراوانی جهش در ژن های آن ها دیده می شود. در این تحقیق وجود منطقه ژنی *pks* در باکتری *E.coli* جدا شده از بیوپسی بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده و افراد نرمال مراجعه کننده به کلینیک گوارش و غدد بیمارستان بقیه الله (عج) مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: مطالعات میکروبیولوژی و مولکولی 20 نمونه بیوپسی افراد سالم و 25 نمونه بیوپسی از بافت روده بزرگ افراد مبتلا به بیماری التهابی روده مورد مطالعه قرار گرفت. پس از شناسایی باکتری *E.coli* از بافت روده با روش های میکروبی و بیوشیمیایی ژنوم باکتری استخراج و به روش Multiplex PCR برای باکتری مورد نظر از لحاظ داشتن ژن های موجود در منطقه *pks* استفاده و محصول PCR به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگاروز 2٪ بررسی شد.

یافته ها: نتایج مشخص نمود که 28٪ از باکتری های *E.coli* جدا شده از نمونه های بیماران، دارای منطقه ژنی *pks* هستند.

واژه های کلیدی: بیماری التهابی روده، *E.coli*، کلی باکترین، ژن *pks*.

### مقدمه

ناشناخته است، نظریه های متعددی نیز در این زمینه وجود دارد. مثلاً برخی از نظریه های ژنتیکی، بیان می کند که بیماری التهابی روده در خانواده ها به صورت ارثی دیده می شود زیرا حدود 15 تا 30 درصد مبتلایان به بیماری های التهابی روده، دارای حداقل یک خویشاوند مبتلا به این بیماری می باشند. البته مطالعاتی در مورد این - که آیا ژن به خصوصی یا گروهی از ژن ها مسئول ایجاد این بیماری است یا خیر در حال انجام است. تغییرات بسیاری در سیستم ایمنی بدن (سیستم دفاعی طبیعی بدن در برابر بیماری ها) مبتلایان به بیماری های التهابی روده دیده شده است و آن چه هنوز ناشناخته است این است که چه عواملی سبب ایجاد این تغییرات می شود. مطالعات زیادی در این زمینه انجام شده است، از جمله مطالعاتی که ارتباط بیماری های التهابی روده را با عوامل عفونی بررسی می کند. بر اساس شواهد استرس نمی تواند

بیماری های التهابی روده یا (Inflammatory Bowel Disease) اصطلاحی است که دو بیماری کولیت اولسراتیو (Ulcerative Colitis) و بیماری کرون (Crohn's Disease) را در بر می گیرد. در کولیت اولسراتیو، التهاب روده در دیواره داخلی روده بزرگ رخ می دهد و بیماری کرون سبب التهاب دیواره داخلی و خارجی در هر دو روده بزرگ و کوچک می شود، بنابراین دیواره داخلی روده قرمز متورم و زخم شده و خونریزی اتفاق می افتد (15). بیماری های التهابی روده بیشتر در افراد جوان بین 18-29 سال دیده می شود هر چند که مواردی نیز در کودکان سنین دو سالگی و یا سالمندان در دهه هفتم و هشتم زندگی وجود داشته است. مردها و زنان شانس یکسانی برای ابتلا به بیماری دارند (15). اگر چه علل دقیق بیماری های التهابی روده

را هم مبتلا نماید. زخم های آفت مانند در دهان شایعند. زخم ها هم چنین ممکن است در مری، معده و قسمت بالایی روده کوچک (یعنی دئودنوم یا دوازدهه) رخ دهند. تمایز بین این زخم ها و زخم های معده و روده تنها توسط معاینات نمونه برداری امکان پذیر است (4). شایع ترین علائم بیماری کرون عبارتست از: درد شکمی در سمت راست و پائین شکم، اسهال، کاهش وزن، خونریزی مقعدی و تب. خونریزی مزمن ممکن است سبب کاهش شمارش گلبول های قرمز یا کم خونی می-گردد. کودکان مبتلا به بیماری کرون ممکن است تأخیر رشد داشته باشند (4).

**ارتباط باکتری *E. coli* با بیماری های التهابی روده**  
اجتماعات متراکم باکتریایی که در دستگاه گوارش زندگی می کنند به نام "microbiota" خوانده می شوند که نقش اصلی آن ها در سلامت و بیماری های انسانی به طور فزاینده ای مورد شناسایی قرار گرفته است. میکروبیوتا عموماً عملکردهای مفید سلول انسانی را تحت تأثیر قرار می دهد و باعث تقویت راه های ایمنی سلولی در برابر پاتوژن ها می گردد (5). یکی از اعضای میکروبیوتا دستگاه گوارش انسانی، *E. coli* است که چند روز بعد از تولد در روده کلونیزه شده و در سراسر زندگی میزبان در روده وجود دارد. جمعیت سویه *E. coli* را می توان حداقل در چهار گروه فیلوژنیک اصلی (A، B1، B2، D) طبقه بندی کرد. سویه *E. coli* گروه B2 فراوانی کمتری در محیط دارد ولی نسبت به سایر گروه ها می تواند به مدت بیشتری در روده باقی بماند و 30%-50% از سویه های ایزوله شده در مدفوع انسان های سالم در کشورهای با درآمد بالا را تشکیل دهد (13، 5). امروزه کشف کرده اند که 34% از سویه های باکتری همسفره *E. coli* متعلق به گروه فیلوژنیک B2، یک منطقه حفاظت شده ژنی به نام منطقه *pks* را حمل می کنند (5). این خوشه ژنی یک پپتید غیر ریپوزومی (NRPS) و پلی

به تنهایی سبب ابتلا به بیماری های التهابی روده شود، ولی مثل سایر بیماری ها علائم و نیازمندی به برنامه درمانی را تشدید می کند (17).

### کولیت اولسراتیو

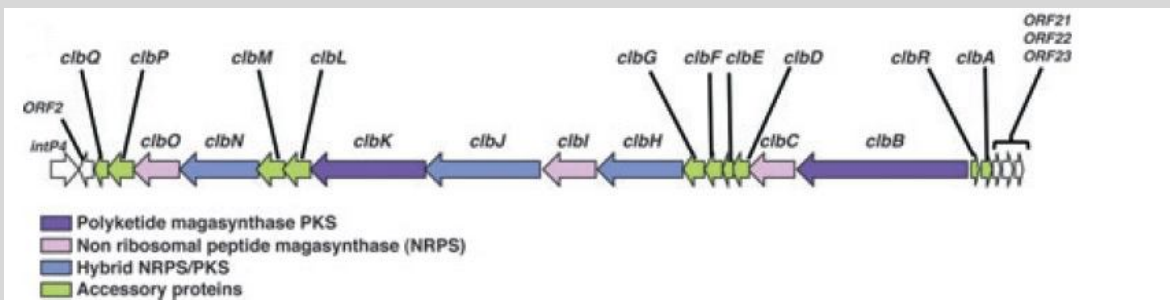
اغلب، کولیت اولسراتیو در افراد جوان 15 تا 40 سال دیده می شود. کولیت اولسراتیو تنها در دیواره داخلی روده بزرگ و مقعد رخ می دهد. وقتی فقط منحصر به مقعد باشد پروکتیت نامیده می شود. التهاب مقعد و روده بزرگ سبب می شود از جذب آب جلوگیری شده و این مسأله سبب ایجاد اسهال می شود. کولیت اولسراتیو بیماری است که گاهی بهبود می یابد و گاهی مجدداً عود می کند (17). شایع ترین علائم کولیت اولسراتیو عبارتست از: اسهال، کرامپ شکمی، خونریزی از مقعد، تب مکرر و تهوع. سایر علائم این بیماری شامل خستگی، کاهش وزن، کاهش اشتها، درد شکمی، درد مفاصل، مشکلات کبدی، از دست دادن آب و املاح بدن، خونریزی که سبب کم خونی می شود (و همین کم خونی است که سبب ایجاد خستگی می شود)، قرمزی و تورم چشم ها است. هیچ کس با اطمینان نمی داند چرا مشکلات خارج از روده ای این گونه با التهاب روده همراه می شوند. این مشکلات با بهبود یافتن کولیت اولسراتیو بهبود می یابد. نیمی از بیمارانی که مبتلا هستند فقط علائم خفیفی دارند (17).

### بیماری کرون

کرون بیماری مزمنی است که دوره های بهبود و عود مجدد دارد. علت این بیماری فرآیند التهاب و ایجاد زخم است که در لایه های عمقی دیواره روده رخ می دهد. شایع ترین ناحیه های آسیب دیده، شامل قسمت پائینی روده کوچک (با ایلئوم) و هم چنین اولین قسمت روده بزرگ می باشند (در صورت درگیری اولین قسمت روده بزرگ به این نوع از بیماری کرون ایلئوکولیت می-گویند). بیماری کرون می تواند هر قسمتی از دستگاه گوارش فوقانی (از دهان گرفته تا معده و روده کوچک)

مگاستنتاز (NRPS)، سه پلی کتاید مگاستنتاز (*pks*)، دو هیبرید *NRPS/pks* مگاستنتاز و دو لوازم جانبی برای ویرایش و اتصال آنزیم است. مطالعات انجام گرفته بر روی باکتری های جهش یافته نشان می دهد که تمام مناطق *pks* و NRPS به همراه 8 ژن فرعی برای تولید یک ژنوتوکسین فعال مورد نیاز هستند (14).

کتاید (*pks*) را کد می کند که اجازه می دهد هیبرید پپتید ترکیبی ژن توکسین کلی باکترین را تولید کند. آنزیم های مورد نیاز برای سنتز کلی باکترین، در منطقه ژنومی با اندازه 54kb تحت عنوان جزیره *pks* حضور دارند که در منطقه لوکوس *tRNA asnW* قرار دارد. همان طور که در شکل 1 دیده می شود این منطقه دارای 23 قالب قابل خواندن (ORF)، سه پپتید غیر ریپوزومی



شکل 1- منطقه ژنومی *pks* یکی از وظایف عمده این منطقه ژنومی کد کردن ژنوتوکسین کلی باکترین است. جزئیات ژن ها در این خوشه ژنی قابل مشاهده است (13).

فسفاتیدیل اینوزیتول و شبه کیناز 3 از خانواده پروتئین کینازها: ATM، ATR و DNA-PK صورت می گیرد (16). نتیجه این فعالیت مهار چرخه سلولی و فعال شدن راه های تعمیر آسیب DNA است. اگر تعمیر به صورت کامل صورت گیرد چرخه تکثیر سلولی به حالت طبیعی برمی گردد در غیر این صورت سلول به سمت آپوپتوزیس یا پیری سلولی می رود این امر می تواند باعث ایجاد ناپایداری ژنومی گردد (9). در آزمایشگاه عفونت با این سویه از باکتری موجب شکستن دو رشته DNA در محیط کشت سلولی از یک دیگر می شود (DSBs). کلی باکترین مانند سیکلومودولین عمل می کند و باعث متوقف شدن و مسدود شدن سیکل چرخه سلول یوکاریوت می شود. مطالعات نشان داده است در تعدادی از بیماری ها مانند IBD روابط همزیستی میزبان و فلور میکروبی شکست می خورد. سابقه بیماری های روده ای مانند IBD، کولیت اولسراتیو و بیماری کرون احتمال ابتلا به سرطان کولورکتال (Colorectal Cancer)

در دسته بندی جدید از *clbB*، *clbN* به عنوان مارکرهایی به ترتیب برای مناطق 3' و 5' در منطقه *pks* نام برده شده است و از *clbA*، *clbQ* به عنوان مارکرهای تکمیلی منطقه *pks* نام برده شده است، هم چنین 12 ژن بیماری زایی برای این منطقه در نظر گرفته می شود. کلی باکترین باعث فعال شدن "پاسخ آسیب DNA" یا به اصطلاح DDRs (DNA Damage Response) در سلول های آلوده به توکسین می شود. یکی از آسیب هایی که به وسیله کلی باکترین ایجاد می شود شکست در دو رشته DNA یا DSB (Double strand break) است که با افزایش سطح هیستون H2AX همراه است. DDRs برای حفظ اطلاعات ژنتیکی ضروری است و حفظ تمامیت ژنومی در سلول های در معرض آسیب در برابر فعالیت های آندوژنی ROS (گونه هایی که در طی متابولیسم خود ایجاد اکسیژن می کنند) و عوامل محیطی (پرتوهای یونیزاسیون و اشعه UV) بر عهده آن ها است. سنجش و فعال سازی DDR هماهنگ با پروتئین های

نمونه بیمار مبتلا به کرون و 20 عدد نمونه بافت روده سالم جهت مقایسه با فلور طبیعی از بیماران مراجعه کننده به کلینیک گوارش بیمارستان بقیه الله (عج)، درون ویال- های استریل در دمای 80- درجه سانتی گراد به آزمایشگاه انتقال داده شد. مراحل جمع آوری نمونه همراه با رضایت نامه و تکمیل فرم پرسشنامه بود. ابتدا نمونه ها برای عکس برداری با میکروسکوپ نوری آماده شد و از هر دو نمونه بافت روده بزرگ بدون حضور *E. coli* واجد ژن *PKS* مثبت و بافت روده بزرگ در حضور *E. coli* واجد ژن *PKS* مثبت، عکس تهیه گردید. بدین منظور ابتدا برش هایی از نمونه های بافتی تهیه و با استفاده از رنگ های همتاکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شد. سپس از برش های آماده شده توسط میکروسکوپ، عکس گرفته شد. برای جداسازی باکتری *E. coli* از بافت روده بزرگ بیماران مبتلا محیط های کشت مغذی از جمله محیط های TSA Agar، BHI broth، BHI Agar، LB broth و افتراقی برای باکتری های خانواده انتروباکتریاسه از قبیل، EMB، Agar Mackconcy، Agar Urea، JMVIC، TSI و بافر PBS جهت شستشوی اولیه قسمتی از بافت مورد استفاده قرار گرفت. تمامی محیط های کشت از شرکت MERCK خریداری شده بود. هر نمونه در شرایط استریل و در زیر هود آزمایشگاهی با کمک اسکالپل به دو قسمت تقسیم شد. یک قسمت در درون ارلن حاوی 5ml محیط LB broth و دیگری در ارلن حاوی 5ml بافر PBS ریخته و به مدت 24 ساعت در انکوباتور لغزنده در دمای 37 درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. بعد از 24 ساعت نمونه ها بیرون آورده شد و تعیین رقت در محیط های حاوی 9 میلی لیتر بافر PBS انجام گرفت و سپس براساس پروتکل میکروبی از تمامی رقت ها بر روی محیط افتراقی مک کانکی آگار برده شد به صورتی که هنگامی که محیط به

را افزایش می دهند زیرا در این بیماری ها روده بزرگ به مدت طولانی ملتهب می باشد (14). بنابراین التهاب فیزیولوژی میزبان را برای ترویج سرطان تغییر می دهد که در کولیت مرتبط با سرطان کولورکتال-Colitis (associated CRC) دیده شده است، گرچه مکانیسم دقیقی التهاب روده ای که منجر به سرطان کولورکتال می شود، ناشناخته است. در کولون افراد مبتلا به سرطان کولون و بیماری های التهابی روده، باکتری *E. coli* از نوع Adhesive و Invasive افزایش می یابد بنابراین فقط سویه هایی از *E. coli* می توانند در روده بزرگ بیماری ایجاد کنند که عضو نرمال فلور میکروبی نیستند و *Extraintestinal E. coli* یا *ExPEC* نامیده می شوند (6، 14). عفونت های گذرای سلول یوکاریوت با *ExPEC* گروه فیلوژنی (*ECOR-B2*)، در واقع تقسیم میوز را متوقف کرده و باعث القا *megalocytosis* می گردد. این رفتار در ارتباط با جزایر ژنومی گسترش یافته- ای در *E. coli* است که جزایر ژنومی *pks* نامیده می شود (6). منشا شیوع منطقه کلی باکترین در میان خانواده انتروباکتریاسه ناشناخته است. این منطقه نه تنها در *E. coli* بلکه در کلبسیلا پنومونی، انتروباکتر آئروجنیز و سیتروباکتر کوسری تشخیص داده شده، این منطقه در بین این گونه ها به شدت حفظ شده و همیشه با تعیین یرسینیا باکترین در ارتباط است. تغییرات ساختاری بین سویه های منحصر به فرد تنها در یک منطقه *intergenic* که حاوی تعداد متغیری از تکرارهای پشت سر هم است مشاهده شده است. در *E. coli* منطقه کلی باکترین به گروه فیلوژنیک B2 محدود شده و در لوکوس *tRNA asnW* قرار گرفته است (6، 14).

### مواد و روش ها

تعداد 18 نمونه بیوپسی روده بزرگ بیماران مبتلا به بیماری های التهابی روده از قبیل 12 نمونه افراد مبتلا به پولیپ 2 نفر مشکوک به پولیپ یا کولیت اولسراتیو و 4

پس از طراحی پرایمر اختصاصی برای ژن های *clbB* و *clbN*، آزمایش مولتی پلکس PCR برای DNAهای استخراج شده از باکتری های بیمار انجام شد. تکثیر ژن با حجم نهایی 25 میکرولیتر برای هر مخلوط واکنش بود. مقدار مورد نیاز از هر ماده برای انجام این آزمایش به شرح زیر است: 12/5 میکرولیتر Master mix، 9/5 میکرولیتر آب یونیزه، 1 میکرولیتر DNA، 0/5 میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای *clbB R* و *clbB F* و *clbN R* و *clbN F* از شرکت DreamTaq، Fermentase، Ca. پرایمرها از شرکت ژن فن آوران تهیه شد. میکروتیوب ها در ترموسیکلر Techno، UK در شرایط دمایی 94 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه، سپس 30 سیکل دمایی به صورت 94 درجه سانتی گراد، 56 درجه سانتی گراد و 72 درجه سانتی گراد و هر یک به مدت 30 ثانیه و در نهایت به مدت 5 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد گذاشته شد. پس از انجام آزمایش Multiplex PCR، محصولات حاصله بر روی ژل آگاروز 2٪ بررسی شد.

### نتایج

باکتری هایی که دارای منطقه ژنومی *pks* هستند قادر به توانایی تولید ژنوتوکسینی به نام کلی باکترین می باشند که می تواند منجر به ناپایداری ژنومی و شکست در DNA دو رشته ای شود. وجود چنین عوامل تحریک کننده ای می تواند با پیشرفت رو به رشد بیماری التهابی روده به سمت سرطان روده بزرگ همراه باشد. باکتری های فاقد منطقه ژنی *pks*، قادر به تولید این سم نیستند. در این تحقیق بافت روده بزرگ افراد سالم (فاقد باکتری *E. coli* واجد ژن PKS) و افراد مبتلا به بیماری التهابی روده بزرگ (دارای باکتری *E. coli* واجد ژن PKS) و نیز باکتری های *E. coli* جدا شده از بافت بیمار با باکتری های *E. coli* بافت افراد سالم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تصویرهای حاصله به وسیله میکروسکوپ

دمای 45 درجه سانتی گراد رسید از محیط حاوی باکتری به میزان 1 میلی لیتر درون پلیت ریخته و بعد محیط را به آن اضافه کرده و در جهت عقربه های ساعت پلیت چرخانده می شود تا محیط کاملاً پخش شود سپس به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد گرما گذاری انجام گرفت. پس از رنگ آمیزی گرم، کشت 4 مرحله ایی باکتری ها بر روی محیط افتراقی EMB انجام و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد گرما گذاری شد تا باکتری *E. coli* ایزوله شود. بعد از جداسازی و خالص سازی باکتری تست های بیوشیمیایی IMVIC، TSI و اوره برای باکتری مورد نظر انجام گرفت و پس از شناسایی به روش بیوشیمیایی یک پلیت کامل حاوی کشت تازه باکتری به درون 5 میلی لیتر محیط LB broth تلقیح کرده بدین منظور از باکتری هایی که در فاز لگاریتمی رشد بودند استفاده شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد گرما گذاری شد و سپس 750 میکرولیتر گلیسرول استریل به فالكون های حاوی باکتری خاص شده اضافه گردید و به درون ویال های استریل انتقال یافت و در فریزر 24- درجه سانتی گراد جهت نگهداری ذخیره شد.

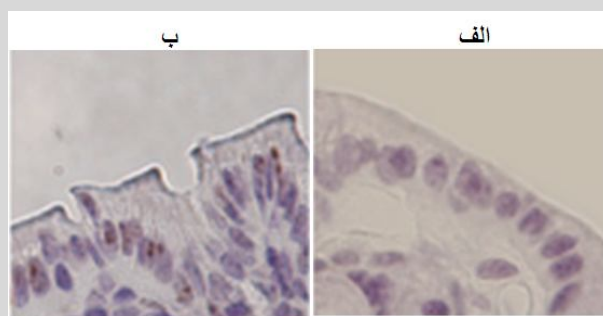
### استخراج ژنوم باکتری ها

پس از تلقیح باکتری ها در 5 میلی لیتر محیط مایع BHI و پس از گرما گذاری به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد (یعنی زمانی که باکتری ها در فاز لگاریتمی رشد بودند)، استخراج ژن از باکتری ها بر اساس دستورالعمل کیت دکتر شایان انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز بر روی ژل آگاروز 1٪ بررسی شد و کمیت آن ها توسط اسپکتروفتومتری در طول موج ها 260 و 280 نانومتر بررسی شد در نهایت DNA استخراج شده از باکتری ها در فریزر 20- درجه سانتی گراد ذخیره شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز چند گانه PCR Multiplex

بررسی شد. نتایج نشان می دهد این تغییرات در بافت در حضور *E. coli* واجد ژن PKS مثبت واضح تر است که احتمالاً در اثر کلی باکترین ترشح شده از باکتری های *E. coli* واجد ژن PKS ایجاد می شود (شکل 2).

نوری نشان دهنده تغییراتی در بافت روده بزرگ است. از آن جا که باکتری *E. coli*، به صورت فلور نرمال روده بزرگ می باشد، تغییرات بافتی در دو نوع بافت شامل بافت در حضور *E. coli* واجد ژن PKS مثبت و بافت روده بزرگ بدون حضور *E. coli* واجد ژن PKS مثبت



شکل 2- عکس میکروسکوپی بافت روده که با هماتوکسیلین آئوزین رنگ آمیزی شده است. شکل سمت راست (الف): بافت روده بزرگ بدون حضور *E. coli* واجد ژن PKS مثبت. شکل سمت چپ (ب) بزرگنمایی (X100) (ب): بافت روده بزرگ در حضور *E. coli* واجد ژن PKS مثبت (با بزرگنمایی X100).

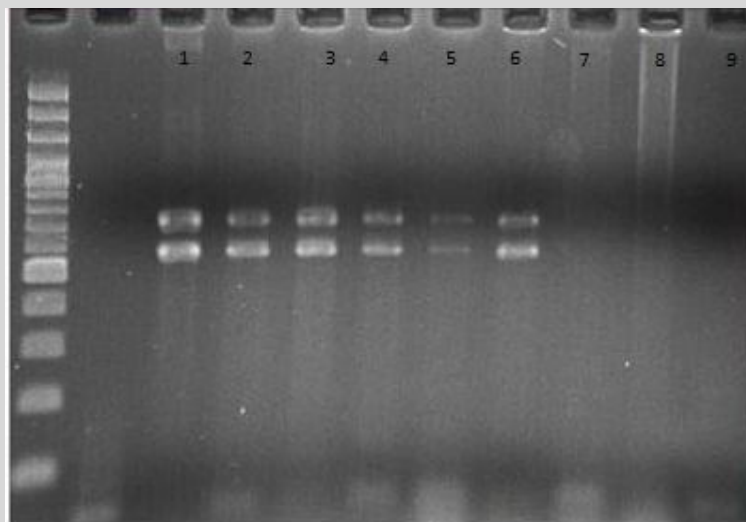
اخیراً افزایش شیوع باکتری *E. coli* در بیماری کرون و سرطان روده بزرگ گزارش شده است (11) و نیز حضور باکتری های مهاجم در هر دو بیماری سرطان روده بزرگ و بیماری کرون احتمالاً می تواند ناشی از نقش آن ها در ایجاد بیماری، مشابه با نقش هلیکوباکتر پیلوری در سرطان معده باشد (12). باوجود شباهت های زیست شناسی که بین بیماری التهاب روده و سرطان کولورکتال پراکنده وجود دارد به نظر می رسد که ترکیبات واسطه ای که طی عمل التهاب بوجود می آید می تواند باعث مهار مسیر آپوپتوزیس گردد (2) که این عمل به خودی خود نشانگر تعامل بین کولون و میکروبیوتای کولون است (20). مطابق نتایج این مطالعه، تصویر میکروسکوپ نوری حاصله از بافت روده دارای باکتری واجد ژن PKS مثبت نشان دهنده تغییراتی در بافت روده است که در اثر کلی باکترین ترشح شده از باکتری های *E. coli* واجد ژن PKS ایجاد می شود.

هم چنین نتایج حاکی از آن بود که باکتری ایزوله شده با رنگ آمیزی گرم، به صورت کوکوباسیل های قرمز رنگ در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. سپس باکتری ها به وسیله تست های بیوشیمیایی تشخیص داده شد. مطابق نتایج حاصله، باکتری *E. coli* از نظر تست های بیوشیمیایی دارای خصوصیات زیر است: مثبت برای تست های Indol، Motility و MR، اسیدی برای تست برای TSI و منفی برای تست های Urea و Citrate. نتایج آزمایش Multiplex PCR بر روی باکتری های *E. coli* ایزوله شده و شناسایی شده به صورت بالا، و پرایمرهای اختصاصی برای ژن های *clbB* و *clbN* نشان داد که 4 نمونه از 17 نمونه بیمار مبتلا به پولیپ، دارای ژن PKS بودند (23/5٪)، ولی در نمونه های کرون ژن مورد نظر یافت نگردید. در مقایسه با 20 نمونه بافت سالم روده بزرگ نیز دو تا از 20 نمونه دارای باند در منطقه مورد نظر (500-700 kb) مشاهده گردید (10٪) (شکل 3).

بحث و نتیجه گیری

سرطان روده بزرگ با هدف اثر چسبندگی باکتری های مخاطی به ویژه باکتری *E. coli*، را بررسی کردند و نتیجه گرفتند باکتری های مخاطی چسبنده در پاتوژنز بیماری کرون و سرطان روده بزرگ دارای نقش حیاتی می باشد. همچنین در این مطالعه باکتری *E. coli* از بافت مخاطی بیماران مبتلا به سرطان کرون و یا بیماری های التهابی روده جدا گردید (8).

همچنین از نظر مولکولی 23/5% افراد مبتلا به بیماری های التهابی روده، برای ژن های *clbB* و *clbN* (تولید کننده کلی باکتین) دارای باکتری *E. coli* واجد ژن *PKS* بود. این نتایج در راستای مطالعات مشابه است که در زیر به برخی از آن ها اشاره می شود. در سال 2004 Hellen Martin و همکارانش، تغییر گلیکوزیلاسیون مخاطی در بیماری های التهابی روده و



شکل 3- نتایج آزمایش Multiplex PCR برای ژن های محدوده ژنومی *PKS* بر روی ژل آگاروز 2%.

از چپ به راست: چاهک 1: *Ladder*، چاهک 2: کنترل منفی، چاهک 2: کنترل مثبت، چاهک های 3-6: نمونه های باکتریایی جدا شده از بیماران که واجد ژن منطقه *pks* بودند، چاهک های 7-9: نمونه های باکتریایی جدا شده از بیماران که فاقد ژن منطقه *pks* بودند.

کلبسیلا پنومونی، انتروباکترآئروژنز نیز وجود دارد (16). مطالعه بر روی *E. coli* جدا شده از بیماران مبتلا به کرون در مقایسه با بافت سالم روده بزرگ نشان داد اولاً فراوانی سویه های *E. coli* متعلق به گروه فیلوژنتیکی B2 در سرطان روده بزرگ در مقایسه با نمونه های روده بیشتر است. ثانیاً بخش انتهایی روده بزرگ نسبت به سایر بخش های آن در افراد مبتلا به سرطان روده دارای فراوانی بیشتری از باکتری های گروه B2 و سیکلومودولین ها است. سویه های *E. coli* گروه B2 دارای تعداد زیادی فاکتورهای بیماری زایی از جمله پیلی های چسبنده هستند که باعث اتصال به مجاری

از دید مولکولی، James R. Johnson و همکاران گزارش کردند که منطقه ژنومی *pks* از چندین ژن تشکیل شده است. ایشان فراوانی ژن *clbB* در سویه های جدا شده از خون و مدفوع را به ترتیب 58% و 32% اعلام کردند و فراوانی ژن های *clbB* و *clbN* در بافت روده بیماران مبتلا به بیماری های التهابی روده را به ترتیب 28% و 8% گزارش نمودند (9). در سال 2009، Johannes Putze و همکاران با مطالعه بر روی ساختار ژنتیکی و توزیع منطقه ژنتیکی کلی باکتین در میان اعضای خانواده انتروباکتریاسه، نشان داد این منطقه ژنی در میان خانواده انتروباکتریاسه علاوه بر *E. coli* در کلبسیلا کوسری،

دچار آسیب DNA می شوند ولی قادر به تعمیر به روش اتصال غیر همولگ ها هستند و می توانند چرخه سلولی و تقسیم سلولی را از سر بگیرند. در واقع عفونت روده بزرگ با دوز پایین *E. coli* واجد *pks* باعث فعال شدن واکنش های برگشت پذیر پاسخ آسیب DNA به همراه تقسیم سلولی می شود اما نشانه هایی از آسیب DNA باقی می ماند و می تواند در بیماری های التهابی روده موثر باشد (19). از آنجا که فلور میکروبی فرد سالم، استقرار پاتوژن ها را مهار می کند، التهاب روده بزرگ موجب استقرار پاتوژن های روده ای مانند *E. coli* می شود. اگر اپی تلیوم، به عنوان اولین لایه دفاعی روده در مقابل آنتی ژن ها و باکتری ها درست کار نکند، احتمال عفونت باکتریایی و التهاب روده افزایش می یابد که در بیماران با التهاب روده مشاهده شده است. مطالعات نشان داده است در تعدادی از بیماری ها مانند IBD روابط همزیستی میزبان و فلور میکروبی شکست می خورد. سابقه بیماری - های روده ای مانند IBD، کولیت اولسراتیو و بیماری کرون احتمال ابتلا به سرطان کولورکتال را افزایش می - دهد زیرا در این بیماری ها روده بزرگ به مدت طولانی ملتهب می باشد (19). بنابراین التهاب فیزیولوژی میزبان را برای ترویج سرطان تغییر می دهد که در کولیت مرتبط با سرطان کولورکتال (Colitis-associated CRC) دیده شده است. یکی از محدودیت های این مطالعه، تعداد نمونه ها است که در صورت افزایش آن ها، جواب های جامع و کامل به دست خواهد آمد.

اداراری می گردد. احتمال دارد این فاکتور چسبندگی به ویژه در گروه B2 موجب اتصال باکتری و تجمع آن ها در سرطان روده بزرگ نیز بشود (16، 10، 7، 1). نتایج انجام مطالعات آزمایشگاهی بر روی موش ها نشان می - دهد ژنوتوکسین کلی باکترین باعث شکسته شدن دو رشته DNA و افزایش فسفوریلایسیون هیستون H2AX در سلول های اتروسیت موش می گردد. هیستون H2AX به عنوان نشان گر حساس برای شکست دو رشته DNA محسوب می شود. از طرفی ژن *ClaA* جزء منطقه ژنی *pks* است که آنزیم فسفو پنتیل ترانسفراز را کد می - کند. این آنزیم برای تولید ژنوتوکسین از *pks* و NRPS ضروری است. آزمایشات تکمیلی نشان داد موش های آلوده شده با سوش های دارای جهش ژنی در *clbA*، سطح H2AX طبیعی دارند در حالی که سطح H2AX در کولون موش های آلوده به سوش های *E. coli* واجد ژن *2/7clbA* یعنی سه برابر سطح طبیعی H2AX است (3). بررسی ها نشان می دهد در روشی که موش ها به مدت 5 روز تحت درمان با آنتی بیوتیک های استرپتومایسین، با سیترا سین و نئومایسین بودند به باکتری *E. coli* واجد ژن *pks* آلوده شدند. در واقع آلوده شدن با دوز پایین در باکتری *E. coli* دارای منطقه ژنی *pks* می تواند باعث ایجاد آسیب در سلول های اپی تلیال روده و متعاقب آن پاسخ آسیب DNA گذرا شود. طی تعمیر ناقص DNA در چرخه تقسیم سلولی، دو رشته DNA شکسته شده و از یک دیگر جدا می شود. بنابراین سلول هایی که در معرض تعداد کمتری از باکتری های واجد *pks* هستند،

#### منابع

1. An, Y., Jin, G., Wang, H., Wang, Y., Liu, H. (2008). Polymorphisms in hMLH1 and risk of early-onset lung cancer in a southeast Chinese population. *Lung Cancer*, 59; 164-170.  
2. Chichlowski, M., Hale, LP. (2008). Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease: an alliance gone bad. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295; G1139-49.

3. Cuevas-Ramos, G., Petita, CR., Maraca, I., Bourya, M., Oswald, E., Nougayrède, JP. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *PNAS*, 107(25); 11537-11542.  
4. DiSario, JA., Foutch, PG., Mai, HD., Pardy, K., Manne, RK. (1991). Prevalence and malignant potential of colorectal polyps in



- asymptomatic, average-risk men. *Am J Gastroenterol*, 86(8); 941-5.
5. Escobar-Páramo, P. (2004). Large-scale population structure of human communal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol*, 70; 5698-5700.
6. Gisselsson, D. (2000). Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97; 5357-5362.
7. Hirata, H., Hinoda, Y., Kawamoto, K., Kikuno, N., Suehiro, Y. (2008). Mismatch repair gene MSH3 polymorphism is associated with the risk of sporadic prostate cancer. *J Urol*, 179; 2020-2024.
8. Helen, MM. (2004). Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*, 127;80-93.
9. Johnson, JR., Johnston, B., Kuskowski, MA., Nougayrede, JP., Oswald, E. (2008). Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *J Clin Microbiol*, 46; 3906-3911.
10. Koessler, T., Oestergaard, MZ., Song, H., Tyrer, J., Perkins, B. (2008). Common variants in mismatch repair genes and risk of colorectal cancer. *Gut*, 57; 1097-1101.
11. Kurokawa, K. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res*, 14; 169-181.
12. Maloy, KJ., Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474; 298.
13. Nowrouzian, FL., Wold, AE., Adlerberth, I. (2005). *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J Infect Dis*, 191; 1078-1083.
14. Nougayrede, JP., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*, 313; 848-851.
15. Parkin, DM. (2004). International variation. *Oncogene*, 23(38); 6329-40.
16. Putze, J. (2009). Genetic structure and distribution of the colibactin among members of the family Enterobacteriaceae. *Infect Immun*, 77; 4696-4703.
17. Rickert, RR., Auerbach, O., Garfinkel, L., Hammond, EC., Frasca, JM. (1979). Adenomatous lesions of the large bowel: an autopsy survey. *Cancer*, 43(5); 1847-57.
18. Rhodes, JM. (1996). Unifying hypothesis for inflammatory bowel disease and associated colon cancer: sticking the pieces together with sugar. *Lancet*, 347; 40-44.
19. Rogakou, EP., Pilch, DR., Orr, AH., Ivanova, VS., Bonner, WM. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273; 5858-5868.
20. Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M., Weber, J. (1998). Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology*, 115; 281-286.
-