

بررسی مولکولی ژن های clbA و clbS در باکتری های/شرشیاکلی جدا شده از بافت های توموری کولورکتال

ساجده سحری^۱، شهلا محمد گنجی^{۲*}، مجتبی سهرابی^۱، عطیه سلیقه^۱

۱ - گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

۲ - پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

چکیده:

مقدمه: برخی سویه های/شرشیاکلی که دارای مجموعه ژنی PKS (پلی کتاید سینتاز) هستند، قادرند ژنوتوکسینی به نام کلی باکترین (Colibactin) را تولید کنند. کلی باکترین در باکتری های PKS مثبت با فعال شدن مسیر سیگنالینگ، باعث آسیب به DNA و در نتیجه گسترش تومور (مانند سرطان کولورکتال) می شود. هدف از این مطالعه بررسی مولکولی ژن های clbA و clbS (دو ژن از ژن های جزیره ژنی PKS) در باکتری های/شرشیاکلی جدا شده از بافت های توموری کولورکتال است.

مواد و روش ها: بدین منظور ۷۹ نمونه بیوپسی از بافت روده ۷۹ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال، پس از اخذ پرسشنامه و رضایت نامه تهیه گردید. با روش های میکروبی و بیوشیمیایی باکتری اشرشیاکلی جدا سازی و شناسایی شد. سپس سویه ها از نظر وجود ژن های clbA و clbS با روش PCR ارزیابی شدند.

یافته ها: باکتری های اشرشیاکلی ایزوله شده از نظر تست های بیوشیمیایی موتیلیتی، متیل رد، اندول و تی اس آی مثبت و برای تست های سیترات و اوره منفی بودند. نتایج آزمایش PCR نشان داد از بین ۷۹ سویه مورد بررسی، در ۶۶/۶٪ افراد نرمال، ۴۰/۹٪ از بیماران مبتلا به التهاب روده بزرگ و ۵۹٪ از مبتلایان به سرطان کولورکتال حضور ژن ویرولانس clbA و هم چنین در ۵۰٪ افراد نرمال و بیماران التهاب روده بزرگ و ۵۸/۶۲٪ مبتلایان به سرطان کولورکتال حضور ژن ویرولانس clbS مثبت بود. هم چنین ۲۷/۸٪ نمونه ها، واجد هر دو ژن (clbA/clbS) بود.

بحث: هر دو ژن clbA و clbS جزء ژن های ضروری جزیره ژنی PKS هستند. با توجه به نتایج به دست آمده و اهمیت کلی باکترین و رابطه آن با ایجاد سرطان کولورکتال، مطالعه کامل تر در این زمینه ضروری به نظر می رسد.

واژه های کلیدی: سرطان کولورکتال، اشرشیاکلی، ژن های clbA و clbS، کلی باکترین.

مقدمه

سرطان کولورکتال بیماری است که چندین فاکتور در ابتلا به آن نقش دارند که یکی از مهم ترین آن ها ابتلا به عفونت های

نویسنده مسئول:

پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری،

تهران، ایران

پست الکترونیکی: shahlamg@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۵

باکتریایی است (۱). طی عفونت با نوع خاصی از باکتری اشرشیاکلی در افراد مبتلا به سرطان کولورکتال، به علت از بین رفتن سد اولیه دفاعی سلول های اپی تلیال روده به راحتی به بافت روده دسترسی پیدا کرده و با استفاده از التهاب موجود، شرایط فلور میکروبی روده را برای پاتوژن خود مهیا می کند (۷). یکی از باکتری های فلور میکروبی روده بزرگ، اشرشیاکلی است که سویه های خاصی از این باکتری می توانند عامل میکروبی سرطان روده بزرگ شود. این سویه ها واجد توالی

کولورکتال است و گروه تحقیقاتی حاضر، برای اولین بار این ارتباط را بر روی جمعیت ایرانی مبتلا به سرطان روده بزرگ بررسی نمود.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها و جداسازی اشرشیاکلی

با توجه به شیوع سرطان کولورکتال در ایران، و مشاوره با متخصص آمار زیستی، مقرر شد حداقل ۳۰ نمونه از بیماران ایرانی مورد آزمایش قرار گیرد. بنابراین در این پروژه تحقیقاتی، ۶ نمونه نرمال و ۴۴ نمونه بیماری التهابی روده بزرگ (بیماری التهابی روده بزرگ شامل پولیپ، کولیت اولسراتیو و کرون دیزیز) از مرکز کولونوسکوپی بیمارستان شهید بهشتی استان قم و با تأیید تست های پاتولوژی و کلینیکی جمع آوری گردید. همچنین تعداد ۲۹ نمونه از افراد مبتلا به سرطان کولون با تأیید تست های پاتولوژیک از مرکز کولونوسکوپی بیمارستان شهید بهشتی و بیمارستان ولیعصر قم و بیمارستان امام تهران تهیه گردید. نمونه ها بیوپسی کولون بود که در افراد مبتلا به سرطان کولون این نمونه از محل تومور تهیه گردید و در سریع ترین وقت ممکن در روی یخ در میکروتیوپ استریل شده حاوی بافر فسفات به آزمایشگاه دانشگاه آزاد واحد قم منتقل گردید. جهت جمع آوری نمونه تازه، پس از هماهنگی با مسئولین بیمارستان های اشاره شده، فرم های پرسش نامه طرح تحقیقاتی و رضایت نامه توسط بیماران تکمیل و امضا شد و در کمیته اخلاق پزشکی آن مرکز تصویب شد.

برای جداسازی باکتری اشرشیاکلی از بافت روده بزرگ بیماران محیط های کشت مغذی از جمله محیط، LB broth و افتراقی برای باکتری های خانواده انتروباکتریاسه، EMB Agar و محیط های بیوشیمیایی از جمله Urea agar، IMViC، TSI و بافر PBS جهت شستشوی اولیه قسمتی از بافت مورد استفاده قرار گرفت. تمامی محیط های کشت از شرکت MERCK آلمان 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 ۵ ml محیط LB broth و دیگری در ارلن حاوی ۵ ml بافر PBS ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار

حفاظت شده ای به نام جزایر ژنی PKS (پلی کتاید سنتز) هستند. پلی کتایدها دسته ای از متابولیت های ثانویه بوده که دارای خاصیت های متنوعی از جمله خاصیت دارویی است. پلی کتاید به همراه پپتید غیرریبوزومی تشکیل هیبرید می دهند و باعث تولید ژنوتوکسینی به نام کلی باکترین (Colibactin) می شوند. هر دو نوع باکتری کومنسال و پاتوژن اشرشیاکلی در روده بزرگ یافت شده است. کلی باکترین در باکتری های انتروباکتریاسه دیده شده است (۱۴). کلی باکترین در باکتری های واجد ژن PKS، بافعال شدن مسیر سیگنالینگ، باعث آسیب به DNA دو رشته ای شده و متعاقب آن منجر به جهش های ژن، بی ثباتی کروموزومی و پیری زودرس و در نهایت تومورزایی در نتیجه گسترش تومور (مانند سرطان کولورکتال) و تشدید لمفومینا در مدل های حیوانی می شود (۱۶). از بین ژن های این جزیره ژنی، دو ژن clbA و clbS برای بررسی در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

ژن clbA جزء منطقه ژنی PKS بوده که آنزیم فسفوپنتیل ترانسفراز را کد می کند. این آنزیم برای تولید ژنوتوکسین از PKS و NRPS ضروری است. آزمایش ها نشان می دهد، 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 اشرشیاکلی واجد ژن clbA سه برابر سطح طبیعی H2AX است.

clbS برای ژنوتوکسیتی E.coli PKS+ و برای سنتز کلی باکترین یا trafficking لازم نیست. ولی برای سلامتی باکتری تولید کننده ژنوتوکسین ضروری است. ویژگی پیوند پروتئین clbS به دارو، فعال سازی پاسخ SOS، فنوتیپ خود-سمیت و افزایش حساسیت جهش uvrB در پیش زمینه clbS و حفاظت سلول های HELA بیان کننده GFP-clbS از این فرضیه حمایت می کند که clbS پروتئین مقاومت کلی باکترین است.

Kunzman و همکارانش در سال ۲۰۱۲ به فعالیت استراز، پپتیداز یا پروتئاز در پروتئین clbS پی بردند و نشان دادند که clbS مانند پروتئین پنهان کننده کلی باکترین عمل می کند و عملکرد حفاظت کننده clbS مخصوص کلی باکترین است (۱۰). هدف از این تحقیق، بررسی مولکولی ژن های clbS و clbA (دو ژن از ژن های جزیره ژنی PKS و تولید کننده کلی باکترین) در باکتری های اشرشیاکلی جدا شده از بافت های توموری

در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها بیرون آورده شد و تعیین رقت در محیط‌های حاوی ۹ ml بافر PBS انجام گرفت. سپس براساس پروتکل میکروبی از تمامی رقت‌ها نمونه بر روی محیط افتراقی مک کانکی آگار برده شد به‌صورتی که هنگامی که محیط به دمای ۴۵ درجه سلیسیوس رسید از محیط حاوی باکتری به میزان ۱ ml درون پلیت ریخته و بعد محیط را به آن اضافه کرده و در جهت عقربه‌های ساعت پلیت چرخانده می‌شود تا محیط به‌طور کامل پخش شود سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری انجام گرفت.

پس از رنگ‌آمیزی گرم، کشت ۴ مرحله‌ای باکتری‌ها بر روی محیط افتراقی EMB انجام و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شد تا باکتری اشرشیاکلی ایزوله شود.

بعد از جداسازی و خالص‌سازی باکتری تست‌های بیوشیمیایی TS I+IMViC و اوره برای باکتری مورد نظر انجام گرفت و پس از شناسایی به‌روش بیوشیمیایی یک پلیت کامل حاوی کشت تازه باکتری به درون ۵ ml محیط LB broth تلقیح کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شد. سپس ۷۵۰ μ L گلیسرول استریل به فالکون-های حاوی باکتری خاص شده اضافه گردید و به درون ویال-های استریل انتقال یافت و در فریزر ۲۰- درجه سلیسیوس جهت نگهداری ذخیره گردید.

استخراج DNA از نمونه‌ها

پس از تلقیح باکتری‌ها در ۵ ml محیط مایع BHI و پس از گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C استخراج DNA از باکتری‌ها براساس دستورالعمل کیت شایان انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ بررسی شد و کمیت آن‌ها توسط اسپکتروفتومتری در طول موج‌ها ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ارزیابی گردید. در نهایت DNA استخراج شده از باکتری‌ها در فریزر ۲۰°C- ذخیره شد.

واکنش مولکولی PCR

پس از طراحی پرایمر اختصاصی برای ژن‌های *clbA* و *clbS* (مطابق جدول ۱) و سفارش سنتز به شرکت کیاژن، آزمایش PCR برای DNAهای استخراج شده از نمونه‌ها انجام شد. تکثیر ژن با حجم نهایی ۸ میکرولیتر برای هر مخلوط واکنش

بود. مواد مورد نیاز برای انجام این آزمایش به‌شرح زیر است: پرایمرهای *clbS* R، *clbS* F، *clbA* R، *clbA* F (۱۰) میکروگرم از هریک، DNA (۱۰۰ نانوگرم)، Master mix DreamTaq از شرکت Fermentase Ca (مطابق دستور کار کیت) و آب مقطر استریل تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر. پرایمرها از طریق شرکت ژن فن‌آوران توسط شرکت سنتز شد. جهت بررسی و تکثیر ژن *clbA* میکروتیوب‌ها در ترموسیکلر Techno انگلستان گذاشته شد و در ادامه طبق برنامه فرآیند PCR انجام گرفت. برای این منظور دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، سپس جهت تکثیر ژن هدف طی ۳۵ چرخه، در هر چرخه دنا تورا سیون در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۷ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه انجام پذیرفت و در انتها جهت طولیل شدن نهایی دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد.

برای ژن *clbS* جهت انجام دنا تورا سیون اولیه دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، سپس جهت انجام دنا تورا سیون هر چرخه دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و طولیل شدن دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه هر سه ۳۵ سیکل و جهت طولیل شدن نهایی دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. پس از انجام آزمایش PCR، محصول‌های بر روی ژل آگاروز ۱٪ بررسی شد. نتایج این مطالعه با آزمون آماری t-Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در صورتی P-Value معنادار در نظر گرفته شد که ($p < 0.05$) بود.

جدول ۱: جدول توالی پرایمر ژن‌های *clbS*، *clbA*

نام پرایمر	سکانس	طول قطعه
<i>clbA</i> _F	CTAGATTATCCGTGGCGATTC	1002 bp
<i>clbA</i> _R	CAGATACACAGATACCATTC	
_F <i>ClbS</i>	TTATCCTGTTAGCTTTTCGTTTC	821 bp
<i>ClbS</i> _F	TTGTATAGTTACACAACATTTTC	

یافته‌ها

در این مطالعه ۷۹ نمونه بیوپسی مورد بررسی قرار گرفت که ۷/۵٪ نمونه‌ها را افراد نرمال تشکیل می‌داد و به ترتیب ۳۶/۷٪ و ۵۵/۱٪ نمونه‌ها مربوط به مبتلایان به سرطان کولورکتال و مبتلایان به بیماری التهابی روده بزرگ (بیماری التهابی روده بزرگ شامل پولیپ، کولیت اولسراتیو و کرون دیزیز) را تشکیل می‌دهد.

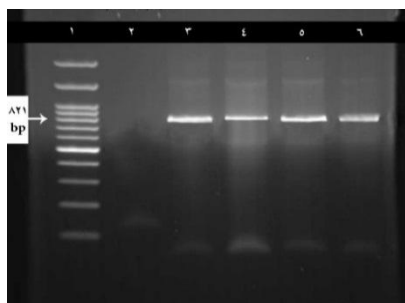
نتیجه بررسی مولکولی

تجزیه و تحلیل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای ژن ویروالانس clbS نشان داد که از بین ۷۹ سویه مورد بررسی در ۵۰٪ از سویه‌های جدا شده از بافت نرمال و نیز ۵۰٪ از سویه‌های جدا شده از بیماری التهابی روده بزرگ و ۵۸/۶۲٪ در سویه‌های جدا شده از بافت مبتلا به سرطان کولورکتال، ژن فوق وجود دارد. بررسی‌های آماری نشان داد که بین گروه‌های مورد بررسی از لحاظ وجود ژن clbS اختلاف معناداری وجود ندارد ($p=0.5$).

نتیجه بررسی‌های آزمایشگاهی الکتروفورز محصول‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با پرایمر اختصاصی ژن clbS بر روی ژل آگارز ۱٪ در تصویر شماره (۳-۲) نشان داده شده است. در صورتی که اندازه باند ۸۲۱ bp باشد، نشان دهنده این است که نمونه مورد نظر واجد ژن clbS است (شکل ۱).

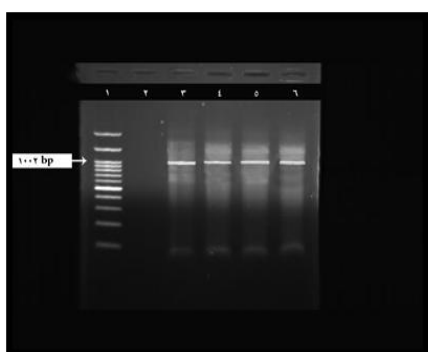
نتیجه بررسی‌های آزمایشگاهی الکتروفورز محصول‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با پرایمر اختصاصی ژن clbA بر روی ژل آگارز ۱٪ در شکل ۲ نشان داده شده است. در صورتی که اندازه باند ۸۲۱ bp باشد، نشان دهنده این است که نمونه مورد نظر واجد ژن clbS است.

تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که در این مطالعه، ۲۷/۸٪ نمونه‌ها، واجد هر دو ژن (clbA/clbS) هستند. از آنجا که این دو ژن جزو ژن‌های ضروری جزیره ژنی PKS هستند، مطالعه بیش‌تر و تکمیلی برای این نمونه‌ها ضروری به نظر می‌رسد. زیرا همکاری ژن‌های موجود در جزیره ژنی PKS است که باعث تولید و ترشح کلی باکترین می‌شود.



شکل ۱: الگوی وجود ژن clbS در سویه‌های اشرشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بافتی بیماران بر روی ژل آگارز ۱٪. به ترتیب از چپ به راست: چاهک ۱: مارکر مولکولی (۱۰۰ bp از شرکت Sinaclone). چاهک ۲: کنترل منفی (میکروتیوب واجد همه موادها و فاقد DNA). چاهک ۳: کنترل مثبت. چاهک‌های ۴-۶: سه سویه واجد ژن clbS که از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال جدا شده بود. اندازه باند مورد نظر، ۸۲۱ bp است.

تجزیه و تحلیل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای ژن ویروالانس clbA نشان داد که از بین ۷۹ سویه مورد بررسی، در ۶۶/۶٪ افراد نرمال، ۴۰/۹٪ از بیماران مبتلا به التهاب روده بزرگ و ۵۹٪ از مبتلایان به سرطان کولورکتال حضور ژن ویروالانس clbA مثبت بود.



شکل ۲: الگوی وجود ژن clbA در سویه‌های اشرشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بافتی بیماران بر روی ژل آگارز ۱٪. به ترتیب از چپ به راست: چاهک ۱: مارکر مولکولی (۱۰۰ bp از شرکت Sinaclone). چاهک ۲: کنترل منفی (میکروتیوب واجد همه موادها و فاقد DNA). چاهک ۳: کنترل مثبت. چاهک‌های ۴-۶: سه سویه واجد ژن clbA که از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال جدا شده بود. اندازه باند مورد نظر، ۸۲۱ bp است.

بحث

مطالعه‌های اخیر ارتباط ترکیب میکروبی روده و سرطان را به خوبی تأیید می‌کند. از آنجا که باکتری اشرشیاکلی رایج‌ترین علت عفونت مجاری ادراری (urinary tract infections) است و اولین بار Esherich در ۱۸۸۵ توصیف کرد که اشرشیاکلی یا باکتریوم کلای یا باسیل روده بزرگ، باسیل گرم

منفی، متعلق به انتروباکتریاسه است. به طور گسترده در روده افراد و حیوانات است و بی‌هوازی اختیاری غالب در روده است. مطالعه‌ها نشان داده است در بیماری‌های التهابی روده بزرگ (Inflammatory bowel disease)، روابط هم‌زیستی میزبان و فلور میکروبی شکست می‌خورد و حتی سابقه احتمال ابتلا به سرطان کولورکتال (colorectal cancer) نیز دیده شده است. گرچه مکانیسم دقیق التهاب روده‌ای که منجر به سرطان کولورکتال می‌شود ناشناخته است، لیکن التهاب کرون می‌تواند منجر به تجمع باکتری‌های ترویج کننده سرطان شود که یک تغییر بزرگ در میکروبیوتا ایجاد می‌کند (۴).

kavas Romass و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان دادند توکسین کلی‌باکترین در سویه‌های باکتری (clb+) باعث شکست DNA دو رشته‌ای شده و در نهایت منجر به جهش‌های ژن، بی‌ثباتی کروموزومی و پیری زودرس و در نهایت هدایت به سمت تومورزایی در نتیجه گسترش تومور (مانند سرطان کولورکتال) و تشدید lymphopenia در مدل‌های حیوانی می‌شود.

Arthur و همکارانش در سال ۲۰۱۲ طی تحقیقاتی که بر روی سویه اشرشیاکلی NC101 جدا شده از روده به‌منظور بررسی ارتباط بین PKS Island و بیماری‌های IBD و CRC انجام دادند متوجه شدند از میان ۳۵ نمونه IBD و ۲۱ نمونه CRC و ۲۴ نمونه که از لحاظ بیماری‌های التهابی روده و سرطان کولورکتال سالم بودند و به‌عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شدند حدود ۲۰/۸٪ در نمونه‌های کنترل و ۴۰٪ در نمونه‌های بیماری IBD و ۶۶/۷٪ از نمونه‌های CRC دارای محدوده‌های ژنومی PKS هستند (۲).

طی مطالعه‌ای که Prorok-Hamon و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی سویه‌های اشرشیاکلی تولید کننده ژنوتوکسین و سیکلوماژولین در سرطان کولون انجام دادند به این نتیجه رسیدند که سویه‌های تولید کننده ژنوتوکسین کلی‌باکترین با فراوانی بالاتری در سرطان کولون حضور دارد که متعلق به گروه B2 فیلوژنی است (۱).

Dalmasso و همکارانش در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که ژنوتوکسین کلی‌باکترین باعث شکسته شدن دو رشته DNA و افزایش فسفوریلاسیون هیستون H2AX در سلول‌های انتروسیت موش می‌گردد. هیستون H2AX به‌عنوان نشانگر

حساس برای شکست دو رشته DNA محسوب می‌شود (۵).

مطالعه‌های Dastjani Farahani و همکارانش در سال ۲۰۱۵ نشان داد، عفونت با نوع خاصی از باکتری اشرشیاکلی در افراد مبتلا به بیماری‌های التهابی روده، به‌خصوص کولیت اولسراتیو، می‌تواند باعث شروع سرطان کولورکتال شود. این باکتری‌ها با استفاده از التهاب موجود، شرایط فلور میکروبی روده را برای پاتوژن خود مهیا می‌کنند. باکتری با تولید توکسین ترشحی کلی‌باکترین که به‌عنوان متابولیت ثانویه باکتری مطرح است، با اختلال در سیکل سلولی باعث شروع، پیشرفت و توسعه سرطان کولورکتال می‌گردد (۷).

Nougayrède و همکارانش، در ادامه تحقیقاتشان بر روی خوشه ژنی PKS پی بردند ClbS برای ژنوتوکسیتی باکتری اشرشیاکلی با جزایر PKS لازم نیست. ایشان هم‌چنین نشان دادند که ClbS اشرشیاکلی یک پروتئین مقاومت در کلی‌باکترین است (۱۳).

در خصوص بررسی مولکولی ژن‌های خوشه ژنی PKS، مطالعه‌هایی در خارج از کشور و ایران انجام شده است. از جمله مطالعه‌های انجام شده در ایران می‌توان به مقاله‌های منتشره توسط گروه تحقیقاتی ما اشاره کرد که به‌اختصاص بر روی ژن‌های clbA و clbB کار شده است (۷).

اما در خصوص بررسی مولکولی ژن‌های clbA و clbS بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی جدا شده از بافت‌های توموری کولورکتال، این تحقیق اولین مطالعه در ایران است.

در این مطالعه مشخص شد که ۲۷/۸٪ نمونه‌ها، واجد هر دو ژن (clbA/clbS) هستند. از آن‌جا که این دو ژن جزو ژن‌های ضروری جزیره ژنی PKS هستند، مطالعه بیش‌تر و تکمیلی برای این نمونه‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد. زیرا همکاری ژن‌های موجود در جزیره ژنی PKS است که باعث تولید و ترشح کلی‌باکترین می‌شود.

در این مطالعه وجود ژن clbA در نمونه‌های باکتری با فراوانی معنی‌داری تأیید شد. با دانستن نقش مهم و کلیدی این ژن‌ها در بیماری‌زایی سویه‌های ایجاد کننده در عفونت‌های روده و ایجاد التهاب و سرطان کولورکتال و با وجود هزینه‌های زیادی که هر ساله برای درمان این نوع عفونت‌ها بر جامعه و خانواده

تحمیل می شود می توان طراحی واکسن علیه این بیماری را پیشنهاد نمود.

مشکلات تهیه بافت تازه روده انسانی و کوچک بودن جامعه آماری، مشکلاتی که باعث تکمیل ناقص پرسشنامه ها شد (مانند بدحال بودن بیمار، کم اطلاعی یا بی اطلاعی بیمار و همراه و...) از جمله محدودیت هایی بودند که با آن مواجه شد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می دانند از متخصصین گوارش بیمارستان شهید بهشتی استان قم، آقایان دکتر سرکشیکیان، دکتر محمدرضا قدیر، دکتر پزشکی، دکتر ایرانی خواه و جراح بیمارستان ولیعصر استان قم آقای دکتر علی بزم و از آقای دکتر امینی و همکاران در کلینیک گوارش بیمارستان بقیه ا... (عج) و نیز مسئولان محترم تومور بانک ایران واقع در بیمارستان امام خمینی تهران جهت همکاری ارزشمندشان در تهیه نمونه های بیوبسی از بیماران و افراد نرمال، سپاسگزاری نمایند.

منابع

1. Antunes LCM, M. J., Schroeter K, Carlucci C, Ferreira RBR, Wang M, et al (2014). "Antivirulence Activity of the Human Gut Metabolome." *mBio*.
2. Arthur JC, P.-C. E., hlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan T-J, et al (2010). "Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota." *Science October 5* 338(6103):120- 3.
3. Bian x, P. A., Zhang Y, Muller (2015). "Two more pieces of the colibactin genotoxin puzzle from *Escherichia coli* show incorporation of an unusual 1-aminocyclopropanecarboxylic acid moiety." *Chem. Sci* 6, 3154.
4. Cuevas-Ramos G, P. C., Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède J-P (2010). "Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(25):11537-542.
5. Dalmasso G, C. A., Delmas J, Darfeuille Michaud A and Bonnet (2014). "The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment." *Gut Microb* 5, 675.
6. Dehghani M, Hafezi N, Vojdani R, Ramzi M, Karimi M, Nourani H, et al. Hematologic Toxicities in Colorectal Cancer Patients who Received FOLFOX4. *Middle East Journal of Cancer*. 2015;6(3):171-7.
7. Fariba Dastjani Farahani, M. S., Shahla Mohammad Ganji (2015). "Study of relationship between a strain of *E. coli* and colorectal cancer." *Iranian Journal of Medical Microbiology* 9.
8. Guerra L, G. R., Frisan T (2011). "bacterial genotoxins contribute to chronic inflammation, genomic instability and tumor progression? ." *Febs Journal* 278(23):4577-588.
9. Hagggar FA, B. R. (2009). "Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors." *Clin Colon Rectal Surg* 22(4):191-7.
10. Kunzman M.H., a. S. S. A. (2012). "Target analysis of α -alkylidene- γ -butyrolactones in uropathogenic *E. coli*." *Mol Biosyst* 8: 3061–3067
11. Maelle Prorok-Hamon, M. K. F., Abdullah Alswied, Carol L Roberts, Fei Song, Paul K Flanagan, Paul Knight, Caroline Codling, Julian R Marchesi, Craig Winstanley, Neil Hall, Jonathan M Rhodes, Barry J Campbell (2013). "Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing lpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer." *Gut microbiota*.
12. Moradi A, K. M., Guya MM, Mirzaei HR, Salmanian R, Rakhsha A, et al (2009). "Survival of colorectal cancer in Iran." *Asian Pac J Cancer Prev* 10(4):583-86.
13. Nougayrède JP, D. D., Petit C, Tronnet S, Martin P, Bonnet R, Oswald E, Bossuet-Greif N (2015). "Escherichia coli ClbS is a colibactin resistance protein." *Molecular Microbiology* 13272.
14. Nougayrède J-P, H. S., Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, et al (2006). "Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells." *Science* 313(5788):848-51.
15. Nougayrède JP, P. C., Oswald E. Role of genotoxic bacteria in colorectal cancer (2013). "Role of genotoxic bacteria in colorectal cancer." *Revue Francophone Des Laboratoires* 10.1016/S1773-035X (13)72226-3.
16. Nowruz Najafzadeh, B. E., Maryam Dastan Imchek (2015). "Hair follicle stem cells: In vitro and in vivo neural differentiation." *world J stem cells* 7(5): 866–872.

