

مقایسه فراوانی ژن های *vat1* و *fimC* در جدایه های اشیریشیاکولی بافتی مبتلایان به سرطان کولورکتال و بیماری التهابی روده بزرگ در جمعیت ایرانی

عطیه سلیقه^۱، محسن زرگر^{۱*}، شهلا محمد گنجی^۲

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

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

چکیده:

سابقه و هدف: بررسی ها نشان داده است که بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده بزرگ در معرض خطر بالای ابتلا به سرطان قرار دارند. باکتری اشیریشیاکولی یکی از عواملی است که در ایجاد بیماری التهابی روده بزرگ و سرطان کولورکتال نقش دارد. **مواد و روش ها:** ۳۸ نمونه بیوپسی از بافت روده تهیه گردید و با روش های میکروبی و بیوشیمیایی باکتری جداسازی و شناسایی شد. پس از استخراج ژنوم سویه ها از نظر وجود ژن های ویروالانس *vat1* و *fimC* با روش واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)، ارزیابی شدند. **یافته ها:** بررسی مولکولی نشان داد که اختلاف معناداری بین گروه های مورد بررسی از لحاظ ژن *vat1* ($p=0.0245$) وجود دارد درحالیکه اختلاف معناداری بین گروه ها از لحاظ ژن *fimC* وجود ندارد ($P=0.201$).

نتیجه گیری: نتایج کسب شده به خوبی رابطه ژن های ویروالانس مورد بررسی را با القا التهاب و القا ازدیاد نرخ جهش تایید می کند. **کلمات کلیدی:** سرطان کولورکتال، بیماری التهابی روده، اشیریشیاکولی، ژن های ویروالانس *vat1*، *fimC*

مقدمه

متفاوتی از بیماری التهابی روده و سرطان را منجر شوند. اجتماعات مترکم باکتریایی که در دستگاه گوارش زندگی می کنند و در آنجا عملکرد گسترده ای دارند، میکروبیوتا^۱ خوانده می شوند، تغییر فلور میکروبی منجر به بیماری های حاد دستگاه گوارش مانند بیماری التهابی روده و سرطان کولورکتال می شود. در مطالعه های انجام شده مشاهده شده است که بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده در معرض خطر بالایی از کولیت مرتبط با سرطان کولورکتال می باشند. ایجاد التهاب مزمن به احتمال زیاد در پیدایش سرطان های دستگاه گوارش مهم می باشد زیرا حدود ۳۰٪ از بیماری های التهابی روده همراه با سرطان کولورکتال گزارش گردیده است (۴،۲۷).

باکتری های مختلفی از جمله انواع پاتوژن باکتری اشیریشیاکولی^۴ در ایجاد سرطان کولورکتال نقش دارند. اکثر سویه های اشیریشیاکولی به صورت کامنسال در دستگاه گوارشی انسان و دام ها حضور دارند اما برخی از آن ها بیماری زا بوده قابلیت تولید و ترشح طیف وسیعی از عوامل ویروالانس را دارا می باشند که بر این اساس به پاتوتیپ های مختلفی تقسیم می شوند (۱۶). اهمیت هر کدام از عوامل ویروالانس به وضعیت میزبان، محل عفونت، و توان ژنتیکی سویه خاص بستگی دارد که بسته به سویه توسط پلاسمید و یا کروموزوم کد می شود (۷).

4 - *Escherichia coli*

سرطان کولورکتال سومین سرطان رایج و چهارمین دلیل مرگ و میر در جهان است. سالانه حدود ۴۰۰ هزار نفر در دنیا به علت ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می دهند (۲۰). با توجه به شیوع بالای این نوع سرطان مشکل بزرگی در سلامت عمومی بشر محسوب می شود. به طور کلی حدود ۲۰٪ از سرطان جهانی را می توان مرتبط با عوامل عفونی دانست. باکتری ها و فرآورده های باکتریایی در شیوع یا گسترش سرطان کولون با تحریک انواع مکانیسم ها از جمله، القای پیش التهابی، مسیر پروکاریسینوزنیک^۱ در سلول های اپی تلیال، تولید اکسیژن فعال، ژنوتوکسیک^۲ و ... نقش دارند (۶). جامعه ی میکروبی با نژاد های متفاوت ممکن است نرخ های

نویسنده مسئول :

دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی
پست الکترونیکی: zmohsen2002@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۱/۱۷

1-Procarcinogenic

2-Genotoxic

3- Microbiota

می باشد. برخی از پروتئاز های ترشچی، توکسین هستند که اثرات گوناگونی در سلول های پستانداران می گذارند(۱۲). ژن *vat* بر روی جزیره ژنومیک PAIs^۶ کد شده است. PAIs شامل مجموعه ای از ژن های ویروالانس می باشد که در ژنوم سویه های پاتوژن حاضر می باشد در حالیکه در سویه های غیر پاتوژن حضور ندارد. PAIs یک ناحیه ژنومی بزرگ را اشغال کرده است که بیش تر از ۱۰Kb می باشد. بررسی ها نشان می دهد مقایسه فراوانی ژن های *vat1* و *fimC* در جدایه های اشیریشیاکولی بافتی مبتلایان سرطان کولورکتال و بیماری التهابی روده بزرگ در جمعیت ایرانی به عنوان اولین کار در ایران می باشد.

مواد و روش ها

نمونه ها در فاصله زمانی تیر ماه ۱۳۹۲ تا بهمن ماه ۱۳۹۳ از بیمارستان های شهید بهشتی و ولی عصر استان قم و مرکز تومور بانک بیمارستان امام خمینی تهران جمع آوری شد و پس از تایید تست پاتولوژی کلینیکی در سریعترین زمان ممکن به آزمایشگاه انتقال یافت. در کل ۳۸ نمونه بیوپسی در دوره ی زمانی ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت که مربوط به افراد طبیعی، بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و مبتلایان بیماری التهابی روده بزرگ بود. تمامی آن ها پرسش نامه و رضایت نامه هایی را پر و امضاء کردند، اما محدودیت هایی مانند نداشتن همراه، بدحال بودن بیمار، کم اطلاعی بیمار یا همراهان آن ها نسبت به برخی سوال های پرسش نامه و... باعث شد تا برخی پرسش نامه ها ناقص پر شود بنابراین برخی نمونه ها از مطالعه خارج شد.

سویه هایی که پس از غنی سازی در محیط آب پیتونه قلیایی، در محیط کشت لوریابرتانی^۸ (*Leuria Bertani*) رشد کردند را به محیط کشت EMB agar^۹ انتقال داده شدند. کلنی هایی که در این محیط رنگ سبز با جلای فلزی داشتند به عنوان باکتری تیپیک در نظر گرفته شدند و با آزمون های بیوشیمیایی اندول، متیل رد، سیترات، تولید هیدروژن سولفید در محیط TSI^{۱۰} و تست اوره آز، مورد ارزیابی قرار گرفتند. سویه هایی که به عنوان اشیریشیاکولی تیپیک مورد تایید قرار گرفتند جهت انجام بررسی های بیش تر از آنها استوک تهیه شد و در دمای ۲۰- درجه سیلسیوس نگه داری شدند.

باکتری های جداسازی شده به مدت ۲۴ ساعت در محیط مایع LB کشت داده شدند و DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA استخراج شد. نمونه های DNA استخراج شده پس از بررسی کیفی و کمی تا زمان انجام واکنش PCR در دمای ۲۰- درجه سیلسیوس، نگه داری شدند. در مرحله بعد برای ژن های

- 7- The Pathogenicity Islands
- 8-*Leuria Bertani*
- 9-Eosin methylene blue agar
- 10- Triple Sugar Iron

ژن های مختلفی فاکتورهای ویروالانس را کد می کنند. در این تحقیق به بررسی مولکولی دو ژن ویروالانس *vat1* و *fimC* در باکتری اشیریشیاکولی جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال پرداخته شده است.

ژن *fimC*

اتصال باکتری مرحله ضروری در آغاز کولونیزاسیون سطوح مخاطی میزبان است و مقدمه عفونت تهاجمی محسوب می شود. باکتری اشیریشیاکولی دارای فاکتورهای اتصال هستند به نام پیلی یا فیمبریه، که به آن ها اجازه می دهد تا به طور موفقیت آمیزی عفونت را آغاز کنند(۲۸). ادهسین ها آنتی ژن های فیمبریالی هستند که باکتری را قادر می سازند تا به موکوس روده متصل شود(۶). از ادهسین های معمول می توان P فیمبریا، فیمبریا نوع ۱، S فیمبریا، FIC فیمبریا و خانواده ادهسین که شامل ادهسین Dr، ادهسین ها یا فیمبریال را نام برد(۲۱،۳۱)، این فیمبریاها به ترتیب توسط ژن های *afa*, *foc*, *sfa*, *fim*, *pap* کد می شوند. تعدادی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه این ژن ها را تولید می کنند. فیمبریه نوع ۱ به وسیله بیش از ۹۰٪ سویه های اشیریشیاکولی بیان می شود(۲۳،۳۰). تیپ ۱ فیمبریال شامل خوشه های ژنی شامل *fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimG*, *fimH* و *fimI* می باشد. ژن *fimC* توسط یک چاپرون پری پلاسمیک کد می شود و یک راهنمای مورد نیاز برای قرار گرفتن فیمبریا بر روی سطح باکتری می باشد. چاپرون های پری پلاسمیک FIMC یک نانومریک است. یک پروتئین ۲۵ کیلو دالتونی اصلی، که از ۲۵ اسید آمینه تشکیل شده است که واسطه ی ساخته شدن تیپ ۱ فیمبریال در باکتری اشیریشیاکولی می شود (۳۰،۲۶،۱۷). به نظر می رسد که پروتئین FIMC شامل ترکیبات غنی از ATP باشد و برخلاف بسیاری از چاپرون های سیتوپلاسمیک نیاز به ATP در برهم کنش ها نمی باشد(۱۹).

ژن *vat* (Vacuolating autotransporter serine protease)

یک سایتوتوکسین واکوئل ساز می باشد و واکوئل داخل سلولی را در کشت سلولی القا می کند، هم چنین محصول پروتئین ژن نامبرده یک سرین پروتئاز از خانواده SPATE^۵ می باشد که یک خانواده ی بزرگ از پروتئاز های که بوسیله ی اشیریشیاکولی و شیگلای^۷ ترشح می شود. SPATE ها شامل دو سایت با فعالیت متفاوت می باشد. سایت کاتالیتیک C-terminal که موجب یک شکست داخل مولکولی شده و باعث رها شدن پروتئین های N-terminal در ماتریکس خارج سلولی می گردد، دامین ترشچی N-terminal در SPATE ها که نوعی پروتئاز است و هر کدام به تنهایی یک سایت کاتالیتیک سرین پروتئاز استاندارد

- 5-Serin Prptease Autotransporter Of Entrobacter^۵
- 6-Shigella

مورد بررسی طراحی پرایمر صورت گرفت.

فراوانی هر یک از سروگروپ ها، ژن های ویروالانس باکتری اشیریشیاکولی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه کنترل مثبت، در واقع نمونه تایید شده ای است که از دانشگاه تولوئوس^{۱۱} در فرانسه اخذ شده است. در تمام واکنش های PCR از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Eppendorf آلمان استفاده شد. پرایمر های مورد استفاده برای تشخیص سروگروپ ها و ژن های ویروالانس باکتری اشیریشیاکولی جداسازی شده از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در (جدول ۱) آورده شده است.

نام پرایمر	توالی (3' - 5')	طول قطعه
<i>fimC-F</i>	GTT TTA TCG TGA CGC CAC CT	408bp
<i>fimC-R</i>	TTC CTG CAT CAG AAG GCA AT	
<i>Vat1-F</i>	GTG TCA GAA CGG AAT TGT C	230bp
<i>Vat1-R</i>	GGG TAT CTG TAT CAT GGC AAG	

جدول ۱: لیست پرایمر های مورد استفاده برای ردیابی ژن های ویروالانس، در اشیریشیاکولی های جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال شرایط انجام واکنش PCR برای ژن های مورد مطالعه به این صورت زیر بود:

Master mix 10µl آمپلیکون، ۵ µl پرایمرهای F و R با غلظت ۱۰ پیکومول، 1µl از DNA الگو با غلظت ۱۰۰ نانوگرم و ۷µl آب مقطر استریل در میکروتیوب ۰/۵ ml ریخته شد و بخوبی مخلوط شد. نهایتاً میکروتیوب ها در دستگاه ترموسایکلر اپندروف با برنامه دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۳ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه، چرخه با دمای ۹۳ درجه سلسیوس به مدت ۳۵ ثانیه، annealing به مدت ۳۰ ثانیه، دمای همانند سازی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۵ ثانیه و در خاتمه دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه گذاشته شد. دمای annealing برای ژن های *fimC*، *vat1* به ترتیب ۴۸ درجه سلسیوس، ۴۶ درجه سلسیوس بود.

بررسی محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگاروز ۱٪ انجام شد و نتایج با دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

نتایج حاصل از این مطالعه در چند بخش زیر قابل ارائه است:

الف- یافته های حاصل از تست های باکتریولوژی

پس از نمونه گیری در دوره زمانی تیرماه ۱۳۹۲ تا بهمن ماه ۱۳۹۳ نمونه ها بعد از سریال رقت در لوله های حاوی سالین فیزیولوژیک که از باکتری غنی شده در محیط LB کلنی مشکوک به باکتری اشیریشیاکولی را به محیط افتراقی و شناسایی انتقال داده شد. سپس کلنی های دارای رنگ سبز با جلای فلزی بر روی محیط افتراقی EMB، انتخاب و تستهای بیوشیمیایی IMVIC برای باکتری اشیریشیاکولی جداسازی شده، انجام شد. این تستها مبنی بر جنس و گونه باکتری های اشیریشیاکولی بود.

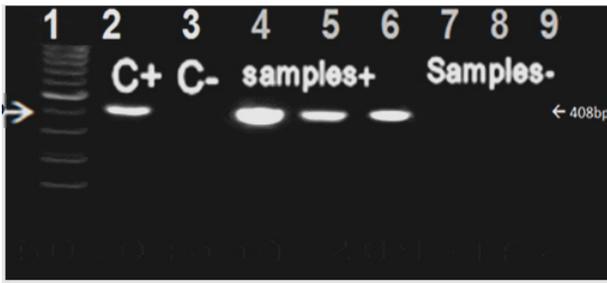
ب- یافته های دموگرافی و کلینیکوپاتولوژی بیماران

در نهایت نتایج دموگرافی، کلینیکوپاتولوژی و آزمایشگاهی بیماران در این مطالعه، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. از آزمون های آماری تک متغیره و چند متغیره نظیر t-Test، Fisher Exact text استفاده شد و در صورتی P-Value معنادار در نظر گرفته شد که (p < ۰,۰۰۵) بود. از ۳۸ نمونه بیوپسی که طی دوره زمانی این پژوهش جمع آوری شده بود، به ترتیب (۷/۱۸/۵)٪، (۱۵/۳۹/۵)٪ و (۱۶/۶۰/۸)٪ نمونه مربوط به افراد طبیعی، بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و مبتلایان بیماری التهابی روده بزرگ (شامل پولیپ و کولیت اولسراتیو و کرون دیزیز) شرکت کننده در این مطالعه بود. نتایج آماری نشان داد که بین گروه های بیماری التهابی روده بزرگ و سرطان کولورکتال و افراد طبیعی شرکت کننده، از لحاظ فاکتورهای میانگین کاهش وزن و مصرف سیگار اختلاف معناداری مشاهده می شود (p < 0.05) و از لحاظ سایر فاکتورهای مورد بررسی اختلاف معناداری مشاهده نشد. (جدول ۲)

ج- یافته های حاصل از تجزیه و تحلیل واکنش زنجیره ای پلی مرز برای ژن های ویروالانس

از بین ۳۸ سویه مورد مطالعه، ۶۶ (۸۰/۴۸)٪ سویه ها برای ژن *vat1* مثبت بود. اندازه قطعه حاصله ۲۳۰bp است. اختلاف معناداری بین گروه های مورد بررسی از لحاظ ژن *vat1* وجود دارد (p = 0.0245) (عکس ۱) (جدول ۳) برای ژن *fimC* نیز، از بین ۳۸ سویه مورد بررسی در ۷۲ (۸۰/۸۷)٪ سویه مثبت بود. اندازه قطعه 408bp است. اختلاف معناداری بین گروه ها از لحاظ ژن *fimC* وجود ندارد (P=0.201) (عکس ۲) (جدول ۲).

نتایج نشان داد که از ۷ نمونه طبیعی، وجود ژن های ویروالانس *vat1* و *fimC* به ترتیب در ۳ و ۵ نمونه طبیعی مثبت گزارش شد. در ۱۶ نمونه مربوط به مبتلایان بیماری التهابی روده بزرگ نیز



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR ژن *fimC* بر روی ژل آگارز ۱٪. از چپ به راست: چاهک شماره ۱: سایز مارکر فرمنتاز 100bp، Cat. no: PR911653، چاهک شماره ۲: کنترل مثبت (نمونه اخذ شده از فرانسه)، چاهک شماره ۳: کنترل منفی، چاهک شماره ۴-۷: نمونه مثبت باند 408bp نشانه وجود ژن

fimC می باشد، چاهک های ۸-۹: نمونه منفی

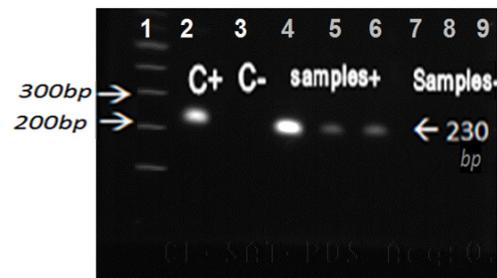
	طبیعی N(%)	بیماری التهابی روده بزرگ (%)N	س ر ط ا ن ک و ل و ر ک ت ا ل N(%)	p-value
Age (mean years±SD)	52±2.8	37±9.9	64±5.6	
gender				p= (0.05) IBD vs. Normal &p=0.27 CRC Vs. Normal
female	5	7	4	
male	2	8	12	
Mean lose Weight*(kg±SD)	0	4.5±11.3	8.3±0.7	(p= 0.04) IBD vs. Normal &p=0.004 CRC Vs. Normal
lose Weight	0*	7*(43.8)	10*(66.7)	
yes	7*(100)	9*(56.2)	5*(33.3)	
no				
Smoking				p= 0.79) IBD vs. Normal &p=0.01CRC Vs. Normal
Yes	1(14.3)	2(12.5)	4*(26.6)	
No	(85.5)6	14(87.5)	11*(73.3)	
<i>fimC</i> gene				(p= 0.21) IBD vs. Normal &p=0.73 CRC Vs. Normal
Positive	5(71.4)	15(93.7)	11(73.3)	
Negative	2(28.5)	1(6.3)	4(26.7)	
<i>vat1</i> gene				p=0.04 IBD vs. Normal &p=0.02 CRC Vs. Normal
Positive	3* (42.8)	14*(87.5)	14* (87.5)	
Negative	4* (57.2)	2* (12.5)	1* (12.5)	

جدول ۲: اطلاعات دموگرافی نمونه های شرکت کننده در این مطالعه

وجود ژن های ویروالانس *vat1* و *fimC* به ترتیب در ۱۴ و ۱۵ تا از نمونه ها مثبت گزارش شد. در بین ۱۵ نمونه مربوط به مبتلایان به سرطان کولورکتال نیز، وجود ژن های ویروالانس *vat1* و *fimC* به ترتیب در ۱۴ و ۱۱ مورد مثبت گزارش شد (جدول ۳).

	طبیعی N(%)	بیماری التهابی روده بزرگ N(%)	س ر ط ا ن ک و ل و ر ک ت ا ل N(%)	p-value
Age (mean years±SD)	52±2.8	37±9.9	64±5.6	
gender				(p= 0.05) IBD vs. Normal &p=0.27 CRC Vs. Normal
female	5	7	4	
male	2	8	12	
Mean lose Weight*(kg±SD)	0	4.5±11.3	8.3±0.7	(p= 0.04) IBD vs. Normal &p=0.004 CRC Vs. Normal
lose Weight	0*	7*(43.8)	10*(66.7)	
yes	7*(100)	9*(56.2)	5*(33.3)	
no				
Smoking				(p= 0.79) IBD vs. Normal &p=0.01CRC Vs. Normal
Yes	1(14.3)	2(12.5)	4*(26.6)	
No	(85.5)6	14(87.5)	11*(73.3)	
<i>fimC</i> gene				(p= 0.21) IBD vs. Normal &p=0.73 CRC Vs. Normal
Positive	5(71.4)	15(93.7)	11(73.3)	
Negative	2(28.5)	1(6.3)	4(26.7)	
<i>vat1</i> gene				p=0.04 IBD vs. Normal &p=0.02 CRC Vs. Normal
Positive	3* (42.8)	14*(87.5)	14* (87.5)	
Negative	4* (57.2)	2* (12.5)	1* (12.5)	

شیوع ژن ویروالانس *vat1*، بیماری التهابی روده ی بزرگ نسبت به طبیعی (p=0.04)، و سرطان کولورکتال نسبت به طبیعی (P=0.02) می باشد که اختلاف بین آن ها معنی دار است. شیوع ژن ویروالانس *fimC*، بیماری التهابی روده ی بزرگ نسبت به طبیعی (p=0.21) و سرطان کولورکتال نسبت به طبیعی (P=0.73) می باشد که اختلاف بین آن ها معنی دار نمی باشد.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن *vat1* بر روی ژل آگارز ۱٪. از چپ به راست: چاهک شماره ۱: سایز مارکر فرمنتاز 100bp، Cat. no: PR۹۱۱۶۵۳، چاهک شماره ۲: کنترل مثبت (نمونه اخذ شده از فرانسه)، چاهک شماره ۳: کنترل منفی، چاهک شماره ۴-۷: نمونه مثبت باند ۲۳۰bp نشانه وجود ژن *vat1* می باشد، چاهک های ۸-۹: نمونه منفی.

گزارش کرد و هم چنین ارتباط آن ها در پاسخ به سیستم ایمنی را بررسی نمود(۵).

عوامل مختلفی در ایجاد این سرطان نقش دارند که یکی از آن ها، عفونت باکتریایی و توکسین های حاصله از آن ها است. یکی از اعضای میکروبیوتا دستگاه گوارش انسانی، اشریشیاکولی است که چند روز بعد از تولد در روده تشکیل کلنی می دهد و در سراسر زندگی میزبان در روده وجود دارد. برای القاء التهاب باکتری ها ممکن است به طور مستقیم سبب تخریب DNA به وسیله تولید ژن اکسیژناز می شود و این امر در انتروباکترها و سویه های باکترئوئیدس به خوبی مشاهده شده است. تحقیقات نشان می دهد که برخی سویه های اشریشیاکولی می توانند باعث القاء ازدیاد نرخ جهش شوند. ایجاد عفونت در میزبان اشریشیاکولی توسط فاکتور های ویروالانس که به وسیله (virulence-associated genes (VAGs) کد شده است صورت می گیرد. دو ژن ویروالانس *vat1*، *vat1* در این ارگانیسم نقش مهمی را در پاتوژنیسیته باکتری دارد. هدف از این مطالعه، ارزیابی دو ژن ویروالانس نام برده در سویه های اشریشیاکولی جدا شده از نمونه های بیوپسی از بافت روده در سه گروه افراد طبیعی، افراد مبتلا به بیماری التهابی روده و مبتلا به سرطان کولورکتال بود. نتایجی را که در این بررسی کسب کردیم به خوبی رابطه این ژن های ویروالانس را با القاء التهاب و القا ازدیاد نرخ جهش تایید می کند. این مطالعه نشان داد که بین گروه های بیماری التهابی روده بزرگ و سرطان کولورکتال و طبیعی شرکت کننده در این پروژه از لحاظ فاکتورهای کاهش وزن سرطان کولورکتال نسبت به طبیعی ($p < 0.05$) بیماری التهابی روده بزرگ نسبت به طبیعی ($p < 0.05$) و از لحاظ مصرف سیگار سرطان کولورکتال نسبت به طبیعی ($p < 0.05$) بیماری التهابی روده بزرگ نسبت به طبیعی ($p < 0.05$) اختلاف معناداری را نشان داد (جدول ۲). هم چنین از نظر بررسی مولکولی، اختلاف معناداری بین گروه های مورد بررسی از لحاظ حضور ژن *vat1* وجود دارد. بدین ترتیب که در گروه مبتلایان به سرطان کولورکتال به طبیعی ($p = 0.02$) و در گروه بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده بزرگ نسبت به طبیعی ($p = 0.04$) می باشد.

بررسی ها نشان داده است که توانایی اتصال به سطوح میزبان جزء اساسی ترین مراحل در کلونیزاسیون موفق پاتوژن ی میکروبی می باشد. سویه های اشریشیاکولی دارای تعداد زیادی فیمبریه و ادھسین مثل P فیمبریه، S، فیمبریه و ادھسین های یک فیمبریال می باشد که به باکتری اجازه می دهد تا به طور موفقیت آمیزی عفونت را آغاز کند، بنابراین کلونیزاسیون سویه های باکتری اشریشیاکولی که واجد فیمبریه یا پیلی می باشند

P-value	سرطان کولورکتال افراد مبتلا به N(%)	بیماری التهابی روده بزرگ افراد مبتلا به N(%)	افراد طبیعی N(%)	تعداد کل نمونه ها N(%)
(p=0.21) IBD vs. Normal & p=0.73 CRC Vs. Normal	11(73.3) 4(26.7)	15(93.7) 1(6.3)	5(71.4) 2(28.5)	31(81.5) 7(18.5)
p=0.04 IBD vs. Normal & p=0.02 CRC Vs. Normal	14* 78.5(0) 1* (12.5)	14* 78.5(0) 2* (12.5)	3(42.8) 4(57.2)	31(81.5) 7(18.5)

جدول ۳: بررسی درصد فراوانی وجود ژن های مورد بررسی(+) و "حضور ژن ویروالانس و" - "عدم حضور ژن ویروالانس)

بحث

برای اولین بار احتمال ایجاد سرطان توسط باکتری توسط Russel در سال ۱۸۹۰ مطرح شد و چند سال بعد ThomasGlover در سال ۱۹۲۶ اعلام کرد که به طور مداوم از بافت تومور دار باکتری خاصی جدا می شود (۳). بهترین مطالعه نشان دهنده ارتباط عفونت و سرطان، وجود هلیکو باکتر پیلوری^{۱۲} است که در دو شکل از سرطان های گوارشی MALT لیمفوما و آدنوما کارسینومای گوارشی می باشد(۱۳). در سرطان کولون باکتری استرپتوکوکوس بویس^{۱۳} و در سرطان ریه کلامیدیا پنومونیه^{۱۴} و سویه هایی از بارتونلا^{۱۵} در تومور های عروق دیده شده است(۱۴،۱۱،۹). مطالعه Darfeuille و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی بیماری کولون نشان داد که در این بیماری تعداد باکتری اشریشیاکولی در مخاط کولون و ایلئوم افزایش یافته است(۱۱). بدین صورت که اشریشیاکولی به ناحیه ایلئوم می چسبد و در شرایط *invio* به سلول های اپی تلیال حمله می کند. در بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو یا بیماری کولون، احتمال خطر ابتلا به سرطان کولورکتال تا ۵ برابر افزایش می یابد. در مطالعه های انجام شده توسط RomanKotlowski و همکاران در سال ۲۰۰۶، بر روی بیماری های التهابی روده نشان داد که در بیماری کولیت اولسراتیو و کولون فراوانی بالایی از باکتری های اشریشیاکولی متعلق به گروه فیلوژنی B2 دیده شد که این گروه به علت فاکتور هایی هم چون خاصیت اتصال دارای اهمیت است(۱۸).

در سال ۲۰۰۷ توسط Rolhion و همکارانش افزایش باکتری اشریشیاکولی مرتبط با موکوس در بیماری های التهابی روده را
12-Helicobacter pillori
13- Streptococcus bovis
14-Chlamydia pneumoniae
15-Bartonella

ما هم خوانی دارد (۱۵).

- درمنش وهمکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی فاکتور های ویروالانس، تعیین سرورگروپ ها و مقاومت اشیریشیاکولی جدا شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه پرداختند. نتایج این بررسی نشان داد که فاکتور های ویروالانس *pap*، *sfa*، *hly* و *cnfl* بیش ترین حضور را در پیلونفریت داشتند در حالی که فاکتورهای ویروالانس *fim*، *pap*، *shly*، *sfa* بیش ترین حضور را در بیماری های التهاب مثانه داشتند. فراوانی ژن *fim* (۹۱/۹٪) گزارش شد با نتایج این تحقیق بسیار نزدیک است (۱).
- پرهام و همکاران در سال ۲۰۰۵ فراوانی ژن *vat* را در سویه های اشیریشیاکولی خارج روده ای (که از نمونه های خارج روده ای جدا شده بود) در پیلونفریت (۵۹/۳٪)، در *cystitis* (۵۷/۹٪) و در *prostatitis* (۷۲/۴٪) گزارش کردند. نتایج ایشان تا حدودی به نتایج به دست آمده با تحقیق حاضر، ۸۲/۶٪ در بیماری التهابی روده و ۸۶/۲٪ در سرطان کولورکتال، نزدیک است (۲۲).

نتیجه گیری

مطالعه های نشان می دهد که فاکتور های ویروالانس مختلفی به پاتوژنیسیته ی باکتری اشیریشیاکولی نسبت داده می شود. آگاهی بهتر از خصوصیات ویروالانس ارگانسیم پاتوژن به پزشک امکان را می دهد که روند پیشرفت عفونت در میزبان و درمان مناسب آن را پیش گیری کند. در این تحقیق برای اولین بار در ایران بررسی ژن های ویروالانس سویه های باکتری اشیریشیا کولی جدا شده از سرطان کولورکتال و بیماران مبتلا به التهاب روده بزرگ صورت گرفت، همان طور که گفته شد حضور این ژن ها در فلور روده، می تواند عاملی مستعد کننده برای توسعه برخی سرطانها از جمله سرطان کولورکتال باشد. در این مطالعه وجود ژن ویروالانس *Vat1* در این باکتری ها با فراوانی معنی داری تایید شد. با دانستن نقش مهم و کلیدی این ژن ها در بیماری زایی سویه های ایجاد کننده در عفونت های روده و ایجاد التهاب و سرطان کولورکتال و با وجود هزینه های زیادی که هر ساله برای درمان این نوع عفونت ها بر جامعه و خانواده تحمیل می شود می توان طراحی واکسن علیه این بیماری را پیشنهاد نمود. هم چنین نتایج این مطالعه اطلاعات جامعی را در ارتباط با اهمیت این ژن ها در آسیب شناسی عفونت روده ی بزرگ، و راهکارهای درمانی را در اختیار دست اندرکاران بهداشت و درمان قرار می دهد. امید است با ارتباط بهتر مراکز درمانی و بیماران و دانشگاه ها اهداف مطالعه هایی به سمت بهبود حال بیماران آینده قدم بگذارد.

می تواند به پیشرفت سرطان روده بزرگ کمک کند که فراوانی بالای ژن ویروالانس *fimC* در سه گروه مورد مطالعه مبنی بر این نکته است. همان طوری که در نتایج آمده است، ۷۱/۴٪ گروه طبیعی، ۹۳/۷٪ گروه التهابی روده بزرگ و ۷۳/۳٪ بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال از نظر ژن ویروالانس *fimC* مثبت هستند و از نظر آماری اختلاف معناداری بین سه گروه مورد مطالعه مشاهده نمی شود ($p > 0.05$) (جدول ۲).

نتایج این مطالعه در راستای نتایج سایر محققینی است که حضور ژن های ویروالانس را در گروه های مورد بررسی شامل افراد طبیعی، مبتلایان به بیماری التهابی روده و مبتلایان به سرطان کولورکتال تایید کرده اند. یکی از فاکتور ویروالانس مورد بررسی در این مطالعه، *vat1* بود که حضور این ژن با فراوانی ۴۲/۸٪، ۸۷/۵٪ و ۸۷/۵٪ به ترتیب در افراد گروه طبیعی، مبتلایان به بیماری التهابی روده بزرگ و مبتلایان به سرطان کولورکتال مشاهده شد و از نظر آماری اختلاف معناداری بین این سه گروه مشاهده می شود (جدول ۲). از میان مقالات زیر به موارد زیر اشاره می شود:

- علی ناظمی و همکاران، در سال ۲۰۰۰ به مطالعه و بررسی توزیع فراوانی ژن های کد کننده فیمبریه در باکتری اشیریشیاکولی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری پرداختند و از ۲۰۰ سویه مورد بررسی برای ژن *fim188* (۹۴٪) نمونه مثبت گزارش شد و هم چنین نشان دادند که ژن *fim* و *pap* شایعترین ژن های کد کننده فیمبریه در اشیریشیا کولی جدا شده از عفونت ادراری در شهر تهران می باشد (۲).
- جانسون وهمکاران، در سال ۲۰۰۸ به بررسی مولکولی، فیلوژنیکی و اپیدمیولوژی خوشه ی ژنی *pks* در اشیریشیاکولی، موفق به شناسایی جزیره ژنومیک با اندازه ۵۲Kb در ناحیه ی ژنی *pks16* شدند. این جزیره ژنی اولین بار در سویه های آزمایشی (ExPEC)¹⁷ مشاهده شد و امروزه در سویه های B2 گروه های فیلوژنیک یافت شده است. بسیاری از سویه ها که منجر به عفونت های خارج روده ای مانند عفونت مجاری ادراری و سپتیسمی می شوند به سویه های B2 گروه های فیلوژنیک متعلق هستند و کلی باکترین نیز می تواند مانند یک فاکتور ویروالانس در این موارد عمل کند. ایشان در این مطالعه، موفق به بررسی فراوانی چند ژن ویروالانس در باکتریهای PKS مثبت شدند. از میان این ژن های ویروالانس، فراوانی ژن *vat1* در ۱۳۱ نمونه باکتری جدا شده از مدفوع و خون بیماران ۶۰٪ بود که تا حدودی با پژوهش

16-polyketide synthase

17-Extra intestinal pathogenic *Escherchia coli*

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری صمیمانه جناب آقای دکتر کلهر و سرکار خانم فراهانی قدردانی می نمایند، هم چنین از متخصصین گوارش و جراحان بیمارستان شهید بهشتی و بیمارستان ولیعصر استان قم 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 طبیعی، کمال تشکر را دارند.

منابع

- ۱- درمنش ب، میرنژاد ر، خداوردی داریان الف، ممتاز ح، یاحقی ع، صفر پور دهکردی ف، پيله ورزاده م. بررسی فاکتورهای ویروالانس، تعیین سروگروپ ها و مقاومت پادزیستی سویه های اشریشیاکلی یوروپاتوژن جدا شده از کودکان مبتلا به پیلونفریت و التهاب مثانه. میکروب شناسی پزشکی ایران. ۱۳۹۲؛ ۲، ۲۷-۳۹
- ۲- ناظمی ع، نادری م، میری نرگسی م، شریفی ش. توزیع فراوانی ژن های کد کننده فیمبریه در اشریشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری. علوم آزمایشگاهی. ۱۳۹۰؛ دوره ۴، ۲: ۳۱-۳۷.
1. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan T-J, Campbell BJ, Abujamel T, Dogan B, Rogers AB, Rhodes JM, Stintzi A, Simpson KW, Hansen JJ, Keku TO, Fodor AA, Jobin C. Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science*. 2012 October 5, 2012;338(6103):120-3.
 2. Antunes LCM, McDonald JAK, Schroeter K, Carlucci C, Ferreira RBR, Wang M, Yurist-Doutsch S, Hira G, Jacobson K, Davies J, Allen-Vercoe E, Finlay B.B. . Antivirulence Activity of the Human Gut Metabolome.. 2014 Jul-Aug;5(4):e01183-14.
 3. Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive Escherichia coli and Crohn's disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2007;23(1):16-20. PubMed PMID: 00001574-200701000-00005
 4. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Blanco J. Distribution and characterization of faecalnecrotoxi-genic Escherichia coli CNF1+ and CNF2+ isolated from healthy cows and calves. *Veterinary Microbiology*. 1998 1/16/;59(2-3):183-92.
 5. Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschäpe H, Schmidt M.A, Karch H. Characterization of Cytolethal Distending Toxin Genes and Expression in Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Strains of Non-O157 Serogroups. *Infection and Immunity*, 2004 08/29/received.
 6. Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, Darcha C, Dubois D, Pereira B, Déchelotte P, Bonnet R, Pezet D, Darfeuille-Michaud A . Colonization of the human gut by E. coli and colorectal cancer risk. *Clinical Cancer Research*, 2014;20(4):859-67.
 7. Brotherton CA, Balskus EP. A prodrug resistance mechanism is involved in colibactin biosynthesis and cytotoxicity. *Journal of the American Chemical Society*, 2013;135(9):3359-62.
 8. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède J-P. Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010;107(25):11537-42.
 9. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2004;127(2):412-21.
 10. Dautin N. Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATEs): biogenesis and function. *Toxins*.2010;2(6):1179-206.
 11. Guerra L, Guidi R, Frisan T. Do bacterial genotoxins contribute to chronic inflammation, genomic instability and tumor progression? *Febs Journal*, 2011;278(23):4577-88.
 12. Homburg S, Oswald E, Hacker J, Dobrindt U. Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in Escherichia coli, 2007-10-01 00:00:00. 255-62 p.
 13. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Nougayrede J-P, Oswald E. Molecular epidemiology

- and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *Journal of clinical microbiology*, 2008;46(12):3906-11.
14. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(2):123-40.
 15. Klemm P. FimC, a chaperone-like periplasmic protein of *Escherichia coli* involved in biogenesis of type 1 fimbriae. *Research in microbiology*, 1992;143(9):831-8.
 16. Kotlowski R, Bernstein CN, Sepehri S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+ D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2007;56(5):669-75.
 17. Masignani V, Pizza M, Rappuoli R. Bacterial Toxins. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes*: Springer New York, 2006. p. 893-955.
 18. Moradi A, Khayamzadeh M, Guya MM, Mirzaei HR, Salmanian R, Rakhsha A, Akbari M. Survival of colorectal cancer in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2009;10(4):583-6.
 19. Mulvey MA. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular microbiology*. 2002;4(5):257-71
 20. Parham NJ, Pollard SJ, Desvaux M, Scott-Tucker A, Liu C, Fivian A, Henderson, I. Distribution of the serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 2005;43(8):4076-82.
 21. Pandey NK, Pal RK, Kashyap M, Bhavesh NS. Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of *Escherichia coli* PapD-like protein (EcpD). *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2012;68(8):954-7.
 22. Parreira V, Gyles C. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW*tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infection and immunity*, 2003;71(9):5087-96.
 23. Pass M, Odedra R, Batt R. Multiplex PCRs for Identification of *Escherichia coli* Virulence Genes. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(5):2001-4.
 24. Pellecchia M, Güntert P, Glockshuber R, Wüthrich K. Sequence-specific ¹H, ¹⁵N and ¹³C Assignments of the Periplasmic Chaperone FimC from *Escherichia Coli*. *Journal of biomolecular NMR*. 1998;11(2):229-30
 25. Robinson CJ, Lee EL, Eribo BE, Ashktorab H, Brim H. Colon Cancer and IBD: Potential Links to Race, Microbiota, Issues. 2010.
 26. Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a University Hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2006:185-8.
 27. Situ BCI. Cancer Facts. American cancer society, 2015. <http://www.cancer.org/research/cancer-factsstatistics/cancerfactsfigures2015>
 28. Söderhäll M. The importance of *Escherichia coli* fimbriae in urinary tract infection: *Microbiologisk och Tumör biologiskt Centrum (MTC)/Microbiology and Tumor Biology Center (MTC)*; 2001.
 29. Tiba MR, Yano T, Leite DdS. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2008;50:255-60.

