فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۳، جلد ۹، شماره ۲، بهار۹۵، صفحه ۴۹ تا ۵۶

بررسی بافتی و مولکولی و اثر سینرژیسم نانو ذرات مس با آنتی بیوتیک بر تومورهای سرطان کولورکتال آلوده به کلبسیلا پنومونیه

صدیقه مهرابیان[۱]، ماریا ولد بیگی[۲]، شهلا محمد گنجی[۳]
۱-استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ودانشگاه خوارزمی، تهران. ایران. mehrabians@yahoo.com
۲-کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران. ایران.
۳-استادیار ژنتیک مولکولی پژوهشگاه ملّی مهندسی ژنتیک وزیست فنا وری، تهران. ایران.
تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: سرطان کولورکتال دومین سرطان رایج در جهان می‌باشد. دامنه تغییرات ژنتیکی در ایجاد سرطان کولورکتال وسیع بوده و بررسی‌ها نشان می‌دهد که عفونت با باکتری کلبسیلا پنومونیه که حاوی ژن‌های pks است، می‌تواند باعث شروع سرطان کولورکتال شود. کلبسیلا عامل بیماری‌های عفونی با درمان سخت است.اثرات جانبی مصرف آنتی بیوتیک که برای درمان به کار می-رود بسیار بالاست. این مطالعه با هدف مسیری برای از بین بردن مقاومت دارویی و استفاده از دوز پایین آنتی بیوتیک در نوعی عفونت خاص باکتریایی که امکان ایجاد تغییر در سلول روده‌ای و بروز سرطان می‌شود و شاید به پیشگیری یا درمان کمکی کنند طراحی شده است.

روش کار: در این روش بعداز تهیه نانو ذرات مس با اندازه ۲۰ نانومتر و درجه خلوص ۹۹/۰۹ ٪، جداسازی و شناسایی باکتری کلبسیلا با استفاده از روش‌های رایج میکروبیولوژی مولکولی انجام شد. جهت شناسایی مقاومت باکتری دیسک گذاری به روش کربی و بایر(Kirby&bauer) همراه با غلظت‌های متفاوت نانوذره مس صورت پذیرفت. اثر هم‌افزایی با آنتی بیوتیک با آغشته کردن دیسک آنتی بیوتیک های مورد استفاده با بیشترین غلظت نانو ذره مس که اثر مهارکنندگی نداشت صورت گرفت. در این مطالعه سویه‌های حاوی ژن pks از طریق pcr شناسایی و جداسازی شدند، سپس با تست‌های مختلف اثرات ضد میکروبی نانوذرات مس و آنتی بیوتیک های بر روی سویه‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفت. آنتی بیوتیک های مقاوم به سویه‌های مذکور شناسایی شد. نسبت به نانو ذرات مس باکتری‌های مزبور حساس بوده بیشترین غلظت نانو ذرات مس که اثر مهارکنندگی نداشت انتخاب شد،

یافته ها: سنجش هاله عدم رشد نشان داد که غلظتppm ۵۲ بالاترین غلظتی است که اثر بازدارندگی نشان می‌دهد. کلبسیلا پنومونیه به آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین، پیپراسیلین، کلیندامایسین و آموکسی سیلین مقاوم و در بررسی اثر سینرژیسم، اثر هم‌افزایی این دو ماده بر باکتری کلبسیلا پنومونیه خاصیت ضد میکروبی نشان داد.

نتیجه گیری: با استفاده از کمترین غلظت نانوذرات که اثر سینرژیستی با آنتی بیوتیک های مقاوم نشان می دهد، می‌توان با استفاده از نانوبیوتیک این بیماری را درمان و پیشگیری نمود.

واژه های کلیدی: سرطان کولورکتال، کلبسیلا پنومو نیه، سینرژیسم، نانو ذرات مس، آنتی بیوتیک.

مقدمه

سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان می-باشد. سرطان کولورکتال شایع ترین سرطان دستگاه گوارش است(۴). براساس آمارهای اخیر میزان بروز استاندارد این بیماری به ترتیب در مردان و زنان در کشورهای پیشرفته ۳۷/۷ و۲۴/۳ به‌ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت می‌باشد(Minister of health,Tehran,2012). سرطان کولورکتال تبدیل به یک مشکل بزرگ در کشورهای آسیایی شده(۵)، به طوری که بروز میزان استاندارد در بسیاری از این کشورها در دو دهه گذشته افزایش یافته است(۸). در ایران میزان بروز استاندارد شده به ترتیب در مردان و زنان ۱۱/۳۱ و ۱۰/۸۹ گزارش شده است. انواع متنوعی از میکروارگانیسم ها به عنوان عامل عفونت این سرطان مرتبط داده می‌شوند. برای مثال عفونت هلیکوباکتر پیلوری به طور قوی به گسترش

سرطان معده مرتبط است(۶). عفونت با سویه‌های انترو پاتوژنیک و استرپتوکوکوس بوویس به طور کلینیکی با بیماری سرطان کولورکتال مرتبط می باشد(۳). اگرچه ماهیت طبیعی این ارتباط ناشناخته بوده، با این حال جالب توجه است که برای سال ها میکروبیوتای غیر بیماری زای روده به عنوان ایجاد کننده سرطان کولورکتال نادیده گرفته شده است. از آن جایی که شرایط کشت برای اکثر میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش انسان ساخته نشده محققان از علم ژنتیک به خصوص نسل جدیدی از همین توالی ژن‌های S_{16} ریبوزومی باکتری ها جهت تعیین خصوصیات میکروبیوتای بیماران سرطان کولورکتال بهره می‌برند(۱۲). فاکتورهای مهم و بیماریزای کلبسیلا پنومونیه شامل کپسول، لیپوپلی ساکارید و سیستم‌های شلاته کننده آهن، ادهسین‌های تشکیل دهنده بیوفیلم و حضور جزایر ژنومی کدکننده کلی باکتین است. یکی از جزایر بیماری زای موجود در ژنوم باکتری کلبسیلا معروف به (G1-1) که دارای ناحیه کدکننده برای دو پپتید پلی‌کتید و غیر ریبوزومی کلی باکتین می باشد، در مطالعه‌ای که به تعیین توالی ژنوم چند سویه از باکتری کلبسیلا پنومونیه مورد شناسایی قرار گرفته شده، این ناحیه کدکننده در لوکوس ash-TRNA قرار داشته و دارای ۹۲ ناحیه کدکننده است. لازم به ذکر است که در نزدیکی ناحیه کدکننده ی کلی باکتین یک ناحیه ژنی دیگر نیز وجود دارد،که در فرآیند کونژوگاسیون و انتقال جزیره بیماری زای G1-1 به دیگر سویه‌ها نقش دارد(۱۸). افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در کلبسیلا پنومونیه از طریق دریافت ژن‌های پلاسمیدی یکی از مشکلات در زمینه مقاومت‌های میکروبی به شمار می‌رود، در مطالعه‌ایی کلبسیلا پنومونیه سویه KPN1H33 از یک بیمار که برای درمان متاستاز سرطان کولون به کلینیک مراجعه کرده بود، جدا شد. در بررسی بعدی مشخص گردید که این سویه مقاوم به کارباپنم و بیمار قبل از مراجعه به کلینیک حامل این سویه‌ی باکتری بوده است. هم چنین دیگر مورد نگران کننده این سویه از کلبسیلا وجود یک ترادف ۱۳۰ کیلوبایتی با ۹۹٪ شباهت به لوکوس PKS(colibactin) و yersini bactin(یک سیدروفور وابسته به سیستم شلاته کننده آهن) باکتری *Citrobacter koseri* می باشد. کلی باکتین یک پپتید غیر ریبوزومی ژنوتوکسیکی است که سبب شکست DNA دو رشته‌ای سلول‌های یوکاریوت و توقف چرخه سلولی می‌شود(۱۷).در مطالعه‌ای که توسط Putze و همکارانش انجام شد جزیره ی بیماریزای PKS در ۳/۵ درصد ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه یافت می-گردد. مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و کوئینولون‌ها نیز در بین سویه‌های کلبسیلا پنومونیه شایع است(۱۸). با توجه به گزارشات ذکر شده انتشار مقاومت‌های دارویی و ژن‌های سرطان‌زا در بین سویه‌های کلبسیلا از مسائل مهم درمان عفونت‌ها محسوب می‌شود. امروزه نانودرمانی، راهی برای کنترل میکروارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو است. نانوذرات مس و آنتی بیوتیک‌های مانند ماکرولید، آمینوگلیکوزید–بتالاکتام، تتراسایکلین که باکتری نسبتاً به آن ها مقاوم شده ، دلایل موجهی برای توانایی بالای نانو ذرات در مهار میکروب‌های مقاوم وجود دارد و نانو ذرات از مقاومت به دارو جلوگیری می‌نمایند، چرا که از آن ها می‌توان چندین مکانیسم به صورت ترکیبی برای مهار رشد میکروبی استفاده نمود. مانند رهاسازی اکسید نیتریک(۱۹) و امکان بسته بندی چندین داروی آنتی بیوتیک و ضد التهاب درون نانوذرات یکسان و کنترل رهاسازی آنها(۲۴). نانو ذرات دارو رسانی هدف‌مند به مکان عفونت و امکان استفاده از مقادیر بسیار کمتر از داروها برای کنترل عفونت را فراهم می‌سازند(۱۴). نانوذرات در یک سلول مشخص می‌تواند فیزیولوژی ساختار(مانند تخریب غشاء که شامل نفوذپذیری هم می-شود) یا فرآیندهای اساسی مانند همانندسازی DNA یا

سنتز پروتیئن را تغییر دهد(۲۳، ۱۰). یک نوع نانوذرات می‌تواند یک یا چند مکانیسم عمل برای غیرفعال نمودن میکروب‌ها داشته باشد و اساساً این مکانیسم‌ها دلیلی بر قدرت بالای نانوذرات در پیش‌گیری از مقاومت دارویی است. هدف از این تحقیق مطالعه بافتی و تغییرات در بافت سرطانی کولورکتال و بررسی اثر سینرژیسم نانو ذرات مس وآنتی-بیوتیک(نانوبیوتیک) بر باکتری های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از تومورهای سرطان کولورکتال است.

مواد روش ها

ابتدا ۳۵ نمونه بیوپسی روده بزرگ مبتلایان به بیماری سرطان کولورکتال و ۲۰ نمونه از افراد سالم جهت مقایسه با فلور طبیعی از بیماران مراجعه کننده به کلینیک گوارش بیمارستان بقیه الله (عج) درون ویال استریل در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد به آزمایشگاه انتقال داده شد. مراحل جمع آوری نمونه همراه با رضایت نامه و تکمیل فرم پرسشنامه بود. نمونه‌ها در ابتدا مطالعه بافتی شده و ازنمونه‌های بدون حضور باکتری کلبسیلا و نمونه-های مثبت دارای باکتری کلبسیلا PKS عکس تهیه گردید. بدین منظور ابتدا برش‌هایی از نمونه‌های بافتی تهیه با استفاده از رنگ‌های هماتوکسین و ائوزین رنگ آمیزی شد. سپس از برش‌های آماده شده توسط میکروسکوپ نوری عکس برداری گردید. برای جداسازی باکتری کلبسیلا پنومونیه از بافت روده بیماران مبتلا از محیط های کشت مغذی از جمله محیط LB.broth و افتراقی برای باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه EMB Agar و محیط های بیوشیمیایی از جمله TSI، Urea agarو IMVIC و بافر PBS جهت شستشوی اولیه قسمتی از بافت مورد مطالعه، استفاده و تمامی محیط ها از شرکت MERCK خریداری شد. پس از رنگ آمیزی گرم کشت ۴ مرحله‌ای باکتری‌ها روی محیط افتراقی EMB انجام و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید تا باکتری کلبسیلا پنومونیه ایزوله شود.

استخراج DNA از نمونه‌ها

پس از تلقیح باکتری‌ها در۵ میلی لیتر محیط مایع BHI و پس از گرما گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد استخراج ژن از باکتری‌ها براساس دستورالعمل کیت سیناکلون انجام شد.کیفیت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ بررسی و کمیت آن ها توسط اسپکتروفتومتری در طول موج ها ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مطالعه و در نهایت DNA استخراج شده از باکتری ها درفریزر ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد.

واکنش مولکولی Duplex PCR

پس از طراحی پرایمر اختصاصی برای ژن‌های clbB و clbN مطابق جدول ۱، آزمایش دوبلکس PCR برای DNAهای استخراج شده از باکتری‌های بیماران انجام شد. تکثیر ژن با حجم نهایی۲۵ میکرولیتر برای هر مخلوط واکنش بود. مقدار مورد نیاز از هر ماده برای انجام این آزمایش به شرح زیر است:۱۲/۵ میکرولیتر Master mix، ۹/۵ میکرولیترDeionized Water، ۱ میکرولیترDNA، و۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای clbB R و clbB و clbN R و clbN F. Master mix از شرکت Ca. ، Fermentase، Dream Taq و پرایمرها از شرکت ژن فن آوران تهیه گردید. میکروتیوب ها در ترموسایکلر UK، Techno و در شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل دمایی به صورت ۹۴ درجه سانتی گراد، ۵۶ درجه سانتی گراد و ۷۲ درجه سانتی گراد و هر یک به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد گذاشته شد. مطابق جدول ۳ پس از انجام آزمایش PCR Duplex، محصولات حاصله بر روی ژل آگارز ۲٪ بررسی گردید.

جدول ۱:توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

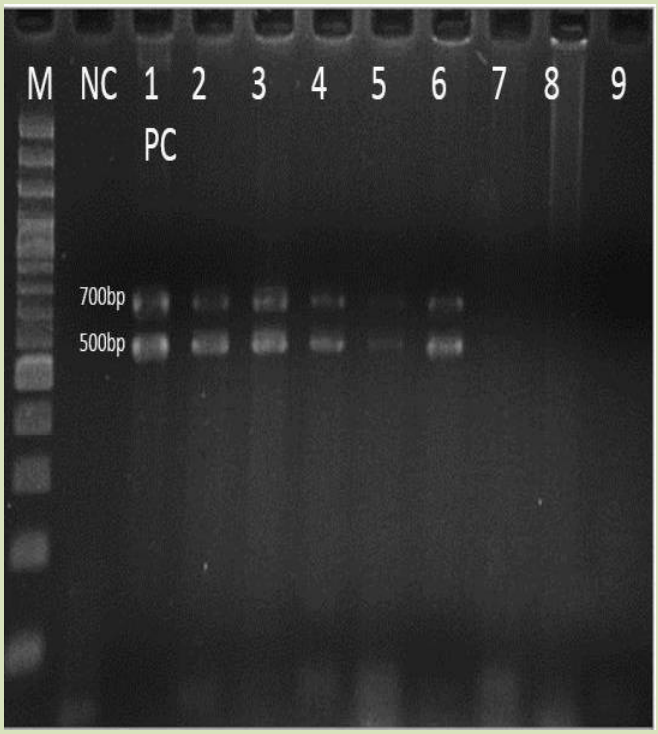
نام پرایمر	توالی (`5به`3)
clbB F	5`GAT TTG GAT ACT GGC GAT AAC CG3`
clbB R	5`CCA TTT CCC GTT TGA GCA CAC3`
clbN F	5`GTT TTG CTC GCC AGA TAG TCA TTC3`
clbN R	5`CAG TTC GGG TAT GTG TGG AAG G3`

بررسی مقاومت کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی-بیوتیک و نانوذرات مس

در این تحقیق از آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین، آمپی سیلین، پیپراسیلین، کلیندامایسین و اریترومایسین استفاده شد. آنتی بیوتیک‌ها به صورت دیسک از شرکت پادتن طب تهیه و با استفاده از روش سنجش هاله مهار رشد میزان مقاومت باکتری سنجیده گردید. نانوذرات مس با اندازه ۲۰ نانومتر و درجه خلوص ۹۹/۰۹٪ تهیه شد. با استفاده از روش MIC و MBC حداقل میزان نانوذرات مس سنجیده و با تهیه دیسک آنتی بیوتیک که باکتری به آن مقاومت نشان داده و آغشته نمودن نانوذرات مس به آن میزان حداقل نانوذرات مس که باکتری به آن مقاوم بود، با استفاده از روش Kirby and bauer مهار رشد باکتری کلبسیلا پنومونیه با روش دیسک مورد سنجش قرار گرفت(۲).

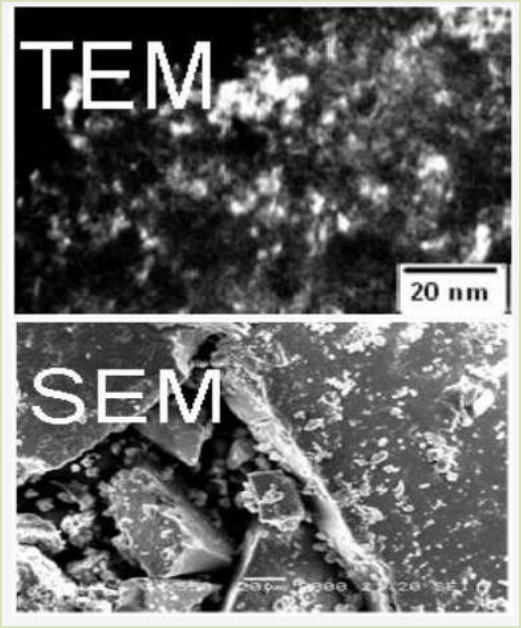
نتایج

نتایج حاکی از آن بود که باکتری ایزوله شده با رنگ آمیزی گرم به صورت کوکوباسیل‌های گرم منفی در زیر میکروسکوپ مشاهده و با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شد. نتایج نشان داد که باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه از نظر تست‌های بیوشیمیایی endol و MR منفی و برای تست‌های citrate و VP مثبت می‌باشند. نتایج آزمایش Duplex pcr بر روی باکتری‌های کلبسیلا ایزوله و شناسایی شده و پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌ها clbB و clbN نشان داد، که از ۱۲ نمونه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از ۳۵ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال ۲ نمونه باکتری دارای ژن‌های clbB و clbN بودند. نتایج آزمایش بافتی(شکل۳) تغییرات سلول را در نمونه بافت سالم و سرطانی نشان می دهد. نتایج آزمایش سنجش هاله عدم رشد نشان داد که در غلظت ۵۲ ppm بالاترین غلظتی می‌باشد که اثر بازدارندگی نشان می‌دهد. نتایج الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری کلبسیلا پنومونیه در جدول ۲ نشان داده شده است. همان طور که در جدول۳ مشخص است، کلبسیلا پنومونیه به آنتی‌بیوتیک-های اریترومایسین، پیپراسیلین، کلیندامایسین و آموکسی-سیلین مقاوم می باشد. بررسی اثر سینرژیسم نانو ذرات مس در غلظت ۵۲ ppm و چهار آنتی بیوتیک مقاوم به کلبسیلا پنومونیه در اثر هم‌افزایی خاصیت ضد میکروبی نسبت به باکتری کلبسیلا پنومونیه نشان داد.

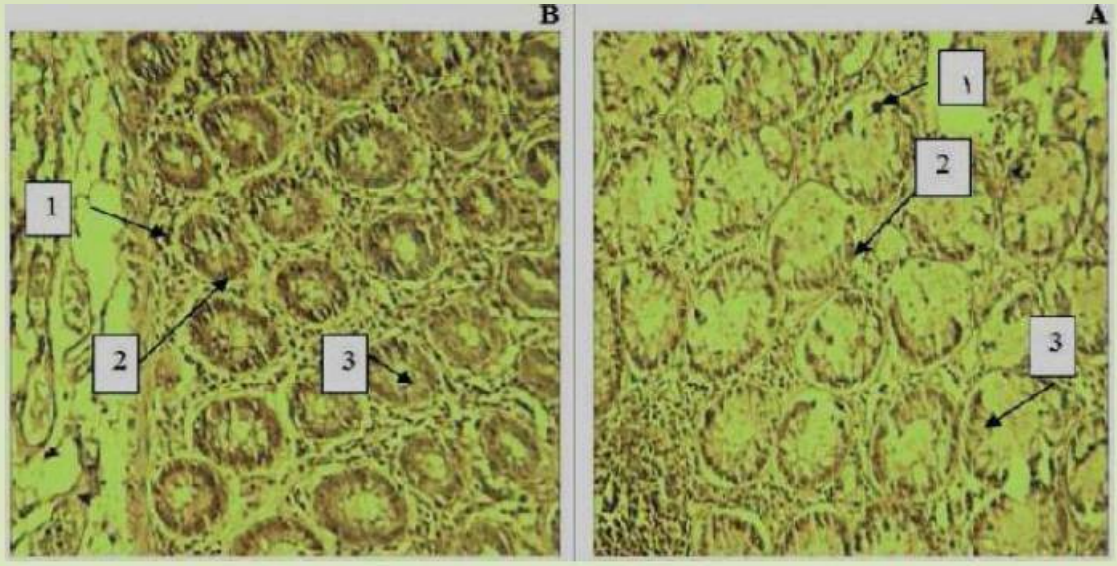


شکل ۱-نتایج آزمایش Duplex PCR برای ژن های clbB و clbN واقع در محدوده ژنومی PKS بر روی ژل آگاروز ۲٪.

از چپ به راست: لدر 100bp، کنترل منفی، چاهک ۱ کنترل مثبت، باکتری کلبسیلا پنومونیه. چاهک های ۶-۲ : نمونه‌های باکتریایی جدا شده از بیماران که واجد ژن منطقه Pks بودند، چاهک های ۹-۷نمونه‌های باکتریایی جدا شده از بیماران که فاقد ژن منطقه Pksبودند.



شکل۲- تصاویر TEM وSEM نانوذرات اکسید مس



شکل

شکل ۳-A نمونه‌ای از بافت توموری کولون،B نمونه‌ای از بافت سالم

۱) سلول‌هایی که هسته آن‌ها به شدت رنگ آمیزی شده،۲) سلول‌هایی که هسته آن‌ها به میزان متوسط رنگ آمیزی شده، ۳) سلول‌هایی که هسته آن‌ها به طور ضعیف رنگ آمیزی شده.

جدول۲-الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های مورد مطالعه کلبسیلا پنومونیه

آنتی بیوتیک / شماره سویه	AM 10µg	PIP 100µg	TE 30µg	AMX 25µg	GM 10µg	E 15µg	CC 2µg	CRO 23 µg
Kcc-11	R	R	13mm	R	16mm	R	R	**23mm**
Knc-13	R	R	18mm	7.5mm	19mm	R	R	**15mm**

R:Resistant I:Intermediate S:Sensitive

PIP= پیپراسیلین، AM = آمپی سیلین، TE = تتراسایکلین، AMX = آموکسی سیلین، GM = جنتامایسین، E = اریترومایسین، CC = کلینداماسین، CRO =سفتریاکسون

جدول ۳- اثر سینرژیسم نانوذرات اکسید مس با آنتی بیوتیک های مختلف بر کلبسیلا پنومونیه

آن ها در ایجاد بیماری مشابه با نقش هلیکوباکترپیلوری

سویه باکتری / آنتی بیوتیک و نانو ذره مس	کلبسیلا پنومونیهKcc-11	کلبسیلا پنومونیهKNC-13
نانو ذره مس۵۲ ppm و اریترومایسین۱۵µg	۸	-
نانو ذره مس۵۲ ppm و پیپراسیلین۱۰۰ µg	۱۶	۱۹
نانو ذره مس۵۲ ppmو آمپی سیلین۱۰ µg	-	۱۱/۵

بحث و نتیجه گیری

ارتباط باکتری با سرطان از مدت‌ها پیش مورد مطالعه قرار گرفته است(۱۶). اما اخیراً شیوع باکتری فامیل انتروباکتریاسه از جمله اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه در سرطان روده بزرگ گزارش شده ، که حضور باکتری-های مهاجم در این سرطان احتمالاً می‌تواند ناشی از نقش در سرطان معده باشد(۱۱،۱۵). التهاب روده بزرگ موجب استقرار پاتوژن روده‌ای مانند کلبسیلا پنومونیه می‌شود. اگر اپی تلیوم به عنوان اولین لایه دفاعی روده در مقابل آنتی ژن‌ها و باکتری‌ها درست کار نکند، احتمال عفونت باکتریایی و التهاب روده افزایش می‌یابد که در بیماران التهاب روده مشاهده شده است. مطالعات

نشان داده که در تعدادی از بیماری‌ها مانندIBD روابط هم زیستی میزبان و فلور میکروبی شکست می‌خورد، سابقه بیماری‌های روده‌ای مانند IBD، کولیت اولسراتیو و بیماری کرون احتمال ابتلا به سرطان کولورکتال را افزایش می‌دهد. در تحقیق حاضر مراجعه کنندگان به بیمارستان اکثراً با علائم ذکر شده در بالا مراجعه نموده‌اند و در تعدادی سرطان کولورکتال تشخیص داده شده است. تحقیق حاضر و تقریباً با تحقیقات سایر محققین هم سویی دارد. در سال ۲۰۰۹ Putze و همکاران به بررسی وجود توکسین کلی باکتین در خانواده انتروباکتریاسه پرداخت و به این نتیجه رسید که علاوه بر سویه‌های اشریشیاکلی این ژن در باکتری‌های دیگر از جمله کلبسیلاپنومونیه و سیتروباکتر و انتروباکتر وجود دارد(۱۸). در این تحقیق باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا شده از غده‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفته است. در تحقیق حاضر علاوه بر جداسازی و شناسایی کلبسیلاپنومونیه و اثر هم افزایی ضد میکروبی نانوذرات مس و آنتی بیوتیک بر علیه سویه‌های کلبسیلا پنومونیه حامل ژن PKS نیز بررسی شد. هر دو سویه جدا شده اثر سینرژیستی نانوذرات مس و آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین۱۵میکروگرم، پیپراسیلین۱۰۰ میکروگرم و آمپی سیلین۱۰ میکروگرم مشاهده شد. نانوذرات مس به دلیل خواص ضدباکتریایی مناسب بیش از سایر نانوذرات جهت دارو رسانی هدف مند آنتی بیوتیک‌ها به محل عفونت نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند(۱۳). نتیجه این دارو رسانی هدف مند بسیار امیدوار کننده بوده باعث شده تا میزان آنتی بیوتیک به میزان قابل توجهی کاهش یابد(۹). در تحقیقی که در سال ۱۳۹۴ توسط سیده فاطمه شفیعی و همکاران انجام شده نانوذرات اکسید مس میزان غلظت باکتریایی را تا ۹۹/۹ درصد کاهش داده است و قطر هاله عدم رشد حاصل از ادغام نانوذرات اکسید مس و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین۱۲میلی متر به دست آمده که افزایش قابل توجهی در بازدارندگی داشته است(۲۰). در تحقیق حاضر نیز آنتی بیوتیک‌های دیگری این اثر هم-افزایی را نشان داده‌اند. در این تحقیق بر روی نانوذرات اکسید مس(Cuo) تمرکز گردیده و خواص ضدمیکروبی آن به عنوان یک دارویی جایگزین جدید مورد بررسی قرار گرفت(۱)، اطلاعات اندکی در مورد فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مس(Cuo) در دسترس است. نانو ذرات مس نسبت به ترکیبات نقره ارزان تر است. اثرات ضد باکتریایی نانوذرات به غلظت نانوذرات و غلظت ابتدایی باکتری وابسته می باشد(۷)، که با تحقیق حاضر هم سویی دارد. در این تحقیق مشاهده گردید که مخلوط نانوذرات اکسید مس و آنتی بیوتیک نواحی ممانعت کننده بزرگ تری را در مقایسه با اکسید مس و هم چنین آنتی بیوتیک مقاوم مورد استفاده به تنهایی ایجاد کرده‌اند که این بیان‌گر افزایش اثر قدرت ضد میکروبی مخلوط فوق می‌باشد. دلیل روشنی برای افزایش فعالیت به طور واضح در نوشتارها بیان نگردیده است، اما گمان براین بوده که این حالت به واسطه ادغام اثرات ضد باکتریایی نانوذرات و آنتی بیوتیک و افزایش مکانیسم‌های اثر دارو است که در برابر باکتری‌های مقاوم به دارو مانع از سازگاری میکروارگانیسم می‌گردد(۲۱).

منابع

1.Azam, A., Ahmed, A., Oves, M., Khan, MS., Memic, M. (2012). Size dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and –negative bacterial strains. International Journal of Nanomedicine, 7(1); 3527-3535.

2.Bauer, AW., Kirby, WMM., Sherris, JC., Truck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Pathol, 45; 493–496.

3.Boleij, A., van Gelder, MMHJ., Swinkels, DW., Tjalsma, H. (2011). Clinical importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer ptients:systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis, 538708.

4.Center, MM., Jemal, A., Smith, RA. (2009). Ward wide variation sin colorectal cancer. CA Cancer J Clin, 59(6); 366-78.
5.Cheung, DY., Kim, TH., Kim, CW., Kim, JI., Cho, SH. (2008). The anatomical distribution of colorectal cancer in Korea: evaluation of the incidence of proximal and distal lesions and synchronous adenomas. Intern Med., 47(19); 1649-54.
6.Chiba, T., Marusawa, H., Ushijima, T. (2012). Inflammation associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. Gastro Enterology, 143;550-63.
7.Colaizzi, JL., Knevel, AM., Martin, AN. (1965). Biophysical study of the mode of action of the tetracycline antibiotics. J. Pharm. Sci, 54(10); 1425-1436.
8.De Kok, IM., Wong, CS., Chia, KS., Sim, X., Tan, CS., Kiemeney, LA. (2008). Gender differences in the tred of colorectal cancer incidence in Singapore, 1968-2002. Int J Colorectal Dis.,23(5); 461-7.
9.Esteban-Cubillo, A., Pecharroman, C., Aguilar, E., Santaren, J., Moya, JS. (2006). Antibacterial activity of copper monodispersed nanoparticles into sepiolite. J Mater Sci, 41(16); 5208–5212.
10. Feng, Q.L. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J Biomed Mater Res, 52(4); 662-8.
11. Gill, SR., Pop, M., DeBoy, RT., Eckburg, PB., Turnbaugh, PJ., Samuel, BS. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science, 312(5778);1355-359.
12. Kuzynski, J., Lauber, CL., Walters, WA., Paefrey, LW., Clemente, JC., Gevers, D. (2012). Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. Nat Rev Genet, 13; 47-58.
13. Leid, J.G. (2012). In vitro antimicrobial studies of silver carbene complexes: activity of free and nanoparticle carbene formulations against clinical isolates of pathogenic bacteria. J Antimicrob Chemother, 67(1); 138-48.
14. Li, Z., Lee, D., Sheng, X., Cohen, RE., Rubner, MF. (2006). Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities. Langmuir, 22(24); 9820–9823.
15. Maloy, KJ., Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. Natyre, 474(7351); 298-306.
16. Nath, G., Gulati, AK., Shukla, VK. (2010). Role of bacteria in carcinogenesis, with special reference to carcinoma of the gallbladder. World Journal of Gastroenterology: WJG, 16(43); 5395-404.
17. Nougayrede, JP., Homburg, S., Taieb, M., Boury, E. (2006). *E.coli* induces DNA doublestrand breaks in eukaryotic. Science, 313; 848-51.
18. Putze, J., Hennequin, C., Nougayrede, JP., Zhang, W., Homburg, S., Karch, H. (2009). Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. Infect Immun, 77; 4696-703.
19. Schairer, D.O. (2012). The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents.Virulence, 3(3); 271-9.
20. Shaffiey, S.F., Ahmadi, M., Shaffiey, S.R., Shapoori, M., Varshoie, H., Azari, F. (2015). Synthesis of copper oxid(cuo) nano particles and surveying its Bacterial properties against *Aerominas hydrophyla* Bactria. Jour of Fasa Med.scie, 5(1).
21. Shahverdi, AR., Fakhimi, A., Shahverdi, HR., Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aueruse* and *Escherichia coli*. Nanomed. Nanotecnol. Biol. Med., 3(2); 168-171.
22. Woodford, N., Turbon, JF., Livermore, DM. (2011). Multiresistant gram negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistanve. FEMS Microbiol Rev.,335736-55.
23. Yamanaka, M., Hara, K., Kudo, J. (2005). Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. Appl Environ Microbiol,. 71(11); 7589-93.
24. Zhang, L. (2010). Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. Curr Med Chem, 17(6); 585-94