فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۴، جلد ۹، شماره ۳، تابستان۹۵، صفحه ۵۷ تا ۶۴

مطالعه بافتی، مولکولی و اثر سینرژیسم نانو ذرات گرافن اکسید و آنتی بیوتیک بر اشریشیاکلی جدا شده از تومورهای سرطان کولورکتال

صدیقه مهرابیان[۱]، آزاده بهزادی[۲]، شهلا محمد گنجی[۳]
۱-استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی و دانشگاه خوارزمی، تهران. ایران.
mehrabians2012@yahoo.com
۲-کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران. ایران.
۳-استادیار ژنتیک مولکولی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران ایران.

تاریخ دریافت:۹۴/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/٤/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: یکی از مهم ترین فاکتورهای ایجاد سرطان کولورکتال عفونت باکتریایی است. عفونت با نوع خاصی از باکتری *E.coli* در افراد مبتلا به بیماری های التهابی روده، می تواند باعث شروع سرطان کولورکتال شود. این باکتری با تولید توکسین ترشحی کلی باکتین شرایط فلورمیکروبی روده را برای بیماری زائی خود فراهم نموده و با اختلال در سیکل سلولی باعث شروع پیشرفت و توسعه سرطان کولورکتال می گردد. لذا هدف از این مطالعه با توجه به مقاوم شدن باکتری بررسی اثر نانو آنتی بیوتیک بر عفونت و میزان بروز و پیشرفت سرطان کولورکتال است.

روش کار: ٦۰ بیوپسی از روده بزرگ مراجعه کنندگان به کلینیک گوارش(۳۰ نمونه از افراد مبتلا به سرطان کولورکتال و ۳۰ نمونه از افراد سالم) از نظر بیماری روده ای و سرطان کولون، ژن clbB وclbN به عنوان مارکر جزایر ژنومی pks بررسی شد. دو نمونه *E.coli* pks جدا شده از بیمار و فرد سالم تحت تاثیر آنتی بیوتیک های رایج درمان روده ای و نانو ذرات گرافن اکسید با روش سنجش قطر هاله عدم رشد قرار گرفتند و اثر سینرژیسم نانو آنتی بیوتیک بر باکتری های مزبور سنجش گردید.

یافته ها: در این مطالعه ارتباط معنی داری بین فراوانی باکتری های *E.coli* واجد ژن *clbB* و *clbN* و سرطان کولورکتال یافت نشد(p=۰/۲). باکتری جدا شده از سرطان کولورکتال نسبت به گروه شاهد مقاومت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک ها نشان داد. اثر سینرژیسم بین آنتی بیوتیک و نانو ذرات گرافن اکسید مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج بررسی این ژن ها در جامعه ایرانی در مقایسه با تحقیقات سایر جوامع فراوانی کمتری را نشان می دهد. باکتری *E.coli* جدا شده از سرطان کولورکتال مقاوم تر از نمونه کنترل است.

واژه های کلیدی: سینرژیسم، گرافن اکسید، اشریشیاکلی، سرطان کولورکتال.

مقدمه

سرطان کولورکتال سومین سرطان رایج و چهارمین دلیل مرگ و میر در جهان است. شیوع سرطان کولورکتال بیش تر از ۹٪ تمام انواع سرطان ها می باشد. این سرطان در ایران پس از سرطان معده، مثانه و پروستات در مردان چهارمین سرطان بوده و در زنان بعد از سرطان سینه دومین سرطان محسوب می شود(۴). از نظر فیلوژنی *E.coli* به چهار گروه *A,B,B_2,D* تقسیم می شود. برخی از سویه های *E.coli* هم زیست، *از گروه* فیلوژنیک B_2 حامل یک جزیره ی بیماری زای ۵۴kb پلی کتید سنتتاز هستند(pks) که آنزیم مورد نیاز برای سنتز یک پپتید پلی کتید ژنوتوکسین به نام Colibactin کد می نماید(۱۱). چندین مطالعه نقش میکروبیوم روده در سرطان زایی وابسته به التهاب را در روده گزارش نموده اند. بیماری کرون(crohn) و کولیت زخم شونده اغلب با خطر سرطان کولورکتال مرتبط می شوند(۱). علاوه بر این عدم تعادل، میکروبیوم به نفع گسترش

پاتوژن فرصت طلب پیش التهابی مانند انتروباکتریاسه و کلستریدیوم دیفیسل در پیشرفت تومور شناخته شده است(۳). هم چنین ارتباط مولکولی بین پاسخ ایمنی میزبان، میکروبیوم روده ای و رخدادهای ژنوتوکسیک در سرطان کولورکتال به صورت التهاب ظاهر می شود. توکسین ها به فرآیند های کلیدی یوکاریوتی مانند پیام رسانی حمله می نمایند و برخی مستقیماً به ژنوم آسیب می رسانند(۱۲). آسیب به DNA می تواند مستقیماً با حمله آنزیماتیک یا به طور غیر مستقیم به واسطه ی تحریک واکنش التهابی با تولید رادیکال های آزاد صورت پذیرد. هم چنین این رادیکال ها می توانند بر روی مکانیسم ترمیم DNA موثر باشند(۱۳). در ایران بعد از بیماری های قلبی-عروقی و سوانح سرطان سومین علت مرگ و میر می باشد(۹). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۶ انجام شد مشخص گردید که عفونت کلبسیلا پنومونیه حاوی ژن های pks می تواند باعث شروع سرطان کولورکتال شود زیرا این باکتری از نمونه های سرطان کولورکتال و افراد شاهد ایزوله شد. کلبسیلا پنومونیه عامل بیماری عفونی با درمان سخت است. اثرات جانبی آنتی بیوتیک که برای درمان به کار می رود بسیار بالاست، در این تحقیق از آنتی بیوتیک رایج بر درمان عفونت های روده ای استفاده شد که اکثر آن ها مقاوم بودند، استفاده از نانو ذرات مس و آنتی بیوتیک ها که به تنهایی باکتری هردو به آن مقاوم بوده در نتیجه اثر هم افزائی یا سینرژیسم با نانو ذره مس بر باکتری کلبسیلا پنومونیه pks جدا شده از تومور های سرطانی خاصیت ضد میکروبی نشان داد(۸). در سال ۲۰۰۹ .Putze.J و همکاران ارتباط فیلوژنی و اپیدمیولوژی باکتری *E.coli* حاوی pks کدکننده ژنوتوکسین کلی باکتین را مورد بررسی قرار داده و دو ژن clbB و clbN را شناسائی نمودند، ۲۸ مورد از ۵۸ سویه دارای ۴۸٪ ژن ها بودند(۱۲). امروزه استفاده از نانو ذرات در درمان تومورهای سرطانی رایج شده است. گرافن اکسید که با روش رسوب دهی شیمیائی فاز بخار تهیه و امکان کنترل ضخامت و تعداد لایه های سنتز شده به درجه سرد کردن و هیدروکربن وابسته می باشد، یک نانو ذره می باشد. با شناسایی غلظت و شکل نانو می توان از آن برای بازدارندگی رشد باکتری جدا شده از تومورهای سرطانی *E.coli* pks استفاده نمود. استفاده از آنتی بیوتیک رایج نیز به عنوان شاهد مثبت ضروری است(۱۴). محققان آمریکائی در تلاش هستند که با استفاده از نانو ذرات قابل انطباق شیوه ای کار آمد از آنتی بیوتیک ها را برای مبارزه با باکتری های بیماری زا ابداع کنند. مرکز تحقیقات ارتش آمریکا به تازگی اعلام کرده است که به جای هدر دادن سرمایه برای تولید آنتی بیوتیک نوین و جدید که تنها تا زمان مقاوم شدن باکتری کارائی دارند، باید بر روی ساخت نانو داروهائی تمرکز کنند که می توانند به تاثیر گذاری بالاتر به مبارزه باکتری بپردازند(۱۰). هدف از این تحقیق رابطه *E.coli* حاوی کلی باکتین با سرطان کولون و در مرحله بعد ایجاد نانو آنتی بیوتیک جهت درمان سریع و عدم مقاومت باکتری است.

مواد و روش ها

در این تحقیق ابتدا اطلاعات کاملی در مورد دموگرافی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال مراجعه کننده به بخش گوارش بیمارستان و مورد کولونوسکوپی قرار گرفته به دست آمد. ۳۰ نمونه از بافت موکوسی تازه افراد مبتلا به سرطان کولون تهیه و در شرایط استریل و ازت مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید. ۳۳ نفر از افرادی که بعد از انجام کولونوسکوپی نتایج پاتولوژی حاکی از سلامت ایشان از نظر سرطان کولورکتال بوده، به عنوان شاهد نمونه موکوسی معرفی شد. پرسشنامه و رضایت نامه توسط بیماران پر و امضاء گردید. تهیه لام از بافت های سالم و سرطانی با استفاده از

روش های بافت شناسی و رنگ‌آمیزی ائوزین – هماتوکسیلین انجام شد. برای جدا سازی باکتری *E.coli* از بافت روده بیماران مبتلا محیط های کشت مغذی از جمله L.B.broth و افتراقی برای باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه EMB agar و محیط‌های بیوشیمیائی از جمله TSI، IMVIC، Urea agar و بافر PBS جهت شستشو اولیه قسمتی از بافت مورد استفاده قرار گرفت. تمام محیط های کشت از شرکت MERCK خریداری شد. پس از رنگ آمیزی گرام کشت چهار مرحله ای باکتری ها بر روی محیط افتراقی EMB انجام و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری گردید تا باکتری *E.coli* ایزوله شود. بعد از جدا سازی و خالص سازی باکتری تست‌های بیوشیمیائی IMVIC،TSI و اوره برای باکتری مورد نظر انجام شد. استخراج DNA از نمونه ها پس از تلقیح باکتری ها در ۵ ml محیط مایع BHI و پس از گرما گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد استخراج ژن باکتری ها بر اساس دستور العمل کیت سینا کلون انجام و کمیت توسط اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی شد. در نهایت DNA استخراج شده از باکتری در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

واکنش مولکولی Duplex PCR

پس از طراحی پرایمر اختصاصی برای ژن های clbB و clbN مطابق جدول ۱ آزمایش دوبلکس PCR برای DNA های استخراج شده از باکتری های بیماران انجام شد. تکثیر ژن با حجم نهائی ۲۵ µl برای هر مخلوط واکنش بود. مقدار مورد نیاز از هر ماده برای انجام این واکنش به شرح زیر است.

µl،Deionizd water۹/۵ µl ،master mix۱۲/۵ µl

DNA۱ ، µl ۵/ از هر یک از پرایمرهای clb BR ، clb BF، clb NR، master mix clb NF از شرکت ژن فن آوران تهیه شد. میکروتیوب ها در ترموسیکلر Techno.UK و در شرایط دمائی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل دمایی به صورت ۹۴ درجه سانتی گراد، ۵۶ و ۷۳ درجه سانتی گراد و هر یک به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد گذاشته شد. پس از انجام آزمایش PCR Duplex محصولات حاصله بر روی ژل آگارز در ۴٪ بررسی شد. نانو ذرات گرافن اکسید با روش اصلاح شده هامر تهیه شد. اندازه نانو ذرات ۱۰-۲ نانومتر درجه خلوص ۹۳ درصد می باشد. غلظت نانو ذرات گرافن اکسید ppm ۱۰۰ است. برای تعیین اثر ضد میکروبی گرافن اکسید غلظت های ppm ۱۰۰، ۵۰، ۲۵،۱۲/۵، ۶/۲۵ در محیط مایع نوترین براث تهیه گردید. به هر لوله ۱ میلی لیتر، باکتری نیم مک فارلند تقریباً 10^8 عدد باکتری در هر سی سی اضافه و ورتکس شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. با دستگاه اسپکتروفتومتر رشد باکتری ها سنجیده شد. کم ترین غلظتی که در آن رشد دیده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری محاسبه گردید. از محیط مایع به محیط جامد منتقل و کشت داده و کمترین غلظتی که در آن رشدی نبود حداقل غلظت کشندگی MBC در نظر گرفته شد.

سنجش قطر هاله عدم رشد

در این روش از آنتی بیوتیک های مختلف که اغلب در عفونت های دستگاه گوارش استفاده می شوند به صورت دیسک در محیط کشت حاوی باکتری *E.coli* قرار داده و قطر هاله عدم رشد سنجیده شد.

بررسی سینرژیسم نانو ذرات گرافن اکسید و آنتی بیوتیک

آنتی بیوتیک های مقاوم به باکتری را انتخاب نموده و میزان ۰/۰۵ میلی لیتر بالاترین غلظت نانو ذرات گرافن اکسید که اثر بازدارندگی نشان داد در روی دیسک آنتی بیوتیک قرار داده بعد از جذب کامل و خشک کردن با

روش سنجش قطر هاله عدم رشد، اثر نانو آنتی بیوتیک سنجیده شد.

تحلیل آماری

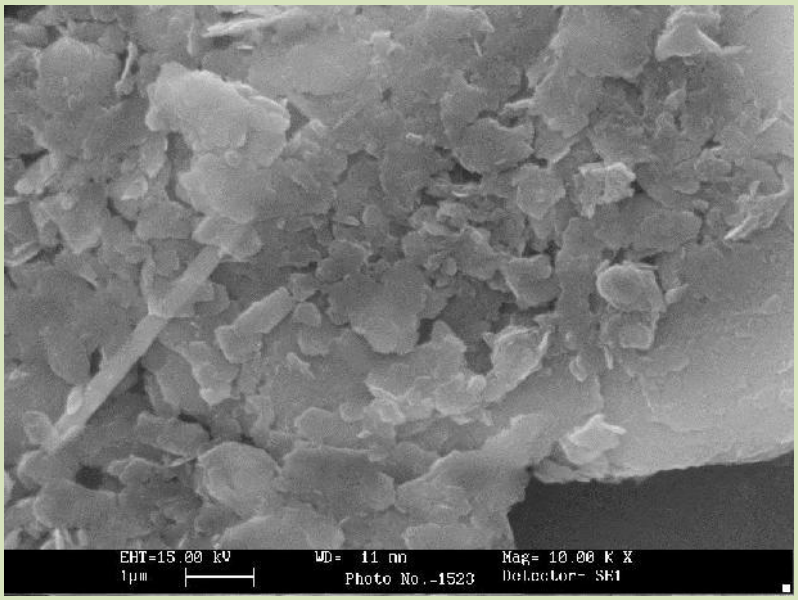
در این مطالعه از آزمون آماری SPSS استفاده و P-value ۰/۰۵≥Pمعنا دار در نظر گرفته شد.

نتایج

اولین قدم در راه تشخیص صحیح آزمایشگاهی نمونه‌گیری دقیق و درست در زمان بروز بیماری است. جدول ۲ اطلاعات فرد مبتلا به سرطان کولون و فردی که به عنوان شاهد انتخاب شده است نشان می دهد.

جدول ۱ – توالی پرایمر های مورد استفاده برای انجام PCR

نام	سکانس
Primer ClbB F	GAT TTG GAT ACT GGC GAT AAC CG
Primer ClbB R	CCA TTT CCC GTT TGA GCA CAC
Primer ClbN F	GTT TTG CTC GCC AGA TAG TCA TTC
Primer ClbN R	CAG TTC GGG TAT GTG TGG AAG G



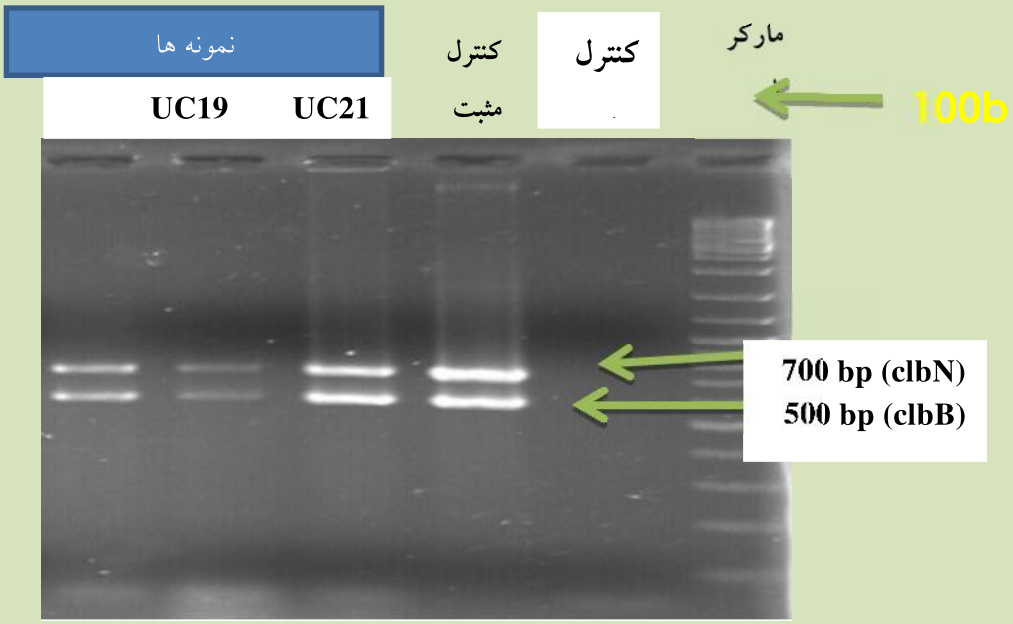
شکل ۱- تصاویر SEM گرافن اکسید سنتز شده با روش اصلاح‌شده هامر(بزرگنمایی ۱۵۰۰۰)

جدول ۲- مشخصات کلی از دو بیمار با نمونه باکتری *E.coli* N-31 و *E.coli* CR-11

کد	N-31	CR-11
سن	۵۱	۲۸
جنس	femal	Femal
وضعیت تاهل	متاهل	مجرد
آیا پس از تشخیص بیماری کاهش وزن داشته است؟	خیر	بله
مقدار کاهش وزن	–	۱۰ کیلوگرم
وضعیت استعمال دخانیات	غیر سیگاری	غیر سیگاری

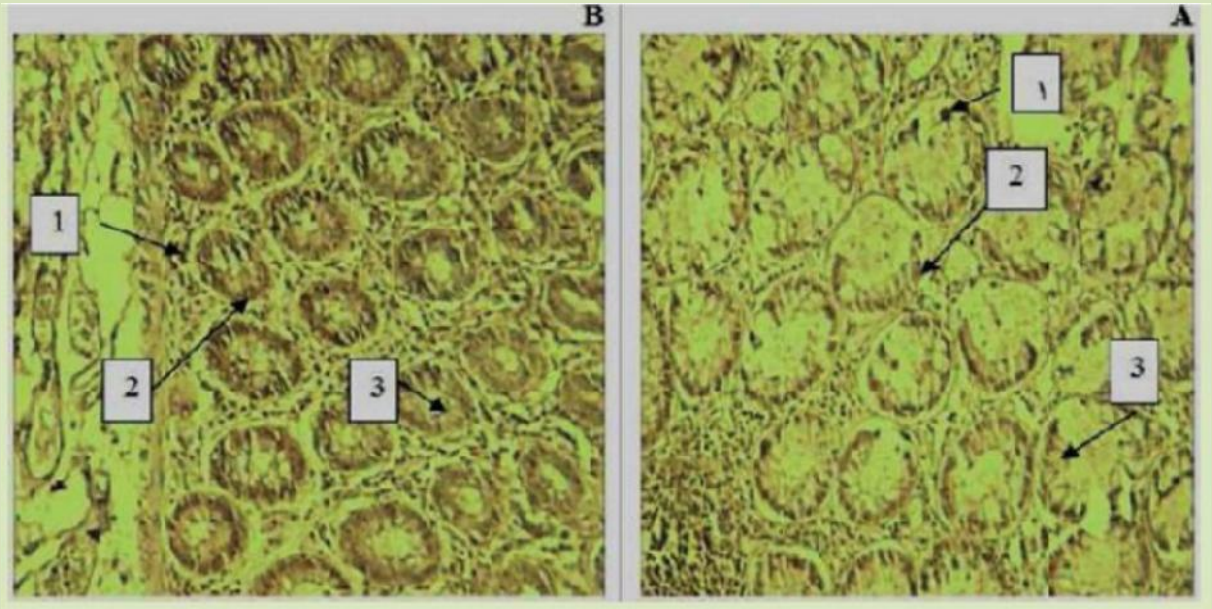
باکتری های ایزوله شده با رنگ آمیزی گرم به صورت کوکوباسیل های گرم منفی در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. نتایج تست های بیوشیمیائی نشان داد که باکتری *E.coli* برای Indol، Motility، MR

و TSI مثبت و برای تست های Citrat و Urea منفی می-باشند. نتایج آزمایش Duplix PCR بر روی باکتری های اشریشیاکلی ایزوله شده و شناسائی شده با روش کشت در محیط های انتخابی و افتراقی و پرایمر های اختصاصی برای ژن های clb B و clb N نشان داد که ۲۰ نمونه از اشریشیاکلی از ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال جدا گردید که ۳ باکتری دارای ۱۵٪ ژن clb B و clb N بودند در گروه کنترل ۳۳ نمونه بافت سالم روده بزرگ ۲۳ نمونه اشریشیاکلی جدا گردید که۸۶٪ در۲ باکتری دارای باند در منطقه مورد نظر (۵۰۰–۷۰۰ kb) مشاهده گردید



شکل ۲ - تصویر ژل آگارز از محصولات PCR

نتایج آزمایش بافتی



شکل ۳- A نمونه ای از بافت توموری کولون، B نمونه ای از بافت سالم

نتایج سنجش هاله عدم رشد نشان داد که CR-11 جدا شده از فرد مبتلا به سرطان کولون نسبت به آنتی بیوتیک های تتراسیکلین، نورفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، سفالوتین مقاوم و فقط به کانامایسین و جنتامایسین حساس است این آنتی بیوتیک ها معمولاً برای عفونت دستگاه گوارش استفاده می شود. درمقابل نانوآنتی بیوتیک که شامل دیسک آنتی بیوتیک ۰/۰۵میلی لیتر از نانو ذرات با غلظت های مختلف می باشد. اثر سینرژیسم در مورد آنتی بیوتیک های مقاوم مشاهده نشد، فقط قطر هاله عدم رشد در مورد دو آنتی بیوتیک جنتامایسین و کانامایسین افزایش پیدا کرد. در مورد *E.coli* N-31 که از گروه کنترل ایزوله شده بود به همه آنتی بیوتیک ها حساسیت نشان داد اما با استفاده از نانو آنتی بیوتیک اثر سینرژیسم به صورت افزایش قطر هاله عدم رشد ظاهر گردید.

جدول ۳ -الگوی مقاومت باکتری اشریشیاکلی سویه CR-11 بر آنتی بیوتیک، نانو ذرات اکسید گرافن واثر سینرژیسم آنتی بیوتیک و نانو ذرات اکسید گرافن

antibiotic شماره سویه	CR_11	TE 30ug	NOR 10ug	NA 30ug	K 30ug	GM 10ug	CF 30 ug
CR-11		R	R	R	12	18	**R**
NGo (50ppm)	growth	R	R	R	17±0.25	21.5±0.5	**R**
NGo (25ppm)	growth	R	R	R	16±0.25	20±0.5	**R**
NGo (12.5ppm)	growth	R	R	R	15±0.25	19±0.25	**R**
NGo (6.25ppm)	growth	R	R	R	15±0.25	19±0.25	**R**

جدول ٤-الگوی مقاومت باکتری اشریشیا کلی سویه N-31 بر آنتی بیوتیک، نانو ذرات اکسید گرافن و اثر سینرژیسم آنتی بیوتیک و نانو ذرات اکسید گرافن

antibiotic شماره سویه	N_31	TE 30ug	NOR 10ug	NA 30ug	K 30ug	GM 10ug	CF 30 ug
N-31		17	27	26	18	18	**20**
NGo (50ppm)	growth	31.5±0.5	35±0.25	31.5± 0.5	24±0.25	22.5±0.5	**28.5±0.5**
NGo (25ppm)	growth	31±0	34±0	29.5±0.5	23.5±0.5	22±0	**25±0**
NGo (12.5ppm)	growth	28.5±0.5	32.5±0.5	28.5±1.5	21±0.75	21.5±0.25	**22.5±0.5**
NGo (6.25ppm)	growth	27±0.75	32±1	28±1	21±0.5	19.5±0	**22±0.25**

R:Resistant I:Intermediate S:Sensitive

NA = نالیدیکسیک اسید **NOR = نوروفلاکسین** **TE = تتراسیکلین**

CF = سفالوتین GM = جنتامایسین K = کانامایسین

Growth = باکتری رشد کرده Ngo =نانو اکسید گرافن N-31 =سویه اشریشیاکلی

بحث و نتیجه گیری

ارتباط باکتری ها با سرطان از مدت ها پیش مورد مطالعه بوده است. اما اخیراً حضور باکتری های مهاجم در سرطان کولون احتمالاً می تواند ناشی از نقش آن ها در ایجاد بیماری مشابه با نقش هلیکوباکتر پیلوری در سرطان معده باشد(۷). 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 بدین صورت

که *E.coli* در ناحیه ایلئوم می چسبد و در شرایط in vivo به سلول های اپی تلیال حمله می کند. در بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو یا بیماری کورون احتمال ابتلا به سرطان کولورکتال تا ۵ برابر افزایش می یابد(۲). بررسی حاضر به منظور جداسازی باکتری *E.coli* حاوی ژن pks از ایزوله های اشریشیاکلی جدا سازی شده از بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و گروه کنترل انجام گرفت. در مطالعه حاضر از روش Duplex-PCR برای بررسی دو ژن clbB و clbN(تولید کننده) کلی باکتین در ایزوله های *E.coli* استفاده شد و باکتری *E.coli* سویه Nissel که به کاشف این ژن از دانشگاه Toulous فرانسه برای این مطالعه هدیه داده شده به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. مطابق نتایج این مطالعه از نظر مولکولی از میان باکتری های *E.coli* جدا شده از مبتلایان به سرطان کولورکتال ٪۱۵ افراد مبتلا برای ژن clbB و clbN(از ژن های مهم محدوده ژنومی pks و تولید کننده کلی باکتین) در باکتری *E.coli* جدا شده مثبت بودند، در حالی که این فراوانی در افراد کنترل تنها ٪۸/۶ بود. بررسی حاضر در راستای مطالعات قبلی شکل گرفت. در سال ۲۰۱۵ در تحقیقی مشابه از مبتلا به سرطان کولورکتال، ٪۱۲/۲ *E.coli* جدا شده دارای ژن clbB و clbN بودند. فراوانی این ژن در *E.coli* جدا شده از افراد کنترل ٪۸/۵ گزارش شده که با تحقیق حاضر همسوئی دارد(۵). در تحقیق حاضر علاوه بر جداسازی و شناسائی اشریشیاکلی اثر هم‌افزائی ضد میکروبی نانو ذرات گرافن اکسید و آنتی بیوتیک بر علیه سویه های اشریشیاکلی حامل ژن pks نیز بررسی شد. هر دو سویه جدا شده اثر سینرژیستی نانو ذرات گرافن اکسید و آنتی بیوتیک های تتراسیکلین، نوروفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، سفالوتین که باکتری *E.coli* CR-11 به آن ها مقاوم بود و فقط کاناماسین و جنتامایسین که حساسیت نشان داد افزایش قطر هاله عدم رشد اثر سینرژیستی را نشان داد اما باکتری *E.coli* N-31 که به همه آنتی بیوتیک ها حساس بود بعد از تهیه نانو آنتی بیوتیک این حساسیت افزایش پیدا کرد. تحقیق حاضر با مطالعاتی که در سال ۱۳۹۴ توسط سیده فاطمه شفیعی و همکاران انجام شده هم سوئی دارد، نانو ذرات اکسید مس میزان غلظت باکتریایی را تا ٪۹۹/۹ کاهش داده است و قطر هاله عدم رشد حاصل از ادغام نانو ذرات اکسیدمس و آنتی بیوتیک تتراسیکلین ۱۲ میلی متر به دست آمده که افزایش قابل توجهی در بازدارندگی داشته است(۱۵). در تحقیق دیگری مخلوط نانو ذرات اکسید مس در مقایسه با گرافن اکسید اثر بخشی بیشتر داشته و آنتی بیوتیک نواحی ممانعت کننده بزرگ تری را در مقایسه با اکسید مس و هم چنین آنتی بیوتیک مقاوم مورد استفاده به تنهائی ایجاد کرده است. این بیان گر افزایش اثر قدرت ضد میکربی نانو آنتی بیوتیک می باشد. دلیل روشنی برای افزایش فعالیت به‌طور واضح در نوشتارها بیان نگردیده است اما گمان بر این است این حالت به علت افزایش مکانیسم های اثر دارو باعث هم افزائی اثر ضد میکروبی می شودکه در برابر باکتری های مقاوم به دارو مانع سازگاری میکرواورگانیسم می گردد(۶).

تشکر و قدردانی

این پژوهش بر گرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی می باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به تصویب رسیده و انجام شده است. بدین وسیله مراتب سپاس را از تمام کسانی که در این پژوهش ما را یاری نموده اند می‌نمائیم.

منابع

1.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.

2.Chiba, T., Marusawa, H., Ushijima, T. (2012). Inflammation associated cancer development in digestive orange: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. Gastroenterology, 143; 550-63.
3.De Kok, IM., Wong, CS., Chia, KS., Sim, X., Tan, CS., Kiemeney, LA. (2008). Gender differerences in the tred of colorectal cancer incidence in Singapore, 1968-2002. Int J Colorectal Dis., 23(5); 461-7.
4.Etemati, A., Sadjadi, A., Semnani, Sh., Nouraie, SM., Khademi, H., Bahadori, M. (2008). Cancer registry in Iran: a brief overview. Arch Iranian Med, 11(5); 577-80.
5. Ganji Mohmmad, Sh., Dastjani, F., Mojtaba Sohrabi. (2015). Study of relationship between a strain of *E.coli* and colorectal cancer. Iranian Journal of medical microbiology .Iran. J. Med microbial, 9;45-49.
6.Geethalakshi, R., Sarada, DVL. (2012). Gold and silver nanoparticles from Trian the a decandra: synthesis, characterization , and antimicrobial properties. Int J Nanomedicin, 7; 53-75.
7.Jemal, A., Center, MM., De Santis, C., Ward, M. (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 19(8); 1893-907.
8.Mehrabian, S., Valadbigy, M., Mohammad Ganji, Sh. (2016). Tissue and molecule investigation and the effect of copper nano particles synergism wih antibiotic on colorectal cancer tumors infected to *Klebsiella pneumonia.* The Quarterly journal of Animal Physiology and Development, 33(2); 15-19.
9.Mousavi, SM., Gouya, MM., Ramazani, R., Davanlou, M., Hajsadeghi, N., Seddighi Z. (2009). Cancer incidence and mortarity in Iran. Annals Oncol, 20(3); 556-63.
10. Nougayrede, JP., Homburg, S., Taieb, M., Boury, E. (2006). *E.coli* induces DNA doublestrand breaks in eukaryotic. Science, 313; 848-51.
11. Pankhurst, QA., Connolly, J., Jones, SK., Dobson, J. (2003). Applications of magnetic Nano particles in biomedicine. Jphs D: Appl Phys, 36; 167-181.
12. 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.
13. Rajilic-Stojanovic, M., Smidt, H., De Vos, WM. (2007). Diversity of the human gastro intestinal tract microbiota revisited. Environ Microbiol, 9; 2125-2136.
14. Rai, VR., Bai, AJ. (2011). Nano particles and their potential application as antimicrobials. In: Mendez-Vilas A.ed Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances. Formatex, Microbiology Series, 3(1); Badajoz, Spain. 197-209
15. Shaffiey, S.F., Ahmad, M., Shaffiey, S.R., Shapoori, M., Varshoie, H., Azari, F. (2015). Synthesis of copper oxide(CuO) nanoparticles and surveying its bactericidal properties against aeromonas hydrophila bacteria. Journal of Fasa University Of Medical Science, 5(1);12-16.