فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۰، جلد ۱۱، شماره ۱،زمستان۹۶، صفحه۶۵ تا ۷۴

بررسی بافتی مولکولی اثر پروبیوتیک بر تومورهای سرطانی آلوده به اشریشیاکلی و کلبسیلاپنومونیه دارای ژنوتوکسین کلی باکتین

سارا الهی امین[۱]، صدیقه مهرابیان[۲و۳]، مریم تاج آبادی ابراهیمی[۴]
۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران.
۲-استاد میکروبیولوژی دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.Mehrabians2012@yahoo.com
۳- استادمیکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران.
٤-استادیار میکروبیولوژی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
تاریخ دریافت:۹۵/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹٦/۸/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: یکی از مهمترین فاکتورهای ایجاد سرطان کولورکتال، عفونت های باکتریایی است. بررسی ها نشان میدهد عفونت با نوع خاصی از باکتری های اشرشیاکلی و کلبسیلاپنمونیه در افراد مبتلا به کولیت اولسراتیو میتواند باعث سرطان کولورکتال شود.پروبیوتیک ها، میکروارگانیسم های زنده و مفیدی هستند که در صورت مصرف در انسان یا حیوان و با اثر بر فلور میکروبی بدن باعث بروز اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان میشوند.امروزه پروبیوتیک به عنوان عاملی برای پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماری های عفونی و سرطانی شناخته شده اند. خاصیت ضد کارسینوژنیک پروبیوتیک با خنثی سازی مسمومیت مواد که باعث آسیب ژنی میگردند، صورت میگیرد.

روش کار: مطالعات میکروبیولوژی و مولکولی ۳۰ نمونه بیوپسی افراد سالم و ۳۰ نمونه بیوپسی از بافت تومور افراد مبتلا به سرطان کولورکتال مورد مطالعه قرار گرفت.پس از شناسایی باکتری های اشرشیاکلی و کلبسیلاپنمونیه از بافت روده ی بزرگ و تومورهای سرطان کولورکتال با روش های میکروبی و بیوشیمیایی ژنوم باکتری استخراج و به روش Multiplex PCR برای باکتری های مورد نظر از لحاظ داشتن ژن های موجود در منطقه ی PKS استفاده ی محصول PCR بررسی شد.پروبیوتیک های مورد استفاده شامل جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم از شرکت تک ژن دریافت شد. با روش های رایج میکروبیولوژی و بیوشیمیایی شناسایی و تایید شد و از مایع رویی کشت با روش سنجش قطر هاله ی عدم رشد اثر آنها بر باکتری های اشرشیاکلی و کلبسیلاپنمونیه مشخص شد.

یافته ها: از ٦ گونه باکتری های اسیدلاکتیک مورد آزمایش همه آنها توان ضدمیکروبی خوبی در مقابل اشرشیاکلی وکلبسیلاپنمونیه دارای ژنوتوکسین کلی باکتین نشان دادند بیشترین اثر مهارکنندگی را باسیلوس کوآگولانس علیه اشرشیاکلی طی روش چاهک با میانگین قطر هاله ی عدم رشد ۱۹/۳ میلیمتر از خود نشان داد. همچنین در مقایسه روش دیسک و چاهک روش چاهک به مراتب حساس تر از روش دیسک بود.

نتیجه‌گیری: طی این مطالعه متابولیت های تولید شده توسط باکتری های اسیدلاکتیک توانستند از رشد باکتری های دارای کلی باکتین جلوگیری کنند. این نشان دهنده نقش مثبت این دسته از باکتری ها در سلامت انسان است.

واژه های کلیدی: باکتری های اسیدلاکتیک- فعالیت ضدمیکروبی- مایع رویی کشت- کلی باکتین.

مقدمه

در ایران بعد از بیماری های قلبی- عروقی و سوانح، سرطان سومین علت مرگ و میر می باشد.(1) در تحقیقی که در سال ۲۰۱۶ انجام شد نشان دادند که عفونت کلبسیلاپنمونیه حاوی ژن های PKS میتواند باعث شروع سرطان کولورکتال شده زیرا این باکتری از نمونه های سرطان کولورکتال و افراد شاهد ایزوله گردید.کلبسیلاپنمونیه عامل بیماری عفونی با درمان سخت است.از نظر فیلوژنی اشرشیاکلی به چهار گروه A,B,B2, D تقسیم می شوند. برخی از سویه های اشرشیاکلی هم زیست از گروه فیلوژنیک B2 حامل یک

جزیره بیماری زای 54kb پلی کتید سنتتاز هستند (Pks) که آنزیم مورد نیاز برای سنتز یک پپتید پلی کتید ژنوتوکسین به نام کلی باکتین کد مینماید.(2) 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 میشود.(3) 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.(4) التهاب همچنین ارتباط مولکولی بین پاسخ ایمنی میزبان، میکروبیوم روده ای و رخدادهای ژنوتوکسیک در سرطان کولورکتال وابسته به التهاب نشان میدهد. توکسین ها به فرآیندهای کلیدی یوکاریوتی مانند پیام رسانی حمله مینمایند و برخی مستقیما به ژنوم آسیب میزنند.(5) باکتری های اسیدلاکتیک مکمل های غذایی هستند که روی میزبان تاثیرات سودمندی دارند و به تعادل فلور میکروبی روده کمک میکنند. از این باکتری ها میتوان به لاکتوباسیلوس ها و بیفیدوباکتریوم اشاره کرد. اثربخشی غذاهای پروبیوتیکی در این است که میکروبهای مذکور تا زمان مصرف مواد غذایی حامل از بقای مناسبی برخوردار باشند و پس از هضم نیز با تحمل شرایط نامناسب معده و صفرا به روده برسند.(6)شواهد نشان داده اند که پروبیوتیک ها با تاثیر بر آنزیم های گوارشی حیوانات و انسان ها، مهار عوامل سرطان زا در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی، سرکوب لوسیون ها و ترکیبات القاکننده سرطان و تومورها در حیوانات آزمایشگاهی نقش موثری در جهت مقابله با سرطان ایفا میکنند.(7) از آنجایی که تکثیر غیرقابل کنترل سلولی و مقاومت آن به مرگ برنامه ریزی شده ویژگی اصلی سلولهای سرطانی میباشد, بنا براین عاملی که باعث بروز آپوپتوز در سلولهای سرطانی شود, میتواند به عنوان ماده ضد سرطانی شناخته شود. با این حال در دهه های اخیر مقاومت به شیمی درمانی مشکل بزرگی محسوب میشود. گفته شده است که حداقل یک دوم کل سرطان ها بدلیل ترکیبات موجود در رژیم غذایی ایجاد میگردند.از این رو ترکیبات غذایی و ارتباط آنها با سلامت افراد توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است که پروبیوتیک ها از جمله این مواد میباشند و همان طور که گفته شد میکروارگانیسم های غیر بیماری زایی هستند که در سیستم گوارشی افراد وجود دارند و اثرات مفید بر میزبان دارند.گفته شده است که پروبیوتیک های خاصی دارای فعالیت ضد سرطانی هستند.(۸)مصرف خوراکی پروبیوتیک میتواند اثر ضد سرطانی داشته باشد و این عمل با خنثی سازی مسمومیت حاصل از موادی که باعث آسیب های ژنی در روده میگردند صورت میگیرد.(۹)در تحقیقی که در سال ۲۰۱۲ انجام شد لاکتوباسیلوس های جدا شده از ترخینه دارای اثر ضد جهشی و ضد سرطانی بالایی میباشند و در واقع به تقویت سیستم ایمنی توسط پروبیوتیک برمیگردد.(۱۰)مکانیزم های مختلفی از جمله اثرات ضد سرطانی,تعدیل فرآیند تمایز در سلول های توموری,تولید اسید های چرب با زنجیره کوتاه و تغییر در بیان ژن تومور که از سمت پروبیوتیک اعمال میشود باعث شده است که توجه زیادی به سمت آنها جلب گردد. به هرحال میتوان نتیجه گرفت که پروبیوتیک ها پتانسیل خوبی دارند تا به عنوان یک استراتژی جدید برای درمان سرطان معرفی شوند.

مواد و روش ها:

در این تحقیق از ۳۰ نمونه افراد مبتلا به سرطان کلون, بافت موکوسی تازه دریافت شد.و ۳۰ نفر از افرادی که بعد از انجام کولونوسکوپی نتایج پاتولوژی حاکی از سلامت ایشان از نظر سرطان کولورکتال بود.نمونه ها در ۸۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. جمع آوری نمونه ها همراه با رضایت نامه و تکمیل فرم پرسشنامه بود.نمونه

ها در ابتدا مطالعه ی بافتی شده و از نمونه های مثبت دارای باکتری ژنوتوکسین کلی باکتین و نمونه های بدون حضور باکتری لام تهیه گردید.بدین منظور ابتدا برش هایی از نمونه های بافتی تهیه، با استفاده از رنگ های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شد، سپس از برش های آماده توسط میکروسکوپ نوری عکس برداری گردید.برای جدا سازی باکتری های اشرشیاکلی و کلبسیلاپنمونیه از محیط کشت مغذی L.B.broth و اختصاصی خانواده ی انتروباکتریاسه EMB ومحیط های بیوشیمیایی TSI و IMVIC و Urea Agar و بافر PBS جهت شست وشوی اولیه قسمتی از بافت مورد استفاده قرار گرفت. بعد از جداسازی و خالص سازی باکتری تست های بیوشیمیایی انجام شد.

استخراج DNA از نمونه ها:

پس از تلقیح باکتری ها در ۵ میلی لیتر محیط مایع BHIو پس از گرماگذاری به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد استخراج ژن باکتری ها بر اساس دستور العمل کیت سیناکلون انجام شد و کمیت توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی شد.در نهایت DNA استخراج شده از باکتری در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

واکنش مولکولی Duplex PCR :

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

0.5uل, 1 uل DNA , 9.5 uل Deionized water
12.5 uل master mix, هر یک از پرایمر های clbBR,clbBF,clbNR ,clbNF از شرکت ژن فن آوران تهیه شد.میکروتیوب ها در ترموسایکلر Techno.UK و در شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، سپس سیکل دمایی بصورت ۹۴درجه سانتیگراد ۵ ثانیه،۷۳ درجه سانتیگراد هریک به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد گذاشته شد. پس از انجام آزمایش Duplex PCR محصولات حاصله برروی ژل آگار ۴٪ بررسی شد.

جدول ۱-توالی پرایمرهای 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

شناسایی باکتری های اسیدلاکتیک:

این باکتری ها شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس- پدیوکوکوس- لاکتوباسیلوس پلانتاروم- لاکتوباسیلوس بولگاریکوس- باسیلوس کوآگولانس- بیفیدوباکتریوم انیمالیس از شرکت تک ژن دریافت شد.بعد از کشت در محیط MRS و بررسی خالص سازی کلونی ها با تست های بیوشیمیایی، تخمیر قندها، مطالعات میکروسکوپی رشد در دمای ۴۵، ۳۷، ۱۵ درجه سانتیگراد و تولید آمونیاک از آرژنین باکتری های موجود تا سطح گونه شناسایی شد.

تهیه مایع رویی کشت باکتری های اسیدلاکتیکی:

باکتری های خالص شده مورد آزمایش در محیط MRS Broth در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند تا کدورتی معادل 0/5 مک فارلندبه دست آید. برای تهیه سوپرناتانت کشت باکتری به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. آماده سازی باکتری های اشرشیاکلی و کلبسیلاپنمونیهPKS که قبلا با انجام آزمایش های رایج میکروبیولوژی و انجام PCR شناسایی شده بودند، پس از کشت در محیط نوترینت براث با کدورت معادل 0/5 مک فارلندمورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی:

برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی با باکتری های اسیدلاکتیک از محیط مولرهینتون آگار استفاده شد. برای این منظور از روش های دیسک (Disk Diffusion Agar) و چاهک(well Diffusion Agar) برای تعیین میزان مهارکنندگی باکتری های اسیدلاکتیکی استفاده شد و اثر آنتاگونیسمی این باکتری ها بر سویه های اشرشیاکلی و کلبسیلاپنمونیه بررسی شد.

نتایج:

باکتری های ایزوله شده از تومورهای سرطانی و بافت روده ای با رنگ آمیزی گرم به صورت کوکوباسیل گرم منفی در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. نتایج تست بیوشیمیایی مطابق جدول۲:

جدول ۲- نتایج تست بیوشیمیایی برای دو باکتری اشریشیاکلی و کلبسیلا :

نوع باکتری	تست اندول	تست حرکت	تست MR	تست VP	تست سیترات	تست UREA
اشریشیا کلی	+	+	+	-	-	-
کلبسیلا	-	-	-	+	+	+

بررسی مولکولی باکتری های مورد آزمایش:

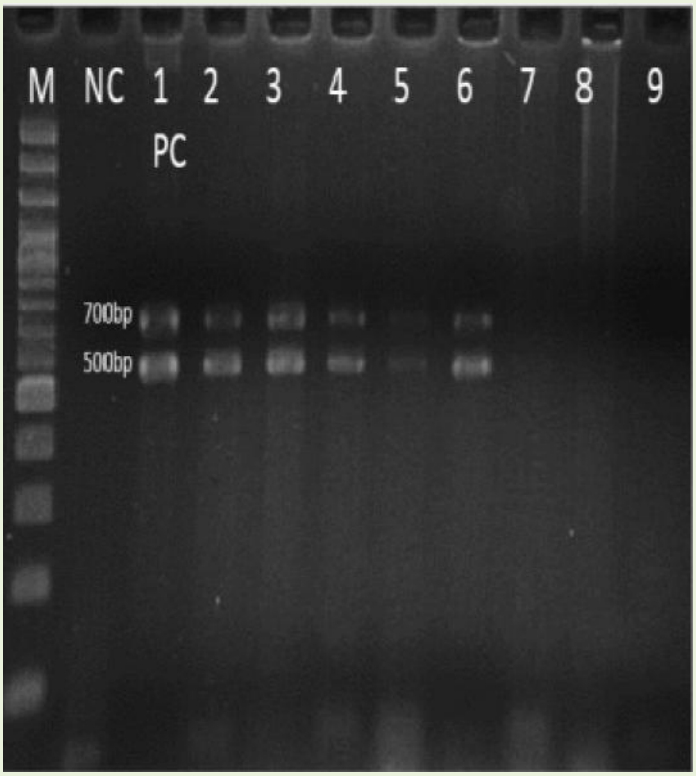
نتایج حاصل از PCR دو باکتری اشرشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه که حاوی ژن clbBو clbN بودند . ژن cIbN دارای ۷۰۰ جفت باز و ژن cIbB دارای ۵۰۰ جفت باز بود

نتایج تست تخمیر قندها:

برای شناسایی گونه های مختلف باکتری های پروبیوتیک از تخمیر قندها (۱۱ قند) استفاده گردید که در جدول ۳ قابل مشاهده است.

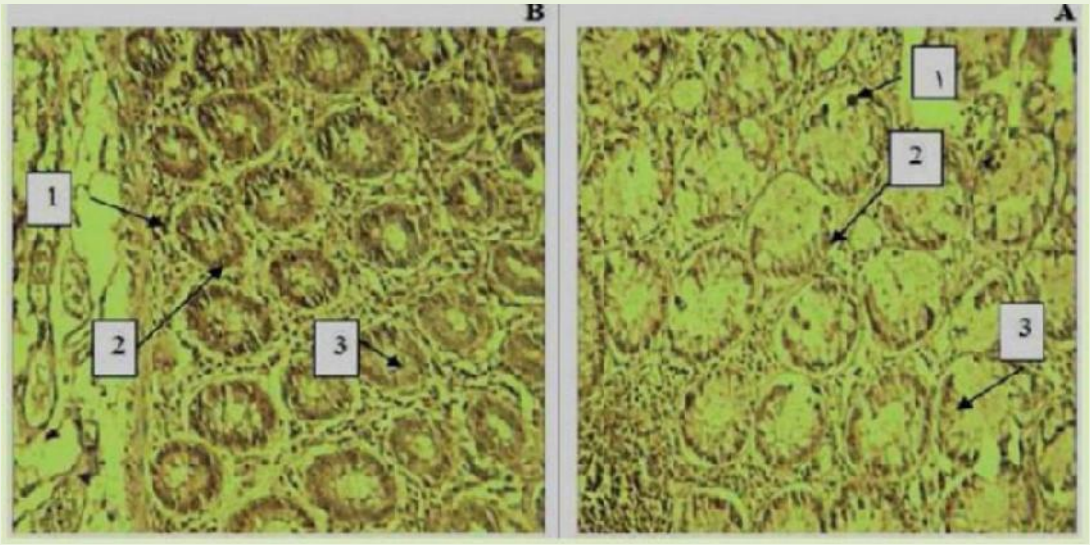
جدول ۳- نتایج شناسایی گونه های مختلف باکتری های پروبیوتیک تست تخمیر قندها

نام قند	گالاکتوز	فروکتوز	رافینوز	آرابینوز	زایلوز	سوکروز	سوربیتول	مانیتول	مالتوز	لاکتوز	گلوکز
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	+	+	+	–	–	+	–	–	+	+	+
پدیوکوکوس	+	+	–	+	+	–	–	–	+	+	+
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس بولگاریکوس	+	+	–	d	–	–	–	–	–	+	+
باسیلوس کوآگولانس	+	+	–	+	–	+	–	+	+	+	+
بیفیدوباکتریوم انیمالیس	+	–	–	+	+	+	–	–	+	+	+



شکل۱- **نتایج آزمایش Duplex PCR برای ژن هایclbB, clbN, و 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 ۹-۷ نمونه‌های باکتریایی جدا شده از بیماران که فاقد ژن منطقه Pksبودند.



شکل۲- Aنمونه‌ای 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.

نتایج حاصل از مقایسه روش دیسک و چاهک برای گونه های مورد آزمایش در مقایسه این دو روش، روش چاهک نسبت به روش دیسک از نتایج بهتر و مثبت تری برخوردار بود و باکتری های اسیدلاکتیکی اثرات مهارکنندگی بهتری در روش چاهک از خود نشان دادند که برای همه ی سویه ها این مساله نمایان بود.(جدول ۴و ۵)

باسیلوس کوآگولانس با میانگین مهارکنندگی کل ۱۹/۳ میلیمتر در روش چاهک و ۱۷/۶ میلیمتر در روش دیسک بالاترین میزان مهارکنندگی و پدیوکوکوس با میانگین مهارکنندگی کل۱۰/۳ میلیمتر در روش چاهک۸/۳ میلیمتر در روش دیسک کمترین میزان مهارکنندگی را از خود نشان داد.

جدول ٤-میانگین میزان مهارکنندگی سویه های جداسازی شده در مهار باکتری های بیماری زا بر حسب میلیمتر(روش دیسک)

باکتری	E.coli N11	E.coli C4	C.penom KN13	C.penom KCC11	C.penom ۱۰۵۳	E.coli ۲۵۹۲۲
اسیدو فیلوس	۱۰/۶±۰/۴۵	۱۰/۳±۰/۴۶	۱۱/۶±۰/۵۵	۱۰/۳±۰/۴۵	۱۰/۳±۰/۴۵	**۱۰±۰/٤٤**
پلانتاروم	–	۱۰±۰/۴۴	۱۰/۳±۰/۴۳	–	۹/۶±۰/۴۳	**۹/٦±۰/٤۳**
بولگاریکوس	۱۱/۳±۰/۵۵	-	۱۷/۳±۰/۶۵	–	-	**-**
پدیوکوکوس	۱۷/۳±۱/۲۵	–	۸/۳±۱/۲۶	۸/۶±۱/۲۶	۱۰/۳±۱/۲۱	**۱۰/۳±۱/۲۱**
باسیلوس کوآگولانس	–	۱۶/۶±۰/۷۳	۱۵/۶±۰/۷۲	۱۷/۳±۰/۷۳	۱۷/۳±۰/۷۳	**۱۷/۳±۰/۷۳**
بیفیدوباکتریوم انیمالیس	–	۹/۶±۰/۴۴	۹/۳±۰/۴۴	۱۰/۳±۰/۴۵	۱۰±۰/۴۵	**۱۰/۳±۰/٤۵**

منفی در جداول بیانگر عدم ایجاد هاله ی رشد میباشد.

جدول ۵- میانگین میزان مهارکنندگی سویه های جداسازی شده در مهار باکتری های بیماری زا بر حسب میلیمتر(روش چاهک)

باکتری	E.coli N11	C4 E.coli	C.penom KN13	C.penom KCC11	C.penom ۱۰۵۳	E.coli ۲۵۹۲۲
اسیدو فیلوس	۱۱/۶±۰/۵۲	۱۱/۶±۰/۵۲	۱۲/۶±۰/۵۲	۱۱/۶±۰/۵۲	۱۲/۶±۰/۵۲	**/٦±۰/۵۲ ۱۱**
پلانتاروم	۱۱/۶±۰/۴	۱۱/۳±۰/۴	۱۱/۶±۰/۴	–	۱۱/۳±۰/۴	**۱۰/٦±۰/٤**
بولگاریکوس	–	–	۱۷/۳±/۰۱	–	–	**–**
پدیوکوکوس	۱۱/۶±۰/۷۳	-	۱۰/۳±۰/۷۳	۱۰/۶±۰/۷۳	۱۱/۶±۰/۷۳	**۱۲±۰/۷۳**
باسیلوس کوآگولانس	۱۹/۳±۰/۴	۱۹±۰/۴	۱۸/۳±۰/۴	۱۸/۶±۰/۴	۱۸/۳±۰/۴	**۱۸/٦±۰/٤**
بیفیدوباکتریوم انیمالیس	-	۱۱/۶±۰/۵۸	۱۰/۳±۰/۵۸	۱۱±۰/۵۸	۱۱/۶±۰/۵۸	**/٦±۰/۵۸ ۱۱**

منفی در جداول بیانگر عدم ایجاد هاله ی رشد میباشد

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). 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 است(۱۱)، که حضور باکتری‌های مهاجم در این سرطان احتمالاً می‌تواند ناشی از نقش آن ها در ایجاد بیماری مشابه با نقش هلیکوباکترپیلوری در سرطان معده باشد(۱۵). التهاب روده بزرگ موجب استقرار پاتوژن روده‌ای مانند کلبسیلا پنومونیه می-شود.اگر اپی تیلیوم 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 است در تعدادی از بیماری‌ها مانندIBD روابط همزیستی 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 نموده اند و در تعدادی سرطان کولورکتال تشخیص داده شده است. تحقیق حاضر و تقریباً با تحقیقات سایر محققین همسویی 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 از دو باکتری اشرشیاکلی جدا شده از تومور سرطان کولورکتال و بافت سالم روده و یک نمونه استاندارد با کد ۲۵۹۲۲ و دو نمونه کلبسیلاپنمونیه جدا شده از تومور سرطان کولورکتال و بافت سالم روده و یک نمونه استاندارد با کد۱۰۵۳ انجام شد و باکتری های پروبیوتیک که از لحاظ مورفولوژی و آزمایش های بیوشیمیایی و پتانسیل پروبیوتیکی شناسایی شدند. این باکتری ها شامل بیفیدوباکتریوم انیمالیس-باسیلوس کوآگولانس-پدیوکوکوس-لاکتوباسیلوس بولگاریکوس-لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس استفاده شد.خصوصیات باکتری های پروبیوتیک مطابق با تحقیق Dunne و همکاران در سال ۲۰۰۱ ارزیابی شد.(۱۱)در این مطالعه مشخص شد که متابولیت های تولیدی توسط این باکتری ها که به کمک سانتریفیوژ جداسازی شده اند قادرند از رشد باکتری های بیماری زای مورد مطالعه جلوگیری کنند.corconnierو همکارانش بیان کردند که مصرف سوپرناتانت (مایع رویی کشت) باکتری های لاکتوباسیلوس

فرمنتوم،لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس و لاکتوکوکوس لاکتیس بر طیف وسیعی از باکتری های بیماری زا اثر ممانعت کنندگی دارد.(۱۲)در این مطالعه نیز سوپرناتانت کشت همه باکتری های مورد آزمایش اثر ممانعت کنندگی نشان داد.طی این بررسی در مقایسه دو روش دیسک و چاهک هاله های عدم رشد ایجاد شده بر علیه باکتری های بیماری زا در روش چاهک در همه موارد بیشتر از دیسک بود که این امر ممکن است بدلیل انتشار مایع روی کشت مورد استفاده از رو یا زیر آگار باشد و این در حالی است که این انتشار در دیسک های خشک شده ی حاوی مایع روی کشت باکتری اسید لاکتیکی کمتر است.در تحقیقی که بوسیله ی ogunbqnwو همکارانش در مورد تعدادی از باکتری های اسید لاکتیک و اثر آنها بر باکتری های روده ای از جمله اشرشیاکلی استفاده از روش چاهک را مناسب معرفی نمودند و اثرات ضد میکروبی قوی نشان دادند(۱۳)مصرف پروبیوتیک و پری بیوتیک میتواند اثرات ضد جهش زایی داشته باشد(۱۴)در تحقیق حاضر باکتری های بیماری زا از تومور های سرطان کولورکتال جدا سازی و شناسایی شده بود.امروزه عفونت باکتریایی را موثر در ایجاد جهش و سرطان میدانند.در زمینه تاثیر پروبیوتیک در پیشگیری از سرطان کولون نیاز به مطالعات انسانی بیشتری میباشد.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی میباشد 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 مارا یاری نمودند می نماییم.

منابع

1-Mousavi sm, Gouya mm, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. 2006 Cancer incidence and mortality in Iran Annal oncol,20(3)556-63

2-Nougayrede JP, Homburg S, Taieb M, Boury E. etal 2006 E. coli induces DNA doublestrand breaks in eukaryotic science. 313:848-51

3-Cheung DY, Kim TH, Kim CW, Kim JI, Cho SH, etal.2008 The antimicrobial distribution of The incidence of Proximal and distal lesions and synchronous adenomas, Intern Med,47(19)1649-54

4-De KOK IM, Wong CS, Chia KS, Sim X, Tan CS, Kiemeney LA, etal 2008 Gender differences in The tread of colorectal cancer incidence in singapare,1968-2002. Int. J colorectal Dis 23(5)461-7

5-Putze J. Hennequin C, Nougayrede JP, Zhang W, Homburg S, Karch H, etal 2009 Genetic genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. Infect Immun,71:4969-4703

6-Hammes WP. Hertel C. 2002 Research approaches for pre and probiotics, challenges and outlook Food. Res Int . 35(213)65-70

7-Burns AJ, Rowland IR 2000 Anti-carcinoge nicity of probiotics and curr issues Intest microbial 1(1)13-24

8-Daniluk U. (2012). Probiotics, The New Approach for cancer prevention and/or potentialization of Anticancer Treatment? J.clin EXP oncol 1:2

9-Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-zobel BL, 2012 protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am J Clin Nutr, 73(2 SUPPT)4515-5s

10-MehrabianS. Tajabadi Ebrahimi M, Abbas Ahmadi M, Bahrami H 2012 study of antimutagenic and anticancer effect of loctic acid bacteria isolated from Tarkhineh by Ames Test. J.Arak Unir Med Sci, 15(7)72-9

11-Dunne C, Omahony L, Murphy L. Thornton G. Morrissey D, O Halloran S, et al 2011 Invitro selection criteria for probiotique bacteria of human origin correlation with invtro Bindingd. Am J clin Nutr 73(2 SUPPL):3865-3925

12-Coconnier MH, Lievin V, Hemery E servin AL (1998) Antagonistic acivity against Helocobacter infection invitro and invivo by the human lactobacillus acidaphillus Strain LB. APPL Environ Microbiol 64:4573-4580

13-Ogunbanwo ST, Sanni AL, onilude A.A,(2003), Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F, and Lactobacillus brevis OGI African journal of biotechnology 2(8)219-227

14-Rafter J. (2013) probiotics and colon cancer. Best Pract Res clin Gastroenterol 17: 849-859.
15- 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.
16.Maloy, KJ., Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. Natyre, 474(7351); 298-306.
17.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.
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.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.
20. 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.
21.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.

Effect of Colloidal Nanosilver Particles on Some of Liver Enzymes in Common Carp *(Cyprinus carpio)*

A. Samsami[1], **R. Rahimi**[1], F. Shaluei[1]

1.Department of Fisheries and Environmental Sciences, University of Shahrekord, Shahrekord. Iran. .**rahimi@nres.sku.ac.ir**

Received:2016.4. 7 **Accepted: 2017. 6. 8**

Abstract

Inroduction & Objective: Despite increasing application of silver nanoparticles (NPs) in industry and consumer products, there is still little known about their potential toxicity, particularly to organisms in aquatic environments. Regarding fast development of the nanotechnology and its diverse applications, is very important having enough data on the probably its side effects on the aquatic body organs. Therefore, in this study the median lethal concentration "LC50" and the effects of nanosilver administration on the liver's biochemistry in cyprinus carpio

Material and Method: For this purpose 84 fish were exposed to concentrations of(0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 ppm) for 96 hours and their mortality were recorded. By using probit analyses the LC50 was obtained 0.23 ppm. In next stage 84 fish in four treatment with three repeat in each treatment were exposed to (1/2 LC50, 1/5 LC50, 1/10 LC50) and contral treatment for 14 days. After 14 days 2 fish in each repeats was selected in random and were passed out with clove powder. Their livers were extracted. Then, Changes in AST,ALP,ALT levels were counted.

Results: Results showed in AST,ALP,ALT levels a significant increase in the nanosilver treated fish ($P<0.05$) when compared to control .

.

Keywords: Nanosilver particles, Cyprinus carpio, AST,ALP,ALT.