فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی 27، جلد 7، شماره 4، پائیز93، صفحه 61 تا 69

بررسی بافتی، مولکولی و باکتریایی نمونه های بیماران مبتلا به بیماری های التهابی روده از بیمارستان بقیه الله (عج) تهران

نجمه نجف زاده[1]، **شهلا محمدگنجی[2]**، رضا بهروزی[2]، صدیقه مهرابیان[1]
1-دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، تهران. ایران.
2-پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران. ایران. **shahlamg@yahoo.com**

تاریخ دریافت: 93/6/29 تاریخ پذیرش:93/8/10

چکیده

مقدمه و هدف: یکی از علل عفونت های داخل بدن، آلودگی با باکتری *E.coli* واجد ژن *pks* است. این ژن، باعث القا فسفوریلاسیون هیستون H2AX در انتروسیت های موش می شود. در سلول هایی که در معرض توکسین می باشند، افزایش قابل توجهی در فراوانی جهش در ژن های آن ها دیده می شود. در این تحقیق وجود منطقه ژنی *pks* در باکتری *E.coli* جداشده از بیوپسی بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده و افراد نرمال مراجعه کننده به کلینیک گوارش و غدد بیمارستان بقیه الله (عج) مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: مطالعات میکروبیولوژی و مولکولی 20 نمونه بیوپسی افراد سالم و 25 نمونه بیوپسی از بافت روده بزرگ افراد مبتلا به بیماری التهابی روده مورد مطالعه قرار گرفت. پس ازشناسایی باکتری *E.coli* از بافت روده با روش های میکروبی و بیوشیمیایی ژنوم باکتری استخراج و به روش Multiplex PCR برای باکتری مورد نظر از لحاظ داشتن ژن های موجود در منطقه *pks* استفاده و محصولPCR به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگاروز 2٪ بررسی شد.

یافته ها: نتایج مشخص نمود که 28٪از باکتری های *E.coli* جداشده از نمونه های بیماران، دارای منطقه ژنی *pks* هستند.

واژه های کلیدی: بیماری التهابی روده، *E.coli*، کلی باکتین، ژنpks.

مقدمه

بیماری‌های التهابی روده یا IBD(Inflammatory Bowel Disease) اصطلاحی است که دو بیماری کولیت اولسراتیو(Ulcerative Colitis) و بیماری کرون(Crohn's Disease) را در بر می‌گیرد. در کولیت اولسراتیو، التهاب روده در دیوارهٔ داخلی روده بزرگ رخ می دهد و بیماری کرون سبب التهاب دیواره داخلی و خارجی در هر دو روده بزرگ و کوچک می‌شود، بنابراین دیواره داخلی روده قرمز متورم و زخم شده و خونریزی اتفاق می افتد(15). بیماری‌های التهابی روده بیشتر در افراد جوان بین 18-29 سال دیده می شود هرچند که مواردی نیز در کودکان سنین دو سالگی و یا سالمندان در دههٔ هفتم و هشتم زندگی وجود داشته است. مردها و زنان شانس یکسانی برای ابتلا به بیماری دارند(15). اگر چه علل دقیق بیماری‌های التهابی روده ناشناخته است، نظریه های متعددی نیز در این زمینه وجود دارد. مثلاً برخی از نظریه های ژنتیکی، بیان می‌کند که بیماری التهابی روده در خانواده‌ها به صورت ارثی دیده می‌شود زیرا حدود 15 تا 30 درصد مبتلایان به بیماری‌های التهابی روده، دارای حداقل یک خویشاوند مبتلا به این بیماری می باشند. البته مطالعاتی در مورد این- که آیا ژن به خصوصی یا گروهی از ژن ها مسئول ایجاد این بیماری است یا خیر در حال انجام است. تغییرات بسیاری در سیستم ایمنی بدن(سیستم دفاعی طبیعی بدن در برابر بیماری ها) مبتلایان به بیماری‌های التهابی روده دیده شده است و آن چه هنوز ناشناخته است این است که چه عواملی سبب ایجاد این تغییرات می شود. مطالعات زیادی در این‌زمینه انجام شده است، از جمله مطالعاتی که ارتباط بیماری‌های التهابی روده را با عوامل عفونی بررسی می کند. بر اساس شواهد استرس نمی‌تواند

به تنهایی سبب ابتلا به بیماری‌های التهابی روده شود، ولی مثل سایر بیماری‌ها علائم و نیازمندی به برنامهٔ درمانی را تشدید می کند(17).

کولیت اولسراتیو

اغلب، کولیت اولسراتیو در افراد جوان 15 تا 40 سال دیده می شود. کولیت اولسراتیو تنها در دیوارهٔ داخلی رودهٔ بزرگ و مقعد رخ می دهد. وقتی فقط منحصر به مقعد باشد پروکتیت نامیده می شود. التهاب مقعد و رودهٔ بزرگ سبب می شود از جذب آب جلوگیری شده و این مسأله سبب ایجاد اسهال می شود. کولیت اولسراتیو بیماری است که گاهی بهبود می یابد و گاهی مجدداً عود می کند(17). شایع ترین علائم کولیت اولسراتیو عبارتست از: اسهال، کرامپ شکمی، خونریزی از مقعد، تب مکرر و تهوع. سایر علائم این بیماری شامل خستگی، کاهش وزن، کاهش اشتها، درد شکمی، درد مفاصل، مشکلات کبدی، از دست دادن آب و املاح بدن، خونریزی که سبب کم خونی می شود(و همین کم خونی است که سبب ایجاد خستگی می شود)، قرمزی و تورم چشم ها است. هیچ کس با اطمینان نمی داند چرا مشکلات خارج از روده ای این گونه با التهاب روده همراه می‌شوند. این مشکلات با بهبود یافتن کولیت اولسراتیو بهبود می‌یابد. نیمی از بیمارانی که مبتلا هستند فقط علائم خفیفی دارند(17).

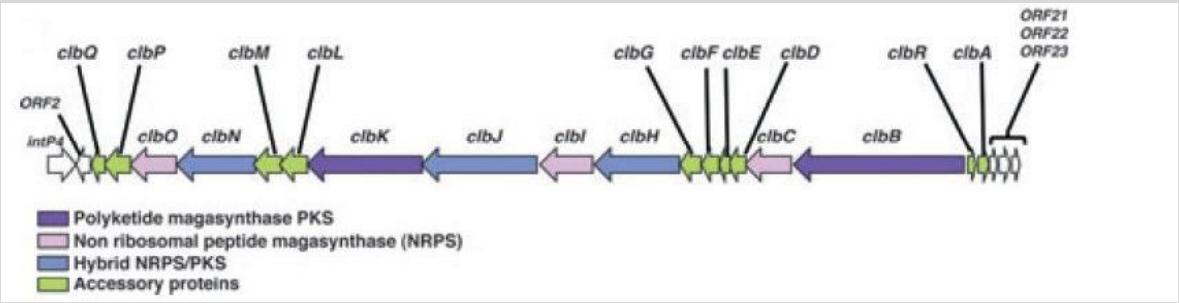
بیماری کرون

کرون بیماری مزمنی است که دوره های بهبود و عود مجدد دارد. علت این بیماری فرآیند التهاب و ایجاد زخم است که در لایه‌های عمقی دیوارهٔ روده رخ می دهد. شایع ترین ناحیه های آسیب دیده، شامل قسمت پائینی رودهٔ کوچک(یا ایلئوم) و هم‌چنین اولین قسمت رودهٔ بزرگ می باشند(در صورت درگیری اولین قسمت روده بزرگ به این نوع از بیماری کرون ایلئوکولیت می-گویند). بیماری کرون می‌تواند هر قسمتی از دستگاه گوارش فوقانی(از دهان گرفته تا معده و روده کوچک) را هم مبتلا نماید. زخم‌های آفت مانند در دهان شایعند. زخم‌ها هم چنین ممکن است در مری، معده و قسمت بالایی رودهٔ کوچک(یعنی دئودنوم یا دوازدهه) رخ دهند. تمایز بین این زخم ها و زخم‌های معده و روده تنها توسط معاینات نمونه برداری امکان پذیر است(4). شایع‌ترین علائم بیماری کرون عبارتست از: درد شکمی در سمت راست و پائین شکم، اسهال، کاهش وزن، خونریزی مقعدی و تب. خونریزی مزمن ممکن است سبب کاهش شمارش گلبول های قرمز یا کم خونی می-گردد. کودکان مبتلا به بیماری کرون ممکن است تأخیر رشد داشته باشند(4).

ارتباط باکتری *E.coli* با بیماری های التهابی روده

اجتماعات متراکم باکتریایی که در دستگاه گوارش زندگی می کنند به نام " microbiota" خوانده می شوند که نقش اصلی آن ها در سلامت و بیماری های انسانی به طور فزاینده‌ایی مورد شناسایی قرار گرفته است. میکروبیوتا عموماً عملکردهای مفید سلول انسانی را تحت تاثیر قرار می دهد و باعث تقویت راه های ایمنی سلولی در برابر پاتوژن ها می گردد(5). یکی از اعضای میکروبیوتا دستگاه گوارش انسانی، *E.coli* است که چند روز بعد از تولد در روده کلونیزه شده و در سراسر زندگی میزبان در روده وجود دارد. جمعیت سویه *E.coli* را می توان حداقل در چهار گروه فیلوژنیک اصلی(A، B1، B2، D) طبقه بندی کرد. سویه *E.coli* گروه B2 فراوانی کمتری در محیط دارد ولی نسبت به سایر گروه‌ها می تواند به مدت بیشتری در روده باقی بماند و 30%-50٪ از سویه های ایزوله شده در مدفوع انسان های سالم در کشورهای با درآمد بالا را تشکیل دهد(13، 5). امروزه کشف کرده اند که 34% از سویه های باکتری همسفره *E.coli* متعلق به گروه فیلوژنیک B2، یک منطقه حفاظت شده ژنی به نام منطقه *pks* را حمل می کنند(5). این خوشه ژنی یک پپتید غیر ریبوزومی(NRPS) و پلی

کتاید(*pks*) را کد می کند که اجازه می دهد هیبرید پپتید ترکیبی ژن توکسین کلی باکتین را تولید کند. آنزیم های مورد نیاز برای سنتز کلی باکتین، در منطقه ژنومی با اندازه 54kb تحت عنوان جزیره *pks* حضور دارند که در منطقه لوکوس tRNA asnW قرار دارد. همان طور که در شکل 1 دیده می شود این منطقه دارای 23 قالب قابل خواندن(ORF)، سه پپتید غیر ریبوزمی مگاسنتتاز(NRPS)، سه پلی کتاید مگاسنتتاز(*pks*)، دو هیبرید *NRPS/pks* مگاسنتتاز و دو لوازم جانبی برای ویرایش و اتصال آنزیم است. مطالعات انجام گرفته بر روی باکتری های جهش یافته نشان می دهد که تمام مناطق *pks* و NRPS به همراه 8 ژن فرعی برای تولید یک ژنوتوکسین فعال مورد نیاز هستند(14).



شکل 1- منطقه ژنومی *pks* یکی از وظایف عمده این منطقه ژنومی کد کردن ژنوتوکسین کلی باکتین است. جزییات ژن ها در این خوشه ژنی قابل مشاهده است(13).

در دسته بندی جدید از clbB, clbN به عنوان مارکرهایی به ترتیب برای مناطق ′3و′5 در منطقه *pks* نام برده شده است و از clbA, clbQ به عنوان مارکرهای تکمیلی منطقه *pks* نام برده شده است، هم چنین 12 ژن بیماری زایی برای این منطقه در نظر گرفته می شود. کلی باکتین باعث فعال شدن "پاسخ آسیب DNA" یا به اصطلاح DDRs(DNA Damage Response) در سلول‌های آلوده به توکسین می شود. یکی از آسیب‌هایی که به وسیله کلی باکتین ایجاد می شود شکست در دو رشته DNA یا DSB(Double strand break) است که با افزایش سطح هیستون H2AX همراه است. DDRs برای حفظ اطلاعات ژنتیکی ضروری است و حفظ تمامیت ژنومی در سلول های در معرض آسیب در برابر فعالیت های آندوژنی ROS(گونه هایی که در طی متابولیسم خود ایجاد اکسیژن می کنند) و عوامل محیطی (پرتوهای یونیزاسیون و اشعه UV) بر عهده آن ها است. سنجش و فعال سازی DDR هماهنگ با پروتئین های فسفاتیدیل اینوزیتول و شبه کیناز3 از خانواده پروتئین کینازها: ATM ، ATR و DNA-PK صورت می گیرد(16). نتیجه این فعالیت مهار چرخه سلولی و فعال شدن راه های تعمیر آسیب DNA است. اگر تعمیر به صورت کامل صورت گیرد چرخه تکثیر سلولی به حالت طبیعی برمی گردد در غیر این صورت سلول به سمت آپوپتوزیس یا پیری سلولی می رود این امر می تواند باعث ایجاد ناپایداری ژنومی گردد(9). در آزمایشگاه عفونت با این سویه از باکتری موجب شکستن دو رشته DNA در محیط کشت سلولی از یک دیگر می-شود(DSBs).کلی باکتین مانند سیکلومودولین عمل می-کند و باعث متوقف شدن و مسدود شدن سیکل چرخه سلول یوکاریوت می شود. مطالعات نشان داده است در تعدادی از بیماری ها مانندIBD روابط همزیستی میزبان و فلور میکروبی شکست می خورد. سابقه بیماری های روده ای مانند IBD، کولیت اولسراتیو و بیماری کرون احتمال ابتلا به سرطان کولورکتال(Colorectal Cancer)

را افزایش می دهند زیرا در این بیماری ها روده بزرگ به مدت طولانی ملتهب می باشد(14). بنابراین التهاب فیزیولوژی میزبان را برای ترویج سرطان تغییر می دهد که در کولیت مرتبط با سرطان کولورکتال(Colitis-associated CRC) دیده شده است، گرچه مکانیسم دقیق التهاب روده ای که منجر به سرطان کولورکتال می‌شود، ناشناخته است. در کولون افراد مبتلا به سرطان کولون و بیماری های التهابی روده، باکتری *E.coli* از نوع Adhesive و Invasive افزایش می یابد بنابراین فقط سویه هایی از *E.coli* می توانند در روده بزرگ بیماری ایجاد کنند که عضو نرمال فلورمیکروبی نیستند و *E.coli* Extraintestinal یا *ExPEC* نامیده می-شوند(14، 6). عفونت های گذرای سلول یوکاریوت با *ExPEC* گروه فیلوژنی(*ECOR-B2*)، در واقع تقسیم میوز را متوقف کرده و باعث القا megalocytosis می-گردد. این رفتار در ارتباط با جزایر ژنومی گسترش یافته-ای در *E.coli* است که جزایر ژنومی *pks* نامیده می-شود(6). منشا شیوع منطقه کلی باکتین در میان خانواده انتروباکتریاسه ناشناخته است. این منطقه نه تنها در *E.coli* بلکه در کلبسیلا پنومونی، انتروباکتر آئروجینز و سیتروباکتر کوسری تشخیص داده شده، این منطقه در بین این گونه ها به شدت حفظ شده و همیشه با تعیین یرسینیا باکتین در ارتباط است. تغییرات ساختاری بین سویه های منحصر به فرد تنها در یک منطقه intergenic که حاوی تعداد متغیری از تکرارهای پشت سر هم است مشاهده شده است. در *E.coli* منطقه کلی باکتین به گروه فیلوژنیک B2 محدود شده و در لوکوس tRNA asnW قرار گرفته است(14، 6).

مواد و روش ها

تعداد 18نمونه بیوپسی روده بزرگ بیماران مبتلا به بیماری های التهابی روده از قبیل 12 نمونه افراد مبتلا به پولیپ 2 نفر مشکوک به پولیپ یا کولیت اولسراتیو و 4 نمونه بیمار مبتلا به کرون و 20 عدد نمونه بافت روده سالم جهت مقایسه با فلور طبیعی از بیماران مراجعه کننده به کلینیک گوارش بیمارستان بقیه الله (عج)، درون ویال-های استریل در دمای 80- درجه سانتی گراد به آزمایشگاه انتقال داده شد. مراحل جمع آوری نمونه همراه با رضایت نامه و تکمیل فرم پرسشنامه بود. ابتدا نمونه ها برای عکس برداری با میکروسکوپ نوری آماده شد و از هر دو نمونه بافت روده بزرگ بدون حضور *E.coli* واجد ژن *PKS* مثبت و بافت روده بزرگ در حضور *E.coli* واجد ژن *PKS* مثبت، عکس تهیه گردید. بدین منظور ابتدا برش هایی از نمونه های بافتی تهیه و با استفاده از رنگ های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شد. سپس از برش های آماده شده توسط میکروسکوپ، عکس گرفته شد. برای جداسازی باکتری *E.coli* از بافت روده بزرگ بیماران مبتلا محیط های کشت مغذی از جمله محیط های TSA Agar، BHI broth ، BHI Agar، LB broth و افتراقی برای باکتری های خانواده انتروباکتریاسه از قبیل، EMB Agar، Mackconcy Agar و محیط های بیوشیمیایی از جمله: TSI، IMVIC، Urea agar و بافر PBS جهت شستشوی اولیه قسمتی از بافت مورد استفاده قرار گرفت. تمامی محیط های کشت از شرکت MERCK خریداری شده بود. هر نمونه در شرایط استریل و در زیر هود آزمایشگاهی با کمک اسکالپل به دو قسمت تقسیم شد. یک قسمت در درون ارلن حاوی 5ml محیط LB broth و دیگری در ارلن حاوی 5ml بافرPBS ریخته و به مدت 24ساعت در انکوباتور لغزنده در دمای 37 درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. بعد از 24 ساعت نمونه ها بیرون آورده شد و تعیین رقت در محیط های حاوی 9 میلی‌لیتر بافر PBS انجام گرفت و سپس براساس پروتکل میکروبی از تمامی رقت ها بر روی محیط افتراقی مک کانکی آگار برده شد به صورتی که هنگامی که محیط به

دمای 45 درجه سانتی گراد رسید از محیط حاوی باکتری به میزان 1 میلی لیتر درون پلیت ریخته و بعد محیط را به آن اضافه کرده و در جهت عقربه های ساعت پلیت چرخانده می شود تا محیط کاملاً پخش شود سپس به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد گرما گذاری انجام گرفت. پس از رنگ آمیزی گرم، کشت 4 مرحله ایی باکتری ها بر روی محیط افتراقی EMB انجام و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد گرماگذاری شد تا باکتری *E.coli* ایزوله شود. بعد از جداسازی و خالص سازی باکتری تست های بیوشیمیایی TSI، IMVIC و اوره برای باکتری مورد نظر انجام گرفت و پس از شناسایی به روش بیوشیمیایی یک پلیت کامل حاوی کشت تازه باکتری به درون 5 میلی لیتر محیط LB broth تلقیح کرده بدین منظور از باکتری هایی که در فاز لگاریتمی رشد بودند استفاده شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد گرماگذاری شد و سپس750 میکرولیتر گلیسرول استریل به فالکون های حاوی باکتری خاص شده اضافه گردید و به درون ویال های استریل انتقال یافت و در فریزر 24- درجه سانتی گراد جهت نگهداری ذخیره شد.

استخراج ژنوم باکتری ها

پس از تلقیح باکتری ها در5 میلی لیتر محیط مایع BHI و پس ازگرما گذاری به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد(یعنی زمانی که باکتری ها در فاز لگاریتمی رشد بودند)، استخراج ژن از باکتری ها بر اساس دستورالعمل کیت دکتر شایان انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز بر روی ژل آگاروز 1٪ بررسی شد و کمیت آن ها توسط اسپکتروفتومتری در طول موج ها 260 و 280 نانومتر بررسی شد در نهایت DNA استخراج شده از باکتری ها در فریزر 20- درجه سانتی گراد ذخیره شد.

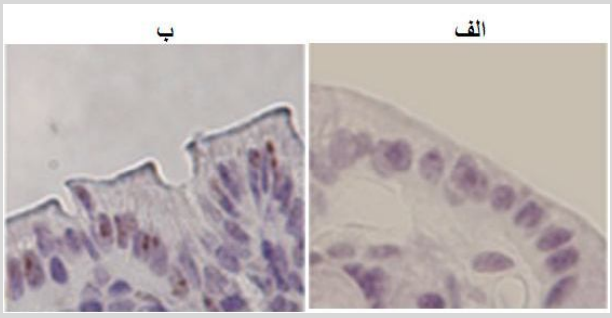
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چند گانه PCR Multiplex

پس از طراحی پرایمر اختصاصی برای ژن های clbB و clbN ، آزمایش مولتی پلکس PCR برای DNAهای استخراج شده از باکتری های بیماران انجام شد. تکثیر ژن با حجم نهایی 25 میکرولیتر برای هر مخلوط واکنش بود. مقدار مورد نیاز از هر ماده برای انجام این آزمایش به شرح زیر است: 12/5 میکرولیترMaster mix ،9/5 میکرولیتر آب یونیزه، 1 میکرولیترDNA، 0/5 میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای clbB R و clbB Fو clbN R و clbN F. master mix از شرکت DreamTaq Fermentase, Ca. و پرایمرها از شرکت ژن فن آوران تهیه شد. میکروتیوب ها در ترموسیکلر Techno, UK و در شرایط دمایی 94 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه، سپس30 سیکل دمایی به صورت 94 درجه سانتی گراد، 56 درجه سانتی گراد و 72 درجه سانتی گراد و هر یک به مدت 30 ثانیه و در نهایت به مدت 5 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد گذاشته شد. پس از انجام آزمایش Multiplex PCR، محصولات حاصله بر روی ژل آگاروز 2٪ بررسی شد.

نتایج

باکتری هایی که دارای منطقه ژنومی *pks* هستند قادر به توانایی تولید ژنوتوکسینی به نام کلی باکتین می باشند که می تواند منجر به ناپایداری ژنومی و شکست در DNA دو رشته ای شود. وجود چنین عوامل تحریک کننده ایی می تواند با پیشرفت رو به رشد بیماری التهابی روده به سمت سرطان روده بزرگ همراه باشد. باکتری-های فاقد منطقه ژنی *pks*، قادر به تولید این سم نیستند. در این تحقیق بافت روده بزرگ افراد سالم(فاقد باکتری *E.coli* واجد ژن PKS) و افراد مبتلا به بیماری التهابی روده بزرگ(دارای باکتری *E.coli* واجد ژن PKS) و نیز باکتری های*E.coli* جدا شده از بافت بیمار با باکتری‌های *E.coli* بافت افراد سالم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تصویرهای حاصله به وسیله میکروسکوپ

نوری نشان دهنده تغییراتی در بافت روده بزرگ است. از آن جا که باکتری *E.coli*، به صورت فلور نرمال روده بزرگ می باشد، تغییرات بافتی در دو نوع بافت شامل بافت در حضور *E.coli* واجد ژن PKS مثبت و بافت روده بزرگ بدون حضور *E.coli* واجد ژن PKS مثبت بررسی شد. نتایج نشان می دهد این تغییرات در بافت در حضور *E.coli* واجد ژن PKS مثبت واضح تر است که احتمالاً در اثر کلی باکتین ترشح شده از باکتری های *E.coli* واجد ژن PKS ایجاد می شود(شکل2).



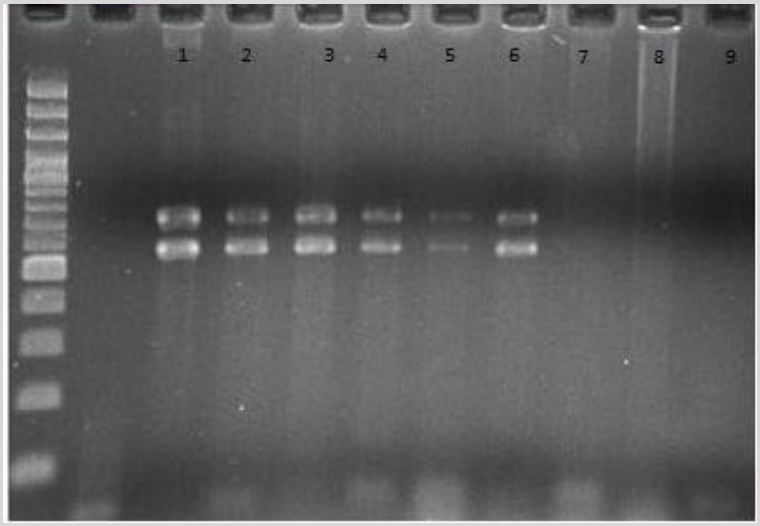
شکل 2- عکس میکروسکوپی بافت روده که با هماتوکسیلین ائوزین رنگ آمیزی شده است. شکل سمت راست(الف): بافت روده بزرگ بدون حضور *E.coli* واجد ژن PKS مثبت. شکل سمت چپ (با بزرگنمایی X100) (ب): بافت روده بزرگ در حضور *E.coli* واجد ژن PKS مثبت(با بزرگنمایی X100).

هم‌چنین نتایج حاکی از آن بود که باکتری ایزوله شده با رنگ آمیزی گرم، به‌صورت کوکوباسیل های قرمز رنگ در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. سپس باکتری ها به‌وسیله تست های بیوشیمیایی تشخیص داده شد. مطابق نتایج حاصله، باکتری *E.coli* از نظر تست های بیوشیمیایی دارای خصوصیات زیر است: مثبت برای تست‌های Indol، Motility و MR، اسیدی برای تست برای TSI و منفی برای تست‌های Citrate و Urea. نتایج آزمایش Multiplex PCR بر روی باکتری های *E.coli* ایزوله شده و شناسایی شده به صورت بالا، و پرایمرهای اختصاصی برای ژن های clbB و clbN نشان داد که 4 نمونه از 17 نمونه بیمار مبتلا به پولیپ، دارای ژن PKS بودند(٪23/5)، ولی در نمونه های کرون ژن مورد نظر یافت نگردید. در مقایسه با 20 نمونه بافت سالم روده بزرگ نیز دو تا از 20 نمونه دارای باند در منطقه مورد نظر (500-700 kb) مشاهده گردید(10%)(شکل 3).

اخیراً افزایش شیوع باکتری *E.coli* در بیماری کرون و سرطان روده بزرگ گزارش شده است(11) و نیز حضور باکتری های مهاجم در هر دو بیماری سرطان روده بزرگ و بیماری کرون احتمالاً می تواند ناشی از نقش آن ها در ایجاد بیماری، مشابه با نقش هلیکوباکتر پیلوری در سرطان معده باشد(12). باوجود شباهت های زیست شناسی که بین بیماری التهاب روده و سرطان کولورکتال پراکنده وجود دارد به نظر می رسد که ترکیبات واسطه ای که طی عمل التهاب بوجود می آید می تواند باعث مهار مسیر آپوپتوزیس گردد (2) که این عمل به خودی خود نشان‌گر تعامل بین کولون و میکروبیوتای کولون است(20). مطابق نتایج این مطالعه، تصویر میکروسکوپ نوری حاصله از بافت روده دارای باکتری واجد ژن PKS مثبت نشان دهنده تغییراتی در بافت روده است که در اثر کلی باکتین ترشح شده از باکتری‌های *E.coli* واجد ژن PKS ایجاد می شود.

بحث و نتیجه گیری

همچنین از نظر مولکولی 23/5% افراد مبتلا به بیماری‌های التهابی روده، برای ژن های clbB و clbN(تولید کننده کلی باکتین) دارای باکتری *E.coli* واجد ژن PKS بود. این نتایج در راستای مطالعات مشابه است که در زیر به برخی از آن ها اشاره می شود. در سال 2004 Hellen Martin و همکارانش، تغییر گلیکوزیلاسیون مخاطی در بیماری های التهابی روده و سرطان روده بزرگ با هدف اثر چسبندگی باکتری های مخاطی به ویژه باکتری *E.coli* ، را بررسی کردند و نتیجه گرفتند باکتری های مخاطی چسبنده در پاتوژنز بیماری کرون و سرطان روده بزرگ دارای نقش حیاتی می باشد. همچنین در این مطالعه باکتری *E.coli* از بافت مخاطی بیماران مبتلا به سرطان کرون و یا بیماری های التهابی روده جدا گردید(8).



شکل 3- نتایج آزمایش *Multiplex PCR* برای ژن های محدوده ژنومی *PKS* بر روی ژل آگاروز 2%.
از چپ به راست: چاهک1: *ladder*، چاهک 2: کنترل منفی، چاهک 2: کنترل مثبت، چاهک های 6-3 : نمونه های باکتریایی جدا شده از بیماران که واجد ژن منطقه *pks* بودند، چاهک های 9-7 نمونه های باکتریایی جدا شده از بیماران که فاقد ژن منطقه *pks* بودند.

از دید مولکولی، James R. Johnson و همکاران گزارش کردند که منطقه ژنومی *pks* از چندین ژن تشکیل شده است. ایشان فراوانی ژن clbB در سویه های جدا شده از خون و مدفوع را به ترتیب58٪ و 32٪ اعلام کردند و فراوانی ژن های clbN و clbB در بافت روده بیماران مبتلا به بیماری های التهابی روده را به ترتیب 28% و 8٪ گزارش نمودند (9). در سال 2009، Johannes Putze و همکاران با مطالعه بر روی ساختار ژنتیکی و توزیع منطقه ژنتیکی کلی باکتین در میان اعضای خانواده انتروباکتریاسه، نشان داد این منطقه ژنی در میان خانواده انتروباکتریاسه علاوه بر *E.coli* در کلبسیلا کوسری، کلبسیلا پنومونی، انتروباکترآئروژنز نیز وجود دارد(16). مطالعه بر روی *E.coli* جدا شده از بیماران مبتلا به کرون در مقایسه با بافت سالم روده بزرگ نشان داد اولاً فراوانی سویه های *E.coli* متعلق به گروه فیلوژنیتیکی B2 در سرطان روده بزرگ در مقایسه با نمونه های روده بیشتر است. ثانیاً بخش انتهایی روده بزرگ نسبت به سایر بخش‌های آن در افراد مبتلا به سرطان روده دارای فراوانی بیشتری از باکتری های گروه B2 و سیکلومودولین ها است. سویه های *E.coli* گروه B2 دارای تعداد زیادی فاکتورهای بیماری زایی از جمله پیلی‌های چسبنده هستند که باعث اتصال به مجاری

ادراری می گردد. احتمال دارد این فاکتور چسبندگی به ویژه در گروه B2 موجب اتصال باکتری و تجمع آن ها در سرطان روده بزرگ نیز بشود(16، 10، 7، 1). نتایج انجام مطالعات آزمایشگاهی بر روی موش ها نشان می-دهد ژنوتوکسین کلی باکتین باعث شکسته شدن دو رشته DNA و افزایش فسفوریلاسیون هیستون H2AX در سلول های انتروسیت موش می گردد. هیستون H2AX به عنوان نشانگر حساس برای شکست دو رشته DNA محسوب می شود. از طرفی ژن ClbA جزء منطقه ژنی *pks* است که آنزیم فسفو پنتیل ترانسفراز را کد می-کند. این آنزیم برای تولید ژنوتوکسین از *pks* و NRPS ضروری است. آزمایشات تکمیلی نشان داد موش های آلوده شده با سوش های دارای جهش ژنی در clbA، سطح H2AX طبیعی دارند در حالی که سطح H2AX در کولون موش های آلوده به سوش های *E.coli* واجد ژن clbA22/7 یعنی سه برابر سطح طبیعی H2AX است(3). بررسی ها نشان می دهد در روشی که موش ها به مدت 5 روز تحت درمان با آنتی بیوتیک های استرپتومایسین، با سیتراسین و نئومایسین بودند به باکتری *E.coli* واجد ژن *pks* آلوده شدند. درواقع آلوده شدن با دوز پایین در باکتری *E.coli* دارای منطقه ژنی *pks* می تواند باعث ایجاد آسیب در سلول های اپی تلیال روده و متعاقب آن پاسخ آسیب DNA گذرا شود. طی تعمیر ناقصDNA در چرخه تقسیم سلولی، دو رشته DNA شکسته شده و از یک دیگر جدا می شود. بنابراین سلول هایی که در معرض تعداد کمتری از باکتری های واجد *pks* هستند، دچار آسیب DNA می شوند ولی قادر به تعمیر به روش اتصال غیر همولگ ها هستند و می توانند چرخه سلولی و تقسیم سلولی را از سر بگیرند.در واقع عفونت روده بزرگ با دوز پایین *E.coli* واجد *pks* باعث فعال شدن واکنش های برگشت پذیر پاسخ آسیب DNA به همراه تقسیم سلولی می شود اما نشانه هایی از آسیبDNA باقی می ماند و می تواند در بیماری های التهابی روده موثر باشد(19). از آنجا که فلور میکروبی فرد سالم، استقرار پاتوژن ها را مهار می کند، 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 آنتی‌ژن ها و باکتری ها درست کار نکند، احتمال عفونت باکتریایی و التهاب روده افزایش می یابد که در بیماران با التهاب روده مشاهده شده است. مطالعات نشان داده است در تعدادی از بیماری ها مانندIBD روابط همزیستی میزبان و فلور میکروبی شکست می خورد. سابقه بیماری-های روده ای مانند IBD، کولیت اولسراتیو و بیماری کرون احتمال ابتلا به سرطان کولورکتال را افزایش می-دهد زیرا در این بیماری ها روده بزرگ به مدت طولانی ملتهب می باشد(19). بنابراین التهاب فیزیولوژی میزبان را برای ترویج سرطان تغییر می دهد که در کولیت مرتبط با سرطان کولورکتال(Colitis-associated CRC) دیده شده است. یکی از محدودیت های این مطالعه، تعداد نمونه ها است که درصورت افزایش آن ها، جواب های جامع و کامل به دست خواهد آمد.

منابع

1.An, Y., Jin, G., Wang, H., Wang, Y., Liu, H. (2008). Polymorphisms in hMLH1 and risk of early-onset lung cancer in a southeast Chinese population. Lung Cancer, 59; 164–170.

2.Chichlowski, M., Hale, LP. (2008). Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease: an alliance gone bad. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 295;G1139-49.

3.Cuevas-Ramosa, G., Petita, CR., Marcqa, I., Bourya, M., Oswald, E., Nougayrède, JP. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. PNAS, 107(25); 11537–11542.

4.DiSario, JA., Foutch, PG., Mai, HD., Pardy, K., Manne, RK. (1991). Prevalence and malignant potential of colorectal polyps in

asymptomatic, average-risk men. Am J Gastroenterol, 86(8); 941-5.

5.Escobar-Páramo, P. (2004). Large-scale population structure of human communal *Escherichia coli* isolates. Appl Environ Microbiol, 70; 5698–5700.

6.Gisselsson, D. (2000). Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. Proc Natl Acad Sci USA, 97; 5357–5362.

7.Hirata, H., Hinoda, Y., Kawamoto, K., Kikuno, N., Suehiro, Y. (2008). Mismatch repair gene MSH3 polymorphism is associated with the risk of sporadic prostate cancer. J Urol, 179; 2020–2024.

8.Helen, MM. (2004). Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in crohn's disease and colon cancer. Gastroenterology, 127;80–93.

9.Johnson, JR., Johnston, B., Kuskowski, MA., Nougayrede, JP., Oswald, E. (2008). Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. J Clin Microbiol, 46; 3906–3911.

10. Koessler, T., Oestergaard, MZ., Song, H., Tyrer, J., Perkins, B. (2008). Commonvariants in mismatch repair genes and risk of colorectal cancer. Gut, 57; 1097–1101.

11. Kurokawa, K. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. DNA Res, 14; 169–181.

12. Maloy, KJ., Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. Nature, 474; 298.

13. Nowrouzian, FL., Wold, AE., Adlerberth, I. (2005). *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. J Infect Dis, 191; 1078–1083.

14. Nougayrede, JP., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. Science, 313; 848–851.

15. Parkin, DM. (2004). International variation. Oncogene, 23(38); 6329-40.

16. Putze, J. (2009). Genetic structure and distribution of the colibactin among members of the family Enterobacteriaceae. Infect Immun, 77; 4696–4703.

17. Rickert, RR., Auerbach, O., Garfinkel, L., Hammond, EC., Frasca, JM. (1979). Adenomatous lesions of the large bowel: an autopsy survey. Cancer, 43(5); 1847-57.

18. Rhodes, JM. (1996). Unifying hypothesis for inflammatory bowel disease and associated colon cancer: sticking the pieces together with sugar. Lancet, 347; 40–44.

19. Rogakou, EP., Pilch, DR., Orr, AH., Ivanova, VS., Bonner, WM. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J Biol Chem, 273; 5858–5868.

20. Swidsinski, A., Khilkin, M., Kerjaschki, D., Schreiber, S., Ortner, M.,Weber, J. (1998). Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. Gastroenterology, 115; 281–286.