



مقایسه‌ی جمعیت باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس و فوزوباکتریوم نوکلئاتوم در بافت رودهی

افراد سالم با بیماران مبتلا به پولیپ و سرطان رودهی بزرگ

دریة احمدی بشیرزاده^۱، احسان ناظم الحسینی مجرد^{۲*}، ناصر هرزندی^۱

^۱- گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

^۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۸، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۶

چکیده

مقدمه: سرطان رودهی بزرگ (CRC) یا (Colorectal Cancer)، دومین سرطان شایع در انسان می‌باشد. مشخص شده است که عوامل غیر وراثتی و اپی ژنتیکی در ایجاد این بیماری به مراتب مؤثرتر از عوامل ارثی عمل می‌کنند. در این میان نقش فلور میکروبی روده یا گات میکروبیوتا (Gut microbiota)، جدی‌تر بوده چنانکه ترکیب و تنوع آنها در طی روند تشکیل تومور در روده، دستخوش تغییراتی می‌شود. از آنجا که شواهدی نشان از دخالت سویه‌های دو باکتری انتروکوکوس فکالیس و فوزوباکتریوم نوکلئاتوم در این بیماری دارد، ما در این تحقیق که بر روی گروهی از جمعیت کشور انجام شد، بررسی کردیم که آیا در بافت‌های پولیپ (ضایعات پیش سرطانی) و تومور رودهی بزرگ، نسبت به بافت سالم، تفاوتی در فراوانی این دو گونه وجود دارد یا خیر. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه‌ی شاهد - موردی، به بررسی ۲۱ نمونه‌ی بافت سالم رودهی بزرگ، ۲۱ نمونه از بافت پولیپ و ۱۹ نمونه بافت توموری روده پرداختیم. میزان ژن ۱۶ *S rRNA* ی اختصاصی دو باکتری مورد مطالعه را به‌عنوان شاخص فراوانی آنها در این سه دسته، به کمک روش *Quantitative Real-Time PCR Absolute* مورد اندازه‌گیری قرار دادیم.

نتایج: نتایج حاصل از این تحقیق گویای افزایش معنادار ($P < 0.05$) جمعیت انتروکوکوس فکالیس و فوزوباکتریوم نوکلئاتوم، در نمونه‌ی بافتی بدخیم روده نسبت به پولیپ و سپس نسبت به نمونه‌های طبیعی است. به علاوه ضریب همبستگی این دو گونه (۰/۷۶۳۴) به‌دست آمد که حاکی از ارتباط سینرژیستی بین آنها در بافت روده می‌باشد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما می‌تواند برساند که افزایش جمعیت این دو گونه در بافت اپیتلیال روده، با افزایش احتمال رشد پولیپ و تبدیل آن به تومور مرتبط است. به عبارتی، رشد بیش از حد این باکتری‌ها احتمالاً از عوامل القای التهاب و کارسینوژنز در اپیتلیال روده و یا نشانی از این عوارض می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان روده ی بزرگ، **qRT-PCR**، انتروکوکوس فکالیس، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم.

*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ایران صندوق پستی: ۱۷۴۱۱-۱۹۸۵۷. خیابان یمن، بزرگراه چمران، تهران، ایران،

تلفن: ۹۸۲۱۲۲۴۳۲۵۱۸، نامبر: ۹۸۲۱۲۲۴۳۲۵۱۷، Email: ehsanmojarad@gmail.com

ارجاع: احمدی بشیرزاده دریه، ناظم الحسینی مجرد احسان، هرزندی ناصر. مقایسه‌ی جمعیت باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس و فوزوباکتریوم نوکلئاتوم در بافت رودهی افراد سالم با بیماران مبتلا به پولیپ و سرطان رودهی بزرگ. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۲؛ ۱۸(۲): ۴۲-۳۳.

مقدمه

سرطان کلورکتال با نزدیک به ۱/۸ میلیون مورد جدید و ۸۱۰۰۰ مورد مرگ در سال ۲۰۱۸، سومین سرطان بدخیم در جهان و چهارمین عامل مرگ میر در اثر سرطان در جهان می‌باشد (۱ و ۲). تشکیل توده در بافت روده‌ی بزرگ و رشد آن، متأثر از عوامل متعدد ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی می‌باشد (۳). مطالعات نشان می‌دهد که التهاب و عفونت، در ۱۵٪ تا ۲۰٪ از بدخیمی‌ها دخیل هستند و یک عامل خطر زمینه‌ساز برای سرطان‌های گوارشی محسوب می‌شوند، در واقع بر خلاف تصور، تنها ۱۵٪ از مبتلایان، دارای پیش‌زمینه‌ی ژنتیکی و سابقه‌ی خانوادگی این نوع سرطان هستند و ۸۵٪ از آنها به‌صورت تک‌گیر درگیر این بیماری می‌شوند (۴ و ۵). در نتیجه شناخت عوامل غیر وراثتی زمینه‌ساز این بیماری برای مطالعه‌ی آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند.

به‌عنوان یک عامل غیر وراثتی، در سال‌های اخیر شواهد زیادی دال بر ارتباط فلور میکروبی روده با CRC به‌دست آمده است (۶ و ۷). فلور میکروبی روده‌ی بزرگ که گات میکروبیوتا خوانده می‌شود، به موازات میزبان و وابسته به محیط فیزیولوژیک آن رشد و تکامل پیدا می‌کند و این دو متقابلاً بر روی یکدیگر تأثیرگذار هستند (۸). آنچه عامل شکل‌گیری الگوی گات میکروبیوتا در انسان است عمدتاً عواملی مانند تغذیه و سبک زندگی می‌باشد و مسلماً تغییر در هر یک از این موارد منجر به تغییر در ترکیب طبیعی گات میکروبیوتا (Dysbiosis) خواهد شد. در پی این دیسبوز، تغییر در محیط روده و بالانس ترکیبات آزاد شده از میکروبیوتا رخ خواهد داد (۹) که می‌تواند مؤثرترین عامل در ایجاد تغییرات ژنتیکی در سلول‌های میزبان باشند، از جمله ایجاد جهش در انکوژن‌ها به‌ویژه KRAS (Kirsten Rat Sarcoma virus) و یا ژن‌های سرکوبگر تومور مانند بتا کاتنین-۱ (CTNNB1) APC (Adenomatous polyposis) و P53 (۱۰). در چند دهه‌ی گذشته یافته‌های بسیاری، نقش تغییر الگوی میکروبیوتا را در تغییرات اپی‌ژنتیکی سلول‌های روده نیز گزارش کرده‌اند (۱۱) مانند ایجاد آسیب DNA، القای تغییر در متیلاسیون و استیلاسیون هیستون‌ها و یا حفظ هموستازی سلول‌های T سیستم ایمنی. در واقع گات میکروبیوتا می‌تواند باعث ایجاد و رشد تومور و یا برعکس، باعث پیشگیری و مهار رشد آن در روده شود (۱۲). با توجه به این نتایج و با در نظر گرفتن اینکه تریلیون‌ها ژن میکروبی در روده با تولید متابولیت‌های گوناگون خود، مسلماً بر بسیاری از مسیرهای تنظیم سلولی انسان مؤثر هستند، در مجموع پیشنهاد می‌شود که گات میکروبیوتا باید به‌عنوان یک ارگان تأثیرگذار بدن با عملکردها و پیچیدگی‌های خاص خود در نظر گرفته شود (۱۳).

پژوهش‌های متعددی در جهان بر روی ارتباط گات میکروبیوتا با عملکرد غشای روده و ایجاد پاسخ‌های التهابی مزمن که در نهایت می‌تواند منجر به سرطان روده شوند، در حال انجام است. شناسایی هر چه بیشتر ارتباطات

بین این باکتری‌ها و ایجاد سرطان کلورکتال، می‌تواند معیار خوبی جهت غربالگری CRC باشند و اما در این میان نقش بعضی از گونه‌های میکروبی بارزتر است (۱۴ و ۱۵).

از جمله، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم. تحقیقات بسیاری نشان داده است که این باکتری در مقادیر بالا باعث ایجاد یک سری از رویدادهای مولکولی خاص تومور می‌شود از جمله فنوتیپ متیله‌کننده‌ی جزیره‌ی CpG (CpG Island Methylation Phenotype (CIMP)) و ناپایداری میکرو ستلایتی (Micro Satellite Instability (MSI)) و همچنین باعث جهش ژنتیکی در ژن بازدارنده‌ی تومور TP53 و چند انکوژن می‌شود. به‌طور کلی این باکتری با تهاجم به سلول میزبان باعث اثر کارسنوژنز در آن می‌شود. فوزوباکتریوم نوکلئاتوم به سلول‌های اپیتلیال میزبان حمله می‌کند، به کمک فاکتور ویروالانس خود یعنی عامل چسبندگی FadA، باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ β -catenin و القای بیان انکوژن‌ها و در نتیجه، تحریک رشد سلول‌های توموری می‌شود. با این وصف، تجمع این باکتری، بیشتر عامل CRC به نظر می‌رسد تا پیامد آن (۱۶ و ۱۷).

همچنین در مورد انتروکوکوس فکالیس گزارش شده است که برای مثال با تولید سوپر اکسیدهای خارج سلولی و فعال کردن مسیرهای آسیب DNA، به سلول‌های اپیتلیال روده در شرایط in-vivo و in-vitro آسیب می‌زند و به این وسیله در روده، تومورزایی را تسهیل می‌کند (۱۷ و ۱۸). همچنین در مقالات به نقش تجمع این پاتوژن فرصت طلب در التهاب‌زایی و توموریزن از طریق مکانیزم‌های متیلاسیون جزایر CpG و ایجاد ناپایداری میکرو ستلایتی به همراه فوزوباکتریوم اشاره شده است. کلونیزه شدن فوزوباکتریوم نوکلئاتوم با ایجاد بستر رشد برای باکتری‌های ثانویه مانند انتروکوکوس فکالیس، زمینه‌ی تجمع این باکتری را بر اپیتلیال روده فراهم می‌کند (۱۹، ۲۰، ۲۱ و ۲۲). این باکتری حتی قادر است استرس اکسیداتیو حاصل از متابولیسم انتروکوکوس فکالیس را نیز، تحمل کرده و در کنار آن تجمع یابد (۱۹، ۲۳ و ۲۴). در روده انتروکوکوس فکالیس انرژی موردنیاز خود را بیشتر از راه تخمیر قندهای جذب نشده به‌دست می‌آورد اما همچنین می‌تواند این انرژی را از تجزیه‌ی موسین که یک کربوهیدرات شدیداً گلیکوزیله است و از سلول‌های گابلت (جامی شکل) ترشح می‌شود، تأمین کند (۲۵). لایه موسینی ضخیم باعث جلوگیری از تماس بیش از حد باکتری‌ها و آنتی‌ژن‌های غذایی با سلول‌های داخلی موکوس روده و جلوگیری از پاسخ‌های بیش حساسیتی (آلرژی) در سیستم ایمنی می‌شود (۱۴). می‌دانیم که تحریک پاسخ‌های آلرژیک سیستم ایمنی به‌صورت مزمن و ایجاد محیط التهابی، خود یکی از عوامل بالقوه‌ی القای تومورزایی می‌باشد.

با توجه به شواهد ذکر شده، ما در این مطالعه به مقایسه‌ی فراوانی گونه‌های انتروکوکوس فکالیس و فوزوباکتریوم نوکلئاتوم در بافت روده‌ی بیماران مبتلا به CRC، مبتلایان به ضایعات پیش سرطانی و افراد طبیعی پرداختیم.

مواد و روش ها

تحقیق حاضر به صورت موردی-شاهدی (case-control) انجام گرفته است. انتخاب و نمونه برداری از بیماران به صورت تصادفی و از بین مراجعه کنندگان به بیمارستان طالقانی تهران و در فاصله ی سال های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۸ انجام شد. این افراد با علائم بالینی هشداردهنده مثل درد شکم، یبوست مزمن، اسهال مزمن، تغییر شکل و باریک شدن مدفوع، خونریزی از مقعد، کم خونی غیر منتظره و یا سن بالای ۵۰ سال مراجعه کرده و به صورت داوطلبانه، رضایت خود را جهت انجام کولونوسکوپی اعلام کردند. در صورت مشاهده ی پولیپ یا زایدی مشکوک نمونه توسط کولونوسکوپ جدا شده و قسمتی از آن جهت تعیین نوع بافت (طبیعی، پولیپ یا تومور) به آزمایشگاه پاتولوژی منتقل شد و قسمت دیگر در تانک ازت به آزمایشگاه انتقال داده شد و تا زمان استفاده در فریزر (۷۰°C-) نگهداری شد. تمامی موارد جزء بیماران جدید بودند و هیچ سابقه ای از سرطان روده، سایر سرطان های گوارشی یا مرتبط و سابقه ی عمل جراحی روده نداشتند. گزارش پاتولوژی موارد تومور (I,II,III,IV) و همچنین موارد ضایعه پیش سرطانی (پولیپ) را مشخص کرده است (شکل ۱).

اطلاعات دموگرافیک بیماران شامل سن، جنس، مصرف سیگار و الکل، وجود خون در مدفوع، دیابت، سابقه ی ناراحتی های روده، سابقه ی خانوادگی ابتلا به سرطان روده، سابقه ی عفونت هلیکوباکتر پیلوری، رژیم غذایی و میزان فعالیت بدنی به منظور بررسی همگن بودن نمونه ها گردآوری شد. بر اساس مقالات و بر اساس نوع مطالعه که در نوع خود یک مطالعه ی پایلوت در جمعیت ایرانی محسوب می شود تعداد ۲۱ نمونه ی سالم و ۲۱ نمونه مبتلا به پولیپ و ۱۹ نمونه ی توموری مشخص گردید (۸، ۱۱ و ۲۸). نمونه برداری از بافت افراد سالم با کسب رضایتنامه و اخذ مجوز کمیته ی اخلاق پژوهشگاه گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد.

در این مطالعه، از سویه های استاندارد فوزوباکتریوم نوکلئاتوم ATCC (25586) و انتروکوکوس فکالیس (29212) ATCC استفاده کردیم. انتروکوکوس فکالیس در دمای ۳۷°C در انکوباتور (Memmert Germany) برای ۴۸ ساعت در شرایط هوایی گرماگذاری شد. از محیط آگار خوندار برای کشت انتروکوکوس فکالیس استفاده گردید. در مورد فوزوباکتریوم نوکلئاتوم از fastidious anaerobe broth (LabM, Bury, UK) با مکمل گلوکز ۱٪ جهت کشت استفاده کردیم. سپس استخراج DNA های باکتریایی را از سوسپانسیون با رقت 10^8 Bact/μlit طی روشی انجام دادیم که ژنوم تمام باکتری های موجود در سوسپانسیون از سلول های باکتری خارج شود و در سوسپانسیون نهایی رقتی برابر 10^8 DNA/μlit را داشته باشیم. این کار به کمک کیت Roche آلمان، (CAT.No.11796828001) و طبق پروتکل آن صورت گرفت.

رقت های 10^8 با کمک دستگاه NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)، لام نتوبار و مقایسه با غلظت نیم مک فارلند تأیید شد و سپس رقت های سریالی تا 10^1 از آنها تهیه کردیم. بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده از باکتری ها با بررسی رقت سوسپانسیون حاصله با دستگاه نانودراپ تأیید شد و جذب نوری (OD) در طول موج ۶۲۵ نانومتر برابر (۰/۱۲۶) خوانش شد که در محدوده ی مناسب (۰/۱۳-۰/۰۸) قرار دارد و برابر رقت 10^8 می باشد. این رقت همچنین برابر کدورت ۰/۵ مک فارلند و شمار باکتری برابر $10^8 \times 1/5$ در ۱۰۰ میلی لیتر سوسپانسیون برای شمارش مستقیم با لام نتوبار است که توسط دو کارشناس ماهر تأیید شد. کیفیت DNA استخراج شده نیز با الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

استخراج DNA باکتریایی از بافت: DNA های پروکاریوتی، به کمک محلول تریزول (Catalog Numbers 15596018 and 15596026) و پروتکل آن، از بافت جداسازی شدند (۲۶). به منظور ارزیابی DNA پس از استخراج، کمیت و کیفیت آن با استفاده از دستگاه Nonodrop و الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید. در این دستگاه جذب نوری محلول DNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر قرائت شد.

DNA استخراج شده از 30 میلی گرم بافت کلون هر کدام از بیماران در نهایت، سوسپانسیونی از DNA های باکتریایی با فراوانی مجهول، موجود در بافت اولیه به دست داد که با روش Absolute Q-PCR این فراوانی ها را به دست آوردیم. برنامه ی دستگاه ABI7500، ۳۵ سیکل تعریف شد و بعد از انجام PCR منحنی ذوب (melt curve) در فاصله 60°C تا 95°C ایجاد گردید.

منحنی استاندارد به دست آمده برای هر کدام از دو باکتری نیز به کمک نرم افزار دستگاه ABI 7500 (Applied Biosystem) رسم گردید.

انتخاب پرایمرها و بررسی اختصاصیت آنها: توالی پرایمرهای اختصاصی این دو گونه به کمک نرم افزار Primer Express از مطالعات گذشته به دست آمد و میزان اختصاصیت آنها به کمک Nucleotide-Nucleotide با کلبه ی توالی های مربوطه در پایگاه اطلاعاتی (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) تأیید شد. PCR با پرایمرهای اختصاصی بر روی دو گونه ی باکتریایی نتیجه ی مثبتی را به همراه داشت و باند کاذب یا cross reaction دیده نشد.

برای فوزوباکتریوم نوکلئاتوم توالی $3' \rightarrow 5'$ پرایمر فوروارد CTTAGGAATGAGACAGAGATG و ریورس TGATGGTAACATACGAAAGG (۲۷) و برای انتروکوکوس فکالیس فوروارد TGTGTAGCGGTGAAATGC و ریورس AAACCCCTCCAACACTTAGC (۲۸) (جدول ۲).

روش quantitative real-time PCR یا PCR کمی، علاوه بر تشخیص دقیق نوع باکتری، قادر به سنجش فراوانی دقیق آن باکتری در نمونه ی مورد آزمایش نیز می باشد. در نتیجه ما پس از انتخاب پرایمرهای

فراوانی دو گونه‌ی باکتریایی موردنظر بر تومورزایی در محیط روده دارد. نتایج بررسی آماری این اطلاعات در جدول ۱ خلاصه شده است. بررسی میزان دقیق دو باکتری مورد مطالعه به کمک qPCR در هر سه گروه بیماران، بر اساس Threshold Cycle (CT) یا سیکل حد آستانه به خوبی نشان می‌دهد که بین CTی فوزوباکتریوم نوکلئاتوم و انتروکوکوس فکالیس در نمونه‌های سه گروه متفاوت بافتی، تفاوت معناداری دیده می‌شود. این داده‌ها می‌رساند که با شروع و پیشرفت بیماری، فراوانی این باکتری‌ها در روده‌ی بزرگ افزایش می‌یابد. این افزایش را جدول ۳ و نمودار ۱ در مورد فوزوباکتریوم نوکلئاتوم می‌توان مشاهده کرد. با پیشرفت سرطان، مشابه چنین افزایش فراوانی را در مورد انتروکوکوس فکالیس نیز به خوبی می‌توان ملاحظه کرد که در جدول ۴ و نمودار ۲ نمایش داده شده است.

اگر با دقت، میانگین CT باکتری‌ها را در هر کدام از سه گروه بافتی، با یکدیگر مورد مقایسه قرار دهیم علاوه بر اینکه به وضوح شاهد روند افزایشی میزان دو باکتری فوزوباکتریوم نوکلئاتوم و انتروکوکوس فکالیس همراه با سرطانی شدن بافت هستیم، نکته‌ی شایان توجه دیگر این است که فراوانی این دو باکتری حتی در مقایسه‌ی دو گروه طبیعی با پولیپ و پولیپ با تومور نیز تفاوت معناداری را نشان می‌دهد. این تفاوت فراوانی به روشنی در دو نمودار ۱ و ۲ نیز قابل تشخیص می‌باشد.

بررسی ارتباط فوزوباکتریوم نوکلئاتوم و انتروکوکوس فکالیس در CRC: در این مطالعه، نتایج آماری به‌دست آمده از بررسی ارتباط فراوانی دو گونه‌ی فوزوباکتریوم نوکلئاتوم و انتروکوکوس فکالیس در سه گروه بیماران با توجه به فاکتور Spearman به‌دست آمده، نمایانگر این مطلب است که ظاهراً این دو باکتری در ریزمحیط تومور روی هم اثر تقویت‌کنندگی یا سینرژیستی دارند. این ارتباط و میزان معناداری آن در نمودار ۳ قابل مشاهده است.

بحث

با توجه به نتایج پژوهش‌ها در سال‌های اخیر، دانشمندان ادعا می‌کنند که تا وقتی که گات میکروبیوتای انسانی به‌عنوان یک "سوپر ارگانیسم" به‌طور دقیق شناخته نشده باشد، درک مرز بین سلامتی و بیماری قابل پیش‌بینی نخواهد بود (۱۱).

برای چنین منظوری، از آنجا که در این تحقیق هدف اصلی ما به‌دست آوردن فراوانی دقیق دو گونه‌ی باکتریایی فوزوباکتریوم نوکلئاتوم و انتروکوکوس فکالیس در نمونه‌های بالینی بوده است، در نتیجه بهترین روش آزمایشگاهی، به کار بردن روش RT-PCR کمی و استفاده از رنگ فلورسانت سایبرگرین است. کارایی این تکنیک برای هدف موردنظر ما، در تحقیقات دیگری مانند مطالعه‌ی رینتتایلا و همکاران، همچنین سلطانی و همکاران، بر روی نمونه‌های مدفوعی، تأیید می‌شود (۲۸ و ۲۹).

اختصاصی برای ژن 16SrRNA هر کدام از دو باکتری موردنظرمان، به کمک روش qRT-PCR به بررسی میزان دقیق این باکتری‌ها در نمونه‌های بالینی از جمعیت کشور پرداختیم.

Real Time-PCR کمی را با استفاده از کیت Takara و دستگاه ABI 7500 (Applied Biosystem) انجام دادیم. هر کیت تاکارا شامل SYBR Premix EX Taq II (2X) ساخت شرکت (TLi RNaseH Plus) و رنگ مرجع ROX می‌باشد. (CAT.No:RR820L). مواد واکنشگر SYBR Premix EX Taq II (2X)، پرایمر Forward (شرکت ژن فناوری)، پرایمر Reverse (شرکت ژن فناوری) به‌عنوان مستر میکس با DNAی الگو طبق پروتکل کیت در پلیت مخصوص qPCR با هم مخلوط شده و به همراه یک ول (No Template Control) (NTC) به دستگاه داده شد.

در PCR کمی، میزان دقیق DNA در نمونه‌ی اولیه (Starting Quantity) بر اساس منحنی استاندارد حاصل از تکثیر سوش‌های استاندارد در رقت‌های سریالی محاسبه می‌شود.

تجزیه و تحلیل آماری کلیه‌ی داده‌های حاصل از Absolute qRT-PCR و اطلاعات دموگرافیک بیماران، به کمک دستگاه ABI7500 و نرم‌افزارهای تجزیه و تحلیل آماری SPSS و Prism انجام شد. مقایسه‌ی فراوانی باکتری‌ها در سه گروه بیماران توسط آزمون One-way ANOVA مربوط به جامعه‌ی غیرطبیعی به‌دست آمد. همچنین در مورد دیگر متغیرها مربوط به اطلاعات بیماران و تفاوت میانگین فراوانی باکتری‌ها در سه گروه بیماران، از آزمون‌های Non-Parametric استفاده گردید و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. به علاوه از آزمون Spearman جهت بررسی ارتباط این دو باکتری در ایجاد و پیشرفت CRC استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه طبق آنچه پیشتر اشاره شد ما به بررسی مجموع ۶۱ نمونه‌ی بافتی از روده‌ی بزرگ پرداختیم که از این تعداد ۲۱ نمونه از بافت‌های سالم مجاور تومور یا پولیپ به‌دست آمده، ۲۱ نمونه از بافت پولیپ و ۱۹ نمونه از بافت توموری. در کل ۳۱/۱٪ از نمونه‌ها ما را نمونه‌های تومور تشکیل دادند و ۳۴/۴٪ هر کدام از دو نمونه‌ی طبیعی و پولیپ را شامل شد. ما محدوده‌ی سنی خاصی را برای مطالعه تعیین نکردیم و یافته‌های ما نیز تفاوت معنی‌داری بین سه گروه مورد بررسی، وابسته به سن نشان نداد. اطلاعات بیماران ما از لحاظ جنسیت و سبک زندگی شامل رژیم غذایی، میزان فعالیت بدنی، مصرف سیگار و الکل و نیز سوابق خانوادگی سرطان روده جمع‌آوری شده و مورد بررسی قرار گرفت.

آماری تمام اطلاعات دموگرافیک ذکر شده، تفاوت‌ها را در تمام موارد، در بین سه گروه طبیعی، پولیپ و تومور، بی‌معنی و با مقدار ($P > 0.05$) نشان داد. این نتیجه نشان از همگن بودن نمونه‌ها جهت بررسی انحصاری تأثیر

در یک تحقیق در سال ۲۰۱۵ بر روی دو گروه از آمریکا و اسپانیا، ترکیب جمعیت میکروبی روده شامل فوزوباکتریها به کمک ژن 16SrRNA در نمونه‌های مدفوعی و بافتی از تومور و بافت مجاور آن مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج، فارغ از تفاوت‌ها در ترکیب کلی میکروبیوم در دو گروه جغرافیایی، در هر دو گروه آمریکایی و اسپانیایی، تغییر ترکیب میکروبیوم را در تومور نسبت به بافت سالم کناری آن معنادار نشان داد. افزایش فراوانی فوزوباکتریها در تومور، به‌خصوص در جمعیت اسپانیایی مشهود بود که با یافته‌های ما تطابق دارد (۳۵).

همه‌ی نتایج و مقایسه‌ی آنها با نتایج تحقیقات مشابه در جهان، پیشنهاد می‌کند که یافته‌های مدفوعی می‌تواند امکان نتیجه‌گیری در مورد پتانسیل متابولیک و عملکردی میکروبیوم روده را در ریزمحیط تومور نیز فراهم کند. پس مطالعه‌ی تغییرات ترکیب میکروبیوم روده در مدفوع در راستای تشخیص ضایعات پیش سرطانی، حداقل به‌عنوان یک روش غیرتهاجمی و در عین حال دقیق و زود هنگام، احتمالاً می‌تواند جایگزین مناسبی برای آزمون‌های غربالگری روتین شود که در بسیاری موارد دارای نتایج کاذب و واکنش‌های متقاطع هستند و همچنین این آزمون‌ها معمولاً هنگامی پاسخ مثبت می‌دهند که سرطان وارد فازهای پیشرفته و غیرقابل بازگشت خود شده است. طبق آمار سایت American Cancer Society مربوط به بررسی بیماران در فاصله‌ی سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۵، در مورد CRC در فاز IV یا مرحله‌ی دیررس و متاستازی نسبت به فاز I، شانس بقای پنج ساله برای بیمار از حدود ۹۰٪ به حدود ۱۵٪ کاهش می‌یابد.

خوشبختانه این نوع سرطان اگرچه یک معضل جهانی است که میلیون‌ها نفر را تحت تأثیر قرار داده است اما از یک لحاظ منحصر به فرد است و آن روند کند پیشرفت CRC می‌باشد که آن را قابل پیشگیری و اغلب درمان‌پذیر می‌کند. علائم بالینی این بیماری تنها در فازهای پیشرفته‌ی آن مشاهده می‌شوند، در نتیجه تنها راه مهار این بیماری و کاهش نرخ مرگ و میر آن، یک برنامه‌ی فعال غربالگری و تشخیص زود هنگام است. این مهم، به سرعت هر روزه با شناخت بیشتر روش‌های غیرتهاجمی با کمک بیومارکرهای قابل تشخیص، در حال میسر شدن می‌باشد (۳۶).

با در نظر گرفتن ارزش تشخیص زود هنگام، ما در این مطالعه بر خلاف اکثر مطالعات، علاوه بر بررسی تراکم دو گونه‌ی مارکر در بافت تومور، بر روی بررسی بافت پولیپ نیز تمرکز کردیم. در این راستا، یافته‌های ما نشان می‌دهد که این افزایش لود باکتریایی، در دو گونه‌ی فوزوباکتریوم نوکلئاتوم و اتروکوکوس فکالیس، در مورد افراد دارای پولیپ نیز صدق کرده و معنادار می‌باشد. طوری که در مورد نمونه‌های پولیپ ما نیز مشابه نمونه‌های توموری در مقابل نمونه‌ی طبیعی، مقدار P کمتر از ۰/۰۱ ($P < 0.05$) Significant) به‌دست آمد. اهمیت این یافته در تشخیص زود هنگام آدنوما و پیش از تبدیل آن به کارسینوما می‌مهاجم و CRC نمایان خواهد شد. مشابه چنین نتایجی از تحقیقات یک گروه در چین نیز

پرایمرها جهت اتصال به نواحی محافظت شده‌ی ژن 16SrRNA انتخاب شدند تا کل این ژن را تکثیر کنند. این بدان علت است که نواحی اختصاصی که معرف گونه‌ی باکتری‌ها هستند در کل قطعه‌ی این ژن پراکنده هستند (۲۸). در حال حاضر، این تکنیک و نتایج به‌دست آمده از آن با تکنیک و نتایج دیگر تحقیقات در دنیا تأیید شده است، از جمله مطالعات جویوموند و همکاران بر روی میکروارگانیزم‌های گوارشی (۳۰)، همچنین کاستیللو و همکاران بر روی باکتری‌های روده‌ی خوک، مایدا و همکاران روی باکتری‌های دهانی کار کرده و از روش real-time PCR (qPCR) و ژن اختصاصی 16SrRNA استفاده کردند و با توجه به نتایجی که به‌دست آوردند، این تکنیک را در مقایسه با روش‌های سنتی مانند کشت افتراقی و رنگ‌آمیزی اختصاصی و شمارش کلونی، به‌عنوان یک روش معتبر برای سنجش کمی باکتری‌ها معرفی کردند (۳۱ و ۳۲).

در مورد انتخاب جمعیت میکروبی، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم، در مطالعه‌ی فوکوجایتی و همکاران در سال ۲۰۱۵ نیز، از طریق تکنیک همین مطالعه یعنی Absolute Quantitative Real-Time PCR، افزایش معنادار جمعیت این گونه در افراد سرطانی نسبت به افراد طبیعی را نشان داد (۲۱). افزایش جمعیت این باکتری و نیز اتروکوکوس فکالیس در سرطان روده در مطالعه‌ی مروری Cynthia L. Sears و همکاران نیز به تفصیل به همراه مکانیزم‌های بیماری‌زایی و توموریزان آنها بیان شده است (۳۳).

در مورد مکانیزم بیماری‌زایی فوزوباکتریوم نوکلئاتوم همان‌طور که در بخش‌های قبل اشاره شد، فاکتور اصلی ویرولانسی این باکتری عامل چسبندگی FadA می‌باشد. این فاکتور در بافت سبب تجمع سایتوکاین‌های التهابی α (Tumor Necrosis Factor), IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 TNF- NF- κ B شده و در نتیجه ایجاد ریزمحیط پیش التهابی مناسب برای پیشرفت CRC می‌کند (۱۷). اهمیت این فاکتور در توموریزان فوزوباکتریوم نوکلئاتوم تا حدی است که اخیراً یک مطالعه بین دو گروه تأیید شده‌ی سالم و مبتلا به CRC، نشان داده است که سوبیه‌ی فوزوباکتریوم نوکلئاتوم fadA-positive تنها در بافت توموری گروه مبتلا به CRC یافت می‌شود و در بافت کلون افراد سالم، این سوبیه مشاهده نشد (۳۴).

مطالعه‌ی حاضر که بر روی نمونه‌های بافتی از کلون بیماران انجام شد، همانند مطالعه‌ی موازی آن بر روی نمونه‌های مدفوعی که توسط سلطانی و همکاران انجام شد، افزایش چشمگیر و معنادار دو باکتری فوزوباکتریوم نوکلئاتوم و اتروکوکوس فکالیس را در حالت سرطانی نسبت به حالت سلامت در افراد نشان داد (۲۸). این نتیجه همسو با نتایج تحقیقات زلر در سال ۲۰۱۴ که گونه‌های باکتریایی مارکر CRC را در بیوپسی و مدفوع مورد مطالعه قرار دادند، تأیید می‌کند که نه تنها اختلاف بین فراوانی این گونه‌ها در بافت کلون افراد سالم با افراد سرطانی معنی‌دار است بلکه این اختلاف در بین نمونه‌های مدفوعی این افراد هم به همین اندازه معنی‌دار است (۱۶).

میکروارگانسیم‌هایی که به‌عنوان پروبیوتیک بر ضد عفونت‌ها و یا در جهت درمان‌های ضدتوموری به کار روند، تبدیل به یک موضوع اساسی برای تحقیقات شده است و انتظارات را در این راستا، از علم و پزشکی بالا برده است (۴۰) چراکه شناخت دقیق این گونه‌ها می‌تواند پایه‌ی طراحی پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها به‌منظور پیشگیری از بیماری‌های التهابی روده و سرطان و یا متوقف کردن آنها در مراحل اولیه باشد.

برای مثال نتایج یک مطالعه نشان داده است که فاکتوری به نام Placental-specific 8 (PLAC8) هنگامی که در مدفوع افزایش می‌یابد می‌تواند با CRC مرتبط باشد. بیان این فاکتور در سلول‌های در حال میتوز بالا می‌رود و مشاهده شده است که باکتری‌هایی با مسیر متابولیکی منتهی به تولید بوتیرات، باعث کاهش بیان PLAC8 و نیز القای آپوپتوز در سلول‌های با مقدار بالای این پروتئین می‌شوند. در نتیجه، رشد چنین باکتری‌هایی می‌تواند باعث مهار رشد تومور در مراحل اولیه شود (۴۱).

باید در نظر گرفت که در روند پیشرفت سرطان روده، ما با یک دینامیک میکروبی مواجه هستیم که در مقالاتی در دنیا نیز به آنها اشاره شده است، بدین معنی که گونه‌های آغازکننده‌ی تومورزایی ممکن است دقیقاً همان گونه‌های پیشبرنده‌ی سرطان در روده و یا گونه‌های نهایی مقیم در تومور بدخیم نباشند (۴۲). پس نیاز است که بررسی گات میکروبیوتا در پایش سرطان روده اولاً به‌صورت چند گونه‌ای و ثانیاً به‌صورت پایش دوره‌ای انجام شود تا حداقل تعدادی گونه که معرف هر مرحله (سلامتی، پولیپ و تومور) از روند بیماری هستند به‌صورت دقیق شناسایی شده و در جهت تشخیص، به کار روند.

در نهایت می‌توان گفت که در آینده جهت استفاده از مارکرهای میکروبی به‌عنوان مارکرهای تشخیصی و یا ابزارهای درمان بیولوژیک، نیاز به مطالعات بیشتر در سمپل‌سایزهای بزرگتر، تکرار آزمایشات و به‌کارگیری تکنیک‌های بالاتری برای شناسایی یک «پنل بیو مارکری» با حساسیت بالا و اختصاصیت مناسب وجود دارد تا در نتیجه بتواند به‌عنوان ابزار دقیقی برای تشخیص و غربالگری پولیپ‌های روده‌ای و CRC و یا درمان آنها مورد استفاده قرار گیرد.

به‌دست آمده است که به مقایسه‌ی نسبت فراوانی شاخه‌های باکتریایی در مدفوع افراد کنترل طبیعی، هم نسبت به پولیپ‌ها و آدنوما و هم نسبت به کارسینوما پرداختند. یافته‌های این دانشمندان نیز تغییر ترکیب میکروبیوتا را همراه با پیشرفت سرطان و کاهش تنوع گونه‌ها در طی این روند نشان داد (۳۷) همچنین فوزوباکتریوم به‌طور کلی رایج‌ترین گونه در بافت تومور و مدفوع بیماران CRCی همراه با متاستاز شناخته شده است (۳۸ و ۳۹).

ضریب همبستگی بین دو متغیر مورد مطالعه در داده‌های کمی با آزمون Spearman محاسبه می‌شود. هر چه این ضریب به عدد (۱) نزدیک‌تر شود به معنای این است که دو متغیر (در اینجا دو باکتری) بر هم اثر هم افزایشی دارند و میل این ضریب به سمت (-۱) نشانگر این است که دو متغیر (دو باکتری) عکس یکدیگر در روند CRC اثرگذار هستند. نتایج مطالعه‌ی ما حاکی از افزایش ضریب هم بستگی بین دو باکتری مورد بررسی یعنی فوزوباکتریوم نوکلئاتوم و انتروکوکوس فکالیس و برابر (۰/۷۶۳۴) به‌دست آمد. این مطلب به این می‌ماند که این دو باکتری در ایجاد و پیشبرد CRC بر یکدیگر اثر سینرژیستی داشته و شرایط رشد یکدیگر را در ریزمحیط تومور تقویت می‌کنند. در واقع ممکن است که این دو باکتری با داشتن مسیرهای متابولیک مرتبط و مکمل، به کمک هم، اثر مخرب‌تری را بر سلامت سلول‌های لایه‌ی اپیتلیال روده بر جای بگذارند.

با توجه به ضریب همبستگی نزدیک به (یک) در مورد دو باکتری فوزوباکتریوم نوکلئاتوم و انتروکوکوس فکالیس و اثر سینرژیستی آنها در موارد CRC، لزوم شناخت بیشتر مسیرهای متابولیک مشترک یا مرتبطی که باعث کلونیزه شدن این دست از باکتری‌ها در ریز محیط تومور می‌شود و یا گونه‌های آنتاگونیست آنها که سبب مهار رشد این باکتری‌های مضر در آن محیط می‌شوند، بیشتر احساس می‌شود. گروهی از باکتری‌ها با اثر آنتاگونیستی و یا رقابتی در شرایط روده می‌توانند جلوی رشد گونه‌های پاتوژن یا بالقوه التهاب‌زا و کارسینوژنیک را گرفته و از کلونیزاسیون بیش از حد آنها در روده جلوگیری کنند. در نتیجه، شناسایی این گونه‌ها و درک متابولیسم و عملکرد دقیق آنها در محیط روده نیز در مطالعات CRC باید مدنظر قرار گیرد. به همین علت است که در سال‌های اخیر یافتن

جدول ۱- نتایج بررسی اثر مشخصات دموگرافیک بیماران بر ریسک CRC

P (< / .05)	گروه‌ها				تعداد (%)
	تومور (Within group%)	پولیپ (Within group%)	سالم (Within group%)	جمع (Within group%)	
	۱۹ (۳۱/۱%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۶۱	متوسط سن ۱- (SD)
۰/۵۸۰	۱۹ (۳۱/۱%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۶۱	جنس
	۱۹ (۳۱/۱%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۶۱	زن
۰/۲۰۷	۱۹ (۳۱/۱%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۶۱	مرد
	۱۹ (۳۱/۱%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۶۱	سابقه‌ی خانوادگی (%)
	۱۹ (۳۱/۱%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۶۱	بله
۰/۴۵۸	۱۹ (۳۱/۱%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۶۱	خیر
	۱۹ (۳۱/۱%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۲۱ (۳۴/۴%)	۶۱	رژیم غذایی

۰/۱۴۷	۱۰ (٪۵۲/۶) ۹ (٪۴۷/۴)	۱۷ (٪۸۱/۰) ۴ (٪۱۹/۰)	۱۵ (٪۷۱/۴) ۶ (٪۲۸/۶)	۴۹ (٪۶۸/۹) ۱۹ (٪۳۱/۱)	همه جور غذا میوه و سبزیجات کم فعالیت فیزیکی
۰/۷۸۲	۱۵ (٪۶۱/۹) ۳ (٪۱۵/۸) ۱ (٪۵/۳)	۱۳ (٪۶۱/۹) ۶ (٪۲۸/۶) ۲ (٪۹/۵)	۱۴ (٪۶۶/۷) ۶ (٪۲۸/۶) ۱ (٪۴/۸)	۴۲ (٪۶۸/۹) ۱۵ (٪۲۴/۶) ۴ (٪۶/۶)	عدم فعالیت فعالیت متوسط فعالیت جدی
۰/۵۰۴	۳ (٪۱۵/۸) ۱۶ (٪۸۴/۲)	۲ (٪۹/۵) ۱۹ (٪۹۰/۵)	۱ (٪۴/۸) ۲۰ (٪۹۵/۲)	۶ (٪۹/۸) ۵۵ (٪۹۰/۲)	مصرف سیگار بله خیر
۰/۳۰۶	۲ (٪۱۰/۵) ۱۷ (٪۸۹/۵)	۰ (٪۰/۰) ۲۱ (٪۱۰۰)	۱ (٪۴/۸) ۲۰ (٪۹۵/۲)	۳ (٪۴/۹) ۵۸ (٪۹۵/۱)	مصرف الکل بله خیر

جدول ۲- توالی پرایمرهای میکروبی مورد مطالعه

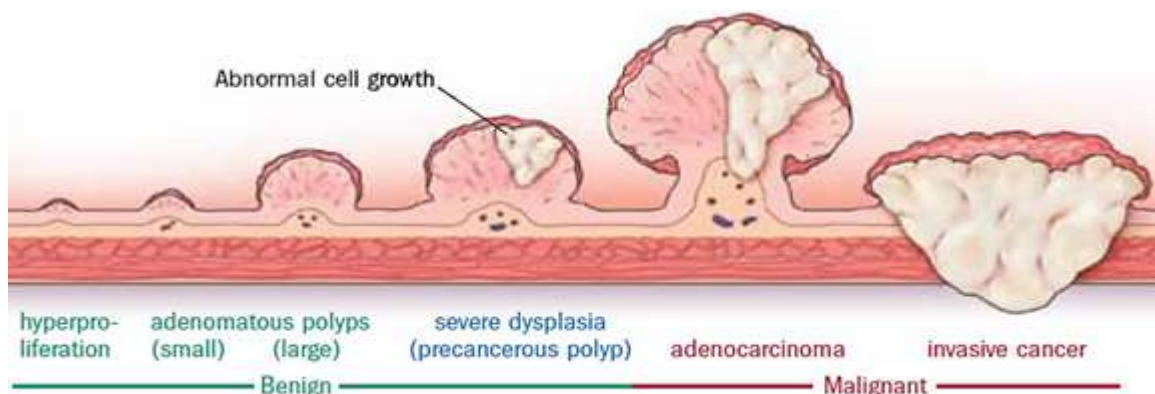
Species	Oligonucleotides 5' → 3'	Tm(°C)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	CTTAGGAATGAGACAGAGATG:F R: TGATGGTAACATACGAAAGG	۵۶	۱۲۰	Fukugaiti et al,2015, 1135-1140
<i>Enterococcus faecalis</i>	F: TGTGTAGCGGTGAAATGC R: AAACCCTCCAACCTTAGC	۵۲	۱۶۲	Rezasoltani et al,2018, 244-249.

جدول ۳- میانگین فراوانی *F.nucleatum* در سه گروه بیماران بر اساس CT

P.V	اختلاف مجموع CTها در دو گروه	۱۹ عدد تومور	۲۱ عدد پولیپ	۲۱ عدد طبیعی	
<۰/۰۰۰۱		۲۳/۳۲	۲۸/۹۰	۳۱/۹۴	Fuso میانگین CT
		۳/۰۵۰	2.939	۱/۴۶۰	انحراف معیار
<۰/۰۰۰۱	۱۷/۷۶			طبیعی با پولیپ	گروهها
	۳۶/۶۳			طبیعی با تومور	
	۱۸/۸۷			پولیپ با تومور	

جدول ۴- میانگین فراوانی *E.faecalis* در سه گروه بیماران بر اساس CT

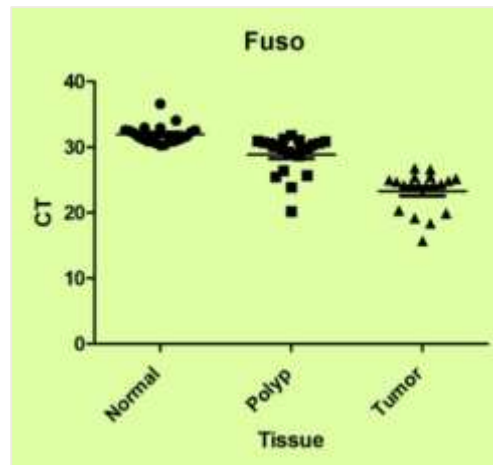
P.V	اختلاف مجموع CTها در دو گروه	۱۹ عدد تومور	۲۱ عدد پولیپ	۲۱ عدد طبیعی	
<۰/۰۰۰۱		۲۱/۹۲	۳۷/۳۷	۳۰/۳۸	Entro میانگین CT
		۱/۴۸۶	۰/۷۷۷	۱/۵۴۸	انحراف معیار
<۰/۰۰۰۱	۲۰/۱۴			طبیعی با پولیپ	گروهها
	۴۰/۵۷			طبیعی با تومور	
	۲۰/۴۳			پولیپ با تومور	



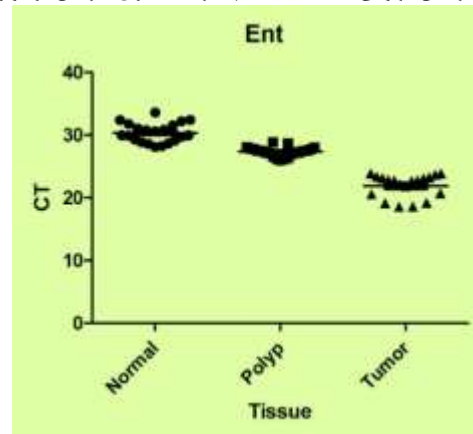
شکل ۱- انواع پولیپها و مراحل تبدیل آنها به تومور

References

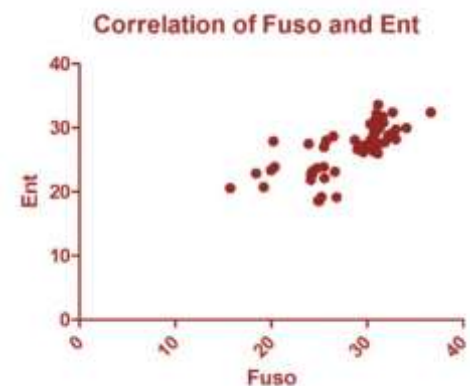
1. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RG, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2017;67:177-93. doi: 10.3322/caac.21395
2. Joachim C, Macni J, Drame M, Pomier A, Escarmant P, Veronique-Baudin J, et al. Overall survival of colorectal cancer by stage at diagnosis: data from the martinique cancer registry. Medicine 2019;98. doi: 10.1097/MD.00000000000016941
3. Mojarad EN, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. GHFBB 2013;6:120.
4. MacFarlane AJ, Stover PJ. Convergence of genetic, nutritional and inflammatory factors in gastrointestinal cancers. Nutrition reviews. 2007;65:S157-66. doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00355.x
5. de Almeida CV, Taddei A, Amedei A. The controversial role of Enterococcus faecalis in colorectal cancer. Therapeutic Advances in Gastroenterology 2018;11:1756284818783606. doi: 10.1177/1756284818783606
6. Jobin C. Colorectal cancer: looking for answers in the microbiota. Cancer Discovery 2013;3:384-7. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0042
7. Mira-Pascual L, Cabrera-Rubio R, Ocon S, Costales P, Parra A, Suarez A, et al. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. Journal of Gastroenterology 2015;50:167-79. doi: 10.1007/s00535-014-0963-x
8. Sun J, Kato I. Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer. Genes & Diseases 2016;3:130-43. doi: 10.1016/j.gendis.2016.03.004
9. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut flora. Biochem J 2017;474:1823-36. doi: 10.5507/bp.2017.051
10. Stary L, Mezerova K, Skalicky P, Zboril P, Raclavsky V. Are we any closer to screening for colorectal cancer using microbial markers? A critical review. Biomedical Papers 2017;161:333-8. doi: 10.5507/bp.2017.051
11. Rezasoltani S, Asadzadeh-Aghdaei H, Nazemalhosseini-Mojarad E, Dabiri H, Ghanbari R, Zali MR. Gut microbiota, epigenetic modification and colorectal cancer. IJM 2017;9:55.
12. Kim M, Vogtmann E, Ahlquist DA, Devens ME, Kisiel JB, Taylor WR, et al. Fecal metabolomic signatures in colorectal adenoma patients are associated with gut microbiota and early events of colorectal cancer pathogenesis. MBio 2020;11:e03186-19. doi: 10.1128/mBio.03186-19
13. Rezasoltani S, Bashirzadeh DA, Mojarad EN, Aghdaei HA, Norouzinia M, Shahrokh S. Signature of gut microbiome by conventional and advanced analysis techniques: advantages and disadvantages. MEJDD 2020;12:5. doi: 10.15171/mejdd.2020.157
14. Yang T, Owen JL, Lightfoot YL, Kladd MP, Mohamadzadeh M. Microbiota impact on the epigenetic regulation of colorectal cancer. Trends in Molecular Medicine 2013;19:714-25. doi: 10.1016/j.molmed.2013.08.005
15. Dahmus JD, Kotler DL, Kastenber DM, Kistler CA. The gut microbiome and colorectal cancer: a review of bacterial pathogenesis. JGO 2018;9:769. doi: 10.21037/jgo.2018.04.07
16. Zeller G, Tap J, Voigt AY, Sunagawa S, Kultima JR, Costea PI, et al. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. Molecular Systems Biology 2014;10:766. doi: 10.15252/msb.20145645
17. Shang FM, Liu HL. Fusobacterium nucleatum and colorectal cancer: A review. WJGO 2018;10:71. doi: 10.4251/wjgo.v10.i3.71
18. Baxter NT, Zackular JP, Chen GY, Schloss PD. Structure of the gut microbiome following colonization with human feces determines colonic tumor burden. Microbiome 2014;2:1-1. doi: 10.1186/2049-2618-2-20



نمودار ۱- افزایش فراوانی *F.nucleatum* با پیشرفت بیماری سرطان در کولون



نمودار ۲- افزایش فراوانی *E.faecalis* با پیشرفت بیماری سرطان در کولون



نمودار ۳- مقایسه‌ی فراوانی *F.nucleatum* و *E.faecalis* در روند CRC

تشکر و قدردانی

با تشکر ویژه از خانم دکتر سماء رضاسلطانی که مرا در تحقیق و تهیه این مقاله یاری کردند و همچنین مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان طالقانی تهران که فضا و امکانات مطالعه را در اختیار ما قرار دادند.

19. Lennard KS, Goosen RW, Blackburn JM. Bacterially-associated transcriptional remodelling in a distinct genomic subtype of colorectal cancer provides a plausible molecular basis for disease development. *PLoS One* 2016;11:e0166282. doi: [10.1371/journal.pone.0166282](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166282)
20. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology* 1993;175:3247-52. doi: [10.1128/jb.175.11.3247-3252.1993](https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3247-3252.1993)
21. Allen-Vercoe E, Jobin C. Fusobacterium and Enterobacteriaceae: important players for CRC?. *Immunology Letters* 2014;162:54-61. doi: [10.1016/j.imlet.2014.05.014](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.05.014)
22. Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *JOE* 2006;32:946-50. doi: [10.1016/j.joen.2006.03.023](https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.03.023)
23. Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH. The response to oxidative stress of *Fusobacterium nucleatum* grown in continuous culture. *FEMS Microbiology Letters* 2000;187:31-4. doi: [10.1111/j.1574-6968.2000.tb09132.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09132.x)
24. Steeves CH, Potrykus J, Barnett DA, Bearne SL. Oxidative stress response in the opportunistic oral pathogen *Fusobacterium nucleatum*. *Proteomics* 2011;11:2027-37. doi: [10.1002/pmic.201000631](https://doi.org/10.1002/pmic.201000631)
25. Murray BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases* 1998;4:37. doi: [10.3201/eid0401.980106](https://doi.org/10.3201/eid0401.980106)
26. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993;15:532-4.
27. Fukugaiti MH, Ignacio A, Fernandes MR, Ribeiro Júnior U, Nakano V, Avila-Campos MJ. High occurrence of *Fusobacterium nucleatum* and *Clostridium difficile* in the intestinal microbiota of colorectal carcinoma patients. *BJM* 2015;46:1135-40. doi: [10.1590/S1517-83824620140665](https://doi.org/10.1590/S1517-83824620140665)
28. Rezasoltani S, Aghdaei HA, Dabiri H, Sepahi AA, Modarressi MH, Mojarad EN. The association between fecal microbiota and different types of colorectal polyp as precursors of colorectal cancer. *Microbial Pathogenesis* 2018;124:244-9. doi: [10.1016/j.micpath.2018.08.035](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.035)
29. Rinttilä T, Lyra A, Krogius-Kurikka L, Palva A. Real-time PCR analysis of enteric pathogens from fecal samples of irritable bowel syndrome subjects. *Gut Pathogens* 2011;3:1-9. doi: [10.1186/1757-4749-3-6](https://doi.org/10.1186/1757-4749-3-6)
30. Gueimonde M. Detection and enumeration of gastrointestinal microorganisms miguel gueimonde and clara de los reyes-gavilan. *Handbook of Probiotics and Prebiotics* 2009;25. doi: [10.1002/9780470432624.ch1](https://doi.org/10.1002/9780470432624.ch1)
31. Castillo M, Martín-Orúe SM, Manzanilla EG, Badiola I, Martín M, Gasa J. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology* 2006;114:165-70. doi: [10.1016/j.vetmic.2005.11.055](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.055)
32. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Koikeguchi S, Petelin M, et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2003;39:81-6. doi: [10.1016/S0928-8244\(03\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00224-4)
33. Sears CL, Garrett WS. Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host & Microbe* 2014;15:317-28. doi: [10.1016/j.chom.2014.02.007](https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.007)
34. Kashani N, Abadi AB, Rahimi F, Foroootan M. FadA-positive *Fusobacterium nucleatum* is prevalent in biopsy specimens of Iranian patients with colorectal cancer. *New Microbes and New Infections* 2020;34:100651. doi: [10.1016/j.nmni.2020.100651](https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100651)
35. Allali I, Delgado S, Marron PI, Astudillo A, Yeh JJ, Ghazal H, et al. Gut microbiome compositional and functional differences between tumor and non-tumor adjacent tissues from cohorts from the US and Spain. *Gut Microbes* 2015;6:161-72. doi: [10.1080/19490976.2015.1039223](https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1039223)
36. Loktionov A. Biomarkers for detecting colorectal cancer non-invasively: DNA, RNA or proteins?. *WJGO* 2020;12:124. doi: [10.4251/wjgo.v12.i2.124](https://doi.org/10.4251/wjgo.v12.i2.124)
37. Liu W, Zhang R, Shu R, Yu J, Li H, Long H, et al. Study of the relationship between microbiome and colorectal cancer susceptibility using 16SrRNA sequencing. *BioMed Research International* 2020. doi: [10.1155/2020/7828392](https://doi.org/10.1155/2020/7828392)
38. Ahn J, Sinha R, Pei Z, Dominianni C, Wu J, Shi J, et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *JNCI* 2013;105:1907-11. doi: [10.1155/2020/7828392](https://doi.org/10.1155/2020/7828392)
39. Bullman S, Pedamallu CS, Sicinska E, Clancy TE, Zhang X, Cai D, et al. Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science* 2017;358:1443-8. doi: [10.1126/science.aal5240](https://doi.org/10.1126/science.aal5240)
40. Adelstein BA, Macaskill P, Chan SF, Katelaris PH, Irwig L. Most bowel cancer symptoms do not indicate colorectal cancer and polyps: a systematic review. *BMC Gastroenterology* 2011;11:1-0. doi: [10.1186/1471-230X-11-65](https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-65)
41. Huang CC, Shen MH, Chen SK, Yang SH, Liu CY, Guo JW, et al. Gut butyrate-producing organisms correlate to Placenta Specific 8 protein: Importance to colorectal cancer progression. *Journal of Advanced Research* 2020;22:7-20. doi: [10.1016/j.jare.2019.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.11.005)
42. Garza DR, Taddese R, Wirbel J, Zeller G, Boleij A, Huynen MA, Dutilh BE. Metabolic models predict bacterial passengers in colorectal cancer. *Cancer & Metabolism* 2020;8:1-3. doi: [10.1186/s40170-020-0208-9](https://doi.org/10.1186/s40170-020-0208-9)



Quantification of *Enterococcus Faecalis* and *Fusobacterium Nucleatum* in Healthy Colorectal Tissues Compared with Polyp and Cancer Colorectal Tissues

Dorrieh Ahmadi Bashirzadeh (Ph.D.)¹, Ehsan Nazemalhosseini Mojarad (Ph.D.)^{2*}, Naser Harzandi (Ph.D.)¹

1- Dept. of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

2- Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 9 August 2021, Accepted: 17 August 2022

Abstract:

Introduction: Colorectal Cancer (CRC) is the second most common cancer in men and women. Recently, investigations have revealed a much larger role for epigenetic and non-hereditary factors in CRC incidence than hereditary factors. Among all non-hereditary factors, gut microbiota alterations are the most prominent factor in the development of CRC. This work aimed to study the quantification of *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum* in healthy colorectal tissues compared with polyp and cancer colorectal tissues of Iranian peoples.

Methods: In this case-control study, 21 biopsy samples of normal colon tissue, 21 polyp tissues, and 19 tumor tissues were investigated. To quantify the *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum* in our samples, we employed the 16SrRNA-specific gene in Real-Time Quantitative PCR method.

Results: The Quantitative Real-Time PCR results demonstrated a significant increase (P -value <0.05) in the population of both bacterial species, *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum* in tumor and polyp tissues compared with normal samples. In addition, the Spearman index for these two species was 0.7634, which refers to a synergistic relationship between these species in the colon environment.

Conclusion: Collectively, by the progression of CRC, the abundance of *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum*, will be increasing. In other words, the enrichment of these species can induce the development and progression of CRC and might be a sign of its occurrence.

Keywords: Colorectal cancer; qRT-PCR; *Enterococcus faecalis*; *Fusobacterium nucleatum*.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: E. Nazemalhosseini Mojarad, Email: ehsanmojarad@gmail.com

Citation: Ahmadi Bashirzadeh D, Nazemalhosseini Mojarad E, Harzandi N. Quantification of enterococcus faecalis and fusobacterium nucleatum in healthy colorectal tissues compared with polyp and cancer colorectal tissues. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(2):33-42.