

## بررسی متابولیت‌ها و مسیرهای بیولوژیکی میکروبیوتا و بازسازی شبکه برهمکنش میکروبیوتا-متابولیت در سرطان روده بزرگ

حسین شهرکی قدیمی<sup>۱</sup>، دکتر پرویز عبدالمالکی<sup>۱\*</sup>، دکتر سید شهریار عرب<sup>۲</sup>

۱- گروه بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- گروه اطفال، دانشگاه کالیفرنیا، لا جولا، ایالات متحده آمریکا

\*صندوق پستی ۱۵۴-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

parviz@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۹

دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۱۰

### چکیده

پیشرفت‌های علمی به‌طور قابل توجهی درک ما از ارتباطات پیچیده بین سرطان و میکروبیوم را افزایش داده است. آزمایشات تجربی نشان داده‌اند که تعامل میزبان و میکروبیوتا نقش مهمی در سلامتی یا بیماری بدن انسان ایفا می‌کند. میکروبیوم انسان دارای مزایای متعددی از جمله تنظیم فرایندهای اساسی مانند انتقال پیام، ایمنی و متابولیسم هستند که به عملکرد مناسب میزبان کمک می‌کند. عدم تعادل میکروبیوتای روده و یا دیس بیوسی با ایجاد و پیشرفت بیماری‌های پیچیده، مانند سرطان روده بزرگ ارتباط دارد. از این‌رو در این پژوهش بر اساس اطلاعات متاژنوم و متابولوم و آنالیزهای عملکردی میکروبیوم روده بزرگ، باکتری‌ها، متابولیت‌ها و مسیرهای بیولوژیکی باکتریایی مهم در سرطان روده بزرگ (CRC) را در مقایسه با گروه سالم شناسایی کردیم. همچنین، سهم باکتری‌های مختلف در مسیرهایی با فراوانی معنی‌دار را مورد بررسی قرار دادیم و در نهایت با تجزیه و تحلیل شبکه برهمکنش باکتری-متابولیت در دو گروه سالم و سرطانی، تفاوت این دو شبکه را از نظر ویژگی‌های توپولوژیکی مشخص کردیم. نتایج ما نشانگرهای زیستی بالقوه را برای CRC معرفی کرد که می‌توانند در طراحی مطالعات آینده استفاده شوند. همچنین، نشان داد که بعضی از باکتری‌ها از جمله *Bacteroides fragilis* و *Bifidobacterium longum* که به ترتیب دارای افزایش و کاهش فراوانی در گروه سرطان هستند، در مسیرهای بیولوژیکی مهم باکتریایی در CRC نیز مشارکت دارند. این یافته‌ها در مجموع نشان داد که میکروبیوم روده یک رویکرد غیرتهاجمی امیدوار کننده برای غربالگری اولیه CRC خواهد بود و ترکیب میکروبیوتای روده و متابولیت‌های آنها می‌تواند اطلاعات مهمی در مورد CRC ارائه دهد.

کلید واژگان: میکروبیوم، میکروبیوتا، دیس بیوسی، سرطان روده بزرگ، متاژنوم

## ۱-مقدمه

سرطان یک بیماری مهم با نرخ مرگ و میر بالا در سراسر جهان است [۱]. همانند بسیاری از بیماری‌های پیچیده دیگر، حساسیت و پیشرفت سرطان عمدتاً تحت تأثیر برهمکنش ژن-محیط قرار می‌گیرد. تا کنون درک ژنتیک و مکانیزم‌های زیستی سلولی و مولکولی که باعث سرطان‌زایی می‌شود، پیشرفت چشمگیر داشته است و به تازگی، دانش ما با پیشرفت بسترهای توالی‌یابی نسل جدید برای مشخص کردن جهش‌های مکرر و تغییرات اپی‌ژنتیکی که در طی تومورزایی به وجود آمده، پیشرفت کرده است اما اطلاعات ما درباره اینکه چگونه عوامل محیطی بر ایجاد سرطان و سازوکار سرطان‌زایی موثر هستند، نسبتاً کم است [۲ و ۳]. تا همین اواخر ارتباط سرطان با میکروب‌هایی که در بدن ما زندگی می‌کردند نامعلوم بود. با این حال، باکتری‌ها، قارچ‌ها، یوکاریوت‌ها (مانند مخمر و قارچ‌ها) و ویروس‌ها (باکتریوفاژ) عوامل محیطی هستند که به‌طور مداوم در معرض آنها قرار می‌گیریم و مطالعات اخیر نشان می‌دهد که آنها می‌توانند تأثیر بسیار زیادی بر سرطان‌زایی داشته باشند [۴].

سرطان روده بزرگ یا سرطان کولورکتال (CRC) تقریباً ۱۰ درصد از همه سرطان‌ها و مرگ‌های ناشی از سرطان را سراسر جهان تشکیل می‌دهد. همچنین این سرطان دومین سرطان شایع در زنان و سومین سرطان در مردان تشخیص داده شده است. این آمار عمدتاً به برنامه‌های غربالگری سراسری و افزایش تست کولونوسکوپی مربوط می‌شود. هرچند عوامل ژنتیکی، شیوه زندگی، چاقی و محیط ممکن است موثر باشند، اما دلایل دقیق این افزایش به‌طور کامل مشخص نیست [۵ و ۶]. سرطان روده بزرگ در روده بزرگ<sup>۲</sup> یا راست روده<sup>۳</sup> شروع می‌شود. بسته به محل شروع، این سرطان‌ها را می‌توان سرطان روده بزرگ یا سرطان راست روده نیز نامید. سرطان روده بزرگ و

سرطان راست روده اغلب با هم گروه بندی می‌شوند زیرا ویژگی‌های مشترک زیادی دارند. کشف سازوکار پیشرفت سرطان جهت شناسایی نشانگرهای زیستی بسیار مهم است [۷].

بدن انسان حاوی تریلیون‌ها میکروب از جمله باکتری‌ها، آرکی‌ها، یوکاریوت‌ها (مانند مخمر و قارچ‌های دیگر) و ویروس‌ها (از جمله باکتریوفاژ) است که در طول زندگی با او همزیستی دارند. به میکروارگانیسم‌های زنده که در یک محیط مشخص یافت می‌شوند میکروبیوتا گفته می‌شود، مانند میکروبیوتای دهان و میکروبیوتای روده و میکروبیوم مجموعه ژنوم‌های همه میکروارگانیسم‌های موجود به همراه عناصر ساختاری و متابولیت‌های آنها را شامل می‌شود. میکروبیوتای انسانی تا حد زیادی بر فیزیولوژی میزبان تأثیر می‌گذارد و نقش مهمی در سلامت و بیماری‌های انسانی ایفا می‌کند. از این میان بدن شامل حداقل ۱۰۰۰ گونه از باکتری‌های شناخته شده است که ژن‌های آنها معادل ۱۵۰ برابر ژن‌های موجود در بدن انسان هستند. ترکیب و عملکرد میکروبیوم با توجه به مناطق جغرافیایی مختلف، سن، جنسیت، نژاد و رژیم‌های غذایی میزبان متفاوت است [۸ و ۹]. باکتری‌ها در طی مدت کوتاهی پس از تولد در بدن میزبان تکثیر و لانه‌گزینی می‌کنند. این جامعه ساده به تدریج در طول رشد میزبان به یک اکوسیستم بسیار متنوع تبدیل می‌شوند. با گذشت زمان، ارتباطات میکروبیوم-میزبان به روابط سودمندی تبدیل شده است و میکروبیوتای انسانی، به‌ویژه میکروبیوتای روده، به‌عنوان یک بخش ضروری شناخته شده است [۱۰]. باکتری‌ها ترکیبات هضم نشده را متابولیزه می‌کنند، مواد مغذی ضروری را تأمین می‌کنند، در مقابل تکثیر و لانه‌گزینی پاتوژن‌های فرصت طلب از میزبان دفاع می‌کنند و در تنظیم رشد اپیتلیال و تأثیر آن بر ایمنی ذاتی دخالت دارند. تغییرات در تعادل میکروبیوتای روده

<sup>3</sup> Rectum<sup>1</sup> Colorectal cancer<sup>2</sup> Colon

به دلایل مختلف از جمله رژیم غذایی ناسالم، بیماری، استرس و داروها که به نام دیس‌بیوسی<sup>۱</sup> شناخته می‌شود، در پاتوفیزیولوژی چندین بیماری نقش دارد. بیماری‌های مزمن مانند چاقی، بیماری‌های التهابی روده<sup>۲</sup> (IBD)، دیابت، نشانگان متابولیک، تصلب شرایین<sup>۳</sup>، بیماری کبد الکلی<sup>۴</sup> (ALD)، بیماری کبد چرب غیرالکلی<sup>۵</sup> (NAFLD)، سیروز و سرطان کبد با میکروبیوتا در ارتباط هستند. گرچه قادر به شناسایی تنوع بسیار زیادی از میکروب‌های موجود در انسان هستیم، اما همچنان نقش بیشتر گونه‌های باکتریایی در سلامتی و بیماری‌ها تا حد زیادی ناشناخته است. کولون و دریچه ایلئوسکال، بالاترین تراکم باکتری درون دستگاه گوارش را نشان می‌دهند که ممکن است به نقش مهم میکروبیوتا در سرطان روده بزرگ اشاره کند [۱۱].

CRC ممکن است از زمینه‌های مختلف ژنتیک فردی، شیوه زندگی و عوامل محیطی (مانند رژیم غذایی و داروها) و عدم تعادل پویا بین میکروبیوتای روده و سیستم ایمنی میزبان نشأت بگیرد [۱]. شواهد فراوانی وجود دارد که نشان می‌دهد ترکیب باکتری‌های روده در بیماران CRC می‌تواند به‌طور بالقوه در ایجاد سرطان نقش داشته باشد. شناسایی و شفاف‌سازی رابطه بین این باکتری‌ها و توسعه CRC بسیار مهم است [۱۳].

باکتری‌های غنی‌شده در ریز محیط تومور، فرصت‌های بسیاری برای تشخیص، پیشگیری و درمان سرطان روده بزرگ (CRC) فراهم کرده‌اند. به‌ویژه، سویه‌های غنی‌شده در روده بیماران مبتلا به CRC می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای زیستی مورد استفاده قرار گیرند. این امر می‌تواند به‌عنوان یک روش تشخیصی برای CRC به کار رود، به‌طوری‌که تکنیک‌هایی مانند qPCR و دیگر روش‌های ارزان و سریع برای ارزیابی میزان این باکتری‌ها

در مدفوع بیماران توسعه یابند تا به‌عنوان ابزار غربالگری برای جمعیت‌های در معرض خطر CRC استفاده شوند. همچنین، برای پروبیوتیک‌هایی که در ریزمحیط تومور ساکن<sup>۶</sup> شده‌اند: می‌توان با استفاده از مکمل‌های خوراکی فراوانی آنها را در روده‌ها برای بهبود سلامت بیماران CRC افزایش داد. از این‌رو، تحقیقات بیشتری در مورد CRC و باکتری‌های روده برای درک بهتر نحوه استفاده از این باکتری‌ها برای پیشگیری یا درمان موثر CRC مورد نیاز است [۱۵ و ۱۴].

به دلیل وجود سد مخاطی در طول دستگاه گوارش، تماس مستقیم بین میکروبیوتای روده با سلول‌های اپیتلیال روده محدود است. از سوی دیگر، متابولیت‌های تولید شده توسط میکروبیوتای روده به آسانی در سرتاسر سد مخاطی منتقل می‌شوند. بنابراین، میکروبیوتا می‌توانند با تولید متابولیت‌هایی که ایجاد یا پیشرفت سرطان را تعدیل می‌کنند، سرطان را افزایش یا کاهش دهند. با ظهور تکنیک‌های متابولومیک با بازدهی بالا، بینش جدیدی در مورد برهمکنش‌های متابولیسم میزبان-میکروبیوتا که در ایجاد تومور کولورکتال نقش دارند ایجاد شده است [۱۶]. همراه با پیش بینی عملکردی مبتنی بر توالی متاژنومی، ایجاد مجموعه متابولیت‌های میکروبی مبتنی بر متابولومیک نیز می‌تواند چشم‌انداز جدیدی را در ارتباط با دیس‌بیوسی میکروبیوتای روده و تولید متابولیت‌های مضر ایجاد کننده تومور کولورکتال، آشکار کند. از طرف دیگر، از همین روش می‌توان در کشف متابولیت‌های مفید تولید شده توسط باکتری‌های روده استفاده کرد. همچنین، تا حد بسیار زیادی معلوم شده است که برهمکنش‌های میکروبیوتای روده با میزبان در بسیاری از جنبه‌های سلامت و بیماری انسان تأثیر دارد [۱۷]. به‌عنوان مثال، محصولات تخمیری میکروبی مانند اسیدهای چرب

<sup>7</sup> Alcohol-associated liver disease

<sup>8</sup> Non-alcoholic fatty liver disease

<sup>10</sup> Colonization

<sup>4</sup> Dysbiosis

<sup>5</sup> Inflammatory bowel disease

<sup>6</sup> Atherosclerosis

زنجیره کوتاه<sup>۱۱</sup> (SCFA) نقش فعالی در فیزیولوژی میزبان سالم به عنوان منابع انرژی برای کلونوسیت‌ها، تنظیم کننده‌های بیان ژن و تمایز سلولی و عوامل ضد التهاب دارند. بسیاری از متابولیت‌ها مانند اسیدهای صفراوی ثانویه می‌توانند فعالیت‌های ژنوتوکسیک داشته و با بروز و پیشرفت بعضی بیماری‌ها ارتباط داشته باشند [۱۸].

در سال‌های اخیر، پلتفرم‌های تحلیلی پیشرفته‌ای برای شناسایی بهتر متابولیت‌ها توسعه یافته‌اند. علاوه بر این، توسعه هوش مصنوعی و همچنین پیشرفت در روش‌های محاسباتی به پردازش داده‌های متابولومیک، شناسایی متابولیت‌ها و همچنین کشف نشانگرهای زیستی کمک زیادی کرده است [۱۹ و ۲۰]. با این حال، در حال حاضر هیچ روش متابولومیک مخصوص باکتری‌ها وجود ندارد. روش‌های متابولومیک موجود متابولیت‌های تولید شده توسط میکروبیوتا و میزبان را تشخیص می‌دهند. بنابراین، می‌توان با ادغام متاژنومیکس<sup>۱۲</sup>، متاترنسکرپتومیکس<sup>۱۳</sup> و متاپروتئومیکس<sup>۱۴</sup>، تشخیص متابولیت‌های خاص میکروبی را تسهیل کرد [۲۱].

شواهد جمع‌آوری شده نشان می‌دهد که میکروبیوتای روده از طریق تولید متابولیت‌های میکروبی در جلوگیری و یا توسعه CRC نقش دارند و گام‌های بلندی در درک ما از نقش متابولیت‌های مشتق از میکروبیوتای روده در سلامتی و بیماری‌ها، به‌ویژه برای CRC برداشته شده است. کشف متابولیت‌های میکروبی که در ایجاد تومور کولورکتال نقش دارند، پیامدهای کلیدی برای کشف نشانگرهای زیستی بالقوه برای غربالگری بیماری‌ها و همچنین اهداف درمانی جدید دارد. علاوه بر این، روشن شدن نقش متابولیت‌ها و مسیرهای بیولوژیکی میکروبی الگوی جدیدی برای تشخیص، پیشگیری و درمان سرطان ارائه می‌دهد. تشخیص روابط کلیدی بین میکروبیوتای روده و متابولیت‌های دخیل در CRC می‌تواند مبنای مهمی

برای پزشکی شخص محور با هدف پیشگیری و مدیریت CRC فراهم کند [۱۷ و ۲۲].

تعداد زیادی از ارتباطات میان میکروب-میکروب و میکروب-میزبان در کنار هم به عنوان یک شبکه پیچیده زیست محیطی در روده انسان خدمت می‌کنند. بر این اساس برهمکنش میزبان و میکروبیوم شامل مبادله متابولیت‌ها و مولکول‌های سیگنالینگ می‌شود و برخی از آنها نقشی اساسی برای ایجاد عملکرد مناسب در میزبان و جامعه میکروب دارند. این مبادله بستگی به عوامل مختلفی نظیر ترکیب میکروبیوم و محیط بیرونی دارد. درک مسیرهای بیولوژیکی، فعالیت متابولیک این جوامع و تاثیر آن بر میزبان، تمرکز بسیاری از مطالعات بوده است و بعضی از آنها بیومارکرهای متابولیک را با پیشرفت بیماری‌ها مرتبط می‌کنند [۲۳ و ۲۴].

در این میان تئوری شبکه به عنوان یک رویکرد بسیار امیدوار کننده برای مدل‌سازی سیستم‌های بیولوژیکی پیچیده با تعاملات چند گانه بین اعضا مانند میکروبیوتا، ظهور کرده است. کاربرد زیست‌شناسی شبکه به‌طور قابل توجهی درک ما را از میکروبیوم انسان افزایش خواهد داد و در نهایت پیامدهای مهمی برای درک بیماری‌ها و اصلاح هدفمند دارویی بیمار خواهد بود [۲۵]. دانش ما در مورد ارتباطات بین گونه‌های میکروبی و برهمکنش آنها با میزبان خود می‌تواند مستقیماً به صورت شبکه ترسیم و بررسی شود. در این شبکه‌ها متابولیت‌ها، میکروب‌ها و یا ژن‌ها به عنوان گره‌ها نشان داده می‌شوند و برهمکنش‌های شناخته شده یا پیش‌بینی شده آنها به عنوان یال نشان داده می‌شوند. چنین شبکه‌ای، اکتشاف بصری مستقیم و تجزیه و تحلیل توپولوژیکی برای شناسایی لینک‌های مهم و یا بازیگران اصلی در جامعه میکروبی را فراهم می‌کند [۲۶]. چندین مطالعه نشان داده است که میکروبیوتای روده می‌تواند مستقیماً در ایجاد آدنوم کولورکتال و پیشرفت

<sup>13</sup> Metatranscriptomics

<sup>14</sup> Metaproteomics

<sup>11</sup> Short-chain fatty acids

<sup>12</sup> Metagenomics

متعاقب آن به CRC نقش داشته باشد [۲۷ و ۲۸]. مطالعات متعددی باکتری‌های خاص تومور را در نمونه‌های مخاطی کولورکتال و/یا مدفوع شناسایی کرده‌اند. در مطالعه فنگ و همکاران مقدار زیادی از باکتریوئیدها و پاراباکتریوئیدها، همراه با باکتری *Bilophila wadsworthia*، باکتری *Lachnospiraceae* *Alistipes putredinis* و *Escherichia coli* در CRC در مقایسه با آدنوم سالم و پیشرفته شناسایی شد. همچنین، ترکیبات روده مانند *Streptococcus* *Bifidobacterium animalis* و *thermophilus* در مدفوع بیماران مبتلا به آدنوم یا CRC کاهش یافت، که نشان‌دهنده تغییر تعادل در میکروبیوتای سالم است [۲۹]. در مطالعه دیگری بر روی بیماران مبتلا به سرطان کولون، گزارش شده که فراوانی *B. fragilis* در افراد CRC در مقایسه با گروه سالم بیشتر است و همچنین حضور ژن *bft* این گونه در بیماران CRC به‌طور معنی‌داری بیشتر است [۳۰].

با توجه به مطالعات متعدد انجام‌شده در زمینه میکروبیوتای روده و سرطان روده بزرگ (CRC)، مطالعه ما با بررسی میکروبیوتای روده از جنبه‌های مختلف، به درک بهتر سازوکارهای میکروبی دخیل در CRC کمک می‌کند. علاوه بر این، با معرفی باکتری‌ها، متابولیت‌ها و مسیرهای بیولوژیکی مهم باکتریایی در CRC، به دانشمندان این امکان را می‌دهد که مطالعات آینده در ارتباط با میکروبیوتا و CRC را طراحی کنند. بنابراین، در این پژوهش با استفاده از متابولیت‌های باکتریایی و داده‌های مربوط به میکروبیوم روده بیماران سالم و دارای سرطان روده بزرگ، ضمن انجام آنالیزهای بیوانفورماتیکی، باکتری‌ها-متابولیت‌ها و مسیرهای بیولوژیکی این باکتری‌ها را در سرطان روده بزرگ در مقایسه با افراد سالم بررسی کردیم. سپس، شبکه‌های برهمکنش میکروبیوتا-متابولیت برای شناسایی بخش‌های خاص در حالت سالم و سرطانی

به امید ایجاد اساسی برای مطالعه شبکه‌های برهمکنش میکروبیوتا-میزبان مربوط به سرطان را بازسازی کردیم. با توجه به نقش حیاتی برهمکنش میکروبیوتا-میزبان در تنظیم و کنترل بسیاری از عملکردهای سلول، مانند تنظیم سیستم ایمنی، عفونت و سرطان و نیز افزایش حجم پیچیدگی داده‌های آزمایشگاهی حاصل از تحقیقات در خصوص متابولیت‌های میکروبی، بازسازی شبکه باکتری-متابولیت با تمرکز بر داده‌های تجربی موجود در مقالات و پایگاه داده‌ها برای بررسی و آنالیز پارامترهای مختلف مؤثر در ارتباطات بین میکروبیوتا-میزبان انجام شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱ جمع‌آوری داده‌ها

برای جمع‌آوری داده‌های میکروبیوم بیماران سرطان کولورکتال و افراد سالم، داده‌های متاژنوم توالی‌یابی شاتگان روده افراد سالم و دارای CRC مربوط به پروژه PRJEB6070 از پایگاه داده موسسه بیوانفورماتیک اروپا (EBI) دانلود شد [۳۱ و ۳۲]. از بین داده‌های فوق تعداد ۲۶۰ داده Single-End به تفکیک ۱۳۰ داده سالم، ۱۳۰ داده سرطان کولورکتال مربوط به نژاد آلمانی برای آنالیزهای بعدی انتخاب شد. پس از ارزیابی کنترل کیفی داده‌های فوق، با توجه به کیفیت مطلوب داده‌ها، انجام سایر مراحل ضروری نبود و با توجه به حذف توالی‌های مربوط به ژنوم انسان توسط محققان این حوزه، داده‌های موردنظر ما از انجام این مرحله مستثنی شد.

برای جمع‌آوری داده‌های مربوط به متابولیت‌های باکتری‌ها از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری<sup>۱</sup> و جستجوگر PubMed و همچنین، پایگاه داده Science Direct استفاده شد. در نهایت با بررسی و مطالعه متن کامل مقالات جمع‌آوری شده و بر حسب نیاز رفرنس آنها و حذف داده‌های تکراری، متابولیت‌های متعلق به ۲۹۳ جنس و تعداد ۱۳۱۸ گونه مشخص شد.

<sup>13</sup> National Center for Biotechnology Information (NCBI)

متابولیت‌های مختلف (اعم از تولید شده یا مصرف شده) ابتدا جمع فراوانی نسبی مربوط به تولیدکنندگان یا مصرف‌کنندگان متابولیت در هر نمونه به‌دست آمد و سپس، برای تست‌های آماری استفاده شد.

### ۲-۳ تجزیه و تحلیل شبکه باکتری-متابولیت در سطح گونه

برای یافتن باکتری‌ها و متابولیت‌ها تاثیرگذار و جستجوی مهمترین گره‌ها یا هاب‌ها در شرایط سالم و سرطانی، از آنالیز شبکه استفاده شد. پس از رسم شبکه برهم‌کنشی باکتری-متابولیت، تمام متابولیت‌های باکتری‌ها و سلول‌های انسانی از نظر شاخص‌های شبکه، از جمله درجه و مرکزیت ارزیابی شدند. درجه نشان دهنده تعداد یال‌های متصل به یک گره متصل است. و هرلندازه درجه‌ی یک گره در شبکه بیشتر باشد، آن گره از نظر برهم‌کنش با سایر گره‌ها دارای اهمیت بیشتری است. مرکزیت از نظر نزدیکی نشان دهنده میانگین فاصله تمام کوتاه‌ترین مسیرها بین یک گره و هر گره دیگر در یک شبکه است و نزدیکی زیاد نشان دهنده نزدیکی یک گره به تمام گره‌های دیگر می‌باشد. مرکزیت از نظر میانی بودن به تعداد دفعاتی که یک گره به‌عنوان یک پل در طول کوتاه‌ترین مسیر بین دو گره دیگر عمل می‌کند، اشاره دارد. بالا بودن مرکزیت از نظر میانی بودن نشان می‌دهد که یک گره نقش ارتباطی مهمی در شبکه ایفا می‌کند و احتمالاً یک گره مهم مرتبط با بیماری است [۳۷ و ۳۸].

با توجه به اینکه برهم‌کنش‌های بین میکروبیوتا و سایر مولکول‌ها سیستم‌های پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهند که می‌توانند به‌طور قابل توجهی تحت شرایط مختلف تغییر کنند، در این پژوهش از ابزار DyNet در Cytoscape برای شناسایی تغییرات گره‌ها یا لبه‌ها در شبکه‌های باکتری-متابولیت در شرایط سالم و CRC استفاده شد. این ابزار ویژگی‌های زیادی را برای تصویرسازی و همگام‌سازی شبکه‌های سلولی بزرگ و پویا ارائه می‌دهد.

### ۲-۲ بررسی باکتری‌ها، متابولیت‌ها و مسیرهای بیولوژیکی باکتری‌ها در CRC و بازسازی شبکه برهم‌کنش باکتری-متابولیت در سطح گونه

در این مرحله محتوای میکروبیومی نمونه را با تجزیه و تحلیل تاکسونومی متاژنوم توسط ابزار MetaPhlAn3 به‌دست آوردیم. با استفاده از این ابزار طبقه‌بندی بالادست هر یک از باکتری‌ها و همچنین فراوانی باکتری‌ها در دو سطح جنس و گونه به‌دست آمد. داده‌های مربوط به باکتری‌ها و متابولیت‌ها با یکدیگر ادغام شدند و برای ایجاد شبکه برهم‌کنش باکتری-متابولیت در شرایط سالم و سرطانی استفاده شدند. داده نهایی برای هر نمونه، شامل فراوانی گونه‌های مختلف باکتری به همراه متابولیت‌های تولید شده و همچنین، متابولیت‌ها و ماکرومولکول‌های مصرف شده توسط هر یک از این گونه‌ها است.

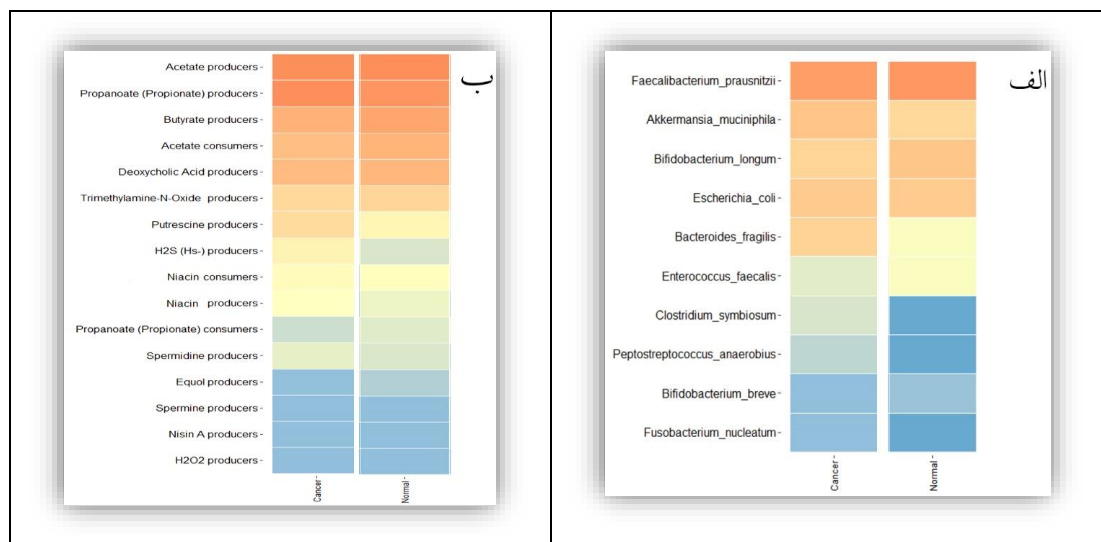
در مرحله بعد برای آنالیز عملکردی متاژنوم از ابزار HumanN 3.0 استفاده شد [۳۳]. از داده‌های نرمال شده مربوط به فراوانی مسیرها که پس از آنالیز دیتاست توسط HumanN 3.0 به‌دست آمد، برای بررسی فراوانی مسیرها و تفاوت معنی‌دار فراوانی مسیرها در شرایط سالم و سرطانی استفاده شد. همچنین از این ابزار برای بررسی سهم باکتری‌ها برای تامین مسیرهایی که تفاوت معنی‌داری در فراوانی نسبت به حالت سالم داشتند استفاده شد. با توجه به فراوانی‌های موجود، تجزیه و تحلیل‌ها و تصویرسازی داده‌ها با استفاده از زبان برنامه نویسی R و به ترتیب با بسته‌های DESeq2 و ggplot2 انجام شد. باکتری‌ها، متابولیت‌ها و مسیرهای بیولوژیکی باکتریایی که دارای شاخص آماری  $| \log_2 \text{foldchange} | \geq 1$  و  $P\text{-adj} < 0.05$  (corrected FDR) بودند به‌عنوان تغییر معنی‌دار فراوانی در گروه CRC در مقایسه با گروه سالم در نظر گرفته شد (فایل‌های ۱ و ۲ و ۳ ضمیمه) [۳۶-۳۴]. در مورد

DyNet به‌طور همزمان طرح چند شبکه را همگام می‌کند. آگاهی از تغییرات رخ داده در این شبکه‌ها، برای درک چگونگی ارتباط شبکه‌های برهمکنش باکتری-متابولیت با بیماری ضروری است. ویژگی مقایسه زوجی شبکه DyNet به کاربران این امکان را می‌دهد تا به راحتی تفاوت‌های بین دو شبکه را شناسایی کنند. مقایسه‌های زوجی را می‌توان بین هر ویژگی بولی یا عددی گره یا لبه انجام داد. به‌عنوان مثال، تفاوت وجود یا عدم وجود گره‌ها بین دو شبکه به‌صورت رنگ‌های سبز و قرمز نشان داده می‌شوند و گره‌ها یا لبه‌های سفید نشان دهنده گره‌های مشترک در دو شبکه هستند [۳۹ و ۴۰]. ابتدا دو شبکه باکتری-متابولیت در هرکدام از شرایط سالم و سرطانی به‌عنوان ورودی ابزار DyNet استفاده شد. سپس، تفاوت‌های بین دو شبکه توسط این ابزار بررسی شد.

### ۳-نتایج

#### ۳-۱ بررسی فراوانی باکتری‌ها و متابولیت‌های موثر در سرطان کولورکتال در سطح گونه

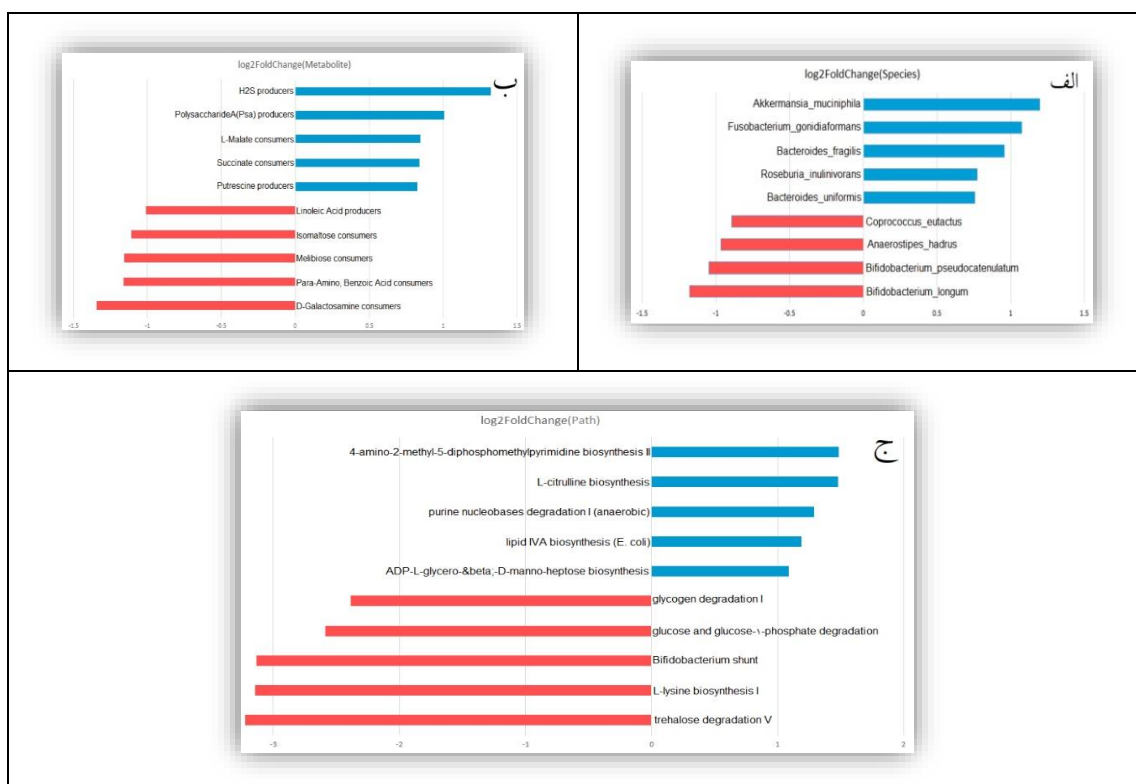
مطابق شکل ۱-الف Faecalibacterium\_prausnitzii دارای بیشترین فراوانی و Fusobacterium\_nucleatum کمترین فراوانی در دو گروه مختلف سالم و سرطانی هستند. در گروه سرطان نسبت به حالت سالم فراوانی Bacteroides\_fragilis، Akkermansia\_muciniphila، Clostridium\_symbiosum و Bifidobacterium\_breve و Bifidobacterium\_longu robius بیشتر و فراوانی Bifidobacterium\_longu در گروه سالم نسبت به گروه سرطان بیشتر است. مطابق شکل ۱-ب، فراوانی تولید استات، پروپیونات و بوتیرات نسبت به فراوانی مصرف آنها در هر دو شرایط سالم و سرطانی بیشتر است و این مورد به تولید فراوان این ترکیبات در روده اشاره دارد. فراوانی Equol، Putrescine producers، Niacin producers و H2S producers در گروه سرطان نسبت به گروه سالم بیشتر است.



شکل ۱ بررسی فراوانی باکتری‌ها و متابولیت‌های موثر در سرطان روده بزرگ الف- نمودار حرارتی فراوانی باکتری‌ها ب- نمودار حرارتی فراوانی متابولیت‌ها

۲-۳ بررسی تفاوت معنی دار فراوانی باکتری‌ها، متابولیت‌ها و مسیرها در CRC در مقایسه با افراد سالم در گروه Cancer باکتری‌های *Akkermansia\_muciniphila* و *Fusobacterium\_gonidiaformans* دارای بیشترین افزایش و باکتری‌های *Bifidobacterium\_longum* و *Bifidobacterium\_pseudocatenulatum* دارای بیشترین کاهش معنی‌داری فراوانی نسبت به گروه سالم هستند (شکل ۲-الف). برای متابولیت‌ها در گروه Cancer، H<sub>2</sub>S، producers و Polysaccharide A (Psa) producers و بیشترین افزایش و D-Galactosamine consumers و 4-

Melibiose consumers و Aminobenzoate consumers دارای بیشترین کاهش معنی‌داری فراوانی نسبت به گروه سالم هستند (شکل ۲-ب). در بررسی مسیرهای متابولیکی باکتریایی در گروه Cancer مسیرهای 4-amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine biosynthesis purine nucleobases و L-citrulline biosynthesis II، degradation I (anaerobic) دارای بیشترین افزایش و مسیرهای L-lysine، trehalose degradation V، biosynthesis I و Bifidobacterium shunt دارای بیشترین کاهش معنی‌داری فراوانی نسبت به گروه سالم هستند (شکل ۲-ج).



شکل ۲ تغییرات معنی‌دار فراوانی در سرطان روده بزرگ در مقایسه با گروه سالم الف- باکتری‌های دارای افزایش یا کاهش معنی‌دار فراوانی در سرطان روده بزرگ ب- متابولیت‌های تولید شده یا مصرف شده‌ی دارای تغییرات معنی‌دار فراوانی در سرطان روده بزرگ ج- مسیرهای بیولوژیکی باکتری دارای تغییرات معنی‌دار فراوانی در سرطان روده بزرگ

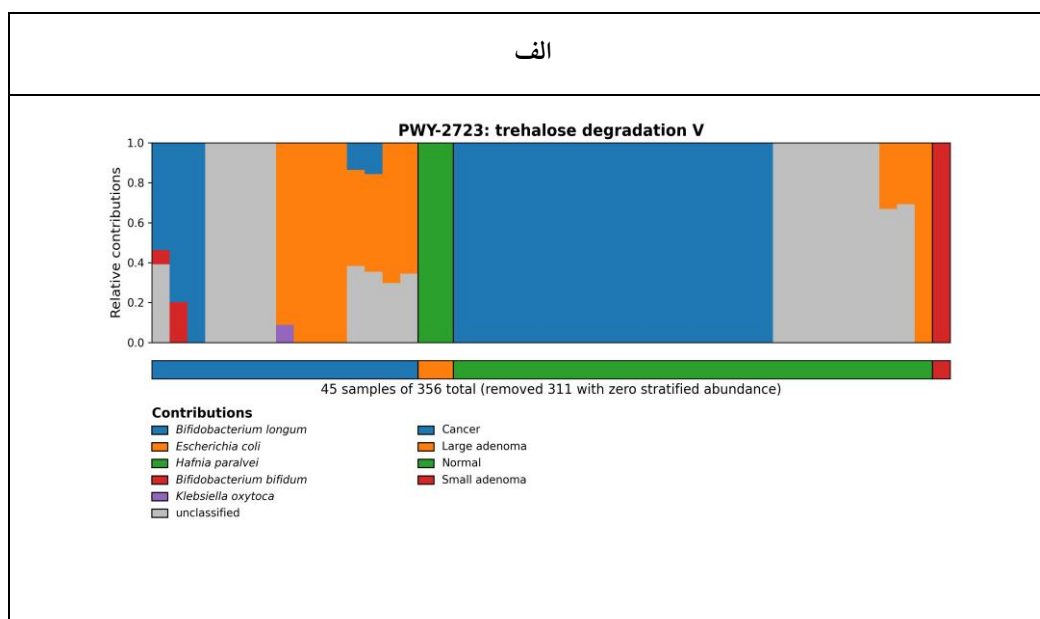
### ۳-۳ بررسی سهم باکتری‌های مختلف در مسیرهایی با

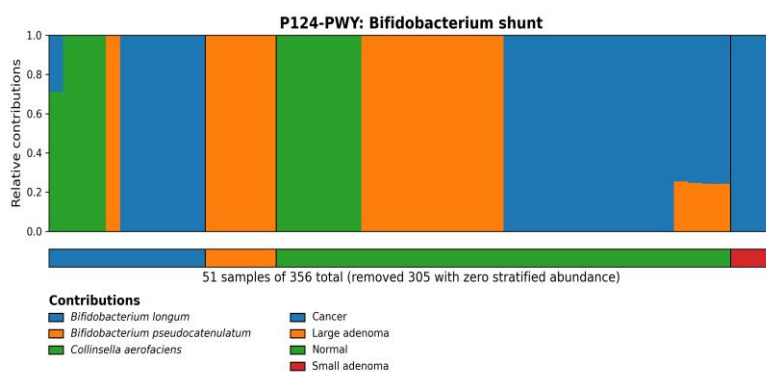
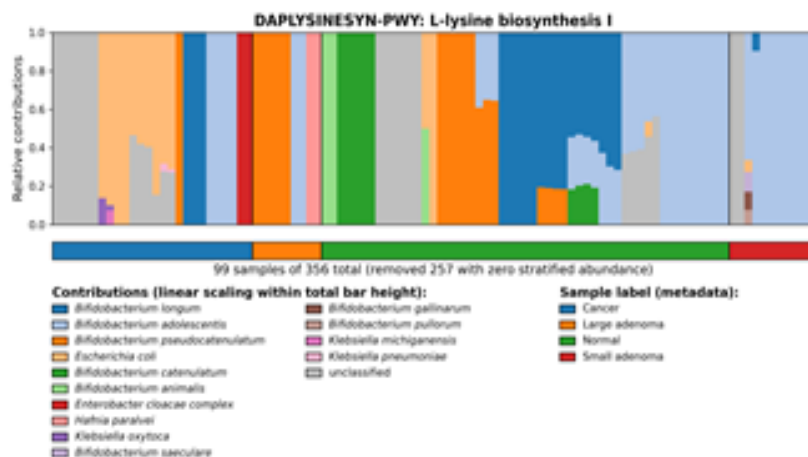
#### تغییرات معنی‌دار فراوانی در CRC

مطابق با شکل ۳-الف که مسیرهای دارای کاهش معنی‌دار فراوانی در CRC نشان داده شده است، برای مسیر trehalose degradation V در گروه سالم دو گونه *Bifidobacterium\_longum* و *Escherichia\_coli* در تامین این مسیر سهم دارند و بیشترین سهم این مسیر در گروه Cancer متعلق به گونه *Escherichia\_coli* است.

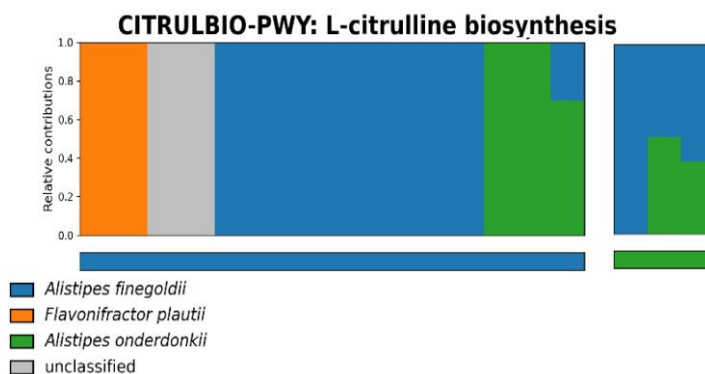
برای مسیر L-lysine biosynthesis I، بیشترین سهم در گروه سالم به گونه‌های *Bifidobacterium\_adolescentis* و *Bifidobacterium\_longum* مربوط می‌باشد و در گروه Cancer بیشترین سهم مربوط به گونه *Escherichia\_coli* می‌باشد. برای مسیر Bifidobacterium shunt در هر دو گروه سالم و Cancer سه گونه *Bifidobacterium*

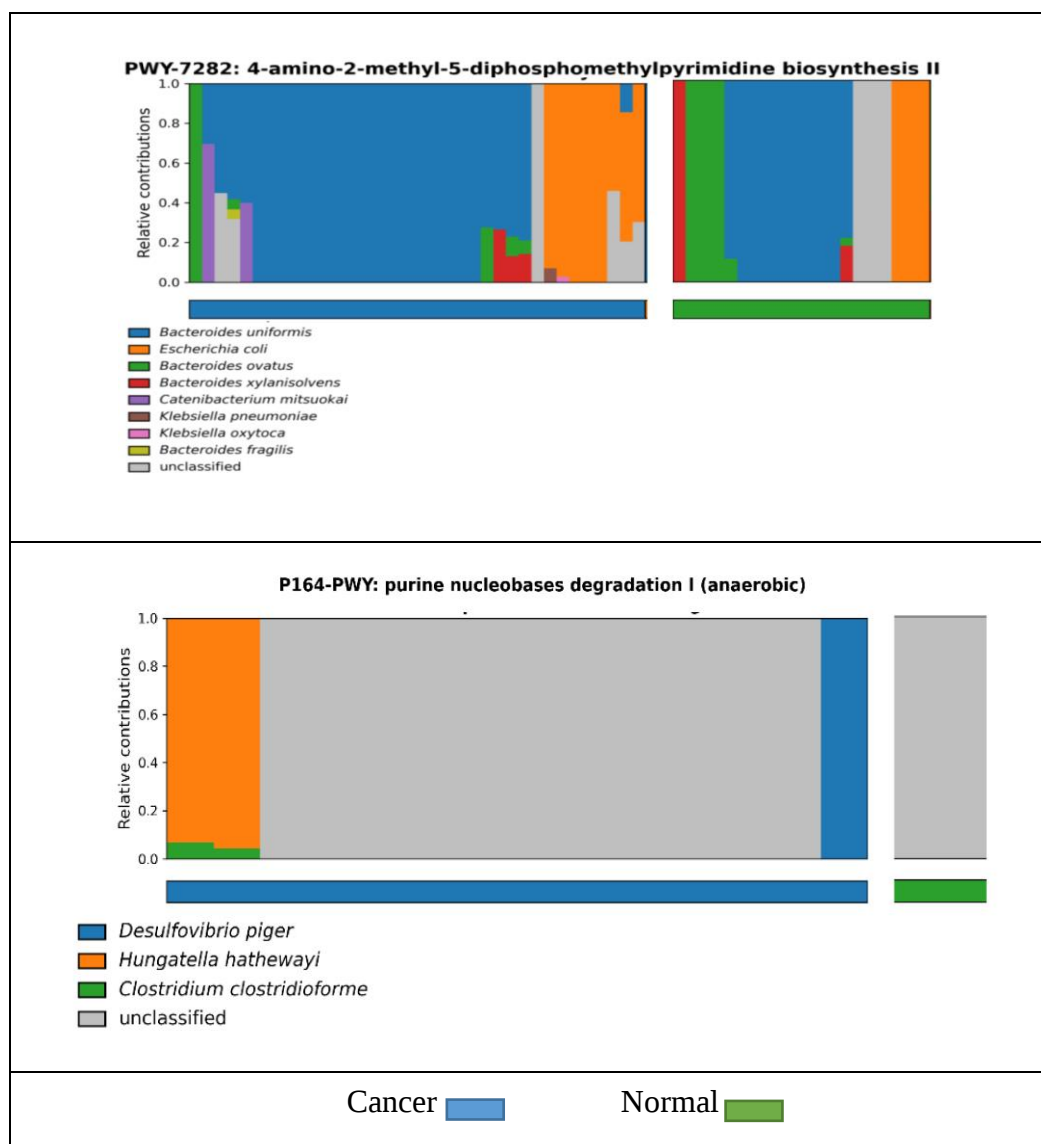
*longum*، *Bifidobacterium\_pseudocatenulatum* و *Collinsella\_aerofaciens* در تامین این مسیر سهم دارند. همانطور که در شکل ۳-ب برای مسیرهای دارای افزایش معنی‌دار فراوانی در CRC نشان داده شده است، برای مسیر 4-amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine biosynthesis II گونه *Bacteroides\_fragilis* که در گروه سالم سهمی نداشته در گروه Cancer مقداری از سهم این مسیر را در اختیار دارد. برای مسیر L-citrulline biosynthesis I، در گروه سالم دو گونه *Alistipes\_finegoldii* و *Alistipes\_nderdonkii* در تامین این مسیر سهم دارند و در گروه Cancer بیشترین سهم مربوط به گونه *Alistipes\_finegoldii* می‌باشد. برای مسیر purine nucleobases degradation I (anaerobic) در مرحله Cancer بیشترین سهم مربوط به گونه *Hungatella\_hathewayi* می‌باشد.





c

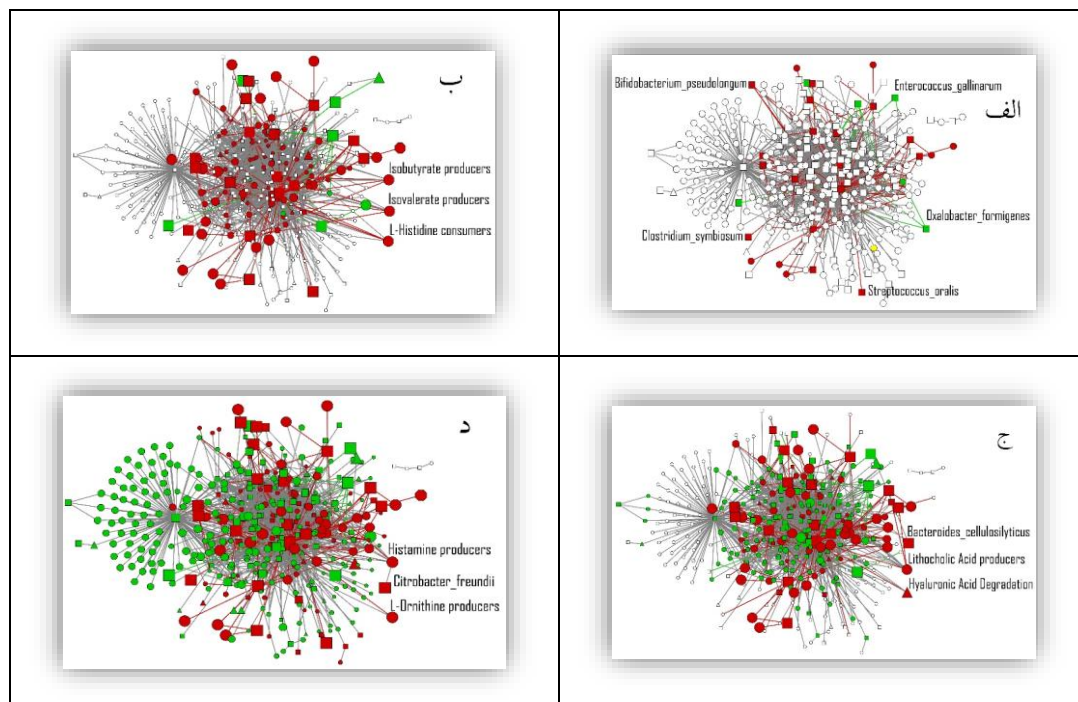




شکل ۳ سهم باکتری‌های مختلف در مسیرهایی با تغییرات معنی‌دار فراوانی در CRC الف- سهم گونه‌های باکتری‌هایی در مسیرهایی با کاهش معنی‌دار فراوانی در CRC ب- سهم گونه‌های باکتری‌هایی در مسیرهایی با افزایش معنی‌دار فراوانی در CRC

در بررسی حضور یا عدم حضور گره، حضور باکتری‌هایی از جمله *Bifidobacterium\_pseudolongum*، *Streptococcus\_oralis* و *Clostridium\_perfringens* همچنین تولید Indolepropionic Acid (Ipa) و مصرف Cortisol نسبت به شبکه سالم مشاهده شد. برخی باکتری‌ها مانند *Enterococcus\_gallinarum* و *Lactobacillus\_sakei* نیز که در شبکه سالم حضور داشتند در حالت سرطان دیگر وجود نداشتند (شکل ۴-الف).

۳-۴ تفاوت‌های شبکه برهمکنش باکتری-متابولیت در شرایط سالم و سرطانی  
 تفاوت‌ها از نظر حضور یا عدم حضور یک گره، درجه، مرکزیت از نظر نزدیکی و مرکزیت از نظر میانی بودن بین شبکه‌های مربوط به برهمکنش باکتری-متابولیت دو گروه سالم و CRC بررسی شد (شکل ۴).



شکل ۴ مقایسه همزمان دو شبکه برهمکنش میکروبیوتا-متابولیت در دو گروه سرطان روده بزرگ و سالم. گره‌ها و یال‌های سبز و قرمز به ترتیب مربوط به گروه سالم و گروه سرطان روده بزرگ هستند الف- تفاوت‌ها از جهت حضور یا عدم حضور یک گره ب- تفاوت‌ها از جهت درجه یک گره ج- تفاوت‌های مرکزیت از نظر میانی بودن یک گره د- تفاوت‌های مرکزیت از نظر نزدیکی یک گره

#### ۴- بحث و نتیجه‌گیری

پیش‌آگهی و بیومارکرهای پیش‌بینی‌کننده در تشخیص بیماری CRC بسیار مهم هستند. میکروبیوم روده به دلیل اینکه می‌تواند در سرطان‌زایی CRC نقش داشته باشد و پیش‌آگهی و پاسخ بیماران CRC به یک درمان خاص را پیش‌بینی کند، به عنوان یک بیومارکر بالقوه معرفی می‌شود. در سال‌های اخیر یکی از امیدوارکننده‌ترین و چالش‌برانگیزترین زمینه‌های تحقیقاتی، تعامل میکروبیوتای روده در توسعه CRC است. یو و همکاران اولین تجزیه و تحلیل پروفایل متاژنومی میکروبیوم‌های مدفوع CRC را برای شناسایی و تایید بیومارکرهای میکروبی در گروه‌های مختلف انجام دادند [۴۱]. همچنین، دای و همکاران نشانگرهای باکتریایی تشخیصی بالقوه را در بین جمعیت‌ها شناسایی کردند و نشان دادند که داده‌های متاژنومیک

در بررسی درجه، بیشترین درجه در هر دو شبکه گروه‌های سالم و سرطانی مربوط به کولونوسیت انسان بوده و بیشترین تغییرات افزایشی درجه در حالت سرطان نسبت به حالت سالم مربوط به مصرف L-Histidine و تولید Isobutyrate و Isovalerate می‌باشد (شکل ۴-ج). همچنین، بیشترین تغییر افزایشی مرکزیت از نظر میانی بودن در شرایط سرطان نسبت به حالت سالم مربوط به تجزیه ماکرومولکول Hyaluronic Acid، تولید Lithocholic Acid و باکتری Bacteroides\_cellulosilyticus می‌شود (شکل ۴-ج). در شرایط سرطان در مقایسه با حالت سالم، بیشترین تغییر افزایشی مرکزیت از نظر نزدیکی مربوط به تولید L-Aspartate، L-Ornithine، Histamine و باکتری Citrobacter\_freundii می‌شود (شکل ۴-د).

می‌تواند ظرفیت‌های کاربردی مفیدی را برای مطالعه میکروبیوتای مرتبط با CRC فراهم کند [۴۲]. به دلیل اینکه رابطه بین میکروبیوم روده و درمان CRC در مطالعات متعدد نشان داده شده، فرصت بی سابقه‌ای برای کشف کاربردهای بالینی جدید میکروبیوم روده در پیش‌بینی و درمان CRC ایجاد شده است. با توجه به این شواهد، پژوهش حاضر به منظور بررسی میکروبیوم روده از نظر فراوانی، مسیرهای بیولوژیکی باکتریایی و تجزیه و تحلیل شبکه باکتری-متابولیت در CRC انجام شد. ما، باکتری‌ها، متابولیت‌ها و مسیرهای مختلفی را به عنوان نشانگرهای CRC شناسایی کردیم که تفاوت معنی‌داری در فراوانی نشان می‌دهند. همچنین، سهم باکتری‌های مختلف را در مسیرهایی که دارای تفاوت معنی‌دار فراوانی در CRC بودند به دست آوردیم. سپس، تغییرات ویژگی‌های توپولوژیکی شبکه برهمکنش باکتری-متابولیت را در CRC در مقایسه با گروه سالم بررسی کردیم. به این ترتیب، باکتری‌ها، متابولیت‌ها و مسیرهای بیولوژیکی باکتریایی مهم را در توالی سرطان کولورکتال در مقایسه با حالت سالم تعیین کردیم.

نتایج ما باکتری‌ها، متابولیت‌ها و همچنین مسیرهای بیولوژیکی باکتریایی را در CRC معرفی کرد که می‌تواند در مطالعات بعدی مورد توجه قرار بگیرند. در این میان به نقش برخی از آنها نیز در تعدادی از مطالعات اشاره شده است. به عنوان مثال، ما مشاهده کردیم که تولید استات، پروپیونات و بوتیرات در هر دو شرایط سالم و سرطانی زیاد است. این عناصر اسیدهای چرب کوتاه زنجیره (SCFA) هستند. استات، پروپیونات و بوتیرات به طور معمول در روده بزرگ با نسبت ۳:۱:۱ وجود دارند که می‌تواند تحت تأثیر ترکیب میکروبیوتای روده، رژیم غذایی و سایر عوامل محیطی باشد. غلظت SCFA ها در امتداد دستگاه گوارش متفاوت است و با بالاترین سطوح

در سکوم و کولون پروگزیمال وجود دارد و میزان آن در کولون دیستال به دلیل جذب توسط سلول‌های اپیتلیال کولون کاهش می‌یابد. SCFA ها به سرعت توسط کولونوسیت‌ها جذب می‌شوند. بوتیرات یکی از منابع اصلی انرژی برای سلول‌های اپیتلیال کولون است، SCFA ها می‌توانند مستقیماً با اپیتلیوم روده بزرگ تماس پیدا کنند و چنین تعاملی به دلیل نقش‌های احتمالی SCFA ها در تومورزایی روده بزرگ مورد توجه قرار گرفته است. در بین SCFA ها، بیشترین مطالعه بر روی بوتیرات انجام شده است و پیشنهاد شده است که ممکن است در CRC نقش ایفا می‌کند [۴۳]. پژوهش ما همچنین نشان داد که تولید Putrescine به عنوان یک پلی آمین در گروه سرطان بیشتر است. پلی آمین‌ها مولکول‌های پلی کاتیونی هستند که بیش از دو گروه آمینو دارند و از اسیدهای آمینه آرژنین و اورنیتین بیوسنتز می‌شوند. دستگاه گوارش دارای سطوح بالایی از پلی آمین‌ها است که عمدتاً شامل پوترسین<sup>۱</sup>، اسپرمین<sup>۲</sup> و اسپرمیدین<sup>۳</sup> می‌باشند و از رژیم غذایی به دست می‌آیند یا توسط میزبان و باکتری‌ها بیوسنتز می‌شوند. قدرت بیماری‌زایی عوامل بیماری‌زای متعددی مانند *Escherichia*، *Helicobacter pylori* و *Shigella flexneri* به پلی آمین‌ها وابسته است. پلی آمین‌ها برای رشد سلولی ضروری هستند و کاهش سطح پلی آمین درون سلولی با نقایص رشد سلولی مرتبط است. همانطور که انتظار می‌رود، سلول‌های توموری به پلی آمین بیشتری برای رشد سریع نیاز دارند. این نیاز در افزایش سطوح پلی آمین‌ها در نمونه ادرار یا خون بیماران سرطانی در مقایسه با افراد سالم منعکس می‌شود [۴۴ و ۴۵ و ۱۷]. میکروبیوتای روده سویا را متابولیزه می‌کنند و اوفلاون داییدزین (پلی فنولی که در سویا وجود دارد) تبدیل به Equol می‌شود. Equol یکی دیگر از ترکیباتی بود که در پژوهش ما تولید آن در شرایط سرطان افزایش نشان داد. پلی فنول‌ها

<sup>3</sup> Spermidine

<sup>1</sup> Putrescine

<sup>2</sup> Spermine

گروهی از ترکیبات موجود در گیاهان هستند [۴۶]. از این رو ممکن است نتایج ما در برخی موارد تحت تاثیر رژیم غذایی بیماران قرار گرفته باشد. متابولیت‌های پلی فنولی توانایی ترمیم DNA آسیب دیده، مهار عوامل بیماری‌زای روده بزرگ و تنظیم آپوپتوز سلولی را دارند [۴۷]. این شواهد نشان می‌دهد که پلی فنول‌ها برای سلامت میزبان و جلوگیری از CRC مفید هستند. همچنین بیان شده است که Equol دارای پتانسیل ضد توموری است و در یک تجزیه و تحلیل داده‌های مبتنی بر جنسیت مشخص شده است که مصرف سویا می‌تواند خطر ابتلا به CRC را در زنان تا ۲۱ درصد کاهش دهد [۴۸ و ۴۹]. در برخی مطالعات بیان شده است که سولفید هیدروژن (H<sub>2</sub>S) ترکیبی که در تجزیه و تحلیل ما دارای افزایش معنی‌دار فراوانی در حلت سرطان نسبت به حالت سالم بود، با مهار اتوفاژی و آپوپتوز، بروز CRC را افزایش می‌دهد. این متابولیت دفاع آنتی‌اکسیدانی و محافظت از DNA سلول‌های سرطانی که باعث تکثیر، متاستاز و تمایز CRC می‌شود را تقویت می‌کند [۵۰]. بررسی ما نشان داد که *Bacteroides fragilis* در حالت سرطان نسبت به حالت سالم دارای فراوانی بیشتری است. همچنین، این گونه مقداری از سهم مسیر 4-amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine biosynthesis II را نیز در حالت سرطان به عهده دارد. این مسیر در گروه سرطان افزایش معنی‌داری در فراوانی نسبت به گروه سالم نشان داد. توماس و همکاران مشخص کردند که جنس *Bacteroides* در مقایسه با افراد سالم در روده بیماران CRC فراوان هستند [۵۱]. اما برخی مطالعات نشان داده‌اند که *Bacteroides* در مقایسه با افراد سالم در روده بیماران CRC کمتر هستند [۵۲]. این تفاوت‌ها ممکن است به دلیل گونه‌های مختلف *Bacteroides* موجود در روده بیماران CRC باشد.

برای مثال در مطالعه‌ای *B. finegoldii*، *B. intestinalis* و *B. capillosus* در افراد سالم در مقایسه با بیماران CRC به

میزان قابل توجهی غنی شده‌اند [۵۳]. در حالی که، در مطالعه‌ای دیگر *B. fragilis* در روده بیماران CRC در مقایسه با افراد سالم غنی شده بود [۵۴]. مطالعه‌ای توسط Purcell و همکاران بر نقش کلیدی ETBF در ایجاد بدسازی<sup>۱</sup> با درجه پایین کولورکتال، آدنوم‌های لوله‌ای و پولیپ‌های دنداندار تاکید کرده است [۵۵]. یافته‌های مشابهی در مطالعه‌ای بر روی بیماران مبتلا به آدنوم کولون بیان بیشتری از ژن توکسین *B. fragilis* (bft) مرتبط با بافت آدنوم را در مقایسه با مخاط سالم طبیعی نشان داده است [۵۶]. *Akkermansia muciniphila* یک باکتری همزیست روده‌ای است که در لایه مخاطی روده انسان کلونیزه می‌شود و اثرات تنظیمی مهمی بر هموستاز روده دارد [۵۷]. بعضی از مطالعات نشان می‌دهد که *A. muciniphila* نسبت به افراد سالم فراوانی نسبی بالاتری در بیماران CRC دارد [۵۸]. مطابق با این مطالعات در پژوهش ما نیز این گونه فراوانی معنی‌داری در گروه سرطان نسبت به گروه سالم نشان داد. تحقیقات بیشتر در مورد ارتباط این گونه با CRC ضروری لازم است. *Bifidobacterium longum* دارای کاهش معنی‌دار فراوانی در سرطان نسبت به گروه سالم بود. این گونه در مسیرهایی که در حالت سرطان نسبت به حالت سالم دارای کاهش معنی‌دار فراوانی بودند نیز مشارکت بالایی داشت. نشان داده شده است که این گونه سرطان کولورکتال را از طریق تعدیل عملکرد سیستم ایمنی سرکوب می‌کند [۵۹]. هماهنگ با مطالعات قبلی پژوهش ما نشان داد که *Fusobacterium nucleatum* در روده افراد سالم نسبت به گروه سرطان کمتر است [۶]. باکتری *F. nucleatum* به عنوان یک باکتری commensal دهانی شناخته شده است و فراوانی نسبتاً کمی در کولون سالم انسان دارد. این باکتری مدت‌ها به عنوان یکی از پاتوژن‌های اصلی در بیماری التهاب لته شناخته شده است و از این

<sup>16</sup> dysplasia

ناشی می‌شوند. تقریباً در تمام جنبه‌های این زمینه به تحقیقات بیشتری نیاز است و با ادامه این مسیر، پیشرفت‌های قابل توجهی در توانایی ما برای پیشگیری، تشخیص و درمان CRC در تمام مراحل ایجاد خواهد شد.

## ۵- منابع

- [1] Kamal, N., Ilowefah, M.A., Hilles, A.R., Anua, N.A., Awini, T., Alshwyeh, H.A., Aldosary, S.K., Jambocus, N.G.S., Alosaimi, A.A., Rahman, A. and Mahmood, S., 2022. Genesis and mechanism of some cancer types and an overview on the role of diet and nutrition in cancer prevention. *Molecules*, 27(6), p.1794.
- [2] Mbemi, A., Khanna, S., Njiki, S., Yedjou, C.G. and Tchounwou, P.B., 2020. Impact of gene-environment interactions on cancer development. *International journal of environmental research and public health*, 17(21), p.8089.
- [3] Mardis, E.R., 2019. The impact of next-generation sequencing on cancer genomics: from discovery to clinic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(9), p.a036269.
- [4] Raza, M.H., Gul, K., Arshad, A., Riaz, N., Waheed, U., Rauf, A., Aldakheel, F., Alduraywish, S., Rehman, M.U., Abdullah, M. and Arshad, M., 2019. Microbiota in cancer development and treatment. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 145, pp.49-63.
- [5] Dekker, E., Tanis, P.J., Vleugels, J., Kasi, P.M. and Wallace, M., 2019. Pure-amc. *Lancet*, 394, pp.1467-80.
- [6] Marcellinaro, R., Spoletini, D., Grieco, M., Avella, P., Cappuccio, M., Troiano, R., Lisi, G., Garbarino, G.M. and Carlini, M., 2023. Colorectal cancer: current updates and future perspectives. *Journal of Clinical Medicine*, 13(1), p.40.
- [7] Sninsky, J.A., Shore, B.M., Lupu, G.V. and Crockett, S.D., 2022. Risk factors for colorectal polyps and cancer. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 32(2), pp.195-213.
- [8] Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev.* 2014 Sep;38(5):996-1047. doi: 10.1111/1574-6976.12075. Epub 2014 Jun 27. PMID: 24861948; PMCID: PMC4262072.

منظر، سازوکارهای قابل قبول بیولوژیکی تومورزایی روده بزرگ در ابتدا پدیدار شد [۶۱]. روبنشتاین و همکارانش نشان دادند که Fn از طریق الحاق FadA، به E-Cadherin متصل می‌شود و به این ترتیب باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ  $\beta$ -catenin می‌شود که موجب القای پاسخ‌های انکوژنی و التهابی می‌شود. علاوه بر این، ژن FadA و بیان پروتئین در آدنوم و آدنوکارسینوم در مقایسه با موکوس افراد غیر توموری افزایش می‌یابد و با بیان ژن‌های Wnt به‌طور قابل توجهی همبستگی دارد. اتصال FadA به E-cadherin مانع فعالیت متعاقب سرکوب کنندگی تومور می‌شود. در مقابل، مهار اتصال FadA به E-cadherin با استفاده از یک پپتید مهار کننده، واکنش التهابی میزبان و رشد تومور را از بین می‌برد [۶۲ و ۶۳ و ۶۴].

یافته‌های ما در مجموع نشان داد که میکروبیوم روده یک رویکرد غیرتهاجمی امیدوارکننده برای غربالگری اولیه CRC خواهد بود. اگرچه نقاط قوت کار ما استفاده از داده‌های متاژنوم و آنالیز عملکردی و بررسی تفاوت‌های شبکه برهمکنش میکروبیوتا-متابولیت در دو گروه سالم و CRC برای معرفی باکتری‌ها و مسیرهای مهم قابل مطالعه در CRC است، پژوهش ما بر نیاز به مطالعه بیشتر تاثیر میکروبیوتا در CRC با در نظر گرفتن نژادهای مختلف و رژیم غذایی تاکید می‌کند. همانطور که می‌توان تصور کرد، مکانیسم‌های دخالت میکروبیوم و متابولیت‌های آنها در پاتوژنز CRC بسیار پیچیده هستند و ما تازه شروع به درک تأثیر متقابل آنها کرده‌ایم. با این حال، بسیاری از آنچه که ما در حال حاضر می‌دانیم برای بهبود مدیریت CRC قابل استفاده است و بسیاری از مطالعات نتایج امیدوارکننده‌ای را نشان داده اند. به‌ویژه در زمینه ارتباط متابولیکی میکروبیوتا و CRC گام‌های بزرگی برداشته شده است و نقش ترکیب میکروبیوتای روده و متابولیت‌های آنها می‌تواند اطلاعات مهمی در مورد CRC ارائه دهد. درمان و بهبود، از رویکردهای جدید، نوآورانه و غیرتهاجمی

- [18] Niekamp, P. and Kim, C.H., 2023. Microbial metabolite dysbiosis and colorectal cancer. *Gut and Liver*, 17(2), p.190.
- [19] Wang, X.N., Yin, Y.H., Cheng, X., Chen, L., Chen, M.L., Zheng, J.Y., Jin, Y.Y., Liu, J.Q., Liu, L.F. and Xin, G.Z., 2019. Development and validation of a systematic platform for broad-scale profiling of microbial metabolites. *Talanta*, 200, pp.537-546.
- [20] Gomes, P.W.P., de Tralia Medeiros, T.C., Maimone, N.M., Leão, T.F., de Moraes, L.A.B. and Bauermeister, A., 2023. Microbial metabolites annotation by mass spectrometry-based metabolomics. In *Microbial Natural Products Chemistry: A Metabolomics Approach* (pp. 225-248). Cham: Springer International Publishing.
- [21] Gomes, P.W.P., de Tralia Medeiros, T.C., Maimone, N.M., Leão, T.F., de Moraes, L.A.B. and Bauermeister, A., 2023. Microbial metabolites annotation by mass spectrometry-based metabolomics. In *Microbial Natural Products Chemistry: A Metabolomics Approach* (pp. 225-248). Cham: Springer International Publishing.
- [22] Nugent, J.L., McCoy, A.N., Addamo, C.J., Jia, W., Sandler, R.S. and Keku, T.O., 2014. Altered tissue metabolites correlate with microbial dysbiosis in colorectal adenomas. *Journal of proteome research*, 13(4), pp.1921-1929.
- [23] Proal, A.D., Lindseth, I.A. and Marshall, T.G., 2017. Microbe-microbe and host-microbe interactions drive microbiome dysbiosis and inflammatory processes. *Discovery medicine*, 23(124), pp.51-60.
- [24] Andrighetti, T., Bohar, B., Lemke, N., Sudhakar, P. and Korcsmaros, T., 2020. MicrobioLink: an integrated computational pipeline to infer functional effects of microbiome-host interactions. *Cells*, 9(5), p.1278.
- [25] Pavlopoulos, G.A., Secrier, M., Moschopoulos, C.N., Soldatos, T.G., Kossida, S., Aerts, J., Schneider, R. and Bagos, P.G., 2011. Using graph theory to analyze biological networks. *BioData mining*, 4, pp.1-27.
- [26] Bauer, E. and Thiele, I., 2018. From network analysis to functional metabolic modeling of the human gut microbiota. *MSystems*, 3(3), pp.10-1128.
- [9] Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T. and Mende, D.R., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature*, 464(7285), pp.59-65.
- [10] Fucarino, A., Burgio, S., Paladino, L., Caruso Bavisotto, C., Pitruzzella, A., Buccieri, F. and Cappello, F., 2022. The Microbiota Is Not an Organ: Introducing the Muco-Microbiotic Layer as a Novel Morphofunctional Structure. *Anatomia*, 1(2), pp.186-203.
- [11] Afzaal, M., Saeed, F., Shah, Y.A., Hussain, M., Rabail, R., Socol, C.T., Hassoun, A., Pateiro, M., Lorenzo, J.M., Rusu, A.V. and Aadil, R.M., 2022. Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Frontiers in microbiology*, 13, p.999001.
- [12] Murphy, N., Moreno, V., Hughes, D.J., Vodicka, L., Vodicka, P., Aglago, E.K., Gunter, M.J. and Jenab, M., 2019. Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Molecular aspects of medicine*, 69, pp.2-9.
- [13] Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J.R. and Dutilh, B.E., 2012. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), pp.575-582.
- [14] Villéger, R., Lopès, A., Veziant, J., Gagnière, J., Barnich, N., Billard, E., Boucher, D. and Bonnet, M., 2018. Microbial markers in colorectal cancer detection and/or prognosis. *World journal of gastroenterology*, 24(22), p.2327.
- [15] Hendler, R. and Zhang, Y., 2018. Probiotics in the treatment of colorectal cancer. *Medicines*, 5(3), p.101.
- [16] Yang, Y., Misra, B.B., Liang, L., Bi, D., Weng, W., Wu, W., Cai, S., Qin, H., Goel, A., Li, X. and Ma, Y., 2019. Integrated microbiome and metabolome analysis reveals a novel interplay between commensal bacteria and metabolites in colorectal cancer. *Theranostics*, 9(14), p.4101.
- [17] Peng, Y., Nie, Y., Yu, J. and Wong, C.C., 2021. Microbial metabolites in colorectal cancer: basic and clinical implications. *Metabolites*, 11(3), p.159.

- dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15, pp.1-21.
- [37] Soofi, A., Taghizadeh, M., Tabatabaei, S.M., Tavirani, M.R., Shakib, H., Namaki, S. and Alighiarloo, N.S., 2020. Centrality analysis of protein-protein interaction networks and molecular docking prioritize potential drug-targets in type 1 diabetes. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 19(4), p.121.
- [38] Winterbach, W., Mieghem, P.V., Reinders, M., Wang, H. and Ridder, D.D., 2013. Topology of molecular interaction networks. *BMC systems biology*, 7, pp.1-15.
- [39] Goenawan, I.H., Bryan, K. and Lynn, D.J., 2016. DyNet: visualization and analysis of dynamic molecular interaction networks. *Bioinformatics*, 32(17), pp.2713-2715.
- [40] Kohl, M., Wiese, S. and Warscheid, B., 2011. Cytoscape: software for visualization and analysis of biological networks. *Data mining in proteomics: from standards to applications*, pp.291-303.
- [41] Yu, J., Feng, Q., Wong, S.H., Zhang, D., yi Liang, Q., Qin, Y., Tang, L., Zhao, H., Stenvang, J., Li, Y. and Wang, X., 2017. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut*, 66(1), pp.70-78.
- [42] Dai, Z., Coker, O.O., Nakatsu, G., Wu, W.K., Zhao, L., Chen, Z., Chan, F.K., Kristiansen, K., Sung, J.J., Wong, S.H. and Yu, J., 2018. Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers. *Microbiome*, 6, pp.1-12.
- [43] Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H.M., Larraufie, P. and Lapaque, N., 2021. SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. *Proceedings of the Nutrition Society*, 80(1), pp.37-49.
- [44] Farriol, M., Segovia-Silvestre, T., Castellanos, J.M., Venereo, Y. and Orta, X., 2001. Role of putrescine in cell proliferation in a colon carcinoma cell line. *Nutrition*, 17(11-12), pp.934-938.
- [45] Barreiro-Alonso, E., Castro-Estrada, P., Sanchez, M., Peña-Iglesias, P., Suarez, L. and Cantabrana, B., 2024. Association of Polyamine and Other Dietary Component Intake and Feces
- [27] Zackular, J.P., Rogers, M.A., Ruffin IV, M.T. and Schloss, P.D., 2014. The human gut microbiome as a screening tool for colorectal cancer. *Cancer prevention research*, 7(11), pp.1112-1121.
- [28] Dulal, S. and Keku, T.O., 2014. Gut microbiome and colorectal adenomas. *The Cancer Journal*, 20(3), pp.225-231.
- [29] Feng, Q., Liang, S., Jia, H., Stadlmayr, A., Tang, L., Lan, Z., Zhang, D., Xia, H., Xu, X., Jie, Z. and Su, L., 2015. Gut microbiome development along the colorectal adenoma–carcinoma sequence. *Nature communications*, 6(1), p.6528.
- [30] Haghi, F., Goli, E., Mirzaei, B. and Zeighami, H., 2019. The association between fecal enterotoxigenic *B. fragilis* with colorectal cancer. *BMC cancer*, 19, pp.1-4.
- [31] Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J.A., Bonazzi, V., McEwen, J.E., Wetterstrand, K.A., Deal, C. and Baker, C.C., 2009. The NIH human microbiome project. *Genome research*, 19(12), pp.2317-2323.
- [32] Emmert, D.B., Stoehr, P.J., Stoesser, G. and Cameron, G.N., 1994. The European bioinformatics institute (EBI) databases. *Nucleic Acids Research*, 22(17), pp.3445-3449.
- [33] Beghini, F., McIver, L.J., Blanco-Míguez, A., Dubois, L., Asnicar, F., Maharjan, S., Mailyan, A., Manghi, P., Scholz, M., Thomas, A.M. and Valles-Colomer, M., 2021. Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. *elife*, 10, p.e65088.
- [34] Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.Y. and Dillies, M.A., 2016. SARTools: a DESeq2-and EdgeR-based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data. *PloS one*, 11(6), p.e0157022.
- [35] Weiss, S., Xu, Z.Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., Lozupone, C., Zaneveld, J.R., Vázquez-Baeza, Y., Birmingham, A. and Hyde, E.R., 2017. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*, 5, pp.1-18.
- [36] Love, M.I., Huber, W. and Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and

- fragilis is associated with early-stage colorectal neoplasia. *PloS one*, 12(2), p.e0171602.
- [56] Cheng, W.T., Kantilal, H.K. and Davamani, F., 2020. The mechanism of *Bacteroides fragilis* toxin contributes to colon cancer formation. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 27(4), p.9.
- [57] Derrien, M., Belzer, C. and de Vos, W.M., 2017. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microbial pathogenesis*, 106, pp.171-181.
- [58] N. Sanapareddy, R.M. Legge, B. Jovov, A. McCoy, L. Burcal, F. Araujo-Perez, T.A. Randall, J. Galanko, A. Benson, R.S. Sandler, J.F. Rawls, Z. Abdo, A.A. Fodor, T.O. Keku Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans ISME J., 6 (10) (2012), pp. 1858-1868
- [59] Shang, F., Jiang, X., Wang, H., Guo, S., Kang, S., Xu, B., Wang, X., Chen, S., Li, N., Liu, B. and Zhao, Z., 2024. Bifidobacterium longum suppresses colorectal cancer through the modulation of intestinal microbes and immune function. *Frontiers in Microbiology*, 15, p.1327464.
- [60] Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., Jung, J., Bass, A.J., Tabernero, J. and Baselga, J., 2012. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome research*, 22(2), pp.292-298.
- [61] Han, Y.W., 2015. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Current opinion in microbiology*, 23, pp.141-147.
- [62] Rubinstein, M.R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G. and Han, Y.W., 2013. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell host & microbe*, 14(2), pp.195-206.
- [63] Han, Y.W., 2014. Oral bacteria and colorectal cancer: etiology and mechanism'. *AACR Education book*, pp.61-64.
- [64] Rubinstein, M.R., Baik, J.E., Lagana, S.M., Han, R.P., Raab, W.J., Sahoo, D., Dalerba, P., Wang, T.C. and Han, Y.W., 2019. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer by inducing Wnt/ $\beta$ -catenin modulator Annexin A1. *EMBO reports*, 20(4), p.e47638.
- Content of N-acetyl Putrescine, and Cadaverine with Patients' Colorectal Lesions.
- [46] Chen, C. and Li, H., 2020. The inhibitory effect of gut microbiota and its metabolites on colorectal cancer. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(11), p.1607.
- [47] Long, J., Guan, P., Hu, X., Yang, L., He, L., Lin, Q., Luo, F., Li, J., He, X., Du, Z. and Li, T., 2021. Natural polyphenols as targeted modulators in colon cancer: molecular mechanisms and applications. *Frontiers in Immunology*, 12, p.635484.
- [48] Yan, L., Spitznagel, E.L. and Bosland, M.C., 2010. Soy consumption and colorectal cancer risk in humans: a meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 19(1), pp.148-158.
- [49] Lv, J., Jin, S., Zhang, Y., Zhou, Y., Li, M. and Feng, N., 2024. Equol: a metabolite of gut microbiota with potential antitumor effects. *Gut Pathogens*, 16.
- [50] Du, P., Tseng, Y., Liu, P., Zhang, H., Huang, G. and Chen, J., 2024. Role of exhaled hydrogen sulfide in the diagnosis of colorectal cancer. *BMJ Open Gastroenterology*, 11(1), p.e001229.
- [51] Thomas, A.M., Jesus, E.C., Lopes, A., Aguiar Jr, S., Begnami, M.D., Rocha, R.M., Carpinetti, P.A., Camargo, A.A., Hoffmann, C., Freitas, H.C. and Silva, I.T., 2016. Tissue-associated bacterial alterations in rectal carcinoma patients revealed by 16S rRNA community profiling. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, p.179.
- [52] He, T., Cheng, X. and Xing, C., 2021. The gut microbial diversity of colon cancer patients and the clinical significance. *Bioengineered*, 12(1), pp.7046-7060.
- [53] Xu, S., Yin, W., Zhang, Y., Lv, Q., Yang, Y. and He, J., 2020. Foes or friends? Bacteria enriched in the tumor microenvironment of colorectal cancer. *Cancers*, 12(2), p.372.
- [54] Weir, T.L., Manter, D.K., Sheflin, A.M., Barnett, B.A., Heuberger, A.L. and Ryan, E.P., 2013. Stool microbiome and metabolome differences between colorectal cancer patients and healthy adults. *PloS one*, 8(8), p.e70803.
- [55] Purcell, R.V., Pearson, J., Aitchison, A., Dixon, L., Frizelle, F.A. and Keenan, J.I., 2017. Colonization with enterotoxigenic *Bacteroides*

# Reconstruction of the microbiota-metabolite interaction network and investigation of metabolites and biological pathways of microbiota in colorectal cancer

Hossein Shahraki Ghadimi<sup>1</sup>, Parviz Abdolmaleki<sup>1\*</sup>, Seyed Shahriar Arab<sup>2</sup>

1. Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Department of Pediatrics, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093, USA

parviz@modares.ac.ir

Receipt: 2024/07/31

Accepted: 2024/11/09

## Abstract

The recent developments in scientific advancements notably enhanced the understanding of the complex relationship between cancer and the microbiome. Various experimental studies demonstrated that the interaction between the host and microbiota plays a crucial role in the health or disease of the human body. The human microbiome has various benefits, including regulating fundamental processes such as signal transmission, immunity, and metabolism, which contribute to the proper functioning of the host. The imbalance of intestinal microbiota or dysbiosis is associated with the onset and progression of complex diseases such as colorectal cancer (CRC). Motivated by these, in this research, by utilizing metagenomics and metabolomics data and functional analyses of the colon microbiome, we have identified bacteria, metabolites, and important bacterial pathways in colorectal cancer compared to the healthy control group. Also, we investigated the role of different bacteria in pathways with significant abundance. Ultimately, by analyzing the network of bacteria-metabolite interaction in both healthy and cancer groups, we identified the differences between these two networks in terms of topological parameters. Our findings introduced potential biomarkers for CRC that could be used in future research orientation. Furthermore, it highlighted that some bacteria, such as *Bacteroides fragilis* and *Bifidobacterium longum*, which had increases and decreases in abundance in the cancer group, respectively, also contribute to key bacterial biological pathways in CRC. These findings underscore the potential of the gut microbiome as a promising non-invasive approach for early CRC screening, emphasizing the significance of gut microbiota composition and their metabolites in providing valuable insights into CRC.

**Keywords:** Microbiome, Microbiota, Dysbiosis, Colorectal cancer, Metagenomics