دراسة التأثير السمي للكولسينات الخام الحرة (غير المرتبطة) المستخلصة من بكتريا *Escherichia coli* في خط خلايا سرطانة الغدة اللبنية الفأرية (AM3) المغروسة في الفئران المختبرية الطبيعية

Study the toxic effect of non-bound colicins extracted from *Escherichia coil* on transplanted Murine adenocarcinoma (AM_3)

هند حسين عبيد ناهي يوسف ياسين * رجوة حسن عيسى**

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد
*المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية
**قسم علوم الحياة / /كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية

Hind Hussein Obaid Nahiy Yousif Yaseen* Rajwa Hassan Essa **

Dept. of Biology/ College of Science /Baghdad University
* Iraqi Center of Cancer and Genetic medicine/ Al-Mustansiyria University
** Dept. of Biology/ College of Science/ Al-Mustansiyria University

المستخلص

استخلصت أربعة انواع من الكولسينات الخام الحرة (غير المرتبطة) ، هي (H_{19} ، H_{13} ، H_9 ، H_5) من بكتريا *E.coli* (التي تنتمي الى المايكروفلورا المعوية الطبيعية) المعزولة من براز اشخاص أصحاء . ثم تم دراسة التأثير السمي للكولسينات في سرطانة الغدة اللبنية الفأرية murine adenocarcinoma (AM3) المغروسة في إناث الفئران الطبيعية . اظهرت نتائج الدراسة ان المضادات البروتينية الأربعة تمتلك تاثيراً مثبطاً لنمو خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري (AM3) عند استعمال الحقن داخل الورم بجرعة مقدارها (200 ملغم/كغم) ، فقد بلغت نسبة تثبيط نمو الورم (98,79 ، 90,45 ، 90,08 ، 88,26)% للكولسينات (H_{19} ، H_{13} ، H_9 ، H_5) على التوالي. اما الحقن داخل التجويف البريتوني ، فانه سبب أيضاً تأثيراً سمياً في تلك الخلايا لكن بنسب تثبيط نمو اقل مما أعطاه الحقن المباشر داخل الورم فبلغت (57,47 ، 36,25، 60,26 ، 53,25)% على الترتيب للكولسينات نفسها عند المعاملة بجرعة مقدارها (200) ملغم / كغم / 24 يوماً .

Abstract

Four types of non-bound colicins (H_5, H_9, H_{13}, H_{19}) extracted from intestinal normal flora *E.coli* isolated from apparently healthy people's stool. Then cytotoxic effect of colicins on transplanted murine adenocarcinoma (AM3) was studied. The results showed,that the four colicins had inhibitory effects on growth of AM3 cells when injected intratumorally at (200) mg/kg. Percentages of tumor inhibition were (98.79, 90.45, 90.08 and 88.26) % for colicins (H_{19}, H_{13}, H_9 and H_5) respectively. Intraperitoneal injection caused less inhibition, (57.47, 36.25, 60.26 and 53.25) % respectively using a daily dose of (200) mg/kg for period of 24 days.

Key Words: *E.coli* , colicins , cytotoxicity , murine adenocarcinoma , AM3 .

المقدمة

تُعد الأورام السرطانية واحدة من أخطر الأمراض التي تواجه حياة الانسان، فهي تحتل المرتبة الثانية من بين مسببات الموت في العالم بعد أمراض القلب والاوعية الدموية [1] . وقد يتبادر إلى الذهن إن السرطان مرض واحد ، لكن في الحقيقة تشير كلمة السرطان إلى حوالي مائة شكل تقريباً من أشكال المرض ، لأن الأورام الخبيثة قد تنشأ من أي نسيج في الجسم ، وبعض الأنسجة لها القدرة على تشكيل أنماط عديدة من السرطان ، فضلاً عن المضاعفات المرضية الثانوية التي تحصل نتيجة المرض [3،2] . فالآمال تعقد على استخدام العلاج المناعي الذي يهدف إلى تقوية وإثارة الجهاز المناعي ضد الخلايا السرطانية للحد منها [5،3] ، والعلاج الجيني الذي يرمي إلى إصلاح الخلل الوراثي بالخلية المتضررة أو قتلها دون الضرر بخلايا الجسم الطبيعية [4،6] ، ومازالت هذه العلاجات قيد البحث والتطوير والتجريب المختبري آملين أن تصبح علاجاً سريرياً فعالاً لإنقاذ حياة المريض . تشمل العلاجات الكيميائية أنواعاً مختلفة من المركبات، وهي مضادات الفعاليات الأيضية ومضادات الإنقسام الخلوي وعوامل الألكلة والهرمونات والأنزيمات [7] والفيتامينات [8] ، فضلاً عن المضادات الحياتية التي تنتج من الأحياء المجهرية [7] . ساهمت الأحياء المجهرية بدورٍ متميزٍ في إنتاج المضادات الحياتية التي تمتلك فعالية مضادة للأورام السرطانية ، وبصورة خاصة الجنس *Streptomyces* الذي ينتمي إلى مجموعة الـ Actinomycetes [10،9] ، في حين لايوجد مضادٌ بكتيري يستعمل سريرياً لهذا الغرض. لكن كانت هناك العديد من الدراسات والبحوث التي اهتمت بموضوع إنتاج مضادات بكتيرية يطلق عليها البكتريوسينات (Bacteriocins) وتعدّ الكولسينات أحد انواعها الرئيسة ، فقد وجد أنها تمتلك تأثيراً قاتلاً للخلايا السرطانية داخل وخارج الجسم الحي [12،11] . فالكولسينات هي مضادات بروتينية غير معروفة ، تنتج من مختلف أفراد العائلة المعوية (*Enterobacteraceae*) وبصورة رئيسة من بكتيريا *Escherichia coli* وتتمكن من قتل الأنواع القريبة منها [13] ، تصنع الكولسينات عن طريق نظام إنزيمي متخصص يقع تحت سيطرة جينات يحملها بلازميد الكولسين (Col. Plasmid) وفي بعض الأنواع تكون محمولة على الكروموسوم [15،14] ، ويعرف حوالي سبعين نوعاً من الكولسينات المشخصة والمدروسة [16] . يعتمد التأثير السمي القاتل للكولسينات في الخلايا السرطانية على نوع الخلايا، ونوع الكولسين، ووقت التعريض والتركيز المستخدم [17,18] . و فيما يخص تأثير هذه المضادات البروتينية في الأورام الصلبة، فقد ثبّط كولسين E_3 (61%) من حجم الورم الصلب (HK- adenocarcinoma) ، وكان لأنواع أخرى دورٌ في تثبيط نمو ورم الـ Lymphoma [19] ، وتمكن كولسين HSC_{10} المنقى جزئياً من تقليل أعداد العقد السرطانية المتكونة في رئة الفئران المحقونة [11] .

المواد وطرائق العمل :

استخلاص الكولسينات الخام الحرة (غير المرتبطة)

إستخلصت اربعة انواع من الكولسينات الخام الحرة (غير المرتبطة) (H_5 , H_9, H_{13}, H_{19}) من عزلات بكتريا *E.coli* (و هي من بكتريا النبيت الطبيعي المعوي) من براز اشخاص اصحاء ، و حسب طريقة [20] ، الموضحة في مخطط (1) ، تم قياس الفعالية بطريقة الحفر (wells method) [13] ، كما حُدد تركيز البروتين الكلي [21] .

مخطط (1) : حث و استخلاص الكولسينات الخام الحرة

زرعت العزلات (H_5 , H_9, H_{13}, H_{19}) كل على حدة في انابيب اِختبار تحوي (6.5) مليليتر وسط B.H.I السائل المعقم ، بدرجة حرارة 37 م لمدة 18 ساعة

↓

حضر وسط (B.H.I السائل + 5% كليسرول) في دوارق مناسبة الحجم ، بواقع (250) مليليتر في كل دورق ، و عقمت بالموصدة و تركت لتبرد

↓

في اليوم التالي ، لقح كل وسط محضر في الخطوة (2) بانبوبة اللقاح المحضرة في خطوة (1) لكل عزلة بكتيرية ، حضنت الدوارق في حاضنة هزازة بدرجة 37 م° ليصل عدد الخلايا حوالي (3×10^{8}) خلية / مليليتر ، (14 ساعة حضن) بسرعة (150– 200) دورة / دقيقة

↓

تضاف مادة المايتومايسين – C بتركيز نهائي مقداره (2) مكغم / مليليتر الى كل دورق ، ثم تعاد الدوارق الى الحاضنة الهزازة لمدة (3) ساعات إضافية

↓

بعد انتهاء فترة الحضن ، نبذ المزروع البكتيري لكل دورق على إنفصال بجهاز الطرد المركزي المبرد بدرجة حرارة (4)°م لمدة نصف ساعة ، بسرعة 7000 دورة/دقيقة

↓

فصل الراشح عن الراسب ، و عدت الرواشح المحضرة هي الكولسينات الخام الحرة ، قيست الفعالية و تركيز البروتين في كل نوع منها

دراسة التأثير السمي للكولسينات في خط خلايا سرطانة الغدة اللبنية الفأرية (AM3) المغروسة في الفئران المختبرية الطبيعية

تم اجراء هذهِ الدراسة لمعرفة التأثير العلاجي للكولسينات في أنموذج اختباري للسرطان في الكائن الحي (Animal Model System) وذلك باتباع الخطوات الآتية:

أولاً: غرس الخلايا السرطانية

تم الحصول على الحيوانات الحاملة للورم (خط خلايا AM3) من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية ، وهي إناث الفئران البيضاء التي سبق وان غُرست بها تلك الخلايا السرطانية على أن يكون قطر كتلة الورم مابين (3-4) سم او أكثر ، وتعد هذه الفئران هي الواهبة للخلايا السرطانية . أما عملية غرس الخلايا فتمت كالآتي:

1.أخذ الحيوان الحامل للورم وعقمت الكتلة الورمية بالكحول الأثيلي (70%) ثم تم رشف (aspiration) الخلايا السرطانية من تلك الكتلة باستعمال محقنة معقمة عن طريق ادخال إبرة ذات قياس (18) لنحصل على حوالي (3-5) مل من الخلايا السرطانية.

2.نقلت الخلايا إلى بيكر معقم وأضيف اليها حجم مساوٍ من الـ PBS المعقم، مزجت جيداً وقطعت القطع الكبيرة ان وجدت، ثم غسلت تلك الخلايا عن طريق النبذ المركزي (1000 دورة/ دقيقة/ 10 دقائق/ بدرجة حرارة الغرفة) ، أهمل الراشح وعُلق الراسب بحجم مساوٍ من الـPBS المعقم ، وهنا تكون الخلايا جاهزة للحقن .

3.حقنـــت الخلايا بفئران إناث طبيعية المناعة بحجم (0.25) مليليتر/ فأرة باستعمال محقنة طبية ذات ابرة قياس (18) ، إذ تمّ ادخالها من المنطقة الظهرية الفخذية وتحت الجلد وصولاً الى المنطقة العنقية فقد حقنت الخلايا وضغطت المنطقة (ماقبل منطقة الحقن) لمنع خروج العالق من فتحة الحقن، ثم عقمت المنطقة .

- مراعاة تعقيم منطقة الحقن مع العناية بنظافة مكان معيشة الحيوانات وتعقم الأقفاص وفرشتها وماء الشرب لتجنب حدوث التلوث .
- تمت عملية الغرس في (120) فأرة أنثى ، وتمت مراقبة الحيوانات لملاحظة ظهور الورم ومتابعة نموه وبعد وصول حجمه الى (100) ملم^3 تمّ البدء بالتجارب العلاجية [22] ، أما الحيوانات التي لم يظهر بها الورم فتم عزلها .

ثانياً: علاج الأورام السرطانية (المغروسة) بالكولسينات بعد عزل الفئران التي ظهر بها الورم ، تم تقسيمها الى مجموعتين:

1. مجموعة العلاج بالحقن داخل الورم Intra-Tumor (I.T)

ضمت (6) مجاميع ثانوية ، كل واحدة منها تحوي (3) فئران ، حقنت المجاميع الأربعة الاولى بالكولسينات المحضرة (H_5, H_9, H_{13}, H_{19}) على التوالي بحجم (0.2) مليليتر بتركيز (200 ملغم/ كغم) أما الخامسة فحقنت بوسط نقيع القلب والدماغ السائل (B.H.I broth) كسيطرة موجبة والأخيرة تركت بدون حقن وعدت كسيطرة سالبة . تم الحقن مليليتر بجرعة واحدة (I.T) يومياً لمدة (5) أيام متتالية باستعمال محقنة الانسولين المعقمة ، مع مراعاة تعقيم كتلة الورم قبل وبعد الحقن .

2.مجموعة العلاج بالحقن داخل التجويف البريتوني Intra-Peritoneal (I.P)

ضمت (6) مجاميع ثانوية، كل واحدة منها تحوي (3) فئران ، حقنت بجرعة واحدة يومياً (I.P) لمدة (24) يوماً متتالية وفق الآتي :

حقنت المجاميع الأربعة الاولى بالكولسينات (H_5, H_9, H_{13}, H_{19}) على التوالي بحجم (0.5) مليليتر بتركيز (200) ملغرام/كغم ، فيما حقنت المجموعة الخامسة بالوسط الزرعي (B.H.I broth) كسيطرة موجبة وتركت السادسة بدون حقن كسيطرة سالبة .

* تم قياس حجم الورم باستعمال آلة القياس (القدمة) Vernier Caplipers ، إذ سجلت قياسات الطول والعرض ، واستخرج الحجم بالاعتماد على طريقة Ge و جماعته [23] وحسب المعادلة الآتية :

$$V = \frac{L*W^2}{2}$$

حيث ان: V =حجم الورم بالملم 3

L = الطول W = العرض

أما حساب النسبة المئوية لتثبيط نمو الورم (Growth Inhibition/GI) فتم وفق طريقة [24] اعتماداً على المعادلة الآتية:

$$GI\% = \frac{A-B}{A} X100$$

حيث أن: GI = النسبة المئوية لتثبيط نمو الورم.

A = حجم الورم في المجموعة غير المعالجة.

B = حجم الورم في المجموعة المعالجة.

النتائج و المناقشة

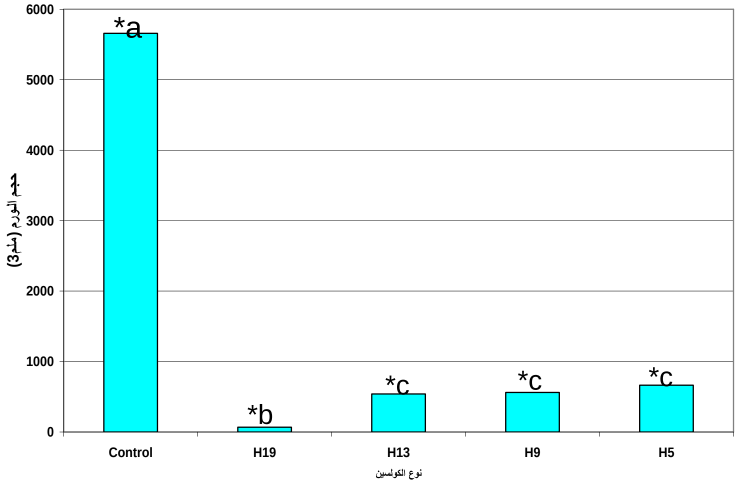
حقنت (120) أنثى بخلايا (AM3) ، ظهر الورم بـ(45) فأرة أي بنسبة (37.5%) ، إذ تراوحت الفترة الزمنية لظهوره مابين (10-20) يوماً، في حين حقق [25] نسبة نجاح وصلت إلى (90-100)% في ظهور الأورام المغروسة في الفئران، وبفترة زمنية تراوحت مابين (3-8) أيام ، يعود سبب هذا التباين إلى التباعد الوراثي مابين الفئران المستخدمة في هذه الدراسة عن الفئران الواهبة للورم ، فقد كانت الحيوانات المغروسة [25] ناتجة عن التزاوج الداخلي ، فضلاً عن دور الجهاز المناعي للمضيف في رفض الخلايا السرطانية الغريبة المغروسة والقضاء عليها، والى جانب ذلك فمن المؤكد أن الخلايا السرطانية لم تتمكن من التكيف مع البيئة الجديدة ، لذلك لم تستطع النمو وإنشاء الأوعية الدموية (Angiogenesis) مما سبب فقدان حيويتها نتيجة عدم حصولها على الغذاء والأوكسجين [26،27،1،25] . حصل ضمور في حجم الورم ، ومن ثم زواله تماماً وبصورة تلقائية في (6) فئران من بين الـ(45) وبنسبة (13.3%) بعد (7) أيام من ظهوره ، ويعزى ذلك إلى الأسباب نفسها أعلاه .

بعد وصول الكتلة الورمية إلى الحجم المناسب ، قُسِّمت الحيوانات إلى مجاميع لغرض البدء بالتجارب العلاجية ، وقد تم مبدئياً اختيار الجرع العلاجية اعتماداً على نتائج اختبار الجرع المميتة الوسطية (LD_{50}) ، بأخذ عُشر (10/1) تلك الجرع وهي (104، 66.4، 81.6، 73.24) ملغم/ كغم، للكولسينات (H_5, H_9, H_{13}, H_{19})على الترتيب ، ونظراً لعدم فعالية هذه الجرع في تثبيط نمو الورم ، فقد تم اعتماد نتائج اختبار معامل الانقسام الخيطي لنخاع عظام الفئران للباحثة [28] ، واختيرت الجرعة التي أعطت أعلى فعالية تثبيطية ، ولم تسبب ظهور أعراض جانبية شديدة على الحيوان ، وهي (200) ملغم/كغم ، فقد أشار [7] إلى أن المواد العلاجية ذات السمّية

الخلوية تؤثر على الخلايا الطبيعية والسرطانية عند استخدامها بتراكيز مرتفعة . ومن خلال ذلك تمّ الحصول على النتائج الآتية :

مجاميع العلاج بالحقن داخل الورم .

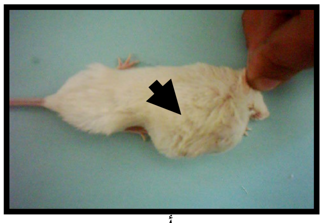
عولجت الحيوانات (بخمسة) جرع يومية داخل الورم لكل نوع من الكولسينات ، مما سبب انخفاضاً معنوياً (P<0.05) في حجم الكتلة الورمية مقارنةً بالسيطرة التي استمرت فيها الخلايا السرطانية بالنمو والتكاثر، يوضح الشكل (1) معدل حجم الورم لكل معاملة ، والتي كانت (68، 540.68، 561، 664) ملم^3 للمـــــواد العلاجية (H_5, H_9, H_{13}, H_{19}) وبنسبة تثبيط نمو مقدارها (98.79، 90.45، 90.08، 88.26)% على الترتيب ، في حين وصل حجم الورم بمعاملة السيطرة إلى (5658) ملم^3 لحين موت الحيوان ونهاية التجربة . وجدت هناك فروقاً معنوية بين المعالجة بكولسين (H_{19}) وبين الأنواع الثلاثة الأخرى ، والتي لم تعطِ فروقاً عند المقارنة فيما بينها . كما وحصل تثبيط نمو الورم تماماً (بنسبة 100%) بأحد الحيوانات المعالجة بالكولسين نفسه . انتهت التجربة عند موت حيوانات السيطرة التي استمرت حياتها لمدة (36) يوماً بعد الغرس ، وقد أصيبت بالهزال وسوء الحالة الصحية ، بينما كانت حيوانات المجاميع العلاجية تتمتع بنشاط وحيوية رغم حدوث انخفاض الوزن وبقيت على قيد الحياة بنسبة (100%) .



شكل (1): التأثير التثبيطي الناتج عن العلاج بالكولسينات (H_5,H_9, H_{13}, H_{19}) على نمو الورم (خلايا AM-3) عند الحقن داخله (IT) ، بجرعة مقدارها (200 ملغم / كغم) لخمسة أيام متتالية .* التحليل الإحصائي: الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية (P>0.005) بين المعاملات المختلفة

مجاميع العلاج بالحقن داخل التجويف البريتوني

عولجت هذه المجاميع بالكولسينات (H_5, H_9, H_{13}, H_{19}) عن طريق الحقن داخل التجويف البريتوني لمدة (24) يوماً متتالية ، ونتيجة لذلك حصل تثبيط نمو الخلايا السرطانية (AM3) تمثل بحصول ضمور وتراجع (Regression) واضح بحجم الورم مقارنة بالسيطرة التي ازداد الحجم فيها بصورة كبيرة شكل(1) ، وكان ذلك واضحاً طيلة فترة نمو الورم .



أ

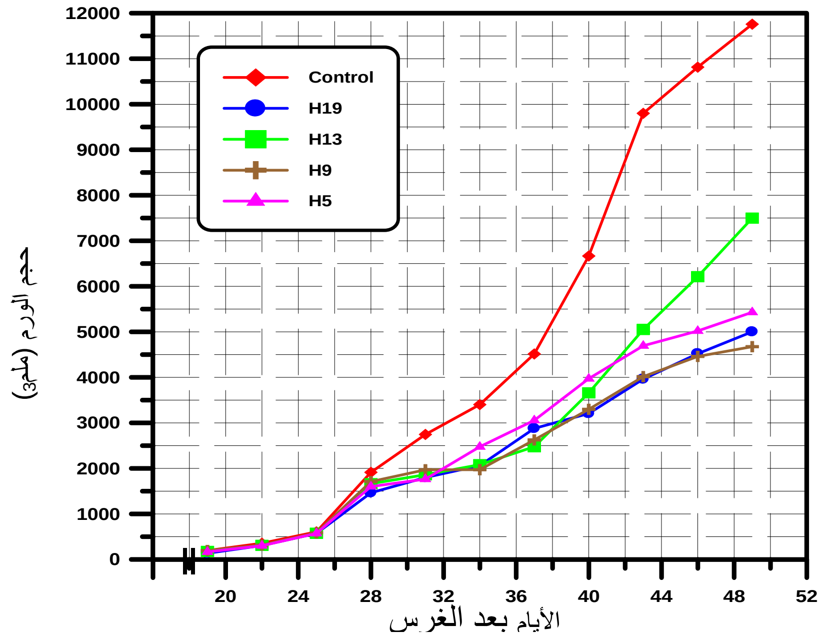
ب　　　　ج

شكل(1): مقارنة بين حجم الورم في مجموعة السيطرة (غير المعالجة)، مع حجمه في أحدى المجاميع العلاجية بالكولسينات:
أ. مجموعة السيطرة　ب. ج . مجموعة العلاج

وكما هو الحال بالعلاج داخل الورم ، فقد انتهت التجربة بموت حيوانات السيطرة الذي حصل في اليوم (الخمسين) من الغرس، وكان معدل حجم الورم فيها قد وصل إلى (11760) ملم^3 ، في حين وصلت الحجوم بالمجاميع المعالجة إلى (5001، 7497، 4673، 5430) ملم^3 ، وبنسبة تثبيط نمو مقدارها (57.47، 36.25، 60.26، 53.25)%عند المعاملة بالكولسينات (H_5, H_9, H_{13}, H_{19}) على الترتيب ، فضلاً عن ذلك فقد أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين مجموعة السيطرة السالبة والمجاميع العلاجية الأربعة ، وبين بعض المجاميع عند مقارنتها مع بعضها البعض كما يوضح الشكل (2) .

أما الشكل (3) فيوضح خط مسير نمو الورم لكل من السيطرة والمجاميع المعالجة بالكولسينات الأربعة . ومن خلال نتائج الدراسة ، وجد أن أفضل المستخلصات المستخدمة، هو كولسين (H_9) الذي أعطى نسبة تثبيط (60.26%) ، ثم (H_{19}) ، وبعده (H_5) ، أما أقلها كفاءة فهو (H_{13}) ، فقد كانت النسبة المئوية لتثبيط نمو الورم هي (36.25%) . ويلاحظ من الشكل (3) أن حجم الورم يزداد بالرغم من استخدام العلاجات ، إلا أن هناك فرقاً كبيراً عن الزيادة الحاصلة بحجمه في المجموعة غير المعالجة ، إذ تتكاثر الخلايا وبسرعة وبدون أي عائق يقف أمامها ، في حين سببت المواد العلاجية قتل تلك الخلايا أو مقدار كبير منها وثبطت انقسامها مما نتج عنه ضمور في حجم الكتلة الورمية ، فضلاً عن ذلك فإن الحيوانات المعالجة تمتعت بحالة صحية أفضل ، وبقيت على قيد الحياة بنسبة (100%) لحين نهاية التجربة مقارنة بالأخرى التي فقدت نشاطها تماماً .

شكل (2): التأثير التثبيطي الناتج عن العلاج بالكولسينات على نمو الورم (خلايا AM-3) عند الحقن داخل التجويف البريتوني (IP) بجرعة مقدارها (200) ملغم/ كغم من وزن الحيوان لمدة (24) يوماً متتالية .



شكل (3): تأثير المعالجة بالكولسينات (H_5, H_9, H_{13}, H_{19}) على حجم الورم (خلايا AM-3) طيلة فترة العلاج ، حقن داخل التجويف البريتوني

عند مقارنة نسب تثبيط نمو الورم عند الحقن داخل الورم مع الحقن داخل البريتون ، وجد أن المعالجة الأولى أكثر كفاءة وفاعلية من الأخرى ، فقد أعطت نسب تثبيط مرتفعة حتى باستعمال المستخلص (H_{13}) الذي كانت نسبة تثبيطه (36.25%) عند الحقن (I.P) ، بينما ارتفعت إلى (90.45%) بالمعالجة (I.T) ، ربما يعزى سبب ذلك إلى تعرض الخلايا السرطانية إلى المادة العلاجية بصورة مباشرة، فتقوم بقتلها أو تثبيط انقسامها وتكاثرها مما يمنع نموها السريع ويقلل من حجم الورم ، فضلاً عن أن كمية وتركيز المضاد البروتيني الذي تتعرض له الخلايا يكون أكثر، على العكس من الحقن (I.P) الذي يحتاج إلى توزيع داخل الجسم (مسار أيضي) لتصل فيه نسبة معينة إلى الكتلة الورمية قد لاتؤثر بصورة كبيرة على الخلايا الورمية ذات القدرة الكبيرة على الانقسام، لذلك يلحظ عدم حصول أي استجابة للدواء خلال الأسبوع الأول من العلاج، فقد استمر نمو الورم بالزيادة ، وبعدها بدأ ظهور التأثير التثبيطي. من جانب آخر ، وجد أن هناك صعوبة في السيطرة على الورم عند زيادة حجمه ، فتصبح الجرعة المعطاة غير فعالة تجاه أعداد الخلايا الهائلة التي تزداد بصورة سريعة .

توافقت نتائج هذه الدراسة مع الأخرى التي اهتمت بالتحري عن فعالية الكولسينات أو البكتريوسينات بصورة عامة تجاه الأورام الصلبة . تمتلك البكتريوسينات تأثيراً مثبطاً لنمو الورم السرطاني ، إذ أنها تساعد في الحد منه ومنع تقدمه (إن لم تؤدِ إلى تثبيط نموه كاملاً) وبصورةٍ معنوية مقارنة بالسيطرة [29] . إذ تساهم الكولسينات (كولسين HSC_{10} المنقى جزئياً) في تقليل انبثاث (metastasis) الخلايا السرطانية (KHT fibrosarcoma) الفأرية المحقونة (I.P) بالفئران ، فضلاً عن تقليل أعداد العقد الورمية المتكونة داخل الرئة ، كما وجد أن الجرع التي تمتلك تأثيراً في الخلايا السرطانية تسبب تأثيرات سمّية في خلايا نخاع العظم الطبيعية ، أما العلاج فإنه يحتاج لجرعات يومية متعددة لأن فعالية الكولسين السمية داخل الجسم الحي لاتتجاوز اليوم الواحد [11] .

إن التأثير العلاجي التثبيطي للكولسينات داخل الجسم الحي يعتمد على تركيز الجرعة المستخدمة وكتلة الورم السرطاني (كثافة الخلايا السرطانية) ونوع الخلايا المعاملة ، فاستخدام الجرعة الواطئة (0.095) مكغم/يومياً من كولسين E_3 النقي، يساعد في تثبيط نمو الورم الصلب (HK-adenocarcinoma) بنسبة (49%) بعد (20) يوماً كما يزيد من فترة بقاء الحيوان من (16) إلى (28) يوما ، في حين تزداد نسبة التثبيط إلى (75%) عند زيادة الجرعة إلى (8.75) مكغم من الكولسين نفسه [19] ، وكان الباحث نفسه قد توصل إلى امتلاك الكولسينات (E_3, E_2, D, A) والـStaphyllococcin والـPyocin، تأثيراً سمياً مثبطاً لنمو أربعة أنواع من الأورام الصلبة

وهي Lymphosarcoma 6C$_3$ و Lp-2 plasmocytoma و skalski و Lymphoma Nemeth-Kellner، وبنسبٍ مختلفة .

فضلاً عن عمل الكولسينات على تثبيط نمو الورم الصلب ، فإنه يساعد كذلك في إطالة فترة حياة الحيوان المعالج ، إذ ازدادت فترة بقاء الحيوانات المصابة بالورم Plasmocytoma والمعالجة بكولسين E$_3$ النقي من (44 - 63) يوما ، أما الأخرى المصابة بـHK-adenocarcinoma والمعالجة بالكولسين نفسه فارتفع من (23-28) يوماً مع اختزال حجم الورم بنسبة (61%) . أما فيما يخص آلية عمل الكولسينات المستخدمة في قتل الخلايا السرطانية ، فهي لاتختلف عما هو عليه في البكتيريا ، إذ تستهدف الغشاء الخلوي أو المادة الوراثية DNA أو صنع البروتي [18،17] .

من النقاط المهمة التي يجب مراعاتها ، هو أن يتم علاج الورم وهو بحجم صغير وذلك لأن الخلايا السرطانية تكون في مرحلة انقسام وتكاثر ، فتتأثر بالعلاجات المستخدمة ، أما عند زيادة حجم الكتلة الورمية فإن عدداً كبيراً من الخلايا يصبح بطور السكون وهنا لن تستجيب لتأثير المواد العلاجية ذات السمية الخلوية [7] .

أما لو تم مقارنة تأثير الكولسينات على الخلايا السرطانية مع بروتينات أخرى (سموم بكتيرية) تنتجها بكتيريا إشيريشيا القولون مثل Verotoxin و Enterotoxin و(SLT-1) shiga-like Toxin-1 ، فإنها جميعاً تمتلك تأثيراً سمياً مثبطاً لنمو الخلايا السرطانية داخل وخارج الجسم الحي ، لكن بالمقابل فإن استعمالها كعلاجات مستقبلية يجب أن يكون فيه حذراً كبيراً بسبب تأثيرها السمي الشديد على الخلايا الطبيعية ، فمثلاً يؤثر الـEnterotoxin على خلايا الأمعاء مسبباً الإسهال ، أما الـ(SLT-1) فإن له تأثيراً سمياً على خلايا الامعاء والكلية مسبباً الإسهال الدزنتري والبول الدموي [31،32،33،30] . أما الكولسينات فإن استعمالها يمكن أن يعدّ أميناً حسب ماتوصلت اليه الباحثة الدليمي [28] (في عدم امتلاكه تأثيراً حالاً لكريات الدم الحمراء ، كما أنه لايسبب حالات الإسهال ، ولايؤثر سلبياً على أعضاء الحيوان وعدم امتلاكه تأثيراً مطفراً) ، فضلاً عن ماتوصلت اليه بعض الدراسات القليلة الاخرى التي اهتمت بالموضوع نفسه .

المصادر

1. Nevidjon, B.M..and Sowers, K.W. 2000.A Nurse’s Guide to Cancer Care, Lippincott.
2. Kumar, V.;Cotran, R.S.and *Robbins,S.L.*2003.*Robbins Basic Pathology*. 7th ed., Saunders an Imprint of Elsevier Science.
3. Leopold, L.; Berger, M.; Cheng, S.; Giles, E. and , Estey, E.2003. Comparative efficacy and safety of Gemtuzamab Ozogamicin monotherapy and high-dose cytarabine combination therapy in patients with acute myeloid leukemia in first relapse.Clin. Adv. Hematol. Oncol., 14: 220-5.
4. Bourgaize, D.; Jewell, T. and Buiser,R. 2000. Biotechnology, Demytifiny the Concepts. 4th ed. McGraw-Hill. New York.,pp.313-35.
5. Linenberger, M. 2005. *CD33*-directed therapy with gemt-Uzumab Ozogamicin in acute myeloid leukemia*:* progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. Leukemia, 19: 176-82.
6. Stone, R.M. 2002. *eloid Leukemia in*The Difficult Problem of Acute My the Older Adult. Cancer J. Clin.52: 363-71.
7. Trounce, J. and Gould, D. 2000.Clinical Pharmacology *for* Nurses. 7th ed. Charchill-Livingstone. Edinburgh. pp.275-86.
8. Giles, F.J.; Keating, A.; Goldstone, A.H.; Avivi, I.; Willman, C.L. and Kantarjian, H.M. 2002. Acute Myeloid Leukemia. Hematology ,pp. 73-110. American Society of Hem.: Education Program Book.
9. Haskell, C.M.1980. *Cancer treatment*. W.B. Saunders Co., Philadelphia., pp.67-75.
10. Harrey, R.A.; Champe, P.C. and Mycek, M.J.2000. Pharmacology. 2nd ed, Lippincott Williams and Wilkins, New York.

11. Hill, R. P. and Farkas-Himsley, H. 1991. Further Studies of The Action of a Partially Purified Bacteriocin Against a Murine Fibrosarcoma. Cancer Research, 51: 1359- 65.
12. Chumchalova, J. and Smarda, J. 2003.Human Tumor Cells are Selectively Inhibited by Colicins. Folia Microbiol., 48: 111-5.
13. Smajs, D.; Pilsl, H. and Braun, V. 1997. Colicin U, Anovel Colicin Produced by Shigella boydii. J. of Bacteriol., 179: 4919- 28.
14. Wooley, R. E.; Brown, J.; Gibbs, P. S.; Nolan, L. K. and Turner, K. R.1994. Effect of Normal Intestinal Flora of Chickens *on* Colonization by Visulent Colicin V-Producing, Avirulent, and Mutant Colicin V- Producing Avian Escherichia coli. Avian Diseas., 38: 141-5.
15. Smajs, D. and Weinstock, G. 2001. *The Iron- and l*Temperature- Regulated CjrBC Genes of Shigella and Enteroinvasive Escherichia co*i* Strains Code for Colicin JS Uptake. J. of Bacteriology, 183: 3958-66.
16. Lazdunski, C.; Bouveret, E.; Rigal, A.; Journet, L.; Lloubes, R. and Benedett, H. 1998. Mini- Review, Colicin Import into Escherichia coli cells. J. of Bacteriol.,180: 4993- 5002.
17. Smarda, J. and Smajs, D. 1998. Colicins-Exocellular Lethal *Proteins of Escherichia coli*. Folia Microbiol, 43: 563-82.
18. Cursino, L.; Smarda, J.; Chartone, E. and Nascimento, A. 2002.Recent Updated aspects of Colicins of Enterobacteriaceae. Braz. J. Microbiol., 33: 196-217.
19. Smarda, J. 1992. Colicins as Anti-Tumour Drugs. Nato Asi Series, 65: 505-10.
20. Herschman, H. R. and Helinski, D. R. 1967. Purification and Characterization of Colicin E_2 and Colicin E_3. The J. of Biological Chemistry, 242: 5360- 8.
21. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protien Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chemical., 193: 265- 75.
22. Shibata, T.; Giaccia, A.J. and Brown, M. 2002. Hypoxia-Inducible Regulation of a Prodrug-Activating Enzyme for Tumor-Specific *Gene Therapy*. Neoplasia, 4: 40-8.
23. Ge, N.L.; Ye, S.; Zheng, N.; Sun, R.; Liu, Y. and Tang , Z. 2003. Prevention of hepatocellular carcinoma in mice by IL-2 and B7-1 genes co-transfected liver cancer cell vaccines. World J. Gastroenterol, 9: 2182-5.
24. Phuangsab, A.; Lorence, R.M.; Riechard, K.W.; Peeples, M.E. and Walter, R.J. 2001. Newcastle disease virus therapy of human tumor xenografts: anti-tumor effects of local or systemic administration. Cancer Letters, 172: 27-36.
25. الشمري،أحمد مجيد حمزة.2003، دراسة تأثير فايروس النيوكاسل في علاج الأورام السرطانية المغروسة في الفئران. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
26. Ruddon, R.W. 1981. Cancer Biology. Oxford University Press, New York.
27. Roitt, I.; Brostoff, J. and Male, D. 2001. Immunology. 6th ed., Mosby, London, New York, Toronto.
28. الدليمي،هند حسين.2006. دراسة بعض التأثيرات الحياتية للكولسينات في الخلايا الطبيعية و السرطانية خارج و داخل الجسم الحي، اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية.
29. Fumarola, D.; Bello, P.; Palma; R. Miragliott, G. and Panaro, A. 1997. Bacteriocins as cytotoxic agents in experimental neoplasms: considerations on the role of possible contaminants. G Batteriol Virol Immunol. 70: 87-93.

30. Farkas- Himsley, H.; Hill, R.; Rosen, B.; Arab, S. and Lingwood, C. D. 1995. The Bacterial Colicin Active Against Tumor Cells in Vitro and in Vivo is Verotoxin 1. Proc- Natl- Acad- Sci- USA. 92: 6996- 7000.
31. Arab, S.; Rutka, J. and Lingwood, C. 1999.. Verotoxin Induces Apoptosis and the Complete, Rapid, Long-Term Elimination of Human Astrocytoma Xenografts in Nude Mice. Oncology Research, 11: 33-9.
32. Gariepy, J. 2001. The use of shiga-like toxin 1 in cancer therapy. Critical Reviews in Oncology-Hematology, 39: 99-106.
33. Pitari, G.M.; Zingman, L.V.; Hodgson, (D.M.); Alekseev, A.E.; Terzic, A. and Waldman, S.A. 2003. Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer. Proc-Natl-Acad-Sci-USA,100: 2695-9.