دراسة بعض التأثيرات الوراثية الخلوية لذيفان الايرولايسين المنتج من بكتريا *Aeromonas hydrophila* في الخـلايا الطبيعيــة و السرطانية في الزجاج *In vitro*

Study of some cytogenetic effects of Aerolysin Produced by *Aeromonas hydrophila* on normal and tumor cells *in vitro*.

سناء جاسم البيضاني عبدالحسين مويت الفيصل نورية عبدالحسين علي
معهد الهندسة الوراثية و التقنيات الاحيائية للدراسات العليا /جامعة بغداد

Sanaa Jassem Al- Baidani Abdul Hussain Moyet Al-Faisal Norrya A. Ali
Genetic Engineering and Biotechnology Institute for Post Graduate Studie/ Baghdad University

المستخلص

هدفت هذه الدراسة التحري عن التأثير السمي للايرولايسين النقي في الخلايا الطبيعية والسرطانية خارج الجسم الحي in vitro حيث درست التأثيرات السمية للايرولايسين المنقى على خـط خـلايا العضلات الجنينية الجرذية الطبيعيــة(Rat Embryo Fibroblast (REF و خط سرطان الغدة اللبنية الفأرية Mouse Mammary Adeno carcinoma (MMA) و خلايا سرطان الحنجرة البشري Human larynx epidermoid carcinoma (Hep-2) في الزجاج *In vitro* . و ذلك من خلال التحري عن معدل تثبيط نمو الخلايا الطبيعية والسرطانية (Inhibitory Rate / I.R.) ومعدل تحفيز النمو (Proliferation Rate / PR) . تم تعريض الخلايا الى عشرة تراكيز من ذيفان الايرولايسين ولمدد 24 و 48 و 72 ساعة حسب بعدها معدل تثبيط و تحفيز الخلايا . اوضحت النتائج بأن تأثير الذيفان كان واضحا عند جميع التراكيز و يعتمد التأثير على التركيز و فترة التعريض .

Abstract

This study aimed to find the cytotoxicity of the aerolysin produced by *Aeromonas hydrophila* on rat embryo fibroblast, mouse mammary adeno carcinoma and human larynx epidermal carcinoma cell lines by estimating the cells inhibitory and proliferation rates . Cells were exposed to ten concentrations of aerolysin toxin for 24, 48 and 72 hours. Then the inhibitory and proliferation rates were calculated. The results showed that the effect of the toxin depends on concentration and exposure time.

المقدمة :

تمتلك الانزيمات او البروتينات المنتجة من قبل البكتريا خصائص من خلالها يمكن ان تستخدم في علاج السرطان ، فعلى الرغم من عدم فهم الميكانيكية التي تستطيع هذه البروتينات من القضاء على الاورام فهناك العديد منها يمكن ان تعد منتجات طبيعية لمحاربة هذا المرض ، وقد وضحت الدراسات الاولية من قبل العديد من الباحثين فعالية المنتجات البكتيرية ضد الاورام السرطانية حيث كشفت هذه الدراسات عن امتلاك مركبات بكتيرية مثل السموم الداخلية والخارجية (Bacterial endo- / exotoxin) والحامض النووي البكتيري (Bacterial DNA) فعالية ضد الاورام السرطانية حيث تؤثر عليها اما تأثيراً مباشراً (Tumoricidal effects) مثل السموم (Toxins) او غير مباشراً مثل تحفيز المناعة الذاتية (Innate immune activiation) [1،2،3،4] .

دراسات اخرى تشير الى وجود بروتينات تسمى Saframycin A (Saf A) وهو منتج من قبل البكتريا له فعالية ضد العديد من خطوط الاورام السرطانية (Tumor cell lines) [5] . فالذيفانات البكتيرية (Bacterial toxins) مثل *Pseudomonas* exotoxin (PE) هي واحدة من هذه المنتجات البكتيرية التي تعتبر علاج قوي ضد الاورام السرطانية [6،7] حيث تمتلك هذه الذيفانات جزيئات تستهدف الخلايا السرطانية مما تؤدي الى زيادة فعالية تحللها

وتزيد من تأثيراتها السمية على هذه الخلايا السرطانية ومن ثم قتلها [8] . وجد ان للسموم البكتيرية المنتجة من قبل بكتريا *Aeromonas hydrophila* تسبب موت الخليةالمعرضة لها في العديد من انظمة الزرع الخلوي [9،10،11] وهي بهذا تشبه تأثير السموم المعوية المنتجة من قبل بكتريا *Shigella dysenteriae* وبكتريا*Clostridium perfringens*) .

المواد و طرق العمل

التأثيرات السمية للايرولايسين في خـلايا العضلات الجنينية الجرذية الطبيعيـة (REF)

تمت دراسة التأثيرات السمية للايرولايسين في نوع من الخلايا الطبيعية وهي REF وهي الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ. تم الحصول على الخط اعلاه من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية بالتمريرة رقم 70 وهي منماة على وسط RPMI- 1640 المزود بـ 5 % من مصل العجل البقري (BCS) .

أضيف 0.1 مليلتر من عالق الخلايا الى كل حفرة من حفر الأطباق ، ثم تمت تغطية سطح حفر الطبق بورق لاصق شفاف معقم خاص لهذا الغرض وحرك الطبق بلطف ، حضن بعدها بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة . أضيف سم الايرولايسين الى الاعمدة من (2-10) بتراكيز متدرجة تراوحت بين (0.014 - 8.6) مايكروغرام / مليلتر وعد الصفان الاخيران كسيطرة سالبة فقد اضيف لهما 0.2 مليلتر من الوسط الزرعي الخالي من المصل . حضنت الاطباق بعدها بدرجة حرارة 37 م و لمدة 72 ساعة .

الكشف عن التأثير السمي للايرولايسين Cytotoxicity Assay

بعد مرور فترة التعريض (Exposure time) المحددة للحضن ، اخرجت الاطباق من الحاضنة وازيل الوسط الزرعي ثم غسلت الخلايا بمحلول (PBS) واضيف لكل حفرة 0.1 مليلتر من صبغة البنفسج البلوري وتركت مدة 20 ثانية .غسلت الحفر بالمحلول الفسيولوجي (PBS) عدة مرات لحين زوال الصبغة الزائدة . جففت الاطباق تماماً و قرأت النتائج باستعمال جهاز الاليزا عند طول موجي 492 نانومتر.

تم حساب معدل تثبيط نمو الخلايا الطبيعية والسرطانية (Inhibitory Rate /I.R.) وفقا لما ورد في المصدر [12] . بينما حسب معدل تحفيز النمو (Proliferation Rate / PR) وفقاً للمصدر [13] و كالتالي:

$$I.R.\% = \frac{A-B}{A} \times 100$$

$$P.R.\% = \frac{B}{A} \times 100$$

R.I%= النسبة المئوية لمعدل التثبيط. % .P.R= النسبة المئوية لمعدل التحفيز
A= الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة. B= الكثافة الضوئية لمجموعة الاختبار

التأثيرات السمية للايرولايسين في خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأرية(MMA) و خلايا سرطان الحنجرة البشري (Hep-2)

تم الحصول على الخطوط السرطانية اعلاه من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية بالتمريرات رقم (223،229،230) بالنسبة للاول والتمريرات رقم (101،102) بالنسبة للثاني وهي منماة على وسط RPMI-1640 المزود بـ 5 % من مصل العجل البقرة (BCS). نميت الخلايا السرطانية بنفس طريقة تنمية وتكثير الخلايا الطبيعية (REF) . واستخدمت نفس الطريقة السابقة من زرع الخلايا (Cell Seeding) ومعاملة الخلايا السرطانية بالايرولايسين والكشف عن التأثير السمي للايرولايسين . علماً ان فترات تعريض الخلايا السرطانية للايرولايسين كانت ثلاث مدد وهي (24،48،72) ساعة لكل نوع من الخلايا .

النتائج و المناقشة

التأثيرات السمية للايرولايسين في خط الخلايا الطبيعية REF

تمت دراسة هذه التأثيرات في نوع من الخلايا الطبيعية وهي REF الخط الخلوي الطبيعي لجنين الجرذ (Rat Embryo Fibroblast) اذ استخدمت تراكيز مختلفة من الايرولايسين في معاملة الخلايا وقد عملت تخافيف مضاعفة من السم (1/2 -1/1024) . اعتمدت التراكيز المستعملة في تجارب اختبار السمية بعد اجراء تجربة اولية

على تركيز اعلى هو 1100مايكروغرام/مليلتر واجراء تخافيف مضاعفة له الى التركيز 2.15 مايكروغرام/ مليلتر، فوجدت ان معظم التراكيز تعطي نسب تثبيط (Inhibition rate) عالية ، لذلك اخذ التركيز الثامن وهو 8.6 مايكروغرام/مليلتر في هذه التجربة واجريت له تخافيف مضاعفة الى عشرة تراكيز من (0.014 - 8.6) مايكروغرام/مليلتر وتم اعتمادها في جميع تجارب اختبارات السمية للايرولايسين في الخلايا الطبيعية والسرطانية .
يوضح الجدول (1) نتائج اختبار السمية لعشرة تراكيزمن سـم الايرولايـسين هي (8.6- 0.014) مايكروغرام / مليلتر على خط الخلايا الطبيعية REF بعد فترة تعرض 72 ساعة ، اذ وجد ان السمية تعتمد على التركيز اذ تزداد بزيادته فقد عملت التراكيزالعالـية (1.08- 8.6) مايكروغرام / مليلتر على زيادة نسبة تثبيط الخلايا وبشكل كبير حتى وصلت في اعلى تركيز الى 78.75% واختلفت بذلك بصورة معنوية (P<0.001) عن التراكيز القليلة من السم والتي انخفضت فيها نسبة التثبيط حتى وصلت الى اقلها في التركيز الاخير اي الى 8.3% .

جدول(1) : التأثيرالسمي للايرولايسين على خط الخلايا الطبيعية REF بعد فترة تعرض 72ساعة

التركيز (مايكروغرام / مليلتر)	المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي النسبة المئوية للتثبيط IR%	
8.6	78.750±4.041	a
4.3	78.3±1.732	a
2.15	78.7±4.041	a
1.08	76.740±1.154	a
o.54	31.250±1.154	b
0.27	31.00±1.154	b
0.13	30.4±2.309	b
0.07	19.6±1.732	c
0.03	12.5±0.577	d
0.014	8.3±0.577	d
اقل فرق معنوي (LSD)	6.169	
الاحتمالية (P)	0.0001	

المتوسطات الحسابية التي تحمل حروف مماثلة لا تختلف معنوياً فيما بينها

وهناك دراسات عديدة تشير الى تأثير سم الايرولايسين على الخلايا الطبيعية من خلال تأثيره السمي العالي على الخلايا المعوية ، بالإضافة إلى خلايا اللبائن [14،15،16،17] ، إذ تؤثر على الغشاء الخلوي لهذه الخلايا نتيجة لتنخر خلاياه كنوع من فعالية الانزيم في بكتريا *Aeromonas entiritis* [18] ، او نتيجة لخلل في عملية نقل الايونات بين الحواجز الخلوية والتي تسبب خلل في وظيفة الغشاء الخلوي وموت الخلية حيث ان السم يتفاعل مع الخلايا الهدف بارتباطه مع لب الجلايكان Glycan core وبروتينات Glycosylphosphatidyl inositol (GPI) مكونة قنوات في الغشاء البلازمي مما يؤدي الى حدوث هذا الخلل وبالتالي موت الخلية ، ومن هذه الخلايا التي تتأثر بالايرولايسين Caco – 2 cells المشتقة من الامعاء البشرية [19] .
وقد يؤدي عمل الايرولايسين الى تحرير مواد مختلفة في الخلية تسمى Inflammatory mediators مثل الـهستامين Histamin و Chemiluminescence response وتحرير انزيم Lipoxygenase من كريات الدم البيض العدلة البشرية (Neutrophils) .

التأثيرات السمية للايرولايسين في خطوط الخلايا السرطانية :

تم التعرف على التأثيرات السمية للايرولايسين في خطوط الخلايا السرطانية في الزجاج من خلال استخدام نوعين من خطوط الخلايا السرطانية والتي تم الحصول عليها من المركز العراقي لوراثة السرطان وهي خط خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري (MMA) Mouse Mammary adenocarcinoma وخط خلايـا سرطـان الحنجرة البشري (Hep-2) Human Larynx epidermoid carcinoma ، حيث تم تعريض هذه الخلايا الى تراكيز مختلفة من سم الايرولايسين وهي (0.014 – 8.6) مايكروغرام / مليلتر .

الجدول (2) يبين التأثيرات السمية للايرولايسين في خط خلايا الغدة اللبنية الفأري بعد ثلاث مدد تعرض (24 ، 48 ،72) ساعة ، اذ وجد ان التأثير السمي يعتمد على التركيز وعلى طول فترة التعرض اذ سجلت اعلى نسبة تثبيط للخلايا بعد مدة تعرض 72 ساعة واقل نسبة بعد فترة تعرض 24 ساعة ، وبينت النتائج ان التراكيز العالية من الايرولايسين كان لها تأثير سـمي عالي وتنخفض نسبة تثبيط الخلايا بانخفاض التركيز وبصورة معنويـــة ($P<0.001$) بعد فترة تعرض 24 ساعة و ($P<0.01$) بعد فترات التعرض 48 و 72 ساعة.

جدول(2) : التأثيرالسمي للايرولايسين على خط الخلايا السرطانية MMA بعد ثلاث فترات تعرض (24، 48 ،72)

التركيز (مايكروغرام / مليلتر)	المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي					
	النسبة المئوية للتثبيط IR% بعد فترة تعرض 24 ساعة		النسبة المئوية للتثبيط IR% بعد فترة تعرض 48 ساعة		النسبة المئوية للتثبيط IR% بعد فترة تعرض 72 ساعة	
8.6	66.3±3.464	a	75.4±2.886	a	84.5±2.309	a
4.3	65.1±2.886	a	74.9±4.364	a	84.2±4.618	a
2.15	63.2±1.732	a	73.5±1.732	a	83.466±1.740	a
1.08	61.3±2.309	a	72.5±2.309	a	78.6±1.732	ab
0.54	50.9±2.886	b	64.0±2.309	b	71.2±5.773	b
0.27	45.4±2.309	b	43.0±1.732	c	53.8±2.886	c
0.13	39.3±1.154	c	32.3±1.154	d	27.4±1.154	d
0.07	24.5±1.154	d	14.20±0.577	e	22.0±1.154	d
0.03	13.5±1.154	e	8.5±0.577	f	20.7±1.732	d
0.014	9.8±0.577	e	5.2±0.115	f	9.7±0.577	e
اقل فرق معنوي(LSD)	6.0409		5.5234		7.9273	
الاحتمالية (P)	0.0001		0.0001		0.0001	

المتوسطات الحسابية التي تحمل حروف مماثلة لا تختلف معنوياً فيما بينها

اما نتائج تأثير الايرولايسين على خط خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2 فقد بينها جدول (3) ، حيث وجد ان التأثير السمي للايرولايسين على هذا النوع من الخلايا متشابه لحد ما مع تأثيره على خط خلايا MMA لكن بشكل اقل ، فأن نسبة التثبيط وزيادتها تعتمد على تركيز السم وعلى طول مدة تعرض الخلايا لسم الايرولايسين ، وان اختلاف نسبة التثبيط مع التراكيز يكون بصورة معنوية ($P<0.001$) .

ان زيادة نسبة التثبيط بزيادة التركيز يفسر مدى فاعلية سم الايرولايسين على خلايا اللبائن بصورة عامة اذ ان السم له فعالية تحللية ضد الغشاء البلازمي لهذه الخلايا مما يسبب تنخر في اغشية هذه الخلايا او تكوين قنوات داخل الغشاء [16] .

جدول(3) : التأثيرالسمي للايرولايسين على خط الخلايا السرطانية Hep-2 بعد ثلاث فترات تعرض (24 ،48 ،72)

التركيز (مايكروغرام / مليلتر)	المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي					
	النسبة المئوية للتثبيط IR% بعد فترة تعرض 24 ساعة		النسبة المئوية للتثبيط IR% بعد فترة تعرض 48 ساعة		النسبة المئوية للتثبيط IR% بعد فترة تعرض 72 ساعة	
8.6	56.4±2.886	a	62.5±1.732	a	91.8±4.041	a
4.3	53.56±1.732	a	61.2±2.886	a	91.6±2.309	a
2.15	32.430±1.732	b	60.5±3.464	a	91.5±3.464	a
1.08	31.2±1.154	b	60.3±2.309	a	91.2±1.732	a
0.54	18.69±0.577	c	50.0±2.886	b	89.8±1.732	a
0.27	16.46±1.154	cd	31.60±1.732	c	37.8±2.309	b
0.13	15.66±1.732	cd	11.8±0.577	d	33.9±1.732	bc
0.07	13.39±0.577	de	3.9±0.057	e	28.1±1.154	cd
0.03	10.30±0.577	ef	2.0±0.057	e	27.37±0.577	d
0.014	8.48±1.154	f	0.0±0.0	e	26.2±1.154	d
اقل فرق معنوي (LSD)	4.1791		5.6165		6.3152	

المتوسطات الحسابية التي تحمل حروف مماثلة لا تختلف معنوياً فيما بينها

جدول (4): التأثيرالسمي للايرولايسين على خطوط الخلايا(MMA,Hep-2 , REF) بعد فترة تعرض 72ساعة

نوع الخلايا	المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي النسبة المئوية للتثبيط IR%	
MMA	43.041±2.909	a
REF	40.504±5.313	a
Hep-2	36.653±3.054	a
اقل فرق معنوي (LSD)	10.774	
الاحتمالية (P)	0.3	

المتوسطات الحسابية التي تحمل حروف مماثلة لا تختلف معنوياً فيما بينها

وهذه النتائج مطابقة للنتائج التي حصلت عليها الدراسات التي اجريت على ذيفان الايرولايسين المنتج من بكتريا *Aeromonas hydrophila* و *Aeromonas enteritis* وتأثيره على بعض الخلايا الطلائية [20] .

وتعزى زيادة نسبة تثبيط الخلايا ايضاً الى ان ذيفان الايرولايسين يدخل الى داخل الخلية وتعمل على تفريغ الخلية من محتوياتها بعملية تسمى Vacuolation مما يؤدي الى موت الخلية وهذا ماحصلت عليه النتائج التي اجريت على ذيفان الهيمولايسين المنتج من بكتريا *Serratia marcescens* وتأثيره في خلايا الـ Hep-2 المشتقة من خلايا سرطان الحنجرة البشري ، وHela cells وخط خلايا الـ RT112 (Bladder carcinoma cells) وغيرها من الخلايا السرطانية ، اذ كان للذيفان فعالية سمية كبيرة على هذه الخلايا في فترات تعرض مختلفة نتيجة التسبب بعملية الـ Vacuolation [20] .

ولمقارنة نسبة التثبيط في الانواع الثلاثة من خطوط الخلايا (MMA، Hep-2 ، REF) فقد بين جدول (4) اختلاف نسب التثبيط في الانواع الثلاثة حيث اظهرت التجربة ان اكثر الخلايا حساسية لذيفان الايرولايسين هي خلايا MMA واقلها هي Hep-2 .

المصادر

1. Chihara , G.; Maeda , Y.; Hamuro , J.; Sasaki , T.; Fukuoka , F. (1969). Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from Lentinus edodes (Berk) sing. Nature (Lond.). 222:687-688.
2. Pastan , I. I. and Kreitman , R. J. (1998). Immunotoxins for targeted cancer therapy. Adv. Drug Deliv. Rev. 31:53-60.
3. Melief , C. J.; Toes , R. E.; Medema , J. P.; Vander Burg , S. H.; Ossendorp , F.; Offringa , R. (2000). Strategies for immunotherapy of cancer. Adv. Immunol. 75:235-282.
4. Seya , T.; Begum , N. A.; Nomura , M.; Tsuji , S.; Matsumoto , M.; Hayashi , A.; Azyma, I. and Toyoshima , K. (2000). Innate immune therapy for cancer. screen for molecules capable of activating the innate immune system . Adv. Exp. Med. Biol. 465:229-237.
5. Chopra , A. K.; Xu , X.; Ribardo , D.; Gonzalez , M. ; Kuble , K.; Peterson , J. W. and Houston , C. W. (2000). The cytotoxic enterotoxin of Aeromonas hydrophila induces proiflammatory cytokine production and activities arachidonic acid metabolism in macrophages . Infect. Immun. 68:2808-2818.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.

6. FitzGerald , D. J.; Willingham , M. C.; Pastan , I. (1988).

7. - Pseudomonas exotoxin – immunotoxins . Cancer Treat. Res. 37:161-173.

8. Braun, V. and Focareta, T. (1991). Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins). Crit. Rev. Microbiol. 18(2): 115-158.

9. Ljungh , A. and Kronevi , T. (1982). Aeromonas hydrophila . toxins- intestinal Fluid accumulation and mucosal injury in animal models . Toxicon 20:397407.

10. Buckley, J.T.; Howard, S.P.; Chopra , A.K.; Houston , C.W. (1999). The cytotoxic enterotoxin of Aeromonas hydrophila is aerolysin. Infect. Immun. 67(1): 466-467.

11. Harrey, R.A.; Champe, P.C. and Mycek, M.J. (2000). Pharmacology.(2nd ed.). Lippincott Williams and Wilkins, New York.

12. Gao, S.; Yu, B.; Li, Y.; Dong, W. and Luo, H. (2003). Antiproliferative effect of Octreotide on gastric cells mediated by Inhibition of Akt/PKB and telomerase. World J. Gastroenterol, 9: 2362-5.

13. Chumchalova, J. and Smarda, J. (2003). Human Tumor Cells are Selectively Inhibited by Colicins. Folia Microbiol., 48: 111-5.

14. Smarda, J.; Matejkova, P. and Vavrickova, A. (2002). Translocation of Colicin from the Receptor to the Inner Cell Membrane: Function of the Peptidoglycan Layer. Folia Microbiol, 47: 213-217.

15. Bernheimer, A. W. and Avigad, L. S. (1974). Partial characterization of Aerolysin, a lytic exotoxin from Aeromonas hydrophila. Infect. Immun. 9(6): 1016-1021.

16. Abrami, L.; Fivaz, M.; Glauser, P.; parton, R. G. and Goot, F. G. (1998). A. Pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. J. cell Biol. 140(3): 525-540.

17. Heuzenroeder, M. W., C. Y. Wong, and R. L. Flower. 1999. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of Aeromonas spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. FEMS Microbiol. Lett. 174:131-136.evidjon, B.M. and Sowers, K.W. (2000). A Nurse's Guide to Cancer Care, Lippincott.

18. Altwegg , M . and Geiss , H. K. (1989) . Aeromonas as aHuman Pathogen Critical Reviews in Microbiol . 16:253-286.

19. Abrami, L., M. Fivaz, P. E. Glauser, N. Sugimoto, C. Zurzolo, and F. G. van der Goot. 2003. Sensitivity of polarized epithelial cells to the pore-forming toxin aerolysin. Infect. Immun. 71:739-746.

20. Hertle, R., M. Hilger, S. Weingardt-Kocher, and I. Walev. 1999. Cytotoxic action of Serratia marcescens hemolysin on human epithelial cells. Infect. Immun. 67:817-825.

21. Figueroa, A. P.; Heuser, J. E.; Akopyants, N. S.; Morisaki, J. H.; Giono, C. S.; Enriquez, R. F. and Berg, D. E. (2001). Cell vacuolation caused by Vibrio cholerae hemolysin. Infect. Immun. 69(3): 1613-1624.