Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics

تثبيط الخلايا السرطانية باستخدام الخلايا المقتولة حرارياً المعزولة من براز Lactobacillus acidophilus لبكتريا الأطفال و مصادر غذائية مختلفة

قيثار رشيد مجيد[1]، ناهي ياسين يوسف[2] ، فاطمة حسن أحمد[1]

1 قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة / جامعة البصرة.

2 المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية

الخلاصة:

منذ تعرف الانسان على مرض السرطان ولحد الان , فهو مازال التحدي الاكبر له . أذ بالرغم من وجود العديد من العلاجات المختلفة سواء الكيمائية والفيزيائية والجراحية , فأنها لم تستطيع أن تحقق النتائج المرجوة كما أنها لها أضرار جانبية , لذلك سعى الباحثون الى إيجاد طرائق علاجية جديدة وبديلة . ومن هذه البدائل قيام المختصين في مجال الاحياء المجهرية بمعالجة الاورام السرطانية وذلك عن طريق استخدام بكتريا حامض اللاكتيك ونواتجها الايضية . لذلك أجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير الخلايا الميتة لبكتريا Lactobacillus acidophilus (المقتولة حراريا HK) في تثبيطها للخلايا السرطانية . إذ عزلت بكتريا Lactobacillus acidophilus من براز الأطفال و عينات غذائية شملت (الموز و الجبن الأبيض الطري) وتم الحصول على 20 عزلة وشخصت اعتماداً على الوسط الانتقائي MRS Agar وكذلك الفحوصات المظهرية والمجهرية و الكيميوحيوية , اختبرت الفعالية المضادة للأكسدة لعزلة البكتريا الخام Lactobacillus acidophilus وكانت افضل فعالية ضد الأكسدة هي فعالية العزلة (Lactobacillus acidophilus B4) المعزولة من الموز إذ بلغت 0151. , بينما أقل فعالية كانت من العزلة (I11) Lactobacillus acidophlius المعزولة من براز الأطفال أذ بلغت 9.911 , بالمقارنة بمضاد الأكسدة الصناعي (BHT(Butylated Hydroxy Toluene ومضاد الأكسدة الطبيعي α-tocopherol . إذ أظهرت النتائج أن الفعالية المضادة للأكسدة باستعمال المضاد الصناعي BHT بلغت 82.70% , في حين فعالية مضاد الأكسدة الطبيعية α-tocopherol هي 73.96% على التوالي . أختبر التأثير السمي للخلايا الميتة لبكتريا Lactobacillus acidophilus في خطوط الخلايا السرطانية المدروسة والتي شملت خط خلايا عنق الرحم (Hela) ، والخط الطبيعي لخلايا الجرذ الجنينية مولدة الألياف الطبيعي (REF). اذ أستخدم في هذه الدراسة ستة تراكيز للخلايا الميتة وهي (93.5 , 187.5 , 375 , 750 , 1500 , 3000) مايكروغرام/ مليلتر . أظهرت النتائج أن الخلايا الميتة لبكتريا Lactobacillus acidophilus والمعزولة من مصادر مختلفة لها تأثيرات واضحة في الخلايا السرطانية , واختلفت درجات التأثير باختلاف مصدر العزل , بالنسبة للخلايا الميتة المعزولة من جبن الطري فكانت أعلى نسبة تثبيط هي88.20% بعد مرور 72 ساعة , في حين لم يظهر أي تأثير سمي للخلايا الميتة في خط الخلايا الطبيعية REF بعده تعرضها لمدة 72 ساعة .

الكلمات الدالة : acidophilus Lactobacillus , الخلايا المقتولة حراريا MTT , Hela, REF , ((HK

المقدمة:

acidophilus Lactobacillus وهي عصيات ذات سلاسل قصيرة منفردة وتكون ذات نهايات مستديرة بقطر 0.6-0.9 مايكروميتر وطول 1.5- 6 مايكروميتر ومستعمراتها ناعمة (1). بعضها يوجد بشكل أزواج وهي غير متحركة وعديمة الأسواط متجانسة التخمر وتنتج D,L- Lactic acid وغير منتجة للأمونيا من الآرجنين ومنتجة للحموضة ومخثرة للحليب والحموضة الكلية التي تنتجها في الحليب تتراوح بين 0.3- 1.9% . كما تعمل بعض أنواعها على تخمير النشا والكلايكوجين ولكن ببطء. يحوي جدارها الخلوي على الحامضيين الامينيين D-Aspartate و L-Lysine . أما إحتياجاتها الغذائية للنمو فهي تحتاج إلى بنتوثينات الكالسيوم والنياسين وحامض الفوليك والرايبوفلافين والثيامين وفيتامين B12. لاتنمو هذه البكتريا في 15م° ولكنها تنمو في درجة حرارة 45 م والدرجة الحرارية المثلى تتراوح بين 38-35م وتنمو في أس هيدروجيني يتراوح بين 7-5 وافضل أس هيدروجيني لها 5.5- 6(2) . السرطان مصطلح يطلق على الأورام الخبيثة Malignant tumors الذي يختلف بشدته وشكله فضلاً عن أستجابته للعلاج من نسيج لآخر ومن شخص لأخر(3). كما يعد السرطان من أكثر مسببات الوفيات في العالم إذ يوجد ملايين الأشخاص في العالم مصابين به وأن هذا العدد في ازدياد مستمر خاصة عند الأشخاص كبار السن فهو لا يميز بين فئة عمرية وأخرى وكذلك الجنس ، وينشأ نتيجة تعرض خلايا الفرد إلى بعض المؤثرات والتغيرات مما تجعلها تختلف عن الخلية الطبيعية التي نشأت منها، كما أنها لا يمكن أن تعود إلى أصلها حتى بعد زوال المسبب وتأثيره(4)

. وأن بعض هذه المؤثرات هي المطفرات التي تؤثر في المادة الوراثية للخلية، ومن أهم هذه المطفرات المواد الكيمياوية المسرطنة مثل المبيدات Pesticides وبعض المُضافات الغذائية والتعرض للأشعاع وغيرها (5 ; 6; 7) . ومنذ تعرف الانسان على هذا المرض ولحد الآن , فهو ما زال التحدي الأكبر له . اذ بالرغم من وجود العديد من العلاجات المختلفة سواء الكيميائية والفيزيائية والجراحية , فأنها لم تستطع أن تحقق النتائج المرجوة كما انها لها أضرار جانبية . لذلك سعى الباحثون الى إيجاد طرائق علاجية جديدة وبديلة. ومن هذه البدائل قيام المختصين في مجال الأحياء المجهرية بمعالجة الأورام السرطانية وذلك عن طريق استخدام بكتريا حامض اللاكتيك التي تكون موجودة في الجهاز الهضمي للأنسان والتي قد تدخل عن طريق الأغذية ومنتجات الألبان وقد شجع الباحثون على دراسة صفاتها العلاجية وميكانيكية عملها وخصوصاً تأثيرها ضد سرطان القولون (8) . ولم يقتصر استخدام البكتريا بشكلها الحيوي الكامل بل وجد ان الخلايا المقتولة حراريا

Corresponding Address:
Kithar Rasheed Majeed
Department of Food Sciences/ College of Agriculture / University of Basrah
Email: kitharrasheed @yahoo.com

(HKC) وأجزاء من بكتريا حامض اللاكتيك مثل جدار الخلية والببتيدوكلايكان ومتعدد السكريات والسايتوبلازم لها تاثير Antiproliferative ضد خطوط الخلايا السرطانية للأنسان (9; 10; 11) . إن بكتريا حامض اللاكتيك (Lactic acid bactecia) لهـا القدرة على منع العديد من الممرضات البكتيرية بوساطة آليات مختلفة منهـا passive and Active mechanisms تشمل التنافس على موقع الإلتصاق و التنافس على المغذيات وتغير بيئة الـ الأس الهيدروجيني. وهناك سلالات مختلفة مـن Bifidobacteria sp. . لها القابلية على الإلتصاق بخلايـا(Ca CO-2) enterocyte – Like human colon carcinoma) cell line داخل المختبر in vitro وخلايا Human – mucus secreting (cell line (HT29 – MTX Cells . وقد شاهد الباحثون أن هناك علاقة بين نواتج الحليب المتخمر ونقصان في حدوث سرطان الثدي ، وتركزت الدراسات فيما بعـد على القولون والكبد وسرطان المثانة . وقد وجد أن الإعطاء الفموي لمستحضرات بكتريا Lactobacillus casei لها تأثير في منع تكرار سرطان المثانة (12). تميزت بكتريا Lactobacillus بأهميتها الطبية اذ وجد أن لها أثراً كبيراً في تعزيز صحة الأنسان . فقد أجريت العديد من البحوث في هذا المجال ودرس تأثير أنواعها المختلفة في عدد من الأخماج التي تسببها البكتريا كذلك بعض الطفيليات فضلا عن تأثيرها في الأورام السرطانية. إذ تمتلك تأثيراً قاتلاً للخلايا السرطانية داخل الجسم الحي وخارجه (13). وتعمل بكتريا المعززات الحيوية على تأخير تطور الأورام ونموها والوقاية من سرطان القولون من خلال فعلها المضاد للمواد المطفرة ، ويمكن ان يتم ذلك باكثر من آلية واحدة منها : المنع المباشر للمسرطنات ، و أدمصاصها الى بوليمرات الكاربوهيدرات الموجودة فـي الجدار الخلوي ومن ثم خفض امتصاصها وتنشيط الجهاز المناعي ، فضلاً عـن تثبيط البكتريا المرضية (14 ; 15). ووجد ان بكتريا حامض اللاكتيك المتواجدة في منتجات الالبان تستطيع التقليل من قابلية التطفير لبعض المطفرات مثل 1,2 dimethylhydrazine. وتمتلك البكتريا هـذه القدرة على تثبيط نمو خلايا الاورام (Tumour cells) وخفض فعالية الانزيمات البكتيرية المسرطنة في القناة الهضمية (16). نظرا للاستخدامات الواسعة لبكتريا -Lactobacil lus في المجالات العديدة والمرتبطة بالأغذية وصحة الأنسان , وبسبب قلة الدراسات حول دور بكتريا L.acidophilus في تثبيطها للخلايا السرطانية في العراق ولقلة الدراسات حول تأثير الخلايا الميتة لهذه البكتريا ارتأينا القيام بهـذه الـدراسـة .

المواد وطرق العمل:

أولاً : جمع العينات

تـم جمـع عينات من بـراز الأطفال وعينات غذائية مختلفة وشملت (الموز والجبن الطري) .

ثانياً : تجهيز العزلات

تـم الحصـول على العزلات البكتيرية من مصادر غذائية مختلفة شملت الموز والجبـن الطري وقد وضعت المـواد الغذائية في أكياس البولي أثلين ونقلت الى المختبر لعزل بكتريا حامض اللاكتيك , أستعمل الوسط الانتقائي MRS Agar المجهـز من شـركة Oxide لعـزل بكتريا حامض اللاكتيك وحفظها. وأسـتخدم وسـط MRS broth لتنمية بكتريا حامض اللاكتيك وتنشيطها , وأيضا جمعت عينـات من براز الأطفال الرضع الأصحاء من كلا الجنسين تراوحت أعمارهم مابين (1- 6) أشـهر من أولئك المعتمدين في رضاعتهم على حليب الام . أخذت مسـحات من تلك العينات ووضعت مباشـرة في أنابيب اختبار حاوية على وسط MRS broth ثم نقلت الى المختبر تحت ظروف مبردة .

ثالثاً : عزل البكتريا وتنقيتها

عزلت بكتريا حامض اللاكتيك باستعمال طريقة التخافيف العشرية وذلك بوضع 1 غـم مـن المصادر الغذائية الصلبة (الجبـن الابيض الطـري و الموز) و نقل حوالـي 1غم مـن عينة البراز الـى انبوبة أختبار حاوية علـى 9 مل من MRS broth وحضنت بحرارة 37 مo لمدة 24 ساعة تحت ظروف لاهوائية باستعمال الحاوية اللاهوائية مع أكياس المولدة للغاز Gas back CO2 ثم أجريت سلسـلة من التخافيف العشـرية للعينات المزروعة باسـتعمال مـاء الببتون ، ثم نقل 0,1 مـل مـن كل تخفيف إلى أطبـاق بتري معقمة وصب فوقه وسـط MRS Agar الصلـب الخـاص بالعزل بعدها حضنـت بحرارة 37مo لمدة 48 سـاعة . وبعد الحضن نقلت المسـتعمرات المعزولة إلى وسـط MRS Agar لتنقيتها بطريقة التخطيط ، وحضنت بحرارة 37 مo لمدة 24 ساعة تحت ظروف لا هوائية مع متابعة النمو خلال هذه المدة (17 ;18) . وشخصت اعتمادا على الوسط الانتقائي MRS Agar فقـط الفحوصات المظهرية والفحوصـات المجهرية والاختبارات الكيميوحيوية تشمل (الكاتليز, أنتاج الغاز من الكلوكوز , تحلل الجيلاتين , انتاج الامونيـا مـن الارجنيـن , الكاربوهيدرات , النمـو بدرجات الحـراره المختلفة , اختزال النترات الى النتريت , الاندول) (19) .

رابعا: قياس الفعالية المضادة للأكسدة

أتبعـت طريقة الثايوسـيانات التي ذكرهـا Bersuder et al. (1998) (20) لقياس الفعالية المضادة لأكسـدة حامض اللينوليك وكما يأتي : خلط 1 مل من كل عزلـة محلية لبكتريـا Lactobacillus acidophilus والمعزولة من مصادر مختلفة ، مع 4 مل إيثانول تركيزه95 ٪ و 4,1 مل حامض اللينوليك تركيزه2,5 ٪ في الإيثانول و 8مل من محلول دارئ الفوسفات (المنظم) ذي تركيز 50 ملي مولاري وذي أس هيدروجيني 7, حضن الخليط في درجة حرارة 40 م لمدة 24 ساعة وأضيف 0,1 مل من هذا الخليط الى 9,7 مل كحول الإيثانول تركيزه 75 ٪ و 0,1 مل من ثايوسيانات الأمونيوم تركيزه 30٪ ثم أضيف 0,1 مل من كلوريد الحديـدوز تركيزه20 ملي مولاري محضر فـي 3,5٪ حامض الهيدروكلوريك الى خليط التفاعل لتكوين مركب معقد أحمر اللون مع البيروكسـيدات الناتجة من الأكسدة . كما استعمل مضاد الأكسدة الصناعي BHT (Butylated Hydroxy Toluene) المـذاب فـي الإيثانـول النقـي , ومضاد الأكسـدة الطبيعي الفا – توكوفيرول المذاب في الهكسـان كنماذج المقارنة , وحضرت العينة الضابطة بالطريقة نفسها أعلاه وذلك بخلط 1مل من خلات الأثيل بدلا من العينة , تم قياس الامتصاص للنماذج ونموذج العينة القياسـي عند طول موجي 500 نانوميتر في جهـاز المطياف الضوئي spectrophotometer وتم حسـاب الفعالية المضادة لأكسدة حامض اللينوليك وفقا للمعادلة التالية :

$$\text{الفعالية المضادة للأكسدة ٪} = \left[1 - \left(\frac{\text{قراءة الامتصاص للنموذج}}{\text{قراءة الامتصاص للعينة الضابطة}}\right)\right] \times 100$$

خامساً: الخلايا المقتولة حراريا (HK)

حضنـت بكتريـا Lactobacillus acidophilus على درجـة حرارة 37 مo لمـدة (24-48) سـاعة وفي ظـروف لاهوائية تم بعدها عمليـة النبذ المركزي 3500 دورة / دقيقـة لمدة 30 دقيقـة بدرجـة 4 مo بعدها تم عزل الراشـح عن الراسب وتم أخذ الراسب وأجري له عملية غسل الراسب مرتين باستخدام محلول الـدارئ الفوسـفات الملحي (PBS). عـدد الخلايـا cfu (108-106) / مل وتم تسـخين الخلايا البكتيرية عند درجة حرارة 95 مo لمدة سـاعة واحدة . بعدها تم غسـل الخلايا بمحلول الدارئ الفوسفات الملحي , ثم نبذه مركزياً بسرعة 3500 دورة لمـدة 30 دقيقـة بدرجـة 4 مo. بعدها وضعت الخلايـا ب 100مل من محلول الدارئ الفوسفات الملحي لمدة 20 دقيقة ثم عوملت بجهاز ultrasonic بماء بارد لمدة دقيقة بدرجة 4 مo , جففت بعدها باستخدام جهاز التجفيد .(21)

سادساً: الفعـاليـة المضـادة للسـرطـان

الخطوط الخلوية Cell line

أسـتعمل كل من الخط الخلوي السـرطاني لسـرطان عنق الرحم (Hela) عند التمريـرة (72) و خـط الخلايا الطبيعية لجنين الجـرذ REF ((Rat Embryo fibroblast عند التمريرة (58) من المركز العراقي لبحوث السـرطان والوراثة الطبية وتم تحضير المحاليل وفقاً لطريقة) 23) الخاصة بالزرع النسيجي وكما هو موضح أدناه :-

تحضيـر الوسـط الزرعـي RPMI 1640 وهـذا الوسـط مجهـز بمادة glutamine ومـادة Hepes buffer ويحضـر كما يلي : يتم إضافة المواد التالية في دورق حجمي سـعتة لتر واحد وتشـمل 10,4غم من RPMI-1640 و15 مليلتـر من بيكربونات الصوديـوم و 10٪ من مصل جنين البقري (FCS) و ستربتومايسين 0,5 مل و البنسلين 0,5 مل , وحضنت في 5٪ من CO2 عند درجـة حـرارة 37 مo لمدة 24 سـاعة , ثم تم عد الخلايا باسـتخدام 0,2 مل من محلول أزرق التريبان و 1,6 مل من محلول دارئ الفوسفات الملحي وعند تكون الطبقـة الاحادية الكاملـة(Confluent monolayer), وضع 200 مايكروليتر مـن عالق الخلايا فـي كل حفرة من حفر الطبـق 96 multi well plate (عدد الخلايـا السـرطانية في كل حفرة ما يقـارب 410 ×3خلية/ حفرة) . تم تغطية

الأطباق بأحكام باستخدام لاصق الشفاف (Para film) , وحضنت الأطباق في حاضنة بدرجة حرارة ٣٧ مº لحين الحصول على طبقة مفردة من الخلايا في كل حفرة , بعد انتهاء مدة الحضن , تم التخلص من الوسط الزرعي القديم , وأضيف ٠,٢ مليليتر من التراكيز المحضرة سابقا من (الخلايا الميتة) وبواقع أربعة مكررات لكل تركيز , كما تم عمل ٦ مكررات لسيطرة (خلايا مضاف اليها الوسط الخالي من المصل وبدون إضافة المستخلصات إلى السيطرة وحضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧ مº لأوقات التعريض Exposure time (٢٤ و ٤٨ و ٧٢) ساعة في حاضنة مزودة ب ٥٪ من غاز ثنائي أوكسيد الكاربون.

اختبار السمية

حضر من مستخلص الخلايا الميتة للعزلات المحلية لبكتريا Lactobacillus acidophilus سته تراكيز مخففه و بشكل مضاعف وكانت التراكيز المحضرة : (٣٠٠٠ و ١٥٠٠ و ٧٥٠ و ٣٧٥ و ١٨٧,٥ و ٩٣,٧٥) مايكروغرام / مليلتير وتحت ظروف معقمة , استعملت جميع التراكيز مباشرة بعد إكمال عملية التحضير في تثبيط الخلايا السرطانية وفقاً لما ذكره (٢٢) و (٢٣) اذ يتم وضع ٢٠٠ مايكروليتر من عالق الخلايا لكل من خلاياHela و REF في كل حفرة من حفر الطبق multi well plate ٩٦ . وبعد ٢٤ ساعة من الحضانة يتم أضافة ٢٠٠ مايكروليتر من الخلايا الميتة وبواقع اربع مكررات لكل تركيز , بعد ذلك حضنت الاطباق بدرجة ٣٧ مº لأوقات التعريضExposure time (٢٤ و ٤٨ و ٧٢) ساعة في حاضنة مزودة ب ٥٪ من CO٢ بعد أنتهاء وقت التعريض Exposure time المطلوب سحبت محتويات كل حفرة وصبغت الخلايا بصبغة MTT ٣)٤,٥-Dimethylthiazol-٢-yl)٢,٥ diphenyltetra-zolium bromide[] وتركت لمدة ساعتين , بعدها تم أضافة ١٠٠ مايكروليتر من DMSO ووضع في حمام مائي هزاز بدرجة ٣٧ مº مع الرج المستمر في حمام مائي هزاز لمدة ١٥ دقيقة . قرأت النتائج لكل طبق بأستخدام جهاز (ELISA) أستخدم هذا الجهاز لقراءة الأمتصاصية الطيفية على طول موجي ٥٥٠ نانوميتر للخلايا الملتصقة في الطبق ومن ثم تحدد نسبة التثبيط الخلايا مقارنة مع السيطرة (العينة الضابطة) من خلال قراءة امتصاصية الكثافة الضوئية في جهاز الأليزا وتحويلها الى نسب مئوية لإيجاد معدل التثبيط Inhibitory rate وحسب المعاملة الأتية :

متوسط العينة الضابطة– متوسط المعالجة

معادلة التثبيط =--- × ١٠٠

متوسط العينة الضابط

التحليل الإحصائي

أستخدم البرنامج (٢٠١١) Genstat Release DE١٠,٣ في التحليل الإحصائي لدراسة تأثير التراكيز الخلايا الميتة المختلفة والاوقات (٢٤ , ٤٨ ، ٧٢) ساعة في نسب التأثير في خطوط الخلايا المختلفة .

النتائج والمناقشة

١-عزل بكتريا Lactobacillus acidophilus وقياس فعاليتها لمضادات الأكسدة

تم الحصول على ٢٠ عزلة من بكتريا lactobacillus acidophilus شملت ١١ عزلة من عينات براز الأطفال و٦ عزلات من جبن الأبيض الطري و ٣ عزلات من الموز, جميعها اخضعت لقياس فعاليتها لمضادات الأكسدة أذ يوضح الجدول (١) نتائج الفعالية المضادة للأكسدة في نظام تثبيط أكسدة حامض اللينوليك بفعل بكتريا acidophilus Lactobacillus , وكانت أعلى فعالية مضادة للأكسدة بالنسبة للبكتريا المعزولة من الموز (B٤) وهي ٥١,٠١٪ بينما كانت أقل فعالية مضادة للأكسدة بالنسبة البكتريا المعزولة من براز الأطفال (I١١)) وهي ١١٩,٩٪.

جدول (1) الفعالية المضادة للأكسدة في نظام تثبيط أكسدة حامض اللينوليك بفعل بكتريا Lactobacillus acidophilus

ت	الرموز *	الفعالية المضادة للأكسده البكتريا٪	ت	الرموز *	الفعالية المضادة للأكسده البكتريا٪
1	I_1	45.3458	11	I_{11}	19.9167
2	I_2	34.0613	12	Cha_1	31.3572
3	I_3	40.8216	13	Cha_2	21.2162
4	I_4	40.5612	14	Cha_3	38.6531
5	I_5	49.6099	15	Cha_4	20.8528
6	I_6	41.1336	16	Cha_5	21.6328
7	I_7	36.5574	17	Cha_6	32.973
8	I_8	28.7051	18	B_1	43.6817
9	I_9	30.2132	19	B_4	51.0140
10	I_{10}	27.4050	20	B_5	33.5413

*(1I , 2I , I3 , I4 , I5 ,I6 , I7 , I8 , I9 , I10 ,I11) براز الاطفال , (B1 , B4 , B5) الموز , (Cha1 , Cha2 , Cha3, Cha4 , Cha5 , (Cha6 تمثل بكتريا Lactobacillus acidophilus . الجبن الابيض الطري

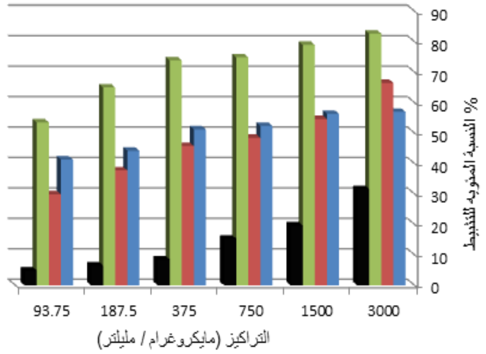
٢ – الخلايا المقتولة حراريا ((HK

تم اختبار التأثير السمي لتراكيز مختلفة للخلايا الميتة لبكترياLactobacillus acidophilus والتي أعطت أعلى فعالية مضادة للأكسدة في تثبيط نمو الخط الخلوي السرطاني HeLa والخط الطبيعي REF ولمدد زمنية مختلفة .

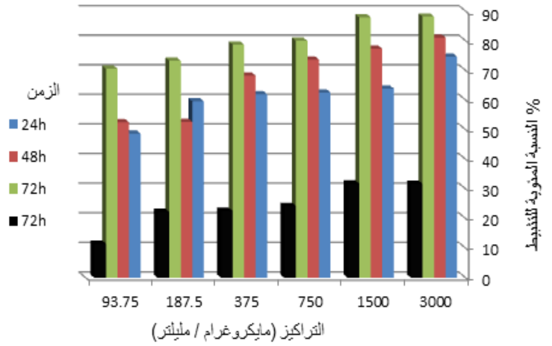
٣- الفعالية المضادة للسرطان

التأثير السمي للخلايا الميتة لبكتريا acidophilus.l في تثبيط الخط الخلوي السرطاني Hela والخط الطبيعي REF

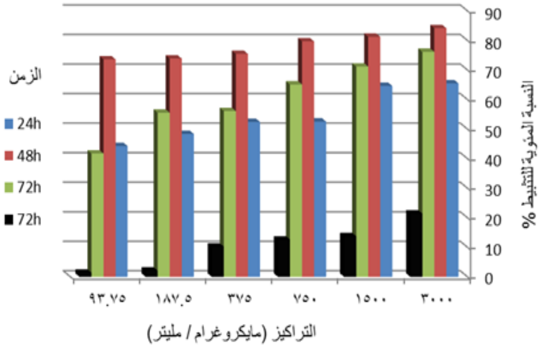
تمثل الاشكال من (١) الى (٣) نتائج التأثير السمي لتراكيز مختلفة من الخلايا الميتة لبكتريا Lactobacillus acidophilus والتي أعطت أعلى فعالية مضادة للأكسدة والمعزولة من مصادر مختلفة , في تثبيط الخط الخلوي السرطاني Hela ولمدد زمنية (٢٤ و ٤٨ و٧٢) ساعة والخط الطبيعي REF ولمدة ٧٢ساعة.



شكل (1) : تأثير الخلايا الميتة من بكتريا Lactobacillus acidophilus المعزولـة من عينات براز الأطفـال في نمو خط خلايا السـرطانية HeLa ولمـدد زمنية مختلفـة (24 , 48 , 72) والخط الطبيعي REF خلال 72 ساعة



شـكل (2) : تأثيـر الخلايـا الميتة مـن بكتريـا Lactobacillus acidophilus المعزولـة مـن مصـدر الجبن على فـي خط خلايا السـرطانية HeLa ولمـدد زمنية مختلفـة (24 , 48 , 72) والخط الطبيعي REF خلال 72 ساعة



شـكل (3) : تأثيـر الخلايا الميتـة من بكتريـا Lactobacillus acidophilus المعزولـة مـن مصدر الموز في نمـو خط الخلايا السـرطانية HeLa ولمـدد زمنية مختلفـة (24 , 48 , 72) والخط الطبيعي REF خلال 72 ساعة

أظهرت النتائج المتمثلة في الاشـكال السـابقة من شكل (1) الى شكل (3) عدم ظهور تأثيـرات واضحة على الخط الخلوي الطبيعـي REF وبمختلف التراكيز المستخدمة للخلايا الميتة وكذلك أختلاف أوقات التعريض، فقد كانت نسبة التثبيط واطئة جدا مقارنة مع الخطوط الخلوية السـرطانية وبمستوى أهمية $0.05 > P$. أذ كانت أعلى نسـبة للتأثير السمي هو 31.70 % بالنسبة للخلايا الميته لبكتريا L.acidophilus المعزولة من الجبن الطري وهذه النسب من التأثير ليس ذي اهميـة كونها أقل من نسـبة 50% فيمكـن اعتبارها كأنها لم تؤثـر اصلا , وهذه الميزة مهمة جدا في التقليل من التأثيرات الجانبية التي قد تحدثها بعض العلاجات المسـتخدمة في تثبيط الخلايا السـرطانية والتي تعمل على قتـل الخلايا الطبيعية أيضـا والتـي تعمل على حـدوث مضاعفات خطـرة على الاشـخاص المرضى وبالتالـي تقلل من فرص العـلاج الناجح. لوحظ من خلال النتائج أيضا أن الخلايا الميتة قد أعطى تأثيرات تثبيطية سـمية لخطوط الخلايا السـرطانية وهذه النتائج قـد أتفقـت مع ما ذكره (25) وقد ذكر كل مـن (26) و (10) و (11) أن بكتريا حامـض اللاكتيـك المقتولة حراريا (HK) والمكونـات الخاصة لها تمتلك بعض الخصائص المضادة للخلايا السـرطانية المختلفة , وكذلك عدم قدرتها على تثبيط الخلايا الطبيعية . وقد يعود السـبب في قابلية خلايا ومكونات جدار بكتريا حامـض اللاكتيك المقتولـة بالحرارة من (كاربوهيدراتيـة وبروتينية ودهنية وغيرهـا) علـى تحفيز أفراز أنترلوكين (IL-6) وعامـل النخر الورمي نوع الفا فـي خطـوط الخلايا البلعمية خارج الأنظمة الحيـة (26; 27). أقترحت عدة عناصـر مضـادة للسـرطان تم الحصول عليهـا من بكتريا حامـض اللاكتيك للوقايـة من السـرطان (28; 30). اعتمـد تأثير الخلايا المقتولـة في تثبيط نمو الخلايا السـرطانية على التركيز المسـتعمل , إذ أدت التراكيز العالية إلى تثبيط نمو الخلايا السـرطانية المدروسـة بنسـب عالية , وقلّ التأثير التثبيطي تدريجياً مع أنخفاض التركيز المسـتعمل، أي أن العلاقة بين النسـبة المئوية لتثبيط الخلايا السـرطانية وتراكيز الخلايا الميتة لبكتريـا Lactobacillus acidophilus . هـي علاقة طردية أذ تزداد شـدة التأثير السـمي بأزديـاد التراكيز وهذه النتيجة تدعـم فكرة أن التأثير السـمي في خطـوط الخلايا السـرطانية يعتمد على تركيز الجرعـة (30) (dose dependant). ونسـتدل مـن ذلـك أن التراكيز العالية للخلايـا الميتـة قامت بتحفيز عملية الموت المبرمــج (Apoptosis)) في الخلايا السرطانية ولوحظ أن التراكيز العالية للخلايا هي التي تسبب تحفيزا أكبر للموت المبرمج وخصوصـاً تراكيز (3000 و 1500 و 750) مايكروغرام / مليلتـر وقـد أختلفت هذه القابليـة بأختلاف مصدر ونوع البكتريـا وقد يعود السـبب في أرتفاع الفعالية التثبيطية لنمو الخلايا السـرطانية بأستعمال الكتلـة الحيويـة للخلايـا الميتـة مـن العزلـة المحليـة لبكتريـا aci-dophilus L. للبكتريا نفسها الى محتواه من البروتينات التي مصدرها الخلايا الميتـة وهـذا يتفق مع ماذكره (31) من خلال دراسـته علـى بكتريا Bacillus spp. و Pseudomonas spp.. أن إعطـاء تراكيـز عالية ومتكررة من خلايا بكتريـا Lactobacillus acidophilus.. ومكوناتها مهم لضمان تثبيط الخلايا

السـرطانية ، وهذا يتفق مع ما توصلت اليه دراسات أخرى إذ أكد الباحث (32) أن الفعاليـة المضادة لأربعة أنواع من بكتريـا العصيات اللبنية المقتولة بالحرارة وهـي L.acidophilus IAM و L.plantarum KCTC و L.bulgaricus KCTC و L.casei spp.casei KCTC3109 تجـاه خطوط خلايا سـرطان القولـون والمثانة والرئة عند تركيـز 100 مايكروغرام/ مليلتر وبوقت تعريض 48 سـاعة كانت عالية ، ولاحظ أن البروتين السـكري لجـدران بكتريا Lacto-bacillus المستخدمة في الدراسة والمقتولة بالحرارة تمتلك أيضا فعالية مضادة تجاه خطوط خلايا سـرطان الرئـة و المعدة و الكلية والقولـون عند تركيز 100 مايكروغـرام / مليلتر وبوقت تعريض 48 سـاعة . إن بكتريـا حامض اللاكتيك تعمـل على التقليل من المواد المسـرطنة الكيميائية وقد تعمل على إزالة السـموم المسـرطنة , وتغير محتوىٍ البيئة التي تحيط الأمعاء , وتقليل الأنشـطة الأيضية مـن البكتريا التي تولد مواداً مسـرطنة , كذلك تعمـل على إنتاج منتجات الأيض مثل butyrate تحسـن من قدرة الخلايا على المـوت (الموت المبرمج) , وتنتج مركبات تمنع نمو الخلايا السرطانية أو تحفيز المناعة وهو نظام للدفاع عن أفضل ضـد الخلايا السـرطانية . لحـد الآن لم يعرف كيفية عمل هـذه البكتريا في تثبيط خلايـا القولون لكن يعتقد أن هنـاك بعض الآليات التي تحدثها هذه البكتريا وتؤثر على النشـاط الأيضـي للفلورا الطبيعيـة وتتداخل هذه مع ظـروف كيموفيزيائية الموجـودة في داخلِ القولون مما يسـاعد على الارتباط وتحطيـم الخلايا المولدة للسـرطان)8). نظراً لدور النظام الغذائي في الأمراض التي تصيب الأنسان مثل مرض السـرطان فقد بينت إمكانية دور بكتريا حامض اللاكتيك لمنع سـرطان القولون لأمتلاكها بعض الخصائص المضادة للسرطان وأن تأثير بكتريا حامض اللاكتيـك تقلـل من بقاء الخلايا السـرطانية أو تقلـل من حجم الـورم . فقد بينت البحوث التأثيرات المثبطة لبكتريا حامض اللاكتيك في خطوط السرطانية البشرية المختلفة ومحاولة لأثبات أذا كان لها تأثير على الخلايا السـرطانية . من بين هذه السـلالات التي تم دراستها الخلايا الميتة L.acidophillus 606 والخلايا الميتة L.casei ATCC393 التـي بينـت الأثـار التثبيطية في نمو الخلايا السـرطانية (32; 27). وأيضـا بينت البحـوث ان الخلايا الميتـة L.acidophillus 606 أقل سـمية للخلايـا الطبيعية من الخلايا الميتـة L.casei ATCC393 أظهرت نتائج الفعالية السـمية للخلايا الميته (المقتولة حرارياً) للعزلة المحلية Lactoba-cillus plantarrum تفوقها على كافة السـلالات العالمية التي شـملت L. acidophilus ATCC 43121) و L. acidophilus ATCC 4356 و L. acidophilus 606 و L. casei YIT 9029 و L. casei ATCC 393) التي أستخدمها الباحث (26 (في دراسته . وجد الباحث Choi et al.,2006 أن القابلية التثبيطية لخلايا و راشح بكتريا L.acidophilus 606 في تثبيط خطوط الخلايا السـرطانية خارج الأنظمة الحية كانت بتقطيعها لـDNA خلايا سرطان القولون و البنكرياس والدم المعاملة بخلايا راشـح بكتريا L.acidophilus 606 المقتولـة بالحـرارة بتركيـز 10 ملغم/مليلتـر وبوقت تعريض 96 سـاعة. وهذا يؤكـد دور خلايا بكتريا L.acidophilus 606 في حث الخلية السـرطانية على الأسـتماتة بتأثيرها في بروتينات الجينات المسـؤولة عن عملية الأستماتة وتثبيط بروتينـات الجينـات المضادة لعمليـة الأسـتماتة (Anti apoptotic protein) وأعتقـد الباحـث أعلاه أن دور راشـح بكتريـا L.acidophilus 606 في حث الخلايا السرطانية على الأستماتة في أثناء التحوير والتعديل في بروتينات الإشارة المنظمة لعملية الأسـتماتة. يستدل من النتائج اعلاه امكانية استخدام الخلايا الميته المقتولة حرارياَ من بكتريا L acidophilus. المعزولة محليا في هذه الدراسة كمواد مسـاعدة في عملية تنظيم الادوية المسـتخدمة في علاج السـرطان خاصة اذا كان لهـذه المواد علاقة وثيقة مع الجينات المنظمة لعمل موت الخلايا المبرمج (Apoptosis) وهذا يحتاج العديد من البحوث والدراسات على المستوى الجيني مستقبلا .

المصادر

1. Holt, H.G.; Sharpe, M.E.; Mair, N.S. and Sneath, P.H.A. (1986). Bergey’s manual of systematic bacteriology . Volume 2 Williams and Wilkins . Baltmore. London . Los Angles . Sydney.
2. Ludwig , W. ; Schleifer, K. and Whtman, W.B. (2009). Bergeys Manual of Systematic e\vf;vcBacteriology. (2nd ed.). Vol. 3., P646.
3. Lehne, R.A. (2001). Pharmacology for Nursing Care. (4th ed.). W.B. Saunders Company.
4. Ruddon, R.W. (1981). Cancer Biology. Oxford University Press, New York.
5. Hall, E.J. (1997). Etiology of Cancer: Physiological Factors. In: Devita, V.J. ; Hallman, S. and Rosenberg, S.A. (eds.), Cancer Principles and Practice of Oncology. (5th ed.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia..
6. Kanecko, M. ; Morimurra, K. ; Nishikawa, T. ; Wanibuchi, H. ; Takada, N. ; Osugi, H. ; Ktnoshita, H. and Fukushima, S. (2002). Different Genetic Alteration: Genotoxic Carcenogenes. Carcinogenesis, 23: 17329-17335.
7. Wahnschaffe, U. ; Bitsch, A. ; Kielhorn, J. and Mangelsdorf, I. (2005). Mutagenicity Testing with Transgenic Mice. Part I: comparision with the Mouse Bone Marrow Micronucleus Test. Carcinogenesis, 4: 3-1.
8. Rafter, J. (2002). Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. Br. J. Nutr., 88 (1): 89-94.
9. Kim, J. Y. ; Woo, H.J. ; Kim, Y.S. ; Kim, K.H. and Lee, H.J. (2003). Cell cycle dysregulation induced by cytoplasm of Lactococcus lactis ssp lactis in SNUC2A, a colon cancer cell line. Nutr. Cancer, 46: 197-201.
10. العبيدي ، مأرب نزيه رشيد (2012) . دراسة تأثير بكتريا Lactobacillus acidophilus المعزولة محلياً ومكوناتها كعامل مضاد للسرطان في خارج وداخل الجسم الحي . أطروحة دكتوراه . معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية , جامعة بغداد .
11. اللعيبي ، فاطمة حسن أحمد (2015) . تأثير السكر المتعدد الخارجي والخلايا المقتولة حراريا لعزلات محلية من بكتريا حامض اللاكتيك في تثبيط نمو الخلايا السرطانية وكمضادات أكسده ومايكروبية . رسالة ماجستير .كلية الزراعة . جامعة البصرة .
12. Guilliams, T.G. (1999). Healthy Microbial Organisms Concise Update Of Important Issues Concerning Natural Health. Ingredien., 2 (2): 1-8.
13. Chumchalova, J. and Smarda, J. (2003). Human Tumour Cells Are selectively Inhibited Colicins. Folia Microbiol., 48:111-115.
14. Mcintosh, G.H. ; Royle, P.J. and Playne, M.J. (1999). A probiotic strain of L. acidophilus reduces DMH induced large intestinal tumors in male Sprague- Dawley rats. Nutr. Cancer, 35: 153-159.
15. Roos, N.M. and Katan, M.B. (2000). Effect of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988-1998. American. J. Clin. Nutr., 71 (20): 405-411.
16. Dunne, C. (2001). Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. Inflam. Bowel. Dis., 7 (2): 136-145.
17. Harrigan, W. F. and McCance, M. E. (1976). Laboratory methods in microbiology. Academic Press. London. U.K.
18. Buck, L. M. and Gilliland, S. E. (1995). Comparisons of freshly isolated strains of Lactobacillus acidophilus of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. J. Dairy Sci., 77 : 2925 – 2933.
19. Langkay, H. A. W.; Balia, R. L.; Tangoe, I.; Tasbac, B. A. and Ludong, M. (2009). Isolation and Identification of Lactic acid bacteria from Row poultry meat Biotechnology in Animal Husbandry, 25(5-6) :1071-1077.
20. Bersuder, P. ; Hole, M. and Smith, G. (1998). Antioxidants from a heated histidine-glucose of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by High performance Liquid Chromotography. J. Am. Oil. Chem., 75: 181-187.
21. Landersjo, C. ; Yang, Z. ; Huttunen, E. and Widmalm, G. (2002). Structural studies of the Exopolysaccharide produced by Lactobacillus rhamnosus strain GG (ATCC53103). Biomacromolecules, 3:

880-884.
22. Abdul-Majeed, M.R. (2000). Induction and characterization of SU. 99 plasmacytoma cell line and its effect on mice immune response. Ph.D. thesis, University of Saddam.
23. Freshney, R.I. (2000). Culture of animal cell: A manual for basic technique. (4th ed.). Wiley-Liss Company, New York, PP: 155-186.
24. Genstat Release 10.3DE(2011).VSN International Ltd.(Rothamsted Experimental.station).
25. Kim, Y. ; Woo, J. ; Kim, S. and Lee, J. (2002). Screening for anti proliferation effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines. Biotechnology Letters, 24: 1431-1436.
26. Choi, S.S. ; Kim, Y. ; Han, K.S. ; You, S. ; Oh, S. and Kim, S.H.(2006). Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. Lett. Appl. Microbiol., 42: 452-458.
27. Lee, J. ; Shin, J. ; Kim, E. ; Kang, H. ; Yim, I. ; Kim, J. ; Joo, H. and Woo, H. (2004). Immunomodulatory and antitumor effects invivo by cytoplasmic fraction of Lactobacilluscasei and Bifidobacterium longum. Journal of Veterinary Science, 5: 41-48.
28. Di Marzio, L. ; Russo, F.P. ; D'Alo, S. ; Biordi, L. ; Ulisse, S. ; Amicosante, G. ; De Simone, C. and Cifone, M.G. (2001). Apoptotic effects of selected strains of lactic acid bacteria on a human T leukemia cell line are associated with bacterial arginine deiminase and ⁄or sphingomyelinase activities. Nutr. Cancer, 40: 185-196.
29. Belury, M.A. (2002). Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. J. Nutr., 132: 2995-2998.
30. Lupi, M. ; Matera, G. ; Bbbranduradi, D. ; Dincalci, M. and Ubezio, P. (2004). Cytostatic and cytotoxic effects of topote4can decoded by a novel mathematical simulation aapproach. Cancer Research, 64: 2825-2832.
31. Vidhyalakshmi, R. and Vallinachiyar, C. (2013). Apoptosis of Human Breast Cancer Cell (MCF-7) Induced by Poly saccharides Produced by bacteria. J. Cancer Scither., 5:031-034.
32. Kim, Y. ; Oh, S. ; Moon, Y.I. and Kim, S.H. (2005). Genetics, Metabolism and Applications. In Abstr. 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria.Available at:http://www.lab8.nl/ (abstract no. H-061).