

بررسی اثر سمیت سلولی و روتوکسین نوع ۱ اشرشیاکلی انتروهوموراژیک بر رده‌های سلولی ورو (Vero) و راجی (Raji)

فریده دکترزاده^۱، مرتضی ستاری^{۲*}، زهیرمحمد حسن^۳، مریم زرین‌قلم‌مقدم^۱

۱- کارشناس ارشد، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۱۵

دریافت مقاله: ۸۸/۰۷/۰۶

چکیده

هدف: وروتوکسین یکی از سموم خانواده توکسین‌های شیگا است. این خانواده شامل توکسین‌های پروتئینی AB، یعنی توکسین‌هایی با یک بخش فعال آنزیماتیک (A) و یک بخش باند شونده به سطح سلول (B) است. سلول‌هایی که دارای جایگاه اتصال یعنی گیرنده Gb3 باشند به آثار توکسیک توکسین پاسخ می‌دهد. نشان داده شده است که وروتوکسین نوع ۱ بر انواعی از سلول‌های توموری که گیرنده Gb3 را دارا هستند، اثر آپوپتوتیک داشته و به صورت انتخابی عمل می‌کند. مطالعات زیادی که روی آثار ضد توموری و ضد رگ‌زایی این سم روی رده‌های سلولی سرطانی مختلف در شرایط آزمایشگاهی و حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفته نشان‌دهنده اثر بخشی آن‌ها است.

هدف از این پژوهش مقایسه آثار سمیت سلولی وروتوکسین نوع ۱ انتروهوموراژیک اشرشیاکلی روی دو رده سلولی ورو (استاندارد طلایی برای بررسی آثار سمیت سلولی وروتوکسین) و راجی (رده سلولی به‌دست آمده از کشت سلول‌های لنفوبلاستوئید بیماران مبتلا به لنفوم بورکیت انسانی) است.

مواد و روش‌ها: پس از تهیه مواد، سویه توکسین‌زا و رده‌های سلولی، سویه مورد نظر کشت داده شد و توکسین‌زایی آن با استفاده از روش آگلوتیناسیون پاسیو معکوس تأیید شد. وروتوکسین ۱ با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی تخلیص شد و آن‌گاه اثر سمیت سلولی آن بر روی دو رده سلولی ورو و راجی با استفاده از آزمون MTT بررسی و اندازه‌گیری شد.

نتایج: یافته‌ها نشان داد که وروتوکسین نوع ۱ روی سلول‌های راجی نیز مانند سلول‌های ورو اثر سرکوب‌گری بالایی دارد و این اثر وابسته به غلظت توکسین است و با رقیق شدن سم اثر سرکوب‌گری آن کاهش می‌یابد. بررسی آماری نشان داد که خاصیت سرکوب‌گری سم روی سلول‌های راجی در رقت‌های ۱:۴ تا ۱:۱۲۸ نسبت به خاصیت سرکوب‌گری سم روی سلول‌های ورو دارای اختلاف معنی‌داری است و این اثر روی سلول‌های ورو بیشتر از سلول‌های راجی است ($P < 0/05$). اما این توکسین در رقت‌های بالاتر قادر به سرکوب معنی‌دار نبوده است. **نتیجه‌گیری:** نتایج به‌دست آمده نشان داد که وروتوکسین نوع ۱ روی سلول‌های راجی مانند سلول‌های ورو اثر سرکوب‌گری بالایی دارد و این اثر بر سلول‌های ورو بیشتر از سلول‌های راجی است ($P < 0/05$).

کلیدواژگان: وروتوکسین، انتروهوموراژیک اشرشیاکلی، رده سلولی ورو، رده سلولی راجی، MTT

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶

۱- مقدمه

اشرشیاکلی‌های (*Escherichia coli*) تولید کننده وروتوکسین (Verotoxin) به‌عنوان گروه مهمی از باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای (Enteropathogen) شناخته می‌شود. حداقل ۱۰۰ سروتایپ اشرشیاکلی قادر به تولید وروتوکسین‌ها هستند [۱]. با این وجود از بین این سروتایپ‌ها اشرشیاکلی O157:H7 شناخته شده‌ترین است. این ارگانیزم ابتدا در سال ۱۹۸۲ به دنبال شیوع کولیت خونریزی‌دهنده (Hemorrhagic colitis) در آمریکا شناسایی شد. گمان می‌شود که این توکسین‌ها مسئول تظاهرات اصلی کولیت خونریزی‌دهنده و نشانگان همولیتیک اورمیک (Hemolytic Uremic Synddrome) باشند [۲].

از نظر آنتی‌ژنی دو شکل مجزا از این توکسین (وروتوکسین نوع ۱ و وروتوکسین نوع ۲) وجود دارد. وروتوکسین‌ها متعلق به خانواده توکسین‌های پروتئینی دو جزئی (AB)، یعنی توکسین‌هایی با یک بخش فعال آنزیماتیک (A) و یک بخش باند شونده به سطح سلول (B) است [۳] و در واقع فقط سلول‌هایی که دارای جایگاه اتصالی باشند به توکسین پاسخ می‌دهند. گیرنده وروتوکسین‌ها Gb3 (Globotriaosyl ceramide) است که در سطح سلول‌های B مراکز زاینده به نام CD77 و در سطح سلول‌های خونی به نام آنتی‌ژن pK نامیده می‌شود. یک واریانت توکسین، Stx2e به Gb4 متصل می‌شود [۴، ۵].

سیتوکین‌هایی (Cytokines) مثل اینترلوکین-۱ (Interleukin-1: IL-1) و (Tumor Necrosis Factor) TNF که تولید آن‌ها توسط توکسین یا لیپوپلی‌ساکارید (Lipopolysaccharide: LPS) در طول عفونت تحریک می‌شود، می‌تواند سنتز Gb3 را در انواع مختلفی از سلول‌ها تحریک کند [۵-۷].

به محض اتصال به غشای سلول هدف، مولکول‌های توکسین از طریق مکانیسم اندوسیتوز وابسته به گیرنده وارد سلول می‌شود. وزیکول‌های حاوی توکسین تشکیل شده در بعضی از سلول‌ها با لیزوزوم‌ها ادغام شده و در نتیجه توکسین

تخریب می‌شود. در سلول‌های حساس به دنبال پردازش در دستگاه گلژی و رتیکلوم اندوپلاسمیک، زیرواحد A توسط یک پروتئاز برش خورده و یک قطعه A1 ۲۷ کیلودالتونی فعال کاتالیتیکی و یک زیرواحد ۴ کیلودالتونی ایجاد می‌شود. زیرواحد A1 آزاد شده، فعالیت N-گلیکوزیدازی (N-glycosidase) داشته و باعث غیرفعال‌سازی ریبوزوم می‌شود [۸].

نشان داده شده است که وروتوکسین نوع ۱ روی سلول‌های توموری از جمله سلول‌های سرطان پستان (Human Breast Cancer)، سلول‌های منژیوما بدخیم (Malignant Meningioma)، آستروسیتوما (Astrosytoma)، گلیوما (Glioma) و سلول‌های تومور کلیه انسان (Human Kidney Tumor) که دارای گیرنده Gb3 است، اثر آپپتوتیک (Apoptotic) دارد. بنابراین وروتوکسین‌ها به‌عنوان یکی از مواد سمیت سلولی (Cytotoxic) انتخابی برای درمان انواع تومورها مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است [۹-۱۶، ۱۵، ۱۶].

لنفوم بورکیت (Burkitt's Lymphoma)، نئوپلاسم پیشرفته سلول‌های B است. این لنفوم از بدخیمی‌های دارای سرعت رشد بالا است. بیمارانی که بیماری در آن‌ها منتشر شده مثل بیماران مبتلا به ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS)، به‌خوبی به شیمی‌درمانی پاسخ نمی‌دهند و میزان زنده ماندن آن‌ها کم است. بنابراین کار روی روش‌های درمانی جدید بسیار ضروری و مورد نیاز است [۱۷، ۱۸]. مطالعات مختلفی روی اثر وروتوکسین بر رده‌های مختلف سلول‌های لنفوم بورکیت از جمله Ramos, Daudi, BL41, MutuI, VT500, و MutuIII صورت گرفته است و نشان داده شده است که وروتوکسین روی این رده‌های سلولی اثر سرکوب‌گری قابل توجهی داشته است [۱۹]. با توجه به مطالعات انجام شده و تأیید وجود گیرنده وروتوکسین، رده سرطانی راجی به‌عنوان شاخصی از رده‌های سرطانی لنفوم بورکیت در این پژوهش استفاده شد.

۳۷ درجه سانتی‌گراد با پلی‌میکسین B با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر مجاور شد تا وروتوکسین استخراج شود. در این مرحله با استفاده از کیت VTEC-RPLA، طبق دستورالعمل کارخانه سازنده، تولید وروتوکسین نوع ۱ و عدم تولید وروتوکسین نوع ۲ توسط سویه مورد نظر تأیید شد. محلول حاوی سم با استفاده از آنتی‌پروتئاز فیل متیل سولفونیل فلوراید (Phenylmethanesulphonyl fluoride: PMSF) با غلظت ۳۰ میلی‌مول در هر میلی‌لیتر با فیلتر ۰/۴۵ میکرون (برای حذف هرگونه آلودگی باکتریایی) فیلتر و سپس روی ستون (کروماتوگرافی جذبی) برده شد. اجزای به‌دست آمده از ستون جمع‌آوری، دیالیز و تقسیم و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. خلوص سم با SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate-Polyacrylamide gel electrophoresis) بررسی شد [۱۵].

۲-۳- آزمون تب‌زایی در خرگوش

۳ خرگوش سفید نیوزیلندی با وزن ۲-۲/۵ کیلوگرم انتخاب شد. سپس دمای بدن خرگوش‌ها قبل و بعد از تزریق وریدی کوئزوگه هر ساعت به‌مدت ۵ ساعت با رکومتر (Rectometer) اندازه‌گیری و ثبت شد. چنانچه پس از تزریق، مجموع دماهای ثبت شده یکی از ۳ خرگوش حداقل ۰/۶ درجه سانتی‌گراد افزایش داشته باشد یا چنانچه مجموع دماهای بدن ۳ خرگوش نسبت به قبل از تزریق حداقل ۱/۴ درجه سانتی‌گراد افزایش نشان دهد، آزمون تب‌زایی مثبت تلقی می‌شود [۲۰].

۲-۴- کشت سلول

کشت سلول با استفاده از منابع [۲۱، ۲۲] انجام پذیرفت. به‌طور خلاصه، سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco) دارای ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma)، ۲۰۰ میکرومول در هر لیتر L-گلوتامین (L-glutamine) و نیز پنی‌سیلین (Penicillin) و استرپتومایسین

از آن‌جا که استاندارد طلایی برای بررسی آثار سمیت سلولی وروتوکسین بررسی این اثر روی سلول‌های ورو (سلول‌های کلیه میمون سبز آفریقایی) است، هدف این پژوهش بررسی آثار سمیت سلولی وروتوکسین نوع ۱ روی رده سلولی راجی (رده سلولی به‌دست آمده از کشت سلول‌های لنفوبلاستوئید (Lymphoblastoid) بیماران مبتلا به لنفوم بورکیت انسانی در مقایسه با سلول‌های ورو است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مواد، باکتری و رده‌های سلولی

سویه باکتری تولید کننده سم وروتوکسین (PA101) یک سویه جدا شده از بیمار بدون علامت و سالم شناسایی شده به‌عنوان اشرشیاکلی وروتوکسیژنی دارای سروتایپ non O157 بود که فقط سم وروتوکسین نوع ۱ را تولید می‌کرد و از بخش میکروبی‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس گرفته شد [۱۸]. برای بررسی وجود، تعیین تیپ و تیتراسیون وروتوکسین نوع ۱ کیت سرولوژیک آگلوتیناسیون پاسیو معکوس VTEC-RPLA (Denka-seiken Co, Japan) (Reverse Passive Agglutination) استفاده شد. محیط کشت تریپتیکس سوی برات (Trypticase Soy Broth: TSB) و پلی‌میکسین B (Polymyxin B) (Sigma)، سلیت ۵۴۵ (Celite 545) خشک و (Sigma) Gb3 برای تولید و استخراج و تخلیص سم استفاده شد. رده‌های سلولی شامل رده سلول ورو از مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی و سلول راجی از انستیتو پاستور ایران (NCBI C124) تهیه شد.

۲-۲- تولید و تخلیص وروتوکسین

سویه مورد نظر در محیط TSB و در انکوباتور شیکردار (Shaker incubator) ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. محیط کشت سانتریفوژ شده و کلونی‌ها با بافر فسفات شستشو داده شد. سپس به‌مدت نیم ساعت در

(Dimethyl Sulphoxide: DMSO) حل شده و جذب نوری (Optical Density: OD) در ۵۴۰ نانومتر محاسبه شد و در مقایسه با OD کنترل منفی (بدون تیمار)، شاخص تحریک (Stimulation Index: SI) محاسبه شد. به عنوان کنترل منفی، سلول‌ها تنها محیط کامل دریافت نمودند (هیچ گونه توکسینی به این حفرات اضافه نشد). آزمایش به صورت سه تایی انجام شد [۱۶، ۲۱، ۲۲].

۲-۶- بررسی آماری

برای نشان دادن اثر سم بر دو رده سلولی ورو و راجی، آزمون MTT پنج بار به صورت مجزا انجام شد. SI محاسبه شد و میانگین آن به دست آمد. برای بررسی نتایج از نرم افزار SPSS و از آزمون آماری آنالیز واریانس توکی (Tukey) استفاده شد. حدود اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شده است و مبنای معنی دار بودن اختلافات $P < 0/05$ است.

۳- نتایج

یافته‌ها نشان داد که وروتوکسین بر سلول‌های راجی و ورو اثر سرکوب‌گری دارد. تظاهرات مرگ سلولی از جمله جدا شدن از بستر در مورد سلول‌های ورو، چروکیده شدن و چگال شدن کروماتین (شکل ۱ و ۲) بعد از تیمار سلول‌ها با سم مشاهده شد. همچنین نشان داده شد که این اثر وابسته به غلظت توکسین است (نمودار ۱). در حقیقت کیتیک رفتار توکسین در مجاورت سلول به گونه‌ای است که با رقیق شدن سم، اثر سرکوب‌گری آن کاهش می‌یابد. این توکسین حداکثر سرکوب‌گری را در رقت ۱:۲ از خود نشان داده است.

بررسی آماری نشان می‌دهد که خاصیت سرکوب‌گری سم بر سلول‌های راجی در رقت‌های ۱:۴ تا ۱:۲۸ نسبت به خاصیت سرکوب‌گری سم بر سلول‌های ورو دارای اختلاف معنی‌داری است ($P < 0/05$)؛ اما این توکسین در رقت‌های بالاتر قادر به اختلاف سرکوب‌گری معنی‌دار نبوده است. مقایسه شدت

(Streptomycin) (داروسازی جابربن حیان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد CO_2 کشت داده شد.

۲-۵- بررسی اثر سم روی سلول‌ها با استفاده از

روش سنجش MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-

2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)

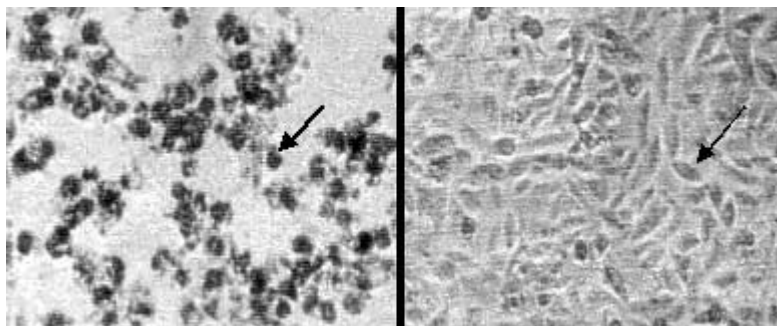
برای بررسی اثر سمیت سلولی، سم روی سلول‌ها و تعیین تعداد سلول‌های زنده باقیمانده از روش سنجش MTT (Sigma) استفاده شد. این آزمون براساس احیای MTT، به نمک‌های رنگی فورمازان (Formazan) به کمک آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است [۲۲].

برای تلقیح در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای از هر یک از رده‌های سلولی، 2×10^4 سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه و در هر چاهک ریخته شد. سوسپانسیون فوق در محیط RPMI-1640 (Gibco) دارای ۱۰ درصد FBS تهیه شد و در شرایط ۵ درصد CO_2 و به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای توزیع یکنواخت سلول‌ها در کف چاهک هنگام پاساژ اولیه پلیت‌ها به مدت ۵ دقیقه به آرامی روی شیکر (Shaker) با سرعت ۴۰ دور در دقیقه چرخانده شد.

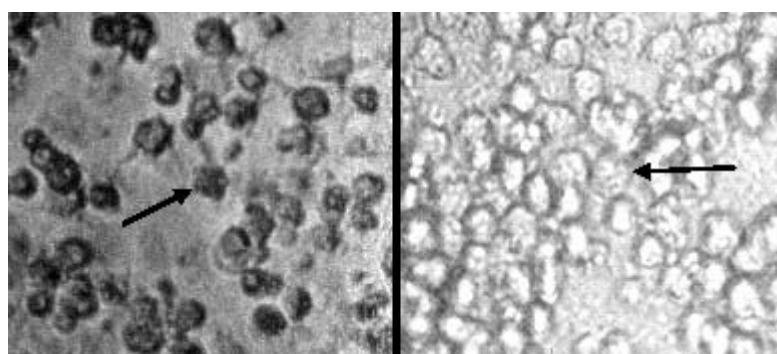
از غلظت ۳۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر سم، رقت‌های ۱:۲۵۶، ۱:۱۲۸، ۱:۶۴، ۱:۳۲، ۱:۱۶، ۱:۸، ۱:۴، ۱:۲ و به ترتیب برابر با ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ نانوگرم در میلی‌لیتر محیط کشت، تهیه و به هر حفره اضافه شد و ۹۶ ساعت در شرایط ۵ درصد CO_2 و ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از ۹۶ ساعت، ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور دارای CO_2 ۵ درصد و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از تخلیه محیط، رسوب (MTT) در سلول‌های زنده به کریستال‌های فورمازان تبدیل می‌شود) حاصل با ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفوکساید

از نظر شدت سرکوب‌گری وجود ندارد. اما در رقت ۱:۴ تا ۱:۱۲۸ شدت سرکوب‌گری توکسین بر رده سلولی ورو شدیدتر از رده سلولی راجی بوده است ($P < 0.05$).

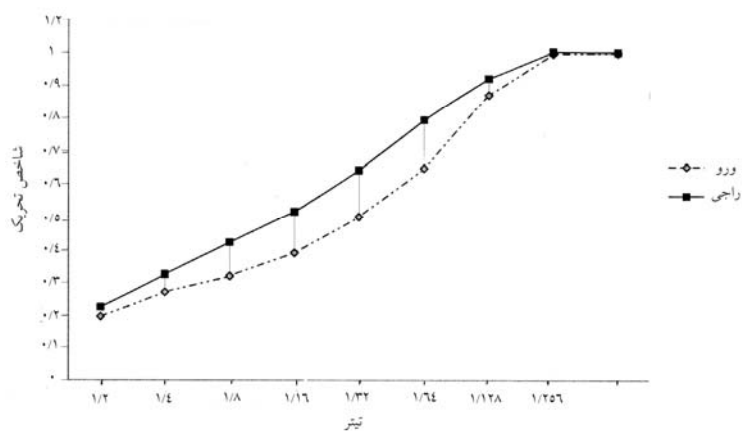
سرکوب‌گری نشان داده است که ظاهراً شدت سرکوب‌گری سم بر سلول‌های ورو شدیدتر بوده است. بررسی‌های آماری نشان داده است که در رقت ۱:۲ بین گروه ورو و راجی اختلاف معنی‌داری



شکل ۱ راست: سلول‌های ورو قبل از تیمار با وروتوکسین (سلول‌ها کاملاً دوکی شکل هستند و به بستر فلاسک چسبیده‌اند)، چپ: آثار آسیب سلولی (Cytopathic) مشاهده شده در سلول‌های ورو (از جمله گرد شدن سلول‌ها، جدا شدن از بستر، پروکیدگی هسته و چگال شدن کروماتین) بعد از تیمار با وروتوکسین؛ بزرگنمایی $\times 100$



شکل ۲ راست: سلول‌های راجی قبل از تیمار با وروتوکسین (سلول‌های گرد شناور در محیط کشت)، چپ: آثار آسیب سلولی مشاهده شده در سلول‌های راجی (پروکیدگی هسته و چگال شدن کروماتین) بعد از تیمار با وروتوکسین؛ بزرگنمایی $\times 100$



نمودار ۱ مقایسه اثر وروتوکسین نوع ۱ بر سلول‌های راجی و ورو

۴- بحث

وروتوکسین نوع ۱ از سموم غیرفعال‌کننده ریبوزوم‌های یوکاریوتی است و سبب مرگ سلول‌هایی می‌شود که در سطح خود دارای گیرنده Gb3 یا CD77 هستند. ساتوشی (Satoshi) و همکاران در سال ۲۰۰۴ با مطالعه روی سلول‌های کارسینومای کبدی (ACHN، A-104، CAKI-1، AKI-2)، سرطان پروستات (PC3، LNCap) و تومور تستیکولار (Testicular Tumor) (2102EP) و مجاورت آن‌ها با مقادیر مختلفی از وروتوکسین نوع ۱ نشان دادند که رشد سلول‌های ACHN، CAKI-1، A-104، 2102EP و LNCap به میزان قابل توجهی با انکوباسیون همزمان با وروتوکسین نوع ۱ مهار می‌شود [۲۳]. سالهیا (Salhia) و همکاران در سال ۲۰۰۲ از یک مدل گزینگرافت ارتوتوپیک (Orthotopic Xenograft Model) منژیومای بدخیم برای بررسی اثر درمان وروتوکسین نوع ۱ استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که یک تزریق داخل توموری وروتوکسین نوع ۱ به میزان زیادی باعث زنده ماندن موش‌هایی می‌شود که دارای تومورهای داخل جمجمه‌ای هستند. کاهش در شبکه عروقی تومور، افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) در تومور و کاهش تکثیر سلولی، از نتایج دیگر تحقیق سالهیا و همکاران بود [۱۱]. در پژوهش حاضر برای بررسی اثر وروتوکسین تخلیص شده روی سلول‌ها از دو رده سلولی ورو و راجی استفاده شد. از سلول‌های ورو به‌عنوان استاندارد طلایی برای بررسی اثر وروتوکسین استفاده می‌شود. سلول راجی سلولی است که از کشت سلول‌های لنفوبلاستوئید بیماران مبتلا به لنفوم بورکیت به‌دست آمده است.

لنفوم بورکیت، نئوپلاسم پیشرفته سلول‌های B است. این لنفوم از بدخیمی‌هایی است که سرعت رشد بالایی دارد. لنفوم بورکیت یکی از سرطان‌هایی است که تلاش‌های زیادی برای یافتن راهی برای درمان آن با استفاده از ایمونوتوکسین‌ها در حال انجام است.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد، با وجود آن‌که حساسیت سلول‌های ورو که به‌عنوان استاندارد طلایی برای بررسی آثار سمیت سلولی وروتوکسین استفاده می‌شوند نسبت به وروتوکسین بیش از سلول‌های راجی است، اثر سرکوب‌گری وروتوکسین بر سلول‌های راجی بالاست و تا حد زیادی به اثر سم روی سلول‌های ورو که به‌عنوان کنترل استفاده شده‌اند، نزدیک است.

به‌نظر می‌رسد مکانیسم اثر وروتوکسین نوع ۱ در حذف تومورها، در اثر القای مرگ برنامه‌ریزی شده باشد.

تاگا (Taga) و همکاران در سال ۱۹۹۷ به بررسی مسیر هدایت انتقالی (Signal transduction) منتهی به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده پرداختند. نتایج نشان داد که اتصال زیرواحد B نوترکیب سم به CD77 باعث افزایش غلظت Ca^{2+} داخل سلولی از طریق ریزش Ca^{2+} خارج سلولی توسط کانال‌های کلسیم می‌شود. همچنین نشان داده شد که شلاته کردن Ca^{2+} خارج سلولی با EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) به‌طور نسبی مانع مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ناشی از تحریک CD77 می‌شود و این فرایند احتمالاً وابسته به Ca^{2+} است [۲۴].

تاتو (Tetaud) و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ناشی از وروتوکسین نوع ۱ شامل فعال شدن آبشار و دپولاریزاسیون میتوکندری است.

یافته‌های ریخت‌شناختی (Morphology) مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از جمله چروکیدگی هسته و فشردگی کروماتین، حدود ۱/۵ ساعت پس از مجاورت سلول‌های توموری با توکسین پدید می‌آید، یعنی سریع‌تر از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی توسط سایر داروهای ضد سرطان که یکی از مزایای این سم است [۲۴، ۲۵].

تومورهایی که در مقابل آثار درمانی داروهای ضد سرطان مقاوم‌ت نشان می‌دهند به‌علت بیان ژن BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) است که از مرگ برنامه‌ریزی شده جلوگیری می‌کند، اما از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در اثر

نیز اثر ضد توموری و ضد رگ‌زایی همراه ایمونوژنیسیته پایین وروتوکسین نوع ۱ و افزایش حساسیت سلول‌های توموری مقاوم به دارو نسبت به وروتوکسین، سبب شده است تا وروتوکسین به‌عنوان داروی ضد سرطان مورد توجه قرار گیرد [۲۸].

۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که حمایت مالی این طرح را در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد بر عهده داشته است، تقدیر و تشکر می‌شود.

وروتوکسین نوع ۱ با بیان این ژن ممانعت نمی‌شود. زیرواحد B توکسین مستقل از زیرواحد A قادر به القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. در واقع کنترل متعادل تعداد سلول‌ها در نتیجه تعادل بین تکثیر و مرگ سلول است. هولوتوکسین وروتوکسین نوع ۱ روی هر دو طرف این معادله اثر می‌گذارد. به بیان دیگر با توقف سنتز پروتئین، زیرواحد A از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند و از طرف دیگر مرگ سلولی را از طریق القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی توسط زیرواحد B افزایش می‌دهد [۲۶، ۲۷].

با توجه به اهمیت ویژه اتخاذ روش‌های درمانی جدید در درمان تومورهای بدخیمی که به درمان دارویی پاسخ نمی‌دهد و

۶- منابع

- [1] Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(1): 142-201.
- [2] Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 1983; 308(12): 681-5.
- [3] Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J Appl Microbiol* 2000; 88(5): 729-45.
- [4] Sandvig K. Shiga toxins. *Toxicon* 2001; 39(11): 1629-35.
- [5] Sandvig K, van Deurs B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev* 1996; 76(4): 949-66.
- [6] Meyers KE, Kaplan BS. Many cell types are Shiga toxin targets. *kidney Int* 2000; 57(6): 2650-1.
- [7] Shin IS, Ishii S, Shin JS, Sung K, Park BS, Jang HY, Kim BW. Globotriaosylceramide (Gb3) content in HeLa cells is correlated to Shiga toxin-induced cytotoxicity and Gb3 synthase expression. *BMB reports* 2009; 42(5): 310-314.
- [8] McKenzie J, Johannes L, Taguchi T, Sheff D. Passage through the Golgi is necessary for Shiga toxin B subunit to reach the endoplasmic reticulum. *FEBS J* 2009; 276(6): 1581-95.
- [9] Mori T, Kiyokawa N, Katagiri YU, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Sato N, Ohmi K, Nakajima H, Takeda T, Fujimoto J. Globotriaosyl ceramide (CD77/Gb3) in the glycolipid-enriched membrane domain participates in B-cell receptor-mediated apoptosis by regulating lyn kinase activity in human B cells *Exp Hematol* 2000; 28(11): 1260-8.
- [10] Brown CJ. Bacterial toxin kills most common form of Brain cancer. *Canad Med Assoc J* 1999; 161(5): 481.

- [11] Salhia B, Rutka JT, Lingwood C, Nutikka A, Van Furth WR. The treatment of malignant meningioma with verotoxin. *Neoplasia* 2002; 4(4): 304-11.
- [12] Distler U, Souady J, Hülsewig M, Drmić-Hofman I, Haier J, Friedrich AW, Karch H, Senninger N, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Schmidt MA, Peter-Katalinić J, Müthing J. Shiga toxin receptor Gb3Cer/CD77: tumor-association and promising therapeutic target in pancreas and colon cancer. *PLoS One* 2009; 4(8): e6813.
- [13] Johansson D, Johansson A, Grankvist K, Andersson U, Henriksson R, Bergström P, Brännström T, Behnam-Motlagh P. Verotoxin-1 induction of apoptosis in Gb3-expressing human glioma cell lines. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(9): 1211-7.
- [14] Johansson D, Kosovac E, Moharer J, Ljuslinder I, Brännström T, Johansson A, Behnam-Motlagh P. Expression of verotoxin-1 receptor Gb3 in breast cancer tissue and verotoxin-1 signal transduction to apoptosis. *BMC Cancer* 2009; 9:67.
- [15] Sattari M, Allameh AA, Hassan ZM, Hosein Zadegan H. Comparative study of cytotoxic effect of verotoxin 1 on Vero and MCF-7 cells. *Hakim* 2005; 8(2): 41-46. (Persian)
- [16] Menge C, Wieler LH, Schlapp T, Baljer G. Shiga toxin 1 from *Escherichia coli* blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations in vitro. *Infect Immun* 1999; 67(5): 2209-17.
- [17] De Boer JD, Boellaard TN, Parkinson S, Blanchard E, Heij HA. Patient compliance in the treatment of Burkitt's lymphoma in rural Zambia: a retrospective study on 80 Burkitt's lymphoma patients in Katete, Zambia. *Afr J Paediatr Surg* 2009; 6(1): 3-6.
- [18] Ferry JA. Burkitt's lymphoma: clinico-pathologic features and differential diagnosis. *Oncologist* 2006; 11(4): 375-83.
- [19] Mangeney M, Lingwood CA, Taga S, Caillou B, Tursz T, Wiels J. Apoptosis induced in Burkitt's lymphoma cells via Gb3/CD77, a glycolipid antigen. *Cancer Res* 1993; 53(21): 5314-9.
- [20] Kashef N, Behzadian-Nejad Q, Najari-Peerayeh S, Mousavi-Hosseini K, Moazzeni M, Djavid GE. Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-tetanus toxoid conjugate. *J Med Microbiol* 2006; 55(Pt 10): 1441-6.
- [21] Freshney RI. Culture of animal cells. New York, John Wiley and sons 1996; 189-298.
- [22] Doyle A, Griffiths JB. Cell and tissue culture laboratory producers in biotechnology. Chichester, John Wiley and sons 1998; 62-3.
- [23] Ishitoya S, Kurazono H, Nishiyama H, Nakamura E, Kamoto T, Habuchi T, Terai A, Ogawa O, Yamamoto S. Verotoxin induces rapid elimination of human renal tumor xenografts in SCID mice. *J Urol* 2004; 171(3): 1309-13.
- [24] Taga S, Carlier K, Mishal Z, Capoulade C, Mangeney M, Lécluse Y, Coulaud D, Tétaud C, Pritchard LL, Tursz T, Wiels J. Intracellular signaling events in CD77-mediated apoptosis of Burkitt's lymphoma cells. *Blood* 1997; 90(7): 2757-67.
- [25] Tétaud C, Falguières T, Carlier K, Lécluse Y, Garibal J, Coulaud D, Busson P, Steffensen R, Clausen H, Johannes L, Wiels J. Two distinct

- Gb3/CD77 signaling pathways leading to apoptosis are triggered by anti-Gb3/CD77 mAb and verotoxin-1. *J Biol Chem* 2003; 278(46): 45200-8.
- [26] Ergonul Z, Hughes AK, Kohan DE. Induction of apoptosis of human brain microvascular endothelial cells by shiga toxin 1. *J Infect Dis* 2003; 187(1): 154-8.
- [27] Fujii J, Matsui T, Heatherly DP, Schlegel KH, Lobo PI, Yutsudo T, Ciraolo GM, Morris RE, Obrig T. Rapid apoptosis induced by Shiga toxin in HeLa cells. *Infect Immun* 2003; 71(5): 2724-35.
- [28] Gariépy J. The use of Shiga-like toxin 1 in cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; 39(1-2): 99-106.