

## بررسی اثر سمیت سلولی وروتوکسین نوع ۱ اشرشیاکلی انتروهموراژیک بردهای سلولی ورو (Vero) و راجی (Raji)

فریده دکترزاده<sup>۱</sup>، مرتضی ستاری<sup>۲\*</sup>، زهیر محمد حسن<sup>۳</sup>، مریم ذرین قلم مقدم<sup>۱</sup>

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 سوم 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 اتصالی یعنی گیرنده Gb3 باشند به آثار توکسیک توکسین پاسخ می‌دهند. نشان داده شده است که وروتوکسین نوع ۱ بر انواعی از سلول‌های توموری که گیرنده Gb3 را دارا هستند، اثر آپوتوتیک داشته و به صورت انتخابی عمل می‌کند. مطالعات زیادی که روی آثار ضد توموری و ضد رگزایی این سم روی رده‌های سلولی سلطانی 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 انتروهموراژیک اشرشیاکلی روی دو رده سلولی ورو (استاندارد طلایی برای بررسی آثار سمیت سلولی وروتوکسین) و راجی (رده سلولی به دست 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 ۱:۲۸ نسبت به خاصیت سرکوب‌گری سم روی سلول‌های ورو دارای اختلاف معنی داری است و این اثر روی سلول‌های ورو بیشتر از سلول‌های راجی است ( $P < 0.05$ ). اما این توکسین در رقت‌های بالاتر قادر به سرکوب معنی دار نبوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست 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، انتروهموراژیک اشرشیاکلی، رده سلولی ورو، رده سلولی راجی، MTT

\*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری‌شناسی پزشکی، کد پستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶

Email: sattarim@modares.ac.ir

تخربی می شود. در سلول های حساس به دنبال پردازش در دستگاه گلزاری و رتیکلوم اندوپلاسمیک، زیر واحد A تو سط یک پروتئاز برش خورده و یک قطعه A1 ۲۷ کیلو Daltonی فعال کاتالیتیکی و یک زیر واحد ۴ کیلو Daltonی ایجاد می شود. زیر واحد A1 آزاد شده، فعالیت N-گلیکوزیدازی داشته و باعث غیرفعال سازی ریبوزوم می شود [۸].

نشان داده شده است که وروتوکسین نوع ۱ روی سلول های توموری از جمله سلول های سرطان پستان (Human Breast Cancer)، سلول های متزیومی بدخیم (Astrosytoma)، آستروسیتوما (Malignant Meningioma) گلیوما (Glioma) و سلول های تومور کلیه انسان (Human Kidney Tumor) که دارای گیرنده Gb3 است، اثر آپوپوتیک (Apoptotic) دارد. بنابراین وروتوکسین ها به عنوان یکی از مواد سمیت سلولی (Cytotoxic) انتخابی برای درمان انواع تومورها مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است [۱۶، ۱۵، ۹-۱۴].

لنفوم بورکیت (Burkitt's Lymphoma)، نئوپلاسم پیشرفتی سلول های B است. این لنفوم از بدخیمی های دارای سرعت رشد بالا است. بیمارانی که بیماری در آن ها منتشر شده (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) به خوبی به شیمی درمانی پاسخ نمی دهند و میزان زندگانی آن ها کم است. بنابراین کار روی روش های درمانی جدید بسیار ضروری و مورد نیاز است [۱۷، ۱۸]. مطالعات مختلف روی اثر وروتوکسین بر رده های مختلف سلول های لنفوم بورکیت از جمله BL41، Daudi، Ramos، VT500، MutuI، MutuIII و MutuII صورت گرفته است و نشان داده است که وروتوکسین روی این رده های سلولی اثر سرکوب گری قابل توجهی داشته است [۱۹]. با توجه به مطالعات انجام شده و تأیید وجود گیرنده وروتوکسین، رده سرطانی راجی به عنوان شاخصی از رده های سرطانی لنفوم بورکیت در این پژوهش استفاده شد.

## ۱- مقدمه

اشرشیاکلی های (*Escherichia coli*) تولید کننده وروتوکسین (Verotoxin) به عنوان گروه مهمی از باکتری های بیماری زای روده ای (Enteropathogen) شناخته می شود. حداقل ۱۰۰ سروتاپ اشرشیاکلی قادر به تولید وروتوکسین ها هستند [۱]. با این وجود از بین این سروتاپ ها اشرشیاکلی O157:H7 شناخته شده ترین است. این ارگانیسم ابتدا در سال ۱۹۸۲ به دنبال شیوع کولیت خونریزی دهنده (Hemorrhagic colitis) در آمریکا شناسایی شد. گمان می شود که این توکسین ها مسئول تظاهرات اصلی کولیت خونریزی دهنده و نشانگان همولیتیک اورمیک (Hemolytic Uremic Syndrome) باشند [۲].

از نظر آنتی زنی دو شکل مجزا از این توکسین (وروتوکسین نوع ۱ و وروتوکسین نوع ۲) وجود دارد. وروتوکسین ها متعلق به خانواده توکسین های پروتئینی دو جزئی (AB)، یعنی توکسین هایی با یک بخش فعال آنزیماتیک (A) و یک بخش باند شونده به سطح سلول (B) است [۳] و در واقع فقط سلول هایی که دارای جایگاه اتصالی باشند به توکسین پاسخ می دهند. گیرنده وروتوکسین ها Gb3 (Globotriaosyl ceramide) است که در سطح سلول های B مراکز زاینده به نام CD77 و در سطح سلول های خونی به نام آنتی زن pK نامیده می شود. یک واریانت توکسین، Stx2e به Gb4 متصل می شود [۴، ۵].

سیتوكین هایی (Cytokines) مثل ایتلرلوکین-1 (Tumor Necrosis Factor: TNF) و (Interleukin-1: IL-1) که تولید آن ها توسط توکسین یا لیپوپلی ساکارید (Lipopolysaccharide: LPS) در طول عفونت تحریک می شود، می توانند ستر Gb3 را در انواع مختلفی از سلول ها تحریک کند [۷-۵].

به محض اتصال به غشای سلول هدف، مولکول های توکسین از طریق مکانیسم اندوسیتوز وابسته به گیرنده وارد سلول می شود. وزیکول های حاوی توکسین تشکیل شده در بعضی از سلول ها با لیزو زوم ها ادغام شده و در نتیجه توکسین

۳۷ درجه سانتی گراد با پایی میکسین B با غلظت  $0/3$  میلی گرم در هر میلی لیتر 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 آنتی پروتئاز فنیل متیل سولفونیل فلوراید (Phenylmethanesulphonyl fluoride: PMSF) با غلظت  $30$  میلی مول در هر میلی لیتر با فیلتر  $0/45$  میکرون (برای حذف هرگونه آلودگی باکتریایی) فیلتر و سپس روی ستنون (کروماتوگرافی جذبی) برده شد. اجزای به دست آمده از ستنون جمع آوری، دیالیز و تقسیم و در  $-20$ - درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. خلوص سم با SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate-Polyacrylamide gel electrophoresis) بررسی شد [۱۵].

### ۳-۲ آزمون تبزایی در خرگوش

۳ خرگوش سفید نیوزیلندری با وزن  $2/5-2$  کیلوگرم انتخاب شد. سپس دمای بدن خرگوش‌ها قبل و بعد از تزریق وریدی کوتیزون‌گه هر ساعت به مدت  $5$  ساعت با رکتومتر (Rectometer) (اندازه‌گیری و ثبت شد. چنان‌چه پس از تزریق، مجموع دماهای ثبت شده یکی از  $3$  خرگوش حداقل  $0/6$  درجه سانتی گراد افزایش داشته باشد یا چنان‌چه مجموع دماهای بدن  $3$  خرگوش نسبت به قبل از تزریق حداقل  $1/4$  درجه سانتی گراد افزایش نشان دهد، آزمون تبزایی مثبت تلقی می‌شود [۲۰].

### ۴-۲ کشت سلول

کشت سلول با استفاده از منابع [۲۱، ۲۲] انجام پذیرفت. به طور خلاصه، سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (Fetal Bovine Serum) FBS (Gibco) (دارای  $10$  درصد L-گلوتامین)،  $200$  میکرومول در هر لیتر (Sigma) و نیز پنی‌سیلین (Penicillin) و استرپتومایسین (L-glutamine)

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 به دست آمده از کشت سلول‌های لنفوبلاستوئید (Lymphoblastoid) (بیماران مبتلا به لنفوم بورکیت انسانی در مقایسه با سلول‌های ورو است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱-۲ 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 به عنوان اشرشیاکلی وروتوکسیژنی دارای سروتاپ non O157 بود که فقط سم وروتوکسین نوع ۱ را تولید می‌کرد و از بخش میکروب‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس گرفته شد [۱۸]. برای بررسی وجود، تعیین تیپ و تیتراسیون وروتوکسین نوع ۱ کیت سرولوژیک آگلوتیناسیون پاسیو معکوس (Denka-seiken Co, Japan) (Reverse Passive Agglutination) استفاده شد. محیط کشت تریپتیکس سوی براث B (Trypticase Soy Broth: TSB) و پایی میکسین B (Celite 545 Sigma) (Polymyxin B) خشک (Sigma) Gb3 و (Sigma) 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 انسیتیو پاستور ایران (NCBI C124) تهیه شد.

### ۲-۲ تولید و تخلیص وروتوکسین

سویه مورد نظر در محیط TSB و در انکوباتور شیکردار (Shaker incubator)  $37$  درجه سانتی گراد به مدت  $24$  ساعت کشت داده شد. محیط کشت ساتریفوژ شده و کلونی‌ها با بافر فسفات شستشو داده شد. سپس به مدت 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 سه‌تایی انجام شد [۲۱، ۲۲، ۱۶].

## ۶-۲- 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 نرم‌افزار 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 ورو توکسین 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 حداقل 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 ۱:۱۲۸ نسبت به خاصیت سرکوب‌گری سم بر سلول‌های ورو دارای اختلاف معنی داری است ( $P < 0.05$ )؛ اما این توکسین در رقت‌های بالاتر قادر به اختلاف سرکوب‌گری معنی دار نبوده است. مقایسه شدت

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

## ۵-۲- بررسی اثر سم روی سلول‌ها با استفاده از روش سنجش (3-(4,5-Dimethylthiazol- MTT 2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)

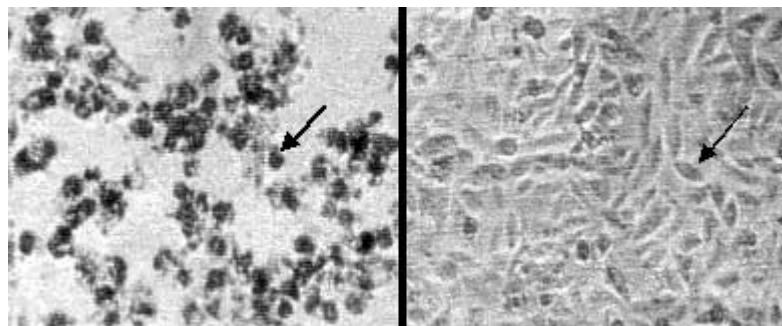
برای بررسی اثر سمیت سلولی، سم روی سلول‌ها و تعیین تعداد سلول‌های زنده با قیمانده از روش سنجش MTT (Sigma) استفاده شد. این آزمون براساس احیای MTT، به نمک‌های رنگی فورمازان (Formazan) (به کمک آنزیمهای دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است [۲۲].

برای تلقیح در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای از هریک از رده‌های سلولی،  $2 \times 10^4$  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 پاساز اولیه پلیت‌ها به مدت ۵ دقیقه به آرامی روی شیکر (Shaker) با سرعت ۴۰ دور در دقیقه چرخانده شد.

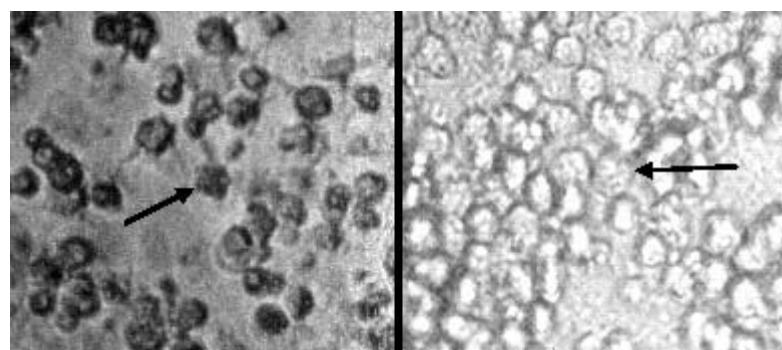
از غلاظت ۳۲۰ نانوگرم در میلی لیتر سم، رقت‌های ۱:۲۵۶، ۱:۱۲۸، ۱:۶۴، ۱:۳۲، ۱:۱۶، ۱:۸، ۱:۴ و ۱:۲ به ترتیب برابر با ۱/۲۵، ۱/۰۵، ۱/۰۵، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ نانوگرم در میلی لیتر محیط کشت، تهیه و به هر حفره اضافه شد و ۹۶ ساعت در شرایط ۵ درصد  $CO_2$  و ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از ۹۶ ساعت، ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی گرم در هر میلی لیتر) به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور دارای 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 برد و سلولی ورو شدیدتر از رده سلولی راجح بوده است (P<0.05).

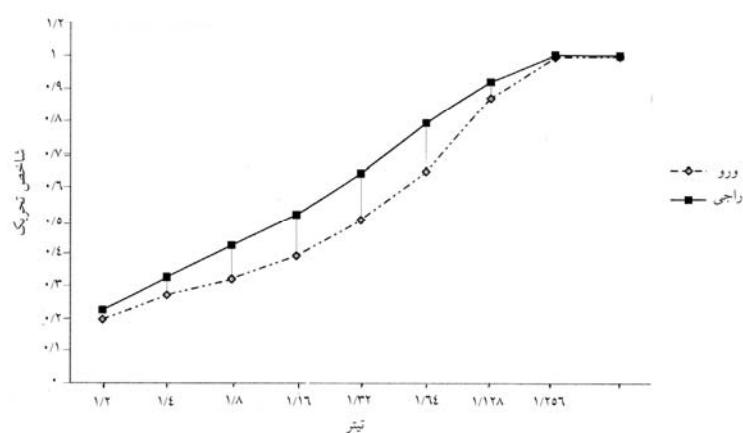
سرکوب‌گری نشان داده است که ظاهراً شدت سرکوب‌گری سم بر سلول‌های ورو شدیدتر بوده است. بررسی‌های آماری نشان داده است که در رقت ۱:۲ بین گروه ورو و راجح اختلاف معنی‌داری



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، چروکیدگی هسته و چگال شدن کروماتین) بعد از تیمار با وروتوکسین؛ بزرگنمایی  $\times 100$



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



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

## ۴- بحث

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

به نظر می‌رسد مکانیسم اثر ورو توکسین نوع ۱ در حافظه تومورها، در اثر القای مرگ برنامه‌ریزی شده باشد.

تاگا (Taga) و همکاران در سال ۱۹۹۷ به بررسی مسیر هدایت انتقالی (Signal transduction) (متنه‌ی 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 کاتالیز کلیسم می‌شود. همچنین نشان داده شد که شلاته کردن  $Ca^{2+}$  خارج (Ethylenediaminetetraacetic acid) EDTA سلولی با  $Ca^{2+}$  می‌شود و این فرایند احتمالاً وابسته به است [۲۴].

تاتو (Tetaud) و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ناشی از ورو توکسین نوع ۱ شامل فعال شدن آبشار و دپلاریزاسیون 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 [۲۵، ۲۶].

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

ورو توکسین نوع ۱ از سموم غیرفعال‌کننده ریوزوم‌های یوکاربیوتی 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 (AKI-1، CAKI-1، A-104، ACHN)، سرطان پروستات (PC3، LNcap) و تومور تستیکولار (2102EP) (Testicular Tumor) و مجاورت آن‌ها با مقادیر مختلفی از ورو توکسین نوع ۱ نشان دادند که رشد سلول‌های قابل توجهی با انکوباسیون همزمان با ورو توکسین نوع ۱ مهار می‌شود [۲۳]. سالهیا (Salhia) و همکاران در سال ۲۰۰۲ از یک مدل گزنوگرافت ارتوتوپیک (Orthotopic Xenograft Model) منتزیومای بدخیم برای بررسی اثر درمان ورو توکسین نوع ۱ استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که یک تزریق داخل توموری ورو توکسین نوع ۱ به میزان زیادی باعث زنده ماندن موسهایی 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 ورو توکسین تخلیص شده روی سلول‌ها از دو رده سلولی ورو و راجی استفاده شد. از سلول‌های ورو به عنوان استاندارد طلایی برای بررسی اثر ورو توکسین استفاده می‌شود. سلول راجی سلولی است که از کشت سلول‌های لنفوبلاستوئید بیماران مبتلا به لنفوم بورکیت به دست 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 ایمونوتوكسین‌ها در حال انجام است.

نیز اثر ضد توموری و ضد رگزایی همراه ایمونوژنیته پایین وروتوکسین نوع ۱ و افزایش حساسیت سلول‌های توموری مقاوم به دارو نسبت به وروتوکسین، سبب شده است تا وروتوکسین به عنوان 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 معانعت نمی‌شود. زیرا واحد B توکسین مستقل از زیرواحد A قادر به القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. در واقع کترل متعادل تعداد سلول‌ها در نتیجه تعادل بین تکثیر و مرگ سلولی است. هولوتوكسین 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 [۲۷، ۲۶].

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: clinicopathologic 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, Najar-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.