ARID Journals

ARID International Journal for Science and Technology (AIJST)

ISSN: 2662-009X

Journal home page: <http://arid.my/j/aijst>

ARID

International Journal for Science and Technology
مجلة أريد الدولية للعلوم والتكنولوجياVOL. 4 NO. 8 December 2021
ISSN: 2662-009X

مجلة أريد الدولية للعلوم والتكنولوجيا

العدد 8 ، المجلد 4 ، كانون الأول 2021 م

Histopathological study for transplanted Murine adenocarcinoma (AM3) treated by colicins extracted from *Escherichia coli*. (II)

Hind Hussein Obaid ^{1*} Nahiy Yousif Yaseen ² Rajwa Hassan Essa ³¹Dept. of Biology/ College of Science /Baghdad University / Baghdad / Iraq.² Ministry of Higher Education and Scientific Research / Baghdad / Iraq.³ Dept. of Biology/ College of Science/ Al-Mustansyria University / Baghdad / Iraq.

دراسة نسيجية مرضية في خط خلايا سرطانة الغدة اللبنية الفأرية (AM3) المعالجة بالكوليسينات المستخلصة من بكتيريا *Escherichia coli* (الجزء الثاني)

هند حسين عبيد ^{1*} ناهي يوسف ياسين ² رجوة حسن عيسى ³¹ قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بغداد/ بغداد / العراق.²وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – بغداد – العراق³ قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية/ بغداد/ العراق.Hind_3000@yahoo.com<https://arid.my/0003-5731><https://doi.org/10.36772/arid.aijst.2021.490>

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28/07/2021

Received in revised form 24/09/2021

Accepted 28/11/2021

Available online 15/12/2021

<https://doi.org/10.36772/arid.aijst.2021.490>

Abstract

This study investigated the therapeutic effect of four types of colicins (H5, H9, H13 and H19) extracted from *E. coli* in transplanted murine adenocarcinoma (AM3) in female mice, by study histopathological effects. Histopathological examination of treated tumors revealed the presence of large necrotic areas with few cancer cells as well as huge infiltration of inflammatory cells with the presence of capsule and a thick layer of fibrous tissue. The best colicin used was H₅ as the animal reached a state of near cure at a dose of 200 mg / kg / 24 days. Colicins had inhibitory effects on growth of AM₃ cells when injected intratumorally at 200mg/Kg. Percentages of tumor inhibition were (98.79, 90.45, 90.08 and 88.26)% for colicins (H₁₉, H₁₃, H₉ and H₅), respectively. Intraperitoneal injection caused less inhibition, (57.47, 36.25, 60.26 and 35.25)%, respectively using a daily dose of 200mg/Kg for a period of (24) days..

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

الملخص

تم التحري في هذه الدراسة عن التأثير العلاجي لأربعة أنواع من الكولسينات (H19, H13, H9, H5) المستخلصة من بكتيريا *E. coli* في سرطانة الغدة اللبنية الفأرية AM3 المغروسة في أنث الفئران الطبيعية من خلال دراسة التأثيرات النسيجية المرضية. أظهر الفحص النسيجي للأورام المعالجة وجود مناطق نخر كبيرة مع قلة عدد الخلايا السرطانية فضلاً عن ارتشاح هائل للخلايا الالتهابية مع وجود طبقة سميكة من النسيج الليفي، وعن أفضل المستخلصات المستخدمة كان كولسين H5 فقد وصل الحيوان تقريباً إلى حالة الشفاء، وذلك عند المعاملة بجرعة مقدارها 200 ملغم/كغم/24 يوم. فضلاً عن ذلك وجد أن الكولسينات الأربعة المستخدمة تمتلك تأثيراً "مثبطاً لنمو خلايا سرطان الغدة اللبنية الفأري AM3 عند استعمال الحقن داخل الورم وجرعة مقدارها 200 ملغم/كغم، فقد بلغت نسبة تثبيط نمو الورم (98.79، 90.45، 90.08، 88.26)% للكولسينات H19, H13, H9, H5 على الترتيب. أما الحقن داخل التجويف البريتوني، فإنه سبب أيضاً تأثيراً سميماً في تلك الخلايا لكن بنسب تثبيط نمو أقل 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.

الكلمات المفتاحية: أشيريشيا القولون، كولسينات، سرطان الغدة اللبنية الفأري؛ AM3.

1. المقدمة:

الورم (Tumor) بصورة عامة هو نمو نسيجي غير طبيعي للخلية، ليس للجسم القدرة على التحكم به والسيطرة عليه، ينشأ نتيجة تعرض تلك الخلية إلى بعض المؤثرات والتغيرات مما يجعلها تختلف عن الخلية الطبيعية التي نشأ منها، كما إنها لا يمكن أن تعود إلى أصلها حتى بعد زوال المسبب وتأثيره، أما مصطلح (Neoplasm) فهو مرادف لمصطلح (Tumor) ويعني نمواً جديداً". تُعد الأورام السرطانية واحدة من أخطر الأمراض التي تواجه حياة الإنسان، فهي تحتل المرتبة الثانية من بين مسببات الموت في العالم بعد أمراض القلب والأوعية 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 للمريض نتيجة الإصابة به [2,3]. لم يقف الإنسان مكتوف الأيدي أمام سطوة السرطان ليستسلم ويرضى بواقعه، بل سعى العلماء والباحثون منذ اكتشاف هذا المرض الوبال إلى دراسته بجوانبه كلها وكشف أسرارها، فلم يعد لغزاً يحيرهم حتى توصلوا إلى أدق الآليات الجزيئية لمعرفة أسباب نشوئه وتطوره وبذلوا جهوداً حثيثة وسخروا طاقاتهم لمواجهة حرب الخلية السرطانية بأسلحة تكون قادرة على قتلها، وتثبيط انقسامها، ومنع انتشارها، وبالتالي إنقاذ حياة الإنسان، فتمّ الكشف عن أنواع مختلفة من المواد المضادة للأورام السرطانية التي تمتلك تأثيراً سميّاً قاتلاً والتي نجحت في القضاء على أنواع من هذه الأورام وإطالة فترة حياة المريض، ومنها العلاج الإشعاعي والمواد الكيميائية المضادة للأورام. إلا أنّ هذه العلاجات لم تعطِ الجواب الشافي، لذلك سعى الباحثون إلى اتخاذ سبل أخرى لمحاربة السرطان [4]. فالآمال تعقد على استخدام العلاج المناعي الذي يهدف إلى تقوية وإثارة الجهاز المناعي ضد الخلايا السرطانية للقضاء عليها [3,5]، والعلاج الجيني الذي يرمي إلى إصلاح الخلل الوراثي بالخلية المتضررة أو قتلها دون الضرر بخلايا الجسم الطبيعية [4,6]، وما زالت هذه العلاجات قيد البحث والتطوير والتجريب المختبري آملين أن تصبح علاجاً سريريّاً فعالاً لإنقاذ حياة المريض. تشمل العلاجات الكيميائية أنواعاً مختلفة من المركبات، وهي مضادات الفعاليات الأيضية ومضادات الانقسام الخلوي وعوامل الأكللة 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* [9,10]، في حين لا يوجد مضادٌ بكتيري يستعمل سريريّاً لهذا الغرض. لكن كانت هناك العديد من الدراسات والبحوث التي اهتمت بموضوع إنتاج مضادات حيائية بكتيرية يطلق عليها البكتيريوسينات (Bacteriocins) وتعدّ

الكوليسينات أحد أنواعها الرئيسية، فقد وجد أنها تمتلك تأثيراً قاتلاً للخلايا السرطانية داخل وخارج الجسم الحي [10,11]. فالكوليسينات هي مضادات بروتينية غير معروفة، تنتج من مختلف أفراد العائلة المعوية (*Enterobacteraceae*) وبصورة رئيسة من بكتيريا *Escherichia coli* وتتمكن من قتل الأنواع القريبة منها [12]. تصنع الكوليسينات عن طريق نظام إنزيمي متخصص يقع تحت سيطرة جينات يحملها بلازميد الكوليسين (Col. plasmid) وفي بعض الأنواع تكون محمولة على الكروموسوم [13,14]، ويعرف حوالي سبعين نوعاً من الكوليسينات المشخصة والمدرسة [15]. يعتمد التأثير السمي القاتل للكوليسينات في الخلايا السرطانية على نوع الخلايا، ونوع الكوليسين، ووقت التعريض والتركيز المستخدم [16,17]. وفيما يخص تأثير هذه المضادات البروتينية في الأورام الصلبة، فقد ثبت كوليسين E3 62% من حجم الورم الصلب adenocarcinomaKH. كما ثبتت أنواع أخرى Lymphoma [18]. وتمكن كوليسين HSC10 من تقليل عدد العقد الورمية في رئة الفئران المحقونة [10]. أما تأثير أربعة أنواع من الكوليسينات في سرطانة الغدة اللبنية الفأرية (AM3)، فقد كان للحقن داخل الورم تأثيراً "تنبيطياً" مرتفعاً وصل إلى نسبة مقدارها 98.79% في حين كانت أعلى نسبة تنبيط 57.47% عند المعالجة داخل التجويف البريتوني بجرعة مقدارها 200 ملغرام/كغم [19]. لذلك هدفت هذه الدراسة في جزئها الثاني للتقصي عن التأثير العلاجي للكوليسينات داخل النسيج الورمي نفسه، من خلال دراسة نسيجية مرضية للأورام المعالجة لتدعم ما تم الحصول عليه من تنبيط في حجم الورم.

2. المواد وطرائق العمل:

2 1 استخلاص الكوليسينات الخام الحرة (غير المرتبطة):

استخلصت أربعة أنواع من الكوليسينات الخام الحرة (غير المرتبطة) (H_5 , H_9 , H_{13} , H_{19}) من عزلات بكتيريا *E. coli* وهي من بكتيريا النبيت الطبيعي المعوي من براز أشخاص أصحاء، وحسب طريقة [20]، (الموضحة في مخطط 1)، تم قياس الفعالية بطريقة الحفر [12] (wells method)، كما حدد تركيز البروتين الكلي [21].

مخطط (1) : حث و استخلاص الكولسينات الخام الحرة

2 2 التأثيرات السمية للكولسينات في خط خلايا سرطانة الغدة اللبنية الفأرية (AM3) المغروسة في الفئران المختبرية الطبيعية.

تم إجراء هذه الدراسة لمعرفة التأثير العلاجي للكولسينات في أنموذج اختباري للسرطان في الكائن الحي (Animal Model System) وذلك باتتبع الخطوات الآتية:

- 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 وأن غُرسَتْ بها تلك الخلايا السرطانية على أن يكون قطر كتلة الورم ما بين 3-4 سم أو أكثر، وتعد هذه الفئران هي الواهة للخلايا السرطانية [22]. أما عملية غرس الخلايا فتتم كالآتي:

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

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

3 - حقنت الخلايا بفئران إناث طبيعية المناعة بحجم 0.25 مل/فأرة باستعمال محقنة طبية ذات أبرة قياس 18، إذ تم إدخالها من المنطقة الظهرية الفخذية وتحت الجلد وصولاً إلى المنطقة العنقية فقد حقنت الخلايا وضغطت المنطقة (ماقبل منطقة الحقن) لمنع خروج العالق من فتحة الحقن، ثم عُقت المنطقة.

- علاج الأورام السرطانية (المغروسة) بالكولسينات:

بعد عزل الفئران التي ظهر بها الورم، تم تقسيمها إلى مجموعتين:

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

ضمت 6 مجاميع ثانوية، كل واحدة منها تحوي 3 فئران، حقنت المجاميع الأربعة الأولى بالكولسينات المحضرة (H₅, H₉, H₁₃, H₁₉) على التوالي بحجم 0.2 مل بتركيز 200 ملغم/كغم أما الخامسة فحقنت بالوسط B.H.I broth كسيطرة موجبة

والأخيرة تركت بدون حقن وعدت كسيطرة سالبة. تم الحقن بجرعة واحدة (I.T) يومياً لمدة 5 أيام متتالية باستعمال محقنة الأنسولين المعقمة، مع مراعاة تعقيم كتلة الورم قبل وبعد الحقن.

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

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

حقنت المجاميع الأربعة الأولى بالكولسينات H_5, H_9, H_{13}, H_{19} على الترتيب بحجم 0.5 مل بتركيز 200 ملغرام/كغم، فيما

حقنت المجموعة الخامسة بالوسط الزرع B.H.I broth كسيطرة موجبة وتركنت السادسة بدون حقن كسيطرة سالبة.

* تم قياس حجم الورم باستعمال آلة القياس (القدمة، Vernier Caplipers)، إذ سجلت قياسات الطول والعرض، واستخرج الحجم حسب المعادلة الآتية [23].

$$V = L * W^2 / 2 \quad \dots\dots\dots (1)$$

حيث إن:

$$V = \text{حجم الورم بالمل}^3$$

$$L = \text{الطول}$$

$$W = \text{العرض}$$

أما حساب النسبة المئوية لتنشيط نمو الورم (Growth Inhibition/GI) فقد تم وفق المعادلة الآتية [24].

$$GI = A - B/A * 100 \quad \dots\dots\dots (2)$$

حيث إن:

$$GI = \text{النسبة المئوية لتنشيط نمو الورم.}$$

$$A = \text{حجم الورم في المجموعة غير المعالجة.}$$

$$B = \text{حجم الورم في المجموعة المعالجة.}$$

- الدراسة النسيجية المجهرية للورم المعالج:

بعد انتهاء التجربة، تم قتل أحد الحيوانات المعالجة لكل نوع من الكولسينات الأربعة، ثم استخرج الورم المتبقي من جسم الحيوان بعد إزالة الجلد عن المنطقة وقطع ارتباطه بالحيوان، وضع بمحلول الفورمالين (10%)، بعدها تم عمل المقاطع النسيجية التي صبغت بصبغة الهيماتوكسيلين-أيوسين [25]، وذلك لدراسة مدى التأثير السمي للكولسينات في خلايا سرطانة الغدة اللبنية الفأرية المزروعة في الحيوان.

3 - النتائج والمناقشة:

ملاحظة: نتائج تأثير الكولسينات في حجم الورم أدناه؛ هي نفسها منشورة في الجزء الأول من الدراسة من قبل الباحثة نفسها [19] وسيتم الإشارة إليها في هذا البحث (الجزء الثاني) في التأثير النسيجي المرضي لتتكامل الصورة علمياً.

حققت 120 أنثى بخلايا AM3، ظهر الورم بـ45 فأرة أي بنسبة 37.5%، إذ تراوحت الفترة الزمنية لظهوره ما بين 10-20 يوماً، في حين حقق الشمري عام 2003 [26] نسبة نجاح وصلت إلى 90-100% في ظهور الأورام المغروسة في الفئران، وبفترة زمنية تراوحت ما بين 3-8 أيام، يعود سبب هذا التباين إلى التباعد الوراثي ما بين الفئران المستخدمة في هذه الدراسة عن الفئران الواهبة للورم، فقد كانت الحيوانات المغروسة من قبل الباحث (الشمري) ناتجة عن التزاوج الداخلي، فضلاً عن دور الجهاز المناعي للمضيف في رفض الخلايا السرطانية الغريبة المغروسة والقضاء عليها، وإلى 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 والأكسجين [27, 28].

حصل ضمور في حجم الورم، ومن ثم زواله تماماً وبصورة تلقائية في 6 فئران من بين الـ45 بنسبة 13.3% بعد 7 أيام من ظهوره، ويعزى ذلك إلى الأسباب نفسها أعلاه. بعد وصول الكتلة الورمية إلى الحجم المناسب، قُسمت الحيوانات إلى مجاميع لغرض البدء بالتجارب العلاجية، باستخدام الجرعة 200 ملغم/كغم التي اعتمدت كجرعة أمينة في الخلايا الطبيعية اعتماداً على نتائج الدليمي [29].

وفيما يخص مجاميع العلاج بالحقن داخل الورم:

عولجت الحيوانات (بخمسة) جرعة يومية داخل الورم لكل نوع من الكوليسينات، مما سبب انخفاضاً معنوياً ($P \leq 0.05$) 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) ملم³ للمواد 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 ملم³ لحين موت الحيوان ونهاية التجربة. وجدت هناك فروقاً معنوية بين المعالجة بكوليسين (H_{19}) وبين الأنواع الثلاثة الأخرى، والتي لم تعط فروقاً عند المقارنة فيما بينها. كما وحصل تثبيط نمو الورم تماماً 100% بأحد الحيوانات المعالجة بالكوليسين 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 بالكوليسينات (H_5 , H_9 , H_{13} , H_{19}) على نمو الورم (خلايا AM-3) عند الحقن داخله (IT)، بجرعة مقدارها (200 ملغم / كغم) لخمس أيام متتالية.

أما مجاميع العلاج بالحقن داخل التجويف البريتوني:

فقد تم معالجتها 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 مقارنةً بالسيطرة التي ازداد الحجم فيها بصورة كبيرة (صورة 1)، وكان ذلك واضحاً طيلة فترة نمو الورم.

الصورة (1): مقارنة بين حجم الورم في مجموعة السيطرة (غير المعالجة)، مع حجمه في إحدى 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 ملم³، في حين وصلت الحجوم بالمجاميع المعالجة إلى (5001، 7497، 5430، 4673) ملم³، 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 ($P \leq 0.05$) 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.

شكل (3): تأثير المعالجة بالكوليسينات (H₅, H₉, H₁₃, H₁₉) على حجم الورم (خلايا AM-3) طيلة فترة العلاج، عند الحقن داخل التجويف البريتوني.

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

ومن خلال نتائج الدراسة، وجد أن أفضل المستخلصات المستخدمة، هو كوليسين H₉ الذي أعطى نسبة تثبيط

60.26%، ثم H₁₉، وبعده H₅، أما أقلها كفاءة فهو H₁₃، فقد كانت النسبة المئوية لتثبيط نمو الورم هي 36.25%.

ويوضح 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 وثبتت 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 مقارنةً بالأخرى التي فقدت نشاطها تماماً.

عند مقارنة نسب تثبيط نمو الورم عند الحقن داخل الورم مع الحقن داخل البريتون، وجد أن المعالجة الأولى أكثر كفاءة وفعالية 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 لتصل فيه نسبة معينة إلى الكتلة الورمية قد لا تؤثر 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.

لقد 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 تؤد إلى تثبيط نموه كاملاً) وبصورة معنوية مقارنة بمقارنة بالسيطرة [30]. إذ تساهم الكولسينات (كولسين HSC_{10} المنقى جزئياً) في تقليل انبثاث (metastasis) الخلايا السرطانية (KHT fibrosarcoma) الفأرية المحقونة داخل البريتون في الفئران، فضلاً عن تقليل أعداد العقد الورمية المتكونة داخل الرئة، كما وجد أن الجرعة التي تمتلك تأثيراً في الخلايا السرطانية تسبب تأثيرات سمية في خلايا نخاع العظم الطبيعية، أما العلاج فإنه يحتاج لجرعات يومية متعددة لأن فعالية الكولسين السمية داخل الجسم الحي لا تتجاوز اليوم الواحد. [31]

إن التأثير العلاجي التثبيطي للكولسينات داخل الجسم الحي يعتمد على تركيز الجرعة المستخدمة وكتلة الورم السرطاني (كثافة الخلايا السرطانية) ونوع الخلايا المعاملة، فاستخدام الجرعة الواحدة 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 يوماً، في حين تزداد نسبة التثبيط إلى 75% عند زيادة الجرعة إلى 8.75 مكغم من الكولسين نفس [18]، وكان الباحث نفسه قد توصل إلى امتلاك الكولسينات (E_3 , E_2 , D, A) والـ Staphylococcin والـ Pyocin، تأثيراً سميّاً مثبطاً لنمو أربعة أنواع من الأورام الصلبة وهي $6C_3$ Lymphosarcoma و $Lp-2$ plasmocytoma و skalski و Lymphoma Nemeth-Kellner، وبنسب 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 بـكولسين E₃ النقي من 44 إلى 63 يوماً، أما الأخرى المصابة بـHK-adenocarcinoma والمعالجة بالكولسين نفسه فارتفع من 23 إلى 28 يوماً مع اختزال حجم الورم بنسبة 61%. أما فيما يخص آلية عمل الكولسينات المستخدمة في قتل الخلايا السرطانية، فهي لا تختلف عما هو عليه في البكتيريا، إذ تستهدف الغشاء الخلوي أو المادة الوراثية DNA أو صنع البروتين [16,17]

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].

الفحص النسيجي المرضي المجهرى للأورام:

درست أورام الغدة اللبنية الفأرية بإجراء الفحص النسيجي المرضي المجهرى للمجاميع المعالجة، وقورنت بمجموعة السيطرة (غير المعالجة)، للتعرف على التغيرات التي سببتها العلاجات المستخدمة، ومنها تم الحصول على النتائج الآتية:

أظهر الفحص النسيجي لمجموعة السيطرة غير المعالجة أن سرطان الغدة اللبنية من النوع الصلب (Solid)، المتألف من عدة طبقات من الخلايا بشكل صفائح (Sheet)، وهي تمثل تكاثر خلايا النسيج الغدي بشكل هائل مع وجود عدد كبير من التراكيب الغدية (glandular structure)، كذلك لوحظ وجود توسع كيسى (Cyst diltation) يحتوي على إفرازات بروتينية، فضلاً عن وجود مواد شبيهة بالحليب تظهر داخل الأسناخ (Duct)، وأظهر الفحص وجود مناطق نخر (Necrosis) تقع في مركز الورم، أما سببه فيعزى إلى كبر حجم الورم وكثرة عدد الخلايا مما يعيق وصول الدم إلى المنطقة مسبباً موت الخلايا هناك، وقد أحيطت الخلايا السرطانية بمحفظة (Capsule) مؤلفة من طبقة خفيفة من النسيج الليفي (Fibrous connective tissue) (الصورة 2).

الصورة (2): مقاطع نسيجية في سرطانة الغدة اللبنية الفأرية لخط (AM3) لمجموعة السيطرة (غير المعالجة)، تظهر فيه الخلايا السرطانية بشكل صلد (solid) و بأعداد هائلة وملاحظة ارتشاح الخلايا الالتهابية b ومنطقة نخرية c (H&E X400)

أما التغيرات المرضية في المجاميع العلاجية فقد تشابهت بصورة عامة، وتمثلت بوجود مناطق النخر وارتشاح الخلايا الالتهابية مع إحاطة الورم بطبقة ليفية، أما عند المقارنة بين أنواع المواد العلاجية، فوجد هناك اختلاف كبير في شدة التأثير اعتمد على نوع الكوليسين المستعمل. أفضل أنواع المستخلصات تأثيراً كان كوليسين H₅، فقد وجدت مناطق كبيرة جداً من النخر مع ارتشاح هائل للخلايا الالتهابية، وهذا يشير إلى حصول تحفيز الإستجابة المناعية ضد الورم، أما الخلايا السرطانية (tumor cells) فقد كانت قليلة جداً، في حين كانت المحفظة كبيرة وتحتوي طبقة سميكة جداً من النسيج الليفي، والذي بدوره سبب عزل الورم عن الجسم، فالحیوان هنا كان في طور الوصول إلى حالة الشفاء (الصورة 3-أ). أما المعالجة بكوليسين H₉ و H₁₉ فكانت متماثلة التأثير، فقد ظهرت منطقة إتهابية كبيرة مع وجود مناطق نخر كبيرة أيضاً، ويُلاحظ وجود الخلايا السرطانية لكن بمنطقة أصغر قطراً مقارنةً بالسيطرة، أما منطقة التليف فهي أكبر (الصورة 3-ب و 5-ج) وبالرغم من تشابه التأثيرات لكلا النوعين، إلا إن حجم الورم ككل يبدو أصغر عند استخدام كوليسين H₉، ورغم أن المستخلصين أعطيا نتائج جيدة، إلا أنها أقل كفاءة من H₅. وأخيراً كان كوليسين H₁₃ الأقل تأثيراً، فبالرغم من وجود مناطق النخر والخلايا الالتهابية والمحفظة التي كانت أكبر مما هو عليه في السيطرة، إلا أن منطقة الخلايا السرطانية كانت كبيرة الحجم (الصورة 3-د)، وبالعودة إلى نتائج الشكل (2) يلحظ أن كوليسين H₁₃ كان الأقل قدرةً في تثبيط نمو الورم مقارنةً بالأنواع الثلاثة الأخرى، فقد كانت النسبة المئوية لتثبيط نمو الورم 36.25%.

أ- مجموعة العلاج بالكولسين (H₅): يلحظ وجود الخلايا السرطانية المرتشحة بأعداد هائلة من الخلايا الالتهابية a، ومحاطة بمحفظة سميكة جداً من النسيج الليفي b(H&E X100)

ج- مجموعة العلاج بكولسين (H₉)

ب- مجموعة العلاج بكولسين (H₁₉)

يلاحظ وجود مناطق كبيرة من النخر a مع ارتشاح خلايا التهابية b كثيرة، أما منطقة التليف c فهي أكبر مما هو عليه في السيطرة، والخلايا السرطانية d تتواجد بمنطقة أصغر مقارنة بالسيطرة.

د- مجموعة العلاج بكولسين (H₁₃): يُلاحظ وجود مناطق نخر a وخلايا التهابية b ومحفظة أكبر مما هو عليه في السيطرة، لكن منطقة الخلايا السرطانية d ذات حجم كبير (H&E X400)

الصورة (3): مقاطع نسيجية في سرطانة الغدة اللبنية الفأرية لخط (AM3)، لمجاميع العلاج بالكولسينات، عند الحقن داخل التجويف البريتوني بجرعة (200 ملغم/كغم/24 يوماً)، وهي مقارنة بين التأثير العلاجي لكل نوع منها

3 - الإستنتاجات:

أستنتج من هذه الدراسة أن الكولسينات المنتجة من بكتيريا اشيريشيا القولون، لها تأثير واضح في علاج سرطانة الغدة اللبنية الفأري من خلال الانخفاض الواضح في حجم كتلة الورم ومن خلال انخفاض عدد الخلايا السرطانية في الفحص النسيجي المرضي؛ فقد وصل الحيوان في أحد المواد العلاجية المستخدمة إلى مرحلة كبيرة من ضمور حجم الورم؛ وهذه النتائج الأولية ممكن أن تقود لاستخدام الكولسينات في علاج الأورام السرطانية كعلاجات مستقبلية واعدة.

قائمة المختصرات

رمز الاختصار	المصطلح العلمي	ت
AM3	Ahmed Majeed2003	1
B.H.I broth	Brain Heart infusion	2
GI	Growth Inhibition	3
رموز المستخلصات البكتيرية المستخدمة في الدراسة	H ₅ , H ₉ , H ₁₃ , H ₁₉	4
H&E	hematoxylin and eosin	5
I.P	Intra-Peritoneal	6
I.T	Intra-Tumor	7

قائمة المصادر والمراجع:

- [1] B.M. Nevidjonand K.W. Sowers,"A Nurse s Guide to Cancer Care", Lippincott (2000).
- [2] V. Kumar, R.S. Cotran and S.L.Robbins, "*Robbins Basic Pathology*". 7th ed. Saunders an Imprint of Elsevier Science. (2003).
- [3] L. Leopold, M. Berger, S. Cheng, E. Giles, and , E. Estey, "Comparative efficacy and safety of Gemtuzamab Ozogamicin monotherapy and high-dose cytarabine combination therapy in patients with acute myeloid leukemia in firstrelapse",*Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 14(2003) 220-5.
- [4] D. Bourgaize, T. Jewell, and R. Buiser,. "Biotechnology, Demytifying the Concepts". 4th ed. McGraw-Hill. New York.,(2000) pp.313-35.
- [5] M. Linenberger,. "CD33-directed therapy with gemt-Uzumab Ozogamiciin acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance". *Leukemia*,19(2005) 176-82.
- [6] R. M. Stone, "Myeloid Leukemia inthe Difficult Problem of Acute Myeloid the Older Adult". *Cancer J. Clin.*52(2002)363-71.
- [7] J. Trounce, and D. Gould, .*Clinical Pharmacology forNurses*. 7th ed. CharchillLivingstone, Edinburgh(2000) pp. 275-86.
- [8] F.J.Giles, A. Keating, A.H. Goldstone,I. Avivi,C.L. Willman, and H.M. Kantarjian,. "Acute Myeloid Leukemia". Hematology ,American Society of Hem.: Education Program Book.(2002) pp. 73-110.
- [9] R.A. Harrey, P.C. Champe, and M.J. Mycek, "Pharmacology". 2nd ed, Lippincott Williams and Wilkins, New York (2000).
- [10] R. P. Hill, and H. Farkas-Himsley, "Further Studies of The Action of aPartially Purified Bacteriocin Against a Murine Fibrosarcoma". *Cancer Research*,51(1991) 1359- 65.
- [11] J. Chumchalova, and J. Smarda, "Human Tumor Cells are Selectively Inhibitedby Colicins",*Folia Microbiol*, 48(2003)111-5.
- [12] D. Smajs, H. PilsI, and V. Braun, "Colicin U, Anovel Colicin Produced by *Shigella boydii*". *J. of Bacteriol*, 179(1997)4919- 28.
- [13] R. E.Wooley, J. Brown, P. S .Gibbs, L. K. Nolan, and K. R. Turner,"Effect of Normal Intestinal Flora of Chickens onColonization by Visulent Colicin , VProducing, Avirulent, and Mutant Colicin V- Producing Avian *Escherichia coli*"*Avian Diseas.*,38(1994)141-5.
- [14] D. Smajs, and G. Weinstock, "*The Iron- and Temperature- CjrBC Genes of Shigella and Enteroinvasive Escherichia coli*Strains Code for Colicin JS Uptak"*e. J. of Bacteriology*,183(2001) 3958-66.
- [15] C. Lazdunski, Bouveret, E.; Rigal, A.; Journet, L.; Lloubes, R. and Benedett, H. "Mini- Review, Colicin Import into *Escherichia coli* cells". *J. of Bacteriol.*, 180(1998)4993-5002.
- [16] J. Smarda, andD. Smajs,. "Colicins-Exocellular Lethal *Proteins of Escherichia coli*". *Folia Microbiol*,43(1998) 563-82.
- [17] L. Cursino, J. Smarda,E. Chartone, and A. Nascimento,. "Updated aspects of Colicins of Enterobacteriaceae". *Braz. J. Microbiol.*, 33(2002) 196-217.
- [18] J. Smarda,. "Colicins as Anti-Tumour Drugs". *Nato Asi Series*, 65(1992) 505-10.

- [19] H. H. Obaid, N. Y. Yaseen, and R. H. Essa, "Study the toxic effect of non-bound colicins extracted from *Escherichia coli* on transplanted Murine adenocarcinoma (AM3)". *Biotechnology Research Center* (special issue),3(2009),2:53-62. (In Arabic).
- [20] H. R. Herschman, and D. R. Helinski, "Purification and Characterization of Colicin E2 and Colicin E3", *The J. of Biological Chemistry*, 242(1967) 5360- 8.
- [21] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent". *J. Biol. Chemical.*, 193(1951) 265-75.
- [22] T. Shibata, A.J. Giaccia, and M. Brown, "Hypoxia-Inducible Regulation of a Prodrug-Activating Enzyme for Tumor-Specific *Gene Therapy*" *Neoplasia*, (2002) 40-8.
- [23] N.L. Ge,; S. Ye,; N. Zheng,; , R. Sun; Y. Liu, and Z. Tang , "Prevention of hepatocellular carcinoma in mice by IL-2 and B7-1 genes co-transfected liver cancer cell vaccines". *World J. Gastroenterol*, 9(2003)2182-5.
- [24] A. Phuangsab, R.M. Lorence, K.W. Riechard, M.E. Peebles, and R.J. Walter, "Newcastle disease virus therapy of human tumor xenografts: anti-tumor effects of local or systemic administration". *Cancer Letters*, 172(2001) 27-36.
- [25] J.D. Bancroft, and A. Steven, "Theory and Practical of Histological Techniques". 2nd ed. Churchill Livingstone, London. (1982) pp. 111, 189-90.
- [26] أحمد مجيد حمزة الشمري، "دراسة تأثير فايرس نيوكاسل في علاج الاورام السرطانية المغروسة في الفئران"، رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد (2003).
- [27] R.W. Ruddon, "Cancer Biology". Oxford University Press, New York. (1981).
- [28] I. Roitt, J. Brostoff, and D. Male, "Immunology". 6th ed., Mosby, London, New York, Toronto, (2001).
- [29] هند حسين عبيد الدليمي، "دراسة بعض التأثيرات البايولوجية للكوليسينات في الخلايا الطبيعية والسرطانية خارج وداخل الجسم الحي". اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية (2006).
- [30] D. Fumarola,; P. Bello, R. Palma, G. Miragliott, and A. Panaro, "Bacteriocin as cytotoxic agents in experimental neoplasms: considerations on the role of possible contaminants". *G Bacteriol Virol Immunol*, 70.(1997) 87-93.
- [31] H. Farkas- Himsley, , R. Hill, B. Rosen, S. Arab, and C. D. Lingwood, " The Bacterial Colicin Active Against Tumor Cells *in Vitro* and *in Vivo* is Verotoxin 1". *Proc- Natl- Acad- Sci- USA*, 92(1995) 6996-7000.