Iraqi Journal of Biotechnology, 2014,Vol.13, No.2 , 1-22

Study the Effect of Locally isolated *Lactobacillus acidophilus* and its components as anticancer *in vivo*

Maareb Nazyh Rasheed[1] Zahra Mahmood Al-Khafaji[2] Nahi Yousif Yaseen[3]

[1&2]Genetic Engineering & Biotechnology Institute- University of Baghdad

[3]Iraqi center for cancer and medical genetic research AL-mustansiryia University, Baghdad, Iraq

Abstract: The aim of this study was to investigate the role of Lactobacilli as a probiotic in colon cancer treatment in rats. Accordingly 29 isolates of Lactobacilli was obtained from 11 samples of feces of newborns. As well as isolating and diagnosis one isolate of Lactobacilli from standard yoghurt named (canon) which used as control for acid and bile salt tolerance. Screening of isolate according to its ability of acid resistance, showed that six isolates were able to stand in pH3.5 for 90 min. The number of living cells were 1.73×10^5 to 6.3×10^5 CFU/ml. Accordingly the number of living cells of other isolates were significantly decreased after 90 min incubation in MRS broth with pH3.5 . The isolate from standard yoghurt did not revealed high resistances to acidity since the living cells were decreased with a rrange equal about to one logarithmic cycle or more. This behaviors is important from static point of view which indicates no high acidity resistance.

The isolates which appear high acidity resistance were selected to test its resistance to bile salts. *Lactobacillus acidophilusone* of diagnosed isolates, appeared high resistance to bile salts, since it was the most efficient isolate among the selected isolate in its high resistance to bile salts. While for *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* which was used for comparison with the other isolates, revealed no resistance for bile salts since the number Components of *Lactobacillus acidophilus* were separated. Colon cancer was induced in rats using Azoxymethane (AOM) at 15mg/Kg (animal body weight) by adding methyl group to guanine (O6- methyl guanine). Two restriction enzymes were used to detect the methylation. The first *HpaII* which is sensitive to presence of methyl group and the second is *MspI* which is resistant to methyl group so the samples treated with former will give a clear band of methylated DNA in gel electrophoresis while *MspI* will give diffused band when the DNA is methylated. The prophylactic effect (pretreatment) and the therapeutic effect (post- treatment) of *Lb. acidophilus* cells and its separated components was studied in vivo on the molecular level, DNA was extracted from rat colon and treated for methylation. The results revealed that the DNA extracted from treated animal showed smear in gel electrophoresis after digestion with *HpaII* which means that lactobacillus could modulate the DNA methylation, in contrast to positive control group which had specific DNA methylation band which indicates the presence of methyl group in the DNA of this animals.

Key words: lactobacillus, colon eancer, methylation, *MspI* , *HpaII*.

دراسة تأثير بكتريا *Lactobacillus acidophilus* المعزولة محلياً ومكوناتها كعامل مضاد للسرطان في داخل الجسم الحي

[1]مآرب نزيه رشيد [2]ناهي يوسف ياسين [1]زهرة محمود ناصر

[1]معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا /جامعة بغداد
[2]المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/جامعة بغداد

الخلاصة: كان الهدف من الدراسة هو استبيان دور العصيات اللبنية كأحياء علاجية في مجال التعامل مع سرطان القولون في الجرذان المختبرية وقد شملت الدراسة عزل وتشخيص 29 عزلة لبكتريا العصيات اللبنية(Lactobacilli) من 11 عينة لغائط الأطفال الرضع حديثي الولادة، فضلا عن عزل وتشخيص عزلة واحدة لبكتريا العصيات اللبنية من اللبن القياسي (كانون)، التي استخدمت لغرض المقارنة في اختبار تحمل الحموضة وأملاح الصفراء. وقد استخدم نظام API 50 CH لتشخيص العزلات. أظهرت غربلة العزلات على أساس قدرتها على مقاومة الحموضة قابلية ست عزلات على أبداء مقاومة عالية للحموضة اذ تراوحت قيم أعدادها الحية ما بين (1.73×10^5 – 6.3×10^5 وحدة تكوين مستعمرات / مللتر) مقارنة بقيم الأعداد الحية لبقية العزلات بعد 90 دقيقة من حضنها في مرق MRS برقم هيدروجيني 3.5 التي انخفضت قيم أعدادها الحية بشكل معنوي ،أما في ما يخص العزلة المعزولة من اللبن القياسي لم تبد مقاومة عالية للحموضة اذ انخفضت أعدادها الحية بمدى يقارب دورة لوغاريتمية واحدة أو أكثر والتي تعد مهمة احصائيا، وبهذا لم تبد مقاومة عالية للحموضة. انتقيت العزلات التي أبدت مقاومة عالية للحموضة لاختبار مقاومتها لأملاح الصفراء، وقد أبدت بكتريا *Lactobacillus* acidophilus (أحدى العزلات المشخصة) مقاومة عالية لأملاح الصفراء، اذ كانت العزلة الأكفأ من بين العزلات المنتقاة في مقاومتها لأملاح الصفراء، أما بالنسبة لبكتريا *Lb.delbrueckii ssp bulgaricus* والتي استخدمت لغرض المقارنة مع بقية العزلات لم تبد مقاومة لأملاح الصفراء، اذ انخفضت قيم أعدادها الحية انخفاض شديد (أي أكثر من دورة لوغاريتمية واحدة). تم استحثاث سرطان القولون في الجرذان المختبرية باستخدام مادة Azoxymethane (AOM) بتركيز 15 ملغم / كغم (وزن الحيوان) التي تؤدي الى حث سرطان القولون، وذلك بإضافة مجموعة المثيل الى ذرة الاوكسجين السادسة في الكوانين (O6 -methyl guanine) وقد استخدمت انزيمات القطع الحساسة وغير الحساسة لمجاميع المثيل في الكشف عن حالة المثيلة، فالانزيم HpaII لا يقطع DNA الحاوي على المثيل لذلك يظهر الاخير بشكل حزمة متماسكة، في حين ان الانزيم MspI يقطع جزيئات DNA بغض النظر عن حالة المثيلة مما يؤدي الى انتشار DNA في هلام الترحيل الكهربائي (يظهر بشكل مسحة متواصلة) .

وقد اجريت دراسة التأثير الوقائي والعلاجي لخلايا ومكونات بكتريا *Lb.acidophilus* في الأنظمة الحية *in vivo* قبل الحقن بالمادة المسرطنة (Pretreatment) وبعد الحقن (Post treatment) على المستوى الجزيئي وقد ظهرت نماذج DNA المستخلصة من قولون الجرذان المختبرية المعاملة بخلايا ومكونات بكتريا *Lb.acidophilus* بشكل مسحه صغيرة ضمن هلام الترحيل مع انزيم التقيد HpaII وهذا بدوره يعكس قابلية خلايا ومكونات بكتريا *Lb.acidophilus* في التأثير والتعديل في مثيلة DNA. مقارنة بنماذج DNA الخاصة بمجموعة حيوانات السيطرة الموجبة والتي ظهرت بشكل حزمة ضمن هلام الترحيل عند حضنها مع الانزيم نفسه، مما يدل على وجود مجاميع المثيل في DNA هذه المجموعة من الحيوانات.

المقدمة

تعد الأمراض السرطانية من أخطر الأمراض التي تهدد حياة الأنسان في مختلف بلدان العالم إذ تحتل المرتبة الثانية من بين مسببات الموت في العالم بعد أمراض القلب والأوعية الدموية، ولقد سعى العلماء والباحثون لمعرفة أدق الآليات الجزيئية في أسباب نشوء السرطان وتطوره وبذلوا جهوداً حثيثة لمواجهة الخلية السرطانية بتثبيط انقسامها وقتلها ومنع انتشارها إذ أستخدم العلاج الجراحي والكيميائي والإشعاعي إلا أن هذه العلاجات لم تكن ذات فعالية في علاج السرطان والحد من انتشاره داخل جسم المريض، فضلاً عن أنها تتسبب بالكثير من التأثيرات الجانبية ومنها قتلها للخلايا الطبيعية في الجسم أو أحداث طفرات وراثية للخلايا الطبيعية (1)، لذا أتجه الباحثون إلى اتخاذ سبل أخرى لمحاربة السرطان باستخدام أنماط جديدة من العلاجات المتمثلة بالعلاج المناعي الذي يهدف لتقوية وتحفيز الجهاز المناعي ضد الخلايا السرطانية للقضاء عليها (2)، والعلاج الجيني الذي يهدف إلى أصلاح الخلل الوراثي لعدد من الجينات في الخلية المتضررة أو قتلها دون الضرر بالخلايا الطبيعية (3)، والعلاج الفايروسي وتأثيره في تدمير الخلايا السرطانية (4)، والعلاج بالطب البديل باستخدام المستخلصات النباتية (5)، ولم يغب عن بال الباحثين المتخصصين في مجال الأحياء المجهرية علاج الأورام السرطانية باستخدام العلاج الحيوي ومن هنا برز دور الأحياء العلاجية (Probiotics) ومن أهمها بكتريا العصيات اللبنية Lactobacillus الموجودة طبيعياً في القناة الهضمية للإنسان والتي تستخدم بشكل آمن وسليم في مجال الأغذية ومنتجات الألبان مما شجع الباحثين لدراسة صفاتها العلاجية وآليات عملها، إذ يعد تأثيرها المضاد للأورام السرطانية وأهمها سرطان القولون وتحفيزها للاستجابة المناعية للعائل (6) ولهذا كان الهدف من هذه الدراسة هو استبيان دور العصيات اللبنية كأحياء علاجية في مجال التعامل مع سرطان القولون.

طرائق العمل

عزل بكتريا Lactobacillus من غائط الأطفال الرضع

جمعت العينات البكتيرية من 11 عينة من غائط الأطفال الرضع ، أصحاء من كلا الجنسين تراوحت أعمارهم ما بين (7–30) يوم معتمدين في رضاعتهم على حليب الام ولم يسبق لهم ان تناولوا اياً من المضادات الحيوية فضلا عن ذلك جمعت (2) عينة من لبن كانون وأستخدمت لغرض المقارنة في أختبار تحمل الحموضة وأملاح الصفراء. وعزلت بتنميتها على وسط MRS وأجريت لها الفحوص الزرعية والمختبرية والكيموحيوية وأهمها اختبار الكاتليز وتحلل الجيلاتين والنشا والكازين فضلا عنّ ذلك شخصت العزلات البكتيرية المعزولة محليا باستعمال نظام API50CH (7).

اختبار مقاومة البكتريا للحموضة

أستخدم وسط مرق MRS المعقم للكشف على مقاومة البكتريا للحموضة إذ لقح مرق MRS ذي رقم هيدروجيني 3.5 بنسبة 1% بالمزروع البكتيري بعدها عملت تخافيف عشرية متسلسلة في وقت الصفر وبعد مرور 90 دقيقة من حضنها في درجة حرارة 37م تحت ظروف قليلة التهوية ثم زرعت في وسط MRS الصلب وحضنت في درجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة تحت ظروف قليلة التهوية (8).

اختبار مقاومة البكتريا لأملاح الصفراء

أستخدم وسط مرق MRS-Thio الذي يحتوي على ملح Sodium thioglycollate بنسبة 2%وأملاح الصفراء بنسبة 2% للكشف على مقاومة البكتريا لأملاح الصفراء إذ لقح مرق MRS-Thio بنسبة 1% بالمزروع البكتيري بعدها عملت تخافيف عشرية متسلسلة في وقت الصفر وبعد ثلاث ساعات من حضنتها في درجة حرارة 37م تحت ظروف قليلة التهوية ثم زرعت على وسط MRS الصلب وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة تحت ظروف قليلة التهوية (9).

طريقة فصل مكونات بكتريا Lb. acidophilus

تم فصل مكونات بكتريا Lb. acidophilus المعزولة من غائط أطفال حديثي الولادة وذلك طبقا للطريقة الموصوفة من قبل (10) وكالاتي:

1- لقح 1000 مليلتر من مرق MRS بعزلة Lb. acidophilus المزروعة على وسط آكار MRS وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة وتحت ظروف قليلة التهوية .

2- نبذت خلايا البكتريا مركزيا بسرعة 13000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة وبدرجة حرارة 4م،قسم الراسب (الخلايا البكتيرية) الى قسمين ،القسم الأول عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م تحت ضغط 15 بار/أنج2ولمدة 15 دقيقة أما القسم الثاني من الخلايا فقد أجريت عليه العمليات الآتية:

أ- غسلت الخلايا البكتيرية بمحلول Tris-HCl ذي تركيز 0.05 مولر ورقم هيدروجيني 8.

ب- غسلت الخلايا البكتيرية بعد ذلك بمحلول كلوكوز EDTA-Tris-Glucose بتركيز 0.01، 0.025 ، 0.06 مولر ذي رقم هيدروجيني 8.

ت- أضيف أنزيم اللايسوزايم الى عالق الخلايا البكتيرية بتركيز 20 ملغم/مل من عالق الخلايا البكتيرية، حضنت بحمام مائي بدرجة حرارة 37 م لمدة 60 دقيقة.

ث- كسرت الخلايا البكتيرية بجهاز الموجات الفوق الصوتية وبعدد 6 دورات بمعدل دورة /دقيقة.

ج- أضيف حجم من محلول EDTA بتركيز 0.025 مولر ذي رقم هيدروجيني 8 مساوي لحجم عالق الخلايا البكتيرية المكسرة.

ح- نبذ عالق الخلايا البكتيرية المكسرة مركزيا بسرعة 15000 دورة / دقيقة بدرجة حرارة 4 م.

خ- عقم الراسب (البروتين السكري) بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م تحت ضغط 15 بار/أنج 2 ولمدة 15 دقيقة.

دراسة التداخل بين خلايا ومكونات بكتريا Lb. acidophilus ومادة (AOM) المسرطنة في الجرذان المختبرية

1- المعاملة بخلايا ومكونات بكتريا Lb. acidophilus قبل المادة المسرطنة (AOM)

خصص لهذه التجربة 18 جرذ وقسمت إلى (6) مجاميع بواقع ثلاث جرذان لكل مجموعة وحسب الطريقة المتبعة من قبل (11).

المجموعة الأولى

مثلت هذه المجموعة السيطرة السالبة التي لم تحقن بأي مادة وأطعمت العليقة القياسية وشربت ماء الحنفية، تم تشريحها في اليوم الرابع عشر.

المجموعة الثانية

مثلت هذه المجموعة السيطرة الموجبة التي تم حقنها بالمادة المسرطنة (AOM) في اليوم الحادي عشر وتم تشريحها في اليوم الرابع عشر أي بعد مرور 72 ساعة من وقت الحقن.

المجموعة الثالثة

مثلت هذه المجموعة الحيوانات التي جرعت خلايا بكتريا Lb. acidophilus بمعدل 6×810 خلية/مليلتر/يوم وذلك حسب الطرق المتبعة (12) وحقنت هذه المجموعة عند اليوم الحادي عشر بمادة (AOM) وتم تشريحها في اليوم الرابع عشر إذ تم التجريع عن طريق الفم بواسطة محقنة حورت لهذا الغرض واستمر التجريع لمدة 14 يوم.

المجموعة الرابعة

مثلت هذه المجموعة الحيوانات التي جرعت البروتين السكري لجدران بكتريا Lb. acidophilus بمعدل 0.1 غرام/كغم من وزن الحيوان/ يوم وذلك حسب الطريقة المتبعة من قبل (13) ولمدة 14 يوم وحقنت هذه الحيوانات عند اليوم الحادي عشر بمادة (AOM) وتم تشريحها في اليوم الرابع عشر.

المجموعة الخامسة

مثلت هذه المجموعة الحيوانات التي جرعت راشح بكتريا Lb. acidophilus بمعدل 0.5 مليلتر/جرذ/يوم وذلك حسب الطريقة المتبعة من قبل (14) إذ تم التجريع لمدة 14 يوم وحقنت عند اليوم الحادي عشر بمادة (AOM) وشرحت في اليوم الرابع عشر.

المجموعة السادسة

مثلت هذه المجموعة الحيوانات التي جرعت سايتوبلازم بكتريا Lb. acidophilus بمعدل 0.1 غرام بروتين/كغم من وزن الحيوان/يوم وذلك حسب الطريقة المتبعة من

قبل (15) ولمدة 14 يوم وحقنت عند اليوم الحادي عشر بمادة (AOM) وشرحت في اليوم الرابع عشر.

2- المعاملـــة بخلايـــا ومكونـــات بكتريـــا *Lb. acidophilus* بعد المـادة المسـرطنة (AOM)

خصص لهذه التجربة 18 جرذ تم تقسيمها إلى (6) مجاميع بواقع ثلاث جرذان لكل مجموعة حسب الطريقة المتبعة من قبل (11).

المجموعة الاولى

مجموعة السيطرة السالبة التي لم تحقن وتجرع بأي مادة وأطعمت العليقة القياسية وشربت ماء الحنفية، شرحت هذه المجموعة بعد مرور شهرين من تاريخ إيوائها.

المجموعة الثانية

مجموعة السيطرة الموجبة التي تم حقنها بمادة (AOM) وبمعدل 15 ملغم/كغم من وزن الحيوان وحقنت هذه الحيوانات مرة واحدة في الأسبوع وعلى مدى أسبوعين متتالين وأطعمت العليقة القياسية وشربت ماء الحنفية، شرحت هذه المجموعة من الحيوانات بعد شهر ونصف من تاريخ الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة (AOM).

المجموعة الثالثة

مجموعة الحيوانات التي تم تجريعها خلايا بكتريا Lb.acidophilus وبمعدل 6×810 خلية/مليلتر/يوم وذلك حسب الطريقة المتبعة من قبل (12) بعد الحقنة الثانية من مادة (AOM) المسرطنة واستمر التجريع لمدة شهر ونصف من تاريخ الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة (AOM) ثم شرحت بعد ذلك.

المجموعة الرابعة

مجموعة الحيوانات التي تم تجريعها البروتين السكري لجدران بكتريا Lb. acidophilus وبمعدل 0.1 غرام/كغم من وزن الحيوان/يوم وذلك حسب الطريقة المتبعة من قبل (13) بعد الحقنة الثانية من مادة (AOM) المسرطنة واستمر التجريع لمدة شهر ونصف من تاريخ الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة (AOM) ثم شرحت بعد ذلك.

المجموعة الخامسة

مجموعة الحيوانات التي تم تجريعها راشح بكتريا Lb.acidophilus بمعدل 0.5 مليلتر/جرذ/ يوم وذلك حسب الطريقة المتبعة من قبل (14) بعد الحقنة الثانية من مادة (AOM) المسرطنة واستمر بالتجريع لمدة شهر ونصف من تاريخ الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة (AOM) ثم شرحت بعد ذلك.

المجموعة السادسة

مجموعة الحيوانات التي تم تجريعها سايتوبلازم بكتريا Lb. acidophilus بمعدل 0.1 غرام بروتين/كغم من وزن الحيوان/ يوم وذلك حسب الطريقة المتبعة من قبل (15) بعد الحقنة الثانية من مادة (AOM) المسرطنة واستمر بالتجريع لمدة شهر ونصف من تاريخ الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة (AOM) ثم شرحت بعد ذلك.

استخلاص DNA من قولون الجرذان المختبرية

تم أستخلاص DNA من قولون الجرذان وذلك حسب التعليمات المرفقة مع عدة الأستخلاص المصنعة من قبل شركة Geneaid الصينية المنشأ وأجريت خطوات الاستخلاص كالأتي:

1- بعد تشريح الجرذان اخذ القولون ووضع في طبق بتري الحاوي على 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسلجي وباستخدام شفرة حادة وملقط دقيق تم إزالة الأنسجة الدهنية الرابطة والعالقة فيه، فتح طوليا وتم تنظيفه بأستخدام المحلول الملحي الفسلجي وقطع إلى قطع صغيرة (بؤر الخبئ الشاذة) بحدود 0.5 سنتمتر ووضع في ابندورف حاوي على المحلول الملحي الفسلجي.
2- بعد التخلص من المحلول الملحي الفسلجي وبأستعمال مدقه دقيقة (Micropestel) المرفقة مع عدة الأستخلاص تم هرس النسيج.
3- أضيف 200 مايكروليتر من المحلول المنظم GT (احد محاليل عدة الأستخلاص) إلى انابيب الابندورف مع الاستمرار بمجانسه هرس النسيج.
4- أضيف 20 مايكروليتر من أنزيم (Protenase-k) (المرفق مع عدة الأستخلاص) إلى عالق النسيج المهروس مع التحريك بلطف لغرض المجانسة.
5- حضن المزيج بالحمام المائي في درجة حرارة 60 مْ ولمدة 30 دقيقة لغرض تحلل الخلايا مع مراعاة تقليب الانابيب كل خمس دقائق اثناء مدة الحضن.
6- إضافة 200 مايكروليتر من المحلول المنظم GBT (المرفق مع عدة الاستخلاص) مع المزج بلطف لمدة 5 ثواني ثم حضن المزيج بالحمام المائي في درجة حرارة 70مْ لمدة 20 دقيقة لضمان تحلل جميع الخلايا بحيث يكون بهيئة محلول رائق شفاف مع مراعاة تقليب الأنابيب كل خمس دقائق أثناء مدة الحضن.
7- تزال بقايا القطع الصغيرة من النسيج عن طريق النبذ المركزي المبرد بسرعة 14000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقتين ثم ينقل الرائق إلى أنبوبة جديدة.
8- أضيف 200 مايكرولتر من الكحول الأيثيلي المطلق إلى رائق خلايا النسيج المتحلل مع التقليب بلطف لمدة 10 ثواني.
9- وضع عمود التنقية الخاص بالعدة (GD column) في الأبندورف الخاص به المرفق مع العدة ونقل رائق خلايا النسيج المتحلل إلى عمود التنقية ونبذ مركزيا بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين.
10- يهمل الابندورف الخاص بعمود التنقية والحاوي على الرائق ويوضع عمود التنقية في ابندورف جديد آخر.
11- اضيف 400 مايكروليتر من المحلول المنظم 1 w (المرفق مع عدة الاستخلاص) لعمود التنقية ونبذ مركزيا بسرعة 14000 ثانية، سُكبَ الرائق الناتج من عملية النبذ وإعيد عمود التنقية إلى نفس الابندورف.
12- أضيف 600 مايكروليتر من محلول الغسل (المرفق مع عدة الاستخلاص)

لعمود التنقية ونبذ مركزيا بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة 30 ثانية، سكب الرائق الناتج من عملية النبذ.

13- نبذ العمود مركزيا بسرعة 14000 دورة/ دقيقة لمدة ثلاث دقائق لضمان جفاف المادة المالئة للعمود.

14- أضيف 100 مايكرولتر من محلول Elution TE (المرفق مع عدة الأستخلاص) إلى مركز العمود وبعد خمس دقائق نبذ مركزيا بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة 30 ثانية للحصول على DNA المنقى.

قياس تركيز DNA المستخلص من قولون الجرذان المختبرية

تم قياس تركيز DNA المستخلص من قولون الجرذان المختبرية (بؤر الخبئ الشاذة) وذلك باضافة 5 مايكرولتر من DNA إلى 495 مايكرولتر من الماء المقطر وتم قياس تركيز DNA بأستعمال جهاز الامتصاص الطيفي بالأطوال الموجية Spectrophotometer، حددت الكثافة البصرية بطول موجي 260 نانومتر وحسب المعادلة الاتية:

تركيز DNA مايكروغرام/مايكرولتر= قيم الكثافة الضوئية بطول 260× معامل التخفيف×50 (16).

الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز

أجريت عملية الترحيل الكهربائي لـ DNA الناتج من الأستخلاص إذ ان تركيز الهلام المناسب لترحيل DNA هو 0.8% تمت عملية الترحيل الكهربائي حسب(16) اذ سحب 8 مايكرولتر من كل عينة من عينات DNA المستخلص ومزجت بلطف مع 2 مايكرولتر من صبغة التحميل، بعدها تم تحميل المزيج بهدوء داخل حفر الهلام و رحلت النماذج بفرق جهد مقداره 5 فولت/سم ولمدة 25 دقيقة فيما يخص ترحيل DNA وساعة ونصف بالنسبة لعينات DNA المعاملة مع أنزيمات التقييد، فحص الهلام باستخدام جهاز Gel documentation system وصور بجهاز التصوير المرفق إذ توثق الصور على الحاسوب.

معاملة DNA المستخلص من قولون الجرذان المختبرية بأنزيمات التقييد

حضر خليط تفاعل تقطيع DNA حسب ماذكر في التعليمات المرفقة مع عدة أنزيمات التقييد المجهزة من قبل شركة (Promega/U.S.A.) والحجوم المرافقة مع استخدام الأنزيم وبحجم تفاعل نهائي 30 مايكروليتر لكلا الأنزيمين كما في الأتي:

ماء خالي الايونات معقم	24.45 مايكروليتر
دارئ RE بتركيز 10x	3 مايكروليتر
البومين المصل البقري تركيزه 10µg/µl	0.3 مايكروليتر
DNA المستخلص بتركيز 1µg/µl	1.5 مايكروليتر
مزجت جيدا بأستعمال الماصة الدقيقة وبعدها أضيف انزيم التقييد تركيز 10U/µl	0.75 مايكروليتر
الحجم النهائي هو	30 مايكروليتر

مزج خليط التفاعل جيدا بوساطة الماصة الدقيقة ثم أغلقت أنابيب التفاعل جيدا وحضنت بالحمام المائي في درجة حرارة 37م لمدة 4 ساعات، بعد انتهاء مدة الحضن تم ترحيل 10 مايكرولتر من DNA المعامل مع 2 مايكرولتر من صبغة التحميل علماً أن تركيز هلام الترحيل 0.8% وقد أستخدم دليل حجمي للكشف عن DNA المقطع، رحلت النماذج بفرق جهد مقداره 4 فولت/سم ولمدة ساعتين ونصف.

النتائج والمناقشة

الأختبارات الكيموحيوية

أ- أختبار الكاتليز

يبين الجدول (1) أن جميع العزلات المحلية أعطت فحصاً سالباً للكاتليز وهذا يتفق مع الصفات العامة للجنس (Holt 1986 and Krieg;) في أن خاصية عدم أنتاج الكاتليز تشترك فيها جميع الأنواع التابعة لجنس Lactobacillus ، ويعود ذلك إلى افتقارها إلى حلقة البروفيرين واجبار انواع الجنس على العيش بالنمط التخمري (17).

ب- أختبار تحلل الجيلاتين

يبين الجدول (1) عدم مقدرة العزلات المحلية على تسيل الجيلاتين وذلك لعدم امتلاكها القابلية على أنتاج أنزيم الجيلاتينيز وهذا يتفق مع ما ذكره (18) في أشتراك جميع الأنواع التابعة لجنس Lactobacillus في هذه الخاصية.

ج- أختبار تحلل النشأ

يظهر الجدول (1) عدم مقدرة العزلات المحلية على تحليل النشأ إذ لم تتكون هالات شفافة زرقاء حول مستعمرات البكتريا في الوسط المغذي المحتوي على النشأ وهذا يتفق مع ما أشار اليه (19) حول عدم مقدرة الأنواع التابعة لجنس Lactobacillus بشكل عام على تحليل النشأ.

د- أختبار تحلل الكازين

أبدت العزلات المحلية عدم قدرتها على تحليل الكازين في وسط أكار الحليب وذلك لعدم قدرتها على أنتاج انزيمات البروتيز كما موضح بالجدول (1) (20).

هـ- النمو في وسط الأكار المغذي

بينت نتائج أختبار النمو في وسط الأكار المغذي عدم قدرة جميع العزلات على النمو في هذا الوسط كما موضح بالجدول (1).

إن عدد العزلات الملتقطة التي أمكن الحصول عليها والمطابقة للصفات المذكورة كانت 30 عزلة أخضعت لأختبار تحملها للحموضة وأملاح الصفراء للتأكد من كونها تابعة لجنس Lactobacillus.

جدول (1): نتائج الأختبارات الكيموحية للعزلات المحلية لبكتريا Lactobacillus

الأختبار	العزلات المحلية البالغ عددها (30)	النتيجة حسب المرجع
أختبار الكاتليز	-	-
أختبار تحلل الجيلاتين	-	-
أختبار تحلل النشأ	-	-
أختبار تحلل الكازين	-	-
النمو في وسط الأكار المغذي	-	-

غربلة العزلات على أساس قدرتها على مقاومة الحموضة

تعد دراسة صفة مقاومة بكتريا Lactobacillus لحموضة المعدة من الصفات التي ينظر اليها ببالغ الأهمية عند أنتقاء سلالة من بكتريا Lactobacillus وأستخدامها لأغراض علاجية في الحيوانات المختبرية أو في تصنيع منتجات علاجية مخمرة. بينت النتائج في الجدول (2) مقدرة عزلات بكتريا Lactobacillus المختلفة في مقاومة الحموضة إذ تراوحت قيم لوغارتيم أعداد بكتريا Lactobacillus المقاومة للحموضة ما بين (4.3- 5.8) بعد 90 دقيقة من حضنها في مرق MRS المعقم ذي رقم هيدروجيني 3.5. والملاحظ ان الاعداد لم تنخفض دورة لوغارتيمية وقد أظهرت كل من العزلات (Lb24, Lb20, Lb18, Lb15, Lb14, Lb7) مقاومة عالية للحموضة إذ تراوحت قيم لوغارتيم أعدادها الحية ما بين (5.24- 5.8) مقارنة بقيم لوغارتيم الأعداد الحية لبقية العزلات بعد 90 دقيقة من حضنها في مرق MRS المعقم ذي رقم هيدروجيني 3.5. أما فيما يخص العزلة Lb9 المعزولة من لبن كانون والتي أستخدمت لغرض المقارنة مع بقية العزلات لم تبدِ مقاومة عالية إذ انخفضت قيم أعدادها اللوغارتيمية أنخفاض شديد من (4.64) في وقت الصفر إلى (3.72) بعد 90 دقيقة من حضنها في مرق MRS المعقم ذي رقم هيدروجيني 3.5 أي ما يقرب من دورة لوغارتيمية واحدة والتي تعد مهمة احصائياً (21) وقد يعزى سبب ذلك إلى مصدر العزل الذي عزلت منه مقارنة ببقية العزلات التي تم عزلها من مصادر معوية بشرية، إذ لاحظ (8) تباين صفة المقاومة للحموضة في عزلات بكتريا Lactobacillus

المعزولة من مصادر معوية بشرية وإن ذلك يكمن في أمتلاك بعضها على بروتينات في جدرانها وظيفتها الرئيسية حمايتها من الظروف الحامضية المحيطة بها والسماح لها بالنمو في ظل تلك الظروف. أي أن صفة المقاومة للحموضة تعتمد على طبيعة السلالة نفسها (22)، وقد ذكر (23) أن قيمة الرقم الهيدروجيني في المعدة يعتمد أساساً على مكونات الوجبة الغذائية المتناولة، فيكون أثناء الصيام حوالي (1.5) ولكنه يعود للأرتفاع بحدود (4– 5) بعد تناول وجبة الغذاء، وعادةً عندما تختار السلالات البكتريا كأحياء علاجية يجب أن يراعى مقاومتها للرقم الهيدروجيني للوسط والذي يكون بحدود (4–2). فضلاً عن ذلك فأن الوقت الذي تستغرقه البكتريا لمرورها وخروجها من المعدة هو تقريباً 90 دقيقة (24) وإن وقت حضن عزلات بكتريا Lactobacillus في مرق MRS المعقم ذي رقم هيدروجيني (3.5) بدرجة حرارة 37 مْ تحت ظروف قليلة التهوية كان 90 دقيقة أيضاً ويمكن ان تعد الظروف المتبعة في هذه الدراسة قاسية إذا ما قورنت بالظروف الطبيعية التي تواجه البكتريا أثناء مرورها في الجهاز الهضمي للأنسان، إذ أن وجود البكتريا في المعدة لن يكون بشكل أنفرادي فالبكتريا تكون محاطة بالعديد من جزئيات الغذاء التي توفر لها الحماية وتقلل من التأثير التثبيطي لحامض الهيدروكلوريك، فضلاً عن أن دخول الغذاء مدعم بالبكتريا يعمل على رفع الرقم الهيدروجيني للمعدة ليصل بحدود (4–5) وهذا يعد ظرفاً بيئياً أقل تطرفاً من الظروف المتبعة في الدراسة.

جدول (2): لوغارتيم الأعداد الحية لبكتريا Lactobacillus المقاومة للحموضة

رمز العزلة	لوغارتيم العدد الحي في وقت الصفر	لوغارتيم العدد الحي بعد 90 دقيقة من حضنها في مرق MRS ذي رقم هيدروجيني 3.5
Lb1	4.74	4.7
Lb2	4.8	4.8
Lb3	4.92	4.9
Lb4	4.82	4.72
Lb5	4.82	4.77
Lb6	4.97	4.84
Lb7	5.8	5.77
Lb8	4.51	4.5
Lb9	4.64	3.72
Lb10	4.35	4.3
Lb11	4.38	4.24
Lb12	4.88	4.86
Lb13	4.65	4.64
Lb14	5.5	5.43
Lb15	5.69	5.69
Lb16	3.95	3.9
Lb17	5	4.87
Lb18	5.17	5
Lb19	4.52	4.5
Lb20	5.39	5.24
Lb21	4.54	4.39
Lb22	4.58	4.56

4.5	4.6	Lb23
5.35	5.4	Lb24
4.25	4.32	Lb25
4.85	5	Lb26
4.75	4.83	Lb27
4.56	4.67	Lb28
4.72	4.8	Lb29
4.31	4.34	Lb30

غربلة العزلات على أساس قدرتها على مقاومة أملاح الصفراء

أنتقيت العزلات التي أبدت مقاومة عالية للحموضة في أختبار مقاومها لأملاح الصفراء إذ يوضح الجدول (3) أن العزلة Lb7 هي الأكفأ من بين العزلات المنتقاة في مقاومتها لأملاح الصفراء فكانت القيم اللوغارتيمية لأعدادها في وقت الصفر (5.54) وبعد مرور ثلاث ساعات من حضنها في مرق MRS-Thio المزود بنسبة 2% من أملاح الصفراء بلغت قيم أعدادها اللوغارتيمية (5.32) علماً ان العزلة Lb7 كانت أيضاً هي العزلة الأكفأ من بين العزلات المنتقاة لمقاومة الحموضة أما بالنسبة للعزلتين Lb14 و Lb15 فقد أبدتا مقاومة لأملاح الصفراء بعد مرور ثلاث ساعات من حضنهما في مرق MRS-Thio الا أن مقاومة العزلة Lb7 لأملاح الصفراء أعلى من مقاومة كلا العزلتين في حين تراوحت قيم الأعداد اللوغارتيمية للعزلات Lb18، Lb20، Lb24 ما بين (4.7– 4.82) بعد مرور ثلاث ساعات من حضنها في مرق MRS-Thio أي أن مقاومة هذه العزلات لأملاح الصفراء كانت متقاربة وهي أقل من مقاومة العزلة Lb7 والعزلتين Lb14 وLb15 أما بالنسبة للعزلة Lb9 المعزولة من لبن كانون والتي أستخدمت لغرض المقارنة مع بقية العزلات لم تبدِ مقاومة عالية إذ أنخفضت قيم أعدادها اللوغارتيمية أنخفاضاً شديداً من (4.72) في وقت الصفر إلى (3.39) (أي اكثر من دورة لوغارتيمية) بعد مرور ثلاث ساعات من حضنها في مرق MRS-Thio، وقد يعزى سبب ذلك إلى مصدر العزل الذي عزلت منه مقارنة مع بقية العزلات المعزولة من مصادر معوية بشرية، إذ تكون الأخيرة متطبعة على بيئة توجد فيها أملاح الصفراء وأعتماداً على النتائج أعلاه فقد عدت العزلة Lb7 هي الأكفأ من حيث المقاومة للحموضة وأملاح الصفراء ولذلك أستخدمت لأجراء التجارب اللاحقة في هذه الدراسة. إذ أن الظروف المستخدمة في هذه التجربة قريبة لما موجود داخل جسم الأنسان من حيث تركيز أملاح الصفراء إذ أستخدام تركيز 2% وهو مقارب لما يفرز داخل جسم الأنسان والذي يتراوح عادةً ما بين (0.5– 2%) فضلاً على ذلك أن بقاء كتلة الطعام داخل الأمعاء يستغرق 1–3 ساعات معتمداً في مدة بقائه على نوع الغذاء المستهلك وهو الزمن المستخدم في التجربة نفسه (22).

أن أختلاف درجة مقاومة بكتريا Lactobacillus لأملاح الصفراء يعود إلى طبيعة أرتباط أملاح الصفراء بجدار البكتريا إذ

أن هذا الأرتباط يحث على زيادة أفراز كميات أخرى من أملاح الصفراء ويعد بمثابة قدحة لتنظيم عملية تخليق الكولسترول وتحويله إلى أملاح صفراء وبالتالي تؤدي إلى خفض نسبة الكولسترول داخل الأنظمة الحية (25).

وذكر (9) أن بكتريا Lb.acidophilus تبدي مقاومة عالية لأملاح الصفراء أكثر من بقية أنواع جنس Lactobacillus وقد يعزى سبب ذلك إلى طبيعة البروتينات الموجودة في جدارها الخلوي علاوةً على وجود الأواصر الهيدروجينية التي تربط طبقة surface layer protein (SLP) مع طبقات الجدار الخلوي الأخرى مما يتيح للSLP أداء أفضل في مقاومة العديد من الظروف الخاصة بالجهاز الهضمي من بينها مقاومتها لتراكيز معينة من أملاح الصفراء. وتمكن (26) من أنتقاء أربع عزلات من جنس Lactobacillus من بين 200 عزلة تعود لجنس بكتريا Lactobacillus و Bifidobacterium المعزولة من مصادر مختلفة على أساس مقاومتها للحموضة بأستخدام أرقام هيدروجينية مختلفة هي 1 و3 ومقاومتها لأملاح الصفراء بأستخدام تراكيز مختلفة تراوحت ما بين (0.5– 1%) وتبين أن هذه العزلات كانت معزولة من مصادر معوية بشرية وهي Lb.rhamnosus HN0676، Lb.rhamnosus HN001، Bifidobacterium lactus HN019 و Lb.acidophilus .

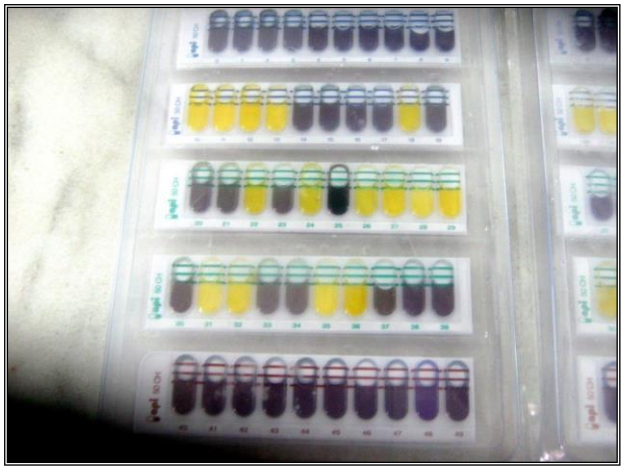
جدول (3): لوغارتيم الأعداد الحية لبكتريا Lactobacillus المقاومة لأملاح الصفراء

رمز العزلة	لوغارتيم العدد الحي في وقت الصفر	لوغارتيم العدد الحي بعد ثلاث ساعات من حضنها في مرق MRS–Thio
Lb7	5.54	5.32
Lb14	5.21	4.91
Lb15	5.31	5
Lb18	4.85	4.73
Lb20	4.98	4.82
Lb24	4.88	4.7
Lb9	4.72	3.39

تشخيص بكتريا Lactobacillus باستخدام نظام API50CH لتشخيص بكتريا حامض اللاكتيك

أستخدم نظام التشخيص API50CH للتأكد من صحة التشخيص للعزلات قيد الدراسة فضلاً على تشخيص العزلات على مستوى النوع وذلك عن طريق الكشف عن قابلية تخمرها للسكريات. إذ بلغت نسبة Lb.brevis 23% ومثلت النسبة الأعلى من بين مجموع العزلات بينما كانت نسبة كل من Lb.acidophilus، Lb.plantarium، Lb.rhamnosus 16.6% أما Lb.fermantum و Lb.paracasei فكانت نسبتها 13.3% من بين مجموع العزلات وشخصت العزلة Lb7 التي أستخدمت لأجراء التجارب اللاحقة في هذه الدراسة على أنها Lb.acidophilus أما العزلة التي أستخدمت

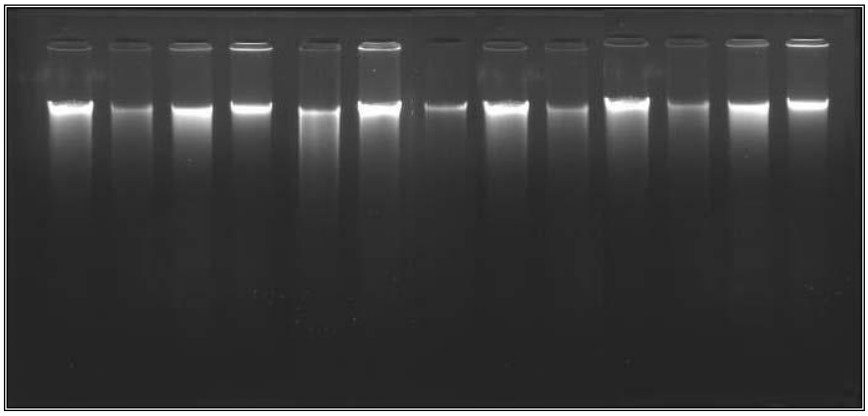
لغرض المقارنة في أختبار المقاومة للحموضة وأملاح الصفراء والمعزولة من لبن كانون شخصت على أنها Lb.delbrueckii spp bulgaricus كما موضح بالشكل (1).



شكل (1): تشخيص بكتريا Lactobacillus باستخدام نظام API50CH لتشخيص بكتريا حامض اللاكتيك

استخلاص DNA من قولون الجرذان المختبرية

أستخلص DNA من قولون الجرذان المختبرية المستعملة في هذه الدراسة وقدرت نقاوته أعتمادا على طريقة الأمتصاص الطيفي بأستخدام جهاز spectrophotometer وتراوحت ما بين (1.8–1.9) كذلك تم التأكد من تركيز DNA بترحيل DNA على هلام الأكاروز قبل معاملته مع أنزيمات التقييد إذ أن من المتطلبات الأساسية لتحقيق النتيجة المثلى عند معاملة DNA مع أنزيمات التقييد هي ضبط تركيز الـ DNA. إذ تراوح تركيز DNA ما بين (870–1550) نانوغرام/مايكرولتر علماً ان التركيز الأمثل للDNA المعامل مع أنزيمات التقييد في هذه الدراسة هو 1 مايكروغرام/مايكرولتر. وكذلك أن أهمية الترحيل الكهربائي أيضاً للتأكد من أن DNA سليم ويوجد بهيئة حزمة واضحة غير مفككة فضلاً عن أنتقاء نماذج DNA الجيدة لأجل معاملتها مع أنزيمات التقييد والحصول على أفضل النتائج.



شكل (2): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بتركيز 0.8% للـ DNA المستخلص من قولون الجرذان المختبرية إذ ان: 1 يمثل DNA قولون الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) وشرحت بعد 24 ساعة، 2 يمثل DNA قولون الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) وشرحت بعد 48 ساعة، 3 يمثل DNA قولون الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) وشرحت بعد 72 ساعة، 4 ،5 ،6 ،7 يمثل DNA قولون الجرذان المختبرية والمعاملة بخلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus قبل حقنها بمادة (AOM ، 8،9 ،10 ،11 يمثل DNA قولون الجرذان المختبرية والمعاملة بخلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus بعد حقنها بمادة (AOM)، 12 ، يمثل DNA قولون الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) وشرحت بعد شهر ونصف من موعد الحقن (سيطرة موجبة)، 13 يمثل DNA قولون الجرذان المختبرية (سيطرة سالبة).

نلحظ من الشكل (2) أن التركيز DNA العالي يظهر بشكل حزمة سميكة لزيادة التركيز وأخرى حزمة دقيقة ذات تألق باهت نوعاً ما لقلة تركيز DNA.

دراسة التداخل بين خلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus ومادة (AOM) المسرطنة

1- الدور الوقائي بخلايا ومكونات بكتريا *Lb.acidophilus* قبل الحقن بمادة المسرطنة (AOM)

أن نماذج DNA المستخلصة من قولون الجرذان المختبرية المعاملة بخلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus لمدة 14 يوم والمحقونة بمادة (AOM) في اليوم الحادي عشر عند حضنها مع أنزيم MSPI لمدة ساعتين ونصف وبدرجة حرارة 37مْ ظهرت بشكل مسحة ضمن هلام الترحيل أما عند حضنها مع أنزيم HPaII فقد ظهرت بشكل مسحة أيضاً ولكنها أصغر حجماً من مسحة أنزيم MSPI وأقل كثافة من حزمة DNA المتكونة نتيجة معاملة نماذج DNA الخاصة بمجموعة حيوانات السيطرة الموجبة مع أنزيم HPaII أما بالنسبة لنماذج DNA الخاصة بمجموعة حيوانات السيطرة السالبة التي تم حضنها مع كلا الأنزيمين MSPI ، HPaII فقد ظهرت بشكل مسحة ضمن هلام الترحيل. كما موضح بالشكل(3).

أن ظهور قطع DNA المعاملة بخلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus بشكل مسحة صغيرة ضمن هلام الترحيل مع أنزيم HPaII مقارنة بقطع DNA الخاصة

بمجموعة حيوانات السيطرة الموجبة والتي ظهرت بشكل حزمة ضمن هلام الترحيل عند حضنها مع الأنزيم نفسه يرجع إلى دور خلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus في التأثير في مثيلة DNA وذلك من خلال التعديل في حث بروتين أنزيم الأصلاح (MGMT) والقيام بنقل مجموعة المثيل من الكوانين محاولاً أرجاعها إلى وضعها الطبيعي في DNA وهذا يتفق مع ماأشار اليه (27) في دور بكتريا Lactobacillus، Bifidobacterium بالتأثير في مثيلة DNA بالحيوانات المختبرية المستحث فيها سرطان القولون بمادة (AOM)، وقد أشار (23) أن تجريع بكتريا Lactobacillus و Bfidobacterium للجرذان المختبرية لمدة أربع أيام ثم تعريضها للمطفر (MNNG) عملت على تقليل الضرر الحاصل في DNA والذي تم الكشف عنه بطريقة Comett assay (single cell micro gel electrophoresis).

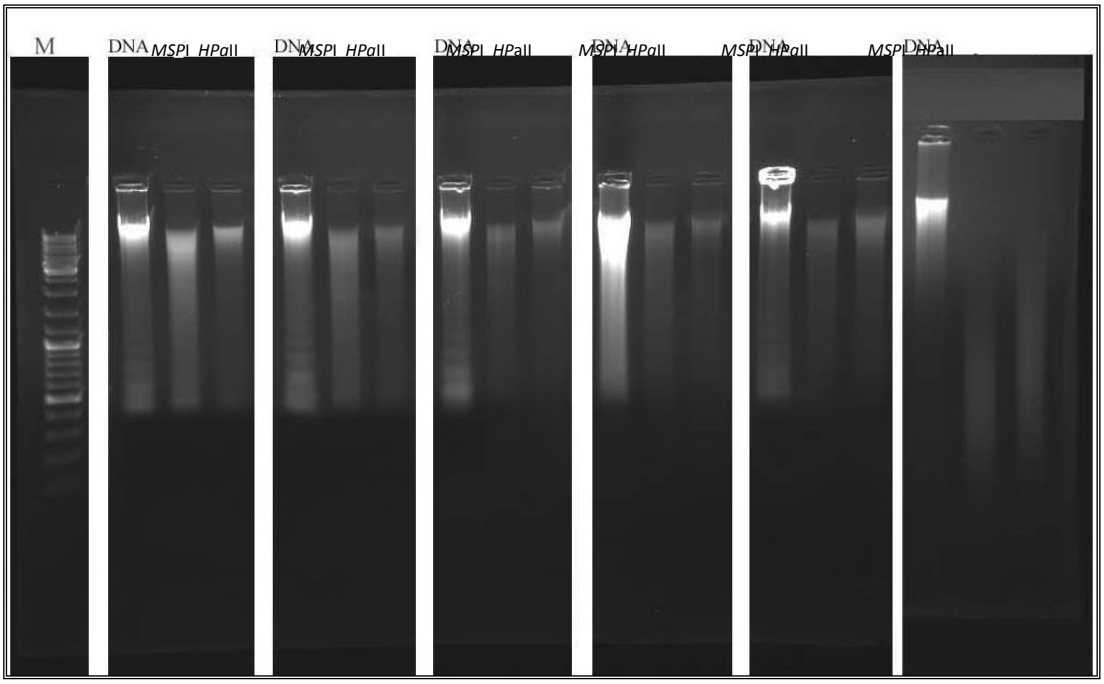
وقد وجد (29) أن كل من بكتريا Lactobacillus و Bfidobacterium تعمل على حث أنزيمات أزالة السمية وأهمها مجموعة Cytochrome P450 وأنزيم Glutatthion S-transderase كما أنها تعمل على خفض أنزيم Hepatic uridine diphosphoglucuronyl transferase الذي يساهم في عمليات أيض المواد المسرطنة في الجرذان المختبرية.

ولاحظ (30) تأثير تناول بكتريا Lb.acidophilus N-2 و Lb.acidophilus NCFM في فعالية الأنزيمات البكتيرية Azoreductase، وnitroreductase و β-glucuronidase لأشخاص أصحاء إذ أنخفضت فعالية هذه الأنزيمات الثلاثة عند تناول كلا السلالتين لمدة عشرة أيام وقد أوصى الباحث بضرورة أستمرارية تناول هذه البكتريا لضمان أنخفاض فعالية هذه الأنزيمات التي تعمل على تحويل المواد السابقة للمسرطنات (Procarcinogens) إلى مواد مسرطنة.

ذكر (31) أن خطورة الأصابة بسرطان القولون تزداد بزيادة فعالية Hepatic cytochrom P450 lA2 الذي يحفز على عملية أرتباط DNA مع N-acetoxy arylamin ليكون Carcinogen-DNA adducts وأن كل من راشح بكتريا Lactobacillus و Bifidobacterium يقلل من مخاطر الأصابة بسرطان القولون عن طريق التداخل والتأثير في وظيفة مكونات P450 وذلك بتثبيط فعالية بعض Hepatic cytochrome بالتأثير في عمليات أيض مادة المسرطنة (AOM).

وأشِار (30) إلى قابلية جنس Lactobacillus ان الحليب المخمر ببكتريا Lb.acidophilus يمتلك خاصية مضادة للتطفير وأن قابليته المضادة للتطفير تزداد بزيادة عدد الخلايا البكترية الحية مما يعكس أهمية الخلايا في أزالة وتثبيط المطفرات وأن أكثر الآليات فاعلية هي الأرتباط خصوصاً للبروتين السكري لجدران الخلايا البكتيرية كما أن لها قابلية الأرتباط بالأمينات متباينة الحلقات Hetro cyclic amines الناتجة من عمليات طبخ اللحوم بدرجات حرارية عالية.

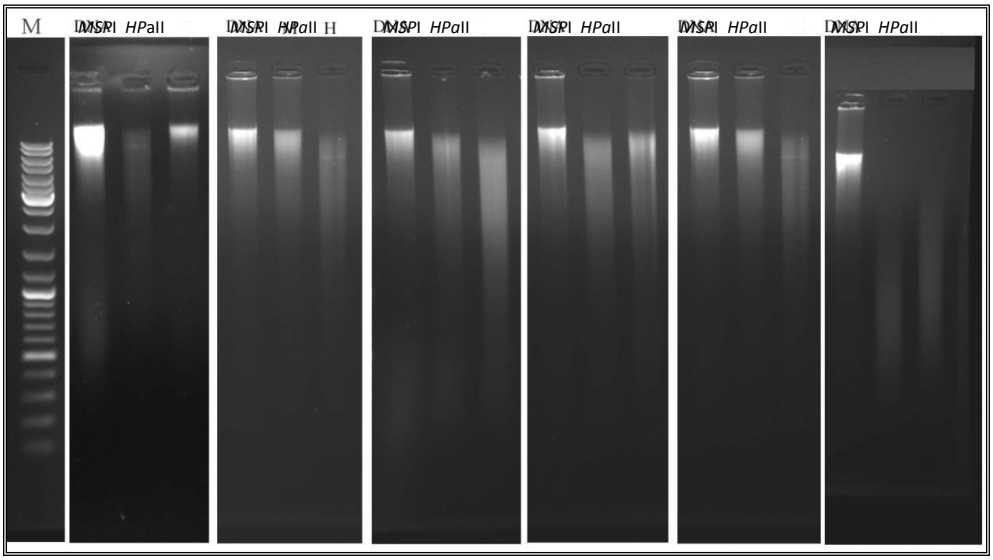
ووجد (32) أن الحليب المخمر ببكتريا Streptococcus thermophilus، B.animalis وLb.acidophilus أدى إلى تخفيض مثيلة الكوانين في DNA الجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون بفعل تناولها الأمينات متباينة الحلقات. فضلاً عن ذلك دور الحوامض الدهنية قصيرة السلسة ومنها البيوترات التي تؤثر في درجة مثيله DNA وتزيد من حث أنزيم Glutathion S-transferase في خلايا القولون وربما كانت مسؤولة عن زيادة التعبير عن الأنزيم في أنسجة القولون وبهذا فأن البيوترات تعد من أهم آليات الحماية من السرطانات التي تستحث في القولون (17).



شكل (3): التأثير الوقائي لخلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus في مثيلة DNA الجرذان المختبرية

2- الدور العلاجي لخلايا ومكونات بكتريا *Lb.acidophilus* بعد حقن المادة المسرطنة (AOM)

أن نماذج DNA المستخلصة من قولون الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) بمعدل 15 ملغم/كغم مرة واحدة في الأسبوع وعلى مدى أسبوعين متتالين والتي شرحت بعد شهر ونصف من موعد أعطاء الحقنة الثانية بمادة (AOM) وعند حضنها مع أنزيم MSPI لمدة ساعتين ونصف وبدرجة حرارة 37مْ ظهرت بشكل مسحة ضمن هلام الترحيل أما عند حضنها مع أنزيم HPaII ظهرت بشكل حزمة عريضة ومتألقة مما يدل على وجود مجاميع المثيل في DNA هذه المجموعة من الحيوانات كما موضح بالشكل(4).



شكل (4): تأثير خلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus في مثيلة DNA للجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون

إذ ان أنزيم HPaII تحسس لمجاميع (CH3) ولم يستطيع الأستمرار في تقطيع DNA مما أدى إلى ظهوره بشكل حزمة وذلك نتيجة لتأثير مادة (AOM) التي تكوّن جذر المثيل تلقائياً ذا القوة العالية للمثيله ويهاجم (O6) ذرة الأوكسجين السادسة في القاعدة النتروجينية الكوانين مؤدياً إلى تحول G→A فضلاً على ذلك فأن مادة (AOM) تمتص من قبل الخلايا الأمعاء مع تقدم الوقت فأنها تعمل على حدوث تغيرات نسيجية كما هو الحال في ظهور البؤر الشاذة والتي تتضمن وجود طفرات في جين K-ras و β-cateinen وهذا يتفق مع ماوجده (31) عند دراسة التأثير العلاجي لبكتريا Bifidobacterium في سرطان القولون المستحث بفعل مادة (AOM)، فضلا على ذلك فقد أكد الباحث (33) ظهور الورم في الجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون بفعل مادة (AOM) بعد تسعة أشهر من الحقنة الثانية بمادة (AOM) مما يدل على أن مادة (AOM) ذات تأثير تراكمي وذلك عند دراسة تأثير زيت السمك في علاج سرطان القولون المستحث في الجرذان المختبرية بفعل مادة (AOM).

أما بالنسبة لنماذج DNA المستخلصة من قولون الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) والتي جرعت خلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus لمدة شهر ونصف وعند حضنها مع أنزيم MSPI لمدة ساعتين ونصف وبدرجة حرارة 37مْ ظهرت بشكل مسحة ضمن هلام الترحيل أما عند حضنها مع أنزيم HPaII فأنها ظهرت بشكل مسحة ولكنها أقصر من مسحة أنزيم MSPI مما يعزز دور خلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus في التعديل بمثيلة DNA أي أنها ساعدت في اصلاح الضرر الناتج في DNA ذلك بتشجيع أزالة O6-methylguanine عن طريق عمليات أصلاح DNA وذلك بتشجيع حث أنزيم (MGMT) الذي يعمل على نقل

مجموعة المثيل من الكوانين إلى الحامض الأميني cysteine الموجود في الموقع الفعال له وبهذا يصبح أنزيم (MGMT) أنزيماً غير فعال فهو يعد بمثابة أنزيم أنتحاري (Suicideenzyme) علماً أن عملية الأصلاح هذه تتوقف على عدد جزئيات أنزيم (MGMT) الفعالة التي يمكنها القيام بعملية الأصلاح موقعياً، أن هذه النتائج جاءت متوافقة مع ماذكره (27) عند دراسة دور بكتريا B.longum وLb.acidophus في خفض تعبير جين rasp-21 المرتبط بتوالد الخلايا وأزدياد عدم تمايزها في الجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون بفعل مادة (AOM).

وأشار الباحث (34) إلى دور خلايا وراشح بكتريا Lb.acidophilus في أزالة مجموعة المثيل من O6-methylguanine وتثبيط تكوين البؤر الشاذة في قولون الجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون بفعل مادة (AOM) وذكر أيضاً قابلية سايتوبلازم بكتريا Lb.casei YIT9029 و B.longum Hy8001 في خفض معدل تكوين الورم في الحيوانات المختبرية، بيد أن الباحث (30) أشار إلى دور البروتين السكري لبكتريا Lactobacillus في تثبيط تكوين الورم بنسبة 70% في الفئران المختبرية المحقونة بخلايا ورمية فضلاً على ذلك، أكد (32) أن تجريع الجرذان المختبرية بخلايا بكتريا Lb.acidophilus ، Lb.casei وLb.rhamnosus بمعدل 1×1010 خلية/مليلتر يومياً ولمدة أربع أسابيع قبل وبعد استحداث سرطان القولون في الجرذان المختبرية بفعل مادة (DMH) أدت إلى تقليص حجم الورم بنسبة 70% وأشار أيضاً أن الحليب المخمر ببكتريا Lb.casei و B.animalis خفض فعالية أنزيم B-glucuronidase وأنزيم (UDP-GT) UDP-glucuronyl transfease الأنزيم الذي يعمل على ربط (MAM) Methylazoxy methnanol بحامض glucuronic في الكبد.

لاحظ (35) أن بكتريا Lb.gasseri، Lb.acidophilus، S.thermophilus، B.longum، B.breve، Lb.confusus خفضت الضرر الحاصل في DNA الجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون بفعل (MNNG) بنسبة 90% وذكر أيضاً قابلية بكتريا Lactobacillus المضادة للتطفير موضحاً أن هذه القابلية تصل ذروتها بالطور اللوغارتيمي للبكتريا ثم تقل بأتجاه طور الركود أي أن القابلية المضادة للتطفير لبكتريا Lactobacillus تتوقف على عدد الخلايا ومقدار الجرعة وأن البروتين السكري لجدران بكتريا Lactobacillus ربما هو المسؤول عن هذه القابلية نتيجة لربط المطفر، فضلاً على ذلك ذكر الباحث (36) أنخفاض نسبة المطفرات في غائط وأدرار الأشخاص الذين يتناولون بكتريا Lactobacillus نتيجة لقابلية البكتريا على ربط والتقاط المطفرات في الأمعاء ثم طرحها عن طريق الغائط والأدرار، أو اجراء عمليات التأيض عليها وأغلب هذه المطفرات هي الأمينات متباينة الحلقات الناتجة من عمليات طبخ اللحوم على درجات حرارية عالية فضلاً عن Nitrosamines، إذ وجد أن بكتريا Lactobacillus تحطم مركبات Nitrosamines.

وتمتلك بكتريا Lactobacillus القابلية على تعزيز وحث الجهاز المناعي لمواجهة الخلايا السرطانية إذ لاحظ (37) أن بكتريا Lb.casei shirota (LCS) أبطأت من نشوء وتكون الورم وعززت أنتاج (IL-12) انترلوكين−12، (INF-γ) أنترفيرون كاما و(TNF-α) وعامل النخر الورمي نوع الفا وبهذا فهي ثبطت تكوين الورم المستحث في الفئران المختبرية بفعل المواد الكيماوية. وذكر (34) أن زيادة فعالية الجهاز المناعي تجاه سرطان القولون المستحث في الجرذان المختبرية بفعل المواد الكيمياوية نتيجة تأثير بكتريا Lb.acidophilus NCFM في زيادة فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية Natural Killer cells (NK) فضلاً على ذلك حث الجهاز المناعي لأنتاج (IL-12) انترلوكين−12، (INF-γ) و(TNF-α). وأشار (36) أن البروتين السكري لجدران بكتريا Lb.casei الفئران المحقونة بمادة 3-methylcholanthrene وغير المعاملة بالخلايا البكتيرية وبناءاً على ما ذكر سابقاً فأن بكتريا Lactobacillus تتمكن من مواجهة السرطان بعدة آليات ولا تقتصر على آلية محددة بذاتها ومنها الأرتباط بالمطفرات والمسرطنات وبهذا فهي تقلل من أمتصاصها وتعمل على أزالتها من الأمعاء أي تكون Desmutagens.

تخفيض الرقم الهيدروجيني للأمعاء نتيجة أنتاجها لحامض اللاكتيك والخليك مما يؤدي إلى أحباط البكتريا المولدة للسرطانات وبهذا فهي تعمل على تغير فلورا الأمعاء، فضلاً عن تأثيرها بزيادة فعالية بعض الأنزيمات، إذ أن

Lb.acidophilus SNUL ،YIT9029 و B.Longum HY8001 ثبط نمو خلايا سرطان القولون CT26 المزروعة في الفئران المختبرية نتيجة لحث وتشجيع الأستماتة للخلايا السرطانية، وأوضح أن معدل الأستماتة للخلايا السرطانية يزداد بزيادة التجريع فضلاً على ذلك أن أستعمال المنتجات الحاوية على Lb.acidophilus، Lb.rhamnosus، Lb.casei، B.longum، Lb.helveticus في الفئران أدى إلى زيادة فعالية البلع للخلايا الأبتلاعية مقارنة بالفئران التي أعطيت حليب معقم فقط (17).

وقد وجد (38) أن بكتريا (LCS) عززت من فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية في الفئران المختبرية المستحث فيها السرطان بفعل مادة 3-Methylcholanthrene مقارنة بمجموعة

الأنزيم الواقي (أنزيم أزالة السمية) GST يمكن أن يستحث بفعل نواتج التخمر وخاصة الحوامض الدهنية قصيرة السلسة وهي تعمل على أحباط أنزيمات α-dehgdroxylase، β-glucourinidase ، Azoreductase، Nitrorductase التي تعمل على تحويل المواد السابقة للمسرطنات إلى مواد مسرطنة.

التأثير في درجة مثيلة DNA وذلك بتشجيع عمليات أصلاح DNA وأزالـة O6- methylguanine.

أحباط تكاثر الخلايا السرطانية وذلك بتشجيع مسار الأستماتة .

منع تكون وتطور الأورام وذلك بتعزيز وتقوية الجهاز المناعي.

References

1. Coleman, R. (2004). Hormone and chemotherapy induced bone loss in breast cancer. Oncology, 18: 16-20.
2. Pennisi, E. (1998). Training viruses to Attack c ancer science, Plenum press, New York.
3. Stone, R. (2002). The difficult problem of acute myeloid leukemia in the older adlt. A Cancer Journal for Clinicians, 52: 363-371.
4. DeJong, M. Scheffer, G.; Broxterman, H.; Hooijberg, J.; Slootstra, J.; Meloen, R.; Kreitman, R.; Husain, S. and Joshi, B. (2003). Multi drug resistance tumor cell romaine sensitive to a recombinant inter lekin-4 pseudomonas exotoxin except when overxpressing the multidrug resistance protein MRPI. Cancer Research, 9: 5009-5019.
5. AL-Shammary, A. (2003). The study of New Castle disease viruses effect in the treatment of transplanted tumor in mice. M.Sc. thesis College of Veterinary Medicine, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.
6. Gayathri, D. and Devaraja, T. (2011). Lactobacillus ssp, as probiotics for human health with special emphasis on colorectal cancer. Indian Journal of Science and Technology, 4: 1008-1014.
7. Harrigan, W. and McCance, M. (1976). Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, New York.
8. Chou, L. and Weimer, B. (1999). Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strain of Lactobacillus acidophilus. Journal of Dairy Science, 82: 23-31.
9. Walker, D. and Gilliland, S. (1993). Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. Journal of Dairy Science, 76: 956-961.
10. Abubaker, F.; Abdulamir, A.; Nordin, N. and Yoke, T. (2010). Methods for precise molecular detection of probiotics microflora: Using Adjusted Molecular Biology protocols, Primer sets and PCR Assays. Biotechnology , 9: 25-32.
11. Suaeyun, R.; Kinouchi, T.; Hideki, A.; Vinitketkumnven, V. and Ohnishi, Y. (1997). Inhibitory effects of lemon grass (Cymbopongon citrarus staph) on formation of Azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon. Carcinogenesis, 18: 949-955.
12. Lee, S. and Lee, W. (2000). Inhibitory effects of lactic acid bacteria (LAB) on the azoxymethone-induced colonic preneoplastic lesions. The Journal of Microbiology, 38: 169-175.
13. Sun, J.; Huishi, Y.; Weile, G. and Yima, C. (2005). Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from Lactobacillus sp. World Journal of Gastroenterology, 11: 6330-6337.
14. Matsumoto, S.; Hara, T.; Nagaoka, Mika, A.; Mitsuyama, K.; Sako, T.; Yamamoto, M.; Kado, S. and Takada, T. (2009). A component of polysaccharide peptidoglycon complex on Lactobacillus induced an improvement of murine model of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. Immunology, 128: 170-180.
15. Lee, J.; Shin, J.; Kim, E.; Kang, H.; Yim, I.; Kim, J.; Joo, H. and Woo, H. (2004). Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by cytoplasmic fraction of Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum. Journal of Veterinary Science, 5: 41-48.
16. Sambrook, J.; Fritsch, W. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning and Laboratory Manual 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratories, New York.
17. الخفاجي، زهره محمود. (2008). الأحياء العلاجية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.
18. Holt, J. and Krieg. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, Williams and Wilkins company, USA.
19. Molin, G.; Johansson, M.; Stahl, M.; Ahrne, S. and Andersoon R. (1992). Systemic of Lactobacillus population on rats intestinal mucosa with special refrence to Lactobacillus reureri. Antonie van Lewwenhock, 16: 174-183.

20. Robinson, R. (1990). Dairy Microbiology. Vol. 1, Elsevier. London.

21. Hedges , A .J., Snannon , R . and Hobbs , R . P .1978 .Comparison of the precision obtained in counting viable bacteria by the Miles & Misra methods. Journal Applied Bacteriology, 45 : 57 – 65 .

22. Lankaputhra, W and Shah, N. (1995). Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp in presence of acid and bile salt. Cultured Dairy Products Journal, 30: 2-7.

23. McDonald, L.; Fleming, H. and Hassan, H. (1990). Acid tolerance of Leuconstoc mesenteriodes and Lactobacillus plantarum. Applied and Environmental Microbiology, 56: 2120-2124.

24. Berrada, N.; Lemeland, F.; Laroch, G.; Thourento, P. and piaia, M. (1991). Bifidobacterium from fermented Milks: survival doring gastric transit. Journal of Dairy Science, 74: 409-413.

25. Chikai, T.; Naka, H. and Ushida, K. (1987). Deconjugation of bile acids by human intestinal bacteria implanted in germ free rat. Lipids, 22: 669-671.

26. Parsad, J.; Gill, H.; Smart, J. and Gopal, P. (1998). Selection and charcterization of Lactobacillus and Bifidobacterium strains for use as probiotics. Intterrational Dairy Journal, 8: 993-1002.

27. Reddy, B. (1999). Possible mechanisms by which pro-and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. Journal of Nutrition, 129: 14785-14825.

28. Zobel, P.; Neudecker, C.; Domizalaff, I.; S.; Schillinger, U.l Rumney, C.; Moretti, M.; Vilarini, I.; Sforzolini, R. and Rowland, I. (1996). Lactobacillus and Bifidobacterium mediated antigenotoxicity in the colon of rats. Nutrition and Cancer, 26: 365-380.

29. Challa, A.; Rao, D. Chawan, C. and Shackelford, L. (1997). Bifidobacterium lomgum and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. Carcinogenesis, 18: 517-521.

30. Rafter, J. (2004). The effects of probiotics on colon cancer development. Nutrition Research Review, 17: 277-284.

31. Liong, T. (2008). Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and In-vivo evidence. International Journal of Molecular Sciences, 9: 854-863.

32. Saikali, J.; Picard, C.; Freitas, M. and Holt, P. (2004). Fermented milks, probiotic cultures and colon cancer. Nutrition and Cancer, 49: 14-24.

33. Chang, W.; Chapkin, R. and Lupton, J. (1998). Fish oil blocks azoxymethane-induced rat colon tumor genesis by increasing cell differentiation and apoptosis rather than decreasing cell proliferation. The Journal of Nutrition, 128: 491-497.

34. Soccol, C.; Vandenberghe, L.; Spier, M.; Medeiros, A.; Yamaguishi, C.; Lindner, J.; Pandey, A. and Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: a review. Food Technology and Biotechnology, 48: 413-434.

35. Wollowski, I.; Rechkemmer, G. and Zobel, p. (2001). Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. American Journal for Clinical Nutrition, 73: 4515-4555.

36. Fotiadis, C.; Stoidis, C.; Spyropoulos, B. and Zografos, E. (2008). Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. World Journal of Gastroenterology, 14: 6463-6457.

37. Park, S.; Kim, Y.; Chung, M.; Kang, B. and Ha, N. (2007). Inhibition of proliferation by anti-microbial peptide islated from Pedicoccus pentosoceus and Lactobacillus spp. cancer cell line (HT-29, SW4801 and CACO-2). Journal of Enviromental Toxicology, 22: 65-71.

38. Takagi, A.; Matsizaki, T.; Sato, M.; Nomoto, K.; Morotomi, M. and Yokokura, T. (2001). Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by probiotics microorganism. Carcinogenesis, 22: 599-605.