تطوير نظام بكتري لتحديد المطفرات في البيئة والاغذية

خامسا: استخدام عقار مضاد للسرطان السايكلوفوسفامايد

*زهرة محمود الخفاجي** *الهام عبد الهادي خلف** *غيث لطفي العزاوي**

تاريخ قبول النشر 2005/9/6

الخـــلاصـــة :

استعمل نظام تطفيـــر بكتـــري G-system مكـــون مـــن ثـــلاث عـــزلات , (*Bacillus*) G3 (*Arthrobacter*) G12 (*Brevibacterium*) G27 لاختبار القابلية التطفيرية للعقار المضاد للســـرطان Cyclophosphamide (CP) وبظروف مشابهة للتطفير بالمطفر القياسي Nitrosoguanidine (NTG).

اثر المركب على المتبقي من الخلايا الحية بعد المعاملة لمدة 15 دقيقة للعزلات الثلاثة عند استعمال تراكيز متدرجة منه ولكن كان بتاثير اقل من NTG. اما التأثير المطفر فقد فاق المعاملة بالـــ NTG في حالة حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين ولكن انعكس الحال عند اتخاذ الطفرات المقاومة للريفامبسين كمقيـــاس وقد انسحب التاثير بنفس النمط عند قياس كفاءة المطفر (طفرة/مايكروغرام من المطفر). أما قابلية العـــزلات للتطفر بالمطفرين فقد تفوقت العزلة G_{12} ، والذي انسحب على حساسية العزلة لعملية التطفيـــر وان كانـــت الطفرة G_3 قد تفوقت عليها في حالة تسجيل المقاومة للريفامبسين كواسمة وراثية والذي كان مشابها لما يحدث في حالة NTG.

المقدمة

نظرا للعلاقة الوثيقـــة بـــين التطفيـــر والتسرطن وباعتبار العملية الاولى هـــي احـــدى مؤشرات التسرطن (1) فلذلك استعملت فحـــوص التطفير للكشف عن التاثير المسرطن للمواد سواء للكشف عن المواد المسرطنة في البيئة او لغيرها من الاغراض (2) وذلك لان العلاقة بين التطفير الكيمياوي والموت في البكتريا وتوليد السرطانات اصبحت من الامور المسجلة رسميا (3) واصـــبح من المقبول في الوقت الحاضر استعمال الاحيـــاء المجهرية لتحديد صلاحية المواد جديدة الاستعمال (4،5)، والسبب يعـــود الـــى حساســـية الاحيـــاء المجهرية لتحديد مدى خطورة المواد المســـرطنة سواء في التربة او صلاحية الادوية (5،6).

وقد وجد ان فحوص التطفير يمكـــن ان تزود بنتائج نوعية حول خطورة المواد المضـــادة للاورام(7)، وعليه فان الجهات المسؤولة تؤكـــد علـــى اجـــراء اختبـــارات الســـمية الوراثيـــة Genotoxicity للادوية قبل طرحهـــا للاســـواق (8). ومركب Cyclophosphamide (CP) من الادوية المستعملة لمعالجـــة انـــواع معينـــة مـــن السرطانات اذ ان له فعالية في ايقاف تكاثر الخلايا (Cytostatic drug) ويعـــد مـــن العلاجـــات الكيمياوية القياسية المســـتعملة (9)، ومـــن جهـــة اخرى فان CP له قابلية تطفيرية في اللبائن (10) بشكل غير مباشر حيث يحتاج الى تنشيط ايضـــي الذي يتم عادة باستعمال S_9(خلاصة كبد الجرذان المحرضة والمحضر بنبذ مهروس الكبـــد علـــى

* معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا/جامعة بغداد/ العراق

سرعة 9000g) ، ولذلك تكون مشتقاته في البول مطفرة سواء للانظمة البكترية او اللبائن (14،13،12،11). وبالاضافة الى ما ذكر فان مركب CP يسبب كسور في الكروسومات (Clastogen) ولذلك يستعمل كسيطرة موجبة في العديد من الدراسات في هذا المجال (18،17،16،15).

وفي محاولة لايجاد نظام تطفير يعتمد على البكتريا الموجبة لصبغة كرام والتي تم تجربتها مع بعض المطفرات الموثقة (19)، تناول هذا الجزء من الدراسة تاثير مركب CP في عزلات النظام المكون من ثلاث عزلات G_{27},G_{12},G_3 باستعمال الواسمات الوراثية (Genetic markers) المقاومة للستربتومايسين والريفامبسين ومقارنة النتائج بالمطفر القياسي NTG.

المواد وطرق العمل

الاوساط الغذائية:

- وسط اكار اساس الدم Blood agar base من شركة Mast/England
- وسط المرق المغذي Nutrient broth من شركة Germany/Merck
- محلول التخفيف ، استعمل % من التربتون (Oxoid) من الماء المقطر.
- محلول دارئ الفوسفات: حضر بتركيز 0.05 عياري وعدل الاس الهيدروجيني الى 5.5 باستعمال محلول عياري من حامض الهيدروكلوريك (HCl).

المضادات الحيوية:

- الستربتومايسين: استعمل بشكل كبريتات الستربتومايسين Streptomycin sulphate من شركة India/Ajanta.
- الريفامبسين Rifampicin : من معمل الادوية في سامراء (SDI) / العراق.
- صبغة البلور البنفسجي Crystal violet : من شركة England /BHD.
- المطفر: استعمل Cyclophosphamide (CP) من شركة Fluka / سويسرا .

العزلات البكترية :

عزل عدد من البكتريا من نماذج تربة من مناطق بعيدة عن مصادر التلوث والمدن ، تم إجراء التخافيف اللازمة وزراعتها على وسط اكار أساس الدم وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة للحصول على مستعمرات معزولة.

* **اختيار تركيز المضاد الحيوي** : تم باستعمال طريقة التدرج بالتركيز في الأطباق (20)

* **اختبار الحساسية لصبغة البلور البنفسجي** :استعملت تراكيز متدرجة من الصبغة 7،6،5،4،3،2، ملغرام/مللتر وحددت حساسية العزلات باستعمال طريقة الأقراص الورقية (21)

* **تحديد عدد البكتريا الحي (Viable count):** تم باستعمال الطرق المعتمدة في هذا المجال (22)

اختبارات التطفير :

تم تحضير مزروع لوغارتيمي للعزلات التي تم انتخابها في وسط المرق المغذي الى كثافة ضوئية OD_{600} بحدود 0.15 –0.25 . فصلت الخلايا عن الوسط بالطرد المركزي وغسلت بمحلول دارئ الفوسفات بأس هيدروجيني 5.5 ثم علقت بنفس الحجم من دارئ الفوسفات وقسمت إلى عدة أقسام بحجم 5 مللتر ، وحدد العدد الحي للخلايا في وقت الصفر ، ثم عوملت النماذج بتراكيز متدرجة من CP (100،75،50،10،5) مايكروغرام/مللتر لمدة 15 دقيقة بدرجة 37° م ، بعد ذلك فصلت الخلايا من المحلول وغسلت بمحلول دارئ الفوسفات ثم علقت وحدد العدد الحي بعد المعاملة مباشرة ،وكذلك زرعت النماذج

على أوساط حاوية على الستربسومايسين (10 مايكروغرام / ملليتر) والريفامبسين(20 مايكروغرام / ملليتر) لتحديد الطفرات المقاومة . ثم حصنت النماذج بدرجة°37 م لليوم الثاني لغرض التعبير الظاهري Phenotypic expression (23) وفي اليوم التالي تم تحديد عدد الخلايا الحي وكذلك تم تحديد عدد الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية الستربتومايسين ،الريفاسين ، الستربتومايسين + الريفامبسين (12، 14)

الحسابات:

أجريت الحسابات وفق المراجع الخاصة(23)

1. تحديد الجزء الحي المتبقي Survival (Sx) fraction
   $Sx = Ns/No$
   X تركيز المطفر
   Ns عدد الخلايا المتبقية بعد المعاملة مباشرة
   No عدد الخلايا الحية في نموذج السيطرة (بدون معاملة)
2. تردد Lethal hits (Hx) وفق المعادلة
   $Sx = \exp[-Hx]$
3. تردد الطفرات Mutant frequency (Mx)
   $Mx = N_m x/No$
   $N_m x$ عدد الطفرات المستحثة عند التركيز
4. حاصل الطفرات Mutant yield (Yx)
   $Yx = N_m /No$
5. أعلى حاصل للطفرات عند تركيز معين أو عند اقل تركيز مستعمل Ymax
6. قابلية الخلايا للتطفير النسبية Relative (Rmt) mutability
   $Rmt = Y_{max}/Hx$
7. حساسية التطفير النسبية Relative mutational sensitivity (Rms)
   $Rms = Y_{max}/x$
8. كفاءة المطفر Mutagen efficiency
   $Mut.\ Eff.$ =No. of mutant/ml /µg mutagen

النتائج والمناقشة

العزلات المستعملة تتأثر بالبلور البنفسجي الذي يصل وزنه الجزيئي الى 409 اما مركبCyclophosphamide (CP) فيصل وزنه الجزيئي الى 279.1 دالتون ويستعمل في علاج السرطانات بكونه من الادوية (Cytostatic drug) (10) وقد استعمل لدراسة تاثيره التطفري في العزلات ويوضح (الشكل1) تاثيره القاتل للخلايا اذ مثل تاثيره في المتبقي من الخلايا ($S\chi$) Survival Fraction وما يقابله من اهداف القتل lethal hits ($H\chi$) في الخلية، ومقارنة هذه المؤشرات عند استعمال المطفر NTG القياسي حيث يوضح ان العزلة G_3 لها اعلى قيم للـ Hx عند التركيز 100 مايكروغرام من CP مقارنة بالـ NTG عند استعمال 50 مايكروغرام (0.766)، اما العزلة G12 فيلاحظ ان التركيز الاكثر تاثيرا في احداث اصابات في الخلية كاهداف قاتلة هي بالتركيز 100 مايكروغرام من CP اما NTG فقد ادى الى مثل هذه النتيجة عند التركيز 10 مايكروغرام ، والعزلة G_{27} كانت خلاياها اكثر عرضة للقتل وبشكل اوضح عند استعمال NTG الذي ادى عند التركيز 100 مايكروغرام الى ايصال اهداف القتل الى اقل بقليل من 100 % اذ اقتربت قيمة Hx من100 (Ln Natural log) البالغة 4.605 (23) اذ لم يبق من الخلايا الا نسبة 0.016 من العدد الذي بدأ به .

وبما ان عمليات القتل تكون بمثابة احداث منفصلة عن التطفير نوعا ما (23) كان لابد من دراسة بعض مؤشرات التطفير

للمواد ، وفي البدء تم حساب حاصل الطفرات Mutant yield Yχ عند اقل تركيز مستعمل (Ymax) لـ 10 مايكروغرام / مللتر من المطفرين والنتائج موضحة في (الشكل2) وباستعمال طفرات المقاومة للستربتومايسين ومقاومة الريفامبسين كواسمات وراثية. ويتضح من النتائج ان تاثير المطفرين يعتمد على العزلة المستعملة بالاضافة الى اعتماده على الواسمة الوراثية.

وفي مجال تحديد التاثير المطفر للمواد تم حساب عدد الطفرات / مللتر التي يحثها المطفر CP والمطفر القياسي NTG كما موضح في الشكل ويوضح الشكل 3 تفوق CP على NTG من حيث الطفرات المقاومة للستربتومايسين في العزلات الثلاثة، في حين انعكس ذلك في الطفرات المقاومة للريفامبسين وتحدد الجهات المسؤولة مثل WHO,EPA الى ان المادة تعد مطفرة (وبالتالي مسرطنة) فيما اذا ادت الى زيادة خطية في تردد الطفرات (Mχ) Mutation frequency عند ازدياد التركيز المستعمل من المادة (22،23) لذلك حسب Mχ على مدى من التراكيز للمركب CP ومقارنة ذلك بالـ NTG كما موضح في (الشكل4) للطفرات المقاومة للستربتومايسين والطفرات المقاومة للريفامبسين ويتضح من الشكل ان هناك زيادة مضطردة في تردد الطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبسين في العزلة G_3 باستعمال CP وNTG ، اماالعزلة G_{12} فقد تفوق CP في حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين وبشكل اقل بالنسبة للطفرات المقاومة للريفامبسين، ونمطا مشابها لوحظ بالنسبة للعزلة G_{27}.

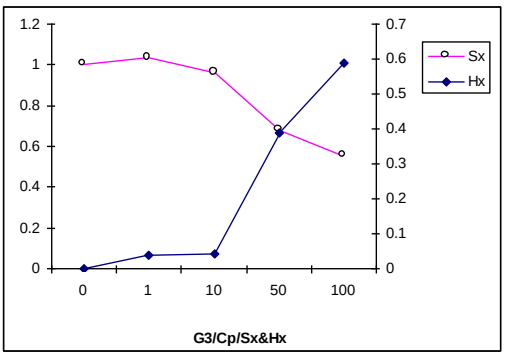
ولتقدير كفاءة CP ومقارنته في NTG تم حساب عدد الطفرات لكل وحدة وزنية من المركبات كما موضح في (الشكل5) الخاص بطفرات الستربتومايسين والطفرات المقاومة للريفامبسين والتي توضح كفاءة NTG مقارنة بمركب CP.

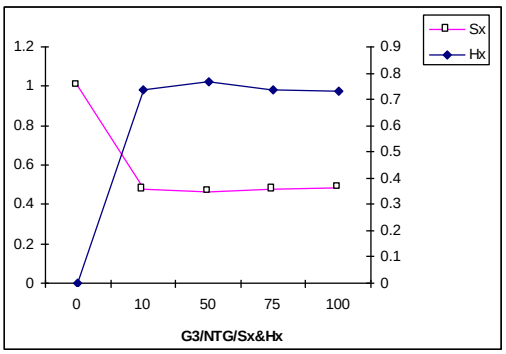
اما قابلية العزلات للتطفر بالمركبات Relative mutability *(Rmt)* (23) موضحة في (الشكل6) خاص بمركب CP والمعاملة المقارنة (استعمال NTG). ومن ملاحظة النتائج نجد ان العزلة G_{12} هي الاكثر قابلية للتطفير أي تحث بها طفرات كثيرة مقارنة بالعزلتين الاخرتين وان تفوقت العزلة G_3 قليلا بالنسبة لطفرات الريفامبسين عند استعمال CP . والمؤشر الاخر الذي يمكن استعماله لتمييز العزلات وحساسيتها Relative mutability sensitivity (*Rms*) فموضحة في (الشكل7) وتشير النتائج الى ان العزلة G_{12} هي الاكثر حساسية وان كانت العزلة G_3 اكثر حساسية في بعض الحالات.

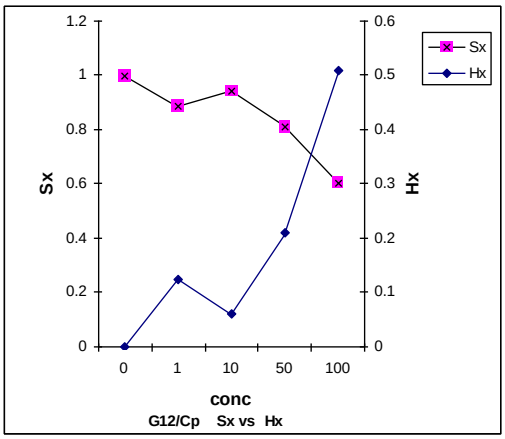
ويتضح من النتائج اعلاه ان CP ذو الوزن الجزيئي 279.1 المستعمل في علاج بعض السرطانات هو مادة مطفرة كما اثبت في العديد من الدراسات الاخرى (19,10) واثبت ذلك في نظام *Salmonella, Escherichia coli* (24,16) وتشير الدراسات الى ان المادة مطفرة غير مباشرة (16) أي تحتاج الى تنشيط ايضي ولكن المسح الذي اجري حول تقييم المطفرات (24 ، 25) والدراسات التي اجريت في هذا المجال تشير الى ان CP مطفر في سلالة ايمس TA1535 الا ان الدراسة لم تشر الى ان هناك سيطرة سالبة أي بدون وجودS كمنشط ايضي بالاضافة الى ان الدراسات الاخرى كانت تنقصها الكثير من التاكيد ولذلك فمن المتوقع ان تكون هناك قابلية تطفيرية للمركب لم يتم تسجيلها مسبقا.

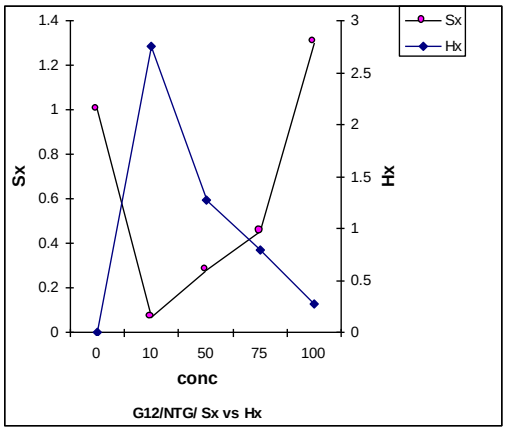
وعليه يمكن ان تستعمل عزلات النظام G-system لدراسة القابلية التطفيرية للعديد من المواد خاصة وان الجهات المسؤولة والمشرعة توصي بعدم الركون الى نظام تطفيري واحد

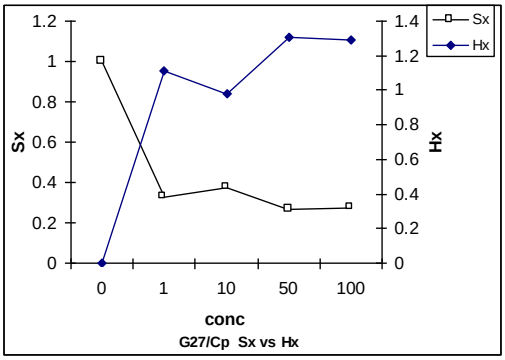
(25) كما ان المراجع تشير في العديد من نتائجها الى ان بعض المواد التي كانت سالبة عند استعمال *Salmonella* / microsomal assay كانت موجبة في حالة استعمال بكتريا *Bacillus* (26).

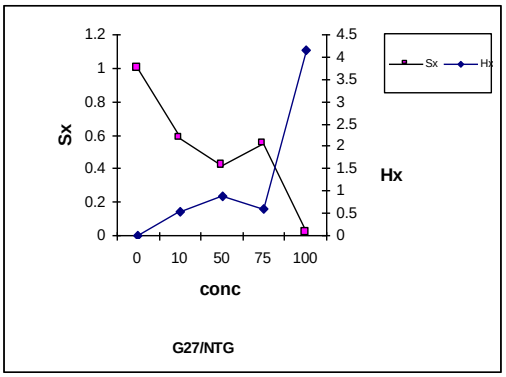




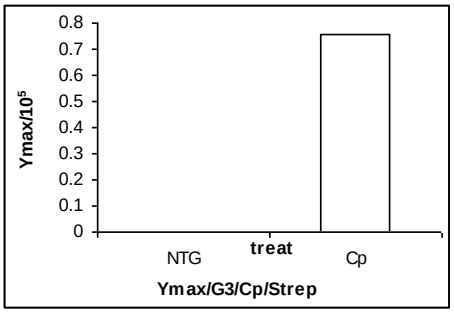


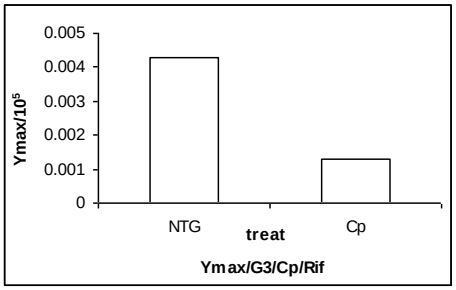


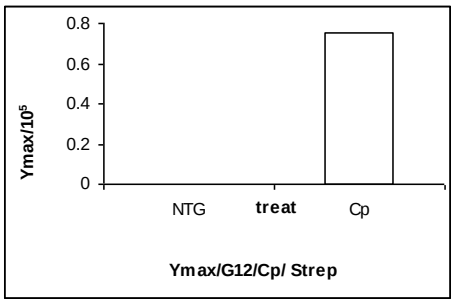


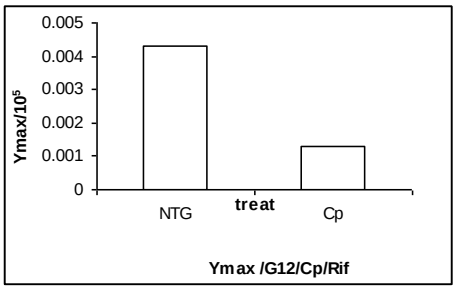


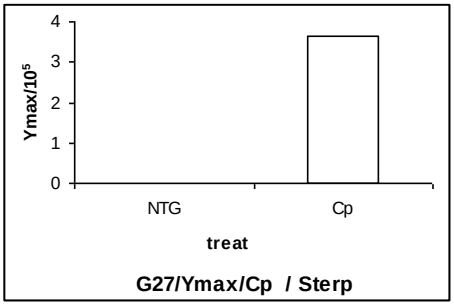
شكل 1 : تأثير تراكيز متدرجة من Cp على نسبة بقاء الخلايا الحية Sx وما يقابلها من قيم Hx على اعزلات الثلاث مقارنة بالمطفر NTG

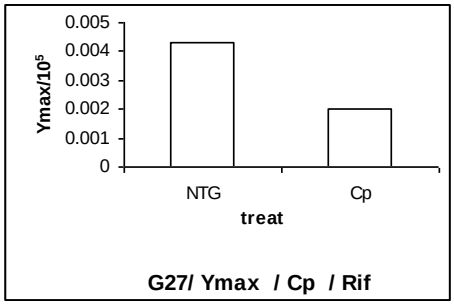




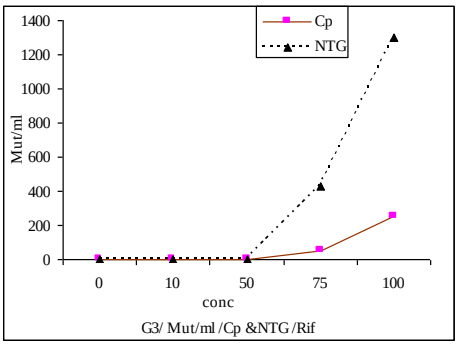


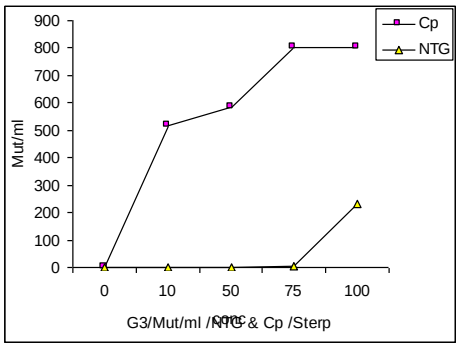


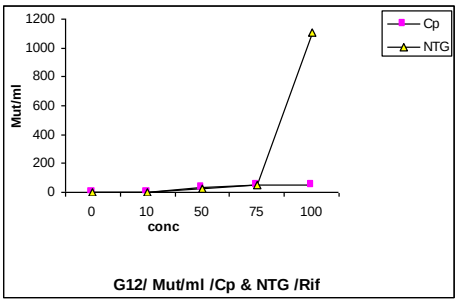


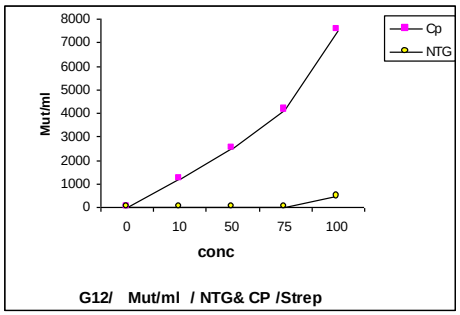


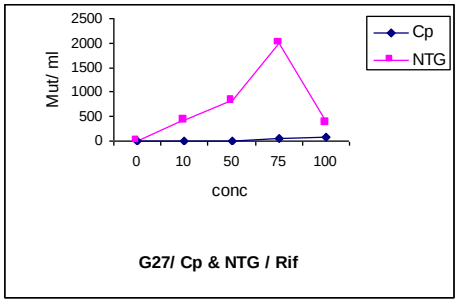
شكل 2 : حاصل الطفرات Ymax الناتج من استعمال Cp والمطفر القياسي NTG بتركيز 10 مايكروغرام لحث الطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبيسين

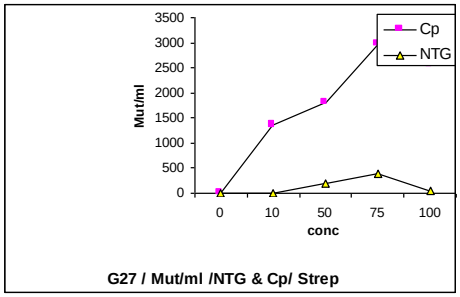




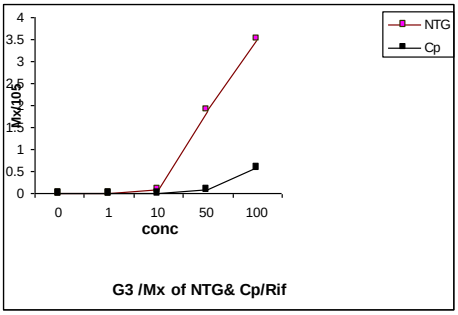


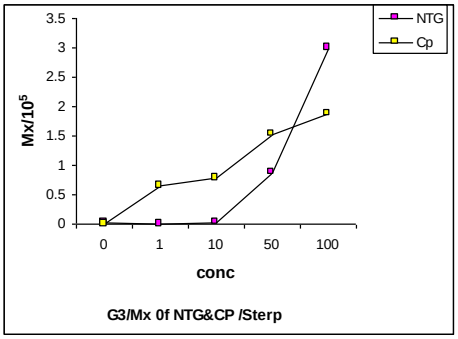


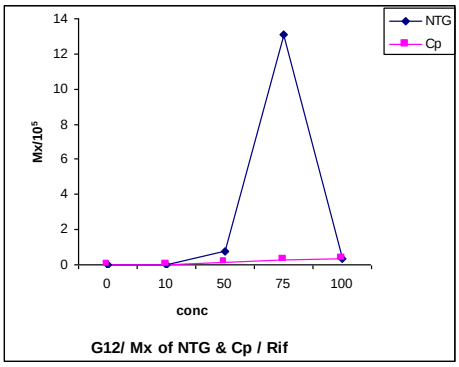


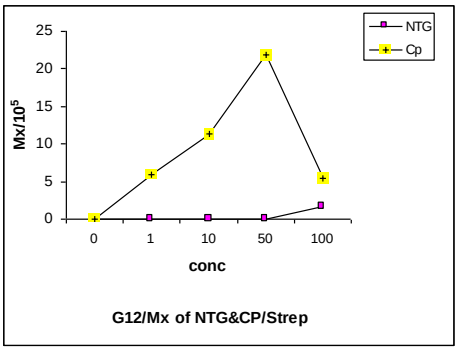


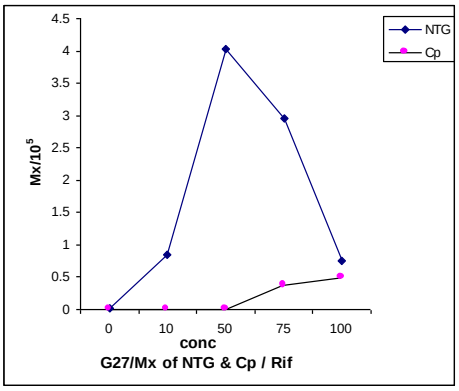
شكل3 : تأثير المطفرات في عدد الطفرت / مللتر في العزلات الثلاث بتأثير Cp و NTG

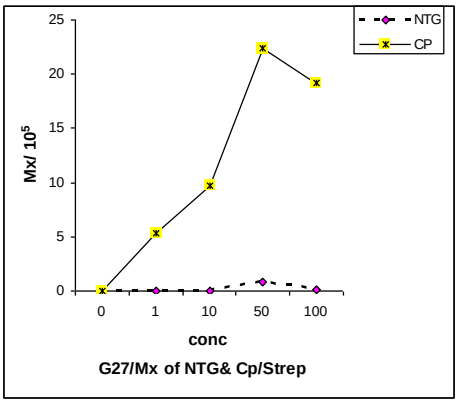




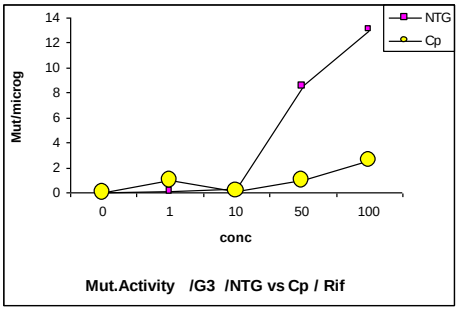


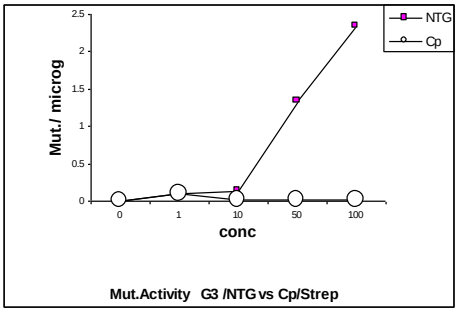


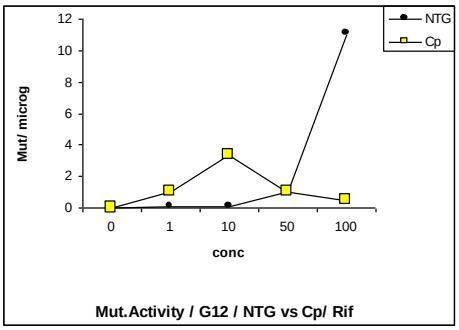


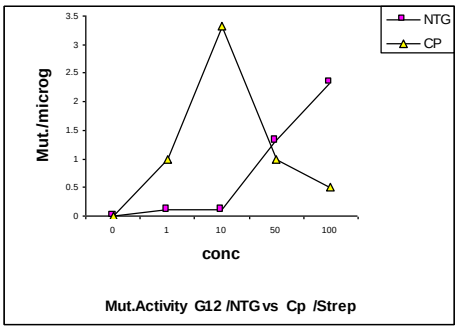


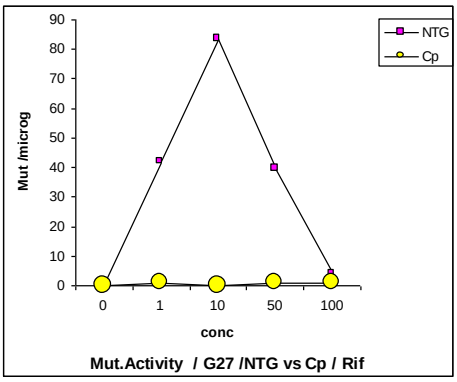
شكل 4 : تردد الطفرات Mx المستحثة بتأثير Cp مقارنة بالمطفر القياسي NTG

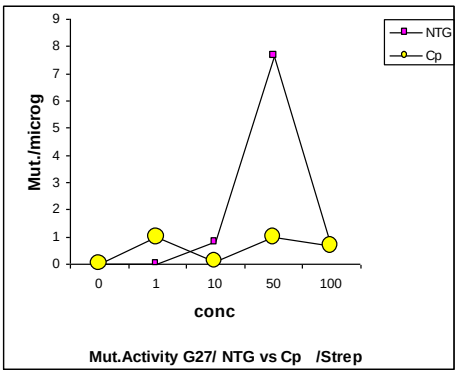




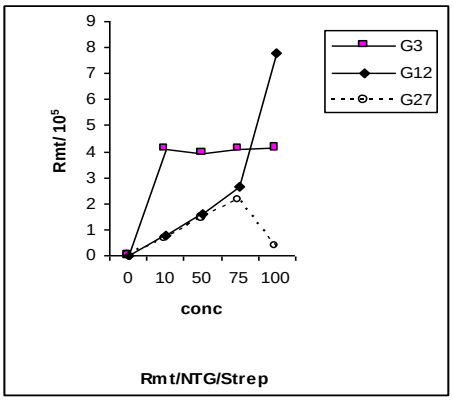


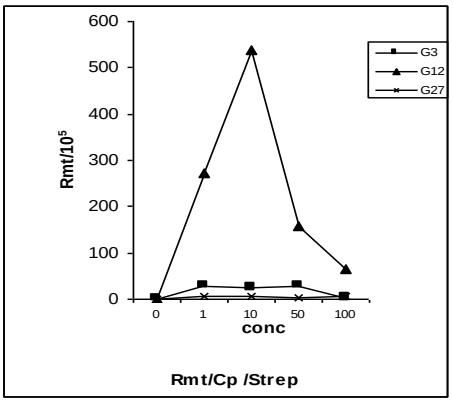


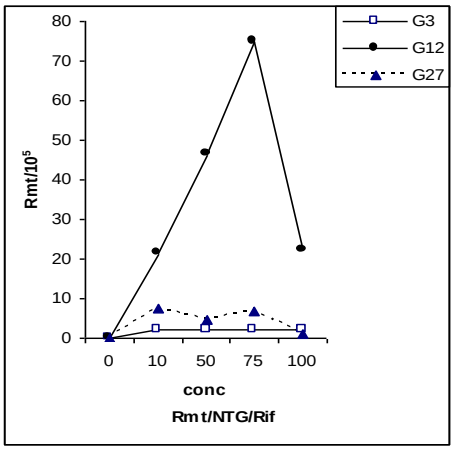


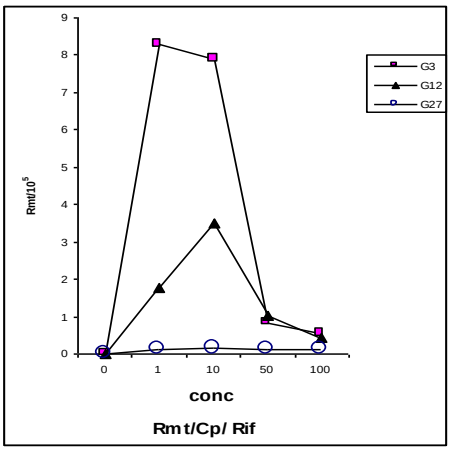


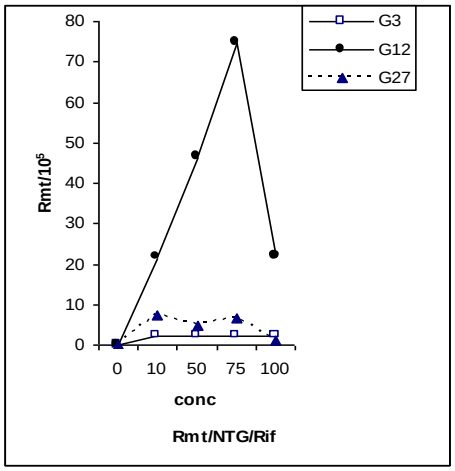
شكل 5 : كفاءة المطفر (طفرة / مايكروغرام) على حث الطفرات في العزلات المستعملة مقارنة بالمطفر القياسي NTG

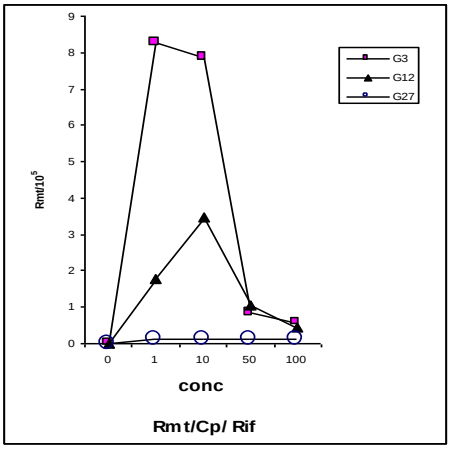




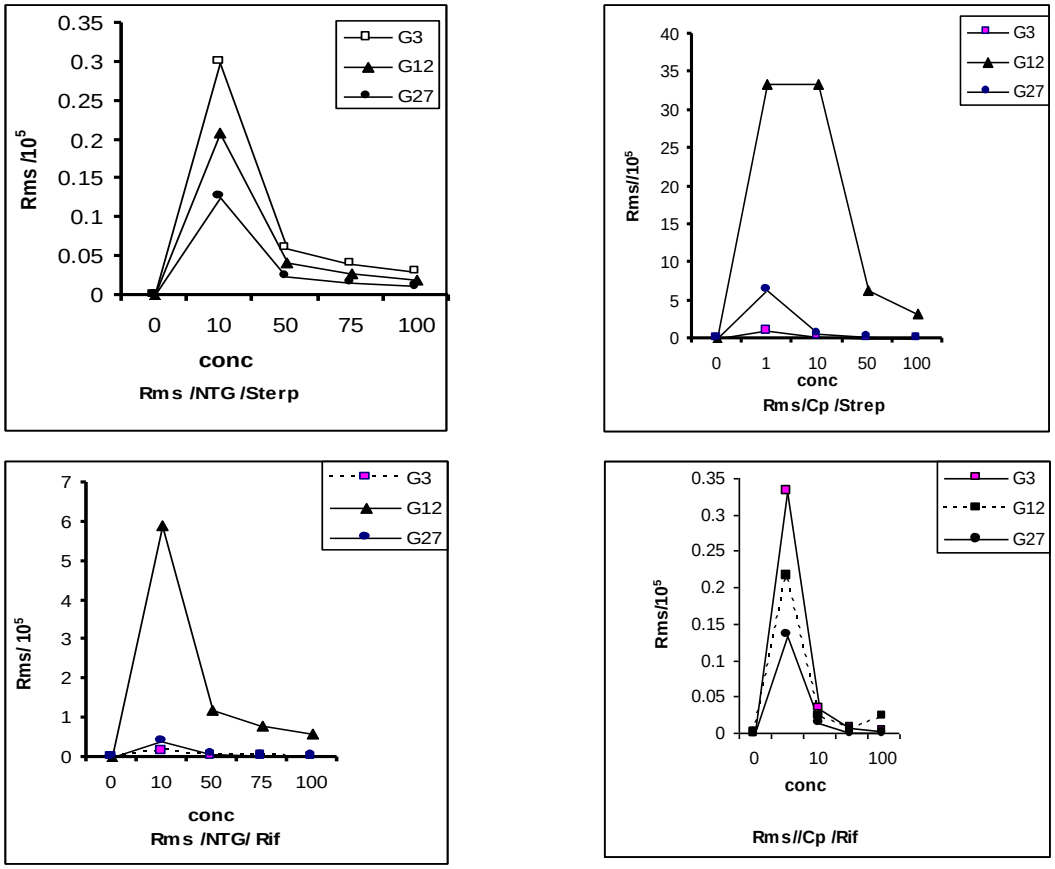








شكل 6 : قابلية العزلات للتطفير Relative mutability بالمطفر Cp مقارنة بالمطفر القياسي NTG



شكل :7 حساسية العزلات Relative mutational sensitivity للتطفيرCP& NTG

Furocoumaryl arcinogenes/ Mutagens & their Interactions with Nucleic Acids. *In* "Microbial Testers:Probing Carcinogenesis"Ed.I.C.Felkner .Marcel Dekker Inc.: New York,Basel.

4. McMahon,R.E.,Cline,J.C.&Thompson,G.Z.1979.Assay of 855 test Chemicals in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens.Cancer Res.*39*: 682-693.

5. Rao,K.S.,Young,M.D.,Shaw, M.S.&Parton,J.W.2004.Mutagenicity testing applied for regulation of developing products. Curr.Separations.*20*:141-144.

References

1. Gericke,D.1983.Microbiological short-time tests for the evaluation of mutagenic potential of chemical substances. Naturwissenschaften *70*:137-179.

2. Ward,J.B.,Rinkus,S.J.&Legator,M.S.1981.Strategies for Overcoming the Deficiencies of Microbial Activation System for Detecting Chemical Mutagens. *In* "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis.Ed.I.C.Felkner. Marcel Dekker Inc.:New York,Basel.

3. Song,P.S.,Ou,C.N.&Tapley,J.1981.Photo-activation of

14. Shukla,Y.,Arora,A.&Taneja,P.2003.Antigenotoxic potential of certain dietary constituents. Teratog. Carcinog.Mutagen.Suppl.*1*: 323-325.

15. Ellenberger,J.&Mohn,G.1975.Mutagenic activity of Cyclophosphamid, ifosfamide,& trofosfamide in different genes of *Escherichia coli*& *Salmonella typhimurium* after biotransformation through extracts of radent liver.Arch. Toxicol.*33*:225-240.

16. Azevedo,J.,Gomes,J.C.,Stringheta, P.C.,Gontijo,A.M.,Padovani,C.R., Riberio, L.R.& Salvadori, D.M.2003.Black bear (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice.Food chem. Toxicol. *41*:1671-1676.

17. Giannotti,E.,Vandin,L.,Repeto,R. &Comelli,R.2002.A comparison of the *in virto* comet assay with the *in vitro* chromosome aberration assay using whole human blood or Chinese hamster.Mutagenesis.*17*:163-170.

18. Shukla,Y.&Taneja,P.2002.Antimutagenic effects of garlic extract on chromosomal aberrations. Cancer lett.*8*:31-36.

19. Kamiguchi,Y.&Tateno,H.2003.Radiation & chemical induced structural chromosome abbations. Mut.Res.*504*:183-191.

20. WHO.1985.Guide to Short-Term Tests for Detecting Mutagenic & Carcinogenic Chemicals. Environmental Health Criteria # 51.

21. Kier,L.D.,Brusick,D.J.,Auletta,A. E.,Van Halle,E.S.,Brown,M.M.,Simmon, V.F.,Dunkel,V.,McCann,J.,Mortelmans,K.,Prival,M.,&Rao,T.K.1986.The *Salmonella typhimurium* /mammalian microsomal assay:A

6. Watanabe,T.&Hirayama,T.2001.Genotoxicity of soil.J.Health. Sci.*47*:433-438.

7. DeMarini,D.M.,pham,H.N.,Katz,A.J.&Brockman,H.E.1984.relationships between structures & mutagenic potencies of heterocyclic nitrogen mustards (ICR compounds) in *Salmonella typhimurium*.Mut Res. *136*: 158-199.

8. Nath,J.&Krishna,G.1998.Ssfety screening of drugs in cancer therapy.Acta Haematologica. *99*: 138-147.

9. Ojo-Amaize,E.A.,Nchekwabe,E.J., Cottam,H.B.,Bai,R.,Okogun,J. I., Adesomoju, A.A.,Oyemade,O.A.&Hamel,E.2002.Hypoestoxide a natural nonmutagenic diterpenaid with antiangiogenic & antitumor activity: Possible mechanisms of action. Cancer Res. *62*:4007-4014.

10. Oesch-Bartlmowiz, B & Oesch, F.2004.Modulation of mutagencity by phosphonylation of mutagen-metabolizing enzymes. Arch-Brochem. Biophys. *423*: 31-36.

11. Benedict,W.F.,Baker,M.S.,Haroun, L.,Choi,E. & Ames, B.N. 1977. Mutagenicity of Cancer Chemotherapeutic agents in the *Salmonella*/ microsome test. Cancer Res.*37*: 2209-2213.

12. Seino,Y.,Nagao,M.,Yahagi,T.,Hoshi,A.,Kawachi,T.& Sugimura,T. 1978.Mutagenicity of several classes of antitumor agents to *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 & TA92.Cancer Res.*38*: 148-156.

13. Pak,K.,Iwasaki,T.,Miyakawa,M.& Yoshida,O.1979.The mutagenic activity of anti-cancer drugs&the urine of given these drugs. Urol.Res.*22*: 119-124.

24. Felkner,I.C.1981.Microbial Testers:Probing Carcinogenesis. Marcel Dekker Inc.:New York,Basel.

25. Felkner,I.C.,Laumbach,A.D.&Harter,M.L.1981.Development of a *B.subtilis* system to Screen Carcinogens/Mutagens:DNA.Damaging Mutation Assays.*In* "Microbial Testers: Probing Carcinogensis".Ed.I.C. Felkner, Marcel Dekker Inc.:New York,Basel.

report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program.Mut.Res.*168*: 69-240.

22. Eckardt,F.&Haynes,R.H.1981.Quantitative Measures of Induced Mutagensis.*In* "Short-Term Tests for Chemical Carcinogens" Eds.H.F. Stich &R.H.C. San. Springer-verlag: New York,Berlin.

23. Taneja,P.,Arora,A.&Shukla,Y.2003.Antimutagenic effects of black tea in the *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay. Asian. Pac.J.Cancer. Prev.*4*:193-198.

Developing of Bacterial Mutagenic Assay System for Detection of Environmental and Food Mutagens V – Using Anticancer Drug Cyclophosphamide

Zahra M.Al-Khafaji ***Elham A.Kalaf****

Gaith L.Al-Azawi*

* Genetic Engineering of Biotechnology Institute for Postgraduate Studies/University of Baghdad.

Abstract

G-system composed of three isolates G3 *(Bacillus),*G_{12} (*Arthrobacter*)and G_{27} (*Brevibacterium*) was used to detect the mutagenicity of the anticancer drug, cyclophosphamide (CP) under conditions similar to that used for standard mutagen, Nitrosoguanidine (NTG).

The CP effected the survival fraction of isolates after treatment for 15 mins using gradual increasing concentrations, but at less extent comparing to NTG. The mutagenic effect of CP was at higher level than that of NTG when using streptomycin as a genetic marker, but the situation was reversed when using rifampicin resistant as a report marker. The latter effect appeared upon recording the mutagen efficiency (ie., number of induced mutants/microgram of mutagen).

Measuring the Relative mutability revealed that isolate G_{12} was highly mutable by both mutagens.

The Relative mutational results showed also that isolate G_{12} is more sensitive, except when recording rifampicin resistance as a genetic marker, and this pattern was similar to NTG.