نقش سیکلوهگزامایدد در افزایش حساسیت سلولهای Vero نسبت به سیتوتوکسین اشرشیاکلی‌های وروتوکسیژنیک

محمدمهدی اصلانی Ph.D.☆♦، ناصر بادامی Ph.D.★

☆ تهران،انستیتوپاستور ایران، بخش میکروبشناسی

★ تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه میکروبشناسی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۶۶۷-۱۳۱۸۵، انستیتو پاستور ایران

چکیده

* **هدف:** تعیین نقش سیکلوهگزامایدد در افزایش حساسیت سلولهای Vero نسبت به سیتوتوکسین اشرشیاکلی‌های وروتوکسیژنیک

* **مواد و روشها:** سیکلوهگزامایدد در غلظتهای متفاوت از ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تا ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمانهای مختلف، شامل روز قبل، همزمان، یک یا دو روز بعد از افزودن، مایع رویی سویه‌های استاندارد و همین‌طور قبل از افزودن نمونه‌های مدفوع (وروتوکسین مثبت به سلولهای Vero) افزوده شد.

* **یافته‌ها:** افزودن سیکلوهگزامایدد به سلولهای Vero باعث افزایش حساسیت سلولهای Vero به میزان ۴ تا ۸ برابر نسبت به وروتوکسین خواهد شد. این اثر کاملاً اختصاصی است و سیکلوهگزامایدد در غلظت مورد اشاره به‌تنهایی سیتوتوکسیسیتی بر سلول Vero ندارد.

* **نتیجه‌گیری:** در سنجش وروتوکسین در نمونه‌های مدفوع، افزودن سیکلوهگزامایدد در غلظت ۴ تا ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث افزایش حساسیت سلولهای Vero به وروتوکسین بدون اثر بر اختصاصی بودن سنجش می‌شود.

گل واژگان: وروتوکسین، اشرشیاکلی‌های تولیدکننده وروتوکسین، سیکلوهگزامایدد

مقدمه

بعضی سویه‌های اشرشیاکلی، سیتوتوکسینی تولید می‌کنند که ابتدا به‌وسیلهٔ Konowalchuk و همکارانش توصیف شد(۱). این توکسین برای سلولهای Vero سیتوپاتیک بوده و بعدها به‌عنوان وروتوکسین یا وروسیتوتوکسین (VT)[1] مطرح شد.

O'Brien (۲) و همکارانش نشان دادند که این سیتوتوکسین کاملاً با توکسین شیگلا ارتباط داشته و بعدها توسط آنها به نام توکسین شبه شیگلا معروف شد. اشرشیاکلی‌های تولید کننده وروتوکسین[2] به سروتایپ‌های مختلف O تعلق داشته و با سندرمهای اورمی‌همولتیک (HUS)[3] (۳، ۴) و کولیت هموراژیک[4] (۵، ۶، ۷) ارتباط دارند. عفونت با VTEC هم به‌صورت HUS، HC و هم به‌صورت اسهال بدون عارضه تظاهر پیدا می‌کند.

تشخیص قطعی عفونت VTEC با مشاهده وروتوکسین با استفاده از سلولهای Vero در نمونه‌های مدفوع یا اشرشیاکلی‌های جدا شده از مدفوع است (۳، ۸). از آنجایی‌که تعداد اشرشیاکلی‌های تولیدکننده وروتوکسین در افراد مبتلا بسیار پایین بوده و برای تشخیص نیاز به انجام کاری بسیار حجیم و حتی غیرعملی یعنی بررسی تعداد بسیار زیادی کلونی است و از سوی دیگر اگر همزمان تعداد زیادی کلونی مورد بررسی قرارگیرد تیتر وروتوکسین در نمونه مدفوع پائین خواهد بود؛ اگر بتوانیم حساسیت سلولهای Vero را نسبت به توکسین افزایش دهیم تشخیص VTEC در این نمونه‌ها امکان‌پذیر خواهد بود.

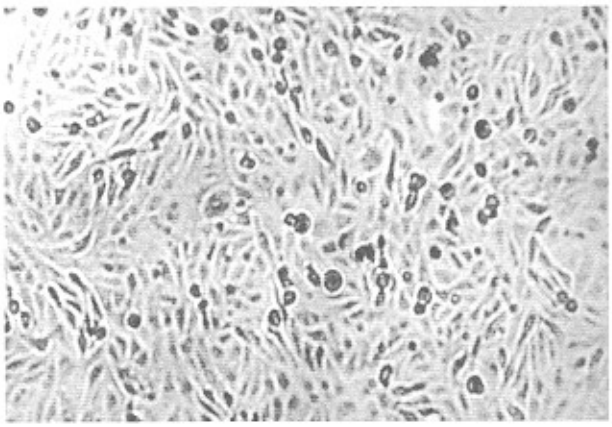
اگرچه مکانیسم عمل وروتوکسین در سطح سلولی هنوز کاملاً شناخته نشده است، اما احتمالاً شبیه توکسین شیگا در شیگلا دیسانتری تیپ ۱ است (۲). در توکسین شیگا، ساب یونیت A، مسئول فعالیت سیتوپاتیک توکسین است که با زیر واحد ۶۰S ریبوزومی سلولهای پستانداران واکنش داده و سبب مهار سنتز پروتئین می‌شود (۹، ۱۰). تصور می‌شود که این عمل از طریق مهار طویل شدن رشته پلی‌پپتیدی در حال ساخت صورت می‌گیرد. اما مکانیسم دقیق آن باید به‌طور کامل مشخص شود (۸، ۱۱، ۱۲).

هدف این مطالعه بررسی واکنش متقابل بین VT و مهارکننده سنتز پروتئین مثل سیکلوهگزامید (۱۳) است تا مشخص شود که آیا می‌توان از سیکلوهگزامید برای افزایش حساسیت سلول Vero در تشخیص وروتوکسین استفاده کرد یا خیر؟

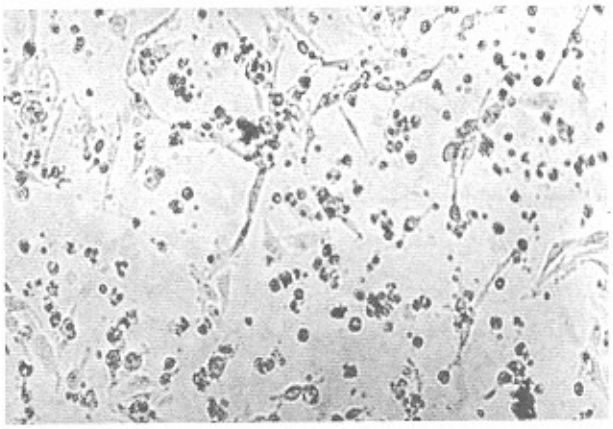
مواد و روشها

* استخراج وروتوکسین

از روش استخراج با پلی‌میکسین-B[5] برای استخراج توکسین (۸) و از سلولهای Vero (شکل ۱) برای بررسی آن استفاده شد (۱۴). استرینهای VT-1 (۱۵) و VT-2 (۱۶) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد و ۵ میکرولیتر از توکسین استخراج شده به هر چاهک (برای هر توکسین دوبار) اضافه شد و پلیتها در ۳۷° سانتی‌گراد در CO_2 پنج درصد انکوبه شدند. سپس برای مدت سه روز اثر سیتوپاتیک (CPE)[6] ناشی از وروتوکسین بررسی شد. تیترهایی که ۵۰ درصد سلولهای CPE را نشان دادند مثبت در نظر گرفته شدند. CPE مشخص کنندهٔ وروتوکسین با گرد شدن سلولها و در نهایت کنده شدن آنها از سطح پلیتها مشخص شد (شکل ۲).



شکل ۱: سلول طبیعی Vero



شکل ۲: اثر سیتوپاتیک وروتوکسین بر سلول Vero

* بررسی نوترالیزاسیون (خنثی سازی)

برای اثبات اختصاصی بودن افزایش حساسیت سیتوتوکسیک مشاهده شده در عصاره سویه‌های کنترل مثبت و سویه‌های اشرشیاکلی جداشده از بیماران در اثر افزودن سیکلوهگزامید، آزمایش نوترالیزاسیون با آنتی‌سرمهای VT-1 و VT-2 انجام گرفت. آنتی‌سرمها رقیق شده و با همان حجم از توکسین مخلوط و در ۳۷° سانتی‌گراد به مدت یک‌ساعت انکوبه شد. آنگاه ۵۰ میکرولیتر از هر مخلوط به سلول Vero اضافه شد. از سرم نرمال خرگوش به عنوان کنترل منفی و عصاره استرینهای VT-1 و VT-2 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷° سانتی‌گراد در اتمسفر CO_2 پنج درصد، مورفولوژی سلول برای تعیین خنثی شدن فعالیت سیتوتوکسیک بررسی شد. اگر توکسین به‌وسیله آنتی‌سرمهای VT خنثی

1. Verocytotoxin
2. Verotoxigenic *Escherichia coli*
3. Heamolytic Uraemic Syndrome
4. Haemorrhagic colitis
5. Colony Sweep Polymyxin-B extraction
6. Cytopathic effect

شده و توسط سرم نرمال خرگوش خنثی نشود، نشان دهندهٔ فعالیت اختصاصی سیتوتوکسیک مشاهده شده است.

* تهیه سیکلوهگزامایداد

از سیکلوهگزامایداد (MERCK Germany) محلولهای ذخیره در غلظتهای ۲۵۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در PBS[1] تهیه شد. ۲ تا ۱۰ میکرولیتر به ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت سلول اضافه شد تا غلظت لازم به‌دست آید.

* تعیین اثر سیکلوهگزامایداد بر روی سیتوتوکسیسیته وروتوکسین

نمونه‌های وروتوکسین روی سلول Vero تیتر شدند. به هر رقت تهیه شده برای تیتر وروتوکسین مقادیر مختلفی از محلول سیکلوهگزامایداد از ۰/۵ تا ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد. پلیتها به‌مدت ۳ روز از نظر سیتوتوکسیسیته بررسی شدند.

اختصاصی بودن فعالیت وروتوکسین به‌وسیلهٔ آزمایش نوترالیزاسیون تأیید شد.

* تشخیص وروتوکسین درنمونه‌های مدفوع

۱۰ نمونه مدفوع تهیه شده از استان ایلام (۱۷) که در بررسیهای اولیه از نظر وروتوکسین مثبت بوده و تیتر شده بودند و ۱۰ نمونه مدفوع از همان خانواده که از نظر وروتوکسین منفی بودند، بار دیگر با افزودن سیکلوهگزامایداد تیتر شدند.

یافته‌ها

* اثر سیکلوهگزامایداد بر سلولهای Vero

سیکلوهگزامایداد به تنهایی در غلظت ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و بیشتر برای سلولهای Vero سیتوتوکسیک بود. اما در غلظت ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر یا کمتر به مدت ۵ روز هیچ اثر سیتوتوکسیکی مشاهده نشد.

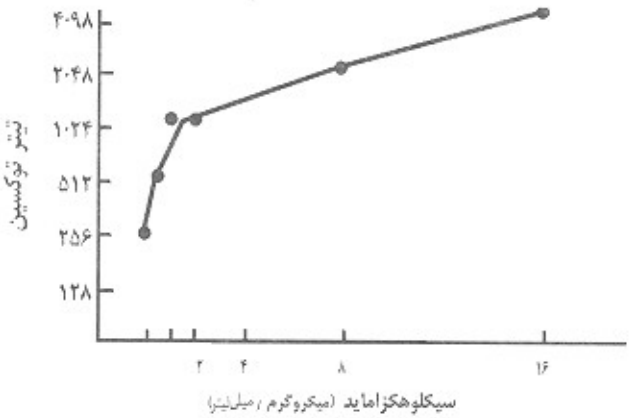
* اثر سیکلوهگزامایداد بر سیتوتوکسیسته استاندارد

افزودن سیکلوهگزامایداد در غلظتهای مختلف باعث افزایش قابل توجه تیتر وروتوکسین شد (نمودار ۱). تیتر وروتوکسین با افزایش غلظت سیکلوهگزامایداد افزایش یافت (نمودار ۱).

این اثر وقتی که غلظت سیکلوهگزامایداد از صفر به دو میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش یافت، بسیار قابل توجه بود.

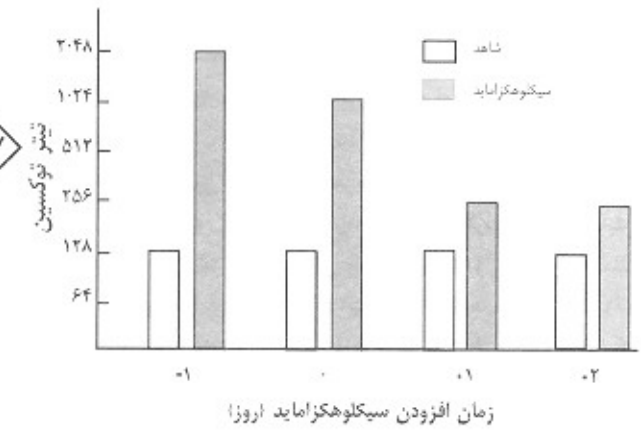
* اثر مدت تماس با سیکلوهگزامایداد بر سیتوتوکسیسته سویه‌های استاندارد

سیکلوهگزامایداد (به مقدار ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) به تیتر ثابت (۱/۱۲۸) وروتوکسین سویه‌های استاندارد در زمانهای مختلف؛ یک روز قبل، بلافاصله، یک روز و دو روز بعد از افزودن وروتوکسین به سلول افزوده شد.



نمودار ۱: اثر سیکلوهگزامایداد در غلظتهای مختلف بر یک تیتر ثابت از وروتوکسین (۱/۲۵۶) سویه استاندارد

در تمام آزمایشهای فوق تیتر وروتوکسین قبل از افزودن سیکلوهگزامایداد ثابت و در حدود ۱۲۸ بود. بیشترین افزایش در تیتر وروتوکسین وقتی به‌دست آمد که سیکلوهگزامایداد یک روز قبل از وروتوکسین به سلول افزوده شد (نمودار ۲).



نمودار ۲: اثر مدت تماس با سیکلوهگزامایداد روی سیتوتوکسیته سویه استاندارد VT سیکلوهگزامایداد (به‌مقدار ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) به تیتر ۱/۱۲۸ وروتوکسین سویه استاندارد در زمانهای مختلف یعنی یک روز قبل، بلافاصله، یک و دو روز بعد از افزودن وروتوکسین به سلول Vero افزوده شد

* استفاده از سیکلوهگزامایداد در سنجش وروتوکسین در نمونه‌های مدفوع

تیتر وروتوکسین در نمونه‌های وروتوکسین مثبت در حضور سیکلوهگزامایداد (۴ میلی‌لیتر) به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. ۳ نمونه که قبلاً منفی بودند در حضور سیکلوهگزامایداد مثبت شدند. فعالیت وروتوکسین بعد از افزودن سیکلوهگزامایداد نیز با آنتی‌سرمهای VT-1 و VT-2 خنثی شد که نشان دهنده اختصاصی بودن سیتوتوکسیسته است (جدول ۱).

1. Phosphate Buffer Saline

جدول ۱: اثر سیکلوهگزاماید بر روی سنجش و روتوکسین در نمونه‌های مدفوع

تعداد نمونه‌های مدفوع	تیتر قبل ازافزودن سیکلوهگزاماید	تیتر بعدازافزودن سیکلوهگزاماید
۷	منفی	منفی
۳	منفی	۴
۵	۲	۸
۲	۴	۱۶
۱	۸	۳۲
۲	۳۲	۲۵۶

بحث

یافته‌های ما نشان می‌دهد که سیکلوهگزاماید در غلظتهای کمتر از ۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، به‌طور قابل توجهی باعث افزایش فعالیت وروتوکسین سویه‌های استاندارد بر سلولهای Vero می‌شود. از آنجایی که این فعالیت به‌طور اختصاصی با آنتی‌سرمهای وروتوکسین خنثی می‌شود نمایانگر فعالیت سیتوتوکسیک ناشی از فعالیت وروتوکسین است. بیشترین افزایش در تیتر وروتوکسین وقتی به‌دست آمد که سیکلوهگزاماید یک روز قبل از افزودن وروتوکسین به سلول اضافه شد و وقتی که سیکلوهگزاماید همزمان با وروتوکسین و یک یا دو روز بعد از آن اضافه شد، تیتر افزایش کمتری داشت که دلیل آن مشخص نشده است.

سیکلوهگزاماید همچنین باعث افزایش حساسیت سلول Vero به وروتوکسین نمونه‌های مدفوع بدون اثر بر اختصاصی بودن تست شد. سه نمونه که در روش معمول سنجش تیتر بسیار پایین داشته و منفی تلقی شده بودند؛ در روش سنجش به همراه سیکلوهگزاماید مثبت شدند (جدول ۱). همچنین افزودن سیکلوهگزاماید به سلولها باعث افزایش تیتر در نمونه‌هایی شد که در روش معمول تیتر ۱/۲ یا کمتر داشتند. افزودن سیکلوهگزاماید منجر به افزایش تیتر نمونه‌ها از ۱/۸ تا ۱/۱۶ شد که حساسیت سنجش را افزایش داده و سبب تشخیص نمونه‌هایی که به‌دلیل تیتر پایین، منفی قلمداد می‌شدند، گردید.

تشخیص وروتوکسین در نمونه‌های مدفوع افراد در حالت نقاهت که معمولاً تیتر بسیار پایینی دارد، توسط روش سنجش با سیکلوهگزاماید دارای اهمیت زیادی است؛ زیرا این افراد در روش معمول منفی معرفی می‌شوند؛ در حالی‌که بالقوه آلوده هستند و در سنجش به همراه سیکلوهگزاماید قابل تشخیص هستند.

اثر سیکلوهگزاماید بر روی سیتوتوکسیته توکسین شیگا قبلاً بررسی شده که با نتایج حاصل از این تحقیق تناقض دارد (۱۸، ۱۹). این اختلاف احتمالاً ناشی از غلظت سیکلوهگزاماید به‌کار رفته (۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در آن مطالعه است که در حدود ۱۰ برابر کمتر از بررسی حاضر بوده است.

فرض بر این بوده که توکسین شیگاسنتز پروتئین را از طریق واکنش با ریبوزوم ۶۰S مهار می‌کند که منجر به مهار طویل شدن رشته پلی‌پپتدی در حال سنتز می‌شود (۱۱، ۱۹). تشابه نزدیک وروتوکسین با توکسین شیگا (۲۰، ۲۱) اشاره بر این دارد که احتمالاً عمل آنها نیز باید مشابه باشد.

این مطالعه روی افزایش سیتوتوکسیته وروتوکسین با سیکلوهگزاماید ممکن است افقهای جدیدی بر روی مکانیسمهای عمل این توکسین باز کند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر خود را از دکتر Takeda-Y برای اهدای آنتی‌سرمهای VT و سویه‌های استاندارد و دکتر سعید بوذری، دکتر محمدرضا پورشفیع و دکتر احمد فیاض به‌ترتیب در بخشهای بیولوژی مولکولی، میکروبشناسی و هاری انستیتوپاستور ابراز می‌دارند.

همچنین از آقایان اسماعیل شفیعی و ناصر اسلامی و خانمها معصومه پرزده و فهیمه شورج سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Konowalchuck J, Speire JI, Stavric S: Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun 1977; 18: 775-779

2. O'brien AD, Laveck GD, Thompson MR, Formal SB: Production of shigella dysenteriae type- 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J Infect Dis 1982; 146: 763-763

3. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Liro H: The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producting *Escherichia coli*. J Infect Dis 1985; 151: 775-782

4. Kamali MA, Stelle BT, Petric M, Lim C: Sporadic cases of Haemolytic Uraemic Syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stool. Lancet 1983; 1: 619-620

5. Chalmer RM, Parry SM, Salmon RL, Smith RM, Willshaw GA, Cheasty T: The surveillance of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* 0157 in Wales, 1990 to 1998. Emerg Infect Dis 1999; 5(4): 566-569

6. Chart H, Jenkins C: The serodiagnosis of infection caused by Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*. J Appl Microbiol 1999; 86(5): 731-740

7. Pai CH, Gordon R, Sims HY, Bryan LE: Sporadic cases of hemorragic colitis associated with *Escherichia coli* 0157: H7. Ann Intern Ed 1984; 101: 738-742

8. Karmali MA, Petric M, Lim C, Cheung R, Arbus GJ: Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxinon. J Clin Microbiol 1985; 22: 614-619

9. Brown JE, Rothman SW, Doctor BP: Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells by *Shigella dysenteriae* 1 toxin. Infect Immun 1980; 29: 98-107

10. Olsens S, Reisbig R, Eiklid K: Subunit structure of

Shigella cytotoxin. J Biol Chem 1981; 256: 8732-8738
11. Obring TG, Moran TP, Collins RJ: Ribonuclease activity associated with the 60S ribosome interacting protein sricin A, phytylaccin and shigatoxin. Biochem Biophys Res Commun 1985; 130: 879-884
12. Osato MS, Brawner TA, Hentges DJ: In vitro inhibition of DNA, RNA and protein synthesis by *Shigella dysenteriae* type 1 enterotoxin. Am J Clin Nutr 1979; 32: 268-628
13. Obring TG, Culp WJ, McKeehan WC, Hardesti B: The mechanism by which cycloheximide and other glutaimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocytes ribosomes. J Biol Chem 1971; 246: 174-181
14. Gentry MK, Dalrymple JM: Quantitative microtiter cytotoxicity assay for shigella toxin. J Clin Microbiol 1980; 12: 361-366
15. Yamasaki S, Furutani M, Ito K, Igarashi K, Nishibuchi M, Takeda Y: Importance of arginine at position 170 of the a Subunit of vero toxin 1 produced by enterhemorrhagic *Escherichia coli* for toxin activity. Microbial phathogenesis 1991; 11: 1-9
16. Yutsudo T, Kurazono H, Sasakawa C, Yoshikawa M, Iwaya M, Takeda T, Takeda Y: Cloning of a verotoxin (VT2) gene from a VT converting phage isolated from *Escherichia coli* 0157: H7 FEMS Microb Lett, 1987; 48: 273-276
17. Aslani MM, Badami N, Mahmodi M, Bouzari S: Verotxoin producing *Escherichia coli* (VTEC) infection in randomely selected population of Ilam province (Iran). Scand J Infect Dis 1998; 30: 473-476
18. Keusch GT: Pathogenesis of Shigella diarrhea III. Effects of Shigella enterotoxin in cell culture. Trans NY Acad Sci 1973; 35: 51-58
19. Keusch GT: Shigella toxin: description and role in diarrhea and dysentery. Pharmacol Ther 1982; 15: 403-438
20. Thompson MR, Steinberg MS, Gemski P, Formal SB, Doctor BP: Inhibition of in vitro protein synthesis by *Shigella dysenteriae* 1 toxin. Biochem Biophys Res Commun 1976; 71: 783-788
21. O'Brien AD, LaVeck GD: Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. Infect Immun 1983; 40: 657-683