



جامعة الموصل
كلية العلوم

فعالية البكتريوسينات المنقاة من جرثومتي *Pseudomonas*
Enterococcus faecalis ، *aeruginosa* والاميجدالين على
بعض خطوط الخلايا السرطانية كعلاج واعد

رشا نزار حسون عبد الله السعدون

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة أميرة محمود محمد الراوي

الخلاصة

أولت الدراسة الحالية اهتماماً للتحري عن فعالية البكتريوسينات المستخلصة من جرثومتي *Enterococcus faecalis* و *Pseudomonas aeruginosa* على أربعة أنواع مختلفة من خطوط الخلايا السرطانية تضمنت خط خلايا سرطان الثدي MCF-7، خط خلايا سرطان المبيض SKOV3، خط خلايا سرطان البروستات PC3 وخط خلايا سرطان الكبد HepG2 مقارنة مع خط الخلايا الطبيعية WRL68 مع دراسة مقارنة لفعالية مركب الاميجدالين المستخلص من حبات المشمش المحلي مع عقار الدوكسوروبيسين المستخدم حالياً علاجاً للسرطان وتأثيرها على بعض المؤشرات للخلايا السرطانية، وبشكل أكثر وضوحاً شملت الدراسة محورين أساسيين، اشتمل المحور الأول إجراء اختبار التحري عن إنتاج البكتريوسين باستخدام طريقتي الأكار ثنائي الطبقة والانتشار بالحفر وتنقية البكتريوسين المنتج من كلا الجرثومتين بثلاث خطوات شملت الترسيب باستخدام كبريتات الأمونيوم والفرز الغشائي، ثم التنقية باستخدام هلام الترشيح سيفادكس G-100.

بلغت الفعالية النوعية لبكتريوسين جرثومة *Ps. aeruginosa* (3125 وحدة/ ملغم بروتين) بعدد مرات تنقية 6.5 واسترداد بنسبة 60%، أما بكتريوسين جرثومة *En. faecalis* فقد بلغت الفعالية النوعية (2700 وحدة/ ملغم بروتين) وبعدد مرات تنقية 6.9 واسترداد بنسبة 62.7%. أظهرت الدراسة أنّ الوزن الجزيئي التقريبي لبكتريوسينات الجرثومتين *Ps. aeruginosa* و *En. faecalis* 29 كيلو دالتون و 27 كيلو دالتون على التوالي باستخدام تقنية الترشيح الهلامي مع عمود سيفادكس G-150.

تداول المحور الثاني إجراء فحص السمية الخلوية (MTT)
2,5 Diphenyl tetrazolium bromide (4,5 dimethylthiazol - 2-yl) 3- للتأثير السام للبكتريوسين المنقى من جرثومتي *En. faecalis*, *Ps. aeruginosa* وبالتركيز 6.2, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 مايكروغرام/ مل على أربعة أنواع من خطوط الخلايا السرطانية MCF-7، SKOV3، PC3 و HepG2 مقارنة مع خط الخلايا WRL68، وبينت النتائج أنّ بكتريوسين جرثومة *Ps. aeruginosa* أعطى أعلى نسبة تثبيط على خلايا سرطان الكبد HepG2 بلغت 63.2% عند التركيز 400 مايكروغرام/ مل فيما بلغت أعلى نسبة تثبيط لبكتريوسين جرثومة *En. faecalis* على خلايا سرطان الثدي MCF-7 التي بلغت 60.9% عند التركيز 400 مايكروغرام/ مل، ولوحظ عدم وجود تأثير عالٍ ضد خط الخلايا WRL68.

فضلاً على ما تقدم، توصلت الدراسة إلى تباين فعالية البكتريوسين المستخلص من كلا الجرثومتين مع اختلاف نسب التثبيط حسب نوع الخط الخلوي السرطاني ونوع البكتريوسين والتركيز المستخدم مع وجود علاقة طردية بين تركيز البكتريوسين المستخدم والفعالية المضادة للسرطان وبشكل أكثر وضوحاً تبين أنّ بكتريوسين جرثومة *Ps. aeruginosa* (السالبة لصبغة كرام) أبدى فعالية تثبيط أعلى مقارنة ببكتريوسين جرثومة *En. faecalis* (الموجبة لصبغة كرام).

ومن خلال نتائج اختبار MTT تم اختيار الخليين HepG2 و MCF-7 بوصفهما الأكثر تأثراً بالبكتريوسينات قيد الدراسة، لإجراء تقييم السمية الخلوية باستخدام High Content Screening (HCS). وتضمنت النتائج قياس بعض المؤشرات الخلوية التي شملت حيوية الخلايا Cell viability، الكثافة النووية Nuclear intensity، نفاذية غشاء الخلية cell membrane permeability، قوة غشاء المايكوكوندريا Mitochondria membrane potential وتحرر سايتوكروم Cytocrome C relasing C على الخليين HepG2 و MCF-7 باستخدام عدة معاملات من البكتريوسينات بالتراكيز 12.5, 25, 50, 100 مايكروغرام/ مل والاميجدالين بالتركيز 100 مايكروغرام/ مل وكذلك عقار الدوكسوروبيسين بوصفه سيطرة موجبة بالتركيز 20 مايكرومول ومقارنة جميع المعاملات مع السيطرة السالبة (خلايا غير معاملة) إذ لوحظت تأثيرات معنوية على معظم المؤشرات الخلوية (دلالة على حدوث الموت الخلوي المبرمج) بزيادة تركيز بكتريوسين الجرثومتين على خلايا HepG2 و MCF-7 وعلى وجه الخصوص بالتركيز 100 مايكروغرام/ مل وكذلك الاميجدالين مقارنة مع السيطرة، فيما لم يؤثر كل من الاميجدالين والبكتريوسين على مؤشر نفاذية غشاء الخلية CMP كمؤشر لحدوث التنخر ولم يظهر فرقاً معنوياً بالمقارنة مع السيطرة، وعند المقارنة مع عقار الدوكسوروبيسين لم يظهر البكتريوسين بتركيز 100 مايكروغرام/ مل والاميجدالين فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ (لكل المؤشرات الخلوية ما عدا نفاذية غشاء الخلية).

Abstract

The current study dealt with detecting the effect of bacteriocins extracted from *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*, on four various cancer cell lines included breast cancer cell line MCF-7, ovary cancer cell lines SKOV3, prostat cancer cell lines PC3 and liver cancer cell lines HepG2 compared to normal cell line WRL68 and then comparing the effectiveness of Amygdalin compound, extracted from the local apricot, with doxorubicin medication, which is currently used as anti-cancer drug and the bacteriocins effect on some cancer cells parameters. More evidently, the study pivoted on two main axes. **The first** involved conducting the detection test concerning the production of bacteriocin using double-layer agar and agar well diffusion methods and then purifying the bacteriocin resulting from both bacterial types using three steps. These steps included precipitation by ammonium sulphate, dialysis and then purifying using sephadex (G-100) filtration gel.

The specific activity of *Ps. aeruginosa* bacteriocin was (3125 U/mg protein) with 6.5 purification folds and yield percentage of 60%. As for *En. faecalis* bacteriocin, the specific activity was (2700 U/mg protein) with 6.9 purification folds and yield percentage of 62.7%. Moreover, using the gel filtration technique with Sephadex G-150 column, the results showed that the approximate molecular weights of *Ps. aeruginosa* and *En. faecalis* bacteriocins were 29 KDa and 27 KDa respectively.

The second axis included conducting the Cytotoxicity test (MTT) 3-(4,5 dimethylthiazol – 2-yl) 2,5 Diphenyl tetrazolium bromide to identify the toxic effect of the bacteriocin purified from *Ps. aeruginosa* and *En. faecalis*, at concentrations of 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 and 6.2 µg/ml on four cancer cell lines, MCF-7, SKOV3, PC3 and HepG2 compared to normal cell line WRL68.

B

Results showed that *Ps. aeruginosa* bacteriocin gave the highest inhibition percentage (63.2%) for HepG2 at the concentration of 400 µg/ml, while the highest inhibitory percentage of *En. faecalis* bacteriocin was (60.9%) for MCF-7 cells at the concentration 400 µg/ml and there was no high effect observed against the normal cell line WRL68.

In addition to what has been mentioned above, the study concluded that the activities of the bacteriocins extracted from both bacteria are different and the inhibition percentages were also different according to the cancer cell line and the type of bacteriocin and the concentration used. Also, there is a direct relationship between the concentration of the bacteriocin and the activity against cancer. In a more evident way, it was shown that the bacteriocin *Ps. aeruginosa* (gram negative) bacteria demonstrated a higher inhibitory effect compared to the bacteriocin *En. faecalis* (gram positive) bacteria.

From the results of MTT test, the two cell lines HepG2 and MCF-7 were selected as they are the most affected by the bacteriocins in question for the purpose of conducting the cytotoxicity evaluation (HCS) High Content Screening . Moreover, results involved measuring certain cellular parameters including Cell viability, Nuclear intensity, Cell membrane permeability, Mitochondria membrane potential and Cytochrome C releasing on the two cell lines HepG2 and MCF-7 using several bacteriocins treatments with concentrations of 100, 50, 25 and 12.5 µg/ ml, and the amygdalin with a concentration of 100 µg/ ml, in addition to the Doxorubicin medication as a positive control with a concentration of 20 µM and then comparing all the treatments with the negative control (untreated cells). Significant effects were observed for all the cellular parameters (A indicator to apoptosis) when increasing the concentration of the two bacteriocins on HepG2 and MCF-7 especially for the concentration 100 µg/ ml and the same was for the Amygdalin compared to the control. Amygdalin and bacteriocin had no effect

C

on the cell membrane permeability (CMP) as an indicator of necrosis and there was no significant difference compared to the control. When comparing to doxorubicin drug, the bacteriocin at a concentration of 100 μ g/ml and amygdalin showed no significant differences at $P \leq 0.05$ (for all the cellular parameters except for the cell membrane permeability).

University of Mosul
College of Sciences



The Activity of Bacteriocins Purified from
Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis
and Amygdalin on some Cancer Cell Lines as
Promising Drug

Rasha Nazar Hasoon Abdulla Al-S'adoon

Ph.D. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Amera Mahmood M. Al-Rawi

1442 A.H.

2021 A.D.