

اثرات سیتوتوکسیک وروتوکسین تیپ ۱ بر روی رده‌های سلولی Vero و MCF-7

دکتر مرتضی ستاری^۱، دکتر عبدالامیر علامه^۲، دکتر زهیر محمدحسن^۳، دکتر حسن حسین زادگان^{۴*}

۱- گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس ۲- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس ۳- گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس ۴- گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

Title: Comparative study of cytotoxic effect of verotoxin1 on Vero and MCF-7 cells.

Authors: Sattari M,(PhD); Allame AA,(PhD); Zahir MH,(PhD); Hosain Zadegan H,(PhD);

Introduction: Verotoxins are subunit toxins, that involve in pathogenesis of Enterohemorrhagic Escherichia coli. Early studies of cytotoxicity on tumor cells indicate that verotoxin1 is effective in in vitro and laboratory animals. Because of specific receptors on studied tumor cells, verotoxin1 exerts selective cytotoxicity. The purpose of this study was to compare the cytotoxicity of verotoxin1 on vero and MCF-7 cell lines.

Methods: Toxin production in five verotoxigenic strains was screened by verotoxin-producing Escherichia coli-reverse passive latex agglutination test (VTEC-RPLA kit, Oxoid, Co, Ltd) and after confirming verotoxin1 production from one of them, toxin purified by affinity chromatography. Then Vero and MCF-7 cells treated with serial dilutions of toxin, and viability and fragmentation of genome were studied.

Results: Our results indicated that MCF-7 cells was also susceptible. The Lethal Dose 50% (LD 50%) for the treated cells was about 50 nanograms of toxin per milliliter. Evidences of apoptosis in the cells were studied by the fragmentation of DNA.

Conclusion: Our results are in accordance with previous studies about cytotoxicity of verotoxin1 against human tumor cells and specially breast cancer lines. It indicates that verotoxin1 can be used as a potential selective cytotoxic factor against wide variety of human tumors.

Keywords: Verotoxin1, vero cells, MCF-7.

Hakim 2005; 8(2); 41-46.

*- نویسنده مسؤول: خرم‌آباد، گلدشت، دانشکده پزشکی، گروه میکروبی‌شناسی. تلفن: ۰۶۶۱-۳۲۲۰۶۸۵، شماره: ۳۲۰۰۳۰۹ و ۰۶۶۱-۴۲۰۹۰۴۰

E-mail: asadzade_2003@yahoo.com

چکیده:

مقدمه: وروتوکسین‌ها^۱ سمومی با ساختمان دو بخشی هستند، که در پاتوژنز سویه‌های اشرشیا کولی اتروهموراژیک دخالت دارند. مطالعات اولیه درمان برخی تومورهای سرطانی و نیز بررسی اثرات سیتوتوکسیسته این سموم روی رده‌های توموری در شرایط محیط کشت^۲ و حیوانات آزمایشگاهی نشان دهنده اثر بخشی آنهاست. این سموم به دلیل دارا بودن گیرنده‌های اختصاصی بر روی رده‌های توموری مطالعه شده بصورت انتخابی عمل می‌نمایند.

روش کار: در این تحقیق ابتدا سم تولید شده از ۵ سویه مولد وروتوکسین بدست آمده از انستیتو پاستور ایران و آزمایشگاه فرانس بو علی با استفاده از کیت آگلوتیناسیون معکوس تأیید، با استفاده از کروماتوگرافی جذبی تخلیص شد. در مرحله بعد رقت‌های مختلف سم بر روی سلول‌های ورو^۳ و MCF-7 تأثیر داده شد، و قابلیت زنده ماندن سلول‌ها^۴ و شکستگی ژنوم آنها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: بدست آمده نشان داد که سلول‌های MCF-7 حساسیت فوق العاده‌ای به وروتوکسین ۱ دارند و مقدار ۵۰ نانوگرم در هر میلی لیتر اثری معادل دوز سیتوتوکسیک ۵۰ درصد CD 50% ایجاد می‌کند. بررسی‌های شکستگی ژنوم سلولی الگوی مشخصی از بروز پدیده آپوپتوزیز را نشان می‌دهد.

بحث: نتایج این تحقیق با بررسی‌های قبلی در مورد سیتوتوکسیسته وروتوکسین ۱ برای بسیاری از سلول‌های سرطانی انسانی از جمله رده‌های توموری پستان همخوانی دارد و نشان می‌دهد که وروتوکسین ۱ می‌تواند به عنوان یکی از مواد بالقوه سیتوتوکسیک انتخابی علیه طیف وسیعی از تومورهای انسانی مورد استفاده قرار گیرد.

گل‌واژگان: وروتوکسین ۱، سلول‌های ورو، MCF-7.

مقدمه:

وروتوکسین‌ها یا سموم شبه شیگا، سمومی با ساختمان زیر واحدی هستند، که توسط برخی از سویه‌های اشرشیا کولی و شیگلا دیسانتریه تیپ ۱ تولید می‌شوند. این سموم به دلیل ساختمان زیر واحدی پروتئینی جزء قویترین سموم شناخته شده هستند. باکتری‌های مولد وروتوکسین علاوه بر اسهال آبکی یا خونی در بروز سندرم اورمی همولیتیک^۵ و کولیت هموراژیک^۶ نیز نقش دارند (۱).

در سال ۱۹۷۷ کونووالکوک و همکارانش اولین بار گزارش کردند، که برخی سویه‌های اشرشیا کولی اثرات سیتوتوکسیک روی سلول‌های ورو دارند، بدین سبب آن را وروتوکسین نام‌گذاری کردند. وروتوکسین‌ها به دو نوع اصلی ۱ و ۲ شناخته شده، نوع ۱ از نظر ساختمانی و ایمنی شناسی مشابه سم شیگا

است. که از شیگلا دیسانتریه نوع ۱ تولید می‌شود. این سموم متشکل از دو زیر واحد A و B هستند، و به ترتیب حدود ۳۲ و ۷/۵ کیلو دالتون وزن دارند. زیر واحد A بخش سمی است که دارای فعالیت N-گلیکوزیدازی است و با حذف باز آدنین از موقعیت ۴۳۲۴ در 28srRNA مانع سنتز پروتئین و مرگ سلول‌های حساس می‌شود. بخش ملکولی گیرنده اصلی این سم بر روی سلول‌های حساس Gb3 یا گلوبوتریا اوسیل سرامید است، که بنام‌های CD-77 در سطح سلول‌های لنفوسیت B مراکز زاینده و یا آنتی ژن pK در سطح سلول‌های خونی P نامیده می‌شود (۲). این گیرنده علاوه بر بخش کورتیکال کلیه‌ها و سلول‌های اندوتلیال عروق، در سطح بسیاری از سلول‌های توموری نیز شناسایی شده است. بنابر این وروتوکسین‌ها به عنوان یکی از مواد سیتوتوکسیک انتخابی برای درمان انواع تومورها مورد مطالعه و توجه قرار گرفته‌اند (۳-۹). در سال‌های اخیر دو مورد از درمان تومورهای بدخیم منژیوما و آستروسیتومای مقاوم به درمان در کانادا گزارش شده است (۴ و ۵).

سرطان پستان غلیبرغم پیشرفت‌های مهم در تشخیص و درمان هنوز از معضلات شایع زنان است. اگرچه وجود داروهای

- 1- Verotoxin
- 2- *In vitro*
- 3- Vero
- 4- Viability
- 5- Hemolytic uremic syndrome
- 6- Hemorrhagic colitis

VTEC-RPLA طبق دستور العمل کارخانه سازنده، تولید و یا عدم تولید دو سم وروتوکسین ۱ و ۲ بررسی شد. یکی از سویه‌ها که تنها تولید کننده وروتوکسین ۱ بود، در محیط TSB کشت و در شرایط ۲۰- درجه و ۱۰ درصد گلیسرول به عنوان استوک نگهداری و بنام PA101 نامگذاری شد.

سویه PA101 در ۳۷ درجه و محیط کشت TSB با ۲ درصد آگار کشت شد. کلنی باکتری‌ها بعد از ۲۴ ساعت جمع‌آوری و با بافر فسفات استریل شستشو داده شدند. سپس با ۰/۳ میلی گرم در هر میلی لیتر از پلی میکسین ب سولفات به مدت نیم ساعت در ۳۷ درجه مجاورت داده شدند، تا وروتوکسین ۱ استخراج شود. محلول حاوی سم با استفاده از آنتی پروتاز فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) با غلظت ۳۰ میلی مولار در هر میلی لیتر استریل، دیالیز و پس از لیوفیلیزه کردن با استفاده از کروماتوگرافی جذبی تخلیص و مجدداً لیوفیلیزه شده، به عنوان سم خالص برای بررسی‌های سیتوتوکسیسیته استفاده شد (۵).

تعیین قابلیت زنده بودن سلول‌های ورو و MCF-7:

از هر یک از رده‌های سلولی ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانهای در محیط کشت RPMI-1640 ۱۰ درصد سرم جنین گاوی در شرایط ۵ درصد CO₂ و ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس با تعویض محیط کشت با غلظت‌های مختلف سم (۰، ۱، ۵، ۵۰، ۱۰۰ نانوگرم در هر میلی لیتر وروتوکسین ۱) تیمار شدند. هر غلظت به صورت سه تایی صورت گرفت. تعداد سلول‌های زنده و مرده با استفاده از جذب رنگ تریپان بلو در روزهای ۱، ۲، ۳ بعد از تیمار در مقایسه با گروه شاهد (بدون تیمار سم) و مقدار سیتوتوکسیک ۵۰ درصد سم برای هر رده سلولی محاسبه گردید (۳).

بررسی قطعه قطعه شدن ژنوم سلول‌ها:

میزان قطعه قطعه شدن DNA سلولی پس از مجاورت با سم بر اساس روش زیر انجام شد: تعداد یک میلیون سلول در هر چاهک از پلیت ۶ خانهای به مدت ۱ روز با (غلظت‌های ۵ و ۵۰ نانوگرم به ترتیب برای ورو و MCF-7) وروتوکسین ۱ تیمار شد. سلول‌ها با بافر فسفات شستشو و در بافر لیز سرد (10mM تریس- HCL با pH برابر ۷/۴، 1mM EDTA از ۰/۲ درصد از تریتون X-100) به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه لیز شدند. سپس با ساتریفوژ در 14000g به مدت ۱۵ دقیقه لیزات سلول‌ها حذف و به سوپرناتانت حاوی ملکول‌های با وزن ملکولی پایین مقدار ۰/۲

مؤثری مانند تاموکسیفن^۱ و رالوکسیفن^۲ (مدولاتورهای گیرنده استروژنی یا آنتی استروژن‌ها) و یا داروهای داخل توموری آناسترازول (Armindex) و لتروزول (مانعت کننده‌های آروماتازی) که به همراه اشعه درمانی و یا ادجوانت درمانی در طی ۳۰ سال گذشته جان بسیاری از زنان مبتلا را نجات داده است (۱۰). ولی معایب مختلفی از جمله عود موارد بیماری ناشی از مناساز در چند ماه پس از درمان، اثرات ناشی از مصرف داروها بر روی متابولیسم گلوکوکورتیکوئیدها و خطرات سرطان بعد از شیمی درمانی سرطان سینه (۱۱ و ۱۲) سبب محدودیت استفاده از این سیستم‌های درمانی شده است.

هدف اصلی این تحقیق با توجه به سابقه مطالعات انجام شده، بررسی اثرات سیتوتوکسیک وروتوکسین ۱ بر روی رده‌های توموری MCF-7 در مقایسه با سلول‌های ورو بوده است.

با توجه به سابقه مطالعات سیتوتوکسیسیته وروتوکسین ۱ بر روی سلول‌های توموری مختلف و اثبات وجود گیرنده مربوطه روی آنها، رده‌های توموری MCF-7 به عنوان مدل و نمونه شاخصی از رده‌های توموری کارسینومای پستانی در این تحقیق استفاده شده است.

روش کار:

سویه‌های مولد وروتوکسین از انستیتو پاستور ایران و آزمایشگاه فرانس بوعلی تهیه گردید. از محیط کشت TSB با ۲٪ آگار و سولفات پلی میکسین ب (سیگما) سلیت ۵۴۵ خشک و Gb3^۴ (سیگما) برای تولید، تخلیص و استخراج سم استفاده شد. کیت سرولوژیک آگلو تیناسیون معکوس^۵ VTEC-RPLA (اکسوئید) برای بررسی وجود و تعیین نوع و تیترا سموم وروتوکسین ۱ و ۲ استفاده شد. رده‌های سلولی ورو و MCF-7 نیز از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

تولید و تخلیص وروتوکسین ۱:

هر یک از ۵ سویه در محیط TSB، دمای ۳۷ درجه با ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سوسپانسیون باکتری‌ها با فیلتر ۰/۴۵ میکرون استریل و با استفاده از کیت

¹ - Tamoxifen

² - Raloxifen

³ - Trypticase soy broth

⁴ - Globotriaocyl ceramide

⁵ - Verotoxigenic Escherichia coli-reverse-passive latex agglutination

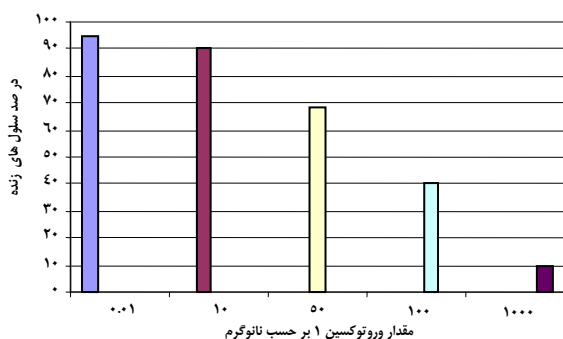
⁶ - Phenyl Methyl Solfonyl Floride

میلی گرم در میلی لیتر از پروتئیناز K در ۳۷ درجه به مدت ۴ ساعت افزوده شد، سپس DNA سلولی دو بار با فنل / کلروفرم استخراج و با اتانول سرد ۲۰°- به مدت یکشب رسوب داده و با سانتریفوژ در 14000g به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه جمع‌آوری و پلت DNA در ۱۵ میکرولیتر از بافر TE حل شد. بعد از یک ساعت تیمار با RNAse در ۳۷ درجه با استفاده از بافر loading در ژل آگارز ۱ درصد دارای اتیدیوم بروماید وجود شکستگی بین نوکلئوزوم‌ها زیر نور ماورای بنفش بررسی شد (۱۴).

یافته‌ها:

شکل ۱-ب: سلول‌های وروی تیمار شده با ۲۰ نانوگرم ورتوکسین ۱

نشان داده شده است، مقدار دوز سیتوتوکسیک ۵۰٪ غلظتی از سم است که بعد از ۳ روز از تیمار سلول‌ها سبب مرگ ۵۰٪ سلول‌های موجود در کشت تک لایه می‌شود. مقدار ۵۰ نانوگرم برای رده MCF-7 و ۵ نانوگرم برای سلول‌های وروی دارای اثر سیتوتوکسیک ۵۰٪ هستند.



نمودار ۱-الف: اثر ورتوکسین ۱ بر قابلیت زنده ماندن سلول‌های MCF-7



نمودار ۱-ب: اثر ورتوکسین ۱ بر قابلیت زنده ماندن سلول‌های وروی

در شکل ۱ نمونه‌ای از سلول‌های وروی و MCF-7 تیمار شده با ورتوکسین ۱ نشان داده شده است، مشاهدات میکروسکوپی نشان داد تیمار همزمان ورتوکسین ۱ با سلول‌ها مانع اتصال آنها در سطح فلاسک‌های کشت و یا چاهک‌های میکروپلیت می‌شود و حداکثر سیتوتوکسیسیته را بر روی آنها ایجاد می‌کند. در همه مطالعات انجام شده حساسیت کمتر سلول‌های MCF-7 نسبت به رده وروی در برابر ورتوکسین ۱ مشاهده شد.

شکل ۱-الف: سلول‌های MCF-7 که تحت تأثیر ۲۰ نانوگرم از ورتوکسین ۱ قرار گرفته است و گرد شدن سلول‌ها و اثرات سیتوپاتیک به وضوح مشاهده می‌شوند.

شکل ۱-ب: سلول‌های وروی که با ۲۰ نانوگرم از ورتوکسین ۱ تیمار شده‌اند، اثرات شدید از جمله گرد شدن سلول‌ها و دفرمه شدن آنها مشاهده می‌شود.

شکل ۱-الف: سلول‌های MCF-7 تیمار شده با ۲۰ نانوگرم از ورتوکسین ۱

در نمودار ۱-الف و ب منحنی اثرات ورتوکسین ۱ به ترتیب بر روی قابلیت زنده ماندن سلول‌های MCF-7 و وروی

بر روی آنها ایجاد می‌کند، که نشانه حساسیت زیاد آنها به وروتوکسین ۱ است.

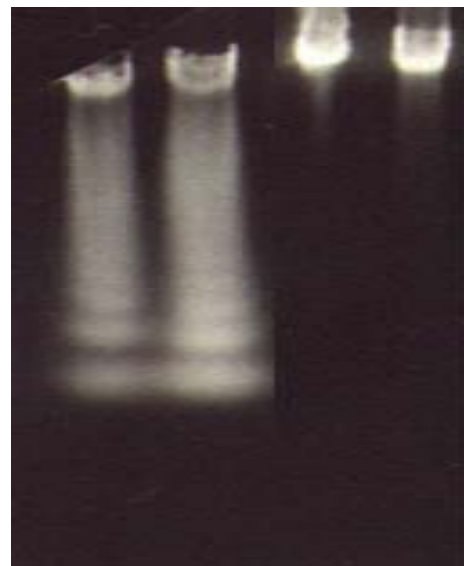
اخیراً وجود گیرنده گلیکو لیپیدی این سم در سطح سلول‌های سرطانی پستان، به همراه لنفوما و میلوما بررسی شده است، ولی علیرغم وجود گیرنده زیاد در سطح برخی از رده‌ها، حساسیت متفاوتی در برابر وروتوکسین ۱ گزارش شده است. این نشان دهنده دخالت سایر عوامل در سیتوتوکسیسیته ناشی از وروتوکسین ۱ بر روی این سلول‌هاست (۸).

وروتوکسین ۱ عامل فعال آنتی نئوپلاستیک موجود در باکتریوسین نیمه خالص است که چندین سال قبل اثر ضد توموری آن بر روی فیبروسارکومای موشی نشان داده شده است (۱۵). بطوریکه درمان موش‌های توموردار دارای Gb3 در سطح سلول‌های توموری مانع متاستاز تومورها شده است (۱۶) و برای رده‌های توموری مختلف از جمله آستروسیتوما (۳ و ۴)، منژیوما (۵)، لنفوم بورکیت (۱۶)، بیماری لنفو پرولیفراتیو بعد از پیوند ناشی از ویروس ایشیتین بار (۶)، میلوم مولتیپل و رده‌های سرطانی پستان (۸) اثرات ضد توموری و سیتوتوکسیسیته وروتوکسین ۱ نتایج بسیار درخشان و امیدوار کننده‌ای داشته است. حتی رده‌های مقاوم چند دارویی در برابر این سم حساسیت بیشتری نسبت به سلول‌های نرمال دارند.

در بسیاری از سرطان‌ها سطح Gb3 در سلول‌های توموری نسبت به سلول‌های نرمال افزایش می‌یابد و حتی در سرطان‌های رده سلولی زاینده از جمله کوریو کارسینوما و بیضه‌ها نیز Gb3 از مارکرهای سرطانی شدن آنهاست (۹). زیر واحد B سم بدون فعالیت زیر واحد A قادر به تحریک آپوپتوزیز است، بنا بر این وروتوکسین ۱ علاوه بر توقف ساخت پروتئین، با استفاده از تحریک کاسپازهای غشای میتوکندری‌های سلول‌های حساس و مستقل از زیر واحد A می‌تواند، سبب تحریک آپوپتوزیز در سلول‌های حساس دارای Gb3 شود (۱۷). این پدیده از مهمترین فرایندهای سلولی است، که در تمایز و حفظ هوموستاز موجودات پر سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴) و اساس طراحی داروهای ضد نئوپلاستی است.

در سلول‌های MCF-7 بررسی شده، ۳ ساعت پس از شروع تیمار با وروتوکسین ۱ شکستگی ژنوم با الکتروفورز مشاهده شده، و در صورتیکه همزمان با پاساژ، سلول‌ها در معرض سم قرار گیرند، بطور کلی در مقایسه با سلول‌های شاهد مانع اتصال سلول‌ها به ته فلاسک‌های کشت می‌شود. ژن bcl-2 و پروتئین مربوطه یکی از راه‌های ممانعت از پدیده مرگ برنامه‌ریزی شده

در شکل ۲- نمونه‌ای از الکتروفورز DNA استخراج شده از سلول‌های تیمار شده در کنار سلول‌های تیمار نشده با وروتوکسین ۱ نشان داده شده است. وجود باندهای مختلف که نشان دهنده شکستگی ژنوم از نواحی بین نوکلئوزوم‌ها است، از معیارهای آپوپتوزیز تحریک شده در سلول‌هاست. که در بررسی‌های مربوط به سیتوتوکسیسیته از آن استفاده می‌شود. در هر دو رده سلولی وجود شکستگی در ژنوم مشخص است. در ستون‌های ۱ و ۲ به ترتیب سلول‌های ورو و MCF-7 تیمار شده با سم و در ستون‌های ۳ و ۴ سلول‌های ورو و MCF-7 بدون تیمار سم مشاهده می‌شوند.



شکل ۲- الکتروفورز ژنوم تیمار شده با وروتوکسین ۱

بحث:

وروتوکسین ۱ یا شبه سم شیگا ۱ (SLT1) از پروتئین‌های غیر فعال کننده ریبوزوم‌های یوکاریوتی است. که عمدتاً توسط سویه‌های پاتوژنیک اشیریشیا کولی سروتیپ O157:H7 و یا سویه‌های انتروهموراژیک اشیریشیا کولی (EHEC) تولید و سبب مرگ سلول‌هایی می‌شود که در سطح خود دارای ملکول‌های Gb3 و یا CD77 هستند. در این تحقیق نشان داده شد که وروتوکسین ۱ مانع رشد رده توموری پستانی انسان بنام MCF-7 می‌شود، حساسیت این سلول‌ها به اندازه سلول ورو که بطور استاندارد برای شناسایی وروتوکسین‌ها استفاده می‌شود، نیست ولی مقادیر بسیار کمی از این سم اثرات سیتوتوکسیک شدیدی

رده‌های توموری پستان همخوانی دارد (۶-۳ و ۸). نیز نشان می‌دهد که وروتوکسین ۱ می‌تواند به عنوان یکی از مواد بالقوه سیتوتوکسیک انتخابی علیه طیف وسیعی از تومورهای انسانی مورد استفاده قرار گیرد. زیرا با توجه به افزایش بیان گیرنده سم به ویژه در سطح سلول‌های متاستازی در مقایسه با انواع داروهای ضد توموری، تنها یکبار استفاده داخل توموری از این سم می‌تواند اثرات مفیدی در بر داشته باشد که لازم است در الگوهای *In vivo* نیز مورد بررسی قرار گیرد.

سلول‌هاست، که با جایگیری در غشای میتوکندری‌ها و تا حدودی غشای هسته و شبکه اندوپلاسمی مانع رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری‌ها می‌شود. این پروتئین در سلول‌های MCF-7 بیش از حد تولید می‌شود (۱۸). علیرغم این گزارشات بررسی‌های الکتروفورز آگارز ما نشان می‌دهد که وروتوکسین ۱ در سلول‌های MCF-7 تیمار شده اثرات شدید شکستگی ژنوم را ایجاد می‌کند، که یکی از معیارهای آپوپتوزیز محسوب می‌شود. نتایج این تحقیق با بررسی‌های قبلی در مورد سیتوتوکسیسیته وروتوکسین ۱ برای بسیاری از سلول‌های سرطانی انسانی از جمله

References:

- 1- Chart H. Clinical significance of verotoxin- producing Echerichia coli O157:H7. *World J Microbiol Biotech* 2000; 16: 719-24.
- 2- Ramotar K, Boyds B, Tyrrel G, et al. Characterization of Shiga-like toxin 1 B subunit purified from overproducing clones of the SLT-1 B cistron. *Biochem J* 1999; 272:805-11.
- 3- Sara A, Murakami M, Boyd B, et al. Verotoxin inhibits the growth of and induce apoptosis in human astrocytoma cells. *J Neurol Oncol* 1998; 40: 137-150.
- 4- Sara A, James R, Lingwood C. Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice. *Oncol Res* 1999; 11: 33-9.
- 5- Salthia B, James R, Lingwood C, et al. The treatment of malignant meningioma with verotoxin. *Neoplasia* 2002; 4: 304-11.
- 6- Arbus GS, Grisara S, Segal O, et al. Verotoxin targets lymphoma infiltrates of patients with post- transplant lymphoproliferative disease. *Leuk Res* 2000; 24: 857-64.
- 7- Wenk J, Peter WA, Jochen C, et al. Glycolipids of germ cell tumors, extended globo- series glycolipids are a hallmark of human embryonal carcinoma cells. *Int J Cancer* 1994; 58: 108-15.
- 8- Lacasse EC, Bary MR, Patterson B, et al. SLT-1 receptor on human breast cancer, lymphoma, and myeloma and absence from CD34+ hematopoietic stem cells: Implications for ex vivo tumor purging and autologous stem cell transplantation. *Blood* 1999; 94: 2901-10.
- 9- Chikara O, Yasuo F, Makoto S, et al. Changes in glycolipid expression in human testicular tumors. *Int J Cancer* 1990; 45:1040-1044.
- 10- Baum M. The changing face of breast cancer post- present and future perspectives. *Breast Cancer Res Treatment* 2002; 75: S1-S5.
- 11- Lawrence W. Tamoxifen- An update on current data and where it can now be used. *Breast Cancer Res Treatment* 2002; 75: S7-S12.
- 12- Carole R, Florent DV, Ibrahima D, et al. Radiation dose, chemotherapy and risk of lung cancer after breast cancer treatment. *Breast Cancer Res Treatment* 2002; 75: 15-24.
- 13- Jean B, Sara A, Clifford AL. Universal method for the facile production glycolipid/lipid matrices for the affinity purification of binding ligands. *Analy Biochem* 1994; 217: 1-6.
- 14- Beatriz M, Sira N, Maria P, et al. Prodiogiogin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British J Pharmacol* 2000; 131: 585-93.
- 15- Hill RP, Frakas H. Further studies of the action of a partially purified bacteriocin against a murine fibrosarcoma. *Cancer Res* 1991; 51: 1359-65.
- 16- Frakas H, Hill P, Rosen B, et al. The bacterial colicin active against tumor cells in vitro and in vivo is verotoxin1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6996-7000.
- 17- Taga S, Carlier D, Tetaud C, et al. Intracellular signaling events in CD77-mediated apoptosis of Burkitts lymphoma cells. *Blood* 1997; 90: 2757-67.
- 18- Villar E, Redendo M, Rodrigo I, et al. bcl-2 expression and apoptosis in priming and metastatic breast carcinomas. *Tumor Biol* 2001; 22: 137-45.