Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 2:04 IRDT on Monday July 19th 2021

ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2021;23(5):65-74

Evaluation of Cytotoxicity Activity of *Salmonella Typhimurium* Protein Fractions on Melanoma B16 Cancer Cell Line

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors

Minoo Najafi[1]
Neda Soleimani[1*]
Atousa Aliahmadi[2]

1. Departments of Microbiology and Microbial Biotechnology and Nanobiotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

*Correspondence
Address: Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. Tel: 02129905519 Fax: 22431664
N_soleimani@sbu.ac.ir

Article History
Received: January 31, 2020
Accepted: April 10, 2021
ePublished: March 6, 2021

ABSTRACT

Background and target: *Salmonella typhimurium* is a gram-negative rod-forming bacterium belonging to the family Enterobacteriaceae and Is one of the most common foodborne pathogens, that With several pathogenic factors, including toxins, Secretory proteins, and secretory system T3SS(That Causes fluid secretion And inflammation), Etc It can a suitable candidate for this stud. The purpose of this study, Evaluation of the cytotoxicity effect of bacterial protein fractions on growth and proliferation of melanoma cancer cells, which is the most resistant type of skin cancer.
materials and methods: In this experimental study, the cancer cell line (B16) melanoma was used. Different bacterial fractions were prepared by the ammonium sulfate method. Interaction of cancer cells with different concentrations of Salmonella typhimurium fractions was studied. Cell proliferation was assessed by MTT assay at 24 and 48 hours.
findings: MTT test results with fractions (Bacteria lysate in culture medium, 80% deposition of lysate proteins, 30% deposition of lysate proteins, 80% deposition on culture media, and 30% deposition on culture media) The highest effect was observed at concentrations of 9.25,30, 8, 72, 10.75 µg / ml, respectively.
Discussion and conclusion: Results show that bacterial fractions of Salmonella typhimurium have high toxicity and lethal effect on melanoma cancer cells. These compounds can be suggested and used as an alternative or complementary to cancer therapy.

keywords: Cytoplasmic extract, Media, *Salmonella typhimurium*, melanoma

Copyright© 2020, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 2:04 IRDT on Monday July 19th 2021

ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیسیتی فرکشن‌های پروتئینی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بر روی رده سلول‌های سرطانی ملانوما (B16)

مینو نجفی

دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

ندا سلیمانی*

استادیار، دکتری باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشگاه شهید بهشتی

آتوسا علی احمدی

استادیار، گروه بیولوژی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: امروزه، سرطان یکی از مهمترین مشکلات سلامتی و شایع ترین علت مرگ در سراسر جهان است. با توجه به عوارض جانبی و ناکارآمدبودن روش‌های رایج سرطان در دهه‌های گذشته از باکتری و متابولیت‌های تولید شده آنها می‌توان به عنوان داروهای جایگزین ضد سرطان استفاده کرد. پروتئین‌ها و توکسین‌های باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* ممکن است ابزاری جدید برای استراتژی های درمانی آینده باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر سایتوتوکسیسیتی فرکشن‌های مختلف پروتئینی *سالمونلا تیفی موریوم* روی میزان کاهش رشد و تکثیر و افزایش مرگ سلول‌های سرطانی ملانوما BL16 به عنوان سرطان سخت درمان پذیر و مقاوم‌ترین نوع سرطان پوست در شرایط آزمایشگاهی، انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از رده سلولی، سرطانی(BL16) ملانوما استفاده شد. پروتئین‌های موجود در لیزات و محیط کشت *سالمونلا تیفی موریوم* با روش رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم در 30٪ و 80٪ اشباع، جمع‌آوری شده و سپس دیالیز شدند (فرکشن‌های باکتریایی تهیه شد). سلول سرطانی ملانوما با غلظت‌های مختلفی از فرکشن‌های مختلف پروتئین باکتریایی تیمار شدند و میزان زنده ماندن سلول‌ها با آزمون MTT در زمانه‌های 24 و 48 ساعت ارزیابی و بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج آزمایش MTT تیمار با فرکشن‌های (باکتری لیز شده در محیط کشت، رسوب 80%پروتئین‌های لیزات، رسوب30% پروتئین‌های لیزات، رسوب 80% پروتئین‌های محیط کشت و رسوب 30% پروتئین‌های محیط کشت) در زمان 24 و 48 ساعته، بیشترین میزان اثر در غلظت‌های 9/25میکروگرم بر میلی لیتر از باکتری لیز شده در محیط کشت، 30 میکروگرم بر میلی‌لیتر از فرکشن رسوب 80%لیزات، 8 میکروگرم بر میلی‌لیتر از رسوب 30% لیزات، 72 میکروگرم بر میلی‌لیتر از فرکشن رسوب 80% محیط کشت و غلظت 10/75 میکروگرم بر میلی‌لیتر از رسوب 30% محیط کشت مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد فرکشن‌های باکتریایی سالمونلاتیفی‌موریوم بسیار سمی و با کشندگی زیادی بر سلول‌های سرطانی ملانوما است. این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان کاندید جایگزین و یا مکمل درمانی سرطان با تاثیر بالا در آینده پیشنهاد و استفاده شود.

کلمات کلیدی: عصاره سیتوپلاسمی، محیط کشت، سالمونلا تیفی موریوم، ملانوما

تاریخ دریافت: 98/11/12
تاریخ پذیرش: 1400/1/21
N_soleimani@sbu.ac.ir

مقدمه

ملانوما نوع مهاجم و بدخیمی از سرطان پوست است که از ملانوسیت‌ها منشا گرفته و می‌تواند در هر بافتی که این نوع سلول‌ها حضور دارند رخ دهد، مانند بخش‌های غیرجلدی مانند موکوس دهانی، حلق، سینوس‌های نزدیک‌بینی، واژن، مجاری‌ادراری، سیستم عصبی مرکزی و چشم‌ها. این نوع از سرطان، دارای میزان بسیار بالایی از مرگ‌ومیر هست [1]. ملانوسیت‌ها سلول‌های رنگ‌دانه‌دار خاصی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 2:04 IRDT on Monday July 19th 2021

هستند که در پوست و چشم‌ها یافت می‌شوند و با تولید ملانین موجب ایجاد رنگ‌دانه‌های مسئول رنگ پوست و رنگ مو می‌گردد. در هنگام رشد جنینی، ملانوسیت‌های جلدی از پیشگامان قلبی-عصبی که توانایی زیادی برای حرکت‌دارند، منشا گرفته و به پوست مهاجرت می‌کنند. در پوست، ملانوسیت‌ها در لایه پایه‌ای از اپیدرم و فولیکول‌های مو ساکن می‌شوند و تعادل حیاتی آن‌ها به وسیله کراتینوسیت‌های اپیدرمال تنظیم می‌شود [2] در ایجاد ملانوما، تغییرات بافت‌شناسی که موجب تبدیل ملانوسیت نرمال به ملانومای بدخیم می‌شود، نقش بسیار مهمی دارند. این تغییرات بافت‌شناسی می‌توانند به جهش‌های ژنتیکی خاصی مربوط باشند که می‌توانند بر پیام‌رسانی مولکولی اثر گذاشته و در فرآیند تبدیل ملانوسیت به ملانوما شرکت کنند[3] پیش‌بینی‌شده است، که در سال 2017 ،87110 مورد جدید ملانوما و 9730 مورد مرگ به دلیل ملانوما در آمریکا رخ دهد. در ایران نیز سرطان پوست یکی از شایع‌ترین موارد سرطان تشخیص داده‌شده در میان زنان و مردان را تشکیل می‌دهد [4]. در جنوب ایران، 15 % از کل سرطان‌های تشخیص داده شده، سرطان پوست است. در شرق ایران، میانگین میزان شیوع سرطان پوست در هنگام سال‌های 1987 تا 2001 ،28/6 % گزارش‌شده است که از این میان، 5 % ملانوما است [5]. این میزان در ایران در حال افزایش است به گونه‌ای‌که در سال 2009، درصد سرطان پوست در میان زنان ایرانی 13/1 % و در میان مردان ایرانی 18/9 % است[4]. ملانوما به‌شدت مهاجم با میزان بالایی از متاستاز است و نسبت به مواد کشنده سلولی مقاومت بالایی از خود نشان می‌دهد. تصور می‌شود که به دلیل اینکه ملانوسیت‌ها از سلول‌هایی منشا می‌گیرند که بسیار متحرک هستند، ویژگی‌های زنده‌مانی بسیار بهبودیافته‌ای دارند. سلول‌های ملانوما در مقایسه با دیگر انواع سلول‌های توموری سطوح بسیار کمی از آپوپتوز را در شرایط درون تنی، از خود نشان می‌دهند و همچنین در شرایط برون تنی نسبت به موادی که آپوپتوز را القا می‌کنند از خود مقاومت نشان می‌دهند. بنابراین در درمان‌های شیمی‌درمانی، رادیودرمانی و پرتودرمانی، ایمنی‌درمانی و درمان بیولوژیک و... دارای مقاومت بالایی بوده و این مقاومت به‌عنوان سدی در برابر درمان موفقیت‌آمیز ملانوما محسوب می‌شود [6]. آثار جانبی داروها، وقت‌گیر و پرهزینه بودن و عدم کارآیی کامل این روش‌های درمانی رایج ، نیاز به جستجو برای روش‌های جدید و راهکارهایی برای درمان این نوع سرطان مطرح است که می‌توان به بهره‌گیری از محصولات میکروبی اشاره کرد. استفاده از باکتری‌های زنده، باکتری‌های تخفیف یافته و یا دست‌کاری ژنتیکی شده، وکتورهای باکتریایی که ناقل عوامل ضد توموری هستند، توکسین‌های باکتریایی به صورت ایمنوتوکسین‌ها و یا کونژوگه شده به آنتی‌ژن‌های سطحی توموری ، ایمنی‌تراپی به واسطه بدنه باکتری‌ها و اسپورهای باکتریایی به ویژه باکتری‌های بی‌هوازی و پروتئین‌های نوترکیب باکتریایی ازجمله مواردی هستند که امروزه برای درمان مطرح هستند. بروز آثار مثبت و نیز کاهش عوارض متعاقب درمان، باعث شده است که استفاده از این عوامل در کانون توجه پژوهشگران و نیز داروسازان قرارگیرد و بتواند در آینده درمانی بالقوه برای انسان باشد [7و8]. از بین باکتری‌های شناخته‌شده، *سالمونلاتیفی‌موریوم* که یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، پاتوژن درون‌سلولی اختیاری و بدون اسپور هستند که به خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارد و یکی از متداول‌ترین پاتوژن‌های ناشی از مواد غذایی هستند [9]، به لحاظ ویژگی‌های منحصربه‌فردی که دارد دارای اهمیت است و به‌طور گسترده در مدل‌های سرطان حیوانات و آزمایشات بالینی فاز اول در بیماران انسانی مورد مطالعه قرارگرفته است. *سالمونلا تیفی‌موریوم* می‌تواند به بافت‌های عمیق و مناطق نکروتیک نفوذ کند و در آنجا تکثیر پیدا کند به علاوه سالمونلا با چندین فاکتور بیماری‌زایی ازجمله توکسین‌ها، پروتئین‌های ترشحی و سیستم ترشحی T3SS و غیره می‌تواند کاندید مناسبی برای این مطالعه باشد [10و11]. که هر یک از این فاکتورها آثار خاص خود را بر سلول اعمال می‌کنند. فاکتورهای بیماری‌زایی این باکتری از مسیرهای مختلف،سبب مرگ سلول‌ها می‌شوند. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیتی فرکشن‌های پروتئینی باکتری سالمونلا روی میزان رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی ملانوما، به عنوان مقاوم‌ترین نوع سرطان پوست است.

مواد و روش‌ها

الف) آماده‌سازی فرکشن‌های مختلف باکتریایی

سویه استاندارد *Salmonella typhimurium* انستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای کشت این باکتری از محیط کشت‌های آماده نوترینت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 2:04 IRDT on Monday July 19th 2021

آگار و نوترینت براث (Merck) استفاده کردیم. برای کشت باکتری ابتدا سویه استاندارد روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شد و سپس برای تهیه بیومس باکتری از آن یک تک کلنی با استفاده از لوپ استریل در کنار شعله برداشته شد و به محیط مایع نوترینت براث تلقیح شد و در انکوباتور شیکردار برای 19ساعت قرارداده شد تا زمان رسیدن به فاز لگاریتمی رشد و سپس در فالکون‌های 50 سی‌سی تقسیم و نگهداری شد.

یک فالکون 50 سی‌سی از محیط کشت حاوی باکتری را به‌منظور لیز کردن باکتری در محیط کشت، جدا و چندین مرحله فریز دفریز شد و برای اطمینان از لیز شدن کامل باکتری به مدت 20دقیقه سونیک شد و سپس با دورrpm 12000 به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و مایع رویی جدا و فیلتر شد (نمونه 1). سایر فالکون‌ها را با دورrpm 12000 به مدت20 دقیقه دردمای 4درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و مایع رویی از پلت ته فالکون جدا شد و به منظور حذف باکتری باقیمانده در مایع رویی با استفاده از پمپ خلاء با فیلتر (sswp) µm 0/3 فیلتر شد و به صورت جداگانه در داخل یک ظرف استریل در 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، و برای انجام مراحل سایر نمونه‌ها آماده‌سازی شد. به منظور تهیه لیزات باکتریایی از بافر لیز کننده استفاده شد.

لیز کردن باکتری و استخراج عصاره سیتوپلاسمی

برای لیز کردن باکتری رسوب جمع‌آوری‌شده در کف فالکون‌ها را داخل یک فالکون ریخته و 50 سی‌سی بافر لیز کننده استریل به آن اضافه شد و چندین مرتبه فریز دفریز انجام شد (ابتدا در دمای 20- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا کاملاً یخ بزند و سریع در بن ماری 45 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا سریع دفریز شود) سپس با سرعت rpm 12000 در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی به آرامی به‌وسیله سرنگ از رسوب کف فالکون جدا و فیلترشد (0/22میکرون) و در داخل فریزر21- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای غلیظ کردن و خالص‌سازی جزئی پروتئین‌ها از روش رسوب‌دهی با نمک سولفات آمونیوم در غلظت‌های 30% و80% اشباع استفاده شد. ابتدا لیزات باکتری داخل بشر ریخته شد و با غلظت 30% آمونیوم سولفات رسوب داده شد و سپس سانتریفوژ شد با دور 13000rpm در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه و رسوب جدا شد و مایع رویی آن دوباره با غلظت 80% رسوب داده شد و سانتریفوژ شد و رسوب آن نگهداری و مایع رویی دور ریخته شد. سپس به همین ترتیب محیط کشت ابتدا با غلظت 30% آمونیوم سولفات رسوب داده شد و دوباره مایع رویی با غلظت 80% رسوب داده شد یعنی در هر مرحله پس از حل شدن کامل نمک(30%) محلول حاصل سانتریفیوژ شد، رسوب نگهداری و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ برای رساندن به درصد اشباع بعدی (80%)سولفات آمونیوم استفاده شد و مانند مرحله پیش انجام شد و دوباره سانتریفیوژ شد، و مایع رویی خارج و دور ریخته شد و رسوب هر مرحله نگهداری شد درنهایت رسوب‌های به‌دست‌آمده جداگانه در PBS استریل حل شد تا زمانی که شفاف شود و برای نمک‌زدایی دیالیز شد. پروتئین‌های استخراج‌شده به وسیله الکتروفورز ناپیوسته ژل پلی آکریل آمید حاوی SDS بررسی شد. برای سنجش مقدار پروتئین کل نمونه عصاره سلولی و سوپرناتانت نمونه دیالیزشده با استفاده از روش بردفورد و با استفاده از سرم آلبومین گاوی(BSA) به‌عنوان پروتئین استاندارد صورت گرفت.

کشت سلول رده سلول‌های سرطانی:

سلول سرطانی BL16 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. در محیط کشت (Gibco) DMEM-F12 به همراه 10 درصد (Gibco) FBS و 100واحد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین_استرپتومایسین (Gibco) در انکوباتور با دمای $37C^{\circ}$ و 5 درصد CO2 کشت داده شد (12)، پس از سه بار پاساژ سلولی، سلول‌ها به تعداد مناسب برای تست شدند.

ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیتی فرکشن‌های مختلف باکتری بر سلول‌های سرطانی به روش آزمایش MTT:

به منظور بررسی میزان رشد و مرگ میر سلول‌ها، طبق پروتکل اعلام‌شده انجام گرفت. سلول‌ها تریپسینه و از فلاسک‌ها جمع‌آوری و با استفاده از لام نئوبار شمارش تعداد کل سلول‌ها انجام شد. تعداد 5000 سلول در هرکدام از چاهک پلیت‌های 96 خانه حاوی میزان200 میکرولیتر محیط کشت منتقل شد [13]. سپس سلول‌ها با

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 2:04 IRDT on Monday July 19th 2021

غلظت‌های مختلف از فرکشن‌های (باکتری لیز شده در محیط کشت، رسوب 80%پروتئین‌های لیزات، رسوب30% پروتئین‌های لیزات، رسوب 80% پروتئین‌های محیط کشت، رسوب 30% پروتئین‌های محیط کشت) و به صورت سه بار تکرار و چند چاهک باقی‌مانده به‌عنوان کنترل و فاقد تیمار در نظر گرفته شد. پلیت‌ها در دو بازه زمانی 24 و 48 ساعت در انکوباتورCO_2 دار(5درصد) و در دمای $37C^{\circ}$ انکوبه شد.

سپس 20µl محلول MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (sigma usa) به هر چاهک اضافه و به مدت یک ساعت در دمای37 درجه انکوبه که در این هنگام کریستال‌های فورمازان تشکیل شد. پس‌ازانکوباسیون، محیط کشت درون چاهک‌ها تخلیه شد و به میزان 100 میکرولیتر حلال DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Gibco) به هر چاهک اضافه شد و پس از چند دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق میزان جذب نوری آن‌ها در طول‌موج 570 نانومتر با دستگاه elisa (BioTek, USA) reader قرائت شد [14].

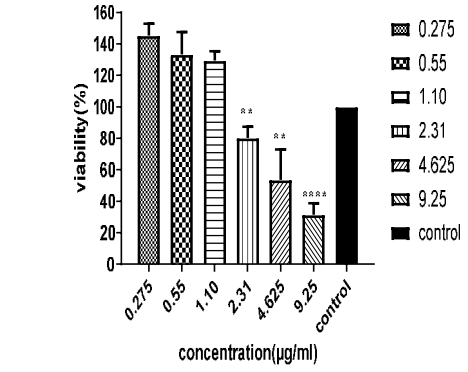
آنالیز آماری

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریسم و نتایج با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه t test و تمامی داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش و حد معنی‌دار بودن $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

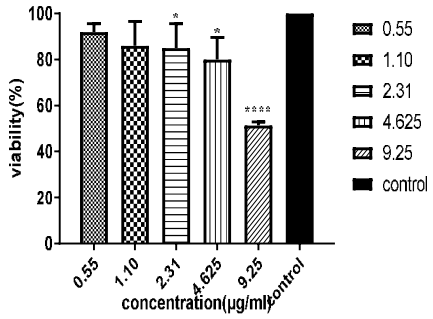
یافته‌ها

نتایج تست MTT، تأثیر تیمار بر میزان رشد و مرگ‌ومیر سلول‌ها را با تغییر رنگ زرد محلول تترازولیوم به رنگ بنفش ناشی از تشکیل کریستال‌های فورمازان در اثر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژنازمیتوکندریایی نشان می‌دهد. بنابراین رنگ بنفش در صورت زنده‌بودن سلول‌ها، مشاهده می‌شود و مقایسه شدت رنگ تولیدشده در چاهک‌های تیمار شده نسبت به چاهک‌های شاهد،افزایش تعداد سلول‌ها یا کاهش آن‌ها را نمایان می‌کند. میزان بقای سلول‌ها تحت تأثیر تیمار، از فرمول ذیل به دست آمد.

(Cell viability = میانگین جذب نوری)/(میانگین جذب نوری شاهد100*)



A)



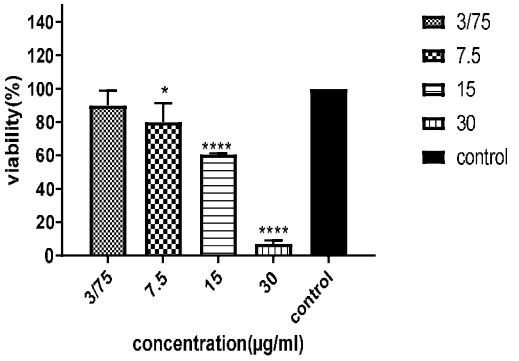
B)

نمودار(1): ارزیابی میزان بقای سلول‌های سرطانی رده سلولی ملانوما تیمار شده با لیزات باکتری در محیط کشت A) 24 ساعته B)48 ساعته

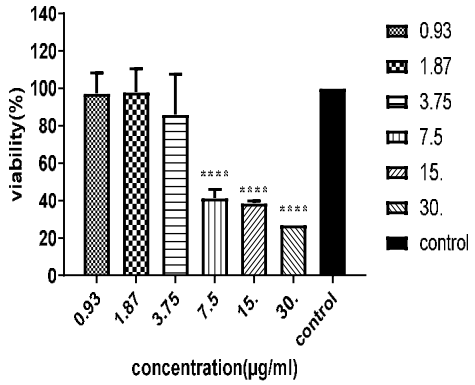
نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از فرکشن لیزات باکتری در محیط کشت (با میزان غلظت کل پروتئین 18,5میکروگرم بر میلیلیتر) روی سلول‌های سرطانی (BL16) ملانوما در آزمایش 24 ساعته و 48 ساعته نشان داد که بیشترین میزان اثر مهارکنندگی رشد در غلظت 9/25 میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده که در 24 و 48 ساعته به ترتیب 70 و 50 درصد از سلول‌ها دچار مرگ شدند. و پس از آن بیشترین اثر در سایر غلظت‌ها مشاهده، و با کاهش غلظت این اثر کشندگی کاهش یافته به شکلی که در غلظت 0,275 میکروگرم بر میلی لیترمیزان کشندگی به صفر رسیده است، به نظرمی‌رسد اثر سیتوتوکسیسیتی لیزات باکتری در محیط کشت سلول‌های سرطانی در دو بازه زمانی 24 و 48 ساعت وابسته به زمان نیست و در غلظت‌های مشابه میزان مرگ سلولی در مدت 24 ساعت بیشتر از همان غلظت در بازه زمانی 48 ساعته هست (نمودار1).

www.SID.ir

Archive of SID



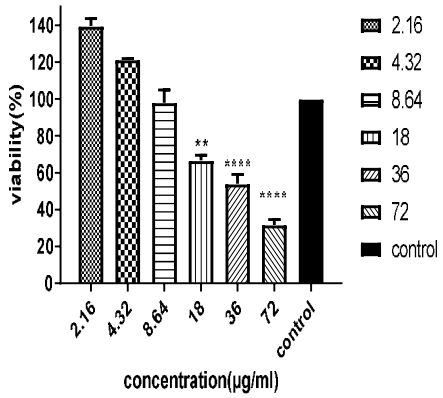
A)



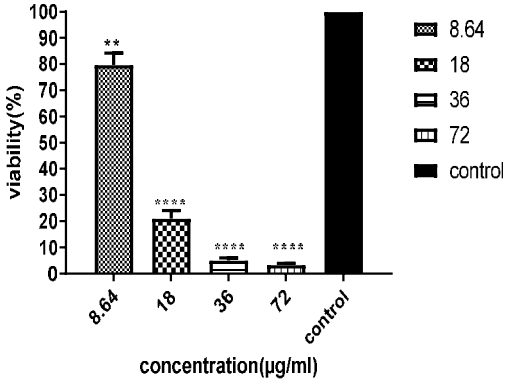
B)

نمودار(2): ارزیابی میزان بقای سلول‌های سرطانی رده سلولی ملانوما تیمار شده با رسوب 80% لیزات باکتری A)24ساعته B)48ساعته

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از فرکشن رسوب 80% لیزات باکتری (با میزان غلظت کل پروتئین60میکروگرم برمیلی لیتر) بر سلول‌های سرطانی (BL16) ملانوما در آزمایش 24 ساعته و 48 ساعته نشان داد که بیشترین میزان اثر مهارکنندگی در غلظت 30 میکروگرم بر میلی‌لیتر است که در 24 و 48 ساعته به ترتیب 75 و 90 درصد از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شدند، و با کاهش غلظت میزان مهار رشد سلول‌ها کاهش پیدا کرده است به گونه‌ای که در غلظت‌های پائین‌تر از7,50میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان مرگ سلول به صفر رسیده است. به نظرمی‌رسد اثر سیتوتوکسیسیتی رسوب 80% لیزات باکتری در غلظت 30 میکروگرم بر میلی‌لیتر دو بازه 24 و 48 ساعته وابسته به زمان است و میزان مرگ سلولی درمدت 48 ساعت بیشتر از 24 ساعته هست ولی سایر غلظت‌ها وابسته به زمان نیستند و در غلظت‌های مشابه میزان مرگ سلولی در مدت 24 ساعت بیشتر از همان غلظت در بازه زمانی 48 ساعته است (نمودار2).



A)



B)

نمودار(3): ارزیابی میزان بقای سلول‌های سرطانی رده سلولی ملانوما تیمار شده با رسوب 80% محیط کشت باکتری A)24ساعته B)48 ساعته

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از فرکشن رسوب 80% محیط کشت باکتری با میزان غلظت کل پروتئین144میکروکرم بر میلی لیتر بر سلول‌های سرطانی(BL16) ملانوما در آزمایش 24 ساعته و 48 ساعته نشان داد که بیشترین میزان اثر مهارکنندگی در غلظت 72میکروگرم بر میلی‌لیتر است که در 24 و 48 ساعته به ترتیب 70 و 95 درصد از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شدند و با کاهش غلظت

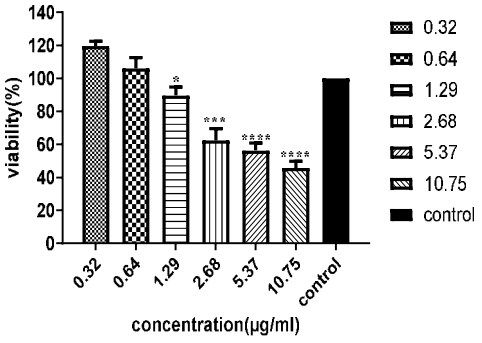
Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 2:04 IRDT on Monday July 19th 2021

www.SID.ir

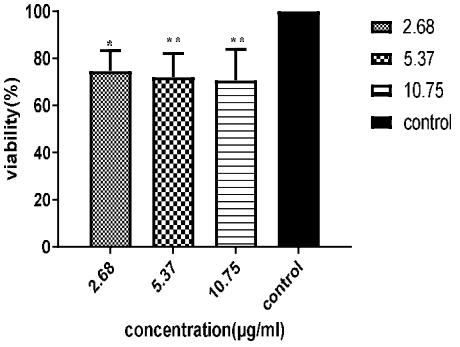
Archive of SID

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 2:04 IRDT on Monday July 19th 2021

پروتئین میزان مرگ سلول‌ها کاهش پیدا کرده است به طوری که در غلظت‌های کمتر از 18 میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان مرگ سلول‌ها به صفر رسیده است. به نظر می‌رسد اثر سیتوتوکسیسیتی رسوب 80% محیط کشت باکتری در دو بازه 24 و 48 ساعته وابسته به زمان است و میزان مرگ سلولی درمدت 48 ساعت بیشتر از 24 ساعته هست و در غلظت‌های مشابه میزان مرگ سلولی در مدت 48ساعت بیشتر از همان غلظت در بازه زمانی 24 ساعته است (نمودار3).



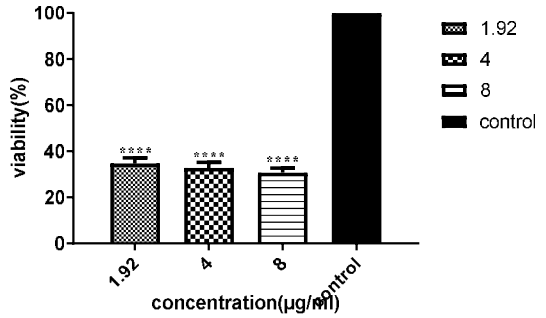
A)



B)

نمودار(4): ارزیابی میزان بقای سلول‌های سرطانی رده سلولی ملانوما تیمار شده با رسوب 30% محیط کشت باکتری A)24ساعته B)48ساعته

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از فرکشن رسوب 30% محیط کشت باکتری(با میزان غلظت کل پروتئین 21,5میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر سلول‌های سرطانی(BL16) ملانوما در آزمایش 24 ساعته و 48 ساعته نشان داد که بیشترین میزان اثر مهارکنندگی در غلظت 10/75 میکروگرم بر میلی‌لیتر است که در 24 و 48 ساعته به ترتیب 60 و 30 درصد از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شدند و با کاهش غلظت پروتین میزان مرگ سلولی کاهش پیدا کرده است. به نظرمی‌رسد اثر سیتوتوکسیسیتی رسوب 80% محیط کشت باکتری در دو بازه 24 و 48 ساعته وابسته به زمان نیست و میزان مرگ سلولی درمدت 24 ساعت بیشتر از 48 ساعته است و در غلظت‌های مشابه میزان مرگ سلولی در مدت 24 ساعت بیشتر از همان غلظت در بازه زمانی 48 ساعته هست (نمودار4).



نمودار(5): ارزیابی میزان بقای سلول‌های سرطانی رده سلولی ملانوما تیمار شده با رسوب 30% لیزات باکتری در مدت 24 ساعته

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از فرکشن رسوب 30% لیزات باکتری(با میزان غلظت کل پروتئین 16میکروگرم بر میلی‌لیتر) روی سلول‌های سرطانی (BL16) ملانوما در آزمایش 24 ساعته نشان داد که بیشترین میزان اثر مهارکنندگی در غلظت 8 میکروگرم بر میلی‌لیتر است که 70 درصد از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شدند و در کمترین غلظت هم یعنی غلظت 1,92 میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان مرگ سلولی بیشتر از 60 درصد بود. و پس از آن بیشترین اثر در سایر غلظت‌ها مشاهده شد (نمودار5).

بحث

باکتری‌ها منابع پنهانی از داروهای و ضد تومور جدید هستند که باید بررسی شوند. امروزه کاربردهای گوناگونی از باکتری‌ها و محصولات آن در درمان سرطان موردتوجه قرارگرفته است. باکتری‌های زنده تخفیف حدت یافته به‌عنوان عامل ضد تومور و وکتورهای باکتریایی برای تحویل عوامل ضد سرطان، پپتیدهای درمانی / پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و فرآورده‌هایی که با اتصال به آنزیم‌های مربوطه فعال می‌شوند برای درمان به‌عنوان یک استراتژی قوی مطرح هستند [15 و 16].

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 2:04 IRDT on Monday July 19th 2021

سالمونلا تیفی موریوم که با چندین فاکتور بیماری‌زایی ازجمله توکسین‌ها، پروتئین‌های ترشحی مانند SipA، SipC، SopB، SopE و SopE2 و دو سیستم ترشحی T3SS(که باعث ترشح مایعات و التهاب نیز می‌شود) و غیره می‌تواند کاندید مناسبی برای مطالعه درزمینه درمان سرطان باشد [10و11].

در سال 2016 Lekshmi R.Nath و همکاران، میزان سایتوتوکسیسیتی آنتی‌اکسیدان DETS جداشده از باسیلوس سرئوس را بر رده سلولی ملانوما (A375) در مدت زمان 24، 48، 72 ساعت بررسی کردند. نتایج حاصل از این آزمون نشان داده است که IC50 ترکیب مذکور در مدت‌زمان 48 ساعت 24/01 میکرو مولار است. همچنین با افزایش غلظت ترکیب فوق، کاهش میزان زنده‌مانی گزارش شده است [20-18]. در سال 2002 Tohru Yamadaو همکاران، میزان سایتوتوکسیسیتی پروتئین Azurin که توسط سودوموناس ائروژینوزا ترشح‌شده، را روی دو رده سلولی ملانوما (UISO-Mel-2) و(UISO-Mel-6) در مدت 24 ساعت با استفاده از آزمون MTT بررسی کردند. نتایج حاصل از این آزمون نشان داده است روی رده سلولی ملانوما UISO-Mel-2 به طور قابل ملاحظه‌ای باعث مرگ سلولی شده است به این صورت که در غلظت‌های 200، 400، 600 و 800 میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب حدوداً 25، 40، 40 و40 درصد سبب مرگ سلولی شده است، درحالی‌که روی رده سلولی ملانوما UISO-Mel-6 تأثیر بسیار کمتری بر مرگ سلولی گذاشته است به این صورت که در غلظت‌های 200و 400 مرگ سلولی صفر بوده و در 600 کمتر از 10 درصد، در 800 حدود 10 درصد باعث مرگ سلولی شده است [21]. در مقایسه پژوهش انجام شده ما با این پژوهش در پژوهش ما، در تمام فرکشن‌ها، غلظت‌های کمتر از غلظت‌های فوق به‌کاررفته بااین‌حال میزان سایتوتوکسیسیتی بیشتر بوده مرگ سلولی بیشتری را نشان می‌دهد که این موضوع خود بیان کننده آثار قوی‌تر فرکشن‌های سالمونلا بر رده ملانوا در این پژوهش بوده است. درسال 2019 Arun a Rani و همکاران، میزان سایتوتوکسیسیی Chondroitin AC lyase گرفته‌شده از pedobacter saltans روی رده سلولی ملانوما SK-Mel28 در مدت 12 و 24 ساعت بررسی کردند . Chondroitin AC lyase از غلظت‌های 0/0013 تا 1/3 میکرومولار استفاده شده است که در غلظت 1/3 میکرومولار در مدت 24 ساعت 58 درصد از رشد سلولی جلوگیری کرده است. میزان IC50 در 12 و24 ساعت به ترتیب 0/68 و 0/54 میکرومولار گزارش شده است [22]. درسال 2018 Maria A Soldatkina وهمکاران، میزان سایتوتوکسیسیتی Batumin که یک پلی آن آنتی‌بیوتیک طبیعی است که توسط سودوموناس باتومیسی تولید شده است، را روی رده سلولی ملانوما (UCT-Mel1) در مدت‌زمان 48 ساعت بررسی کردند. میزان IC50 4/5 میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است. همچنین گزارش شده است که ترکیب مورد نظر به صورت وابسته به دوز باعث کاهش رشد سلول‌ها شده است [23]. مقایسه نتایج میزان IC50 در این مطالعه و آزمایش‌های 48 ساعته در پژوهش فوق، با غلظت کمتر شاهد رخداد IC50 می‌باشیم و تأثیر بیشتری در مرگ سلولی مشاهده نمودیم که این اختلاف نتایج ممکن است به دلیل تفاوت نوع رده سلولی و همچنین نوع تکنیک بکار رفته باشد، در مقایسه با آزمایش 24 ساعته در پژوهش ما فرکشن لیزات باکتری در محیط کشت با میزان (IC50=4/625) تأثیر مشابهی دارد و فرکشن لیزات باکتری در محیط کشت با (IC50=1/92) کارآمدتر بوده است. Jessica Pahle وهمکاران در سال 2017، میزان سایتوتوکسیسیتی انتروتوکسین باکتری کلستریدیوم پرفرژنز recCPE(Clostridium perfrigens Enterotoxin) بر روی رده سلولی ملانوما (SK-Mel5) با استفاده از آزمون MTT در مدت‌زمان 72 ساعت بررسی کردند CPEبه واسطه اتصال به پروتئین Claudin -3 وClaudin-4 که درسطح و در سیتوپلاسم سلول‌های سرطانی وجود دارند باعث لیز سلولی می‌شود. طبق گزارش داده شده در این مطالعه میزان بیان این پروتئین در رده سلولی بالا صفر بوده است، درنتیجه این انتروتوکسین به میزان بسیار کمی بر مرگ سلولی تاثیرگذاشته، که با گروه کنترل تفاوت چندانی نداشته است [24]. در مقایسه نتایج این پژوهش با نتایج مطالعات ما نشان داد که لیزات باکتری سالمونلا در محیط کشت، غلظت‌های کمتر از 30 میکروگرم بر میلی‌لیتر رسوب 80% لیزات، رسوب 30% محیط کشت در دو زمان 24 و 48 آثار کشندگی قوی‌تری در مقایسه با *کلستریدیوم پرفرژنز* دارد و با افزایش زمان میزان مرگ کمتر می‌شود اما در مورد فرکشن رسوب 80% لیزات در غلظت 30میکروگرم بر میلی‌لیتر و رسوب 80% محیط کشت وابسته به زمان است و با افزایش زمان میزان مرگ‌ومیر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 2:04 IRDT on Monday July 19th 2021

بیشتر می‌شود. همچنین نشان داده شد که همه فرکشن‌های به کار رفته دارای رفتار وابسته به غلظت می‌باشد و با افزایش غلظت میزان مرگ‌ومیر بیشتر می‌شود. نتایج حاصل از بررسی پروتئین‌های موجود در لیزات و محیط کشت باکتری نشان داد که بیشترین میزان مرگ سلولی ناشی از تیمار رسوب 80% محیط کشت، در مطالعه 48 ساعته این موضوع مطرح می‌نماید که وجود برخی متابولیت‌ها و پروتئین‌های میکروبی تولیدشده مذکور (همه فرکشن‌های مطالعه شده) دارای آثار کشندگی بر رده ملانوما(BL16) دارد که با آزمایش‌های تکمیلی می‌تواند سازوکار این مرگ سلولی را تعیین نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد پروتئین‌های موجود در لیزات و محیط کشت یاکتری *سالمونلا تیفی موریوم*، به دلیل کاهش میزان بقا در سلول‌های سرطانی رده ملانوما، می‌تواند به‌عنوان ترکیب مکمل در کنار درمان‌های سرطان ملانوما مورد مطالعه دقیق‌تر قرار گیرد. به منظور بررسی دقیق‌تر سازوکار عمل پروتئین‌های موجود در لیزات و محیط کشت یاکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و چگونگی اثرگذاری آن روی سلول‌های سرطانی، مطالعه تحریک آپاپتوز و نکروز از طریق فلوسیتومتری پیشنهاد می‌شود مطالعات دقیق مولکولی در آینده صورت گیرد.

منابع

1) Rodríguez-Cerdeira, C., Carnero Gregorio, M., López-Barcenas, A., Sánchez-Blanco, E., Sánchez-Blanco, B., Fabbrocini, G., ... & Guzman, R. A. (2017). Advances in immunotherapy for melanoma: a comprehensive review. Mediators of inflammation, 2017.

2) Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S., & Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. Physiological reviews, 84(4), 1155-1228.

3) Wellbrock, C., Weisser, C., Geissinger, E., Troppmair, J., & Schartl, M. (2002). Activation of p59Fyn leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling. Journal of Biological Chemistry, 277(8), 6443-6454.

4) Enayatrad, M., Mirzaei, M., Salehiniya, H., Karimirad, M. R., Vaziri, S., Mansouri, F., & Moudi, A. (2016). Trends in incidence of common cancers in Iran. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17(S3), 39-42.

5) Nahar, V. K., Hosain, A., Sharma, M., Jacks, S. K., & Brodell, R. T. (2016). Need for primary prevention for skin cancers in Iran. Journal of research in health sciences, 16(3), 170-171.

6) Soengas, M. S., & Lowe, S. W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. Oncogene, 22(20), 3138-3151.

7) Jiang, S. N., Phan, T. X., Nam, T. K., Nguyen, V. H., Kim, H. S., Bom, H. S., ... & Min, J. J. (2010). Inhibition of tumor growth and metastasis by a combination of Escherichia coli–mediated cytolytic therapy and radiotherapy. Molecular therapy, 18(3), 635-642.

8) Forbes, N. S. (2010). Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. Nature Reviews Cancer, 10(11), 785-794.

9) Eng, Shu-Kee, Priyia Pusparajah, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Hooi-Leng Ser, Kok-Gan Chan, and Learn-Han Lee. "Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance." Frontiers in Life Science 8, no. 3 (2015): 284-293.

10) Zheng, J. H., & Min, J. J. (2016). Targeted cancer therapy using engineered *Salmonella typhimurium*. Chonnam medical journal, 52(3), 173-184.

11) Wang, C. Z., Kazmierczak, R. A., & Eisenstark, A. (2016). Strains, mechanism, and perspective: Salmonella-based cancer therapy. International journal of microbiology, 2016.

12) Soleimani, N. (2017). Evaluation of proliferation and survival of spleen immune cells treated by Deacetylchitin nanoparticles on breast cancer mouse model. URMIA MEDICAL JOURNAL, 28(4), 33-39.

13) Jiang, L., Zhou, J., Zhong, D., Zhou, Y., Zhang, W., Wu, W., ... & Ma, Y. (2017). Overexpression of SMC4 activates TGFβ/Smad signaling and promotes aggressive phenotype in glioma cells. Oncogenesis, 6(3), e301-e301.

14) Fatahi, A., & Soleimani, N. (2018). Evaluation of cytotoxicity activity of cell extracts of kefir microorganisms on glioblastoma cancer cells. URMIA MEDICAL JOURNAL, 29(1), 12-19.

15) Pyo, K. H., Jung, B. K., Chai, J. Y., & Shin, E. H. (2010). Suppressed CD31 expression in sarcoma-180 tumors after injection with Toxoplasma gondii lysate antigen in BALB/c mice. The Korean journal of parasitology, 48(2), 171.

16) Cheong, I., Huang, X., Thornton, K., Diaz, L. A., & Zhou, S. (2007). Targeting cancer with bugs and liposomes: ready, aim, fire. Cancer research, 67(20), 9605-9608.

17) Radhakrishnan, V., Song, Y. S., & Thiruvengadam, D. (2008). Romidepsin (depsipeptide) induced cell cycle arrest, apoptosis and histone hyperacetylation in lung carcinoma cells (A549) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins

www.SID.ir

Archive of SID

expression. Biomedicine & pharmacotherapy, 62(2), 85-93.

18) Kanno, S. I., Maeda, N., Tomizawa, A., Yomogida, S., Katoh, T., & Ishikawa, M. (2012). Involvement of p21waf1/cip1 expression in the cytotoxicity of the potent histone deacetylase inhibitor spiruchostatin B towards susceptible NALM-6 human B cell leukemia cells. International journal of oncology, 40(5), 1391-1396.

19) Lee, J. W., Shin, J. G., Kim, E. H., Kang, H. E., Yim, I. B., Kim, J. Y., ... & Woo, H. J. (2004). Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum. Journal of veterinary science, 5(1), 41-48.

20) Nath, L. R., Kumar, S. N., Das, A. A., Nambisan, B., Shabna, A., Mohandas, C., & Anto, R. J. (2016). In Vitro Evaluation of the Antioxidant, 3, 5-Dihydroxy-4-ethyl-trans-stilbene (DETS) Isolated from Bacillus cereus as a Potent Candidate against Malignant Melanoma. Frontiers in microbiology, 7, 452.

21) Yamada, T., Goto, M., Punj, V., Zaborina, O., Chen, M. L., Kimbara, K., ... & Chakrabarty, A. M. (2002). Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(22), 14098-14103.

22) Rani, A., Rajulapati, V., & Goyal, A. (2019). Antitumor effect of chondroitin AC lyase (Ps PL8A) from Pedobacter saltans on melanoma and fibrosarcoma cell lines by in vitro analysis. Pharmacological Reports, 71(1), 167-174.

23) Soldatkina, M. A., Klochko, V. V., Zagorodnya, S. D., Rademan, S., Visagie, M. H., Lebelo, M. T., ... & Reva, O. N. (2018). Promising anticancer activity of batumin: a natural polyene antibiotic produced by Pseudomonas batumici. Future medicinal chemistry, 10(18), 2187-2199.

24) Pahle, J., Menzel, L., Niesler, N., Kobelt, D., Aumann, J., Rivera, M., & Walther, W. (2017). Rapid eradication of colon carcinoma by Clostridium perfringens Enterotoxin suicidal gene therapy. BMC cancer, 17(1), 129.

Downloaded from mjms.modares.ac.ir at 2:04 IRDT on Monday July 19th 2021

www.SID.ir