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**

**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

**ARTICLE INFO**

***Article Type***

Original Research



***Authors***

Minoo Najafi1

Neda Soleimani1\*

Atousa Aliahmadi2

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

*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.*

**ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیسیتی فرکشن‌های پروتئینی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بر روي رده سلول‌های سرطانی ملانوماB16) )**

**مینو نجفی**

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

**ندا سليماني\***

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 باکتریو 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* روي ميزان کاهش رشد و تکثير و افزایش مرگ سلول‌های سرطاني ملانوما BL16 به عنوان سرطان سخت درمان پذیر و مقاوم‌ترین نوع سرطان پوست در شرایط آزمایشگاهی، انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در اين مطالعه تجربي از رده سلولي، سرطاني(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 سرطاني ملانوما با غلظت‌هاي مختلفي از فرکشن‌های مختلف پروتئين باكتريايي تیمار شدند و ميزان زنده ماندن سلول‌ها با آزمون MTT در زمانه‌های 24 و 48 ساعت ارزيابی و بررسی شد.

یافته‌ها: نتايج آزمایش MTT تيمار 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 ۲۴ و 48 ساعته، بيشترين ميزان اثر در غلظت‌های 25/9میکروگرم 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 75/10 میکروگرم بر میلی‌لیتر از رسوب 30% محیط کشت مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتايج نشان می‌دهد فرکشن‌های باکتریایی سالمونلا‌تیفی‌موریوم بسیار سمی و با کشندگي زیادی بر سلول‌های سرطاني ملانوما است. اين ترکيبات می‌توانند به‌عنوان کانديد جايگزين و يا مکمل درماني سرطان با تاثیر بالا در آینده پيشنهاد و استفاده شود.

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

تاریخ دریافت: 12/11/98

تاریخ پذیرش: 21/1/1400

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 بخش‌هاي غیرجلدي مانند موکوس دهانی، حلق، سینوس‌هاي نزدیک‌بینی، واژن، مجاري‌ادراري، سیستم عصبی مرکزي و چشم‌ها. این نوع از سرطان، داراي میزان بسیار بالایی از مرگ‌ومیر هست] 1[. ملانوسیت‌ها سلول‌های رنگ‌دانه‌دار خاصی 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، ملانوسیت‌هاي جلدي از پیشگامان قلبی-عصبی که توانایی زیادي براي حرکت‌دارند، منشا گرفته و به پوست مهاجرت می‌کنند. در پوست، ملانوسیت‌ها در لایه پایه‌اي از اپیدرم و فولیکول‌های مو ساکن می‌شوند و تعادل حیاتی آن‌ها به‌ وسیله‌ کراتینوسیت‌هاي اپیدرمال تنظیم می‌شود ]2[ در ایجاد ملانوما، تغییرات بافت‌شناسی که موجب تبدیل ملانوسیت نرمال به ملانوماي بدخیم می‌شود، نقش بسیار مهمی دارند. این تغییرات بافت‌شناسی می‌توانند به جهش‌هاي 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 سرطان‌هاي تشخیص داده‌ شده، سرطان پوست است. در شرق ایران، میانگین میزان شیوع سرطان پوست در هنگام سال‌هاي 1987 تا 2001 ،6/28 % 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 1/13 % و در میان مردان ایرانی 9/18 % 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، ویژگی‌هاي زنده‌مانی بسیار بهبودیافته‌ای دارند. سلول‌های ملانوما در مقایسه با دیگر انواع سلول‌های توموري سطوح بسیار کمی از آپوپتوز را در شرایط درون تنی، از خود نشان می‌دهند و همچنین در شرایط برون تنی نسبت به موادي که آپوپتوز را القا می‌کنند از خود مقاومت نشان می‌دهند. بنابراین در درمان‌هاي شیمی‌درمانی، رادیودرمانی و پرتودرمانی، ایمنی‌درمانی و درمان بیولوژیک و... داراي مقاومت بالایی بوده و این مقاومت به‌عنوان سدي در برابر درمان موفقیت‌آمیز ملانوما محسوب می‌شود ]6[. آثار جانبي داروها، وقت‌گير و پرهزينه بودن و عدم كارآيي كامل اين روش‌های درماني رایج ، نياز به جستجو براي روش‌های جديد و راهكارهايي براي درمان این نوع سرطان مطرح است که مي‌توان به بهره‌گیری از محصولات ميكروبي اشاره كرد. 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 ، ايمني‌تراپي به‌ واسطه بدنه باكتري‌ها و اسپور‌هاي باكتريايي به ویژه باكتري‌هاي بی‌هوازی و پروتئين‌هاي نوتركيب باكتريايي ازجمله مواردي هستند كه امروزه برای درمان مطرح هستند. بروز آثار مثبت و نیز کاهش عوارض متعاقب درمان، باعث شده است كه استفاده از این عوامل در کانون توجه پژوهشگران و نیز داروسازان قرارگیرد و بتواند در آینده درمانی بالقوه برای انسان باشد ]7و8[. از بين باكتري‌هاي 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 اهميت 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 چندين فاكتور بیماری‌زایی ازجمله توکسین‌ها، پروتئین‌های ترشحی و سیستم ترشحی T3SS و غیره می‌تواند كانديد مناسبي براي اين مطالعه باشد ]10و11[. که هر يك از اين فاكتورها آثار خاص خود را بر سلول اعمال مي‌كنند. فاكتور‌هاي بیماری‌زایی اين باكتري از مسيرهاي مختلف،سبب مرگ سلول‌ها مي‌شوند. هدف از اين مطالعه، ارزیابی اثر سيتوتوکسيسيتي فرکشن‌های پروتئینی باکتری سالمونلا روي ميزان رشد و تکثير سلول‌های سرطاني 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 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 دور rpm 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 دور rpm12000 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 3/0 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 ( 22/0میکرون) 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 دورrpm 13000 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 سرطاني:**

سلول سرطانی BL16 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. در محيط كشت (Gibco) 12DMEM-F به همراه ۱۰ درصد (Gibco) FBS و 100واحد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین\_استرپتومایسین (Gibco) در انکوباتور با دمای ˚C37 و ۵ درصد CO2 کشت داده شد (12)، پس از سه بار پاساژ سلولي، سلول‌ها به تعداد مناسب براي تست شدند.

**ارزيابي اثر سيتوتوکسيسيتي فرکشن‌های مختلف باکتری بر سلول‌های سرطاني به روش آزمایش MTT:**

 به‌ منظور بررسي ميزان رشد و مرگ مير سلول‌ها، طبق پروتكل اعلام‌شده انجام گرفت. سلول‌ها تريپسينه و از فلاسک‌ها جمع‌آوری و با استفاده از لام نئوبار شمارش تعداد کل سلول‌ها انجام شد. تعداد ۵۰۰۰ سلول در هرکدام از چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه حاوي ميزان200 میکرولیتر محيط كشت منتقل شد ]13[. سپس سلول‌ها با غلظت‌هاي 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 زماني ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتورCO2 دار(5درصد) و در دماي ˚C37انکوبه شد.

سپس 20μlمحلول (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- MTT diphenyltetrazolium bromide) (sigma usa) به هر چاهك اضافه و به مدت يک ساعت در دماي37 درجه انکوبه که در این هنگام کريستال‌هاي فورمازان تشكيل شد. پس‌ازانكوباسيون، محيط کشت درون چاهک‌ها تخليه شد و به ميزان ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Gibco)به هر چاهك اضافه شد و پس از چند دقيقه انكوباسيون در دماي اتاق ميزان جذب نوري آن‌ها در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه (BioTek, USA) elisa reader قرائت شد ]14[.

**آناليز آماري**

تحليل آماري داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریسم و نتايج با آزمون آناليز واريانس یک‌طرفه t test و تمامی داده‌ها به ‌صورت ميانگين ± انحراف معيار گزارش و حد معنی‌دار بودن p < 0.05 در نظر گرفته شد. تمامي آزمایش‌ها سه بار تكرار شدند.

**یافته‌ها**

نتايج تست MTT، تأثير تيمار بر ميزان رشد و مرگ‌ومیر سلول‌ها را با تغيير رنگ زرد محلول تترازوليوم به رنگ بنفش ناشي از تشکيل کريستال‌هاي فورمازان در اثر فعاليت آنزيم سوکسينات دهيدروژنازميتوکندريايي نشان می‌دهد. بنابراين رنگ بنفش در صورت زنده‌بودن سلول‌ها، مشاهده مي‌شود و مقايسه شدت رنگ توليدشده در چاهک‌هاي تيمار شده نسبت به چاهک‌هاي شاهد،افزايش تعداد سلول‌ها يا کاهش آن‌ها را نمايان مي‌کند. ميزان بقاي سلول‌ها تحت تأثير تيمار، از فرمول ذيل به دست آمد.

(Cell viability = میانگین جذب نوری)/(میانگین جذب نوری شاهد\*100)



 A) 

B)

نمودار(۱): ارزيابي ميزان بقاي سلول‌های سرطاني 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 25/9 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 نظرمي‌رسد اثر سيتوتوکسيسيتي لیزات باکتری در محیط کشت سلول‌های سرطاني در دو بازه زماني ٢٤ و ٤٨ ساعت وابسته به زمان نیست و در غلظت‌هاي مشابه ميزان مرگ سلولي در مدت 24 ساعت بيشتر از همان غلظت در بازه زماني 48 ساعته هست (نمودار1).



A)

 

B)

نمودار( 2): ارزيابي ميزان بقاي سلول‌های سرطاني رده سلولی ملانوما تیمار شده با رسوب 80% لیزات باکتری (A24ساعته 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 نظرمي‌رسد اثر سيتوتوکسيسيتي 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 غلظت‌هاي مشابه ميزان مرگ سلولي در مدت 24 ساعت بيشتر از همان غلظت در بازه زماني 48 ساعته است (نمودار2).



A) 

B)

نمودار( 3): ارزيابي ميزان بقاي سلول‌های سرطاني رده سلولی ملانوما تیمار شده با رسوب 80% محیط کشت باکتری (A24ساعته 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 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 مي‌رسد اثر سيتوتوکسيسيتي 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 غلظت‌هاي مشابه ميزان مرگ سلولي در مدت 48ساعت بيشتر از همان غلظت در بازه زماني 24 ساعته است (نمودار3).



 A)

 

B)

نمودار( 4): ارزيابي ميزان بقاي سلول‌های سرطاني رده سلولی ملانوما تیمار شده با رسوب 30% محیط کشت باکتری (A24ساعته 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 75/10 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 نظرمي‌رسد اثر سيتوتوکسيسيتي 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 غلظت‌هاي مشابه ميزان مرگ سلولي در مدت 24 ساعت بيشتر از همان غلظت در بازه زماني 48 ساعته هست (نمودار4).



نمودار( 5): ارزيابي ميزان بقاي سلول‌های سرطاني 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 كاربردهاي گوناگوني از باكتري‌ها و محصولات آن در درمان سرطان موردتوجه قرارگرفته است. باكتري‌هاي زنده‌ تخفيف حدت يافته به‌عنوان عامل ضد تومور و وكتورهاي باكتريايي برای تحویل عوامل ضد سرطان، پپتیدهای درمانی / پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و فرآورده‌هایی که با اتصال به آنزیم‌های مربوطه فعال می‌شوند براي درمان به‌عنوان يك استراتژي قوي مطرح هستند ]15 و 16[.

*سالمونلا تیفی موریوم* که با چندين فاكتور بیماری‌زایی ازجمله توکسین‌ها، پروتئین‌های ترشحی مانند SipA ، SipC ، SopB ، SopE و SopE2و دو سیستم ترشحی T3SS(که باعث ترشح مایعات والتهاب نیز می‌شود) و غیره می‌تواند كانديد مناسبي براي 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 کهIC50 ترکیب مذکور در مدت‌زمان 48 ساعت 01/24 میکرو مولار است. همچنین با افزایش غلظت ترکیب فوق، کاهش میزان زنده‌مانی گزارش ‌شده است ]18-20[. 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 سایتوتوکسیسییChondroitin 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 0013/0 تا 3/1 میکرومولار استفاده ‌شده است که در غلظت 3/1 میکرومولار در مدت 24 ساعت 58 درصد از رشد سلولی جلوگیری کرده است. میزان IC50 در 12 و24 ساعت به ترتیب 68/0 و 54/0 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. میزانIC50 5/4 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 نتايج 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 ٢٤ و ٤٨ آثار کشندگی قوی‌تری در مقایسه با *کلستریدیوم پرفرژنز* دارد و با افزايش زمان ميزان 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 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. نتايج حاصل از بررسي پروتئین‌های موجود در لیزات و محیط کشت باکتری نشان داد که بيشترين ميزان مرگ سلولي ناشي از تيمار رسوب 80% محیط کشت، در مطالعه 48 ساعته اين موضوع مطرح می‌نماید که وجود برخي متابوليت‌ها و پروتئین‌های ميکروبي توليدشده 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**

نتايج مطالعه حاضر نشان می‌دهد پروتئین‌های موجود در لیزات و محیط کشت یاکتری *سالمونلا تیفی موریوم*، به دليل کاهش ميزان بقا در سلول‌های سرطاني رده ملانوما، مي‌تواند به‌عنوان ترکيب مکمل در کنار درمان‌هاي سرطان ملانوما مورد مطالعه دقیق‌تر قرار گیرد. به منظور بررسي دقیق‌تر سازوکار عمل پروتئین‌های موجود در لیزات و محیط کشت یاکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و چگونگی اثرگذاري آن روي سلول‌های سرطاني، مطالعه تحريک آپاپتوز و نکروز از طريق فلوسيتومتري پيشنهاد می‌شود مطالعات دقيق مولکولي در آينده صورت گيرد.

**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 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.