



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

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Minoo Najafi¹
Neda Soleimani^{1*}
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

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 be a suitable candidate for this study. 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

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

مینو نجفی

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

ندا سلیمانی*

استادیار، دکتری باکتری‌شناسی 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 شایع‌ترین علت مرگ در سراسر جهان است. با توجه به عوارض جانبی و ناکارآمد بودن 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 استراتژی‌های درمانی آینده باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیته 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، رسوب 30٪ پروتئین‌های لیزات، رسوب 80٪ پروتئین‌های محیط کشت و رسوب 30٪ پروتئین‌های محیط کشت) در زمان 24 و 48 ساعته، بیشترین میزان اثر در غلظت‌های 9/25 میکروگرم بر میلی لیتر از باکتری لیز شده در محیط کشت، 30 میکروگرم بر میلی لیتر از فرکشن رسوب 80٪ لیزات، 8 میکروگرم بر میلی لیتر از رسوب 30٪ لیزات، 72 میکروگرم بر میلی لیتر از فرکشن رسوب 80٪ محیط کشت و غلظت 10/75 میکروگرم بر میلی لیتر از رسوب 30٪ محیط کشت مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد فرکشن‌های باکتریایی سالمونلا تیفی موریوم بسیار سمی و با کشندگی زیادی بر سلول‌های سرطانی ملانوما است. این ترکیبات می‌توانند به عنوان 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 منشأ گرفته و می‌تواند در هر بافتی که این نوع سلول‌ها حضور دارند رخ دهد، مانند بخش‌های غیرجلدی مانند موکوس دهانی، حلق، سینوس‌های نزدیک بینی، واژن، مجاری ادراری، سیستم عصبی مرکزی و چشم‌ها. این نوع از سرطان، دارای میزان بسیار بالایی از مرگ و میر هست [1]. ملانوسیت‌ها سلول‌های رنگ‌دانه‌دار خاصی

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 ایمونوتوکسین‌ها و یا کونژوگه شده به آنتی‌ژن‌های سطحی توموری، ایمنی‌تراپی به واسطه بدنه باکتری‌ها و اسپورهای باکتریایی به ویژه باکتری‌های بی‌هوازی و پروتئین‌های نوترکیب باکتریایی از جمله 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، سالمونلا تیفی موریوم که یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، پاتوژن درون سلولی 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 منحصر به فردی که دارد دارای اهمیت است و به‌طور گسترده در مدل‌های سرطان حیوانات و آزمایشات بالینی فاز اول در بیماران انسانی مورد مطالعه قرار گرفته است. سالمونلا تیفی موریوم می‌تواند به بافت‌های عمیق و مناطق نکروتیک نفوذ کند و در آنجا تکثیر پیدا کند به علاوه سالمونلا با چندین فاکتور بیماری‌زایی از جمله 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 می‌کند. فاکتورهای بیماری‌زایی این باکتری از مسیرهای مختلف، سبب مرگ سلول‌ها می‌شوند. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیته 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

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 حرکت دارند، 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] پیش‌بینی شده 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٪ گزارش شده است که از این میان، 5٪ ملانوما است [5]. این میزان در ایران در حال افزایش است به گونه‌ای که در سال 2009، درصد سرطان پوست در میان زنان ایرانی 13/1٪ و در میان مردان ایرانی 18/9٪ است [4]. ملانوما به شدت 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 بهبود یافته‌ای 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 به عنوان سدی در برابر درمان موفقیت‌آمیز ملانوما محسوب می‌شود [6]. آثار جانبی داروها، وقت‌گیر و پرهزینه بودن و عدم کارایی کامل این روش‌های درمانی رایج، نیاز به جستجو برای روش‌های جدید و راهکارهایی

غلظت 30% آمونیوم سولفات رسوب داده شد و سپس سانتریفوژ شد با دور 13000rpm در دمای 4 درجه سانتی گراد 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 سانتریفوژ شد، رسوب نگهداری و مایع رویی حاصل از سانتریفوژ برای رساندن به درصد اشباع بعدی (80%) سولفات آمونیوم استفاده شد و مانند مرحله پیش انجام شد و دوباره سانتریفوژ شد، و مایع رویی خارج و دور ریخته شد و رسوب هر مرحله نگهداری شد در نهایت رسوب‌های به دست آمده جداگانه در PBS استریل حل شد تا زمانی که شفاف شود و برای نمک‌زدایی دیالیز شد. پروتئین‌های استخراج شده به وسیله الکتروفورز ناپیوسته ژل پلی آکریل آمید حاوی SDS بررسی شد. برای سنجش مقدار پروتئین کل نمونه عصاره سلولی و سوپرناتانت نمونه دیالیز شده با استفاده از روش بردفورد و با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد صورت گرفت.

کشت سلول رده سلول‌های سرطانی:

سلول سرطانی BL16 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. در محیط کشت DMEM-F12 (Gibco) به همراه 10 درصد FBS (Gibco) و 100 واحد آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین (Gibco) در انکوباتور با دمای 37°C و 5 درصد CO2 کشت داده شد (12)، پس از سه بار پاساژ سلولی، سلول‌ها به تعداد مناسب برای تست شدند.

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

به منظور بررسی میزان رشد و مرگ میر سلول‌ها، طبق پروتکل اعلام شده انجام گرفت. سلول‌ها تریپسینه و از فلاسک‌ها جمع‌آوری و با استفاده از لام نئوبار شمارش تعداد کل سلول‌ها انجام شد. تعداد 5000 سلول در هر کدام از چاهک پلیت‌های 96 خانه حاوی میزان 200 میکرولیتر محیط کشت منتقل شد [13]. سپس سلول‌ها با

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 سانتی گراد 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 19 ساعت قرارداده شد تا زمان رسیدن به فاز لگاریتمی رشد و سپس در فالكون‌های 50 سی‌سی تقسیم و نگهداری شد.

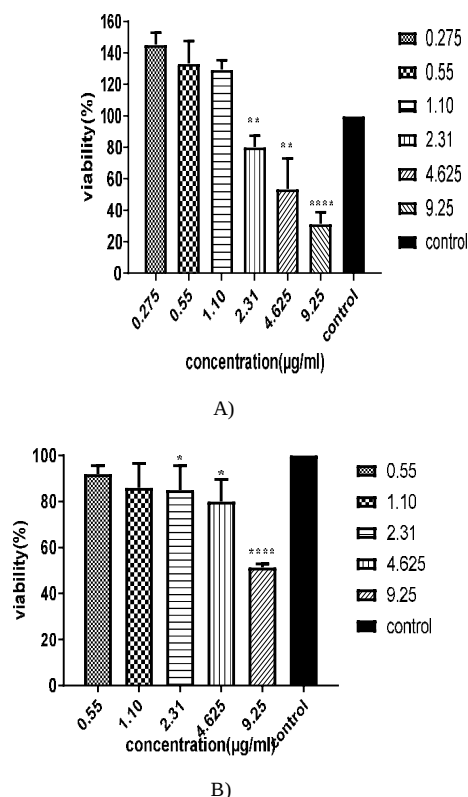
یک فالكون 50 سی‌سی از محیط کشت حاوی باکتری را به منظور لیز کردن باکتری در محیط کشت، جدا و چندین مرحله فریز دفریز شد و برای اطمینان از لیز شدن کامل باکتری به مدت 20 دقیقه سونیک شد و سپس با دور 12000 rpm به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و مایع رویی جدا و فیلتر شد (نمونه 1). سایر فالكون‌ها را با دور 12000 rpm به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفوژ و مایع رویی از پلت ته فالكون جدا شد و به منظور حذف باکتری باقیمانده در مایع رویی با استفاده از پمپ خلاء با فیلتر 0/3 μm (sswp) فیلتر شد و به صورت جداگانه در داخل یک ظرف استریل در 4 درجه سانتی گراد 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 جمع‌آوری شده در کف فالكون‌ها را داخل یک فالكون ریخته و 50 سی‌سی بافر لیز کننده استریل به آن اضافه شد و چندین مرتبه فریز دفریز انجام شد (ابتدا در دمای 20- درجه سانتی گراد قرار گرفت تا کاملاً یخ بزند و سریع در بن ماری 45 درجه سانتی گراد قرار گرفت تا سریع دفریز شود) سپس با سرعت 12000 rpm در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی به آرامی به وسیله سرنگ از رسوب کف فالكون جدا و فیلتر شد (0/22 میکرون) و در داخل فریزر 21- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

برای غلیظ کردن و خالص‌سازی جزئی پروتئین‌ها از روش رسوب‌دهی با نمک سولفات آمونیوم در غلظت‌های 30% و 80% اشباع استفاده شد. ابتدا لیزات باکتری داخل بشر ریخته شد و با

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



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

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از فرکشن لیزات باکتری در محیط کشت (با میزان غلظت کل پروتئین 18,5 میکروگرم 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 کسندگی کاهش یافته به شکلی که در غلظت 0,275 میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان کسندگی به صفر رسیده است، به نظر می‌رسد اثر سیتوتوکسیسیته 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 (نمودار 1).

غلظت‌های مختلف از فرکشن‌های (باکتری لیز شده در محیط کشت، رسوب 80% پروتئین‌های لیزات، رسوب 30% پروتئین‌های لیزات، رسوب 80% پروتئین‌های محیط کشت، رسوب 30% پروتئین‌های محیط کشت) و به صورت سه بار تکرار و چند چاهک باقی‌مانده به عنوان کنترل و فاقد تیمار در نظر گرفته شد. پلیت‌ها در دو بازه زمانی 24 و 48 ساعت در انکوباتور CO₂ دار (5 درصد) و در دمای 37°C انکوبه شد.

سپس 20 µl محلول MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (sigma usa) به هر چاهک اضافه و به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه انکوبه که در این هنگام کریستال‌های فورمازان تشکیل شد. پس از انکوباسیون، 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 طول موج 570 نانومتر با دستگاه elisa (BioTek, USA) reader قرائت شد [14].

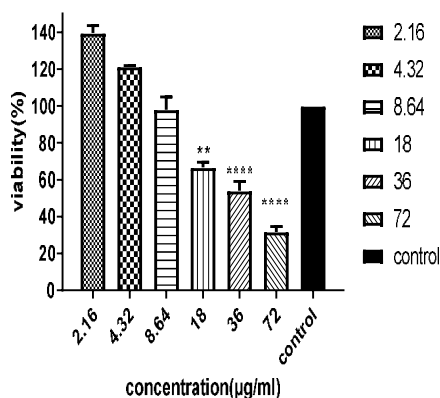
آنالیز آماری

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

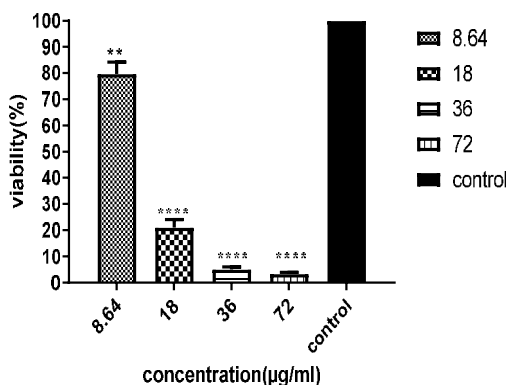
یافته‌ها

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 دهیدروژناز میتوکندریایی نشان می‌دهد. بنابراین رنگ بنفش در صورت زنده بودن 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.

و 48 ساعته وابسته به زمان است و میزان مرگ سلولی در مدت 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 (نمودار 2).



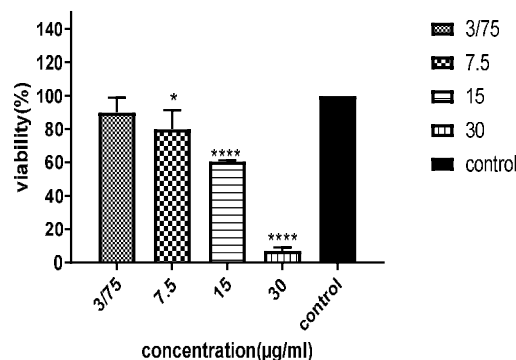
A)



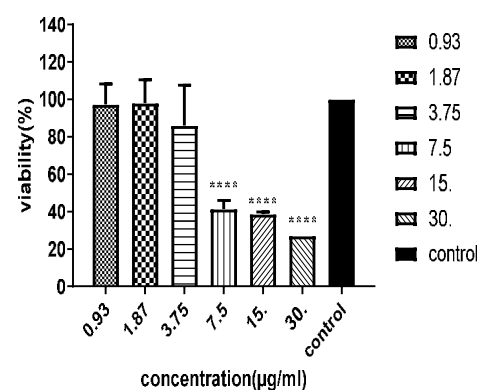
B)

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

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از فرکشن رسوب 80% محیط کشت باکتری با میزان غلظت کل پروتئین 144 میکروگرم بر میلی لیتر بر سلول‌های سرطانی (BL16) ملانوما در آزمایش 24 ساعته و 48 ساعته نشان داد که بیشترین میزان اثر مهارکنندگی در غلظت 72 میکروگرم بر میلی لیتر است که در 24 و 48 ساعته به ترتیب 95 و 90 درصد از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شدند و با کاهش غلظت



A)

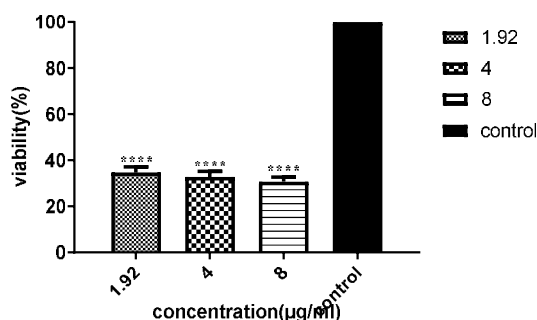


B)

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

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از فرکشن رسوب 80% لیفات باکتری (با میزان غلظت کل پروتئین 60 میکروگرم بر میلی 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 میلی لیتر 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 پایین‌تر از 7.5 میکروگرم بر میلی لیتر میزان مرگ سلول به صفر رسیده است. به نظرمی‌رسد اثر سیتوتوکسیسیته رسوب 80% لیفات باکتری در غلظت 30 میکروگرم بر میلی لیتر دو بازه 24

کاهش غلظت پروتئین میزان مرگ سلولی کاهش پیدا کرده است. به نظرمی‌رسد اثر سیتوتوکسیسیته‌ی رسوب 80% محیط کشت باکتری در دو بازه 24 و 48 ساعته وابسته به زمان نیست و میزان مرگ سلولی در مدت 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 (نمودار 4).



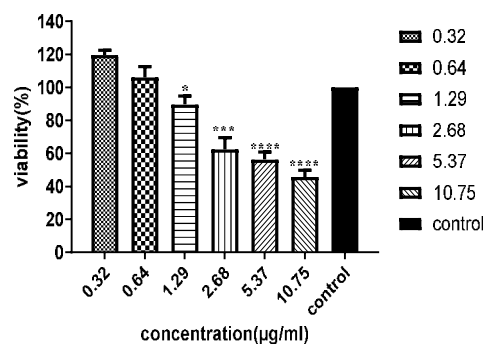
نمودار (5): ارزیابی میزان بقای سلول‌های سرطانی رده سلولی ملانوما تیمار شده با رسوب 30% لیزات باکتری در مدت 24 ساعته

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از فرکشن رسوب 30% لیزات باکتری (با میزان غلظت کل پروتئین 16 میکروگرم 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 (نمودار 5).

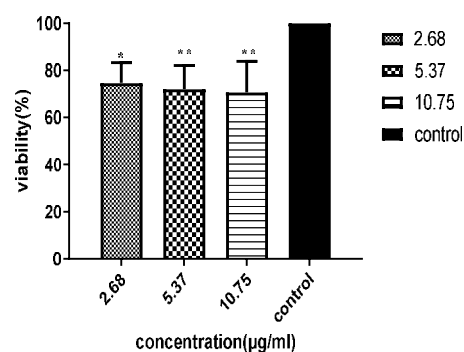
بحث

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

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 سیتوتوکسیسیته‌ی رسوب 80% محیط کشت باکتری در دو بازه 24 و 48 ساعته وابسته به زمان است و میزان مرگ سلولی در مدت 48 ساعت بیشتر از 24 ساعته هست و در غلظت‌های مشابه میزان مرگ سلولی در مدت 48 ساعت بیشتر از همان غلظت در بازه زمانی 24 ساعته است (نمودار 3).



A)



B)

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

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از فرکشن رسوب 30% محیط کشت باکتری (با میزان غلظت کل پروتئین 21.5 میکروگرم 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

غلظت 1/3 میکرومولار در مدت 24 ساعت 58 درصد از رشد سلولی جلوگیری کرده است. میزان IC50 در 12 و 24 ساعت به ترتیب 0/68 و 0/54 میکرومولار گزارش شده است [22]. در سال 2018 Maria A Soldatkin و همکاران، میزان سایتوتوکسیسیتی Batumin که یک پلی آن آنتی بیوتیک طبیعی است که توسط سودوموناس باتومیسی تولید شده است، را روی رده سلولی ملانوما (UCT-Mel1) در مدت زمان 48 ساعت بررسی کردند. میزان IC50 4/5 میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است. همچنین گزارش شده است که ترکیب مورد نظر به صورت وابسته به دوز باعث کاهش رشد سلول ها شده است [23]. مقایسه نتایج میزان IC50 در این مطالعه و آزمایش های 48 ساعته در پژوهش فوق، با غلظت کمتر شاهد رخداد IC50 می باشیم 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 و همکاران در سال 2017، میزان سایتوتوکسیسیتی انترتوکسین باکتری کلوستریدیوم پرفرژنز *recCPE* (*Clostridium perfringens* Enterotoxin) (SK-Mel5) با استفاده از آزمون MTT در مدت زمان 72 ساعت بررسی کردند CPE به واسطه اتصال به پروتئین 3- Claudin و Claudin-4 که در سطح و در سیتوپلاسم سلول های سرطانی وجود دارند باعث لیز سلولی می شود. طبق گزارش داده شده در این مطالعه میزان بیان این پروتئین در رده سلولی بالا صفر بوده است، در نتیجه این انترتوکسین به میزان بسیار کمی بر مرگ سلولی تأثیر گذاشته، 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، غلظت های کمتر از 30 میکروگرم بر میلی لیتر رسوب 80% لیزات، رسوب 30% محیط کشت در دو زمان 24 و 48 آثار کشندگی قوی تری در مقایسه با کلوستریدیوم پرفرژنز دارد و با افزایش زمان میزان مرگ کمتر می شود اما در مورد فرکشن رسوب 80% لیزات در غلظت 30 میکروگرم بر میلی لیتر و رسوب 80% محیط کشت وابسته به زمان است و با افزایش زمان میزان مرگ و میر

سالمونلا تیغی موریوم که با چندین فاکتور بیماری زایی از جمله توکسین ها، پروتئین های ترشحی مانند SipA، SipC، SopB، SopE و SopE2 و دو سیستم ترشحی T3SS (که باعث ترشح مایعات و التهاب نیز می شود) و غیره می تواند کاندید مناسبی برای مطالعه در زمینه درمان سرطان باشد [10 و 11].

در سال 2016 Lekshmi R.Nath و همکاران، میزان سایتوتوکسیسیتی آنتی اکسیدان DETS جدا شده 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 مدت زمان 48 ساعت 24/01 میکرو مولار است. همچنین با افزایش غلظت ترکیب فوق، کاهش میزان زنده ماندن گزارش شده است [18-20]. در سال 2002 Tohru Yamada و همکاران، میزان سایتوتوکسیسیتی پروتئین Azurin که توسط سودوموناس اثر وینوزا ترشح شده، را روی دو رده سلولی ملانوما (UIISO-Mel-2) و (UIISO-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 UIISO-Mel-2 به طور قابل ملاحظه ای باعث مرگ سلولی شده است به این صورت که در غلظت های 200، 400، 600 و 800 میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب حدوداً 25، 40، 40 و 40 درصد سبب مرگ سلولی شده است، در حالی که روی رده سلولی ملانوما UIISO-Mel-6 تأثیر بسیار کمتری بر مرگ سلولی گذاشته است به این صورت که در غلظت های 200 و 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 فرکشن ها، غلظت های کمتر از غلظت های فوق به کار رفته با این حال میزان سایتوتوکسیسیتی بیشتر بوده مرگ سلولی بیشتری را نشان می دهد که این موضوع خود بیان کننده آثار قوی تر فرکشن های سالمونلا بر رده ملانوما در این پژوهش بوده است. در سال 2019 Arun a Rani و همکاران، میزان سایتوتوکسیسیتی Chondroitin AC lyase گرفته شده از pedobacter saltans روی رده سلولی ملانوما SK-Mel28 در مدت 12 و 24 ساعت بررسی کردند. Chondroitin AC lyase از غلظت های 0/0013 تا 1/3 میکرومولار استفاده شده است که در

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, Priya 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

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 باکتری 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 باکتری سالمونلا تیفی موریوم و چگونگی اثرگذاری آن روی سلول‌های سرطانی، مطالعه تحریک آپاپتوز و نکرز 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., & Scharl, 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) Enayatradd, 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

- 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.
- 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.