ORIGINAL ARTICLE

Cytotoxic Effect and Cell Death Mechanism of Salmonella Typhimurium Protein Fractions on Breast Cancer Cells In Vitro

Neda Soleimani[1],
Somayeh Delfani[2],
Setareh Soroush[2,3]

[1] Assistant Professor, Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Bheshti University, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran
[3] Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

(Received January 31, 2021 ; Accepted October 31, 2021)

Abstract

Background and purpose: Cancer is the second leading cause of death in the world after cardiovascular disease. In relation to cancerous diseases in developed countries, the prevalence of breast cancer is increasing. Treatment in early stages is of great importance in the recovery of patients. The purpose of this study was to investigate the cytotoxic effect of bacterial fractions of *Salmonella typhimurium* on growth and proliferation of breast cancer cells in vitro.

Materials and methods: In this experimental study, the breast cancer cell line MCF7 was used. Different bacterial fractions were prepared by ammonium sulfate method. Interactions between cancer cells and different concentrations of *Salmonella typhimurium* fractions were studied at 24 and 48 hours. Cell proliferation was assessed by MTT assay.

Results: According to MTT test, bacterial fractions and 80% protein deposition at 24 and 48 hours showed the highest cytotoxicity effect at 24 hours and in 100 µg/ml bacterial lysates and 40 µg/ml of 80% protein deposition. Following the treatment of cancer cells with bacterial lysate, the rate of induction of apoptosis was 67% and necrosis was 7%.

Conclusion: Bacterial fractions *of Salmonella typhimurium* have high toxicity and lethal effect on breast cancer cells and induce apoptosis. Purification of these compounds could reveal new information on the mechanisms of cell death and cell signaling that could be suggested in the future as a basis to develop alternative cancer treatments.

Keywords: cytoplasmic extract, apoptosis, *Salmonella typhimurium*, breast cancer

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31 (204): 14-25 (Persian).

* **Corresponding Author: Somayeh Delfani -** School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran (E-mail: somayehdelfani@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و یکم شماره ۲۰۴ دی سال ۱۴۰۰ (۲۵-۱۴)

ارزیابی اثر سمیت و مکانیسم مرگ سلولی پروتئین ها و عصاره استخراج شده سیتوپلاسمی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بر روی سلول های سرطانی پستان در شرایط آزمایشگاهی

ندا سلیمانی[۱]
سمیه دلفانی[۲]
ستاره سروش[۲و۳]

چکیده

سابقه و هدف: سرطان، بعد از بیماری‌های قلبی، دومین عامل مرگ و میر در جهان محسوب می‌شود. از میان سرطان ها، شیوع سرطان پستان در اکثر کشورهای پیشرفته، در حال افزایش است. درمان سریع در مراحل اولیه این بیماری، از عوامل موثر در بهبود بیماران مبتلا به سرطان پستان می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر سمیت سلولی و مکانیسم مرگ سلولی پروتئین‌ها و عصاره استخراج شده سیتوپلاسمی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بر روی میزان رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی پستان در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از سلول‌های سرطانی پستان، رده MCF7 استفاده شد. فرکشن‌های مختلف باکتریایی به روش آمونیوم سولفات تهیه شد. سپس میان کنش میزان اثر سیتوتوکسیسیتی آن بر سلول‌ها با استفاده از تست MTT در زمان‌های ۲۴و ۴۸ ساعت بررسی شد. برای بررسی میزان القای آپوپتوز و نکروز و تعیین نوع مرگ از روش فلوسیتومتری استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج تست سیتوتوکسیستی با فرکشن‌های باکتری و رسوب ۸۰ درصد پروتئین، در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعته، بیش‌ترین میزان اثر کشندگی در زمان ۲۴ ساعت و در لیزات باکتری در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و رسوب ۸۰ درصد پروتئین، در ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. در اثر تیمار سلول های سرطانی با لیزات باکتری، میزان القای آپوپتوز ۶۷ درصد، نکروز ۷ درصد دیده شد.

استنتاج: پروتئین‌ها و عصاره استخراج شده سیتوپلاسمی باکتریایی *سالمونلا تیفی موریوم* دارای اثر سمیت و کشندگی زیادی بر سلول‌های سرطانی است. این ترکیب می‌تواند موجب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی گردد. با خالص‌سازی این ترکیبات می‌توانند مسیر جدیدی از مطالعه مکانیسم مرگ سلولی و سیگنالینگ سلولی آن را راهگشایی نمود و پایه ساخت مکمل‌های درمانی در آزمایشگاه مطرح شود.

واژه های کلیدی: عصاره سیتوپلاسمی، آپوپتوز، *سالمونلا تیفی موریوم*، سرطان پستان

مقدمه

سرطان پستان، شایع‌ترین بیماری بدخیم در میان زنان و یکی از عوامل مهم مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و کشورهای درحال توسعه می‌باشد. تقریبا ۷۷ درصد از تمام بیماری‌های بدخیم پستان در زنانی

مولف مسئول: سمیه دلفانی– لرستان: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان E-mail: somayehdelfani@gmail.com
۱. استادیار، گروه میکروب شناسی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه میکروب شناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
۳. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۹/۱۱/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۹/۱۱/۱۳ تاریخ تصویب :۱۴۰۰/۸/۹

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

رخ می‌هد که بیش از ۵۰ سال سن دارند. ۱۵ درصد از موارد در زنان با سن کم‌تر از ۵۰ سال وتنها ۶/۵ درصد از تمامی موارد در زنان کم‌تر از ۴۰ سال دیده می‌شود(۱). در ایران براساس آمارهای موجود در دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران (انستیتو کانسر)، پیش‌بینی می‌شود که ۲۰-۱۰ درصد از کل جمعیت ایرانی، سرطان را در طول زندگی خود تجربه کنند. شایع‌ترین سرطان در میان زنان در ایران، سرطان پستان است که۲۲ درصد از کل سرطان‌های زنان را شامل می‌شود. بیش‌ترین میزان شیوع در نواحی شمال و غرب کشور است. فاکتورهای زیادی در افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان وجود دارد که شامل افزایش سن، سابقه خانوادگی، استفاده طولانی مدت از هورمون درمانی جایگزینی، چاقی پس از یائسگی، فعالیت کم جسمانی، قاعدگی زودرس، سن بالا در زمان اولین حاملگی، یائسگی دیرهنگام، داروهای مصرفی در درمان نازایی، دریافت استروژن در دوران بارداری، نوع تغذیه، تماس با میدان‌های الکترومغناطیسی، تماس محیطی با حشره‌کش‌ها و یا با مواد شیمیایی و ... می‌باشد(۷-۱). علی‌رغم وجود روش‌های درمانی مختلف هنوز هم جراحی به‌عنوان اولین روش درمانی برای سرطان پستان محسوب می‌شود(۸). درمان‌های رایج سرطان ها ممکن است اندازه تومور را کاهش دهند، اما گذرا بوده و بر بقای بیمار اثر مثبتی نداشته و احتمال عود بیماری نیز وجود دارد(۹). روش‌های درمانی رایج بر مبنای این فرضیه که توده سرطانی جمعیتی هموژن می‌باشد، استوار است(۱۰) و سلول‌های با تکثیر سریع و تمایز یافته را هدف قرار می‌دهند(۱۱). ولی از بیش از یک قرن پیش، سرطان به‌عنوان جمعیت هتروژنی از سلول‌ها از نظر مورفولوژیکی مطرح شده(۱۲) و در دهه اخیر نیز تفاوت‌های عملکردی را برای آن‌ها قائل شده‌اند(۱۰). در حقیقت بافت سرطانی شامل زیرجمعیت محدودی از سلول‌ها با خواص ویژه است که این سلول‌ها مسئول پیدایش تومور، متاستاز(۱۳)، عود مجدد و مقاومت به درمان‌های رایج هستند(۱۴) و نسبت به سایر سلول‌ها توانایی بیش‌تری برای القای تومور در موش‌های دارای نقص سیستم ایمنی دارند. اثرات 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 حدت یافته و یا دست‌کاری ژنتیکی شده، وکتورهای باکتریایی که ناقل عوامل ضد توموری می‌باشند، توکسین‌های باکتریایی به‌صورت ایمنوتوکسین و یا کونژوگه شده به آنتی‌ژن‌های سطحی توموری، ایمنی‌تراپی به‌واسطه بدنه باکتری‌ها و اسپورهای باکتریایی بخصوص باکتری‌های بی‌هوازی و پروتئین‌های نوترکیب باکتریایی ازجمله مواردی هستند که امروزه جهت درمان مطرح می‌باشند(۸،۷). از بین باکتری‌های شناخته‌شده، *سالمونلاتیفی‌موریوم* که یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، پاتوژن درون‌سلولی اختیاری و بدون اسپور می‌باشد و به خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارد و یکی از متداول‌ترین پاتوژن‌های ناشی از مواد غذایی می‌باشد(۹)، به لحاظ ویژگی‌های منحصربه‌فردی که دارد حائز اهمیت است و به‌طور گسترده در مدل‌های سرطان حیوانات و آزمایشات بالینی فاز اول در بیماران انسانی مورد مطالعه قرارگرفته است. *سالمونلا* با چندین فاکتور بیماری‌زایی ازجمله توکسین، پروتئین‌های ترشحی و سیستم ترشحی T3SS (که باعث ترشح مایعات و التهاب نیز می‌شود) و غیره می‌تواند کاندید مناسبی برای این مطالعه باشد(۱۰،۱۱)، هر یک از این فاکتورها اثرات خاص خود را بر سلول اعمال می‌کنند و فاکتورهای بیماری‌زای این باکتری از مسیرهای مختلف، سبب مرگ سلول‌ها می‌شوند. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر سمیت و مکانیسم مرگ سلولی پروتئین‌ها و عصاره استخراج شده سیتوپلاسمی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بر روی میزان رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی پستان رده MCF7 می‌باشد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، که در آزمایشگاه دانشگاه شهید بهشتی، با کد اخلاق LUM/۳۲۴۰/۹۵ به منظور انجام مطالعه، سویه استاندارد *Salmonella enterica* ATCC 9150 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. تایید هویت باکتری، در محیط کشت اختصاصی، رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی و تست اوره آز انجام شد. به منظور تهیه فرکشن‌های باکتریایی(۱۵)، ابتدا سویه استاندارد بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. برای تهیه بیومس، باکتری از یک تک کلنی با استفاده از لوپ استریل در کنار شعله برداشته شد و به محیط مایع نوترینت براث تلقیح گردید. تا زمان رسیدن به فاز لگاریتمی رشد در انکوباتور شیکردار برای ۱۶ ساعت قرار داده شد و سپس در فالکون‌های ۵۰ سی‌سی تقسیم و نگهداری شد. برای لیز کردن باکتری به رسوب جمع‌آوری شده، بافر لیزکننده استریل اضافه شد و فریز دفریز انجام شد (ابتدا در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا کاملاً یخ بزند و سریع در بن ماری ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا سریع دفریز شود). روش، چهار مرتبه تکرار شد. سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی به‌آرامی به‌وسیله سرنگ از رسوب کف فالکون جدا و با فیلتر ۰/۲۲میکرون فیلتر و در داخل فریزر۲۱- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید(۱۷،۱۶). به منظور استخراج و خالص‌سازی جزئی پروتئین‌ها از روش رسوب‌دهی با نمک سولفات آمونیوم در غلظت ۸۰ درصد اشباع استفاده شد. ابتدا عصاره سیتوپلاسمی باکتری داخل بشر ریخته شد و با غلظت ۳۰ درصد آمونیوم سولفات رسوب داده شد و سپس سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و رسوب جدا گردید و مایع رویی آن مجدداً با غلظت ۸۰ درصد رسوب داده شد و سانتریفوژ شد و رسوب آن نگهداری و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب نگهداری و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ برای رساندن به درصد اشباع بعدی (۸۰ درصد) سولفات آمونیوم مورد استفاده قرار گرفت و مانند مرحله پیش انجام شد و مجدداً سانتریفیوژ گردید و مایع رویی خارج و دور ریخته شد و رسوب هر مرحله نگهداری شد، درنهایت رسوب‌های به‌دست‌آمده جداگانه درPBS استریل حل شد تا زمانی که شفاف گردد و برای نمک‌زدایی دیالیز شد. پروتئین‌های استخراج‌شده به‌وسیله الکتروفورز ناپیوسته ژل پلی‌آکریل 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.

سلول سرطانی MCF7 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. در محیط کشت(Gibco) DMEM-F۱۲ به همراه ۱۰ درصد(Gibco) FBS و ۱۰۰ واحد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین(Gibco) در انکوباتور با دمای $37C^{\circ}$ و ۵ درصد CO2 کشت داده شد(۱۲)، پس از سه بار پاساژ سلولی، سلول‌ها به تعداد مناسب برای تست آماده شدند. به‌منظور 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 ۵۰۰۰ سلول در هرکدام از چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه حاوی میزان ۲۰۰ میکرو لیتر محیط کشت منتقل شد(۱۳). سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از فرکشن‌های (باکتری لیز شده و دیواره آن و به‌صورت سه بار تکرار و چند چاهک بدون تیمار به‌عنوان کنترل و فاقد تیمار در نظر گرفته شد. پلیت‌ها در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور CO2 دار (۵ درصد) و در دمای $37C^{\circ}$ انکوبه شد. سپس ۲۰µl محلول (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-MTT diphenyltetrazolium bromide) (sigma usa) به هر چاهک اضافه و به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد که در این حین کریستال‌های

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

فورمازان تشکیل شد. پس از انکوباسیون، محیط کشت درون چاهک‌ها تخلیه شد و به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر حلال (Gibco) DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه گردید و پس از چند دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق میزان جذب نوری آن‌ها در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه elisa reader (BioTek, USA) قرائت شد(۱۴).

به طور کلی آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول با ایجاد تغییراتی در غشاء سلول همراه است. انتقال فسفولیپید فسفاتیدیل سرین از سطح سیتوپلاسمی غشا به سطح خارج سلولی آن به عنوان شاخص شروع مرگ آپوپتوزی در نظر گرفته می‌شود. جهت تشخیص مرگ سلولی القا شده بواسطه تیمار با کیت رنگ‌آمیزی AnnexinV-FLOUS and propidium iodide خریداری شد. عدم تقارن ایجاد شده در سطح غشاء به‌واسطه انتقال فسفولیپید فسفاتیدیل سرین از سطح سیتوپلاسمی به سطح خارج سلولی غشا اساس عملکرد این تکنیک را تشکیل می‌دهد. در این روش رنگ‌آمیزی دوگانه سلول‌ها با استفاده از AnnexinV و PI اساس جداسازی سلول‌های سالم از انواع آپوپتوزی و نکروزی را امکان‌پذیر می‌نماید. AnnexinV یک پروتئین متصل شونده به فسفولیپیدهاست که تمایل بالائی جهت اتصال به فسفاتیدیل سرین دارد. این اتصال در حضور یون کلسیم کاتالیز می‌شود. PI نیز ترکیبی با پتانسیل قرارگیری در بین بازهای DNA می‌باشد. از AnnexinV به‌عنوان یک پروب فلورسانت جهت شناسایی DNA در سلول‌های نکروزی که یکپارچگی و تمامیت خود را از دست داده‌اند، استفاده می‌شود که در نهایت موجب جداسازی سلول‌های آپوپتوزی و نکروزی از یکدیگر می‌شود. دستگاه فلوسیتومتر (Becton Dickinson FACSalibor) براساس شدت نور ساطع شده توسط هر سلول، میزان تشعشع نور فلورسانت از رنگ‌های AnnexinV-FLUOS و PI را با استفاده از فیلترهای مختلف از هم جدا می‌سازد. حدود ۱۰۰ هزار سلول در هر چاهک تزریق شد. به هر چاهک معادل غلظت Ic50 تیمار شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌ها به سرعت تریپسینه شده و با رنگ‌های AnnexinV و PI تیمار شدند. سپس نمونه به دستگاه فلوسیتومتری داده شد. داده‌های خام به‌دست آمده از دستگاه توسط نرم‌افزار Flowing Saftware به شکل دات بلات بازیابی شد. در نمودار چهارگانه دات بلات، سلول‌های قرار گرفته در سمت چپ پائین، سمت راست پائین، سمت راست بالا و سمت چپ بالا به ترتیب به عنوان سلول‌های سالم، سلول‌های قرار گرفته در فاز اولیه آپوپتوز سلول‌های قرار گرفته در فاز تاخیری آپوپتوز و سلول‌های نکروزی شناسائی می‌شوند(۲۶،۲۷).

آنالیز آماری

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار گراف پد (Prism 6) و نتایج با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه t-test و تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش و حد معنی‌دار بودن $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. تمامی تست‌ها سه بار تکرار شدند.

یافته‌ها

پروتئین‌های رسوب داده شده به وسیله غلظت‌های مختلف سولفات آمونیوم، روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد دارای SDS، الکتروفورز شدند و پیوندها با رنگ‌آمیزی نیترات نقره مشخص شدند (تصویر شماره ۱) در غلظت اشباع ۸۰ درصد محیط کشت یک باند با وزن مولکولی حدود ۷۰ کیلو دالتون و باند دیگر حدود ۳۵ کیلو دالتون مشاهده شد. وزن مولکولی پروتئین‌های رسوب داده شده با وزن مولکولی پروتئین‌های ترشحی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* (بین ۲۶تا ۸۰ کیلودالتون) مطابقت داشت.

نتایج تست MTT، تأثیر تیمار بر میزان رشد و مرگ‌و میر 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 زنده بودن

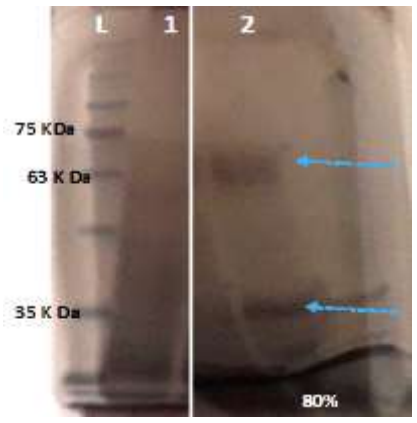
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

سلول‌ها، مشاهده می‌گردد و مقایسه شدت رنگ تولید شده 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:

(۱۰۰*میانگین جذب نوری شاهد)/(میانگین جذب نوری تست)=درصد بقا سلول

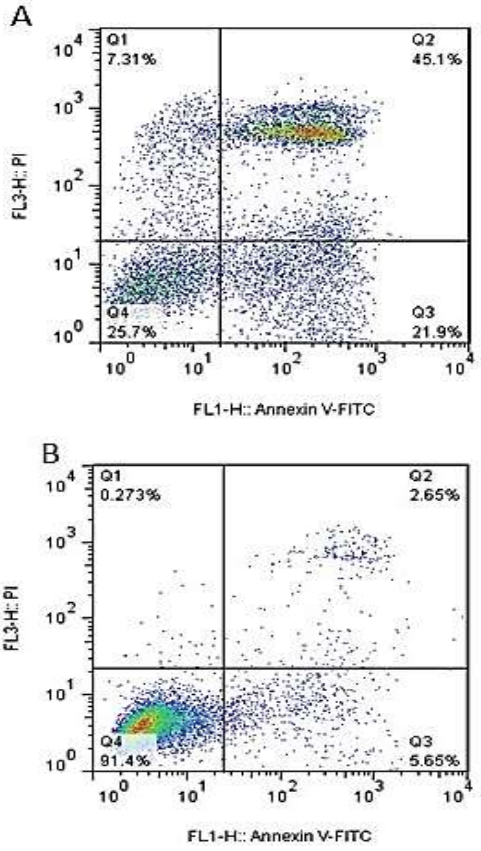
نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از عصاره سیتوپلاسمی باکتری در محیط کشت بر سلول‌های سرطانی پستان رده MCF7 در تست ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته نشان داد که بیش‌ترین میزان اثر مهارکنندگی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در ۲۴ و ۴۸ ساعته به‌ترتیب ۵۰ و ۳۰ درصد از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شدند. به نظر می‌رسد اثر سیتوتوکسیک عصاره سیتوپلاسمی باکتری بر سلول‌های سرطانی در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت وابسته به زمان بوده و در غلظت‌های مشابه میزان مرگ سلولی در مدت ۲۴ساعت بیش‌تر از همان غلظت در بازه زمانی ۴۸ ساعته می‌باشد. از سوی دیگر میزان اثر سیتوتوکسیستی با افزایش غلظت افزایش می‌یابد که یک نوع رفتار وابسته به غلظت را شاهد هستیم.

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از فرکشن رسوب ۸۰ درصد عصاره سیتوپلاسمی باکتری بر سلول‌های سرطانی پستان در تست ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته نشان داد (نمودار شماره ۲)که بیش‌ترین میزان اثر مهارکنندگی در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد که در ۲۴ و ۴۸ ساعته به‌ترتیب حدود ۷۰ و ۵۰ درصد از سلول‌ها دچار مرگ سلولی شدند. پس از آن با کاهش غلظت اثر توکسیک کاهش یافت به نظر می‌رسد اثر سیتوتوکسیک رسوب ۸۰ درصد عصاره سیتوپلاسمی باکتری در غلظت‌های مختلف دو بازه ۲۴ و ۴۸ ساعته وابسته به غلظت و با افزایش غلظت مرگ افزایش می‌یابد. با توجه به آن‌که ترکیب مورد مطالعه پروتئین می‌باشد و داروی شیمیایی نیست، احتمال دارد در محیط کشت پایداری کوتاه مدت و نیمه عمر کوتاه داشته باشد که این می‌تواند از دلایل اختلاف اثر سیتوتوکسیسیتی در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت باشد. در نمودار چهارگانه دات پلات، سلول‌های (AnnexinV-/PI-)، (AnnexinV+/PI-)، (AnnexinV-/pi+) و (AnnexinV+/PI+) به‌ترتیب به عنوان سلول‌های سالم، سلول‌های قرار گرفته درفازاولیه مرگ، سلول‌های قرارگرفته درفازتاخیری مرگ، سلول‌های نکروزی شناسائی می‌شوند. نتایج حاصل ازتیمار رده سلولی پستان نشان داد (نمودار شماره ۳) که درصد آپوپتوز برای سلول‌های پس از۲۴ ساعت تیمار با PM.L به‌ترتیب ۶۷ درصد به‌دست آمد($P<0/05$) درصد نکروز برای سلول‌های سرطانی از۲۴ساعت تیمار با PM.L ۷/۳۱درصد، به‌دست آمد این درحالی است که میزان آپوپتوز در نمونه کنترل ۸/۳۰ درصد و میزان نکروز ۰/۲۷۳ درصد به‌دست آمد (تصویر شماره ۲). در مرگ با مکانیم آپوپتوزیز همه اجزای سلولی بسته‌بندی شده و در وزیکول‌هایی قرار می‌گیرند و در نهایت این وزیکول‌ها توسط سلول های بیگانه خوار از جمله ماکروفاژها پاکسازی می‌شود. این در حالی است که مرگ به صورت نکروز سبب رخداد التهاب شدید می‌شود که این خود می‌تواند آسیب‌های بافتی و حتی سیستمیک پدید آورد.

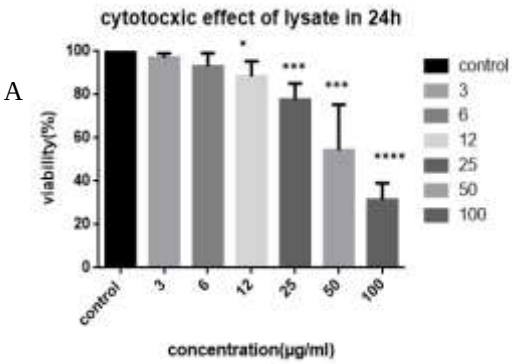


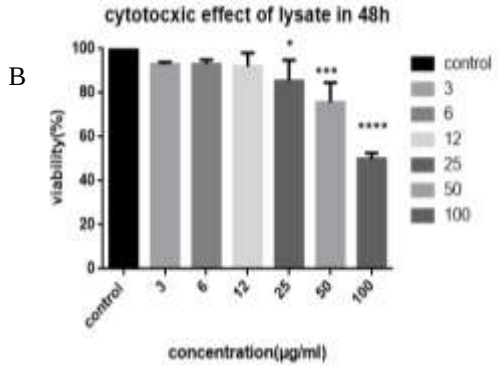
تصویر شماره ۱: الگوی الکتروفورزی SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره. پروتئین‌های استخراج شده محیط کشت به روش رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات ۸۰ درصد رنگ‌آمیزی با نیترات نقره. شرایط الکتروفورز: ژل متراکم کننده ۴ درصد، ژل جداکننده ۱۲ درصد، ولتاژ ۱۱۰mV (ستون L: مارکر، ستون ۱: عصاره سیتوپلاسمی باکتری. ستون ۲ رسوب ۸۰ درصد)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

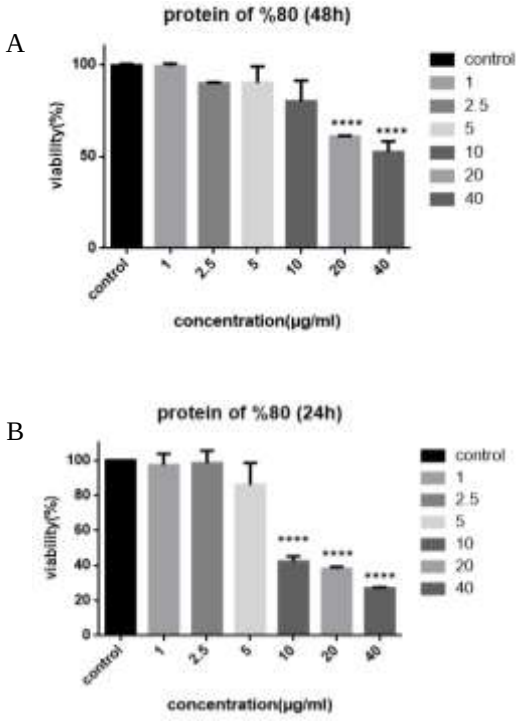


تصویر شماره ۲: مطالعه القای مرگ سلولی در رده سلولی توموری سرطانی پستان با استفاده از رنگ‌آمیزی Annexinv-FLOUS/PI و پس از تیمار با گروه‌های مورد آزمایش. سلول‌های رنگ‌آمیزی شده قرارگرفته شده در (Q4=AnnexinV-/PI-)، (Q3=AnnexinV+/PI-)، (Q2=AnnexinV+/PI+)، (Q1=AnnexinV-/PI+) که به‌عنوان سلول‌های سالم، سلول‌های قرار گرفته شده در فاز اولیه آپوپتوز، سلول‌های قرار گرفته شده در فاز تاخیری آپوپتوز، و سلول‌های نکروزی شناسایی می‌شوند. A: تیمار با تاثیرعصاره فیلترشده عصاره سیتوپلاسمی باکتری در محیط کشت در بازه زمانی ۲۴ ساعته B: گروه کنترل.



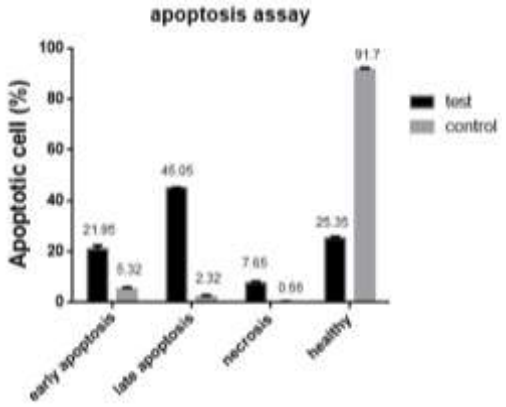


نمودار شماره ۱: ارزیابی میزان بقای سلول‌های سرطانی رده سلولی سرطانی پستان تیمار شده با عصاره سیتوپلاسمی باکتری در مدت زمان A) ۲۴ ساعته B) ۴۸ ساعته به صورت سه بار تکرار با سطح معنی‌داری کم‌تر از P<۰/۰۵.



نمودار شماره۲: ارزیابی میزان بقای سلول‌های سرطانی رده سلولی سرطان پستان تیمار شده با پروتئین‌های رسوب ۸۰ درصد عصاره سیتوپلاسمی باکتری در دو بازه زمانی ۲۴ (A) و ۴۸ ساعته (B) در مقایسه با گروه کنترل به صورت سه بار تکرار با سطح معنی‌داری کم‌تر از P <۰/۰۵.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]



نمودار شماره ۱: درصد میزان اپوپتوزیز در اثر تیمار سلول‌های سرطانی پستان با عصاره سیتوپلاسمی باکتری سالمونلا در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت سه بار تکرار، در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت.

نتایج آپوپتوزیز نشان می‌دهد که در تیمار سلول‌های سرطانی پستان رده MCF7 با عصاره سیتوپلاسمی باکتری در غلظت ۲۰میکروگرم در میلی‌لیتر به‌مدت ۲۴ ساعت در اثر تیمار ترکیب مورد آزمون با سلول‌ها، ۲۱/۹۵ درصد سلول‌ها در مرحله پیش آپوپتوزیز می‌باشند، در حالی که گروه کنترل حدود ۵/۳۲ درصد سلول‌ها درگیر هستند. در مرحله آپوپتوز تاخیری در مقایسه با گروه کنترل بدون تیمار، ۴۵ درصد سلول‌ها در این فاز قرار دارند. حدود ۷/۶۵ درصد از سلول‌ها نیز وارد فاز نکروز شدند.

بحث

سرطان بیماری است که امروزه به دلیل مقاومت به درمان و مشاهده عودهای مکرر همواره نیازمند معرفی ترکیبات موثر جهت درمان آن می‌باشد. اخیرا مطالعاتی بر روی اثرات متابولیت‌های باکتریایی بر روی سلول‌های سرطانی صورت گرفته 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 می‌باشند. در دهه گذشته باکتری‌های جنس کلستریدیوم، سالمونلا و بیفیدوباکتریوم برای ژن‌درمانی و سلول درمانی که تومورها را هدف قرار می‌دهند، بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. سویه‌های تخفیف حدت یافته کلستریدیوم و سالمونلا توانایی از بین بردن سلول‌های سرطانی را به دلیل تکثیر خود در هسته‌های تومور نشان می‌دهند. نه‌تنها سویه‌های باکتریایی زنده ضعیف شده به‌عنوان عوامل ضد سرطان پیشنهاد شده‌اند بلکه محصولاتی از آن‌ها مانند آنزیم‌ها، متابولیت‌های ثانویه، پروتئین‌ها یا پپتیدها و سموم مشتق شده نیز در درمان سرطان به‌عنوان یک استراتژی قوی مطرح هستند. به‌خصوص توکسین‌های نوترکیب باکتریایی، که در حال حاضر به‌عنوان عوامل ضد سرطانی مبتنی بر پایه توکسین درمانی نمود دارد. سالمونلا تیفی موریوم xc که با چندین فاکتور بیماری‌زایی ازجمله توکپستانا، 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 در زمینه درمان سرطان باشد(۱۰،۱۱). سالمونلا تیفی با سیستم ترشحی نوع سه (T3SS) خود فاکتورهای سیتوتوکسیک خود را اعمال می‌کند. دو تا T3SS که توسط دو ناحیه از کروموزوم باکتری به نام جزایر پاتوژنسیته ۱ و ۲ (SPI-1 و SPI-2) کد می‌گردند. این نواحی، پروتئین‌های موثری را نیز کد می‌کنند که از طریق این سیستم ترشحی، ترشح شده و وارد سلول‌های اپی‌تلیال در سطح موکوسی روده می شوند. پروتئین‌های کد شده توسط SPI-1 سبب افزایش التهاب می‌شوند. پروتئین‌های کد شده از SPI-2 سبب زنده ماندن داخل سلولی سالمونلا تیفی موریوم در سلول‌های اپی‌تلیال می‌شوند. حضور این فاکتورها در القای اثرات سیتوتوکسیک سلول میزبان موثر است(۱۸). این استراتژی باعث ارتقای کارایی کاندید درمان مورد نظر در القای پاسخ‌های ایمنی برضد تومور می‌گردد که در پیشبرد اهداف کاربردی و درمان سرطان ها حائز اهمیت می‌باشد. دو ترکیب با شناسه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

(VNP20009 سالمونلای تغییر یافته از نظر ژنتیکی) در بیماران با سرطان پیشرفته و TAPET-CD (سالمونلای تولیدکننده سیتوزین دآمینار اشریشیاکلی) در بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن با موفقیت فاز ۱ کلینیکال در بیماران سرطانی را طی نمودند(۱۸،۱۹). همه عوامل یاد شده هر یک به نوعی نقش مستقیم و سیتوتوکسیک این باکتری را در درمان سرطان به‌طور کاربردی بازگو می‌کند. بنابراین معرفی ترکیبات جدید حاصل از این باکتری، متابولیت‌های ثانویه باکتریایی که بتواند با مکانیسم‌های متعدد در درمان سرطان مؤثر واقع شود، بسیار احساس می‌گردد. مطالعات چندانی بر روی فرکشن‌های مختلف باکتری صورت نپذیرفته است. در این پژوهش، نتایج مطالعات ما بر روی فرکشن باکتری سالمونلا به‌عنوان یک کاندید درمانی، نشان داد که عصاره سیتوپلاسمی باکتری دارای ترکیبات القاکننده مرگی از نوع آپوپتوز می‌باشد، که در غلظت‌های کم‌تر از ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره سیتوپلاسمی باکتری، در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعته رفتار وابسته به غلظت و تا حدی وابسته به زمان از خود نشان می دهد و با افزایش زمان، میزان مرگ کم‌تر گردد و در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسوب ۸۰ درصد عصاره سیتوپلاسمی وابسته به زمان می‌باشد و با افزایش زمان میزان مرگ‌ومیر بیش‌تر می‌شود. همچنین نشان داده شد که همه فرکشن‌های بکار رفته وابسته به غلظت می‌باشد و با افزایش غلظت میزان مرگ‌ومیر بیش‌تر می‌شود. نتایج حاصل از بررسی پروتئین‌های موجود در عصاره سیتوپلاسمی و محیط کشت باکتری نشان داد که بیش‌ترین میزان مرگ سلولی ناشی از تیمار رسوب ۸۰ درصد در مطالعه ۴۸ساعته در غلظت‌های مورد استفاده می‌باشد. این موضوع نشان می‌دهد که وجود برخی متابولیت‌ها و پروتئین‌های میکروبی تولید شده سبب مرگ سلول‌های سرطانی در رده سرطانی پستان می‌گردد که احتمالا این اثر می‌تواند مربوط به فاکتورهای ترشحی همچون Salmonella Outer Proteins (sop) باشد(۲۰). این اثر مرگ در برخی مطالعات بر روی سایر باکتری‌ها نیز مشاهده شده است. به‌عنوان مثال در سال ۲۰۰۲ Yamada و همکاران، میزان سایتوتوکسیسیتی پروتئین Azurin که توسط سودوموناس ائروژینوزا ترشح‌شده، را بر روی دو رده سلولی سرطانی پستان (UISO-Mel-2) و(UISO-Mel-6) در مدت ۲۴ساعت با استفاده از آزمون MTT بررسی کردند. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که این پروتئین بر روی رده سلولی سرطانی پستان UISO-Mel-2 به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای باعث مرگ سلولی شده است، به این صورت که در غلظت‌های ۲۰۰ ، ۴۰۰ ، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب حدوداً ۲۵ ، ۴۰ ، ۴۰ و ۴۰ درصد سبب مرگ سلولی شده است، درحالی‌که بر روی رده سلولی سرطانی پستان UISO-Mel-6 تأثیر بسیار کم‌تری بر روی مرگ سلولی گذاشته است، به این صورت که در غلظت‌های ۲۰۰و ۴۰۰ مرگ سلولی صفر بوده و در ۶۰۰ کم تر از ۱۰ درصد، در ۸۰۰ حدود ۱۰ درصد باعث مرگ سلولی شده است(۲۱). در مقایسه این تحقیق با نتایج پژوهش ما، فرکشن‌های سالمونلا در غلظت‌های کم‌تر میزان مرگ بیش‌تری را القا کرده و موثرتر و بهتر اثر سیتوتوکسیسیتی از خود نشان داده و موفق‌تر بوده است که می‌توان به اثرکشندگی بیش‌تر فرکشن سالمونلا نسبت به سودوموناس اشاره کرد. در سال ۲۰۱۹ Rani و همکاران، میزان سایتوتوکسیسیتی Chondroitin AC lyase گرفته شده از *pedobacter saltans* بر روی رده سلولی سرطانی پستان SK-Mel28 در مدت ۱۲و۲۴ ساعت بررسی کردند. Chondroitin AC lyase از غلظت‌های ۰/۰۰۱۳ تا ۱/۳ میکروگرم استفاده‌شده است که در غلظت ۱/۳ میکروگرم در مدت ۲۴ ساعت ۵۸ درصد از رشد سلولی جلوگیری کرده است. میزان IC50 در ۱۲ و۲۴ ساعت به‌ترتیب ۰/۶۸ و ۰/۵۴ میکروگرم گزارش‌شده است که این اختلاف در نتایج این پژوهش با پژوهش ما به نوع قدرت فرکشن باز می‌گردد و این ترکیب در مقایسه با فرکشن‌های سالمونلا اثرات کشندگی قوی‌تر دارد(۲۲). درسال ۲۰۱۸ Soldatkina و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

همکاران، میزان سایتوتوکسیسیتی Batumin که یک پلی آن آنتی‌بیوتیک طبیعی است که توسط سودوموناس باتومیسی تولید شده است، را بر روی رده سلولی سرطانی پستان (UCT-Mel1) در مدت‌زمان ۴۸ ساعت بررسی کردند. میزان IC50 ۴/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش‌شده است. همچنین ترکیب مورد نظر به‌صورت وابسته به دوز سبب کاهش رشد سلول‌ها شده است(۲۳). مقایسه نتایج میزان مرگ در این مطالعه و پژوهش حاضر، این فرکشن قوی‌تر از فرکشن‌های سالمونلا عمل نموده است و اثرات توکسیک قوی‌تری دارد که این اختلاف می‌تواند به دلیل اختلاف در نوع و ماهیت ترکیب مورد نظر باشد. مطالعات بررسی آپوپتوزیز با فلوسیتومتری نیز نشان داد که مرگ القا شده به واسطه باکتری سالمونلا در مطالعه حاضر بیش‌تر از نوع آپوپتوز است که این پیامد خود می‌تواند نتیجه مناسبی از اثرگذاری این ترکیب به‌عنوان کاندید در مطالعات پیش بالینی باشد. این درحالی است که میزان بروز آپوپتوز در غلظت‌های بکار رفته از سالمونلا در مقایسه با کار دیگران بیش‌تر بوده است که این می‌تواند به دلیل اختلاف در غلظت ترکیبات مورد استفاده و نوع فرکشن مورد مطالعه باشد(۲۸). استفاده از دخالت در کنترل مسیرهای آبشار آپوپتوتیک، ابزاری قوی را برای کنترل مسیرهای تحریک مرگ فراهم ساخته و یک راهبرد پیشگیری بالقوه‌ای را نشان می‌دهد که تحقیقات وسیعی در این راستا در جریان بوده و نتایج اولیه خوبی را به بار آورده است. از این‌رو شناسایی دقیق مسیرها، مکانیسم‌ها، عوامل درگیر در آن‌ها و عوامل مداخله‌گر و تغییردهنده چنین مسیرهایی یک عرصه نوین را در تحقیقات پدید خواهد آورد.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد پروتئین‌های موجود در عصاره سیتوپلاسمی باکتری سالمونلا تیفی موریوم، به دلیل کاهش میزان بقا در سلول‌های سرطانی از مسیر آپوپتوزیز، می‌تواند به عنوان ترکیب متابولیتی میکروبی مفید در پایه مطالعات داروسازی در آزمایشگاه مورد ارزیابی و مطالعه دقیق تر قرار گیرد. مکانیسم عمل پروتئین‌های موجود در عصاره سیتوپلاسمی و محیط کشت باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و نحوه اثرگذاری آن بر روی سلول‌های سرطانی می‌تواند راهگشای شناسایی مسیرهای القای مرگ و کشف اثر فاکتورهای جدید در محیط آزمایشگاهی باشد.

References

1. Rodríguez-Cerdeira C, Carnero Gregorio M, López-Barcenas A, Sánchez-Blanco E, Sánchez-Blanco B, Fabbrocini G, et al. Advances in immunotherapy for melanoma: a comprehensive review. Mediators Inflamm 2017; 2017: 3264217.
2. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. Physiol Rev 2004; 84(4): 1155-1228.
3. Wellbrock C, Weisser C, Geissinger E, Troppmair J, Schartl M. Activation of p59Fyn leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling. J BiolChem 2002; 277(8): 6443-6454.
4. Enayatrad M, Mirzaei M, Salehiniya H, Karimirad MR, Vaziri S, Mansouri F. Trends in incidence of common cancers in Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2016; 17(S3): 39-42.
5. Nahar VK, Hosain A, Sharma M, Jacks SK, Brodell RT. Comment on: Need for primary prevention for skin cancers in Iran. J Res Health Sci 2016; 16(3): 170-171.
6. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. Oncogene 2003; 22(20): 3138-3151.
7. Jiang SN, Phan TX, Nam TK, Nguyen VH,

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

Kim HS, Bom HS, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by a combination of Escherichia coli–mediated cytolytic therapy and radiotherapy. Mol Ther 2010; 18(3): 635-642.

8. Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. Nature Reviews Cancer 2010; 10(11): 785-794.
9. Kee SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, Lee LH. Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Frontiers in Life Science 8, no 2015; 8(3): 284-293.
10. Zheng JH, Min JJ. Targeted cancer therapy using engineered Salmonella typhimurium. Chonnam med J 2016; 52(3): 173-184.
11. Wang CZ, Kazmierczak RA, Eisenstark A. Strains, mechanism, and perspective: Salmonella-based cancer therapy. International Journal of Microbiology 2016.
12. Soleimani N. Evaluation of proliferation and survival of spleen immune cells treated by Deacetylchitin nanoparticles on breast cancer mouse model. Stud Med Sci 2017; 28(4): 33-39.
13. Jiang L, Zhou J, Zhong D, Zhou Y, Zhang W, Wu W, et al. Overexpression of SMC4 activates TGFβ/Smad signaling and promotes aggressive phenotype in glioma cells. Oncogenesis 2017; 6(3): e301.
14. Fatahi A, Soleimani N. Evaluation of cytotoxicity activity of cell extracts of kefir microorganisms on glioblastoma cancer cells. Stud Med Sci 2018; 29(1): 12-19.
15. Suarez N, Ferrara F, Rial A, Dee V, Chabalgoity JA. Bacterial Lysates as Immunotherapies for Respiratory Infections: Methods of Preparation. Front Bioeng Biotechnol 2020; 8(545): 1-8.
16. Cheong I, Huang X, Thornton K, Diaz LA, Zhou S. Targeting cancer with bugs and liposomes: ready, aim, fire. Cancer Research 2007; 67(20): 9605-9608.
17. Radhakrishnan V, Song YS, Thiruvengadam D. 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. Biomed Pharmacother 2008; 62(2): 85-93.
18. Kanno SI, Maeda N, Tomizawa A, Yomogida S, Katoh T, Ishikawa M. 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. Int J Oncol 2012; 40(5): 1391-1396.
19. Lee JW, Shin J G, Kim E H, Kang HE, Yim I B, Kim JY, et al. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum. Journal of veterinary science 2004; 5(1): 41-48.
20. Nath L R, Kumar S N, Das A A, Nambisan B, Shabna A, Mohandas C, et al. 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. Front microbiol 2016; 7(452): 1-16.
21. Yamada T, Goto M, Punj V, Zaborina O, Chen ML, Kimbara K, et al. Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences 2002; 99(22): 14098-14103.
22. Rani A, Rajulapati V, Goyal A. Antitumor effect of chondroitin AC lyase (Ps PL8A) from Pedobacter saltans on melanoma and fibrosarcoma cell lines by in vitro analysis. Pharmacol Rep 2019; 71(1): 167-174.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]

23. Soldatkina MA, Klochko VV, Zagorodnya SD, Rademan S, Visagie MH. Lebelo MT, et al. Promising anticancer activity of batumin: a natural polyene antibiotic produced by Pseudomonas batumici. Future med chem 2018; 10(18): 2187-2199.
24. Pahle J, Menzel L, Niesler N, Kobelt D, Aumann J, Rivera M, et al. Rapid eradication of colon carcinoma by Clostridium perfringens Enterotoxin suicidal gene therapy. BMC Cancer 2017; 17: 129.
25. Pyo KH, Jung BK, Chai JY, Shin EH. Suppressed CD31 expression in sarcoma-180 tumors after injection with Toxoplasma gondii lysate antigen in BALB/c mice. Korean J Parasitol 2010; 48(2): 171-174.
26. Mohabati Mobarez A, Soleimani N, Esmaeili SA, Farhangi B. Nanoparticle-based immunotherapy of breast cancer using recombinant Helicobacter pylori proteins. Eur J Pharm Biopharm 2020; 155: 69-76.
27. Etemad-Moghadam S, Fouladdel S, Azizi E, Alaeddini M. In vitro study on the effect of doxorubicin on the proliferation markers MCM3 and Ki-67. J BUON 2013; 18(4): 1062-1068.
28. Camacho EM, Mesa-Pereira B., Medina C, Medina C, Flores A, Santero E. Engineering Salmonella as intracellular factory for effective killing of tumour cells. Sci Rep 2016; 6: 30591.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26]