

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

Neda Soleimani¹,
Somayeh Delfani²,
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)

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^۱سمیه دلفانی^۲ستاره سروش^{۳و۲}

چکیده

سابقه و هدف: سرطان، بعد از بیماری های قلبی، دومین عامل مرگ و میر در جهان محسوب می شود. 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 می باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر سمیت سلولی و مکانیسم مرگ سلولی پروتئین ها و عصاره استخراج شده سیتوپلاسمی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بر روی میزان رشد و تکثیر سلول های سرطانی پستان در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی از سلول های سرطانی پستان، رده MCF7 استفاده شد. فرکشن های مختلف باکتریایی به روش آمونیوم سولفات تهیه شد. سپس میان کنش میزان اثر سیتوتوکسیسیته آن بر سلول ها با استفاده از تست MTT در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد. برای بررسی میزان القای آپوپتوز و نکروز و تعیین نوع مرگ از روش فلوئوسیتومتری استفاده شد.

یافته ها: بر اساس نتایج تست سیتوتوکسیسیته با فرکشن های 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 میلی لیتر و رسوب ۸۰ درصد پروتئین، در ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. در اثر تیمار سلول های سرطانی با لیزات باکتری، میزان القای آپوپتوز ۶۷ درصد، نکروز ۷ درصد دیده شد.

استنتاج: پروتئین ها و عصاره استخراج شده سیتوپلاسمی باکتریایی *سالمونلا تیفی موریوم* دارای اثر سمیت و کشندگی زیادی بر سلول های سرطانی است. این ترکیب می تواند موجب القای آپوپتوز در سلول های سرطانی گردد. با خلص سازی این ترکیبات می توانند مسیر جدیدی از مطالعه مکانیسم مرگ سلولی و سیگنالینگ سلولی آن را راهگشایی نمود و پایه ساخت مکمل های درمانی در آزمایشگاه مطرح شود.

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

مقدمه

سرطان پستان، شایع ترین بیماری بدخیم در میان زنان و یکی از عوامل مهم مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و کشورهای در حال توسعه می باشد. تقریباً ۷۷ درصد از تمام بیماری های بدخیم پستان در زنان

توسعه یافته و کشورهای در حال توسعه می باشد. تقریباً ۷۷ درصد از تمام بیماری های بدخیم پستان در زنان

E-mail: somayehdelfani@gmail.com

مؤلف مسئول: سیمیه دلفانی - لرستان: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

۱. استادیار، گروه میکروپ شناسی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه میکروپ 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

رخ می‌دهد که بیش از ۵۰ سال سن دارند. ۱۵ درصد از موارد در زنان با سن کم‌تر از ۵۰ سال و تنها 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 ۱۰-۲۰ درصد از کل جمعیت ایرانی، سرطان را در طول زندگی خود تجربه کنند. شایع‌ترین سرطان در میان زنان در ایران، سرطان پستان است که ۲۲ 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 دیر هنگام، داروهای مصرفی در درمان نازایی، دریافت استروژن در دوران بارداری، نوع تغذیه، تماس با میدان‌های الکترومغناطیسی، تماس محیطی با حشره کش‌ها و یا با مواد شیمیایی و ... می‌باشد (۷-۱).

علی‌رغم وجود روش‌های درمانی مختلف هنوز هم جراحی به عنوان اولین روش درمانی برای سرطان پستان محسوب می‌شود (۸). درمان‌های رایج سرطان‌ها 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 هموزن 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 به عنوان 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 به صورت ایمونوتوکسین و یا کونژوگه شده به آنتی‌ژن‌های سطحی توموری، ایمنی‌تراپی به واسطه بدنه باکتری‌ها و اسپورهای باکتریایی بخصوص باکتری‌های بی‌هوازی و پروتئین‌های نو ترکیب باکتریایی از جمله مواردی هستند که امروزه جهت درمان مطرح می‌باشند (۸، ۷). از بین باکتری‌های شناخته شده، *سالمونلا تیفی موریوم* که یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، پاتوژن درون سلولی 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 منحصر به فردی که دارد حائز اهمیت است و به طور گسترده در مدل‌های سرطان حیوانات و آزمایشات بالینی فاز اول در بیماران انسانی مورد مطالعه قرار گرفته است. *سالمونلا* با چندین فاکتور بیماری‌زایی از جمله 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.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، که در آزمایشگاه 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، رنگ آمیزی 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 فالكون‌های 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 به آرامی به وسیله سرنگ از رسوب کف فالكون جدا و با فیلتر ۰/۲۲ میکرون فیلتر و در داخل فریزر ۲۱- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۶، ۱۷). 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 ۱۳۰۰۰ rpm 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 سانتریفوژ برای رساندن به درصد اشباع بعدی (۸۰ درصد) سولفات آمونیوم مورد استفاده قرار گرفت و مانند مرحله پیش انجام شد و مجدداً سانتریفوژ گردید و مایع رویی خارج و دور ریخته شد و رسوب هر مرحله نگهداری شد، در نهایت رسوب‌های به‌دست‌آمده جداگانه در PBS استریل حل شد تا زمانی که شفاف گردد و برای نمک‌زدایی دیالیز شد. پروتئین‌های استخراج‌شده به وسیله الکتروفورز ناپیوسته ژل پلی‌آکریل 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. 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 ۳۷°C و ۵ درصد CO2 کشت داده شد (۱۲)، پس از سه بار پاساژ سلولی، سلول‌ها به تعداد مناسب برای تست آماده شدند. به منظور بررسی میزان رشد و مرگ میر سلول‌ها، طبق پروتکل اعلام‌شده انجام گرفت. سلول‌ها تریپسینه و از فلاسک‌ها جمع‌آوری و با استفاده از لام نوبار شمارش تعداد کل سلول‌ها انجام شد. تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر کدام 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 به صورت سه بار تکرار و چند چاهک بدون تیمار به عنوان 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 ۳۷°C انکوبه شد. سپس ۲۰۰ μl محلول (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-MTT diphenyltetrazolium bromide) (sigma usa) به هر چاهک اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد که در این حین کریستال‌های

فورمازان تشکیل شد. پس از انکوباسیون، محیط کشت درون چاهک‌ها تخلیه شد و به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر حلال DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Gibco) به هر چاهک اضافه گردید و پس از چند دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق میزان جذب نوری آن‌ها در طول موج 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 رنگ آمیزی AnnexinV-FLOUS and propidium iodide خریداری شد. عدم تقارن ایجاد شده در سطح غشاء به واسطه انتقال فسفولیپید فسفاتیدیل سرین از سطح سیتوپلاسمی به سطح خارج سلولی غشا اساس عملکرد این تکنیک را تشکیل می‌دهد. در این روش رنگ آمیزی دو گانه 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 بالایی 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 به عنوان 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 فلو سیتومتر (Becton Dickinson FACSalibur) 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 IC_{50} تیمار شد. بعد از

گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌ها به سرعت ترپسینه شده و با رنگ‌های AnnexinV و PI تیمار شدند. سپس نمونه به دستگاه فلو سیتومتری داده شد. داده‌های خام به دست آمده از دستگاه توسط نرم افزار Flowing Software به شکل دات بلات بازیابی شد. در نمودار چهار گانه 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

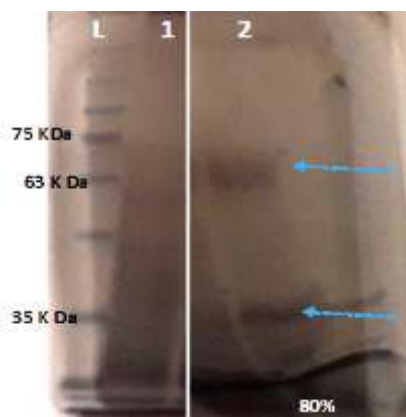
تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار گراف پد (Prism 6) و نتایج با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه t-test و تمامی داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش و حد معنی دار بودن $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. تمامی تست‌ها سه بار تکرار شدند.

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 رنگ آمیزی نترات 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 ۲۶ تا ۸۰ کیلودالتون) مطابقت داشت.

نتایج تست MTT، تأثیر تیمار بر میزان رشد و مرگ و میر 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

می‌تواند از دلایل اختلاف اثر سیتوتوکسیسیته در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت باشد. در نمودار چهار گانه دات بلات، سلول‌های (AnnexinV-/PI-)، (AnnexinV+/PI-)، (AnnexinV-/pi+) و (AnnexinV+/PI+) به ترتیب به عنوان سلول‌های سالم، سلول‌های قرار گرفته در فاز اولیه مرگ، سلول‌های قرار گرفته در فاز تاخیری مرگ، سلول‌های نکروزی شناسائی می‌شوند. نتایج حاصل از تیمار رده سلولی پستان نشان داد (نمودار شماره ۳) که درصد آپپتوز برای سلول‌های پس از ۲۴ ساعت تیمار با PM.L به ترتیب ۶۷ درصد به دست آمد ($P < 0.05$) درصد نکروز برای سلول‌های سرطانی از ۲۴ ساعت تیمار با PM.L ۷۳/۳۱ درصد، به دست آمد این در حالی است که میزان آپپتوز در نمونه کنترل ۸/۳۰ درصد و میزان نکروز ۰/۲۷۳ درصد به دست آمد (تصویر شماره ۲). در مرگ با مکانیم آپپتوزیز همه اجزای سلولی بسته‌بندی شده و در وزیکول‌هایی قرار می‌گیرند و در نهایت این وزیکول‌ها توسط سلول‌های 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.



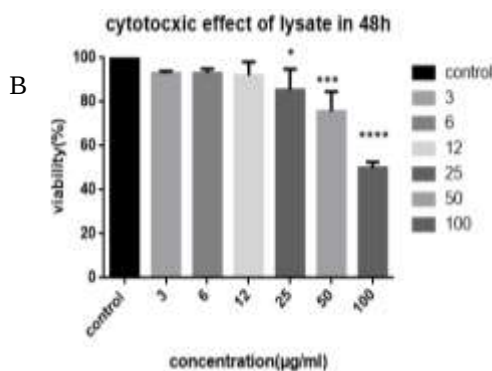
تصویر شماره ۱: الگوی الکتروفورزی SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره. پروتئین‌های استخراج شده محیط کشت به روش رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات ۸۰ درصد رنگ‌آمیزی با نیترات نقره. شرایط الکتروفورز: ژل متراکم کننده ۴ درصد، ژل جداکننده ۱۲ درصد، ولتاژ ۱۱۰mV (ستون ۱: مارکر، ستون ۲: عصاره سیتوپلاسمی باکتری. ستون ۲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

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:

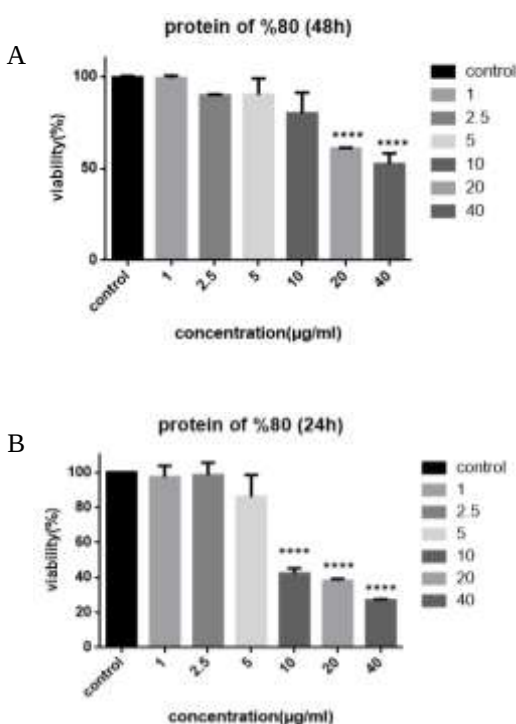
$$(100 \times \text{میانگین جذب نوری شاهد}) / (\text{میانگین جذب نوری تست}) = \text{درصد بقا سلول}$$

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 به ترتیب 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 ۲۴ ساعت 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.

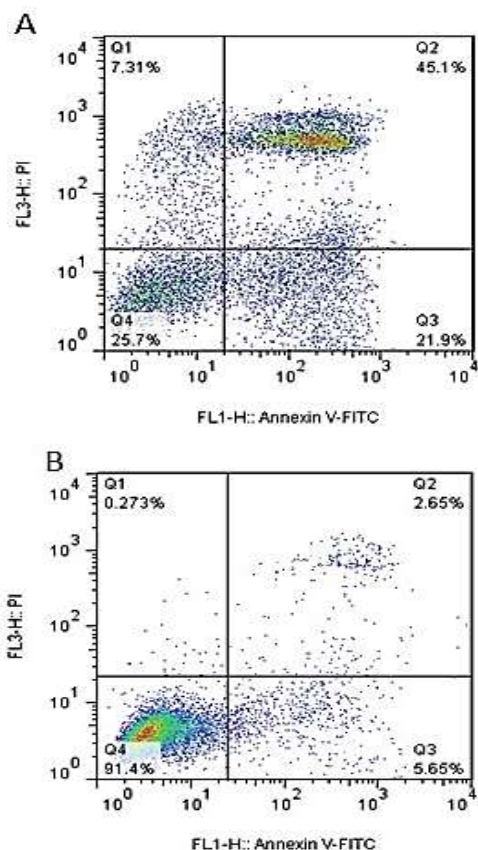
نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف از فرکشن رسوب ۸۰ درصد عصاره سیتوپلاسمی باکتری بر سلول‌های سرطانی پستان در تست ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته نشان داد (نمودار شماره ۲) که بیش‌ترین میزان اثر مهارکنندگی در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد که در ۲۴ و ۴۸ ساعته به ترتیب حدود ۷۰ و ۵۰ درصد از سلول‌ها دچار مرگ سلولی 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 آن که 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



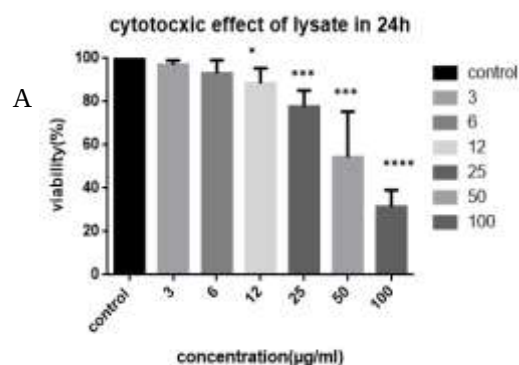
نمودار شماره ۱: ارزیابی میزان بقای سلول‌های سرطانی رده سلولی سرطانی پستان تیمار شده با عصاره سیتوپلاسمی باکتری در مدت زمان (A) ۲۴ ساعته (B) ۴۸ ساعته به صورت سه بار تکرار با سطح معنی‌داری کمتر از $P < 0.05$.



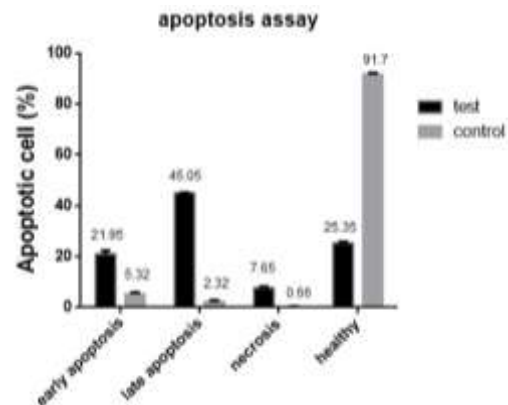
نمودار شماره ۲: ارزیابی میزان بقای سلول‌های سرطانی رده سلولی سرطان پستان تیمار شده با پروتئین‌های رسوب ۸۰ درصد عصاره سیتوپلاسمی باکتری در دو بازه زمانی (A) ۲۴ و (B) ۴۸ ساعته در مقایسه با گروه کنترل به صورت سه بار تکرار با سطح معنی‌داری کمتر از $P < 0.05$.



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 قرار گرفته شده در (Q4=AnnexinV-/PI-), (Q3=AnnexinV+/PI-), (Q2=AnnexinV+/PI+), (Q1=AnnexinV-/PI+) که به عنوان 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 تاثیر عصاره فیلتر شده عصاره سیتوپلاسمی باکتری در محیط کشت در بازه زمانی ۲۴ ساعته B: گروه کنترل.



باکتری‌های جنس کلستریدیوم، سالمونلا و بیفیدوباکتریوم برای ژن‌درمانی و سلول‌درمانی 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. نه تنها سویه‌های باکتریایی زنده ضعیف شده به‌عنوان عوامل ضد سرطان پیشنهاد شده‌اند بلکه محصولات آن‌ها مانند آنزیم‌ها، متابولیت‌های ثانویه، پروتئین‌ها یا پپتیدها و سموم مشتق شده نیز در درمان سرطان به‌عنوان یک استراتژی قوی مطرح هستند. به‌خصوص توکسین‌های نو ترکیب 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 از جمله توکسین‌ها، پروتئین‌های ترشحی مانند SipA، SipC، SopB، SopE و SopE2 و دو سیستم ترشحی T3SS (که باعث ترشح مایعات و التهاب نیز می‌شود) و غیره می‌تواند کاندید مناسبی برای مطالعه در زمینه درمان سرطان باشد (۱۱، ۱۰). 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 می‌شوند. 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 بر ضد تومور می‌گردد که در پیشبرد اهداف کاربردی و درمان سرطان‌ها حائز اهمیت می‌باشد. دو ترکیب با شناسه



نمودار شماره ۱: درصد میزان آپوپتوز 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 آپوپتوز نشان می‌دهد که در تیمار سلول‌های سرطانی پستان رده MCF7 با عصاره سیتوپلاسمی باکتری در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت در اثر تیمار ترکیب مورد آزمون با سلول‌ها، ۲۱/۹۵ درصد سلول‌ها در مرحله پیش آپوپتوز 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. اخیراً 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

(VNP20009 سالمونلای تغییر یافته از نظر ژنتیکی) در بیماران با سرطان پیشرفته و TAPET-CD (سالمونلای تولیدکننده سیتوزین دامینار اشریشیاکلی) در بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن با موفقیت فاز ۱ کلینیکال در بیماران سرطانی را طی نمودند (۱۹، ۱۸). همه عوامل یاد شده هر یک به نوعی نقش مستقیم و سیتوتوکسیک این باکتری را در درمان سرطان به طور کاربردی بازگو می کند. بنابراین معرفی ترکیبات جدید حاصل از این باکتری، متابولیت های ثانویه باکتریایی که بتواند با مکانیسم های متعدد در درمان سرطان مؤثر واقع شود، بسیار احساس می گردد. مطالعات چندانی بر روی فرکشن های مختلف باکتری صورت پذیرفته است. در این پژوهش، نتایج مطالعات ما بر روی فرکشن باکتری سالمونلا به عنوان یک کاندید درمانی، نشان داد که عصاره سیتوپلاسمی باکتری دارای ترکیبات القاکننده مرگی از نوع آپوپتوز می باشد، که در غلظت های کم تر از ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر 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 کم تر گردد و در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر رسوب ۸۰ درصد عصاره سیتوپلاسمی وابسته به زمان می باشد و با افزایش زمان میزان مرگ و میر بیش تر می شود. همچنین نشان داده شد که همه فرکشن های بکار رفته وابسته به غلظت می باشد و با افزایش غلظت میزان مرگ و میر بیش تر می شود. نتایج حاصل از بررسی پروتئین های موجود در عصاره سیتوپلاسمی و محیط کشت باکتری نشان داد که بیش ترین میزان مرگ سلولی ناشی از تیمار رسوب ۸۰ درصد در مطالعه ۴۸ ساعته در غلظت های مورد استفاده می باشد. این موضوع نشان می دهد که وجود برخی متابولیت ها و پروتئین های میکروبی تولید شده سبب مرگ سلول های سرطانی در رده سرطانی پستان می گردد که احتمالاً این اثر می تواند مربوط به فاکتورهای ترشحی همچون *Salmonella Outer Proteins* (sop) باشد (۲۰). این اثر

مرگ در برخی مطالعات بر روی سایر باکتری ها نیز مشاهده شده است. به عنوان مثال در سال ۲۰۰۲ Yamada و همکاران، میزان سایتوتوکسیسیته پروتئین Azurin که توسط سودوموناس اثرورژینوزا ترشح شده، را بر روی رده سلولی سرطانی پستان (UIISO-Mel-2) و (UIISO-Mel-6) در مدت ۲۴ ساعت با استفاده از آزمون MTT بررسی کردند. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که این پروتئین بر روی رده سلولی سرطانی پستان UIISO-Mel-2 به طور قابل ملاحظه ای باعث مرگ سلولی شده است، به این صورت که در غلظت های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب حدوداً ۲۵، ۴۰، ۴۰ و ۴۰ درصد سبب مرگ سلولی شده است، در حالی که بر روی رده سلولی سرطانی پستان UIISO-Mel-6 تأثیر بسیار کم تری بر روی مرگ سلولی گذاشته است، به این صورت که در غلظت های ۲۰۰ و 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، فرکشن های سالمونلا در غلظت های کم تر میزان مرگ بیش تری را القا کرده و موثرتر و بهتر اثر سیتوتوکسیسیته از خود نشان داده و موفق تر بوده است که می توان به اثر کشندگی بیش تر فرکشن سالمونلا نسبت به سودوموناس اشاره کرد. در سال ۲۰۱۹ Rani و همکاران، میزان سایتوتوکسیسیته Chondroitin AC lyase گرفته شده از *pedobacter saltans* بر روی رده سلولی سرطانی پستان SK-Mel28 در مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت بررسی کردند. Chondroitin AC lyase از غلظت های ۰/۰۱۳ تا ۱/۳ میکروگرم استفاده شده است که در غلظت ۱/۳ میکروگرم در مدت ۲۴ ساعت ۵۸ درصد از رشد سلولی جلوگیری کرده است. میزان IC50 در ۱۲ و ۲۴ ساعت به ترتیب ۰/۶۸ و ۰/۵۴ میکروگرم گزارش شده است که این اختلاف در نتایج این پژوهش با پژوهش ما به نوع قدرت فرکشن باز می گردد و این ترکیب در مقایسه با فرکشن های سالمونلا اثرات کشندگی قوی تر دارد (۲۲). در سال ۲۰۱۸ Soldatkin و

همکاران، میزان سایتوتوکسیسیته Batumin که یک پلی آن آنتی بیوتیک طبیعی است که توسط سودوموناس باتومیسی تولید شده است، را بر روی رده سلولی سرطانی پستان (UCT-Mel1) در مدت زمان ۴۸ ساعت بررسی کردند. میزان IC₅₀ ۴/۵ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است. همچنین ترکیب مورد نظر به صورت وابسته به دوز سبب کاهش رشد سلول ها شده است (۲۳). مقایسه نتایج میزان مرگ در این مطالعه و پژوهش حاضر، این فرکشن قوی تر از فرکشن های سالمونلا عمل نموده است و اثرات توکسیک قوی تری دارد که این اختلاف می تواند به دلیل اختلاف در نوع و ماهیت ترکیب مورد نظر باشد. مطالعات بررسی آپوپتوز با فلوسیتومتری نیز نشان داد که مرگ القا شده به واسطه باکتری سالمونلا در مطالعه حاضر بیش تر از نوع آپوپتوز است که این پیامد خود می تواند نتیجه مناسبی از اثرگذاری این ترکیب به عنوان کاندید در مطالعات پیش بالینی باشد. این در حالی است که میزان بروز آپوپتوز در غلظت های بکار رفته از سالمونلا در مقایسه با کار دیگران بیش تر بوده است که این می تواند 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 بالقوه ای را نشان می دهد که تحقیقات وسیعی در این راستا در جریان بوده و نتایج اولیه خوبی را به بار آورده است. از این رو شناسایی دقیق مسیرها، مکانیسم ها، عوامل درگیر در آن ها و عوامل مداخله گر و تغییردهنده چنین مسیرهایی یک عرصه نوین را در تحقیقات پدید خواهد آورد.

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

References

- 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.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 2004; 84(4): 1155-1228.
- Wellbrock C, Weisser C, Geissinger E, Troppmair J, Scharl 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.
- 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.
- 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.
- Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003; 22(20): 3138-3151.
- Jiang SN, Phan TX, Nam TK, Nguyen VH,

- 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 TGF β /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.

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.