



Scan online to view this article

Evaluation of the cytotoxicity of antagonist actinomycetes on colorectal cancer cell line

Arghavan Kouroshnia¹, Sirous Zeinali², Shiva Irani¹, Akram Sadeghi^{3*}

1. Department of Biology, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran, Iran

2. Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3. Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Abstract

Aim and Background: Actinomycetes are a good resource to discover new drugs based on their abundant secondary metabolites. Because both fungal and human cells are eukaryotes, the metabolites of fungal antagonist actinomycetes may also inhibit the growth of cancer cells.

Materials and Methods: The antagonistic activity of 24 actinomycete strains that inhibited the growth of cells of a plant pathogen, *Phytophthora capsici*, was investigated against 4 other plant pathogens. The siderophores production of two selected strains that showed the highest antagonistic activity against pathogens was evaluated. The cytotoxicity effects of two strains on the SW480 cell line was measured using MTT assay in vitro and the IC50 percentage was determined.

Results: Only two selected strains had 30 and 54% inhibitory effect against *Phytophthora drechsleri*, respectively. The strain 408 had no inhibitory effect against *Pythium ultimum*, while the strain 6010 completely prevented *Pythium ultimum* growth. The strain 6010, unlike the strain 408, controlled the growth of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* pathogens about 70%. Only the strain 408 was able to produce siderophore. The significant effect of the treatment on colorectal cancer cells was observed at 2.47 and 2.71% (v/v) concentrations for both 408 and 6010 strains, respectively.

Conclusion: The results of this study confirmed our hypothesis that secondary metabolites of antagonistic actinomycetes can lead to cancer cells death. The use of fungal or oomycete cells is introduced as an easy, safe, and inexpensive method for screening actinomycetes that are candidates for the discovery of new anticancer drugs.

Keywords: Colorectal Neoplasms, Actinomycetes, Cell Viability, Iau Science.

Corresponding author:

Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Email: aksadeghi@abrii.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بررسی اثر سمیت سلولی سویه های اکتینومیستی آنتاگونیست بر روی رده سلولی سرطان کلورکتال ارغوان کورش نیا^۱، سیروس زینلی^۲، شیوا ایرانی^۱، اکرم صادقی^{۳*}

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران
۳. بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

سابقه و هدف: اکتینومیست ها به دلیل داشتن متابولیت های ثانویه فراوان منبع خوبی برای کشف داروهای جدید هستند. از آنجا که سلول های قارچی و انسانی هر دو یوکاریوت هستند به احتمال متابولیت های اکتینومیست های آنتاگونیست قارچی، رشد سلول های سرطانی را نیز مهار می کنند. هدف از این پژوهش بررسی اثرات ضد سرطانی دو سویه اکتینومیست بر روی سلول های سرطانی کلورکتال است.

مواد و روش ها: فعالیت آنتاگونیستی ۲۴ سویه اکتینومیستی که از رشد سلول های یک بیمارگر گیاهی، *Phytophthora capsici* ممانعت می کردند بر علیه ۴ عامل بیمارگر گیاهی دیگر بررسی شد. دو سویه منتخب که بیشترین فعالیت آنتاگونیستی را بر علیه بیمارگرها نشان دادند، از نظر تولید سیدروفور بررسی شدند. اثر سیتوتاکسیسیته این دو سویه با استفاده از تست MTT در *in vitro* بر روی رده سلولی SW480 مورد سنجش قرار گرفته و درصد IC_{50} تعیین شد.

یافته ها: تنها دو سویه منتخب بر علیه بیمارگر *Phytophthora drechsleri* به ترتیب ۳۰ و ۵۴ درصد اثر بازدارندگی داشتند. سویه ۴۰۸ بر علیه *Pythium ultimum* تأثیر ممانعت کننده نداشت در حالی که سویه ۶۰۱۰ به طور کامل از رشد آن جلوگیری کرد. این سویه برخلاف سویه ۴۰۸، رشد دو بیمارگر *Rhizoctonia solani* و *Fusarium oxysporum* را نیز در حدود ۷۰ درصد کنترل کرد. تنها سویه ۴۰۸ قادر به تولید سیدروفور بود. تأثیر معنی دار تیمار بر سلول های سرطانی روده به ترتیب در غلظت های ۲/۴۷ و ۲/۷۱ درصد (حجمی/حجمی) معنی دار بود.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه فرضیه ما را که متابولیت های ثانویه اکتینومیست های آنتاگونیست می توانند موجب مرگ سلول های سرطانی بشوند اثبات کرد. استفاده از سلول های قارچی و یا اوومیستی به عنوان روشی ساده، ایمن و ارزان برای غربال اکتینومیست های کاندید کشف داروهای ضد سرطان جدید معرفی می شود.

واژه های کلیدی: نئوپلاسم های کولورکتال، اکتینومیست ها، قابلیت زیستی سلول، Iau Science

مقدمه

سرطان روده بزرگ یا کولورکتال (Colorectal (CRC) cancer) که با رشد غیرعادی تومورها در روده بزرگ

نویسنده مسئول:

بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
پست الکترونیکی: aksadeghi@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۶

ایجاد شده است، چهارمین سرطان شایع در دنیا و سومین عامل شایع مرگ و میر سرطان در جهان است (۱). بر اساس داده های مربوط به نرخ مرگ و میر سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization) و پیش بینی های انجام شده، تا سال ۲۰۳۵ این بیماری افزایش چشم گیری در تمام دنیا به خصوص در کشورهای

گیاهی در شرایط آزمایشگاهی کاری بی خطر و کم هزینه است. سویه های اکتینومیستی بسیاری بر اساس این سیستم غربالگری، جداسازی، شناسایی و معرفی شده اند (۸).

با توجه به این که سلول های انسانی و قارچی هر دو از نظر ساختاری به یوکاریوت ها تعلق دارند بنابراین، احتمال این که یک متابولیت با قابلیت بازدارندگی از رشد (آنتاگونیستی) و یا مرگ سلول های قارچی اثرهای مشابهی بر سلول های انسانی داشته باشد زیاد است. استفاده از سلول های قارچی به جای سلول های انسانی در مراحل اولیه غربالگری می تواند موجب صرفه جویی در زمان و هزینه های آزمایشگاهی تحقیق شود. مطالعه حاضر با هدف غربال سویه های تولید کننده متابولیت های محلول با اثر کشندگی بر یک رده سلولی سرطان کولون (SW480) از میان ۲۴ سویه اکتینومیستی آنتاگونیست قارچ *Phytophthora capsici* عامل ایجاد بیماری مرگ گیاهچه فلفل (۹) انجام شد.

مواد و روش ها

جداسازی، کشت و بررسی خاصیت آنتاگونیستی اکتینومیستها

بیست و چهار سویه اکتینومیستی که پیشتر اثر آنتاگونیستی آن ها بر علیه اوومیست فیتوفترا کپسیسی (*Phytophthora capsici*) بررسی شده بود از کلکسیون میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران^۱ تهیه شد. از روش کشت متقابل (۱۰) برای ارزیابی فعالیت ضد قارچی این سویه ها بر علیه چهار عامل بیمارگر گیاهی دیگر شامل *Phytophthora drechsleri*، پیتیوم اولتیموم (*Pythium ultimum*)، ریزوکتونیا سولانی (*Rhizoctonia solani*) و فوزاریوم اکسیسپوروم (*Fusarium oxysporum* f. sp.) (ABRIICC 10294) (*cucumerinum*) (۱۱) استفاده شد.

بیمارگرهای *P. drechsleri* strain AZ94 (شماره دسترسی: GenBank MF138111) توسط دکتر Azimi عضو هیات علمی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی

اروپای شرقی، اغلب کشورهای آسیایی، خاورمیانه و شمال آفریقا و برخی از کشورهای آمریکای جنوبی خواهد داشت (۲).

اگرچه تاکنون داروهای زیادی توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (Food and Drug Administration) جهت بهبود سرطان روده بزرگ تأیید شده است اما این داروها عوارض جانبی مختص به خود را دارند. از جمله می توان به دو داروی FU-5 (نام تجاری *Adrucil*[®] شرکت Teva) و Capecitabine (نام تجاری *XELODA*[®] شرکت Roche) اشاره کرد که سمیت نسبی دارند. علاوه بر این عوارض این داروها در افراد مختلف، متفاوت و غیر قابل پیش بینی بوده است (۲).

اکتینومیستها (Actinomycetes) باکتری های گرم مثبت و رشته ای هستند که به صورت آزاد، ساپروفیت و گاه همزیست با گیاهان دیده می شوند. این باکتری ها را می توان از تمام اکوسیستم ها از جمله خاک، آب، رسوبات دریایی و آب های گرم جداسازی کرد (۳). اکتینومیستها دارای پتانسیل بالایی در تولید متابولیت های ثانویه مانند آنتی بیوتیک ها، آنزیم ها، قارچ کش ها، مواد ضد سرطان و دیگر ترکیب های مفید هستند. حدود ۲۳۰۰۰ نوع متابولیت ثانویه شامل آنتی بیوتیک ها و ترکیب های ضد میکروبی فعال توسط میکروارگانیسم ها تولید می شود که اکتینومیستها بیش از ۷۵ درصد آن ها را تولید می کنند. حدود ۱۴۰-۱۳۰ فرآورده میکروبی و تعداد مشابهی از مشتقات آن ها در پزشکی به خصوص شیمی درمانی و دام پزشکی کاربرد دارد و حدود ۲۰-۱۵ فرآورده نیز در بخش کشاورزی مورد استفاده قرار می گیرد (۴). کشف متابولیت های ارزشمند موجود در منابع طبیعی بر دانش تجربی در مورد میکروب ها متمرکز است. پرکاربردترین گروه های میکروبی مورد توجه دانشمندان اکتینومیستها و قارچ های رشته ای هستند.

به طور کلی اکتینومیستها از مهم ترین باکتری های خاک و شامل جنس های مهمی مانند *استرپتومایسس (Streptomyces)* و *فرانکیا (Frankia)* است (۵). اکتینومیستها به خصوص جنس *استرپتومایسس* با تولید متابولیت های ثانویه محلول در آب و یا فرار قابلیت کنترل اکثر قارچ های بیمارزای گیاهی را دارند (۶، ۷). بررسی قابلیت ممانعت از رشد یا آنتاگونیستی قارچ های بیمارگر

¹ Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

ایران^۲ و بیمارگرهای *R. solani* AG-2-2 (سویه) و *P. ultimum* (سویه MK1248) توسط دکتر کاکوئی نژاد عضو هیات علمی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند^۳ تهیه شدند.

جهت کشت متقابل یک لوپ پر از میسلیوم و اسپور کشت جوان هر سویه باکتری به صورت خطی در دو سمت پلیت حاوی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار^۴ (PDA) کشت داده شد. یک پلاک مربع شکل به ضلع ۰/۵ سانتی متر از کشت جوان هر بیمارگر در مرکز پلیت قرار داده شد. سویه های باکتری و بیمارگرها به صورت هم زمان کشت داده شدند تا بتوان کارآمدترین باکتری های آنتاگونیست را جدا کرد. کشت هم زمان و گرمخانه گذاری در شرایط بهینه قارچ به جای شرایط بهینه باکتری نیز موجب انتخاب باکتری هایی می شود که پتانسیل کنترل رشد قارچ را حتی در شرایطی که به سود باکتری نیست دارند (۱۲). پلیت ها به مدت پنج روز در دمای ۲۳°C انکوبه شدند. درصد مهار رشد با استفاده از فرمول $n = (a - b) / a \times 100$ محاسبه شد، جایی که "n" درصد مهار رشد، "a" شعاع رشد عامل بیمارگر در محیط کنترل (بر حسب سانتی متر) و "b" فاصله رشد بیمارگر در جهت باکتری ها (بر حسب سانتی متر) است. این آزمایش دو بار تکرار شد.

تولید سیدروفور

تولید سیدروفور بر روی محیط کشت جامد حاوی کروم آزرول (CAS^۵) ارزیابی شد (۱۳). محیط آگار CAS تهیه و در پتری دیش ریخته شد. سویه های باکتریایی به صورت لکه ای بر روی سطح محیط کشت شدند. پلیت ها به مدت سه روز در دمای ۲۹°C انکوبه شدند. نسبت قطر منطقه هاله نارنجی اطراف باکتری به قطر کلنی محاسبه و ثبت شد.

خصوصیت های ژنوتیپی

جداسازی DNA طبق روش تریپاتی و راول (۱۴) انجام شد. فرآیند PCR ژن *16S rRNA* طبق پروتکل Yuan و Crawford DL (۱۵) و با استفاده از جفت آغازگر (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')^{27F}

و 1525R (-AAAGGAGGTGATCCAGCC- 3') انجام شد. توالی طول کمابیش کامل ژن *16S rRNA* هر دو سویه در پایگاه داده GenBank با شماره های دسترسی MN889432 (سویه ۴۰۸) و MN888938 (سویه ۶۰۱۰) ثبت شد. توالی های به دست آمده با توالی سایر اکتینومیست های موجود در پایگاه داده های GenBank، EMBL و DDBJ با استفاده از BLAST به صورت دستی هم تراز شدند (۱۶).

تهیه سری رقت های مختلف از روشناور سویه های

۴۰۸ و ۶۰۱۰

هر یک از سویه های ۴۰۸ و ۶۰۱۰ در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت^۱ ISP2 (۱۰ گرم در لیتر عصاره مالت، ۴ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۴ گرم در لیتر گلوکز با اسیدیته ۷/۲) درون ظروف ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری کشت داده شدند. ارلن ها به مدت ۵ روز در داخل شیکر انکوباتور با دمای ۲۹°C و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شدند (۱۷). روشناور باکتری ها با استفاده از سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm) جدا و جهت تیمار سلول های سرطانی در یخچال ۴°C نگهداری شد. روشناور باکتری های مورد بررسی به دلیل حساسیت بالای رده سلولی به آلودگی، کامل صاف و فیلتر شده است.

کشت سلول

رده سلولی SW480 (رده سلولی سرطان روده بزرگ انسان) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (کد C506) تهیه شد. سلول ها در محیط کشت DMEM High glucose (شرکت زیست فناوری کوثر) که با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪ (Gibco) و آنتی بیوتیک های استرپتومایسین (۱۰۰ گرم بر میلی لیتر) و پنی سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی لیتر) غنی شده بود، کشت و در انکوباتور با دمای ۳۷°C و دی اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شدند (۱۸).

بررسی میزان سمیت سلولی با روش MTT assay

ابتدا سلول های SW480 با کمک تریپسین از فلاسک ۲۵ میلی لیتری جدا و به فالكون ۱۵ میلی لیتری منتقل شدند. رسوب سلولی با استفاده از سانتریفیوژ (۵ دقیقه در ۱۵۰۰ rpm) تهیه شد. به رسوب حاصل ۲ میلی لیتر

⁶ International Streptomyces Project-2

² Iranian Research Institute of Plant Protection

³ Sugar Beet Seed Institute

⁴ Potato Dextrose Agar

⁵ Chrome Azurol S

آن جلوگیری کرد (در شکل ۱ با فلش سبز مشخص شده است). پلیت شاهد یا قارچ بیمارگر بدون تیمار باکتری در وسط قرار دارد.

این سویه آنتاگونیست برخلاف سویه ۴۰۸، رشد دو عامل بیمارگر قارچی شامل ریزوکتونیا سلوانی و فوزاریوم اکیسیپوروم را نیز در حدود ۷۰ درصد کنترل کرد (جدول ۱).

تولید سیدروفور توسط سویه‌های اکتینومیست

با بررسی نتایج حاصل از ارزیابی تولید سیدروفور با معرف CAS مشخص شد که تنها در اطراف سویه ۴۰۸ هاله نارنجی رنگ تشکیل شده است (شکل ۳).

هم‌چنین عدم تشکیل هاله نارنجی در اطراف سویه ۶۰۱۰ نشان دهنده ناتوانی آن در تولید سیدروفور بود.

شناسایی ژنتیکی سویه های منتخب

جهت شناسایی باکتری‌ها، توالی‌یابی ژن *16SrRNA* سویه‌ها انجام گرفت و نتایج آن در GeneBank ثبت شد.

سویه ۴۰۸ (MN889432) و ۶۰۱۰ (MN888938) با شباهت بالای ۹۹٪ متعلق به جنس *استرپتومایسس* و بیشترین شباهت را به ترتیب به *S. thinghirensis* و *S. monomycini* داشتند (جدول ۱).

بررسی اثر سمیت سلولی روشناور کشت سویه‌های منتخب

یافته‌ها نشان داد که سویه‌های ۴۰۸ و ۶۰۱۰ سمیت و توان کشندگی رده سلولی سرطان روده بزرگ (SW480) را دارند. هم‌چنین نشان داده شد که این اثر وابسته به غلظت روشناور است (شکل ۴) که بر اساس تحلیل XY و رگرسیون غیرخطی محاسبه شد.

در واقع با افزایش غلظت، اثر بازدارندگی روشناور بر روی رده سلولی سرطانی روده بزرگ افزایش پیدا کرد. چهل و هشت ساعت پس از تیمار سلول‌ها ۵۰٪ مرگ سلولی (IC_{50}) سویه‌های ۴۰۸ و ۶۰۱۰ به ترتیب در غلظت‌های حجمی ۲/۴۷٪ و ۲/۷۱٪ مشخص شد. بررسی آماری نشان داد که بازدارندگی سویه‌های ۴۰۸ و ۶۰۱۰ بر سلول‌های SW480 با غلظت‌های حجمی ۲/۴۷٪ و ۲/۷۱٪ دارای اختلاف معنی‌داری است

محیط کشت کامل اضافه شد. ۱۰ میکرولیتر از آن جهت شمارش سلولی بر روی لام نئوبار قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی 10^4 سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه، اضافه شد (۱۹).

محیط کشت سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون که سلول‌ها دارای کانفلوانسی ۸۰٪ رسیده اند، تخلیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی روشناور باکتری با غلظت ۲۰، ۱۰، ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ درصد (حجمی-حجمی) به هر چاهک اضافه شد. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

جهت خوانش نمونه‌ها در ۲۴ ساعت اول و دوم، ابتدا ۰/۰۰۵ گرم از پودر MTT تهیه شده از شرکت سیگما در یک میلی لیتر بافر فسفات (PBS) حل شد و سپس محیط کشت حاوی MTT ۱۰٪ تهیه و به ازای هر چاهک پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط کشت جایگزین محیط قبلی شد. در مرحله بعد پلیت ۹۶ خانه به مدت چهار ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ قرار داده شد. پس از خارج کردن پلیت از انکوباتور و تخلیه محیط سلول‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه و پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در شیکر مخصوص قرار داده شد. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش الیزا اندازه گیری شد. محاسبات آماری بر اساس تحلیل XY و رگرسیون غیرخطی توسط نرم‌افزار Graphpad prism انجام شد.

نتایج

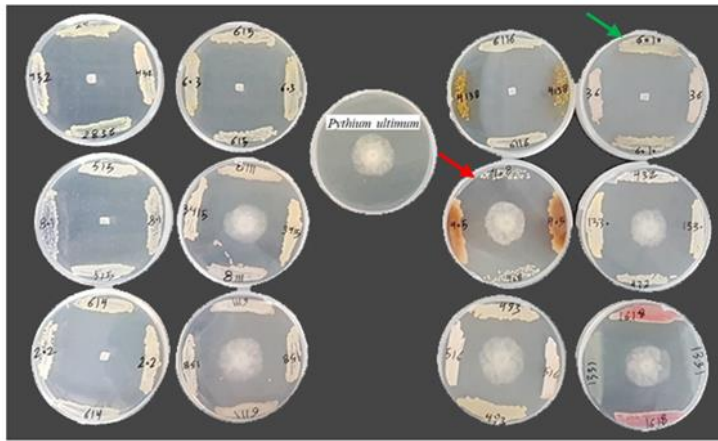
اثرهای آنتاگونیستی سویه‌های اکتینومیستی بر

بیمارگرهای گیاهی اوومیستی و قارچی

نتایج حاصل از بررسی خصوصیت‌های آنتاگونیستی ۲۴ سویه اکتینومیستی (شکل ۱) نشان داد که تنها دو سویه ۴۰۸ و ۶۰۱۰ (شکل ۲) که بر علیه بیمارگر اوومیستی فیتوفترا کپسیسی فعالیت آنتاگونیستی داشتند و رشد آن را به ترتیب ۲۰ و ۱۰۰ درصد مهار می‌کردند بر علیه بیمارگر *P. drechsleri* نیز به ترتیب ۳۰ و ۵۴ درصد اثر بازدارندگی از رشد داشتند. سویه ۴۰۸ بر علیه دیگر بیمارگر اوومیستی مورد مطالعه پیتومیوم اولتیموم، تأثیر ممانعت کننده نداشت (در شکل ۱ با فلش قرمز مشخص شده است) در حالی که سویه ۶۰۱۰ به‌طور کامل از رشد

($P < 0.05$) است. با توجه به این نتایج می توان گفت که

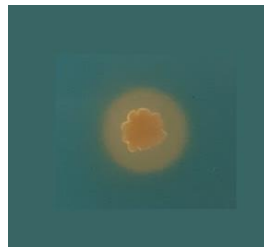
اثر بازدارندگی سویه ۴۰۸ (v/v) (۲/۴۷٪) نسبت به سویه



شکل ۱. مهار رشد عامل بیماریگر اوومیسیتی *P. ultimum* در شرایط *in vitro* توسط ۲۴ سویه اکتینومیسیتی



شکل ۲. مورفولوژی کلنی های دو سویه منتخب



شکل ۳. تولید هاله نارنجی در اطراف سویه ۴۰۸ که نشان دهنده تولید سیدروفور توسط این باکتری است.

جدول ۱: فعالیت آنتاگونیستی، تولید سیدروفور و مشخصات ژنتیکی سویه های منتخب

شماره دسترسی	سویه ی استاندارد با بیشترین میزان شباهت	تولید سیدروفور	درصد فعالیت ضد قارچی					محصول میزبان	سویه
			<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>	<i>P. ultimum</i>	<i>P. drechsleri</i>	<i>P. capsici</i>		
MN889432	<i>S. thingihrensis</i> DSM 41919T (FM202482)	+	-	-	-	۳۰	۲۰	گوجه فرنگی	۴۰۸
MN888938	<i>S. monocyini</i> NRRL B-24309 ^T (JNYL01000005)	-	۷۰	۶۹	۱۰۰	۵۴	۱۰۰	گندم	۶۰۱۰

نمودار هر دو سویه به عنوان کنترل در نظر گرفته شده و در واقع معرف چاهکی است که تیمار نشده است. سلول-

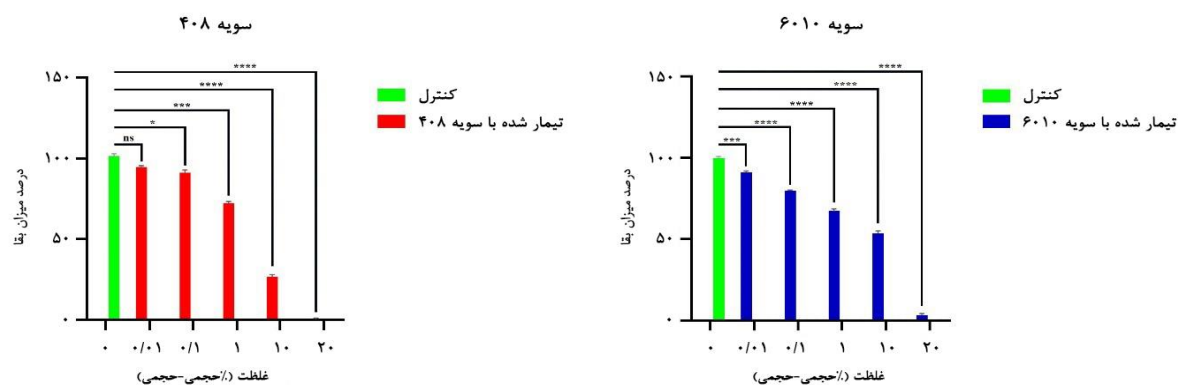
۶۰۱۰ (v/v) (۲/۷۱٪) در شرایط یکسان به طور معنی داری بیش تر است. غلظت صفر (ستون سبز رنگ) در

داد. در تیمار با غلظت (v/v) ۰/۰۱٪ از روشناور سویه ۶۰۱۰ نیز مرگ سلولی نزدیک به کنترل (حدود ۱۰٪ مرگ سلولی) بود. در غلظت (v/v) ۰/۱٪ از کنترل فاصله بیش-تری گرفته و به حدود ۲۵٪ مرگ سلولی رسید. در غلظت (v/v) ۱٪ مرگ در به طور تقریبی نیمی از سلولها (حدود ۴۰٪ مرگ سلولی) مشاهده شد. در غلظت ۱۰٪ مرگ هم چنان نزدیک به ۵۰ درصد بود. در حالی که در تیمار با غلظت ۲۰٪ (v/v) بیش از ۹۰٪ مرگ سلولی مشاهده شد.

های تیمار شده با غلظت (v/v) ۰/۰۱٪ از سویه ۴۰۸ هم-چنان در سطحی نزدیک به سطح کنترل (حدود ۸٪ مرگ سلولی) قرار دارد.

پس از افزایش ۱۰ برابری غلظت معادل (v/v) ۰/۱٪ مرگ سلولی به میزان بسیار ناچیزی (حدود ۱۰٪ مرگ سلولی) از سطح کنترل فاصله گرفت. در غلظت (v/v) ۱٪ کمابیش کمی به IC_{50} نزدیک شد (حدود ۳۰٪ مرگ سلولی).

تیمار با غلظت های بالاتر معادل (v/v) ۱۰٪ و (v/v) ۲۰٪ مرگ سلولی بالایی (حدود ۸۰٪ مرگ سلولی) را نشان



	سویه ۴۰۸	سویه ۶۰۱۰
IC_{50}	۲/۴۷۹	۲/۷۱۴
R Squared	۰/۹۷۱۶	۰/۸۲۳۰

شکل ۴. نمودار اثرهای سلولی روشناور ۴۰۸ و ۶۰۱۰ بر روی رده سلولی SW480

طبیعی با خواص ضد سرطانی و عوارض کم تر مورد توجه چشمگیری قرار دارند (۲۰).

اکتینومیست ها یکی از منابع طبیعی هستند که در زیستگاه خاک و آب به وفور مشاهده می شوند و به عنوان امیدوارکننده ترین منبع داروهای جدید برای سرطان به-شمار می روند. این منابع نامحدود برای صنایع بیوتکنولوژی و دارویی مهم هستند زیرا انواع بسیار زیادی از میکروارگانیسم ها شامل جنس ها و گونه های باکتریایی

بحث

هدف از این مطالعه، بررسی اثرهای ضد سرطانی سویه های اکتینومیستی جدا شده از خاک بر روی سلول های سرطانی روده بود. از آنجایی که داروهای شیمیایی موجود در دنیا جهت درمان سرطان روده دارای عوارض جانبی از جمله ریزش مو، زخم های دهان، آسیب عصبی (نوروپاتی)، خونریزی، عفونت، اسهال و استفراغ به صورت شایع هستند، بنابراین درمانی با عوارض کم تر در اولویت های بهداشت جهانی قرار دارد. بنابراین، منابع

در خاک وجود دارد که تاکنون موفق به شناسایی و بررسی آن‌ها نشده‌ایم (۲۱).

Dhaneesha و همکاران خاصیت ضد سرطانی *Streptomyces artemisiae* MCCB 248 در برابر رده سلولی سرطان ریه انسان (NCI-H460) را نشان دادند.

Prashanthi و همکاران نیز با بررسی *Streptomyces griseoaurantiacus* JUACT 01 بر روی رده سلول‌های سرطانی کبد (Hep G2)، تأثیر آن را بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی نشان دادند.

Davies و همکاران در طی مطالعه‌ای اثرهای ضد سرطانی عصاره *Streptomyces bingchenggensis* ULS14 را بر روی تمام رده‌های سلولی نشان دادند. پس از بررسی ساختار ماده مؤثره مشخص شد که از نظر ساختاری مشابه استاروسپورین و کیگامایسین است (۲۲).

Silva و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای دیگر اثرهای ضد سلولی متابولیت‌های ثانویه جدا شده از سویه‌های مختلف متعلق به اکتینومیست‌ها را بر روی چندین رده سلول سرطانی بررسی کردند، که در نهایت مشخص شد ترکیب‌های دو سویه CMAA 1527 و CMAA 1653 مؤثر بودند (۲۳). هر روز بر تعداد اکتینومیست‌های جدیدی که شناسایی می‌شوند اضافه می‌شود (۲۴).

جهت تأیید خاصیت آنتاگونیستی اکتینومیست‌ها، ۲۴ سویه که در ابتدا بر علیه اوومیست فیتوفترا کپسیسی فعالیت ضد قارچی از خود نشان داده بودند، بر علیه ۴ قارچ و اوومیست دیگر بررسی شدند. در نهایت دو سویه ۴۰۸ و ۶۰۱۰ پس از تأیید خاصیت آنتاگونیستی آن‌ها برای بررسی اثرهای ضد سلولی انتخاب شدند. تأثیر ضد قارچی و ضد اوومیستی اکتینومیست‌ها به‌وفور گزارش شده است. Sadeghi و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که ترکیب‌های فرار و محلول در آب دو سویه از جنس *استریتومایسس توانایی مهار عامل بیماری‌گر P. drechsleri* را در شرایط آزمایشگاه و گلخانه دارد (۲۵).

Abbasi و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که تولید سیدروفور توسط سویه‌های SS14 و IT20 توانایی خوبی در کنترل بیماری تحت شرایط گلخانه‌ای دارند (۹).

ترکیب‌های محلول در آب سویه ۶۰۱۰ توانست به‌خوبی از رشد سلول‌های سرطانی ممانعت کند. این نتیجه با خصوصیت آنتاگونیستی این سویه بر علیه پنج بیمارگر قارچی و اوومیستی بررسی شده مطابقت داشت. ارتباط میان خاصیت آنتاگونیستی و ضد سرطانی بودن سویه‌های اکتینومیست‌ها در مطالعه‌های دیگر نیز مشاهده شده است. Abdel-Aziz و همکاران (۲۰۱۹) اثرهای ضد سرطانی (رده سلولی HepG2)، ضد قارچی، ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی سه *استریتومایسس* جدا شده از خاک را نشان دادند (۲۶).

سویه ۴۰۸ در مقایسه با سویه ۶۰۱۰ تأثیر آنتاگونیستی کم‌تری داشت و تنها دو بیمارگر اوومیستی را کنترل کرد. هر چند تأثیر ضد سلولی خوبی حتی بهتر از سویه ۶۰۱۰ نشان داد. اثرهای ضد سلولی برخی ترکیب‌های سیدروفوری گزارش شده است. کارونا و همکاران (۲۰۱۷) و پیو و همکاران (۲۰۱۹) اثرهای ضد سرطانی سیدروفور را بر روی چندین سلول سرطانی انسانی گزارش کردند (۲۸، ۲۷). از آنجا که سویه ۴۰۸ قادر به تولید سیدروفور است شاید بتوان تأثیر ضد سلولی آن را به این ویژگی نسبت داد. از طرفی ممکن است این سویه با استفاده از دو مکانیسم مختلف یعنی تولید متابولیت‌های محلول در آب و سیدروفور موجب مرگ سلولی شده باشد. فعالیت ضد سرطانی متابولیت‌های جدا شده از *Streptomyces MUM256* به اثبات رسیده است. سویه *استریتومایسس* اثرهای ضد سلول‌های سرطانی کولون دارد (۲۹).

در این مطالعه سمیت سلولی سویه‌های ۴۰۸ و ۶۰۱۰ در برابر رده سلولی سرطانی روده انسان با روش MTT که روشی است برای ارزیابی کارایی دارو مورد بررسی قرار گرفت و مقادیر IC_{50} توسط اکتینومیست‌های ۴۰۸ و ۶۰۱۰ بر روی رده سلول سرطانی کولورکتال (SW480) نشان داده شد.

یک داروی درمانی ایده‌آل باید از سمیت بالایی برخوردار باشد و بتواند بر روی سلول‌های سرطانی با گرید بالا نیز اثر کند. به‌همین منظور این دو سویه بر روی رده سلولی SW480 که دارای گرید چهارسرطانی است، مورد بررسی قرار گرفت و توانست در برخی از دوزهای تعیین شده مرگ بالای ۵۰٪ را نمایش دهد. در حالی‌که، بسیاری از داروهای ضد سرطان مورد استفاده هنوز فاقد

خاصیت دارویی ضد سرطانی بر روی این سلول‌های سرطانی هستند (۳۰).

نتایج این تحقیق نشان داد سویه‌های آنتاگونیست بیمارگرهای قارچی و اوومیستی کاندیدهای خوبی برای بررسی اثرهای ضد سلولی هستند. بنابراین به دلیل هزینه بودن تست‌های سلولی پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های مربوط به انتخاب سویه‌هایی با ترکیب‌های مؤثر از سویه‌های آنتاگونیست بیمارگرهای قارچی گیاهان استفاده شود. تأیید اثرهای ضد قارچی و هم‌چنین تولید سیدروفور توسط این سویه‌ها برای اطمینان از کارایی سویه ساده، ایمن و ارزان است. لازم به ذکر است با توجه به محدودیت‌هایی از جمله این که امکان دارد سلول‌های سرطانی نسبت به این سویه‌ها از خود مقاومت نشان دهند (۳۱). بنابراین ضروری است در مراحل بعدی با شناسایی متابولیت(های) مؤثر موجود در روشناور، مقاومت دارویی نیز بررسی شود. در نهایت این دو سویه ما را یک قدم به معرفی دارویی جدید برای درمان سرطان روده نزدیک‌تر خواهد کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه اثرهای ضدسرطانی قوی روشناور دو سویه اکتینومیستی را بر روی رشد سلول‌های SW480 سرطان روده بزرگ انسان نشان داد. این دو سویه طی یک مرحله غربالگری ساده، ایمن و ارزان از میان ۲۴ سویه اکتینومیستی انتخاب شدند. با توجه به اثرهای ضد سلولی قوی مشاهده شده ادامه مطالعه برای جداسازی و شناسایی متابولیت(های) مؤثر از این دو سویه به‌عنوان محصول طبیعی که به‌طور بالقوه این امکان وجود دارد که موجب درمان سرطان شود، پیشنهاد داده می‌شود که بر روی آن‌ها بررسی بیش‌تری انجام شود.

1. Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. 2019. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd gastroenterologiczny*, 14(2), 89.
2. Araghi, M., Soerjomataram, I., Jenkins, M., Brierley, J., Morris, E., Bray, F., & Arnold, M. 2019. Global trends in colorectal cancer mortality: projections to the year 2035. *International journal of cancer*, 144(12), 2992-3000.
3. Balagurunathan, R., Radhakrishnan, M., Shanmugasundaram, T., Gopikrishnan, V., & Jerrine, J. 2020. Sample Collection, Isolation, and Diversity of Actinobacteria. In *Protocols in Actinobacterial Research* (pp. 1-24). Springer, New York, NY.
4. Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A. 2017. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial pathogenesis*, 111, 458-467.
5. Hug, J. J., Bader, C. D., Remškar, M., Cirnski, K., & Müller, R. 2018. Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes. *Antibiotics*, 7(2), 44.
6. Mahajan, G. B., & Balachandran, L. 2012. Antibacterial agents from actinomycetes-a review. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4(4), 240-53.
7. Sakineh, A., Ayme, S., Akram, S., & Naser, S. 2021. Streptomyces strains modulate dynamics of soil bacterial communities and their efficacy in disease suppression caused by *Phytophthora capsici*. *Scientific reports*, 11(1), 1-14.
8. Abbasi, S., Safaie, N., Sadeghi, A., & Shamsbakhsh, M. 2019. Streptomyces strains induce resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in tomato through different molecular mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1505.
9. Abbasi, S., Safaie, N., Sadeghi, A., & Shamsbakhsh, M. 2020. Tissue-specific synergistic bio-priming of pepper by two *Streptomyces* species against *Phytophthora capsici*. *PloS one*, 15(3), e0230531.
10. Yuan, W. M., & Crawford, D. L. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 3119-3128.
11. Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of soils*, 12(1), 39-45.
12. Tripathi, G., & Rawal, S. K. 1998. Simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from *Streptomyces aureofaciens*. *Biotechnology techniques*, 12(8), 629-631.
13. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
14. Das, R., Romi, W., Das, R., Sharma, H. K., & Thakur, D. 2018. Antimicrobial potentiality of actinobacteria isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. *BMC microbiology*, 18(1), 1-16.
15. Jahangiri, B., Khalaj-Kondori, M., Asadollahi, E., & Sadeghizadeh, M. 2019. Cancer-associated fibroblasts enhance cell proliferation and metastasis of colorectal cancer SW480 cells by provoking long noncoding RNA UCA1. *Journal of cell communication and signaling*, 13(1), 53-64.
16. Abdulrehman, G., Xv, K., Li, Y., & Kang, L. 2018. Effects of meta-tetrahydroxyphenylchlorin photodynamic therapy on isogenic colorectal cancer SW480 and SW620 cells with different metastatic potentials. *Lasers in medical science*, 33(7), 1581-1590.
17. Kaufmann-Molnár, I., & Fringer, A. 2019. Chemotherapeutic side effects in colon cancer. A qualitative study from the point of view of those affected. *Pflege*, 32(3), 129-136.

18. Pham, J. V., Yilma, M. A., Feliz, A., Majid, M. T., Maffetone, N., Walker, J. R., ... & Yoon, Y. J. 2019. A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. *Frontiers in microbiology*, 10, 1404.
19. Davies-Bolorunduro, O. F., Adeleye, I. A., Akinleye, M. O., & Wang, P. G. 2019. Anticancer potential of metabolic compounds from marine actinomycetes isolated from Lagos Lagoon sediment. *Journal of pharmaceutical analysis*, 9(3), 201-208.
20. Silva, L. J., Crevelin, E. J., Souza, D. T., Lacerda-Júnior, G. V., de Oliveira, V. M., Ruiz, A. L. T. G., & Melo, I. S. 2020. Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer discovery. *Scientific reports*, 10(1), 1-15.
21. Dhaneesha, M., Naman, C.B., Krishnan, K.P., Sinha, R.K., Jayesh, P., Joseph, V., Singh, I.B., Gerwick, W.H. and Sajeevan, T.P., 2017. *Streptomyces artemisiae* MCCB 248 isolated from Arctic fjord sediments has unique PKS and NRPS biosynthetic genes and produces potential new anticancer natural products. *3 Biotech*, 7(1), p.32.
22. Prashanthi, K., Suryan, S. and Varalakshmi, K.N., 2015. In vitro anticancer property of yellow pigment from *Streptomyces griseoaurantiacus* JUACT 01. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, pp.869-876.
23. Duangupama, T., Intaraudom, C., Pittayakhajonwut, P., Suriyachadkun, C., Tadtong, S., Sirirote, P., & Thawai, C. 2021. *Streptomyces musisoli* sp. nov., an actinomycete isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(7), 004857.
24. Sadeghi, A., Koobaz, P., Azimi, H., Karimi, E., & Akbari, A. R. 2017. Plant growth promotion and suppression of *Phytophthora drechsleri* damping-off in cucumber by cellulase-producing *Streptomyces*. *BioControl*, 62(6), 805-819.
25. Abbasi, S., Sadeghi, A., & Safaie, N. 2020. Biocontrol of Cucumber Damping-off by *Streptomyces* Strains Producing Siderophore and Cellulase under Extreme Condition. *Biol J Microorganism*, 9, 1-13.
26. Abdel-Aziz, M. S., Hathout, A. S., El-Neleety, A. A., Hamed, A. A., Sabry, B. A., Aly, S. E., & Abdel-Wahhab, M. A. 2019. Molecular identification of actinomycetes with antimicrobial, antioxidant and anticancer properties. *Comunicata Scientiae*, 10(2), 218-231.
27. Gokarn, K., Sarangdhar, V., & Pal, R. B. 2017. Effect of microbial siderophores on mammalian non-malignant and malignant cell lines. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 1-11.
28. Saha, P., San Yeoh, B., Xiao, X., Golonka, R. M., Kumarasamy, S., & Vijay-Kumar, M. 2019. Enterobactin, an iron chelating bacterial siderophore, arrests cancer cell proliferation. *Biochemical pharmacology*, 168, 71-81.
29. Tan, L. T. H., Chan, C. K., Chan, K. G., Pusparajah, P., Khan, T. M., Ser, H. L., ... & Goh, B. H. 2019. *Streptomyces* sp. MUM256: A source for apoptosis inducing and cell cycle-arresting bioactive compounds against colon cancer cells. *Cancers*, 11(11), 1742.
30. Neugut, A. I., Lin, A., Raab, G. T., Hillyer, G. C., Keller, D., O'Neil, D. S., ... & Hershman, D. L. 2019. FOLFOX and FOLFIRI use in stage IV colon cancer: analysis of SEER-medicare data. *Clinical colorectal cancer*, 18(2), 133-140.
31. Gao, Y., Shang, Q., Li, W., Guo, W., Stojadinovic, A., Mannion, C., Man, Y.G. and Chen, T., 2020. Antibiotics for cancer treatment: A double-edged sword. *Journal of Cancer*, 11(17), p.5135.

