جداسازی و شناسایی مولکولی اکتینومیست‌های دریازی خلیج فارس و ارزیابی آن‌ها جهت تولید متابولیت‌های سیتوتوکسیک ضد سرطان سینه در شرایط آزمایشگاهی

عارف بحری[۱]
الهام معظمیان[۲*]
نگار آذرپیرا[۳]

۱. کارشناسی ارشد گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲. استادیار میکروب‌شناسی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۳. استاد مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

***مسئول مکاتبات:**
elhammoazamian@gmail.com

کدمقاله: ۱۳۹۶۰۳۰۴۲۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۳
این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده

اکتینومیست‌های دریایی ظرفیت زیادی برای تولید ترکیبات فعال زیستی منحصر به فرد با توجه به سازگاری خاص خود در محیط‌های دریا دارند. هدف از این تحقیق جداسازی اکتینومیست‌های تولیدکننده ترکیبات ضد سرطانی از رسوبات بستر جنگل حرای خلیج‌فارس و بررسی پتانسیل تولید متابولیت‌های ضدسرطان سینه از این ارگانیسم‌ها است. در این مطالعه، ۴۰ نمونه از رسوبات بستر جنگل حرا در سال ۱۳۹۴جمع‌آوری شد. نمونه‌ها رقیق شدند و برای جداسازی اکتینومیست‌ها روی محیط کشت انتخابی استارچ کازیین آگار کشت داده شدند. جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و میکروسکوپی کلنی‌ها شناسایی و جداسازی شدند. جداسازی متابولیت‌ها با استفاده از اتیل استات از اکتینومیستهای جداسازی شده انجام شد و اثر کشندگی سلولی آن‌ها بر رده‌ی سلولی سرطان سینه انسانی در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی گردید. در انتها باکتری‌های تولید کننده متابولیت مؤثر بر رده سلولی سرطان سینه، با روش مولکولی شناسایی شدند. از رسوبات، تعداد ۱۸۶ ایزوله *اکتینومیست* جداسازی و شناسایی شد. نتایج نشان داد که متابولیت ایزوله‌های اکتینومیست دارای فعالیت سمیت سلولی متغیری بر ضد رده سلولی سرطان سینه می‌باشند و ایزوله‌های ۲HP و ۴HP دارای بیشترین فعالیت کشندگی سلول نسبت به بقیه ایزوله‌ها بودند. نتایج این تحقیق نشان داد رسوبات جنگل حرای خلیج‌فارس غنی از اکتینومیست‌های فعال تولیدکننده ترکیبات ضدسرطانی جدید است، که نیازمند شناسایی و خالص‌سازی این دسته از باکتری‌ها می‌باشد. این نتایج شواهدی را مبنی بر ضرورت بررسی بر روی میکروب‌های دریایی کشف شده به‌عنوان یک پتانسیل جدید دارویی در زمینه داروسازی نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: خلیج‌فارس، اکتینومیست‌های دریایی، ضدسرطان، متابولیت ثانویه.

مقدمه

اکتینومیست‌ها (*Actinomycetes*) باکتری‌های گرم مثبت و رشته‌ای هستند که به صورت آزاد، ساپروفیت و گاه همزیست با گیاهان دیده می‌شوند. این باکتری‌ها را می‌توان در همه اکوسیستم‌ها از جمله خاک، آب، رسوبات دریایی و نیز آب‌های گرم جداسازی کرد (Abdi Soofiani *et al.*, 2011). اکتینومیست‌ها حدود ۱۰ درصد از جمعیت باکتریایی رسوبات بستر دریا را تشکیل می‌دهند. میکروارگانیسم‌های زیستگاه‌های دریایی به عنوان منابع شگفت‌انگیز تولید مواد بیواکتیو قوی به شمار می‌روند (Bandari *et al.*, 2016). اکتینومیست‌ها دارای پتانسیل بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه مثل آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، علف‌کش‌ها، مواد ضدسرطان و دیگر ترکیبات مفید می‌باشند (Valli *et al.*, 2012; Petrova and Shishkov, 2006). حدود ۲۳۰۰۰ هزار نوع متابولیت ثانویه فعال توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود و اکتینومیست‌ها بیش از ۷۵ درصد از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات ضد میکروبی مختلف، تولید می‌کنند. این ترکیبات به عنوان منابع جدید فعال، شناخته شده‌اند (Dehnad

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-10]

et al., 2009; Demin, 2009). در سال ۲۰۱۲ ترکیب سیلواالاکتام را از استرپتومایسس‌های خاکزی جداسازی شد که مانع از تکثیر سلول‌های سرطانی و غیر سرطانی گشته و خاصیت آنتی‌بیوتیکی نیز دارا می‌باشد (Schulz *et al*., 2012).

در سال‌های اخیر به دلیل نیاز به داروهای جدید، میکروارگانیسم‌های دریایی به عنوان منبع جدید با پتانسیل تولید متابولیت‌های منحصر به فرد، مورد توجه قرار گرفته‌اند (Sharma and Parihar, 2010). در سال ۲۰۱۶ استرپتومایسس‌ها را به‌عنوان باکتری‌های تولیدکننده متابولیت‌های از بین برنده بیوفیلم باکتری‌ها معرفی نمودند (Rosa *et al*., 2016). سرطان یکی از جدی‌ترین مسائلی است که زندگی بشر را تهدید می‌کند و سرطان سینه دومین عامل مرگ و میر در زنان محسوب می‌شود. بسیاری از فراورده‌های طبیعی دریایی که دارای خاصیت ضد سرطانی هستند از اکتینوباکترهای دریایی مشتق شده‌اند. این متابولیت‌ها نقش مهمی را در شناسایی ترکیبات دارویی ایفا می‌نمایند. در حال حاضر مطالعات کمی بر روی نقش ضد سرطانی ترکیبات فعال زیستی حاصل از اکتینوباکترهای دریایی صورت گرفته‌است (بی آزار و همکاران، ۱۳۹۵). در نیم قرن گذشته هزاران آنتی‌بیوتیک به طور موفقیت‌آمیز برای درمان بیماری‌های میکروبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. بنابراین جای تعجب نیست که تعداد زیادی از سلول‌های باکتریایی و سرطانی به داروهای ضدمیکروبی مقاوم شده‌اند. در گذشته راه حل این مشکل استفاده از داروهای ضدسرطان و ضدمیکروبی جدید از منابع رایج بود. با این وجود در سال‌های اخیر استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل فرسودگی منابع رایج به‌شدت کاهش یافته‌است. به همین دلیل توجه به منابع نادری چون اکتینوباکترهای دریایی توجه همه را به خود جلب کرده است. این باکتری‌ها توانایی تولید متابولیت‌های فعال زیستی را دارا می‌باشند، به طوری که بعضی از متابولیت‌های فعال در درمان سرطان فقط از محیط‌های دریایی جداسازی شده‌اند (Ravikumar *et al*., 2010). در سال ۲۰۱۷ ویژگی ضد سرطانی مایع رویی حاصل از کشت استرپتومایسس‌ها بر علیه رده سلولی سرطان کولون و کبد در شرایط آزمایشگاهی گزارش شد (El-Naggar and El-Ewasy, 2017). تاکنون ترکیبات متعددی از باکتری‌های جنس *استرپتومایسس* جداسازی شده است که باعث مهار رشد و القای آپوپتوزیس در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی از جمله سرطان گردن دهانه رحم، سرطان کبد انسانی و لوسمی پرومیلوسیتیک حاد شده است (Dong Yeok *et al*., 2008; Lee *et al*., 2007). به‌منظور یافتن ترکیبات ضدسرطان جدید، در این تحقیق اکتینومیست‌ها از اکوسیستم حرای خلیج نایبند عسلویه واقع در خلیج‌فارس با هدف تعیین اثرات سلول‌کشی آن‌ها بر رده سلولی سرطان سینه انسانی در شرایط آزمایشگاهی جداسازی شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق به‌منظور جداسازی باکتری‌های اکتینومیست، مختصات جغرافیایی خلیج نایبند واقع در منطقه عسلویه استان بوشهر با استفاده از دستگاه GPS مختصات نمونه‌برداری در خرداد ماه ۱۳۹۴ به دست آمد. ۴۰ نقطه به فاصله ۵۰۰ متری از یکدیگر تعیین شدند. مختصات ایستگاه‌های مربوط به هر نمونه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: مختصات ایستگاه‌های نمونه‌برداری.

ایستگاه	طول شرقی	عرض شمالی
۱	۳۰۳۹۵۶۷	۶۶۲۳۱۸
۲	۳۰۳۹۴۴۶	۶۶۲۴۵۷
۳	۳۰۳۹۳۲۶	۶۶۲۶۵۱
۴	۳۰۳۹۲۰۴	۶۶۲۷۶۲
۵	۳۰۳۹۰۸۲	۶۶۳۲۳۲
۶	۳۰۳۸۹۶۴	۶۶۳۲۳۲

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-10]

ایستگاه	طول شرقی	عرض شمالی
۷	۳۰۳۸۸۵۰	۶۶۴۴۹۸
۸	۳۰۳۸۷۳۵	۶۶۴۴۹۸
۹	۳۰۳۸۶۱۷	۶۶۴۹۱۱
۱۰	۳۰۳۸۴۹۹	۶۶۵۲۷۰
۱۱	۳۰۳۸۳۷۸	۶۶۵۴۳۶
۱۲	۳۰۳۸۲۵۶	۶۶۵۵۴۸
۱۳	۳۰۳۸۱۳۵	۶۶۵۶۵۹
۱۴	۳۰۳۹۴۴۴	۶۶۲۲۶۵
۱۵	۳۰۳۹۳۲۲	۶۶۲۴۰۳
۱۶	۳۰۳۹۲۰۱	۶۶۲۵۷۰
۱۷	۳۰۴۰۹۲۶	۶۶۲۶۵۷
۱۸	۳۰۴۰۸۰۵	۶۶۲۷۶۸
۱۹	۳۰۳۸۸۳۷	۶۶۲۹۵۹
۲۰	۳۰۳۸۸۱۷	۶۶۳۱۸۰
۲۱	۳۰۳۸۵۹۸	۶۶۳۴۸۴
۲۲	۳۰۳۸۵۹۸	۶۶۴۰۳۵
۲۳	۳۰۳۸۳۶۶	۶۶۴۵۳۰
۲۴	۳۰۳۸۲۶۵	۶۶۶۱۷۹
۲۵	۳۰۳۸۱۲۹	۶۶۵۲۴۸
۲۶	۳۰۳۸۰۰۸	۶۶۵۳۸۶
۲۷	۳۰۳۷۸۸۷	۶۶۵۵۵۳
۲۸	۳۰۳۷۷۶۶	۶۶۵۶۹۲
۲۹	۳۰۳۹۱۹۶	۶۶۲۱۸۵
۳۰	۳۰۴۰۹۲۳	۶۶۲۳۸۲
۳۱	۳۰۳۸۹۵۶	۶۶۲۶۲۸
۳۲	۳۰۳۸۸۳۵	۶۶۲۸۲۲
۳۳	۳۰۳۸۷۱۵	۶۶۳۰۱۶
۳۴	۳۰۳۸۵۹۴	۶۶۳۱۵۴
۳۵	۳۰۳۸۴۷۲	۶۶۳۲۹۳
۳۶	۳۰۳۸۳۵۳	۶۶۳۵۹۷
۳۷	۳۰۳۸۲۳۳	۶۶۳۸۴۶
۳۸	۳۰۳۸۱۱۲	۶۶۴۰۱۲
۳۹	۳۰۳۷۹۹۲	۶۶۴۱۷۸
۴۰	۳۰۳۷۸۳۷	۶۶۴۵۱۰

نمونه‌های جمع‌آوری شده در ظروف مخصوص نمونه‌برداری ریخته شد و در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا اشکال رویشی اکتینومیست‌ها و سایر باکتری‌ها کاهش یابند (Takizawa *et al.*, 1993). به‌منظور جداسازی اکتینومیست‌ها، از روش رقیق‌سازی متوالی استفاده شد و رقت‌های مختلف تهیه شده از نمونه‌های رسوب به مدت ۷ روز در محیط کشت ترکیبی استارچ کازیین آگار (شامل: ۱۵ گرم آگار، ۱ گرم پتاسیم فسفات، ۲ گرم کلرید سدیم، ۲ گرم پتاسیم نیترات، ۰/۳ گرم کازئین، ۰/۰۵ گرم منیزیم سولفات ۷ آبه، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن ۷ آبه، ۰/۰۲ کربنات کلیسم، به یک لیتر آب دریای فیلتر شده برای افزایش

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-10]

جداسازی اکتینومیست) در pH۷/۵ کشت داده شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. برای جلوگیری از رشد قارچ و باکتری به ترتیب مقدار ۲۵ میکروگرم در لیتر نیستاتین و ۱۰ میکروگرم در لیتر نالیدیکسیک اسید به محیط کشت افزوده شد. پس از گذشت ۷ روز، کلنی‌های اکتینومیست با ویژگی‌های اختصاصی انتخاب و جداسازی گردید (Das *et al*., 2010).

به‌منظور استخراج متابولیت‌های ضدسرطانی، ایزوله‌های فعال اکتینومیست‌ها در محیط مایع استارچ کازیین براث تلقیح شدند. برای تولید ترکیبات ضدسرطانی ارلن‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه شیکردار در دور ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. برای جداسازی میسلیوم‌ها از فاز مایع، محیط کشت حاوی متابولیت از فیلترهای سرنگی عبور داده و در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. با توجه به حلالیت ترکیبات آنتی‌بیوتیکی در حلال‌های آلی، برای استخراج متابولیت‌های ضدسرطانی از حلال آلی اتیل استات استفاده شد. یک برابر حجم سوپرناتانت به دست آمده از هر ایزوله، اتیل استات به آن اضافه شد. فاز آلی حاوی ترکیبات آنتی‌بیوتیک، توسط دستگاه جداکننده فاز آلی از ابی انجام شد و توسط گرما تغلیظ گردید. از متابولیت استخراج شده برای بررسی فعالیت ضدسرطانی ایزوله‌ها استفاده شد (Jianyou *et al*., 2011; Singh *et al*., 2006).

رده‌ی سلولی 4T1 از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI 1640 (بیوسرا، انگلستان) که با سرم جنین گاوی ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) غنی‌شده بود، کشت داده شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد انکوبه گردید (بی آزار و همکاران، ۱۳۹۵؛ موسوی و همکاران، ۱۳۹۰).

به‌منظور بررسی خاصیت ضدسرطانی متابولیت‌ها، ابتدا سلول‌ها درون پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. به این منظور، ۹۰ میکرولیتر محیط کشت، حاوی ۲×۱۰^{۴} سلول و ۱۰ میکرولیتر از متابولیت‌های جداسازی شده (غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد. تست برای نمونه‌های کنترل مثبت با افزودن تریتون X-100 و کنترل منفی (فاقد متابولیت)، ۲۴ ساعت انکوباسیون انجام گردید.

جهت ارزیابی کشندگی سلول از تست MTT استفاده گردید. این روش بر اساس احیا رنگ دی‌متیل‌دی فنیل‌تترازولیوم‌بروماید محلول، به یک فراورده نامحلول فورمازان بنفش رنگ توسط فعالیت آنزیم ردوکتاز میتوکندری در سلول‌های زنده استوار است و می‌توان تعداد سلول‌های زنده را از غیرزنده تشخیص داد. محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI تهیه گردید. تست MTT برای بررسی فعالیت سلول‌کشی متابولیت‌ها بر رده‌ی سلولی استفاده گردید و نتایج با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۳۰ و ۶۹۲ نانومتر خوانده شد (Valliappan *et al*., 2013). ایزوله‌هایی که بیشترین ویژگی کشندگی سلول را دارا بودند، انتخاب نموده و در غلظت‌های مختلف ($۱۰^{-۱}$، $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۶}$) و در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت اثرات سلول‌کشی بررسی گردید (Stewart and Paul Kleihues, 2009; Ravikumar *et al*., 2010).

به منظور مشاهده اثرات تغییرات سلولی متابولیت‌ها بر روی رده سلولی سرطان سینه، با استفاده از میکروسکوپ معکوس عکس‌برداری انجام گردید.

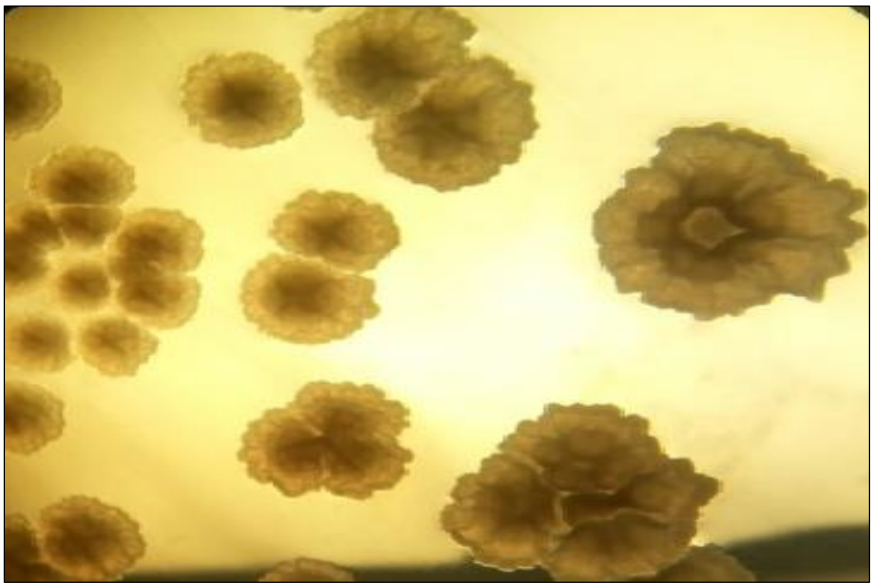
شناسایی مولکولی ایزوله‌های اکتینومیست با استفاده از روش 16S rDNA انجام گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA ژنوم باکتریایی طبق دستورالعمل شرکت سازنده (یکتا طب تجهیز، ایران) صورت گرفت. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، با حجم ۲۵ میکرولیتر، ۱۸ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۵/۲ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر(سیناژن–ایران)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (سیناژن–ایران) با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (سیناژن–ایران) با غلظت میکروگرم بر میکرولیتر، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای رفت (27f (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') و برگشت (1492r (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر)، ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم پلی مراز (سیناژن–ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر مخلوط شدند. در این تکنیک برای آغاز فرایند پلی‌مریزاسیون دستگاه ترمال سیکلر (BioRAD) به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-10]

تنظیم گردید و متعاقباً ۳۵ سیکل PCR به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۵۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱ دقیقه اجرا گردید. در نهایت به مدت ۴ دقیقه نیز عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس جهت اطمینان از تکثیر ژن 16S rDNA، الکتروفورز روی ژل آگارز ٪۱، حاوی بافر TBE 1X به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ انجام شد. در نهایت جهت مشاهده نتایج ژل از دستگاه UV ترانس لومیناتور استفاده گردید. در نهایت محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد (معظمیان و همکاران، ۱۳۹۵).

نتایج

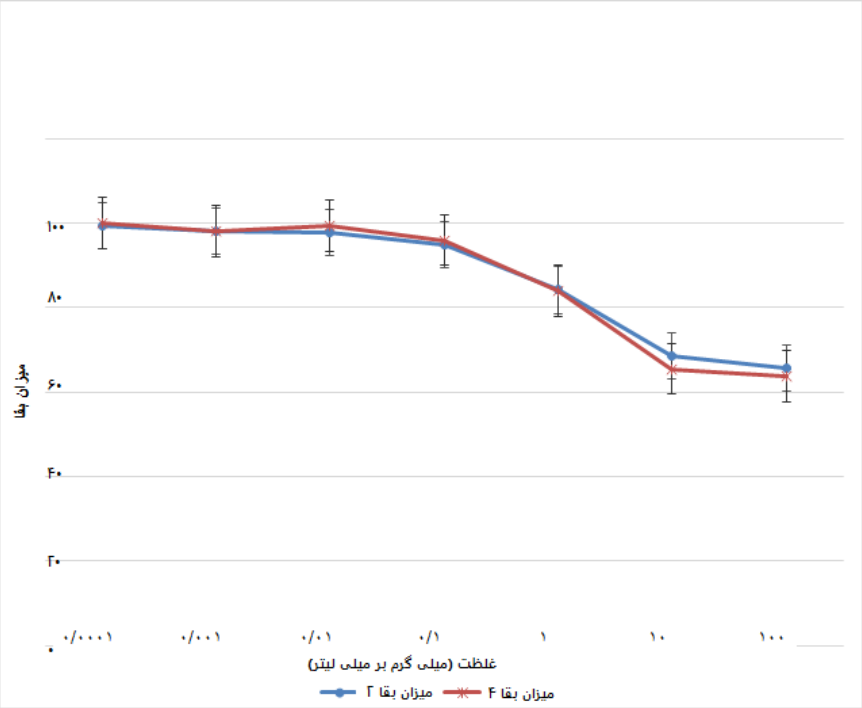
از ۴۰ نمونه رسوبات دریا، ۱۸۶ ایزوله اکتینومیست دریازی به دست آمد که بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و میکروسکوپی جداسازی شدند. ویژگی مورفولوژیکی آن‌ها به‌گونه‌ای است که دارای ظاهری خشن و خشک می‌باشند و به علت نزدیکی خانواده اکتینومیست‌ها به قارچ‌ها ظاهری شبیه به آن‌ها دارند (شکل ۱).



شکل ۱: کلنی اکتینومیست‌های جداسازی شده.

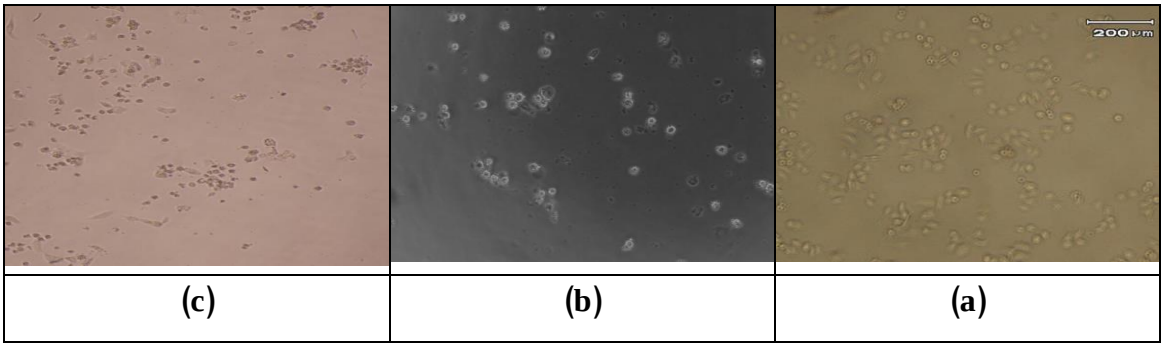
در این مرحله، متابولیت ۱۸۶ ایزوله جداسازی شده با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی رده سلولی سرطان سینه تیمار گردید. بیشترین اثر سلول‌کشی در نمونه ۲ (۳۴/۲۷ درصد) و نمونه ۴ (۳۳/۵۰ درصد) مشاهده گردید. نتایج متابولیت جداسازی شده از نمونه‌های ۲ و ۴ در غلظت و زمان‌های مختلف نشان داد که با افزایش غلظت و زمان میزان بقا سلول‌های سرطانی کاهش می‌یابد، بطوریکه در نمونه ۲، در مدت زمان ۴۸ ساعت میزان بقا سلول‌های سرطانی از ۹۹/۲ درصد در رقت ۰/۰۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۶۵/۶۶ درصد در رقت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت. همچنین در نمونه ۴، میزان بقا سلول‌ها از ۹۹/۹۸ درصد در رقت ۰/۰۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۶۳/۸ درصد در رقت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاهش نشان داد (شکل ۲).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-10]



شکل ۲: مقایسه نمودار روند تغییرات دو استرپتومایسس ۲ و ٤ در غلظت‌های متفاوت در زمان ٤٨ ساعت.

تأثیرات تغییرات سلولی متابولیت اکتینومیست‌های ایزوله ۲HP و ۴HP با استفاده از میکروسکوپ معکوس مشاهده و بعد از ۴۸ ساعت عکس‌برداری گردید. نتایج نشان داد متابولیت‌ها باعث ایجاد تغییرات ریخت‌شناسی مرتبط با آپوپتوزیس مانند قطعه‌قطعه شدن در سلول‌های 4T1 شد، بطوریکه در سلول‌های تیمار شده، ساختار دوکی شکل سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های کنترل از بین رفته و به صورت کروی یا متلاشی شده مشاهده گردید (شکل ۳).



شکل ۳: اثرات تغییرات سلولی متابولیت‌های ایزوله ۲HP (b) و (c) در مقایسه با کنترل منفی (a) روی رده سلولی سرطان سینه بعد از ٤٨ ساعت.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-10]

ژن ۱۶S rDNA سویه‌های انتخاب شده تعیین توالی شد. میزان ترادف نسبی ژن ۱۶S rDNA تکثیر یافته با استفاده از نرم‌افزار BLAST با سایر باکتری‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که توالی ایزوله‌های ۲HP و ۴HP انتخاب شده، بر اساس همولوژی سکانس ۹۸ درصد با گونه‌های استرپتومایسس مشابهت ژنتیکی حاصل گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

تنوع زیستی گسترده موجود در دریاها و اقیانوس‌ها نشانه تنوع مواد شیمیایی در محیط‌های دریایی است. نظر به اینکه میکروارگانیسم‌های دریایی به خصوص اکتینومیست‌ها دارای بزرگ‌ترین تولید ترکیبات متابولیک متنوع و ژنومی هستند، تلاش در جهت کشف اکتینومیست‌های دریایی به‌عنوان منبع دارویی جدید متمرکز شده است. با انجام غربالگری‌های محدود که تا به امروز به اکتینومیست‌های دریایی اختصاص یافته است میزان کشف متابولیت‌های ثانویه جدید تولید شده توسط اکتینومیست‌های دریایی از نوع خاکزی آن‌ها بیشتر شده است. با توجه به روند صعودی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها و مشکلات داروهای شیمی درمانی، امروزه توجه دانشمندان را به استفاده از مواد طبیعی دریایی سوق داده است (Abdi Soofiani *et al*., 2011). تجزیه و تحلیل ساده داده‌های مطالعات گذشته نشان می‌دهد یک جستجو با عنوان دارو از دریا با افزایش ۱۳ درصدی در هرسال مواجه بوده است و این میزان در حال افزایش می‌باشد. بنابراین به جرأت می‌توان گفت که اقیانوس‌ها کتابخانه عظیمی از ترکیبات و محصولات طبیعی منحصر به فرد و مواد فعال زیستی امیدوارکننده و شگفت‌آور می‌باشند، که هرگز در محیط‌زیست زمینی یافت نمی‌گردند. اخیر به اثبات رسیده است که کف اقیانوس، اکوسیستمی است که فرم‌های منحصر به فردی از اکتینومیست‌ها را در خود جای داده است. به نظر می‌رسد که اکتینومیست‌ها در تمام اقیانوس‌ها توزیع شده‌اند، به طوری که در مناطقی مانند نواحی جزر و مدی، آب دریا، ماهی‌ها، عروس‌های دریایی، خزه‌های دریایی، مانگروها، اسفنج‌ها و در رسوبات اقیانوسی یافت شده‌اند. از آنجایی که شرایط محیطی دریا نسبت به شرایط خشکی بسیار متفاوت است، به نظر می‌رسد که اکتینومیست‌های دریا نسبت به فرم خاکی خود بسیار متفاوت باشند. بنابراین آن‌ها قادر خواهند بود که ترکیبات فعال زیستی و آنتی‌بیوتیک‌های جدید تولید نمایند (Bandari *et al*., 2016; Bernan *et al*., 1997). در این تحقیق خلیج‌فارس به‌عنوان یک اکوسیستم دریایی برای بررسی فعالیت ضد سرطانی اکتینومیست‌های موجود در نمونه رسوبات که با روش‌های مورد استفاده در این تحقیق قابل‌کشت هستند، انتخاب شد. در این پژوهش محل‌های نمونه‌برداری جنگل‌های حرا واقع در خلیج نای‌بند عسلویه انتخاب گردید. نمونه‌برداری بیشتر نزدیک به ریشه درختان حرا برای افزایش جداسازی باکتری صورت گرفت و کلنی‌های قابل توجهی از اکتینومیست‌ها از آن‌ها جداسازی شد که افتراق اولیه بر اساس مورفولوژِی کلنی انجام گردید. در این تحقیق تعداد ۱۸۶ ایزوله اکتینومیست از خلیج نای‌بند عسلویه به دست آمد که راویکومار و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز جدایه‌های اکتینومیست را از اکوسیستم حرا جمع‌آوری کردند و گزارش نمودند که اکوسیستم حرا مکان مناسبی برای جداسازی اکتینومیست‌ها می‌باشد (Ravikumar and *et al*., 2012). در مطالعه حاضر اثرات سلول کشی متابولیت‌های جداسازی شده در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل نشان‌دهنده مهار رشد سلول‌های سرطانی بود. در سال ۲۰۱۳ سویه‌های باکتری‌های اکتینومیستال از اقیانوس هند جداسازی و گزارش شد، جدایه‌های مورد بررسی دارای اثر مهاری بر روی رده‌ی سلولی سرطان سینه هستند (Kumar *et al*., 2013). همچنین والی و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش نمودند که عصاره اکتینومیست در برابر سلول‌های سرطانی گردن دهانه رحم و رده‌ی سلولی سرطان سینه از خود اثر سلول‌کشی نشان دادند که با تحقیق حاضر در تأثیر سمیت سلولی عصاره اکتینومیست‌ها بر رده سرطان سینه شباهت داشت (Valli *et al*., 2012). در سال ۲۰۱۳ نیز ایزوله‌های باکتری اکتینومیست از منطقه جزر و مدی جداسازی و گزارش شد که عصاره اکتینومیست‌ها اثر سلول‌کشی بر رده‌ی سلولی سرطان سینه دارا می‌باشد

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-10]

(Jayamadhuri and Krishna, 2013). همچنین طی تحقیقاتی که روی اکتینومیست‌های دریایی در سال ۲۰۱۳ انجام شد گزارش گردید که اکتینومیست‌ها دارای پتانسیل بالایی در درمان سرطان دارند که با تحقیق حاضر مشابهت داشت (Fedorov *et al.*, 2013).

در سال ۲۰۱۶ پروتئین نوترکیبی از *Streptomyces globisporus* تولید گردید که برعلیه رده‌های سرطانی به صورت اختصاصی عمل نموده و آن‌ها را از بین می‌برد (Li *et al.*, 2016). همچنین در این سال از باکتری *Streptomyces caniferus* ترکیبات لاکتون ماکرولید جداسازی نمودند که فعالیت ضدسرطانی و ضدقارچی از خود نشان می‌دهد (Pérez *et al.*, 2016). تاکنون ترکیباتی از قبیل اکتالاکین و هالیکومایسین و دسی پپتید B و A سالینامید از این گروه از باکتری‌ها در محیط‌های دریایی استخراج شده که دارای اثرات ضدتوموری می‌باشند. اخیراً متابولیت‌های مختلف القاکننده آپوپتوزیس از گونه‌های مختلف باکتری‌های استرپتومایسس به دست آمده است که در این میان می‌توان به متابولیت‌های PCC (cytotoxic compound Pure) اشاره کرد که از باکتری‌های استرپتومایسس به دست می‌آیند و باعث القای آپوپتوزیس در رده‌های سلولی سرطان خون و سرطان گردن دهانه رحم انسان می‌گردند. مکانیسم اثر آن‌ها از طریق فعال‌سازی کاسپاز ۳ و کاهش بیان پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 و باعث القای آپوپتوزیس در رده‌های سلولی سرطان خون می‌گردد. در سلول‌های سرطان گردن دهانه رحم، تراکم کروماتین، قطعه‌قطعه شدن DNA و وقوع آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده مشاهده گردید (Lee *et al.*, 2007). در سال ۲۰۱۳ اثر ضدسرطانی رنگدانه گونه‌های استرپتومایسس‌های جداسازی شده از رسوبات دریای هند را گزارش نمودند (Karuppiah *et al.*, 2013). با توجه به این اثرات، مطالعات بیشتر در جهت شناسایی مکانیسم‌های احتمالی القای آپوتوزیس توسط متابولیت‌های مستخرج از اکتینومیست‌ها بر روی رده‌ی سرطانی ضروری به نظر می‌رسد.

به طور کلی با توجه به مقاومت‌های دارویی و مشکلات ایجاد شده ناشی از عوارض داروهای شیمی درمانی در بیماران سرطانی در انسان، شناسایی ترکیبات جدید دارویی مؤثر، از جمله متابولیت باکتری‌های اکتینومیستال می‌تواند در جهت مطالعات بیشتر در زمینه درمان سرطان نقش زیادی را ایفا کند. امید است که توجه بیشتری بر روی منابع طبیعی دریایی برای درمان سرطان و دیگر بیماری‌ها سوق پیدا کند.

منابع

بی آزار، ش.، معظمیان، ا. و آذرپیرا، ن.، ۱۳۹۵. اثرات سیتوسیدالی پروتئین کریستالی باسیلوس تورنجینسیس بر روی رده سلولی سرطان سینه موش در شرایط آزمایشگاهی. مجله سلول و بافت، دوره ۷، شماره ۳، صفحات ۲۵۰-۲۴۳.

معظمیان، ا.، رسولی، م. و عصایی، ص.، ۱۳۹۵. ارتباط پلی مورفیسم ژن اینترلوکین-۲۷ (964 A/G-) با تظاهرات بالینی عفونت هلیکوباکتر پیلوری. مجله دنیای میکروب‌ها، دوره ۹، شماره ۱، صفحات ۲۱-۱۵.

موسوی، س.، م.، ا.، قنبروند، ف. و دهناد، ع.، ۱۳۹۰. مهار رشد و القای آپوپتوزیس توسط متابولیت-های محلول در اتر باکتری Streptomyces sp. ABRIINW در سلول‌های K562 لوسمی میلوییدی انسان. مجله سلول و بافت، جلد ۲، شماره ۳، صفحات ۲۳۴-۲۲۵.

Abdi Soofiani, S., Dehnad, A. R., Nahaei, M. R., Parsa Yegane, L., Barzegari, A. and Maleki Kakolr, H., 2011. Molecular Identification of Streptomyces Spp. with Antibacterial Activity Isolated from East Azerbaijan Soils. Medical, Journal Tabriz University Medical Science, 33(2):9-56.

Bandari, Z., Mozamian, E. and Azarpira N., 2016. Investigating the Cytotoxic Effects of Persian Gulf Marine Actinomycetes protease on blood cancer cell line. Basic and Clinical Cancer Research, 8(4):3-14.

Bernan, V. S. and Greenstein W. M., 1997. Maises marine microorganisms as a source of new natural products. Advance in Applied Microbiology, 43:57-87.

Das, S., Ward, L. R. and Burke, C., 2010. Screening of marine Streptomyces spp. for potential use as probiotics in aquaculture. Marin Drugs, 305(1-4):32-41.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-10]

Dehnad, A., Bakhshi, R., Parsa Yeganeh, L., Monadi Sefidan, A., Montazam, S. H. and Abdi Soofiani, S., 2009. Screening of Streptomycetes with Antibacterial Activity from Soil Samples of Azerbaijan Regions of Iran. Journal of Microbial Biotechnology, 1(1):18-22.

Demin, S., 2009. Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances. World Journal Microbiology Biotechnology, 26 (12): 2123-2139.

Dong Yeok, S., Shin, H., Kim, G. and Cheong, J., 2008. Streptochlorin isolated from Streptomyces sp.induces apoptosis in human hepatocarcinoma cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. Journal Microbiology Biotechnology, 18(11):1862- 1867.

El-Naggar, N. E. and El-Ewasy, S., M., 2017. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories Streptomyces glaucescens NEAE-H. Science Reports, 14 (7):421-429.

Fedorov, S. N., Ermakova, S. P., Zvyagintseva, T. N. and Stonik, V. A., 2013. Anticancer and Cancer Preventive Properties of Marin Polysaccharides: Some Results and Prospects. Marine Drugs, 11(12):4876-4901.

Jayamadhuri, R. and Krishna, K., 2013. In vitro Anticancer Activity of Marine Bacteria Isolated from Andhra Pradesh and Tamil Nadu Coastal Regions. International Journal of Chemical, Environmental and Biological Sciences, 2:2320-4079.

Jianyou, L., Jianrong, X. and Yongheng, C., 2011. Isolation and identification of two marine-derived Streptomyces from marine mud of coast and offshore Zhuhai and bioactive potential for plant pathogenic fungi. African Journal of Biotechnology, 10(56):11855-60.

Karuppiah, V., Aarthi, C., Sivakumar, K. and Kannan L., 2013. Statistical optimization and anticancer activity of a red pigment isolated from Streptomyces sp. PM4. Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine, 3(8):650-6.

Kumar, R. S., Rajkapoor, B. and Perumal, P., 2013. In vitro and in vivo anticancer activity of indigofera cassioides rottl. Ex. DC. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4(5):379–385.

Lee, C., Lim, H., Moon, S. and Shin, C., 2007. Novel anticancer agent, benzyldihydroxyoctenone, isolated from Streptomyces sp. causes G1 cell cycle arrest and induces apoptosis of HeLa cells. Cancer Science, 98(6):795-802.

Li, W., Li, X., Huang, T., Teng, Q., Crnovcic, I., Rader, C. and Shen, B., 2016. Engineered production of cancer targeting peptide (CTP)-containing C-1027 in Streptomyces globisporus and biological evaluation. Bioorganic and Medicinal Chemistry Journal, 0968-0896(16):30251-6.

Pérez, M., Schleissner, C., Fernández, R., Rodríguez, P., Reyes, F., Zuñiga, P., de la Calle, F. and Cuevas, C., 2016. PM100117 and PM100118, new antitumor macrolides produced by a marine Streptomyces caniferus GUA-06-05-006A. Journal Antibiotic, 69(5):388-394.

Petrova, D. H. and Shishkov, S. A., 2006. Novel thermostable serine collagenase from Thermoactinomyces sp. 21E: purification and some properties. Journal Basic Microbiology, 46(4):275-85.

Ravikumar, S., Gnanadesigan, M., Thajuddinm N., Chakkaravarthi, V. S. D. and Banerjee, B. M., 2010. Anticancer property of sponge associated Actinomycetes along Palk Strait. Journal of Pharmacy Research, 3(10):2415–2417.

Ravikumar, S., Suganthi, P. and Moses, F. M., 2012. Crude bioactive compounds of Actinomycetes from Manakkudy mangrove sediment. Journal of Pharmacy Research, 4(3):877–879.

Rosa, J. P., Tibúrcio, S. R., Marques, J. M., Seldin, L. and Coelho, R. R., 2016. Streptomyces lunalinharesii 235 prevents the formation of a sulfate-reducing bacterial biofilm. Brazilian Journal of Microbiology, 1517-8382(16):30276-30283.

Schulz, D., Nachtigall, J., Geisen, U., Kalthoff, H., Imhoff, J. F., Fiedler, H. P. and Süssmuth, R. D., 2012. Silvalactam, a 24-membered macrolactam antibiotic produced by Streptomyces sp. Tü 6392. Journal Antibiotic, 65(7):369-72.

Sharma, H. and Parihar, L., 2010. Antifungal activity of extracts obtained from Actinomycetes. Journal of Yeast and Fungal Research, 1(10):197-200.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-10]

Singh, L. S., Baruah, I. and Bora T. C., 2006. Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. Biotechnology, 5(2):217-221.

Stewart, B.W. and Paul Kleihues, P., 2009. International agency research on cancer. Lyon, France. World Cancer Report, 12(5):40-56.

Takizawa, M., Colwell, R. R., Hill, R. T., 1993. Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. Applied Environmental Microbiology, 59(4):997-1002

Valli, S., Suvathi, S. S., Aysha, O., Nirmala, P., Vinoth, K. P. and Reena, A., 2012. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(6):469-73.

Valliappan, A., Shin, H., Kim, T. and Lee, H., 2013. Streptokordin, a novel cytotoxic compound of the methyl pyridine class from a marine - derived Streptomyces sp. KORDI-3238. Antibiotic, 59(4):34-240.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-10]