



ارزیابی اثرات ضد سرطانی فراکسیون های مختلف استخراج شده از اکتینوباکتری های Streptomyces rochei IKBG22 جدا شده از گیاه جعفری کوهی علیه رده های سلولی سرطانی MKN45 و AGS

یداله بهرامی*، دکتر سارا محمدزاده، کیمیا رفیعی بوژانی، دکتر مسعود مدرسی، دکتر کامران منصوری، الهام کاکایی
گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

چکیده

سرطان معده یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها و دومین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان است. اکتینوباکترها، به‌ویژه جنس *استرپتومایسس*، از مهم‌ترین تولیدکنندگان متابولیت‌های ثانویه با خواص ارزشمند دارویی از جمله اثرات ضدسرطانی محسوب می‌شوند. این پژوهش با هدف تولید، استخراج و ارزیابی اثرات ضدسرطانی متابولیت‌های ثانویه سویه اندوفیت Streptomyces rochei IKBG22 که پیش‌تر از گیاه جعفری کوهی جدا شده بود) بر روی رده‌های سلولی سرطان معده (MKN45 و AGS) انجام گرفت. برای این منظور، سویه باکتری در محیط کشت بهبودیافته Y1 در مقیاس بالا کشت و تخمیر داده شد. عصاره خام با استفاده از حلال اتیل استات به روش مایع-مایع استخراج گردید و سپس به کمک کروماتوگرافی ستونی به شش فراکسیون مجزا (F1 تا F6) تفکیک شد. ارزیابی عملکرد فراکسیون‌ها بر روی زنده مانی سلول‌های سرطانی با استفاده از آزمون MTT در بازه‌های زمانی ۲۴ تا ۷۲ ساعته نشان داد که در این میان، فراکسیون F3 دارای قوی‌ترین اثر سایتوتوکسیک و ضدسرطانی است. بررسی مکانیسم مرگ سلولی نیز ثابت کرد که فراکسیون F3 اثرات خود را از طریق القای شدید استرس اکسیداتیو و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) اعمال کرده که این امر در نهایت منجر به القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (آپوپتوز) در سلول‌های سرطانی می‌شود. در نهایت، خلص‌سازی فراکسیون مؤثر F3 با استفاده از دستگاه HPLC و شناسایی ساختار ترکیبات خلص‌شده با تکنیک‌های پیشرفته NMR و LC-MS، حضور ترکیبات زیست‌فعال ارزشمندی از جمله دی‌پپتیدهای حلقوی نظیر Cyclo(L-Pro-Gly) و Cyclo(L-Pro-L-Val)، آمینواسید گابا (GABA) و p-Cresol را تأیید کرد. نتیجه‌گیری کلی این مطالعه نشان می‌دهد که متابولیت‌های ثانویه استخراج‌شده از این باکتری دارای اثرات ضدسرطانی قدرتمند و سمیت انتخابی هستند و با مهار رشد سلول‌های سرطانی از طریق آپوپتوز، می‌توانند کاندیدای بسیار مناسبی برای توسعه داروهای جدید در درمان سرطان معده باشند.

مواد و روش ها

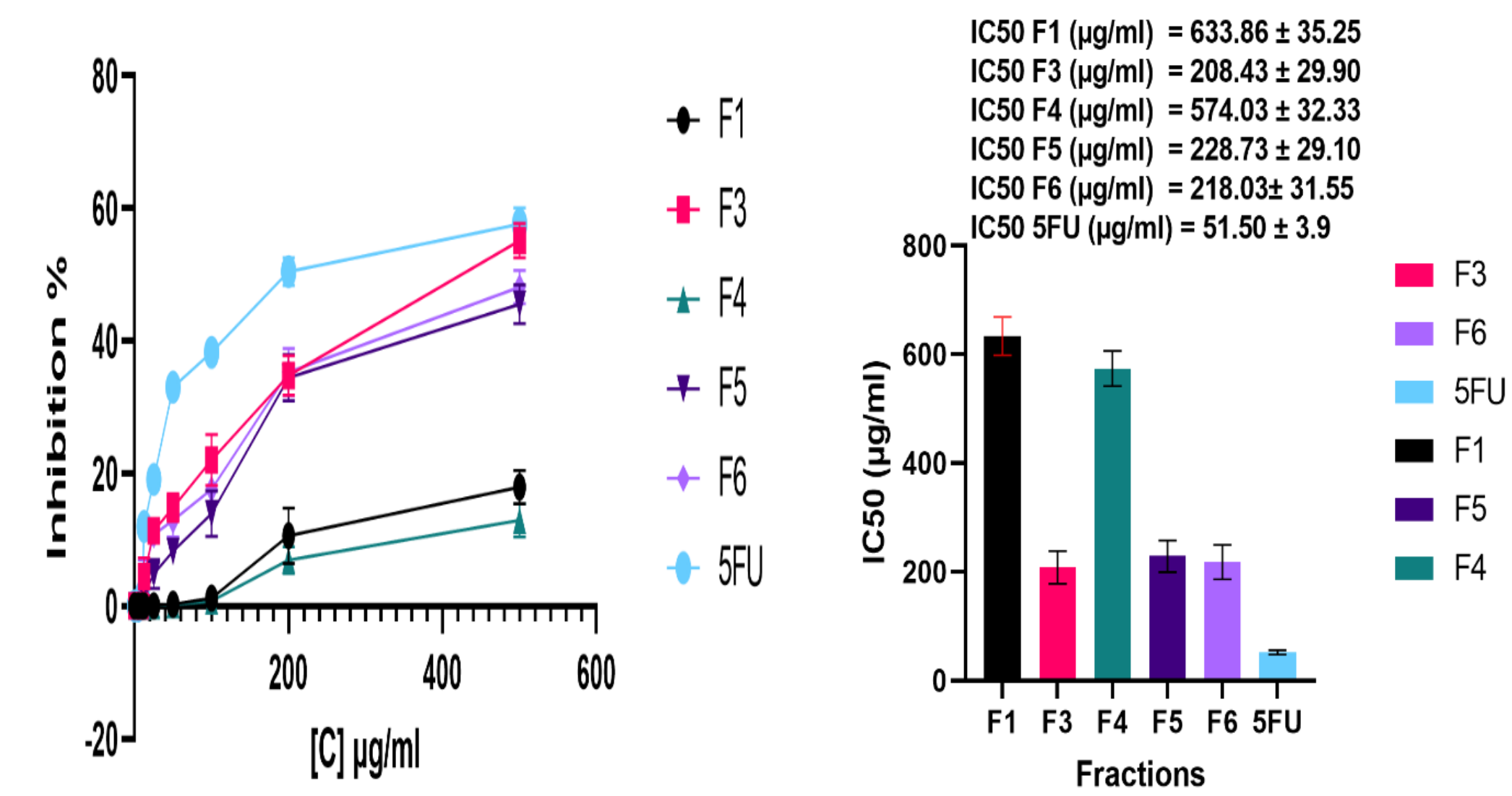
سویه Streptomyces rochei IKBG22 با استفاده از محیط بهبودیافته Y1 در مقیاس بالا کشت داده شد. عصاره اتیل استاتی آن با استفاده از روش مایع-مایع استخراج و سپس با کمک کروماتوگرافی ستونی فراکسیونه گیری شد (شکل 2 و 3). عملکرد فراکسیون ها بر رشد و زنده ماندن رده‌های سلولی MKN-45 و AGS توسط تست MTT مورد بررسی قرار گرفت (72-24 ساعت). القاء تولید ROS و آپوپتوز نیز در رده های سرطانی تیمار شده مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس فراکسیون F3 که دارای بیشترین اثر بود توسط HPLC خلص سازی و متعاقبا ترکیب خلص شده مورد ررسی NMR و LC-MS قرار گرفت.



شکل 2 مراحل عصاره گیری

نتایج

که پس از تأیید هویت مولکولی سویه Streptomyces rochei IKBG22 انجام فرآیند تخمیر، عصاره‌گیری با حلال اتیل استات صورت گرفت و شش فراکسیون مختلف (F1 تا F6) با استفاده از کروماتوگرافی ستونی جداسازی شدند. ارزیابی‌های سمیت سلولی نشان داد که فراکسیون F3 قوی‌ترین اثر ضدسرطانی را بر روی سلول‌های سرطان معده (رده‌های AGS و MKN45) داشته و کمترین میزان IC50 را در تیمار ۷۲ ساعته ثبت کرده است، در حالی که تأثیر آن بر سلول‌های سالم فیبروبلاست انسانی بسیار ناچیز بوده و سمیت انتخابی مطلوبی را از خود به نمایش گذاشته است. بررسی مکانیسم اثر این فراکسیون از طریق فلوسایتومتری ثابت کرد که بخش F3 میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را در سلول‌های سرطانی به شدت افزایش داده و با ایجاد استرس اکسیداتیو، سلول‌ها را وادار به ورود به فاز آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی) اولیه و ثانویه می‌کند. در نهایت، خلص‌سازی این فراکسیون با استفاده از دستگاه HPLC و ارزیابی دقیق ساختار شیمیایی آن با تکنیک‌های پیشرفته NMR و LC-MS تأیید کرد که این عصاره حاوی مخلوطی از ترکیبات زیست‌فعال کلیدی است که مهم‌ترین آن‌ها شامل دی‌پپتیدهای حلقوی (مانند Cyclo(L-Pro-Gly) و Cyclo(L-Pro-L-Val)، گابا (GABA) و p-Cresol می‌باشند (شکل 4 و 5).



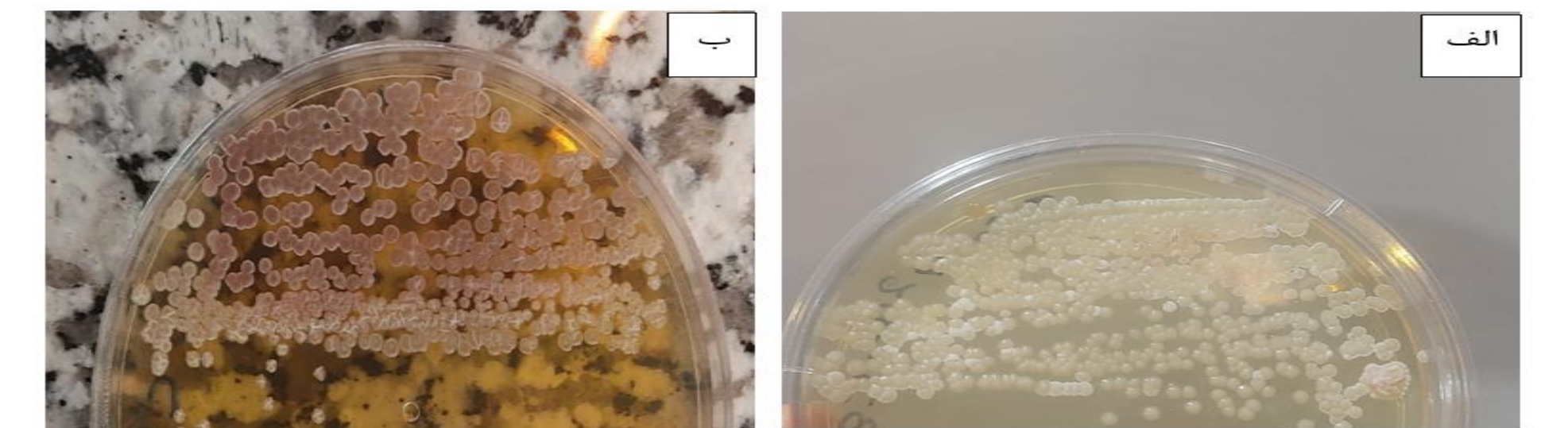
شکل 4 تیمار 24 ساعته، نمودار مهار رشد رده MKN45 توسط فراکسیون های F1، F3، F4، F5، F6 و داروی 5FU (الف)، نمودار درصد مهار توسط فراکسیون های F1، F3، F4، F5، F6 و داروی 5FU (ب). نتایج به صورت میانگین $50 \pm$ IC خطای استاندارد (\pm SD) نشان داده شده است.



شکل 3 مراحل فراکسیونه کردن

مقدمه

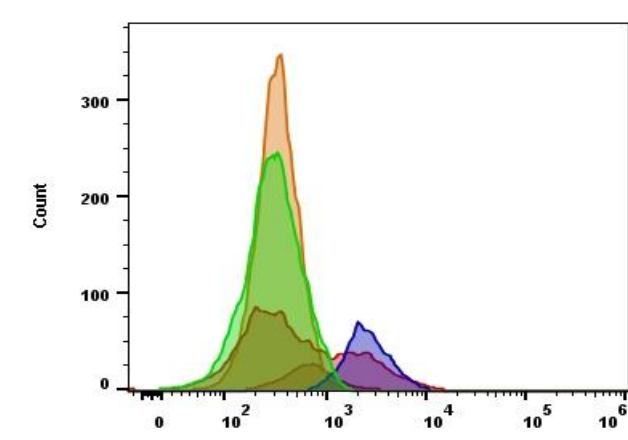
سرطان معده چهارمین سرطان در جهان و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است. بروز آن در مناطق مختلف دنیا متفاوت است اما به طور کلی یک مشکل اساسی در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود. اکتینوباکترها و به ویژه جنس استرپتومایسس، از مهم ترین تولیدکنندگان متابولیت‌های ثانویه با خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد انگلی، ضد سرطانی می‌باشند که از نظر اقتصادی، بیوتکنولوژیکی و پزشکی مهم هستند. در مطالعات قبلی از گیاه جعفری کوهی جداسازی و شناسایی شد. لذا Streptomyces rochei IKBG22 گروه، با استفاده از تخمیر، (شکل 1) IKBG22 هدف از این مطالعه تولید متابولیت های ثانویه سویه استخراج و سپس تخلیص عصاره اتیل استاتی، و بررسی اثرات ضد سرطانی و شناسایی ترکیبات حاصل می پردازیم.



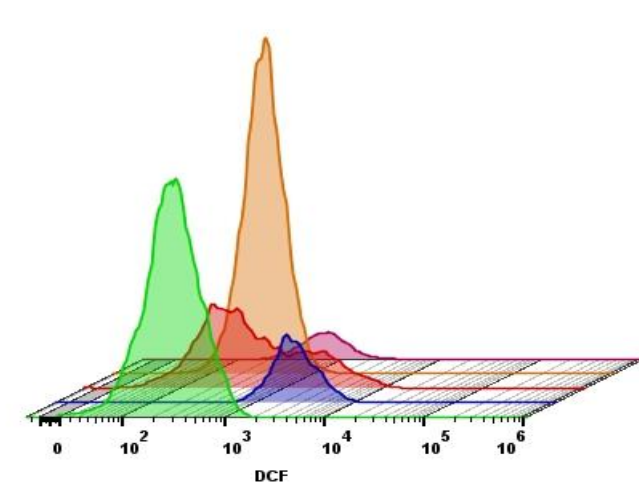
شکل 1 کلنی های سویه IKBG22 بر روی محیط ISP-2، فاقد اسپور (3 روز) (الف) و دارای (اسپور 10 روز) (ب)

بحث و نتیجه گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که اکتینوباکترهای اندوفیت، به‌ویژه سویه Streptomyces rochei IKBG22 جدا شده از گیاه جعفری کوهی، منبعی غنی از متابولیت‌های ثانویه با خواص ضدسرطانی ارزشمند برای مقابله با سرطان معده هستند. ارزیابی‌ها ثابت کرد که در میان عصاره‌های استخراج‌شده، فراکسیون F3 دارای قوی‌ترین اثر سایتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی AGS و MKN45 است، در حالی که با داشتن «سمیت انتخابی»، تأثیر بسیار ضعیفی بر روی سلول‌های سالم فیبروبلاست انسانی می‌گذارد که این ویژگی برای کاهش عوارض جانبی داروها بسیار حائز اهمیت است. بررسی‌های سلولی نشان داد که این فراکسیون اثرات ضدسرطانی خود را از طریق افزایش شدید استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) اعمال کرده که این امر در نهایت منجر به القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (آپوپتوز) در سلول‌های سرطانی می‌شود. همچنین، با استفاده از آنالیزهای پیشرفته‌ای نظیر HPLC، NMR و LC-MS مشخص شد که این فراکسیون حاوی مخلوطی از ترکیبات فعال زیستی مهمی از جمله دی‌پپتیدهای حلقوی مانند Cyclo(L-Pro-Gly) و Cyclo(L-Pro-L-Val)، ترکیبات فلاونوئیدی، GABA و p-Cresol است. در نهایت، این دستاوردها ثابت می‌کند که متابولیت‌های طبیعی تولید شده توسط این باکتری پتانسیل درمانی بسیار بالایی دارند و کاندیداهای مناسبی برای توسعه داروهای جدید ضدسرطان محسوب می‌شوند.



Sample Name	Mean: FL1-A	Mean: FL1-H
F3 AGS 24Hdx	343	789
F3 AGS 34Hdx	2876	824
F3 AGS 48Hdx	1121	585
F3 AGS 64Hdx	379	298
Control AGS 24Hdx	848	511



Sample Name	Mean: FL1-A	Mean: FL1-H
F3 MKN45 24Hdx	343	789
F3 MKN45 34Hdx	2876	824
F3 MKN45 48Hdx	1121	585
F3 MKN45 64Hdx	379	298
Control MKN45 24Hdx	848	511

شکل 5 نتایج فلوسایتومتری – سطح ROS حاصل از اثر فراکسیون F3 بر سلول های AGS.