زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۲۴۰- ۲۳۱

مقاله پژوهشی

بررسی اثر پروتئین‌های نوترکیب فاکتور کشنده (LF) و فاکتور محافظت کننده (mPA) بر روی سلول‌های سرطانی انسانی

محبوبه غلامی[۱]، مجید مقبلی[۲*]، فرشید کفیل زاده[۱]، محمد کارگر[۱]، مریم بی‌خوف تربتی[۳]

۱- گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

۲- گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۳- گروه زیست شناسی، واحد یادگار امام، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: moghbeli552@gmail.com

DOI: 10.22034/ascij.2021.687848

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۵

چکیده

سرطان باعث حدود ۱۳ درصد مرگ و میر انسان‌ها است و هنوز درمان مناسبی برای آن یافت نشده است. روش‌های متداول درمان سرطان مانند جراحی، شیمی درمانی و رادیو درمانی دارای عوارض جانبی زیادی بوده و در بعضی موارد هیچ تاثیری بر روی درمان سرطان ندارد لذا ایجاد درمان‌های مناسب و هدفمند می‌تواند انقلابی در درمان سرطان ایجاد کند. از روشهای نوین می‌توان ژن درمانی و استفاده از ایمونوتوکسین‌ها را نام برد که می‌توانند تا درصد بالایی هدفمند عمل کنند. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر پروتئین تغییر یافته PA که فقط به سلول‌های سرطانی متصل می‌گردد همراه با فاکتور کشنده (LF) بر روی سلول‌های سرطانی می‌باشد. در این راستا پروتئینهای نوترکیب mPA و LF از *باسیلوس سوبتیلیس* نوترکیب جدا شد و بعد از بررسی وجود باند پروتئین و غلظت آنها به ترتیب با استفاده از روش SDS-PAGE و بردفورد، اثر ترکیبی از غلظت‌های مختلف این پروتئین‌ها بر روی سلول‌های سرطانی ریه، پستان، پروستات و پانکراس با روش MTT بررسی شد. نتایج پژوهش نشان داد که میزان ۷۵ نانوگرم از پروتئین نوترکیب LF و ۵۰ نانوگرم از پروتئین نوترکیب mPA بیشترین تاثیر در مرگ سلول‌های سرطانی داشته و باعث مرگ بیش از ۹۸درصد انواع سلول‌های سرطانی مورد بررسی را داشت. با حصول این نتایج امید است که با تولید توکسین‌های هدفمند مانند ترکیب mPA و LF بتوان یک بعد جدید به درمان سرطان اضافه شود.

کلمات کلیدی: پروتئین‌های نوتکیب، فاکتور کشنده، فاکتور محافظت کننده، *باسیلوس سوبتیلیس*، سرطان.

مقدمه

سرطان بیماری ای پیش رونده است و گفته می‌شود ۷۰ درصد مرگ‌های ناشی از سرطان در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد. در بسیاری از موارد در زمان تشخیص تومورهای ثانویه تشکیل شده که این تشخیص دیر هنگام به طور معمول مسئول مرگ و میر بالای سرطان می‌باشد. درمان‌های مرسوم مانند شیمی درمانی و رادیوتراپی دارای درصد بقای کمی بوده که علت آن پیشرفت تومور، مقاومت به درمان و عدم اختصاصیت درمان برای تومور می‌باشد. درمان باکتریایی دارای مکانیسم‌های منحصر به فردی برای درمان سرطان می‌باشند که روش‌های استاندارد به آن دسترسی ندارند (۱۳). باکتری‌ها می‌توانند به طور

اختصاصی تومورها را هدف قرار داده، به طور فعال در بافت نفوذ کرده و به شکل کنترل شده‌ای ایجاد سمیت کنند (۱۳، ۱٤، ۱٦، ۱۷، ۲۰).

باسیلوس آنتراسیس باکتری گرم مثبت هوازی – بی-هوازی اختیاری و عامل بیماری سیاه زخم می‌باشد (۱۹). توکسین ترشح شده توسط این باکتری (توکسین آنتراکس) متشکل از سه قسمت: PA یا فاکتور محافظت کننده،LF یا فاکتور کشنده وEF یا فاکتور مولد ادم می‌باشد. هر کدام از دو فاکتورLF و EF همراه با PA اثر خود را اعمال می‌کنند. PA ، از طریق انتهای کربوکسیل خود به گیرنده‌های سطح سلول از جمله UPA متصل شده و پس از ایجاد منفذ در غشای سلول سبب ورود زیرواحدهای LF و EF به درون سلول می‌گردد. (۷، ۱۱).

uPA سرین پروتئاز موجود در سلول‌های یوکاروتیک با توانایی تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین، دارای گیرنده سطح سلولی (uPAR) و اثرگذار بر پروتئین-های ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. بیان بالای UPA و گیرنده‌های سطح سلولی آن نشانه ای مبتنی بر وجود تومورهای مختلف سرطانی است و به ندرت در سلول‌های نرمال بدن مشاهده می‌شود (۱، ۲). با تغییر بر روی ژن کدکننده PA به نحوی جهش ایجاد شد که پروتئین تغییر یافته بیان شده فقط به گیرنده-های سطح سلول‌های سرطانی مانند گیرنده UPA متصل می‌گردد و سپس با ورود LF به درون سلول-های سرطانی باعث مرگ این سلول‌ها می‌شود، در این صورت می‌توان گامی بلند در جهت درمان سرطان برداشت (۲، ۵، ۸، ۱۰، ۱۳).

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر پروتئینهای نوترکیب LF وPA که در تحقیقات قبلی تولید شده‌اند بر روی سلول‌های سرطانی می باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب LF و PA از *باسیلوس سوبتیلیس*: ژن LF توسط همین تیم تحقیقاتی قبلا در *باسیلوس سوبتیلیس* کلون و بیان شده است (۹) و ژن تغییر یافته PA نیز توسط مقبلی و همکاران در سال ۲۰۱۹ در *باسیلوس سوبتیلیس* کلون و بیان شده است (نتایج هنوز چاپ نشده است) لذا در مرحله اول جهت جداسازی این پروتئین‌های نوترکیب، از سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* حاوی پلاسمیدهای حامل ژن کشت تازه تهیه شد و از باکتری تعدادی کلونی تک به سرم فیزیولوژی اضافه گردید تا غلظت محلول در OD_{600} برابر ۱ شود. سپس از این محلول به ازای هر ۱ میلی لیتر محیط کشت MFA (جدول ۱) حاوی کلرامفنیکل (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ۵۰ ماکرولیتر سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. محیط ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت rpm ۱۵۰ قرار داده و پس از گذشت ۳ ساعت، بوسیله ۱ میلی‌مولار محلول IPTG بیان القا شد و شرایط کشت به مدت ٤ ساعت ادامه یافت. سپس با استفاده از سانتریفوژ در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد و فیلتر کردن محلول رویی با فیلتر ۰/۲ میکرون، باکتریها جدا و کمیت و کیفیت پروتئین نوترکیب بوسیله روش SDS-PAGE (۱۸) و معرف بردفورد (۳) بررسی شد. به عنوان کنترل منفی از باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* حاوی پلاسمید بدون ژن استفاده شد.

رسم منحنی استاندارد بردفورد: به منظور رسم منحنی استاندارد استوک ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA (bovine serum albumin) تهیه گردید. از این استوک رقت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ٤۰ و ۵۰ میلی-گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت با ۲/۵ میلی لیتر معرف بردفورد مخلوط گردید. پس از

گذشت ۱۰ دقیقه، میزان جذب در ۵۹۵ نانومتر بررسی گردید.

کشت سلول‌های سرطانی: سلول‌های سرطانی مورد استفاده شامل سلول‌های سرطانی ریه، پستان، پروستات و پانکراس بودند و به عنوان کنترل منفی از سلول کلیه انسانی استفاده شد. تمام سلول‌ها از کلکسیون سلولی انستیتو پاستور و کلکسیون سلولی مرکز ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شد. سلول‌ها در فلاسک T25 و محیط کشت Dulbeccos Modified Eagles medium (DMEM) با ۰/۴۵ درصد گلوکز، ۱۰ درصد سرم گاوی جنینی، گلوتامین ۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین در دمای ۳۷ درجه و در مجاورت ۵ درصد CO2 کشت داده شدند. بعد از تکثیر سلول‌ها به میزان کافی ، سلول‌ها جدا شده و شمارش شدند. تعداد ۱۰۰۰۰ سلول به هر حفره پلیت ۹۶ خانه ته صاف اضافه شده و در شرایط قبلی قرار داده شده تا سلول‌ها به ۵۰ درصد همپوشانی برسند. سپس سلول‌ها با محیط DMEM بدون سرم دو مرحله شستشو داده شده تا مواد اضافی حذف گردند.

بررسی اثر ترکیب پروتئین‌های نوترکیب بر روی سلول‌های سرطانی با روش MTT: به سلول‌ها مقادیر ۰ ، ۲۵ ، ۵۰ و ۷۵ نانوگرم از rLF ترکیب شده با مقدار ۵۰ نانوگرم rPAm مجموعا در ۲۰۰ میکرولیتر بافر به هر چاهک اضافه گردید. به عنوان کنترل از ترکیب ۵۰ نانوگرم PA طبیعی (nPA) با ۵۰ نانوگرم rLF استفاده شد. تمامی نمونه‌ها با ۳ بار تکرار گذاشته شد. پلیت‌ها در شرایط قبلی به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده و سپس محیط تخلیه شده و محیط DMEM تازه دارای 10درصدfetal calf serum اضافه شد. به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از MTT ۲/۵ میلی-گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شدند و سپس محیط خالی شد و رنگ آبی تولید شده بوسیله سلول‌های سالم، با ۱۰۰ میکرولیتر از ۰/۵ درصد SDS ، ۲۵mM HCl در ۹۹درصد ایزوپروپانل حل شد. پلیتها ۱۰ دقیقه ورتکس شده و MTT اکسید شده در طول موج ۵۷۰ با ریدر (ELISA-reader, Organon-Teknika, Netherland) اندازه‌گیری شد. میزان توکسیسیتی ایجاد شده با فرمول زیر محاسبه گردید: متوسط جذب نوری سلول‌های تیمار شده تقسیم بر جذب نوری سلول‌های تیمار نشده ضربدر ۱۰۰ درصد.

آنالیز آماری نتایج حاصل از تست سلولی MTT: نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آزمون‌های آنالیز واریانس ANOVA، آزمون Tukey HSD، T test و آزمون همبستگی Pearson بر روی داده‌ها انجام گرفت و نتایج مشاهده شد.

جدول۱- مواد تشکیل دهنده MFA

دوز	نام
۰/۳۴ درصد	Yeast extract
۰/۲ درصد	Cose animo acid
۰/۱ درصد	KH_2po_4
۰/۱ درصد	K_2hpo_4

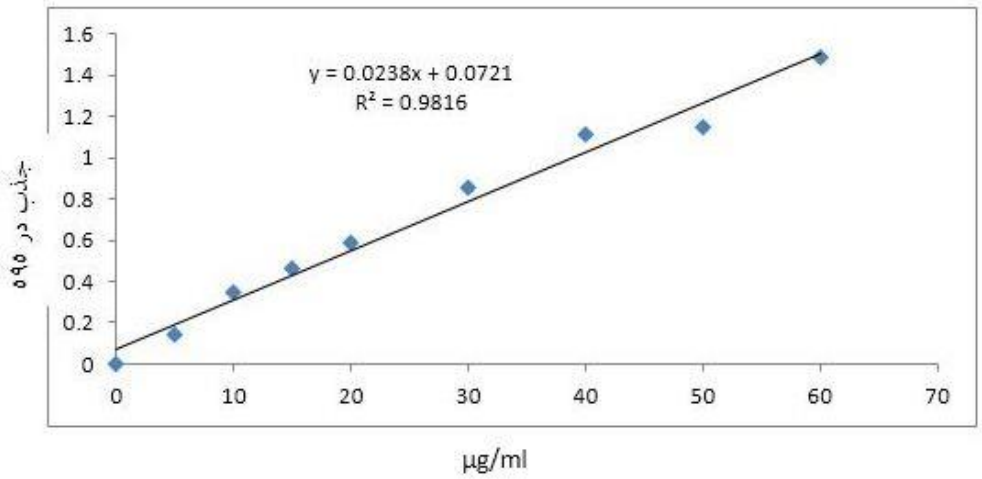
نتایج

با استفاده از BSA منحنی استاندارد رسم شد (شکل۱) و معادله آن مشخص گردید. معادله به‌دست آمده از این نمودار $y = ۰/۰۲۳۸x + ۰/۰۷۲۱$ و $R^2 = ۰/۹۸۱۶$ می‌باشد. با استفاده از معادله زیر منحنی و میزان جذب

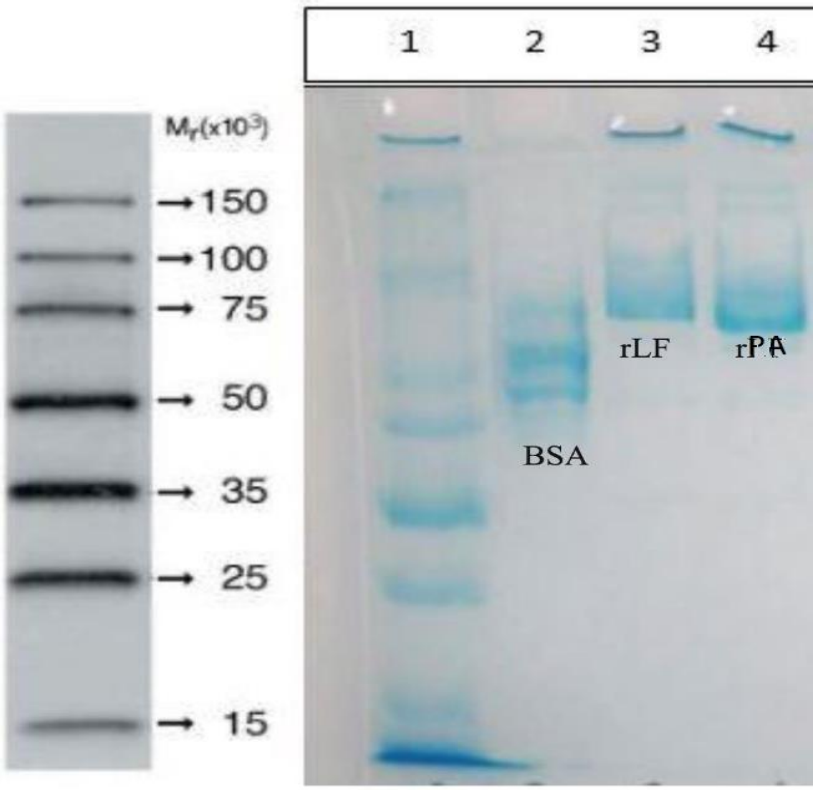
پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از معرف بردفورد غلظت پروتئین rLF، ۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت پروتئین rPAm، ۹۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. پس از جدا سازی پروتئین های نوترکیب، SDS PAGE انجام گردید که نتایج آن در شکل ۲ آمده است. همانطور که در شکل مشخص است پروتئینهایی با اندازه حدود ۹۰ و ۸۳ کیلو دالتون به ترتیب برای rLF و rPA بدست آمده است. از آنجا که قبلا با وسترن بلاتینگ وجود این پروتئین‌ها تایید شده است در این تحقیق هدف جداسازی میزان مناسبی از پروتئینهای نوترکیب جهت تستهای لازم بود لذا جهت تایید وسترن بلاتینگ انجام نشد و از SDS-PAGE جهت بررسی وجود پروتئین‌ها با وزن مولکولی مورد نظر استفاده شد.

بررسی روی سلول‌های سرطانی: نتایج بررسی اثر پروتئین rPAm و پروتئین نوترکیب LF (rLF) بر روی سلول‌های سرطانی ریه، پستان، پروستات و پانکراس در شکل ۳ مشاهده می‌شود. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، میزان صفر نانو گرم کمترین تاثیر را در زنده مانی سلول‌های سرطانی داشت ولی مقادیر ۲۵ و ۵۰ و ۷۵ نانوگرم تاثیر چشمگیری بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی داشتند و از میان آنها میزان ۷۵ نانوگرم rLF بیشترین تاثیر را دارد.

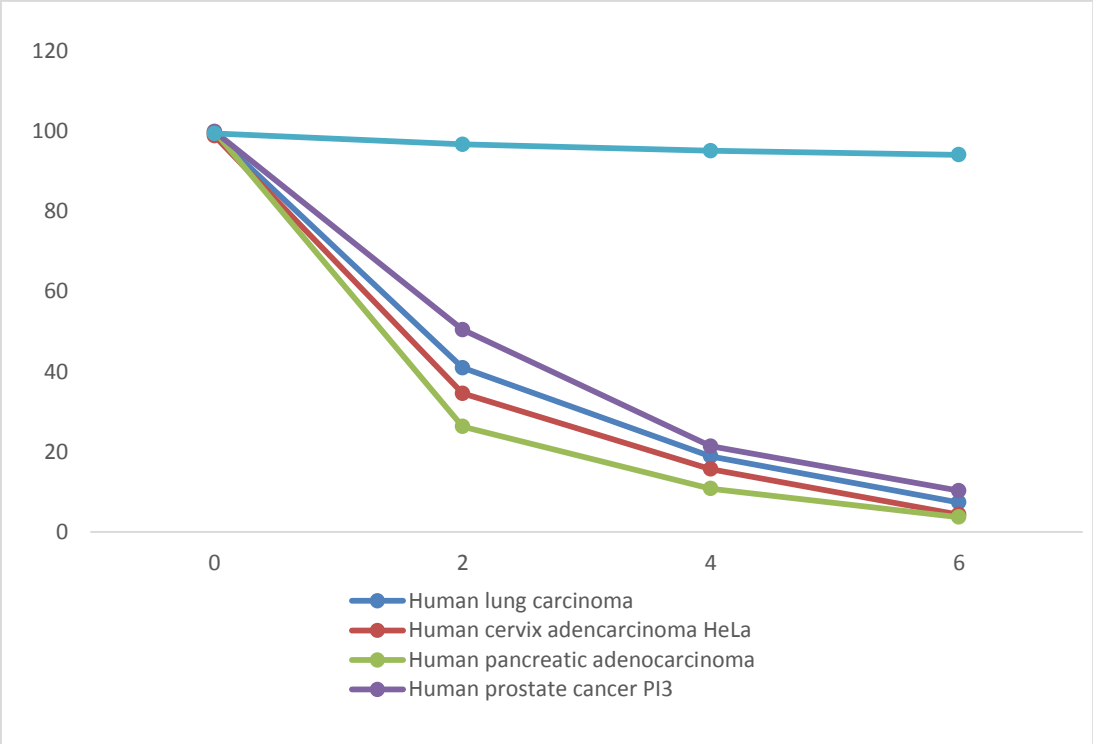
نتایج آنالیز آماری داده‌های حاصل از تست سلولی MTT: از میان مقادیر مختلف مورد بررسی از پروتئین نوترکیب rLF به همراه ۵۰ نانوگرم rPAm، میزان صفر نانوگرم با میانگین 0.28 ± 98.92 بیشتر تاثیر را در زنده مانی سلول ها داشته و افزایش میزان پروتئین نوترکیب rLF به همراه rPAm سبب کاهش میانگین زنده‌مانی سلول‌ها شد. میانگین زنده‌مانی سلول‌ها ۸/۲٤ ± ۲۵/۸۸ در حضور ۷۵ نانوگرم از پروتئین نوترکیب به دست آمد. نتایج آنالیز واریانس (آنووا) نشان داد که اختلاف معناداری در سطح اطمینان ۹۵ درصد بین سه مقدار ۲۵ و ۵۰ و ۷۵ نانوگرم از این پروتئین‌ها بر روی سلول‌های مورد بررسی وجود دارد ولی در مقدار صفر نانوگرم از این پروتئین تاثیر معناداری در زنده مانی سلول‌های مورد بررسی در سطح اطمینان ۹۵ درصد مشاهده نشد. بر اساس آزمون آنالیز واریانس و تست Tukey HSD، اختلاف معنی‌داری بین هیچ یک از رده‌های سلولی مورد بررسی با کنترل منفی در مقدار صفر نانوگرم از پروتئین نوترکیب در سطح اطمینان ۹۵ درصد مشاهده نشد ولی بین تمامی رده‌های سلولی سرطانی با کنترل منفی (رده سلولی کلیوی) در مقدار ۲۵، ۵۰ و ۷۵ نانوگرم از پروتئین نوترکیب اختلاف معناداری در سطح اطمینان ۹۵ درصد مشاهده شد. همچنین بررسی ارتباط گروه‌ها با استفاده از آزمون Pearson نشان دهنده ارتباط بسیار قوی و مثبت بین دو گروه ۲۵ و ۵۰ نانوگرمی پروتئین با ۰/۸٤٤ =r^2 ارتباط بسیار قوی و مثبت بین دو گروه ۲۵ و ۷۵ با ۰/۹۰۷ =r^2 و ارتباط بسیار قوی و مثبت بین دو گروه۵۰ و ۷۵ با ۰/۹٤۲ =r^2 در سطح اطمینان ۹۹ درصد بود. این ارتباط بدین معناست که افزایش مقدار پروتین نوترکیب سبب کاهش درصد زنده‌مانی در سلول‌های سرطانی مورد بررسی شده است. بررسی میانگین هر یک از مقادیر پروتئین نوترکیب با میزان صفر آن با روش T test مستقل در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. بین میانگین مقادیر صفر و ۲۵ نانوگرمی این پروتئین اختلاف معناداری در سطح اطمینان ۹۵درصد مشاهده نشد اما بین میانگین‌های مقادیر صفر با ۵۰ نانوگرم و صفر با ۷۵ نانوگرم اختلاف در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنا دار بود.



شکل ۱- نمودار استاندارد برادفورد



شکل ۲- بررسی پروتئین‌های نوترکیب جدا شده با استفاده از SDS-PAGE. لاین ۱: مارکر پروتئینی، لاین ۲: پروتئین BSA ، لاین ۳: پروتئین نوترکیب LF ، لاین ٤: پروتئین نوترکیب PA.



شکل ۳- نتایج بررسی اثر پروتئین نوترکیب موتانت PA (rPAm) و پروتئین نوترکیب LF (rLF) بر روی سلول‌های سرطانی

بحث

سرطان باعث ۱۳ درصد عوامل مرگ و میر انسان‌هاست. درمان‌های ضد سرطان در بیماران مبتلا به تومورهای جامد پیشرفته نیاز به درمان‌های جدید را آشکار می‌سازد. در درمان ایده آل، سلول‌های سرطانی با حداقل عوارض جانبی ریشه کن خواهند شد (۱٤، ۲٦). باکتری‌ها به روش های مختلف در درمان سرطان به کار می‌روند که کاربرد آن به صورت اثرات مستقیم ضد تو موری و یا انتقال عواملی دارای این آثار می-باشد. سموم باکتریایی از طریق کشتن سلول‌ها و تغییر فرایندهای سلولی کنترل کننده تکثیر، آپوپتوز و تمایز که با سرطان در ارتباط است عمل می‌کند. درمان‌های باکتریایی دارای مکانیسم‌های منحصر به فردی برای درمان سرطان می‌باشند که روش‌های استاندارد به آن دسترسی ندارند که این مربوط به سه ویژگی منحصر به فرد باکتری‌ها می‌باشد، تقریبا همه تومورها از نظر فشار اکسیژن پایین یا هیپوکسی هستند و باکتری‌های بی‌هوازی این محیط را ترجیح می‌دهند. علاوه بر این باکتری‌ها به آسانی قابل دستکاری بوده و می‌توانند بر محدودیت‌هایی که برای درمان های معمول سرطان وجود دارند غلبه کنند. همچنین بر خلاف سایر درمان‌ها همچون اشعه درمانی، درمان باکتریایی نفوذ مناسبی در بافت‌های توموری دارد با این وجود ایرادات درمان‌های باکتریایی مربوط به ماهیت توکسیک باکتری‌ها و نیز ناپایداری ژنتیکی آنها را نمی‌توان نادیده گرفت.به منظور غلبه بر این مشکلات تلاش‌های قابل توجهی انجام شده از آن جمله استفاده از باکتری های مهندسی شده و ضعیف شده، تکنولوژی DNA نوترکیب و نیز به کاربردن همزمان این درمان با درمان‌های دیگر همچون شیمی درمانی، پروتئین‌های شوک حرارتی فلزات سنگین و تابش را می‌توان اشاره کرد (۱٤، ۱۵، ۱٦، ۱۷، ۱۹، ۲۰). در طول دهه گذشته *سالمونلا*، *کلستریدیوم* و جنس‌های

دیگر کنترل رشد تومور و ارتقا بقا در مدل‌های حیوانی را نشان داده‌اند (۲۲، ۲۳). باکتری‌ها به روش-های مختلف در درمان سرطان به کار می‌روند. بدین صورت که یا به عنوان وکتورهای ژن درمانی به کار می‌روند یا از توکسین‌های تولیدی توسط باکتری‌ها در درمان سرطان استفاده می‌شود (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۹، ۲۰). چند مقاله مهم در اواخر دهه ۱۹۷۰ به بیان خواص ایمونوتوکسین‌ها در از بین بردن سلول‌ها پرداختند و سمت و سوی آینده این فناوری را تشکیل دادند. مطالعه ای در سال ۱۹۷۸ بیان کرد که توکسین دیفتری پتانسیل کشتن سلول‌های پستانداران را دارد و در ادامه دانشمندان به این یافته رسیدند که یک مولکول توکسین دیفتری میتواند یک سلول را بکشد. بنابراین پتانسیل توکسین دیفتری و توکسین‌های مشابه اثبات شدند. پتانسیل توکسین وابسته به طول عمر و پایداری داخل سلولی ناحیه آنزیمی توکسین است. در ابتدا اهمیت توکسین‌های پروتیینی تنها به عنوان فاکتورهای بیماریزایی باکتری‌ها یا سموم خورده شده در گیاهان سمی مطرح بود. سال‌ها بعد به صورت جالبی متوجه شدند که چندین نوع از این توکسین‌ها مکانیسم‌های بیوشیمیایی مشترکی مانند مهار سنتز پروتیین دارند. توکسین دیفتری و اگزوتوکسین سودوموناس مکانیسم‌های مشابهی دارند: آنها فاکتور طویل‌سازی ۲ (EF-2) را ADP ریبوزیله نموده و سنتز پروتئین را در مرحله طویل سازی مهار می کنند. پژوهشگران از این توکسین‌ها جهت ساخت ایمونوتوکسین‌ها ایده گرفته-اند (۲۱، ۲۴، ۲۵).

Thorpe و همکارانش اثبات نمودند که می‌توان از توکسین‌های پروتئینی برای کشتن انواع سلول‌های از پیش انتخاب شده، استفاده نمود. اما آنتی‌بادی‌های آنها جهت تهیه ایمونوتوکسین فعالیت ضعیفی داشتند (۲۴). بعدها با استفاده از همین رویکرد و استفاده از تکنولوژی آنتی‌بادی منوکلونال Kohler و Milstein ایمونوتوکسین‌هایی با اختصاصیت بهتر تولید شدند. این ایمونوتوکسین‌ها مشتق شده از ریسین، توکسین دیفتری و اگزوتوکسین سودوموناس بودند (۲۵و۲۶). pA پروتئینی با وزن مولکولی ۸۳ کیلودالتون و متشکل از ٤ دمین که از طریق انتهای کربوکسیل خود به گیرنده‌های سطح سلول از جمله UpA متصل شده، پس از ایجاد منفذ در غشای سلول سبب ورود زیر واحد های LF و EF توکسین به درون سلول می-گردد. uPA سرین پروتئاز موجود در سلول های یوکاریوتیک با توانایی تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین، دارای گیرنده سطح سلولی (uPAR) و اثر گذار بر پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. بیان بالای uPA و گیرنده سطح سلولی آن نشانه‌ای مبتنی بر وجود تومورهای مختلف سرطانی است و به ندرت در سلول‌های نرمال بدن بیان می‌شوند. این پروتئین نقش اساسی در تجزیه ماتریکس بیرون سلولی، مهاجرت و ترمیم سلول دارا می‌باشد. بنابراین با ایجاد جهش در ژن PA می‌توان پروتئینی تولید نمود که فقط به سلول‌های که دارای بیان بالای uPA می‌باشد اتصال گردد. در مطالعه‌ای که مقبلی و خلعتبری در سال ۱۳۹۸ انجام دادند توانستند با استفاده از جهش نقطه-ای با تکنیک Single Overlap Extension PCR پروتئین PA تولید نمایند تا بتواند فقط به سلول‌هایی که دارای بیان بالای uPA می‌باشد متصل گردد (۱، ٤، ۸، ۱۰، ۱۲).

پژوهش حاضر با هدف تولید ایمونوتوکسینی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی، برای اولین بار در ایران انجام گردید. در این پژوهش اثر پروتئین rPAm و rLF بر روی چهار رده سلولی سرطانی (کارسینومای ریه انسانی، سلول‌های سرطان سینه انسانی، آدنوکارسینومای پانکراتیک انسانیو سرطان پروستات انسانی) و رده سلولی کلیوی به عنوان کنترل منفی از طریق آزمایش MTT مورد بررسی قرار گرفت. در این

تست، به سلول‌ها مقادیر ۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ نانوگرم از rLF ترکیب شده با مقدار ۵۰ نانوگرم rPAm به هر چاهک اضافه گردید. به عنوان کنترل از ترکیب ۵۰ نانوگرم PA طبیعی (nPA) با ۵۰ نانوگرم rLF استفاده شد. MTT اکسید شده در طول موج ۵۷۰ با ریدر ELISA-reader, Organon-Teknika, Netherland اندازه‌گیری شد. میزان توکسیسیتی ایجاد شده با فرمول ذکرشده محاسبه گردیدو نتایج نشان داد که میزان صفر نانو گرم کمترین تاثیر را در زنده‌مانی سلول‌های سرطانی داشت ولی مقادیر ۲۵ و ۵۰ و ۷۵ نانوگرم تاثیر چشمگیری بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی داشتند و از میان آنها میزان ۷۵ نانوگرم rLF بیشترین تاثیر را داشت.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از تست سلولی MTT نشان داد که این پروتئین سبب کاهش درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی می‌شود به نحوی که مقدار صفر نانوگرمی آن هیچ تاثیر کشندگی معناداری در سطح اطمینان ۹۵ درصد بر روی سلول‌های مورد بررسی نشان نداد ولی مقادیر ۲۵ تا ۷۵ نانوگرمی پروتئین سبب کاهش معنادار درصد زنده‌مانی سلول-های سرطانی در سطح اطمینان ۹۵ درصد شد.

نتیجه‌گیری

بررسی میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب LF و PA در *باسیلوس سوبتیلیس* با استفاده از روش برادفورد و SDS PAGE انجام گردید. نتایج تست سلولی MTT نشان داد که میزان صفر نانوگرم کمترین تاثیر را در زنده‌مانی سلول‌های سرطانی داشت ولی مقادیر ۲۵ و ۵۰ و ۷۵ نانوگرم تاثیر چشمگیری بر زنده‌مانی سلول-های سرطانی داشتند و از میان آنها میزان ۷۵ نانوگرم rLF بیشترین تاثیر را داشت. نتایج آنالیز آزمون‌های ANOVA، Tukey HSD، Pearson، T test و بررسی اختلاف بین گروه‌های مختلف با سلول کلیوی به عنوان کنترل منفی نشان داد که این پروتئین سبب کاهش درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی می‌شود به نحوی که مقدار صفر نانوگرمی آن هیچ تاثیر کشندگی معناداری در سطح اطمینان ۹۵ درصد بر روی سلول‌های مورد بررسی نشان نداد. افزایش میزان پروتئین سبب کاهش میانگین زنده‌مانی سلول‌ها شده است. همچنین مقادیر ۲۵ تا ۷۵ نانوگرمی پروتئین سبب کاهش معنادار درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی در سطح اطمینان ۹۵ درصد شد. در مقدار ۷۵ نانوگرمی از پروتئین نوترکیب کمترین میانگین زنده مانی سلول‌ها ۸/۲۴ ± ۲۵/۸۸ به دست آمد. این نتایج نشان داد می‌توان از پروتئین LF و پروتئین جهش یافته PA به عنوان عاملی در جهت از بین بردن سلول‌های سرطانی استفاده نمود. به دلیل شیوع بالای سرطان در جهان لزوم دست یابی به یک داروی موثر و جامع لازم است. این نتایج، درمان باکتریایی سرطان را به عنوان درمانی امید بخش برای سرطان مطرح می سازد. با توجه به ناتوانی درمان‌های مرسوم مانند شیمی درمانی و اشعه درمانی در مراحل پیشرفته تومور، مقاومت به درمان و عدم اختصاصیت شیوه‌های رایج درمان، امید است که با تولید توکسین‌های هدفمند مانند ترکیب mPA و LF بتوان یک بعد جدید به درمان سرطان اضافه شود.

منابع

1. Abi-Habib R.J., Singh R., Liu S., Bugge T.H., Leppla S.H., Frankel A.E.(2006), A Urokinase-Activated recombinant anthrax toxin is selectively cytotoxic to many human tumor cell types. *Molecular Cancer Therapy*, 5(10): 2556-2562.

2. Abrami L., Kunz B., Vander Goot F.G. (2010), Anthrax toxin triggers the activation of src-like kinases to mediate its own uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 1420-1424.

3. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals in Biochemistry*, 72*:* 248-254

4. Bromberg-White J., Lee C.S., Duesbery N. 2010. Consequences and utility of the Zinc-Dependent metalloprotease activity of anthrax lethal toxin. *Toxins*, 5: 1038-1053.

5. Chen K.H., Liu S., Leysath C.E., Miller-Randolph S., Zhang Y., Fattah R., Bugge T.H., Leppla S.H. 2016. Anthrax toxin protective antigen variants that selectively utilize either the CMG2 or TEM8 receptors for cellular uptake and tumor targeting. *Journal of Biology and Chemistry*, 291: 22021-22029.

6. Duesbery N.S., Webb C.P., Leppla S.H. 1998. Proteolytic inactivation of MAP-Kinase-Kinase by Anthrax Lethal Factor. *Science*, 280:734-737.

7. Baillie L.W., Huwar T.B., Moore S. 2010. An anthrax subunit vaccine candidate based on protective region of B. anthracis protective antigen and lethal factor. *Vaccine*, 28: 6740-6748

8. Liu S., Schubert R.L., Bugge T.H., Leppla S.H. 2003. Anthrax toxin: structures, functions and tumour targeting. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5: 843-853.

9. Gholami M., Moghbeli M., Kafilzadeh, F., Kargar M., Torbati M.B., Tavizi A., Eslami Z. 2021. Production of recombinant lethal factor of Bacillus anthracis in Bacillus subtilis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 51(1): 9-15.

10. Liu S., Aaronson H., Mitola D.J., Leppla S.H., Bugge T.H. 2003. Potent antitumor activity of a urokinase-activated engineered anthrax toxin. *PNAS*, 2: 657-662.

11. Liu S., Moayeri M., Leppla S.H. 2014. Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 6:317-325.

12. Martin EW, Buzza MS, Driesbaugh KH, Liu S, Fortenberry YM, Leppla SH, Antalis TM. 2015. Targeting the membrane-anchored serine protease testis in with a novel engineered anthrax toxin prodrug to kill tumor cells and reduce tumor burden. *Oncotarget*, 32: 33534-33553.

13. Minchinton A.I., Tannock I.F. 2006. Drug penetration in solid tumors. *National Review of Cancer*, 6:583–592.

14. Neil S. 2010. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Natural Review of Cancer*, 10(11): 785-794.

15. Patyar S., Joshi R., Prasad Byrav D.R., Prakash A., Medhi B., Das B.K. 2010. Bacterial in cancer therapy: anovel experimental strategy. Journal of Biomedical Sciences, 17(1): 21.

16. Ryan R.M., Green J., Lewis C.E. 2006. Use of bacteria in anticancer therapies. *Bioassays*, 28(1): 84-94.

17. Sai L., Xiaoping X., Xin Z., Longjiang L., Qianmimng C., Jing L. 2014. Tumor-targeting bacterial therapy: A potential treatment for oral cancer. *Oncology Letters*, 8(6): 2359-2366.

18. Sambrook J.F., Russell D.W. 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold spring harbor Laboratory Press, 2100 pp.

19. Smith H., Keppie J., Stanley J.L. 1995. The Chemical Basis of the Virulence of Bacillus anthracis. V. The Specific Toxin Produced by *Bacillus anthracis* in vivo. *British Journal of Experimental Pathology*, 5: 460-472.

20. St Jean A.T., Zhang M.M., Forbes N.S., 2008. Bacterial therapies: completing the cancer treatment toolbox. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(5): 511-517.

21. Sun Z., Fu Y.X. and Peng H. 2018. Targeting tumor cells with antibodies

enhances anti-tumor immunity. *Biophysics Reports*, 4(5): 243-253.

22. Taherianfard A., Hasan F., Bandehpour M., Mosaffa N., Mashhadi Abbas F., Hameed A. 2010. Cloning and expression of C-terminal of Clostridium perfringens type A enterotoxin and its biological activity. *African Journal of Microbiology Research*, 4(14): 1469-1474.

23. Wein A.N., Liu S., Zhang Y., McKenzie A.T., Leppla S.H. 2013. Tumor therapy with a urokinase plasminogen activator-activated anthrax lethal toxin alone and in combination with paclitaxel. Invest New Drugs. 31:206-212.

24. Williams S.A., Merchant R.F., Garrett-Mayer E., Isaacs J.T., Buckley J.T., Denmeade S.R. 2007. A prostate-specific antigen-activated channel-forming toxin as therapy for prostatic disease. *Journal of National Cancer Institute*, 99(5):376-385.

25. Xu J., Liu X.S., Zhou S.F., Wei M.Q. 2009. Combination of immunotherapy with anaerobic bacteria for immunogene therapy of solid tumours. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 13: 36-52.

26. Yaghoobi H., Bandehpour M., Kazemi B. 2015. Designing and Cloning of cytolethal distending toxin B as Biological Tool against cancer. 10th International Breast Cancer Congress, p: 113