مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره دوم (پیاپی ۳۵) تابستان ۱۳۹۷
صفحات ۱۴۲-۱۳۲

Original Article

# اثرات سمیت سلولی پروتئین کریستالی توکسین *باسیلوس تورنجینسیس* بر روی انگل *لیشمانیا تروپیکا*

**نغمه فریدونی[۱]، الهام معظمیان[۲*]، منوچهر رسولی[۳]**

[۱] کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، [۲] استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران، [۳] استادیار، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

## چکیده

*سابقه و هدف:* لیشمانیوز گروهی از بیماری های عفونی هستند که توسط انگل داخل سلولی اجباری از جنس *لیشمانیا* از راسته کینتوپلاست داران ایجاد می گردد. استفاده از عوامل کنترل کننده زیستی-میکروبی به عنوان یکی از روش های جایگزین درمانی عفونت های لیشمانیایی توسعه یافته است. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر فعالیت های پروتئین های کریستالی *باسیلوس تورنجنسیس* علیه انگل *لیشمانیا تروپیکا* می باشد.

*مواد و روش ها:* در این مطالعه مقطعی-توصیفی، ٤٧ جدایه باکتری *باسیلوس تورنجنسیس* از نمونه های خاک مناطق مختلف استان فارس بر اساس ویژگی های فنوتیپی، رنگ آمیزی توکسین کریستالی، مشاهده با میکروسکوپ نوری و شناسایی مولکولی جداسازی شدند. پس از هضم آنزیمی توکسین های جداسازی شده با استفاده از پروتئیناز K، فعالیت سیتوسیدالی آنها بر روی گونه *لیشمانیا تروپیکا* ارزیابی گردید. جدایه هایی که بیشترین تاثیر توکسیسیتی را داشتند، با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز نوع توکسین مشخص گردید.

*یافته ها:* در این مطالعه، یک جدایه با بیشترین ویژگی سیتوسیدالی بر روی گونه *لیشمانیا تروپیکا* شناسایی گردید. توکسین کریستالی Cry1 جدایه 35sb بر روی این گونه *لیشمانیا* موثر بود. این توکسین در غلظت $10^{-1}$ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین خاصیت سیتوسیدالی (حدود ٤٠ درصد) را داشت. اثرات سیتوپاتیک پروماستیگوت های تیمار شده با توکسین کریستالی به صورت کوتاه و متورم شدن مشاهده گردید.

*نتیجه گیری:* با توجه به نتایج این پژوهش، پیشنهاد می گردد که پروتئین های کریستالی *باسیلوس تورنجینسیس* می توانند با انجام مطالعات تکمیلی به عنوان یک کاندیدای مناسب در درمان بیماری لیشمانیوز مطرح باشند.

*واژگان کلیدی: باسیلوس تورنجینسیس*، پروتئین کریستالی، پروماستیگوت، *لیشمانیاتروپیکا*.

دریافت مقاله: تیر ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۶

## مقدمه

لیشمانیوز گروهی از بیماری های عفونی هستند که توسط انگل تک یاخته ای داخل سلولی اجباری از جنس *لیشمانیا* (*Leishmania*) از راسته کینتو پلاستداران (*Kinetoplastis*) و خانواده تریپانوزوماتیده (*Tripanosomatid*) ایجاد می گردد، که عموماً توسط گونه های پشه خاکی ماده منتقل می شوند. این بیماری در ۸۸ کشور جهان به عنوان مشکل بهداشتی اندمیک است (۱). ارگانیسم ایجاد کننده بیماری بر اساس انتشار جغرافیایی آنها، لیشمانیوز دنیای جدید یا قدیم اطلاق می شود و تعداد موارد جدید سالیانه دو میلیون نفر تخمین زده شده است. به طوری که یک و نیم میلیون مورد لیشمانیوز جلدی

*) آدرس برای مکاتبه: شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۷۷۱۱۰۹۹٤ پست الکترونیک: moazamian@iaushiraz.ac.ir

(سالک) و پنجاه هزار مورد شامل اشکال احشایی می باشد (۲). حساسیت به بیماری لیشمانیوز عمومیت دارد. ابتلای به عفونت ناشی از *لیشمانیا تروپیکا* (*Leishmania tropica*) و *لیشمانیا ماژور* (*Leishmania major*) ممکن است مصونیت همیشگی را به دنبال دارد. اما مقاومت در مقابل سایر گونه های *لیشمانیا* ممکن است ایجاد نشود. مصونیت حاصله در اثر فعالیت بازوی ایمنی سلولی بروز می نماید (۲). *باسیلوس تورنجینسیس* (*Bacillus thuringiensis*) باکتری گرم مثبت، بی هوازی اختیاری، تولید کننده اسپور و از اعضای خانواده باسیلاسه (Bacillaceae) می باشد. کریستال های پروتئینی باکتری *باسیلوس تورنجیسیس* در شکل و اندازه های مختلفی توسط باکتری تولید می شوند و بر دو نوع متفاوت کرای (Cry) و سیت (Cyt) می باشند. پروتئین های این باکتری فعالیت قوی در برابر انگل های نماتودای مشخص در شرایط آزمایشگاهی و در بدن موجودات زنده دارند (۳). *باسیلوس تورنجینسیس* از لحاظ زیستی در برابر انگل ها فعال است و غربالگری *باسیلوس تورنجنسیس* از پروتئین های در بردارنده پاراسپورال ها برای تحقیقات بیشتر بر روی فعالیت زیستی آنها در برابر انگل های پروتوزوآ بسیار ضروری می باشد (٤). برخی از سویه های *باسیلوس تورنجینسیس برای نماتودها و پروتوزوآ ها نیز سمی می باشند* (۵). امروزه استفاده از عوامل زیستی میکروبی کنترل کننده به عنوان روش های جایگزین درمانی توسعه یافته است (٦ و ۷). حنان (Hanan) و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص نمودند که دلتاتوکسین *باسیلوس تورنجینسیس* بر علیه پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* موثر می باشد، اما مکانیسم ضد لیشمانیایی این توکسین شناسایی نشده است (۸). هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ضد لیشمانیایی توکسین کریستالی *باسیلوس تورنجینسیس* علیه انگل *لیشمانیاتروپیکا* بود.

## مواد و روش ها

*الف) جداسازی و شناسایی باکتری:* به منظور جداسازی باکتری *باسیلوس تورنجینسیس* از خاک های نسبتاً مرطوب، تعداد ۱۰۱ نمونه خاک از عمق ۵ تا ۱۰ سانتی متری از استان فارس (شیراز، کازرون، مرودشت، کنارتخته، فسا، قلات) جمع آوری گردید. نمونه ها در کیسه های پلاستیکی استریل در دمای ٤ درجه سلیسیوس تا زمان استفاده نگهداری شدند. به منظور جداسازی باکتری از روش تغییر یافته سازمان بهداشت جهانی استفاده گردید. در این روش ۵ گرم از نمونه خاک در فویل آلومینیومی قرار داده شد و به مدت ۵ ساعت در آون با دمای ۹۰ درجه سلیسیوس نگهداری شد. در ادامه، ۱ گرم از خاک به ۹ میلی لیتر سرم نمکی اضافه شد. ۱ میلی لیتر از این محلول در حمام بخار با دمای ۸۰ درجه سلیسیوس به مدت ۱۲ دقیقه قرار داده شد. سپس بر روی محیط نوترینت آگار (کیولب-کانادا) کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ٢٤ ساعت نگهداری گردید. سویه استاندارد *باسیلوس تورنجینسیس* PTCC1493 از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های صنعتی ایران تهیه گردید. پس از ٢٤ ساعت، کلنی های شبیه باکتری *باسیلوس تورنجینسیس* جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفتند (۹). جداسازی باکتری *باسیلوس تورنجینسیس* با استفاده از مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی گرم و مشاهده توکسین کریستالی انجام شد. پس از کشت باکتری در محیط ایجاد کننده اسپور و ورود باکتری به مرحله اسپورزایی، رنگ آمیزی توکسین باکتری انجام گرفت. در این روش نمونه باکتری بر روی لام شیشه ای تثبیت گردید و سپس با محلول حاوی رنگ ۰/۳۳۱ درصد بریلینت آبی که در استیک اسید ۵۰ درصد حل شده، رنگ آمیزی شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۱۰۰، توکسین باکتریایی مشاهده گردید (۱۰).

*ب) جداسازی پروتئین های کریستالی:* به منظور جداسازی پروتئین های کریستالی، ابتدا رسوب باکتری با استفاده از نمک طعام و ۰/۱ درصد تریتون X-100 (مرک، آلمان) شسته شد. سپس جداسازی توکسین با بافر حاوی کربنات سدیم (۵۰ میلی مولار و pH ۱۰) همراه با دی تیو تریتول (۱۰ میلی مولار) (مرک، آلمان) و اتیلن دی آمین ترا استیک (۱ میلی مولار) انجام گرفت (۱۱) .

*ج) هضم آنزیمی پروتئین:* پروتئین های جداسازی شده، با آنزیم

پروتئیناز K (مرک، آلمان) با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر هضم گردید و در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۹۰ دقیقه گرماگذاری شد. برای توقف فعالیت پروتئازی از فنیل متیل سولفونید فلوراید یک میلی مولار (سیگما، آمریکا) استفاده گردید (۱۱ و ۱۲).

*د) کشت انگل: لیشمانیا تروپیکا* از بخش انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز با کد (MHOM/IR/90/Shiraz) تهیه گردید. کشت اولیه انگل بر روی محیط دوفازی ناوی –مک نیل–نیکل (Novy-Mac Neal-Nicolle) انجام شد. نمونه ها در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس نگهداری شدند. تولید انبوه انگل در محیط (RPMI-1640 گیبکو، دانمارک) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد پنی سیلین–استرپتومایسین انجام گرفت (۱۳).

*ه) سنجش سیتوپاتیک انگل:* مقدار ۹۰ میکرولیتر از انگل های کشت داده شده (به تعداد $10^6$) به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه ای اضافه گردید. سپس انگل ها با توکسین های استخراج شده از ۴۷ نمونه باکتری با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر به صورت سه بار تکرار تیمار شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. سپس جدایه ای که بیشترین تاثیر سیتوتوکسیسیتی بر روی انگل ها داشت انتخاب گردید و با غلظت های مختلف توکسین (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) بر روی این گونه انگل مورد ارزیابی قرار گرفت. MTT یک روش رنگ سنجی است که اساس آن احیا شدن و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول (۳–۴ و دی متیل–۲– تترازولیل–۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید) می باشد. در این مطالعه، مقدار ۵ میلی گرم پودر زرد رنگ (MTT مرک، آلمان) به ۱ میلی لیتر بافر (PBS مرک، آلمان) با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر (۰/۰۱۱۴ گرم از $Na_2HPO_4$، ۰/۰۰۲۷ گرم از $KH_2Po_4$، ۰/۰۰۲۲ گرم از اسید کلریدریک و ۰/۰۸ گرم از نمک طعام در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر) اضافه گردید. پس از حل کردن کامل، محلول از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد تا کاملاً استریل شده و ذرات نامحلول احتمالی موجود در آن حذف شوند. به منظور انجام آزمون MTT بر روی گونه *لیشمانیای* تیمار شده با توکسین پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، به هر چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT اضافه گردید. پلیت های یاد شده دوباره به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. در ادامه، پلیت ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰ در دمای ۴ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ شدند. رسوب حاوی سلول ها در ته پلیت جمع آوری شدند. کریستال های فورمازان در آب غیرمحلول هستند و باید قبل از رنگ سنجی توسط حلالی مانند ایزوپروپانول به حالت محلول درآید. به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از ایزوپروپرانول (سیگما، آلمان) اضافه گردید. سپس پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی تکان داده شد.خوانش جذب حاصل در طول موج ۶۳۰–۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه قرائت کننده الایزا (گارنیکو، ایران) انجام شد و نتایج ثبت گردید (۱۳). سپس درصد زنده مانی سلول ها و میزان توکسیسیتی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۴):

درصد زنده مانی= میانگین جذب توکسیکانت/میانگین جذب کنترل منفی × ۱۰۰

درصد توکسیستی= درصد زنده مانی– ۱۰۰

*و) تصویربرداری با میکروسکوپ معکوس:* به منظور مشاهده اثرات سیتوپاتیک، تصویر برداری از انگل ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس (اولیمپوس، فیلیپین) انجام گرفت.

*ز) استخراج ژنوم باکتریایی:* استخراج DNA به روش ذوب و انجماد انجام شد. به طور خلاصه، ابتدا باکتری در محیط مایع نوترینت براث (کیولب، کانادا) ۱۸ ساعت کشت داده شد. مقدار ۱ سی سی از سوسپانسیون حاوی باکتری به میکروتیوپ های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. سپس با دستگاه میکروسانتریفیوژ به مدت ۳ دقیقه با دور ۳۵۰۰ rpm، باکتری رسوب داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به رسوب اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه ورتکس گردید. محلول حاوی رسوب، به مدت ۱ ساعت در فریزر ۷۰– درجه سلیسیوس قرار گرفت. در ادامه میکروتیوپ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلیسیوس انکوبه شد. در نهایت نمونه ها به مدت ۴۰ ثانیه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مقدار ۲۰ میکرولیتر از روماند حاوی DNA به میکروتیوپ استریل منتقل و به عنوان نمونه DNA

مورد استفاده قرار گرفت (۱۵).

*ح) شناسایی مولکولی جدایه های باسیلوس تورنجینسیس:* به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* باکتریایی از پرایمرهای اختصاصی موجود در جدول ۱ استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلی مراز با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۸ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۵/۲ میکرولیتر بافر PCR با غلظت 10X، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ پیکومول بر میکرولیتر)، ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA پلی مراز (سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر) انجام گرفت (۱٤ و ۱٦). واکنش PCR در دستگاه ترمال سیکلر (BioRAD) با شرایط واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی DNA ژنومی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ٥٤ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٤ دقیقه انجام گردید. واکنش PCR برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

*ط) شناسایی توکسین:* به منظور شناسایی نوع توکسین در جدایه ای که بیشترین اثر کشندگی را داشت از پرایمرهای اختصاصی ژن های *cry1* و *cry2* استفاده گردید (جدول ۱). واکنش PCR در دستگاه ترمال سیکلر (BioRAD) برای ژن *cry1* با شرایط واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۳ دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی DNA ژنومی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ٥٤ درجه سلیسیوس به مدت ٤٥ ثانیه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. همچنین چرخه دمایی برای تکثیر ژن *cry2* شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٤ دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی DNA ژنومی در دمای ۹٥ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ٦٥ درجه سلیسیوس به مدت ٤٥ ثانیه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه بود (۱٦). در نهایت محصولات واکنش جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

*ی) آنالیز آماری:* از آنجایی که نمونه های خاک از مناطق مختلف کشور جمع آوری شده است و با توجه به اینکه در این پروژه شرایط آب و هوایی یکی از فاکتورهای مهم در جداسازی است، در نتیجه در بخش آماری، نحوه پراکندگی آماری در وضعیت های مختلف به کمک نسخه هجدهم نرم افزار *SPSS* مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه از آزمون آماری مربع کای،آزمون تی مربوط به میانگین ها و ANOVA مربوط به آنالیز واریانس یک طرفه میانگین استفاده شد. همچنین نتایج کشت انگل و تیمار آن با توکسین با استفاده از نسخه ششم نرم افزار *Prism* بررسی گردید.

جدول ۱: توالی پرایمر های استفاده شده در مطالعه.

| نام ژن | توالی پرایمر | اندازه قطعه (جفت باز) |
|---|---|---|
| ***16S rRNA*** | 27F: 5'-CATGATTCATGCGGCAGATAAAC-3'<br>1492R: 5'-TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT- 3' | ۱۱۷۸ |
| ***cry1*** | F: 5'-CATGATTCATGCGGCAGATAAAC-3'<br>R: 5'-TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT-3' | ۲۷۸ |
| ***cry2*** | F: 5'-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG-3'<br>R: 5'-CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT-3' | ۷۰۲ |

## یافته ها

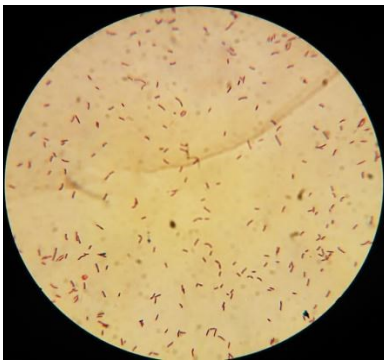
*الف) شناسایی فنوتیپی جدایه های باکتریایی:* از ۱۰۱ نمونه خاک جمع آوری شده در ۷ منطقه از استان فارس با شرایط جغرافیایی و آب و هوایی متفاوت، تعداد ٤٤٤٦ کلنی حاصل گردید که در مراحل اولیه بر اساس تفاوت های ظاهری و شکل

کلنی، جداسازی شدند. از این میان تعداد ۱۵۹۸ کلنی، مشابه کلنی سویه استاندارد *باسیلوس تورنجینسیس* PTCC1493 بود. ۵۳۲ کلنی مشابه کلنی *باسیلوس تورنجینسیس* که در مرکز حالت برآمده شبیه به تخم مرغ نیمرو به رنگ کرم و مات بودند انتخاب شدند. در نهایت تعداد ٤٧ جدایه *باسیلوس تورنجینسیس* جداسازی گردید (شکل ۱).

*ب) تاثیر توکسین باسیلوس تورینجنسیس بر روی انگل لیشمانیا تروپیکا:* در این مطالعه، *لیشمانیا تروپیکا* با توکسین فعال شده ٤٧ جدایه *باسیلوس تورینجنسیس* با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر تیمار گردید. از میان ٤٧ نمونه تیمار شده با توکسین فعال شده، نمونه 35sb بیشترین اثر کشندگی را بر روی *لیشمانیا تروپیکا* داشت. این جدایه از خاک شیراز جداسازی شده بود (نمودار ۱). سپس *لیشمانیا تروپیکا* با توکسین جدایه 35sb که بیشترین فعالیت کشندگی را نشان داد، با غلظت های مختلف تیمار گردید. رده انگل *لیشمانیا* دوکی شکل هستند و به صورت چسبیده به هم مشاهده می شوند. سلول های تیمار شده با توکسین *باسیلوس تورنجینسیس*، به صورت از بین رفتن اتصال بین رده های انگل و کاهش حجم سلول و از بین رفتن شکل انگل و متلاشی شدن آن مشاهده گردید. نتایج نشان داد که در غلظت $10^{-1}$ میلی گرم بر میلی لیتر دارای بیشترین خاصیت سیتوسیدالی در حدود ٤٠ درصد می باشد که با توجه به نتایج آزمون های آماری انجام شده درجه آزادی ۱ و $p<0/05$ معنی دار می باشد. از این رو فرضیه موثر بودن توکسین *باسیلوس تورنجینسیس* در درمان علیه بیماری لیشمانیوز در شرایط آزمایشگاهی تایید گردید. سویه استاندارد تهیه شده در این پژوهش فاقد اثر لیشمانیایی بود.

*ج) اثرات سیتوپاتیک ۳۵sb بر روی لیشمانیا تروپیکا:* اثرات سیتوپاتیک توکسین فعال شده جدایه 35sb بر روی *لیشمانیا تروپیکا* با استفاده از میکروسکوپ معکوس و نوری عکسبرداری و ثبت گردید. نتایج نشان داد که تغییرات سیتوپاتولوژیکی با کاهش و کوتاه شدن یا متورم شدن پروماستیگوت ها آغاز می شود. به دنبال این تغییر کندی

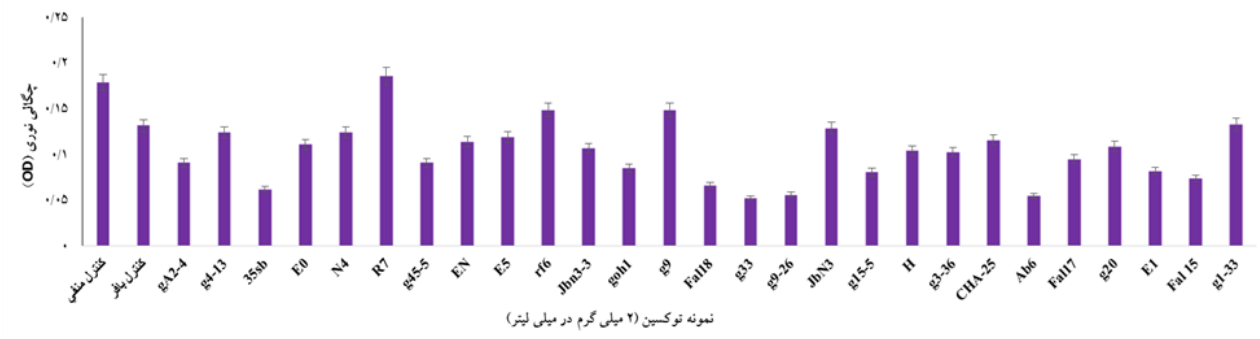
الف



ب

ج

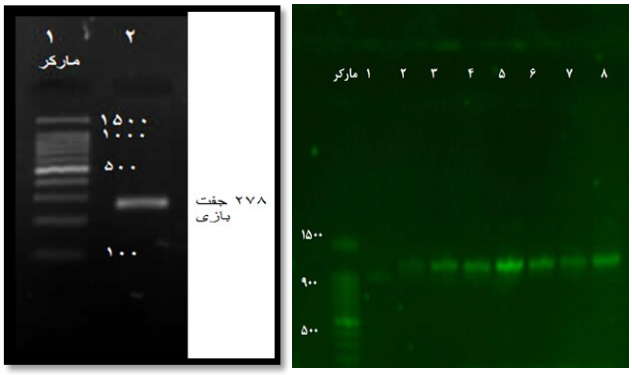
شکل ۱: الف) کلنی *باسیلوس تورنجینسیس*، ب) ساختار باکتری، ج) ساختار توکسین کریستالی. توکسین تیره و اسپور شفاف دیده می شود.




نمودار ۱: تاثیر توکسین باکتری های جداسازی شده با غلظت ۲ میلی گرم/میلی لیتر بر روی *لیشمانیا تروپیکا*.

حرکت و تکمیل تورم و آماس نمایان گردید. پروماستیگوت های تغییر شکل یافته از حالت دوکی شکل به کروی تبدیل شدند (شکل ۲).

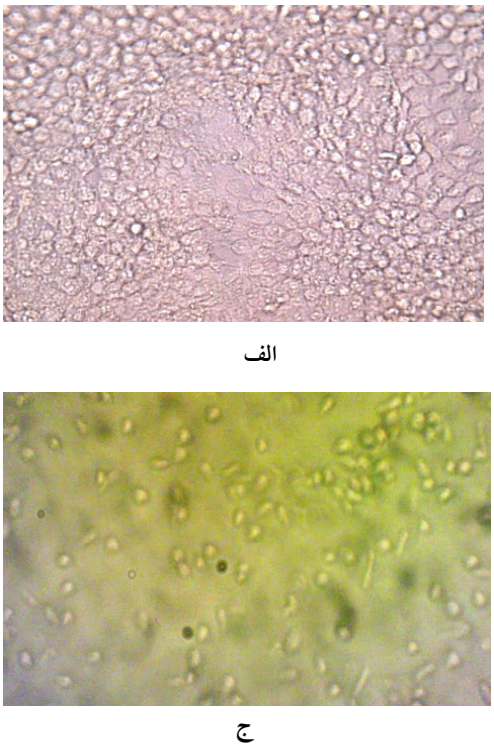
*د) شناسایی مولکولی باکتری و تعیین نوع توکسین:* نتایج PCR حاکی از تکثیر قطعه ۱۱۷۸ جفت بازی با استفاده از پرایمر *16S rRNA* بود. تعیین توالی باکتری جداسازی شده نشان داد که باکتری مربوط به گونه *باسیلوس تورنجینسیس* می باشد. همچنین نتایج PCR حاکی از تکثیر قطعه ۲۷۸ جفت بازی با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن کد کننده توکسین *cry1* بود (شکل ۳). در این مطالعه هیچ کدام از باکتری ها دارای ژن کد کننده توکسین *cry2* نبودند.




شکل ۳: نتایج الکتروفورز حاصل از .PCR سمت راست: ستون ۸-۱ جدایه های *باسیلوس تورنجینسیس* با اندازه ۱۱۷۸ جفت باز که مرتبط با تکثیر ژن *16S rRNA*می باشد. سمت چپ: ستون ۱) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲) جدایه 35sb با اندازه ۲۷۸ جفت بازی که مربوط به توکسین *cry1* می باشد.

## بحث

لیشمانیوز بیماری انگلی است که به وسیله جنس *لیشمانیا* ایجاد می شود و به اشکال جلدی، جلدی مخاطی و احشایی دیده می شود. بروز سالانه این بیماری یک و نیم تا دو میلیون نفر، افراد در معرض خطر ۵۰۰ میلیون نفر می باشد. این بیماری در ۸۸ کشور جهان به صورت اندمیک وجود دارد و ایران یکی از مناطق اندمیک می باشد (۱۷).




شکل ۲: الف) عکسبرداری با میکروسکوپ معکوس کنترل منفی، ب) عکسبرداری با میکروسکوپ معکوس انگل *لیشمانیا تروپیکا* تیمار شده با توکسین، ج) عکسبرداری با میکروسکوپ نوری نمونه کنترل منفی، د) عکسبرداری با میکروسکوپ نوری انگل *لیشمانیا تروپیکا* تیمار شده با توکسین (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر از ۴۸ ساعت).

در این مطالعه، ٤٧ جدایه باکتری *باسیلوس تورنجنسیس*، از نمونه های خاک مناطق مختلف استان فارس بر اساس ویژگی های فنوتیپی جداسازی شدند.

معظمیان (Moazzamian) و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش نمودند که میزان جدایه های *باسیلوس تورنجینسیس* از نمونه های خاک مناطق مختلف ایران بین ۲۳/۸ درصد (نمونه خاک باغ های شیراز) تا ۱/۱ (نمونه خاک مرکز شهر تهران) متفاوت است (۱۸). این تعداد با نتایج حاصل شده از خاک کشورهای آسیایی مانند ژاپن، کره و ویتنام مشابهت دارد (۱۹ و ۲۰). در سال ۲۰۰۰ میزوکی (Mizuki) موفق به جداسازی سویه A1190 شد که قادر به تولید پروتئین Cry با وزن مولکولی ۸۱ کیلو دالتون بود و همچنین فعالیت ضد سرطانی داشت. این مسئله منجر به دسته بندی جدید پروتئین های پاراسپورال گردید. به طوری که پاراسپورین نام گرفت و به عنوان پروتئینی که توانایی کشندگی سلول های سرطانی را دارد تعریف گردید (۲۱). پروتئین های گرفته شده از این سویه باکتریایی فعالیت قوی در برابر انگل های نماتودای مشخص در شرایط آزمایشگاهی و در بدن موجود زنده دارند. این پروتئین پاراسپورین ضمانتی بر توسعه تحقیقات بالینی آینده برای انسان و سایر مهره داران می باشد. در این سال میزوکی (Mizuki) و همکاران تاثیر پاراسپورین را بر روی سلول های MOLT-4 و HeLa مورد بررسی قرار دادند و نتیجه آن تاثیر ده برابری توکسین بر روی سلول های MOLT-4 نسبت به سلول های HeLa سلول های T نرمال بود (۲۱).

در سال ۲۰۱۵ اوکاسو (Okassov) و همکاران پروتئین پاراسپورین را استخراج و اثر سیتوتوکسیک آن را بر روی سلول های لوسمی T-Cell انسان بررسی نمودند (١٦). در مطالعه حاضر، پس از هضم آنزیمی توکسین های جداسازی شده با استفاده از پروتئیناز K، فعالیت سیتوسیدالی آنها بر روی *لیشمانیا تروپیکا* ارزیابی گردید. جدایه هایی که بیشترین تاثیر توکسیسیتی را داشتند با روش مولکولی نوع توکسین آنها *cry1* شناسایی گردید. پارک (Park و همکاران با روش PCR اثبات کردند که پروتئین کریستالی Cry1 *باسیلوس تورینجنسیس* دارای وزن های مولکولی متفاوت ۲۱/۵، ۳۱، ٤٥، ٥٨ و ٦٦ کیلو دالتون می باشد (۲۲). در این مطالعه، *باسیلوس تورنجینسیس* 35sb دارای توکسین Cry1 با بیشترین ویژگی سیتوسیدالی بر روی گونه *لیشمانیا تروپیکا* حاصل گردید. نتایج نشان داد که این سویه در غلظت ۱-۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر دارای بیشترین خاصیت سیتوسیدالی در حدود ٤٠ درصد می باشد. اثرات سیتوپاتیک پروماستیگوت های تیمار شده با توکسین کریستالی به صورت کوتاه و متورم شدن مشاهده گردید. این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه کوندو (Kondo) مشابهت دارد (۲۳).

بر اساس مشاهدات در این تحقیق ممکن است تغییرات سیتوپاتیک به دلیل تاثیر پروتئین های سیتوتوکسین در غشای سلولی و سیتوپلاسم پروتئین های *لشیمانیا* در پروماستیگوت باشد. حنان (Hanan) و همکاران گزارش نمودند که در غلظت ٤/٩٥ میکروگرم بر میلی لیتر ٥٠ درصد از پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* از بین رفتند. اندازه پروماستوگیت ها به صورت محسوسی افزایش داشت، که این مساله می تواند به دلیل از دست دادن قابلیت کنترل نفوذپذیری غشا سلولی از طریق اتصالات Cry1 *باسیلوس تورنجینسیس* در گیرنده های سلولی باشد. درحالی که تغییرات سیتوپلاسمی به صورت دانه ای ریز شدن و یا آگلوتیناسیون آشکار می شود. این پدیده را می توان به آگلوتیناسیون پروتئین های سیتوپلاسمی ناشی از اختلالات یونی حاصل از هجوم یون های $Ca^{+2}$ و بالا رفتن مداوم غلظت کلسیم سیتوپلاسمی در سلول های حساس به توکسین ارتباط داد (۹ و ۲۳). پاسخ ایمنی محافظتی در لیشمانیوز یک پاسخ ایمنی سلولی قوی می باشد. اگرچه عفونت *لیشمانیایی* باعث القای پاسخ آنتی بادی نیز می گردد. اما به نظر می رسد که این آنتی بادی ها نقشی در محافظت علیه انگل نداشته باشند و در واقع اغلب با اشکال غیر بهبود یابنده بیماری همراه هستند (٢٤). در این تحقیق نیز مشابه نتایج کوندو و همکاران انگل های *لیشمانیای* تیمار شده با توکسین موثر، پس از گذشت ٤٨ ساعت ٦٪ الی ١٠٠٪ انگل ها از بین رفتند. سلول ها متورم شده حرکت بسیار کند و نهایتا ترکیده و از بین رفتند (۲۳).

آزمون آسیب شناسی سیتوپلاسمی در پروماستیگوت های موثر از *باسیلوس تورنجینسیس* این تحقیق نشان داده است که تغییرات آسیب شناسی یا پاتولوژیک از طریق چندین تغییر رخ می دهد. تغییرات سیتوپاتولوژیکی با کاهش و کوتاه شدن یا متورم شدن پروماستیگوت ها آغاز می شود. به دنبال این تغییر کندی حرکت و تکمیل تورم و آماس همراه با دانه های ریز سیتوپلاسمی نمایان می شود. پروماستیگوت های تغییر شکل یافته از حالت دوکی شکل به کروی تبدیل می شوند. سپس سلول ها می میرند و پس از آن تجزیه کامل سلولی آغاز می شود (۲۵). در این تحقیق، توکسین های کریستالی *باسیلوس تورینجنسیس*، موجب از بین رفتن پروماستیگوت ها می شوند. این تورم و آماس به عنوان یک علامت معمول سمیت سلول های انگلی با اندوتوکسین *باسیلوس تورنجینسیس* در نظر گرفته شده است. فعالیت ضد لیشمانیایی *باسیلوس تورینجنسیس*، یک یافته جدید است و رابطه آن با دیگر فعالیت های زیستی چون فعالیت همولیتیکی، لکتینی و سیتوتوکسینی این باکتری، در برابر سلول های سرطانی بدن انسان نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. به طور کلی استفاده از پروتکل های مشابه درمانی در این پژوهش در مقایسه با روش های درمانی گیاهی، قابل اعتمادتر و دوره آزمون کوتاه تری دارد، همچنین تفسیر نتایج نیز آسان تر می باشد. درمان فیزیکی شامل کورتاژ، برداشت ضایعه به وسیله جراحی، اشعه درمانی، گرما و یا سرما درمانی می باشد که با توجه به درمان های یاد شده عوارض جانبی این درمان ها بسیار بیشتر از درمان با این توکسین می باشد. *باسیلوس تورینجنسیس* از لحاظ زیستی در برابر انگل ها فعال می باشد. بنابراین غربالگری *باسیلوس تورینجنسیس* حاوی پروتئین های دربردارنده پاراسپورال ها در برابر انگل های پروتوزوآیی و اثرات آنها بر روی فعالیت زیستی پروتوزوها به خصوص *لیشمانیا* ضروری می باشد.

## نتیجه گیری

در این مطالعه اثرات ضد لیشمانیایی توکسین کریستالی باکتری *باسیلوس تورنجینسیس* بر روی انگل *لیشمانیا تروپیکا* ثابت گردید. بهترین تاثیر کشندگی بر روی انگل *لیشمانیا تروپیکا* برای جدایه 35sb *باسیلوس تورنجیسیس* با ٤٠٪ کشندگی حاصل گردید. توکسین *باسیلوس تورنجینسیس*، اتصال بین رده های انگل را از بین برد و به صورت کاهش حجم سلول و از بین رفتن شکل انگل و متلاشی شدن آن مشاهده گردید. هرچند که مکانیسم و نوع گیرنده آن نامشخص است. با توجه به نتایج حاصل از تغییرات ساختاری انگل *لیشمانیا تروپیکا* و نحوه عملکرد و عوارض کمتر توکسین *باسیلوس تورنجینسیس*، این روش می تواند مناسب تر از سایر روش های درمانی باشد. از این رو انجام پژوهش های گسترده تر تکمیلی به عنوان یک روش جایگزین درمانی پیشنهاد می گردد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دکتر غلامرضا حاتم جهت حمایت های اجرایی کمال امتنان را دارند. این مقاله حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد (کد تصویب ۱۳۹۳/۳۰۱٤/۲٤۷٤۸).

## References

1. Khan NH, Messenger LA, Wahid S, Sutherland CJ. Phylogenetic position of *Leishmania* isolates from Khyber Pakhtunkhwa province of Pakistan. Exp Parasitol. 2016; 24(167): 61-66.
2. Sarkari B, Ahmadpour NB, Motazedian MH, Mirjalali H, Akhoundi M, Mohebali M, Hajjaran H. Inter- and intraspecific variations of *Leishmania* strains isolated from patients with cutaneous and visceral leishmaniases in Fars province, south of Iran. Iran J Med Sci. 2016; 41 (3): 209-216.

**3.** Radosavljevic J, Naimov S. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against summer fruit tortrix (adoxophyes orana-fischer von rösslerstamm). J Invertebr Pathol. 2016; 14(138): 63-65.

**4.** Sobel JD, Nyirjesy P, Brown W. Tinidazole therapy for metronidazole-resistant *Vaginal trichomoniasis*. Clin Infect Dis. 2001; 33: 1341-1346.

**5.** Ozbilgin A, Harman M, Karakuş M, Bart A, Toz S, Kurt O, Çavuş I, Polat E, Gunduz C, Van Gool T, Ozbel Y. Leishmaniasis in Turkey: Visceral and cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* in Turkey. Acta Trop. 2017; 173: 90-96.

**6.** Ul Bari A. Chronology of cutaneous leishmaniasis: an overview of the history of the disease. J Prev Alzheimer's Dis. 2006; 16: 24-27.

**7.** Lainson R. The neotropical *leshmania* species: a brief historical review of their discovery ecology and taxonomy. Rev Pan –Amaz Saude. 2010; 2: 13-32.

**8.** Hanan A, El-Sadawy H, Abou El-Hag A, Janette M, Shaaban S, Hala A. In vitro activity of *Bacillus thuringiensis* (H14) 43 kDa crystal protein against *Leishmania major*. J Agric Environ Sci. 2008; 3(4): 583-589.

**9.** Santana MA, Moccia CC, Gillis AE. *Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples. J Med Microbiol. 2008; 75: 357-358.

**10.** Rampersad J. Ammons D. *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical result. BMC Microbiol. 2005; 24(5): 52.

**11.** Moazamian E, Bahador N, Rasouli M, Azarpira N. Ubiquity of parasporin producers in *Bacillus thuringiensis* natural population of Iran. Healthmed. 2012; 7(3): 971-975.

**12.** Brasseur K, Auger P, Asselin E, Parent S, Cote JC, Sirois M. parasporin-2 from a new *Bacillus thuringiensis* 4r2 strain induces caspases activation and apoptosis in human cancer cells. PLoS One. 2015; 10(8): 135.

**13.** Daneshbod Y, Oryan A, Davarmanesh M, Shirian S, Negahban S, Aledavood A, Davarpanah MA, Soleimanpoor H, Daneshbod K. Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. Arch Pathol Lab Med. 2011; 135(4): 478-482.

**14.** Biazar S, Moazamian E, Azarpira N. Cytocidal effects of *Bacillus thuringiensis* crystal protein on mice breast cancer cell line in in vitro condition. J Cell Tissue. 2017; 3: 243-250.

**15.** Porcar M, Deleclusse A, Ibarra JE, Juarez-Perez V. Early transcription of *Bacillus thuringiensis* cry genes in strains active on lepidopteran species and the role of gene content on their expression. Antonie Van Leeuwenhoek. 2014; 105(6): 1007-1115.

**16.** Okassov A, Nerseyan A, Kitada S, Ilin A. Parasporins as new natural anticancer agents. J Balkan Union Oncol. 2015; 20(1): 5-16.

**17.** Armijos RX. Weigel MM. Calvopina M. Hidalgo A. Cevallos W. Correa J. Safety, immunogenecity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus bcg adjuvant against new world cutaneous leishmaniasis. Vaccine. 2004; 22: 1320-1326.

**18.** Moazamian E, Bahador N, Rasouli M, Azarpira N. Isolation, characterization and serotype classification of *Bacillus thuringiensis* from different soil samples of Fars province. J Microb World. 2010; 3: 24-30 [In Persian].

**19.** Moazamian E, Bahador N, Rasouli M, Azarpira N, Kalani M. Investigation of cytocidal activity of *Bacillus thuringiensis* parasporal toxin on CCRF-CEM cell line. J Fasa Univ Med Sci. 2012; 2(4): 247-253.

**20.** Poornima K, Selvanayagam P, Shenbagarathai R. Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytocidal activity against cancer cells. J Appl Microbiol. 2010; 109: 348-354.

**21.** Mizuki E, Park YS, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, Higuchi K, Ohba M. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. Clin Diagn Lab Immunol. 2000; 7(4): 625- 634.

**22.** Park HW, Bideshi DK, Federici BA. Molecular genetic manipulation of truncated Cry 1c protein synthesis in *Bacillus thuringiensis* to improve stability and yield. Appl Environ Microbiol. 2000; 66: 4449-4455.

**23.** Kondo S, Mizuki E, Akao T, Ohba M. Antitrichomonal strains of *Bacillus thuringiensis*. Parasitol Res. 2002; 88: 1090-1092.

**24.** Cappello M, Bungiro RD, Harrison LM. A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hookworm parasite *Ancylostoma ceylanicum.* Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103: 15154-15159.

**25.** Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Europ J Clin Microbiol Infect Dis. 2004; 27: 305-318.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 2, June 2018

Original Article

# Cytocidal effects of *Bacillus thuringiensis* crystal protein against Leishmaniatropica

**Naghme Feridoni[1], Elham Moazamian[2], Manoochehr Rasouli[3]**

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Science, Science and Research branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Science, Agriculture and Modern Technology, Shiraz branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
[3]Assistant Professor, Medical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

## Abstract

*Background & Objectives*: Leishmaniasis is an infectious disease that is caused by an obligate intracellular parasite which belongs to genus *Leishmania*, order Kinetoplastida. Using bio-microbial control agents as one of the alternative therapies for leishmaniasis infections has been developed. The aim of this study was to assess *Bacillus thuringiensis* crystal protein effects against *Leishmania tropica* parasite.

*Materials & Methods*: In this cross-sectional descriptive study, 47 *B. thuringiensis* isolates from soil samples in different regions of Fars province were collected based on the phenotypic characteristic, crystal toxin staining, and molecular identification. After enzyme digestion of toxin isolates using Proteinase K, their cytocidal effects on *L. tropica* were analyzed. The isolates with the most toxicity effect were identified by PCR.

*Results:* Our results identified one isolate with the most cytocidal effect on *L. tropica*. The sb35 isolate crystalline toxin (Cry1) was the most effective toxin on *Leishmania*, showing the highest cytocidal effect (about 40%) at the concentration of $10^{-1}$ mg/ml. Cytopathic effects of promastigote treatment with crystallized toxins were observed as shrinking and inflammation.

*Conclusion:* Considering the results obtained in this study, using crystallized proteins of *B. thuringiensis* can be considered as an appropriate candidate for treating leishmaniasis by performing complementary studies.

*Keywords:* *Bacillus thuringiensis*, Crystal protein, Promastigote, *Leishmania tropica*.

**Correspondence to**: Elham Moazamian

Tel: +98 9177110994

E-mail: moazamian@iaushiraz.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(2): 132-142.