**مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی**
دوره 22، شماره 3، پاییز 91، صفحات 175 تا 183

**Original Article**

# اثرات مهار رشدی و تمایزی متابولیت محلول در اتیل استات باکتری بومی ایران، *Streptomyces calvus*، بر روی رده سلولی K562 لوسمی میلوئیدی انسان

**سیّد محمد امین موسوی[1]، فریده قنبروند[2]، علیرضا دهناد[3]**

[1] استادیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
[2] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
[3] استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال و شمال غرب

## چکیده

**سابقه و هدف:** *با توجه به اینکه مقاومت دارویی یکی از مشکلات اساسی در درمان لوسمی میلوبید مزمن می باشد، بنابراین یافتن داروهای جدید ضدسرطان به ویژه از منابع طبیعی از اولویت‌های تحقیقاتی محسوب می‌گردد. لذا در مطالعه حاضر، اثرات ضدسرطانی متابولیت محلول در اتیل استات باکتری بومی ایران، Streptomyces calvus ، بر روی رده سلولی K562 لوسمی میلوئیدی انسان مورد بررسی قرار گرفت.*

**روش بررسی:** *در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف متابولیت و برای مدت زمان 12 تا 72 ساعت تیمار شد. از آزمون دفع رنگ تریپان بلو برای بررسی اثرات مهار رشدی متابولیت استفاده شد. برای بررسی سلول‌های تمایز یافته از آزمون بلع ذرات لاتکس و رنگ آمیزی رایت- گیمسا استفاده شد.*

**یافته‌ها:** *متابولیت محلول در اتیل استات باعث مهار رشد سلول های K562 به صورت وابسته به غلظت و زمان شد. تیمار سلول‌ها با غلظت 200 نانوگرم بر میلی‌لیتر متابولیت برای مدت زمان 12 الی 72 ساعت، باعث کاهش 50-19 درصدی رشد سلول‌ها گردید. نتایج حاصل از آزمون بلع ذرات لاتکس و رنگ آمیزی رایت- گیمسا نشان دهنده تمایز مونوسیت- ماکروفاژی در سلول های K562 بود.*

**نتیجه‌گیری:** *با توجه به اثرات مهار رشدی و تمایزدهندگی متابولیت حاصل از باکتری S.calvus در سلول‌های K562، می‌توان این متابولیت را برای مطالعات بیشتر در تمایز درمانی بیماران مبتلا به CML پیشنهاد نمود.*

**واژگان کلیدی:** *استرپتومایسس، تمایز، فرآورده‌های طبیعی، لوسمی میلوئیدی مزمن.*

## مقدمه

لوسمی میلوئیدی مزمن (CML)، بیماری بدخیم مربوط به تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز است که با افزایش تعداد سلول‌های میلوئیدی در خون محیطی و نیز در استخوان همراه است (1). مشخصه بیماری CML وجود کروموزوم فیلادلفیا (Ph) است که به دلیل جابجایی دو طرفه کروموزومی بین بازوهای بلند کروموزوم‌های 9 و 22 ایجاد می‌شود (2). حاصل این جابجایی کروموزومی، تشکیل ژن هیبرید BCR-ABL است که پروتئین $p210^{Bcr-Abl}$ را کد می‌کند (3). پروتئین Bcr-Abl یک تیروزین کیناز غیرطبیعی است که دائماً فعال بوده و فعالیت تیروزین کینازی این پروتئین منجر به تکثیر نامنظم سلولی، عدم وابستگی به فاکتور رشد، کاهش اتصال سلول‌های لوسمیک به مغز استخوان و کاهش میزان آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود (4، 5). تاکنون راه کارهای درمانی مختلفی برای درمان CML پیشنهاد شده است که از جمله آنها می‌توان به پیوند مغز استخوان، استفاده از هیدروکسی اوره و بوسولفان و درمان با اینترفرون آلفا اشاره کرد (2). اخیراً نیز ایماتینیب مسیلات (Gleevec، STI571) و مشتقات آن که به

**آدرس نویسنده مسئول:** تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست شناسی جانوری، دکتر سیّد محمد امین موسوی (**email**: moosav_m@ tabrizu.ac.ir)
**تاریخ دریافت مقاله:** 90/9/13
**تاریخ پذیرش مقاله:** 91/2/4

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02 ]

طور اختصاصی کیناز Bcr-Abl را مهار می‌کنند، به عنوان روش درمانی استاندارد برای درمان CML به کار می‌روند (5). با وجود اثرات قابل توجه ایماتینیب در درمان بیماری CML، ایجاد مقاومت دارویی و عود مجدد بیماری، از جمله مشکلات اساسی در درمان بیماران می‌باشد، به طوری که هیچ یک از راهکارها و داروهای بالا قادر به درمان کامل بیماری CML نبوده‌اند (2). ترکیبات ضدسرطان جدید که از منابع طبیعی از قبیل باکتری‌های جنس اکتینومیست به دست می‌آیند، به دلیل تنوع شیمیایی و کارایی بالا، توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند (8-6). اکتینومیست‌ها باکتری‌های گرم مثبت و ساپروفیت با زندگی آزاد می‌باشند که به طور گسترده‌ای در خاک و آب دیده می‌شوند و تنوع شیمیایی و مورفولوژیکی فراوانی را نشان می‌دهند (9). اعضای جنس اکتینومیست به ویژه استرپتومایسس‌ها (*Streptomyceses*) تولید کننده بیش از نیمی از متابولیت‌های فعال زیستی از جمله ترکیبات ضد سرطان می‌باشند (10). اغلب این ترکیبات به صورت متابولیت ثانویه تولید شده و در محیط اطراف آزاد می‌شوند (11). متابولیت‌هایی همچون اکتینومایسین D، آنتراسایکلین‌ها (شامل دونوروبیسین و دوکسوروبیسین)، میتوسان‌ها (میتومایسین C) و آنتراسنون‌ها (میترامایسین) که از باکتری‌های جنس استرپتومایسس به دست می‌آیند، در درمان انواع مختلفی از سرطان‌ها مانند تومور ویلمز در کودکان، لوسمی‌ها، سرطان‌های ریه و سینه به کار می‌روند (12). هم چنین اثرات ضدسرطانی ترکیبات مختلف حاصل از باکتری‌های جنس استرپتومایسس بر روی رده‌های مختلف سلولی از جمله لوسمی میلوئیدی مزمن (K562)، رده سلولی کارسینومای کولون (HCT-15)، سرطان سینه (MDA-MB-231)، سرطان کبد (HepG2) و سرطان ریه (A549) مشاهده شده است (15-13). در مطالعه حاضر، اثرات ضد سرطانی متابولیت محلول در اتیل استات حاصل از گونه جدید باکتری بومی ایران به نام *Streptomyces* calvus ABRIINW 673 که از خاک همدان جداسازی شده، مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، رده سلولی K562 به عنوان مدل فاز حاد بیماران مبتلا به CML (16) انتخاب و اثرات اصلی‌ترین متابولیت به دست آمده در زمینه رشد، مرگ و تمایز مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روشها

### جداسازی و کشت اکتینومیست‌ها

نمونه‌های خاک از مناطق مختلف استان همدان جمع‌آوری و به منظور جداسازی اکتینومیست‌ها و ازجمله باکتری *S.calvus*، رقت‌های مختلف تهیه شده از نمونه‌های خاک به مدت 7 روز در محیط کشت SCA (Starch- casein agar) در انکوباتور با دمای 29 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از گذشت هفت روز، کلنی‌های مورد نظر بر اساس ویژگی‌های ظاهری و رنگدانه کلنی انتخاب و به پلیت جدید حاوی محیط کشت SCA منتقل و به مدت 5 روز در دمای 28 درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. تک کلنی‌های مورد نظر به محیط کشت مایع ISP ( International *Streptomyces* project medium) که به طور اختصاصی برای کشت استرپتومایسس‌ها به کار می‌رود انتقال یافته و به مدت 4-3 روز در انکوباتور شیکردارکشت داده شد. از کلنی‌های جدا سازی شده استوک تهیه شده و در دمای 70- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (17، 18).

### جداسازی متابولیت

به منظور جداسازی متابولیت، مقداری از باکتری‌های خالص جدا شده از خاک به محیط کشت مولر هینتون براث (Muller Hinton Broth) اضافه شده و در انکوباتور شیکردار با دمای 29 درجه سانتی‌گراد و دور حرکت rpm 125 قرار گرفت و 36 ساعت بعد میزان کدورت محیط کشت در طول موج 600 نانومتر اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد 1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل به ظرف جدید حاوی محیط مولر هینتون براث انتقال یافته و همانند مرحله اول در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. پس از 36 ساعت، تمامی محیط کشت در دور rpm 4000 به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب (بیومس) حاصل دور ریخته شده و مایع رویی از کاغذ صافی شماره 1 عبور داده شد. حلال آلی اتیل استات به نسبت 1:1 به مایع حاصل اضافه شد و به مدت 1 ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای 29 درجه سانتی‌گراد و دور حرکت rpm 175 قرار گرفته و به شدت هم زده شد. مخلوط حاصل به دکانتور انتقال یافته و فاز مایع از فاز حلال جدا گردید. فاز حلال که حاوی ترکیبات مورد نظراست در دمای 34 درجه سانتی‌گراد و در فشار پایین تغلیظ شد (17، 18).

### آماده سازی و تهیه غلظت‌های مختلف متابولیت

حلال اتیل استات در دمای اتاق تبخیر و پودر خشک به دست آمده در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور تهیه غلظت‌های مختلف، پودر حاصل در حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شده و غلظت‌های مختلف 10،

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02 ]

100، 200، 500، 700 و 1000 نانوگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید.

### کشت سلول

رده سلولی K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI 1640 (Biosera، انگلستان)که با سرم جنین گاوی (Biosera، انگلستان )10 درصد و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین (100 واحد بر میلی‌لیتر) (سیناژن، تهران) غنی شده است،کشت داده شد. سلول‌ها در مدت کشت سلولی در شرایط دمای 37 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 95 درصد و $CO_2$ پنج درصد نگهداری شد (19).

### بررسی رشد و زیستایی سلولی

به منظور بررسی اثر متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus* بر رشد و زیستایی سلول‌های K562، تعداد $2 \times 10^4$ سلول در فاز رشد لگاریتمی در ظروف 96 چاهکی (SPL life science، کره جنوبی) قرار داده شد. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف متابولیت (1000، 700، 500، 200، 100، 10 نانوگرم بر میلی‌لیتر) برای فواصل زمانی 12، 24، 48 و 72 ساعت تیمار شد. اثرات متابولیت بر رشد و زیستایی سلول‌های K562 با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو (Sigma، آمریکا) و لام هموسایتومتر بررسی شد و با گذشت هر بازه زمانی تعداد سلول‌های موجود در هر چاهک شمارش شد. این آزمایش سه بار به طور مستقل تکرار گردید. آزمون دفع رنگ تریپان بلو، در واقع روشی کمّی برای تعیین درصد سلول‌های زیستا و مرده است. تریپان بلو از غشای هر دو سلول زنده و مرده عبور می‌کند، ولی تنها سلول‌های زنده به دلیل داشتن فعالیت حیاتی قادر به دفع رنگ تریپان بلو می‌باشند. به عبارت دیگر، در این آزمون سلول‌های زنده به صورت سفید و شفاف و سلول‌های مرده به رنگ آبی تیره در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده‌اند (20).

### بررسی تغییرات ریخت شناسی سلولی

تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده با متابولیت و سلول‌های تیمار نشده (کنترل) با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus، ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفت.

### رنگ‌آمیزی رایت- گیمسا

به منظور بررسی اثرات تمایز مونوسیت- ماکروفاژی متابولیت حاصل از باکتری *S. calvus* از رنگ‌آمیزی رایت- گیمسا استفاده شد. برای مشاهده تغییرات ریخت‌شناسی در هسته و سیتوپلاسم، سلول‌های تیمار شده با متابولیت و سلول‌های کنترل پس از تهیه اسمیر، توسط متانول تثبیت و با استفاده از رنگ رایت- گیمسا رنگ آمیزی گردید. تغییرات ریخت شناسی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی 40x مورد بررسی قرار گرفت.

### تست بیگانه خواری

بدین منظور، تعداد $5 \times 10^4$ سلول در ظروف 24 چاهکی (SPL life science، کره جنوبی) کشت داده شد و با غلظت مورد نظر متابولیت (200 نانوگرم بر میلی‌لیتر) و در زمان مورد نظر (48 ساعت) تیمار شد. سوسپانسیون ذرات لاتکس احاطه شده با پروتئین (Gravindex، انگلستان) به میزان 1:10 با بافر فسفات رقیق شد. سپس محتوای هر چاهک (سلول‌های تیمار شده و کنترل) جمع‌آوری شده و به مدت 5 دقیقه و با دور rpm 1000 سانتریفیوژ گردید. سپس 100 میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده ذرات لاتکس و 100 میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640 که با سرم FBS 20% غنی شده است با رسوب سلولی مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت 2 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از تهیه اسمیر، حداقل 200 سلول با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش گردید. سلول‌هایی که حداقل 10 ذره لاتکس را بلعیده باشند، سلول‌های دارای توانایی بیگانه‌خواری در نظر گرفته شد (21).

### تحلیل آماری

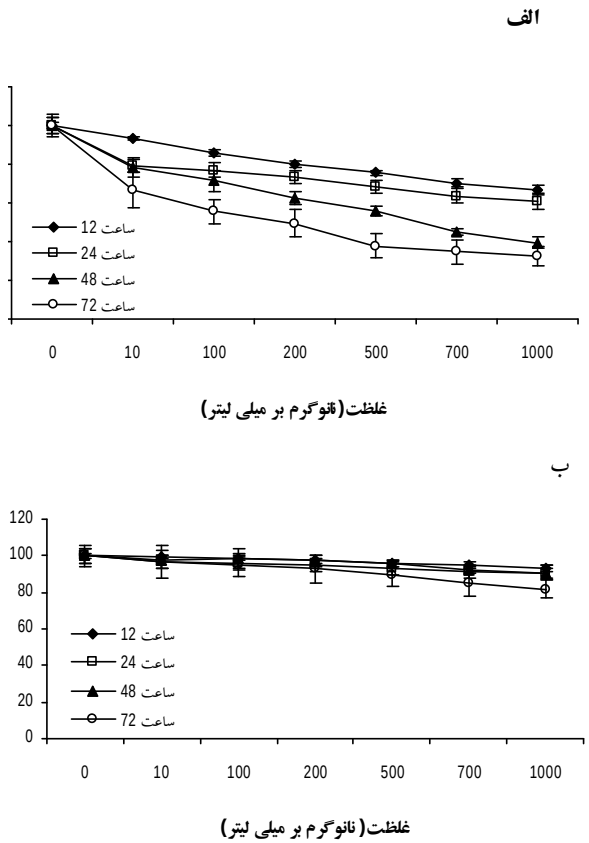
تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2003، SPSS 14.0 و آزمون Student *t* -test انجام شد و داده‌های با ارزش $p<0/05$ معنی‌دار تلقی شد.

## یافته‌ها

### متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus* باعث مهار رشد سلول‌های K562 گردید

همان طور که در نمودار 1-الف نشان داده شده است، این متابولیت باعث مهار رشد سلول‌های K562 به صورت وابسته به غلظت شد. به عنوان مثال، 48 ساعت پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های 10، 100، 200، 500، 700 و 1000 نانوگرم بر میلی‌لیتر از متابولیت، میزان رشد سلول‌ها نسبت به گروه کنترل به ترتیب 21/8، 28/4، 37/5، 45/5، 54/8 و 60/5 درصد کاهش یافت.

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02 ]

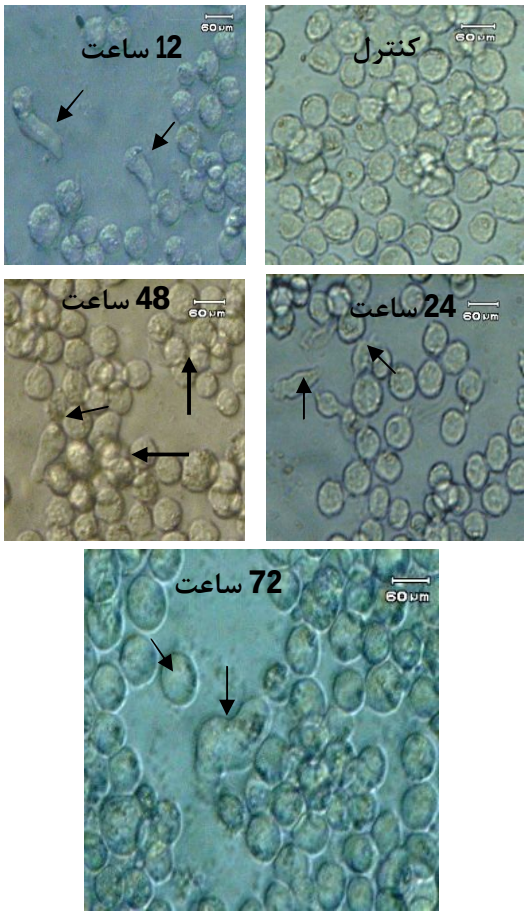



**نمودار 1-** اثرات متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S.calvus* بر رشد و زیستایی سلول‌های K562. سلول‌های K562 با غلظت‌های مختلف متابولیت و زمان‌های متفاوت تیمار شد و اثرات آن بر رشد (الف) و زیستایی (ب) سلول‌ها با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و شمارش سلولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد (SD) نمایش داده شده است.

این حالت به صورت وابسته به زمان نیز قابل مشاهده بود. به عنوان مثال، پس از تیمار سلول‌های K562 با غلظت 200 نانوگرم بر میلی‌لیتر متابولیت برای مدت زمان 12، 24، 48 و 72 ساعت، میزان مهار رشد به ترتیب برابر 19/2، 26/6، 37/5 و 50/4 درصد بود (جدول 1). علاوه براین، میزان $IC_{50}$ (غلظتی از دارو که باعث مهار رشد 50 درصدی می گردد) 48 ساعت پس از تیمار با متابولیت‌ها برابر 570 نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

### متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus* تغییری در زیستایی سلول‌های K562 ایجاد نکرد.

بررسی اثرات غلظت‌های مختلف متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S.calvus* بر روی زیستایی سلول‌های K562 و در زمان‌های مختلف نشان داد که این متابولیت تغییر معنی‌داری در زیستایی سلول‌ها ایجاد نمی‌کند (نمودار 1- ب). به عنوان مثال، 72 ساعت پس از تیمار سلول‌ها با غلظت 200 نانوگرم بر میلی‌لیتر $p=0/23$ به دست آمد. بنابراین می‌توان گفت که این متابولیت باعث القای مرگ سلولی در سلول‌های K562 نمی‌گردد (جدول 2).



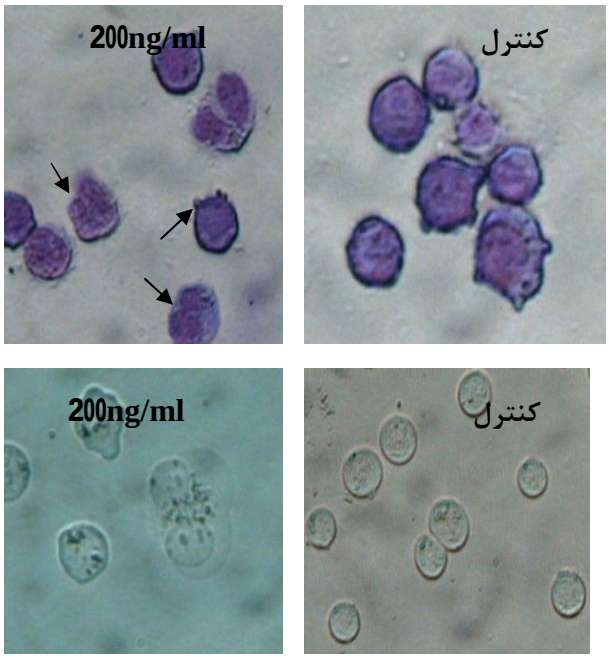

**شکل 1-** تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های K562 تیمار شده با متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus*. سلول‌ها با غلظت 200 نانوگرم بر میلی‌لیتر متابولیت به مدت 12، 24، 48 و 72 ساعت تیمار شده و تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی 40x) مورد بررسی قرار گرفت. فلش‌های کوچک افزایش اندازه و دوکی شدن سلول‌ها و فلش‌های بزرگ تجمعات سلولی را نشان می دهند.

### متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus* سبب تغییرات ظاهری در سلول‌های K562 گردید

بررسی تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده با متابولیت و سلول‌های کنترل نشان دهنده تغییرات قابل ملاحظه در ظاهر سلول‌های تیمار شده با متابولیت می‌باشد. تغییرات ظاهری 12 ساعت پس از تیمار با متابولیت و از غلظت 200 نانوگرم بر میلی لیتر آغاز گردید و در غلظت‌های کم متابولیت (10، 100و 200

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02 ]

نانوگرم بر میلی لیتر) به صورت وابسته به زمان افزایش یافت. همان طور که در شکل 1 نشان داده شده است، اندازه برخی از سلول‌ها نسبت به سلول‌های کنترل افزایش یافته و ظاهری دوکی شکل پیدا کردند و تشکیل پای کاذب دادند. هم چنین، سلول‌های تیمار شده با متابولیت به هم چسبیده و تجمعات سلولی (aggregation) تشکیل دادند که نشان دهنده احتمال تمایز سلول‌ها به سمت رده مونوسیت- ماکروفاژی می‌باشد.




**شکل 2-** اثرات تمایزی متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus* در سلول‌های K562. سلول‌های K562 با غلظت 200 نانوگرم بر میلی‌لیتر متابولیت به مدت 48 ساعت تیمار شد و تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های تمایز یافته با استفاده از رنگ‌آمیزی رایت- گیمسا (الف) و آزمون بلع ذرات لاتکس (ب) مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات ظاهری سلول‌ها شامل کاهش نسبت هسته به سیتوپلاسم، لوبیایی شکل شدن هسته، توان بیگانه‌خواری سلول‌ها و تشکیل پای کاذب با فلش نشان داده شده است (بزرگنمایی 40x)

### متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus* باعث القای تمایز مونوسیت- ماکروفاژی در سلول‌های K562 گردید.

به منظور اثبات بیشتر اثرات تمایزی متابولیت از رنگ‌آمیزی رایت- گیمسا و تست بیگانه خواری ذرات لاتکس استفاده شد. همان طور که در شکل 2- الف مشاهده می شود مقایسه رنگ آمیزی رایت- گیمسای سلول‌های کنترل و تیمار شده نشان داد که سلول‌های کنترل ظاهری کروی داشته و نسبت هسته به سیتوپلاسم در این سلول‌ها بالاست، در حالی که در سلول‌های تیمار شده نسبت هسته به سیتوپلاسم کاهش یافته و هسته به شکل لوبیایی دیده می‌شد که نشان دهنده تمایز سلول‌های K562 به رده مونوسیت- ماکروفاژ می‌باشد.

توانایی بیگانه‌خواری که یکی از ویژگی‌های سلول‌های ماکروفاژ بالغ می‌باشد نیز در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که درصد بالایی از سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل توانایی بالایی در بلع ذرات لاتکس نشان می‌دادند (شکل2- ب). لازم به ذکر است که در این آزمون سلول‌هایی که بیش از 10 ذره لاتکس را بلعیده بودند، به عنوان سلول‌های دارای توانایی بیگانه‌خواری در نظر گرفته شدند

## بحث

شیمی درمانی به عنوان راهکار اصلی درمان سرطان که عمدتاً باعث مرگ سلول های سرطانی می‌شود، اغلب دارای اثرات جانبی به خصوص مقاومت دارویی می‌باشد که این مسئله مخصوصاً در سرطان خون باعث گرایش به راهکارهای نوین درمانی شده است (22، 23). در این میان یک راهکار نوین درمانی به نام تمایز درمانی توصیه شده است (24). در واقع در تمایز درمانی سلول‌های سرطانی که اغلب تمایز نیافته‌اند به سمت تمایز نهایی رانده شده و از این طریق علاوه بر مهار رشد باعث حساس‌تر شدن به داروهای شیمی درمانی و یا مرگ خود به خودی می‌شود (25). بنابراین یکی از الویت‌های اصلی تحقیقات سرطان یافتن ترکیباتی با خاصیت تمایز دهندگی می‌باشد (26). لذا اهمیت مطالعه حاضر در بررسی اثرات تمایزی متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus* در سلول‌های K562 لوسمی میلوئیدی مزمن انسانی می‌باشد.

تاکنون اثرات مهار رشدی متابولیت های حاصل از گونه‌های مختلف باکتری استرپتومایسس در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفته است. استرپتومایسس گونه KORDI-3238 به دست آمده و به روشی مشابه با مطالعه حاضر و توسط حلال اتیل استات جداسازی شده است، باعث مهار رشد در چندین رده سلول انسانی از جمله MDA-MB-231 (سرطان سینه)، HCT-15 (سرطان کولون)، PC-3 (سرطان پروستات) و K562 (لوسمی میلوئیدی مزمن) شده است (27). میزان $IC_{50}$ 48 ساعت پس از تیمار سلول‌های فوق با این ترکیب به ترتیب برابر 7/5، 7/8، 3/2 و 8/6 میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد، در حالی که نتایج حاصل از

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02 ]

**جدول 1-** درصد رشد سلول‌های K562 تیمار شده با متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus*.

| | درصد رشد نسبت به کنترل * | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 12 ساعت | 24 ساعت | 48 ساعت | 72 ساعت |
| کنترل | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 10 ng/ml | 93/41 ±0/91<br>P = 0/024 | 79/25 ± 3/25<br>P = 0/023 | 78/2 ± 4/85<br>P = 0/027 | 66/47±9<br>P = 0/028 |
| 100 ng/ml | 85/81 ± 1/28<br>P = 0/006 | 76/98 ± 3/46<br>P = 0/006 | 71/55 ± 5/44<br>P = 0/009 | 55/64 ± 6/26<br>P = 0/007 |
| 200 ng/ml | 80/28 ± 1/56<br>P = 0/007 | 73/37 ± 3/36<br>P = 0/008 | 62/49 ± 3/03<br>P = 0/001 | 49/53 ± 7/44<br>P = 0/009 |
| 500 ng/ml | 75/43 ± 1/60<br>P = 0/002 | 68/11 ± 3/39<br>P = 0/002 | 55/74 ± 2/3<br>P = 0/002 | 37/64 ± 6/26<br>P = 0/006 |
| 700 ng/ml | 70/35 ± 1/87<br>P = 0/005 | 63/71 ± 3/51<br>P = 0/001 | 45/18 ± 1/88<br>P = 0/004 | 34/67 ± 6/48<br>P = 0/006 |
| 1000 ng/ml | 66/85 ± 2/22<br>P = 0/009 | 60/51 ± 3/85<br>P = 0/024 | 39/43 ± 2/88<br>P = 0/004 | 32/40 ± 4/96<br>P = 0/003 |

* میانگین ± خطای استاندارد(SD)

**جدول 2-** درصد زیستایی سلول‌های K562 تیمار شده با متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus*.

| | درصد زیستایی نسبت به کنترل * | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 12 ساعت | 24 ساعت | 48 ساعت | 72 ساعت |
| کنترل | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 10 ng/ml | 99/69 ±0/91<br>P = 0/5 | 96/82 ± 3/25<br>P = 0/065 | 97/84 ± 4/85<br>P = 0/065 | 97 ± 9<br>P = 0/219 |
| 100 ng/ml | 98/87 ± 1/28<br>P = 0/47 | 95/92 ± 3/46<br>P = 0/067 | 98/25 ± 5 /44<br>P = 0/54 | 94/95 ± 6/26<br>P = 0/25 |
| 200 ng/ml | 97/29 ± 1/56<br>P = 0/54 | 94/53 ± 3/36<br>P = 0/27 | 97/34 ± 3/03<br>P = 0/11 | 92/88 ± 7/44<br>P = 0/23 |
| 500 ng/ml | 95/89 ± 1/6<br>P = 0/25 | 93/07 ± 3/39<br>P = 0/079 | 95/45 ± 2/3<br>P = 0/127 | 89/14 ± 6/26<br>P = 0/11 |
| 700 ng/ml | 94/68 ± 1/87<br>P = 0/22 | 91/59 ± 3/51<br>P = 0/11 | 92/52 ± 1/88<br>P = 0/069 | 84/74 ± 6/48<br>P = 0/41 |
| 1000 ng/ml | 93/13 ± 2/22<br>P = 0/32 | 90/70 ± 3/85<br>P = 0/79 | 90/26 ± 2/88<br>P = 0/069 | 81/81 ± 4/96<br>P = 0/06 |

* میانگین ± خطای استاندارد (SD)

مطالعه حاضر نشان داد که 48 ساعت پس از تیمار با متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus* میزان $IC_{50}$ برابر 570 نانوگرم بر میلی‌لیتر می باشد. با توجه به اینکه متابولیت حاصل از باکتری *S. calvus* در محدوده غلظت نانوگرم بر میلی‌لیتر باعث مهار رشد 50 درصدی سلول‌های K562 می‌گردد، لذا می‌توان این متابولیت را به عنوان ترکیبی با قدرت اثردهی بیشتر در غلظت‌های پایین‌تر معرفی کرد. علاوه بر اثرات مهار رشدی متابولیت های حاصل از باکتری‌های جنس استرپتومایسس، ترکیباتی نیز جداسازی شده‌اند که باعث کاهش زیستایی و القای آپوپتوز در چندین رده سلولی

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02 ]

می‌گردند که از آن جمله می‌توان به متابولیت‌های PCC (Pure cytotoxic compound) و F3-2-5 اشاره کرد که از باکتری‌های *Streptomyces* sp. به دست می‌آید و باعث کاهش زیستایی و القای آپوپتوز به ترتیب در سلول‌های لوسمی انسانی (HL60، K562، U937 و THP-1) و سلول‌های HeLa (سرطان گردن رحم انسان) می‌شوند (10، 28). PCC در غلظت 30 نانوگرم بر میلی‌لیتر و در مدت زمان 48 ساعت و از طریق فعال‌سازی کاسپاز 3 و کاهش بیان پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 باعث القای آپوپتوز در رده‌های سلولی سرطان خون می‌گردد (10). در سلول‌های HeLa که با غلظت 80 میکرومولار متابولیت F3-2-5 و در بازه زمانی بالاتر از 24 ساعت تیمار شده بود تراکم کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA و وقوع آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده مشاهده گردید (28). این در حالی است که نتایج مطالعه حاضر نشان داد که متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus* کاهش معنی‌داری در زیستایی سلول‌ها ایجاد نمی‌کند و می‌توان گفت باعث القای مرگ سلولی در سلول‌های K562 نمی‌گردد. در مطالعه مشابهی نیز نشان داده شد که فراکشن جدا سازی شده با حلال اتیل استات تحت عنوان 2-31 که از *Streptomyces* sp. H7372 به دست می‌آید باعث مهار رشد در دو رده سلولی سرطان سینه، MCF-7 و MDA-MB-231 می‌گردد، به طوری که اثرات توکسیک بر روی این سلول‌ها نداشته و باعث القای مرگ سلولی در آنها نمی‌گردد. میزان $IC_{50}$ 72 ساعت پس از تیمار این دو رده سلولی با فراکشن مذکور کمتر از 0/3 µg/ml می‌باشد. این فراکشن باعث توقف چرخه سلولی در فاز $G_1$ در سلول‌های MCF-7 و در فاز S در سلول‌های MDA-MB-231 می‌گردد (29). با توجه به این که متابولیت حاصل از باکتری *S. calvus* دارای اثرات توکسیک و القاء کننده مرگ نبوده و اثرات ضد سرطان خونی خود را صرفاً از طریق مهار رشد القاء می‌کند، بنابراین تصور می‌شود که بتواند اثرات جانبی مرگ سلول‌های طبیعی را کاهش دهد. به نظر می‌رسد که این متابولیت‌ها خواصی مشابه با ترکیبات Chemopreventive داشته و می‌تواند از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری کند. ترکیبات Chemopreventive در واقع ترکیبات طبیعی و یا سنتتیک می‌باشند که از سرطان‌زایی جلوگیری می‌کنند و به طور معمول اثرات خود را از طریق توقف عملکرد عوامل سرطان‌زا و یا مهار رشد سلول‌های تومور نشان می‌دهند (30). در زمینه اثرات تمایزی متابولیت‌های حاصل از باکتری‌های جنس استرپتومایسس تاکنون دو ترکیب میترامایسین و کرومومایسین گزارش شده است (31). این ترکیبات باعث القای تمایز اریتروئیدی در سلول‌های K562 می‌گردند (32). همچنین ترکیب دیگری به نام اسپیکامایسین شناخته شده است که باعث القای فعالیت فاگوسیتی در سلول‌های HL-60 (لوسمی پرومیلوسیتیک انسانی) می‌گردد. این ترکیب در غلظت‌های 640 ng/ml - 2/5 باعث القای تمایز در این سلول‌ها می‌گردد (33). با توجه به اینکه بسیاری از ترکیبات القا کننده تمایز همانند همین (Haemin)، سیتوزین آرابینوزید (Ara-C) و بوتیریک اسید باعث القای تمایز اریتروئیدی در سلول‌های K562 می‌شون د(34) و نیز گزارشات معدودی از ترکیبات القاء کننده تمایز مونوسیت- ماکروفاژی در سلول‌های K562 وجود دارد (35). مطالعه حاضر نشان داد که متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus* باعث تمایز مونوسیت- ماکروفاژی در سلول‌های K562 می‌گردد. نکته قابل توجه در این مطالعه این است که با تیمار سلول‌های K562 با متابولیت محلول در اتیل استات نتایجی مشابه با تیمار این سلول‌ها با TPA (تترا دکانوئیل فوربول 13- استات) به دست آمد (35). لذا متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus* که القاء کننده تمایز مونوسیت- ماکروفاژی در سلول‌های K562 می‌باشد می‌تواند به عنوان مدل آزمایشگاهی جالبی برای مطالعه این نوع تمایز مطرح شود. با توجه به اثرات مهار رشدی و تمایزدهندگی متابولیت محلول در اتیل استات باکتری *S. calvus* و اینکه این گونه باکتری به تازگی در ایران شناسایی شده است، می‌توان این متابولیت را به عنوان کاندیدای مناسبی برای مطالعات بیشتر در تمایز درمانی بیماران مبتلا به CML پیشنهاد نمود.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از امور پژوهشی دانشگاه تبریز که هزینه قسمتی از طرح را تقبل فرموده‌اند، ابراز می‌دارند.

## *REFERENCES*

1. Appleby N, Burke E, Curran TA, Neary E. Chronic myeloid leukemia: molecular abnormalities and treatment options. TSMJ 2005; 6: 45-51.

2. Singhal N, Bapsy P, Babu KG, George J. Chronic myeloid leukemia. JAPI 2004; 52: 410-16.

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02 ]

3. Rosca A, Arion C, Colita A, Nedelcu L, Scirneciu C, Andreescu O, et al. Chronic myelogenous leukemia prognosis and evolution. Bulletin of the Trasilvania University of Brasov 2009; 2: 97-104.

4. Frazer R, Irvine AE, McMullin MF. Chronic myeloid leukemia in the 21 st century. Ulster Med J 2007; 76: 8-17.

5. Cardama AQ, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanism of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. Cancer control 2009; 16: 122-31.

6. Rocha A, Lopes P, Schwartsmann G. Natural products in anticancer therapy. Curr opin pharmacol 2001; 1: 364-69.

7. Menshawi BS, Fayad W, Mahmoud K, Hallouty SM, Manawaty M. Screening of natural products for therapeutic activity against solid tumors. IJEB 2010; 48: 258-64.

8. Lin X, Wen Y, Li M, Chen Z, Guo J, Song Y, et al. A new strain of *streptomyces avermitilis* produces high yield of oligomycin A with potent anti- tumor activity on human cancer cell lines in vitro. Appl Microbiol Biotechnol 2009; 81: 839-45.

9. Lakshmipathy DT, Kannabiran K. A morphological, biochemical and biological studies of halophilic *streptomyces* sp. Isolated from saltpan environment. AJID 2009; 5: 200-206.

10. Jeong S, Han M, Jin C, Kim G, Choi BT, Nam T, et al. Apoptosis induction of human leukemia cells by *Streptomyces* sp. SY-103 metabolites through activation of caspase-3 and inactivation of Akt. Int J Mol Med 2010; 25: 31-40.

11. Akhand MA, Al- Bari MA, Khondkar I, Khondkar p. Characterization and Antimicrobial Activities of a Metabolite from a New *Streptomyces* Species from Bangladeshi Soil. JSR 2010; 2: 178-85.

12. Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. J Antibiot 2009; 62: 5-16.

13. Han B, Cui CB, Cai B, Xiu Feng JI, Xin Sheng Y. Actinolactomycin, a new 2-oxonanonoidal antitumor antibiotic produced by *Streptomyces flavoretus* 18522, and its inhibitory effect on the proliferation of human cancer cells. Chin Chem Lett 2005; 16: 471-74.

14. Kharat KR, Kharat A, Hardikar BP. Antimicrobial and cytotoxic activity of streptomyces sp. From Lonar Lake. Afr J Biotechnol 2009; 8: 6645-48.

15. Shin C, Lim H, Moon S, Kim S, Yong Y, Kim BJ, et al. A novel antiproliferative agent, phenylpyridineylbutenol, isolated from *streptomyces* sp. Bioorg Med Chem Lett 2006; 16: 5643-45.

16. Koeffler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. Blood 1980; 56: 344-50.

17. Dehnad A, Parsa L, Bakhshi R, Abdi Soofiani S, Mokhtarzadeh A. Investigation antibacterial activity of *streptomycetes* isolates from soil samples, west of Iran. Afr J Microbiol Res 2010; 4: 1542-49.

18. Sadigh Eteghad S. Isolation and molecular identification of efficacious antibiotical secondary metabolites producer actinomycetes, against resistance Staphylococci clinical isolates (Dissertation). Tabriz: Islamic azad University; 2010. [In Persian]

19. Moosavi MA, Yazdanparast R, Lotfi A. GTP induces s-phase cell-cycle arrest and inhibits DNA synthesis in k562 cells but not in normal human peripheral lymphocytes. J Biochem Mol Biol 2006; 39: 492-501.

20. Doyle A, Griffiths JB, Editors. Cell and tissue culture: laboratory procedure in biotechnology. New York, NY, USA: John Wiley & Sons Ltd; 1998.

21. Moosavi MA, Yazdanparast R. Distinct MAPK signaling pathways, p21 up-regulation and caspase-mediated p21 cleavage establishes the fate of U937 cells exposed to 3-hydrogenkwadaphnin: Differentiation versus apoptosis. Toxicol Appl Pharmacol 2008; 230: 86-96.

22. Meshkini A, Yazdanparast R. Induction of megakaryocytic differentiation in chronic myelogenous leukemia cell K562 by 3- hydrogenkwadaphnin. JBMB 2007; 40: 944-51.

23. Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, Fisher PB. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. Pharmacol Ther 2001; 90: 105-156.

24. Moosavi MA, Yazdanparast R, Lotfi A. 3-hydrogenkwadaphnin induces monocytic differentiation and enhances retinoic acid- mediated granulocytic differentiation in NB4 cell line. J Biochem Mol Biol 2006; 39: 722-29.

25. Spira AI, Carducci MA. Differentiation therapy. Curr Opin Pharmacol 2003; 3: 338-43.

26. Ahmadi AH, Moosavi MA, Hosseinpour feizi MA. The inductive effect of boric acid on growth inhibition and differentiating changes of human chronic myeloid leukemia K562 cell line. AMUJ 2010; 13: 1-11.

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02 ]

27. Jeong S, Shin H, Kim T, Lee H, Park S, Kim H. Streptokordin, a novel cytotoxic compound of the methylpyridine class from a marine- derived *streptomyces* sp. KORDI-3238. Antibiot 2006; 59: 234-40.

28. Lee C, Lim H, Moon S, Shin C, Kim S, Kim B, et al. Novel anticancer agent, benzyldihydroxyoctenone, isolated from *Streptomyces* sp. causes G1 cell cycle arrest and induces apoptosis of HeLa cells. Cancer Sci 2007; 98: 795-802.

29. Yip W, Cheenpracha S, Chang L, Choke HO C, Fong Seow H. Anti-proliferative and anti-invasive properties of a purified fraction from *Streptomyces* sp. H7372. Int J Oncol 2010; 37: 1229-41.

30. Levi M, Borne R, Williamson J. A review of cancer chemopreventive agents. Curr Med Chem 2001; 8: 1349- 62.

31. Bianchi N, Osti F, Rutigliano C, Corradini FG, Borsetti E, Tomassetti M, et al. The DNA-binding drugs mithramycin and chromomycin are powerful inducers of erythroid differentiation of human K562 cells. BJH 1999; 104: 258-65.

32. Menedez N, Brana AF, Salas JA, Mendez C. Involvement of chromomycin ABC transporter system in secretion of deacetylaed precursor during chromomycin biosynthesis. Microbiology 2007; 153: 3061-70.

33. Hayakawa Y, Nakagawa M, Kawai H, Tanabe K, Nakayama H, Shimazu A, et al. Spicamycin, a new inducer of differentiation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. J Antibiot 1983, 36: 934- 37.

34. Nowak D, Stewart D, Koeffler HP. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. Blood 2009; 113: 3655-65.

35. Lerga A, Crespo P, Bersiano M, Delgado MD, Canelles M, Cales C, et al. Regulation of c-Myc and Max in megakaryocytic and monocytic- macrophagic differentiation of K562 cells induced by protein kinase C modifiers: c-Myc is down-regulated but dose not inhibit differentiation. Cell Growth Differ 1999; 10: 639-54.

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02 ]