مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸

ارزیابی اثر سیتوسیدالی مگنتوزوم باکتری مگنتواسپریلیم گریفس والدنز بر روی رده سلولی سرطان سینه

فاطمه هاشمی‌نژاد .M.Sc[۱]، الهام معظمیان .Ph.D[۱*]، مجتبی صلوتی .Ph.D[۲]

۱- گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوریهای نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲- مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: elhammoazamian@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۵

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش خالص‌سازی مگنتوزوم باکتری مگنتواسپریلیم گریفس والدنز و بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی نانو ذرات مگنتوزوم خالص شده بر علیه رده سلولی سرطان سینه است.

مواد و روش‌ها: پس از تهیه سویه استاندارد، باکتری بر روی محیط DSMZ براث کشت داده شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰-۷ روز در شرایط میکروائروفیل انکوبه شد. جهت اطمینان از آزمون‌های فنوتیپی و روش مولکولی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی MT1166 و عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی انجام شد. تاثیر مگنتوزوم خالص شده از مگنتو اسپریلیم گریفس والدنز با غلظت‌های مختلف بر روی رده سلولی سرطان سینه مورد بررسی قرار گرفت. جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آزمون Kruskalwalis و نرم افزار SPPSS-21 استفاده شد.

نتایج: در نتایج رنگ آمیزی گرم باکتری به‌شکل مارپیچ گرم منفی مشاهده شد. نتایج میکروسکوپ الکترونی نشان داد که باکتری تولیدکننده مگنتوزوم با اندازه ۶۰ نانومتر می‌باشد. درصد سلول‌های زنده در برابر مگنتوزوم خالص شده از باکتری مگنتواسپریلیم گریفس والدنز ۸۵ درصد به‌دست آمد که با توجه به آنالیز آماری (p=۰/۰٤) حاصل شد.

نتیجه‌گیری: مگنتوزوم باکتری مگنتواسپریلیم گریفس والدنز، منجر به مرگ ۱۵ درصد سلول‌های سرطانی شد .نتایج نشان داد که اندازه و ساختار مگنتوزوم‌های باکتری‌های مگنتوتاکتیک از اهیت بالایی در از بین بردن سلول‌های سرطان سینه دارا می‌باشند.

واژگان کلیدی: مگنتو اسپریلیم گریفس والدنز، مگنتوزوم، سرطان سینه

مقدمه

نانوذرات آهن کاربرد وسیعی در علم پزشکی به‌خصوص در ساخت شناسه‌گرهای زیستی فلورسانس، درمان تومورهای سرطانی، تشخیص زیستی پاتوژن‌ها دارند (۱-۳). باکتری‌های مگنتوتاکتیک گروهی از باکتری‌های گرم منفی که به‌صورت آرام در طول میدان مغناطیسی و میدان‌های دیگر جهت‌گیری و شنا می‌کند. این توانایی بر روی ساختار کریستال درون سلولی به‌نام مگنتوزوم‌ها بنا شده است (۴). مگنتوزوم‌های موجود در باکتری‌های مغناطیسی اطراف غشاء از مواد معدنی آهن مگنتیک، مگنتیت (Fe_3O_4) یا گریگیت (Fe_3S_4) تشکیل شده‌اند (۵).

درمیان روش‌های مختلف موجود در بیوسنتر نانوذرات، استفاده از باکتری‌های پروکاریوتی از توجه ویژه‌ای برخوردار است. مگنتیت یکی از محصولات رایج احیا، از طریق باکتری بوده که می‌تواند به‌عنوان یک شاخص پتانسیل فیزیکی به‌صورت اکتیویته زیست‌شناسی در سیستم‌های زمین‌شناسی استفاده شد باکتری‌های مگنتوتاکتیک قادر به‌تولید کریستال‌های مغناطیسی (Fe_3O_4) تک-دامنه است که به‌طور متوالی و به‌صورت زنجیره‌های دوتایی و اشکال دایره‌ای تشکیل می‌شوند (۶). مطالعات مختلفی بر روی گونه‌های باکتری‌های مگنتوتاکتیک در نقاط مختلف جهان انجام شده است. سویه مگنتواسپریلیم گریفس والدنزیک باکتری میکروائروفیل و گرم منفی از باکتری‌های مغناطیسی است که از شاخه پروتئوباکتر، طبقه آلفا پروتئوباکتر، رده رودوسپیریلا می‌باشد (۷). شکل‌گیری مگنتوزوم نسبت به تغییر شرایط شیمیایی و فیزیکی بسیار حساس می‌باشد. غلظت اکسیژن یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی است که نه تنها بر معدنی شدن زیستی مگنتوزوم تاثیر می‌گذارد بلکه بر رشد باکتری‌های مگنتوتاکتیک اثرگذار است (۸). شاید ادعای اینکه سرطان را می‌توان با استفاده از آهن‌ربا درمان کرد، ادعای گزافی به‌نظر برسد. اما گروهی از محققان فرانسوی از ساختارهای اکسید آهن استخراج شده از باکتری‌ها برای کشتن انتخابی سلول‌های سرطانی با استفاده از یک میدان مغناطیسی متناوب بهره برده‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که مگنتوزوم‌ها باعث ازبین‌رفتن انسجام بین سلول‌های سرطانی شده که منجر به افزایش نفوذ داروهای ضد سرطانی درون تومور می‌شود و این عملکرد با افزایش تخریب سلول‌های سرطانی همراه می‌باشد (۹).

Alphandery و همکارانش (۹) در سال ۲۰۱۴ به‌منظور ارزیابی کردن فعالیت ضدتوموری از سوسپانسیون محتوی مگنتوزوم استفاده کردند. تومورهای سینه xeno-grafted زیر پوست موش که تحت تاثیر جریان میدان مغناطیسی قرار گرفته بودند با تیمار با مگنتوزوم ها، اثرات مثبت در درمان سرطان به‌ثبت رسید. با توجه به‌فراوانی سرطان سینه در دنیا و عوارض داروهای شیمی درمانی، هدف از این پژوهش ارزیابی اثر سمیت سلولی مگنتوزوم باکتری مگنتواسپریلیم گریفس والدنز بر روی رده سلولی سرطان سینه MCF-7 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه استاندارد مگنتواسپریلیم گریفس والدنز گونه MSR-1 با کد اختصاصی (DSM6361) از شرکت Detschesammlung von microorganismen und zellkulturen آلمان خریداری شد. این سویه در محیط کشت اختصاصی DSMZ آلمان کشت داده شد. برای تهیه محیط کشت مواد بر طبق روش استاندارد DSMZ Medium 380 (آلمان) باکتری *Magnetospirillum* عمل شد. محلول عناصر معدنی و محلول ویتامین در حجم یک لیتر و محلول کوئینات فریک در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه شد. به‌ازای هر لیتر محلول مادر، ۱۰ میلی لیتر محلول ویتامین، ۵ میلی مولار محلول عناصر معدنی، ۲ میلی‌مولار محلول کوئینات فریک، KH2PO4 ۰/۶۸

گرم، Succinic acid ۰/۳۷گرم ، L(+)-Tartaric acid ۰/۳۷ گرم، Na ۰/۰۵ گرم، Na-thioglycolate ۰/۰۵ گرم، NaNO3 acetat ۰/۱۲ گرم و Resazurin ۰/۵ میلی‌گرم مورد استفاده قرار گرفت. قبل ازمخلوط کردن این ترکیبات pH محلول حاوی عناصر معدنی با اضافه کردن KOH یا هیدروکسید پتاسیم به ۶/۵ رسانده و به‌کمک گاز N2 اکسیژن‌زدایی شد. محلول کوئینات فریک و عناصر معدنی به‌مدت ۱۵ دقیقه با فشار ۱۵پاسکال در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. بعد از اتوکلاوگذاری، زمانی که دمای محلول به ۴۵ درجه سانتی‌گراد رسید، محلول ویتامین فیلتر شده به آن اضافه شد. محلول ویتامین واجد Pyridoxine-HCl، Nicotinic acid، Riboflavin، Thiamine-HCl·2H2O Folic acid می‌باشد. سایر مواد از شرکت Merck آلمان تهیه شد. با سوزن استریل مقداری از باکتری MSR-1 که داخل محیط است برداشته و داخل محیط کشت مایع باکتری تزریق شد و بعد درون جار بی‌هوازی قرار داده و برای شارژکردن به دستگاه آنوکسومات وصل شد و به‌مدت ۱ هفته تا ۱۰روز برای رشد باکتری درون انکوباتور گذاشته تا زمانی که رنگش کدر شود (۱۰، ۱۱). بعد از ۱ هفته تا ۱۰روز که باکتری ها بر روی محیط مایع رشد کرد از روی محیط مایع برداشته بر روی محیط کشت جامد DSMZ به‌صورت کشت خطی کشت داده و درون جار بی‌هوازی و هوازی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ هفته تا ۱۰روز نگه‌داری شد (۱۲). جهت شناسایی باکتری از رنگ آمیزی گرم و ارزیابی حرکت باکتری در زیر میکروسکوپ به‌وسیله آهن‌ربای مغناطیسی انجام شد. به این منظور مقداری از باکتری‌هایی که رشد کرده را با سرنگ برداشته بر روی لام گذاشته و آب مقطر را بر روی آن ریخته و در زیر میکروسکوپ نوری با قرار دادن آهن‌ربا از طرف قطب شمال و جنوب حرکت باکتری مشاهده و ثبت شد (۱۳). به‌منظور بررسی دقیق باکتری و مشاهده نانوذرات آهن درون آن، عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی زایس مدل EM900 انجام گرفت. برای مشاهده نمونه به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی چند لاندا از محیط کشت غلیظ شده حاوی باکتری را برداشته بر روی گرید (شبکه مسی) ریخته شد. پس از خشک شدن WFI (آب تزریقی) ریخته داخل محفظه مخصوص قرار داده و به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی (Ziemens 300kv) در آزمایشگاه دانشکده هوا و فضا خواجه نصیر طوسی مشاهده و عکس‌برداری شد (۱۴). جهت جداسازی و خالص‌سازی مگنتوزوم‌ها، از روش فیزیکی استفاده شد که دیواره باکتری با استفاده از دستگاه French press (شرکت Thermo، آلمان) پاره شد که عصاره سلولی حاصل شد. این دستگاه با فشار مستقیم باعث لیز سلول می‌شود. نحوه‌ی کار آن بدین گونه می‌باشد که با سانتریفیوژ ۷۰۰۰ دور در دقیقه محیط کشت باعث جدا شدن باکتری از محیط می‌شود. در انتها رسوب به‌دست آمده را از خروجی دستگاه برداشته می‌شود. حدودا ۱۰ گرم (بر اساس محاسبات OD باکتری) از سلول‌های مگنتواسپریلیم گریفیس والدنز استخراج شده را در ۵۰ میلی لیتر از HEPES ۵۰ میلی‌مولار و EDTA ۴ میلی‌مولار با سه بارعبور دادن از دستگاه French press (2000IB/IN2) دیواره سلولی باکتری را پاره کرد (کلیه بافرهای نام برده که برای استخراج مگنتوزوم استفاده شد، حاوی فنیل متیل سولفونیل فلوراید به‌عنوان بازدارنده پروتئین می‌باشد). سلول‌های سالم و آشغال‌های سلول به‌وسیله سانترفیوژ با دور rpm ۱۰۰۰۰ در دقیقه جداسازی شد. مایع رویی از میان ستون جداسازی مغناطیسی عبور داده شد (ستون بین دو مغناطیس قرار داده شد که این ستون یک میدان مغناطیسی قوی را تولید می‌کند و جاذب مغناطیسی آهن است).

ابتدا ذرات مغناطیسی خارج شده با ۵۰ میلی‌لیتر از HEPES ۱۰ میلی‌مولار و NaCl ۲۰۰ میلی‌مولار (pH=7/4) بعد با ۱۰۰ میلی‌لیتر از HEPES ۱۰ میلی‌مولار شستشو داده شد. سپس ستون از ذرات مغناطیس پاک شد و ذرات مغناطیسی با بافر HEPES

۱۰ میلی‌مولار از ستون به‌وسیله فلاش کردن یا با فشار خارج شد و در یخچال نگه‌داری شد (۱۵).

جهت شناسایی مولکولی استخراج DNA با استفاده از کیت (یکتا تجهیز آزما-ایران) براساس دستورالعمل کیت انجام شد. برای شناسایی دقیق‌تر و جهت تکثیر از پرایمرهای اختصاصی MT12166 رفت و برگشت مگنتواسپیریلیم گریفیس استفاده شد (۱۶). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad-USA) انجام گرفت. تمام اجزا واکنش از شرکت یکتا تجهیز آزما خریداری شد. مخلوط واکنش شامل: ۲۵ ماکرولیتر Master Mix (شامل بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، کلرید منیزیم dNTP، آنزیم Taq DNA پلی‌مراز) ۳ ماکرولیتر DNA، ۲ ماکرولیتر پرایمر رفت (5′-TTAAGGGGCAGAGAGGGAA-3′)، ۲ ماکرولیتر پرایمر برگشت (5′-GGCGACGATGAAGCTCTTAC-3′) با غلظت ۱۰ پیکومول و ۱۸ ماکرولیتر آب می باشد. توالی پرایمرها بر اساس مطالعات چاپ شده انتخاب شدند و سنتز آن‌ها توسط شرکت توپاز ژن در ایران انجام شد. در این تکنیک برای آغاز فرایند پلیمریزاسیون دستگاه ترمال سیکلر به‌مدت ۱ دقیقه بر روی دمای ۹۴ درجه سلسیوس تنظیم شد و متعاقبا ۳۵ سیکل PCR به‌صورت ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، ۵۸/۸ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس برای مدت ۱ دقیقه اجرا شد. در نهایت به‌مدت ۴ دقیقه نیز عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. سپس جهت اطمینان از تکثیر ژن ۱۶ S rDNA، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد، حاوی بافر TBE 1X به‌مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ انجام شد (۱۶). در نهایت جهت مشاهده نتایج ژل از دستگاه UV Transilluminator-USA استفاده شد (۱۷). در نهایت محصول PCR به حجم ۳۰ میکرولیتر همراه با پرایمرهای رفت و برگشت (با غلظت‌های ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر) برای توالی یابی به شرکت First Base به کشور مالزی ارسال شد. در این پژوهش رده سلولی سرطان سینه انسانی MCF-7 که مشابه سلول‌های اپیتلیال می‌باشد با کد C135 جهت بررسی خاصیت ضدسرطانی مگنتووزم استخراج شده، از کلکسیون رده سلولی انیستیتو پاستور ایران تهیه شد .سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 Sigma-Aldrichav، امریکا) حاوی ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی سیلین به‌میزان ۱۰۰ unit/mL و استریتوماسیون به‌میزان ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵ درصد اکسیژن و فشار ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. شمارش سلول‌ها با کمک هموسایتومتر انجام شد. درصد سلول‌های زنده با تریپان‌بلو تعیین شد. به‌منظور بررسی فعالیت ضدتکثیری مگنتزوم باکتری مگنتواسپیریلیم گریفیس ابتدا سلول‌های رده سلولی کشت داده شدند به‌طوری‌که به‌هر چاهک پلیت۹۶ خانه‌ای تعداد 1×10^4 سلول اضافه شد. ظروف کشت حاوی سلول به‌مدت۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند. سپس سلول‌ها با ۱۰ میکرولیتر مگنتوزوم‌های خالص شده با غلظت‌های مختلف (غلظت‌های ۱، ۱/.، ۰۱/.، ۰۰۱/.، ۰۰۰۱/.، ۰۰۰۰۱/. میلی گرم بر میلی لیتر) به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه و تیمار سلولی انجام گرفت. نمونه کنترل مثبت (سلول‌های کشته شده با تریتون X۱۰۰) و کنترل منفی (فاقد توکسین) نیز ارزیابی شد. پس از اتمام مراحل کار کشت سلولی و اثر دادن غلظت های مختلف بر سلول‌های هدف، به‌هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از MTT اضافه شد. سپس به‌مدت ۳ ساعت در انکوباتور (۵ درصد) CO_2 در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن، مایع رویی دور ریخته شد و با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفوکساید به‌هر چاهک و قرار دادن آن برای مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر و دور از روشنایی، کریستال‌های فورمازان ایجاد شده حل شدند. سپس با

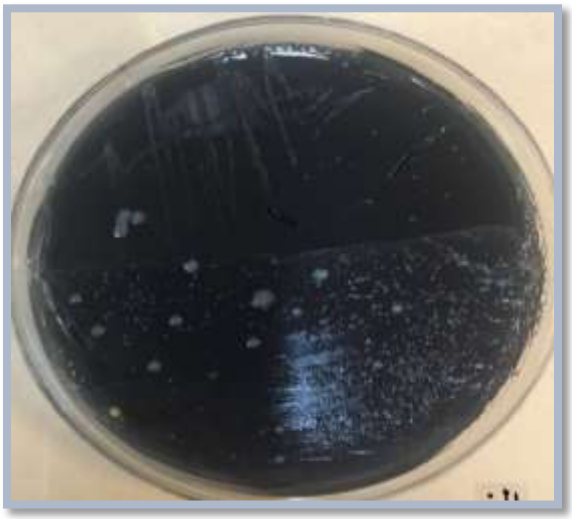
استفاده ازالیزا ریدر میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر در مقابل کنترل قرائت شد (۱۸، ۱۹).

آنالیز آماری

تحلیل نتایج آزمون با استفاده از نرم افزار آماری spss نسخه ۲۱ و آزمون آنالیز واریانس و تست اماری غیرپارامتریک Kruskaiwalis انجام شد. همچنین از نرم افزارCurve expert 1.4 جهت به‌دست آوردن IC50 مگنتوزوم جدا شده از باکتری در راستای کشت سلول استفاده شد.

نتایج

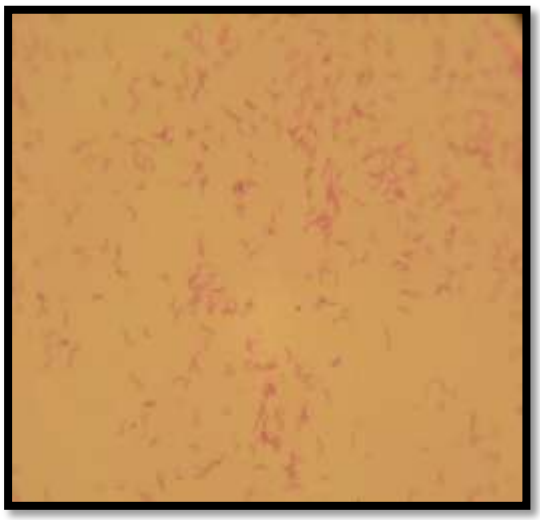
پس از کشت باکتری مگنتواسپریلیوم گریفس والدنز، کلنی‌های این باکتری به‌صورت برآمده، با شکلی نامنظم و به‌رنگ کرم مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: مرفولوژی کلنی مگنتواسپریلیم گریفس والدنز درمحیط کشت DSMZ

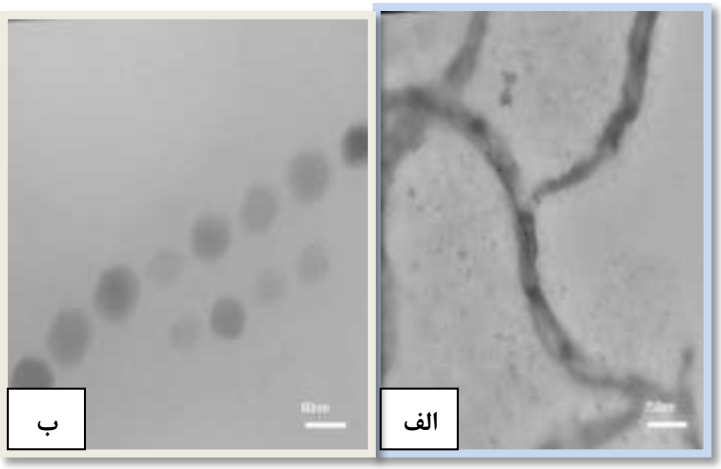
کلنی‌های باکتری مگنتو اسپریلیم گریفس والدنز بعد از کشت رنگ آمیزی شدند و مارپیچ‌های گرم منفی مشاهده و ثبت شد (شکل ۲).

با قرار دادن باکتری مگنتواسپریلیم گریفس والدنز در زیر میکروسکوپ نوری و قرار دادن آهن‌ربا در دو طرف قطب شمال و جنوب در نزدیکی صفحه میکروسکوپ، باکتری به‌سرعت به‌طرف قطب شمال آهنربا تمایل داشت که North seeking تشخیص داده شد.



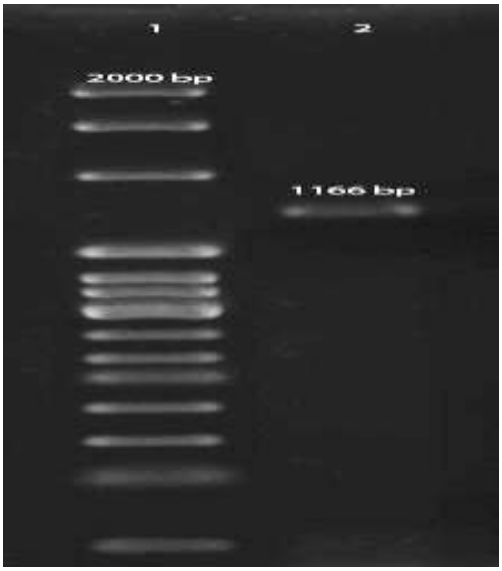
شکل۲: رنگ‌آمیزی گرم باکتری مگنتواسپریلیم گریفس والدنزکه باکتری مارپیچی مشاهده شد.

عکس‌برداری با استفاده از میکروسوپ الکترونی جهت تعیین ساختار باکتری و مگنتوزوم مگنتواسپریلیم گریفس والدنز انجام شد. این از باکتری مارپیچی شکل، دارای دو تاژک یکی در ابتدا و یکی در انتها، که توانایی تولید ۲۰ مگنتوزوم دارند مشاهده شدند. اندازه مگنتوزوم این باکتری ۵۰ و ۶۰ نانومتر مشاهده شد که جز دسته مگنتوزوم‌های بزرگ در باکتری‌های مگنتوتاکتیک می‌باشد (شکل۳).



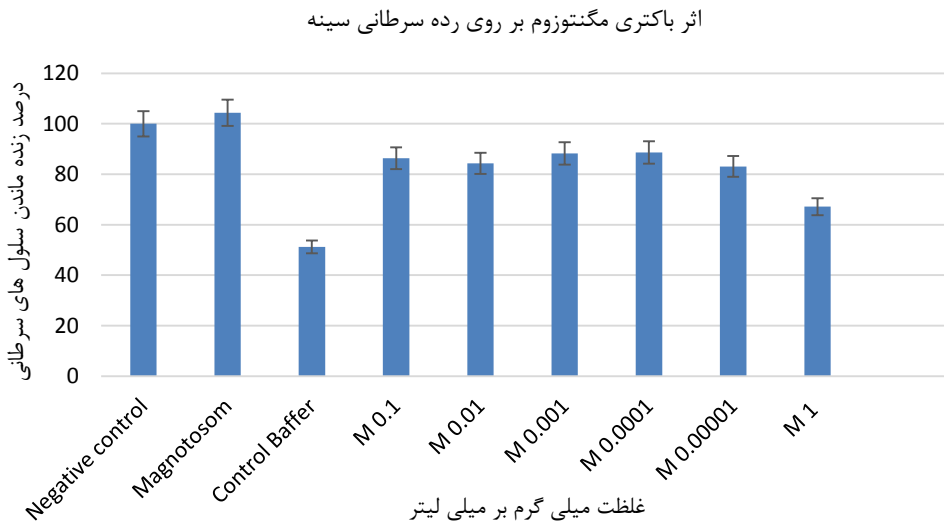
شکل ۳: ساختار مگنتوزوم با میکروسکوپ الکترونی. الف: باکتری مگنتواسپریلیم گریفس والدنز با مقیاس ۷۵۰ نانومتر. ب: ذرات مگنتوزوم با مقیاس ۶۰ نانومتر.

در شناسایی مولکولی باند ۱۱۶۶ جفت بازی حاصل شد که بعد از انجام تعیین توالی، ۹۸ درصد همولوژی با باکتری مگنتواسپیریایم گریفیس در بانک ژنی نشان داد. نتایج ژل الکتروز درشکل ۴ آمده است.



شکل۴: ژل الکتروفورز محصول PCR. ستون اول مارکر ۱۰۰ جفت بازی سیناژن. ستون دوم محصول PCR حاصل از ژن مگنتواسپریلیم گریفس والدنز با اندازه ۱۱۶۶ جفت باز می‌باشد.

پس از جداسازی مگنتوزوم باکتری مگنتوتاکتیک، اثر سیتوسیدالی آن‌ها در غلظت‌های مختلف به‌مدت ۲۴ ساعت ارزیابی شد، نتایج در شکل ۵ آمده است. توان سلول‌های زنده و خاصیت ضد سرطانی مگنتوزوم باکتری مگنتو اسپریلیم گریفس والدنز در غلظت‌های مختلف بر روی رده سلولی سرطان سینه MCF-7 در مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی (فاقد مگنتوزوم) مورد مقایسه قرار گرفته شد. نمودار نشان میدهد که روند اثر غلظت بر توان سلول های زنده و خاصیت ضد سرطانی نمونه مگنتوزوم باکتری جداسازی شده تاثیر مثبتی ندارد. علاوه‌براین ماکزیمم توان سلول‌های زنده در برابر مگنتواسپریلیم گریفس والدنز ۸۵ درصد می‌باشد که با توجه به تست آماری Kruskalwalis (p=۰/۰۴) این تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد.



شکل۵: ارزیابی اثر مگنتوزوم باکتری مگنتوتاکتیک در خوانش ۲۴ ساعته برروی رده‌ی سرطانی سینه MCF-7. M: باکتری مگنتواسپریلیم گریفس والدنز می‌باشد که سمیت سلولی مکنتوزوم باکتری مگنتواسپریلیم گریفس والدنز در غلظت‌های مختلف بر رده سلولی MCF-7 با نمونه‌های کنترل مقایسه شده است. با توجه به آنالیز آماری ۰/۰۴ حاصل شد.

عکس‌برداری با میکروسکوپ معکوس

اثر سیتوپاتیک مگنتوزوم باکتری مگنتواسپریلیم گریفس والدنزبر روی رده سلولی سرطان سینه با استفاده از میکروسکوپ معکوس مشاهده و ثبت شد (شکل ۶).

شکل ۶: عکس‌برداری با میکروسکپ معکوس (Micros, Austalia). سمت چپ: کنترل منفی، سمت راست: سلول‌های تیمار شده با مگنتوزوم باکتری مگنتواسپریلیم گریفس برروی رده سلول سرطانی سینه MCF-7 با بزرگ‌نمایی ۳۰ µm

سلول‌های رده سلولی سرطان سینه انسانی MCF-7، دوکی شکل بوده و به‌صورت چسبیده به‌هم مشاهده شدند. سلول‌های تیمار شده با مگنتوزوم باکتری مگنتو اسپریلیم گریفس والدنز، اتصال بین رده سلول‌های سرطانی از بین نرفته و حجم سلول کاهش نیافته و از بین رفتن شکل سلول و متلاشی شدن آن بسیار کم مشاهده شد. همان طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، تاثیر مگنتوزوم به‌تنهایی اثرات سایتوپاتیک نشان نداد و سلول‌های چسبیده به‌هم بدون از دست دادن ساختار باقی ماندند.

بحث

در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات طبیعی برای مقابله با سرطان با توجه به‌عوارض جانبی کم و تاثیرات امید بخش مورد توجه قرار گرفته است. روش‌های درمانی معمول با چالش‌های بسیاری روبه‌رو هستند و ازاین‌رو روش‌های درمانی جایگزین مورد نیاز زیادی هستند. علاوه‌براین، طبیعت بهترین الهام بخش را ارائه می‌دهد و اخیرا بسیاری از روش‌های درمانی با منشا طبیعی در برابر سرطان را ثابت کرده‌اند که باکتری‌های مغناطیسی و روش‌های درمانی مبتنی بر مگنتوزوم از جمله آن‌ها هستند (۲۰، ۲۱).

در کل درمان تومور بسیار دشوار است زیرا سوخت و ساز و میزان اکسیژن سلول‌های قسمت خارجی و داخلی تومور کاملا متفاوت است و همین امر درمان را با مشکل مواجه می‌کند. محققان دانشگاه مک گیل و پلیتکنیکی در کانادا برای حل این مشکل، از باکتری‌های مغناطیسی استفاده کردند. این باکتری‌ها به‌راحتی توسط یک میدان مغناطیسی ضعیف هدایت شده و به‌محل تومور می‌رسند و دارورسانی می‌کنند. یکی‌دیگر از مزیت‌های باکتری‌های مغناطیسی این است که این باکتری‌ها تمایل دارند به‌سمت مکان‌های فاقد اکسیژن مهاجرت کنند و هسته تومور دقیقا جایی است که در آن غلظت اکسیژن کم است. میدان مغناطیسی مورد نیاز برای حرکت نانوربات‌های باکتریایی بسیار ضعیف بوده و هیچ صدمه‌ای به‌بدن وارد نمی‌کند (۲۲).

پژوهش حاضر به‌منظور ارزیابی اثر سیتوسیدالی مگنتوزوم باکتری مگنتوسپریلیم گریفس والدنس برروی رده سلولی سرطان سینه مورد بررسی قرار گرفته شد. باکتری‌های مگنتوتاکتیک میکروآیروفیل بوده و تشکیل مگنتوزوم در آن فقط در فشار پایین اکسیژن میسر می‌باشد (۲۳).

در تحقیق حاضر نیز تولید نانوذرات آهن در شرایط میکروآیروفیل امکان‌پذیر بود. همچنین، این باکتری‌ها درمجاورت میدان مغناطیسی دارای مگنتوتاکسی بوده و به‌سمت قطب شمال حرکت می‌کردند که مطابق با تحقیقات پژوهشگران پیشین می‌باشد (۲۴).

در عکس‌های میکروسکوپ الکترونی SEM تجمعات خارج سلولی نانوذرات آهن توسط باکتری مگنتواسپیریلیم والدنس به‌وضوح قابل مشاهده می‌باشد، که نشان‌گر

توانایی ترشحی و خارج سلولی بودن نانوذرات تولیدی توسط این باکتری می‌باشد.

نتایج این پژوهش با پژوهش Alphandery و همکاران مشابه بود که این باکتری‌ها تحت تاثیر میدان ژئومغناطیسی و در جهت آن حرکت می‌کنند که به‌این رفتار باکتری‌ها مگنتوتاکسیس می‌گویند به‌عبارتی این باکتری‌ها یا به‌سمت شمال حرکت می‌کنند یا جنوب که این وابسته به جهت‌یابی مغناطیسی دوقطبی‌های سلولی است. Alphandery و همکارانش بیان کردند که این باکتری جز پروکاریوت‌های گرم منفی‌اند، متحرک بوده و از طریق تاژه حرکت می‌کنند. میکروائروفیل و مزوفیل و همه‌ی آن‌ها دارای مگنتوزوم می‌باشند. که در واقع مگنتوزوم ساختاری ویزیکول مانند در درون این باکتری‌ها است که در آن واکنش کانی سازی زیستی انجام می‌شود و طی آن اشکال معدنی شامل مگنتیت Fe_3O_4 و گرگیت Fe_3S_4 ایجاد می‌شود (۲۵).

معمولا نانوذرات مغناطیسی که به‌صورت شیمیایی سنتز شده‌اند و جهت حرارت درمانی مغناطیسی سرطان پستان مورد استفاده قرار می‌گیرند، بسیار کوچک بوده و دارای اندازه‌ای کمتر از ۲۰ نانومتر می‌باشند. از این روش با موفقیت بر روی سرطان پستان زیر پوست موش استفاده شده است (۲۶). در پژوهش حاضر بعد از جدا سازی مگنتوزوم باکتری، این ذرات با میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد و اندازه‌ی این ذرات در حدود ۶۰ نانومتر محاسبه شد. با توجه به این که اندازه‌ی ذرات در درمان سرطان بسیار مهم می‌باشد و با ایجاد فروپید در تومور باید عملکرد خود را نشان دهد، نمونه‌ی مگنتوزوم در این پژوهش از لحاظ اندازه مناسب ایجاد عملکرد در درمان رده‌ی سلولی سرطان پستان گزارش نشد زیرا اندازه آن‌ها بزرگ می‌باشد (۲۶).

باکتری‌های مگنتوتاکتیک و مگنتوزوم‌ها برای درمان سرطان در سال ۲۰۱۵ توسط Abhilasha استفاده شده و در درمان سرطان پیشنهاد شدند (۲۷). با توجه به گزارش‌های بالا می‌توان بیان کرد که نانوذرات می‌توانند در درمان سرطان بسیار موثر باشند. اما با توجه به این‌که ساختار این ذرات، در عملکرد این ذرات بسیار موثر می‌باشند، باید به اندازه‌ی این ذرات هم توجه شود. نانوذرات مغناطیسی به‌دلیل دارا بودن خصوصیت ویژه مغناطیسی، اهمیت کاربردی بالایی را در تشخیص و درمان سرطان پیدا کرده اند. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهند که نانوذرات مغناطیسی از طریق تقویت تولید گونه های فعال اکسیژن یا مکانیسم های ناشناخته دیگر، عملکرد داروهای ضد سرطانی (مانند داروی دوکسوروبیسین و سیسپلاتین) را در کشتن سلول‌های سرطانی تقویت می‌کنند. به‌عبارت‌دیگر نانوذرات مغناطیسی موجب افزایش سمیت سلولی داروی ضد سرطانی شده و نیز نقش مهمی را در انتقال دارو به سلول‌های توموری ایفا می‌کند (۲۷، ۲۸). امروزه فناوری‌های نانو برای انتقال هدفمند دارو برای کاهش عوارض جانبی درمان با داروها در حال توسعه است. محققان بر این عقیده‌اند که مگنتوزوم‌های تولید شده توسط باکتری‌های مگنتوتاکتیک یک نوع نانومواد مغناطیسی جدید با خصوصیات منحصر به‌فردی هستند که به‌عنوان نانوکریستال‌های آرمان‌گرایانه متمایزدسته‌بندی می‌شوند. با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود که باکتری‌های مغناطیسی با مگنتوزومهای با اندازه کوچک‌تر جداسازی و به‌عنوان حامل دارو ارزیابی شد.

نتیجه‌گیری

هدف از این پژوهش ارزیابی اثرسمیت سلولی مگنتوزوم باکتری مگنتوسپریلیم گریفس والدنس برروی رده سلولی سرطان سینه می‌باشد. در ایران تاکنون تحقیقی دال بر تاثیر مگنتوزوم باکتری‌های مگنتوتاکتیک بر روی سلول‌های سرطانی صورت نگرفته است. نتایج این تحقیق نشان داد که اندازه و ساختار نانوذرات آهنربایی از اهمیت

بالایی در از بین بردن سلول‌های سرطان سینه دارا می‌باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از انستیتو پاستور تهران و همچنین خانم دکتر حاتمی گیگلو، به‌خاطر همکاری شایسته‌شان در انجام پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Silveira TS, Martins JL, Silva KT, Abreu F, et al. Microscopystudies on uncultivated magnetotacticbacteria, Modern Research andEducational Topics in Microscopy. FORMATEX. 2007; 111-121.

2. Shamsipor F, Zamani AH, Ghodsi R. Conjugation of Nanoparticles for Monoclonal Antibodies to Super Paramagnetic Iron oxide Detection of HER2/neu antigen on Breast cancer cell lines. AJMB. 2009; 10(1): 1-31.

3. Bazylinski DA, Williams TJ, Lefèvre CT, Trubitsyn D, et al. Magnetovibrioblakemorei gen. nov., sp. nov., a magnetotactic bacterium (Alphaproteobacteria: Rhodospirillaceae) isolated from a salt marsh. INT J of SYST EVOL MICR. 2013; 63(Pt3): 1824-1833.

4. Lefèvre CT, Pósfai M, Abreu F, Lins U, et al. Morphological features of elongated-anisotropic magnetosome crystals in magnetotactic bacteria of the Nitrospirae phylum and the Deltaproteobacteria class. Earth Planet Sci Lett. 2011; 312(1-2): 194–200.

5. Yang J, Li SH, Huang X, Tabg T, et al. A key time point for cell growth and magnetosome synthesis of Magnetospirillum gryphis waldense based on real-time analysis of physiological factors. Fron Microbiol. 2013; 4(210): 173-182.

6. Yan l, zhang S, chen P, liu H, et al. Magnetotactic bacteria, magnetosomoses and their application. Microbiol Reserch. 2012;167(9): 507-519.

7. Bazylinski DA, Schlezinger DR, Howes BH, Frankel RB,et al. Occurrence and distribution of diverse populations of magnetic protists in a chemically stratified coastal salt pond. Chemical Geology. 2000;169(3-4): 319-328.

8. Hayashi K, Nakamura M, Miki H, Ozaki S, et al. Magnetically Responsive Smart Nanoparticles for Cancer Treatment with a Combination of Magnetic Hyperthermia and Remote-Control Drug Release. Theranostics. 2014; 4(8): 834-844.

9. Alphandéry E. Perspectives of breast cancer thermotherapies. J Cancer. 2014; 5(6):472-9.

10. Xiang L, Wei J, Jianbo S, Guili W, et al. Purified and sterilized magnetosomes from Magnetospirillum gryphis waldense MSR-1 were not toxic to mouse fibroblasts in vitro. Lett Appl Microbiol. 2007; 45(1): 75-80.

11. Hatami-GiklouJajan L, Hosseini SN, Ghorbani M, Mousavi SF, et al. Effects of Environmental Conditions on High-Yield Magnetosome Production by Magnetospirillum gryphis waldense MSR-1. Iran Biomed J. 2019; 23(3): 209-19.

12. Dziuba M, Koziaeva V, Grouzdev D, Burganskaya E, et al. Magnetospirillum caucaseum sp. nov., Magnetospirillum marisnigri sp. nov.and Magnetospirillum moscoviense sp. nov., freshwater magnetotactic bacteria isolated from three distinct geographical locations in European Russia. Int J Syst Evol Microbiol. 2016; 66(5): 2069-77.

13. Fdez-Gubieda ML, Muela A, Alonso J, García-Prieto A, et al. Magnetitebiom ineralization in Magnetospirillum gryphis waldense: time-resolved magnetic and structural studies.ACS Nano. 2013; 23;7(4): 3297-305.
14. Raschdorf O, Schüler D, Uebe R. Preparation of Bacterial Magnetosomes for Proteome Analysis. Methods Mol Biol. 2018; 1841: 45-57.
15. Jogler C, Lin W, Meyerdierks A, Kube M, et al. Toward Cloning of the MagnetotacticMetagenome: Identification of Magnetosome Island Gene Clusters in Uncultivated Magnetotactic Bacteria from Different Aquatic Sediments. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(12): 3972–3979.
16. Moazamian E, Bahador N, Azarpira N, Rasouli M. Anti-cancer Parasporin Toxins of New Bacillus thuringiensis Against Human Colon (HCT-116) and Blood (CCRF-CEM) Cancer Cell Lines. Curr Microbiol. 2018; 75(8): 1090-1098.
17. Ohba M, Mizuki E, Uemori A. Parasporin, A New Anti-Cancer Protein Group from Bacillus Thuringiensis. Anticancer Res. 2009; 29(1): 427-433.
18. Nabiuni M, Yarahmadi A, Delfan B, Mirsepasi S. The anti-proliftrative and lethal effects of D-alpha tocopheryl succinate (vitamin E succinate) and Honey bee venom (BV) on human promylocyte leukemia cell line (HL-60). JCT. 2013; 3(4): 287-296.
19. JohnJacob J, Suthindhiran K. Magnetotactic bacteria and magnetosomes. Mater Sci Eng. 2016; (68)1:919-928.
20. Yan L,Xing W. Chapter 12 - Methods to Study Magnetotactic Bacteria and Magnetosomes. Methods in Microbiology. 2018; 45: 357-386.
21. Chien T, TalDanino A. Advances in bacterial cancer therapies using synthetic biology. Curr Opin Cell Biol. 2017; 5: 1-8.
22. Arakaki A, Nakazawa H, Nemoto M, Mori T, et al. Formation of magnetite by bacteria and its application. J R SOC INTERFACE. 2008; 5(26): 977-999.
23. Vincenti B, Ramos G, Cordero ML, Douarche C, et al. Clement E. Magnetotactic bacteria in a droplet self-assemble into a rotary motor. Nat Commun. 2019; 8; 10(1): 5082.
24. DeNardo SJ, DeNardo GL, Natarajan A, Miers LA, et al. Thermal dosimetry predictive of efficacy of 111In-ChL6 nanoparticle AMF- induced thermoablative therapy for human breast cacer in mice. J Nucl Med. 2007; 48(3): 437-444.
25. Alphandery E, Chebbi I, Guyot F, Durand-Dubief M. Use of bacterial magnetosomes in the magnetic hyperthermia treatment of tumours: A review. Int J Hyperth. 2013; 39(1): 801-9.
26. Alphandery E. Efficacy of Thermotherapy to Treat Breast Cancer: A Review. Alphandéry, Journal Women’s Health Care. 2013; 1: 2-4.
27. Abhilasha S. Magnetotactic bacteria for cancer therapy. Biotechnol Let. 2015; 37(3): 491-498.
28. Mathuriya AS. Magnetotactic bacteria: nanodrivers of the future. Crit Rev Biotechnol. 2015; 36(5): 788-802.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2019; 10(2) *Original Article*

Evaliuation of Cytotoxicity effect of *Magnetospirillum gryphiswaldense*'s Magnetosome on MCF-7 Cell Line

Hashemi Nejad F, M.Sc.[1], Moazamian E, Ph.D.[1*], Salouti M, Ph.D.[2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shiraz Islamic Azad University, Shiraz, Iran
2. Biology research center, Zanjan Islamic Azad University, Zanjan, Iran

* Email corresponding author:elhammoazamian@gmail.com

Received:15 Jul. 2019 Accepted: 26 Nov. 2019

Abstract

Aim: The aim of this study was purification of magnetosomes of *Magnetospirillum gryphiswaldense* and investigation cytotoxicity effect of the purified particles of this bacterium on the breast cancer cell lines.

Material and Methods: In this study, the standard strain of bacteria was cultured on DSMZ broth at temperature of 28°C for seven to ten days and incubated under the microaeraphilic conditions. To ensure phenotype tests, the PCR reactions were performed using specific primers (MT1166), associated with scanning electron microscope imaging. The influence of purified magnetosome from *Magnetospirillum gryphiswaldense* in various concentrations was investigated on the breast cancer cell lines. Kruskalwalis test was performed for statistical analysis.

Results: Gram staining results showed that the bacterium was gram negative spirillum. Electronic micrographs indicated that the magnetosome of this bacterium was 60 nanometer in size. Purified magnetosome from *Magnetospirillum gryphiswaldense* did not show considerable cytotoxic properties on the breast cancer cell lines. The percentage of living cells against magnetosomes purified from the bacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* was 85% (p=0.04).

Conclusion: *Magnetospirillum gryphiswaldense* magnetosomes killed 15% of the cancer cells. The size and structure of magnetosomes of Magnetotactic bacteria are great importance in the elimination of the breast cancer cells.

Keywords: *Magnetospirillium gryphiswaldense*, magnetosome, breast cancer