دوفصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال یازدهم، شماره ۲، صفحه ۱۱۵ - ۱۰۸ (اسفند ۱۳۸۷)

غربال‌گری فرآورده‌های حاصل از استرپتومایسس‌ها با استفاده از تکنیک کشت سلولی به منظور شناسایی مواد آنتی‌تومور

دکتر سعید تاج‌بخش[*1]، سپهر صالحی[2]، دکتر نسرین معظمی[3]
[1] استادیار باکتری شناسی، گروه میکروب شناسی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
[2] کارشناس ارشد باکتری شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون
[3] استاد میکروب شناسی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی وصنعتی ایران- تهران

چکیده

زمینه: یافتن مواد آنتی‌تومور جدید از اهمیت خاصی در جهت درمان و مبارزه با سرطان برخوردار است. استرپتومایسس‌ها از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های تولید کننده مواد آنتی‌تومور می‌باشند. هدف از این مطالعه، یافتن مواد آنتی‌تومور در استرپتومایسس‌های جدا شده از خاک توسط تکنیک کشت سلولی بود.

مواد و روش‌ها: منحنی رشد استرپتومایسس تهیه شد و به منظورتولید فرآورده‌های میکروبی، نخست سوسپانسیون اسپور به محیط کشت اولیه تلقیح شد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، باکتری‌ها به محیط کشت تولیدی انتقال یافتند. پس از ۱۲۰ساعت انکوباسیون در محیط کشت تولیدی، در اواخر فاز ثابت رشد فرآیند تولید قطع شد ومایعات تخمیری استرپتومایسس‌ها جمع‌آوری شدند. برای غربال‌گری مواد آنتی‌تومور، روش «سنجش افتراقی مواد سایتوتوکسیک منتشر شده درآگار» بکار گرفته شد که طی آن مایعات تخمیری مذکور روی سلول‌های T مربوط به لنفوم موش مورد آزمایش قرار گرفتند. فرآورده‌هایی که قادر به کشتن سلول‌های سرطانی بودند، با نمایان شدن هاله‌ای آبی رنگ در کشت‌های حاوی سلول سرطانی مشخص شدند.

یافته‌ها: مجموعاً، ۱۲۵ فرآورده مربوط به ۱۲۵ سوش استرپتومایسس به دست آمد که دو فرآورده توانستند پاسخ مثبت (هاله آبی) تولید نمایند.

نتیجه‌گیری: دو فرآورده استرپتومایس‌های جدا شده از خاک، فعالیت سایتوتوکسیک در کشت سلولی حاوی سلول‌های توموری از خود نشان دادند، این دو فرآورده می‌توانند ویژگی آنتی‌توموری داشته باشند که نیازمند پژوهش‌های آینده می‌باشند.

واژگان کلیدی: استرپتومایسس، آنتی‌تومور، سرطان، سایتوتوکسیک
دریافت مقاله: ۸۷/۹/۱۳- پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۱۴

* بوشهر، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی و انگل شناسی، صندوق پستی ۳۶۳۱
Email: tajbakhshsaeed@yahoo.com

مقدمه

سـرطان بیماری مهلکی است که بشر از دیرباز با آن درگیر بوده است. با وجود این‌که امروزه مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی کاهش پیـدا کرده ولی کماکان سـرطان مشکل عمده‌ای در پزشـکی به شمار می‌آید به طوری‌که در آمریکا پس از بیماری‌های قلبی- عروقی، دومیـن علت مرگ و میر می‌باشد (۱). سرطان آثار فراگیری را برجای می‌گذارد و علاوه بر عوارض جسمی، از نظر روانی نیز بیمار در شرایط نامطلوبی قرار می‌دهد. لذا هرگونه پژوهش در جهت درمان و مبارزه با این عارضه، از اهمیت خاصی برخوردار است.

یک گروه از مهم‌ترین داروها در زمینهٔ شیمی درمانی تومورها، آنتی‌تومورهایی هستند که از میکروارگانیسم‌ها و به ویژه استرپتومایسس‌ها بدست می‌آیند و معمولاً به نام آنتی‌بیوتیک‌های ضد تومور خوانده می‌شوند (۲ و ۳). مثلاً اکتینـومایسیـن- D توسط استرپتـومایسس پوروولـوس (Streptomyces purvuls) و اکتینومـایسیـن- A وB توسـط استرپتـومـایسـس آنتـی‌بیوتیکـوس (S. antibiuticus) تولید می‌گردند (۳). میتومایسین-C از استرپتومایسس پورپوراسنس (S purpurascens) (۴) و کروموکسی مایسیـن از استرپتومایسـس لیـابـانی (S. liabani) (۵) بدست آمده‌اند. موررومایسین- A و B (moromycins A and B) که داروهای جدیدی می‌باشند و همچنین میترامایسین (mithramycin) نیز توسط استرپتومایسس‌ها تولید می‌شوند (۶ و ۷).

استرپتومایسس‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های عمدهٔ مولد آنتی‌بیوتیک‌های ضد تومور، باکتری‌هایی هستند هوازی، گرم مثبت، و بدلیل عدم جدا شدن سلول‌ها پس از تقسیم، به صورت میسلیوم پدیدار می‌شوند. بنابراین بارزترین جنبهٔ مورفولوژی استرپتومایسس، تشکیل فیلامنت‌های رویشی و هوایی بسیارمنشعب می‌باشد (۲). در کشت‌های مایعی که در آن‌ها توسط شیکر عمل هوادهی انجام می‌گیرد، استرپتومایسس به شکل میکروکلنی‌ها یا تجمعات کروی رشد می‌کند. این باکتری چه در محیط جامد و چه در محیط مایع رنگدانه‌های قابل انتشاری را تولید می‌نماید (۲ و ۸).

یافتن ترکیبات آنتی‌توموری جدید یکی از مسائل اصلی در مطالعات مربوط به آنتی‌تومورها محسوب می‌گردد. برای دستیابی به این هدف، گام نخست این است که تعدادی سوش استرپتومایسس از طبیعت جداسازی گردد و پس از تولید فرآورده‌های این ارگانیسم‌ها، تکنیک‌های غربال‌گری روی آن‌ها پیاده شده و آن فرآورده‌هایی که دارای فعالیت آنتی-توموری هستند، شناسایی شوند. بدین ترتیب سوش‌های میکروبی مفیدی که طی روش‌های غربال‌گری مشخص و انتخاب شده‌اند، در اختیار محققین قرار می‌گیرد (۳ و ۹). برای این منظور، هم روش‌هایی در موجود زنده (in vivo) وجود دارد که در طی آن‌ها از موش‌های مبتلا به لوسمی لیمفوئید L1210 و یا لوسمی P388 استفاده می‌شود (۱۱-۹) و هم روش‌هایی در ویترو (in vitro) انجام می‌شود که یکی از آن‌ها تکنیک کشت سلولی می‌باشد (۱۲ و ۱۳). شایان ذکر است که از لاین‌های سلولی L1210 و P388 در ویتـرو نیـز استفاده شـده است (۹ و ۱۴). در این پـژوهش جهت غربـال‌گری فرآورده‌هـای حاصـل از استرپتومایسس‌ها، تکنیکی به نام «سنـجش افتراقی

مواد سایتوتوکسیک منتشر شده در آگار» (Differential Agar Diffusion Bioassay for SubstancesCytotoxic) یا روش DADBCS (۱۵) بکار برده شده است.

مواد و روش‌کار

قبلاً با به کارگیری روش‌های ویژهٔ جداسازی، ۱۲۵ گونه مجهول استرپتومایسس از خاک جداسازی شده بود. جهت غربال‌گری فرآوردهٔ این باکتری‌ها به منظور شناسایی مواد آنتی‌تومور، لازم بود که فرآورده‌های تخمیری (fermentation broth) آن‌ها تولید شود. با توجه به اینکه آنتی‌تومورها متابولیت ثانویه هستند (۱۶ و ۱۷) و در فاز ثابت رشد باکتری تولید می‌گردند، در مرحلهٔ اول لازم بود که منحنی رشد استرپتومایسس تهیه گردد.

الف- تهیه منحنی رشد

منحنی رشد برای یکی از استرپتومایسس‌های جدا شده به این صورت تهیه شد: محیط ISP-4 (International Streptomyces project -4) در چند لولهٔ آزمایش بزرگ تهیه گردید و استرپتومایسس بر روی آن کشت داده شد. پس از ۴ روز، استرپتومایسس به خوبی روی این محیط اسپور تولید نمود. سپس اسپورهای موجود بر روی سطح محیط را به وسیله محیط مایع Spo (Sporolation Broth) شسته و سوسپانسیون اسپور تهیه شد و نهایتاً غلظت آن به میزان ۱۰۷ اسپور در میلی‌لیتر تنظیم گردید. در مرحله بعد به طور جداگانه ۲/۵ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون اسپور در ۱۶ عدد ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد که این ارلن‌ها حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط Spo مایع بودند. تعداد ۱۵ ارلن در انکوباتور شیکردار با میزان چرخش ۲۲۰ rpm، اینکوبه شدند. یکی از ارلن‌ها به عنوان زمان صفر در نظر گرفته شد و بدون شیک دادن و انکوباسیون، سوسپانسیون میکروبی آن توسط کاغذ صافی واتمن صاف گردید و به وسیله فور خشک شد. در رابطه با ارلن‌های درون شیکر، هر ۸ ساعت یک ارلن از شیکر خارج شد و سوسپانسیون میکروبی آن به طریق فوق الذکر صاف و خشک گردید. بنابراین ۱۶توده میکروبی خشک شده از ۱۶ ارلن بدست آمد که مربوط به زمان‌های صفر تا ۱۲۰ساعت بود و توسط وزن کردن و کم نمودن وزن کاغذ، وزن خشک هر کدام از آن‌ها بدست آمد و منحنی رشد ترسیم گردید.

ب- تولید فرآورده

از هر سوش استرپتومایسس، یک کشت بر روی محیط ISP-4 شیب دار تهیه شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اینکوبه شد. به طور متوسط، پس از ۴ روز اینکوباسیون، سطح ISP-4 را به طور کامل میکروب و به ویژه اسپور آن فراگرفت. در مرحله بعد کل میکروارگانیسم و اسپورهای سطح ISP-4 شسته شده و به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت اولیه (preculture medium) موجود در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری، تلقیح گردید. محیط کشت اولیه، BHI مایع (Brain Heart Infusion Broth) بود. ارلن حاوی کشت اولیه در انکوباتور شیکردار در ۲۱۰rpm (۱۰) و در دمای ۳۰°C قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت (۱۰و۱۸)، ۲/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی کشت اولیه به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولیدی (production medium) موجود در ارلن ۲۵۰

میلی‌لیتری انتقال یافت. محیط کشت تولیدی، محیط Spo مایع بود. این محیط با همان شرایط در اینکوباتور شیکردار قرار گرفت با این تفاوت که مدت زمان انکوباسیون حدوداً ۵ روز در نظر گرفته شد. استرپتومایسس در این مدت وارد فاز ثابت رشد شده و متابولت‌های ثانویه را تولید می‌نماید. لذا حداکثر پس از ۵ روز پروسه قطع شد. محتویات محیط کشت تولیدی با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ شده و مایع رویی آن جمع‌آوری گردید.

ج-غربال‌گری فرآورده‌ها توسط تکنیک کشت سلولی

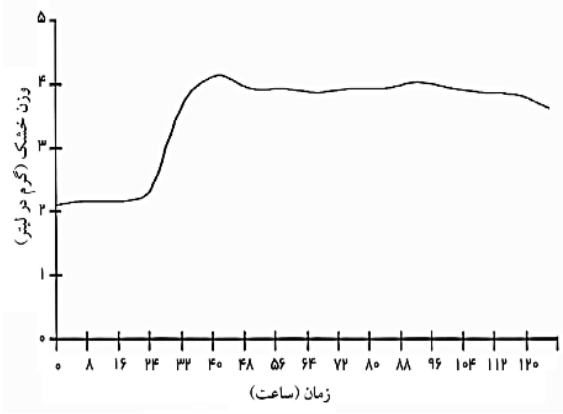
کشت سلول‌های توموری مداوم (continous) به منظور غربال‌گری آنتی‌تومورها بکار می‌رود که در آن اثر آنتی‌توموری مواد را به طور مستقیم بر روی سلول‌های سرطانی بررسی می‌نمایند. سلول سرطانی مورد استفاده، EL-4 نام داشت که در واقع یک سلول T لنفوم موشی بود و از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران خریداری گردید. EL-4 به صورت مداوم و سوسپانسیونی رشد می‌نماید. همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، تکنیک مورد استفاده، «سنجش افتراقی مواد سایتوتوکسیک منتشر شده در آگار» نام داشت (۱۵). در این روش به ۳/۶ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی EL-4 در محیط RPMI-1640 که شمارش آن ۴×۱۰۶ cell /ml بود، ۲/۷ میلی‌لیتر سرم جنین گاو، ۱ میلی‌لیتر محلول گلوکز (۰/۰۷۵ گرم بر میلی‌لیتر) و ۷/۶ میلی‌لیتر محلول آگار ۲/۸ درصد اضافه شد. سوسپانسیون نهایی بدست آمده به سرعت در یک پلیت ۹ سانتی‌متری ریخته شد که پس از جامد شدن آگار، سلول‌ها در سطح و عمق محیط گیر می‌افتادند.

پس از جامد شدن آگار، دیسک‌های کاغذی با قطر ۱۲/۵ میلی‌متر به فرآورده‌های استرپتومایسس آغشته گردید و بر روی سطح آگار قرار گرفت. میتومایسین- C با غلظت ۲۰۰µg/ml، به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد که یک دیسک نیز به آن آغشته و در پلیت گذاشته شد. پس از قرارگیری دیسک‌ها بر روی سطح آگار، پلیت به مدت ۸ تا ۱۰ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد گاز Co2 اینکوبه شد. در مدت زمان اینکوباسیون، فرآورده‌ها از دیسک به درون آگار منتشر شده و در صورتی که فعال باشند، سلول‌های سرطانی ناحیه قرارگیری دیسک را می‌کشند. پس از ۸ تا ۱۰ ساعت به منظور بررسی فعالیت سایتوتوکسیک، نخست دیسک‌ها از روی سطح آگار برداشته شدند. سپس سطح آگار کاملاً با محلول ۰/۰۵ درصد رنگ حیاتی (DPIP 2,6- dichloro phenol 2–indo - phenol) پوشانده شد. در اثر رنگ آبی DPIP، سطح و عمق محیط آبی رنگ می‌شد. پس از ۵ دقیقه، اضافی رنگ دور ریخته شد و پلیت به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد گاز Co2 قرار گرفت که پس از این مدت، نتیجه آزمایش بررسی شد.

یافته‌ها

الف- منحنی رشد

منحنی ۱، رشد مربوط به یک سوش استرپتومایسس را نشان می‌دهد. آنتی‌تومورها به عنوان متابولیت ثانویه در فاز ثابت رشد تولید می‌شوند. با توجه به منحنی رشد، زمان فاز ثابت رشد مشخص گردید؛ بنابراین در اواخر این زمان فرآیند تولید را قطع کرده و آنتی‌تومورها را پی‌جویی نمودیم.



نمودار ۱: منحنی رشد یک سوش استرپتومایسس

ب- کشت استرپتومایسس در محیط مایع و تولید فرآورده

در محیط ISP-4، استرپتومایسس‌ها به طور میانگین پس از ۴ روز به خوبی رشد کردند و مقدار زیادی اسپور تولید نمودند. در محیط کشت اولیه، استرپتومایسس‌ها پس از ۴۸ ساعت رشد خوبی نشان دادند و کلنی آن‌ها به صورت تجمعاتی محیط کشت را پر کرد. در محیط تولیدی نیز باکتری‌ها به صورت تجمعات مشخصی رشد خود را نشان دادند. ضمناً گاهی در مراحل نهایی رشد پیگمان‌ها نیز مشاهده می‌شدند.

ج-غربال‌گری فرآورده ها توسط روش سنجش افتراقی مواد سایتوتوکسیک منتشر شده در آگار (DADBCS)

سلول EL-4 در محیط مغذی آگاردار در پلیت جایگزین شد. سپس دیسک‌های آغشته به فرآورده‌های مورد آزمایش بر روی آن قرار گرفت و پلیت به مدت ۸ تا ۱۰ساعت در انکوباتور قرار گرفت. در مدت زمان اینکوباسیون، فرآورده‌ها در صورت فعال بودن، موجب مرگ سلول‌های ناحیه قراگیری دیسک شدند. پس از ۱۰ ساعت، دیسک‌ها را از روی محیط برداشته و محیط با رنگ DPIP پوشانده شد که DPIP رنگ آبی به محیط داد. پس از ۱/۵ تا ۲ ساعت انکوباسیون، نتیجه آزمایش آماده گردید، بدین صورت که سلول‌های زنده رنگ را احیاء کرده و در نتیجه در ناحیه‌ای از پلیت که سلول زنده وجود داشت، رنگ آبی محیط از بین می‌رفت، ولی سلول‌های مرده توانایی احیاء رنگ را نداشتند و در نتیجه در محل قرارگیری دیسک و تأثیر فرآورده‌ها (در صورتی که فرآورده سلول را از بین برده باشد) رنگ احیاء نشده و به صورت هاله آبی رنگ نمایان می‌شد. از مجموع ۱۲۵ فرآورده مربوط به ۱۲۵ سوش استرپتومایسس، دو فرآورده توانستند پاسخ مثبت (هاله آبی) در این آزمایش ایجاد نمایند.

بحث

جهت تولید فرآورده‌های تخمیری، استرپتومایسس‌ها در محیط تولیدی به مدت ۵ روز اینکوبه شدند که استرپتومایسس در این مدت وارد فاز ثابت رشد شده و متابولیت‌های ثانویه مثل آنتی‌بیوتیک‌های ضد تومور را تولید نمودند. وی (Wei) و همکاران (۱۸)، استرپتومایسس آرانه ۲۰۴۶ (S. arane 2046) را به مدت ۱۲۰ تا ۱۴۴ ساعت در محیط تولیدی اینکوبه کردند و پس از این مدت، میزان مناسبی از آنتی‌تومور بدست آوردند. مائیس (Maiese) و همکاران (۱۹) زمان ۹۶ ساعت را در نظر گرفتند. آن‌ها نشان دادند که پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت، میزان آنتی‌بیوتیک به حداکثر رسیده و سپس ثابت باقی می‌ماند. آنتی‌تومورها متابولیت‌های ثانویه هستند و در فاز ثابت رشد تولید می‌شوند. با توجه به محدوده زمانی فاز ثابت رشد (تقریباً از ساعت چهل و هشتم به بعد) در منحنی رشد استرپتومایسس (منحنی ۱) و همچنین باتوجه به زمان‌هایی که توسط پژوهشگران فوق الذکر بکار رفته، یک زمان اینکوباسیون ۵ روزه را برای تولید فرآورده‌ها

مناسب پنداشتیم که طی این مدت در فاز ثابت رشد، آنتی‌تومور تولید شده و به بیرون از باکتری ترشح می‌شود.

در این تحقیق، فرآورده‌های تولیدی از محیط مایع بیرون سلول باکتری جمع‌آوری گردید. مائیس و همکاران (۱۹)، ماتسون (Matson) و همکاران (۲۰) و بسیاری از محققین دیگر نیز فرآورده‌های تولیدی خود را از مایع تخمیری بیرون سلولی منتشر شده در بین میسلیوم‌ها بدست آورند (۱۷ و ۲۱). این گونه عملکرد بدین دلیل است که به طور کلی بیشتر متابولیت‌های ثانویه به خارج از سلول میکروارگانیسم تولید کننده ترشح می‌شود و تعداد کمی از آن‌ها درون سلول باقی می‌ماند. این امر به ویژه در مورد آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ساتیوتوکسیک صادق است؛ زیرا باقی ماندن این مواد درون باکتری ممکن است برای خود آن باکتری مضر باشد (۲۲). دلیل بارز دیگر که نشان دهنده خارج سلولی بودن چنین فرآورده‌هایی است، نقش آن‌هاست چرا که این‌گونه مواد باید در جهت رقابت بکار روند.

در غربال‌گری توسط روش DADBCS، دو فرآورده اثر سایتوتوکسیک روی سلول‌های سرطانی نشان دادند. به طور کلی سیستم غربال‌گری با استفاده از کشت سلول‌های سرطانی، یک سیستم معتبر برای شناخت ضد سرطان‌ها به شمار می‌آید. اینویوئی (Inouye) و همکاران کشت سلول P388 را بکار بردند و ممانعت از رشد این سلول‌ها را توسط آنتی‌تومور استرپتونیگرین مشخص کردند (۲۳). امروزه استرپتونیگرین به عنوان یک آنتی‌تومور قوی پذیرفته شده است. ممانعت از رشد سلول KB توسط مایع تخمیری سوش C-38-383، گزارشی بود که بوش (Bush) و همکاران منتشر کردند (۱۰) که بعداً این فرآورده ربکامایسین (rebeccamycin) نامیده شد و فعالیت آن بر ضد تومورهای موشی ثابت گردید. ماتسون و همکاران (۲۰) در طی مطالعه‌ای دیگر، مایع تخمیری سوش C-49-OC9 را بر روی سلول C26 که مربوط به کلون موش می‌باشد، امتحان کردند که ماده مذکور اثر سلول کشی روی C26 داشت. فعالیت آنتی‌توموری این فرآورده در تومورهای موشی نیز نشان داده شده است. با توجه به مطالعات فوق الذکر، آشکار است که بین فعالیت آنتی‌توموری در کشت سلول (در ویترو) با فعالیت آنتی‌توموری در حیوان، رابطه بسیار نزدیکی وجود دارد به طوری‌که بسیاری از داروهایی که بر روی تومورهای آزمایشی حیوانات مؤثربودند، در این روش‌ها نیز پاسخ مثبت تولید کرده‌اند (۹ و ۱۴). با این وجود برای اینکه فعالیت آنتی‌توموری فرآورده‌های سایتوتوکسیک مطالعهٔ ما در حیوان اثبات گردد، جا دارد که این فرآورده‌ها روی موش‌های مبتلا به سرطان‌های استاندارد نیز آزمایش شوند. به این نکته نیز باید اشاره شود که هرچند در زمینه شناسایی مواد ضد سرطان غالباً سلول P388 بکار می‌رود، ولی همان‌گونه که در مطالعات پژوهشگران مختلف مشاهده می‌گردد، لاین‌های سلولی گوناگونی در این رابطه مورد استفاده قرار می‌گیرد. ما به دو علت از سلول EL-4 استفاده نمودیم: یکی این که به صورت سوسپانسیون رشد می‌کند که این ویژگی، لازمه روش DADBCS می‌باشد و دیگر این که در مطالعات غربال‌گری، سلول‌های سرطانی موشی کارایی وسیعی دارند و EL-4 نیز یک سلول موشی است.

از مجموع ۱۲۵ فرآورده مربوط به ۱۲۵ سوش استرپتومایسس، دو فرآورده توانستند پاسخ مثبت تولید

نمایند. بنابراین در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان نمود که با توجه به این که این دو فرآورده فعالیت سایتوتوکسیک در کشت سلولی حاوی سلول‌های توموری نشان دادند، می‌توانند ویژگی آنتی‌توموری داشته باشند.

References:

1. Stricker TP, Kumar V. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al, editors. Robbines basic pathology. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, 173-223.
2. Mitchell TG. Actinomycetes. In: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, et al, editors. Zinsser microbiology. 20th ed .USA: Prentice Hall International Inc, 1992, 526-37.
3. Tsukagoshi S, Takeuchi T, Hmezawa H. Antitumor substance. In: Rehm HJ, Reed G, editors. Biotechnology. Vol 4. Weinheim: Verlag Chemie, 1986, 509-30.
4. Mandwal AK, Subramanian PM, Bhatia MC, et al. Production of mitomycin C and porfiromycin by Streptomyces species. J Nat Prod 1985; 48: 334.
5. Iwami M, Kawai Y, Kiyoto S, et al. A new antitumor antibiotic, Chromoxymycin.1. Taxonomic studies on the producing strain: a new subspecies of the genus Streptomyces. J Antibiot 1986; 39: 6-11.
6. Abdelfattah MS, Kharel MK, Hitron JA , et al. Moromycins A and B, isolation and structure elucidation of C-glycosylangucycline-type antibiotics from Streptomyces sp. KY002. J Nat Prod 2008: 71: 1569-73.
7. Perez M, Baig I, Brana AF, et al. Generation of new derivatives of the antitumor antibiotic mithramycin by altering the glycosylation pattern through combinatorial biosynthesis. Chembiochem 2008; 9: 2295-304.
8. Locci R. Streptomycetes and related genera. In: Williams ST, editor. Bergey's manual of systematic bacteriology. 8th ed. Vol 4. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, 2451-508.
9. Nakayama K. Prescreen of antitumor compounds. In: Rhem HJ, Reed G, editors. Biotechnology. Vol 1. Weinheim: Verlag Chemic, 1986, 395-9.
10. Bush JA, Long BH, Catino JJ, et al. Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent. J Antibiot 1987: 40: 668-78.
11. Lam KS, Veitch JA, Forenza S, et al. Biosynthesis of elsamicin A, a novel antitumor antibiotic. J Nat Prod 1989; 52: 1015-21.
12. Zandi K, Farsangi MH, Nabipour I, et al. Isolation a 60 KDa protein with in vitro anticancer activity against human cancer cell lines from the purpule fluid of the Persian Gulf Sea hare, Aplysia dactylomela. Afr J Biotechnol 2007; 6:1280-83.
13. Mizui Y, Sakai T, Iwata M, et al. Pladienolides, new Substances from Culture of Streptomyces Platensis Mer-11107.III. In vitro and in vivo antitumor activities. J Antibiot 2004; 57: 188-96.
14. Elespuru RK, White RJ. Biochemical prophage induction assay: a rapid test for ntitumor agents that interact with DNA. Cancer Res 1983; 43: 2819-30.
15. Perlman D, Lummis WL, Geiersbach HJ. Differential agar-diffusion bioassay for cytotoxic substances. J Pharm Sci 1969; 58: 633-4.
16. Dietera A, Hamm A, Fiedler HP, et al. pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic, and antitumor compound produced by a novel alkaliphilic Streptomyces strain. J Antibiot 2003; 56: 639-46.
17. Hu JF, Wunderlich D, Thiericke R, et al. Jenamidines A to C: unusual alkaloides from Streptomyces sp. with specific antiproliferative properties obtained by chemical screening. J Antibiot 2003; 56:747-54.
18. Wei TT, Chan JA, Roller PP, et al. Detection of gilvocarcin antitumor complex by a biochemical induction assay (BIA). J Antibiot 1982; 35: 529-32.
19. Maiese WM, Lechevalier MP, Lechevalier HA, et al. LL-E19020 alpha and beta. Animal growth promoting antibiotics: taxonomy, fermentation and biological activity, J Antibiot 1989; 42: 1489-93.
20. Matson JA, Bush JA. Sandramycin, a

novel antitumor antibiotic produced by a Nocardioides sp. Production, isolation, characterization and biological properties. J Antibiot 1989; 42: 1763-7.
21. Martin GD, Tan LT, Jensen PR, et al. Marmycin A and B , cytotoxic pentacyclic C-glycosides from a marine Sediment – derived actinomycete related to the genus Streptomyces. J Nat Prod 2007; 70:1406-9.
22. Vining LC. Secondary metabolism. In: Rehm HJ, Reed G, editors. Biotechnology. Vol 4. Weinheim: Verlag Chemic, 1986, 19-38.
23. Inouye Y, Okada H, Roy SK, et al. Biological properties of streptonigrin derivatives. I. Antimicrobial and cytocidal activities. J Antibiot 1985; 38: 1429-32.