دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و پنجم، شماره ۳، صفحه ۲۲۶-۲۱۰ (مرداد و شهریور ۱۴۰۱)

Iran South Med J 2022; 25(3): 210-226

ارزیابی اثر سمیت رنگدانه استخراج شده از *Haloarcula sp.* بر رده سلولی MDA-MB-468 سرطان پستان

ساغر شهبازی (MSc)[1*]، محسن زرگر (phD)[1]، محمدرضا ذوالفقاری (phD)[1]، محمدعلی آموزگار (phD)[2***]**

[1] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
[2] گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۲/۵- پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۵/۱۲)

چکیده

زمینه: میکروارگانیسم‌های نمک دوست، پتانسیل تولید بیومولکول‌های جدید از جمله ترکیبات ضدسرطانی برای استفاده در کاربردهای پزشکی، را دارند. این مطالعه با هدف بررسی خواص ضدسرطانی رنگدانه‌های استخراج شده از آرکی نمک دوست بومی ایران انجام شد.

مواد و روش‌ها: عصاره رنگدانه ***Haloarcula sp.*** که قبلاً از دریاچه آران- بیدگل جداسازی و شناسایی شده بود، استخراج گردید. اثر رنگدانه استخراج شده، بر روی رده سلولی **MDA-MB-468** سرطان پستان، با استفاده از روش **MTT** و رنگ‌آمیزی **PI** و **FITC** مورد آزمایش قرار گرفت. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصارهٔ رنگدانه به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. در نهایت بیان ژن‌های آپوپتوزی از جمله ژن‌های **BAX**، **CASP3**، **CASP7**، **CASP9**، **P21**، **P53**، **SOX2**، توسط تکنیک **Real time PCR** مورد بررسی قرار گرفت. برای تحلیل اطلاعات از آزمون **t** و تحلیل اندازه‌های تکراری استفاده گردید.

یافته‌ها: در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، عصارهٔ رنگدانه زنده مانی سلول‌های **MDA-MB-468** را پس از ۴۸ ساعت در غلظت ۴۵/۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، به‌طور قابل توجهی مهار کرد (**p<۰/۰۵ ***). علاوه بر این، جمعیت کل سلول‌های آپوپتوز اولیه و ثانویه (۴۴/۴ درصد) در رده سلولی مورد مطالعه افزایش یافت که با افزایش معنادار بیان ژن‌های **P53**، **BAX**، **CASP7**، **CASP9**، همراه بود.

نتیجه‌گیری: آرکی‌های نمک دوست می‌توانند به‌عنوان منبع مناسبی از پیگمان‌های طبیعی با فعالیت ضدسرطانی و به‌عنوان یک درمان مؤثر احتمالی در شیمی درمانی در نظر گرفته شوند.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، رده سلولی **MDA-MB-468**، رنگدانه، ***Haloarcula sp.***،

** قم، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

E.mail: zargar@qom-iau.ac.ir, amoozegar@ut.ac.ir
***ORCID: 0000-0002-1425-4330**
****ORCID: 0000-0002-3108-5655**
*****ORCID: 0000-0002-9638-0532**

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

مقدمه

به‌طور کلی درمان‌های بالینی برای سرطان شامل شیمی درمانی، ایمونوتراپی، اشعه درمانی، جراحی و برخی روش‌های دیگر می‌باشد. در سال‌های اخیر داروهای ضد تومور به‌طور گسترده برای شیمی درمانی استفاده می‌شوند. داروهای آنتی تومور تجاری از نظر منشأ به دو گروه تقسیم می‌شوند، داروهای شیمیایی سنتتیک و داروهای طبیعی که از ارگانیسم‌ها به دست می‌آیند (۱). داروهای شیمیایی معمولاً تنها گزینه برای شیمی درمانی هستند اما بسیاری از این داروهای شیمیایی نه تنها سلول‌های توموری بلکه سلول‌های طبیعی بدن را نیز از بین می‌برند و اثرات جانبی زیادی دارند (۲). در مقایسه با داروهای شیمیایی، داروها و محصولات طبیعی که از ارگانیسم‌ها به دست می‌آیند هم می‌توانند مؤثرتر باشند و هم سمیت کمتری دارند و می‌توانند از منابع مختلف شامل گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها به دست آیند. داروهای ضدسرطان به دست آمده از جانوران معمولاً از بین توکسین‌های زیستی انتخاب می‌شوند، در حالی که داروهای طبیعی به دست آمده از گیاهان و میکروارگانیسم‌ها، همان متابولیت‌ها و یا مولکول‌های زیست فعال تولید شده توسط این ارگانیسم‌هاست (۳ و ۴).

همچنین علی‌رغم گسترش داروهای جدید، برای بسیاری از تومورها و به‌طور مشخص برای تومورهای پیشرفته و متاستازی، درمان‌ها اغلب تسکین دهنده و بسیار ناکافی هستند و در بسیاری از موارد این داروها که ممکن است حتی به صورت تجاری نیز عرضه نشده باشند طول عمر را در حد چند هفته و چند ماه و به ندرت در حد سال افزایش می‌دهند. با توجه به این مسائل و تأکید بر این نکته که تحقیقات در مورد یافتن درمان‌های هدفمند برای درمان سرطان همچنان ادامه دارد، به نظر می‌رسد نیاز گسترده‌ای برای داروهای ضدسرطان جدید وجود دارد که به خصوص در مراحل پیشرفته بیماری در درمان سرطان مؤثر باشند (۵).

هالوفیل‌ها دسته‌ای از میکروارگانیسم‌های اکستریموفیل هستند که در محیط‌های با غلظت نمک بالا یافت می‌شوند. توانایی زندگی در این محیط‌های سخت، این میکروارگانیسم‌ها را تبدیل به گزینه جالبی برای تولید مولکول‌های زیست فعال مهم در پزشکی و تولید داروهای طبیعی می‌کند (۸-۶). مطالعات اخیر در مورد میکروارگانیسم‌های نمک دوست در محیط‌های نمکی، که منابع ارزشمندی در بیوتکنولوژی، از جمله پلیمرهای زیستی، بیوسورفکتانت‌ها، اگزوپلی ساکاریدها و ترکیبات زیست فعال (رنگدانه‌ها، مواد ضدتوموری و ضدمیکروبی و غیره) را فراهم می‌کنند، توسعه یافته است (۱۱-۹). بسیاری از میکروارگانیسم‌های نمک دوست و تحمل کننده نمک، حاوی غلظت بالایی از رنگدانه‌های مختلف هستند (۱۲).

نتایج حاصل از تحقیقات نشان می‌دهد که رنگدانه‌های سنتتیک عامل ایجاد کننده اختلالاتی از قبیل فشارخون، سرطان‌زایی، تومورهای بدخیم، واکنش‌های آنافیلاکسی و آلرژی‌زا هستند. با توجه به مشکلات ناشی از مصرف رنگدانه‌های مصنوعی، جستجو برای یافتن پیگمان طبیعی مناسب، آغاز گردید (۱۳). دلیل اصلی علاقه به استفاده از میکروارگانیسم‌ها در تولید رنگدانه، تکثیر و تولید بالا با استفاده از دستکاری‌های ژنتیکی است. بعلاوه تولید رنگ‌های طبیعی از طریق تخمیر میکروبی دارای مزایای زیادی از جمله تولید ارزان‌تر، بازدهی بالاتر، استخراج آسان‌تر و سهولت در کنترل تولید است (۱۴ و ۱۵).

ساختارهای شیمیایی متنوع باعث افزایش قابلیت عملکردی پیگمان‌ها برای کاربردهای مختلف بیولوژیکی می‌شود زیرا ساختارهای دقیق شیمیایی رنگدانه‌ها به‌طور جداگانه، تعیین کنندهٔ ویژگی‌های مورد انتظار است و

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

همچنین نحوه تعامل آن‌ها با سایر مولکول‌ها را مشخص می‌کند (۱۶). عملکرد این رنگدانه‌ها به یک اثر محافظتی از میکروارگانیسم‌های نمک دوست در برابر آسیب نوری در محدوده مرئی مربوط می‌باشد و منجر به مقاومت باکتری در برابر آسیب اکسیداتیو DNA در اثر اشعه و قرار گرفتن در معرض H2O2، می‌شود. بنابراین رنگدانه‌ها باعث افزایش بقای باکتری‌ها در محیط‌های نمکی و دمای پایین می‌شوند. همچنین رنگدانه‌ها می‌توانند از پیشرفت سرطان جلوگیری کنند (۱۷ و ۱۸).

انتخاب ردهٔ سلول سرطانی (MDA-MB-468) براساس میزان شیوع آن سرطان در ایران، بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی بوده است. بر اساس آمار این سازمان در سال‌های اخیر سرطان‌های پستان، ریه و پروستات جزء پنج سرطان فراوان در جهان بوده‌اند. تعداد زیادی از مبتلایان به سرطان پستان در مراحل ابتدایی قابل درمان هستند. بیماران در مراحل بالاتر که فاقد متاستاز می‌باشند، در ۳۰–۵ درصد موارد با درمان‌های کمکی درمان قطعی می‌یابند اما تعداد زیادی از بیماران به دلیل بازگشت سرطان پستان فوت می‌کنند لذا استفاده از روش‌ها و داروهای جدیدتر در این بیماران بسیار ضروری است (۱۹).

ترکیبات طبیعی از جمله رنگدانه‌های حاصل از میکروارگانیسم‌های مختلف مانند آرکی‌ها و باکتری‌ها می‌توانند به‌عنوان ترکیبات فعال زیستی در مهار برخی از بیماری‌ها از جمله سرطان مؤثر باشند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر رنگدانه‌های به دست آمده از آرکی نمک دوست بومی ایران، در بیان ژن‌های مسیر آپوپتوزی در مدل سلولی MDA-MB-468 سرطان پستان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کلیه مواد محیط کشت برای رشد آرکی نمک دوست از شرکت Merck (آلمان)، و ال–گلوتامین، آنتی‌بیوتیک پن استرپ (پنی‌سیلین و استرپتومایسین)، سرم جنین گاوی (FBS)، Tripsine/EDTA 10x از شرکت Gibco (آمریکا)، و MTT، DMSO، PBS، Trizol از شرکت DNA Biotech (ایران)، کیت Real-Time PCR و SYBR Green از شرکت یکتا تجهیز (ایران)، کیت سنتز cDNA از شرکت Parstous (ایران) خریداری شد. دستگاه ریل تایم پی‌سی آر مدل RG 6000 ساخت شرکت کیاژن–کربت آلمان، و سانتریفیوژ SIGMA مدل 4-16K آلمان، و انکوباتور CO2 ساخت شرکت RS Biotech آمریکا، و میکروسکوپ Oplympus ژاپن، و فریزر ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد ساخت شرکت Angleantoipolar ایتالیا و شیکر انکوباتور Wise cube آلمان، و دستگاه خوانشگر الایزا (USA، Bio-tek Instruments) Eliza Reader (آمریکا)، و دستگاه فلوسایتومتری (BD، FACS Calibur) ساخت آمریکا، می‌باشد. این بررسی در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی قم تحت شماره ۱۰۸. ۱۴۰۰. IR.IAU.QOM.REC به تصویب رسیده است.

کشت میکروارگانیسم

آرکی نمک دوست *Haloarcula sp. Strain A15* با *Accession CP002921*، موجود در محیط‌های نمکی که قبلاً از نواحی بومی ایران از دریاچه آران- بیدگل، جداسازی و شناسایی شده بود، از آزمایشگاه اکسترموفیل دانشگاه تهران تحویل گرفته شد و در محیط کشت و شرایط مناسب کشت داده شد. از محیط کشت Modified Growth Medium(MGM) با مقدار نمک ۲۳ درصد استفاده شد. کلیه مواد کشت از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد. pH محیط پیش از اتوکلاو بر ر وی ۷ تنظیم گردید. پلیت‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و رشد آرکی پس از ۷ روز مشاهده شد (۲۰).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

استخراج رنگدانه

به‌منظور استخراج رنگدانه، سویه آرکی حاوی پیگمان در محیط کشت مایع در یک انکوباتور شیکردار با دور RPM ۱۵۰۰ در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت چند روز انکوبه شد. در ابتدا و به منظور انباشتگی مناسب میکروارگانیسم فعال، یک پیش کشت در محیط کشت مایع صورت گرفت، حجم محیط کشت مایع برای پیش کشت ده درصد حجم نهایی کشت مایع مورد نظر بود. حجم نهایی محیط کشت مایع ۲۵۰ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. استخراج رنگدانه با روش استخراج حلال انجام گرفت. سلول‌ها توسط سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰RPM به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری شد. رسوب با آب مقطر استریل شستشو داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰RPM سانتریفیوژ گردید. ۵ میلی‌لیتر متانول به رسوب اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در یک حمام آب گرم (بن ماری) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا تمام رنگدانه‌های قابل مشاهده استخراج گردد. توسط سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰RPM به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی جدا شده و سپس از طریق کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱ دارای اندازه منافذ ۱۱ میکرومتر، فیلتر گردید. عصاره رنگدانه با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین، کل رنگدانه با استفاده از مقدار به دست آمده در طول مدت جذب (۴۹۰nm) محاسبه شد. در مرحله بعد متانول با دستگاه (BUCHI Rotavapor R_114) Rotary evaporator (سوئیس) تبخیر شده و رنگدانه خشک به دست آمد و در فریز ۲۰- نگهداری شد (۲۱).

مقدار کل رنگدانه طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{The total pigment content } (\mu g.\ g) = A \times V\ (mL) \times 104 / A^{1\%}_{1cm} \times P(g)$$

A: جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر، V: حجم حلال متانول، A1%1cm: ضریب جذب پیگمان در متانول، P: وزن بیومس

کشت سلول‌های سرطانی

رده سلولی سرطان انسان که در این پروژه مورد استفاده قرار گرفت، MDA-MB-468 برای سرطان پستان می‌باشد. سلول‌ها به صورت تک لایه در محیط RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) همراه با ۱۰ درصد (v/v) سرم جنین گاو (FBS)، سدیم بی کربنات و ۲۰۰ میلی مولارال- گلوتامین، اسید آمینه‌های غیرضروری (NEAA) (به‌ترتیب به مقدار ۱۰ میکرولیتر و ۵ میکرولیتر به ازای هر میلی‌لیتر محیط کامل) و آنتی‌بیوتیک پن‌استرپ، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در اتمسفر مرطوب ۹۵ درصد و ۵ درصد CO2 رشد داده شد. استوک آنتی‌بیوتیک پن‌استرپ با غلظت ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰۰۰ واحد/ میلی‌لیتر پنی‌سیلین خریداری شد (۱۰۰X). غلظت نهایی آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط کشت سلول به‌ترتیب ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۰ واحد/ میلی‌لیتر است. برای کشت مجدد سلول‌های چسبنده، ابتدا باید سلول‌ها از کف فلاسک جدا شوند. به این منظور ابتدا محیط رویی سلول‌ها که حاوی سلول‌های مرده است، دور ریخته شد. سپس روی سلول‌ها PBS اضافه گردید تا سلول‌ها سست شده و سلول‌های مرده باقی مانده از کف فلاسک شسته شوند. در ادامه سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. جهت جداکردن سلول‌ها از سطح فلاسک، از محلول Tripsine/EDTA استفاده شد. پس از اضافه کردن تریپسین، فلاسک به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. پس از جدا شدن کامل سلول‌ها، محیط کامل

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

(DMEM، ۱۰ درصد FBS و پن‌استرپ 1X) به فلاسک افزوده گردید تا تریپسین خنثی شود و آسیبی به سلول وارد نشود (۲۲).

ارزیابی سمیت به روش MTT

برای ارزیابی اثر عصاره پیگمان استخراج شده بر توانایی زیستی رده سلولی ذکر شده، روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)، مورد استفاده قرار گرفت. این تست بر پایه تجزیه نمک تترازولیوم MTT به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی بنا نهاده شده است. احیای نمک تترازولیوم MTT باعث تشکیل بلورهای فورمازان می‌شود. بلورهای فورمازان در حلال‌های آبی مثل DMSO (Dimethyl sulfoxide) حل می‌شوند و محلول بنفش رنگ به دست می‌آید. سلول‌های مرده قادر به تبدیل MTT به فورمازان نیستند، در نتیجه شدت رنگ بنفش متناسب با سلول‌های زنده است. میزان جذب این محلول رنگی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر پلیت خوان در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید.

به این منظور ابتدا یک غلظت استوک از رنگدانه در DMSO حل شد به‌طوری که غلظت نهایی DMSO در هر میلی‌لیتر، ۲۰ ماکرولیتر باشد. این غلظت از DMSO هیچ اثر سیتوتوکسیکی برای سلول‌های مورد آزمون نداشت. در این پژوهش گروه مورد تیمار در آزمون MTT بر اساس مدت زمان مواجه سلول مدل MDA-MB-468 به‌عنوان سلول سرطان پستان در سه زمان مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سنجیده شد. در این آزمون صرفاً یک گروه سلولی مورد مطالعه برای تیمار وجود داشت اما غلظت‌های مورد نظر شامل ۱۲ و ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر بودند. طبق پروتوکل MTT، از آنجایی که سلول‌های مورد آزمون از نوع چسبنده (adherent) بودند، سلول‌ها پس از کشت شدن (Seed) با تراکم ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه، برای چسبیده شدن به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. سپس عصارهٔ رنگدانه با غلظت‌های ۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر بر روی آن اثر داده شد. برای ارزیابی زنده ماندن سلول‌ها، ۱۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت، محیط حذف شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به منظور حل کردن بلورهای فورمازان تشکیل شده، به هر چاهک اضافه شد و سپس جذب رنگ در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه Eliza Reader(Bio-tek Instruments ،USA) (آمریکا)، اندازه‌گیری شد. نتایج بر اساس مقایسه جذب نمونه‌ها (۵۶۰ نانومتر) نسبت به گروه کنترل گزارش گردید. غلظتی از رنگدانه که سبب مهار تکثیر سلول‌های سرطانی به میزان ۵۰ درصد گردید به‌عنوان LD50 در نظر گرفته شد و به‌عنوان غلظت تیمار برای ادامه مراحل انتخاب شد. در این تست، DMSO (۴۰۰-۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید که صد در صد دارای اثر توکسیک بود. همچنین محیط کشت سلولی به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (۲۳).

آزمون آپوپتوز

سوسپانسیون سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده و گروه کنترل توسط آنزیم تریپسین تهیه شد. در مرحله اول پس از جداسازی سلول‌ها از فلاسک، با اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر از محلول PBS در ۱۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و شستشو داده شد تا محیط سلول‌ها حذف شود. پس از شستشو، رسوب سلولی به وسیله 1x Binding Buffer به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسید. به دلیل اینکه رنگ FITC

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

و PI با یکدیگر همپوشانی دارند، برای تصحیح و تنظیم همپوشانی، نمونه در ۴ لوله تقسیم گردید. (یک لوله بدون رنگ، یک لوله حاوی رنگ Annexin FITC-V، یک لوله حاوی رنگ PI، و لوله آخر حاوی هر دو رنگ FITC و PI). لوله اول که همان سلول بدون رنگ بود به همراه لوله سوم در ۴ درجه سانتی‌گراد نگه شد. به لوله دوم و چهارم ۵ میکرولیتر، Annexin FITC-V اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه گشت. پس از اتمام زمان انکوباسیون به لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر از محلول Binding Buffer (۱ ایکس) اضافه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و به رسوب سلولی ۵۰۰ میکرولیتر دیگر Binding Buffer (۱ ایکس) اضافه شد. در هنگام خوانش نمونه‌ها، به لوله سوم و چهارم ۳ میکرولیتر رنگ پروپیدیوم یدید اضافه گردید. نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACS ،BD ،USA Calibur) (آمریکا) خوانده شدند. رنگ FITC و PI توسط لیزر ۴۸۸ نانومتر تحریک شده و در دو کانال ۵۳۰ نانومتر و ۶۱۰–۵۷۵ نانومتر نشر پیدا کردند.

آپوپتوز به کمک Annexin V کونژوگه با فلوئوروکروم ایزوتیوسیانات فلورسین (FITC) و نکروز با PI (Iodide Propidium) سنجش گردید و در کانال‌های FL1-H و FL3-H مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد سلول‌های مستقر در هر ناحیه با استفاده از نرم‌افزار Flowjo محاسبه و بر اساس درصد گزارش گردید و تقسیم نقاط ثبت شده در منحنی دو بعدی به چهار ناحیه Q1تا Q4 انجام گرفت. ناحیهQ1 نمایانگر سلول‌های نکروزی، ناحیهٔ Q2 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده ثانویه، و ناحیه Q3 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده اولیه و ناحیه Q4 نمایانگر سلول‌های سالم می‌باشد. در پلات فلوسایتومتری محور X و Y، شدت فلورسانس را نشان می‌دهند. محور X شدت فلورسانس مربوط به Annexin V- FITC می‌باشد. هر چقدر از سمت چپ به سمت راست محور پیش می‌رویم، شدت فلورسانس افزایش می‌یابد. همچنین محور Y، شدت سیگنال‌های نشر شده از PI را نشان می‌دهد. در مواردی که هر دو فلوروکروم به‌طور همزمان به کار گرفته شوند، به منظور محاسبهٔ میزان نیاز به جبران فلورسانس در مجموعه داده‌ها، باید در ابتدا مقدار کنترل‌های اولیه از مقدار کل کسر شود. بدین ترتیب که ابتدا فلوروکروم FITC را به تنهایی استفاده کرده و درصدی از کل تابش که در کانال FL-1 به دست می‌آید را مشخص می‌کنیم که به آن درصد (Emission ratio) گفته می‌شود. سپس این روش برای فلوروکروم PI نیز تکرار می‌شود. سنجش صحیح فلورسانس برای فلوروکروم FITC در کانال FL-1، از طریق فرمول (درصد Emission ratio از کل فلورسانس PI)– (میزان کل فلورسانس سنجیده شده در FL-1)=FITC محاسبه می‌شود (۲۴ و ۲۵).

آزمون چرخه سلولی

ابتدا تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول با دور ۱۵۰۰RPM به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد سرد (اتانول باید در فریزر نگهداری شود) به صورت قطره قطره به نمونه اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس ۳ مرتبه با PBS شسته شده و هربار پس از اضافه کردن PBS با دور ۱۵۰۰RPM به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ گردید. در آخر تمام PBS از روی پلت سلولی ایجاد شده تخلیه شد و به سلول‌ها ۵۰ میکرولیتر آنزیم Rnase (۱۰۰ میکروگرم/ میکرولیتر) اضافه گشت. سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد و در انتها به سلول‌ها ۱۰ میکرولیتر رنگ PI اضافه گردید و نمونه‌ها توسط

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

دستگاه فلوسایتومتری (FACS Calibur ،BD ،USA) خوانده شد (۲۶).

بررسی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز به روش کمی

برای استخراج total RNA از سایر محتویات سلولی مانند DNA و پروتئین‌ها، نمونه‌های بافتی و سلولی پس از شستشو توسط PBS به کمک trizol (شرکت DNA Biotech، ایران)، استخراج شد. به منظور تعیین غلظت و کیفیت RNA استخراج شده، آنالیز اسپکتروفوتومتری (طیف سنجی) نمونه‌های RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (ترموفیشر،آمریکا) انجام شد. در RNA خالص، نسبت جذب نوری ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر برابر ۱/۲-۸ می‌باشد.

cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت Parstous، ایران) ، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده سنتز و رونویسی معکوس (qRT-PCR) انجام شد. cDNA ساخته شده، به منظور بررسی تغییرات بیان ژنی بین سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده (گروه کنترل) وارد واکنش Real time PCR شد، که برای هر دو حالت، بیان ژن مورد نظر با ژنی که بیان پایه (Housekeeping gene) دارد مقایسه گردید. پرایمرها از شرکت بن یاخته به‌صورت غلظت‌های آمادهٔ استفاده، تهیه شدند. توالی‌های پرایمرها برای همه ژن‌ها با نرم‌افزار GeneRunner توسط خود شرکت بن‌یاخته طراحی و سپس از Primer-BLAST (NCBI) برای بررسی اختصاصی بودن آن‌ها استفاده شد. توالی پرایمرهای ژن‌های هدف در جدول ۱ و اجزای مورد نیاز جهت واکنشSYBR Green Real time PCR Master Mix (شرکت یکتا تجهیز، ایران) مطابق جدول ۲ تهیه شد، به طوری که حجم نهایی واکنش ۱۳ میکرولیتر بود. برنامه دمایی واکنش Real-time PCR نیز، مطابق جدول ۳ صورت گرفت. در نهایت نتایج به صورت سیکل آستانه (CT) یا به اصلاح cycle of threshold) گزارش شد و برای بررسی بیان ژن‌ها از برنامه REST استفاده گردید (۲۷).

جدول ۱) پرایمرهای مورد استفاده در آنالیز Real time PCR

ژن ها	نام پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال	طول محصول PCR (bp)
CASP3	Forward	5' AAG CGA ATC AAT GGA CTC TGG 3'	۶۰	۱۷۵
	Reverse	5' CAA GTT TCT GAA TGT TTC CCT GAG 3'		
CASP9	Forward	5' GTT TGA GGA CCT TCG ACC AGC T 3'	۶۰	۱۲۹
	Reverse	5' CAA CGT ACC AGG AGC CAC TCTT 3'		
HPRT	Forward	5' CCT GGC GTC GTG ATT AGT G 3'	۶۰	۱۹۸
	Reverse	5' TCA GTC CTG TCC ATA ATT AGT C 3'		
CASP7	Forward	5' TTTGCTTACTCCACGGTTCC 3'	۶۰	۲۰۰
	Reverse	5' GAGCATGGACACCATACACG 3'		
P53	Forward	5' GTATTTCACCCTCAAGATCC 3'	۶۰	۸۳
	Reverse	5' TGGGCATCCTTTAACTCTA 3'		
P21	Forward	5' CTTGCACTCTGGTGTCTG 3'	۶۰	۱۰۶
	Reverse	5' CTTGGAGTGATAGAAATCTGTCA 3'		
SOX2	Forward	5' GCCGAGTGGAAACTTTTGTCG 3'	۶۰	۱۵۴
	Reverse	5' GCAGCGTGTACTTATCCTTCTT 3'		
BAX	Forward	5' TGG CAG CTG ACA TGT TTT CTG AC 3'	۶۰	۱۹۵
	Reverse	5′ TCA CCC AAC CAC CCT GGT CTT 3'		

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

جدول ۲) اجزای مورد نیاز جهت واکنش qPCR	
حجم (میکرولیتر)	مواد مورد نیاز
۶/۵	Master Mix (2x SYBR Green Real-time PCR Master Mix)
۰/۵	پرایمر Forward (10 pmol)
۰/۵	پرایمر Reverse (10 pmol)
۱	cDNA
۴/۵	diH2O

جدول ۳) برنامه زمانی مراحل واکنش qPCR ژن‌ها			
مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل
فعال‌سازی آنزیم	۹۵	۱۰ دقیقه	۱
واسرشتگی	۹۵	۲۰ ثانیه	۴۵
اتصال	۶۰	۳۰ ثانیه	
گسترش	۷۲	۳۰ ثانیه	

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از تست‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism، ویرایش ۸ به‌ترتیب از قسمت Analyze، Column analyses، به روش t-test و در آزمون MTT برای مقایسه یک متغیر در طی سه زمان، از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶، با روش Repeated Measurements Analysis یا تحلیل واریانس اندازه‌های مکرر استفاده گردید. مقادیر $p<۰/۰۵$ به‌عنوان تفاوت معنادار بین گروه تست و گروه کنترل در نظر گرفته شد. نمودارهای این مطالعه نیز با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism ویرایش ۸ رسم شدند. همچنین در Real-time PCR، به دنبال دریافت داده‌های مربوط به سیکل آستانه، به منظور آنالیز میزان بیان، این داده‌ها وارد برنامه REST 2009 شدند. سپس Relative expression (بیان نسبی) آن‌ها وارد برنامه GraphPad Prism ویرایش ۸ شد. جهت بررسی میزان معناداری، داده‌ها توسط t-Test مورد بررسی قرارگرفت.

یافته‌ها

تعیین کل رنگدانه و ویژگی‌های مورفولوژیکی آرکی نمک دوست

مقدار کل رنگدانه در عصاره متانولی با اندازه‌گیری جذب آن در طول موج ۴۹۰ نانومتر، بر حسب میکروگرم برآورد شد و محتوای رنگدانه کل سویه، ۷۳۴/۱ میکروگرم در لیتر محاسبه شد. همچنین ویژگی‌های مورفولوژیک سویه A۱۵، در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول ۴) ویژگی‌های مورفولوژیکی: +:مثبت، -: منفی	
خصوصیات	سویه A15
رنگ‌آمیزی گرم	گرم منفی
شکل	پلیمورف (چند شکلی)
کلنی	قرمز-نارنجی موکوئیدی
اسپور	-
کاتالاز	+
اکسیداز	+
رشد در NaCl صفر درصد	-

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

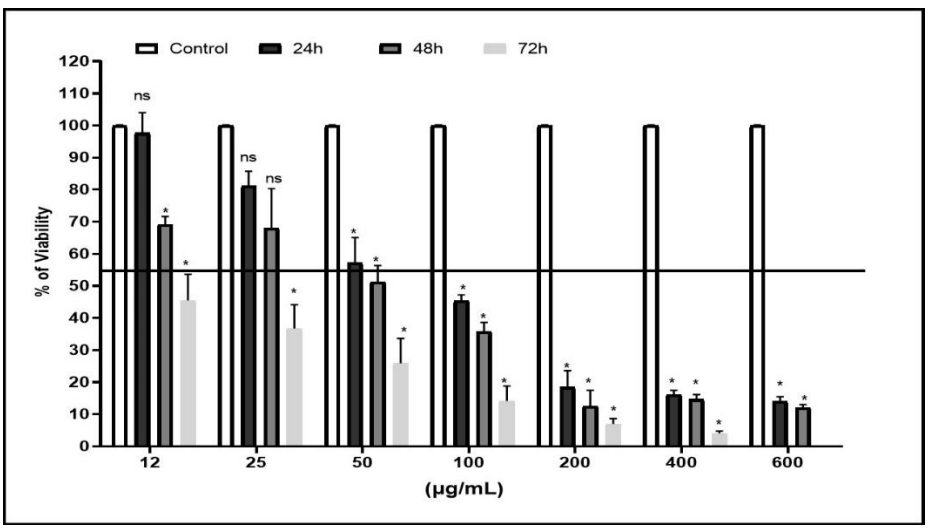
[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

ارزیابی زنده مانی و تعیین LD50

به منظور تعیین غلظت مؤثر و زمان تأثیر، عصاره رنگدانه سویه A۱۵، با غلظت‌های ۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رده سلول سرطانی پستان (MDA-MB-468) در فلاسک‌های جداگانه شامل گروه تیمار شده و تیمار نشده در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اثر داده شد و پس از طی این زمان میزان توانایی زیستی سلول‌ها اندازه‌گیری شد. در نهایت درصد زنده مانی سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۲۷).

= درصد توانایی زیستی	میانگین جذب نمونه‌های تیمار شده با هر غلظت از متابولیت / میانگین جذب نمونه تیمار نشده	×۱۰۰

نتایج نشان داد که درمقایسه با سلول‌های تیمار نشده، غلظت ۴۵/۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگدانه سویه A۱۵ در زمان ۴۸ ساعت موجب کاهش توانایی زیستی لاین سلولی سرطان پستان مورد مطالعه تا حدود ۵۰ درصد (LD50) می‌شود (p<۰/۰۵*) (شکل ۱). بنابراین یک فعالیت ضدتکثیری وابسته به دوز و زمان در شرایط آزمایشگاهی علیه سلول‌های MDA-MB-468 مشاهده شد. بر اساس تجزیه و تحلیل آماری داده‌های MTT، دوز LD۵۰، معادل ۴۵/۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، برای MDA-MB-468 تعیین گردید. با توجه به این نتایج، غلظت ۴۵/۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و زمان ۴۸ ساعت برای مراحل بعدی انتخاب گردید.



شکل ۱) **تعیین غلظت مؤثر (LD50)**: تأثیر غلظت‌های ۱۲، ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره رنگدانهٔ سویه A15 بر روی سلولی MDA-MB-468 در ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از تیمار. میزان زنده مانی بین میانگین زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت (p= ۰/۰۲۹)، ۲۴ و ۷۲ ساعت (p<۰/۰۰۱)، ۴۸ و ۷۲ ساعت (p= ۰/۰۰۱) معنادار بود. **غلظت ۱۲ میکروگرم در میلی لیتر**: میزان زنده مانی در سلول‌های تحت درمان نسب به کنترل در زمان ۲۴ ساعت، تفاوت معنی‌داری نداشت ولی در زمان‌های ۴۸، ۷۲ ساعت نسبت به کنترل، دارای تفاوت معنی‌دار با (p<۰/۰۵*) بود. همچنین میزان بقاء در زمان ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌دار با زمان ۲۴ ساعت نداشت ولی در زمان ۷۲ ساعت نسبت به زمان ۲۴ ساعت دارای کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۵*) بود. **غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر**: میزان زنده مانی در سلول‌های تحت درمان نسب به کنترل در زمان‌های ۲۴، ۴۸ ساعت، تفاوت معنی‌داری نداشت ولی در زمان ۷۲ ساعت دارای تفاوت معنی‌دار با (p<۰/۰۵*) بود. همچنین میزان بقاء در زمان ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌دار با زمان ۲۴ ساعت نداشت ولی در زمان ۷۲ ساعت نسبت به کنترل (p<۰/۰۵*)بود. **غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر**: میزان زنده مانی در سلول‌های تحت درمان نسب به کنترل، در زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت دارای تفاوت معنی‌دار با (p<۰/۰۵*) بودند و تفاوت معناداری در بین زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده نشد. در نتیجه غلظت ۴۵/۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان ۴۸ ساعت به عنوان LD50 تعیین شد.

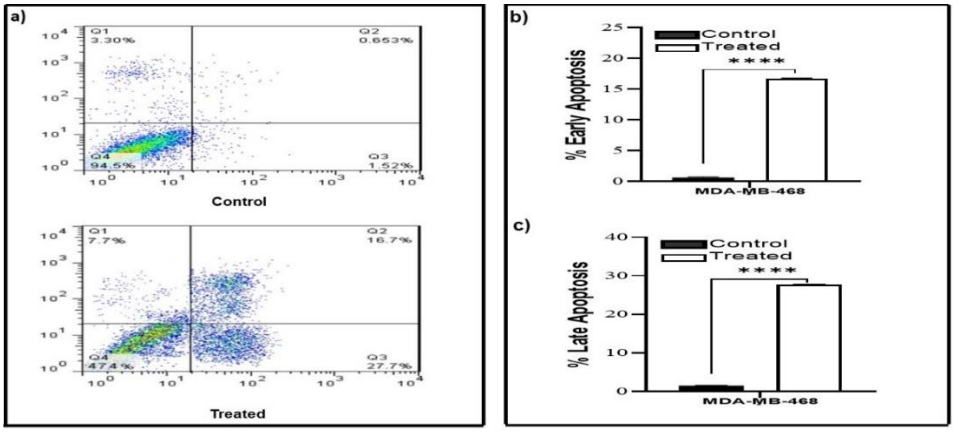
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

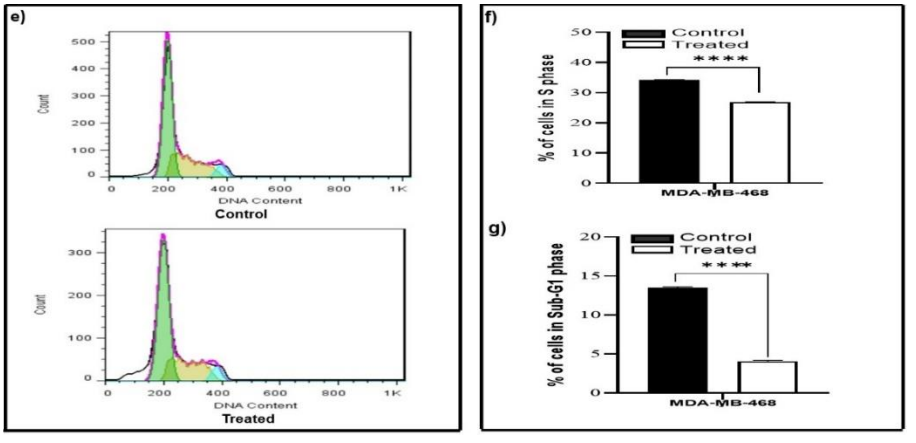
اثر عصاره رنگدانه بر آپوپتوز و چرخه سلولی

آزمون annexin-PI برای ردهٔ سلولی سرطانی تیمار شده و تیمار نشده با عصاره رنگدانه، به منظور تعیین نقش آن در القای آپوپتوز انجام شد. همانطور که شکل نشان می‌دهد، درصد سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه و سلول‌های نکروز شده در سلول‌های گروه کنترل (بدون تیمار) MDA-MB-468 به‌ترتیب ۹۴/۵، ۱/۵۲، ۰/۶۵ و ۳/۳ درصد بود. در مقابل، درصد سلول‌های زنده، آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه و سلول‌های نکروز شده در سلول‌های گروه تحت درمان به‌ترتیب ۷۴/۴، ۲۷/۷، ۱۶/۷ و ۷/۷ درصد بود.

در نتیجه درصد آپوپتوز ثانویه و اولیه به ترتیب حدود ۱۶ و ۲۶ درصد در ردهٔ سلولی MDA-MB-468 افزایش معنی‌داری داشته است ($p<۰/۰۰۱^{****}$) (شکل ۲a-c). همچنین آنالیز چرخه سلولی برای سلول‌های تیمار نشده و تیمار شده با عصاره پیگمان *Haloarcula sp.*، نشان داد که به‌ترتیب درصد سلول‌های فاز S چرخه سلولی را در سلول‌های MDA-MB-468 از ۳۴/۲۲ درصد به ۲۶/۸۵ درصد ($p<۰/۰۰۱^{****}$) افزایش و در فاز sub-G1 از ۴/۰۷ به ۱۳/۵۱ درصد ($p<۰/۰۰۱^{****}$) کاهش یافت (شکل ۳e-g).



شکل ۲) اثر رنگدانه سویه A15 بر آپوپتوز ردهٔ سلولی سرطانی MDA-MB-468. a) نتایج بررسی میزان آپوپتوز در بین سلول‌های گروه کنترل (تیمار نشده) و سلول‌های تیمار شدهٔ رنگ‌آمیزی شده با PI+ و Annexin-V-. در این نمودارها، Q1 نشان‌دهنده درصد سلول‌های نکروز شده، Q2 نشان‌دهنده درصد سلول‌های آپوپتوز ثانویه، Q3 نشان‌دهنده درصد سلول‌های آپوپتوز اولیه و Q4 نشان‌دهندهٔ درصد سلول‌های زنده است. b) مقایسه میزان درصد سلول‌های دارای early آپوپتوز در بین گروه تحت درمان و گروه کنترل. c) مقایسه میزان درصد سلول‌های دارای late آپوپتوز در بین گروه تحت درمان و گروه کنترل. علامت **** نشان‌دهندهٔ $p<۰/۰۰۱$ می‌باشد.



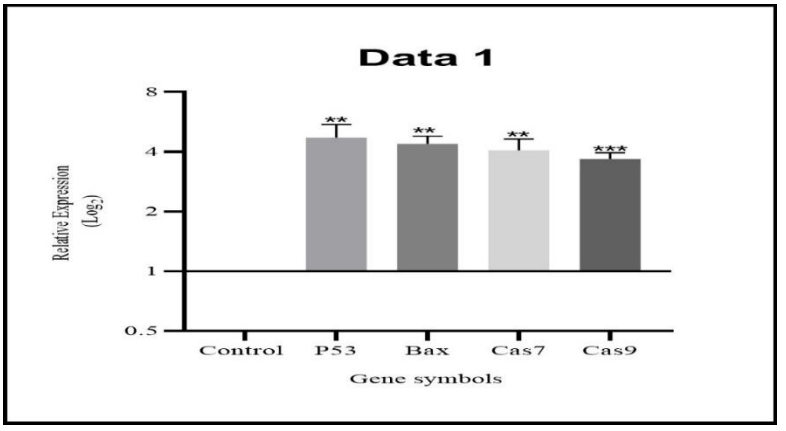
شکل ۳) اثر رنگدانه سویه A15 بر چرخه سلولی در رده سلولی سرطانی MDA-MB-468. e) نتایج آنالیز چرخه سلولی در بین سلول‌های گروه کنترل (تیمار نشده) و سلول‌های تحت تیمار. f) مقایسه درصد سلول‌های فاز S چرخه سلولی در بین گروه تحت درمان و گروه کنترل. g) مقایسه درصد سلول های فاز sub-G1 چرخه سلولی در بین گروه تحت درمان و گروه کنترل. علامت **** نشان‌دهندهٔ $p<۰/۰۰۱$ می‌باشد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش Real time PCR

بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و چرخه سلولی، از جمله P53، P21، BAX، SOX2، CASP7، CASP9، CASP3 در هنگام تیمار با رنگدانه مورد بررسی قرار گرفت. به منظور آنالیز داده‌های بیانِ نسبی، از ژن HPRT به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. بیان ژن‌های P53، BAX، CASP7، CASP9، پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت ۴۵/۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌صورت معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کردند و این افزایش بیان به ترتیب معادل ۴/۷۱، ۴/۳۸، ۴/۰۷ و ۳/۶۸ برابر بود (جدول ۵). در مقابل، طبق آنالیزهای آماری، افزایش بیان ژن‌های CASP3، P21 و کاهش بیان ژن SOX2 معنادار نبودند (شکل ۴).



شکل ۴) نتایج بررسی اثر رنگدانه بر بیان ژن‌های P53 (p=۰/۰۰۹)**، BAX (p=۰/۰۰۱)**، CASP7 (p=۰/۰۰۵)**، CASP9 (p=۰/۰۰۱)*** در ردهٔ سلولی سرطانی MDA-MB-468، در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار) که میزان بیان کنترل برابر یک در نظر گرفته می‌شود.

جدول ۵) میزان بیان نسبی و معناداری ژن‌ها

ژن‌ها	بیان نسبی (Relative Expression)	معناداری آماری (p-Value)
HPRT	۱	
P53	۴/۷۱	**p=۰/۰۰۹
BAX	۴/۳۸	**p=۰/۰۰۱
CASP7	۴/۰۷	**p=۰/۰۰۵
CASP9	۳/۶۸	***p<۰/۰۰۱

بحث

در مطالعه حاضر سویه‌ای از میکروارگانیسم‌های نمک دوست بومی ایران انتخاب شد. غلظت‌های مختلف ۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصارهٔ رنگدانه در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت بر میزان زنده مانی سلول‌های MDA-MB-468 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج اولیه نشان داد که رنگدانه استخراج شده از سویه A۱۵ پس از ۴۸ ساعت، حتی در غلظت‌های کم، توانایی زیستی رده سلولی سرطان پستان را کاهش می‌دهد. سپس غلظت LD۵۰ رنگدانه سویه آرکی A۱۵، بر رده سلولی سرطان پستان (MDA-MB-468) به دست آمد. نتایج ما نشان داد که غلظت ۴۵/۹۵ میگروگرم در میلی‌لیتر رنگدانه این سویه در زمان ۴۸ ساعت توانایی زیستی سلول‌های سرطان

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]
[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

پستان را تا حدود پنجاه درصد به طور معنادار کاهش می‌دهد ($p<۰/۰۵^*$).

سرطان پستان رشد مهار نشدهٔ سلول‌های غیرطبیعی است که در بافت‌های مختلف پستان مانند مجاری انتقال‌دهنده شیر، بافت تولیدکنندهٔ شیر و یا در بافت غیرغددی رخ می‌دهد (۲۸). در دهه‌های اخیر سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ ومیر در جوامع انسانی بوده است. با وجود روش‌های درمانی متعددی که برای سرطان ارائه شده است همچنان بسیاری از بیماران مبتلا به این بیماری شانس کمی برای بقا دارند و نیازمندی به درمان‌های جدید همچنان در این حوزه احساس می‌شود. بنابراین یافتن فاکتورهایی که به‌صورت ویژه سلول‌های سرطانی را هدف قرار دهد می‌تواند رویکرد کارآمدی در درمان سرطان باشد (۲۹). از سال ۲۰۰۷ و پس از یک دهه توقف، استفاده از ترکیبات طبیعی در درمان سرطان از سر گرفته شد. ترکیبات طبیعی از منابع مختلفی مثل گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها به دست می‌آیند. میکروارگانیسم‌ها به دلیل چرخه زندگی کوتاه و نیازمندی کم به مواد غذایی و محیط برای رشد یکی از گزینه‌های مهم برای دستیابی به ترکیبات طبیعی (۳۰) هستند. میکروارگانیسم‌های نمک دوست گروهی از میکروارگانیسم‌های اکستریموفیل هستند که توانایی زندگی در شرایطی با نمک بالا را دارند. گفته می‌شود این موجودات برای زندگی در چنین شرایط سختی مولکول‌ها و ترکیبات متفاوتی نسبت به موجودات غیرنمک دوست تولید می‌کنند و به نظر می‌رسد این ترکیبات می‌توانند منبع مهمی در یافتن ترکیبات جدید برای درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان باشند.

در سال‌های اخیر برخی تحقیقات برای تعیین نقش مولکول‌های فعال زیستی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های نمک دوست از جمله رنگدانه‌ها در درمان سرطان انجام‌شده است. در مطالعه آبس (Abbes) و همکاران، اثر عصاره رنگدانه‌های Halobacterium halobium بر زنده ماندن HepG2 انسانی مورد بررسی قرار گرفت. این سویه‌های آرکی‌های نمک دوست هالوآرکئا از یک معدن خورشیدی در تونس جدا شده و نتایج تأکید می‌کند که افزایش غلظت عصاره رنگدانه این میکروارگانیسم‌های نمک دوست به میزان قابل توجهی باعث کاهش میزان زنده ماندن رده سلولی HepG2 می‌شود (۱۵). همچنین در مطالعه هو (Hou) و همکاران، رنگدانه‌های استخراج شده حاصل از Haloarchaea Halogeometricum limi و Haloplanus vescus strain RO5-8، یک فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی در مقایسه با بتا کاروتن نشان دادند. علاوه بر این، عصاره‌های کاروتنوئیدی، سلول‌های HepG2 را در شرایط آزمایشگاهی و به شیوه وابسته به دوز مهار کرد (۲۰).

در مطالعهٔ دیگری از رضائیان و همکاران، گزارش شده است که پیگمان استخراج شده از باکتری تحمل کننده نمک Kocuria sp. QWT-12 جدا شده از پساب کارخانه صنعتی در قم، توانایی زیستی رده‌های سلولی سرطان پستان انسانی MCF-7 را با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تا پنجاه درصد کاهش داد. همچنین این پیگمان توانایی زیستی رده سلولی سرطان ریه انسان A549، را با غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تا پنجاه درصد کاهش داد (۳۱). نیلام (Neelam) و همکاران، به جداسازی سویه باکتریایی نمک دوست *Piscibacillus sp.* و فعالیت ضدسرطانی در برابر سرطان پستان پرداختند. نتایج آزمایش تکثیر سلولی نشان داد که عصاره حاصل از این سویه باعث کاهش زنده ماندن سلول‌های MDA-MB-231 سرطان

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

پستان می‌شود که با استفاده از روش MTT تأیید شد و با مطالعه ما همخوانی دارد (۲۱).

پتانسیل ضدسرطان سویه‌های فوق‌الذکر نشان می‌دهد که میکروارگانیسم‌های ساکن در زیستگاه‌های نمکی به‌طور خاص، یک منبع امیدوار کننده برای کشف مواد زیست فعال جدید می‌باشند.

در مطالعه حاضر همان‌طور که شکل‌ها نشان می‌دهند، جمعیت سلول‌های آپوپتوز اولیه و ثانویه در سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره رنگدانهٔ استخراج شده، در کل ۴۴/۴ درصد بود. به عبارت دیگر نتایج نشان می‌دهد که پیگمان سویه A۱۵، دارای اثر ضدسرطانی بوده و باعث مرگ حدود ۵۰ درصد سلول‌های سرطان پستان در رده سلولی MDA-MB-468 شد. بنابراین رنگدانه استخراج شده، فعالیت ضد تکثیر و فعالیت آپوپتوزی را در سلول سرطانی مورد مطالعه نشان می‌دهد. همچنین نتایج ما نشان می‌دهد که عصاره رنگدانه A۱۵ *Haloarcula sp.* strain این توانایی را دارد که درصد سلول‌هایی که در فاز S چرخه سلولی هستند را در رده‌های سلولی سرطان پستان کاهش دهد. این بدین معنی است که احتمالاً این رنگدانه از طریق مداخله در چرخه سلولی و توقف سلول‌ها در مرحله S بر توانایی زیستی و تکثیر سلول‌های سرطان پستان تأثیر می‌گذارد. هگازی (Hegazy) و همکاران رنگدانه استخراج شده از Natrialba sp. M6 strain، اثر ضدسرطانی بالایی از خود نشان داد و باعث مرگ ۵۰ درصد در هر چهار رده سلولی سرطانی (Caco-2، Hela، HepG2، MCF-7) در دوزهای کمتر از ۳۹ میکروگرم در میلی‌لیتر شد. همچنین، جمعیت سلولی آپوپتوز در رده‌های سلولی سرطان انسانی تحت تیمار با رنگدانه، بیش از ۴۸ درصد گزارش شد که با تحقیق ما همخوانی دارد (۲۴).

در مرحله بعدی بیان ژن‌های آپوپتوزی از جمله P53، BAX، CASP7، CASP9، پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت ۴۵/۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به صورت معناداری افزایش پیدا کردند. این بدین معنی است که احتمالاً به نظر می‌رسد این رنگدانه ممکن است از طریق القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، در رده سلولی مورد مطالعه بر کاهش زنده مانی سلول‌های سرطان پستان تأثیر بگذارد. به عبارت دیگر فرض می‌شود رنگدانه قرمز استخراج شده از سویه A۱۵ دارای توانایی احتمالی القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی MDA-MB-468، از طریق بیان بالای ژن‌های کاسپازی باشد.

در مطالعه هگازی و همکاران، تعیین درصد فعال‌سازی caspase ۳/۷ در سلول‌های سرطانی Caco-2 تیمار نشده و تیمار شده با رنگدانه تولید شده توسط haloalkaliphilic archaeon Natrialba sp. M6 انجام شد. نتایج نشان دادند که این رنگدانه دارای اثر آپوپتوز ناشی از کاسپاز بر روی رده‌های سلولی سرطانی انسان مورد مطالعه بود که با مطالعه ما همخوانی داشت (۲۴).

همچنین در تحقیق مشتاقی و همکاران، سلول‌های رده MCF-7 با غلظت‌های مختلف سیاه دانه تیمار شدند. نتایج Real time PCR نشان داد که بیان ژن caspase 3 در زمان ۷۲ ساعت تحت تأثیر غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش معناداری داشتند (۳۲).

نتایج مطالعه احمدی‌راد نشان داد که رزوراترول که یک فلاوونویید گیاهی می‌باشد، پس از ۲۴ ساعت موجب کاهش بیان ژن‌های APOBEC3B و DNMT-1 و افزایش بیان TET-1 در رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-453 شد(۳۳).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

در پژوهش نیلام و همکاران، تجزیه و تحلیل PCR ترانس کریپتاز معکوس (RT-PCR) نشان داد که عصاره حاصل از *Piscibacillus sp.* منجر به مهار بیان Bcl-xL و نشانگر چرخه سلولی کیناز ۲ وابسته به سیکلین (CDK2) گردید (۲۱).

بنابراین با توجه به نتایج تحقیق حاضر و سایر مطالعات صورت گرفته، عصاره رنگدانه‌های طبیعی تولید شده توسط گیاهان و میکروارگانیسم‌های نمک دوست، دارای اثرات سیتوتوکسیک توسط مکانیسم‌های مختلف مانند مهار چرخه سلولی و القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در سلول‌های سرطانی از طریق مسیر وابسته به P53 و یا مسیر غیروابسته به P53 می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثرات ضدسرطانی رنگدانه مشتق شده از آرکی نمک دوست مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد آرکی *Haloarcula sp.* strain A۱۵ موجود در محیط‌های نمکی بومی ایران، دارای فعالیت احتمالی سایتوتوکسیک و ضد تکثیر و القای آپوپتوزی در رده سلولی MDA-MB-468 می‌باشد. پژوهش حاضر پتانسیل احتمالی میکروارگانیسم‌های نمک دوست را به‌عنوان ماده خام و اولیه طبیعی ضدسرطان پس از مطالعات در مدل حیوانی و در صورت موفقیت‌آمیز بودن نتایج، نشان می‌دهد. بنابراین فرض می‌شود امکان معرفی این ترکیب پس از پژوهش‌های بیشتر، به‌عنوان یک ماده اولیه جدید با منشاء طبیعی در حوزه پزشکی وجود دارد.

سپاس و قدردانی

قدردانی صمیمانه خود را از جناب آقای مسعود شهبازی از گروه زبان‌های خارجی دانشگاه خوارزمی تهران، برای ویرایش چکیده انگلیسی، ابراز می‌داریم. این بررسی در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی قم تحت شماره ۱۰۸. ۱۴۰۰. IR.IAU.QOM.REC به تصویب رسیده است. این تحقیق برگرفته از پایان‌نامه دکتری تخصصی میکروبیولوژی می‌باشد.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان مقاله بیان نشده است.

References:

1.Wood AK, Sehgal CM. A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy. Ultrasound Med Biol 2015; 41(4): 905-28. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2014.11.019.
2.Takenaka K. Xenotransplantation assay for cancer stem cells. Nihon Rinsho 2015; 73(5): 756-64. PMID: 25985627.
3.Xu C-f, Wang J. Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. Asian J Pharm 2015; 10(1): 1-12.
doi: 10.1016/j.ajps.2014.08.011.
4.Chinembiri TN, Du Plessis LH, Gerber M, et al. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. Molecules 2014; 19(8): 11679-721. doi: 10.3390/molecules190811679.
5.Rugo HS, Barry WT, Moreno-Aspitia A, et al. Randomized phase III trial of paclitaxel once per week compared with nanoparticle albumin-bound nab-paclitaxel once per week or ixabepilone with bevacizumab as first-line chemotherapy for locally recurrent or metastatic breast cancer: CALGB 40502/NCCTG N063H (Alliance). J Clin Oncol 2015; 33(21): 2361-9. doi: 10.1200/JCO.2014.59.5298.
6.Menasria T, Aguilera M, Hocine H, et al. Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. Microbiol Res 2018; 207: 289-98. doi: 10.1016/j.micres.2017.12.011.
7.Dulinska-Litewka J, Sharoni Y, Halubiec P, et al. Recent Progress in Discovering the Role of

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

Carotenoids and Their Metabolites in Prostatic Physiology and Pathology with a Focus on Prostate Cancer-A Review-Part I: Molecular Mechanisms of Carotenoid Action. Antioxidants (Basel) 2021; 10(4): 585. doi: 10.3390/antiox10040585.
8. Ram S, Mitra M, Shah F, et al. Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges. J Funct Foods 2020; 67: 103867. doi: 10.1016/j.jff.2020.103867.
9. Chattopadhyay P, Chatterjee S, Sen SK. Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. Afr J Biotechnol 2008; 7(17): 2972-2985. https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59211.
10. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 1985; 39(4): 783-91. https://www.jstor.org/stable/2408678?origin=crossref.
11. Wilson ZE, Brimble MA. Molecules derived from the extremes of life. Nat Prod Rep 2009; 26: 44-71. doi: 10.1039/b800164m.
12. Alcaino J, Baeza M, Cifuentes V. Astaxanthin and related xanthophylls. In: Martin JF, Garcia-Estrada C, Zeilinger S, editors. Biosynthesis and molecular genetics of fungal secondary metabolites. New York: Springer, 2014, 187-208.
13. Seifzadeh M, Khanipour AA, Morady Y. The evaluation of the quality of beta-carotene derived from Azolla Filiculoides in the Anzali Wetland using the alkaline hydrolysis method in summer. Iran Sci Fish J 2017; 25(5): 75-86. (Persian) doi: 10.22092/ISFJ.2017.110316.
14. Panesar R, Kaur S, Panesar PS. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. Curr Opin Food Sci 2015; 1: 70-6. doi: 10.1016/j.cofs.2014.12.002.
15. Sinha S, Choubey S, Ajay Kumar A, et al. Identification, Characterization of pigment producing bacteria from Soil and Water and Testing of Antimicrobial Activity of Bacterial Pigments. Int J Pharm Sci Rev Res 2017; 42(2): 119-24. https://www.researchgate.net/publication/351124547_Identification_Characterization_of_Pigment_Producing_Bacteria_from_Soil_and_Water_and_Testing_of_Antimicrobial_Activity_of_Bacterial_Pigments.
16. Jaswir I, Noviendri D, Hasrini RF, et al. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. J Med Plants Res 2011; 5(33): 7119-31. doi: 10.5897/JMPRX11.011.
17. Basirnejad M, Milani A, Bolhassani A. Carotenoids and cancer: biological functions. Acta Sci Pharm Sci 2017; 1(6): 11-20. doi: 10.1111/bph.v174.11/issuetoc.
18. Giani M, Garbayo I, Vilchez C, et al. Haloarchaeal Carotenoids: Healthy Novel Compounds from Extreme Environments. Mar Drugs 2019; 17(9): 524. doi: 10.3390/md17090524.
19. Liu C-C, Yang H, Zhang L-L, et al. Biotoxins for cancer therapy. Asian Pac J Cancer Prev 2014; 15(12): 4753-8. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.12.4753.
20. Amoozegar MA, Makhdoumi-Kakhki A, Shahzadeh Fazeli SA, et al. Halopenitus persicus gen. nov., sp. nov., an archaeon from an inland Salt Lake. Int J Syst Evol Microbiol 2012; 62(Pt 8): 1932-6. doi: 10.1099/ijs.0.036921-0.
21. Cojoc LR, Enache MI, Neagu SE, et al. Carotenoids produced by halophilic bacterial strains on mural paintings and laboratory conditions. FEMS Microbiol Lett 2019; 366(21): fnz243. doi: 10.1093/femsle/fnz243.
22. Hou J, Cui HL. In Vitro Antioxidant, Antihemolytic, and Anticancer Activity of the Carotenoids from Halophilic Archaea. Curr Microbiol 2018; 75(3): 266-71. doi: 10.1007/s00284-017-1374-z.
23. Neelam DK, Agrawal A, Tomer AK, et al. A Piscibacillus sp. isolated from a soda lake exhibits anticancer activity against breast cancer MDA-MB-231 cells. Microorganisms 2019; 7(2): 34. doi: 10.3390/microorganisms7020034.
24. Hegazy GE, Abu-Serie MM, Abo-Elela GM, et al. In vitro dual (anticancer and antiviral) activity of the carotenoids produced by haloalkaliphilic archaeon Natrialba sp. M6. Sci Rep 2020; 10(1): 5986. doi: 10.1038/s41598-020-62663-y.
25. Montazeri-Najafabadi B, Doosti A, Kiani J. Evaluation of the effects of UCA1 gene knockout with a new CRISPR/Cas9 gene editing technique in ovarian cancer cell line. Pars J Medical Sci 2021; 19(1): 10-20. (Persian) doi: 10.52547/jmj.19.1.3.
26. Gong X, Smith JR, Swanson HM, et al. Carotenoid lutein selectively inhibits breast cancer cell growth and potentiates the effect of chemotherapeutic agents through ROS-mediated mechanisms. Molecules 2018; 23(4): 905. doi: 10.3390/molecules23040905.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

27.Safarpour A, Ebrahimi M, Fazeli SAS, et al. Supernatant metabolites from halophilic archaea to reduce tumorigenesis in prostate cancer in-vitro and in-vivo. Iran J Pharm Res 2019; 18(1): 241-253. doi: 10.22037/IJPR.2019.2363.
28.Ebrahimi SO, Reiisi S. MiR-6165 Dysregulation in Breast Cancer and Its Effect on Cell Proliferation and Migration. Iran South Med J 2021; 24(5): 439-453. (Pesian)http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-1514-en.html.
29.Johari-Ahar M, Barar J, Alizadeh AM, et al. Methotrexate-conjugated quantum dots: synthesis, characterisation and cytotoxicity in drug resistant cancer cells. J Drug Target 2016; 24(2): 120-33. doi: 10.3109/1061186X.2015.1058801.
30.Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti- cancer agents. Chem Rev 2009; 109(7): 3012-43. doi: 10.1021/cr900019j.
31.Rezaeeyan Z, Safarpour A, Amoozegar MA, et al. High carotenoid production by a halotolerant bacterium, Kocuria sp. strain QWT-12 and anticancer activity of its carotenoid. EXCLI J 2017; 16: 840-51. doi: 10.17179/excli2017-218.
32.Moshtaghi F, Esmaeilzadeh Bahabadi S, Mazaheri M, et al. Increasing of Caspase3 Gene Expression in Mcf7 Breast Cancer Cell Line by Nigella Sativa Hydro Alcoholic Extract. SSU_Journals 2016; 24(1): 1-11. (Persian)http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-3410-en.html.
33.Ahmadirad H, Hajizadeh MR, Mahmoodi M, et al. Effect of resveratrol the expression of some genes involved epigenetic in breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-453). SSU_Journals 2017; 25(7): 526-36. (Persian)http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-3717-en.html.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]

Iran South Med J 2022; 25(3): 210-226

Original Article

The Cytotoxicity Effect of Extracted Pigment from *Haloarcula* sp. on MDA-MB-468 Breast Cancer Cell Line

S. Shahbazi (MSc)[1*], M. Zargar (PhD)[1**], M. R. Zolfaghari (PhD)[1], M. A. Amoozegar (PhD)[2]***

[1] Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
[2] Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received 25 April, 2022 Accepted 3 August, 2022)

Abstract

Background: Halophilic microorganisms have the potential to produce new biomolecules, including anti-cancer compounds, for medical applications. The purpose of this study was to evaluate the anti-cancer properties of pigments extracted from native Iranian halophilic Archaeon.

Materials and Methods: Pigment extract of *Haloarcula* sp. previously isolated and identified from Aran-Bidgol Lake was extracted. The effect of the extracted pigment on MDA-MB-468 breast cancer cell line was tested by MTT method and PI and FITC staining. Cells with different concentrations of pigment extract were incubated for 24, 48 and 72 hours. Finally, the expression of apoptotic genes, including *BAX*, *CASP3*, *CASP7*, *CASP9*, *P21*, *P53*, and *SOX2*, was examined by Real-Time PCR. Statistical analyses of the data were performed using the t-test and Repeated-Measures ANOVA.

Results: Compared to untreated cells, the pigment extract inhibited the viability of MDA-MB-468 cells significantly after 48 hours at a concentration of 45.95 µg/ml ($p^{*}<0.05$). In addition, the total population of early and late apoptotic cells (44.4%) increased in the studied cell line, which was associated with a significant enhancement of the expression of the *P53*, *BAX*, *CASP7*, and *CASP9* genes.

Conclusion: Halophilic archaea can be considered a suitable source of natural pigments with anti-cancer activity and potential benefits in chemotherapy.

Keywords: Apoptosis, MDA-MB-468 Cell Line, *Haloarcula* sp., Pigment

©Iran South Med J. All right sreserved

Cite this article as: Shahbazi S, Zargar M, Zolfaghari M.R, Amoozegar M.A. The Cytotoxicity Effect of Extracted Pigment from Haloarcula sp. on MDA-MB-468 Breast Cancer Cell Line. Iran South Med J 2022; 25(3): 210-226

[**] *Address for correspondence:* Department of Microbiology, School of Basic Science, Qom branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
E.mail: zargar@qom-iau.ac.ir, amoozegar@ut.ac.ir
*ORCID: 0000-0002-1425-4330
**ORCID: 0000-0002-3108-5655
***ORCID: 0000-0002-9638-0532

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-21]

[DOI: 10.52547/ismj.25.3.210]