

بررسی اثرات توکسین آزورین بر میزان بیان برخی از ژن های آپوپتوزی و چرخه سلولی در رده سلولی A549

سامره نوری^{1,*}، بهروز عطایی²

1- مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
sam.nouri82@yahoo.com

2- مرکز تحقیقات عفونتهای بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
ataei@med.mui.ac.ir

خلاصه

سرطان ریه یکی از شایع ترین و مرگبارترین انواع سرطان در سراسر جهان است که سالانه تعداد زیادی از افراد را به کام مرگ می کشاند. این بیماری معمولاً به دو نوع اصلی تقسیم می شود: سرطان ریه سلول های کوچک و سرطان ریه سلول های غیرکوچک. روش های درمانی رایج شامل جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی و اخیراً ایمونوتراپی و درمان های هدفمند هستند. با این حال، بسیاری از بیماران به دلیل تشخیص در مراحل پیشرفته و مقاومت دارویی، پاسخ مناسبی به درمان های رایج نمی دهند. بنابراین، توسعه روش های جدید درمانی ضروری به نظر می رسد. استفاده از توکسین های باکتریایی به عنوان یک استراتژی نوین در درمان سرطان مورد توجه محققان قرار گرفته است. توکسین آزورین که توسط باکتری *Pseudomonas aeruginosa* تولید می شود، به دلیل توانایی اش در القای آپوپتوز و تنظیم مسیرهای سیگنال دهی سلولی، به عنوان یک عامل ضدسرطانی مورد بررسی قرار گرفته است. پژوهش ها نشان داده اند که آزورین می تواند از طریق القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی و همچنین توقف چرخه سلولی، اثرات ضدسرطانی قابل توجهی داشته باشد. در این مطالعه، اثرات آپوپتوزی توکسین آزورین بر روی رده سلولی A549 سرطان ریه بررسی شد. برای این منظور، انتقال وکتور نوترکیب حاوی ژن آزورین به سلول های سرطانی از طریق روش لیپوفکتامین انجام شد. سپس، RNA کل از سلول ها استخراج و cDNA سنتز گردید و میزان بیان ژن های مرتبط با آپوپتوز و چرخه سلولی با استفاده از روش Real-Time PCR ارزیابی شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در سلول های تیمار شده با آزورین، بیان ژن های آپوپتوزی *p53* و *BAX* به طور معناداری افزایش یافت ($p < 0.05$)، در حالی که بیان ژن ضدآپوپتوزی *BCL2* و همچنین ژن های چرخه سلولی *Cyclin* و *Cyclin D1* کاهش چشم گیری داشت ($p < 0.05$). افزایش نسبت *BAX/BCL2* همراه با کاهش بیان سایکلین ها بیانگر فعال شدن مسیر آپوپتوز و همچنین توقف چرخه سلولی در سلول های تیمار شده بود. نتایج این تحقیق نشان دهنده اثرات مثبت توکسین آزورین در مهار رشد سلول های سرطانی ریه از طریق القای آپوپتوز و توقف چرخه سلولی است. این یافته ها پیشنهاد می دهند که آزورین می تواند به عنوان یک گزینه بالقوه و نویدبخش در توسعه روش های درمانی سرطان ریه مورد استفاده قرار گیرد. برای تأیید این نتایج، مطالعات بیشتری به ویژه در مدل های حیوانی و بالینی مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: سرطان ریه، توکسین آزورین، *P53*، سایکلین ها

۱. مقدمه

سرطان ریه یکی از شایع‌ترین و مرگبارترین انواع سرطان در سراسر جهان است که عمدتاً به دلیل مصرف سیگار، آلودگی هوا و قرار گرفتن در معرض مواد سرطان‌زا ایجاد می‌شود. این بیماری به دو نوع اصلی، سرطان ریه سلول کوچک (SCLC) و سرطان ریه غیر سلول کوچک (NSCLC) تقسیم می‌شود که هر کدام ویژگی‌های بالینی و درمانی خاص خود را دارند. سرطان ریه اغلب در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود، زیرا علائم آن مانند سرفه مزمن، تنگی نفس و درد قفسه سینه معمولاً در مراحل اولیه نامحسوس هستند. این تأخیر در تشخیص باعث کاهش شانس موفقیت درمان و افزایش نرخ مرگ‌ومیر در بیماران مبتلا به این بیماری می‌شود [۱]. رده سلولی A549 که از آدنوکارسینومای ریه مشتق شده است، دارای ویژگی‌های خاصی است که آن را به مدل مناسبی برای بررسی سرطان ریه غیر کوچک (NSCLC) تبدیل می‌کند. این سلول‌ها دارای تغییرات ژنتیکی و مولکولی خاصی هستند که باعث افزایش تکثیر، مقاومت به مرگ برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) و قابلیت تهاجم در محیط‌های آزمایشگاهی می‌شوند [۲].

چالش‌های درمانی سرطان ریه شامل مقاومت دارویی، عوارض جانبی درمان، و محدودیت‌های تشخیص زودهنگام است. درمان‌های رایج شامل جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و روش‌های جدیدتر مانند ایمنی‌درمانی و درمان‌های هدفمند هستند. با این حال، در بسیاری از موارد، سلول‌های سرطانی در برابر داروهای شیمی‌درمانی مقاوم می‌شوند و پاسخ به درمان کاهش می‌یابد. علاوه بر این، برخی از بیماران به دلیل شرایط جسمانی ضعیف قادر به تحمل روش‌های تهاجمی درمانی نیستند. پیشرفت‌های جدید در ژن‌درمانی و پزشکی شخصی‌سازی‌شده امیدهایی برای بهبود نتایج درمانی به همراه داشته است، اما همچنان نیاز به تحقیقات گسترده‌تر برای افزایش اثربخشی و کاهش عوارض جانبی درمان‌های موجود وجود دارد [۳]. یکی از استراتژی‌های درمانی که اخیراً بسیار مورد توجه پژوهشگران است استفاده از باکتری‌ها در درمان سرطان است. باکتری‌ها به شیوه‌های گوناگونی در درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند که این کاربردها می‌توانند شامل اثرات مستقیم ضد توموری یا انتقال عوامل مؤثر بر این فرآیند باشند. دو راهکار اصلی برای بهره‌گیری از باکتری‌ها به عنوان وکتور درمانی عبارتند از: همانندسازی اختصاصی باکتریایی در تومور و انتقال پلاسمید به درون سلول. سموم باکتریایی از طریق از بین بردن سلول‌ها و ایجاد تغییر در فرآیندهای سلولی مرتبط با تکثیر، آپوپتوز و تمایز، که همگی در پیشرفت سرطان نقش دارند، اثرگذاری خود را نشان می‌دهند [۴]. توکسین آزورین باکتری سودوموناس آئروژینوزا، یکی از توکسین‌های باکتریایی با خواص ضد سرطانی است که در سال‌های اخیر توجه محققان را به خود جلب کرده است. آزورین یک پروتئین با جرم مولکولی ۱۴ کیلو دالتون است که از ۱۲۸ اسید آمینه تشکیل شده و شامل یک مارپیچ آلفا به همراه هشت ورقه بتا می‌باشد. این پروتئین دارای یک بخش آب‌گریز و یک ساختار β است. همچنین، آزورین که متعلق به باکتری‌ها است، یک اتم مس را درون ساختار خود جای داده و به دلیل ویژگی‌های نوری خاص، در ۳۰۸ نانومتر دارای باند انتشار فلئورسنت است [۵]. ژن مسئول کد کردن این پروتئین دارای ۱۲۸۷ جفت باز بوده و آزورین به عنوان یک باکتريوسین مهم در گروه پروتئین‌های اکسیداسیون-احیا (redox) دسته‌بندی می‌شود [۶]. مکانیسم ورود آزورین به سلول‌های پستانداران از طریق مسیر اندوسیتوز وابسته به caveolae انجام می‌شود و پس از عبور از اندوزوم ثانویه، لیزوزوم و دستگاه گلژی، در سلول جای می‌گیرد. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که پپتیدی به نام p28 (شامل ۵۰ تا ۷۷ اسید آمینه) که از این پروتئین مشتق شده، یا ناحیه خاصی به نام PED (دامنه ورود پروتئین) مسئول ورود کامل آن به سلول است [۷]. پس از ورود آزورین به درون سلول‌های سرطانی، پپتید مشتق شده آن، p28، در هسته پردازش شده و به بخش آب‌گریز در ناحیه اتصال DNA پروتئین سرکوب‌کننده تومور p53 (با جرم ۲۱ کیلو دالتون و متشکل از ۳۹۳ اسید آمینه) متصل می‌شود. این اتصال باعث ایجاد یک کمپلکس شده که از تخریب پروتئینی p53 جلوگیری می‌کند. این پروتئین از طریق پیوند با بخش NH₂ پایانی p53 و اثرگذاری بر فرآیندهای مختلف سلولی نظیر رونویسی، ترمیم DNA، حفظ ثبات ژنومی و تنظیم چرخه سلولی، موجب القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده

سلول (آپوپتوز) می‌شود [۸]. در این پژوهش اثرات بیان انتروتوکسین آزورین بیان شده در وکتور بیانی، بر روی برخی ژن‌های مسیر آپوپتوز از جمله *p53* و برخی از ژن‌های چرخه سلولی بررسی شده است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. خرید و کشت سلول

رده سلولی A549 از انستیتو پاستور تهران (ایران) تهیه شد و پس از انتقال سریع به هود بیولوژیک، محیط کشت اولیه آن دور ریخته شد، زیرا سلول‌های زنده به کف فلاسک متصل بوده و در محیط کشت شناور نبودند. سپس، ۰/۲۵ میلی‌لیتر EDTA به فلاسک اضافه شد و پس از دو دقیقه، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه (RPMI) حاوی FBS افزوده شد. پس از پیپت کردن، محیط حاوی سلول‌ها به داخل فالکون منتقل و به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت، سوسپانسیون سلولی به فلاسک ۷۵ سانتی‌متر مربعی انتقال یافته و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ دار انکوبه شد.

۲.۲. طراحی و سفارش وکتور عادی و نو ترکیب

پلاسمید pBudCE4.1-azurin نو ترکیب و نسخه بدون تغییر ژنی pBudCE4.1 طراحی و سفارش داده شد. هضم آنزیمی با استفاده از *SacI* و *SmaI* صورت گرفت. همچنین، توالی‌های ژن هدف (azurin) توسط شرکت سازنده در وکتور نو ترکیب قرار داده شد.

۳.۲. تکثیر و همسانه سازی وکتور

وکتور نو ترکیب و پلاسمید خالی در باکتری *Top10* با شوک حرارتی و محلول کلسیم کلرید وارد شد. پس از گسترش باکتری‌ها در محیط LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک انتخابی زئوسین کشت داده شد و ماتریکس تهیه شد. برای تهیه ماتریکس، هر تک‌کلونی به صورت مجزا کشت داده شد. یک پلیت حاوی محیط کشت LB Agar حاوی زئوسین به هفت بخش تقسیم شد و هر قسمت شماره گذاری شد. همچنین، تاریخ روز کشت بر روی پلیت ثبت گردید. در شرایط استریل و کنار شعله، هر تک‌کلونی روی بخش مشخص شده‌ای از پلیت کشت داده شد. سپس، پلیت برای رشد باکتری به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. این فرآیند برای پلاسمید فاقد ژن نیز به عنوان کنترل انجام شد. هدف از ایجاد ماتریکس، شناسایی کلونی‌های مناسب برای استخراج وکتور بود. از نمونه‌های ماتریکس رشد یافته، درون محیط LB-Broth حاوی آنتی‌بیوتیک زئوسین در حجم‌های جداگانه کشت داده شد.

۴.۲. استخراج پلاسمید

برای این منظور، از ماتریکس تأیید شده از نظر حضور وکتور نو ترکیب pBudCE4.1-azurin حامل ژن azurin در فالکون‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط LB Broth دارای آنتی‌بیوتیک، به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما (تهران، ایران) انجام گرفت.

۵.۲. انتقال وکتورهای نو ترکیب و عادی به درون سلولهای سرطانی

در مرحله بعد ابتدا تعداد $10^5 \times 3$ سلول کشت داده شد و در هر چاهک پلیت ۶ خانه ای pBudCE4.1 (به عنوان کنترل) و وکتور نو ترکیب به صورت جداگانه با استفاده از کیت لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (کمپانی سینا ژن) به رده سلولی ترانسفکت گردید. روش عملیات ترانسفکشن به این صورت بود که ابتدا ۷/۵ میکرولیتر از محلول لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640 بدون سرم و آنتی بیوتیک اضافه شد. همچنین ۲/۵ میکروگرم در میکرولیتر DNA پلاسمیدی در ۱۵۰ میکرولیتر از محیط بدون سرم و آنتی بیوتیک تهیه شد. سپس پلیت در انکوباتور قرار داده شد و پس از ۷۲ ساعت برای بررسی از انکوباتور خارج شد و مورفولوژی آن‌ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

۶.۲. استخراج RNA

برای بررسی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، پس از ترانسفکشن، سلول‌ها با PBS شسته و RNA با کیت RNA plus استخراج شد. پس از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ rpm، رسوب سلولی در RNA plus حل و به تیوب‌های کوچک منتقل شد. با افزودن کلروفرم و سانتریفیوژ، RNA از سایر اجزا جدا شد و فاز بالایی به تیوب فاقد RNase منتقل شد. پس از رسوب دهی با ایزوپروپانول و شست‌وشو با اتانول ۷۵٪، RNA نیمه خشک باقی ماند. برای حذف DNA، آنزیم DNase و بافر X ۱۰ اضافه شد و در نهایت نمونه‌ها با EDTA تثبیت شدند.

۷.۲. سنتز cDNA

سنتز cDNA با استفاده و بر اساس دستورالعمل کیت شرکت یکتا تجهیز آزما انجام شد. مبنای ساخت cDNA در این کیت بر اساس آنزیم ترانس کریپتاز معکوس می‌باشد که از ویروس M-MLV گرفته شده است.

بررسی میزان تغییرات بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز و چرخه سلولی در سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با تکنیک RT-

۸.۲. PCR

پرایمرهای ژن‌های مورد بررسی طراحی و سفارش داده شد، همچنین به منظور بررسی اثرات وکتور نو ترکیب pBudCE4.1-azurin بر روی بیان ژن‌های آپوپتوز اولیه و چرخه سلولی در سلول‌های ترانسفورم شده در مقایسه با سلول‌های غیر ترانسفورم (سلول‌های نرمال به عنوان گروه کنترل) و سلول‌هایی که وکتور دست نخورده pBudCE4.1 را دریافت کرده بودند (گروه شاهد)، از تکنیک PCR کمی یا Q-Real time PCR استفاده شد. نام ژن‌ها و پرایمرهای مورد استفاده برای هر واکنش در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- پرایمرها و توالی‌های مورد استفاده در این مطالعه

نام ژن	نام پرایمر	توالی	سایز محصول bp
<i>P53</i>	P-F P-R	5'TGCGTGTGGAGTATTTGGATGAC3' 5'TGTCGTCGGGCTTCAGGTAATC3'	170
<i>CYCLIN E</i>	CYCLIN E-F CYCLIN E-R	5'-TGTTGGATCTCTGTGTCCTGG-3' 5'-TCTATGTGCGCACTGATACCC-3'	237
<i>BAX</i>	B-F B-R	5'AGGTCTTTTCCGAGTGGCAGC3' 5'GCGTCCCAAAGTAGGAGAGGAG3'	234



<i>BCL2</i>	B-F B-R	5'GACGACTTCTCCCGCCGCTAC3' 5'CGGTTTCAGGTACTCAGTCATCCAC3'	245
<i>CYCLIN D1</i>	D-F D-R	5'-AAGTTGCAAAGTCCTGGAGCC-3' 5'-TCGGCTCTCGCTTCTGCTG-3'	125
<i>GAPDH</i>	G-F G-R	5'GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC3' 5'-GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC-3'	183
<i>AZURIN</i>	A-F A-R	5'ATGCTACGTAAACTCGCTGCC3' 5'TGTCGTCGGGCTTCAGGTAATC3'	292

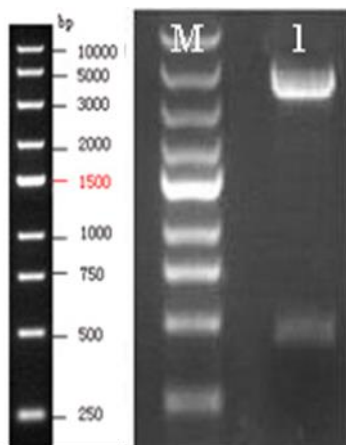
۹.۲. بررسی و تجزیه تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها در این پژوهش حداقل دو بار تکرار شدند و داده‌های به دست آمده به وسیله‌ی نسخه ۲۰ نرم افزار spss انجام شد و در این مطالعه مقدار p کوچکتر از ۰/۰۵ به لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۴. نتایج

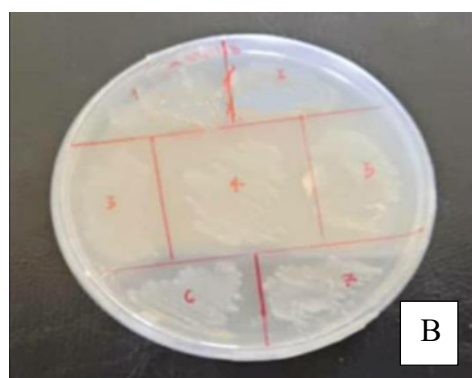
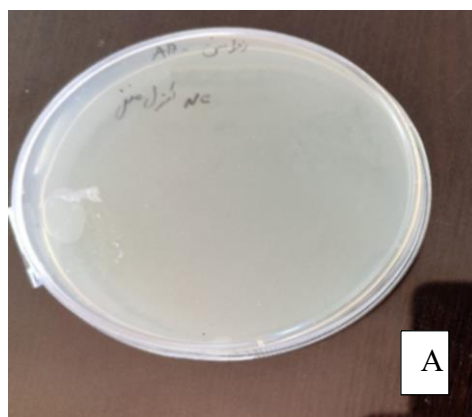
۱.۴. نتایج هضم آنزیمی وکتور

پس از سفارش و سنتز ژن‌های *azurin* درون وکتور نوترکیب pBudCE4.1-*azurin*، صحت قرار گرفتن ژن هدف در وکتور نوترکیب توسط شرکت و با استفاده از روش‌های هضم آنزیمی (با کمک آنزیم‌های محدود کننده *Pst*I و *Xba*I) و توالی‌یابی DNA صورت پذیرفت (شکل ۱).



شکل ۱- نتیجه هضم آنزیمی بر روی وکتور نو ترکیب (M: pBudCE4.1-azurin DNA یک کیلو جفت بازی (Thermo Fisher Scientific، آمریکا)، شماره ۱: هضم آنزیمی وکتور نو ترکیب بوسیله آنزیم های برش دهنده

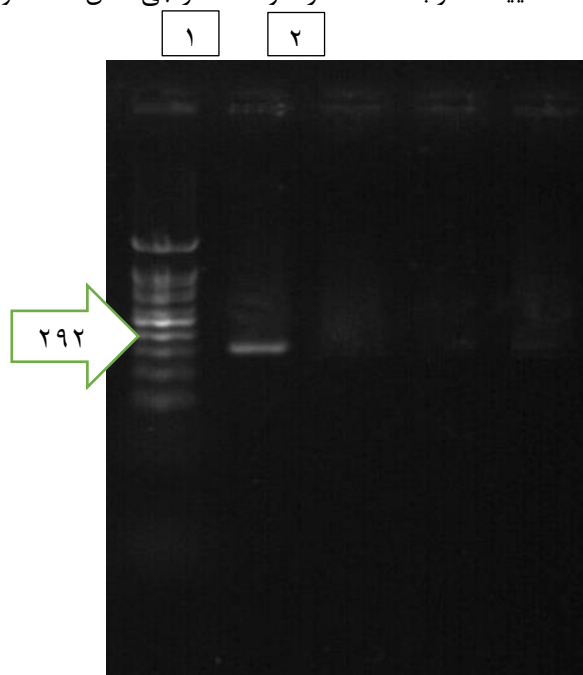
۲.۴. نتایج گسترش وکتور نو ترکیب حاوی ژن آزورین و ژن مقاومت به زئوسین جهت غربالگری در باکتری *TOP10* نتایج در شکل ۲ مشاهده می شود.



شکل ۲ - تأیید ترانسفورماسیون و تهیه ماتریکس از تک کلونی‌های رشد یافته. قسمت A پلیت حاوی باکتری ترانسفورم نشده که به علت عدم وجود ژن مقاومت به زئوسین هیچ کلنی تشکیل نشده است. قسمت B تهیه ماتریکس از باکتری‌های رشد یافته حاوی وکتور نوترکیب که به دلیل وجود ژن مقاومت به زئوسین در وکتور نوترکیب در محیط حاوی آنتی بیوتیک زئوسین رشد یافته اند.

۳.۴. نتایج تأیید صحت ترانسفورماسیون

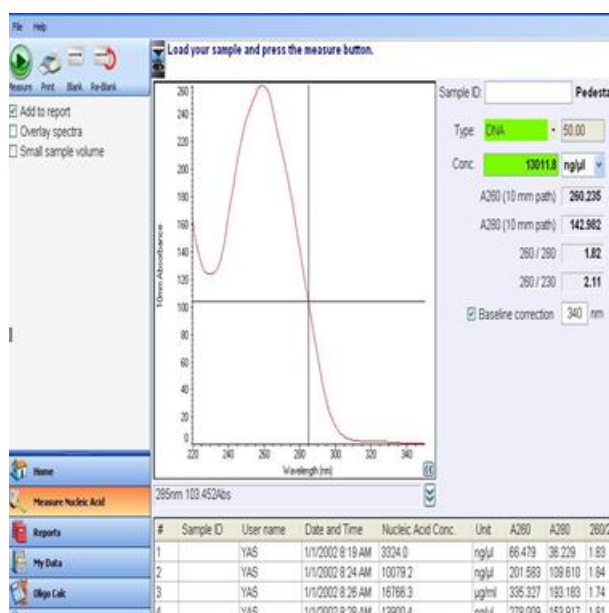
صحت ترانسفورماسیون توسط PCR تأیید شد و باند ۲۹۱۲ از نمونه استخراجی نشان دهنده وجود ژن آزرین در وکتور نوترکیب است (شکل ۳).



شکل ۳ - (۱) DANA LADDER ۱۰۰ جفت بازی (۲) محصول PCR ژن Azurin ۲۹۲ bp

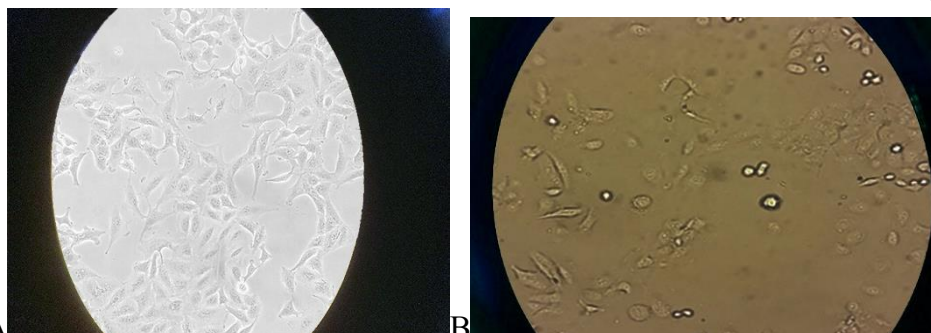
۵.۴. نتایج بررسی کیفیت پلاسمید استخراجی

از نمونه‌های ماتریکس رشد یافته، درون محیط LB-Broth حاوی آنتی بیوتیک زئوسین در حجم‌های جداگانه کشت داده شد و سپس با کمک کیت Maxiprep شرکت یکتا تجهیز آزما استخراج پلاسمید انجام شد. غلظت پلاسمیدهای استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ بیانگر کیفیت و میزان مناسب از پلاسمیدهای استخراج شده بود (شکل ۴).



شکل ۴- نسبت 2.11 نشان دهنده غلظت مناسب و با کیفیت پلاسمید، بدون آلودگی الکی (فنولی) و پروتئینی است.

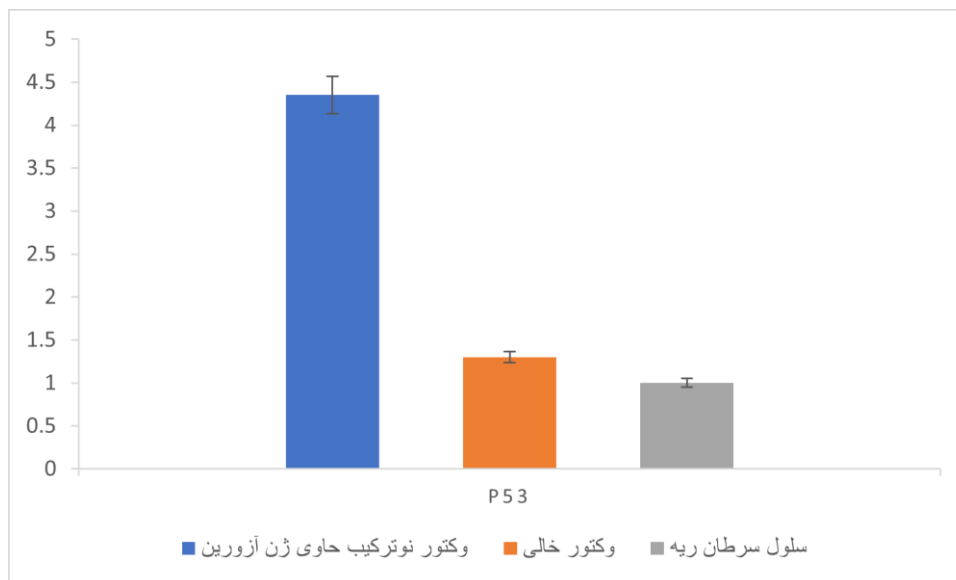
۶.۴. نتایج بررسی مورفولوژی و تراکم سلول‌ها بعد از ۷۲ ساعت ترنسفکشن با وکتور نو ترکیب حاوی ژن آزرین بررسی با میکروسکوپ نوری، مورفولوژی A549 ترسفت شده با وکتور نو ترکیب حاوی ژن آزرین نشان دهنده کاهش تراکم سلولی و تغییرات ظاهری این سلول‌ها بود (شکل ۵).



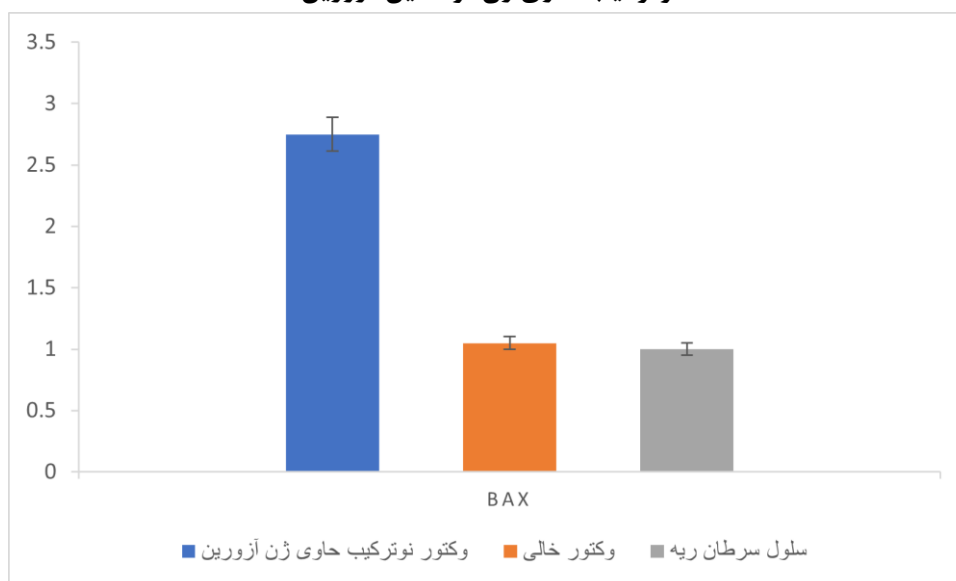
شکل ۵- سلول‌های تیمار نشده رده سلولی A549 کشت شده در محیط RPMI (A) و سلول‌های تیمار شده ترسفت شده با وکتور نو ترکیب حاوی ژن آزرین رده سلولی A549 (B)

۷.۴. نتایج آنالیز آماری ارزیابی تغییرات ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز

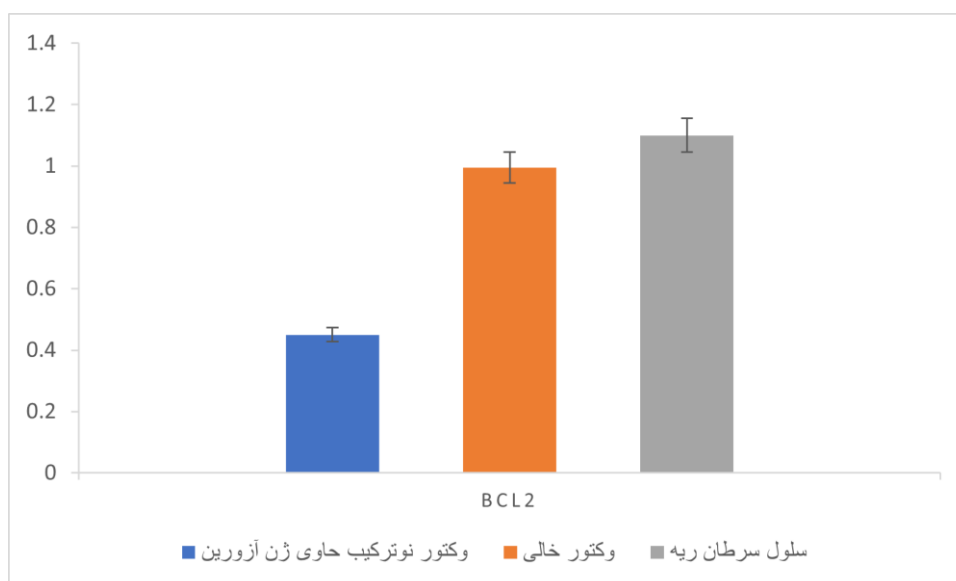
همان طور که در شکل‌های ۶ و ۷ مشاهده می‌شود میزان بیان ژن‌های *BAX*, *p53* در سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور نو ترکیب حاوی ژن توکسین آزرین نسبت به سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور خالی و سلول‌های عادی افزایش معناداری داشته است. ($p < 0.05$). همچنین با توجه به شکل ۸ میزان بیان ژن *BCL2* در سلول‌های ترانسفورم شده در مقایسه با سلول‌های عادی و سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور خالی کاهش چشمگیری داشته است ($p < 0.05$).



شکل ۶- میزان بیان ژن $p53$ در سلول‌های عادی و ترانسفورم شده با وکتور خالی و ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب حاوی ژن توکسین آزورین



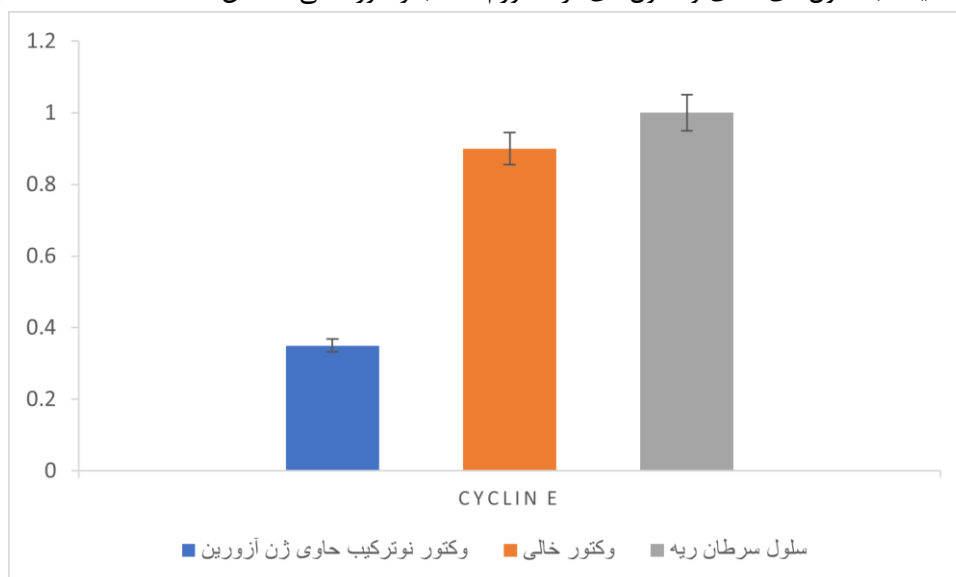
شکل ۷- میزان بیان ژن BAX در سلول‌های عادی و ترانسفورم شده با وکتور خالی و وکتور نوترکیب حاوی ژن توکسین آزورین



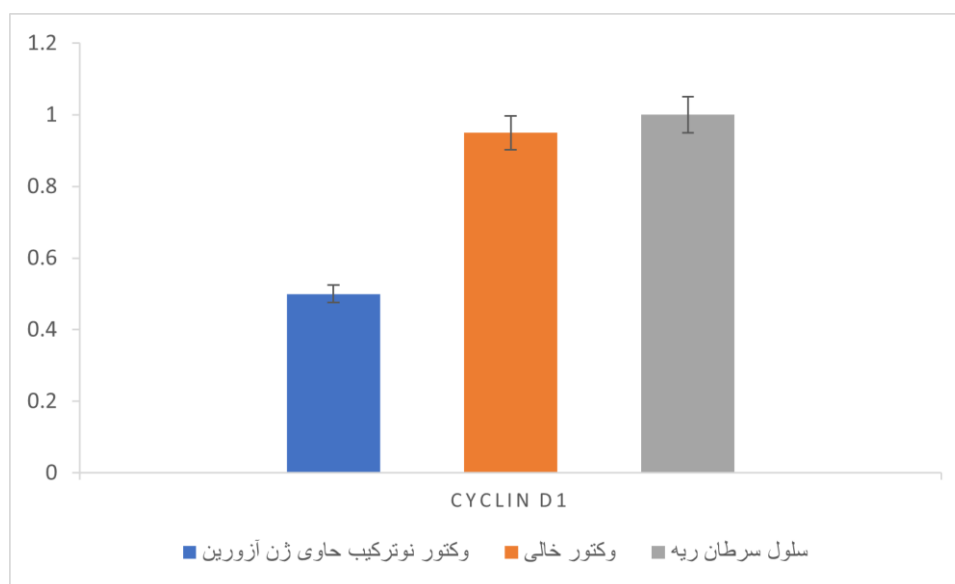
شکل ۸ - میزان بیان ژن *BCL2* در سلول‌های عادی و ترانسفورم شده با وکتور خالی و وکتور نو ترکیب حاوی ژن توکسین آزورین

۸.۴. نتایج آنالیز آماری ارزیابی تغییرات ژن‌های دخیل در مسیر چرخه سلولی

با توجه به شکل‌های ۹ و ۱۰ میزان بیان ژن‌های *Cyclin D1* و *Cyclin E* در سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور نو ترکیب در مقایسه با سلول‌های عادی و سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور خالی کاهش داشته است. ($p < 0.05$)



شکل ۹ - میزان بیان ژن *Cyclin E* در سلول‌های عادی و ترانسفورم شده با وکتور خالی و وکتور نو ترکیب حاوی ژن توکسین آزورین



شکل ۱۰- میزان بیان ژن *Cyclin D1* در سلول‌های عادی و ترانسفورم شده با وکتور خالی و وکتور نوترکیب حاوی ژن توکسین آزرین

۵. بحث و نتیجه گیری

سرطان ریه، یکی از سرطان‌های خطرناک است. سرطان معمولاً به دلیل رشد غیر قابل کنترل سلول‌ها ایجاد می‌شود. تشخیص سرطان در هر فرد، باعث ایجاد نگرانی، استرس و ترس می‌شود. بنابراین، داشتن اطلاعات در مورد علل ایجاد، مکان سرطان، علائم، روش‌های تشخیص و درمانی بسیار مهم است [۹]. یکی از سخت‌ترین جنبه‌های درمان سرطان ریه با پرتو درمانی، تعیین بهترین راه برای انتقال آن است. در حالت ایده‌آل، پزشکان می‌خواهند مؤثرترین دوز را برای یک تومور فراهم کنند، در حالی که قرار گرفتن در معرض اندام‌ها، بافت‌ها و ساختارهای مجاور سالم را محدود می‌کنند [۱۱، ۱۰]. چالش ریه‌ها این است که آنها همیشه در حال حرکت هستند. این امر می‌تواند تمرکز مستقیم پرتو بر روی تومورها را دشوار کند. برای همین است که باید روش‌های مناسب را پس از تشخیص سرطان ریه اتخاذ کرد تا آسیب کمتری به دیگر ارگان‌ها برسد. بنابراین پژوهشگران همواره در حال بررسی یافتن روش‌های نوین، مؤثرتر و کم‌ریسک‌تر هستند [۱۲]. درمان سرطان ریه با استفاده از توکسین‌های باکتریایی مانند آزرین رویکردی نوین و امیدبخش است که از مکانیسم‌های طبیعی باکتری‌ها برای القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی بهره می‌برد. این توکسین‌ها می‌توانند با افزایش بیان پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی مانند BAX و کاهش فاکتورهای ضد آپوپتوزی مانند BCL2، مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های سرطانی را تسریع کنند [۱۳]. تحقیقات نشان داده‌اند که آزرین از طریق مهار مسیرهای چرخه سلولی نیز به سرکوب رشد تومور کمک کرده و می‌تواند به‌عنوان یک گزینه درمانی مکمل در کنار روش‌های رایج مورد بررسی قرار گیرد [۱۴].

در این پژوهش، اثرات آپوپتوزی توکسین آزرین بر روی رده سلولی A549 سرطان ریه بررسی شد. برای این منظور، وکتور نوترکیب حاوی ژن آزرین طراحی و در باکتری TOP10 تکثیر شده و پس از استخراج، به‌وسیله لیپوفکتامین به سلول‌های سرطانی منتقل گردید. سپس RNA استخراج و cDNA سنتز شد و بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و چرخه سلولی با استفاده از Real-Time PCR ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های *p53* و *BAX* در سلول‌های تیمار شده با وکتور نوترکیب افزایش معناداری نسبت به گروه‌های کنترل داشت ($p < 0.05$)، در حالی که میزان بیان *BCL2* و ژن‌های چرخه سلولی *Cyclin D1* و *Cyclin E* کاهش یافت ($p < 0.05$). از آنجایی که این ژن‌ها در تنظیم آپوپتوز نقش

کلیدی دارند، افزایش *Bax* و کاهش *Bcl-2* همراه با کاهش بیان سایکلین‌ها بیانگر فعال شدن مسیر آپوپتوز در این سلول‌هاست. بنابراین، یافته‌ها حاکی از تأثیر موفقیت‌آمیز آزورین در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان ریه می‌باشند. در پژوهشی در سال ۲۰۱۱ پروتئین آزورین باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان یک کاندیدا برای درمان سرطان پستان غیر قابل درمان معرفی شد. در مطالعه آن‌ها، میزان ارتباط پروتئین آزورین و تعامل آن با مولکول‌های چسبندگی سلولی، به ویژه P-Cadherin، در سلول‌های سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت و اثرات ضد سرطانی آزورین مانند مطالعه‌ی ما مشخص شد [۱۵]. مطالعه‌ی در سال (۲۰۱۹) نشان داد که پروتئین GRB-Azurin به صورت انتخابی بر سلول‌های مختلف سرطان پستان اثر گذاشته و از طریق مسیر وابسته به p53 موجب القای آپوپتوز در رده‌های سلولی MDA-MB-231، MCF7 و SK-BR-3 می‌شود [۱۶]. در راستای این یافته‌ها، مطالعه حاضر نیز نشان داد که آزورین با افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی اولیه مانند *P53* و *BAX* و مهار رشد سلول‌های سرطانی، آپوپتوز را در رده سلولی سرطان ریه القا می‌کند. این نتایج تأییدی بر اثرات ضدسرطانی آزورین در انواع مختلف سرطان می‌باشد.

در مطالعه‌ای در سرطان ریه، آزورین، یک پروتئین ضدسرطانی با منشأ باکتریایی، سطح اینترگرین $\beta 1$ و محلی‌سازی غشایی آن را تنظیم کرده و سیگنال‌دهی داخل سلولی و تهاجم سلولی را مختل می‌کند. آزورین وقتی با جفیتینیب و ارلوتینیب ترکیب می‌شود، حساسیت سلول‌های سرطانی ریه به این داروها را افزایش می‌دهد و همچنین باعث کاهش سفتی سلول‌ها می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد آزورین با داشتن فعالیت ضد سرطانی می‌تواند به عنوان مکملی برای بهبود اثر داروهای ضدسرطانی فعلی استفاده شود [۱۷]. در مطالعه‌ی حاضر نیز تغییر بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز در سرطان ریه باعث القای موفق آپوپتوز بواسطه اثر باکتریوسین آزورین بوده است. در مطالعه‌ی دیگری توسط یانگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی سلول‌های استئوسارکوم U2OS تحت تیمار با پروتئین باکتریایی آزورین، کاهش بیان ژن *Bcl-2* (مهار کننده آپوپتوز) نشان داده شد، در حالی که *BAX* و *CASPASE-3* به طور قابل توجهی افزایش بیان یافته بودند [۱۸]. در صورتی که در مطالعه ما بیان ژن‌های *P53* و *BAX* در سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب بیان کننده آزورین افزایش داشتند، بیان ژن‌های *CyclinD*، *CyclinE1* و *Bcl2* در سلول‌های ترانسفورم شده کاهش پیدا کرد. یافته‌های ما در این مطالعه و یافته‌های بررسی سایر پژوهشگران نشان دهنده خواص ضد سرطانی و آپوپتوزی باکتریوسین آزورین است و روشی نوین در درمان برخی سرطان‌ها از جمله سرطان ریه است.

۶. مراجع

- Adams, S.J., Stone, E., Baldwin, D. R., Vliegthart, R., Lee, P. & Fintelman, F. J. (2023), "Lung cancer screening," *The Lancet*, **401** (10374), pp 390-408.
- Fan, C., Wang, W., Zhao, B., Zhang, S. & Miao, J. (2006), "Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14** (9), pp 3218-3222.
- Harrison, S., Judd, J., Chin, S. & Ragin, C. (2022), "Disparities in lung cancer treatment," *Current Oncology Reports*, **24** (2), pp 241-248.
- Sarotra, P. & Medhi, B. (2017), Use of bacteria in cancer therapy," *Current Strategies in Cancer Gene Therapy*, pp 111-121.
- Wittung-Stafshede, P. (2004), Role of cofactors in folding of the blue-copper protein azurin," *Inorganic Chemistry*, **43**(25), 7926-7933.
- Arvidsson, R.H., Nordling, M. & Lundberg, L. G. (1989), "The azurin gene from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization," *European Journal of Biochemistry*, **179** (1), pp 195-200.



7. Taylor, B. N., Mehta, R. R., Yamada, T., Lekmine, F., Christov, K., Chakrabarty, A. M. ... & Das Gupta, T. K. (2009), "Noncationic peptides obtained from azurin preferentially enter cancer cells," *Cancer Research*, **69** (2), pp 537-546.
8. Chakrabarty, A. M. (2016), "Bacterial azurin in potential cancer therapy," *Cell Cycle*, **15** (13), pp 1665-1666.
9. Tao, M. H. (2019), "Epidemiology of lung cancer," *Lung Cancer and Imaging*, 4-1.
10. Barr, T., Ma, S., Li, Z. & Yu, J. (2024). "Recent advances and remaining challenges in lung cancer therapy," *Chinese Medical Journal*, **137** (05), pp 533-546.
11. Tartarone, A., Giordano, P., Leroise, R., Rodriquenz, M. G., Conca, R. & Aieta, M. (2017). "Progress and challenges in the treatment of small cell lung cancer," *Medical Oncology*, **34** (6), 110.
12. Cascales, A., Martinetti, F., Belemsagha, D. & Le Pechoux, C. (2014), "Challenges in the treatment of early non-small cell lung cancer: what is the standard, what are the challenges and what is the future for radiotherapy?" *Translational Lung Cancer Research*, **3** (4), pp 195.
13. Lucas, R., Hadizamani, Y., Gonzales, J., Gorshkov, B., Bodmer, T., Berthiaume, Y. ... & Hamacher, J. (2020), "Impact of bacterial toxins in the lungs," *Toxins*, **12** (4), pp 223.
14. Trivanović, D., Pavelić, K. & Peršurić, Ž. (2021), "Fighting cancer with bacteria and their toxins," *International Journal of Molecular Sciences*, **22** (23), pp 12980.
15. Bernardes, N., Abreu, S., Carvalho, F. A., Fernandes, F., Santos, N. C. & Fialho, A. M. (2016), "Modulation of membrane properties of lung cancer cells by azurin enhances the sensitivity to EGFR-targeted therapy and decreased $\beta 1$ integrin-mediated adhesion," *Cell Cycle*, **15** (11), pp 1415-1424.
16. Paydarnia, N., Khoshtinat Nikkholi, S., Fakhravar, A., Mehdiabdol, M., Heydarzadeh, H. & Ranjbar, S. (2019), "Synergistic effect of granzyme B-azurin fusion protein on breast cancer cells," *Molecular Biology Reports*, **46**, pp 3129-3140.
17. Bernardes, N., Abreu, S., Carvalho, F. A., Fernandes, F., Santos, N. C. & Fialho, A. M. (2016), "Modulation of membrane properties of lung cancer cells by azurin enhances the sensitivity to EGFR-targeted therapy and decreased $\beta 1$ integrin-mediated adhesion," *Cell Cycle*, **15** (11), pp 1415-1424.
18. Yang, D. S., Miao, X. D., Ye, Z. M., Feng, J., Xu, R. Z., Huang, X. & Ge, F. F. (2005), "Bacterial redox protein azurin induce apoptosis in human osteosarcoma U2OS cells," *Pharmacological Research*, **52** (5), pp 413-421.