

بررسی تأثیر عصاره سیتوتوکسیک استخراج شده از باکتری استرپتومیسس گریز کولوآلبوس بر روی سلولهای سرطانی اپیدرمویید دهان انسان (KB)

دکتر شیلا صفائیان^۱، دکتر مهدی آسمار^۲، مهین فرهنگ^۳

چکیده

مقدمه: می دانیم که میکروارگانیسم های دریایی یکی از منابع بسیار مهم ترکیبات جدید محسوب می شوند. اکتینومیسست ها از باکتری های گرم مثبت رشته ای هستند که در همه جا گسترده می باشند و نقش بسیار مهمی را در توسعه داروها به ویژه داروهای ضدسرطانی ایفا می نمایند.

روش بررسی: سوبه دریایی باکتری استرپتومیسس گریز کولوآلبوس *Streptomyces Griscocoloalbus* از مرجان نرم *Erecta Sinularia* واقع در خلیج فارس جداسازی شد. شرایط فرمانتاسیون و رشد باکتری و تولید ترکیب سیتوتوکسیک در محیط کشت بررسی گردید. مراحل خالص سازی نسبی عصاره های باکتری استرپتومیسس گریز کولوآلبوس انجام گرفت و اثر عصاره های توکسیک بر روی سلولهای سرطانی اپیدرمویید دهان (KB) توسط آزمون نوترال رد مورد بررسی قرار گرفت و نیز اثرات سیتوپاتولوژیک عصاره استونی بر روی سلولهای (KB) بررسی شد.

نتایج: مقادیر $IC_{50} = 4/19 \mu g/ml$ برای عصاره استونی و مقادیر $IC_{50} = 44/79 \mu g/ml$ برای عصاره متانولی تعیین گردید. تغییرات مورفولوژیک ناشی از تأثیر این عصاره توکسیک در سلولهای KB بررسی گردید و نکروز و تغییرات هسته مشاهده شده در سلولهای سرطانی موجب شد که عصاره استونی باکتری استرپتومیسس گریز کولوآلبوس به عنوان کاندیدی جهت داروهای سیتوتوکسیک معرفی می گردد.

واژه های کلیدی: سیتوتوکسیک، استرپتومیسس گریز کولوآلبوس، سلولهای سرطانی (KB)

۳۰۲- انستیتو پاستور ایران - تهران

مقدمه

می دانیم محصولات طبیعی باکتریایی منبع بسیار غنی برای ترکیبات جدید با فعالیت های بیولوژیک مختلف می باشند. ساختمان شیمیایی این ترکیبات بسیار متفاوت و پیچیده بود و غالباً

فعالیت های ویژه ای را در سیستم مختلف بیولوژیک از خود نمایش می دهند. در دهه ۱۹۶۰ کاوش در محیط دریایی به عنوان منبع جدیدی جهت جداسازی ترکیبات فعال بیولوژیک آغاز گردید^(۱۰). باکتری های دریایی موجودات بسیار پیچیده ای می باشند و اشکال زیستی متنوعی از میکروارگانیسم ها را نشان می دهند ولی امروزه تنها حدود ۵ درصد از میکروارگانیسم های قابل کشت دریایی مورد شناسایی قرار گرفته اند و حدس زده

۱- استادیار گروه بیولوژی دریا

۲- استاد گروه انگل شناسی

۳- کارشناس ارشد انگل شناسی

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران

می‌شود که کمتر از یک درصد ترکیبات شیمیایی مفید آنها تحت را در رابطه با ترکیبات آنتی بیوتیک و آنتی تومور و سایر ترکیبات با خواص بیولوژیک نشان می‌دهد^(۵).

گروه باکتری‌های اکتینومیتال‌ها در محیط‌های دریایی و همزیست با سایر جانوران دریایی از قبیل اسفنج‌ها و نرم‌تنان درصد بسیار اندکی (کمتر از یک درصد)^(۱۵) را در محیط‌های دریایی تشکیل می‌دهد این در حالی است که این گروه اندک دارای خواص بیولوژیک فراوانی می‌باشد و تا کنون ترکیباتی از قبیل اکتالاکین^(۱۳) سالینامید A و B و هالیکومایسین^(۵) و دسی‌پتید PM-۳۹۱۳۰^(۵) از این گروه از باکتری‌ها در محیط‌های دریایی استخراج شده که دارای اثرات ضد توموری می‌باشند. در این مقاله بیان خواهیم نمود که ترکیبات سیتوتوکسیک در کدامین مرحله از رشد باکتری دریایی استریتومیسس گریزکولوآلبوس تولید می‌گردد و تأثیر عصاره‌های سیتوتوکسیک باکتری را بر روی رده سلولهای سرطانی اپیدرموئید دهان انسان (KB) تحت بررسی قرار داده تا مشخص شود، مرگ سلولهای سرطانی KB در نتیجه تأثیر نکروز ترکیبات بر روی سلولها بوده و یا تحت تأثیر مکانیسم آپوپتوزیس می‌باشد. امروزه یافتن ترکیبات سیتوتوکسیک با ساختارهای جدید مولکولی با توجه به افزایش انواع تومورها و سرطان‌ها و توکسیک بودن بسیار زیاد ترکیبات از اهمیت زیادی برخوردار شده است، با توجه به این که محیط‌های دریایی دارای شرایط ویژه‌ای برای رشد باکتری می‌باشند لذا امید می‌رود بتوان از این عصاره به عنوان کاندیدی مناسب در جهت مطالعات بیشتر در راستای استخراج و شناسایی ترکیبات فعال بیولوژیک سیتوتوکسیک و بررسی اثرات آنها در جانوران آزمایشگاهی به منظور دستیابی به داروهای ضد سرطانی جدید در مطالعات بعدی استفاده نمود.

روش بررسی

میکروارگانسیم: باکتری *Streptomyces griseolobus* تولیدکننده ترکیب سیتوتوکسیک^(۱) از مرجان نرم *Simularia Erecta* واقع در جزیره لارک در خلیج فارس جداسازی شد^(۲)

جستجو قرار گرفته باشد. مطالعات مقدماتی، نتایج بسیار خوبی این باکتری از میان ۴۶ سویه باکتری هتروتروف از مرجان نرم نامبرده جداسازی گردید و پس از تهیه مایع فرمانتاسیون به وسیله تست کشندگی آرتمیما مطابق روش آندرسون و همکاران در سال ۱۹۹۱ این باکتری انتخاب گردید^(۳). ابتدا استریتومیسس گریزکولوآلبوس در محیط کشت ISP4 سطح شیدار کشت داده شد سپس ۳۰ ارلن ۱۰۰cc هم شکل انتخاب شده و به هر کدام ۲۵cc از محیط کشت G اضافه شد. میزان اسپور تلقیح شده 5×10^6 اسپور در هر میلی لیتر بود. ارلن‌ها در درجه حرارت 28°C با دورهای ۲۵۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۱۹۲ ساعت بر روی شیکر گرماگذاری شدند. قبل از شروع آزمایش PHV اندازه‌گیری شد. در هر بار ۳ ارلن تحت شرایط استریل در فاصله زمانی ۲۴ ساعت انتخاب و تمامی مواد ارلن تخلیه شد و پس از تعیین PH باکتریایی محیط کشت در ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و پلیت باکتری توزین شد و وزن تر محاسبه گردید.

مطالعه فعالیت بیولوژیک: فعالیت سیتوتوکسیک کشت فرمانتاسیون G در زمان‌های مختلف طبق روش تست کشندگی آرتمیما با روش آندرسون و همکاران ۱۹۹۱ سنجش شد جهت بررسی اثر توکسیک محیط‌های کشت، محیط کشت سوپرناتانت ابتدا تحت سرما و خلاء خشک و توزین گردید و با استفاده از تست آرتمیما میزان LC_{۵۰} سنجش شد^(۳) و بهترین فاز تولید ترکیب سیتوتوکسیک انتخاب و عصاره استونی مطابق روش یاسوشی و همکاران در سال ۱۹۹۷ تهیه شد جهت تهیه عصاره متانولی ابتدا سوپرناتانت باکتریایی تحت سرما و خلاء خشک گردید و به مدت ۲۴ ساعت متانول بر روی آن اضافه شد. عصاره متانولی توسط سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه جدا شده و عصاره تحت خلاء خشک گردید^(۱۴). از این عصاره‌ها در آزمون‌های سیتوتوکسیک بر علیه سلولهای سرطانی استفاده شد. مراحل خالص سازی عصاره باکتری در دیاگرام آورده شده است.

کشت سلولهای KB: سلولهای سرطانی اپیدرموئید دهان انسان (KB) از بخش کشت سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت آموپول تهیه گردید و به محیط کشت روزلت پارک مدیوم انستیتو

۱۶۴۰ RPMI منتقل شد. محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ در ۷/۳ PH تهیه گردید و توسط فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرون استریل گردید

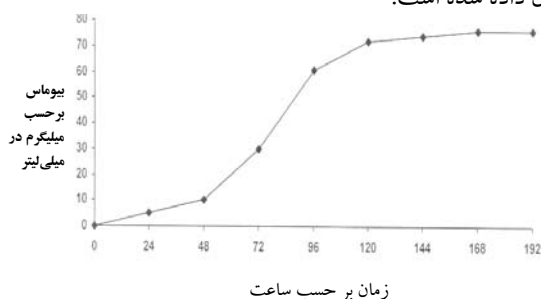
آزمون نوترال رد بر مبنای جذب رنگ در لیزوزوم سلولهای زنده بود که پس از لیز شدن غشای سیتوپلاسمی سلولهای مورد نظر و رنگ آنها استخراج گردید و میزان رنگ جذب شده توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر بررسی شد، به طوری که میزان OD به دست آمده نشانگر مقدار رنگ جذب شده توسط سلولهای زنده می باشد. از روش Guilet و همکاران (۲۰۰۱) در این بررسی استفاده شد^(۹). OD به دست آمده نشانگر میزان جذب رنگ توسط سلولهای زنده می باشد هر چه تعداد سلولهای سرطانی زنده بیشتر باشد OD به دست آمده نیز بالاتر است. OD خالص برای هر نمونه به صورت: OD زمینه - OD اولیه = OD خالص می باشد. میزان IC₅₀ (میزان ممانعت از رشد سلولهای سرطانی) ۵۰٪ از سلولهای مطابق فرمول زیر محاسبه گردید^(۱۳).

$$IC_{50} = \frac{100 \times OD \text{ نمونه} - OD \text{ کنترل منفی}}{OD \text{ کنترل منفی}}$$

ارزیابی مورفولوژی سلولها: ابتدا سلولهای KB در چمبراسلاید کشت و با عصاره ها تیمار گردیدند. در ساعات ۶ و ۱۲ مطالعه سلولها با میکروسکوپ اینورت بررسی و سپس سلولها توسط متانول به مدت یک دقیقه فیکس شده و توسط گیمسا دو درصد به مدت نیم ساعت رنگ آمیزی شدند و توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

در این تحقیق رشد باکتری Streptomycete Simularia Erecta جدا شده از مرجان نرم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تولید بیوماس باکتری فوق در محیط کشت G بر حسب میلی گرم در میلی لیتر در نمودار (۱) نشان داده شده است.



دیگرام مراحل خالص سازی عصاره باکتری استرپتوکوکوس گریز کولوآلبوس

و به محیط کشت به نسبت ۲۰۰ μg/ml پنی سیلین G و ۸۰ μg/ml جنتامایسین و نیز به نسبت ۱۰ درصد سرم جنین گاو فیلتر شده به محیط اضافه گردید. روزانه محیطهای کشت سلولی از جهت چگونگی رشد سلولها KB بوسیله میکروسکوپ معکوس بررسی و درصد بقا آنها بر میزان تراکم سلولی کنترل شد^(۱۱). برای آزمون نوترال رد ابتدا توسط عمل ترینیزاسیون سلولها از سطح فلاسک جدا شده و به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ انجام شد. پس از تعیین درصد بقا به میزان ۲۵۰۰۰ سلول در هر کدام از میکروپلیت های ۹۶ حفره ای کشت سلولی توزیع گردیدند، و از محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ به مقدار ۲۰۰ μl به هر حفره اضافه شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا سلولهای در میکروپلیت ها رشد نمایند، در طول این مدت تراکم سلولی توسط میکروسکوپ معکوس بررسی شده و بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت سلولها عوض شد و محیط کشت جدید حاوی غلظت های مختلف عصاره های استونی و متانولی (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲ میکرولیتر) اضافه گردید و آزمون سه بار تکرار شد. از کنترل منفی دی متیل سولفو کساید (DMSO) یک درصد در هر چاهک به میزان ۱۰۰ میکرولیتر استفاده شد و ترکیب دو کسور بیسین به عنوان کنترل مثبت به کار برده شد.

ارزیابی میزان سمیت با استفاده از آزمون نوترال رد: اساس کار

نمودار ۱: تولید بیوماس در باکتری استرپتومیسس

گریز لوکوالبوس بر حسب میلی گرم در میلی لیتر

اثر کشندگی عصاره محیط کشت G باکتریایی بر روی آرتیما فرانسیسکانا مورد بررسی قرار گرفت و درصد LC₅₀ آن بر حسب میکرو گرم در میلی لیتر در زمانهای مختلف تعیین گردید. که نتایج در جدول (۱) آمده است. همانطور که در نمودار (۱) نشان داده شده این باکتری در محیط کشت ۹۶ ساعت در درجه حرارت ۲۸ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۲۵۰ دور در دقیقه بیشترین افزایش میزان بیوماس (وزن تر) را داشته است و پس از آن باکتری وارد رشد ثابت می گردد و فاز رشد لگاریتمی این باکتری از ۴۸ تا ۹۶ ساعت می باشد. با بررسی اثرات کشندگی در جدول (۱) عصاره محیط کشت G بر روی آرتیما فرانسیسکانا زمان شروع تولید ترکیب سیتوتوکسیک تعیین گردید. به طوری که اثرات توکسیک ضعیف محیط کشت باکتری پس از ۹۶ ساعت به میزان LC₅₀=۶۱۱ μg/ml ملاحظه گردید و به تدریج بر اثرات توکسیک افزوده شد به طوری که در محیط کشت ۱۶۸ ساعت اثر کشندگی به LC₅₀=۲۵۰ μg/ml رسید، لذا این ترکیبات به لحاظ اینکه پس از رشد ثابت باکتری ایجاد می شوند جزو متابولیت های ثانویه قلمداد می گردند. پس از آنکه زمان و شرایط مناسب برای حداکثر تولید متابولیت ثانویه تعیین گردید مجدداً از حجم های فوق در جهت خالص سازی نسبی عصاره استفاده شد و عصاره های استنی و متانولی مطابق روش ذکر شده تهیه گردید و اثرات این عصاره ها بر روی سلولهای سرطانی رده اپیدرموئید دهان انسان KB بررسی شد (جدول ۲). محیط کشت ۱۶۸ ساعت باکتریایی و درجه حرارت ۲۸ درجه سانتی گراد به عنوان بهترین شرایط تولید ترکیبات توکسیک در باکتری استرپتومیسس گریز کولوآلبوس معرفی گردید. نتایج حاصل از آزمون نوترال رد بر روی سلولهای سرطانی KB با غلظت های مختلف در جدول (۲) نشان داده شده است. به طوری که ملاحظه می گردد فراکسیون عصاره استونی پلیت باکتری دارای اثرات ممانعت کنندگی از رشد ۵۰ درصد سلولهای سرطانی به غلظت LC₅₀=۴/۱۹ μg/ml و عصاره متانولی سوپر نانتت دارای LC₅₀=۴۴/۴۹ μg/ml می باشد.

نتایج حاصل بوسیله برنامه نرم افزاری ۲۷ Lichfield - Wilcoxon , PC/ Pharm ver به دست آمده است (جدول ۲).
جدول ۱: میزان LC₅₀ بر حسب μg/ml در آرتیما فرانسیسکانا در

محیط کشت G

میزان LC ₅₀ بر حسب μg/ml در آرتیما فرانسیسکانا	زمان (ساعت)
۰	۰
۰	۲۴
۰	۴۸
۰	۷۲
۶۱۱	۹۶
۴۱۰	۱۲۰
۳۶۵	۱۴۴
۲۵۰	۱۶۸
۲۵۰	۱۹۲

جدول ۲: میزان ممانعت از رشد سلولهای KB توسط عصاره های استونی و متانولی استرپتومیسس گریز کولوآلبوس توسط تست

نوترال رد بر حسب μg/ml

اثر بر روی سلولهای سرطانی KB	
ترکیب	Lc 50=(μg/ml)KB cell
۱- فراکسیون اتیل استاتی از عصاره استونی پلیت	۴/۱۹
۲- عصاره متانولی از سوپر نانتت	۴۴/۷۹
۳- دوکسی رویسین	<۱/۱

جهت بررسی اثرات مورفولوژیک عصاره ها بر روی سلولهای KB گسترش های تهیه شده از سلولهای سرطانی تحت تیمار با غلظت های ۱ μg/ml، ۲ μg/ml، ۴ μg/ml عصاره استنی و کنترل منفی تهیه و با رنگ گیمسا رنگ آمیزی شدند پس از ۸ ساعت سلولهای KB (کنترل منفی) دارای دیواره سلولی مشخص همراه با زواید سیتوپلاسمی گسترده بوده و اندازه سلولها تقریباً یکسان می باشد. اندازه هسته ها نسبتاً یکسان بوده و تغییر شکل خاص

آلکالوئیدی، و لاکتون ها تعلق دارند و از لحاظ رشد نتایج مشابه به دست آمده است^(۷،۴).

جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک تکمیلی از عصاره های استونی و متانولی از محیط فرمانتاسیون ۱۶۸ ساعته تهیه گردید. میزان ممانعت از رشد سلولهای سرطانی KB در عصاره استونی $IC_{50} = 4/19 \mu g/ml$ بوده و عصاره متانولی دارای $IC_{50} = 44/179 \mu g/ml$ می باشند.

مشاهده می گردد. هسته ها نسبت به سیتوپلاسم بسیار درشت بوده که از ویژگی های سلولهای سرطانی می باشد. (شکل ۱ الف)
در غلظت $4 \mu g/ml$ همانگونه که در شکل ب ملاحظه می گردد در این سلولها ضمن افزایش حجم سلول و ظهور واکنش های خاص در داخل سلولها شواهدی را مبنی بر نکروز سلولی نشان می دهد. اما اثرات خاص مبنی بر تغییرات هسته و هستک ها ملاحظه می گردد به نظر می رسد این دوز باعث ایجاد نکروز در سلولها گشته است.

همانگونه که در شکل های (ج) ملاحظه می شود در لام تیمار شده با غلظت $1 \mu g/ml$ عصاره استونی هسته سلولها دچار تغییرات عمده ای شده است به علاوه دیواره سلولها تغییر کرده و زواید سیتوپلاسمی کاهش یافته است این امر تغییرات سیتواسکلتی سلول را نشان می دهد در بعضی قسمتها حالت کشیدگی و پارگی مشاهده می گردد.

بحث

همانگونه که نتایج کشت باکتری استرپتومیسس گریز کولوآلبوس در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است مشخص گردید که این باکتری دیر رشد می باشد. رشد لگاریتمی این باکتری ۴۶ الی ۹۶ ساعت مشاهده گردید. پس از آن باکتری وارد فاز رشد ثابت گردید و مطابق آزمون هایی که بر اساس آزمون کشندگی آرمیا به دست آمد شروع و تولید ترکیبات سیتوتوکسیک پس از مرحله رشد لگاریتمی آغاز شد. لذا می توان محیط کشت G در ۲۵۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و درجه حرارت ۲۸ درجه سانتی گراد در مدت زمان ۱۶۸ ساعت را به عنوان شرایط مناسب برای رشد و تولید ترکیب سیتوتوکسیک ذکر کرد. باکتری های جنس استرپتومیسس از باکتری های گرم مثبت و کند رشد می باشند، این گروه از باکتریها دارای متابولیت های ثانویه بوده و تا کنون گروهی از متابولیت های ثانویه سیتوتوکسیک و آنتی تومور از باکتری دریایی گزارش شده است و عمدتاً به گروههای ترکیبات اسیدهای آروماتیک، منوترین های

شکل (۱) الف سلولهای طبیعی KB، دارای جدار چین خورده، زواید سیتوپلاسمی مشخص و پیشرفته و هسته های طبیعی می باشد. توسط آنالیز دستگاهی سلولهای KB متوسط طول سلولها $34/5$ میکرون، متوسط عرض $15/6$ میکرون و متوسط قطر هسته 4 میکرون تعیین گردید.

* بزرگنمایی ۴۰۰ رنگ آمیزی شده.

ب) سلولهای KB در $4 \mu g/ml$ غلظت عصاره استونی، طول متوسط سلولها با استفاده از آنالیز دستگاهی ۸۵ میکرون و متوسط $22/8$ میکرون تعیین گردید.

* بزرگنمایی ۱۰۰۰

ج) اشکال ناهمگون هسته و کوچک شدن سلولها در غلظت های $1 \mu g/ml$

عصاره استونی.

پایین‌تر از غلظت ممانعت از رشد ۵۰ درصد سلولهای KB می‌باشد^(۶). با توجه به شکسته شدن هستک‌ها و ناهمگون شدن هسته‌های سلولهای KB در غلظت‌های پایین تصور می‌شود که اثر این عصاره بر روی هسته‌های سلولهای KB می‌باشد. اخیراً جهت تشخیص داروهای ضد سرطانی از عکس العمل ایجاد شده توسط داروها بر روی سلولهای سرطانی و تشکیل آپوپتوزیس بر روی سلولهای هدف، آن ترکیبات را شناسایی نمود. برخی از ترکیبات طبیعی بیولوژیک سیتوتوکسیک از قبیل تاکسول، اتوپساید، کامپوتسین، سیپلاتین در دوزهای پایین سبب شکسته شدن کروماتین و اشکال نامنظم هسته می‌گردد و این تأثیر توسط متابولیت‌های باکتریایی تاکنون تنها در ترکیب سیتوترنین جدا شده از سویه استرپتومیسیت خاکی مشاهده شده است^(۱۲).

بنابراین عصاره استونی در غلظت ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌تواند بر روی سلولهای KB اثر نکروز داشته باشد و در غلظت‌های ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌تواند تغییرات خاصی در هسته و هستک‌ها و سیتوپلاسم نشان دهد لذا از عصاره استونی میتوان به عنوان کاندید داروهای ضد سرطانی استفاده نمود و جهت مراحل آتی خالص‌سازی و تعیین ساختار ترکیب فعال این عصاره و بررسی اثر آن بر روی جانداران آزمایشگاهی انجام خواهد گرفت.

سپاسگزاری

از انستیتو پاستور ایران که امکان کشت سلولی را فراهم نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

سیتوتوکسیک جدا شده از آن». مجله علوم دریایی ایران - شماره دوم/ بهار، ۱۳۸۱: ۵۹-۵۱.

مطالعات پیشین در مورد ترکیبات سیتوتوکسیک و آنتی‌تومور حاصل از باکتری‌های دریایی در سال ۱۹۸۷ توسط مونرو و همکاران به چاپ رسیده است و بر این اساس تعریف اصطلاح سیتوتوکسیسته به اثر توکسیک بر علیه سلولهای توموری در محیط کشت سلولی گفته می‌شود و این میزان در رابطه با ترکیبات عصاره $IC_{50} < 20 \mu g/ml$ و در ترکیبات خالص $IC_{50} < 4 \mu g/ml$ می‌باشد^(۴). بر این اساس عصاره متانولی با وجود آنکه دارای $IC_{50} = 44/79 \mu g/ml$ می‌باشد آن را نمی‌توان عصاره سیتوتوکسیک قلمداد نمود این در حالی است که عصاره استونی با $IC_{50} = 4/19 \mu g/ml$ دارای اثر سیتوتوکسیک مناسبی می‌باشد. به نظر می‌رسد ترکیب یا ترکیبات اصلی سیتوتوکسیک این باکتری نیمه قطبی می‌باشند که به میزان بیشتری در حلال استون وارد شده است با توجه به نتایج دست آمده عصاره استونی به میزان قابل توجهی دارای مقادیر ترکیبات توکسیک بیشتر از عصاره متانولی می‌باشد. از عصاره استونی برای بررسی اثرات سیتوپاتولوژیک استفاده گردید و روشن شد که تورم سلول که یکی از تظاهرات اشکال عوامل آزارسان می‌باشد در غلظت $4 \mu g/ml$ به خوبی مشاهده می‌شود. با بررسی لام‌ها در زیر میکروسکوپ تورم سلولی و تغییرات چربی سلول که با ظهور واکنش‌های بزرگ و کوچک مشاهده گردید این امر دلیلی روشن بر وجود نکروز و مرگ برخی از سلولها را روشن می‌نماید، اما در غلظت پایین $1 \mu g/ml$ زواید سیتوپلاسمی سلول‌ها کاهش یافته و هسته‌ها دچار ناهمگونی شده‌اند، این غلظت بسیار

منابع

- ۱- صفائی‌ان ش، نوحی الف، عریان ش، آسمار م، روستائیان ع. « بررسی مرجان نرم *Simularia erecta* از خلیج فارس و مطالعه تاکسونومیک سویه‌ای باکتری استرپتومیسیت تولید کننده ترکیب

- از ارگانوسم‌های منتخب». پایان نامه دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، ۷۹-۱۳۷۸: ۲۵۶.
- 3- Anderson JECM, Coetz and JL, Mlaughtin M, suffness A. *Blind comparision of simple bench top bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreeens*. *Phytochemical Analysis*, 1991,2: 107-111.
- 4- Attaway DH, Zabrosky OR. *Marine biotechnology*, USA, CRP prees, 1993 2 nd ed: 499.
- 5- Bernan VSM, Greenstein WM. *Maises marine microorganisms as a source of new natural products*, *Advance in Applied Microbiology*. 1997, 43: 57-87.
- 6- Cotran RV, kumar SL. Robbins, Robbins pathologic basis of diseases, 1997, Vol 1, 5nd ed: 578.
- 7- Cho WKHS, Lee JR, Rho TS, Kom SJ, Mo J, Shin. *New laclon-containg metabolist from marine derived bacterium of genus Streptomyces*, *J. Nat. product*, 2001, 64: 664-667.
- 8- Fenical WRP, Jensen, *Marine Biotechnology, pharmaceutical and bioactive natural products*. Pleunm press, 1991, Vol: 1: 414-450.
- 9- Guilet DJJ, Heksbut. *Novel cytotoxic phenyl furano coumarins from cal ophyllum dispar*. *J. Nat. prod*, 2001, Vol. 64: 563-568.
- ۲- ناجی سید حسین زاده ط. «استخراج و تعیین ساختار مولکولی مواد مؤثر در برخی از مرجانهای نرم خلیج فارس و بررسی اثرات فیزیولوژیک و فارماکولوژیک مواد طبیعی موجود در آنها بر تعدادی
- 10- Iwai YY, Takahashi. *The search for bioactive compounds from microorganisms*. New York, 1992. Springer: 281-302.
- 11- Kameyama TA, Takahashi S, Kurasawa H, shizuka Y, Okami T, Takeuchi H. *Umezawa. Bisucaberin, a new Sidrophore, sensitising tumor cells to macrophage mediated cytotoxicity*, *The Journal of Antibiotics*, 1987, Vol. XL, 12, 1664-1670.
- 12- Kayeya HH, Zhang KK, Obinata, Cytotrienin A. *A novel apoptosis inducer in HL-60 cells*. *The Journal of Antibiotics*, 1997, 50: 370-373.
- 13- Tapiolas DMM, Roman. Fenical, octalactins from a marine bacterium *Sterptomyces* sp., *J. Am. Soc*, 1991, Vol. 113: 4681-4683.
- 14- Yasuchi ST, Yoshida T, Tsujta K, Ochiaid T. *Agatsuma, GE3, a novel hexadesipeptide antitumor antibiotic, produced by Streptomyces* sp., *J. Antibiotic*, 1997. 50: 659-664.
- 15- Zheng ZW, Zeng Y, Huang Z, Yang L, Lio. *Detection of antitumor and antimicrobial activities marine organism associated actinomycetes isolated from the taiwan strait, Chanes*. *FEMS Microbiology letters*, 2000, 188: 87-91.

