

# Evaluation of in vitro Effect of Pyocyanine Pigment on Interleukin-2 Secretion from Peripheral Blood Mononuclear Cells in Cancer Patients

Anahita Mohseni<sup>1</sup> , Afsoon Shariat<sup>\*1</sup> 

1. Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

 [10.30699/ijmm.15.3.327](https://doi.org/10.30699/ijmm.15.3.327)



## ABSTRACT

**Background and Aim:** The pyocyanine pigment in *Pseudomonas aeruginosa* stimulates blood cells to secrete IL-2. IL-2 cytokine is an activator of cytotoxic T cells and natural killer cells. These cells destroy the target cells of patients with cancer. This study aimed to evaluate the effects of pyocyanine on the IL-2 secretion from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with breast, prostate, and bladder cancers.

**Materials and Methods:** In this cross-sectional descriptive study, a total of 30 *P. aeruginosa* isolates were collected from different clinical specimens (urine, blood, burns, etc.) of patients admitted to Namazi Hospital in Shiraz, Iran, from October to December 2019. The pyocyanine was extracted from the isolates by chloroform. Also, twenty-eight peripheral blood samples were selected from 21 patients with breast, prostate, and bladder cancers and 7 healthy controls. Following the isolation of PBMCs from patients and the control group using Ficoll density gradient, samples were prepared for cell culture. Half of the PBMCs were treated with pyocyanine (0.5 µg/mL), and the rest of them remained without treatment. Then, the IL-2 secretion from the treated and untreated cells with pyocyanine was investigated by ELISA method. Statistical analysis was done using SPSS 22.

**Results:** Significant increases were seen in the IL-2 secretion from PBMCs in the patients with breast ( $P=0.032$ ), prostate ( $P=0.002$ ), bladder ( $P=0.009$ ) cancers, and healthy controls ( $P=0.004$ ) after treatment with pyocyanine in comparing with before treatment with this pigment in vitro.

**Conclusion:** Low concentrations of pyocyanine can stimulate the PBMC of cancer patients to secrete IL-2 cytokines. Further studies should be performed on the immunostimulatory effects of pyocyanine in laboratory animals.

**Keywords:** Cancer, Immunostimulant, Pyocyanine, Interleukin-2

Received: 2021/03/27; Accepted: 2021/05/02; Published Online: 2021/06/21

**Corresponding Information:** Afsoon Shariat, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.  
Email: [afsoonsh1980@yahoo.com](mailto:afsoonsh1980@yahoo.com)



Copyright © 2021, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Mohseni A, Shariat A. Evaluation of in vitro Effect of Pyocyanine Pigment on Interleukin-2 Secretion from Peripheral Blood Mononuclear Cells in Cancer Patients. Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (3) 327-344

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

## Introduction

Cancer is a complex disease that affects cells and disrupts the rate of cell proliferation and differentiation (1, 2). Usually, a secondary tumor is formed at the time of diagnosis, which is a late diagnosis and is the cause of high cancer mortality (1). In the Middle East, breast cancer accounts for 32% of cases of

women's cancers and is the first cause of women's death aging 40 to 45 years old (1, 3). At the same time, prostate cancer is the most common malignant tumor in men. Generally, one in six men will develop prostate cancer in their lifetime (4). Breast cancer and prostate cancer are the most common causes of death in

Iranian women and men, respectively (5). Also, bladder cancer is a common disease. In men, its incidence is 2 to 2.5 times more than women; however, it is also common in women who smoke (6). Conventional therapies, such as chemotherapy and radiation therapy, have low survival rates due to tumor progression, resistance to treatment, and non-specific treatment of tumors (7). Scientists are trying to use technology to introduce new treatments for cancer. Various applications of bacteria have been investigated so far (7). Natural compounds derived from them (including bacterial pigments) are reported to have anti-cancer and antioxidant activity, and have unique cancer treatment mechanisms (7).

The most important feature of *Pseudomonas aeruginosa* is the production of the blue-green pigment of pyocyanine (8).

This pigment has an immunostimulatory effect on cancer patients and is related to cell apoptosis having great potential to inhibit cell proliferation. Hence, due to the action of superoxide dismutase and catalase, it generates a large amount of reactive oxygen species (ROS) (7). These results support the cytotoxicity of pyocyanine in cancer cells. These mechanisms have led to better cancer treatment strategies (9). Also, the pyocyanine has stimulatory activities on IL-2 cytokine such that low concentrations of pyocyanine exacerbated the responses of T lymphocytes (production of IL-2) and B lymphocytes (differentiation to immunoglobulin-producing cells), whereas high concentrations of this pigment had inhibitory effects (10). IL-2 is a pro-inflammatory cytokine that is produced in T cells and participates in the stimulation of immune responses (11). Eventually, since the pyocyanine has immunostimulatory effects and considering that this pigment induces the transcription of inflammatory cytokines and stimulates the secretion of IL-2 from blood cells; the use of the immune system in cancer treatment is a promising approach and it is hoped that with the advancement of studies in this field, a new dimension will be added to cancer treatment (12, 13). This study aims to evaluate the ability of different clinical isolates of *P. aeruginosa* to produce pyocyanine and the in vitro immunostimulatory effects of pyocyanine on the IL-2 secretion from PBMCs in patients with breast, prostate, bladder cancers, and healthy control group.

## Materials and Methods

### Isolation and Identification of *Pseudomonas aeruginosa* from Clinical Samples

In this cross-sectional descriptive study, after approval in the committee for ethics in biomedical research of Kazerun Branch, Islamic Azad University, being presented with the code IR.IAU.KAU.REC-.1399.-031, a total of 30 *P. aeruginosa* isolates were collected

from different clinical specimens such as urine, blood, burn, sputum, and wound infections of patients admitted to Namazi Hospital in Shiraz from October to December 2019. All isolates were identified as *P. aeruginosa* using gram stain and biochemical characterization (14). The isolates were randomly evaluated to determine the rate of pyocyanine production. To maintain the bacteria, the strain was inoculated in the broth medium of tryptic soy broth (Quelab, Canada) containing glycerol, and then stored at -70°C (15).

### Extraction of Pyocyanine from *Pseudomonas aeruginosa* Isolates

All bacterial isolates were cultured on *Pseudomonas* agar culture media (Quelab, Canada), and incubated at 37°C for 48 hours. The positive isolates in the production of pyocyanine showed blue-green pigments. Then, chloroform (Merck, Germany) was poured on the culture medium (1:2 ratio), then vortex (Labinco, Netherlands) vigorously for 1 minute. The culture was centrifuged at 5000 rpm (Hettich, Germany) for 10 minutes, and formed two organic and aqueous phases. The supernatant was separated and pyocyanine was extracted. Then, added 1 mL of 0.1M HCl (Merck, Germany) to observe pink to deep red color. The pigment was purified by repeated addition of the chloroform solvent (16).

Extracted pyocyanine was poured into a watch glass (Schott Duran, Germany) and kept for 24 to 48 h under a hood (BioBase, Iran) to completely remove chloroform. Finally, the dried pigment was separated by a sterile lancet (Azmaplast, Iran) and stored in the refrigerator in powder form for later stages. The concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) of the pigment was determined by measuring the optical density at a wavelength of 520 nm using a spectrophotometer (Unico, USA) (16, 17).

### Patients and Study Population

Due to the rapidly increasing prevalence of breast, prostate, and bladder cancers, and the urgent need for their treatment, the samples were selected from among the patients diagnosed with these cancers. Twenty-one patients with breast (n=7), prostate (n=7), and bladder (n=7) cancers admitted to the Cancer Center of Shiraz Namazi Hospital were included in this study from August to December 2019. The reason for choosing 7 samples per group was that the number was statistically acceptable. Seven healthy volunteers were recruited as a control group. There was no history of cancer in this group. The age range (46-65 years old) and male to female ratio were similar in studied cancer patients and healthy controls. Patient and control groups were matched for age and gender. Five mL fresh blood was obtained from cancer patients and healthy individuals by venous puncture and collected in sterile tubes containing EDTA. The

sample was sent to the laboratory for the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The

specifications of breast, prostate, and bladder cancer patients were shown in [table 1](#).

**Table 1.** Specifications of breast, prostate, and bladder cancer patients

No.	Sexuality	Age	Family history	Stage	Metastasis
<b>Breast cancer patients (n=7)</b>					
1	Woman	59	No	III	Yes
2	Woman	53	No	II	Unknown
3	Woman	46	Yes	I	No
4	Woman	55	No	II	Unknown
5	Woman	63	Yes	II	Unknown
6	Woman	57	No	II	Unknown
7	Woman	50	No	II	Unknown
<b>Prostate cancer patients (n=7)</b>					
1	Man	72	Yes	III	Unknown
2	Man	59	Yes	II	No
3	Man	56	Yes	II	No
4	Man	62	No	II	No
5	Man	70	No	III	Unknown
6	Man	57	Yes	I	No
7	Man	65	No	I	No
<b>Bladder cancer patients (n=7)</b>					
1	Man	49	No	I	No
2	Man	58	No	I	No
3	Woman	60	No	II	No
4	Man	39	Yes	I	No
5	Man	44	Yes	I	No
6	Man	50	No	I	No
7	Woman	45	Yes	I	No

### Separation of PBMCs from Patients with Cancer and Healthy Controls

Separation of PBMCs from patients with cancer and healthy control samples was performed using the ficoll density gradient method (18). The blood sample was transferred to a 50 mL tube and diluted 1:1 ratio with PBS (Merck, Germany). Then, diluted blood samples were slowly added to the Ficoll (Inno-Train, Germany). The samples were centrifuged at 400 rpm for 20 minutes at 20°C (Hettich, Germany). The PBMCs (cloudy layer) were collected from the diluted plasma/ficoll interface using a serological pipette and the cells were placed into a sterile 50 mL tube. Again, the cells were washed by adding PBS and centrifuged at 330 rpm for 10 minutes (19).

### Cultures of PBMCs Isolated from Patients with Cancer and Healthy Controls

After the separation was performed, 100 µL PBMCs isolated from the patients with cancer and the healthy control group was transferred to a 25 cm<sup>2</sup> flask

(Jetbiofil, Canada) containing RPMI 1640 medium (Biosera, France) and 20% fetal bovine serum (FBS) (Biosera, France). The flask was placed in a 5% CO<sub>2</sub> incubator (Lab Tech, South Korea) at 37°C and 98% humidity. After 48 hours, the culture medium was replaced and the cells were passaged (20).

In order to harvest the cells attached to the bottom of the flask, the medium was washed thoroughly and slowly with PBS. Then, added the trypsin enzyme (Merck, Germany) to the flask and placed in the incubator at 37°C for 2 to 5 minutes. After pipetting, the cells isolated from the flask floor were transferred to a 15 mL sterile falcon tube. The tube containing the cells was centrifuged for about 5 minutes at 1200 rpm. The supernatant was evacuated to the cells and the new medium was added. The cell suspension was split into several new flasks. 20 µL cell suspension was mixed with 20 µL trypan blue (Sigma, USA). Then, live cells (cells that do not penetrate the color) were counted in the 25th hemocytometer (HBG, Germany) (20).

### Effect of Pyocyanine on the Secretion of IL-2 from PBMCs of Patient and Control Groups

Half of the PBMCs of cancer patients and healthy controls were treated with pyocyanine (0.5 µg/mL), and the rest of them remained without treatment. Then, the supernatants were removed and the concentration of IL-2 was determined by ELISA using a commercial human IL-2 ELISA kit (Thermo Fisher Scientific, Australia), according to the manufacturer's instructions.

#### Statistical Analysis

The secretion of IL-2 from the treated and untreated cells with pyocyanine was compared by paired

sample's T-test. Also, statistical analysis of the samples was done using SPSS version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA). All results were expressed as mean ± standard error (SE). A p-value of 0.05 or less was considered statistically significant.

### Results

#### Selection of the Highest Pyocyanine Producer Isolate

Among clinical isolates, isolate 11 (from a wound source) was the highest pyocyanine-producing agent, and this isolate was used for testing in the same sample. [Table 2](#) shows the concentrations of pyocyanine produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolates.

**Table 2.** The concentrations of pyocyanine produced by *P. aeruginosa* isolates

No. Isolates	Source	OD	Concentration of pyocyanine (µg/mL)
1	Urine	0.20	3.41
2	Urine	0.19	3.24
3	Wound	0.08	1.36
4	Blood	0.42	7.17
5	Urine	0.10	1.70
6	Burn	0.17	2.90
7	Burn	0.21	3.58
8	Blood	0.27	4.60
9	Blood	0.34	5.80
10	Blood	0.19	3.24
11	Wound	0.58	9.90
12	Urine	0.06	1.02
13	Urine	0.20	3.41
14	Blood	0.46	7.85
15	Burn	0.55	9.38
16	Urine	0.30	5.12
17	Sputum	0.07	1.19
18	Wound	0.09	1.53
19	Blood	0.33	5.63
20	Urine	0.40	6.82
21	Urine	0.07	1.19
22	Blood	0.45	7.68
23	Blood	0.17	2.90
24	Urine	0.08	1.36
25	Sputum	0.09	1.53
26	Burn	0.46	7.85
27	Urine	0.39	6.65
28	Sputum	0.33	5.63
29	Blood	0.13	2.21
30	Urine	0.45	7.68

### Comparison of IL-2 Secretion from PBMCs of Patients and Control Groups Before and After Treatment with Pyocyanine

The ELISA method was used to compare the secretion levels of IL-2 in PBMCs of cancer patients

(n=21) and healthy control samples (n=7) before and after treatment with pyocyanine pigment (Figures 1-4). In all groups, after treatment with pyocyanine, the secretion level of IL-2 of PBMC was higher than that of pretreatment with this pigment.

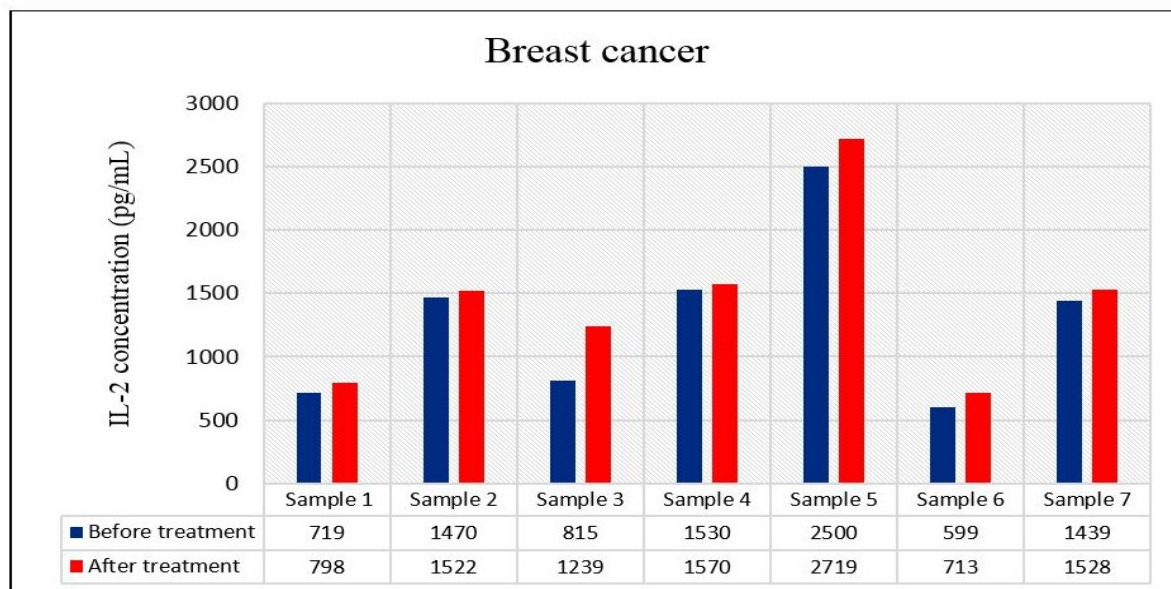


Figure 1. IL-2 production from PBMCs of breast cancer patients (n=7) before and after treatment with pyocyanine

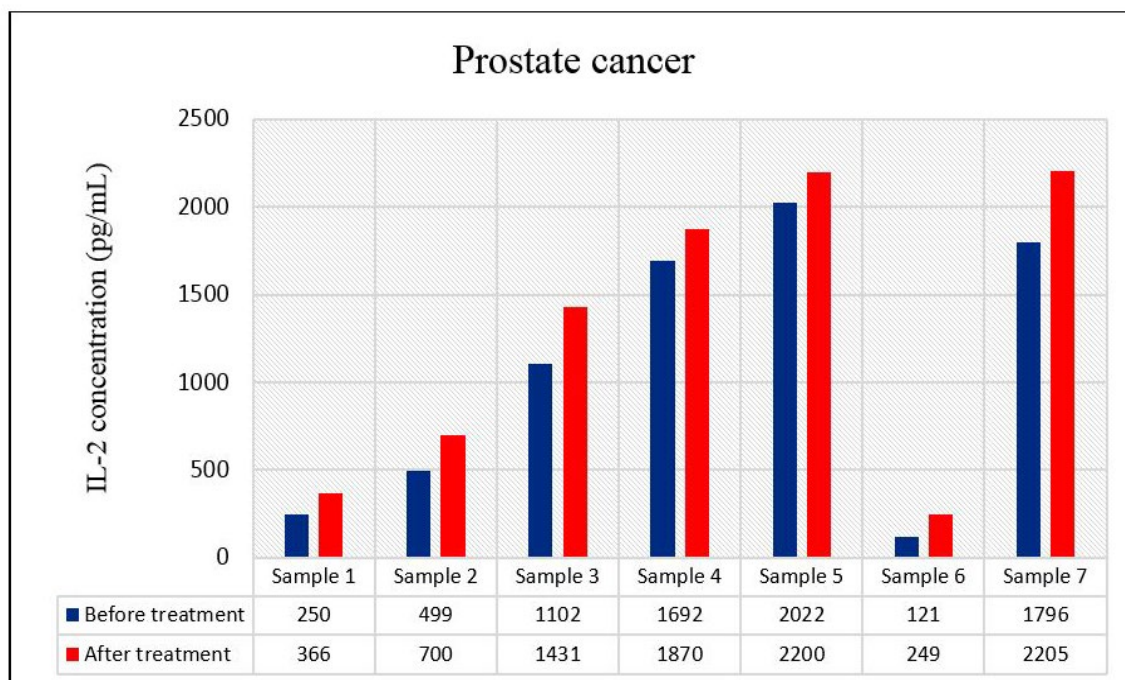


Figure 2. IL-2 production from PBMCs of prostate cancer patients (n=7) before and after treatment with pyocyanine



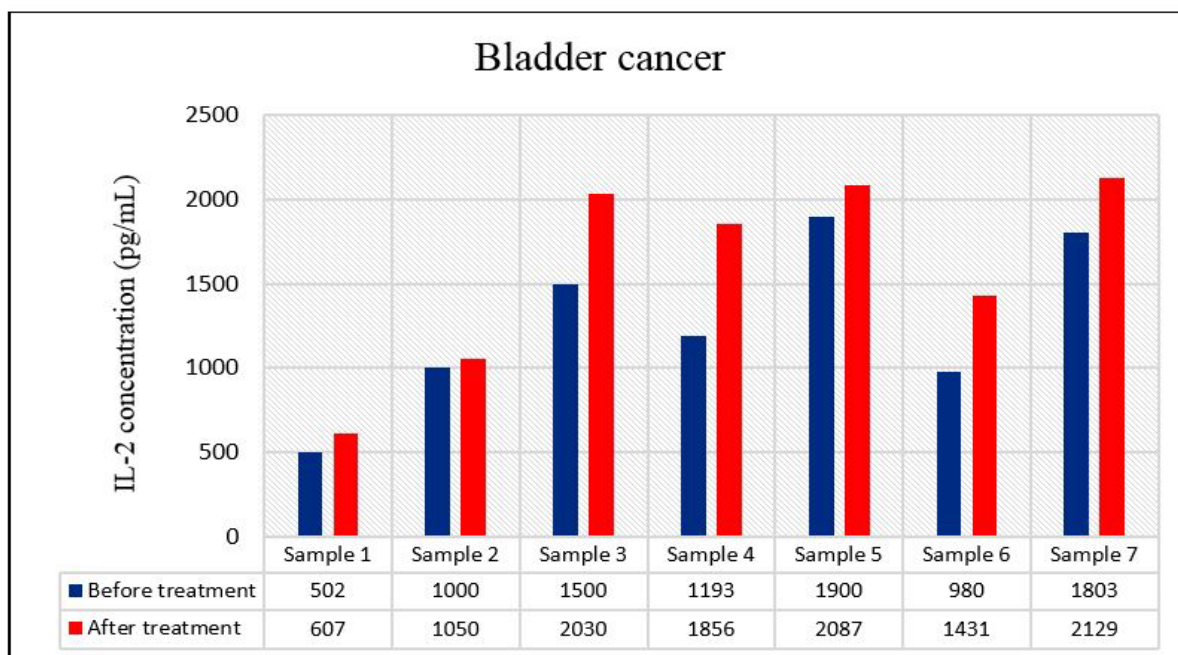


Figure 3. IL-2 production from PBMCs of bladder cancer patients (n=7) before and after treatment with pyocyanine

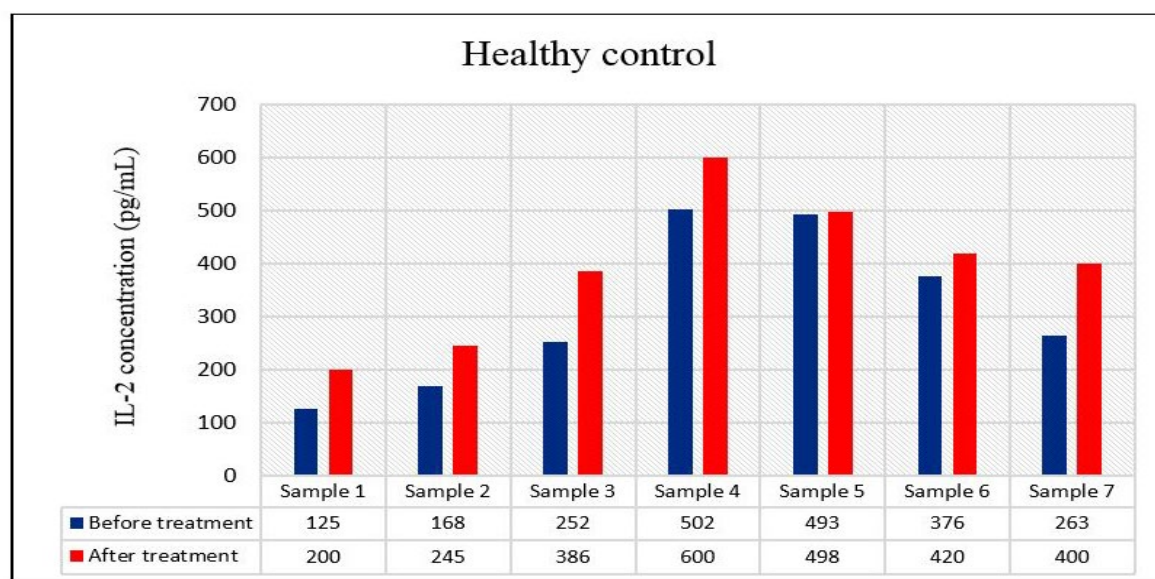


Figure 4. IL-2 production from PBMCs of healthy individuals (n=7) before and after treatment with pyocyanine

The secretion of IL-2 from PBMCs of breast cancer patients was significantly increased after treatment with pyocyanine in comparison with before treatment with this pigment with a mean of  $1440 \pm 252.2$  pg/mL vs  $1296 \pm 246.56$  pg/mL ( $P=0.032$ ) (Figure 5).

The secretion of IL-2 from PBMCs of prostate cancer patients was significantly higher in the treated cells with pyocyanine than that in untreated cells with this pigment with a mean of  $1288.71 \pm 320.93$  pg/mL vs  $1068.86 \pm 298.27$  pg/mL ( $P=0.002$ ) (Figure 5).

The IL-2 secretion level from PBMCs of bladder cancer patients was significantly increased after treatment with pyocyanine in comparison with before treatment with this pigment with a mean of  $1598.57 \pm 223.26$  pg/mL vs  $1268.29 \pm 188.54$  pg/mL ( $P=0.009$ ) (Figure 5).

The secretion of IL-2 from PBMCs of healthy control individuals was significantly higher in the treated cells with pyocyanine than that in untreated cells with this pigment with a mean of  $392.71 \pm 52.17$  pg/mL vs  $311.29 \pm 56.74$  pg/mL ( $P=0.004$ ) (Figure 5).

Therefore, in breast cancer, prostate cancer, bladder cancer, and healthy controls, the increase in IL-2 concentration after treatment with pyocyanine

was 11.1%, 20.5%, 26%, and 26.1%, respectively (Figure 5).

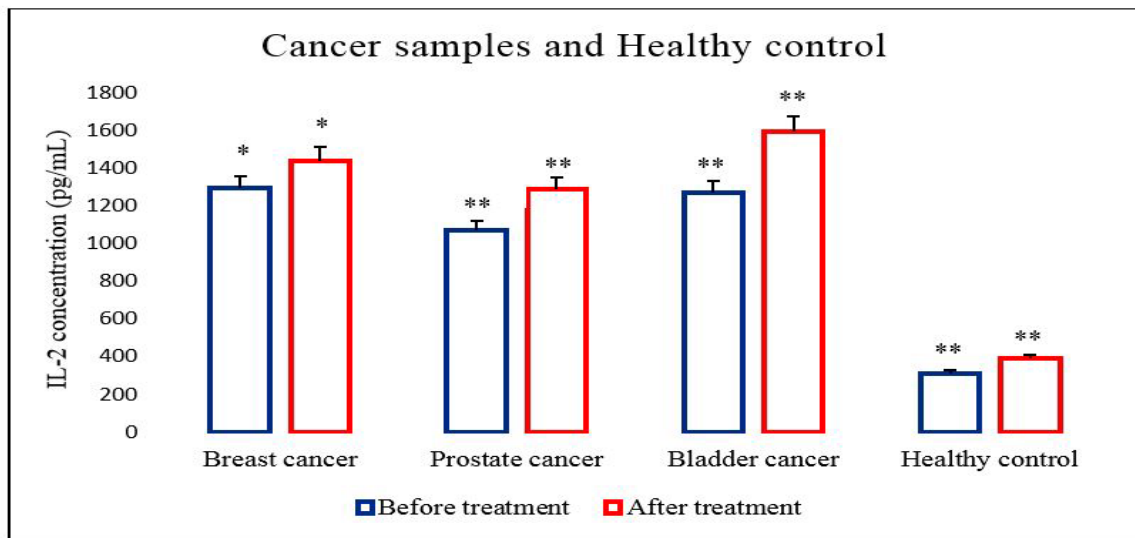


Figure 5. Comparison of IL-2 secretion from PBMCs of cancer samples and healthy control before and after treatment with pyocyanine.  $P < 0.05$  (\*) and  $P < 0.01$  (\*\*).

## Discussion

The bacterial pigments have immunostimulatory effects on the immune system by the release of cytokines in cancer patients (21). Despite the importance of the immune system in response to cancer treatment, there has been no report on how to stimulate the immune system with the pyocyanine pigment of *Pseudomonas aeruginosa*.

Based on the results of this study, a low concentration of pyocyanine stimulates the IL-2 secretion by PBMCs in cancer patients in vitro. Immuno-therapy using IL-2 is the most effective anti-cancer treatment (12). The mechanism of the action of pyocyanine on IL-2 production is still unclear. Pigment probably stimulates the patient's immune system (22). In 2011, research conducted by Rada and colleagues found that pyocyanine can induce the transcription of inflammatory cytokines and epidermal growth factor receptors, as well as IL-1, IL-6, IL-8 cytokines, and TNF $\alpha$  (alpha tumor necrosis factor) (22). Perhaps certain bacterial pigments (such as pyocyanine) activate signal transduction pathways through Toll-like receptors (TLR) in PBMC, thereby stimulating the secretion of cytokines including IL-2 (23). The immunostimulatory effect of pyocyanine depends on the concentration of pyocyanine tested (24).

In one study, the inhibitory and stimulating activity of pyocyanine on IL-2 secretion was tested (10). The results were different and the cellular response was related to the concentration of pyocyanine (10). Low

concentrations (0.1, 0.2, 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) of pyocyanine will increase the response of T lymphocytes (IL-2 production) and B lymphocytes (differentiation of immunoglobulin-producing cells), while high concentrations of this pigment (1  $\mu\text{g/mL}$ ) has an inhibitory effect (10). Similarly, in this study, it was observed that after treatment with a low concentration of pyocyanine (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) in vitro, the IL-2 secreted by the PBMC of breast cancer, prostate cancer and bladder cancer patients increased.

IL-2 is an activator of cytotoxic T cells (CTL) and natural killer cells (NK cells) (10). NK cells destroy the target cell by secreting their granules (enzymes and proteins) and designing apoptosis (25). NK cells are transformed into lymphokine-activated killer cells (LAK cells) under the action of IL-2 (25). LAK cells have higher apoptotic activity and can destroy different tumor cells (25).

In studies on the role of IL-2 in cancer treatment, similar studies have been conducted on the positive effects of IL-2 in the recovery and treatment of patients with kidney, breast, prostate, and bladder cancer (26-30). Metastatic melanoma and renal cell carcinoma treated with high-dose Interleukin-2 (30). In advanced melanoma, high-dose IL-2 injection is effective in 15% to 20% of patients (30). The patients with metastatic breast cancer were treated with IL-2 and this cytokine increased the number of NK cells and

cell lysis function in the body (29). Freytag and colleagues demonstrated the IL-2 gene therapy strategy for local and metastatic prostate cancer in 2007 (28). The result was a 50% reduction in tumors in patients after IL-2 treatment (28). Askeland and colleagues in 2012, showed the function of IL-2 in increasing the NK cells in patients with bladder cancer, and the systemic result of IL-2 in reducing the size of the tumor, tumor growth, and survival time of cancer patients (27). These results indicate that IL-2 has an important role in reducing inflammation in the tumor environment and can have a very positive effect during regular periods, which can indicate a reduction in tumor volume growth. It is recommended in future research, increase the size of the statistical community as much as possible.

### Conclusion

The results of this study indicate that treatment with pyocyanine pigment can increase the IL-2 concentration of PBMCs in patients with breast, prostate, bladder cancer, and healthy controls. Low concentrations of pyocyanine may activate the host's immune response. This pigment stimulates the secretion of IL-2 by activating the TLR signal transduction

pathway in PBMC and inducing the transcription of cytokines. With the unique properties of pyocyanine and the human desire for biology and low-risk treatments, we hope that it can broaden our understanding of immunobiology and recognize the immunostimulatory effects of various bacterial pigments on cancer patients. Although this study is the first step to identify the immunostimulatory effects of pigments in vitro, the anti-tumor effects of pyocyanine in experimental animals should be further studied. Also, more efforts are needed to determine the mode of action and the potential of using the pigment in the stimulation of PBMCs in cancer patients for the anti-cancer IL-2 secretion.

### Acknowledgment

This article is the result of a part of the master's thesis of microbiology from the Islamic Azad University, Kazerun Branch. The project was approved by the committee for ethics in biomedical research of Islamic Azad University, Kazerun Branch (IR.IAU.KAU.-REC.1399.031). The authors thank all those who helped them writing this article.

### Conflict of Interest

The authors declared no conflict of interests.





## ارزیابی اثر رنگدانه پیوسیانیل بر ترشح اینترلوکین ۲ از سلول‌های تک هسته خون محیطی در بیماران سرطانی در شرایط آزمایشگاهی

آناهیتا محسنی<sup>۱</sup>، افسون شریعت<sup>۱\*</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** رنگدانه پیوسیانیل در سودوموناس آئروژینوزا ترشح اینترلوکین ۲ از سلول‌های خونی را تحریک می‌کند. اینترلوکین ۲ با فعالیت سلول‌های T سیتوتوکسیک و کشنده طبیعی، سلول هدف در بیماران سرطانی را از بین می‌برد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر پیوسیانیل بر ترشح اینترلوکین ۲ از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) در بیماران مبتلا به سرطان‌های سینه، پروستات و مثانه است.

**مواد و روش کار:** در تحقیق توصیفی-مقطعی حاضر، ۳۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های مختلف بالینی (ادرار، خون، سوختگی و غیره) بیماران بستری در بیمارستان نمازی شیراز در بازه زمانی مهر ماه تا آذر ماه ۹۸ جمع‌آوری شد. پیوسیانیل توسط کلروفرم از جدایه‌ها استخراج گردید. همچنین ۲۸ نمونه خون محیطی از ۲۱ بیمار مبتلا به سرطان‌های سینه، پروستات و مثانه و ۷ فرد سالم جمع‌آوری شد. پس از جداسازی PBMC از بیماران و گروه کنترل به وسیله فیکول، نمونه‌ها برای کشت سلولی آماده شدند. نیمی از PBMCها با پیوسیانیل (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شده و مابقی سلول‌ها بدون تیمار باقی ماندند. میزان ترشح اینترلوکین ۲ از سلول‌های تیمار و غیرتیمار با پیوسیانیل با استفاده از الیزا بررسی گردید. آنالیز آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد.

**یافته‌ها:** پس از تیمار سلول‌ها با پیوسیانیل در شرایط آزمایشگاهی، افزایش معنی‌داری در میزان ترشح اینترلوکین ۲ از سلول‌های خون محیطی در بیماران مبتلا به سرطان‌های سینه ( $P=0/032$ )، پروستات ( $P=0/002$ ) و مثانه ( $P=0/009$ ) مشاهده گردید. نتیجه‌گیری: غلظت کم پیوسیانیل سبب تحریک ترشح اینترلوکین ۲ از PBMCs در بیماران سرطانی در شرایط آزمایشگاهی شده و انجام مطالعات بیشتر در مورد اثرات تحریک‌کنندگی ایمنی پیوسیانیل روی حیوانات آزمایشگاهی ضروری است.

**کلید واژه‌ها:** پیوسیانیل، اینترلوکین ۲، تحریک‌کننده ایمنی، سرطان

کپی‌رایت © مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله  
دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۰۷  
پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۲  
انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۴/۰۷  
موضوع: میکروبی شناسی مولکولی

### نویسنده مسئول:

افسون شریعت،  
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد  
کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران  
ایمیل:

[afsoons1980@yahoo.com](mailto:afsoons1980@yahoo.com)

### مقدمه

نیز شیوع بالایی داشته و در مردان ۲/۵-۲ برابر شایع‌تر است. البته با رواج مصرف سیگار و دخانیات در بین زنان نیز در حال شیوع است (۶). درمان‌های مرسوم مانند شیمی‌درمانی و اشعه‌درمانی به دلیل پیشرفت تومور، مقاومت به درمان و عدم اختصاصیت درمان برای تومور سبب کاهش بقای بیمار می‌گردند (۷). دانشمندان در تلاش هستند با استفاده از تکنولوژی، شیوه‌های جدیدی برای درمان سرطان معرفی کنند؛ در این راستا، کاربردهای متنوع باکتری‌ها بررسی شده است (۷). ترکیبات طبیعی مشتق شده از آنها از جمله رنگدانه‌های باکتریایی دارای فعالیت ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی بوده و مکانیسم‌های منحصر به فردی در درمان سرطان دارند (۷).

سرطان، بیماری پیچیده‌ای است که بر سلول اثر گذاشته و سرعت تکثیر و تمایز سلولی را مختل می‌کند (۱، ۲). در اکثر موارد بدلیل تشخیص دیر هنگام، تومورهای ثانویه تشکیل شده که به‌طور معمول عامل مرگ و میر بالای ناشی از سرطان هستند (۱). در خاورمیانه، سرطان سینه ۳۲٪ از موارد سرطان‌های زنان و اولین علت مرگ زنان ۴۵-۴۰ سال را تشکیل می‌دهد (۱، ۳). در مقابل، سرطان پروستات شایع‌ترین سرطان بدخیم در مردان بوده و به‌طور کلی از هر ۶ مرد ۱ نفر در طول زندگی خود به این سرطان مبتلا خواهد شد (۴). بنابراین، سرطان‌های سینه و پروستات به ترتیب شایع‌ترین علل مرگ و میر در زنان و مردان ایرانی هستند (۵). سرطان مثانه

(۱۴). جدایه‌ها به‌طور تصادفی جهت تعیین میزان تولید پیوسیانین مورد ارزیابی قرار گرفتند. سویه‌ها در محیط کشت مایع تریپتیک سوی برات (Quelab, Canada) حاوی گلیسرول تلقیح شده و سپس در دمای ۷۰- درجه سلیسیوس ذخیره گردیدند (۱۵).

### استخراج پیوسیانین از ایزوله‌های سودوموناس

#### آئروژینوزا

تمام جدایه‌های باکتریایی روی محیط کشت سودوموناس آگار (Quelab, Canada) کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس انکوبه گردیدند. سویه‌های تولیدکننده پیوسیانین، رنگدانه آبی مایل به سبز تشکیل دادند. در مرحله بعد، کلروفرم (Merck, Germany) (نسبت ۱:۲) روی محیط کشت ریخته شد و توسط شیکر (Labinco, Netherlands) به مدت یک دقیقه به خوبی تکان داده شد. سپس توسط سانتریفیوژ (Hettich, Germany) با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه دو فاز آلی و آبی تشکیل گردید. مایع رویی جداسازی شده و پیوسیانین استخراج گردید. برای تأیید صحت پیوسیانین، با افزودن یک میلی‌لیتر اسید کلریدریک (۰/۱ مولار، Merck, Germany) به آن رنگ قرمز مشاهده شد. نهایتاً پیگمان استخراج شده با افزودن مکرر حلال کلروفرم خالص‌سازی گردید (۱۶).

سپس پیوسیانین استخراج شده درون یک شیشه ساعت (Schott, Germany) ریخته شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در زیر هود (BioBase, Iran) نگهداری گردید تا به‌طور کامل کلروفرم خارج شود. سرانجام، رنگدانه خشک شده را توسط یک لانتست استریل- (Azmaplast, Iran) جدا کرده و به‌صورت پودر جهت مراحل بعدی در یخچال نگهداری گردید. غلظت رنگدانه بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر با اندازه‌گیری چگالی نوری در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico, USA) تعیین شد (۱۶، ۱۷).

### بیماران و جمعیت مورد مطالعه

به دلیل افزایش شیوع سرطان‌های سینه، پروستات و مثانه، و اهمیت درمان این بیماری‌ها، نمونه‌های تحقیق از میان مبتلایان به این بیماری‌ها انتخاب شدند. تعداد ۲۱ بیمار مبتلا به سرطان‌های سینه (۷ نفر)، پروستات (۷ نفر) و مثانه (۷ نفر) بستری در بخش سرطان بیمارستان نمازی شیراز، در بازه زمانی مرداد ماه تا آذر ماه ۹۸ در این مطالعه وارد شدند. دلیل انتخاب ۷ نمونه از هر گروه این بود که این تعداد از نظر آماری قابل قبول بود. همچنین، ۷ داوطلب سالم که سابقه سرطان نداشتند نیز به‌عنوان گروه کنترل انتخاب گردیدند. محدوده سنی (۴۶-۶۵ سال) و نسبت مرد به زن، در گروه‌های بیماران و کنترل

مهمترین ویژگی باکتری سودوموناس آئروژینوزا تولید رنگدانه سبز آبی پیوسیانین است (۸). این رنگدانه دارای اثرات تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی در بیماران سرطانی بوده و با آپوپتوز مرتبط است و قابلیت مهمی در مهار تکثیر سلولی دارد، به‌طوری‌که در نتیجه عملکرد آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز، مقادیر زیادی از گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species, ROS) را تولید می‌کند (۷). این امر سبب سمیت سلولی پیوسیانین در سلول‌های سرطانی شده و این مکانیسم‌ها منجر به استراتژی‌های درمانی بهتر در درمان سرطان می‌گردند (۹). همچنین رنگدانه پیوسیانین دارای فعالیت‌های تحریکی بر روی ترشح سیتوکین اینترلوکین ۲ بوده به‌طوری‌که غلظت کم این رنگدانه باکتریایی باعث تشدید پاسخ لنفوسیت‌های T (تولید اینترلوکین ۲) و لنفوسیت‌های B (تمایز به سلول‌های تولیدکننده ایمونوگلوبولین) می‌شود، درحالی‌که غلظت بالای پیوسیانین دارای اثرات بازدارنده است (۱۰). اینترلوکین ۲ یک سیتوکین پیش التهابی است که توسط سلول‌های T ساخته شده و در تحریک پاسخ‌های ایمنی مشارکت دارد (۱۱). نهایتاً، از آنجا که پیوسیانین دارای اثرات تحریک‌کنندگی ایمنی بوده و با توجه به اینکه این رنگدانه سبب القای رونویسی از سیتوکین‌های التهابی و تحریک ترشح اینترلوکین ۲ از سلول‌های تک‌هسته خون محیطی می‌گردد، به‌کارگیری سیستم ایمنی در درمان سرطان رویکردی حیاتی بوده و امید است با پیشرفت مطالعاتی در این زمینه بعد جدیدی به درمان سرطان اضافه شود (۱۲، ۱۳). هدف از این تحقیق، ارزیابی ایزوله‌های مختلف بالینی سودوموناس آئروژینوزا برای تولید پیوسیانین و اثرات تحریک‌کنندگی ایمنی این رنگدانه بر میزان ترشح سیتوکین اینترلوکین ۲ از سلول‌های خون محیطی در بیماران مبتلا به سرطان‌های سینه، پروستات، مثانه و گروه کنترل سالم در شرایط آزمایشگاهی است.

### مواد و روش‌ها

#### جداسازی و شناسایی سودوموناس آئروژینوزا از

#### نمونه‌های بالینی

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، پس از تأیید در کمیته اخلاق پژوهش زیست پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون با کد: IR.IAU.KAU.REC.1399.031، ۳۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های مختلف بالینی از قبیل: ادرار، خون، سوختگی، خلط و عفونت زخم بیماران بستری در بیمارستان نمازی شیراز در بازه زمانی مهر ماه تا آذر ماه ۹۸ جمع‌آوری گردید. سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و خصوصیات بیوشیمیایی شناسایی شدند

تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) به آزمایشگاه فرستاده شدند. مشخصات بیماران مبتلا به سرطان‌های سینه، پروستات و مثانه در جدول ۱ نشان داده شده است.

سالم مشابه بودند. ۵ میلی‌لیتر خون تازه از بیماران مبتلا به سرطان و افراد سالم از طریق وریدی گرفته شد و در لوله‌های استریل حاوی EDTA جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها برای جداسازی سلول‌های

جدول ۱. مشخصات دموگرافیک و تاریخچه‌ی پزشکی نمونه‌های سرطانی سینه، پروستات و مثانه

ایزوله	جنسیت	سن	سابقه خانوادگی	مرحله بیماری	متاستاز
<b>بیماران سرطان سینه (۷ نفر)</b>					
۱	زن	۵۹	خیر	III	بله
۲	زن	۵۳	خیر	II	نامعلوم
۳	زن	۴۶	بله	I	خیر
۴	زن	۵۵	خیر	II	نامعلوم
۵	زن	۶۳	بله	II	نامعلوم
۶	زن	۵۷	خیر	II	نامعلوم
۷	زن	۵۰	خیر	II	نامعلوم
<b>بیماران سرطان پروستات (۷ نفر)</b>					
۱	مرد	۷۲	بله	III	نامعلوم
۲	مرد	۵۹	بله	II	خیر
۳	مرد	۵۶	بله	II	خیر
۴	مرد	۶۲	خیر	II	خیر
۵	مرد	۷۰	خیر	III	نامعلوم
۶	مرد	۵۷	بله	I	خیر
۷	مرد	۶۵	خیر	I	خیر
<b>بیماران سرطان مثانه (۷ نفر)</b>					
۱	مرد	۴۹	خیر	I	خیر
۲	مرد	۵۸	خیر	I	خیر
۳	زن	۶۰	خیر	II	خیر
۴	مرد	۳۹	بله	I	خیر
۵	مرد	۴۴	بله	I	خیر
۶	مرد	۵۰	خیر	I	خیر
۷	زن	۴۵	بله	I	خیر

انجام شد. سپس سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی توسط یک پیپت سرولوژیکی جمع‌آوری و به یک لوله ۵۰ میلی‌لیتری استریل منتقل شدند. مجدداً سلول‌ها با افزودن PBS شسته شده و در دور ۳۳۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند (۱۹).

#### کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران سرطانی و گروه کنترل سالم

۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی جدا شده از گروه‌های بیماران و کنترل به فلاسک ۲۵ cm<sup>2</sup> (Jetbiofil, Canada) حاوی محیط RPMI 1640 (Biosera, France) و ۲۰٪ سرم جنین گاوی

#### جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی از بیماران سرطانی و گروه کنترل سالم

جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی از بیماران سرطانی و نمونه کنترل سالم با استفاده از روش شیب گرادیان فیکول صورت گرفت (۱۸). بدین ترتیب که هر یک از نمونه‌های خون به لوله ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شدند و به نسبت ۱:۱ با بافر فسفات- (Phosphate-buffered saline, PBS) (Merck, Germany) رقیق گردیدند. نمونه‌های خون رقیق شده به آرامی به فیکول (Inno-Train, Germany) اضافه شدند. در مرحله بعد سانتریفیوژ (Hettich, Germany) با دور ۴۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰ درجه سلسیوس

قرار گرفتند و مابقی سلول‌ها بدون تیمار باقی ماندند. سپس سوپرناتانت‌ها برداشته شده و غلظت اینترلوکین ۲ توسط روش الیزا با استفاده از کیت تجاری IL-2 انسانی (Thermo Fisher ELISA Scientific, Australia) طبق دستورالعمل تعیین گردید.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

ترشح اینترلوکین ۲ از سلول‌های تیمار و غیرتیمار با پیوسیانین با استفاده از آزمون T تست زوجی مقایسه شد. همچنین، تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام گرفت. همه نتایج به صورت  $\text{mean} \pm \text{standard error}$  (SE) بیان شدند. مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### انتخاب ایزوله تولید کننده پیوسیانین با بالاترین غلظت

ایزوله ۱۱ (از منبع زخم) بالاترین تولید کننده پیوسیانین در بین ایزوله‌های بالینی بود که از همان نمونه برای آزمایش استفاده شد. جدول ۲ میزان غلظت‌های پیوسیانین تولید شده توسط ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا را نشان می‌دهد.

(Biosera, France) (Fetal bovine serum, FBS) منتقل شد. فلاسک‌ها در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار (Lab Tech, South Korea) و دمای ۳۷ درجه سلیسیوس و رطوبت ۹۸٪ قرار داده شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض گردید و سلول‌ها پاساژ داده شدند (۲۰). برای برداشت سلول‌های متصل به کف فلاسک، محیط کشت به طور کامل و به آرامی با PBS شسته شد. سپس آنزیم تریپسین (Merck, Germany) به فلاسک اضافه کرده و به مدت ۵-۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سلیسیوس قرار گرفت. سلول‌های جدا شده از کف فلاسک به یک لوله استریل ۱۵ میلی لیتری منتقل شدند. لوله حاوی سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع فوقانی روی سلول‌ها تخلیه و محیط جدید اضافه شد. پس از پیتاژ، سوسپانسیون سلولی به چند فلاسک جدید بر حسب تراکم سلولی تقسیم گشت. ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلول با ۲۰ میکرولیتر تریپان بلو (USA, Sigma) مخلوط شد و سلول‌های زنده (سلول‌هایی که رنگ به داخل آنها نفوذ نکرده بود) توسط هموسیتومتر (HBG, Germany) شمارش گردید (۲۰).

#### اثر پیوسیانین بر ترشح IL-2 از سلول‌های تک‌هسته‌ای

##### خون محیطی در بیماران سرطانی و گروه کنترل

نیمی از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران سرطانی و گروه کنترل سالم با پیوسیانین (۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) تحت تیمار

جدول ۲. غلظت‌های پیگمان پیوسیانین توسط ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا

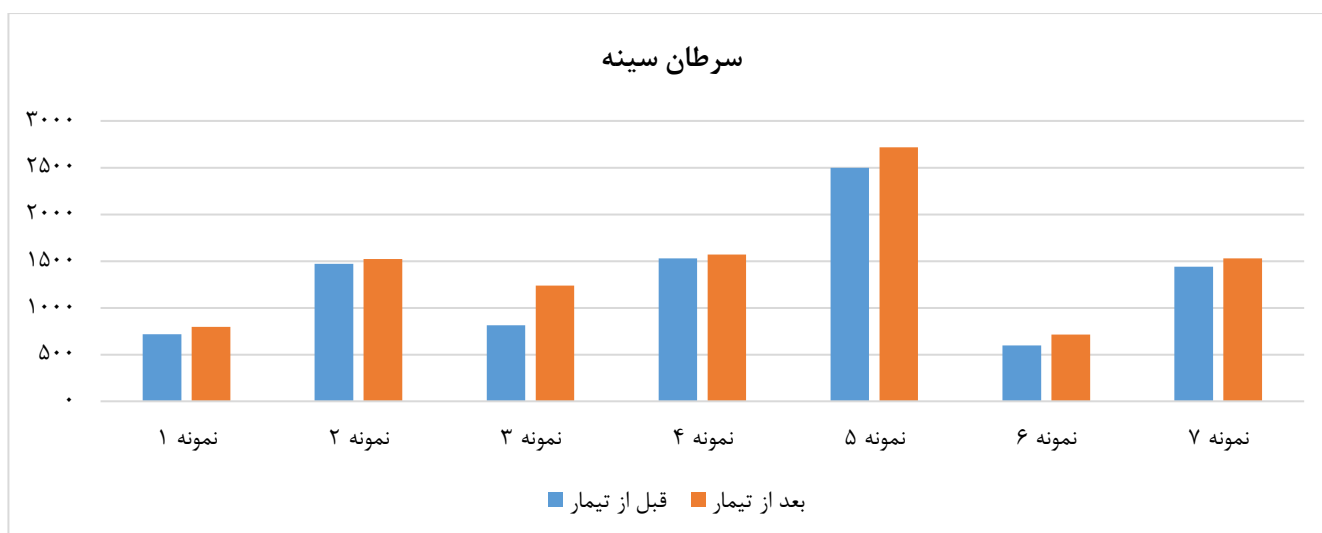
ایزوله	منبع	جنسیت	سن	بخش	جذب نوری	غلظت پیوسیانین (µg/mL)
۱	ادرار	زن	۳۵	داخلی	۰/۲۰	۳/۴۱
۲	ادرار	مرد	۶۲	عفونی	۰/۱۹	۳/۲۴
۳	زخم	مرد	۵۱	جراحی	۰/۰۸	۱/۳۶
۴	خون	زن	۷۲	ICU	۰/۴۲	۷/۱۷
۵	ادرار	مرد	۵۶	عفونی	۰/۱۰	۱/۷۰
۶	سوختگی	زن	۴۴	سوختگی	۰/۱۷	۲/۹۰
۷	سوختگی	زن	۲۴	سوختگی	۰/۲۱	۳/۵۸
۸	خون	زن	۵۶	ICU	۰/۲۷	۴/۶۰
۹	خون	مرد	۳۸	جراحی	۰/۳۴	۵/۸۰
۱۰	خون	زن	۳۲	داخلی	۰/۱۹	۳/۲۴
۱۱	زخم	مرد	۷۵	جراحی	۰/۵۸	۹/۹۰
۱۲	ادرار	زن	۳۹	ICU	۰/۰۶	۱/۰۲
۱۳	ادرار	زن	۵۸	داخلی	۰/۲۰	۳/۴۱
۱۴	خون	مرد	۳۸	داخلی	۰/۴۶	۷/۸۵
۱۵	سوختگی	مرد	۴۷	سوختگی	۰/۵۵	۹/۳۸

ایزوله	منبع	جنسیت	سن	بخش	جذب نوری	غلظت پیوسیانین (µg/mL)
۱۶	ادرار	زن	۶۳	عفونی	۰/۳۰	۵/۱۲
۱۷	خلط	زن	۲۸	عفونی	۰/۰۷	۱/۱۹
۱۸	زخم	مرد	۴۷	عفونی	۰/۰۹	۱/۵۳
۱۹	خون	زن	۳۰	عفونی	۰/۳۳	۵/۶۳
۲۰	ادرار	مرد	۴۶	عفونی	۰/۴۰	۶/۸۲
۲۱	ادرار	مرد	۳۲	عفونی	۰/۰۷	۱/۱۹
۲۲	خون	زن	۲۳	عفونی	۰/۴۵	۷/۶۸
۲۳	خون	مرد	۷۰	ICU	۰/۱۷	۲/۹۰
۲۴	ادرار	زن	۵۲	عفونی	۰/۰۸	۱/۳۶
۲۵	خلط	زن	۴۵	عفونی	۰/۰۹	۱/۵۳
۲۶	سوختگی	مرد	۵۲	سوختگی	۰/۴۶	۷/۸۵
۲۷	ادرار	زن	۲۷	عفونی	۰/۳۹	۶/۶۵
۲۸	خلط	مرد	۳۶	عفونی	۰/۳۳	۵/۶۳
۲۹	خون	زن	۲۹	عفونی	۰/۱۳	۲/۲۱
۳۰	ادرار	مرد	۳۶	داخلی	۰/۴۵	۷/۶۸

نمونه‌های کنترل سالم (۷ نفر) قبل و بعد از تیمار با رنگدانه پیوسیانین مقایسه شد (شکل ۴-۱). در تمام گروه‌ها، سطح ترشح اینترلوکین ۲ از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، پس از تیمار با پیوسیانین در مقایسه با مرحله قبل از تیمار با این رنگدانه افزایش یافته بود.

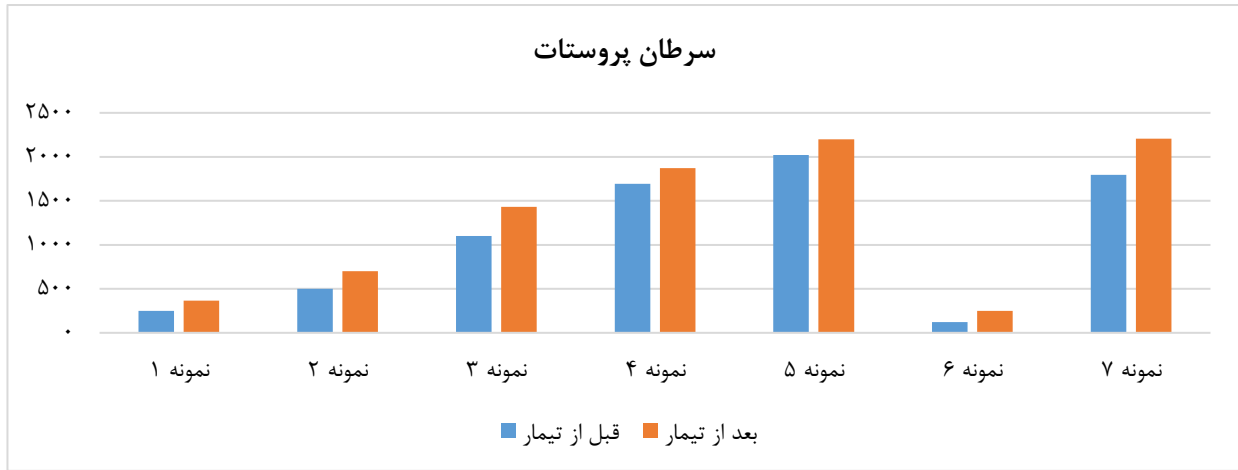
### مقایسه ترشح اینترلوکین ۲ از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در گروه‌های بیمار و کنترل، قبل و بعد از تیمار با پیوسیانین

با روش الیزا، میزان ترشح اینترلوکین ۲ از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در بیماران مبتلا به سرطان (۲۱ نفر) و

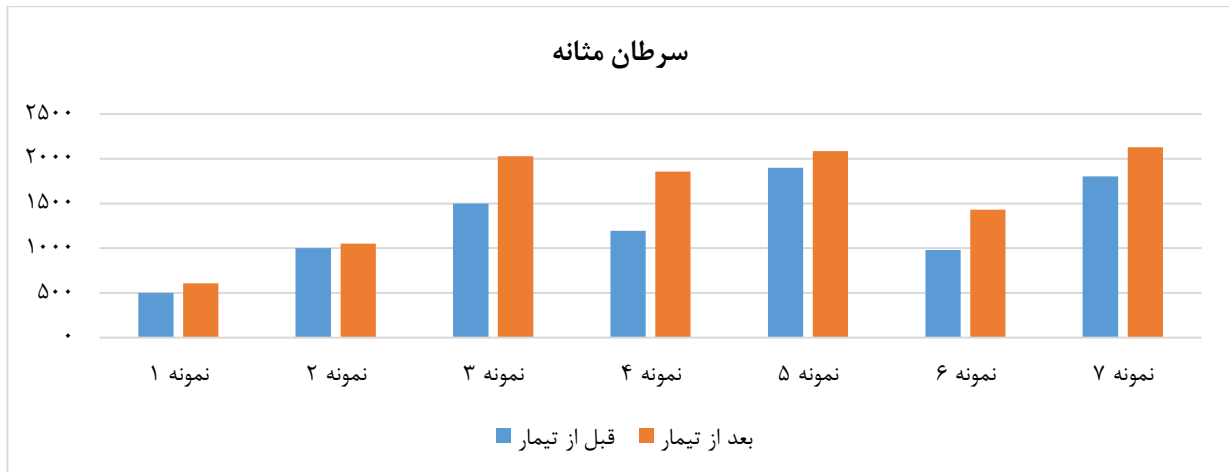


شکل ۱. میزان غلظت اینترلوکین ۲، قبل و بعد از تیمار با پیگمان پیوسیانین در نمونه‌های سرطان سینه

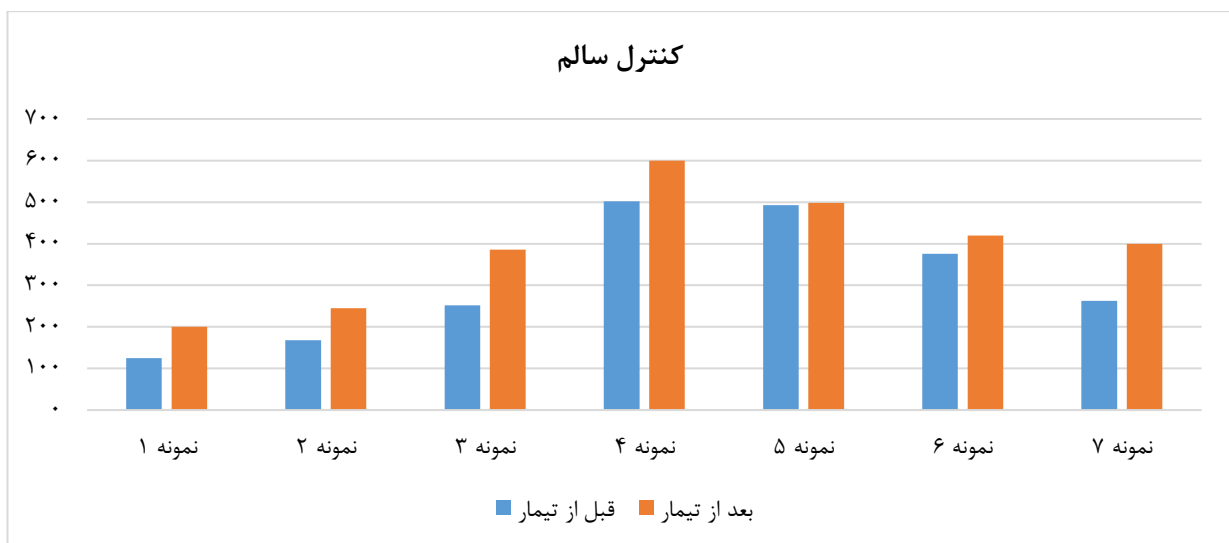




شکل ۲. میزان غلظت اینترلوکین ۲، قبل و بعد از تیمار با پیگمان پیوسیانین در نمونه‌های سرطان پروستات



شکل ۳. میزان غلظت اینترلوکین ۲، قبل و بعد از تیمار با پیگمان پیوسیانین در نمونه‌های سرطان مثانه



شکل ۴. میزان غلظت اینترلوکین ۲، قبل و بعد از تیمار با پیگمان پیوسیانین در نمونه‌های کنترل سالم

با قبل از تیمار با این رنگدانه با میانگین  $1268/29 \pm 188/54$  pg/mL افزایش یافت ( $P=0/009$ ) (شکل ۵).

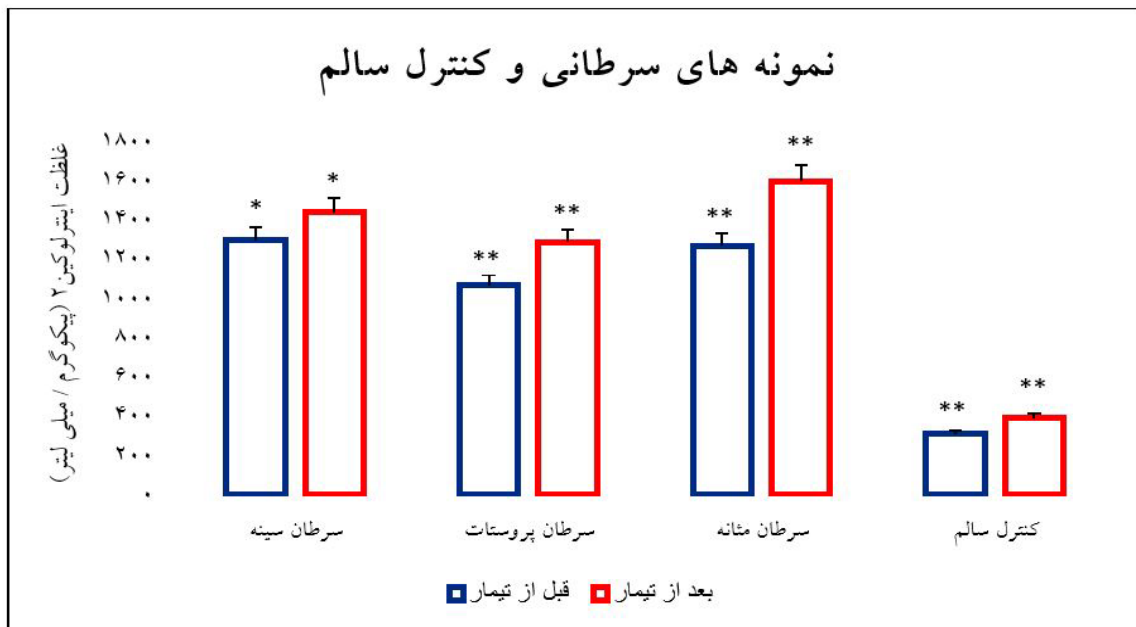
ترشح IL-2 از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی افراد کنترل سالم در سلول‌های تحت تیمار با پیوسیانین به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های تیمار نشده با این رنگدانه با میانگین  $392/71 \pm 52/17$  pg/mL در مقابل  $311/29 \pm 56/74$  pg/mL بود ( $P=0/004$ ) (شکل ۵).

بنابراین، افزایش غلظت IL-2 پس از تیمار با پیوسیانین در نمونه‌های سرطان سینه، پروستات، مثانه و کنترل سالم به ترتیب  $11/1\%$ ،  $20/5\%$ ،  $26\%$  و  $26/1\%$  بود (شکل ۵).

ترشح IL-2 از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در بیماران مبتلا به سرطان سینه پس از تیمار با پیوسیانین در مقایسه با قبل از تیمار با این رنگدانه با میانگین  $1440 \pm 2252$  pg/mL در مقابل  $1296 \pm 246/56$  pg/mL افزایش یافته بود ( $P=0/032$ ) (شکل ۵).

ترشح IL-2 از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پروستات در سلول‌های تحت تیمار با پیوسیانین به‌طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های غیر تیمار با این رنگدانه با میانگین  $1288/71 \pm 320/93$  pg/mL در مقابل  $1068/86 \pm 298/27$  pg/mL بود ( $P=0/002$ ) (شکل ۵).

سطح ترشح IL-2 از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در بیماران مبتلا به سرطان مثانه پس از تیمار با پیوسیانین در مقایسه



شکل ۵. مقایسه ترشح اینترلوکین ۲ از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در نمونه‌های سرطانی و کنترل سالم قبل و بعد از تیمار با پیوسیانین. (\*\*\*)  $P < 0/001$  و (\*\*\*)  $P < 0/005$

## بحث

براساس نتایج این مطالعه، غلظت کم پیوسیانین سبب تحریک ترشح اینترلوکین ۲ از سلول‌های تک‌هسته خون محیطی در بیماران سرطانی در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. ایمونوتراپی با استفاده از اینترلوکین ۲ مؤثرترین درمان علیه سرطان است (۱۲). مکانیسم تأثیر پیوسیانین بر تولید اینترلوکین ۲ ناشناخته است. این احتمال وجود دارد که این رنگدانه، سیستم ایمنی میزبان را

رنگدانه‌های باکتریایی با آزادسازی سیتوکین‌ها در بیماران سرطانی بر روی سیستم ایمنی بدن اثرات تحریک‌کنندگی ایمنی دارند (۲۱). با وجود اهمیت زیاد سیستم ایمنی در پاسخ به درمان سرطان، تاکنون گزارشی درباره چگونگی تحریک سیستم ایمنی با پیگمان پیوسیانین سودوموناس آئروژینوزا ثبت نشده است.

درمان شده‌اند (۳۰). تزریق دوز بالای اینترلوکین ۲ در ۲۰-۱۵٪ بیماران مبتلا به ملانوما پیشرفته مؤثر بود (۳۰). در پژوهش دیگری، بیماران مبتلا به سرطان سینه با اینترلوکین ۲ تحت درمان قرار گرفتند و این سیتوکین باعث افزایش تعداد سلول‌های NK و عملکرد لیز سلولی در بدن گردید (۲۹). طی تحقیقی Freytag و همکاران در سال ۲۰۰۷، استراتژی‌های ژن درمانی اینترلوکین ۲ را برای درمان موضعی و متاستاتیک سرطان پروستات بکار بردند و نشان دادند که منجر به کاهش ۵۰ درصدی تومورها در بیماران پس از درمان با اینترلوکین ۲ گردید (۲۸). در تحقیقی Askeland و همکاران در سال ۲۰۱۲، نقش اینترلوکین ۲ در ازدیاد سلول‌های کشنده طبیعی در بیماران مبتلا به سرطان مثانه و نتیجه سیستمیک اینترلوکین ۲ در کاهش اندازه‌ی تومور، رشد تومور و طول مدت زنده ماندن بیماران سرطانی را بررسی نمودند (۲۷). این نتایج نشان می‌دهد که اینترلوکین ۲ در کاهش التهاب در محیط تومور نقش بسزایی داشته و در یک دوره منظم می‌تواند تأثیرات بسیار مثبتی از جمله کاهش روند رشد حجم تومور به همراه داشته باشد. در تحقیقات آینده توصیه می‌شود تا حد امکان اندازه جامعه آماری افزایش یابد.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد رنگدانه پیوسیانین سبب افزایش ترشح غلظت اینترلوکین ۲ توسط سلول‌های تک هسته خون محیطی در بیماران مبتلا به سرطان سینه، پروستات، مثانه و افراد سالم در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد. احتمالاً غلظت کم پیوسیانین می‌تواند پاسخ ایمنی میزبان را فعال کند. بنظر می‌رسد این رنگدانه از طریق فعالیت مسیر سیگنال‌دهی گیرنده‌های شبه تول در سلول‌های تک هسته خون محیطی و القاء رونویسی از سیتوکین، ترشح اینترلوکین ۲ را تحریک می‌نماید. امید است با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد پیوسیانین و تمایل انسان به درمان‌های بیولوژیک و کم خطر، دانش ایمونوبیولوژی در زمینه اثرات تحریک کنندگی ایمنی رنگدانه‌های مختلف باکتریایی جهت درمان بیماران سرطانی افزایش یابد. گرچه این تحقیق اولین گام در شناسایی اثرات تحریک کنندگی ایمنی رنگدانه در شرایط آزمایشگاهی است و باید مطالعات بیشتری در مورد اثرات ضدتوموری پیوسیانین در حیوانات آزمایشگاهی صورت گیرد. همچنین، تلاش‌های زیادی به منظور تشخیص مکانیسم عملکرد این پیگمان در تحریک سلول‌های تک‌هسته خون محیطی در

تحریک کند (۲۲). در مطالعه Rada و همکاران در سال ۲۰۱۱ مشخص شد که پیوسیانین رونویسی از سیتوکین‌های التهابی و گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمال را القا نموده بطوریکه ترشح سیتوکین‌های اینترلوکین ۱، اینترلوکین ۶، اینترلوکین ۸ و فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا به شدت توسط پیوسیانین افزایش می‌یابد (۲۲). احتمالاً برخی پیگمان‌های باکتریایی از جمله پیوسیانین از طریق فعال کردن مسیر سیگنال‌دهی گیرنده‌های شبه تول (Toll like receptors, TLRs) در سلول‌های تک هسته خون محیطی سبب تحریک ترشح سیتوکین‌ها از جمله اینترلوکین ۲ می‌گردند (۲۳). اثرات تحریک‌کنندگی ایمنی پیوسیانین، وابسته به غلظت رنگدانه مورد آزمایش است (۲۴).

طی پژوهشی فعالیت مہاری و تحریک کنندگی پیوسیانین بر روی ترشح اینترلوکین ۲ بررسی گردید و نتایج متفاوتی بدست آمد. بطوریکه پاسخ سلولی میزبان، مرتبط با غلظت پیوسیانین به کار رفته بود (۱۰). پیوسیانین با غلظت کم (۰/۵، ۰/۲، ۰/۱)  $\mu\text{g/mL}$  پاسخ‌های لنفوسیت‌های T (تولید اینترلوکین ۲) و لنفوسیت‌های B (تمایز به سلول‌های تولید کننده ایمونوگلوبولین) را تشدید نمود، در حالی که غلظت‌های بالای این رنگدانه (۱  $\mu\text{g/mL}$ ) دارای اثرات مہاری بود (۱۰). به طور مشابهی، در تحقیق حاضر پس از تیمار سلول‌های PBMC با غلظت کم پیوسیانین (۰/۵  $\mu\text{g/mL}$ ) در بیماران مبتلا به سرطان‌های سینه، پروستات و مثانه، افزایش غلظت اینترلوکین ۲ توسط این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی مشاهده گردید.

اینترلوکین ۲ فعال کننده سلول‌های T سیتوتوکسیک (CTL) و سلول‌های کشنده طبیعی (NK cells) است (۱۰). سلول‌های NK سلول‌های هدف را با ترشح گرانول‌های آنها (آنزیم‌ها و پروتئین‌ها) و طراحی آپوپتوز نابود می‌کنند (۲۵). سلول‌های NK تحت تأثیر اینترلوکین ۲ به سلول‌های کشنده فعال لنفوکین (lymphokine-activating killer cells, LAK cells) تبدیل می‌شوند (۲۵). فعالیت سیتولیتیک سلول‌های LAK علیه تومورها بیشتر بوده و سلول‌های توموری مختلفی را از بین می‌برد (۲۵).

در مطالعات مرتبط با نقش اینترلوکین ۲ در درمان سرطان، تحقیقات مشابهی در زمینه اثرات مثبت اینترلوکین ۲ در درمان بیماران مبتلا به سرطان‌های کلیه، سینه، پروستات و مثانه انجام شده است (۲۶-۳۰). به طوری که طبق تحقیقات صورت گرفته، سرطان کلیه و ملانوم متاستاز پیشرفته با دوز بالای اینترلوکین ۲

## تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچگونه تضاد منافی نداشته‌اند.

## منابع مالی

ندارد.

بیماران سرطانی جهت ترشح سایتوکین ضدسرطانی اینترلوکین ۲ مورد نیاز است.

## سپاسگزاری

این پژوهش برگرفته از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون است. از تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند قدردانی می‌گردد.

## Referance

1. Knox SS. From omics to complex disease: a systems biology approach to gene-environment interactions in cancer. *Cancer Cell Int.* 2010;10:11. [DOI:10.1186/1475-2867-10-11] [PMID] [PMCID]
2. Noori Dalooi MR, Sadr Z. Cancer immunotherapy: Use the immune system to fight cancer. *J Sabzevar Uni Med Sci.* 2020;26(1):1-11.
3. Marrazzo E, Frusone F, Milana F, Sagona A, Gatzemeier W, Barbieri E, et al. Mucinous breast cancer: A narrative review of the literature and a retrospective tertiary single cancer analysis. *Breast.* 2020;49:87-92. [DOI:10.1016/j.breast.2019.11.002] [DOI:10.1016/j.breast.2019.11.002] [PMID] [PMCID]
4. Pakzad R, Rafiemanesh H, Ghoncheh M, Sarmad A, Salehiniya H, Hosseini S, et al. Prostate cancer in Iran: trends in incidence and morphological and epidemiological characteristics. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(2):839-43. [DOI:10.7314/APJCP.2016.17.2.839] [PMID]
5. Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and mortality of various cancers in Iran and compare to other countries: a review article. *Iran J Public Health.* 2018;47(3):309-16.
6. Rezaianzadeh A, Mohammadbeigi A, Moballeggi J, Mohammadsalehi N. Survival analysis of patients with bladder cancer, life table approach. *J Midlife Health.* 2012;3(2):88-92. [DOI:10.4103/0976-7800.104468] [DOI:10.4103/0976-7800.104468] [PMID] [PMCID]
7. Song S, Vuai MS, Zhong M. The role of bacteria in cancer therapy - enemies in the past, but allies at present. *Infect Agent Cancer.* 2018;13:9. [DOI:10.1186/s13027-018-0180-y] [PMID] [PMCID]
8. El-Fouly MZ, Sharaf AM, Shahin AAM, El-Bialy HA, Omara AMA. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Radiat Res Appl Sci.* 2015;8(1):36-48. [DOI:10.1016/j.jrras.2014.10.007]
9. Zhao J, Wu Y, Alfred AT, Wei P, Yang S. Anticancer effects of pyocyanin on HepG2 human hepatoma cells. *Lett Appl Microbiol.* 2014;58(6):541-8. [DOI:10.1111/lam.12224] [PMID]
10. Ulmer AJ, Pryjma J, Tarnok Z, Ernst M, Flad HD. Inhibitory and stimulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human T and B lymphocytes and human monocytes. *Infect Immun.* 1990;58(3):808-15. [DOI:10.1128/iai.58.3.808-815.1990] [PMID] [PMCID]
11. Lissoni P. Therapy implications of the role of Interleukin-2 in cancer. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017;13(5):491-8. [DOI:10.1080/1744666X.2017.1245146] [PMID]
12. Choudhry H, Helmi N, Abdulaal WH, Zeyadi M, Zamzami MA, Wu W, et al. Prospects of IL-2 in cancer immunotherapy. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9056173. [DOI:10.1155/2018/9056173] [PMID] [PMCID]
13. Setrerrahmane S, Xu H. Tumor-related interleukins: old validated targets for new anti-cancer drug development. *Mol Cancer.* 2017;16(1):153. [DOI:10.1186/s12943-017-0721-9] [PMID] [PMCID]
14. Holt JG, Krieg NG, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. 206-8.
15. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019;37(1):177-92. [DOI:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013] [PMID]
16. Moayedi A, Nowroozi J, Akhavan Sepahi A. Cytotoxic effect of pyocyanin on human pancreatic cancer cell line. *Iran J Basic Med Sci.* 2018;21(8-): 794-9.

17. Priyaja P, Jayesh P, Philip R, Bright Singh IS. Pyocyanin induced in vitro oxidative damage and its toxicity level in human, fish and insect cell lines for its selective biological applications. *Cytotechnology*. 2016;68(1):143-55. [[DOI:10.1007/s10616-014-9765-5](https://doi.org/10.1007/s10616-014-9765-5)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
18. Dieter C, Dutra Lourenco E, Emerim Lemos N. Association of long non-coding RNA and leukemia: a systematic review. *Gene*. 2020;735:144405. [[DOI:10.1016/j.gene.2020.144405](https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144405)] [[PMID](#)]
19. Weckle A, Aiello AE, Uddin M, Galea S, Coulborn RM, Soliven R, et al. Rapid fractionation and isolation of whole blood components in samples obtained from a community-based setting. *J Vis Exp*. 2015;(105):52227. [[DOI:10.3791/52227](https://doi.org/10.3791/52227)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
20. Piccinini F, Tesei A, Arienti C, Bevilacqua A. Cell counting and viability assessment of 2D and 3D cell cultures: expected reliability of the trypan blue assay. *Biol Proced Online*. 2017;19(1):8. [[DOI:10.1186/s12575-017-0056-3](https://doi.org/10.1186/s12575-017-0056-3)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
21. Shahbazi S, Abolhasani A. Immunostimulants: types and functions. *J Med Microbiol Infec Dis*. 2016;4(3-4):45-51. [URL:<http://jommid.pasteur.ac.ir/article-1-131-en.htm>]
22. Rada B, Gardina P, Myers TG, Leto TL. Reactive oxygen species mediate inflammatory cytokine release and EGFR-dependent mucin secretion in airway epithelial cells exposed to Pseudomonas pyocyanin. *Mucosal Immunol*. 2011;4(2):158-71. [[DOI:10.1038/mi.2010.62](https://doi.org/10.1038/mi.2010.62)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
23. Venegas FA, Köllisch G, Mark K, Diederich WE, Kaufmann A, Bauer S, Chavarría M, Araya JJ, García-Piñeres AJ. The bacterial product violacein exerts an immunostimulatory effect via TLR8. *Sci Rep*. 2019; 9(1):13661. [[DOI:10.1038/s41598-019-50038-x](https://doi.org/10.1038/s41598-019-50038-x)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
24. Azman AS, Mawang CI, Abubakar S. Bacterial Pigments: The bioactivities and as an alternative for therapeutic applications. *Nat Prod Commun*. 2018;13(12):1747-54. [[DOI:10.1177/1934578X1801301240](https://doi.org/10.1177/1934578X1801301240)]
25. Rosenberg SA. IL-2: The first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*. 2014;192(12):5451-8. [[DOI:10.4049/jimmunol.1490019](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1490019)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
26. Antony GK, Dudek AZ. Interleukin 2 in cancer therapy. *Curr Med Chem*. 2010;17(29):3297-302. [[DOI:10.2174/092986710793176410](https://doi.org/10.2174/092986710793176410)] [[PMID](#)]
27. Askeland EJ, Newton MR, O'Donnell MA, Luo Y. Bladder cancer immunotherapy: BCG and beyond. *Adv Urol*. 2012;2012:181987. [[DOI:10.1155/2012/181987](https://doi.org/10.1155/2012/181987)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
28. Freytag SO, Stricker H, Movsas B, Kim JH. Prostate cancer gene therapy clinical trials. *Mol Ther*. 2007;15(6):1042-52. [[DOI:10.1038/sj.mt.6300162](https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300162)] [[PMID](#)]
29. Repka T, Chiorean E, Gay J, Herwig K, Kohl K, Yee D, et al. Trastuzumab and Interleukin-2 in HER2-positive metastatic breast cancer: a pilot study. *Clin Cancer Res*. 2003;9(7):2440-6.
30. Ridolfi L, de Rosa F, Ridolfi R, Gentili G, Valmorri L, Scarpi E, et al. Radiotherapy as an immunological booster in patients with metastatic melanoma or renal cell carcinoma treated with high-dose Interleukin-2: evaluation of biomarkers of immunologic and therapeutic response. *J Transl Med*. 2014;12:262. [[DOI:10.1186/s12967-014-0262-6](https://doi.org/10.1186/s12967-014-0262-6)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]