Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 2 (May-June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Molecular detection of heat-killed probiotic bacteria and study of apoptosis induction on colon cancer HT-29 cell line

Sepideh Karimi Ardestani[1], Farzaneh Tafvizi[1], Maryam Tajabadi Ebrahimi[2]

1. Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, parand, Iran
2. Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2016/01/24
Accepted: 2016/04/20
Available online:2016/06/20

Article Subject:
Molecular Microbiology

IJMM 2016; 10(2): 42-52

Corresponding author at:

Dr. Farzaneh Tafvizi

Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

Tel:
+989125709532

Email:
farzanehtafvizi54@gmail.com

Abstract

Background and Aim: Due to the high prevalence of colon cancer in human societies such as Iran, the aim of this study is the molecular identification and assesses cytotoxic effects of heat-killed probiotic bacteria and induced apoptosis in HT-29 cell lines of colon cancer compared with normal cells.

Materials and Methods: Molecular detection was performed on local probiotic bacteria isolated (TD4) from Tarkhineh dough. Both cell lines HT-29 colon cancer and HEK-293 were affected by 0.01, 0.1, 1, 10, 100, and 1000 µg/ml of heat-killed TD4 isolate for periods of 24, 48, and 72 hours. Cell viability was measured using MTT assay. DNA fragmentation assay was performed after 48 and 72 hours base on the IC50 concentration of heat-killed bacteria.

Results: TD4 isolate was submitteded *L. berevis* in GenBank. According to MTT assay, *lactobacillus berevis* depended on time and dose reduced survival and proliferation of colon cancer of HT-29 cell line, with the highest cytotoxic effect in 1000 µg/ml for 72 hours. At this dose and time, viability was 23% and 50% in HT-29 and HEK-239 cell lines, respectively. DNA fragmentation assay showed apoptosis induction by heat-killed bacteria in the HT-29 cell line.

Conclusions: *Lactobacillus berevis* showed cytotoxic effects and induced apoptosis on HT-29 colon cancer cell line while the cytotoxic effect was slight on HEK-239 compared to HT-29. Future studies are still required to confirm these bacteria as a biological anti-cancer product in treatment and prevention.

KeyWords: Probiotic, *Lactobacillus brevis*, Colon cancer, Apoptosis, HT-29 cell line

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Karimi Ardestani S, Tafvizi F, Tajabadi Ebrahimi M. Molecular detection of heat-killed probiotic bacteria and study of apoptosis induction on colon cancer HT-29 cell line. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (2) :42-52

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۲ – خرداد و تیر ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

شناسایی مولکولی باکتری پروبیوتیک کشته شده با حرارت و بررسی آپوپتوزیس القا شده توسط باکتری بر رده سلول HT-29 سرطان کولون

سپیده کریمی اردستانی [۱]، فرزانه تفویضی [۱]، مریم تاج آبادی ابراهیمی [۲]

۱. گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

۲. گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۴/۱۱/۰۴

پذیرش:۱۳۹۵/۰۲/۰۱

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۳/۳۱

موضوع:

میکروب شناسی مولکولی

IJMM 1395; 10(2): 42-52

نویسنده مسئول:

دکتر فرزانه تفویضی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۵۷۰۹۵۳۲+

پست الکترونیک:

farzanehtafvizi54@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: با توجه به شیوع بالایی سرطان کولون در جوامع انسانی و از جمله ایران، هدف این مطالعه شناسایی مولکولی و بررسی اثر سایتوتاکسیک باکتری پروبیوتیک کشته شده توسط حرارت و القا آپوپتوزیس بر رده سلولی HT-29 سرطان کولون و مقایسه آن با رده سلولی نرمال می‌باشد.

مواد و روش کار: شناسایی مولکولی باکتری بومی جدا شده از دوغ ترخینه (TD4) انجام شد. دو رده سلولی HT-29 و HEK-293 تحت تاثیرغلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر از باکتری کشته شده با حرارت، در ۳ زمان ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت قرار گرفتند. درصد زیستایی سلول‌ها توسط آزمون MTT سنجیده شد. آزمون قطعه قطعه شدن DNA در غلظت IC50 از باکتری کشته شده با حرارت انجام شد.

یافته‌ها: باکتری *TD4* به عنوان *لاکتوباسیلوس برویس* در بانک ژنی ثبت گردید. *لاکتوباسیلوس برویس* (*TD4*) در الگوی وابسته به زمان و دوز، بقا و تکثیر سلول‌های سرطانی کولون رده *HT-29* را کاهش داد که بیشترین اثر سایتوتوکسیتی مربوط به رقت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان ۷۲ ساعت بود. درصد زیستایی در دوز و زمان فوق الذکر، در سلول‌های *HT-29* و *HEK-293*، به ترتیب ۲۳٪ و ۵۰٪ برآورد شد. آزمون قطعه قطعه شدن *DNA* هم، القا آپوپتوزیس توسط باکتری کشته شده با حرارت را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: *لاکتوباسیلوس برویس، اثر سایتوتوکسیک و القا آپوپتوزیس بر روی رده سلولی* HT-29 *نشان داد و اثر سایتوتوکسیک کمتری در رده سلولی* HEK- 293 *نسبت به رده* HT-29 *مشاهده شد. بطوریکه با انجام مطالعات بیشتر می‌توان از این باکتری‌ها به عنوان یک محصول بیولوژیک ضد سرطانی در درمان و پیشگیری بهره جست.*

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس برویس*، سرطان کولون، آپوپتوزیس، رده سلولی HT-29

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم‌های زنده و غیر بیماری‌زای موجود در بعضی مواد غذایی هستند که زمانیکه مقادیر کافی از آن‌ها وارد بدن شوند تأثیر مثبتی بر سلامت میزبان می‌گذارند. لاکتوباسیل ها و بیفیدوباکترها از متداول‌ترین باکتری‌های مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک می‌باشند؛ اما بعضی از مخمرها و دیگر باسیل‌ها نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱).

واژه پروبیوتیک به معنی حیات بخش، از زبان یونانی برگرفته شده است. این واژه اولین بار توسط Lilly و Stillwell در سال ۱۹۶۵، جهت تعریف مواد ترشحی به وسیله یک میکروارگانیسم که سبب تحریک رشد یک میکروارگانیسم می‌شود، استفاده شد (۲).

Parker، پروبیوتیک‌ها را به عنوان ارگانیسم‌هایی که در برقراری تعادل میکروبی روده مؤثر هستند، تعریف کرد (۳). واژه پروبیوتیک به معنای محصولی حاوی میکروارگانیسم‌های زنده و مشخص با تعدادی کافی می‌باشد که به وسیله کولونیزاسیون در بخشی از بدن از طریق ایجاد تعادل در فلور میکروبی باعث اعمال اثرات مفید بر سلامتی میزبان می‌شوند (۴). سرطان که یک بیماری نامتجانس ژنتیکی است، پس از بیماری‌های قلبی و عروقی، دومین علت شایع مرگ و میر در جهان به شمار می‌رود. این بیماری، در اثر جهش در ژن‌هایی که مسیرهای حیاتی سلول را کنترل می‌کنند به وجود می‌آید. این مسیرها شامل مسیر رشد نمو وآپوپتوزیس می‌باشند. سرطان با تشکیل توده سلولی که از قوانین تکاملی حاکم بر ماهیت یک موجود زنده پرسلولی پیروی نکرده و با عدم توجه به فاکتورهای رشد داخلی و خارجی، توانائی تکثیر خود به خودی، فرار از آپوپتوزیس و متاستاز سبب ایجاد بیماری می‌شود (۵، ۶).

شایع‌ترین نوع سرطان دستگاه گوارش در ایران سرطان کولورکتال است که از نظر بروز در مردان ایرانی، رتبه سوم و در زنان، رتبه چهارم را به خود اختصاص داده است (۷).

طبق مطالعات انجام یافته به شکل *in vitro* و *in vivo*، پروبیوتیک ها در مهار زخم‌های نئوپلاستیک اولیه و تومورهای سرطانی در مدل‌های موشی نقش دارند. پروبیوتیک ها، از طریق جلوگیری از تبدیل پروکارسینوژن به کارسینوژن، اتصال و غیرفعال کردن ترکیبات میتوژنی، کاهش رشد باکتری‌های پروکارسینوژنز، کاهش جذب میتوژن ها و افزایش عملکرد سیستم ایمنی بر علیه سلول‌های سرطانی فعالیت می‌کنند. با توجه به تأثیر میکروفلور روده در کاهش توسعه سرطان روده، تولید انواع جدیدی از فرآورده‌ها که ضمن جلوگیری از ایجاد سرطان، باعث مهار سلول‌های سرطانی شده و هیچ اثر مخربی بر روی سلول‌های سالم نداشته باشد امری مهم به نظر می‌رسد. بدین جهت سعی بر این است که از پروبیوتیک ها به این منظور استفاده شود. پروبیوتیک ها از طریق تحریک سیستم ایمنی بدن، از بین بردن آنزیم‌های مخرب و سرطان زا مثل اسیدهای صفراوی ثانویه و مواد موتاژنی که توسط باکتری‌های روده ایجاد می‌شوند، می‌توانند در جلوگیری ازسرطان کولون نقش مهمی بازی کنند (۸).

بر طبق مطالعات انجام یافته، باکتری‌های غیر زنده از جمله سلول کامل غیرفعال، عصاره اگزوپلی ساکارید، پپتیدوگلیکان، عصاره سلولی و اجزای مختلف سلولی نیز دارای فعالیت‌های بالقوه درمانی و ضد سرطانی می‌باشند که البته کمیت و کیفیت این خصوصیات بسیار وابسته به نوع باکتری و سویه می‌باشد (۹، ۱۰).

هدف از این مطالعه، شناسایی مولکولی و بررسی اثر سایتوتوکسیک و القا آپوپتوزیس توسط باکتری بومی TD4 کشته شده با حرارت با ویژگی پروبیوتیکی بر رده سلولی HT-29 سرطان کولون و مقایسه آن با رده سلولی نرمال می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جدایه های باکتریایی

در این تحقیق، باکتری بومی *لاکتوباسیلوس برویس* TD4 که قبلاً توسط دکتر Tajabadi و همکاران از دوغ ترخینه جداسازی شدند و توان و ظرفیت پروبیوتیکی این باکتری از جمله میزان تحمل به نمک‌های صفراوی، بررسی میزان جذب کلسترول، مقاومت ایزوله‌ها در شرایط اسیدی به اثبات رسیده است، استفاده شد (۱۱).

استخراج DNA

یک کلنی از نمونه باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* TD4 مورد آزمایش به محیط MRS broth منتقل و در دمای ۳۷°C و تراکم ۱۰٪ CO_2 به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. بقیه مراحل استخراج با استفاده از کیت Molecular Biological System Transfer (MBST) بر اساس جذب ستونی DNA بر روی غشاء سیلیکا صورت گرفت. جهت بررسی کیفیت DNA استخراج شده در روش فوق از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۷ درصد استفاده شد.

تکثیر قطعه 16S rDNA و شناسایی باکتری:

جهت تکثیر قطعه تقریباً ۱۵۰۰ bp ناحیه ژنی 16S rRNA از پرایمرهای تهیه شده از شرکت تکاپو زیست ایران که توالی آن‌ها در ذیل قید شده است، استفاده شد:

Primer Forward: 5'- GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'
Primer Reverse: 5'- CTACGGCTACCTTGTTACGA -3'

واکنش PCR (Polymerase Chain Reaction) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad) انجام گرفت (۱۲). از Master Mix محصول شرکت Ampliqon استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل، ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix (که حاوی تمامی اجزای لازم جهت انجام واکنش PCR، بغیر از پرایمر و DNA الگو می‌باشد)، ۰/۴ µM از هر پرایمر، ۲۰ نانوگرم از DNA باکتری و مابقی حجم تا ۲۵ میکرولیتر از آب مقطر استریل بهینه سازی شد. برنامه حرارتی PCR به شرح ذیل انجام گرفت: ۱ سیکل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۰ سیکل با برنامه دمایی ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت ۱ سیکل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس. محصول PCR روی ژل الکتروفورز ۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. خالص سازی قطعه مورد نظر انجام شد. سپس T/A cloning جهت کولون نمودن قطعه مورد نظر انجام گرفت. سپس تعیین توالی قطعه تکثیر شده، توسط شرکت بیونیر کره جنوبی انجام گردید. ترادف قطعات تعیین توالی شده در بانک اطلاعاتیBLAST مورد مقایسه قرار گرفت و باکتری شناسایی شد.

تهیه باکتری کشته شده

جهت تهیه باکتری کشته شده توسط حرارت، ابتدا باکتری TD4 در محیط De Man Rogosa and Sharp (MRS –Broth) به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس و شرایط بی‌هوازی گرماگذاری گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و سپس مایع رویی جدا شد. کار شستشوی رسوب توسط بافر فسفات با pH معادل ۷/۲ سه بار تکرار شد. سپس ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات به رسوب اضافه و سوسپانسیون حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۸۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد تا باکتری کشته شود. جهت اطمینان از غیر فعال شدن باکتری، مجدداً کشت داده شد و پس از حصول اطمینان از عدم رشد باکتری در محیط کشت، رسوب حاصل فریز درای شد و بصورت پودر جهت انجام تیمارهای لازم در کشت سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

کشت سلول‌های سرطانی کولون رده HT-29

سلول‌های سرطانی کولون رده HT-29 و سلول نرمال HEK-293 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شدند. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS)، ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین–استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در یک اتمسفر مرطوب با غلظت CO_2 ۵ درصد کشت داده شدند. جهت بررسی وضعیت مورفولوژی، سلامت و تعداد سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند، توسط تریپسین ۰/۰۵٪ از ته فلاسک جدا شدند و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در آن با استفاده از لام نئوبار و رنگ ترپان بلو توسط میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از اطمینان از عدم آلودگی، از سلول‌های با درصد زیستایی بالای ۹۰ درصد جهت انجام آزمایش استفاده گردید.

بررسی اثر سمیت سلولی با روش MTT assay

به منظور ارزیابی اثر سایتوتوکسیک سلول باکتری کامل کشته شده توسط حرارت بر سلول‌های سرطانی کولون رده HT-29 و سلول نرمال HEK-293 از آزمون MTT استفاده شد. برای انجام آزمایش حجم ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت حاوی ۱۰۰۰۰ سلول HT-29 در هر خانه پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد. سپس رقت‌های مختلف پودر لیوفیلیزه شده باکتری TD4، شامل (۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت ها به مدت ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از طی زمان‌های لازم، ۱۰۰ میکرولیتر رنگ MTT (۵،۴،۳–دیمتیل تیازولیل -۲) -۲، ۵- دیفنیل تترازولیوم بروماید) (Sigma, Germany) با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی-لیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس مجهز به CO2 انکوبه شدند. در پایان کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن محلول DMSO خالص به چاهک‌ها حل شدند و سرانجام جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر ثبت گردید. نتایج حاصله به صورت میزان درصد زیستایی و IC50 (غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می‌شود) گزارش شدند. جهت گرفتن نتیجه بهتر، آزمایش‌های این تحقیق با سه بار تکرار انجام گرفت و میزان بقای سلولی طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

۱۰۰ × (جذب نوری کنترل/جذب نوری تست)= میزان بقای سلولی

آزمون قطعه قطعه شدن DNA (DNA fragmentation) :

سلول‌های سرطان کولون HT-29 با غلظت IC50 باکتری TD4 کشته شده با حرارت تیمار شدند. پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت با محلول PBS سلول‌ها را شستشو داده و سپس تریپسینه گردیدند. سوسپانسیون سلولی را در ۴۰۰ rpm سانتریفوژ شد و به رسوب حاصل ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (10 mM Tris-HCL (pH=7.5 400 mM Nacl, 100 mM EDTA, 0.6% SDS و ۱۰ میکرولیتر محلول RNAase (4mg/mL) اضافه گردید. محلول حاصل به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول نمک طعام (6M Nacl) به عنوان رسوب دهنده پروتـین اضافه شد. محلول به دست آمده به مدت ۵ دقیقه برروی یخ انکوبه شد و سپس در ۱۸۰۰۰ xg در دمای اتاق به مدت ده دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی جمع آوری شد و به آن ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه برروی یخ انکوبه گردید و مجدداً در ۱۸۰۰۰ xg به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل با ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد. رسوب حاصل در دمای اتاق خشک شد و در ۲۰۰ میکرولیتر بافر شامل موارد ذیل [10 mM Tris-HCL,Tris-EDTA,1mM EDTA, (pH 8.0)] حل گردید. غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. DNA با استفاده از ژل آگارز ۲٪ در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید و DNA با دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده گردید.

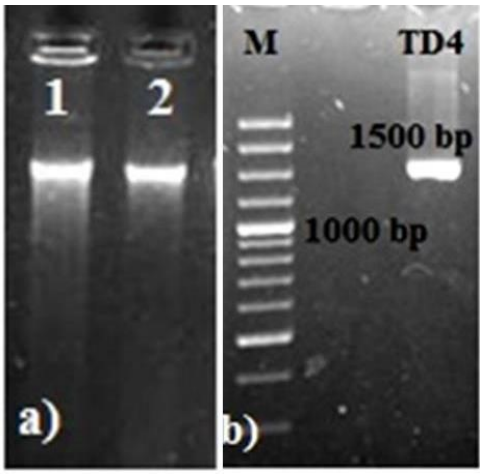
آنالیز آماری

بر اساس تست آماری Two way ANOVA گروه‌های تست با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفتند. معنی دار بودن داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ver.19 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) و آزمون Tukey's و One way ANOVA و بر اساس $P \geq ۰/۰۵$ محاسبه شد.

یافته‌ها

شناسایی مولکولی

نتایج حاصل از استخراج DNA و محصول PCR (قطعه ۱۵۰۰ bp) ایزوله TD4 در شکل ۱ نمایش داده شده است.



شکل ۱: نتایج حاصل از DNA استخراج شده بر اساس کیت MBST و محصول PCR. a) چاهک‌های ۱ و ۲ نمونه‌هایی از DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۷ درصد می‌باشند. b) نمایش محصول PCR (قطعه تقریباً ۱۵۰۰ bp) حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA ایزوله جدا شده از دوغ ترخینه (TD4) به همراه مارکر مولکولی (M) بر روی ژل آگارز ۲ درصد.

در نهایت با انجام توالی یابی و مقایسه هم ردیفی در پایگاه NCBI Blastn، باکتری TD4، ۱۰۰ درصد تشابه با *لاکتوباسیلوس برویس* نشان داد و به عنوان *لاکتوباسیلوس برویس* و با شماره دستیابی KP165844 در NCBI و IBRC_M1079 در بانک ژنی و مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ثبت گردید.

بررسی اثر سایتوتوکسیک باکتری پروبیوتیک TD4

درصد زیستایی حاصل از تیمار سلول‌های HT-29 و HEK-293 با غلظت‌های مختلف ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ µg/mL از باکتری‌های کشته شده *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) طی مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در جدول ۱، ۲ و شکل ۲ و ۳ ارائه شده است. ارزش عدد P نسبت به گروه کنترل سنجیده شده است.

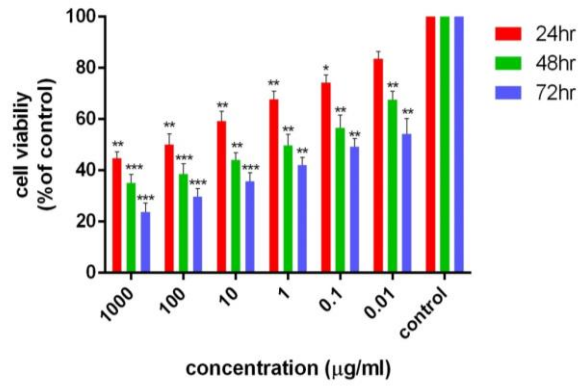
براساس نتایج بدست آمده، *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) در الگوی وابسته به زمان و دوز، بقا و تکثیر سلول‌های سرطانی کولون رده HT-29 را کاهش داد. بیشترین مقدار سمیت سلولی مربوط به غلظت ۱۰۰۰µg/ml در زمان ۷۲ ساعت بود.

جدول ۱- میانگین توان زیستی رده سلولی HT-29 تیمار شده با باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) کشته شده توسط حرارت در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت با روش MTT assay.

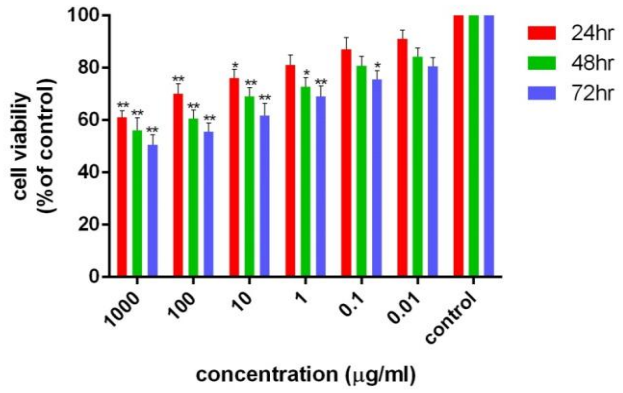
زمان	۰/۰۱ µg /ml	۰/۱ µg /ml	۱ µg /ml	۱۰ µg /ml	۱۰۰ µg /ml	۱۰۰۰ µg /ml
۲۴ساعت	۸۳/۵ ± ۰/۳۳ P> ۰/۰۵	۷۴/۲۵ ±۰/۲۸ P <۰/۰۵	۶۷/۷۵ ±۰/۳۲ P <۰/۰۱	۵۹/۲۵ ± ۰/۴۶ P <۰/۰۱	۵۰ ± ۰/۶۲ P <۰/۰۱	۴۴/۷۵ ± ۰/۲۸ P <۰/۰۱
۴۸ساعت	۶۷/۵ ±۰/۳۸ P <۰/۰۱	۵۶/۵ ± ۰/۸۸ P <۰/۰۱	۴۹/۷۵ ±۰/۷۸ P <۰/۰۱	۴۴ ±۰/۲۸ P <۰/۰۱	۳۸/۵ ± ۰/۵۸ P <۰/۰۰۱	۳۵ ± ۰/۳۶ P <۰/۰۰۱
۷۲ساعت	۵۴/۷۵ ±۰/۴۱ P <۰/۰۱	۴۹/۲۵ ±۰/۳۵ P <۰/۰۱	۴۲ ±۰/۴۷ P <۰/۰۱	۳۵/۷۵ ± ۰/۶۲ P <۰/۰۰۱	۲۹/۷۵ ± ۰/۳۸ P <۰/۰۰۱	۲۳/۷۵ ± ۰/۴۷ P <۰/۰۰۱

جدول ۲- میانگین توان زیستی رده سلولی HEK- 293 با باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) کشته شده با حرارت در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT assay.

زمان	۰/۰۱ µg/ml	۰/۱ µg/ml	۱ µg/ml	۱۰ µg/ml	۱۰۰ µg/ml	۱۰۰۰ µg/ml
۲۴ساعت	۹۱ ±۰/۳۹	۸۷ ±۰/۸۶	۸۱ ± ۰/۷۵	۷۶ ± ۰/۴۲	۷۰ ± ۰/۴۷	۶۱ ± ۰/۳۶
۴۸ساعت	۸۴/۲۵ ±۰/۳۵	۸۰/۷۵ ± ۰/۴۱	۷۲/۷۵ ± ۰/۴۴	۶۹ ± ۰/۳۱	۶۰/۵ ± ۰/۳۴	۵۶ ± ۰/۶۷
۷۲ساعت	۸۰/۵ ±۱/۱۵	۷۵/۵ ± ۰/۳۷	۶۹/۵۴ ± ۰/۳۴	۶۱/۷۵ ± ۰/۳۱	۵۵/۵ ± ۰/۳۷	۵۰/۵ ± ۰/۴۱



شکل ۲: مقایسه اثر سمیت سلول‌های HT-29 مربوط به باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) کشته شده با حرارت در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (*:P <۰/۰۵ ، **:P <۰/۰۱ ، ***P <۰/۰۰۱ : n=4).



شکل ۳- مقایسه اثر سمیت سلول‌های HEK-293 مربوط به باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) کشته شده با حرارت ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (*:P <۰/۰۵ ، **:P <۰/۰۱ ، ***P <۰/۰۰۱ : n=4).

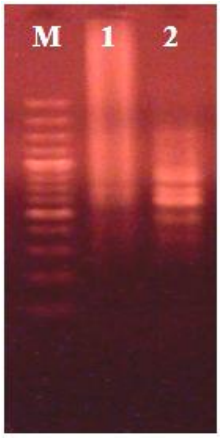
نتایج محاسبه میزان IC50 مربوط به باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) کشته شده توسط حرارت در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در جدول ۳ ارائه شده است. برابر با ۰/۴۷±۱۰۰µg/ml بود که در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود.

جدول ۳- مقادیر IC50 مربوط به اثر باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

Time (hrs)	TD4-ic50-(HT29)
۲۴	۱۰۰±۰/۴۷ µg /ml
۴۸	۱/۵ ±۰/۳۴ µg /ml
۷۲	۰/۰۹ ±۰/۲۸ µg /ml

نتایج آزمون قطعه قطعه شدن DNA

نتایج حاصل از استخراج DNA از سلول‌های رده HT-29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) حاکی از القا آپوپتوزیس در رده سلولی HT-29 بود. الگوی نردبانی یا DNA قطعه قطعه شده حاصل از اثر باکتری در شکل ۴ نمایش داده شده است.



شکل ۴- الگوی قطعه قطعه شدن DNA سلول‌های HT-29 پس از تیمار با باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) کشته شده پس از گذشت ۴۸ ساعت (چاهک شماره ۱) و پس از گذشت ۷۲ ساعت (چاهک شماره ۲) ، M: مارکر 100 bp.

بحث

سرطان کولورکتال یکی از چهار سرطان شایع در سراسر دنیا به شمار می‌رود (۱۳). ویژگی اصلی سلول‌های سرطانی تکثیر غیر قابل کنترل سلولی و مقاومت در برابر مرگ برنامه ریزی شده می‌باشد، بنابراین عاملی که باعث بروز آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی شود، می‌تواند به عنوان ماده ضد سرطانی شناخته شود. گفته شده است که حداقل یک دوم کل سرطان‌ها به دلیل ترکیبات موجود در رژیم غذایی ایجاد می‌گردند (۱۴). از این رو ترکیبات غذایی و ارتباط آن‌ها با سلامت افراد، توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است که پروبیوتیک ها از جمله این مواد می‌باشند و همان طور که گفته شد، میکروارگانیسم‌های غیر بیماری‌زایی هستند که در سیستم گوارشی افراد وجود دارند و اثرات مفیدی بر میزبان دارند. پروبیوتیک های خاصی دارای فعالیت‌های ضد سرطانی هستند (۱۴).

مطالعات مختلف و متنوعی پیرامون اثر سایتوتوکسیک و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی توسط باکتری‌های پروبیوتیک و فرآورده‌های حاصل از این باکتری‌ها از جمله عصاره اگزوپلی ساکارید، مایع رویی سلولی، اجزای دیواره باکتری و باکتری کشته شده با حرارت انجام گرفته است. لازم به ذکر است که فعالیت ضد تکثیری بسیار وابسته به سویه باکتری می‌باشد و از یک سویه به سویه دیگر متفاوت می‌باشد، همچنین بکارگیری اجزا مختلف باکتری که قبلاً به آن اشاره شد نیز نتایج متفاوتی در مهار تکثیر سلول‌های سرطانی و القا آپوپتوزیس دارند. توجه به این نکته ضروری است، از آنجایی که غذای سنتی ترخینه و دوغ ترخینه یک غذای تخمیری محلی و مختص کشور ایران بوده و سرشار از باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد و باکتری بکار رفته در این تحقیق، *لاکتوباسیلوس برویس* نیز از دوغ ترخینه جداسازی شده است و یک باکتری بومی به حساب می‌آید و اولین بار است که اثر ضد تکثیری و القا آپوپتوزیس توسط این باکتری مورد بررسی قرار می‌گیرد، مطالعاتی که دقیقاً منعکس کننده اثرات ضد تکثیری این باکتری باشد محدود است. درادامه سعی شده است، نتایج مقالاتی که نزدیک به مطالعه حاضر می‌باشند، ارائه شود.

در تحقیق حاضر، اثر سایتوتوکسیک باکتری بومی *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) کشته شده توسط حرارت بر روی سلول‌های سرطانی HT-29 ارزیابی شد. این باکتری پروبیوتیک مانع از تکثیر سلولی رده HT-29 در روند وابسته به زمان و دوز شد. نتایج حاصل از مقایسه تست MTT در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و در غلظت‌های مختلف نشان داد که *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) کشته شده توسط حرارت در زمان ۷۲ ساعت و غلظت µg/ml ۱۰۰۰ بیشترین تأثیر سمیت سلولی را داشت (۰/۴۷ ± ۲۳/۷۵) که این کاهش زیستایی در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود ($p<0.001$) و در مقابل در زمان ۲۴ ساعت و غلظت µg/ml ۰/۱ کمترین تأثیر را بروی سلول‌ها داشت که از لحاظ آماری در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود (P> ۰/۰۵). تیمار سلول‌های نرمال رده HEK-293 با غلظت‌های مختلف µg/ml ۱۰۰۰،۱۰۰ ،۱۰، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ باکتری کشته شده توسط حرارت *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) طی مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت نیز سبب کاهش میزان زیستایی سلول‌ها شد، ولی میزان اثر سایتوتوکسیک مشاهده شده در مقایسه با رده سلولی HT-29 بسیار کمتر بود. بطوریکه میزان درصد زیستایی در غلظت µg/ml ۱۰۰۰ و زمان ۷۲ ساعت در رده سلولی HEK-293 حدود ۰/۴۱ ± ۵۰/۵ درصد بر آورد گردید.

بر طبق مطالعات انجام شده توسط Taverniti و همکاران *L. plantarum ,L. casei , L. bulgaricus* سبب کاهش درصد

زیستایی سلول‌های HT-29 و Caco-2 شدند. مطالعات نشان داده است که اجزای متفاوتی از باکتری‌ها نظیر دیواره سلولی، پپتیدوگلیکان، سیتوپلاسم و حتی باکتری کامل کشته شده توسط حرارت همه دارای اثرات پیشگیرانه در برابر رده سلول‌های سرطانی می‌باشند. چون توجه آنها بیشتر بر سیستم ایمنی بدن معطوف بود، آن‌ها به این نتیجه رسیدند که باکتری کشته شده ایمن‌تر و با ثبات‌تر بوده و دارای اثری متشابه با انواع زنده آن است. در این تحقیق نیز جهت ارزیابی اثرات پروبیوتیک بومی ایران، از باکتری کشته شده توسط حرارت استفاده شد (۱۵).

بر طبق مطالعات Choi و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بر روی تعداد زیادی لاکتوباسیل ها از جمله *L. acidophilus 606* *L.brevis ATCC 8287* , *L. casei ATCC 393* که توسط حرارت کشته شده بودند نشان داد که سبب کاهش درصد زیستایی رده‌های سلول‌های سرطانی شد. آن‌ها که از رده سلولی HT-29 به عنوان رده سرطانی و از سلول‌های Human Embryo fibroblast یا به اختصار hEF به عنوان رده نرمال استفاده کردند و اثر سایتوتوکسیکی کمتری بر رده نرمال نسبت به رده سرطانی گزارش کردند. در نتیجه تأثیر *لاکتوباسیلوس برویس ATCC 8287* که از غلظت 10^8 CFU/ml استفاده شده بود، درصد زیستایی ۸/۷۴ ± ۲۸/۵۳ بر روی HT-29 و ۱/۴۶ ± ۳۳/۰ بر روی رده نرمال پس از ۹۶ ساعت تیمار مشاهده شد که در مقایسه با تحقیق حاضر که از غلظت باکتری به میزان 10^{10} CFU ml^{-} استفاده شد درصد زیستایی در رده HT-29 و HEK-293 پس از گذشت ۷۲ ساعت ۲۳٪ و ۵۰٪ برآورد شد. اثر سایتوتوکسیک نسبتاً بیشتری که در تحقیق choi و همکاران مشاهده شد (۲۸٪ در برابر ۲۳٪) ناشی از در نظر گرفتن زمان تیمار بیشتری یعنی ۹۶ ساعت در برابر ۷۲ ساعت تحقیق حاضر می‌باشد که وضعیت وابسته به زمان بودن این اثر را نشان می‌دهد. از طرفی آزمایشات حاضر که از لحاظ غلظت باکتری با مطالعه choi و همکارانش متفاوت بود نتایج بهتری را نشان می‌داد. چراکه اثر سایتوتوکسیک کمتری بر روی سلول‌های نرمال در تحقیق حاضر نسبت به مطالعات Choi حاصل شده است.

همچنین در مطالعه choi و همکاران نشان داده شد که اثر باکتری کشته شده بر سلول سرطانی کمی بیشتر از عصاره پلی‌ساکارید بود و همچنین با استفاده از باکتری کشته شده توسط حرارت، القاء آپوپتوزیس نیز بیش از نکروز اتفاق افتاد که این امر در مطالعه حاضر نیز مشهود بود و ما نیز شاهد القاء آپوپتوزیس و همچنین اثر سایتوتوکسیکی کمتری در سلول نرمال HEK-293 بودیم. در مطالعه حاضر، *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4)، به عنوان باکتری کشته شده و رده سلولی HT-29 به عنوان سلول سرطانی و HEK-293 به عنوان سلول نرمال مورد استفاده قرار گرفت (۱۶).

در مطالعه Sadeghi و همکارانش در سال ۲۰۱۳، نیز کاهش درصد زیستایی و تکثیر سلولی با استفاده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 و *لاکتوباسیلوس رامنسوس* GG در رده سلولی نرمال و سرطانی مشاهده شد. آن‌ها از غلظت‌های مختلفی از باکتری کشته شده با حرارت و مایع رویی باکتری برای مطالعه خود استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند که خواص ضد تکثیری باکتری‌ها بر روی رده سلول‌های سرطانی بسیار وابسته به سوش می‌باشد. بطوریکه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* A7 آثار ضد تکثیری قوی‌تری را نشان داد. کاهش درصد زیستایی در رده سلول‌های سرطانی و نرمال در زمان ۴۸ ساعت با استفاده از غلظت‌های (۶۲۰ OD: ۰/۰۲۵, ۰/۰۵, ۰/۱) مورد بررسی قرار گرفت که نتایج درصد زیستایی در بیشترین غلظت بر روی سلول‌های HT-29 توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس رامنسوس* GG به ترتیب حدود ۵۰٪ و ۶۲/۷٪ گزارش شد. در حالیکه در تحقیق حاضر علاوه بر زمان ۴۸ ساعت، زمان ۷۲ ساعت نیز مورد بررسی قرار گرفت و در بیشترین غلظت مورد مطالعه که ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود در زمان ۴۸ ساعت، درصد زیستایی در رده سلولی سرطانی HT-29 ، ۳۵٪ گزارش شد که با افزایش زمان به ۷۲ ساعت درصد زیستایی در رده سلولی HT-29 به ۲۳٪ رسید که نشان می‌دهد *لاکتوباسیلوس برویس* مورد مطالعه در تحقیق حاضر از توان سایتوتوکسیک قویتری نسبت به دو باکتری فوق برخوردار است. از نظر بررسی اثر سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های نرمال در دو مطالعه تقریباً با هم برابری می‌کردند و توان زیستایی در تحقیق Sadeghi و همکاران در زمان ۴۸ ساعت، حدود ۵۰٪ و در تحقیق حاضر ۵۶٪ برآورد شد. گفتنی است با افزایش زمان به ۷۲ ساعت توان زیستی سلول‌های سرطانی رده HT-29 در تحقیق حاضر به ۵۰٪ رسید. نکته قائل توجه دیگر و از جمله نتایج متفاوتی که در تحقیق حاضر نسبت به تحقیق صادقی و همکاران حاصل شد این است که در مطالعه Sadeghi و همکاران، اثر سمیت و مهاری باکتری‌های پروبیوتیک مورد مطالعه وابسته به دوز نبود و هیچ تفاوت معنی داری بین غلظت‌های مورد مطالعه در کاهش درصد زیستایی مشاهده نشد. در حالیکه در تحقیق حاضر، اثر مهاری و ضد تکثیری *لاکتوباسیلوس برویس* کاملاً

وابسته به دوز و زمان می‌باشد و در تمامی غلظت‌ها تفاوت معنی داری در کاهش درصد زیستایی مشاهده گردید (**۱۷**).

Kim و همکارانش در سال ۲۰۱۰، پیشنهاد دادند که ترکیبات به دست آمده از باکتری‌های پروبیوتیک توانایی مهار تعدادی از سرطان‌ها را دارند. آن‌ها بر اساس تجزیه پروتئوم دریافتند که چندین پروتئین در مرگ سلولی به طریق اتوفاژ دخالت دارند که شامل GRP78 و Beclin-1 می‌باشند که توسط پلی ساکاریدهای خارج سلولی تنظیم می‌شوند (**۱۸**).

در تحقیق حاضر نیز اثر باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) کشته شده توسط حرارت بر روی رده سلولی سرطانی و مهار رشد سلول‌های HT-29 مشاهده گردید و با نتایج Choi در ۲۰۰۶ و Sadeghi در ۲۰۱۳ مطابقت داشت (۱۷، ۱۶).

همچنین در سال ۲۰۰۹، Ku و همکارانش نشان دادند، پلی ساکارید استخراج شده از بیفیدیوباکتریوم اثرات بازدارنده‌ای روی چند رده سلولی سرطانی مانند HT-29 وMCF-7 دارد. این در حالی بود که به طور همزمان از رده سلول نرمال و Caco-2 نیز با غلظت یکسان استفاده شد و در دو رده اخیر آنها شاهد تحریک رشد سلول بودند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که پلی ساکاریدها می‌توانند خاصیت مهار انتخابی بر روی رده‌های سلولی سرطان‌زا داشته باشند ولی در مقایسه با باکتری کامل کشته شده نه تنها سبب مهار سلول نرمال نشده بود بلکه باعث تحریک آن نیز شد، در حالیکه باکتری کشته شده در تحقیق حاضر سبب کاهش درصد زیستایی تا حدود ۵۰٪ شد (**۱۹**).

Altonsy و همکاران در مطالعه خود به القای مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس در سلول‌های کارسینومای کولون انسانی Caco-2 توسط باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (*L. rhamnosus*) و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* (*Bifidobacterium lactis*) اشاره کردند (**۲۰**).

نتایج حاصل از تحقیقات Baldwin و همکاران نیز پیشنهاد می‌کند که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* می‌توانند باعث افزایش القای آپوپتوزیس در رده سلولی کارسینومای LS315 شوند و می‌توانند به عنوان ادجوانت با شیمی درمانی به کار گرفته شوند (**۲۱**).

از بین رفتن سلول‌ها با آپوپتوزیس فرایند تنظیمی مهمی برای حفاظت در برابر انکوژن ها می‌باشد. علاوه بر این، بر طبق نتایج محققان، ترکیبات حاصل از *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* قادر است از پیشرفت سرطان روده بزرگ در مدل‌های حیوانی جلوگیری کنند (**۲۲**).

Chiu و همکاران نیز با تحقیقات خود نشان دادند که ترکیبات محلول ترشح شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* و *رامنوسوس* باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های لوکمیای مونوسیتی می‌شوند، درنتیجه می‌توان پروبیوتیک ها را به عنوان عاملی ایمن برای مبارزه با سرطان در نظر گرفت که هیچ گونه عارضه جانبی در پی ندارند (**۲۳**).

Mehrabian و همکاران اثرات ضد جهشی و ضد سرطانی لاکتوباسیلوس جدا شده از ترخینه را اثبات نمودند. این در صد در بالاترین میزان خود ۶۰/۳۸ و کمترین آن ۳۹/۶۷ بود. مطالعه حاضر که در راستای استفاده از لاکتوباسیلوس های فوق بود نیز اثر ضد تکثیری سلول‌های سرطانی آن را تأیید کرد (**۲۴**).

Kabiriو همکاران نیز در آزمایش‌های خود توانستند رشد رده سرطانی K562 (لوکمیای میلوئیدی مزمن) را توسط عصاره سیتوپلاسمی پروبیوتیک هایی مانند *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در شرایط آزمایشگاهی مهار نمایند. تحقیقات آن‌ها ثابت کرد که دیواره سلولی لاکتوباسیلوس ها نیز به طور معنی داری باعث القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطان میلوئیدی خون می‌شوند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که افزایش غلظت سیتوپلاسمی سبب افزایش در مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود؛ یعنی فعالیت سلول‌کشی وابسته به دوز می‌باشد. این مطلب در مطالعه‌ای حاضر نیز بر روی سلول کشته شده، این مطلب را تأیید شد. چرا که اثر ضد تکثیری با افزایش دوز (در ۱۰۰۰µg/ml) افزایش یافت. طبق نتایج حاصل شده می‌توان گفت که باکتری‌های پروبیوتیک به ویژه جنس‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم توانایی مهار سلول‌های سرطانی را در هر دو شرایط طبیعی و آزمایشگاهی دارند و نیاز به مطالعاتی است که بتوان کارایی آن‌ها را در سطح بالینی سنجید (**۲۵**).

Liu و Pan نیز در سال ۲۰۱۰ ده سویه بومی از لاکتوباسیلوس در تایوان و دو باکتری اسید لاکتیک را مورد استفاده قرار دادند. آن‌ها از اجزاء سیتوپلاسم و باکتری کشته شده توسط حرارت بر روی رده‌های سلول سرطانی کولون و سینه جهت آزمایشات خود استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد، اثر ممانعتی بسته به نوع سوش متفاوت می‌باشد، ولی سلول کشته شده توسط حرارت لاکتوباسیلوس ها کاهش در صد زیستایی بین ۷۹/۶-۲۹/۷ را نشان داد. آن‌ها ازمقدار ۵۰۰µg/ml استفاده کردند که در مقایسه حاضر در مطالعه خود این مقدار را به مقادیر مختلف در زمان‌های متفاوت بسط دادیم و در زمان ۷۲ ساعت

بهترین نتیجه یعنی حدود ۲۳/۷۵ درصد زیستایی حاصل شد (۲۶).

با توجه به اینکه اثرات ضد تکثیری و ضد سرطانی باکتری‌های پروبیوتیک وابسته به جنس و سویه می‌باشد، به نظر می‌رسد استفاده از باکتری‌های بومی که با فلور دستگاه گوارشی افراد سازگاری بیشتری دارند و با انجام آزمایشات تکمیلی، نتایج مطلوبتری در بکارگیری از این باکتری‌های بومی به عنوان یک مهارکننده رشد سلول‌های سرطانی در جامعه ایرانی خواهند داشت. با توجه مطالعات و نتایج فوق نشان داده می‌شود که بررسی در زمینه باکتری‌های پروبیوتیک کشته شده توسط حرارت نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد تا بتوان از آن‌ها به عنوان دارویی مکمل که دارای ایمنی بالا و ثبات بیشتری نسبت به انواع زنده آن‌هاست استفاده نمود.

با توجه به میزان درصد بقاء سلولی در رده سلولی HEK-293 با میزان مشابه غلظت و زمان اثر باکتری کشته شده توسط حرارت بر روی رده سلولی HT-29 به نظر می‌رسد که *لاکتوباسیلوس برویس* (TD4) کشته شده توسط حرارت که باکتری بومی منطقه ایران بوده و با فلور دستگاه گوارش مردم کشورمان سازگاری بالایی دارد، اثر سمیت کمتری بر روی سلول‌های نرمال HEK-293 در مقایسه با رده سلولی HT-29 به عنوان سلول سرطانی دارد که این خود می‌تواند نشان دهنده تفاوت اثر این باکتری بین سلول‌های نرمال و سرطانی بوده و این تفاوت می‌تواند به عنوان یک نکته مثبت جهت کنترل و درمان سرطان کاربرد داشته باشد؛ زیرا یکی از مسائل مهم جهت مصرف داروهای ضد سرطان، توانایی آن دارو در سرکوب سلول سرطانی و کمترین اثر سمی بر روی سلول‌های نرمال می‌باشد. از انجاییکه این باکتری دارای سازگاری بالا با فلور دستگاه گوارش مردم کشورمان است با بهینه سازی و غنی سازی محصولات خوراکی می‌توان گام‌های موثری در پیشگیری و درمان سرطان روده برداشت.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات همکاران محترم در آزمایشگاه شرکت تک ژن قدردانی می‌شود.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Sevda ER, Kopara AT, Kivance M. Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells. Turk J Biol. 2015; 39(1): 23-30.
2. Lilly DM, Still Well RH. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. Science. 1965;147(3659):747-8.
3. Parker RB. Probiotics, the other half of the antibiotic story. Anim Nutr Health 1974; 29: 4-8.
4. Scherezenmeir J, De Verse M. Probiotics, and synbiotics-approaching a definition. Am J Clin Nutr. 2001; 73(2 Suppl): 361S-64S.
5. Kitano H. Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy. Nat Rev Cancer. 2004; 4(3): 227-37.
6. McCormick F. Cancer Gene Therapy: Fringe or cutting edge? Nat Rev Cancer. 2001; 1(2):130- 41.
7. Fakheri H, Janbabai G, Bari Z, Eshqi F. The epidemiologic clinical and pathologic characteristics of colorectal cancers from 1999 to 2007 in Sari, Iran. J Mazandaran Univ Med Sci. 2008; 18(67): 58-66.
8. Mahmoudi Aslzadeh H, Fazeli M, Eaidi A, Samadi N, Jamalifar H, Parsaseresht L. Study of probiotic effect of Bifidobacterium bifidum on CacoII cancer cell line. Iran J Bio. 2013; 26(3):378-85.
9. Kim JY, Woo HJ, Kim YS, Kim KH, Lee HJ. Cell cycle dysregulation induced by cytoplasm of Lactococcus lactis ssp. lactis in SNUC2A, a colon cancer cell line. Nutr Cancer. 2003;46(2):197-201.
10. Manjunath N, Ranganathan B. A cytotoxic substance produced by a wild culture of Lactobacillus casei D-34 against tumor cells. Indian J Exp Biol. 1989; 27(2): 141–145.
11. Tajabady Ebrahimi M, Bahrami H, Ziary Z.Tarkhineh source of probiotic lactic acid bacteria. Iran Quart J Biol Sci. 2011; 4(12): 1-9.

12. Srivastava S, Singh V, Kumar V, Verma PC, Srivastava R, Basu V, Gupta V, Rawat AK. Identification of regulatory elements in 16S rRNA ge ne of Acinetobacter species isolated from water samp le. Bioinformation. 2008;3(4):173-6.

13. Moghimi-Dehkordi B, Safaee A, Zali MR. Prognostic factors in 1,138 Iranian colorectal cancer patients. Int J colorectal Dis. 2008; 23(7): 683-8.

14. Daniluk U. Probiotics, the New Approach for Cancer Prevention and/or Potentialization of Anti-cancer Treatment. J clin Exp Oncol. 2012; 1: 2.

15. Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability. J Genes Nutr. 2011; 6(3):261–74.

16. Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S, Kim SH. Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. Lett Appli Microbiol. 2006; 42(5):452-58.

17. Sadeghi-aliabadi H , Mohammadi F , Fazeli H , Mirlohi M. Effects of Lactobacillus plantarum A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. Iran J Basic Med Sci. 2014; 17(10):815-19.

18. Kim Y, Oh S, Yun HS, Oh S, Kim SH. Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. Lett Appli Microbiol. 2010; 51(2):123-30.

19. Ku S, You HJ, Ji GE. Enhancement of Anti-tumorigenic Polysaccharide Production, Adhesion, and Branch Formation of Bifidobacterium bifidum BGN4 by Phytic Acid. Food Sci Biotechnol. 2009; 18(3):1-6.

20. Altonsy MO, Andrews SC, Tuohy KM. Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells (Caco-2) by Atopobium, and commensal, probiotic and enteropathogenic bacteria: mediation by the mitochondrial pathway. Int J Food Microbiol. 2010; 137(2-3): 190-203.

21. Baldwin C, Millette M, Oth D, Ruiz MT, Luquet FM, Lacroix M. Probiotic Lactobacillus acidophilus and L. casei mix sensitize colorectal tumoral cells to 5-fluorouracil-induced apoptosis. Nutr Cancer J. 2010; 62(3): 371-78.

22. Bonyadi F, Tukmechi A, Mohebalian H, Urmia I. An overview of probiotics and their role in cancer management.J Mazand Univ Med Sci. 2014; 24 (112): 128-40.

23. Chiu YH, Hsieh YJ, Liao KW, Peng KC. Preferential promotion of apoptosis of monocytes by Lactobacillus casei rhamnosus soluble factors. Clin Nutr J. 2010; 29(1): 131-40.

24. Mehrabian S, Tajabadi Ebrahimi M, AbbasAhmadi M, Bahrami H. Study of antimutagenic and anticancer effect of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh by Ames Test. J Arak Univ Med Sci. 2012; 15(7): 72-9.

25. Kabiri F, Nejati V, Tukmechi A, Delirezh N, Nikbakhsh P. Inhibitiory properties of cytoplasmic extract of Lactobacilli isolated from common carp intestine on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: an in vitro study. Tehran Univ Med J. 2011; 68(12): 691-98.

26. Liu C, Pan T. In Vitro Effects of Lactic Acid Bacteria on Cancer Cell Viability and Antioxidant Activity. Drug Analysis J. 2010;18(2):77-86.