

The Effect of *Lactobacillus brevis* on Apoptosis and *casp* (*casp8*, *casp3*) Gene Expression in HeLa Cancer Cells

Neda Chobdar¹, Changiz Ahmadizadeh^{1*}

1. Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

doi [10.30699/ijmm.14.1.84](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.1.84)



ABSTRACT

Background: Cervical and breast cancer are considered to be the most common cause of death among Iranian women. Various studies have shown that probiotics are effective fighting cancer. The aim of the present study was to investigate the effect of *Lactobacillus brevis* on apoptosis and *casp* (*casp3*, *casp8*) gene expression in HeLa cancer cells.

Materials & Methods: In this study, *L. brevis* bacteria were collected from the vaginal fluid of females referred to Alzahra Hospital and isolated and cultured in MRS agar medium. Inhibition of HeLa cancer cell proliferation by bacteria was evaluated by MTT assay. Apoptosis of cancer cells was measured by fluorescent microscopy using DAPI method. Finally, expression of *Caspase* and *akt* genes was measured by Real time PCR.

Results: The results indicated that *L. brevis* had the same effect on HeLa cancer cells ($P=0.42$, $P=0.26$). On the other hand, there was no significant increase in *akt* gene expression ($p > 0.05$).

Conclusion: *Lactobacillus brevis* bacteria can be considered biologically safe for the development of a novel, high-impact, low-throughput therapeutic strategy. On the other hand, side-by-side treatment and prevention against cancer will be cost-effective.

Keywords: *Lactobacillus brevis*, Caspase, Cancer, HeLa cells

Received: 2019/12/16; Accepted: 2020/02/14; Published Online: 2020/03/24

Corresponding Information: Changiz Ahmadizadeh, Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
Email: dr_ahmadizadeh@yahoo.com



Copyright © 2020, 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



Chobdar N, Ahmadizadeh C. The effect of *Lactobacillus brevis* on Apoptosis and *casp* (*casp8*, *casp3*) gene Expression in HeLa Cancer Cells. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (1) :84-100

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

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

Introduction

The most common malignancy of cancer in women is cervical cancer, which is the third most common cancer of the genital tract after breast cancer (1). HeLa is a type of immortalized cell line used in scientific research as the oldest and most common category (3). This cancer is caused by the irregular growth of the cervical epithelial cells and the continuous loss of cells worldwide. The most important factor is Human papillomavirus (HPV). For cancer research studies, HeLa cancer cells are used, the advantages of which include the ability to proliferate indefinitely and

endure long passages (5). Various studies have shown that probiotics have an effective role in the fight against cancer. Their anticancer mechanisms include suppressing mutations, inhibiting cancer-causing compounds and tumors, and strengthening the immune system. In 6% of cases, HPV infection is the major factor that can be prevented using probiotics (6). The anticancer effects of probiotics are by preventing the conversion of procarcinogen to carcinogen, binding and inactivating mitogenic compounds, reducing the growth of pro-carcinogenic

bacteria, reducing mitogen uptake and enhancing immune function (7). One of the functional mechanisms of probiotics, including *Lactobacillus*, is the induction of anti-cancer apoptosis (8). Apoptosis, which occurs in response to various stressors such as physiological, pathological or cytological stimuli in the body (9), plays an effective role in controlling the physiology of the body and many pathological conditions. Resistance to apoptosis is one of the hallmarks of cancer and reduced susceptibility to apoptosis results in increased threshold therapy for classic cases such as chemotherapy and radiotherapy (10).

Most anticancer drugs induce apoptosis through the mitochondrial pathway (12). Caspases are proteases that act as essential initiators and performers of the apoptotic process. Classically, the *caspase 3* cascade is most likely initiated by autoproteolysis by breaking the so-called initiator caspases (2, 8, 9, 10, 12). Initial caspases break down and activate caspases (caspases 3, 6, and 7). This results in an apoptotic process (13).

Importance of Caspase-9 is that it is upstream signaling of *Caspase 3* and is stimulated by 1-Apaf / cytochrome c and is inhibited by the oncogene product Akt (16). Two major pathways for apoptosis have been identified:

1: responds to foreign pathway (death receptor dependent pathway) and internal factors such as DNA damage;

2: Internal pathway (mitochondrial pathway). The external pathway of apoptosis begins through death receptors and leads to activation of *caspase 8*. Activated *caspase 8* can directly activate executable caspases, and activated caspases such as *caspase 3* are subsequently activated by the initiator caspases and trigger the caspase cascade. (17). The aim of this study was to investigate the effect of *Lactobacillus brevis* on apoptosis and *casp8* (*casp8*, *casp3*) gene expression in HeLa cancer cells.

Methods and Materials

In this cross-sectional study, sampling of vagina was performed on women referring to Alzahra Maternity Hospital (Tehran, Iran) from to Eight out of 70 samples were positive for *L. brevis* bacteria which were isolated after MRS agar culture. To maintain the samples at -70°C, a new 12-hour culture of *L. brevis* was prepared in MRS agar culture medium. Then a standard bacterial loop was removed and 25% glycerol was added to MRS broth. After 12 h incubation, the samples were gradually cooled and placed in -70°C freezer.

Bacterial identification in the collected samples began with DNA extraction. DNA was extracted by agarose gel electrophoresis and spectrophotometric methods. PCR was performed on DNA. The primers sequence was designed by oligo5 software for PCR (Table 1).

In this project, HeLa cancer cells were obtained from Pasteur Institute of Iran's Cell Bank. Cells were cultured in flasks containing 5 mL RPMI1640 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), antibiotic penicillin 0.1 µg / µL and streptomycin 0.1 µg / µL.

To determine the viability test, cells were stained with trypan blue. Cell counting was performed. The mean was multiplied by 104 and dilution coefficient and the number of cells was obtained in one milliliter of solution.

Microculture Tetrazolium Test (MTT) and Dapi staining was done. Then the RNA was extracted. Samples were randomly electrophoresed on agarose gel to evaluate the quality of the extracted RNAs. For this purpose, 2% gel was made and then the samples were electrophoresed at 80 V for 1 hour.

RNA was extracted from cDNA to measure gene expression changes by real-time PCR. The primers used were designed by oligo 5 software and then blasted by the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

The collected data were analyzed using SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA).

Results

The aim of this study was to investigate the mechanism of *L. brevis* as probiotic inhibitory effect on HeLa cervical cancer cells and its effect on expression of *casp8*, *casp3* and *ak1* genes. The results of the relevant tests were as follows:

Toxicity of Isolated Bacteria on HeLa Cancer Cell

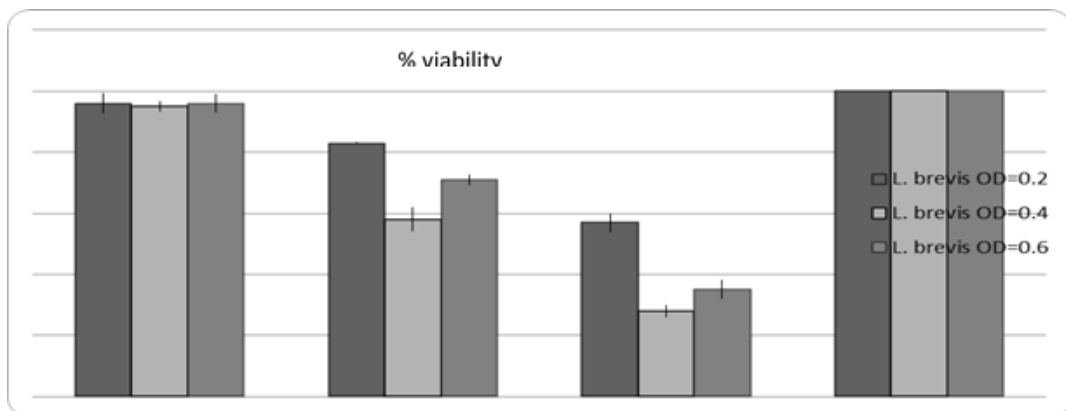
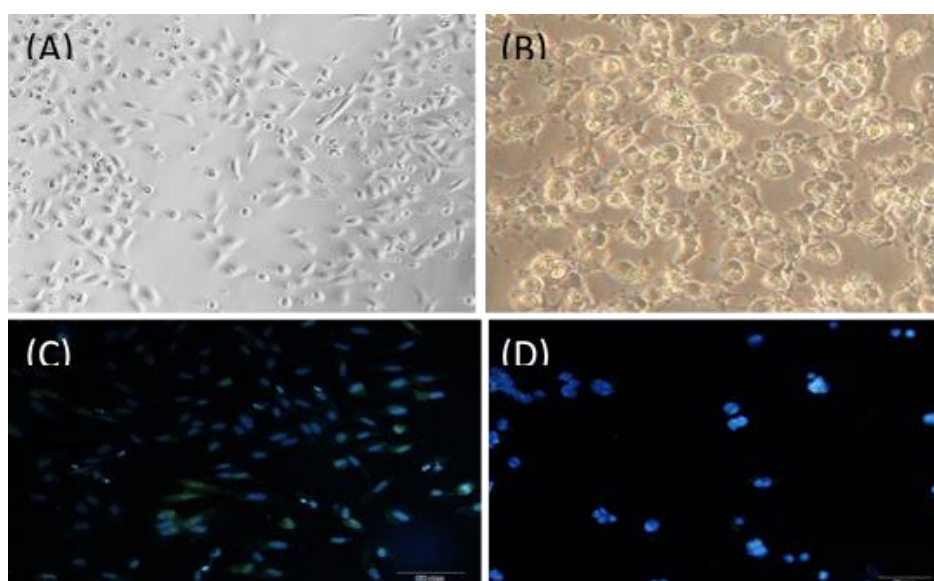
In order to evaluate the toxicity of *Lactobacilli* bacteria on HeLa cells, the number of cells needed for the experiment were optimized first, and then cultured in 10,000 wells per 96 well plate. When the number of cells was doubled, the bacteria were cultured with increasing concentrations and then treated for 24, 48 and 72 hours. After 4 h no effect was observed but in the 12 h of treatment, *Lactobacillus* bacteria were observed. During 48 hours of incubation, results were greater than IC50. The results of MTT are shown in Figure 1.

Table 1. Sequences of primers used to identify *Lactobacillus brevis* bacteria

Gene	(5'-3')	Product size
16s rRNA	F: GAACGCGAAGAACCCTTAC	1500 bp
	R: GCGTGTGTACAAGACCC	

Table 2. Characteristics of primers used

Primer's name		Primer Sequence
<i>CASP3</i>	Forward	5-TACCCTGAAATG GGCTTGTGT -3'
	Reverse	5' - GTTAACACGAGTGAGGATGTG - 3'
<i>AKT1</i>	Forward	5'-TGCCACACGCTTACTGAGA-3'
	Reverse	5'-CAAGTAGTCCAGGGCGGACA-3'
<i>Casp8</i>	Forward	5' - - CCCAAGAGGAACAGCGATAAG -3'
	Reverse	5' - GGTCGATGGTGGTGTCAAAG -3'
<i>GAPDH</i>	Forward	5 -CGGTGGATCCCCTTTATTG-3
	Revers	5-CTAACCAGGAATTCCGATG-3

**Figure 1.** The effect of different time treatments on *Lactobacillus brevis* Culture.**Figure 2.** Staining of cells treated with DAPI staining

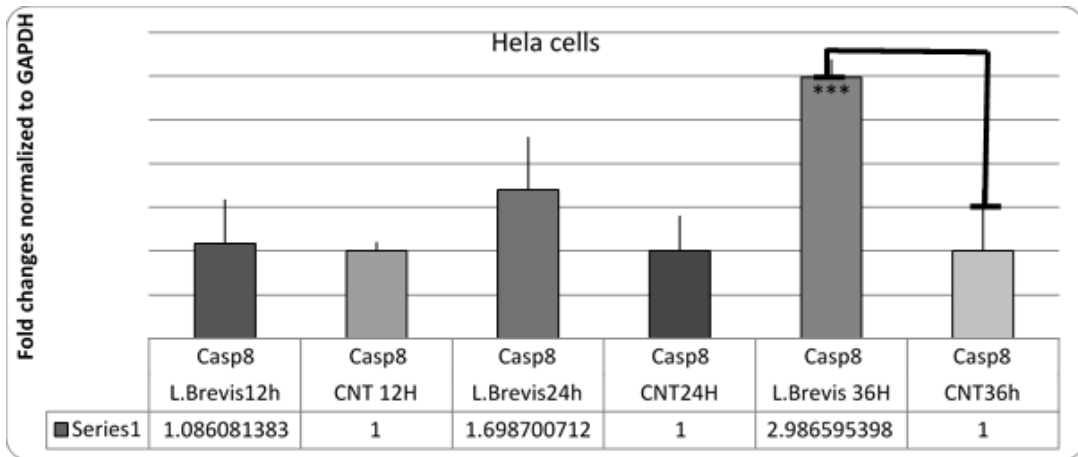


Figure 3. Diagram of changes in Casp8 gene expression in HeLa cells affected by *L. brevis*. ***; (P = 0.42)

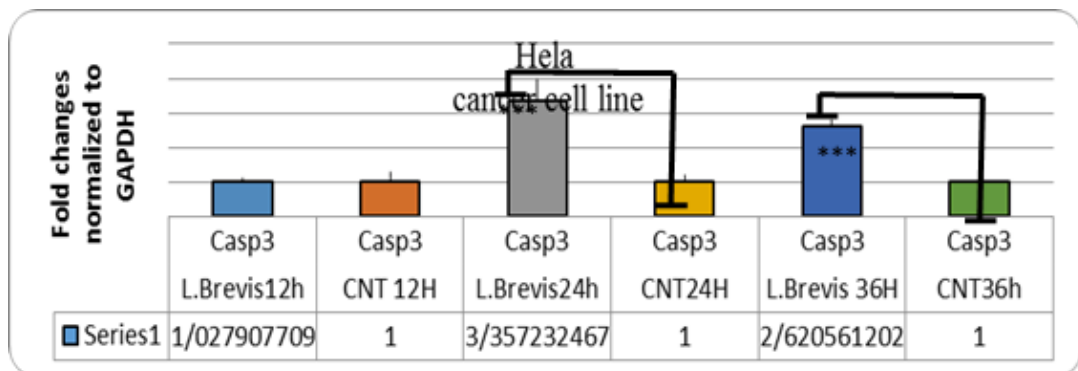


Figure 4. Graph of expression of CASP3 gene in HELA cells affected by *L. brevis*.

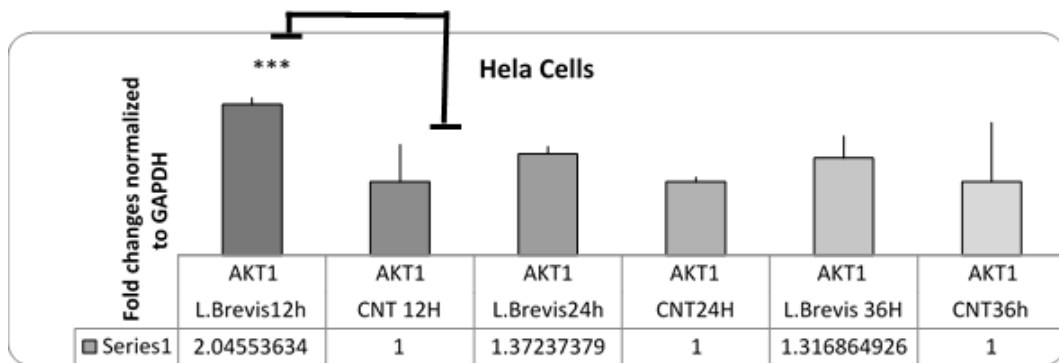


Figure 5. Chart of changes in *akt1* gene expression in HeLa cells affected by *L. brevis* (P = 0.42). The *akt1* gene had increased expression in the early hours due to the resistance of the cancer to apoptosis.

DAPI staining

The results of DAPI staining to evaluate apoptosis from different treatments are as follows (Figure 2). Treated cells compared to non-treated cells (with killed bacteria) entered apoptosis and smaller nuclei have formed.

To evaluate gene expression changes, HeLa cells were affected by IC50 concentration of lactobacillus

bacteria obtained in MTT assay. RNA was then extracted from these cells.

HELA cells were treated with IC50 concentrations of lactobacillus isolates for 12, 24 and 36 hours, respectively. P-value<0.05 was considered significant.

In addition, in order to ensure the apoptosis of the cells upstream of the *caspase 3* gene, caspase 3 was also investigated. There was a significant increase in this gene. The *akt1* gene had increased expression in

the early hours due to the resistance of the cancer to apoptosis.

Since *akt1* gene plays an important role in the biology of cervical cancer, it has also been evaluated with regard to its anti-apoptotic effect to make it more reliable. As shown in the Figure 5, the *akt* gene did not increase significantly at 24 and 36 h, and the cells would be allowed to initiate apoptosis.

Discussion

The main feature of cancer cells is uncontrolled cell proliferation. It also provides resistance to programmed death, so a factor that induces apoptosis in cancer cells can be recognized as an anticancer drug (20). There are also foods that can have a positive impact on the control of cancer cell growth. Therefore, dietary compounds and their role in human health have attracted the attention of many scientists.

Probiotics are some of the non-pathogenic organisms in the food that are present in the digestive system. These microorganisms also have beneficial effects on the health of the host. Certain probiotics have been reported to have anticancer activities (21). The results of tests on HeLa cell line and examination of genes involved in apoptosis of these cells showed that *Lactobacillus brevis* has the ability to inhibit the growth of HeLa cancer cells. Extract of this bacterium increased casp8 and casp3 gene expression at 24h and 36h ($P > 0.05$). However, no significant increase in *akt1* gene expression was observed. Since caspase gene is a pro-apoptotic protein, apoptosis of cells was predicted by treatment with bacterial extract. Also, apoptosis of cancer cells by treatment of these bacteria with DAPI staining showed the antibiotic effect of the isolated probiotic.

Various studies on probiotics have shown that probiotics are living microorganisms that have a positive effect on improving the pathogenicity of the host and balance the number of microorganisms in the gut and strengthen the immune system. Probiotics play an important role in improving health. In the absence of these bacteria, the balance of the intestinal flora becomes disrupted and disease and inflammation occur (22).

Research has also shown that vaginal lactobacilli are not only effective in preventing bacterial and fungal infections, but also in controlling and preventing viral and cancer infections. According to these results, enhancing and preserving the microbial flora of vaginal *Lactobacillus* is one of the most important and low cost methods of cancer prevention. *Lactobacillus* family bacteria are commonly found as probiotics in yogurt and other dairy products. The regulating and stimulating properties of these bacteria on the host

immune system have been well documented in other studies (23).

The results of tests performed on HeLa cell line and cell treatments and the study of genes involved in apoptosis in this study showed that the expression of caspase gene that was changed after treatment with *Lactobacillus* extract. Further studies have been done on this probiotic bacterium and its anticancer properties that have proven the nutritional value of this probiotic. Cancer cells divide through a series of regulated processes, and the remainder of their cells are absorbed by adjacent tissues and immune cells. Numerous studies have shown that probiotic bacteria can play an important role in regulating apoptosis through internal and external pathways that have potential mechanisms for cancer prevention. This is consistent with the present study (24).

Investigating the influence of *Lactobacillus brevis* on gastric gastritis healing caused by *Helicobacter pylori* mouse model Orcid *et al.*, (2018) showed that inflammation and remission were reduced in groups infected with *L. brevis* infection. The eradication rate of *H. pylori* infection in the treatment group showed a decrease in inflammation after histological examination. The results of the Orcid *et al.* study are consistent with our study (25).

Recent studies have confirmed the presence of caspases and *AKT* signaling pathway in cervical cancer cell and cancer cell death. As a result of this study, *Akt1*, a major mediator of the signaling pathway, which induces cancer cell survival, inhibits apoptosis of cancer cells, and drugs and therapies that inhibit *AKT* signaling pathway induce apoptosis of cancer cells. This is also consistent with our study (27). Studies have shown that *AKT* is activated by a number of growth factors through the RAS, PI3 signaling pathway. *AKT* has been reported as a result of activation of cervical cancer. In high grade cervical cancers, gene is highly active. In another study, of the 44 cervical cancer samples, 33 reported active *AKT*. This finding suggests that activation of *AKT* is a common process in cervical cancer. The *AKT* pathway is an important target for the study of cervical cancer. The findings of this study are consistent with our study (28).

The issue that active form of caspase-9, cleaves procaspase 3 and induces *caspase 3* activation may be important in apoptosis. In line with the importance of these two caspases in apoptosis, Sanguinarine increases *caspase 3* and 9 treatment about 6 to 7-fold. In fact, these caspases are activated in human colon HT-29 cells, indicating that Sanguinarine induces apoptosis by a caspase-dependent pathway in this cell line (29). In a study in 2015, Jafari *et al.* it was reported that *caspase 3* is a key regulator of apoptosis and is associated with the incidence of apoptosis in breast cancer. Therefore, it can be considered as an

important marker for predicting response or resistance to therapeutic drugs (chemotherapy). The results of their study are consistent with our study (30). Concerning gastric cancer, it has also been reported that *caspase 3* expression levels in gastric tissue of gastric cancer patients are lower than in normal gastric mucosa (31).

Conclusion

Lactobacillus brevis can be biologically safe for the development of a novel, high-impact, low side-effect therapeutic strategy. On the other hand, side-by-side

treatment and prevention against cancer will be cost-effective.

Acknowledgement

I would like to sincerely thank the Vice-Chancellor for Education and Research of the Islamic Azad University of Ahar Branch. I would like to thank all those who helped me during this research. It is worth noting that this article is the result of a thesis by Ms. Neda Chobdar at Islamic Azad University, Ahar branch, Iran.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



تأثیر لاکتوباسیل برویس بر آپوپتوز و بیان ژن‌های کاسپاز (*casp3*, *casp8*) در سلول‌های سرطانی HeLa

ندا چوبدار^۱، چنگیز احمدی زاده^{۱*}

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: براساس سرشماری‌های صورت گرفته سرطان رحم و پستان شایع‌ترین نوع بیماری و عامل مرگ و میر در میان زنان ایرانی به شمار می‌رود. مطالعات مختلف نشان داده است که پروبیوتیک‌ها نقش مؤثری در مقابله با سرطان دارند. هدف از مطالعه حاضر مطالعه تأثیر لاکتوباسیل برویس بر آپوپتوز و بیان ژن‌های کاسپاز (*casp3*, *casp8*) در سلول‌های سرطانی HeLa می‌باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه باکتری لاکتوباسیل برویس از مایع واژینال خانم‌های مراجعه کننده به بیمارستان الزهرا جمع آوری شد و با کشت در محیط MRS آگار جداسازی و تعیین هویت شدند. مهار تکثیر سلول‌های سرطانی HeLa توسط باکتری‌ها با استفاده از روش MTT بررسی شد. همچنین با استفاده از روش DAPI آپوپتوز سلول‌های سرطانی با میکروسکوپ فلورسنت مورد سنجش قرار گرفت. در نهایت میزان بیان ژن‌های کاسپاز وژن *AKT* با استفاده از روش Real time PCR سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده حاکی از اثرمهار لاکتوباسیلوس برویس بر سلول‌های سرطانی HeLa بوده است و بیان ژن *CASP3* و *CASP8* در ساعت ۱۲، ۲۴ و ۳۶ پس از تیمار با عصاره کشته شده باکتری افزایش معنی‌داری پیدا نموده است. $P \text{ value} = 0/26$ و $P \text{ value} = 0/42$ از طرفی افزایش معنی‌داری در بیان ژن *AKT* در این ساعت‌ها مشاهده نشده است ($p > 0/05$).

نتیجه‌گیری: از باکتری‌های لاکتوباسیلوس برویس می‌توان جهت ایجاد یک راهکار نوین درمانی با تأثیر بالا، عوارض جانبی پایین، مصون از نظر بیولوژیکی دانست. از طرفی درمان جانبی و پیشگیری بر علیه سرطان مقرون به صرفه خواهد بود.

کلید واژه‌ها: لاکتوباسیل برویس، کاسپاز، سرطان، سلول‌های HeLa

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۲۵

پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۵

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۱/۰۵

موضوع:

میکروبیولوژی، مواد غذایی

نویسنده مسئول:

چنگیز احمدی زاده، گروه میکروبیولوژی،

واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

ایمیل:

dr_ahmadizadeh@yahoo.com

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

مقدمه

HeLa رده‌ای از سلول‌های سرطانی دهانه رحم انسانی است که در سال ۱۹۵۱ جدا شد و اکنون در بسیاری از مطالعات بر روی سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). این سرطان در جهان از رشد فزاینده و نامنظم سلول‌های اپی‌تلیالی دهانه رحم و ریزش مداوم سلول‌ها ایجاد می‌شود و مهم‌ترین عامل آن، ویروس پاپیلوما انسانی است، جهت مطالعات تحقیقاتی در زمینه سرطان، از سلول‌های سرطانی HeLa استفاده می‌شود که از مزیت‌های آن می‌توان به توانایی تکثیر نامحدود و تحمل پاساژهای طولانی اشاره کرد (۵). امروزه میکروارگانیسم‌های زنده‌ای شناخته شده‌اند که با مطالعات صورت گرفته اثر مثبت سلامت‌بخش آن در

شایع‌ترین بدخیمی سرطان در زنان، سرطان دهانه رحم است که بعد از سرطان پستان سومین سرطان شایع دستگاه تناسلی است (۱). سرطان دهانه رحم، گونه‌ای از سرطان است که از گردن رحم آغاز و بیشتر به شکل کارسینوم سلول سنگ‌فرشی مشاهده می‌شود. این سرطان در ابتدا، معمولاً نشانه‌ای ندارد، ولی علائم بعدی آن می‌تواند به صورت خونریزی واژنی و درد لگن یا فعالیت زناشویی دردناک بروز کند (۲). HeLa یک نوع رده سلولی فناپذیر مورد استفاده در تحقیقات علمی است که به عنوان قدیمی‌ترین و شایع‌ترین رده شناخته شده است (۳). سلول‌های

باقی می ماند. کاسپاز-۳ فعال شده، مهارکننده DNase (فعال کننده کاسپاز) را می شکند و به مرگ سلولی منجر می شود (۱۴). کمبود و تنظیم کاهشی کاسپاز-۳ با کارسینوژن پستان همراه است که نشان می دهد کاسپاز-۳ می تواند یک بیومارکر در پیشگیری و درمان سرطان باشد. در این راستا نشان داده شده است که کاسپاز-۳ عملکردی، برای رادیوتراپی و شیمی درمانی مؤثر و ضروری است (۱۵). اهمیت کاسپاز-۹ از این نظر است که پیام رسانی بالادست کاسپاز-۳ است و به وسیله Apaf/۱-سیتوکروم c تحریک و توسط فرآورده انکوژن akt مهار می شود (۱۶). دو مسیر اصلی برای آپاپتوز شناسایی شده است:

۱: مسیر خارجی (مسیر وابسته به گیرنده مرگ) و عوامل داخلی از قبیل آسیب DNA پاسخ می دهد؛

۲: مسیر داخلی (مسیر میتوکندریایی). مسیر خارجی آپاپتوز از طریق گیرنده های مرگ آغاز گردیده و منجر به فعال شدن کاسپاز ۸ می شود. کاسپاز ۸ فعال شده می تواند به طور مستقیم کاسپازهای اجرایی را فعال کند و کاسپازهای اجرایی مانند کاسپاز ۳ در مراحل بعدی و توسط کاسپازهای آغازگر فعال می شوند و آبشار کاسپازی را به راه می اندازند. (۱۷). هدف از این مطالعه بررسی اثر تأثیر لاکتوباسیل برویس بر آپاپتوز و بیان ژن های کاسپاز (*casp3*, *casp8*) در سلول های سرطانی HeLa بوده است.

مواد و روش ها

نمونه گیری و نگهداری

در این مطالعه مقطعی، نمونه گیری از واژن زنانی که طی دوره ۶ ماهه به بیمارستان زنان و زایمان الزهرا مراجعه کرده بودند، انجام شد. نمونه گیری از نمونه ها به وسیله تست های استاندارد میکروبیولوژی و مولکولی برای شناسایی وجود لاکتوباسیلوس برویس، ارزیابی شدند. از ۷۰ نمونه که به صورت تصادفی جمع آوری شده بود، ۸ نمونه از نظر باکتری لاکتوباسیلوس برویس مثبت گزارش و بعد از کشت در محیط MRS آگار جداسازی شدند. برای نگهداری نمونه ها در دمای -۷۰ درجه، ابتدا یک کشت تازه ۱۲ ساعته لاکتوباسیلوس برویس در محیط کشت MRS آگار تهیه شد. سپس یک لوپ استاندارد ار باکتری برداشته شده و به محیط کشت MRS برات ۲۵٪ گلیسرول اضافه شد. نمونه ها بعد از ۱۲ ساعت گرمخانه گذاری، به تدریج سرد شده و در فریزر -۷۰ درجه قرار گرفتند.

انسان به اثبات رسیده است. مطالعات مختلف نشان داده است که پروبیوتیک ها نقش مؤثری در مقابله با سرطان دارند. از جمله مکانیسم های ضد سرطانی آنها شامل سرکوب موتاسیون ها، مهار ترکیب های القاکننده سرطان و تومورها و تقویت سیستم ایمنی بدن است. در ۹۰ درصد موارد این بیماری، عفونت ویروس پاپیلوم انسانی (HPV) عامل اصلی است که پروبیوتیک ها می توانند از آن جلوگیری کنند (۶). اثرات ضد سرطانی پروبیوتیک ها از طریق جلوگیری از تبدیل پروکارسینوژن به کارسینوژن، اتصال و غیر فعال کردن ترکیبات میتوژنی، کاهش رشد باکتری های پروکارسینوژن، کاهش جذب میتوژن ها و افزایش عملکرد سیستم ایمنی می باشد (۷). همچنین یکی از مکانیسم های عملکردی پروبیوتیک ها از جمله لاکتوباسیلوس ها القای آپاپتوز با خاصیت ضد سرطانی است (۸). آپاپتوز که در پاسخ به عوامل تنش زای گوناگون مانند عوامل فیزیولوژیک، پاتولوژیک یا محرک های سیتولوژیک در بدن رخ می دهد (۹)؛ نقش موثری در کنترل فیزیولوژی بدن و بسیاری از شرایط پاتولوژیک ایفا می کند. مقاومت به آپاپتوز از نشانه های سرطان بوده و کاهش حساسیت به آپاپتوز منجر به افزایش آستانه درمانی برای موارد کلاسیک مانند شیمی درمانی و رادیوتراپی می شود (۱۰).

پپتیدهای کشف شده از موجودات دریایی موجب تحریک مرگ سلولی با مکانیسم های مختلفی از جمله آپاپتوز، تأثیر بر توازن توبولین-میکروتوبول، مهار رگزی، ضدتکثیر و سیتوتوکسیک شده است. آپاپتوز شکل تنظیم شده ژنتیکی مرگ سلولی است که نقش مهمی را در حذف سلول های آلوده، آسیب دیده یا سایر سلول های ناخواسته از بدن ایفا می کند. با درک این که نقش در آپاپتوز می تواند در بروز بیماری هایی از قبیل سرطان ایفای نقش کند (۱۱). کاسپازها اجراکنندگان اصلی آپاپتوز هستند. اکثر داروهای ضد سرطان، آپاپتوز را از مسیر میتوکندریایی تحریک می کنند (۱۲). کاسپازها، پروتئازهایی هستند که به عنوان آغاز کننده ها و اجراکننده های ضروری فرآیند آپاپتیک ایفای نقش می کنند. به صورت کلاسیک، آبشار کاسپازی ۳ به وسیله شکستن کاسپازهای به اصطلاح آغازگر (۲، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲) به احتمال زیاد به واسطه اتوپروتئولیز آغاز می شود. کاسپازهای آغازگر، کاسپازهای اجراکننده (کاسپازهای ۳، ۶ و ۷) را شکسته و فعال می کنند. این کار به فرآیند آپاپتوز منجر می شود (۱۳). کاسپاز-۳ یکی از مهمترین پروتئازهای اجراکننده در مسیر شناخته شده آپاپتوز است. کاسپاز-۳ تا زمانی که کاسپازهای آغازگر به وسیله پروتئولیز مستقیم فعالش نکرده اند، به صورت خاموش

شناسایی باکتری به روش زنجیره ای پلیمرز

شناسایی باکتری در نمونه های جمع آوری شده با استخراج DNA آغاز شد. به منظور جداسازی DNA از نمونه ها با روش نمک اشباع (که ضمن حذف پروتئین ها با اتصال به DNA، آن را از

سایر قسمت ها جدا می کنند)، برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز استفاده شد. PCR بر روی DNA ها انجام شد. برای انجام PCR توالی پرایمرها توسط نرم افزار Oligo5 طراحی شد (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی باکتری لاکتوباسیلوس برویس

اندازه محصول	(5'-3')	ژن
۱۵۰۰bp	F: GAACGCGAAGAACCCTTAC	16s rRNA
	R: GCGTGTGTACAAGACCC	

کار با سلول های سرطانی HeLa

در این پروژه سلول های سرطانی HeLa از بانک سلولی انیستیتوی پاستور ایران تهیه شد. سلول ها در داخل فلاسک حاوی ۹۰ سی سی محیط کشت RPMI1640 غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS (Fetal Bovine Serum)، آنتی بیوتیک (penicillin 0.1 µg/µL and streptomycin 0.1 µg/µL) کشت داده شد. بعد از یک شبانه روز با PBS شستشو داده و محیط کشت تازه به آن افزوده و در انکوباتور قرار داده شد، و سلول ها پاساژ داده شدند و سپس با شمارش سلول ها و با توجه به محاسبات مربوط به seeding density مورد نظر برای انجام آزمایشات، مقدار مورد نیاز از سوسپانسیون سلولی توسط محیط کشت کامل به حجم مورد نظر رسانده شد و بعد از بررسی فلاسک مورد نظر توسط میکروسکوپ، در داخل انکوباتور قرار داده شد.

تعیین درصد زنده بودن سلول ها (viability test)

در این مرحله، سلول ها با تریپان بلو رنگ آمیزی شد. ۱۰۰ ماکرولیتر از محلول یکنواخت حاوی سلول ها داخل تیوب ریخته و به مقدار برابر یعنی تریپان بلو افزوده شد. سپس با استفاده از لام نفوبار شمارش سلولی انجام شد. میانگین به دست آمده در ۱۰۴ و ضریب رقت ضرب شده و تعداد سلول ها در یک میلی متر محلول به دست آمد.

تست MTT (Microculture Tetrazolium Test)

تست MTT روش رنگ سنجی برپایه احیا شدن و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی bromide 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium، به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال های آبی است. ابتدا تعداد مناسبی از سلول های HeLa در هریک از چاهک ها کشت داده می شوند. بعد از ۲۴ ساعت چاهک ها کنترل شده و

مقدار مناسبی از باکتری لاکتوباسیل برویس زنده به چاهک ها افزوده می شود. به چاهک ها ۴ نوع OD مختلف باکتری افزوده می شود و پلیت ها به مدت ۲، ۶ ساعت برای تأثیر باکتری ها انکوبه می شوند. OD باکتری ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شده پس از هر زمان انکوباسیون محیط داخل چاهک ها دور ریخته شده و هر خانه با ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT جایگزین می شود. سلول های تیمار نشده با باکتری به عنوان کنترل به کار برده شدند. سپس پلیت ها به مدت ۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در تاریکی انکوبه شدند. پس از آن، محلول MTT با ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به همراه ۲۵ میکرولیتر بافر جایگزین و تراکم نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. زیست پذیری سلولی نسبی به صورت $\frac{\text{نمونه ها } A_{570}}{\text{کنترل } A_{570}} \times 100$ محاسبه گردید. کل آزمایش به صورت سه تکرار انجام شد (۱۹).

رنگ آمیزی سلولی دیپی (Dapi Staining)

رنگ آمیزی (4',6-diamidino-2-phenylindole) DAPI روشی مناسب و سریع برای تشخیص اجسام آپوپتوتیک و به تبع آن تغییرات مورفولوژیک به شمار می رود. برای بررسی مستقیم اثرات لاکتوباسیل بر سلول های HeLa بعد از تیمار همه سلول ها با محیط کاندیشن به مدت ۲۴ ساعت مابع رویی سلول ها را کاملاً خالی کرده و با افزودن ۶۰ ماکرولیتر پارافرمالدهید ۴ درصد به هر چاهک به مدت ۸ دقیقه فیکس کردیم؛ سلول های داخل هر چاهک را با ۶۰ ماکرولیتر PBS، ۳ بار شستشو دادیم. سپس سلول های داخل هر چاهک با ۶۰ ماکرولیتر محلول نفوذپذیرکننده Triton x-100 نفوذپذیر گردید. سپس سلول ها را با PBS شستشو داده و داخل سلول های هر چاهک ۵۰ ماکرولیتر رنگ (4,6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOLE) ریخته و انکوبه کرده، دوباره ۳ بار

ابتدا ژل ۲ درصد ساخته سپس نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ V الکتروفورز شد.

سنتز cDNA

برای اندازه‌گیری میزان تغییرات بیان ژن به روش PCR Real-time می‌بایست از روی نمونه RNA استخراج شده cDNA سنتز شود. RNA توسط آنزیم رونوشت‌بردار معکوس به cDNA تبدیل می‌شود. برای این منظور از آنزیم M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher, U.S) استفاده شد.

پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR

پرایمر مورد استفاده توسط نرم افزار 5 oligo طراحی شد و سپس توسط وب سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST شدند و توسط شرکت تکاپوزیست سنتز گردید.

آنالیز آماری

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) بررسی شدند و تحلیل داده‌ها با آزمون مربع کای و آزمون فیشر با در نظر گرفتن مرز معنی‌داری $P < 0.05$ انجام شد.

با PBS شستشو داده و پلیت‌ها تا قبل از عکس‌برداری، داخل یخچال قرار داده شدند. سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسانت Olympus DP70 camera مجهز به Olympus IX81 invert (Olympus Corp., Tokyo, Japan) ارزیابی شدند.

استخراج RNA از نمونه

به منظور استخراج RNA، ابتدا سلول‌های تیمار شده با باکتری تحت تأثیر بافر ترايزول لیز شدند. لیزات سلولی حاصله به میکروتیوب‌های Dnase/Rnase-free منتقل شدند. سپس کلروفرم به میکروتیوب اضافه و سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد مایع روایی دور ریخته شد و به آن ایزوپروپانول ۷۰ درصد اضافه شد. تیوب‌ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۷۰- نگهداری شده، و سپس تیوب‌ها را به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و در انتها رسوب حاصل در ۲۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل گردید. مقدار RNA استخراج شده به روش نوری و با استفاده از دستگاه NanoDrop (Wilmington, DE, USA) اندازه‌گیری و کیفیت RNA حاصله با روش الکتروفورز روی ژل ارزیابی شد. از نمونه RNA بعداً برای سنتز cDNA استفاده شد.

الکتروفورز نمونه

به منظور بررسی کیفیت RNAهای استخراج شده، نمونه‌ها به صورت رندوم بر روی ژل آگارز، الکتروفورز شدند. بدین منظور

جدول ۲. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

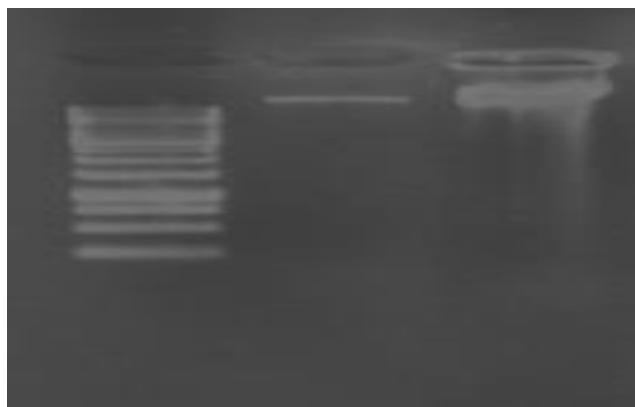
توالی پرایمر	نام پرایمر	
5'-TACCCTGAAATG GGCTTGTGT -3'	Forward	CASP3
5'- GTTAACACGAGTGAGGATGTG - 3'	Reverse	
5'-TGCCACACGCTTACTGAGA-3'	Forward	AKT1
5'-CAAGTAGTCCAGGGCGGACA-3'	Reverse	
5'- CCCAAGAGGAACAGCGATAAG -3'	Forward	Casp8
5'- GGTCGATGGTGGTGTCAAAG -3'	Reverse	
5'-CGGTGGATCCCCTTTATTG-3	Forward	GAPDH
5'-CTAACCAGGAATTCCGATG-3	Reverse	

یافته‌ها

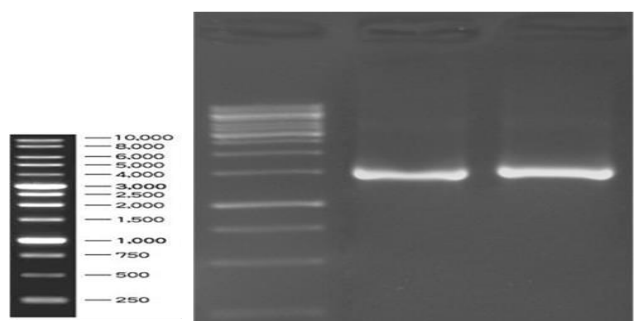
جداسازی و شناسایی باکتری‌های لاکتوباسیلوس

در این مطالعه به منظور بررسی مکانیسم اثر پروبیوتیک *Lactobacillus brevis* بر سلول‌های سرطان دهانه رحم رده سلولی HeLa و تأثیر آن بر بیان ژن‌های *cas3* و *akt1* و *cas8* استخراج و کشت باکتری از نمونه زنان مراجعه کننده به بیمارستان

زنان و زایمان الزهرا انجام شد در نهایت روی سلول‌های سرطان دهانه رحم تأثیر داده شد و بیان ژن‌های مورد نظر بعد از تأثیر عوامل مداخله‌گر بررسی شد که نتایج تست‌های مربوطه به شرح ذیل است:



شکل ۱. DNA استخراج شده برای لاکتوباسیلوس برویس بر روی ژل آگارز ۱ درصد



شکل ۲. الکتروفورز آگارز باکتری‌های لاکتوباسیل جداسازی شده از مایع نمونه‌ها.

رنگ آمیزی DAPI

نتایج رنگ‌آمیزی DAPI جهت بررسی آپوپتوزهای حاصل از تیمارهای مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است. سلول‌های مورد تیمار در مقایسه با سلول‌های بدون تیمار با باکتری کشته شده وارد آپوپتوز شده و هسته‌های ریزتری را تشکیل داده‌اند.

استخراج RNA

به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن‌ها، سلول‌های HeLa تحت تأثیر غلظت IC50 باکتری‌های لاکتوباسیل که در آزمون MTT به دست آمده بود قرار گرفتند. سپس RNA این سلول‌ها استخراج شد.

استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها و الکتروفورز برای DNA

ی استخراجی باکتری‌ها

با استفاده از دستگاه نانو دراپ کمیت و کیفیت DNA مورد ارزیابی قرار گرفت. DNA بیشترین جذب در طول موج ۲۶۰ nm دارد و بیشترین طول موج جذب RNA و پروتئین به ترتیب ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر است و همانطور که در شکل حاصل از نتایج دستگاه نانودراپ نشان داده شده است که همه نمونه‌های DNA استخراجی از کمیت و کیفیت بالا برخوردار بوده و بالاترین پیک جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر بوده است (شکل ۱).

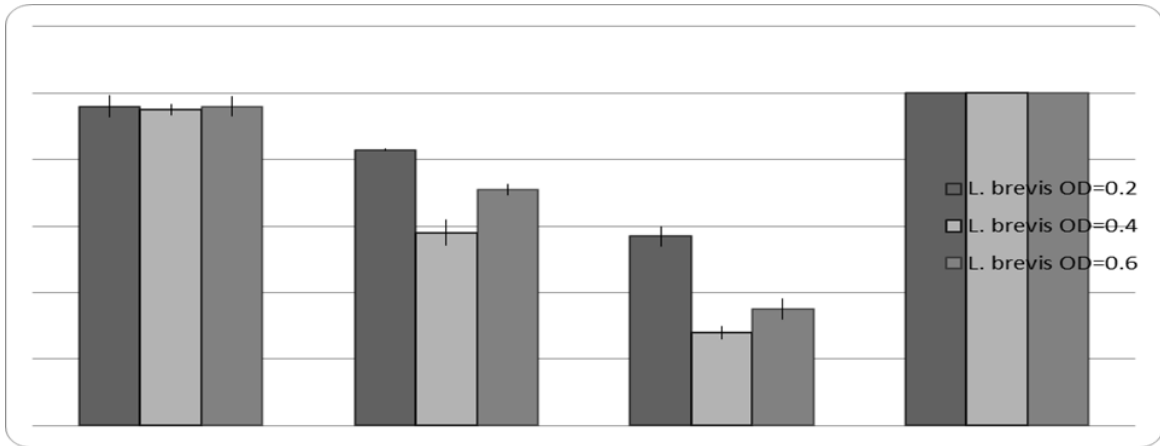
انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ژن 16S rDNA

همانطور که مشاهده می‌شود انتظار بر آن است که پس از انجام PCR، قطعه تکثیر شده، ۱۵۰۰ جفت باز باشد. پس از انجام PCR بر طبق پروتکل پیشنهادی محصول PCR در آگارز دو درصد الکتروفورز شد و نتیجه الکتروفورز به شکل ۲ آورده شده است. باند شارپ نشان دهنده تکثیر اختصاصی برای یکی از نمونه باکتری‌ها بوده است (شکل ۲).

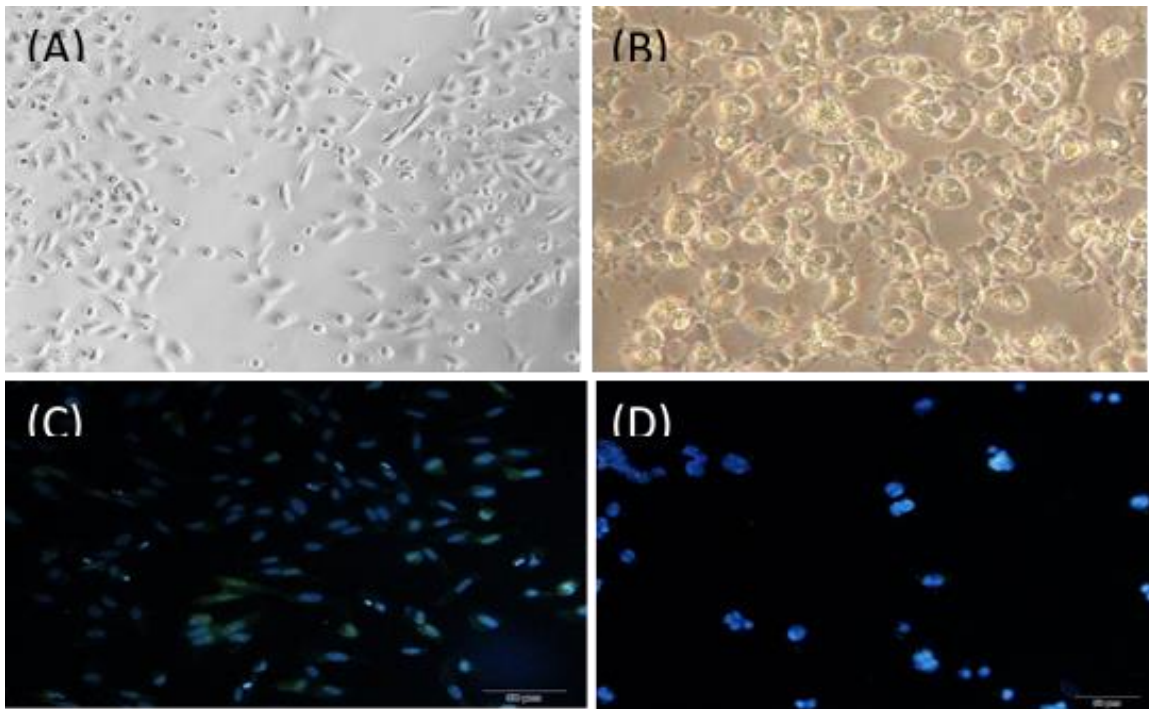
بررسی سمیت باکتری‌های جدا شده بر روی

سلول سرطانی HeLa

به منظور بررسی سمی بودن باکتری‌های لاکتوباسیل بر روی سلول‌های HeLa، ابتدا تعداد سلول‌های مورد نیاز برای آزمایش بهینه‌سازی شد، سلول‌های مذکور به تعداد ۱۰۰۰۰ عدد در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. زمانی که تعداد سلول‌ها ۲ برابر شد، با غلظت‌های افزایشی باکتری‌های کشت داده شده و سپس تیمارها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. بعد از ۴ ساعت هیچ اثری دیده نشد اما در تیمار ۱۲ ساعته باکتری‌های لاکتوباسیل مشاهده شد. طی مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدن، نتایج بیشتر از IC50 حاصل شد. نتایج حاصل از MTT در شکل ۳ نشان داده شده‌اند.

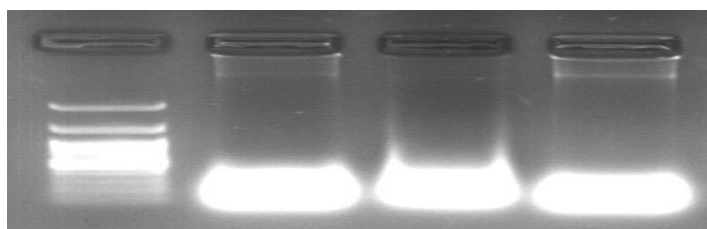


شکل ۳. اثر تیمارهای زمانی مختلف بر کشت لاکتوباسیلوس برویس.

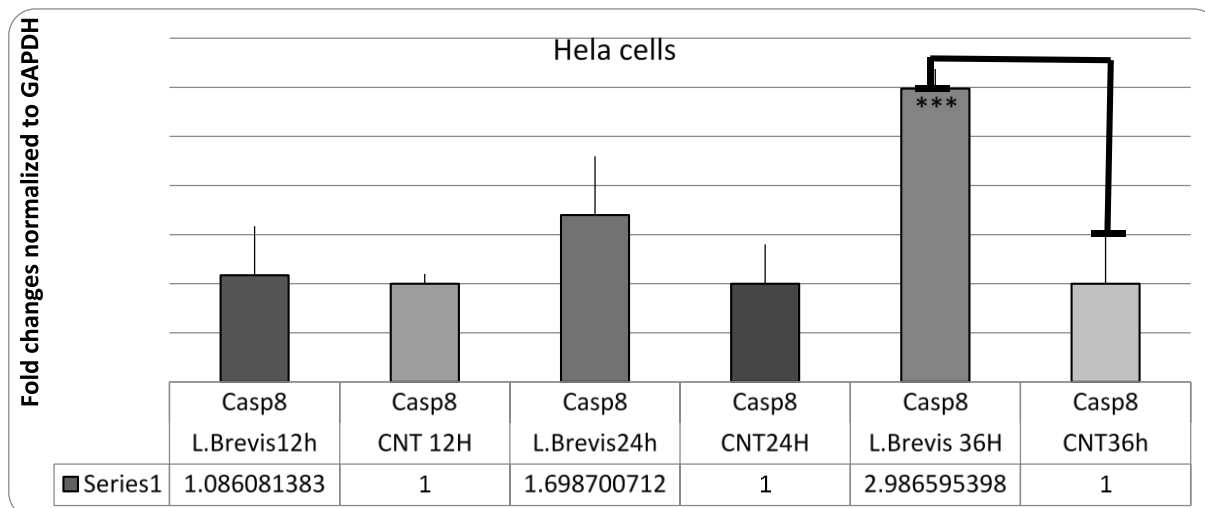


شکل ۴. رنگ آمیزی سلول‌های تیمار شده با رنگ DAPI.

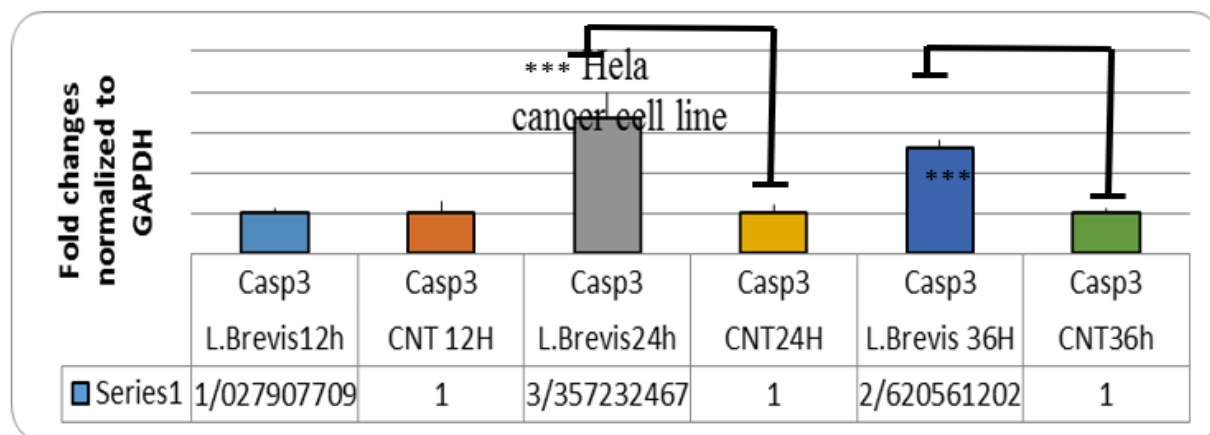
A: سلول‌های سالم زیر میکروسکوپ نوری معمولی. B: سلول‌های آپوپتوز شده زیر میکروسکوپ نوری معمولی. C: هسته سلول‌های سالم رنگ شده با DAPI زیر میکروسکوپ فلورسنت. D: هسته سلول‌های آپوپتوز شده و رنگ شده با DAPI زیر میکروسکوپ فلورسنت که هسته‌های قطعه قطعه شده دارند.



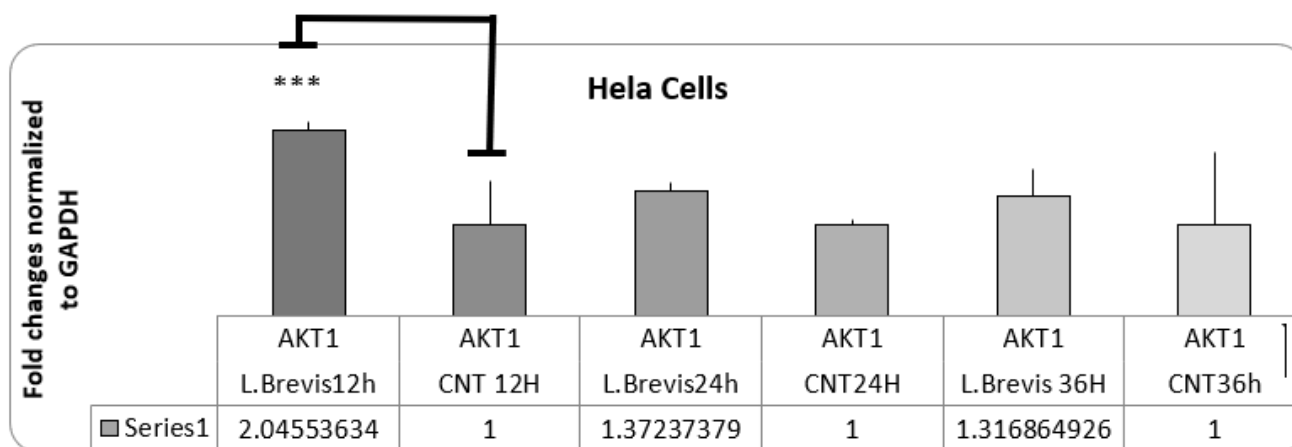
شکل ۵. تصویر ژل الکتروفورز Total RNA استخراج شده از نمونه‌ها.



شکل ۶. نمودار تغییرات میزان بیان ژن *casp8* در سلول‌های HeLa تحت تأثیر باکتری‌های لاکتوباسیل. ***; (P-value = 0.42)



شکل ۷. نمودار میزان بیان ژن *casp3* در سلول‌های HELA تحت تأثیر باکتری‌های لاکتوباسیل. ***; (Pvalue = 0.26)



شکل ۸. نمودار تغییرات میزان بیان ژن *akt* در سلول‌های HeLa تحت تأثیر باکتری‌های لاکتوباسیل. P-value = 0.42. در ساعت اولیه ژن AKT1 به علت مقاومت سرطان به آپوپتوز افزایش بیان داشته است.

همچنین در پژوهش‌هایی که انجام شده بر خلاف تصور رایج، نشان داده شده است که لاکتوباسیل‌های واژینال نه تنها در جلوگیری از بروز عفونت‌های باکتریایی و قارچی بلکه در کنترل و پیشگیری از عفونت‌های ویروسی و سرطان نیز مؤثر هستند. با توجه به این نتایج، تقویت و حفظ فلور میکروبی لاکتوباسیلوس‌های واژن از مهم‌ترین و کم هزینه‌ترین روش‌های پیشگیری از سرطان است. باکتری‌های خانواده لاکتوباسیلوسه به‌طور رایج به‌عنوان پروبیوتیک در ماست و سایر لبنیات یافت می‌شوند. ویژگی‌های تنظیم‌کنندگی و تحریک‌کنندگی این باکتری‌ها بر سیستم ایمنی میزبان به خوبی در مطالعات گذشته مشخص شده است (۲۳).

نتایج تست‌های انجام شده بر روی رده سلولی *HeLa* و تیمارهای سلولی و بررسی ژن‌های دخیل در آپوپتوز در این مطالعه نشان می‌دهد که بیان ژن *کاسپاز ۳* از تیمار با عصاره باکتری لاکتوباسیلوس تغییر یافته است. بنابراین تأثیر عصاره این باکتری پروبیوتیک بر ژن‌های القا کننده آپوپتوز گزارش می‌شود. مطالعات دیگری هم روی این باکتری پروبیوتیک و خواص ضد سرطانی آن انجام گرفته است که ارزش غذایی این پروبیوتیک را به ثابت کرده است.

سلول‌های سرطانی از طریق یک سری از فرآیندهای تنظیم شده، تقسیم می‌شوند و بخش‌های باقی مانده آنها توسط بافت‌های مجاور و سلول‌های ایمنی جذب می‌شوند. مطالعات متعدد نشان داد که باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز از طریق مسیرهای درونی و بیرونی داشته باشند. فعال شدن مسیر آپوپتوز، مکانیسم قوی در کنترل سرطان است (۲۴). این نتایج، با یافته‌های با مطالعه حاضر همخوانی دارد.

در مطالعه Esmaili و همکاران در سال ۲۰۱۲ شناسایی باکتری لاکتوباسیلوس برویس جدا شده از زیتون به روش PCR-RFLP انجام شد. ۲۸ سویه باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده روی محیط MRS کشت داده شد و تست‌های بیوشیمیایی انجام گرفت. نتیجه این بررسی نشان داد که لاکتوباسیلوس برویس که از سویه‌های پروبیوتیک است قابل جداسازی از زیتون ایران است. افزایش باکتری لاکتوباسیلوس برویس می‌تواند ارزش پروبیوتیکی زیتون را افزایش دهد (۲۴). Orcid و همکاران در سال ۲۰۱۸ با بررسی تأثیر لاکتوباسیلوس برویس بر بهبود گاستریت معده ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری مدل موشی نشان دادند که در گروه‌های آلوده به عفونت بعد از درمان با لاکتوباسیلوس برویس کاهش التهاب و بهبودی حاصل شد. میزان ریشه‌کنی عفونت هلیکوباکتر پیلوری در گروه درمانی، بعد از بررسی بافتی، کاهش

با توجه به اینکه ژن *atkl1* نقش بسیار مهمی در بیولوژی سرطان دهانه رحم داشت و نیز با توجه به اثر ضد آپوپتوزی به منظور اطمینان بیشتر این ژن نیز مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل دیده می‌شود ژن *akt* در ساعت‌های ۲۴ و ۳۶ افزایش معنی داری ندارد و به سلول‌ها اجازه داده خواهد شد نسبت به پدیده آپوپتوز اقدام نمایند.

بحث

ویژگی اصلی سلول‌های سرطانی تکثیر غیر قابل کنترل سلولی است. همچنین مقاومت در برابر مرگ برنامه‌ریزی شده نیز ایجاد می‌شود، بنابراین عاملی که باعث بروز آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی شود، می‌تواند به‌عنوان ماده ضد سرطانی شناخته شود (۲۰). همچنین مواد غذایی نیز وجود دارند، که می‌توانند بر روی کنترل رشد سلول‌های سرطانی، تأثیر مثبت داشته باشند. بنابراین ترکیبات غذایی و نقش آن‌ها در سلامت انسان، توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است.

پروبیوتیک‌ها نوعی از ارگانسیم‌های غیر بیماری‌زا در مواد غذایی هستند که در سیستم گوارشی افراد نیز وجود دارند. این میکروارگانسیم‌ها نیز اثرات مفیدی بر سلامت میزبان دارند.

گزارش شده است که پروبیوتیک‌های خاصی دارای فعالیت‌های ضد سرطانی هستند (۲۱). نتایج تست‌های انجام شده روی رده سلولی *HeLa* و بررسی ژن‌های دخیل در آپوپتوز این سلول‌ها نشان داد که باکتری لاکتوباسیلوس برویس توانایی مهار رشد سلول‌های سرطان *HeLa* را دارد. عصاره این باکتری باعث افزایش بیان ژن *casp3* و *casp8* طی ۲۴ ساعت و ۳۶ ساعت می‌شود ($p \text{ value} > 0.05$). این در حالی است که هیچ افزایش معنی داری در بیان ژن *akt1* مشاهده نشد. از آنجایی که ژن *کاسپاز ۳* یک پروتئین پرو آپوپتوتیک است، آپوپتوز سلول‌ها از طریق تیمار با عصاره باکتری پیش‌بینی می‌شد. همچنین آپوپتوز سلول‌های سرطانی با تیمار این باکتری‌ها توسط روش رنگ‌آمیزی DAPI، تأثیر ضد باکتریایی پروبیوتیک جداسازی شده را نشان می‌داد.

مطالعات مختلفی که روی پروبیوتیک‌ها انجام گرفت، نشان داد که پروبیوتیک‌ها میکروارگانسیم‌های زنده‌ای هستند که در بهبود شرایط بیماری‌زایی میزبان اثر مثبت دارند و باعث تعادل تعداد میکروارگانسیم‌ها روده و تقویت سیستم ایمنی بدن می‌شوند. پروبیوتیک‌ها نقش مهمی در بهبود سلامتی دارند. در صورت فقدان این باکتری‌ها، تعادل فلور روده، بهم خورده و بیماری و التهاب ایجاد می‌شود (۲۲).

Lim و همکاران در سال ۲۰۱۴، بیان کردند فعالیت کاسپاز در MCF7 تیمار شده، نشان می دهد که افزایش فعالیت های کاسپاز ۳، ۸ و ۹ در همان غلظت (IC50) می تواند اثبات کند که مسیرهای بیرونی و ذاتی برای فعال شدن کاسپاز ۳ در این غلظت اتفاق افتاده است. آپوپتوز با واسطه کاسپاز می تواند یک مسیر گیرنده مرگ (خارجی) یا مسیر میتوکندری (ذاتی) یا هر دو مسیر را با هم فعال کند (۳۲). Kramer و همکاران در سال ۲۰۰۷ بیان کردند که، Pro-caspase-8 به FASD محدود به Fas متصل می شود و منجر به فعال سازی Caspase-8، و سپس منجر به فعال سازی کاسپاز - ۳ می شود. این آبشار کاسپاز باعث تخریب DNA و در نهایت مرگ سلولی می شود (۳۳). Waida و همکاران در سال ۲۰۰۳، بیان کردند که پروتئین ها با فعال کردن آنزیم هایی مانند کاسپاز - ۸، آبشار آپوپتوز در سلول سرطانی را القاء می کنند (۳۴) Balasubashini و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیان کردند که زهر ماهی ماهی با فعال کردن کاسپاز - ۸ در سلول های HeLa و HEp2 باعث بروز آپوپتوز می شود (۳۵). Giaccone و همکاران در سال ۲۰۰۰ در مطالعه خود پیشنهاد کردند که ICD-85 قادر به القای آپوپتوز وابسته به کاسپاز ۸ در سلول های HeLa است (۳۶).

نتیجه گیری

از باکتری های لاکتوباسیلوس برویس می توان برای ایجاد یک راهکار نوین درمانی با تأثیر بالا، عوارض جانبی پایین، مصون از نظر بیولوژیکی دانست. از طرفی درمان جانبی و پیشگیری علیه سرطان مقرون به صرفه خواهد بود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر صمیمانه سپاسگزاری می شود. از تمامی کسانی که در طول اجرای این پژوهش مرا را یاری کردند تقدیر و تشکر می نمایم. شایان ذکر است که این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد خانم ندا چوبدار از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر است.

تعارض در منافع

در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی نداشته اند.

منابع مالی

منابع مالی این تحقیق توسط، دانشگاه اصفهان تامین شده است.

التهاب را نشان داد. نتایج مطالعه Orcid، با مطالعه ما همخوانی دارد (۲۵). Saber و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مطالعه ای نشان داده اند که *lactobacilli* به کار رفته در محصولات لبنی می تواند پاسخ ایمنی میزبان را تقویت نماید (۲۶).

باتوجه به مطالعات گذشته، وجود کاسپازها و مسیر سیگنالینگ *akt* در سلول سرطانی دهانه رحم و مرگ سلول سرطانی تأیید شده است. در نتیجه این مطالعه، *akt1* واسطه اصلی مسیر سیگنالینگ، که باعث بقای سلول سرطانی می شود از آپوپتوز سلول های سرطانی ممانعت می کند و داروها و درمان هایی که باعث مهار مسیر سیگنالینگ *akt* می شود باعث آپوپتوز سلول های سرطانی می شود. این مورد نیز با مطالعه ما همخوانی دارد (۲۷). در بررسی های صورت گرفته نشان داده شد *akt* توسط تعدادی از فاکتورهای رشد از طریق مسیر سیگنالینگ RAS, PI3 فعال می شود. در نتیجه فعال شدن *akt* در سرطان دهانه رحم گزارش شده است. در سرطان های دهانه رحم با گرید بالا، ژن *akt* بسیار فعال است. در تحقیق دیگر، از ۴۴ نمونه سرطان دهانه رحم ۳۳ مورد افزایش فعال *akt* را گزارش کردند. این یافته نشان می دهد که فعال شدن *akt* یک فرایند رایج در سرطان دهانه رحم است. مسیر *akt* یک هدف مهم برای مطالعه سرطان دهانه رحم است. یافته های این تحقیق با مطالعه ما همخوانی دارد (۲۸).

این مساله که شکل فعال کاسپاز ۹، پروکاسپاز ۳ را می شکند و شکل فعال کاسپاز ۳ را ایجاد می کند، می تواند در آپوپتوز حائز اهمیت باشد. در راستای اهمیت این دو کاسپاز در آپوپتوز، Sanguinarine درمان توسط کاسپازهای ۳ و ۹ را حدود ۶ تا ۷ برابر افزایش می دهد. در واقع این کاسپازها در سلول های HT-29 کولون انسان فعال می شوند که نشان می دهد Sanguinarine آپوپتوز را به وسیله مسیر وابسته به کاسپاز در این رده سلولی تحریک می کند (۲۹). Jafari و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مطالعه ای گزارش کردند که کاسپاز ۳ تنظیم کننده کلیدی آپوپتوز است و با میزان بروز آپوپتوز در سرطان پستان مرتبط است. بنابراین می تواند به عنوان یک مارکر مهم برای پیش بینی پاسخ یا مقاومت به داروهای درمانی (شیمی درمانی) در نظر گرفته شود. نتایج مطالعه آنها با مطالعه ما همخوانی داشت (۳۰). در رابطه با سرطان معده نیز گزارش شده است که سطوح بیان کاسپاز ۳ در بافت معده بیماران مبتلا به سرطان معده در مقایسه با مخاط معده طبیعی پایین تر است (۳۱).

Referance

- Hong S, Cheng S, Songock W, Bodily J, Laimins LA. Suppression of microRNA 424 levels by human papillomaviruses is necessary for differentiation-dependent genome amplification. *J Virol*. 2017; 15;91(24):e01712-1717. [DOI:10.1128/JVI.01712-17] [PMID] [PMCID]
- Roberts CC1, Tadesse AS, Sands J, Halvorsen T, Schofield TL, Dalen A, et al. Detection of HPV in Norwegian cervical biopsy specimens with type-specific PCR and reverse line blot assays. *J Clin Virol*. 2006;36(4):277-282. [DOI:10.1016/j.jcv.2006.03.013] [PMID]
- Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Bio Techniques*. 2009; 46: 277-84. [DOI:10.2144/000113089] [PMID] [PMCID]
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*. 1953; 97:695-710. [DOI:10.1084/jem.97.5.695] [PMID] [PMCID]
- Moore MR1. Opposed to the being of Henrietta: Bio slavery, pop culture and the third life of HeLa cells. *Med Humanit*. 2017;43(1):55-61. [DOI:10.1136/medhum-2016-011072] [PMID]
- Guandalini S, Cernat E, Moscoso D. Probiotics and prebiotics in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in children. *Benef Microbes*. 2015; 6(2): 209-217. [DOI:10.3920/BM2014.0067] [PMID]
- Whelan K. Probiotics and prebiotics in the management of irritable bowel syndrome: a review of recent clinical trials and systematic reviews. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2011 Nov 1;14(6):581-7. [DOI:10.1097/MCO.0b013e32834b8082] [PMID]
- Barrons R, Tassone D. Use of Lactobacillus probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clin Ther*. 2008; 30(3): 453-468. [DOI:10.1016/j.clinthera.2008.03.013] [PMID]
- Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. *J Qazvin Univ MedSci*. 2013;17(3):48-57.
- Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun AM, et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemo resistance. *Oncogene*. 2002;21(57):8843-8851. [DOI:10.1038/sj.onc.1206044] [PMID]
- Glenn K. Venoms to drugs: Translating venom peptides into therapeutics. *Aust Biochem* 2013;44(3):13-16.
- Chien SY1, Wu YC, Chung JG, Yang JS, Lu HF, Tsou MF, et al. Quercetin induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDAMB-231 cells. *Hum Exp Toxicol*. 2009; 28(8): 493-503. [DOI:10.1177/0960327109107002] [PMID]
- Rodríguez-Berriguete G, Galvis L, Fraile B, de Bethencourt FR, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, et al. Immunoreactivity to caspase-3, caspase-7, caspase-8, and caspase-9 forms is frequently lost in human prostate tumors. *Hum Pathol* 2012; 43(2): 229-237. [DOI:10.1016/j.humpath.2011.04.024] [PMID]
- Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Antitumor effect of TAT-oxygen dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 2002; 62(7): 2013-8.
- Yang S, Zhou Q, Yang XC. Caspase-3 status is a determinant of the differential responses to genistein between MDA-MB231 and MCF-7 breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(6): 903-11. [DOI:10.1016/j.bbamcr.2007.03.021] [PMID]
- Li Y, Liu J, Liu X, Xing K, Wang Y, Li F, Yao L. Resveratrol-induced cell inhibition of growth and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells are associated with modulation of phosphorylated Akt and caspase-9. *Appl Biochem Biotechnol*. 2006; 135(3): 181-192. [DOI:10.1385/ABAB:135:3:181]
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y, Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol* 2006; 208: 319-326. [DOI:10.1002/path.1885] [PMID]
- Ferchichi, M., Valcheva, R., Vost, H., Onno, B. and Dousset, X. Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology* 2007; 24: 678-686. [DOI:10.1016/j.fm.2007.04.001] [PMID]
- Javidnia K, Miri R, Amirghofran Z, Jafari A, Amoozegar Z. Cytotoxicity and antimicrobial assessment of *Euphorbia hebecarpa*. *Iran j Pharm Res* 2004; 3(2): 75-82.
- Daniluk U. Probiotics, the New Approach for Cancer Prevention and/or Potentialization of Anti-cancer Treatment. *J clin Exp Oncol* 2012; 1: 2. [DOI:10.4172/2324-9110.1000e105]
- de Moreno de LeBlanc A, Matar C, LeBlanc N, Perdígón G. Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model. *Breast Cancer Res* 2005;7(4):R477-86. [DOI:10.1186/bcr1032] [PMID] [PMCID]
- Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Nielsen, S.D., Michaelsen, K.F., Jeppesen, D.L., Valerius, N.H. and Pærregaard, A. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111(2):389-395. [DOI:10.1067/mai.2003.389] [PMID]

23. Zhong, L., Zhang, X. and Covasa, M. Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(24),7878. [[DOI:10.3748/wjg.v20.i24.7878](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7878)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
24. Esmaeili T, Emami Z, Ahadi A.M, Shahanipour K, Shafiqi M. Identification OF *Lactobacillus Plantarum* Isolated from olive by PCR-RFLP. *J Microbiol biotechn.* 2012;12, 21-28
25. ORCID B., Kermanian, F, Khalili F, Sadat Z.R.N, Yaslianifard S. Influence of *Lactobacillus brevis* on the recovery of gastric gastritis caused by *Helicobacter pylori* infection in a C57BL / 6 mouse model. *Knowledge Health.* 2018;13 (2):15-21.
26. Saber A, Alipour B, Faghfoori Z, Yari Khosroushahi A. Cellular and molecular effects of yeast probiotics on cancer. *Crit. Rev. Microbiol.* 2017;43(1):96-115. [[DOI:10.1080/1040841X.2016.1179622](https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1179622)] [[PMID](#)]
27. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2002;2(7):489. [[DOI:10.1038/nrc839](https://doi.org/10.1038/nrc839)] [[PMID](#)]
28. Malur S, Krause N, Köhler C, Schneider A. Sentinel lymph node detection in patients with cervical cancer. *Gynecologic oncology.* 2001;80(2):254-7. [[DOI:10.1006/gyno.2000.6041](https://doi.org/10.1006/gyno.2000.6041)] [[PMID](#)]
29. Lee JS, Jung WK, Jeong MH, Yoon TR, Kim HK. Sanguinarine induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-9-dependent pathway. *Int J Toxicol* 2012; 31: 70-7. O'Donovan N O'Donovan N1, Crown J, Stunell H, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Caspase 3 in breast cancer. *Clin CancerRes* 2003; 9: 738-42. [[DOI:10.1177/1091581811423845](https://doi.org/10.1177/1091581811423845)] [[PMID](#)]
30. Jafari A,1 Hassan Pourrazi,1, Saeid Nikookheslat, and Behzad Baradaran. Effect of Exercise Training on Bcl-2 and Bax Gene Expression in the Rat Heart. *Gene Cell Tissue.* 2015; 1;182:258-66. [[DOI:10.17795/gct-32833](https://doi.org/10.17795/gct-32833)]
31. Kim PK, Armstrong M, Liu Y, Yan P, Bucher B, Zuckerbraun BS, et al. IRF-1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in mouse mammary cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 2004; 23: 1125-1135. [[DOI:10.1038/sj.onc.1207023](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207023)] [[PMID](#)]
32. Lim, S. W., Loh, H. S., Ting, K. N., Bradshaw, T. D., and Zeenathul, N. A. (2014). Antiproliferation and induction of caspase-8-dependent mitochondria-mediated apoptosis by β -tocotrienol in human lung and brain cancer cell lines. *Biomed. Pharmacother.* 68, 1105-1115. [[DOI:10.1016/j.biopha.2014.10.006](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.10.006)] [[PMID](#)]
33. Kramer PH, Arnold R, Lavrik IN: Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 2007, 7:532-542 [[DOI:10.1038/nri2115](https://doi.org/10.1038/nri2115)] [[PMID](#)]
34. Waida JS, Dowdy SF. Modulation of cellular function by TAT mediated transduction of full-length proteins. *Curr Protein PeptSci.*2003; 4:97-104. [[DOI:10.2174/1389203033487289](https://doi.org/10.2174/1389203033487289)] [[PMID](#)]
35. Balasubashini M Sri, Karthigayan S, Somasundaram ST, Balasubramanian T, Rukkumani R, Venugopal PM. FV peptide induces apoptosis in HEp 2 and HeLa cells: an insight into the mechanism of induction. *Journal of Carcinogenesis.*2006; 5:1-9. [[DOI:10.1186/1477-3163-5-1](https://doi.org/10.1186/1477-3163-5-1)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
36. Giaccone. Chemotherapy Triggers Apoptosis in a Caspase-8-dependent and Mitochondria controlled Manner in the Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line NCIH460. *Cancer Research.* 2000; 60:7133-41.