مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۹، شماره ۱۲، اسفند ۱۴۰۱ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی خصوصیات پروبیوتیکی و اثرات سمی عصاره سلولی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از فرآورده‌های لبنی استان گیلان بر رده سلول سرطانی HT-29 و سلول نرمال HUVEC

حسنیه کفشدار جلالی: دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

خسرو عیسی زاده: استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران (* نویسنده مسئول) Issa_kaam@yahoo.com

عباسعلی رضائیان: استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

چکیده

زمینه و هدف: برخی از غذاها از جمله محصولات لبنی مثل ماست، منابع خوبی برای پروبیوتیک‌ها محسوب می شوند. هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی خصوصیات پروبیوتیکی و اثرات سمی عصاره سلولی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از فرآورده‌های لبنی استان گیلان بر رده سلول سرطانی HT-29 و سلول نرمال HUVEC بود.

روش کار: برای انجام تحقیق حاضر، ابتدا لاکتوباسیلوس‌ها از نمونه‌های لبنی جداسازی شدند، سپس شناسایی مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، ژنتیکی و فیلوژنتیکی روی آنها انجام گرفت. با استفاده از توالی یابی و سپس آنالیز سکانس‌های تعیین شده در سایت NCBI، گونه لاکتوبا سیلوس فرمنتوم (L. Fermentum) با هومولوژی ۸۸/۶۱٪ تشخیص داده شد و درخت فیلوژنتیکی آن رسم گردید و به عنوان سویه Limosilactobacillus fermentum GL ثبت گردید. عصاره لاکتوبا سیلوس‌های جدا شده بر روی رده سلول‌های سرطانی HT-29 و سلول‌های نرمال HUVEC اثر داده شد و بقای سلول‌ها تحت اثر لاکتوباسیلوس با استفاده از تست MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) بررسی گردید.

یافته‌ها: نشان داد عصاره سیتوپلاسمی باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم در غلظت ۱ mg/ml، باعث کاهش ۵۰٪ از سلول‌های HT-29 شده، ولی هیچ اثر سمی روی سلول‌های نرمال HUVEC نداشته است.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج بدست آمده، عصاره سیتوپلاسمی لاکتوبا سیلوس فرمنتوم جدا شده از محصولات لبنی، موجب کاهش رشد سلول‌های سرطانی HT-29 نسبت به سلول نرمال HUVEC شد که با انجام مطالعات بیشتر می‌تواند به عنوان یک محصول پروبیوتیک، در درمان و پیشگیری از سرطان روده بزرگ مورد استفاده قرار گیرد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

کلیدواژه‌ها

پروبیوتیک،
سلول سرطانی،
لاکتو باسیلوس،
HUVEC،
HT-29

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۷

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳

شیوه استناد به این مقاله:

Kafshdar Jalali H, Issazadeh K, Rezaeian AA. Evaluation of Probiotic Properties and Toxic Effects of Lactobacilli Cell Extract Isolated from Dairy Products of Guilan Province on HT29 Cancer Cells and HUVEC Normal Cells. Razi J Med Sci. 2023;29(12): 323-333.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

Razi Journal of Medical Sciences. 2023;29(12):323-333. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Evaluation of Probiotic Properties and Toxic Effects of Lactobacilli Cell Extract Isolated from Dairy Products of Guilan Province on HT29 Cancer Cells and HUVEC Normal Cells

Hossnieh Kafshdar JalaliL: PhD Student, Microbiology Department, Faculty of Basic Scienc-es, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

Khosro Issazadeh: Assistant Professor, Microbiology Department, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran (Corresponding author) Is-sa_kaam@yahoo.com

Abbas Ali Rezaeian: Assistant Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Is-lamic Azad University, Jahrom, Iran

Abstract

Background & Aims: Due to the negative effects of cancer, various methods such as surgery, chemotherapy and radiotherapy are used to treat cancer and are used as primary methods in the treatment of colorectal cancer. However, the success rate of this treatment is not enough and the death rate due to it increases every year, and a series of necessary strategies are needed to control this deadly disease (5). In general, the main characteristic of cancer cells is uncontrollable cell proliferation and resistance to programmed death, so an agent that causes apoptosis in cancer cells can be known as an anticancer substance (8). Among various cases, probiotics control the digestive enzymes of animals and humans, inhibit cancer agents in the body and in laboratory conditions, and also play an important role in suppressing compounds and tumors caused by cancer in laboratory animals (9, 10). HT29 is not only used to study the biology of human colon cancers, but is of particular interest in studies focused on digestion and accessibility due to its ability to express the characteristics of colon cells (11). HUVEC are human umbilical vein endothelial cells used to study endothelial cell function and pathology (eg, angiogenesis). Primary isolated HUVECs are probably the most popular used in research, as human umbilical vessels are more readily available than other blood vessel types (8). Today, due to the increasing prevalence of gastrointestinal cancer, this issue is considered as an important global health challenge, and in the past few decades, it has been shown that the imbalance in the intestinal microbiota is related to the rate of various chronic disorders, including cancer. Oral administration of different strains of probiotics can prevent the occurrence of cancer or reduce the incidence of inflammation after surgery (12). Therefore, the researcher is trying to answer the question whether probiotic properties and toxic effects of Lactobacillus cell extract isolated from dairy products of Gilan province have an effect on HT-29 cancer cell line and normal HUVEC cell or not.

Methods: In order to carry out this research, lactobacilli were first isolated from dairy samples, then morphological, biochemical, genetic and phylogenetic identification was performed on them. Using sequencing and then analyzing the determined sequences on the NCBI site, Lactobacillus fermentum species (L. Fermentum) was detected with 88.61% homology and its phylogenetic tree was drawn and registered as Limosilactobacillus fermentum GL strain. The isolated lactobacillus extract was affected on the HT-29 cancer cell line and normal HUVEC cells, and the survival of the cells under the effect of lactobacillus was determined using the MTT test (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide) was investigated. Finally, considering that all the tests were performed in triplicate, Minitab ver16 software and GraphPad Prism ver9

Keywords

Probiotic,

Cancer Cells,

Lactobacilli,

HT29,

HUVEC

Received: 07/01/2023

Published: 04/03/2023

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

software were used to determine the mean (One-Way Unstacked ANOVA) and standard deviation, respectively ($p < 0.05$).

Results: The results showed that the bacteria were gram positive, catalase negative, oxidase negative, negative movement, no growth at 15°C and growth at 37°C and 45°C. Also, molecular analysis showed the amplification of S rRNA16 gene in two of the 4 samples. Further, the blast results showed that the desired sequence of one of the samples with 61.88% similarity belongs to Lactobacillus fermentum. Then, the phylogenetic tree resulting from the analysis of S rRNA 16 sequence was performed by NCBI genome database and MEGA 7 software, and its relationship with other bacteria is shown. Finally, gene registration was done from the sequence obtained in the NCBI database and the desired bacterium was named Limosilactobacillus fermentum GL.

Also, the results of cell viability were evaluated using the MTT colorimetric method. Based on the results, cytoplasmic extract in concentrations of 0.5, 0.75 mg/ml did not significantly change the cell viability of HT-29 cells, and concentrations of 1, 1.5, 2 mg/ml increased cell viability by 4.87±50%, respectively, decreased 8.61±40%, 5.80±25%. The IC50 value of cytoplasmic extract for HT-29 cells was 1.43 mg/ml. Also, the results of the cytotoxicity study showed that the concentrations used of the cytoplasmic extract had no inhibitory effect on the normal HUVEC cell line for 24 hours ($P<0.05$).

Conclusion: Despite recent advances in cancer treatment strategies, cancers are one of the most important causes of death worldwide. Although some anticancer treatments such as surgery, chemotherapy, and radiotherapy have been used with varying degrees of success in many types of cancer patients, these treatments are expensive and have harmful side effects including cardiotoxicity, diarrhea, intestinal strictures, and Inability to effectively absorb nutrients. Probiotics have been suggested as supplements to increase the effectiveness of anti-cancer treatments (24).

The results showed that the concentrations of 1, 1.5 and 2 mg/ml of lactobacillus extract can reduce the cell viability by 50±4.87, 40±8.61 and 25±5.80% respectively during 24 hours. . Based on the MTT test, a concentration of 1 mg/ml of the cytoplasmic extract inhibited 50% of HT29 cells and had no toxic effect on normal HUVEC cells. In a study after 24-hour treatment of HT29 cells with 109 CFU/mL of Lactobacillus casei ATCC 393, cell survival decreased by 78% (13). Probably, in the future, these species or their metabolites can be used as food supplements or additives with anti-cancer activity, and for the production of such products, the selection of Lactobacillus strain is of high value (4). As shown in the results, the cell extract of Limosilactobacillus fermentum GL had important effects on growth inhibition in HT-29 cells by suppressing cell proliferation. However, the exact underlying mechanisms of the effects of probiotics on cancer cells have not been fully defined (4). It should be noted that the bacteria used in this study (Limosilactobacillus fermentum GL) were isolated from traditional dairy samples of Gilan and their anti-proliferative and anti-cancer effects were investigated for the first time.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Kafshdar Jalali H, Issazadeh K, Rezaeian AA. Evaluation of Probiotic Properties and Toxic Effects of Lactobacilli Cell Extract Isolated from Dairy Products of Guilan Province on HT29 Cancer Cells and HUVEC Normal Cells. Razi J Med Sci. 2023;29(12): 323-333.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

مقدمه

لاکتوباسیلوس‌ها گروهی از باکتری های گرم مثبت، میکروآئروفیل یا بی هوازی هستند که قادر به تشکیل اسپور یا کاتالاز نیستند و با عدم وجود سیستم سیتوکروم و توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی در ایجاد تعادل فلورای روده و حفظ سلامت نقش مهمی بازی می‌کنند (۱). پروبیوتیک ها به طور عمده از سویه‌های لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم، استرپتوکوکوس و برخی از گونه های انتروکوکوس تشکیل شده اند (۲). خانواده لاکتوبا سیلوس جزو فلور نرمال دستگاه گوارش است و در لبنیات تخمیری وجود دارد که دارای قابلیت اتصال به روده و تنظیم سیستم ایمنی را دارد و می تواند یک درمان بالقوه و اثر مهاری برای سرطان روده بزرگ باشد (۳).

در همین راطبه و طبق گزارش های سازمان جهانی بهداشت سرطان، یکی از موارد اصلی علت مرگ و میر در سراسر جهان است که عفونت ها و رژیم غذایی نامناسب باعث بدخیمی های معمول از جمله سرطان برای جوامع می شود. سرطان کلورکتال سومین سرطان شایع در جهان است و پیش بینی می شود مرگ و میر در اثر آن تا ۲۰ سال آینده تقریباً دو برابر شود (۴). با توجه به عوارض منفی سرطان از روش های مختلفی مانند جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی جهت درمان سرطان استفاده می شود و به عنوان روش های اولیه در درمان سرطان کولورکتال استفاده می شوند. با این حال میزان موفقیت این درمان کافی نیست و میزان مرگ و میر ناشی از آن هر سال افزایش می یابد و یک سری استراتژی های لازم برای کنترل این بیماری کشنده مورد نیاز می باشند (۵). در بین موارد مختلف سرطان، سرطان کولورکتال با یک پولیپ روده خوش خیم آدنوما شروع می شود که با دیسپلازی درجه بالا، آدنوکارسینومای تهاجمی و متاستاز به اندام های دور دست منجر به آدنومای پیشرفته می شود. مفهوم پیشرفت تدریجی سرطان روده بزرگ به عنوان تومورزایی چند مرحله ای شناخته می شود و تصور می شود در هر مرحله با تغییرات ژنتیکی خاص در سرکوبگرهای تومور یا آنکوژن ها همراه است (۶،۷).

بطور کلی ویژگی اصلی سلول های سرطانی تکثیر غیر قابل کنترل سلولی و مقاومت در برابر مرگ برنامه ریزی شده می باشد، بنابراین عاملی که باعث بروز آپوپتوز در سلول های سرطانی شود، می‌تواند به عنوان یک ماده ضد سرطانی شناخته شود (۸). در بین موارد مختلف پروبیوتیک ها با کنترل آنزیم های گوارشی حیوانات و انسانها، باعث مهار عوامل سرطانی در بدن و شرایط آزمایشگاهی شده و همچنین در سرکوب ترکیبات و تومور های ناشی از سرطان در حیوانات آزمایشگاهی نقش مهمی برعهده دارند (۹،۱۰). HT29 نه تنها برای مطالعه بیولوژی سرطان‌های روده بزرگ انسان مورد استفاده قرار می گیرد، بلکه به دلیل توانایی در بیان ویژگی‌های سلول‌های روده بزرگ مورد توجه ویژه‌ای در مطالعات متمرکز بر هضم غذا و قابل دسترس بودن، قرار می گیرد (۱۱). HUVEC، سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسانی هستند که برای مطالعه‌ی عملکرد و آسیب شناسی سلول های اندوتلیال (به عنوان مثال آنژیوژنز) استفاده می شوند. HUVEC های جدا شده اولیه احتمالاً محبوب ترین موردی است که در تحقیقات مورد استفاده قرار می گیرد، زیرا رگ های ناف انسان نسبت به سایر انواع رگ های خونی در دسترس تر هستند (۸). امروزه بعلت شیوع روز افزون سرطان دستگاه گوارش، این موضوع بعنوان یک چالش مهم بهداشت جهانی در نظر گرفته می شود و در چند دهه گذشته نشان داده شده است که عدم تعادل در میکروبیوتای روده با میزان ابتلا به اختلالات مزمن مختلف از جمله سرطان مرتبط است و تجویز خوراکی سویه های مختلف پروبیوتیک ها می تواند از بروز سرطان جلوگیری کند و یا باعث کاهش بروز التهاب پس از عمل شود (۱۲). با توجه به مطالب فوق و تاثیر منفی سرطان بر زندگی فردی و اجتماعی، تحمیل هزینه‌های سنگین بر دوش خانواده‌ها و جامعه، اهمیت کشف روشی ایمن جهت درمان، نبود اجماع نظر کلی در مورد بهترین روش و با توجه به عدم انجام تحقیقی در زمینه موضوع مورد نظر محقق در صدد پاسخگویی به این سوال است که خصوصیات پروبیوتیکی و اثرات سمی عصاره سلولی لاکتوبا سیلوس های جدا شده از فرآورده های لبنی استان گیلان بر رده سلول سرطانی HT-29 و سلول نرمال HUVEC تاثیر دارند یا خیر؟

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

روش کار

برای انجام تحقیق حا ضر ابتدا نمونه های لبنی شامل ماســـت، آب پنیر، دوغ و کشـــک محلی (۲۰ نمونه) از مناطق مختلف ا ستان گیلان در شرایط بهدا شتی درون فالکون‌های ا ستریل منا سب جمع آوری شدند. سپس جهت جدا سازی لاکتوبا سیلوس‌ها، ml ۱ و یا mg ۱ از نمونه (برحســـب نوع نمونه)، به ml ۹ آب پپتونه ۰/۱٪ اضافه شد و به این ترتیب از همه ی نمونه ها رقت تهیه کرده و µl۵۰ از هر رقتی به صورت سطحی در محیط MRS Agar کشت داده شد. جهت مهار ر شد مخمر ها هنگام تهیه ی محیط کشت به میزان mg/l ۰/۱ از آنتی بیوتیک نیستاتین به آن اضافه گردید و در دمای C° ۳۷ به مدت ۲ تا ۳ روز انکوبه شـــدند. بعد از انکوباســـیون، همه ی ایزوله های با مورفولوژی باســـیل گرم مثبت و فاقد ا سپور مجدداً در محیط کشت MRS Agar کشت داده شدند و جهت شناسایی آنها در حد جنس از تست های کاتالاز، اکســـیداز، حرکت، تســـت تحمل دما و قند ا ستفاده شد. سرانجام همه ی ایزوله های خالص شده شـــماره گذاری شـــده و در محیط MRS Broth حاوی ۲۰٪ از گلیســـرول در فریزر C° ۲۰- و C° ۷۰- جهت مطالعات بعدی نگهداری شدند .

در ادامه µl ۱۰ از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها در ml 4 از MRS broth در محدوده‌های مختلف pH (۲، ۳، ۴، ۵) تلقیح و نتایج بعد از ســـه ســـاعت انکوباســـیون در ۳۷°C و در طول موج nm ۶۲۰ بـــه همراه کنترل (MRS broth در pH 6.5) خوانده شد.تعداد باکتری ها در محیط MRS agar بعد از سه ساعت انکوبا سیون در ۳۷°C شـــمارش شـــده و میزان زنده مانی به صـــورت لگـــاریتم مقـــادیر cfu (Colony Forming Unit)/ml محا سبه گردید (۱۳،۱۴). تا میزان تحمل PH مشخص شود.

بعد از تســـت تحمل PH و به منظور بررســـی تحمل جدایه ها به نمک صـــفراوی مقدار µl 10 از رشـــد فعال ایزوله ها در ml 4 از MRS broth با غلظت های مختلف (۰/۳٪، ۰/۵٪، ۰/۸٪، ۰٪) از نمک صفراوی شرکت (oxoid) تلقیح گردید. بعد از انکوباسیون در C° ۳۷ به مدت ۳ ســـاعت، نتیجه به همراه کنترل در طول موج nm ۶۲۰ خوانده شد (۱۵). سپس برای برر سی ت ست تحمل فنل در جدایه ها، µl ۱۰ از کشـــت ۲۴ ســـاعته جدا یه ها را، در ml 4 از MRS broth با مقادیر فنل (۰٫۲٪ ، ۰٫۳٪ ، ۰٫۴٪ و ۰٫۵٪) تلقیح کرده و به همراه کنترل، بعد از۳ ســـاعت انکوباســـیون در C° ۳۷ جذب نوری آن در طول موج nm ۶۲۰ خوانده شـــد (۱۴). همچنین جهت انجام تســـت تحمل نمک، جدایه ها در MRS broth به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در C° ۳۷ انکوبه شدند. مقدار µl ۱۰ از MRS broth با ر شد جدایه ها در ســـه غلظت مختلف نمک یعنی ۴٪، ۸٪ و 10٪ در ml 4 از MRS broth تلقیح شـــدند و نتایج به همراه نمونه کنترل بعد از انکوباســـیون در C° 37 به مدت ۳ ساعت، با اسپکتروفتومتر در طول موج nm ۶۲۰ قرائت و ثبت گردید (۱۵).

بعد از این مرحله به منظور بررســـی حســـاســـیت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها مقاومت ضـــدمیکروبی ایزوله ها در مقابل آنتی بیوتیک های منتخب (شـــرکت پادتن طب) شامل آمپی سیلین (mg 10)، وانکومایسین (µg ۱۰)، جنتامایســـین (µg ۱۰)، کلیندامایســـین (µg 20)، ، تترا سایکلین(µg 30) و ا سترپتومایسین (µg ۱۰)، به روش انتشار دیسک در آگار انجام گرفت. به این صورت که ابتدا µl ۱۰۰ از MRS broth فعال با رشد باکتری، به طور یکنواخت در محیط مولرهینتون آگار به کمک ســـوآب اســـتریل تلقیح گردید. پس از خشـــک شـــدن، دیسک ها بر بستر آگار از هر ایزوله، قرار گرفت و پلیت ها به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال جهت انتشـــار آنتی بیوتیک گذاشـــته شـــد. همه ی پلیت ها به مدت ۲۴ ســـاعت در دمای C° 37 انکوبه گردید. نتایج با مقادیر اســـتاندارد (CLSI-2020) CLSI مقایســـه گردید. قطر هاله ی مهاری ر شد اندازه گیری شد و نتایج به صورت مقاوم ≥ mm ۱۵، نیمه حســـاس = mm 16 -19 و حساس ≤ mm ۲۰ ثبت گردید (۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹).

در مرحله بعد جهت بررســـی فعالیت ضـــدمیکروبی جدایه ها روی باکتری های فرصـــت طلب بیماری زا، فعالیت آنتی باکتریال محلول رویی ایزوله ها در مقابل گونه های باکتریایی استوک موجود در آزمایشگاه شامل اســـتافیلوکوکوس اورئوس، باســـیلوس ســـرئوس، شـــیگلا

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

بویدی ای، پسودوموناس آئروژینوزا و کلبسیلا پنمونیه به روش انتشار در چاهک-پلیت انجام گرفت. ابتدا سوسپانسیون باکتری های بیماری زای انتخاب شده در محیط مولرهینتون براث کشت داده، پس از انکوباسیون، کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد، سپس با سوآب استریل، از کشت فعال باکتری های بیماری زا روی محیط مولرهینتون آگار، کشت متراکم و در سه جهت داده شد. چاهک هایی به قطر 7 mm با استفاده از یک انتهای پیپت پاستور استریل بر روی محیط آگار در فواصل مشخص و مناسب ایجاد شد، سپس ۱۰۰ µl از محلول رویی کشت فعال لاکتوباسیلوس تیمار شده (توسط سود یک نرمال در pH 6.5) و ۱۰۰ µl از محلول رویی چهار جدایه لاکتوباسیلوس (خنثی شده و خنثی نشده) به جهت نشان دادن نقش مهاری پراکسید هیدروژن با آنزیم کاتالاز ۵ mg/ml تیمار گردید و پس از مدت زمان نیم ساعت در 25 °C به طور جداگانه در چاهک های دوم و سوم پلیت ها افزوده شده و ته چاهک ها با آگار-آگار بسته شد. به منظور انتشار بهتر محلول رویی، پلیت ها حدود سه ساعت در دمای یخچال سرماگذاری شدند. سپس پلیت ها در دمای 37 °C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید و قطر هاله ی مهاری رشد مربوط به هر سویه، بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. به منظور کاهش خطا، هر آزمون سه بار تکرارشده و میانگین قطر هاله ها محاسبه و ثبت شد. قطر مناطق مهاری رشد به صورت (ضعیف ≥ mm ۱۴)، (متوسط= 15- 19mm) و (قوی ≤ mm ۲۰). برای هر جدایه ثبت گردید (۱۷).

نهایتا جهت آماده سازی عصاره سیتوپلاسمی، کلنی های رشد کرده روی آگار به MRS broth منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در C ° ۳۷ گرماگذاری شدند. سپس ml ۱ از کشت ۲۴ ساعته در 50 ml محیط کشت تازه MRS broth مجدداً کشت داده شده و در دمای C ° 37 با چرخش ۲۵۰ rpm گرماگذاری شد. جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ nm اندازه گیری شد تا میزان جذب محیط کشت حاوی باکتری به ۱ برسد. سپس جهت جدا سازی روبی، محیط کشت حاوی باکتری به لوله منتقل شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از شستشو با محلول PBS، باکتری با استفاده از روش فریز-ذوب کردن لیز شد و سپس سونیکیت (تخریب سلولی) گردید. با استفاده از سانتریفیوژ، دیواره های سلولی رسوب داده شد و مایع رویی به عنوان عصاره سیتوپلا سمی جدا گردید. سنجش پروتئین موجود در عصاره سیتوپلاسمی با روش برادفورد محاسبه شد. سپس غلظتهای مختلف 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mg/ml از عصاره سیتوپلا سمی تهیه و توسط فیلتر ۰/۲۲ µm استریل گردید(20). همچنین تایید مولکولی لاکتوباسیلوس با استفاده از روش PCR انجام شد. به این منظور، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج (DNA کارمانیا پارس ژن، ایران) انجام شد و از پرایمر یونیورسال ژن ۱۶S rRNA به عنوان آغازگر واکنش PCR استفاده گردید، در نهایت محصول PCR توسط الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت.

الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ با استفاده از دستگاه الکتروفورز به مدت یک ساعت و با ولتاژ ۸۰ انجام شد. سپس محصول PCR روی ژل، توسط صفحه دستگاه یووی ترانس ایلومیناتور از نظر وجود باند بررسی شد. پس از تایید جنس لاکتوباسیلوس، نمونه ی مورد نظر همراه با پرایمرهای ۱۶S rRNA جهت تعیین توالی به شرکت بایونیر کره ارسال گردید. سپس توالی دریافتی با توالی های موجود در پایگاه ژنی NCBI توسط نرم افزار BLAST مقایسه شد. درخت فیلوژنتیکی آن با استفاده از نرم افزار MEGA ۷ برای توالی 16S rRNA ترسیم شد و سرانجام ثبت ژن از توالی بدست آمده در پایگاه NCBI انجام گرفت.

در مرحله آخر و جهت تعیین بررسی اثر سمی عصاره سلولی جدایه ها روی سلول های HT29 و HUVEC سلول های رده سرطانی HT29 و سلول نرمال HUVEC از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و سلول های خریداری شده در محیط کشت DMEM حاوی پنی سیلین و استرپتومایسین در فشار ۵٪ از Co2 و دمای C ° 37 کشت داده شدند. برای کشت مجدد نیز از همین محیط استفاده شد. اثر سمی لاکتوباسیلوس با استفاده از تست رنگ سنجی MTT

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

(3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) انجام شد. با انجام این تست مقدار IC50 (غلظتی که در آن تنها ۵۰٪ سلول ها زنده می مانند)، مشخص شد و برای تیمار بعدی سلول ها از این غلظت استفاده شد (5). جهت انجام آن به یک پلیت ۹۶ خانه و قایقک استریل نیاز می باشد. درون هر چاهک، ۲۰۰ µl از رده های سلولی ریخته شد و ۲۴ ساعت در دمای 37 °C انکوبه شد. غلظت های 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mg/ml از عصاره سلولی باکتری روی رده های سلولی در فواصل زمانی ۲۴ ساعته، تیمار شدند. سپس محتویات چاهک های پلیت ۹۶ خانه خارج شده و 5 mg/ml از رنگ MTT (سیگما، آلمان)، به آن ا ضافه شد و ۴ ساعت در 5% $C0_2$ و دمای 37 °C انکوبه و سپس رنگ MTT خارج گردید و ۲۰۰ µl DMSO (دی متیل سولفوکسید) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 37 °C اضافه گردید. در نهایت میزان جذب نمونه ها با دستگاه الایزا ریدر(هلند)، در طول موج 570 nm قرائت شد و میزان کشندگی سلول و دوز کشندگی 50%(IC50)، نیز محاسبه گردید (۲۱، ۲۲)

بعد از طی کردن تمام مراحل فوق با توجه به اینکه تمام آزمون ها به صورت سه تکرار انجام گرفت، از نرم افزار Minitab ver16 و نرم افزار GraphPad Prism ver9 به ترتیب برای تعیین میانگین (آزمون آماری ANOVA One-Way Unstacked) و انحراف استاندارد استفاده گردید ($p <۰/۰۵$).

یافته‌ها

نتایج نشان داد باکتری به صورت باکتری گرم مثبت، کاتالاز منفی، اکسیداز منفی، حرکت منفی، عدم رشد در دمای 15 °C و رشد در دمای 37 °C و 45 °C، دیده شد (جدول ۱).

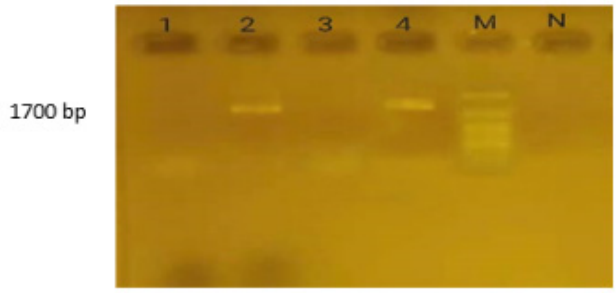
همچنین آنالیز مولکولی نشان دهنده تکثیر ژن S ۱۶rRNA در دو نمونه از ۴ نمونه ی مورد نظر بود (شکل ۱) که در ادامه نتایج بلاست نشان داد که توالی مورد نظر یکی از نمونه ها با مشابهت ۸۸.۶۱ ٪، متعلق به لاکتوباسیلوس فرمنتوم می باشد. سپس، درخت فیلوژنتیک حاصل از آنالیز توالی ۱۶ S rRNA توسط پایگاه اطلاعات ژنومی NCBI و نرم افزار MEGA 7 انجام شد و ارتباط آن با سایر باکتری ها نشان داده شده است (شکل ۲۷). در نهایت ثبت ژن از توالی بدست آمده در پایگاه NCBI انجام گرفت و باکتری مورد نظر

جدول ۱- آنالیز باکتریولوژیک و بیوشیمیایی ایزوله های جدا شده از نمونه های لبنی جمع آوری شده از مناطق مختلف استان گیلان

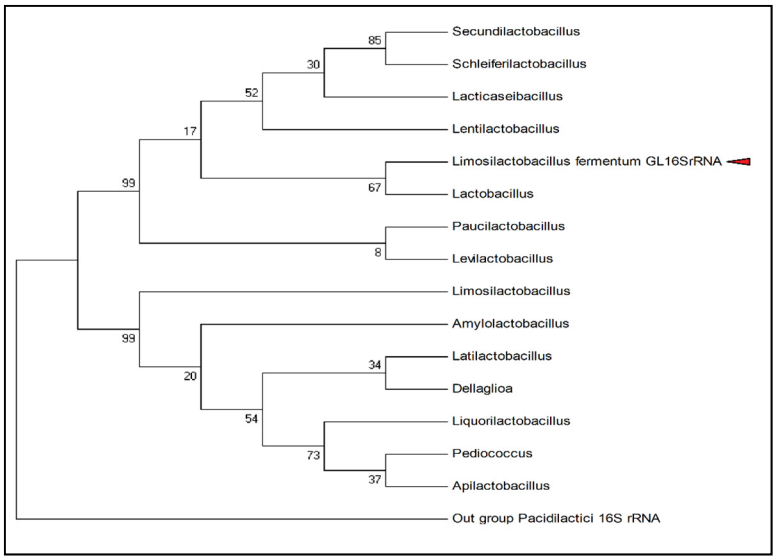
جدایه تست	مورفولوژی کلنی	بررسی میکروسکوپی	رنگ آمیزی گرم	کاتالاز	اکسیداز	حرکت	تحمل دما °C 15	37	45	تخمیر کربوهیدرات گلوکز	لاکتوز	فروکتوز	گالاکتوز	رامنوز	آرابینوز
1	کلنی کرم رنگ، مات، مدور نامنظم	باسیل بلند	+	–	–	–	–	+	++	+	+	+	+	–	–
2	کلنی خاکستری، مات، مدور	باسیل متوسط	+	–	–	–	–	+	++	+	+	+	+	+	+
3	کلنی کرم رنگ، مات، لبه های نامنظم	باسیل کوتاه	+	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+	+	–
4	کلنی کرم رنگ، مات، مدور	باسیل بلند	+	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–

(رشد نرمال +، رشد قوی++، رشد ضعیف –)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]



شکل ۱- تصویر قطعه 1700 جفت بازی ژن ۱۶S rRNA نمونه مورد مطالعه. (ستون M مارکر 100 bpو ستون N کنترل منفی)



شکل ۲- درخت فیلوژنتیک حاصل از آنالیز توالی ۱۶S rRNA

Limosilactobacillus fermentum GL نامیده شد.

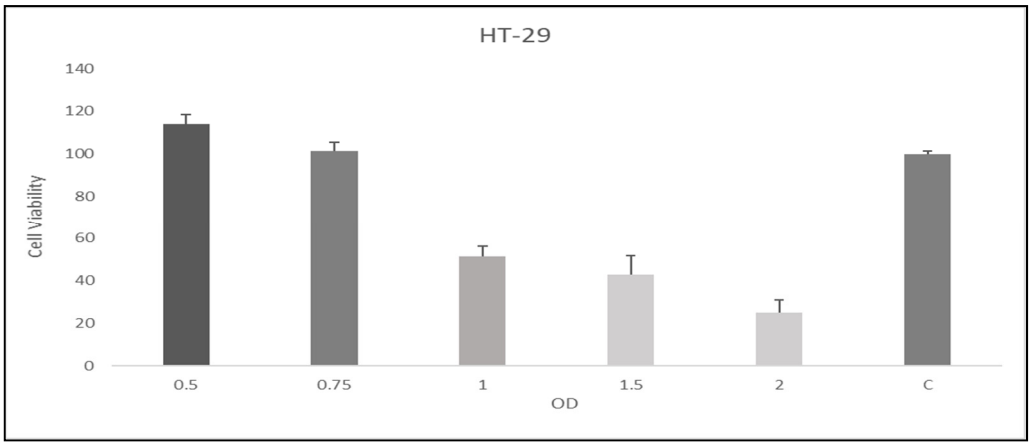
همچنین نتایج زنده مانی سلول با استفاده از روش رنگ سنجی MTT مورد برر سی قرار گرفت. بر ا ساس نتایج، ع صاره سیتوپلا سمی در غلظت های 0.75 , 0.5 mg/ml تغییر قابل توجهی در زنده مانی سلولی سلول های HT-29 ایجاد نکرد و غلظت های 1, 1.5, 2 mg/ml زنده مانی سلولی را به ترتیب %40±8.61, %50±4.87 %25±5.80 کاهش داد. مقدار IC_{50} عصاره سیتوپلاسمی برای سلول های HT-29 ، 1.43 mg/ml بود(نمودار ۱).

همچنین، نتایج مطالعه ی سمیت سلولی نشان داد که غلظت های ا ستفاده شده از ع صاره سیتوپلا سمی هیچ اثر مهاری بر روی رده سلولی طبیعی HUVEC به مدت ۲۴ ساعت نداشت($p<۰/۰۵$) (نمودار ۲).

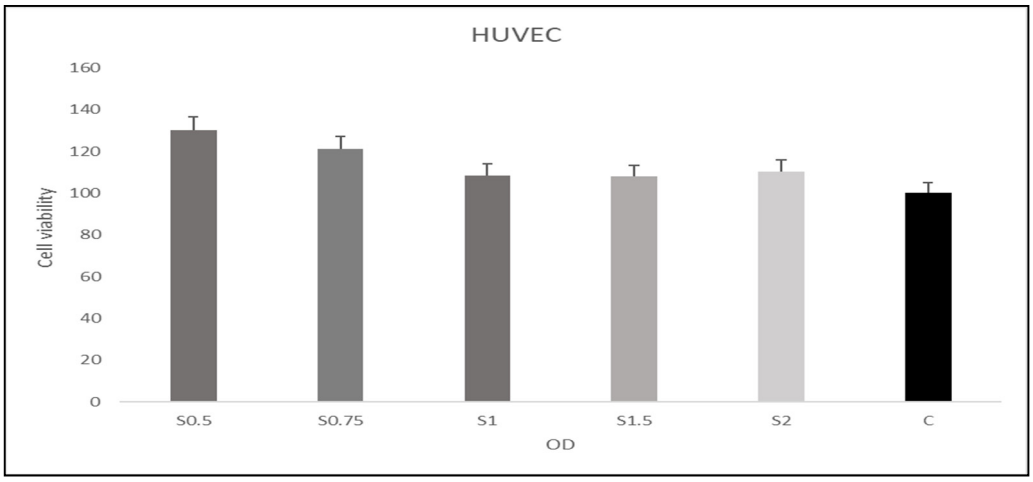
بحث

درمان بیماری ها با کمک میکروارگانیسم ها روشی نوین و در حال توسعه می باشد که از باکتری های مفید به عنوان عوامل درمانی در اختلالات ایمنی و بیماری‌های عفونی استفاده می شود. پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم های غیربیماری زایی هستند که هرگاه در مقادیر مناسب تجویز شوند، با بهبود وضعیت سلامتی، قادرند از برخی از بیماری ها پیشگیری نموده و یا آن ها را بهبود بخشند. از ویژگی های مهم باکتری های پروبیوتیک می توان توانایی آن ها در کاهش تعداد و کاهش قدرت بیماری زایی عوامل ایجاد کننده ی بیماری را اشاره کرد. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم هایی هستند که درحفظ تعادل میکروبی روده وسلامتی انسان نقش مهمی دارند. میکروارگانیسم های پروبیوتیک اکثراً

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]



نمودار ۱- نتایج MTT و تعیین اثر عصاره باکتری روی سلول سرطانی HT-29



نمودار ۲- نتایج MTT و تعیین اثر عصاره باکتری روی سلول نرمال HUVEC

شامل لاکتوباسیلوس ها و بیفیدوباکترها هستند که این باکتری ها به طور عمده در لبنیات موجودند. اجزای دیواره سلولی، DNA و متابولیت های پروبیوتیک ها می‌توانند برسیستم ایمنی بدن میزبان تأثیر بگذارند. لاکتوباسیلوس‌ها باکتری های گرم مثبت هستند که بیماری زا نبوده و به طور وسیعی در طبیعت پراکنده اند. این باکتری ها به طور ویژه ای بر سیستم ایمنی موثر هستند و به طور وسیعی در محصولات لبنی همچون ماست، پنیر، آب پنیر و غیره حضور دارند. عمدتاً فعالیت های ضد سرطانی پروبیوتیک ها در آزمایشات و مطالعات in vitro نشان داده شده است اما در کارهای in vivo نیز نشان داده اند که پروبیوتیک ها می توانند در سرکوب زخم های تومورهای سرطانی در مدل های موش نقش داشته باشند (۲۳). با وجود پیشرفت های اخیر در استراتژی های درمان سرطان، سرطان ها از عوامل بسیار مهم مرگ و میر در سراسر جهان هستند. اگرچه برخی از درمان های ضد سرطان مانند جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی با موفقیت های متفاوتی در بسیاری از انواع بیماران سرطانی استفاده شده است، این درمان ها گران هستند و دارای عوارض جانبی زیان باری از جمله سمیت قلبی، اسهال، تنگی روده، و ناتوانی در جذب مؤثر مواد مغذی هستند .پروبیوتیک ها به عنوان مکمل برای افزایش اثربخشی درمان های ضد سرطان پیشنهاد شده اند (۲۴).

در مطالعه ی حا ضر، لاکتوبا سیلوس بر ا ساس روش های متداول کشت و بیوشیمیایی و همچنین آنالیز

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

مولکولی بر اساس ژن ۱۶S rRNA از نمونه های لبنی جداسازی شد. سپس اثرات ضد سرطانی عصاره سیتوپلاسمی آن با استفاده از آزمون های سمیت سنجی بررسی شد.

نتایج حاصل از سمیت سنجی در این مطالعه، نشان داد که غلظت های ۱ mg/ml ، ۱/۵ و ۲ از عصاره لاکتوباسیلوس، طی زمان ۲۴ ساعت قادرند زنده ماندن سلول ها را به ترتیب ۴/۸۷±۵۰، ۸,۶۱±۴۰ و ۵/۸۰±۲۵ در صد کاهش دهند. بر اساس تست MTT، غلظت ۱ mg/ml از عصاره سیتوپلاسمی، ۵۰٪ سلول های HT29 را مهار می کند و هیچ اثر سمی بر روی سلول های نرمال HUVEC ندارد. در مطالعه ای پس از تیمار ۲۴ ساعته ی سلولهای HT29 با 109 CFU/mL لاکتوباسیلوس کازئی ATCC 393، بقای سلولی تا ۷۸٪ کاهش یافت (۱۳). مطالعات مختلف نشان داد پروبیوتیک‌ها با القای خواص ضد سرطان زایی، اثرات ضد جهش زایی، تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، سیستم ایمنی بدن میزبان را فعال می کند و با مهار تبدیل مواد سرطان زا به سرطان، توسط باکتری‌ها و کاهش اسیدیته ی روده که منجر به کاهش فعالیت میکروبی می شود، می تواند به پیشگیری و درمان سرطان های دستگاه گوارش کمک کند (۱۲) که این نتایج با نتایج به دست آمده در مطالعه ی ما همخوانی دارد. احتمالاً در آینده، این گونه ها و یا متابولیت های آنها می توانند به عنوان مکمل غذایی یا افزودنی هایی با فعالیت ضد سرطانی استفاده شوند و برای تولید این گونه فرآورده ها انتخاب سویه ی لاکتوباسیلوس از ارزش بالایی برخوردار است (۴).

همانطور که در نتایج نشان داده شد، عصاره سلولی *Limosilactobacillus fermentum GL* در سلول‌های HT-29 با سرکوب تکثیر سلول ها، تاثیرات مهمی در مهار رشد داشتند. با این حال، مکانیسم های زیربنایی دقیق اثرات پروبیوتیک‌ها بر سلول های سرطانی به طور کامل تعریف نشده است (۴). لازم به ذکر است که باکتری های مورد استفاده در این مطالعه (*Limosilactobacillus fermentum GL*)، از نمونه های لبنیات سنتی گیلان جدا شده و اثرات ضد تکثیر و ضد سرطانی آنها برای اولین بار بررسی شده است. امید است نتایج این تحقیق دیدگاه روشنی در زمینه آثار پروبیوتیکی فراورده‌های لبنی استان گیلان بر رده سلول سرطانی HT-29 و سلول نرمال HUVEC قرار داده باشد شاید بتوان از عوارض منفی انواع دارو و شیمی درمانی و هزینه‌های سنگین آن کاست و در نتیجه خدمتی به جامعه نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه ی حاضر اولین موردی است که نشان می‌دهد عصاره ی سلولی *Limosilactobacillus fermentum GL* می‌تواند به طور مؤثری تکثیر در سلول های سرطانی را مهار کند و به علت اینکه برخلاف شیمی درمانی، مصرف پروبیوتیک ها کمتر باعث عوارض جانبی می شود (۲۱)، بنابراین، پیشنهاد می‌کنیم همانطور که در مطالعه ی حاضر توضیح داده شد، استفاده از *Limosilactobacillus fermentum GL* ، می‌تواند به عنوان یک پروبیوتیک جدید برای درمان سرطان کلورکتال عمل کند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله، نویسندگان از تمام افرادی که در انجام این پژوهش همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می کنند.

References

1 .Sarmast Ghahfarokhi E, Mobini Dehkordi M, Beheshtimaal K. Isolation and evaluation of lactic acid production content in native Lactobacillus of Chaharmahal va Bakhtiari province isolated from dairy products. Biol J Microorganism. 2012;1(3):41-52.

2. Reuben RC, Roy PC, Sarkar SL. ASM Rubayet Ul Alam, and I. K. Jahid. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. J Dairy Sci. 2020;103(2):1223-1237.

3. Guo et al. Lactobacillus acidophilus GICC 6074 inhibits growth and induces apoptosis in colorectal cancer cells in vitro and in HT-29 cells induced-mouse model. J Func Foods. 2020;75(104290):1-10.

4. Nowak A, Zakłos-Szyda M, Rosicka-Kaczmarek

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]

J, Motyl I. Anticancer Potential of Post Fermentation Media and Cell Extacts of Probiotic Strains: An In Vitro Study. Cancers (MDPI). 2020:14(1853):1-22.

5. Jones LE, Nagelkerke JF, Ensink NG, van der Velde EA, Tollenaar RA, Fleuren GJ, et al. Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma. Lab Invest. 2001;81(5):681-8.

6. Ahmadizadeh C. The study of expression of PTEN and AKT1 genes in coculturing of HT29 colon cancer cell line with Streptococcus thermophilus. Feyz J Kashan Univ Med Sci. 2018;22(6):624-31.

7. Jin SJ, Yang Y, Ma L, Ma BH, Ren LP, Guo LC, et al. In vivo and in vitro induction of the apoptotic effects of oxysophoridine on colorectal cancer cells via the Bcl-2/Bax/caspase-3 signaling pathway. Oncol Lett. 2017;14(6):8000-6.

8. Asadi M, Shanehbandi D, Kermani TA, Sanaat Z, Zafari V, Hashemzadeh S. Expression level of caspase genes in colorectal cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2018;19(5):1277.

9. Curigliano G, Mayer EL, Burstein HJ, Winer EP, Goldhirsch A. Cardiac Toxicity from Systemic Cancer Therapy: A Comprehensive Review. In Progress in Cardiovascular Diseases 2010;53(2):94–104.

10. Grosu-Tudor SS, Zamfir M. Probiotic potential of some lactic acid bacteria isolated from romanian fermented vegetables. Ann Roman Soc Cell Biol. 2012 Jun 1;17(1).

11. Hekmati M, Ben-Shaul Y, Polak-Charcon S. A morphological study of a human adenocarcinoma cell line (HT29) differentiating in culture. Similarities to intestinal embryonic development. Cell Diff Dev. 1990;31(3):207-18.

12. Davoodvandi A, Fallahi F, Tamtaji OR, Tajiknia V, Banikazemi Z, Fathizadeh H, et al. An Updte on the Effects of Probiotics on Gastrointestinal Cancers. Front Pharmacol. 2021;12(680400):1-21.

13. Elkay AI, El Hamid Hussein RA, Abu- zinadah OA. Differential control of growth, apoptotic activity and gene expression in human colon cancer by extracts dorived from medicinal herbs, Rhazya stricta and zingiber officinale and their combination. World J Gasteroenterol. 2014;20(41):15275.

14. Yazdani Y, Farazmandfar T, Azadeh H, Zekavatian Z. The prognostic effect of PTEN expression status in colorectal cancer development and evaluation of factors affecting it: miR-21 and promoter methylation. J Biomed Sci. 2016;23(1):1-8.

15. Matijašic BB, Rogelj I. Lactobacillus K7-a new candidate for a probiotic strain. Food Technol Biotechnol. 2000;38(2):113-9.

16. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria, 3rd ed CLSI guideline M45 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

17. Emami A, Hashemizade Z, Noeiaghdam R. Study of antimicrobial properties of Lactobacillus casei and L. acidophillus against common microorganisms causing nosocomial infections. J Qazvin Uni Med Sci. 2009;56(3):6. [In Persian].

18. Xanthopoulos, Vassillis, Evanthia Litopoulou-Tzanetaki, and N. Tzanetakis. Characterization of Lactobacillus isolates from infant faeces as dietary adjuncts. Food Microbiol. 2000;17(2):205-215.

19. Zhang, Bei, Yanping Wang, Zhongfang Tan, Zongwei Li, Zhen Jiao, and Qunce Huang. Screening of probiotic activities of lactobacilli strains isolated from traditional Tibetan Qula, a raw yak milk cheese. Asian-Austral J Anim Sci. 2016;29(10):1490.

20. Vlková E, Rada V, Popelářová P, Trojanová I, Killer J. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves. Livestock Sci. 2006 Dec 1;105(1-3):253-9.

21. Zhang B, Li A, Zuo F, Yu R, Zeng Z, Mo H, Chen S. Recombinant Lactococcus lactis NZ 9000 Secretes a bioactive kisspeptin that inhibits proliferation and migration of human colon carcinoma HT-29 cells. Microbial Cell Factories. 2016;15(1):102.

22. Perez-Tomas R. Multidrug Resistance: Retrospect and Prospects in Anti-Cancer Drug Treatment. Curr Med Chem. 2006;13(16):1859–1876).

23. Nakayama M, Oshima M. Mutant p53 in colon cancer. J Mol Cell Biol. 2019;11(4):267-76.

24. Martínez-Maqueda D, Miralles B, Recio I. HT29 cell line. The Impact of Food Bioactives on Health: Springer, Cham; 2015. p. 113-24.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-26]