



## ارزیابی اثرات مهار رشدی *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus paracasei* پاراکازی کشته شده با حرارت در رده سرطانی K562 لوسمی میلوئیدی مزمن انسان در شرایط آزمایشگاهی

**ملیحه ریکی:** کارشناس ارشد زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (\*\*نویسنده مسئول) malihe.riki@yahoo.com  
**امیر توکمه‌چی:** استادیار، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران  
**اکرم حاجی رحیمی:** کارشناس ارشد زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران  
**فرزانه بنیادی:** کارشناس ارشد زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

رده سلولی K562،  
پروبیوتیک،  
خواص ضد سرطانی

**زمینه و هدف:** پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های گوناگونی تعریف می‌شوند که دارای اثرات مفید در جلوگیری و درمان شرایط پاتولوژیک ویژه هستند. خواص ضد سرطانی این گروه از باکتری‌ها در مطالعات گوناگون به اثبات رسیده است. هدف این مطالعه ارزیابی اثرات ضدتوموری پروبیوتیک‌های *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus paracasei* پاراکازی کشته شده با حرارت در رده سرطانی K562 لوسمی میلوئیدی مزمن بود.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی در شرایط بی‌هوازی کشت و در دمای ۱۰۰°C کشته شدند. باکتری‌های کشته شده با حرارت پس از خشک شدن بوسیله دستگاه انجماد خشک، توسط اتوکلاو استریل شدند. سپس غلظت‌های ۱۲۵،۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از باکتری‌ها تهیه و خواص سلول‌کشی آنها علیه رده سرطانی K562 در شرایط آزمایشگاهی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT سنجیده شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که *Lactobacillus casei* کشته شده با حرارت به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) باعث القاء مرگ سلولی رده سرطانی مورد بررسی در تمام زمان‌های مورد مطالعه می‌شوند و با افزایش غلظت بر میزان سلول‌کشی آنها افزوده می‌گردد. **نتیجه‌گیری:** بر اساس این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که *Lactobacillus casei* کشته شده با حرارت، می‌تواند به عنوان کاندیدای بالقوه برای مطالعات بیشتر به عنوان دارویی در درمان لوسمی میلوئیدی مزمن مورد بررسی قرار گیرند.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت کننده:** پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه

#### شیوه استناد به این مقاله:

Riki M, Tukmechi A, Hajirahimi A, Bonyadi F. Evaluation of inhibitory effects of heat-killed *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: an in vitro study. Razi J Med Sci. 2019;26(1):1-9.

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با 1.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.



Original Article

## Evaluation of inhibitory effects of heat-killed *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: An in vitro study

- © **Malihe Riki**, MSc in Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Iran (\*Corresponding author) malihe.riki@yahoo.com  
**Amir Tukmechi**, PhD, Assistant Professor of Department of Pathobiology and Quality Control, Urmia Lack Studies Research Institute, Urmia University, Iran  
**Akram Hajirahimi**, MSc in Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Iran  
**Farzane bonyadi**, MSc in Biology, Histology and Embryology, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Iran

### Abstract

**Background:** Probiotics are defined as different microorganisms that may have positive effects on preventing or treatment of special pathologic conditions. Anti-cancer properties of these bacteria have been shown in few studies. The aim of this study was to evaluate anti-tumor effects of heat-killed *L. casei* and *L. paracasei* on K562 cell line (chronic myeloid leukemia).

**Methods:** In this experimental study, bacteria were cultured in special medium at anaerobic condition, then, cells killed at temperature of 100°C. Killed cells were dried by lyophilization, finally were sterilized by autoclaving. Then, different concentrations of heat-killed bacteria (125, 250, 500, 1000 and 2000 µg/ml) were prepared separately. Anti-tumor properties of heat-killed bacteria were determined in vitro at 24, 48 and 72 h with MTT assay.

**Results:** Our result showed that heat-killed cells of *L. casei* and *L. paracasei* statistically ( $p < 0.05$ ) have Anti-tumor properties in K562. In addition, Anti-tumor properties of heat-killed cells have direct relationship with concentration.

**Conclusion:** Based on obtained results we conclude that the heat killed *Lactobacillus* can be used as a potential candidate for further studies on chronic myeloid leukemia treatments.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** Research studies on the Lake, Urmia University

### Keywords

K562,  
Probiotic,  
Anti-tumor properties

Received: 01/12/2018

Accepted: 12/02/2019

### Cite this article as:

Riki M, Tukmechi A, Hajirahimi A, Bonyadi F. Evaluation of inhibitory effects of heat-killed *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: an in vitro study. Razi J Med Sci. 2019;26(1):1-9.

This work is published under [CC BY-NC-SA 1.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



دست می‌دهند (۸). لذا تلاش در جهت بکارگیری داروهایی با پتانسیل بالا که آثار سوء داروهای شیمی درمانی را ندارند، اما در درمان سلول‌های سرطانی مؤثرند، ادامه دارد.

پروبیوتیک‌ها عبارتند از سلول‌های میکروبی که اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان دارند (۹). پروبیوتیک‌ها در حقیقت باکتری‌های مفید دستگاه گوارش هستند که دارای قابلیت‌های مختلفی بوده و از مهمترین آنها ایجاد تعادل در دستگاه گوارش و سیستم ایمنی بدن می‌باشد (۱۰). لاکتوباسیلوس‌ها بیشترین میکروارگانیسم‌هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پروبیوتیک‌ها از جمله لاکتوباسیلوس‌ها باعث مهار رشد بسیاری از انواع سلول‌های پاتولوژیک می‌شوند. این گروه از باکتری‌ها می‌توانند باعث افزایش پاسخ ایمنی میزبان شده و همچنین اثرات پیشگیری کننده در ابتلا به سرطان و نیز مهار کنندگی رشد تومور سرطانی داشته باشند (۱۱). لاکتوباسیلوس‌ها فلور طبیعی روده هستند و با جلوگیری از عفونت‌های روده‌ای، کاهش کلسترول، تحریک سیستم ایمنی و کاهش ریسک سرطان کولون نقش مهمی را در سلامتی انسان بازی می‌کنند (۱۲). اثرات مفید گونه‌های مختلف این باکتری‌ها در مطالعات مختلف نشان داده شده است. با این حال خواص از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت می‌باشد. در مطالعات گوناگون، محققین این خواص را اختصاصی گونه و سویه دانسته‌اند (۱۳). ادعای ضدسرطانی بودن پروبیوتیک‌ها به شدت مورد توجه و پژوهش قرار گرفته است. شواهد فراوانی وجود دارد، مبنی بر اینکه پروبیوتیک‌ها با دارا بودن خواص ضد سرطانی، قادر به کاهش ریسک ابتلا به سرطان و نیز درمان نسبی برخی سرطان‌ها هستند. یافته‌های به دست آمده از مطالعات نشان می‌دهند که اجزای سلولی لاکتوباسیلوس‌ها شامل سلول کامل، سلول‌های کشته شده توسط حرارت، دیواره سلولی، پپتیدو گلیکان و عصاره سیتوپلاسمی دارای عملکردهای متفاوتی به هنگام مجاور شدن با سلول‌های سرطانی هستند (۱۴). در یک مطالعه مقایسه‌ای در بین ۲۲۳ بیمار مبتلا به

لوسمی یا سرطان خون یک نوع سرطان بدخیم مغز استخوان و خون بوده که منجر به تجمع غیر قابل کنترل سلول‌های غیرطبیعی خون و مهار عملکرد آنها شده و در بسیاری از موارد منجر به مرگ می‌گردد (۱). لوسمی با توجه به منشأ سلولی، به میلوئید و لنفوئید و با توجه به سیر بیماری، به مزمن و حاد تقسیم‌بندی می‌شود. بر این اساس به چهار گروه سرطان خون لنفوبلاستیک حاد، سرطان خون میلو بلاستیک حاد، سرطان خون لنفوبلاستیک مزمن و سرطان خون میلو بلاستیک مزمن طبقه‌بندی می‌گردد (۲).

وقوع هر دو شکل حاد و مزمن لوسمی تا حدودی در مردان شایع‌تر از زنان است (۳). لوسمی نسبت به دیگر سرطان‌ها بیشترین مرگ را در افراد زیر ۲۰ سال باعث می‌شود (۱). لوسمی میلوئیدی مزمن یکی از شناخته شده‌ترین انواع لوسمی است که به دلیل یک جابه‌جایی دو طرفه بین ژن *abl* در کروموزوم ۹ و ژن *bcr* موجود در کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی چند توان به وجود می‌آید. نتیجه این جابه‌جایی کروموزومی منجر به شکل‌گیری ژن الحاقی *Abl-Bcr* می‌شود (۴، ۵). محصول این ژن الحاقی در لوسمی میلوئیدی مزمن، پروتئین ۲۱۰ کیلو دالتونی *P210Bcr-Abl* می‌باشد که یک تیروزین کیناز با فعالیت مداوم است. این پروتئین باعث تکثیر بی‌رویه سلول‌های رده میلوئیدی و اختلال در مرگ برنامه‌ریزی سلولی می‌گردد (۵). بیشتر مطالعات در زمینه لوسمی میلوئیدی به حالت *in vitro* محدود می‌گردد. چندین رده سلولی از بیمارانی با لوسمی میلوئیدی تهیه و شناسایی شده است که یکی از آنها رده سلولی *K562* می‌باشد (۶).

بطور کلی، داروهایی که در شیمی درمانی بکار می‌روند منجر به القاء آپوپتوزیس و مهار رشد می‌شوند (۷)؛ اما اثرات جانبی این داروها و مقاومتی که سلول‌های سرطانی نسبت به آنها نشان می‌دهند، از مشکلات و موانع مهم در شیمی درمانی به شمار می‌روند. در حال حاضر داروهایی که در درمان لوسمی بکار گرفته می‌شوند، عمدتاً به دلیل ایجاد مقاومت به دارو اثر خود را از

مدت ۲۴-۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوای و دمای  $30^{\circ}\text{C}$  کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۳۵۰۰ و در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل دو مرتبه با بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH برابر ۶/۹ شستشو داده شدند. باکتری‌ها پس از شستشو به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $100^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. سپس باکتری‌ها به مدت یک شبانه‌روز داخل دستگاه انجماد خشک (Chist, Germany) قرار داده شد تا خشک شوند. برای تهیه غلظت‌های مختلف، از باکتری مورد نیاز وزن شده و جهت استریل کردن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای  $121^{\circ}\text{C}$  اتوکلاو شدند.

تهیه غلظت‌های مختلف از باکتری‌ها: در این تحقیق، عمل رقیق‌سازی توسط محیط کشت RPMI انجام گرفت و رقت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از باکتری‌ها در شرایط استریل تهیه شد.

تست MTT: برای سنجش خاصیت ضدتوموری دیواره‌های سلولی از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. نمک‌های تترازولیوم مانند MTT را می‌توان برای ارزیابی میزان سلول‌های زنده به کار برد. این رنگ‌ها فقط در میتوکندری سلول‌های زنده توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز به صورت ذرات نامحلول بنفش رنگ فورمازان شکسته می‌شوند. جهت سنجش خاصیت ضد توموری باکتری‌های کشته شده با حرارت، از سلول‌های K562 پس از سانتریفیوژ و شمارش، مقدار  $100\ \mu\text{l}$  با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در محیط کشت RPMI به همراه ۱۵٪ FBS به هر چاهک میکروپلیت-های ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد. سپس  $100\ \mu\text{l}$  محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف باکتری‌های کشته شده با حرارت، به چاهک‌ها اضافه شد.

در نهایت غلظت‌های تأثیر داده شده باکتری‌ها، به نصف میزان اولیه (۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰) تقلیل یافت. در هر میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، سه چاهک دیگر نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و به هر چاهک  $100\ \mu\text{l}$  سلول به همراه  $90\ \mu\text{l}$  محیط کشت RPMI و  $10\ \mu\text{l}$  بافر فسفات سالین استریل افزوده شد. در مرحله بعد میکروپلیت‌ها با تراکم سلولی ۲۰۰۰۰ حاوی لاکتوباسیلوس‌های کازیبی و پاراکازیبی کشته شده تأثیر داده شده، به مدت ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای

سرطان گردن رحم مشاهده گردید که دیواره سلولی جدا شده از ل. کازیبی کشته شده با حرارت، دارای اثرات ضد توموری می‌باشد (۱۵). هم‌چنین Chin و Tzu در سال ۲۰۱۰ تأثیرات مهارتی لاکتوباسیلوس پاراکازیبی و ل. پلانتریوم کشته شده با حرارت، بر رده‌های HT-29 و Caco-2 سرطان کولون را نشان دادند (۱۶). مطالعات نشان می‌دهند، لاکتوباسیلوس روتری (*reuteri*) باعث القاء ترشح عواملی می‌شود که سبب آپوپتوز در سلول‌های لوسمی میلوئیدی می‌گردد (۱۷).

مرور منابع علمی موجود نشان می‌دهد که تاکنون تحقیقی در خصوص استفاده از لاکتوباسیلوس‌های کازیبی و پاراکازیبی کشته شده با حرارت برای ارزیابی اثرات سلول‌کشی و آپوپتوتیک در رده سرطانی K562 یافت نشده است. با توجه به اهمیت پروبیوتیک‌ها برای درمان سرطان، در این مطالعه اثر مهار رشدی لاکتوباسیلوس‌های کازیبی و پاراکازیبی کشته شده با حرارت برای اولین بار بر روی رده سلولی K562 لوسمی انسان مورد بررسی قرار گرفته است.

## روش کار

کشت سلول: سلول‌های K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور (C122) تهیه و در  $10$  میلی‌لیتر محیط کشت RPMI 1640 (Roswell park Memorial Institute, Gibco, England Fetal)، در حضور ۱۰ درصد FBS، (Bovine Serum, Gibco, England Sigma)،  $100$  میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک Streptomycin (American Penicillin, American Sigma) و  $100$  واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک Penicillin (American Sigma) در آنکوباتور با  $5\%$   $\text{CO}_2$  و  $95\%$  رطوبت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۸-۷۲ ساعت کشت داده شدند. سلول‌ها پس از رشد تا حدود  $80\%$  سطح فلاسک، از فلاسک جدا، شمارش و برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده کردن باکتری‌های کشته شده با حرارت: لاکتوباسیلوس کازیبی و پاراکازیبی جدا شده از روده ماهی کپور معمولی، از کلکسیون میکروارگانیسم آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه بدست آمدند (۱۸). هر کدام از باکتری‌ها به صورت جداگانه در  $10$  میلی‌لیتر محیط کشت MRS (deMan-Rogosa-Sharpe, Merck, Germany) به

مطالعه ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده با لاکتوباسیلوس‌های کشته شده توسط حرارت: به منظور بررسی تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های K562 تیمار شده با لاکتوباسیلوس‌های کشته شده توسط حرارت و سلول‌های تیمار نشده (کنترل) از رنگ آمیزی سلول‌ها توسط تریپان‌بلو (Merk, Germany) استفاده شد. بدین منظور، سلول‌ها با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لاکتوباسیلوس‌ها و به مدت ۲۴ ساعت تیمار و سپس توسط رنگ تریپان‌بلو (۰.۴٪) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری معکوس (Zeiss, Germany) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) One-Way Analysis of Variance نرم افزار SPSS ویراست ۲۹ و آزمون Tukey's (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها  $p < 0.05$  بود، هم‌چنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار Microsoft Excel 2010 انجام گرفت.

### یافته‌ها

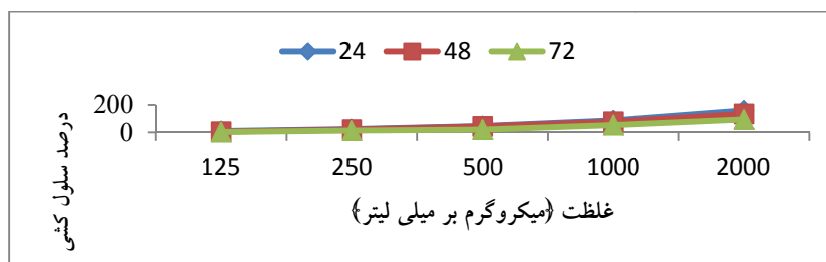
یافته‌های به‌دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که لاکتوباسیلوس‌های کشته شده توسط حرارت در

۳۷°C انکوباتور در حضور ۵٪ گاز CO<sub>2</sub> قرار داده شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، ۵mg از پودر MTT را در ۱ ml بافر فسفات سالین حل کرده و به هر چاهک، ۲۰ μl از محلول MTT اضافه گردید. سپس میکروپلیت‌ها به مدت چهار ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. طی این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های زنده برم موجود در محلول MTT را احیا کرده و آن را به صورت ذرات کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان در می‌آورد. از آنجایی که این ذرات نامحلول می‌باشند، به هر چاهک ۱۰۰ μl محلول دی‌متیل سولفوکسید خالص (DMSO) اضافه شد تا رسوبات حل گردند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الایزیدر ثبت گردید.

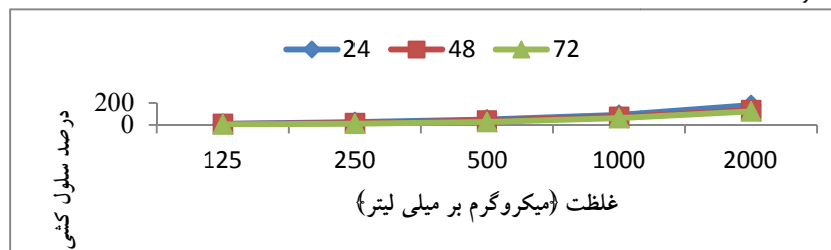
درصد سلول کشی دیواره‌ها با این فرمول محاسبه شد (۱۹):

$100 \times [\text{جذب نوری شاهد} + (\text{جذب نوری شاهد} - \text{جذب نوری نمونه}) = \text{درصد سلول کشی}]$

بر اساس این فرمول IC<sub>50</sub> (غلظتی که در آن موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی به میزان ۵۰٪ می‌گردد) دیواره‌های سلولی محاسبه گردید. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و داده‌ها به صورت Mean ± Standard Deviation ارائه شدند.



**نمودار ۱-** مقایسه میزان سلول کشی غلظت‌های مختلف لاکتوباسیلوس کازی کشته شده با حرارت در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر رده سرطانی K562 با استفاده از تست MTT.



**نمودار ۲-** مقایسه میزان سلول کشی غلظت‌های مختلف لاکتوباسیلوس پاراکازی کشته شده با حرارت در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر رده سرطانی K562 با استفاده از تست MTT.

از طرفی برای مشاهده شکل ظاهری سلول‌های تیمار شده پس از ۲۴ ساعت، از رنگ تریپان بلو استفاده شد. این ماده به سلول‌های مرده نفوذ و آنها را رنگ آمیزی می‌کند. بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های K562 تیمار شده و کنترل، توسط میکروسکوپ نوری پس از رنگ آمیزی توسط تریپان بلو نشان داد که این سلول‌ها شد. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، سلول‌های K562 تیمار شده، یکپارچگی غشاء خود را از دست داده و چروکیده شدند. این تغییرات ظاهری با تکه تکه شدن سلول‌های K562، به صورت

مقایسه با گروه کنترل، به طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) باعث مهار رشد وابسته به غلظت و زمان در سلول‌های K562 شد. به طوری که با افزایش غلظت، درصد مرگ سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد و با افزایش زمان از میزان سلول‌کشی کاسته می‌گردد. بنابراین لاکتوباسیلوس کازویی (نمودار ۱ و جدول ۱) و لاکتوباسیلوس پاراکازویی (نمودار ۲ و جدول ۲) کشته شده با حرارت، توانستند بیشترین میزان سلول‌کشی را پس از ۲۴ ساعت انجام دهند و در تمام غلظت‌ها، به طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) رشد سلول‌های سرطانی را مهار نمایند.

**جدول ۱- آنالیز آماری درصد مهار رشد سلول‌های K562 تیمار شده با لاکتوباسیلوس کازویی کشته شده با حرارت**

درصد مهار رشد			غلظت ( $\mu\text{g/ml}$ )
۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	
$2/24 \pm 2/18_b$	$5/14 \pm 1/0_1c$	$9/37 \pm 2/79_e$	۱۲۵
$12/93 \pm 1/14_b$	$20/17 \pm 9/33_{bc}$	$23/27 \pm 3/65_d$	۲۵۰
$20/67 \pm 9/33_b$	$44/18 \pm 11/99_{bc}$	$29 \pm 12/19_c$	۵۰۰
$53/14 \pm 13/07_{ab}$	$77/80 \pm 20/64_{ab}$	$86/53 \pm 3/04_b$	۱۰۰۰
$93/17 \pm 17/a$	$135/12 \pm 18/42_a$	$159/76 \pm 10/56_a$	۲۰۰۰

\* داده‌ها به صورت Mean  $\pm$  Standard Deviation بیان شدند. \*حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  می‌باشد.

**جدول ۲- آنالیز آماری درصد مهار رشد سلول‌های K562 تیمار شده با لاکتوباسیلوس پاراکازویی کشته شده توسط حرارت**

درصد مهار رشد			غلظت ( $\mu\text{g/ml}$ )
۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	
$6/38 \pm 2/28_c$	$10/65 \pm 4/36_d$	$10/81 \pm 3/94_d$	۱۲۵
$11/89 \pm 1/25_c$	$17/9 \pm 3/7_{cd}$	$25/91 \pm 2/68_d$	۲۵۰
$27/79 \pm 2/26_{bc}$	$40/52 \pm 3/92_c$	$49/38 \pm 14/38_c$	۵۰۰
$61/76 \pm 8/69_b$	$74/61 \pm 7/9_b$	$91/5 \pm 9/49_b$	۱۰۰۰
$123/12 \pm 20/23_a$	$135/32 \pm 6/39_a$	$180/42 \pm 4/5_a$	۲۰۰۰

\* داده‌ها به صورت Mean  $\pm$  Standard Deviation بیان شدند. \*حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  می‌باشد.



**شکل ۱- تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های K562 تیمار شده با لاکتوباسیلوس‌های کازویی و پاراکازویی کشته شده توسط حرارت با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰X).** A: سلول‌های کنترل، B: سلول‌های تیمار شده با ل. کازویی کشته شده با حرارت، C: سلول‌های تیمار شده با ل. پاراکازویی کشته شده با حرارت.

وزیکول‌های محصور به غشاء (اجسام آپوپتوتیک) همراه بود (شکل ۲).

### بحث و نتیجه‌گیری

در حال حاضر داروهایی که برای درمان لوسمی به کار می‌روند، اغلب به دلیل ایجاد مقاومت دارویی باعث عدم تأثیر و در نهایت مرگ بیمار می‌شوند (۲۰). بنابراین مطالعات جهانی وسیعی برای یافتن داروهای جدید، با به‌کارگیری رده‌های سلولی مختلف در جریان است. رده سلولی K562 یکی از رده‌های سلولی معروف لوسمی است که به عنوان مدلی مناسب برای لوسمی میلوئیدی مزمن و مقاوم به دارو محسوب می‌شود. هم‌چنین مطالعات نشان داده که بسیاری از عوامل درمانی سرطان به دلیل اثرات سمی آن‌ها بر سلول‌ها و بافت‌های طبیعی بدن، محدود شده است (۲۱). لذا اهمیت مطالعه حاضر در بررسی اثرات مهار رشدی در سلول‌های K562 لوسمی میلوئیدی مزمن انسانی می‌باشد. از جمله مطالعات انجام شده پیرامون مهار رشد رده سرطانی K562، می‌توان به تحقیقات زونگ و همکاران در سال ۲۰۱۰ اشاره نمود. این گروه از محققین، تأثیر غلظت‌های مختلف داروی ضد قارچی گریزوفولونین را بر مهار رشد رده K562 در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند و مشاهده نمودند که این دارو باعث مهار رشد وابسته به غلظت و زمان سلول‌های سرطانی شدند (۲۲). از جمله ترکیبات طبیعی دیگری که دارای خواص ضدتوموری علیه K562 می‌باشند، می‌توان به کورکومین و امودین اشاره کرد. این ترکیبات قادر هستند در شرایط آزمایشگاهی رشد رده سرطانی K562 را بسته به غلظت، مهار نمایند (۲۳ و ۲۴).

امروزه با شناخت عملکرد پروبیوتیک‌ها در حفظ سلامت و اهمیت آن‌ها در پیشگیری از بیماری‌ها، از این میکروارگانیسم‌ها به منظور ارتقای سطح سلامت بیماران استفاده می‌شود (۲۵). از جالب‌ترین و بحث‌انگیزترین ویژگی‌هایی که به باکتری‌های پروبیوتیک اسید لاکتیک نسبت داده شده است، فعالیت‌های ضدسرطانی آنها می‌باشد (۲۶). برخلاف عوامل درمانی چون شیمی درمانی، پروبیوتیک‌ها و ترکیبات مشتق از آن‌ها سلول‌های توموری را بدون آسیب رساندن به سلول‌های طبیعی و سایر عوارض جانبی از

بین می‌برند (۲۷). مطالعات انجام شده در شرایط *in vivo* و *in vitro* نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها به طور بالقوه باعث کاهش خطر ابتلا به سرطان کولون می‌شوند (۲۸). Seow گزارش نمود، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و کازی، رشد سلول‌ها را در دو رده MGH و RT112 سرطان مثانه، مهار می‌نمایند (۲۹). هم‌چنین در تحقیقی که در سال ۲۰۰۴ توسط Lee و همکاران صورت گرفت، معلوم شد که عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس کازی و بیفیدوباکتر (*Bifidobacterium*) تأثیر مستقیمی بر مهار رشد سلول‌های سرطانی دارند. به این ترتیب که در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب مهار رشد تقریباً ۵۰ درصدی سلول‌های سرطانی گردیدند (۳۰). Kim, فعالیت‌های ضدسرطانی پپتیدوگلیکان‌ها و سایر ترکیبات دیواره سلولی سویه‌های مختلفی از لاکتوباسیلوس‌ها، از جمله لاکتوکوک (*Lactococcus*) استرپتوکوک (*Streptococcus*) و بیفیدوباکتر (*Bifidobacterium*) را نشان داد (۳۱). هم‌چنین بر اساس تحقیقات انجام شده، بخش‌های پلی‌ساکاریدی جدا شده از لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس ۶۰۶ کشته شده با حرارت، تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند، در صورتی که پروتئین‌ها و لیپیدهای جدا شده از این باکتری‌ها، تأثیری بر تکثیر سلول‌های سرطانی نداشتند. لذا احتمالاً بخش پلی‌ساکاریدی دیواره سلولی، بخش اصلی مربوط به اثرات ضد سرطانی دیواره سلولی لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد (۳۲). Bonyadi، به بررسی اثرات مهار رشدی دیواره سلولی مخمر ساکارومیسس سرویسیه به عنوان یک پروبیوتیک بر رده سرطانی K562 پرداخت. نتایج حاصل از این مطالعه ایجاد مرگ سلولی وابسته به غلظت را نشان داد (۳۳). بنابراین در توافق با این گزارشات، در مطالعه حاضر تأثیر باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازی و لاکتوباسیلوس پاراکازی کشته شده با حرارت، بر رشد رده سلول‌های سرطانی K562 (سرطان سلول‌های میلوئیدی خون انسان) بررسی شد. یافته‌های حاصل از تأثیر لاکتوباسیلوس‌های کشته شده توسط حرارت در این مطالعه، بر مهار رشد سلول‌های سرطانی نشان داد که هر دو باکتری توانستند پس از کشته شدن توسط حرارت، رشد سلول‌های سرطانی را مهار نمایند. به

immunological characterization of human haemic cell lines: Evidence for heterogeneity. *Leukemia Res*; 1977. 1: 35.

7. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Zhao J, Crogan-Grundy C. Discovery of 4-aryl-4Hchromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based highthroughput screening assay. 4 structure-activity relationships of fused rings at the 7, 8-positions. *J Med Chem*; 2007. 50: 2858-64.

8. Wong S, McLaughlin J, Cheng D, Witte ON. Cell context-specific effects of the BCR-ABL oncogene monitored in hematopoietic progenitors. *Blood*; 2003. 101: 4088-97.

9. Salinas I, Abelli L, Bertoni F, Picchiatti S, Roque A, Furones D, et al. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L). *Fish Shellfish Immunol*; 2008. 25(1-2):114-23.

10. Drisko JA, Giles CK, Bischoff BJ. Probiotics in health maintenance and disease prevention. *Altern Med Rev*; 2003. 8(2):143-55.

11. Tsai YT, Cheng PC, Fun CK, Pan TM. Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain *Lactobacillus paracasei* subsp *Paracasei* NTU 101. *Inter J Food Microb*; 2008. 128: 219-25.

12. Pei-Ren L, Roch-Chui YU, Cheng-Chun C, Echu. Determinations of the antimutagenic activities of several probiotic bifidobacteria under acidic and bile conditions against benzo pyrene by a modified Ames test. *Inter J Food Microb*; 2004. 93: 249-57.

13. Gackowska L, Michalkiewicz J, Krotkiewski M, Helmin Basa A, Kubiszewska I. Combined effect of different lactic acid bacteria strains on the mode of cytokines pattern expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Physiol Pharmac*; 2006. 57: 13-21.

14. Lee JW, Shin JG, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY, et al. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *J Vet Sci*; 2004. 5(1):41-8.

15. Okawa T, Niibe H, Arai T, Sekiba K, Noda K, Takeuchi S, Hashimoto S, Ogawa N. Effect of LC9018 combined with radiation therapy on carcinoma of the uterine cervix. *Cancer*; 1993. 72: 1949-54.

16. Chin FL and Tzu MP. In Vitro Effects of Lactic Acid Bacteria on Cancer Cell Viability and Antioxidant Activity. *J Food Drug Anal*; 2010. 2 (18): 77-86.

17. Bartosch S, Woodmansey EJ, Paterson JC, McMurdo ME, Macfarlane GT. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis* and oligofructose in elderly persons, determined by real-

طوری که با افزایش غلظت، قدرت سلول کشی آن‌ها افزایش یافت. با توجه به مروری بر مطالعات انجام شده و مقایسه‌ای که مابین نتایج این مطالعه با آنها انجام شد، می‌توان ل. کازیبی و ل. پاراکازیبی کشته شده توسط حرارت را به عنوان ترکیباتی طبیعی با قدرت القاء آپوپتوزیس و یک کاندیدای بالقوه برای مطالعات بیشتر در درمان لوسمی مطرح کرد و اثرات مهار رشدی آن‌ها را در رده سلولی K562 مورد توجه قرار داد.

به طور کلی این مطالعه، عملکرد مؤثر لاکتوباسیلوس‌های کازیبی و پاراکازیبی کشته شده توسط حرارت را در حالت وابسته به غلظت و زمان، بر مهار رشد را نشان داد. هم‌چنین نویسندگان این مقاله، انجام آنالیزهای بیوشیمیایی ل. کازیبی و ل. پاراکازیبی پس از کشته شدن توسط حرارت، جهت یافتن عوامل مؤثر بر مهار رشد سلول‌های سرطانی را پیشنهاد می‌دهند.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، به دلیل حمایت مالی برای انجام این تحقیق، ابراز می‌دارند.

### References

1. Kwan JM, Fialho AM, Kundu M, Thomas J, Hong CS, Gupta TK, et al. Bacterial proteins as potential drugs in the treatment of leukemia. *Leukemia Res*; 2009. 33: 1392-99.
2. Mahmoud Abadi A. [Leukemia (Blood cancer)]. Mashhad: Kerdegari Publisher; 2008. P. 11-55. (Persian)
3. Alavi S, Arzanian MT, Moradmand M, Ashraftalesh H. [Prevalence of prognostic factors in children with Acute Lymphoblastic Leukemia admitted to Mofid Childrens]. *Iran J Pediatrics*; 2005. 15: 237-242. (Persian)
4. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*; 2000. 96: 3343-56.
5. Ten Bosch GJA, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJM, Leeksa OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD34+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood*; 1996. 88: 3522-7.
6. Karpas A, Hayhoe FGJ, Green berger JS, Barker CR, Cawley JC, Lowenthal R.M. and Moloney WC. The establishment and cytological, cytochemical and

۸

- time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clin In Dis*; 2005. 40(1): 28-37.
18. Azizpour K. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of west Azarbaijan. *Res J Biol Sci*; 2009. 4(3); 324-6.
19. Kabiri F, Nejati V, Tukmechi A, Delirez N, Nikbakhsh P. [Inhibitory properties of cytoplasmic extract of *Lactobacilli* isolated from common carp intestine on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: an in vitro study]. *Tehran Uni Med J*; 2011; 68: 691-698. (Persian)
20. Rahmani M, Nguyen TK, Dent P, Grant S. The multikinase inhibitor sorafenib induces apoptosis in highly Imatinib Mesylate-resistant Bcr/Abl+ human leukemia cells in association with signal transducer and activator of transcription 5 inhibition and myeloid cell leukemia-1 down-regulation. *Mol Pharmacol*; 2007. 72: 788-95.
21. Damia G, Broggin M. Improving the selectivity of cancer treatments by interfering with cell response pathways. *Eur J Cancer*; 2004. 40(17):2550-9.
22. Zhong N, Chen H, Zhao Q, Wang H, Yu X, Ashley M, et al. Effects of Griseofulvin on Apoptosis Through Caspase-3- and Caspase-9-Dependent Pathways in K562 Leukemia Cells: An In Vitro Study. *Curr Thera Res*; 2010. 6: 384-97.
23. Xie J, Que W, Chen M, Sun J, Liu T, Liu H, et al. Antitumor effects of curcumin in human chronic myeloid leukemia occur through cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis. *Afr J Pharm Pharmacol*; 2011. 5: 985-92.
24. Chun-Guang W, Jun-Quang Y, Bei Zhong L, Dan-Ting J, Chong W, Liang Z, et al. Anti-tumor activity of emodin against human chronic myelocytic leukemia K562 cell lines in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*; 2010. 627: 33-41
25. Hart AL, Kamm MA. Mechanism of action of probiotics. *Recent advances. Inflamm Bowel Dis*; 2009. 15: 300-10.
26. Rafter J. The effects of probiotics on colon cancer development. *Nut Res Rev*; 2004. (17): 277-84.
27. Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. *A J Gastro*; 2000. 95(1): 2-4.
28. Brady LJ, Gallaher DD, Busta FF. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J Nut*; 2000. 130: 410-4.
29. Seow SW, Rahmat JNB, Mohamed AAK, Mahendran R, Lee YK, Bay BH. *Lactobacillus* species is more cytotoxic to human bladder cancer cells than *Mycobacterium bovis* (*Bacillus Calmette-Guerin*). *J Uro*; 2002. 168: 2236-9.
30. Lee JW, Shin JG, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY, et al. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *J Vet Sci*; 2004. 5: 41-8.
31. Kim JY, Woo HJ, Kim YS, Lee HJ. Screening for antiproliferative effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines. *Bio Lett*; 2002. 24: 1431-6.
32. Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S and Kim SH. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. *Let Ap Microb*; 2006. 42: 452-8.
33. Bonyadi F, Nejati V, Tukmechi A, Hasanzadeh SH, Riki M. Evaluation of Apoptotic Effects of Cell Wall and Cytoplasmic Extract from *Saccharomyces cerevisiae* on K562 Cell Line. *Armaghane-Danesh, Yasuj Uni Med Sci J*; 2013. 18(9):699-710. (Persian)