



## ارزیابی اثرات مهار رشدی لاکتوباسیلوس کازی و لاکتوباسیلوس پاراکازی کشته شده با حرارت در رده سرطانی K562 لوسومی میلوبیدی مزمن انسان در شرایط آزمایشگاهی

مليحه ريك: کارشناس ارشد زبست‌شناسي، گروه زبست‌شناسي، دانشكده علوم، دانشكاه اروميه، اروميه، ايران (\*نويسنده مسئول)  
 امير توكمچي: استاديار، گروه پاتوبیولوژي و کترل کيفي، پژوهشکده مطالعات درياچه اروميه، دانشكاه اروميه، اروميه، ايران  
 اکرم حاجی رحیمی: کارشناس ارشد زبست‌شناسي، گروه زبست‌شناسي، دانشكده علوم، دانشكاه اروميه، اروميه، اiran  
 فرزانه بنيادي: کارشناس ارشد زبست‌شناسي، گروه زبست‌شناسي، دانشكده علوم، دانشكاه اروميه، اروميه، اiran

### چکیده

کلیدواژه‌ها  
K562، رده سلولی پروپوپوتیک، خواص ضد سرطانی

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۰  
تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۲۳

**زمینه و هدف:** پروپوپوتیک‌ها به عنوان میکرووارگانیسم‌های گوناگونی تعریف می‌شوند که دارای اثرات مفید در جلوگیری و درمان شرایط پاتولوژیک و بیزه هستند. خواص ضد سرطانی این گروه از باکتری‌ها در مطالعات گوناگون به اثبات رسیده است. هدف این مطالعه ارزیابی اثرات ضدتوموری پروپوپوتیک‌های لاکتوباسیلوس کازی و لاکتوباسیلوس پاراکازی کشته شده با حرارت در رده سرطانی K562 لوسومی میلوبیدی مزمن بود.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی در شرایط بی‌هوایی کشت و در دمای  $100^{\circ}\text{C}$  کشته شدند. باکتری‌های کشته شده با حرارت پس از خشک شدن بوسیله دستگاه انجماد خشک، توسط اتوکلاو استریل شدند. سپس غلظت‌های  $1,000$ ،  $5,000$ ،  $12,500$  و  $20,000$  میکروگرم در میلی‌لیتر از باکتری‌ها تهیه و خواص سلول کشی آنها علیه رده سرطانی K562 در شرایط آزمایشگاهی در زمان‌های  $24$ ،  $48$  و  $72$  ساعت با روش MTT سنجیده شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که لاکتوباسیلوس‌های 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 سلول کشی آنها افزوده می‌گردد.

**نتیجه گیری:** بر اساس این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که لاکتوباسیلوس‌های کشته شده با حرارت، می‌توانند به عنوان کاندیدای بالقوه برای مطالعات بیشتر به عنوان دارویی در درمان لوسومی میلوبیدی مزمن مورد بررسی قرار گیرند.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.  
**منبع حمایت کننده:** پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشكاه 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 CC BY-NC-SA 1.0 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.



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). لاکتوپاسیلوس‌ها بیشترین میکرووارگانیسم‌هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پروبیوتیک‌ها از جمله لاکتوپاسیلوس‌ها 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). لاکتوپاسیلوس‌ها فلور طبیعی روده هستند و با جلوگیری از عفونت‌های روده‌ای، کاهش کلسترول، تحریک سیستم ایمنی و کاهش ریسک سرطان کلولون 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 لاکتوپاسیلوس‌ها شامل سلول کامل، سلول‌های کشته شده توسط حرارت، دیواره سلولی، پپتیدوگلیکان 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 میلوبئید 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 میلوبلاستیک حاد، سرطان خون لنفوبلاستیک مزمن و سرطان خون میلوبلاستیک 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 میلوبئیدی مزمن یکی از شناخته شده‌ترین انواع لوسمی است که به دلیل یک جابه‌جایی دو طرفه بین ژن *abl* در کروموزوم ۹ و ژن *ber* در کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی چند توان به وجود می‌آید. نتیجه این جابه‌جایی کروموزومی منجر به شکل‌گیری ژن الحقیقی *Abl-Bcr* می‌شود (۴، ۵).  
محصول این ژن الحقیقی در لوسمی میلوبئیدی مزمن، پروتئین ۲۱۰ کیلو دالتونی *Abl-P210Bcr-Abl* می‌باشد که یک تیروزین کیناز با فعالیت مداوم است. این پروتئین باعث تکثیر بی‌رویه سلول‌های رده میلوبئیدی و اختلال در مرگ برنامه‌ریزی سلولی می‌گردد (۵). بیشتر مطالعات در زمینه لوسمی میلوبئیدی به حالت *in vitro* محدود می‌گردد. چندین رده سلولی از بیمارانی با لوسمی میلوبئیدی تهیه و شناسایی شده است که یکی از آن‌ها رده سلولی K562 می‌باشد (۶).

بطورکلی، داروهایی که در شیمی درمانی بکار می‌روند منجر به القاء آپوپتوزیس و مهار رشد می‌شوند (۷)، اما اثرات جانبی این داروهای 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، عمدها به دلیل ایجاد مقاومت به دارو اثر خود را از

مدت ۲۴-۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوایی و دمای  $30^{\circ}\text{C}$  کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها به  $40^{\circ}\text{C}$  مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۳۵۰۰ و در دمای  $40^{\circ}\text{C}$  سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل دو مرتبه با بافر فسفات  $10\text{ مولار}$  و pH  $6/9$  شستشو داده شدند. باکتری-ها 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  $2500$ ،  $500$ ،  $1000$ ،  $2000$  و  $4000$  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 ضدتوموری باکتری‌های کشته شده با حرارت، از سلول‌های K562 پس از سانتریفیوژ و شمارش، مقدار  $1\mu\text{l}$   $100$  با تراکم  $20000$  سلول در محیط کشت  $\text{RPMI}$  به همراه  $15\%$  FBS به هر چاهک میکروپلیت-۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد. سپس  $1\mu\text{l}$   $100$  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 ( $125$ ،  $1000$ ،  $500$ ،  $250$ )  $2000$  تقليل یافت. در هر میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، سه چاهک دیگر نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و به هر چاهک  $1\mu\text{l}$   $100$  سلول به همراه  $1\mu\text{l}$   $90\mu\text{l}$  محیط کشت  $\text{RPMI}$  و  $1\mu\text{l}$  بافر فسفات سالین استریل افزوده شد. در مرحله بعد میکروپلیت‌ها با تراکم سلولی  $20000$  حاوی لاکتوباسیلوس‌های کازیی و پاراکازیی کشته شده تأثیر داده شده، به مدت  $24$  و  $48$  و  $72$  ساعت در دمای

سرطان گردن رحم مشاهده گردید که دیواره سلولی جدا شده از ل. کازیی کشته شده با حرارت، دارای اثرات ضد توموری می‌باشد (۱۵). همچنین Chin و Tzu در سال ۲۰۱۰ تاثیرات مهاری لاکتوباسیلوس پاراکازیی و HT-29 ل. پلاتلتاریوم کشته شده با حرارت، بر رده‌های 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 کازیی و پاراکازیی کشته شده با حرارت برای ارزیابی اثرات سلول‌کشی و آپوپتوزیک در رده سرطانی K562 یافته نشده است. با توجه به اهمیت پروبیوتیک‌ها برای درمان سرطان، در این مطالعه اثر مهار رشدی لاکتوباسیلوس‌های کازیی و پاراکازیی 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 انسنتیتو پاستور (C122) تهیه و در  $10\text{ میلی‌لیتر}$  محیط کشت Roswell park Memorial Institute، (RPMI 1640 Fetal FBS)، در حضور  $10\text{ درصد}$  Gibco, England (Bovine Serum, Gibco, England) میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک Sigma، (Streptomycin) و  $100\text{ واحد بین‌المللی}$  بر میلی‌لیتر از American (American Penicillin) در آنتی‌بیوتیک Sigma، (Penicillin) در انکوباتور با  $5\% \text{CO}_2$  و  $95\% \text{O}_2$  رطوبت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت  $48-72$  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 کازیی و پاراکازیی 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  $10\text{ میلی‌لیتر}$  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 (ANOVA) نرم افزار SPSS ویراست ۲۹ و آزمون Tukey's (آزمون اختلاف حقیقی) که به طور مخفف HSD (نمایدۀ 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

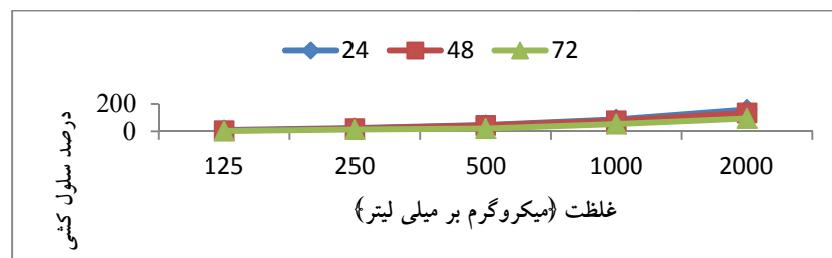
یافته‌های به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که لاکتوباسیلوس‌های کشته شده توسط حرارت در

$37^{\circ}\text{C}$  انکوباتور در حضور ۵٪ گاز  $\text{CO}_2$  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، ۱۰ 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 گرددند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزایدر ثبت گردید.

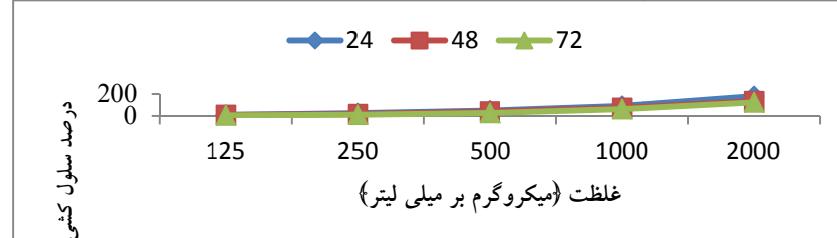
درصد سلول کشی دیواره‌ها با این فرمول محاسبه شد (۱۹):

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

بر اساس این فرمول IC50 (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 آرائۀ شدن Mean  $\pm$  Standard Deviation



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



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

از طرفی برای مشاهده شکل ظاهری سلول‌های تیمار شده پس از ۲۴ ساعت، از رنگ تریپان‌بلو 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 تریپان‌بلو نشان داد که این لاکتوپاسیلوس‌ها باعث ایجاد تغییرات ریخت‌شناسی 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 لاکتوپاسیلوس کازی (نمودار ۱ و جدول ۱) و لاکتوپاسیلوس پاراکازی (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 بالاکتوپاسیلوس کازی کشته شده با حرارت

درصد مهار رشد			غلظت (μg/ml)
ساعت ۷۲	ساعت ۴۸	ساعت ۲۴	
۲/۲۴±۲/۱۸ <sub>b</sub>	۵/۱۴±۱/۰ <sub>c</sub>	۹/۳۳±۲/۷ <sub>e</sub>	۱۲۵
۱۲/۹۳±۱/۱۴ <sub>b</sub>	۲۰/۱۷±۹/۳۳ <sub>bc</sub>	۲۳/۲۷±۳/۶۵ <sub>d</sub>	۲۵۰
۲۰/۶۷±۹/۳۳ <sub>b</sub>	۴۴/۱۸±۱۱/۹۹ <sub>bc</sub>	۴۹/۲۹±۱۲/۱۹ <sub>c</sub>	۵۰۰
۵۳/۱۴±۱۳/۰ <sub>ab</sub>	۷۷/۸۰±۲۰/۶۴ <sub>ab</sub>	۸۶/۵۳±۳/۰ <sub>۴b</sub>	۱۰۰۰
۹۳/۱۷±۱۷/ <sub>a</sub>	۱۳۵/۱۲±۱۸/۴۲ <sub>a</sub>	۱۵۹/۷۶±۱۰/۵۶ <sub>a</sub>	۲۰۰۰

\*داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{Standard Deviation}$  میان شدن.  $P < 0.05$  می‌باشد.

**جدول ۲** - آنالیز آماری درصد مهار رشد سلول‌های K562 تیمار شده بالاکتوپاسیلوس پاراکازی کشته شده توسط حرارت

درصد مهار رشد			غلظت (μg/ml)
ساعت ۷۲	ساعت ۴۸	ساعت ۲۴	
۶/۳۸±۲/۲۸ <sub>c</sub>	۱۰/۶۵±۴/۳۶ <sub>d</sub>	۱۰/۸۱±۳/۹۴ <sub>d</sub>	۱۲۵
۱۱/۸۹±۱/۲۵ <sub>c</sub>	۱۷/۹±۳/۷ <sub>cd</sub>	۲۵/۹۱±۲/۶۸ <sub>d</sub>	۲۵۰
۲۷/۷۹±۲/۲۶ <sub>bc</sub>	۴۰/۵۲±۳/۹۲ <sub>c</sub>	۴۹/۳۸±۱۴/۲۸ <sub>c</sub>	۵۰۰
۶۱/۷۶±۸/۶۹ <sub>b</sub>	۷۴/۶۱±۷/۹ <sub>b</sub>	۹۱/۵±۹/۴۹ <sub>b</sub>	۱۰۰۰
۱۲۳/۱۲۲±۲۰/۲۳ <sub>a</sub>	۱۳۵/۳۲±۶/۳۹ <sub>a</sub>	۱۸۰/۴۲±۴/۵ <sub>a</sub>	۲۰۰۰

\*داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{Standard Deviation}$  میان شدن.  $P < 0.05$  می‌باشد.



**شکل ۱** - تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های K562 تیمار شده بالاکتوپاسیلوس‌های کازی و پاراکازی کشته شده توسط حرارت با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی  $\times 40$ ). A: سلول‌های کنترل، B: سلول‌های تیمار شده با L. کازی کشته شده با L. پاراکازی کشته شده با حرارت.

بین می‌برند (۲۷). مطالعات انجام شده در شرایط *in vitro* و *in vivo* نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها به طور بالقوه باعث کاهش خطر ابتلا به سرطان کولون می‌شوند (۲۸). Seow گزارش نمود، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و *Kaziby*، رشد سلول‌ها را در دو رده MGH و RT112 سرطان مثانه، مهار می‌نمایند (۲۹). همچنان در تحقیقی که در سال ۲۰۰۴ توسط Lee و همکاران صورت گرفت، معلوم شد که عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس کازبی 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 پیتیدوگلیکان‌ها و سایر ترکیبات دیواره سلولی سویه‌های مختلفی از لاکتوباسیلوس‌ها، از جمله لاکتوکوک *(Lactococcus)* استرپتپوکوک *(Streptococcus)* و بیفیدوباکتر *(Bifidobacterium)* را نشان داد (۳۱). همچنان بر اساس تحقیقات انجام شده، بخش‌های پلی‌ساقاریدی 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 پلی‌ساقاریدی دیواره سلولی، بخش اصلی مربوط به اثرات ضد سرطانی دیواره سلولی لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد (۳۲). Bonyadi، به بررسی اثرات مهار رشدی دیواره سلولی مخمر ساکارومیس 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 کازبی و لاکتوباسیلوس پاراکازبی کشته شده با حرارت، بر رشد رده سلول‌های سرطانی K562 (سرطان سلول‌های میلوبیدی 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

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

## بحث و نتیجه‌گیری

در حال حاضر داروهایی که برای درمان لوسومی 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 مختلف در جریان است. رده سلولی K562 یکی از رده‌های سلولی معروف لوسومی است که به عنوان مدلی مناسب برای لوسومی میلوبیدی مزمن و مقاوم به دارو محسوب می‌شود. همچنان 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 لوسومی میلوبیدی 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 دارویی ضد قارچی گریزوفولوین 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 عليه 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

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 hightthroughput 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, Picchietti 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-

طوري که با افزایش غلظت، قدرت سلولکشی آنها افزایش یافت. با توجه به مروری بر مطالعات انجام شده و مقایسه‌ای که مابین نتایج این مطالعه با آنها انجام شد، می‌توان ل. کازی و ل. پاراکازی 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 کازی و پاراکازی کشته شده توسط حرارت را در حالت وابسته به غلظت و زمان، بر مهار رشد را نشان داد. همچنان نویسنده‌گان این مقاله، انجام آنالیزهای بیوشیمیایی ل. کازی و ل. پاراکازی پس از کشته شدن توسط حرارت، جهت یافتن عوامل مؤثر بر مهار رشد سلول‌های سرطانی را پیشنهاد می‌دهند.

## تقدیر و تشکر

نویسنده‌گان 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, Arzani MT, Moradmand M, Ashraftaleh 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, Leeksma 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 RM. and Moloney WC. The establishment and cytological, cytochemical and

- 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, Delirezh N, Nikbaksh 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, Broggini 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 chronicmyeloid leukemia occur through cell cycle arrest anddecrease the Bcl-2/Bax ratio toinduce apoptosis. *Afr J Pharm Pharacol*; 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)