



## 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

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

#### کلیدواژه‌ها

پروبیوتیک،  
سلول سرطانی،  
لاکتوباسیلوس،  
HUVEC،  
HT-29

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۷

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳

**زمینه و هدف:** برخی از غذاها از جمله محصولات لبنی مثل ماست، منابع خوبی برای پروبیوتیک‌ها محسوب می‌شوند. 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 لاکتوباسیلوس فرمنتوم (*L. Fermentum*) با همولوژی ۸۸/۶۱٪ تشخیص داده شد و درخت فیلوژنتیکی آن ر سم گردید و به عنوان سویه *Limosilactobacillus fermentum* GL ثبت گردید. عصاره لاکتوباسیلوس‌های 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 لاکتوباسیلوس 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.

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 به صورت دسترسی آزاد مطابق با 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.

## 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 Sciences, 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, Islamic 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

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  $4.87 \pm 50\%$ , respectively, decreased  $8.61 \pm 40\%$ ,  $5.80 \pm 25\%$ . 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  $50 \pm 4.87$ ,  $40 \pm 8.61$  and  $25 \pm 5.80\%$  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.**

## مقدمه

لاکتوباسیلوس‌ها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، میکرواُتروفیل یا بی‌هوازی 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). پروبیوتیک‌ها به طور عمده از سویه‌های لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم، استرپتوکوکوس و برخی از گونه‌های انتروکوکوس تشکیل شده‌اند (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 می‌تواند یک درمان بالقوه و اثرمهری برای سرطان روده بزرگ باشد (۳).

در همین رابطه و طبق گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت سرطان، یکی از موارد اصلی علت مرگ و میر در سراسر جهان است که عفونت‌ها و رژیم غذایی نامناسب باعث بدخیمی‌های معمول از جمله سرطان برای جوامع می‌شود. سرطان کلورکتال سومین سرطان شایع در جهان است و پیش‌بینی می‌شود مرگ و میر در آن تا ۲۰ سال آینده تقریباً دو برابر شود (۴). با توجه به عوارض منفی سرطان از روش‌های مختلفی مانند جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی جهت درمان سرطان استفاده می‌شود و به عنوان روش‌های اولیه در درمان سرطان کولورکتال استفاده می‌شوند. با این حال میزان موفقیت این درمان کافی نیست و میزان مرگ و میر ناشی از آن هر سال افزایش می‌یابد و یک سری استراتژی‌های لازم برای کنترل این بیماری کشنده مورد نیاز می‌باشند (۵). در بین موارد مختلف سرطان، سرطان کولورکتال با یک پولیپ روده خوش‌خیم آدنوما شروع می‌شود که با دیسپلازی درجه بالا، آدنوکارسینومای تهاجمی و متاستاز به اندام‌های دور دست منجر به آدنومای پیشرفته می‌شود. مفهوم پیشرفت تدریجی سرطان روده بزرگ به عنوان تومورزایی چند مرحله‌ای شناخته می‌شود و تصور می‌شود در هر مرحله با تغییرات ژنتیکی خاص در سرکوبگرهای تومور یا آنکوژن‌ها همراه است (۶،۷).

بطور کلی ویژگی اصلی سلول‌های سرطانی تکثیر غیر قابل کنترل سلولی و مقاومت در برابر مرگ برنامه

ریزی شده می‌باشد، بنابراین عاملی که باعث بروز آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شود، می‌تواند به عنوان یک ماده ضد سرطانی شناخته شود (۸). در بین موارد مختلف پروبیوتیک‌ها با کنترل آنزیم‌های گوارشی حیوانات و انسانها، باعث مهار عوامل سرطانی در بدن و شرایط آزمایشگاهی شده و همچنین در سرکوب ترکیبات و تومورهای 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 می‌گیرد، بلکه به دلیل توانایی در بیان ویژگی‌های سلول‌های روده بزرگ مورد توجه ویژه‌ای در مطالعات متمرکز بر هضم غذا و قابل دسترس بودن، قرار می‌گیرد (۱۱). HUVEC، سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسانی هستند که برای مطالعه‌ی عملکرد و آسیب‌شناسی سلول‌های اندوتلیال (به عنوان مثال آنژیوژنز) استفاده می‌شوند. HUVEC‌های جدا شده اولیه احتمالاً محبوب‌ترین موردی است که در تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا رگ‌های ناف انسان نسبت به سایر انواع رگ‌های خونی در دسترس‌تر هستند (۸). امروزه بعلاوه شیوع روزافزون سرطان دستگاه گوارش، این موضوع بعنوان یک چالش مهم بهداشت جهانی در نظر گرفته می‌شود 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 سویه‌های مختلف پروبیوتیک‌ها می‌تواند 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 سیلوس‌های جدا شده از فرآورده‌های لبنی استان گیلان بر رده سلول سرطانی HT-29 و سلول نرمال HUVEC تاثیر دارند یا خیر؟

## روش کار

برای انجام تحقیق حاضر ابتدا نمونه های لبنی شامل ماست، آب پنیر، دوغ و کشک محلی (۲۰ نمونه) از مناطق مختلف استان گیلان در شرایط بهداشتی درون فالکون‌های استریل مناسب جمع آوری شدند. سپس جهت جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها، ۱ ml و یا ۱ mg از نمونه (برحسب نوع نمونه)، به ۹ ml آب پپتونه ۰/۱٪ اضافه شد و به این ترتیب از همه ی نمونه ها رقت تهیه کرده و ۱۵۰ μl از هر رقتی به صورت سطحی در محیط MRS Agar کشت داده شد. جهت مهار رشد مخمرها هنگام تهیه ی محیط کشت به میزان ۰/۱ mg/l از آنتی بیوتیک نیستاتین به آن اضافه گردید و در دمای ۳۷ °C به مدت ۲ تا ۳ روز انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، همه ی ایزوله های با مورفولوژی باسیل گرم مثبت و فاقد اسپور مجدداً در محیط کشت MRS Agar کشت داده شدند و جهت شناسایی آنها در حد جنس از تست های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، تست تحمل دما و قند استفاده شد. سرانجام همه ی ایزوله های خالص شده شماره گذاری شده و در محیط MRS Broth حاوی ۲۰٪ از گلیسرول در فریزر ۲۰ °C و -۷۰ °C جهت مطالعات بعدی نگهداری شدند.

در ادامه ۱۰ μl از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها در 4 ml از MRS broth در محدوده‌های مختلف pH (۲، ۳، ۴، ۵) تلقیح و نتایج بعد از سه ساعت انکوباسیون در ۳۷ °C و در طول موج ۶۲۰ nm به همراه کنترل (MRS broth در pH 6.5) خوانده شد. تعداد باکتری‌ها در محیط MRS agar بعد از سه ساعت انکوباسیون در ۳۷ °C شمارش شده و میزان زنده مانده به صورت لگاریتم مقادیر (Colony Forming Unit)/ml (cfu) محاسبه گردید (۱۳، ۱۴). تا میزان تحمل PH مشخص شود.

بعد از تست تحمل PH و به منظور بررسی تحمل جدایه‌ها به نمک صفراوی مقدار ۱۰ μl از رشد فعال ایزوله‌ها در 4 ml از MRS broth با غلظت‌های مختلف (۰/۱۳٪، ۰/۱۵٪، ۰/۱۸٪) از نمک صفراوی شرکت (oxid) تلقیح گردید. بعد از انکوباسیون در ۳۷ °C به مدت ۳ ساعت، نتیجه به همراه کنترل در طول موج

۶۲۰ nm خوانده شد (۱۵). سپس برای بررسی تست تحمل فنل در جدایه‌ها، ۱۰ μl از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها را، در 4 ml از MRS broth با مقادیر فنل (۰/۲٪، ۰/۳٪، ۰/۴٪ و ۰/۵٪) تلقیح کرده و به همراه کنترل، بعد از ۳ ساعت انکوباسیون در ۳۷ °C جذب نوری آن در طول موج ۶۲۰ nm خوانده شد (۱۴). همچنین جهت انجام تست تحمل نمک، جدایه‌ها در MRS broth به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ °C انکوبه شدند. مقدار ۱۰ μl از MRS broth با رشد جدایه‌ها در سه غلظت مختلف نمک یعنی ۰/۴٪، ۰/۸٪ و ۱/۱۰٪ در 4 ml از MRS broth تلقیح شدند و نتایج به همراه نمونه کنترل بعد از انکوباسیون در ۳۷ °C به مدت ۳ ساعت، با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۰ nm قرائت و ثبت گردید (۱۵).

بعد از این مرحله به منظور بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها مقاومت ضد میکروبی ایزوله‌ها در مقابل آنتی بیوتیک‌های منتخب (شرکت پادتن طب) شامل آمپی سیلین (10 mg)، وانکومایسین (۱۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، کلیندامایسین (20 μg)، تتراسایکلین (30 μg) و استرپتومایسین (۱۰ μg)، به روش انتشار دیسک در آگار انجام گرفت. به این صورت که ابتدا ۱۰۰ μl از MRS broth فعال با رشد باکتری، به طور یکنواخت در محیط مولر هینتون آگار به کمک سوآب استریل تلقیح گردید. پس از خشک شدن، دیسک‌ها بر بستر آگار از هر ایزوله، قرار گرفت و پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال جهت انتشار آنتی بیوتیک گذاشته شد. همه ی پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید. نتایج با مقادیر استاندارد (CLSI-2020) CLSI مقایسه گردید. قطر هاله ی مهارش در شد اندازه گیری شد و نتایج به صورت مقاوم  $\geq 15$  mm، نیمه حساس  $= 16-19$  mm و حساس  $\leq 20$  mm ثبت گردید (۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹).

در مرحله بعد جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها روی باکتری‌های فرصت طلب بیماری‌زا، فعالیت آنتی باکتریال محلول روی ایزوله‌ها در مقابل گونه‌های باکتریایی استوک موجود در آزمایشگاه شامل استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، شیگلا

سرعت ۵۰۰۰ rpm سانترفیوژ 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 سانترفیوژ، دیواره های سلولی رسوب داده شد و مایع رویی به عنوان عصاره سیتوپلاسمی 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 سیتوپلاسمی 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 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 37 °C کشت داده شدند. برای کشت مجدد نیز از همین محیط استفاده شد. اثر سمی لاکتوباسیلوس با استفاده از تست رنگ سنجی MTT

بویدی ای، پseudomonas آئروژینوزا و کلبسیلا پنمونیه به روش انتشار در چاهک-پلیت انجام گرفت. ابتدا سوسپانسیون باکتری های بیماری زای انتخاب شده در محیط مولر هینتون برات 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 مولر هینتون 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 سوآب 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 مهارى پراکسید هیدروژن با آنزیم کاتالاز 5 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 مهارى رشد مربوط به هر سوبیه، بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. به منظور کاهش خطا، هر آزمون سه بار تکرار شده و میانگین قطر هاله ها محاسبه و ثبت شد. قطر مناطق مهارى رشد به صورت (ضعیف  $\geq 14$  mm)، (متوسط = 15-19 mm) و (قوی  $\leq 20$  mm). برای هر جدایه ثبت گردید (۱۷).

نهایتاً جهت آماده سازی عصاره سیتوپلاسمی، کلنی های رشد کرده روی آگار به MRS broth منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در 37 °C گرماگذاری شدند. سپس ۱ ml از کشت ۲۴ ساعته در 50 ml محیط کشت تازه MRS broth مجدداً کشت داده شده و در دمای 37 °C با چرخش ۲۵۰ rpm گرماگذاری شد. جذب نوری محیط کشت در طول موج 6۰۰ nm اندازه گیری شد تا میزان جذب محیط کشت حاوی باکتری به ۱ برسد. سپس جهت جدا سازی رسوب سلولی، محیط کشت حاوی باکتری به لوله منتقل شد و به مدت ۱۰ دقیقه با



تمام آزمون‌ها 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 ( $p < 0.05$ ).

### یافته‌ها

نتایج نشان داد باکتری به صورت باکتری گرم مثبت، کاتالاز منفی، اکسیداز منفی، حرکت منفی، عدم رشد در دمای  $15^{\circ}\text{C}$  و رشد در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و  $45^{\circ}\text{C}$  دیده شد (جدول ۱).

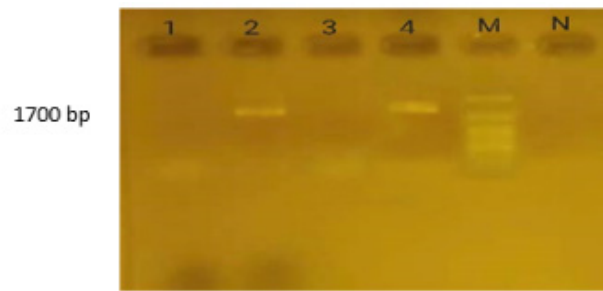
همچنین آنالیز مولکولی نشان دهنده تکثیر ژن S rRNA ۱۶ در دو نمونه از ۴ نمونه ی مورد نظر بود (شکل ۱) که در ادامه نتایج بلاست نشان داد که توالی مورد نظر یکی از نمونه‌ها با مشابهت ۸۸.۶۱٪، متعلق به لاکتوباسیلوس فرمنتوم می باشد. سپس، درخت فیلوژنتیک حاصل از آنالیز توالی S rRNA ۱۶ توسط پایگاه اطلاعات ژنومی NCBI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

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) انجام شد. با انجام این تست مقدار  $IC_{50}$  (غلظتی که در آن تنها ۵۰٪ سلول‌ها زنده می‌مانند)، مشخص شد و برای تیمار بعدی سلول‌ها از این غلظت استفاده شد (۵). جهت انجام آن به یک پلیت ۹۶ خانه و قایقک استریل نیاز می‌باشد. درون هر چاهک،  $200\ \mu\text{l}$  از رده‌های سلولی ریخته شد و ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد. غلظت‌های 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mg/ml از عصاره سلولی باکتری روی رده‌های سلولی در فواصل زمانی ۲۴ ساعته، تیمار شدند. سپس محتویات چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه خارج شده و 5 mg/ml از رنگ MTT (سیگما، آلمان)، به آن اضافه شد و ۴ ساعت در ۵٪  $\text{CO}_2$  و دمای  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه و سپس رنگ MTT خارج گردید و  $200\ \mu\text{l}$  DMSO (دی متیل سولفوکسید) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  اضافه گردید. در نهایت میزان جذب نمونه‌ها با دستگاه الیزا ریدر (هلند)، در طول موج 570 nm قرائت شد و میزان کشدگی سلول و دوز کشدگی ۵۰٪ ( $IC_{50}$ )، نیز محاسبه گردید (۲۱)، (۲۲) بعد از طی کردن تمام مراحل فوق با توجه به اینکه

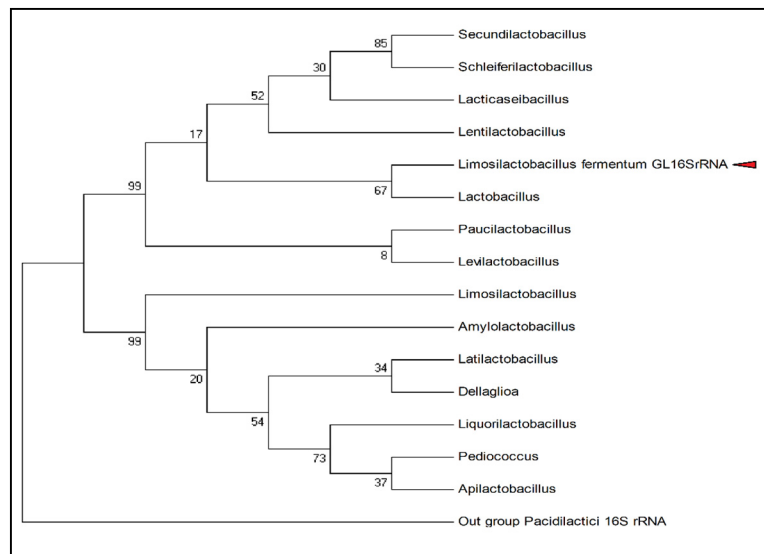
جدول ۱- آنالیز باکتریولوژیک و بیوشیمیایی ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های لبنی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان گیلان

جدایه تست	مورفولوژی کلنی	بررسی میکروسکوپی	رنگ آمیزی گرم	کاتالاز	اکسیداز	حرکت	تحمل دما $^{\circ}\text{C}$			تخمیر کربوهیدرات										
							15	37	45											
1	کلنی کرم رنگ، مات، مدور نامنظم	باسیل بلند	+	-	-	-	-	+	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	کلنی خاکستری، مات، مدور نامنظم	باسیل متوسط	+	-	-	-	-	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	کلنی کرم رنگ، مات، لیه‌های نامنظم	باسیل کوتاه	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	کلنی کرم رنگ، مات، مدور	باسیل بلند	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(رشد نرمال +، رشد قوی ++، رشد ضعیف -)



شکل ۱- تصوير قطعه 1700 جفت بازى ژن 16S rRNA نمونه مورد مطالعه. (ستون M ماركر 100 bp و ستون N كنترل منفى)



شکل ۲- درخت فيلوژنتيك حاصل از آناليز توالى 16S rRNA

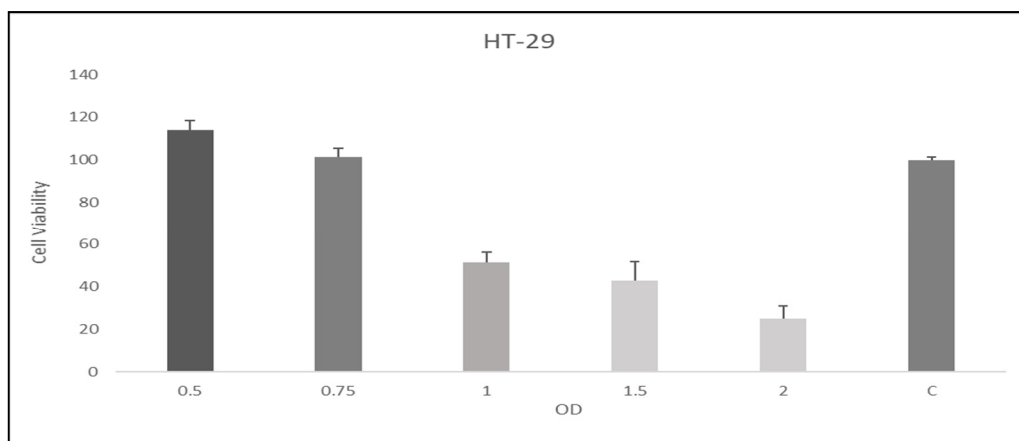
### بحث

درمان بيمارى ها با كمك ميكروارگانيسم ها روشى نوين و در حال توسعه مى باشد كه از باكتري هاى مفيد به عنوان عوامل درمانى در اختلالات ايمنى و بيمارى هاى عفونى استفاده مى شود. پروبيوتيك ها، ميكروارگانيسم هاى غيربيمارى زاى هستند كه هرگاه در مقادير مناسب تجويز شوند، با بهبود وضعيت سلامتى، قادرند از برخى از بيمارى ها پيشگيرى نموده و يا آن ها را بهبود بخشند. از ويژگى هاى مهم باكتري هاى پروبيوتيك مى توان توانايى آن ها در کاهش تعداد و کاهش قدرت بيمارى زاى عوامل ايجاد كننده ي بيمارى را اشاره كرد. پروبيوتيك ها ميكروارگانيسم هاى هستند كه درحفظ تعادل ميكروبي روده و سلامتى انسان نقش مهمى دارند. ميكروارگانيسم هاى پروبيوتيك اكثرأ

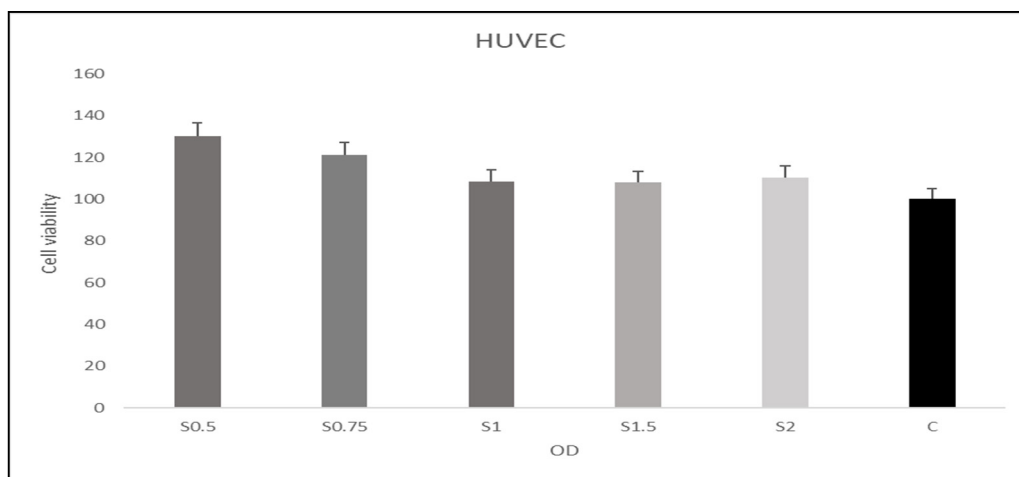
*Limosilactobacillus fermentum GL* ناميده شد.

همچنين نتايج زنده مانى سلول با استفاده از روش رنگ سنجى MTT مورد بررسى قرار گرفت. براساس نتايج، عصاره سيتوپلاسمى در غلظت هاى 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mg/ml HT-29 ايجاد نكرد و غلظت هاى 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mg/ml زنده مانى سلولى سلول هاى HT-29 ايجاد نكرد و غلظت هاى 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mg/ml زنده مانى سلولى را به ترتيب 50±4.87%, 40±8.61%, 25±5.80% کاهش داد. مقدار IC<sub>50</sub> عصاره سيتوپلاسمى براى سلول هاى HT-29، 1.43 mg/ml بود (نمودار ۱). همچنين، نتايج مطالعه ي سميت سلولى نشان داد كه غلظت هاى استفاده شده از عصاره سيتوپلاسمى هيچ اثر مھارى بر روى رده سلولى طبيعى HUVEC به مدت ۲۴ ساعت نداشت (p < 0.05) (نمودار ۲).





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

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 حاضر، لاکتوبا سیلوس بر اساس روش های متداول کشت و بیوشیمیایی و همچنین آنالیز

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 می توانند بر سیستم ایمنی بدن میزبان تأثیر بگذارند. لاکتوباسیلوس ها 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. عمده تاً 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

سرطانی آنها برای اولین بار بررسی شده است. امید است نتایج این تحقیق دیدگاه روشنی در زمینه آثار پروبیوتیکی فراورده‌های لبنی استان گیلان بر 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 مطالعه‌ی حاضر اولین موردی است که نشان می‌دهد عصاره‌ی سلولی *Limosilactobacillus fermentum GL* می‌تواند به طور مؤثری تکثیر در سلول‌های سرطانی را مهار کند و به علت اینکه برخلاف شیمی درمانی، مصرف پروبیوتیک‌ها کمتر باعث عوارض جانبی می‌شود (۲۱)، بنابراین، پیشنهاد می‌کنیم همانطور که در مطالعه‌ی 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 و سیله، نویسنده‌گان از تمام افرادی که در انجام این پژوهش همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

### 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 UI 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, Zakłós-Szyda M, Rosicka-Kaczmarek

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

نتایج حاصل از سمیت سنجی در این مطالعه، نشان داد که غلظت‌های ۱ mg/ml، ۱/۵ و ۲ از عصاره لاکتوباسیلوس، طی زمان ۲۴ ساعت قادرند زنده ماندن سلول‌ها را به ترتیب  $50 \pm 4/87$ ،  $40 \pm 8/61$  و  $25 \pm 5/80$  در صد کاهش دهند. بر اساس تست MTT، غلظت ۱ mg/ml از عصاره سیتوپلاسمی، ۵۰٪ سلول‌های HT29 را مهار می‌کند و هیچ اثر سمی بر روی سلول‌های نرمال HUVEC ندارد. در مطالعه‌ای پس از تیمار ۲۴ ساعته‌ی 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 سرطان‌زایی، اثرات ضد جهش‌زایی، تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، سیستم ایمنی بدن میزبان را فعال می‌کند و با مهار تبدیل مواد سرطان‌زا به سرطان، توسط باکتری‌ها و کاهش اسیدیته‌ی روده که منجر به کاهش فعالیت میکروبی می‌شود، می‌تواند به پیشگیری و درمان سرطان‌های دستگاه گوارش کمک کند (۱۲) که این نتایج با نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی ما همخوانی دارد. احتمالاً در آینده، این گونه‌ها و یا متابولیت‌های آنها می‌توانند به عنوان مکمل غذایی یا افزودنی‌هایی با فعالیت ضد سرطانی استفاده شوند و برای تولید این گونه فرآورده‌ها انتخاب سویه‌ی 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 سلول‌ها، تاثیرات مهمی در مهار رشد داشتند. با این حال، مکانیسم‌های زیربنایی دقیق اثرات پروبیوتیک‌ها بر سلول‌های سرطانی به طور کامل تعریف نشده است (۴). لازم به ذکر است که باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه (*Limosilactobacillus fermentum GL*)، از نمونه‌های لبنیات سنتی گیلان جدا شده و اثرات ضد تکثیر و ضد

- J, Motyl I. Anticancer Potential of Post Fermentation Media and Cell Extracts 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. Ahmadzadeh C. The study of expression of PTEN and AKT1 genes in coculturing of HT29 colon cancer cell line with *Streptococcus thermophilus*. *Feys 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, Shانهبندى D, Kerمانى 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 Update 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 derived from medicinal herbs, *Rhazya stricta* and *zingiber officinale* and their combination. *World J Gastroenterol*. 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. Matijašić 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. acidophilus* 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.