Archive of SID

فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی (دوره۳-شماره ۱)..... صفحات ۴۲ تا ۵۲

اثر ضد تکثیری باکتری بومی پروبیوتیک کشته‌شده با حرارت در رده سلولی AGS

الناز رسولی[۱]، فرزانه تفویضی[۲*]، مریم تاج‌آبادی ابراهیمی[۳]

[۱]گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

[۲]گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

[۳]گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی یکی از روش‌های مناسب برای درمان سرطان بوده و یافتن ترکیبات ضد سرطان به‌ویژه القاکننده آپوپتوز دارای اهمیت خاصی می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثر سایتوتوکسیک باکتری‌های پروبیوتیک کشته‌شده توسط حرارت و القا آپوپتوز بر رده سلولی AGS سرطان معده و مقایسه آن با رده سلولی نرمال HEK-293 می‌باشد. در این تحقیق از سویه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در رقت‌های µg/ml ۰/۰۱،۱،۱۰،۱۰۰،۱/۱۰۰۰،۰/۰ در زمان‌های h ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ استفاده شد. درصد زیستایی سلول‌ها توسط آزمون MTT سنجیده شد. جهت بررسی آپوپتوز از رقت‌های IC50 در زمان‌های h ۴۸ از کیت Annexin V استفاده گردید. نتایج MTT بیانگر آن بود که باکتری‌های کشته‌شده توسط حرارت در الگوی وابسته به زمان، دوز و سویه، بقا و تکثیر سلول‌های سرطانی معده رده AGS را کاهش داد. بیشترین اثر سایتوتوکسیک مربوط به رقت µg/ml ۱۰۰۰ در زمان h ۷۲ بود. در القاء آپوپتوز هم‌وابستگی به دوز، زمان و سویه تائید شد. باکتری پروبیوتیک کشته‌شده توسط حرارت، اثر سایتوتوکسیک و القا آپوپتوز بر روی رده سلولی AGS سرطان معده دارد و اثر سایتوتوکسیک کمتری در رده سلولی HEK-293 نسبت به رده AGS مشاهده شد. به‌طوری‌که با انجام مطالعات بیشتر می‌توان از این باکتری‌ها به‌عنوان یک محصول بیولوژیک ضد سرطانی در درمان و پیشگیری بهره برد.

واژه‌های کلیدی: باکتری پروبیوتیک کشته‌شده توسط حرارت، سایتوتوکسیک، سرطان معده

* farzanehtafvizi54@gmail.com
Tafvizi@piau.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان در کشورهای توسعه‌یافته و درحال‌توسعه به ترتیب اولین و دومین عامل مرگ‌ومیر می‌باشد. سرطان معده در جهان به‌عنوان چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ بر اثر سرطان شناخته می‌شود (۱). سرطان، جزء بیماریزا چندعاملی به‌حساب می‌آید که ناشی از ایجاد بافت سرطانی در معده می‌باشد و عوامل ژنتیکی، محیطی و عفونی در بروز آن دخالت دارند (۳و۲). یکی از مهم‌ترین عوامل شناخته‌شده برای ایجاد سرطان، غیرفعال شدن ژن-های سرکوب‌کننده تومور[1] و فعال شدن انکوژن‌ها[2] بر اثر تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی می‌باشد (۴). همچنین از عوامل غیر ژنتیکی مرتبط با سرطان معده می‌توان به نوع تغذیه، مصرف الکل، استعمال دخانیات و عفونت هلیکوباکتر پیلوری اشاره‌کرده. طبق گزارش‌ها منتشرشده توسط انجمن سرطان آمریکا، غذاهای دودی، ماهی شور، گوشت و سبزیجات ترش، ریسک بروز سرطان معده را بالا می‌برند. در مقابل، میوه‌ها و سبزیجات تازه که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند احتمال ابتلا به سرطان را کاهش می‌دهند (۵). از عوامل دیگر ایجاد سرطان معده عفونت هلیکوباکترپیلوری می‌باشد. به‌طورکلی عفونت اولیه هلیکوباکترپیلوری باعث ایجاد یک گاستریت خفیف می-گردد. در بعضی افراد این التهاب به زخم معده منجر خواهد شد. در صورت ادامه روند بیماریزا و عدم درمان زخم معده، التهاب معده ایجاد خواهد شد. افرادی که دچار این نوع التهاب هستند درخطر ایجاد بدخیمی و سرطان قرار دارند (۶).

مطالعات مختلف و متنوعی پیرامون اثر سایتوتوکسیک و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی توسط باکتری‌های پروبیوتیک و فرآورده‌های حاصل از این باکتری‌ها ازجمله عصاره اگزوپلی‌ساکارید، سوپرناتانت سلولی، اجزای دیواره باکتری و باکتری کشته‌شده با حرارت انجام‌گرفته است. لازم به ذکر است که فعالیت ضد تکثیری بسیار وابسته به سویه باکتری می‌باشد و از یک‌سویه به سویه دیگر متفاوت می‌باشد (۷ و ۸). همچنین به‌کارگیری اجزا مختلف باکتری که قبلاً به آن اشاره شد نیز نتایج متفاوتی در مهار تکثیر سلول‌های سرطانی و القا آپوپتوز دارند. توجه به این نکته ضروری است، ازآنجایی‌که غذای سنتی ترخینه و دوغ ترخینه یک غذای تخمیری محلی و مختص کشور ایران بوده و سرشار از باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد و باکتری بکار رفته در این تحقیق، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (TD3) نیز از دوغ ترخینه جداسازی شده است و یک باکتری بومی به‌حساب می‌آید که اثر ضد تکثیری و القا آپوپتوز توسط این باکتری‌ها موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداره‌های باکتریایی

در این تحقیق، از باکتری بومی *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*[3] (TD3) که قبلاً توسط دکتر تاج‌آبادی و همکاران از دوغ ترخینه جداسازی شده است و در شرکت تک ژن نگهداری می‌شود، مورداستفاده قرارگرفته. توان و ظرفیت پروبیوتیکی این باکتری ازجمله میزان تحمل به نمک‌های صفراوی، بررسی میزان جذب کلسترول، مقاومت ایزوله‌ها در شرایط اسیدی در پروژه‌های قبلی به اثبات رسیده است و باکتری با کد شناسایی IBRC-M10784 در مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی قابل‌دسترس می‌باشد (۹).

تهیه باکتری کشته‌شده

جهت تهیه باکتری کشته‌شده توسط حرارت، ابتدا *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در De Man Rogosa and Sharp (MRS –Broth) به مدت ۴۸ h در انکوباتور ۳۷ °C و شرایط بی‌هوازی گرما گذاری گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و سپس مایع رویی جدا شد. کار شستشوی رسوب توسط بافر فسفات با pH معادل

[1] Tumor suppressor genes
[2] Oncogenes
[3] *Lactobacillus paracasei*

www.SID.ir

Archive of SID

۷/۲ سه بار تکرار شد. سپس ۱۰ ml بافر فسفات به رسوب اضافه و سوسپانسیون حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۸۰ °C حرارت داده شد تا باکتری کشته شود. جهت اطمینان از غیرفعال شدن باکتری، مجدد کشت داده شد و پس از حصول اطمینان از عدم رشد باکتری در محیط کشت، رسوب حاصل فریزدرای شد و به‌صورت پودر جهت انجام تیمارهای لازم درکشت سلولی مورداستفاده قرار گرفت.

کشت سلول

در این مطالعه رده سلول‌های سرطانی معده (AGS) و رده سلولی نرمال HEK-293 از بانک سلولی مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی تهیه شدند. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی[1]، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی سیلین–استرپتومایسین در دمای ۳۷ °C در یک اتمسفر مرطوب با غلظت ۵ درصد دی اکسیدکربن کشت داده شدند. جهت بررسی وضعیت مورفولوژی، سلامت و تعداد سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند، توسط تریپسین ۰/۰۵ درصد از ته فلاسک جدا شدند و در ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریوفوژ شدند. رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده‌بودن سلول‌های موجود در آن با استفاده از لام نئوبار و رنگ تریپان بلو توسط میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از اطمینان از عدم آلودگی، از سلول‌های با درصد زیستایی بالای ۹۰ درصد جهت انجام آزمایش استفاده شد.

بررسی اثر سمیت سلولی با روش MTT assay

به‌منظور ارزیابی اثر سایتوتوکسیک سلول باکتری کامل کشته‌شده توسط حرارت بر سلول‌های سرطانی معده AGS و سلول نرمال HEK-293 از آزمون MTT استفاده شد. برای انجام آزمایش حجم ۱۰۰ µl محیط کشت حاوی ۱۰۰۰۰ سلول AGS در هر خانه پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد. سپس رقت‌های مختلف پودر لیوفیلیزه شده باکتری، شامل(۰/۰۱ µg/ml، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰) به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت تا به مدت ۷۲،۴۸،۲۴ h انکوبه شدند. پس از طی زمان‌های لازم، ۱۰۰ میکرو لیتر رنگ MTT (Sigma, Germany) با غلظت ۰/۵ mg/ml به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ h در انکوباتور ۳۷°C مجهز به CO2 انکوبه شدند.

در پایان بلوره‌های بنفش‌رنگ فورمازان تشکیل‌شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن محلول DMSO خالص به چاهک‌ها حل شدند و سرانجام جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر ثبت گردید. نتایج حاصله به‌صورت میزان درصد زیستایی وIC50 غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می‌شود گزارش شدند. جهت گرفتن نتیجه بهتر، آزمایش‌های این تحقیق با سه بار تکرار انجام گرفت.

فلوسایتومتری

به‌منظور بررسی القا آپوپتوز در سلول‌های AGSتیمارشده با باکتری پروبیوتیک و مقایسه آن با گروه کنترل، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با دورنگ Annexin- FITC و پروپیدیوم یدید (PI)، طبق دستورالعمل کیت-Annexin V FITC (Affymetrix, eBioscience, USA) انجام گرفت. تجزیه‌وتحلیل نتایج با استفاده از تقسیم‌بندی انجام‌شده توسط نرم‌افزار دستگاه به چهار ناحیه Q_1 تا Q_4 انجام شد. بر طبق گروه‌بندی، Q_1 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده جوان با شاخص رنگ‌آمیزی $Annexin\text{-}FITC^+$ و PI^-، Q_2 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده پیر با ویژگی $Annexin\text{-}FITC^+$ و PI^+، Q_3 نمایانگر سلول‌های سالم با شاخص رنگ‌آمیزی $Annexin\text{-}FITC^-$ و PI^- و Q_4 سلول‌های نکروز شده با شاخص رنگ‌آمیزی $Annexin\text{-}FITC^-$ و PI^+ می‌باشند. برای انجام تست، سلول‌ها بر طبق روش گفته‌شده در آزمون سنجش زیستایی کشت شدند. پس از مشخص شدن غلظت IC50 تیمار سلول‌ها انجام گرفت سپس سلول‌ها با بافر فسفات سالین شسته شدند. به رسوب

[1] Fetal Bovine Serum: FBS

www.SID.ir

Archive of SID

حاصل از سانتریفوژ سلول‌ها، ۲۰۰ µl بافر بایندینگ در اضافه شد. سپس ۵ µl از رنگ Annexin V اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس سلول‌ها با محلول بایندینگ شستشو داده شدند و سپس ۱۰µl رنگ PI به سلول‌ها اضافه شد. درنهایت آنالیز توسط دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت.

آنالیز آماری

بر اساس تست آماری two way ANOVA گروه‌های تست با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفتند. معنی‌دار بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.19 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA) و آزمون Tukey's و One way ANOVA و بر اساس P۰/۰۵) محاسبه شد.

نتایج

بررسی درصد زیستایی رده سلولی AGS تحت تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری کشته‌شده با حرارت در زمان‌های مختلف

درصد زیستایی حاصل از تیمار سلول‌های AGS با غلظت‌های مختلف µg/ml ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ از باکتری‌های کشته‌شده با حرارت باکتری در جدول ۱ خلاصه‌شده است. نتایج نشان داد که کاهش درصد زیستایی در زمان h ۲۴ و غلظت‌های µg/ml ۱ تا ۱۰۰۰ ازلحاظ آماری معنی‌دار بود (جدول ۱). اثر سایتوتوکسیک در زمان h ۴۸ و غلظت‌های µg/ml ۰/۱ تا ۱۰۰۰ ازلحاظ آماری معنی‌دار بود. مهار تکثیر سلولی در تمامی غلظت‌ها در زمان h ۷۲ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. بیشترین اثر ضد تکثیری باکتری در زمان h ۷۲ و غلظت µg/ml ۱۰۰۰ باکتری دیده شد. به‌طوری‌که ۲۷ درصد، بقای زیستی در زمان h ۷۲ برای سلول‌های سرطانی مشاهده شد. نتایج نشان داد که اثر مهاری و سایتوتوکسیک بودن باکتری کاملاً وابسته به دوز باکتری و زمان می‌باشد. مقادیر IC50 مربوط به اثر باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* در سه زمان h ۲۴، ۴۸ و ۷۲ بر رده سلولی AGS در جدول ۳ ارائه‌شده است.

بررسی درصد زیستایی رده سلولیHEK-293 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری کشته‌شده با حرارت در زمان‌های h ۲۴، ۴۸ و ۷۲

درصد زیستایی حاصل از تیمار سلول‌های HEK-293 با غلظت‌های مختلف µg/ml ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ از باکتری کشته‌شده با حرارت h ۲۴، ۴۸ و ۷۲ در جدول ۲ خلاصه‌شده است. نتایج نشان داد که کاهش درصد زیستایی غلظت‌های µg/ml ۱۰۰ و۱۰۰۰ باکتری بر سلول‌های HEK-293 در زمان h ۲۴ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. در زمان h ۴۸ کاهش درصد زیستایی در غلظت‌های µg/ml ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ از باکتری بر سلول‌های HEK-293 نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. مهار رشد و تکثیر سلولی در زمان h ۷۲ در چهار

جدول (۱) میانگین توان‌زیستی رده سلولی AGS تیمارشده با باکتری کشته‌شده توسط حرارت *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* (TD3) در مدت‌زمان‌های h ۲۴، ۴۸، ۷۲ با روش MTT assay.

زمان	۰/۰۱µg/ml	۰/۱µg/ml	۱µg/ml	۱۰µg/ml	۱۰۰µg/ml	۱۰۰۰µg/ml
۲۴ hr	۸۲/۵ ± ۰/۴۹	۷۳/۲۵ ± ۰/۳۵	۶۷/۵ ± ۰/۴۳ *	۵۹/۲۵ ± ۰/۳۹ **	۵۱/۲۵ ± ۰/۴۲ **	۴۳/۵ ± ۰/۳۶ **
۴۸ hr	۷۷/۷۵ ±۰/۳۵	۶۷/۲۵ ± ۰/۴۶ *	۵۸ ± ۰/۵۸ **	۵۲/۲۵ ± ۰/۳۸ **	۴۱/۵ ± ۰/۴۴ **	۳۵ ± ۰/۴۲ **
۷۲ hr	۶۷/۵ ±۰/۴۴ *	۵۶/۲۵ ± ۱/۲۴ **	۴۹/۷ ± ۰/۳۰ **	۴۱/۲۵ ± ۰/۵۸ **	۳۵ ± ۰/۳۲ ***	۲۷ ± ۰/۵۲ ***

مقایسه درصد بقای سلول‌های AGS تیمارشده با غلظت‌های مختلف باکتری کشته‌شده با حرارت باکتری در مدت‌زمان‌های h ۲۴، ۴۸ و ۷۲؛ نتایج به‌صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش‌شده است(*:P <۰/۰۵ ، **:P <۰/۰۱، *** P <۰/۰۰۱)

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت µg/ml ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ باکتری دیده‌شده. بیشترین خاصیت ضد تکثیری در زمان ۷۲ h و بیشترین دوز دیده شد. به‌طوری‌که مهار ۵۰ درصدی رشد سلول‌های سرطانی مشاهده‌شده (جدول ۲). مقادیر IC50 مربوط به اثر باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* در سه زمان ۲۴ h، ۴۸ و ۷۲ بر رده سلولی HEK-293 در جدول ۳ ارائه‌شده است.

بررسی درصد زیستایی رده سلولیHEK-293 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری کشته‌شده با حرارت در زمان‌هایh ۲۴، ۴۸ و ۷۲

درصد زیستایی حاصل از تیمار سلول‌های HEK-293 با غلظت‌های مختلف µg/ml ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ از باکتری کشته‌شده با حرارت ۲۴ h، ۴۸ و ۷۲ در جدول ۲ خلاصه‌شده است. نتایج نشان داد که کاهش درصد زیستایی غلظت‌های µg/ml ۱۰۰ و۱۰۰۰ باکتری بر سلول‌های HEK-293 در زمان ۲۴h نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. در زمان ۴۸ h کاهش درصد زیستایی در غلظت‌های µg/ml ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ از باکتری بر سلول‌های HEK-293 نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. مهار رشد و تکثیر سلولی در زمان ۷۲ h در چهار غلظت µg/ml ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ باکتری دیده‌شده. بیشترین خاصیت ضد تکثیری در زمان ۷۲ h و بیشترین دوز دیده شد. به‌طوری‌که مهار ۵۰ درصدی رشد سلول‌های سرطانی مشاهده شده (جدول ۲). مقادیر IC50 مربوط به اثر باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* در سه زمان ۲۴ h، ۴۸ و ۷۲ بر رده سلولی HEK-293 در جدول ۳ ارائه‌شده است.

بررسی آپوپتوز القاء شده توسط باکتری

از رقت‌های µg/ml ۱۰ و ۲۳ باکتری در زمان ۴۸ h ، جهت انجام تست فلوسایتومتری استفاده شد که نتایج early apoptosis و late apoptosis در شکل‌های ۱، ۲ و جداول ۴ و ۵ به ارائه‌شده است. میزان آپوپتوز اولیه القاشده (early apotosis) در غلظت µg/ml ۲۳ (غلظت IC50) و µg/ml ۱۰ به ترتیب ۰/۷ ± ۱۷ /۷۹ و ۰/۸ ± ۱۸/۱۰ درصد بود. افزایش آپوپتوز در هر دو غلظت نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که ازنظر آماری معنی‌دار بود (P <۰/۰۰۱). در مقایسه آپوپتوز و نکروز در هر دو غلظت، درصد آپوپتوز بیشتری نسبت به نکروز مشاهده شد که ازنظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۵).

جدول (۲) میانگین توان‌زیستی رده سلولی HEK-293 تیمارشده با باکتری کشته‌شده توسط حرارت *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* در مدت‌زمان‌های h ۲۴، ۴۸، ۷۲ با روش MTT assay.

زمان	۰/۰۱µg/ml	۰/۱µg/ml	۱µg/ml	۱۰µg/ml	۱۰۰µg/ml	۱۰۰۰µg/ml
h۲۴	۹۱ ±۰/۳۹	۸۷ ±۰/۸۶	۸۱ ± ۰/۷۵	۷۶ ± ۰/۴۲	۷۰ ± ۰/۴۷ *	۶۱ ± ۰/۳۶ **
h۴۸	۸۴/۲۵ ±۰/۳۵	۸۰/۷۵ ± ۰/۴۱	۷۲/۷۵ ± ۰/۴۴	۶۹ ± ۰/۳۱ *	۶۰/۵ ± ۰/۳۴ **	۵۶ ± ۰/۶۷ **
h۷۲	۸۰/۵ ±۱/۱۵	۷۵/۵ ± ۰/۳۷	۶۹/۵۴ ± ۰/۳۴ *	۶۱/۷۵ ± ۰/۳۱ **	۵۵/۵ ± ۰/۳۷ **	۵۰/۵ ± ۰/۴۱ **

مقایسه درصد بقای سلول‌های HEK-293 تیمارشده با غلظت‌های مختلف باکتری کشته‌شده با حرارت باکتری در مدت‌زمان‌هایh ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ؛ نتایج به‌صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش‌شده است(*:P <۰/۰۵ ، **:P <۰/۰۱، *** P <۰/۰۰۱).

www.SID.ir

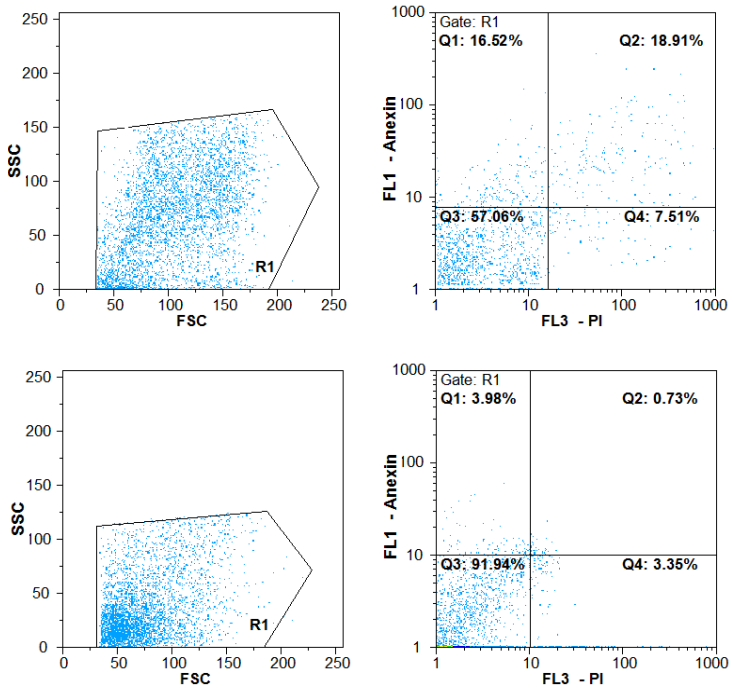
Archive of SID

جدول (۳) مقادیر IC50 مربوط به اثر باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* در سه زمان مختلف، بر دو رده سلولی.

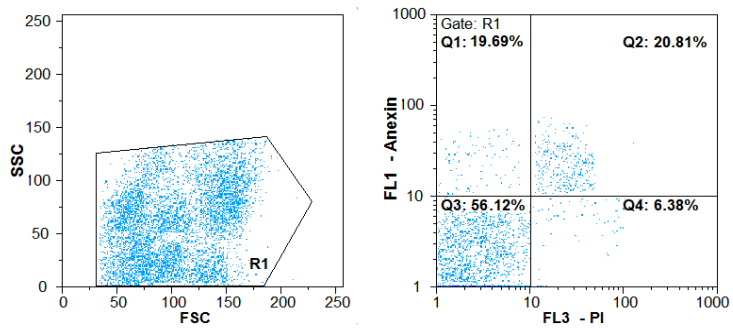
Time (hrs)	IC50 (AGS) µg/ml	IC50 (HEK-293) µg/ml
۲۴	۱۸۵	۱۴۸۰
۴۸	۲۳	۱۱۷۰
۷۲	۱/۷	۱۰۸۰

جدول (۴) بررسی میزان آپوپتوز القاء شده توسط *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در طی زمان ۴۸ h بر روی رده سلولی AGS.

	Control	IC50 (23 µg/ml)	P	10 µg/ml	P
Early apoptosis	۴/۵۹ ± ۰/۹	۱۷/۷۹ ± ۰/۷	<۰/۰۱	۱۸/۱۰ ± ۰/۸	<۰/۰۱
Late apoptosis	۱/۳ ± ۱/۳	۴/۵۹ ± ۰/۹	<۰/۰۰۱	۱۹/۸۶ ± ۰/۳	<۰/۰۰۱
Necrosis	۳/۰۱ ± ۱/۲	۸/۲۵ ± ۱/۱	<۰/۰۱	۶/۹۴ ± ۱/۳	<۰/۰۵



a) دوز ۱۰ µg/ml

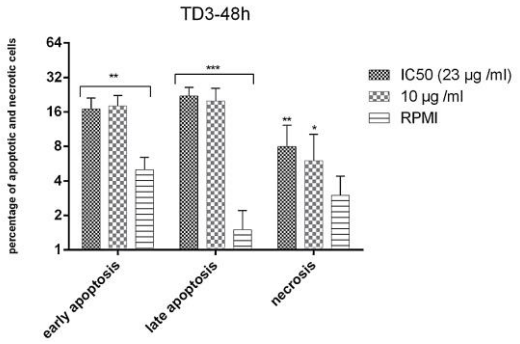


b) دوز ۲۳ µg/ml

شکل (۱) آپوپتوز القاء شده توسط باکتری در زمان ۴۸ h. a) دوز ۱۰ µg/ml b) دوز ۲۳ µg/ml

www.SID.ir

Archive of SID



شکل (۲) مقایسه آپوپتوز القاء شده در غلظت‌های مختلف باکتری در زمان h ۴۸ در رده سلولی AGS.

جدول (۵) مقایسه آپوپتوز و نکروز القاء شده توسط باکتری TD3 در زمان h ۴۸ در رده سلولی AGS.

	IC50 (23 µg/ml)	10 µg/ml
Apoptotic cells	۴۰/۷۳	**۳۷/۹۶**
Necrotic cells	۸/۲۵	**۶/۹۴**
P.value	<۰/۰۰۱	**<۰/۰۰۱**

بحث

از روش‌های درمانی سرطان معده می‌توان به جراحی، شیمی‌درمانی و اشعه درمانی اشاره‌کرده. متأسفانه سرطان معده چندان به شیمی‌درمانی حساس نیست و در بعضی موارد بعد از عمل جراحی به‌منظور کوچک نمودن تومور و کاهش علائم انجام می‌شود. درروش اشعه درمانی، با استفاده از انرژی بالای رادیواکتیو، رشد سلول‌های سرطانی تا حدی متوقف می‌شود. در بیشتر موارد، اشعه درمانی با شیمی‌درمانی و جراحی ترکیب می‌شود (۱۰).

همچنین استفاده از داروهای ضد سرطان دارای محدودیت‌هایی می‌باشند که یکی از آن‌ها مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به دارو است که می‌تواند ناشی از مقاومت ذاتی تومور نسبت به دارو باشد یا در طول شیمی‌درمانی کسب شود و درنتیجه با افزایش سلول‌های مقاوم روند درمان مشکل‌تر می‌شود (۱۱).

درمان‌های رایج سرطان، اغلب باعث از بین رفتن سلول‌های سالم می‌شود که می‌تواند باعث اثرات سمی و عوارض جانبی در بیمار شود. به همین دلیل نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای درمان این بیماریزا احساس می‌شود (۱۲و۱۳).

پروبیوتیک‌ها نقش‌های ضد توموری خود را از طریق بهبود فلور طبیعی معده، تخریب کارسینوژن های احتمالی، تعدیل ایمنی سیستمیک و وابسته به سیستم گوارش و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان سیستمیک و موضعی اعمال می‌کنند. اثر ضد سرطانی پروبیوتیک‌ها از طریق یک مکانیسم منفرد اعمال نمی‌شود بلکه به‌واسطه ترکیب هم‌زمان چند رویداد است(۱۴).

باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند با باکتری‌های مضر از طریق اتصال رقابتی جابجا شوند یا مهار رشد/کشتن باکتری‌های پاتوژن را از طریق ترکیبات ضد باکتریایی یا کاهش pH انجام دهند. پروبیوتیک‌ها همچنین دارای توانایی تعدیل ایمنی از طریق تحریک سلول‌های ایمنی میزبان مثل القای تولید سیتوکین هستند. باکتری‌های پروبیوتیک، می‌توانند مواد سمی را خنثی کرده و آن‌ها را از روده حذف نمایند. به‌علاوه، پروبیوتیک‌ها می‌توانند یکپارچگی اپیتلیال و بافتی را از طریق سنتز نیتریک اکساید با دوز کم، تحریک تولید مخاط، افزایش تکثیر سلولی اپیتلیال، مهار تولید اندوژنوس کارسینوژن و فراهم کردن مواد مغذی با تولید SCFA تحت تأثیر قرار دهند(۱۰).

در تحقیق حاضر، اثر سایتوتوکسیک باکتری بومی *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* کشته‌شده توسط حرارت بر روی سلول‌های سرطانی AGS سرطان معده مورد ارزیابی قرار گرفت. این باکتری‌های پروبیوتیک مانع از تکثیر سلولی رده AGS درروند وابسته به زمان، دوز و سویه شدند. نتایج حاصل از مقایسه تست MTT در زمان‌های h ۲۴، ۴۸ و ۷۲ و در غلظت‌های مختلف نشان داد که *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* کشته‌شده توسط حرارت در الگوی وابسته به زمان و دوز سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

در ادامه نتایج محاسبه IC50 مربوط به باکتری در زمان ۲۴ h برابر با ۱۸۵ µg/ml و در زمان‌های۴۸ h و ۷۲ به ترتیب ۲۳ µg/ml، ۱/۷ µg/ml بود.

تیمار سلول‌های نرمال رده HEK-293 با غلظت‌های مختلف ۰/۰۱ µg/ml، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ باکتری کشته‌شده توسط حرارت باکتری طی مدت ۲۴ h، ۴۸ و۷۲ نیز سبب کاهش میزان زیستایی سلول‌ها شد. ولی میزان اثر سایتوتوکسیک مشاهده‌شده در مقایسه با رده سلولی AGS بسیار کمتر بود. در ادامه باید اشاره کرد که میزان IC50 محاسبه‌شده در مورد باکتری بر روی سلول نرمال HEK-293 در زمان‌های ۲۴ h، ۴۸ و ۷۲ به ترتیب برابر µg/ml ۱۱۷۰، ۱۴۸۰ و۱۰۸۰ بود. نتایج حاکی از این است که غلظت‌های بسیار کمتری از باکتری قادر به مهار رشد سلول-های سرطانی در رده سلولی AGS می‌باشد. این در حالی است که مهار رشد و یا IC50 سلول‌های رده نرمال HEK-293 در غلظت‌های ۸ برابری، ۵۰ برابری و ۶۳۵ برابری از باکتری پروبیوتیک به ترتیب در سه زمان ۲۴ h، ۴۸ و ۷۲ حاصلید. این یافته حساسیت بیشتر سلول‌های سرطانی رده AGS نسبت به باکتری پروبیوتیک در مقایسه با سلول‌های نرمال HEK-293 و ایمن بودن سلول‌های نرمال HEK-293 نسبت به باکتری را به اثبات می‌رساند.

آپوپتوز و نکروز القاشده بر اساس داده‌های فلوسایتومتری در سلول‌های تیمارشده با باکتری در زمان ۴۸ h نشان داد که آپوپتوز القاشده در غلظتIC50 (۲۳µg/ml) نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. همچنین در مقایسه آپوپتوز و نکروز، افزایش ۵ برابری آپوپتوز نسبت به نکروز در غلظتIC50 (۲۳ µg/ml) و افزایش ۵/۴ برابری در غلظت ۱۰ µg/ml مشاهده شد که ازنظر آماری معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$).

در مطالعه انجام‌شده در سال ۲۰۱۲ توسط کوسین[1] و همکارانش بر روی شیر تخمیر شده توسط *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی*[2]، توان پیش آپوپتوزی آن بر روی سلول‌های سرطانی معده HGT-1 بررسی شد. آن‌ها نشان دادند که سوپرناتانت شیر تخمیر شده توسط *پروپیونی باکتریوم*[3] *فرودنریچی* سبب القا آپوپتوز در سلول‌های HGT-1 به‌صورت وابسته به زمان و دوز می‌شود و با بروز خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی آپوپتوز ازجمله متراکم و قطعه‌قطعه شده، تشکیل اجسام آپوپتوزی، فعال‌سازی کاسپاز، رهایی سیتوکروم c و تجمع سلول‌ها در فاز subG1 چرخه سلولی همراه است. همچنین این شیر تخمیر شده، اثر سایتوتوکسیک ماده شیمی‌درمانی مورداستفاده در سرطان معده به نام کامپوتکسین[4] را بهبود می‌بخشد. درواقع در این مطالعه نشان داده شد که محصولات لبنی تخمیر شده، عاملی برای القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی معده از طریق فعال کردن چندین مکانیسم درون‌سلولی فعال‌کننده کاسپازها هستند (۱۵).

در تحقیق حاضر نیز، تأثیر مطلوب باکتری کشته‌شده توسط حرارت بر روی سلول‌های سرطانی AGS مشاهده شد. همچنین در این تحقیق نیز با افزایش غلظت باکتری‌های کشته‌شده با حرارت، افزایش آپوپتوز مشاهده شد.

کریمی و همکارانش در سال ۱۳۹۵ اثر سایتوتوکسیک باکتری‌های بومی *لاکتوباسیلوس برویس* کشته‌شده توسط حرارت بر روی سلول‌های سرطانی HT-29 را ارزیابی کرد. این باکتری پروبیوتیک مانع از تکثیر سلولی رده HT-29 درروند وابسته به زمان، دوز و سویه شد. اثر سایتوتوکسیک و القا آپوپتوز بر روی رده سلولی HT-29 سرطان کلون حاصل شد و اثر سایتوتوکسیک و مهاری کمتری در رده سلولی HEK- 293 نسبت به رده HT-29 مشاهده شد (۱۶).

گونئوم[5] و فلو در سال ۲۰۱۵ به بررسی القای انتخابی آپوپتوز در سلول‌های سرطانی معده توسط *لاکتوباسیلوس کفیری* (PTF) پرداختند. نشان دادند که PTF باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی AGS به‌صورت وابسته به دوز می‌گردد. نتایج حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که PTF برای سلول‌های خونی سفید ایمن هستند و به‌طور انتخابی اثرات آپوپتوزی را در سلول‌های سرطانی معده القا

[1] Cousin
[2] *Propionibacterium freudenreichii*
[3] *Propionibacterium*
[4] Camptothecin
[5] Ghoneum

www.SID.ir

Archive of SID

می‌کنند. در این مطالعه، تیمار سلول‌های AGS با PTF باعث تنظیم منفی قابل‌توجهی در سطح Bcl-2 سلول‌های سرطانی AGS شده با کاهش پلاریزاسیون میتوکندریایی سلول‌های AGS در ارتباط بود. این امر ممکن است منجر به آزادسازی مولکول‌های پیش آپوپتوزی شود که سبب فعال‌سازی کاسپازها و نهایتاً منجر به آپوپتوز می‌شوند. در مطالعه ما نیز، القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی AGS به دوز وابسته بود که با نتایج گونئوم مطابقت دارد (۱۷).

دی لوسیا[1] و همکاران در ۲۰۱۳، جهت مطالعه خود از سوپرناتانت باکتری *لاکتوباسیلوس گاسری* بر روی سلول HCT-116 استفاده کردند. آن‌ها متوجه اثر این باکتری در القاء آپوپتوز و مانع تکثیر سلول از طریق مسیر کاسپاز ۳ شدند. مسیر کاسپاز ۳، مسیر داخلی میتوکندریایی است که سبب القای آپوپتوز می‌شود (۱۸).

روسو[2] و همکاران در سال ۲۰۰۷، اثرات *لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG* را بر روی رشد سلولی و متابولیسم پلی آمین در رده سلولی HGC-27 بررسی کردند. این سلول‌ها نسبت به جناح‌های دیواره سلولی باکتری مقاوم بودند، درحالی‌که افزایش غلظت فراکشن سیتوپلاسمی، منجر به القای اعمال ضد تکثیری و پیش آپوپتوزی می‌شد. داده‌های حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که عصاره-های سیتوپلاسمی می‌توانند مسئول عملکرد ضد تکثیری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بر روی تکثیر سلولی HGC-27 باشد (۱۹).

حق‌شناس و همکارانش در سال ۲۰۱۴ به بررسی اثرات مختلف دو پروبیوتیک به نام *لاکتوباسیلوس پلانتاروم 15HN* و *لاکتوکوکوس لاکتیس 44Lac* بر روده رده‌های سلولی سرطانی پرداختند. این پروبیوتیک‌ها در محصولات لبنی سنتی موجود بودند. نتایج این مطالعه نشان دادند متابولیک‌های ترشح‌شده از این پروبیوتیک‌ها، دارای اثرات سایتوتوکسیک بر روی رده‌های سلولی سرطانی HT29، AGS، MCF-7 و Hela هستند درحالی‌که هیچ اثر جانبی بر رده سلولی نرمال HUVEC اعمال نمی‌کنند. سنجش‌های سایتوتوکسیک از طریق فلوسایتومتری و میکروسکوپ فلئورسانس نشان داد که آپوپتوز مکانیسم سایتوتوکسیک اصلی برای متابولیت ترشح‌شده از این دو پروبیوتیک است (۲۰).

اورلاندو[3] و همکاران نیز اثر دو باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* را بر دو رده سرطانی HGC-27 و DLD-1 موردبررسی قراردادند. آن‌ها نیز از باکتری‌ها به‌صورت زنده کشته‌شده توسط حرارت استفاده کردند و به‌وسیله تست MTT درصد زیستایی و با روش فلوسایتومتری میزان آپوپتوز را بررسی کردند. به‌طورکلی، خاصیت ضد تکثیر و القاء آپوپتوز در هر دو باکتری و هر دو رده سلولی مشابه بود و بر اساس مطالعه آن‌ها زنده یا غیرفعال بودن باکتری درنتیجه بی‌تأثیر بود اما با افزایش غلظت، میزان آپوپتوز نیز افزایش پیدا کرد به‌گونه‌ای که در غلظت ۵ µg/ml، افزایش آپوپتوز تا ۶۶/۳ درصد نیز مشاهده شد (۲۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به میزان درصد بقاء بالای سلولی در رده سلولیHEK-293 با میزان مشابه غلظت و زمان اثر باکتری کشته‌شده توسط حرارت بر روی رده سلولی AGS به نظر می‌رسد که *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* کشته‌شده توسط حرارت که باکتری بومی منطقه ایران بوده و با فلور دستگاه گوارش مردم کشورمان سازگاری بالایی دارند، اثر سمیت زیادی بر روی سلول‌های سرطانی AGS در مقایسه با سلول‌های نرمالHEK-293 دارد که این خود می‌تواند نشان‌دهنده تفاوت اثر این باکتری بین سلول‌های نرمال و سرطانی بوده و این تفاوت می‌تواند به‌عنوان یک نکته مثبت جهت کنترل و درمان سرطان کاربرد داشته باشد؛ زیرا یکی از مسائل مهم جهت مصرف داروهای ضد سرطان، توانایی آن دارو در سرکوب سلول‌های سرطانی و کمترین اثر سمی بر روی سلول‌های نرمال می‌باشد. با توجه به اینکه اثرات ضد تکثیری و ضد سرطانی باکتری‌های پروبیوتیک وابسته

[1] Di Luccia
[2] Russo
[3] Orlando

www.SID.ir

Archive of SID

به جنس و سویه می‌باشد، شناسایی توان سایتوتوکسیک و ضد تکثیری باکتری‌های بومی ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به این نکته که تهیه و تولید باکتری‌های کشته‌شده به‌طور نسبی راحت‌تر بوده و دارای عمر مفید بیشتری می‌باشند، با انجام آزمودن‌های تأییدی به‌کارگیری آن‌ها به‌منظور غنی‌سازی و استفاده در ترکیبات غذایی پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011; 61(2): 69-90.

2. Zabaleta J. Multifactorial etiology of gastric cancer. Methods Mol Biol. 2012; 863: 411-35.

3. Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between Helicobacter pylori seropositivity and gastric cancer. Gastroenterology. 1998; 114 (6): 1169-79.

4. Fock KM. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther. 2014;40(3):250-60.

5. Kushi LH, Doyle C. American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. CA Cancer J Clin. 2006;56(5):254-81.

6. Carl-Mcgrath S, Ebert M, Röcken C, Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis. Cancer Therapy. 2007; 5:879–896.

7. Kim JY, Woo HJ, Kim YS, Kim KH, Lee HJ. Cell cycle dysregulation induced by cytoplasm of *Lactococcus lactis ssp*. lactis in SNUC2A, a colon cancer cell line. Nutr Cancer. 2003;46(2):197-201.

8. Manjunath N, Ranganathan B. A cytotoxic substance produced by a wild culture of *Lactobacillus casei D-34* against tumor cells. Indian J Exp Biol.1989; 27(2): 141–145.

9. Tajabadi Ebrahimi M, Bahrami H, Ziary Z.Tarkhineh source of probiotic lactic acid bacteria. Iran Quart J Biol Sci. 2011; 4(12): 1-9.

10. Alberts SR, Cervantes A, Van de Velde CJ. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. Ann Oncol, 2003;14 Suppl 2:ii31-6.

11. Katzung BG, Masters SB, Terevor AJ. Basic and clinical pharmacology. New York: Norwalk. 1997; 409.

12. Szymanski MS, Porter RA. Preparation and quality control of silver nanoparticle-antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays. J Immunol Methods. 2013; 387(1-2):262-9.

13- Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. Clin Microbiol Rev. 2003; 16, 658–672.

14. Sousae Silva JP, Freitas AC. Probiotic Bacteria-Fundamentals, Therapy and Technological Aspects. 2014; Pan Stanford. Taylor & Francis group. CRC Press. DOI: 10.4032/9789814411639

15. Cousin FJ, Jouan-Lanhouet S, Dimanche-Boitrel MT, Corcos L, Jan G. Milk fermented by propionibacterium freudenreichii induces apoptosis of HGT- 1 human gastric cancer cells. PLos One. 2012; 7(3): e31892.

16. Karimi Ardestani S, Tafvizi F , Tajabadi Ebrahimi M. Molecular detection of heat-killed probiotic bacteria and study of apoptosis induction on colon cancer HT-29 cell line**.** Iran J Med Microbiol. 2016; 10(2): 42-52.

17. Ghoneum M, Felo N. Selective induction of apoptosis in human gastric cancer cells by Lactobacillus kefiri (PFT), a novel kefir product. Oncol Rep. 2015;34(4):1659-66.

18. Di Luccia B, Manzo N, Baccigalupi L, Calabrò V, Crescenzi E, Ricca E, Pollice A. Lactobacillus gasseri SF1183 Affects Intestinal Epithelial Cell Survival and growth. PLos One. 2013; 23;8(7):e69102.

19. Russo F, Orlando A, Linsalata M, Cavallini A, Messa C. Effects of Lactobacillus rhamnosus GG on the cell growth and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric cancer cells. Nutr Cancer. 2007; 59, 106–114.

20. Haghshenas B, Abdullah N, Nami Y, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Different effects of two newly-isolated probiotic Lactobacillus plantarum 15HN and Lactococcus lactis subsp. Lactis 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. Anaerobe. 2014; 30:51-9.

21. Orlando A, Refolo MG, Messa C, Amati L, Lavermicocca P, Guerra V, Russo F. Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed Lactobacillus paracasei IMPC2.1 and Lactobacillus rhamnosus GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. Nutr Cancer. 2012. 64 (7): 1103–1111

www.SID.ir

Archive of SID

Antiproliferation Effect of Heat Killed Indigenous Probiotic Bacteria on AGS Cell Line

Elnaz Rasuli[1], **Farzaneh Tafvizi**[*2], Maryam Tajabady Ebrahimi [3]

[1]Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran
[2]Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran
[3]Department of Biology, Centaral Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Aopoptosis induction is one of the best method cancer therapy and funding the anti cancer component, especially inducing opoptosis is of the significant important. This study aimed to assess cytotoxic effects of heat-killed probiotic bacteria and induced apoptosis on gastric cancer AGS cells compared to normal cells (HEK-293).

AGS cancer cell line AGS was cultured in RPMI medium, and cell line HEK-239 was selected as the control. Both cell lines received 0.01, 0.1, 1, 10, 100, and 1000 µg/ml of heat-killed *lactobacillus paracasei* for periods of 24, 48, and 72 hours. Viability of cells was measured using MTT assay. Apoptosis assay was performed in IC50 of cell culture by Annexin V and propidium iodide staining methods in 48 hours. According to MTT assay, heat-killed bacteria reduced viability and proliferation of gastric cancer cell line AGS in pattern of time, dose and strain dependent. The highest cytotoxic effect was observed in 1000 µg/ml for 72 hours. Annexin V staining and flow cytometry confirmed induced apoptosis in AGS cell line in pattern of time, dose and strain dependent. Heat-killed probiotic bacteria showed cytotoxic and induced apoptosis effects on AGS gastric cancer cell line, with slight cytotoxic effect on HEK-239 compared to AGS. Further studies are still required to confirm these bacteria as a biological anti-cancer product in treatment and prevention.

Keywords: Cytotoxic, Gastric Cancer Heat-killed *Probiotic Bacteria*.

www.SID.ir

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop