

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

الناز رسولی^۱، فرزانه تفویضی^{۲*}، مریم تاج آبادی ابراهیمی^۳

^۱گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

^۲گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

^۳گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی یکی از روش های مناسب برای درمان سرطان بوده و یافتن ترکیبات ضد سرطان به ویژه الفاکنده آپوپتوز دارای اهمیت خاصی می باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر سایتوتوکسیک باکتری های پروبیوتیک کشته شده توسط حرارت و القاء آپوپتوز بر رده سلولی AGS سرطان معده و مقایسه آن با رده سلولی نرمال HEK-293 می باشد. در این تحقیق از سویه لاکتوباسیلوس پاراکازئی در رقت های ۰/۰۱، ۱/۱۰۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۰۰۱ استفاده شد. درصد زیستایی سلول ها توسط آزمون MTT سنجیده شد. جهت بررسی آپوپتوز از رقت های IC50 در زمان های ۴۸ h از کیت Annexin V استفاده گردید. نتایج MTT بیانگر آن بود که باکتری های کشته شده توسط حرارت در الگوی وابسته به زمان، دوز و سویه، بقا و تکثیر سلول های سرطانی معده رده AGS را کاهش داد. بیشترین اثر سایتوتوکسیک مربوط به رقت ۱۰۰۰ μg/ml در زمان ۷۲ h بود. در القاء آپوپتوز هم وابستگی به دوز، زمان و سویه تأیید شد. باکتری پروبیوتیک کشته شده توسط حرارت، اثر سایتوتوکسیک و القاء آپوپتوز بر روی رده سلولی AGS سرطان معده دارد و اثر سایتوتوکسیک کمتری در رده سلولی HEK-293 نسبت به رده AGS مشاهده شد. به طوری که با انجام مطالعات بیشتر می توان از این باکتری ها به عنوان یک محصول بیولوژیک ضد سرطانی در درمان و پیشگیری بهره برد.

واژه های کلیدی: باکتری پروبیوتیک کشته شده توسط حرارت، سایتوتوکسیک، سرطان معده

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

مقدمه

لازم به ذکر است که فعالیت ضد تکثیری بسیار وابسته به سویه باکتری می‌باشد و از یک سویه به سویه دیگر متفاوت می‌باشد (۷ و ۸). همچنین به کارگیری 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، از آنجایی که 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 به حساب می‌آید که اثر ضد تکثیری و القا آپوپتوز توسط این باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جدارده‌های باکتریایی

در این تحقیق، از باکتری بومی لاکتوباسیلوس پاراکازئی^۳ (TD3) که قبلاً توسط دکتر تاج‌آبادی و همکاران از دوغ ترخینه جداسازی شده است و در شرکت تک ژن نگهداری می‌شود، مورد استفاده قرار گرفته. توان و ظرفیت پروبیوتیکی این باکتری از جمله 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 قابل دسترسی می‌باشد (۹).

تهیه باکتری کشته شده

جهت تهیه باکتری کشته شده توسط حرارت، ابتدا لاکتوباسیلوس پاراکازئی در De Man Rogosa and Sharp (MRS -Broth) به مدت ۴۸ h در انکوباتور ۳۷ °C و شرایط بی‌هوای 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

سرطان در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه به ترتیب اولین و دومین عامل مرگ و میر می‌باشد. سرطان معده در جهان به عنوان چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ بر اثر سرطان شناخته می‌شود (۱). سرطان، جزء بیماری‌ها چند عاملی به حساب می‌آید که ناشی از ایجاد بافت سرطانی در معده می‌باشد و عوامل ژنتیکی، محیطی و عفونی در بروز آن دخالت دارند (۲ و ۳). یکی از مهم‌ترین عوامل شناخته شده برای ایجاد سرطان، غیرفعال شدن ژن‌های سرکوب کننده تومور^۱ و فعال شدن انکوژن‌ها^۲ 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 اشاره کرده. طبق گزارش‌ها منتشر شده 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 هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. به طور کلی عفونت اولیه هلیکوباکتر پیلوری باعث ایجاد یک گاستریت خفیف می‌گردد. 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 در خطر 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 از جمله عصاره انکوپلی ساکارید، سوپرناتانت سلولی، اجزای دیواره باکتری و باکتری کشته شده با حرارت انجام گرفته است.

¹ Tumor suppressor genes

² Oncogenes

³ *Lactobacillus paracasei*

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

داده شد. سپس رقت‌های مختلف پودر لیوفیلیزه شده باکتری، شامل ($0.1 \mu\text{g/ml}$ ، 0.1 ، 1 ، 10 ، 100 و 1000) به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت تا به مدت $72, 48, 24$ h انکوبه شدند. پس از طی زمان‌های لازم، 100 میکرو لیتر رنگ MTT (Sigma, Germany) با غلظت 0.5 mg/ml به هر چاهک اضافه شد و به مدت 4 h در انکوباتور 37°C مجهز به CO_2 انکوبه شدند.

در پایان بلوره‌های بنفش‌رنگ فورمازان تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن محلول DMSO خالص به چاهک‌ها حل شدند و سرانجام جذب نوری در 570 نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر ثبت گردید. نتایج حاصله به صورت میزان درصد زیستایی و IC_{50} غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان 50 درصد می‌شود گزارش شدند. جهت گرفتن نتیجه بهتر، آزمایش‌های این تحقیق با سه بار تکرار انجام گرفت.

فلوسایتومتري

به منظور بررسی القا آپوپتوز در سلول‌های AGS تیمار شده با باکتری پروبیوتیک و مقایسه آن با گروه کنترل، رنگ آمیزی سلول‌ها با دورنگ Annexin-FITC و پروپیدیوم یدید (PI)، طبق دستورالعمل کیت-Annexin V-FITC (Affymetrix, eBioscience, USA) انجام گرفت. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از تقسیم‌بندی انجام شده 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 رنگ آمیزی Annexin-FITC^+ و PI^- و Q_2 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده پیر با ویژگی Annexin-FITC^+ و PI^+ ، Q_3 نمایانگر سلول‌های سالم با شاخص رنگ آمیزی Annexin-FITC^- و PI^- و Q_4 سلول‌های نکروز شده با شاخص رنگ آمیزی Annexin-FITC^- و PI^+ می‌باشند. برای انجام تست، سلول‌ها بر طبق روش گفته شده در آزمون سنجش زیستایی کشت شدند. پس از مشخص شدن غلظت IC_{50} تیمار سلول‌ها انجام گرفت سپس سلول‌ها با بافر فسفات سالین شسته شدند. به رسوب

$7/2$ سه بار تکرار شد. سپس 10 ml بافر فسفات به رسوب اضافه و سوسپانسیون حاصله به مدت 30 دقیقه در بن ماری 80°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 به صورت پودر جهت انجام تیمارهای لازم در کشت سلولی مورد استفاده 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 10 درصد سرم جنین گاوی¹، 10 درصد آنتی‌بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین در دمای 37°C در یک اتمسفر مرطوب با غلظت 5 درصد دی اکسید کربن کشت داده شدند. جهت بررسی وضعیت مورفولوژی، سلامت و تعداد سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. زمانی که سلول‌ها حداقل به 70 درصد رشد سلولی رسیدند، توسط تریپسین 0.05 درصد از ته فلاسک جدا شدند و در 1500 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در آن با استفاده از لام نئوبار و رنگ تریان بلو توسط میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از اطمینان از عدم آلودگی، از سلول‌های با درصد زیستایی بالای 90 درصد جهت انجام آزمایش استفاده شد.

بررسی اثر سمیت سلولی با روش MTT assay

به منظور ارزیابی اثر سایتوتوکسیک سلول باکتری کامل کشته شده توسط حرارت بر سلول‌های سرطانی معده AGS و سلول نرمال HEK-293 از آزمون MTT استفاده شد. برای انجام آزمایش حجم $100 \mu\text{l}$ محیط کشت حاوی 10000 سلول AGS در هر خانه پلیت 96 خانه قرار

¹ Fetal Bovine Serum: FBS

۴۸ h و غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از لحاظ آماری معنی‌دار بود. مهار تکثیر سلولی در تمامی غلظت‌ها در زمان ۷۲ h نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. بیشترین اثر ضد تکثیری باکتری در زمان ۷۲ h و غلظت ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ باکتری دیده شد. به طوری که ۲۷ درصد، بقای زیستی در زمان ۷۲ h برای سلول‌های سرطانی مشاهده شد. نتایج نشان داد که اثر مهار و سایتوتوکسیک بودن باکتری کاملاً وابسته به دوز باکتری و زمان می‌باشد. مقادیر IC_{50} مربوط به اثر باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازی در سه زمان ۲۴ h، ۴۸ و ۷۲ بر رده سلولی AGS در جدول ۳ ارائه شده است.

بررسی درصد زیستایی رده سلولی HEK-293 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری کشته شده با حرارت در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲

درصد زیستایی حاصل از تیمار سلول‌های HEK-293 با غلظت‌های مختلف ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از باکتری کشته شده با حرارت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ در جدول ۲ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که کاهش درصد زیستایی غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ باکتری بر سلول‌های HEK-293 در زمان ۲۴ h نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. در زمان ۴۸ h کاهش درصد زیستایی در غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از باکتری بر سلول‌های HEK-293 نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. مهار رشد و تکثیر سلولی در زمان ۷۲ h در چهار

حاصل از ساتریفورژ 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 ۱۰ μl رنگ PI به سلول‌ها اضافه شد. در نهایت 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 One way ANOVA و بر اساس P/0.05 محاسبه شد.

نتایج

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

درصد زیستایی حاصل از تیمار سلول‌های AGS با غلظت‌های مختلف ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از باکتری‌های کشته شده با حرارت باکتری در جدول ۱ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که کاهش درصد زیستایی در زمان ۲۴ h و غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از لحاظ آماری معنی‌دار بود (جدول ۱). اثر سایتوتوکسیک در زمان

جدول (۱) میانگین توان زیستی رده سلولی AGS تیمار شده با باکتری کشته شده توسط حرارت لاکتوباسیلوس پاراکازی (TD3) در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ با روش MTT assay

زمان	۰/۱ $\mu\text{g/ml}$	۱ $\mu\text{g/ml}$	۱۰ $\mu\text{g/ml}$	۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$	۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$
۲۴ hr	۸۲/۵ ± ۰/۴۹	۷۳/۲۵ ± ۰/۳۵	۶۷/۵ ± ۰/۴۳	۵۹/۲۵ ± ۰/۳۹	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 **
۷۲ hr	۶۷/۵ ± ۰/۴۴	۵۶/۲۵ ± ۱/۲۴	۴۹/۷ ± ۰/۳۰	۴۱/۲۵ ± ۰/۵۸	۳۵ ± ۰/۵۲ ***

مقایسه درصد بقای سلول‌های AGS تیمار شده با غلظت‌های مختلف باکتری کشته شده با حرارت باکتری در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲؛ نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (P < 0.05: *، P < 0.01: **، P < 0.001: ***)

غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ ، 10 ، 100 و 1000 باکتری دیده شده. بیشترین خاصیت ضد تکثیری در زمان 72 h و بیشترین دوز دیده شد. به طوری که مهار 50 درصدی رشد سلول‌های سرطانی مشاهده شده (جدول ۲). مقادیر IC_{50} مربوط به اثر باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازی در سه زمان 24 h ، 48 و 72 بر رده سلولی HEK-293 در جدول ۳ ارائه شده است.

بررسی آپوپتوز القاء شده توسط باکتری

از رقت‌های $10 \mu\text{g/ml}$ و 23 باکتری در زمان 48 h ، جهت انجام تست فلوسایتومتری استفاده شد که نتایج early apoptosis و late apoptosis در شکل‌های ۱، ۲ و جداول ۴ و ۵ به ارائه شده است. میزان آپوپتوز اولیه القاشده (early apoptosis) در غلظت $23 \mu\text{g/ml}$ (غلظت IC_{50}) و $10 \mu\text{g/ml}$ به ترتیب $0.7 \pm 0.79/17$ و $0.8 \pm 0.18/10$ درصد بود. افزایش آپوپتوز در هر دو غلظت نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.001$). در مقایسه آپوپتوز و نکروز در هر دو غلظت، درصد آپوپتوز بیشتری نسبت به نکروز مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۵).

غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ ، 10 ، 100 و 1000 باکتری دیده شده. بیشترین خاصیت ضد تکثیری در زمان 72 h و بیشترین دوز دیده شد. به طوری که مهار 50 درصدی رشد سلول‌های سرطانی مشاهده شده (جدول ۲). مقادیر IC_{50} مربوط به اثر باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازی در سه زمان 24 h ، 48 و 72 بر رده سلولی HEK-293 در جدول ۳ ارائه شده است.

بررسی درصد زیستایی رده سلولی HEK-293 تحت تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری کشته شده با حرارت در زمان‌های 24 h ، 48 و 72

درصد زیستایی حاصل از تیمار سلول‌های HEK-293 با غلظت‌های مختلف 0.1 ، 0.1 ، 1 ، 10 ، 100 و 1000 از باکتری کشته شده با حرارت 24 h ، 48 و 72 در جدول ۲ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که کاهش درصد زیستایی غلظت‌های 1000 و $100 \mu\text{g/ml}$ باکتری بر سلول‌های HEK-293 در زمان 24 h نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. در زمان 48 h کاهش درصد زیستایی در غلظت‌های 10 ، 100 و 1000 از باکتری بر سلول‌های HEK-293 نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. مهار رشد و تکثیر سلولی در زمان 72 h در چهار غلظت

جدول (۲) میانگین توان زیستی رده سلولی HEK-293 تیمار شده با باکتری کشته شده توسط حرارت لاکتوباسیلوس پاراکازی در مدت‌زمان‌های 24 h ، 48 ، 72 با روش MTT assay.

زمان	$0.1 \mu\text{g/ml}$	$0.1 \mu\text{g/ml}$	$1 \mu\text{g/ml}$	$1 \mu\text{g/ml}$	$10 \mu\text{g/ml}$	$100 \mu\text{g/ml}$
$h24$	91 ± 0.39	87 ± 0.86	81 ± 0.75	76 ± 0.42	70 ± 0.47	61 ± 0.36
					*	**
$h48$	$84/25 \pm 0.35$	$80/75 \pm 0.41$	$72/75 \pm 0.44$	69 ± 0.31	60.5 ± 0.34	56 ± 0.67
				*	**	**
$h72$	80.5 ± 1.15	$75/5 \pm 0.37$	$69/54 \pm 0.34$	$61/75 \pm 0.31$	$55/5 \pm 0.37$	50.5 ± 0.41
			*	**	**	**

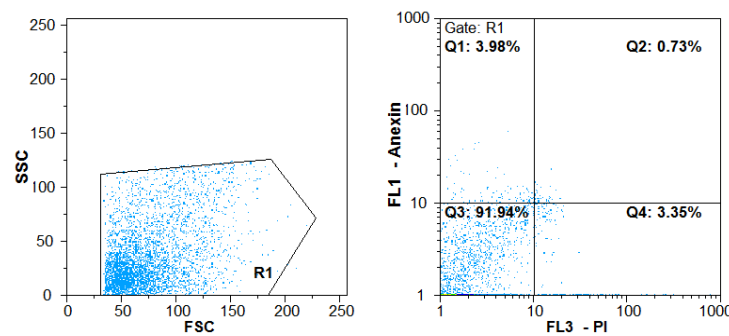
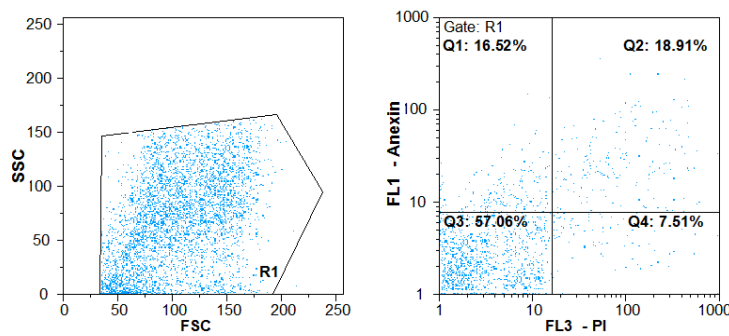
مقایسه درصد بقای سلول‌های HEK-293 تیمار شده با غلظت‌های مختلف باکتری کشته شده با حرارت باکتری در مدت‌زمان‌های 24 h ، 48 و 72 ؛ نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است ($P < 0.05$ ؛ $P < 0.01$ ؛ $P < 0.001$).

جدول (۳) مقادیر IC50 مربوط به اثر باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی در سه زمان مختلف، بر دوره سلولی.

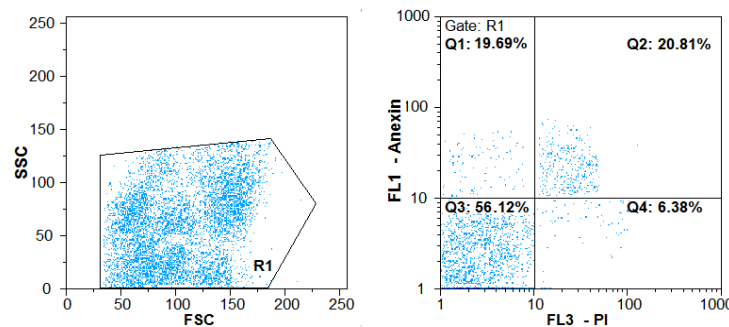
Time (hrs)	IC50 (AGS) $\mu\text{g/ml}$	IC50 (HEK-293) $\mu\text{g/ml}$
۲۴	۱۸۵	۱۴۸۰
۴۸	۲۳	۱۱۷۰
۷۲	۱/۷	۱۰۸۰

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

	Control	IC50 (23 $\mu\text{g/ml}$)	P	10 $\mu\text{g/ml}$	P
Early apoptosis	۴/۵۹ \pm ۰/۹	۱۷/۷۹ \pm ۰/۷	<۰/۰۱	۱۸/۱۰ \pm ۰/۸	<۰/۰۱
Late apoptosis	۱/۳ \pm ۱/۳	۴/۵۹ \pm ۰/۹	<۰/۰۰۱	۱۹/۸۶ \pm ۰/۳	<۰/۰۰۱
Necrosis	۳/۰۱ \pm ۱/۲	۸/۲۵ \pm ۱/۱	<۰/۰۱	۶/۹۴ \pm ۱/۳	<۰/۰۵



(a) دوز ۱۰ $\mu\text{g/ml}$



(b) دوز ۲۳ $\mu\text{g/ml}$

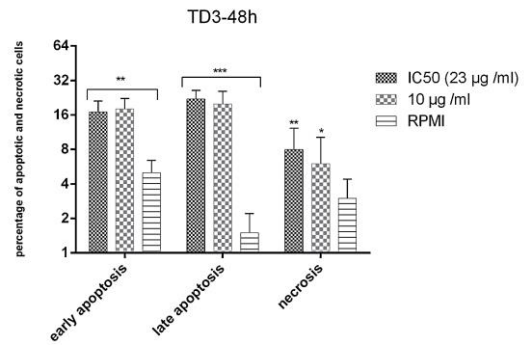
شکل (۱) آپوپتوز القاء شده توسط باکتری در زمان ۴۸ h (a) دوز ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ (b) دوز ۲۳ $\mu\text{g/ml}$

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 (۱۲ و ۱۳).

پروبیوتیک‌ها نقش‌های ضد توموری خود را از طریق بهبود فلور طبیعی معده، تخریب کارسینوژن‌های 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 به واسطه 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. به علاوه، 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 پاراکازنی کشته شده توسط حرارت بر روی سلول‌های سرطانی AGS سرطان معده مورد ارزیابی قرار گرفت. این باکتری‌های پروبیوتیک مانع از تکثیر سلولی رده AGS در روند وابسته به زمان، دوز و سویه شدند. نتایج حاصل از مقایسه تست MTT در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ و در غلظت‌های مختلف نشان داد که لاکتوباسیلوس پاراکازنی کشته شده توسط حرارت در الگوی وابسته به زمان و دوز سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی شد.



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

جدول (۵) مقایسه آپوپتوز و نکروز القاء شده توسط باکتری TD3 در زمان ۴۸ h 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 اشاره کرد. متأسفانه سرطان معده چندان به شیمی‌درمانی حساس نیست و در بعضی موارد بعد از عمل جراحی به منظور کوچک نمودن تومور و کاهش علائم انجام می‌شود. در روش 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 در نتیجه با افزایش سلول‌های مقاوم روند درمان مشکل‌تر می‌شود (۱۱).

دادند که سوپرناتانت شیر تخمیر شده توسط پروبیونی باکتریوم^۳ فرودنریچی سبب القا آپوپتوز در سلول‌های HGT-1 به صورت وابسته به زمان و دوز می‌شود و با بروز خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی آپوپتوز از جمله 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 مورد استفاده در سرطان معده به نام کامپوتکسین^۴ را بهبود می‌بخشد. در واقع 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 درون سلولی فعال‌کننده کاسپازها هستند (۱۵).

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

کریمی و همکارانش در سال ۱۳۹۵ اثر سایتوتوکسیک باکتری‌های بومی لاکتوباسیلوس برویس کشته شده توسط حرارت بر روی سلول‌های سرطانی HT-29 را ارزیابی کرد. این باکتری پروبیوتیک مانع از تکثیر سلولی رده HT-29 در روند 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 مهارت کمتری در رده سلولی HEK-293 نسبت به رده HT-29 مشاهده شد (۱۶).

گونوم^۵ 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 به صورت وابسته به دوز می‌گردد. نتایج حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که PTF برای سلول‌های خونی سفید ایمن هستند و به طور انتخابی اثرات آپوپتوزی را در سلول‌های سرطانی معده القا

در ادامه نتایج محاسبه IC50 مربوط به باکتری در زمان ۲۴ h برابر با ۱۸۵ µg/ml و در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ به ترتیب ۲۳ µg/ml، ۱/۷ µg/ml بود.

تیمار سلول‌های نرمال رده HEK-293 با غلظت‌های مختلف ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ µg/ml آپوپتوز کشته شده توسط حرارت باکتری طی مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ نیز سبب کاهش میزان زیستایی سلول‌ها شد. ولی میزان اثر سایتوتوکسیک مشاهده شده در مقایسه با رده سلولی AGS بسیار کمتر بود. در ادامه باید اشاره کرد که میزان IC50 محاسبه شده در مورد باکتری بر روی سلول نرمال HEK-293 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ به ترتیب برابر µg/ml ۱۱۷۰، ۱۴۸۰ و ۱۰۸۰ بود. نتایج حاکی از این است که غلظت‌های بسیار کمتری از باکتری قادر به مهار رشد سلول‌های سرطانی در رده سلولی AGS می‌باشد. این در حالی است که مهارت 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، 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 القا شده بر اساس داده‌های فلوسایتومتری در سلول‌های تیمار شده با باکتری در زمان ۴۸ h نشان داد که آپوپتوز القا شده در غلظت IC50 (۲۳ µg/ml) نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. همچنین در مقایسه آپوپتوز و نکروز، افزایش ۵ برابری آپوپتوز نسبت به نکروز در غلظت IC50 (۲۳ µg/ml) و افزایش ۵/۴ برابری در غلظت ۱۰ µg/ml مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار بود (P < ۰/۰۰۱).

در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۲ توسط کوسین^۱ و همکارانش بر روی شیر تخمیر شده توسط پروبیونی باکتریوم فرودنریچی^۲، توان پیش آپوپتوزی آن بر روی سلول‌های سرطانی معده HGT-1 بررسی شد. آن‌ها نشان

³ *Propionibacterium*

⁴ Camptothecin

⁵ Ghoneum

¹ Cousin

² *Propionibacterium freudenreichii*

سایتوتوکسیک از طریق فلوسایتومتری و میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که آپتوز مکانیسم سایتوتوکسیک اصلی برای متابولیت ترشح شده از این دو پروبیوتیک است (۲۰).

اورلاندو^۳ و همکاران نیز اثر دو باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی و لاکتوباسیلوس رامنوسوس را بر دو رده سرطانی HGC-27 و DLD-1 مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نیز از باکتری‌ها به صورت زنده کشته شده توسط حرارت استفاده کردند و به وسیله تست MTT درصد زیستایی و با روش فلوسایتومتری میزان آپتوز را بررسی کردند. به طور کلی، خاصیت ضد تکثیر و القاء آپتوز در هر دو باکتری و هر دو رده سلولی مشابه بود و بر اساس مطالعه آن‌ها زنده یا غیرفعال بودن باکتری در نتیجه بی‌تأثیر بود اما با افزایش غلظت، میزان آپتوز نیز افزایش پیدا کرد به گونه‌ای که در غلظت ۵ μg/ml، افزایش آپتوز تا ۶۶/۳ درصد نیز مشاهده شد (۲۱).

نتیجه گیری

با توجه به میزان درصد بقاء بالای سلولی در رده سلولی HEK-293 با میزان مشابه غلظت و زمان اثر باکتری کشته شده توسط حرارت بر روی رده سلولی AGS به نظر می‌رسد که لاکتوباسیلوس پاراکازئی کشته شده 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 نرمال HEK-293 دارد که این خود می‌تواند نشان‌دهنده تفاوت اثر این باکتری بین سلول‌های نرمال و سرطانی بوده و این تفاوت می‌تواند به عنوان 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

می‌کنند. در این مطالعه، تیمار سلول‌های AGS با PTF باعث تنظیم منفی قابل توجهی 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 آپتوزی شود که سبب فعال‌سازی کاسپازها و نهایتاً منجر به آپتوز می‌شوند. در مطالعه ما نیز، القای آپتوز در سلول‌های سرطانی AGS به دوز وابسته بود که با نتایج گونوم مطابقت دارد (۱۷).

دی لوسی^۱ 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 آپتوز و مانع تکثیر سلول از طریق مسیر کاسپاز ۳ شدند. مسیر کاسپاز ۳، مسیر داخلی میتوکندریایی است که سبب القای آپتوز می‌شود (۱۸).

روسو^۲ 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 آپتوزی می‌شد. داده‌های حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که عصاره‌های 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 پلاتناروم 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 ترشح شده 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. سنجه‌های

¹ Di Luccia

² Russo

³ Orlando

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 kefir* (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 gasser* 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

به جنس و سویه می‌باشد، شناسایی توان سایتوتوکسیک و ضد تکثیر باکتری‌های بومی ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به این نکته که تهیه و تولید باکتری‌های کشته شده به‌طور نسبی راحت‌تر بوده و دارای عمر مفید بیشتری می‌باشند، با انجام آزمون‌های 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.

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

Elnaz Rasuli¹, **Farzaneh Tafvizi**^{*2}, Maryam Tajabady Ebrahimi³

¹Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

²Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

³Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Apoptosis 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*.