

تعیین بهترین زمان سلول‌کشی دیواره سلولی لاکتوباسیلوس کازی و لاکتوباسیلوس پاراکازی در رده سرطانی K562

چکیده

ملیحه ریگی^۱فرح فرخی^۱امیر توکمه‌چی^{۲*}

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبریان، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/۱۶

زمینه و هدف: مطالعه حاضر به منظور تاثیر دیواره سلولی به دست آمده از باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازی و لاکتوباسیلوس پاراکازی به عنوان پروبیوتیک (جدا شده از روده ماهی کپور) بر مرگ سلولی رده سرطانی K562 که در شرایط آزمایشگاهی انجام شد و نقش تراکم سلول‌های سرطانی بر نتایج حاصل از تست MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-Diphenyl tetrazolium Bromide] نیز بررسی گردید.

روش بررسی: برای این منظور ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی Man Rogosa Sharpe Agar (MRS) در شرایط بی‌هوازی کشت و پس از شستشو با بافر Phosphate Buffer Saline (PBS) به کمک دستگاه سونیکاتور شکسته شده و جهت جدا کردن دیواره سلولی از سایر ترکیبات سانتریفیوژ شدند. سپس غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از دیواره سلولی باکتری‌ها به طور جداگانه در محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI) تهیه و خواص سلول‌کشی آن‌ها علیه رده سرطانی K562 در شرایط آزمایشگاهی در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و تراکم‌های ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ از سلول‌های سرطانی با روش MTT سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که دیواره سلولی این لاکتوباسیلوس‌ها به طور معنی‌داری ($P=0/0246$) باعث القای مرگ در سلول‌های سرطانی می‌شوند و با افزایش غلظت بر میزان سلول‌کشی آن‌ها افزوده می‌شود. هم‌چنین مشخص شد تغییر تعداد سلول‌های سرطانی که در معرض دیواره سلولی قرار گرفتند هیچ تاثیری بر نتایج حاصل از تست MTT ندارد ($P=0/098$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت تاثیر سلول‌کشی دیواره سلولی پروبیوتیک‌ها وابسته به گونه باکتری بوده و با افزایش غلظت دیواره سلولی بر میزان آن افزوده می‌شود.

کلمات کلیدی: K562، پروبیوتیک، خواص ضد سرطانی، تست MTT.

* نویسنده مسئول: آذربایجان غربی، ارومیه، خیابان شهید بهشتی، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده آرتمیا و آبریان
تلفن: ۰۹۱۴-۴۷۳۳۰۱
E-mail: a.tukmachi@urmia.ac.ir

مقدمه

بیش‌تر از هر سرطان دیگر باعث مرگ و میر افراد زیر ۲۰ سال می‌گردد.^۱ لوسمی میلوئید مزمن (Chronic Myeloid Leukemia, CML) نوعی سرطان خون است که به دلیل جابه‌جایی دو طرفه بین ژن ABL بر روی کروموزوم ۹ و ژن BCR بر روی کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی خونی چند توان ایجاد می‌شود. انکوژن BCR-ABL حاصل از این جابه‌جایی پروتیین p210BCR-ABL را کد می‌کند که فعالیت پیوسته و مداوم تیروزین کیناز سبب تکثیر بی‌رویه و اختلال در

لوسمی (Leukemia) یک نوع سرطان بدخیم مغز استخوان و خون بوده که منجر به تجمع غیر قابل کنترل سلول‌های غیر طبیعی خون و مهار عملکرد آن‌ها شده و در بسیاری از موارد منجر به مرگ می‌گردد. لوسمی پنجمین علت شایع مرگ ناشی از سرطان در مردان و ششمین علت شایع مرگ ناشی از سرطان در زنان می‌باشد. لوسمی،

سلول‌های توموری مختلف در شرایط In-vivo و In-vitro موثر می‌باشند.^{۱۳}

هم‌چنین بررسی‌ها نشان می‌دهند، تیمار سلول‌های HT-29 (یکی از رده‌های سلول‌های سرطانی کولون) با پلی‌ساکاریدهای جدا شده از لاکتوباسیلوس/اسیدوفیل ۶۰۶، باعث مهار سلول‌ها می‌شوند. این پلی‌ساکاریدها در اکثر سلول‌ها از طریق القای آپوپتوز عمل مهار رشد سلولی را انجام می‌دهند.^{۱۴} *L. reuteri* باعث القای ترشح عواملی می‌شود که سبب آپوپتوز در سلول‌های لوسمی میلوئیدی می‌گردد.^{۱۵} یافته‌های به‌دست آمده از مطالعات مختلف نشان می‌دهند که دیواره سلولی خالص شده باکتری بیفیدوباکتریوم/اینفانتیس (*Bifidobacterium infantis*) مسئول فعالیت ضد سرطانی می‌باشد.^{۱۶} بر اساس مطالعات انجام گرفته توسط Kabiri، مشخص شد که عصاره‌های سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس کازی و پاراکازی جدا شده از روده ماهی کپور در مقایسه با گروه شاهد که عصاره‌ای دریافت نکرده بودند دارای فعالیت سلول کشی هستند.^{۱۷}

یافته‌های این محققین نشان داد که دیواره سلولی این باکتری‌ها نه تنها رشد سلول‌های سرطانی را مهار نکردند، بلکه رشد آن سلول‌ها را نسبت به گروه شاهد که هیچ غلظتی دریافت نکرده بود افزایش دادند. اما طبق مطالعات انجام گرفته دیواره سلولی و پپتیدوگلیکان لاکتوباسیلوس‌ها دارای خاصیت ضد سرطانی است.^{۱۷} دیواره سلولی جدا شده از *Bifidobacterium infantis* منجر به مهار فعالیت‌های توموری در سلول‌های صفافی موش در In vitro می‌گردد.^{۱۸} هم‌چنین مطالعات آزمایشگاهی در مورد گلیکوپروتئین‌های جدا شده از دیواره سلولی لاکتوباسیلوس بولگاری (*L. bulgaricus*)، فعالیت ضد توموری آن‌ها را مشخص نمود.^{۱۹}

هدف از این تحقیق، مطالعه تاثیر دیواره‌های سلولی به‌دست آمده از باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازی و پاراکازی جدا شده از ماهی کپور بر سلول‌های سرطانی K562، جهت القا مرگ سلولی با روش MTT در شرایط آزمایشگاهی بود. هم‌چنین از آنجایی که در تحقیقات مختلف برای سنجش میزان مرگ سلولی به روش MTT از تراکم‌های متفاوت سلولی مانند ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سلول در هر خانه میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده می‌شود،^{۲۰} لذا تاثیر تراکم‌های مختلف از سلول‌های سرطانی که با غلظت‌های مختلف دیواره سلولی مجاور شدند را بر نتایج حاصل از تست MTT بررسی گردید.

مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) سلول‌های پیش‌ساز میلوئید می‌شود.^۲ رده سرطانی K562 جزو سلول‌های سرطانی خون با منشأ میلوئیدی است که برای اولین بار از یک پیر زن ۵۳ ساله مبتلا به سرطان خون مزمن جدا شد.^۳

پروبیوتیک‌ها عبارتند از سلول‌های میکروبی که اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان دارند. امروزه استفاده از این میکروارگانیسم‌های مفید موضوع مطالعه در انسان و حیوانات پرورشی می‌باشد.^۴ لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها بیش‌ترین میکروارگانیسم‌هایی هستند که به‌عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. اثرات مفید گونه‌های مختلف این میکروارگانیسم‌ها در مطالعات متعددی مورد اشاره قرار گرفته است، اما خواص آن‌ها از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت بوده و در بررسی‌های گوناگون محققین این خواص را اختصاص به گونه و سویه باکتری دانسته‌اند.^۵ در واقع پروبیوتیک‌ها دسته‌ای از میکروارگانیسم‌های زنده هستند که در صورت مصرف به‌میزان مشخص، اثرات مفیدی را بر سلامت مصرف‌کننده ایجاد می‌کنند.^۶ این میکروارگانیسم‌ها دارای اثرات تحریکی و تقویتی بر سیستم ایمنی می‌باشند.

برای مثال، در مطالعه‌ای که در موش‌های مبتلا به نقص سیستم ایمنی صورت گرفت، نقش پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یک عامل موثر در بهبود پاسخ‌های ایمنی نشان داده شد.^۷ پروبیوتیک‌ها در حقیقت باکتری‌های مفید دستگاه گوارش هستند که دارای قابلیت‌های مختلفی بوده و از مهم‌ترین آن‌ها ایجاد تعادل در دستگاه گوارش و سیستم ایمنی بدن می‌باشد.^۸ هم‌چنین این عوامل قادرند پاسخ‌های ایمنی ذاتی شامل ترشح سایتوکین‌ها از لنفوسیت‌ها را تحریک نمایند.^{۹،۱۰}

هم‌چنین یافته‌های به‌دست آمده از مطالعات نشان می‌دهند که اجزای سلولی لاکتوباسیلوس‌ها شامل سلول کامل، سلول‌های کشته شده توسط حرارت، دیواره سلولی، پپتیدوگلیکان و عصاره سیتوپلاسمی دارای عملکردهای متفاوتی به‌هنگام مجاور شدن با سلول‌های سرطانی هستند.^{۱۱} از جالب‌ترین و بحث‌انگیزترین ویژگی‌هایی که به باکتری‌های پروبیوتیک اسید لاکتیک نسبت داده شده است، فعالیت‌های ضد سرطانی آن‌ها می‌باشد.^{۱۲} بسیاری از درمان‌های کنونی برای مهار رشد این رده سرطانی تا حدود قابل توجهی موثر می‌باشند اما دارای اثرات جانبی هستند. شواهد نشان می‌دهند که برخی از پروتئین‌های باکتریایی و پپتیدهای کوتاه در برابر

روش بررسی

مطالعه حاضر به صورت آزمایشگاهی (In-vitro) از مهرماه ۱۳۹۰ تا مرداد ماه ۱۳۹۱ و در پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه طی مراحل زیر انجام گرفت:

کشت سلول: سلول‌های K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور (C122) تهیه و در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Gibco, England)، در حضور ۱۰ درصد (Gibco, England) Fetal Bovine Serum (FBS) و آنتی بیوتیک‌های Streptomycin (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و Penicillin (۱۰۰ واحد بر میلی لیتر) در انکوباتور با ۵٪ گاز CO₂ و ۹۵٪ رطوبت در دمای ۳۷ °C به مدت ۷۲-۴۸ ساعت کشت داده شدند. سلول‌ها پس از رشد (تا حدود ۸۰ درصد سطح فلاسک)، از فلاسک جدا، شمارش و برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

کشت باکتری‌ها و تهیه دیواره سلولی آن‌ها: لاکتوباسیلوس کازویی و پاراکازویی مورد استفاده در این بررسی که توسط Azizpour از روده ماهی کپور معمولی جدا شدند، از کلکسیون میکروارگانیسم آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه تهیه شدند.^{۲۱} هر کدام از باکتری‌ها به صورت جداگانه در ۱۰ ml محیط آبگوشت (MRS) (Merck, Germany) deMan-Rogosa-Sharpe به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۰ °C کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ rpm و در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصل دو مرتبه با بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH برابر ۶/۹ شستشو داده شد. رسوب به دست آمده به مدت یک شبانه روز در سرمای ۸۰ °C - نگهداری شد. سپس طبق روش Lebediker^{۲۲}، باکتری‌ها از حالت انجماد خارج و ۱ ml بافر لیزکننده به باکتری‌ها اضافه شد. طرز تهیه بافر لیزکننده به شرح زیر است:

ابتدا محلولی شامل ۱۴۰ میلی مول NaCl، ۲/۷ میلی مول KCl، ۱۰ میلی مول Na₂HPO₄، ۱/۸ میلی مول KH₂PO₄، با pH برابر با ۷/۳ تهیه شده و توسط اتوکلاو استریل گردید و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. جهت تهیه بافر به صورت روزانه ۱۰ درصد گلیسرین، ۰/۲ mmol لیزوزیم، ۱۰ میلی مول ۲- مرکاپتو اتانل و ۲- ۰/۱ درصد تریتون X-۱۰۰ به محلول فوق اضافه شد. در مرحله بعد

عمل خرد کردن باکتری‌ها در کنار یخ، توسط دستگاه سونیکاتور (Tomy, Japan) با دامنه ۶۰ درصد به مدت دو دقیقه انجام گرفت. به منظور جلوگیری از بالا رفتن دمای محلول و پروب سونیکاتور، دستگاه به مدت چهار دقیقه خاموش گردید. در انتها نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ °C با دور ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی (به عنوان عصاره سیتوپلاسمی) جدا شده و رسوب حاصل نیز به عنوان دیواره سلولی جدا شد. سپس دیواره‌ها به مدت یک شبانه روز داخل دستگاه فریز درایر (Freeze drier, Christ, Germany) قرار داده شد تا خشک شوند. برای تهیه غلظت‌های مختلف از دیواره مقادیر مورد نیاز وزن شده و جهت استریل کردن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C اتوکلاو شدند.

تهیه غلظت‌های مختلف از دیواره سلولی: در این تحقیق عمل رقیق سازی توسط محیط کشت RPMI انجام گرفت و رقت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از دیواره سلولی در شرایط استریل تهیه شد.

تست MTT: برای سنجش خاصیت ضد توموری دیواره‌های سلولی از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. نمک‌های ترازولیوم مانند MTT را می‌توان برای ارزیابی میزان سلول‌های زنده به کار برد. این رنگ‌ها فقط در میتوکندری سلول‌های زنده توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز به صورت ذرات نامحلول بنفش رنگ فورمازان شکسته می‌شوند.

جهت سنجش خاصیت ضد توموری دیواره‌های سلولی ابتدا سلول‌های K562 سانتریفیوژ و شمارش شده سپس مقدار ۱۰۰ μl با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در محیط کشت RPMI که حاوی ۱۵ درصد FBS بود، به هر چاهک از یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد. سپس ۱۰۰ μl محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف دیواره‌های سلولی به همه چاهک‌ها اضافه شد.

در نهایت غلظت‌های تاثیر داده شده دیواره‌های سلولی به نصف میزان اولیه (۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰) تقلیل یافت. در هر میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، سه چاهک نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و به هر چاهک ۱۰۰ μl سلول به همراه ۹۰ μl محیط کشت RPMI و ۱۰ μl بافر فسفات سالین استریل افزوده شد. در مرحله بعد میکروپلیت‌ها با تراکم سلولی ۲۰۰۰۰ حاوی دیواره سلولی لاکتوباسیلوس‌های کازویی و پاراکازویی تاثیر داده شده به مدت ۱۲، ۲۴،

۱۹ و آزمون Tukey (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می شود) استفاده گردید. در تمام بررسی ها سطح معنی دار آزمون ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد، هم چنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار Microsoft Excel 2010 انجام گرفت.

یافته ها

داده های به دست آمده از آزمون MTT نشان دادند که دیواره سلولی این لاکتوباسیلوس ها در مقایسه با گروه شاهد دارای فعالیت سلول کشی می باشند. بر اساس نتایج به دست آمده اثر مهار دیواره های سلولی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، مرگ سلول های سرطانی نیز افزایش می یابد. هم چنین دیواره های سلولی در همه زمان ها و غلظت ها توانستند به طور معنی داری ($P < 0.05$) رشد سلول های سرطانی را مهار نمایند. از طرفی بهترین زمان سلول کشی در مورد لاکتوباسیلوس کازیبی پس از ۲۴ ساعت مشاهده شد (جدول ۱) و در مورد لاکتوباسیلوس پاراکازیبی پس از ۷۲ ساعت (جدول ۲) به بیش ترین میزان خود رسید به طوری که میزان مهار رشد سلول های سرطانی توسط لاکتوباسیلوس های کازیبی در غلظت های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت به ترتیب $13/66 \pm 6/36$ ، $34/22 \pm 4/47$ ، $76/35 \pm 13/5$ و $98/29 \pm 5/53$ درصد و در مورد لاکتوباسیلوس پاراکازیبی در همان غلظت ها پس از ۷۲ ساعت به ترتیب $33/92 \pm 3/52$ ، $48/05 \pm 4/58$ ، $48/05 \pm 4/58$ و $96/48 \pm 14/77$ درصد بود. از طرفی برای بررسی تاثیر تعداد سلول های سرطانی بر میزان مرگ آن ها در حضور غلظت های مختلف دیواره

۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای 37°C انکوباتور در حضور ۵٪ گاز CO_2 قرار داده شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون ۵mg از پودر MTT را در ۱ml بافر PBS حل کرده و به هر چاهک ۲۰μl از محلول MTT اضافه گردید. سپس میکروپلیت ها به مدت چهار ساعت داخل انکوباتور قرار داده شدند که طی این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول های زنده، عنصر برم موجود در محلول MTT را احیا کرده و آن را به صورت ذرات کریستال های بنفش رنگ فورمازان در می آورد. از آنجایی که این ذرات نامحلول می باشند، به هر چاهک ۱۰۰μl محلول دی متیل سولفوکسید خالص اضافه شد تا رسوبات حل گردند و میکروپلیت ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند. در نهایت جذب نمونه ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر ثبت گردید. درصد سلول کشی دیواره ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد: ^{۱۷}

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

بر اساس این فرمول IC_{50} (غلظتی که در آن موجب مهار رشد سلول های سرطانی به میزان ۵۰٪ می گردد) دیواره های سلولی محاسبه گردید. سپس بر اساس نتایج به دست آمده، بعد از تعیین بهترین زمان مجاور شدن دیواره ها بر سلول های سرطانی با تراکم ۲۰۰۰۰، تراکم های سلولی ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ به چاهک های یک میکروپلیت ۹۶ خانه ای اضافه گردید و درصد سلول کشی در بهترین زمان سلول کشی مربوط به هر نوع باکتری محاسبه گردید. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{standard Deviation}$ ارائه شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) One-Way Analysis of Variance نرم افزار SPSS ویراست

جدول ۱: نتایج حاصل از خواص ضد توموری دیواره سلولی جدا شده از لاکتوباسیلوس کازیبی در زمان های مختلف

زمان (ساعت)	غلظت دیواره (μg/ml)	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰
۱۲	$13/58 \pm 3/59^a$	$27/85 \pm 11/99^a$	$61/17 \pm 11/04^a$	$98/23 \pm 23/7^b$	
۲۴	$13/66 \pm 6/36^a$	$34/22 \pm 4/47^a$	$76/35 \pm 13/5^a$	$112/29 \pm 5/53^a$	
۴۸	$14/7 \pm 4/55^a$	$29/52 \pm 6/17^a$	$64/33 \pm 15/51^a$	$101/74 \pm 9/84^b$	
۷۲	$5/98 \pm 2/33^b$	$25/4 \pm 4/75^a$	$51/94 \pm 6/4^b$	$95/92 \pm 23/34^b$	

* داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{Standard Deviation}$ بیان شده اند. * حروف غیر یکسان در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح $P < 0.05$ می باشد.

جدول ۲: نتایج حاصل از خواص ضد توموری دیواره سلولی جدا شده از لاکتوباسیلوس پاراکازی در زمان‌های مختلف

غلظت دیواره (µg/ml)				زمان (ساعت)
۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	
۶۶/۷۰±۲۵/۱۰ ^a	۵۴/۵۲±۲/۷۳ ^a	۳۱/۲۹±۳/۸۷ ^a	۱۳/۵۸±۳/۵۸ ^a	۱۲
۹۷/۵۰±۶/۹۶ ^a	۶۴/۲۸±۹/۶۸ ^a	۵۲/۲۲±۳/۲۲ ^b	۱۵/۲۷±۴/۰۲ ^a	۲۴
۹۷/۸۷±۱۱/۶۵ ^a	۵۶/۶۸±۱۱/۱۶ ^a	۳۲/۲۵±۹/۶۵ ^a	۱۲/۵۱±۲/۷۸ ^a	۴۸
۱۳۳/۴۹±۱۴/۰۵ ^b	۹۶/۴۸±۱۴/۷۷ ^b	۴۸/۰۵±۴/۵۸ ^b	۳۳/۹۲±۳/۵۲ ^b	۷۲

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

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5- Diphenyl tetrazolium Bromide

جدول ۳: یافته‌های حاصل از تاثیر تراکم سلولی رده سرطانی K562 مجاور شده با غلظت‌های مختلف ($\mu\text{g/ml}$) دیواره سلولی هر دو لاکتوباسیلوس بر تست MTT

غلظت دیواره (μg/ml)	تعداد سلول در هر ml		باکتری
۴۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰۰	لاکتوباسیلوس
۲۰۰۰	۱۹/۳±۳/۶ ^a	۷/۷۶±۵/۹۳ ^a	
۱۰۰۰	۳۲/۸±۰/۷ ^{ab}	۲۵/۰۵±۳/۹۶ ^a	کازی
۴۰۰	۱۱۲/۲۹±۵/۷۸ ^a	۱۳/۶۷±۶/۶۵ ^a	
۲۰۰	۷۸/۳۱±۹/۴۶ ^a	۲۶/۳±۴/۶ ^a	لاکتوباسیلوس
۱۰۰	۳۸/۶۲±۶/۶۸ ^a	۱۸/۷۸±۱۱/۷۱ ^a	
۴۰	۱۲۴/۸۵±۱۴ ^a	۳۷/۳۶±۱۰/۱۹ ^a	پاراکازی
۲۰	۷۱/۴۶±۱۸/۶۳ ^a	۱۷/۳۴±۳/۵۲ ^a	
۱۰	۱۳۰/۲۴±۲۱/۶ ^a	۳۱/۴۸±۴/۵۸ ^a	
۵	۱۲۶/۹۸±۱۴/۰۶ ^a	۷۹/۹۴±۱۴/۷۷ ^a	

*حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $P<0/05$ می‌باشد

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5- Diphenyl tetrazolium Bromide

تعادل حیاتی بین تکثیر و مرگ سلولی می‌باشد. هر عامل داخلی یا خارجی که باعث اختلال در این تعادل گردد، نتیجه آن ابتلا به سرطان می‌باشد.^{۲۳} در طول ۱۰۰ سال گذشته مرگ و میر ناشی از سرطان سیر صعودی داشته است.^{۱۹} بنابراین راه حل‌هایی برای حفظ کنترل رشد سلول‌ها و درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته است، تا باعث القای مرگ سلول‌های سرطانی و یا مهار تکثیر آن‌ها گردد.^{۲۴} بسیاری از عوامل درمانی سرطان به دلیل اثرات سمی آن‌ها بر سلول‌ها و بافت‌های طبیعی بدن، محدود شده است.^{۲۵} بر خلاف عوامل درمانی چون شیمی درمانی، پروبیوتیک‌ها و ترکیبات مشتق از آن‌ها سلول‌های توموری را بدون آسیب رساندن به سلول‌های طبیعی و سایر عوارض جانبی از بین می‌برند.^{۲۶} باکتری‌های خانواده لاکتوباسیل‌سه به‌طور رایج به‌عنوان پروبیوتیک در ماست و سایر لبنیات استفاده می‌شوند.

سلولی، تراکم‌های سلولی ۵،۰۰۰، ۱۰،۰۰۰ و ۲۰،۰۰۰ استفاده شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در مورد هر دو باکتری *لاکتوباسیلوس کازیی* و *پاراکازیی* به‌جز غلظت $1000 \mu\text{g/ml}$ *لاکتوباسیلوس کازیی* که بین تراکم سلولی ۱۰،۰۰۰ و ۲۰،۰۰۰ آن‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بودند در سایر غلظت‌ها و تراکم‌های سلولی هیچ اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) مشاهده نشد. بنابراین تغییر تعداد سلول سرطانی هیچ‌گونه تأثیری بر نتیجه نهایی آزمون MTT نخواهد داشت (جدول ۳).

بحث

به‌طور معمول سرطان به‌عنوان رشد کنترل نشده سلول‌ها تعریف می‌شود. نگهداری هموستازی بافت‌های طبیعی یست‌انداران، شامل یک

جهش نمایند، در حالی که پس از قرار گرفتن در معرض سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس‌ها این جهش‌زایی کاهش می‌یابد.^{۳۶} Orrhage ظرفیت اتصال هشت گونه از لاکتوباسیلوس‌های دستگاه گوارش انسان را به آمین‌های هتروسیکلیک (Heterocyclic) جهش‌زا گزارش کرد. این آمین‌ها از پختن مواد غذایی غنی از پروتئین ایجاد می‌گردند. بر اساس گزارش این محقق، به‌نظر می‌رسد این اتصال به‌صورت فیزیکی انجام می‌گیرد.^{۳۷} پیشنهاد شده است که پپتیدوگلیکان‌ها و پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی این لاکتوباسیلوس‌ها دو تا از مهم‌ترین عوامل این اتصالات می‌باشند.^{۳۸} در یک مطالعه مقایسه‌ای در بین ۲۲۳ بیمار مبتلا به سرطان سرویکس مشاهده گردید که دیواره سلولی جدا شده از لاکتوباسیلوس کازی کشته شده با حرارت، دارای اثرات ضد توموری می‌باشد.^{۳۹}

Kim، فعالیت‌های ضد سرطانی پپتیدوگلیکان‌ها و سایر ترکیبات دیواره سلولی سویه‌های مختلفی از لاکتوباسیلوس‌ها، از جمله لاکتوکوک (*Lactococcus*)، استرپتوکوک (*Streptococcus*) و بیفیدوباکتر (*Bifidobacterium*) را نشان دادند.^{۴۰} هم‌چنین بر اساس تحقیقات انجام‌شده، بخش‌های پلی‌ساکاریدی جدا شده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۶۰۶ کشته شده با حرارت، تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند، در صورتی که پروتئین‌ها و لیپیدهای جدا شده از این باکتری‌ها، تاثیری در تکثیر سلول‌های سرطانی نداشتند. لذا احتمالاً بخش پلی‌ساکاریدی دیواره سلولی بخش اصلی مربوط به اثرات ضد سرطانی دیواره سلولی لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد.^{۴۱} مطالعه حاضر به‌منظور بررسی تاثیر دیواره سلولی لاکتوباسیلوس کازی و لاکتوباسیلوس پاراکازی بر یکی از رده‌های سلولی معروف لوسمی (K562) صورت پذیرفت. هم‌چنین از آنجایی که در تحقیقات برای سنجش تاثیر ترکیبات بر سلول‌های مختلف به‌روش MTT، در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای تعداد متفاوتی سلول قرار داده می‌شود.^{۴۲} و^{۱۳}

در این مطالعه برای مشاهده تاثیر تراکم سلول‌های سرطانی K562 تعداد سلول‌های سرطانی را تغییر داده و نتایج حاصل از تست MTT، مورد مقایسه قرار گرفت. یافته‌های حاصل از تاثیر دیواره سلولی باکتری‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از ماهی کپور بر مهار رشد سلول سرطانی نشان داد که دیواره‌های سلولی هر دو باکتری توانستند رشد سلول‌های سرطانی را مهار نمایند به‌طوری که با افزایش غلظت

ویژگی‌های تنظیم‌کنندگی و تحریک‌کنندگی این باکتری‌ها بر سیستم ایمنی میزبان به‌خوبی در مطالعات گذشته مشخص گردیده است.^{۳۷} یکی از مسائلی که در مورد لاکتوباسیلوس‌ها و وجود آن‌ها به‌عنوان فلور گوارشی در انسان و بسیاری از حیوانات مطرح می‌باشد این است که خواص تقویتی و تحریکی این عوامل فقط محدود به ایمنی مخاطی نبوده بلکه این باکتری‌ها می‌توانند با مکانیسم‌های مختلف سیگنال‌های لازم جهت تحریک و تقویت سیستم ایمنی مرکزی را نیز مخابره کنند و در این رابطه گزارش‌های زیادی مبنی بر کاربرد این عوامل در مقابله با عفونت‌های مختلف، سرطان‌ها و سایر ناهنجاری‌های ایمنولوژیک وجود دارد.^{۳۸} لاکتوباسیلوس‌ها رایج‌ترین میکرواورگانیزم‌های مورد استفاده به‌عنوان پروبیوتیک می‌باشند که خواص ضد توموری این دسته از باکتری‌ها در مطالعات گوناگون نشان داده شده است.^{۳۹} بررسی‌های انجام‌شده توسط محققین در مورد تاثیر برخی لاکتوباسیلوس‌ها بر تعدادی از رده‌های سلول‌های سرطانی نشان داد، باکتری‌های سالم و کشته شده با حرارت، عصاره سیتوپلاسمی و پپتیدوگلیکان دیواره سلولی استخراج شده از این لاکتوباسیلوس‌ها تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار می‌نماید.^{۴۰}

مطالعات انجام‌شده در شرایط In vivo و In vitro نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها به‌طور بالقوه باعث کاهش خطر ابتلا به سرطان کولون می‌شوند.^{۴۱} بر اساس مطالعات انجام‌شده، تحریک رشد پروبیوتیک‌های بیفیدوباکتر (*Bifidobacteria*) در روده می‌تواند منجر به جلوگیری از سرطان روده بزرگ شود.^{۴۲} تاثیر بیفیدوباکتر لانگوم (*Bifidobacterium langum*) پس از خشک کردن در شرایط خلأ، بر سرطان روده بزرگ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پس از چهار هفته مطالعه نشان داد که این باکتری‌ها منجر به جلوگیری از بروز تومور روده بزرگ شده و هم‌چنین تعداد و حجم تومورها را نیز کاهش می‌دهند.^{۴۳} Seow، گزارش کرد دو *L. rhamnosus GG* و *L. casei* رشد سلول‌ها را در دو رده MGH و RT112 سرطان مثانه، مهار می‌نماید.^{۴۴}

هم‌چنین طبق یافته‌های محققین، شیر تخمیر شده حاوی باکتری‌های *B. infantis*، *B. bifidum*، *B. animalis*، *B. acidophilus* و *L. Paracasei* رشد رده سلولی MCF7 سرطان پستان را مهار می‌کند.^{۴۵} بسیاری از ترکیبات جهش‌زا در رژیم غذایی غنی از گوشت وجود دارند، که می‌توانند به دستگاه گوارش متصل شده و ایجاد

ضد سرطانی می‌باشد و می‌توانند سلول‌های سرطانی را به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) از بین ببرند. هم‌چنین طبق نتایج این تحقیق پس از انجام مقایسه بین تراکم‌های سلولی مختلفی که با دیواره‌های سلولی مجاور شدند، هیچ اختلاف معنی‌داری ($P < 0/05$) مشاهده نشد. **سپاسگزاری:** این مقاله بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی تاثیر عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی لاکتوباسیلوس کازیری و لاکتوباسیلوس پاراکازیری بر بیان ژن p53 به‌روش الایزا" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۰ و کد ۱۲۹ می‌باشد که با حمایت دانشگاه ارومیه اجرا شده است.

قدرت سلول‌کشی آن‌ها افزایش یافت. لذا نتایج این تحقیق مخالف یافته‌های Kabiri می‌باشد.^{۱۷} دلیل این امر می‌تواند ناشی از این مسئله باشد که در مطالعه حاضر رسوب باقیمانده به‌عنوان دیواره سلولی توسط اتوکلاو استریل شد ولی در مطالعات صورت گرفته توسط Kabiri، دیواره سلولی به‌دست آمده از این باکتری‌ها با فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون استریل گردید.^{۱۷} با توجه به این‌که ترکیبات ضد سرطانی دیواره سلولی، به‌صورت کامل از فیلتر عبور نمی‌نماید. این نتایج تاییدکننده این مطلب می‌باشد که طبق تحقیقات انجام گرفته توسط سایر محققین، دیواره سلولی لاکتوباسیلوس‌ها دارای خاصیت

References

1. Kwan JM, Fialho AM, Kundu M, Thomas J, Hong CS, Das Gupta TK, et al. Bacterial proteins as potential drugs in the treatment of leukemia. *Leuk Res* 2009;33(10):1392-9
2. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M; European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2007;370(9584):342-50.
3. Ekert H, Jurk IH, Waters KD, Tiedemann K. Prophylactic cotrimoxazole and lactobacilli preparation in neutropenic patients. *Med Pediatr Oncol* 1980;8(1):47-51.
4. Salinas I, Abelli L, Bertoni F, Picchiotti S, Roque A, Furones D, et al. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol* 2008;25(1-2):114-23.
5. Kirjavainen PV, El-Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright PF. The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;26(2):131-5.
6. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2 Suppl):361S-364S.
7. Bujalance C, Moreno E, Jimenez-Valera M, Ruiz-Bravo A. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *Int J Food Microbiol* 2007;113(1):28-34.
8. Drisko JA, Giles CK, Bischoff BJ. Probiotics in health maintenance and disease prevention. *Altern Med Rev* 2003;8(2):143-55.
9. Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nutr* 2000;83(2):167-76.
10. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2 Suppl):451S-455S.
11. Lee JW, Shin JG, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY, et al. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *J Vet Sci* 2004;5(1):41-8.
12. Rafter J. The effects of probiotics on colon cancer development. *Nutr Res Rev* 2004;17(2):277-84.
13. Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S, Kim SH. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. *Lett Appl Microbiol* 2006;42(5):452-8.
14. Iyer C, Kosters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappaB and MAPK signalling. *Cell Microbiol* 2008;10(7):1442-52.
15. Bartosch S, Woodmansey EJ, Paterson JC, McMurdo ME, Macfarlane GT. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clin Infect Dis* 2005;40(1):28-37.
16. 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.
17. Kabiri F, Nejati V, Tukmechi A, Delirez N, Nikbakhsh P. Inhibitory properties of cytoplasmic extract of *Lactobacilli* isolated from common carp intestine on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: an in vitro study. *Tehran Univ Med J (TUMJ)* 2011;68(12):691-8. [Persian]
18. Sekine K, Ohta J, Onishi M, Tatsuki T, Shimokawa Y, Toida T, et al. Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation (WPG) of *Bifidobacterium infantis*. *Biol Pharm Bull* 1995;18(1):148-53.
19. Grusoy O, Kinik O. Probiotics: A new popular option for cancer inhibition. *Int J Dairy Sci* 2006;1(1):100-3.
20. Lebediker M. Bacterial Protein Extraction (mini-scale) Sonication. [Internet] 2002 [cited 15 Nov 2012]; Available from: http://wolfson.huji.ac.il/purification/TagProteinPurif/Cell_Lysis_BPer.html
21. Azizpour K. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of west Azarbaijan, Iran. *Res J Biol Sci* 2009;4(3):324-6.
22. Renukadevi KP, Angayarkanni J, Karunakaran G. Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *Serratia rubidaea* and its cytotoxicity on lung cancer cell line NCI-H69. *Acta Technica Corviniensis Bull Eng* 2012;Fascicule 2:97-101.

23. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
24. Sellers WR, Fisher DE. Apoptosis and cancer drug targeting. *J Clin Invest* 1999;104(12):1655-61.
25. Damia G, Broggin M. Improving the selectivity of cancer treatments by interfering with cell response pathways. *Eur J Cancer* 2004;40(17):2550-9.
26. Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. *Am J Gastroenterol* 2000;95(1 Suppl):S2-4.
27. Erickson KL, Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr* 2000;130(2S Suppl):403S-9S.
28. Perdígón G, Fuller R, Raya R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr Issues Intest Microbiol* 2001;2(1):27-42.
29. Willett W. The search for the causes of breast and colon cancer. *Nature* 1989;338(6214):389-94.
30. Kim JE, Kim JY, Lee KW, Lee HJ. Cancer chemopreventive effects of lactic acid bacteria. *J Microbiol Biotechnol* 2007;17(8):1227-35.
31. Brady LJ, Gallaher DD, Busta FF. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J Nutr* 2000;130(2S Suppl):410S-414S.
32. Kulkarni N, Reddy BS. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial beta-glucuronidase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994;207(3):278-83.
33. Moorehead RJ, Hoper M, McKelvey ST. Assessment of ornithine decarboxylase activity in rectal mucosa as a marker for colorectal adenomas and carcinomas. *Br J Surg* 1987;74(5):364-5.
34. Seow SW, Rahmat JN, Mohamed AA, Mahendran R, Lee YK, Bay BH. *Lactobacillus* species is more cytotoxic to human bladder cancer cells than *Mycobacterium Bovis* (bacillus Calmette-Guerin). *J Urol* 2002;168(5):2236-9.
35. Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L, Di Fronzo G. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutr Cancer* 1997;28(1):93-9.
36. Lankaputhra WE, Shah NP. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutat Res* 1998;397(2):169-82.
37. Orrhage K, Sillerström E, Gustafsson JA, Nord CE, Rafter J. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat Res* 1994;311(2):239-48.
38. Zhang XB, Ohta Y. Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton of lactic acid bacteria on mutagens. *J Dairy Sci* 1991;74(5):1477-81.
39. Okawa T, Niibe H, Arai T, Sekiba K, Noda K, Takeuchi S, et al. Effect of LC9018 combined with radiation therapy on carcinoma of the uterine cervix. A phase III, multicenter, randomized, controlled study. *Cancer* 1993;72(6):1949-54.
40. Kim JY, Woo HJ, Kim YS, Lee HJ. Screening for antiproliferative effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines. *Biotechnol Lett* 2002;24:1431-6.
41. Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S, Kim SH. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. *Lett Appl Microbiol* 2006;42(5):452-8.
42. Khorramizadeh MR, Falak R, Pezeshki M, Safavifar F, Mansouri P, Ghahary A, et al. Dermal wound fibroblasts and matrix metalloproteinases (MMPs): Their possible role in allergic contact dermatitis. *Iranian J Allergy Asthma Immunol* 2004;7:11.

The best time of cytotoxicity for extracted cell wall from *Lactobacillus casei* and *paracasei* in K562 cell line

Malihe Riki M.Sc.¹
Farah Farokhi Ph.D.¹
Amir Tukmechi Ph.D.^{2*}

1- Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.

2- Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.

* Corresponding author: Dept. of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University, Shahid Beheshti Ave., West Azarbaijan, Iran.
Tel: +98-914-1473201
E-mail: a.tukmachi@urmia.ac.ir

Abstract

Received: August 04, 2012 Accepted: November 06, 2012

Background: The aim of this study was to evaluate the effect of extracted cell walls from *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* as probiotic bacteria (isolated from common carp intestine) on K562 and the role of cell concentration on the results of MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-Diphenyl tetrazolium Bromide] test.

Methods: For this purpose, bacteria were cultured in specific medium (MRS broth) at anaerobic condition for 24-48 hour. After incubation period culture medium was centrifuged, then the cells were washed twice with PBS buffer to remove additional medium. Finally, collected bacterial cell disrupted by Sonication and cell walls were separated from other components by centrifugation. After that, different concentrations of cell walls (500, 1000, 2000 and 4000 µg/ml) were prepared in RPMI medium for each bacteria, separately. Then anticancer properties of the cell walls were determined in vitro at 12, 24, 48 and 72 h, also the effect of K562 concentration was assayed with MTT technique.

Results: The results showed extracted cell wall from both probiotic statistically (P=0.098) have anti turmeric properties in K562 and their properties will arise in relation with concentration. As well as, we found that the number of cell had not any affect on the result of MTT assay.

Conclusion: We conclude that the cytotoxicity property of extracted cell wall is related in the type of bacteria, but this anticancer property would warrant further study on the clinical application of extracted cell wall.

Keywords: anticancer properties, K562, MTT test, probiotic.