تعیین بهترین زمان سلول‌کشی دیواره سلولی *لاکتوباسیلوس کازیی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* در رده سرطانی K562

ملیحه ریکی[۱]
فرح فرخی[۱]
امیر توکمه‌چی[۲*]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲- گروه باکتریولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

* نویسنده مسئول: آذربایجان غربی، ارومیه، خیابان شهید بهشتی، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده آرتمیا و آبزیان تلفن: ۰۹۱۴-۱۴۷۳۲۰۱
E-mail: a.tukmachi@urmia.ac.ir

چکیده

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

زمینه و هدف: مطالعه حاضر به‌منظور تاثیر دیواره سلولی به‌دست آمده از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازیی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* به‌عنوان 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) به‌کمک 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 به‌طور 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 به‌طور معنی‌داری (P=۰/۰۲۴۶) 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=۰/۰۹۸).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به‌دست 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.

مقدمه

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، بیش‌تر از هر سرطان دیگر باعث مرگ و میر افراد زیر ۲۰ سال می‌گردد.[۱] لوسمی میلوییید مزمن (Chronic Myeloid Leukemia, CML) نوعی سرطان خون است که به‌دلیل 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 تیروزین‌کیناز سبب تکثیر بی‌رویه و اختلال در

مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) سلول‌های پیش‌ساز میلویید می‌شود.[۲] رده سرطانی K562 جزو سلول‌های سرطانی خون با منشا میلوییدی 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 مصرف کننده 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.[۹و۱۰]

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 پروتیین‌های باکتریایی و پپتیدهای کوتاه در برابر سلول‌های تومووری 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 پلی ساکاریدها 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 میلوییدی 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 کازیی* و *پاراکازیی* 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 صفاقی موش در In vitro می‌گردد.[۱۸] هم‌چنین مطالعات آزمایشگاهی در مورد گلیکوپروتیین‌های 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 کازیی* و *پاراکازیی* 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.

روش بررسی

مطالعه حاضر به‌صورت 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 میلی‌لیتر محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Gibco, England)، در حضور ۱۰ درصد Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, England) و آنتی‌بیوتیک‌های Streptomycin (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و Penicillin (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) در انکوباتور با ۵٪ گاز CO_2 و ۹۵٪ رطوبت در دمای ۳۷ °C به‌مدت 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 کازیی* و *پاراکازیی* 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] هرکدام از باکتری‌ها به‌صورت جداگانه در ۱۰ml محیط آبگوشت deMan-Rogosa-Sharpe (MRS) (Merck, Germany) به مدت ۴۸–۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۰ °C کشت داده شدند. پس از رشد، باکتری‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰rpm 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 به‌دست آمده به‌مدت یک شبانه روز در سرمای ۸۰ °C– نگه‌داری شد. سپس طبق روش Lebendiker،[۲۲] باکتری‌ها از حالت انجماد خارج و ۱ml بافر لیزکننده به باکتری‌ها اضافه شد. طرز تهیه بافر لیزکننده به شرح زیر است:

ابتدا محلولی شامل ۱۴۰ میلی‌مول NaCl، ۲/۷ میلی‌مول KCl، ۱۰ میلی‌مول Na2HPO4، ۱/۸ میلی‌مول KH2PO4، (PBS) با pH برابر با ۷/۳ تهیه شده و توسط اتوکلاو استریل گردید و تا زمان استفاده در یخچال نگه‌داری شد. جهت تهیه بافر به‌صورت روزانه ۱۰ درصد گلیسیرین، ۰/۲mmol لیزوزیم، ۱۰ میلی‌مول 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 به‌مدت دو دقیقه انجام گرفت. به‌منظور جلوگیری از بالا رفتن دمای محلول و پروب سونیکاتور، دستگاه به‌مدت چهار دقیقه خاموش گردید. در انتها نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ °C با دور ۱۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی (به‌عنوان عصاره سیتوپلاسمی) جدا شده و رسوب حاصل نیز به‌عنوان دیواره سلولی جدا شد. سپس دیواره‌ها به‌مدت 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 به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C اتوکلاو شدند.

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

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

جهت سنجش خاصیت ضد توموری دیواره‌های سلولی ابتدا سلول‌های K562 سانتریفیوژ و شمارش شده سپس مقدار ۱۰۰µl 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 ۱۰۰µl 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 به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و به هر چاهک ۱۰۰µl سلول به‌همراه ۹۰µl محیط کشت RPMI و ۱۰µl بافر فسفات سالین استریل افزوده شد. در مرحله بعد میکروپلیت‌ها با تراکم سلولی ۲۰۰۰۰ حاوی دیواره سلولی *لاکتوباسیلوس‌های کازیی* و *پاراکازیی* تاثیر داده شده به‌مدت ۱۲، ۲۴،

۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ °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 میکروپلیت‌ها به‌مدت چهار ساعت داخل انکوباتور قرار داده شدند که طی این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های زنده، عنصر برم موجود در محلول MTT را احیا کرده و آن را به‌صورت ذرات کریستال‌های بنفش‌رنگ فورمازان در می‌آورد. از آنجایی که این ذرات نامحلول می‌باشند، به هر چاهک ۱۰۰µl محلول دی متیل سولفوکسید خالص اضافه شد تا رسوبات حل گردند و میکروپلیت‌ها به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر ثبت گردید. درصد سلول‌کشی دیواره‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:[۱۷]

۱۰۰×[جذب نوری شاهد+ (جذب نوری شاهد- جذب نوری نمونه)]= درصد سلول‌کشی

بر اساس این فرمول IC50 (غلظتی که در آن موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی به‌میزان ۵۰٪ می‌گردد) دیواره‌های سلولی محاسبه گردید. سپس بر اساس نتایج به‌دست آمده، بعد از تعیین بهترین زمان مجاور شدن دیواره‌ها بر سلول‌های سرطانی با تراکم ۲۰۰۰۰، تراکم‌های سلولی ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ به چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید و درصد سلول‌کشی در بهترین زمان سلول‌کشی مربوط به هر نوع باکتری محاسبه گردید. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و داده‌ها به‌صورت Mean± Standard Deviation ارایه شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه One-Way Analysis of Variance (ANOVA) نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۹ و آزمون Tukey (آزمون اختلاف حقیقی که به‌طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد، هم‌چنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 انجام گرفت.

یافته‌ها

داده‌های به‌دست آمده از آزمون MTT نشان دادند که دیواره سلولی این لاکتوباسیلوس‌ها در مقایسه با گروه شاهد دارای فعالیت سلول‌کشی می‌باشند. بر اساس نتایج به‌دست آمده اثر مهاری دیواره‌های سلولی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، مرگ سلول‌های سرطانی نیز افزایش می‌یابد. هم‌چنین دیواره‌های سلولی در همه زمان‌ها و غلظت‌ها توانستند به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) رشد سلول‌های سرطانی را مهار نمایند. از طرفی بهترین زمان سلول‌کشی در مورد *لاکتوباسیلوس کازیی* پس از ۲۴ ساعت مشاهده شد (جدول ۱) و در مورد *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* پس از ۷۲ ساعت (جدول ۲) به بیش‌ترین میزان خود رسید به‌طوری که میزان مهار رشد سلول‌های سرطانی توسط *لاکتوباسیلوس‌های کازیی* در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پس از ۲۴ ساعت به‌ترتیب ۱۳/۶۶±۶/۳۶، ۳۴/۲۲±۴/۴۷، ۷۶/۳۵±۱۳/۵ و ۱۱۲/۲۹±۵/۵۳ درصد و در مورد *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* در همان غلظت‌ها پس از ۷۲ ساعت به‌ترتیب ۳۳/۹۲±۳/۵۲، ۴۸/۰۵±۴/۵۸، ۹۶/۴۸±۱۴/۷۷ و ۱۳۳/۴۹±۱۴/۰۵٪ بود. از طرفی برای بررسی تاثیر تعداد سلول‌های سرطانی بر میزان مرگ آن‌ها در حضور غلظت‌های مختلف دیواره

جدول ۱: نتایج حاصل از خواص ضد توموری دیواره سلولی جدا شده از *لاکتوباسیلوس کازیی* در زمان‌های مختلف

زمان (ساعت)	**غلظت دیواره** (µg/ml)			
	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰
۱۲	۱۳/۵۸±۳/۵۹[a]	۲۷/۸۵±۱۱/۹۹[a]	۶۱/۱۷±۱۱/۰۴[a]	۹۸/۸۲±۲۳/۷[b]
۲۴	۱۳/۶۶±۶/۳۶[a]	۳۴/۲۲±۴/۴۷[a]	۷۶/۳۵±۱۳/۵[a]	۱۱۲/۲۹±۵/۵۳[a]
۴۸	۱۴/۷±۴/۵۵[a]	۲۹/۵۲±۶/۱۷[a]	۶۴/۳۳±۱۵/۵۱[a]	۱۰۱/۷۴±۹/۸۴[b]
۷۲	۵/۹۸±۲/۳۳[b]	۲۵/۴±۴/۷۵[a]	۵۱/۹۴±۶/۴[b]	۹۵/۹۲±۲۳/۳۴[b]

* داده‌ها به‌صورت Mean± Standard Deviation بیان شده‌اند. * حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.

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

زمان (ساعت)	غلظت دیواره (µg/ml)			
	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰
۱۲	۱۳/۵۸±۳/۵۸[a]	۳۱/۲۹±۳/۸۷[a]	۵۴/۵۲±۲/۷۳[a]	۶۶/۷۰±۲۵/۱۰[a]
۲۴	۱۵/۲۷±۴/۰۲[a]	۵۲/۲۲±۳/۲۲[b]	۶۴/۲۸±۹/۶۸[a]	۹۷/۵۰±۶/۹۶[a]
۴۸	۱۲/۵۱±۲/۷۸[a]	۳۲/۲۵±۹/۶۵[a]	۵۶/۶۸±۱۱/۱۶[a]	۹۷/۸۷±۱۱/۶۵[a]
۷۲	۳۳/۹۲±۳/۵۲[b]	۴۸/۰۵±۴/۵۸[b]	۹۶/۴۸±۱۴/۷۷[b]	۱۳۳/۴۹±۱۴/۰۵[b]

* داده‌ها به‌صورت Mean± Standard Deviation بیان شده‌اند. * حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ 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 (µg/ml) دیواره سلولی هر دو لاکتوباسیلوس بر تست MTT

باکتری	تعداد سلول در هر ml	غلظت دیواره (µg/ml)			
		۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰
لاکتوباسیلوس کازیی	۵۰۰۰	۱۹/۳±۳/۶۱[a]	۳۲/۸±۰/۷[ab]	۶۶/۴۶±۱۸/۶۶[a]	۱۰۸/۸۲±۱۰/۹۷[a]
	۱۰۰۰۰	۷/۷۶±۵/۹۳[a]	۲۵/۰۵±۳/۹۶[a]	۶۷/۲۸±۱۵/۱۹[a]	۱۲۰/۳۸±۱۵/۷۸[a]
	۲۰۰۰۰	۱۳/۶۷±۶/۶۵[a]	۳۴/۲۲±۴/۶۷[b]	۷۶/۳۵±۱۴/۱[a]	۱۱۲/۲۹±۵/۷۸[a]
لاکتوباسیلوس پاراکازیی	۵۰۰۰	۲۶/۳±۴/۶[a]	۳۸/۶۲±۶/۶۸[a]	۷۸/۳۱±۹/۴۶[a]	۱۲۴/۸۵±۱۴[a]
	۱۰۰۰۰	۱۸/۷۸±۱۱/۷۱[a]	۳۷/۳۶±۱۰/۱۹[a]	۷۱/۴۶±۱۸/۶۳[a]	۱۳۰/۲۴±۲۱/۶[a]
	۲۰۰۰۰	۱۷/۳۴±۳/۵۲[a]	۳۱/۴۸±۴/۵۸[a]	۷۹/۹۴±۱۴/۷۷[a]	۱۲۶/۹۸±۱۴/۰۶[a]

* حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد
MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5- Diphenyl tetrazolium Bromide

سلولی، تراکم‌های سلولی ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ استفاده شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در مورد هر دو باکتری *لاکتوباسیلوس کازیی* و *پاراکازیی* به‌جز غلظت ۱۰۰۰µg/ml *لاکتوباسیلوس کازیی* که بین تراکم سلولی ۱۰۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ آن‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بودند در سایر غلظت‌ها و تراکم‌های سلولی هیچ اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) مشاهده نشد. بنابراین تغییر تعداد سلول سرطانی هیچ‌گونه تاثیری بر نتیجه نهایی آزمون MTT نخواهد داشت (جدول ۳).

بحث

به‌طور معمول سرطان به‌عنوان رشد کنترل نشده سلول‌ها تعریف می‌شود. نگه‌داری هموستازی بافت‌های طبیعی پستانداران، شامل یک 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 به‌دلیل اثرات سمی آن‌ها بر سلول‌ها و بافت‌های طبیعی بدن، محدود شده است.[۲۵] بر خلاف عوامل درمانی چون شیمی‌درمانی، 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 لاکتوباسیلاسه به‌طور رایج به‌عنوان پروبیوتیک در ماست و سایر لبنیات استفاده می‌شوند.

ویژگی‌های تنظیم‌کنندگی و تحریک‌کنندگی این باکتری‌ها بر سیستم ایمنی میزبان به‌خوبی در مطالعات گذشته مشخص گردیده است.[۲۷] یکی از مسایلی 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.[۲۸] لاکتوباسیلوس‌ها رایج‌ترین میکرواورگانیسم‌های مورد استفاده به‌عنوان پروبیوتیک می‌باشند که خواص ضد توموری این دسته از باکتری‌ها در مطالعات گوناگون نشان داده شده است.[۲۹] 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.[۳۰]

مطالعات انجام‌شده در شرایط In vivo و In vitro نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها به‌طور بالقوه باعث کاهش خطر ابتلا به سرطان کولون می‌شوند.[۳۱] بر اساس مطالعات انجام‌شده، تحریک رشد پروبیوتیک‌های بیفیدوباکتر (*Bifidobacteria*) در روده می‌تواند منجر به جلوگیری از سرطان روده بزرگ شود.[۳۲] تاثیر بیفیدوباکتر لانگوم (*Bifidobacterium langum*) پس از خشک کردن در شرایط خلا، 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.[۳۳] Seow، گزارش کرد دو *L. rhamnosus GG* و *L. casei* رشد سلول‌ها را در دو رده MGH و RT112 سرطان مثانه، مهار می‌نماید.[۳۴]

هم‌چنین طبق یافته‌های محققین، شیر تخمیر شده حاوی باکتری‌های *L. Infantis*، *B. bifidum*، *B. animalis*، *L. acidophilus* و *L. Paracasei*، رشد رده سلولی MCF7 سرطان پستان را مهار می‌کنند.[۳۵] بسیاری از ترکیبات جهش‌زا در رژیم غذایی غنی از گوشت وجود دارند، که می‌توانند به دستگاه گوارش متصل شده و ایجاد 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 پروتیین 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 کازیی* 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 پروتیین‌ها و لیپیدهای جدا شده از این باکتری‌ها، تاثیری در تکثیر سلول‌های سرطانی نداشتند. لذا احتمالا بخش پلی‌ساکاریدی دیواره سلولی، بخش اصلی مربوط به اثرات ضد سرطانی دیواره سلولی لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد.[۴۱] مطالعه حاضر به‌منظور بررسی تاثیر دیواره سلولی *لاکتوباسیلوس کازیی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* 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.[۴۲و۱۷و۱۳]

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

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 ضد سرطانی می‌باشد و می‌توانند سلول‌های سرطانی را به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) 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<۰/۰۵) مشاهده نشد.

سپاسگزاری: این مقاله بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی تاثیر عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی *لاکتوباسیلوس کازیی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازیی* 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.

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 co-trimoxazole and lactobacilli preparation in neutropenic patients. *Med Pediatr Oncol* 1980;8(1):47-51.
4. Salinas I, Abelli L, Bertoni F, Picchietti S, Roque A, Furones D, et al. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (Sparus aurata L.). *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25(1-2):114-23.
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, Rutherfurd 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, Delirezh 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. Lebendiker 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 lipopolysaccaride from serratia rubidaea and its cytotoxity 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, Broggini 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. Perdigón 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 metaloprotoeinases (MMPs): Their possible role in allergic contact dermatitis. *Iranian J Allergy Asthma Immunol* 2004;7-11.

TUMJ monthly Tehran University Medical Journal

Tehran University Medical Journal, February 2013; Vol. 70, No. 11: 691-699 *Original Article*

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.