DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.1.2

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیتی متابولیتهای ترشحی و عصاره سلولی *بیفیدوباکتریوم*های جداسازی شده از محصولات لبنی بر رده سلولی سرطان کولون (SW1116) و نرمال کلیه (HEK 293)

مریم ثریا و الهام معظمیان*

ایران، شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری های نوین، گروه میکروب شناسی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

چکیده

پروبیوتیکها مکمل خوراکی میکروبی زنده هستند و با افزایش غلظت باکتریهای مفید مثل *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* و کاهش سطح میکروبهای بیماری‌زا، میکروفلور روده را تغییر می‌دهند. پروبیوتیکها توانایی قابل توجهی در درمان سرطان کولون دارند و ممکن است نقش مهمی در پیشگیری از سرطان داشته باشند. هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی *بیفیدوباکتریوم‌ها* و تأثیر متابولیتها و عصاره سلولی باکتری بر رده نرمال کلیه(HEK298) و رده سرطان کولون (SW1116) می باشد. در این تحقیق ۱۰۰ نمونه محصولات لبنی سنتی جمع آوری و جهت جداسازی *بیفیدوباکتریوم‌ها* روی محیط *بیفیدوباکتریوم* آگار کشت داده شد. پس از شناسایی باکتری به روش بیوشیمیایی و مولکولی، اثر سیتوتوکسیسیتی متابولیت ترشحی و عصاره سلولی باکتری بر روی رده‌های سلولی سرطان کولون و نرمال کلیه از طریق تست ام تی تی (MTT) (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ارزیابی گردید. در این تحقیق بیفیدوباکتریوم های جداسازی شده گونه بیفیدیوم شناسایی شد. نتایج نشان داد که متابولیت ترشحی *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم*(*Bifidobacterium bifidum*) دو جدایه 2 و 3 بیشترین اثر سیتوتوکسیسیتی (۹۵ درصد) بر روی رده سرطان کولون نشان دادند. متابولیت ترشحی جدایه های ۲ و ۳ بر روی HEK-293 به ترتیب ۱۲ درصد و ۸۱ درصد اثر سیتوتوکسیسیتی نشان دادند. اثر سیتوتوکسیسیتی متابولیت ترشحی *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* جدایه ۲ بر روی رده نرمال HEK-293 بسیار کمتر از تاثیر آن بر روی رده سرطانی SW1116 می باشد. بنابراین می‌توان با انجام مطالعه‌های بیشتر از این باکتری به عنوان یک محصول پروبیوتیک ضدسرطان، در درمان و پیشگیری از سرطان کولون استفاده نمود.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم*، متابولیت ترشحی، عصاره سلولی باکتری ، رده سلولیSW1116 و HEK-293.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۷۷۱۱۰۹۹۴ ، پست الکترونیکی: elhammoazamian@gmail.com

مقدمه

فلور روده انسان حاوی انواعی از باکتریهاست. بسیاری از این باکتریها برای گوارش بهینه غذا مفیدند. دسته ای از این باکتریها که به باکتریهای پروبیوتیک معروف هستند، علاوه بر کمک به گوارش مولکولهای پیچیده، ترکیباتی مانند ویتامینها و آنتی بیوتیکهای مختلف را تولید می‌کنند که برای بدن مفید می باشند. یکی از مهم‌ترین منابع باکتریهای پروبیوتیک شیر و فرآورده های لبنی هستند (۱۶ و ۲۰). پروبیوتیکها با اتصال و ساکن شدن در دستگاه گوارش، باعث مهار رشد باکتریهای بیماری‌زا می‌شوند و تعادل میکروبی روده را بهبود می‌بخشند و باعث ارتقا عملکرد سد مخاطی دستگاه گوارش می‌شوند. مطالعات حیوانی و آزمایشگاهی و همچنین مطالعات همه‌گیر شناسی نقش

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.1.2
مقاله پژوهشی

مثبت باکتریهای پروبیوتیک در مقابل سرطان را نشان داده‌اند. اکثر مکانیسمهای پیشنهاد شده درگیر در مشخصات ضد سرطانی باکتریهای پروبیوتیک با حذف مواد سرطان‌زا، تولید مواد ضدتومورزا یا ضد جهش‌زا و افزایش ایمنی میزبان، درحال تغییر فعالیتهای متابولیکی میکروفلور روده و شرایط فیزیکی و شیمیایی کولون هستند. مرسوم‌ترین گونه‌های باکتریایی که به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود باکتری‌های اسید لاکتیک می باشد که معروفترین آنها از جنسهای *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* می‌باشند. باکتریهای اسیدلاکتیک ارگانیسمهای پروبیوتیک مفیدی هستند که به بهبود تغذیه، تعادل میکروبی، افزایش ایمنی در درمان و فعالیت ضد-توموری به خوبی کمک می‌کنند (۲ و ۱۹). محققان حدس می زنند که کاهش سطح پی اچ (pH) کولون توسط بیفیدوباکتریوم‌ها می‌تواند علت مهار سرطان‌زاها باشد. باکتریهای پروبیوتیک با ایجاد حالت اسیدیته، از رشد و تکثیر باکتریهای بیماری زای موجود در کولون جلوگیری می‌نمایند و در سطح آنزیمهای باکتریایی مانند (بتاگلوکورونیدازها) که باعث تبدیل پیش سرطان‌زاها به سرطان‌زاها می‌شوند، تعادل ایجاد می‌کنند (۵ و ۲۶). مطالعات اخیر نشان می‌دهند که عصاره سیتوپلاسمی و پپتیدوگلیکان مشتق شده از باکتریهای اسید لاکتیک سبب مهار تکثیر سلولهای سرطانی می‌شوند (۲۴ و ۲۵). هدف از انجام این مطالعه ارزیابی تأثیر متابولیت ترشحی و عصاره سلولی بیفیدوباکتریوم بر رده های سلولی سرطان کولون (SW1116) و نرمال کلیه (HEK-293) می باشد.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه: این مطالعه تجربی به منظور جداسازی سویه‌های *بیفیدوباکتریوم* از محصولات لبنی سنتی استان فارس در جنوب ایران انجام گرفت. در مجموع ۱۰۰ نمونه محصولات لبنی سنتی جمع آوری و در فالکونهای استریل در درون بسته‌های یخی به آزمایشگاه منتقل شد و تا شروع آزمایش در دمای یخچال نگهداری شد.

جداسازی و شناسایی باکتری *بیفیدوباکتریوم*: ابتدا از نمونه‌های جمع آوری شده رقت سازی در سرم فیزیولوژی صورت گرفت و از نمونه رقت سازی شده جهت غنی سازی در محیط کشت اختصاصی بیفیدوباکتریوم آگار(BFM) (از شرکت مرک آلمان) تلقیح گردید و در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از ۷۲ ساعت کلونیهای مشکوک به بیفیدوباکتریوم با استفاده از تستهای مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی گرم، تستهای بیوشیمیایی شامل کاتالاز، اکسیداز و تست تخمیر قندها (گلوکز، مانوز، اینوزیتول، سوربیتول، ساکارز، آمیلوز، آرابینوز) ارزیابی شد (۱۱).

شناسایی مولکولی: استخراج دی ان آ (DNA) با استفاده از دستورالعمل کیت (یکتا طب تجهیز، ایران) انجام شد. برای بررسی کیفیت دی ان آ (DNA) استخراج شده از ژل آگارز یک درصد برای الکترفورز استفاده شد. سپس واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *بیفیدوباکتریوم* شامل FBif520 (5`GGG TGG TAA TGC CGG ATG3`) و RBif520 (5`CCA CCG TTA CAC CGG GAA3`) انجام شد. جهت تنظیم نمودن برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر از سویه استاندارد *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* با کد PTCC1736 کلکسیون میکروبی ایران (سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران)، استفاده گردید. واکنش زنجیرهٔ پلیمرازی با چرخه های واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و نهایتا یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از انجام PCR ، به منظور بررسی وجود یا

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.1.2

عدم وجود محصول مورد نظر و ا طمینان از انجام کامل و صحیح واکنش محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید. در نهایت جهت تعیین گونه باکتری تعیین توالی محصول PCR به شرکت فرست بیس (base 1th) کشور مالزی ارسال گردید. نتایج حاصل از توالی محصولات PCR با توالی‌های موجود در بانک ژنی با برنامه بلاست (BLAST) مقایسه گردید و میزان تشابه نمونه‌های تعیین توالی شده با توالی موجود در بانک ژن مقایسه شد (۳).

تهیه متابولیت ترشحی و عصاره سلولی *بیفیدوباکتریوم*-ها: به منظور جداسازی متابولیت ترشحی *بیفیدوباکتریوم*، باکتریهای جداسازی شده به محیط بیفیدوباکتریوم براث تلقیح گردید و به مدت ۱۲۰ ساعت تحت شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور گرمخانه شد. پس از آن نمونه ها را با دور ۴۰۰۰ به مدت نیم ساعت سانتریفیوژ و سپس مایع رویی جمع آوری شد. برای اطمینان از عدم حضور باکتری از فیلتر ۰/۲ میکرومتری استفاده گردید. متابولیت ترشحی جداسازی شده را در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد درون آون به مدت یک هفته نگهداری و تغلیظ گردید. سپس وزن کرده و غلظت میلی گرم بر میلی لیتر با استفاده از پی بی اس (PBS) تهیه شد (۱۸). برای تهیه عصاره سلولی بعد از کشت باکتری و انجام سانتریفیوژ رسوبهای جدا شده را با دستگاه سونیکاتور به منظور لیز تمام اجزاء باکتری عمل سونیکیشن انجام گردید. نمونه‌ها را وزن کرده و با استفاده از نرمال سیلین اضافه کرده و با در دست داشتن وزن، غلظت آنها محاسبه گردید (۱ و ۲).

کشت سلول: در این تحقیق رده سلول سرطانی کولون SW1116 که شبیه اپی تلیال می باشد و رده نرمال HEK293 که از سلولهای کلیه جنین انسان گرفته شده از انستیتو پاستور تهیه شد. رده سلولی SW1116 به فلاسک حاوی محیط کشت سلولی آر پی ام آی ۱۶۴۰ (RPMI) و رده سلولی HEK293 به محیط کشت دی ام ای ام (DMEM) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، گلوتامین، پنی سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند. فلاسک حاوی سلول در داخل انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. بعد از ۷۲ ساعت برای ادامه رشد و پاساژ سلولها، با استفاده از تریپسین 1X تریپسینه شده و پاساژ داده شدند. سوسپانسیون حاصل در ۱۵۰۰ دور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ در آر پی ام آی ۱۶۴۰ تعلیق شده و تعداد سلولها با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام نئوبار در ۱ میلی لیتر شمارش شد (۱۰).

تاثیر متابولیت ترشحی و عصاره سلولی حاصل از *بیفیدوباکتریوم*ها بر سلولهای رده سرطانی SW1116 و نرمال HEK-293: ۹۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی 1×10^4سلول به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه ای اضافه کرده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از ۲۴ ساعت سلولها با ۱۰ میکرولیتر از متابولیت ترشحی و عصاره سلولی به ترتیب با غلظتهای ۰/۰۳ و ۰/۰۴ میلی گرم بر میلی لیتر تیمار شدند. هر تست سه بار تکرار گردید و با کنترل منفی (سلول بدون تیمار) و کنترل مثبت تیمار شده بادی ام اس او (DMSO) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در مجاور 5 درصد دی اکسید کربن انکوبه و نتایج ثبت گردید. اثر سیتوتوکسیک متابولیتها و عصاره سلولی جدایه هایی که بیشترین تاثیر کشندگی را بر روی رده سلولی SW1116 داشتند، بر روی رده نرمال HEK-293 نیز مورد بررسی قرار گرفت (۳ و ۴).

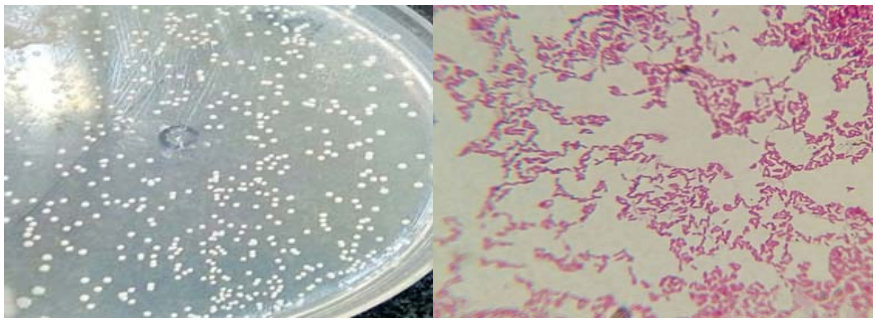
آنالیز آماری: جهت تعیین مقدار IC50 از نرم افزار کرو اکسپرت (Curve expert) استفاده شد. برای انجام آنالیز اطلاعات گروههای آزمایشی مختلف از نرم افزار اکسل و اس پی اس اس (SPSS) شماره ۱۸ استفاده گردید. نتایج گروههای مختلف با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.1.2
مقاله پژوهشی

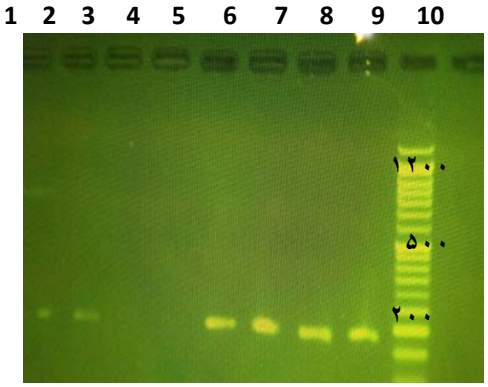
مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آزمون آماری آنوا (ANOVA) و مجذور کای(Chi Squre) برای به دست آوردن واریانس داده ها جهت تعیین معنی دار بودن یا نبودن استفاده گردید.

نتایج

جداسازی و شناسایی *بیفیدوباکتریوم*: در شناسایی باکتری از نظر صحت جنس و گونه، کلونیهای گرد، محدب، سفید و پر انتخاب شده، و بعد ار رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ به صورت باکتریهای گرم مثبت که به صورت Y یا V شکل و به رنگ بنفش جداسازی شدند (شکل ۱). تست کاتالاز منفی بود و در نهایت نتایج تست تخمیر قندها و مقایسه با جدول برگی برابر با *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* بود (شکل ۲).



شکل ۱- کلونیهای *بیفیدوباکتریوم* روی محیط BFM آگار (سمت چپ) و رنگ آمیزی گرم *بیفیدوباکتریوم* (سمت راست).



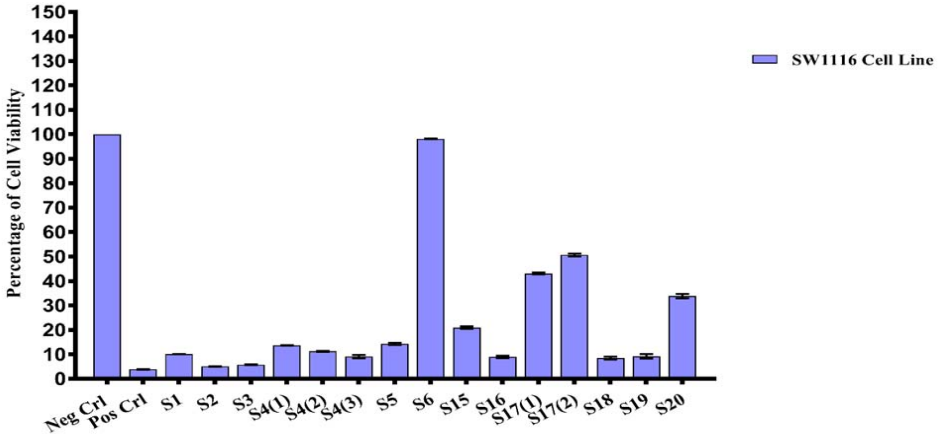
شکل ۲- نتایج الکتروفورز. ستونهای ۷-۱: جدایه های *بیفیدوباکتریوم*، ستون ۹: مارکر ۱۰۰ جفت بازی سینا ژن، ستون ۸: کنترل مثبت، ستون ۱۰: کنترل منفی.

ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیتی متابولیت ترشحی و عصاره سلولی جدایه‌های *بیفیدوباکتریوم* بر رده سلولی سرطان کولون: نتایج ارزیابی اثر متابولیت ترشحی جدایه‌های *بیفیدوباکتریوم* بعد از کشت ۱۲۰ ساعته بر روی رده سلولی SW1116 در کشت ۲۴ ساعته و درصد زنده ماندن سلولهای سرطانی کولون در شکل (۳) آمده است. متابولیت ترشحی دو جدایه ۲ و ۳ با غلظت ۰/۰۳ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین اثر سیتوتوکسیسیتی روی رده سلولی کولون دارا بودند که به ترتیب ۹۴/۹ درصد و۹۴/۲ درصد می باشد.

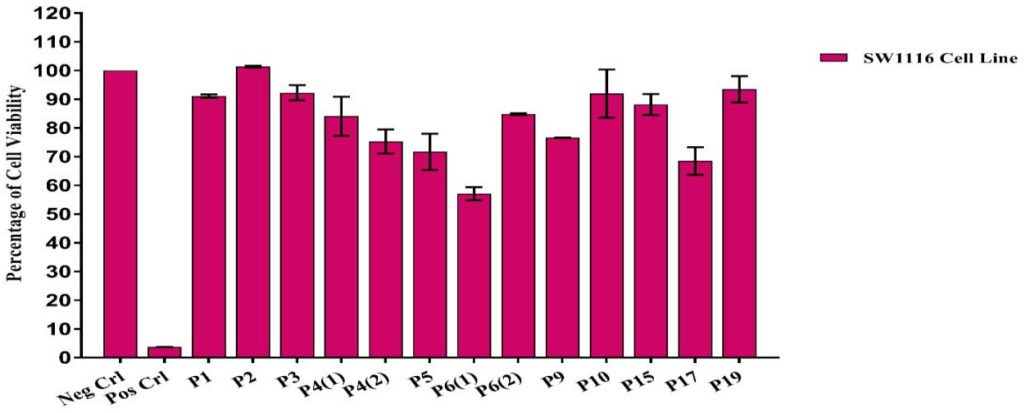
نتایج ارزیابی اثر عصاره سلولی جدایه‌های *بیفیدوباکتریوم* بعد از کشت ۱۲۰ ساعته بر روی رده سلولی SW1116 در

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.1.2
مقاله پژوهشی

کشت ۲۴ ساعته و درصد زنده ماندن سلولهای سرطانی کولون در شکل ۴ آمده است. دو جدایه ۶ و ۱۷ با غلظت ۰/۰۴ میلی گرم بر میلی بیشترین اثر سیتوتوکسیسیتی بر روی رده سلولی کولون به ترتیب با ۴۳ درصد و ۳۲ درصد حاصل گردید.



شکل ۳- ارزیابی درصد سلولهای زنده تیمار شده توسط متابولیتهای جدا سازی شده از جدایه‌های *بیفیدوباکتریوم*.(کنترل منفی (بدون تیمار): Neg Crl،کنترل مثبت (DMSO): Pos Crl، متابولیت ترشحی: S).

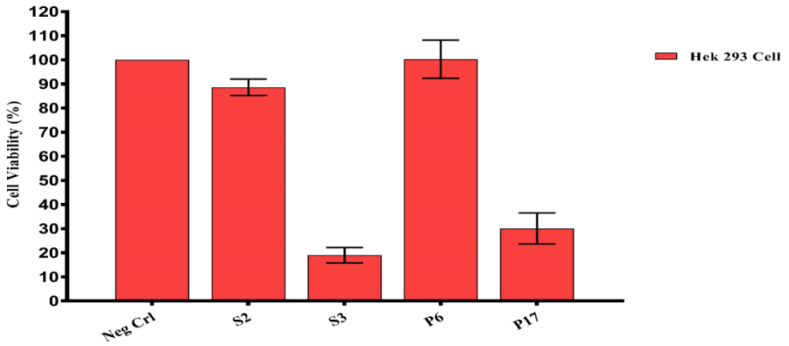


شکل۴- ارزیابی درصد سلولهای زنده تیمار شده توسط عصاره سلولی *بیفیدوباکتریوم* های جدا سازی شده. (کنترل منفی (بدون تیمار): Neg Crl،کنترل مثبت (DMSO): Pos Crl، عصاره سلولی باکتری: P).

تعیین ۵۰ درصد کشندگی (IC50):ایزوله هایی که بیشترین اثر کشندگی را داشتند، IC50 آنها محاسبه گردید. خاصیت ضدسرطانی متابولیتها و عصاره سلولی ذکر شده در غلظتهای مختلف بررسی و نتایج بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون ثبت گردید. بهترین اثر کشندگی متابولیتها در غلظت اولیه ۰/۰۳ گرم بر میلی لیتر و بهترین اثر کشندگی عصاره باکتری ۰/۰۴ گرم بر میلی لیتر می باشد. ۵۰ درصد کشندگی متابولیت ترشحی دو جدایه ۲ و ۳ و عصاره سلولی جدایه ۶ با استفاده از نرم افزار Curve Expert محاسبه گردید. نتایج نشان داد که IC50 متابولیت ترشحی دو جدایه ۲ و ۳ و عصاره سلولی جدایه ۶ به ترتیب ۰/۰۰۶ و ۰/۰۰۸ و ۰/۰۴۹ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.1.2
مقاله پژوهشی

ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیتی متابولیت ترشحی و عصاره سلولی جدایه های موثر بر روی رده HEK293: نتایج ارزیابی اثر متابولیت ترشحی جدایه‌های ۲ و ۳ و عصاره سلولی جدایه‌های ۶ و ۱۷ بعد از کشت ۱۲۰ ساعته بر روی رده سلولی HEK293 در کشت ۲۴ ساعته و درصد زنده ماندن سلولهای نرمال کلیه در شکل(۵) آمده است. عصاره سلولی جدایه ۶ با غلظت ۰/۰۴ میلی گرم بر میلی لیتر و متابولیت ترشحی جدایه ۲ با غلظت ۰/۰۳ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین اثر سیتوتوکسیسیتی روی رده سلولی کولون و کمترین اثر را برروی سلولهای نرمال دارا بودند.



شکل ۵- اثر سیتوتوکسیسیتی متابولیت ترشحی و عصاره سلولی جدایه های موثر بر روی رده HEK293. (کنترل منفی: Neg Crl، متابولیت ترشحی: S، عصاره سلولی: P).

نتایج توالی یابی و آنالیز BLAST: جدایه هایی که بیشترین اثر سیتوتوکسیسیتی را بر روی رده سلولی سرطان کولون داشتند تعیین توالی شدند. آنالیز داده ها نشان داد که جدایه ۲ مربوط به باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* سویهTMC3115 با ۹۹ درصد شباهت و جدایه ۳ مربوط به باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* سویه JCM 7004 با ۹۹ درصد شباهت مشاهده گردید.

بحث

در جهان مطالعات زیادی در زمینه جداسازی و شناسایی باکتریهای پروبیوتیک صورت گرفته است. مارمول و همکاران با بررسی چشم اندازهای اینده سرطان کولون بیان کردند که پروبیوتیکها یک درمان بالقوه برای سرطان کولون هستند و پروبیوتیکها میکروارگانیسمهای بادوامی هستند که بیفیدوباکتر و *لاکتوباسیلوس* از جمله مهمترین پروبیوتیکها در درمان سرطان کولون هستند. نقش حفاظتی پروبیوتیک بر این فرضیه استوار است که دیس بیوسیز دلیل اصلی سرطان کولون است (۱۴ و ۲۱). با توجه به اثرات درمانی متفاوت باکتریهای مختلف پروبیوتیک، باید سویه‌ها و دوز موثر در درمان هر بیماری مشخص شود تا بتوان از پروبیوتیکها به عنوان درمان کمکی به همراه درمانهای رایج بیماریهای گوارشی استفاده کرد (۳ و ۲۷). نقش فلور میکروبی روده و باکتریهای اسید لاکتیک در پیشگیری از سرطان روده بزرگ از طریق افزایش باکتریهای مفید، کاهش سطح پاتوژن، تغییر سوخت و ساز بدن، فعالیت آنزیمی، کاهش التهاب و افزایش عملکرد سیستم ایمنی به دفاع در مقابل سرطان کمک می‌کند (۷ و ۲۸). کو (Ku) و همکاران با تحقیقی بر روی بیفیدوباکتریوم‌ها دریافتند که آنها دارای سطح بالایی از کربوهیدراتهای میکروبی هستند که دارای فعالیت ضد توموری می‌باشند و اثبات مهار انتخابی در سلولهای سرطانی با درمان پروبیوتیک با توجه به غربالگری و انتخاب مواد ضدسرطانی حیاتی است (۱۶). سیروبا (Ciorba) و همکاران به منظور جلوگیری از عوارض گوارشی (موکوزیت و اسهال) در درمان سرطان از پروبیوتیکها استفاده نمودند که نتایج سودمندی به دنبال داشت (۹). در سال ۲۰۱۲ پورجعفر و همکاران نقش

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.1.2
مقاله پژوهشی

باکتریهای پروبیوتیک را در پیشگیری از سرطان بررسی کردند و این نتایج حاصل شد که سویه‌های بیفیدوباکتریوم و *لاکتوباسیلوس* از مهم‌ترین میکروارگانیسمهای پروبیوتیک می‌باشند و با تولید ترکیبات ضد سرطانی و ضد جهش زا در بدن انسان نقش اساسی در پیشگیری از سرطان را دارند (۲۴). در مطالعه حاضر، *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* به عنوان یک عامل بازدارنده از سرطان کولون استفاده شد و اثرات ضد سرطانی آن به اثبات رسید. همچنین اثر ضد سرطانی و افلاتوکسین زدایی پروبیوتیکهای اسید لاکتیک از طریق بهبود تعادل میکروبی دستگاه گوارش توسط کاسمانی (Kasmani) و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد که دستگاه گوارش میزبان را به طور سودمندی تحت تاثیر قرار داد (۱۲). پروبیوتیک و پربیوتیک در مراقبت‌های اولیه سرطان کولون از طریق مکانیسمهای عمل مختلف از جمله: تحریک پاسخ ایمنی، کاهش التهاب به طور مستقیم برای مهار تشکیل تومور عمل می‌کنند و باعث جلوگیری از سرطان کولون می شوند (۹). بررسی کاهش امکان سرطان با استفاده از چند سویه پروبیوتیک در مقابل برخی مواد کارسینوژن در سال توسط مهرابیان و همکاران انجام شد و این نتیجه حاصل شد که کشت های پروبیوتیک اثر ضد جهشی و ضد سرطانی قوی دارند (۲۲). در این تحقیق اثر متابولیت ترشحی و عصاره سلولی باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم بر روی سلولهای سرطانی SW1116 و رده نرمال HEK293 مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که متابولیتهای ترشحی باکتری توانایی بیشتری نسبت به عصاره باکتری در مهار سرطان کولون را دارد. بر طبق مطالعات چو (Choi) بنیادی و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی تعداد زیادی لاکتوباسیل‌ها که توسط حرارت کشته شده بودند نشان داد که سبب کاهش درصد زیستایی رده های سلولهای سرطانی می باشد. آنها از رده سلولی HT-29 به عنوان رده سرطانی و از سلولهای فیبروبلاست انسانی به عنوان رده نرمال استفاده کردند و اثر سایتوتوکسیکی کمتری بر رده نرمال نسبت به رده سرطانی گزارش کردند(۸). ی و همکاران نیز بر روی اثر سیتوتاکسیک باکتری پروبیوتیک کشته شده توسط حرارت و القا آپوپتوزیس بر رده سلولی HT-29 سرطان کولون و مقایسه آن با رده سلولی نرمال HEK-293 کار کردند و نتیجه گرفتند *لاکتوباسیلوس* برویس، اثر سیتوتوکسیک و القا آپوپتوزیس بر روی رده سلولی HT-29 نشان داد و اثر سایتوتوکسیک کمتری در رده سلولیHEK-293 نسبت به رده HT-29 مشاهده کردند (۶). در این تحقیق نشان داده شد اثر سیتوتوکسیسیتی متابولیت ترشحی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم جدایه ۲ بر روی رده نرمال HEK-293 بسیار کمتر از تاثیر آن بر روی رده سرطانی SW1116 می باشد. مطالعات نشان داده است که اجزای متفاوتی از باکتریها نظیر دیواره سلولی، پپتیدوگلیکان، عصاره سیتوپلاسم و حتی باکتری کامل کشته شده توسط حرارت همه دارای اثرات پیشگیرانه در برابر رده سلولهای سرطانی می باشند. باکتری کشته شده ایمن تر و با ثبات تر بوده و دارای اثری متشابه با انواع زنده آن است (۲۷). لازم به ذکر است که فعالیت ضد تکثیری بسیار وابسته به سویه باکتری می باشد و از یک سویه به سویه دیگر متفاوت می‌باشد، همچنین به کارگیری اجزای مختلف باکتری که قبلا به آن اشاره شد نیز نتایج متفاوتی در مهار تکثیر سلولهای سرطانی دارند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که متابولیتهای ترشحی باکتری تاثیر بیشتری نسبت به عصاره باکتری بر روی رده سرطان کولون داشتند. زارعی و همکاران در سال ۱۳۹۶ اثرات مستقیم عصاره دیواره سلولی باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر تکثیر رده سلولی سرطانی اریتروميلوئیدی انسانی K562 را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که عصاره باکتری منجر به مرگ بیشتر سلولهای سرطانی شده است (۱). لی (Lee) و همکاران در تحقیقی گزارش کردند که عصاره سیتوپلاسمی باکتریهای *لاکتوباسیلوس* و بیفیدوباکتریوم تاثیر مستقیمی بر مهار رشد رده سلولهای سرطانی داشته است (۱۸). در تحقیق حاضر نتایج ارزیابی اثر عصاره

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.1.2
مقاله پژوهشی

سلولی ایزوله‌های بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم، بر روی رده سلولی SW1116 و درصد زنده ماندن سلولهای سرطانی کولون مورد بررسی قرار گرفت و بررسیها نشان داد عصاره سلولی دو جدایه بیفیدوباکتریم ۶ و ۱۷ بیشترین اثر سیتوتوکسیسیتی روی رده سلولی کولون دارا بودند که به ترتیب با ۴۳ درصد و ۳۲ درصد اثر کشندگی داشتند. کیم (Kim) و همکاران تاثیر اجزای سلولی ده نوع پروبیوتیک مختلف را بر یازده نوع رده سرطانی بررسی کردند. نتایج این محققان حاکی از تاثیر پروبیوتیکها بر مهار رده های سرطانی بود و این اثر را به پپتیدوگلیکان های آنها نسبت دادند (۱۵). یوو (You) و همکاران نشان دادند که سلول و عصاره سیتوپلاسمی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم جداسازی شده از مدفوع انسانی می تواند اثر مهاری روی سلولهای سرطانی داشته باشد و همین طور قطعات پلی ساکاریدی جدا شده از بیفیدوباکتریوم بیفیدوم روی رشد سلولهای سرطانی در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) نقش مهاری دارد(۲۹). در این تحقیق نیز نتایج ارزیابی اثر متابولیتهای ترشحی ایزوله بیفیدوباکتریوم بر روی رده سلولی SW1116 و درصد زنده ماندن سلولهای سرطانی مورد بررسی قرار گرفت که متابولیت ترشحی دو جدایه ی ۲ و ۳ بیشترین اثر سیتوتوکسیسیتی روی رده سلولی کولون دارا بودند که به ترتیب با درصدهای ۵/۱ درصد و۵/۸ درصد توان زنده ماندن را داشتند. در یک ارزیابی فعالیت ضد میکروبی مایع رویی کشت باکتریهای اسید لاکتیک مشاهده شد متابولیتهای ترشحی از رشد باکتریهای بیماری زا جلوگیری کردند و نقش مثبت این باکتریها در سلامت انسان به اثبات رسید (۱۳). طی ارزیابی تاثیر متابولیتهای *لاکتوباسیلوس* رامونسوس جی جی بر روی رده سلولی سرطان کولون در سال ۲۰۱۲ مشخص شد. سه فاکتور زمان، غلظت و pH بر روی تاثیر مایع رویی کشت در مهار رشد سلولهای سرطانی اثر دارد (۲۳). بنیادی و همکاران در رابطه با تاثیر پروبیوتیکها بر سرطان بررسیهایی انجام داد که نشان می دهد که باکتریهای پروبیوتیک ممکن است خطر سرطان را از طریق کاهش بروز آنها و سر کوب تومورها کاهش دهند. همچنین طبق مطالعات بالینی، مصرف پروبیوتیکها فعالیت سلولهای کشنده طبیعی و سطح ایمنوگلوبین ها را افزایش می دهد. او نتیجه گرفت که پروبیوتیکها پتانسیل خوبی دارند تا به عنوان یک استراتژی جدید برای درمان سرطان معرفی شوند (۶). بررسی اثر بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر روی رده سلولهای سرطانی روده بزرگ در سال ۲۰۱۳ توسط محمودی اصل زاده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که اثر مهاری وابسته به غلظت بوده و غلظت ۳۰ میکرولیتری تا ۸۰ در صد از رشد سلولهای توموری را مهار کرده است (۳). در تحقیق حاضر نیز اثر کشندگی با افزایش غلظت افزایش یافت و در غلظت ۰/۰۳ میلی گرم بر میلی لیتر بیشرین اثر متابولیت باکتری و در غلظت ۰/۰۴ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین اثر کشندگی عصاره باکتری بر روی رده سرطانی کولون مشاهده شد. با کاهش غلظت در هر دو نمونه اثر کشندگی کاهش یافت که با نتایج محمودی اصل زاده مطابقت دارد. پس می توان نتیجه گرفت اثر مهاری وابسته به غلظت می باشد. نتایج این تحقیق نشان داد متابولیت ترشحی *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* جدایه ۲ به میزان زیادی باعث کاهش تکثیر سلولهای سرطانی می شود. بنابراین با توجه به اثرات مثبت متابولیت ترشحی و عصاره سلولی *بیفیدوباکتریوم* بر روی رده سلولی SW1116 و میزان سمیت کم بر روی بر روی رده نرمال HEK293 می توان پروبیوتیکها را به عنوان عاملی برای پیشگیری از سرطان کولون معرفی کرد. اما تحقیقات بالینی بیشتری برای فهم مکانیسم های اصلی که پروبیوتیکها در سرطان کولون ایفا می کنند نیاز است.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.1.2
مقاله پژوهشی

منابع

۱. زارعی، ل. ابطحی فروشانی، م. قراجه داغی هرگلان، ع. اسماعیلی گورچین قلعه، ه. ۱۳۹۶. اثرات باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر تکثیر رده سلولی K562 . مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا. ۷(۱): ۲۷-۲۱.

۲. سلطانی کردشولی، م.ح. معظمیان، ا. کلانی، م. ۱۳۹۸. تاثیر دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* بر تحریک تولید سایتوکین های اینتلوکین-۴ و اینترفرون گاما. ۸(۳۲): ۷۱-۸۰.

۳. محمودی اصل زاده، ح. فاضلی، م.ر. عبدی، ا. صمدی، ن. جمالی فر، ح. پارساسرشت، ل. ۱۳۹۲. بررسی اثر پروبیوتیکی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بر روی رده سلولهای سرطانی CacoII. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۶(۳): ۳۶۸-۳۸۵.

۴. نوری، ص. ناظری، س. حسینی، پ. ۱۳۹۷. شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از سرکه سیب. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۱(۱): ۱۰۶-۱۱۳.

5. Soltan dallal M.M. Mojarad M. Baghbani F. Raoofian R. Mardaneh J. Salehipour Z. 2015. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and lactobacillus casei on the behavior of colorectal tumor cells (CaCo-2). Arch Iran Med. 18(3): 167 – 172.

6. Bonyadi F. Tukmechi A. Mohebalian H. Urmia I. 2014. An overview of probiotics and their role in cancer management. J Mazand Univ Med Sci. 24(112): 128-40.

7. Chiu Y.H. Hsieh Y.J. Liao K.W. Peng K.C. 2010. Preferential promotion of apoptosis of monocytes by *Lactobacillus casei rhamnosus* soluble factors. Clin Nutr J. 29(1): 131- 40.

8. Choi S. S. Kim Y. Han K. S. You S. Oh S. and Kim S. H. 2006. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferationand oxidative stress in vitro. Journal compilation The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology 42. 452–458.

9. Ciorba A. M. Hallemeier L. C. Stenson F. W. and Parikh J. P. 2015. Probiotics to prevent gastrointestinal toxicity from cancer therapy: An interpretive review and call to action. Curr Opin Support Palliat Care. 9(2): 157–162.

10. Danino FG. Trindade EB. Burini RC. 2015. Probiotic in primary care for colon cancer. Arq 8. Gasteroentrol. 47(1): 8-93.

11. Hernandez C. Muro A. Gonzalez F.Guerrero-Barrera A. 2014. Cell culture: History 9 development and prospect. International Journal of Current research. 2(6): 681-686.

12. Kasmani F. Tourshizi MA. 2010. Anti neoplastic effect of probiotic lactic acid and aflatoxinremoval. National conference on probiotics.

13. Kazemi Darsanki R. Ghaemi N. Mirpour M. Mirdavoudi F. 2011. Evaluating Antimutagenic activity of probiotic bacteria isolated from probiotic products. Qom Univ Med Sci J. 6(2): 37-44.

14. Kim J.Y. Woo H. J. Kim Y. S. Kim K. H. Lee H. J. 2003. Cell cycle dysregulation induced by cytoplasm of *Lactococcus lactis ssp. lactis* in SNUC2A, a colon cancer cell line. Journal of Nutr Cancer; 46(2),P197–201.

15. Kim Y. Oh S. Yun H. S. Oh S. Kim S. H.2010. Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. Letter of Applied Microbiol. 51(2): 123-130.

16. Ku S. Soo Park M. Eog Ji J. and You H. 2016. Review on *Bifidobacterium bifidum* BGN4 Functionality and Nutraceutical Applications as a Probiotic Microorganism. Int. J. Mol. Sci. 17, 1544.

17. Lahtinen S.J. Davis E. Ouwehand A C. 2012. *Lactobacillus* sprcies causing obesity in human where is the evidence. Benef microbs. 3(3):171-174.

18. Lee J. W. Shin J. G. Kim E. H. Kang H. E. Yim I. B. Kim J. Y. 2004. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum. J Vet Sci, 5(1): 41-8.

19. Liang S. 2016. Effects of Probioticcs on small Intestinal Bcterial Overgroth in paitients with gasteric and colorectal cancer. Turk J Gastroentrol. 31(2): 51-246.

20. Bahmani S, Azarpira N, Moazamian E. 2019. Anti-colon cancer activity of *Bifidobacterium* metabolites on colon cancer cell line SW742. Turk J Gastroenterol. 30(9):835-842.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.1.2

21. Moazamian E, Bahador N, Azarpira N, Rasouli M. 2018. Anti-cancer Parasporin Toxins of New *Bacillus thuringiensis* Against Human Colon (HCT-116) and Blood (CCRF-CEM) Cancer Cell Lines. Curr Microbiol. 75(8):1090-1098.

22. Mehrabian S. Tajabadi Ebrahimi M. AbbasAhmadi. M Bahrami H. 2012. Study of antimutagenic and anticancer effect of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh by Ames Test. J Arak Univ Med Sci. 15(7): 72-9.

23. Parsa N. 2012. Environmental Factors Including Huuman Cancers, Iranian Journal Public Health. 41(11): 1-9.

24. Pourjafar H. Mirzaei H. Ghasemnezhad R. Homayouni Rad A. 2012. Study of Morphological and Protective Characteristics of beads obtained from Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus Probiotic as a Predominant and Natural flora in human gut. J Army Univ Med Sci. 2011 Dec; 9(4): 233-240**.**

25. Sadeghi-Aliabadi H. Mohammadi F. Fazeli H. Mirlohi M. 2014. Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. Iran J Basic Med Sci. 17:815-819.

26. Taverniti V. and Guglielmetti S. 2011. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). Genes Nutr. 6:261–274.

27. Vijaya K. G. Lee E. M. and Mark A. M. 2013. Probiotics: Mechanisms of Action and Clinical Applications. J Prob Health. 1:101.

28. Wasilewska E, Złotkowska D, Pijagin ME. 2013. The role of intestinal microflora and probiotic bacteria in prophylactic and development of colorectal cancer. Postepy Hig Med Dosw. 67: 837-847.

29. You HJ, Oh DK, Ji GE. 2004. Anticancerogenic effect of a novel chiroinostol-contaning polysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* BGN4.FEMS Microbial. Lett. 240:131-136.

مقاله پژوهشی
DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.1.2

Cytotoxic effects of secretory metabiotics and bacterial cell extract isolated from *Bifidobacterium bifidium* on SW1116 Colon Cancer and HEK293 normal kindry Cells lines

Soraya M. and Moazamian E. *

Dept. of Microbiology, Faculty of Science, Agriculture and new technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, I.R. of Iran.

Abstract

Probiotics are live microbial and act to alter the intestinal microflora by increasing concentrations of beneficial bacteria such as lactobacillus and Bifidobacteria, and reducing the levels of pathogenic micro-organisms. Probiotics have the potential to impact significantly on the treatment of colorectal cancer .The aim of this study was to isolation and identification *Bifidobacterium* and the effects of their metabolites and sediment bacteria on colon cancer cell line (SW1116) and normal kidney cell line (HEK-293). In this study 100 dairy products was collected and cultured on BFM media for isolation of *Bifidobacterium* strains. After bacterial identification via biochemical and molecular methods, cytotoxicity effects of secretory metabolites and bacterial extract on colon cancer cell line and normal cell line was evaluated using MTT assay. In this research the isolated *Bifidobacterium* was identificated. The results show that secretory metabolites 2 and 3 isolates showed the most cytotoxicity effect about %95 on colon cancer cell line. 2 and 3 isolates showed cytotoxicity effect on normal kidney cells %12 and %81, respectively. It was determind that the cytotoxicity effect of 2 isolate *Bifidobacterium bifidum* on HEK 293 normal cell is much less than its effect on SW1116 cancer cell line. Therefore, this bacterium can be used in the treatment and prevention of colon cancer by conducting further studies as an anti-cancer probiotic product.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, Colon Cancer, Secretory metabolites, Bacterial cell extract, Cell lines.