

ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیته متابولیت‌های ترش‌حی و عصاره سلولی بیفیدوباکتریوم‌های 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 میکروبی 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) می‌باشد. در این تحقیق ۱۰۰ نمونه محصولات لبنی سستی جمع‌آوری و جهت جداسازی بیفیدوباکتریوم‌ها روی محیط بیفیدوباکتریوم آگار کشت داده شد. پس از شناسایی باکتری به روش بیوشیمیایی و مولکولی، اثر سیتوتوکسیسیته 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 بیفیدوباکتریوم‌های جداسازی شده گونه بیفیدیوم شناسایی شد. نتایج نشان داد که متابولیت ترش‌حی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (*Bifidobacterium bifidum*) دو جدایه 2 و 3 بیشترین اثر سیتوتوکسیسیته (۹۵ درصد) بر روی رده سرطان کولون نشان دادند. متابولیت ترش‌حی جدایه‌های ۲ و ۳ بر روی HEK-293 به ترتیب ۱۲ درصد و ۸۱ درصد اثر سیتوتوکسیسیته نشان دادند. اثر سیتوتوکسیسیته متابولیت ترش‌حی بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم جدایه ۲ بر روی رده نرمال HEK-293 بسیار کمتر از تأثیر آن بر روی رده سرطانی SW1116 می‌باشد. 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 سلولی SW1116 و HEK-293.

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

مقدمه

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

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 می‌باشند. یکی از مهم‌ترین منابع باکتری‌های

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 جمع‌آوری شده رقت‌سازی در سرم فیزیولوژی صورت گرفت و از نمونه رقت‌سازی شده جهت غنی‌سازی 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 دی‌ان‌آ (DNA) با استفاده از دستورالعمل کیت (یکتا طب تجهیز، ایران) انجام شد. برای بررسی کیفیت دی‌ان‌آ (DNA) استخراج شده از ژل آگارز یک درصد برای الکتروفورز استفاده شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بیفیدوباکتریوم شامل (5'GGG TGG FBif520 و 5'CCA CCG RBif520 TAA TGC CGG ATG3') و (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 زنجیره‌ای پلیمرز با چرخه‌های واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از انجام PCR، به منظور بررسی وجود یا

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 اسیدلاکتیک می‌باشد که معروفترین آنها از جنس‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* می‌باشند. باکتری‌های اسیدلاکتیک ارگانسم‌های 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 می‌زنند که کاهش سطح پی‌اچ (pH) کولون توسط بیفیدوباکتریوم‌ها می‌تواند علت مهار سرطان‌ها باشد. باکتری‌های پروبیوتیک با ایجاد حالت اسیدیته، از رشد و تکثیر باکتری‌های بیماری‌زای موجود در کولون جلوگیری می‌نمایند و در سطح آنزیم‌های باکتریایی مانند (بتاگلوکورونیدازها) که باعث تبدیل پیش‌سرطان‌ها به سرطان‌ها می‌شوند، تعادل ایجاد می‌کنند (۵ و ۲۶). مطالعات اخیر نشان می‌دهند که عصاره سیتوپلاسمی و پپتیدوگلیکان مشتق شده از باکتری‌های اسیدلاکتیک سبب مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شوند (۲۴ و ۲۵). هدف از انجام این مطالعه ارزیابی تأثیر متابولیت ترشحی و عصاره سلولی بیفیدوباکتریوم بر رده‌های سلولی سرطان کولون (SW1116) و نرمال کلیه (HEK-293) می‌باشد.

مواد و روشها

جمع‌آوری 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 جمع‌آوری و در فالكون‌های استریل

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 ۱X 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 نئو بار در ۱ میلی لیتر شمارش شد (۱۰).

تاثیر متابولیت ترش‌چی و عصاره سلولی حاصل از بیفیدوباکتریوم‌ها بر سلولهای رده سرطانی SW1116 و

نرمال HEK-293: ۹۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی 1×10^4 سلول 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 ترش‌چی 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 ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه و نتایج ثبت گردید. اثر سیتوتوکسیک متابولیتها و عصاره سلولی جدایه‌هایی 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 IC_{50} 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

عدم وجود محصول مورد نظر و اطمینان 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 ترش‌چی و عصاره سلولی بیفیدوباکتریوم-

ها: به منظور جداسازی متابولیت ترش‌چی 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 نمونه‌ها 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 ترش‌چی 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).

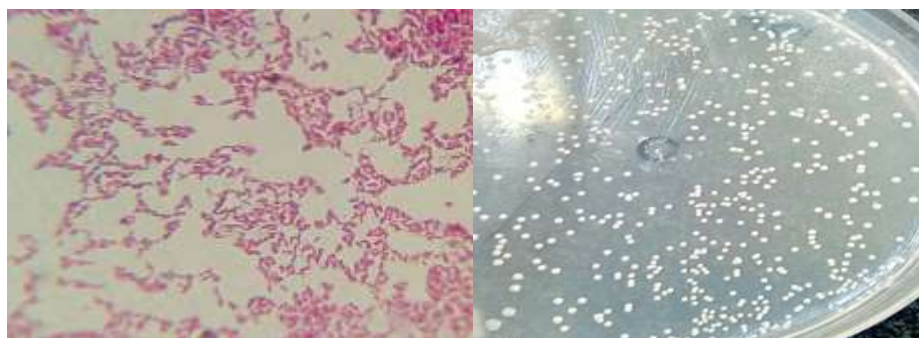
کشت سلول: در این تحقیق رده سلول سرطانی کولون SW1116 که شبیه اپی تلیال می باشد و رده نرمال HEK293 که از سلولهای کلیه جنین انسان گرفته شده از انستیتو پاستور تهیه شد. رده سلولی SW1116 به فلاسک حاوی محیط کشت سلولی آر پی ام آی ۱۶۴۰ (RPMI) و

و پر انتخاب شده، و بعد از 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).

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

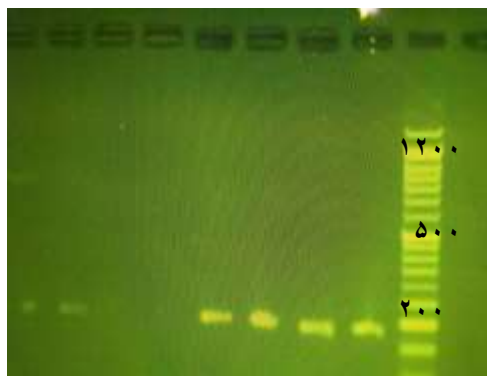
نتایج

جداسازی و شناسایی بیفیدوباکتریوم: در شناسایی باکتری از نظر صحت جنس و گونه، کلونی‌های گرد، محدب، سفید



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

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



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

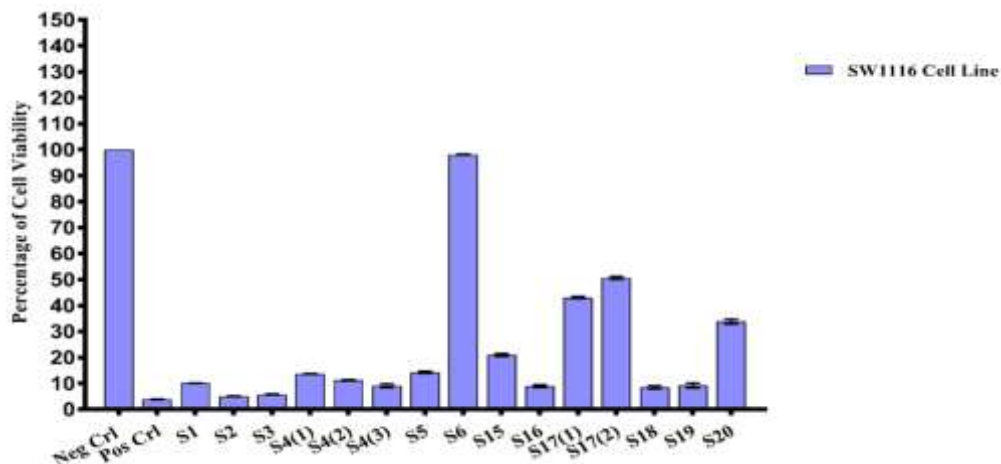
ترش‌هی دو جدایه ۲ و ۳ با غلظت ۰/۰۳ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین اثر سیتوتوکسیسیته روی رده سلولی کولون دارا بودند که به ترتیب ۹۴/۹ درصد و ۹۴/۲ درصد می باشد.

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

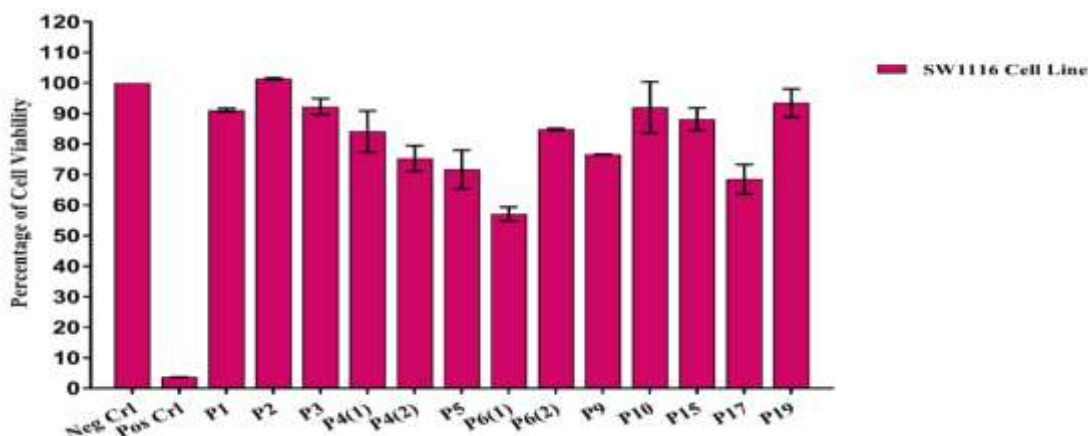
ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیته متابولیت ترش‌هی و عصاره سلولی جدایه‌های بیفیدوباکتریوم بر رده سلولی سرطان کولون: نتایج ارزیابی اثر متابولیت ترش‌هی جدایه‌های بیفیدوباکتریوم بعد از کشت ۱۲۰ ساعته بر روی رده سلولی SW1116 در کشت ۲۴ ساعته و درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی کولون در شکل (۳) آمده است. متابولیت

روی رده سلولی کولون به ترتیب با ۴۳ درصد و ۳۲ درصد حاصل گردید.

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 سیتوتوکسیسیته بر



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



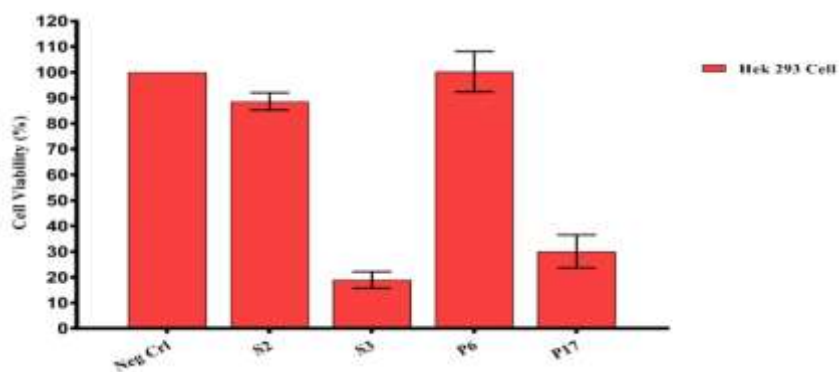
شکل ۴- ارزیابی درصد سلولهای زنده تیمار شده توسط عصاره سلولی بیفیدوباکتریوم های جدا سازی شده. (کنترل منفی (بدون تیمار): Neg Ctrl، کنترل مثبت (DMSO): Pos Ctrl، عصاره سلولی باکتری: P).

کشندگی متابولیت ترش‌چی 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 ترش‌چی 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.

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

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 ترش‌هی جدایه ۲ با غلظت ۰/۰۳ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین اثر سیتوتوکسیسیته روی رده سلولی کولون و کمترین اثر را بر روی سلول‌های نرمال دارا بودند.

ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیته متابولیت ترش‌هی و عصاره سلولی جدایه های موثر بر روی رده HEK293: نتایج ارزیابی اثر متابولیت ترش‌هی 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



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

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

نتایج توالی‌یابی و آنالیز BLAST: جدایه‌هایی که بیشترین اثر سیتوتوکسیسیته را بر روی رده سلولی سرطان کولون داشتند تعیین توالی شدند. آنالیز داده‌ها نشان داد که جدایه ۲ مربوط به باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم سویه TMC3115 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 اندازه‌های آینده 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

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 سیتوتوکسیک کمتری در رده سلولی HEK-293 نسبت به رده HT-29 مشاهده کردند (۶). در این تحقیق نشان داده شد اثر سیتوتوکسیستی 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 مشابه 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 می باشد، 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 اریترومیلوئیدی 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

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 بیفیدوم 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 پریبیوتیک 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 می‌شوند (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 کشت‌های پروبیوتیک اثر ضد جهشی و ضد سرطانی قوی دارند (۲۲). در این تحقیق اثر متابولیت ترش‌حی و عصاره سلولی باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم 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 رده‌های سلولهای سرطانی می باشد. آنها از رده سلولی HT-29 به عنوان رده سرطانی و از سلولهای فیروبلست انسانی به عنوان رده نرمال استفاده کردند و اثر سیتوتوکسیکی کمتری بر رده نرمال

در رابطه با تاثیر پروبیوتیکها بر سرطان بررسیهایی انجام داد که نشان می‌دهد که باکتریهای پروبیوتیک ممکن است خطر سرطان را از طریق کاهش بروز آنها و سرکوب تومورها کاهش دهند. همچنین طبق مطالعات بالینی، مصرف پروبیوتیکها فعالیت سلولهای کشنده طبیعی و سطح ایمنوگلوبین‌ها را افزایش می‌دهد. 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 مهاري وابسته به غلظت بوده و غلظت ۳۰ میکرولیتر تا ۸۰ درصد 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 بیشترین 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 می‌توان نتیجه گرفت اثر مهاري وابسته به غلظت می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد متابولیت ترشحي بیفیدوباکتریوم جدایه ۲ به میزان زیادی باعث کاهش تکثیر سلولهای سرطانی می‌شود. بنابراین با توجه به اثرات مثبت متابولیت ترشحي و عصاره سلولی بیفیدوباکتریوم بر روی رده سلولی SW1116 و میزان سمیت کم بر روی رده نرمال HEK293 می‌توان پروبیوتیکها را به عنوان عاملی برای پیشگیری از سرطان کولون معرفی کرد. اما تحقیقات بالینی بیشتری برای فهم مکانیسم‌های اصلی که پروبیوتیکها در سرطان کولون ایفا می‌کنند نیاز است.

سلولی ایزوله‌های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، بر روی رده سلولی SW1116 و درصد زنده ماندن سلولهای سرطانی کولون مورد بررسی قرار گرفت و بررسیها نشان داد عصاره سلولی دو جدایه بیفیدوباکتریوم ۶ و ۱۷ بیشترین اثر سیتوتوکسیسیته 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 پپتیدوگلیکان‌های آنها نسبت دادند (۱۵). یوو (You) و همکاران نشان دادند که سلول و عصاره سیتوپلاسمی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم جداسازی شده از مدفوع انسانی می‌تواند اثر مهاري 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 مهاري دارد (۲۹). در این تحقیق نیز نتایج ارزیابی اثر متابولیت‌های ترشحي ایزوله بیفیدوباکتریوم بر روی رده سلولی SW1116 و درصد زنده ماندن سلولهای سرطانی مورد بررسی قرار گرفت که متابولیت ترشحي دو جدایه ۲ و ۳ بیشترین اثر سیتوتوکسیسیته روی رده سلولی کولون دارا بودند که به ترتیب با درصد‌های ۵/۱ درصد و ۵/۸ درصد توان زنده ماندن را داشتند. در یک ارزیابی فعالیت ضد میکروبی مایع رویی کشت باکتریهای اسید لاکتیک مشاهده شد متابولیت‌های ترشحي 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

منابع

۱. زارعی، ل. ابطیجی 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. ۳۲(۸): ۷۱-۸۰.
۳. محمودی اصل زاده، ح. فاضلی، م.ر. عبدی، ا. صمدی، ن. جمالی فر، ح. پارساشرشت، ل. ۱۳۹۲. بررسی اثر پروبیوتیکی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر روی رده سلولهای سرطانی CacoII. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۶(۳): ۳۸۵-۳۶۸.
۴. نوری، ص. ناظری، س. حسینی، پ. ۱۳۹۷. شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانناروم جدا شده از سرکه سیب. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی 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 proliferation and 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. Gastroentrol. 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 aflatoxin removal. 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* species causing obesity in human where is the evidence. Benef microbes. 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 Probiotics on small Intestinal Bacterial Overgrowth in patients with gastric 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 Gastroentrol. 30(9):835-842.

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 Human 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-containing polysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* BGN4. *FEMS Microbiol. Lett.* 240:131-136.

Cytotoxic effects of secretory metabiotics and bacterial cell extract isolated from *Bifidobacterium bifidum* 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 identified. 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.