[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019

Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 18, No. 2, Summer 2018, Pages 191-203

Cytotoxic Effects of Lactobacilli Isolated from Azerbaijan Traditional Cheeses on Colorectal Tumor Cells HCT 116 and Identification of Paramount Strains

Rabiei M, Zarrini Gh*, Mahdavi M

Department of Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
**** Corresponding author.*** Tel: +984133392707, Fax: +984133356027, E-mail: zarrini@tabrizu.ac.ir

Received: Dec 22, 2017 Accepted: May 20, 2018

ABSTRACT

Background & objectives: Colorectal cancer is one of the most common cancers in the world. Much attention has been given to nutritional supplements that can alter intestinal flora as factors preventing colon cancer. Research has shown that lactic acid bacteria in foods are potentially capable of inducing apoptosis. In this regard, the most focus has been on *Lactobacillus* genus. This study, investigated the cytotoxic effect of metabolites of isolated strain from Azerbaijan traditional cheeses on HCT116 colorectal cancer cells .

Methods: In this cross-sectional study, after collecting samples of traditional "Lighvan" and "jug" cheeses in the region of Azerbaijan, MRS medium was used for isolation of lactobacilli. The isolates were identified by biochemical and molecular approaches after primary confirmation. The metabolites were produced in MRS broth, and their supernatants were separated. The inhibitory effect of the supernatants of the isolates on HCT116 cancer cells was studied and their effects were evaluated by microscopy and MTT assay.

Results: In this study, three isolates of "Lighvan" and sixteen isolates of "jug" cheeses were obtained. The results of anticancer activity showed that the supernatants of the isolates CT2 and JT1 had a significant anticancer effect on HCT116 cancer cells ($p<0.05$) .Identification of the isolates CT2 and JT1 showed 99% and 96% similarity with *Lactobacillus brevis*, respectively.

Conclusion: Lactobacilli in Azerbaijan traditional dairy products have a significant value in terms of anticancer properties.

Keywords: Lactobacillus; HCT116 Cells; Cytotoxicity

[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019

سمیت سلولی لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از پنیرهای سنتی آذربایجان بر سلول‌های سرطان کلورکتال HCT116 و غربالگری سویه‌های برتر

میترا ربیعی، غلامرضا زرینی، مجید مهدوی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۱۳۳۳۹۲۷۰۷ فاکس: ۰۴۱۳۳۳۵۶۰۲۷ پست الکترونیک: zarrini@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین عوامل سرطان در دنیا است. توجه زیادی روی مکمل‌های غذایی که می‌توانند فلور روده را به عنوان عوامل پیشگیری‌کننده از سرطان کولون تغییر دهند، متمرکز است. طبق تحقیقات انجام‌شده، باکتری‌های تولید کننده لاکتیک اسید موجود در مواد غذایی به صورت بالقوه قادر به القای آپوپتوز هستند. در این زمینه بیشترین بررسی روی جنس لاکتوباسیلوس بوده است. طی این پروژه، فعالیت سمیت سلولی متابولیت‌های حاصل از لاکتوباسیل‌های جداسازی‌شده از پنیرهای سنتی آذربایجان بر روی سلول‌های سرطان کلورکتال HCT116 مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در این مطالعه تحلیلی، نمونه های پنیرهای سنتی لیقوان و کوزه منطقه آذربایجان جمع آوری و از محیط کشت MRS برای جداسازی لاکتوباسیل ها استفاده شد. جدایه‌ها پس از شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی، جهت تولید متابولیت و جداسازی مایع رویی در محیط MRS مایع کشت داده شدند. اثر مهاری مایع رویی حاصل از جدایه ها روی سلول‌های سرطانی HCT116 توسط میکروسکوپ و همچنین تست MTT بررسی گردید.

یافته ها: در این بررسی تعداد ۳ جدایه از پنیر لیقوان و ۱۶ جدایه از پنیر کوزه جداسازی شد. نتایج بررسی فعالیت ضدسرطانی نشان داد که مایع رویی جدایه های CT2 و JTa1 اثر ضدسرطانی قابل توجه روی سلول‌های سرطانیHCT116 داشتند ($p<۰/۰۵$). شناسایی جدایه های CT2 وJTa1 به ترتیب وجود ۹۹ و ۹۶ درصد شباهت با *لاکتوباسیلوس برویس* را نشان دادند.

نتیجه گیری: لاکتوباسیل‌های موجود در لبنیات سنتی آذربایجان از نظر خواص ضدسرطانی از ارزش قابل توجهی برخوردار هستند.

واژه های کلیدی: لاکتوباسیلوس، سلول‌های سرطان کلورکتال HCT116، سمیت سلولی

دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۱ **پذیرش:** ۱۳۹۷/۰۲/۳۰

مقدمه

سرطان موضوع مهم تحقیقات تجربی، اپیدمیولوژیک و بالینی در سطوح مولکولی، سلولی، بافت و بالینی در طول چند دهه گذشته است [۱]. این بیماری یکی از علل اصلی مرگ در سراسر جهان بوده [۳-۱] و تعداد کل موارد در حال افزایش است [۴،۳].

سرطان کلورکتال، سرطان روده بزرگ و راست روده (کولون و رکتوم) است. سرطان کولون یکی از مهمترین علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان است [۶،۵]. سالانه بیش از ۵۱۰۰۰ مورد سرطان و ۳۵۰۰۰ مورد مرگ ناشی از سرطان در ایران گزارش می‌شود که در این میان سرطان کولون

[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019

سومین و چهارمین سرطان شایع به ترتیب در مردان و زنان ایرانی است. سرطان کولون تحت تاثیر فاکتورهای ژنتیکی و محیطی است. علاوه بر آن مطالعات اپیدمیولوژیکی تایید می‌کند که این سرطان به میزان بیشتری نسبت به عوامل ژنتیکی، تحت تاثیر عوامل محیطی قرار دارد [۶].

درمان‌های رایج برای این بدخیمی شامل شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و جراحی است [۷]. جراحی‌ها برای درمان سرطان کولون در سه چهارم بیماران امکان پذیر است، اما با وجود این، حدود نیمی از بیماران پس از جراحی دچار عود غیرقابل درمان بیماری می‌شوند. شیمی درمانی کمکی و یا پرتودرمانی عود و مرگ و میر ناشی از سرطان کولورکتال را کاهش می‌دهد [۸]. اما همه این روش‌ها با خطر بالای بروز عوارض همراه بوده و همیشه موفقیت‌آمیز نیستند [۷]. سرطان کولون انسان رفتاری ناهمگن در سطح سلولی و مولکولی نشان می‌دهد و سلول‌های تومور می‌توانند مقاومت خود به شیمی درمانی را افزایش دهند [۹]. بنابراین، نیاز به توسعه روش‌های جدید درمانی پیشگیرانه برای این بدخیمی وجود دارد [۷].

آپوپتوز[1] در بسیاری از تومورهای انسانی مختل می‌شود، و نیز پدیده مهمی در مرگ سلول‌های توموری ناشی از شیمی درمانی است. بنابراین، تمرکز روی القای آپوپتوز از طریق هدف قراردادن پروتئین‌های مرتبط با این پدیده، ممکن است روشی موثر در درمان سرطان باشد [۱۰].

ترکیبات غذایی شناخته شده ای هم که از سرطان کلورکتال جلوگیری می‌کند، به دنبال آسیب DNA، آپوپتوز را افزایش داده و ممکن است سبب ایجاد مکانیسم مهمی برای پیشگیری از سرطان شود. بسیاری از سرطان‌ها در انسان از عوامل قابل پیشگیری مانند عفونت، التهاب، سیگارکشیدن، و رژیم غذایی ایجاد می‌شود [۱۱،۱]. از سوی دیگر، پیش آگهی سرطان کلورکتال پیشرفته ضعیف است و از این رو پیشگیری از بروز این بیماری لازم است [۱۲]. تغییر فلور روده ممکن است موجب رشد تومور گردد؛ در نتیجه توجه زیادی روی مکمل‌های غذایی که می‌توانند فلور روده را به عنوان عوامل پیشگیری‌کننده از سرطان کولون تحت تاثیر قرار دهند متمرکز شده است. نتایج بسیاری از مطالعات نشان می‌هد که باکتری‌های پروبیوتیک با تحت تاثیر قراردادن سرعت واکنش‌های مربوط به تقسیم سلول‌های اپیتلیال کولون، موجب کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود [۱۳]. بررسی‌ها نشان داده اند که عوامل ضدسرطانی مصرفی به همراه مواد غذایی، از جمله باکتری‌های لاکتیک اسید (LAB)[2]، به صورت بالقوه قادر به القای آپوپتوز هستند [۱۰،٤]. در این زمینه بیشترین تمرکز و تحقیقات روی جنس *لاکتوباسیلوس* بوده است.

جنس لاکتوباسیلوس شامل گونه‌های متنوعی می‌باشد [۱٤]. این جنس اولین بار توسط بیجرینک[3] در سال ۱۹۰۱ شرح داده شد. در سال ۱۹۱۹، اورلا-جنسن[4] این جنس را با توجه به دمای رشد بهینه و مسیر تخمیر هگزوز در آن‌ها، به سه زیرجنس ترموباکتریوم، استرپتوباکتریوم و بتاباکتریوم تقسیم کرد [۱۵].

لاکتوباسیل‌ها، باسیل‌ها یا کوکوباسیل‌هایی به طول ۱۰-۱ و عرض ۲/۱-۰/۵ میکرون، گرم مثبت، غیر اسپورزا، کاتالاز منفی، به ندرت متحرک و با محتوای GC در محدوده ۵۵-۳۳ درصد هستند [۱۸-۱٤]. این باکتری‌ها سیتوکروم و کاتالاز ندارند ولی در مجاورت اکسیژن هوا رشد می‌کنند و میکروآئروفیل بوده، در حضور هوا رشد کمی دارند و وجود ۵ درصد دی اکسیدکربن در محیط باعث تحریک رشد آنها می‌شود [۱٤،۲]. دمای بهینه رشد آنها ٤۰-۳۰

[1] Apoptosis

[2] Lactic Acid Bacteria
[3] Beijerinck
[4] Orla-Jensen

[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019

درجه سلسیوس می‌باشد اما توانایی رشد تا دمای ۵۳-۵۰ درجه سلسیوس را هم دارند. این باکتری‌ها قدرت تحمل اسید را در محیط داشته و گرچه pH بهینه برای رشد آنها ۸/۵-۵/۵ می‌باشد، اما به طور کلی در pH کمتر از ۵ نیز قادر به رشد هستند [١٤]. فعالیت ضدسرطانی لاکتوباسیل‌ها، عمدتاً از طریق القای آپوپتوز صورت می‌گیرد [۲]. در آزمایشگاه، القای مسیر میتوکندریایی آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون انکوبه شده به همراه برخی لاکتوباسیل‌ها مشاهده شده است که نشان‌دهنده امکان استفاده از این باکتری‌ها به عنوان یاور[1] در شیمی‌درمانی ضد سرطان است [۱۱]. هدف از این پروژه، جداسازی لاکتوباسیل‌های جدید از پنیرهای سنتی آذربایجان به منظور دستیابی به سویه‌های جدید و در نتیجه متابولیت‌های جدید با فعالیت سمیت سلولی علیه سلول‌های سرطان کلورکتال HCT116 بوده است.

روش کار

جداسازی لاکتوباسیل‌ها

طی این مطالعه تحلیلی که از مهرماه ٩٤ تا بهمن ماه ۹۵ در شهرهای تبریز، بناب و آذرشهر در دست انجام بود، نمونه‌های پنیرهای لیقوان و پنیرهای کوزه منطقه آذربایجان به عنوان منابع جداسازی باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفت. پس از رقیق سازی نمونه‌ها توسط سرم فیزیولوژی، سوسپانسیون‌ها در محیط MRS[2] جامد شرکت HiMedia-India کشت داده شدند. پس از گرماگذاری به مدت ٤٨ ساعت در گرمخانه $۳۷^{O}C$، به منظور تایید اولیه، کلنی‌های ظاهرشده مربوط به باسیل‌ها توسط رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز مشخص و از باکتری‌های مربوطه کشت خالص تهیه گردید [۱۹،۲۰]

تولید متابولیت

به منظور استخراج متابولیت، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت‌های تازه باکتریایی، در محیط MRS براث شرکت Biolife-Italy تلقیح شده و کشت‌ها به مدت ٢٤ ساعت در گرمخانه شیکردار $۳۷^{0}C$ گرماگذاری شدند. پس از آن، میزان جذب کشت‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به میزان ۱/۲۵ تعیین گردید. کشت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حاوی متابولیت‌ها از رسوب باکتریایی جدا شده و توسط فیلتر ۰/۲۲میکرونی استریل شد [۲۱]

شناسایی جدایه‌های برتر

شناسایی بیوشیمیایی

پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم و همچنین تست کاتالاز جهت جداسازی اولیه، در این مرحله، تست‌های بیوشیمیایی ووژ- پروسکوئر (VP)، تخمیر کربوهیدرات‌ها (گلوکز، گالاکتوز، لاکتوز، آرابینوز، مالتوز، مانیتول، سوربیتول، ساکارز، گزیلوز، ملیبیوز، رافینوز و ترهالوز)، هیدرولیز آرژنین و رشد در دماهای مختلف ($۱۵^{0}C$و $٤۵^{0}C$) برای جدایه‌های برتر انجام گرفت [٢٤-٢٢].

شناسایی مولکولی

جهت شناسایی دقیق‌تر جدایه‌ها، از روش PCR استفاده شد. برای شناسایی مولکولی لاکتوباسیل‌های برگزیده این پروژه، با تمرکز بر تکثیر و توالی‌یابی ژن 16S rRNA، از روش PCR و بررسی نتایج با روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال 27F و 1492R انجام گرفت (جدول ٤). سکانس توالی‌ها توسط شرکت "Bioneer" کشور کره انجام و آنالیز توالی‌ها توسط نرم افزار BLAST سایت NCBI صورت گرفت [۲۷-۲۵]. دندروگرام مربوط به سویه‌های جداسازی شده توسط نرم افزار Mega5[3] که جهت آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌های DNA

[1] Adjuvant
[2] De Man, Rogosa and Sharpe
[3] Molecular Evolutionary Genetic Analysis

[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019

و پروتئینی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، انجام شد. توالی‌های DNA آنالیز شد و درخت فیلوژنتیکی رسم گردید.

بررسی‌های سلولی

کشت سلول‌های سرطانی

سلول‌های سرطان کلورکتال HCT116 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت سلول RPMI 1640[1] شرکت Gibco-England حاوی ۱۰٪ FBS[2] شرکت SIGMA آلمان و ۱٪ مخلوط پنی سیلین و استرپتومایسین (SIGMA-Germany) در شرایط دمای ۳۷^{O}C و میزان CO2 ۵٪ کشت داده شدند [۲۸].

بررسی سمیت سلولی

بررسی میکروسکوپی: سلول‌های HCT116 پس از تریپسینه شدن و شست و شو توسط PBS[3]، به میزان 10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کامل کشت سلولی کشت داده شده و به ترتیب با ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۵۰ میکرولیتر متابولیت باکتریایی، در بازه‌های زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. چاهک اول هر ردیف به عنوان کنترل منفی (بدون تیمار) تعیین گردید. پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷^{O}C و میزان ۵٪CO_2، نتایج مورد بررسی قرار گرفته و جدایه برتر هر ماده لبنی از نظر میزان سمیت سلولی با سطح معنی داری $p<۰/۰۵$ انتخاب گردید [۲۸].

تست MTT: این تست به منظور بررسی دقیق‌تر سمیت سلولی متابولیت حاصل از جدایه برتر و برآورد میزان زیستایی سلول‌های تیمارشده انجام گردید. سلول‌ها طبق پروتکل فوق کشت داده شده و به صورت سه بار تکرار با متابولیت مورد بررسی تیمار شدند. پس از ۷۲ ساعت، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر ۱ میلی لیتر PBS، به هر چاهک اضافه شد و پلیت کشت به مدت ۳ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. پس از سه ساعت، مایع رویی پلیت‌ها تخلیه و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO[4] افزوده شد. پس از آن، میزان رنگ تولید شده که نمایانگر میزان سلول‌های زنده است، توسط دستگاه الایزا ریدر در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان بقای سلولی پس از تیمار محاسبه گردید[۳۰-۲۸].

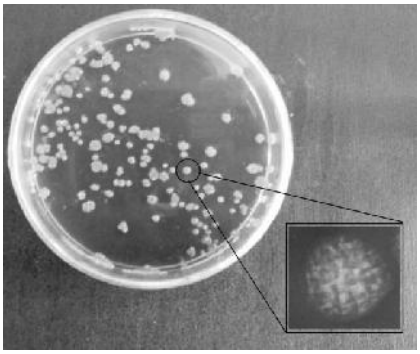
تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات بررسی سمیت سلولی با سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین ذکر شده است. برای تحلیل یافته‌های الایزا و بقای سلولی از نرم افزار SPSS-16 به روش توکی[5] استفاده شد. برای معنی‌دار بودن یافته‌ها از $p<۰/۰۵$ استفاده شد.

یافته‌ها

جداسازی لاکتوباسیل‌ها

کلنی‌های ظاهرشده روی محیط MRS آگار که مربوط به لاکتوباسیل‌ها بودند، کلنی‌های گرد، محدب، نیمه شفاف، نرم و دارای رنگ کرمی بودند [۳۱] (شکل ۱). به طور کلی از کل مواد لبنی جمع‌آوری‌شده تعداد ۳ جدایه از پنیر لیقوان و ۱۶ جدایه از پنیرهای کوزه جداسازی، و به ترتیب طبق جدول ۱ کدگذاری گردید. جدایه‌ها گرم مثبت (شکل ۲) و کاتالاز منفی بودند.



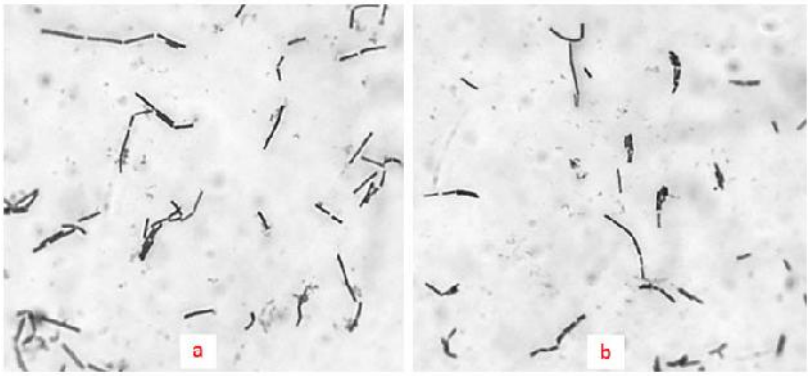
شکل ۱. مورفولوژی کلنی لاکتوباسیل‌های جداسازی شده بر روی محیط کشت MRS آگار

[1] Roswell Park Memorial Institute 1640
[2] Fetal Bovine Serum
[3] Phosphate Buffered Solutions
[4] Dimethyl Sulfoxide
[5] Tukey

[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019

جدول ۱. جدایه‌های حاصل از پنیرهای سنتی جمع آوری شده

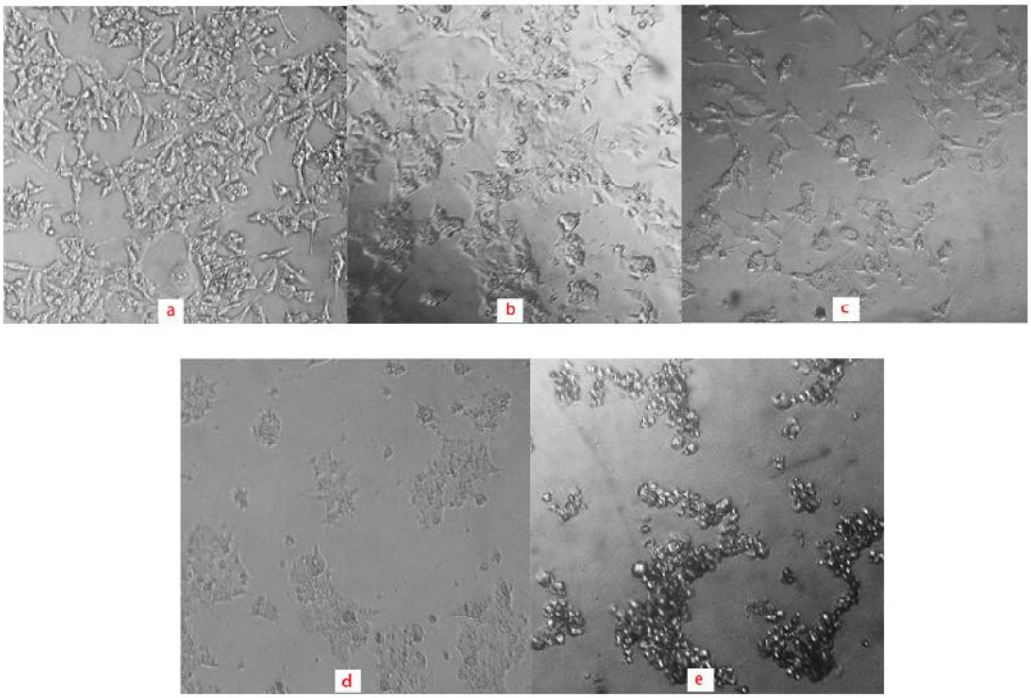
ماده لبنی	تعداد جدایه حاصله	کد گذاری
پنیر لیقوان	۳	CT_1, CT_2, CT_3
پنیر کوزه	۱۶	JT_1, …, JT_{16}



شکل ۲. رنگ آمیزی گرم دو جدایه *Lactobacillus* sp. CT_2 (a) و *Lactobacillus* sp. JTa_1 (b) بررسی سمیت سلولی

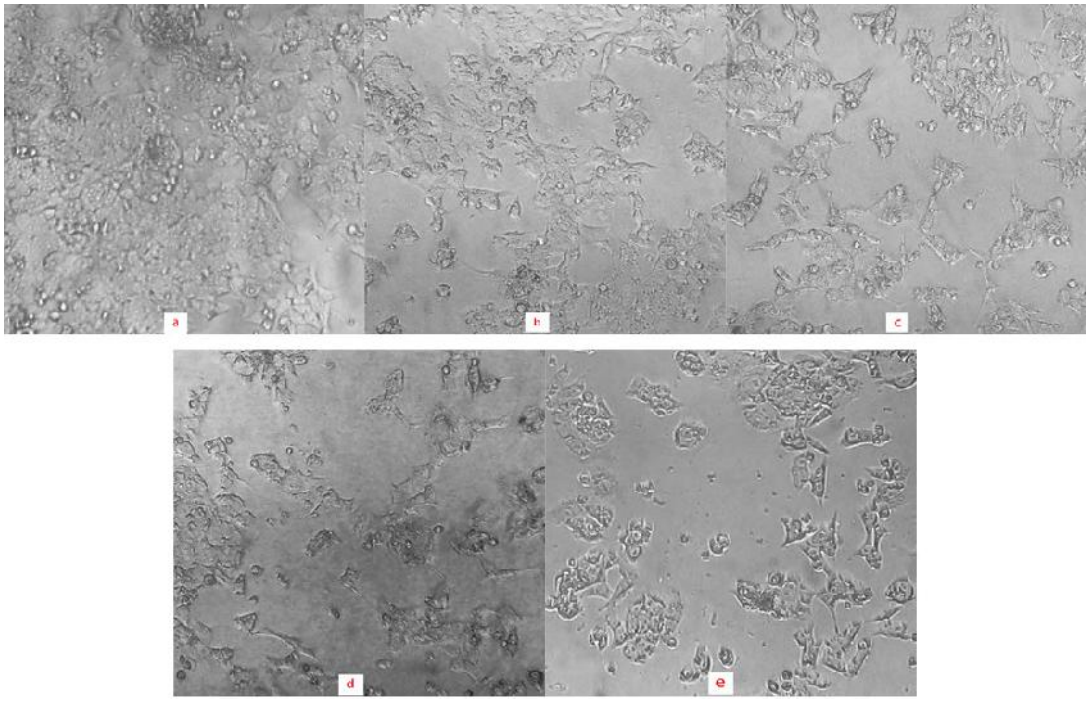
بررسی میکروسکوپی

در این مرحله، در نتیجه مقایسه تغییرات سلولی ناشی از تیمار سلول‌ها با متابولیت‌ها (شکل ۳ و ٤)، از میان جدایه‌های پنیر لیقوان جدایه CT_2، و از میان جدایه‌های پنیرهای کوزه جدایه JT_{a1} به دلیل اعمال بیشترین تغییرات در مورفولوژی سلول‌های سرطانی تحت تیمار، به عنوان جدایه‌های برتر هر ماده لبنی انتخاب شدند.



شکل ۳. تغییرات مورفولوژی سلول‌های تحت تیمار با مایع رویی جدایه *Lactobacillus* sp. CT_2. کاهش بقای سلولی وابسته به غلظت و زمان قابل مشاهده است. (a: سلول‌های کنترل، b: سلول‌های تحت تیمار با ۵ میکرولیتر مایع رویی طی ۲٤ ساعت، c: سلول‌های تحت تیمار با ۵ میکرولیتر مایع رویی طی ٤۸ ساعت، d: سلول‌های تحت تیمار با ۵ میکرولیتر مایع رویی طی ۷۲ ساعت، e: سلول‌های تحت تیمار با ۱۵ میکرولیتر مایع رویی طی ۲٤ ساعت)

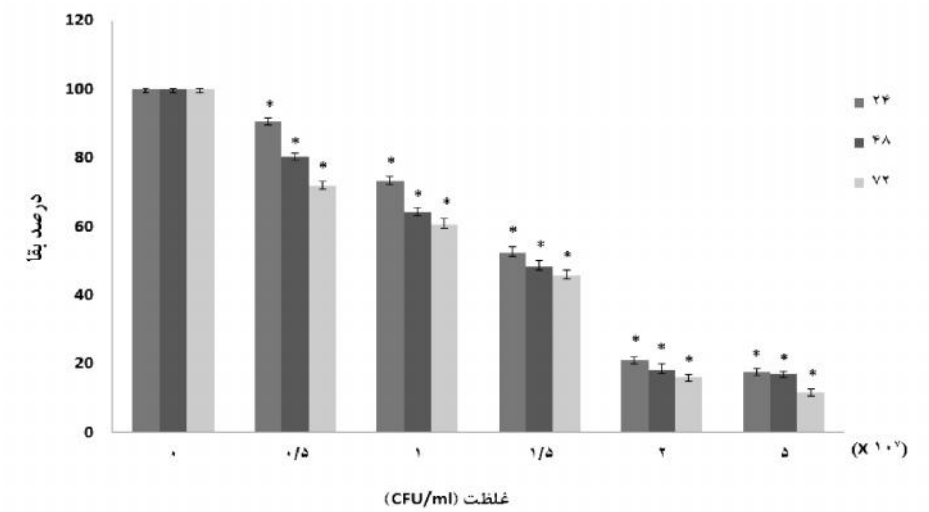
[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019



شکل ٤. تغییرات مورفولوژی سلول‌های تحت تیمار با مایع رویی جدایه *Lactobacillus* sp. JTa_1. کاهش بقای سلولی عمدتا وابسته به غلظت بوده و ارتباط اندکی با زمان تیمار دارد. (a: سلول‌های کنترل، b: سلول‌های تحت تیمار با ۵ میکرولیتر مایع رویی طی ۲٤ ساعت، c: سلول‌های تحت تیمار با ۵ میکرولیتر مایع رویی طی ٤۸ ساعت، d: سلول‌های تحت تیمار با ۵ میکرولیتر مایع رویی طی ۷۲ ساعت، e: سلول‌های تحت تیمار با ۱۵ میکرولیتر مایع رویی طی ۲٤ ساعت)

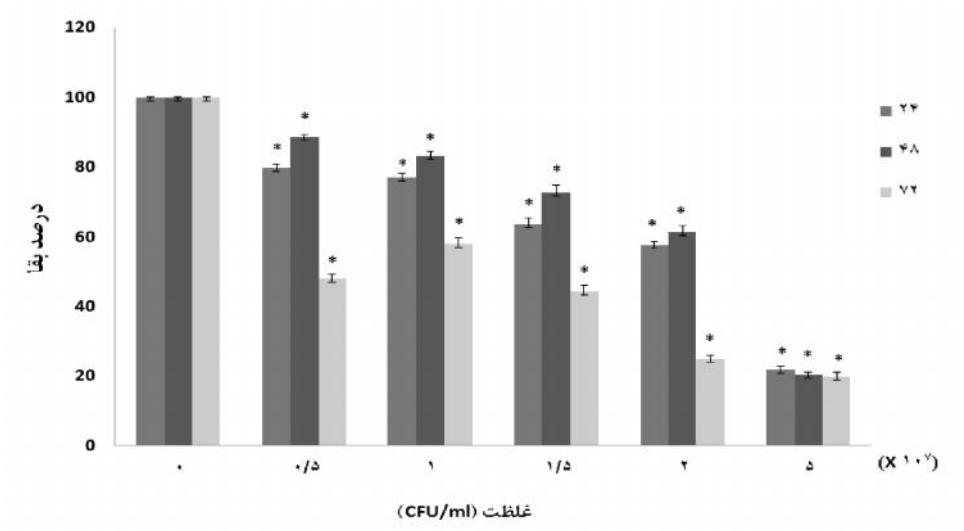
تست MTT

نتایج این تست در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. شکل ۵ مربوط به نتایج تست MTT مایع رویی جدایه حاصل از پنیر لیقوان (CT_2) و شکل ۶ مربوط به نتایج تست MTT مایع رویی جدایه حاصل از پنیر کوزه (JTa_1) است.



شکل ۵. بررسی اثر سمیت سلولی جدایه CT_2 توسط تست MTT. کاهش بقای سلولی وابسته به غلظت و زمان قابل مشاهده است (*$p<0.05$)

[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019

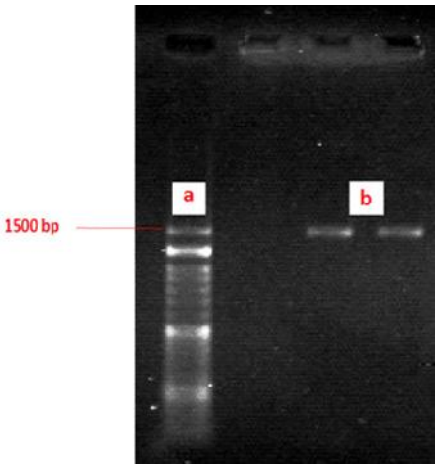


شکل ۶. بررسی اثر سمیت سلولی جدایه JTa_1 توسط تست MTT. کاهش بقای سلولی عمدتا وابسته به غلظت بوده و ارتباط اندکی با زمان تیمار دارد (*$p<0.05$)

همانطور که مشاهده می‌گردد مایع رویی هر دو جدایه دارای اثر ضدتکثیری و سمیت سلولی روی سلول‌های سرطانی هستند. مقادیر ارائه شده در نمودارها به صورت میانگین سه تکرار مستقل±انحراف استاندارد (SD) می‌باشد (*$p<۰/۰۵$).

شناسایی جدایه‌های برتر

نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی مرتبط با جدایه‌های برگزیده، به ترتیب در جداول ۲ و ۳ و شکل ۷ نشان داده شده است.



شکل ۷. باند مربوط به توالی‌های تکثیر شده در واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال 27 F و 1492 R (a: DNA ladder: 50 bp، b: باند نمونه‌های CT_2 و JTa_1 به طول تقریبی1500 bp)

جدول ۲. نتایج تست‌های بیوشیمیایی جدایه‌های برگزیده

	رنگ آمیزی گرم	تست کاتالاز	تست VP	هیدرولیز آرژینین	رشد در ۱۵ و ٤٥ درجه
CT_2	+	–	–	+	+، +
JTa_1	+	–	–	+	+، +

جدول ۳. نتایج تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط جدایه‌های برگزیده

	گلوکز	گالاکتوز	لاکتوز	آرابینوز	مالتوز	مانیتول	سوربیتول	ساکارز	گزیلوز	ملیبیوز	رافینوز	ترهالوز
CT_2	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+
JTa_1	+	+	–	+	+	+	–	–	+	+	–	+

[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019

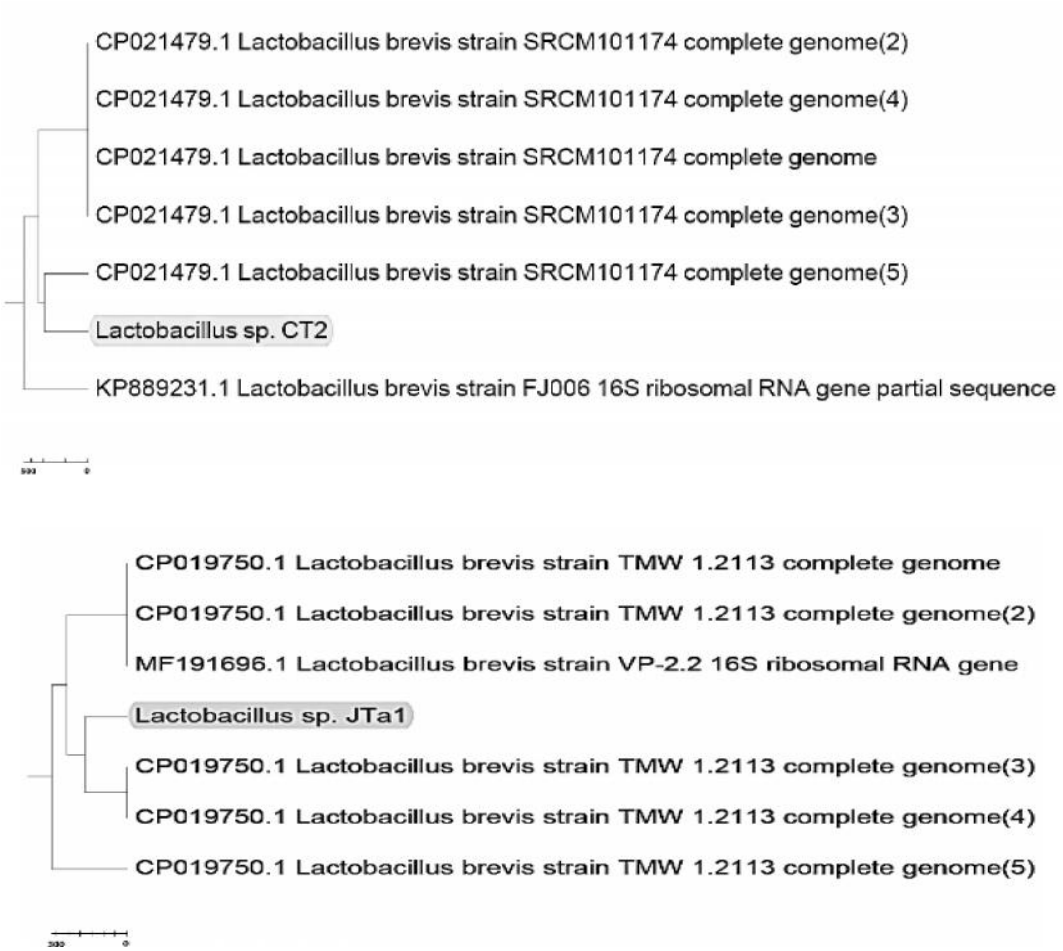
جدول ٤. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR [۱۹]

پرایمر	توالی
27 F	5' – AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3'
1492 R	5' – ACGGCTACCTTGTTACGACTT – 3'

نتایج حاصل از مقایسه توالی جدایه‌های این پروژه با توالی‌های موجود در سایت NCBI و میزان قرابت ژنتیکی این جدایه‌ها در جدول ۵ و شکل ۸ نشان داده شده است. توالی جدایه‌های *Lactobacillus* sp. CT_2 و *Lactobacillus* sp. JTa_1 به ترتیب با کدهای: MF506845 و MF506846، در NCBI ثبت شد (جدول ۵).

جدول ۵. شناسایی جدایه‌ها بر پایه مقایسه توالی ژن 16S rRNA

جدایه	گونه	تشابه	کد دست یابی	منبع جداسازی
CT_2	*Lactobacillus brevis*	٪۹۹	MF506845	پنیر لیقوان حاصل از شیر گوسفند
JTa_1	*Lactobacillus brevis*	٪۹۶	MF506846	پنیر کوزه حاصل از شیر گوسفند



شکل ۸. دندروگرام جدایه‌های *Lactobacillus* sp. CT_2 و *Lactobacillus* sp. JTa_1

[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019

بحث

طی این پروژه اثر ضدسرطانی متابولیت‌های موجود در مایع رویی لاکتوباسیل‌های جداسازی شده مورد بررسی قرار گرفت. اثر سمیت سلولی این ترکیبات به خوبی ملاحظه شد. بررسی میکروسکوپی سلول‌های سرطانی تیمارشده با مایع رویی حاصل از همه جدایه‌ها نشان داد که ترکیبات مذکور دارای اثر ضدتکثیری و سمیت سلولی روی سلول‌های HCT116 هستند. به منظور غربالگری سویه‌های دارای بیشترین اثر ضدسرطانی و همچنین کمترین اثرات جانبی، روش MTT به عنوان تست تاییدی برای جدایه دارای بیشترین اثر مهاری در کمترین زمان انجام پذیرفت. چنان که در نتایج این تست ملاحظه می‌گردد، هر دو جدایه مورد بررسی در این تست، فعالیت ضدسرطانی قابل توجهی نشان دادند. نمودار نتایج، حاکی از این مطلب است که اثر سمیت سلولی متابولیت حاصل از جدایه CT_2 وابسته به غلظت و زمان بوده، و با افزایش این پارامترها، شاهد کاهش بقای سلولی هستیم. در مقابل، اثر سمیت سلولی متابولیت حاصل از جدایه JT_{a1} با توجه به افزایش بقای سلولی با گذر از زمان ۲٤ ساعت به ٤۸ ساعت، عمدتاً وابسته به غلظت بوده و ارتباط اندکی با تغییر زمان تیمار دارد. این امر احتمالاً به سبب متابولیزه شدن ترکیبات موجود در مایع رویی با گذر زمان، و یا به دلیل واکنش سلول‌های سرطانی در مقابل این ترکیبات می‌باشد. هر چند توجه دقیق به نمودار نتایج حاصل از تست MTT جدایه CT_2 نشان می‌دهد که با وجود تاثیر هر دو متغیر غلظت و زمان تیمار بر سلول‌ها، تاثیر افزایش غلظت بیش از افزایش زمان مشهود است که این امر از روی تصاویر مربوط به تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های تحت تیمار، قابل مشاهده است. مقایسه IC_{50} زمان ۷۲ ساعت مایع رویی دو جدایه نشان می‌دهد که متابولیت حاصل از جدایه JT_{a1} با IC_{50} زمان ۷۲ ساعت $1/3 \times 10^{7}$ CFU/ml، ترکیبات مهاری قوی‌تری نسبت به متابولیت حاصل از جدایه CT_2 با IC_{50} زمان ۷۲ ساعت $1/4 \times 10^{10}$ CFU/ml، دارد ($p<0/05$). با توجه به قرابت هر دو جدایه با یک نوع گونه (*لاکتوباسیلوس برویس*[1])، تفاوت در میزان اثر ضدسرطانی ممکن است مرتبط با اختلاف ژنتیکی دو سویه باشد که این مسئله در باب مطالعه روی نوع ترکیبات ضدسرطانی و بررسی علل تفاوت در میزان اثر آنها می‌تواند بسیار قابل توجه باشد.

از محدودیت‌های این مطالعه نبودن بررسی مشابه روی اثرات ضدسرطانی باکتری‌های اسید لاکتیک از منبع لبنیات سنتی بود که این موضوع می‌تواند مقایسه دقیق بین نتایج این بررسی و بررسی‌های مشابه را دشوار سازد؛ با این حال، مقایسه این نتایج با نتایج تحقیقات مشابه روی لاکتوباسیل‌ها صرف نظر از منبع جداسازی، می‌تواند در برآورد میزان اثربخشی ترکیبات این بررسی راه گشا باشد.

چویی و همکاران در بررسی خود نشان دادند که عصاره *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با غلظت 10^{8} CFU/ml، بقای سلولی را نسبت به گروه کنترل ۲۸-۲۱ درصد کاهش می‌دهد [۱۰] که در مقایسه با مقادیر به دست آمده در این تحقیق، اثر مهاری بسیار کمتر است. صادقی علی آبادی و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که مایع رویی *لاکتوباسیلوس پلنتارم*، اثر مهاری قابل توجهی بر سلول‌های سرطان کلورکتال Caco-2 دارد [۲۸]. سلطان دلال و همکاران اثر ضدسرطانی مایع رویی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با غلظت‌های مشابه این پروژه را روی سلول‌های Caco-2 بررسی کردند. مشاهده شد که اثر سمیت سلولی در بهترین حالت بیش از ۳۸ درصد نیست [۲۹]، که این نیز گواهی بر اثر بالای متابولیت‌های بررسی شده در این پروژه بود. کاهولی و همکاران در مطالعه‌ای اثر سمیت سلولی مایع رویی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* را روی سلول‌های سرطان کلورکتال ارزیابی کردند. این نتایج تقریباً مشابه نتایج این پروژه بود [۳۰]. ای آر و همکاران اثر ضد

[1] *Lactobacillus brevis*

[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019

سرطانی تعداد زیادی از لاکتوباسیل‌ها را بر سلول‌های سرطانی Caco-2 مورد بررسی قرار دادند. نتایج این بررسی چندان قابل توجه نبود [۱۳].

در توضیح اثر سمیت سلولی قابل توجه متابولیت‌های جدایه‌های به دست آمده در این پروژه در مقایسه با سایر بررسی‌ها، شاید بتوان گفت که متابولیت‌های تولید شده در لاکتوباسیل‌های جدا شده، همانند باکتری‌های دیگر، وابسته به سویه است و جداسازی سویه‌های جدید از منابع لبنی بومی امکان دستیابی به سویه‌های جدید و در نتیجه یافتن متابولیت‌های جدید و موثر را افزایش می‌دهد و در نتیجه اثر سمیت سلولی بسیار بالای بدست آمده را می‌توان توضیح داد. لذا نتایج به دست آمده طی پروژه حاضر می‌تواند احتمال فعالیت بالای ضدسرطانی پروبیوتیک‌های لبنیات سنی را نسبت به سایر پروبیوتیک‌ها تایید نماید.

نتیجه گیری

اثربخشی بسیاری از ترکیبات ضدسرطان با القای آپوپتوزدر سلول‌های سرطانی ارتباط دارد. بنابراین در غربالگری برای دستیابی به ترکیبات مفید در عرصه درمان سرطان، یافتن ترکیباتی که آپوپتوز را القاء می‌کنند می‌تواند از اهمیت بالایی برخوردار باشد [۳۲]. نتایج به دست آمده از این بررسی نشان می‌دهد که سویه‌های بومی لاکتوباسیل‌های موجود در لبنیات سنتی آذربایجان کاندید مناسبی برای یافتن ترکیبات موثر ضدسرطان است و این می‌تواند ناشی از وابسته به سویه بودن متابولیت‌های تولیدشده در این لاکتوباسیل‌ها باشد. بر این اساس، توجه به لبنیات سنتی و ترغیب افراد به استفاده از این محصولات و همچنین افزایش کاربرد این فراورده‌ها در زمینه صنایع غذایی می‌تواند در افزایش میزان سلامت جامعه مفید باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه تبریز است. از حمایت دانشگاه تبریز در قالب این پایان‌نامه قدردانی می‌شود.

References

1- Kim J-E, Kim JY, Lee KW, Lee HJ. Cancer chemopreventive effects of lactic acid bacteria. J Microbiol Biotechnol. 2007 Aug;17(8):1227–35.
2- Vidya S, Thiruneelakandan G. Probiotic potentials of Lactobacillus and its anticancer activity. Int J Curr Res. 2015 Sep; 7(9): 20680-20684.
3- Rafie N, Golpur Hamedani S, Ghiasvand R, Miraghajani M. Kefir and cancer: A systematic review of literatures. Arch Iran Med. 2015 Dec;18(12):852–7.
4- Mehrabian S, Tajabadi Ebrahimi M, Abbas Ahmadi M, Bahrami H. Study of antimutagenic and anticancer effect of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh by Ames Test. AMUJ. 2012 Mar; 15(66): 72-79. [Full text in Persian]
5- Rajput A, Dominguez San Martin I, Rose R, Beko A, LeVea C, Sharratt E, et al. Characterization of HCT116 human colon cancer cells in an orthotopic model. J Surg Res. 2008 Jun;147(2):276–81.
6- Nabiuni M, Gholami S, Teimoori-toolabi L, Zandi F, Azari S, Yarahmadi A. Curcumin inhibits the expression of aquaporin 5: The new perspective in inhibition of colon carcinogenesis. J Cell & Tissue. 2012 Summer; 3(2):113–119. [Full text in Persian]
7- Yun J-M, Afaq F, Khan N, Mukhtar H. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells. Mol Carcinog. 2009 Mar;48(3):260–270.
8- Osterlund P, Ruotsalainen T, Korpela R, Saxelin M, Ollus A, Valta P, et al. Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: A randomised study. Br J Cancer. 2007 Oct; 97(8):1028–34.
9- Davoodi H, Hashemi SR, Seow HF. 5-Fluorouracil induce the expression of TLR4 on HCT116

[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019

colorectal cancer cell line expressing different variants of TLR4. Iran J Pharm Res. 2013 spring;12(2):453–60.
10- 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 May;42(5):452–8.
11- Daniluk U. Probiotics, the new approach for cancer prevention and / or potentialization of anti-cancer treatment? J Clin Exp Oncol. 2012 Sep; 1(2): 1-2.
12- Rafter J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. Br J Nutr. 2002 Sep; 88 Suppl 1:S89-94.
13- Er S, Koparal AT, Kivanç M. Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells. Turkish J Biol. 2015 Mar; 39(1):23–30.
14- Ghobadi Dana M, Hatef Salmanian A, Yakhchali B. Isolation and identification of indigenous lactobacilli in traditional dairy products in Iran. Iran J Med Microbial. 2012 Summer; 1(2): 99-116. [Full text in Persian]
15- Bernardeau M, Guguen M, Vernoux JP. Beneficial lactobacilli in food and feed: Long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. FEMS Microbiol Rev. 2006 Jul; 30(4):487–513.
16- Mithun S, Dipak V, Sheela S. Isolation and identification of lactobacilli from raw milk samples obtained from aarey milk colony. Int J Sci Res Publ. 2015 Apr;5(4):1–5.
17- Chavoshi Frooshani M, Imani Fooladi AA, Saadatmand S. Antimicrobial effects of bacterial cell debris and supernatant of *Lactobacillus casei* isolated from yoghurt against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Ardabil Univ Med Sci. 2011Autumn; 11(3): 208-217. [Full text in Persian]
18- Suganya K, Murugan T, Murugan M. Isolation and characterization of probiotic lactic acid bacteria from milk and curd samples. Int J Pharma Bio Sci. 2013;4(1):317–24.
19- Kermanshahi RK, Peymanfar S. Isolation and identification of Lactobacilli from cheese, yoghurt and silage by 16S rDNA gene and study of bacteriocin and biosurfactant production. Jundishapur J Microbiol. 2012 Apr; 5(4):528–32.
20- Yanagida F, Chen YS, Yasaki M. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from lake. J Basic Microbiol. 2007 Apr;47(2):184–90.
21- Hu P, Song W, Shan Y, Du M, Huang M, Song C, et al. Lactobacillus paracasei subsp. paracasei M5L induces cell cycle arrest and calreticulin translocation via the generation of reactive oxygen species in HT-29 cell apoptosis. Food Funct [Internet]. 2015 Jul; 6(7):2257–65.
22- Bassyouni RH, Abdel-all WS, Abdel-all MG, Kamel Z. Characterization of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Egypt as a probiotic. Life Science Journal, 2012 Oct; 9(4): 2924-2933.
23- Suneel D, Basappa K. Identification and characterization of *Lactococcus garvieae* and antimicrobial activity of its bacteriocin isolated from cow’s milk. Asian J Pharm Clin Res. 2013 Jul;6(SUPPL.3):104–8.
24- Estifanos H. Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from curd and in vitro evaluation of its growth inhibition activities against pathogenic bacteria. African J Microbiol Res. 2014 Mar;8(13):1419–25.
25- Chang CK, Wang SC, Chiu CK, Chen SY, Chen ZT, Duh P Der. Effect of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on immunopotentiating activity. Asian Pac J Trop Biomed. 2015 Jul;5(4):281–6.
26- Jose N, Bunt C, Hussain M. Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. Microorganisms. 2015 Jun; 3(2):198–212.
27- Plengvidhya V, Breidt F, Lu Z, Fleming HP. DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. Appl Environ Microbiol. 2007 Dec;73(23):7697–702.
28- Sadeghi-Aliabadi H, Mohammadi F, Fazeli H, Mirlohi M. 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. 2014 Oct; 17(10):815–9.
29- Soltan Dallal MM, Mojarrad M, Baghbani M, Raoofian R, Mardaneh J, Salehipour Z. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on colorectal tumor cells activity

(CaCo-2). Arch Iran Med. 2015 Mar; 18(3): 167-172.
30- Kahouli I, Malhotra M, Alaoui-Jamali M, Prakash S. In-Vitro characterization of the anti-cancer activity of the probiotic bacterium lactobacillus fermentum NCIMB 5221 and potential against colorectal cancer. J Cancer Sci Ther. 2015 Jul; 7(7):224–35.
31- Zahid M. Antimicrobial activity of bacteriocins isolated from lactic acid bacteria against resistant pathogenic strains. Int J Nutr Food Sci. 2015 May; 4(3):326- 331.
32- Liu K, Liu PC, Liu R, Wu X. Dual AO/EB staining to detect cells compared with flow cytometry. Med Sci Monit Basic Res. 2015 Feb; 21:15–20.

[DOI: 10.29252/jarums.18.2.191]
Downloaded from jarums.arums.ac.ir at 18:55 IRDT on Wednesday June 26th 2019