

Anticancer and Antiproliferative Effects of Combined Treatment with 5-Fluorouracil and Probiotic *Lactobacillus* Strains against Colorectal Cancer Cells

Sanaz Salek¹ , Elham Moazamian^{1*} , Afshin Mohammadi Bardbori² , Seyedeh Azra Shamsdin³ 

¹ Dept of Microbiology, College of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

² Dept of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

³ Gastroenterohepatology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: Jun. 18, 2024

Received in revised form:
Oct. 16, 2024

Accepted: Oct. 27, 2024

Published Online: Feb. 03, 2025

* Correspondence to:

Elham Moazamian
Dept of Microbiology, College of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Email:

elhammoazamian@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: The efficacy of 5-fluorouracil (5-FU) as a chemotherapy drug for colorectal cancer (CRC) is well-established. However, due to resistance to 5-FU and its associated complications, it is necessary to search for adjuvant therapies against CRC. Considering the anticancer potential of probiotic metabolites, this study assessed the anticancer effects of potential probiotic strains isolated from mule milk, camel milk, and the standard probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), used alone and in combination with 5-FU, against the human colon cancer cell line (HT-29) and normal human embryonic kidney (HEK-293).

Materials & Methods: Biochemical and molecular techniques were implemented to identify the strains isolated from mule and camel milk. The MTT assay was also employed to assess the anticancer effects of the probiotic strains of *Lactobacillus* isolated from mule milk and camel milk and of LGG, used alone and in combination with 5-FU, on the two cell lines HT-29 and HEK-293. The data were statistically analyzed using analysis of variance, and significant differences between means were assessed using Tukey's post hoc test. Minitab 20 software performed all statistical calculations in the level of significance less than 0.05.

Results: The results demonstrated the potential probiotic properties of all the studied *Lactobacillus* strains. The combination of cell extracts from *Lactobacillus* strains with 5-FU effectively reduced the viability of HT-29 cells. Nonetheless, this combination can reduce the cytotoxic effects of 5-FU on the viability of HEK-293 cells, thereby increasing their viability.

Conclusion: These results point to the possibility of using *Lactobacillus* strain cell extracts as an adjuvant therapy for cancer treatment.

Keywords: Colorectal cancer, *Lactobacillus*, Probiotic, 5-Fluorouracil, Anticancer Activity

How to cite this paper: Salek S, Moazamian E, Mohammadi Bardbori A, Shamsdin SZ. Anticancer and Antiproliferative Effects of Combined Treatment with 5-Fluorouracil and Probiotic *Lactobacillus* Strains against Colorectal Cancer Cells. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2025;32(6):11-26.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is among the most prevalent types of cancer and ranks as the third most malignant tumor globally, constituting a primary cause of cancer-related mortality (1,2). Chemotherapy with 5-Fluorouracil (5-FU), an anticancer drug, is commonly used on cancer patients (3). However, resistance to the drug and side effects like gastrointestinal mucositis can make treatment less effective and increase the risk of

death (1,2). Therefore, it is essential to develop supplementary strategies to enhance treatment outcomes (4). Probiotics have the potential to be a promising approach to the prevention and treatment of cancer. Laboratory studies have shown that the use of probiotics can be a promising strategy for cancer prevention and treatment (4). This is because they can stop the growth of cancer by lowering the number of bacteria linked to colon diseases, increasing the process of apoptosis, blocking enzymes that cause cancer, and making the immune system



stronger (5). Probiotics may slow down the onset and progression of colorectal cancer through various mechanisms, including metabolic activity of the intestinal microbiota, binding to and degradation of carcinogenic components in the intestinal lumen, production of short-chain fatty acids, and immune modulation (7). This study investigated the anticancer effects of potential probiotic *Lactobacillus* strains isolated from mule and camel milk alone and combined with 5-FU on the human colorectal adenocarcinoma cells (HT-29) and normal human embryonic kidney cells (HEK-293). Then it compared the results with a standard probiotic strain (*Lactobacillus rhamnosus*, GG).

Methods

To this end, a laboratory received 8 specimens of mule and camel milk from Shiraz, Kharameh, and Zarghan (Iran) for microbiological examination. Lactobacilli were isolated from the specimens and identified through morphological, physiological, and biochemical characteristics. All *Lactobacillus* strains were analyzed for 16S rRNA to validate the biochemical characteristics results. The specimens were sent to Codon Genetics Group (Tehran, Iran) for sequencing; the results were analyzed using BLAST software on the NCBI GenBank website. The agar well diffusion method (AWDM) was also employed to measure the antimicrobial activity of the *Lactobacillus* strains against *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Moreover, gelatinase production and hemolytic activity of the strains were evaluated. The disc diffusion method (DDM) was used to assess the antibiotic sensitivity of the strains to penicillin, ampicillin, vancomycin, rifampicin, chloramphenicol, streptomycin, and tetracycline. The isolated strains and the standard probiotic strain were cultivated on MRS agar medium and then on MRS broth medium. Following overnight incubation, the absorbance was assessed at a wavelength of 600 nm, yielding a value of 1. The culture media were centrifuged to separate the bacteria, and then RPMI 1640 medium was added to them. After applying ultrasonic treatment to the suspensions, we centrifuged them again, separated the supernatant (cell extract), and stored it at -80°C . To determine the half-maximal inhibitory concentration (IC50) of 5-FU, 1×10^4 HT-29 cells were

cultured in each well of a 96-well plate and then incubated with 5% carbon dioxide (CO₂) at 37°C for 24 hours. After the cells were treated with different concentrations of 5-FU, their viability was measured by using the MTT assay. To determine the most effective dilution of *Lactobacillus* cell extract, HT-29 and HEK-293 cells were treated with three serial dilutions (1, 1:10, and 1:100); the 1:10 dilution was used for subsequent analyses as the optimal dilution. Both cell lines were treated with a combination of cell extract and 5-FU, and then their viability was measured by using the MTT assay. The assay included a negative control (no treatment) and a positive control (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (IC50) of 5-FU) for both cell lines.

Results

Based on morphological, biochemical, and molecular characteristics, *Lactobacillus* strains, including *Limosilactobacillus fermentum* and *Lactiplantibacillus plantarum*, were isolated from mule milk, and *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus gallinarum*, and *Lactiplantibacillus plantarum* were isolated from camel milk. Results demonstrated the ability of these strains to grow under acidic and alkaline conditions (pH = 3 to 8), which is crucial for the viability of probiotics in the gastrointestinal tract. The supernatant of the strains exhibited moderate antimicrobial activity; however, none demonstrated the ability to hydrolyze gelatin. In addition, all strains showed sensitivity to penicillin, ampicillin, rifampicin, and chloramphenicol, while demonstrating resistance to vancomycin and streptomycin. The results indicated that the IC50 of HT-29 in 5-FU was 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This concentration of 5-FU also decreased the viability of HEK-293 cells to 41.27%. The study results showed that the dilution of *Lactobacillus* cell extract 1:10 had the biggest effect on the viability of HT-29 cells. This was different from the other dilutions and the control sample. The 1:10 dilution was chosen for subsequent tests because it resulted in the most significant reduction in the viability of HT-29 cells but had no significant effect on the viability of HEK-293 cells. Also, results demonstrated that adding cell extracts of *Lactobacillus* strains (alone) or 5-FU (alone) made HT-29 cells much less likely to survive. The combination of cell extracts and 5-FU significantly reduced the viability of HT-29 cells. In the absence of 5-FU, no significant difference was observed between

the cell extracts of *Lactobacillus* strains in terms of their effects on the viability of studied cell lines. The addition of cell extracts of *Lactobacillus* strains (alone) failed to significantly reduce the viability of HEK-293 cells. The viability of the positive control experienced a significant decline, dropping from 100% to 40.91%, whereas the cells treated with 5-FU and cell extracts of *Lactobacillus* strains exhibited significantly higher viability. Therefore, it can be concluded that the addition of the cell extract of *Lactobacillus* strains not only fails to significantly reduce the viability of HEK-293 cells but also significantly diminishes the cytotoxic effects of 5-FU.

Conclusion

All studied *Lactobacillus* strains exhibited potential probiotic properties; the cell extracts of these strains did not show cytotoxic effects on the viability of HEK-293 cells, but they could reduce the viability of HT-29 cells as much as 5-FU does. The simultaneous addition of 5-FU and cell extracts of *Lactobacillus* strains mitigated the cytotoxic effect of 5-FU on the viability of HEK-293 cells and, thereby, increased the viability of these cells. This combination also further reduced the viability of HT-29 cells. The study findings suggest that cell extracts from *Lactobacillus* strains may function as a potential adjuvant in anticancer therapy. Nevertheless, more studies are needed to verify these findings in order to establish the effectiveness of cell extracts from *Lactobacillus* strains in cancer treatment.

Authors' Contribution

Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal Analysis, Investigation, Resources, Visualization and, Data Curation: SS, EM, AMB, SASH, Supervision: EM, AMB, SASH, Writing–Original Draft Preparation: SS, Writing–Review & Editing: EM, AMB and, SASH, Project Administration: EM.

Ethical Statement

This study was approved by the Ethics Committee of Islamic Azad University of Shiraz (Iran) (IR.IAU.SHIRAZ.REC.1399.043). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

We declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.

Acknowledgment

The present article was extracted from the Ph.D. thesis written by Sanaz Salek. The authors of this article would like to thank the Islamic Azad University of Shiraz for their scientific and administrative support of this project.

اثرات ضدسرطانی و ضدتکثیری درمان ترکیبی ۵-فلورواوراسیل با سویه‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس علیه سلول‌های سرطانی روده بزرگ

ساناز سالک^۱ ID، الهام معظمیان^{۱*} ID، افشین محمدی بردبری^۲ ID، سیده عدرا شمس‌دین^۳ ID

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
^۲ گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
^۳ مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۹

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۶

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۱۱/۱۵

مقدمه: اگرچه ۵-فلورواوراسیل به‌عنوان داروی شیمی‌درمانی برای سرطان کولورکتال مؤثر است؛ اما به علت مقاومت و عوارض جانبی مرتبط با آن، جستجو برای درمان‌های کمکی از اهمیت بالایی برخوردار است. متابولیت‌های پروبیوتیک‌ها ظرفیت ضدسرطانی دارند. در مطالعه حاضر، اثر ضدسرطانی سویه‌های پتانسیل پروبیوتیکی جداشده از شیر الاغ، شتر و سویه پروبیوتیک استاندارد لاکتوباسیلوس رامنوسوس (LGG) علیه رده سرطانی کولون انسان HT-29 و نرمال کلیه جنینی انسان HEK-293 به‌تنهایی و به همراه ۵-فلورواوراسیل ارزیابی شدند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، سویه‌هایی که از شیر الاغ و شتر جدا شده بودند، با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی گردیدند. اثر ضدسرطانی سویه‌های لاکتوباسیلوس پتانسیل پروبیوتیکی جداشده از شیر الاغ، شتر و سویه استاندارد پروبیوتیک LGG بر دو رده سلولی HT-29 و HEK-293 به‌تنهایی یا در ترکیب با FU-۵ با روش MTT ارزیابی شدند. برای تحلیل آماری داده‌ها از آنالیز واریانس استفاده گردید و اختلاف معنی‌دار میان میانگین‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی توکی بررسی شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار Minitab vol.20 انجام گردید. $P \leq 0.05$ به لحاظ آماری معنی‌دار تعیین شد.

یافته‌های پژوهش: همه سویه‌های لاکتوباسیلوس مطالعه‌شده خواص پتانسیل پروبیوتیکی را نشان دادند. ترکیب عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس به همراه ۵-فلورواوراسیل به‌طور مؤثر میزان زنده ماندن سلول‌های HT-29 را کاهش داد؛ اما عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس به همراه ۵-فلورواوراسیل می‌تواند اثر سیتوتوکسیک ۵-فلورواوراسیل بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 را کاهش دهد و در نتیجه، بر میزان زنده‌مانی بیفزاید.

بحث و نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهند، عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس ممکن است به‌عنوان یک درمان کمکی بالقوه ضدسرطان عمل کند. با این حال، برای بررسی سویه‌های لاکتوباسیلوس به‌عنوان راهبرد درمان کمکی سرطان، مطالعات بیشتری لازم است.

واژه‌های کلیدی: سرطان کولورکتال، لاکتوباسیلوس، پروبیوتیک، ۵-فلورواوراسیل، فعالیت ضدسرطانی

استاد: سالک ساناز، معظمیان الهام، محمدی بردبری افشین، شمس‌دین سیده‌عدرا. اثرات ضدسرطانی و ضدتکثیری درمان ترکیبی ۵-فلورواوراسیل با سویه‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس علیه سلول‌های سرطانی روده بزرگ. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، بهمن ۱۴۰۳؛ ۳۲(۶): ۲۶-۱۱.

Email: elhammoazamian@gmail.com



مانند اسهال و موکوزیت و غیره می‌شوند (۱، ۳، ۵، ۶).

این احتمال وجود دارد که عمل پروبیوتیک‌ها توسعه و پیشرفت سرطان کولورکتال را از طریق فعالیت متابولیک میکروبیوتای روده، اتصال و تخریب اجزای سرطان‌زا در لومن روده، تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، اسید لینولئیک کونژوگه و تعدیل ایمنی به حداقل برساند (۷).

بر اساس این سابقه، تحقیق درباره استفاده بالقوه باکتری‌های پروبیوتیک به عنوان یک درمان کمکی برای سرطان بسیار موجه به نظر می‌رسد. با توجه به اینکه گونه‌های خاص پروبیوتیکی آثار متفاوت ضدسرطان دارند، در مطالعه حاضر، فعالیت ضدسرطانی سویه‌های لاکتوباسیلوس پروبیوتیکی جداشده از شیر الاغ و شتر به تنهایی و به همراه داروی ۵-فلوروووراسیل بر دو رده سلولی آدنوکارسنوم کولونی HT-29 و نرمال کلیه جنینی انسان HEK-293 ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی سویه‌های لاکتوباسیلوس: در این مطالعه آزمایشگاهی، هشت نمونه شیر از الاغ و شتر شیرده از مناطق شیراز، خرامه و زرقان جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها با استفاده از بطری‌های استریل شده جمع‌آوری و برای بررسی میکروبیولوژیکی به آزمایشگاه با جعبه یخ منتقل شدند. نمونه‌ها تا شروع آنالیز در یخچال (حدود ۴ درجه سانتی-گراد) نگهداری گردیدند.

برای جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر از هر نمونه شیر با ۹۰ میلی‌لیتر محلول فیزیولوژیکی استریل شده به مدت حدود ۳-۱ دقیقه به صورت استریل همگن شدند؛ سپس از پنج سری رقت سریالی تهیه شده (۱۰-۵-۱-۰)، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه برداشته شد و روی محیط MRS آگار (de Man, Rogosa and Sharpe) کشت گردید. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند؛ سپس تک‌کلنی‌ها به طور تصادفی انتخاب و به منظور خالص‌سازی چندین بار روی محیط MRS آگار کشت گردیدند. کلنی‌هایی که مشخصات کلی لاکتوباسیلوس‌ها را نشان می‌دادند، از هر پلیت برای

مقدمه

سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در جهان و سومین تومور شایع بدخیم است که از مهم‌ترین علل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان به‌شمار می‌رود (۱). این سرطان تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی قرار دارد. علاوه بر این، مطالعات اپیدمیولوژیکی تأیید می‌کنند که این سرطان بیش از عوامل ژنتیکی، تحت تأثیر عوامل محیطی است (۱).

شیمی‌درمانی یکی از درمان‌های متداول برای سرطان کولورکتال است و ۵-فلوروووراسیل (۵-Fluorouracil, FU) یک داروی ضد نوپلاستیک پرمصرف است که تأثیر فراوانی بر تقسیم سلول‌های تومور دارد. این دارو با هدف قرار دادن آنزیم تیمیدیلانت سنتاز، رشد سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند و با ایجاد شکست در دو رشته DNA باعث توقف چرخه سلولی و آپوپتوز می‌شود (۲). با وجود این، مقاومت در برابر ۵-FU می‌تواند در هر شرایط و زمان درمانی رخ دهد و به ایجاد سرطان‌های بدخیم منجر گردد؛ همچنین این بیماران ممکن است به موکوزیت گوارشی مبتلا شوند که یک اثر منفی شدید سیتوتوکسیک ۵-FU است و می‌تواند مشکلات و فشارهای بالینی را افزایش دهد (۳، ۲). این عوامل و تأثیرات ناشی از ۵-FU باعث تأخیر در شیمی‌درمانی، کاهش دوز و ادامه ندادن روند درمان می‌گردد که در نتیجه می‌تواند میزان مرگ‌ومیر در بیماران را افزایش دهد (۳، ۲)؛ بنابراین، توسعه راهبردهای جدید برای درمان‌های کمکی یا جایگزین، غلبه بر عوارض جانبی نامطلوب و بهبود میزان پاسخ اهمیت بسیاری دارد. استفاده از پروبیوتیک‌ها ممکن است یک راهبرد امیدوارکننده در پیشگیری و درمان سرطان باشد. پروبیوتیک به میکروارگانسیم‌های زنده و غیر پاتوژنی اطلاق می‌شود که در صورت مصرف مقادیر کافی، آثار سلامت بخشی ویژه‌ای برای میزبان دارند (۴). در مطالعات آزمایشگاهی و نمونه‌های حیوانی، پروبیوتیک‌ها مزایایی را در کاهش جمعیت باکتری‌های مرتبط با بیماری‌های کولون، افزایش القای آپوپتوز، مهار آنزیم‌های سرطان‌زا و تحریک دستگاه ایمنی میزبان نشان داده‌اند. عملکرد پروبیوتیک‌ها همچنین باعث کاهش عوارض جانبی ناشی از درمان‌های ضد نوپلاستیک،

آزمایش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انتخاب شدند (۸).

شناسایی سویه‌های لاکتوباسیلوس: جدایه‌های باکتریایی خالص از نظر مورفولوژی سلولی، واکنش گرم، کاتالاز، اکسیداز، تولید اسید از گلوکز و رشد در ۳، ۴، ۷، ۸، pH بررسی گردیدند (۸). در پایان، جدایه‌های باکتریایی تأیید شده در جنس لاکتوباسیل بر اساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها، تا سطح گونه شناسایی شدند (۸).

شناسایی مولکولی سویه‌های لاکتوباسیلوس: برای تأیید نتایج خصوصیات بیوشیمیایی، همه سویه‌های لاکتوباسیلوس از نظر 16S rRNA تجزیه و تحلیل گردیدند. استخراج DNA با استفاده از کیت جداسازی DNA سیناکلون (تهران، ایران، سری ساخت ۹۸۶۰۷۷۳)، بر اساس دستورالعمل سازنده انجام شد. تکثیر با استفاده از پرایمرهای یونیورسال (327 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 'F-5' و 31492 'R-5' ACGGCTTACCTTGTTACGACTT) صورت گرفت (۹). محصولات PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد تجزیه و تحلیل گردیدند؛ سپس محصولات خالص شده برای تعیین توالی به شرکت گروه ژنتیک کدون (تهران، ایران) ارسال شدند و نتایج با استفاده از نرم‌افزار BLAST در سایت NCBI Gen-Bank تجزیه و تحلیل گردیدند.

بررسی خواص ضد میکروبی: فعالیت ضد میکروبی با استفاده از روش انتشار چاهک آگار (Agar Well Diffusion Method) انجام شد (۱۰). اثر مهارى سوپرناتانت‌های کشت بدون سلول (Cell-Free Culture Supernatants, CFCS) بر اشریشیا کلی ATCC 25922 و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 بررسی گردید. قطر نواحی بازدارنده اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری و به‌عنوان فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت بیان شد.

بررسی خواص ژلاتینازی و همولیتیکی: همه سویه‌های لاکتوباسیل برای بررسی تولید ژلاتیناز و فعالیت همولیتیکی ارزیابی گردیدند (۱۱).

مقاومت به ترکیبات آنتی‌بیوتیکی: برای تعیین

حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها از روش دیسک دیفیوژن (Disk Diffusion Method) استفاده شد (۱۲).

آنتی‌بیوتیک‌هایی با سازوکارهای اثر متفاوت شامل پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، ونکومايسين (مهارکننده‌های سنتز دیواره سلولی)، ریفامپیسین (مهارکننده سنتز نوکلئیک‌اسید) و کلرامفنیکل، استریتومايسين و تتراسایکلین (مهارکننده‌های سنتز پروتئین) بررسی گردیدند.

تهیه عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس: سویه استاندارد لاکتوباسیلوس رامنوسوس (ATCC 53103) GG از دانشگاه علوم پزشکی شیراز دریافت شد. سویه‌های جداسازی شده و سویه استاندارد روی محیط MRS آگار کشت گردیدند. کلنی‌های باکتری به محیط MRS براث کشت داده شدند و به مدت یک شب گرمخانه‌گذاری گردیدند؛ سپس ۱ میلی‌لیتر از کشت در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه MRS براث ساب کالچر داده شد. جذب محیط به‌صورت دوره‌ای در طول موج ۶۰۰ نانومتر تا رسیدن به ۱ اندازه‌گیری گردید؛ سپس به کمک سانتریفیوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه، از محیط کشت MRS جدا شد و محیط RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, RPMI) به آن‌ها اضافه گردید؛ سپس سوسپانسیون آماده‌شده هر سویه در مجاورت یخ تحت تأثیر امواج فراصوت در دستگاه سونیکاتور به مدت ۵ دقیقه، با دامنه ۳۰ درصد و توان ۵ تا ۶ وات قرار گرفت. در مرحله بعد، سوسپانسیون‌ها مجدداً سانتریفیوژ گردیدند (۸۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه) و سوپرناتانت حاصل (عصاره سلولی) هر سویه جدا و در فریزر نگهداری شد (۱۳).

کشت رده‌های سلولی: رده‌های سلولی سرطانی HT-29 و نرمال HEK-293 از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد. رده سلولی HT-29 در محیط کشت RPMI 1640 (گیبکو، آمریکا، سری ساخت ۷۲۴۰۰۰۲۱) و رده سلولی HEK-293 در محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (گیبکو، آمریکا، سری ساخت ۱۲۸۰۰۰۸۲) به روش استاندارد مربوطه کشت گردید. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در اتمسفر حاوی ۵ درصد

سلول‌ها، تست MTT انجام گردید. جذب رنگ تبدیل شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الیزا ریدر (BioTek, USA) اندازه‌گیری شد و میزان زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه گردید (۱۴).

تجزیه و تحلیل داده‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار (mean±SD) ارائه گردید. برای تحلیل آماری داده‌ها از آنالیز واریانس استفاده شد و اختلاف معنی‌دار میان میانگین‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی توکی بررسی گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار Minitab vol.20 صورت گرفت. $P \leq 0.05$ به لحاظ آماری معنی‌دار تعیین شد. این مطالعه به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز (IR.IAU.SHIRAZ.REC.1399.043) رسیده است.

یافته‌های پژوهش

جداسازی و شناسایی سویه‌های لاکتوباسیلوس: در این مطالعه، مجموعاً پنج سویه لاکتوباسیلوس از نمونه‌های شیر الاغ و شتر جداسازی شد؛ همچنین از سویه پروبیوتیک استاندارد لاکتوباسیلوس رامنوسوس (GG (LGG به منظور مقایسه ویژگی‌های پروبیوتیکی با سویه‌های وحشی استفاده گردید. با توجه به رنگ آمیزی گرم و آزمایش‌ها بیوشیمیایی، این میکروارگانیسم‌ها گرم مثبت، غیرمتحرک، میله‌ای شکل، کاتالاز و اکسیداز منفی بودند و بنابراین، به عنوان لاکتوباسیلوس شناسایی شدند. تست‌های رشد در ۳، ۴، ۷، ۸، pH و همچنین تولید گاز دی‌اکسید کربن از قند گلوکز برای تعیین نوع تخمیر (همو یا هتروفرومنتیتیو) به عنوان تست‌های تأییدی انجام گردید. در پایان، شناسایی جدایه‌ها بر اساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها تا سطح گونه انجام شد (جدول شماره ۱).

دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد رطوبت گرمخانه‌گذاری شدند.

بررسی میزان زنده‌مانی سلولی با آزمون MTT: برای تعیین نیمه حداکثر غلظت بازدارندگی IC50 (Half maximal inhibitory concentration) داروی FU-5، تعداد ۱×۱۰۴ سلول HT-29 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسید کربن گرمخانه‌گذاری شدند؛ سپس با غلظت‌های مختلف FU-5 (۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار گردیدند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، میزان زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از تست MTT تجزیه و تحلیل شد.

برای به دست آوردن بهترین رقت مؤثر عصاره سلولی سویه باکتریایی، در ابتدا سه رقت سریالی (۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰) از عصاره سلولی هر سویه جداگانه تهیه شد. در ادامه، در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۹۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی حاوی ۱×۱۰۴ سلول کشت گردید و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند؛ سپس هر چاهک با ۱۰ میکرولیتر از رقت عصاره سلولی سویه تیمار شد و پس از گرمخانه‌گذاری شبانه، تست MTT انجام گردید. در نهایت، از رقت مؤثر و بهینه ۱:۱۰ عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس برای آزمون‌های بعدی استفاده شد.

در ادامه، در پلیت‌های بعدی، تعداد ۱×۱۰۴ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت گردید و با نمونه‌های آزمایشی (عصاره سلولی و FU-5 + عصاره سلولی) تیمار شد و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. کنترل منفی بدون هیچ‌گونه تیماری و کنترل مثبت با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر 5-FU (IC50) برای هر دو رده سلولی در نظر گرفته شد. پس از آن، برای اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی

جدول شماره ۱. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی

SN98	SP56	SS39	SZ19	SJ06	آزمایش‌های بیوشیمیایی
شیر شتر	شیر شتر	شیر شتر	شیر الاغ	شیر الاغ	نوع نمونه
شیراز	زرقان	شیراز	خرامه	شیراز	مکان جمع‌آوری نمونه
میله‌ای	میله‌ای	میله‌ای	میله‌ای	میله‌ای	مورفولوژی

+	+	+	+	+	رنگ آمیزی گرم
-	-	-	-	-	کاتالاز
-	-	-	-	-	اکسیداز
هتروفرمنتاتیو	هموفرمنتاتیو	هموفرمنتاتیو	هتروفرمنتیتیو	هتروفرمنتاتیو	همو / هتروفرمنتاتیو
+	-	-	+	+	تولید گاز از گلوکز
+	+	+	+	+	pH3 رشد در
+	+	+	+	+	pH4 رشد در
+	+	+	+	+	pH7 رشد در
+	+	+	+	+	pH8 رشد در
+	+	+	+	+	گلوکز
+	-	+	+	+	مانوز
+	+	+	+	+	فروکتوز
+	+	+	+	+	لاکتوز
+	-	-	+	+	آرابینوز
+	+	+	+	+	گالاکتوز
+	+	+	+	+	مالتوز
+	+	-	+	+	سوکروز
-	+	-	-	+	زایلوز
+	+	+	+	+	ترهالوز

ثبت (+)، منفی (-)

شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش مولکولی: نتایج تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای ژن 16S rRNA نشان داد که هر پنج جدایه متعلق به جنس *لاکتوباسیلوس* هستند (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲. نتایج شناسایی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* بر اساس توالی ژن 16S rRNA

کد ایزوله	شماره دسترسی ایزوله	16S rRNA نتیجه توالی یابی	مشابهت (درصد)
SJ06	OQ311327	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	۱۰۰
SZ19	OQ311328	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	۱۰۰
SS39	OQ311329	<i>Lactobacillus helveticus</i>	۱۰۰
SP56	OQ311330	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	۱۰۰
SN98	OQ311331	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	۱۰۰

سویه‌های پاتوژن *اشریشیا کلی* ATCC 25922 و *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 بررسی گردید. بر اساس مشاهدات، سوپرناتانت همه سویه‌های بررسی شده فعالیت ضد میکروبی متوسطی را نشان دادند (جدول شماره ۳).

مقادیر شباهت با استفاده از نرم‌افزار BLAST در سایت GenBank تعیین شد. خواص ضد میکروبی: فعالیت ضد میکروبی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* با استفاده از روش انتشار چاهک آگار علیه

جدول شماره ۳. قطر هاله بازدارنده (میلی متر) سوپرناتانت های سویه های لاکتوباسیلوس در برابر پاتوژن ها

پاتوژن	قطر هاله بازدارنده (میلی متر)					
	SJ06	SZ19	SS39	SP56	SN98	LGG
<i>E. coli</i> ATCC 25922	۱۷	۱۴	۱۹	۱۸	۱۴	۱۵
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	۱۴	۱۲	۲۰	۱۶	۱۳	۱۵

در این آزمون، سمیت سلولی ایجاد شده توسط عصاره سلولی سویه لاکتوباسیلوس به تنهایی و همراه با FU-5 روی رده های سلولی HT-29 و HEK-293 با روش MTT ارزیابی گردید. به طور خاص، سلول های HEK-293 به عنوان سلول های طبیعی و غیرسرطانی استفاده شدند تا بتوان خواص سایتوتوکسیک و ضدسرطانی سویه ها را از یکدیگر تفکیک کرد. یافته های به دست آمده از این مطالعه نشان داد که درباره رقت های نهایی مختلف عصاره سلولی سویه لاکتوباسیلوس (۱:۱۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۱۰۰۰)، کمترین میزان زنده ماندن سلول HT-29 مربوط به رقت ۱:۱۰ آن بود که تفاوت این رقت با سایر رقت ها و با نمونه کنترل معنی دار است ($P < 0.05$) (جدول شماره ۴). از آنجا که رقت ۱:۱۰ عصاره سلولی سویه های لاکتوباسیلوس بیشترین کاهش میزان زنده ماندن در سلول های HT-29 را داشت و بر میزان زنده ماندن سلول های HEK-293 تأثیر معنی داری نداشت، از رقت ۱:۱۰ عصاره سلولی سویه لاکتوباسیلوس برای آزمون های بعدی استفاده شد (جدول های شماره ۴ و ۵).

خواص ژلاتینازی و همولیتیکی: بر اساس نتایج به دست آمده، هیچ یک از سویه های لاکتوباسیلوس در محیط غنی شده با ژلاتین، اطراف کلنی هاله شفاف ایجاد نکردند و قادر به هیدرولیز ژلاتین نبودند. سویه های SZ19 و SN98 آلفا-همولیتیک بودند، در حالی که سویه های SP56، SS39 و LGG فعالیت گاما-همولیتیکی از خود نشان دادند.

مقاومت به آنتی بیوتیک ها: میزان حساسیت سویه های لاکتوباسیلوس به ترکیبات آنتی بیوتیکی متداول و مرتبط با استفاده از روش انتشار از دیسک بررسی شد (۱۲). همه سویه ها به پنی سیلین، آمپی سیلین، ریفامپین و کلرامفنیکل حساس و نسبت به ونکو مایسین و استرپتومایسین مقاوم بودند. میزان زنده ماندن سلولی با روش MTT: ارزیابی IC50 داروی FU-5 با استفاده از روش MTT انجام گردید. نتایج نشان می دهد که غلظت 50 μg/ml از FU-5 برای به دست آوردن IC50 روی رده سلول های HT-29 مورد نیاز است که همین غلظت از FU-5 باعث رسیدن میزان زنده ماندن در سلول های HEK-293 به ۴۱/۲۷ درصد شده است.

جدول شماره ۴. تأثیر رقت های مختلف عصاره سلولی سویه های لاکتوباسیلوس بر میزان زنده ماندن سلول های HT-29

سویه ها	رقت های عصاره سلولی			
	۰	۱:۱۰	۱:۱۰۰	۱:۱۰۰۰
SJ06	۱۰۰ ± ۱/۶۱ ^A	۵۰/۲۰ ± ۱/۰۲ ^D	۷۲/۶۰ ± ۳/۶۵ ^C	۸۱/۶۱ ± ۳/۳۹ ^B
SZ19	۱۰۰ ± ۱/۶۱ ^A	۵۲/۶۳ ± ۰/۸۹ ^D	۷۴/۵۷ ± ۰/۴۲ ^C	۸۲/۰۶ ± ۰/۷۰ ^B
SS39	۱۰۰ ± ۱/۶۱ ^A	۴۶/۲۷ ± ۰/۸۷ ^D	۷۰/۸۶ ± ۱/۲۸ ^C	۸۲/۰۳ ± ۱/۳۹ ^B
SP56	۱۰۰ ± ۱/۶۱ ^A	۵۲/۵۸ ± ۰/۲۷ ^D	۷۰/۷۷ ± ۱/۸۵ ^C	۸۰/۷۴ ± ۱/۷۳ ^B

SN98	$100 \pm 1/61^A$	$51/96 \pm 0/99^D$	$77/21 \pm 2/84^C$	$81/98 \pm 1/68^B$
LGG	$100 \pm 1/61^A$	$53/25 \pm 0/78^D$	$70/10 \pm 2/49^C$	$83/48 \pm 0/23^B$

SJ06 و SZ19: سویه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده از شیر الاغ؛ SS39، SP56 و SN98: سویه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده از شیر شتر؛ LGG: سویه لاکتوباسیلوس پروبیوتیک استاندارد. *حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میان میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 در رقت‌های مختلف عصاره سلولی سویه لاکتوباسیلوس است ($P < 0.05$).

جدول شماره ۵. تأثیر رقت‌های مختلف عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293

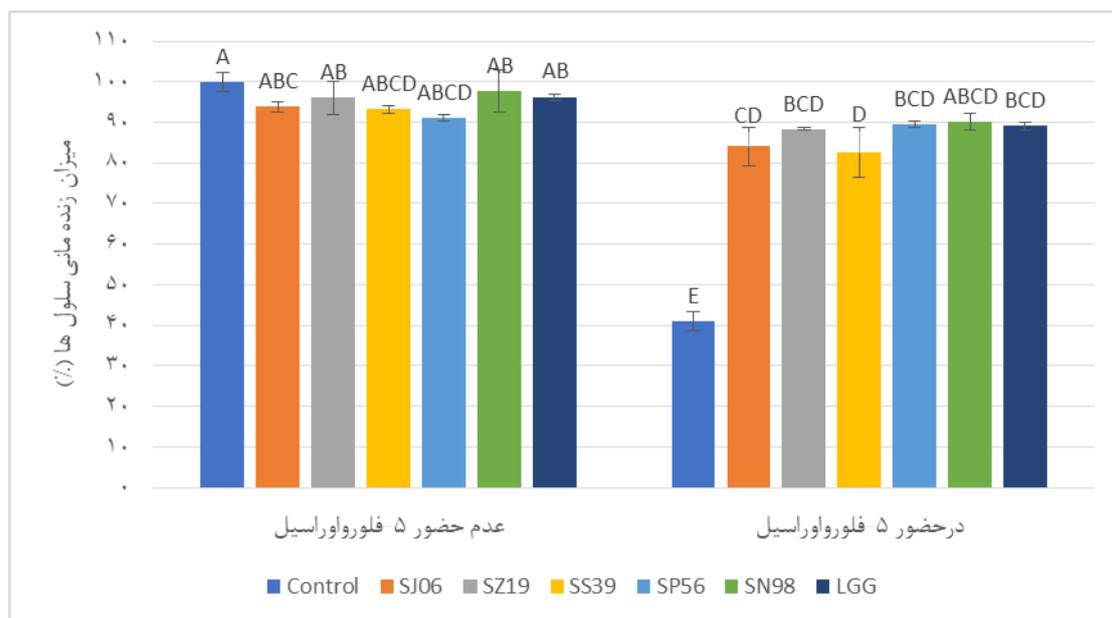
سویه‌ها	رقت‌های عصاره سلولی			
	۰	۱:۱۰	۱:۱۰۰	۱:۱۰۰۰
SJ06	$100 \pm 2/83^A$	$93/84 \pm 1/33^A$	$98/94 \pm 3/67^A$	$100/70 \pm 3/62^A$
SZ19	$100 \pm 2/83^A$	$96/01 \pm 4/02^A$	$98/94 \pm 5/92^A$	$100/35 \pm 4/83^A$
SS39	$100 \pm 2/83^A$	$92/32 \pm 0/97^A$	$97/30 \pm 2/60^A$	$100/70 \pm 3/62^A$
SP56	$100 \pm 2/83^A$	$91/14 \pm 4/06^A$	$99/35 \pm 4/40^A$	$100/94 \pm 2/86^A$
SN98	$100 \pm 2/83^A$	$97/71 \pm 5/15^A$	$99/24 \pm 2/75^A$	$100/53 \pm 5/40^A$
LGG	$100 \pm 2/83^A$	$96/25 \pm 0/80^A$	$100/29 \pm 3/20^A$	$100/62 \pm 2/45^A$

SJ06 و SZ19: سویه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده از شیر الاغ؛ SS39، SP56 و SN98: سویه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده از شیر شتر؛ LGG: سویه لاکتوباسیلوس پروبیوتیک استاندارد. *حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میان میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 در رقت‌های مختلف عصاره سلولی سویه لاکتوباسیلوس است ($P < 0.05$).

سلول‌های HEK-293 نشده است. در حضور FU-5 نیز، درحالی‌که میزان زنده‌مانی نمونه کنترل مثبت به‌طور معنیداری کاهش یافته و از ۱۰۰ درصد به ۴۰/۹۱ درصد رسیده بود، سلول‌های تیمار شده با FU-5 و عصاره سلولی سویه لاکتوباسیلوس به‌طور معنیداری میزان زنده‌مانی بالاتری را در مقایسه با FU-5 نشان دادند ($P < 0.05$) (شکل شماره ۱). سمت چپ؛ بنابراین به‌طور کلی، افزودن عصاره سلولی سویه لاکتوباسیلوس به‌تنهایی تأثیر معنی‌داری بر کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 ندارد. با این حال، هنگامی‌که سلول‌های HEK-293 با عصاره سلولی سویه لاکتوباسیلوس و FU-5 تیمار شدند، عصاره سلولی توانست آثار سایتوتوکسیک FU-5 بر سلول‌های HEK-293 را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد.

نتایج نشان داده‌اند که افزودن عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس (به‌تنهایی) و FU-5 (به‌تنهایی) به‌طور معنیداری موجب کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 شده است ($P < 0.05$). بررسی افزودن همزمان FU-5 و عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس می‌تواند به‌طور معنیداری موجب کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 شود ($P < 0.05$). مقایسه میان عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس نیز نشان داد، در حالتی که FU-5 به محیط اضافه نشده باشد، میان عصاره سلولی سویه‌های جداسازی شده از شیر الاغ، شتر و پروبیوتیک استاندارد لاکتوباسیلوس / رامنوسوس GG تفاوتی معنیداری وجود ندارد (شکل شماره ۱). سمت راست).

افزودن عصاره سلولی سویه لاکتوباسیلوس (به‌تنهایی) باعث کاهش معنی‌داری بر میزان زنده‌مانی



شکل شماره ۱. تأثیر عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس و ۵-فلورواوراسیل بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 (سمت راست) و HEK-293 (سمت چپ). SJ06، SJ06، SZ19: SJ06 و SZ19: سویه‌های لاکتوباسیلوس جداشده از شیر الاغ؛ SS39، SP56 و SN98: سویه‌های لاکتوباسیلوس جداشده از شیر شتر؛ LGG: سویه لاکتوباسیلوس پروبیوتیک استاندارد. *حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار میان نمونه‌ها است ($P < 0.05$).

سیتوتوکسیک این سویه‌ها به‌تنهایی و به همراه داروی شیمی‌درمانی ۵-فلورواوراسیل روی دو رده سلولی HT-29 و HEK-293 بررسی گردیدند و با سویه پروبیوتیک استاندارد لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG مقایسه شدند.

تحمل شرایط اسیدی معیار مهمی برای تأیید زنده بودن و فعالیت سویه‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارش است (۱۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سویه‌های لاکتوباسیلوس می‌توانند در pHهای مختلف، از ۳ تا ۸ رشد کنند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که گونه‌های لاکتوباسیلوس جداشده قادر به تحمل محیط‌های بسیار اسیدی و بازی هستند؛ بنابراین، می‌توان آن‌ها را به‌عنوان سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک مقاوم به اسید در نظر گرفت (۱۶)، (۱۵).

توانایی جلوگیری از رشد پاتوژن‌های باکتریایی را می‌توان با تولید مواد ضد میکروبی توضیح داد (۱۷). بر اساس مشاهدات این مطالعه، سوپرناتانت همه سویه‌های بررسی شده با pH اولیه خود، فعالیت ضد میکروبی متوسطی نشان دادند. مطابق با نتایج سایر مطالعات (۱۷، ۱۸) و همان‌طور که انتظار می‌رفت، سوپرناتانت این سویه‌ها قادر به جلوگیری از رشد

بحث و نتیجه‌گیری

راهبردهای نوین درمانی برای مقابله با عوارض جانبی و بهبود پاسخ به درمان سرطان اهمیت بسیاری دارند (۶، ۷). استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یک روش مکمل می‌تواند به افزایش اثربخشی شیمی‌درمانی و کاهش عوارض جانبی درمان‌های مرسوم کمک کند (۳، ۷). با توجه به اینکه در سلول‌های مختلف، مسیرهای متفاوتی در تنظیم تکثیر سلولی نقش دارند، آثار پروبیوتیک‌ها بر سلول‌های گوناگون می‌تواند متغیر باشد؛ همچنین گونه‌ها و جنس‌های مختلف پروبیوتیک ممکن است تأثیرات ایمنولوژیکی و فیزیولوژیکی متفاوتی در شرایط سرطانی گوناگون داشته باشند (۱).

در مطالعه حاضر، بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی، سویه‌ها به‌عنوان لیموسی لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتی‌پلانتی باسیلوس پلانتاروم (جداشده از شیر الاغ)، لاکتوباسیلوس هلویتیکوس، لاکتوباسیلوس گالیناروم و لاکتی‌پلانتی باسیلوس پلانتاروم (جداشده از شیر شتر) شناسایی شدند. فعالیت ضدسرطانی و

پاتوژن‌های بررسی شده بودند. اسید لاکتیک، به‌عنوان محصول اصلی تخمیر لاکتوباسیل‌ها، خواص بازدارندگی چشمگیری دارد (۱۹). اثر ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتر به متابولیت‌های مختلفی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین‌ها نسبت داده می‌شود (۱۹). میزان حساسیت سویه‌های لاکتوباسیلوس به ترکیبات آنتی‌بیوتیکی متداول و مرتبط با استفاده از روش انتشار از دیسک بررسی گردید. همه سویه‌ها به پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، ریفامپیسین و کلرامفنیکل حساس و نسبت به ونکومایسین و استرپتومایسین مقاوم بودند. هرچند سویه‌های لاکتوباسیلوس تاریخچه مصرف بسیار طولانی دارند؛ اما به علت شیوع مقاومت‌های دارویی، بررسی ایمنی و حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها امری ضروری است. مقاومت سویه‌های لاکتوباسیلوس به ونکومایسین پدیده‌ای مورد انتظار است. سر دی-آل‌آنین واحدهای پپتیدو گلیکان‌های واقع بر روی سمت سیتوپلاسمی دیواره سلولی لاکتوباسیل‌ها با دی-لاکتات یا دی-سرین جایگزین می‌شود و مانع از اتصال ونکومایسین و اعمال اثر آنتی‌بیوتیکی می‌گردد (۲۰). در واقع، آثار متفاوت آنتی‌بیوتیک‌ها روی گونه‌ها و سویه‌های مختلف جنس لاکتوباسیلوس بیشتر ناشی از موتاسیون‌های کروموزومی در ژنوم این باکتری‌ها است (۲۱).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که اثربخشی عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس (به‌تنهایی) و ۵-فلورواوراسیل (به‌تنهایی) به‌طور چشمگیری باعث کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 شد. علاوه بر این، آثار عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس به همراه ۵-فلورواوراسیل در کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 معنی‌دار بود، به‌طوری‌که تفاوت میان میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 در حضور عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس و ۵-فلورواوراسیل به‌طور معنی‌داری کمتر از میزان زنده‌مانی این سلول‌ها در حضور ۵-فلورواوراسیل (به‌تنهایی) بود.

عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس (به‌تنهایی) تأثیر معنی‌داری بر میزان کاهش زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 نداشت. در حضور ۵-فلورواوراسیل (به‌تنهایی)، میزان

زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 به‌طور چشمگیری کاهش یافت؛ اما میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 تیمار شده با عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس به همراه ۵-فلورواوراسیل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت؛ بنابراین، عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس هیچ تأثیر سایتوتوکسیک بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 ندارد و در عین حال، آثار سایتوتوکسیک ۵-فلورواوراسیل بر سلول‌های HEK-293 را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد.

در نهایت، عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس SJ06 و SZ19 جداسازی شده از شیر الاغ و سویه‌های SS39، SP56 و SN98 جداسازی شده از شیر شتر عملکردی مشابه با عصاره سلولی سویه لاکتوباسیلوس استاندارد LGG داشتند.

چنگ و همکاران در سال ۲۰۱۸، اثر ضد تکثیری عصاره سلولی سویه لاکتوباسیلوس پاراکاژی را بر سلول‌های سرطانی کولون بررسی کردند و نتایج نشان داد که این عصاره سلولی موجب کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولون شده است (۶). پژوهشگران دیگری نیز قابل توجه ضد تکثیری عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس را روی سلول‌های سرطانی کولون گزارش کرده‌اند (۲۳، ۲۲). علاوه بر این، در مطالعات دیگر مشاهده شده است که میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولون تیمار شده با عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس به همراه ۵-فلورواوراسیل بیشتر کاهش یافته و فعالیت ضد تکثیر همزمان آن‌ها به‌طور قابل توجهی بهتر از درمان با ۵-فلورواوراسیل به‌تنهایی بوده است (۲۴، ۶، ۵). نتایج مطالعه حاضر نیز تأیید کرد که میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولون HT-29 تیمار شده با عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس به همراه ۵-فلورواوراسیل بیشتر کاهش یافته و فعالیت ضد تکثیر همزمان آن‌ها به‌طور چشمگیری بهتر از درمان با ۵-فلورواوراسیل به‌تنهایی بوده است. ان و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که درمان ترکیبی داروی شیمی‌درمانی ۵-فلورواوراسیل و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس زنده‌مانی سلول‌های سرطانی کولون را مهار می‌کند و با القای فعالیت کاسپاز-۳ به مرگ سلولی منجر می‌شود؛ در نتیجه، این پروبیوتیک می‌تواند اثر

میتوکندری می‌شوند. این منافذ از طریق فعال‌سازی کاسپازها باعث القای آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 می‌شوند (۳۰-۲۸، ۵). پیتید لاکتوفرین که در عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس‌ها یافت می‌گردد، باعث مهاجرت سلول‌های سرطانی، القای آپوپتوز و مهار چرخه سلولی می‌شود. خاصیت ضدسرطانی لاکتوفرین به اتصال الکترواستاتیکی ناحیه کاتیونی N-ترمینال آن به مولکول‌های اسیدی مانند اسیدهای سیالیک، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و پروتئوگلیکان‌ها نسبت می‌دهند که به‌طور فراوان در سطح سلول‌های سرطانی بیان می‌گردند (۳۰).

همه سویه‌های لاکتوباسیلوس مطالعه‌شده خواص پتانسیل پروبیوتیکی را نشان دادند. عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس تأثیر سایتوتوکسیک بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 ندارد؛ اما می‌تواند به‌اندازه ۵- فلورواوراسیل میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 را کاهش دهد. استفاده هم‌زمان از ۵-فلورواوراسیل و عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس می‌تواند اثر سایتوتوکسیک ۵- فلورواوراسیل بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 را کاهش دهد و در نتیجه، بر زنده‌مانی بیفزاید. در عین حال، عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس به همراه ۵- فلورواوراسیل موجب کاهش بیشتر میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 شد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که عصاره سلولی سویه‌های لاکتوباسیلوس ممکن است به‌عنوان یک درمان کمکی بالقوه ضدسرطان عمل کنند. با این حال، مطالعات بیشتری درباره این سویه‌های لاکتوباسیلوس مورد نیاز است تا بتوان آن را به‌عنوان یک راهبرد جدید برای درمان کمکی سرطان در نظر گرفت.

سپاس‌گزاری

مقاله حاضر از رساله دکتری نوشته ساناز سالک مستخرج شده است. نویسندگان این مقاله از حمایت علمی و اداری دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز از این طرح تشکر می‌کنند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافع

درمانی داروی ۵-فلورواوراسیل در سرطان کولون را تقویت کند و به کاهش این نوع سرطان کمک نماید (۲۵). در پژوهش جم و همکاران، اثر ضدسرطانی سویه لاکتوباسیلوس پاراکازئی به همراه ۵-فلورواوراسیل بر موش‌های مبتلا به سرطان کولون نشان داد که درمان ترکیبی این دو موجب کاهش معنی‌دار اندازه و تعداد تومورها و افزایش تعداد کل سلول‌های آپوپتوز شده است (۲۴).

در مقابل، در مطالعات دیگر نشان داده شده است که میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 توسط لاکتوباسیل‌ها کاهش نمی‌یابد و لاکتوباسیل‌ها هیچ‌گونه اثر سیتوتوکسیکی بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 نشان نمی‌دهند (۲۷، ۲۶، ۲۲). نتایج مطالعه حاضر تأیید کرد که سویه‌های لاکتوباسیل هیچ‌گونه اثر سیتوتوکسیکی بر میزان زنده‌مانی سلول‌های غیرسرطانی HEK-293 ندارند.

نتایج مطالعات نشان می‌دهد که خواص ضدتکثیری و ضدسرطانی سویه‌های لاکتوباسیل را می‌توان به پروتئین‌های فعال، اسیدهای چرب زنجیره کوتاه و باکتریوسین‌هایی که تولید می‌کنند، نسبت داد که قادر به تحریک آپوپتوز سلول‌های تومور هستند و فعالیت ضدتکثیری از خود نشان می‌دهند؛ همچنین احتمال می‌رود که لاکتوباسیلوس‌ها بتوانند میزان آپوپتوز سلول‌های HT-29 را افزایش دهند که ناشی از ۵-فلورواوراسیل است و پروتئین‌های پروآپوپتوتیک را فعال می‌کند (۲۸).

در مطالعات آزمایشگاهی و نمونه‌های حیوانی نیز نشان داده شده است که ۵-فلورواوراسیل و پروبیوتیک‌ها به‌طور چشمگیری بیان پروتئین‌های پروآپوپتوتیک Bax، Bid، Bad و Bak را در سلول‌های HT-29 تحریک و در عین حال پروتئین‌های ضدآپوپتوتیک Bcl-2 و Bcl-XL را مهار می‌کنند. به‌طور کلی، نتایج مطالعات نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها قادر به القای آپوپتوز ذاتی از طریق افزایش بیان کاسپاز-۹، کاسپاز-۳ و پروتئین‌های پروآپوپتوتیک و کاهش بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوتیک در سلول‌های HT-29 هستند. لاکتوباسیلوس‌ها با تولید باکتریوسین و اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه باعث ایجاد منفذ روی غشا سیتوپلاسمی و

با افراد یا سازمان‌های دیگر وجود ندارد.

کد اخلاق

این مطالعه مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز به شماره (IR.IAU.SHIRAZ.REC.1399.043) قرار گرفته است.

حمایت مالی

تحقیق حاضر بدون حمایت مالی از هیچ‌یک از مؤسسات یا سازمان‌ها و صرفاً با استفاده از هزینه‌های شخصی نویسندگان انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در طراحی و اجرای پژوهش، جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها، نگارش و تأیید نهایی مقاله مشارکت داشته‌اند.

References

- Kahouli I, Malhotra M, Westfall S, Alaoui-Jamali M, Prakash S. The potential of *Lactobacillus* probiotic treatments in colorectal cancer (CRC). *Cancer Res* 2017; 77:254-9. doi:10.1158/1538-7445.AM2017-254.
- Gonzalez-Vallinas M, Molina S, Vicente G, de la Cueva A, Vargas T, et al. Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacol Res* 2013; 72:61-8. doi: 10.1016/j.phrs.2013.03.010.
- Golkhalkhali B, Paliany AS, Chin KF, Rajandram R. The roles of adjuvant supplements in colorectal cancer patients on chemotherapy—reaping benefits from metabolic crosstalk. *Nutr Cancer* 2018; 70:184-91. doi:10.1080/01635581.2018.1412470.
- Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley EM. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25:4-15. doi:10.1111/nmo.12046.
- Budu O, Banciu C, Pinzaru I, Sarău C, Lighezan D, et al. A combination of two probiotics, *Lactobacillus sporogenes* and *Clostridium butyricum*, inhibits Colon Cancer Development: an in Vitro Study. *Microorganisms* 2022; 10:1-14. doi:10.3390/microorganisms10091692.
- Chang CY, Pan TM. Anticancer and antimigration effects of a combinatorial treatment of 5-fluorouracil and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 fermented skim milk extracts on colorectal cancer cells. *J Agric Food Chem* 2018; 66:5549-55. doi: 10.1021/acs.jafc.8b01445.
- Serban DE. Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Lett* 2014; 345:258-70. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.013.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of determinate bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore 1994; 786-8.
- Khorsandi A, Ziaee E, Shad E, Razmjooei M, Eskandari MH, et al. Antibacterial effect of essential oils against spoilage bacteria from vacuum-packed cooked cured sausages. *J Food Prot* 2018; 81:1386-93. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-474.
- Santini C, Baffoni L, Gaggia F, Granata M, Gasbarri R, et al. Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *Int J Food Microbiol* 2010;141: 98-108. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.039.
- Han D, Unno T, Jang J, Lim K, Lee SN, et al. The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animals, and birds in South Korea. *Int J Food Microbiol* 2011; 144:387-92. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.024.
- Saboori B, Shahidi F, Hedayati S, Javadmanesh A. Investigating the probiotic properties and antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from an Iranian fermented dairy product, kashk. *Foods* 2022; 11:1-13. doi: 10.3390/foods11233904.
- Helwig U, Lammers KM, Rizzello F, Brigidi P, Rohleder V, et al. *Lactobacilli*, *bifidobacteria* and *E. coli* nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12:5978-86. doi:10.3748/wjg.v12.i37.5978.
- Moazamian E, Bahador N, Azarpira N, Rasouli M. Anti-cancer parasporin toxins of new *Bacillus thuringiensis* against human colon (HCT-116) and blood (CCRF-CEM) cancer cell lines. *Curr Microbiol* 2018; 75:1090-98. doi:10.1007/s00284-018-1479-z.
- Belicová A, Mikulášová M, Dušínský R. Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza cheese. *Biomed Res Int* 2013; 2013:1-8. doi:10.1155/2013/760298.
- Azat R, Liu Y, Li W, Kayir A, Lin DB, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *J Zhejiang Univ Sci B* 2016; 17:597-609. doi:10.1631/jzus.B1500250.
- Owusu-Kwarteng J, Tano-Debrah K, Akabanda F, Jespersen L. Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough. *BMC Microbiol* 2015; 15:1-10. doi: 10.1186/s12866-015-0602-6.
- Bin Masalam MS, Bahieldin A, Alharbi MG, Al-Masaudi S, Al-Jaouni SK, et al. Isolation, molecular characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria in Saudi raw and fermented milk. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018; 2018:1-12. doi: 10.1155/2018/7970463.
- Servin AL. Antagonistic activities of *lactobacilli* and *bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28:405-40. doi: 10.1016/j.femsre.2004.01.003.
- Goldstein EJ, Tyrrell KL, Citron DM. *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin Infect Dis* 2015;60: 98-107. doi.org/10.1093/cid/civ072.

21. Solieri L, Bianchi A, Mottolèse G, Lemmetti F, Giudici P. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by in vitro screening and principal component analysis. *Food Microbiol* 2014; 38:240-9. doi: 10.1016/j.fm.2013.10.003.
22. Nowak A, Zakłós-Szyda M, Rosicka-Kaczmarek J, Motyl I. Anticancer potential of post-fermentation media and cell extracts of probiotic strains: an in vitro study. *Cancers* 2022; 14:1-22. doi: 10.3390/cancers14071853.
23. Baghbani-Arani F, Asgary V, Hashemi A. Cell-free extracts of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* display antiproliferative and antioxidant activities against HT-29 cell line. *Nutr. Cancer* 2020; 72:1390-9. doi: 10.1080/01635581.2019.1685674.
24. Jam SA, Talebi M, Alipour B, Khosroushahi AY. The therapeutic effect of potentially probiotic *Lactobacillus paracasei* on dimethylhydrazine induced colorectal cancer in rats. *Food Biosci* 2021; 41:101097. doi: 10.1016/j.fbio.2021.101097.
25. An J, Ha EM. Combination therapy of *Lactobacillus plantarum* supernatant and 5-fluorouracil increases chemosensitivity in colorectal cancer cells. *J Microbiol Biotechnol* 2016; 26:1490-1503. doi:10.4014/jmb.1605.05024.
26. Karimi Ardestani S, Tafvizi F, Tajabadi Ebrahimi M. Heat-killed probiotic bacteria induce apoptosis of HT-29 human colon adenocarcinoma cell line via the regulation of Bax/Bcl2 and caspases pathway. *Hum Exp Toxicol* 2019; 38:1069-81. doi:10.1177/0960327119851255.
27. Manoharan M, Ragothaman P, Balasubramanian TS. Initiation of apoptotic pathway by the cell-free supernatant synthesized from *Weissella cibaria* through in-silico and in-vitro methods. *Appl Biochem Biotechnol* 2024; 196:4700-24. doi: 10.1007/s12010-023-04688-3.
28. Sankarapandian V, Venmathi Maran BA, Rajendran RL, Jogalekar MP, Gurunagarajan S, et al. An update on the effectiveness of probiotics in the prevention and treatment of cancer. *Life* 2022; 12:1-19. doi: 10.3390/life12010059.
29. Tang G, Zhang L. Update on strategies of probiotics for the prevention and treatment of colorectal cancer. *Nutr Cancer* 2022; 74:27-38. doi: 10.1080/01635581.2020.1865420.
30. Dos Reis SA, da Conceição LL, Siqueira NP, Rosa DD, da Silva LL, et al. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutr Res* 2017; 37:1-9. doi: 10.1016/j.nutres.2016.11.009.

doi:

2017; 37:1-9.
10.1016/j.nutres.2016.11.009.