Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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

Sanaz Salek [1], Elham Moazamian[1*], Afshin Mohammadi Bardbori [2], Seyedeh Azra Shamsdin [3]

[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] Gasteroenterohepatology 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

A B S T R A C T

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

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, 1x104 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 µg/ml (IC50) of 5-FU) for both cell lines.

Results

Based on morphological, biochemical, and molecular characteristics, *Lactobacillus* strains, including Limosi*lactobacillus 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 µg/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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIUMS

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

اثرات ضدسرطانی و ضدتکثیری درمان ترکیبی ۵–فلورواوراسیل با سویه‌های پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس* علیه سلول‌های سرطانی رودهٔ بزرگ

ساناز سالک [۱]، الهام معظمیان [۱*]، افشین محمدی بردبری [۲]، سیده عذرا شمس‌دین [۳]

[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

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

نویسنده مسئول:

الهام معظمیان

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

Email:
elhammoazamian@gmail.com

چکیده

مقدمه: اگرچه ۵–فلوراوراسیل 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 مطالعهٔ حاضر، اثر ضدسرطانی سویه‌های پتانسیل پروبیوتیکی جداشده از شیر الاغ، شتر و سویهٔ پروبیوتیک استاندارد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (LGG) GG علیه ردهٔ سرطانی کولون انسان HT-29 و نرمال کلیهٔ جنینی انسان HEK-293 به‌تنهایی و به همراه ۵–فلوراوراسیل 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 سویهٔ استاندارد پروبیوتیک LGG بر دو ردهٔ سلولی HT-29 و HEK-293 به‌تنهایی یا در ترکیب با ۵–FU 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: همهٔ سویه‌های *لاکتوباسیلوس* مطالعه‌شده خواص پتانسیل پروبیوتیکی را نشان دادند. ترکیب عصارهٔ سلولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* به همراه ۵–فلوراوراسیل به‌طور مؤثر میزان زنده ماندن سلول‌های HT-29 را کاهش داد؛ اما عصارهٔ سلولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* به همراه ۵–فلوراوراسیل می‌تواند اثر سیتوتوکسیک ۵–فلوراوراسیل بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 را کاهش دهد و درنتیجه، بر میزان زنده‌مانی بیفزاید.

بحث و نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهند، عصارهٔ سلولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* ممکن است به‌عنوان یک درمان کمکی بالقوهٔ ضدسرطان عمل کند. بااین‌حال، برای بررسی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* به‌عنوان راهبرد درمان کمکی سرطان، مطالعات بیشتری لازم است.

واژه‌های کلیدی: سرطان کولورکتال، *لاکتوباسیلوس*، پروبیوتیک، ۵–فلوراوراسیل، فعالیت ضدسرطانی

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

CC BY NC

حق‌مؤلف © نویسندگان

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-فلوراوراسیل (۵-Fluorouracil, 5-FU) یک داروی ضد نئوپلاستیک پرمصرف است که تأثیر فراوانی بر تقسیم سلول‌های تومور دارد. این دارو با هدف قرار دادن آنزیم تیمیدیلات سنتاز، رشد سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند و با ایجاد شکست در دو رشتهٔ DNA باعث توقف چرخهٔ 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 درنتیجه می‌تواند میزان مرگ‌ومیر در بیماران را افزایش دهد (۳، ۲)؛ بنابراین، توسعهٔ 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 میکروارگانیسم‌های 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 نئوپلاستیک، مانند اسهال و موکوزیت و غیره می‌شوند (۶، ۵، ۳، ۱).

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 زنجیرهٔ کوتاه، اسید لینولئیک کونژوگه و تعدیل ایمنی به حداقل برساند (۷).

بر اساس این سابقه، تحقیق دربارهٔ استفادهٔ بالقوهٔ باکتری‌های پروبیوتیک به‌عنوان یک درمان کمکی برای سرطان بسیار موجه به‌نظر می‌رسد. با توجه به اینکه گونه‌های خاص پروبیوتیکی آثار متفاوت ضدسرطان دارند، در مطالعهٔ حاضر، فعالیت ضدسرطانی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* پروبیوتیکی جداشده از شیر الاغ و شتر به‌تنهایی و به همراه داروی ۵-فلوراوراسیل بر دو ردهٔ سلولی آدنوکارسنوم کولونی HT- 29 و نرمال کلیهٔ جنینی انسان HEK-293 ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی سویه‌های *لاکتوباسیلوس*: در این مطالعهٔ آزمایشگاهی، هشت نمونه شیر از الاغ و شتر شیرده از مناطق شیراز، خرامه و زرقان جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها با استفاده از بطری‌های استریل‌شده جمع‌آوری و برای بررسی میکروبیولوژیکی به آزمایشگاه با جعبهٔ یخ منتقل شدند. نمونه‌ها تا شروع آنالیز در یخچال (حدود ۴ درجهٔ سانتی‌گراد) نگهداری گردیدند.

برای جداسازی *لاکتوباسیلوس*ها، ۱۰ میلی‌لیتر از هر نمونه شیر با ۹۰ میلی‌لیتر محلول فیزیولوژیکی استریل‌شده به مدت حدود ۳-۱ دقیقه به‌صورت استریل همگن شدند؛ سپس از پنج سری رقت سریالی تهیه‌شده (۱۰-۵- ۱۰-۱)، 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 درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند؛ سپس تک‌کلنی‌ها به‌طور تصادفی انتخاب و به‌منظور خالص‌سازی چندین بار روی محیط MRS آگار کشت گردیدند. کلنی‌هایی که مشخصات کلی *لاکتوباسیلوس*ها را نشان می‌دادند، از هر پلیت برای

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

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 تأییدشده در جنس لاکتوباسیل بر اساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها، تا سطح گونه شناسایی شدند (۸).

شناسایی مولکولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس*: برای تأیید نتایج خصوصیات بیوشیمیایی، همهٔ سویه‌های *لاکتوباسیلوس* از نظر S rRNA۱۶ تجزیه‌وتحلیل 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 ('F-5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ۳۲۷ و 'R-5' ACGGCTTACCTTGTTACGACTT ۳۱۴۹۲) صورت گرفت (۹). محصولات PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد تجزیه‌وتحلیل گردیدند؛ سپس محصولات خالص‌شده برای تعیین توالی به شرکت گروه ژنتیک کدون (تهران، ایران) ارسال شدند و نتایج با استفاده از نرم‌افزار BLAST در سایت NCBI Gen-Bank تجزیه‌وتحلیل گردیدند.

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

بررسی خواص ژلاتینازی و همولیتیکی: همهٔ 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، ونکومایسین (مهارکننده‌های سنتز دیوارهٔ سلولی)، ریفامپیسین (مهارکنندهٔ سنتز نوکلئیک‌اسید) وکلرامفنیکل، استرپتومایسین و تتراسایکلین (مهارکننده‌های سنتز پروتئین) بررسی گردیدند.

تهیهٔ عصارهٔ سلولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس*: سویهٔ استاندارد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG (ATCC 53103) از دانشگاه علوم پزشکی شیراز دریافت شد. سویه‌های جداسازی‌شده و سویهٔ 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 تازهٔ 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 دامنهٔ ۳۰ درصد و توان ۵ تا ۶ وات قرار گرفت. در مرحلهٔ بعد، سوسپانسیون‌ها مجدداً سانتریفوژ گردیدند (۸۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه) و سوپرناتانت حاصل (عصارهٔ 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. ردهٔ سلولی HT-29 در محیط کشت RPMI 1640 (گیبکو، آمریکا، سری ساخت ۷۲۴۰۰۰۲۱) و ردهٔ 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 درجهٔ سانتی‌گراد، در اتمسفر حاوی ۵ درصد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد رطوبت گرمخانه‌گذاری شدند.

بررسی میزان زنده‌مانی سلولی با آزمون MTT: برای تعیین نیمهٔ حداکثر غلظت بازدارندگی IC50 (Half maximal inhibitory concentration) داروی ۵-FU، تعداد ۱×۱۰۴ سلول HT-29 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسید کربن گرمخانه‌گذاری شدند؛ سپس با غلظت‌های مختلف ۵-FU (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 تجزیه‌وتحلیل شد.

برای به‌دست آوردن بهترین رقت مؤثر عصارهٔ سلولی سویهٔ باکتریایی، در ابتدا سه رقت سریالی (۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰) از عصارهٔ 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 عصارهٔ سلولی سویه تیمار شد و پس از گرمخانه‌گذاری شبانه، تست MTT انجام گردید. درنهایت، از رقت مؤثر و بهینهٔ ۱:۱۰ عصارهٔ 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 (عصارهٔ سلولی و ۵-FU + 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 سلول‌ها، تست MTT انجام گردید. جذب رنگ تبدیل‌شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الیزا ریدر (BioTek,USA) اندازه‌گیری شد و میزان زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه گردید (۱۴).

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به‌صورت 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 کمیتهٔ 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 سویهٔ *لاکتوباسیلوس* از نمونه‌های شیر الاغ و شتر جداسازی شد؛ همچنین از سویهٔ پروبیوتیک استاندارد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG (LGG) به‌منظور مقایسهٔ ویژگی‌های پروبیوتیکی با سویه‌های وحشی استفاده گردید. با توجه به رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش‌ها بیوشیمیایی، این میکروارگانیسم‌ها گرم مثبت، غیرمتحرک، میله‌ای شکل، کاتالاز و اکسیداز منفی بودند و بنابراین، به‌عنوان *لاکتوباسیلوس* شناسایی شدند. تست‌های رشد در pH: ۳،۴،۷،۸ و همچنین تولید گاز دی‌اکسید کربن از قند گلوکز برای تعیین نوع تخمیر (همو یا هتروفرمنتیتیو) به‌عنوان تست‌های تأییدی انجام گردید. در پایان، شناسایی جدایه‌ها بر اساس پروفایل تخمیر کربوهیدرات‌ها تا سطح گونه انجام شد (جدول شمارهٔ ۱).

جدول شماره ۱. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

رنگ‌آمیزی گرم	+	+	+	+	+
کاتالاز	–	–	–	–	–
اکسیداز	–	–	–	–	–
همو/ هتروفرمنتاتیو	هتروفرمنتاتیو	هتروفرمنتیتیو	هموفرمنتاتیو	هموفرمنتاتیو	هتروفرمنتاتیو
تولید گاز از گلوکز	+	+	–	–	+
pH3 رشد در	+	+	+	+	+
pH4رشد در	+	+	+	+	+
pH7رشد در	+	+	+	+	+
pH8رشد در	+	+	+	+	+
گلوکز	+	+	+	+	+
مانوز	+	+	+	–	+
فروکتوز	+	+	+	+	+
لاکتوز	+	+	+	+	+
آرابینوز	+	+	–	–	+
گالاکتوز	+	+	+	+	+
مالتوز	+	+	+	+	+
سوکروز	+	+	–	+	+
زایلوز	+	–	–	+	–
ترهالوز	+	+	+	+	+

ثبت (+)، منفی (–)

شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش مولکولی: نتایج تجزیه‌وتحلیل مقایسه‌ای ژن S rRNA۱۶ نشان داد که هر پنج جدایه متعلق به جنس *لاکتوباسیلوس* هستند (جدول شمارهٔ ۲).

جدول شماره ۲. نتایج شناسایی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* بر اساس توالی ژن S rRNA۱۶

کد ایزوله	شمارهٔ دسترسی ایزوله	نتیجهٔ توالی‌یابی 16S rRNA	مشابهت (درصد)
SJ06	OQ311327	Limosi*lactobacillus* fermentum	۱۰۰
SZ19	OQ311328	Lactiplantibacillus plantarum	۱۰۰
SS39	OQ311329	*Lactobacillus* helveticus	۱۰۰
SP56	OQ311330	*Lactobacillus* gallinarum	۱۰۰
SN98	OQ311331	Lactiplantibacillus plantarum	۱۰۰

مقادیر شباهت با استفاده از نرم‌افزار BLAST در سایت GenBank تعیین شد.

خواص ضدمیکروبی: فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های لاکتوباسیلوس با استفاده از روش انتشار چاهک آگار علیه سویه‌های پاتوژن *اشریشیا کلی* ATCC 25922 و *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 بررسی گردید. بر اساس مشاهدات، سوپرناتانت همهٔ سویه‌های بررسی‌شده فعالیت ضدمیکروبی متوسطی را نشان دادند (جدول شمارهٔ ۳).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

جدول شماره ۳. قطر هالهٔ بازدارنده (میلی‌متر) سوپرناتانت‌های سویه‌های *لاکتوباسیلوس* در برابر پاتوژن‌ها

پاتوژن	قطر هالهٔ بازدارنده (میلی‌متر)					
	SJ06	SZ19	SS39	SP56	SN98	LGG
E. coli ATCC 25922	۱۷	۱۴	۱۹	۱۸	۱۴	۱۵
S. aureus ATCC 25923	۱۴	۱۲	۲۰	۱۶	۱۳	۱۵

خواص ژلاتینازی و همولیتیکی: بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، هیچ‌یک از سویه‌های *لاکتوباسیلوس* در محیط غنی‌شده با ژلاتین، اطراف کلنی هالهٔ شفاف ایجاد نکردند و قادر به هیدرولیز ژلاتین نبودند. سویه‌های SZ19 و SN98 آلفا-همولیتیک بودند، درحالی‌که سویه‌های SS39،SP56 و LGG فعالیت گاما-همولیتیکی از خود نشان دادند.

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها: میزان حساسیت سویه‌های لاکتوباسیلوس به ترکیبات آنتی‌بیوتیکی متداول و مرتبط با استفاده از روش انتشار از دیسک بررسی شد (۱۲). همهٔ سویه‌ها به پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، ریفامپیسن و کلرامفنیکل حساس و نسبت به ونکومایسین و استرپتومایسین مقاوم بودند.

میزان زنده‌مانی سلولی با روش MTT: ارزیابی IC50 داروی FU-۵ با استفاده از روش MTT انجام گردید. نتایج نشان می‌دهد که غلظت µg/ml50 از FU-۵ برای به‌دست آوردن IC50 روی ردهٔ سلول‌های HT-29 مورد نیاز است که همین غلظت از FU-۵ باعث رسیدن میزان زنده‌مانی در سلول‌های HEK-293 به ۴۱/۲۷ درصد شده است.

در این آزمون، سمیت سلولی ایجادشده توسط عصارهٔ سلولی سویهٔ *لاکتوباسیلوس* به‌تنهایی و همراه با FU-۵ روی رده‌های سلولی HT-29 و HEK-293 با روش MTT ارزیابی گردید. به‌طور خاص، سلول‌های HEK- 293 به‌عنوان سلول‌های طبیعی و غیرسرطانی استفاده شدند تا بتوان خواص سایتوتوکسیک و ضدسرطانی سویه‌ها را از یکدیگر تفکیک کرد. یافته‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که دربارهٔ رقت‌های نهایی مختلف عصارهٔ سلولی سویهٔ *لاکتوباسیلوس* (۱:۱۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۱۰۰۰)، کمترین میزان زنده‌مانی سلول HT-29 مربوط به رقت ۱:۱۰ آن بود که تفاوت این رقت با سایر رقت‌ها و با نمونهٔ کنترل معنیدار است ($P<0.05$) (جدول شمارهٔ ۴). ازآنجاکه رقت ۱:۱۰ عصارهٔ سلولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* بیشترین کاهش میزان زنده‌مانی در سلول‌های HT-29 را داشت و بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 تأثیر معنیداری نداشت، از رقت ۱:۱۰ عصارهٔ سلولی سویهٔ *لاکتوباسیلوس* برای آزمونهای بعدی استفاده شد (جدول‌های شمارهٔ ۴ و ۵).

جدول شماره ٤. تأثیر رقت‌های مختلف عصارهٔ سلولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29

سویه‌ها	رقت‌های عصارهٔ 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}

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

SN98	۱۰۰ ±۱/۶۱^{A}	۵۱/۹۶ ±۰/۹۹^{D}	۷۲/۲۱ ±۲/۸۴^{C}	۸۱/۹۸ ±۱/۶۸^{B}
LGG	۱۰۰ ±۱/۶۱^{A}	۵۳/۲۵ ±۰/۷۸^{D}	۷۰/۱۰ ±۲/۴۹^{C}	۸۳/۴۸ ±۰/۲۳^{B}

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

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

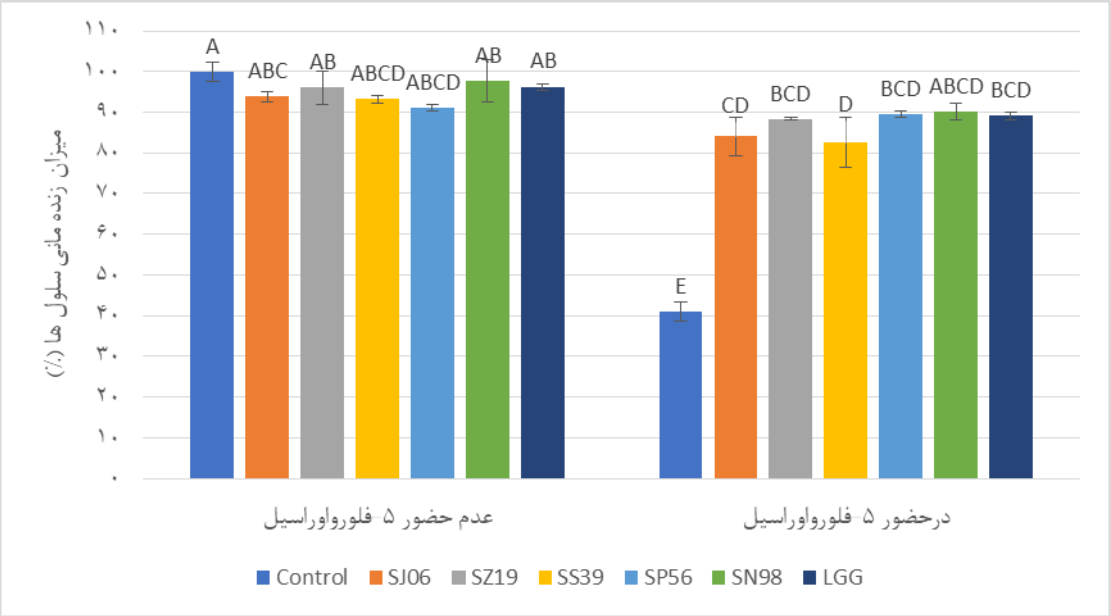
سویه‌ها	رقت‌های عصارهٔ سلولی			
	۰	۱:۱۰	۱:۱۰۰	۱:۱۰۰۰
SJ06	۱۰۰ ±۲/۸۳^{A}	۹۳/۸۴ ±۱/۳۳^{A}	۹۸/۹۴ ±۳/۶۷^{A}	۱۰۰/۷۰ ±۳/۶۲^{A}
SZ19	۱۰۰ ±۲/۸۳^{A}	۹۶/۰۱ ±۴/۰۲^{A}	۹۸/۹۴ ±۵/۹۲^{A}	۱۰۰/۳۵ ±۴/۸۳^{A}
SS39	۱۰۰ ±۲/۸۳^{A}	۹۲/۳۲ ±۰/۹۷^{A}	۹۷/۳۰ ±۲/۶۰^{A}	۱۰۰/۷۰ ±۳/۶۲^{A}
SP56	۱۰۰ ±۲/۸۳^{A}	۹۱/۱۴ ±۴/۰۶^{A}	۹۹/۳۵ ±۴/۴۰^{A}	۱۰۰/۹۴ ±۲/۸۶^{A}
SN98	۱۰۰ ±۲/۸۳^{A}	۹۷/۷۱ ±۵/۱۵^{A}	۹۹/۲۴ ±۲/۷۵^{A}	۱۰۰/۵۳ ±۵/۴۰^{A}
LGG	۱۰۰ ±۲/۸۳^{A}	۹۶/۲۵ ±۰/۸۰^{A}	۱۰۰/۲۹ ±۳/۲۰^{A}	۱۰۰/۶۲ ±۲/۴۵^{A}

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

نتایج نشان داده‌اند که افزودن عصارهٔ سلولی سویه‌های لاکتویاسیلوس (به‌تنهایی) و FU-۵ (به‌تنهایی) به‌طور معنیداری موجب کاهش میزان زندهمانی سلولهای HT-29 شده است (P<0.05). بررسی افزودن همزمان FU-۵ و عصارهٔ سلولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* میتواند به‌طور معنیداری موجب کاهش میزان زندهمانی سلولهای HT-29 شود (P<0.05). مقایسهٔ میان عصارهٔ سلولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* نیز نشان داد، در حالتی که FU-۵ به محیط اضافه نشده باشد، میان عصارهٔ سلولی سویه‌های جداسازی‌شده از شیر الاغ، شتر و پروبیوتیک استاندارد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG تفاوتی معنیداری وجود ندارد (شکل شمارهٔ ۱. سمت راست).

افزودن عصارهٔ سلولی سویهٔ *لاکتوباسیلوس* (به‌تنهایی) باعث کاهش معنی‌داری بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 نشده است. در حضور FU-۵ نیز، درحالی‌که میزان زندهمانی نمونهٔ کنترل مثبت به‌طور معنیداری کاهش یافته و از ۱۰۰ درصد به ۴۰/۹۱ درصد رسیده بود، سلولهای تیمارشده با FU-۵ و عصارهٔ سلولی سویهٔ *لاکتوباسیلوس* به‌طور معنیداری میزان زنده‌مانی بالاتری را در مقایسه با FU-۵ نشان دادند (P<0.05) (شکل شمارهٔ ۱. سمت چپ)؛ بنابراین به‌طورکلی، افزودن عصارهٔ سلولی سویهٔ *لاکتوباسیلوس* به‌تنهایی تأثیر معنی‌داری بر کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 ندارد. بااین‌حال، هنگامی‌که سلول‌های HEK- 293 با عصارهٔ سلولی سویهٔ *لاکتوباسیلوس* و FU-۵ تیمار شدند، عصارهٔ سلولی توانست آثار سایتوتوکسیک FU-۵ بر سلول‌های HEK-293 را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]



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

بحث و نتیجه‌گیری

راهبردهای نوین درمانی برای مقابله با عوارض جانبی و بهبود پاسخ به درمان سرطان اهمیت بسیاری دارند (۷، ۶). استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یک روش مکمل می‌تواند به افزایش اثربخشی شیمی‌درمانی و کاهش عوارض جانبی درمان‌های مرسوم کمک کند (۷، ۳). 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 ایمونولوژیکی و فیزیولوژیکی متفاوتی در شرایط سرطانی گوناگون داشته باشند (۱).

در مطالعهٔ 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 سیتوتوکسیک این سویه‌ها به‌تنهایی و به همراه داروی شیمی‌درمانی ۵-فلوراوراسیل روی دو ردهٔ سلولی HT-29 و HEK-293 بررسی گردیدند و با سویهٔ 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 مطالعهٔ 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 ضدمیکروبی توضیح داد (۱۷). بر اساس مشاهدات این مطالعه، سوپرناتانت همهٔ سویه‌های بررسی‌شده با pH اولیهٔ خود، فعالیت ضدمیکروبی متوسطی نشان دادند. مطابق با نتایج سایر مطالعات (۱۸، ۱۷) و همان‌طور که انتظار می‌رفت، سوپرناتانت این سویه‌ها قادر به جلوگیری از رشد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

پاتوژن‌های بررسی‌شده بودند. اسید لاکتیک، به‌عنوان محصول اصلی تخمیر لاکتوباسیل‌ها، خواص بازدارندگی چشمگیری دارد (۱۹). اثر ضدمیکروبی 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. همهٔ سویه‌ها به پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، ریفامپیسین و کلرامفنیکل حساس و نسبت به ونکومایسین و استرپتومایسین مقاوم بودند. هرچند سویه‌های *لاکتوباسیلوس* تاریخچهٔ 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-آلانین واحدهای پپتیدوگلیکان‌های واقع بر روی سمت سیتوپلاسمی دیوارهٔ سلولی لاکتوباسیل‌ها با دی-لاکتات یا دی-سرین جایگزین می‌شود و مانع از اتصال ونکومایسین و اعمال اثر آنتی‌بیوتیکی می‌گردد (۲۰). درواقع، آثار متفاوت آنتی‌بیوتیک‌ها روی گونه‌ها و سویه‌های مختلف جنس *لاکتوباسیلوس* بیشتر ناشی از موتاسیون‌های کروموزومی در ژنوم این باکتری‌ها است (۲۱).

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

عصارهٔ سلولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* (به‌تنهایی) تأثیر معنی‌داری بر میزان کاهش زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 نداشت. در حضور ۵-فلوراوراسیل (به‌تنهایی)، میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 به‌طور چشمگیری کاهش یافت؛ اما میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 تیمارشده با عصارهٔ سلولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* به همراه ۵-فلوراوراسیل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت؛ بنابراین، عصارهٔ سلولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* هیچ تأثیر سایتوتوکسیک بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HEK-293 ندارد و در عین حال، آثار سایتوتوکسیک ۵-فلوراوراسیل بر سلول‌های HEK-293 را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد.

درنهایت، عصارهٔ سلولی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* SJ06 و SZ19 جداسازی‌شده از شیر الاغ و سویه‌های SS39، SP56 و SN98 جداسازی‌شده از شیر شتر عملکردی مشابه با عصارهٔ سلولی سویهٔ *لاکتوباسیلوس* استاندارد LGG داشتند.

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

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 سویهٔ *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 داده‌شده 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 مطالعهٔ 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 *لاکتوباسیلوس*‌ها 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 داده‌شده 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. به‌طورکلی، 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. *لاکتوباسیلوس*‌ها با تولید باکتریوسین و اسیدهای چرب با زنجیرهٔ کوتاه باعث ایجاد منفذ روی غشا سیتوپلاسمی و میتوکندری می‌شوند. این منافذ از طریق فعال‌سازی کاسپازها باعث القای آپوپتوز و توقف چرخهٔ سلولی در فاز G0/G1 می‌شوند (۳۰-۲۸، ۵). پپتید لاکتوفرین که در عصارهٔ سیتوپلاسمی *لاکتوباسیلوس*‌ها یافت می‌گردد، باعث مهاجرت سلول‌های سرطانی، القای آپوپتوز و مهار چرخهٔ سلولی می‌شود. خاصیت ضدسرطانی لاکتوفرین به اتصال الکترواستاتیکی ناحیهٔ 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).

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

سپاس‌گزاری

مقالهٔ حاضر از رسالهٔ دکتری نوشتهٔ 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manual of determinate bacteriology. Williams and Wilikins, Baltimore 1994; 786-8.
9. 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.
10. 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.
11. 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 KoreaInt. J Food Microbiol 2011; 144:387-92. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.024.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Belicová A, Mikulášová M, Dušinský 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]

21. Solieri L, Bianchi A, Mottolese 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, Zakłos-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-fluouracil 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-04-02]