Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics

تثبيط الخلايا السرطانية باستخدام الخلايا المقتولة حرارياً لبكتريا *Lactobacillus plantarum* المعزولة من مصادر غذائية مختلفة

قيثار رشيد مجيد[1]، ناهي ياسين يوسف[2]، فاطمة حسن أحمد[1]

1 قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة/ جامعة البصرة
2 المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية/ الجامعة المستنصرية

الخلاصة:

عزلت بكتريا Lactobacillus plantarum من عينات غذائية مختلفة و شملت (الموز و الطماطة و اللالنكي و اللبن الرائب المستورد) وتم الحصول على 23 عزلة وشخصت اعتماداً على الوسط الانتقائي MRS Agar وكذلك الفحوصات المظهرية واالمجهرية و الكيميوحيوية , اختبرت الفعالية المضادة للأكسدة لعزلة البكتريا الخام Lactobacillus plantarum وكانت افضل فعالية ضد الأكسدة هي فعالية العزلة (Lactobacillus plantarum yR1) المعزولة من اليوكرت المستورد إذ بلغت 47.12 , بينما أقل فعالية كانت من العزلة (Lactobacillus plantarum Mr3) المعزولة من اللالنكي أذ بلغت 14.61 , بالمقارنة بمضادات الأكسدة الصناعي BHT ومضاد الأكسدة الطبيعي α-tocopherol . إذ أظهرت النتائج أن الفعالية المضادة للأكسدة باستعمال المضاد الصناعي BHT بلغت 82.70% , في حين فعالية مضادة الأكسدة الطبيعية α-tocopherol هي و73.96% على التوالي . أختبر التأثير السمي للخلايا الميتة لبكتريا Lactobacillus plantarum في خطوط الخلايا السرطانية المدروسة والتي شملت خط خلايا عنق الرحم (Hela) ، والخط الطبيعي لخلايا الجرذ الجنينية مولدة الألياف الطبيعي (REF). اذ أستخدم في هذه الدراسة ستة تراكيز للخلايا الميتة وهي (93.5 و 187.5 و 375 و 750 و 1500 و 3000) مايكروغرام/ مليلتر . أظهرت النتائج أن الخلايا الميتة لبكتريا Lactobacillus plantarum والمعزولة من مصادر مختلفة لها تأثيرات واضحة في الخلايا السرطانية , واختلفت درجات التأثير باختلاف مصدر العزل , بالنسبة للخلايا الميتة المعزولة من اليوكرت المستورد فكانت أعلى نسبة تثبيط هي86.38% بعد مرور 24 ساعة , في حين لم يظهر أي تأثير سمي للخلايا الميتة في خط الخلايا الطبيعية REF بعده تعرضها لمدة 72 ساعة .

الكلمات الدالة : Lactobacillus plantarum , الخلايا المقتولة حراريا MTT , Hela , REF , HK))

المقدمة:

يعد السرطان أحد المسببات الرئيسية والمهمة على مستوى العالم في زيادة حالات الوفيات بين الأشخاص فهو لا يميز بين فئة عمرية وأخرى وكذلك الجنس . ومنذ تعرف الانسان على هذا المرض ولحد الآن , فهو ما زال التحدي الأكبر له . اذ بالرغم من وجود العديد من العلاجات المختلفة سواء الكيميائية والفيزيائية والجراحية , فأنها لم تستطع أن تحقق النتائج المرجوة كما انها لها أضرار جانبية . لذلك سعى الباحثون الى إيجاد طرائق علاجية جديدة وبديلة. ومن هذه البدائل قيام المختصين في مجال الأحياء المجهرية بمعالجة الأورام السرطانية وذلك عن طريق استخدام بكتريا حامض اللاكتيك التي تكون موجودة في الجهاز الهضمي للأنسان والتي قد تدخل عن طريق الأغذية ومنتجات الألبان وقد شجع الباحثون على دراسة صفاتها العلاجية وميكانيكية عملها وخصوصاً تأثيرها ضد سرطان القولون (1). ولم يقتصر استخدام البكتريا بشكلها الحيوي الكامل بل وجد ان الخلايا المقتولة حراريا (HKC) وأجزاء من بكتريا حامض اللاكتيك مثل جدار الخلية والبيتيدوكلايكان ومتعدد السكريات والسايتوبلازم لها تاثير Antiproliferative ـد خطوط الخلايا السرطانية للأنسان (2; 3; 4) . تميزت بكتريا Lacto-bacillus بأهميتها الطبية اذ وجد أن لها أثراً كبيراً في تعزيز صحة الأنسان . فقد أجريت العديد من البحوث في هذا المجال ودرس تأثير أنواعها المختلفة في عدد من الأخماج التي تسببها البكتريا كذلك بعض الطفيليات فضلا عن تأثيرها في الأورام السرطانية. إذ تمتلك تأثيراً قاتلاً للخلايا السرطانية داخل الجسم الحي وخارجه)5). وتعمل بكتريا المعززات الحيوية على تأخير تطور الأورام ونموها والوقاية من سرطان القولون من خلال فعلها المضاد للمواد المطفرة ، ويمكن ان يتم ذلك باكثر من آلية واحدة منها : المنع المباشر للمسرطنات ، و أدمصاصها الى بوليمرات الكاربوهيدرات الموجودة في الجدار الخلوي ومن ثم خفض امتصاصها وتنشيط الجهاز المناعي ، فضلاً عن تثبيط البكتريا المرضية (6; 7).

ووجد ان بكتريا حامض اللاكتيك المتواجدة في منتجات الالبان تستطيع التقليل من قابلية التطفير لبعض المطفرات مثل 1,2 dimethylhydrazine. وتمتلك البكتريا هذه القدرة على تثبيط نمو خلايا الاورام (Tumour cells) وخفض فعالية الانزيمات البكتيرية المسرطنة في القناة الهضمية(8). نظرا للاستخدامات الواسعة لبكتريا Lactobacillus في المجالات العديدة والمرتبطة بالأغذية وصحة الأنسان , وبسبب قلة الدراسات حول دور بكتريا L.plantarum في تثبيطها للخلايا السرطانية في العراق ولندرة الدراسات حول تأثير الخلايا الميتة لهذه البكتريا ارتأينا القيام بهذه الدراسة .

المواد وطرائق العمل:

أولاً : جمع العينات

تم جمع عينات غذائية مختلفة وشملت الموز و الطماطة و اللالنكي (اليوسفي) واللبن الرائب.

ثانياً : تجهيز العزلات

تم الحصول على العزلات البكتيرية من مصادر غذائية مختلفة وقد وضعت المواد الغذائية في أكياس البولي أثلين ونقلت الى المختبر لعزل بكتريا حامض

Corresponding address:
Kithar Rasheed Majeed
Department of Food Sciences/ College of Agriculture / University of Basrah
Email: kitharrasheed @yahoo.com

اللاكتيك , أستعمل الوسط الانتقائي MRS Agar المجهز من شركة Oxide لعزل بكتريا حامض اللاكتيك وحفظها. وأستخدم وسط MRS broth لتنمية بكتريا حامض اللاكتيك وتنشيطها .

ثالثاً : عزل البكتريا وتنقيتها

عزلت بكتريا حامض اللاكتيك باستعمال طريقة التخافيف العشرية وذلك بوضع 1 غم من المصادر الغذائية الصلبة في أنبوبة اختبار حاوية على 9 مل من MRS broth وحضنت بحرارة 37 مo لمدة 24 ساعة تحت ظروف لاهوائية باستعمال الحاوية اللاهوائية مع أكياس المولدة للغاز Gas back CO2 ثم أجريت سلسلة من التخافيف العشرية للعينات المزروعة باستعمال ماء البيتون ، ثم نقل 0.1 مل من كل تخفيف إلى أطباق بتري معقمة وصب فوقه وسط MRS Agar (المذاب) الخاص بالعزل بعدها حضنت بحرارة 37مo لمدة 48 ساعة . وبعد الحضن نقلت المستعمرات المعزولة إلى وسط MRS Agar لتنقيتها بطريقة التخطيط ، وحضنت بحرارة 37 مo لمدة 24 ساعة تحت ظروف لا هوائية مع متابعة النمو خلال هذه المدة (9 (10; . وشخصت اعتمادا على الوسط الانتقائي MRS Agar فقط الفحوصات المظهرية والفحوصات المجهرية والاختبارات الكيميوحيوية (11) .

رابعا: قياس الفعالية المضادة للأكسدة

أتبعت طريقة الثايوسيانات التي ذكرها (12) لقياس الفعالية المضادة لأكسدة حامض اللينوليك وكما يأتي : خلط 1 مل من كل عزلة محلية لبكتريا Lactobacillus plantarum والمعزولة من مصادر مختلفة ، مع 4 مل إيثانول تركيزه95 % و 4.1 مل حامض اللينوليك تركيزه2.5 % في الإيثانول و 8مل من محلول دارئ الفوسفات (المنظم) ذي تركيز 50 ملي مولاري وذي أس هيدروجيني 7, حضن الخليط في درجة حرارة 40 م لمدة 24 ساعة وأضيف 0.1 مل من هذا الخليط الى 9.7 مل كحول الإيثانول تركيزه 75 % و 0.1 مل من ثايوسيانات الأمونيوم تركيزه 30% ثم أضيف 0.1 مل من كلوريد الحديدوز تركيزه20 ملي مولاري محضر في 3.5% حامض الهيدروكلوريك الى خليط التفاعل لتكوين مركب معقد أحمر اللون مع البيروكسيدات الناتجة من الأكسدة . كما استعمل مضاد الأكسدة الصناعي BHT المذاب في الإيثانول النقي , ومضاد الأكسدة الطبيعي الفا – توكوفيورول المذاب في الهكسان كنماذج المقارنة , وحضرت العينة الضابطة بالطريقة نفسها أعلاه وذلك بخلط 1مل من خلات الأثيل بدلا من العينة , تم قياس الامتصاص للنماذج ونموذج العينة القياسي عند طول موجي 500 نانوميتر في جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer وتم حساب الفعالية المضادة لأكسدة حامض اللينوليك وفقا للمعادلة التالية :

الفعالية المضادة للأكسدة % = (1 - (قراءة الامتصاص للنموذج/ قراءة الامتصاص للعينة الضابطة))* 100

خامساً: الخلايا المقتولة حراريا ((HK

حضنت بكتريا Lactobacillus plantarum على درجة حرارة 37 مo لمدة (48-24) ساعة وفي ظروف لاهوائية تم بعدها عملية النبذ المركزي 3500 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة بدرجة 4 مo بعدها تم عزل الراشح عن الراسب وتم أخذ الراسب وأجري له عملية غسل مرتين باستخدام محلول الدارئ الفوسفات الملحي (PBS). المتوقع فيه عدد الخلايا 106-108) cfu) / مل وتم تسخين الخلايا البكتيرية عند درجة حرارة 95 مo لمدة ساعة واحدة . بعدها تم غسل الخلايا بمحلول الدارئ الفوسفات الملحي , ثم نبذه مركزياً بسرعة 3500 دورة لمدة 30 دقيقة بدرجة 4 مo. وضعت الخلايا ب 100مل محلول الدارئ الفوسفات الملحي لمدة 20 دقيقة ثم عوملت بجهاز ultrasonic بماء بارد لمدة دقيقة بدرجة 4 مo , جففت بعدها باستخدام جهاز التجفيد .(13).

سادساً: الفعالية المضادة للسرطان

الخطوط الخلوية Cell line

أستعمل كل من الخط الخلوي السرطاني لسرطان عنق الرحم (Hela) عند التمريرة (72) و خط الخلايا الطبيعية لجنين الجرذ (Rat Embryo) REF fibroblast عند التمريرة (58) من المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية (14) وتم تحضير المحاليل وفقاً لطريقة) 15) الخاصة بالزرع النسيجي وكما هو موضح أدناه :-

تحضير الوسط الزرعي RPMI 1640 وهذا الوسط مجهز بمادة glutamine ومادة Hepes buffer ويحضر كما يلي : يتم إضافة المواد التالية في دورق حجمي سعتة لتر واحد وتشمل 10.4غم من RPMI-1640 و15 مليلتر من بيكربونات الصوديوم و 10% من مصل جنين البقري (FCS) و ستربتومايسين 0.5 مل و البنسلين 0.5 مل , وحضنت في 5% من CO2 عند درجة حرارة 37 مo لمدة 24 ساعة , ثم تم عد الخلايا باستخدام 0.2 مل من محلول أزرق التريبان و 1.6 مل من محلول دارئ الفوسفات الملحي وعند تكون الطبقة الاحادية الكاملة(Confluent monolayer), وضع 002 مايكروليتر من عالق الخلايا في كل حفرة من حفر الطبق multi well plate 96 (عدد الخلايا السرطانية في كل حفرة ما يقارب 410 ×3خلية / حفرة) . تم تغطية الأطباق بأحكام باستخدام لاصق الشفاف (Para film) , وحضنت الأطباق في حاضنة بدرجة حرارة 37 مo لحين الحصول على طبقة مفردة من الخلايا في كل حفرة , بعد انتهاء مدة الحضن , تم التخلص من الوسط الزرعي القديم , وأضيف 0.2 ملليتر من التراكيز المحضرة سابقا من (الخلايا الميتة) وبواقع أربعة مكررات لكل تركيز , كما تم عمل 6 مكررات لسيطرة (خلايا مضاف اليها الوسط الخالي من المصل وبدون إضافة المستخلصات إلى السيطرة وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م لأوقات التعريض 24) Exposure time و 48 و72) ساعة في حاضنة مزودة ب 5% من غاز ثنائي أوكسيد الكاربون.

اختبار السمية

حضر مستخلص الخلايا الميتة للعزلات المحلية لبكتريا Lactobacillus plantarum وحضرت سته تراكيز مخففه بشكل مضاعف من مستخلص الخلايا الميتة وكانت التراكيز المحضرة كالآتي : (3000 و 1500 و750 و 375 و 187.5 و 93.75) مايكروغرام / ملليتير وتحت ظروف معقمة , استعملت جميع التراكيز مباشرة بعد إكمال عملية التحضير في تثبيط الخلايا السرطانية وفقاً لما ذكره (16) و (15) اذ يتم وضع 002 مايكروليتر من عالق الخلايا لكل من خلايا Hela , REF في كل حفرة من حفر الطبق multi well plate 96 . وبعد 24 ساعة من الحضانة يتم أضافة 200 مايكروليتر من الخلايا الميتة وبواقع اربع مكررات لكل تركيز , بعد ذلك حضنت الاطباق بدرجة 37 مo لأوقات التعريض Exposure time) 24 و 48 و 72) ساعة في حاضنة مزودة ب 5% من CO2 بعد أنتهاء وقت التعريض Exposure time المطلوب سحبت محتويات كل حفرة وصبغت الخلايا بصبغة MTT 3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5 diphenyltetra-zolium bromide]] وتركت لمدة ساعتين , بعدها تم أضافة 100 مايكروليتر من DMSO ووضع في حمام مائي هزاز بدرجة 37 مo مع الرج المستمر في حمام مائي هزاز لمدة 15 دقيقة . قرأت النتائج لكل طبق بأستخدام جهاز (ELISA) أستخدم هذا الجهاز لقراءة الأمتصاصية الطيفية على طول موجي 550 نانوميتر للخلايا الملتصقة في الطبق ومن ثم تحدد نسبة التثبيط الخلايا مقارنة مع السيطرة (العينة الضابطة) من خلال قراءة أمتصاصية الكثافة للضوئية في جهاز الأليزا وتحويلها الى نسب مئوية لأيجاد معدل التثبيط Inhibi-tory rate وحسب المعاملة الأتية :

معادلة التثبيط = ((متوسط العينة الضابطة– متوسط المعالجة)/ متوسط العينة الضابط)*100

التحليل الأحصائي

أستخدم البرنامج (17(2011) Genstat Release 10.3DE) في التحليل الأحصائي لدراسة تأثير التراكيز الخلايا الميتة المختلفة والاوقات (24 , 48 ، 72) ساعة في نسب التأثير في خطوط الخلايا المختلفة .

النتائج والمناقشة:

1 - عزل بكتريا Lactobacillus plantarum و قياس فعاليتها لمضادات الأكسدة

تم الحصول على 23 عزلة من بكتريا Lactobacillus plantarum شملت 4 عزلات من الموز و5 عزلات من الطماطة و 4 عزلات من اللالنكي و10 عزلات من اللبن الرائب , جميعها اخضعت لقياس فعاليتها لمضادات الأكسدة أذ يوضح الجدول (1) نتائج الفعالية المضادة للأكسدة في نظام تثبيط أكسدة حامض اللينوليك بفعل بكتريا Lactobacillus plantarum , وكانت أعلى فعالية مضادة للأكسدة بالنسبة للبكتريا المعزولة من اللبن الرائب (yR1) وهي 47.14% بينما كانت أقل فعالية مضادة للأكسدة بالنسبة البكتريا المعزولة من اللالنكي((Mr3وهي 14.61 % .

2 – الخلايا المقتولة حراريا ((HK

جدول (1) الفعالية المضادة للأكسدة في نظام تثبيط أكسدة حامض اللينوليك بفعل بكتريا Lactobacillus plantarum

ت	الرموز*	الفعالية المضادة للأكسده البكتريا٪	ت	الرموز*	الفعالية المضادة للأكسده البكتريا٪
1	B_2	29.7451	12	Mr_3	14.6125
2	B_3	32.2932	13	Mr_4	27.1450
3	B_6	32.6573	14	yR_1	47.1278
4	B_7	33.6973	15	yR_2	42.2483
5	T_1	38.2215	16	yR_3	22.5447
6	T_2	41.7576	17	yR_4	14.7004
7	T_3	40.8736	18	yR_5	31.4092
8	T_4	22.1008	19	yR_6	36.4014
9	T_5	26.3650	20	yR_7	27.1450
10	Mr_1	33.0733	21	yR_8	32.5533
11	Mr_2	30.4212	22	yR_9	28.9067
			23	yR_{10}	34.7745

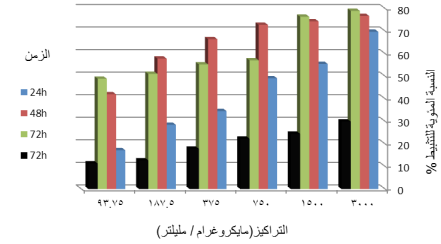
B2 * , 3B ,B6 , 7B (الموز) 1T,T2 , T3 , 4T, 5T (الطماطة) 1Mr ,2Mr ,3Mr, 4Mr (اللالنكي) yR1 ,yR2 , yR3 , yR4 , yR5 , yR6 , yR7 , yR8 , yR9 ,yR10 (اللبن الرائب)

تم اختبار التأثير السمي لتراكيز مختلفة للخلايا الميتة لبكتريا Lactobacillus plantarrum والتي أعطت أعلى فعالية مضادة للأكسدة في تثبيط نمو الخط الخلوي السرطاني HeLa والخط الطبيعي REF ولمدد زمنية مختلفة .

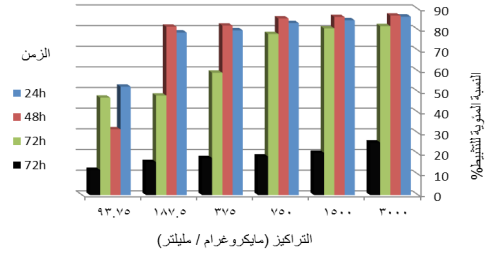
3- الفعالية المضادة للسرطان

التأثير السمي للخلايا الميتة لبكتريا L.plantarum في تثبيط الخط الخلوي السرطاني Hela والخط الطبيعي REF

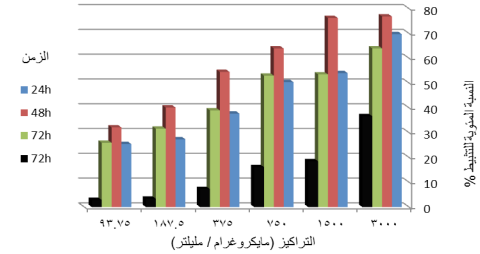
تمثل الاشكال من (1) الى (4) نتائج التأثير السمي لتراكيز مختلفة من الخلايا الميتة لبكتريا Lactobacillus plantarum والتي أعطت أعلى فعالية مضادة للأكسدة والمعزولة من مصادر مختلفة , في تثبيط الخط الخلوي السرطاني Hela ولمدد زمنية (24 و 48 و72) ساعة والخط الطبيعي REF ولمدة 72ساعة.



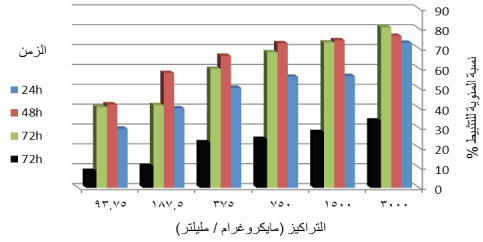
شكل (1): تأثير الخلايا الميتة لبكتريا Lactobacillus plantarum المعزولة من الموز في نمو خط الخلايا السرطانية HeLa ولمدد زمنية مختلفة (24 , 48 , 72) ساعة والخط الطبيعي REF خلال72 ساعة



شكل (2) : تأثير الخلايا الميتة من بكتريا Lactobacillus plantarum المعزولة من مصدر اللبن الرائب المستورد في نمو خط الخلايا السرطانية HeLa ولمدد زمنية مختلفة (24 , 48 , 72) والخط الطبيعي REF خلال 72 ساعة



شكل (3): تأثير الخلايا الميتة من بكتريا Lactobacillus plantarum المعزولة من مصدر اللالنكي في نمو خط الخلايا السرطانية HeLa ولمدد زمنية مختلفة (24 , 48 , 72) والخط الطبيعي REF خلال 72 ساعة



شكل (4) : تأثير الخلايا الميتة من بكتريا Lactobacillus plantarum المعزولة من مصدر الطماطة في نمو خط الخلايا السرطانية HeLa ولمدد زمنية مختلفة (24 , 48 , 72) والخط الطبيعي REF خلال 72 ساعة

أظهرت النتائج المتمثلة في الاشكال السابقة من شكل (1) الى شكل (4) عدم ظهور تأثيرات واضحة على الخط الخلوي الطبيعي REF وبمختلف التراكيز المستخدمة للخلايا الميتة وكذلك أختلاف أوقات التعريض، فقد كانت نسبة التثبيط واطئة جدا مقارنة مع الخطوط الخلوية السرطانية وبمستوى أهمية0.05 P < . أذ كانت أعلى نسبة للتأثير السمي هو 33.88 % بالنسبة للخلايا الميته لبكتريا L.plantarum المعزولة من الطماطة وهذه النسب من التأثير ليس ذي اهمية كونها أقل من نسبة 50% فيمكن اعتبارها كأنها لم تؤثر اصلا , وهذه الميزة مهمة جدا في التقليل من التأثيرات الجانبية التي قد تحدثها بعض العلاجات المستخدمة في تثبيط الخلايا السرطانية والتي تعمل على قتل الخلايا الطبيعية أيضا والتي تعمل على حدوث مضاعفات خطرة على الاشخاص المرضى وبالتالي تقلل من فرص العلاج الناجح. لوحظ من خلال النتائج أيضا أن الخلايا الميتة قد أعطت تأثيرات تثبيطية سمية لخطوط الخلايا السرطانية وهذه النتائج قد أتفقت مع ما ذكره (18) وقد ذكر كل من (19) و (3) أن بكتريا حامض اللاكتيك المقتولة حراريا (HK) والمكونات الخاصة لها تمتلك بعض الخصائص المضادة للخلايا السرطانية المختلفة , وكذلك عدم قدرتها على تثبيط الخلايا الطبيعية . وقد يعود السبب في قابلية خلايا ومكونات جدار بكتريا حامض اللاكتيك المقتولة بالحرارة من (كاربوهيدراتية وبروتينية ودهنية وغيرها) على تحفيز أفراز أنترلوكين (IL-6) وعامل النخر الورمي نوع الفا في خطوط الخلايا البلعمية خارج الأنظمة الحية (20 ; 19). أقترحت عدة عناصر مضادة للسرطان تم الحصول عليها من بكتريا حامض اللاكتيك للوقاية من السرطان (21; 22). اعتمد تأثير الخلايا المقتولة في تثبيط نمو الخلايا السرطانية على التركيز المستعمل, إذ أدت التراكيز العالية إلى تثبيط نمو الخلايا السرطانية المدروسة بنسب عالية , وقل التأثير التثبيطي تدريجياً مع أنخفاض التركيز المستعمل، أي أن العلاقة بين النسبة المئوية لتثبيط الخلايا السرطانية وتراكيز الخلايا الميتة لبكتريا Lactobacillus spp. هي علاقة طردية أذ تزداد شدة التأثير السمي بأزدياد التراكيز وهذه النتيجة تدعم فكرة أن التأثير السمي في خطوط الخلايا السرطانية يعتمد على تركيز الجرعة (dose dependant) (23). ونستدل من ذلك أن التراكيز العالية للخلايا الميتة قامت بتحفيز عملية الموت المبرمج Apoptosis)) في الخلايا السرطانية ولوحظ أن التراكيز العالية للخلايا هي التي تسبب تحفيزا أكبر للموت المبرمج وخصوصا تراكيز (3000 و 1500 و 750) مايكروغرام / مليلتر وقد أختلفت هذه القابلية بأختلاف مصدر ونوع البكتريا وقد يعود السبب في أرتفاع الفعالية التثبيطية لنمو الخلايا السرطانية بأستعمال الكتلة الحيوية للخلايا الميتة من العزلة المحلية لبكتريا L. plantarum للبكتريا نفسها الى محتواه من البروتينات التي مصدرها الخلايا الميتة وهذا يتفق مع ماذكره (24) من خلال دراسته على بكتريا Bacillus spp. و Pseudomonas spp.. أن إعطاء تراكيز عالية ومتكررة من خلايا بكتريا Lactobacillus spp.. ومكوناتها مهم لضمان تثبيط الخلايا السرطانية ، وهذا يتفق مع ما توصلت اليه دراسات أخرى إذ أكد الباحث (25)أن الفعالية المضادة لأربعة أنواع من بكتريا العصيات اللبنية المقتولة بالحرارة وهي L.acidophilus IAM و L.plantarum KCTC و L.bulgaricus KCTC و L.casei spp.casei KCTC3109 تجاه خطوط خلايا سرطان القولون والمثانة والرئة عند تركيز 100 مايكروغرام/ مليلتر وبوقت تعريض 48 ساعة كانت عالية ، ولاحظ أن البروتين السكري لجدران بكتريا Lactobacillus المستخدمة في الدراسة والمقتولة بالحرارة تمتلك أيضا فعالية مضادة تجاه خطوط خلايا سرطان الرئة و المعدة و الكلية والقولون عند تركيز 100 مايكروغرام / مليلتر وبوقت تعريض 48 ساعة . إن بكتريا حامض اللاكتيك تعمل على التقليل من المواد المسرطنة الكيميائية وقد تعمل على إزالة السموم المسرطنة , وتغير محتوى البيئة التي تحيط الأمعاء , وتقليل الأنشطة الأيضية من البكتريا التي تولد مواداً مسرطنة , كذلك تعمل على إنتاج منتجات الأيض مثل butyrate تحسن من قدرة الخلايا على الموت (الموت المبرمج) , وتنتج مركبات تمنع نمو الخلايا السرطانية أو تحفيز المناعة وهو نظام للدفاع عن أفضل ضد الخلايا السرطانية ، لحد الآن لم يعرف كيفية عمل هذه البكتريا في تثبيط خلايا القولون لكن يعتقد أن هناك بعض الآليات التي تحدثها هذه البكتريا وتؤثر على النشاط الأيضي للفلورا الطبيعية وتتداخل هذه مع ظروف كيموفيزيائية الموجودة في داخل القولون مما يساعد على الارتباط وتحطيم الخلايا المولدة للسرطان1). نظراً لدور النظام الغذائي في الأمراض التي تصيب الأنسان مثل مرض السرطان فقد بينت إمكانية دور بكتريا حامض اللاكتيك لمنع سرطان القولون لأمتلاكها بعض الخصائص المضادة للسرطان وأن تأثير بكتريا حامض اللاكتيك تقلل من بقاء الخلايا السرطانية أو تقلل من حجم الورم . فقد بينت البحوث التأثيرات المثبطة لبكتريا حامض اللاكتيك في خطوط السرطانية البشرية المختلفة ومحاولة لأثبات أذا كان لها تأثير على الخلايا السرطانية . من بين هذه السلالات التي تم دراستها الخلايا الميتة L.acidophillus 606 والخلايا الميتة L.casei ATCC393 التي بينت الأثار التثبيطية في نمو الخلايا السرطانية (25 ; 20). وأيضا بينت البحوث ان الخلايا الميتة L.acidophillus 606 أقل سمية للخلايا الطبيعية من الخلايا الميتة L.casei ATCC393. أظهرت نتائج الفعالية للسمية للخلايا الميته (المقتولة حرارياً) للعزلة المحلية Lactobacillus plantarum تفوقها على كافة السلالات العالمية التي شملت L. acidophilus (ATCC 43121) و L. acidophilus ATCC 4356 و L. acidophilus 606 و L. casei YIT 9029 و L. casei ATCC 393) التي أستخدمها الباحث (19) في دراسته . يستدل من النتائج اعلاه امكانية استخدام الخلايا الميته المقتولة حرارياً من بكتريا L plantarum. المعزولة محليا في هذه الدراسة كمواد مساعدة في عملية تنظيم الادوية المستخدمة في علاج السرطان خاصة اذا كان لهذه المواد علاقة وثيقة مع الجينات المنظمة لعمل موت الخلايا المبرمج (Apoptosis) وهذا يحتاج العديد من البحوث والدراسات على المستوى الجيني مستقبلا .

References:

1. Rafter, J. (2002). Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. Br. J. Nutr., 88 (1): 89-94.
2. Kim, J. Y. ; Woo, H.J. ; Kim, Y.S. ; Kim, K.H. and Lee, H.J. (2003). Cell cycle dysregulation induced by cytoplasm of Lactococcus lactis ssp lactis in SNUC2A, a colon cancer cell line. Nutr. Cancer, 46: 197-201.
3. العبيدي ، مأرب نزيه رشيد (2012) . دراسة تأثير بكتريا Lactobacillus acidophilus المعزولة محلياً ومكوناتها كعامل مضاد للسرطان في خارج وداخل الجسم الحي . أطروحة دكتوراه . معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية , جامعة بغداد.
4. اللعيبي ، فاطمة حسن أحمد (2015) . تأثير السكر المتعدد الخارجي والخلايا المقتولة حراريا لعزلات محلية من بكتريا حامض اللاكتيك في تثبيط نمو الخلايا السرطانية وكمضادات أكسده ومايكروبية . رسالة ماجستير .كلية الزراعة . جامعة البصرة .
5. Chumchalova, J. and Smarda, J. (2003). Human Tumour Cells Are selectively Inhibited Colicins. Folia Microbiol., 48:111-115.
6. Mcintosh, G.H. ; Royle, P.J. and Playne, M.J. (1999). A probiotic strain of L. acidophilus reduces DMH induced large intestinal tumors in male Sprague- Dawley rats. Nutr. Cancer, 35: 153-159.
7. Roos, N.M. and Katan, M.B. (2000). Effect of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988-1998. American. J. Clin. Nutr., 71 (20): 405-411.
8. Dunne, C. (2001). Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. Inflam. Bowel. Dis., 7 (2): 136-145.
9. Harrigan, W. F. and McCance, M. E. (1976). Laboratory methods in microbiology. Academic Press. London. U.K.
10. Buck, L. M. and Gilliland, S. E. (1995). Comparisons of freshly isolated strains of Lactobacillus acidophilus of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. J. Dairy Sci., 77 : 2925 – 2933.
11. Langkay, H. A. W.; Balia, R. L.; Tangoe, I.; Tasbac, B. A. and Ludong, M. (2009). Isolation and Identification of Lactic acid bacteria from Row poultry meat . Biotechnology in Animal Husbandry, 25(5-6) :1071-1077.

12. Bersuder, P. ; Hole, M. and Smith, G. (1998). Antioxidants from a heated histidine-glucose of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by High performance Liquid Chromotography. J. Am. Oil. Chem., 75: 181-187.
13. Landersjo, C. ; Yang, Z. ; Huttunen, E. and Widmalm, G. (2002). Structural studies of the Exopolysaccharide produced by Lactobacillus rhamnosus strain GG (ATCC53103). Biomacromolecules, 3: 880-884.
14. الشمري ، أحمد مجيد حمزة. (2003). دراسة تأثير فايروس النيوكاسل في علاج المغروسة في الفئران. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، الأورام السرطانية جامعة بغداد
15. Freshney, R.I. (2000). Culture of animal cell: A manual for basic technique. (4th ed.). Wiley-Liss Company, New York, PP: 155-186.
16. Abdul-Majeed, M.R. (2000). Induction and characterization of SU. 99 plasmacytoma cell line and its effect on mice immune response. Ph.D. thesis, University of Saddam.
17. Genstat Release 10.3DE(2011).VSN International Ltd.(Rothamsted Experimental.station .
18. Kim, Y. ; Woo, J. ; Kim, S. and Lee, J. (2002). Screening for anti proliferation effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines. Biotechnology Letters, 24: 1431-1436.
19. Choi, S.S. ; Kim, Y. ; Han, K.S. ; You, S. ; Oh, S. and Kim, S.H.(2006). Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. Lett. Appl. Microbiol., 42: 452-458.
20. Lee, J. ; Shin, J. ; Kim, E. ; Kang, H. ; Yim, I. ; Kim, J. ; Joo, H. and Woo, H. (2004). Immunomodulatory and antitumor effects invivo by cytoplasmic fraction of Lactobacilluscasei and Bifidobacterium longum. Journal of Veterinary Science, 5: 41-48.
21. Di Marzio, L. ; Russo, F.P. ; D'Alo, S. ; Biordi, L. ; Ulisse, S. ; Amicosante, G. ; De Simone, C. and Cifone, M.G. (2001). Apoptotic effects of selected strains of lactic acid bacteria on a human T leukemia cell line are associated with bacterial arginine deiminase and ⁄or sphingomyelinase activities. Nutr. Cancer, 40: 185-196.
22. Belury, M.A. (2002). Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. J. Nutr., 132: 2995-2998.
23. Lupi, M. ; Matera, G. ; Bbbranduradi, D. ; Dincalci, M. and Ubezio, P. (2004). Cytostatic and cytotoxic effects of topote4can decoded by a novel mathematical simulation aapproach. Cancer Research, 64: 2825-2832.
24. Vidhyalakshmi, R. and Vallinachiyar, C. (2013). Apoptosis of Human Breast Cancer Cell (MCF-7) Induced by Poly saccharides Produced by bacteria. J. Cancer Scither., 5:031-034.
25. Kim, Y. ; Oh, S. ; Moon, Y.I. and Kim, S.H. (2005). Genetics, Metabolism and Applications. In Abstr. 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria.Available at:http://www.lab8.nl/ (abstract no. H-061)

Inhibition of cancer cells by using heat killed cells of *Lactobacillus planetarum* isolated from various food samples

Kithar Rasheed Majeed[1], Nahi Yousif Yaseen[2], Fatima Hassan Ahmed[1]

1 Department of Food Sciences/ College of Agriculture / University of Basrah
2 Iraqi Center for Cancer and Medical Genetics Research / University of Al-Mustanseria

Abstract :

Lactobacillus plantarum bacteria was isolated from different food samples included banana, tomato, mandarin orange, and imported yogurt . Twenty three isoletes of Lactobacillus plantarum were obtained , and identified depending on selective medium MRS agar as well as phenotypic tests, microscopic tests and biochemical examinations . Antioxidant activity of crude bacterial isolates were tested . Results showed that the highest activity was belong to Lactobacillus plantarum isolated from imported yogurt (yR1) 47.12%, while the lower activity was belong to Lactobacillus plantarum isolated from mandarin orange (Mr3) 14.61%. compared with the industrial antioxidant (BHT) and α- tocopherol with activites of antioxidant was (82.70 and 73.96) % respectively. The cytotoxicity effect of the Heat killed (HK)of Lactobacillus plantarum on two of the cancer cells lines, human cervix uteri epitheloid carcinoma (Hela) and rat embryogenic fibroblast (REF) as normal cell line , were studied . In this study, six concentrations of (HK) cells which were (93.5, 187.5 , 375, 750,1500, 3000) mcg/ml. The results showed that all types of dead cells of lactobacillus plantarum which clear effect on tumor cells differed depending on the degree of influence For the (HK) cells, the highest percentage of inhibition for imported yogurt was 86.38 after 24 hours. While there was no effect of HK on (Rat Embroy Fibroblast) ofter exposure time 72h.

Key words: *Lactobacillus plantarum, MTT, REF, Hela, heat killed cells*