Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics

دراسة تأثير بكتريا *Lactobacillus acidophilus* المعزولة محلياً ومكوناتها كعامل مضاد لسرطان القولون المستحث في الجرذان المختبرية

مآرب نزية رشيد[1]، زهرة محمود الخفاجي[1] ، ناهي يوسف ياسين[2]

1 معهد الهندسة الوراثية والتقنية الأحيائية للدراسات العليا-جامعة بغداد
2 المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية-الجامعة المستنصرية

الخلاصة:

أن التقدم الحاصل في العلوم المايكروبية وعلاقتها بالسرطان والجهود المبذولة للقضاء على هذا المرض الخطير دون التأثير في الخلايا الطبيعية لذا هدفت الدراسة الى أستبيان دور العصيات اللبنية كأحياء علاجية في مجال التعامل مع سرطان القولون في الجرذان المختبرية . بينت الدراسة الحالية تأثير اضافة مجاميع المثيل في DNA الجرذان المختبرية باستخدام مادة (Azoxymethane (AOM بتركيز 15 ملغم / كغم (وزن الحيوان) التي تؤدي الى حث سرطان القولون ، وذلك بأضافة مجموعة المثيل الى ذرة الاوكسجين السادسة في الكوانين (O6 -methyl guanine) وقد استخدمت انزيمات القطع الحساسة وغير الحساسة لمجاميع المثيل في الكشف عن حالة المثيلة ، فالانزيم HpaII لايقطع DNA المثيل لذلك يظهر الاخير بشكل حزمة متماسكة ، في حين ان الانزيم MspI يقطع جزيئات DNA بغض النظر عن حالة المثيلة مما يؤدي الى انتشار DNA في هلام الترحيل الكهربائي (يظهر بشكل مسحه متواصلة) .أذ تمت دراسة الدور العلاجي لخلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus في الانظمة الحية (in vivo (Post treatment وقد ظهرت نتائج فحص بؤر الخبئ الشاذة (Aberrant Crypt Foci (ACF انخفاض في عدد هذه البؤر بالنسبة لمجموعة الجرذان المختبرية التي جرعت بخلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus بعد حقنها بالمادة المسرطنة والتي شرحت بعد شهر ونصف من موعد الحقنة الثانية من المادة المسرطنة ، اذ بلغت النسبة المئوية لانخفاض عدد البؤر الخبئ الشاذة في قولون الجرذان المختبرية المجرعة بخلايا بكتريا Lb.acidophilus (ظهور 9 بؤر شاذة مقارنة بـ 80 بؤرة في السيطرة الموجبة للقولون الكامل)88.8% في حين بلغت النسبة المئوية لانخفاض البؤر في قولون الجرذان المختبرية التي جرعت البروتين السكري لجدران بكتريا Lb.acidophilus 87.5 % (ظهور 10 بؤر شاذة مقارنة بـ 80 بؤرة في السيطرة الموجبة للقولون الكامل ، اما بالنسبة للجرذان البمختبرية التي جرعت سايتوبلازم وراشح المزروع البكتيري اذ بلغت النسبة المئوية نخفاض عدد البؤر الشاذة 86.25 % (ظهور 11 بؤرة شاذة مقارنة بـ 80 بؤرة في السيطرة الموجبة للقولون الكامل. اما في ما يخص نماذج DNA المستخلصة من قولون الجرذان المختبرية (بؤر الخبئ الشاذة) المحقونة بالمادة المسرطنة والمعاملة بخلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus والتي شرحت بعد شهر ونصف من موعد الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة ، والتي عند حضنها مع انزيم التقيد HpaII الحساس لمثيلة DNA ، ظهرت بشكل مسحه ضمن هلام الترحيل مما يعزز دور خلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus في التعديل بمثيلة DNA مقارنة بنماذج DNA المستخلصة من قولون الجرذان مجموعة السيطرة الموجبة (يؤر الخبئ الشاذة) المحقونة بالمادة المسرطنة والتي شرحت بعد شهر ونصف من موعد الحقنة الثانية من المادة المسرطنة والتي عند حضنها مع انزيم التقيد HpaII الحساس لمثيلة DNA ظهرت بشكل حزمة عريضه ومتلفة ضمن هلام الترحيل مما يدل على وجود مجاميع المثيل في DNA هذه المجموعة من الحيوانات .

الكلمات المفتاحية: بكتريا العصيات اللبنية، سرطان القولون في الجرذان المختبرية، بؤر الخبئ الشاذة،Azoxymethane.

المقدمة:

أن أستحداث السرطان في الحيوانات المختبرية يحتاج إلى وقت طويل اذ يتوقف ذلك على نوع المادة المسرطنة وتركيزها ومدى سرعة تأيضها فضلاً على عمر ونوع الحيوان المستعمل، وأن من أهم المواد الكيميائية المستعملة في أستحداث سرطان القولون في الجرذان المختبرية والتي تتميز بسرعة تأيضها وخصوصية تأثيرها في قولون الحيوانات المختبرية ووقتها القصير في حدوث azoxymethan (AOM) الحيوانات المختبرية هي مادة DNA تغييرات في بعد DNA إذ أن أولى عمليات التسرطن في القولون بفعل المادة تبدأ بمثيلة عن طريق methylazoxy methanol (MAM) تأيضها وتحولها إلى في الكبد بعدها تنتقل إلى القولون عن طريق مجرى P450 IIE1 سايتوكروم مع (MAM) الدم. أما طريق الأيض الآخر الذي تسلكه هذه المادة هو أرتباط في الكبد ويفرز إلى الأمعاء عن طريق الصفراء glucuronic acid حامض فأن β-glucuronidase وبفعل الأنزيمات البكتيرية في الأمعاء ومنها انزيم الذي يلتقط من قبل الخلايا (MAM) المرتبط يتحلل مائياً وينتج glucuronide الذي يعمل على Methyl carbonium Ion المخاطية ويتحول إلى مركب فعال هي القاعدة النتروجينية DNA أن الهدف الأساسي في مثيله .(1) DNA مثيله وفي حالة عدم O6-methylguanine الكوانين إذ تتحول الكوانين إلى DNA Guanine Methyl Transferase أصلاحها عن طريق أنزيم أصلاح Mismatch re- فأنها سوف تزدوج (الأزدواج الخاطئ Methyl (MGMT) pair) الكوانين إلى Gβ-A وبهذا يؤدي تحول DNA مع الثيامين أثناء تضاعف فأنه يعمل على نقل مجموعة (MGMT) الأدنين(2). أما دور أنزيم الأصلاح الموجود في الموقع الفعال Cysteine المثيل من الكوانين إلى الحامض الأميني

Corresponding Address:
Maareb N.Rasheed
Genetic Engineering& Biotechnology Institute
Email: mohgen2000@yahoo.com

يتحول من شكله الفعال إلى (MGMT) لهذا الأنزيم وبهذا فأن أنزيم الأصلاح عند نقله مجموعة المثيل، وأن هذا التفاعل هو (inactivation) غير الفعال DNA تفاعل غير عكسي وعلى هذا الأساس فأن عملية الأصلاح في مثيله الفعالة القادرة على نقل مجموعة (MGMT) تعتمد على عدد جزيئات أنزيم ولم يغب عن بال الباحثين ، Cysteine المثيل وربطها بالحامض الأميني المتخصصين في مجال الأحياء المجهرية علاج الأورام السرطانية بأستخدام ومن أهمها (Probiotics) العلاج الحيوي ومن هنا برز دور الأحياء العلاجية الموجودة طبيعياً في القناة الهضمية Lactobacillus بكتريا العصيات اللبنية للأنسان والتي تستخدم بشكل آمن وسليم في مجال الأغذية ومنتجات الألبان مما شجع الباحثين لدراسة صفاتها العلاجية وآليات عملها، فتمتلك بكتريا العصيات وذلك بتعطيلها المطفر في Antimutagenesis اللبنية القابلية المضادة للتطفير أشار الباحث (3) إلى أمكانية ربط المطفرات، Adsorption الأمعاء وأمتزازه إلى البروتين السكري لجدران الخلايا المقتولة بالحرارة كما هو الحال في المقتولة بالحرارة الذي Lb.casei LC9018 البروتين السكري لجدران بكتريا - Bact وتنتج بكتريا .(HCAs) له القابلية للأرتباط بالأمينات متباينة الحلقات glucuronide الذي يحلل β-glucuronidase أنزيم riodes, Clostridia المتكون glucuronide وأن العديد من المركبات والمواد السامة تزال بفعل وبكميات كبيرة β-glucuronidase في الكبد وفضلاً عن ذلك أن أنتاج أنزيم يعمل على تحويل المسرطنات الأولية إلى مواد مسرطنة، وكذلك الحال بالنسبة لذا فأن β-glucosidase, Nitroreductase, Azoreductase لأنزيمات بكتريا حامض اللاكتيك تعمل على كبح هذه الأنزيمات، إذ أشار الباحثان(4) إلى Azoreductase, في خفض فعالية الأنزيمات Lb.acidophilus قابلية بكتريا في الجرذان المختبرية المعاملة β-glucosidase, Nitroreductase, التي تحث سرطان القولون في 1,2Dimethylhydrazinz (DMH) بمادة الحيوانات المختبرية. أن منتجات الأيض للأحياء العلاجية تلعب دوراً بارزاً في منع عمليات التسرطن ولعل أهم مواد الأيض هي الحوامض الدهنية قصيرة Butyrate ومنها البيوترات Short Chain Fatty Acid (SCFA) السلسلة التي لها دور في تشجيع أستماتة الخلايا السرطانية والتقليل من فرص ظهور بؤر بنسبة 45% في الحيوانات المختبرية المصابة بسرطان (ACF) الخبئ الشاذة القولون، إذ تعد هذه البؤر التراكيب الأولية للأورام في القولون (5)، فضلاً عن ذلك تشارك بكتريا العصيات اللبنية في مواجهة السرطان وذلك بتحفيزها الجهاز لـها القـابليـة عـلى تحـفيز أنتاج انترفيون Lb.casei المناعي إذ وجد أن بكتريا وانترلوكين 14(14-Lانترلوكين (1 ،12(12-Lانترلوكين (1 ،IFN-β كاما .(في الفئران المختبرية المصابة بسرطان القولون (6 10(10-L1)

طرائق العمل:

- المعاملة بخلايا مكونات بكتريا Lb. acidophilus بعد المادة المسرطنة (AOM)

خصص لهذه التجربة 18 جرذ تم تقسيمها إلى (6) مجاميع بواقع ثلاث جرذان لكل مجموعة حسب الطريقة المتبعة من قبل (1)

المجموعة الاولى

مجموعة السيطرة السالبة التي لم تحقن وتجرع بأي مادة وأطعمت العليقة القياسية وشربت ماء الحنفية، شرحت هذه المجموعة بعد مرور شهرين من تاريخ إيوائها.

المجموعة الثانية

مجموعة السيطرة الموجبة التي تم حقنها بمادة (AOM) وبمعدل 15 ملغم/كغم من وزن الحيوان وحقنت هذه الحيوانات مرة واحدة في الأسبوع وعلى مدى أسبوعين متتالين وأطعمت العليقة القياسية وشربت ماء الحنفية، شرحت هذه المجموعة من الحيوانات بعد شهر ونصف من تاريخ الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة (AOM).

المجموعة الثالثة

مجموعة الحيوانات التي تم تجريعها خلايا بكتريا Lb.acidophilus وبمعدل 1×109 خلية/مليلتر/يوم وذلك حسب الطريقة المتبعة من قبل (7) بعد الحقنة الثانية من مادة (AOM) المسرطنة واستمر التجريع لمدة شهر ونصف من تاريخ الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة (AOM) ثم شرحت بعد ذلك.

المجموعة الرابعة

مجموعة الحيوانات التي تم تجريعها البروتين السكري لجدران بكتريا Lb. acidophilus وبمعدل 0.1 غرام/كغم من وزن الحيوان/يوم وذلك حسب الطريقة المتبعة من قبل (8) بعد الحقنة الثانية من مادة (AOM) المسرطنة واستمر التجريع لمدة شهر ونصف من تاريخ الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة (AOM) ثم شرحت بعد ذلك.

المجموعة الخامسة

مجموعة الحيوانات التي تم تجريعها راشح بكتريا Lb.acidophilus بمعدل 0.5 مليلتر/جرذ/ يوم وذلك حسب الطريقة المتبعة من قبل (9) بعد الحقنة الثانية من مادة (AOM) المسرطنة واستمر بالتجريع لمدة شهر ونصف من تاريخ الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة (AOM) ثم شرحت بعد ذلك.

المجموعة السادسة

مجموعة الحيوانات التي تم تجريعها سايتوبلازم بكتريا Lb. acidophilus بمعدل 0.1 غرام/كغم من وزن الحيوان/ يوم وذلك حسب الطريقة المتبعة من قبل (10) بعد الحقنة الثانية من مادة (AOM) المسرطنة واستمر بالتجريع لمدة شهر ونصف من تاريخ الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة (AOM) ثم شرحت بعد ذلك.

***فحص بؤر الخبئ الشاذة (Aberrant Crypt Foci (ACF في قولون الجرذان المختبرية**

تم فحص بؤر الخبئ الشاذة (ACF) في قولون الجرذان المختبرية وذلك طبقا للطريقة المتبعة من قبل (11) بعد تشريح الجرذان، اخذ القولون ووضع في طبق بتري حاوي على 5 مليلتر من المحلول الملحي الفلسجي وباستخدام شفرة حادة وملقط دقيق تم إزالة الانسجة الدهنية والرابطة العالقة فيه وفتح طوليا ونظف باستخدام المحلول الملحي الفسلجي وقطع إلى قطع صغيرة بحدود 1 سنتمتر ثم ثبتت هذه القطع لمدة 24 ساعة في محلول 10% فورمالين بعدها غسلت بالماء الجاري للتخلص من بقايا المثبت وصبغت بصبغة المثيل الزرقاء بتركيز 0.2% جففت باستخدام ورق ترشيح ثم فحصت المجهر الضوئي باستخدام العدسة ذات القوة 40X.

***استخلاص DNA من قولون الجرذان المختبرية**

تم أستخلاص DNA من قولون الجرذان وذلك حسب التعليمات المرفقة مع عدة الأستخلاص المصنعة من قبل شركة Geneaid الصينية المنشأ وأجريت خطوات الاستخلاص كالأتي

1 - بعد تشريح الجرذان اخذ القولون ووضع في طبق بتري الحاوي على 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسلجي وباستخدام شفرة حادة وملقط دقيق تم إزالة الأنسجة الدهنية الرابطة والعالقة فيه، فتح طوليا وتم تنظيفه بأستخدام المحلول الملحي الفسلجي وقطع إلى قطع صغيرة (بؤر الخبئ الشاذة) بحدود 0.5 سنتمتر ووضع في ابندورف حاوي على المحلول الملحي الفسلجي.

2 - بعد التخلص من المحلول الملحي الفسلجي وبأستعمال مدقه دقيقة (Mi-cropestel) المرفقة مع عدة الأستخلاص تم هرس النسيج.

3 - أضيف 200 مايكروملتير من المحلول المنظم GT (احد محاليل عدة الأستخلاص) إلى انابيب الابندورت مع الاستمرار بمجانسه هرس النسيج.

4 - أضيف 20 مايكروليتر من أنزيم (Protenase-k) (المرفق مع عدة الأستخلاص) إلى عالق النسيج المهروس مع التحريك بلطف لغرض المجانسة.

5 - حضن المزيج بالحمام المائي في درجة حرارة 60 مْ ولمدة 30 دقيقة لغرض تحلل الخلايا مع مراعاة تقليب الانابيب كل خمس دقائق اثناء مدة الحضن.

6 - إضافة 200 مايكروليتر من المحلول المنظم GBT (المرفق مع عدة الاستخلاص) مع المزج بلطف لمدة 5 ثواني ثم حضن المزيج بالحمام المائي في درجة حرارة 70مْ لمدة 20 دقيقة لضمان تحلل جميع الخلايا بحيث يكون بهيئة محلول رائق شفاف مع مراعاة تقليب الأنابيب كل خمس دقائق أثناء مدة الحضن.

7 - تزال بقايا القطع الصغيرة من النسيج عن طريق النبذ المركزي المبرد بسرعة 14000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقتين ثم ينقل الرائق إلى أنبوبة جديدة.

8 - أضيف 200 مايكرولتر من الكحول الأيثيلي المطلق إلى رائق خلايا النسيج المتحلل مع التقليب بلطف لمدة 10 ثواني.

9 - وضع عمود التنقية الخاص بالعدة (GD column) في الأبندورف الخاص

به المرفق مع العدة ونقل رائق خلايا النسيج المتحلل إلى عمود التنقية ونبذ مركزيا بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين.
10 - يهمل الابندورف الخاص بعمود التنقية والحاوي على الرائق ويوضع عمود التنقية في ابندورف جديد آخر.
11 - اضيف 400 مايكروليتر من المحلول المنظم 1 w المرفق مع عدة الاستخلاص) لعمود التنقية ونبذ مركزيا بسرعة 14000 ثانية، سُكبَ الرائق الناتج من عملية النبذ وإعادة عمود التنقية إلى نفس الابندورف.
12 - أضيف 600 مايكروليتر من محلول الغسل (المرفق مع عدة الاستخلاص) لعمود التنقية ونبذ مركزيا بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة 30 ثانية، سكب الرائق الناتج من عملية النبذ.
13 - نبذ العمود مركزيا بسرعة 14000 دورة/ دقيقة لمدة ثلاث دقائق لضمان جفاف المادة المالئة للعمود.
14 - أضيف 100 مايكرولتر من محلول Elution TE المرفق مع عدة الأستخلاص) إلى مركز العمود وبعد خمس دقائق نبذ مركزيا بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة 30 ثانية للحصول على DNA المنقى.
*قياس تركيز DNA المستخلص من قولون الجرذان المختبرية
تم قياس تركيز DNA المستخلص من قولون الجرذان المختبرية (بؤر الخبئ الشاذة) وذلك باضافة 5 مايكرولتر من DNA إلى 495 مايكرولتر من الماء المقطر وتم قياس تركيز DNA بأستعمال جهاز الامتصاص الطيفي بالأطوال الموجية Spectrophotometer، حددت الكثافة البصرية بطولين موجين 260 و280 نانومتر وحسب المعادلة الاتية(12).

$$\text{تركيز DNA مايكروغرام/مايكرولتر} = \frac{\text{قيم الكثافة الضوئية عند } 260}{\text{قيم الكثافة الضوئية عند } 280} \times \text{معامل التخفيف} \times 50$$

*** الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز**
أجريت عملية الترحيل الكهربائي للـDNA الناتج من الأستخلاص إذ ان تركيز الهلام المناسب لترحيل DNA هو 0.8% تمت عملية الترحيل الكهربائي حسب الخطوات الآتية (12)
1 - تم أعداد قالب صب الهلام (Gel tray) الخاص بجهاز الترحيل الكهربائي مع وضع المشط الخاص لتكوين الحفر على بعد 1 سنتمتير من أحدى حافتي القالب.
2 - حضر هلام الاكاروز بتركيز 0.8% وذلك للكشف عن DNA المستخلص إذ أضيف 0.4 غرام من مسحوق الأكاروز إلى 50 مليلتر من محلول دارئ البورات TBE بقوة 1x، سخن في حمام مائي بدرجة غليان مع التحريك المستمر إلى حين اكتمال الإذابة وترك ليبرد إلى درجة 40 مْ بعدها أضيف 2 مايكرولتر من صبغة بروميد الايثيوم ومزجت بلطف مع الهلام.
3 - صب محلول الهلام على القالب برفق وبشكل مستمر هادئ لتجنب الفقاعات الهوائية التي تزال بالماصة الدقيقة أن وجدت وترك الهلام ليتصلب لمدة 35-30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة.
4 - رفع المشط من الأكاروز المتصلب بهدوء ووضع القالب في حوض الترحيل الكهربائي الحاوي على محلول دارئ البورات TBE بقوة 1x ثم غمر الهلام في المحلول نفسه بحيث يصل إلى ارتفاع (5-3) مليلتر فوق الهلام.
5 - سحب 8 مايكرولتر من كل عينة من عينات DNA المستخلص ومزجت بلطف مع 2 مايكرولتر من صبغة التحميل، بعدها تم تحميل المزيج بهدوء داخل حفر الهلام ويراعى عدم خروج العينة من سطح الحفرة.
6 - وصلت أقطاب التيار الكهربائي لطبق الهلام مع مجهز الطاقة إذ رحلت النماذج بفرق جهد مقداره 5 فولت/سم ولمدة 52 دقيقة.
7 - فحص الهلام باستخدام جهاز Gel documentation system وصور بجهاز التصوير المرفق إذ توثق الصور على الحاسوب.
*** معاملة DNA المستخلص من قولون الجرذان المختبرية بأنزيمات التقييد**
حضر خليط تفاعل تقطيع DNA حسب ماذكر في التعليمات المرفقة مع عدة أنزيمات التقييد المجهزة من قبل شركة (Promega/U.S.A.) والحجوم المرافقة مع استخدام الأنزيم وبحجم تفاعل نهائي 30 مايكروليتر لكلا الأنزيمين كما في الأتي:

ماء خالي الايونات معقم	24.45 مايكروليتر
دارئ RE بتركيز 10x	3مايكروليتر
البومين المصل البقري تركيزه 10µg/µl	0.3مايكروليتر
DNAالمستخلص بتركيز 1µg/µl	1.5مايكروليتر

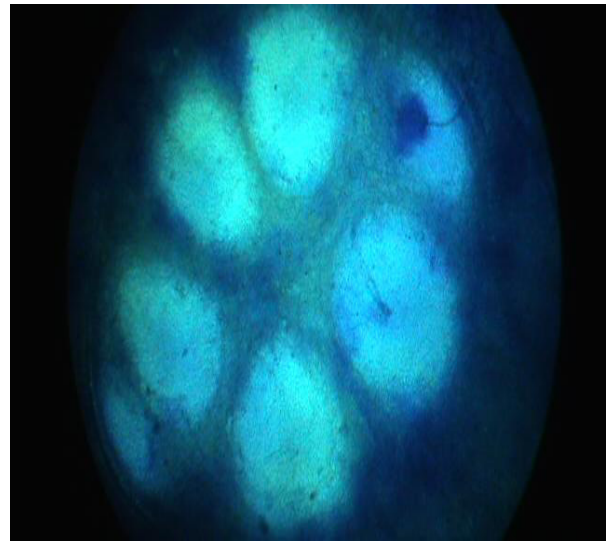
مزجت جيدا بأستعمال الماصة الدقيقة وبعدها أضيف

أنزيم التقييد تركيز µl/10U	0.75 مايكروليتر
الحجم النهائي هو	30 مايكروليتر

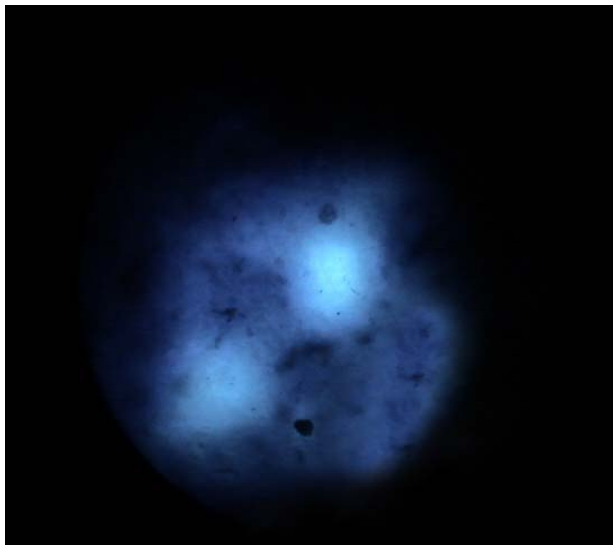
مزج خليط التفاعل جيدا بوساطة الماصة الدقيقة ثم أغلقت أنابيب التفاعل جيدا وحضنت بالحمام المائي في درجة حرارة 37مْ لمدة 4 ساعات، بعد انتهاء مدة الحضن تم ترحيل 10 مايكرولتر من DNA المعامل مع 2 مايكرولتر من صبغة التحميل علماً أن تركيز هلام الترحيل 0.8% وقد أستخدم دليل حجمي للكشف عن DNA المقطع، رحلت النماذج بفرق جهد مقداره 4 فولت/سم ولمدة ساعتين ونصف.

النتائج:

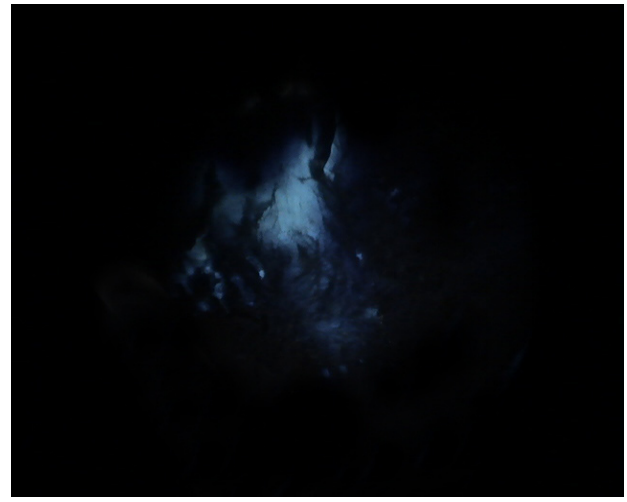
*** فحص بؤر الخبئ الشاذة (ACF) في قولون الجرذان المختبرية**
أظهرت نتائج فحص بؤر الخبئ الشاذة (ACF) أو ما تدعى بقرحه السرطان الأولية precancer lesion أنخفاض عدد هذه البؤر بالنسبة لمجموعة الجرذان المختبرية التي جرعت بخلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus بعد حقنها بالمادة المسرطنة والتي شرحت بعد شهر ونصف من موعد الحقنة الثانية بالمادة المسرطنة (AOM) إذ بلغت النسبة المئوية لأنخفاض عدد (ACF) البؤر في الجرذان المختبرية المجرعة بخلايا بكتريا Lb.acidophilus 88.8% والتي مثلت أعلى نسبة مئوية لأنخفاض (ACF) مقارنة ببقية مكونات بكتريا Lb.acidophilus وذلك نتيجة للتأثير التعاوني المشترك لمكوناتها من السايتوبلازم والبروتين السكري لجدرانها في حين بلغت النسبة المئوية لأنخفاض عدد (ACF) البؤر في الجرذان المختبرية التي جرعت البروتين السكري لجدران بكتريا Lb.acidophilus 87.5% أما بالنسبة للجرذان المختبرية التي جرعت السايتوبلازم وراشح لبكتريا Lb.acidophilus كانت النسبة المئوية لأنخفاض عدد (ACF) 86.25%. تراوحت عدد البؤر الشاذة لكل منطقة اصابة (Aberrant crypt (AC لكل بؤرة بين25-1 وذات حجوم مختلفة منها الكبيرة والصغيرة، من خلال هذه النتائج يتضح أن النسب المئوية لأنخفاض (ACF) كانت متقاربة، الا أن أعلاها كانت بفعل تأثير خلايا بكتريا Lb.acidophilus مقارنة بباقي مكوناتها وهذا يرجع للتأثير التعاوني المشترك للسايتوبلازم والبروتين السكري لخلايا بكتريا Lb.acidophilus في أنخفاض عدد (ACF) إذ أن عدد بؤر الخبئ الشاذة تعد من المؤشرات الحيوية التي تدرس في قولون الجرذان المختبرية أثناء مرحلة البدء لتسرطن القولون.



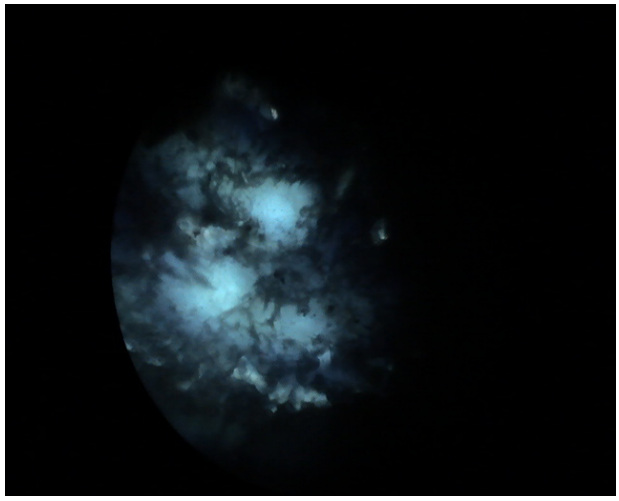
شكل (1) بؤر الخبئ الشاذة (ACF) في الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM)



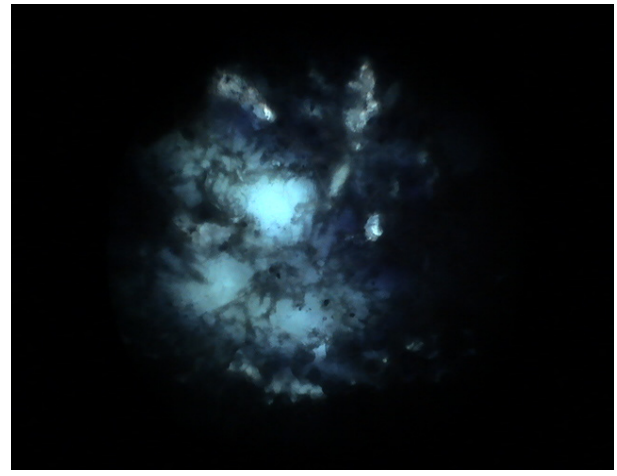
شكل (2) بؤر الخبئ الشاذة (ACF) في الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) والتي جرعت خلايا بكتريا *Lb.acidophilus*



شكل (3) بؤر الخبئ الشاذة (ACF) في الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) والتي جرعت البروتين السكري لبكتريا *Lb.acidophilus*



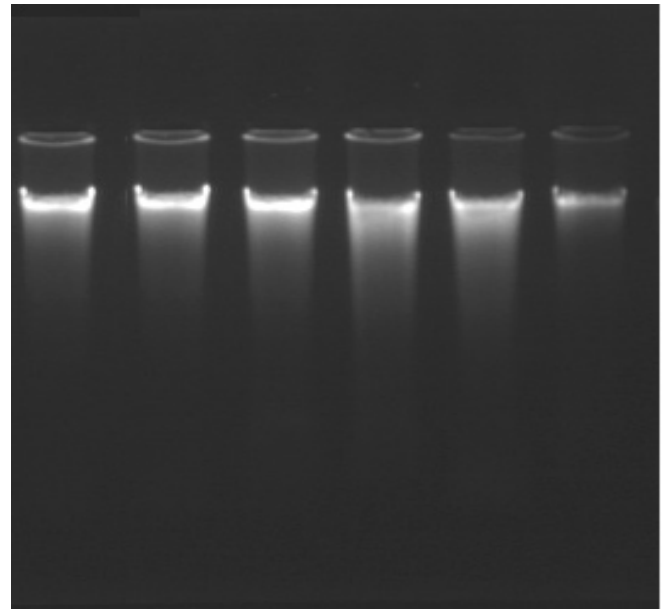
شكل (4) بؤر الخبئ الشاذة (ACF) في الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) والتي جرعت راشح بكتريا Lb.acidophilus



شكل (5) بؤر الخبئ الشاذة (ACF) في الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) والتي جرعت سايتوبلازم بكتريا Lb.acidophilus

*** أستخلاص DNA من قولون الجرذان المختبرية**

أستخلص DNA من قولون الجرذان المختبرية المستعملة في هذه الدراسة وقدرت نقاوته أعتمادا على طريقة الأمتصاص الطيفي بأستخدام جهاز spe-trophotometer وتراوحت ما بين (1.8-1.9) كذلك تم التأكد من تركيز DNA بترحيل DNA على هلام الأكاروز قبل معاملته مع أنزيمات التقييد إذ أن من المتطلبات الأساسية لتحقيق النتيجة المثلى عند معاملة DNA مع أنزيمات التقييد هي ضبط تركيز الـDNA. إذ تراوح تركيز DNA ما بين (1550-870) نانوغرام/مايكرولتر علماً ان التركيز الأمثل للـDNA المعامل مع أنزيمات التقييد في هذه الدراسة هو 1 مايكروغرام/مايكرولتر. وكذلك أن أهمية الترحيل الكهربائي أيضاً للتأكد من أن DNA سليم ويوجد بهيئة حزمة واضحة غير مفككة فضلاً عن أنتقاء نماذج DNA الجيدة لأجل معاملتها مع أنزيمات التقييد والحصول على أفضل النتائج.

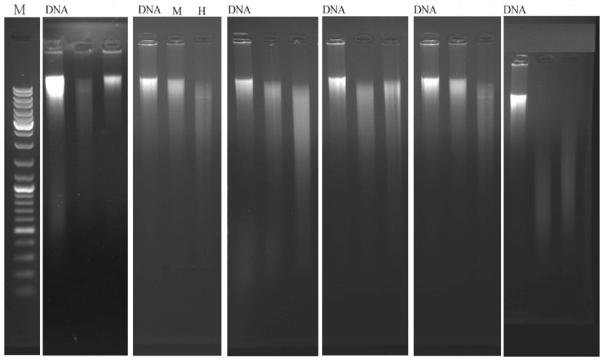


شكل (6) الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بتركيز 0.8% للـ DNA المستخلص من قولون الجرذان المختبرية

إذ ان: 1،2،3،4يمثل DNA قولون الجرذان المختبرية المعاملة بخلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus بعد حقنها بمادة (5 ،AOM)، يمثل DNA قولون الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) وشرحت بعد شهر ونصف من موعد الحقن (سيطرة موجبة)، 6 يمثل DNA قولون الجرذان المختبرية (سيطرة سالبة).

*** الدور العلاجي لخلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus بعد حقن المادة المسرطنة (AOM)**

أن نماذج DNA المستخلصة من قولون الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) بمعدل 15 ملغم/كغم مرة واحدة في الأسبوع وعلى مدى أسبوعين متتالين والتي شرحت بعد شهر ونصف من موعد أعطاء الحقنة الثانية بمادة (AOM) وعند حضنها مع أنزيم MSPI لمدة ساعتين ونصف وبدرجة حرارة 37مْ ظهرت بشكل مسحة ضمن هلام الترحيل أما عند حضنها مع أنزيم HPaII ظهرت بشكل حزمة عريضة ومتألقة مما يدل على وجود مجاميع المثيل في DNA هذه المجموعة من الحيوانات كما موضح بالشكل(7) ، أما بالنسبة لنماذج DNA المستخلصة من قولون الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) والتي جرعت خلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus لمدة شهر ونصف وعند حضنها مع أنزيم MSPI لمدة ساعتين ونصف وبدرجة حرارة 37مْ ظهرت بشكل مسحة ضمن هلام الترحيل أما عند حضنها مع أنزيم HPaII فأنها ظهرت بشكل مسحة ولكنها أقصر من مسحة أنزيم MSPI مما يعزز دور خلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus في التعديل بمثيله DNA .



شكل (7) تأثير خلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus في مثيلة DNA للجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون شكل (7) تأثير خلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus في مثيلة DNA للجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون

المناقشة:

يتضح من خلال النتائج أن النسب المئوية لأنخفاض (ACF) كانت متقاربة، الا أن أعلاها كانت بفعل تأثير خلايا بكتريا Lb.acidophilus مقارنة بباقي مكوناتها وهذا يرجع للتأثير التعاوني المشترك للسايتوبلازم والبروتين السكري لخلايا بكتريا Lb.acidophilus في أنخفاض عدد (ACF) إذ أن عدد بؤر الخبئ الشاذة تعد من المؤشرات الحيوية التي تدرس في قولون الجرذان المختبرية أثناء مرحلة البدء لتسرطن القولون. وهذه البؤر لا تظهر مباشرة بعد أعطاء المادة الكيميائية المسرطنة وأنما تحتاج إلى وقت إذ يزداد عددها بمرور الوقت. اذ وجد الباحث (13) عندما حقن الجرذان المختبرية بمادة (AOM) وبنسبة 15 ملغم/كغم،ظهور البؤر الشاذة بعد شهر ونصف من موعد الحقنة الثانية بمادة (AOM)، ووجد الباحثان (7) أن ظهور البؤر الشاذة كانت بعد شهرين من موعد الحقنة الثانية بمادة (AOM) وبنسبة 15 ملغم/كغم للجرذان المختبرية، كما لاحظ الباحثان أن بكتريا Lb.acidophilus YH2104 استطاعت أن تخفض عدد البؤر الشاذة بنسبة 67.5% وأكد الباحث (11) أن البؤر الشاذة ظهرت في قولون الجرذان المختبرية بعد شهرين من موعد الحقنة الثانية بمادة (AOM) وأن بكتريا B.longum خفضت عدد البؤر الشاذة بنسبة 20% بينما أشار الباحث (14) إلى دور راشح بكتريا Lb.acidophilus في خفض عدد البؤر الشاذة في قولون الجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون بمادة (AOM). كما لاحظ الباحث (15) أحتواءه (ACF) على طفرة في جين K-ras عند موقع الشفرة GAT 12 والشفرة GAC 13 وذكر أيضاً أن استحداث سرطان القولون في الجرذان المختبرية بمادة (AOM) وتكون متشابهة -إلى حد ما- لعملية تتابع الأحداث Adenoma- carcinoma في الأنسان، ولاحظ الباحث (16) أحتواء البؤر الشاذة على طفرة في جين APC عند موقع الشفرة 36، 34، 32 و38 في الجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون بمادة ([4,5-b] PhIp) 2-Amino-1-methyL-6-phenylimidozo pyridine وأشار أيضا الى زيادة أعدادها وكبر حجمها بعد 8 أشهر من تناول (PhIp) مع العليقة. أن نماذج DNA المستخلصة من قولون الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) بمعدل 15 ملغم/كغم مرة واحدة في الأسبوع وعلى مدى أسبوعين متتالين والتي شرحت بعد شهر ونصف من موعد أعطاء الحقنة الثانية بمادة (AOM) وعند حضنها مع أنزيم HPaII ظهرت بشكل حزمة عريضة ومتألقة مما يدل على وجود مجاميع المثيل في DNA هذه المجموعة من الحيوانات إذ ان أنزيم HPaII تحسس لمجاميع (CH3) ولم يستطيع الأستمرار في تقطيع DNA مما أدى إلى ظهوره بشكل حزمة وذلك نتيجة لتأثير مادة (AOM) التي تكوّن جذر المثيل تلقائياً ذا القوة العالية للمثيله ويهاجم (O6) ذرة الأوكسجين السادسة في القاعدة النتروجينية الكوانين مؤدياً إلى تحول G→A فضلاً على ذلك فأن مادة (AOM) تمتص من قبل الخلايا الأمعاء مع تقدم الوقت فأنها تعمل على حدوث تغيرات

نسيجية كما هو الحال في ظهور البؤر الشاذة والتي تتضمن وجود طفرات في جين K-ras وβ-cateinen وهذا يتفق مع ماوجده الباحث (3) عند دراسة التأثير العلاجي لبكتريا Bifidobacterium في سرطان القولون المستحث بفعل مادة (AOM)، فضلا على ذلك فقد أكد الباحث (17) ظهور الورم في الجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون بفعل مادة (AOM) بعد تسعة أشهر من الحقنة الثانية بمادة (AOM) مما يدل على أن مادة (AOM) ذات تأثير تراكمي وذلك عند دراسة تأثير زيت السمك في علاج سرطان القولون المستحث في الجرذان المختبرية بفعل مادة (AOM).

أما بالنسبة لنماذج DNA المستخلصة من قولون الجرذان المختبرية المحقونة بمادة (AOM) والتي جرعت خلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus لمدة شهر ونصف وعند حضنها مع أنزيم MSPI لمدة ساعتين ونصف وبدرجة حرارة 37مْ ظهرت بشكل مسحة ضمن هلام الترحيل أما عند حضنها مع أنزيم HPaII فأنها ظهرت بشكل مسحة ولكنها أقصر من مسحة أنزيم MSPI مما يعزز دور خلايا ومكونات بكتريا Lb.acidophilus في التعديل بمثيله DNA أي أنها ساعدت في اصلاح الضرر الناتج في الـ DNAذلك بتشجيع أزالة O6-methylguanine عن طريق عمليات أصلاح DNA من خلال تشجيع حث أنزيم (MGMT) الذي يعمل على نقل مجموعة المثيل من الكوانين إلى الحامض الأميني cysteine الموجود في الموقع الفعال له وبهذا يصبح أنزيم (MGMT) أنزيماً غير فعال فهو يعد بمثابة أنزيم أنتحاري (Suicide enzyme) علماً أن عملية الأصلاح هذه تتوقف على عدد جزئيات أنزيم (MGMT) الفعالة التي يمكنها القيام بعملية الأصلاح موقعياً، أن هذه النتائج جاءت متوافقة مع ماذكره (18) عند دراسة دور بكتريا B.longum وLb.acidophus في خفض تعبير جين rasp-21 المرتبط بتوالد الخلايا وأزدياد عدم تمايزها في الجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون بفعل مادة (AOM).

وأشار الباحث (19) إلى دور خلايا وراشح بكتريا Lb.acidophilus في أزالة مجموعة المثيل من O6-methylguanine وتثبيط تكوين البؤر الشاذة في قولون الجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون بفعل مادة (AOM) وذكر أيضاً قابلية سايتوبلازم بكتريا Lb.casei YIT9029 و B.longum Hy8001 في خفض معدل تكوين الورم في الحيوانات المختبرية، بيد أن الباحث (20) أشار إلى دور البروتين السكري لبكتريا Lactobacillus في تثبيط تكوين الورم بنسبة 70% في الفئران المختبرية المحقونة بخلايا ورمية فضلاً على ذلك، أكد الباحث (21) أن تجريع الجرذان المختبرية بخلايا بكتريا Lb.casei، Lb.acidophilus وLb.rhamnosus بمعدل 1×1010 خلية/ مليلتر يومياً ولمدة أربع أسابيع قبل وبعد استحداث سرطان القولون في الجرذان المختبرية بفعل مادة (DMH) أدت إلى تقليص حجم الورم بنسبة 70% وأشار أيضاً أن الحليب المخمر ببكتريا Lb.casei و B.animalis خفض فعالية أنزيم B-glucuronidase وأنزيم (UDP-GT) UDP-glucuronyl transfease الأنزيم الذي يعمل على ربط (MAM) Methylazoxy methnanol بحامض glucuronic في الكبد.

لاحظ الباحث (22) أن بكتريا Lb.gasseri، Lb.acidophilus، Lb.confusus، B.breve، B.longum، S.thermophilus خفضت الضرر الحاصل في DNA الجرذان المختبرية المستحث فيها سرطان القولون بفعل (MNNG) بنسبة 90% وذكر أيضاً قابلية بكتريا Lactobacillus المضادة للتطفير موضحاً أن هذه القابلية تصل ذروتها بالطور اللوغارتيمي للبكتريا ثم تقل بأتجاه طور الركود أي أن القابلية المضادة للتطفير لبكتريا Lactobacillus تتوقف على عدد الخلايا ومقدار الجرعة وأن البروتين السكري لجدران بكتريا Lactobacillus ربما هو المسؤول عن هذه القابلية نتيجة لربط المطفر، فضلاً على ذلك ذكر الباحث (23) أنخفاض نسبة المطفرات في غائط وأدرار الأشخاص الذين يتناولون بكتريا Lactobacillus نتيجة لقابلية البكتريا على ربط والتقاط المطفرات في الأمعاء ثم طرحها عن طريق الغائط والأدرار، أو اجراء عمليات التأيض عليها وأغلب هذه المطفرات هي الأمينات متباينة الحلقات الناتجة من عمليات طبخ اللحوم على درجات حرارية عالية فضلاً عن Nitrosamines، إذ وجد أن بكتريا Lactobacillus تحطم مركبات Nitrosamines.

وتمتلك بكتريا Lactobacillus القابلية على تعزيز وحث الجهاز المناعي لمواجهة الخلايا السرطانية إذ لاحظ الباحث (24) أن بكتريا Lb.casei (LCS) shirota أبطأت من نشوء وتكون الورم وعززت أنتاج (IL-12) انترلوكين-12، (TNF-γ) عامل النخر الورمي نوع كابا و(TNF-α) وعامل النخر الورمي نوع الفا وبهذا فهي ثبطت تكوين الورم المستحث في الفئران المختبرية بفعل المواد الكيماوية. وذكر الباحث (19) أن زيادة فعالية الجهاز المناعي تجاه سرطان القولون المستحث في الجرذان المختبرية بفعل المواد الكيمياوية نتيجة تأثير بكتريا Lb.acidophilus NCFM في زيادة فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية (Natural Killer cells (NK فضلاً على ذلك حث الجهاز المناعي لأنتاج (IL-12) انترلوكين12-، (TNF-γ) و(TNF-α). وأشار الباحث (23) أن البروتين السكري لجدران بكتريا Lb.acidophilus، Lb.casei YIT9029، SNUL وB.Longum HY8001 ثبط نمو خلايا سرطان القولون CT26 المزروعة في الفئران المختبرية نتيجة لحث وتشجيع الأستماتة للخلايا السرطانية، وأوضح أن معدل الأستماتة للخلايا السرطانية يزداد بزيادة التجريع فضلاً على ذلك أن أستعمال المنتجات الحاوية على Lb.acidophilus، Lb.rhamnosus، Lb.helveticus، B.longum، Lb.casei في الفئران أدى إلى زيادة فعالية البلع للخلايا الأبتلاعية مقارنة بالفئران التي أعطيت حليب معقم فقط (25).

وبناءاً على ما ذكر سابقاً فأن بكتريا Lactobacillus تتمكن من مواجهة السرطان بعدة آليات ولا تقتصر على آلية محددة بذاتها ومنها

1 - الأرتباط بالمطفرات والمسرطنات وبهذا فهي تقلل من أمتصاصها وتعمل على أزالتها من الأمعاء أي تكون Desmutagens.

2 - تخفيض الرقم الهيدروجيني للأمعاء نتيجة أنتاجها لحامض اللاكتيك والخليك مما يؤدي إلى أحباط البكتريا المولدة للسرطانات وبهذا فهي تعمل على تغير فلورا الأمعاء، فضلاً عن تأثيرها بزيادة فعالية بعض الأنزيمات، إذ أن الأنزيم الواقي (أنزيم أزالة السمية) GST يمكن أن يستحث بفعل نواتج التخمر وخاصة الحوامض الدهنية قصيرة السلسة وهي تعمل على أحباط أنزيمات α-dehgdroxylase، Nitrorductase، Azoreductase، β-glucourinidase التي تعمل على تحويل المواد السابقة للمسرطنات إلى مواد مسرطنة.

3 - التأثير في درجة مثيله DNA وذلك بتشجيع عمليات أصلاح DNA وأزالة O6-methylguanine.

4 - أحباط تكاثر الخلايا السرطانية وذلك بتشجيع مسار الأستماتة .

5 - المنع تكون وتطور الأورام وذلك بتعزيز وتقوية الجهاز المناعي.

References:

1. Suaeyun, R.; Kinouchi, T.; Hideki, A.; Vinitketkumnven, V. and Ohnishi, Y. (1997). Inhibitory effects of Lemon grass (cymbopongon citrarus staph) on formation of Azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon. Carcinogenesis, 18: 949-955.
2. Wali, R.; Skarosi, S.; Hart, J.; Zhang, Y.; Dolan, M.; Moschel, R.; Nguyen, L.; Mustafi, R.; Brasitus, T. and Bissonnette, M. (1999). Inhibition of O6- methylguonoine- DNA methyl transferase increases azoxymethane -induced colonic tumors in rats. Carcinogenesis, 20: 2355-2360.
3. Liong, T. (2008). Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and In-vivo evidence. International Journal of Molecular Sciences, 9: 854-863.

4. Gayathri, D. and Devaraja, T. (2011). Lactobacillus ssp, as probiotics for human health with special emphasis on colorectal cancer. Indian Journal of Science and Technology, 4: 1008-1014.
5. Dicks, L. and Botes, M. (2010). Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. Beneficial Microbes, 1: 11-29.
6. Fengliu, C. and Mingpan, T. (2010). Invetro effects of Lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity. Journal of Food and drug analysis, 18: 77-86.
7. Lee, S. and Lee, W. (2000). Inhibitory effects of lactic acid Bacteia (LAB) on the Azoxymethon-induced colonic preneoplastic lesions. The Journal of Microbiology, 38: 169-175.
8. Sun, J.; Huishi, Y.; Weile, G. and Yima, C. (2005). Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from Lactobacillus sp. World Journal of Gastroenterology, 11: 6330-6337.
9. Matsumoto, S.; Hara, T.; Nagaoka, Mika, A.; Mitsuyama, K.; Sako, T.; Yamamoto, M.; Kado, S. and Takada, T. (2009). A component of polysaecharide peptidoglycon complex on Lactobacillus induced an improvement of murine model of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. Immunology, 128: 170-180.
10. Lee, J.; Shin, J.; Kim, E.; Kang, H.; Yim, I.; Kim, J.; Joo, H. and Woo, H. (2004). Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by cytoplasmic fraction of lactobacillus casei and Bifidobacterium longum Bacteriology. Journal of veterinary Science, 5: 41-48.
11. Rowland, I.; Rumney, C.; Coutts, J. and Leivense, L. (1998). Effect of Bifidobacterium Longum and inulin on gut bacterial metabolisim and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. Carcinogenesis, 19: 281-285.
12. Sambrook, J.; Fritsch, W. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning and laboratory manual 2nd edition. Cold spring Harbour laboratories, New york.
13. Gosse, F.; Guyot, S.; Rossi, S.; Lobstein, A.; Fischer, B.; Seiler, N. Raul, F. (2005). Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived mtastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. Carcinogenesis, 26: 1291-1295.
14. Arimochi, H.; Kinouchi, T.; Kataoka, K.; Kuwahara, T. and Ohnishi, Y. (1997). Effect of Intestinal bacteria on formation of precursor lesions of colon cancer in rats. Nutration and cancer, 24: 121-123
15. Vivona, A.; Shpitz, B.; Medline, A.; Bruce, R.; Hay, K.; Wold, M.; stern, H. and Gallinger, S. (1993). K-ras mutations in aberrant ctypt foci, adenomas and adenocorcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis. Carcinogenesis, 14: 1777-1781.
16. Ochiai, M.; Ushigome, M.; Fujiwara, K.; Ubagai, T.; Kawamori, T.; Sugimura, Takashi.; Nagao, M. and Nakagama, H. (2003). Characterization of Dysp[lastic Aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine. American Journal of Pathology, 163: 1607-1614
17. Chang, W.; Chapkin, R. and Lupton, J. (1998). Fish Oil Blocks Azoxymethane-induced rat colon tumorigenesis by increasing cell differentiation and apoptosis rather than decreasing cell proliferation. The Journal of Nutrition, 128: 491-497
18. Reddy, B. (1999). Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. Journal of Nutrition, 129: 14785-14825
19. Soccol, C.; Vandenberghe, L.; Spier, M.; Medeiros, A.; Yamaguishi, C.; Lindner, J.; Pandey, A. and Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: A review. Food Technology and Biotechnology, 48: 413-434.
20. Rafter, J. (2004). The effects of probiotics on colon cancer development. Nutrition Research review, 17: 277-284.
21. Saikali, J.; Picard, C.; Freitas, M. and Holt, P. (2004). Fermented milks, Probiotic cultures and colon cancer. Nutrition and Cancer, 49: 14-24.
22. Wollowski, I.; Rechkemmer, G. and Zobel, p. (2001). Protective Role of probiotics and prebiotics in colon cancer. American Journal for Clinical Nutrition, 73: 4515-4555
23. Fotiadis, C.; Stoidis, C.; Spyropoulos, B. and Zografos, E. (2008). Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. World Journal of Gastroenterology, 14: 6463-6457.
24. Park, S.; Kim, Y.; Chung, M.; Kang, B. and Ha, N. (2007). Inhibition of proliferation by anti-microbial peptide islated from pedicoccus pentosoceus and Lactobacillus spp. cancer cell line (HT-29, SW4801 and CACO-2). Journal of Enviromental Toxicology, 22: 65-71.
25. الخفاجي، زهره محمود. (2008). الأحياء العلاجية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Study the Effect of *Lactobacillus acidophilus* Local isolate and its Components as colon anticancer induced in rats

Maareb N.Rasheed[1], Zahra M.Al-Khafji[1], Nahi Y.Yaseen[2]

1 Genetic Engineering& Biotechnology Institute
2 Iraqi Center For Cancer Research& Medical geneti

Abstract:

Knowledge of microbiology and its relation to tumor is in continuous progress.Many efforts directed to eradicate the tumor cell without hart the normal living body cells.

The aim of this study was to investigate the role of Lactobacilli as a Probiotic in colon cancer treatment in rats. Colon cancer was induced in rats using Azoxymethane (AOM) at 15mg/Kg(animal body weight) by adding methyl group to guanine (O6- methyl guanine) . The later showed by using methylation sensitive restriction enzymes such as HpaII (sensitive to presence of methyl group), and MspI (resistant to methyl group) so the samples treated with former will give a clear band of methylated DNA in gel electrophoresis while MspI will give diffused band when the DNA is methylated . The post- treatment effect of Lb. acidophilus and its components was studied as well .The animals were injected with AOM at one week interval for two weeks ,Then fed Lb . acidophilus and its components for 6 weeks started a week after the last injection. It has been shown that Lb .acidophilus cells reduced the ACF by 88.8%(only 9 foci were found compared to 80 foci in control treatment) the animal administrated with glycoprotein samples reduced the development of foci by 87.57%. (only 10 foci were found compared to 80 foci in control treatment). the animal administrated with cytoplasm sample and crude growth medium there was 86.25% reduction (only 11 foci were found compared to 80 foci in control treatment). either in terms of DNA samples extracted from the colon of rats (aberrant crypt foci) injected carcinogens and treatment cells and bacteria components Lb .acidophilus which explained after amonth and a half from the date of the second injection carcinogens, which when incubation with restriction enzyme HpaII methylation sensitive DNA enzyme , appeared smear wtthin the gel electrophoresis which enhances the role of cells and bacteria components Lb. acidophilus in the modulate DNA methylation compared with DNA samples extracted from the colon of rats positive group injected carcinogens which explained after amonth and ahalf later than the second injection of carcinogens and that when incubation with restriction enzyme HpaII appeared in broad and radiant within gel electrophoresis which indicates the presence of methyl group in the DNA of this animals group.