



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Biological Journal of Microorganism

12rd Year, Vol. 12, No. 46, Summer 2023 pp. 13-25

Received: 20.04.2022 Accepted: 08.06.2022

(Research Paper)

Cytotoxic Effects of *Lactobacillus* Cytoplasmic Extract isolated from Guilan province dairy products on Colon Cancer Cell Line (HT-29)

Nasim Padasht

Department of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran, nasim.padasht70@yahoo.com

Khosro Issazadeh*

Department of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran, issa_kaam@yahoo.com

Marjan Shaheli

Department of Biology, Arsanjan Branch, Islamic Azad University, Arsanjan, Iran, Marjan.Shaheli@iau.ac.ir

Abstract

Introduction: Probiotic bacteria, including lactobacilli, are known to prevent many cancers. In this regard, the present study aimed to evaluate the anti-cancer effects of *Lactobacillus* cytoplasmic extract isolated from dairy products in Guilan province on the HT-29 colon cancer cell line.

Materials and Methods: In this study, *Lactobacillus* bacteria were isolated and identified from dairy products based on conventional culture and biochemical methods. Then, using specific primers, the *16S rRNA* gene of the bacteria was amplified and the confirmed samples were compared with the sequences in NCBI after sequencing. Different concentrations of 0.5, 0.75, 1, 1.5, and 2 mg/mL were made from the cytoplasmic extract of the selected strain. Finally, the cytotoxicity effects of *Lactobacillus* cytoplasmic extract on cancer HT-29 and normal HUVEC cell lines were investigated by the MTT method.

Results: The results of the MTT assay showed that the cytoplasmic extract of *Lactobacillus* dose-dependently reduced the survival and proliferation of colon cancer cells at 24 h, with the

*Corresponding Author

2322-5181/ © The Authors.

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



10.22108/BJM.2022.133373.1466

highest inhibitory effect at 2 mg/ml. Concentrations of 1, 1.5, and 2 mg/mL decreased cell viability by $50\pm 4.87\%$, $40\pm 8.61\%$, and $25\pm 5.80\%$, respectively. The IC_{50} value of the cytoplasmic extract was 1.43 mg/mL for the HT29 cells. Also, cytotoxic effects on the normal HUVEC cell line were not observed.

Discussion and Conclusion: According to the results of the study, the cytoplasmic extract of *Lactobacillus* isolated from dairy products reduced the growth of HT-29 cancer cells, which with further studies can be used as a biological product in the treatment and prevention of colon cancer.

Keywords: Probiotics, *Lactobacillus*, Anti-cancer, HT-29



<https://bjm.ui.ac.ir>

زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها

سال دوازدهم، شماره ۴۶، تابستان ۱۴۰۲، صفحه ۱۳ - ۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۸

مقاله پژوهشی

اثرات سمیت سلولی عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس جدا شده از محصولات لبنی استان گیلان بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT-29)

نسیم پاداشت: دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، nasim.padasht70@yahoo.com

خسرو عیسی زاده*: استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، issa_kaam@yahoo.com

مرجان شاه‌ایلی: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران، Marjan.Shaheli@iau.ac.ir

چکیده

مقدمه: باکتری‌های پروبیوتیک از جمله لاکتوباسیلوس‌ها به عنوان یکی از عوامل پیشگیری از ابتلا به انواع مختلف سرطان شناخته شده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضدسرطانی عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس جدا شده از محصولات لبنی استان گیلان بر رده سلولی سرطان روده بزرگ HT-29 است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه باکتری‌های لاکتوباسیلوس توسط روش‌های متداول کشت و براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی از محصولات لبنی جداسازی و شناسایی شدند. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ژن *16S rRNA* باکتری‌ها تکثیر شد و نمونه‌های تأیید شده پس از تعیین توالی، با توالی‌های موجود در NCBI مقایسه شدند. غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۱، ۰/۷۵، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم / میلی‌لیتر از عصاره سیتوپلاسمی سوپه منتخب ساخته شدند؛ اثرات سمیت سلولی عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس بر رده سلولی سرطانی HT-29 و سالم HUVEC توسط روش MTT بررسی شدند.

نتایج: نتایج تست MTT بیان کرد عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس به صورت وابسته به دوز، بقا و تکثیر سلول‌های سرطانی روده بزرگ را در مدت زمان ۲۴ ساعت کاهش می‌دهد که بیشترین اثر مهاري مربوط به غلظت ۲ میلی‌گرم / میلی‌لیتر بود. غلظت‌های ۱،

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © The Authors.

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



10.22108/BJM.2022.133373.1466

۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، زنده‌مانی سلول‌ها را به ترتیب $50 \pm 4/87$ ، $40 \pm 8/61$ و $25 \pm 5/80$ درصد کاهش دادند. همچنین میزان IC50 عصاره سیتوپلاسمی بر رده سلولی HT29 معادل $1/43$ میلی‌گرم / میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین اثرات سایتوتوکسیک بر رده سلولی نرمال HUVEC مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: براساس نتایج، عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس جداشده از محصولات لبنی موجب کاهش رشد سلول‌های سرطانی HT-29 شد که با انجام مطالعات بیشتر می‌تواند به‌عنوان یک محصول بیولوژیک در درمان و پیشگیری از سرطان روده بزرگ استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس، ضدسرطانی، HT-29

مقدمه

سرطان روده بزرگ^۱ (CRC) سومین علت شایع مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است که در کشورهای توسعه‌یافته شیوع بیشتری دارد (۱). درمان‌های سنتی سرطان عمدتاً برداشتن تومور از طریق جراحی، رادیوتراپی و درمان دارویی است؛ با این حال، رادیوتراپی به‌طور اجتناب‌ناپذیری می‌تواند به سلول‌های طبیعی اطراف بافت‌های سرطانی آسیب برساند و باعث شکستن DNA دو رشته‌ای و از بین بردن اطلاعات ژنتیکی شود و همچنین می‌تواند باعث فیروز پیشرونده رگ‌های خونی و بافت‌های نرم شود. درمان دارویی نیز می‌تواند به آسیب بافت‌ها و اندام‌های طبیعی مانند مغز استخوان، کلیه و مخاط دهان منجر شود و متابولیسم طبیعی را مختل کند. التهاب و لنف ادم ثانویه نیز از عوارض جانبی درمان دارویی‌اند (۲). در زمان حاضر، محققان به‌طور مداوم درحال بررسی روش‌های درمانی با عوارض جانبی کم و یافتن ترکیبات ضدسرطانی هستند.

پروبیوتیک‌ها میکروارگانسیم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان کافی، تأثیرات مثبتی بر

میزبان دارند. باکتری‌های اسید لاکتیک^۲ (LAB) یکی از رایج‌ترین انواع میکروبیوتای پروبیوتیک‌اند و برای استفاده در مواد غذایی تأیید شده‌اند (۳). مطالعات قبلی نشان داده‌اند برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک و مواد مغذی تولیدشده توسط آنها اثرات مهمی بر تومورهای بدخیم دارند (۴). لاکتوباسیلوس‌ها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای شکل و تولیدکننده اسید لاکتیک و به‌عنوان فلور نرمال دستگاه گوارش و دستگاه تناسلی انسان‌ها هستند. مطالعه‌ای نشان داد فریکروم^۳ مشتق‌شده از لاکتوباسیلوس کازئی^۴ از طریق مسیر پیام‌رسانی (JNK)^۵ موجب سرکوب سلول‌های توموری می‌شود (۵). مطالعات نشان داده‌اند لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس^۶ و لاکتوباسیلوس کازئی می‌توانند به‌عنوان درمان کمکی برای شیمی‌درمانی ۵-فلوئورواوراسیل^۷ به‌منظور القای آپوپتوز رده سلولی سرطان کولورکتال استفاده شوند (۶). مطالعه جی یون لی و همکاران نشان داد پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس^۸ R0011 و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس R0052 می‌توانند به‌طور مؤثر علائم روده را در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال بهبود بخشند (۷). براساس گزارش‌ها،

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس: نمونه‌های لبنی

از مناطق مختلف استان گیلان تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها، ۱ میلی‌لیتر یا ۱ میلی‌گرم از هر نمونه، به ۹۹ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد اضافه و رقت‌های مختلفی از آنها تهیه شد. هر کدام از رقت‌ها در محیط MRS آگار حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سیکلوهاگزامید (برای جلوگیری از رشد مخمر) کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کلنی‌های رشد کرده در سطح آگار به صورت جداگانه کشت داده و از نظر واکنش گرم و کاتالاز بررسی شدند. از باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت، فاقد اسپور و کاتالاز منفی، کشت خالص تهیه شد و با استفاده از آزمون‌های اکسیداز، رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و تحمل NaCl بررسی شدند.

تأیید مولکولی لاکتوباسیلوس

استخراج DNA: تأیید مولکولی لاکتوباسیلوس با استفاده از روش PCR انجام شد. به این منظور، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (کارمانیا پارس ژن، ایران) انجام شد. ابتدا رسوب سلولی پس از سانتریفیوژ کردن کشت باکتریایی جدا شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده^{۱۶} به آن اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد. محلول به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از اتمام انکوباسیون، ۳۰۰ میکرولیتر از بافر رسوب‌دهنده^{۱۷} به آن اضافه و به مدت ۵ ثانیه ورتکس شد. پس از اضافه کردن ۴۰ میکرولیتر از بافر حامل^{۱۸} و ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، محلول داخل ستون ریخته و سانتریفیوژ با چرخش ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه انجام شد.

مکانیسم ضدسرطانی پروبیوتیک‌ها شامل تغییر ترکیب میکروارگانیزم‌های روده، تخریب ترکیبات سرطان‌زا در روده و تولید ترکیباتی با قابلیت ضدسرطانی و تقویت‌کننده سد روده‌ای در برابر سلول‌های سرطانی است (۸). برخی از پروبیوتیک‌ها و محصولات آنها با تنظیم بیان پروتئین‌های خانواده Bcl-2 و پروتئین‌های خانواده کاسپاز می‌توانند سرطان را مهار کنند؛ برای مثال، لاکتوباسیلوس پاراکازئی^۹ K5 می‌تواند با تنظیم بیان پروتئین‌های خاص خانواده Bcl-2، آپوپتوز سلول‌های Caco-2 سرطان کولون انسان را به روشی وابسته به دوز و زمان القا کند (۹). انتروکوکوس فاسیوم^{۱۰} RM11 و لاکتوباسیلوس فرمنتوم^{۱۱} RM28 که در شیر تخمیر شده یافت می‌شوند، به ترتیب ۲۱ و ۲۳ درصد از تکثیر سلول‌های Caco-2 جلوگیری می‌کنند (۱۰). باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند با سایر فلورهای میکروبی روده انسان همکاری کنند تا کربوهیدرات‌های غیرقابل هضم موجود در رژیم غذایی را به اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه^{۱۲} (SCFAs) مانند بوتیرات و پروپیونات تخمیر کنند و در نتیجه وضعیت پایدار میکروبی‌های روده را بهبود بخشند و رشد سرطان روده بزرگ را مهار کنند (۱۱). پروبیوتیک پدیوکوکوس پنتوساسئوس^{۱۳} GS4 اسید لینولئیک کونژوگه^{۱۴} (CLA) تولید می‌کند که ممکن است نقش مهمی در بهبود سرطان روده بزرگ داشته باشد (۱۲). هدف از این پژوهش بررسی اثر سایتوتوکسیک غلظت‌های مختلف عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس جدا شده از محصولات لبنی بر رده سلولی سرطان روده بزرگ (HT-29) و سلول‌های سالم ورید بند ناف انسان (HUVEC)^{۱۵} با استفاده از روش MTT است.

استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

واکنش PCR: واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس آمپلیکون Taq DNA Polymerase (حاوی Ampliqon Taq DNA Polymerase، dNTPs و منیزیم کلرید)، ۲ میکرولیتر از آغازگرهای عمومی ژن *16S rRNA* (جدول ۱)، ۳ میکرولیتر از DNA و ۵ میکرولیتر آب مقطر و طبق برنامه دمایی و زمانی ارائه شده در جدول ۲ انجام شد؛ در نهایت، محصول PCR با الکتروفورز ارزیابی شد.

مایع داخل لوله جمع‌آوری، خارج و ستون داخل آن قرار داده شد. ۳۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو I^{۱۹} به آن اضافه و به مدت ۱ دقیقه و با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، محلول زیری خارج و ۴۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو II^{۲۰} به داخل ستون اضافه شد. سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. سپس ستون داخل لوله جمع‌آوری جدید قرار گرفت و ۵۰ میکرولیتر آب فاقد دئوکسی‌ریبونوکلاز به آن اضافه شد. سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. DNA

جدول ۱- توالی و مشخصات آغازگرهای ژن *16S rRNA*

منبع	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)	ترتیب توالی	آغازگر	نام ژن
(۱۳)	۵۶	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	27F	<i>16S rRNA</i>
	۵۶	5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'	1492R	<i>16S rRNA</i>

جدول ۲- برنامه دمایی و زمانی واکنش PCR برای تکثیر ژن *16S rRNA*

تعداد چرخه‌ها	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	برنامه
۱	۵ دقیقه	۹۴	واسرشت‌سازی اولیه
۳۲	۴۵ ثانیه	۹۴	واسرشت‌سازی
۳۲	۴۵ ثانیه	۵۵	اتصال آغازگرها
۳۲	۱ دقیقه	۷۲	طویل‌سازی
۱	۱ دقیقه	۷۲	طویل‌سازی نهایی

آگارز ۱ درصد با استفاده از دستگاه الکتروفورز افقی به مدت یک ساعت و با ولتاژ ۸۰ ولت انجام شد. پس از گذشت یک ساعت از حرکت محصول PCR روی ژل، ژل روی صفحه دستگاه یووی ترانس ایلومیناتور قرار داده و از نظر وجود باند بررسی شد.

تعیین توالی و ترسیم درخت فیلوژنی: پس از انجام الکتروفورز و بررسی باندهای تشکیل شده روی ژل، نمونه‌های مدنظر همراه با پرایمرهای *16S rRNA* برای تعیین توالی به شرکت (سیناژن، ایران) ارسال شدند.

الکتروفورز محصول PCR: الکتروفورز محصول PCR

در ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. برای آماده کردن ژل آگارز، ۰/۳ گرم پودر آگارز به کمک حرارت در ۳۰ میلی‌لیتر بافر TAE IX حل شد. پس از ریختن آگارز در قالب و تشکیل چاهک‌های مخصوص بارگذاری نمونه، محصول PCR قبل از بارگذاری روی پارافلم قرار داده شد و با بافر بارگذاری حاوی بروموفنول بلو، گلیسرول و EDTA ترکیب و با استفاده از میکروپیپت در قسمت بالایی ژل بارگذاری شد. سپس الکتروفورز روی ژل

سونیکاتور انجام گرفت. با استفاده از سانتریفیوژ، دیواره‌های سلولی رسوب داده شدند و مایع رویی به عنوان عصاره سیتوپلاسمی جدا شد. سنجش پروتئین موجود در عصاره سیتوپلاسمی با روش برادفورد محاسبه شد. سپس غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم / میلی لیتر از عصاره سیتوپلاسمی تهیه و با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل شدند.

کشت سلولی: رده سلولی سرطان کولون (HT29) و سلول‌های اندوتلیالی ورید ناف انسان (HUVEC) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد محلول پنی سیلین استریپتومایسین (Pen-Strep)^{۲۹} کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند.

بررسی بقای سلولی (MTT assay): به منظور بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره باکتریایی از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد (۱۶). اساس این روش شکستن نمک زرد تترازولیوم توسط سلول‌های زنده به کریستال‌های فورمازان بنفش رنگ غیرمحلول در آب است. نمک تترازولیوم در حضور آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده، شکسته و به ترکیب نامحلول فورمازان به رنگ بنفش تبدیل می‌شود. فورمازان توسط حلال‌های آلی مانند DMSO، حل و جذب نوری رنگ بنفش توسط اسپکتروفوتومتری در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت می‌شود.

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر (۱۰^۵ × ۱) از سلول‌های HT-29 و HUVEC در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، ۲۰۰ میکرولیتر از

سپس توالی دریافتی هر جدایه با توالی‌های موجود در بانک ژنی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)^{۲۱} توسط ابزار پایه‌ای برای جستجوی برهم‌نهی‌های موضعی (BLAST)^{۲۲} مقایسه شد تا نزدیک‌ترین سویه به جدایه‌ها شناسایی شود. گفتنی است از میان ۲ سویه جداسازی شده، جدایه L1 برای ادامه این پژوهش انتخاب شد، درخت فیلوژنی آن، رسم و اثر ضدسرطانی آن ارزیابی شد. به منظور رسم درخت فیلوژنی، توالی‌های یافت شده به همراه توالی جدایه مدنظر وارد نرم افزار تجزیه و تحلیل ژنتیک تکاملی مولکولی (MEGA 7، ۷، مگا)^{۲۳} شدند و هم‌ردیفی^{۲۴} آنها انجام شد. پس از هم‌ردیفی، درخت فیلوژنی با روش اتصال همسایگی (NJ)^{۲۵} و بوت استرپ (Bootstrap) ۱۰۰۰ رسم شد (۱۴، ۱۵).

آماده‌سازی عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس:

برای آماده‌سازی عصاره سیتوپلاسمی، کلنی‌های رشد کرده روی MRS آگار^{۲۶} به MRS برات، منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. سپس ۱ میلی لیتر از کشت ۲۴ ساعته در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت تازه MRS برات مجدداً کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد تا میزان جذب نوری محیط کشت حاوی باکتری به ۱ برسد. سپس برای جداسازی رسوب سلولی، محیط کشت حاوی باکتری به لوله منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از شستشو با محلول نمکی بافر فسفات (PBS)^{۲۷}، باکتری با استفاده از روش فریز - ذوب کردن^{۲۸} لیز شد و سپس عمل خرد کردن با

ساعت، محتوای چاهک‌ها دور ریخته و به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه شد و پلیت به مدت ۵ دقیقه روی چرخنده^{۳۰} قرار گرفت تا کریستال‌های فورمازان به‌طور کامل پخش شود؛ درنهایت، جذب نوری چاهک‌های رنگ‌شده در طول موج ۴۹۰ نانومتر با دستگاه خوانشگر میکروپلیت^{۳۱} (بایوتک ELX 800، آمریکا) خوانده شد و میزان بقای سلولی از فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times (\text{جذب نوری سلول‌های کنترل} / \text{جذب نوری سلول‌های تیمار شده}) = \text{میزان بقای سلولی}$$

نمونه‌ها بود (شکل ۱)؛ درنهایت، به‌منظور تأیید محصول PCR، نمونه‌های منتخب به همراه آغازگرهای اختصاصی برای تعیین توالی به شرکت (سیناژن، ایران) فرستاده شدند. برای شناسایی باکتری مدنظر در حد گونه، توالی‌های دریافتی با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه NCBI با استفاده از بلاست مقایسه شدند. نتایج بلاست نشان دادند توالی نمونه‌های L1 و L2 با مشابهت ۸۸/۵۱ درصد و ۸۷/۳۲ درصد، به‌ترتیب مربوط به لاکتوباسیلوس دلبروکی HBUAS53123 و لیموسی لاکتوباسیلوس فرمنتوم HFD1 هستند (جدول ۳).

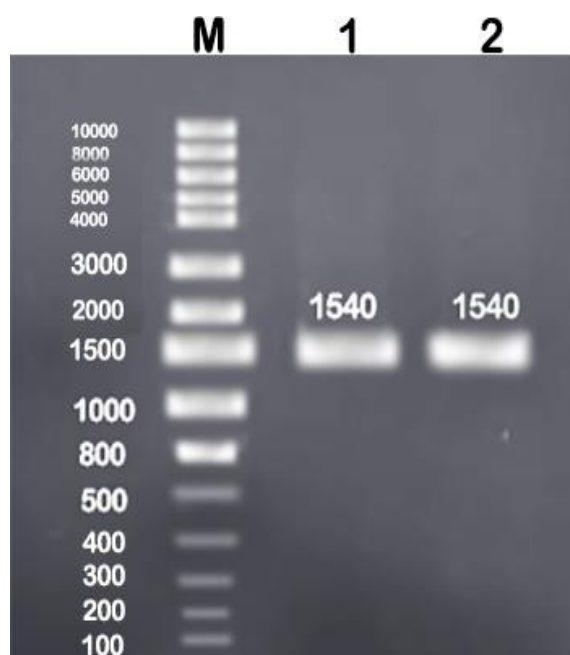
توسیم درخت فیلوژنی: براساس توالی ژن *16S rRNA* ارتباط فیلوژنی جدایه L1 با دیگر سویه‌های موجود در پایگاه NCBI تعیین شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، جدایه L1 و لاکتوباسیلوس دلبروکی HBUAS53123 با بوت استرپ ۶۲ درصد در یک خوشه از درخت فیلوژنی قرار گرفتند که می‌توان نتیجه گرفت نزدیک‌ترین سویه به جدایه L1 است.

غلظت‌های مختلف عصاره سیتوپلاسمی در چاهک‌ها ریخته شد. در چاهک‌های کنترل هیچ تیماری روی سلول‌ها صورت نگرفت. سپس انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محتوای پلیت، خالی و با PBS شستشو داده شد و داخل هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT، اضافه و میکروپلیت در فویل آلومینیومی قرار داده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از اتمام ۴

نتایج

جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها: نمونه‌های لبنی پس از رقیق‌سازی و تهیه سوسپانسیون، در MRS آگار به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. کلنی‌های ظاهرشده بر سطح آگار بررسی شدند و از کلنی‌های گرد و مایل به رنگ سفید کشت خالص تهیه شد. کلنی‌ها براساس رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز بررسی شدند. تعداد ۵ کلنی باکتریایی دارای خواص بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس از جمله میله‌ای شکل، گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند. سپس کلنی‌های تأییدشده توسط آزمون‌های تحمل غلظت‌های مختلف NaCl و رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد ارزیابی و درنهایت، ۲ نمونه منتخب L1 و L2 برای شناسایی مولکولی استفاده شدند.

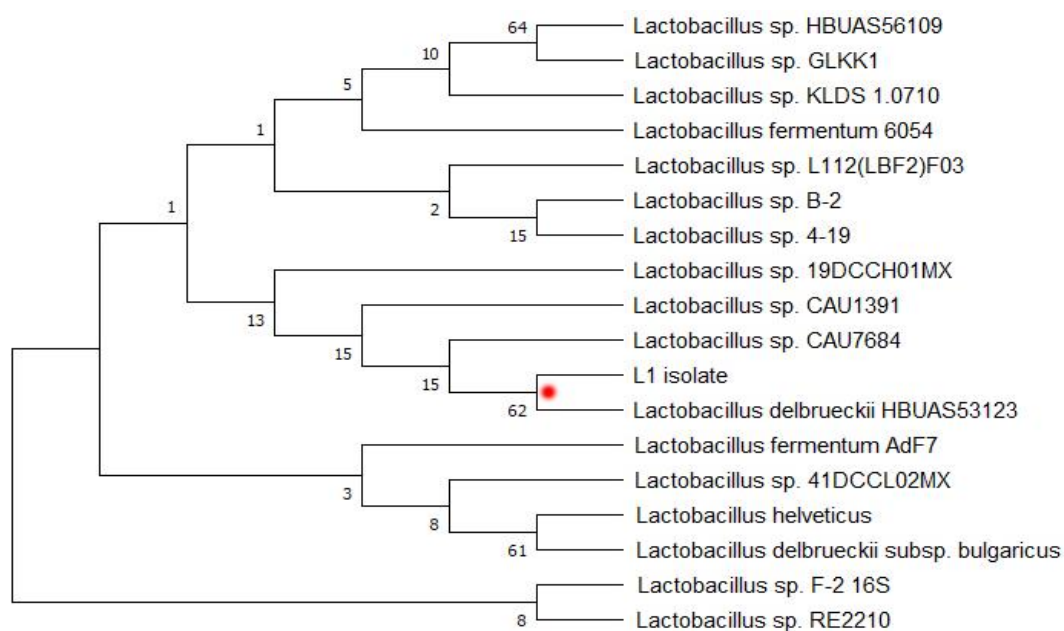
شناسایی باکتری‌ها با استفاده از PCR و توالی‌یابی: آزمایش PCR برای ژن *16S rRNA* در ۲ جدایه مدنظر، انجام و محصول PCR الکتروفورز شد. محصول PCR هر ۲ نمونه، باندی حدود ۱۵۴۰ جفت‌باز را روی ژل ۱ درصد ایجاد کردند که نشان‌دهنده تکثیر ژن *16S rRNA* در



شکل ۱- تصویر قطعه ۱۵۴۰ جفت‌بازی ژن *16S rRNA* جدایه‌های مطالعه شده (ستون ۱ مربوط به جدایه L1 و ستون ۲ مربوط به جدایه L2 است). ستون M مارکر ۱۰۰۰ جفت‌بازی

جدول ۳- نتایج بلاست توالی ژن *16S rRNA* جدایه‌های L1 و L2 با توالی‌های موجود در سایت NCBI

شماره دسترسی	همپوشانی (درصد)	همسانی (درصد)	سویه	جدایه
MH392983.1	۹۲	۸۸/۵۶	لاکتوباسیلوس دلبروکی HBUAS53123	L1
CP050919.1	۲۸	۸۷/۳۲	لیموسی لاکتوباسیلوس فرمنتوم HFD1	L2

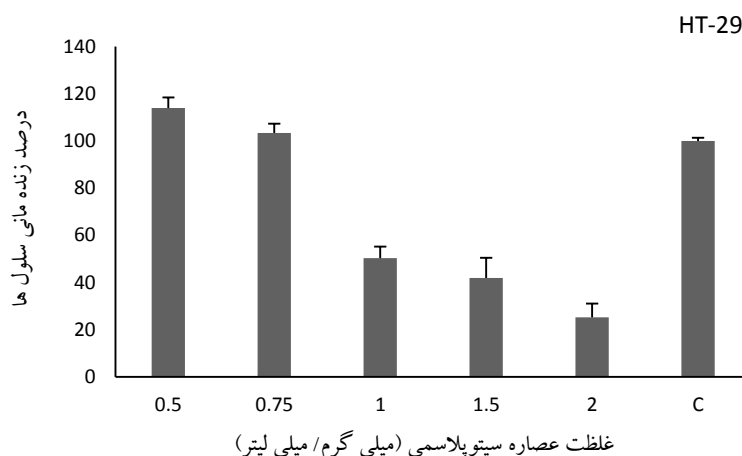


شکل ۲- درخت فیلوژنتیک جدایه L1 براساس آنالیز توالی ژن *16S rRNA*

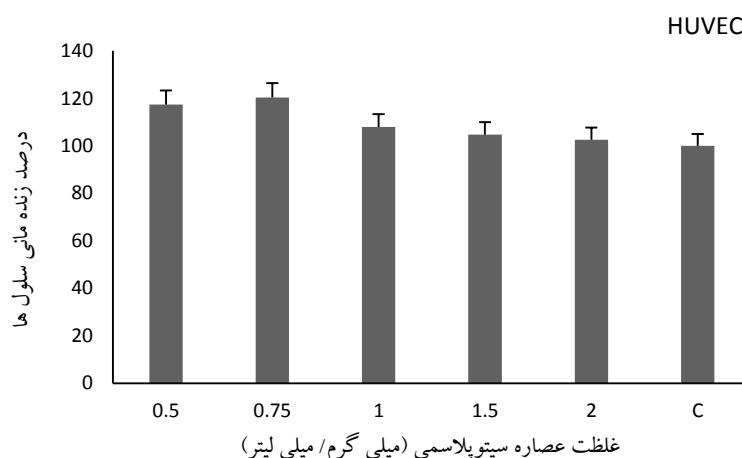
بررسی میزان سمیت سلولی با آزمون MTT: تیمار

سلول‌های HT29 با غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد. غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر رشد سلولی اثر مهاری نداشتند؛ با این حال، غلظت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، زنده‌مانی سلول‌ها را به ترتیب $50 \pm 4/87$ ، $41 \pm 8/61$ و $25 \pm 5/80$ درصد کاهش دادند. براساس نتایج، فعالیت ضد تکثیری عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس به صورت وابسته به

دوز بود و در غلظت ۲ میکروگرم / میلی‌لیتر بیشترین اثر مهاری (۷۵ درصد) مشاهده شد. همچنین میزان IC_{50} عصاره سیتوپلاسمی بر رده سلولی HT-29 معادل ۱/۴۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (شکل ۳). همچنین، نتایج بررسی سمیت سلولی در رده سلولی نرمال HUVEC نشان دادند غلظت‌های استفاده‌شده از عصاره سیتوپلاسمی در مدت ۲۴ ساعت نه تنها بر سلول اثر مهاری ندارند، بلکه تکثیر سلولی را به میزان غیر چشمگیری افزایش می‌دهند (شکل ۴).



شکل ۳- درصد بقای سلول‌های HT-29 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس



شکل ۴- درصد بقای سلول‌های HUVEC پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس

بحث و نتیجه گیری

با وجود پیشرفت‌های اخیر در استراتژی‌های درمان سرطان، سرطان‌ها دومین عامل مرگ و میر در سراسر جهان‌اند. اگرچه برخی از درمان‌های ضدسرطان مانند جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی با موفقیت‌های متفاوتی در بسیاری از انواع بیماران سرطانی استفاده شده است، این درمان‌ها گران‌اند و عوارض جانبی زیان‌باری از جمله سمیت قلبی، اسهال، تنگی روده و ناتوانی در جذب مؤثر مواد مغذی دارند (۱۷، ۱۸). پروبیوتیک‌ها به عنوان درمان‌های مکمل برای افزایش اثربخشی عوامل ضدسرطان پیشنهاد شده‌اند و در مطالعات متعددی فعالیت ضدسرطانی آنها بررسی شده است؛ با این حال، فعالیت ضدتکثیری پروبیوتیک‌ها بسیار وابسته به سویه است و به طور گسترده‌ای از یک سویه به سویه دیگر و با توجه به نوع سلول سرطانی متفاوت است. علاوه بر این، استفاده از اجزای مختلف باکتریایی از جمله دیواره‌های سلولی، مایع رویی کشت و عصاره سیتوپلاسمی نتایج متفاوتی مانند فعالیت ضدتکثیری، القای آپوپتوز و سایر خواص ضدسرطانی ایجاد می‌کند. در مطالعه حاضر لاکتوباسیلوس دلبروکی براساس روش‌های متداول کشت و بیوشیمیایی و همچنین آنالیز مولکولی براساس ژن *16S rRNA* از نمونه‌های لبنی جداسازی شد. سپس اثرات ضدسرطانی عصاره سیتوپلاسمی آن با استفاده از آزمون سمیت‌سنجی بررسی شدند.

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس دلبروکی بر سلول‌های سرطانی HT-29 نشان دادند غلظت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، طی زمان ۲۴ ساعت زنده‌مانی سلول‌ها را به ترتیب $(50 \pm 4/87)$ (P value < 0.01)، $(41 \pm 8/61)$ (P value < 0.01) و $(25 \pm 5/80)$ (P value < 0.001) درصد کاهش

می‌دهند؛ با این حال، غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ از عصاره موجب افزایش ناچیزی در تکثیر سلول‌های سرطانی شدند. همچنین، غلظت ۱/۴۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره سیتوپلاسمی رشد سلول‌های HT-29 را تا ۵۰ درصد کاهش داد. در مطالعه‌ای که اثر ضدتکثیری عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی بر رده سلولی HT-29 با روش MTT بررسی شد، پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته غلظت‌های ۵ و ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی به ترتیب زنده‌مانی سلول‌ها را به میزان ۴۰ و ۱۹ درصد کاهش دادند (P value < 0.001)؛ با این حال، غلظت‌های ۰/۸ و ۰/۰۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره لاکتوباسیلوس دلبروکی به صورت چشمگیری (P value < 0.05) رشد سلول‌های سرطانی را افزایش دادند (۱۹). براساس این مشاهدات به نظر می‌رسد غلظت‌های پایین‌تر عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس دلبروکی، با ایجاد تغییراتی در مسیر پیام‌رسانی سلولی موجب افزایش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی HT-29 می‌شود.

در پژوهش حاضر، عصاره سیتوپلاسمی علاوه بر اینکه هیچ سمیتی بر سلول‌های سالم اندوتلیال و رید ناف انسان نداشت، به شکل غیرچشمگیری زنده‌مانی سلول‌ها را افزایش داد. با توجه به اینکه سلول‌های اندوتلیال و رید ناف انسان پتانسیل مهاجرت به ماتریکس خارج سلولی و تشکیل عروق خونی جدید را دارند و برای رگ‌زایی و متاستاز، مهاجم و برهم‌کنش سلول‌های توموری با سلول‌های میزبان ضروری‌اند، به نظر می‌رسد افزایش سلول‌های HUVEC به نفع سلول‌های سرطانی و افزایش شانس متاستاز باشد (۲۰).

ریخت‌شناسی از جمله چروکیدگی سلولی، متراکم شدن کروماتین و تشکیل اجسام آپوپتوتیک^{۳۳} مشخص می‌شود (۲۶).

فعالیت ضدسرطانی لاکتوباسیل‌ها می‌تواند ناشی از پلی‌ساکاریدها و پپتیدوگلیکان‌ها باشد؛ با این حال، حضور آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و سموم موجود در عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس‌ها به‌طور چشمگیری زنده ماندن سلول‌های سرطانی کولورکتال را کاهش می‌دهند (۲۷). اثرات ضدسرطانی لاکتوباسیلوس‌ها می‌تواند به دلیل وجود پپتیدهای موجود در عصاره سیتوپلاسمی آنها به نام لاکتوفرین باشد. لاکتوفرین فعالیت ضدسرطانی خود را با القای آپوپتوز و همچنین مهار چرخه سلولی و مهاجرت در سلول‌های سرطانی اعمال می‌کند. اساس ویژگی ضدسرطانی لاکتوفرین را می‌توان به اتصال الکترواستاتیکی ناحیه N ترمنال کاتیونی این پپتید، به مولکول‌های اسیدی از جمله پروتئوگلیکان‌ها، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها^{۳۴} و اسیدهای سیالیک نسبت داد که در سطح سلول‌های سرطانی به شدت بیان می‌شوند (۲۸). یکی دیگر از مکانیسم‌های ضدسرطانی لاکتوباسیلوس‌ها، تقویت سیستم ایمنی با تولید سیتوکین‌های IFN- γ و TNF- α و در نتیجه، حذف سلول‌های توموری است (۲۹).

همچنین مشخص شده است یکی از مکانیسم‌های ضدتکثیری لاکتوباسیلوس، وجود اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه در عصاره سیتوپلاسمی آن است. در واقع، SCFAs همراه با لیگاند‌های TLR، با تأثیر بر پیام‌رسانی سلولی، در چرخه سلولی و تکثیر اختلال ایجاد می‌کنند (۳۰)؛ در نتیجه، اثرات پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس به تحریک سیستم ایمنی محدود نمی‌شوند؛ بلکه از زنده ماندن و تکثیر سلول‌های سرطانی روده بزرگ

در مطالعه‌ای اثر غلظت‌های ۲۰۰۰-۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی لاکتوکوکوس لاکتیس تهیه‌شده با روش ذوب - انجماد بر رده سلولی سرطان روده بزرگ SW480 ارزیابی شد. براساس نتایج، اجزای مختلف باکتریایی به ترتیب زنده‌مانی سلول‌ها را در محدوده ۹۸-۴۹ درصد و محدوده ۹۷-۴۷ درصد کاهش دادند؛ با این حال، اثرات سمیت بر رده سلولی مطالعه‌شده در مقایسه با گروه کنترل تیمارنشده تغییر چشمگیری نداشت (۲۱). در مطالعه کیم و همکاران^{۳۲} (۲۲)، عصاره سیتوپلاسمی لاکتوکوکوس لاکتیس فعالیت ضدتکثیری چشمگیری در برابر رده سلولی سرطان روده بزرگ SNUC2A نشان داد. براساس نتایج غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره سیتوپلاسمی، زنده‌مانی سلول سرطانی را تا بیش از ۸۰ درصد کاهش داد.

در مطالعه‌ای مشخص شد کفیر به‌طور چشمگیری نسبت *Bax* به *Bcl-2* را در سلول‌های سرطانی HT-29 و Caco-2 افزایش می‌دهد که نشان‌دهنده القای آپوپتوز سلولی در رده‌های سلولی سرطانی است (۲۳). همچنین مشخص شده است لاکتوباسیلوس روتری با شرکت در مسیر خارجی آپوپتوز از بروز سرطان روده بزرگ جلوگیری می‌کند (۲۴). لاکتوباسیلوس می‌تواند با تولید نیترات و نیتريت بر *Bcl-2* اثر مهاری داشته باشد و به این شیوه موجب القای آپوپتوز شود (۲۵). آپوپتوز، یک فرایند تنظیم‌شده مرگ سلولی است که باعث حذف آسیب‌ها یا سلول‌های ناخواسته، بدون آسیب در ارگانیسم‌های چندسلولی می‌شود. این فرایند به منظور کنترل رشد و ثابت نگه‌داشتن شرایط محیط داخلی بدن انجام می‌شود و از طریق تغییرات

Pichia kudriavzevii AS-12, induces apoptosis pathways in human colorectal cancer cell lines. *Journal of Nutrition Research* 2017; 41: 36-46.

- (5) Ijiri, M., Fujiya, M., Konishi, H., Tanaka, H., Ueno, N., Kashima, S., Moriichi, K., Sasajima, J., Ikuta, K., & Okumura, T. Ferrichrome identified from *Lactobacillus casei* ATCC334 induces apoptosis through its iron-binding site in gastric cancer cells. *Journal of Tumor Biology* 2017; 39 (6): 1010428317711131.
- (6) Baldwin*, C., Millette*, M., Oth, D., Ruiz, M. T., Luquet, F. M., & Lacroix, M. Probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *L. casei* Mix Sensitize Colorectal Tumoral Cells to 5-Fluorouracil-Induced Apoptosis. *Journal of Nutrition and Cancer* 2010; 62 (3): 371-378.
- (7) Lee, J. Y., Chu, S. H., Jeon, J. Y., Lee, M. K., Park, J. H., Lee, D. C., Lee, J. W., & Kim, N. K. Effects of 12 weeks of probiotic supplementation on quality of life in colorectal cancer survivors: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Digestive and Liver Disease* 2014; 46 (12): 1126-1132.
- (8) Zhu, Q., Gao, R., Wu, W., & Qin, H. The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. *Journal of Tumor Biology* 2013 34; 3: 1285-1300.
- (9) Rosa, L. S., Santos, M. L., Abreu, J. P., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Silva, H. L. A., Esmerino, E. A., Duarte, M. C. K. H., Pimentel, T. C., Freitas, M. Q., Silva, M. C., Cruz, A. G., & Teodoro, A. J. Antiproliferative and apoptotic effects of probiotic whey dairy beverages in human prostate cell lines. *Food Research International Journal* 2020; 37: 109450.
- (10) Thirabunyanon, M., Boonprasom, P., & Niamsup, P. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Journal of Biotechnology Letters* 2008; 31 (4): 571-576.

جلوگیری می کنند. نتایج این مطالعه نشان دادند عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس دلبروکی بر رشد سلول های سرطانی HT-29 اثر مهاری دارد که احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات ضدسرطانی است.

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، استفاده از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس دلبروکی، ابزاری امیدوارکننده برای پیشگیری از بروز سرطان روده بزرگ می تواند باشد؛ با این حال، انجام مطالعات بیشتر برای شناسایی مسیرهای پیام رسانی و مکانیسم های دخیل در اثرات ضدسرطانی این باکتری و شناسایی ترکیبات موجود در عصاره سیتوپلاسمی آن لازم است.

سپاسگزاری

از آقای دکتر حسین زحمتکش برای یاری های ارزنده شان طی پژوهش حاضر قدردانی می شود.

References

- (1) dos Reis, S. A., da Conceição, L. L., Siqueira, N. P., Rosa, D. D., da Silva, L. L., & Peluzio, M. do C. G. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Journal of Nutrition Research* 2017; 37: 1-19.
- (2) Liu, C., Zheng, J., Ou, X., & Han, Y. Anti-cancer Substances and Safety of Lactic Acid Bacteria in Clinical Treatment. *Journal of Frontiers in Microbiology* 2021; 12.
- (3) Riaz Rajoka, M. S., Zhao, H., Mehwish, H. M., Li, N., Lu, Y., Lian, Z., Shao, D., Jin, M., Li, Q., Zhao, L., & Shi, J. Anti-tumor potential of cell free culture supernatant of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *Food Research International Journal* 2019; 123: 286-297.
- (4) Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z., Mousavi jam, A., & Yari Khosroushahi, A. Secretion metabolites of probiotic yeast,

- (11) Wang, G., Yu, Y., Wang, Y., Wang, J., Guan, R., Sun, Y., Shi, F., Gao, J., & Fu, X. Role of SCFAs in gut microbiome and glycolysis for colorectal cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology* 2019; 234 (10): 17023-17049.
- (12) Dubey, V., Ghosh, A. R., Bishayee, K., & Khuda-Bukhsh, A. R. Appraisal of the anti-cancer potential of probiotic *Pediococcus pentosaceus* GS4 against colon cancer: in vitro and in vivo approaches. *Journal of Functional Foods* 2016; 23: 66-79.
- (13) Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial *16S rRNA* Genes. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 2008; 74 (8): 2461-2470.
- (14) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. In: *Molecular Biology and Evolution*. London: Oxford University Press (OUP); 1993.
- (15) Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Journal of Molecular Biology and Evolution* 2018; 35 (6): 1547-1549.
- (16) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65 (1-2): 55-63.
- (17) Perez-Tomas, R. Multidrug Resistance: Retrospect and Prospects in Anti-Cancer Drug Treatment. *Journal of Current Medicinal Chemistry* 2006; 13 (16): 1859-1876.
- (18) Curigliano, G., Mayer, E. L., Burstein, H. J., Winer, E. P., & Goldhirsch, A. Cardiac Toxicity from Systemic Cancer Therapy: A Comprehensive Review. *Journal of Progress in Cardiovascular Diseases* 2010; 53 (2): 94-104.
- (19) 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. *Journal of Nutrition and Cancer* 2019; 72 (8): 1390-1399.
- (20) Eccles, S. A. Parallels in invasion and angiogenesis provide pivotal points for therapeutic intervention. *The International Journal of Developmental Biology* 2004; 48 (5-6): 583-598.
- (21) Hosseini, S. S., Goudarzi, H., Ghalavand, Z., Hajikhani, B., Rafeieiatani, Z., & Hakemi-Vala, M. Anti-proliferative effects of cell wall, cytoplasmic extract of *Lactococcus lactis* and nisin through down-regulation of cyclin D1 on SW480 colorectal cancer cell line. *Iranian Journal of Microbiology* 2020; 12 (5): 424-430.
- (22) Kim, J. Y., Woo, H. J., Kim, Y. S., Kim, K. H., & Lee, H. J. Cell Cycle Dysregulation Induced by Cytoplasm of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in SNUC2A, a Colon Cancer Cell Line. *Journal of Nutrition and Cancer* 2003; 46 (2): 197-201.
- (23) Khoury, N., El-Hayek, S., Tarras, O., El-Sabban, M., El-Sibai, M., & Rizk, S. Kefir exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic effects on colon adenocarcinoma cells with no significant effects on cell migration and invasion. *International Journal of Oncology* 2014; 45 (5): 2117-2127.
- (24) Iyer, C., Kusters, A., Sethi, G., Kunnumakkara, A. B., Aggarwal, B. B., & Versalovic, J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF- κ B and MAPK signalling. *Journal of Cellular Microbiology* 2008; 10 (7): 1442-1452.
- (25) Xu, W., Liu, L. Z., Loizidou, M., Ahmed, M., & Charles, I. G. (2002). The role of nitric oxide in cancer. *Cell Research* 2002; 12 (5-6): 311-320.

- (26) Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35 (4): 495-516.
- (27) Tukenmez, U., Aktas, B., Aslim, B., & Yavuz, S. The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells in vitro. *Journal of Scientific Reports* 2019; 9 (1): 1-14.
- (28) Cutone, A., Ianiro, G., Lepanto, M. S., Rosa, L., Valenti, P., Bonaccorsi di Patti, M. C., & Musci, G. Lactoferrin in the Prevention and Treatment of Intestinal Inflammatory Pathologies Associated with Colorectal Cancer Development. *Cancers* 2020; 12 (12): 3806.
- (29) Brisbin, J. T., Gong, J., Parvizi, P., & Sharif, S. Effects of Lactobacilli on Cytokine Expression by Chicken Spleen and Cecal Tonsil Cells. *Journal of Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17 (9): 1337-1343.
- (30) Kahouli, I., Malhotra, M., Westfall, S., Alaoui-Jamali, M. A., & Prakash, S. Design and validation of an orally administrated active *L. fermentum*-*L. acidophilus* probiotic formulation using colorectal cancer Apc Min/+ mouse model. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 2016; 101 (5): 1999-2019.
- 23- Molecular Evolutionary Genetics Analysis
 24- Alignment
 25- Neighbor Joining
 26- De man, rogosa and sharpe (MRS) agar
 27- Phosphate-buffered saline (PBS)
 28- Freeze-Thaw
 29- Penicillin Streptomycin solution (Pen-Strep)
 30- Rotator
 31- Microplate Reader
 32- Kim et al.
 33- Apoptotic
 34- Glycosaminoglycans (GAGs)

-
- 1- Colorectal cancer (CRC)
 2- Lactic acid bacteria (LAB)
 3- Ferrichrome
 4- *Lactobacillus casei*
 5- c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway
 6- *Lactobacillus acidophilus*
 7- 5-fluorouracil (5-FU)
 8- *Lactobacillus rhamnosus*
 9- *Lactobacillus paracasei*
 10- *Enterococcus faecium*
 11- *Lactobacillus fermentum*
 12- Short-chain fatty acids (SCFAs)
 13- *Pediococcus pentosaceus* GS4
 14- Conjugated linoleic acids (CLA)
 15- Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)
 16- Lysis buffer
 17- Precipitation buffer
 18- Carrier buffer
 19- Wash buffer I
 20- Wash buffer II
 21- National Center for Biotechnology Information
 22- Basic Local Alignment Search Tool