بسم الله الرحمن الرحیم

بررسی تاثیر نانو ذرات خرفه *Portulaca oleracea* L. و عصاره باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* بر روی رده سلولی ***CacoII*** بر روی بیان ژن های CASPAS8 و CASPAS 9

مقدمه: نانو ذرات خرفه *Portulaca oleracea* و ضمنا باکتری‌های پروبیوتیك که میکروارگانیسم‌های زنده و مفیدی هستند که با تأثیر بر آنزیم‌های گوارشی حیوانات و انسان‌ها، مهار عوامل سرطان‌زا را در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی و ترکیبات القا کننده سرطان و تومورها در حیوانات آزمایشگاهی نقش مؤثری در جهت مقابله با سرطان ایفا می‌کنند. هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر نانو ذرات خرفه *Portulaca oleracea* و عصاره باکتری پروبیوتیک*Lactobacillus plantarum* روی رده سلولی *CacoII* بر روی بیان ژن های CASPAS8 و CASPAS 9 می‌باشد.

مواد و روش‌ها : در این مطالعه که به صورت تجربی انجام شده است از کشت باکتری *Lactobacillus plantarum*، مایع رویی جدا شد.سپس اثرات سمیت سلولی مایع رویی جدا شده از باکتری و نانوذرات خرفه *Portulaca oleracea* همچنین باکتری‌ها بر روی رده سلولی سرطان کولون *CacoII* در مدت زمان 24،48و72ساعت با استفاده از روش MTT بررسی شد.همچنین بیان ژن‌های CASPAS9و CASPAS9با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج .:مایع رویی که حاوی باکتری *Lactobacillus plantarum* *باعث* کاهش تکثیر سلولی می شوند .نتایج به دست آمده نشان داد که درصد مهاري محلول رویی (سوپرناتانت) *Lactobacillus*

plantarum روي سلول‌هاي سرطانی *CacoII* ، ژن‌های CASPAS9و CASPAS9 در طول 48 ساعت افزایش بیان معناداری داشته است.

نتیجه‌گیری :مي‌توان از باكتري *Lactobacillus plantarum* و نانوذرات خرفه *Portulaca oleracea* ، جهت ايجاد يك راهكار نوين درماني با تأثير بالا، عوارض جانبي پايين، بي‌خطر از نظر بيولوژيكي و هزينه كمتر براي درمان و همچنين پيشگيري از سرطان كولون بهره برد.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، *Lactobacillus plantarum*، سرطان کولون، *Portulaca oleracea*، CacoII، CASPAS8، CASPAS89

1-مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده، غیر بیماری‌زا و بی‌خطری هستند که برای بهبود تعادل میکروبی ، به ویژه در دستگاه گوارش، تجویز می‌شوند واثرات خوبی روی سلامت میزبان خود بر جای می‌گذارند.باکتری‌های اسیدلاکتیک، مانند گونه‌های لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس و بیفیدوباکتریوم مهمترین پروبیوتیک‌هایی هستند که به عنوان مکمل‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. پروبیوتیک‌ها از طریق رونده، کاهش تهاجم ارگانیسم‌های بیماری‌زا و اصلاح پاسخ pHمکانیسم‌های مختلف، از جمله کاهش ایمنی میزبان، اثرات مفید خود را اعمال می‌کنند. این باکتری‌ها علاوه بر کمک به گوارش، مولکول‌های پیچیده و ترکیباتی مانند ویتامین‌ها و آنتی بیوتیک‌های مختلف را تولید می‌کنند که برای بدن مفید می‌باشند.

خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* گیاهی علفی و یک ساله از خانواده Portulacaceae با 21 جنس و 56 گونه مختلف است[۱, ۲]. گیاه خرفه در مناطقی با شرایط آب و هوایی مثل خشکی، شوره زار و کمبود مواد مغذی نیز رشد می‌کند[۳].

ترکیبات شیمیایی موجود در قسمت‌های مختلف این گیاه شامل کربوهیدرات، پروتئین، کلسیم، روی، پتاسیم،سدیم،منگنز، آهن، فسفر،سلنیوم و ویتامین های C،E،A،فیبر،کوآنزیم Q10،اسید آمینه‌های ضروری ،آلفاتوکوفرول،گلوتاتیون،کاروتن،پلی ساکاریدها،ساپونین،آلکالوییدها،اسیدهای چرب،استروییدها،نوراپی‌نفرین و دوپامین است. فلاونوئیدها از دیگر ترکیبات موجود در خرفه هستند که جز خانواده پلی‌فنول‌ها به شمار می‌آیند. از جمله ترکیبات فلاونوئیدی موجود در این گیاه می‌توان به کرستین، کامفرول،میرستین، آپیجنین، لوتئولین، ژنیستئین و ژنیستین اشاره کرد،که به دلیل خصوصیات آنتی اکسیدانی یا ضد رادیکالی‌شان شناخته شده‌اند. به علاوه، آنها دارای فعالیت ضد التهابی نیز هستند. آنتی‌اکسیدان‌ها، مولکول‌ها یا ترکیباتی هستند که به عنوان از بین برنده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند.این رادیکال‌ها می‌توانند به سایر مولکول‌های حیاتی آسیب رسانده و باعث از دست رفتن عملکرد آنها شوند(۴, ۵).

2-مواد و روش ها

2-1-تهیه سویه باکتری

سـویه باکتری *Lactobacillus plantarum* با شـناسـنامه های مربوطه 14917ATCC از مرکز ذخایر ژنتیک تهران تهیه شد.

2-2-کشت باکتری

کپسول حاوی باکتری *Lactobacillus plantarum* به صورت کاملا استریل، زیر هود لامینار باز کرده و مقداری از محیط اختصـاصی MRS را توسط سمپلر درون کپسول ریخته تا کپسول داخل محیط حل شود، سپس محیط حاوی باکتری را از کپسول توسط سمپلر خارج کرده و به ارلن حاوی محیط MRS اضافه شد ، ارلن را در انکوباتور شیکر به مدت 48 ساعت درانکوباتوردر دمای 37 درجه قرار داده شد.

برای تهیه متابولیت باکتری، لوله حاوی محیط کشـت و باکتری را در سـانتریفیوژ با دور 3000 به مدت 5 دقیقه قرار داده شـد، محلول رویی حاوی متابولیت باکتری اسـت.ابتدا آن را با استفاده از فیلتر ۰/۲۲میکرون استریل کرده و سپس از غلظت‌های مختلف آن جهت مشخص کردن 50IC استفاده شد.

2-3- تهیه لاین سلولی

رده های سلولی Cacoiiبا شناسنامه های مربوطه C.NO NCBI139از انستیتوپاستور خریداری شد.

2-4- کشت سلولی

کشت سلول‌های جانوری روشی مناسب برای مطالعه سلول‌های جداشده از بافت‌های مختلف انسانی و حیوانی می باشد. این روش امروزه در مطالعات زیادی نظیر تولید واکسن‌ها، مطالعات مربوط به سلول‌های سرطانی، تولید آنتی‌بادی‌های‌مونوکلونال، هورمون تراپی و غیره کاربردهای بسیاری دارد. در این روش سلول‌های خاصی از بافت‌های جانوری جداشده و در محیط‌های کشت مخصوص در شرایط جوی مناسب، جهت مطالعات مختلف، رشد و تکثیر می‌یابند. در تکنیک کشت سلول عوامل مهمی مانند محیط کشت‌های مناسب،pH مناسب محیط، شرایط استریل محیط، درصد اکسیژن و دی اکسید کربن، دما و بسیاری عوامل در حصول نتیجه مناسب اثر گذار می‌باشند.

2-5- نگه‌داری رده سلولی

سلول در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا که حاوی 10٪ سرم جنین گوساله و 1٪ آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین استرپتومایسین و در انکوباتور با شرایط 5٪ دی‌اکسیدکربن و رطوبت 90٪ قرار داده شد.

2-6-پاساژ سلول‌ها

زمانی که تراکم سلولی در فلاسک‌ها به بیش از 85 درصد کف فلاسک رسید، سلول‌ها پاساژ داده می‌شوند. به این صورت که ابتدا در زیر هود لامینار، محیط کشت خالی و سلول‌ها دو مرتبه با PBS استریل شستشو می‌شوند و به آن 1 میلی لیتر محلول 0.25٪EDTA –Trypsin استریل اضافه و به مدت 3 دقیقه در دمای

37 درجه در انکوباتور قرار می‌گیرند و پس از مشـاهده شناور شدن با میکروسکوپ معکوس، برای توقف فعالیت آنزیم هم حجم آنزیم بکار رفته محیط کشـت حاوی سـرم به فلاسـک اضـافه شد و محتوای داخل فلاسـک بین فلاسـک‌های جدید تقسـیم گردید. نهایتا فلاسک‌ها در انکوباتور با شرایط استاندارد نگهداری شدند. فلاسک‌ها با درج مشخصات و تاریخ، مجددا در انکوباتور محتوی دی اکسید کربن قرار گرفتند.

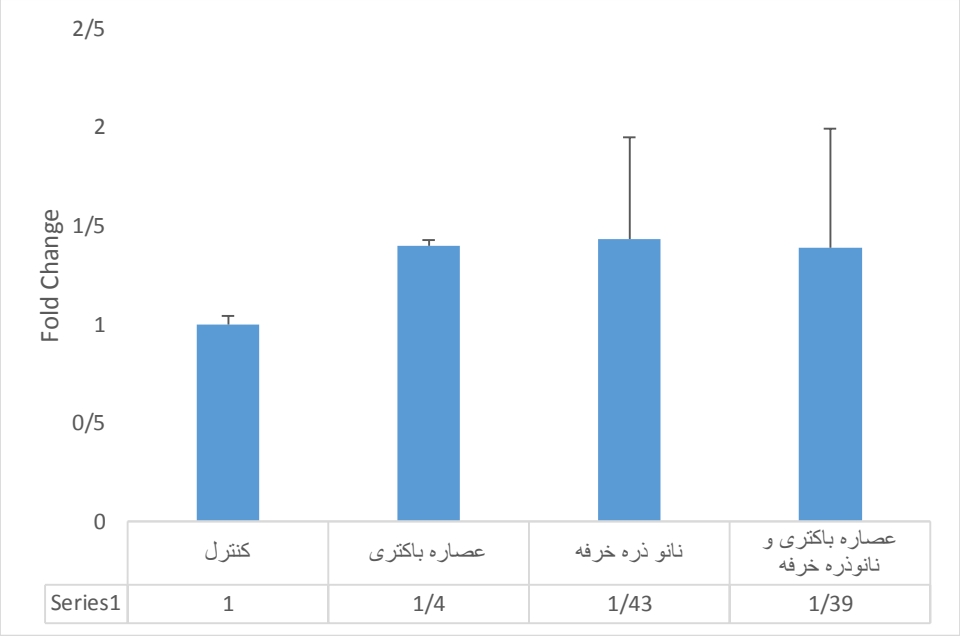
3-نتایج

۳-۱- میزان بیان ژن CASPAS8

میزان بیان ژن CASPAS8 در 24 سـاعت در حضـور عصـاره باکتری نسبت به گروه کنترل1/4 برابر افزایش داشته است ولی این افزایش معنادار نمی باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن CASPAS8 در 24 ساعت در حضور نانو ذرات خرفه نسبت به گروه کنترل 1/43 برابر افزایش داشته است ولی این افزایش معنادار نمی باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن CASPAS8 در 24 سـاعت در حضور عصاره باکتری و نانو ذرات خرفه نسبت به گروه کنترل 1/39برابر افزایش داشته است ولی این افزایش معنادار نمی باشد (P<0/05).

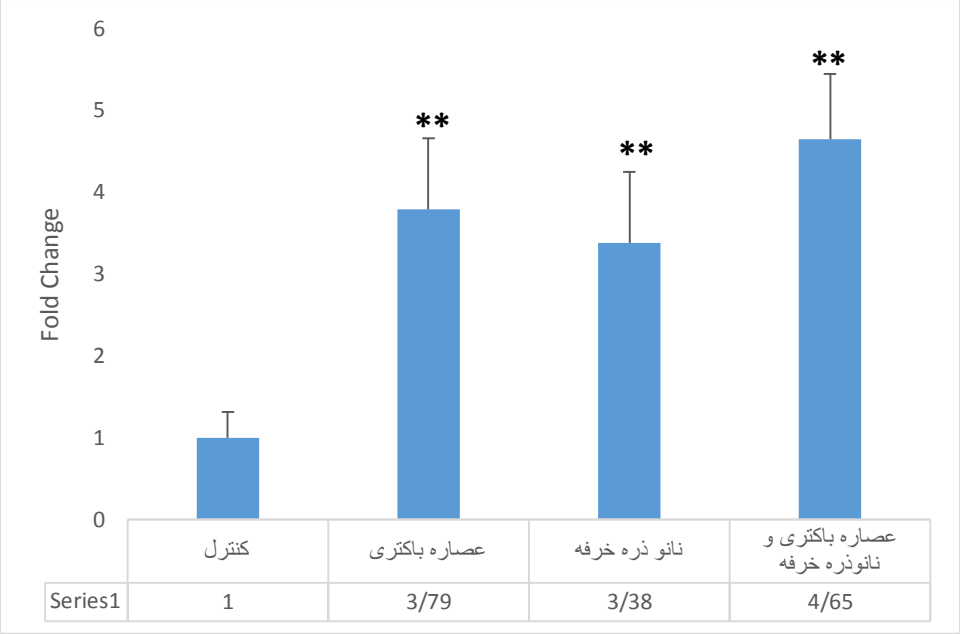


نمودار (۳-1) نمودار بیان ژن CASPAS8 در 24 ساعت

میزان بیان ژن CASPAS8 در 48 ساعت در حصور عصاره باکتری ۳/۷۹ برابر افزایش داشته است که این افزایش معنادار می باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن CASPAS8 در 48 ساعت در حضور نانو ذرات خرفه نسبت به گروه کنترل ۳/۳۸برابر افزایش داشته است و این افزایش معنادار می باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن CASPAS8 در 48 ساعت در حضور عصاره باکتری و نانو ذرات خرفه نسبت به گروه کنترل ۴/۶۵ برابر افزایش داشته است و این افزایش معنادار نمی باشد (P<0/05).

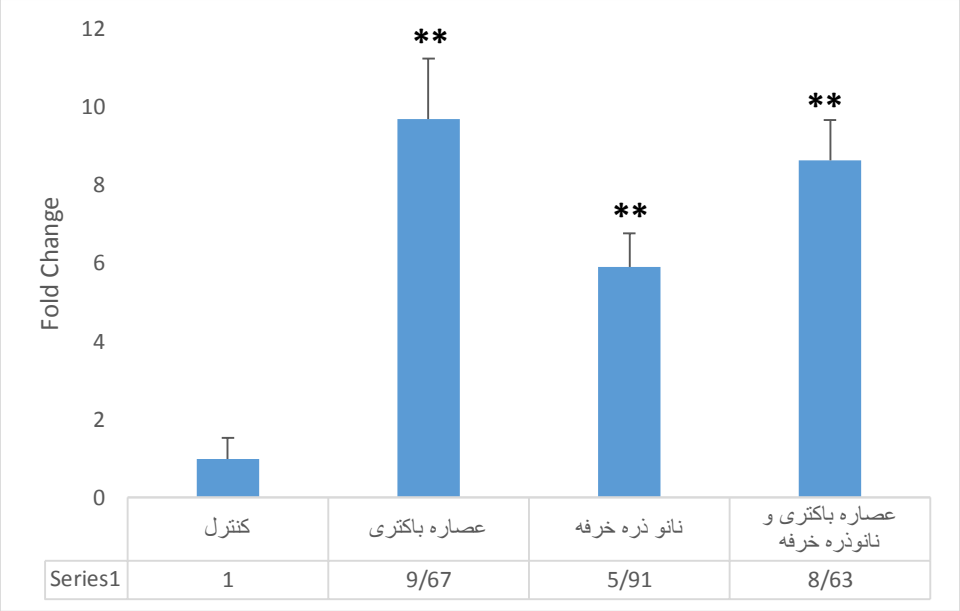


نمودار (۳- 2)نمودار بیان ژن CASPAS8 در 48 ساعت

میزان بیان ژن CASPAS8 در 72 ساعت در حضور عصاره باکتری ۹/۶۷ برابر افزایش داشته است که این افزایش معنادار می باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن CASPAS8 در 72 ساعت در حضور نانو ذرات خرفه نسبت به گروه کنترل ۵/۹۱ برابر افزایش داشته است و این افزایش معنادار می باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن CASPAS8 در 72 ساعت در حضور عصاره باکتری و نانو ذرات خرفه نسبت به گروه کنترل ۸/۶۳ برابر افزایش داشته است و این افزایش معنادار نمی باشد(P<0/05).



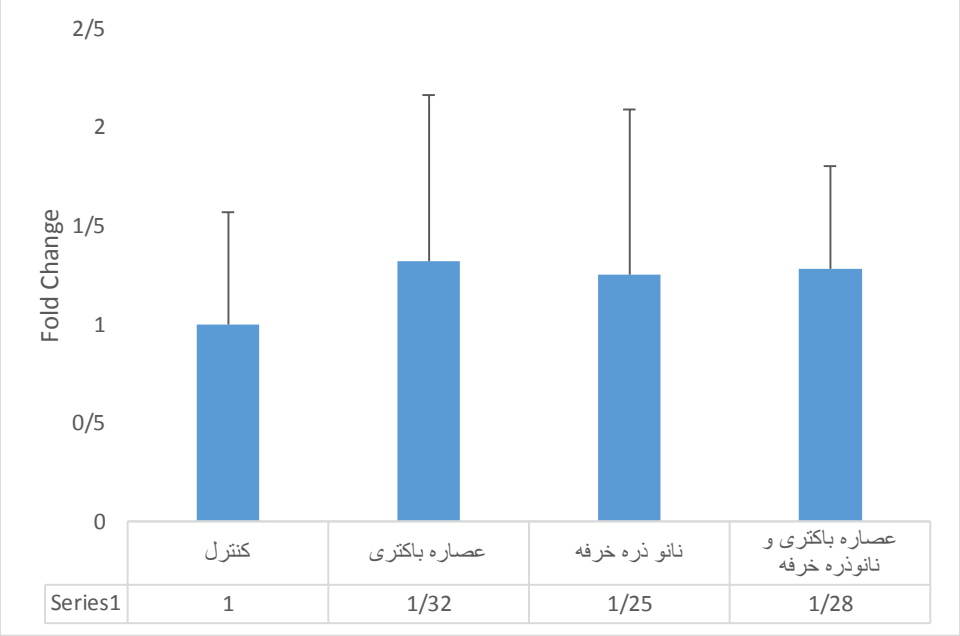
نمودار (۳- 3)نمودار بیان ژن CASPAS8 در 72 ساعت

3-۲- میزان بیان ژن CASPAS9

میزان بیان ژن CASPAS9 در 24 ساعت نسبت در حضور عصاره باکتری به گروه کنترل ۱/۳۲ برابر افزایش داشته است ولی این افزایش معنادار نمی باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن CASPAS9 در 24 ساعت در حضور نانو ذرات خرفه نسبت به گروه کنترل ۱/۲۵ برابر افزایش داشته است ولی این افزایش معنادار نمی باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن CASPAS9 در 24 ساعت در حضور عصاره باکتری و نانو ذرات خرفه نسبت به گروه کنترل ۱/۲۸ برابر افزایش داشته است ولی این افزایش معنادار نمی باشد (P<0/05).

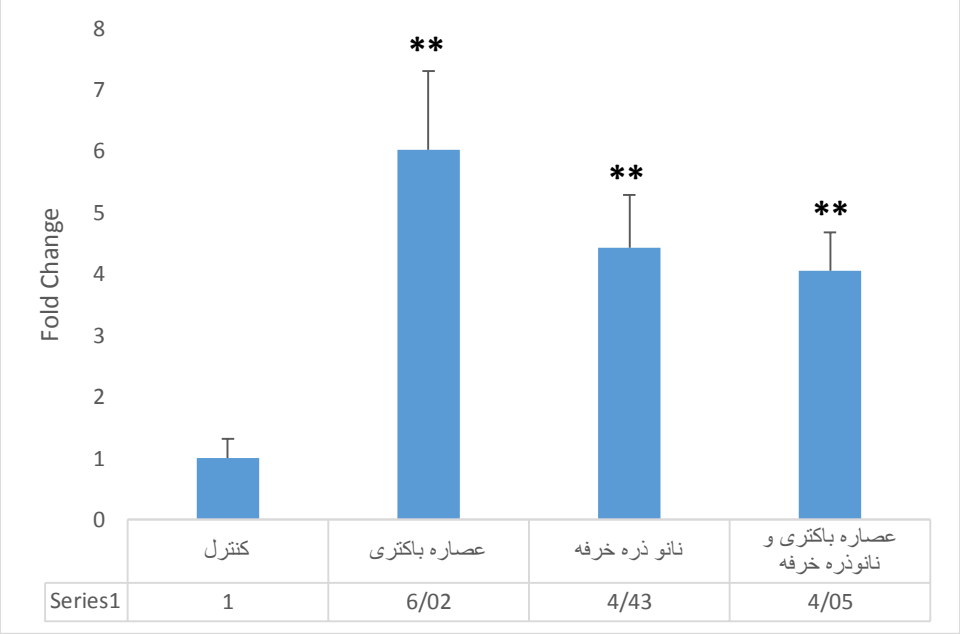


نمودار (۳- 4)نمودار بیان ژن CASPAS9 در 24 ساعت

میزان بیان ژن CASPAS9 در 48 ســاعت در حضور عصاره باکتری۶/۰۲ برابر افزایش داشته است که این افزایش معنادار می باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن CASPAS9 در 48 ســاعت در حضور نانو ذرات خرفه نسبت به گروه کنترل ۴/۴۳برابر افزایش داشته است ولی این افزایش معنادار نمی باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن CASPAS9 در 48 ســاعت در حضور عصاره باکتری و نانو ذرات خرفه نسبت به گروه کنترل ۴/۰۵ برابر افزایش داشته است ولی این افزایش معنادار نمی باشد (P<0/05).

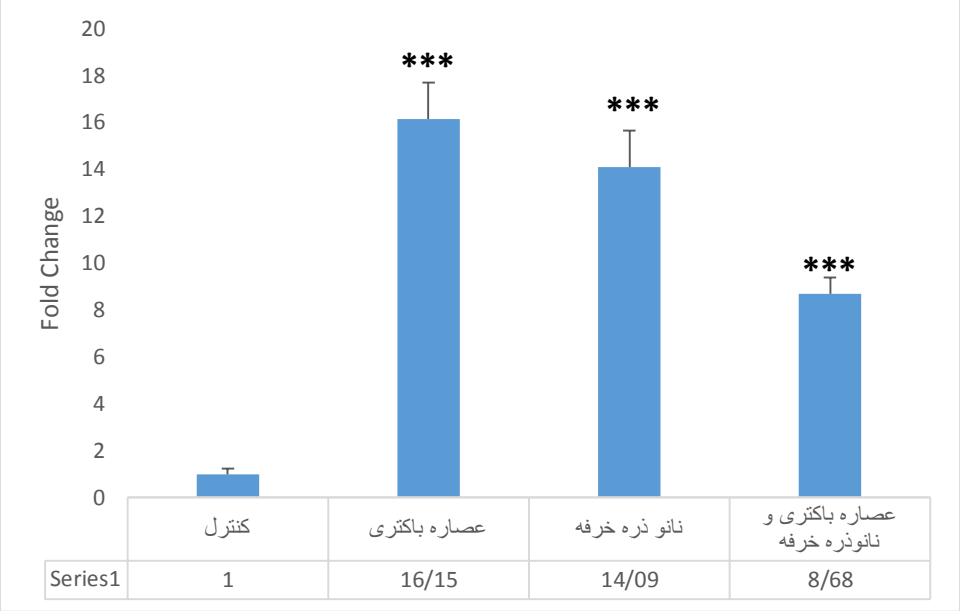


نمودار (۳- 5)نمودار بیان ژن CASPAS9 در 48 ساعت

میزان بیان ژن CASPAS9 در 72 ساعت در حضور عصاره باکتری ۱۶/۱۵ برابر افزایش داشته است که این افزایش معنادار می باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن CASPAS9 در 72 ساعت در حضور نانو ذرات خرفه ۱۴/۰۹ برابر افزایش داشته است که این افزایش معنادار می باشد (P<0/05).

میزان بیان ژن CASPAS9 در 72 ساعت در حضور عصاره باکتری و نانو ذرات خرفه ۸/۶۸ برابر افزایش داشته است که این افزایش معنادار می باشد (P<0/05).



نمودار (۳- 6)نمودار بیان ژن CASPAS9 در 72 ساعت

5- بحث

محمودی اصـــل زاده در ســـال1398از *Bifidobacterium bifidum* بعنوان پروبیوتیک روی کنسر کلورکتال کار کرد که با نتیجه این تحقیق همسو بوده است.

Jin و همکاران در سال 2017 نشان دادند نانو ذرات خرفه می تواند تکثیر سلولهای سرطانی کولون و سلولهای بنیادی سرطان کولون را مهار کند که این اثر وابسته به دوز ان می باشد بدلیل تشابه کار برروی سرطان کولون هم راستا با هم هستند(۶).

همچنین **Baricault laurent** در سال **2018** نشان داد که *L.helaventicus* بجای پلانتاروم سلول های سرطانی **29HT** به جای **CacoII 73** درصد تأثیر را روی مهار رشد سلول های سرطانی داشته است که با نتایج تحقیق حاضر همسو می باشد(۷).

Biffi کاشف بیفیدیوم اثر مهاری **5** گونه باکتری تولید کننده اسید لاکتیک روی سلول های سرطانی سینه ,(**7MCF**)انجام دادکه هر **5** گونه باکتری تا **85** در صد رشد سلول های سرطانی را مهار کرد.که هم راستا با این پژوهش می باشد(۸).

Pretlow و همکاران نشان دادند که پروبیوتیک ها میتوانند به عنوان عوامل پیشگیری و تسکین علایم سرطان کولون داشته باشند(۹)

Altonsy و همکاران نشان داده شدکه ترکیبی از پروبیوتیک به طور((*Bifdobacterium lactis* پاسخ چشمگیری بصورت آپوپتوتیک به یک کارسینوژن را در کولون انتهایی دارد(۱۰).

جین و همکارانش در سال **2017** مشخص کردند که عصاره خرفه رشد سلولهای بنیادی سرطان روده بزرگ را به صورت وابسته به دوز مهار می کند که هم راستا با نتایج این تحقیق می باشد [۶].

L.Elise نشـــان داد که ترکیبات تولیدی توســـط Bacillus polyfermenticus رشـــد سـلول¬¬های سـرطانی 29HT و سلول های سرطانی CacoII را به ترتیب 56 -35 درصد و 95 تا 99 درصد مهار کرد.نتایجی هم جهت با این پژوهش می باشد[۱۱].

L.Elise نشـان داد که ترکیبات تولیدی توسـط *Bacillus polyfermenticus* **رشد سـلول های سـرطانی 29HT و سلول های سرطانی** CacoII **را به ترتیب 56 -35 درصد و 95 تا 99 درصد مهار کرد.نتایجی هم جهت با این پژوهش می باشد(۱۱).**

پروبیوتیک ها روی بیماری های Auto immune اثر دارد بر اسـاس تحقیقات روی بیماریی هایی همچونIBD،CROHN،ULCERATIVE COLIT، تاثیرات بسـزایی در تسـکین ودرمان بیماریی های Inflamatory می شود(۱۲).

جهت ایجاد هرگونه اثر درمانی توسـط باکتری های پروبیوتیک و عصـاره آن ها، می بایسـتی اثرات ضدالتهابی و آپوپتوزی این سلول ها بر روی شرایط التهابی در محیط آزمایشگاهی، مورد بررسی قرار گیرد.

در بررسی **Goldin** سال **2017**، گزارش هایی حاکی از توانایی *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus acidophilus* قادرند توان القایی آپوپتوز **5**-فلورویوراسیل را در رده سلولی کارسینومای کلورکتال **513LS** افزایش دهند(۱۳) .

عصاره بذر خرفه ازطریق فعالسازی مسیر سیگنالینگ NF-kap9paB4TLR/ می تواند روند اثر ضد توموری خود را القا نماید که با اهداف نتیجه حاضر همسو می باشد(۱۴).

در سال **2018**،توسط Lee Kyony Do مهار رشد سلول های توموری به وسیله بوتانول استخراجی از *B. adolescentis*را نشان داد و در این مطالعه غلظت **20** میکرولیتری از بوتانول تا **70** درصد توانست سلول های سرطانی Cacoll را از بین ببرد. نتایج این تحقیق نشان داد که اثر مهاری وابسته به غلظت بود بیشترین اثر از محلول رویی (سوپرناتانت های**72**)ساعته حاصل شد(۱۵).

CASPAS8 از طریق مسیر گیرنده های مرگ سلولی و **CASPAS9** از طریق مسیرهای وابسته به میتوکندری فعال می شوند **CASPAS8** فعال شده باعث فعال شدن **CASP3** و درنتیجه القای آپوپتوزمی‌شود(۱۶).

کاسپازها جزء خانواده سیستئین پروتئازها هستند که نقش محوری در شروع و فاز اجرایی آپوپتوز ایفا می‌نماید.

پژوهش انجام شده توسط **Urruticoechea** و همکاران نشان داده است عوامل خطر شانس ابتلاء افراد را به سرطان کولورکتال افزایش می دهد[۱۷] تحقیقات اخیر با برخی زمینه های پژوهش حاضر همسو می باشد.

نتایج تحقیقات **Wollowski** و همکاران در سال **2001** که موید نتیجه تحقیق حاضر می‌باشد نشان داد مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها می تواند خاصیت ضد کارسینوژنی داشته باشد و این عمل با خنثی سازی مسمومیت ژنوتوکسین ها در روده صورت می‌گیرد. اثبات این مسئله در آزمایشگاه با استفاده از کارسینوژن **1** و**2** دی متیل هیدرازین در کولون موش نشان داده شد. مطالعات جدید نشان داده است که ترکیبات متابولیتی با طول عمر کوتاه جدا شده از شیر که توسط سویه هایی نظیر لاکتوباسیلوس بلگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس تخمیر شده، در غیرفعال کردن عوامل خطرزا و کارسینوژن روده بسیار موثر می باشند [۱۸].

Abrahamse و همکاران در سال **1999** نشان دادند که پس از مصرف پروبیوتیک‌ها در کولون موش، آنزیم محافظت کننده گلوتاتیون ترانسفرازII القاء می گردد. مجموع این عوامل با هم موجب

کاهش بار عوامل ژنوتوکسیک در روده و نیز باعث افزایش تولید عواملی میگردد که ترکیبات سمی را غیرفعال می سازد. به عنوان مثال بوتیرات یکی از عوامل محافظتی می باشد که باعث کاهش خطر سرطان می گردد[۱۹] که با نتایج تحقیق حاضر همسو می باشد.

مطالعه ای بر روی مدل حیوانی و آزمایشگاهی نشان داد که باکتری های اسید لاکتیک موجود در شیر های تخمیری می توانند اثرات مهار کننده روی گسترش زخم های پیش سرطانی و تومورها در مدل حیوانی داشته باشد. به علاوه، در آزمون **Ames** با استفاده از گونه بیفیدوباکتریوم انیمالیس اثر مهار کننده ای در برابر عوامل موتاژن مستقیم مانند مدل حیوانی نشان داده شد [۲۰]. در آزمون ایمز موتاسیون برگشتی در سالمونلاتیفی موریوم مورد بررسی قرار می گیرد و متداول ترین روش تعیین پتانسیل جهش زایی و سرطان زایی مواد شیمیایی است[۲۱] .

تحقیقات **Gahyva** و همکاران در سال **2005** نشان داده است که مصرف باکتری های پروبیوتیک یا عصاره این باکتریها و یا ترکیباتی از آن ها موجب کاهش سرطان کولون و کاهش ظهور تومورها می شود. بررسی های آزمایشگاهی نشان داده است که اجزای دیواره سلولی باکتری های پروبیوتیک با مواد موتاژن ترکیب شده و از شدت سرطانزایی آن ها می کاهد [۲۲]که موید تحقیق حاضر می باشند.

در طی چند دهه گذشـــته، وجود میکروارگانیســـم های پروبیوتیک در انواع مختلف مواد غذایی به خصـــوص فرآورده های لبنی در حال افزایش بوده اســـت. لاکتوباســـیلوس اســـیدوفیلوس و باســـیلوس کوآگولانس جزء باکتری های پروبیوتیک محســـوب شـــده و هر دو فلور طبیعی روده هستند که اثرات مفید بســـیاری روی انســـان ها دارند [۲۳]. 85 درصد سرطان ها در اثر جهش های ژنتیکی به وجود می آیند بنابراین می توان نتیجه گرفت بیشـــتر ترکیبات جهش زا به احتمال زیاد ســـبب ســـرطان می شوند. امروزه اســـتفاده از روش ایمز جهت شناسایی مواد جهش زا رایج است که روشی به مراتب ارزان تر از ســـایر روش ها می باشد. Hirayama و همکاران در سال 2000 نشان دادند که اکثر سویه های مورد اســـتفاده در تســـت ایمز گالاکتوز منفی بوده و باعث اختلال در اپران گالاکتوز دخیل در ســـنتز لیپوپلی ســـاکارید ســـطح باکتری، در بیماری زایی دچار نقص هســـتند. به طور کلی، مکانیسم هایی که باکتری های پروبیوتیک برای کاهش مولد موتاسیون زا و سرطان زا به کار می گیرند کاملا شناخته شده نیست [۲۴]. اما برخی از آن ها عبارت اند از:

اتصـــال به ماده موتاسیون زا و جلوگیری از جذب آن ها توسط بدن و تجزیه برخی ترکیبات موتاسیون زا در بررســـی خود به این نتیجه رســـید که لاکتوباســـیلوس اسیدوفیلوس در شرایط In Vitro توانایی

اتصـــال به آفلاتوکسین را دارد[۱۲] . همچنین لاکتوباسیلوس ها توانایی تجزیه ترکیبات N-نیتروزآمین موجود در مواد غذایی که عوامل مهم ایجاد سرطان محسوب می شوند، را نیز دارد[۲۵] .

کاهش فعالیت برخی آنزیم های مضـــر و مهار باکتری های مضـــر روده: آنزیم های مدفوعی مانند نیتروردوکتاز، آزوردوکتاز، بتا- گلوکورونیداز، گلیکولیک اســید هیدرولاز قادرند ترکیبات پیش جهش زا و پیش ســرطان زا را به ترکیبات جهش زا و سرطان زا تبدیل کنند. این آنزیم ها توسط باکتری های مهم روده تولید می شــوند و ثابت شــده اســت که کاهش این آنزیم های مضــر که رابطه مستقیمی با کاهش باکتری های مضــر دارد، ریســک ابتلا به ســرطان را کاهش می دهد. در بررســی Goldin و همکارانش، گزارش هایی حاکی از توانایی باکتری های پروبیوتیک در کاهش فعالیت ســه آنزیم مضر بتاگلوکونیداز، نیتروردوکتاز، آزوردوکتاز به دست آمد [۱۳].

تولید متابولیت های ویژه و کاهش اسید های صفراوی: باکتری های پروبیوتیک برخی متابولیت ها مانند بوتیرات، فولات و غیره تولید می کنند که با اثر روی ســلول های اپی تلیال روده، تکثیر ســلول های ســرطانی را کاهش می دهند. Biffi و همکارانش، در مطالعه خود نشــان دادند که تولید متابولیت ها توسط باکتری های پروبیتیک با جلوگیری از تکثیر سرطان های سلولی ارتباط دارندکه با تحقیق حاضر همسو می باشد [۸].

سلول های باکتری های پروبیوتیک قادرند سبب تحریک و تقویت سیستم ایمنی و افزایش میزان سینوکین شوند، هم چنین عاملی ممانعت کننده از رشد تومور و کاهش سرطان می باشند[۲۶] . Sekine و همکارانش در بررسی خود، اثرات مثبت را در تحریک سیستم ایمنی موش ها در مهار مواد موتاسیون زا نشان دادند[۲۷] . هم چنین تحقیقات انجام شده، نقش مثبت باکتری های پروبیوتیکی را در کاهش عوامل جهش زا تایید می کنند.

در تحقیقات Guandalini و Kich و همکاران در سال 2015 نشان داده شده که پروبیوتیک ها در سرکوب زخم اولیه نئوپلاستیک اولیه و تومورهای سرطانی روده بزرگ نقش دارند [۲۸] و [۲۹].

اثرات ضد سرطانی پروبیوتیک ها از طریق جلوگیری از تبدیل کارسینوژن، اتصال و غیرفعال کردن ترکیب میتوژنی، کاهش رشد باکتری های پروکارسینوژنز، کاهش جذب میتوژن ها و افزایش عملکرد سیستم ایمنی می باشد [۳۰] . همچنین، یکی از مکانیسم های عملکردی پروبیوتیک ها ازجمله لاکتوباسیلوس ها خاصیت ضد تکثیری سلول های سرطانی ازجمله سرطان کولون با القای آپوپتوز است که با اهداف تحقیق حاضر همسو می باشد(۳۱).

1. Liu, L., et al., *Fatty acids and β-carotene in Australian purslane (Portulaca oleracea) varieties.* Journal of chromatography A, 2000. **893**(1): p. 207-213.
2. Gatreh-Samani, K., et al., *Purslane (Portulaca oleracea) effects on serum paraoxanase-1 activity.* Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences, 2011. **13**.
3. Uddin, M., et al., *Purslane weed (Portulaca oleracea): a prospective plant source of nutrition, omega-3 fatty acid, and antioxidant attributes.* The Scientific World Journal, 2014. **2014**.
4. Movahedian Ataar, A., et al., *Antioxidant Effect of Ziziphus vulgaris, Portulaca oleracea, Berberis integerima and gundelia tournefortti on lipid peroxidation, Hb glycosylation and Red Blood Cell Hemolysis.* Journal of Medicinal Plants, 2011. **10**(40): p. 80-88.
5. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.* Chemico-biological interactions, 2006. **160**(1): p. 1-40.
6. Jin, H., et al., *Portulaca oleracea extract can inhibit nodule formation of colon cancer stem cells by regulating gene expression of the Notch signal transduction pathway.* Tumor Biology, 2017. **39**(7): p. 1010428317708699.
7. Baricault, L., et al., *Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation.* Carcinogenesis, 1995. **16**(2): p. 245-252.

8. Biffi, A., et al., *Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line.* 1997.

9. Pretlow, T.P., et al., *Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa.* Cancer Research, 1991. **51**(5): p. 1564-1567.

10. Altonsy, M.O., S.C. Andrews, and K.M. Tuohy, *Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells (*CacoII*) by Atopobium, and commensal, probiotic and enteropathogenic bacteria: mediation by the mitochondrial pathway.* International journal of food microbiology, 2010. **137**(2-3): p. 190-203.

11. Ma, E.L., et al., *The anticancer effect of probiotic Bacillus polyfermenticus on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition.* International journal of cancer, 2010. **127**(4): p. 780-790.

12. El-Nezami, H., et al., *Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media.* Journal of food protection, 1998. **61**(4): p. 466-468.

13. Saarela, M., et al., *Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties.* Journal of biotechnology, 2000. **84**(3): p. 197-215.

14. Zheng, G.-Y., et al., *Portulacerebroside A induces apoptosis via activation of the mitochondrial death pathway in human liver cancer HCCLM3 cells.* Phytochemistry Letters, 2014. **7**: p. 77-84.

15. Lee, D.K., et al., *Anti-proliferative effects of Bifidobacterium adolescentis SPM0212 extract on human colon cancer cell lines.* BMC cancer, 2008. **8**(1): p. 1-8.

16. Köhler, C., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, *Evaluation of caspase activity in apoptotic cells.* Journal of immunological methods, 2002. **265**(1-2): p. 97-110.

17. Urruticoechea, A., et al., *Recent advances in cancer therapy: an overview.* Current pharmaceutical design, 2010. **16**(1): p. 3-10.

18. Wollowski, I., G. Rechkemmer, and B.L. Pool-Zobel, *Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer.* The American journal of clinical nutrition, 2001. **73**(2): p. 451s-455s.

19. Abrahamse, S., B. Pool-Zobel, and G. Rechkemmer, *Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells.* Carcinogenesis, 1999. **20**(4): p. 629-634.

20. Brady, L.J., D.D. Gallaher, and F.F. Busta, *The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer.* The Journal of nutrition, 2000. **130**(2): p. 410S-414S.

21. Horn, R.C. and V.M.F. Vargas, *Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay.* Mutagenesis, 2003. **18**(2): p. 113-118.

22. Gahyva, S.M.M. and J.F. Siqueira Junior, *Direct genotoxicity and mutagenicity of endodontic substances and materials as evaluated by two prokaryotic test systems.* Journal of Applied Oral Science, 2005. **13**: p. 387-392.

23. Shah, N., *Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods.* Journal of dairy science, 2000. **83**(4): p. 894-907.

24. Hirayama, K. and J. Rafter, *The role of probiotic bacteria in cancer prevention.* Microbes and infection, 2000. **2**(6): p. 681-686.

25. Rowland, I., P. Grasso, and M. Davies, *The methylation of mercuric chloride by human intestinal bacteria.* Experientia, 1975. **31**(9): p. 1064-1065.

26. Matsuzaki, T., *Immunomodulation by treatment with Lactobacillus casei strain Shirota.* International journal of food microbiology, 1998. **41**(2): p. 133-140.

27. Sekine, K., et al., *A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from Bifidobacterium infantis with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice.* Cancer Research, 1985. **45**(3): p. 1300-1307.

28. Kich, D.M., et al., *Probiotic: effectiveness nutrition in cancer treatment and prevention.* Nutricion hospitalaria, 2016. **33**(6): p. 1430-1437.

29. Guandalini, S., E. Cernat, and D. Moscoso, *Prebiotics and probiotics in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in children.* Beneficial microbes, 2015. **6**(2): p. 209-217.

30. Whelan, K., *Probiotics and prebiotics in the management of irritable bowel syndrome: a review of recent clinical trials and systematic reviews.* Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2011. **14**(6): p. 581-587.

31. Barrons, R. and D. Tassone, *Use of Lactobacillus probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review.* Clinical therapeutics, 2008. **30**(3): p. 453-468.

Investigating the effect of *Portulaca oleracea* L. nanoparticles and Lactobacillus plantarum probiotic bacteria extract on CacoII cell line on the expression of CASPAS8 and CASPAS9 genes.

Introduction: Portulaca oleracea purslane nanoparticles and probiotic bacteria, which are living and useful microorganisms, which, by affecting the digestive enzymes of animals and humans, inhibit carcinogens in the body and laboratory conditions and compounds that induce cancer and tumors in laboratory animals, play an effective role in They perform to fight cancer. The purpose of this study is to investigate the effect of Portulaca oleracea purslane nanoparticles and Lactobacillus plantarum probiotic bacteria extract on CacoII cell line on the .expression of CASPAS8 and CASPAS9 genes

Materials and methods: In this study, which was conducted experimentally, the supernatant was isolated from the culture of Lactobacillus plantarum. Then, the effects of the cytotoxicity of the supernatant isolated from the bacteria and Portulaca oleracea purslane nanoparticles as well as the bacteria on the CacoII colon cancer cell line during The time of 24, 48 and 72 hours was checked using MTT method. Also, the expression of CASPAS9 and CASPAS9 genes was .checked using Real Time PCR method

Results: Supernatant containing Lactobacillus plantarum bacteria reduces cell proliferation. The obtained results showed that the inhibitory percentage of Lactobacillus plantarum supernatant on CacoII cancer cells, CASPAS8 and CASPAS9 genes had a significant increase in expression during 48 hours

Conclusion: Lactobacillus plantarum bacteria and Portulaca oleracea purslane nanoparticles can be used to create a new therapeutic solution with high effect, low side effects, biologically safe and less expensive for the treatment and prevention of colon cancer

Key words: Probiotics, *Lactobacillus plantarum*, colon cancer, *Portulaca oleracea*, CacoII, CASPAS9, CASPAS8