Investigation of the Effect of Supernatant from Probiotic Bacteria *Lactobacillus Sakei* on the SK-OV-3 Cell Line in Ovarian Cancer

Neda Rahimipour[1], Hossein Sazegar*[2], Fariba Sharifnia[3]

1-MSc, Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3- Associate Professor, Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Ovarian cancer is one of the most dangerous types of malignancies in the female reproductive system and accounts for the highest mortality rates. This study aimed to induce apoptosis in SK-OV-3 cancer cells using metabolites from *Lactobacillus sakei* bacteria.

Materials and Methods: Different concentrations of *Lactobacillus sakei* supernatant (0.5, 1, 2, 3, 4, and 5 mg/mL) were collected and lyophilized. The appropriate cytotoxic concentration of the supernatant was determined at 24, 48, and 72 hours after treatment of SK-OV-3 cells. Then, the induction of apoptosis and the change in the expression of apoptosis-related genes were investigated under the influence of the IC_{50} concentration of the supernatant.

Results: The MTT test results showed that the concentration of 5 mg/mL of the supernatant had the highest cytotoxic effect on SK-OV-3 cells at 72 hours, and the flow cytometry results confirmed the induction of apoptosis at this concentration. Also, a decrease in the expression of *BCL-2* and *Survivin* genes (anti-apoptotic genes) and an increase in the expression of *BAX* and *FAS* genes (pro-apoptotic genes) under the influence of the supernatant at this concentration and time were confirmed ($p<0.05$).

Conclusion: The results of this study demonstrate that the supernatant of *Lactobacillus sakei* bacteria is capable of inducing apoptosis and altering the expression of genes related to programmed cell death in SK-OV-3 cancer cells.

Keywords: *Lactobacillus sakei*, Ovarian Cancer, Apoptosis, Bacterial Metabolite.

***Corresponding author:**
Hossein Sazgar, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Email: bio.gene84@gmail.com

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-04]

بررسی اثر سوپرناتانت باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس ساکئی* بر ردهٔ سلولی SK-OV-3 سرطان تخمدان

ندا رحیمی‌پور[۱]، حسین سازگار[*۲]، فریبا شریف‌نیا[۳]

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم‌پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: سرطان تخمدان یکی از خطرناک‌ترین انواع بدخیمی‌ها در دستگاه تناسلی زنان با بالاترین میزان مرگ‌ومیر است. این پژوهش با هدف القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ردهٔ SK-OV-3 از طریق متابولیت‌های باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی* انجام شد.

مواد و روش‌ها: غلظت‌های مختلفی از سوپرناتانت باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی* (۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) جمع‌آوری و لیوفیلیزه گردید. غلظت مناسب سیتوتوکسیک سوپرناتانت در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌های SK-OV-3 مشخص گردید. سپس القای آپوپتوز و تغییر بیان‌ژن‌های مرتبط با آپوپتوز تحت‌تأثیر غلظت IC_{50} سوپرناتانت مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج تست MTT نشان داد که غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سوپرناتانت در زمان ۷۲ ساعت بیشترین اثر سیتوتوکسیک را بر روی سلول‌های SK-OV-3 دارد و نتایج فلوسایتومتری القای آپوپتوز را در این غلظت تأیید نمود. همچنین، کاهش بیان‌ژن‌های *BCL-2* و *Survivin* (ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک) و افزایش بیان‌ژن‌های *BAX* و *FAS* (ژن‌های پروآپوپتوتیک) تحت‌تأثیر سوپرناتانت در این غلظت و زمان تأیید شد ($p< 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که سوپرناتانت باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی* قادر به القای آپوپتوز و تغییر بیان‌ژن‌های مرتبط با مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌های سرطانی ردهٔ SK-OV-3 است.

واژگان کلیدی: لاکتوباسیلوس ساکئی، سرطان تخمدان، آپوپتوز، متابولیت باکتریایی.

نویسنده مسئول: ؛ استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
- **پست الکترونیکی**bio.gene84@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۰۷

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-04]

۱- مقدمه

اصطلاح «سرطان تخمدان» به طیف وسیعی از سرطان‌ها اشاره دارد که از سلول‌های تخمدان، لولهٔ فالوپ یا صفاق با منشاهای بافت‌شناسی، آسیب‌شناسیِ بالینی و ویژگی‌های مولکولی مختلف ایجاد می‌شوند (۱). تقریباً ۹۰ درصد سرطان‌های تخمدان را سرطان اپی‌تلیال تخمدان تشکیل می‌دهد که هتروژن بوده و رده‌بندی آن براساس نوع سلول درگیر است که مشتمل بر سروزی[۱]، موسینوسی[۲]، اندومتریال[۳]، سلول روشن[۴] و برنر[۵] می‌باشد و با انواع گوناگون سلول‌های اپی‌تلیال تخمدان در دستگاه تناسلیِ زنانه منطبق است (۲). اما به‌طور کلی، یکی از کُشنده‌ترین بدخیمی‌هایی که زنان را در سطح جهان تحت‌تأثیر قرار می‌دهد، هنوز هم سرطان تخمدان است (۳) که میزان بقای آن بیشتر به شناساییِ زودهنگام بستگی دارد (۴). ماهیت فاقد علائم بودن سرطان تخمدان، شناسایی و غربالگری اولیه آن را سخت می‌کند (۵). شایع‌ترین علامت گزارش‌شده توسط بیماران مبتلا به سرطان اپی‌تلیال تخمدان پُرخطر، درد شکم یا لگن است. با افزایش اندازهٔ تومور، نسبت زنان علامت‌دار و تعداد علائم نیز افزایش می‌یابد (۶). شاخص‌های تومور اپی‌تلیال تخمدان، شامل آنتی‌ژنِ سرطانی ۱۲۵ (CA125) و پروتئین اِپیدیدیم انسانی ۴ (HE4) هستند که در تشخیص، ردیابیِ اثربخشی و مراقبت از عود مفید هستند (۷). بنابراین، جست‌وجو برای درمان‌های جایگزینِ سرطان یا روش‌های تکمیلی که قادر به کاهش عوارض جانبی ناشی از درمان هستند، به‌طور فزاینده‌ای ضروری می‌شود. پروبیوتیک‌ها، میکروأرگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در مقادیر کافی تجویز می‌شوند، فواید سلامتی متعددی را ارائه می‌کنند و به حفظ یک رابطهٔ متعادل میزبان و میکروبی کمک می‌کنند. مطالعه‌های مختلف اثرهای ضدتکثیری و ضدسرطانی پروبیوتیک‌ها را گزارش کرده‌اند (۸-۱۱). تسلط گونه‌های باکتریاییِ خاص مانند لاکتوباسیل‌ها در میکروبیوتای واژن در مهار رشد سایر باکتری‌های بیماری‌زا مؤثر است. این باکتری‌ها، اسید لاکتیک را تولید و آزاد می‌کنند و محیطی با pH پایین ایجاد می‌کنند که مانع از رشد پاتوژن‌ها می‌شود. گونه‌های لاکتوباسیلی که به‌عنوان عوامل پروبیوتیک شناخته می‌شوند، معمولاً برای این منظور مورداستفاده قرار می‌گیرند (۱۲). مطالعه‌های پیشین نیز نشان داده‌اند که لاکتوباسیل‌ها نه‌تنها رشد و فرایندهای عفونی پاتوژن‌ها را کنترل می‌کنند، بلکه التهاب سیستمیک، تکثیر سلولی و آپوپتوز را نیز تعدیل می‌نمایند. بااین‌حال، در بررسی اثرهای سویه‌های مختلف لاکتوباسیل‌ها بر سلول‌های سرطانی اختلاف‌نظر وجود دارد (۱۳). علاوه‌بر این، کمبود اطلاعات در مورد مکانیسم عمل پروبیوتیک‌ها از طریق سنجش بیان‌ژن نیز وجود دارد (۱۴). بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی اثرهای آپوپتوزی *لاکتوباسیلوس ساکئی*[۶]، بر ردهٔ سلولی سرطان تخمدان انجام شد. در این مطالعه سنجش سمیّت سلولی انجام شد و آپوپتوز و بیان‌ژن‌های مرتبط با آپوپتوز به‌عنوان نشانگرهای بالقوّه تجزیه‌وتحلیل شدند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت سلول باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی*

سوش میکروبی استاندارد *Lactobacillus Sakei PTCC171* از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه و در محیط‌کشتMRS broth[۷] در جار بی‌هوازی به‌مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس با غلظت نیم مک‌فارلند (۰/۰۸ – ۰/۱۳ = OD) استاندارد گردید. برای جمع‌آوری مایعِ رویِیِ کشتِ باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی* (supernatant)، سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ rpm در دمای اتاق به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. مایعِ رویی از یک فیلتر ۰/۲ میکرونی عبور داده شد تا از عدم‌وجود باکتری اطمینان حاصل شود و سپس توسط فریز درایر لیوفیلیزه یا خشک شد. رسوب سه مرتبه با PBS شسته شد و در نهایت، رسوبِ شسته‌شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. در زمان استفاده، ۱ میلی‌گرم پودر لیوفیلیزه در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد. pH نیز با استفاده از NaOH به ۷/۳ تنظیم شد.

[1] Serouse
[2] Mosinous
[3] Endometrial
[4] Clear Cell
[5] Brenner

[6] *Lactobacillus Sakei*
[7] Man-Rogosa-Sharpe Broth

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-04]

۲-۲- کشت سلول سرطانی

ردهٔ سلولیِ سرطانِ تخمدان SK-OV-3 از مرکز ملّی منابع ژنتیک و بیولوژیکیِ ایران خریداری شد. سلول‌ها در فلاسک فیلتردار ۲۵ سانتی‌متر مربعی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر RPMI 1640، همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) و پنی‌سیلین[1] (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین[2] (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت داده شدند (در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ CO_2 درصد به‌مدت ۲۴ ساعت). پس از رشد ۸۰ درصدی، سلول‌ها با PBS شسته شدند و با محلول trypsin/EDTA از فلاسک جدا و به محیط تازه اضافه شدند و انکوبه گردیدند. سپس سلول‌ها با لام نئوبار شمارش شدند. درصد سلول‌های زنده نیز با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو تعیین شدند.

۲-۳- تست MTT

۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد و در انکوباتور CO_2 در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. در گام بعدی، سلول‌ها با رقّت‌های مختلف سوپرناتانت باکتریایی (۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ mg/mL) تیمار شدند. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. سلول‌های تیمارنشده به‌عنوان کنترل منفی درنظر گرفته شدند. سپس محیط‌کشت داخل چاهک‌ها با دقت برداشته و با محیط تازه جایگزین شد. ۲۰ میکرولیتر MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در تاریکی اضافه و انکوباسیون به‌مدت ۴ ساعت در تاریکی در انکوباتور حاوی CO_2 انجام شد. سپس مواد رویی دور ریخته و کریستال‌های فورمازان تولیدشده توسط سلول-های زنده در ۵۰ میکرولیتر DMSO (دی‌متیل‌سولفوکسید) حل شدند. پلیت سلولی در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISAخوانده و زنده ماندن سلول محاسبه شد. هر آزمون نیز به‌صورت سه تکرار انجام شد (۱۵).

۲-۴- تست فلوسایتومتری

سلول‌های SK-OV-3 (10^5 × ۳ سلول در چاهک) با مقدار IC_{50} سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس ساکئی* که در مرحلهٔ قبل به دست آمد، به‌مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. فلوسایتومتری با استفاده از کیت تشخیص آپوپتوز Annexin-V-FITC/Propidium iodide (ترموفیشر، آمریکا) انجام شد. سلول ها دو مرتبه با PBS سرد (۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن) شست‌وشو داده شدند و مجدداً در معرض بافر اتصال[3] قرار داده شدند. سپس، فلورسئین ایزوتیوسیانات[4] (FITC) و فسفاتیدیل سرین[5] (PI) طبق دستورالعمل کیت اضافه شدند؛ در نهایت سلول‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند و آنالیز سایتومتری آپوپتوز انجام شد (۱۶).

۲-۵- Real-Time PCR

برای ارزیابی تأثیر سوپرناتانت کشت *لاکتوباسیلوس ساکئی* بر تغییر بیان‌ژن‌های آپوپتوز در ردهٔ سلولی SK-OV-3 ابتدا سلول‌ها به‌طور جداگانه در چاهک‌های پلیت شش خانه کشت داده شدند. سپس آن‌ها با مقدار IC_{50} از سوپرناتانت کشت باکتری که در تست MTT به دست آمد، به‌مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد تیمار شدند. سلول‌های تیمارنشده به‌عنوان کنترل منفی درنظر گرفته شدند. RNA تام سلولی، با استفاده از محلول RNX-Plus (سینا کلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید و DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) و پرایمرهای رندوم هگزامر سنتز شدند. ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن مرجعِ داخلی استفاده شد. همچنین توالی پرایمرهای مورداستفاده در جدول ۱ نیز نشان داده شده است:

[1] Penicillin
[2] Streptomycin
[3] Binding Buffer
[4] Fluorescein isothiocyanate
[5] Phosphatidylserine

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-04]

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورداستفاده.

اندازهٔ قطعه	توالی پرایمر	نام ژن
۲۴۵ جفت‌باز	5´- GACGACTTCTCCCGCCGCTAC-3´ 5´- CGGTTCAGGTACTCAGTCATCCAC-3´	*BCL-2*-F: *BCL-2*-R:
۲۳۴ جفت‌باز	5´- AGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGC -3´ 5´- GCGTCCCAAAGTAGGAGAGGAG -3´	*BAX*-F: *BAX*-R:
۱۶۳ جفت‌باز	5´-CAATTCTGCCATAAGCCCTGTC-3´ 5´-GTCCTTCATCACACAATCTACATCTTC-3´	*FAS*-F: *FAS*-R:
۱۷۰ جفت‌باز	5´- AGAACTGGCCCTTCTTGGAGG -3´ 5´- CTTTTTATGTTCCTCTATGGGGTC -3´	*Survivin* -F: *Survivin* -R:
۱۸۳ جفت‌باز	5´- GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC-3´ 5´-GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC-3´	*GAPDH*-F: *GAPDH*-R:

cDNA هر گروه در رقّت سریال‌های ۱:۵، ۱:۲۵، ۱:۱۲۵ و ۱:۳۱۲۵ تهیه گردید. حجم نهایی برای هر واکنش µL ۱۳ بود که حاوی µL ۱ از هر cDNA نمونه (۵۰ نانوگرم)، ۶/۵ میکرولیتر SYBR green (یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران)، µL ۰/۵ از هر دو پرایمرهای F/R و µL ۴/۵ آب مقطر. همهٔ واکنش‌ها به‌صورت تکرار سه تایی انجام شدند. برای هر واکنش q-PCR برنامهٔ دمایی زیر انجام شد: ۳ دقیقه دِناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دِناتوراسیون در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد. در نهایت، منحنی ذوب با افزایش دما از ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد (۱ درجهٔ سانتی‌گراد در ثانیه) رسم شد. جهت محاسبهٔ بیان‌ژن، چرخه‌های آستانه (CT) توسط نرم‌افزار Rotor-Gene Real-Time Analysis نسخهٔ ۶ رسم شد. تغییرهای نسبیِ بیان‌ژن‌ها توسط روش لیواک $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با مقایسهٔ هر ژن هدف و ژن مرجع ارزیابی شد (۱۷).

۶-۲- آنالیز آماری

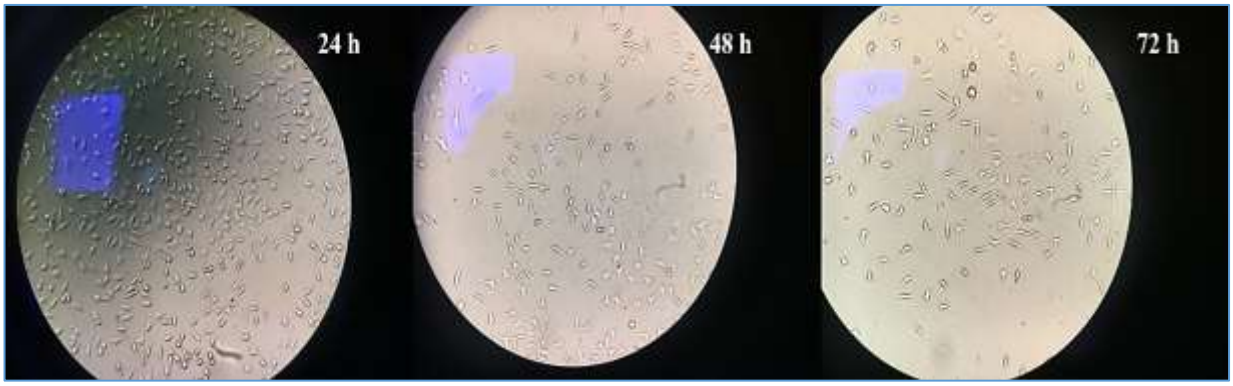
نتایج آزمون آماری توصیفی به شکل میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند. جهت بررسی وجود یا عدم‌وجود ارتباط معنادار از آزمون t-test استفاده گردید. نمودارها به کمک نرم‌افزار GraphPad Prism 10 رسم شد و تمام داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ درنظر گرفته شدند.

۳- نتایج

۳-۱- فعالیت سیتوتوکسیک سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس ساکئی* علیه سلول‌های سرطانی ردهٔ SK-OV-3

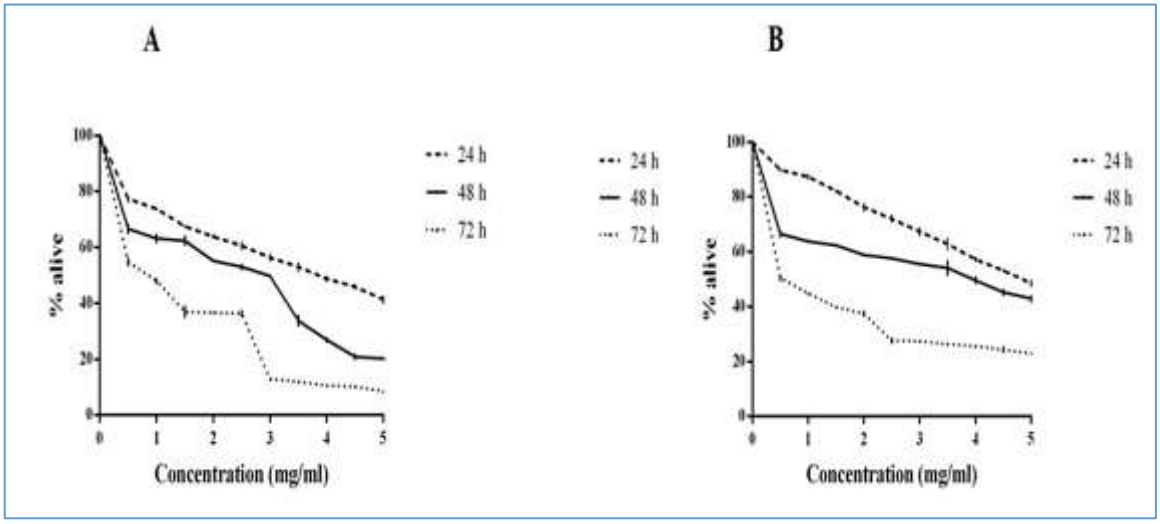
نتایج بررسی‌های سمیّت سلولی نشان‌دهندهٔ کاهش قابل‌توجه توانایی تکثیر و زنده ماندن سلول‌های سرطانی با افزایش غلظت سوپرناتانت و طولانی‌تر شدن زمان تأثیر آن بود. این نتایج حاکی از تأثیر معنادار این عصاره بر سلول‌های سرطانیِ تخمدان (SK-OV-3) نسبت به گروه شاهد بود ($p<0.05$). در این مطالعه، تمامی سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سوپرناتانت برای زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت‌تأثیر قرار گرفتند. این آزمون در سه نوبت تکرار شد و تصاویر برخی از سلول‌ها زیرِ میکروسکوپ در شکل ۱ ارائه شده است:

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-04]



شکل ۱- رشد سلول‌های تیمارشده توسط سوپرناتانت در زمان‌های مختلف. سلول‌های ردهٔ SK-OV-3 تیمارشده با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار (از تصاویر غلظت‌های دیگر به‌دلیل تعداد زیاد صرف‌نظر شد).

تجزیه‌وتحلیل آماری نشان داد که سوپرناتانت باکتری به‌طور وابسته به غلظت، رشد و تکثیر سلول‌های SK-OV-3 را در تمام زمان‌های انکوباسیون کاهش می‌دهد. زنده ماندن سلول‌های SK-OV-3 در غلظت‌های سوپرناتانت ۱-۵ پس از ۲۴ ساعت ($p<0.05$) و ۰/۵-۵ پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون ($p<0.05$) کاهش یافت (شکل ۲). مقادیر IC_{50} (mg/mL) برای این سلول‌ها محاسبه شد. همان‌طورکه در جدول ۲ نشان داده شده است، مقادیر IC_{50} (mg/mL) به‌طور وابسته به زمان انکوباسیون کاهش یافته است، اما در غلظت ۵ mg/mL به‌مدت ۷۲ ساعت بالاترین تأثیر را نشان داده است.



شکل ۲- سوپرناتانت باکتری رشد و تکثیر سلول‌های SK-OV-3 را در تمام مدت انکوباسیون به روشی وابسته به غلظت کاهش داد. A: سوپر ناتانت به‌طور قابل‌توجهی تکثیر سلول‌های SK-OV-3 را در غلظت‌های (۱-۵) بعد از ۲۴ ($p< 0.05$) و غلظت (۰/۵-۵) پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون ($p<0.05$) مهار کرد. B: بقای سلولیِ گروه کنترل (بدون افزودن سوپرناتانت) در مقایسه با گروه تیمار در غظت و زمان‌های مختلف بیشتر گزارش شد (غلظت (۲/۵-۵) بعد از ۲۴ ساعت و (۰/۵-۵) بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت ($p<0.05$)).

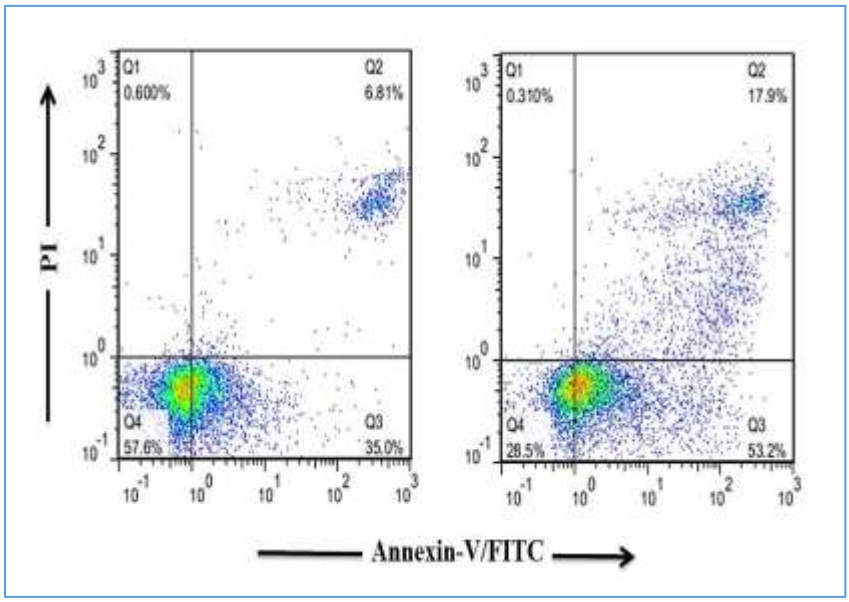
جدول۲- مقدار IC_{50} سلول‌های انکوبه‌شده با سوپرناتانت باکتری در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

Cell	IC_{50} (mg/mL)		
	24 h	48 h	72 h
SK-OV-3	4.21	3.49	1.00

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-04]

۲-۳- نتایج فلوسایتومتری

برای ارزیابی آپوپتوز از تکنیک فلوسایتومتری بر اساس پروتکل کیت Annexin-V-FITC/Propidium iodide بهره گرفته شد. نتایج نشان‌دهندهٔ القای قوی آپوپتوز در سلول‌های SK-OV-3 پس از ۷۲ ساعت تیمار با سوپرناتانت باکتری به غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود. با توجه به اینکه در آزمون MTT غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و زمان ۷۲ ساعت بهترین نتیجه را به‌همراه داشت، آزمون‌های بعدی فقط در همین غلظت و زمان انجام شدند. طبق شکل ۳، پس از تیمار سلول‌های SK-OV-3 با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سوپرناتانت در مقایسه با گروه کنترل، درصد سلول‌ها در مراحل مختلف آپوپتوز و نکروز به روش فلوسایتومتری محاسبه گردید. در سلول‌های تیمارشده در مقابلِ گروه کنترل، میزان آپوپتوز اولیه ۵۳/۲ درصد (در مقابل ۳۵/۰۰ درصد در گروه کنترل) و آپوپتوز ثانویه ۱۷/۹ درصد (در مقابل ۶/۸۱ درصد در گروه کنترل) مشاهده شد. درصورتی‌که میزان نکروز در هر گروه بسیار ناچیز گزارش شد. همانطور که ملاحظه می‌شود، سلول‌هایی که با سوپرناتانت باکتری تیمار شدند میزان آپوپتوز بالاتری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهند.

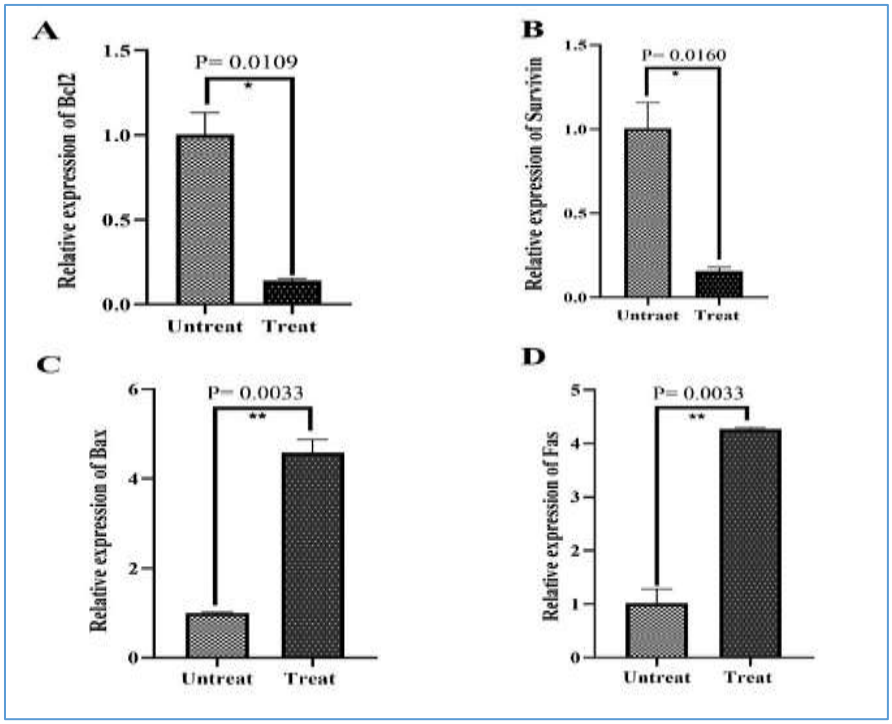


شکل ۳- نمودار فلوسایتومتری برای تشخیص آپوپتوز در ردهٔ سلول SK-OV-3 تحت‌تیمار با سوپرناتانت باکتری در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار).

۳-۳- آنالیز بیان‌ژن‌های آپوپتوزی

برای ارزیابی بیان‌ژن‌ها، چرخه‌های آستانه با استفاده از نرم‌افزار Rotor-Gene Real-Time Analysis (نسخهٔ ۶) ترسیم شد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، میزان بیان‌ژن *BCL-2* و *Survivin* در نمونه‌های تیمارشده با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سوپرناتانت پس از ۷۲ ساعت تأثیر، نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد (p=0.0109 و p=0.0160). در مقابل بیان‌ژن‌های *BAX* و *FAS* افزایش معنی داری را تجربه کرد (p=0.0033 و p=0.0033). این اختلاف‌های معنادار نشان‌دهندهٔ تأثیر سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس ساکئی* بر تغییر بیان‌ژن‌های مرتبط با آپوپتوز است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-04]



شکل ۴- مقایسهٔ سطح بیان‌ژن‌های آپوپتوزی تحت‌تأثیر غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سوپرناتانت در زمان ۷۲ ساعت. (A و B): کاهش بیان‌ژن‌های anti-apoptotic (ژن‌های *BCL-2* و *Survivin*) در گروه تحت‌درمان با سوپرناتانت در مقایسه با گروه کنترل، (C و D): افزایش بیان‌ژن‌های pro-apoptotic (ژن‌های *BAX* و *FAS*) در گروه تحت‌درمان با سوپرناتانت در مقایسه با گروه کنترل.

۴- بحث

سرطان، امروزه یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در جوامع بشری محسوب می‌شود و تقریباً ۱۰ درصد از کل مرگ‌های جهان را به خود اختصاص داده است. سالانه بیش از ۱/۲ میلیون نفر در ایالات متحده به این بیماری مبتلا می‌شوند و آمارهای جهانی نشان می‌دهند و حدود ۹ میلیون مورد جدید سرطان در هر سال شناسایی می‌شود که ۴ میلیون مورد آن در کشورهای توسعه‌یافته و ۵ میلیون مورد در کشورهای درحال توسعه رخ می‌دهد. سرطان پس از بیماری‌های قلبی-عروقی، دومین علت مرگ‌ومیر در ایالات متحده است و سالانه بیش از ۵۶ هزار نفر را قربانی می‌کند. در ایران، سرطان سومین علت مرگ‌ومیر محسوب شده و روزانه ۹۸ نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند (۱۸). در میان سرطان‌های دستگاه تناسلی زنان، سرطان تخمدان به دلیل ماهیت بی‌علامت خود تا مراحل پیشرفته، یکی از چالش‌برانگیزترین بدخیمی‌ها محسوب می‌شود. بیش از دو سوم بیماران در زمان تشخیص، در مراحل پیشرفته بیماری قرار دارند. این سرطان که نیازمند مداخلات جراحی و درمانی پیچیده است، بارِ فیزیکی و روانی قابل‌توجهی بر بیماران تحمیل می‌کند. سرطان تخمدان یکی از کُشنده‌ترین بدخیمی‌های زنان است و سالانه بیش از ۲۳۳۰۰ مورد جدید در ایالات متحده شناسایی شده و انتظار می‌رود که ۱۳۹۰۰ نفر در اثر این بیماری جان خود را از دست بدهند. خطر ابتلا به این سرطان در طول زندگیِ زنان حدود ۱/۵ درصد و خطر مرگ ناشی از آن حدود ۱ درصد تخمین زده شده است. در کشورهای غربی، سرطان تخمدان ششمین سرطان شایع زنان و پنجمین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در ایالات متحده محسوب می‌شود (۱۹).

در سال‌های اخیر، نقش آپوپتوز به‌عنوان یک پاسخ مهم سلولی در مقابله با تومورها شناخته شده است. مطالعه‌های متعدد نشان داده‌اند که تنظیم بیان‌ژن‌های پروآپوپتوتیک می‌تواند رشد سرطان تخمدان را در محیط‌های آزمایشگاهی (*in-vitro*) و مدل‌های حیوانی (*in-vivo*) مهار کند. در مطالعه‌ای دانشمندان نشان دادند که ترکیب *لاکتوباسیلوس ساکئی* و بره موم می‌تواند تولید IFN-γ را القا کند و به‌عنوان یک عامل ضدتومور در سرطان پستان معرفی شد (۱۹، ۲۰). در مطالعهٔ دیگری توسط سلطان

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-04]

دلال و همکاران روی سرطان پستان، مشخص شد که تجویز پروبیوتیک منجر به کاهش رشد تومور، افزایش وزن بدن و بهبود بقا در مدل‌های حیوانی شده است. همچنین بررسی‌های هیستولوژیکی، حاکی از بهبود عملکرد سیستم ایمنی در موش‌های دریافت‌کنندهٔ پروبیوتیک بود (۲۱). علاوه‌بر این، مطالعه‌ها نشان داده‌اند که متابولیت‌های باکتریایی می‌توانند در درمان سرطان نقش مهمی را ایفا کنند، به‌طوری‌که برخی از این ترکیب‌ها به‌عنوان القاکننده‌های آپوپتوز شناخته شده‌اند (۲۲، ۲۳).

در راستای مطالعه‌های پیشین و با هدف بررسی تأثیر پروبیوتیک‌ها بر سرطان تخمدان، مطالعهٔ حاضر طراحی و اجرا شد. در این پژوهش، اثر سوپرناتانت باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی* بر تغییر بیان‌ژن‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک بررسی گردید. برای این منظور، غلظت‌های مختلف سوپرناتانت بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه و ابتدا آزمون MTT جهت تعیین غلظت بهینه انجام شد. نتایج نشان داد که غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پس از ۷۲ ساعت، بیشترین اثر سیتوتوکسیک را بر سلول‌های ردهٔ SK-OV-3 داشت. سپس جهت ارزیابی القای آپوپتوز، آزمون Annexin-V انجام شد و نتایج آن به‌طور معناداری القای آپوپتوز را تأیید نمود. به‌منظور بررسی تغییر بیان‌ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، سلول‌های SK-OV-3 تحت تیمار با سوپرناتانت (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به‌مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند و پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، واکنش Real-Time PCR برای بررسی بیان‌ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک (*BCL-2* و *Survivin*) و پروآپوپتوتیک (*BAX* و *FAS*) انجام شد. نتایج تجزیه‌وتحلیلِ آماری نشان داد که بیان‌ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک کاهش و بیان‌ژن‌های پروآپوپتوتیک افزایش یافته است ($p<0.05$). همسو با مطالعه‌های دیگرِ پژوهشگران، یافته‌ها نشان می‌دهند که این تغییرهای بیان‌ژنی نشان‌دهندهٔ فعال شدن مسیر مرگ سلولی در سلول‌های سرطانیِ تحتِ تیمار بود که نویدبخش کاربردهای پزشکی در آینده است که مطالعه‌های دانشمندان و گزارش‌های علمی نیز تأییدی بر نتایج به‌دست‌آمده است.

۵- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سوپرناتانت باکتری *لاکتوباسیلوس ساکئی* تأثیر قابل‌توجهی بر سلول‌های سرطانیSK-OV-3 داشته و با تغییر بیان‌ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، منجر به فعال شدن مسیرهای مرگ سلولی شده است. یافته‌های این تحقیق می‌تواند زمینه‌ساز توسعهٔ روش‌های درمانی ِنوین مبتنی بر پروبیوتیک‌ها در مقابله با سرطان باشد.

۶- ملاحظات اخلاقی

ندارد.

۷- تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامهٔ کارشناسی‌ارشد مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال می‌باشد و تمامی مراحل مطالعه در ردهٔ سلولیِ سرطانی انجام شده است. بدین وسیله از همکاران محترم این دانشگاه صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

۸- تعارض منافع

نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان تعارض ندارد.

۹- سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان در طراحی پژوهش، جمع‌آوری و تحلیل داده‌ها و همچنین نگارش مقاله مشارکت داشته‌اند و نسخهٔ نهایی مقاله را تأیید نموده‌اند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-04]

۱۱- منابع

1.Shih I-M, Wang Y, Wang T-LJTAjop. The origin of ovarian cancer species and precancerous landscape. 2021;191(1):26-39.
2.Áyen Á, Jimenez Martinez Y, Marchal JA, Boulaiz HJIjoms. Recent progress in gene therapy for ovarian cancer. 2018;19(7):1930.
3.Cabasag CJ, Fagan PJ, Ferlay J, Vignat J, Laversanne M, Liu L, et al. Ovarian cancer today and tomorrow: A global assessment by world region and Human Development Index using GLOBOCAN 2020. 2022;151(9):1535-41.
4.Bonifácio VDJTMTMDoMA. Ovarian cancer biomarkers: moving forward in early detection. 2020:355-63.
5.Obstetricians ACo, Gynecol GJIpdtssoliowO. American Academy of Obstetrics and Gynecology. 2004;103(2):225-30.
6.Chan JK, Tian C, Kesterson JP, Monk BJ, Kapp DS, Davidson B, et al. Symptoms of women with high-risk early-stage ovarian cancer. 2022;139(2):157-62.
7.Golara A, Kozłowski M, Cymbaluk-Płoska AJIJoMS. The role of long non-coding RNAs in ovarian cancer cells. 2024;25(18):9922.
8.Aminaei M, Karami F, Marvibaigi M, Sotoodehnejadnematalahi F, Tajabadi Ebrahimi MJF, Health. Primary evidence on the potential of Lactobacillus paracasei in treatment of hepatocellular carcinoma. 2018;4(3):27.
9.Górska A, Przystupski D, Niemczura MJ, Kulbacka JJCm. Probiotic bacteria: a promising tool in cancer prevention and therapy. 2019;76(8):939.
10.Isazadeh A, Hajazimian S, Shadman B, Safaei S, Bedoustani AB, Chavoshi R, et al. Anti-cancer effects of probiotic lactobacillus acidophilus for colorectal cancer cell line caco-2 through apoptosis induction. 2020;27(2):262-7.
11.Amiri-Farsani M, Taheri Z, Tirbakhsh Gouran S, Chabok O, Safarpour-Dehkordi M, Kazemi Roudsari MJN, Nucleotides, et al.
Cancer stem cells: Recent trends in cancer therapy. 2024;43(12):1383-414.
12.Chee WJY, Chew SY, Than LTLJMcf. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. 2020;19(1):203.
13.Samiei Mosleh I, Karami F, Salahshourifar I, Tajabadi Ebrahimi M, Marvibaigi MJP, Pharmacology. Investigating the effects of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus paracasei supernatant on cervical cancer cells. 2023;27(4):426-34.
14.Wang K-D, Xu D-J, Wang B-Y, Yan D-H, Lv Z, Su J-RJP, et al. Inhibitory effect of vaginal Lactobacillus supernatants on cervical cancer cells. 2018;10(2):236-42.
15.Taheri M, Badrlou E, Hussen BM, Kashi AH, Ghafouri-Fard S, Baniahmad AJFio. Importance of long non-coding RNAs in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of prostate cancer. 2023;13:1123101.
16.Safarpour-Dehkordi M, Chabok O, Asgari M, Khademi R, Doosti AJAoM. A comprehensive investigation of the medicinal efficacy of antimicrobial fusion peptides expressed in probiotic bacteria for the treatment of pan drug-resistant (PDR) infections. 2024;206(3):93.
17.Safarpour-Dehkordi M, Samimi-Dehkordi N, Asgari M, Khademi R, Kabirian-Dehkordi M, Amiri M, et al. Co-expression network analysis for the identification of potential prostate cancer genes and in vitro confirmation of their expression in cell model in the presence of Staphylococcal tsst-1 gene. 2024;43(3):214-29.
18.Safarpour-Dehkordi M, Doosti A, Jami M-SJCJ. Integrative analysis of lncRNAs in kidney cancer to discover a new lncRNA (LINC00847) as a therapeutic target for staphylococcal enterotoxin tst gene. 2020;22(Suppl 1):101.
19.Lin Y, Wang X, He S, Duan Z, Zhang Y, Sun X, et al. Immunostimulatory gene therapy combined with checkpoint blockade reshapes tumor microenvironment and enhances ovarian cancer immunotherapy. 2024;14(2):854-68.
20.Onur E, Gökmen GG, Nalbantsoy A, Kışla DJC. Investigation of the supportive therapy potential of propolis extract and Lactobacillus acidophilus LA-5 milk combination against breast cancer in mice. 2022;149:155743.
21.Mehdi Soltan Dallal M, Shirazi L, Hossein Yazdi M, Mahdavi M, Mokarrari S, Rahimi Forushani A, et al. Effect of oral administration of Lactobacillus reuteri in increased survival and resistance to neoplasm in mice breast cancer. 2013;70(11).
22.Ji G, Zhao J, Si X, Song WJADDR. Targeting bacterial metabolites in tumor for cancer therapy: An alternative approach for targeting tumor-associated bacteria. 2024;211:115345.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-04]

23.Mahmoodzadeh Hosseini H, Imani Fooladi AA, Soleimanirad J, Nourani MR, Davaran S, Mahdavi MJTB. Staphylococcal entorotoxin B anchored exosome induces apoptosis in negative esterogen receptor breast cancer cells. 2014;35(4):3699-707.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-02-04]