مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۱۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹

بررسی اثرات ساکارومیسس بولاردی غنی شده با نانواکسید سلنیوم بر سلول‌های سرطان پستان توسط DMBA القا شده در رت

سمیرا زمانی M.Sc.[1]، فرشته قندهاری Ph.D.[1*]، مهنوش فاطمی Ph.D[2]، ملاحت رضایی Ph.D[3]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Ghandehari@iaufala.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۶

چکیده

هدف: این مطالعه به بررسی اثرات ضدسرطانی ساکارومایسس بولاردی و ساکارومایسس بولاردی غنی‌شده با نانواکسید سلنیوم بر سلول‌های سرطان پستان القا شده در رت توسط کارسینوژن ۷-۱۲ دی‌متیل بنزا آنتراسن پرداخته است.

مواد و روش‌ها: سرطان سینه با تزریق کارسینوژن به نوک سینه رت‌های ماده القا شد. بعد از رسیدن تومورها به‌سایز ۱۰ میلی‌متر و جهت تهیه مقاطع بافتی و سلول‌های منفرد تومورها جدا شد. سلول‌های سرطانی با غلظت‌های متفاوتی از سوسپانسیون *ساکارومایسس بولاردی* و *ساکارومایسس بولاردی* غنی‌شده با نانواکسید سلنیوم تیمار شدند. سایتوتوکسیتی با دو روش MTT و تریپان‌بلو بررسی شد.

نتایج: مقایسه دو گروه دریافت کننده ساکارومایسس بولاردی و مخمر غنی‌شده با نانواکسید سلنیوم با استفاده از دو آزمون تغییرات درصد زیستایی سلول‌های سرطانی در هر دو غلظت ۰/۵ µg/ml و ۱ مشاهده شد. به‌علاوه با افزایش غلظت، زیستایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. درصد زیستایی سلول‌های سرطانی در گروه‌های آزمایشی تیمار با مخمر غنی شده با نانواکسید سلنیوم با افزایش غلظت مخمر غنی شده کاهش یافت. با مقایسه غلظت‌های مختلف مخمر با مخمر غنی شده، نشان داده شد که بین اثر سایتوتوکسیستی آن‌ها برروی سلول‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

نتیجه‌گیری: مخمرهای پروبیوتیکی احتمالا می‌توانند کاندید مناسبی برای درمان بیماری‌ها و در راس آن سرطان باشند، به‌ویژه زمانی که با ترکیبات نانواکسید سلنیوم همراه شوند.

واژگان کلیدی: ساکارومایسس بولاردی، نانواکسید سلنیوم، سرطان سینه

مقدمه

طبق آمار منتشر شده از سوی وزارت بهداشت و درمان، در حال حاضر سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان کشور به‌شمار می‌رود و دومین سرطان کشنده پس از ریه است. بالابودن آمار مبتلایان به این نوع سرطان در کشورمان ضرورت انجام تحقیقات بیشتر برای پی‌بردن به مکانیسم‌های ایجاد سرطان و ابداع روش‌های درمانی موثرتر را آشکار می‌سازد. سرطان پستان را می‌توان توسط انواع مختلفی از عواملی نظیر هورمون‌ها، پرتوهای یونیزان و مواد کارسینوژن ایجاد نمود، اما یکی از پرکاربردترین روش‌های القا سرطان پستان در رت، استفاده از نوعی ماده شیمیایی به‌نام ۷ و ۱۲ دی‌متیل بنزا آنتراسن می‌باشد. وجود عواملی مانند تنوع پروسه‌های پاتولوژیک و مکانیسم‌های مقاومت به درمان، انتخاب مناسب‌ترین و کارآمدترین نوع درمان را برای هر یک از بیماران مشکل ساخته است و این امر لزوم انجام آزمایش‌های In vitro drug sensitivity/resistant را روشن می‌سازد.

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و مفیدی هستند که در صورت مصرف در انسان یا حیوان و با اثر بر فلور میکروبی بدن باعث بروز اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان می‌شوند. امروزه پروبیوتیک‌ها به‌عنوان عاملی برای پیش‌گیری از ابتلا به‌بسیاری از بیماری‌های عفونی و سرطانی شناخته شده‌اند (۱). ریکی و همکاران (۲) نشان دادند که لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس پاراکازیی کشته شده باحرارت قادر به‌مهار رشد سلول‌های لوسمی میلوئید می‌باشند. ثابت شده است که پروبیوتیک‌ها می‌توانند نقش‌های ضدسرطان را ازطریق چندین مکانیسم، ازجمله القا پاسخ‌های سیستم ایمنی، فعالیت‌های ضدپرولیفراتیو و القا آپوپتوزیس اعمال کنند (۳). مخمرها گروهی از پروبیوتیک‌ها بوده و مانند باکتری‌های پروبیوتیک، تاثیر به‌سزایی در درمان و تامین سلامت انسان دارد. مطالعات نشان داده که مخمرها ازجمله ساکارومایسس سرویزیه و ساکارومایسس بولاردی باعث افزایش پاسخ ایمنی شده و هم‌چنین اثرات پیش‌گیری کننده از ابتلا به سرطان و مهارکنندگی رشد سلول‌های توموری را دارند (۴، ۵). علاوه بر این سلنیوم به‌فرم‌های سلنیت، سلنات، سلنوسیستئین و سلنومتیونین به‌طور طبیعی کوفاکتور موثری برای عمل‌کرد صحیح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در بدن محسوب می‌شود و مصرف دزهای پایین سلنیوم به‌نظر می‌رسد که نه‌تنها برای پیش‌گیری سرطان‌ها مفید است بلکه می‌تواند به‌طور مثبت بر بسیاری از سایر کارکردهای موجود زنده از طریق کاهش التهاب، کاهش بیماری‌های قلبی و تنظیم فشار خون عمل نماید (۶). مکانیسم پیشنهاد شده برای خاصیت ضدسرطانی سلنیوم و ترکیبات سلنیومی شامل تغییر در متابولیسم کارسینوژن‌ها، القای ترمیم DNA، تنظیم التهاب و سیستم ایمنی، تنظیم چرخه سلولی و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی، مهار تحرک سلولی، مهار رگ‌زایی یا آنژیوژنز و القای آپوپتوزیس می‌باشد (۷). به‌منظور بهبود ایمنی ترکیبات سلنیومی، فرمولاسیون آن‌ها به‌صورت نانوذرات مزایای زیادی دارد. کپسوله کردن سلنیوم در اندازه‌های نانو به‌طرز کارآمدی باعث فراتنظیمی فعالیت سلنوآنزیم‌ها همراه با کم‌ترین سمیت در مقایسه با ترکیبات سلنیومی دیگر می‌شود (۸). طبق مطالعات انجام شده، دریافت سلنیوم به‌صورت مخمر غنی شده باسلنیوم به‌عنوان یک روش بسیار مناسب، ایمن در غنی‌سازی موادغذایی شناخته شده است، زیرا در این روش، سد بیولوژیک بین سلنیوم معدنی و فرد مصرف‌کننده قرار دارد و خطر دریافت سلنیوم در حد زیاد، کاهش می‌یابد و مخمر غنی شده با سلنیوم تنها شکل سلنیوم است که تاکنون در پژوهش‌های تداخلی ضدسرطان در انسان‌ها کارایی داشته است (۹). در یک مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که تغذیه موش‌ها توسط مخمر غنی شده با سلنیوم می‌تواندکاهش قابل توجهی از رشد تومورهای متاستاتیک مغز را نشان دهد (۱۰).

در این پژوهش از مدل رت نژاد ویستار استفاده شده که قادر به تقلید شرایط تومورهای انسانی تا حد بسیار زیادی می‌باشد و بنابراین می‌تواند مدل مناسبی برای مطالعه اثر ترکیبات ضدسرطانی به‌شمار آید. با بررسی داده‌های به‌دست آمده از این مطالعه به‌این موضوع پی خواهیم برد که آیا استفاده از مدل رت نژاد ویستار می‌تواند مدل مناسبی برای مطالعه اثر ترکیبات

ضدسرطانی به‌شمار آید و این‌که آیا ساکارومایسس بولاردی غنی‌شده با نانواکسیدسلنیوم قادر به ازبین بردن سلول‌های سرطانی هستند؟

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، ۱۰رت ماده بالغ از نژاد ویستار با میانگین وزنی (۲۰±۱۵۰) از مرکز نگه‌داری حیوانات در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان خریداری و در شرایط استاندارد ۱۲/۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی، حرارت ۵±۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵±۵۰ و دسترسی به آب و غذا مناسب نگه‌داری شد.

القا سرطان و تیمار رت‌ها: ۶۰ میلی‌گرم DMBA بر کیلوگرم (Sigma آلمان) محلول در ۱ میلی‌لیتر روغن کنجد به‌نوک سینه چپ ۱۰ رت تزریق شد. پس از رسیدن تومور به‌اندازه ۱ میلی‌لیتر، حیوانات توسط دی‌اتیل‌اتر بی‌هوش و تومورها به‌طور کامل خارج شد. یک سوم تومور به‌منظور تهیه مقاطع بافتی برای مطالعه هیستوپاتولوژیک در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و دو سوم باقی‌مانده جهت تهیه سلول‌های منفرد مورد استفاده قرار گرفت (۲). تمام مراحل انجام آزمایش طبق اصول مصوبه کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان با کد IR.IAU.FALA.REC.1396.012 انجام شد.

تهیه اسلایدهای بافتی: نمونه به‌دست آمده از تومور جدا شده به‌مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و در ادامه پس از انجام مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی، قالب‌گیری، برش با میکروتوم، رنگ‌آمیزی با هماتوتوکسین- ائوزین، نمونه‌ها بر روی لام‌ها مونته شدند و تغییرات هیستوپاتولوژیک با کمک میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت.

تهیه سلول‌های منفرد از بافت تومور: برای تهیه سلول منفرد از بافت تومور، تومورها به‌زیر هود لامینار انتقال داده شده، از قسمت‌های داخلی تومور قطعاتی بریده و به‌فالکون‌های ۱۰ میلی لیتر حاوی بافر HBSS انتقال داده شد. پس از جدا کردن خون و بافت اضافه، باقی‌مانده تومور با اسکالپل به‌ذرات بسیار ریز خرد و در دور ۱۵۰۰rpm به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از آن محلول رویی دور ریخته شد و به‌رسوب فالکون ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (Gibco) حاوی ۱۰ درصد FBS اضافه شد. پس از پیتاژ ۲ میلی‌لیتر از این مخلوط را به فلاسک منتقل و حجم فلاسک را به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون فلاسک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 محیط روی فلاسک تخلیه و ۵ میلی‌لیتر محیط کشت تازه به فلاسک اضافه و مجدد انکوبه شد (۲). (تعویض محیط و پاساژ سلول‌ها هر چند روز یک‌بار انجام می‌شد). رده سلول نرمال MCF10α خریداری شده از انستیتو پاستور نیز پاساژ وکشت داده شد. جهت انجام کشت سلولی، رده سلولی در محیط کشت DMEM (Gibco) حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Gibco) در حضور ۵ درصد CO_2 و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محیط سلول‌ها، هر سه روز یک مرتبه تعویض شد تا زمانی‌که سلول‌ها جهت تیمار به غلظت ۸۰ درصد برسند.

تهیه سوسپانسیون مخمری و غنی‌سازی با نانواکسید سلنیوم: مخمر ساکارومایسس بولاردی از شرکت دارویی(Yomogy) خریداری و در محیط سابرودکستروز براث کشت داده شد. کدورت سوسپانسیون میکروبی مطابق با لوله شماره ۰/۵ استاندارد مک فارلند تنظیم و جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر بین ۰/۱-۰/۰۸ تنظیم شد.

به ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده از مخمر ۹۰ میلی‌لیتر نانواکسید سلنیوم با غلظت (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از سانتریفوژ جهت حذف سلنیوم اضافی رسوبات توسط

سالین نرمال استریل دوبار شست‌وشو داده شد و در نهایت از رسوبات حاصله سوسپانسیون تهیه، شمارش و رقتی معادل با $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml ازمخمر غنی شده با نانواکسید سلنیوم تهیه شد (۱۱).

ارزیابی میزان سایتوتوکسیسیتی: سنجش تترازولیوم (MTT) اساس این تست شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات و هیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول فورمازان می‌باشند.

$۱۰^{۴}$ از سلول‌های موردنظر در چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه کشت و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط رویی خارج و سلول‌ها توسط بافر PBS شست‌وشو و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم حاوی غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از مخمر ساکارومایسس بولاردی و ساکارومایسس بولاردی غنی‌شده با نانواکسید سلنیوم و نانواکسید سلنیوم (غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌هر چاهک از پلیت اضافه شد و به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. پس از آن محیط هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر محیط فاقد سرم تازه جایگزین شد. به‌هر یک از چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (Sigma آلمان) با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه و پلیت مجددا به‌مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. نهایتا محیط رویی هر چاهک تخلیه و به‌منظور حل شدن بلورهای فورمازان ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید به‌هر یک از چاهک‌ها اضافه و پیتاژ شد. جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر قرائت و درصد حیات سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۲).

$$\text{درصد بقا سلول} = \frac{\text{جذب نورسلول تیمار شده}}{\text{جذب نور کنترل}} \times ۱۰۰$$

سنجش توانایی زیستی سلولی با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو: در چاهک‌های یک پلیت ۶ خانه‌ای ۱۸۰ میکرولیتر، از سوسپانسیون سلولی حاوی $۱۰^{۴}$سلول اضافه و به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور CO_2 دار و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پس از ۴۸ ساعت محیط رویی خارج ، و ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم و ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۰/۵ و ۱ مخمر ساکارومایسس بولاردی و مخمر ساکارومایسس بولاردی غنی شده با نانواکسید سلنیوم و نانواکسید سلنیوم (غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت تمام چاهک‌ها تریپسین زنی شده سپس با اضافه کردن محیط کشت کامل و غیر فعال شدن تریپسین به نسبت ۰/۰۱ تریپان بلو، ۰/۴ درصد به‌هر چاهک اضافه و پلیت به‌مدت ۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار انجام گرفت. سلول‌های آبی رنگ به‌عنوان سلول‌های مرده و سلول‌های بی‌رنگ به‌عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از فرمول زیر درصد حیات سلول‌ها را در هر غلظت محاسبه شد.

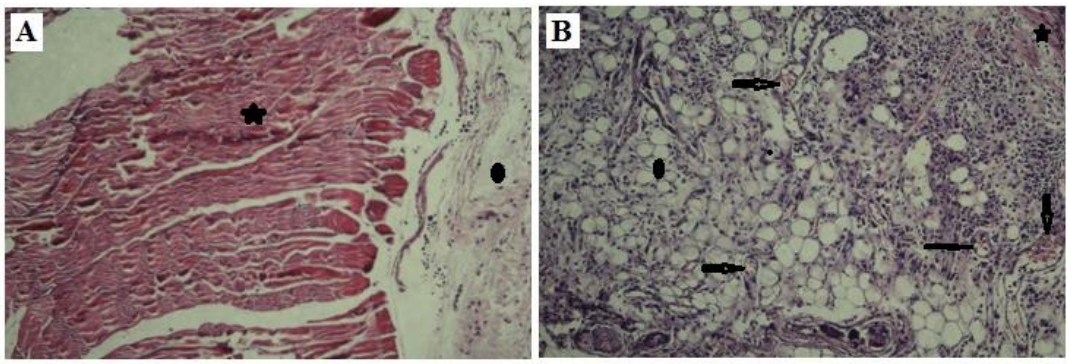
$$\text{توانایی زیستی سلول‌ها} = \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد سلول های مرده}} \times ۱۰۰$$

تحلیل آماری

نتایج و داده‌های به‌دست آمده از انجام مطالعات با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و جهت مقایسه غلظت‌ها در دو روش ارزیابی سایتوتوکسیسیتی از آنالیز T مستقل test (independent T) استفاده شد و با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تحلیل آماری قرار گرفت و نمودارها توسط نرم افزار Excel (ورژن ۱۶) ترسیم شد. هر نقطه روی نمودار بیان‌گر میانگین سه روز آزمایش و هر روز سه تکراراست. Error bar = Mean ± SD

نتایج

مطالعات هیستوپاتولوژیکی به‌منظور اطمینان از بدخیم بودن تومورها انجام شد. طبق نتایج به‌دست آمده از مقایسه بافت پستان سالم (شکل ۱– A) با اسلایدهای بافتی تهیه شده از پستان موش‌هایی مواجهه با DMBA تهاجم سلول‌های سرطانی دراستروما و عضله بافت پستان (شکل ۱– B) مشاهده شد که تاییدی بر ایجاد سرطان پستان در این جانوران بود.

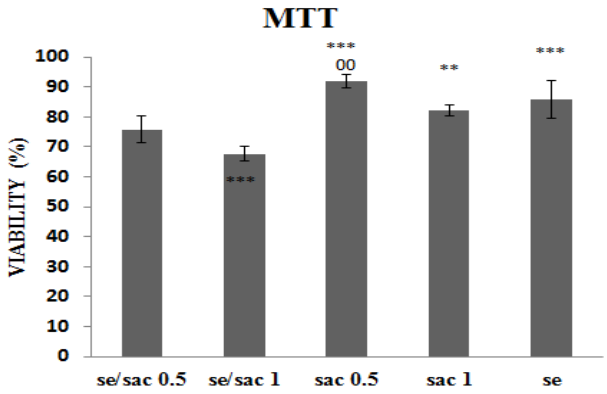


شکل ۱: مقایسه نمونه‌های بافت پستان. A: بافت پستان موش‌های سالم با استروما (بیضی) و بافت عضله (ستاره) نرمال. B: بافت پستان موش‌های سرطانی. تهاجم سلولهای سرطانی در کل استروما و بافت عضلانی (بیضی و ستاره بترتیب). فلش‌ها آنژیوژنز (رگ زایی) را نشان می‌دهد.

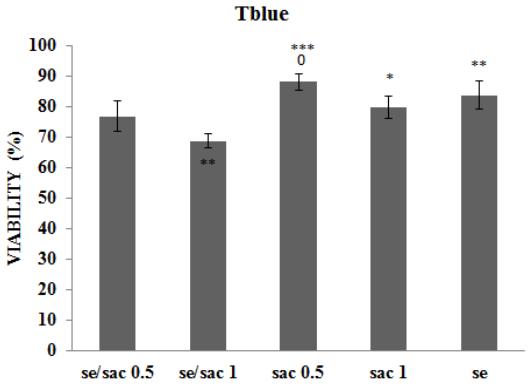
طبق نمودار قابلیت زیستایی سلول‌های سرطانی به‌روش MTT (نمودار ۱) در سلول‌های تیمار شده با غلظت نیم *ساکاورمایسس بولاردی* غنی شده با نانو اکسیدسلنیوم به‌طور معنی داری کمتر از سلول‌های تیمار شده با ساکارومایسس به‌تنهایی در غلظت ۰/۵ می‌باشد ولی با سایر گروه‌ها اختلاف مشاهده شده معنی‌دار نیست. در غلظت بالاتر یعنی غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر ساکارومایسس بولاردی غنی شده با نانواکسیدسلنیوم قابلیت زیستایی این رده سلولی به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های تیمار شده با غلظت نیم ($p\leq ۰/۰۰۱$) و یک ($p\leq ۰/۰۱$) ساکارمایسس بولاردی به‌تنهایی و نانواکسید سلنیوم به تنهایی ($p\leq ۰/۰۰۱$) می‌باشد. نتایج حاصل به‌روش تریپان بلو در نمودار ۲ نشان داده شده است. طبق نمودار قابلیت زیستایی سلول‌های سرطانی تیمار شده با ساکارمایسس بولاردی غنی شده با نانواکسید سلنیوم در غلظت ۱ با غلظت نیم تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد. درحالی‌که در غلظت ۱ ساکارمایسس بولاردی غنی شده با نانواکسید سلنیوم قابلیت زیستایی سلول‌های سرطانی به‌طور معنی‌داری کمتر از سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۵ ($p\leq ۰/۰۰۱$) و یک ($p\leq ۰/۰۵$) *ساکاورمایسس بولاردی* به‌تنهایی و نانواکسید سلنیوم به‌تنهایی ($p\leq ۰/۰۱$) می‌باشد.

تفاوت معنی‌داری در قابلیت زیستایی سلول‌ها در گروه‌های آزمایشی نسبت به سلول‌های تیمار شده با ساکارمایسس بولاردی غنی شده با نانواکسیدسلنیوم در غلظت ۰/۵ مشاهده نشد، به‌استثنای گروه تیمار شده با ساکارمایسس بولاردی به‌تنهایی در غلظت ۰/۵ ($p\leq ۰/۰۵$). به‌دنبال مقایسه نتایج در روش MTT و Tblue (نمودار ۳) هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین نتایج هر یک از گروه‌های آزمایشی نسبت به هم‌دیگر مشاهده نشد.

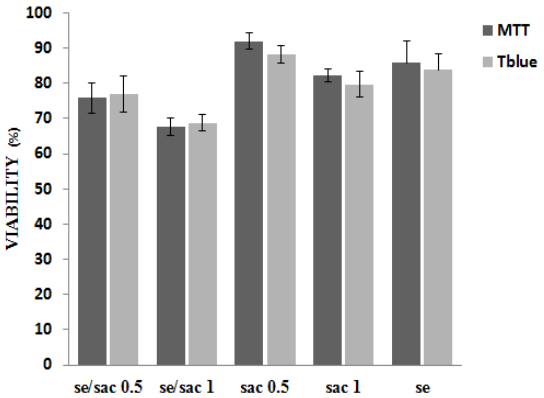
طبق نمودار ۴ در قابلیت زیستایی سلول‌های نرمال به‌روش MTT به‌دنبال تیمار با غلظت‌های نیم و یک میکروگرم در میلی‌لیتر ساکارومایسس بولاردی غنی شده با نانواکسید سلنیوم، ساکاورمایسس بولاردی و نانو اکسیدسلنیوم کاهش ۱۰ تا ۱۵ درصد مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری در گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد.



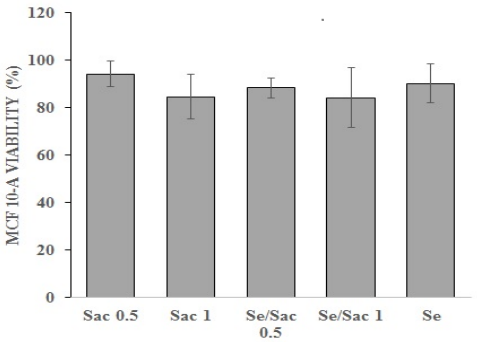
نمودار ۱: مقایسه قابلیت زیستایی سلول‌های سرطانی در گروه‌های آزمایشی با روش MTT. داده‌ها به‌صورت Mean ±SD بیان شد. ستاره‌های بالای نمودار مقایسه ساکارو مایسس بولاردی غنی شده با نانواکسید سلنیم غلظت ۱ با سایر گروه‌ها. بیضی‌ها مقایسه غلظت نیم آن با سایر گروه‌ها. ستاره‌های زیر نمودار مقایسه نانواکسید سلنیوم با سایر گروه‌ها



نمودار۲: مقایسه قابلیت زیستایی سلول‌های سرطانی در گروه‌های آزمایشی با روش تریپان بلو. داده‌ها به‌صورت Mean ±SD بیان شد. ستاره‌های بالای نمودار مقایسه ساکارو مایسس بولاردی غنی‌شده با نانواکسید سلنیوم در غلظت ۱ با سایر گروه‌ها. بیضی‌ها مقایسه غلظت نیم آن با سایر گروه‌ها. ستاره‌های زیر نمودار مقایسه نانواکسید سلنیوم با سایر گروه‌ها



نمودار۳: مقایسه قابلیت زیستایی سلول‌های سرطانی گروه‌های آزمایشی در دو روش تریپان بلو و MTT. داده‌ها به‌صورت Mean ±SD بیان شد.



نمودار ۴: بررسی قابلیت زیستایی سلول‌های نرمال MCF10α در گروه‌های آزمایشی به‌روش MTT. داده‌ها به‌صورت Mean ±SD بیان شد.

بحث

گزارشات پیشین حاکی از آن است که اکثر تومورهای القا شده توسط DMBA از نوع ادنوکارسینوما بوده و مشخصات تومورهای انسانی را از نظر رشد، وابستگی به هورمون‌ها و هیستولوژی تقلید می‌کنند و درنتیجه مدل حیوانی مناسبی جهت تحقیق در مورد کارسینوژنز تومورهای پستان انسانی می‌باشند (۱۲). ازاین‌رو در پژوهش حاضر از این مدل حیوانی استفاده شد و بررسی‌های بافتی نیز بیان‌گر القا سرطان سینه در این مدل حیوانی بود. بررسی توانایی زیستی سلول‌های سرطانی با استفاده از دو روش رنگ آمیزی با تریپان بلو و MTT نشان داد که مخمر ساکارومایسس بولاردی به‌تنهایی در هر دو غلظت و هم‌چنین نانواکسید سلنیوم به‌تنهایی سمیت قابل توجهی بر توانایی زیستی سلول‌های سرطانی نداشتند و به‌طور میانگین ۱۰ تا ۱۷ درصد باعث کاهش زیستایی این سلول‌ها شدند. این‌درحالی است که هر دو غلظت ساکارومایسس بولاردی غنی شده با نانواکسید سلنیوم توانایی زیستایی سلول‌ها را کاهش دادند و این کاهش در غلظت بالاتر به‌مراتب معنی‌دارتر نسبت به‌سایر موارد مورد آزمون بود. به‌طوری‌که به‌دنبال تیمار سلول‌های توموری با این غلظت از ساکارومایسس بولاردی غنی شده، تقریبا کاهش ۳۵ درصدی در توانایی زیستایی این سلول‌ها مشاهده شد. این نتایج با استفاده از دو روش نیز در راستای هم‌دیگر بود. تحقیقات پیشین بیان‌گر این است که پروبیوتیک‌ها با تاثیر بر آنزیم‌های گوارشی حیوانات و انسان‌ها، مهار عوامل سرطان‌زا در داخل بدن و شرایط آزمایشگاهی، مهار ترکیبات القاکننده سرطان و تومورها در حیوانات نقش موثری در جهت مقابله با سرطان ایفا می‌کنند (۱۳). هم‌چنین اثرات ضدسرطانی پروبیوتیک‌ها از طریق جلوگیری از تبدیل پروکارسینوژن به کارسینوژن، اتصال و غیرفعال کردن ترکیبات میتوژنی، کاهش رشد باکتری‌های پروکارسینوژنز، کاهش جذب میتوژن‌ها و افزایش عمل‌کرد سیستم ایمنی می‌باشد (۱۴). بنابراین استفاده از مخمرساکارومایسس بولاردی به‌عنوان یک باکتری پروبیوتیک در درمان و پیش‌گیری از سرطان موثر بوده و نتایج این تحقیق نیز هم‌راستا با تحقیقات گذشته در زمینه استفاده از پروبیوتیک‌ها در درمان سرطان می‌باشد. سایر مطالعاتی که پیش از این در رابطه با اثرات سایتوتوکسیک مخمر ساکارومایسس بولاردی صورت گرفته است نیز توانایی این مخمر را در کاهش توانایی زیستی سلول‌های سرطانی نشان داده است. تحقیقات متعددی در رابطه با مخمرهای پروبیوتیکی صورت گرفته است که بیان‌گر این موضوع است که مخمرها نیز با استفاده از مکانیسم‌هایی هم‌چون اتصال به مواد سرطان‌زا و تخریب آن‌ها، جلوگیری از تولید مواد سرطان‌زا مانند آمونیاک و اسیدهای صفراوی ثانویه، تولید مواد ضدسرطان و تقویت پاسخ‌های ایمنی میزبان می‌توانند از سرطان پیش‌گیری کنند (۴). مطالعات دیگر نیز مشخص کرده است که مخمر ساکارومایسس بولاردی کشته شده با حرارت می‌تواند باعث وقوع آپوپتوزیس سلولی در سه رده سلول‌های سرطان پستان (HCC70، ZR-75-1، MCF-7) شود که به‌کلسیم درون سلولی وابسته است. هم‌چنین نشان داده شده که با تزریق ۴۵ روزه ساکارومایسس بولاردی به‌تومورهای ایجادشده در رت به‌دنبال تزریق سلول‌های MCF-7 به‌مرور زمان می‌توان

کاهش قابل توجهی در حجم تومور مشاهده نمود (۴، ۱۵). چان و همکاران خاصیت ضدتوموری مخمرها را به بتاگلوکان و مانان موجود در دیواره سلولی آن‌ها نسبت داده اند(۱۶). ساکارومیسس سرویزیه حاوی ترکیبی به‌نام ارگوسترول است که یکی از اجزای اصلی غشای سیتوپلاسمی آن محسوب می‌شود. درمطالعه سوبیاح و همکاران نشان داده شد که این ترکیب رشد سلول‌های سرطان سینه (MCF-7 و MDA-231) را درشرایط *In vitro* با مکانیسمی که ممکن است شامل محصولات اکسایشی ارگوسترول باشد، مهار می‌کند (۱۷). بتاگلوکان جداشده از ساکارومایسس بولاردی قادر است مقاومت میزبان را در برابر آنتی‌ژن‌های خارجی مختلف مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها و آلودگی‌های انگلی افزایش دهد و هم‌چنین ممکن است باعث فعالیت میزبان علیه تومورها ازطریق تحریک سیستم ایمنی شود(۱۸). همین امر بیان‌گر اهمیت وجود بتاگلوکان در دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس بولاردی بوده و در پژوهش حاضر نیز احتمالا یکی از دلایل کاهش توانایی زیستی سلول‌های سرطانی است. مقایسه نتایج پژوهش حاضر با سایر مطالعات بیان‌گر آن است که مخمرها از جمله ساکارومایسس بولاردی دارای خاصیت ضدسرطانی است و غنی شدن مخمر با نانواکسید سلنیوم، می‌تواند اثرات سایتوتوکسیک مخمر را افزایش دهد. یافته‌های پیشین نشان می‌دهند که به‌وسیله حفظ سطح مناسب سلنیوم در رژیم غذایی می‌توان از بروز انواع سرطان‌ها پیش‌گیری کرد. اثرات سلنیوم بر سلول‌های سرطانی وابسته به‌غلظت بوده و سطوح کم و متوسط می‌توانند رشد سلول‌ها را تحریک در حالی‌که سطوح بالاتر سیتوتوکسیک هستند. به‌عبارتی خواص سایتوتوکسیک سلنیوم به‌عوامل مختلفی ازجمله دوز سلنیوم مصرفی، نوع ترکیب سلنیومی و مراحل مختلف سرطان (مرحله ابتدایی و مرحله پیشرفته) وابسته است (۱۹). مطالعات نشان می‌دهد که نفوذپذیری سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم بیش‌تر و بافت‌های سرطانی، مواد مغذی با سایز کوچک در حد ۲ نانومتر را از طریق فرآیند انتشار می‌توانند دریافت کنند (۲۰). از این‌رو استفاده از ترکیبات سلنیومی در سطح نانو در این تحقیق عامل مهمی در افزایش خاصیت سیتوتوکسیک مخمرهای غنی شده نسبت به مخمر به‌تنهایی می‌باشد. مطالعات نشان داده است که پروبیوتیک‌ها قادر به تولید مهارکننده‌های رشد سلولی و انتخابی برای سلول‌های سرطانی هستند. در پژوهش حاضر ساکارومایسس بولاردی خاصیت سایتوتوکسیک پایین‌تری نسبت به سلول‌های نرمال نشان داد و مقایسه این پژوهش با سایر پژوهش‌ها بیان‌گر آن است که این ویژگی احتمالا به‌دلیل حلالیت ذاتی بالای پلی‌ساکاریدهای دیواره و عصاره سیتوپلاسمی این دسته از پروبیوتیک‌ها می‌باشد (۲۱).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج حاصل از تحقیقات، مخمرهای پروبیوتیکی مانند باکتری‌های پروبیوتیک احتمالا می‌توانند گام مناسبی برای درمان بیماری‌ها و در راس آن‌ها سرطان باشند، به‌ویژه زمانی که با ترکیبات سلنیوم درسایز نانو همراه شوند. زیرا پروبیوتیک‌ها ترکیبات ایمن و موثر بر سلامت میزبان می‌باشند و سلنیوم نیز در مقادیر مشخصی می‌تواند به‌طور سینرژیسم اثر سایتوتوکسیک پروبیوتیک‌ها را افزایش دهد. هم‌چنین نتایج به‌دست آمده در این تحقیق با نتایج به‌دست آمده برروی رده‌های سلولی انسانی نشان‌گر این مطلب است که مدل القایی سرطان پستان رت که در این تحقیق مورد استفاده قرارگرفته است می‌تواند یک مدل مناسب و قابل اطمینان برای انجام آزمایشات سایتوتوکسیک باشد.

منابع

1. Kwan JM, Fialho AM, Kundu M, Thomas J, et al. Bacterial proteins as potential drugs in the treatment of leukemia. Leukemia Res. 2009; 33(10): 1392-99.

2. Riki M, Tukmechi A, Hajirahimi A, bonyadi F. Evaluation of Inhibitory Effects of heat-killed Lactobacillus casei and Lactobacillus paracasei on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: an in vitro study. RJMS. 2019; 26 (1) :1-9.
3. Tsai YT, Cheng PC, Fun CK, Pan TM. Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain Lactobacillus paracasei subsp Paracasei NTU 101. Inter J Food Microb. 2008; 128(2): 219-25.
4. Bonyadi F, Nejati V, Tukmechi A, Hasanzadeh SH, et al. Evaluation of Apoptotic Effects of Cell Wall and Cytoplasmic Extract from Saccharomyces cerevisiae on K562 Cell Line. Armaghane-Danesh. Yasuj Uni Med Sci J. 2013. 18(9):699-710.
5. Ghoneum M, Wang L, Agrawal S, Gollapudi S. Yeast therapy for the treatment of breast cancer: a nude mice model study *In Vivo*: Anticancer research. 2007; 21(2): 251-8
6. Behne D, Hofer T, Von Berswardt- Wallrabe R, Elger W. Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism. J Nutr.1982;102(11):1682-1687.
7. Wrobel J, Power R, Toborek M. Critical Review Biological Activity of Selenium: International Union of Biochemistry and Molecular Biology. 2015; 68(2): 97–105.
8. Sanmartín C, Plano D, Sharma A, Antonio Palop J. Selenium Compounds, Apoptosis and Other Types of Cell Death: An Overview for Cancer Therapy: International Journal of Molecular Sciences.2012; 13(8): 9649-9672.
9. Yu S, Zhu YJ, Li WG. Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong: Biol Trace Elem Res. 2009; 56(1): 117–24.
10. Wrobel JK, Seelbach MJ, Chen L, Power RF, et al. Supplementation with selenium-enriched yeast attenuates brain metastatic growth: Nutr Cancer. 2013;65(4): 563–70.
11. Chen L, Pan DD, Zhou YZ. Protective effect of selenium- enriched lactobacillus on CC14- induced liver injury in mice and it´s possible mechanisms: Gastroenterology. 2005; 11(37): 5795-5800.
12. Hamta A, Shariatzadeh SMA, Solimani M. Verification of some cancer markers and blood factors in DBMA induced breast cancer on SD rats. Journal of Behbod. 2012; 15(3): 200-207. [Persian]. Issues Intest Microbiol. 2000; 1(1): 13-24
14. Shira D, Sherwood LG. Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease: J Expert Review of Anti-infective Therapy. 2006; 4 (2); 261-275.
15. Boniadi F, Tukmechi A, Nejati V. Comparative study on the effect of obtained cell wall and cytoplasmic fraction from Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces boulardii on K562 cell line. Pharma Sci .2012; 18(1) :78-96.
16. Chan WKD, Cheung CC, Law HKD, Lau YLD, et al. Ganoderma lucidum polygosaccharides can induce human monocytic leukemia cells into dendritic cells with immune stimulatory function. J Hematol Oncol. 2008; 1- 9.
17. Subbiah MT, Abplanalp W. Ergosterol (majorsterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products. Int J Vitam Nutr Res.2003; 73(1): 19-23.
18. Rodriguez A, Cuesta A, Ortuno J, Esteban MA, et al. Immuno stimulant properties of a cell wall-modified whole Saccharomyces cerevisi aestrain administered by diet to seabream (Sparusaurata L.): Vet Immunol Immuno pathol.2003; 96(3-4): 183-92.

19. Sanmartín C, Plano D, Sharma A, Antonio Palop J. Selenium Compounds, Apoptosis and Other Types of Cell Death: An Overview for Cancer Therapy. International Journal of Molecular Sciences. 2012; 13(8): 9649-9672.
20. Yang X, Liu J, He H, Zhou L, et al. SiO2 nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells. Part Fibre Toxicol. 2010; 7(1):1-12.
21. Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, et al. Effects of Lactobacillus strains on cancer cell. proliferation and oxidative stress in vitro. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology. 2006; 42(5) 452–4.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2021; 11(4) *Original Article*

Cytotoxic effects study of nano-selenium oxide-enriched Saccharomyces bullardi on induced breast cancer cells by DMBA in rat

Zamani S[1] M.Sc., Ghandehari F[1*] Ph.D., Fatemi M[2] M.Sc., Rezaee M3 M.Sc.

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Falavarjan Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciece, Falavarjan Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3. Department of Biochemistry, Faculty of Basic Sciece, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

* Email corresponding author: ghandehari@iaufala.ac.ir

Received: 4 Agu. 2020 Accepted: 6 Mar. 2021

Abstract

Aim: This research aimed to study the anticancer effects of nano-selenium oxide-enriched Saccharomyces bullardi on DMBA-induced breast cancer cells in rats.

Material and Methods: In order to induce cancer, the carcinogen with a concentration of 60 mg/kg was injected into the left breast nipple of the female rats. When the tumors grew to about 10 mm, the cancerous tumor was isolated from the breast of the animals and used to make tissue sections and individual cells. Cancer cells were treated with different concentrations of S. boulardi suspension and nano-selenium oxide-enriched S. boulardi. The cytotoxicity assay was performed with two methods of MTT and Trypan blue staining.

Results: Comparison between two cell groups treated with S. boulardii and nano-selenium oxide-enriched S. boulardi using two tests, it was found that there were significant changes in cancer cells viability in both 0.5,1 µg/ml concentrations. with increasing the concentration, the cancer cell viability was significantly decreased. cell viability in the cell line treated with nano-selenium oxide-enriched S. boulardi yeast, with the increase in the concentration of enriched yeast was decreased. A comparison between the yeast and enriched yeast in different concentrations, revealed that there was a significant difference between cytotoxicity effects of them on the cells.

Conclusion: Probiotic yeasts could be an appropriate candidate for the treatment of some diseases including cancers, especially when combined with selenium compounds.

Keywords: Saccharomyces boulardi, nano-selenium oxide, Breast cancer.