Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره شانزدهم، شماره اول، ۱۳۹۹، پیاپی ۴۰: ۱۱۷-۱۰۷

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی عصاره سیتوپلاسمی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* بر رده سرطانی C140

حمیدرضا نیک دوست[۱]، سمانه عیدی[۲]*، هادی محب علیان[۲]

۱- دانش آموخته دکترای عمومی دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۲۳

چکیده

با توجه به افزایش بیماری های مرتبط با نقص ایمنی و سرطان در سال های اخیر، تلاش های زیادی در جهت استفاده از عوامل تعدیل کننده سیستم ایمنی با منشا طبیعی به عنوان ترکیبات دارویی، شکل گرفته است که در این میان مخمرها می توانند به عنوان ترکیبات محرک ایمنی مورد استفاده قرار گیرند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی عصاره سیتوپلاسمی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* بر رده سرطانی میلوئیدی مزمن C140 بود. برای این منظور عصاره‌ی سیتوپلاسمی سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس* در زمان‌های ۴۸،۲۴ و ۷۲ ساعت با مقادیر ۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مجاورت سلول‌های سرطانی C140 قرار داده شد و اثر آن با استفاده از آزمون های MTT و فلوسایتومتری بررسی شد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که در دوزهای پائین تر از ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره در زمان‌های مورد مطالعه، هیچ گونه تاثیری بر روی سلول های سرطانی مشاهده نشد؛ در حالیکه از دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بالا خاصیت سلول کشی عصاره سیتوپلاسمی وابسته به زمان بوده و با افزایش زمان، درصد مهار رشد نیز به طور معنی داری افزایش یافت ($p<۰/۰۰۱$). همچنین مشخص شد عصاره‌ی سیتوپلاسمی مخمر در دوز ۲۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بعد از ۷۲ ساعت مواجهه باعث مرگ ۵۰٪ سلول‌های سرطانی شد ($IC50 = 273\ \mu g/ml$). در آزمون فلوسایتومتری نیز ، درصد آپوپتوز سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره سیتوپلاسمی مخمر به میزان ۲۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۴۸/۲ ٪ بود در حالیکه در سلول‌های سرطانی تیمار نشده درصد آپوپتوز ۰/۱۷ ٪ بود.

کلمات کلیدی: سایتوتوکسیسیتی، عصاره سیتوپلاسمی، *کاندیدا آلبیکنس*، رده سرطانیC140، آزمون MTT، فلوسایتومتری.

* نویسنده مسئول: سمانه عیدی

آدرس: مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، کد پستی: ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴، صندوق پستی: ۱۷۹۳، تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۵۶۲۷

پست الکترونیک: eidi@um.ac.ir

مقدمه

سرطان، به عنوان دومین عامل مرگ و میر در انسانها (۱۷)، در نتیجه تقسیم غیرقابل کنترل سلول ها بوجود می آید که ناشی از اثر عوامل محیطی و اختلالات ژنتیکی است. چهار دسته از ژن های کلیدی که در هدایت سلول های سرطانی نقش دارند شامل آنکوژن ها، ژن های مهار کننده توموری، ژن های ترمیم کننده DNA و ژن های مرگ برنامه ریزی شده هستند. چنانچه یک موتاسیون ژنتیکی در سلول تولید شود، سلول های طبیعی از مسیر خود خارج شده و تحت تاثیر فرمانده های جدید قرار می گیرند که به سوی سرطانی شدن سلول ها پیشرفت می کنند (۲). سرطان خون یا لوسمی بیماری پیش رونده بدخیم بافتهای خونساز بدن است. این بیماری در اثر تکامل ناقص گویچه های سفید خون و پیش سازهای آن در خون و مغز استخوان ایجاد می شود (۷). در لوسمی روند طبیعی دچار اخلال شده و رشد سلول های خونی از کنترل خارج می شود (۱۱). لوسمی ها به چهار دسته تقسیم می شوند. لوسمی حاد لنفوییدی (Acute Lymphoid Leukemia-ALL)، لوسمی مزمن لنفوییدی (Chronic Lymphoid Leukemia- CLL)، لوسمی حاد میلوییدی (Acute Myeloid Leukemia -AML) و لوسمی مزمن میلوییدی (Chronic Myeloid Leukemia-CML) تقسیم می شوند(۱۴). لوسمی میلوییدی مزمن به دلیل جا به جایی متقابل بین ژن abl بر روی کروموزوم ۹ و ژن bcr بر روی کروموزوم ۲۲ در سلولهای بنیادی خون ایجاد می شود (۲۳). در نتیجه ژن ترکیبی bcr.abl به وجود می آید که مسئول تولید یک پروتئین ۲۱۰ کیلو دالتونی با فعالیت تیروزین کینازی به نام پروتئین p210 bcr-abl می باشد که علاوه بر تکثیر بی رویه و مستقل از فاکتور رشد سلول های پیش ساز میلوییدی، باعث تقسیم سلولی و اختلال در مرگ برنامه ریزی می شود (۲۱). ژن ترکیبی bcr.abl را اصطلاحاً کروموزوم فیلادلفیا گویند. عامل اصلی این سرطان تولید پروتئینی به نام BCR-ABL است که تیروزین کیناز سیتوپلاسمی فعالی است که موجب القای لوسمی در سلول های بنیادی خونساز می گردد (۱۳). تاکنون چندین رده سلولی از لوسمی میلوئیدی مزمن به دست آمده که یکی از آنها C140 است.

با توجه به افزایش بیماری های مرتبط با نقص ایمنی و سرطان در سال های اخیر، تلاش های زیادی در جهت استفاده از عوامل ایمونومدولاتوری با منشا طبیعی به عنوان ترکیبات دارویی، شکل گرفته است (۴) که در این میان مخمرها می توانند به عنوان ترکیبات محرک ایمنی مورد استفاده قرار گیرند. مزایای این دسته از میکروارگانیسم ها شامل نیازهای ساده رشد، تقسیم سلولی سریع، سهولت در دستکاری ژنتیکی و ابزار آزمایشی مناسب برای آنالیز عملکردهای بیولوژیکی گسترده ژنوم می باشد (۲۲). بر این اساس هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی عصاره سیتوپلاسمی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* بر رده سرطانی C140 بود.

مواد و روش کار

کشت انبوه مخمر کاندیدا آلبیکنس

در تحقیق حاضر، سویه استاندارد *کاندیدا آلبیکنس*(ATCC 90028) موجود در بانک سلول های قارچی بخش قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد به کار برده شد. سویه مذکور در محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از

تهیه کشت‌های تازه و خالص مخمری، جهت انبوه سازی آن، از محیط کشت مایع YPG (Yeast, Peptone, Glucose) (گلوکز: ۲۰ گرم، پپتون: ۲۰ گرم، عصاره مخمری: ۱۰ گرم در یک لیتر آب مقطر) حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۵۰mg/ml) استفاده شد. محیط‌های کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار با دور ۱۳۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. سپس سلول‌های مخمری با سانتریفوژ یخچال دار با g ×۴۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه جمع آوری شده و سه بار با آب مقطر استریل به روش سانتریفوژ با g × ۲۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه شستشو گردیدند (۵).

شکستن سلول های مخمری و تهیه عصاره سیتوپلاسمی

برای شکستن مخمرها از روش سونیکاسیون استفاده گردید. برای این منظور، سوسپانسیونی از سلول‌های مخمری در بافر فسفات سدیم سرد (۰/۱مولار، pH =۷/۲) تهیه شد و سپس پروب دستگاه سونیکاتور (دکتر هیلشر، آلمان) در داخل لوله حاوی نمونه قرار داده شد. عمل خرد کردن سلول‌ها با دامنه ۶۰ ٪ به مدت دو دقیقه انجام شد.

به‌منظورجلوگیری از بالا رفتن دمای محلول و پروب سونیکاتور، دستگاه به مدت چهاردقیقه خاموش می‌شد. این عمل‌چندین بار تکرار شده و هر دفعه شکسته شدن سلول‌های مخمری به وسیله میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۰). بعد از اطمینان از شکسته شدن سلول‌ها، سوسپانسیون مذکور با دور g × ۵۰۰ به مدت یک دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. رسوب حاصله در واقع دیواره سلولی بوده و مایع رویی به عنوان عصاره سیتوپلاسمی در نظر گرفته شد. مایع رویی (حاوی عصاره سیتوپلاسمی) پس از سنجش مقدار پروتئین آن به روش برادفورد برای تهیه غلظت های مختلف عصاره سیتوپلاسمی، جمع آوری شده و در منهای ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۰).

کشت رده سلولی C140

رده سرطانی C140 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. ابتدا این سلول ها از حالت انجماد خارج و پس از شمارش سلولی و تعیین درصد زنده مانی سلول ها(۹۶٪) به فلاسک کشت سلولی حاوی محیط RPMI 1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS،گیبکو، انگلستان)، ۱۰۰ واحد بین المللی بر میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین منتقل گردید و فلاسک در انکوباتور CO2 با ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد (۶). محیط کشت فلاسک هر دو روز یکبار تعویض گردید و به طور روزانه با کمک میکروسکوپ معکوس وضعیت سلولها تحت نظارت دقیق قرار داشت به محض مشاهده ی اشغال ۸۰ درصد سطح فلاسک توسط سلول ها (Conflouency 80)، سلول های فلاسک به نسبت ۱به ۲ و در پاره ای از اوقات که سلول ها در پیک مرحله تکثیر خود بودند به نسبت ۱به ۳ پاساژ داده شدند. بعد از ۴ مرحله پاساژ که بطور میانگین هر ۵ یا ۶ روز انجام گرفت و بعد از اطمینان از حصول تعداد کافی سلول (۳ تکرار برای هر تیمار و تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول برای هر تکرار) این سلول ها به پلیت های ۹۶ چاهکی منتقل گردیدند.

آزمون سایتوتوکسیسیتی MTT

(3-(4,5-Dimethyl Thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide)

برای به دست آوردن درصد سلول های مرده از آزمون MTT استفاده شد (۱۱). به طور خلاصه، مقدار 10^5

سلول از سلول های C140 به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد. پس از گذشت ۶ ساعت ۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف عصاره سیتوپلاسمی مخمر (۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ µg/ml) به چاهک‌ها اضافه گردید. از هر غلظت عصاره سیتوپلاسمی مخمر ۳ بار تکرار صورت گرفت. یک سری از چاهک ها به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد که فقط حاوی DMSO (Dimethyl Sulfuxide) بودند. میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در حضور ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، محلول MTT (۵ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر PBS) به تمامی چاهک ها افزوده شده و میکروپلیت ها به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس میکروپلیت‌ها با دور g × ۱۸۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و در پایان کریستالهای بنفش رنگ فورمازان تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول ها با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر محلول DMSO خالص به چاهک ها و قراردادن پلیت‌ها به مدت ۱۰تا ۱۵ دقیقه در انکوباتور حل شدند و سرانجام شدت نور جذب شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر Stat Fax ثبت گردید. درصد سلول کشی عصاره ها با فرمول زیر محاسبه شد(۱۲).

درصد سلول کشی عصاره = جذب متوسط نمونه ی تیمار شده - جذب متوسط نمونه‌ی کنترل / جذب متوسط نمونه‌ی کنترل ×۱۰۰

آزمون فلوسایتومتری

بعد از ۷۲ ساعت مجاورت سلول‌های تیمار شده با غلظت IC_{50} (۲۷۳ میکرو گرم در میلی‌لیتر) با عصاره سیتوپلاسمی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* تعداد ۲×۱۰^{۵} سلول برداشت شد. سلول‌ها ابتدا در لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری با PBS شسته شده و سپس به سلول‌های حاصل ۲۰۰ میکرو لیتر محلول بافر FACS اضافه گردید و بعد از سانتریوفیوژ میزان ۵ میکرولیتر آنکسین V کنژوگه با FITC (Fluorescein isothiocyanate) به ۱۹۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه شده و سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از آن سلول‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر FACS شستشو داده شده و مجددا" ۱۹۰ میکرو لیتر محلول بافر FACS به سلول ها اضافه گردید. در مرحله بعد، به سوسپانسیون سلولی ۱۰ میلی‌لیتر ترکیب پروپیدیوم یدید (Propidium iodide, PI) اضافه شد و سلول حاصل توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری

تجزیه وتحلیل داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA: نرم افزار SPSS نسخه ۲۵) و آزمون تعقیبی توکی (Post- hoc Tukey test) استفاده گردید. در تمامی بررسی ها سطح معنی دار آزمون ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

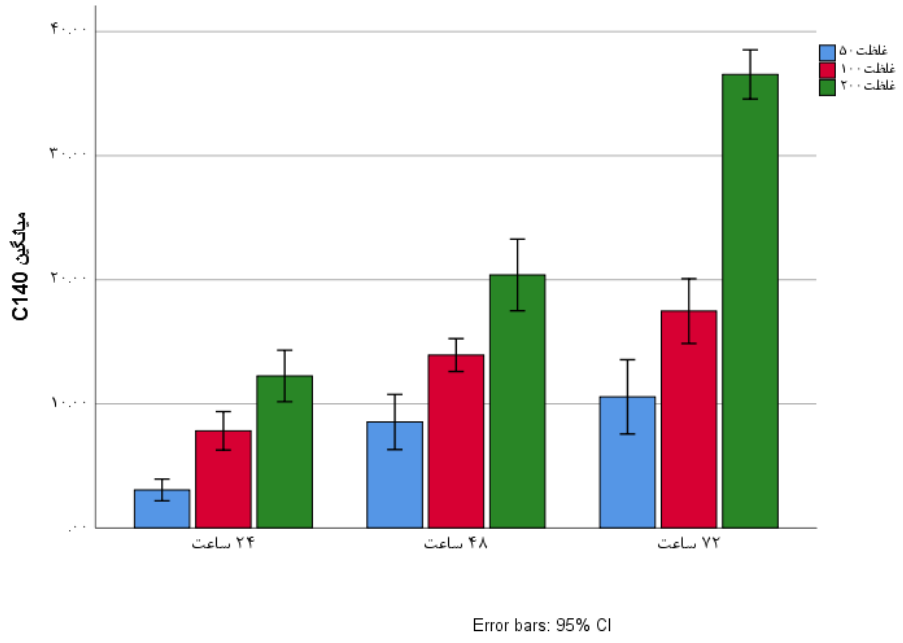
نتایج

در بررسی حاضر، نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که در دوزهای ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره سیتوپلاسمی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* در زمان‌های مورد مطالعه هیچ گونه تاثیر سایتوتوکسیسیتی بر روی سلول های C140 مشاهده نشد؛ در حالیکه مشخص شد که از دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بالا خاصیت سلول کشی عصاره سیتوپلاسمی وابسته به

زمان بوده و با افزایش زمان، درصد مهار رشد نیز به طور معنی داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$) (تصویر ۱). همچنین در تمامی زمان های مورد مطالعه، مرگ سلولی ناشی از عصاره سیتوپلاسمی مخمر از دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بعد وابسته به دوز بوده و با افزایش دوز میزان سلول کشی نیز افزایش یافت بطوریکه متوسط درصد مرگ سلول‌های C140 در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مداخله با عصاره سیتوپلاسمی مخمر به ترتیب ۷/۷۰ ، ۱۴/۲۸۳ و ۲۱/۵۲۶ درصد بود (جدول ۱). اثر متقابل بین غلظت ها و زمان ها بر روی درصد مرگ سلول های C140 تفاوت معنی دار داشت ($p<۰/۰۰۱$).

با استفاده از آزمون MTT، میزان IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) عصاره سیتوپلاسمی مخمر برابر با ۲۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد و به همین جهت از دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به بعد اثرات سایتوتوکسیسیتی بر رده سرطانی C140 مشاهده شد.

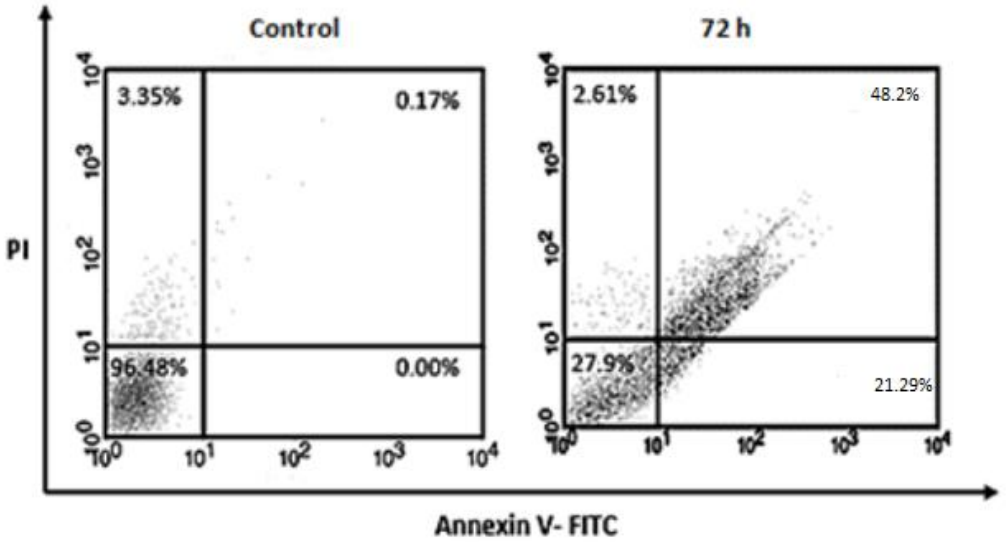
بنابراین در آزمون فلوسایتومتری، درصد آپوپتوز سلول‌های C140 تیمار شده با عصاره سیتوپلاسمی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* به میزان۲۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۴۸/۲ ٪ بود در حالیکه در سلول‌های C140 تیمار نشده درصد آپوپتوز ۰/۱۷ ٪ بود (تصویر ۲).



تصویر ۱: درصد تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره سیتوپلاسمی *کاندیدا آلبیکنس* در زمان‌های مختلف بر رده سرطانی C140

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار مرگ سلول‌های C140 در غلظت های مختلف در زمان های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از مداخله با عصاره سیتوپلاسمی *کاندیدا آلبیکنس*

زمان	غلظت (µg/ml)	میانگین± انحراف معیار	مقدار P
۲٤ ساعت بعد	۵۰	۳/۰۵۶ ± ۰/۳۵۲	<۰,۰۰۱
	۱۰۰	۰/۶۲۴ ± ۷/۸۲۳	<۰,۰۰۱
	۲۰۰	۰/۸۳۵ ± ۱۲/۲۴۳	<۰,۰۰۱
	کل	۴/۰۱۶ ± ۷/۷۰۷	
٤۸ ساعت بعد	۵۰	۰/۸۹۵ ± ۸/۵۳۳	<۰,۰۰۱
	۱۰۰	۰/۵۳۳ ± ۱۳/۹۳۰	<۰,۰۰۱
	۲۰۰	۱/۱۶۲ ± ۲۰/۳۸۶	<۰,۰۰۱
	کل	۵/۱۹۸ ± ۱۴/۲۸۳	
۷۲ ساعت بعد	۵۰	۱/۲۰۶ ± ۱۰/۵۶۰	<۰,۰۰۱
	۱۰۰	۱/۰۵۱ ± ۱۷/۴۷۳	<۰,۰۰۱
	۲۰۰	۰/۷۹۷ ± ۳۶/۵۴۶	<۰,۰۰۱
	کل	۱۱/۶۹۰ ± ۲۱/۵۲۶	



تصویر ۲. : گراف فلوسایتومتری درصد آپوپتوز سلول‌های C140 تیمار شده با عصاره سیتوپلاسمی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* (۲۷۳µg/ mL) در مقایسه با سلول‌های C140 تیمار نشده

گروه تیمار: آنکسین Vو PI هر دو مثبت: ٤۸/۲ ٪ (مربع سمت راست بالا)؛ مراحل انتهایی آپوپتوز
آنکسین V مثبت و PI منفی: ۲۱/۲۹ ٪ (مربع سمت راست پایین)؛ مراحل ابتدایی آپوپتوز
آنکسین V منفی و PI مثبت: ۲/٦۱ ٪ (مربع سمت چپ بالا)؛ نکروز
آنسکین Vو PI هر دو منفی: ۲۷/۹ ٪ (مربع سمت چپ پایین)؛ سالم
گروه کنترل: آنکسین Vو PI هر دو مثبت: ۰/۱۷ ٪ (مربع سمت راست بالا)؛ مراحل انتهایی آپوپتوز
آنکسین V مثبت و PI منفی: ۲۱/۲۹ ٪ (مربع سمت راست پایین)؛ مراحل ابتدایی آپوپتوز
آنکسین V منفی و PI مثبت: ۳/۳۵ ٪ (مربع سمت چپ بالا)؛ نکروز
آنسکین Vو PI هر دو منفی: ۹٦/٤۸ ٪ (مربع سمت چپ پایین)؛ سالم

بحث و نتیجه گیری

در حال حاضر بیماری سرطان به عنوان یکی از مهم ترین عوامل مرگ و میر انسان در جوامع مختلف می باشد و درمان‌های رایج اغلب با عوارض نامناسبی همراه است که گاها"خود این درمان ها و عوارض جانبی ناشی از آن ها منجر به مرگ می‌شود. امروزه معرفی مکمل های غذایی و داروهای ایمن با آثار جانبی کم، بارقه امیدی برای اکثر بیماران صعب العلاج است و مصرف آن ها به عنوان مکمل و جایگزین مناسب نسبت به داروهای با آثار جانبی بالا کاربردگسترده ای دارد (۹). از جمله عوامل ایمونومدولاتوری با منشا طبیعی می توان به مخمرها اشاره کرد. در این ارتباط حیدری و همکاران در سال ۱۳۸۹، با بررسی اثرات پروتئین‌های سیتوپلاسمی *کاندیدا آلبیکنس* بر الگوی ترشحی Th1 و Th2 در موش $Balb/_C$ به این نتیجه رسیدند که پروتئین های سیتوپلاسمی استخراج شده می تواند به عنوان یک ماده پیشنهادی برای تامین سیستم ایمنی مقاوم همراه با مصونیت یا پیش گیری از عفونت های کاندیدایی، به ویژه در بیماران ایدزی و سرطانی مورد استفاده قرار گیرد (۳). بر همین اساس در مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی عصاره سیتوپلاسمی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* بر رده سرطانی C140 ، نشان داده شد که عصاره سیتوپلاسمی مخمر می‌تواند رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی را کند کرده و روند آپوپتوز را در این سلول‌ها فعال نماید؛ به نحوی که IC_{50} عصاره سیتوپلاسمی مخمر در مجاورت سلول‌های C140 معادل ۲۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمدکه این امر توسط آزمون فلوسایتومتری به اثبات رسید که عامل مرگ سلول های سرطانی آپوپتوز(مرگ برنامه ریزی شده) می‌باشد و نه نکروز. همچنین از دیگر اهداف مطالعه حاضر، بررسی چگونگی تغییر خاصیت آپوپتوتیک عصاره سیتوپلاسمی مخمر درگذر زمان بود که نشان داده شد القاء آپوپتوز در این رده سلولی توسط عصاره سیتوپلاسمی مخمر هم وابسته به دوز و هم وابسته به زمان بود.

محققان تلاش های زیادی برای یافتن اثرات ضد سرطانی عصاره های مختلف گیاهی و همینطور دیواره‌ی سلولی و عصاره سیتوپلاسمی قارچ‌ها و باکتری‌های مختلف بر روی رده‌های سرطانی گوناگون انجام داده اند. از جمله رده های سرطانی که بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است رده سرطانی K562 است که بسیار شبیه به رده سرطانی C140 مطالعه حاضر می باشد. در این راستا، مکریانی و همکاران در سال ۲۰۱۵ به بررسی اثر دیواره‌ی سلولی استخراج شده از مخمرهای *ساکارومایسس سرویزیه* و *ساکارومایسس بولاردی* به همراه نانوذرات روی جهت مهار رشد رده سرطانی K562 پرداختند. در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که دیواره‌ی سلولی *ساکارومایسس بولاردی* در مقایسه با دیواره سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* به طور معنی‌داری سبب مهار رشد رده‌ی K562 می‌شود. نانو ذرات روی نیز به طور معنی‌داری قادر به مهار رشد رده‌ی سلولی K562 در شرایط آزمایشگاهی شد. همچنین دیواره سلولی هر دو نوع مخمر به همراه نانو ذرات روی سبب مهار رشد این رده‌ی سرطانی شدند (۸). بنیادی و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر آپوپتوتیک عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* را بر رده‌ی سرطانی K562 بررسی کردند.آن ها به این نتیجه رسیدند که خاصیت ضد توموری عصاره سیتوپلاسمی با گذر زمان به طور معنی‌داری افزایش یافت در حالی که خاصیت ضد توموری دیواره‌ی سلولی با گذر زمان کاهش داشت.

البته دیواره‌ی سلولی مخمر به طور معنی‌داری در مقایسه با عصاره‌ی سیتوپلاسمی اثر مهاری بیشتری بر رده‌ی K562 داشت. همچنین نتایج الکتروفورز این مطالعه نشان داد که دیواره‌ی سلولی ساکارومیسس سرویزیه باعث القای نکروز سلولی در سلول‌های K562 شد و عصاره سیتوپلاسمی مخمر نیز سبب هضم DNA سلول‌های K562 گردید (۱). کبیری و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که عصاره سیتوپلاسمی پروبیوتیک های متعلق به لاکتوباسیلوس های جدا شده از روده ماهی کپور معمولی می توانند رشد رده ی سرطانی K562 را در حالت وابسته به دوز مهار نمایند (۶).

رودبار محمدی و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثرات ضد توموری ترکیبات دیواره‌ی سلولی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* در مهار تولید آنزیم‌های متالوپروتئینازها در رده‌ی سلولی فیبرو سارکومای انسانی را بررسی کردند. نتایج حاصل از آزمون MTT در این مطالعه نشان داد که ترکیبات دیواره‌ی سلولی مخمر دارای اثرات مهاری بر روی سلول‌های سرطانی در مقایسه با گروه کنترل بوده زیرا میزان زنده ماندن سلول‌های توموری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است. همچنین تولید متالوپروتئینازها در حضور ترکیبات دیواره‌ی سلولی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* به طور معنی‌داری کاهش یافته است (۴).

مشابه با مطالعه حاضر، زونگ و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ وابسته به زمان بودن مهار رشد رده سرطانی K562 را نشان دادند (۲۴). در مطالعه ای که توسط گونیوم و گولاپودی در سال ۲۰۰۴ درآمریکا صورت گرفت، سه رده سرطان سینه (MCF-7 ، ZR-75-1 و) HCC70به همراه *کاندیدا آلبیکنس* کشته شده با حرارت، به مدت 72 ساعت با نسبت 1:10 کشت شدند. بررسی ها و نتایج حاصل از فلوسایتومتری و بررسی مورفولوژیک وضعیت سلول ها، وقوع آپوپتوز سلولی را در هر سه نوع رده سلول سرطانی نشان داد. می توان گفت این آپوپتوز به دنبال فاگوسیتوز مخمر توسط سلولهای سرطانی اتفاق می افتد (۱۶). در سال ۲۰۰۸ بررسی دیگری توسط گونیوم و همکاران صورت گرفت. در این مطالعه مخمر کشته شده *ساکارومایسس سرویزیه* با حرارت به طور مستقیم درون تومور ایجاد شده در موش به صورت *in vivo* تزریق شد. نتایج حاصل از این بررسی بیانگر پس رفت قابل توجه تومور، القای ۸۴/۵ درصدی آپوپتوز و تنظیم فعالیت طبیعی سیستم ایمنی بود (۱۵). لی وهمکاران در سال ۲۰۰۴ درکره جنوبی نشان دادند که عصاره‌ی سیتوپلاسمی *لاکتوباسیلوس کاسئی* و *بیفیدوباکتریوم لانگوم* تاثیر مستقیمی بر مهار رشد رده‌های سرطانی SNUC2A ، SNU1، NIH/3T3 و Jurkat دارند به این ترتیب که در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب مهار رشد ۵۰٪ سلول‌های سرطانی شدند (۱۹). کیم و همکاران در سال ۲۰۰۳ در کره، اثر ضد سرطانی بخش سیتوپلاسمی باکتری *لاکتوباسیلوس لاکتیس* را بروی رده‌ی سرطانی SNUC2A بررسی کردند و نشان دادند که اثر مهاری بر روی سنتز DNA رده سرطانی مذکور توسط بخش سیتوپلاسمی باکتری وابسته به دوز است (۱۸). در مجموع مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌ی سیتوپلاسمی مخمر *کاندیدا آلبیکنس* اثر سایتوتوکسیسیتی بر رده‌ی C140 داشته و در دوز ۲۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بعد از ۷۲ ساعت مواجهه باعث مرگ ۵۰٪ سلول‌های سرطانی شد که این اثر با توجه به نتایج آزمون MTT با گذشت زمان و افزایش دوز نسبت مستقیمی دارد و آزمون فلوسایتومتری هم که در زمان ۷۲ ساعت انجام شد موید این نتیجه بود.

انجام مطالعات بیشتر جهت یافتن مکانیسم دقیق مسیر آپوپتوز توسط عصاره سیتوپلاسمی مخمر و همینطور تجزیه شیمیایی عصاره سیتوپلاسمی و استفاده بالینی از این مواد پیشنهاد می گردد.

تقدیر و تشکر

به این وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و دانشکده دامپزشکی به خاطر تأمین اعتبار طرح تحقیقاتی شماره ۳/۴۸۶۵۳ تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱- بنیادی، ف.، نجاتی، و.، توکمه چی، ا.، حسن زاده، ش.، ریکی، م. (۱۳۹۲). ارزیابی اثرات آپوپتوتیک دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی استخراج شده از مخمر *ساکارومیسس سرویسیه* بر رده سرطانی K562. *مجله ارمغان دانش*، دوره ۱۸، شماره ۹، صفحات ۷۱۰-۶۹۹.

۲- پارسا، ن. (۱۳۹۰). اساس سلولی و مولکولی سرطان در انسان. *مجله سلول و بافت*، دوره ۲، شماره ۴، صفحات ۳۷۶-۳۶۵.

۳- حیدری، ر.، یادگاری، م. ح.، رودبار محمدی، ش.، رودباری، م. (۱۳۸۹). بررسی اثرات پروتئین های سیتوپلاسمی *کاندیدا آلبیکنس* بر روی الگوی ترشحی Th1 و Th2 در موش Balb/C. *مجله دانشکده پزشکی اصفهان*، دوره ۲۸، شماره ۱۰۶، صفحات ۱۵۹-۱۴۹.

۴- رودبار محمدی، ش.، رودباری، م.، وحیدی، م.، محمد حسن، ز.، دارابی، ن. (۱۳۹۱). بررسی اثرات ضد توموری ترکیبات دیواره سلولی *کاندیدا آلبیکنس* بر مهار تولید آنزیم های متالوپروتئینازها در رده سلولی فیبروسارکومای انسانی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران*، دوره ۱۰، شماره ۲، صفحات ۱۱۰-۱۰۳.

۵- شکری، ح. ا.، اسدی، ف.، خسروی، ع. ر. (۱۳۸۵). استخراج و تخلیص بتا گلوکان از دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* و تاثیر آن بر فعالیت فاگوسیتوز و ترشح TNFα در موش های Balb/C. *مجله پزشکی کوثر*، دوره ۱۱، شماره ۳، صفحات ۲۵۹-۲۵۱.

۶- کبیری، ف.، نجاتی، و.، توکمه چی، ا.، دلیرژ، ن.، نیک بخش، پ. (۱۳۸۹). مهار رشد رده سرطانی K562 لوکمیای میلوییدی مزمن انسان با استفاده از عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوسهای جدا شده از روده ماهی کپور معمولی در شرایط آزمایشگاهی. *مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران*، دوره ۶۸ ، شماره ۱۲، صفحات ۶۹۸-۶۹۱.

۷- محمودآبادی، ا. (۱۳۸۶). لوکمی (سرطان خون) به زبان ساده. چاپ اول، انتشارات کردگاری، مشهد، صفحات ۵۵-۱۱.

۸- مکریانی، س.، توکمه چی، ا.، نوجوان، م. (۱۳۹۴). مهار رشد رده سرطانی با استفاده از دیواره سلولی استخراج شده از پروبیوتیک های *Saccharomyces cerevisia* و *Saccharomyces boulardi* به همراه نانوذرات روی. مجله علوم پزشکی رازی، دوره ۲۲، شماره ۱۳۲، صفحات ۴۵-۳۵.

۹- نصرالهی، ز.، رودبار محمدی، ش.، اطیابی، ف.، حسن، ز.، یادگاری، م. ح.، اسفندیاری منش، م.، ملارضی، ا. (۱۳۹۲). *مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی*، دوره ۱۶، شماره ۱، صفحات ۹۷-۸۹.

10- Agrawal, P. B., Pandi, A. B. (2003). Isolation of alphaglucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*: Cell disruption and adsorption. *Biochemical Engineering Journal*, **15**: 37-45.

11- Chang, K. H., Park, J. S., Choi, J. H., Kim, C. J., Paik, H. D. (2007). Cytotoxic effects of partially purified substances from *Bacillus polyfermenticus* SCD supernatant toward a varity of tumor cell lines. *Food Science and Biotechnology*, **16**:163-6.

12- Chin-Feng, L., Tzu-Ming, P. (2010). *In vitro* effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity. *Journal of Food and Drug Analysis*, **18**: 77-86.

13- Deininger, M. V., Goldman, J. M., Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid Leukemia. *Blood*, **96**: 3343-3356.

14- Dwyer, M. (2002). Multifacted approach to the treatment of bcr-abl-positive leukemias. *The Oncologist*, **7**:34-38.

15- Ghoneum, M., Badr El-Din, N. K., Noaman, E., Tolentino, L. (2007). *Saccharomyces cerevisiae*, the Baker's Yeast, suppresses the growth of Ehrlich

carcinoma-bearing mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **57**:581-592

16- Ghoneum, M., Gollapudi, S. (2004). Phagocytosis of *Candida albicans* by metastatic and non metastatic human breast cancer cell lines in vitro. *Cancer Detection and Prevention*, **28**: 17-26.

17- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. (2010). Cancer statistics, 2010. *A Cancer Journal for Clinicians*, **60**: 277-300.

18- Kim, J., Woo, H. J., Kim, Y. S., Kim, K. H. Lee, H. J. (2003). Cell cycle dysregulation induced by cytoplasmic of *Lactococcus lactis* ssp. lactis in SNUC2A, a colon cancer cell line. *Nutrition and Cancer*, **46**: 197-201.

19- Lee, J. W., Shin, J. G., Kim, E. H., Kang, H. E., Yim, I. B., Kim, J. Y., Joo, H.G., Woo, H. J. (2004). Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *Journal of Veterinary Science*, **5**: 41-48.

20- Magnelli, P., Cipollo, J. F., Abeijon, C. (2002). A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and beta-(1, 6)-D glucan fine structure. *Analytical Biochemistry*, **301**: 136-150.

21- Rodriguez, A., Cuesta, A., Ortuno, J., Esteban, M. A., Meseguer, J. (2003). Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by died to seabream (Sparus aurata L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **96**:183-192.

22- Simon, J. A., Bedalov, A. (2004).Yeast as a model system for anticancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*, **4**: 1-8.

23- Tukmechi, A., Rahmati Andani, H. R., Manaffar, R., Sheikhzadeh, N. (2011). Dietary administration of betamercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. *Fish and Shellfish Immunology*, **30**:923-8.

24- Zhong, N., Chen, H., Zhao, Q., Wang, H., Yu, X., Eaves A. M., Sheng, W., Miao, J., Cui, F., Wang, J. (2010). Effects of griseofulvin on apoptosis through caspase-3– and caspase-9–dependent pathways in K562 leukemia cells: an in vitro study. *Current Therapeutic Research*, **71**: 384-397.