

دارو رسانی هدفمند در سرطان پستان موش با استفاده از نانوذرات آهن حاوی عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس GG در شرایط آزمایشگاهی

DOR:

سالار مکرانی^۱، امیر توکمه چی^۲، ناصر هرزندی^۱، لیلیا جبل عاملی^۱
۱- گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی، ایران a.tukmachi@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۹/۸/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از داروهای شیمی درمانی در درمان سرطان دارای اثرات ناخواسته بر بافت های سالم بیمار می باشند. با این وجود پروبیوتیک ها عوامل طبیعی و ضد سرطان هستند بدون آن که دارای اثرات ناخواسته بر بدن بیمار باشند. در این تحقیق یک سیستم دارو رسانی هوشمند بر پایه نانوذرات به منظور درمان سرطان پستان موش در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. روش کار: در ابتدا نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن (MINPs) سنتز و با مقادیر متفاوتی از عصاره سیتوپلاسمی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس (L. GG) شامل ۰، ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر بارگذاری شدند. سپس این ترکیب به مدت سه هفته در موش هایی که به طور تجربی در آن ها سرطان پستان القا شده بود، به کمک ایجاد یک میدان مغناطیسی تجویز گردید. در خاتمه اثر درمانی این ترکیب از طریق وسترن بلات و Quantitative Polymerase Chain Reaction مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته ها: نتایج نشان داد که نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن قادرند عصاره سیتوپلاسمی پروبیوتیک را در موضع سرطانی متمرکز نمایند. هم چنین یافته ها نشان دادند که در اثر تجویز این ترکیب اندازه و حجم بافت توموری به طور معنی داری در مقایسه با موش های سرطانی درمان نشده کاهش می یابد. نانوذرات بارگذاری شده با ۲/۵ میلی گرم عصاره سیتوپلاسمی باکتری به طور معنی داری اثر ضد توموری بالاتری بوده و از طریق آپوپتوز سبب القای مرگ سلولی می شود. نتیجه گیری: بر اساس یافته های به دست آمده می توان نتیجه گرفت که نانوذرات اکسید آهن بارگذاری شده با عصاره سیتوپلاسمی L. GG به دلیل ایمنی، یک دست بودن و خواص مغناطیسی نامزد خوبی جهت درمان سرطان پستان موش می باشند.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، دارو رسانی، ضد سرطان، نانوذرات، T1۴.

مقدمه

سرطانی جدید برای پیشگیری یا درمان سرطان ها به خصوص سرطان سینه ضروری به نظر می رسد (۲،۵). پروبیوتیک ها عبارتند از مکمل های غذایی که حاوی میکروارگانیسم های غیر بیماری زای زنده یا فرآورده های آن ها می باشند که اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان دارند (۱۹). امروزه خواص ضد سرطانی پروبیوتیک ها به اثبات رسیده و واضح است که دارای نقش ویژه ای در درمان سرطان دارند. گونه های متعددی از لاکتوباسیلوس - ها وجود دارد که می توانند در نطفه پیدایش سرطان را

سرطان سینه شایع ترین نوع بدخیمی بوده و هنوز به عنوان دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در بین خانم ها محسوب می شود (۱۴). علی رغم پیشرفت های اخیر که در حوزه درمان سرطان صورت گرفته است متاستاز عامل اصلی مرگ بوده و سرطان سینه تمایل دارد به سایر بافت - های بدن هجوم ببرد. متاسفانه، تومورهای متاستاتیک را نمی توان به کمک جراحی یا پرتو درمان نمود (۱۸)، در حال حاضر نیز شیوه درمانی موثری برای سرطان های متاستاز یافته وجود ندارد. بنابراین ایجاد داروهای ضد

است یکی در نقش حامل بودن دیگری در ایجاد حرارت در موضع به دلیل خواص مغناطیسی (magnetic hyperthermia). معمولاً نانوذرات مغناطیسی آهن دارای یک بخش مرکزی متشکل از آهن بوده که در اطراف توسط یک پوشش پلی ساکاریدی محصور شده است. زمانی که این ذرات در یک میدان مغناطیسی قرار می گیرد ارتعاشات مولکولی سبب رهایش داروی بارگذاری شده در آن می گردد (۱۲). بر اساس این یافته ها تصمیم گرفته شد تا با بارگذاری عصاره سیتوپلاسمی باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG در نانوذرات مغناطیسی آهن یک ابزار مولکولی کارآمد در جهت درمان سرطان پستان موش معرفی گردد. در واقع با همراه نمودن اثرات ضد توموری نانوذرات مغناطیسی و خواص ضد سرطانی پروبیوتیک بتوان تحولی در درمان سرطان سینه ایجاد نمود. لذا با فراهم نمودن یک میدان مغناطیسی در خارج از بدن و متمرکز نمودن نانوذرات حامل عصاره سیتوپلاسمی باکتری می توان به این ایده دست یافت (۳۰).

مواد و روش ها

تهیه عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG
این باکتری (ATCC 53103) از سازمان پژوهش های صنعتی ایران تهیه گردید. برای تهیه عصاره سیتوپلاسمی ابتدا باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر محیط آبگشت MRS در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴-۱۸ ساعت و در حضور ۵ درصد گاز دی اکسید کربن کشت داده شد. سپس محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ و رسوب به دست آمده دو مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. سپس سوسپانسیونی از باکتری در بافر فسفات (PBS، ۰/۱ مولار و pH برابر با ۶/۹) تهیه و با کمک گرفتن از لوله های استاندارد مک فارلند تراکم باکتری برابر با 109 CFU/ml تنظیم شد. سوسپانسیون باکتری با استفاده از روش سونیکاسیون در کنار یخ به تعداد ۱۰ چرخه شامل

سرکوب نمایند (۲۸، ۱۰). Gorbach و Goldin برای اولین بار نشان دادند جیره غنی از باکتری L. GG می تواند بروز سرطان کولون را مهار نماید. مطالعات آزمایشگاهی انجام گرفته توسط Orlando و همکاران (۲۰۱۶) پیرامون L. GG به دو شکل زنده و کشته شده نشان می دهد که این پروبیوتیک قادر است از تکثیر سلول های سرطانی دستگاه گوارش جلوگیری و سبب القای آپوپتوزیس در آن ها شود (۲۸-۲۶). پیشرفت های اخیر در خصوص دانش نانو تکنولوژی تحول عظیمی در رابطه با درمان سرطان ایجاد نمود و از طرفی نانوذرات آهن نخستین ذراتی بودند که در سرطان مورد استفاده قرار گرفتند. نانوذرات مغناطیسی عبارتند از ذرات مغناطیسی هوشمند که با اندازه بسیار ریزشان دارای سطح جذب زیادی هستند. مشخص است که نانوذرات مغناطیسی آهن دارای اهمیت ویژه ای در دارورسانی و درمان سرطان هستند (۳۵). این ذرات به دلیل اندازه بسیار کوچک و سطح جذب وسیع شان می توانند به راحتی به موضع سرطان هدایت شوند. بنابراین نانوذرات مغناطیسی آهن می توانند به عنوان ناقل در حمل عوامل ضد سرطانی ایفای نقش نمایند. از طرفی با فراهم نمودن یک میدان مغناطیسی در خارج از بدن می توان داروهای ضد سرطانی را در موضع سرطان متمرکز کرد. به طور کلی داروهای ضد سرطانی در نانوذرات مغناطیسی آهن بارگذاری شده و در درمان سرطان مورد استفاده قرار می گیرند (۶). در اصل اکثر داروهای ضد سرطان سبب ایجاد آسیب های ناخواسته بر بافت ها و سلول های سالم می شوند. اثرات سمی شناخته شده این داروها شامل التهاب معده، التهاب مخاطی، ریزش مو و عوارض شدید دیگر مثل آسیب های بافت قلب و اثرات سمی در کبد (۱۶). برای غلبه بر این مشکلات، چند رهیافت کلی وجود دارد یکی از این استراتژی ها استفاده از سیستم دارورسانی هوشمند به کمک نانوذرات مغناطیسی آهن بوده که با دو مکانیسم خود دارای اثرات ضد توموری

کار مقدار ۱ میلی گرم نانوذرات بارگذاری شده در ۱۰ میلی لیتر بافر PBS حل و هر ۶۰ دقیقه ۲/۵ میلی لیتر محلول نمونه برداری و در طول موج ۴۸۰ نانومتر نور جذبی به کمک اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. رهائش عصاره سیتوپلاسمی طبق رابطه زیر محاسبه شد (۳۱):

$$\text{Cf release \%} = \left\{ \frac{5 \times \sum (i-1)^{(b-1)} (Ci) + (50 \times Cn)}{\text{amount of Cf in MINPs}} \right\} \times 100$$

در رابطه فوق Ci و Cn غلظت عصاره سیتوپلاسمی در زمان شروع و پس از ۶ ساعت می باشند.

خصوصیات نانوذرات

در این تحقیق شکل نانوذرات بارگذاری شده با عصاره سیتوپلاسمی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (transmission electron microscope) و نگاره (scanning electron microscope) بررسی شد. برای تهیه گراف در میکروسکوپ الکترونی گذاره از دستگاه فیلیس مدل CM 100 با ولتاژ ۱۲۰ کیلو ولت استفاده شد. هم چنین تصاویر میکروسکوپ نگاره با همکاری مرکز میکروسکوپ الکترونی دانشگاه کردستان تهیه گردید.

مدل حیوانی و تجویز نانوذرات بارگذاری شده

موش های صحرایی ۷ هفته BALB/c از خانه حیوانات موسسه پاستور خریداری شد. در این مطالعه از مجوز اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی صادر شده به شماره AECVU-102-2019 دانشکده دامپزشکی و دستورالعمل کمیته ملی پژوهش و مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی (۲۰۱۱) استفاده شد. در ابتدا سرطان سینه با تلقیح رده T1۴ طبق روش Lu و همکاران (۲۰۱۲) در موش های صحرایی القا گردید (۲۰). به طور خلاصه ۱۰۰۰۰۰ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلولی RPMI سوسپانسیون شده و به طور زیر جلدی در نزدیک نوک پستان موش ها تلقیح گردید. زمانی که تومور پستان قابل ملامسه شد حیوانات به صورت داخل صفاقی (۳۰) میکرولیتر نانوذرات حاوی عصاره سیتوپلاسمی باکتری) تا

یک چرخه در دقیقه با حداکثر ۷۰ درصد فرکانس متلاشی گردید. در نهایت سوسپانسیون متلاشی شده با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس ساتریفیوژ گردید (۲۹). سوپرناتانت جمع آوری و محتوای پروتئینی آن با کیت سنجش پروتئین (پارس ازمون) سنجیده شد. مقدار پروتئین موجود در هر میلی لیتر از عصاره سیتوپلاسمی به دست آمده به طور تقریبی ۲/۵ میلی گرم اندازه گیری شد.

ستز نانوذرات مغناطیسی آهن

ستز نانوذرات بر اساس روش Xuan و همکاران (۲۰۱۹) انجام گرفت (۳۶)، ابتدا نمک های همکاران (۲۰۱۹) انجام گرفت (۳۶)، ابتدا نمک های $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (۰/۵۴ گرم)، Sodium acetate (۱/۵ گرم) و sodium acrylate (۱/۵ گرم) در ۲۰ میلی لیتر اتیلن گلیکول حل شد. پس از مخلوط شدن به مدت یک ساعت محلول هموژن به یک ارلن منتقل و اتوکلاو شد. پس از سرد شده محلول به مدت ۱۰ ساعت در دمای محیط قرار گرفت تا ذرات نانوی آهن رسوب نمایند سپس این ذرات با آب و الکل شستشو داده شده و به مدت ۱۵ ساعت به حال خود رها گردید تا آب و الکل تبخیر شوند. سپس نانوذرات مغناطیسی آهن با اکسید سیلیس پوشش داده شدند (۳۱).

بارگذاری نانوذرات با عصاره سیتوپلاسمی و سنجش

رهائش

برای بارگذاری نانوذرات آهن با عصاره سیتوپلاسمی باکتری مقدار ۴۰ میلی گرم نانوذرات به ۱۰ میلی لیتر محلول حاوی ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر عصاره سیتوپلاسمی منتقل شد. مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق مخلوط شده و سپس نانوذرات مغناطیسی بارگذاری شده به کمک آهنربا از سایر اجزای محلول جداسازی شد (۳۶). رهائش عصاره سیتوپلاسمی نیز در طی ۷۲۰ دقیقه با گرمخانه گذاری نانوذرات مغناطیسی حاوی عصاره سیتوپلاسمی در دمای ثابت ۳۷ درجه سلسیوس و pH های ۳، ۵ و ۷ اندازه گیری شد. برای این

UK به مدت ۱ ساعت گرمخانه گذاری گردید. به منظور کنترل بارگذاری غشا با آنتی بادی ضد بتا اکتین (۳۴) به مدت ۱ ساعت مجاور شد. سپس غشا با آنزیم پراکسیداز کونژگه به مدت یک ساعت مجاور شد. از معرف لومینول و محلول پراکساید به عنوان سوپسترای آنزیم استفاده گردید و کمپلکس ایمنی موجود بر روی غشا با بکار بردن دستگاه کمی لومینسانس (Bio-Rad, USA) مورد شناسایی قرار گرفت (۲۴).

بیان ژن کاسپاز ۳

ابتدا RNA نمونه های بافت تومور با استفاده از محلول تریزول (یکتا تجهیز، ایران) استخراج و کمیت و کیفیت آن به کمک نانودراپ سنجیده شد. در مرحله بعد cDNA با به کار بردن مقدار ۲ میکروگرم RNA استخراج شده و کیت سنتز تک مرحله ای (سیناکولون، ایران) ساخته شد. واکنش qPCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر در استریپ های ۴۸ خانه StepOne™ و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۰/۳ میکرومول در لیتر از پرایمرهای رفت و برگشت (جدول ۱)، مستر میکس یک برابر غلظت سایبر گرین (یکتا تجهیز، ایران) و ۰/۲ میکرولیتر cDNA انجام گرفت. برنامه حرارتی واکنش شامل یک چرخه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه به ترتیب شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه (۱۷، ۱۴). آنالیز داده های حاصل با اندازه گیری مقادیر چرخه آستانه (threshold cycle; CT) در طی فاز لگاریتمی تکثیر صوت گرفت. مقدار ΔCT از طریق اختلاف مقدار ΔCT کاسپاز ۳ از مقدار ΔCT ژن بتا اکتین محاسبه شد. در نهایت مقدار نسبی بیان بر اساس $2^{-\Delta CT}$ محاسبه گردید (۴).

آنالیز آماری داده ها

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{Standard Error}$ بیان شد. آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی برای مقایسه

۳ هفته درمان شدند. دوزهای مورد استفاده شامل: ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن از عصاره سیتوپلاسمی بارگذاری شده در نانوذرات مغناطیسی آهن بود. هر سه روز یک بار تمام موش ها به مدت ۴ دقیقه در معرض میدان مغناطیسی ۴ kA/m (۲ کیلو وات و ۵۴۰ کیلوهرتز) قرار داده شدند (۳۱). از داروی کپسیتابین به طور داخل صفاقی (6mg/kg) و سرم فیزیولوژی استریل به عنوان اهد استفاده شد. پس از ۳ هفته درمان از هر تیمار ۴ سر موش به طور تصادفی نمونه برداری و به کمک زایلازین و کتامین بی هوش شدند. تومور پستان از هر موش نمونه برداری و در محلول ۱۰ درصد فرمالین قرار داده شد هم چنین در طی درمان اندازه تومور به طور روزانه ثبت گردید.

اندازه گیری میزان گونه های اکسیژن فعال

اندازه گیری میزان ROS در بافت توموری پستان موش با استفاده از کیت فلورومتري (MyBioSource, USA) انجام گرفت. ابتدا برش های کوچکی از بافت تازه تومور در بافر با استفاده از میکروتوم به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه گردید. سپس میزان ROS بر اساس دستورالعمل کیت و با به کار بردن الایزایدر (Promega, USA) در طول موج-های ۵۰۰ و ۵۲۵ نانومتر خوانش گردید.

آنالیز وسترن بلات

ابتدا ۱۰ گرم بافت تومور پستان با استفاده از هموژنایزر در بافر حاوی فلورید فیل متان سولفونیل (PMSF; Goldbio, USA) کنار یخ لیز شد. سپس محلول لیز شده با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و با استفاده از جوشاندن دناتوره گردید. سپس میزان پروتئین محلول لیز شده اندازه گیری و مقداری معادل ۳۰ میکروگرم پروتئین در ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE بارگذاری و بر روی غشای پلی وینیلیدن دیفلوراید (۰.۴۵ μm; Sigma, USA) منتقل شد. سپس غشا در حضور آنتی بادی منوکلونال کاسپاز ۳ شکافته شده (ab214430, 17 kDa; Abcam, Cambridge, UK) شد.

ROS در نمونه های بافت تومور پستان اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که همه دوزهای نانوذرات حاوی عصاره سیتوپلاسمی قادر هستند مقدار ROS را در بافت توموری کاهش دهند (نمودار ۲). لازم به ذکر است که نسبت کاهش ROS در موش های درمان شده وابسته به دوز ماده مورد استفاده بود. بر این اساس، موش های درمان شده با ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر نانوذرات حاوی عصاره سیتوپلاسمی به طور معنی داری سطح ROS کمتری در مقایسه با سایر گروه ها در بافت تومور پستان بودند.

نتایج مربوط به وسترن بلات کاسپاز ۳

آنالیز وسترن بلات ثابت نمود که نمونه های تومور موش های درمان شده با مقادیر متفاوت نانوذرات حاوی عصاره سطح کاسپاز بالاتری نسبت به موش های درمان نشده داشتند (نمودار ۳). مقدار کاسپاز ۳ به طور معنی داری در نمونه تومور موش های درمان شده با ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر نانوذرات حاوی عصاره سیتوپلاسمی در مقایسه با سایر گروه ها بالاتر بود. در واقع مقدار کاسپاز ۳ در موش های همین گروه ۲/۳ برابر بیشتر از موش های درمان نشده بود.

بیان ژن کاسپاز ۳

نتایج qPCR مکانیسم مرگ سلولی ناشی از نانوذرات حاوی عصاره را توجیه نمود. هفته پس از درمان موش ها بافت سرطانی همه موش ها جمع آوری و بیان ژن کاسپاز ۳ که مرتبط با مسیر آپوپتوز می باشد سنجیده شد. نتایج نشان داد که افزایش معنی داری از نظر بیان کاسپاز ۳ در گروه های درمان شده با نانوذرات و کپسیتابین وجود دارد (نمودار ۴). نتایج نشان داد که افزایش بیان ژن کاسپاز ۳ در بافت تومور وابسته به دوز دارو می باشد. لازم به توضیح است که در مطالعه حاضر اختلاف آماری معنی - داری از نظر میزان بیان ژن کاسپاز ۳ در موش های درمان شده با نانوذرات با دوز ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر و کپسیتابین مشاهده نشد (شکل ۲).

میانگین ها مورد استفاده قرار گرفت. آزمون t-test غیر وابسته برای مقایسه تفاوت های میانگین بیان ژن کاسپاز ۳ در موش های درمان شده با نانوذرات بارگذاری شده با عصاره سیتوپلاسمی و موش های درمان نشده بکار رفت. همه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و برای مقایسه اختلاف میانگین ها سطح کمتر از ۰/۰۵ نظر گرفته شد.

نتایج

رهایش دارو

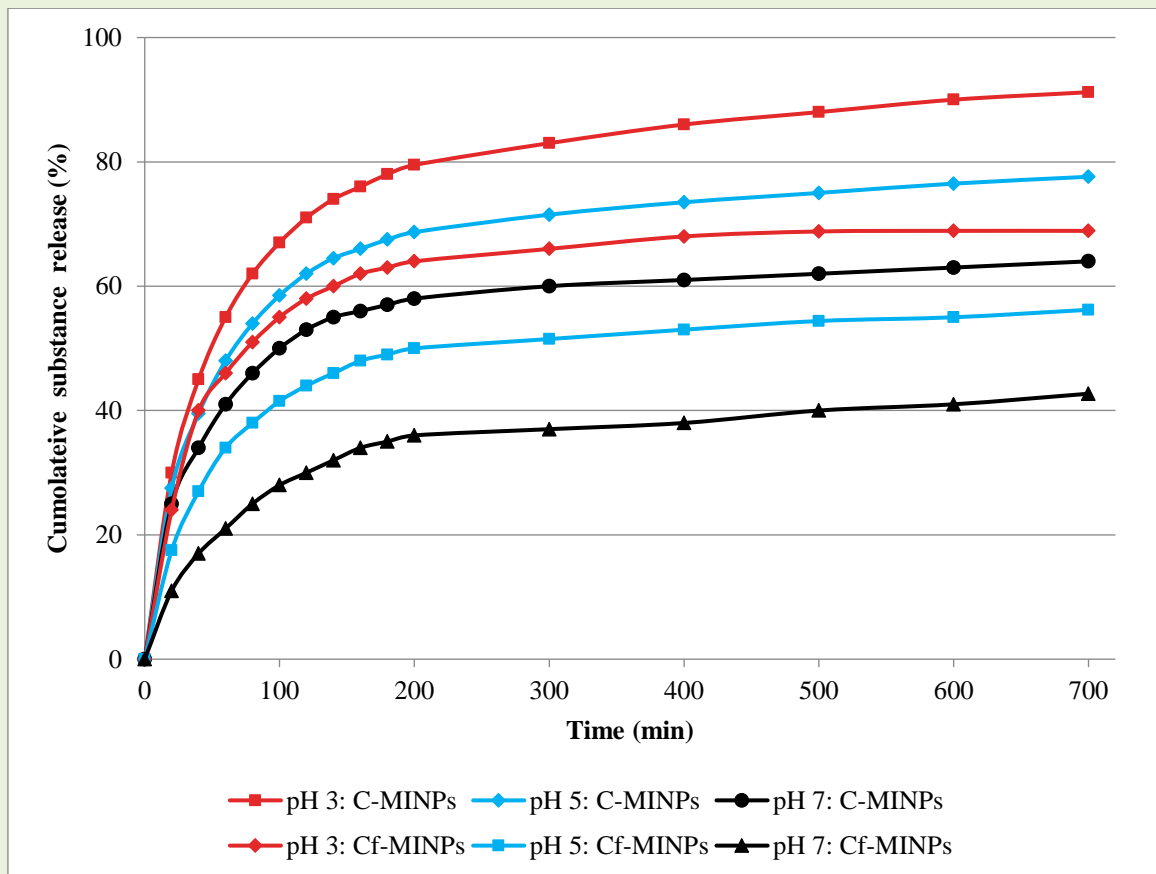
نتایج نشان داد که رهایش داروی کپسیتابین از نانوذرات وابسته به pH است. در حدود ۹۱/۲ درصد کپسیتابین در pH برابر با ۳، ۷۷/۶ درصد و ۶۴ درصد به ترتیب در pH های ۵ و ۷ بعد از ۷۲۰ دقیقه رها می شود. هم چنین عصاره سیتوپلاسمی پروبیوتیک به ترتیب ۵۸/۲، ۵۶/۱ و ۴۲/۷ درصد در pH های ۳، ۵ و ۷ رها می شود. در واقع رهایش ترکیبات در pH برابر با ۳ سریع تر از بقیه pH ها صورت می گیرد. همان گونه که نمودار ۱ نشان می - دهد حداکثر رهایش دارو پس از یک ساعت در pH اسیدی برابر با ۴۶/۱ درصد و در pH خنثی ۲۱/۴ درصد می باشد (نمودار ۱).

خصوصیات نانوذرات

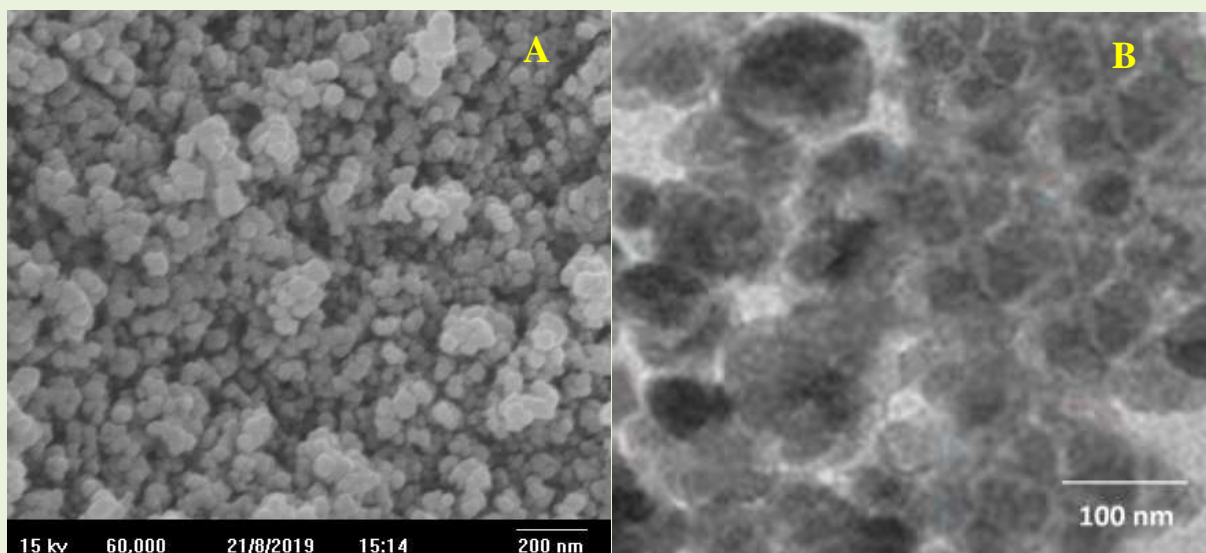
در این تحقیق اندازه و شکل نانوذرات مغناطیسی آهن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (شکل ۱ الف) و میکروسکوپ نگاره (شکل ۱ ب) بررسی شد. نتایج به دست آمده با استفاده از میکروسکوپ نگاره نشان داد که نانوذرات بارگذاری شده با عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس رامنوسوس به صورت کرویو با سایز متوسط ۱۰۹ نانومتر می باشند. تصاویر میکروسکوپ گذاره ثابت نمود که اندازه و شکل ذرات یک دست می - باشد (شکل ۲).

اندازه گیری گونه های فعال اکسیژن

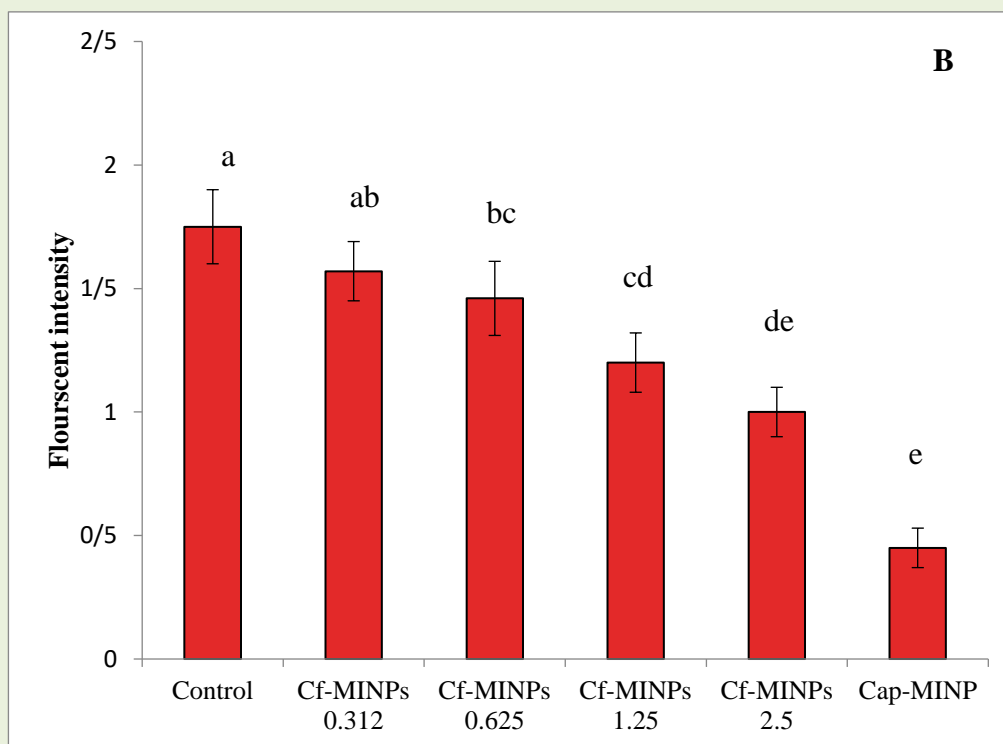
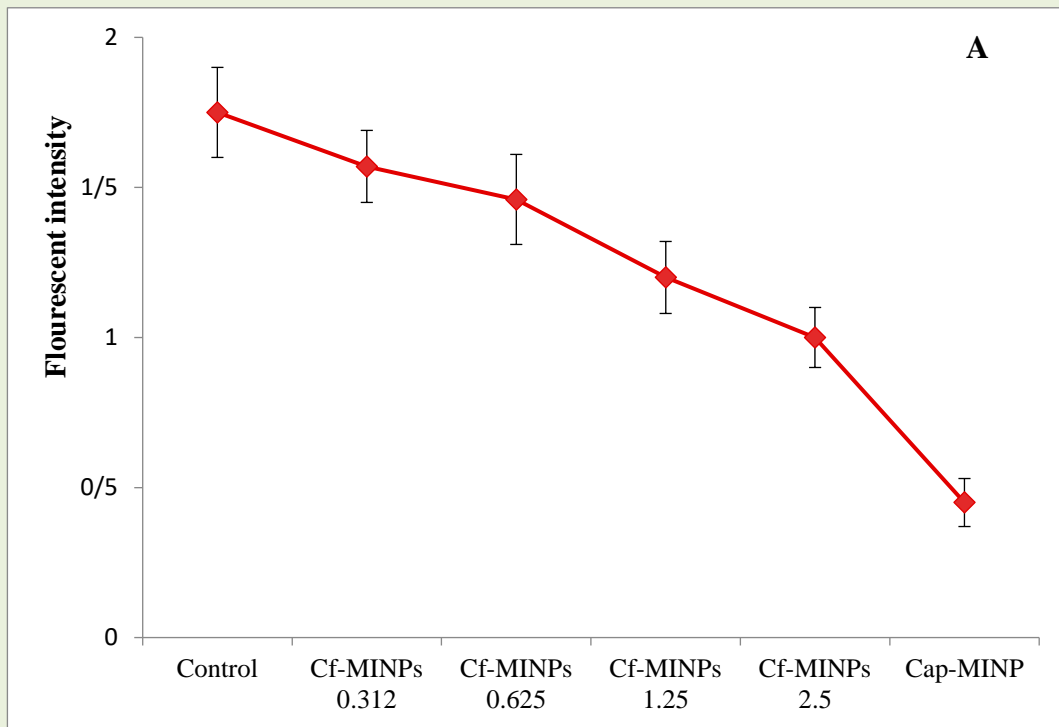
پس از سه هفته درمان موش های دارای تومور پستان با نانوذرات بارگذاری شده با عصاره سیتوپلاسمی مقادیر



نمودار ۱- ارزیابی رهش عصاره سیتوپلاسمی و کپسیتاین در دامای ۳۷ درجه سلیوس و pH های مختلف.

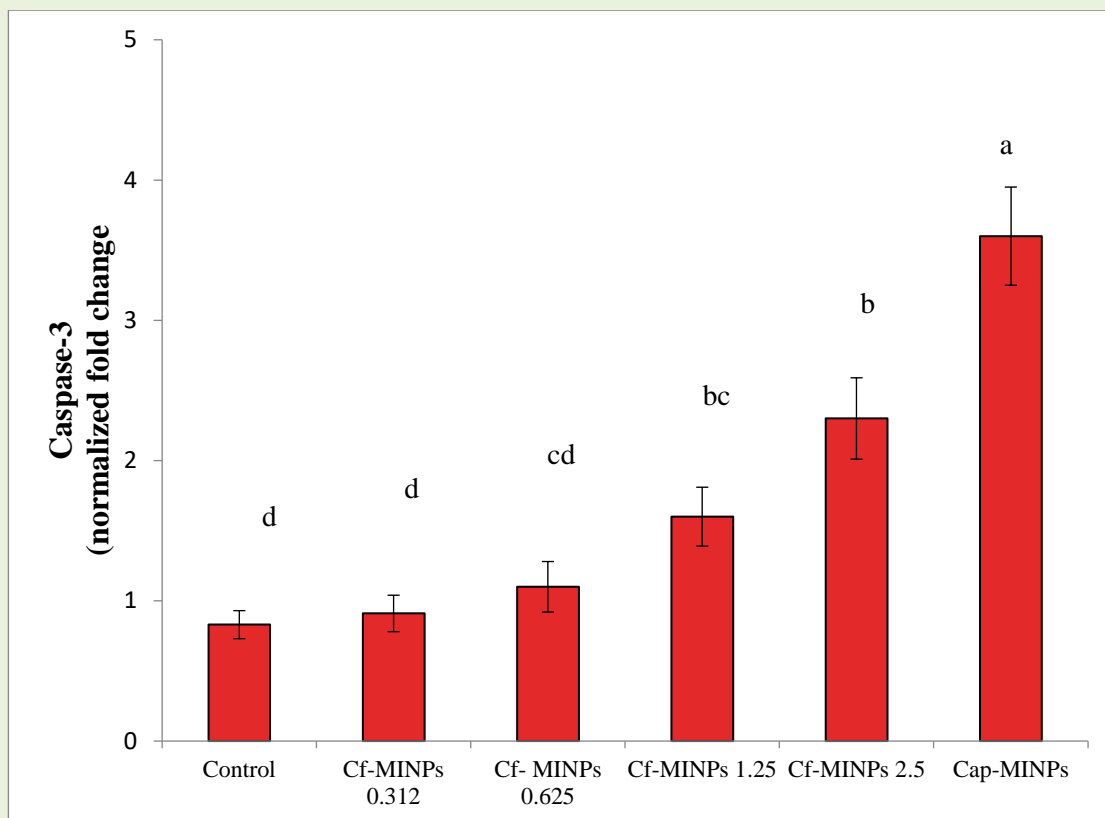


شکل ۱- شکل و اندازه نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن بارگذاری شده با عصاره سیتوپلاسمی،
(A) گراف میکروسکوپ گذاره و (B) تصویر میکروسکوپ نگاره



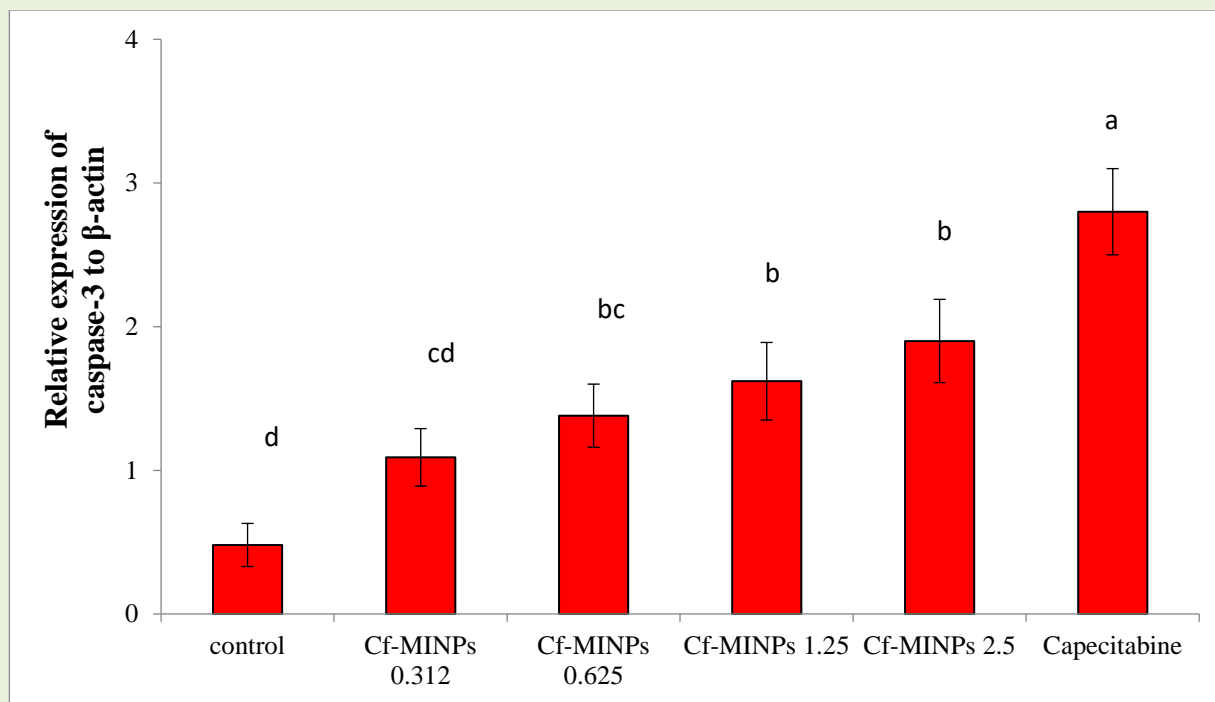
نمودار ۲- اندازه گیری میزان تولید ROS در موش های شاهد و تحت درمان (A و B).

اختلاف آماری معنی دار در بین گروه ها با حروف متفاوت آورده شده است ($P < 0/05$).



نمودار ۳. نتایج بررسی بیان ژن کاسپاز ۳ با روش وسترن بلات.

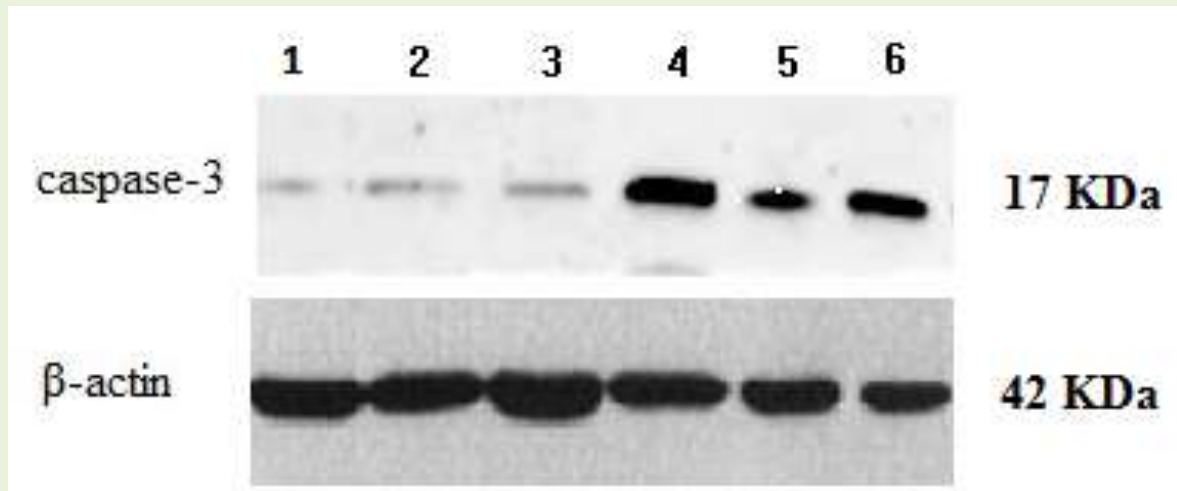
تفاوت آماری معنی دار بین گروه ها با حروف متفاوت نشان داده شده است ($P < 0/05$).



نمودار ۴- تاثیر غلظت های مختلف نانوذرات بارگذاری شده با عصاره سیتوپلاسمی و کپسیتابین بر بیان ژن کاسپاز ۳ در موش های

دارای سرطان تجربی پستان.

تفاوت آماری معنی دار بین گروه ها با حروف متفاوت نشان داده شده است ($P < 0/05$).



شکل ۲- بیان ژن کاسپاز ۳ و بتا اکتین

بحث و نتیجه گیری

نتایج نشان داد که عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG بارگذاری شده در نانوذرات مغناطیس آهن می تواند به طور معنی داری سبب مهار سرطان سینه از طریق آپوپتوز شود. مطالعات زیادی ثابت کرده اند که تجویز باکتری های مولد اسید لاکتیک می تواند سبب مهار تکثیر سلول های سرطانی و القای آپوپتوز در آن ها گردند. Kim و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که عصاره سیتوپلاسمی پروبیوتیک ها به طور بالقوه دارای اثرات ضد تکثیری علیه رده های سرطانی می باشد. این محققان نشان دادند که ترکیبات موجود در عصاره سیتوپلاسمی دارای فعالیت ضد توموری هستند، اما هنوز مکانیسم عملکرد آنها ناشناخته است (۱۵). An و همکاران (۲۰۱۹) توانستند پروتئینی به اندازه ۸ کیلو دالتون از لاکتوباسیلوس رامنوسوس جدا نمایند، این پروتئین توانست رشد سرطان کولون را متوقف نماید. این دانشمندان اظهار کردند که پروتئین فوق رشد تومور را از طریق توقف چرخه سلولی مهار می نماید (۱). Hassan (۲۰۱۹) پیشنهاد نمود که متابولیت های لاکتوباسیلوس ها حاوی تعدادی پپتید، اسید آمینه، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، اسید لاکتیک و مواد شیمیایی دیگری است که ممکن است نقش مهمی در فعالیت ضد توموری پروبیوتیک ایفا نمایند (۱۱). در حال حاضر شیمی درمانی روش استاندارد درمان سرطان

محسوب می شود، اگرچه ممکن است این روش با داشتن عوارض جانبی، شیوه ایده عالی برای درمان نباشد (۲۱). استفاده از پروبیوتیک ها برای درمان سرطان می تواند خطرات و شدت مسمومیت ناشی از داروهای شیمی درمانی را نداشته باشد. از این رو در مطالعه حاضر از عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG برای درمان سرطان تجربی پستان در موش استفاده شد، که دلیل آن ایمن بودن و اثرات ضد سرطانی بود. محدودیت اصلی در به کار بردن عصاره سیتوپلاسمی این باکتری به دست آمدن مقدار آن بود که ممکن است برای درمان کافی نباشد. لذا این محدودیت ممکن است کاربرد این ترکیب را برای درمان در موجود زنده با مشکل مواجه نماید. از طرف دیگر فعالیت سم زدایی کبد می تواند بخش اعظم عصاره سیتوپلاسمی را قبل از رسیدن به موضع سرطانی حذف و نیمه عمر آن را در جریان خون به شدت کاهش دهد. برای حل این مشکل تصمیم گرفته شد عصاره سیتوپلاسمی باکتری را از طریق بارگذاری در نانوذرات مغناطیسی آهن به موضع سرطانی منتقل شود. مطالعات زیادی وجود دارند که ثابت می نمایند نانوذرات به خصوص نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن قادر هستند برای این هدف به کار روند. در حال حاضر در دانش نانو تکنولوژی تحول عظیمی در حوزه درمان سرطان اتفاق افتاده است، طوری که نانوذرات اکسید آهن در ردیف

نخست نانوذراتی هستند که در سرطان کاربرد دارند. Ndog و همکاران (۲۰۱۵) پیشنهاد کردند که اتکیزش نانوذرات آهن در یک میدان مغناطیسی می تواند در شرایط درون تن و برون تن خاصیت ضد توموری داشته باشد (۲۳). علاوه بر این کشتن مستقیم سلول های سرطانی می تواند در ترکیب عصاره سیتوپلاسمی و نانوذرات تقویت گردد و در شرایط درون تن مشاهده گردید حجم تومور بعد از درمان با ۲/۵ میلی گرم نانوذرات حاوی عصاره سیتوپلاسمی به طور قابل توجهی کاهش می یابد. این تاثیر به طور عمده در بین روزهای ۱۲ و ۱۹ درمان اتفاق افتاد. از نظر علمی ترکیبات ضد تومور باید به راحتی در دسترس سلول های سرطانی قرار بگیرند، در این راستا نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن به خوبی در آب توزیع می شوند که این نشان می دهد به راحتی می تواند در دسترس سلول قرار بگیرند. در مطالعه قبلی محققان اثرات سلول کشی نانوذرات بر روی رده سرطانی سگک به روش MTT انجام شد. نتایج نشان داد که این رده سرطانی تا غلظت های ۴۰ میلی گرم نانوذرات تحت تاثیر قرار نمی گیرد. با این وجود نانوذرات مغناطیسی آهن دارای اثرات سمی پایین بوده و از این جهت آن ها را ترکیبات قابل دسترس و مناسب برای کاربردهای زیستی ساخته است. مشخص شده است که پس از تجویز داخل صفاقی نانوذرات جذب آن ها به داخل خون به سرعت اتفاق می افتد که دلیل آن اندازه کوچک ذره می باشد (۲۳). لذا نانوذرات مغناطیسی آهن بلافاصله در تمامی اندام های بدن نظیر کبد، کلیه و طحال پخش می شود، اما با استفاده از یک میدان مغناطیسی می توان آن ها را در موضع دلخواه (سرطان پستان) متمرکز نمود. در این راستا Gao و همکاران (۲۰۱۸) ثابت کردند که ایجاد یک میدان مغناطیسی تنها مانع از پخش شدن داروی ضد سرطانی در همه بافت ها می گردد بلکه باعث افزایش کارایی داروی ضد سرطانی و تمرکز آن نیز می شود (۸). همان طور که

نتایج تحقیق حاضر نشان داد حداکثر میزان رهایش عصاره سیتوپلاسمی از نانوذرات در طی یک ساعت نخست صورت می گیرد ولی با در نظر گرفتن زمان و pH پس از ۷۲۰ دقیقه میزان رهایش تا ۶۳/۱ درصد افت پیدا می کند. این نتیجه در راستای نتایج به دست آمده توسط Benyettou و همکاران (۲۰۱۶) و Gholami و همکاران (۲۰۱۹) می باشد (۳،۹) که نشان دادند حداکثر رهایش دارو از ناقل در یک محیط اسیدی صورت می گیرد. بنابراین نانوذرات حاوی عصاره سیتوپلاسمی می تواند برای درمان سرطان به منظور دارورسانی در یک میدان مغناطیسی سودمند باشند. در مطالعه حاضر اثرات نانوذرات حاوی عصاره بر روی میزان تولید ROS در بافت سرطان پستان موش ارزیابی شد. همان طور که نشان داده شد تمامی دوزهای به کار رفته نانوذرات حاوی عصاره سطح ROS را در نمونه تومور کاهش می دهند، و دوزهای ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر نانوذرات حاوی عصاره به طور معنی داری پس از سه هفته سطح آن را کاهش می دهند. تاکنون مطالعات زیادی در ارتباط با اثر پروبیوتیک ها بر تولید ROS انجام گرفته است. برای مثال، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس کورینی فورمیس و لاکتوباسیلوس گاسری قادر هستند مقدار ROS را در بافت توموری از طریق کاهش فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز کاهش دهند (۳۳). به نظر می رسد آنزیم NADPH اکسیداز مهم ترین عامل تولید ROS باشد (۲۵). مکانیسم دیگر فعالیت ضد اکسیدانی پروبیوتیک ها تولید متابولیت های متعددی است که فعالیتی مشابه گلوکاتایون پراکسیداز، بوتیرات و فولات دارند (۷). علاوه بر این گزارش شده است که برخی از لاکتوباسیلوس ها سبب القای فعالیت آنزیم های ضد اکسیداسیون می شوند نظیر سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز، گلوکاتایون ردکتاز و کاتالاز (۲۵). امروزه مشخص شده است که پروبیوتیک ها قادر هستند

محققان نشان دادند که پروبیوتیک کشته شده با حرارت (۲۸) و عصاره های آن ها می تواند سبب افزایش میزان بیان ژن کاسپاز ۳ در رده های سرطانی شود، اما ثابت گردیده شد که اگر عصاره سیتوپلاسمی در نانوذرات مغناطیسی آهن بارگذاری شود در سلول های سرطان پستان از طریق فعال شدن کاسپاز ۳ آپوپتوزیس اتفاق می افتد. بر اساس نتایج به دست آمده می توان نتیجه گرفت که نانوذرات مغناطیسی آهن حاوی عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس رامنوسوس سبب القای آپوپتوز می شود. لذا نتایج آزمون های وسترن بلات و qPCR تأیید نمود که دوز ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر به طور معنی داری سطح کاسپاز ۳ را در تومور پستان افزایش می دهد. هم چنین در پایان سه هفته درمان با نانوذرات حاوی عصاره سیتوپلاسمی به طور معنی داری اندازه و حجم تومور پستان در موش کاهش نشان داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مطالعه مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج را به دلیل حمایت در تصویب پایان نامه ابراز می دارند.

منابع

1. An, BC., Hong, S., Park, HJ., Kim, BK., Ahnm, JY., Ryu, Y. (2019). Anti-colorectal cancer effects of probiotic-derived p8 protein. *Genes (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/genes10080624>.
2. Avtanski, D., Poretsky, L. (2018). Phytopolyphenols as potential inhibitors of breast cancer metastasis. *Mol Med.*, <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0032-7>.
3. Benyettou, F., Ocadiz Flores, JA., Ravaux, F., Rezgui, R., Jouiad, M., Nehme, SI. (2016). Mesoporous γ -Iron oxide nanoparticles for magnetically triggered release of doxorubicin and hyperthermia treatment. *Chem Europ J*. <https://doi.org/10.1002/chem.201602956>
4. Bressenot, A., Marchal S., Bezdnetnaya, L., Garrier, J., Guillemin, F., Plénat, F. (2009). Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts

از طریق فعال نمودن مسیرهای آپوپتوزی سبب مرگ سلول های سرطانی شوند. کاسپاز ۳ عضوی از خانواده سیستین پروتئاز است که نقش مرکزی در آپوپتوز ایفا می کند (۷). سلول های منفی از نظر بیان کاسپاز ۳ دارای هسته آبی رنگ هستند اما سلول های مثبت دارای هسته قهوه ای رنگ و بدون هیچ گونه تغییر ساختاری هسته هستند. نتایج ما نشان داد که تزریق نانوذرات حاوی عصاره می تواند سبب افزایش میزان کاسپاز ۳ در بافت تومور پستان موش شوند. بیشترین میزان بیان کاسپاز ۳ به طور معنی داری در موش های درمان شده با ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده گردید. در این راستا Sharma و همکاران (۲۰۱۱) ثابت کردند محلول حاوی سلول های لیز شده لاکتوباسیلوس می تواند سبب القای آپوپتوز در سلول های دارای سرطان کبد از طریق کاسپاز ۳ شوند (۳۲). برای نخستین بار مشخص شد که عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG می تواند میزان بیان ژن کاسپاز ۳ را در موش های دارای سرطان تجربی پستان تغییر دهد. نتایج qPCR نشان داد که درمان با ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر نانوذرات می تواند به طور معنی داری بیان ژن کاسپاز ۳ را افزایش دهد. اگرچه بسیاری از

of human carcinoma. *J Histochem Cytochem*. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.952044>

5. Chen, C., Nong, Z., Xie, Q., He, J., Cai, W., Tang, X. (2017). Dodecyl-6-methoxycyclohexa-2,5-diene-1,4-dione inhibits the growth and metastasis of breast carcinoma in mice. *Sci Rep.*, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07162-3>
6. Chen, J., Shi, M., Liu, P., Ko, A., Zhong, W., Liao, W. (2014). Reducible polyamidoamine-magnetic iron oxide self-assembled nanoparticles for doxorubicin delivery. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.057>.
7. Devarajan, E., Sahin, AA, Chen, JS., Krishnamurthy, RR., Aggarwal, N., Brun, AM. (2002). Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206044>.
8. Gao, Z., Li, Y., You, C., Sun, K., An, P., Sun, C. (2018). Iron oxide nanocarrier-mediated

- combination therapy of cisplatin and artemisinin for combating drug resistance through highly increased toxic reactive oxygen species generation. *ACS Applied Bio Materials.*, <https://doi.10.1021/acsabm.8b00056>.
9. Gholami, L., Tafaghodi, M., Abbasi, B., Daroudi, M., Kazemi, O.R. (2019). Preparation of superparamagnetic iron oxide/doxorubicin loaded chitosan nanoparticles as a promising glioblastoma theranostic tool. *J Cell Physiol.*, <https://doi.10.1002/jcp.27019>.
10. Górka, A., Przystupski, D., Niemczura, M.J., Kulbacka, J. (2019). Probiotic bacteria: a promising tool in cancer prevention and therapy. *Curr Microbiol.* <http://doi:10.1007/s00284-019-01679-8>.
11. Hassan, Z. (2019). Anti-cancer and Biotherapeutic Potentials of Probiotic Bacteria. *J Cancer Sci.*, <https://doi.10.4172/1948-5956.1000575>
12. Hilger, I., Kaiser, W.A. (2012). Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomedicine.*, <https://doi.org/10.2217/nnm.12.112>
13. Iwanowycz, S., Wang, J., Hodge, J., Wang, Y., Yu, F., Fan, D. (2016). Emodin inhibits breast cancer growth by blocking the tumor-promoting feedforward loop between cancer cells and macrophages. *Mol Cancer Ther.* <https://doi.10.1158/1535-7163.MCT-15-0987>
14. Jazgara, M., Ghannam, A., Soukkaieh, C., Murad, M. (2016). Nti-proliferative activity of λ -carrageenan through the induction of apoptosis in human breast cancer cells. *Iran J Cancer Prev.*, <https://doi.10.17795/ijcp-3836>.
15. Kim, JY., Woo, HJ., Kim, Y., Lee, HJ. (2002). Screening for antiproliferative effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines. *Biotechnol Letters.*, <https://doi.org/10.1023/A:1019875204323>.
16. Kossatz S, Grandke J, Couleaud P, Latorre A, Aires A, Crosbie-Staunton K, Ludwig R, Dähring H, Ettelt V, Lazaro-Carrillo A, Calero M, Sader M, Courty, J, Volkov Y, Prina-Mello A, Villanueva A, Somoza Á, Cortajarena AL, Miranda R, Hilger I (2015) Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. *Breast Cancer Res.* <https://doi.10.1186/s13058-015-0576-1>.
17. Lee, JE., Lee, J., Kim, JH., Cho, N., Lee, SH., Park, SB. (2019). Characterization of the anti-cancer activity of the probiotic Bacterium *Lactobacillus fermentum* using 2D vs. 3D culture in colorectal cancer cells. *Biomolecules.*, <https://doi.org/10.3390/biom9100557>.
18. Li, Z., Yu, Y., Wang, M., Xu, H., Han, B., Jiang, P. (2019). Anti-breast cancer activity of spg-56 from sweet potato in mcf-7 bearing mice in situ through promoting apoptosis and inhibiting metastasis. *Sci Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29099-x>.
19. Lin, PW., Nasr, TR., Berardinelli, AJ., Kumar, A., Neish, AS. (2008). The probiotic *Lactobacillus GG* may augment intestinal host defense by regulating apoptosis and promoting cytoprotective responses in the developing murine gut. *Pediatric Research.* <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181827c0f>.
20. Lu, X., Zhum, Y., Bai, R., Wu, Z., Qian, W., Yang, L., Cai, R. (2019). Long-term pulmonary exposure to multi-walled carbon nano-tubes promotes breast cancer metastatic cascades. *Nat Nanotechnol.*, <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0472-4>.
21. Ma, EL., Choi, YJ., Choi, J., Pothoulakis, C., Rhee, SH., Im, E. (2010). The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition. *Int J Cancer.*, <https://doi.10.1002/ijc.25011>
22. National Research Council (NRC) 8th ed. Washington, USA: National Academies Press; 2011. Committee for the update of the guide for care and use of laboratory animals; pp. 11-41.
23. Ndong, C., Tate, JA., Kett, WC., Batra, J., Demidenko, E., Lewis, LD. (2015). Tumor cell targeting by iron oxide nanoparticles is dominated by different factors in vitro versus in vivo. *Plo one.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115636>.
24. Nigieh, SE., Yeap, SK., Nordin, N., Rahman, H., Rosli, R. (2019). In vivo anti-tumor effects of citral on 4t1 breast cancer cells via induction of apoptosis and downregulation of aldehyde dehydrogenase activity. *Molecules.* <https://doi.org/10.3390/molecules24183241>.
25. Nowak, A., Paliwoda, A., Błasiak, J. (2019). Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, <https://doi.10.1080/10408398.2018.1494539>.
26. Orlando, A., Messa, C., Linsalata, M., Cavallini, A., Russo, F. (2009). Effects of GG on proliferation and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric and DLD-1 colonic cancer cell lines. *Immunopharmacol*

- Immunotoxicol. <https://doi.10.1080/08923970802443631>.
27. Orlando, A., Refolo, MG., Messa, C., Amati, L., Lavermicocca, P., Guerra, V. (2012). Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. *Nutr Cancer*, <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.717676>.
28. Orlando, A., Linsalata, M., Russo, F. (2016). Antiproliferative effects on colon adenocarcinoma cells induced by co-administration of vitamin K1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int J Oncol.*, <https://doi.10.3892/ijo.2016.3463>.
29. Pepper, SJ., Britz, ML. An. (2019). Acid up-regulated surface protein of *Lactobacillus paracasei* strain GCRL 46 is phylogenetically related to the secreted glucan- (GpbB) and immunoglobulin-binding (SibA) protein of pathogenic streptococci. *Int J Mol Sci.*, <https://doi.org/10.3390/ijms20071610>
30. Piehler, S., Dähring, H., Grandke, J., Göring, J., Couleaud, P., Aires, A. (2020). Iron oxide nanoparticles as carriers for dox and magnetic hyperthermia after intratumoral application into breast cancer in mice: impact and future perspectives. *Nanomaterials (Basel)*. <https://doi.10.3390/nano10061016>.
31. Sharifi, M., Hasan, A., Nanakali, NMQ., Salihi, A., Qadir, FA., Muhammad, HA. (2020) Combined chemo-magnetic field-photothermal breast cancer therapy based on porous magnetite nanospheres. *Sci Rep.*, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62429-6>.
32. Sharma Singh, RL., Kakkar, P. (2011). Modulation of Bax/Bcl-2 and caspases by probiotics during acetaminophen induced apoptosis in primary hepatocytes. *Food Chem Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.041>.
33. Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients.*, <https://doi.org/10.3390/nu9050521>.
34. Wu, H., Inoue, M. (2006). Immuno histochemical analysis for Mdm2 and p53 proteins in methylcholanthrene-induced mouse rhabdomyosarcomas. *J Vet Med Sci.*, <https://doi.org/10.1292/jvms.68.427>.
35. Wu, M., Huang, S. (2017). Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment. *Mo. Cli. Oncol.*, <https://doi.10.3892/mco.2017.1399>.
36. Xuan, S., Wang, F., Lai, FMY., Sham, KWY., Wang, XJ., Lee, S. (2011). Synthesis of biocompatible, mesoporous Fe₃O₄ nano/microspheres with large surface area for magnetic resonance imaging and therapeutic applications. *ACS Appl Mater Int.*, <https://doi.10.1021/am1012358>.
37. Zhou, Y., Tian, L., Zhang, YC., Guo, BF., Zhou, QW. (2014). Apoptotic effects of psiRNA-STAT3 on 4T1 breast cancer cells in vitro. *Asian Pac J Cancer Prev.*, <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.16.6977>.



In Vivo Murine Breast Cancer Targeting by Magnetic Iron Nanoparticles Involved L. GG Cytoplasmic Fraction

S. Mokriani ¹, **A. Tukmechi** ², N.Harzandi¹, L. Jabalameli ¹

1.Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

2.Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, West Azarbaijan province, Iran. a.tukmachi@urmia.ac.ir

Received:2020. 1. 11

Accepted: 2021.7.10

Abstract

Inroduction & Objective: The use of chemical anti-cancer drugs frequently create serious side effects. However, probiotics are natural and treat different kinds of cancer without undesired effects. In this study, a nano delivery system was planned to transport the *Lactobacillus rhamnosus* GG (L. GG) cytoplasmic fraction (Cf) to cancerous tissue in the mouse model.

Material and Methods: Magnetic iron nanoparticles (MINPs) were synthesized and loaded with L. GG-Cf (0, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 mg/ml) and administrated for three weeks to treat experimentally induced murine breast cancer in a constant magnetic field. At the end of the trial, the treating efficacy of this complex molecule was evaluated via western blotting and qPCR.

Results: Results showed MINPS can deliver and accumulate the L. GG-Cf in cancer tissue, also the size and volume of the tumors were reduced. Additionally, in cancer tissues of treated mice with 2.5 mg/ml of Cf-MINPs significant induced apoptosis was seen compared to untreated (control), and our data proved that this induction may be due to the caspase-3 pathway.

Conclusion: In conclusion, L. GG-Cf could treat the murine breast cancer and MINPs are a suitable candidate for drug delivery because of their safety, uniformity, and magnetic properties.

Keywords: Anti-Cancer, Drug Delivery, In Vivo, Nanoparticles, Probiotic, 4T1.