

بررسی اثرات سایتوتوکسیسیته 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 پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۰

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 منشأ 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 سایتوتوکسیسیته عصاره سیتوپلاسمی مخمر کاندیدا آلبیکنس بر رده سرطانی میلوئیدی مزمن C140 بود. برای این منظور عصاره سیتوپلاسمی سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس در زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با مقادیر ۰/۱، ۱، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مجاورت سلول های سرطانی C140 قرار داده شد و اثر آن با استفاده از آزمون های MTT و فلوسایتمتری بررسی شد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که در دوزهای پائین تر از ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره در زمان های مورد مطالعه، هیچ گونه تاثیری بر روی سلول های سرطانی مشاهده نشد؛ در حالیکه از دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر 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 ($p < 0/001$). همچنین مشخص شد عصاره سیتوپلاسمی مخمر در دوز ۲۷۳ میکروگرم بر میلی لیتر و بعد از ۷۲ ساعت مواجهه باعث مرگ ۵۰٪ سلول های سرطانی شد ($IC_{50} = 273 \mu g/ml$). در آزمون فلوسایتمتری نیز، درصد آپوپتوز سلول های سرطانی تیمار شده با عصاره سیتوپلاسمی مخمر به میزان ۲۷۳ میکروگرم بر میلی لیتر ۴۸/۲٪ بود در حالیکه در سلول های سرطانی تیمار نشده درصد آپوپتوز ۰/۱۷٪ بود.

کلمات کلیدی: سایتوتوکسیسیته، عصاره سیتوپلاسمی، کاندیدا آلبیکنس، رده سرطانی C140، آزمون MTT، فلوسایتمتری.

* 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 بافت های 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 اختلال 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 میلوئیدی (Acute Myeloid Leukemia - AML) و لوسمی مزمن میلوئیدی (Chronic Myeloid Leukemia-CML) تقسیم می شوند (۱۴). لوسمی میلوئیدی 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 میلوئیدی، 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 آن ها 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 سایتوتوکسیسیته 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 آنتی بیوتیک کلرامفنیکل کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از

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، گیکو، 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 (Confluency 80)، سلول های فلاسک به نسبت ۱ به ۲ و در پاره ای از اوقات که سلول ها در پیک مرحله تکثیر خود بودند به نسبت ۱ به 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 سایتوتوکسیسیستی 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 ۱۰^۵

تهیه کشت های تازه و خالص مخمری، جهت انبوه سازی آن، از محیط کشت مایع (Yeast, YPG (Peptone, Glucose) (گلوکز: ۲۰ گرم، پیتون: ۲۰ گرم، عصاره مخمری: ۱۰ گرم در یک لیتر آب مقطر) حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۵۰ mg/ml) استفاده شد. محیط های کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار با دور ۱۳۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. سپس سلول های مخمری با سانتریفوژ یخچال دار با ۴۵۰۰ × g به مدت ۵ دقیقه جمع آوری شده و سه بار با آب مقطر استریل به روش سانتریفوژ با ۲۵۰۰ × g 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 سلول های مخمری در بافر فسفات سدیم سرد (۰/۱ مولار، pH=۷/۲) تهیه شد و سپس پروب دستگاه سونیکاتور (دکتر هیلشر، آلمان) در داخل لوله حاوی نمونه قرار داده شد. عمل خرد کردن سلول ها با دامنه ۶۰٪ به مدت دو دقیقه انجام شد.

به منظور جلوگیری از بالا رفتن دمای محلول و پروب سونیکاتور، دستگاه به مدت چهار دقیقه خاموش می شد. این عمل چندین بار تکرار شده و هر دفعه شکسته شدن سلول های مخمری به وسیله میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۰). بعد از اطمینان از شکسته شدن سلول ها، سوسپانسیون مذکور با دور ۵۰۰ × g 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

بافر (PBS) به تمامی چاهک ها افزوده شده و میکروپلیت ها به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس میکروپلیت ها با دور $1800 \times g$ 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 قرار دادن پلیت ها به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در انکوباتور حل شدند و سرانجام شدت نور جذب شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر Stat Fax ثبت گردید. درصد سلول کشتی عصاره ها با فرمول زیر محاسبه شد (۱۲).

سلول از سلول های C140 به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای ته صاف اضافه شد. پس از گذشت ۶ ساعت ۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی غلظت های مختلف عصاره سیتوپلاسمی مخمر (۱/۰، ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ $\mu g/ml$) به چاهک ها 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 Sulfoxide) بودند. میکروپلیت ها 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

$100 \times$ جذب متوسط نمونه ی کنترل / جذب متوسط نمونه ی تیمار شده = درصد سلول کشتی عصاره

آزمون فلوسایتومتری

بعد از ۷۲ ساعت مجاورت سلول های تیمار شده با غلظت IC_{50} (۲۷۳ میکرو گرم در میلی لیتر) با عصاره سیتوپلاسمی مخمر کاندیدا آلبیکنس تعداد 2×10^5 سلول برداشت شد. سلول ها ابتدا در لوله فالكون ۱۵ میلی لیتری با PBS شسته شده و سپس به سلول های حاصل ۲۰۰ میکرو لیتر محلول بافر FACS اضافه گردید و بعد از سانتریفوژ میزان ۵ میکرو لیتر آنکسین V کتروگه با FITC (Fluorescein isothiocyanate) به ۱۹۵ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه شده و سلول ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از آن سلول ها با ۲۰۰ میکرو لیتر محلول بافر FACS شستشو داده شده و مجدداً ۱۹۰ میکرو لیتر محلول بافر FACS به سلول ها اضافه گردید. در مرحله بعد، به سوسپانسیون سلولی ۱۰ میلی لیتر ترکیب پروپیدوم دید

(Propidium iodide, PI) اضافه شد و سلول حاصل توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل 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 $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

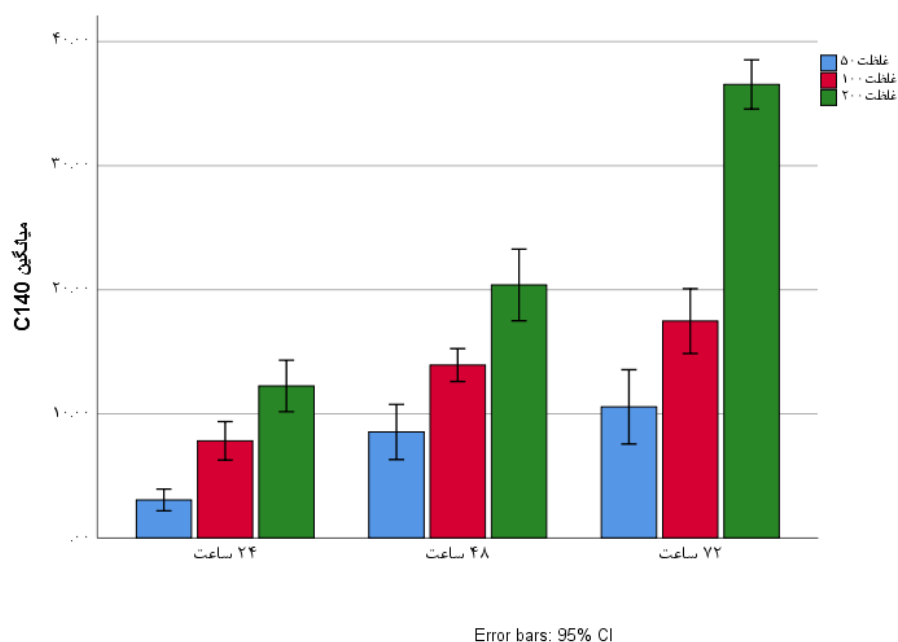
نتایج

در بررسی حاضر، نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که در دوزهای ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از عصاره سیتوپلاسمی مخمر کاندیدا آلبیکنس در زمان های مورد مطالعه هیچ گونه تاثیر سایتوتوکسیستی بر روی سلول های C140 مشاهده نشد؛ در حالیکه مشخص شد که از دوز ۵۰ میکرو گرم بر میلی لیتر به بالا خاصیت سلول کشتی عصاره سیتوپلاسمی وابسته به

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

بنابراین در آزمون فلوسایتومتری، درصد آپوپتوز سلول های C140 تیمار شده با عصاره سیتوپلاسمی مخمر *کاندیدای آلبیکنس* به میزان ۲۷۳ میکروگرم بر میلی لیتر ۴۸٪ بود در حالیکه در سلول های C140 تیمار نشده درصد آپوپتوز ۱۷٪ بود (تصویر ۲).

زمان بوده و با افزایش زمان، درصد مهار رشد نیز به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$) (تصویر ۱). همچنین در تمامی زمان های مورد مطالعه، مرگ سلولی ناشی از عصاره سیتوپلاسمی مخمر از دوز ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به بعد وابسته به دوز بوده و با افزایش دوز میزان سلول کشتی نیز افزایش یافت بطوریکه متوسط درصد مرگ سلول های 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 ($p < 0.001$).

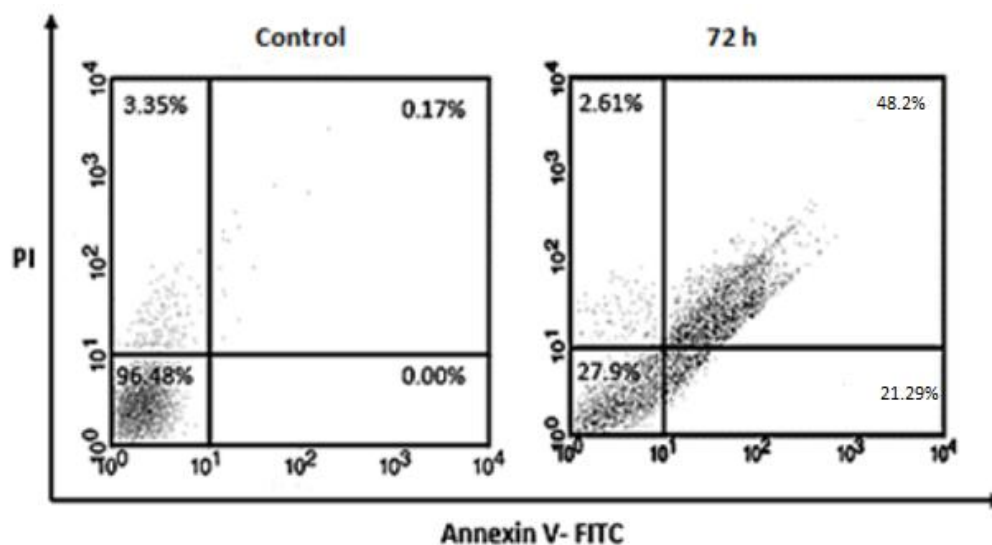


تصویر ۱: درصد تاثیر غلظت های مختلف عصاره سیتوپلاسمی *کاندیدای آلبیکنس* در زمان های مختلف بر رده سرطانی C140

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار مرگ سلول‌های C140 در غلظت‌های مختلف در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مداخله با

عصاره سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس

زمان	غلظت (µg/ml)	میانگین ± انحراف معیار	مقدار P
۲۴ 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	
۴۸ 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

در مقایسه با سلول‌های C140 تیمار نشده (۲۷۳ µg/mL)

گروه تیمار: آنسکین V و PI هر دو مثبت: ۴۸/۲٪ (مربع سمت راست بالا); مراحل انتهایی آپوپتوز آنسکین V مثبت و PI منفی: ۲۱/۲۹٪ (مربع سمت راست پایین); مراحل ابتدایی آپوپتوز آنسکین V منفی و PI مثبت: ۲/۶۱٪ (مربع سمت چپ بالا); تکروز آنسکین V و PI هر دو منفی: ۲۷/۹٪ (مربع سمت چپ پایین); سالم گروه کنترل: آنسکین V و PI هر دو مثبت: ۰/۱۷٪ (مربع سمت راست بالا); مراحل انتهایی آپوپتوز آنسکین V مثبت و PI منفی: ۲۱/۲۹٪ (مربع سمت راست پایین); مراحل ابتدایی آپوپتوز آنسکین V منفی و PI مثبت: ۳/۳۵٪ (مربع سمت چپ بالا); تکروز آنسکین V و PI هر دو منفی: ۹۶/۴۸٪ (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 درمان های رایج اغلب با عوارض نامناسبی همراه است که گاه "خود این درمان ها و عوارض جانبی ناشی از آن ها منجر به مرگ می شود. 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 کاربرد گسترده ای دارد (۹). از جمله عوامل ایمنومدولاتوری با منشا طبیعی می توان به مخمرها اشاره کرد. در این ارتباط حیدری و همکاران در سال ۱۳۸۹، با بررسی اثرات پروتئین های سیتوپلاسمی *کاندیدا آلیکنس* 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 مصنوعیت 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 سایتوتوکسیسییتی عصاره سیتوپلاسمی مخمر *کاندیدا آلیکنس* بر رده سرطانی C140، نشان داده شد که عصاره سیتوپلاسمی مخمر می تواند رشد و تکثیر سلول های سرطانی را کند کرده و روند آپوپتوز را در این سلول ها فعال نماید؛ به نحوی که IC_{50} عصاره سیتوپلاسمی مخمر در مجاورت سلول های C140 معادل ۲۷۳ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد که این امر توسط آزمون فلو سائتومتری به اثبات رسید که عامل مرگ سلول های سرطانی آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده) می باشد و نه نکروز. همچنین از دیگر اهداف

مطالعه حاضر، بررسی چگونگی تغییر خاصیت آپوپتوتیک عصاره سیتوپلاسمی مخمر در گذر 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 دیواره ی سلولی و عصاره سیتوپلاسمی قارچ ها و باکتری های مختلف بر روی رده های 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، مکرانی و همکاران در سال ۲۰۱۵ به بررسی اثر دیواره ی 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 دیواره ی سلولی *ساکارومایسس بولاردی* در مقایسه با دیواره سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* به طور معنی داری سبب مهار رشد رده ی K562 می شود. نانوذرات روی نیز به طور معنی داری قادر به مهار رشد رده ی سلولی K562 در شرایط آزمایشگاهی شد. همچنین دیواره سلولی هر دو نوع مخمر به همراه نانوذرات روی سبب مهار رشد این رده ی سرطانی شدند (۸). بنیادی و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر آپوپتوتیک عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* را بر رده ی سرطانی K562 بررسی کردند. آن ها به این نتیجه رسیدند که خاصیت ضد توموری عصاره سیتوپلاسمی با گذر زمان به طور معنی داری افزایش یافت در حالی که خاصیت ضد توموری دیواره ی سلولی با گذر زمان کاهش داشت.

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 و همکاران در سال ۲۰۰۴ در کره 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 میلی لیتر 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 بر روی 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 آلیکنس* اثر سایتوتوکسیسیته بر رده‌ی C140 داشته و در دوز ۲۷۳ میکروگرم بر میلی لیتر 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.

البته دیواره‌ی سلولی مخمر به طور معنی داری در مقایسه با عصاره‌ی سیتوپلاسمی اثر مهاری بیشتری بر رده‌ی K562 داشت. همچنین نتایج الکتروفورز این مطالعه نشان داد که دیواره‌ی سلولی ساکارومایسس سرویزیه باعث القای نکروز سلولی در سلول‌های K562 شد و عصاره سیتوپلاسمی مخمر نیز سبب هضم DNA سلول‌های K562 گردید (۱). کیری و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که عصاره سیتوپلاسمی پروبیوتیک‌های متعلق به لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی کپور معمولی می تواند رشد رده‌ی 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 آلیکنس* در مهار تولید آنزیم‌های متالوپروتینازها در رده‌ی سلولی فیرو 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 متالوپروتینازها در حضور ترکیبات دیواره‌ی سلولی مخمر *کاندیدا آلیکنس* به طور معنی داری 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 مطالعه‌ی ای که توسط گونیوم و گولاپودی در سال ۲۰۰۴ در آمریکا صورت گرفت، سه رده سرطان سینه (MCF-7، ZR-75-1 و HCC70) به همراه *کاندیدا آلیکنس* کشته شده با حرارت، به مدت 72 ساعت با نسبت 1:10 کشت

لوکمیای میلوئیدی 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 ۳۵-۴۵.

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 ۸۹-۹۷.

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 variety 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). Multifaceted 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

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 سروسیسه بر رده سرطانی K562. مجله ارمنان 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 آلیکنس 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 آلیکنس بر مهار تولید آنزیم های متالوپروتینازها در رده سلولی فیروسارکوما 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 ساکارومیسس سروزیسه و تاثیر آن بر فعالیت فاگوسیتوز و ترشح TNF α در موش های Balb/c. مجله پزشکی کوثر، دوره ۱۱، شماره ۳، صفحات ۲۵۹-۲۵۱.

۶- کبیری، ف.، نجاتی، و.، توکمه چی، ا.، دلیرز، ن.، نیک بخش، پ. (۱۳۸۹). مهار رشد رده سرطانی K562

K562 leukemia cells: an in vitro study. *Current Therapeutic Research*, **71**: 384-397.

- 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 diet 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

Evaluation of cytotoxic effects of cytoplasmic extract of *Candida albicans* on C140 cell line

Hamid Reza Nikdoust¹, Samaneh Eidi^{2*}, Hadi Mohebalian²

1-Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2-Assistant Professor in department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 10 March 2020

Accepted: 11 April 2020

Abstract

*According to the increasing prevalence of diseases associated with immunodeficiency and cancer in recent years, many efforts have been made to use immunomodulatory agents with natural origin as drug compounds, whereby yeasts can be used as immunomodulatory compounds. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effects of *Candida albicans* cytoplasmic extract on chronic myeloid leukemia C140 cell line. For this purpose, different concentrations (0.1, 1, 10, 50, 100 and 200 µg/mL) of cytoplasmic extract of standard strain of *Candida albicans* were exposed with C140 cancer cells and incubated at 37 °C for 24, 48 and 72 hours. Effects of cytoplasmic extract of yeast on cancer cell line were determined by MTT and flow cytometry assays.*

*The results showed that it was observed no cytotoxic effect from cytoplasmic extract on the cancer cell line at doses below 50 µg/ml at the time studied; whereas, the cell-killing property of cytoplasmic extract of yeast was increased from dose of 50 µg/ml as time-dependent. In addition to, Cytoplasmic extract of *Candida albicans* killed 50% of cancer cells with 273 µg/ml after 72 hours of exposure (IC₅₀ =273 µg/ml). The results of flow cytometry showed that the percentage of apoptosis in cancer cells treated with yeast cytoplasmic extract was 48.2%, whereas the percentage of apoptosis in untreated cancer cells was 0.17%.*

Keywords: Cytotoxicity, cytoplasmic extract, *Candida albicans*, C140 cancer cell line, MTT test, flow cytometry.

**Corresponding author: Samaneh Eidi*

Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Azadi square, University campus, P.O. Box: 9177948974-1793, Mashhad, Iran.

Tel: +98 51 38805627

E-mail: eidi@um.ac.ir