مهار رشد رده سرطانی K562 با استفاده از دیواره سلولی استخراج شده از پروبیوتیک‌های Saccharomyces cerevisiae و Saccharomyces boulardi به همراه نانو ذرات روی

سالار مکریانی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران.
* **امیر توکمه‌چی:** گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (*نویسنده مسئول).
مجید نوجوان: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی میلوئید مزمن یکی از سرطان‌های شایع در انسان می‌باشد و هدف از مطالعه حاضر استفاده از دیواره سلولی استخراج شده از مخمرهای Saccharomyces cerevisiae و Saccharomyces boulardii به همراه نانوذرات روی جهت مهار رشد رده K562 بود.

روش کار: برای تهیه دیواره سلولی این دو مخمر، کشت آن‌ها در یک محیط پایه، شرایط هوازی و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انجام گرفت. پس از رشد مخمرها محیط کشت سانتریفیوژ و رسوب سلولی با بافر استریل شستشو شده و در نهایت سونیکاسیون انجام گرفت و نانو ذرات روی با روش بیولوژیک تهیه شد. سپس، خاصیت ضد توموری غلظت‌های مختلف دیواره سلولی مخمرها به تنهایی و در ترکیب با نانو ذره روی با روش MTT و الکتروفورز سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که دیواره سلولی مخمر Saccharomyces boulardii در مقایسه با دیواره سلولی Saccharomyces cerevisiae به طور معنی‌داری (p=۰/۰۲۹) سبب مهار رشد رده K562 می‌شود. همچنین نانو ذرات روی به طور معنی‌داری (p=۰/۰۲۱) قادر هستند رشد رده سرطانی K562 را در شرایط آزمایشگاهی مهار نمایند. همراه کردن نانو ذرات روی با دیواره سلولی استخراج شده از مخمرها نیز اگر چه سبب افزایش درصد مهار رشد رده سرطانی K562 در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد، اما در مقایسه با استفاده هر کدام از دیواره‌های سلولی استخراج شده به تنهایی از نظر آماری در سطح p<۰/۰۵ معنی‌دار نیست.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های به دست آمده از این بررسی می‌توان نتیجه گرفت که دیواره سلولی هر دو مخمر Saccharomyces به همراه نانوذرات روی سبب مهار رشد رده سرطانی K562 در شرایط آزمایشگاهی می‌گردند.

کلیدواژه‌ها: ساکارومایسس سرویسیه، ساکارومایسس بولاردی، نانوذرات روی، مهار رشد، رده سرطانی K562.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و غیر بیماری‌زای موجود در بعضی از مواد غذایی هستند که وقتی در مقادیر کافی وارد بدن شوند تأثیر مثبتی بر سلامتی میزبان می‌گذارند (۱). غذاهای پروبیوتیک یک گروه از غذاهای بهبود دهنده‌ی سلامتی، تحت عنوان غذاهای عملگر می‌باشند (۲) که سلامتی را بر اساس تغذیه مهیا می‌کنند (۳). میکروب‌هایی مانند Bifidobacterium و Lactobacillus، Saccharomyces و Propionibacterium به علت اثرات بهبوددهندگی که بر سلامتی دارند، به عنوان پروبیوتیک مطرح هستند (۴) و قادرند رشد سلول‌های توموری القا شده در جوندگان را مهار نمایند. پروبیوتیک‌ها مواد مختلفی را تولید می‌کنند که بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر مهارکننده دارند. این ترکیبات مهارکننده شامل: اسیدهای آلی نظیر استات، پروپیونات، بوتیرات،H_2O_2 و ترکیبات باکتریوسین است. این مواد نه تنها تعداد سلول‌های زنده بیماری‌زا را کم می‌کنند بلکه ممکن است متابولیسم باکتری‌ها یا تولید سموم توسط آن‌ها را نیز تحت تأثیر قرار دهند (۵). مهار

رقابتی جایگاه‌های اتصال باکتریایی بر روی سطوح اپی‌تلیال روده، یک مکانیسم دیگر اثر بخشی پروبیوتیک‌ها است. بسیاری از بیماری‌زاهای روده‌ای برای استقرار در روده و ایجاد بیماری باید بتوانند به دیواره روده متصل شوند. تعدادی از گونه‌های پروبیوتیکی به دلیل توانایی اتصالشان به سلول‌های اپی‌تلیال انتخاب شده‌اند (۶). پروبیوتیک‌ها احتمالاً از مواد غذایی که مورد مصرف باکتری‌های بیماریزا قرار می‌گیرد، استفاده می‌کنند. پروبیوتیک‌ها با افزایش سطح سیتوکاین‌ها و ایمنوگلوبولین‌ها، افزایش تکثیر سلول‌های مونو نوکلئاز، فعال‌کردن ماکروفاژها، افزایش فعالیت NKها، تعدیل خود ایمنی و تحریک ایمنی در برابر باکتری‌های بیماریزا و پروتوزوآها باعث افزایش ایمنی می‌شوند. Saccharomyces boulardii (S. boulardii) هر دو سیستم کمپلمان و رتیکلواندوتلیال را فعال می‌کند (۷).

میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک قادر به کاهش فعالیت آنزیم‌های مضر روده‌ای هستند که منشأ میکروبی یا غذایی دارند که ترکیبات پیش‌ساز دخالت‌کننده در ایجاد سرطان را به ترکیبات سرطان‌زا دارند. از جمله این آنزیم‌ها می‌توان به بتاگلوکورونیداز، نیتروردوکتاز، گلیکوزیداز، هیدرولاز، آزوردوکتاز اشاره نمود که سبب کاهش فعالیت این آنزیم‌ها می‌شوند. در مدل‌های حیوانی تولید ترکیبات ضد موتاسیون توسط Bifidobacterium longum در کولون مشاهده گردیده است (۸). کاهش آنزیم‌های مضر روده‌ای منجر به کاهش ترکیبات سرطان‌زا از روده و مجاری ادراری و مثانه می‌شود (۹). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که

Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae) کشته شده با حرارت می‌تواند آپوپتوز را در رده‌های سرطانی پستان (MCF-7، ZR-75-1 و Hcc70) القا کند (۱۰). باکتری‌های اسید لاکتیک با مکانیسم‌هایی همچون تغییر فعالیت‌های متابولیک میکروفلور روده و تغییر شرایط فیزیکی و شیمیایی کولون، متصل شدن به مواد سرطان‌زا و تخریب آن‌ها، تغییرات کمی و کیفی میکروفلور روده و جلوگیری از تولید سرطان‌زاهایی مانند آمونیاک، تولید مواد ضد سرطان و تقویت پاسخ های ایمنی میزبان می‌توانند از سرطان کولون پیشگیری کنند (۱۱). اثبات این مسئله با استفاده از ماده سرطان‌زای ۱ و ۲ دی متیل هیدرازین در کولون موش نشان داده شده است (۱۲). پروبیوتیک‌ها تولید مقادیر بالای اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه می‌کنند و در کولون موش آنزیم‌های محافظت کننده گلوتاتیون ترانسفراز II را القا می‌کنند (۱۳). باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در شیرهای تخمیری می‌توانند اثر مهارکننده، روی گسترش زخم‌های پیش سرطانی و تومورها در مدل حیوانی داشته باشند (۱۴). Streptococcus thermophilus و Lactobacillus bulgaricus موجود در شیرهای تخمیری در غیر فعال کردن عوامل خطرزا و سرطان‌زا روده بسیار مؤثر می‌باشند. کاهش آنزیم‌های مضر روده‌ای منجر به کاهش ترکیبات سرطان‌زا از روده و مجاری ادراری و مثانه می‌شود (۱۲). بتاگلوکان جدا شده از S. cerevisiae قادر است مقاومت میزبان را در برابر آنتی‌ژن‌های خارجی مختلف مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها و آلودگی‌های انگلی افزایش دهد و ممکن است باعث فعالیت میزبان علیه تومورها به وسیله تحریک سیستم ایمنی گردد (۱۵). عصاره سیتوپلاسمی باکتری‌های Lactobacillus casei و Bifidobacterium تأثیر مستقیمی بر مهار رشد رده سلول‌های سرطانی دارند (۱۶). تزریق مستقیم داخل توموری مخمر Saccharomyces cerevisiae کشته شده با حرارت می‌تواند باعث پس‌رفت قابل توجه تومور و القای آپتوپتوز و تنظیم فعالیت طبیعی سیستم ایمنی گردد (۱۰). مخمر S. cerevisiae در شرایط کشت آزمایشگاهی سبب کاهش افلاتوکسین‌های B1 و B2 در پودر ماهی می‌شود (۱۷). S. cerevisiae در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند سبب حذف سرب از مواد غذایی شود (۱۲). استفاده از عصاره و دیواره سلولی S. cerevisiae و S. boulardii در مهار رشد رده سرطانی K562 در شرایط آزمایشگاهی مؤثر می‌باشد (۱۸).

نانو فناوری در دو دهه‌ی اخیر پیشرفت‌های

فراوانی را در تکنولوژی تجهیزات و مواد با ابعاد بسیار کوچک به دست آورده است و به سوی تحولی فوق‌العاده، تمدن بشری را تا پایان این قرن دگرگون خواهد کرد (۱۹). در بین فناوری‌های برتر و نوظهور، نانو فناوری از اهمیت بالایی برخوردار است، چرا که امکان پیشتازی در آن‌ها بیشتر است. نانوفناوری با ارائه رویکردی جدید در توسعه علوم و فنون مختلف یکی از امید بخش‌ترین فناوری‌های قرن حاضر لقب گرفته است. سلول‌های سرطانی در مقابل عوامل شیمی درمانی به طور ذاتی آسیب-پذیرتر از سلول‌های سالم هستند، اما داروها به صورت انتخابی عمل نمی‌کنند و ممکن است به بافت‌های سالم نیز آسیب برسانند. بافت سرطانی، مواد مغذی را تا زمانی که رشدش در حدود ۲ نانومتر است از طریق انتشار مواد غذایی به دست می‌آورد (۲۰). بعد از این لازم است که رگ‌های خونی شکل گیرد. پدیده رگ زایی در بافت‌های سرطانی غیرطبیعی بوده و مویرگ‌های جدید، سوراخ‌دار بوده، که سبب افزایش نفوذپذیری خون از عروق به بافت‌ها شده و باعث رشد سلول‌های سرطانی می‌شود. اندازه این منافذ عروقی در بافت سرطانی بین ۷۸۰-۱۰۰ نانومتر می‌باشد و در حالت طبیعی بین ۱۰-۵ نانومتر است (۲۱). این مهم ترین تفاوت بین مویرگ‌های سالم و سرطانی می‌باشد (۲۲). اندازه نانو ذرات در درمان سرطان طوری انتخاب می‌شوند که بتوانند از روزنه‌های غشا مویرگ‌های توده سرطانی عبور کنند در حالی که قادر به خروج از مویرگ‌های طبیعی نیستند. این امر سبب ایجاد غلظت بالایی از نانو ذرات در توده سرطانی می‌شود. هرچه اندازه نانو ذره کوچک‌تر باشد مدت زمان ماندگاری آن در بدن بیشتر بوده و دیرتر توسط پروتئین‌های آپسون شناسایی و توسط سیستم ایمنی بدن حذف می‌شوند. یکی از روش‌های گریز از سیستم ایمنی در نانو ذره‌ها، ایجاد پوشش پلیمری در سطح آن‌ها می‌باشد. روش دیگر آب دوست‌کردن نانو ذره است (۲۳). تأثیر نانو ذرات نقره بر روی باسیل‌های گرم منفی بیماری‌زای مقاوم به آنتی بیوتیک بتالاکتام نشان می‌دهد که این نانو ذره می‌تواند اثر مهاری بر تمامی باسیل‌های گرم منفی داشته و با افزایش غلظت نانو ذرات نقره، قطر هاله عدم رشد افزایش می‌یابد (۲۴). لازم به ذکر است مرور منابع علمی نشان داد که تاکنون هیچ گونه پژوهشی پیرامون استفاده از نانوذرات جهت مهار رشد رده سرطانی K562 در شرایط آزمایشگاهی انجام نشده است. همچنین در این تحقیق برای نخستین بار اثر همزمانی دیواره‌های سلولی استخراج شده از مخمرها با نانوذرات روی بر مهار رشد این رده سرطانی مورد مطالعه قرار گرفت.

سرطان خون یا لوسمی بیماری پیش‌رونده بدخیم بافت‌های خون‌ساز بدن است. این بیماری در اثر تکامل ناقص گویچه‌های سفید خون و پیش‌سازهای آن در خون و مغز استخوان ایجاد می‌شود (۲۵). در لوسمی روند طبیعی دچار اخلال شده و رشد سلول‌های خونی از کنترل خارج می‌شود (۲۶). لوسمی‌ها به چهار دسته تقسیم می‌شوند. 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 می‌شوند (۲۷). لوسمی لنفوییدی، سلول‌های لنفاوی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۸). با نشان دادن گسترش کلونی در این سلول‌ها و جابه جایی متقابل بین ژن abl بر روی کروموزوم ۹ و ژن bcr بر روی کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی می‌توان تشخیص لوسمی میلوییدی مزمن را تأیید نمود (۲۹). در نتیجه ژن ترکیبی bcr.abl به وجود می‌آید که مسئول تولید یک پروتئین ۲۱۰ کیلو دالتونی با فعالیت تیروزین کینازی به نام پروتئین p210 bcr-abl می‌باشد که علاوه بر تکثیر بی‌رویه و مستقل از فاکتور رشد سلول‌های پیش‌ساز میلوییدی، باعث تقسیم سلولی و اختلال در مرگ برنامه‌ریزی می‌شود (۳۰). 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 سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌گردد (۳۱).

بنابراین هدف از مطالعه حاضر در مرحله نخست بررسی تاثیر دیواره سلولی استخراج شده از مخمرهای S. cerevisiae و S. boulardi بر مهار رشد رده سرطانی K562 به همراه نانوذرات روی در شرایط آزمایشگاهی بود. همچنین در مرحله دوم تاثیر همراه کردن نانوذرات روی بر مهار رشد این رده سرطانی با دیواره‌های سلولی استخراج شده از پروبیوتیک‌های مورد استفاده در این تحقیق بود.

روش کار

تهیه محیط کشت و نحوه تکثیر مخمرها: مخمرهای ساکارومیس سرویسیه و ساکارومیس بولاردی به ترتیب از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران (PTCC 5269) و مرکز کلکسیون میکروارگانیسم-های آمریکا (ATCC 74012) تهیه و به طور جداگانه در محیط کشت پایه حاوی عصاره مخمر (۱٪)، گلوکز (۵٪) و K2HPO4 (۱٪) با pH=۵/۸ به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار و با دور rpm ۱۳۰، کشت شدند. پس از رشد، مخمرها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل دو مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل، شستشو داده شد (۳۲).

تهیه دیواره سلولی مخمرها: برای شکستن مخمر از روش سونیکاسیون استفاده گردید (۲۶). ابتدا سوسپانسیونی از رسوب سانتریفوژ شده سلول‌های مخمر به وسیله بافر فسفات سدیم سرد (۰/۱ مولار، pH=۷/۲) تهیه و به وسیله دستگاه سونیکاتور با دامنه‌ی ۶۰ درصد به مدت دو دقیقه تخریب شدند. به منظور جلوگیری از بالا رفتن دمای محلول و پروب سونیکاتور، دستگاه به مدت چهار دقیقه خاموش گردید. این عمل چندین بار صورت گرفت و میزان شکسته شدن سلول‌های مخمری به وسیله میکروسکوپ نوری ارزیابی شد (۲۶). بعد از اطمینان از شکسته شدن سلول‌ها، سوسپانسیون مذکور با دور g× ۵۰۰ به مدت یک دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی گراد سانتریفیوژ و از سلول‌های سالم شکسته نشده جدا و رسوب تولید شده به عنوان دیواره سلولی در نظر گرفته شد. رسوب تولید شده با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به صورت سوسپانسیون درآمده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور g× ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. شستشوی دیواره سلولی سه بار دیگر تکرار و رسوب حاصل لیوفیلیزه شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۶).

نحوه تهیه بافر لیزکننده (فسفات سدیم ۰/۱مولار،pH=۷/۲): ابتدا ۰/۰۷۱۶ گرم از Na2HPO4.7H2O و ۰/۰۲۸۵ گرم از Na2HPO4.2H2O توزین و درون یک لیتر آب مقطر حل شدند و سپس اتوکلاو گردید (۳۳).

تهیه غلظت‌های مختلف دیواره‌های سلولی: پس از تعیین غلظت پروتئین موجود در هر کدام از دیواره‌های سلولی به روش بیوره با استفاده از محیط کشت سلولRPMI (گیبکو، انگلستان) عمل تهیه رقت‌ها صورت گرفت. اساس روش بیوره واکنش پروتئین‌های موجود در نمونه با سولفات مس معرف بیوره بوده که یک کمپلکس آبی رنگ تشکیل می‌گردد، شدت رنگ حاصله رابطه مستقیم با غلظت پروتئین موجود در نمونه دارد. دیواره‌های سلولی در رقت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر محیط کشت تهیه شدند (۳۴).

نحوه سنتز زیستی نانو ذره: در بررسی حاضر، امکان سنتز زیستی کلوئید نانو ذره روی با استفاده از گیاهان دارویی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور در مرحله اول، نانو ذره روی با استفاده از عصاره آبی گیاهان ترنجبین و ریشه گیاه چوبک تهیه شدند. برای تهیه عصاره آبی گیاهان ترنجبین و گیاه چوبک ابتدا مقدار ۲۵ گرم از قسمت‌های پودر شده هر گیاه با ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در مرحله بعد ابتدا عصاره‌ها با کاغذ صافی نمره ۱ واتمن صاف و با استفاده از دستگاه روتاری عمل تغلیظ انجام شد. نانو ذره روی در ابعاد ۵۰ نانومتر توسط آزمایشگاه نانوتکنولوژی، دانشگاه ارومیه تهیه شد (۲۱).

تهیه سلول‌های سرطانی و کشت آن‌ها: رده

سرطانی K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران(C122) تهیه و در محیط کشت RPMI در حضور ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (گیبکو، انگلستان) و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، در انکوباتور ۵٪ CO2 دار کشت داده شد (۳۵).

سنجش خاصیت ضد توموری دیواره‌های سلولی و نانو ذرات روی با روش MTT: روش MTT یک تکنیک رنگ سنجی بوده که به کمک آن سلول‌های زنده از سلول‌های مرده تشخیص داده خواهند شد. در این مطالعه برای بررسی خاصیت ضد توموری دیواره‌های سلولی و نانوذرات روی از روش Chang و همکاران (۳۶) و Kim و همکاران (۳۷) استفاده شد. به طور خلاصه، پس از سانتریفیوژ و شمارش سلول‌های K562 به روش تریپان بلو، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر (با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در محیط کشت کامل RPMI به همراه ۱۵٪ FBS) به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف دیواره‌های سلولی و نانوذرات به چاهک‌ها اضافه گردید. سه چاهک دیگر به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر سلول به همراه ۹۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰ میکرولیتر بافر لیز کننده افزوده شد. در مرحله بعد پلیت‌ها به مدت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در حضور ۵ درصد گاز CO2 گرم خانه گذاری شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۳ـ۴ و ۵ دی متیل تیازول ۲ـ۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید، ۵ mg/ml در بافر PBS) به تمامی چاهک‌ها افزوده شده و میکروپلیت به مدت چهار ساعت گرم خانه گذاری گردید. در این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های سالم و زنده، برم محلول MTT را احیاء کرده و آن را به صورت ذرات نامحلول بنفش رنگ فورمازان در می‌آورد. در پایان کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO (دی متیل سولفوکساید) خالص به چاهک‌ها و قرار دادن پلیت‌ها به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در انکوباتور شیکردار حل شدند و سرانجام شدت نور جذب شده (OD) در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (StatFax, USA) ثبت گردید. درصد سلول کشی عصاره‌ها با فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد سلول کشی =
[(OD نمونه - OD کنترل) ÷ OD کنترل] ×۱۰۰

سنجش میزان آپوپتوز و نکروز سلول‌های K562 به روش الکتروفورز: بررسی وقوع آپوپتوز یا نکروز با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا سلول‌های تیمار شده با دیواره سلولی مخمرها و نانوذرات روی تحت تأثیر بافر لیز کننده قرار گرفتند. پس از سانتریفوژ، DNA با استفاده از ترکیب فنل-کلروفورم-ایزوآمیل الکل جداسازی شد. DNA جداسازی شده با اتانول مطلق و به مدت یک شب رسوب داده شد. در نهایت رسوب DNA در بافر TE (Tris-HCl, 10 EDTA 10 mM) حل شد و روی ژل آگارز ۲٪ درصد با ولتاژ ۸۰ ولت و به مدت ۱ ساعت در حضور مارکر با وزن ۱ کیلوباز بارگذاری شد (۵ و ۳۷).

جهت تجزیه وتحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA: نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹) و آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. در تمامی بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد، همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار اکسل (نسخه ۲۰۱۰) انجام گرفت.

یافته‌ها

نتایج آزمون MTT: یافته‌های به دست آمده از این مطالعه نشان داد که دیواره سلولی هر دو مخمر در مقایسه با گروه شاهد که هیچگونه دیواره سلولی دریافت نکردند، سبب مهار رشد رده سرطانی مورد مطالعه می‌گردند. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت دیواره سلولی، میزان

مهار رشد سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد. این شرایط در تمامی زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده شد. بیشترین درصد مهار رشد دیواره سلولی هر دو مخمر در ۱۲ ساعت اول با بالاترین غلظت به کار رفته مشاهده شد. به تدریج با افزایش غلظت و زمان در هر ردیف اختلاف آماری معنی داری در سطح $p<۰/۰۵$ دیده شد. S. boulrdii و S. cerevisiae در غلظت ۱۲۵ میکرگرم بر میلی لیتر در ۱۲ ساعت اول فاقد هر گونه خاصیت ضد توموری بودند ولی با افزایش غلظت آن‌ها، بر میزان خاصیت مهار کنندگی رشد رده سرطانی افزوده شد طوری که در غلظت ۴۰۰۰ خاصیت سلول کشی به ۹۸/۵٪ رسید (جدول ۱).

بررسی نتایج به دست آمده نشان داد که نانو ذرات روی در مقایسه با گروه شاهد دارای فعالیت مهار کنندگی رشد رده سرطانی K562 هستند و این خاصیت وابسته به غلظت نانو ذرات مورد استفاده و زمان مجاور شدن می‌باشد و با افزایش غلظت در هر زمان مشخص، درصد سلول‌های مهار شده بیشتر می‌شود (جدول ۲).

جدول ۳ نشان می‌دهد که بیشترین تاثیر

جدول ۱- مقایسه خاصیت سلول کشی غلظت‌های مختلف دیواره سلولی ساکارومایسس سرویسیه با ساکارومایسس بولاردی در زمان‌های مختلف در سلول‌های K562

غلظت	ساکارومایسس بولاردی				ساکارومایسس سرویسیه			
(µg/ml)	۱۲	۲۴	۴۸	۷۲	۱۲	۲۴	۴۸	۷۲
۱۲۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲۵۰	۱۱/۲۱±۰/۲۳ [a]	[a] ۱۰/۰۵±۰/۸۹	[a] ۸/۱۲±۰/۴۳	۵/۲±۰/۳۹ [a]	۸/۷±۰/۴۵ [a]	۸/۰۹±۰/۷۸ [a]	۷/۲±۰/۶۶ [a]	۰ [a]
۵۰۰	۳۳/۳±۲/۱۱ [a]	۳۰/۱۳±۴/۱۲ [a]	۲۶/۳±۳/۸۱ [b]	۱۸/۱±۳/۰۸ [c]	۲۴/۲±۳ [b]	۲۲/۱۲±۳/۲۹ [b]	۱۹/۸۸±۳/۰۹ [c]	۱۲±۲/۲۹ [d]
۱۰۰۰	۵۹/۱۸±۵/۹ [a]	۵۱/۵±۶/۱۱ [b]	۴۰/۱±۵/۵۶ [c]	۳۳/۳±۵/۰۹ [d]	۵۰/۱۲±۶/۰۱ [b]	۴۷/۲۳±۵/۰۹ [b]	۳۵/۱۲±۵/۲۱ [d]	۲۲±۴/۸۸ [e]
۲۰۰۰	۷۴±۶/۱۲ [a]	۶۹/۸±۷/۱۱ [b]	۶۲/۶±۶/۷۷ [c]	۴۱±۵/۸۹ [e]	۶۷/۵±۵/۵۴ [b]	۶۴/۱۲±۶/۷۸ [c]	۵۴/۲±۵/۷۸ [d]	۳۴/۱±۶/۱ [f]
۴۰۰۰	۹۸/۵±۸/۳۱ [a]	۸۱/۱۵±۷/۰۱ [c]	۷۳±۶ [d]	۶۲/۹±۵/۵ [e]	۹۰/۱۲±۷/۴۲ [b]	۷۳/۲±۶/۶ [d]	۶۶/۱۳±۴/۴۵ [e]	۵۸/۲±۵/۰۸ [f]

اعداد به صورت Mean ± Standard Deviation بیان شده‌اند. حروف یکسان در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف آماری در سطح $p<۰/۰۵$ می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه خاصیت سلول کشی غلظت‌های مختلف نانوذرات روی در زمان‌های مختلف در سلول‌های K562

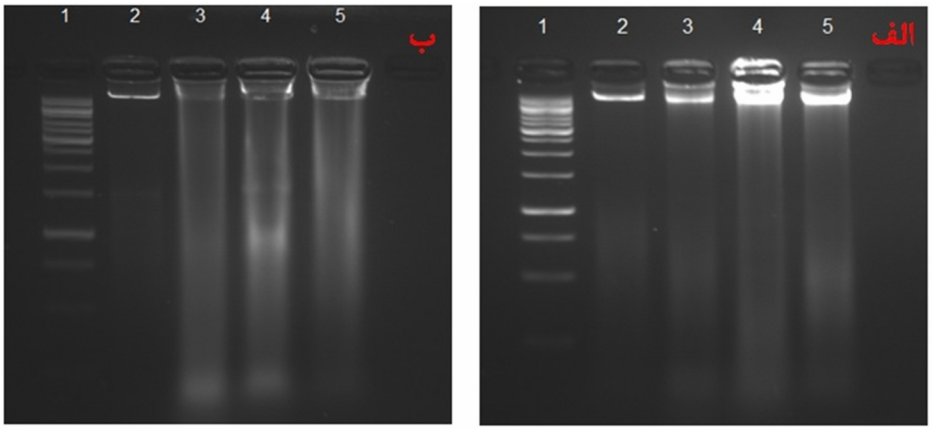
غلظت (µg/ml)	نانوذره روی			
	۱۲	۲۴	۴۸	۷۲
۲۵	۰	۰	۰	۰
۵۰	۰	۰	۰	۰
۱۰۰	۷/۳۲±۰/۲۳ [a]	۶/۸۹±۰/۸۹ [a]	۶/۴۳±۰/۴۳ [a]	۶±۰/۳۹ [a]
۲۵۰	۱۳/۵۶±۱/۱۱ [a]	۱۲/۶۷±۱/۱۲ [a]	۱۰/۴۳±۱/۸۱ [b]	۹/۰۱±۱/۰۸ [b]
۵۰۰	۲۵/۸۹±۲ [a]	۲۴/۲۳±۱/۹۹ [a]	۲۲/۱۲±۲/۰۹ [b]	۱۹/۱۱±۲/۱۲ [b]

اعداد به صورت Mean ± Standard Deviation بیان شده‌اند. حروف یکسان در هر ردیف نشان دهنده عدم وجود اختلاف آماری در سطح $p<۰/۰۵$ می‌باشد

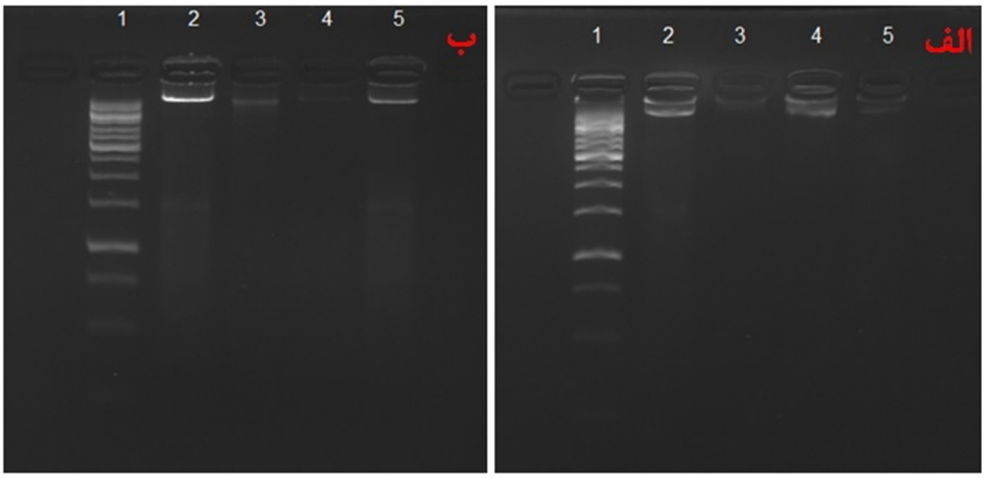
جدول ۳- بررسی خاصیت سلول کشی دیواره سلولی ساکارومایسس بولاردی با غلظت ۴۰۰۰ µg/ml و نانوذره روی با غلظت ۵۰۰ µg/ml به تنهایی و ترکیبی در زمان‌های مختلف در سلول‌های K562

تیمار	زمان (ساعت)			
	۱۲	۲۴	۴۸	۷۲
ساکارومایسس بولاردی	۹۸/۵±۲ [a]	۸۱/۱۵±۲ [a]	۷۳±۲ [a]	۶۲/۹±۲ [a]
نانوذره روی	۲۵/۸۹±۲ [b]	۲۴/۲۳±۲ [b]	۲۲/۲۲±۲ [b]	۱۹/۱۱±۲ [b]
ترکیب س. بولاردی و روی	۹۹/۰۲±۲ [a]	۸۷/۲±۲ [a]	۷۶/۵۶±۲ [a]	۶۸/۱۴±۲ [a]

اعداد به صورت Mean ± Standard Deviation بیان شده‌اند. حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف آماری در سطح $p<۰/۰۵$ می‌باشد.



تصویر ۱- بررسی وضعیت مرگ سلولی، سلول‌های K562 تحت تیمار با دیواره سلولی *ساکارومیسس بولاردی* (الف) و *س. سرویسیه* (ب) بعد از ۱۲ ساعت . چاهک ۱. مارکر kb ۱ (کنترل مثبت) نشانگری است که حاوی DNA با وزن‌های مشخص می‌باشد. با الکتروفورز، هر قطعه از DNA بر اساس وزن در یک ناحیه‌ی مشخص متوقف میشود. چاهک ۲. کنترل منفی. چاهک ۳. تیمار با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر. چاهک ۴. تیمار با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر. چاهک ۵ تیمار با غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر.



تصویر ۲- بررسی وضعیت مرگ سلولی، سلول‌های K562 تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات روی بعد از ۱۲ (الف) و ۲۴ (ب) ساعت. چاهک۱: مارکرkb ۱ (کنترل مثبت) چاهک۲: کنترل منفی چاهک ۳: تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر چاهک ۴: تیمار با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر چاهک ۵: تیمار با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر.

مخمرها مربوط به دیواره سلولی S. boulardii در غلظت ۴۰۰۰ میکرگرم بر میلی لیتر در ۱۲ ساعت اول می‌باشد و بیشترین میزان خاصیت مهار رشد رده سرطانی تحت تاثیر نانو ذره روی در رقت ۵۰۰ میکرگرم بر میلی لیتر در ۱۲ ساعت اول می‌باشد. افزایش غلظت بیش از مقدار به کار رفته سبب مسمومیت می‌شود. میزان مهار کنندگی ساکارومیسس بولاردی ۹۸/۵٪ و نانو ذره روی۲۵/۸۹٪ است که نشان دهنده اختلاف آماری در سطح $p<۰/۰۵$ می‌باشد. مجاورت هم زمان دیواره سلولی S. boulardii و نانو ذره روی با سلول‌های سرطانی، میزان سلول کشی آن به ۹۹/۰۲٪ می‌رسد که در مقایسه با دیواره S. boulardii اختلاف معنی داری، نشان نمی‌دهد.

بر اساس تصویر ۱ تیمار سلول‌های K562 با دیواره‌های سلولی به دست آمده از هر دو مخمر القاء آپوپتوز مشخص گردید. تیمارهای ۱۲ و ۲۴ ساعت مجاورت نانوذرات روی با رده سرطانی K562 نشان می‌دهد که مرگ سلولی از نوع نکروز می‌باشد (تصویر ۲).

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر تأثیر دیواره سلولی ساکارومیسس سرویسیه، ساکارومایسس بولاردی و نانو ذرات روی بر رشد رده سرطانی سلول‌های میلوئیدی خون انسان (K562) بررسی شد.

دیواره‌های استخراج شده از هر دو مخمر پروبیوتیکی توانست به طور معنی داری در سطح $p<۰/۰۵$ سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی شوند. البته این مهار رشد وابسته به غلظت مورد استفاده دیواره سلولی و زمان مجاور شدن با رده سرطانی می‌باشد. به طور مشخص گذشت زمان مجاورت اثر مهاری دیواره‌های سلولی کاهش و با افزایش غلظت آن‌ها درصد مهار رشد شلول نیز افزایش می‌یابد. یافته‌های به دست آمده در بررسی حاضر با نتایج کبیری و همکاران (۳۵) مطابقت دارد. این پژوهشگران ثابت کردند که مجاورت رده سرطانی K562 با عصاره سیتوپلاسمی استخراج شده از پروبیوتیک‌های جنس لاکتوباسیلوس سبب مهار رشد در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد. همچنین با یافته‌های Ghoneum و Gollapudi در سال (۱۰) که اظهار داشتند ساکارومیسس سرویسیه می‌تواند رشد اکثر رده‌های سرطانی مانند پستان، زبان، روده و خون را مهار نماید همخوانی دارد. مطالعات اثر ساکارومیسس سرویسیه توسط بنیادی و همکاران (۱۹) و ریکی و همکاران (۳۸) نشان می‌دهد که عصاره و دیواره مخمر دارای خاصیت ضد سرطانی می‌باشند.

در بررسی حاضر مشخص گردید که بیشترین درصد مهار رشد رده سرطانی K562 دیواره‌های سلولی استخراج شده از این دو مخمر با غلظت ۴۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر و در ۱۲ ساعت اول انکوباسیون می‌باشد. بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که در این غلظت تأثیر دیواره سلولی ساکارومیسس بولاردی در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۸/۳۱ ± ۹۸/۵، ۷/۰۱ ± ۸۱/۱۵، ۶ ± ۷۳ و ۵/۵ ± ۶۲/۹ به طور معنی‌داری در سطح $p<۰/۰۵$ نسبت به دیواره سلوی مخمر ساکارومایسس سرویسیه بیشتر می‌باشد.

با توجه به اینکه تا کنون تحقیق پیرامون استفاده همزمان ترکیبات استخراج شده از پروبیوتیک‌ها با نانوذرات در دنیا وجود ندارد لذا دانش ما در مورد مکانیسم این روش درمانی ناقص بوده و به نظر می‌رسد مطالعات بیشتری باید انجام گردد تا به طور دقیق دلیل این پدیده مشخص گردد. همچنین پیشنهاد می‌گردد که با روش‌های مولکولی به طور دقیق ژن‌های دخیل در این مهار رشد مشخص گردند.

آپوپتوز، یک فرآیند تنظیم شده مرگ سلولی است که باعث حذف آسیب‌ها یا سلول‌های ناخواسته، بدون آسیب در ارگانیسم‌های چند سلولی می‌شود. این فرآیند به منظور کنترل رشد و ثابت نگاه داشتن شرایط محیط داخل بدن انجام می‌گردد و از طریق تغییرات ریخت‌شناسی از جمله چروکیدگی سلولی، متراکم شدن کروماتین و تشکیل اجسام آپوتیک مشخص می‌شود (۳۸). نکروز به دلیل عدم توانایی سلول در نگهداری هومئوستاز و متعاقب آن ورود آب و یون‌های خارج سلولی، سلول و ارگانل‌های داخل سلولی (به صورت برجسته میتوکندری) متورم شده و پاره می‌شوند. بنابراین در بدن موجودات زنده، سلول مرده نکروتیک سبب یک آسیب بافتی گسترده و در نتیجه یک پاسخ التهابی شدید می‌شود (۳۸). با توجه به تجزیه شدن مولکول DNA سلول‌هایی که دچار آپوپتوز می‌گردند، در الکتروفورز حالتی مشابه نردبان مشاهده خواهد شد. بر این اساس در تصویر ۱ حالت نردبانی به طور واضح مشهود بوده و نشان می‌دهد که دیواره سلولی هر دو مخمر سبب القاء آپوپتوز در رده سرطانی K562 می‌شوند. در مقابل اگر سلول دچار نکروز شود مولکول DNA به طور کامل نابود شده و در الکتروفورز تغییراتی مشاهده نخواهد شد. تصویر ۲ نیز نشان می‌دهد که نانوذرات روی با آلقاء نکروز سبب مهار رشد رده سرطانی K562 می‌شوند.

Choi و همکاران (۴۰) اثرات ضد سرطانی چندین گونه Lactobacillus کشته شده توسط حرارت و اجزای محلول باکتری‌ها مثل پلی ساکارید را بررسی نمودند و قطعات DNA سلول‌های سرطانی کولون که توسط پلی ساکارید Lactobacillus acidophilus تیمار شده بود، روی ژل آگارز برده شد و قطعات اسمیری DNA بر روی ژل نمایش داده شد. این نتایج نشانگر این بود که بعضی از جمعیت‌های سلول به طریق نکروز از میان رفته‌اند. سپس آن‌ها تیمارها را با PI رنگ آمیزی اختصاصی و با میکروسکوپ فلورسانت مشاهده کردند و به این نتیجه رسیدند، چون

قطعاتی که با PI رنگ گرفته‌اند بسیار ناچیز هستند، پس پلی ساکارید باکتری مذکور باعث القای آپوپتوز شده است. در بررسی دیگر توسط موسوی و همکاران (۴۱) نشان داده شد که ژن نوکلئوستمین بیان بالایی در سلول‌های K562 دارد. تیمار سلول‌های K562 با SiRNA اختصاصی نوکلئوستمین در غلظت ۲۰۰ نانو مولار پس از ۴۸ ساعت، سطح mRNA نوکلئوستمین را در مقایسه با سلول‌های کنترل به میزان ۵۵ درصد مهار کرد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که همراه نمودن دیواره سلولی مخمرهای ساکارومایسس سرویسیه و ساکارومایسس بولاردی با نانوذرات روی می‌تواند سبب مهار رشد رده سرطانی K562 در شرایط آزمایشگاهی گردد. همچنین این بررسی نشان داد که می‌توان به آینده استفاده از ترکیبات طبیعی نظیر ترکیبات به دست آمده از پروبیوتیک‌ها جهت مهار رشد و توسعه انواع مختلف سرطان‌ها امیدوار بود. در نهایت پیشنهاد می‌گردد که تاثیر ضد توموری ترکیبات مورد استفاده در این بررسی در مدل حیوانی نیز مورد مطالعه قرار گیرد تا نتایج آن بتواند برای استفاده بالینی تعمیم داده شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه و مهاباد ابراز می‌دارند.

منابع

1. Thomas RK. High throughout oncogene mutation profiling in human cancer. Natu Gen 2007;39: 347-51.
2. Wollowski I, Rchkemmer G, Beatricel L, Poll Z. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am J clin Nutr 2011;73:4515-55.
3. Sanders MEA. Probiotics. Food Technol 2009;53(11):67-77.
4. Espinoza YR, Navarro YG. Non-dairy probiotic products. Food Microbiol 2008;27(1):1-41.
5. Maroufi B, Sussan AK, Kariminia A, Naderimanesh H. The effect of vitamin E on splenocytes apoptosis of gamma-irradiated BALB/c mice. Iranian J Aller Asth Immunol 2005;4:77-82.
6. Mirzaii H, Mehdinia J. The use of probiotic for treatment and prevention of digestive disease. J Phys Lab 2006;23:22-7. Persian.
7. Mojab F, Mirdilami A. Probiotics and pribiotics. J Raz 2011;12:25-30. Persian.
8. Hart AL, Kamm MA. Mechanism of action of probiotics. Recent advances. Inflamm Bowel Dis 2009;15:300-10.
9. Homayoni A, Ehsani MR, Azizi A. Selection of appropriate probiotic strains for use in ice cream, in: proceedings of the third IDF international symposium on ice cream. Germany; 2004. p.124.
10. Ghoneum M, Gollapudi S. Phagocytosis of Candida albicans by metastatic and non metastatic human breast cancer cell lines in vitro. Cancer Det Pre 2004;28:17-26.
11. Lee A, Whyte MKB, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. Mol Biol 1993;54:283-8.
12. Yezhelyev MV, Gao X, Xing Y. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. Lanc Oncol 2006;7:6567-667.
13. Abrahamse SL, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration in isolated ret colon of rats. Carcin 1999;38:76-83.
14. Brady Lj, Callader DD, Busta FF. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. J Natr 2000;130:410-4.
15. Salminem S, Tanaka R. Annual review on cultured milks and probiotics. IDF Nutr 1995;4:47-50.
16. Lee YK, Puong KY, Ouwehand H, Salminen S. Displacement of bacterial pathogens from mucus and caco- 2 cell surface by Lactobacilli. J Med Microbiol 2003;52:9930-5.
17. Saeedi Asl M, Safari R. Inhibitory effects of Saccharomyces cerevisiae on B1 and B2 aphlatoxin in medium. Comp Biopathol 2011;2:223-2. Persian.
18. Mroti Sharif Abad M, Salehi A, Mehrnia M. Effects of Saccharomyces boulardi on liver enzyme after challenge with Salmonella typhimorium in rat. First international probiotics and special product conferences, Tehran, Iran. Persian.
19. 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. (Persian).
20. Rashedi H, Amoabedini G, Eskandari S. Nanobiotechnolohy. 1st Ed. Tehran: Tehran University; 2010. P. 1-144. (Persian).
21. KochekZadeh A. Commercial nanoparticles for cancer treatment. Biotechnol 2010;6 :67-81. (Persian).
22. Koebnick C, Wagner I, Leitzmann P, Stern U, Zunft HJ. Probiotic beverage containing Lactobacillus casei Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. Can J Gastroenterol

2003;17:655-59.
23. Magnelli P, Cipollo J.F and Abeijon C. A refined method for the determination of Saccharomyces cerevisiae cell wall composition and beta-(1, 6)-Dglucan fine structure. Anal Biochem 2011;301: 136-50.
24. Dodi M, Naghsh N, Heidarpoor A. Effects on silver nanoparticles on pathogenic gram positive bacilli that resistance on broad spectrum of beta lactam Antibiotics. J Lab Sci 2011;5(2):345-61. (Persian).
25. Abadi MA. Leukemia (blood cancer). 1st Ed. Mashhad: Kerdegari publisher; 2008. P.11-55. (Persian).
26. Chang KH, Park JS, Choi JH, Kim CJ, Paik HD. Cytotoxic effects of partially purified substances from Bacillus polyfermenticus SCD supernatant toward a Varity of tumor cell lines. Food Sci Biotechnol 2007;16:163-6.
27. Dwyer M. Multifacted approach to the treatment of bcr-abl-positive leukemias. The Oncologist 2002;7:34-8.
28. Mahbad A, Moidi N. Essential of hematology. 1st th Ed. Tehran: Eshraghie; 2008. P. 243-67. (Persian).
29. Tukmechi A, Rahmati Andani HR, Manaffar R, Sheikhzadeh N. Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated Saccharomyces cerevisiae enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Fish Shellfish Immunol 2011; 30:923-8.
30. Rodriguez A, Cuesta A, Ortuno J, Esteban MA, Meseguer J. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole saccharomyces cerevisiae strain administered by died to seabream (Sparus aurata L.). Vet Immunol Immunopathol 2003;96:183-92.
31. Deininger MV, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology og chronic myeloid Leukemia. Blood, 96: 3343-3356.distinctcaspase cascades in death recepto and stress-activated apoptosis. Ex Cell Res 2000; 256: 27-33.
32. Cortes J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. Hematol Oncol Clin North 2004;18:569-84.
33. Agrawal PB, Pandi AB. Isolation of alphaglucosidase from Saccharomyces cerevisiae: Cell disruption and adsorption. Biochem Engin J 2003;15:37-45.
34. Maria S, Gunner M, Rangne F, Jaana M, Tiina M. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. J Biotechnol 2000; 84(3):197-215.
35. Kabiri F, Nejati V, Tukmechi A, Delirezh N, Nikbakhsh P. Inhibitiory properties of cytoplasmic extract of Lactobacilli isolated from common carp intestine on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: an in vitro study. Tehran Uni Med J 2011;68:691-8. (Persian).
36. Chang KH, Park JS, Choi JH, Kim CJ, Paik HD. Cytotoxic effects of partially purified substances from Bacillus polyfermenticus SCD supernatant toward a Varity of tumor cell lines. Food Sci Biotechnol 2007;16:163-6.
37. Kim J, Woo HJ, Kim YS, Kim KH, Lee HJ. Cell cycle dysregulation induced by cytoplasmic of Lactococcus lactis ssp. lactis in SNUC2A, a colon cancer cell line. Nutr Cancer 2003;46:197-201.
38. Riki M, Farokhi F, Tukmechi A. The best time of cytotoxicity for extracted cell wall from Lactobacillus casei and L. paracasei in K562 cell line. Tehran Uni Med J 2013;70(11):691-699. (Persian).
39. Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell death. Onc 2004;23:2766-73.
40. Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S, Kim SH. Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. Lett Appl Microbiol 2006;42:452-8.
41. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-hydrogenkwadaphnin in K562 and Jurkat cells is reduced by guanosine. J Biochem Mol Biol 2005;38:391-8.

Growth inhibition of K562 cell line by extracted cell wall from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. boulardi* as probiotic with zinc nanoparticles

Salar Mokriani, Department of biology, Faculty of Basic science, Urmia Islamic Azad University, Urmia, Iran.
***Amir Tukmechi,** Department of Pathobiology and Quality Control, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran (*Corresponding author).
Majid Nojavan, Department of biology, Faculty of Basic science, Urmia Islamic Azad University, Urmia, Iran.

Abstract

Background: Chronic myeloid leukemia is a common cancer in human, so the goal of this study was the use of natural compound such as cell wall obtained from Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae) and Saccharomyces boulardi (S. boulardi) and zinc nanoparticles on the growth inhibition of K562 cell line.
Methods: For cell wall preparation, both yeasts were cultured in a basic medium at aerobic condition and 28 °C. Then the medium was centrifuged and precipitately washed with sterile buffer and the cells disrupted by sunicator. Also zinc nanoparticles were prepared by biological method. Anti-cancer property of different concentrations of the yeasts' cell wall with zinc nanoparticles were assayed by MTT and electrophoresis methods.
Results: The results showed that *S. boulardi* cell wall significantly ($p=0.029$) inhibits the growth of K562 cell line compared to *S. cerevisiae*. Also zinc nanoparticles significantly ($p=0.021$) inhibit K562 cell line. Results revealed that combination the zinc nanoparticles with both yeasts' cell wall decreased anti-cancer property but this was not significant at the level of $p<0.05$.
Conclusion: Based on this finding it should be concluded that combination of zinc nanoparticles with Saccharomyces cell walls could inhibit the growth of K562 cell line *in vitro*. But these anti-cancer properties would warrant further study on the clinical application of yeast cell wall.

Keywords: Saccharomyces cerevisiae, S. boulardi, Zinc nanoparticles, Growth inhibition, K562 cell line.