مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۸، شماره۹، دی۱۳۹۲(شماره پی در پی۸۱)

ارزیابی اثرات آپوپتوتیک دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی استخراج شده از مخمر *ساکارومیسس سرویسیه* بر رده سرطانی K562

فرزانه بنیادی[۱]*، وحید نجاتی[۱]، امیر توکمه چی[۲]، شاپور حسن زاده[۳]، ملیحه ریکی[۱]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران،[۲]گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه،ایران، [۳]گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اثرات مفیدی بر سلامتی ایجاد می‌کنند که یکی از آنها، اثرات ضد توموری است. هدف این مطالعه ارزیابی خاصیت مهاری دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی مخمر ساکارومیسس سرویسیه به عنوان یک پروبیوتیک بر رده سرطانی K562 (رده لوسمی میلوئیدی) و بررسی اثرات آپوپتوتیک ایجاد شده در آن رده بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ابتدا مخمر ساکارومیسس سرویسیه کشت داده شده و سپس به کمک سونیکاتور خرد و در نهایت دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی آن جدا شدند. سپس غلظت های مختلف از دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی تهیه شدند. درصد مهار رشد ترکیبات حاصل بر رده سرطانی K562 در زمان‌های مختلف (۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) به روش MTT سنجیده شد. هم‌چنین برای بررسی آپوپتوز و نکروز از آزمون قطعه قطعه شدن DNA به روش الکتروفورز استفاده شد. داده‌ها با آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: خاصیت ضد توموری عصاره سیتوپلاسمی با گذر زمان به طور معنی‌داری افزایش یافت، در حالی که تأثیر دیواره سلولی در طول زمان کاهش معنی‌داری داشت($p<۰/۰۵$). هم‌چنین ترکیبات حاصل از مخمر ساکارومیسس سرویسیه باعث القای نکروز و درصد کمی آپوپتوز، در رده سرطانی K562 شدند.

نتیجه‌گیری: دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی مخمر ساکارومیسس سرویسیه در حالت وابسته به زمان بر سلول‌های سرطانی K562 اثر مهاری داشته و باعث القای نکروز و آپوپتوز در آن می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: رده سلولی K562، ساکارومیسس سرویسیه، دیواره سلولی، عصاره سیتوپلاسمی، اثرات آپوپتوتیک

***نویسنده مسئول**: **فرزانه بنیادی**، آذربایجان غربی، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
Email: farzane.bonyadi@yahoo.com

مقدمه

سرطان عبارت از یک بیماری شناخته شده است که در اثر تجمع نواقص ژنتیکی ایجاد می‌گردد(۱). وقوع جهش‌های متوالی منجر به تقویت و افزایش پتانسیل رشد سلول‌ها می‌گردد. در این حالت توده توموری از چندین مجموعه سلولی که دارای ویژگی‌های متفاوتی هستند و ساختار ناهمگونی دارند، تشکیل می‌شود. بنابراین سلول سرطانی قادر نیست مشابه یک سلول معمولی و طبیعی در بدن و بافت مربوط به خود انجام وظیفه کند، علاوه بر این با رشد غیر طبیعی خود به سلول‌های مجاور نیز آسیب می‌رساند(۲). سلول K562 اولین رده لوسمی میلوئیدی شناخته شده است که از نوع اریترولوکمیا بوده و اولین بار از زن ۵۳ ساله مبتلا به لوسمی میلوئید مزمن گرفته شده است. این سلول‌ها از نوع غیر چسبنده و گرد بوده که جابه‌جایی بین دو ژن bcr و ab1 در آن رخ داده است(۳).

آپوپتوز به معنی مرگ برنامه‌ریزی شده ژنتیکی سلول بوده که نقش مهمی در بسیاری از شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک ایفاء می‌کند. اگرچه اغلب مرگ سلولی را برای سهولت به دو دسته، مرگ برنامه‌ریزی شده(آپوپتوز)و مرگ تصادفی(نکروز) تقسیم می‌کنند، ولی مطابق یک طبقه‌بندی حدود ۱۱ نوع مرگ سلولی وجود دارد که برخی از آنها؛ آپوپتوزیس، نکروزیس، اتوفاژی، انکوزیس و پیروپتوزیس می‌باشند(۴).

پروبیوتیک‌هامیکروارگانیسم‌های زنده‌ای بوده که در صورت مصرف به وسیله انسان یا حیوان، با ایجاد تعادل در فلور میکروبی روده باعث ایجاد اثرات مفید بر سلامتی میزبان می‌شوند(۵). مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها می‌تواند خاصیت ضد سرطانی داشته باشد و این عمل با خنثی‌سازی اثر آسیب رساننده‌های ژنی در روده صورت می‌گیرد. پروبیوتیک‌ها می‌توانند نقش مؤثری در جلوگیری از بیماری‌ها از جمله سرطان روده بزرگ از طریق کاهش غلظت آنزیم‌های مدفوع و کاهش نمک‌های صفراوی و جذب سرطان-زاهای مضر، داشته باشند(۶).

مصرف *ساکارومیسس‌ها* از راه خوراکی، می‌تواند از بیماری‌های معده و روده جلوگیری کند و به مانند آنتی‌بیوتیک‌ها برای اسهال، اسهال رایج کودکان، اسهال مسافران و دیگر بیماری‌های روده‌ای مانند کولیت و زخم‌های روده‌ای استفاده شوند(۷). ترکیبات جدا شده از *ساکارومیسس سرویسیه* نیز دارای فعالیت ضد میکروبی بوده و باعث افزایش تعداد مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و ایمنی بدن شده و مانند آنتی بیوتیک عمل می‌کنند(۸). در سالیان اخیر توجه دانشمندان به منابع غذایی پیشگیری کننده بیشتر شده و بحث پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها اهمیت فراوانی در درمان‌های غذایی سرطان پیدا کرده است(۹). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که *ساکارومیسس سرویسیه* کشته شده با حرارت، می‌تواند آپوپتوز و مرگ سلولی را در رده‌های سرطانی پستان(MCF-7، ZR-75-1 و HCC70)، القاء

کند(۱۰). بررسی‌های انجام گرفته نشان می‌دهد که برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک قادرند رشد سلول‌های توموری القاء شده(شیمیایی و پیوندی) را در جوندگان مهار نمایند(۱۱). هم‌چنین مطالعه انجام گرفته بنیادی و همکاران(۲۰۱۲) مهار رشد سلول‌های K562 به وسیله دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی مخمرهای پروبیوتیکی *ساکارومیسس سرویسیه* و *ساکارومیسس بولاردی* را در حالت وابسته به دوز ثابت کرد(۱۲). در این مطالعه تنها وجود اثرات ضدتوموری ترکیبات حاصل از مخمر *ساکارومیسس سرویسیه* ثابت گردید، ولی نوع مرگ سلولی حاصل در سلول‌های سرطانی بررسی نشد. مرور منابع علمی موجود نشان می‌دهد که تاکنون تحقیقی در خصوص استفاده از عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی مخمر *ساکارومیسس سرویسیه* برای ارزیابی اثرات آپوپتوتیک در رده سرطانی K562 یافت نشده است. بر این اساس هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر عامل زمان در خاصیت مهاری دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی مخمر *ساکارومیسس سرویسیه* بر رده سرطانی K562 و بررسی اثرات آپوپتوتیک ایجاد شده در آن رده، در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، مخمر *ساکارومیسس سرویسیه* در محیط کشت حاوی عصاره مخمر به همراه ۵ درصد گلوکز و ۱ درصد K_2HPO_4 به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار و با دور ۱۳۰ rpm، کشت داده شد. پس از رشد، مخمرها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل دو مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل، شستشو داده شد(۱۳).

برای شکستن مخمرها از سونیکاتور (تامی، ژاپن) استفاده گردید. لذا سوسپانسیونی از سلول‌های مخمری در بافر فسفات سدیم سرد(۰/۱ مولار، pH=۷/۲) تهیه و سپس به کمک دستگاه با دامنه ۶۰ درصد به مدت دو دقیقه شکسته شدند(۱۴). در نهایت محلول حاصل با دور g× ۵۰۰ به مدت یک دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله در واقع دیواره سلولی بوده و مایع رویی به عنوان عصاره سیتوپلاسمی در نظر گرفته شد. سپس رسوب حاصله (حاوی دیواره سلولی) با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل سه مرتبه شستشو داده شد و بعد از لیوفیلیزه شدن، تا زمان استفاده در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مایع رویی(حاوی عصاره سیتوپلاسمی) پس از سنجش مقدار پروتئین آن به روش بیورت(کیت سنجش پروتئین، پارس آزمون، ایران) (۱۵) برای تهیه غلظت‌های مختلف عصاره سیتوپلاسمی، جمع‌آوری شده و در منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۱۶).

رده سرطانی K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران(C122) تهیه و در محیط RPMI 1640 [1] در حضور۱۰ درصد سرم جنین گاوی(گیبکو،

1- Roswell Park Memorial Institute Medium(RPMI)

انگلستان)، ۱۰۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین در انکوباتور با ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد(۱۵).

برای به دست آوردن درصد سلول‌های مرده از آزمون MTT[1] استفاده شد(۱۷). به طور خلاصه، سلول‌های K562 (با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول) به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد. سپس رقت‌های مختلف عصاره سیتوپلاسمی و دیواره سلولی(۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه گردید و پلیت‌ها به مدت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرم خانه‌گذاری شدند(۱۵). پس از پایان زمان انکوباسیون، محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر PBS) به تمامی چاهک‌ها افزوده شده و میکروپلیت به مدت چهار ساعت گرم خانه‌گذاری گردید. در پایان کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن محلول DMSO[2] خالص به چاهک‌ها حل شدند و سرانجام شدت نور جذب شده در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (استات فاکس، آمریکا) ثبت گردید. درصد سلول کشی عصاره‌ها با فرمول مربوطه محاسبه شد(۱۸).

بررسی وقوع آپوپتوز یا نکروز با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا سلول‌های تیمار شده با دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی مخمر *ساکارومیسس سرویسیه* تحت تأثیر بافر لیز کننده EDTA قرار گرفتند. پس از سانتریفوژ، DNA با استفاده از ترکیب فنل ـ کلروفورم ـ 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 Kb ۱ بارگذاری شد(۱۹).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

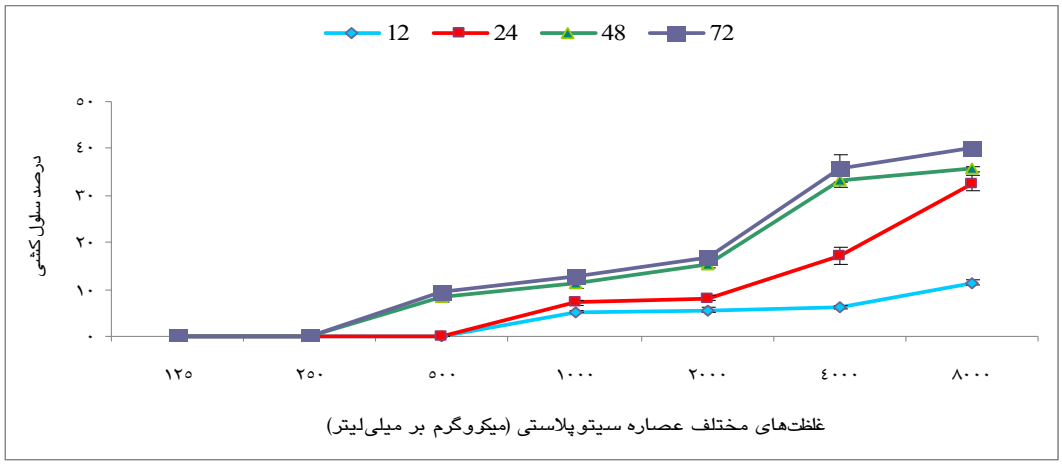
در بررسی حاضر مشخص شد که خاصیت سلول‌کشی عصاره سیتوپلاسمی وابسته به زمان بوده و با افزایش زمان، درصد مهار رشد نیز به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p<0/05$)(نمودار ۱). در حالی که نتایج مربوط به دیواره نشان می‌دهد که سلول‌کشی آن با گذشت زمان به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($p<0/05$) (نمودار ۲).

بر اساس تصاویر مشاهده شده در تمامی زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مرگ سلولی ناشی از عصاره سیتوپلاسمی مخمر وابسته به دوز بوده و با افزایش دوز میزان سلول کشی نیز افزایش می‌یابد.

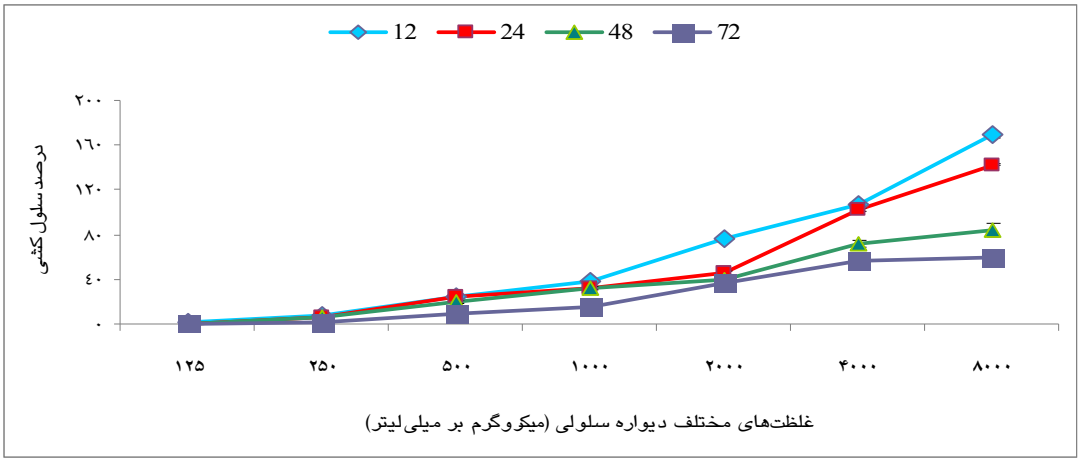
1- 3-(4,5-Dimethyl Thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide
2-Dimethyl Sulfuxide

همان طور که مشاهده می‌شود با کاهش غلظت، تأثیر عصاره سیتوپلاسمی بیشتر شده و باند حاصل از DNA کم رنگ تر می‌گردد. می‌توان گفت که نوکلئازهای موجود در عصاره سیتوپلاسمی مستقیما بر DNA سلول‌های سرطانی اثر گذاشته و باعث هضم آن، می‌شوند (تصویر ۱).

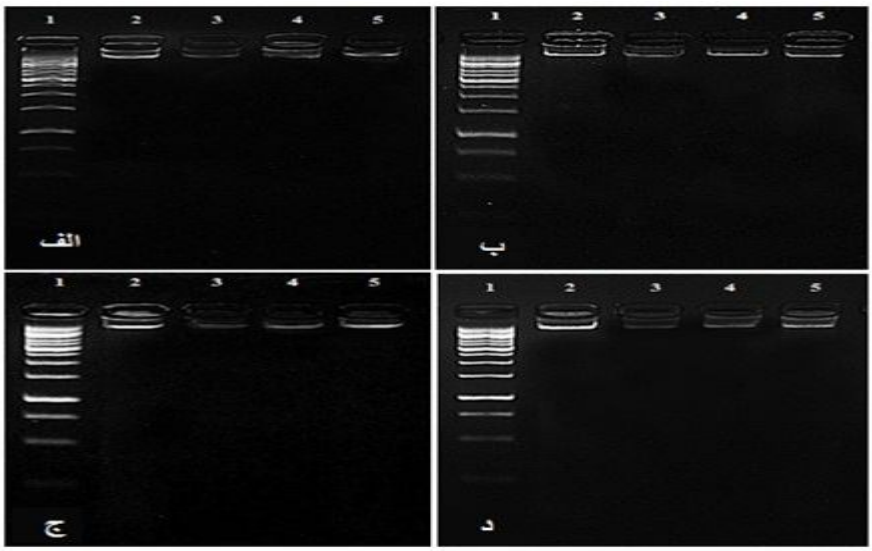
تصاویر دیواره سلولی *ساکارومیسس سرویسیه* نشان دهنده مرگ سلولی به صورت نکروز در رده K562 است. حالت گسترش (اسمیر) و در نتیجه نکروز سلولی در تیمارهای ۱۲ و ۲۴ ساعته به خوبی مشخص است. در تیمار ۴۸ ساعته کمی آپوپتوز نیز به همراه نکروز دیده می‌شود. تیمار ۷۲ ساعته بیانگر گسترش و در نتیجه نکروز سلولی است (تصویر ۲).



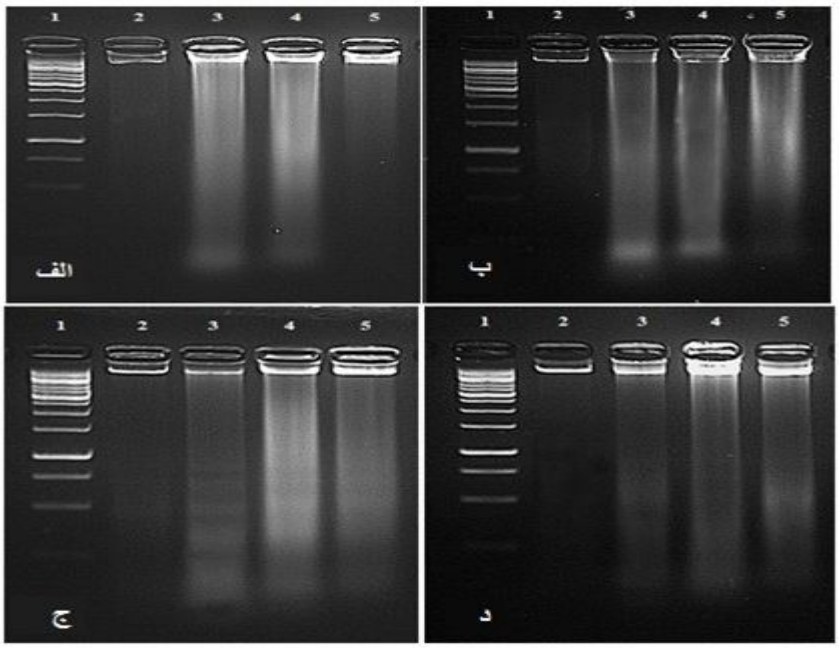
نمودار ۱. درصد تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره سیتوپلاسمی *ساکارومیسس سرویسیه در زمان‌های* مختلف (۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر رده سرطانی K562



نمودار ۲. درصد تأثیر غلظت‌های مختلف دیواره سلولی *ساکارومیسس سرویسیه در زمان‌های* مختلف (۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر رده سرطانی K562.



تصویر ۱: بررسی وضعیت مرگ سلولی رده K562 تحت تأثیر عصاره سیتوپلاسمی. الف) زمان ۱۲ ساعت، ب) زمان ۲۴ ساعت، ج) زمان ۴۸ ساعت، د) زمان ۷۲ ساعت. باند ۱: مارکر 1 Kb، باند ۲: کنترل منفی، باند ۳: عصاره سیتوپلاسمی با غلظت ۸۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، باند ۴: عصاره سیتوپلاسمی با غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، باند ۵: عصاره سیتوپلاسمی با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر.



تصویر ۲: بررسی وضعیت مرگ سلولی سلول‌های K562 تحت تاثیر دیواره سلولی. الف) زمان ۱۲ ساعت، ب) زمان ۲۴ ساعت، ج) زمان ۴۸ ساعت، د) زمان ۷۲ ساعت. باند ۱: مارکر 1 Kb، باند ۲: کنترل منفی، باند ۳: دیواره سلولی با غلظت ۸۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، باند ۴: دیواره سلولی با غلظت ۴۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، باند ۵: دیواره سلولی با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر.

بحث

در حال حاضر سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر انسان در جوامع مختلف می‌باشد، به طوری که محققان همواره تلاش می‌کنند تا از بروز این عارضه پیشگیری نموده یا آن را درمان نمایند. برای مثال، می‌توان به بررسی‌های مختلفی اشاره کرد که پیرامون مهار رشد رده سرطانی K562 انجام شده است. زونگ و همکاران(۲۰۱۰) تأثیر غلظت‌های مختلف گریزوفولوین (داروی ضد قارچی) را بر مهار رشد رده K562 در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. آنها دریافتند که ۲۴ ساعت پس از مجاور شدن این دارو با سلول سرطانی تکثیر آن کاهش یافته و این مهار رشد وابسته به غلظت دارو و زمان است. هم‌چنین آنها ثابت کردند که مکانیسم تأثیر گریزوفولوین بر رده K562، به صورت توقف چرخه سلولی در مرحله G2/M و نهایتاً مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوزیس) می‌باشد(۲۰).

از جمله ترکیبات طبیعی دیگری که دارای خواص ضد توموری علیه K562 می‌باشند، می‌توان به کورکومین و امودین اشاره کرد. این ترکیبات قادر هستند در شرایط آزمایشگاهی رشد رده سرطانی K562 را بسته به غلظت، مهار و سبب القاء آپوپتوزیس در آن گردند(۲۲ و ۲۱).

امروزه با شناخت عملکرد پروبیوتیک‌ها در حفظ سلامت و اهمیت آنها در پیشگیری از بیماری‌ها، از این میکروارگانیسم‌ها به منظور ارتقای سطح سلامت بیماران استفاده می‌شود(۶). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ به وسیله لی و همکاران صورت گرفت معلوم شد که عصاره سیتوپلاسمی *Lactobacillus casei* و *Bifidobacterium animalis* تأثیر مستقیمی بر مهار رشد رده سلول‌های سرطانی دارند (۱۸). در سال ۲۰۰۳ نیز در مطالعه صورت گرفته به وسیله کیم و همکاران، تأثیر ۱۰ پروبیوتیک بر ۱۱ رده سلولی از جمله K562 بررسی شده است. نتایج حاصل از مطالعه نشان دهنده مهار رشد سلول‌های K562 به وسیله عصاره‌های سیتوپلاسمی بوده، در صورتی که پپتیدوگلیکان استخراج شده از آنها عدم مهار را نشان داده‌اند و سلول‌های کامل پروبیوتیک، رشد درصد کمی از سلول‌های K562 را مهار کرده‌اند(۲۳). مخمرها نیز از جمله پروبیوتیک‌هایی هستند که دارای خواص ضد سرطانی می‌باشند. مطالعه صورت گرفته به وسیله بنیادی و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی *ساکارومیسس سرویسیه* می‌تواند به طور معنی‌داری رشد رده K562 را مهار نماید که این مهار رشد وابسته به دوز می‌باشد(۱۲). بررسی منابع نشان دادند که تاکنون هیچ تحقیقی در خصوص بررسی تأثیر گذر زمان در خاصیت ضدتوموری دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی انجام نشده است. بنابراین هدف این مطالعه بررسی چگونگی تغییر خاصیت ضدتوموری این ترکیبات در گذر زمان می‌باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که مهار رشد رده سرطانی K562 به وسیله عصاره سیتوپلاسمی علاوه بر این که وابسته به دوز بوده، وابسته به زمان نیز

می‌باشد و با گذر زمان افزایش می‌یابد. در حالی که این حالت در مورد دیواره سلولی صادق نبوده و با گذر زمان درصد مهار رشد کاهش می‌یابد. این یافته با نتایج به دست آمده به وسیله زونگ و همکاران (۲۰۱۰) که وابسته به زمان بودن مهار رشد رده سرطانی K562 را نشان می‌دهد، هم‌خوانی دارد. هم‌چنین یافته‌های حاضر با نتایج حاصل از بررسی گونیوم و گولاپودی در سال ۲۰۰۵ که ثابت کردند، *ساکارومیسس سرویسیه* می‌تواند رشد اکثر رده‌های سرطانی انسان (شامل پستان، زبان، روده و خون) مهار نماید، هم‌خوانی دارد(۲۴).

در سال ۲۰۰۶ نیز تحقیقی به وسیله چویی و همکاران پیرامون اثرات ضد سرطانی چندین گونه *Lactobacillus* کشته شده به وسیله حرارت و اجزای محلول باکتری‌ها مثل پلی‌ساکارید انجام گرفت، که در بررسی قطعات DNA سلول‌های سرطانی کولون تیمار شده به وسیله پلی‌ساکارید *Lactobacillus acidophilus* روی ژل، قطعات اسمیری DNA تشخیص داده شد که نشان دهنده نکروز در جمعیت سلولی می‌باشد(۲۵). بررسی‌ها نشان دادند که تاکنون مطالعه‌ای در زمینه ارزیابی اثرات آپوپتوتیک دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی مخمر *ساکارومیسس سرویسیه* بر رده-های سرطانی صورت نگرفته است. بنابراین هدف این قسمت از مطالعه، بررسی نوع مرگ سلولی ایجاد شده در سلول‌های K562 به وسیله این ترکیبات می‌باشد.

در مطالعه حاضر نتایج مربوط به ژل الکتروفورز نشان دهنده حالت اسمیر و نکروز سلولی در تیمار مربوط به دیواره است. البته در زمان ۴۸ ساعت آپوپتوز کمی به همراه نکروز دیده شد. این نتایج با نتایج حاصل از بررسی چویی و همکاران(۲۰۰۶) و مطالعه زونگ و همکاران(۲۰۱۰) مطابقت دارد. بر اساس مرور منابع علمی، دلیل این امر هنوز به درستی ثابت نشده است، اما برخی از مطالعات مکانیسم خاصیت ضد توموری مخمرها را به بتا گلوکان و مانان موجود در دیواره سلولی آنها نسبت می‌دهند(۲۶). این ترکیبات سبب تحریک ایمنی ذاتی و متعاقب آن افزایش فعالیت ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های کشنده طبیعی [1] در جهت سنتز و ترشح سایتوکین‌ها شده و از این طریق خاصیت ضد توموری خود را القاء می‌نمایند(۲۷).

نتایج مربوط به ژل الکتروفورز عصاره نیز ضعیف شدن باندهای DNA سلول‌های K562 را بعد تیمار نشان می‌دهد که علت این امر هنوز به خوبی مشخص نشده است، اما مرور منابع از وجود یکسری نوکلئازها در عصاره سیتوپلاسمی مخمر *ساکارومیسس سرویسیه* خبر می‌دهند که می‌توانند باعث هضم و از بین بردن DNA سلول‌های K562 شوند. برای مثال گفته می‌شود که دو آنزیم Apn1 و Apn2 در *ساکارومیسس سرویسیه* وجود دارند که دارای فعالیت ۳ـ فسفو دی استرازی هستند به طوری که Apn1 بیشتر از ۹۰ درصد این فعالیت را عهده‌دار بوده(۲۸) و Apn2 که دارای فعالیت ۵- فسفودی استرازی نیز هست، ۱۰ درصد این فعالیت را عهده‌دار

1-Natural Killer cells(NK Cells)

می‌باشد(۲۹). علاوه بر آن یکسری نوکلئازها در مخمر وجود دارند که در رونویسی کروموزومی و تعمیر آسیب DNA آن نقش دارند و به طور مداوم فعالیت اندونوکلئازی و اگزونوکلئازی را انجام می-دهند(۳۰). این نوکلئازها نیز می‌تواند دلیلی برای شکسته شدن و خرد شدن DNA سلول‌های K562 باشند.

نتیجه‌گیری

در مجموع این مطالعه نشان داد که دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی مخمر *ساکارومیسس سرویسیه* در حالت وابسته به زمان بر سلول‌های سرطانی K562 اثر مهاری داشته و باعث القاء نکروز و آپوپتوز در آن می‌شوند. لازم به ذکر است انجام مطالعات بیشتر در جهت تجزیه شیمیایی دیواره سلولی و عصاره سیتوپلاسمی مخمرها و تشخیص مکانیسم دقیق تأثیر و استفاده بالینی از آنها، پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر، حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی می‌باشد. نویسندگان این تحقیق مراتب تقدیر و تشکر خود را از پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی و دانشکده علوم دانشگاه ارومیه به خاطر حمایت مالی ابراز می‌دارند.

REFERENCES

1.Migliore L, Coppedè F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. Mutat Res 2002; 512: 135-53.
2.Go VL, Wong DA, Butrum VL, Wong DA, Butrum R. Diet, nutrient and cancer prevention. J Nutr 2001; 139: 3121-6.
3.Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG. K562 - A human erythroleukemic cell line. Int J Cancer 1979; 23: 143-7.
4.Tait J. Imaging of Apoptosis. Eur J Nucl Med 2008; 49: 1573-9.
5.Stanton C, Meehan H. Market potential for probiotics. Am J Clin Nutrit 2001; 48: 132-5.
6.Hart AL, Kamm MA. Mechanism of action of probiotics. Recent advances. Inflamm Bowel Dis 2009; 15: 300-10.
7.Htwe K, Yee KS, Tin M, Vandenplas Y. Effect of *Saccharomyces boulardii* in the Treatment of Acute Watery Diarrhea in Myanmar Children: A Randomized Controlled Study. Am J Trop Med Hyg 2008; 78: 214-6.
8.Kaiser AB, Kernodle D. Synergism between poly-(l - 6)-13n-glucopyranose glucana and cefazolin in prophylaxis of staphylococcal wound infection in guinea pig model. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2449-51.
9.Shida K. Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with Lactobacillus casei to produce cytokines and augment –natural killer cell activity. Clin Vaccine Immunol 2006; 13: 997-1003.
10.Ghoneum M, Gollapudi S. Phagocytosis of *Candida albicans* by metastatic and non metastatic human breast cancer cell lines *in vitro*. Cancer Detect Prev 2004; 28: 17-26.
11.Lee JW, Shin JG, Kim EH, Kang HE, Yim IB., Kim JY, et al. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of Lactobacillus casei and *Bifidobacterium longum*. J Vet Med Sci 2004; 5: 41-8.
12.Bonyadi 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. Pharm Sci 2012; 18; 69-78.
13.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 Immun 2011; 30: 923-8.
14.Agrawal PB, Pandi AB. Isolation of alphaglucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*: Cell disruption and adsorption. Biochem Ene J 2003; 15: 37-45.
15.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. T U M J 2011; 68: 691-698.
16.Magnelli P, Cipollo JF, Abeijon C. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and beta-(1, 6)-Dglucan fine structure. *Analytical Biochemistry* Biochem Ene J 2001; 301: 136-50.
17.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.
18.Chin-Feng L, Tzu-Ming P. *In vitro* effects of lactic acid bacteria on cancer cell viability and antioxidant activity. J Food Drug Anal 2010; 18: 77-86.
19.Maroufi B, Sussan Ardestani K, Kariminia A, Naderimanesh H. The Effect of Vitamin E on Splenocytes Apoptosis of Gamma-Irradiated BALB/c Mice. Iran J Allergy Asthma Immunol 2005; 4: 77-82.

20.Zhong N, Chen H, Zhao Q, Wang H, Yu X, Ashley M, et al. Effects of Griseofulvin on Apoptosis Through Caspase-3– and Caspase-9–Dependent Pathways in K562 Leukemia Cells: An In Vitro Study. Curr Thera Res 2010; 6: 384-97.
21.Xie J, Que W, Chen M, Sun J, Liu T, Liu H, et al. Antitumor effects of cucurmosin in human chronicmyeloid leukemia occur through cell cycle arrest anddecrease the Bcl-2/Bax ratio toinduce apoptosis. Afr J Pharm Pharacol 2011; 5: 985-92.
22.Chun-Guang W, Jun-Quang Y, Bei.Zhong L, Dan-Ting J, Chong W, Liang Z, et al. Anti-tumor activity of emodin against human chronic myelocytic leukemia K562 cell lines in vitro and *in vivo*. Eur J Pharmacol 2010; 627: 33-41.
23.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.
24.Ghoneum M, Gollapudi S. Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) enhances yeast-induced apoptosis in human breast cancer cells *in vitro*. Anticancer Res 2005; 25: 859-70.
25.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; 452-8.
26.Chan WKD, Cheung CC, Law HKD, Lau YLD, Chan GCD. Ganoderma lucidum polysaccharides can induce human monocytic leukemia cells into dendritic cells with immunostimulatory function. *J* Hematol *&* Oncol 2008; 1: 9.
27.Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. Effect of orally administered β-glucan on macrophage function in mice. Int J Pharm 1990; 12: 675-84.
28.Johnson AW, Demple B**.** Yeast DNA 3-repair diesterase is the major cellular apurinic/apyrimidinic endonuclease: Substrate specificity and kinetics. J Biol Chem 1988; 263: 18017-22.
29.Unk I, Haracska L, Johnson RE, Prakash S, Prakash L. Apurinic endonuclease activity of yeast Apn2 protein. J Biol Chem 2000; 275: 22427-34.
30.Biswas E, Xiu Zhu F, Biswas S. Stimulation of *RTH1* Nuclease of the Yeast *Saccharomyces cere*V*isiae* by Replication Protein A. Biochem 1997; 36: 5955-62.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Evaluation of Apoptotic Effects of Cell Wall and Cytoplasmic Extract from *Saccharomyces cerevisiae* on K562 Cell Line

Bonyadi F[1*], Nejati V [1], Tukmechi A[2], Hasanzadeh SH[3], Riki M[1]

[1]Department of Biology, Urmia University, Urmia, Iran, [2]Department of Pathobiology and Biotechnology, Artemia and Aquatic Animals Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran, [3]Department of Veterinary Histology and Embryology, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 17 April 2013 Accepted: 9 June 2013

Abstract

Background & aim: Probiotics are living microorganisms that have beneficial effects, such as anti-tumor effects on the health. The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of cell wall and cytoplasmic extracts of Saccharomyces cerevisiae as a probiotic cancer Category K562 (myeloid leukemia) and apoptotic effects of this yeast.

Methods: In this experimental study, the Saccharomyces cerevisiae was cultured, and using the micro sonicator the cell wall and cytoplasmic extracts were separated. Then, different concentrations of cell wall and cytoplasmic extracts were prepared. The inhibitory growth percentage of cancer K562 cell line at different times (12, 24, 48 and 72 h) was measured by MTT assay. Apoptosis and necrosis were also evaluated by DNA fragmentation electrophoresis method. The collected dara were analyzed by ANOVA and Tukey test.

Results: Anti-tumor activity of cytoplasmic extracts significantly increased over time, while the impact of anti-tumor activity of the cell wall over time was significantly reduced ($p < 0.05$). The composition of the Saccharomyces cerevisiae also induces apoptosis, and less necrosis at K562 cell line.

Conclusion: This study showed that the cell wall and cytoplasmic extracts of Saccharomyces cerevisiae in a time-dependent had an inhibitory effect on K562 cells and induced necrosis and apoptosis.

Keywords: K562, *S. Cerevisiae*, Cell wall, Cytoplasmic Extract, Apoptotic Effects

[*]**Corresponding Auther: Bonyadi F**, Department of Biology, Urmia University, Urmia, Iran
Email: farzane.bonyadi@yahoo.com