# ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیسیتی عصاره سلولی میکروارگانیسم‌های کفیر بر روی رده سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما

ارغوان فتاحی[۱]، ندا سلیمانی*[۲]

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۰۹/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۱۱/۰۹

## چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** کفیر یک پروبیوتیک کمپلکس از دانه‌های دارای میکروارگانیسم‌هایی نظیر استرپتوکوکسی‌های اسیدلاکتیک، لاکتوباسیل‌های مزوفیلیک اسیدلاکتیک، مخمرهای تخمیرکننده و غیر تخمیرکننده لاکتوز و باکتری‌های اسید استیک است که پژوهش‌های متعددی در زمینه خواص درمانی محصولات پروبیوتیک انجام پذیرفته است. هدف از این مطالعه، اثر سیتوتوکسیسیتی عصاره سلولی میکروارگانیسم‌های کفیر بر روی میزان رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما، به‌عنوان حادترین نوع تومورهای مغزی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، از رده سلولی، سرطانی U87 (گلیوبلاستوما) استفاده شد. بررسی میانکنش سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مختلف عصاره سلولی و بدنه میکروارگانیسم‌های کفیر پس از لیز، موردمطالعه قرار گرفت. میزان تکثیر سلول‌ها با استفاده از تست MTT، در زمانه‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج تست MTT، تیمار با عصاره سلولی میکروارگانیسم‌های کفیر در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعته، بیشترین میزان اثر به ترتیب در غلظت ۰/۰۲۴ و ۰/۰۴۵ میلی‌گرم عصاره و بیشترین میزان اثر بدنه سلولی میکروارگانیسم‌های کفیر در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعته به ترتیب در غلظت ۷ میلی‌گرم مشاهده گردید.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد عصاره سلولی میکروارگانیسم‌های کفیر به‌عنوان یک محصول پروبیوتیک دارای اثر سمیت و کشندگی بیشتری بر سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما دارد. این ترکیب می‌تواند به‌عنوان کاندید جایگزین و یا مکمل درمانی سرطان پیشنهاد و مورداستفاده قرار گیرد.

**کلمات کلیدی**: عصاره سلولی میکروارگانیسم‌های کفیر، گلیوبلاستوما، پروبیوتیک، اثر ضد سرطان

**مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و نهم، شماره اول، ص ۱۹-۱۲، فروردین ۱۳۹۷**

**آدرس مکاتبه**: تهران، گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تلفن: ۲۹۹۰۵۵۱۶-۰۲۱

Email: N_Soleimani@sbu.ac.ir

## مقدمه

تومورهای مغزی و CNS یکی از ده سرطان منتهی به مرگ در ایران است. گلیوما، دسته‌ای از تومورهای درگیرکننده سیستم عصبی مرکزی (CNS) هستند که از تقسیم بی‌رویه سلول‌های نوروگلیا ناشی شده است که مطابق دسته‌بندی سازمان بهداشت جهانی (WHO)، به انواع آستروسیتوما (astrocytoma)، اولیگودندروگلیوما (oligodendroglioma)، گلیومای مختلط (mixed gliomas) مانند اولیگوآستروسیتوما (oligoastrocytoma) و اِپندیموما (ependymoma) دسته‌بندی می‌شوند (۱). در سال ۲۰۱۶ میزان مبتلایان جدید در ایالات‌متحده آمریکا، معادل ۲۳۷۷۰ نفر تخمین زده شده است که از این تعداد ۱۶۰۵۰ نفر جان باخته‌اند (۲). ۸۰ درصد از تومورهای مغزی اولیه بدخیم (Primary malignant brain tumors) و ۳۰ درصد از تمامی تومورهای سیستم عصبی مرکزی را انواع گلیوما ایجاد می‌کنند (۳). گلیوبلاستوما (glioblastoma multiforme) شایع‌ترین و حادترین نوع از تومورهای مغزی بدخیم در بزرگ‌سالان (WHO grade IV)، نوعی از تومورهای سلول‌های آستروسایتیک با علائم بافت‌شناسی از قبیل افزایش میتوز، پلی مورفیسم، تکثیر اندوتلیال (endothelial proliferation) و نکروز می‌باشد و به سرعت به بافت‌های اطراف منتشر می‌شود (۴). روش‌های

[۱] دانشجوی کارشناسی میکروب شناسی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

[۲] استادیار، دکتری باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

مورداستفاده جهت درمان گلیومای حاد، با توجه به نوع، محل بروز و درجه تومور و سلامت عمومی بیمار تعیین می‌شود که جراحی و برداشتن تومور، پرتودرمانی، استفاده از داروهای ضد تشنج (antiepileptic) و کورتیکواستروئیدها، و شیمی‌درمانی با عوامل آلکیلاسیون DNA مانند تموزولومید (temozolomide) از این موارد می‌باشد (۴). درمان گلیوبلاستوما به دلیل وجود سد خونی-مغزی که مانع ورود داروهای شیمیایی به مغز می‌باشد و نیز بازگشت دوباره تومور که ناشی از ویژگی خود-نوسازی سلول‌های بنیادی (cancer stem cells) گلیوما بوده، سبب گردیده که درمان‌های مذکور ضعیف انجام پذیرد و عودهای مکرر بروز نماید (۵، ۶). این عامل موجب شده که میانگین بقای بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما کاهش یابد. اثرات جانبی داروها، وقت‌گیر، پرهزینه بودن و عدم کارآیی کامل این روش‌های درمانی، نیاز به جستجو برای روش‌های جدید و راهکارهایی برای پیشگیری از ابتلا را توجیه می‌کند. با توجه به موارد ذکرشده، ازجمله راهکارهای جایگزین که برای درمان و پیشگیری تومورهای بدخیم مغز و نخاع مطرح است می‌توان به بهره‌گیری از محصولات میکروبی اشاره کرد. امروزه نقش پروبیوتیک‌ها در درمان و پیشگیری از سرطان‌ها بیش‌ازپیش موردتوجه قرار دارد. نوشیدنی سنتی کِفیر از محصولات پروبیوتیک رایج در دنیاست که از تخمیر شیر با استفاده از دانه‌های کفیر (kefir grains) به‌عنوان آغازگر به دست می‌آید. قارچ‌های کفیر، دانه‌های سفیدرنگ ژله‌ای حاوی جمعیتی از باکتری‌های اسیدلاکتیکی، باکتری‌های اسید استیکی، مخمر و قارچ، در یک ماتریکس پلی ساکاریدی هستند و فرآیند تخمیر اسیدی- الکلی در نتیجه رابطه همزیستی میان این میکروارگانیسم‌هاست. منشأ قارچ‌های کفیر، شیر استفاده‌شده، و نحوه انجام فرآیند تخمیر، در تنوع میکروفلور تشکیل‌دهنده کفیر دخیل است، اما گونه‌های باکتریایی *Lactobacillus kefiri*، *L. acidophilus*، *L. paracasei*، *L. delbrueckii*، *L. plantarum*، *L. kefiranofaciens* و *Acetobacter aceti* و *A. rasens* و نیز گونه‌های مخمر *S. cervisiae*، *S. unisporus*، *Candida kefyr* و *Kluyveromyces maxianus*، میکروارگانیسم‌های غالب در ساختار قارچ کفیر و نوشیدنی تخمیری آن هستند. در این میان، *Lactobacillus kefiri*، ۸۰ درصد جمعیت لاکتوباسیل‌های کفیر را تشکیل می‌دهد. بر اساس آنچه بیان شد، فرض بر این است که میکروارگانیسم‌های تشکیل‌دهنده کفیر می‌توانند در پیشگیری و درمان انواع گوناگون سرطان مؤثر باشند. با توجه به اینکه تاکنون از دانه‌های کفیر به‌عنوان کاندید درمانی برای گلیوما استفاده نشده است، هدف از این پژوهش به‌کارگیری دانه‌های کفیر و تعیین اثر عصاره و دیواره میکروارگانیسم‌های سازنده آن بر روی سلول‌های گلیال سرطانی است.

## مواد و روش‌ها

### الف. آماده‌سازی نمونه کفیر:

کفیر از شرکت کفیر نوش گلستان (Household in Golestan, Iran) تهیه گردید. قارچ کفیر به میزان ۲۰ گرم وزن شد و در یک ظرف شیشه‌ای ۲۰۰ میلی‌لیتر شیر پاستوریزه کم‌چرب به دمای اتاق رسیده (۲۵°) به آن اضافه شد. و در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت اولیه، قارچ‌های کفیر با یک آبکش از دوغ حاصل جداشده، محتویات ظرف خوب همگن شد و دوغ نیز جمع‌آوری گردید. به جهت بررسی تأثیر لیزات سلولی میکروارگانیسم‌های موجود در قارچ‌های کفیر بر روی سلول‌ها، میزان ۴ گرم قارچ کفیر توزین شد و در ۸ میلی‌لیتر بافر PBS (phosphate buffered saline) غوطه‌ور گردید و با استفاده از یک اسکالپل استریل به‌خوبی خرد و سپس با استفاده از سونیکاتور همگن شد. بدین‌صورت که ابتدا پروب سونیکاتور (Vibra-Cell™ VCX130, USA) با الکل و PBS شستشو داده شد. برای شکننده شدن ساختار دیواره، قارچ کفیر غوطه‌ور در PBS، ۱۰ بار در فریزر ۸۰°-، فریز و دفریز شد. سپس ۲۵ بار و هر بار به مدت ۲۵ ثانیه با زمان استراحت یک دقیقه با فرکانس ۲۰kHz سونیکاسیون انجام شد. پس‌ازآن با سانتریفیوژ (۲۰ دقیقه، دور ۶۰۰۰ rpm) سوپرناتانت از رسوب جدا شد و با لوپ استریل مقدار کمی از هر دو آن‌ها بر روی یک پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار در دمای ۳۷°C کشت داده شد و ۲۴ ساعت بعد برای اطمینان از عدم وجود سلول زنده و نیز آلودگی محیطی، بررسی شد. سوپرناتانت و پلت حاصل از لیز قارچ کفیر با سونیکاتور، در ۲۰- فریز و تا روز آزمایش نگهداری شد (۱۶).

### کشت سلول رده سلول‌های سرطانی:

رده سلولی گلیوبلاستوما U87 (تهیه‌شده از بانک سلولی دانشگاه تربیت مدرس-تهران) در محیط کشت DMEM-F12 به همراه ۱۰ درصد FBS، ۱۰۰ واحد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین در انکوباتور با دمای ۳۷° و ۵ درصد $CO_2$، کشت داده شد (۱۸). پس از سه بار پاساژ سلولی، سلول‌ها به تعداد مناسب برای تست گردیدند.

### ارزیابی اثر سیتوتوکسیسیتی کفیر بر سلول‌های سرطانی به روش تست MTT:

به‌منظور بررسی میزان رشد و مرگ میر سلول‌ها، طبق پروتکل اعلام شده انجام گرفت. سلول‌ها تریپسینه و از فلاسک‌ها جمع‌آوری و با استفاده از لام نئوبار شمارش تعداد کل سلول‌ها انجام شد. تعداد

۵۰۰۰ سلول در هرکدام از چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه حاوی میزان ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت منتقل شد (۱۹). سپس سلول‌ها به سه گروه شامل گروه‌های تیمار شده با لیزات، دیواره سلولی و گروه بدون تیمار به‌عنوان کنترل تقسیم شدند. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از لیزات سلولی، دیواره سلولی میکروارگانیسم‌های کفیر، تیمار شد و چند چاهک باقی‌مانده به‌عنوان کنترل و فاقد تیمار در نظر گرفته شد. پلیت‌ها در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور CO2 دار (۵ درصد) و دمای ۳۷° انکوبه شدند. در تیمار با عصاره میکروارگانیسم‌های کفیر از غلظت ۱۲ تا ۶۵ میکروگرم به‌صورت سریال رقت استفاده گردید. سپس ۲۰µl محلول (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT به هر چاهک اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷° انکوبه که در این حین کریستال‌های فورمازان تشکیل شد. پس از انکوباسیون، محیط کشت درون چاهک‌ها تخلیه شد و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه گردید و پس از چند دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق میزان جذب نوری آن‌ها در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه Absorbance reader (ELx800™, BioTek, USA) قرائت شد (۲۰).

**آنالیز آماری:**

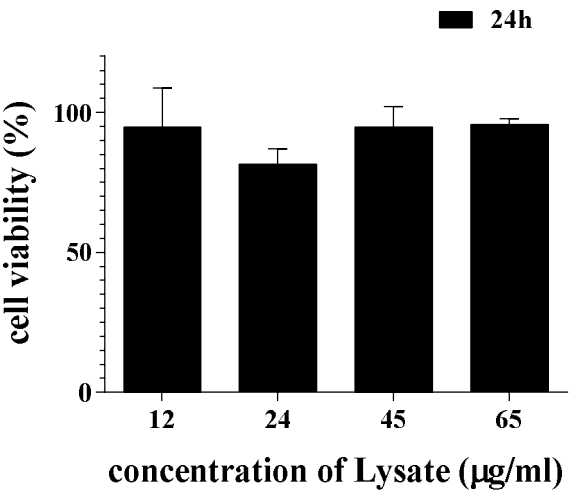
تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام می‌گیرد، نتایج با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش و حد معنی‌دار بودن $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. تمامی تست‌ها سه بار تکرار شدند.

## یافته‌ها

نتایج تست MTT، تأثیر تیمار بر میزان رشد و مرگ‌ومیر سلول‌ها را با تغییر رنگ زرد محلول تترازولیوم به رنگ بنفش ناشی از تشکیل کریستال‌های فورمازان در اثر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی نشان می‌دهد. بنابراین رنگ بنفش در صورت زنده‌بودن سلول‌ها، مشاهده می‌گردد و مقایسه شدت رنگ تولیدشده در چاهک‌های تیمار شده نسبت به چاهک‌های شاهد، افزایش تعداد سلول‌ها یا کاهش آن‌ها را نمایان می‌کند.

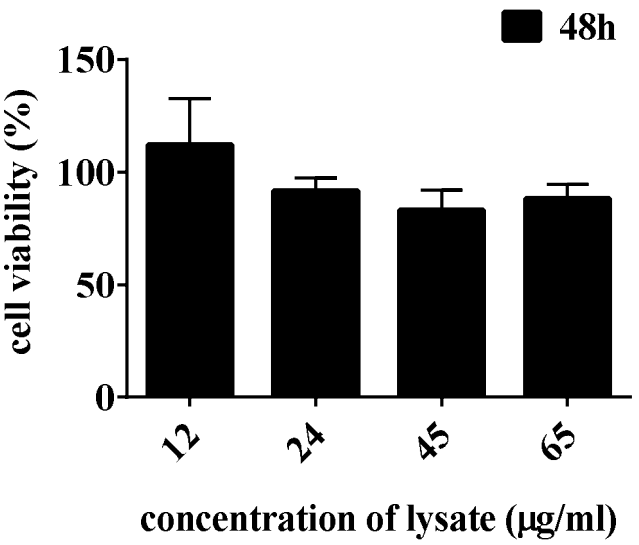
میزان بقای سلول‌ها تحت تأثیر تیمار، از فرمول ذیل به دست آمد:

$$(\%)\ cell\ viability = (\text{میانگین جذب نوری تیمار})/(\text{میانگین جذب نوری شاهد}) \times ۱۰۰$$



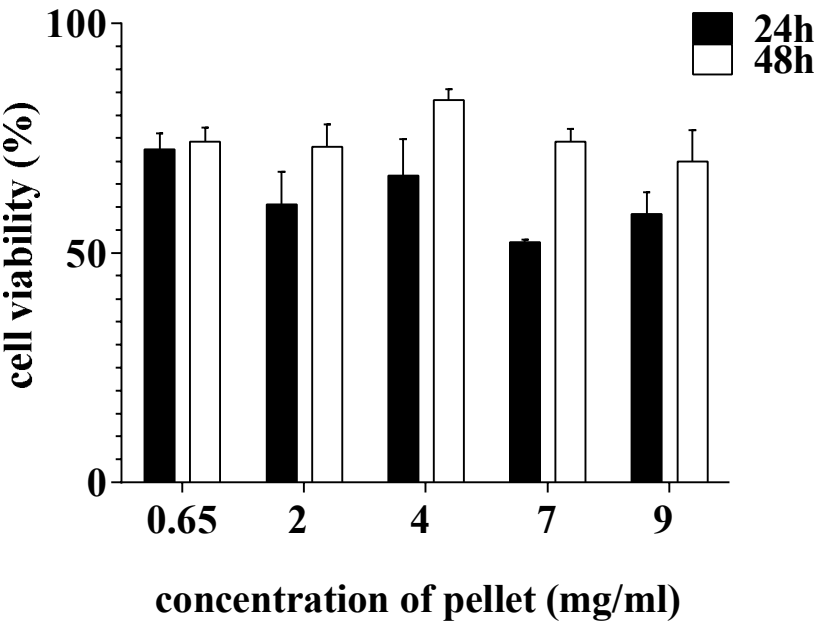

**نمودار (۱):** ارزیابی میزان بقای سلول‌های سرطانی رده U87 تیمار شده با عصاره میکروارگانیسم‌های کفیر در بازه زمانی ۲۴ ساعت

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره میکروارگانیسم‌های کفیر بر سلول‌های سرطانی رده U87 نشان داد که بیشترین میزان اثر مهارکنندگی سلول‌ها در غلظت ۲۴ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد و پس‌ازآن بیشترین اثر در سایر غلظت مشاهده گردید.




**نمودار (۲):** مقایسه میزان بقای سلول‌های سل لاین U87 تیمار شده با عصاره میکروارگانیسم‌های کفیر در بازه زمانی ۴۸ ساعت

در نمودار ۱ و نمودار ۲، در بازه زمانی ۴۸ ساعت، نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره میکروارگانیسم‌های کفیر بر سلول‌های سرطانی رده U87 نشان داد که بیشترین میزان اثر مهارکنندگی سلول‌ها در غلظت ۴۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد که حدود ۶۵ درصد از سلول‌ها در این غلظت دچار مرگ سلولی گردیدند. به نظر می‌رسد اثر سیتوتوکسیسیتی عصاره میکروارگانیسم‌های کفیر بر سلول‌های سرطانی در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت وابسته به زمان می‌باشد و در غلظت‌های مشابه میزان مرگ سلولی در مدت ۴۸ ساعت بیشتر از همان غلظت در بازه زمانی ۲۴ ساعته می‌باشد.




**نمودار (۳):** مقایسه میزان بقای سلول‌های سل لاین U87 تیمار شده با بدنه میکروارگانیسم‌های کفیر در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت

در تیمار با پلت میکروارگانیسم‌های کفیر از غلظت ۶۰۰ میکروگرم تا ۳ میلی‌گرم به‌صورت سریال رقت استفاده گردید. نتایج تیمار با رسوب دیواره میکروارگانیسم‌های کفیر، در تست ۲۴ ساعت نشان داد بیشترین میزان بقا در غلظت 0.65 mg/ml (درصد ۷۲) و پس‌ازآن به ترتیب در غلظت ۴، ۲ و ۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. نتایج تیمار با رسوب دیواره میکروارگانیسم‌های کفیر، در تست ۴۸ ساعت نشان داد بیشترین میزان بقا در غلظت ۴ می‌باشد. کم‌ترین میزان بقا در غلظت 7 mg/ml مشاهده شد ($IC_{50}$). و در تست ۴۸ ساعته، میزان بقای سلول‌ها در غلظت ۹، به درصد ۶۹ و در غلظت ۴ mg/ml به درصد ۸۳ رسید (نمودار ۳). در غلظت‌های مختلف نتایج مختلفی از میانکنش سلول‌ها با پلیت صورت گرفته است. اما نتایج کلی نشان می‌دهد میزان اثر این ترکیب در مدت‌زمان ۲۴ ساعت بیشتر از ۴۸ ساعت می‌باشد.

## بحث

نوشیدنی سنتی کِفیر از محصولات پروبیوتیک رایج در دنیاست که هم به‌صورت خانگی و هم در مقیاس صنعتی از تخمیر شیر توسط قارچ‌های کفیر به‌عنوان آغازگر به دست می‌آید. قارچ‌های کفیر، دانه‌های سفیدرنگ ژله‌ای حاوی جمعیتی از باکتری‌های اسیدلاکتیکی، باکتری‌های اسید استیکی، مخمر و قارچ، در یک ماتریکس پلی ساکاریدی هستند. این ماده غذایی پروبیوتیک، در سال‌های اخیر نظر محققان را به‌عنوان گزینه‌ای برای درمان بیماری‌های گوناگون جلب کرده است. خواص متعدد آن از قبیل خاصیت ضد میکروبی، بهبود زخم، تقویت سیستم ایمنی دستگاه گوارش، تنظیم جذب کلسترول و اثرات ضد توموری و ضد متاستاتیک بر رده‌های سرطانی گوناگون، انواعی از خواص درمانی این ماده غذایی پروبیوتیک است.

نقش متابولیت‌های میکروبی ازجمله پروبیوتیک‌ها در درمان بیمارها ازجمله سرطان غیرقابل‌انکار است. در حال حاضر روش‌های درمانی جدید برای انواع گلیوما در دست پژوهش می‌باشد؛ بهره‌گیری از روش‌های اپی ژنتیک علیه گلیوبلاستوما مولتی فورم (GBM) مانند خاموش کردن ژن MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase) با متیلاسیون پروموتر آن و استفاده از این روش به همراه رادیوتراپی و داروی تموزولومید، مدت‌زمان کلی بقای بیماران مبتلا به تومورهای غیرقابل‌برداشت را افزایش داده است (۷). مهارکننده‌های هیستون دِاستیلاز (Histone Dacetylase inhibitors)، از طریق مکانیسم‌های گوناگون مانند توقف چرخه سلولی، مکانیسم‌های آپاپتوتیک ذاتی و بیرونی، اتوفاژی و ... می‌توانند خاصیت ضد سرطانی خود را اعمال کنند؛ CDK5 گونه‌ای از HDACI است که مطالعات جدید تأثیر سایتوتوکسیک آن را بر سلول‌های گلیوبلاستوما نشان داده‌اند (۸،۹،۱۳). در مطالعه‌ای، اثر عصاره کفیر فاقد سلول بر سلول‌های سرطان خون رده KG-1 (acute erythroleukemia)، تحریک آپاپتوز و نکروز و کاهش تکثیر سل لاین سرطانی اریترو لوکمی انجام شد که نتایج حاصل نشان داد عصاره سلولی کفیر موجب مرگ سلول‌های سرطانی خونی می‌گردد (۱۴). در مطالعه‌ای دیگر، در موش آزمایشگاهی آلوده به سل لاین سرطان سینه 4TI پس از رژیم غذایی آب با کفیر طی ۲۸ روز، کاهش معنی‌داری در وزن و اندازه تومورها و افزایش تولید سلول‌های T کمکی و سایتوتوکسیک به همراه تأثیر ضد متاساتیک کفیر بر تومورها مشاهده شد (۱۵). مطالعات نشان دادند که عصاره کفیر موجب کاهش بیان ژن TGF-α در سلول‌های سرطانی لنفوسیت T رده HuT-102 (HTLV-1-Positive malignant T-lymphocyte) و در نتیجه کاهش ۹۸ درصد تکثیر سلول‌ها در تیمار با دوز µg/µl ۶۰ در طی ۲۴ ساعت می‌گردد (۱۶). در مطالعه حاضر، سوپرناتانت عصاره میکروارگانیسم‌های موجود در کفیر همگن‌شده و پلت آن موردبررسی قرار گرفتند. نتایج ما بر روی سلول‌های گلیوما نشان داد که عصاره کفیر در غلظت ۲۴ میکروگرم در مدت‌زمان ۲۴ ساعت اثرات سیتوتوکسیک از خود بروز می‌دهد. این در حالی است که این اثر بر روی سلول‌های خونی در غلظت بیشتر با اثر بیشتری مشاهده شده است. این اختلاف ممکن است به دلیل اختلاف در نوع رده سلولی در مطالعه انجام‌شده و در مقایسه با مطالعات دیگران باشد و یا گونه کفیر مورداستفاده در این تحقیق متفاوت از گونه‌های بکار رفته در سایر مطالعات باشد.

نتایج حاصل از مطالعات Khoury و همکاران نشان داد که تیمار کفیر با رده سلولی سرطان معده SGC7901 موجب کاهش تکثیر سلولی وابسته به دوز می‌شود (۱۷). نیز در مطالعه‌ای دیگر، تیمار عصاره فاقد سلول کفیر با رده سلولی سرطان خون KG-1 (acute erythroleukemia) موجب کاهش تکثیر رده سلولی سرطانی اریترولوکمی می‌شود (۱۴). تیمار رده سلولی سرطانی روده، Caco-2 و HT-29 با عصاره کفیر نشانگر مهار تکثیر به‌صورت وابسته به دوز و زمان، در این سلول‌ها بود (۱۶). نتایج مطالعات ما نشان داد که اثر کفیر در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعته وابسته به غلظت می‌باشد و با افزایش زمان میزان مرگ کم‌تر می‌شود.

نتایج حاصل از بررسی سوپرناتانت و پلت نشان داد که بیشترین میزان مرگ سلولی ناشی از تیمار سوپرناتانت باکتری، در مطالعه ۲۴ ساعته در غلظت‌های مورداستفاده می‌باشد. این موضوع نشان می‌دهد که وجود برخی متابولیت‌های میکروبی تولیدشده در این فرایند در بازه زمانی تولیدشده مذکور سبب مرگ سلول‌های سرطانی در رده گلیوبلاستوما می‌گردد.

نیز نتایج تیمار با رسوب دیواره میکروارگانیسم‌های کفیر، بیانگر آن است که این متابولیت‌های میکروبی می‌تواند در غلظته ای خیلی بالاتر از عصاره سلولی میکروارگانیسم‌های کفیر سبب مرگ سلول‌های سرطانی در رده گلیوبلاستوما گردد.

پروبیوتیک‌ها و متابولیت‌های تولیدی آن‌ها از قبیل اسیدهای آلی، باکتریوسین‌ها، پپتیدها و ...، توانایی مداخله در مسیرهای متابولیکی تنظیم‌کننده تکثیر، تمایز، آپاپتوز، متاستاز و آنژیوژنز را دارند. سوپرناتانت باکتری‌های *L. acidophilus* و *L. delbrueckii* بر روی سل لاین‌های سرطانی AGS، MCS-7، SW620 و HT-29 با تحریک آپاپتوز از طریق مسیر وابسته به caspase 3 و کاهش بیان Bcl-2، خاصیت ضد سرطان نشان داده‌اند. مخمر *S. cervisiae*، نیز اثرات معنی‌دار ضد توموری و مهارکنندگی رشد را در سلول‌های سرطانی HepG2 و نیز سرطان سینه نشان داده است. کفیر نیز یک ماده غذایی متشکل از مجموعه‌ای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشد و بخش عمده این پروبیوتیک‌ها را باکتری‌های اسیدلاکتیکی (LAB) تشکیل می‌دهد. ترکیبات بیواکتیو موجود در عصاره کفیر، عمدتاً شامل اسیدلاکتیک، اسید استیک، هیدروژن پرواکسید، باکتریوسین، آنتی‌بیوتیک‌ها و متابولیت‌های متنوع دیگر می‌باشد. اسید تولید شده توسط باکتری‌ها منجر به کاهش pH و اسیدی شدن آن می‌گردد که می‌تواند منجر به مهار رشد باکتری‌ها و تولید متابولیت‌ها گردد. در اینجا مخمرهای موجود در کفیر طی یک رابطه همزیستی با مصرف لاکتات، گالاکتوز و سایر محصولات تولیدی باکتری‌ها و تولید دی اکسید کربن، اتانول و ویتامین‌های مختلف، شرایط رشد را برای باکتری‌ها فراهم کرده و این چرخه منجر به ادامه حیات میکروفلور قارچ‌های کفیر می‌گردد.

## نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد کفیر و نوشیدنی کفیر، به دلیل کاهش میزان بقا در سلول‌های سرطانی، می‌تواند به عنوان ترکیب مکمل در کنار درمان‌های تومور مغزی گلیوبلاستوما بکار گرفته شود. به جهت بررسی دقیق‌تر مکانیسم عمل کفیر و نحوه اثرگذاری آن بر روی سلول‌های سرطانی، مطالعه تحریک آپاپتوز و نکروز از طریق فلوسیتومتری پیشنهاد می‌شود مطالعات دقیق مولکولی در آینده صورت گیرد.

## References:


1. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. Genes Dev 2001;15(11):1311–33.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. CA: A Cancer J Clin 2016;66(1):7-30.
3. Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma. Cancer Genet 2012;205(12):613-21.
4. Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. JAMA 2013;310(17):1842-50.
5. Dietrich J, Imitola J, Kesari S. Mechanisms of Disease: the role of stem cells in the biology and treatment of gliomas. Nat Clin Prac Oncol 2008;5(7):393-404.
6. Oberoi RK, Parrish KE, Sio TT, Mittapalli RK, Elmquist WF, Sarkaria JN. Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood–brain barrier to treat glioblastoma. Neuro-Oncology 2016;18(1):27-36.
7. Thon N, Thorsteinsdottir J, Eigenbrod S, Schüller U, Lutz J, Kreth S, et al. Outcome in unresectable glioblastoma: MGMT promoter methylation makes the difference. J Neurol 2017;264(2):350-8.
8. Choi SA, Kwak PA, Park CK, Wang KC, Phi JH, Lee JY, et al. A novel histone deacetylase inhibitor, CKD5, has potent anti-cancer effects in glioblastoma. Oncotarget 2017;8(6):9123-33.
9. Mackowiak PA. Recycling metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. Front Public Health 2013;1:52.
10. Kooiman P. The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. Carbohydrate Research. 1968;7(2):200-11.
11. de Moreno de LeBlanc A, Matar C, Farnworth E, Perdigón G. Study of Immune Cells Involved in the Antitumor Effect of Kefir in a Murine Breast Cancer Model. J Dairy Sci 2007: 90(4):1920-8.

12. Guzel-Seydim ZB, Kok-Tas T, Greene AK, Seydim AC. Review: Functional Properties of Kefir. Crit Rev Food Sci Nutr 2011;51(3):261-8.
13. Rafie N, Hamedani SG, Ghiasvand R, Miraghajani M. Kefir and Cancer: A Systematic Review of Literatures. Arch Iran Med (AIM) 2015;18(12).
14. Jalali F, Sharifi M, Salehi R. Kefir induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human acute erythroleukemia. Med Oncol 2015;33(1):7.
15. Zamberi NR, Abu N, Mohamed NE, Nordin N, Keong YS, Beh BK, et al. The Antimetastatic and Antiangiogenesis Effects of Kefir Water on Murine Breast Cancer Cells. Integr Cancer Ther 2016;15(4):NP53-NP66.
16. Rizk S, Maalouf K, Baydoun E. The antiproliferative effect of kefir cell-free fraction on HuT-102 malignant T lymphocytes. Clin Lymphoma Myeloma 2009;9(3):012.
17. Khoury N, El-Hayek S, Tarras O, El-Sabban M, El-Sibai M, Rizk S. Kefir exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic effects on colon adenocarcinoma cells with no significant effects on cell migration and invasion. Int J Oncol 2014;45(5):2117-27.
18. Soleimani N, mohabbati mobarez A, khodamabadi N. Evaluation of proliferation and survival of spleen immune cells treated by Deacetylchitin nanoparticles on breast cancer mouse model. J Urmia Univ Med Sci 2017; 28 (4):33-9.
19. Jiang L, Zhou J, Zhong D, Zhou Y, Zhang W, Wu W, et al. Overexpression of SMC4 activates TGF[beta]/Smad signaling and promotes aggressive phenotype in glioma cells. Oncogenesis 2017;6:e301.
20. Soleimani N, Mohabati Mobarez A, Tavakoli-Yaraki M, Farhangi B. Evaluation of nitric oxide production and proliferation activity of recombinant Bacterioferritin of Helicobacter pylori on macrophages. Microbial Pathogenesis 2016; 100: 149-53.

Original Article

# CYTOTOXICITY EFFECT OF KEFIR MICROORGANISMS CYTOPLASMIC EXTRACTS ON GLIOBLASTOMA CANCER CELLS

*Arghavan Fatahi[1], Neda Soleimani[2*]*

## Abstract

***Background & Aims***: Kefir is a complex composition of microbial species such as streptococci, mesophilic lactobacilli, lactose or non-lactose fermenting yeast and acetic acid bacteria. Numerous studies have been performed to indicate the positive therapeutic effect and healing properties of probiotic products. The aim of this study was to investigate the effect of cytotoxicity of kefir microorganisms' cytoplasmic extracts on growth and proliferation of glioblastoma cancer cells as the most acute type of brain tumors.

***Materials & Methods*:** In this experimental study, kefir microorganisms' cytoplasmic extract was prepared. The interaction of U87 glioblastoma cancer cells with different concentrations of cell extracts and cell wall of kefir microorganisms was studied. Cell proliferation was evaluated using MTT assay method after 24 and 48 hours.

***Results:*** The results of cytotoxicity test show that the highest effect of cell extracts of kefir microorganisms on cancer calls was obtained 0.24 and 0.045 mg of extract at 24 and 48 hours, respectively, and the highest effect of cell wall of kefir microorganisms in both times was a density of 7 mg.

***Conclusion:*** The cell extracts of kefir microorganisms as a probiotic product have a higher toxicity and fecundity effect on glioblastoma cells. This combination can be suggested as an alternative candidate for cancer treatment supplement.

***Keywords:*** Kefir microorganisms cytoplasmic extracts, Glioblastoma, Probiotics, Anticancer effect

***Address***: Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, School of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
***Tel***: +9829905516
***Email***: N_soleimani@sbu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2018: 29(1): 19 ISSN: 1027-3727

*[1] Bsc., Department of Biological Sciences, School of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran*
*[2] Assistant Professor, Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, School of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran (Corresponding Author)*