Archive of SID

مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۸، شماره‌ی ۷۳، زمستان ۱۳۸۹، صفحات ۳۷ تا ۴۸

بررسی اثر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به‌عنوان پروبیوتیک برپاسخ‌های ایمنی در موش Balb/c برضد بافت پیوندی تومور با منشا سرطان پستان

دکتر محمد مهدی سلطان دلال[۱]، محمدحسین یزدی[۲]، دکتر زهیر محمد حسن[۳]، مرضیه هولاکویی[٤]،
ترانه پیمانه عابدی محتسب[٥]، فرزانه امین هراتی[٥]، سولماز آقا امیری[۲]، مهدی مهدوی[٦]

نویسنده‌ی مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده‌ی بهداشت، بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی soltanirad34@yahoo.com

دریافت: ۸۸/۴/۱۴ پذیرش:۸۹/۵/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: *خواص ضد توموری باکتری‌های خانواده‌ی لاکتوباسیلوس در مطالعات گوناگون نشان داده شده است. این خواص احتمالا به‌دلیل وجود ویژگی ایمنومدولاتوری یا تنظیم کننده‌ی سیستم ایمنی مربوط به این باکتری‌ها می‌باشد. هدف مطالعه‌ی حاضر بررسی اثرات مصرف لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به‌عنوان پروبیوتیک بر پاسخ‌های ایمنی در موش‌های مبتلا شده به سرطان پستان با روش پیوند تومور می‌باشد.*

روش بررسی: *تعداد ۱۸ سرموش ماده‌ی ٦ تا ۸ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۵ تا ۳۰ گرم در شرایط یکسان به‌طور تصادفی در دو گروه شاهد و مورد تقسیم شدند که هرگروه شامل ۹ عدد موش بود. موش‌های گروه اول به‌مدت ۲ هفته قبل از توموری شدن روزانه به‌میزان نیم میلی‌لیتر سوسپانسیون لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ($۲/۷\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) را دریافت کردند و بعد از توموری شدن هم با وقفه‌های ۳ روزه به‌صورت دوره‌های ۷ روزه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را دریافت نمودند. گروه دوم به‌عنوان گروه کنترل در تمام طول مطالعه با حجم یکسان و شرایط مساوی PBS دریافت کردند.*

یافته‌ها: *نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که موش‌های دریافت کننده‌ی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای میزان IL-12 بیشتری در کشت سلول‌های طحالی خود در مقایسه با موش‌های گروه کنترل بوده، میزان TGF-β نیز که به‌عنوان یکی از سایتوکاین‌های سرکوبگر ایمنی مطرح می‌باشد، در موش‌های گیرنده‌ی پروبیوتیک کمتر بود. همچنین میزان پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری ٤۸ ساعته در گروه گیرنده‌ی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تحریک مجدد با آنتی‌ژن اختصاصی تومور بیشتر بود که از نشانه‌های تحریک سلول‌های Th_1 می‌باشد. علاوه براین، سرعت رشد تومور نیز در موش‌های گروه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس کمتر ازگروه کنترل بود.*

نتیجه‌گیری: *بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان گفت که مصرف روزانه‌ی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌تواند باعث تقویت پاسخ ایمنی سلولی شده، احتمالا به‌عنوان یک عامل حمایت کننده در درمان سرطان می‌تواند مطرح شود، اما هنوز نیاز به انجام مطالعات بیشتر و بررسی‌های دیگری برای کشف این اثرات وجود دارد*

واژگان کلیدی: لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس، پاسخ ایمنی سلولی، سرطان پستان

۱- دکترای تخصصی میکروب شناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- دکترای ایمونولوژی، استاد دانشگاه تربیت مدرس
٤- کارشناسی ارشد قارچ شناسی، دانشگاه تربیت مدرس
٥- کارشناس میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
٦- دانشجوی دکترای ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های زنان در جهان می‌باشد که شیوع متفاوتی در بین ملل مختلف دارد. بالاترین شیوع این بدخیمی مربوط به زنان سفید پوست در آمریکا و کمترین آن مربوط به زنان چینی و ژاپنی می‌باشد (۱). در سال ۲۰۰۱ انجمن سرطان آمریکا ۱۹۲۲۰۰ مورد از این بیماری را گزارش نمود که بیانگر اهمیت این مساله می‌باشد. در سال ۲۰۰۳ در جامعه‌ی آمریکا ۳۹۸۰۰ نفر زن و ۴۰۰ نفر مرد به دلیل ابتلا به سرطان پستان جان خود را از دست دادند. بیشترین میزان این بیماری در کشورهای توسعه یافته‌ی اروپایی و شمال آمریکا بوده و بیشترین میزان مرگ و میر این دسته از سرطان‌ها بین سنین ۴۰ تا ۵۰ می‌باشد که سالانه ۱۴۰۰۰ مورد مرگ از این بیماری مشاهده می‌شود (۳و۲). همچنین سرطان پستان به عنوان دومین سرطان شایع در بین زنان کشورمان مطرح می‌باشد و میزان شیوع آن ۱۲۰ در ۱۰۰/۰۰۰ نفر می‌باشد (۴). سرطان پستان یک بیماری پیچیده و دارای علایم کلینیکی مختلف و سرانجام‌های متفاوت می‌باشد و پاسخ‌های ایمنی به نظر نقش عمده‌ای در روند توسعه‌ی این بیماری دارند (۵). بسیاری از مطالعات صورت گرفته روی بیماران مبتلا به سرطان پستان حاکی از کاهش پاسخ‌های ایمنی از جمله پاسخ افزایش حساسیت تاخیری، عملکرد سایتولیتیک، کاهش تکثیر در سلول‌های ایمنی و در نتیجه کاهش سایتوکائین‌ها در اثر ابتلا به این سرطان می‌باشد (۶). پروبیوتیک‌ها در حقیقت همان باکتری‌های مفید در دستگاه گوارش بدن هستند که دارای قابلیت‌های مختلفی می‌باشند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها ایجاد تعادل بین دستگاه گوارش و سیستم ایمنی بدن می‌باشد (۷). در واقع پروبیوتیک‌ها دسته‌ای از میکروارگانیسم‌های زنده هستند که در صورت مصرف با یک میزان معین اثرات مفیدی را بر سلامت ایجاد می‌کنند (۸). این میکروارگانیسم‌ها دارای اثرات تحریک‌کنندگی و تقویت‌کنندگی بر روی سیستم ایمنی هستند. به‌طور مثال در مطالعه‌ای که روی موش‌های مبتلا به نقص ایمنی صورت گرفت نقش پروبیوتیک‌ها به عنوان یک عامل موثر Immunomodulator در بهبود پاسخ ایمنی نشان داده شد (۹). امروزه لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها بیشترین میکروارگانیسم‌هایی هستند که به‌عنوان پروبیوتیک کاربرد دارند. اثرات مفید گونه‌های مختلف این باکتری‌ها در مطالعات مختلف نشان داده شده است. با این حال این خواص از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت بوده، در مطالعات گوناگون، محققین این خواص را اختصاصی گونه و سویه دانسته‌اند (۱۰). از آنجا که برخی سویه‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس‌کازیی در مطالعات گذشته به عنوان عوامل موثر در ممانعت از رشد تومورهای پیوندی در مدل‌های تجربی حیوانی شناخته شده‌اند (۱۲و۱۱)، لذا در این مطالعه هدف بررسی اثر سویه‌ی جدید لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC4356 بر پاسخ‌های ایمنی در تومور سرطان پستان ایجاد شده در مدل موش Balb/c بود.

روش بررسی

سویه‌ی لاکتوباسیلوس: سوش استاندارد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC4356 از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و بیماری‌زای ایران تهیه شده، در محیط آگار MRS (Merck)کشت داده شد.

حیوانات آزمایشگاهی: تعداد ۶۰ عدد موش Balb/c Inbred ماده با سن تقریبا ۶ تا ۸ هفته از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند و در شرایط استاندارد نگهداری حیوانات آزمایشگاهی (۱۲/۱۲ روشنایی/تاریکی، غذای پلت استاندارد، دمای ۲۴ درجه و رطوبت ۵۲) نگهداری شدند، ضمن اینکه در هر گروه به‌منظور جلوگیری از دست رفتن احتمالی موش‌ها در حین مطالعه ۲ موش اضافه در نظر گرفته شد. ضمنا موش‌ها پس از انتقال به حیوانخانه به‌مدت یک هفته به‌منظور تطبیق با شرایط محیط جدید

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری شدند و پس از آن مطالعه روی آن‌ها شروع شد.

گروه‌ها و روش تجویز پروبیوتیک: تهیه CFU مناسب و روش تجویز پروبیوتیک به این صورت بود که ابتدا باکتری در محیط MRS کشت داده شد، پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کلنی‌های رشد کرده روی محیط MRS با استفاده از PBS جمع‌آوری شده، با روش رقت سازی میزان $۲/۷ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml از باکتری تهیه و روزانه نیم میلی‌لیتر از این محلول با استفاده از سوزن مخصوص گاواژ به موش‌های گروه پروبیوتیک خورانده شد. گروه کنترل به به‌میزان مساوی PBS دریافت کردند. روند تجویز روزانه در این مطالعه به این صورت بود که ۱۴ روز قبل از پیوند تومور به ترتیب گروه اول، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و گروه دوم به‌عنوان گروه کنترل به‌صورت هم حجم، PBS دریافت نمودند. بعد از پیوند نیز موش‌ها با وقفه‌های ۳ روزه و به‌صورت دوره‌های ۷ روزه متوالی پروبیوتیک دریافت نمودند و این روند تا پایان روز ۴۴ مطالعه ادامه یافت.

توموری نمودن موش‌ها: موش توموری مدل سرطان خود به خودی پستان (Spontaneous) به‌عنوان استوک تومور استفاده شد (۱۳) و تومور بعد از نخاعی نمودن موش به‌صورت استریل از بدن آن خارج شد و در نرمال سالین استریل با اسکالپل وتیغ جراحی به قطعات ۵ میلی‌متر مکعبی تقسیم شد، سپس هر کدام از موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین/زایلین (با دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از وزن بدن) بیهوش شده، قطعات تقسیم شده تومور با روش جراحی در زیر پوست ناحیه‌ی فلانک راست آن‌ها پیوند زده شد و جای جراحی با کلیپس مخصوص بخیه زده شد. حدود یک هفته بعد از پیوند رشد تومورها با چشم قابل دیدن بود.

اندازه‌گیری سیر رشد تومور در موش‌های توموری: بدین منظور یک هفته پس از توموری نمودن موش‌ها که قطر تومور آن‌ها کمتر از ۵ میلی‌متر بود، حجم تومور در دو جهت طول و عرض اندازه‌گیری شده، این عمل هر هفته دوبار تا انتهای کار با استفاده از کولیس ورنیه صورت گرفت و سپس حجم تومور با فرمول عرض^{۲} × طول ۱/۲ محاسبه گردید.

بررسی و محاسبه‌ی حجم نهایی تومور در موش‌های توموری: جهت بررسی تغییرات مربوط به حجم تومور پس از پیوند و قبل از آغاز تجویز دوباره‌ی پروبیوتیک به موش‌ها حجم تومور با روش اندازه‌گیری گفته شده در بالا با استفاده از کولیس ورنیه مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی حجم تومور هر هفته دوبار انجام شد و این عمل تا یک هفته پس از آخرین تجویز نیز ادامه یافت. بررسی وضعیت حجم تومور بر اساس درصد افزایش حجم تومور با فرمول

$$\frac{\text{حجم تومور در روز آخر}}{\text{حجم تومور در روز صفر}} \times ۱۰۰$$

محاسبه گردید.

تهیه‌ی کشت سلولی طحالی و سنجش سایتوکاین‌های TGFβ و IL12 در سوپ رویی کشت طحال: ۳۰ روز بعد از پیوند تومور از هر گروه ۸ موش را نخاعی کرده، تحت شرایط استریل طحال از بدن آن‌ها خارج شد، سپس با استفاده از پنس وقیچی استریل طحال را قطعه قطعه نموده، از آن سوسپانسیون سلولی تهیه شد و در دور ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ نموده، به رسوب به‌دست آمده ۵ میلی‌لیتر از بافر لیزکننده RBC اضافه شد و پس از ۵ دقیقه با اضافه نمودن PBS سرد سلول‌ها از شوک لیز خارج و با PBS سانتریفیوژ شدند، سپس در محیط RPMI+FBS (Sigma) سوسپانسیون شده، پس از شمارش سلولی تعداد ۵×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر از آن تهیه شد و در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای ۲ میلی‌لیتر از محیط فوق قرار گرفت و با آنتی ژن اختصاصی تومور که از قبل از تومور یکی از موش‌ها با روش هضم با آنزیم کلاژناز و سپس دیالیز پروتئین و اندازه‌گیری پروتئین با روش برادفورد تهیه شده بود، به مدت ۶۰ ساعت تحریک شد. مایع رویی کشت به‌دست آمده از سلول‌های طحالی پس از این مدت جمع آوری و پس از

www.SID.ir

Archive of SID

سانتریفیوژ (در دور G۳۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) از لحاظ میزان تولید سایتوکائین‌های TGF-β و IL-12, با روش ELISA و با استفاده از کیت سنجش سایتوکائین کمپانی R&D بررسی شد.

بررسی میزان Proliferation سلول‌های ایمنی با روش MTT: بدین منظور پس از تهیه کشت سلول طحالی، سوسپانسیونی به میزان یک میلیون سلول در میلی‌لیتر تهیه شد و در پلیت‌های مسطح ۱۰۰ میکرولیتر از آن را در هر چاهک ریخته، سپس با استفاده از ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از PHA تحریک شد، در برخی از چاهک‌ها به‌عنوان کنترل، PHA اضافه نشد تا ضریب عدم تحریک محاسبه گردد. حجم نهایی چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بود، به‌عنوان بلانک از محیط RPMI خالی استفاده شد، پلیت‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در مجاورت با CO2 انکوبه شدند و پس از ۷۲ ساعت به هر چاهک ۲۵ میکرولیتر ماده‌ی MTT اضافه گردید و ۴ ساعت دیگر انکوباسیون ادامه یافت. در این مدت احیای ماده‌ی MTT توسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال‌های فورمازان شد که برای حل شدن آن‌ها پس از این مدت به همه‌ی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر ماده‌ی DMSO اضافه کرده، سپس در طول موج ۵۷۰nm جذب سلول‌های تحریک شده به تحریک نشده به‌عنوان اندیکس تحریکی محاسبه شد.

بررسی میزان التهاب ناشی از DTH: ابتدا به میزان ۲۰ میکرولیتر از آنتی ژن اختصاصی تومور (تهیه شده از تومور اصلی) را در کف پای چپ و۲۰ میکرولیتر PBS را در کف پای راست هر موش از موش‌های هر دو گروه پروبیوتیک و کنترل تزریق کرده، سپس قطر التهاب ناحیه‌ی تزریق را در ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت بعد با استفاده کولیس ورنیه ثبت گردید. با استفاده از فرمول قطر پای چپ منهای قطر پای راست تقسیم بر قطر پای راست ضرب‌در ۱۰۰ نتایج را بررسی کردیم.

آنالیز آماری: برای آنالیز آماری نمونه‌ها از آزمون t-test استفاده شد و برای معنی‌داری داده‌ها آلفای ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

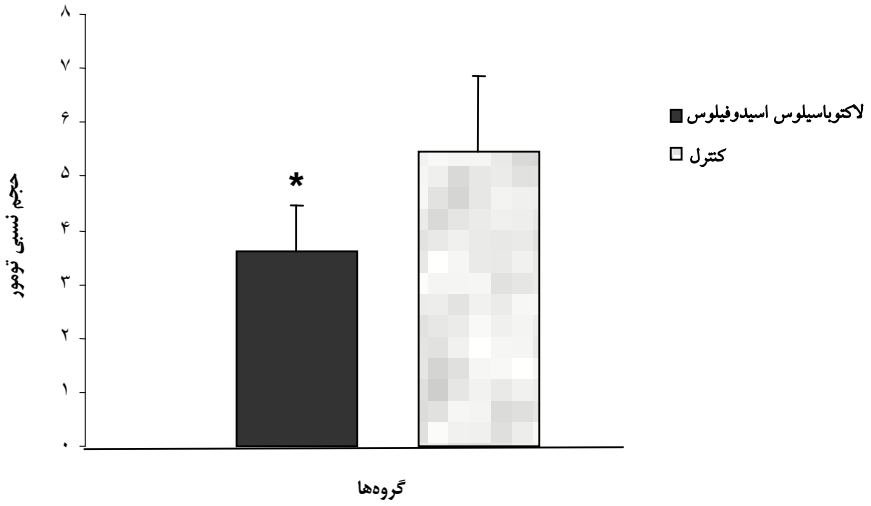
یافته‌ها

نتایج سیر رشد و حجم نهایی تومور: نتایج نشان دهنده‌ی پایین‌تر بودن حجم نهایی تومور در موش‌های گیرنده‌ی پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل یا گیرنده PBS بود (شکل ۱). در واقع نتایج در گروه لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس نشان داد که سرعت رشد تومور در موش‌های گیرنده این پروبیوتیک نسبت به گروه کنترل کمتر بوده که احتمالا این پدیده ناشی از اثر تقویت کنندگی لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس بر سیستم ایمنی این گروه از موش‌ها در مقابله با این تومور بود.

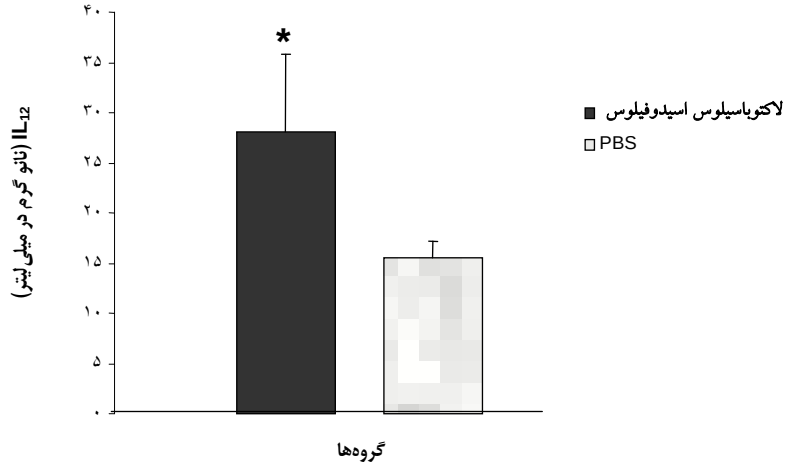
نتایج سنجش سایتوکائین‌های TGF-β و IL-12 در سوپ رویی کشت طحال: مایع رویی کشت به‌دست آمده از سلول‌های طحالی پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در مجاورت آنتی ژن اختصاصی تومور جمع‌آوری و پس از سانتریفیوژ (در دور G۳۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) از لحاظ میزان تولید سایتوکائین‌های TGF-β و IL12 با روش ELISA و با استفاده از کیت سنجش سایتو کائین کمپانی R&D بررسی شد. نتایج به‌دست آمده از بررسی میزان IL-12 در سوپ رویی کشت سلول‌های طحالی نشان دهنده‌ی افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۰۵) این سایتوکائین در موش‌های گیرنده‌ی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مقایسه با گروه کنترل بود (شکل ۲). همچنین بررسی میزان TGF-β نیز نشان داد که در موش‌های گروه گیرنده‌ی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس میزان این سایتوکائین به‌صورت معنی‌داری (P<۰/۰۰۵) کاهش پیدا کرد (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID



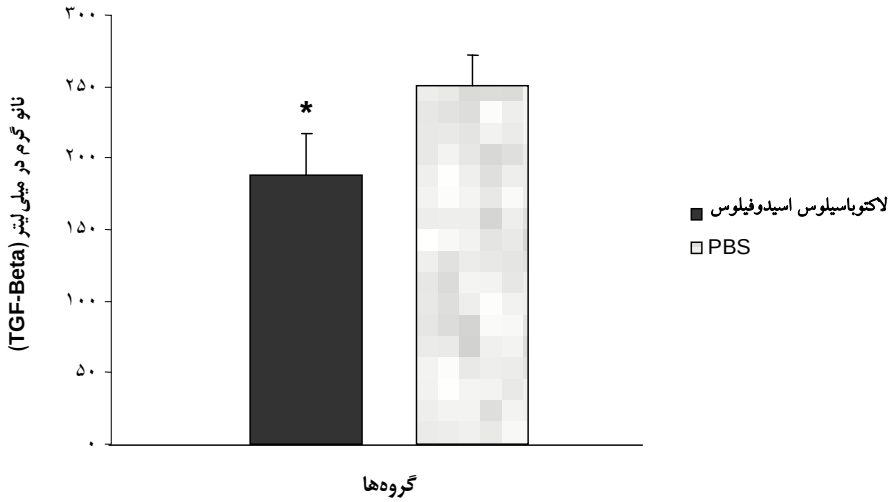
شکل ۱: بررسی حجم نهایی تومور: حجم تومور در دو جهت طول و عرض اندازه‌گیری شده، این عمل دو بار در هفته تا انتهای کار با استفاده از کولیس ورنیه صورت گرفت و سپس حجم تومور با فرمول ذکر شده در متن محاسبه شد. معنی‌داری داده‌ها در این تست ($P\leq ۰/۰۰۵$) در نظر گرفته شد.



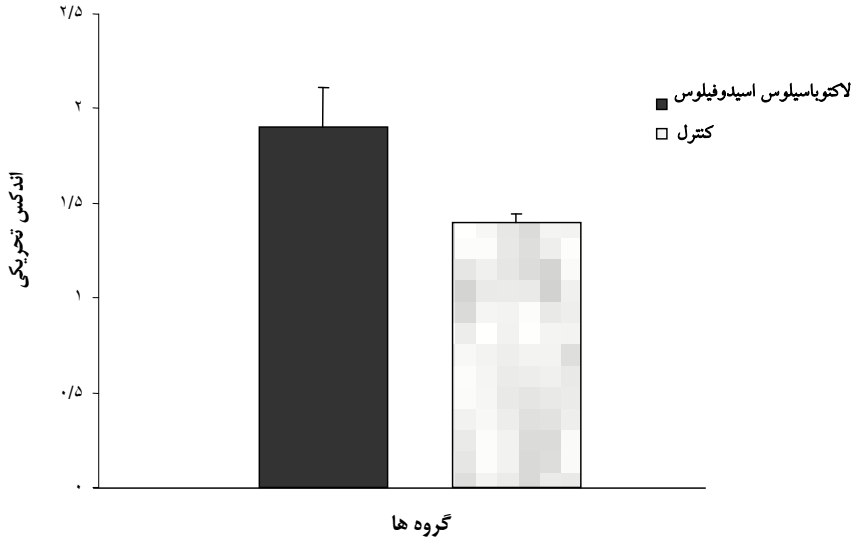
شکل ۲: میزان IL12 در سوپ رویی کشت سلول‌های طحالی: تحت شرایط استریل طحال از بدن موش‌ها خارج شد، سپس با استفاده از پنس و قیچی استریل طحال را قطعه‌قطعه نموده، از آن سوسپانسیون سلولی تهیه شد و در دور ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و با بافر لیز RBC مجاور شد، سپس در محیط RPMI+FBS (Sigma) سوسپانسیون شده و پس از شمارش سلولی تعداد ($۵x۱۰^{۶}$ cell/ml) از آن تهیه شد و در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای ۲ میلی‌لیتر از محیط فوق قرار گرفته، با آنتی‌ژن اختصاصی تومور به مدت ۶۰ ساعت تحریک شد. مایع رویی کشت بدست آمده از سلول‌های طحالی پس از این مدت جمع‌آوری و از لحاظ تولید IL12 با روش الایزا بررسی شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: میزان TGF-β در سوپ رویی کشت سلول‌های طحالی: مایع رویی کشت به‌دست آمده از سلول‌های طحالی پس از تحریک با آنتی‌ژن توموری جمع‌آوری و پس از فعال سازی TGF-β در PH اسیدی که طبق دستورالعمل کیت سنجش الیزای TGF-β کمپانی R&D صورت گرفت و جزییات آن در دستورالعمل کیت موجود بود از لحاظ میزان تولید سایتوکائین ,TGF-β با روش ELISA بررسی شد.



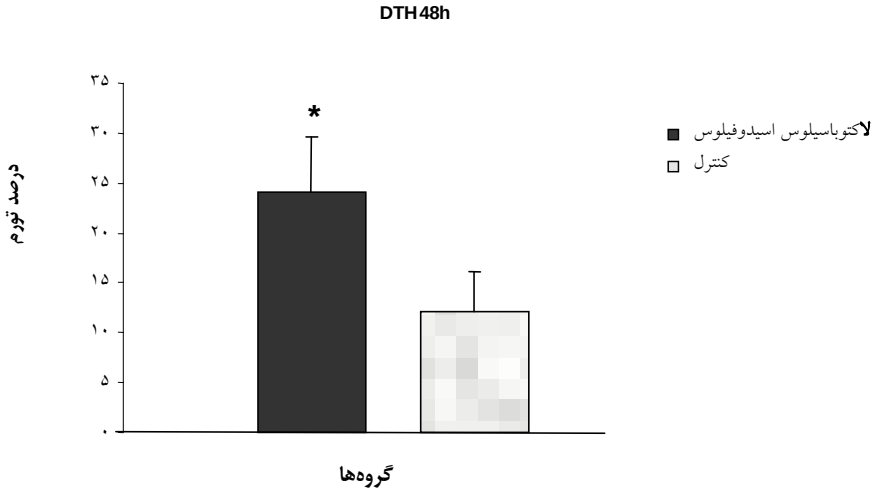
شکل ۴: تحریک سلول‌های طحالی با PHA: پس از تهیه‌ی کشت سلول طحالی سوسپانسیونی به میزان یک میلیون سلول در میلی‌لیتر تهیه شد و در پلیت‌های مسطح ۱۰۰ میکرولیتر از آن را در هر چاهک ریخته، سپس با استفاده از ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از PHA تحریک شد. همچنین به‌عنوان بلانک از محیط RPMI خالی استفاده شد، پلیت‌ها به‌مدت ۶۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی و در مجاورت با CO2 انکوبه شدند. سپس با استفاده از روش MTT در طول موج ۵۷۰nm جذب سلول‌های تحریک شده به تحریک نشده به‌عنوان اندکس تحریکی محاسبه شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج تست پرولیفراسیون سلول‌های ایمنی با روش MTT: برای این منظور از تست MTT استفاده شد که جزییات آن در بخش مواد و روش‌ها مشخص گردید. به‌طور کلی این نتایج نشان دهنده‌ی تحریک بیشتر و تکثیر بیشتر سلول‌های طحالی در مجاورت با PHA در موش‌های گیرنده‌ی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مقایسه با گروه کنترل بود که در واقع مربوط به اثر Immunostimulatory این باکتری بر سیستم ایمنی می‌باشد (شکل ۴).

نتایج بررسی میزان التهاب ناشی از DTH در ۴۸ ساعت: پس از تهیه‌ی آنتی‌ژن اختصاصی از بافت توموری یک موش مبتلا به آدنوکارسینومای پستان با روش سونیکیشن و تخلیص با دیالیز، این آنتی‌ژن در پای چپ موش‌های سرطانی گیرنده‌ی لاکتوباسیلوس و PBS تزریق شد و برای کنترل از تزریق PBS تنها در پای راست آن‌ها استفاده شد. طبق نتایج به‌دست آمده از این تست در ۴۸ ساعت پس از تزریق آنتی ژن اختلاف معنی‌داری ($P<0/005$) در التهاب موضعی پای چپ موش‌های گیرنده‌ی پروبیوتیک در مقایسه با موش‌های گروه کنترل وجود داشت (شکل ۵).



شکل ۵: نتایج بررسی میزان التهاب ناشی از DTH در ۴۸ ساعت: در ابتدا میزان ۲۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن اختصاصی تومور (تهیه شده از تومور اصلی حاوی ۲/۵ میکروگرم آنتی‌ژن) را در کف پای چپ و۲۰ میکرولیتر PBS را در کف پای راست هر موش از موش‌های هر دو گروه پروبیوتیک و کنترل تزریق گردید، سپس قطر التهاب ناحیه‌ی تزریق را در ۴۸ ساعت بعد با استفاده کولیس ورنیه ثبت شد. نتایج در گروه گیرنده‌ی پروبیوتیک در ۴۸ ساعت پس از تزریق دارای اختلاف معنی‌داری ($P<0/005$) نسبت به گروه کنترل بود.

بحث

بسیاری از مطالعات صورت گرفته روی بیماران مبتلا به سرطان پستان حاکی از کاهش پاسخ‌های ایمنی از جمله پاسخ افزایش حساسیت تاخیری، عملکرد سایتولیتیک، کاهش تکثیر در سلول‌های ایمنی و در نتیجه کاهش سایتوکائین‌ها در اثر ابتلا به این سرطان می‌باشد (۶). بنابراین استفاده از عوامل تقویت‌کننده سیستم ایمنی می‌تواند در تعیین پیش‌آگهی این سرطان تعیین‌کننده باشد. باکتری‌های خانواده‌ی لاکتوباسیل به طور رایج به‌عنوان پروبیوتیک در ماست وسایر لبنیات استفاده می‌شوند. ویژگی‌های تنظیم کنندگی و تحریک کنندگی این باکتری‌ها بر روی سیستم ایمنی به خوبی در مطالعات گذشته مشخص گردیده است (۱۴و۱۳). در واقع این دسته از

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری‌ها دارای تاثیرات مثبت زیادی در بدن هستند که از آن جمله می‌توان به جلوگیری از کارسینوژنزیس و رشد تومور اشاره کرد (۱۵). این باکتری‌ها حداقل به سه طریق خواص تنظیم کنندگی خود را در سیستم ایمنی نشان می‌دهند. یعنی با القای خواص آنتی باکتریال و پیش التهابی ناشی از عملکرد سایتوکائین‌های Th1 نظیر IFN-δ , IL-12 و TNF-ά ، با القای پاسخ ضد التهابی و تحمل خوراکی به‌واسطه‌ی تولید سایتو کاین‌های Th2 به ویژه IL-10,TGF-β و با تحریک پاسخ ایمنی ذاتی و اختصاصی به صورت موضعی و سیستمیک که شامل تولید آنتی بادی از کلاس‌های مختلف و تکثیر لنفوسیت‌های T اختصاصی است (۱۴). یکی از مسایلی که در مورد لاکتوباسیلوس‌ها و وجود آن‌ها به عنوان فلور گوارشی در انسان و بسیاری از حیوانات مطرح می‌باشد، این‌است که خواص تقویتی و تحریکی این عوامل فقط محدود به ایمنی مخاطی نبوده بلکه این باکتری‌ها می‌توانند با مکانیسم‌های مختلف سیگنال‌های لازم جهت تحریک و تقویت سیستم ایمنی مرکزی را نیز مخابره کنند و در این رابطه گزارشات زیادی مبنی بر کاربرد این عوامل در مقابله با عفونت‌های مختلف، سرطان‌ها و سایر ناهنجاری‌های ایمنولوژیک وجود دارد (۱۵). سایتوکائین‌های القایی به‌واسطه‌ی لاکتوباسیل‌ها دارای نقش عمده‌ای در القای خواص تنظیم کنندگی این عوامل بر روی سیستم ایمنی هستند (۱۶). در میان سایتوکائین‌های القایی توسط لاکتوباسیلوس‌های مختلف که به شدت سبب تحریک ماکروفاژها و سلول‌های کشنده‌ی طبیعی اثر می‌کنند می‌توان از IL-12 و IFN-δ نام برد که این موضوع می‌تواند تاییدی بر خواص ضد توموری و ضد عفونت این باکتری‌ها باشد (۱۷). در مقابل القای تولید سایتوکائین‌هایی مثل IL-10 و TGF-β توسط برخی دیگر از لاکتو باسیلوس‌ها، با مهار فعالیت ماکروفاژهای T تحریک و توسعه‌ی عملکرد سلول‌های T تنظیمی موجب کاهش التهاب می‌گردد (۱۸). در مطالعه‌ی حاضر یافته‌های ما نشان داد که تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌تواند موجب تحریک ترشح IL-12 در سلول‌های طحالی گردد. IL-12 از جمله سایتوکائین‌هایی است که بیشتر توسط سلول‌های عرضه‌کننده‌ی آنتی‌ژن (APCs) مثل ماکروفاژها و سلول‌های دندرتیک ترشح می‌شود و یکی از عوامل دخیل در تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌باشد که نقش عمده‌ای در تمایز سلول‌های لنفوسیت TH_0 به‌سمت TH_1 ایفا می‌کند (۱۹). از طرفی IL-12 می‌تواند به فعالیت سلول‌های کشنده‌ی طبیعی نیز کمک کند و در واقع به‌عنوان یک عامل تحریک کننده برای این سلول‌ها مطرح می‌باشد (۲۰) و از آنجا که سلول‌های کشنده‌ی طبیعی اولین خط دفاعی بدن در مقابله با تومورها می‌باشند، لذا تقویت آن‌ها می‌تواند منجر به پیش‌آگهی بهتری در بیمار گردد. از طرف دیگر کاهش میزان TGF-β به‌عنوان یک سایتوکائین سرکوب‌گر با پاسخ‌های ایمنی در موش‌های گیرنده‌ی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، می‌تواند به بهتر شدن شرایط دفاعی بدن در مقابله با تومور کمک کند. گذشته از اینکه فاکتور TGF-β در سرطان‌های مختلف توسط خود سلول‌های توموری در اطراف ناحیه‌ی تومور ترشح شده ضمن تحریک رگ‌زایی به داخل تومور، باعث فعالیت سلول‌های لنفوسیتی T Regulatory در اطراف تومور می‌گردد (۲۱) که این خود منجر به ایجاد تحمل ایمونولوژیک نسبت به سلول‌های توموری می‌شود و در واقع شرایط را برای رشد تومور و تهاجم آن بهتر می‌کند. لذا کاهش این سایتوکائین می‌تواند به نوعی نشانه‌ی بهتر بودن پیش‌آگهی سرطان باشد. یکی از نشانه‌های فعالیت ایمنی سلولی وابسته به سلول‌های Th1 که در واقع پاسخ ایمنی مورد نیاز در شرایط ابتلا به تومور می‌باشد، پاسخ افزایش حساسیت تاخیری DTH نسبت به آنتی‌ژنی است که بدن در ابتدا با آن مواجه بوده، پس از مدتی دوباره با آن برخورد می‌کند. در واقع در این شرایط بدن در پاسخ ثانویه ناشی از عملکرد

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های Th1 خاطره‌ای دچار یک التهاب موضعی می‌گردد که از ۲۴ ساعت پس از تماس دوباره آغاز شده و معمولا در ۴۸ ساعت به اوج رسیده، پس از ۷۲ ساعت فروکش می‌نماید (۲۲). در این مطالعه نتایج تست DTH نشانه‌ی دیگری از تاثیر تجویز پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس برتقویت پاسخ ایمنی سلولی وابسته به لنفوسیت‌های Th1 می‌باشد. در مطالعات دیگری بر روی اثرات پروبیوتیکی محصولات حاصل از تخمیر شیر توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کازیی بر پاسخ‌های ایمنی موش‌های مبتلا به سرطان پستان (۲۴و۲۳) نشان داده شده که این محصولات تخمیری نیز می‌توانند دارای خواص ایمنومدولاتوری باشند که وجه تمایز تحقیق حاضر با مطالعه‌ی نامبرده در استفاده از خود لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به‌عنوان ایمنومدولاتور و نه محصول حاصل از تخمیر آن بر روند پاسخ‌های ایمنی می‌باشد که در نوع خود مطالعه‌ای جدید می‌باشد و اگرچه این خواص پروبیوتیک‌ها در سایر مطالعات بررسی شده‌اند (۷)، اما در رابطه با مدل حیوانی سرطان تا به حال گزارشی مبنی بر تاثیر پروبیوتیک‌ها در بهبود پاسخ‌های ایمنی وجود نداشته است. در ابتدای بحث موضوع وجود کاهش در تکثیر سلول‌های ایمنی در افراد مبتلا به سرطان پستان در طی بررسی‌های انجام شده مطرح شد که در مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر میزان تکثیر سلول‌های ایمنی در طحال موش‌های گیرنده‌ی این پروبیوتیک نشان داد که می‌توان از این پروبیوتیک به‌عنوان یک عامل Immuno Stimolator برای تقویت و افزایش تکثیر سلول‌های ایمنی نیز بهره برد و در نهایت داده‌های مربوط به حجم نهایی تومور نیزکه نشان دهنده‌ی کاهش معنی‌دار حجم تومور در موش‌های گیرنده‌ی پروبیوتیک می‌باشد، می‌تواند تاییدی بر فعال شدن بازوی سلولی سیستم ایمنی در نتیجه‌ی تجویز لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس باشد. با توجه به مجموعه‌ی نتایج این مطالعه باید گفت می‌توان به نتایج خوبی از انجام مطالعات انسانی استفاده از این پروبیوتیک درتقویت سیستم ایمنی مبتلایان به این نوع سرطان امیدوار بود، ولیکن هنوز هم نیاز است تا مطالعات بیشتری برای شناخت دیگر مکانیسم‌ها و اثرات دقیق‌تر پروبیوتیک‌ها بر پاسخ‌های ایمنی در مقابله با تومورها صورت پذیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه‌ی طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره‌ی قرارداد ۶۹۵۴ مورخ ۱۳۸۷/۲/۲۷ بود که از دست‌اندرکاران تقدیر می‌گردد.

Reference

1- Willett W. The search for the causes of breast and colon cancer. *Nature*. 1989; 338: 389-94.

2- Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistic. *Cancer J Clin*. 2003; 53: 5-26.

3- American society. Breast cancer facts & figures. 2003-2004: 1-23.

4- Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breasty J*. 2007; 13:383-91.

5- Stewart TH, Heppner GH. Immunological enhancement of breast cancer. *Parasitol*. 1997; 115: S141-53.

6- Marrogi AJ, Munshi A, Merogi AJ. Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming

www.SID.ir

Archive of SID

growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma. *Int J Cancer*. 1997; 74: 492-501.

7- Perdigon G, de Macias ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgardo AP. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus. Immunol*. 1988; 63: 17-23.

8- Meydani SN, Ha WK. Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71: 861-72.

9- de Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71: 405-11.

10- Gackowska L, Michalkiewicz J, Krotkiewski M, Helmin Basa A, Kubiszewska I. Combined effect of different lactic acid bacteria strains on the mode of cytokines pattern expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Physiol Pharmacol*. 2006; 57: 13-21.

11- Perdigon G, Fuller R, Raya R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr Issues Intest Microbiol*. 2001; 2: 27-42.

12- Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002; 129: 263-76.

13- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1999. 17: 189-220.

14- Shida K, Suzuki T, Kiyoshima-Shibata J, Shimada SI, Nanno M. 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.

15- Asano M, Karasawa E, Takayama T. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* (LC 9018) against experimental mouse bladder tumor (MBT-2). *J Urol*. 1986; 136: 719-21.

16- Mcintosh GH, Royle PJ, Playne MJ. A probiotic strain of *L. acidophilus* reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer*. 1999; 35: 153-9.

17- Drisko JA, Giles CK, Bischoff BJ. Probiotics in health maintenance and disease prevention. *Altem med Rev*. 2003; 8: 143-55.

18- Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics and synbiotics.Approaching a definition. *Am J Clin Nutr*. 2001; 73: 362-4.

19- Bujalancel C, Moreno E, Jimenez-Valera M, Ruiz Bravo A. A probiotic strain of lactobacillus plant arum stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice: *Int J Food Microbiol*. 2007: 113: 28-34.

20- Kirjavainen PV, El-Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright FA. The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacillion mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999; 26: 131-5.

21- Trinchieri G: Interleukin-12: A cytokine produced by antigenpresenting cells with

www.SID.ir

Archive of SID

immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*. 1994; 84: 4008-27.

22- Hombach A, Heuser C, Abken H. Simultaneous targeting of IL2 and IL12 to Hodgkin's lymphoma cells enhances activation of resting NK cells and tumor cell lysis. *Int J Cancer*. 2005; 115: 241-7.

23- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 2000; 342: 1350-8.

24- de Waard R, Garssen J, Snel J, et al. Enhanced antigen-specific delayed-type hypersensitivity and immunoglobulin G2b responses after oral administration of viable *Lactobacillus casei* YIT9029 in Wistar and Brown Norway rats. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001; 8: 762-7.

www.SID.ir

Archive of SID

The Evaluation of Probiotic Effect of L.Acidophilus on the Immune Responses in BALB/C Mice against Transplanted Tumor Derived from Breast Tissue

Soltan Dallal MM[1], Yazdi MH[1], Hassan ZM[2], Holakuyee M[3], Abedi Mohtasab TP[1], Aminharaty F[1], Agha Amiri S[1], Mahdavi M[2]

[1]Dept. of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[2]Dept. of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[3]Dept. of Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Corresponding author: Soltan Dallal MM, Dept. of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email: soltanirad34@yahoo.com

Received: 5 Jul 2009 **Accepted:** 14 Aug 2010

Background and objective: Antitumor effect of lactic acid bacteria have been shown in many studies, this effect maybe due to the immunomodulatory properties of these bacteria. In present work we have studied the effect of *Lactobacillus (L) acidophilus* on the immune responses of BALB/c mice against transplanted tumor derived from breast tissue.

Materials and Methods: 6-8 week-old in-bred BALB/c mice, each weighing 25–30 g, were used. The mice were divided into two groups each consisted of 9 mice as test and control groups. The *L.acidophilus* ATCC4356 strain was used in this study. It was inoculated in MRS agar and cultivated overnight under anaerobic conditions then collected and resuspended in PBS. After preparation of proper amount of this suspension it was orally (2.7×10^8 *CFU/ml)* administered to the mice with a gastric feeding 2 weeks before tumor transplantation and 3 weeks after that, with 3 days break and 7 days administration. The control mice received an equal volume of PBS during the study.

Results: Results of the present work showed that *L.acidophilus* can increase the production of immunomodulatory cytokine IL-12 and decrease the TGF-β which can suppress immune response. Moreover, the growth rate of tumor in group which received *L.acidophilus* were decreased and the results of delayed type hypersensitivity (DTH) of this group in 48h were better than control group.

Conclusion: The results of our study suggest that daily use of *L.acidophilus* can regulate immune response with Th1 dominance and may be helpful for cancer immunotherapy, but further studies are needed to investigate the other mechanisms of this effect.

Keywords: Lactobacillus acidophilus, Cellular immune response, Breast cancer

www.SID.ir