مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۱/هفته چهارم مرداد ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۲۲

ارزیابی اثرات پیشگیرانه‌ی مخمر غنی شده با سلنیوم بر بافت‌شناسی کبد و فعالیت آنزیم‌های آن پس از القای سرطان کولورکتال در رت

جمیله عابدی[۱]، دکتر امیر توکمه‌چی[۲]، دکتر وحید نجاتی[۳]، دکتر رحیم حب نقی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان کولورکتال از شایع‌ترین علت‌های مرگ ناشی از سرطان در دنیا می‌باشد. مطالعات زیادی پیرامون به کارگیری پروبیوتیک‌ها و سلنیوم در پیشگیری از سرطان‌ها انجام شده است. مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی تغییرات آنزیم‌های کبدی رت شامل آلانین آمینو ترانسفراز (ALT یا Alanine transaminase)، آسپارات آمینو ترانسفراز (AST یا Aspartate transaminase) و آلکالین فسفاتاز (ALP یا Alkaline phosphatase) در سرطان کولون القا شده توسط دی متیل هیدرازین و اثرات پیشگیرانه‌ی مخمر Saccharomyces cerevisiae (اشکال ساده و غنی شده با سلنیوم) انجام گرفت.

روش‌ها: ۴۰ سر موش صحرایی ماده در محدوده‌ی وزنی ۲۵۰-۲۰۰ g به پنج گروه شاهد سالم، شاهد مبتلا به سرطان، مخمر، سلنیوم و مخمر غنی شده با سلنیوم تقسیم شدند. کلیه‌ی حیوانات به جز شاهد سالم، داروی سرطان‌زای دی متیل هیدرازین را دو بار در هفته به مدت پنج هفته و با دوز ۴۰ mg/kg دریافت کردند، اما گروه سالم فقط سرم فیزیولوژی دریافت کردند. گروه سلنیوم، سلنیوم محلول در آب را به مقدار ۴ mg/ml، گروه مخمر همزمان با دی متیل هیدرازین Saccharomyces cerevisiae را با تراکم ۵×۱۰^{۸} CFU/ml و گروه آخر، مخمر غنی شده با سلنیوم را به همین مقدار از طریق گاواژ روزانه دریافت کردند. در پایان هفته‌ی ۴۰، حیوانات تشریح، نمونه‌های خونی تهیه و میزان آنزیم‌ها سنجیده شد.

یافته‌ها: میانگین سطح آنزیم‌ها در گروه شاهد مبتلا به سرطان از همه بالاتر بود و در سایر گروه‌ها، کاهش معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵۰$). لازم به ذکر است بیشترین کاهش در سطح آنزیمی، مربوط به گروهی بود که مخمر غنی شده با سلنیوم را دریافت کردند.

نتیجه‌گیری: سطح آنزیم‌های کبدی در سرطان کولون القا شده با دی متیل هیدرازین افزایش می‌یابد. استفاده از مخمر غنی شده با سلنیوم، سبب کاهش میزان آنزیم‌های ALT، AST و ALP می‌گردد. مخمر غنی شده با سلنیوم از ایجاد تغییرات بافتی در کبد به هنگام دریافت ماده‌ی سرطان‌زا پیشگیری می‌کند.

واژگان کلیدی: رت، سرطان کولون، دی متیل هیدرازین، آنزیم‌های کبدی، سلنیوم، ساکارومایسس سرویسیه

ارجاع: عابدی جمیله، توکمه‌چی امیر، نجاتی وحید، حب نقی رحیم. **ارزیابی اثرات پیشگیرانه‌ی مخمر غنی شده با سلنیوم بر بافت‌شناسی کبد و فعالیت آنزیم‌های آن پس از القای سرطان کولورکتال در رت.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۱): ۹۹۱-۱۰۰۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده‌ی آتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر امیر توکمه‌چی
Email: atokmachi@gmail.com

مقدمه

سرطان کولورکتال (Colorectal cancer) از شایع‌ترین علت‌های مرگ ناشی از سرطان در دنیا می‌باشد. این بیماری چهارمین سرطان شایع در ایران است که یک پنجم تمام سرطان‌ها را شامل می‌شود (۱). سرطان کولورکتال به دو دسته‌ی ارثی و غیر ارثی طبقه‌بندی می‌شود که ۹۵-۶۵ درصد از نوع غیر ارثی می‌باشد. مطالعات زیادی ارتباط بین عوامل تغذیه و سرطان روده‌ی بزرگ را ثابت کرده است. برای مثال، می‌توان به میزان بالای چربی در رژیم غذایی به خصوص چربی حیوانی، گوشت قرمز، کتواستروئیدها (محصولات متابولیکی کلسترول)، محصولات پیرولیز (ترکیبات حاصل از کباب کردن یا سرخ کردن گوشت)، مصرف روزانه‌ی الکل، مصرف داروهای غیر استروئیدی اشاره داشت (۲). در مقابل، تغذیه‌ی با چربی پایین، کلسیم بالا و مصرف روزانه‌ی سبزیجات در رژیم غذایی، خطر ابتلا به سرطان کولورکتال را کاهش می‌دهد (۳).

از آن جایی که سرطان یک فرایند چند مرحله‌ای است، در مراحل ابتدایی پیشرفت آن به صورت کند است و در زمان طولانی اتفاق می‌افتد، اما در ادامه به صورت خیلی سریع پیشرفت می‌کند. هدف اصلی در پیشگیری از سرطان توسط مواد طبیعی یا مصنوعی، تأثیر بر فرایند سرطان‌زایی از طریق کند کردن و یا مهار این فرایند و یا معکوس کردن آن می‌باشد (۴).

روش‌های متعددی برای درمان سرطان کولورکتال استفاده می‌شود که نوع روش درمانی بر اساس مرحله‌ی بیماری و پیشرفت آن متفاوت می‌باشد. یکی از رایج‌ترین روش‌های درمانی برای تومورهای متاستاتیک استفاده از داروهای مختلف ضد التهابی و نیز داروهای شیمی درمانی است. اما عدم موفقیت کامل در درمان این بیماری به دلایل مختلفی است که مقاوم شدن همزمان سلول‌های سرطانی نسبت به داروهای مختلف، از مهم‌ترین این دلایل می‌باشد؛ همچنین این روش‌های درمانی دارای عوارضی هستند. بنابراین پیشگیری از این عارضه با رژیم غذایی و ترکیبات طبیعی، می‌تواند در بروز یا کاهش شدت بیماری نقش مهمی داشته باشد (۲).

پروبیوتیک‌ها دسته‌ای از میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان کافی، اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان می‌گذارند. پروبیوتیک‌ها خاصیت ضد سرطانی دارند و این عمل را با خنثی‌سازی اثر آسیب رساننده‌های ژنی در روده انجام می‌دهند (۵). پروبیوتیک‌ها غلظت آنزیم‌های مدفوعی و نمک‌های صفراوی را کم می‌کنند و با کاهش جذب موتاژن‌های مضر که عامل سرطان کولون هستند، نقش مؤثری در پیشگیری از این بیماری دارند. یکی از عواملی که می‌تواند در کنترل سرطان کمک کننده باشد، تقویت سیستم ایمنی است. امروزه یکی از مهم‌ترین موارد مطرح در زمینه‌ی تقویت سیستم ایمنی پروبیوتیک‌ها می‌باشند (۶). به کارگیری پروبیوتیک‌ها در پیشگیری از بیماری‌ها و بهبود وضعیت سلامتی انسان و دام، پیشینه‌ی چندین هزار ساله دارد (۷). مطالعات نشان داده است که Saccharomyces cerevisiae کشته شده با حرارت، توانایی ایجاد آپوپتوز و مرگ سلولی را در رده‌های سرطانی پستان (HCC-۷۰، ZR-۶۵ و MCF-۷) دارد (۶).

سلنیوم اثر حفاظتی در برابر عوامل مختلف

کارسینوژن دارد. همچنین این عنصر اثر معکوس در پیشرفت سرطان در مراحل ابتدایی دارد (۸). هر چند مکانسیم فعالیت ضد سرطانی این عنصر به طور کامل شناخته نشده است، اما می‌توان گفت این عنصر به عنوان آنتی اکسیدان و دفع کننده‌ی سموم و محافظ سیستم ایمنی است و در جلوگیری از رشد سلول‌های توموری و مهار رگ‌زایی نقش دارد (۹). سلنیوم یکی از اجزای مهم دو آنزیم تئورودکسین ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز است که این آنزیم‌ها در بدن به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کنند (۹).

مطالعات انجام گرفته توسط Rayman نشان می‌دهد که مصرف مخمر غنی شده با سلنیوم (شکل آلی این عنصر)، می‌تواند در مقایسه با سلنیوم معدنی، میزان این عنصر را به مقدار طبیعی در سرم خون برساند (۱۰).

در ارزیابی آسیب کبدی، سنجش سطوح آنزیم‌هایی نظیر (Alanine aminotransferase) ALT، (Alkaline phosphatase) ALP و (Asparate aminotransferase) AST به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد. وقوع نکروز یا آسیب غشای سلول باعث رها شدن این آنزیم‌ها به خون می‌شود. سطوح افزایش یافته‌ی این آنزیم‌های سرمی، حاکی از نشت سلولی و نشان‌گر آسیب ساختار و اختلال عملکرد غشاهای سلولی در کبد می‌باشد (۱۱).

هدف از این مطالعه بررسی تغییرات آنزیم‌های کبدی در سرطان کولون القا شده و تأثیر دی متیل هیدرازین، پروبیوتیک Saccharomyces cerevisiae، سلنیوم و ترکیب Saccharomyces cerevisiae با سلنیوم بر سطح این آنزیم‌ها می‌باشد.

روش‌ها

روش آماده‌سازی مخمر و غنی‌سازی با سلنیوم

مخمر مورد استفاده در این تحقیق از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های صنعتی ایران (PTCC ۵۲۶۹) تهیه شد. همچنین نمک سلنیت سدیم (Na_2SeO_3) از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه گردید. غنی‌سازی مخمر بر اساس روش استاندارد Yin و همکاران انجام شد (۱۲). ابتدا محیط کشت مخمر حاوی عصاره‌ی مخمر (۲ درصد)، گلوکز (۵ درصد) و K_2HPO_4 (۱ درصد) تهیه شد. سپس pH آن برابر با ۵/۸ تنظیم شد. در نهایت، محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. در مرحله‌ی بعد، به دو ظرف مجزای حاوی ۹۰ ml محیط کشت در شرایط استریل ۱۰ mg مخمر افزوده و اجازه داده شد مخمر در دمای ۲۷/۴ ^oC به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور شیکردار رشد نمایند.

بعد از ۱۲ ساعت به یکی از محیط کشت مخمرها مقدار ۹۰ µl سلنیت سدیم با غلظت ۱۰ mg/ml اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط قبلی ادامه یافت. ظرف دیگر، بدون اضافه کردن سلنیوم به حالت خالص و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس هم مخمر غنی شده با سلنیوم و هم مخمر ساده به صورت جدا و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و دو مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. سپس با سرم فیزیولوژی استریل رقیق و با دستگاه اسپکتوفتومتردر طول موج ۶۶۰ nm در نور جذبی ۱/۵۷ تنظیم گردید تا تراکم 5×10^8 CFU/ml از سلول مخمر به دست آید.

تهیه‌ی حیوانات و گروه‌بندی آن‌ها

حیوانات مورد استفاده در این مطالعه، ۴۰ سر موش

صحرایی مـاده‌ی نـژاد ویسـتار بودنـد کـه از خانـه‌ی حیوانات دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه تهیه شدند. مـوش‌هـا در محـدوده‌ی سـنی ۵-۴ هفتـه و وزنـی ۲۵۰-۲۰۰ g قـرار داشـتند. آن‌هـا در اتـاق بـا درجـه حـرارت ۲۵-۲۰ °C و بـا شـرایط نـوری ۱۲ سـاعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از سه هفته سازگاری حیوانات با شرایط محیط، بـه صـورت تصادفی به پنج گروه ۸ تایی تقسیم شدند.

گروه اول به عنوان شاهد سالم در نظر گرفته شـد و گـروه دوم، سـوم، چهـارم و پـنجم جهـت القـای کارسینوم کولون، ماده‌ی سـرطان‌زای ۱ و ۲ دی متیـل هیدرازین را با دوز ۴۰ mg/kg وزن بدن و به صورت زیر جلدی، دو بار در هفته و به مدت ۵ هفته دریافت کردند. گروه دوم همزمان با دریافت ماده‌ی سرطان‌زا، سلنیوم را به صـورت محلـول در آب خـوراکی و بـه مقدار ۴ mg/l دریافت کردند (۹).

همزمان با دی متیل هیـدرازین، گـروه سـوم مخمـر Saccharomyces cerevisiae را بـــا تـــراکم ۵×۱۰^{۸} CFU/ml و بـه میـزان ۱ ml و گـروه چهـارم مخمر غنی شده با سلنیوم را به همین غلظت و میـزان از طریق گاواژ روزانه دریافت کردند. گروه پنجم به عنـوان شاهد مبتلا به سرطان تنها مـاده‌ی سـرطان‌زا را دریافـت کردنـد. حیوانـات گـروه اول (شـاهد سـالم) بـا سـرم فیزیولوژی گاواژ شدند. مدت تیمار در این گـروه‌هـا ۱۰ هفته ادامه یافت که همزمـان بـا اولـین تزریـق دی متیـل هیدرازین شروع شد و تا ۵ هفته بعـد از آخـرین تزریـق ادامه یافت. جهت ایجـاد کارسـینوم کولـون، رت‌هـا تـا هفته‌ی ۴۰ با آب و غذای معمولی تغذیه شدند.

القای سرطان

مـاده‌ی کارسـینوژن دی متیـل هیـدرازین (DMH یـا Dimethyl hydrazine) بلافاصله قبـل از اسـتفاده در ۱ mM ETDA حل شد و pH آن به ۶/۵ رسانده شد. سپس با دوز ۴۰ mg/kg وزن بـدن بـه صـورت زیـر جلدی دو بار در هفته و به فاصـله‌ی مسـاوی تزریـق شد. در هفته‌ی ۴۰ القای سرطان با تهیه‌ی مقاطع بافتی از روده و مشاهده‌ی کریپـت‌هـای نابـه‌جـا (ACF یـا Aberrant crypt foci) تأیید شد. در هفته‌ی ۴۰، پـس از بیهوش کـردن رت‌هـا خـون‌گیـری از قلـب انجـام، پلاسما جدا و آنالیزهای بیوشیمایی انجـام شـد. جهـت تهیه‌ی نمونه‌های هیستوپاتولوژیک، بافت کبد خـارج و پس از پایدارسازی در فرمالین ۱۰ درصد و قالب‌گیـری در پـارافین، بـرش‌هـای ۵ µ تهیـه و مقـاطع پـس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسلین و ائوزین بررسی شدند.

سنجش آنزیم‌ها

سنجش آنزیم‌های ALT، AST و ALP با اسـتفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون و دسـتگاه اتوآنـالیزور مدل BT۳۰۰۰ اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریـانس یـــک طرفـــه (One-way ANOVA یـــا One-way analysis of variance)، نـرم‌افـزار SPSS نسـخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون Tokey اسـتفاده شـد. در تمـام بررسـی‌هـا، سطح معنی‌دار بـودن آزمـون‌هـا $P < ۰/۰۵۰$ در نظـر گرفته شد.

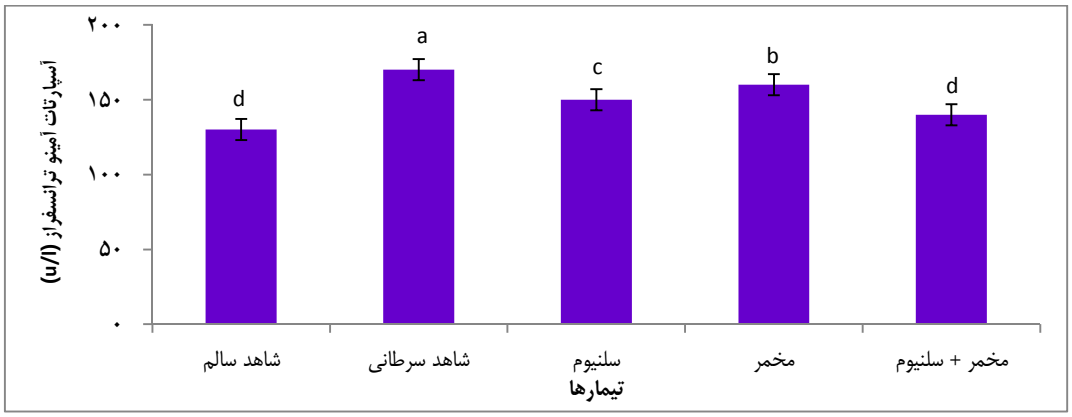
یافته‌ها

یافته‌ها نشان داد که سطح آنزیم آسپارتات (AST) در هر چهار گروه دریافت کننـده‌ی دی متیـل هیـدرازین نسبت به گروه شاهد سالم افزایش یافته است که ایـن

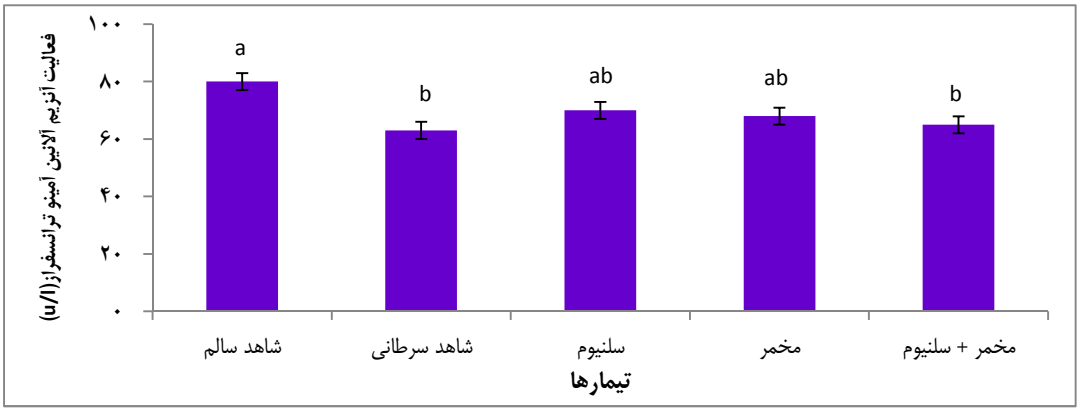
افزایش در گروه دوم که تنها دی متیل هیدرازین دریافت کردند، معنی‌دار بود. شکل ۱ نشان می‌دهد تیمار با پروبیوتیک توانسته است تأثیر معنی‌دار ($P < ۰/۰۵۰$) بر کاهش سطح آنزیم نسبت به گروه شاهد مبتلا به سرطان داشته باشد. هر چند که این میزان کاهش به سطح شاهد سالم نرسیده است و تفاوت معنی‌دار ($P < ۰/۰۵۰$) بین این دو گروه است.

سطح آنزیم در گروه سلنیوم نیز تفاوت معنی‌داری ($P < ۰/۰۵۰$) را با شاهد مبتلا به سرطان نشان داد و این کاهش بیشتر از گروه مخمر بود. گروه پنجم که مخمر غنی شده با سلنیوم را همراه با کارسینوژن دریافت کرده بودند، کاهش بیشتری نسبت به هر دو تیمار (مخمر و سلنیوم) نشان داد و کاهش معنی‌داری ($P < ۰/۰۵۰$) نسبت به گروه شاهد مبتلا به سرطان داشت. هر چند سطح آنزیم به اندازه‌ی آن در گروه شاهد سالم نرسید، اما تفاوت معنی‌داری ($P < ۰/۰۵۰$) نیز با آن نداشت.

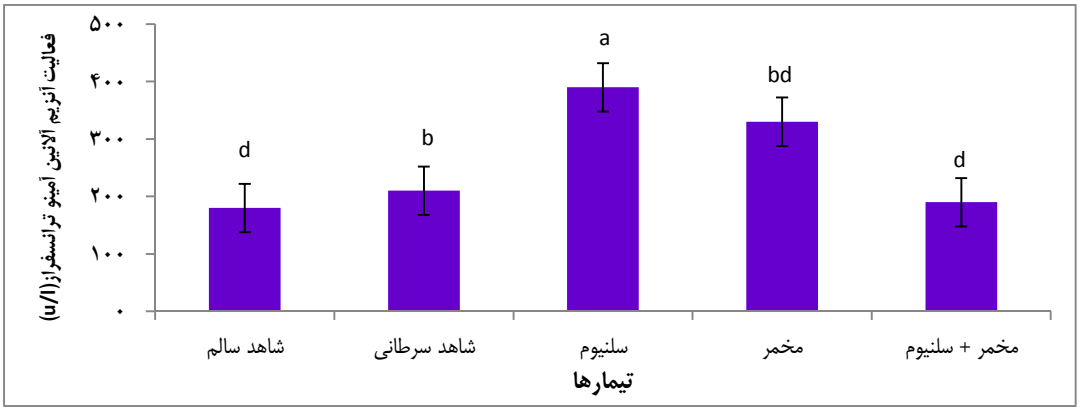
در بررسی فعالیت آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) سرم، افزایش سطح آن در گروه شاهد مبتلا به سرطان نسبت به گروه شاهد سالم مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۱. سطح آنزیم AST (Aspartate transaminase) سرم تیمارهای مختلف. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵۰$ می‌باشد.



شکل ۲. سطح آنزیم ALT (Alanine transaminase) سرم تیمارهای مختلف. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $P < ۰/۰۵۰$ می‌باشد.



شکل ۳. سطح آنزیم ALP (Alkaline phosphatase) سرم تیمارهای مختلف. حروف متفاوت نشان دهنده‌ی وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۵۰ می‌باشد.

سطح آنزیم در گروه‌هایی که به همراه دی متیل هیدرازین، مخمر، سلنیوم و مخمر غنی شده با سلنیوم را دریافت کردند، نسبت به شاهد مبتلا به سرطان کاهش و نسبت به شاهد سالم افزایش داشت، اما هیچ کدام از این تغییرات معنی‌دار (P < ۰/۰۵۰) نبود.

نتایج آنالیز بیوشیمیایی آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) طبق شکل ۳ نشان داد که سطح آنزیم به طور معنی‌داری (P < ۰/۰۵۰) درگروه شاهد مبتلا به سرطان نسبت به گروه تحت تیمار افزایش یافته است. همچنین گروه تیمار شده با سلنیوم، تفاوت معنی‌داری (P < ۰/۰۵۰) با شاهد سالم و بقیه‌ی گروه‌ها نشان داد؛ به طوری که میزان افزایش آن از گروه شاهد مبتلا به سرطان نیز بیشتر بود.

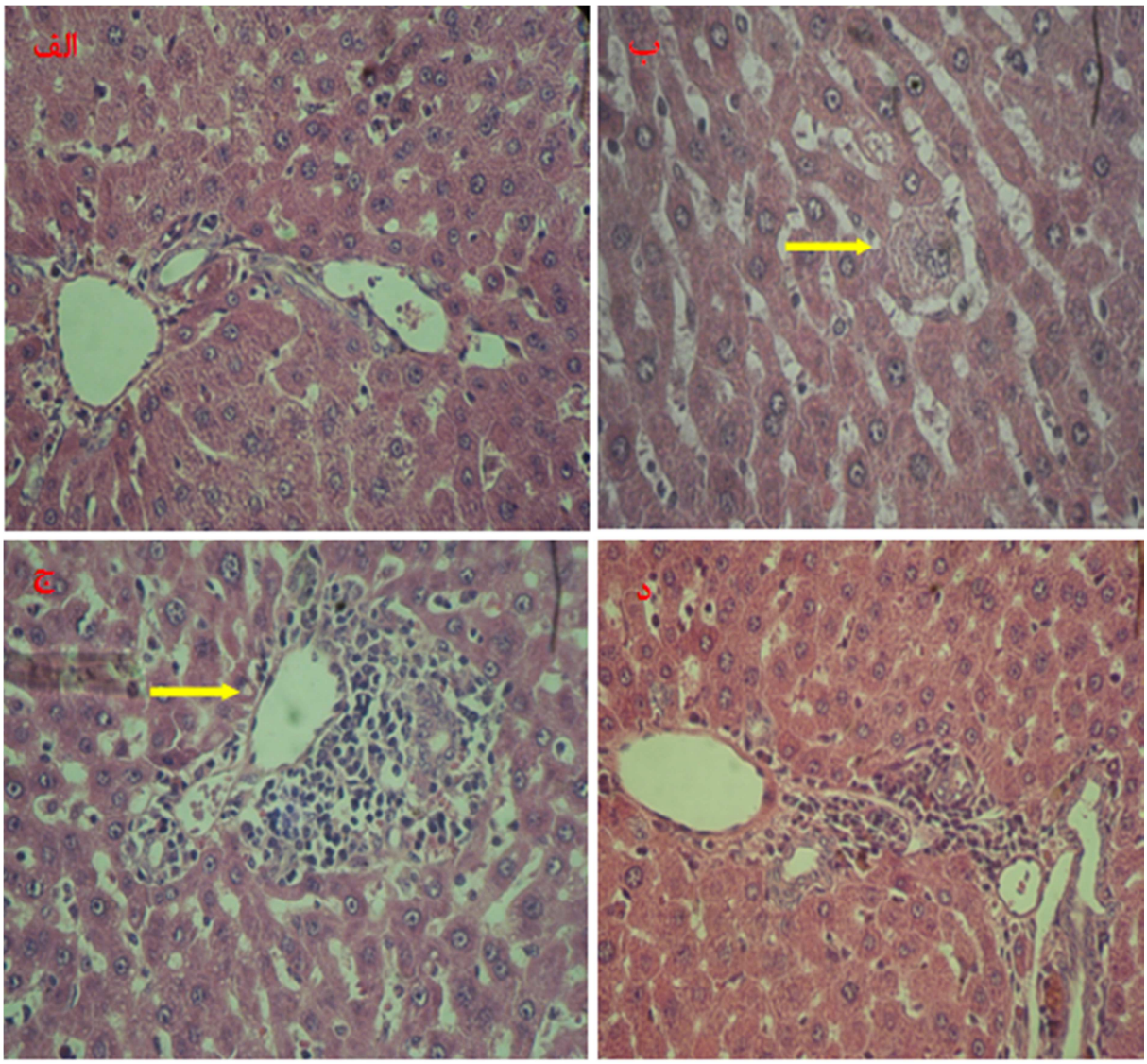
گروه‌های تیمار شده با مخمر و مخمر غنی شده با سلنیوم، کاهش قابل توجهی نسبت به گروه شاهد مبتلا به سرطان نشان دادند؛ به طوری‌که سطح این آنزیم در گروه تغذیه شده با مخمر غنی شده، نزدیک به شاهد سالم بود و تفاوت معنی‌داری (P < ۰/۰۵۰) با گروه شاهد سالم نشان نداد.

نتایج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژیکی بافت کبد

برای بررسی این احتمال که در اثر استفاده از دی متیل هیدرازین در کبد، تغییرات بافت شناسی ایجاد شده است، مقطع‌گیری از کبد سه گروه شاهد سالم، مخمر غنی شده با سلنیوم و گروه شاهد مبتلا به سرطان انجام شد. نتایج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژی بافت کبد حاکی از آسیب دیدگی کبد در موش‌های مبتلا به سرطان بود. این آسیب دیدگی، به صورت تشکیل کانون‌های آماسی فراوان در نقاط مختلف کبد این گروه بود. همان‌طور که شکل ۴ نشان می‌دهد، در کبد موش سالم فضای پورت و فضاهای سینوزوئیدی به صورت طبیعی دیده می‌شود (الف)، اما در کبد موش شاهد مبتلا به سرطان، سلول‌ها تحلیل رفته‌اند و فضاهای سینوزوئیدی گسترده‌تر شده‌اند. وجود کانون‌های آماسی در فضای پورت مشاهده می‌گردد (ج)، همچنین در کبد موش شاهد مبتلا به سرطان، سلول‌های غیر طبیعی و تغییر یافته هر چند به تعداد کم دیده می‌شود (ب). در کبد موش تیمار شده با ترکیب مخمر غنی شده با سلنیوم، نسبت به موش شاهد مبتلا به سرطان، کاهش

درکانون‌های آماسی دیده می‌شود و فضای پورت به طور تقریبی سالم است و فضاهای سینوزوئیدی تا حدودی در حالت طبیعی است و تحلیل رفتن سلول‌ها نسبت به موش شاهد مبتلا به سرطان کمتر است (د).

این مطالعات بافتی نشان می‌دهد که استفاده از ترکیب مخمر غنی شده با سلنیوم تأثیر چشمگیری در جلوگیری از تشکیل کانون‌های آماسی و تخریب کبدی در برابر مواد سرطان‌زا دارد و تغذیه با این ترکیب (مخمر غنی شده با سلنیوم) از آسیب سلول‌های کبدی در برابر ماده‌ی کارسینوژن دی متیل هیدرازین تا حدی زیادی کاسته است.



شکل ۴. برش بافتی کبد: کبد موش شاهد سالم فضای پورت سالم و فضاهای سینوزوئیدی طبیعی (الف)، کبد موش شاهد مبتلا به سرطان، افزایش فضاهای سینوزوئیدی و وجود کانون‌های آماسی هم در فضای پورت و هم در سینوزوئید. فلش قسمت (ب) نشان دهنده‌ی سلول تغییر یافته و غیر طبیعی، در قسمت (ج) فلش نشان دهنده‌ی کانون آماسی در فضای پورت است. کبد موش تیمار شده با ترکیب سلنیوم و مخمر که نسبت به شاهد مبتلا به سرطان در کانون‌های آماسی دیده کاهش می‌شود و فضای پورت سالم است (د).

بحث

فعالیت آنزیم‌های کبدی سرم برای ارزیابی عملکرد آن مورد استفاده قرار می‌گیرند و افزایش در فعالیت آن‌ها، مربوط به نابودی هپاتوسیت‌ها یا آسیب کبدی صرف نظر از علت آن می‌باشد (۱۳). وقوع نکروز یا آسیب غشای سلول، باعث رها شدن این آنزیم‌ها به گردش خون می‌شود. افزایش سطح AST، آسیب کبد هنگام ابتلا به بعضی بیماری‌ها نظیر هپاتیت‌های ویروسی، انفارکتوس قلبی و صدمات عضلانی را نشان می‌دهد. ALT که تبدیل آلانین به پیروات و گلوتامات را کاتالیز می‌کند، برای کبد اختصاصی است و پارامتر مناسب‌تری برای تشخیص آسیب کبد می‌باشد (۱۴).

بر خلاف ALT که به طور عمده در کبد یافت می‌شود، AST در بسیاری از بافت‌های دیگر از جمله قلب، عضلات اسکلتی، کلیه و مغز یافت می‌شود و از این رو کمتر به عنوان یک عامل اختصاصی در بیماری‌های کبدی مطرح است. به طور تقریبی در تمام آسیب‌های کبدی سطح این دو آنزیم بالا می‌رود و بالاترین مقدار در نکروز شدید کبد برای مثال در ضایعات کبدی ناشی از سموم و کلاپس دراز مدت خون رخ می‌دهد (۱۳).

افزایش سطح سرمی ALP به دلیل افزایش تولید در حضور فشار فزاینده‌ی صفراوی است (۱۴). این افزایش غلظت به طور معمول بیانگر اختلال در عملکرد سیستم صفراوی است.

نتایج این مطالعه نشان داد که سطح هر سه آنزیم در گروه شاهد مبتلا به سرطان نسبت به شاهد سالم افزایش دارد. هر چند که این افزایش در ALT معنی‌دار نبود، اما دو آنزیم دیگر افزایش معنی‌داری را نشان دادند ($P < ۰/۰۵۰$). این می‌تواند به دلیل تأثیر سمیت DMH کبد و یا از بین رفتن ثبات غشای هپاتوسیت‌ها باشد. این ماده‌ی سرطان‌زا در کبد و کولون توسط سیتوکروم p۴۵۰ به متابولیت فعال Methyldiazuniom تبدیل می‌شود که این متابولیت فعال باعث ایجاد جهش می‌گردد. سپس این متابولیت فعال با اتصال به DNA باعث ایجاد جهش‌های O_6-متیل گوانین در DNA می‌شود (۲). دادخواه و همکاران نشان دادند که DMH باعث اختلال در سیستم آنتی اکسیدانی در بافت کبد می‌شود. همچنین گزارش کردند میزان فعالیت آنزیم‌های متابولیزه کننده‌ی مواد سمی در کبد و کولون در اثر DMH افزایش می‌یابد (۲).

سطح آنزیم ALT در هر سه گروه تیمار شده با مخمر، سلنیوم و مخمر غنی شده با سلنیوم در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به سرطان کاهش نشان داد؛ اما این کاهش معنی‌دار نبود ($P < ۰/۰۵۰$). در گروه تحت تیمار با مخمر غنی شده با سلنیوم، کاهش بیشتری نسبت به دو گروه دیگر دیده شد.

در سنجش آنزیم AST تفاوت معنی‌داری ($P < ۰/۰۵۰$) بین گروه شاهد سالم و مبتلا به سرطان وجود داشت، که این افزایش در ضایعات کبدی دیده می‌شود. هر چند در سایر گروه‌های تیمار شده با DMH این افزایش دیده می‌شود، اما میزان افزایش آن در گروه تیمار شده با مخمر و سلنیوم و مخمر غنی شده با سلنیوم کمتر از گروه شاهد مبتلا به سرطان است و این کاهش در گروه تیمار شده با مخمر غنی شده با سلنیوم، نسبت به شاهد مبتلا به سرطان معنی‌دار است ($P < ۰/۰۵۰$).

نتایج بیوشیمیایی حاصل از سنجش آنزیم ALP

نیز افزایش معنی‌دار ($P < ۰/۰۵۰$) بین گروه‌های شاهد سالم و شاهد مبتلا به سرطان و کاهش در حد معنی‌داری ($P < ۰/۰۵۰$) در گروه مخمر و مخمر غنی شده با سلنیوم را نشان داد. اما در گروه تیمار شده با سلنیوم، افزایش سطح آنزیم حتی بیشتر از شاهد مبتلا به سرطان مشاهده شد.

Ng و همکاران نشان دادند پروبیوتیک‌ها از جذب سموم جلوگیری می‌کنند و با کاهش جذب آمونیاک و سموم، سبب کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو می‌شوند (۸). در نتیجه، به درمان بیماری‌های کبدی کمک می‌کنند و از ابتلا به بیماری‌های کبدی نیز پیشگیری می‌کنند. همچنین Shida و همکاران بیان کردند که پروبیوتیک‌ها می‌توانند موجب کاهش میزان سرطان‌ها، بیماری‌های عفونی، بهبود بیماری‌های التهابی روده و همچنین جلوگیری از آلرژی‌ها در مدل‌های تجربی حیوانی و انسان شوند (۱۵). کاهش در سطح سرمی آنزیم‌های کبدی در گروه‌های تیمار شده با پروبیوتیک‌ها نتیجه‌ی افزایش پاسخ ایمنی و کاهش استرس‌های ناشی از بیماری‌ها در کبد می‌باشد (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر نیز تیمار با مخمر توانست سطح هر سه آنزیم را نسبت به گروه شاهد مبتلا به سرطان کاهش دهد.

Foster و Sumar گزارش کردند که ارتباط اکولوژیک بین میزان سلنیوم موجود در گیاهان و میزان مرگ و میر سرطان‌ها در ایالات متحده، دلالت بر اثرات ضد سرطانی این عنصر دارد. البته باید توجه داشت که سلنیوم در میزان بالا می‌تواند سمی باشد و خطر بروز سرطان را افزایش دهد (۱۷).

Foltz و Schwarz برای اولین بار پیشنهاد کردند که سلنیوم با وجود ویژگی‌های سمیت در غلظت‌های بالا ممکن است یک عنصر ضروری برای بدن باشد. یکی از نقش‌های سلنیوم به عنوان یک ماده‌ی مغذی پیشگیری کننده از سرطان است (۱۸).

در بررسی آنزیم AST کاهش معنی‌دار بین گروه سلنیوم با گروه شاهد سالم مشاهده شد و در آنزیم ALT نیز کاهش در سطح آنزیم در گروه سلنیوم دیده شد؛ هر چند این کاهش معنی‌دار نبود ($P < ۰/۰۵۰$). این تأثیر ممکن است به علت داشتن خصوصیات آنتی اکسیدانی و نقش مهم آن در حذف رادیکال‌های آزاد باشد که باعث تعدیل آنزیم‌های کبدی می‌شود. اما نتایج مربوط به آنزیم ALP نشان داد که گروه تغذیه شده با سلنیوم نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری دارد. این می‌تواند به علت اثر جانبی و ایجاد سمیت دارویی بر روی سلول‌های کبدی و یا انسداد مجاری صفروای در اثر مصرف سلنیوم معدنی باشد. همچنین افزایش می‌تواند دلایل دیگری نیز داشته باشد، برای مثال پازوکی و همکاران بیان کردند که غلظت سرمی آلکالین فسفاتاز می‌تواند هم منشأ کبدی و هم منشأ غیر کبدی داشته باشد، برای مثال در برخی بیماری‌های استخوانی و برخی بدخیمی‌ها افزایش می‌یابد. گاهی تومورها قادر به تولید آلکالین فسفاتاز هستند (۱۳).

در هر سه آنزیم سنجیده شده، سطح کاهش در گروه مخمر غنی شده با سلنیوم نسبت به سایر تیمارها بیشتر است و این کاهش در AST هم نسبت به گروه شاهد مبتلا به سرطان و هم نسبت به تیمار مخمر معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵۰$). در آنزیم ALP این کاهش معنی‌دار نسبت به هر سه گروه (شاهد مبتلا به سرطان، مخمر و سلنیوم) مشاهده شد؛ به طوری که نزدیک به شاهد سالم بود و تفاوت معنی‌داری با سالم نداشت.

کبد یکی از اندام‌های اصلی جانوران است. برای بررسی‌های پاتولوژیک کبد مناسب است؛ زیرا ضایعات پاتولوژیک ناشی از مواد شیمیایی و سمی در آن ایجاد می‌شود. کبد نقش مهمی در متابولیسم و دفع مواد زاید شیمیایی و فلزات سنگین ایفا می‌کند و غلظت این مواد سمی در کبد بیشتر از سایر ارگان‌های بدن است. بنابراین سلول‌های کبدی اولین هدف مواد سمی هستند.

برای بررسی این احتمال که در اثر استفاده از دی متیل هیدرازین در کبد تغییرات بافت شناسی ایجاد شده است، مقطع‌گیری از کبد سه گروه شاهد سالم، مخمر غنی شده با سلنیوم و گروه شاهد مبتلا به سرطان انجام شد. نتاج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژی بافت کبد حاکی از آسیب دیدگی کبد در موش‌های مبتلا به سرطان بود که این آسیب دیدگی به صورت تشکیل کانون‌های آماسی فراوان در نقاط مختلف کبد این گروه می‌باشد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که استفاده از داروی کارسینوژن باعث آسیب در بافت کبد شده است؛ به طوری که کانون‌های آماسی هم در فضای پورت و هم در سایر قسمت‌های کبد مشاهده می‌شود. در توضیح آن باید گفت این ضایعات در کبد اگر چه به طور مستقیم مرتبط با تغییرات نئوپلاستیک نمی‌باشند؛ اما می‌تواند به صورت غیر مستقیم بازتابی از سرطان در کولون باشد.

با توجه به این‌که یکی از عروق تأمین کننده‌ی خون‌رسانی کبد، سیستم باب کبدی است و این شبکه‌ی عروقی، خون سیاهرگی حاوی مواد غذایی را از لوله‌ی گوارشی به کبد حمل می‌کند، هر گونه توده‌ی اضافی فشارنده به این سیستم، می‌تواند بر خون رسانی کبد تأثیر بگذارد، تغذیه‌ی هپاتوسیت‌ها و نیز حجم خون وارد شده به سینوزوئیدها را تحت تأثیر قرار دهد. در ضمن، ورود محصولات سرطانی از سیستم باب به کبد می‌تواند توجیه کننده‌ی حضور سلول‌های التهابی در فضاهای پورت کبد و سینوزوئیدها باشد. پروبیوتیک‌ها با کاهش جذب سموم، سبب کاهش التهاب و آسیب کبدی می‌شوند و از بیماری‌های کبدی پیشگیری می‌کنند (۱۹).

Yu و همکاران استفاده از مکمل سلنیوم را برای پیشگیری از سرطان اولیه‌ی کبدی و همچنین سایر بیماری‌های کبدی نظیر هپاتیت B مؤثر دانستند (۲۰). همچنین به گفته‌ی این پژوهشگران، سلنیوم با اثر بر روی سیستم ایمنی و شرکت در پاسخ‌های اولیه و ثانویه‌ی ایمنی و جلوگیری از مسمومیت سلولی، از آسیب بافت کبد در آغاز سرطان کبدی جلوگیری می‌کند. Chen و همکاران گزارش کردند که ترکیبات استخراج شده از مخمر با مهار رشد سلولی و تنظیم چرخه‌ی سلولی باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کبد انسانی می‌شوند (۲۱).

Yu و همکاران همچنین اثربخشی سلنیوم غنی شده در مخمر را برای پیشگیری از آسیب کبدی در مراحل ابتدایی سرطان کبدی گزارش کردند (۲۰). نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد که استفاده از مخمر غنی شده با سلنیوم می‌تواند از اثرات آسیب DMH بر روی بافت کبد و سلول‌های کبدی بکاهد. با استفاده از ترکیب مخمر غنی شده با سلنیوم، تأثیر چشمگیری در جلوگیری از تشکیل کانون‌های آماسی و تخریب کبدی در برابر ماده‌ی سرطان‌زا مشاهده شد.

تحت شرایط مناسب مخمرها قادر هستند مقادیر زیادی از ریز عنصرها مثل سلنیوم را در خود جذب کنند. ریز عنصرها در اشکال آلی سمیت کمتری

دارند. مخمرها قادر به تجمع مواد معدنی مختلف و تشکیل گیرنده‌های آلی در غلظت‌های خیلی بالاتر از حالت طبیعی هستند (۲۲).

Utterback و همکاران گزارش کردند سلنومخمر موجب افزایش بیشتری در سلنیوم تخم‌مرغ در مقایسه با سلنیت سدیم می‌شود. یکی از علل بالا بودن سلنیوم با استفاده از سلنومخمر این است که سلنیوم موجود در سلنومخمر به طور عمده به شکل سلنومیتونین می‌تواند در ساختمان پروتئین‌ها وارد شود. در حالی که منابع غیر آلی سلنیوم مانند سلنیت سدیم در دسترس نیستند (۲۳).

بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که سطح آنزیم‌های کبدی در سرطان کولون القا شده با دی متیل هیدرازین افزایش می‌یابد. استفاده از مخمر غنی شده با سلنیوم سبب کاهش آنزیم های ALT، AST و ALP می‌گردد. مهم‌ترین توجیه آن است که سلنیوم غنی شده در مخمر به فرم سلنو متیونین است که در مقایسه با سایر شکل‌های سلنیوم بهتر جذب می‌شود و قابلیت دسترسی زیستی (Bioavailability) بالاتری دارد. مطالعات بافتی نیز نشان داد که استفاده از ترکیب مخمر با سلنیوم تأثیر چشمگیری در جلوگیری از تشکیل کانون‌های آماسی و تخریب کبدی در برابر مواد سرطان‌زا دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی دانشکده‌ی علوم دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.

References

1. Mahdavinia M, Bishehsari F, Ansari R, Norouzbeigi N, Khaleghinejad A, Hormazdi M, et al. Family history of colorectal cancer in Iran. BMC Cancer 2005; 5: 112.
2. Dadkhah A, Fatemi F. Effects of anti tomuric property of black cumin on induced colon cancer with dimethyl hydrazine in rat. Proceedings of the 1st Province Seminar of the latest Findings of the Clinical Lab Scinces; 2009 May 5; Qom, Iran. p. 1-32. [In Persian].
3. Manju V, Nalini N. Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. Clin Chim Acta 2005; 358(1-2): 60-7.
4. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. Adv Exp Med Biol 2007; 595: 1-75.
5. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am J Clin Nutr 2001; 73(2 Suppl): 451S-5S.
6. Ghoneum M, Matsuura M, Braga M, Gollapudi S. S. cerevisiae induces apoptosis in human metastatic breast cancer cells by altering intracellular Ca2+ and the ratio of Bax and Bcl-2. Int J Oncol 2008; 33(3): 533-9.
7. Fuller R, Gibson GR. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. Scand J Gastroenterol Suppl 1997; 222: 28-31.
8. Sakoda LC, Graubard BI, Evans AA, London WT, Lin WY, Shen FM, et al. Toenail selenium and risk of hepatocellular carcinoma mortality in Haimen City, China. Int J Cancer 2005; 115(4): 618-24.
9. Karunasinghe N, Ferguson LR, Tuckey J, Masters J. Hemolysate thioredoxin reductase and glutathione peroxidase activities correlate with serum selenium in a group of New Zealand men at high prostate cancer risk. J Nutr 2006; 136(8): 2232-5.
10. Rayman MP. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? Br J Nutr 2004; 92(4): 557-73.
11. Drotman RB, Lawhorn GT. Serum enzymes as indicators of chemically induced liver damage. Drug Chem Toxicol 1978; 1(2): 163-71.
12. Yin H, Fan G, Gu Z. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (Saccharomyces cerevisiae) by response surface methodology (RSM). LWT - Food Science and

Technology 2010; 43(4): 666-9.
13. Harrison TR. Harrison's principles of internal medicine: Diseases of the liver and bile ducts. Trans. Pazooki B, Moradi Moghaddam A, Nariman Sadad AS. Tabriz, Iran: Zoghi Publication; 1991.
14. Muriel P, Garciapina T, Perez-Alvarez V, Mourelle M. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. J Appl Toxicol 1992; 12(6): 439-42.
15. Shida K, Suzuki T, Kiyoshima-Shibata J, Shimada S, 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(9): 997-1003.
16. Ziaei H, Karimi Tarshizi AM, Bashtani M, Naimipour H, Zeinali A. The effect of antibiotics on alternative compounds inhibit humoral and some parameters of broiler chickens. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 2000; 16(2): 142-53. [In Persian].
17. Foster LH, Sumar S. Selenium in health and disease: a review. Crit Rev Food Sci Nutr 1997; 37(3): 211-28.
18. Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. Nutrition 1999; 15(3): 255.
19. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. Inflamm Bowel Dis 2009; 15(2): 300-10.
20. Yu SY, Zhu YJ, Li WG. Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. Biol Trace Elem Res 1997; 56(1): 117-24.
21. Chen J, Song X, Zhang H, Qu YB, Miao JY. Sophorolipid produced from the new yeast strain Wickerhamiella domercqiae induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells. Appl Microbiol Biotechnol 2006; 72(1): 52-9.
22. Ren Z, Zhao Z, Wang Y, Huang K. Preparation of selenium/zinc-enriched probiotics and their effect on blood selenium and zinc concentrations, antioxidant capacities, and intestinal microflora in canine. Biol Trace Elem Res 2011; 141(1-3): 170-83.
23. Utterback PL, Parsons CM, Yoon I, Butler J. Effect of supplementing selenium yeast in diets of laying hens on egg selenium content. Poult Sci 2005; 84(12): 1900-1.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 13.04.2013
Vol. 32, No. 291, 4th Week, August 2014
Accepted: 13.07.2013

Preventive Impacts of Selenium-Enriched Yeast on Liver and Enzyme Activity after Inducing Colorectal Cancer in Rat

Jamileh Abedi[1], Amir Tukmechi PhD[2], Vahid Nejati PhD[3], Rahim Hobbenaghi PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Colorectal cancer is the most common cause of death in the world. More studies were done on using the probiotics and selenium for cancer prevention. In this research, liver enzymes (such as alanine aminotransferase, asparate aminotransferase and alkaline phosphatase) changes were assessed following dietary administration of Saccharomyces cerevisiae (simple and selenium-enriched forms) in the rat with colorectal cancer induced by dimethyl hydrazine.

Methods: Forty female rats, with 200-250 g initial body weight, were divided into five groups as healthy control, cancer control, simple form of yeast, selenium and selenium-enriched yeast. All animals received carcinogenic agent (40 mg/kg body weight) twice weekly for five weeks, except healthy controls which only received normal saline. Selenium group received 4 mg/ml of selenium nitrate in water; Saccharomyces cerevisiae was administered at the concentration of 5×10^8 CFU/ml with dimethyl hydrazine in yeast group; the last group received selenium-enriched yeast at the same concentration. At the end of forty weeks after Dimethyl hydrazine injection, all animals were euthanized and blood samples were taken for enzymes assay.

Findings: Although the mean of enzymes activity were higher at cancer control, other groups significantly showed lower enzymes activity ($P < 0.05$). The most decrease of enzyme activity was seen in animals that received selenium-enriched yeast.

Conclusion: The level of liver enzymes activity increases in colorectal cancer induced by dimethyl hydrazine in rat. Selenium-enriched yeast administration in rat could decreases the enzymes level and prevent tissue damage after carcinogenic agent injection.

Keywords: Colorectal cancer, Dimethyl hydrazine, Liver enzymes, Rat, Saccharomyces cerevisiae, Selenium

Citation: Abedi J, Tukmechi A, Nejati V, Hobbenaghi R. **Preventive Impacts of Selenium-Enriched Yeast on Liver and Enzyme Activity after Inducing Colorectal Cancer in Rat.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(291): 991-1003

1- MSc Student, Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran
2- Assistant Professor, Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran
3- Associate Professor, Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran
4- Associate Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Corresponding Author: Amir Tukmechi PhD, Email: atokmachi@gmail.com