

مقاله پژوهشی

بررسی اثر سلنیوم بر آسیب‌های تومور مغزی در مدل حیوانی گلیوبلاستوما مولتی فرم

سپیده خاکسار^{۱*}، آرش سمیعی^۲

۱. گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۲. گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

پذیرش: ۲۰ تیر ۱۴۰۱

دریافت: ۲۷ اردیبهشت ۱۴۰۱

چکیده

زمینه و هدف: گلیوبلاستوما مولتی فرم، یکی از شایع‌ترین نوع تومور بدخیم مغزی اولیه در بزرگسالان می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که ریز مغذی‌ها، مانند سلنیوم، این توانمندی را دارند که اثرات مثبتی در درمان گلیوبلاستوما داشته باشند و یک کاندید امیدوارکننده همراه با درمان‌های جراحی و رادیو شیمی‌درمانی باشند. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد سرطانی سلنیوم بر آسیب‌های تومور مغزی است.

روش‌ها: در این مطالعه، موش‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه اصلی کنترل و دریافت‌کننده سلنیوم در دوزهای ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم تقسیم شدند. ۱۰ × ۱ سلول‌های گلیوما C6 موش صحرایی در هسته دم‌دار راست مغز موش پیوند زده شد. پنج روز بعد از جراحی، گروه‌های درمان سلنیوم را به‌صورت درون‌صفاقی به‌مدت پنج روز دریافت کردند. فعالیت حرکتی، وزن حیوان، حجم تومور، طول عمر و تغییرات هیستوپاتولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: سلنیوم در دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، موجب کاهش حجم تومور، بهبود فعالیت حرکتی و تعدیل کاهش وزن حیوانات شد. همچنین، تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی، یک کاهش قابل‌توجهی در حجم تومور و تهاجم سلول‌های تومور به بافت‌های اطراف تومور در موش‌های تحت درمان با دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم سلنیوم را نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاضر، می‌توان بیان کرد که سلنیوم پتانسیل کافی برای مهار آسیب‌های تومور مغزی را دارد.

واژه‌های کلیدی: بافت‌شناسی، تومور مغزی، حجم تومور، سلنیوم

مقدمه

درمان موثر شده است [۲]. آمار سرطان مغز در ایران در مردان ۳/۹ و در زنان ۲/۸ به ازای هر ده هزار نفر می‌باشد که در ایران ۲۹٪ این تعداد به گلیوبلاستوما مربوط می‌شود [۳]. طول عمر بیماران گلیوبلاستوما پس از تشخیص به‌طور میانگین کمتر از یک سال می‌باشد و شیمی‌درمانی و رادیوتراپی این میزان را تا ۶ ماه افزایش می‌دهد. سرعت بالای تهاجم سلول‌های توموری و رگرایی‌های جدید از ویژگی‌های بارز این بیماری است [۴]. التهاب، میزان حضور رادیکال‌های آزاد، تکثیر غیرقابل‌کنترل سلول‌های تومور و مقاومت به آپوپتوز از دیگر فرآیندهای پاتوفیزیولوژی تومور مغزی است [۵] که آگاهی از آن می‌تواند در پیشگیری از بیماری و طراحی روند درمان کمک‌کننده باشد.

تومور مغزی، یک توده سلولی غیرطبیعی در مغز می‌باشد. منشاء تومور ممکن است از بافت مغز (تومور مغزی اولیه) یا از محل دیگری که به مغز متاستاز شده باشد (تومور مغزی ثانویه) باشد. تومورهای مغزی اولیه در اثر تقسیم سلولی کنترل نشده و غیرطبیعی ایجاد می‌شوند. تومورهای مغزی ثانویه تومورهای شایعی هستند و اغلب در بیماران یافت می‌شوند که سلول‌های سرطانی در مراحل پایانی سرطان لاعلاج به ویژه سرطان‌های ریه و سینه متاستاز داده‌اند [۱]. تومور مغزی اولیه (گلیوما و گلیوبلاستوما مولتی فرم) تقریباً غیرقابل درمان است و بیماران حداکثر تا ۱۵ ماه زنده می‌مانند. گلیوبلاستوما مولتی فرم، شایع‌ترین و کشنده‌ترین سرطان سیستم عصبی مرکزی است و یکی از تهاجمی‌ترین انواع تومور به‌شمار می‌رود. تشخیص دیر هنگام و پیشرفت سریع این بیماری مانع از امکان ایجاد یک

مواد و روش‌ها

حیوانات و شرایط نگهداری

موش‌های صحرایی بالغ نر نژاد ویستار در محدوده وزنی بین ۲۰۰ الی ۲۳۰ گرم و سن ۸-۱۰ هفته به تعداد ۳۵ عدد از انستیتو پاستور خریداری شده و در شرایط استاندارد (دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی با شروع روشنایی در ساعت هفت صبح) برای آزمایش نگهداری شدند. حیوانات در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. در این تحقیق سعی شده است که از حداقل موش‌های صحرایی استفاده گردد. تمامی مراحل آزمایش نیز بر اساس پروتکل تأیید شده کمیته اخلاق دانشگاه شهید بهشتی اجرا شد. این تحقیق به روش تجربی انجام گردید. پیش از شروع آزمایش‌ها، زمان یک هفته‌ای برای سازش حیوانات با محیط آزمایشگاه اختصاص داده شد.

گروه‌های آزمایشی

موش‌های صحرایی نر به صورت تصادفی به سه گروه اصلی (کنترل، دریافت‌کننده سلنیات سدیم ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم و دریافت‌کننده سلنیات سدیم ۱/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) دسته بندی شدند. هر گروه اصلی به دو زیرگروه جداگانه تقسیم شدند. در زیرگروه اول، حجم تومور توسط دستگاه تصویربرداری MRI مورد سنجش قرار گرفت و در ادامه برای ارزیابی طول عمر تحت نظر قرار گرفت (تعداد ۵ موش). در زیرگروه دوم، تغییرات پاتوهیستولوژی از جمله تغییرات مورفولوژی سلول‌ها ارزیابی شدند (تعداد ۵ موش). گروه کنترل، سلول‌های گلیوما C6 را بدون هیچ تیماری دریافت کردند. موش‌های گروه درمانی بعد از دریافت سلول‌های گلیوما C6، سلنیات سدیم را با دوزهای ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم [۱۲] برای پنج روز متوالی به صورت درون صفاقی دریافت کردند. یک گروه سالم نیز برای ارزیابی فعالیت حرکتی حیوان طراحی شده است (۵ موش). همچنین، ارزیابی فعالیت حرکتی حیوان و وزن حیوان در همه موش‌ها صورت گرفت. گروهی با عنوان گروه شاهد (sham) هم در مطالعات طراحی شده است که محیط کشت سلول به حیوانات دریافت‌کننده سلول‌های گلیوما تزریق شده است که تفاوت معناداری در نتایج حاصل شده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد. بنابراین از وارد کردن نتایج آن چشم پوشی شده است.

سلنیوم یک مکمل غذایی مهم است که می‌توان آن را در سبزیجات و گوشت نیز یافت. محبوبیت آن در میان سایر مکمل‌های غذایی به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن است. در سی سال گذشته اثبات شده است که سلنیوم برای عملکرد طبیعی بسیاری از سیستم‌های بدن از جمله مغز ضروری است [۶]. برای اولین بار، استفاده از ترکیبات سلنیوم به‌عنوان یک عامل درمانی در تومورهای بدخیم توسط جراح فرانسوی پیر دلبرت^۱ در آغاز قرن گذشته ذکر شد [۴] و این که سلنیوم ممکن است بدن را در برابر گلیوبلاستوما محافظت کند، برای اولین بار در اواخر دهه ۱۹۸۰ بر اساس مشاهدات کاهش غلظت سرمی سلنیوم در بیماران مبتلا به بدخیمی‌های مغزی پیشنهاد شد [۷]. سلنیوم یک ریز مغزی با عملکردهای مهم ضدسرطانی و آنتی‌موتازنیک است [۸]. از دیگر خصوصیت بارز سلنیوم، خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن است. بدین صورت که سلنیوم یک فاکتور مهم در تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوکوتاتیون پراکسیداز و تیوردوکسین ردوکتاز به شمار می‌آید که همین امر موجب می‌شود که اثر محافظتی در برابر آسیب‌های حاصل از استرس اکسیداتیو دارد [۹]. گزارشات پیشین نشان داده است که خصوصیتی از سلنیوم دیده شده است که حاکی از اثرات ضدسرطانی آن در پیشگیری و درمان است از جمله آن‌ها افزایش فعالیت پروتئین سرکوب‌کننده تومور p53، القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، کاهش التهاب، تعدیل در فرآیند استرس اکسیداتیو و مهار فرآیند رگ‌زایی می‌باشند [۱۰]. همچنین، یکی از مهمترین مشکلات در مسیر درمان تومور، عدم توانایی ترکیبات درمانی یا داروها در عبور از سد خونی-مغزی است. در این ارتباط، یکی از امتیازات برجسته سلنیوم توانایی عبور آن از سد خونی-مغزی می‌باشد [۱۱]. به‌طوری‌که در حوزه درمان، توجه خاصی به شیمی‌درمانی ترکیبی نوین به همراه ترکیبات سلنیوم شده است [۸].

باتوجه به اهمیت نقش مداخلات تغذیه‌ای به‌ویژه ریزمغذی‌ها در جلوگیری و درمان بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی، از جمله تومورهای مغزی بر آن شدیم تا اثر ریز مغذی سلنیوم را بر میزان پیشرفت تومور مغزی گلیوبلاستوما در مدل حیوانی بررسی کنیم.

¹ Pierre Delbet

کشت سلول گلیوما C6 موش صحرایی

لاین سلولی گلیوما C6 موش صحرایی (NCBI Code: C575) از انستیتو پاستور خریداری شد. این لاین سلولی از تومور سلول گلیال موش صحرایی تکثیر پیدا کرده است. سلول ساتنریفیوژ شده و DMSO آن حذف گردیده و سلول به محیط کشت حاوی DMEM F-12K (Kaighn's) به همراه سرم گاوی جنینی (FBS) ۱۰٪ و پنی سیلین-استرپتومیسین ۱٪ منتقل و کشت داده شد. به منظور تعویض محیط کشت یا به عبارتی انتقال سلول‌های در حال تکثیر به فلاسک حاوی محیط جدید، باید محیط کشت را دور ریخت. لایه سلولی با بافر PBS شستشو داده شد و محیط کشت FBS ۱۰٪ اضافه شد. برای تریپسینه کردن سلول‌ها، محیط کشت رویی خارج شد و با بافر PBS شستشو داده شد. سپس لایه سلولی با تریپسین ۰/۲۵٪ جدا شد. سپس برای خنثی کردن تریپسین، از محیط کشت FBS ۱۰٪ به میزان سه برابر حجم تریپسین استفاده شد. پس از شمارش سلول‌ها، رسوب سلولی به وسیله ساتنریفیوژ در دور ۱۵۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه تهیه شد [۲]. در نهایت، به ازای هر یک میلیون سلول موجود در رسوب، ۱۰ میکرولیتر محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک به رسوب اضافه و الیکوت‌های یک میلیون سلولی جهت تزریق آماده شدند.

پیوند سلول‌های گلیوما C6 با استفاده از جراحی استریوتاکسی

برای القاء مدل گلیوبلاستوما مولتی فرم (Glioblastoma multiforme)، جراحی استریوتاکسی مورد استفاده قرار گرفت. موش‌های صحرایی به وسیله تزریق کتامین (۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به صورت درون صفاقی بیهوش شدند. پس از بیهوشی، سر حیوان در دستگاه استریوتاکس (Stoelting, USA) قرار گرفته و موی سر آن تراشیده شد و سر آن به وسیله دستگاه استریوتاکس ثابت گردید تا امکان اعمال جراحی بر روی آن وجود داشته باشد. سپس ناحیه‌ی سر، ضد عفونی شده و با تیغ بیستوری یک برش طولی روی پوست سر ایجاد شد. به دنبال آن بافت‌های زیر جلدی کنار زده شده تا استخوان جمجمه در معرض دید قرار گیرد. سپس با استفاده از مختصات هسته دم دار (Caudate Nucleus) به دست آمده از اطلس پاکسینوس، مکان مورد نظر در سمت راست مغز موش

صحرایی علامت گذاری شد (-3.0; +1 mm AP; Bregma; 3.5 mm ML; 4.0-4.5 mm DV relative to the dura [۱۳] و با استفاده از مته سوراخ گردید و ۱۰ میکرولیتر محیط کشت F-12 عاری از سرم که حاوی $10^6 \times 1$ سلول‌های گلیوما C6 است [۱۳، ۲]، به وسیله سرنگ همپلتون به هسته دم‌دار از هسته‌های عقده‌های قاعده‌ای تزریق شد. سلول‌ها با یک سرعت سه میکرولیتر/دقیقه تزریق شدند. به منظور اطمینان از تزریق سلول‌ها، به مدت ده دقیقه سرنگ در همان محل نگه داشته شد و سپس به آرامی بیرون آورده شد. در نهایت ناحیه جراحی توسط موم پر گشت. همه حیوانات پس از اتمام جراحی، به مدت پنج روز دوره احیاء را گذراندند.

ارزیابی فعالیت حرکتی

در گروه سالم، گروه کنترل (روز دهم بعد از القاء مدل گلیوبلاستوما) و گروه درمان ۳۰ دقیقه بعد از آخرین تزریق سلنیات سدیم (روز دهم بعد جراحی)، رفتار حرکتی حیوان با استفاده از دوربین و شمارشگر به مدت پنج دقیقه مورد مونیتورینگ قرار گرفت زیرا یکی از نشانه‌های افراد مبتلا به تومور مغزی، اختلالات حرکتی است. جایجایی حیوان در راستای خط افقی در سطح صاف (در یک باکس) به عنوان فعالیت حرکتی آن در نظر گرفته شد [۱۴].

ارزیابی وزن موش صحرایی

وزن موش صحرایی نیز به عنوان پارامتر فیزیولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. وزن حیوان در روز جراحی، قبل از شروع تزریقات (روز پنجم بعد از جراحی) و پایان تزریقات (روز دهم بعد از جراحی) مورد سنجش قرار گرفت. روز جراحی به عنوان روز اول ریکاوری لحاظ شد.

ارزیابی طول عمر (میزان بقاء)

یکی از مهم‌ترین فاکتورها برای بررسی اثربخشی درمان، طول عمر حیوان است. بعد از روز دهم، حیوانات هر روز مورد بررسی رفتاری قرار گرفتند و زمانی که بیش از دو روز اسهال مداوم، عدم تغذیه و یا کاهش وزن روزانه بیش از ۲۰ گرم در موش مشاهده می‌شد، بیانگر نزدیک شدن حیوان به مرگ است. با دیدن نشانه‌هایی از عدم تحرک، خونریزی از بینی و حالت خمیدگی کمر، حیوان نوتانایز شده و آن روز به عنوان روز مرگ گزارش شد.

اندازه‌گیری حجم تومور به وسیله تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI)

پس از ده روز از پیوند سلول‌های گلیوما C6، اندازه تومور با استفاده از MRI محاسبه شد. آزمایش MRI توسط اسکتر تسلا ۳ (MAGNETOM Prisma, Siemens, Germany)، در آزمایشگاه ملی نقشه‌برداری مغز ایران انجام شد. این دستگاه دارای قدرت میدان مغناطیسی ۱/۳ تسلا می‌باشد. موش‌ها با استفاده از کتامین و زایلازین بیهوش شدند و در یک کویل مربع شکل ۷۲ میلی متری قرار گرفتند. تصاویر در سه برش کرونال^۳، سائیتال^۴ و محوری^۵ از کل مغز حیوان گرفته شد. تصویربرداری با پروتکل T2-weighted turbo-spin-echo و پارامترهای تصویربرداری با استفاده از یک توالی اکتساب سریع با افزایش آرامش (RARE) با زمان تکرار (TR): ۲۳۰۰ میلی‌ثانیه، زمان اکو (TE): ۱۰۷ میلی‌ثانیه و برش‌هایی با ضخامت یک میلی‌متر صورت گرفت. در هر محور، ناحیه مورد نظر (ROI) که شامل بافت‌های تومور بود، برای هر برش به صورت جداگانه توسط نرم افزار MRicron ترسیم شد و حجم تومور در هر محور با استفاده از نرم افزار FSL محاسبه شد و میانگین این سه محور به عنوان کل حجم تومور گزارش شد. در این روش به دلیل مشخص بودن مرزهای تومور در هر محور، خطا تا حد زیادی کاهش می‌یابد.

ارزیابی بافتی

ارزیابی پارامترهای بافت‌شناسی بر روی بافت تومور مغزی (هسته دم دار) و نواحی اطراف آن صورت گرفت. در روز دهم بعد از القاء مدل گلیوبلاستوما، مغز حیوان به دنبال بیهوشی عمیق خارج شد و بافت تومور جدا شده در فرمالدهید ۴٪ به عنوان فیکساتیو قرار داده شد. سپس به ترتیب مرحله آگیری در درجات صعودی الکلی (به ترتیب الکلی ۵۰، ۷۰، ۸۵، ۹۵ و ۱۰۰ درصد به صورت جداگانه) و مرحله شفاف‌سازی با زایلول انجام شد. بعد از انجام مرحله نفوذ (پارافینه کردن بافت در سه مرحله هر کدام به مدت ۴۵ دقیقه)، قالب‌گیری و برش‌گیری در اندازه‌های ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم صورت گرفت.

² Magnetic Resonance Imaging

³ Coronal

⁴ Sagittal

⁵ Axial

⁶ Region of Interest

برش‌ها بر روی لام آلبومینه قرار داده شده و پارافین زدایی با زایلول و آبدهی در درجات نزولی الکلی (به ترتیب الکلی ۱۰۰، ۹۵، ۷۰ و ۵۰ درصد به صورت جداگانه) انجام گرفت. مراحل پارافین‌زدایی و آبدهی قبل از رنگ‌آمیزی ضروری است زیرا اغلب رنگ‌های مورد استفاده در رنگ آمیزی، محلول در آب هستند. به منظور رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E)، لام‌ها ۴۵ دقیقه در ظرف حاوی هماتوکسیلین و ۱۵ دقیقه در ظرف حاوی ائوزین قرار داده شدند. سپس، مجدداً باید مراحل آگیری و شفاف‌سازی قبل از مونتاژ تکرار می‌شد. زیرا چسب مورد استفاده در مرحله مونتاژ تنها با زایلول امتزاج پذیر است. در نهایت، مرحله مونتاژ تکمیل شد. با استفاده از رنگ‌آمیزی H&E، تغییرات پاتولوژیک شامل تغییرات مورفولوژی سلولی، خونریزی و تهاجم سلول‌های تومور به بافت‌های اطراف تومور ارزیابی شدند. یک پاتولوژیست ناآشنا به گروه‌بندی آزمایشات، اسلایدها را با استفاده از میکروسکوپ نوری ارزیابی کرد.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیزها با کمک نرم افزار SPSS (version ۲۵) انجام شد. داده‌های حاصل از امتیازهای فعالیت حرکتی و حجم تومور با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و با مقایسه میانگین‌ها و تست پشتیبان LSD محاسبه گردید. آنالیز داده‌های حاصل از وزن موش صحرایی نیز با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه و با مقایسه میانگین‌ها انجام گرفت. داده‌های طول عمر (میزان بقاء) با استفاده از نرم افزار Prism و آنالیز واریانس یک‌طرفه آنالیز شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار از میانگین گزارش شد. معیار معناداری برای هر گروه $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

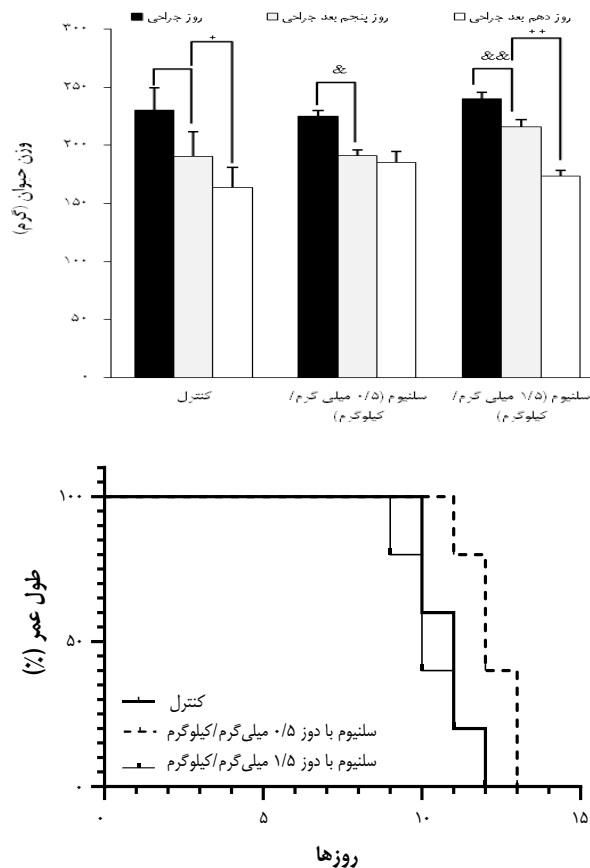
یافته‌ها

اثر سلنیوم بر فعالیت حرکتی موش صحرایی

فعالیت حرکتی موش‌های صحرایی در گروه کنترل به طور معناداری در مقایسه با گروه سالم کاهش یافت ($p < 0/001$). در گروه درمان، سلنیوم با دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم توانست فعالیت حرکتی حیوان را بهبود دهد و این افزایش فعالیت حرکتی در مقایسه با گروه کنترل معنادار بود ($p < 0/01$)، نمودار ۱).

اثر سلیوم بر طول عمر

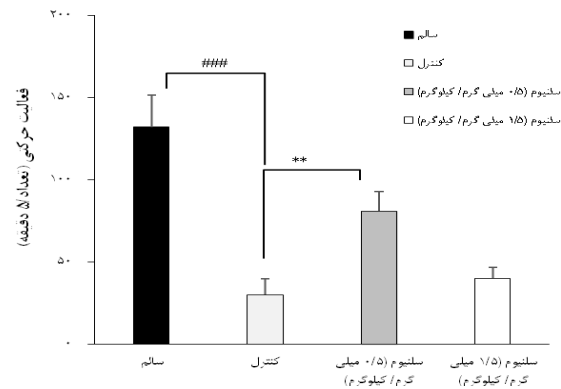
طول عمر حیوانات در گروه دریافت‌کننده سلیوم در دوز ۱/۵ میلی گرم/کیلوگرم ($10/4 \pm 1/2$) در مقایسه با گروه کنترل ($10/8 \pm 5/1$) تغییر چندانی نشان نداد. درحالی‌که در گروه دریافت‌کننده سلیوم در دوز ۰/۵ میلی گرم/کیلوگرم ($12/2 \pm 8/1$)، افزایش طول عمر ناچیزی داشته اند که این افزایش معنادار نبود (نمودار ۲).



نمودار ۲- اثر سلیوم بر وزن و میزان بقای موش‌های صحرایی مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم. الف: اثر سلیوم بر وزن حیوان. ب: اثر سلیوم بر میزان بقاء. هر ستون نمایانگر میانگین \pm انحراف معیار از میانگین می‌باشد. $\&$: تفاوت معنی‌دار با روز جراحی با $p < 0/05$ و $\&\&$: تفاوت معنی‌دار با روز جراحی با $p < 0/01$. $\&\&\&$: تفاوت معنی‌دار با روز پنجم بعد جراحی با $p < 0/05$ و $\&\&\&\&$: تفاوت معنی‌دار با روز پنجم بعد جراحی با $p < 0/01$. گروه کنترل موش‌های صحرایی مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم بدون درمان هستند.

اثر سلیوم بر حجم تومور

همان‌طوری که در تصاویر گرفته شده از برش‌های کرونال، سائیتال و محوری کاملاً مشهود است، نواحی تومور در این سه



نمودار ۱- اثر سلیوم بر فعالیت حرکتی موش‌های صحرایی مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم. هر ستون نمایانگر میانگین \pm انحراف معیار از میانگین می‌باشد. $\&$: تفاوت معنی‌دار با گروه سالم با $p < 0/001$ و $\&\&$: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0/01$. گروه کنترل موش‌های صحرایی مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم بدون درمان هستند.

اثر سلیوم بر وزن حیوان

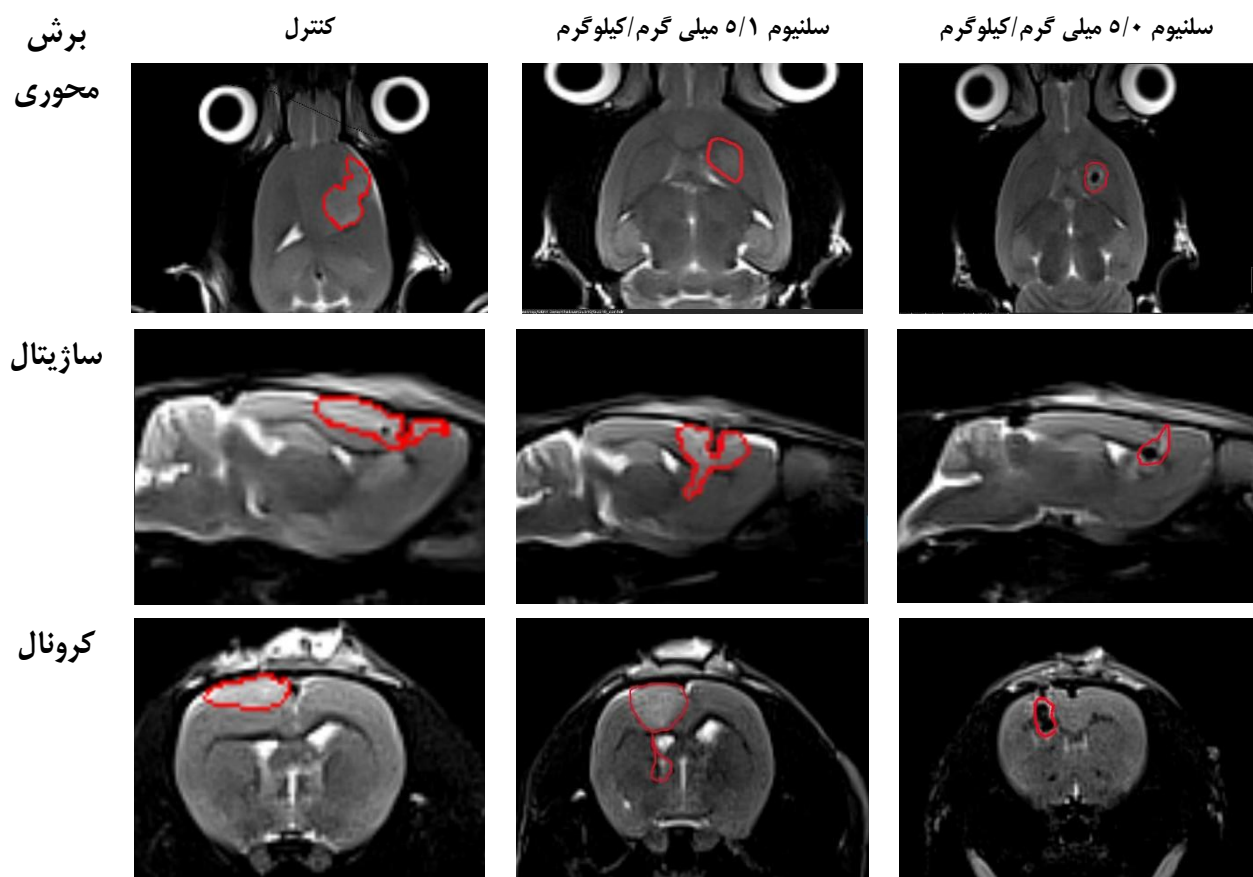
وزن حیوان در روز پیوند سلول‌های گلیوبلاستوما، پایان ریکاور و آخرین روز تزریقات اندازه‌گیری شد. هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر سلیوم بر تغییرات کاهش وزن در طول پروسه پژوهش از زمان جراحی تا پایان درمان بود. میانگین وزن حیوان‌ها در گروه کنترل در روز پنجم بعد از جراحی (190 ± 20) نسبت به روز جراحی (230 ± 18)، کاهش چشمگیری داشت ($p < 0/01$). این کاهش وزن تا روز دهم نیز ادامه داشت (163 ± 15) و در مقایسه با روز پنجم بعد جراحی اختلاف معناداری نشان داد ($p = 0/03$). در گروه دریافت‌کننده سلیوم در دوز ۱/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، از زمان پیوند سلول گلیوبلاستوما (240 ± 6) تا شروع تزریقات کاهش وزن معناداری مشاهده شد ($p < 0/01$). در این گروه، وزن حیوانات در روز دهم بعد جراحی (173 ± 8) در مقایسه با روز پنجم بعد جراحی یا شروع تزریقات (215 ± 11) کاهش معناداری داشته است ($p < 0/01$). کاهش وزن در گروه دریافت‌کننده سلیوم در دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم از روز جراحی (225 ± 15) تا روز پنجم یا شروع تزریقات ادامه داشت ($p = 0/01$) ولی از شروع تزریقات تا پایان تزریقات، کاهش وزن ناچیزی مشاهده شد. به‌طوری‌که، میانگین وزن در روز پایان تزریقات (191 ± 10) نسبت به شروع تزریقات (185 ± 11) کاهش معناداری نشان نداده است. این نتایج نشان‌دهنده این است که سلیوم در دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم توانست کاهش وزن حاصل از القاء مدل گلیوبلاستوما را در موش صحرایی کنترل کند (نمودار ۳الف).

شواهدی از خونریزی داخل توموری نیز وجود داشت. در ضمن، در گروه کنترل، نشانه‌هایی کاملاً واضح از تهاجم سلول‌های خوشه‌ای توموری به پارانشیم نرمال اطراف تومور وجود داشت. به‌علاوه، حضور سلول‌های توموری در اطراف عروق خونی در بافت پارانشیم نواحی دوردست نیز مشاهده گردید (شکل ۲الف و ۲ب). در گروه دریافت‌کننده سلنیوم با دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، سلول‌های توموری با تراکم کمتری در پارانشیم مغزی حضور داشتند. به‌طوری‌که، در زیر میکروسکوپ نیز کاهش حجم تومور در مقایسه با سایر گروه‌ها کاملاً واضح است که نشان‌دهنده تقسیم سلولی کنترل‌شده‌تری در مقایسه با سایر گروه‌ها بود و شواهدی مبنی بر تهاجم سلول‌های تومور به بافت‌های اطراف مشاهده نشد (شکل ۲ج و ۲د). در گروه دریافت‌کننده سلنیوم با دوز ۱/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، نیز تراکم بالای سلول‌های توموری به شکل گرد، بیضوی و متراکم دیده شد و حجم تومور قابل‌توجه بود. در این گروه

برش در گروه دریافت‌کننده سلنیوم در دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل کاهش چشمگیری داشته است (شکل ۱). کل حجم تومور در گروه دریافت‌کننده سلنیوم در دوز ۱/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم ($18 \pm 68/17$ میلی‌متر مکعب) در مقایسه با گروه کنترل ($10 \pm 92/43$ میلی‌متر مکعب) اختلاف معناداری نشان نداد. درحالی‌که کل حجم تومور در گروه دریافت‌کننده سلنیوم در دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل حجم تومور به یک پنجم کاهش یافت ($p < 0/001$ ، نمودار ۳).

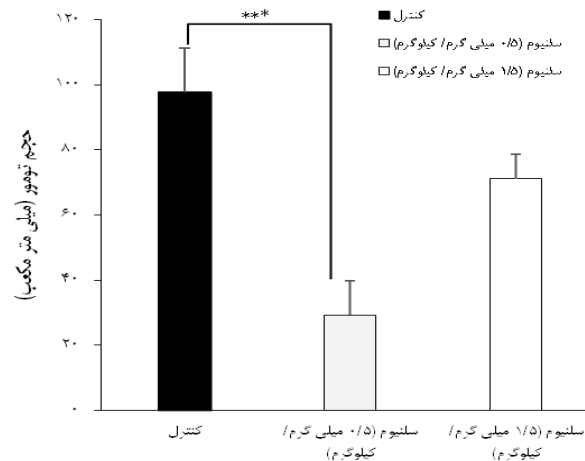
اثر سلنیوم بر پارامترهای هیستوپاتولوژیکی

در گروه کنترل، بررسی هیستوپاتولوژیک نشان داد که سلول‌های توموری به شکل گرد و بیضوی با تراکم قابل توجهی تجمع یافته بودند. از نظر مورفولوژیکی، هسته سلول‌های توموری شدیداً هایپرکروماتیک و بزرگ بودند.



شکل ۱- تصویربرداری MRI روز دهم پس از پیوند سلول‌های گلیوما C6 در گروه‌های آزمایشی مختلف. تصاویر در سه برش محوری (Axial)، سازیتال (Sagittal) و کرونال (Coronal). نواحی تومور با خطوط قرمز مشخص شده است. گروه کنترل موشهای صحرایی مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم بدون درمان هستند.

گلیوبلاستوما اثبات شده است [۱۷-۱۵]. از طرف دیگر، در تومورهای مغزی استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد در مراحل مختلف پیشرفت سرطان نقش کلیدی ایفاء می‌کند. رادیکال‌های آزاد اضافی ساختار کروموزوم را تغییر می‌دهند، به DNA آسیب زیادی می‌رسانند، موجب جهش ژنتیکی می‌شوند و تومور ایجاد می‌کنند [۱۸]. از سوی دیگر، تولید نامنظم گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) منجر به آپوپتوز سلول‌های تومور نیز شده و محیط نامساعدی را برای بقای این سلول‌ها ایجاد می‌کند [۱۹]. به دلیل نقش دوگانه تولید بی رویه گونه‌های فعال اکسیژن در تعیین سرنوشت سلول‌های سرطانی، هر دو خاصیت آنتی‌اکسیدانی یا القاء کننده استرس اکسیداتیو کاندیداهای درمانی می‌تواند برای درمان سرطان مؤثر باشند [۲۰]. نقش القاء‌کنندگی آپوپتوز سلول‌های گلیوبلاستوما توسط سلنیوم را به تشدید تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش غلظت کلسیم درون سلولی نسبت داده‌اند [۲۱، ۱۷]. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و با استناد به مطالعات پیشین، می‌توان این‌طور استنباط کرد که سلنیوم ممکن است در دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم با القاء استرس اکسیداتیو موجب راه اندازی آپوپتوز و کاهش حجم تومور شده است در حالی که در دوز بالاتر (۱/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) القاء استرس اکسیداتیو و تشدید تولید رادیکال‌های آزاد به حدی بوده است که نه تنها به کاهش حجم تومور منجر نشده است بلکه حمایت‌کننده آسیب‌های حاصل از تومور مغزی بوده است. برای اطمینان از مکانیسم دقیق مرتبط با رادیکال‌های آزاد، مطالعه اثرات سلنیوم بر رادیکال‌های آزاد و میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی درون زای پیشنهاد می‌شود. در گزارش دیگری اثر سمیت سلولی نانوذرات حاوی سلنیوم را بر رده سلولی گلیوبلاستوما ثابت کردند [۲۲]. در ضمن، تحقیقات قبلی نشان داده است که سلول‌های تومور توانایی تشدید ایجاد رگ‌های خونی جدید از شبکه مویرگی موجود (آنژیوژنیز) را دارد. به طوری که سلنیوم اثر مهارکنندگی خود را بر رشد تومور گلیوبلاستوما از طریق کاهش توسعه رگ‌های خونی جدید مرتبط با تومور نشان داده است [۴]. با توجه به مکانیسم‌های پیشنهادی مطالعات پیشین، سلنیوم ممکن است حجم تومور را از طریق افزایش آپوپتوز، سرکوب رگ‌زایی جدید و تشدید تجمع رادیکال‌های آزاد در مرکز تومور کاهش داده است. برای شفاف‌سازی مکانیسم‌های درگیر می‌توان در قالب پیشنهاداتی



نمودار ۳- اثر سلنیوم بر حجم تومور در موش‌های مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم. هر ستون نمایانگر میانگین \pm انحراف معیار از میانگین می‌باشد. ***: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0/001$ گروه کنترل موش‌های صحرائی مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی‌فرم بدون درمان هستند.

نیز آرایش سلول‌های توموری غالباً به صورت صفحه‌ای بوده و تهاجم قابل توجه‌ای از سلول‌های توموری در نواحی زیر قشر رویت شد و در خارج از مرکز تومور، سلول‌های توموری در امتداد رگ‌های خونی بافت میزبان جمع شدند (شکل ۵۲ و ۵۳).

بحث

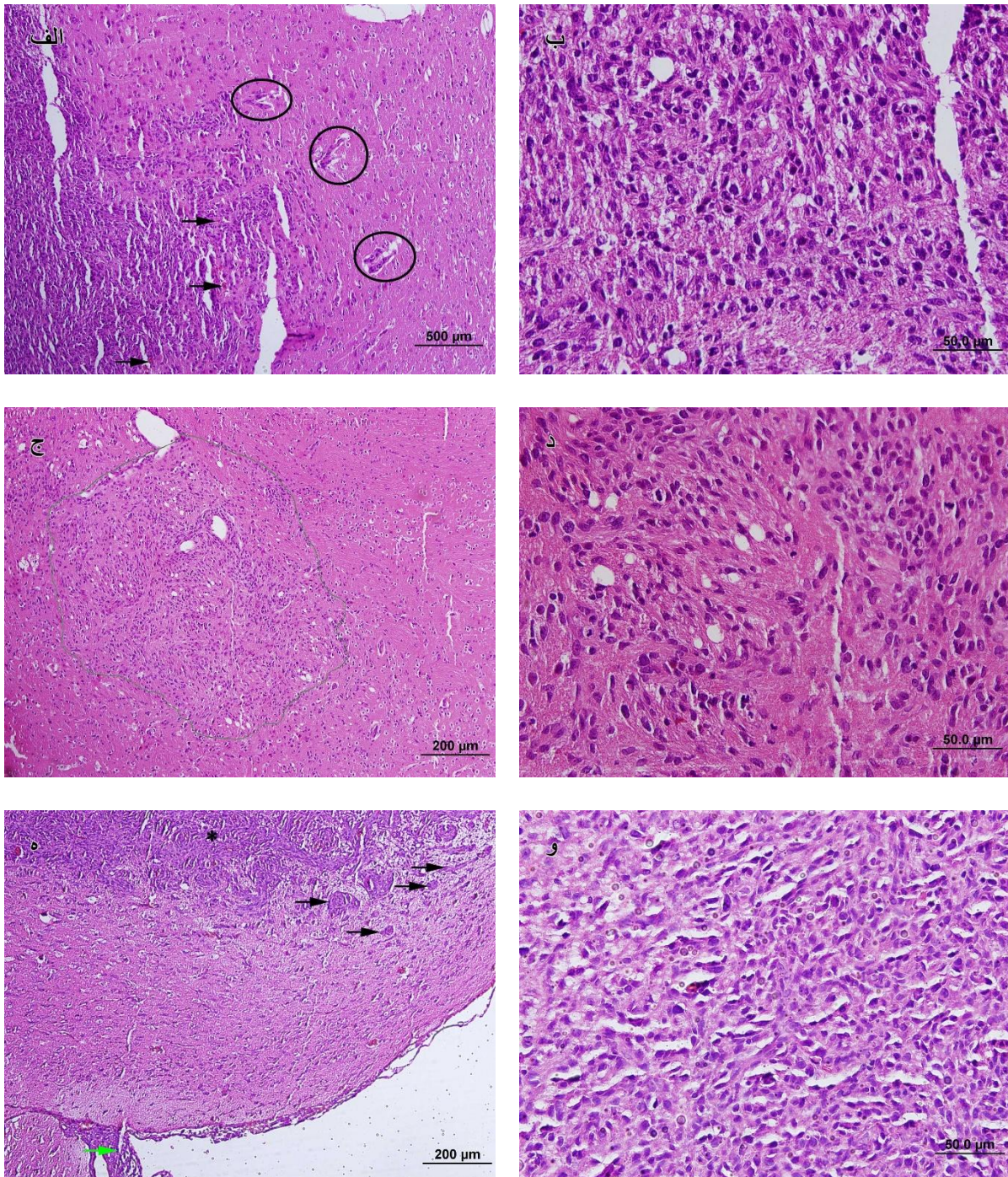
در بیماری تومور مغزی گلیوبلاستوما، عواملی از جمله پیچیدگی فرآیندهای پاتوفیزیولوژی بیماری، ایجاد مقاومت به درمان و عود مجدد تومور موجب شده است که درمان قطعی این بیماری را به یک چالش بزرگ تبدیل کرده است. بدین جهت، کنترل و جلوگیری از پیشرفت تومور می‌تواند گامی مثبت محسوب شود.

در این مطالعه برای اولین بار اثر ضد سرطانی سلنیوم بر تومور مغز در شرایط درون‌تنی^۷ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سلنیوم در دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، موجب کاهش حجم تومور و بهبود فعالیت حرکتی حیوانات شد. این احتمال وجود دارد که سلنیوم به واسطه توانایی عبور از سد خونی-مغزی توانسته رشد سلول‌های تومور را در مغز سرکوب کند. در گزارشات پیشین اثرات مهارکنندگی سلنیوم در تکثیر، مهاجرت سلول‌های سرطانی و القاء آپوپتوز در مدل برون‌تنی^۸

^۷ *in vivo*

^۸ *in vitro*

^۹ Reactive oxygen species (ROS)



شکل ۲- تاثیر سلیوم بر میزان ضایعه در سطح بافتی در موش‌های به گلیوبلاستومای مولتی‌فرم. الف: تصویری از تومور در گروه کنترل (موش‌های صحرائی مبتلا به گلیوبلاستومای مولتی‌فرم بدون درمان) با بزرگنمایی ۱۰. فلش‌های سیاه، به خونریزی داخل توموری اشاره دارد. همچنین تهاجم خوشه‌ای سلول‌های توموری در پارانشیم اطراف (دایره سیاه) مشهود است. ب: بزرگنمایی ۴۰ از نمونه قبلی در گروه کنترل. تراکم بالای سلول‌های توموری در مرکز تومور کاملاً مشهود است. ج: تصویری از تومور در گروه دریافت‌کننده سلیوم در دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم با بزرگنمایی ۱۰. ناحیه توموری با خط چین مشخص شده است و مساحت کمتر تومور در این گروه نسبت به گروه‌های دیگر کاملاً مشهود است. د: تصویری از تومور در گروه دریافت‌کننده سلیوم در دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم با بزرگنمایی ۴۰. تراکم پائین سلول‌های توموری کاملاً قابل مشاهده است. ه: تصویری از تومور در گروه دریافت‌کننده سلیوم در دوز ۱/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم با بزرگنمایی ۱۰. ستاره مشکی، تومور القایی را نشان می‌دهد. علاوه بر آن، تهاجم سلول‌های توموری به پارانشیم اطراف (فلش سیاه) و ناحیه زیر قشری (فلش سبز) مشهود است. و: تصویری از تومور در گروه دریافت‌کننده سلیوم در دوز ۱/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم با بزرگنمایی ۴۰. تراکم بالای سلول‌های توموری گرد و بیضوی کاملاً قابل رویت است. الف/ج/ه: بزرگنمایی ۱۰ برابر، نوار مقیاس ۲۰۰ میکرومتر؛ ب/د/و: بزرگنمایی ۴۰ برابر، نوار مقیاس ۵۰ میکرومتر.

سلنیوم وابسته به دوز است ولی به طور متناقض با نتایج حاضر، بیان کرد که در رده سلولی گلیوبلاستوما، دوزهای پایین سلنیوم خاصیت آنتی اکسیدانی داشت، در حالیکه دوزهای بالا، مرگ سلول‌های گلیوبلاستوما را به دنبال داشت [۲۵]. این تناقض ممکن است به دلیل متفاوت بودن شرایط بررسی مدل بیماری گلیوبلاستوما با مطالعه حاضر باشد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، سلنیوم توانست حجم تومور و گسترش سلول‌های توموری به بافت‌های اطراف را کاهش دهد. بنابراین، با توجه به خواص ضدسرطانی امیدوارکننده این ریزمغذی کمیاب، احتمالاً می‌توان آن را به عنوان یک کاندید بالقوه برای درمان تکمیلی در گلیوبلاستوما معرفی کرد ولی برای شفافیت مسیرهای ملکولی درگیر در اثرات نوروپروتکتیو سلنیوم بر تومور مغزی نیاز به تحقیقات بیشتری حس می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از آقای دکتر محمدرضا بیگدلی به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

ملاحظات مالی

این طرح پژوهشی بدون حمایت مالی سازمانی به انجام رسیده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

س.خ: ایده، طراحی، اجراء، نظارت بر مطالعه، آنالیز آماری و نگارش مقاله؛ آ.س: اجراء مطالعه، آنالیز آماری و نگارش مقاله.

برای مطالعات بعدی پیشنهاد داد. درضمن، بهبود فعالیت حرکتی حیوانات در گروه دریافت‌کننده سلنیوم در دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم را می‌توان تا حدودی به کاهش حجم تومور، مهار مهاجم سلول‌های توموری به بافت‌های اطراف و جلوگیری از آسیب به مراکز کنترل‌کننده حرکات مانند سایر هسته‌های عقده‌های قاعده ای و کورتکس حرکتی نسبت داد که برای تحقق این فرضیات در این زمینه، نیاز به مطالعات بیشتری حس می‌شود.

زمانی که میزان تقسیم سلول‌های سرطانی از میزان مرگ و میر آن بیشتر شود، تومور رشد می‌کند. با تمرکز بر مهار تکثیر و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، می‌توان رویکردهای درمانی جدیدی در سرطان ایجاد کرد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سلنیوم در دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم موجب شد سلول‌های توموری محدود به مرکز تومور باقی ماندند و شواهدی مبنی بر مهاجم سلول‌های تومور به بافت‌های طبیعی اطراف مشاهده نشد. در راستای نتایج مطالعه حاضر، تحقیقی نشان داده شده است که رژیم غذایی حاوی سلنیوم (به همراه ویتامین، روی و توکوفرول)، یک اثر نوروپروتکتیو را در مدل حیوانی تومور مغزی نشان داد؛ به طوری که مورفولوژی مهاجمی سلول‌های بدخیم و مهاجرت سلول‌های تومور به بافت‌های سالم پس از تیمار کاهش یافت [۲۳]. ترکیبات سلنیوم توانست از طریق جلوگیری از مهاجرت سلول‌های اندوتلیال از مسیر ماتریکس خارج سلولی (ECM) و مهار بیان متالوپروتئینازهای ماتریکس مانع از مهاجم تومور شود [۲۴]. همچنین، التهاب یک نشانگر مهم در سرطان است [۵]. نتایج بافت‌شناسی حاضر نشان‌دهنده التهاب کمتر در گروه تحت درمان با سلنیوم بود. بنابراین احتمالاً اثرات ضدالتهابی سلنیوم نیز در کاهش آسیب تومور مغزی نقش موثری داشته است.

علاوه بر این، تامین میزان موثر سلنیوم بسیار مهم است زیرا جراح فرانسوی پیر دلبرت مرگ بیمارانی که بیش از حد سلنیات سدیم دریافت کردند را گزارش کرد. در مبحث مرتبط با استفاده از مکمل‌های سلنیوم به عنوان گزینه درمانی تکمیلی، به میزان دوز آن و حالت سمی آن در دوز بالا تاکید شده است. بنابراین عملکرد سلنیوم در سرطان کاملاً وابسته به دوز است [۸]. در گزارش دیگری نیز اثبات شده است که اثرات مشاهده شده از

¹⁰ Extracellular matrix

فهرست منابع

- [1] Echevarria ME, Fangusaro J, Goldman S, Pediatric central nervous system germ cell tumors: a review. *Oncologist* 13 (2008) 690-699.
- [2] Le TNT, Lim H, Hamilton AM, Parkins KM, Chen Y, Scholl TJ, Ronald JA, Characterization of an orthotopic rat model of glioblastoma using multiparametric magnetic resonance imaging and bioluminescence imaging. *Tomography* 4 (2018) 55-65.
- [3] Jazayeri SB, Shokraneh F, Ramezani R, Alimi M, Saadat S, Rahimi-Movaghar V, Epidemiology of primary brain and spinal cord tumors in Iran: a systematic review. *Neurosci J Shefaye Khatam* 1 (2013) 13-20.
- [4] Yakubov E, Eibl T, Hammer A, Holtmannspotter M, Savaskan N, Steiner HH, Therapeutic potential of selenium in glioblastoma. *Front Neurosci* 15 (2021) 666679.
- [5] Berger MS, Bruce JN, Chen TC, Zadeh G, Introduction: Glioblastoma: an update on pathophysiology and management strategies. *Neurosurgical Focus* 37 (2014).
- [6] Burk RF, Hill KE, Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta* 1790 (2009) 1441-1447.
- [7] Philipov P, Tzatchev K, Selenium concentrations in serum of patients with cerebral and extracerebral tumors. *Zentralbl Neurochir* 49 (1988) 344-347.
- [8] Yakubov E, Buchfelder M, Eyüpoglu IY, Savaskan NE, Selenium Action in Neuro-Oncology. *Biol Trace Element Res* 161 (2014) 246-254.
- [9] Barchielli G, Capperucci A, Tanini D, The role of selenium in pathologies: An updated review. *Antioxidants (Basel)* 11 (۲۰۲۲) 252.
- [10] Almondes KG, Leal GV, Cozzolino SM, Philippi ST, Rondo PH, The role of selenoproteins in cancer. *Rev Assoc Med Bras* (1992) 56 (2010) 484-488.
- [11] Sunde RA, Raines AM, Selenium regulation of the selenoprotein and nonselenoprotein transcriptomes in rodents. *Adv Nutr* 2 (2011) 138-150.
- [12] Naziroglu M, Senol N, Ghazizadeh V, Yuruker V, Neuroprotection induced by N-acetylcysteine and selenium against traumatic brain injury-induced apoptosis and calcium entry in hippocampus of rat. *Cell Mol Neurobiol* 34 (2014) 895-903.
- [13] Kang C, Yuan X, Zhong Y, Pu P, Guo Y, Albadany A, Yu S, Zhang Z, Li Y, Chang J, Sheng J, Growth inhibition against intracranial C6 glioma cells by stereotactic delivery of BCNU by controlled release from poly(D,L-lactic acid) nanoparticles. *Technol Cancer Res Treat* 8 (2009) 61-70.
- [14] Pathak N, Cheruku SP, Rao V, Vibhavari RJA, Sumalatha S, Gourishetti K, Rao CM, Kumar N, Dehydrozingerone protects temozolomide-induced cognitive impairment in normal and C6 glioma rats besides enhancing its anticancer potential. *3 Biotech* 10 (2020) 438.
- [15] Sundaram N, Pahwa AK, Ard MD, Lin N, Perkins E, Bowles AP, Jr., Selenium causes growth inhibition and apoptosis in human brain tumor cell lines. *J Neurooncol* 46 (2000) 125-133.
- [16] Rooprai HK, Kyriazis I, Nuttall RK, Edwards DR, Zicha D, Aubyn D, Davies D, Gullan R, Pilkington GJ, Inhibition of invasion and induction of apoptosis by selenium in human malignant brain tumour cells in vitro. *Int J Oncol* 30 (2007) 1263-1271.
- [17] Wang K, Fu XT, Li Y, Hou YJ, Yang MF, Sun JY, Yi SY, Fan CD, Fu XY, Zhai J, Sun BL, Induction of S-phase arrest in human glioma cells by selenocysteine, a natural selenium-containing agent via triggering reactive oxygen species-mediated DNA damage and modulating MAPKs and AKT pathways. *Neurochem Res* 41 (2016) 1439-1447.
- [18] Anitha TS, Kuduvalli SS, Biswas I, Vignesh M, Mangaiyarkarasi N, Insights into molecular mediators of oxidative stress and inflammation in glioblastoma multiforme. *SBV J Basic Clin Applied Health Sci* 3 (2020) 137-143.
- [19] Orlicka-Plocka M, Fedoruk-Wyszomirska A, Gurda-Woźna D, Pawelczak P, Krawczyk P, Giel-Pietraszuk M, Framski G, Ostrowski T, Wyszko E, Implications of oxidative stress in glioblastoma multiforme following treatment with purine derivatives. *Antioxidants* 10 (2021) 950.
- [20] Wang J, Yi J, Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther* 7 (2008) 1875-1884.
- [21] Ertlav K, Naziroğlu M, Ataizi ZS, Braidy N, Selenium enhances the apoptotic efficacy of docetaxel through activation of TRPM2 channel in DBTRG glioblastoma cells. *Neurotox Res* 35 (2019) 797-808.
- [22] Khangholi S, Mahdavi M, Yazdi MH, Shahverdi AR, The toxicity of synthetic and biogenic selenium nanoparticles on human brain glioblastoma cell line: an in vitro comparison. *Int J Med Toxicol Forensic Med* 10 (2020) 26851.
- [23] Hervouet E, Staehlin O, Pouliquen D, Debien E, Cartron PF, Menanteau J, Vallette FM, Olivier C, Antioxidants delay clinical signs and systemic effects of ENU induced brain tumors in rats. *Nutr Cancer* 65 (2013) 686-694.
- [24] Yoon SO, Kim MM, Chung AS, Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells. *J Biol Chem* 276 (2001) 20085-20092.
- [25] Harmanci D, Erbayraktar Z, Sayin O, Guner GA, In vitro effects of selenium on human glioblastoma multiforme cell lines: a preliminary study. *Acta Clin Croat* 56 (2017) 48-57.

Research paper

Evaluation of the effect of selenium on damages of brain tumor in animal model of glioblastoma multiforme

Sepideh Khaksar^{1*}, Arash Samiee²¹Department of Plant Sciences, Faculty of biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran²Department of Physiology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 17 May 2022

Accepted: 11 July 2022

Abstract

Background and Aim: Glioblastoma multiform is one of the most common primary malignant brain tumors in adults. Recent studies have shown that micronutrients, such as selenium, have the potential to have positive effects in the treatment of glioblastoma and can be a promising candidate combined with surgical and radiochemical therapies. The aim of this study was to evaluate the anti-cancer effects of selenium on brain tumor damages.

Methods: Rats were randomly divided into three main groups: control and selenium-received groups at doses of 0.5 and 1.5 mg/kg. A 1×10^6 rat Glioma C6 cells were transplanted in the right caudate nucleus of the rat brain. Five days after surgery, the treatment groups received selenium intraperitoneally for five days. Motor activity, animal weight, tumor volume, survival rate, and histopathological changes were assessed.

Results: Selenium 0.5 mg/kg reduced tumor volume, improved locomotor activity, and attenuated weight loss of the animals. Also, histological analysis showed a significant reduction in tumor volume and invasion of tumor cells to the surrounding tissues of tumor in rats treated by selenium 0.5 mg/kg.

Conclusion: According to the present results, it can be stated that selenium has sufficient potential to inhibit brain tumor damages.

Keywords: Histology, Brain tumor, Tumor volume, Selenium

Please cite this article as follows:

Khaksar S, Samiee A, Evaluation of the effect of selenium on damages of brain tumor in animal model of glioblastoma multiforme. *Iran J Physiol Pharmacol* 6 (2022) 107-117.

*Corresponding author: s.khaksar@alzahra.ac.ir (ORCID: 0000-0003-2251-7329)