مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۳، شماره۳، مرداد و شهریور۱۳۹۷(شماره پی در پی۱۲۸)

اثرات سایتوتوکسیک ملاتونین بر رده سلولی لوسمی میلوئیدی مزمن K562 در شرایط آزمایشگاهی

معصومه آهنجان[۱]، سید میثم ابطحی فروشانی[*۱]

[۱]گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ وصول: ۹۶/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۳

چکیده:

زمینه و هدف: ملاتونین در بدن از منابع مختلف ساخته می‌شود. در برخی از مطالعات گذشته به اثرات انکواستاتیک ملاتونین اشاره شده است. هدف مطالعه حاضر ارزیابی اثرات ملاتونین بر روی سلول‌های K562 به عنوان مدلی از لوسمی میلوئید مزمن است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی تعداد ۶×۱۰^{۴} سلول از رده K562 به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های متفاوت شامل؛ صفر، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار از ملاتونین تیمار شدند. تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس در مقایسه با نمونه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت. اثرات مهار رشد و کشندگی ملاتونین با استفاده از MTT (دی متیل تیازول ـ دی فنیل تترازولیوم بروماید) و نوترال رد سنجیده شد. از رنگ‌آمیزی رایت‌ـ گیمسا جهت ارزیابی تمایز استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری کروسکال والیس و نرم‌افزار SPSS تحلیل شدند (P<۰/۰۵).

یافته‌ها: اختلاف معنی‌داری در مهار رشد سلولی بین غلظت‌های صفر و ۵۰ میکرومولار با سایر غلظت‌ها و غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار با سایر غلظت‌ها در این رده سلولی دیده شد. بیشترین اثر مهار رشد سلولی در غلظت‌های بالای ملاتونین رخ داد. حداکثر اثر سایتوتوکسیتی ملاتونین بر رده سلولی K562 در غلظت ۲۰۰ میکرومولار است، در حالی که در غلظت ۵۰ میکرومولار اثر سایتو توکسیسی‌ته ملاتونین حداقل بود (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: ملاتونین قابلیت مهار تکثیر سلول‌های سرطانی رده K562 را در شرایط آزمایشگاهی دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اثرات سایتوتوکسیک، لوسمی، ملاتونین، K562.

[*] **نویسنده مسول: سید میثم ابطحی فروشانی**، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب شناسی.

Email: meysamabtahi@hotmail.com

مقدمه

سرطان‌های خون با توجه به منشأ سلول میلوئیدی و لنفوئیدی و با توجه به سیر بیماری به چهار نوع تقسیم‌بندی می‌شود که عبارتند از؛ لوسمی میلوئیدحاد، لوسمی میلوئیدی مزمن، لوسمی لنفوسیتی حاد، لوسمی لنفوسیتی مزمن. لوسمی میلوئیدی مزمن(CML)[1] یک بیماری هماتولوژیک بدخیم است که برسلول‌های پیش‌ساز اثر می‌گذارد و به دنبال آن کلون بدخیم گسترش یافته و وارد خون و بافت‌ها می‌شود. لوسمی میلوئیدی مزمن اولین بار به وسیله جان هیوز بنت در سال ۱۸۴۵ در درمانگاه سلطنتی ادینبورگ[2] توصیف شده است. لوسمی مزمن میلوئید اولین بدخیمی بود که با یک اختلال کروموزومی خاص با نام کروموزوم فیلادلفیا(Ph) [3] شناسایی شد. موسسه ملی سرطان تخمین می‌زند ۳۳۹۹۰ نفردرایالات متحده با CML زندگی می‌کنند. لوسمی یک سرطان مغز استخوان و خون است که متوسط سن تشخیص ۶۵ سالگی اعلام گردیده است. این بیماری در کودکان بسیار نادر و میزان آن در سن بالا افزایش می‌یابد (۱). این بیماری بدین صورت است که اثرات مهاری در تقسیم‌های سلول‌های میلوئیدی برداشته می‌شود، یعنی سلول‌ها بدون نیاز به فاکتورهای رشدی تقسیم می‌شوند و افزایش می‌یابند و تعداد بسیار کمی از این سلول‌ها به مرحله بلوغ وارد می‌شوند تا بتوانند عملکرد طبیعی خود را انجام دهند. علت ایجاد این بیماری‌ها اختلالات کروموزومی و ژنتیکی می‌باشد (۲). البته شیوع بالایی از CML در بین بازماندگان بمب اتمی در طی جنگ جهانی دوم و هم‌چنین در میان بیماران تحت پرتودرمانی برای درمان بدخیمی‌ها دیده می‌شود. در حال حاضر کروموزوم فیلادلفیا در ۹۵ درصد از بیماران مبتلا به CML، نتیجه انتقال ژن ABL واقع در کروموزوم ۹ و فیوز با بخش باقیمانده از ژن BCR بر روی کروموزوم ۲۲ است. ژن هیبرید حاصل از جابه‌جایی به صورت BCR-ABL نمایش داده می‌شود و محصول بیان ژن، یک پروتئین فیوژن ۱۲۰ کیلودالتونی غیر طبیعی است که دارای فعالیت تیروزین کیناز(TK)[4] است که نه تنها باعث افزایش تکثیر سلولی شده، بلکه باعث اختلال در آپوپتوز سلول‌ها نیز می‌شود و در نهایت مسئول توسعه سرطان خون است (۳). در بیماران CML ممکن است علایمی خاصی دیده نشود، اما اغلب خستگی، ضعف در تنفس حتی در فعالیت‌های روزمره پایه، کاهش وزن ناشی از بی اشتهایی، اختلال در خواب، طحال بزرگ یا درد در سمت چپ شکم زیردنده‌ها، کم‌خونی (کاهش گلبول‌های قرمز)، عرق شبانه، عدم تحمل دماهای گرم گزارش شده است. برخی از بیماران ممکن است در زمان تشخیص تعداد گلبول‌های سفید خون بسیار بالایی داشته باشند. این می‌تواند مشکلات ویسکوزیته (ضخامت و چسبندگی خون) ایجاد کند و جریان خون رابه مغز، ریه‌ها، چشم‌ها وسایر مکان‌ها دچار مشکل کند و هم‌چنین باعث ایجاد آسیب در عروق خونی شود (۴).

برخلاف سایر انواع سرطان‌ها، لوسمی یک تومور جامد نیست که پزشک بتواند با عمل جراحی

آن را خارج نماید، به همین دلیل درمان CML در طول سال‌ها به شکل یک انقلاب واقعی ادامه یافته است. طی سال‌های ۱۸۶۵ تا ۱۹۷۵ بیشتر از داروهای مسکنی مانند آرسنیک[۱]، پرتوافشانی به طحال، داروی ضدسرطان باسولفن[۲]، بعدها هیدروکسی اوره[۳] استفاده شد و افزایش ناچیزی در بقا مشاهده شد. هیچ یک از این عوامل قادر به سرکوب کروموزوم فیلادلفیا و تغییر روند طبیعی بیماری نبودند. در سال ۱۹۷۵ روش پیوند مغزاستخوان بیشتر مورد توجه قرار گرفت. در سال ۱۹۸۰ اثربخشی اینترفرون ـ آلفا (IFN-α)[۴] در ایجاد پاسخ‌های هماتولوژیک و سیتوژنتیک، تأیید شد و بقا طولانی‌تر شد (۳). از اواخر دهه‌ی ۲۰۰۰ بیشتر داروهای مهار کننده‌ی تیروزین کیناز از جمله ایماتینب[۵]، داراتینب[۶]، نیلوتینیب[۷] استفاده شد. این داروهای مهارکننده تیروزین کیناز می‌توانند بیماری را برای دوره‌های بسیار طولانی کنترل کنند و کیفیت زندگی را به میزان زیادی بالا نگهدارند، اما هیچ یک از این روش‌ها باعث درمان قطعی CML نشده‌اند و اکثریت آنها با اثرات جانبی از قبیل مقاومت دارویی و آسیب جدی به سلول‌ها و بافت‌های سالم همراه است (۵)، لذا جستجو برای به کارگیری ترکیباتی که توانایی تومورکشی بیشتر و اثرات جانبی کمتر داشته باشد ادامه دارد. یک استراتژی توسعه دارویی جایگزین، استفاده از داروهایی است که تاکنون در درمان بیمارهای غیر سرطانی استفاده شده است. مزیت این روش این است که پروفایل‌های فارموکوکینتیکی، فارموکودینامیکی و توکسیسیتی این داروها در اصل به خوبی شناخته شده است و سریع می‌تواند وارد فاز درمانی شود. از جمله این داروها ملاتونین (N استیل ـ ۵ ـ متوکسی ـ تریپتامین[۸]) است. ملاتونین توجه زیادی را به خود جلب کرد، زیرا عملکرد سیستم ایمنی را به طور مؤثری هم در حیوان‌ها و هم در انسان‌ها تحت تأثیر قرار می‌هد. ملاتونین به عنوان یک مدولاتور ایمنی با خواص بافری در نظر گرفته شد، که تحریک مناسب سیستم ایمنی را در چالش‌ها فراهم می‌کند (۶).

سلول‌های سرطانی K562 جز سلول‌های سرطانی خون با منشأ میلوئیدی هستند که برای اولین بار از یک خانم ۵۳ ساله مبتلا به سرطان خون مزمن جداسازی شده است. این رده آزمایشگاهی به واسطه برخی ویژگی‌های خاص جهت تحقیق‌های آزمایشگاهی، بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷). رده سلولی K562 مدلی مناسب برای بررسی توان تمایزدهی ترکیب‌های مختلف به شمار می‌آید. به طوری که مثلاً نشان داده شده است که ترکیبات مختلف مانند آنتراسیکلین قادر به القا تمایز اریتروئیدی در سلول‌های K562 می‌باشند و یا ترکیبی به نام فوربال ۱۲ـ مریستات ـ ۱۳ــ استات باعث القا تمایز مگاکاریوسیتی و ماکروفاژی در سلول‌های K562

1- Arsenic
2-Busulfan
3-Hydroxycarbamide
4-Interferon alfa
5-Imatinib
6-Dasatinib
7-Nilotinib
8-N-acetyl-5-methoxy tryptamine

می‌شود (۸). با این حال بسیاری از این ترکیب‌ها به خاطر اثرات جانبی یا خاصیت تمایزدهندگی ضعیف قابلیت استفاده در بدن ندارد، پس تلاش برای یافتن ترکیب‌های جدید همواره مورد توجه بوده است. پس هدف این مطالعه تعیین اثرات ملاتونین بر روی سلول‌های K562 به عنوان مدلی از لوسمی میلوئید مزمن است.

روش بررسی

کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه با کد ۹۰۵-۲ مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت. در این مطالعه تجربی رده سلولی K562 از بانک سلولی ایران (شماره CCL-243:ATCC) تهیه شد. سلول‌ها به فلاسک کشت منتقل و در محیط کشت کامل حاوی ۹۰ درصد RPMI[1]، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی[2] و یک درصد آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) کشت داده شد (تمامی مواد از شرکت بایووست آمریکا[3]خریداری شد) و در گرم‌خانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و هم‌چنین ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض و سلول‌ها پاساژ گردیدند و با میکروسکوپ معکوس از سلامت سلول‌ها اطمینان حاصل شد.

به منظور بررسی اثرات ملاتونین بر ظاهر سلول K562، سلول‌ها تا مرحله آخر فاز لگاریتمی کشت و سپس سوسپانسیونی با دانسیته بالا از سلول‌های K562 تهیه و تعداد ۶×۱۰^{۴} سلول به پلیت‌های ۴۸ خانه منتقل گردید. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت صفر، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار (به ترتیب ۱۳، ۱۹/۵، ۲۶، ۳۲/۵ و ۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از ملاتونین تیمار و در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و هم‌چنین ۹۵ درصد رطوبت برای ۲۴ ساعت انکوبه شدند. تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده با ملاتونین با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس در مقایسه با نمونه‌های کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه جهت بررسی اثر کشندگی ملاتونین برسلول‌های K562 از آزمون احیای نمک تترازولیوم MTT [4] استفاده شد. این تست برپایه شکسته شدن نمک MTT تترازولیوم زرد به فورمازان کریستالی ارغوانی رنگ به واسطه فعالیت میتوکندریایی سلول‌های زنده فعال از نظر متابولیکی می‌باشد. کریستال فورمازان تشکیل شده قابل حل بوده و جذب محلول رنگی حاصل می‌تواند به طور کلی به وسیله اسپکتروفتومترهای چند چاهکی بررسی گردد (۹). بعد از تیمار سلول‌های K562 به مدت ۲۴ ساعت با ملاتونین، هر تیمار جداگانه به یک میکروتیوب منتقل و

1- Roswell Park Memorial Institute
2- Fetal Bovine Serum (FBS)
3-biowest, United States
4- Methyl thiazolyl tetrazolium

با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سوسپانسیون سلولی به پلیت ۹۶ خانه ته تخت منتقل و MTT با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌متر به نسبت ۱ به ۱۰ اضافه و سلول‌ها برای ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از اضافه شدن دی متیل سولفواکسید (DMSO)[1] و چندین بار پیپتاژ میزان جذب نوری ایجاد شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر به وسیله الایزا ریدر قرائت گردید.

برای تعیین آستانه توکسیسیته ملاتونین روی رده‌ی سلولی K562 از روش رنگ‌آمیزی نوترال‌رد[2] استفاده گردید. اساس این تست بر توانایی سلول‌های زنده در ترکیب و اتصال رنگ نوترال رد در لیزوزم است، در حالی که سلول‌های غیرزنده نمی‌تواند رنگ نوترال رد را بگیرند. در این تست بعد از ترکیب شدن سلول با رنگ، آنها شسته یا فیکس و سپس رنگ ترکیب شده با سلول به کمک یک محلول اسیدی اتانول از سلول آزاد می‌شود. افزایش یا کاهش تعداد سلول‌ها یا موقعیت فیزیولوژیک منجر به تغییرات هم‌زمان در مقدار ترکیب رنگ به وسیله سلول‌های در کشت می‌شود. این نشان دهنده درجه سمیت ناشی از ماده مورد آزمایش است (۱۰). بعد از تیمار سلول‌های K562 به مدت ۲۴ ساعت با ملاتونین، هر تیمار جداگانه به یک میکروتیوب منتقل و با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سوسپانسیون سلولی به پلیت ۹۶ خانه ته تخت منتقل و رنگ ۱X نوترال‌رد به نسبت ۱ به ۱۰ با محیط کشت اضافه شد و سلول‌ها برای ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد انکوبه شدند. به توده سلولی محلول نمک فسفات باخاصیت بافری (PBS)[3] اضافه و شستشوی سلول‌ها سه بار انجام شد. به سلول‌های موجود در میکروتیوب، محلول اسید استیک گلاسیال- اتانول (۵۰ درصد الکل ۹۶ درصد، ۴ درصد اسید استیک و ۴۶ درصد آب مقطر) اضافه گردید و بعد از چندین بار پیپتاژ میزان جذب نوری ایجاد شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر به وسیله الایزا ریدر قرائت گردید (۱۱). برای مطالعه اثر تمایزی ملاتونین بر رده سلولی K562 از رنگ‌آمیزی رایت- گیمسا استفاده شد. در تحقیق حاضر تمامی آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین سه بار تکرار ± خطای استاندارد نمایش داده شد. نمودارها در نرم‌افزار Excel رسم گردید و نتایج نیز با نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری کروسکال والیس مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح P<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشاهدات میکروسکوپ نوری، نشان‌دهنده ظاهری دایره مانند در رده سلولی K562 در شرایط بهینه رشد سلولی است. سلول‌ها به صورت فشرده با

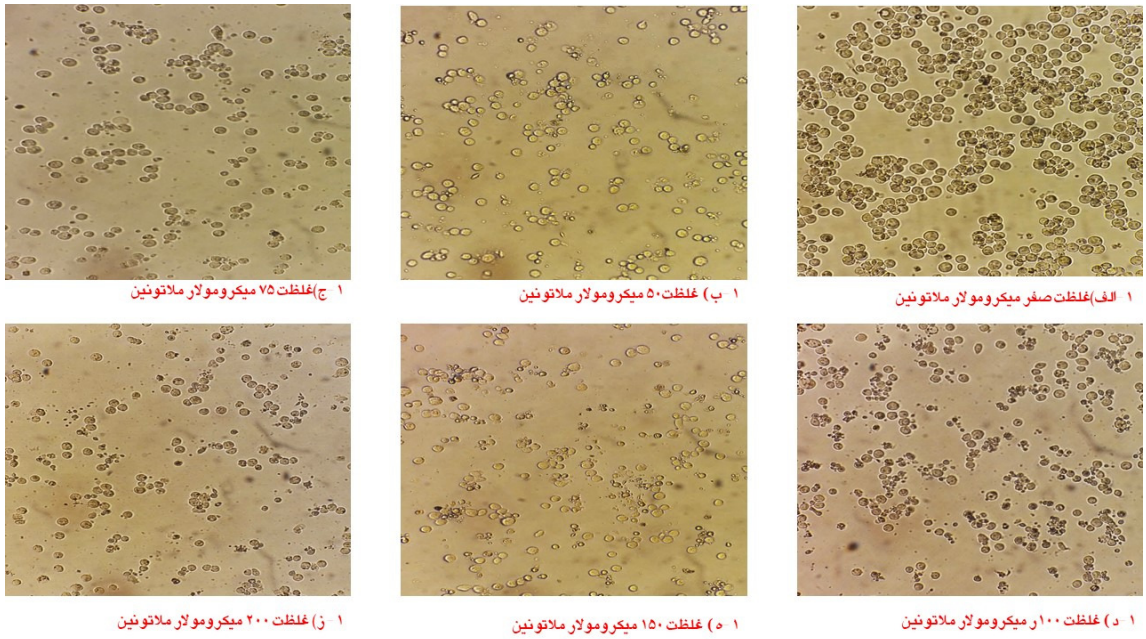
1- Dimethyl sulfoxide
2- Neutralator
3- Phosphate buffered saline

تعداد بالا و اتصال بسیار ضعیف به سطح فلاسک تکثیر شدند. به دنبال واکشت‌های متعدد تغییری در مورفولوژی سلول‌ها مشاهده نشد و رشد و تکثیر را تا حد بالایی حفظ کرد. این رده سلولی به آلودگی با میکروارگانیسم‌های گوناگون بسیار حساس است. همان گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود اثرات مهاری ملاتونین بر روی رشد رده سلولی K562 بعد از ۲۴ ساعت مشخص است و به صورت وابسته به غلظت مهار رشد سلولی افزایش یافت. به گونه‌ایی که در غلظت ۲۰۰ میکرومولار حداکثر مهار رشد سلول وجود دارد. بررسی تغییرات ظاهری بر روی سلول-های تیمار شده با ملاتونین نشان دهنده تغییرات ریخت شناسی مشخصی در سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل بود.

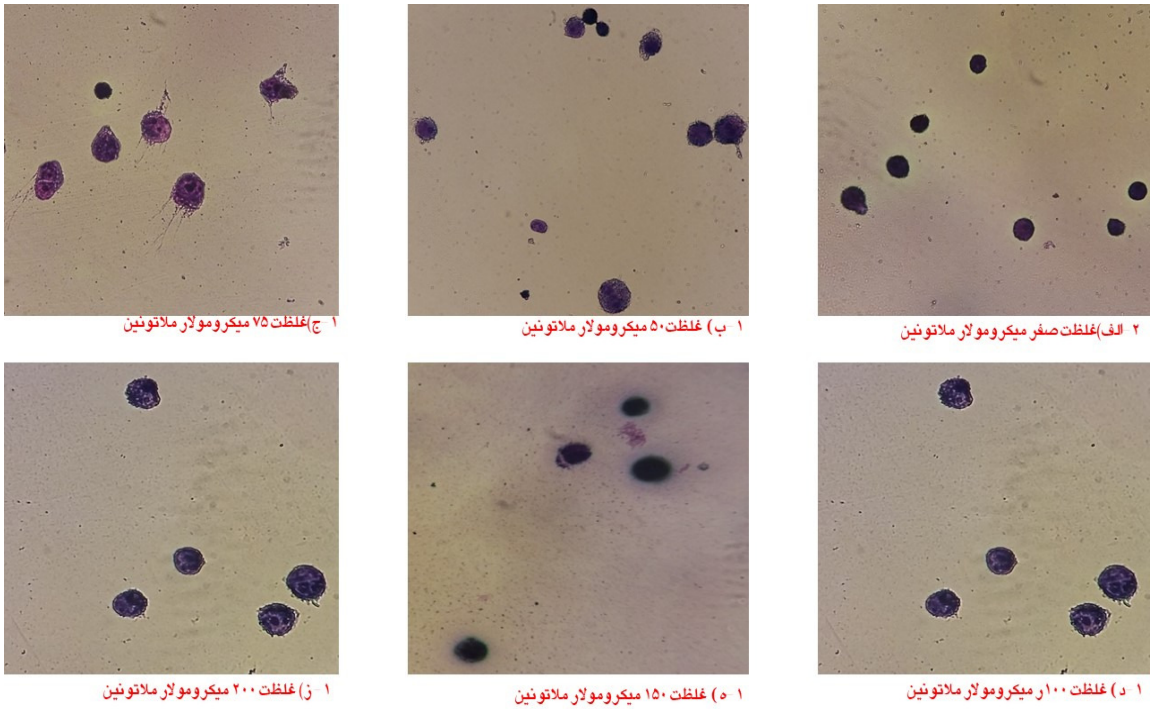
تحلیل آماری سنجش سمیت MTT برای رده سلولی K562 نشان داد که در زمان انکوباسیون ۲۴ ساعته، درصد زیستایی با افزایش غلظت ملاتونین در رده سلولی K562 کاهش می‌یابد (نمودار۱). البته تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از آزمون کروسکال ـ والیس اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های صفر و ۵۰ میکرومولار با سایر غلظت‌ها، غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار با سایر غلظت‌ها و غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار با سایر غلظت‌ها در این رده سلولی نشان داد ($P<0/05$). بیشترین اثر مهار رشد سلولی در غلظت‌های بالای ملاتونین رخ داد.

بررسی سمیت سلولی با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی نوترال‌رد نشان داد که ملاتونین در غلظت‌های مورد نظر بر رده سلولی K562 اثر سایتوتوکسیتی داشته به طوری که درصد بقای گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت (نمودار۲). تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از آزمون کروسکال ـ والیس اختلاف معنی‌داری بین تمامی غلظت‌ها نشان داد. حداکثر اثر سایتوتوکسیتی ملاتونین بر رده سلولی K562 در غلظت ۲۰۰ میکرومولار است. در حالی که در غلظت ۵۰ و ۷۵ میکرومولار اثر سایتوتوکسیته ملاتونین حداقل بود.

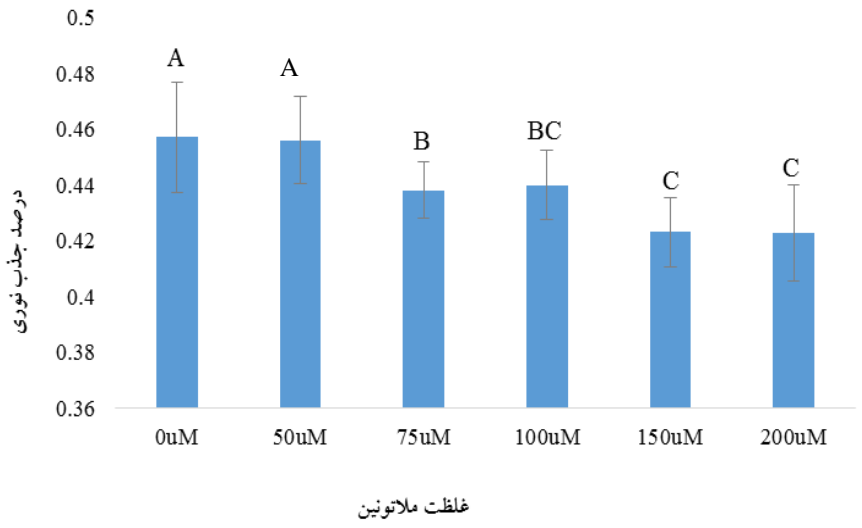
به منظور بررسی بیشتر اثرات تمایزی ملاتونین از رنگ‌آمیزی رایت ــ گیمسا استفاده شد. سلول K562 سلول‌هایی با ظاهر کروی و نسبت هسته به سیتوپلاسم بالا می‌باشد، در حالی که بعد از تیمار با ملاتونین سلول‌های بزرگ با نسبت هسته به سیتوپلاسم کمتر و حاوی گرانول‌های متعدد مشاهده گردید (شکل ۲).



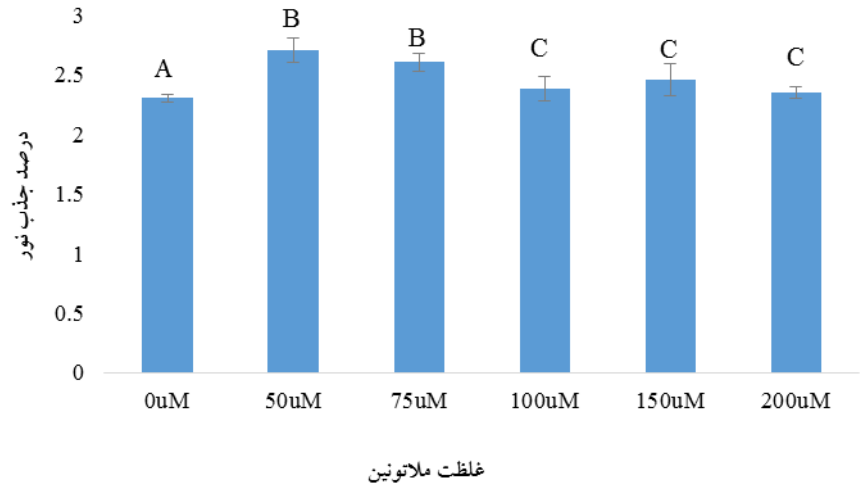
شکل ۱: مورفولوژی سلول‌های رده K562 در زیر میکروسکوپ ۲۴ ساعت بعد از تیمار با ملاتونین (عکس‌ها با بزرگ‌نمایی X40 تهیه شده است).



شکل ۲: اثرات تمایزی ملاتونین در سلول‌های رده K562 در زیر میکروسکوپ ۲۴ ساعت بعد از تیمار با ملاتونین (عکس‌ها با بزرگ‌نمایی X40 تهیه شده است).



نمودار ۱: اثر غلظت‌های مختلف ملاتونین بر درصد زنده‌مانی سلول‌های K562 بررسی شده با آزمون MTT. حروف متفاوت اختلاف سطح معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).



نمودار ۲: مقایسه میزان برداشت نوترال رد به وسیله رده سلولیK562 تیمار شده با غلظت‌های مختلف ملاتونین. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.

بحث

در مطالعه حاضر مشخص شد که ملاتونین به طور وابسته به غلظت سبب مهار رشد سلول‌های K562 می‌شود. ملاتونین هورمون اصلی غده صنوبری است. این هورمون یک اندول‌آمین است که درطول تکامل فیلوژنی خیلی زود ظاهر شده است. پس از ورود تریپتوفان به صورت فعال طی دو مرحله به سروتونین تبدیل و در طی دو مرحله بعد سروتونین

به ملاتونین تبدیل می‌شود (۱۲). ملاتونین نقش مهمی در سیستم ساعت بیولوژیک داشته، در نیمه شب به بالاترین مقدار و در طول روز به کم‌ترین مقدار ممکن می‌رسد (۱۳). این هورمون در جلوگیری و درمان کولیت سندرم روده تحریک پذیر، قولنج و اسهال کودکان و سرطان‌هایی چون؛ ریه‌ها، پوست، پستان، تخمدان، پروستات، کبد وکولون اثر بالقوه‌ای دارد (۱۴). در غلظت فیزیولوژیکی، ملاتونین تکثیر سلول‌ها را مهار می‌کند، در حالی که در غلظت دارویی آن فعالیت سایتوتوکسیکی بر سلول‌های سرطانی دارد. ملاتونین در مغز استخوان به غلظت بالایی می‌رسد و سبب محافظت از مغز استخوان و بافت‌های لنفوئیدی از اثرات سمی داروها در موش می‌شود (۱۵).

تجویز آنی ملاتونین باعث افزایش پاسخ سلول‌های NK[۱] به IFN-γ[۲] می‌شود و مصرف مداوم آن نه تنها افزایش فعالیت سلول‌های NK بلکه افزایش تعداد سلول‌های NK در گردش را موجب می‌شود. تعداد سلول‌های NK افزایش یافته به وسیله ملاتونین منجر به افزایش سایتوکین‌هایی مانند IL-2[۳]، IL-6،IL-12 و IFN-γ از لنفوسیت Th1 و مونوسیت‌ها می‌شود (۱۶). درمان سلول‌های لوسمی انسانی رده RAMOS-1 با ملاتونین، منجر به آزاد شدن سیتوکروم سی[۴] میتوکندری شده و پس از آن محصول ژن Bcl-2 کاهش یافته که نشان دهنده فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوز است (۱۷). ملاتونین اثرات ضدرگزایی را از طریق مهار عوامل رشد تومور مانند IGF[۵]، EGF(۶)، VEGF[۷]، ET-1[۸] که میتوژن‌های قوی هستند و باعث تحریک سلول سرطانی می‌شوند (۱۸) و مهار بیان پروتئین HIF-1alpha و القاء هیپوکسی در سلول‌های سرطانی اعمال می‌کند (۱۹). مطالعه‌ها نشان داد که ملاتونین بیان دو عامل ضدرگزایی miRNA3195 و miRNA374b را در سلول‌های PC-3 hypoxic افزایش می‌دهد (۲۰). بسیاری از سلول‌ها برای تکثیر سلولی نیازمند پیوندی اسیدهای چرب در غشا سلول هستند، لذا تزریق ملاتونین به سلول‌های توموری، ازجذب اسیدچرب به ویژه اسیدلینولئیک جلوگیری می‌کند و مانع از تکثیر سلولی می‌شود که مستقل از مکانیزم‌های تنظیم ایمنی است (۲۱). مطالعه‌های متعدد حیوانی نشان داد که ملاتونین می‌تواند آسیب‌های ریه ناشی از تابش یونیزه در هنگام شیمی درمانی را کاهش دهد. هنگامی که مناطق توراسیکی موش‌ها مورد تابش(18 Gy) قرار گرفتند، تزریق ملاتونین باعث جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید و آسیب شدید ریه شد. علاوه بر این، جانگ و همکاران بیان داشتند که ملاتونین موجب کاهش آسیب ریه ناشی از اشعه (12 Gy) در موش‌ها می‌شود که نشان دهنده کاهش قابل توجهی در استرس اکسیداتیو و تولید سیتوکین‌ها از جمله TGF-β1[۹] و TNF-α است. به طور خلاصه، نتایج نشان می‌دهد که تجویز دارویی مانند ملاتونین در

1- Natural killer cells
2- Interferon gamma
3- Interleukin-2
4-Cytochrome-c
5-Insulin-like growth factor 1
6-Epidermal growth factor
7-Vascular endothelial growth factor
8-Endothelin 1
9-Transforming growth factor beta

بیماران مبتلا به سرطان، آسیب به اندام ها را کاهش می‌دهد (۲۲).

مکانیسم‌های متعددی وجود دارد که ملاتونین می‌تواند اثرات اونکواستاتیک خود را اعمال کند؛ الف) تأثیر مستقیم بر ژن‌های پیش آپوپتوزی در هر دو مسیر بیرونی و درونی، ب)فعالیت آنتی اکسیدانی (۲۳)، ج) جلوگیری از آسیب اکسیداتیو (۲۴)، د) کاهش جذب عوامل کلیدی برای رشد تومور، ر) افزایش مکانیسم‌های تحریک کننده ایمنی در میان سلول‌های بدن، ز) تأثیر بر تمایز سلول‌های سرطانی، س) فعالیت ضدرگزایی (۱۶).

در این مطالعه نیز مشخص گردید که مکانیسم مهار رشد ملاتونین وابسته به مهار تکثیر سلولی می‌باشد. مهار رشد به وسیله ملاتونین، درصد سلول‌ها را در فازهای G2,G1,G0 و M کاهش می‌دهد که نشانگر توقف چرخه سلولی است (۲۵). کاهش در تقسیم سلولی و چرخه سلولی با افزایش معنی‌دار در بیان پروتئین‌های P53 و P21 همراه است (۲۶). خاصیت مهاری ملاتونین بر تکثیر سلولی به وسیله مکانیسم‌های ذیل اتفاق می‌افتد؛ ملاتونین با کاهش کالمودلین منجر به مهار تکثیر می‌شود. هم‌چنین بیان ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی و ورود مجدد سلول‌های خاموش از فاز صفر به چرخه سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۷).

سوریسوزا و همکاران اثرات پرواکسیدانت ملاتونین را در سلول‌های لوسمی انسان مطالعه کردند. ایشان اظهار داشتند که ملاتونین نه تنها تکثیر در سلول‌های لوسمی را القا نمی‌کند، بلکه در غلظت‌های بالاتر با افزایش تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن باعث مهار رشد این سلول‌ها و افزایش آپوپتوز می‌شود. در حالی که ملاتونین میزان آپوپتوز و تولید رادیکال‌های آزاد در سلول‌های سالم را کاهش می‌دهد (۱۴). تجزیه و تحلیل نتایج مطالعه حاضر مشخص ساخت که بیشترین اثر مهار رشد سلولی در غلظت‌های بالای ملاتونین رخ می‌دهد. حداکثر اثر سایتوتوکسیتی ملاتونین بر رده سلولی K562 در غلظت ۲۰۰ میکرومولار است. در حالی که در غلظت ۵۰ میکرومولار اثر سایتوتوکسیته ملاتونین حداقل بود.

در همین راستا، هیووانا و همکاران نشان دادند که ملاتونین به طور قابل ملاحظه‌ای توانایی تکثیر سلول‌های پالپ دندان[1] hDPCها را در یک شیوه وابسته به غلظت و زمان مهار می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ملاتونین در غلظت‌های فیزیولوژیکی می‌تواند مانع از تکثیر و رشد سلول‌های hDPC شود، اما ممکن است در تمایز DPCها برای بازسازی عاج دندان نقش داشته باشد (۲۸). کیم و همکاران نشان دادند که ملاتونین، آنژیوژنز تومور را سرکوب کرده و شکل‌گیری مویرگ‌های داخل تومور را ضعیف می‌کند و باعث کاهش رشد تومور در موش‌های دارای آدنوکارسینوم کلیه (RENCA)[2] می‌شود. علاوه بر این، در موش‌های تزریقی با ملاتونین در معرض

1- Human dental pulp cells
2- Renal adenocarcinoma

هیپوکسی گزارش شده است که سطح سرمی VEGF[1] کاهش می‌یابد. قابل توجه است که کاهش بیان HIF-1[2] و ژن هدف آن VEGF می‌تواند با اثر آنتی‌اکسیدانی ملاتونین و حذف گونه‌های واکنشگر اکسیژن داخل سلولی رخ دهد (۲۹). بعضی مطالعه‌ها نشان می‌دهد که ملاتونین سبب تمایز استئوبلاست و استخوان-سازی می‌گردد (۳۰). پارک و همکاران اعلام کردند که ملاتونین باعث تمایز سلول MC3T3 استئوبلاستیک[3] موش می‌شود (۳۱). ملاتونین به عنوان عامل توسعه استئوبلاست انسان مورد مطالعه قرار گرفته است. ساتومورا و همکارانش که ملاتونین باعث تمایز استئوبلاست در انسان می‌شود. نتایج نشان می دهد که در یک افزایش وابسته به دوز ملاتونین بیان mRNA کلاژن نوع I[4]، استئوپونتی[5] و استئوکلسین[6] افزایش می‌دهد. علاوه بر این، تشکیل ماتریکس خارج سلولی با استفاده از ملاتونین افزایش یافت. این نتایج نشان می دهد که ملاتونین در دوزهای دارویی می‌تواند باعث تمایز استئوبلاست‌های انسانی شود (۳۲). در مطالعه حاضر به منظور بررسی بیشتر اثرات تمایزی ملاتونین از رنگ‌آمیزی رایت ـ گیمسا استفاده شد. سلول‌های K562 سلول‌هایی با ظاهر کروی و نسبت هسته به سیتوپلاسم بالا می‌باشد، در حالی که بعد از تیمار سلول‌های بزرگ با نسبت هسته به سیتوپلاسم کمتر و حاوی گرانول‌های متعدد مشاهده گردید که نشان از تمایز این رده‌ی سلولی داشت. البته در غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار سلول‌ها دچار آپوپتوز شدند.

براساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که ملاتونین موجب مهار تکثیر و القا تمایز در سلول‌های سرطانی رده K562 می‌شود. این خاصیت ضدتکثیری وابسته به غلظت است به گونه‌ایی که بیشترین اثر مهار رشد سلولی در غلظت‌های بالای (بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار) ملاتونین رخ داد. تمایز درمانی یک راهکار مهم در درمان CML مطرح می‌گردد و در این میان یافتن ترکیب‌های مناسب تمایز دهنده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هر چند مقاله حاضر یک مطالعه آزمایشگاهی اولیه بود اما با افزایش مدت زمان تیمار و انجام آزمایش‌های دقیق‌تر به طور قطع می‌توان تمایز سلولی را واضح‌تر مشخص کرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ایمنی شناسی می‌باشد و منابع مالی آن به وسیله دانشگاه ارومیه و پژوهشگر تأمین شده است.

1- Vascular endothelial growth factor
2- Hypoxia-inducible factors
3-Osteoblastic
4-Type I collagen
5-Osteopenia
6-Osteocalcin

REFERENCES

1.Jabbour EJ, Cortes JE, Kantarjian HM. Tyrosine kinase inhibition: a therapeutic target for the management of chronic-phase chronic myeloid leukemia. Expert review of anticancer therapy. 2013; 13(12): 1433-52.
2.Buyukasik Y, Haznedaroglu IC, Ilhan O. Chronic myeloid leukemia: Practical issues in diagnosis, treatment and follow-up. International Journal of Hematology and Oncology 2010; 27(1): 001-12.
3.Bollmann PW, Giglio AD. Chronic myeloid leukemia: past, present, future. Einstein (São Paulo) 2011; 9(2): 236-43.
4.Cid DMC, Magalhaes SMM, Quixada ATdS, Honorio RPP, Costa PFTF, Reis SRCd, et al. Chronic myeloid leukemia: an overview of the determinants of effectiveness and therapeutic response in the first decade of treatment with imatinib mesylate in a Brazilian hospital. Revista brasileira de hematologia e hemoterapia. 2013; 35(6): 389-94.
5.Zhang G, Li M, Han S, Chen D, Wang Y, Ye W, et al. Induction of human chronic myeloid leukemia K562 cell apoptosis by virosecurinine and its molecular mechanism. Molecular Medicine Reports 2014; 10(5): 2365-71.
6.Hardeland R, Cardinali DP, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin and brain inflammaging. Progress in Neurobiology 2015; 127: 46-63.
7.Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 96(10): 3343-56.
8.Limb JK, Yoon S, Lee K, Kim BH, Lee S, Bae Y, et al. Regulation of megakaryocytic differentiation of K562 cells by FosB, a member of the Fos family of AP-1 transcription factors. Cellular and Molecular Life Sciences 2009; 66(11-12): 1962-73.
9.Lin HY, Juan SH, Shen SC, Hsu FL, Chen YC. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264. 7 macrophages involve heme oxygenase-1. Biochemical Pharmacology 2003; 66(9): 1821-32.
10.Repetto G, Del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nature Protocols 2008; 3(7): 1125.
11.Motlagh BM, Ahangaran NA, Froushani SMA. Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2015; 18(7): 672.
12.Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. Journal of Pineal Research 2003; 34(4): 233-41.
13.Shokrzadeh M, Ataee R, Asemi A. Evaluation of inhibitory effect of melatonin on gastric adenocarcinoma AGS and MKN45 cell lines. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2013; 23(107): 96-105.
14.Büyükavcı M, Özdemir Ö, Buck S, Stout M, Ravindranath Y, Savaşan S. Melatonin cytotoxicity in human Leukemia cells: Relation with its pro- oxidant effect. Fundamental & Clinical Pharmacology 2006; 20(1): 73-9.
15.Büyükavci M, Özdemir Ö, Buck S, Ravindranath Y, Savaşan S. Effect of melatonin on the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human leukemia cells. in Vivo 2011; 25(3): 405-9.
16.Talib WH. Melatonin and Cancer Hallmarks. Molecules. 2018; 26; 23(3).
17.Trubiani O, Recchioni R, Moroni F, Pizzicannella J, Caputi S, Di Primio R. Melatonin provokes cell death in human B-Lymphoma cell by mitochondrial –dependent apoptotic pathway activation. Journal of Pineal Research 2005; 39(4): 425-31.
18.Liu H, Xu L, Wei JE, Xie MR, Wang SE, Zhou RX. Role of CD4+ CD25+ regulatory T cells in melatonin-mediated inhibition of murine gastric cancer cell growth in vivo and in vitro. The Anatomical Record 2011; 294(5): 781-8.
19.Kaminski WE, Beham AW, Kzhyshkowska J, Gratchev A, Puellmann K. On the horizon: flexible immune recognition outside lymphocytes. Immunobiology 2013; 218(3): 418-26.
20.Hornedo-Ortega R, Cerezo AB, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC, Mas A. Melatonin and other tryptophan metabolites produced by yeasts: Implications in cardiovascular and neurodegenerative diseases. Frontiers in Microbiology 2016; 6: 1565.
21.Fildes JE, Yonan N, Keevil BG. Melatonin–a pleiotropic molecule involved in pathophysiological processes following organ transplantation. Immunology 2009; 127(4): 443-9.
22.Ma Z, Yang Y, Fan C, Han J, Wang D, Di S, et al. Melatonin as a potential anticarcinogen for non-small-cell lung cancer. Oncotarget 2016; 7(29): 46768.
23.Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni G, Cardinali D, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin. The FEBS Journal 2006; 273(13): 2813-38.

24.Tuli HS, Kashyap D, Sharma AK, Sandhu SS. Molecular aspects of melatonin (MLT)-mediated therapeutic effects. Life sciences 2015; 135: 147-57.
25.Long F, Dong C, Jiang K, Xu Y, Chi X, Sun D, et al. Melatonin enhances the anti-tumor effect of sorafenib via AKT/p27-mediated cell cycle arrest in hepatocarcinoma cell lines. RSC Advances 2017; 7(34): 21342-51.
26.MartínRenedo J, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz-Andrés O, González P, González -Gallego J. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. Journal of Pineal Research 2008; 45(4): 532-40.
27.Rodriguez C, Martín V, Herrera F, García-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Casado-Zapico S, et al. Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells. International Journal of Molecular Sciences 2013; 14(4): 6597-613.
28.Liu Q, Fan W, He Y, Zhang F, Guan X, Deng Q, et al. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human dental pulp cells. Archives of oral biology. 2017; 83:33-9.
29.Kim KJ, Choi JS, Kang I, Kim KW, Jeong CH, Jeong JW. Melatonin suppresses tumor progression by reducing angiogenesis stimulated by HIF-1 in a mouse tumor model. Journal of Pineal Research 2013; 54(3): 264-70.
30.Xiong XC, Zhu Y, Ge R, Liu LF, Yuan W. Effect of Melatonin on the extracellular-regulated kinase signal pathway activation and human osteoblastic cell line hFOB 1.19 proliferation. International Journal of Molecular Sciences 2015; 16(5): 10337-53.
31.Park KH, Kang JW, Lee EM, Kim JS, Rhee YH, Kim M, et al. Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways. Journal of Pineal Research 2011; 51(2): 187-94.
32.Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E, et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. Journal of Pineal Research 2007; 42(3): 231-9.

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

Original Article

Cytotoxic effects of Melatonin on the Cell Line of Chronic Myeloid Leukemia K562 in Vitro

Ahanjan M[1], Abtahi Froushani SM[1]*

[1]Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: 11 March 2018 Accepted: 25 July 2018

Abstract

Background & Aim: Melatonin is produced from different sources in the body. In some of the previous studies, the effects of oncostatic melatonin have been reported. The aim of this study was to evaluate the effects of melatonin on K562 cells as a model for chronic myeloid leukemia.

Methods: In this experimental study, 6×10^4 cells of K562 cell line were treated with melatonin for 24 hours with different concentrations of 0, 50, 75, 100, 150 and 200 µM. The morphological changes of the treated cells were evaluated by inverse optical microscopy in comparison with the control sample. The effects of inhibition of melatonin growth and fecundity were measured using MTT (dimethyl thiazole diphenyl tetrazolium bromide) and neutrally. The Wright-Gimsa staining was used to evaluate the distinction. Data were analyzed using Kruskal-Wallis statistical test.

Results: There was with other concentrations in this cell line. The highest inhibitory effect of cellular growth was observed in high concentrations of melatonin. Maximum cytotoxic effect of melatonin on K562 cell line was observed at 200 µm. However, at 50 µm concentration, the effect of cytotoxicity of melatonin was minimal ($p < 0.05$).

Conclusion: Melatonin has the potential to inhibit proliferation of K562 cancer cells in vitro.

Key words: Cytotoxic effects, Leukemia, Melatonin, K562

***Corresponding author**: **Abtahi Froushani SM**, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
Email: meysamabtahi@hotmail.com

Please cite this article as follows: Ahanjan M, Abtahi Froushani SM. Cytotoxic effects of Melatonin on the Cell Line of Chronic Myeloid Leukemia K562 in Vitro. Armaghane-danesh, 2018; 23(3): 303-316