اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک هورمون ملاتونین در رده سلول‌های لوسمیک NB4

مهدیه مهرپوری [۱] (Ph.D)، رامین یوسف‌پور [۲] (M.Sc)، آوا صفراوغلی‌آذر [۲] (M.Sc)، داوود بشاش [۲*] (Ph.D)

۱- کمیته پژوهشی دانشجویان، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۲۷۱۷۵۰۴-۰۲۱ d.bashash@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱

چکیده

هدف: سمیت بالا و عوارض جانبی داروهای شیمی‌درمانی از عوامل محدودکننده مصرف این عوامل می‌باشند، لذا جستجو برای یافتن داروهای جدید با سمیت کم‌تر و کارآیی بیش‌تر ادامه دارد. ملاتونین، محصول اصلی غده پینه‌آل، نه تنها نقش مهمی در تنظیم ریتم شبانه‌روزی ایفا می‌کند، بلکه هم‌چنین اثرات آنتی‌پرولیفراتیو و آپوپتوزی را در طیف گسترده‌ای از تومورها اعمال می‌نماید. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر داروی ملاتونین در کاهش بقا و القای آپوپتوز در سلول‌های NB4 (مشتق شده از لوسمی پرومیلوستیک حاد) است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، جهت ارزیابی اثرات سایتوتوکسیک ملاتونین، سلول‌های NB4 با غلظت‌های مختلف دارو (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار) تیمار شدند. سپس فعالیت متابولیک سلول‌ها، القا آپوپتوز، میزان فعالیت کاسپاز ۳، تولید ROS و هم‌چنین بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز به ترتیب از طریق تست‌های MTT assay، رنگ‌آمیزی Annexin-V/PI، کیت ارزیابی فعالیت کاسپاز ۳، کیت ارزیابی ROS سلولی و RQ-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد که ملاتونین منجر به کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 به صورت وابسته به دوز و زمان می‌گردد ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین، نتایج بیانگر آن است که احتمالاً تاثیر ضد لوسمیک ملاتونین از طریق القاء فعالیت کاسپاز ۳، افزایش سطح داخل سلولی ROS و تغییر سطح بیان ژن‌های Bcl-2، Survivin و Bax صورت می‌گیرد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ملاتونین دارای اثرات سایتوتوکسیک در سلول‌های NB4 بوده و به عنوان یک داروی کاندید امیدبخش در درمان APL مطرح می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ملاتونین، آپوپتوز ، سرطان خون پرومیلوسیتی حاد

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL) با تشکیل ۵-۱۰ درصد از موارد لوسمی‌های میلوئیدی حاد، یکی از شناخته شده‌ترین انواع بدخیمی‌های هماتولوژیک به‌شمار می‌رود که بیش‌ترین شیوع را در بین جوانان دارد [۱،۲]. طی سال‌های اخیر بررسی‌های مولکولی و آزمایشگاهی گوناگون طیف وسیعی از ناهنجاری‌های ژنتیکی مرتبط با این بیماری را شناسایی کرده‌اند [۳]. در این بین می‌توان از جابه‌جایی بین دو کروموزوم ۱۵ و ۱۷ نام برد که در ۹۷ درصد موارد APL یافت شده و با ایجاد ژن ترکیبی PML/RARα و پروتئین کایمریک PML/RARα همراه است [۴]. با این وجود، تلاش‌ها برای یافتن دیگر سازوکارهای دخیل در پاتوژنز و هم‌چنین مکانیسم‌های مقاومت به درمان با داروهای شیمی‌درمانی هم‌چنان ادامه دارد [۵]. با شناسایی نقش داروی ATRA در درمان بیماران APL، این دارو به صورت گسترده برای درمان بیماران APL به‌کار گرفته شد. علی‌رغم درمان درصد بالایی از بیماران با این دارو، محدودیت‌هایی از قبیل سندروم رتینوئیک اسید و ایجاد مقاومت به دارو در بیماران درمان شده به عنوان چالش‌های درمان با ATRA باقی ماند [۶]. هر چند درمان با آرسنیک تری‌اکسید (AS2O3) یکی از استراتژی‌های درمانی در بیماران مقاوم به ATRA است؛ اما در کنار اثربخشی مطلوب این دارو، سمّیت و عوارض جانبی از عوامل محدودکننده برای مصرف آن می‌باشند [۷]. لذا جستجو برای شناسایی عوامل درمانی که برای تومور سمّیت داشته باشند و در عین حال عوارض جانبی پایینی داشته باشند ادامه دارد. در این بین استفاده از عواملی که برای درمان سایر بیماری‌ها استفاده می‌شوند یک استراتژی درمانی حائز اهمیت خواهد بود؛ زیرا در این حالت سمّیت و کینتیک دارو به خوبی شناخته شده و می‌تواند به سرعت وارد فاز درمانی بشود.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.3.534]

از جمله این عوامل درمانی می‌توان به ملاتونین (N استیل ۵ متوکسی تریپتامین) اشاره کرد که مشتق اسیدآمینه تریپتوفان بوده و توسط غده‌ی پینه‌آل و سایر ارگان‌ها نظیر شبکیه، مغز استخوان و تیموس تولید می‌شود [۹،۸]. ملاتونین نه تنها از واسطه‌های اصلی برای تنظیم ریتم شبانه‌روزی است، بلکه در تعدیل سیستم ایمنی، پیشگیری از التهاب، زدودن رادیکال‌های آزاد و گشاد شدن عروق نقش دارد [۱۱،۱۰]. هم‌چنین، پژوهش‌های مختلف صورت گرفته نشان داده‌اند که ملاتونین دارای اثرات ضدتکثیری و پیش‌آپوپتوزی در طیف وسیعی از تومورهای توپر بوده و به عنوان یک عامل ضدتوموری امیدبخش مطرح می‌باشد. در این راستا مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که تجویز ملاتونین در سرطان‌های پستان و پروستات با مهار تکثیر سلولی و در نتیجه فواید درمانی همراه می‌باشد [۱۳،۱۲]. از سویی دیگر، بررسی‌های صورت گرفته روی سلول‌های سرطانی پستان نشان داده است که ملاتونین با افزایش ژن‌های پیش‌آپوپتوزی و کاهش ژن‌های آنتی‌آپوپتوزی می‌تواند اثر داروهای شیمی‌درمانی مورد استفاده را تقویت نماید [۱۴]. اخیراً نیز در مطالعه‌ای نشان داده شد که ملاتونین قادر است از طریق القای توقف در چرخه‌ی سلولی و تحریک مسیرهای آپوپتوزی رشد سلول‌های سرطانی معده را مهار نماید [۱۵]. با توجه به این‌که بدخیمی‌های خونی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان هستند، مطالعه اثر ملاتونین در این بیماری‌ها می‌تواند در ارتقای روش‌های درمانی موجود کمک‌کننده باشد. در این راستا مطالعاتی که تاکنون انجام گرفته است نشان داده‌اند که ملاتونین دارای خاصیت درمانی و اثرات محافظتی علیه تعدادی از بدخیمی‌های خونی لنفوئیدی از جمله CLL و لنفوم‌ها می‌باشد، اگر چه مکانیسم اثر آن به خوبی شناخته نشده است [۱۶]. در این مطالعه سلول‌های NB4 به‌عنوان مدلی از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد با داروی ملاتونین تیمار شدند و تاثیر این دارو بر فعالیت متابولیک، آپوپتوز و بیان ژنی سلول‌ها ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

کشت و تیمار سلولی NB4 با ملاتونین. در این مطالعه تجربی، سلول‌های NB4 (مشتق از لوسمی پرومیلوسیتی حاد) (انستیتوپاستور) در محیط کشت RPMI1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار دی‌اکسیدکربن ۵ درصد نگهداری شدند. جهت اطمینان از صحت سلول‌های NB4، mRNA ژن ترکیبی PML/RARα با استفاده از تکنیک RT-PCR برای این رده مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تهیه استوک ۱۰ میلی‌مولار داروی ملاتونین، مقادیر مورد نظر از دارو در اتانول حل گردید و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. تیمار سلول‌های NB4 با غلظت‌های مختلف ملاتونین (۰/۵ تا ۲ میلی‌مولار) و زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت صورت گرفت. جهت جلوگیری از اثرات حلال روی میزان پرولیفراسیون و بقاء رده‌ی سلولی NB4، سلول‌ها با غلظت‌های مشخصی از اتانول به عنوان کنترل منفی تیمار شدند. تمامی آزمایشات به منظور افزایش دقت کار به صورت سه‌گانه انجام گرفت. هم‌چنین مطالعه‌ی حاضر توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تایید و تصویب گردید (شماره تاییدیه کمیته اخلاق: IR.SBMU.RETECH.REC.1398.390).

بررسی فعالیت متابولیک سلول‌ها با آزمون MTT assay. برای ارزیابی تاثیر داروی ملاتونین بر فعالیت متابولیک سلول‌های NB4، تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی و فاقد دارو اضافه گردید و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور CO_2 دار انکوبه گردید. محلول MTT در غلظت ۵mg/ml به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس پلیت مذکور با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و پس از خالی کردن محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر چاهک اضافه گردید. در ادامه، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. از آن‌جا که آزمون MTT وابستگی مستقیم به طیف رنگی ایجاد شده بر پایه روش رنگ‌سنجی نوری دارد، عدم توجه به جزییات ابتدایی در روش‌های رنگ‌سنجی می‌تواند منجر به ایجاد خطا شود. از این موارد می‌توان تفاوت در تعداد سلول‌هایی که در مرحله ابتدایی در هر چاهک قرار داده می‌شود، میزان تقسیم سلول‌ها، افزوده نشدن یکسان محلول MTT به همه‌ی چاهک‌ها و به جای ماندن اثر انگشت در سطوح زیرین چاهک‌ها را نام برد.

بررسی شاخص آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی AnnexinV/PI. به منظور تاثیر دارو بر القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، سلول‌های NB4 در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف داروی ملاتونین تیمار گردید. پس از شست‌وشوی سلول‌ها با استفاده از بافر فسفات سالین (PBS) و افزودن معرف‌های AnnexinV-FITC(Roche، آلمان)، PI (Roche، آلمان) و بافر انکوباسیون، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای ۴ سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با استفاده از دستگاه

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.3.534]

فلوسایتومتر (PartecPasIII، آلمان) بررسی شدند و نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار FloMax 2.3 مورد آنالیز قرار گرفت.

ارزیابی فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳. برای ارزیابی تاثیر دارو بر فعالیت کاسپاز ۳ از کیت ارزیابی کاسپاز ۳ (Sigma، آمریکا) استفاده شد. اساس این ارزیابی شناسایی رنگ مولکول p-NA است که به انتهای سوبسترای اختصاصی کاسپاز متصل است. به صورت خلاصه، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف داروی ملاتونین به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار انکوبه گردیدند. سپس پلیت مذکور با دور g ۶۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی خالی شد. متعاقباً پلت سلولی حاصل، لیز و مجدداً پلیت با دور g ۲۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در ادامه ۵ میکروگرم از سوپرناتانت با ۸۵ میکرولیتر بافر و ۱۰ میکرولیتر از سوبسترای کاسپاز ۳ در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲ ساعت در انکوباتور CO_2 دار انکوبه گردید. در ادامه، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA reader در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید. شکسته شدن سوبسترا به‌واسطه‌ی کاسپاز ۳ با آزاد شدن p-NAهمراه است که در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت می‌گردد.

بررسی تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) داخل سلولی

برای ارزیابی تولید گونه‌های فعال اکسیژن داخل سلولی از کیت ارزیابی ROS سلولی که شامل DCFH-DA (Invitrogen، نیوزلند) است استفاده گردید. DCFH-DA توسط سلول‌ها جذب شده و به‌واسطه‌ی استراز غیراختصاصی شکسته و DCFHرا ایجاد می‌کند که به‌واسطه‌ی ROS اکسید وDCF را ایجاد می‌کند که شدیداً دارای خاصیت فلورسنت است. برای این منظور، بعد از انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مورد نظر ملاتونین برای مدت ۲۴ ساعت، سلول‌ها با DCFH-DA مواجه و برای ۳۰ دقیقه در انکوباتور CO_2 دار انکوبه شدند. در ادامه، سلول‌ها دوبار شسته و در بافر PBS شناور شدند. در نهایت شدت فلورسنت نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج تحریکی ۴۸۵ نانومتر و طول موج نشری ۵۳۰ نانومتر سنجیده شد و میزان ROS نسبت به گروه کنترل محاسبه گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA. پس از تیمار سلول‌ها با دوزهای ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار ملاتونین و گذشت ۲۴ ساعت، استخراج RNA از سلول‌های تیمارشده و همچنین نمونه کنترل با استفاده از محلول ترایزول انجام پذیرفت. کمّیت و درصد خلوص RNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از دستگاه NanodropND2000 ارزیابی شد. برای انجام واکنش رونویسی معکوس از کیت سنتز cDNA(TAKARA، ژاپن) استفاده شد. جهت سنتز cDNA نمونه‌ها مطابق با دستورالعمل کیت به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ ثانیه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. باید بدانیم که کیفیت RNA استخراج شده می‌تواند بر بازده و عملکرد آزمون RQ-PCR (Real Time Quantitative RT-PCR) تأثیر بگذارد. بنابراین در صورتی که RNA استخراج شده فاقد کیفیت مطلوب بوده و یا از خلوص خوبی برخوردار نباشد قادر است روی کارایی RQ-PCR اثر منفی اعمال نماید.

بررسی کمّی بیان ژن‌های Bcl-2، surviving و Bax دخیل در آپوپتوز. برای بررسی کمّی بیان ژن‌های Bcl-2، survivin و Bax از روش RQ-PCR استفاده گردید. برای هر واکنش ۱۰ میکرومولار SYBR green master mix (Amplicon)، ۲ میکرومولار cDNA، ۰/۵ میکرومولار از هر یک از پرایمرها و ۷ میکرومولار آب مقطر فاقد نوکلئاز استفاده گردید. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ سیکل برای واسرشت (۵ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و مرحله اتصال/ بازآرایی توام (۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه) می‌باشد. به منظور ارزیابی اختصاصیت محلول تکثیریافته، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. در انتها و برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمون در جدول ۱ آورده شده است. از نکات مهمی که لازم است رعایت شود تا خطای مثبت کاذب حین انجام RQ-PCR به حداقل برسد استفاده از یک کنترل منفی فاقد RNA یا cDNA می‌باشد تا آلودگی احتمالی شناسایی گردد. بعلاوه تکثیر یک ژن رفرنس اجازه می‌دهد تا ژن‌های مورد بررسی نسبت به آن‌ها نرمال شده و ارزیابی شوند. البته متغیرهای نظیر پیپت کردن نامناسب مواد واکنش، ناپایداری مواد اولیه مورد استفاده و همچنین تغییرات در شدت نور تولید شده پتانسیل بالایی برای ایجاد تغییر در نتایج این روش دارند.

آنالیز آماری. تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل mean ± SD قید شدند. همچنین برای محاسبات آماری از روش Paired Student's t-test و نرم‌افزار SPSS 21 و GraphPad Prism7 استفاده گردید و $P<0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

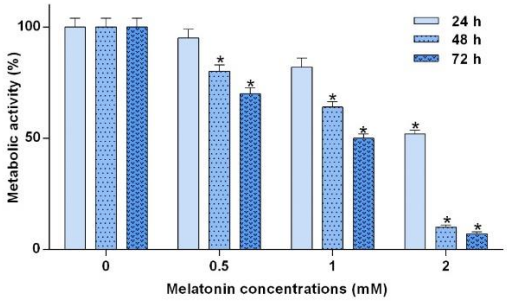
[DOI: 10.29252/koomesh.22.3.534]

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون Real Time Quantitative RT-PCR

ژن	آغازگر مستقیم (´3-´5)	آغازگر معکوس (´3-´5)	سایز (bp)
HPRT	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	۱۱۱
Bcl-2	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	۲۴۹
Survivin	CCAGATGACGACCCCATAGAG	TTGTTGGTTTCCTTTGCAATTTT	۱۵۲
Bax	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	۲۴۲

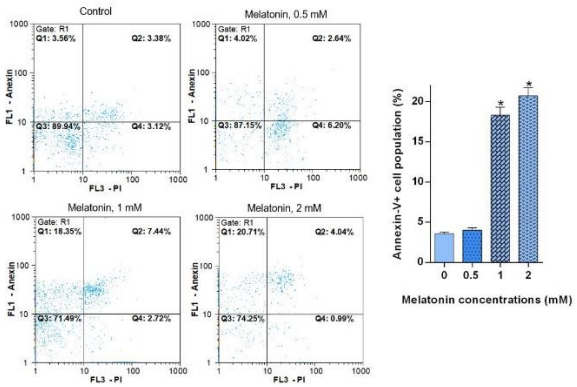
نتایج

ملاتونین فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. برای ارزیابی این‌که آیا ملاتونین قادر است میزان فعالیت متابولیک را در سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتی حاد کاهش دهد، سلول‌های NB4 با دوزهای افزاینده‌ی ملاتونین تیمار شدند و میزان فعالیت متابولیک آن‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که ملاتونین فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 را به صورت وابسته به دوز کاهش می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است متعاقب ۲۴ ساعت تیمار دارویی، دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار ملاتونین تاثیر چندانی بر فعالیت متابولیک سلولی ندارند، در حالی‌که دوز ۲ میلی‌مولار به طور موثری منجر به مرگ سلول‌های NB4 طی این زمان می‌شود. بعلاوه نتایج اثر غلظت‌های مختلف ملاتونین در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که این دارو به صورت وابسته به زمان فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 را کاهش می‌دهد که بیش‌ترین اثر مهاری در غلظت ۲ میلی‌مولار رخ می‌دهد.



شکل ۱. بررسی تاثیر داروی ملاتونین بر فعالیت متابولیک سلول‌های NB4. سلول‌ها در محیط کامل با دوزهای مختلف داروی ملاتونین برای مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند و سپس آزمون MTT برای آن‌ها انجام شد. میزان IC_{50} در مطالعه صورت پذیرفته حدود ۱ میلی‌مولار در طی ۴۸ ساعت تخمین زده می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و *، ($P < ۰/۰۵$) نشان‌گر معنادار بودن از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

ملاتونین منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های NB4 می‌شود. برای ارزیابی این‌که آیا تیمار سلول‌های NB4 با ملاتونین باعث فعال شدن آپوپتوز می‌شود، سلول‌ها پس از تیمار با هورمون، از نظر درصد سلول‌های Annexin-V و Annexin-V/PI توسط فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. همان‌طور که انتظار می‌رفت، نتایج حاصل نشان داد که ملاتونین به صورت وابسته به دوز منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های NB4 می‌شود. تیمار سلول‌ها با این دارو با افزایش جمعیت سلول‌های Annexin-V مثبت همراه است. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است کم‌ترین و بیش‌ترین میزان آپوپتوز سلولی در غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌مولار از داروی ملاتونین حاصل شده است.

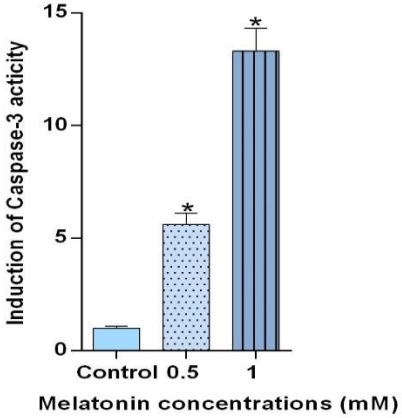


شکل ۲. بررسی درصد جمعیت سلول‌های آپوپتیک پس از تیمار با ملاتونین. سلول‌ها در محیط کامل با دوزهای مختلف داروی ملاتونین برای مدت زمان ۲۴ ساعت انکوبه شدند و سپس رنگ آمیزی Annexin-V/PI برای آن‌ها انجام شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود تیمار سلول‌های NB4 با این مهارکننده باعث افزایش درصد جمعیت سلول‌های Annexin-V مثبت به صورت وابسته به دوز می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و *، ($P < ۰/۰۵$) نشان‌گر معنادار بودن از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

ملاتونین منجر به افزایش فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ در سلول‌های NB4 می‌شود. کاسپازها خانواده‌ای از پروتئازهای سیستئین–آسپارتات هستند که نقش کلیدی در تنظیم و اجرای مرگ سلولی آپوپتوتیک ایفا می‌کنند [۱۷]. در این مطالعه به منظور آگاهی از این‌که آیا داروی ملاتونین قادر است با فعال‌شدن مسیر کاسپاز ۳ همراه باشد، اثر داروی ملاتونین بر فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ اندازه‌گیری شد. برای این منظور، سلول‌ها با غلظت‌های مورد نظر از داروی ملاتونین به مدت ۲۴

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]
[DOI: 10.29252/koomesh.22.3.534]

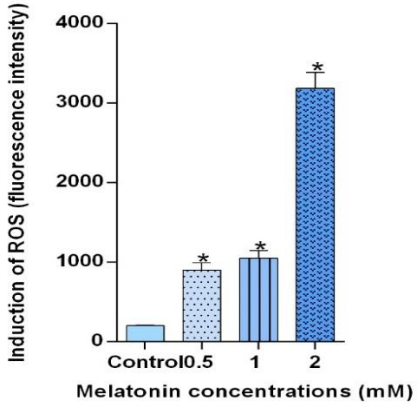
ساعت تیمار شده و میزان تغییر در فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ اندازه‌گیری شد. پس از ۲۴ ساعت از تیمار دارویی سلول‌ها، ملاتونین به صورت وابسته به دوز و به ترتیب در دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار منجر به القاء آنزیم کاسپاز ۳ به میزان ۵/۶ و ۱۳/۳ برابر شد (شکل ۳).



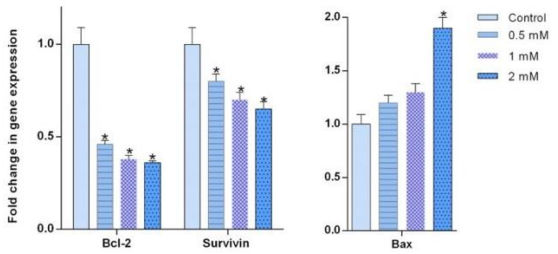
شکل ۳. بررسی فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ پس از تیمار با ملاتونین. سلول‌ها با غلظت‌های مورد نظر از داروی ملاتونین به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند و سپس میزان تغییر در فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ با اندازه‌گیری غلظت p-NA آزاد شده اندازه‌گیری شد. ملاتونین در دوزهای ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار به ترتیب منجر به القاء آنزیم کاسپاز ۳ به میزان ۵/۶ و ۱۳/۳ برابر شد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و *، ($P<۰/۰۵$) نشان‌گر معنادار بودن از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

ملاتونین تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را در سلول‌های NB4 القا می‌کند. ROS در تنظیم فیزیولوژی سلول نقش دارد؛ اما تجمع ROS در سلول‌ها می‌تواند منجر به القاء مرگ سلولی شود. از آن‌جا که داروها ممکن است از طریق القاء تولید ROS مسیر آپوپتوز را تحریک کنند، لذا تصمیم گرفته شد تا در این مطالعه میزان تجمع ROS داخلی سلولی ارزیابی شود. برای این منظور متعاقب تیمار ۲۴ ساعته سلول‌های NB4 با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار داروی ملاتونین، میزان ROS داخل سلولی ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود ملاتونین قادر است به صورت وابسته به دوز میزان ROS را در داخل سلول‌ها افزایش دهد که سازگار با آپوپتوز افزایش یافته در این سلول‌ها به صورت وابسته به دوز می‌باشد.

ملاتونین رونویسی ژن‌های Bcl-2 و survivin را کاهش و رونویسی ژن Bax را افزایش می‌دهد. فعال‌شدن مسیر آپوپتوز اهمیت زیادی در بدخیمی‌ها دارد؛ به طوری که بیان تغییریافته‌ی فاکتورهای آنتی‌آپوپتوزی و پیش‌آپوپتوزی می‌تواند با عود و یا رفتار تهاجمی در بدخیمی‌ها همراه باشد. آپوپتوز دو مکانیسم مختلف دارد که شامل مسیر درون‌سلولی و برون‌سلولی می‌باشد. در مسیر درون‌سلولی تعادل بین فاکتورهای پیش‌آپوپتوزی و آنتی‌آپوپتوزی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است [۱۸]. لذا در این مطالعه اثر داروی ملاتونین بر بیان mRNA ژن‌های آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 و survivin و ژن پیش‌آپوپتوزی Bax به صورت کمّی و با استفاده از تکنیک RQ-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد متعاقب ۲۴ ساعت تیمار سلول‌های NB4 با داروی ملاتونین، بیان ژن‌های Bcl-2 و survivin به صورت وابسته به دوز کاهش و بیان ژن Bax نیز به صورت وابسته به دوز افزایش می‌یابد (شکل ۵). نتایج حاصل نمایانگر به هم خوردن توازن بین پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی و آنتی‌آپوپتوزی می‌باشد که برآیند آن در جهت پیشروی مرگ سلولی آپوپتوتیک می‌باشد.



شکل ۴. بررسی تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) داخل سلولی پس از تیمار با ملاتونین. سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار از داروی ملاتونین به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند و سپس میزان میزان تجمع ROS داخلی سلولی با استفاده از کیت ارزیابی ROS سلولی بررسی شد. نتایج نشان داد که ملاتونین قادر است به صورت وابسته به دوز میزان ROS را در داخل سلول‌ها افزایش دهد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و *، ($P < ۰/۰۵$) نشان‌گر معنادار بودن از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.



شکل ۵. تاثیر ملاتونین در تغییر فعالیت رونویسی ژن‌های Bcl-2، survivin و Bax در سلول‌های NB4. سلول‌های NB4 با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار از دارو به مدت ۲۴ ساعت تیمار و پس از ساخت cDNA میزان بیان ژن‌ها با استفاده از تکنیک qRT-PCR محاسبه شد. نتایج حاصل نشان داد متعاقب تیمار سلول‌ها با داروی ملاتونین، بیان ژن‌های Bcl-2 و survivin به صورت وابسته به دوز کاهش و بیان ژن Bax نیز

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]
[DOI: 10.29252/koomesh.22.3.534]

به صورت وابسته به دوز افزایش می‌یابد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و *، ($P<۰/۰۵$) نشان‌گر معنادار بودن از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

بحث و نتیجه‌گیری

ملاتونین فاکتوری اساسی در بدن است که تولید آن با سلامتی و کاهش کارسینوژنز در انسان‌ها و حیوانات همراه است [۱۹-۲۱]. ارزیابی‌های اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهند که اختلال در ملاتونین ممکن است خطر ابتلا به نئوپلاسم‌های خونی را افزایش دهد. فرضیه‌ای مطرح شد مبنی بر این‌که کاهش تولید شبانه ملاتونین ممکن است خطر ابتلا به سرطان را در برخی بیماران توضیح دهد؛ زیرا اختلال در ساعت بیولوژیک بدن یکی از عواملی است که افراد را مستعد ابتلا به نئوپلاسم‌های خونی می‌کند. بعلاوه شیفت‌های کاری شبانه ممکن است تراشح نرمال ملاتونین را مختل کرده و خطر ابتلا به تومور های میلوئیدی و لنفوم را افزایش دهد [۲۲،۲۳]. مطالعه‌ای توسط Rana و همکارانش انجام گرفت که نشان داد سطوح پلاسمایی ملاتونین در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن در مقایسه با افراد سالم با کاهش معنی‌داری همراه است و این کاهش در افرادی با شیفت کاری شبانه چشمگیرتر است [۲۴]. در مطالعه‌ای که توسط Parent و همکارانش انجام شد میزان ابتلا به لنفوم‌های غیرهوچکین در افرادی که در شیفت شب کار می‌کردند به میزان قابل توجهی بیش‌تر از افرادی بود که شیف شب نداشتند [۲۵]. بنابراین این مطالعات مطرح می‌کنند که ترشح مختل ملاتونین یک فاکتور مهم در ابتلا به نئوپلاسم‌های خونی می‌باشد و ممکن است ملاتونین در جهت درمان بیماران مبتلا به بدخیمی مفید واقع شود. لذا در این مطالعه ما اثر ملاتونین را روی سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد مورد بررسی قرار دادیم.

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهند که تیمار سلول های NB4 با ملاتونین با کاهش فعالیت متابولیک سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان همراه‌اند. علی‌رغم این‌که دوز های پایین ملاتونین در بازه‌ی زمانی کوتاه اثرات مهارکنندگی قابل توجهی نداشتند، با افزایش دوز و زمان تیمار سلول ها با دارو، فعالیت متابولیک سلول ها با کاهش چشمگیری همراه بود. در این راستا Nooshinfar و همکارانش مشخص کردند که ملاتونین قادر است زنده‌مانی و فعالیت متابولیک را در رده‌ی سلولی سرطان پستان MCF-7 کاهش دهد و به عنوان یک داروی مفید در کنار سایر عوامل شیمی‌درمانی نظیر آرسنیک تری‌اکسید مورد استفاده قرار بگیرد [۲۶]. در مطالعه‌ی دیگری که توسط Krestinina و همکارانش انجام شد، مشخص گردید که ملاتونین در غلظت ۱ میلی‌مولار می‌تواند میزان رشد و زنده‌مانی سلول‌های رده‌ی HL-60 را کاهش دهد. به علاوه این گروه نشان دادند که ترکیب این دارو با سایر عوامل شیمی‌درمانی نظیر ATRA قادر است اثرات آن‌ها را تقویت کند [۲۷].

یکی از مکانیسم هایی که با کمک آن ها، داروهایی با خاصیت ضدسرطان، می‌توانند منجر به کاهش بقاء سلول‌های سرطانی شود، تاثیرگذاری این داروها بر مسیرهای آپوپتوتیک است. هنگامی که تعادل بین ژن های پیش‌برنده آپوپتوز و مهارکننده آن در سلولی برهم خورد، مسیرهای آپوپتوتیک می‌توانند فعال و یا مهار شوند. پژوهش‌های زیادی نشان داده‌اند که داروهای شیمی‌درمانی با تاثیرگذاری بر ژن‌های خانواده پروتئین‌های Bcl-2 منجر به فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی می‌شوند. در واقع، بیان کاهش یافته ژن های آنتی‌آپوپتوتیک نظیر Bcl-2 و survivin در کنار بیان افزایش‌یافته‌ی ژن‌های پیش‌آپوپتوتیک نظیر Bax می‌تواند با فعال کردن پروتئین‌هایی نظیر کاسپاز منجر به القا آپوپتوز در انواع گوناگونی از سرطان‌ها شود [۲۸]. در این مطالعه، نتایج به دست آمده نشان داد که هورمون ملاتونین احتمالاً از طریق کاهش بیان ژن های مهارکننده آپوپتوز هم‌چون Bcl-2 و survivin همراه با افزایش بیان ژن Bax، ژن پیش‌برنده آپوپتوز، منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های مشتق شده از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد شده است. هم‌چنین، ما دریافتیم که تیمار سلول‌های لوسمیک با این هورمون منجر به افزایش فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ نیز می‌شود. در همین راستا، مطالعه دیگری روی سلول‌های HL-60 نشان داده است که ملاتونین نه تنها از طریق کاهش بیان پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 سبب القای مرگ در سلول‌های HL-60 می‌شود، بلکه افزایش بیان پروتئین پیش‌آپوپتوتیک Bax نیز می‌تواند به عنوان مکانیسم دیگر دخیل در سایتوتوکسیسیته این دارو مطرح باشد [۲۹].

آپوپتوز یکی از پیچیده‌ترین سیستم های تنظیمی در سلول‌ها می‌باشد که طیف وسیعی از مدیاتورهای داخلی در تنظیم آن دخالت دارند. این مسیر، توسط بسیاری از ژن‌ها، محصولات درون سلولی و هم‌چنین سیگنال‌های خارجی کنترل می‌شود. در بین تمامی تنظیم‌کننده‌های آپوپتوز، ROS، یک محصول حیاتی میتوکندریایی، نسبت به سایرین از اهمیت بیش‌تری برخوردار است. مطالعات گذشته نشان می‌دهند که ROS در حد متعادل، نمی‌تواند به سلول آسیبی بزند ولی چنان‌چه میزان تولید آن در درون سلول افزایش پیدا کند، با تاثیرگذاری روی ژن Bax و افزایش بیان آن، منجر به القاء آپوپتوز در سلول هدف می‌شود. این خاصیت، توسط بسیاری

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.3.534]

از داروهای شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات نشان می‌دهند که برخی از داروهای شیمی‌درمانی هم‌چون دوکسوروبیسین، می‌توانند با تحریک افزایش تولید ROS منجر به القاء مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی شوند. در این مطالعه هم‌راستا با افزایش بیان ژن Bax، نتایج حاصل نشان داد که احتمالاً ملاتونین نیز از طریق افزایش تولید ROS درون سلولی، منجر به افزایش ژن Bax می‌شود که این پروتئین پیش‌برنده آپوپتوز نیز از طریق شکستن کاسپاز ۳ منجر به القاء آپوپتوز در این رده سلولی لوسمی پرومیلوسیتیک حاد می شود. تولید ROS توسط ملاتونین تنها به این یافته محدود نمی شود و مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که در سلول‌های لوسمیک لنفوبلاستیک حاد نیز ملاتونین از طریق تولید ROS منجر به القاء مرگ سلولی می‌شود [۳۰]. هم‌چنین، مطالعات دیگر صورت گرفته در سرطان سینه نیز نشان داده است که ملاتونین در این بدخیمی نیز از طریق افزایش ROS منجر به شکسته شدن کاسپاز ۳ و در نتیجه کاهش بقاء و تکثیر سلول‌های MCF-7 می‌شود [۲۶].

در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که ملاتونین می‌تواند از طریق تغییر بیان ژن های مرتبط با آپوپتوز، فعال کردن کاسپاز، تجمع ROS داخل سلولی و در نهایت فعال کردن مسیر آپوپتوز اثرات سایتوتوکسیک خود را روی سلول‌های NB4 اعمال نماید. امید می‌رود با بررسی‌های آزمایشگاهی و کارآزمایی‌های بالینی بیش‌تری در زمینه سلامت و مکانیسم عمل دارو بتوان از ملاتونین به عنوان یک داروی منا سب برای درمان بیماران APL، چه به صورت منوتراپی و چه در ترکیب با سایر داروهای متداول استفاده نمود.

محدودیت‌ها و پیشنهادات مطالعه:

یکی از محدودیت های مطالعه‌ی حاضر عدم ارزیابی پروتئین های Bcl-2، survivin و Bax به‌دلیل نبود امکانات وسترن بلاتینگ بود. پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده متعاقب تیمار سلول ها با ملاتونین تغییرات در سطوح پروتئین‌های مذکور با استفاده از روش وسترن بلاتینگ مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این مطالعه قابل تعمیم به سایر رده‌های سلولی نمی‌باشد و پیشنهاد می شود در تحقیقات آینده اثر این دارو بر رده‌های سلولی مختلف مورد ارزیابی قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح مصوب شورای پژوهشی کمیته پژوهشی دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره ثبت ۶۹۹۱۴ /ص/ ۱۳۹۷ می‌باشد. از کمیته پژوهشی دانشجویان، و معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی برای حمایت مالی از این مطالعه قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Tallman MS, Altman JK. How I treat acute promyelocytic leukemia. Blood 2009; 114: 5126-5135.
[2] Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. The Lancet 2013; 381: 484-495.
[3] Rogaia D, Grignani F, Nicoletti I, Pelicci P. The acute promyelocytic leukemia-specific PML/RAR alpha fusion protein reduces the frequency of commitment to apoptosis upon growth factor deprivation of GM-CSF-dependent myeloid cells. Leukemia 1995; 9: 1467-1472.
[4] Rowley J, Golomb H, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. The Lancet 1977; 309: 549-550.
[5] Wu J, Wong WW-L, Khosravi F, Minden MD, Penn LZ. Blocking the Raf/MEK/ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis. Cancer Res 2004; 64: 6461-6468.
[6] Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH, Nerlov C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Blood 2002; 99: 1909-1912.
[7] Antman KH. Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. The Oncologist 2001; 6: 1-2.
[8] Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. Sleep Med Rev 2005; 9: 11-24.
[9] Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. Integr Cancer Ther 2008; 7: 189-203.
[10] Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. Toxicology 2010; 278: 55-67.
[11] Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. Progress in brain research. Elsevier 2010; 127-151.
[12] Dauchy RT, Xiang S, Mao L, Brimer S, Wren MA, Yuan L, et al. Circadian and melatonin disruption by exposure to light at night drives intrinsic resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. Cancer Res 2014; 74: 4099-4110.
[13] Sainz RM, Mayo JC, Tan Dx, León J, Manchester L, Reiter RJ. Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. The Prostate 2005; 63: 29-43.
[14] Alonso-González C, Menéndez-Menéndez J, González-González A, González A, Cos S, Martínez-Campa C. Melatonin enhances the apoptotic effects and modulates the changes in gene expression induced by docetaxel in MCF-7 human breast cancer cells. Int J Oncol 2018; 52: 560-570.
[15] Song J, Ma S-J, Luo J-H, Zhang H, Wang R-X, Liu H et al. Melatonin induces the apoptosis and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells via blockade of the AKT/MDM2 pathway. Oncology reports 2018; 39: 1975-83.
[16] Li T, Yang Z, Jiang S, Di W, Ma Z, Hu W, et al. Melatonin: does it have utility in the treatment of haematological neoplasms? Br J Pharmacol 2018; 175: 3251-3262.
[17] Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. J Clin Invest 2005; 115: 2665-2672.
[18] Lee SH, Lee EH, Lee SH, Lee YM, Kim HD, Kim YZ. Epigenetic role of histone 3 lysine methyltransferase and demethylase in regulating apoptosis predicting the recurrence of atypical meningioma. J Korean Med Sci 2015; 30: 1157-1166.
[19] Bonmati-Carrion MA, Arguelles-Prieto R, Martinez-Madrid MJ, Reiter R, Hardeland R, Rol MA, et al. Protecting the melatonin rhythm through circadian healthy light exposure. Int J Mol Sci 2014; 15: 23448-23500.
[20] Tanaka T, Yasui Y, Tanaka M, Tanaka T, Oyama T, Rahman KW. Melatonin suppresses AOM/DSS-induced large bowel oncogenesis in rats. Chem Biol Interact 2009; 177: 128-136.
[21] Sánchez-Barceló E, Mediavilla M, Tan D, Reiter RJ. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. Curr Med Chem 2010; 17: 2070-2095.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]
[DOI: 10.29252/koomesh.22.3.534]

[22] Lahti TA, Partonen T, Kyyrönen P, Kauppinen T, Pukkala E. Night-time work predisposes to non-Hodgkin lymphoma. Int J Cancer 2008; 123: 2148-2151.

[23] Yong M, Nasterlack M, Messerer P, Oberlinner C, Lang S. A retrospective cohort study of shift work and risk of cancer-specific mortality in German male chemical workers. Int Arch Occup Environ Health 2014; 87: 175-183.

[24] Rana S, Shahid A, Ullah H, Mahmood S. Lack of association of the NPAS2 gene Ala394Thr polymorphism (rs2305160: G> A) with risk of chronic lymphocytic leukemia. Asian Pac J Cancer Prev 2014; 15: 7169-7174.

[25] Parent MÉ, El-Zein M, Rousseau MC, Pintos J, Siemiatycki J. Night work and the risk of cancer among men. Am J Epidemiol 2012; 176: 751-759.

[26] Nooshinfar E, Bashash D, Safaroghli-Azar A, Bayati S, Rezaei-Tavirani M, Ghaffari SH, et al. Melatonin promotes ATO-induced apoptosis in MCF-7 cells: Proposing novel therapeutic potential for breast cancer. Biomed Pharmacother 2016; 83: 456-465.

[27] Krestinina O, Fadeev R, Lomovsky A, Baburina Y, Kobyakova M, Akatov V. Melatonin Can Strengthen the Effect of Retinoic Acid in HL-60 Cells. Int J Mol Sci 2018; 19: 2873.

[28] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 1998; 281: 1322-1326.

[29] Rubio S, Estévez F, Cabrera J, Reiter RJ, Loro J, Quintana J. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells. J Pineal Res 2007; 42: 131-138.

[30] Büyükavcı M, Özdemir Ö, Buck S, Stout M, Ravindranath Y, Savaşan S. Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. Fundam Clin Pharmacol 2006; 20: 73-79.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.3.534]

Volume 22, Issue 3 (Summer 2020), 534 - 541

Cytotoxic and apoptotic effects of melatonin hormone on NB4 leukemic cells

Mahdieh Mehrpouri (Ph.D)[1], Ramin Yousefpour (M.Sc)[2], Ava Safaroghli-Azar (M.Sc)[2], Davood Bashash (Ph.D)[*2]
1 - Student Research Committee, Department of Hematology and blood banking, School of Allied Medicine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 – Dept. of Hematology and Blood banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 21 22717504 d.bashash@sbmu.ac.ir Received: 27 Oct 2019; Accepted: 21 Jan 2020

Introduction*:* Given to the fact that the high toxicity and side effects of chemotherapeutic drugs have limited their clinical use, it is not surprising that novel therapeutic drugs with less toxicity and more efficacy have entered into the novel protocols. Relatively, Melatonin, a main product of pineal gland, not only plays a key role in the regulation of circadian rhythm, but also exerts anti-proliferative and apoptotic effects on a wide range of tumors. The aim of this study was to evaluate the anti-proliferative and apoptotic effects of melatonin in acute promyelocytic leukemia-derived cell line NB4**.**

Materials and Methods*:* NB4 cells were exposed to the increasing concentrations of the melatonin drug (0.5, 1, and 2 mM). Subsequently, metabolic activity, induction of apoptosis, caspase-3 activity, ROS production and apoptosis-related target genes were investigated using MTT assay, Annexin-V/PI staining, caspase-3 activity kit, cellular ROS assay kit and RQ-PCR analysis, respectively.

Results: Our data delineated that melatonin resulted in the reduction of metabolic activity of NB4 cells in a dose- and time-dependent manner (P<0.05). Furthermore, melatonin increased the percentage of apoptotic cells (P<0.05) probably through induction of caspase-3 activity, increment in the intracellular level of ROS and alteration in the expression level of Bcl-2, survivin and Bax.

Conclusion: The results of this study clearly indicated the anti-leukemic effect of melatonin in NB4 cells and is a promising as a candidate drug in the treatment of APL.

Keywords*:* Melatonin, Apoptosis, Acute Promyelocytic Leukemia.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.3.534]