مقاله پژوهشی

بررسی اثرات سلول‌های ماکروفاژ رده RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین بر روی سلول‌های سرطانی رده اریترولوکمی K562

معصومه آهنجان، سیدمیثم ابطحی فروشانی*، ناهیده افضل آهنگران

گروه میکروب‌شناسی، بخش ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۱/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۸/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: ماکروفاژها تحت تأثیر ریز محیط، عملکردهای متنوع و به‌تبع آن فنوتیپ‌های گوناگونی را نشان می‌دهند. از طرفی ملاتونین به لطف عملکردهای چندگانه می‌تواند سبب توسعه سرطان و یا محدودیت رشد سرطان در هماهنگی با دیگر فاکتورها شود. بااین‌حال، هیچ اطلاعاتی در مورد نقش ملاتونین در شکل دادن به ماکروفاژها در محیط تومور وجود ندارد. هدف این مطالعه تعیین اثر سلول‌های ماکروفاژ تیمار شده با ملاتونین بر روی سلول‌های سرطانی رده K562. است.

مواد و روش‌ها: برای این منظور سلول‌های RAW264.7 در پلیت ۲۴ خانه با تراکم سلولی ۶×۱۰^{۴} برای ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سلول‌ها با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌های K562 با نسبت ۱: ۱۰ به سلول‌های RAW264.7 تحت تیمار اضافه شدند. قدرت زنده‌مانی سلول‌های K562 با روش MTT و NR تعیین شد و میزان آپوپتوز و نکروز در این سلول‌ها به‌وسیله‌ی رنگ‌آمیزی با آکریدین اورنج و اتیدیوم برماید ارزیابی گردید. همچنین میزان MPO و NO در سلول‌های RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین موردسنجش قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون کراسکال والیس و من ویتنی مورد ارزیابی قرار گرفتند ($P<۰/۰۵$).

نتایج: میزان رشد و زنده‌مانی سلول‌های K562 در مجاورت سلول‌های RAW264.7 تحت تیمار با ملاتونین در غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ میکرومولار افزایش یافت. هرچند در غلظت‌های بالاتر این روند تغییر یافت. میزان MPO و NO نیز با افزایش غلظت ملاتونین کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از افزایش قابل‌توجه میزان زنده‌مانی و سایر قابلیت‌های حیاتی سلول‌های K562 در مجاورت سلول‌های RAW264.7 تحت تیمار با غلظت‌های پایین ملاتونین است.

کلمات کلیدی: سیتوتوکسیتی، ماکروفاژ رده RAW264.7، ملاتونین، K562

مقدمه

تحقیقات گسترده مشخص ساخت که ایمونوتراپی سرطان به واقعیت تبدیل خواهد شد اگر این واقعیت درک شود که ماکروفاژها نقش مهمی در رشد و یا نابودی تومورها ایفا می‌کنند (۱). ماکروفاژها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی هم در ایمنی ذاتی و هم در ایمنی اکتسابی به رسمیت شناخته شده‌اند، این سلول‌ها حذف فضاهای بین انگشتی در طول توسعه جنینی، فاگوسیتوز سلول‌های پیر قرمز خون و حذف تیموسیت‌های آپوپتوز شده در طی انتخاب مثبت و منفی از سلول‌های T را بر عهده دارند (۲). ماکروفاژهای ناهمگن مقیم بافت، نقش‌های متعدد، اعم از دفاع میزبان در برابر عوامل عفونی، بازسازی استخوان، توسعه بافت، بهبود زخم و تنظیمات سیستم ایمنی بدن را در طیف گسترده‌ای از فنوتیپ‌ها انجام می‌دهند (۳). ماکروفاژها بر اساس فعالیت‌های عملکردی خود به گروه‌های ذیل

*نویسنده مسئول: سید میثم ابطحی فروشانی، گروه میکروب‌شناسی، بخش ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران Email: meysamabtahi@hotmail.com
https://orcid.org/0000-0003-2579-6618

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]

تقسیم‌بندی می‌شوند (۴): ماکروفاژهای کلاسیک حفظ‌کننده هموستاز بافت بوده و از اصلی‌ترین فاگوسیتوزکننده‌ها و نابودکننده سلول‌های سرطانی می‌باشند (۵)، این سلول‌ها تولیدکننده نیتریک اکسید سنتاز (iNOS)، گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و نیتروژن، فعال‌کننده مسیرهای Trif و MyD88[1] هستند که منجر به فعال‌سازی عوامل رونویسی IRF3[2]،AP-1[3] و NFκB[4] و درنتیجه فعال کردن ژن‌های TNFs، ژن‌های اینترفرون، CXCL10[5]، NOS_2، IL-12 و IL-18 در پاسخ التهابی می‌گردد (۶). ماکروفاژهای کلاسیک دارای گیرنده رفتگر، گیرنده‌های شناساگر الگو، گیرنده‌های لکتین نوع C، گیرنده‌های RIG[6] مانند هلیکاز و گیرنده Nod[7] هستند (۷). آن‌ها با سطوح بالایی از MHC-II، نشانگر CD68[8] و مولکول‌های کمک محرک CD80 و CD86 مشخص می‌شوند و تحریک‌کننده ایمنی اکتسابی به‌ویژه با فعال کردن سلول‌های T هستند (۸).

ماکروفاژهای M2 یا آلترناتیو ضدالتهابی هستند و در رگ زایی و بازسازی بافت نقش دارند. درحالی‌که این سلول‌ها برخی مولکول‌های MHC-II را افزایش می‌دهند اما قادر به ارائه آنتی‌ژن‌های کارآمد نیستند، ماکروفاژهای M2 پاسخ Th2 را ترویج می‌کنند (۶). این جمعیت توسط، بیان گیرنده متصل شونده به مانوز، نشانگرهایی مانند CD163 و CD204، CD301، گیرنده C لکتین (۹) و CD206 که یک گیرنده روبنده است (۱۰) شناخته می‌شوند. ژن پاسخ‌دهنده به کمپلمان ۳۲ (RGC-32) که تنظیم‌کننده چرخه سلولی است در بسیاری از سلول‌ها ازجمله ماکروفاژهای M2 دیده می‌شود. ویژگی‌های آن‌ها تحت تأثیر بیان بالای گیرنده مانوز، آرژیناز-۱ است (۱۱).

ماکروفاژهای مرتبط با تومور[9] مانند ماکروفاژهای M2 فاقد بیان گونه‌های واکنش‌گر نیتروژن هستند و در عرضه آنتی‌ژن ناتوان می‌باشند. مقالات گذشته TAMS را با ماکروفاژهای با فنوتیپ M2 برابر دانسته‌اند، اما اکنون مشخص است که TAMS یک جمعیت متمایز و متنوع با ویژگی‌هایی خاص خود متأثر از ریز محیط تومور، مراحل پیشرفت تومور، نوع تومور هستند که گاهی این ویژگی‌ها باهم تداخل دارند (۱۲). این ماکروفاژها سلول‌های توموری را توسط تولید پروتئین مونوسیت کموتاکتیک (MCP)، فاکتور محرک کلونی ماکروفاژ (M-CSF)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، آنژیوپویتین ۱ (ANG1) تقویت می‌کند (۱۳). همبستگی بین TAMها و فاکتورهای پاتولوژیکی برای همه‌ی انواع تومورها بررسی نشده است. ماکروفاژهای TAMS با شیمی‌درمانی برای سرطان پستان با انتشار فاکتورهای مقاومت به شیمی‌درمانی یا تنظیم مقاومت دارویی در سلول‌های بنیادی سرطانی تداخل ایجاد می‌کنند (۱۴).

براین اساس امروز معتقد هستند که سلول‌های ماکروفاژ بر اساس ریز محیط اطراف خود به‌صورت فنوتیپ‌های متفاوتی تبدیل می‌گردند (۱۵). یافتن یک سیتوکین، کموکین، ترکیب یا مواد زیستی که عوارض جانبی را ایجاد نخواهد کرد دشوار است (۱۶). تلاش‌های قبلی در تحریک ماکروفاژها با عوارض جانبی خطرناک همراه بوده است (۱۷). سیگنال‌های التهابی مانند LPS[10] یا TNF-α به‌راحتی می‌توانند ماکروفاژها را نسبت به فنوتیپ M1 در شرایط آزمایشگاهی پلاریزه کنند. بااین‌حال، استفاده از مواد مانند LPS و TNF-α در in vivo یک پاسخ التهابی کامل در بدن ایجاد می‌کند که حاوی سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی است. آن‌ها می‌توانند تب و التهاب را در چندین بافت ازجمله سطوح مخاطی و ریه‌ها ایجاد کنند. این سیگنال‌های التهابی نیز بسیار سمی هستند (۱۸) و می‌تواند به بیماران سرطانی آسیب برساند و سلامت آن‌ها را به خطر بیندازد. ماکروفاژها به دلیل خواص انعطاف‌پذیری که دارد کاندیدی مناسب است برای شناسایی مواد و پروتکل‌هایی که می‌توانند به‌طورجدی سیستم ایمنی بدن را برای حمله به سلول‌های سرطانی، جلوگیری از رگ زایی و متاستاز و درنهایت محافظت از میزبان یاری دهد. از بین مواد مختلفی که می‌تواند اثرات ضد سرطانی داشته باشند، ملاتونین توجه زیادی را به خود جلب کرد. ملاتونین (N استیل-۵-متوکسی-تریپتامین) یک اندول‌آمین است که در طول تکامل فیلوژنی خیلی زود ظاهر شده است. پس از ورود تریپتوفان به‌صورت فعال به سلول‌های پینه‌آل طی دو مرحله به سروتونین تبدیل می‌شود. در طی دو مرحله بعد سروتونین به ملاتونین تبدیل می‌شود. 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) اقدامات آنتی‌اکسیدانی، ج) کاهش

1 - Myeloid differentiation primary response 88
2 - Interferon regulatory factor 3
3 - Activator protein 1
4 - Nuclear factor κB
5 - C-X-C motif chemokine 10

6 - RIG-I-like receptors
7 - Nod-like receptors
8 - Cluster of Differentiation 68
9 - Tumor-associated macrophages (TAMs)
10 - Lipopolysaccharide

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]

جذب عوامل کلیدی برای رشد تومور و مولکول‌های سیگنالینگ رشد تومور، د) افزایش مکانیسم‌های تحریک‌کننده ایمنی در میان سلول‌های بدن، ر) مؤثر در تمایز سلول‌های سرطانی، ز) فعالیت ضد رگ زایی (۱۹).

رده سلولی RAW264.7 از مایع صفاقی موش BALB /c تحریک‌شده با ویروس لوسمی موش آبلسون توسط پرفسور Ohmori در دانشگاه Meikai ایجادشده و ویژگی‌های فنوتیپی مونوسیت‌ها و ماکروفاژهای را نشان داد. رده سلولی RAW264.7 به استرس غذایی بسیار حساس بوده و گلوتامین و سرین را به میزان بسیار بالاتر از سایر آمینواسیدها مصرف می‌کنند. سرین اولین اسیدآمینه است که از محیط کشت حذف می‌شود. هدف این مطالعه تعیین اثر سلول‌های ماکروفاژ تیمار شده با غلظت‌های مختلف ملاتونین بر روی سلول‌های سرطانی رده اریترولوکمی K562 است و در این پژوهش فرض بر این است که عملکرد ضد توموری ماکروفاژهای RAW264.7 بر سلول‌های اریترولوکمی K562 مؤثر است.

مواد و روش‌ها

مطالعه کنونی از نوع تجربی- بنیادی است، رده سلولی ماکروفاژی RAW264.7 از انستیتو پاستور تهران به‌صورت در حال رشد تهیه و در ۹۰ درصد محیط کشت کامل DMEM high glucose[11]، ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ۱ درصد آنتی-بیوتیک پن‌استریپ (پنی‌سیلین+ استرپتومایسین)، ۲ درصد از L- گلوتامین کشت و سپس در گرم‌خانه با ۵ درصد دی‌اکسید کربن، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (تمامی مواد از شرکت biowest, United States خریداری شد). پس از چهار روز محیط کشت تعویض و سرانجام در روز هفتم با محلول لیدوکائین+ PBS + EDTA (حاوی ۲۰ درصد لیدوکایین + ۰/۲۸ درصد از EDTA + ۸۰ درصد از PBS) که هم‌دما با دمای اتاق است سلول‌ها پاساژ گردید و با میکروسکوپ معکوس از سلامت سلول‌ها اطمینان حاصل شد.

رده سلولی K562 از دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به‌صورت یک ویال فریز دریافت شد. این رده سلولی تحت شرایط و امکاناتی مشابه رده سلولی RAW264.7 در محیط کشت کامل حاوی ۹۰ درصد RPMI[12] کشت داده شد. به‌منظور بررسی هدف موردنظر تست‌های ذیل صورت گرفت.

11 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
12 - Roswell Park Memorial Institute

تست سنجش سمیت MTT[13]

آزمون برداشت نمک تترازولیوم (MTT) یکی از روش‌های رنگ سنجی متداول برای بررسی میزان سمیت مواد بر عملکرد میتوکندری سلول است. آسیب به روند تولید انرژی در سلول از متداول‌ترین روش‌های آسیب سموم است. این تست بر پایه شکسته شدن نمک تترازولیوم زرد به فورمازان کریستالی ارغوانی رنگ به‌واسطه فعالیت میتوکندریایی در سلول‌های زنده فعال ازنظر متابولیکی است. کریستال فورمازان تشکیل‌شده قابل‌حل بوده و جذب محلول رنگی حاصل می‌تواند توسط اسپکتروفتومترهای بررسی گردد. افزایش یا کاهش تعداد سلول-ها در کنار سلامت میتوکندری سلول‌های زنده منجر به تغییرات هم‌زمان در مقدار احیای MTT به فورمازون توسط سلول‌های در کشت می‌شود (۲۰). به‌منظور انجام این تست، تعداد ۶×۱۰^{۴} سلول به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین در پلیت‌های ۲۴ خانه تیمار شدند. به تعداد ۱۰ برابر سلول‌های RAW264.7 سلول‌های رده K562 اضافه شد و برای ۲۴ ساعت انکوبه گردید. خصوصیات مورفولوژیکی سلول‌های شناور K562 در تماس با سلول‌های RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین بعد از طی این مدت با کمک میکروسکوپ معکوس بررسی و ثبت گردید. سپس سلول‌های غیر چسبنده K562 جداشده و پس از شمارش بارنگ تریپان بلو تست سنجش سمیت MTT برای رده سلولی K562 صورت گرفت. سلول‌های K562 به پلیت ۹۶ خانه ته تخت منتقل و MTT با غلظت ۵ mg/ml اضافه و سلول‌ها برای ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به‌منظور حل شدن کریستال‌های فورمازان، DMSO اضافه شد و بعد از چندین بار پیپتاژ سوسپانسیون حاصل، میزان جذب نوری ایجادشده در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر توسط الایزا ریدر قرائت گردید.

تعیین آستانه توکسیسیته ملاتونین بر رده‌های سلولی

رنگ نوترال رد یکرنگ کاتیونی است که توسط سلول‌های زنده به‌صورت فعال به شیوه اندوسیتوز برداشت‌شده و در بخش لیزوزومی آن‌ها ذخیره می‌گردد. این آزمون نیز مانند آزمون MTT یک تست سنجش قدرت حیاتی (Vitality) است؛ زیرا هر چه سلولی ازنظر سلامت غشایی در وضعیت بهتری قرار گرفته باشد، به نحو بارزتری قادر به برداشت رنگ خواهد بود. در این

13 - 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]

تست بعد از برداشت رنگ، به‌منظور حذف رنگ‌های آزاد موجود در محیط آن‌ها شسته می‌شوند. در مرحله بعدی لازم است که رنگ به دام افتاده در درون سلول‌های زنده آزاد شود تا بتوان به قیاسی از قابلیت عملکرد و سلامتی غشاء سلول‌های زنده دست یافت. بدین منظور پس ار تثبیت سلول‌ها، به کمک یک محلول اسیدی اتانول رنگ از سلول‌ها آزاد می‌شود. افزایش یا کاهش تعداد سلول‌ها در کنار سلامت غشایی سلول‌های زنده منجر به تغییرات هم‌زمان در مقدار آزادسازی رنگ توسط سلول‌های در کشت می‌شود؛ بنابراین کاهش شدت رنگ آزادشده حاکی از اثر سم بر غشاء سلولی است (۲۱).

در این روش نیز مانند تست MTT بعد از مجاورت رده سلولی K562 در تماس با سلول‌های RAW264.7 تیمار شده با غلظت-های صفر، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین، سلول‌های K562 به پلیت ۹۶ خانه ته تخت منتقل و رنگ 1X نوترال‌رد به نسبت ۱ به ۱۰ با محیط کشت اضافه و سلول‌ها برای ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سلول سه بار مورد شستشو قرار گرفتند. به سطح سلول‌ها محلول سلوشن بافر (۵۰ درصد الکل ۹۶ درصد، ۴ درصد اسید استیک و ۴۶ درصد آب مقطر) اضافه و میزان جذب نوری ایجادشده در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر توسط الایزا ریدر قرائت گردید. البته این آزمون و تست MTT برای رده سلولی RAW264.7 به‌تنهایی نیز صورت گرفت.

تست دفع رنگ تریپان بلو

در کنار تست‌های MTT و NR که در اصل قدرت حیاتی سلول‌های زنده را می‌سنجد، تست تریپان بلو یک تست عالی برای تشخیص زنده‌مانی viability است. به‌عبارت‌دیگر در این آزمون فقط زنده یا مرده بودن سلول به‌صورت مطلق تعیین می‌گردد. این در حالی است که سلول ممکن است زنده باشد ولی در عملکرد غشایی و یا عملکرد میتوکندری و تأمین انرژی و یا به عبارتی در قدرت حیاتی یا زیستایی (Vitality) دچار نقصان شده باشد. نحوه انجام تست به شرح ذیل است: بعد از تهیه سوسپانسیون سلولی به نسبت یک‌به‌یک از سوسپانسیون سلولی و رنگ تریپان بلو باهم مخلوط شدند. سپس از محلول همگن به‌اندازه یک قسمت به لام نئوبار منتقل شد. سلول‌های موجود در ۵ خانه اطراف و وسط شمارش گردید. تعداد کل سلول‌ها در هر میلی‌لیتر به شرح ذیل محاسبه شد (رابطه ۱):

$$C= N\times 2\times 5\times 10^4$$

N : تعداد متوسط سلول‌ها در هر خانه.

۲: ضریب رقیق شدن بارنگ تریپان بلو.

۵: تعداد خانه‌های که سلول در آن شمارش شده است.

$۱۰^۴$: ضریب بزرگی یک میلی‌لیتر در مقایسه با حجم ۰/۱ میلی‌لیتری مجموع ۲۵ خانه.

مشاهده ریخت‌شناسی ویژه سلول‌های آپوپتوزی و نکروزی توسط میکروسکوپ فلوئورسنت پس از رنگ‌آمیزی هم‌زمان سلول‌ها با اتیدیوم بروماید (EB) و آکریدین ارنج (AO)

برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها از رنگ‌های فلورسنت اتیدیوم بروماید (EB) و آکریدین ارنج (AO) استفاده گردید. آکریدین ارنج به‌تمامی سلول‌ها نفوذ کرده و هسته آن‌ها را سبز می‌کند. اتیدیوم بروماید فقط به سلول‌هایی که استحکام غشایی خود را ازدست‌داده باشند جذب‌شده و هسته را قرمز می‌کند. بدین منظور به سلول‌های K562 در تماس با سلول‌های RAW264.7 تیمار شده با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین به نسبت ۱ به ۱ محلول رنگ اضافه شد. محلول رنگ شامل ۰/۱ درصد اتیدیوم بروماید و ۰/۱ درصد آکریدین اورنج و ۹۹/۸ درصد PBS بود. محلول رنگ و سلول‌های K562 برای ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. سپس بلافاصله با میکروسکوپ فلورسانس با لامپ جیوه و فیلترهای UV، آبی و سبز مورد مشاهده قرار گرفت.

سنجش میزان تولید میلوپراکسیداز در مایع رویی سلول‌های RAW264.7

میلوپراکسیداز (MPO) آنزیمی آهن‌دار در گرانول‌های آزوروفیلیک نوتروفیل‌ها است و در سلول‌های پلی‌مرفونوکلئر و به‌ویژه در لیزوزم‌های منوسیتی یافت می‌شود. میلوپراکسیداز در عملکرد میکروب‌کشی وابسته به اکسیژن سلول‌ها نقش دارد و باعث تبدیل پراکسید هیدروژن به HOCl می‌شود که خاصیت میکروب‌کشی آن ۵۰ برابر قوی‌تر است. تحریک لوکوسیت‌های چندهسته‌ای موجب انفجار تنفسی می‌شود و با تولید گونه‌های فعال ازجمله $HClO_2, OH, O_2$ و نیز فعال‌سازی آنزیم‌هایی هم چون الاستاز، NADPH اکسیداز و MPO همراه است. ازآنجایی‌که MPO نهایتاً موجب تولید گونه‌های فعال و اکسیداسیون مولکول‌های حیاتی مانند لیپید، پروتئین می‌شود لذا نقش مهمی در سیستم ایمنی و تنظیم التهاب ایفا می‌کند؛ بنابراین با سنجش میزان MPO در سلول‌های ایمنی تحت تأثیر تیماری خاص می‌توان تا حدودی به عملکرد سلول‌ها پی برد. با

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]

سنجش میزان MPO سلول‌های ایمنی تحت تأثیر تیماری خاص می‌توان تا حدودی به عملکرد سلول‌ها پی برد (۲۳). مراحل انجام سنجش میزان MPO برای سلول RAW264.7 به شرح ذیل صورت پذیرفت: تعداد ۶×۱۰^{۴} سلول به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین در پلیت‌های ۲۴ خانه تیمار شدند. مایع رویی سلول-های RAW264.7 از سطح سلول جدا و با سرعت ۲۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. از مایع رویی هر غلظت به‌صورت جداگانه به میزان ۱۰ میکرو لیتر به پلیت ۹۶ خانه ته تخت منتقل و میزان ۸۰ میکرولیتر از محلول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۰/۷۵ میلی‌مولار به مایع رویی اضافه شد. از محلول TMB (۲/۹ میلی‌مولار از TMB در ۱۴/۵ درصد DMSO حل شد) ۱۱۰ میکرولیتر به هر نمونه اضافه و برای ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. درنهایت بعد از اضافه شدن ۵۰ میکرولیتر از محلول H_2SO_4 دو مولار و چندین بار پیپتاژ میزان جذب نوری در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر توسط الایزا ریدر قرائت گردید. برای منحنی استاندارد از ۱۰ میکرومولار هورس ردیش پراکسیداز (HRP) (2.5 and 25 milliunit/ml HRP) استفاده و فعالیت MPO به‌عنوان تفاوت در جذب مربوط به منحنی استاندارد HRP محاسبه شد و درنهایت غلظت MPO توسط منحنی استاندارد تعیین گردید (۲۴).

سنجش میزان تولید نیتریک اکساید به شیوه گریس در مایع رویی سلول‌های RAW264.7

نیتریک اکساید گازی با نیمه‌عمر کوتاه است که اثرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی متنوعی دارد. در بسیاری از سیستم-های بیولوژیکی بدن، NO به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان عمل می‌کند و اثرات خود را از طریق تولید گوانوزین مونوفسفات حلقوی به‌جا می‌گذارد. NO در سیستم‌های بیولوژیکی بدن اثرات متفاوتی دارد، از عملکردهای NO در سیستم ایمنی بدن می‌توان به آثار ضدویروسی، ضد میکروبی، تحریک و سرکوب سیستم ایمنی و آثار سیتوتوکسیک و سیتوپروتکتیو اشاره نمود. نیتریک اکساید یک رادیکال آزاد مؤثر در سرطان است و می‌تواند وقایع مرتبط با سرطان (رگ زایی، آپوپتوز، چرخه‌ی سلولی، تهاجم و متاستاز) را تنظیم کند. همچنین NO می‌تواند با سوپراکساید واکنش داده و واسطه‌های ثانویه نیرومندی مانند پروکسی نیتریت و دی‌اکسید نیتروژن را تشکیل دهد که این واسطه‌ها اثرات سیتوتوکسیک خود را از طریق تأثیر بر متابولیسم‌های چربی و آسیب DNA و تغییرات پس ترجمه‌ای پروتئین اعمال می‌کند. NO ارتباط تنگاتنگی با وضعیت التهابی دارد و به‌عنوان یک میانجی التهاب عمل می‌کند. باید توجه داشت بر اساس نوع سلول و بافت موردبررسی NO در سرطان دارای هر دو نقش پیش التهابی و ضدالتهابی است.

سنجش NO با استفاده از معرف Griess (۰/۵ درصد سولفانیلیک اسید، ۰/۰۰۲ درصد از N-1 نفتیل- اتلن دی مایند دی هیدروکلراید، ۱۴ درصد اسید استیک گلاسیال) و منحنی استاندارد نیتریت سدیم انجام گرفت. مایع رویی سلول‌های RAW264.7 تیمار شده با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین از سطح سلول جدا و با سرعت ۲۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی هر غلظت به‌صورت جداگانه به میزان ۱ به ۱ با محیط کشت DMEM high glucose رقیق شد. برای هر نمونه هم‌حجم از معرف گریس اضافه و تمامی نمونه‌ها به‌آرامی پیپتاژ شدند. جذب آن در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد (۲۵)، هم‌زمان با استفاده از غلظت‌های مختلف نیتریت سدیم منحنی استاندارد ترسیم و غلظت نیتریت موجود در نمونه‌ها تعیین گردید.

آنالیز آماری

هر آزمایش حداقل سه بار تکرار گردید و نتایج به‌صورت $\bar{X} \pm SD$ گزارش شد. داده‌های مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار Minitab v17 و آزمون کراسکال والیس و من ویتنی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج با $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

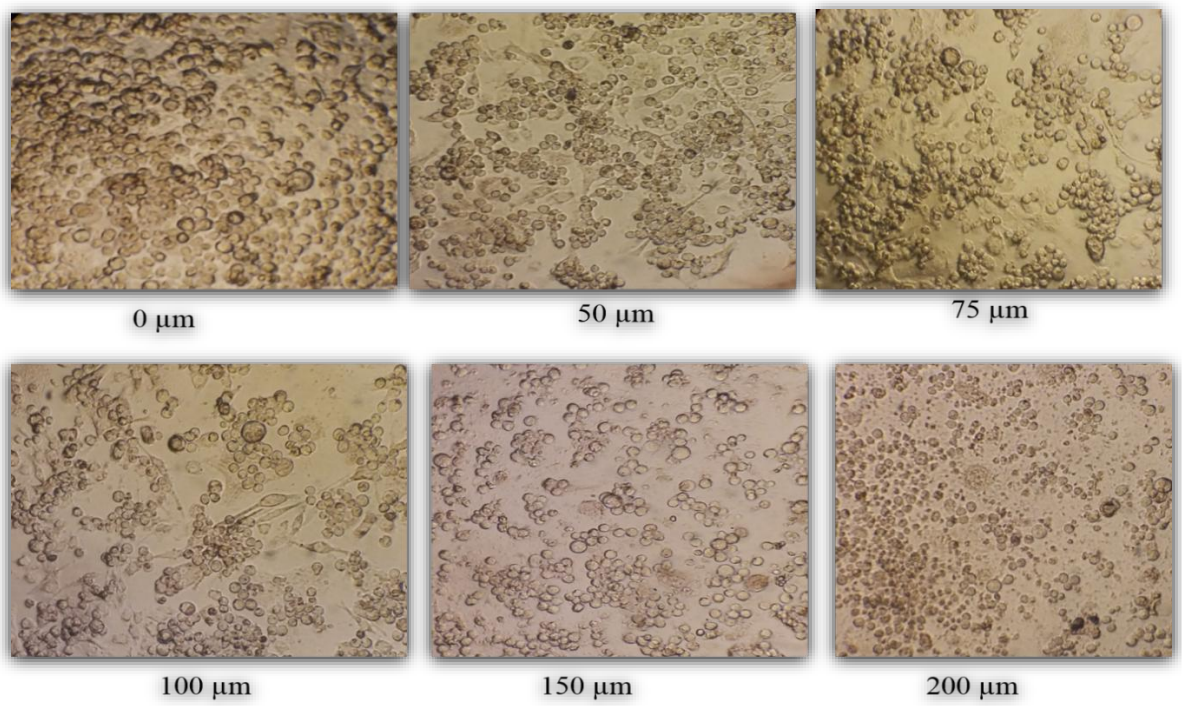
نتایج

در نمونه‌های تیمار شده مشخص شد که در غلظت‌های پایین ملاتونین تعداد و تمایز رده سلولی RAW264.7 بیشتر است و به‌تبع آن تعداد بالاتری از سلول‌های رده K562 نیز وجود دارد. با افزایش غلظت به ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار تراکم سلول-های RAW264.7 و به دنبال آن تعداد و تراکم رده K562 نیز کاهش می‌یابد به گونه‌ایی که در غلظت ۲۰۰ میکرومولار حداقل تعداد هر دو رده سلولی دیده شد (شکل ۱).

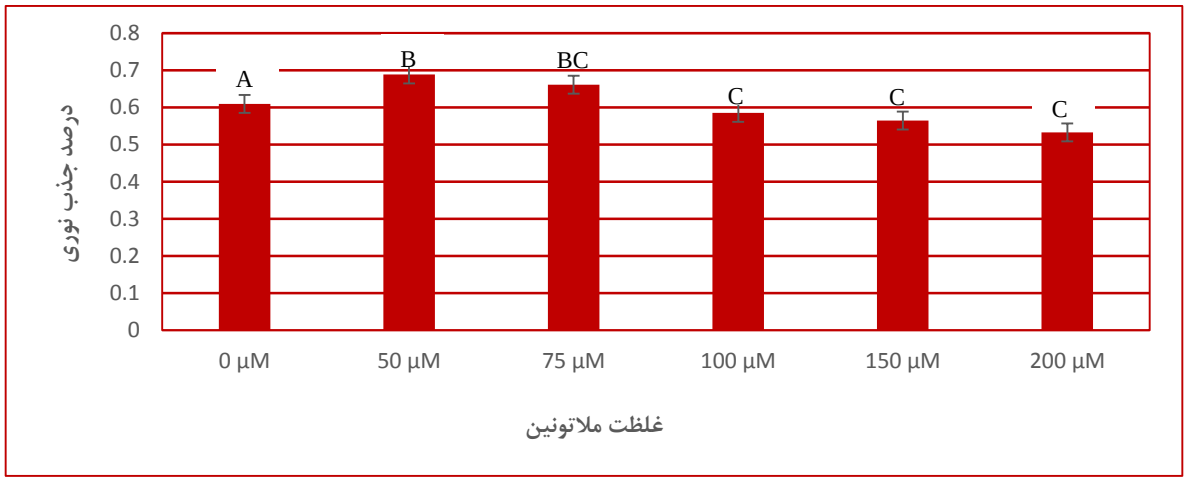
تست سنجش سمیت MTT برای رده سلولی K562 بعد از مجاورت با سلول RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت ملاتونین جهت تیمار رده سلول RAW264.7 میزان مهار رشد سلول‌های سرطانی K562

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]



شکل ۱- مورفولوژی سلول‌های رده K562 در زیر میکروسکوپ فازمعکوس ۲۴ ساعت بعد از مجاورت با سلول RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین (عکس‌ها با بزرگ‌نمایی X40 تهیه‌شده است). (فلش زرد نشان‌دهنده سلول RAW264.7 و فلش مشکی نشان‌دهنده سلول K562).



نمودار ۱- درصد مهار رشد رده سلولی K562 بعد از مجاورت با سلول RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین در تست MTT. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

افزایش یافت (P<۰/۰۵). بیشترین درصد مهار رشد رده سلولی K562 در غلظت ۲۰۰ میکرومولار مشاهده شد. البته در غلظت-های اولیه فاقد هرگونه خاصیت ضد توموری بودند ولی با افزایش غلظت ملاتونین، بر میزان خاصیت مهارکنندگی رشد رده سرطانی افزوده شد (نمودار ۱).

آزمون کروسکال-والیس در تحلیل تست MTT برای رده سلولی RAW264.7 جداگانه نیز صورت گرفت، نتایج نشان داد بین گروه‌های فوق ازنظر جذب نوری تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵). بالاترین مهار رشد رده سلولی RAW264.7 نیز در غلظت ۲۰۰ میکرومولار دیده شد. برای مقایسه مقادیر مهار رشد سلولی، بین رده سلولی K562 بعد از مجاورت با سلول RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین بارده سلولی RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین از آزمون من ویتنی استفاده شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از این آزمون مقدار آماره

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]

آزمون z=-۹/۰۵۵ و سطح معنی‌داری صفر بود (P<۰/۰۵)؛ بنابراین در سطح خطای پنج درصد فرض برابری درصد مهار رشد در دو رده سلولی تیمار شده با ملاتونین رد شد. درصد مهار رشد رده سلولی RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین کمتر بود.

به‌منظور بررسی رشد و زیستایی سلول از آزمون دفع رنگ تریپان بلو استفاده شد. به‌طور واضح مشخص است که رده سلولی K562 بعد از مجاورت با سلول RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین در غلظت ۲۰۰ میکرومولار بالاترین درصد مهار رشد را نسبت به کنترل داشت. در غلظت ۷۵ میکرومولار بالاترین میزان رشد را نسبت به کنترل داشت.

تعیین سمیت سلولی با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی نوترال رد (NR) برای رده سلولی K562 بعد از مجاورت با سلول RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین

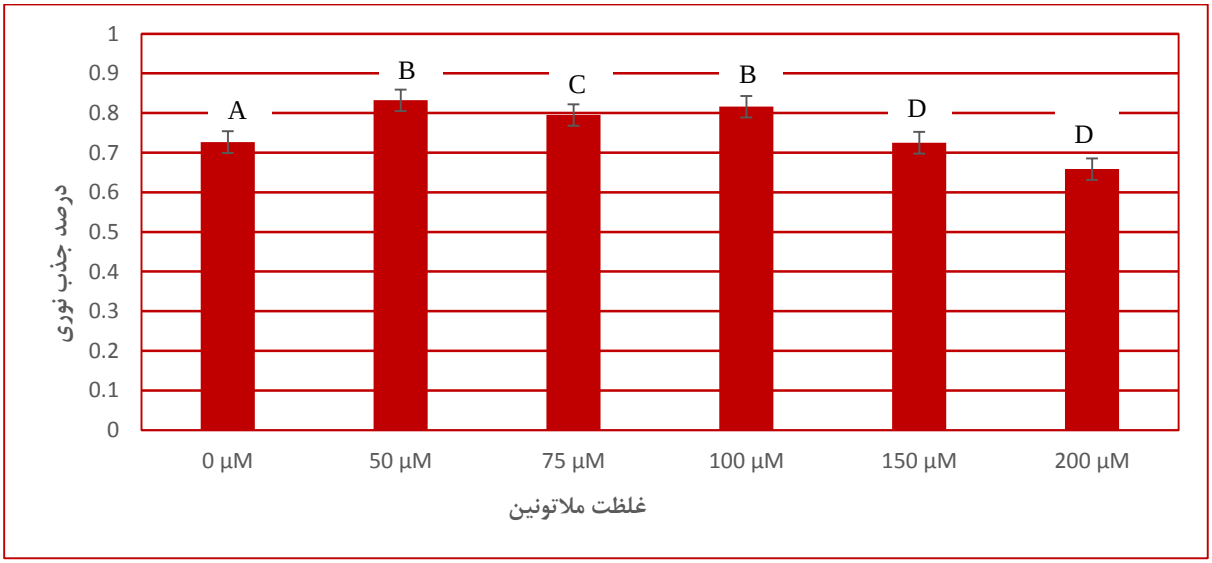
نتایج سمیت سلولی در تیمار ملاتونین بر رده سلولی RAW264.7 و سپس مجاورت آن بر رده سلولی K562 با کمک تست نوترال رد نشان داد که با افزایش غلظت ملاتونین، بر رده سلولی RAW264.7 سبب افزایش مرگ‌ومیر رده سلولی K562 می‌شود. به‌نحوی‌که کمترین تأثیر سمیت بر رده سلولی K562 در غلظت ۵۰ میکرومولار و بالاترین تأثیر سمیت در غلظت ۲۰۰ میکرومولار دیده شد (نمودار ۲).

نتایج آزمون کروسکال-والیس نشان داد که درصد سیتوتوکسیتی ملاتونین برای رده سلولی RAW264.7 به‌طور معنی‌داری در گروه‌های تحت تیمار بیشتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵). به‌نحوی‌که بیشترین سمیت در غلظت ۲۰۰ میکرومولار دیده شد و کمترین اثر سیتوتوکسیتی در غلظت ۵۰ میکرومولار مشاهده گردید.

برای مقایسه مقادیر سمیت سلولی، بین رده سلولی K562 بعد از مجاورت با سلول RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین بارده سلولی RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین از آزمون من ویتنی استفاده شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از این آزمون مقدار آماره آزمون z=-۹/۴۴۹ و سطح معنی‌داری صفر بود (P<۰/۰۵)؛ بنابراین در سطح خطای پنج درصد فرض برابری درصد سمیت سلولی در دو رده سلولی تیمار شده با ملاتونین رد شد. درصد سمیت سلولی برای رده سلولی RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین بیشتر بود.

مشاهده ریخت‌شناسی ویژه سلول‌های آپاپتوز و نکروز توسط میکروسکوپ فلورسنت برای رده سلولی K562 بعد از مجاورت با سلول RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین

پس از انجام مراحل رنگ‌آمیزی، لام‌های حاوی سلول‌های کنترل و تیمار شده با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مشاهده



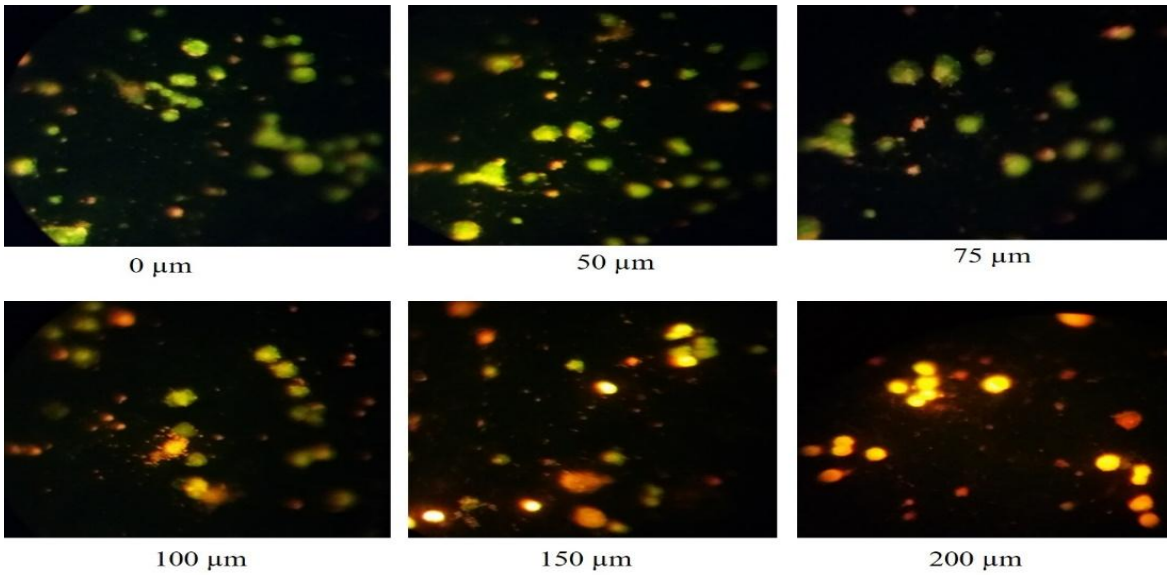
نمودار ۲- سیتوتوکسیتی ملاتونین بر رده سلولی K562 بعد از مجاورت با سلول RAW264.7 بر اساس میزان جذب توسط دستگاه الایزا ریدر. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]

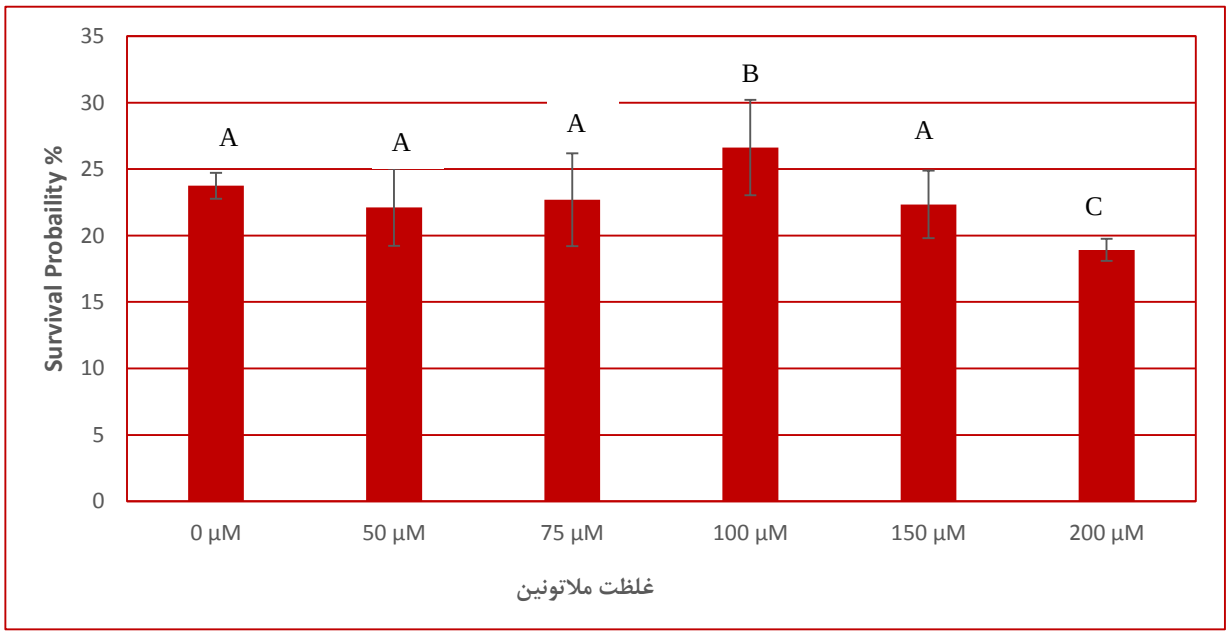
گردید (شکل ۲). درصد سلول‌های آپوپتوزی زودرس در تمام تیمارها بیش از گروه کنترل بود. درصد سلول‌های آپوپتوز دیررس در گروه کنترل و گروه‌های تحت تیمار متفاوت بود و بیشترین تعداد سلول‌های آپوپتوزی دیررس مربوط به تیمار ۲۰۰ میکرومولار بود.

سنجش میزان تولید میلوپراکسیداز در مایع رویی سلول‌های RAW264.7

نمودار ۳ فعالیت MPO رده سلولی RAW264.7 را در پنج گروه تحت تیمار با گروه کنترل نشان می‌دهد. با افزایش غلظت ملاتونین مؤثر بر سلول‌های RAW264.7 میزان فعالیت MPO



شکل ۲- مشاهده ریخت‌شناسی سلول‌های آپوپتوزی و نکروزی توسط میکروسکوپ فلوئورسنت در رده سلولی K562 بعد از مجاورت با سلول RAW264.7 تیمار شده با ملاتونین. سلول‌های سبز سلول‌های زنده هستند که هیچ آپوپتوزی بعد ۲۴ ساعت نشان نداده‌اند (عکس‌ها با بزرگ‌نمایی X40 تهیه شده است).



نمودار ۳- میزان فعالیت MPO در رده سلول RAW264.7 تحت تیمار با ملاتونین. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]

کاهش یافت. به‌نحوی‌که کمترین میزان فعالیت به نسبت گروه کنترل در گروه با غلظت تحت تیمار ۲۰۰ مکرومولار دیده شد.

سنجش میزان تولید نیتریک اکساید به شیوه گریس در مایع رویی سلول‌های RAW264.7

بررسی‌های آماری و استفاده از آزمون کروسکال-والیس نشان داد میزان تولید نیتریک اکساید تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تحت تیمار با کنترل ندارد ($p>0.05$)، اما با افزایش غلظت ملاتونین میزان تولید NO کاهش یافت به‌نحوی‌که کمترین میزان تولید NO مربوط به غلظت ۲۰۰ میکرومولار است (جدول ۱).

جدول ۱- بررسی غلظت نیتریک اکساید تولیدشده در رده‌ی سلولی RAW264.7 تحت تیمار با ملاتونین ($P<۰/۰۵$).

غلظت ملاتونین (µM)		سطح نیتریک اکساید (µmol/L)
صفر	A	۷/۹۱±۰/۸۶
۵۰	A	۷/۳۱±۰/۳۸
۷۵	A	۷/۳۰±۰/۳۲
۱۰۰	A	۶/۹۴±۰/۴۷
۱۵۰	A	۶/۸۲±۰/۳۸
۲۰۰	A	۶/۷۶±۰/۳۸

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

بحث و نتیجه‌گیری

در مراحل اولیه سرطان، پاسخ ایمنی ذاتی برای میزبان مفید است و شامل نظارت مؤثر ایمنی اکتسابی برای از بین بردن سلول‌های تومور است، اما با گسترش سرطان و بدخیم شدن آن سیستم ایمنی ذاتی و ماکروفاژهای مربوط به تومور شکل‌گرفته و منجر به سرکوب پاسخ ایمنی اکتسابی و پیشرفت تومور می‌گردد (۲۶). هم ماکروفاژ و هم نوتروفیل‌ها می‌توانند فنوتیپی برای ترویج تومور پیداکرده و باعث توسعه تومور شوند. از طرف دیگر جمعیت مخلوط سلول‌های میلوئیدی نابالغ (که عمدتاً شامل مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌هاست) به‌طورکلی به‌عنوان سلول‌های سرکوبگر میلوئید شناخته می‌شوند[14] (MDSCs) در سرکوب سیستم ایمنی علیه تومور کمک می‌کنند. اگرچه به‌خوبی مشخص شده است که کشت هم‌زمان سلول‌های توموری با ماکروفاژ تکثیر آن‌ها را گسترش می‌دهد اما در مورد جزییات مکانیسم میان کنش سلول‌های توموری – ماکروفاژ اطلاعات کمی در دسترس است (۲۷).

از نکات مثبت این مطالعه آن است که آنچه به‌صورت کیفی در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردیده به‌وسیله سایر تست‌های نیز تائید شد. نتایج تست برداشت نوترال رد، قابلیت احیای MTT و تغییرات مورفولوژیک سلول‌های ماکروفاژ بعد از تیمار با ملاتونین در مطالعه‌ی حاضر همگی حاکی از کاهش معنی‌دار قابلیت‌های حیاتی سلول‌های ماکروفاژ شامل فاگوسیتوز نوترال رد، فعالیت متابولیکی و قابلیت‌های تمایزی در این سلول‌ها بوده است. به‌طور هم‌زمان نتایج حاصل از مجاورت سلول‌های K562 با ماکروفاژهای تیمار شده با ملاتونین نیز به‌خوبی نشان از کاهش توان تروفیک و حمایتی سلول‌های ماکروفاژ از سلول‌های K562 است. به‌طوری‌که درصد زنده‌مانی این سلول‌ها در تست تریپان بلو به‌طور مشخص توسط ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار و بیشتر، کاهش است. به‌طوری‌که بیشترین میزان کاهش در زنده‌مانی سلول‌های K562 مجاور شده با ماکروفاژهای تیمار شده با ۲۰۰ میکرو مولار از ملاتونین مشاهده می‌شود. به‌طور معکوس ماکروفاژهایی که با غلظت متوسط ۵۰ و ۷۵ میکرومولار از ملاتونین مجاور شده‌اند اوج فعالیت متابولیک میتوکندری نسبت به ماکروفاژهای بدون تیمار نشان می‌دهد که حاکی از افزایش قابلیت‌های حیاتی این سلول‌ها پس از مجاورت با ملاتونین است. در همین راست نیز نتایج کشت هم‌زمان K562 مجاور شده با ماکروفاژ تیمار شده با ملاتونین در غلظت‌های ۵۰ و ۷۵ میکرومولار حاکی از افزایش قابل‌توجه میزان زنده‌مانی و سایر قابلیت‌های حیاتی سلول‌های K562 بوده است. در اینجا نیز نتایج نشان داده است که سطوح پایین ملاتونین (۵۰ و ۷۵ میکرومولار) منجر به تقویت عملکرد ماکروفاژهای بافتی در گسترش سلول‌های توموری می‌شود. غلظت‌های به نسبت بالاتر

14 - Myeloid derived suppressor cells

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]

ملاتونین در شرایط آزمایشگاهی منجر به کاهش توان حمایتی ماکروفاژها از سلول‌های K562 گردید.

Phiphatwatcharaded و همکاران در سال ۲۰۱۴ با ارزیابی تست MTT بر رده سلولی RAW264.7 بیان داشتند که ملاتونین در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار، بنزوئیل ملاتونین در غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار و استیل ملاتونین در غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار هیچ‌گونه اثر کاهشی برزنده‌مانی رده سلولی RAW264.7 تحریک‌شده با LPS ندارد (۲۸). نتایج ما با این مطالعه هماهنگی ندارد و این شاید به علت تحریک ماکروفاژ با LPS است. Szliszka و همکاران در سال ۲۰۱۱ تست MTT را برای رده سلولی RAW264.7 بعد از تیمار با Neobavaisoflavone انجام دادند. نتایج نشان داد که Neobavaisoflavone در غلظت ۱۰۰-۱ میکرومولار بر روی حیات سلول‌ها تأثیری نداشت و برای ماکروفاژها سمی نبود. درصد سلول‌های مرده مورد آزمایش با MTT و LDH تقریباً صفر درصد بود (۲۹). این نتایج نیز با مطالعات ما هماهنگی ندارد که شاید به علت نوع تیمار متفاوت است.

در برخی از سلول‌های سرطانی خون[15]، ملاتونین تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) را به دنبال قطبی شدن غشای بیرونی میتوکندری افزایش داد و این امر باعث آپوپتوز شد (۳۰). علاوه بر این، سطح بیان Fas / FasL، یکی دیگر از شاخص‌های مسیر بیرونی آپوپتوز، توسط ملاتونین در سلول‌های سرطان خون با تولید ژن‌های پروآپوپتیک مانند کاسپاز ۸ افزایش یافت (۳۱). بین نتایج مطالعه ما و مطالعه اخیر مرگ سلول‌های سرطانی هماهنگی دیده شد اما تفاوت در میزان تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن شاید به دلیل تفاوت در رده سلولی تحت تیمار باشد.

با افزایش غلظت ملاتونین مؤثر بر سلول‌های RAW264.7 میزان فعالیت MPO و NO کاهش یافت. به‌نحوی‌که بالاترین میزان فعالیت به نسبت گروه کنترل در گروه با غلظت تحت تیمار ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار دیده شد. مطالعات پیشین به‌خوبی ثابت کرده است سطوح بالای رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن که توسط سلول‌های ماکروفاژ تولید می‌شوند منجر به حذف و نابودی سلول‌های توموری خواهند شد به‌طور بالعکس و تا حدی متضاد به نظر می‌رسد که تولید میزان کم نیتریک اکساید و همچنین رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط ماکروفاژهای پشتیبان بافت (M0)، تولید می‌گردد (۳۲)، به‌عنوان میانجی‌های ثانویه به سلول‌های بافت، از قبیل سلول‌های توموری تأثیر کرده و با راه‌اندازی برخی از مسیرهای داخل سلولی از قبیل mToR موجب پیشبرد تکثیر سلول‌های توموری می‌شود (۲۱). ذکر این نکته خالی از لطف نیست که مقادیر پایین و متوسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن که در شرایط پلاریزه شدن ماکروفاژها به سمت M2 دیده می‌شود یک فرآیند التهابی ناکامل است که خود موجب آسیب به DNA و ایجاد سرطان در سلول‌های بافت از قبیل سلول‌های بافت معده می‌گردد (۳۳).

پدیده‌های اکسیداتیو نقش مهمی در سیگنالینگ و مدیریت مراحل اولیه التهاب دارد. نوتروفیل‌های فعال باعث انفجار اکسیداتیو می‌شوند که اثرات سمی روی تهاجم میکروب‌ها دارد؛ تولید ROS در آسیب بافتی، یک گرادیان غلظت ایجاد می‌کند که لکوسیت را به محل آسیب بافتی هدایت می‌کند. علاوه بر این، ROS بلوغ مونوسیت را القاء می‌کند و چسبندگی به اندوتلیال را در دیاپدز افزایش می‌دهد؛ بنابراین، فراتر از اثرات ضد سپتیک تولید ROS می‌تواند استخدام و بلوغ لکوسیت‌ها را تنظیم کند (۳۴). Choi و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی اثر ملاتونین بر تولید نیتریک اکساید و IL-6 در رده سلولی RAW264.7 پرداختند. نتایج نشان داد که ملاتونین تولید اکسید نیتریک و IL-6 را در هر دو سطح رونویسی و ترجمه‌ی ژن در سلول‌های RAW264.7 سرکوب می‌کند (۳۵)؛ که با نتایج مطالعه حاضر هماهنگی دارد.

تقویت پاسخ‌های سیستم ایمنی با کمک ایمونوتراپی یکی از الزامی‌ترین روش‌های برای درمان لوسمی‌هاست، به‌ویژه بعد از تخلیه مغز استخوان بیمار برای تحریک تولید سلول‌های خون‌ساز روش‌های درمانی ترکیبی با مشارکت ایمونوتراپی توصیه می‌شود. بااین‌وجود روش‌های ایمونوتراپی به‌تنهایی برای حذف کامل تومور کافی نیستند. علت این مسئله پویایی و تغییر دائم سیستم ایمنی بدن است، از طرفی تومور بر اساس شدت بدخیمی می‌تواند خود را با انواع تغییرات وفق دهد، به‌طور مثال تومور می‌تواند آنتی‌ژن‌های سطحی خود را پس از یک دوره ایمونوتراپی تغییر دهد و یا همانند اکثر سرطان‌ها با شدت پیشروی بالا، عدم پاسخ مناسب به ایمونوتراپی می‌تواند به خاطر وجود سلول‌های سرطانی بنیادی باشد که توانایی بالایی در تطابق با سیستم

15 - Haematological

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]

ایمنی داشته و به سهولت از دسترس سیستم ایمنی فرار می-کنند. لذا به‌کارگیری روش‌های ترکیبی ایمونوتراپی به همراه رادیوتراپی، شیمی‌درمانی و جراحی نتایج بهتری خواهند داشته-اند. اگرچه ماکروفاژها نقش‌های متنوع و مهمی در دفاع از بدن دارند، اما به علت ماهیت انعطاف‌پذیر آن‌ها و تأثیرپذیری از فاکتورهای گوناگون گاهی ناتوان در انجام عملکردهای اصلی هستند. لذا یک رویکرد محتاطانه برای استفاده از ماکروفاژ در درمان بیماری‌ها باید مدنظر باشد. پس تحقیقات بیشتر در مورد مکانیسم‌های دقیق فعالیت ماکروفاژ ضروری به نظر می‌رسد؛ اما ازآنجایی‌که درمان سرطان بدون ملاتونین سخت است و ملاتونین اثرات امنی بر سلول‌های ماکروفاژ در شرایط in vitro دارد لذا استفاده از ملاتونین در درمان لوسمی میلوئیدی مزمن توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد پژوهشگر است. کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه با کد ۹۰۵-۲ د مورد ارزیابی و تائید قرار گرفت.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Mills CD, Lenz LL, Harris RA. A breakthrough: macrophage-directed cancer immunotherapy. Cancer research. 2016;76(3):513-6.
2. Morrissette N, Gold E, Aderem A. The macrophage–a cell for all seasons. Trends in cell biology. 1999;9(5):199-201.
3. ordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity. 2010;32(5):593-604.
4. alli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. Nature immunology. 2011;12(11):1035-44.
5. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. The Journal of Immunology. 2005;174(2):636-45.
6. Weagel E, Smith C, Liu P, Robison R, O'Neill K. Macrophage polarization and its role in cancer. J Clin Cell Immunol. 2015 (1);6:338.
7. G eissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science. 2010;327(5966):656-61.
8. A rnold CE, Whyte CS, Gordon P, Barker RN, Rees AJ, Wilson HM. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. Immunology. 2014;141(1):96-110.
9. Prokop S, Heppner FL, Goebel HH, Stenzel W. M2 polarized macrophages and giant cells contribute to myofibrosis in neuromuscular sarcoidosis. The American journal of pathology. 2011;178(3):1279-86.
10. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-γ-and CD40L-mediated costimulation. Journal of leukocyte biology. 2006;79(2):285-93.
11. Bowdridge S, Gause WC. Regulation of alternative macrophage activation by chromatin remodeling. Nature immunology. 2010;11(10):879.
12. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nature reviews immunology. 2008;8(12):958.
13. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. Nature reviews Immunology. 2009;9(4):259.
14. Alahari SV, Dong S, Alahari SK. Are macrophages in tumors good targets for novel therapeutic approaches? Molecules and cells. 2015;38(2):95.
15. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nature medicine. 2013;19(11):1423.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]

16. Galván-Peña S, O'Neill LA. Metabolic reprograming in macrophage polarization. Frontiers in immunology. 2014;5.
17. Thomas J, Badini M. The role of innate immunity in spontaneous regression of cancer. Indian journal of cancer. 2011;48(2):246.
18. Apostolaki M, Armaka M, Victoratos P, Kollias G. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. TNF Pathophysiology. 11: Karger Publishers; 2010. p. 1-26.
19. Srinivasan V, R Pandi-Perumal S, Brzezinski A, P Bhatnagar K, P Cardinali D. Melatonin, immune function and cancer. Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery. 2011;5(2):109-23.
20. Lin H-Y, Juan S-H, Shen S-C, Hsu F-L, Chen Y-C. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264. 7 macrophages involves heme oxygenase-1. Biochemical pharmacology. 2003;66(9):1821-32.
21. Repetto G, Del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nature protocols. 2008;3(7):1125.
22. Zhang J-H, Yu J, Li W-X, Cheng C-P. Evaluation of Mn^ 2^+ Stimulated and Zn^ 2^+ Inhibited Apoptosis in Rat Corpus Luteal Cells by Flow Cytometry and Fluorochromes Staining. Chinese Journal of Physiology. 1998;41(2):121-6.
23. Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KL, Wojtkiewicz G, et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. PloS one. 2013;8(7):e67976.
24. Froushani, S.M.A. and S. Mashouri, The Beneficial Effects of Hypiran in Ameliorating Rat Model of Ulcerative Colitis. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences, 2018(In Press).
25. Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. Free Radical Biology and Medicine. 2003;34(8):955-68.
26. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. Immunological reviews. 2008;222(1):155-61.
27. Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Takeya M. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. Advanced drug delivery reviews. 2016;99 (7):180-5.
28. Phiphatwatcharaded C, Topark-Ngarm A, Puthongking P, Mahakunakorn P. Anti-Inflammatory Activities of Melatonin Derivatives in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells and Antinociceptive Effects in Mice. Drug development research. 2014;75(4):235-45.
29. Szliszka E, Skaba D, Czuba ZP, Krol W. Inhibition of inflammatory mediators by neobavaisoflavone in activated RAW264. 7 macrophages. Molecules. 2011;16(5):3701-12.
30. Sánchez-Hidalgo M, Lee M, de la Lastra CA, Guerrero JM, Packham G. Melatonin inhibits cell proliferation and induces caspase activation and apoptosis in human malignant lymphoid cell lines. Journal of pineal research. 2012;53(4):366-73.
31. Casado-Zapico S, Rodriguez-Blanco J, García-Santos G, Martín V, Sánchez-Sánchez AM, Antolín I, et al. Synergistic antitumor effect of melatonin with several chemotherapeutic drugs on human Ewing sarcoma cancer cells: potentiation of the extrinsic apoptotic pathway. Journal of pineal research. 2010;48(1):72-80.
32. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. World journal of surgical oncology. 2013;11(1):118.
33. Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. Free radical research. 2010;44(5):479-96.
34. Radogna F, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. Biochemical pharmacology. 2010;80(12):1844-52.
35. Choi EY, Jin JY, Lee JY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ. Melatonin inhibits Prevotella intermedia lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and interleukin-6 in murine macrophages by suppressing NF-κB and STAT1 activity. Journal of Pineal Research. 2011;50(2):197-206.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]

Oiginal Article

Investigating the Effects of RAW264.7 Macrophages Treated with Melatonin on the Erythroleukemia Cell Line K562

Ahanjan M, Abtahi Foroushani SM*, Afzale Ahangaran N

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: 12 Apr 2018 Accepted: 10 Nov 2018

Abstract

Background & Objectives: Macrophages have a variety of functions and different phenotypes that are affected by the microenvironment. Due to the multiple functions, Melatonin can promote the cancer progression or cancer regression in relation to other factors. However, there is no information about the role of melatonin on the formation of macrophages in the tumor environment. The purpose of the present study is to evaluate the effects of melatonin treated RAW264.7 macrophages on the growth rate of erythroleukemia cell line K562.

Materials & Methods: RAW264.7 cells were cultured in the 24-well plates at a density of 6×10^4 cells per well. After culturing for 24 h, the cells were treated for 24 h with melatonin at concentrations 0, 50, 75, 100, 150, 200 µmol/L. After removal of the supernatant, macrophages and K562 were co-cultured in 1:10 ratio. K562 vitality was then determined by MTT and NR assay. The rate of apoptosis in the cell population was evaluated by staining with acridine orange and ethidium bromide colors. Also, NO and MPO were measured in the supernatant of macrophages RAW264.7. Data were statistically analyzed using Kruskal-Wallis and Mann–Whitney U test ($P<0.05$).

Results: The growth rate and vitality of K562 cells co-cultured with melatonin-treated macrophages was increased at concentrations of 50 and 75 µmol/L. Nevertheless, at higher concentrations of melatonin, this process was reversed. The levels of MPO and NO were decreased by increasing concentrations of melatonin.

Conclusion: These results indicated that treatment of macrophage with melatonin, especially at lower doses (50 and 75µmol/L) could remarkably increase the K562 viability and vitality.

Keywords: Cytotoxicity, Melatonin, RAW264.7 Macrophage, K562

***Corresponding Author: : Abtahi Foroushani Seyyed Meysam,** Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Email: meysamabtahi@hotmail.com
https://orcid.org/0000-0003-2579-6618

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-07]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2019.8.4.14.0]