

ارزیابی اثر ملاتونین بر میزان بیان ژن‌های AKT، Survivin، XIAP و کاسپاز ۳ در جهت افزایش حساسیت به سیس پلاتین در سلول‌های کشت داده شده OVCAR3

سحر بقال صدری فروش^۱، مرتضی باقری^{۲*}، عیسی عبدی راد^۳، فتاح ستوده نژاد نعمت الهی^۴

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۰۵/۱۳ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۰۸/۰۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان تخمدان هفتمین سرطان شایع و پنجمین دلیل شایع مرگ‌ومیر بین زنان دنیا است. بنابراین، یافتن داروهای جدید که باعث افزایش کارایی داروهای شیمی‌درمانی شود و امکان استفاده از آن در دوزهای پایین‌تر، که منجر به کاهش عوارض جانبی گردد ضروری است. هدف از این مطالعه ارزیابی کردن اثر ملاتونین بر میزان بیان ژن‌های AKT، Survivin، XIAP و کاسپاز ۳ در جهت افزایش حساسیت به سیس پلاتین در سلول‌های کشت داده شده OVCAR3 بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه سلول‌های OVCAR3 با غلظت‌های مختلف ملاتونین (۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۱/۱۲۵، ۰/۰۳۱۲/۶۲۵، ۰/۰۰۱) میکرومولار و غلظت‌های مختلف سیس پلاتین (۰/۰۰۱، ۰/۰۹۳۷، ۱/۸۷۵، ۳/۷۵، ۷/۵، ۱۵) میکرومولار در زمان‌های کشت ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شد. سیس سمیت سلولی با تست MTT مورد بررسی قرار گرفت. تست Real time PCR برای ارزیابی سطح نسبی بیان ژن‌های AKT، Survivin، XIAP و کاسپاز ۳ در گروه‌های کنترل، ملاتونین، سیس پلاتین و ترکیبی ملاتونین و سیس پلاتین اجرا شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که ملاتونین تکثیر سلول‌های سرطانی کشت یافته OVCAR3 را بر اساس یک مکانیسم وابسته به دوز و زمان مهار می‌کند. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که در گروه‌های ملاتونین و ترکیبی ملاتونین-سیس پلاتین افزایش معنی‌داری در سطح بیان ژن کاسپاز ۳ مشاهده می‌شود. همچنین بیان ژن مهارکننده آپوپتوز Survivin در گروه ترکیبی ملاتونین-سیس پلاتین کاهش (اختلاف مرزی) یافت. درحالی‌که در گروه‌های تست‌شده سطح بیان نسبی ژن‌های Akt و Xiap تغییرات معنی‌داری نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد با مصرف ملاتونین سلول‌های OVCAR3 به سیس پلاتین حساسیت بیشتری پیدا می‌کنند. آن می‌تواند برای مدیریت بیماران مبتلا به سرطان تخمدان به کار رود.

کلیدواژه‌ها: ملاتونین، سیس پلاتین، رده سلولی OVCAR3، کاسپاز ۳، AKT، Survivin، XIAP

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره هفتم، ص ۵۳۶-۵۲۵، مهر ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده پزشکی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، تلفن: ۰۴۴۳۱۹۸۸۰۰۰

Email: mortezabagheri@umsu.ac.ir

مقدمه

افزایش میزان مرگ‌ومیر می‌گردد. خطر اینکه یک زن در طول عمر خود به سرطان تخمدان مبتلا شود ۱-۱/۵ درصد و مرگ ناشی از آن تقریباً ۵۰ درصد است (۳). معمول‌ترین و مؤثرترین روش درمان سرطان تخمدان جراحی همراه با ترکیب شیمی‌درمانی پلاتین/تاکسان است (۴).

سرطان تخمدان هفتمین سرطان شایع بین زنان در دنیا و پنجمین دلیل شایع مرگ‌ومیر بین زنان است. در ایران به‌عنوان هشتمین سرطان، و یکی از دلایل شایع مرگ‌ومیر در زنان است (۱، ۲). سرطان تخمدان در مراحل اولیه بیماری علائم قابل توجهی را بروز نمی‌دهد و تشخیص آن در مراحل پیشرفته توموری منجر به

^۱ دانشجوی دکتری، زیست‌شناسی سلولی مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

^۲ استادیار ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده پزشکی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استاد ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده پزشکی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

^۴ استادیار ایمونولوژی سلولی و مولکولی، زیست‌شناسی سلولی مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

حجره، کارسینوم پوست، و سرطان تخمدان، سینه و گردن رحم نشان داده شده است (۱۵).

آپوپتوز یک فرایند فیزیولوژیکی مرگ سلولی است که به توسعه و نگهداری سلول‌ها و بافت‌های سالم کمک می‌کند. بی‌نظمی در مسیرهای آپوپتوز منجر به برخی از بیماری‌ها مانند سرطان، بیماری‌های خود ایمنی و نقص ایمنی و اختلالات عصبی می‌شود (۱۶). موجودات زنده دو مسیر پیام‌رسانی، یعنی مسیرهای درونی و بیرونی را تکامل داده‌اند تا از طریق فعال‌سازی کاسپازها باعث ایجاد آپوپتوز شوند. در حال حاضر، دو نوع کاسپاز آپوپتوزی شامل کاسپازهای آغازگر (کاسپاز ۲، ۸، ۹ و ۱۰) و کاسپازهای مؤثر (کاسپاز ۳، ۶ و ۷)، به‌طور گسترده‌ای شناسایی شده‌اند (۱۷). جالب اینکه فرایند آپوپتوز توسط پروتئین‌هایی که به‌عنوان پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز (IAP) نامیده می‌شوند از طریق اتصال مستقیم به کاسپازها مسدود می‌شود (۱۸).

هدف از انجام این پژوهش تعیین اثر ملاتونین بر بهبود عملکرد سیستم پلاتین در درمان سرطان تخمدان در رده سلولی OVCAR3 است و به این منظور بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز (Survivin, Akt, Xiap, Caspase-3) ارزیابی می‌گردد.

مواد و روش کار

مواد:

ملاتونین، سیستم پلاتین و MTT از شرکت سیگما (St. Louis, MO) تهیه شد. سلول‌های سرطانی تخمدان انسانی، رده سلولی OVCAR3 (کد NCBI: C209)، از بانک ملی سلول‌های ایران (NCBI)، انستیتو پاستور خریداری شد. معرف‌های کشت سلولی از تأمین‌کنندگان مناسب تجاری موجود به دست آمد.

کشت سلولی:

سلول‌های سرطانی تخمدان انسانی، رده سلولی OVCAR3، در محیط RPMI 1640 (سیگما-آلد ریچ، ایالات متحده آمریکا) با ۱۰٪ سرم جنین گاو (Gibco, USA)، 100 U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده شد (USA, Gibco). در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در پنج درصد CO₂ کشت داده شد.

آماده‌سازی ملاتونین:

ملاتونین در دی‌متیل سولفوکسید (DMSO، مرک، آلمان) حل شد و به‌این ترتیب یک محلول مایع ۰/۲ مولار (۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس، محلول موجود با RPMI-1640 رقیق شد تا غلظت‌های مختلف محلول کار بلافاصله قبل از استفاده آماده شود.

سیس پلاتین، یکی از داروهای ضد سرطان، در درمان انواع مختلفی از بدخیمی‌ها استفاده می‌شود. سیس پلاتین به DNA متصل شده و باعث تغییر کنفورماسیون DNA شده و بر روی همانندسازی آن تأثیر می‌گذارد (۵). سیس پلاتین باعث توقف چرخه سلولی در فاز G2 و همچنین باعث آپوپتوز می‌شود (۶). شیمی‌درمانی مبتنی بر پلاتین هنوز هم یک درمان مؤثر برای سرطان تخمدان است ترکیب پلاتین دارای فعالیت بالینی علیه طیف وسیعی از سرطان‌های جامد از جمله تخمدان، بیضه، مثانه، کولورکتال، ریه و سر و گردن است سیس پلاتین باعث مرگ سلول‌های سرطانی به‌وسیله آسیب به DNA، مهار سنتز DNA و میتوز، و باعث القاء آپوپتوز می‌شود (۷). باین‌حال، قرار گرفتن در معرض طولانی‌مدت سیس پلاتین منجر به مقاومت به شیمی‌درمانی می‌شود (۸). مقاومت به شیمی‌درمانی در حال حاضر علت اصلی عود بیماری و کاهش میزان بقای عمر در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان می‌باشد (۹). بین ۷۰ تا ۸۰ درصد از بیماران مبتلا به سرطان تخمدان به درمان‌های استاندارد نظیر جراحی و شیمی‌درمانی پاسخ می‌دهند. باین‌حال خطر بازگشت بیماری در اغلب بیماران مبتلا به سرطان تخمدان وجود دارد. کاهش میزان بقا در زنان مبتلا به سرطان تخمدان به علت مقاومت به دارو دیده می‌شود (۱۰). بنابراین، یافتن ترکیبات / داروهای جدید که باعث افزایش کارایی سیس پلاتین شود ضروری است و امکان استفاده از آن را در دوزهای پایین‌تر فراهم آورده و عوارض جانبی سمی آن را کاهش می‌دهد. در این راستا، ملاتونین به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت مطرح بوده و همراه با عوامل شیمی‌درمانی باعث افزایش جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک می‌شود.

ملاتونین (N-استیل-۵-متوکسی تریپتامین) هورمونی است که توسط غده پینه آل، شبکیه، دستگاه گوارش و چند اندام دیگر تولید، و توسط پینه آل ترشح می‌گردد، گیرنده‌های ملاتونین در نواحی مختلف مغز انسان و روده، تخمدان‌ها و عروق خونی وجود دارند (۱۱) و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی، از جمله تنظیم ریتم شبانه‌روزی، سیستم ایمنی بدن، خونریزی و ردیابی رادیکال‌های آزاد درگیر می‌شود (۱۲ و ۱۳). مکانیسم‌های ملاتونین در سرکوب رشد تومور شامل موارد زیر می‌باشد: اثرات ضد انعقادی، ضد تکثیری، توانایی ایجاد آپوپتوز، ضد رگ‌زایی و ضد متاستازی، فعالیت ضد استروژنی، مهار فعالیت تلومراز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی مستقیم و غیرمستقیم، اثرات متابولیک و تنظیم بی‌ثباتی ژنومی است (۱۴). علاوه بر این خواص ضد سرطانی ملاتونین در طیف گسترده‌ای از تومورها، از جمله سرطان پروستات، سارکوم، سرطان کولورکتال، هپاتوکارسینوما، ملانوم، تومورهای عصبی، کارسینوم

تست MTT:

اثرات درمانی سیس پلاتین و ملاتونین بر دوام سلول با استفاده از روش رنگ سنجی با استفاده از (۳- (۴، ۵-دی متیل تiazول-۲-یل) -۲،۵-دیفنیل تترازولیم برومید (MTT)) ارزیابی شد (سیگما-آلدريج، آمریکا). به طور خلاصه، سلول‌های OVCAR3 در پلیت ۹۶ خانه کاشته و در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS کشت داده شدند، سپس سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در همان محیط همراه با FBS ۲٪ در معرض غلظت‌های مختلف سیس پلاتین (۱۵، ۷/۵، ۳/۷۵، ۱/۸۷۵، ۰/۹۳۷، ۰/۱۰۰۱) میکرومولار یا ملاتونین (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۳۱۲/۶۲۵، ۰/۰۰۱) میکرومولار قرار گرفتند. متعاقباً، ۲۰ میکرولیتر محلول ۵ MTT میلی گرم در میلی لیتر) به هر خانه اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. همه تیمارها در سه تکرار انجام شد. مقدار جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکرو پلیت اندازه‌گیری شد (USA, Biotek Instruments) و نتایج به‌عنوان درصدی از دوام سلول‌های کنترل ارائه شد. غلظت دارو که باعث ایجاد مهار ۵۰٪ در رشد سلول (IC50) برای هر تیمار از منحنی دوز-پاسخ درصد مهار رشد در برابر آزمایش محاسبه شد برای ارزیابی عملکرد هم‌افزایی ملاتونین و سیس پلاتین، سلول‌ها با مقدار IC50 ۴۸ ساعت ملاتونین تحت درمان قرار گرفتند و غلظت‌های مختلف سیس پلاتین به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و زنده ماندن سلول تعیین شد.

استخراج RNA:

پس از گذشت زمان مناسب از تیمار سلول‌ها، با استفاده از EDTA-Trypsin، سلول‌ها از پلیت‌ها جدا شده و برای استخراج RNA از کیت RNA (RNX- Plus Solution (SinaClon) (شماره کاتالوگ: RN7713C) استفاده شد. برای تعیین و تأیید غلظت RNA از دستگاه بیوفتومتر استفاده شد. اساس کار این دستگاه اسپکتروفتومتری است و سرعت و دقت بالایی در سنجش غلظت اسیدهای نوکلئیک دارد. این دستگاه OD نمونه را در طول موج ۲۶۰ نانومتر برای تعیین غلظت RNA اندازه‌گیری می‌کند، هر واحد OD در طول موج ۲۶۰ نانومتر برابر با ۴۰ نانوگرم بر میلی لیتر از RNA تک رشته‌ای است. علاوه بر تعیین غلظت RNA، این دستگاه با سنجش طول موج ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و تعیین نسبت ۲۸۰ نانومتر بر ۲۶۰ نانومتر خلوص RNA را تعیین می‌نماید. نسبت مورد قبول ۱/۶ تا ۲ است و کمتر از این نسبت نشان‌دهنده‌ی آلودگی پروتئینی و فنولی قلمداد می‌گردد.

سنتز cDNA:

برای سنتز cDNA از کیت (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Cat Number: #K1622 Kit) استفاده شد.

جفت پرایمرهای موردنظر که در این مطالعه به کار رفتند شامل موارد زیر می‌باشد: tcttccagccttcttctctg و cgtagcaggtctttgaggatg برای ژن بتا-اکتین (۱۰۲ باز)، cagccaacctcagagagaca و acagggccattgtcccata برای ژن کاسپاز-۳ (۱۹۰ باز)، tcagcccaaccttcacatct و tgcagctctatgacaggag برای ژن سورویونین (۱۵۶ باز)، gccatctgagacacatgagca و ctcttgggttagtgagca برای XIAP (۱۵۵ باز)، acctgaccaagatgacagca و ccatcctccaagctatcgt برای AKT (۱۳۲ باز).

Real-Time PCR

به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مذکور در نمونه‌ها، روش Real-Time PCR انجام شد. برای این منظور از کیت Thermo (scientific SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2X استفاده شد. برای انجام واکنش‌های Real-Time PCR از دستگاه Mic Magnetic Induction Cycler Instrument استفاده شد.

آنالیزهای آماری:

نتایج حاصل از Real time PCR با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ آنالیز گردید. آزمایشات با سه بار تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار (La, GraphPad Software, Inc., Jolla, CA) GraphPad Prism 6 انجام شد. نتایج به‌صورت میانگین \pm خطای استاندارد (SEM) ارائه شده است. مقدار $P < 0.05$ برای نشان دادن آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی درصد زیستایی سلول‌های OVCAR3 در حضور غلظت‌های مختلف ملاتونین در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت.

رده سلولی OVCAR3 با غلظت‌های مختلف ملاتونین (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۳۱۲/۶۲۵، ۰/۰۰۱) میکرو مولار در سه زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد در صد سلول‌های زنده با افزایش سطح ملاتونین و زمان کاهش می‌یابد و بیشترین تأثیر در زمان ۷۲ ساعت و در غلظت ۱۰ میکرو مولار معادل ۶۹/۹۶ درصد می‌باشد (شکل شماره یک-الف).

بررسی درصد زیستایی سلول‌های OVCAR3 در حضور غلظت‌های مختلف سیس پلاتین در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت

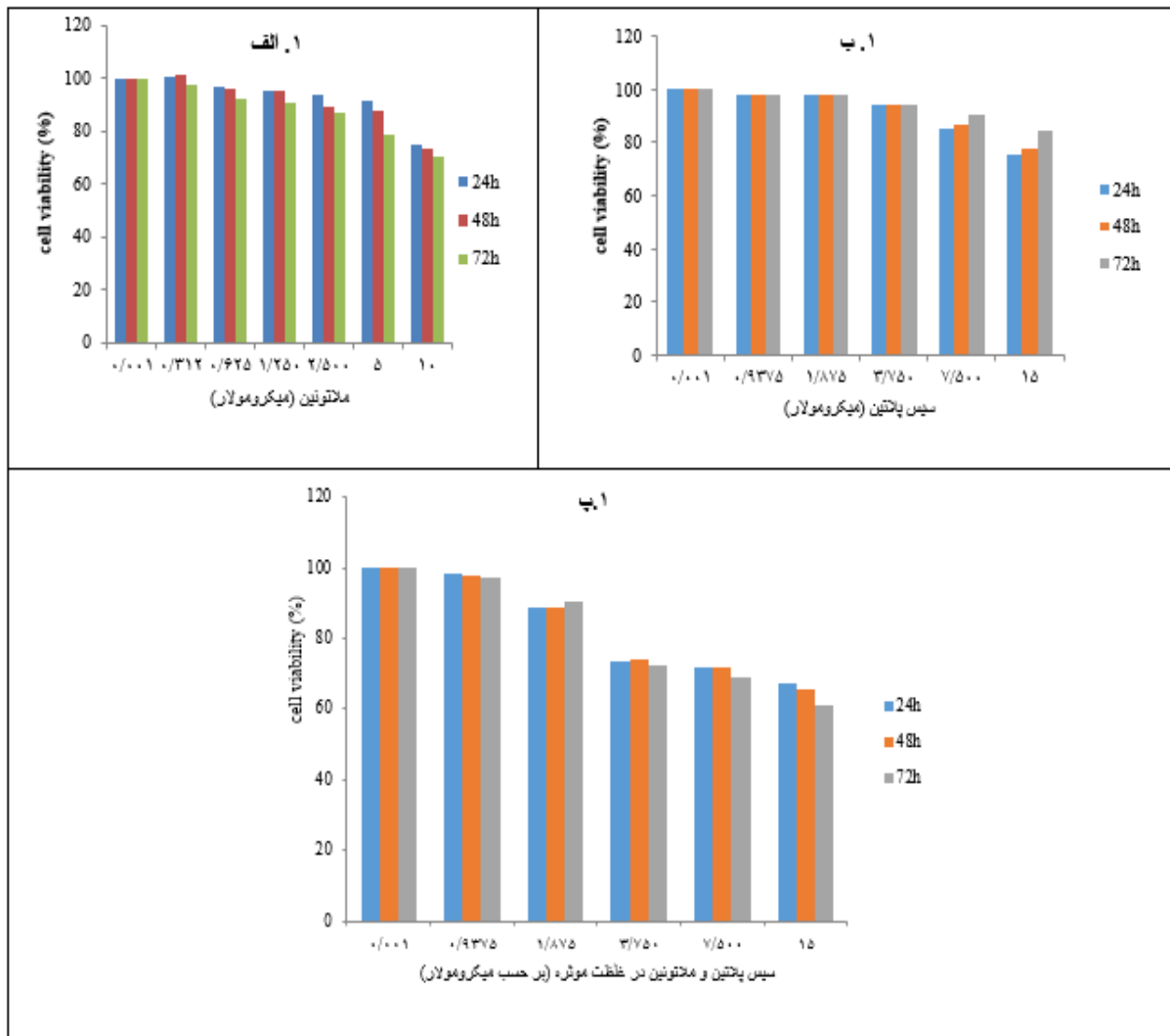
همچنین این رده سلولی با غلظت‌های مختلف سیس پلاتین (۱۵، ۷/۵، ۳/۷۵، ۱/۸۷۵، ۰/۹۳۷، ۰/۱۰۰۱) میکرومولار در سه زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت، و نشان داد بیشترین تأثیر در زمان ۲۴ ساعت و در غلظت ۱۵ میکرومولار سیس پلاتین

سیس پلاتین، درصد سلول‌های زنده کاهش می‌یابد. با توجه به آنچه اشاره شد با مصرف غلظت مؤثره ملاتونین (۴ میکرومولار) عملکرد سیس پلاتین به‌تنهایی بهبود یافته است (مصرف سیس پلاتین از ۱۲/۸ میکرومولار به ۴/۱ میکرومولار کاهش یافته است). در غلظت ۱/۸۷۵ میکرومولار سیس پلاتین به‌تنهایی که هیچ تأثیری بر روی سلول‌های موردنظر نداشت. درحالی‌که با درمان ترکیبی ملاتونین و سیس پلاتین درصد سلول‌های زنده به ۸۸ درصد کاهش یافت. درمان منفرد سیس پلاتین با غلظت ۳/۷۵ میکرومولار منجر به زیستایی ۹۴ درصد شد درحالی‌که که درمان ترکیبی ملاتونین و سیس پلاتین باعث شد زیستایی به ۷۳ درصد کاهش یابد و این میزان تأثیر بیشترین مقدار می‌باشد (شکل شماره یک-پ).

معادل ۷۵/۳۴ درصد می‌باشد. در غلظت‌های ۱۵ و ۷/۵ میکرومولار سیس پلاتین با افزایش زمان درصد سلول‌های زنده افزایش پیدا کرده و یک مقاومت دارویی ایجاد شده است و غلظت‌های ۱/۸۷۵ و ۰/۹۳۷ میکرومولار سیس پلاتین هیچ تأثیری روی سلول‌ها نداشت (شکل شماره یک-ب).

بررسی درصد زیستایی سلول‌های OVCAR3 در حضور غلظت ۴ میکرومولار ملاتونین+غلظت‌های موردنظر سیس پلاتین در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت.

بر اساس یافته‌های این مطالعه، غلظت ۴ میکرومولار ملاتونین + غلظت‌های مختلف سیس پلاتین (۱۵، ۷/۵، ۳/۷۵، ۱/۸۷۵، ۰/۹۳۷، ۰/۰۰۱) میکرومولار در سه زمان موردنظر بررسی شد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که درمان ترکیبی با افزایش غلظت

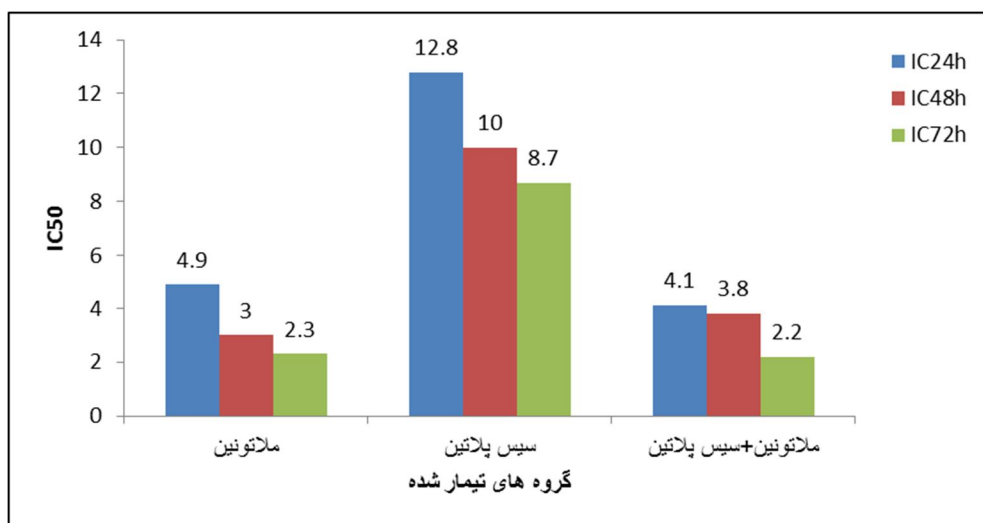


شکل (۱): مقایسه میانگین زیست‌پذیری سلول‌ها با سیس پلاتین و ملاتونین به‌تنهایی و یا به‌صورت ترکیبی در زمان‌های مختلف. مقادیر به‌صورت Mean±SD نشان داده شده است.

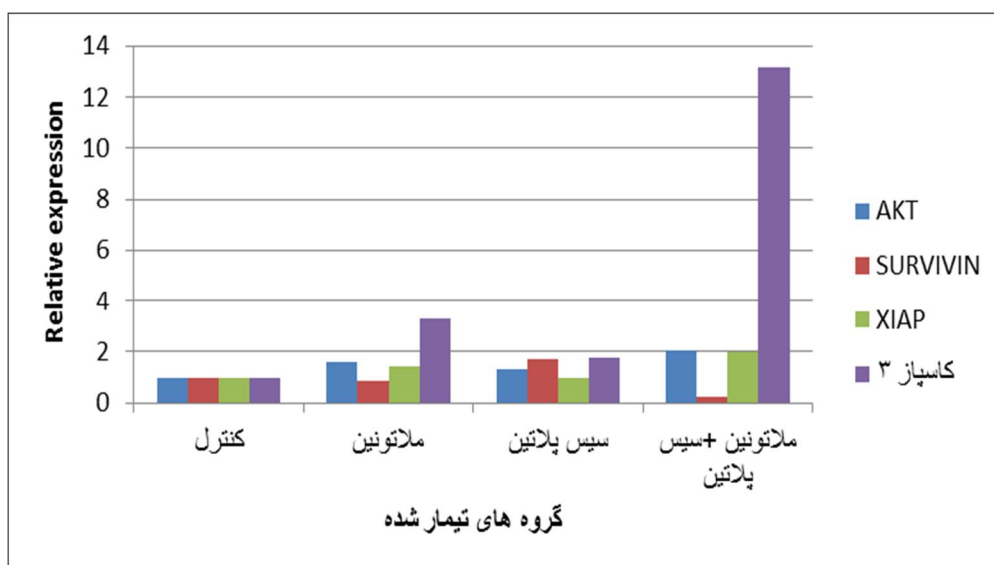
بررسی IC50 سلول‌های OVCAR3 در حضور سیس پلاتین و ملاتونین به صورت منفرد و ترکیبی در زمان‌های موردنظر.

مقادیر IC50 سیس پلاتین و ملاتونین در درمان منفرد پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به ترتیب در شکل ۳ نشان داده شده است. مقادیر IC50 سیس پلاتین به تنهایی ۱۲/۸ میکرومولار در ۲۴ ساعت، ۱۰ میکرومولار در ۴۸ ساعت و ۸/۷ میکرومولار در ۷۲ ساعت بود. مقادیر IC50 فقط برای ملاتونین ۴/۹ میکرومولار در ۲۴ ساعت، ۳ میکرومولار در ۴۸ ساعت و ۲/۳ میکرومولار در ۷۲ ساعت بود (شکل ۲).

برای ارزیابی حساسیت سلول OVCAR3 به سیس پلاتین در حضور ملاتونین، ما آزمایش MTT را در حضور مقادیر ثابت ملاتونین (۴ میکرومولار) با غلظت‌های مختلف سیس پلاتین بر روی سلول‌های OVCAR3 اجرا کردیم (شکل ۲). نتایج این بررسی نشان داد که مصرف هم‌زمان ملاتونین با سیس پلاتین به طور معنی‌داری مقادیر IC50 سیس پلاتین را به ترتیب به ۴/۱ میکرومولار، ۳/۸ میکرومولار و ۲/۲ میکرومولار در ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت در مقایسه با سیس پلاتین به تنهایی ($p < 0.05$) کاهش داد.



شکل (۲): مقایسه میانگین IC50 سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده در زمان‌های مختلف مقادیر به صورت Mean±SD نشان داده شده است.

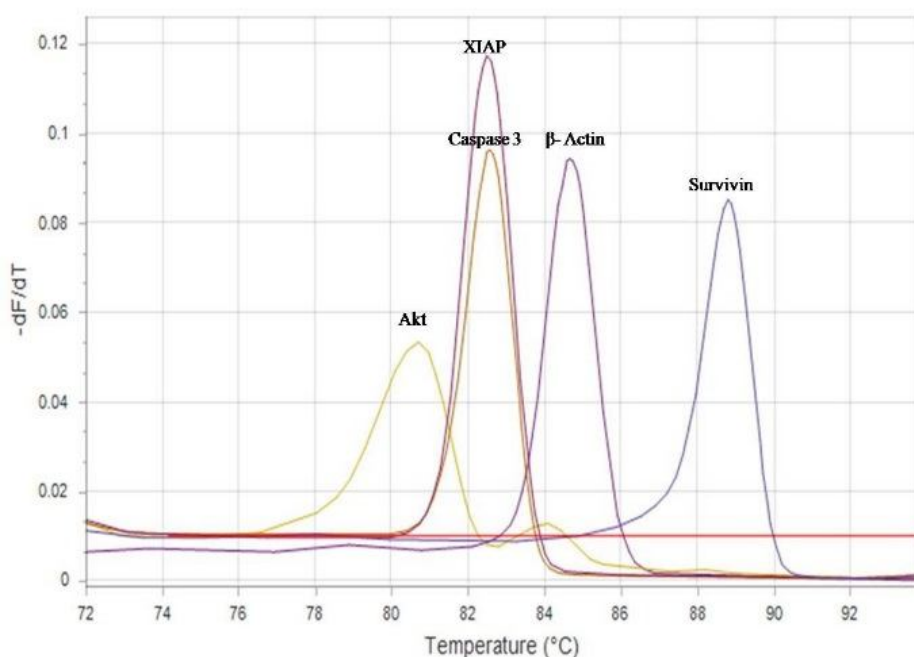


شکل (۳): بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در گروه‌های موردنظر

ارزیابی بیان ژن‌های کاسپاز ۳, Akt, Xiap, Survivin:

روند کاهشی نشان می‌دهد و این کاهش مرزی در گروه ترکیبی می‌باشد (جدول ۲). همچنین بیان ژن XIAP به‌عنوان یکی دیگر از ژن‌های مهارکننده آپوپتوز در گروه ترکیبی ملاتونین-سیس پلاتین، نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد که معنی‌دار نبود (جدول ۳). بیان ژن Akt به‌عنوان یکی از پروتئین‌های مهم در گروه ترکیبی ملاتونین-سیس پلاتین نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد که معنی‌دار نبود (جدول ۴). آنالیز بیان ژن‌ها به‌طور خلاصه در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج مربوط به منحنی ذوب در شکل شماره ۴ آورده شده است که نتایج نشان می‌دهد تکثیر به‌صورت اختصاصی صورت گرفته است.

بر اساس یافته‌های Real time PCR حاصل از این پژوهش بیان ژن کاسپاز ۳ به‌عنوان مهم‌ترین کاسپاز مؤثر افزایش معنی‌داری در گروه تیمار شده با ملاتونین و گروه ترکیبی ملاتونین-سیس پلاتین نسبت به گروه کنترل دارد و بیان نسبی ژن به ترتیب معادل ۳/۲۷۲ و ۱۳/۱۳۲ می‌باشد و در گروه سیس پلاتین تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). همچنین بیان ژن‌های مهارکننده آپوپتوز Survivin در گروه‌های ملاتونین، سیس پلاتین و گروه ترکیبی ملاتونین-سیس پلاتین نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۰/۸۴۱، ۱/۷۲۹ و ۰/۲۱۸ می‌باشد که در گروه منفرد ملاتونین و ترکیبی ملاتونین-سیس پلاتین بیان ژن



شکل (۴): منحنی ذوب اختصاصی ژن‌های مورد مطالعه

جدول (۱): آنالیز بیان ژن کاسپاز ۳

نتیجه	P(H1)	فاصله اطمینان	میانگین خطای	بیان نسبی ژن	کاسپاز-۳
		۹۵ درصد	استاندارد		
		(95%CI)	(Standard Error)		
افزایش	۰/۰۰۱	۵/۶۸۶-۳۱/۲۷۳	۱۶/۳۲۹	۱۳/۱۳۲	ملاتونین + سیس پلاتین
افزایش	۰/۰۰۱	۱/۵۳۷-۶/۹۶۴	۴/۲۵۰	۳/۲۷۲	ملاتونین
بدون تغییر معنی‌دار	۰/۶۵۳	۰/۳۲۸-۹/۵۱۴	۴/۹۲۱	۱/۷۶۵	سیس پلاتین

جدول (۲): آنالیز بیان ژن Survivin

نتیجه	P(H1)	فاصله اطمینان ۹۵ درصد (95%CI)	میانگین خطای استاندارد (Standard Error)	بیان نسبی ژن	Survivin
کاهش	۰/۰۵۶	۰/۲۱۸-۰/۲۱۸	۰/۲۱۸	۰/۲۱۸	ملاتونین + سیس پلاتین
بدون تغییر معنی دار	۰/۶۵۴	۰/۶۷-۱/۰۶۱	۰/۸	۰/۸۴۱	ملاتونین
بدون تغییر معنی دار	۰/۰۰۱	۱/۱۹۳-۲/۵۲۲	۱/۷۶۶	۱/۷۲۹	سیس پلاتین

جدول (۳): آنالیز بیان ژن Xiap

نتیجه	P(H1)	فاصله اطمینان ۹۵ درصد (95%CI)	میانگین خطای استاندارد (Standard Error)	بیان نسبی ژن	پروتئین مهارکننده آپوپتوز وابسته به ایکس Xiap
افزایش	۰/۰۵۲	۱/۹۸۶-۱/۹۸۶	۱/۹۸	۱/۹۸۶	ملاتونین + سیس پلاتین
بدون تغییر معنی دار	۰/۰۱۹	۱/۴۲۴-۱/۴۲۴	۱/۴۲	۱/۴۲۴	ملاتونین
بدون تغییر معنی دار	۰/۶۶۹	۰/۶۶۷-۱/۴۰۹	۰/۹۸۷	۰/۹۶۶	سیس پلاتین

جدول (۴): آنالیز بیان ژن Akt

نتیجه	P(H1)	فاصله اطمینان ۹۵ درصد (95%CI)	میانگین خطای استاندارد (Standard Error)	بیان نسبی ژن	Akt
افزایش	۰/۰۵۴	۲/۰۴۲-۲/۰۴۲	۲/۰۴۲	۲/۰۴	ملاتونین + سیس پلاتین
بدون تغییر معنی دار	۰/۰۷۲	۱/۱۱۴-۲/۳۵۳	۱/۶۴	۱/۶۱	ملاتونین
بدون تغییر معنی دار	۰/۰۳۰	۱/۳۴۷-۱/۳۴۷	۱/۳۴	۱/۳۴	سیس پلاتین

بحث و نتیجه‌گیری

استراتژی‌های درمانی کنونی برای سرطان تخمدان اغلب محدود است و شواهد نشان داده است که شیمی‌درمانی به‌تنهایی برای کاهش سلول‌های تومور مؤثر نیست. بنابراین، یافتن گزینه‌های درمانی جدید با عوارض جانبی مورد توجه قرار گرفته است. ملاتونین به‌عنوان یک مولکول طبیعی با خواص ضد سرطانی بالقوه و کارآیی آن در کاهش عوارض جانبی درمان‌های فعلی، ممکن است گزینه مناسبی در درمان سرطان تخمدان باشد.

در این مطالعه مشاهده کردیم ملاتونین وابسته به دوز و زمان عمل می‌کند و باعث کاهش درصد زیستایی سلول‌های سرطانی

مورد مطالعه می‌شود و مؤثرترین تأثیر در غلظت ۴ میکرو مولار ملاتونین مشاهده شد. نتایج مطالعات متعددی نشان داده است اثر ضد توموری ملاتونین ممکن است متفاوت باشد و نه تنها به غلظت مورد استفاده، بلکه به نوع سلول‌ها و شرایط کشت نیز بستگی دارد (۱۹). ملاتونین بر رشد سلولی در دوزهای پایین تأثیر نمی‌گذارد، برعکس دوزهای بالا، باعث کاهش قابل توجهی در سنتز DNA می‌شود (۲۰). در این مطالعه ما ترکیب ملاتونین-سیس پلاتین را به‌عنوان یک درمان جدید برای درمان سرطان تخمدان در رده سلولی OVCAR3 ارزیابی کردیم و مشاهده کردیم ملاتونین باعث کاهش مصرف سیس پلاتین به‌اندازه یک‌سوم شده است و در نتیجه

۷ و ۹ تأثیر می‌گذارد و به این معنی است که مهارکننده کاسپازها است (۲۸).

در این مطالعه ما بیان ژن‌های مهارکننده آپوپتوز Xiap و Survivin بررسی کردیم و بیان ژن Survivin در گروه تیمار شده با ملاتونین+ سیس پلاتین کاهش نسبی ۰/۲۱۸ مشاهده شد ولی در سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار نبود.

XIAP یک عامل کلیدی در ایجاد بدخیمی و مقاومت در برابر درمان است که با اختلال در آپوپتوز سلولی و تکثیر غیرطبیعی همراه است. واضح است که XIAP یکی از کارآمدترین مهارکننده‌های کاسپاز، و از اعضای خانواده مهارکننده‌های آپوپتوز می‌باشد و مهار آپوپتوز توسط XIAP عمدتاً از طریق اتصال به کاسپاز آغازگر ۹- و کاسپاز مؤثر ۳- و کاسپاز ۷- هماهنگ می‌شود (۲۹).

همچنین مسیر سیگنالینگ PI3K نقش تنظیمی مهمی در تنظیم چرخه سلولی، آپوپتوز، ترمیم DNA، فرایند پیری، آنژیوژنز، متابولیسم سلولی و تحرک دارد. فعال‌سازی این مسیر موجب افزایش تکثیر سلولی، بقا، تحرک و همچنین آنژیوژنز که مسئول تمام جنبه‌های مهم تومورزایی است می‌شود. به همین دلیل بسیاری از شرکت‌های دارویی و آزمایشگاه‌های تحقیقاتی به‌طور فعال در حال توسعه مهارکننده‌های PI3K و دیگر اجزای کلیدی در این مسیر سیگنالینگ هستند (۳۰). یکی از اثرات ضد تکثیری ملاتونین غیرفعال کردن مسیر Akt می‌باشد (۳۱). Akt یکی دیگر از پروتئین‌های مهم است که مولکول‌های سیگنالینگ کلیدی را که در کنترل تکثیر سلولی، اندازه، تمایز، بقا و آپوپتوز نقش دارد را فسفریله می‌کند (۳۲). ملاتونین به‌طور قابل‌توجهی نسبت کل Akt-P / Akt را کاهش می‌دهد (۳۳).

مطالعات قبلی نشان داده شده که سیس پلاتین آپوپتوز را به‌صورت وابسته به دوز در رده‌های سلولی حساس (A2780-s)، اما نه در رده‌های سلولی مقاوم (A2780-cp) می‌تواند ایجاد می‌کند. افزایش آپوپتوز با کاهش محتوای پروتئین XIAP در سطح mRNA همراه نیست، و نشان می‌دهد سیس پلاتین به‌جای تنظیم بیان ژن، این عامل ضد آپوپتوز را در سطح پروتئین تنظیم می‌کند. در حضور مهارکننده PI 3-K (LY294002)، بیان بیش‌ازحد XIAP نتوانست آپوپتوز ناشی از سیس پلاتین را مسدود کرده و فسفوریلاسیون Akt را القا کند، که نشان می‌دهد که محل عمل XIAP بالادست Akt در این مسیر بقای سلول است (۳۴). سیس پلاتین تأثیری بر سطح mRNA، XIAP، Akt و PI 3-K (p85) ندارد (۳۴).

XIAP و Akt از نظر عملکرد در حفظ هموستاز بین مرگ سلولی و تکثیر سلولی مرتبط هستند (۳۵). XIAP ممکن است یک پیوند اصلی بین مسیر سیگنالینگ آپوپتوز سلولی و مسیر بقای

باعث کاهش عوارض جانبی سیس پلاتین می‌گردد. از یافته‌های این مطالعه می‌توان برای مدیریت و درمان بیماران مبتلا به سرطان تخمدان استفاده نمود.

هدف از شیمی‌درمانی ایجاد آپوپتوز در سلول می‌باشد اگرچه ملاتونین سلول‌های طبیعی را از آپوپتوز محافظت می‌کند ولی مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی ترویج می‌دهد. ملاتونین باعث افزایش فعالیت سیتوتوکسیک عوامل شیمی‌درمانی می‌شود همچنین ملاتونین همراه با سیس پلاتین نسبت سلول‌هایی را که وارد آپوپتوز می‌شوند به میزان قابل‌توجهی افزایش می‌دهد (۲۱). ملاتونین از طریق مکانیسم‌هایی نظیر فعال‌سازی مسیرهای مرتبط با p53، و فعال شدن مسیرهای آپوپتوتیک داخلی و خارجی باعث القاء مسیر آپوپتوز می‌شود. گزارش شده است که ملاتونین باعث فعال شدن کاسپاز ۳ و ۹ می‌شود (۲۲).

از روش‌های بالقوه درمان آپوپتوزی شامل: فعال شدن کاسپازها و پلی (ADP-ریبوز) پلیمراز (PARP)، مهار PKB / Akt، مهار خانواده پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز (IAP) و فعال شدن پروتئین Bcl-2 می‌باشد (۲۳).

کاسپازها یکی از عوامل مهم در شروع و اجرای آپوپتوز هستند و بر این باورند که سطوح پایین یا اختلال در عملکرد کاسپاز مؤثر ممکن است آپوپتوز را کاهش داده و سرطان‌زایی را تسهیل کند (۲۴). در پژوهش حاضر بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه ملاتونین منفرد و در گروه ترکیبی ملاتونین-سیس پلاتین افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل نشان داد و بیشترین افزایش در گروه ترکیبی ملاتونین-سیس پلاتین مشاهده شد.

خانواده پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های آپوپتوز هستند که مسیرهای ذاتی و بیرونی را تنظیم می‌کنند. هشت عضو از این خانواده گزارش شده‌اند که پروتئین مهارکننده آپوپتوزی مرتبط با XIAP و Survivin متعلق به این خانواده می‌باشد (۲۵).

Survivin به‌عنوان یک پروتئین دوام‌مندی است که می‌تواند تکثیر سلولی را تنظیم کرده و مرگ سلولی آپوپتوز را سرکوب کند تولید پروتئین Survivin در بسیاری از تومورهای انسانی و همچنین بافت‌های جنینی افزایش دارد ولی در سلول‌های کاملاً تمایز یافته و بالغ اصلاً دیده نمی‌شود (۲۶). هدف قرار دادن این مولکول‌های ضد آپوپتوز ممکن است یک پتانسیل درمانی برای درمان سرطان تخمدان ایجاد کند. فن و همکاران نشان دادند که ملاتونین رشد سلول‌های HepG2 و SMMC-7721 را به‌طور قابل‌توجهی مهار می‌کند و باعث پیشرفت آپوپتوز به‌تنهایی از طریق کاهش بیان Survivin و XIAP می‌شود اما بر بیان cIAP-1 و cIAP-2 تأثیر نمی‌گذارد (۲۷). Survivin بر روی کاسپازهای ۳،

سلول‌های OVCAR3 نشان می‌دهد با مصرف ملاتونین در غلظت مؤثره سلول‌های OVCAR3 به سیس پلاتین حساسیت بیشتری پیدا می‌کند و می‌تواند برای مدیریت بیماران مبتلا به سرطان تخمدان و نیز کاهش عوارض جانبی دارویی استفاده شود.

تعارض در منافع

ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه افرادی که ما را در اجرای این مطالعه یاری نمودند سپاسگزاری می‌گردد.

سلول می‌باشد. هدف قرار دادن XIAP ممکن است هم‌زمان آپوپتوز و تکثیر سلولی را تحت تأثیر قرار دهد (۳۶). که در این مطالعه نیز در گروه تیمار شده با سیس پلاتین تغییر معنی‌داری در ژن Xiap و Akt مشاهده نشد.

بر اساس یافته‌های ما درمان ترکیبی ملاتونین-سیس پلاتین باعث افزایش چشمگیری در بیان کاسپاز ۳ (با اختلاف معنی‌دار) و کاهش بیان در ژن Survivin (اختلاف مرزی) شد و این تغییرات در بیان ژن‌ها باعث افزایش حساسیت سلول‌های OVCAR3 به سیس پلاتین و شروع مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی می‌شود. طبق داده‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه تغییری در بیان ژن‌های Xiap و Akt مشاهده نشد و بهتر است برای تأیید این مطلب بیان پروتئین این ژن‌ها نیز بررسی شود. یافته‌های این مطالعه در

References:

- Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. *Ann Oncol* 2009; 20(3): 556-63.
- Arab M, Khayamzadeh M, Tehranian A, Tabatabaefar M, Hosseini M, Anbiaee R, et al. Incidence rate of ovarian cancer in Iran in comparison with developed countries. *Indian J Cancer* 2010; 47(3): 322-7.
- Lalwani N, Prasad SR, Vikram R, Shanbhogue AK, Huettner PC, Fasih N. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. *Radiographics* 2011; 31(3):625-46.
- Tortolero-Luna G, Mitchell MF. Epidemiology of ovarian cancer. *J Cell Biochem Suppl* 1995; 23: 200-7.
- Kim HJ, Oh GS, Lee JH, Lyu AR, Ji HM, Lee SH, et al. Cisplatin ototoxicity involves cytokines and STAT6 signaling network. *Cell Res* 2011; 21(6): 944-56.
- Mueller S, Schittenhelm M, Honecker F, Malenke E, Lauber K, Wesselborg S, et al. Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin in vitro. *Int J Oncol* 2006; 29(2): 471-9.
- Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014; 740: 364-78.
- Maiti AK. Gene network analysis of oxidative stress-mediated drug sensitivity in resistant ovarian carcinoma cells. *Pharmacogenomics J* 2010; 10(2):94-104.
- Ayyagari VN, Hsieh TH, Diaz-Sylvester PL, Brard L. Evaluation of the cytotoxicity of the Bithionol-cisplatin combination in a panel of human ovarian cancer cell lines. *BMC cancer* 2017; 17(1): 1-5.
- Lambert HE, Gregory WM, Nelstrop AE, Rustin GJ. Long-term survival in 463 women treated with platinum analogs for advanced epithelial carcinoma of the ovary: life expectancy compared to women of an age-matched normal population. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14(5): 772-8.
- Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12(2):151-80.
- Fan LL, Sun GP, Wei W, Wang ZG, Ge L, Fu WZ, et al. Melatonin and doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2010; 16(12):1473-81.

13. Altun A, Ugur-Altun B. Melatonin: Therapeutic and clinical utilization. *Int J Clin Pract* 2007; 61(5): 835-45.
14. Bojková B, Kubatka P, Qaradakhi T, Zulli A, Kajo K. Melatonin May Increase Anticancer Potential of Pleiotropic Drugs. *Int J Mol Sci* 2018; 19(12):3910.
15. Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem* 2010; 36: 4462-81.
16. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer* 2015; 14(1): 48.
17. Troy CM, Jean YY. Caspases: therapeutic targets in neurologic disease. *Neurotherapeutics* 2015; 12: 42-8.
18. Brady SW, Zhang J, Tsai MH, Yu D. PI3K-independent mTOR activation pro-Motes lapatinib resistance and IAP expression that can be effectively reversed by mTOR and Hsp90 inhibition. *Cancer Biol Ther* 2015; 16: 402-11.
19. Rodriguez C, Martín V, Herrera F, Garcia-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Casado-Zapico S, et al. Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells. *Int J Mol Sci* 2013; 14(4):6597-613.
20. Carpentieri A, De Barboza GD, Areco V, López MP, De Talamoni NT. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res* 2012; 65(4):437-44.
21. Pariente R, Pariente JA, Rodríguez AB, Espino J. Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *J Pineal Res* 2016; 60(1):55-64
22. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2002; 2(2):113-32.
23. Susan Elmore. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516.
24. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 87.
25. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 2007; 12: 1543-68.
26. Jaiswal PK, Goel A, Goel A. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res* 2015; 141(4): 389-97.
27. Fan L, Sun G, Ma T, Zhong F, Wei W. Melatonin overcomes apoptosis resistance in human hepatocellular carcinoma by targeting surviving and XIAP. *J Pineal Res* 2013; 55(2):174-83.
28. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 2007; 12: 1543-68.
29. Danson S, Dean E, Dive C, Ranson M. IAPs as a target for anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7:785-94.
30. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(8): 627-44.
31. Amornphimoltham P, Patel V, Sodhi A, Nikitakis NG, Sauk JJ, Sausville EA, et al. Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 2005; 65(21):9953-61.
32. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA Advances in protein kinase B surviving: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 233-42.
33. Proietti S, Cucina A, D'Anselmi F, Dinicola S, Pasqualato A, Lisi E, et al. Melatonin and vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGFbeta-1-dependent growth inhibition of breast cancer cells. *J Pineal Res* 2011; 50(2):150-8.
34. Asselin E, Mills GB, Tsang BK. XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian

- epithelial cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61(5):1862-8.
35. Gagnon V, Van Themsche C, Turner S, Leblanc V, Asselin E. Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* 2008; 13:259-71.
36. Jiang C, Yi XP, Shen H, Li YX. Targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits pancreatic cancer cell growth through p-Akt depletion. *World J Gastroenterol* 2012; 18(23):2956-65.

AN EVALUATION OF MELATONIN INFLUENCE ON SENSITIVITY TO CISPLATIN THROUGH EXPRESSION OF SURVIVIN, XIAP, CASPASE-3, AND AKT GENES IN OVCAR3 OVARIAN CANCER CELLS

Sahar Baghal-Sadriforush¹, Morteza Bagheri^{2*}, Isa Abdi Rad³, Fattah Sotoodehnejadnematlahi⁴

Received: 04 August, 2021; Accepted: 23 October, 2021

Abstract

Background & Aims: Ovarian cancer is the seventh most common cancer and the fifth most common cause of death among women worldwide. Therefore, it is necessary to find new drugs that increase the effectiveness of chemotherapy drugs and the possibility of using them in lower doses, which leads to a reduction in side effects. The aim of this study was to evaluate the effect of melatonin on the expression of XIAP, Survivin, AKT, and caspase 3 genes in order to increase cisplatin sensitivity in cultured OVCAR3 cells.

Materials & Methods: In this study, OVCAR3 cells with different concentrations of melatonin (0.001, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 μ M) and different concentrations of cisplatin (0.001, 0.937, 1.875, 3.75, 7.5, 15 μ M) were cultivated at 24, 48, and 72 hours. Then, cytotoxicity was assessed by MTT assay. Real-time PCR test was performed to evaluate the relative gene expression level of XIAP, Survivin, AKT, and caspase 3 genes in control, melatonin, cisplatin, and a combination of melatonin and cisplatin groups.

Results: The results of this study showed that melatonin inhibits the proliferation of cultured OVCAR3 cells based on a dose and time-dependent mechanism. The results of analysis showed that there is a significant increase in the gene expression level of caspase 3 regarding melatonin and melatonin-cisplatin groups. Also, the expression of Survivin apoptosis inhibitor gene in melatonin-cisplatin combination group decreased (borderline difference). There were no significant changes in tested groups regarding relative gene expression of Xiap and Akt.

Conclusion: The findings of this study show that OVCAR3 cells became more sensitive to cisplatin in the presence of melatonin. It can be used to manage patients with ovarian cancer.

Keywords: Melatonin, Cisplatin, OVCAR3 cell line, Caspase 3, XIAP, Survivin, AKT

Address: Cellular and Molecular Medicine Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Tel: +984431988000

E-mail: mortezabagheri@umsu.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(7): 536 ISSN: 2717-008X

¹ Department of biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Cellular and Molecular Research Center, Cellular and Molecular Medicine Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)

³ Cellular and Molecular Research Center, Cellular and Molecular Medicine Institute, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

⁴ Department of biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran