دانشگاه خوارزمی
دانشکده علوم زیستی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد سلولی- تکوینی جانوری

اثر زهر زنبور عسل و L- آسکوربیک اسید (ویتامینC) بر القاء تمایز رده‌ی سلولی سرطانی پرومیلوسیتی HL-60

استاد راهنما
دکتر هما محسنی‌کوچصفهانی

استاد مشاور
دکتر محمد نبیونی

دانشجو
سارا میرسپاسی

اسفندماه ۱۳۹۰

اثر زهر زنبور عسل و L- آسکوربیک اسید (ویتامین C) بر القاء تمایز رده ی سلولی سرطانی پرومیلوسیتی HL-60.

چکیده:

لوسمی حاد پرومیلوسیتی یک‌ی از انواع لوسمی میلوئیدی است که سلول ها در مرحله پرومیلوسیت تمایز میلوئیدی متوقف شده‌اند. امروزه برای درمان سرطان غیر از شیمی درمانی ترکیبی، از روش تمایز درمانی توسط عوامل تمایز دهنده نیز استفاده می شود. L- آسکوربیک اسید موجب مهار تکثیر و القاء تمایز بر روی رده سلولی HL-60 می‌گردد. چون استفاده از غلظت بالای تمایز دهنده به دلیل اثرات جانبی امکان پذیر نیست، لذا سعی می شود با استفاده از ترکیباتی قدرت تمایزی آنها را افزایش داد. با توجه به اثرات ضد تکثیری و ضد سرطانی زهر زنبور عسل، در این مطالعه، اثر آن برعملکرد تمایزی L- آسکوربیک اسید بررسی شد . پس از تعیین غلظت های سمی و غیرسمی L- آسکوربیک اسید و زهر زنبور عسل بر روی سلول های HL-60 توسط شمارش سلولی با تریپان بلو و روش MTT، از روش رنگ آمیزی رایت- گیمسا و تست NBT جهت بررسی تمایز استفاده شد . جهت تحلیل داده ها از نرم افزار Instate 3 و آزمون آماری one-way ANOVA استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان می دهد که زهر زنبور عسل در الگویی وابسته به دوز و زمان بر روی سلول های HL-60 موثر بوده و در غلظت ۲/۵ µg/ml در طول ۷۲ ساعت باعث مهار تکثیر بر روی سلول های HL-60 می‌گردد و اثر تمایزی بر روی این سلول ها ندارد. L- آسکوربیک اسید در غلظت ۰/۰۱mM باعث مهار تکثیر و القاء تمایز بسمت دودمان گرانولوسیت شد و این تمایز القاء شده با هم افزایی با غلظت مهار تکثیری زهر زنبور عسل بطور چشمگیری افزایش یافت . بر پایه این نتایج پیشنهاد می شود که زهر زنبور عسل درغلظت‌های غیر سمی می‌تواند توان تمایزی L- آسکوربیک اسید بر روی سلول‌های HL-60 را افزایش دهد.

کلمات کلیدی: L- آسکوربیک اسید، زهر زنبور عسل، تمایز درمانی، رده‌ی سلول سرطانی پرومیلوسیتی HL-60.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول

مقدمه ۱

۱- ۱- سرطان ۲

۱- ۲- سلول‌های سرطانی بنیادی ۳

۱- ۳- تمایز درمانی ۴

۱- ۴- تمایز گرانولوسیت‌ها ۵

۱- ۵- لوسمی حاد پرومیلوسیتی ۶

۱- ۶- رده‌ی سلولی HL-60 ..... ۸

۱- ۷- مسیرهای سیگنالینگ دخیل در تمایز رده سلولی HL-60 ..... ۱۱

۱- ۷- ۱- مهار کننده‌های پروتئین کینازهای وابسته به سیکلین (CKI); p21 وp27 ..... ۱۱

۱- ۷- ۲- پروتئین c-Myc ۱۲

۱- ۷- ۳- پروتئین کیناز C (PKC) ۱۳

۱- ۸- تمایز و آپوپتوز ۱۴

۱- ۹- زهر زنبور عسل ۱۵

۱- ۱۰- ترکیبات موجود در زهر زنبور عسل ۱۵

۱- ۱۱- زنبور درمانی ۱۸

۱- ۱۲- L- آسکوربیک اسید (ویتامین C) ۲۱

۱- ۱۳- جذب و انتقال L- آسکوربیک اسید ۲۳

۱- ۱۴- اعمال فیزیولوژیک L- آسکوربیک اسید ۲۴

۱- ۱۵- فرضیه و اهداف تحقیق ۳۰

فصل دوم

مواد و روش کار ۳۲
۱- ۲- طرح کلی کار ۳۳
۲- ۲- مواد و وسایل مورد نیاز ۳۴
۳- ۲- تهیهٔ محلول‌های مورد نیاز ۳۸
۱- ۳- ۲- تهیهٔ محیط کشت RPMI-1640 ..... ۳۸
۲- ۳- ۲- تهیه محلول PBS ۳۹
۳- ۳- ۲- تهیه محلول اولیه L- آسکوربیک اسید ۳۹
۴- ۳- ۲: تهیه محلول اولیه زهر زنبور عسل ۳۹
۵- ۳- ۲- تهیهٔ محلول MTT ۳۹
۶- ۳- ۲: تهیهٔ محلول NBT ۰/۱ درصد ۴۰
۷- ۳- ۲- تهیهٔ محلول PMA ۴۰
۸- ۳- ۲- تهیهٔ رنگ رایت- گیمسا ۴۰
۹- ۳- ۲- تهیهٔ محلول تریپان بلو ۰/۴ درصد ۴۱
۱۰- ۳- ۲- تهیه محلول معرف بردفورد ۴۱
۱۱- ۳- ۲- تهیه محلول استاندارد BSA ۴۱
۴- ۲- روش‌ها ۴۱
۱- ۴- ۲- پاساژ سلولی ۴۱
۲- ۴- ۲- تعویض محیط کشت ۴۲
۳- ۴- ۲: روش شمارش سلو لی و تعیین درصد زنده بودن سلول ها با استفاده از تریپان بلو ۴۳
۴- ۴- ۲- منجمد کردن سلول‌ها ۴۵
۵- ۴- ۲- ذوب کردن سلول‌ها ۴۶
۶- ۴- ۲- سنجش میزان بقاء سلولی با روش MTT ۴۷

۷- ۴- ۲- رنگ آمیزی رایت- گیمسا ۴۹

۸- ۴- ۲- آزمون احیاء NBT ۴۹

۹- ۴- ۲- بررسی محتوای غلظت کل پروتئین موجود در عصاره سیتوزولی به روش بردفورد..... ۵۰

۱۰- ۴- ۲- بررسی میزان بیان کاسپاز۳ با روش رنگ سنجی ۵۱

۱۱- ۴- ۲- رنگ آمیزی DAPI ۵۲

۱۲- ۴- ۲- آنالیز آماری ۵۳

فصل سوم

نتایج ۵۴

۱- ۳- بررسی مورفولوژی ظاهری سلول‌های HL-60 قبل از تیمار ۵۵

۲- ۳- اثر زهر زنبور عسل بر روی تکثیر سلول‌های HL-60 ..... ۵۵

۳- ۳- اثر L- آسکوربیک اسید بر روی تکثیر سلول های HL-60 ..... ۶۱

۴- ۳- نتایج حاصل از هم افزایی زهر زنبور عسل و L- آسکوربیک اسید بر روی تکثیر سلول های HL-60..... ۶۵

۵- ۳- مورفولوژی سلول HL-60 در اثر القاء آپوپتوز ۶۸

۶- ۳- بررسی مورفولوژی و تمایز سلول‌های HL-60 توسط رنگ آمیزی رایت- گیمسا ۷۰

۷- ۳- اثر زهر زنبور عسل بر تمایز سلول‌ه‌ای HL-60 ..... ۷۱

۸- ۳- اثر L- آسکوربیک اسید بر تمایز سلول‌های HL-60 ..... ۷۱

۹- ۳- نتایج حاصل از هم افزایی زهر زنبو ر عسل و L- آسکوربیک اسید بر تمایز سلول های HL-60 ..... ۷۵

۱۰- ۳- نتایج حاصل از بررسی محتوای غلظت کل پروتئین مو جود در عصاره سیتوزولی گروه های کنترل و تیمار ۷۷

۱۱- ۳- نتایج حاصل از بررسی میزان بیان کاسپاز ۳ در سلول‌های HL-60 پس از تیمار با زهر زنبور، L- آسکوربیک اسید به تنهایی و بصورت هم زمان ۷۸

۱۲- ۳- نتایج حاصل از رنگ آمیزی سلول‌های HL-60 با رنگ DAPI ۸۱

فصل چهارم

بحث ونتیجه گیری..... ۸۴

۱- ۴- بحث ونتیجه‌گیری ۸۵

۲- ۴- نتیجه‌گیری کلی ۹۷

۳- ۴- پیشنهادات ۹۸

فصل پنجم

۱- ۵- منابع ۹۹

۱- ۱- سرطان:

سلول های سالم و طبیعی در بدن به دقت و با نظم خاص و بسته به نیاز بدن تقسیم می شوند. در موجودات جوان به خاطر رشد و نمو بدن تکثیر سلول بر مرگ آن غلبه دارد. درحالی که در موجود بالغ بین فرآیند تولد و مرگ سلول تعادل برقرار است. هرگاه سیستم کنترل سلول دچار مشکل شود، سلول بی رویه و بدون توجه به نیاز بدن شروع به رشد و تقسیم می‌کند. تجمع سلولی حاصل از تقسیم بی‌رویه یک نوع سلول را توده سرطانی یا تومور نامند که اگر توانایی انتشار به سایر بافت ها و اندام ها را داشته باشد، بیماری سرطان را ایجاد خواهد کرد . سلول‌های سرطانی به بافت های مجاور حمله کرده و آنها را تخریب می کنند و در نقاط دور دست کانون های ثانویه (متاستاز) ایجاد می کنند. سرطان حاصل جهش ژنی است، ولی دو تفاوت عمده و کلیدی بین سرطان و سایر بیماری ها وجود دارد. اول آنکه سرطان عمدتاً حاصل جهش ژنی در سلول سوماتیک است، در حالیکه بیماری های ژنتیکی از جهش در سلول زاینده حاصل می شوند. برخی از افراد به طور ارثی حامل جهش هایی هستند که آنها را مستعد ابتلا به سرطان می کند و بخشی از قضیه ارثی بودن سرطان مربوط به این جهش ها است. تفاوت دوم این است که برخلاف جهش های منتهی به بیماری ژنتیکی یک جهش ژنی برای ایجاد سرطان کافی نیست (Hanahan & Weinberg., 2011; Opdenakker & Damme., 2004). جهش‌ها باعث افزایش فعالیت انکوژن ها (ras و c-myc)، کاهش فعالیت ژن های سرکوب کننده تومور (PTEN و P53)و هم چنین کاهش فعالیت ژن هایی که در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نقش دارند (Caspases و Bax) می-شوند (Leszcyniecka et al., 2001; Kitada et al., 2002). سرطان فرآیندی از تغییرات سلولی است که باعث می‌شود سلول بیشتر خودمختار شود . درمان سرطان شامل مجموعه ای از راهکار ها برای تخریب، کنترل و یا برداشتن بافت سرطانی اولیه یا پشرفته است (Kitada et al., 2002).

۲- ۱- سلول‌های سرطانی بنیادی (Cancer Stem Cells):

مشکل اصلی در تحقیقات سرطان شناسایی سلول هایی است که قابلیت شروع و حفظ رشد تومور را دارند . مجموعه‌ای از سلول‌ها که سلول‌های بنیادی سرطانی Cancer Stem Cells (CSCs) نامیده می شوند، مسئول حفظ خاصیت سرطانی تومور هستند. سلول‌های سرطانی شامل نسبتی از سلول های بنیادی سرطانی هستند. در واقع در داخل جمعیت سلول‌های سرطانی زیر گروهی از این سلول ها بعنوان سلول‌های بنیادی تجدید شونده عمل می‌کنند. نقشCSCs برای برخی سرطان‌ها مشخص شده‌است ولی منشاء آنها هنوز مشخص نیست . برنامه‌های ژنتیکی کنترل خود نوسازی و تمایز یک موضوع کلیدی در منشاء CSCs است. با اینکه وجود CSCs از ۵۰ سال قبل مطرح شد، ولی بررسی خصوصیات

آنها در ۱۵سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است (Wang et al., 2005; Li & Neaves., 2006).

سلول‌های سرطانی بنیادی در بسیاری از تومورها از جمله تومورهای پروستات، مغز، تخمدان و سینه شناسایی شده اند و تنها ۱ تا ۲ درصد از جمعیت سلول های تومور را تشکیل می دهند (Gil et al., 2008). بررسی مسیرهای سرطان‌زایی از شروع تا متاستاز باید بر روی شناسایی خصوصیات سلول هایی باشد که سرطان را شروع می کنند و درمان برای موثر بودن و جلوگیری از بازگشت سرطان باید با هدف تأثیر بر روی این سلول ها باشد. بررسی این سلول ها می‌تواند در رأس مطالعه سیستم های سرطانی باشد (Wang et al., 2005). خود نوسازی و توان تمایز و مقاومت به آپوپتوز یک خصوصیت سلول بنیادی است و شاید مهمترین خصوصیت یک سلول بنیادی خاصیت خود نوسازی آن است که این خاصیت بین سلول‌های سرطانی و سلول‌های بنیادی مشترک است (Reya et al., 2001; Gil et al., 2008).

۳- ۱- تمایز درمانی:

امروزه علم تکوینی راهکارهایی را برای بهبودی و تثبیت درمان ارائه می دهد **(Burnett & Eden., 1997)**. روش‌های درمانی مختلفی برای ریشه‌کن نمودن سرطان وجود دارد که شیمی درمانی اصلی‌ترین روش محسوب می شود. عوارض جانبی شدید داروهای شیمی درمانی بر روی بافت‌های سالم وهم چنین مقاوم شدن برخی سلول های سرطانی به داروهای شیمیایی، درمان سرطان را مشکل می کند. هم چنین بسیاری از درمان های سرطان مخصوصاً شیمی درمانی و رادیوتراپی، نکروز و مسیرهای سیگنالینگ التهابی را القاء می کنند. امروزه برای درمان سرطان از روش درمانی دیگری تحت عنوان تمایز درمانی نیز استفاده می شود **(Burnett & Eden., 1997**; Pae et al., 2001; Opdenakker & Damme., 2004).

تمایز یک مرحله از تخصیص یافتگی عمل سلول و نهایی شدن سرنوشت و کسب فنوتیپ بالغ و از دست دادن خصوصیات سلول نابالغ مثل خود نوسازی است (Wang et al., 2005). با توجه به اینکه سلول‌های سرطانی نوعی سلول بنیادی محسوب می گردند مهار تکثیر و القاء تمایز در آنها مورد توجه قرار گرفته‌است که امروزه تحت عنوان تمایز درمانی در درمان سرطان نامیده می‌شود. نظریه تمایز درمانی اولین بار در سال ۱۹۸۷ توسط Sach مطرح شد. وی نشان داد که سلول های میلوئیدی M1 موش در صورت مواجه با اینترکولین- ۶ به مونوسیت و گرانولوسیت تمایز می یابند (Sharon et al., 1999). استفاده از روندهای دخیل در طی رشد و نمو طبیعی سلول و تمایز می تواند برای برگشت

سلول‌های سرطانی نابالغ به مسیر عادی مفید باشد. با استفاده از ترکیباتی به تنهایی و یا ترکیبی می توان تغییراتی که در برنامه‌های نرمال کنترل رشد و تمایز سلول های سرطانی ایجاد شده است را اصلاح کرد و سلول های سرطانی را به مسیر عادی برگرداند. سلول های سرطانی تمایز یافته تکثیرشان مهار می شود و دچار مرگ سلولی برنامه ریزی شده می - شوند (Leszcyniecka et al., 2001; Spira & Carducci., 2003).

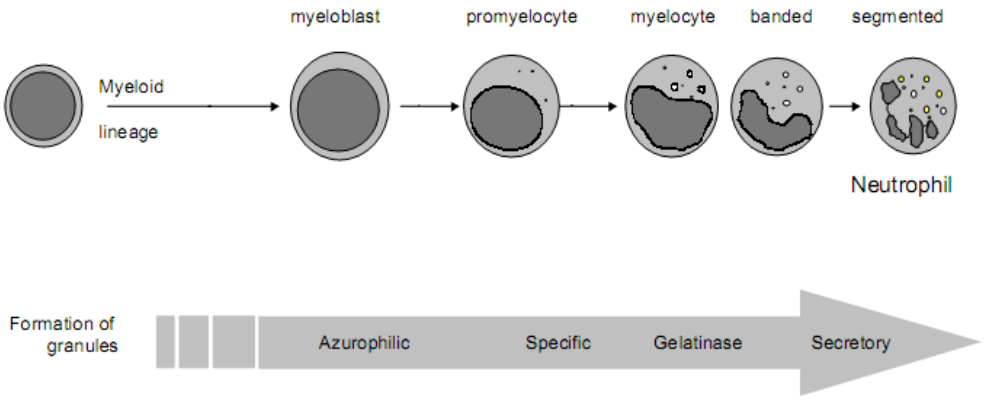
هدف تمایز درمانی القاء مهار تکثیر و بیان خصوصیات سلول سالم است (Wang et al., 1997). درسال ۱۹۸۶، Munker و همکاران، مهار تکثیر و القاء تمایز توسط ترکیبات ویتامین D3 بر روی رده های سلولی M1, HEL, THP, HL-60 و U937 بررسی کردند

(Munker et al., 1986). در سال ۱۹۹۰، Pollock و همکاران، تحت تاثیر یکسری فاکتورهای رشد و نوروتروفیک تکثیر سلولی را در سلول‌های سرطانی PC12 متوقف و علائم تمایز به نورون های شبه سمپاتی‌کی را ایجاد کردند (Pollock et al., 1990).

۴-۱- تمایز گرانولوسیت‌ها:

سلول‌های پروژنیتور خونی موجود در مغز استخوان می توانند به سرنوشت های میلوئیدی و لنفوئیدی تمایز پیدا کنند. سلول‌های لنفوئیدی شامل T و B سل‌ها هستند. دودمان‌های میلوئیدی شامل ماکروفاژها، مونوسیت ها و گرانولوسیت‌ها هستند. سلول‌های پروژنیتور می‌توانند به یکی از دودمان‌ها متعهدشوند و وارد مسیرهای تکثیر و تمایز سلولی گردند

(Verploegen., 2002; Miller & Koeffler., 1986). بر اساس شکل هسته و شکل گیری گرانول‌های سیتوپلاسمی، تمایز نوتروفیل‌ها را می‌توان به‌چندین مرحله تقسیم‌کرد: میلوبلاست، پرومیلوسیت، میلوسیت، متامیلوسیت و بندسل ها که د ارای هسته های نواری شکل هستند و سلول های سگمانته که دارای هسته های قطعه قطعه هستند (Skalnik., 2002). گرانولوسیت‌ها درطی تمایز در مرحله میلوبلاست دارای گرانول های azurophilic و در مرحله میلوسیت دارای گرانول های ثانویه یا specific و در مرحله متامیلوئیدی و بند سل دارای گرانول‌های ثالث یا gelatinase و در آخرین مرحله تمایز دارای دانه های ترشحی (secretory) می‌شوند (Borregaard & Cowland., 1997) (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱: مراحل تمایز سلول بنیادی خونی بسمت گرانولوسیت شامل چندین مرحله میلوبلاست، پرومیلوسیت، میلوسیت، بندسل‌ها و سلول‌های سگمانته است. سلول در طی تمایز از نظر محتوای دانه های درون سلولی متفاوت می باشد (Verploegen., 2002).

۵-۱- لوسمی پرومیلوسیتی حاد (Acute Promyelocytic Leukemia):

سرطان پرومیلوسیتی حاد (APL) یکی از ا نواع سرطان‌های میلوئیدی حاد است که با تجمع سلول ها در مرحلهٔ پرومیلوسیتی، تکثیر بی رویه و عدم تمایز نهایی این سلول ها تعریف می شود و با حضور فراوان سلول های نابالغ پرومیلوسیتی در مغز استخوان و خون همراه است . در این لوسمی جابه جایی کروموزومی t(15:17) (q22;q12-21) صورت می‌گیرد که منجر به اتصال ژن رسپتور رتینوئیک اسید (RARα) روی کروموزوم۱۷ به ژن promyelocytic (PML) روی کروموزوم ۱۵ شده و باعث ایجاد یک پروتئین مرکب تحت عنوان PML-RARα می‌شود، این پروتئین مرکب بوجود آمده دارای عملکرد هایی است که منجر به ایجاد سرطان میلوئیدی می گردد. ژن PML یک فاکتور رونویسی انگشت روی را کد می کند، اگرچه نقش این پروتئین بطور کامل فهمیده نشده است ولی در تکثیر و تمایز سلول‌های پرومیلوسیت شرکت می‌کند. ژن PML شبیه به یک سرکوب کننده تومور عمل می کند. هنگامی که این جا به جایی صورت می‌گیرد پروتئین الحاقی PML-RAR-α فعالیت مهاری ژن PML را مهار می‌کند که نتیجه آن تکثیر

بی‌رویه سلول‌های نابالغ است که توانایی تمایز به سلول بالغ را ندارند . یکی از اثرات شکل گیری PML-RAR-α مهار تمایز در مرحله پرومیلوسیتی است

(Altucci et al., 2004; Sharon et al., 1999). سلول‌های میلوئیدی برتری رشد بر سلول‌های نرمال دارند و این برتری به دلیل سرعت تکثیر بالا نیست. این سلول‌ها معمولا آهسته‌تر از سلول‌های نرمال تقسیم می‌شوند ولی بدلیل عدم کسب عمل سلول بالغ تجمع می یابند. تکثیر و بلوغ وقایع مرتبط بهم هستند و اگر بلوغ رخ دهد رشد می تواند به نسبت بسیار زیادی کم شود (Koeffler & Golde., 1980). مطالعات نشان داده است که چنانچه سلول های لوسمی نابالغ در مجاورت عوامل موثر در رون‌ده‌ای تمایز قرار گیرند تکثیر آنها مهار شده و ب ه سمت بلوغ پیش می روند و در نهایت دچار مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز) می‌گردند و از بین می‌روند (Yang et al., 2003; Leszcyniecka et al., 2001; Spira & Carducci., 2003).

ترکیبات متنوعی مثل دی متیل سولفوکسید (DMSO)، رتینوئیک اسید، فوربل استر (phorbol ester)، ۱،۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D_3 (D_3 (1,25-dihydroxy vitamin) تمایز را در سلول های لوسمی حاد پرومیلوسیت به سمت سلول‌های بالغ القاء می‌کنند

(Pae et al., 2001). در سلول‌های APL، پروتئین PML-RARα بیان بیشتری در مقایسه با پروتئین RARα دارد و یک اثر غالب منفی را بر RARα نشان می‌دهد. هدف عوامل القاء تمایز، کاهش ژن الحاقی PML-RARα و القاء تمایز یا آپوپتوز در سلول‌های لوسمی می‌باشد. این عوامل برای درمان لوسمی میلوئیدی استفاده می‌شوند (Jiang et al., 2008; Sharon et al., 1999).

تمایز درمانی دارای اثرات جانبی کمتری نسبت به سایر روش های درمان سرطان می باشد. پیشنهاد می‌شود این روش می‌تواند بعنوان یک روش درمانی موفق برای درمان لوسمی حاد پرومیلوسیتی مورد استفاده قرار گیرد (Pae et al., 2001).

۶-۱- رده‌ی سلولی HL-60:

رده‌ی سلولی HL-60 (Human Leukemia) که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت یک ر ده‌ی سلولی مربوط به سرطان حاد پرومیلوسیتی است که توسط Collins و همکاران در سال۱۹۷۷ از خون جنب یک زن ۳۶ سالهٔ قفقازی مبتلا به لوکمیای حاد پرومیلوسیتی جدا شد. این سلول‌ها دارای کاریوتایپ غیر عادی بوده و غالباً دارای ۴۵ کروموزوم

می‌باشند و ویژگی‌های مورفولوژیکی تغییر یافته‌ای از خود نشان می دهند. زمان مضاعف شدن این سلول ها ۳۶-۴۸ ساعت است. در محیط کشت به راحتی و تا مدت ۳ سال توانایی تکثیر دارند و دارای قدرت بالای القاء سرطان در موش-ها می‌باشند

(Gallagher et al., 1979; Koeffler and Golde., 1980). رشد سلول‌های HL-60 کاملاً به حضور FBS وابسته است و بهترین تحریکات رشد در FBS ۲۰ - ۱۰ ٪ دیده می‌شود. این سلول ها به صورت منفرد و شناور بدون هیچ گرایشی به توده ای شدن یا اتصال به شیشه یا پلاستیک رشد می کنند. از نظر شکل ظاهری کروی و یا بیضوی هستند و دارای قطر μm ۲۵- ۹ می‌باشند. این سلول‌ها به سرعت تکثیر می‌شوند و توانایی تبدیل به سلول بالغ را ندارند. در مرحله پرومیلوسیت، سیتوپلاسم سلول‌ها شدیداً بازوفیلی و دارای دانه‌های برجسته azurophilic است. نسبت هسته به سیتوپلاسم در این سلول ها بالاست و دارای کروماتین نامتراکم و ۴-۲ هستک هستند. تمایز HL-60 با کاهش اندازه سلول، کاهش نسبت هسته به سیتوپلاسم، افزایش پیکنوز و قطعه ای شدن هسته، کاهش خاصیت بازوفیلی سیتوپلاسم و جایگزینی دانه‌های azurophilic با دانه‌های specific همراه است. عوامل القاء تمایز قطعه‌ای شدن هسته و تشکیل دانه‌های specific را افزایش می‌دهند

(Gallagher et al., 1979; Koeffler & Golde., 1980; Jiang et al., 2008).

سلول‌های HL-60 حداقل در سه ژن انکوژن *c-myc*، N-*ras*، p53 ساختار غیر نرمال نشان می دهند (Collins et al., 1987). این رده‌ی سلولی در حضور موادی نظیر بوتیرات، هیپوزانتین، فوربول مریستات استات (phorbol ester)، ۱،۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D3 ($1,25\text{-dihydroxy vitamin } D_3$)، رتینوئیک اسید و دی متیل سولفوکسید (DMSO) از وضعیت تکثیر بی‌رویه خارج شده و بسمت مونوسیت، ماکروفاژو یا گرانولوسیت تمایز می یابد. بیش از ۵۰ ترکیب مثل DMSO و رتینوئیک اسید باعث القاء تمایز بسمت گرانولوسیت در این رده ی سلولی می شود. تمایز بسمت دو مسیر میلوئیدی متفاوت مزیتی جهت استفاده از این رد ه‌ی سلولی محسوب می شود (Yang et al., 2003; Gallagher et al., 1979; Miller & Koffler., 1986). سلول‌های HL-60 مارکر سطح سلولی خاصی برای سلول های لنفوئیدی ندارند. در صورت القاء تمایز، رسپتورهای سطح سلولی مرتبط با دودمان تمایز یافته را بیان می‌کنند و مورفولوژی، فعالیت آنزیمی و آنتی‌ژن سطح سلولی، سلول تمایز یافته را بدست می‌آورند. سلول HL-60 تمایز یافته بسیاری از ویژگی‌های سلول بالغ را مثل فاگوسیتوز، شیموتاکسی و توانایی احیاء NBT را دارا است. Breithman

در سال ۱۹۸۰ اولین بار نشان داد که رتینوئیک اسید تمایز نهایی را در رده‌ی سلولی HL-60 القاء می‌کند. سلول‌های HL-60 در صورت تمایز، تمایز نوتروفیلی را بصورت متامیلوسیت، بند سل و قطعات نوتروفیلی نشان می دهند (Gallagher et al., 1979; Breithman et al., 1980). درطی سال‌های ۱۹۸۰ تا ۱۹۹۰ مطالعات وسیعی د ر مورد رتینوئیک اسید و لوسمی حادپرومیلوسیتی انجام شد

(Spira & Carducci., 2003). Collins در سال ۱۹۹۰ نشان داد اثر ویتامین A در القاء تمایز در ارتباط با رسپتور رتینوئیک اسید است. RAR-α یک نقش ضروری و مرکزی را درالقاء تمایز نهایی توسط RA در HL-60 ایفاء می‌کند (Collins & Robertson., 1990). رسپتور رتینوئیک اسید متعلق به خانواده رسپتورهای هورمونی هسته شامل : استروژن، تیروئید و ویتامین D است. رتینوئیک‌ها و ویتامین D_3 با رسپتورهای هسته‌ای متعلق به خانواده رسپتورهای هورمون‌های استروئید/ تیروئید که از اعضاء خانواده فاکتورهای رونویسی هستند ، واکنش می دهند. ساختار هر رسپتور هسته‌ای از ۶ دومین تشکیل می‌شود و دارای سه ایزوفرم α و β و γ می‌باشند که توسط ژن های مجزایی کد می‌شوند

(Sharon et al., 1999; Bertolaso et al., 1998).

سلول‌های HL-60 به خاطر تمایز به انواع دودمان های میلوئیدی و تغییرات مورفولوژیکی و ژنی فاحش مرتبط با تمایز در این رده‌ی سلولی در بسیاری از تحقیقات مورد توجه قرار گرفته‌اند و این رده به عنوان رده‌ی سلولی مدل سرطان حاد پرومیلوسیتی مطرح است. تجربیات انجام گرفته با استفاده از این رد ه‌ی سلولی و تمایز این سلول های سرطانی، نشان می‌دهد که سرطان وضعیت غیر قابل برگشتی نمی باشد و با استفاده از ویژگی های بنیادی این نوع سلول ها، می‌توان آنها را به وضعیت عادی‌تری سوق داد

Golde., &(Sokoloski et al., 1997; Breitman et al., 1980; Gallagher et al., 1979; Koeffler 1980).

۷-۱- مسیرهای سیگنالینگ دخیل در تمایز رده سلولی HL-60:

۱- ۷- ۱- مهار کننده‌های پروتئین کینازهای وابسته به سیکلین(CKIs)؛ p21 وp27:

چرخه سلولی توسط فعال و غیر فعال شدن مداوم پروتئین کیناز های وابسته به سیکلین (cyclin- = CDK dependent protein kinase) تنظیم می‌شود که مراحل خاصی از چرخه سلولی مثل گذر از G_1-S و G_2-M را کنترل می‌کنند. CDK برای فعالیت نیاز به اتصال به سیکلین های خاص (E, B, A وD) دارند که بطور منظم در طی چرخه سلولی بیان می‌شوند. فعالیت CDK هم چنین توسط مهارکننده CDK (CDK inhibitors) تنظیم می‌شود. CKI به کمپلکس CDK متصل می‌شوند و آن را غیرفعال می کنند. p21 و p27 جزء مهارکننده‌های CDK هستند. کنترل تمایز رابطه بسیار قوی با تنظیم تکثیر دارد و مولکول های دخیل در کنترل چرخه سلولی مثل p21 و p27، در تنظیم تمایز و آپوپتوز در سلول نیز شرکت دارند (Fabiani et al., 2007). تمایز، سیکل سلولی را در مرحله G_1 متوقف و سلول وارد فاز G_0 می‌شود و تکثیر سلولی متوقف می شود و در ادامه ژن های لازم برای تمایز بیان می شود. در یک سلول تمایز یافته، تکثیر سلولی کاهش می یابد و در ادمه این روند آپوپتوز به طور اساسی القاء می‌شود. توقف رشد و القاء آپوپتوز یک هدف مهم در تمایز سلولی و یک اصل اساسی برای درمان سرطان هستند . در طول تمایز سلول های لوسمی فعالیت ژن های مرتبط با چرخه سلولی مثل سیکلین های وابسته به کینازها (CDK) و مهار کننده های آنها تغییر می‌یابد. بیان p21 به عنوان یک مهارکننده CDK در طول تمایز سلول‌های لوسمی افزایش می‌یابد. در بسیاری از موارد افزایش بیان p21 برای عمل p53 که یک پروتئین متوقف کننده تومور می باشد، نیاز است. p21 می‌تواند بصورت وابسته و یا مستقل از p53، موجب توقف سیکل سلولی گردد . پیشنهاد می‌شود که افزایش بیان p21 در طی مراحل توقف سیکل سلولی و تمایز، با تغییر در میزان فسفوریلاسیون ژن‌های مرتبط با سیکل سلولی مثل پروتئین رتینوبلاستوما (RB) باشد. بیان p21 و p27 القاء تمایز مونوسیت و گرانولوسیت را در سلول های HL-60 تسریع می‌کند. نتایج نشان می‌دهد که القاء بیان p21 یک مکانیسم رایج برای توقف سیکل سلولی در طی تمایز سلولی است . Ahou و همکارانش نشان دادند که بیان بالای ژن p21 با توجه به نوع القاء کننده منجر به تمایز به سمت مونوسیت / ماکروفاژ و یا سلول‌های شبه نوتروفیلی می‌شود. Liu و همکارانش نیز گزارش کردند که بیان بالای p21 و p27 بیان مارکرهای خاص مرتبط با تمایز مونوسیت/ ماکروفاژی را در رده‌ی سلولی U937 القاء کرد. بیان p27 و p21 antisense RNA، القاء تمایز در سلول‌های HL-60 توسط ATRA را به سمت سلول‌های شبه گرانولوسیتی مهار کرد. در تمایز القاء شده با ۱- ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین D3 در سلول‌های HL-60، p27 باعث توقف سیکل سلولی و القاء تمایز شد، در صورتی که p21 در تمایز القاء شده توسط PMA در رده‌ی سلولی HL-60 بسمت مونوسیت/ ماکروفاژ ضروری است. p21 و p27 برای

توقف چرخه سلولی در سلول های HL-60 تیمار شده با ATRA ضروری هستند، ولی میزان شرکت p21 برای القاء تمایز سلولی بیشتر از p27 است. تحقیقات نشان می‌دهند که بیان p21 و p27 برای القاء تمایز رده‌ی سلولی HL-60 توسط القاء کننده‌های متنوع ضروری است، اما میزان شرکت این مهار کننده ها به نوع القاء کننده‌ای که استفاده می‌شود، وابسته است

.(Horie et al., 2004; Fabiani et al., 2007)

۲- ۷- ۱- پروتئین c-Myc:

پروتئین c-Myc یک فاکتور رونویسی است که برای کنترل تکثیر، تمایز و آپوپتوز سلول HL-60 نیاز است و می تواند با مکانیسم هایی که مستقیماً با سیکل سلولی در ارتباط است تمایز سلولی را متوقف کند . ژن *c-myc* برای کنترل تکثیر، تمایز و آپوپتوز سلولی نیاز است و باعث القاء رشد و تکثیر و متوقف شدن تمایز نهایی سلول می‌شود. Jiang نشان داد که *c-myc* در سلول HL-60 افزایش می یابد و میزان c-Myc در صورت مواجه با رتینوئیک اسید تمام ترانس (ATRA)، به سرعت در سطح mRNA و پروتئین کاهش می یابد. کاهش این فاکتور رونویسی در حضور بسیاری از عوامل القاء کننده تمایز مثل رتینوئیک اسید و TPA (12-0- tetradeconylphorbol 13- acetate) نیز مشاهده می‌شود. سرکوب شدن ژن *c-myc* برای تمایز نهایی در بسیاری از انواع سلول ها مثل سلول های میلوئیدی نیاز است . دو هدف ژنی Myc، *human telomerase reverse transcriptase* (*h*TERT) و *carbamoyltransferase-dihydrooroatase* (CAD) است. فاکتور mad1 به عنوان یک مهار کننده Myc نقش مهمی در تنظیم مراحل سیکل سلولی و تمایز دارد . بیان c-Myc در ارتباط با تکثیر سلولی است در صورتی که بیان بالای پروتئین mad با تمایز نهایی سلول ارتباط دارد. بیان بالای mad1 در حضور ATRA و چندین عامل القایی نقش مهم آن را در القاء تمایز نشان می دهد. تحقیقات نشان می‌دهد که Mad1 با بلوکه کردن تکثیر بطور غیر مستقیم، باعث شروع مراحل تمایز می‌شود. ATRA باعث توقف چرخه سلولی در مرحله G_0/G_1 و down-regulation c-Myc و سیکلین E و بالا رفتن بیان p21 و p27 در طی القاء تمایز گرانولوسیتی، می شود .(Jiang et al., 2008)

۳-۷-۱- پروتئین کیناز C (PKC):

پروتئین کیناز C یک خانواده از پروتئین کیناز ها هستند که در کنترل اعمال سایر پروتئین ها دخالت می کنند و برای فعالیت خود به کلسیم و diacylglycerol و فسفولپید مثل فسفاتیدیل سرین نیاز دارند. پروتئین کیناز C (PKC) ، سیگنال‌های خارج سلولی را در سلول انتقال می‌دهند و نقش مهمی در انتقال آبشار سیگنالینگ در سلول ایفاء می کنند. فعالیت PKC نقش اساسی در تکثیر و تمایز سلول های لوسمی دارد. پروتئین کیناز دارای ۹ ایزوتایپ (L، η، ζ، ε، δ، γ، $ß_2$، $ß_1$، α) است؛ این ایزوتایپ ها در تنظیم و خواص آنزیمی و توزیع بافتی متفاوت هستند و اساس بیولوژیک این اختلاف شناخته نشده است

(Tonetti et al., 1994; Hocevar et al., 1992; Costa et al., 2001). اثر بسیاری از فاکتورهای رشد و تمایز از طریق پروتئین کیناز C اعمال می شود. جابه جا شدن پروتئین کیناز C به هسته و فعال شدن آن نقش مهمی در انتقال سیگنال های خارجی در بسیاری از سلول ها مخصوصاً سیگنال های تنظیم رشد ایفاء می کند. بسیاری از مطالعات تنظیم فعالیت PKC را به دنبال القاء تمایز توسط ATRA و ویتامین D3 و فوربل استر در سلول‌های HL-60 گزارش کرده‌اند. تحقیقات نشان می‌دهد PKC ß برای القاء تمایز مونوسیتی در سلول های HL-60 نیاز است. نتایج نشان می-دهد که $ß_2$ و PKC α نقش‌های متفاوتی در تکثیر و القاء تمایز مونوسیتی در رده ی سلولی HL-60 ایفاء می کنند (Hocevar et al., 1992; Tonetti et al., 1994). دو ایزوفرم پروتئین کیناز C $ß_2$ و δ در القاء تمایز مونوسیت توسط فوربل استر (phorbol ester)، در رده‌ی سلولی HL-60 دخیل‌اند

(Hocevar & Fields., 1991; Mischak et al., 1993; Macfarlane& Manzel., 1994)، در حالی که Bertolaso در سال ۱۹۹۸، نشان داد PKC ζ نقش مهمی در القاء تمایز گرانولوسیت توسط ATRA ایفاء می کند (Bertolaso et al., 1998).

۸-۱- تمایز و آپوپتوز:

در سلول‌های لوسمی میلوئیدی حاد نظم حاکم بر مکانیسم های تمایز و مرگ سلولی از بین می رود. در اثر استفاده از عوامل مناسب نتیجه آن از بین رفتن سلول در اثر آپوپتوز است . تعدادی از عواملی که در تنظیم این مراحل شرکت می - کنند شامل: p53، کاسپاز، آنتی ژن APO-1/Fas و خانواده bcl-2 است. در صورت القاء تمایز توسط ATRA در سلول‌های HL-60 در mRNA و پروتئین bcl2 کاهش مشاهده شد . مطالعات نشان می دهد سلول تیمار شده با

ATRA می‌تواند متحمل تمایز شود ولی آپوپتوز مهار می شود. در سال ۱۹۹۳، Xu نشان داد که د ر تیمار سلول ها با ویتامین D3 تمایز القاء شد و کاهش بیان bcl-2 مشاهده شد ولی آپوپتوز القاء نگردید . Bunce و Colleagues در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که مواجهه سلول های HL-60 با غلظت های بالای ATRA یا 9-cis RA در ترکیب با غلظت‌های کم ویتامین D3 نتیجه آن آپوپتوز بدون القاء تمایز بود . این نشان می‌دهد که تمایز و آپوپتوز می تواند توسط مکانیسم‌های مولکولی و بیوشیمیایی متفاوتی که به بیان متفاوت bcl2 وابسته است مستقل از هم رخ دهند و یا تحریک شوند. این نشان می دهد که مکانیسم های آپوپتوز و تمایز با هم جفت نشده‌اند و ویتامین D و ATRA می‌توانند هر کدام را بصورت جداگانه تحت تأثیر قرار دهند

(Sharon et al., 1999).

۹- ۱- زهر زنبور عسل (Honey Bee Venom):

زنبور عسل با نام علمی *Apis mellifera* دارای زهری شفاف می باشد که آن را در کیسه های زهری ذخیره نموده و برای دفاع شخصی از آن استفاده می کند

(Jang et al., 2003 ; Chu et al., 2007).

۱۰- ۱- ترکیبات موجود در زهر زنبور عسل:

زهر زنبور (api-toxin) دارای بیش از ۱۸ ترکیب فعال از جمله آنزیم ها، پپتیدها و ... با خواص دارویی فراوان می-باشد (Son et al., 2007; Orsolic , 2011).

از جمله اجزاء مهم زهر زنبور می توان به موارد زیر اشاره کرد:

- ملیتین (Mellitin):

ملیتین که ۶۰-۵۰ درصد زهر زنبور را تشکیل می‌دهد پروتئین کوچکی با ۲۶ اسید آمینه است و جزء سمی اصلی زهر می‌باشد (Jo et al., 2012) و دارای اثرات ضد التهابی، ضد آرتریتی و سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی است و باعث افزایش فعالیت فسفولیپاز- A_2 می‌شود (Son et al., 2007). kim پیشنهاد می کند که ملیتین موجود در زهر

زنبور بدلیل فعال کردن فسفولیپاز- A_2 دارای اثرات سمی بر ضد سلول های سرطانی می‌باشد (Kim et al., 2004). زمانی که مقداری از مولکول‌های ملیتین در غشاء سلولی نفوذ کند، فسفولیپیدها توسط آن شکسته و سلول لیز می گردد. در کیسهٔ زهر زنبور ملیتین بصورت تترامر می باشد اما هنگام اثر گذاری بر روی سلول بصورت مونومر عمل می نماید و باعث لیز شدن سلول می‌شود. این ویژگی ساختاری می تواند نقش مهمی در اثر سمی ملیتین بر روی سلول های سرطانی و اثرات ضدالتهابی آن داشته باشد (Terra and Guimaraes., 2007). تحقیقات نشان داده است که این ماده قادر به القاء آپوپتوز بوده و اثرات ضد توموری دارد (Jang et al., 2003).

- فسفو لیپاز A_2 (Phospholipase A_2):

۲۰-۱۵ درصد زهر را تشکیل می دهد و دارای اثر سیتوتوکسیک بر روی سلول های سرطانی است و باعث فروپاشی ساختار فسفولیپیدهای غشاء سلولی و درنتیجه فروپاشی غشاء سلولی می گردد (Chu et al., 2007).

- آپامین (Apamin):

کوچکترین نوروتوکسین موجود در زهر و متشکل از ۱۰ اسید آمینه می باشد. آپامین دارای اثرات سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی و ضددرد و ضدالتهابی است . این پپتید بعنوان یک مهار کنندهٔ کانال های Ca-K عمل می کند و با کاهش رهاشدن هیستامین از بافت های ریه، آلرژی مسیر های هوایی را کاهش می دهد و بر روی برخی غشاهای پس سیناپسی سیستم عصبی مرکزی و محیطی دارای اثر است (Son et al., 2007).

- آدولاپین (Adolapin):

آدولاپین پپتید دیگر موجود در زهر زنبور است که در سال ۱۹۸۲ توسط Shkenderov از زهر جدا شد و یک درصد ترکیبات زهر را تشکیل می دهد و دارای ویژگی های ضدالتهابی، ضددرد و مهارکننده فعالیت فسفولیپاز A_2 موجود در زهر می‌باشد و از طریق مهار آنزیم سیکلواکسیژناز (COX) باعث مهار سنتز پروستاگلاندین ها می‌شود (Son et al., 2007).

- پپتید Mast Cell Degranulating (MCD):

پپتید MCD، پپتیدی متشکل از ۲۲ اسید آمینه می باشد که دارای دو پیوند دی سولفید بین اسید آمینه سیستئین است. پپتید MCD ساختمانی مشابه آپامین دارد و دارای بار مثبت بالایی است . این پپتید دارای خواص بیولوژیکی قالب توجهی می‌باشد. پپتید MCD در رابطه با واکنش‌های آلرژیک فعالیت می‌کند و با حداقل غلظت قادر به آزاد کردن هیستامین از ماست سل‌ها (Mast cell) می‌باشد (Son et al, 2007). از طرفی در غلظت‌های بالاتر، دگرانوله شدن ماست سل‌ها را مهار می‌نماید. ماست سل‌ها در خون وجود دارند و همراه آن به تمام بافت های بدن می‌روند. MCD به رسپتور ماست سل متصل می شود و مانع از اتصال IgE به این رسپتور می گردد و مانع رها شدن هیستامین می شود و پپتید MCD بعنوان یک عامل ضدآلرژیک عمل می کند. اگرچه پپتید MCD و آدولاپین دارای فعالیت ضدالتهابی هستند ولی این ترکیبات در مقدار بسیار کمی در زهر وجود دارند (Buku., 1999; Buku., 2001).

- هیالورونیداز (Hyaluronidase):

اصلی ترین جزء آلرژیک زهر زنبور است و دارای ۳۴۵ اسید آمینه می باشد. هیالورونیداز پلیمرهای هیالورونیک اسید را هیدرولیز می‌کند و آنها را به قطعات ۶-۴ واحدی تبدیل می‌کند. در اثر این عمل حد فاصل سلول‌ها از هم جدا می‌شود و راه برای نفوذ سایر اجزای زهر زنبور باز می شود. به همین علت هیالورونیداز را یک فاکتور انتشار می‌دانند. شباهت زیادی بین هیالورونیداز و آنزیم PH-20 اسپرم پستانداران که باعث اتصال اسپرم و تخمک بهم می شود، وجود دارد (Chu et al., 2007; Gmachl & Kreil., 1993).

۱۱- ۱- زنبور درمانی (Apitherapy):

زنبور درمانی، استفاده از زنبور عسل برای درمان بیماری های مختلف است. زهرزنبور در طب قدیم برای درمان بیماری-های مختلفی از جمله دردهای مفصلی، بیماری های عفونی، بیماری‌های پوستی و غیره رواج داشته است؛ امروزه استفاده از زهرزنبور در درمان بیماری‌هایی از قبیل آرتریت روماتوئید، ام اس یا مالتیپل اسکلروزیس، دردهای التهابی و احشایی و هم چنین سرطان و تومورهای سرطانی مورد توجه قرار گرفته است

(Jang et al., 2003; Orsolic et al., 2003). این ترکیب از گذشته های دور به طرق مختلفی مورد استفاده بوده است. ساده‌ترین این روش ها، تحریک زنبور عسل جهت نیش زدن زنبور در مکان مورد نظر ا ست. تزریق زهر و یا به کارگیری آن به همراه طب سوزنی روش های متداول دیگری برای استفاده از این ماده می باشند (Munstedt et al.,)

2005. زهر زنبور دارای خاصیت ضد التهابی و ضد آرتریتی است. زهر با مهار بیان COX-2 و بلوکه کردن تولید سیتوکین‌های پیش التهابی مثل فاکتور نکروز توموری -α (Tumor Necrosis Factor-α) و اینترلوکین- 1β (Interleukin-1β) می‌تواند واکنش‌های التهابی را مهار کند

(Nam et al., 2003). کاهش بیان COX-2 و PLA2 و کاهش میزان (TNF-α) و IL-1β و IL-6 و NO و گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species) برای اثر ضد آرتریتی زهر زنبور گزارش شده است . نتایج نشان می دهد که اثر ضدآرتریتی زهر با اثر ضدالتهابی آن رابطه دارد (Dennis et al., 1992; Tischfield., 1997).

BV به دلیل ویژگی های ضد التهابی در درمان بیماری MS موثر می باشد و با تحریک سلول های اولیگودندروسیت موجب میلینه شدن مناطق دمیلینه شده می گردد

(Mirshafiey., 2007). زهر بدلیل دارا بودن چندین بیوآمین مثل هیستامین، اپی‌نفرین، نوراپی‌نفرین، آپامین، سروتونین، Procamine که در انتقال عصبی دخیل اند، باعث بهبود بیماری های عصبی متنوع می شود. زهر زنبور همچنین دارای اثرات ضد سرطانی می باشد. سلول‌های سرطانی مختلفی از جمله کلیه، ریه، کبد، پروستات، مثانه، سینه و لوکمیا در حضور این ماده دچار مرگ سلولی و یا مهار تکثیر گشته‌اند. نخستین بار Havas در سال ۱۹۵۰ اثر زهر زنبور را بر روی یک تومور القاء شده گزارش کرد و پس از آن نیز مطالعات فراوانی بر روی خاصیت کشندگی این ترکیب در سلول‌ها و تومورهای سرطانی صورت‌گرفت

(Son et al., 2007). آپوپتوز، نکروز و لیزشدن مکانیسم های احتمالی هستند که زهر رشد سلولی و تشکیل کلونی را در سلول‌های سرطانی مهار می‌کند (Orsolic et al., 2003). پیشنهاد می‌شود که فعال شدن فسفولیپاز-A_2، کاسپاز و متالوپروتئیناز های ماتریکس (MMP) توسط ملیتین زهر یک مکانیسم مهم برای اثر ضد سرطانی زهر هستند (Holle et al., 2003; Moon et al., 2006). متالوپروتئیناز های ماتریکس نقش مهمی را در ترمیم بافتها، آنژیوژنز، آپوپتوز، گسترش تومور و متاستاز ایفاء می کنند (Cho et al., 2010). Hait و همکارانش اثر مهاری ملیتین را در محیط *in vitro* گزارش کردند و نشان دادند که ملیتین بعنوان یک مهار کننده کالمودولین، رشد را در سلول های لوسمی انسان و موش مهار می‌کند و بیان کردند که ملیتین یکی از پرتوان‌ترین مهار کننده‌های فعالیت کالمودولین است. ملیتین با اتصال به کالمودولین باعث مهار آن می شود و توان مهارکنندگی رشد سلول و تشکی ل کلونی آن از داروی