

Association between rs2119882 (MT1A) Melatonin Receptor Polymorphism and Childhood Leukemia Using RFLP-PCR Method

Mohaddeseh Nemati¹,
Hossein Karami²,
Abbasali Dehpouri Jouibari³,
Abbas Mohammadpour⁴,
Seyedeh sakineh Jalalzadeh¹,
Ramin Ataee²

¹ MSc Student in Biology, Department of Biology, Islamic Azad University, Gaemshahr Branch, Gaemshahr, Iran

² Associate Professor, Thalassemia Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Gaemshahr Branch, Gaemshahr, Iran

⁴ PhD Student in Molecular Biology Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 15, 2021 ; Accepted January 16, 2022)

Abstract

Background and purpose: Melatonin is a well-known neuroendocrine reproductive hormone-based hormone that has an important role in the circadian clock system and has potent antioxidant properties. New studies have also suggested an antitumor role for melatonin. The role of melatonin receptors is proven in many cancers, including colon and breast cancers, but so far, no study has been performed in children with leukemia. To the best of our knowledge, this is the first study to investigate MT1A receptor polymorphism in children with leukemia using RELP-PCR.

Materials and methods: In this case-control study, 84 patients and 70 healthy individuals were included. After informed consent had been obtained, 10 ml of peripheral blood were taken from the participants. Genomic DNA was extracted using salting-out method and PCR-RFLP was used to evaluate the frequency of allelic and genotypic polymorphisms.

Results: The genotypes of MT1 gene rs2119882 polymorphism in control group included 40% TT genotype, 50% TC genotype, and 10% CC genotype. In patients, 40% had TT genotype, 35% had TC genotype, and 25% had CC genotype. Chi-square test showed a significant difference in genotypes between the groups studied ($P < 0.05$).

Conclusion: This study confirmed the association between MT1 gene rs2119882 polymorphism and increased risk of childhood leukemia. Therefore, screening for melatonin receptor polymorphism can be helpful in prognosis and prevention of disease and appropriate treatment strategies in this cancer.

Keywords: children leukemia, rs2119882 gene polymorphism, MTNR1A

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31 (205): 29-41 (Persian).

* **Corresponding Author: Ramin Ataee** - Thalassemia Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: raminataee1349@gmail.com)

ارتباط پلی مورفیسم رسپتور ملاتونینی (rs2119882(MT1A) در
لوکمی کودکان به روش RFLP-PCRمحدثه نعمتی¹حسین کرمی²عباسعلی دهپورجوباری³عباس محمدپور⁴سیده سکینه جلالزاده¹رامین عطایی²

چکیده

سابقه و هدف: ملاتونین یک هورمون، با ساختار تولیدمثلی است که در ساعت بیولوژیک بدن نقش دارد و دارای خواص آنتی اکسیدانت می باشد و نقش آنتی تومور و محافظت سلولی برای آن در نظر گرفته شده است. با توجه به این که نقش رسپتورهای ملاتونینی در بسیاری از سرطان ها از جمله کولون و پستان ثابت شده و تاکنون مطالعه ای در کودکان مبتلا به لوکمی صورت نگرفته است، این مطالعه برای اولین بار بصورت یک مطالعه مورد شاهدهی با هدف بررسی پلی مورفیسم رسپتور ملاتونینی MT1A در کودکان مبتلا به لوکمی به روش جدید RFLP-PCR انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد شاهدهی (case-control) 84 بیمار و 70 فرد سالم شرکت کردند و 10 میلی لیتر خون محیطی از آن ها پس از رضایت آگاهانه دریافت شد. سپس DNA ژنوم با روش نمکی استخراج و به روش RFLP-PCR برای ارزیابی فراوانی آللی و پلی مورفیسم ژنتیکی بررسی شد.

یافته ها: در بررسی پلی مورفیسم rs2119882 ژن MT1A در میان 70 فرد کنترل، 40 درصد افراد ژنوتیپ TT، 50 درصد ژنوتیپ TC و 10 درصد ژنوتیپ CC را داشتند. در 84 فرد بیمار، 40 درصد ژنوتیپ TT، 35 درصد ژنوتیپ TC و 25 درصد ژنوتیپ CC را دارا بودند. براساس نتایج آزمون Chi-Square، تفاوت معناداری بین ژنوتیپ ها در دو گروه مورد مطالعه مشاهده می شود ($P<0/05$).

استنتاج: در مطالعه حاضر ارتباط بین پلی مورفیسم ژن (rs2119882) MT1 و افزایش ریسک لوکمی در کودکان مشاهده شد، لذا غربالگری پلی مورفیسم رسپتور ملاتونین می تواند در پیش آگهی و پیشگیری از بیماری و راهکارهای درمانی مناسب در سرطان کمک کننده باشد.

واژه های کلیدی: لوکمی کودکان، پلی مورفیسم ژن (rs2119882(MTNR1A)، رسپتور ملاتونین

مقدمه

سرطان ها بیماری های رو به گسترشی هستند و در حال حاضر سالانه پنجاه هزار نفر در ایران مبتلا به این بیماری می شوند (1). سرطان خون رتبه پنجم کشندگی در جهان و دوم در ایران را به خود اختصاص داده است.

E-mail: raminataee1349@gmail.com

مؤلف مسئول: رامین عطایی - ساری: مرکز آموزشی درمانی بوعلی

30. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قایمشهر، قایمشهر، ایران

2. دانشیار، مرکز تحقیقات تالاسمی، انستیتو هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قایمشهر، قایمشهر، ایران

4. دانشجوی PhD بیولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1400/1/22 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/3/23 تاریخ تصویب: 1400/10/26

درمان‌های مرسوم برای این بیماری در ایران شامل شیمی‌درمانی و پیوند مغز استخوان است (2). از این رو بررسی عوامل موثر بر بقای این دسته از بیماران بسیار حائز اهمیت است (3). ملاتونین یا N-استیل متوکسی تربیتامین، یکی از هورمون‌های کنترل‌کننده خواب است که سطح آن تحت تاثیر سن، جنس، فصل و برخی بیماری‌ها می‌باشد و با افزایش سن تولید آن کاهش می‌یابد. ملاتونین به علت دارا بودن ساختمان حلقوی غنی از الکترون قابلیت حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد را دارد. همچنین با داشتن انتهای ساختمانی N-استیل و O-متیل در ساختمان خود یک مولکول دو گانه دوست است و به همین خاطر می‌تواند از کلیه غشاهای زیستی عبور کند و حتی در سطح داخل سلولی (میتوکندری، سیتوزول، هسته) فعالیت می‌کند. همچنین به علت کوچک بودن مولکول و غیرسمی بودن به عنوان یک آنتی‌اکسیدان وسیع الطیف شناخته شده است (4).

لوسمی یا لوکمی (leukemia) ریشه در زبان لاتین به معنای "خون سفید" دارد و فرآیند تکثیر، خونسازی و ایمنی طبیعی بدن را مختل می‌کند. اجتماع این یاخته‌های سرطانی در مغز استخوان، موجب تشکیل توده‌هایی در اندام‌های حیاتی بدن نظیر مغز و یا بزرگ شدن غده‌های لنفاوی، طحال، کبد و ناهنجاری عملکرد اندام‌های حیاتی بدن می‌شوند (5). لوسمی شایع‌ترین سرطان اطفال در جهان است و در بزرگسالان 10 بار شایع‌تر و در مردان 2 برابر شایع‌تر می‌باشد. لوسمی نسبت به سایر سرطان‌ها شیوع بالاتری در خاورمیانه و شرق مدیترانه دارد و بر اساس شدت و میزان پیشرفت روند بیماری به دو دسته کلی شامل حاد و مزمن تقسیم می‌شود (6). خانواده رسپتورهای ملاتونینی از چهار دسته تشکیل شده است که شامل: MT1, MT2, MT3, MT4 می‌باشد. MT1A و MT2 تقریباً در تمام بافت‌ها که CNS را هم شامل می‌شود، بیان می‌شوند، در حالی که MT3 (که فاکتور مهارشده رشد نیز نام دارد) و MT4 به‌طور غالب در مغز بیان می‌شوند (۸،۷).

باتوفیز یولوژی شرایط نورودژنراتیو را پاک می‌کند (9) و می‌تواند اثرات مستقیم بر سلول‌های توموری داشته باشد. در غلظت فیزیولوژیکی ملاتونین تکثیر سلول‌ها را مهار می‌کند، درحالی‌که در غلظت دارویی فعالیت سایتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی دارد. ملاتونین در مغز استخوان به غلظت بالایی می‌رسد و سبب محافظت از مغز استخوان در بافت لنفوئیدی در برابر اثرات سمی داروها می‌گردد (10). برخی یافته‌ها از مطالعات محققان در مدل‌های حیوانی و یا رده‌های سلولی سرطان پستان دلالت بر این موضوع دارد که آثار آنتی‌کانسری ملاتونین بر تومورهای وابسته به هورمون عمدتاً وابسته به کارایی‌شان از طریق مسیرهای Signalling استروژنیک است (11). عمدتاً آثار ملاتونین بر سلول‌های کانسری نه تنها به‌وسیله مکانیسم‌های وابسته به اتصالشان به رسپتور به اثبات رسیده (در غشا یا هسته)، بلکه از طریق غیروابسته به رسپتور از طریق اتصال به کالמודولین و یا آثار آنتی‌اکسیدانی می‌تواند این آثار را اعمال کند (12).

نتایج نشان می‌دهد که تجویز دارویی مانند ملاتونین در بیماران مبتلا به سرطان، آسیب اندام‌ها را کاهش می‌دهد. مکانیسم‌های متعددی وجود دارد که ملاتونین می‌تواند اثرات انکواستاتیک خود را اعمال کند که شامل: تاثیر مستقیم بر ژن‌های پیش‌آپوپتوزی در هر دو مسیر بیرونی و درونی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، جلوگیری از آسیب اکسیداتیو، کاهش جذب عوامل کلیدی برای رشد تومور، افزایش مکانیسم‌های تحریک‌کننده ایمنی در میان سلول‌های بدن، تاثیر بر تمایز سلول‌های سرطانی و فعالیت ضد رگ‌زایی می‌شود (7).

ملاتونین رسپتور 1A (MT1A) بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره 4 در موقعیت q35.24 قرار دارد و دارای 3 اگزون می‌باشد. rs2119882 از این ژن بر روی بالادست ژن قرار دارد. این ژن همچنین به نام melatonin receptor 1A نیز خوانده می‌شود. اندازه mRNA این ژن 1289 bp می‌باشد و دارای 350 باقیمانده اسید آمینه است. MT1 انسانی از رسپتورهای ملاتونینی

کلون شده اند و از گیرنده‌های متصل شونده به خانواده G پروتئینها (GPCRs) هستند. با وجودی که بسیاری از رستورهای MT1 به‌طور عمومی به‌ترتیب در مغز و شبکه بیان می‌شوند، همچنین به‌طور گسترده در تعدادی از دیگر بافت‌ها شامل فولیکول‌های تخمدان، پروستات، سلول‌های سیستم ایمنی و کلیه گسترش یافته‌اند. در ضمن نقش ملاتونین در سرطان مشخص شده است.

تولید و آزاد شدن بیش‌تر هورمون‌ها، یک الگوی زمانی یا یک دوره 24 ساعته را نشان می‌دهد و عوامل مربوط به شیوه زندگی مانند کارهای شیفتی در شب و اختلالات خواب، یا تماس با عوامل خاص مانند نور در شب که ریتم شبانه روزی را مختل می‌کند، سبب تغییر عملکرد غدد درون‌ریز شده و این امر به‌طور معمول عامل بیماری‌های وابسته به هورمون، مانند سرطان پستان یا سرطان پروستات است. برداشتن غده پینه‌آل، رشد تومور را افزایش داده و مصرف ملاتونین، این اثر را معکوس کرده و تومورزایی ناشی از مواد سرطان‌زا را مهار می‌کند و سبب کاهش رشد سلول‌های توموری می‌شود. به عنوان نمونه، این هورمون فعالیت و بیان ژن‌های گیرنده استروژن را در سلول‌های سرطان پستان مهار می‌کند. در پژوهشی مشاهده شد با افزودن ملاتونین به تاموکسیفن، گسترش بیماری آهسته‌تر شد. در بررسی دیگری نیز مصرف دوزهای بالایی از ملاتونین (700 میلی‌گرم در روز) کاهشی گذرا در اندازه برخی توده‌های توموری داشته است. افزودن ملاتونین به شیمی درمانی و رادیوتراپی سبب کاهش آسیب به سلول‌های خونی شده و درمان را قابل تحمل‌تر می‌نماید. مطالعات نشان داده میزان ملاتونین سرم و ادرار در زنان مبتلا به سرطان پستان پایین است و تجویز ملاتونین سبب مهار رشد تومورهای پستانی می‌گردد (7).

سرطان‌های بیماری‌های رو به گسترشی هستند و در حال حاضر سالانه پنجاه هزار نفر در ایران مبتلا به این بیماری می‌شوند (1). سرطان خون رتبه پنجم کشندگی در جهان و دوم در ایران را به خود اختصاص داده است. درمان‌های

مرسوم برای این بیماری در ایران شامل شیمی‌درمانی و پیوند مغز استخوان است (2). از این‌رو بررسی عوامل موثر بر بقای این دسته از بیماران بسیار حائز اهمیت است (3). ملاتونین یا N-استیل متوکسی تریپتامین، یکی از هورمون‌های کنترل‌کننده خواب است که سطح آن تحت تاثیر سن، جنس، فصل و برخی بیماری‌ها می‌باشد و با افزایش سن تولید آن کاهش می‌یابد. ملاتونین به علت دارا بودن ساختمان حلقوی غنی از الکترون قابلیت حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد را دارد. همچنین با داشتن انتهای ساختمانی N-استیل و O-متیل در ساختمان خود یک مولکول دو گانه دوست است و به همین خاطر می‌تواند از کلیه غشاهای زیستی عبور کند و حتی در سطح داخل سلولی (میتوکندری، سیتوزول، هسته) فعالیت می‌کند. همچنین به علت کوچک بودن مولکول و غیرسمی بودن به عنوان یک آنتی‌اکسیدان وسیع‌الطیف شناخته شده است (4).

لوسمی یا لوکمی (leukemia) ریشه در زبان لاتین به معنای "خون سفید" دارد و فرآیند تکثیر، خونسازی و ایمنی طبیعی بدن را مختل می‌کند. اجتماع این یاخته‌های سرطانی در خارج از مغز استخوان، موجب تشکیل توده‌هایی در اندام‌های حیاتی بدن نظیر مغز و یا بزرگ شدن غده‌های لنفاوی، طحال، کبد و ناهنجاری عملکرد اندام‌های حیاتی بدن می‌شوند (5). لوسمی شایع‌ترین سرطان اطفال در جهان است و در بزرگسالان 10 بار شایع‌تر و در مردان 2 برابر شایع‌تر می‌باشد. لوسمی نسبت به سایر سرطان‌ها شیوع بالاتری در خاورمیانه و شرق مدیترانه دارد و بر اساس شدت و میزان پیشرفت روند بیماری به دو دسته کلی شامل حاد و مزمن تقسیم می‌شود (6). خانواده رستورهای ملاتونینی از چهار دسته تشکیل شده است که شامل: MT1, MT2, MT3, MT4 می‌باشد. MT1A و MT2 تقریباً در تمام بافت‌ها که CNS را هم شامل می‌شود، بیان می‌شوند، در حالی که MT3 (که فاکتور مهاری رشد نیز نام دارد) و MT4 به‌طور غالب در مغز بیان می‌شوند (۸،۷).

ملاتونین مواد مضر در گیر در پاتوفیزیولوژی شرایط نورودژنراتیو را پاک می کند (9) و می تواند اثرات مستقیم بر سلول های توموری داشته باشد. در غلظت فیزیولوژیکی ملاتونین تکثیر سلول ها را مهار می کند، در حالی که در غلظت دارویی فعالیت سایتوتوکسیک بر سلول های سرطانی دارد. ملاتونین در مغز استخوان به غلظت بالایی می رسد و سبب محافظت از مغز استخوان در بافت لنفوییدی در برابر اثرات سمی داروها می گردد (10). برخی یافته ها از مطالعات محققان در مدل های حیوانی و یا رده های سلولی سرطان پستان دلالت بر این موضوع دارد که آثار آنتی کانسری ملاتونین بر تومورهای وابسته به هورمون عمدتاً وابسته به کارایی شان از طریق مسیرهای Signalling استروژنیک است (11). عمدتاً آثار ملاتونین بر سلول های کانسری نه تنها به وسیله مکانیسم های وابسته به اتصالشان به رسپتور به اثبات رسیده (در غشا یا هسته)، بلکه از طریق غیر وابسته به رسپتور از طریق اتصال به کالמודولین و یا آثار آنتی اکسیدانی می تواند این آثار را اعمال کند (12). نتایج نشان می دهد که تجویز دارویی مانند ملاتونین در بیماران مبتلا به سرطان، آسیب اندام ها را کاهش می دهد. مکانیسم های متعددی وجود دارد که ملاتونین می تواند اثرات انکواستاتیک خود را اعمال کند که شامل: تاثیر مستقیم بر ژن های پیش آپوپتوزی در هر دو مسیر بیرونی و درونی، فعالیت آنتی اکسیدانی، جلوگیری از آسیب اکسیداتیو، کاهش جذب عوامل کلیدی برای رشد تومور، افزایش مکانیسم های تحریک کننده ایمنی در میان سلول های بدن، تاثیر بر تمایز سلول های سرطانی و فعالیت ضد رگزایی می شود (7). ملاتونین رسپتور 1A (MT1A) بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره 4 در موقعیت q35.24 قرار دارد و دارای 3 اگزون می باشد. rs2119882 از این ژن بر روی بالادست ژن قرار دارد. این ژن همچنین به نام melatonin receptor 1A خوانده می شود. اندازه mRNA این ژن 1289 bp می باشد و دارای 350 باقیمانده اسید آمینه است. MT1 انسانی از رسپتورهای ملاتونینی کلون شده اند و از گیرنده های

متصل شونده به خانواده G پروتئین ها (GPCRs) هستند. با وجودی که بسیاری از رسپتورهای MT1 به طور عمومی به ترتیب در مغز و شبکه بیان می شوند، همچنین به طور گسترده در تعدادی از دیگر بافت ها شامل فولیکول های تخمدان، پروستات، سلول های سیستم ایمنی و کلیه گسترش یافته اند. در ضمن نقش ملاتونین در سرطان مشخص شده است. تولید و آزاد شدن بیش تر هورمون ها، یک الگوی زمانی یا یک دوره 24 ساعته را نشان می دهد و عوامل مربوط به شیوه زندگی مانند کارهای شبی و اختلالات خواب، با تماس با عوامل خاص مانند نور در شب که ریتم شبانه روزی را مختل می کند، سبب تغییر عملکرد غدد درون ریز شده و این امر به طور معمول عامل بیماری های وابسته به هورمون، مانند سرطان پستان یا سرطان پروستات است. برداشتن غده پینه آل، رشد تومور را افزایش داده و مصرف ملاتونین، این اثر را معکوس کرده و تومورزایی ناشی از مواد سرطان زا را مهار می کند و سبب کاهش رشد سلول های توموری می شود. به عنوان نمونه، این هورمون فعالیت و بیان ژن های گیرنده استروژن را در سلول های سرطان پستان مهار می کند. در پژوهشی مشاهده شد با افزودن ملاتونین به تاموکسیفن، گسترش بیماری آهسته تر شد. در بررسی دیگری نیز مصرف دوزهای بالایی از ملاتونین (700 میلی گرم در روز) کاهشی گذرا در اندازه برخی توده های توموری داشته است. افزودن ملاتونین به شیمی درمانی و رادیوتراپی سبب کاهش آسیب به سلول های خونی شده و درمان را قابل تحمل تر می نماید. مطالعات نشان داده میزان ملاتونین سرم و ادرار در زنان مبتلا به سرطان پستان پایین است و تجویز ملاتونین سبب مهار رشد تومورهای پستانی می گردد (7). با توجه به شیوع نسبتاً بالای لوکمی در میان کودکان بخصوص در استان های شمالی و با توجه به این که نقش رسپتورهای ملاتونینی در بسیاری از کانسرها از جمله کولون و پستان ثابت شده است، اما مطالعه جامعی در کودکان مبتلا به لوکمی صورت نگرفته، این مطالعه با هدف بررسی پلی مورفیسم

رِسپتور ملاتونینی rs2119882(MT1A) در کودکان مبتلا به لوکمی مراجعه‌کننده به بیمارستان بوعلی ساری به روش RFLP-PCR طرح ریزی شده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه مورد-شاهدی، 84 بیمار و 70 فرد سالم در سنین 4 تا 10 سال، با میانگین سنی $5 \pm 1/2$ سال در گروه بیمار و $6 \pm 1/3$ سال در گروه کنترل شرکت کردند که تفاوت معنی دار بین این دو گروه مشاهده نشد. تقریباً 60 درصد کودکان پسر و 40 درصد دختر بودند و مبتلا به All-Tcell، B-All، All (لوکمی لنفوسستیک حاد از نوع B-cell و یا T-cell) بودند. پس از کسب رضایت آگاهانه از خانواده کودکان، 5 میلی‌لیتر از خون محیطی افراد بیمار گرفته شد. نمونه‌ها از تاریخ 97/1/24 لغایت 98/1/15 جمع‌آوری شدند. DNA ژنومی با استفاده از روش نمکی استخراج شد و با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی فراوانی آللی و ژنوتیپی پلی‌مورفیسم انجام گردید. همچنین با تهیه پرسشنامه، اطلاعات افراد حضور یافته در پژوهش دریافت شد. لازم به توضیح است این طرح با کد 967 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد R.MAZUMS.REC.1399.475 تصویب و کلیه مراحل آن با توجه به پروتکل‌های اخلاقی مصوب انجام پذیرفته است. حجم نمونه با استفاده از نرم‌افزار GPower 3.1.9.2 محاسبه شد. حجم نمونه لازم برای آزمون تفاوت نسبت وجود پلی‌مورفیسم موردنظر در دو گروه مستقل (مورد و شاهد) محاسبه گردید. میزان خطای آلفا و بتا به ترتیب 0/05 و 0/20 در نظر گرفته شد. حجم نمونه مورد نظر برای تفاوتی 10 درصد در دو جمعیت مورد و شاهد حدود 80 نفر در هر گروه محاسبه گردید.

جهت دریافت نمونه از کودکان، پس از تماس با خانواده‌های افراد مذکور و توجیه نمودن آن‌ها درباره این پژوهش، از این افراد درخواست شد که جهت همکاری در روز خاصی به آزمایشگاه مراجعه کنند تا از آن‌ها نمونه

خون تهیه شده و اطلاعات مربوط به آن‌ها در پرسشنامه طراحی شده‌ای درج گردد. همچنین نمونه افراد شاهد موجود در مطالعه از افراد سالم خانواده همین افراد تهیه شد که سعی شده از برادران و یا خواهران در رده‌های سنی مشابه با رضایت آگاهانه نمونه‌های خونی به عنوان کنترل تهیه شود. از تمام افراد وارد شده به مطالعه به میزان 5 سی‌سی نمونه خون تهیه شد و درون لوله حاوی EDTA (جهت جلوگیری از انعقاد) جمع‌آوری شد و پرسشنامه افراد سرطانی توسط خود فرد بیمار زیر نظر یک فرد آموزش دیده تکمیل شد. نمونه‌های خون جمع‌آوری شده تا زمان تکمیل نمونه‌گیری و جمع‌آوری کل تعداد نمونه‌های مورد نیاز در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری و ذخیره شد. پس از جمع‌آوری تمام نمونه‌های مورد نیاز، نمونه‌های خون افراد مبتلا و سالم به آزمایشگاه مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران جهت انجام دادن بقیه مراحل آزمایش منتقل شد.

به منظور شناسایی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها، از تکنیک RFLP-PCR استفاده گردید. جهت واکنش PCR مربوط به ژن موردنظر، از دو جهت آغازگر اختصاصی مناسب جهت تکثیر محدوده ژنی محتوی قطعه پلی‌مورفیک استفاده شد که مشخصات مواد مصرفی و پرایمرها در جداول شماره 1 و 2 آمده است. جهت تشخیص محل دقیق اتصال این آغازگرها به ژن رسپتور ملاتونین A1، ابتدا توالی ژن در سایت NCBI تعیین و سپس توالی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Gen Runner ردیف و سپس پرایمرهای طراحی شده BLAST شد. انتخاب آنزیم محدودالایتر (AlwI) (restriction enzyme) با استفاده از نرم‌افزار NEB Cutter صورت گرفت که در صورت برش توسط آنزیم دو قطعه با اندازه‌های 61 bp و 154 bp ایجاد می‌شد. قطعه قابل تکثیر 206 bp و اندازه پرایمرها 20 bp و 22 bp بود.

برای بررسی‌های آماری از آزمون Odds Ratio و آزمون کای اسکوار استفاده شد. از این آزمون‌های آماری به منظور بررسی مورد تأیید بودن نتایج مشاهده

شده استفاده شد. در واقع نتایج این آزمون‌ها نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود اختلاف در نسبت فاکتور خطر مورد نظر بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد و ($P < 0/05$) معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

جدول شماره 1: مواد مصرفی برای واکنش PCR

غلظت	مقدار	مواد مصرفی
1 X	12 μ l	Master mix (Arian Gene Co)
5 μ g	5 μ l	Template DNA (Arian Gene Co)
0/5 μ m	0/8 μ l	Forward primer
0/5 μ m	0/8 μ l	Reverse primer
-	7 μ l	H2O
-	25 μ l	Total

جدول شماره 2: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

محلول	آزیم محدودالایز	توالی پرایمر	محل
(rs2119882) Forward: GCGTTTCATTGTGTTTCCTC (MTNR1A) Reverse: CATTATCGGAACATCTAGCAC	AvaII	T: 206 bp C: 154+61bp	

یافته‌ها

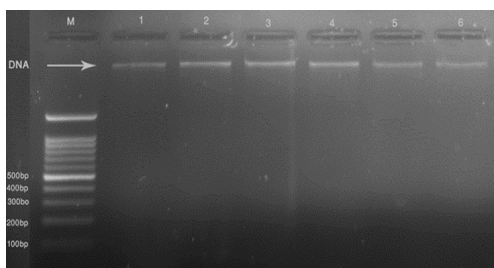
اهداف مطالعه حاضر بررسی تفاوت پلی‌مورفیسم رستپورهای MT1A بین گروه‌های تست و شاهد و تفاوت ژنوتیپی و فراوانی آللی بین گروه مورد و کنترل بوده است.

معادل 4 میکرولیتر از نمونه DNA و 1 میکرولیتر از Loading Dye (بافر سنگین‌کننده) پس از مخلوط شدن در هر یک از چاهک‌ها ریخته و پس از اتمام الکتروفورز با دستگاه Gel Doc از ژل فوق عکس‌برداری شد. DNAهای ژنومی به صورت نقاط روشنی روی ژل آگارز نمایان می‌شود که مکان آن‌ها در تصویر شماره 1 توسط فلش نشان داده شده است (نمونه‌های شماره 1 تا 6).

تصویر شماره 1 مربوط به ژل آگارز 1 درصد DNA ژنومی استخراج شده از لوکوسیت‌های خون محیطی است. از تمام نمونه‌های بیماران و کنترل، DNA مناسب جهت انجام PCR استخراج گردید.

معادل 4 میکرولیتر از نمونه DNA و 1 میکرولیتر از Loading Dye (بافر سنگین‌کننده) پس از مخلوط شدن

در هر یک از چاهک‌ها ریخته و پس از اتمام الکتروفورز با دستگاه Gel Doc از ژل فوق عکس‌برداری شد. DNAهای ژنومی به صورت نقاط روشنی روی ژل آگارز نمایان می‌شود که مکان آن‌ها در تصویر شماره 1 توسط فلش نشان داده شده است (نمونه‌های شماره 1 تا 6).



تصویر شماره 1: نتایج بررسی کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز 1 درصد.

بعد از بررسی کیفیت DNA استخراج شده از افراد کنترل و بیمار، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) براساس پروتکل ذکر شده، صورت گرفت. در این تکنیک پس از قرار دادن نمونه‌های افراد کنترل و بیمار در دستگاه ترموسایکلر، چرخه حرارتی مربوطه وارد شده، در طی زمان مشخصی (حدود 1 ساعت و 50 دقیقه) انجام شد. به منظور بررسی کیفیت محصول حاصل از PCR، از ژل آگارز 1/5 درصد استفاده شد. در این پروژۀ ژن ملاتونین، مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌ها از نظر وجود پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2119882 (MTNR1A) با استفاده از تکنیک PCR-RFLP ارزیابی شدند. همان‌طور که در تصویر شماره 2 نشان داده شده است، محصول حاصل از PCR ژن rs2119882 (MTNR1A) که قطعه‌ای به طول 206 جفت باز است، شامل ناحیه‌ای می‌باشد که پلی‌مورفیسم مورد نظر در آن رخ می‌دهد. به منظور بررسی کیفیت محصول PCR و اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، از ژل آگارز 1/5 درصد استفاده شد و در تصویر شماره 3 هضم آنزیمی را مشاهده می‌کنید.

به میزان OR به دست آمده (1/06 to 5/87) CI 95 درصد،
OR=2/5، احتمالاً این ژنوتیپ فاکتور خطر به لوکمی را
نشان می دهد.

جدول شماره 3: نتایج مربوط به فراوانی ژنوتیپ های مشاهده شده
در پلی مورفیسم rs2119882 ژن MT 1

ژن	ژنوتیپ	گروه بیمار تعداد (درصد)	گروه کنترل تعداد (درصد)	OR (95 CI درصد)	سطح معنی داری
MT 1	TT	40 (34)	40 (28)	Ref (1)	-
	TC	35 (29)	50 (35)	0/7 (0/037 to 1/29)	P < 0/2559
	CC	25 (21)	10 (7)	2/5 (1/06 to 5/87)	0/355
	TC+CC			0/1 (0/56 to 1/70)	P < 1/000

همان طور که در جدول شماره 4 مشاهده می شود،
تفاوت توزیع ژنوتیپ TC در افراد بیمار و کنترل معنی دار
بوده است (P=0/0326) و با توجه به میزان OR به دست
آمده (0/3051 to 0/9502) CI 95 درصد، OR=0/5385،
احتمالاً این ژنوتیپ اثر محافظتی به لوکمی را نشان
می دهد و یک فاکتور Protective محسوب می شود.

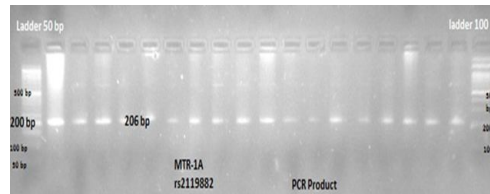
جدول شماره 4: بررسی فراوانی ژنوتیپ MT1A

ژن	ژنوتیپ	OR (95 CI درصد)	سطح معنی داری
MT 1	TT+CC	Ref (1)	-
	TC	0/5385 (0/3051 to 0/9502)	P < 0/0326

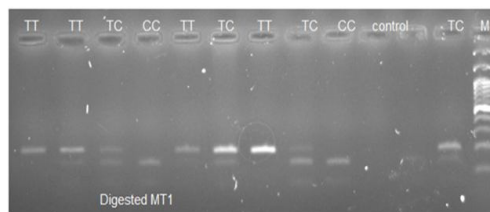
نتایج آزمایشات نشان داد که در جمعیت بیمار،
فراوانی آلل T برابر 57 درصد و فراوانی آلل C برابر 43
درصد بود. در گروه کنترل، فراوانی آلل T برابر با 65
درصد و فراوانی آلل C برابر با 35 درصد بود. براساس
نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون (P=0/3526)،
 $\chi^2=0/864$ کای اسکوار، چون P کم تر از 0/05 نمی باشد،
بنابراین تفاوت معنی داری در توزیع آللی پلی مورفیسم
rs2119882 ژن MT 1، بین دو گروه بیمار و کنترل
مشاهده نمی شود (جدول شماره 5).

جدول شماره 5: بررسی فراوانی آللی MT 1

ژن	آلل	گروه بیمار (درصد)	گروه کنترل (درصد)	χ^2	سطح معنی داری
MT 1	T	57	65	0/864	0/3526
	C	43	35		



تصویر شماره 2: محصولات حاصل از PCR ژن rs2119882(MTNR1A)
که اندازه قطعه 206 bp، نشان داده شده است. یک ردیف مربوط
به مارکر 100 bp جهت تشخیص قطعه تکثیر شده است.



تصویر شماره 3: ژل آگارز 1/5 درصد مربوط به RFLP جهت بررسی
پلی مورفیسم rs2119882 ژن MT 1، DNA=M، مارکر 100 جفت
بازی. قطعات بازی 206، 154 و 61 جفت بازی قابل رویت است.
افراد هموزیگوت طبیعی (TT)، هموزیگوت موتانت (CC) و افراد
هتروزیگوت موتانت (TC) می باشند.

نتایج آزمایشات (جدول شماره 3) نشان داد که در
میان 70 فرد کنترل، 28 نفر (40 درصد) دارای ژنوتیپ
TT، 35 نفر (50 درصد) دارای ژنوتیپ TC و 7 نفر (10
درصد) دارای ژنوتیپ CC بودند. در میان 84 فرد بیمار،
34 نفر (40 درصد) دارای ژنوتیپ TT، 29 نفر (35
درصد) دارای ژنوتیپ TC و 21 نفر (25 درصد) دارای
ژنوتیپ CC بودند. جهت بررسی معنی دار بودن نتایج از
آزمون Chi-Square استفاده شد. که $\chi^2=9/076$ با
مقدار P=0/0107 به دست آمد. بنابراین در این آزمون،
تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ ها در دو گروه مورد
مطالعه مشاهده می شود (P<0/05). در ادامه به منظور
تعیین OR، CI و P-value از آزمون Odds-Ratio با
کمک برنامه نرم افزاری (v,12.1.40) Med Cale استفاده
شد (جدول شماره 3). همان طور که در جدول شماره 3
مشاهده می شود، تفاوت توزیع ژنوتیپ CC در افراد
بیمار و کنترل معنی دار بوده است (P=0/0355) و با توجه

بحث

در این مطالعه نتایج آزمایشات نشان داد که در فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده در پلی مورفیسم rs2119882 MT 1 در میان 70 فرد کنترل، 28 نفر (40 درصد) دارای ژنوتیپ TT، 35 نفر (50 درصد) دارای ژنوتیپ TC و 7 نفر (10 درصد) دارای ژنوتیپ CC بودند. در میان 84 فرد بیمار، 34 نفر (40 درصد) دارای ژنوتیپ TT، 29 نفر (35 درصد) دارای ژنوتیپ TC و 21 نفر (25 درصد) دارای ژنوتیپ CC بودند. جهت بررسی معنی دار بودن نتایج از آزمون Chi-Square استفاده شد. $X^2 = 9/076$ با مقدار $P = 0/0107$ به دست آمد. بنابراین آزمون، تفاوت معناداری بین ژنوتیپ‌ها در دو گروه مورد مطالعه نشان داد ($P < 0/05$). در ادامه به منظور تعیین OR، CI و P از آزمون Odds-Ratio، تفاوت توزیع ژنوتیپ هتروزیگوت TC نسبت به هموزیگوت‌ها در افراد بیمار و کنترل معنی دار بوده است ($P = 0/0326$) و باتوجه به میزان OR به دست آمده ($0/3051$ to $0/9502$) CI 95 درصد، $OR = 0/5385$ ، احتمالاً این ژنوتیپ اثر محافظتی به لوکمی را نشان می‌دهد و یک فاکتور Protective محسوب می‌شود و تفاوت توزیع ژنوتیپ CC در افراد بیمار و کنترل معنادار بوده است ($P = 0/0355$) و باتوجه به میزان OR به دست آمده ($1/06$ to $5/87$) CI 95 درصد، $OR = 2/5$ ، احتمالاً این ژنوتیپ فاکتور خطر به لوکمی را نشان می‌دهد.

نقش فیزیولوژیک و پاتولوژیک ملاتونین در سرطان پستان، ملانوما، سرطان کولون، ریه و لوکمی و سرویکس و معده مورد توجه قرار گرفته است (13-15) و مشخص شده که بیان MT2 در پاسخ به آسیب بافتی افزایش می‌یابد (15). در سلول‌های کانسر پستانداران ژن‌های آروماتاز حاوی پروموتورهای کنترل شده به وسیله cAMP می‌باشند و برخی از عوامل همچون ملاتونین که باعث کاهش cAMP گردد، می‌تواند باعث کاهش فعالیت آروماتاز شود. همچنین افزایش بیان رسپتور MT1 باعث تقویت آثار مهار رشد ملاتونین در

سلول‌های کانسر پستان (MCF-7) که از لحاظ بیان استروژن مثبت بوده‌اند، شده است (7).

شواهدی در رابطه با فعالیت ملاتونین در غشاء GI به وسیله Rahimimoff Questel نشان داده شده است. به طوری که آن‌ها ثابت کرده‌اند که ملاتونین می‌تواند باعث کاهش انقباض خوبخود روده‌ها گردد (سم‌زدایی از طریق خواص ملاتونین در برداشت رادیکال آزاد و به دلیل توانایی آن برای تنظیم افزایشی آنزیم‌های سم زدا نظیر کاتالاز، سوپراکسید دیس موتاز و گلو تاتیون پراکسیداز انجام می‌شود (16، 17). ملاتونین نه تنها در غشاء GI وجود دارد بلکه برخی یافته‌ها دلالت بر این موضوع دارند که این ماده به طور موضعی به وسیله دو آنزیم AANAT و HIOMT تولید می‌شود که این آنزیم‌ها در غشاء اپی تلیال رودی بیان می‌شوند. همچنین نشان داده شده است که غلظت ملاتونین در روده 100-10 بار بیش تر از سرم است (18). همچنین مشخص شد که این هورمون در جلوگیری و درمان کولیت سندرم روده تحریک پذیر، قولنج و اسهال کودکان و سرطان‌هایی چون، ریه‌ها، پوست، پستان، تخمدان، پروستات، کبد و کولون اثر بالقوه‌ای دارد (10). عملکرد آنتی اکسیدانی MT1 و MT2 اجزای سلولی را از اثرات آسیب‌زننده ROS حفظ می‌کند. موش‌های با نقص MT2 نسبت به حالت نرمال در معرض مقدار بیش تری از ROS و استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرند و رادیکال‌های آزاد اثرات مخرب خود را بر جای می‌گذارند (19).

شکرزاده و همکاران (1392) در تحقیقی نقش رسپتور ملاتونینی در بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم معده در استان مازندران را بررسی کردند. در این تحقیق 30 بیمار مبتلا به آدنوکارسینومای معده و 30 فرد سالم انتخاب شدند. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که بیان گیرنده MT2 در بافت‌های سرطانی و بافت‌های مجاور آن‌ها در مقایسه با بافت‌های افراد سالم تا حد زیادی بالاتر است و بیان آن در بافت‌های مجاور بافت

سرطانی بسیار بیش تر از خود بافت های سرطانی و بافت های طبیعی است (18).

در پژوهشی مشاهده شد با افزودن ملاتونین به تاموکسیفن، گسترش بیماری آهسته تر شد. در بررسی دیگری نیز مصرف دوزهای بالایی از ملاتونین (700 میلی گرم در روز) کاهشی گذرا در اندازه برخی توده های توموری داشته است. همچنین، گفته می شود افزودن ملاتونین به شیمی درمانی و رادیوتراپی سبب کاهش آسیب به سلول های خونی شده و درمان را قابل تحمل تر می نماید. مطالعه ای بیان کرد میزان ملاتونین سرم و ادرار در زنان مبتلا به سرطان پستان، پایین است و تجویز ملاتونین سبب مهار رشد تومورهای پستانی می گردد (20). Shih-Chi و همکاران در سال 2017 به بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن گیرنده غشای ملاتونین A/1B با بروز و متاستاز کارسینوم کبدی پرداختند (21). در این مطالعه، تأثیر پلی مورفیسم ژن گیرنده ملاتونین بر خطر و پیشرفت تومورهای کبدی بین 335 بیمار مبتلا به HCC و 1196 فرد عاری از سرطان بررسی شد. نتایج حاکی از آن بود که افراد دارای یک هاپلوتیپ خاص از چهار SNP های MTNR1B بیش تر مستعد ابتلا به HCC بودند و داده های این پژوهش ارتباط پلی مورفیسم ژن گیرنده ملاتونین با خطر HCC و متاستاز سرطان کبدی را نشان می دهد (21). بررسی متاآنالیز در سال 2005 در مورد نقش ملاتونین در 10 مورد درمان بالینی تصادفی تومورها، در سرطان های ریه، مغز، پوست، کلیه و پستان که شامل 643 بیمار بودند، میزان ملاتونین، خطر مرگ را در سال اول تا 34 درصد کاهش داده است (22). در سال 2013 تأثیر ملاتونین بر روی شکست رشته DNA بررسی و مشخص شد که ملاتونین باعث افزایش ظرفیت ترمیم DNA از طریق تأثیر بر ژن های کلیدی مطرح در مسیرهای مسئول تخریب DNA می شود (17).

Büyükavci و همکاران اثرات پرواکسیدانت ملاتونین را در سلول های لوکمی انسان مطالعه کردند، ایشان اظهار داشتند که ملاتونین نه تنها تکثیر در سلول های

لوسمی را القا نمی کند، بلکه در غلظت های بالاتر با افزایش تولید گونه های واکنشگر اکسیژن باعث مهار رشد این سلول ها و افزایش آپوپتوز می شود. در حالی که ملاتونین میزان آپوپتوز و تولید رادیکال های آزاد در سلول های سالم را کاهش می دهد (10).

در مطالعه Cois و همکارانش، غلظت های فیزیولوژیک ملاتونین (9-10 مولار)، به طور معنی دار قابلیت تهاجمی سلول های MCF-7 کانسر پستان را کاهش داد و ملاتونین باعث افزایش بیان پروتئین های چسبنده (adhesion proteins) همچون E-Cadherin و integrin-1 β شده است (23).

در مطالعه Trubiani و همکاران در سال 2005 نشان داده شد که ملاتونین نه تنها تکثیر در سلول های لوسمی را القا نمی کند، بلکه در غلظت های بالاتر با افزایش تولید گونه های واکنشگر اکسیژن باعث مهار رشد این سلول و افزایش آپوپتوز می شود. در حالی که ملاتونین میزان آپوپتوز و تولید رادیکال های آزاد در سلول های سالم را کاهش می دهد (22). درمان سلول های لوسمی انسانی با ملاتونین منجر به آزاد شدن سیتوکروم سی میتوکندری شده و پس از آن محصول ژن Bcl-2 کاهش یافته که نشان دهنده فعال سازی مسیرهای آپوپتوز است. ملاتونین اثرات ضد رگزیایی را از طریق مهار عوامل رشد تومور مانند Insulin-like growth factor1 (IGF)، Epidermal growth factor (EGF)، Vascular endothelial growth factor (VEGF) و Endothelin-1 (ET-1) که میتوز های قوی هستند و باعث تحریک سلول سرطانی می شوند و مهار بیان پروتئین HIF-1 α و القا هیپوکسی در سلول های سرطانی اعمال می کند (24). مهار رشد به وسیله ملاتونین، درصد سلول ها را در فازهای G₀، G₁، G₂ و M کاهش می دهد که نشانگر توقف چرخه سلولی است و کاهش در تقسیم سلولی و چرخه سلولی با افزایش معنی دار در بیان پروتئین های P53 و P21 همراه است (22). همچنین مطالعات بیان کرد که ملاتونین بیان دو عامل ضد

رگزایی miRNA3195 و miRNA374b را در سلول‌های PC-3 hypoxic افزایش می‌دهد (25).

در مطالعات قبلی ما، بیان رسپتورهای MT1 و MT2 در کانسر معده در استان مازندران که شیوع بالایی از این کانسر را داراست، انجام شد (18). این مطالعه تکمیل‌کننده مطالعات قبلی در رابطه با بیان این ژن‌ها می‌باشد. این مطالعه برای اولین بار با هدف تعیین پلی‌مورفیسم رسپتور ملاتونینی MT1 در نمونه‌های خونی (گلوبول‌های سفید) لوکمی کودکان بیمارستان مازندران برنامه‌ریزی شد. به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم ژن رسپتور ملاتونین rs2119882 (MT1A) احتمالاً با بیماری لوکمی کودکان مرتبط می‌باشد و ژنوتایپ CC احتمالاً فاکتور بیمای‌زایی و ژنوتایپ TC نقش محافظتی داشته باشند. به‌طور کلی غربالگری پلی‌مورفیسم رسپتور ملاتونین می‌تواند در پیش‌آگهی بیماری، پیشگیری از پیشرفت بیماری و همچنین استفاده از راهکارهای درمانی مناسب در جهت افزایش طول عمر و بهبود کیفیت زندگی در بیماران مبتلا به سرطان کمک‌کننده باشد. قابل ذکر است که این نتیجه محدود به جمعیت مورد مطالعه حاضر می‌باشد و به مطالعات بیش‌تر بر روی تعداد

بیش‌تری از افراد برای تایید ارتباط پلی‌مورفیسم ژن رسپتور ملاتونین (MT1 rs2119882) با بیماری لوکمی نیاز می‌باشد.

با شناسایی پلی‌مورفیسم رسپتورهای ملاتونینی در کودکان مبتلا به لوکمی استان مازندران و با توجه به مطالعات قبلی که نقش فارماکولوژیک برای ملاتونین بیان کرده‌اند و یا آگونیست‌های اختصاصی این رسپتورها را در پیشگیری یا درمان سرطان موثر دانسته‌اند، می‌توان به ارتباط این رسپتور در اتیولوژی این بیماری بخصوص در بیماران لوکمی پی‌برد و از طریق روش‌های پیشگیری‌کننده و درمانی مناسب و برخی غربالگری‌ها به راه‌های جدیدی برای درمان این بیماری دست یافت.

سپاسگزاری

این طرح با در معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران کد اخلاق R.MAZUMS.REC.1399.475 تصویب شده است و بدین‌وسیله از همکاری‌ها و حمایت‌های مالی آن معاونت و همکاری بی‌دریغ پرسنل محترم مرکز تحقیقات تالاسمی و بخش کودکان بیمارستان بوعلی ساری سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Ghadimi MR, Rasouli M, Mahmoodi M, Mohammad K. Prognostic factors for the survival of patients with esophageal cancer in Northern Iran. J Res Med Sci 2011; 16(10): 1261-1272.
- Saffar A, Rahgozar M, Shahi F, Biglarian A. Survival analysis for acute myeloid leukemia. Razi Journal of Medical Sciences 2015; 22(134): 41-48 (Persian)
- Salehi M, Gohari MR, Vahabi N, Zayeri F, Yahyazade SH, Kafashian MR. Comparison of artificial neural network and Cox regression model in survival prediction of breast cancer patient. SJIMU 2013; 21(2): 120-128 (Persian).
- Quiroz Y, Ferrebuz A, Romero F, Vaziri N, Rodriguez-Iturbe Yasmir B. Melatonin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and progression of renal damage in rats with renal mass reduction. Am J Physiol Renal Physiol 2008; 294(2): F336-F344.
- Wu J, Fantasia JE, Kaplan R. Oral manifestations of acute myelomonocytic leukemia: a case report and review of the classification of leukemias. J Periodontol 2002; 73(6): 664-668.

6. Lai R, Hirsch-Ginsberg CF, Bueso-Ramos C. Pathologic diagnosis of acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000; 14(6): 1209-1235.
7. Sjöblom M, Safsten B, Flemstrom G. Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284(6): G1034-G1044.
8. Hidalgo J. Metallothioneins and Brain Injury: What Transgenic Mice Tell Us. *Environ Health Prev Med* 2004; 9(3): 87-94.
9. Ebadi M, Sharma S. Metallothioneins 1 and 2 attenuate peroxynitrite-induced oxidative stress in Parkinson disease. *Exp Biol Med* (Maywood) 2006; 231(9): 1576-1583.
10. Büyükcavci M, Özdemir Ö, Buck S, Ravindranath Y, SavaanS. Effect of melatonin on the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human leukemia cells. *in Vivo* 2011; 25(3): 405-409.
11. Becker-André M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, André E, Missbach M, Saurat JH, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; 269(46): 28531-28534.
12. Zhou D, Clarke P, Wang J, Chen S. Identification of a promoter that controls aromatase expression in human breast cancer and adipose stromal cells. *J Biol Chem* 1996; 271(25): 15194-15202.
13. Turek FW, Gillette MU. Melatonin, sleep, and circadian rhythms rationale for development of specific melatonin agonists. *Sleep Med* 2004; 5(6): 523-532.
14. Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett* 2001; 22(1): 45-47.
15. Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasák M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull* 2001; 55(2): 133-145.
16. Oprea-Ilie G, Haus E, Sackett-Lundeen L, Liu Y, McLendon L, Busch R, et al. Expression of melatonin receptors in triple negative breast cancer (TNBC) in African American and Caucasian women: relation to survival. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 137(3): 677-687.
17. Rodriguez C, Martín V, Herrera F, García-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Casado-Zapico S, et al. Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells. *Int J Mol Sci* 2013; 14(4): 6597-6613.
18. Nasri Nasrabadi N, Ataee R, Abedian kenari S, Shokrzadeh M, Najafi M, Hoseini SV, et al. Expression of MT2 Receptor in Patients with Gastric Adenocarcinoma and its Relationship with Clinicopathological Features. *J Gastrointest Canc* 2014; 45(1): 54-60.
19. Aghanassir F, Aghaei H, Imani Fouladi AA, Nourani MR. Evaluation of Metallothionein Molecules Gene Expression Following Sciatic Nerve Injury. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 25(124): 170-182 (Persian).
20. Farhud DD, Aghasi M, Sadighi H. Gene and Aging. *Iranian J Publ Health* 2008; 37(3): 1-8.
21. Shih-Chi S, Yung-Chuan H, Yu-Fan L, Russel JR, Chia-Hsuan C, Chia-Ming Y, et al. Association of melatonin membrane receptor 1A/1B gene polymorphisms with the occurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8(49): 85655-85669.
22. Trubiani O, Recchioni R, Moroni F, Pizzicannella J, Caputi S, Di Primio R. Melatonin provokes cell death in human B-Lymphoma cell by mitochondrial –dependent apoptotic pathway activation. *Journal of*

- Pineal Research 2005; 39(4): 425-431.
23. Cois S, Fernández R, Güézmés A, Sánchez-Barceló EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4383-4390.
24. Kaminski WE, Beham AW, Kzhyshkowska J, Gratchev A, Puellmann K. On the horizon: flexible immune recognition outside lymphocytes. *Immunobiology* 2013; 218(3): 418-426.
25. Hornedo-Ortega R, Cerezo AB, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC, Mas A. Melatonin and other tryptophan metabolites produced by yeasts: Implications in cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Front Microbiol* 2015; 6: 1565.