Archive of SID

پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، علمی ـ پژوهشی، سال هفدهم، بهار، شماره ۱، ۱۳۹۹، ۳۰۵۸-۳۰۴۵

ارزیابی تاثیر ملیتین بر شاخص‌های بیوشیمیایی عملکرد کبد و کلیه و بیان KI67 در موش‌های مبتلا به سرطان پستان تجربی

فرناز دباغ مقدم[۱]، سمیه حامدی*[۲]، پژمان مرتضوی[۳]، محمد نبیونی[٤]، نسیم حیاتی رودباری[٥]

چکیده

امروزه توجه به برخی فراورده‌های طبیعی مانند ملیتین موجود در زهر زنبور عسل در حال افزایش است. برخی مطالعات نشان دهنده خاصیت ضد سرطانی این محصول می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر جهت ارزیابی تاثیرات ملیتین بر سرطان پستان القاء شده و همچنین شاخص‌های عملکردی کبدی و کلیوی موش‌های نژاد Balb/c انجام گرفته است. پس از تهیه و کشت رده‌ی سلولی 4T1، القای سرطان پستان در ناحیه پستانی موش‌ها انجام و دوره‌ی درمانی ۲۰ روز در ۹ گروه (شامل گروه های تیمار با دوزهای ٦، ۳، ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ملیتین، دوکسوروبیسین، سیس پلاتین، PBS، DMSO، کنترل سالم، کنترل منفی) درنظر گرفته شد. در پایان دوره، نمونه خون حیوانات اخذ و پس از جدا نمودن سرم بیومارکرهای عملکرد کبدی و کلیوی اندازه‌گیری شدند. از نمونه بافت توموری القا شده، پس از تثبیت شدن در فرمالین به روش رایج ایمنوهیستوشیمی اسلاید بافتی تهیه و جهت بررسی بیان KI67 مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که شاخص کلیوی BUN و آنزیم‌های کبدیALP، AST و ALT در گروه تیمار شده با ملیتین دوز ٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم نداشت. نتایج هیستوپاتولوژی نشان دهنده کاهش تهاجم سلول‌های توموری در گروه‌های درمانی ملیتین بود که این کاهش در دوز ٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشتر مشهود بود. در ایمونوهیستوشیمی، بیان KI67 در بین گروه‌ها تغییر معنی‌داری نشان نداد. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده‌ی تاثیر مفید ملیتین در جلوگیری از رشد سلول‌های توموری بدون ایجاد جراحت در اندام‌های کبد و کلیه در مقایسه با داروهای رایج دیگر می‌باشد.

واژگان کلیدی: *سرطان پستان ، رده سلولی T1٤، موش، ملیتین، KI67.*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۲

مقدمه

سرطان پستان رایج ترین سرطان در میان زنان است و براساس آمارهای سازمان جهانی بهداشت از هر ۸ الی ۱۰ زن، یک نفر مبتلا به سرطان پستان می‌شود. بر اساس آمارهای ایران، در کشور ما از هر۱۰ الی۱۵ زن، احتمال ابتلای یک زن به سرطان پستان وجود دارد اما سن بروز سرطان پستان در زنان ایران دست کم یک دهه کمتر از زنان کشورهای توسعه یافته است(۱). سرطان پستان، دومین علت رایج مرگ ناشی از سرطان بوده و یک بیماری به شدت ناهمگن است که در اثر تأثیر متقابل عاملهای خطر وراثتی و محیطی ایجاد شده و به تجمع پیشرونده تغییرات ژنتیک و اپی -ژنتیک در سلولهای سرطان پستان منجر می‌شود. اگرچه شواهد اپیدمیولوژیک بر وجود عاملهای خطر ویژه (مانند سن، چاقی، مصرف الکل، برخورد با استروژن در طول زندگی) تأکید دارد، وجود سابقه خانوادگی سرطان پستان قویترین عامل خطر برای این بیماری به شمار میآید. تقریباً ۲۰ درصد همه سرطان‌های پستان را انواع خانوادگی تشکیل میدهند و از نظر بیماریزایی، وابستگی خاصی به ژن مستعدکننده ویژه آن بیماری دارند(۲). روش‌های متعددی در درمان سرطان پستان مورد استفاده قرار می‌گیرد که شامل: درمان سیستمیک، جراحی، جراحی حفظ پستان، جراحی برداشتن پستان، پرتودرمانی و شیمی درمانی می‌باشد که در این نوع درمان، بیماران داروی ضد سرطان را به صورت وریدی یا خوراکی دریافت می‌کنند. این داروها که به شکل ترکیبی هستند شامل: سیکلوفسفامید، متوتروکسات، فلورواوراسیل، فلورواوراسیل، پکلی تاکسل، سیس پلاتین، دوکسوروبیسین می‌باشند. مقدار بالای دارو علاوه بر سلول‌های سرطانی، سلول‌های اصلی تولید کننده خون در

۱-دانشجوی دکتری زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات ، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
*۲-گروه علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران(sahar_hamedi@yahoo.com)
۳ -گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
٤-دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم سلولی و مولکولی، تهران، ایران
٥- گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مغز استخوان را نیز از بین می‌برند به این دلیل بیماران نیازمند پیوند سلول‌های اصلی جهت جلوگیری از بروز عوارض تهدید کننده هستند (۲). نظر به اینکه ترکیبات درمانی و رایج امروزی که برای انواع مختلف سرطان ها تجویز می‌شوند، دارای مشکلاتی مانند سمیت و مقاومت دارویی هستند و ازسوی دیگر ترکیباتی که القاء کننده آپوپتوز هستند می‌توانند در درمان سرطان مفید باشند، تحقیقات گسترده‌ای در ارتباط با خواص ضد سرطانی ترکیبات طبیعی بدست آمده از گیاهان و جانوران، صورت گرفته است. یکی از این مواد طبیعی با خاصیت های منحصر به فرد، زهر زنبور عسل می‌باشد.

زهر زنبور عسل، ترکیبی مایع، بی‌رنگ و اسیدی با pH ٤/٥ تا ٥/٥ می‌باشد که با اتانول غیر فعال شده (۳) و دارای حداقل ۱۸ جزء فعال می‌باشد که حاوی پپتیدهای مختلف از جمله ملیتین، آپامین و آدولاپین، آنزیم‌هایی از جمله هیالورونیداز و فسفولیپاز A_2، آمین‌های فعال زیستی نظیر هیستامین و اپی‌نفرین و اجزای غیر پپتیدی با خواص دارویی فراوان می‌باشد و فسفولیپاز A_2 و ملیتین به عنوان ۲ جزء اصلی زهر زنبور عسل در نظر گرفته می‌شوند(٤). در کیسه‌ی زهر زنبور، ملیتین به صورت تترامر وجود دارد ولی در مرحله‌ی تاثیرگذاری روی سلول به صورت منومر عمل می‌کند(٤). ملیتین با فرمول شیمیایی $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$ بازمانده‌ی یک زنجیره ی طویل پپتیدی بوده و گزارشات متنوعی در مورد فعالیت‌های بسیار قوی همولیتیکی آن گزارش شده است (٥). در ناحیه (N-Terminal) ساختار ملیتین، اکثر اسیدهای آمینه‌ها (۲۰ مورد اول) از نوع هیدروفوب می‌باشد، در حالی که در ناحیه‌ی (C-Terminal) عمدتا از عامل‌های هیدروفیلی ساخته شده است که این ساختار آمفی پاتیکی، به ملیتین اجازه می‌دهد که بتواند تعاملاتی با غشاهای فسفولیپیدی سلول‌ها برقرار کند(٦). امروزه از فرایند زهر درمانی، به روش‌های مختلف بهره گرفته می‌شود و زهر زنبور عسل به دلیل ساختار منحصر به فردش دارای خواص بسیار ارزشمندی می‌باشد به طوری که در چند دهه‌ی اخیر از تمامی محصولات و نیز زهر و نیش زنبور عسل در نقاط مختلف جهان در ارتباط با درمان بیماری‌های خطرناک مانند سرطان‌های مختلف آزمایشات و تحقیقات آزمایشگاهی ارزشمندی صورت گرفته است. همچنین در ارتباط با بیماری اماس (مولتیپل اسکروزیس) به دلیل داشتن خاصیت ضد التهابی باعث بهبودی شده است(۷). اخیراً ملیتین به عنوان یک ترکیب ضد سرطان مورد توجه قرار گرفته است و محققین با ایجاد تغییراتی در مولکول آن سعی کرده‌اند انواع واکنش های آلرژیک ناشی از بکارگیری ملیتین را کاهش دهند(۸). در سرطان‌هایی مانند سرطان کلیه، ریه، کبد، پروستات، مثانه و لوسمی‌ها، سلول‌های بدخیم می‌توانند هدف ملیتین قرار بگیرند(۹). با این همه مکانیسم اثرات ضدسرطانی ملیتین به طور کامل شناخته نشده است(۸). زهر زنبور عسل از طریق القاء آپوپتوز، رشد و تکثیر سلول‌های بدخیم را در سلول‌های سرطانی ریه (۱۰) سرطان کبد (۱۱) سرطان سرویکس و سرطان پستان مهار می‌کند(۱۲). همچنین ملیتین تاثیرات متفاوتی شامل ضد آلرژی، ضد انژیوژنز، نوروپروتکتیو (۱۳،۱٤) و خواص ضد سرطانی از خود به نمایش می‌گذارد و گزینه‌ی مناسبی برای تاثیرات ضد التهابی در مواردی از جمله آرتریت روماتوئید می‌باشد(۱٥). ملیتین میتواند باعث توقف چرخه‌ی سلولی و مهار رشد سلول‌های سرطانی از جمله در سرطان پستان و نیز القاء آپوپتوز شود(۱٦،۱۷). این ترکیب دارای فعالیت بالای لیز سلولی به خصوص لیز غشاء گلبول‌های قرمز می‌باشد(۱۸) و در توالی خود بخشی دارد که شبیه به شوینده عمل می‌کند و احتمالاً خاصیت لیزکنندگی ملیتین به همین بخش وابسته است(۱۹). مکانیسم ضدسرطانی ملیتین با آپوپتوز، نکروز و لیز سلول‌های سرطانی در ارتباط می‌باشد(۲۰).

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که زهر زنبور عسل دارای خواص ضدسرطانی می‌باشد که می‌تواند سیستم سلولی و ایمنی بدن را تحریک نموده و با فعال کردن مسیرهای آبشاری پر اهمیت مانند آپوپتوز، از پیشروی تکثیر سلول‌های سرطانی ممانعت به عمل آورد. نکته ی قابل توجه غیر سمی بودن این ماده برای سلول‌های سالم و نداشتن عوارض مسمومیت می‌باشد که در کنار این خواص، دارای ویژگی‌های ضدویروسی، ضدباکتریایی و ضدانگلی هم می‌باشد. از این رو جهت بررسی‌های بیشتر، به مطالعه و ارزیابی تاثیرات ملیتین بر سرطان پستان القاء شده در موش نژاد Balb/c و تاثیراتش برشاخص‌های کبدی و کلیوی در مقایسه با داروی ضدسرطانی رایج پرداختیم.

مواد و روش‌کار

ملیتین

پس از تهیه ملیتین از شرکت سیگما که حاوی ۵ میلی‌گرم پودر لیوفیلیزه بود، طبق دستورالعمل شرکت دارویی سیگما هر ۱ میلی‌گرم از ملیتین وزن شده، در ۱ میلی‌لیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) حل شد و با فیلتر ۰/۲۲ میکرونی استریل گردید.

تهیه و کشت رده ی سلولی سرطانی پستان موش 4T1

رده‌ی سلولی 4T1 (NBCI code:C604) از بانک سلولی انسیتو پاستور تهران–ایران تهیه و در محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 حاوی (۱۰٪ حجم/حجم) سرم جنین گاوی، آنتی‌بیوتیک(در هر میلی‌لیتر ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین) تحت شرایط کنترل شده دما(۳۷ درجه سانتی‌گراد) و اتمسفر مرطوب حاوی CO_2 (۵٪) کشت داده شد. رده ی سلولی 4T1 به صورت تک لایه و چسبنده در کف فلاسک‌ها رشد نموده به همین دلیل هر هفته سه بار تعویض محیط کشت در نظر گرفته شد و برای برداشتن سلول‌ها از محلول تریپسین استفاده گردید. به منظور شمارش سلولی از رنگ‌آمیزی تریپان بلو ۰/٤ ٪ و لام هموسایتومتر(نئوبار) استفاده شد. سلول‌های زنده به دلیل حفظ تمامیت غشایی از ورود رنگ به داخل سیتوپلاسم ممانعت می‌کنند، در حالی که سلول‌های مرده آبی رنگ و با اندازه‌ی درشت می‌شوند(۲۱).

حیوانات مورد مطالعه

تعداد ٤۰ سر موش‌های ماده نژاد Balb/c (خالص) از موسسه‌ی انسیتو پاستور کرج خریداری شد و در اتاق پرورش حیوانات تحت شرایط کنترل شده از نظر دما، رطوبت و نور نگهداری شدند و سپس در گروه‌های ۵ تایی تقسیم‌بندی شدند(جدول ۱). تمامی آزمایشات بر اساس اصول اخلاقی پژوهش در خصوص حیوانات رعایت گردید و کد اخلاقی از مرکز تکثیر، پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی به شماره ٦۱٦/۹۷٤۵ تهیه گردید.

جدول۱ – گروه بندی موش‌های درمانی و کنترل

نوع گروه	مسیر تزریق	مقدار تزریق
کنترل سالم	درون صفاقی	–
کنترل منفی	درون صفاقی	–
سرطانی– PBS	درون صفاقی	–
سرطانی– DMSO	درون صفاقی	–
سرطانی– دوکسوروبیسین	درون صفاقی	۳ میلی‌گرم/ کیلوگرم
سرطانی– سیس پلاتین	درون صفاقی	۵ میلی گرم/ کیلوگرم
سرطانی– ملیتین	درون صفاقی	۱ میلی‌گرم/ کیلوگرم
سرطانی– ملیتین	درون صفاقی	۳ میلی‌گرم/ کیلوگرم
سرطانی– ملیتین	درون صفاقی	٦ میلی‌گرم/ کیلوگرم

ایجاد مدل سرطانی–حیوانی

پس از تریپسینه کردن سلول‌های 4T1 و خنثی سازی توسط FBS ۱۰٪و سانتریفیوژ در دور RPM ۱۳۰۰ برای ۵ دقیقه و رسیدن به رسوب سلولی و حل کردن در ۱ میلی‌لیتر FBS

www.SID.ir

Archive of SID

٪۱۰سلول‌ها شمارش شدند. برای ایجاد سرطان در هر سر موش حدود ۱ میلیون سلول 4T1 نیاز بود. تزریق به صورت زیر پوستی به ناحیه پد سینه راست موش انجام گردید. پس از ١٤ روز حجم تومورها محاسبه گردید و در اندازه‌ی ۲ میلی متر مکعب دوره ی درمانی تزریق ۲۰ روز آغاز گردید(۲۲).

تعیین دوز تزریقی ملیتین

بر اساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده و دوز کشنده میانه(ld50) در موش، دوزهای٦ و۳ و۱ میلی‌گرم/کیلوگرم جهت تزریق درون‌صفاقی به حیوانات انتخاب گردید.

تعیین دوز تزریقی داروی سیس‌پلاتین

داروی سیس‌پلاتین ۱۰ میلی‌گرم با دستورالعمل لزوم انحلال در حلال DMSO و دارنده‌ی پروانه‌ی ساخت از Naprod life sciences pvt. Ltd. India با رعایت نکات ضروری در خصوص داروهای سایتوتوکسیک به صورت ویال تهیه و در دمای زیر ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور از نور و یخ زدگی نگهداری و محافظت گردید. قبل از مصرف رقیق‌سازی انجام گرفت. بر اساس دستورالعمل موجود همراه داروی سیس‌پلاتین، بر اساس غلظت دارو محاسبات انجام گرفت و دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم جهت تزریق درون صفاقی به حیوانات انتخاب گردید.

تعیین دوز تزریقی داروی دوکسوروبیسین

داروی دوکسوروبیسین ۱۰ میلی‌گرم بر ۵ میلی‌لیتر با نام تجاری Doxotil به صورت ویال حاوی ۵ میلی‌لیتر از داروی مورد نظر تهیه گردید. بر اساس دستورالعمل موجود همراه داروی دوکسوروبیسین، بر اساس غلظت دارو محاسبات انجام گرفت و دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم جهت تزریق درون صفاقی به حیوانات انتخاب گردید.

خونگیری از حیوانات و تهیه‌ی سرم از نمونه‌های خونی

از آنجایی که مقدار خون یک حیوان معادل ٪۱۰ کل وزن بدن آن می‌باشد، حجم خون موش‌ها تخمین زده شد. برای گرفتن حجم زیاد خون و سپس حذف کردن حیوان، از این روش استفاده گردید. ابتدا حیوانات با کلروفرم بیهوش گردیدند و به کمک قیچی و پنس استریل جراحی، قفسه‌ی سینه باز گردید و با استفاده از سرنگ انسولین عمل جمع آوری خون از قلب انجام گرفت. پس از اتمام خونگیری، جهت جلوگیری از لیز شدن گلبول های قرمز، به سرعت سرسرنگ، از سرنگ جدا گردید و خون به داخل میکروتیوب استریل منتقل شد. پس از دو دقیقه استراحت دادن به نمونه‌ها در فضای اتاق، به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰ RPM سانتریفیوژ گردید و سپس به آرامی مایع شفاف رویی خارج گردید و جهت آنالیزهای بعدی در فریزر ٤۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش شاخص‌های عملکرد کبدی و کلیوی

جهت سنجش شاخص‌های آسیب کبدی و کلیوی که شامل آسپارتات ترانس آمیناز (AST)، آلانین ترانس آمیناز(ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلبومین (Albumin)، کراتینین (Creatinine)، BUN و پروتئین تام سرم (Total Protein) می‌باشد، آنالیزهای مورد نظر با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر هیتاچی۹۰۲ (HITACHI 902) و با کیتهای شرکت پارس آزمون به روش رایج انجام گرفت.

هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی

از نمونه‌های بافتی تومور القاء شده در موش‌ها پس از فیکس شدن در فرمالین بافر۱۰٪ به روش رایج قالب‌های پارافینی تهیه و سپس برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و به روش هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی گردید. همچنین از هر قالب، یک برش به ضخامت ۳ میکرون تهیه و بر روی لام سایلین S3003 قرار گرفتند و با استفاده از روش

www.SID.ir

Archive of SID

ایمونوهیستوشیمی مارکر KI67 که یک مارکر جهت بررسی شدت تقسیم سلولی است، مورد مطالعه قرار گرفتند. سطح بافت‌ها با آنتی بادی KI67 (شرکتAbcam,USA(به شکل کامل پوشانده وبه روش رایج با استفاده از آنتی بادی ثانویه و ماده کروموژن و رنگ آمیزی زمینه هماتوکسیلین، آماده شدند. بافت‌های شاهد منفی با بافر TBS پوشانده شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی تاثیر داروها بر میزان پیشرفت تومور، نمونه‌های هیستوپاتولوژی به صورت زیر امتیازدهی شد: صفر=عدم پلئومورفیسم/ ۱=هسته‌های کوچک و منظم و یک شکل/ ۲=درجه متوسط از تفاوت در اندازه و شکل هسته و هایپرکرومازیای هسته به همراه حضور هستک/ ۳=درجه شدید از تفاوت در اندازه هسته همراه با هسته هایپرکروماتیک و اغلب همراه با یک یا تعداد بیشتری هستک مشخص. همچنین متعاقب آن، شاخص میتوز در ۱۰ فیلد با بزرگنمایی (HPF)٤٠ و شاخص تهاجم سلول‌های توموری مورد بررسی قرار گرفت و به صورت صفر= عدم میتوز / ۱= تعداد ۹-۱ میتوز / ۲= تعداد ۱۹-۱۰ میتوز / ۳= بیش از ۲۰ عدد میتوز / و جهت تهاجم سلول‌های توموری بصورت: صفر= عدم وجود سلولهای توموری در درم و هیپودرم/ ۱= نفوذ به درم / ۲= نفوذ به هیپودرم / ۳= نفوذ به بافت عضلانی زیر پوست امتیازدهی شد. جهت بررسی ایمونوهیستوشیمی مارکرKI67 بافت‌های گروه‌های مورد مطالعه، ۱۰ فیلد میکروسکوپی بصورت تصادفی انتخاب و با بزرگنمایی عدسی ٤٠ تعداد ۱۰۰ سلول اپیتلیال شمارش شد و میزان ایمنوراکتیویته بصورت زیر ارزیابی و ارائه گردید: ۰= عدم بیان / ۱= بیان زیر۱۰ درصد / ۲= بیان ۲۵-۱۰ درصد/ ۳= بیان بیش از ۲۵ درصد.

تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۲۱ داده‌های کمی با استفاده از آزمون آماری one-way ANOVA و داده‌های کیفی از طریق آزمون آماری Mann-Whitney و سطح معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) مورد بررسی قرار گرفتند.

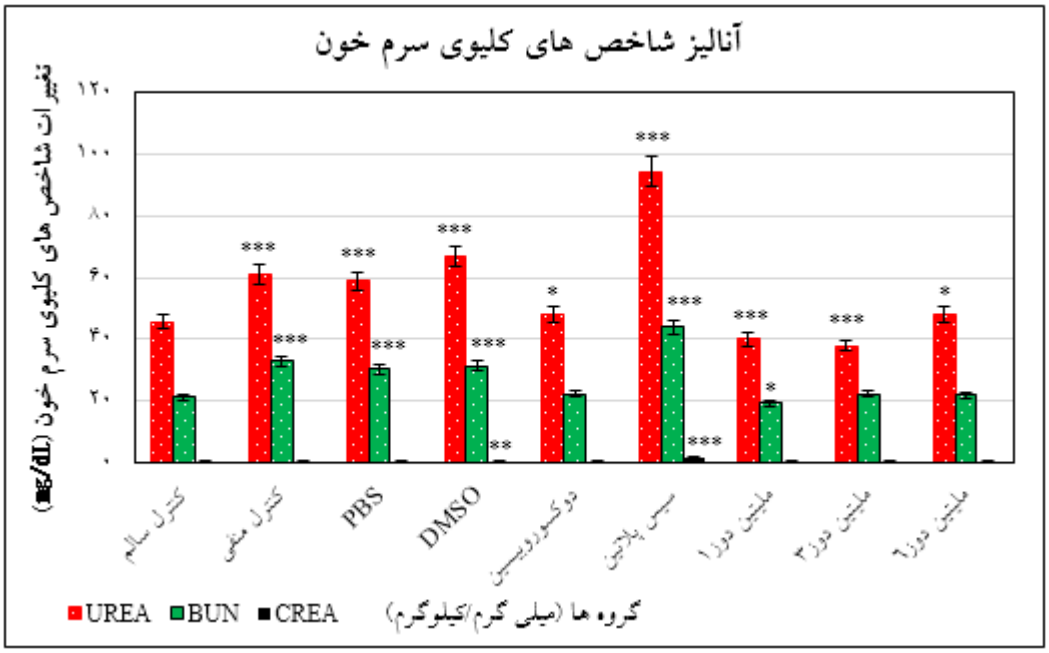
نتایج

شاخص‌های کلیوی سرم خون

در بررسی شاخص‌های کلیوی سرم خون از جمله BUN، گروه تیمار شده با داروی سیس‌پلاتین نسبت به گروه کنترل سالم افزایش آماری معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۰۱$)، در حالی که گروه‌های تیمار شده با ملیتین دوز ۳ و ٦ میلی‌گرم/کیلوگرم و دوکسوروبیسین نسبت به گروه کنترل سالم اختلاف آماری معنی‌داری نشان ندادند. در ارتباط با شاخص اوره، داوری سیس پلاتین در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش آماری معنی‌داری نشان داد($p<۰/۰۰۱$)، همچنین گروه‌های تیمار شده با ملیتین دوز ٦ میلی‌گرم/کیلوگرم و داروی دوکسوروبیسین، افزایش آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم نشان دادند ($p<۰/۰۵$). در ارتباط با شاخص کراتینین، بین گروه تیمار شده با دوکسوروبیسین و گروه‌های تحت تجویز غلظت های مختلف ملیتین در مقایسه با گروه کنترل سالم، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید (نمودار۱).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۱ –تغییر شاخص‌های کلیوی سرم خون گروه‌های مورد مطالعه (* p<۰/۰۵)، (** p<۰/۰۱)، (*** p<۰/۰۰۱). سالم (n=۳۵) و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی(n=۵۵).

آنزیم‌های کبدی سرم خون

در بررسی آنزیم کبدی AST سرم خون، گروه‌های تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین و دوزهای مختلف ملیتین نسبت به گروه کنترل سالم تغییرات آماری معنی‌داری نشان ندادند. در بررسی آنزیم ALT، گروه های تیمار شده با سیس‌پلاتین و دوکسوروبیسین افزایش آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم نشان دادند (p<۰/۰۰۱)، در حالی که گروه تیمار شده با ملیتین دوز۶ میلی‌گرم/کیلوگرم تغییرات آماری معنی داری در ارتباط با آنزیم ALT در مقایسه با کنترل سالم نشان نداد. در ارتباط با آنزیم ALP، برخلاف گروه های تیمار شده با داروهای دوکسوروبیسین و سیس پلاتین که در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش آماری معنی داری را نشان دادند (p<۰/۰۰۱)، گروه های تیمار شده با ملیتین دوز ۶ میلی‌گرم/ کیلوگرم افزایش آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم نشان دادند (p<۰/۰۰۱) (نمودار۲).

تغییرات آلبومین و پروتئین تام در سرم خون

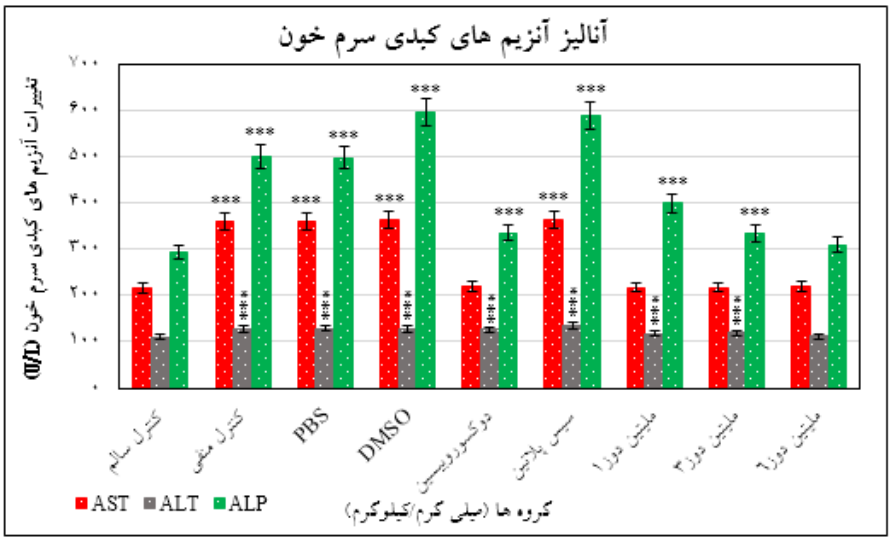
در گروه‌های تیمار شده با ملیتین با دوزهای ۶، ۳ و۱ میلی‌گرم/کیلوگرم مقادیر سرمی آلبومین و پروتئین تام، تغییرات آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم نشان ندادند. در گروه‌های تیمار شده با سیس‌پلاتین و دوکسوروبیسین مقادیر سرمی آلبومین و پروتئین تام کاهش آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم نشان دادند (p<۰/۰۰۱). در گروه تیمار شده با DMSO، مقادیر سرمی آلبومین و پروتئین تام کاهش آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم نشان داد(p<۰/۰۰۱). در گروه تیمار شده با PBS، مقادیر سرمی آلبومین و پروتئین تام کاهش آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم نشان داد (p<۰/۰۰۱)(نمودار۳).

هیستوپاتولوژی

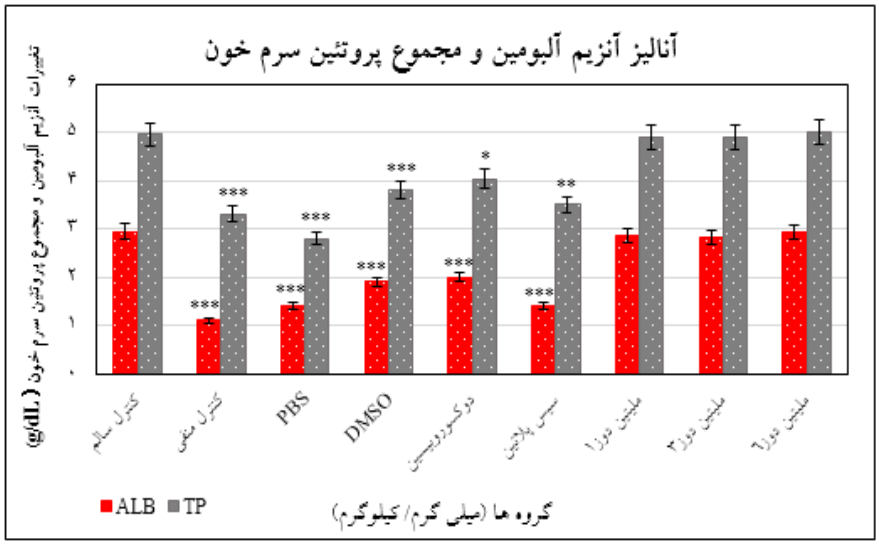
نتایج حاصل از بررسی پلئومورفیسم، شاخص میتوزی و تهاجم در تمامی گروه‌های مورد مطالعه در نمودار ٤ قابل مشاهده می‌باشد. در گروه تیمار شده با دوکسوروبیسین، پلئومورفیسم، شاخص میتوزی و تهاجم، کاهش آماری

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۲ – تغییرآنزیم‌های کبدی سرم خون گروه‌های مورد مطالعه (* p<۰/۰۵)، (** p<۰/۰۱)، (*** p<۰/۰۰۱).

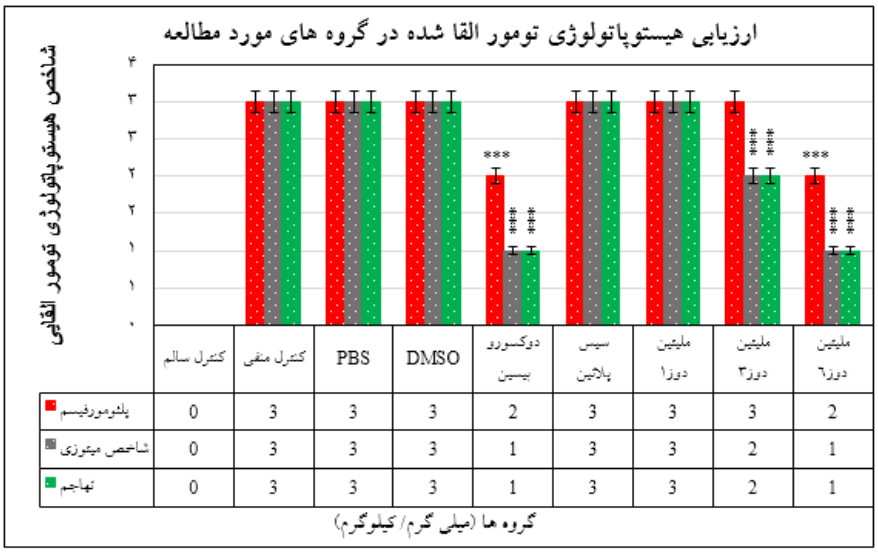


نمودار۳ –تغییرات آلبومین و پروتئین تام در سرم خون گروه‌های مورد مطالعه (* p<۰/۰۵)، (** p<۰/۰۱)، (*** p<۰/۰۰۱).

معنی‌داری نسبت به گروه کنترل منفی نشان داد(p<۰/۰۰۱). در گروه سرطانی تیمار شده با ملیتین دوز ۳، شاخص میتوزی و تهاجم، کاهش آماری معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل منفی(p<۰/۰۰۱) نشان داد در حالی که پلئومورفیسم تغییر آماری معنی‌داری از خود نشان نداد. در گروه تیمار شده با ملیتین دوز۶، پلئومورفیسم، شاخص میتوزی و تهاجم، کاهش آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل منفی نشان داد(p<۰/۰۰۱). در بررسی برش‌های بافتی گروه کنترل منفی، تهاجم بسیار شدید سلول‌های توموری در هیپودرم و لایه‌ی عضلانی زیری آن، نکروز شدید در مرکز تومور، پلئومورفیسم شدید و هایپرکرومازی شدید با میتوز بالا دیده شد. در بررسی برش‌های بافتی گروه سرطانی-PBS، تهاجم

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار٤ – ارزیابی هیستوپاتولوژی تومور القا شده در گروه‌های مورد مطالعه (* $p<0/05$)، (** $p<0/01$)، (*** $p<0/001$).

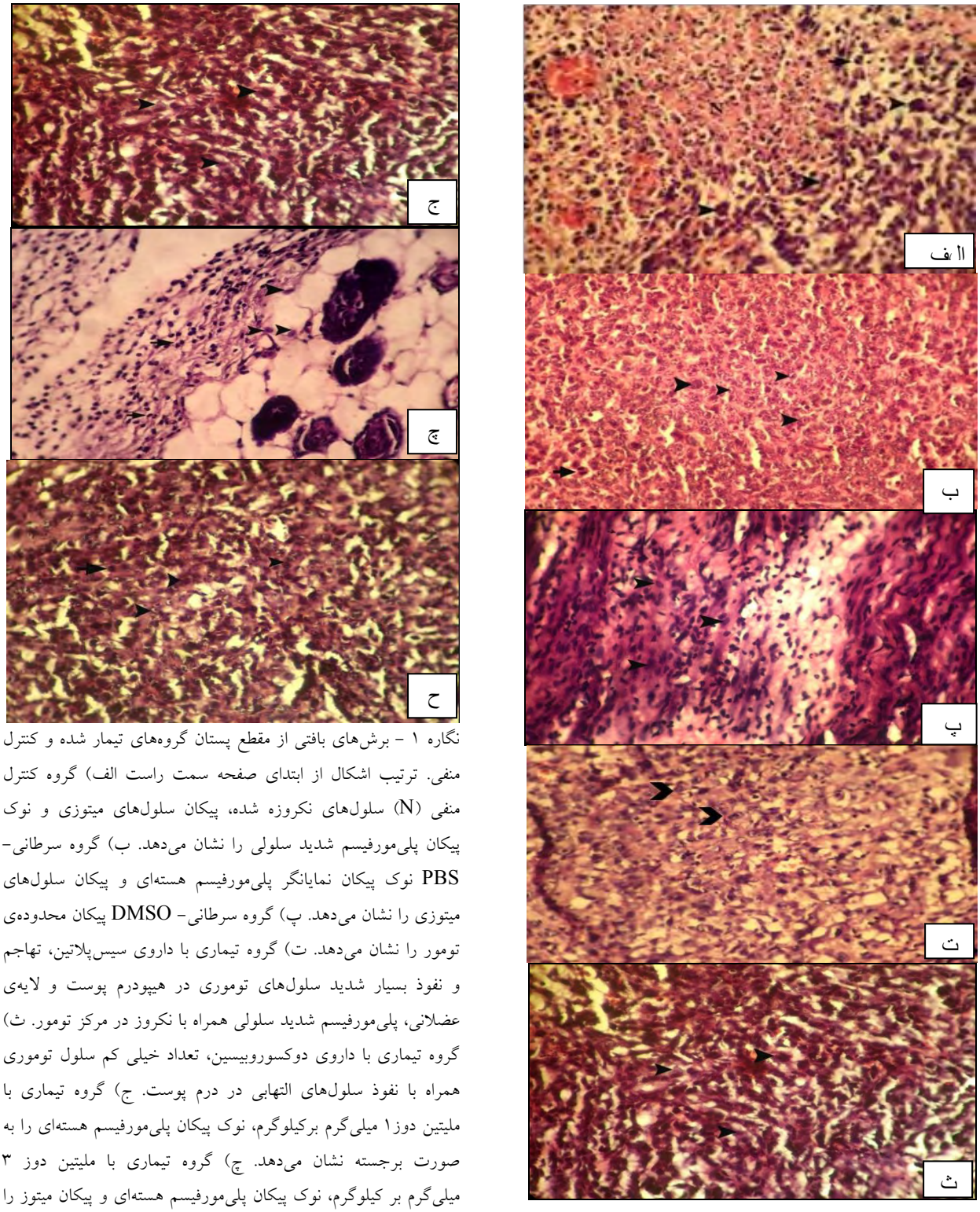
بسیار شدید سلول‌های توموری در هیپودرم و لایه‌ی عضلانی زیری آن، نکروز شدید در مرکز تومور، پلئومورفیسم شدید و هایپرکرومازی شدید با میتوز بالا دیده شد. در بررسی برش‌های بافتی گروه سرطانی-DMSO، تهاجم سلول‌های توموری به درم و لایه‌ی هیپودرم همراه با سلول‌های التهابی مشاهده شد. در بررسی برش‌های بافتی از مقطع پستان تیمار شده با سیس پلاتین، تهاجم و نفوذ بسیار شدید سلول‌های توموری در هیپودرم پوست و لایه‌ی عضلانی، پلی مورفیسم شدید سلولی همراه با نکروز در مرکز تومور مشاهده و در مقایسه با برش‌های بافتی از مقطع پستان تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین، تعداد خیلی کم سلول توموری همراه با نفوذ سلول‌های التهابی در درم پوست مشاهده گردید. در بررسی برش‌های بافتی از مقطع پستان تیمار شده با ملیتین دوز ۱ میلی‌گرم/ کیلوگرم، تهاجم شدید سلول های توموری به هیپودرم، پلی مورفیسم شدید سلولی، هایپرکرومازی هسته‌ها همراه با سلول های التهابی مشاهده شد. در بررسی برش‌های بافتی از مقطع پستان تیمار شده با ملیتین دوز ۳ میلی‌گرم/ کیلوگرم، تهاجم شدید سلول‌های توموری به هیپودرم، پلی‌مورفیسم شدید سلولی، هایپرکرومازی هسته‌ها همراه با سلول‌های التهابی مشاهده گردید. در بررسی از مقطع پستان تیمار شده با ملیتین دوز ٦ میلی‌گرم/ کیلوگرم تعداد کمی سلول‌های توموری از هیپودرم پوست، پلی‌مورفیسم سلولی بسیار کم همراه با تعداد کمتری از سلول‌های التهابی مشاهده گردید(نگاره۱).

ایمونوهیستوشیمی

در گروه کنترل منفی نتایج ایمونوهیستوشیمی نشان داد که مارکر Ki67 به صورت خیلی ضعیف در کمتر از ٥٪ هسته‌ی سلول‌های اپیتلیال بیان شد که با توجه به گایدلاین‌های ایمونوهیستوشیمی میزان بیان آن صفر قلمداد گردید. همین مورد در رابطه با گروه‌های درمان با دوکسوروبیسن، سیس‌پلاتین و ملیتین نیز تکرار گردید(نگاره ۲).

www.SID.ir

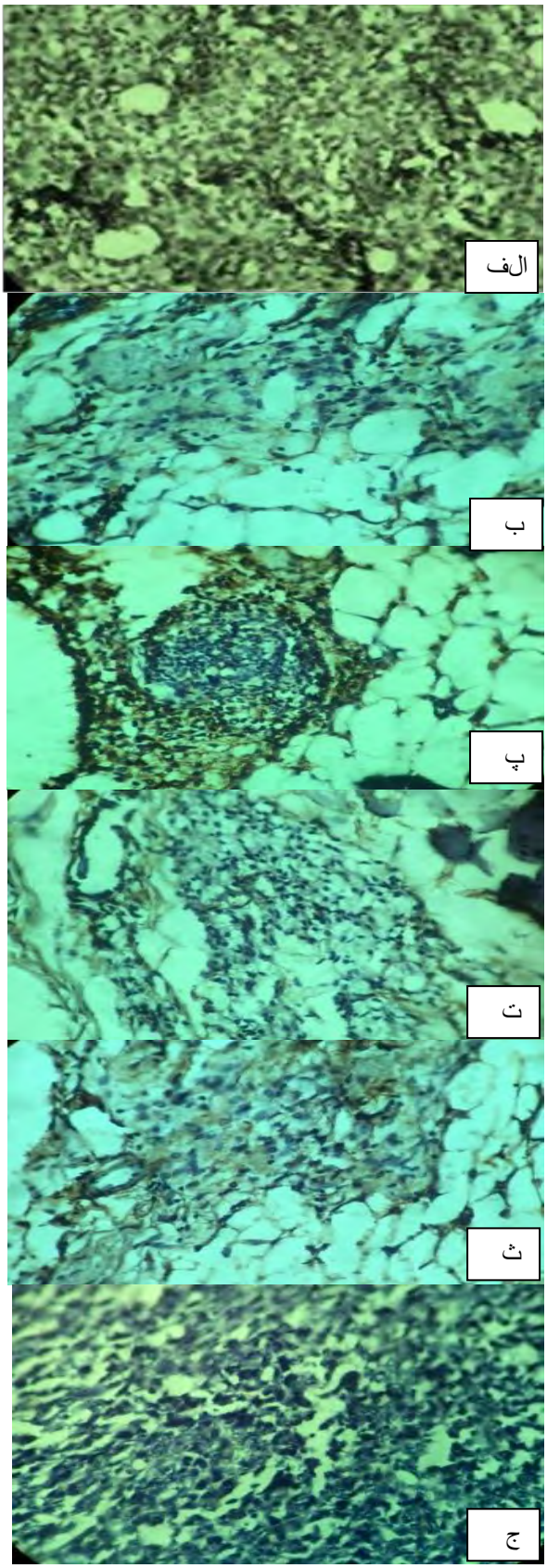
Archive of SID

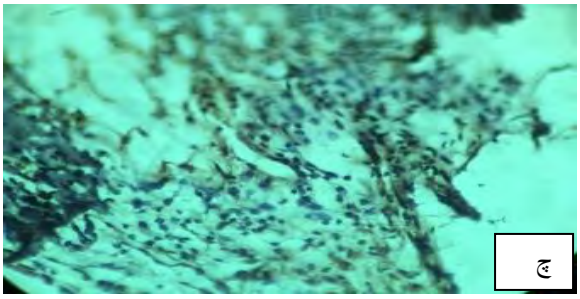


نگاره ۱ – برش‌های بافتی از مقطع پستان گروه‌های تیمار شده و کنترل منفی. ترتیب اشکال از ابتدای صفحه سمت راست الف) گروه کنترل منفی (N) سلول‌های نکروزه شده، پیکان سلول‌های میتوزی و نوک پیکان پلی‌مورفیسم شدید سلولی را نشان می‌دهد. ب) گروه سرطانی- PBS نوک پیکان نمایانگر پلی‌مورفیسم هسته‌ای و پیکان سلول‌های میتوزی را نشان می‌دهد. پ) گروه سرطانی- DMSO پیکان محدوده‌ی تومور را نشان می‌دهد. ت) گروه تیماری با داروی سیس‌پلاتین، تهاجم و نفوذ بسیار شدید سلول‌های توموری در هیپودرم پوست و لایه‌ی عضلانی، پلی‌مورفیسم شدید سلولی همراه با نکروز در مرکز تومور. ث) گروه تیماری با داروی دوکسوروبیسین، تعداد خیلی کم سلول توموری همراه با نفوذ سلول‌های التهابی در درم پوست. ج) گروه تیماری با ملیتین دوز۱ میلی‌گرم برکیلوگرم، نوک پیکان پلی‌مورفیسم هسته‌ای را به صورت برجسته نشان می‌دهد. چ) گروه تیماری با ملیتین دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نوک پیکان پلی‌مورفیسم هسته‌ای و پیکان میتوز را به صورت برجسته نشان می‌دهد. ح) گروه تیماری با ملیتین دوز ٦، نوک پیکان نفوذ سلول‌های توموری در هیپودرم و پیکان سلول‌های التهابی چند هسته‌ای را نشان می‌دهد(400X, H&E).

www.SID.ir

Archive of SID





نگاره ۲ – بررسی مارکر KI67 در مقاطع هیستوپاتولوژی تومور پستان در گروه‌های مورد مطالعه. ترتیب از سمت بالای صفحه سمت راست الف) تیمار شده با ملیتین دوز ۱mg/kg ، ب) تیمار شده با ملیتین دوز ۳mg/kg ، پ) تیمار شده با ملیتین دوز ٦mg/kg ، ت) تیمار شده با دوکسوروبیسین، ث) تیمار شده با DMSO ،ج) تیمار شده با سیس پلاتین ،چ) کنترل منفی–سرطانی)IHC,400X(.

بحث

سرطان به عنوان یک بیماری موضعی شروع می‌شود، اما با پیشرفت آن، سلول‌های تومور به عنوان متاستازهای دوردست به بافت‌های اطراف و در نهایت به اندامهای دیگر حمله می‌کنند. تهاجم و متاستاز تا حد زیادی بر شدت بیماری حاکم هستند و در مدیریت بیماری یک هدف مهم در نظر گرفته می‌شوند. عواملی که می توانند بر یک یا هر دو عامل تأثیر بگذارند، می‌توانند منجر به یک درمان مؤثر از سرطان‌های انسانی شوند. داده های جمع آوری شده حاکی از آن است که ملیتین به دلیل اثرات آن بر تنظیم آپوپتوز و عوامل مختلفی که باعث القاء آپوپتوز در انواع مختلف سرطان می‌شود ، مورد مطالعه قرار گرفته است. ملیتین در فعال کردن کاسپازها در سرطان‌های مختلفی مانند سرطان خون U937 (۲۳) و Jurkat (۲٤)، HCC (,SMMC-7721 (Hep3B, HepG2 and BEL-7402) (۲٤) و سلول‌های گردن رحم HeLa (۲٤) تاثیرات قابل توجهی را القا کرده است. آپوپتوز یک فرآیند سلولی منظم و مهم است که در شرایط فیزیولوژیکی و آسیب شناختی اتفاق می‌افتد(۲۵). این رویداد دلیل اصلی برای تنظیم وقوع و یا گسترش سرطان

www.SID.ir

Archive of SID

است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که زهر زنبور عسل دارای اثرات ضد سرطان بالقوه‌ای در برابر سرطان پستان (۲۶)، سرطان کبدی(HCC) (۲۷)، تخمدان (۲۸)، پروستات(۲۹)، ملانوما(۳۰)، ریه(۳۱)، لوسمی(۳۲) و سرطان گردن رحم(۳۳) می‌باشد که نتایج پژوهش ما نیز از تاثیر ضد سرطان پستان توسط ملیتین حمایت می‌کند.

Alonezi و همکاران در سال ۲۰۱۶ بیان کردند که تغییرات ناشی از تیمار سلول‌های حساس به سیس پلاتین توسط ملیتین منجر به کاهش سطح اسیدهای‌آمینه‌ها در مسیر پرولین/گلوتامین/آرژنین و همچنین کاهش سطح کارنیتین‌ها، پلی‌آمین‌ها، آدنوزین‌تری‌فسفات(ATP) و دینوکلئوتید آدنین نیکوتین آمید(NAD^+) گردید، همچنین مطالعات آن‌ها در خصوص رده‌ی سلولی سرطان تخمدان A2780 تحت تیمار با ملیتین تغییرات مثبتی در خصوص میزان لیپیدهای غشایی نشان داد که این تأثیرات منحصر به فرد ملیتین در مقایسه با تاثیرات مخرب سیس پلاتین منجر شد که ملیتین به عنوان یک درمان کمکی در درمان سرطان شناخته شود(۳٤). در مطالعه‌ی حاضر نیز نتایج بدست آمده از مطالعات هیستوپاتولوژی نشان دهنده‌ی موثر بودن ملیتین با دوز ٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم در کاهش تهاجم و پیشرفت سلول‌های توموری 4T1 بود و همچنین با توجه به نتایج بررسی شاخص‌های کبدی و کلیوی، ملیتین بدون ایجاد آسیب در بافت‌های کبد و کلیه برخلاف دوکسوروبیسین و سیس‌پلاتین که از نظر بالینی نیز در بیماران تحت درمان با این دو دارو به عنوان عوارض جانبی آن شناخته می‌شود، باعث کاهش قطر تومور و تهاجم بافتی شده است. ملیتین احتمالا با توجه به دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی باعث محافظت کبدی و کلیوی می‌شود.

در یک مطالعه دیگر، Orsolic و همکاران در سال ۲۰۰۹، اثرات مهار کننده‌ی رشد زهر زنبور عسل به تنهایی یا همراه با یک دارویی با سمیت سلولی بنام بلومایسین روی سلول‌های HeLa و V79 در شرایط آزمایشگاهی مورد آزمایش قرار دادند. نتایج این مطالعه بیان کننده‌ی القای آپوپتوز، نکروز و لیز سلولی توسط زهر زنبور عسل در مهار رشد سلول های V79 بود. همچنین مشخص گردید که سلول‌های HeLa مقاومت بیشتری به زهر زنبور عسل نشان می‌دهند(۳۳). همسو با این مطالعه، در مطالعه‌ی حاضر با مقایسه تاثیرات ضد سرطانی ملیتین و حضور دو داروی شیمی‌درمانی سیس‌پلاتین و دوکسوروبیسین به عنوان کنترل و همچنین مطالعات هیستوپاتولوژی و ایمنوهیستوشیمی مشخص شد که دوز بالای ملیتین تاثیرات ضدسرطانی مشابه‌ای با تاثیرات داروی دوکسوروبیسین داشته و برخلاف داروی سیس‌پلاتین هیچ تاثیر منفی و سوء‌ی برای موش‌های تحت تیمار نداشت و مکانیسم عمل ملیتین در بررسی‌های هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی نشان دهنده‌ی درجه متوسط از تفاوت در اندازه و شکل هسته و هایپرکرومازی هسته به همراه حضور هستک و نفوذ به درم در گروه‌های تیمار شده با ملیتین دوز ٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که همسو با نتایج بدست آمده از داروی دوکسوروبیسین بود.

در مطالعه دیگر که توسط Jang و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام گرفت، مکانیسم‌هایی که توسط آن زهر زنبورعسل سلول‌های ملانوما K1735M2 را در شرایط آزمایشگاهی و ملانوما B16 را در موش‌های C57BL / 6 مهار می‌کند، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج *in vivo* نشان داد که تجویز ملیتین باعث مهار قابل توجه رشد سلول‌های ملانوما B16 شد که مهار نسبی تومور به ترتیب ۲۰ و ۵۳ درصد بود و با توجه به نتایج بررسی شاخص های کبدی و کلیوی، ملیتین آسیبی به این ارگان ها وارد نکرده بود (۳۵). همسو با نتایج حاصل از بررسی این محققان، در مطالعه‌ی حاضر نیز ملیتین سبب آسیب کبدی و کلیوی طی آزمایشات خونی- سرمی نگردید.

Lee و همکاران در سال ۲۰۱٦ بیان کردند که ملیتین با اثرات ضدالتهابی از طریق مهار IL-6، IL-1 و TNF-α،

www.SID.ir

Archive of SID

میتواند از بروز التهاب در بافت‌های کبد و کلیه جلوگیری نماید. با توجه به اینکه در مطالعه‌ی ما نیز در مقایسه با گروه کنترل منفی در گروه‌های درمانی با ملیتین شاخص‌های کبدی و کلیوی کاهش آماری معنی‌داری را نشان دادند، این تاثیر میتواند ناشی از خاصیت ضدالتهابی ملیتین باشد(۳۶). Rady و همکاران در سال ۲۰۱۷ بیان کردند که زهر زنبور عسل و ترکیبات منحصر به فرد آن به ویژه ملیتین پتانسیل لازم برای درمان سرطان را دارند. بنابراین ملیتین می‌تواند به عنوان یک روش جایگزین برای داروهای شیمی‌درمانی در درمان سرطان مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد. در صورت موفقیت، این روش در بسیاری از نقاط جهان که داروهای گران قیمت شیمی‌درمانی در سیستم مراقبت‌های بهداشتی در دسترس نیست، می‌تواند از ارزش فوق العاده‌ای برخوردار باشد(۳۷).

در یک جمع بندی کلی از نتایج حاصل از این مطالعه میتوان مدعی بود که ملیتین در تمامی دوزهای مطالعه شده هیچ آسیب کلیوی به حیوانات وارد نکرده و خاصیت نفروتوکسیکی از خود نشان نداده است. در صورتیکه گروه تیمار شده با داروی سیس پلاتین دچار اثرات نفروتوکسیک شد. همچنین ملیتین بر خلاف داروی سیس‌پلاتین در تمامی دوزهای مطالعه شده هیچ آسیب کبدی برای حیوانات نداشت. نتایج به دست آمده از گروه‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین و ملیتین مشابه بودند و هیچ آسیب کبدی و کلیوی را در موش های تحت درمان ایجاد نکردند.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله کمال تشکر و سپاسگزاری خود را از جناب آقای علیرضا مثنوی و سرکار خانم دکتر لطیفه کریم زاده که در انجام مراحل آماری و آزمایشگاهی این تحقیق یاری نمودند اعلام میدارند.

فهرست منابع

1. Nouri Daloui M. Tabarestani S. Molecular Genetics, Diagnosis and Treatment of Breast Cancer: A Review Article. Sabzevar University of Medical Sciences 2010;17(2):87-747
2. Yeo SW. Seo JC. Choi YH. Jang KJ. Induction of growth inhibition and apoptosis by bee venom in human breast carcinoma MCF-7 cells. Kor Acup Mox Soc 2003;20(3):45-62
3. Moon DO. Park SY. Lee KJ. Heo MS. Kim KC. Kim MO. Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. Int Immunopharmacol 2007;7(8):1092-101
4. Kaiser T. Brennecke SP. Moses EK. Methylen etetrahydrofolate reductase polymorphism are not a risk factor for preeclampsia/eclampsia in Australian women. Gynecol Obstet 2000;50(2):100-102
5. Bazzo R. Tappin MJ. Pastore A. Harvey TS. Carver JA. Campebell ID. The structure of melittin. Eur J Biochem 1988;173:139e46
6. Malekzadeh R. Derakhshan MH. Malekzadeh Z. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. Arch Iran Med 2009;12:576e83
7. D'Elia AV. Driul L. Giacomello R. Frequency of factor V, prothrombin and methylene tetrahydro folate reductase gene variants in preeclampsia. Gynecol Obstet Invest 2002;53(2):84-87
8. Bramwell VW. Somavarapu S. Outschoorn I. Alpar HO. Adjuvant action of melittin following intranasal immunisation with tetanus and diphtheria toxoids. J Drug Target 2003;11(8-10):525-30
9. Son DJ. Ha SJ. Song HS. Lim Y. Melittin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through induction of apoptosis via suppression of nuclear factor-κB and Akt activation and enhancement of apoptotic protein expression. Pharmacology and

www.SID.ir

Archive of SID

Experimental Therapeutics 2006; 317(2):627-34

10. Jang MH. Shin MC. Lim S. Han SM. Park HJ. Shin I. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. J Pharmacol Sci 2003;91(2):95-10411. Wang C. Chen T. Zhang N. Yang M. Li B. Lü X. Melittin, a major component of bee venom , sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting IκBα kinase-NFκB. J. Biolog Chem 2009;284(6):3804-13
12. Ip SW. Liao SS. Lin SY. Lin JP. Yang JS. Lin ML. The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer MCF7 cells. In Vivo 2008;22(2):237-45
13. Huh J.E. Baek Y.H. Lee M.H. Choi D.Y. Park, D.S. Lee J.D. Bee venom inhibitstumor angiogenesis and metastasis by inhibiting tyrosine phosphorylation ofVEGFR-2 in LLC-tumor-bearing mice. Cancer Lett 2010;292:98–110
14. Shin S.H. Kim Y.H. Kim J.K. Park K.K. Anti-allergic effect of bee venom inan allergic rhinitis mouse model. Biol. Pharm. Bull 2014;37:1295–1300
15. Kwon Y.B. Lee J.D. Lee H.J. Han H.J. Mar W.C. Kang S.K. Beitz A.J. Lee J.H. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associ-ated edema and nociceptive responses. Pain 2001;90:271–280
16. Ling C. Li B. Zhang C. Gu W. Li S. Huang X. (Anti-hepatocarcinoma effect of recombinant adenovirus carrying melittin gene). Chinese journal of hepatology 2004;12(12):741-4
17. Ciu S. Yu M. He Y, Xiao L. Wang F. Song C. Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway. Hepatology 2008;47(6):1964-73
18. Uawonggul N. Thammasirira KS. Chaveerach A. Chuachan C. Daduang S. Plant extract activities against the fibroblast cell lysis by honey bee venom J Med Plants Res 2011;5(10):1978-86
19. Winder D. Günzburgb WH. Erfle V. Salmons B. Expression of antimicrobial peptides has an antitumour effect in human cells. Biochem Biophy ResCommun 1998;242(3):608-12
20. Putz T. Ramoner R. Gander H. Rahm A. Bartsch G. Thurnher M. Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-(3, 4)-bisphosphate. Cancer Immunol Immunother 2006;55(11):1374-83
21. Nosrati N. Bakovic M. Paliyath G. Molecular Mechanisms and Pathways as Targets for Cancer Prevention and Progression with Dietary Compounds. Molecular Sciences 2017;18:2050
22. Dabbagh Moghaddam F. Hamedi S. Dezfulian M. Anti-tumor effect of C-phycocyanin from Anabaena sp.ISC55 in inbred BALB/c mice injected with 4T1 breast cancer cell. Comparative clinical Pathology 2016;25(5):947-952
23. Moon DO. Park SY. Choi YH. Kim ND. Lee C. Kim GY. Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells. Toxicon. 2008;51:112–120
24. Wang C. Chen T. Zhang N. Yang M. Li B. Lu X. Melittin a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting IkappaBalpha kinase-NFkappaB. J. Biol. Chem. 2009;284:3804–3813
25. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2011;30;87

www.SID.ir

Archive of SID

26. Jeong YJ. Choi Y. Shin JM. Cho HJ. Kang JH. Park KK. Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. Food Chem. Toxicol 2014;68:218–225
27. Wang X. Xiong L. Yu G. Li D. Peng T. Luo D. Cathepsin S silencing induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. Am. J. Transl. Res 2015;7:100–110
28. Jo M. Park MH. Kollipara PS. An BJ. Song HS. Han SB. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. Toxicol. Appl. Pharmacol 2012;258:72–81
29. Park MH. Choi MS. Kwak DH. Oh KW. Yoon DY. Han SB. Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF-kappaB. Prostate 2011;71:801–812
30. Tu WC. Wu CC. Hsieh HL. Chen CY. Hsu SL. Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. Toxicon. 2008;5:318–329
31. Choi KE. Hwang CJ. Gu SM. Park MH. Kim JH. Park JH. Cancer cell growth inhibitory effect of bee venom via increase of death receptor 3 expression and inactivation of NF-kappa B in NSCLC cells. Toxins (Basel) 2014;6:2210–2228
32. Moon DO. Park SY. Heo MS. Kim KC. Park C. Ko WS. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. Int. Immunopharmacol 2006;6:1796–1807
33. Orsolic N. Potentiation of bleomycin lethality in HeLa and V79 cells by bee venom. Arh. Hig. Rada Toksikol 2009;60:317–326.
34. Alonezi S. Tusiimire J. Wallace J. Dufton M. Parkinson J. Young L. Clements C. Park J. Jeon J. Metabolomic Profiling of the Effects of Melittin on Cisplatin Resistant and Cisplatin Sensitive Ovarian Cancer Cells Using Mass Spectrometry and Biolog Microarray Technology. Published online 2016 Oct 13. Metabolites 2016;6(4):35
35. Jang MH. Shin MC. Lim S. Han SM. Park HJ. Shin I. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. J. Pharmacol. Sci 2003;91:95–104
36. Lee G. Bae H. Anti-Inflammatory Applications of Melittin, a Major Component of Bee Venom: Detailed Mechanism of Action and Adverse Effects. Molecules 2016;21:616
37. .Rady I. Siddiqui I. Rady M. Mukhtar H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. Cancer Lett 2017;28(402):16–23.

www.SID.ir