

تأثیر ملاتونین بر افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی مقاوم به توپوتکان SW480/TPT در سرطان کولورکتال

وحید رامشکنیا^۱، منیره موحدی^۲، عباس اخوان^۳، امیر ولیزاده^{۴*}، بهمن یوسفی^۵

تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۰۸/۲۵ تاریخ پذیرش ۱۴۰۴/۰۱/۰۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی، از جمله توپوتکان، یکی از چالش‌های اصلی در درمان سرطان کولورکتال است. توپوتکان یک مهارکننده‌ی توپوایزومراز I است که در درمان این سرطان استفاده می‌شود، اما مقاومت ناشی از P-glycoprotein (P-gp) اثربخشی آن را محدود می‌کند. در این مطالعه، نقش و مکانیسم اثر ملاتونین بر روی مقاومت دارویی توپوتکان در سلول‌های مقاوم SW480/TPT بررسی شد.

مواد و روش کار: سلول‌های SW480 و SW480/TPT در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، غلظت‌های مختلف TPT (۵-۰.۱ میکرومولار) با یا بدون ملاتونین (۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) در محیط RPMI-1640 (بدون FBS) رقیق شده و به هر چاهک افزوده شد. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با این ترکیبات تیمار شدند. آپوپتوز با استفاده از کیت Cell Death Detection ELISA™ (Roche Applied Science) طبق پروتکل سازنده ارزیابی شد. همچنین برای بررسی اثر ملاتونین بر بیان ژن MDR1 و پروتئین P-gp، سلول‌های SW480/TPT با ملاتونین (۱۰ میکرومولار) به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. تمام آزمایش‌ها حداقل در سه تکرار مستقل انجام شدند و برای مقایسه گروه‌ها، آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد.

یافته‌ها: تیمار هم‌زمان سلول‌های SW480/TPT با ملاتونین و توپوتکان باعث کاهش معنادار IC50 توپوتکان از 0.3 ± 2.8 میکرومولار به 0.1 ± 0.8 میکرومولار شد (کاهش ۷۱.۴ درصد، $P < 0.001$). این ترکیب درمانی درصد سلول‌های آپپتوتیک را از $2 \pm 15\%$ در گروه توپوتکان به‌تنهایی به $4 \pm 45\%$ در گروه ترکیبی افزایش داد (افزایش ۳ برابری، $P < 0.001$). بررسی مولکولی نشان داد که ملاتونین بیان ژن MDR1 را به میزان $5 \pm 65\%$ و سطح پروتئین P-gp را به میزان $4 \pm 58\%$ در مقایسه با سلول‌های SW480/TPT تیمار نشده کاهش داد ($P < 0.001$).

بحث و نتیجه‌گیری: ملاتونین با کاهش بیان P-gp و MDR1 می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب کمکی در شیمی‌درمانی سرطان کولورکتال مطرح شود. مطالعات بیشتر در مدل‌های حیوانی و بالینی برای تأیید این اثرات ضروری است.

کلیدواژه‌ها: ملاتونین، سرطان کولورکتال، توپوتکان، مقاومت دارویی، P-glycoprotein، آپوپتوز

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره دوازدهم، ص ۹۶۰-۹۵۰، اسفند ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: تبریز، علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی، تلفن: ۰۹۳۹۵۵۰۲۸۰۰

Email: Amir.valizadeh67@gmail.com

مقدمه

رایج با ۱.۹۳ میلیون مورد جدید و دومین علت مرگ ناشی از سرطان با ۹۱۶،۰۰۰ مرگ در سال ۲۰۲۰ است که ۱۰ درصد از کل تشخیص‌های بدخیم را به خود اختصاص داده است (۱). افزایش خطر CRC معمولاً با سن، سبک زندگی غربی، رژیم غذایی، سابقه

بر اساس گزارش GLOBOCAN 2020 که توسط آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC) سازمان بهداشت جهانی منتشر شده است، سرطان کولورکتال (CRC) سومین نوع سرطان

^۱ استادیار بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ دانشجوی بیوشیمی بالینی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۳ دانشجوی بیوشیمی بالینی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴ دانشجوی بیوشیمی بالینی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

^۵ دانشیار بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

شخصی و بیماری مزمن روده مرتبط است (۲-۴). توپوتکان (TPT) یک ترکیب محلول در آب، مشتق مصنوعی کمپوتوسین است که از طریق مهار آنزیم توپوایزومراز I عمل می‌کند. این آنزیم در فرآیند همانندسازی DNA نقش حیاتی دارد و مهار آن باعث ایجاد شکست در DNA و در نهایت مرگ سلولی می‌شود. TPT دارای فعالیت ضد نوپلاستیک قابل توجهی در سرطان کولورکتال و ریه سلول کوچک است. بااینکه، شیمی‌درمانی متداول‌ترین روش درمان بیماران CRC است اما مهم‌ترین مشکل آن ایجاد مقاومت به دارو در طول پروسه درمانی است (۵، ۶). P-glycoprotein مهم‌ترین ترانسیپورتر معکوس غشاء سلولی است که با انتقال داروهای شیمی‌درمانی وارد شده به سلول به بیرون، باعث کاهش غلظت دارو در داخل سلول شده و بنابراین منجر به ایجاد مقاومت دارویی و در نتیجه کاهش آپوپتوز می‌شود (۷). همچنین نتایج مطالعات، نشان می‌دهد بیان این ترانسیپورتر در سلول‌های سرطانی به دنبال شیمی‌درمانی افزایش می‌یابد. یکی از استراتژی‌های مهم درمان Co-targeting مولکول‌ها و مسیرهایی است که در پیشرفت سرطان نقش دارند. ترکیبی از عوامل ضد سرطان در مقایسه با مونوتراپی اثربخشی بهتری را نشان می‌دهد زیرا مشخصاً مسیرهای کلیدی را به صورت هم‌افزایی یا افزایشی هدف قرار می‌دهند. این رویکرد به طور بالقوه مقاومت دارویی را کاهش می‌دهد در حالی که مزایای ضد سرطانی درمانی مانند کاهش رشد تومور، توقف میتوز، کاهش پتانسیل متاستاتیک و القای آپوپتوز را فراهم می‌کند (۸). علاوه بر بیان بالای P-gp، سایر مکانیسم‌های مقاومت دارویی در سرطان کولورکتال شامل تغییر در هدف دارویی (مانند جهش در توپوایزومراز I)، فعال‌سازی مسیرهای ترمیم DNA، تغییر در مسیرهای سیگنالینگ بقا مانند PI3K/AKT و MAPK/ERK، و تنظیم نامناسب microRNA ها (به ویژه miR-27a و miR-451 که در تنظیم بیان MDR1 نقش دارند) است. شناخت این مکانیسم‌ها می‌تواند به توسعه استراتژی‌های جدید برای غلبه بر مقاومت دارویی کمک کند (۹-۱۱).

ملاتونین (N-استیل-۵-متوکسی تریپتامین)، هورمونی که عمدتاً توسط غده پینه‌آل تولید می‌شود، خواص ضد سرطانی متعددی در سرطان کولورکتال نشان داده است (۱۲). مطالعات اخیر نشان می‌دهند که ملاتونین می‌تواند رشد سلول‌های سرطان کولورکتال را مهار کند، آپوپتوز را القا نماید و متاستاز را کاهش دهد. این اثرات از طریق مکانیسم‌های متعدد شامل تنظیم چرخه سلولی، مهار انکوپروتئین‌های کلیدی مانند β -catenin، و تعدیل مسیرهای التهابی صورت می‌گیرد (۱۳-۱۵). علاوه بر سرطان کولورکتال، خواص ضد سرطانی ملاتونین در سایر بدخیمی‌ها از جمله سرطان سینه (۱۶، ۱۷)، مهار سلول‌های سرطان تخمدان (۱۸)، سرطان

آندومتر (۱۹)، سلول‌های ملانوم عنبیه انسان (۲۰)، سلول‌های تومور پروستات (۲۱) و تومورهای روده (۱۳، ۱۴) نیز گزارش شده است. با توجه به نقش ملاتونین در مهار رشد تومور و تعدیل مقاومت دارویی، این مطالعه به بررسی تأثیر آن بر مقاومت دارویی توپوتکان در سلول‌های SW480/TPT می‌پردازد. بنابراین به کارگیری ملاتونین توأم با داروی شیمی‌درمانی می‌تواند رویکرد درمانی امیدبخشی در ارتباط با تعدیل برخی عوارض جانبی ناشی از این داروهای سایتوتوکسیک و نیز تقویت کارایی آن‌ها مخصوصاً در مواردی از سرطان‌ها که به دارو مقاوم شده‌اند باشند.

در این مطالعه، هدف ما بررسی نقش و مکانیسم اثر ملاتونین بر روی مقاومت دارویی توپوتکان در سلول‌های مقاوم SW480/TPT بود. به منظور بررسی مکانیسم مولکولی کلیدی، سطوح بیان ژنی MDR-1 و پروتئین P-gp و همچنین فعالیت P-gp در حضور یا عدم حضور مختلفی از مهارکننده‌های مسیرهای سیگنال‌دهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

کشت سلولی:

سلول‌های سرطان کولون انسانی (SW480) و سلول‌های سرطان کولون انسانی مقاوم به TPT (SW480/TPT) از مجموعه کشت سلولی انسیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شدند. سلول‌های SW480 و SW480/TPT در محیط کشت RPMI-1640 با افزودن ۱۰ درصد FBS، در محیطی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. سلول‌ها تا زمانی که به ۸۰ درصد تلاقی برسند زیر کشت قرار گرفتند. همه رده‌های سلولی مورد استفاده در این مطالعه به طور معمول از نظر منفی بودن مایکوپlasما تأیید شدند. سلول‌های SW480/TPT در حضور ۰.۵ میکرومول TPT کشت داده شدند و به مدت ۲ هفته در محیط کشت بدون دارو رشد یافتند تا برای انجام آزمایش‌ها آماده شوند. برای تأیید حفظ مقاومت دارویی در سلول‌های SW480/TPT پس از دوره دوهفته‌ای رشد در محیط بدون دارو، سنجش MTT با توپوتکان انجام شد و مقادیر IC₅₀ مجدداً تعیین شدند که نشان‌دهنده حفظ فنوتیپ مقاومت در این سلول‌ها بود.

سنجش بقای سلولی:

سلول‌های SW480 و SW480/TPT در یک صفحه ۹۶ چاهکی در محیط RPMI-1640 با ۱۰ درصد FBS و با تراکم ۳۰۰۰ سلول در هر چاهک تا ۲۴ ساعت قبل از درمان کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، غلظت‌های مختلف TPT با یا بدون ملاتونین در محیط RPMI-1640 (بدون FBS) رقیق شده و به هر چاهک افزوده شد. آزمایش‌ها برای هر گروه، در سه تکرار و

تجزیه و تحلیل شاخص ترکیبی:

شاخص ترکیبی (CI) معیاری است که برای ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک ترکیب دو دارو استفاده می‌شود. این با استفاده از فرمول محاسبه می‌شود: $CI = (D1/Dx1) + (D2/Dx2) + \alpha(D1D2/Dx1Dx2)$ که در آن D1 و D2 غلظت دو دارو در ترکیب، Dx1 و Dx2 غلظت هر دارو به تنهایی باعث کاهش ۵۰ درصد در زنده ماندن سلولی می‌شود و α بسته به اینکه داروها متقابلاً منحصربه‌فرد هستند یا غیر انحصاری، ۰ یا ۱ است.

$CI < 1$ نشان‌دهنده یک تعامل هم‌افزایی بین داروها است، $CI = 1$ یک اثر افزایشی است و $CI > 1$ نشان‌دهنده یک اثر متضاد است.

استخراج RNA، سنتز cDNA، و RT-PCR:

سلول‌های SW480/TPT و SW480 در تراکم 2×10^6 سلول در هر فلاسک T-25 کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با ملاتونین (۱۰ میکرومولار) یا حلال آن به‌عنوان کنترل به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. RNA کل سلولی با استفاده از معرف AccuZol™ طبق دستورالعمل‌های تولیدکننده (Bioneer، Daejeon، Daedeok-gu، کره) از سلول‌ها استخراج شد. RNA کل (۲ میکروگرم) تحت واکنش RT با استفاده از MMLV ترانس کریپتاز معکوس (Promega، Madison، WI، USA) و پرایمر oligo-Dt قرار گرفت.

سیس محصولات cDNA تحت تکثیر توسط فرایند PCR با SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio، Otsu، Shiga، ژاپن) و پرایمرهای خاص (جدول ۱) با استفاده از سیستم Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science، Mortlake، NSW، استرالیا) قرار گرفتند. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و برای هر نمونه‌ی آزمایش‌شده، مقدار چرخه آستانه (Ct) برای ژن هدف یا ژن β -actin تعیین شد. سطح بیان نسبی mRNA هر ژن به سطح بیان β -actin نرمال‌سازی شد که امکان محاسبه cDNA هدف به‌صورت $2^{-(Ct \text{ target gene} - Ct \beta\text{-actin})}$ را فراهم کرد.

جدول (۱): توالی پرایمرهای مورد استفاده برای RT-PCR.

توالی (۵'→۳')		پرایمر
CCCATCATTGCAATAGCAGG	Forward	MDR1
GTTCAAACCTCTGCTCCTGA	Reverse	
TCACCCACACTGTGCCCCATCTACGA	Forward	β -actin
CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	Reverse	

همراه با یک شاهد (کنترل) خالی انجام شد. پس از ۴۸ ساعت تیمار، محیط کشت حذف شد و ۲۰۰ میکرولیتر محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱۰ درصد MTT (۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) اضافه شد. پس از انکوباسیون به مدت ۴ ساعت، محصول فورمازان درون سلولی کاهش‌یافته، از طریق تعویض ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI-1640 با همان حجم از دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO)، حل شد. مقادیر جذب در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش میکروپلیت (State Fax، 2100، Awareness Technology Inc، Palm City، FL، USA) اندازه‌گیری شد. غلظت مهار (IC50) هر آزمایش محاسبه شد. علاوه بر این میزان کاهش مقاومت سلولی (RF) با تقسیم مقدار IC50 سلول‌های مقاوم تیمار شده بر مقدار IC50 در سلول‌های والدی تیمار شده، محاسبه شد.

سنجش تجمع درون سلولی Rh123:

سلول‌های SW480/TPT و SW480 در چگالی 5×10^5 سلول در میلی‌لیتر در پلیت ۶ چاهکی کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ میکرومول Rho123 در حضور یا عدم حضور ملاتونین (۱۰ میکرومولار) یا وراپامیل (۱۰ میکرومولار، کنترل مثبت) انکوبه شدند. وراپامیل به‌عنوان کنترل مثبت برای مهارکننده P-gp استفاده شد. شدت فلورسانس میانگین درون سلولی (MFI) مرتبط با Rho123 با استفاده از فلورومتر FP-6200 (Jasco Co، توکیو، ژاپن) اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که دستگاه فلورومتر FP-6200 (Jasco Co) دارای دقت ± 2 درصد و محدوده خطای کمتر از ۵ درصد است. برای کاهش خطا، هر آزمایش حداقل ۳ بار تکرار شد و میانگین نتایج گزارش شده است. تغییرات کمتر از ۱۰ درصد در شدت فلورسانس به‌عنوان تغییر معنی‌دار در نظر گرفته نشد. تحریک توسط لیزر یون آرگون، در طول موج ۴۸۸ نانومتر صورت گرفت و فلورسانس منتشرشده از طریق فیلتر عبوری ۵۳۰ نانومتری جمع‌آوری شد.

استخراج پروتئین و وسترن بلات

سلول‌های SW480/TPT و SW480 در تراکم 2×10^6 سلول در هر فلاسک T-25 کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها

شد. برای مقایسه گروه‌ها، آزمون‌های ANOVA POST HOC یک‌طرفه (Dunnett و Tukey) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأثیر سیتوتوکسیک توپوتکان و ملاتونین بر سلول‌های SW480/TPT و SW480:

بررسی اثرات سیتوتوکسیک توپوتکان بر روی سلول‌های SW480 و SW480/TPT با استفاده از سنجش MTT نشان داد که مقدار IC50 برای سلول‌های SW480/TPT (0.3 ± 0.28 میکرومولار) به‌طور معناداری بیشتر از سلول‌های حساس SW480 (0.1 ± 0.05 میکرومولار) است ($P < 0.001$). شاخص مقاومت (RF) که از تقسیم IC50 سلول‌های مقاوم بر IC50 سلول‌های حساس به دست می‌آید، برابر با ۵.۶ محاسبه شد که نشان‌دهنده مقاومت قابل توجه سلول‌های SW480/TPT به توپوتکان است (شکل ۱).

در مرحله بعد، اثر غلظت‌های مختلف ملاتونین (۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) بر حساسیت سلول‌ها به توپوتکان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ملاتونین به‌تنهایی تا غلظت ۲۰ میکرومولار اثر سیتوتوکسیک قابل توجهی بر سلول‌ها ندارد (بقای سلولی بیش از ۹۰ درصد). با این حال، تیمار هم‌زمان سلول‌ها با ملاتونین و توپوتکان باعث کاهش معنادار IC50 توپوتکان در سلول‌های مقاوم شد. بیشترین اثر در غلظت ۱۰ میکرومولار ملاتونین مشاهده شد که IC50 توپوتکان را به 0.1 ± 0.08 میکرومولار کاهش داد ($P < 0.001$).

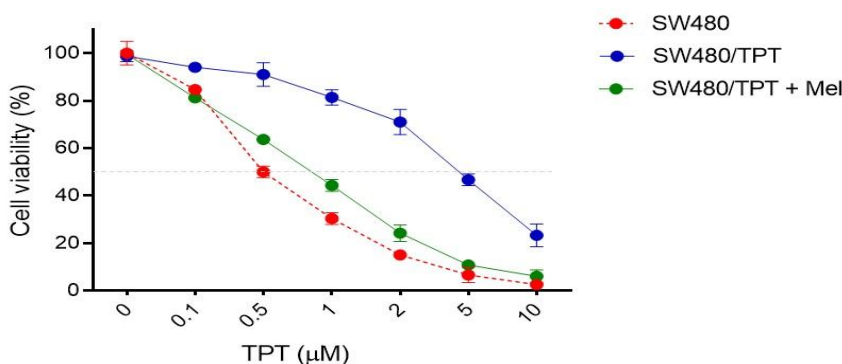
شده بود، استخراج شد. مقادیر مساوی از پروتئین‌ها تحت SDS/PAGE قرار گرفتند و برای ایمونوبلات به غشای PVDF منتقل شدند. باندهای پروتئینی پس از انکوباسیون با آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه با استفاده از بستر ECL Western Blotting (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) مشاهده شدند.

آپوپتوز سلولی

سلول‌های SW480 و SW480/TPT با تراکم ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت داده شدند. سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از کشت، به مدت ۴۸ ساعت با توپوتکان (۰.۵ میکرومولار)، ملاتونین (۱۰ میکرومولار)، یا ترکیبی از هر دو تیمار شدند. آپوپتوز با استفاده از کیت Cell Death Detection ELISA که بر اساس تشخیص قطعات نوکلئوزومی هیستون-DNA در سیتوپلاسم سلول‌های آپوپتوتیک عمل می‌کند، ارزیابی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

نرم‌افزار (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) Prism 7.04 برای پردازش داده‌ها و تحلیل‌های آماری استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شد و $P < 0.05$ value از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای ارزیابی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف و لون استفاده



شکل ۱: حساسیت سلول‌های SW480 و SW480/TPT به TPT و ملاتونین. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف TPT به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT تعیین شد. هر نقطه نمایانگر میانگین $\pm$ انحراف است.

بررسی شاخص ترکیبی (CI): این یافته نشان‌دهنده اثر سینرژیستیک ملاتونین و توپوتکان در مهار رشد سلول‌های SW480/TPT است (جدول ۲).

بررسی شاخص ترکیبی (CI): محاسبه شاخص ترکیبی برای ترکیب ملاتونین و توپوتکان نشان داد که CI در تمام غلظت‌های مورد آزمایش کمتر از ۱ بود

جدول (۲): مقایسه IC50 و شاخص مقاومت در گروه‌های مختلف

گروه درمانی	IC50 (μ M)	شاخص مقاومت (RF)	شاخص ترکیبی (CI)
توپوتکان + SW480	0.5 ± 0.1	۱.۰	-
توپوتکان + SW480/TPT	2.8 ± 0.3	۵.۶	-
توپوتکان + ملاتونین + SW480/TPT	0.8 ± 0.1	۱.۶	0.72 ± 0.08

کلاسیک P-gp بود که افزایش ۳ برابری در تجمع Rh123 ایجاد کرد (جدول ۳).

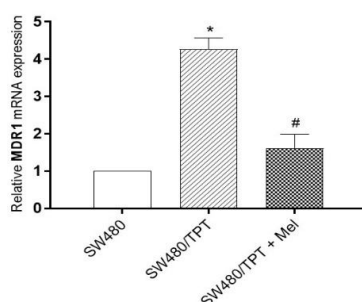
در آزمایش خروج Rh123، پس از بارگذاری سلول‌ها با Rh123، میزان خروج آن در طی زمان اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که سلول‌های SW480/TPT سرعت خروج بالاتری نسبت به سلول‌های حساس دارند (۷۰ درصد خروج در مقابل ۳۰ درصد پس از ۲ ساعت). تیمار با ملاتونین باعث کاهش معنادار سرعت خروج Rh123 شد (کاهش به ۴۰ درصد پس از ۲ ساعت، $P < 0.01$).

جدول (۳): درصد تجمع و خروج Rhodamine 123 در گروه‌های مختلف.

گروه	تجمع Rh123 (%)	خروج Rh123 پس از ۲ ساعت (%)
SW480	100 ± 5	30 ± 3
SW480/TPT	35 ± 4	79 ± 5
ملاتونین + SW480/TPT	86 ± 6	40 ± 4
وراپامیل + SW480/TPT	95 ± 7	35 ± 3

همچنین، نتایج وسترن بلات نشان داد که سطح پروتئین P-gp در سلول‌های SW480/TPT به میزان 0.2 ± 3.8 برابر بیشتر از سلول‌های حساس است. تیمار با ملاتونین باعث کاهش 4 ± 58 درصد در سطح این پروتئین شد ($P < 0.001$). این کاهش با نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن همخوانی داشت (شکل ۲).

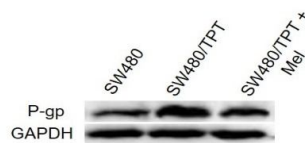
الف



بررسی بیان ژن MDR1 و سطح پروتئین P-gp:

آنالیز RT-PCR کمی نشان داد که بیان ژن MDR1 در سلول‌های SW480/TPT به‌طور معناداری (0.3 ± 4.2 برابر) بیشتر از سلول‌های والد است ($P < 0.001$). تیمار با ملاتونین (۱۰ میکرومولار) به مدت ۴۸ ساعت باعث کاهش 5 ± 65 درصد در بیان ژن MDR1 در سلول‌های مقاوم شد ($P < 0.001$).

ب



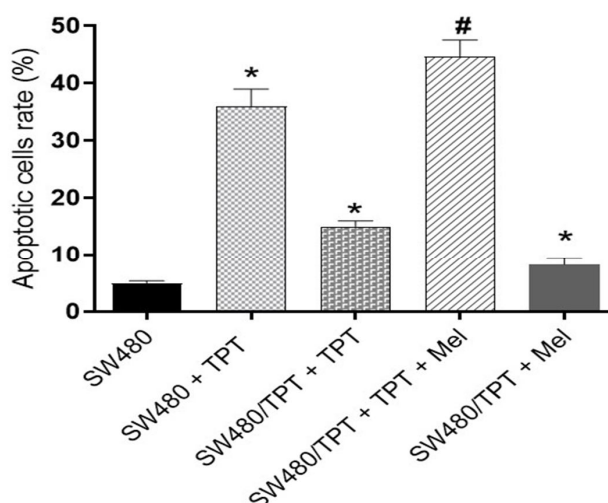
شکل (۲): تأثیر ملاتونین بر بیان MDR-1 و P-gp در سلول‌های SW480/TPT. (الف) بیان نسیی ژن MDR1 و (ب) وسترن بلات

P-gp داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n = 3$) نمایش داده شده‌اند؛ $p < 0.05$ در مقایسه با سلول‌های والدین SW480 و $p < \#$ در مقایسه با سلول‌های SW480/TPT بدون درمان

بررسی آپوپتوز سلولی:

سنجش آپوپتوز با استفاده از کیت ELISA نشان داد که درصد سلول‌های آپوپتوتیک در سلول‌های SW480/TPT تیمار شده با

توپوتکان (۰.۵ میکرومولار) به‌تنهایی $15 \pm 2\%$ است (شکل ۳). تیمار هم‌زمان با ملاتونین (۱۰ میکرومولار) و توپوتکان باعث افزایش معنادار میزان آپوپتوز به $45 \pm 4\%$ شد ($P < 0.001$).



شکل (۳): تحلیل آزمون مرگ سلولی با استفاده از ELISA در سلول‌های SW480/TPT. سلول‌ها با ملاتونین، TPT و ترکیب ملاتونین به همراه TPT تیمار شدند.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ملاتونین از طریق دو مکانیسم اصلی باعث افزایش حساسیت سلول‌های مقاوم SW480/TPT به توپوتکان می‌شود: (۱) کاهش بیان ژن MDR1 و به تبع آن کاهش سطح پروتئین P-gp، و (۲) مهار مستقیم فعالیت پمپ P-gp که منجر به افزایش تجمع دارو در داخل سلول می‌شود. این یافته‌ها با مطالعات قبلی که نشان داده‌اند ملاتونین می‌تواند در سلول‌های سرطانی مختلف باعث کاهش بیان P-gp شود، همخوانی دارد (۲۲، ۲۳). علاوه بر این، اثر سینرژیستیک ملاتونین و توپوتکان در القای آپوپتوز می‌تواند ناشی از افزایش غلظت داخل سلولی توپوتکان و در نتیجه تقویت مهار توپوایزومراز I باشد. مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی یکی از چالش‌های اصلی در درمان سرطان کولورکتال است. در این مطالعه، نشان داده شد که ملاتونین می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی درمانی مؤثر در غلبه بر مقاومت سلول‌های سرطان کولون SW480/TPT به توپوتکان عمل کند.

توپوتکان یا مشتق کمپتوتسین اثرات ضد توموری را در برابر بسیاری از انواع سرطان نشان داده است، و بسیاری از مطالعات اثر ضد توموری TPT را در ترکیب با سایر عوامل شیمی‌درمانی برای افزایش کارایی با استفاده از دوز کمتر و درعین حال محدود کردن

سمیت برجسته کرده‌اند (۲۴، ۲۵). برخی از مطالعات اثر ترکیب داروهای درمانی با ترکیبات ضد سرطانی مانند ملاتونین را بررسی کردند که پتانسیل غلبه بر مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی و کاهش سمیت آن‌ها را دارند. مطالعه حاضر اثرات هم‌افزایی ضد پرولیفراتیو را با ترکیب TPT با ملاتونین در سلول‌های SW480 گزارش می‌کند. نتایج آزمون MTT نشان داد که سلول‌های SW480/TPT در مقایسه با سلول‌های حساس SW480 چشمگیری (۵.۶ برابر) به توپوتکان دارند. این مقاومت احتمالاً به دلیل افزایش بیان ژن MDR1 و افزایش سطح پروتئین P-gp در سلول‌های مقاوم است. P-gp به‌عنوان یک پمپ افلاکسی غشایی، باعث خروج داروهای شیمی‌درمانی از داخل سلول می‌شود و در نتیجه غلظت دارو در داخل سلول کاهش یافته و سلول‌ها در برابر آن مقاوم می‌گردند. در این راستا، راحمی و همکاران نشان داد که مهارکننده‌های IRAK می‌توانند با مهار التهاب و کاهش بیان P-gp، چندین رده سلولی سرطان سینه را به توپوتکان حساس کنند (۲۶).

تیمار هم‌زمان سلول‌های مقاوم با ملاتونین و توپوتکان به‌طور معناداری باعث کاهش IC50 توپوتکان و افزایش میزان آپوپتوز سلولی شد. این اثرات سینرژیستیک ملاتونین و توپوتکان با محاسبه

مطالعات آینده می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی دخیل در معکوس‌سازی مقاومت دارویی و بهبود استراتژی‌های درمانی برای سرطان کولورکتال کمک کند.

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ملاتونین می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب مکمل در کنار داروهای شیمی‌درمانی رایج مانند توپوتکان در درمان سرطان کولورکتال عمل کند. مهار پمپ P-gp و کاهش بیان ژن MDR1 توسط ملاتونین، باعث افزایش تجمع و اثرات سایتوتوکسیک داروهای شیمی‌درمانی در سلول‌های مقاوم شده و در نتیجه منجر به بهبود پاسخ درمانی می‌شود. این ترکیب کردن ملاتونین با داروهای رایج شیمی‌درمانی می‌تواند یک راهکار امیدبخش در غلبه بر مقاومت دارویی در سرطان کولورکتال باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (شماره گرنت ۷۲۲۶۲)، تبریز، ایران انجام شد.

منابع مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (شماره گرنت ۷۲۲۶۲)، تبریز، ایران انجام شد.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافع مرتبط با نگارش و انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مؤلفان

نویسندگان به‌صورت فعال در تمام مراحل اجرا و تحلیل نتایج مطالعه و همچنین تألیف مقاله مشارکت داشته و نسخه نهایی آن را مطالعه و تأیید می‌نمایند.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر دارای کد اخلاق به شماره IR.TBZMED.AEC.1402.085 از دانشگاه علوم پزشکی تبریز است.

شاخص ترکیبی ($CI < 1$) تأیید شد. مکانیسم این اثر ترکیبی، احتمالاً مرتبط با توانایی ملاتونین در مهار بیان ژن MDR1 و کاهش سطح پروتئین P-gp است که منجر به افزایش تجمع توپوتکان در سلول‌های مقاوم می‌شود. به‌عبارت‌دیگر، ملاتونین با مهار پمپ P-gp، امکان تجمع بیشتر توپوتکان در سلول‌ها را فراهم می‌کند و در نتیجه اثرات سایتوتوکسیک این دارو افزایش می‌یابد.

نتایج آزمایش‌ها تجمع و خروج Rhodamine 123 نیز مؤید این موضوع است. در سلول‌های مقاوم، تجمع Rh123 به‌عنوان سوبسترای P-gp به‌طور معناداری کمتر از سلول‌های حساس بود. اما بیمار با ملاتونین باعث افزایش قابل توجه تجمع Rh123 شد که نشان‌دهنده مهار عملکرد پمپ P-gp توسط ملاتونین است. در آزمایش خروج Rh123 نیز مشاهده شد که سلول‌های مقاوم سرعت خروج بیشتری نسبت به سلول‌های حساس دارند و ملاتونین این سرعت را کاهش می‌دهد.

ملاتونین همچنین باعث کاهش معنادار بیان ژن MDR1 و سطح پروتئین P-gp در سلول‌های مقاوم گردید. این تغییرات در سطوح mRNA و پروتئین احتمالاً از طریق مهار مسیرهای سیگنال‌دهی درگیر در تنظیم MDR1 صورت می‌گیرد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که ملاتونین می‌تواند با مهار مسیرهای PI3K/Akt و MAPK/ERK که در تنظیم بیان ژن MDR1 نقش دارند، به کاهش مقاومت دارویی کمک کند (۳۰-۲۷).

علی‌رغم یافته‌های امیدوارکننده این مطالعه، لازم است به برخی محدودیت‌ها اشاره شود. اول اینکه، این مطالعه تنها بر روی یک رده سلولی سرطان کولورکتال (SW480) و مشتق مقاوم آن (SW480/TPT) انجام شده است. برای تعمیم‌پذیری بیشتر نتایج، لازم است این آزمایش‌ها روی رده‌های سلولی متنوع‌تری از سرطان کولورکتال و همچنین نمونه‌های بافتی اولیه انجام شود. دوم، اگرچه ما مکانیسم اثر ملاتونین را از طریق مهار P-gp/MDR1 بررسی کردیم، اما ممکن است بسیاری از مسیرهای سیگنالی در این فرآیند دخیل باشند که نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. سوم، این مطالعه به‌صورت *in vitro* انجام شده است و برای ارزیابی اثربخشی و ایمنی این رویکرد درمانی، انجام مطالعات *in vivo* و در نهایت کارآزمایی‌های بالینی ضروری است. رفع این محدودیت‌ها در

References:

1. Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. Gut 2023;72(2):338-44. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327736>
2. Anselmino LE, Malizia F, Avila A, Cesatti L, N, Mamberto M, Zanotti LC, et al. Overcoming Therapy Resistance in Colorectal Cancer: Targeting the Rac1 Signaling Pathway as a

- Potential Therapeutic Approach. *Cells* 2024;13(21):1776.
<https://doi.org/10.3390/cells13211776>
3. Tang Z, Ji L, Han M, Xie J, Zhong F, Zhang X, et al. Pyroptosis is involved in the inhibitory effect of FL118 on growth and metastasis in colorectal cancer. *Life Sci* 2020;257:118065.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118065>
 4. Masoudi N, Sadeghi S, Pashaei MR, Valizad Hasanloei MA. Evaluation of the relationship between serum levels of carcinoembryonic antigen (cea) and homeostasis model assessment of insulin resistance-2 (homa2-ir) in colorectal cancer patients. *Stud Med Sci* 2022;33(3):152-9.
<https://doi.org/10.52547/umj.33.3.152>
 5. Jagiela J, Bartnicki P, Rysz J. Nephrotoxicity as a Complication of Chemotherapy and Immunotherapy in the Treatment of Colorectal Cancer, Melanoma and Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22(9).
<https://doi.org/10.3390/ijms22094618>
 6. Lozon L, Saleh E, Menon V, Ramadan WS, Amin A, El-Awady R. Effect of safranal on the response of cancer cells to topoisomerase I inhibitors: Does sequence matter? *Front Pharmacol* 2022;13:938471.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.938471>
 7. Shi X, Valizadeh A, Mir SM, Asemi Z, Karimian A, Majidina M, et al. miRNA-29a reverses P-glycoprotein-mediated drug resistance and inhibits proliferation via up-regulation of PTEN in colon cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2020;880.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173138>
 8. Shimia M, Amini M, Ravari AO, Tabnak P, Valizadeh A, Ghaheri M, et al. Thymoquinone reversed doxorubicin resistance in U87 glioblastoma cells via targeting PI3K/Akt/mTOR signaling. *Chem Biol Drug Des* 2024;104(2).
<https://doi.org/10.1111/cbdd.14587>
 9. Haynes J, Manogaran P. Mechanisms and Strategies to Overcome Drug Resistance in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2025;26(5):1988.
<https://doi.org/10.3390/ijms26051988>
 10. Li Q, Geng S, Luo H, Wang W, Mo Y-Q, Luo Q, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2024;9(1):266.
<https://doi.org/10.1038/s41392-024-01953-7>
 11. Yousefi B, Valizadeh A, Molavand M, Majidinia M. Reversal effect of fenofibrate on P-glycoprotein-mediated multidrug resistance through PPAR γ -dependent upregulation of PTEN expression in SW-480 colorectal cancer cells. *Stud Med Sci* 2024;35(6):467-78.
<https://doi.org/10.61186/umj.35.6.467>
 12. Baghal-Sadriforoush S, Bagheri M, Abdi rad I, Sotoodehnejadnematalahi F. An evaluation of melatonin influence on sensitivity to cisplatin through expression of survivin, xiap, caspase-3, and akt genes in ovc3 ovarian cancer cells. *Stud Med Sci* 2021;32(7):525-36.
<https://doi.org/10.52547/umj.32.7.525>
 13. Anisimov VN, Popovich IG, Shtylik AV, Zabezhinski MA, Ben Huh H, Gurevich P, et al. Melatonin and colon carcinogenesis. III. Effect of melatonin on proliferative activity and apoptosis in colon mucosa and colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2000;52:71-6. [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(00\)80022-6](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(00)80022-6)
 14. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA. Melatonin and colon carcinogenesis. I. Inhibitory effect of melatonin on development of intestinal tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Carcinogenesis* 1997;18:1549-53.
<https://doi.org/10.1093/carcin/18.8.1549>
 15. Bartsch H, Bartsch C. Effect of melatonin on experimental tumors under different photoperiods and times of administration. *J Neural Transm*

- 1981;52:269-79.
<https://doi.org/10.1007/BF01256752>
16. Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine* 2005;27:179-88.
<https://doi.org/10.1385/ENDO:27:2:179>
 17. Hill SM, Teplitzky S, Ram PT. Melatonin synergizes with retinoic acid in the prevention and regression of breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 1999;460:345-62. https://doi.org/10.1007/0-306-46814-X_39
 18. Petranka J, Baldwin W, Biermann J. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. *J Pineal Res* 1999;26:129-36.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1999.tb00574.x>
 19. Kanishi Y, Kobayashi Y, Noda S, Ishizuka B, Saito K. Differential growth inhibitory effect of melatonin on two endometrial cancer cell lines. *J Pineal Res* 2000;28:227-33.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2000.280405.x>
 20. Hu DN, Roberts JE. Melatonin inhibits growth of cultured human uveal melanoma cells. *Melanoma Res* 1997;7:27-31.
<https://doi.org/10.1097/00008390-199702000-00005>
 21. Gilad E, Laufer M, Matzkin H. Melatonin receptors in PC3 human prostate tumor cells. *J Pineal Res* 1999;26:211-20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1999.tb00586.x>
 22. Fan L, Sun G, Ma T, Zhong F, Wei W. Melatonin overcomes apoptosis resistance in human hepatocellular carcinoma by targeting survivin and XIAP. *J Pineal Res* 2013;55(2):174-83.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12060>
 23. Gao Y, Xiao X, Zhang C, Yu W, Guo W, Zhang Z, et al. Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF- κ B/iNOS signaling pathways. *J Pineal Res* 2017;62(2).
<https://doi.org/10.1111/jpi.12380>
 24. Tsang PS, Cheuk AT, Chen QR, Song YK, Badgett TC, Wei JS, et al. Synthetic Lethal Screen Identifies NF- κ B as a Target for Combination Therapy with Topotecan for patients with Neuroblastoma. *BMC Cancer* 2012;12.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-101>
 25. Adams DJ, Sandvold ML, Myhren F, Jacobsen TF, Giles F, Rizzieri DA. Anti proliferative activity of ELACY (CP-4055) in combination with cloretazine (VNP40101M), idarubicin, gemcitabine, irinotecan and topotecan in human leukemia and lymphoma cells. *Leuk Lymphoma* 2008;49(4):786-97.
<https://doi.org/10.1080/10428190801935752>
 26. Rahemi S, Danesh B, Nematollahi-Mahani SN, Fallah H. Inhibition of IRAK Signaling Can Improve Topotecan Sensitivity of Breast Cancer Cell Lines by Decrease of P-gp Gene Expression. 2022.
 27. Mayo JC, Hevia D, Quiros-Gonzalez I, Rodriguez-Garcia A, Gonzalez-Menendez P, Cepas V, et al. IGFBP3 and MAPK/ERK signaling mediates melatonin-induced antitumor activity in prostate cancer. *J Pineal Res* 2017;62(1). <https://doi.org/10.1111/jpi.12373>
 28. Mihanfar A, Yousefi B, Azizzadeh B, Majidinia M. Interactions of melatonin with various signaling pathways: implications for cancer therapy. *Cancer Cell Int* 2022;22(1):420.
<https://doi.org/10.1186/s12935-022-02825-2>
 29. Mao L, Summers W, Xiang S, Yuan L, Dauchy RT, Reynolds A, et al. Melatonin Represses Metastasis in Her2-Positive Human Breast Cancer Cells by Suppressing RSK2 Expression. *Mol Cancer Res* 2016;14(11):1159-69.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0158>
 30. Liu Z, Zou D, Yang X, Xue X, Zuo L, Zhou Q, et al. Melatonin inhibits colon cancer RKO cell

migration by downregulating Rho-associated
protein kinase expression via the p38/MAPK
signaling pathway. Mol Med Rep

2017;16(6):9383-92.

<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7836>

MELATONIN ENHANCES TOPOTECAN SENSITIVITY IN RESISTANT SW480/TPT COLORECTAL CANCER CELLS

Vahid Rameshknia¹, Moireh Movahhedi², Abbas Akhavan³, Amir Valizadeh^{4*}, Bahman Yousefi^{5*}

Received: 15 November, 2024; Accepted: 25 March, 2025

Abstract

Background & Aims: Chemoresistance, particularly to topotecan (TPT), remains a major obstacle in colorectal cancer treatment. As a topoisomerase I inhibitor, TPT's efficacy is limited by P-glycoprotein (P-gp)-mediated drug resistance. This study examined melatonin's potential to overcome TPT resistance in SW480/TPT cells and its underlying mechanisms.

Materials & Methods: SW480 and drug-resistant SW480/TPT cells were maintained in RPMI-1640/10% FBS. Cells were treated with TPT (0.1-5 μ M) alone or combined with melatonin (1-20 μ M) in serum-free medium for 48 hours. Apoptosis was quantified using the Cell Death Detection ELISA™ kit. MDR1 expression and P-gp levels were assessed after melatonin treatment (10 μ M, 48h). All experiments included ≥ 3 biological replicates, with data analyzed by one-way ANOVA.

Results: Melatonin synergistically enhanced TPT efficacy, reducing the IC₅₀ from 2.8 ± 0.3 μ M to 0.8 ± 0.1 μ M (71.4% reduction, $p < 0.001$). Combination therapy increased apoptosis from $15 \pm 2\%$ (TPT alone) to $45 \pm 4\%$ (3-fold increase, $p < 0.001$). Mechanistically, melatonin downregulated MDR1 expression by $65 \pm 5\%$ and decreased P-gp levels by $58 \pm 4\%$ versus untreated controls ($p < 0.001$).

Conclusion: Melatonin significantly reverses TPT resistance in colorectal cancer cells by suppressing P-gp/MDR1. These findings position melatonin as a promising adjuvant for combination chemotherapy, warranting further investigation in preclinical models and clinical trials.

Keywords: Melatonin, Colorectal cancer, Topotecan, Drug resistance, P-glycoprotein, Apoptosis

Address: Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Tel: +989395502800

Email: Amir.valizadeh6@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2025; 35(12): 960 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ Assistant Professor of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Clinical Biochemistry Student, Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Clinical Biochemistry Student, Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Clinical Biochemistry Student, Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)

⁵ Associate Professor of Clinical Biochemistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)