

## مقاله پژوهشی

# اثر سیتوتکسیتی توأم داروهای کپسیتابین و ملاتونین روی رده‌های سلولی HER2 مثبت (SK-BR-3) و HER2 منفی (MCF-7) سرطان پستان انسانی و اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

سپیده شایان<sup>۱</sup>، لعیبا تکبیری اسکویی<sup>۲\*</sup>، فاطمه جوانی جونی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دکتری گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲\*</sup> استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استادیار گروه بیوشیمی - بیوفیزیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

\* (نویسنده مسئول مکاتبات): layatakbiri536@gmail.com

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۲

## چکیده

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در زنان است. ملاتونین، یک ایندول آمین طبیعی سنتز شده در غده صنوبری می‌باشد. مطالعات زیادی نشان می‌دهند که ملاتونین به دلیل داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک می‌تواند کاندیدی جذاب برای درمان ترکیبی سرطان باشد. فرض مطالعه حاضر بر این است که ملاتونین در ترکیب با کپسیتابین ممکن است اثر هم افزایی در رده‌های سلولی سرطان پستان MCF-7 و SK-BR-3 نشان دهند. برای مطالعه اثر داروهای فوق بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به تنهایی و به صورت ترکیبی روی رده‌های سلولی انجام گرفت. نتایج نشان داد در هر دو رده سلولی، استفاده ترکیبی دو دارو منجر به افزایش بیشتر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شده اند خاصیت سینرژستی این دو ترکیب کاملاً در نتایج آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مشهود است استفاده توأم این دو ترکیب منجر به کاهش دوز کپسیتابین می‌گردد که در نتیجه منجر به کاهش اثرات جانبی این دارو خواهد شد.

**کلیدواژه‌ها:** ملاتونین، کپسیتابین، سرطان پستان، MCF-7، SK-BR-3، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز.

## مقدمه

تشخیص داده شده است و سرطان پستان در ۱۲٪ از کل زنان در ایالات متحده در طول عمر آن‌ها تشخیص داده می‌شود [۲]. سرطان پستان دارای یک تشخیص بافت شناسی است که طبق معیارهای استاندارد پاتولوژیک انجام می‌شود. شایع‌ترین

در سراسر جهان، بعد از سرطان پوست غیر ملانوما، سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است [۱]. بیش از ۲۵۰ هزار مورد جدید سرطان پستان در سال ۲۰۱۷ در ایالات متحده

گیرنده‌های MT1 و MT2 هر دو در ارگان‌های مختلف بیان می‌شوند [۸] مطالعات بیشماری نشان داده‌اند که ملاتونین بر روی انواع بدخیمی‌ها اثرات آنکوآستاتیک دارد و اثرات آن بر سرطان پستان نیز مورد مطالعه گسترده‌ای است [۹]. داده‌های کلینیکی و همچنین مطالعات حیوانی شواهدی را ارائه داده‌اند که نشان می‌دهد، ملاتونین بروز سرطان‌های آزمایشی را کاهش می‌دهد و رشد برخی از تومورهای پستان انسان را به میزان قابل توجهی مهار می‌کند [۱۰، ۱۱]. به طور کلی، مشخص شده است که ملاتونین از طریق مکانیسم‌های مختلفی اثرات سیتوتوکسیک ضدپرولیفراتیو و اثرات سیتوتوکسیک آپوپتوزی خود را در سلول‌های سرطانی پستان اعمال می‌کند [۱۲].

فلونوروراسیل<sup>۸</sup> یکی از قدیمی‌ترین و پرمصرف‌ترین داروهای سیتوتوکسیک است. فعالیت ضد توموری آن به طور کلی به مهار سنتز تیریمیدین و اختلال در تکثیر DNA به واسطه تشکیل یک کمپلکس سه گانه با تیمیدیلات سنتاز<sup>۹</sup> و ۵-متیلن تراهیدروفولات و یک متابولیت اسید فولینیک نسبت داده می‌شود [۷، ۸]. قرار گرفتن طولانی مدت سلول‌های بدخیم در معرض فلونوروراسیل و شدت دوز بالا برای یک برنامه معین از تجویز برای به حداکثر رساندن فعالیت ضد توموری و بهره مندی بیمار از درمان ضروری است [۱۴، ۱۵].

کپسیتابین<sup>۱۰</sup> یک کاربامات فلوروپیریمیدین جدید است که به عنوان یک ۵'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) و به صورت خوراکی طراحی شده است. کپسیتابین در حال حاضر در حداقل ۴۵ کشور از جمله ایالات متحده آمریکا و کانادا برای بیماران مبتلا به سرطان پستان مقاوم در برابر تاکسان<sup>۱۱</sup> تأیید شده است [۱۳، ۱۴].

گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و گونه‌های نیتروژن فعال، از جمله سوپر اکسید آنیون ( $O_2^{\bullet-}$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، پراکسی نیتريت ( $-ONOO$ ) و اکسید نیتريك ( $\bullet NO$ )، به طور یکپارچه در انتشار سیگنال در فیزیولوژی، یوکاریوتی دارای نقش ضروری هستند. به این ترتیب، سیگنال‌دهی ROS با پیری، آسیب شناسی‌های قلبی عروقی،

بافت شناسی سرطان پستان، کارسینوم داکتال تهاجمی<sup>۱</sup> است (۷۵-۵۰ درصد از بیماران) و پس از آن سرطان کارسینوم لوبولار تهاجمی<sup>۲</sup> (۱۵-۵ درصد بیماران)، همراه با کارسینوم داکتال/لوبولار<sup>۳</sup> مخلوط و سایر موارد نادر که باقی مانده بیماران را تشکیل می‌دهد [۳].

دو هدف اصلی مولکولی در پاتوزن سرطان پستان مشخص شده است. یکی از آنها گیرنده استروژن آلفا<sup>۴</sup> است که تقریباً در ۷۰٪ از سرطان‌های تهاجمی پستان بیان شده است. ER $\alpha$  یک گیرنده هورمون استروئیدی و یک فاکتور رونویسی است که با فعال شدن توسط استروژن، مسیرهای رشد انکوژنیک را در سلول‌های سرطانی پستان فعال می‌کند. بیان گیرنده هورمون پروژسترون استروئیدی همچنین یک نشانگر سیگنالینگ ER $\alpha$  است [۴]. هدف اصلی مولکولی دوم عامل رشد اپیدرمی<sup>۵</sup> است که یک گیرنده تیروزین کیناز داخل غشایی در خانواده گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی است و تقریباً در ۲۰٪ از سرطان‌های پستان تقویت و یا بسیار بیان می‌شود [۵]. بنابراین سرطان پستان بر اساس وجود یا عدم وجود نشانگرهای مولکولی در گیرنده‌های استروژن یا پروژسترون و فاکتور رشد اپیدرمال انسانی ۲ (ERBB2؛ یا همان HER2) به ۳ زیر گروه اصلی طبقه بندی می‌شود: گیرنده هورمون مثبت HER2 منفی (۷۰٪ بیماران)، HER2 مثبت (۲۰-۱۵ درصد) و سه گانه منفی (تومورهای فاقد هر سه نشانگر مولکولی استاندارد؛ [۲]).

ملاتونین<sup>۶</sup> هورمونی است که توسط لرنر<sup>۷</sup> و همکارانش کشف شد و از غده اپی فیز پستانداران ترشح می‌شود [۶، ۷]. بسیاری از اثرات ضد سرطانی ملاتونین در درجه اول از طریق اتصال به دو گیرنده غشایی مرتبط با پروتئین G (GPCR) انجام می‌شود. این دو GPCR که در انسان و پستانداران یافت می‌شوند، شامل گیرنده MT1 ملاتونین (قبلاً Mel1a) هستند که توسط ژن MTNR1A و گیرنده MT2 ملاتونین (قبلاً Mel1B) رمزگذاری شده توسط ژن MTNR1B هستند.

<sup>1</sup> invasive ductal carcinoma

<sup>2</sup> invasive lobular carcinoma

<sup>3</sup> ductal/lobular carcinomas

<sup>4</sup> Estrogen Receptor  $\alpha$

<sup>5</sup> Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

<sup>6</sup> N-acetyl-5-methoxytryptamine

<sup>7</sup> Lerner

<sup>8</sup> 5-fluorouracil; FU-5

<sup>9</sup> thymidylate synthase

<sup>10</sup> Capecitabine <sup>®</sup> Xeloda با نام تجاری

<sup>11</sup> taxane

مشکل در خواب و یا تغییر در طعم ایجاد کند. حالت تهوع و استفراغ معمولاً به صورت شدید ایجاد می‌شوند. اسهال از عوارض جانبی رایج این دارو است. یکی دیگر از عوارض جانبی این دارو ریزش موی موقت است. رشد طبیعی مو باید پس از پایان درمان برگردد. همچنین ممکن است تغییرات موقتی ناخن ایجاد شود. کپسیتابین ممکن است باعث گردد بیمار یک مشکل پوستی به نام سندرم دست و پا پیدا کند [۱۸]. بنابراین دست یابی به روش درمانی که اثرات جانبی کپسیتابین را کاهش دهد از اهمیت بسیاری برخوردار است. ترکیب کپسیتابین با ملاتونین احتمالاً بتواند از اثرات جانبی داروی کپسیتابین کاسته و همچنین ترکیب این دو دارو اثر درمانی بیشتری داشته باشد. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی اثر توأم درمانی داروی کپسیتابین و ملاتونین بر روی سلول‌های سرطانی پستان می‌باشد.

## مواد و روش کار

### کشت سلول و رده‌های سلولی مورد استفاده

سلول‌های رده سرطانی C207 SK-7 (C135) MCF-7 و BR-3 پستان به صورت یخ‌زده در نیتروژن مایع از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)<sup>۲</sup> و ۱ درصد پنسیلین استرپتومایسین جهت جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها در شرایط رشد مورد نیاز (دمای ۳۷ درجه سلسیوس - ۵% CO<sub>2</sub>) کشت داده شدند.

### تهیه غلظت‌های مختلف ترکیبات

جهت انجام آزمون غلظت‌های IC<sub>50</sub> بدست آمده طبق مطالعه شایان و همکاران استفاده گردید IC<sub>50</sub> غلظتی از دارو است که به میزان ۵۰% خاصیت مهارکنندگی یک فعالیت بیولوژیکی را داشته باشد (۱۹)

X 200

ΔOD Control

به این منظور غلظت‌های IC<sub>50</sub>، ۴/۵۲ mM، μg/ml ۶۱۹/۳۶ برای ملاتونین (Cas no. 73-31-4) و کپسیتابین (Cas No. 154361-50-9) به ترتیب در رده سلولی MCF-

التهاب، تخریب عصبی و سرطان مرتبط است. یکی از اجزای آنزیمی ضروری سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتازهای وابسته به یون فلزی (SODs) هستند. سه عضو از خانواده SOD در فیزیولوژی پستانداران وجود دارد. همه اعضای خانواده SOD به کوفاکتورهای فلزی برای کاتالیز اکسیداسیون الکترون و به دنبال آن کاهش الکترونی O<sub>2</sub>•- نیاز دارند. انتظار می‌رود که هر یک از اعضای خانواده SOD نقش‌های تقسیم‌بندی شده خاصی مانند تنظیم فاکتورهای رونویسی حساس به ردوکس، سنجش سطح اکسیژن میتوکندریایی یا محافظت از بافت اطراف در برابر التهاب اکسیداتیو در طول عفونت بر عهده داشته باشند.

اثرات سرکوب‌کننده تومور MnSOD و Cu/ZnSOD به خوبی توصیف شده است [۱۶] اعتقاد بر این است که سوپراکسیداز به‌عنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده به روشی متمایز از مولکول‌های واسطه‌شده توسط H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، •OH، و ONOO- عمل می‌کند، اگرچه مکانیسم آن به‌طور کامل شناخته نشده است. نام سوپراکسید آنیون به این معنا گمراه‌کننده است که یک سوپر اکسیدان نیست بلکه یک احیا کننده نسبتاً متوسط است. با این حال، سوپراکسید که هم یک رادیکال و هم یک آنیون است، می‌تواند با مکانیسم هسته دوست با مولکول‌های آلی واکنش دهد. به دلیل این خاصیت هسته دوست، سوپراکسید قادر است الکل‌ها، فنل‌ها و تیول‌ها را به سرعت پروتون زدایی کند و استرها را هیدرولیز کند [۱۷]. با پروتون زدایی از باقی مانده‌های پروتئینی سرین یا ترئونین، سوپراکسید آنیون می‌تواند واسطه فسفوریلاسیون پروتئین‌های متعدد توسط پروتئین کینازها شود و در نتیجه سرعت واکنش هسته دوست بین کینازها و پروتئین‌های فسفریله کننده را تسریع کند. به عنوان مثال، نشان داده شده است که سوپراکسید در فعال شدن بسیاری از پروتئین کینازها و کینازهای فعال شده با میتوزن. یکی دیگر از محرک‌های مهم فسفوریلاسیون آنزیمی توسط سیگنال دهی سوپراکسید آنیون از طریق فعال سازی فسفاتیدیل لینوزیتول ۳-کیناز است که متعاقباً MAPK و PKB را فعال می‌کند [۱۶].

مصرف داروی کپسیتابین ممکن است حالت تهوع، استفراغ، از دست دادن اشتها، یبوست، خستگی، ضعف، سردرد، سرگیجه،

<sup>2</sup> Fetal Bovin serum

<sup>1</sup> superoxide dismutases

توسط غلظت  $IC_{50}$  ملاتونین و کپسیتابین و همچنین استفاده توأم از آن‌ها پرداخته شده است. در نمودار ۱ میزان سوپر اکسید دیسموتاز در مایع رویی سلول‌ها آورده شد سوپر اکسید دیسموتاز در مایع رویی سلول‌ها آورده شده است.

ملاتونین و کپسیتابین در هر دو رده سلولی منجر به افزایش معنی‌دار میزان SOD در سلول‌های SK-BR-3 و MCF-7 نسبت به سلول‌های تیمار نشده (کنترل) شده است. ترکیب ملاتونین + کپسیتابین افزایش بیشتر میزان SOD را منجر شده‌اند. خاصیت سینرژیستی این دو ترکیب کاملاً در نتایج SOD مشهود است و اختلاف آن معنی‌دار می‌باشد ( $P-Value < 0.05$ ). البته افزایش میزان SOD در رده سلولی SK-BR-3 بیشتر از رده سلولی MCF-7 است.

### بحث و نتیجه‌گیری

سرطان به گروهی از بیماری‌ها اطلاق می‌گردد که با رشد و تهاجم غیرطبیعی سلول‌ها مشخص شده و می‌تواند از محل منشأ یا محل اولیه به سایر قسمت‌های بدن سرایت کند. در این تعریف باید به چند نکته تأکید شود. سرطان به‌عنوان گروهی از بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود. بیش از ۱۰۰ نوع سرطان طبقه‌بندی شده است. بافت مورد نظر منشأ ویژگی‌های متمایز سرطان را نشان می‌دهد. حدود ۸۵ درصد از سرطان‌ها از سلول‌های اپیتلیال منشأ گرفته و به‌عنوان کارسینوم طبقه‌بندی می‌شوند. سرطان‌های ناشی از سلول‌های مزودرم (مانند استخوان، ماهیچه) سارکوم و سرطان‌های بافت غده‌ای (مثلاً پستان) آدنوکارسینوم نامیده می‌شوند. انواع مختلف سرطان ویژگی‌های متفاوتی دارند. [۲۰].

غالب روش‌های درمانی موجود برای مقابله با سرطان پستان دارای اثرات و عوارض جانبی بوده و قادر به حذف انحصاری سلول‌های سرطانی نبوده و به سلول‌های سالم نیز آسیب می‌زند. در همین راستا بخشی از پژوهش‌های اخیر به کاهش این عوارض جانبی پرداخته‌اند [۲۱].

کپسیتابین یک داروی خوراکی فلوتوروراسیل است که برای شیمی‌درمانی کمکی<sup>۲</sup> در سرطان معده استفاده می‌شود [۲۲]. همچنین این دارو برای درمان کمکی سرطان پستان متاستاتیک

7 و غلظت‌های ۵/۱ mM و ۶۷۹/۵۱  $\mu\text{g/ml}$  در رده سلولی SK-BR-3 و همچنین جهت اثر توأم آن‌ها از غلظت ملاتونین (۱/۵۹ mM) و کپسیتابین ( $239/4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) جهت تیمار روی سلول‌ها تهیه و استفاده گردید. [۱۹]

### سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

جهت انجام این سنجش از کیت Nasdox<sup>TM</sup> شرکت ناوند سلامت استفاده گردید.

برای این منظور محیط کشت حاوی حداقل  $10^6$  سلول در ۸۰۰ دور به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و مایع رویی دور ریخته شد. سلول‌های ته نشین شده با بافر PBS خنک شسته شده و مرحله قبلی دوباره تکرار شد. سپس سلول‌ها با ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر لیزکننده به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت یخ قرار داده شدند. در نهایت سلول‌ها همراه بافر سانتریفیوژ گشته (۱۲۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) و از مایع رویی<sup>۱</sup> به عنوان نمونه استفاده شد. مراحل انجام تست به ترتیب طبق جدول ۱ انجام شد. اختلاف جذب نوری نمونه و کنترل در زمان صفر تا ۳ دقیقه با فاصله ۱ دقیقه قرائت و میانگین اختلاف آن‌ها به عنوان  $\Delta OD$  در فرمول زیر مورد محاسبه فرار گرفت.

$$\text{SOD activity} = \Delta OD \text{ Test} \quad (\text{U/ml})$$

جدول ۱- معرف‌های مورد استفاده در لوله‌های نمونه و کنترل در سنجش سوپراکسید دیسموتاز

| معرف  | لوله نمونه (میکرولیتر) | لوله کنترل (میکرولیتر) |
|---|------------------------|------------------------|
| نمونه   | ۵۰۰                    | -                      |
| معرف یک (R1)  | ۲۰۰۰                   | ۲۰۰۰                   |
| آب دیونیزه (DW)   | -                      | ۵۰۰                    |
| معرف بعدی را باید در داخل اسپکتروفتومتر اضافه نموده و زمان‌ها را مد نظر داشته باشید |                        |                        |
| معرف دو (R2)  | ۵۰۰                    | ۵۰۰                    |
| خوانش در طول موج ۴۲۰ نانومتر  |                        |                        |

### نتایج

در این مطالعه توسط کیت Nasdox<sup>TM</sup> به بررسی میزان سوپر اکسید دیسموتاز در رده سلول‌های مورد بررسی پس از تیمار

<sup>2</sup> adjuvant chemotherapy

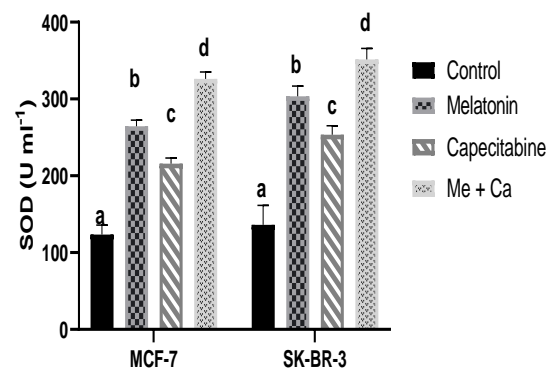
<sup>1</sup> Supernatant

ملاتونین بر آنژیوژنز در سرطان پستان انجام دادند. میزان زنده مانی سلولی با استفاده از روش MTT پس از درمان ملاتونین در سلول‌های سرطانی سه گانه منفی اندازه‌گیری شد. پس از آن، سلول‌ها در موش‌ها قرار داده شدند و روزانه با ملاتونین درمان قرار گرفتند، ملاتونین در شرایط آزمایشگاهی (۱ میلی مولار) باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌ها شد ( $p < 0.05$ ). موش‌های مبتلا به سرطان پستان تحت تیمار با ملاتونین نشان داد که اندازه تومور و تکثیر سلولی (Ki-67) در مقایسه با حیوانات شاهد بعد از ۲۱ روز درمان کاهش یافته است ( $p < 0.05$ ). در نتیجه، درمان ملاتونین در کاهش رشد تومور و تکثیر سلولی و همچنین در مهار آنژیوژنز اثربخشی معنی‌داری را نشان داد [۲۷].

در مطالعه Shen و همکاران در سال ۲۰۱۸، به بررسی اثر توأم استفاده از ملاتونین با داروی ضد سرطانی پرداخته‌اند. نتایج آن‌ها نشان داد که درمان ترکیبی راپامایسین و ملاتونین باعث کاهش زنده مانی سلولی، تکثیر و ظرفیت کلونوژنیک می‌شود. درمان ترکیبی با راپامایسین و ملاتونین با تغییرات در عملکرد میتوکندری با افزایش تولید ROS، افزایش آپوپتوز و میتوفاژی همراه است. به طور کلی، یافته‌های آن‌ها نشان می‌دهد که ملاتونین می‌تواند به عنوان یک ماده کمکی همراه با راپامایسین مورد استفاده قرار گیرد، در حالی که اثرات جانبی آن را به حداقل می‌رساند و اثربخشی را بهبود می‌بخشد [۲۸].

در مطالعه مشابه دیگری که توسط Wu و همکاران در سال ۲۰۲۲ انجام گرفته است به بررسی اثر هم‌زمان استفاده از ملاتونین و MA-۳ بر سلول‌های سرطان پستان پرداخته است. نتایج این مطالعه نشان داد تیمار با ملاتونین به طور قابل توجهی تکثیر سلول‌های سرطان پستان را به روشی وابسته به غلظت و زمان ( $P < 0.05$ )، کاهش داد، توانایی تشکیل کلونی و همچنین مهاجرت سلولی را سرکوب ( $P < 0.01$ ) و آپوپتوز سلول‌ها را القا کرده است ( $P < 0.01$ ). همچنین درمان ملاتونین به تنهایی به طور قابل توجهی بیان Bax و Beclin1 را افزایش داد و بیان Bcl2 و P62 را کاهش داد. در مقایسه با درمان ملاتونین به تنهایی، درمان ملاتونین همراه با MA-۳ به طور قابل توجهی بیان Beclin1، LC3-II/LC3-I، Bax و E-cadherin را کاهش داد. این محققین نتیجه گرفتند که ملاتونین می‌تواند باعث اتوفاجی

پس از استفاده از آنتراسایکلین‌ها<sup>۱</sup> و تاکسان‌ها<sup>۲</sup> تأیید شده است [۲۳]. کپسیتابین در ترکیب با داورهای دیگر مانند pyrotinib، neratinib و lapatinib برای درمان سرطان پستان متاستاتیک HER2 مثبت استفاده شده است [۲۴، ۲۵]. همچنین ترکیب کپسیتابین با bevacizumab در درمان سرطان HER2 منفی استفاده شده و مرگ و میر در این افراد را کاهش داده است [۱۹]. در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای توسط Masuda و همکاران پیرامون بررسی اثر درمانی کپسیتابین بر افراد دارای سرطان پستان HER2 منفی انجام گرفت. در این مطالعه ۹۱۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان HER2 منفی بررسی شد. این افراد شیمی درمانی با نئودجوانت را انجام داده بودند (آنتراسایکلین، تاکسان یا هردو). تجزیه و تحلیل نهایی نشان داد که زنده مانی همراه با عدم بیماری در گروه درمان شده با کپسیتابین بیشتر از گروه کنترل بود (۷۴/۱٪ در مقابل ۶۷/۶٪). بقای کلی در گروه کپسیتابین طولانی تر از گروه کنترل بود (۸۹/۲٪ در مقابل ۸۳/۶٪) [۳۳].



نمودار ۱- میزان فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در سوپرناتانت سلول‌های MCF-7 و SK-BR-3 پس از تیمار توسط کپسیتابین، ملاتونین و ترکیب آن‌ها. سلول‌ها در معرض غلظت  $IC_{50}$  ترکیبات قرار گرفتند، حرف‌های متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $P$ -Value  $< 0.05$  می‌باشد، Me: ملاتونین، Ca: کپسیتابین

\*  $p$ -value  $< 0.05$  & ( $n=3$ ) (Bar: Mean  $\pm$  SD)

مطالعات مختلفی به بررسی اثرات ضد سرطانی ملاتونین پرداخته‌اند، به عنوان مثال Jardim-Perassi و همکاران در سال ۲۰۱۴، یک مطالعه آزمایشگاهی برای ارزیابی اثرات درمان

<sup>1</sup> anthracyclines  
<sup>2</sup> taxanes

فعالیت SOD به طور کلی در سلول‌های سرطانی در مقایسه با هم‌تایان طبیعی آنها کمتر است، که قبلاً توسط Oberley و Buettner بررسی شده بود. نشان داده شد که بیان بیش از حد SOD در سلول‌های سرطانی، سلول‌ها را به الگوی رشدی مشابه با سلول‌های طبیعی باز می‌گرداند [۳۲]. در مطالعه حاضر نیز درمان با ملاتونین و کپسیتابین به ویژه درمان توأم این دو ترکیب منجر به افزایش معنی‌دار SOD در سلول‌های سرطانی شده است. خاصیت سینرژستی این دو ترکیب کاملاً در نتایج SOD مشهود است.

طبق این مطالعه و مطالعات قبلی استفاده توأم این دو ترکیب منجر به کاهش دوز مصرفی کپسیتابین می‌گردد که در نتیجه منجر به کاهش اثرات جانبی این دارو می‌گردد.

### منابع

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J.Clin.* 2018;68: 394-424.
- [2] Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *Jama.* 2019; 321:288-300.
- [3] Corben A, Pathology of invasive breast disease. *Surg. Clin.* 2013; 93: 363-392.
- [4] Joshi H, Press MF. Molecular oncology of breast cancer. *The Breast: Elsevier.* 2018; 282-307.
- [5] Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M, Hammond ME, Hayes DF, McShane LM, Saphner TJ, Spears PA, Allison KH. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update. *J Clin. Oncol.* 2023; 41: 3867-3872.
- [6] Bourin M. Physiology and Pharmacology of Melatonin. *Psychiatry and Neuroscience Update: From Epistemology. Clin. Psychiatry.* 2021; 4: 261-277.
- [7] St Hilaire MA, Ámundadóttir ML, Rahman SA, Rajaratnam SM, Rüger M, Brainard GC, Czeisler CA, Andersen M, Gooley JJ, Lockley SW. The spectral sensitivity of human circadian phase resetting and melatonin suppression to light changes dynamically with light duration. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 2022; 119: 22053-1119.
- [8] Oishi A, Gbahou F, Jockers R. Melatonin receptors, brain functions, and therapies. *Hand Clin Neurol.* 2021; 179: 345-356.

سلول‌های سرطان پستان MDA-MB-231 برای مهار تکثیر سلولی و متاستاز و ترویج آپوپتوز سلولی شده و سرکوب اتوفاژی می‌تواند اثر مهاری ملاتونین را بر رشد و متاستاز سلول‌های سرطان پستان تضعیف کند [۲۹].

Godoy و همکاران در سال ۲۰۲۳ به اثر ترکیبی ملاتونین و Alpelisib بر سلول‌های سرطان پستان پرداخته‌اند. در مطالعه آن هاسنچش MTT نشان داد که MDA-MB-453 و T-47D کاهش زنده‌مانی سلولی را در همه گروه‌ها نشان دادند، به‌ویژه در MDA-MB-453 تیمار شده با ملاتونین و Alpelisib به صورت توأم. p-AKT, PI3K, mTOR و HIF-1 $\alpha$  پس از درمان با Melatonin + Alpelisib در خطوط سلولی MDA-MB-453 و T-47D مهار شدند. بیان کاسپاز-۳ در تمام گروه‌ها در سلول‌های MDA-MB-453 و T-47D افزایش یافت، که این افزایش در گروه ملاتونین + Alpelisib بارزتر بود [۳۰].

در مطالعه دیگری عمل ترکیبی ملاتونین با سیتارابین<sup>۱</sup> یا ABT-737 به کاهش فعالیت تکثیر سلول‌های لوسمیک، کاهش پتانسیل غشایی میتوکندری و افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و Ca<sub>2</sub> سیتوزولی کمک کرد. آن‌ها بیان داشتند که این یافته‌ها از پیشنهاد اولیه مبنی بر اینکه ملاتونین می‌تواند مزایایی برای درمان سرطان ارائه دهد و به عنوان مکملی برای داروهای مورد استفاده در درمان سرطان در نظر گرفته شود، حمایت می‌کند [۳۱].

در مطالعه Shayan و همکاران نتایج حاصل از MTT نشان داد که بین مهار سلولی کپسیتابین و ترکیب ملاتونین - کپسیتابین اختلاف چشمگیری وجود دارد و همچنین استفاده توأم این دو ترکیب منجر به افزایش بیشتر خاصیت سیتوتوکسیتی آن‌ها می‌شود مقادیر CI نشان دهنده‌ی افزایش اثرات مهاری هنگام استفاده هم‌زمان (سینرژسم) می‌باشد. کاسپاز-۳ که اولین کاسپاز مؤثر سلول است و نقش مهمی در عملکرد مرگ سلولی آپوپتوز ایفا می‌کند، توسط ملاتونین - کپسیتابین بیان بیشتری داشت. در کل، نتایج نشان داد که مرگ سلولی ناشی از ملاتونین - کپسیتابین می‌تواند تحت کنترل آپوپتوز وابسته به کاسپاز و Bax/Bcl-2 باشد. [۱۹]

<sup>1</sup> cytarabine

- [9] Franco PI, do Carmo Neto JR, Milhomem AC, Machado JR, Miguel MP. Antitumor effect of melatonin on breast cancer in experimental models: A systematic review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2023; 1878: 188-838.
- [10] Carnevale Galeti AO, Oliveira JG, Pinheiro MG, dos Santos MB, Colombo J, de Almeida Chuffa LG, de Campos Zuccari DA. Verification of agomelatine in comparison with melatonin as a therapeutic agent to treat breast cancer. *Melatonin res*. 2021; 4: 141-510
- [11] Bonm00ati-Carrion MA, Tomas-Loba A. Melatonin and cancer: A polyhedral network where the source matters. *Antioxid Act*. 2021; 10: 210.
- [12] Talib WH, Alsayed AR, Abuawad A, Daoud S, Mahmood AI. Melatonin in cancer treatment: current knowledge and future opportunities. *Molecules*. 2021; 26: 2506.
- [13] Thomas D, Zalberg J. 5-fluorouracil: a pharmacological paradigm in the use of cytotoxics. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 1998; 25: 887-895.
- [14] [14] Lee JJ, Beumer JH, Chu E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2016;78:447-64.
- [15] Schwartzberg L, Vogel W, Campen C. Methotrexate and fluorouracil toxicities: a collaborative practice approach to prevention and treatment. *The ASCO Post*. 2014; 5: 345-368.
- [16] Griess B, Tom E, Domann F, Teoh-Fitzgerald M. Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer. *Free Radic . Biol. Med*. 2017; 112: 464-79.
- [17] [17] Keith CT, Borisy AA, Stockwell BR. Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2005;471-480.
- [18] Alzahrani SM, Al Doghaither HA, Al-Ghafari AB, Pushparaj PN. 5-Fluorouracil and capecitabine therapies for the treatment of colorectal cancer. *Oncol. Rep*. 2023; 50: 1-6.
- [19] Shayan S, Takbiri Osgoei L, Javani Jouni F. Effect of capecitabine and melatonin on HER2+ (SK-BR-3) and HER2- (MCF7) human breast cancer cell lines. *Trop. J. Pharm. Res*. 2023; 22: 1387-1393.
- [20] Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. *World J. Clin. Oncol*. 2016; 7: 54.
- [21] Ashiq MGB. Breast cancer treatment by nanophotolysis Approach. *Results Phys*. 2018; 9: 982-986.
- [22] Zhang Y, Yuan Z, Shen R, Jiang Y, Xu W, Gu M, et al. Identification of biomarkers predicting the chemotherapeutic outcomes of capecitabine and oxaliplatin in patients with gastric cancer. *Oncol Lett*. 2020; 20: 1-10.
- [23] Lluch A, Barrios CH, Torrecillas L, Ruiz-Borrego M, Bines J, Segalla J, et al. Phase III Trial of Adjuvant Capecitabine After Standard Neo-/Adjuvant Chemotherapy in Patients With Early Triple-Negative Breast Cancer (GEICAM/2003-11\_CIBOMA/2004-01). *J Clin Oncol*. 2020; 38: 203-213.
- [24] Saura C, Oliveira M, Feng Y-H, Dai M-S, Chen S-W, Hurvitz SA, et al. Neratinib Plus Capecitabine Versus Lapatinib Plus Capecitabine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Previously Treated With  $\geq 2$  HER2-Directed Regimens: Phase III NALA Trial. *J Clin Oncol*. 2020; 38: 3138-49.
- [25] Xu B, Yan M, Ma F, Hu X-C, Feng JF, Ouyang Q, et al. Pyrotinib or lapatinib plus capecitabine for HER2+ metastatic breast cancer (PHOEBE): A randomized phase III trial. *Am. J. Clin*. 2020; 24: 34-54.
- [26] Lang I, Brodowicz T, Ryvo L, Kahan Z, Greil R, Beslija S, et al. Bevacizumab plus paclitaxel versus bevacizumab plus capecitabine as first-line treatment for HER2-negative metastatic breast cancer: interim efficacy results of the randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 TURANDOT trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14: 125-133.
- [27] Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NR, Iskander A, et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PloS one*. 2014; 9: 34-45.
- [28] Shen Y-Q, Guerra-Librero A, Fernandez-Gil BI, Florido J, García-López S, Martínez-Ruiz L, et al. Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: Suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation. *J. Pineal Res*. 2018;64:e12461.
- [29] Wu D, Zhang Y, Tang H, Yang J, Li M, Liu H, et al. [Melatonin inhibits growth and metastasis of MDA-MB-231 breast cancer cells by activating autophagy]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2022; 42: 278-285.
- [30] Godoy BLV, Moschetta-Pinheiro MG, Chuffa LGdA, Pondé NF, Reiter RJ, Colombo J, Zuccari DAPdC. Synergistic actions of Alpelisib and Melatonin in breast cancer cell lines with PIK3CA gene mutation. *Life Sci*. 2023; 324: 121-208.
- [31] Lomovsky AI, Baburina YL, Fadeev RS, Lomovskaya YV, Kobyakova MI, Krestinin RR, et al. Melatonin Can Enhance the Effect

- of Drugs Used in the Treatment of Leukemia. Biochem. (Mosc.). 2023; 88: 73-85.
- [32] Dhar SK, Clair DKS. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. Free Radic. Biol. Med. 2012; 52: 2209-2222.
- [33] Masuda N, Lee S-J, Ohtani S, Im Y-H, Lee E-S, Yokota I, et al. Adjuvant capecitabine for breast cancer after preoperative chemotherapy. New Eng. J.ed. 2017; 376: 2147-2159.



## The combined cytotoxic effect of capecitabine and melatonin on HER2-positive (SK-BR3) and HER2 negative (MCF-7) cell lines of human breast cancer and measurement of superoxide dismutase enzyme activity

Shayan S.<sup>1</sup>, Takbiri Osgoei L.<sup>2\*</sup>, Javani Jouni F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2\*</sup> Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Biochemistry and biophysics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

\* (Corresponding author): layatakбири536@gmail.com

Received: December 2023

Accepted: January 2024

### Abstract

Breast cancer is one of the most common cancers diagnosed in women. Melatonin is a natural indole amine synthesized in the pineal gland. A large number of studies show that melatonin can be an attractive candidate for combination therapy due to its antioxidant and cytotoxic activities. It was hypothesized that melatonin in combination with capecitabine may show a synergistic effect on MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cell lines.

To investigate the effect of the above medicines on the level of superoxide dismutase enzyme activity, It was performed alone and in combination, on cell lines. The results showed that in both cell lines, the combined use of two medicines led to a greater increase in the activity of the superoxide dismutase enzyme. The synergistic property of these two compounds is clearly evident in the results of the superoxide dismutase enzyme. The combined use of these two compounds leads to a reduction in the dose of capecitabine. Which will result in reducing the side effects of this medicine.

**Keywords:** Melatonin, capecitabine, breast cancer, MCF7, SK-BR-3, superoxide dismutase.