BIRJAND UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES
Journal of Translational Medical Research
https://journal.bums.ac.ir

Original Article

The effects of High and Low-PAD Score (Based on Phenolic level, Antioxidant level and Diastase activity) honey on Lactate Dehydrogenase (LDH) activity level and glucose consumption in 5-Fluorouracil Treated HT-29 Cells: An in vitro study

Arshiya Mesbah Mousavi[1], Mohsen Khorashadizadeh[2, 3], Asghar Zarban[4], Elham Chamani[5]*

[1] Student Research Committee, Birjand University of Medical Science, Birjand, Iran
[2] Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[3] Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[4] Department of Clinical Biochemistry, Cardiovascular Diseases Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[5] Geriatric Health Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

***Corresponding author:** Elham Chamani
Tel: +98-5632381508 Fax: +98-5632430076 E-mail: chamani.elham@bums.ac.ir

ABSTRACT

Background and Aims: Resistance to 5-fluorouracil (5-FU) is a significant challenge in the treatment of colorectal cancer. Metabolic factors in the tumor microenvironment, such as elevated glucose concentration, contribute to this resistance. This study aimed to evaluate the effects of honey with different PAD scores (Phenolic level, Antioxidant level, Diastase activity) on HT-29 cell response to 5-FU and their association with lactate dehydrogenase (LDH) activity and glucose consumption.

Materials and Methods: In this *in vitro* study, HT-29 cells were cultured under two conditions: normal glucose (Normal Glc) and high glucose (High Glc). Experimental groups included: 5-FU alone; 5-FU combined with High-PAD score and Low-PAD score honey; honey alone (High-PAD score and Low-PAD score); untreated controls; and 5-FU under High Glc. The MTT assay assessed cell viability, while glucose consumption and LDH activity were measured using commercial kits. All experiments were performed in triplicate. Statistical analyses were conducted using SPSS software (version 19) using one-way ANOVA and t-tests ($P \leq 0.05$).

Results: The IC50 of 5-FU increased 2.2-fold in High Glc (110 µM), compared to Normal Glc (50 µM). In Normal Glc, combining 5-FU with High-PAD score and Low-PAD score honey reduced the IC50 to 25 µM. The highest normalized LDH activity (0.8226±0.0096) and the most significant decrease in extracellular glucose (10±1.41 mg/dL) were observed in the 5-FU+High-PAD score honey group. The High Glc control exhibited elevated LDH (~0.83) but much higher residual glucose (298.5 mg/dL).

Conclusion: Co-administration of 5-FU with honey, particularly high-PAD score honey, can mitigate drug resistance, likely by increasing glucose consumption and LDH activity.

Keywords: 5-Fluorouracil (5-FU), Colorectal cancer, High-PAD score, HT-29 cells, Low-PAD score

Citation: Mesbah Mousavi A, Khorashadizadeh M, Zarban A, Chamani E. [Evaluation of the Effects of High and Low-PAD Score Honey on LDH Activity Level and Glucose Consumption in 5-FU Treated HT-29 Cells: An in vitro study]. Journal of Translational Medical Research. 2025; 32(3): 200-212. [Persian]

DOI http://doi.org/10.61186/JBUMS.32.3.196

OPEN ACCESS Crossref

Received: September 12, 2025 **Accepted:** October 30, 2025

Copyright © 2025, Journal of Translational Medical Research. This open-access article is available under the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 (CC BY-NC 4.0) International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which allows for the copying and redistribution of the material only for noncommercial purposes, provided that the original work is properly cited.

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]

مقاله اصیل پژوهشی

بررسی اثر عسل با PAD score (بر اساس سطح فنولی، سطح آنتی‌اکسیدانی و فعالیت دیاستازی) بالا و پایین بر سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و میزان مصرف گلوکز در سلول‌های HT-29 تحت تیمار با ۵–فلوئورویوراسیل: مطالعه‌ای آزمایشگاهی (In vitro)

ارشیا مصباح موسوی[۱]، محسن خراشادی‌زاده[۲،۳]، اصغر زربان[۴]، الهام چمنی[۵*]

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت به ۵–فلوئورویوراسیل (5-FU) یکی از چالش‌های اصلی در درمان سرطان کولورکتال است. عوامل متابولیکی در ریزمحیط تومور، از جمله غلظت بالای گلوکز، در ایجاد این مقاومت نقش دارند. این مطالعه با هدف بررسی اثر عسل با PAD score (Phenolic level, Antioxidant level, Diastase activity) متفاوت بر پاسخ سلول‌های HT-29 به 5-FU و ارتباط آن با فعالیت لاکتات دهیدروژناز (LDH) و مصرف گلوکز انجام شد.

روش تحقیق: در این مطالعه آزمایشگاهی (in-vitro)، سلول‌های HT-29 در دو شرایط کشت با غلظت گلوکز نرمال (Normal Glc) و گلوکز بالا (High Glc) تیمار شدند. گروه‌های آزمایشی شامل: 5-FU تنها؛ ترکیب 5-FU با عسل High-PAD score و Low-PAD score؛ عسل تنها (High-PAD score وLow-PAD score)؛ کنترل‌های بدون تیمار و 5-FU در شرایط High Glc بودند. بقای سلولی با آزمون MTT سنجیده شد و مصرف گلوکز و فعالیت LDH با کیت‌های تجاری اندازه‌گیری گردید. همه آزمایش‌ها در سه تکرار بیولوژیک انجام شد. تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون t انجام شد (P<۰/۰۵).

یافته‌ها: مقدار IC50 برای 5-FU در شرایط High Glc (۱۱۰ میکرومولار) نسبت به Normal Glc (۵۰ میکرومولار)، ۲/۲ برابر افزایش یافت. در محیط Normal Glc، ترکیب 5-FU با عسل High-PAD score و Low-PAD score مقدار IC50 را به ۲۵ میکرومولار کاهش داد. بالاترین فعالیت LDH نرمال‌شده (۰/۰۰۹۶±۰/۸۲۲۶) و بیشترین کاهش گلوکز خارج سلولی (۱۰±۱/۴۱mg/dL) در گروه 5-FU+ عسل High-PAD score مشاهده شد.

گروه کنترل High Glc دارای مقدار بالای LDH (0.83~) اما گلوکز باقی‌مانده محیطی بسیار بالاتر (۲۹۸/۵ mg/dL) بود.

نتیجه‌گیری: همراهی 5-FU با عسل —به ویژه عسل با PAD score بالا— می‌تواند مقاومت دارویی را کاهش دهد که احتمالاً از طریق افزایش مصرف گلوکز و افزایش فعالیت LDH صورت می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: ۵-فلوئورویوراسیل (5-FU)، سرطان کولورکتال، عسل با PAD score بالا، سلول‌هایHT-29، عسل با PAD score پایین

مجله "تحقیقات پزشکی ترجمانی". ۱۴۰۴؛ ۳۲ (۳): ۲۱۲-۲۰۰

دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۲۱ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۰۸

[۱] کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[۲] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[۳] گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[۴] گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

[۵] مرکز تحقیقات سلامت سالمندان، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

***نویسنده مسئول: الهام چمنی**

آدرس: مرکز تحقیقات سلامت سالمندان، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

تلفن: ۵۶۳۲۳۸۱۵۰۸–۰۹۸+ نمابر:۵۶۳۲۴۳۰۰۷۶–۰۹۸+ پست الکترونیکی: chamani.elham@bums.ac.ir

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]

مقدمه

سرطان کولورکتال[1] (CRC) یکی از بارزترین چالش‌های سلامت عمومی در سطح جهان است و براساس آمارهای جهانی یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر مرتبط با سرطان به شمار می‌رود (۱). با وجود پیشرفت‌های تشخیصی و درمانی، میزان عود و مرگ‌ومیر در گروهی از بیماران همچنان بالا بوده و نقطه‌ضعف مهمی که موفقیت درمانی را محدود می‌سازد، پدیدهٔ مقاومت دارویی است (۲). ۵-فلورواوراسیل (5-FU) به‌عنوان پایه اصلی شیمی‌درمانی در CRC شناخته می‌شود و در ترکیب‌های استاندارد (مثل FOLFOX) به کار می‌رود؛ با این حال، طیف وسیعی از مکانیسم‌های سلولی و مولکولی می‌تواند پاسخ به این دارو را کاهش دهد یا منجر به مقاومت اکتسابی گردد. مکانیسم اثر 5-FU عمدتاً از طریق مهار تیمیدیلات سنتاز و اختلال در سنتز DNA و RNA است که نهایتاً منجر به مهار تکثیر و القای مرگ سلولی می‌شود (۳). با این وجود، سلول‌های توموری می‌توانند با تغییر مسیرهای بازسازی DNA، تنظیم بیان آنزیم‌های هدف، تعدیل مسیرهای آپوپتوز، و نیز با تغییرات متابولیکی نسبت به این آسیب‌ها مقاومت ایجاد کنند (۴). در این میان، شواهد رو به افزایشی نشان می‌دهد که تغییرات متابولیکی ریزمحیط تومور نقش کلیدی در تنظیم حساسیت به دارو دارند؛ به‌ویژه هیپرگلیسمی یا افزایش دسترسی گلوکز در ریزمحیط توموری می‌تواند مسیرهای سیگنالینگ بقا را فعال و پاسخ‌دهی به شیمی‌درمانی را تضعیف کند (۵).

یکی از شاخص‌ترین ویژگی‌های متابولیکی سلول‌های سرطانی «اثر واربورگ[2]» است؛ پدیده‌ای که در آن سلول‌ها حتی در حضور اکسیژن به استفاده غالب از مسیر گلیکولیز تمایل دارند. در این سازگاری متابولیک، آنزیم لاکتات دهیدروژناز ایزوفرم A[3] (LDH-A) نقشی کلیدی ایفا می‌کند؛ به‌گونه‌ای که با تبدیل پیرووات به لاکتات، شرایط لازم برای تداوم رشد و بقای سلول‌های توموری را فراهم می‌سازد (۶). شواهد بالینی و تجربی نشان داده‌اند که افزایش بیان یا فعالیت LDH-A با پیش‌آگهی نامطلوب و بروز مقاومت دارویی در طیف وسیعی از سرطان‌ها از جمله (CRC) مرتبط است (۷). افزون بر این، داده‌های اخیر حاکی از آن است که مسیرهای اپی‌ژنتیکی و تنظیمات رونویسی ـ مانند محور METTL3/m6A ـ می‌توانند موجب افزایش بیان LDH-A شده و بدین‌ترتیب مقاومت دارویی را تقویت کنند. این گروه از سازگاری‌های متابولیک، امروزه به‌عنوان اهداف درمانی بالقوه و نویدبخش در سرطان مطرح شده‌اند (۸).

افزون بر نقش‌های یادشده، غلظت گلوکز در ریزمحیط سلولی می‌تواند مسیرهای متعددی را تحت‌تأثیر قرار دهد. به‌عنوان نمونه، هیپرگلیسمی از طریق فعالسازی فرایند اپی‌تلیالی–مزانشیم (EMT)، کاهش بیان E-cadherin و افزایش شاخص‌هایی نظیر vimentin و HMGA2، موجب افزایش توانایی مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی شده و در مقابل، حساسیت آن‌ها را نسبت به آپوپتوز و داروهای سیتوتوکسیک کاهش می‌دهد (۹). علاوه بر این، فعال‌سازی محورهایی همچون Myc/SMAD3 و تقویت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در پاسخ به غلظت بالای گلوکز، از مکانیسم‌های شناخته‌شده در ایجاد مقاومت دارویی به‌شمار می‌رود (۱۰). از سوی دیگر، ترکیبات طبیعی غنی از فنول‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها ـ نظیر برخی انواع عسل ـ در مطالعات پیش‌بالینی به‌عنوان گزینه‌های مکمل مطرح شده‌اند. شواهد حاصل از مطالعات in vitro نشان داده‌اند که عسل می‌تواند از طریق کاهش تکثیر سلولی، القای آپوپتوز و مهار مسیرهای بقا و تهاجم همچون Wnt/β-catenin در مهار رشد تومور نقش داشته باشد. همچنین، در برخی بررسی‌ها اثر هم‌افزایی عسل با ۵-FU گزارش شده است که به افزایش مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و افزایش حساسیت به دارو منجر می‌شود (۱۱). با این حال، باید توجه داشت که عسل یک ماتریس پیچیده است که علاوه بر ترکیبات فنولی، حاوی مقادیر قابل‌توجهی قند نیز هست؛ ازاین‌رو در تفسیر نتایج پژوهش‌ها ضروری است تغییرات ناشی از غلظت گلوکز محیطی و اثرات متابولیکی آن به‌طور همزمان مد نظر قرار گیرند تا بتوان اثرات مفید بالقوه را از پیامدهای مرتبط با بار قندی عسل به‌درستی تفکیک نمود (۹).

[1] Colorectal cancer
[2] Warburg effect
[3] Lactate dehydrogenase A

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]

پارامتر ترکیبی PAD[1] به‌عنوان شاخصی برای درجه‌بندی و پیش‌بینی اثرات زیستی عسل به‌کار می‌رود. یافته‌های زربان و همکاران نشان می‌دهد نمونه‌های High-PAD score (مثلاً عسل عناب) نسبت به Low-PAD score (مثلاً عسل‌های تجاری) فنول، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت دیاستازی (یکی از شاخص‌های مهم در ارزیابی کیفیت عسل طبیعی) بیشتری دارند (تقریباً 606 µg GAE/mg در برابر 112؛ 203 µM/L≈در برابر 4.6≈؛ و 524 U/L≈در برابر 210≈) و در رده MCF-7 مهار رشد قوی‌تر (IC_{50} ≈ 170 µg/mL در برابر 385 µg/mL≈)، کاهش مهاجرت و تعدیل بیان ژن‌های Bax/p53/p21/Bcl-2 نشان می‌دهند (۱۲). همچنین، در مدل حیوانی، مصرف «عسل‌های قوی» غنی از فنول و آنتی‌اکسیدان شاخص زخم معده را حدود ۵۰درصد نسبت به عسل‌های «ضعیف» کاهش دادند و شاخص‌های اکسیداتیو/التهابی را بهبود بخشیدند (۱۳). این داده‌ها از کارآمدی PAD برای طبقه‌بندی اثرات زیستی و ضدتوموری عسل حمایت می‌کند.

بر پایه شواهد مقدماتیِ حاکی از تشدید مقاومت دارویی در غلظت‌های بالای گلوکز و گزارش‌های هم‌افزایی عسل با 5-FU، این پژوهش با هدف ارزیابی مقایسه‌ای اثر عسل‌های PAD-score بالا در برابر PAD-score پایین بر فعالیت LDH و میزان مصرف گلوکز در سلول‌های HT-29 تحت تیمار 5-FU طراحی شد؛ همچنین شرایط کشت با گلوکزِ بالا (High Glc) به‌منزله وضعیت مقایسه‌ای در نظر گرفته شد. فرضیه ی ما این است که عسل‌های PAD-score بالا از طریق تعدیل متابولیسم گلوکز و افزایش استرس متابولیک (حالتی که در آن تعادل متابولیکی سلول به‌هم می‌خورد و تولید و مصرف انرژی، مواد مغذی، یا متابولیت‌ها دیگر در حالت ناپایدار قرار می گیرد)، حساسیت به 5-FU را بیش از عسل‌های PAD-score پایین افزایش می‌دهند؛ به شرط اینکه تفسیر نتایج پس از نرمال‌سازی اثر قندِ افزوده عسل انجام شود.

روش تحقیق

مواد و تجهیزات

HT-29 (انستیتو پاستور ایران، تهران)؛ DMEM (Biosera, France)؛ FBS ده درصد (Biosera, France)؛ پنی‌سیلین/استرپتومایسین یک درصد (Biosera, France)؛ PBS (Biosera, France)؛ تریپسین (Biosera, France)؛ EDTA–5-Fluorouracil; 5-FU (Sigma-Aldrich, USA)؛ نمونه‌های عسل با PAD-score High و Low (عسل آپیزان، شرکت کاووش آریان آزما)؛ کیت سنجش گلوکز-GOD POD (Pars Azmun, Iran)؛ کیت سنجش فعالیت LDH (Pars Azmun, Iran)؛ معرف MTT (Sigma-Aldrich, USA)؛ DMSO (Merck, Germany).

آماده‌سازی و کنترل کیفیت رده سلولی

کریوویال‌های حاوی رده سلولی HT-29 در شرایط استریل و با افزودن تدریجی محیط کشت کامل (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) یخ زدایی شدند. سپس، سلول‌ها به فلاسک‌های کشت منتقل و در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، $CO_2$۵%، رطوبت ۹۵%) کشت داده شدند. سلول‌ها حداقل سه بار پاساژ داده شدند و تنها در صورتی برای آزمایش استفاده شدند که درصد بقای آنها ≤۸۰% بود. آزمایش‌های کنترل آلودگی (میکروبی، قارچی و مایکوپلاسما) پیش از شروع آزمایش‌ها انجام شد. تمام مراحل در شرایط استریل و زیر هود لامینار با استفاده از تجهیزات استریل انجام گرفت.

آماده‌سازی نمونه‌های عسل

در ابتدا استوکی از نمونه‌های عسل با غلظت ۱۰٪ در محیط کشت DMEM حل شد. برای حذف آلودگی میکروبی، محلول‌های عسل ابتدا در محیط کشت گرم‌شده (۳۷ درجه سانتی‌گراد) مخلوط و سپس با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل شد. در مرحله بعد از استوک اولیه، غلظت‌های ۱۰٪، ۵٪، ۲/۵٪، ۱/۲۵٪ و ۰/۶۲۵٪ تهیه شد و جهت بررسی اثر بر سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه‌ها به دو دسته عسل طبیعی High-PAD score و

[1] Phenolic level, Antioxidant level, Diastase activity

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]

عسل تجاری Low-PAD score طبقه‌بندی شدند. معیار فعالیت آنتی‌اکسیدانی (PAD) نمونه‌ها، مقادیر اعلامی توسط تأمین کننده بود.

طراحی آزمایش و تیمارها

آزمایش شامل هشت گروه به شرح زیر (جدول ۱) بود:

جدول ۱ – شرح گروه‌های سلولی مورد آزمایش بر اساس 5-FU، عسل PAD score پایین/بالا و سطح گلوکز

شماره گروه	نوع گروه
۱	محیط Normal Glc + 5-FU
۲	محیط Normal Glc + 5-FU + عسل Low-PAD score
۳	محیط Normal Glc + 5-FU + عسل High-PAD score
۴	محیط Normal Glc + عسل High-PAD score
۵	محیط Normal Glc + عسل Low-PAD score
۶	محیط Normal Glc بدون تیمار (کنترل)
۷	محیط High Glc بدون تیمار (کنترل)
۸	محیط High Glc + 5-FU

انتخاب غلظت‌های عسل

برای بررسی اثر ترکیبی، از غلظت زیرسیتوتوکسیک 0.625% عسل در ترکیب با 5-FU استفاده شد. برای ارزیابی اثر مستقل عسل، غلظت 2.5% (IC50 عسل) انتخاب شد که بر اساس آزمون‌های پیش‌آزمایشی و منحنی دز–پاسخ تعیین شده بود.

میزان غلظت گلوکز در محیط کشت Normal Glc برابر 100 mg/dL و در محیط کشت High Glc برابر با 450 mg/dL می‌باشد.

آزمون MTT برای سنجش بقای سلولی و استخراج IC50

آزمایش MTT در پلیت‌های ۹۶ خانه با تعداد ۱۰،۰۰۰ سلول در هر خانه انجام شد. پس از ۲۴ ساعت تثبیت سلول‌ها، تیمارها (5-FU، عسل یا ترکیب آن‌ها) انجام شدند. مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت بود.

پس از افزودن محلول MTT (غلظت نهایی ۰/۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و انکوباسیون به مدت ۳ تا ۴ ساعت، فرمازان تشکیل‌شده با افزودن DMSO حل شد و جذب نوری در طول موج ۵۷۰–۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد بقای سلولی با فرمول زیر محاسبه شد:

بقای سلولی = (جذب نمونه / جذب کنترل)×100

منحنی دز–پاسخ با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism رسم و مقدار IC50 استخراج شد. هر آزمایش در سه تکرار انجام شد.

سنجش مصرف گلوکز محیط

در هر خانه از پلیت‌های ۶ خانه، تعداد 500,000 سلول کشت شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، تیمارها اعمال گردید و ۷۲ ساعت بعد، محیطِ رویی جمع‌آوری شد. غلظت گلوکزِ محیط در زمان شروع و پایان تیمار با استفاده از کیت سنجش گلوکز (بر پایه روش آنزیمی گلوکز اکسیداز–پراکسیداز) و اتوآنالایزر اندازه‌گیری شد. به‌منظور حذف سیگنال زمینه ناشی از عسل، براساس روشی که در پایان نامه خود با کد ۴۵۶۹۱۵، ستآپ و اعتبارسنجی کردیم، برای هر شرایط، بلانکِ «محیط + عسل بدون سلول» که دقیقاً همان تیمارها را دریافت کرده بود، به‌صورت موازی سنجش شد (۱۶–۱۴). مقادیر گلوکز مصرف‌شده با فرمول زیر نرمال‌سازی شدند:

$$Glu_{\text{مصرفی نرمال شده}} = (Glu_{\text{ابتدایی}} - Glu_{\text{پس از }72h}) - Glu_{\text{محیط+عسل (بدون سلول)}}$$

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]

داده‌های گزارش‌شده بر اساس این نرمال‌سازی محاسبه شدند.

سنجش فعالیت LDH

به‌منظور اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم (LDH)، به هر چاهک یک میلی‌لیتر تریپسین افزوده شد و پس از جدا شدن سلول‌ها، با محیط کامل (حاوی سرم) اثر تریپسین خنثی گردید. سلول‌ها به مدت 5 دقیقه در ۱۲۰۰ RPM سانتریفیوژ شدند، سپس مایع رویی حذف و رسوب سلولی با ۴ میلی‌لیتر PBS شست‌وشو داده شد. این مرحله یک بار دیگر تکرار گردید و در نهایت سلول‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر PBS سوسپانسیون شده و به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. نمونه‌ها در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از جداسازی مایع رویی، سلول‌ها دو بار (هر بار ۱۰ ثانیه با فاصله چند ثانیه‌ای) سونیکیت گردیدند. لیزات سلولی با کیت تجاری و روش اسپکتروفوتومتریک (طول موج مطابق دستورالعمل کیت) اندازه‌گیری شد.

داده‌ها با شاخص نرمال‌شده زیر گزارش شدند:

LDH index (نرمال شده) = LDH داخل سلول / LDH داخل + خارج سلول

این شاخص امکان مقایسه دقیق‌تر بین گروه‌ها را فراهم کرد.

تحلیل آماری

داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار (Mean±SD) گزارش شدند. مقایسه‌های چندگروهی با آزمون ANOVA یک‌طرفه انجام شد. مقایسه‌های دوگروهی با آزمون t مستقل تحلیل شدند. نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۹ استفاده شد و آستانه معناداری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 تیمار شده با 5-FU در محیط Normal Glc و High Glc

شکل یک روند کاهشی میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 را با افزایش غلظت 5-FU نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشخص است، میزان IC50 برای 5-FU در محیط High Glc برابر ۱۱۰ میکرومولار می‌باشد که نسبت به محیط Normal Glc (IC50 5-FU = 50 µM) افزایش چشم‌گیری داشته است. میزان زنده‌مانی بین گروه ۱ و ۸ با یکدیگر و همچنین در مقایسه با گروه کنترل دارای تفاوت معناداری (P<۰/۰۰۱) می‌باشد.

میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 تیمار شده با عسل High-PAD score و Low-PAD score در محیط Normal GlC

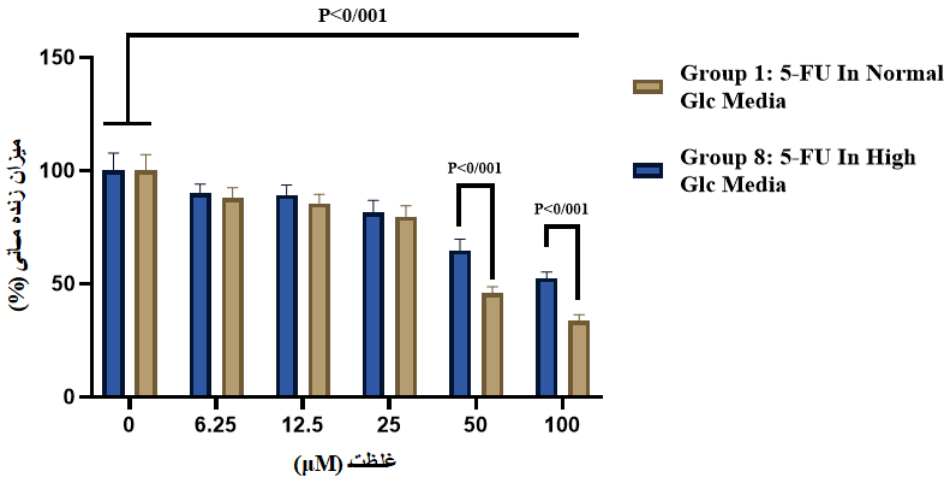
همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، تیمار سلول‌های HT-29 با هر دو عسل High-PAD score و Low-PADscore در دامنه غلظتی ۱۰-۰/۶۲۵ درصد نسبت به گروه کنترل باعث ایجاد تفاوت معنی‌داری در میزان زنده‌مانی سلول‌ها شده است. این در حالی است که در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ درصد بین سلول‌های تیمار شده با عسل High-PAD score و Low-PAD score تفاوت معنی‌داری مشاهده شد؛ به گونه‌ای که عسل High-PADscore در هر دو غلظت منجر به کاهش بیشتری در میزان زنده‌مانی سلول‌ها شده است.

بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 تیمار شده با درمان ترکیبی 5-FU و عسل High-PAD score و عسل Low-PAD sore

میزان IC50 برای 5-FU در محیط Normal Glc برابر ۵۰ میکرومولار می‌باشد (شکل ۳). این در حالی است که تیمار همزمان سلول‌ها با 5-FU و ۰/۶۲۵ درصد عسل High-PAD score و Low-PAD score سبب کاهش معنی‌دار میزان IC50 تا ۲۵ میکرومولار شد که نسبت به تیمار سلول‌ها با 5-FU به تنهایی

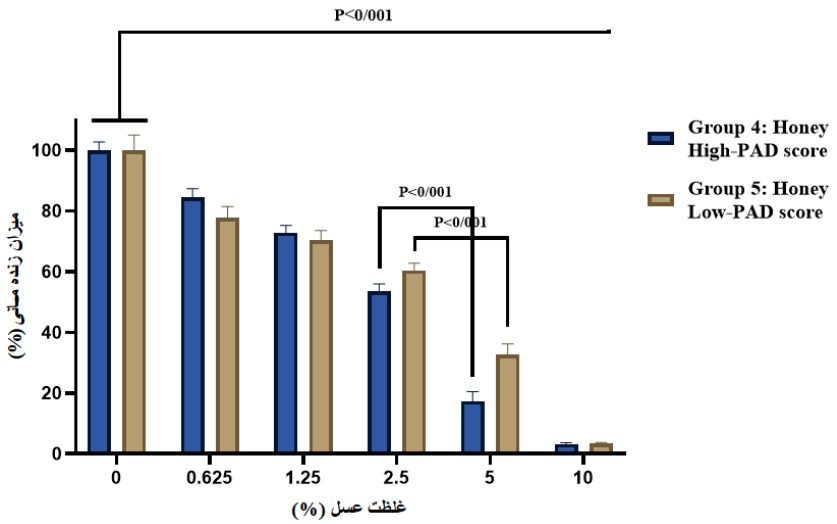
[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]

معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱)(شکل ۳).



شکل ۱- مقایسه میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 در تیمار با 5-FU در محیط High Glc و Normal Glc:

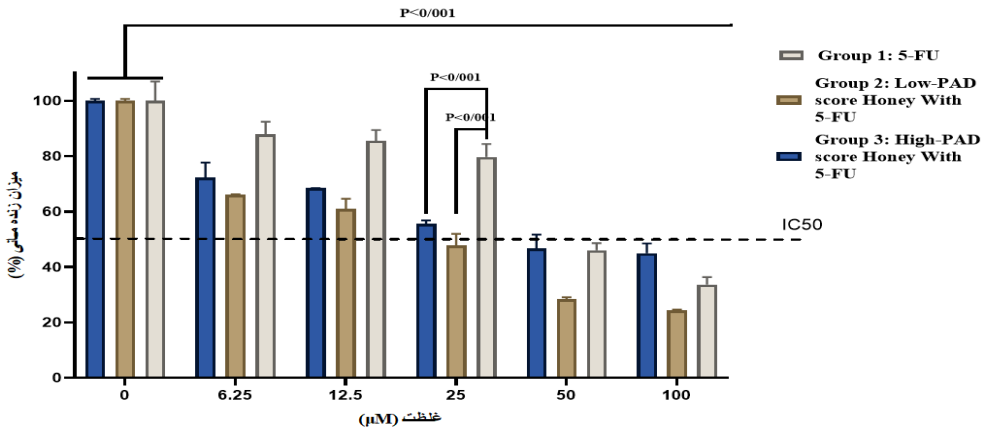
گروه ۱: 5-FU در محیط Normal Glc گروه ۸: 5-FU در محیط High Glc



شکل ۲- میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 در تیمار با عسل PAD score بالا و پایین بصورت مجزا در محیط Glc Normal:

گروه ۴: عسل High-PAD score گروه ۵: عسل Low-PAD score

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]



شکل ۳- میزان زنده‌مانی سلول‌های HT-29 در تیمار با 5-FU به‌صورت تک و ترکیبی با انواع مختلف عسل در محیط Normal Glc:

گروه ۱: 5-FU گروه ۲: عسل Low-PAD score + 5-FU گروه ۳: عسل High-PAD score + 5-FU

بررسی فعالیت آنزیم LDH در سلول‌های HT-29 تیمار شده با درمان ترکیبی 5-FU و عسل High-PAD score و عسل Low-PAD sore

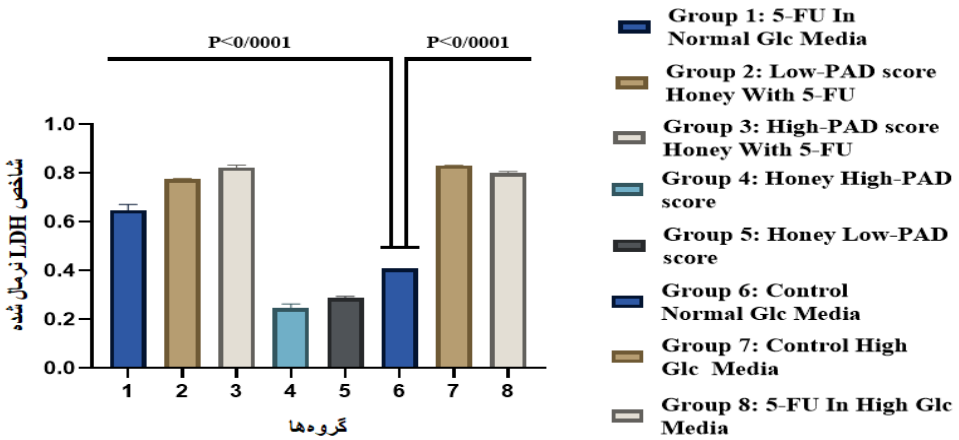
به منظور ارزیابی بقا و آسیب سلولی، از شاخص LDH نرمال‌شده (نسبت LDH داخل‌سلولی به مجموع داخل و خارج‌سلولی) استفاده شد.

در شکل ۴، سطح LDH نرمال‌شده داخل سلولی در گروه‌های مختلف تیمار شده نشان داده شده است. بین گروه‌های مختلف در محیط Normal Glc و گروه کنترل Normal Glc تفاوت معنی‌دار در سطح LDH وجود دارد (P<۰/۰۰۰۱).

بررسی میزان مصرف گلوکز در سلول‌های HT-29 تیمار شده با درمان ترکیبی 5-FU و عسل High-PAD score و عسل Low-PAD sore

به منظور ارزیابی میزان مصرف گلوکز توسط سلول‌ها مقدار گلوکزِ اولیه و باقی‌مانده در محیط پس از نرمال‌سازی اثر قندِ عسل استفاده شد.

برای نرمال‌سازی میزان گلوکز و حذف اثر افزایش قند ناشی از افزودن عسل به محیط کشت مقادیر گلوکز را درحالت‌های زیر نیز محاسبه کردیم (جدول ۲):



شکل ٤- مقایسه سطح LDH نرمال شده در گروه‌های مختلف

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]

جدول ۲- میزان گلوکز در محیط کشت حاوی عسل بدون سلول

عنوان	میزان گلوکز mg/dl
عسل Low-PAD score با غلظت ۲/۵٪ در محیط Normal Glu	۹۵۹ ± ۷
عسل Low-PAD score با غلظت ۰/۶۲۵٪ در محیط Normal Glu	۳۷۸ ± ۲/۸
عسل High-PAD score با غلظت ۲/۵٪ در محیط Normal Glu	۸۳۷ ± ۹/۸
عسل High-PAD score با غلظت ۰/۶۲۵٪ در محیط Normal Glu	۲۷۶/۵ ± ۰/۷

همان‌طور که مشخص است (جدول۳)، تفاوت معناداری (P<۰/۰۵) بین گروه ۳ (5-FU + عسل High-PAD score) با گروه ۴ (عسل High-PAD score) در میزان گلوکز محیط رویی وجود دارد. این تفاوت نشان دهنده این است که سلول‌ها وقتی تحت تیمار ترکیبی قرار می‌گیرند (گروه ۳) میزان بیشتری گلوکز مصرف می‌کنند نسبت به زمانی که تحت تیمار با 5-FU یا عسل به‌طور مجزّا و تکی قرار می‌گیرند.

در نهایت داده‌های اولیه ما پس از نرمال‌سازی به‌صورت زیر تبدیل شدند:

جدول ۳- داده‌های نهایی نرمال‌شده گلوکز

شماره گروه تیمار	نوع گروه تیمار	میزان اولیه گلوکز mg/dl	میزان نرمال‌شده گلوکز mg/dl
۱	محیط 5-FU + Normal Glc	۵۸/۵ ± ۰/۷	۵۸/۵ ± ۰/۷
۲	محیط 5-FU + Normal Glc + عسل Low-PAD score	۳۴۳ ± ۱/۴۱۴	۳۵ ± ۴/۲۴
۳	محیط 5-FU + Normal Glc + عسل High-PAD score	۲۶۶/۵ ± ۰/۷۰۷۱	۱۰ ± ۱/۴۱
٤	محیط Normal Glc + عسل High-PAD score	۷۵۷ ± ۵/۶۵۷	۸۰ ± ۴/۲۴
٥	محیط Normal Glc + عسل Low-PAD score	۸۷۹ ± ۴۸/۰۸	۸۰ ± ۴۱/۰۱
٦	محیط Normal Glc بدون تیمار (کنترل)	۷۱ ± ۱/۴۱	۷۱ ± ۱/۴۱
۷	محیط High Glc بدون تیمار (کنترل)	۲۹۸/۵ ± ۳/۵۳	۲۹۸/۵ ± ۳/۵۳
۸	محیط 5-FU + High Glc	۳۷۴/۵ ± ۷/۷۷	۳۷۴/۵ ± ۷/۷۷

بحث

سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در سطح جهان بوده و سومین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان محسوب می‌شود. درمان با ۵-فلوراوراسیل (5-FU) همچنان پایه اصلی شیمی‌درمانی در این بیماران است و از طریق مهار آنزیم تیمیدین سنتاز سنتز DNA را مختل می‌سازد. با وجود این، بروز مقاومت دارویی و کاهش پاسخ به 5-FU یکی از چالش‌های عمده در مدیریت سرطان کولورکتال است، موضوعی که مطالعه حاضر در زمینه نقش شرایط متابولیکی و ترکیب با عوامل طبیعی از جمله عسل به بررسی آن پرداخته شده است (۳, ۱۷).

یافته‌های این مطالعه نشان داد که محیط غنی از گلوکز مقاومت سلول‌های سرطان کولورکتال HT-29 نسبت به داروی 5-FU را به‌طور معناداری افزایش می‌دهد. میزان IC50 دارو در محیط High Glc به ۱۱۰ میکرومولار رسید که در مقایسه با ۵۰ میکرومولار در محیط Normal Glc اختلاف قابل توجهی دارد. این مشاهده نشان می‌دهد که هیپرگلیسمی می‌تواند به‌عنوان یک عامل کلیدی در کاهش اثربخشی شیمی‌درمانی عمل کند. Bergandi و همکاران گزارش کردند که در شرایط گلوکز بالا، تجمع داخل‌سلولی 5-FU کاهش یافته و همراه با افت سطح

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]

گونه‌های اکسیژن فعال[1] (ROS)، پاسخ ضدتوموری دارو تضعیف می‌شود (۱۸). همچنین Lu و همکاران نشان دادند که در سلول‌های مقاوم به 5-FU، مسیرهای گلیکولیتیک (GLUT1، HK2، LDH-A) فعال‌تر می‌شوند و مهار این مسیرها حساسیت سلول‌ها به دارو را بازمی‌گرداند (۱۹).

از سوی دیگر، نتایج تیمار سلول‌ها با عسل نشان داد که هر دو نوع عسل High-PAD score و Low-PAD score در غلظت‌های ۰/۶۲۵ تا ۱۰ درصد باعث کاهش معنادار زنده‌مانی سلول‌ها شدند، اما این اثر در عسل High-PAD score بارزتر بود. این یافته با گزارش Afrin و همکاران همخوانی دارد که نشان دادند عسل مانوکا در ترکیب با 5-FU موجب افزایش ROS، القای آپوپتوز و تغییر فنوتیپ‌های متابولیک می‌شود (۲۰). Cianciosi و همکاران نیز بیان کردند که ترکیبات فنولی عسل می‌توانند اثرات ضدتوموری داشته و در ترکیب با داروهای شیمی‌درمانی به‌طور سینرژیک عمل کنند (۲۱). همچنین Waheed و همکاران نشان دادند که فلاونوئیدهایی مانند کوئرستین از طریق نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری (MOMP) مسیر آپوپتوز را در سلول‌های HT-29فعال می‌کنند (۲۲). بنابراین می‌توان گفت که کیفیت بیوشیمیایی عسل (ظرفیت فنولی و آنتی‌اکسیدانی) در تعیین شدت اثر ضدتوموری نقش اساسی دارد.

نتایج ما نشان داد که عسل Low-PAD score در غلظت پایین (۶۲۵%/) تأثیری بر حساسیت سلول‌ها به 5-FU نداشت، در حالی که ترکیب 5-FU با همان غلظت از عسل High-PAD score کاهش چشمگیر زنده‌مانی سلول‌ها را رقم زد (P<۰/۰۰۰۱). این اثر هم‌افزایی با یافته‌های Afrin و همکاران و Cianciosi و همکاران همسو است که نقش ترکیبات فنولی غنی را در تقویت پاسخ به 5-FU تأیید کرده‌اند (۲۰).

بررسی شاخص LDH نرمال‌شده نشان داد که در اغلب گروه‌های تیمارشده در محیط Normal Glc تفاوت معنی‌دار نسبت به کنترل وجود دارد (P≤۰/۰۰۰۱) . این یافته بیانگر فعال‌شدن مسیرهای مرگ سلولی و آسیب غشایی است. عدم وجود تفاوت معنادار بین گروه سلول‌های تیمار شده با 5-FU در محیط High Glc و گروه کنترل High Glc را می‌توان ناشی از دو عامل دانست: کاهش تعداد سلول‌های زنده و شرایط تنش‌زای متابولیکی که باعث تغییر در آزادسازی LDH می‌شود. مشابه این پدیده، Chan و همکاران تأکید کرده‌اند که سنجش LDH به‌تنهایی نمی‌تواند تمایز دقیق آپوپتوز از نکروز را مشخص کند و باید همراه با آزمون‌های مکمل مانند Annexin V/PI و فعالیت کاسپازها تفسیر شود (۲۲). همچنین Fotakis و Timbrell نیز بر محدودیت‌های LDH در شرایطی که تعداد سلول‌ها کاهش می‌یابد تأکید کردند (۲۳).

یافته‌های ما نشان داد که مصرف گلوکز در گروه ترکیبی (5-FU + High-PAD score) به‌طور معناداری بیشتر از گروه عسل High-PAD score به‌تنهایی بود (P≤۰/۰۵). این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده پاسخ متابولیکی تطابقی سلول‌ها تحت درمان با 5-FU باشد. مطالعات نشان داده‌اند که بازآرایی مسیرهای گلیکولیتیک در مقاومت به 5-FU نقش مهمی دارد (۲۴). Xiang و همکاران گزارش کردند که فعال‌سازی STAT3/HK2 باعث تقویت گلیکولیز و مقاومت به 5-FU در سلول‌های کولورکتال می‌شود (۲۵). از سوی دیگر، Denise و همکاران نشان دادند که سلول‌های مقاوم به 5-FU بیشتر به OXPHOS وابسته می‌شوند و مصرف گلوکز در آن‌ها کاهش می‌یابد (۲۶). بنابراین افزایش مصرف گلوکز در گروه ترکیبی ما می‌تواند یک پاسخ حاد و گذرا به استرس ناشی از داروی 5-FU و استرس اکسیداتیو ناشی از حضور فنول‌های عسل باشد، پیش از آنکه سلول‌ها به سمت فاز پایدارتر مقاومت و وابستگی به OXPHOS تغییر کنند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که وجود گلوکز بالا مقاومت سلول‌های HT-29 به داروی 5-FU را افزایش می‌دهد. عسل مورد استفاده در این مطالعه (عسل آپیزان، شرکت کاووش آریان آزما)، به ویژه عسل با PAD score بالا، توانست به‌تنهایی اثرات ضدتوموری داشته و در ترکیب با 5-FU اثر هم‌افزایی معنی‌داری

[1] Reactive oxygen species

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]

ایجاد کند. همچنین شاخص LDH و الگوی مصرف گلوکز نشان دادند که تغییرات متابولیکی نقش مهمی در پاسخ سلولی به دارو دارند. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که ترکیب عوامل طبیعی با داروهای شیمی‌درمانی می‌تواند رویکردی نویدبخش برای بهبود درمان سرطان کولورکتال باشد.

محدودیت‌های مطالعه

از محدودیت‌های این مطالعه، عدم گنجاندن گروه 5-FU + عسل (PAD score بالا و پایین) در محیط High Glc و فقدان کنترل‌های هم‌اسمولار است؛ زیرا افزودن عسل در محیط با غلظت گلوکز بالا (High Glc) می‌تواند با افزایش بار قندی و تغییر اسمولاریته، به‌همراه ویژگی‌های ذاتی عسل(glucose oxidase، pH پایین)، متغیرهای مداخله‌گر ایجاد کرده و تفسیر اختصاصی اثر PAD score را دشوار سازد. همچنین، اسمولاریته و گلوکز خارج‌سلولی به‌طور پویشی پایش نشد و جزء پلی‌فنولیِ کم‌قند به صورت جداگانه آزمون نشد. این ملاحظات قابلیت تعمیم یافته‌ها را محدود می‌کند و ضرورتِ مطالعات تکمیلی با کنترل‌های هم‌اسمولار، سنجش‌های بیوانرژتیک (میزان مصرف ATP) و به‌کارگیری جزء پلی‌فنولیِ کم‌قند را برجسته می‌سازد. همچنین از محدودیت‌های دیگر می توان به بررسی و استفاده از تنها یک رده سلولی سرطان کولورکتال، عدم بررسی مکانیزم‌های دقیق مولکولی، عدم بررسی اثرات عسل و 5-FU در شرایط in vivo و عدم استفاده از روش‌های چندگانه برای تعیین زنده‌مانی مثل آپوپتوز یا نکروز اشاره کرد. همچنین اثر قندهای منفرد عسل (گلوکز، فروکتوز، ساکاروز) به‌طور جداگانه و با کنترل‌های هم‌اسمولار ارزیابی نشد؛ بنابراین یافته‌ها بازتاب‌دهنده‌ی اثر کل عسل است.

تقدیر و تشکّر

این مقاله حاصل طرح پژوهشی مصوب با کد ۶۶۶۳ می‌باشد.

نویسندگان، مراتب تقدیر و تشکر خود را از حوزه معاونت تحقیقات و فناوری و آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بیرجند اعلام میدارند.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر پس از تأیید شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند و اخذ مجوز اخلاق با کد IR.BUMS.REC.1403.342 انجام شد.

حمایت مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند اجرا شده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی و طراحی مطالعه: الهام چمنی، محسن خراشادی‌زاده، اصغر زربان.

انجام آزمایشات: ارشیا مصباح موسوی.

تأمین منابع: الهام چمنی.

اعتبارسنجی داده‌ها: محسن خراشادی‌زاده و الهام چمنی.

نگارش – پیش‌نویس اولیه: ارشیا مصباح موسوی، الهام چمنی.

نگارش – بازنگری و ویرایش: الهام چمنی، محسن خراشادی‌زاده.

تأیید نهایی نسخه‌ی آماده انتشار: اصغر زربان، محسن خراشادی‌زاده، الهام چمنی.

پاسخ‌گویی در قبال صحت و تمامیت کار: ارشیا مصباح موسوی، الهام چمنی.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]

منابع

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024;74(3):229-63. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38572751/
2. Van der Jeught K, Xu H-C, Li Y-J, Lu X-B, Ji G. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2018;24(34):3834. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30228778/
3. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer. 2003;3(5):330-8. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12724731/
4. Zhang N, Yin Y, Xu S-J, Chen W-S. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. Molecules. 2008;13(8):1551-69. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18794772/
5. Zhao H, Wu K. Effect of hyperglycemia on the occurrence and prognosis of colorectal cancer. Am J Transl Res. 2024;16(5):2070. URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11170586/
6. Wang M, Zhou Q, Cao T, Li F, Li X, Zhang M, et al. Lactate dehydrogenase A: a potential new target for tumor drug resistance intervention. J Transl Med. 2025; 23(1): 713. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40598234/
7. Zhang Q, Luo Y, Qian B, Cao X, Xu C, Guo K, et al. A systematic pan-cancer analysis identifies LDHA as a novel predictor for immunological, prognostic, and immunotherapy resistance. Aging (Albany NY). 2024;16(9):8000-18. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38709280/
8. Zhang K, Zhang T, Yang Y, Tu W, Huang H, Wang Y, et al. N6-methyladenosine-mediated LDHA induction potentiates chemoresistance of colorectal cancer cells through metabolic reprogramming. Theranostics. 2022;12(10):4802-17. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35832094/
9. Wu J, Chen J, Xi Y, Wang F, Sha H, Luo L, et al. High glucose induces epithelial-mesenchymal transition and results in the migration and invasion of colorectal cancer cells. Exp Ther Med. 2018;16(1):222-30. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29896243/
10. Li W, Zhang X, Sang H, Zhou Y, Shang C, Wang Y, et al. Effects of hyperglycemia on the progression of tumor diseases. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):327. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31337431/
11. Al Refaey HR, Newairy A-SA, Wahby MM, Albanese C, Elkewedi M, Choudhry MU, et al. Manuka honey enhanced sensitivity of HepG2, hepatocellular carcinoma cells, for Doxorubicin and induced apoptosis through inhibition of Wnt/β-catenin and ERK1/2. Biol Res. 2021;54(1):16. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34049576/
12. Karbasi S, Asadian AH, Azaryan E, Naseri M, Zarban A. Quantitative analysis of biochemical characteristics and anti-cancer properties in MCF-7 breast cancer cell line: a comparative study between Ziziphus jujube honey and commercial honey. Mol Biol Rep. 2024;51(1):344. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38400882/
13. Mohammadi Y, Tahergorabi Z, Sharifzadeh GR, Rajabi Moghadam M, Zarban A. Protective Effects of Some Graded Iranian Honey Samples Against Cold Water Immersion-Induced Gastric Ulcers in Rats.Food Sci Nutr. 2024;12(12):10211-22. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39723096/
14. Blake DA, McLean NV. A colorimetric assay for the measurement of D-glucose consumption by cultured cells. Anal Biochem. 1989;177(1):156-60. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2742145/
15. Hulme C, Westwood M, Myers J, Heazell A. A high-throughput colorimetric-assay for monitoring glucose consumption by cultured trophoblast cells and placental tissue. Placenta. 2012;33(11): 949-51. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22951137/
16. TeSlaa T, Teitell MA. Techniques to monitor glycolysis. Methods Enzymol. 2014; 542: 91-114. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24862262/

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]

17. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538338/

18. Bergandi L, Mungo E, Morone R, Bosco O, Rolando B, Doublier S. Hyperglycemia promotes chemoresistance through the reduction of the mitochondrial DNA damage, the Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-XL ratio, and the cells in Sub-G1 phase due to antitumoral drugs induced-cytotoxicity in human colon adenocarcinoma cells.Front Pharmacol. 2018;9:866. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30150934/

19. Lu Y-n. Blocking lncRNA NOP14-AS1 overcomes-۵ Fu resistance of colon cancer cells by modulating miR-30a-5p-LDHA-glucose metabolism pathway. Discov Oncol. 2025;16(1):1-12. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40180667/

20. Afrin S, Giampieri F, Forbes-Hernández TY, Gasparrini M, Amici A, Cianciosi D, et al. Manuka honey synergistically enhances the chemopreventive effect of 5-fluorouracil on human colon cancer cells by inducing oxidative stress and apoptosis, altering metabolic phenotypes and suppressing metastasis ability. Free Radic Biol Med. 2018;126:41-54. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30056083/

21. Cianciosi D ,Forbes-Hernández TY, Afrin S, Gasparrini M, Reboredo-Rodriguez P, Manna PP, et al. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. Molecules. 2018;23(9):2322. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30208664/

22. Waheed M, Hussain MB, Javed A, Mushtaq Z, Hassan S, Shariati MA, et al. Honey and cancer: A mechanistic review. Clin Nutr. 2019;38(6):2499-503. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30639116/

23. Chan FK-M, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. Immune Homeostasis: Methods Mol Biol. 2013:979: 65-70. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23397389/

24. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicol Lett. 2006;160(2):171-7. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16111842/

25. Xiang J, Zhang H, Shen K ,Feng J, Yang K, Shi T, et al. SPARC Promotes Aerobic Glycolysis and 5-Fluorouracil Resistance in Colorectal Cancer Through the STAT3/HK2 Axis. Cancer Med. 2025;14(11):e70972. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40415238/

26. Denise C, Paoli P, Calvani M, Taddei ML, Giannoni E, Kopetz S, et al. 5-fluorouracil resistant colon cancer cells are addicted to OXPHOS to survive and enhance stem-like traits. Oncotarget. 2015;6(39):41706. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26527315/

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.196]