Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences

Akbarzadeh-Khiavi and Safary. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2025;47(3):
doi: 10.34172/mj.025.33809
https://mj.tbzmed.ac.ir

TUOMS PRESS

Effect of nano-formulated Panitumumab on AKT/PTEN/caspase 3 apoptosis and gene expression and BAX/Bcl2 signaling pathway in KRAS-mutant SW480 cells

Mostafa Akbarzadeh-Khiavi[1], **Azam Safary**[2,3]*

[1]Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Connective Tissue Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Biomedicine Institute, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 28 Aug 2024
Revised: 1 Jan 2025
Accepted: 4 Jan 2025
ePublished: 16 Jun 2025

Keywords:
- Colorectal cancer
- Panitumumab
- Gold nanoparticles
- Apoptosis

Abstract

Background. This study aims to design and synthesize a nanostructure to address drug resistance in colorectal cancer cells. Specifically, it targets cells with mutations in the *KRAS* gene that resist the chemotherapy drug, Panitumumab. Then, the biological effects of this nanostructure were investigated in colorectal cancer cells (SW480).

Methods. The targeted nanostructure was composed of PEGylated gold nanoparticles conjugated to Panitumumab (GNP-PEG-Pan), and its physicochemical properties were determined. The cytotoxic effects of this nanostructure on SW480 cells were assessed using the MTT assay technique. The effect of this nanostructure on apoptosis in cancer cells was evaluated using flow cytometry techniques. The expression levels of genes involved in apoptosis, including *AKT*, *PTEN*, *Bax*, *Bcl2*, and *Caspase 3*, were evaluated after the application of the targeted nanostructure using Real-time PCR techniques.

Results. The results of the study indicated cytotoxic and apoptotic effects of the targeted nanostructure against SW480 cells and overcoming drug resistance in this cell line. This targeted nanostructure played a key role in inducing apoptosis in *KRAS* mutant colorectal cancer cells by increasing the expression of *PTEN*, *Bax*, and *caspase 3* genes and decreasing the expression of the *AKT* and *Bcl2* genes.

Conclusion. Our findings demonstrated that the engineered nanostructure can inhibit cell proliferation and induce apoptosis in *KRAS* mutant colorectal cancer cells. Therefore, this nano-formulated antibody can be proposed as a novel therapeutic option for colorectal cancer and other solid tumors.

Practical Implications. The engineered targeted nanostructure (GNP-PEG-Pan) enhances cytotoxic effects and induces apoptosis in *KRAS*-mutant CRC cells resistant to Panitumumab.

How to cite this article: Akbarzadeh-Khiavi M, Safary A. Effect of nano-formulated Panitumumab on AKT/PTEN/caspase 3 apoptosis and gene expression and BAX/Bcl2 signaling pathway in KRAS-mutant SW480 cells. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2025;47(3): doi: 10.34172/mj.025.33809. Persian.

Extended Abstract

Background

Drug resistance in colorectal cancer (CRC) is a critical barrier to effective therapy, especially in cases involving mutations in the *KRAS* gene. These mutations lead to resistance against Panitumumab (Pan), an anti-EGFR monoclonal antibody widely

*Corresponding author; Email: azamsafary@yahoo.com
© 2025 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

used in the treatment of CRC. This study aimed to design and synthesize a novel nanostructure, composed of PEGylated gold nanoparticles (GNPs) conjugated to Pan (GNP-PEG-Pan), to specifically target *KRAS*-mutant CRC cells and overcome their drug resistance. The biological effects of this nanostructure were evaluated in SW480 CRC cells to assess its potential as a therapeutic option.

Methods

GNPs were synthesized using the citrate reduction method. In brief, 125 mL of distilled water containing 0.25 mM $HAuCl_4$ was boiled. Then, 12.5 mL of 40 mM sodium citrate was added dropwise while stirring, resulting in a ruby-red color. The solution was stored at 4°C in a dark container. To enhance stability and facilitate conjugation with Pan, GNPs were PEGylated by adding 7 mg of thiolated polyethylene glycol (SH-PEG-COOH, 2000 Da) to 50 mL of the GNP solution. This mixture was incubated for 4 hours, followed by centrifugation at 10000 rpm and washing with PBS. The PEGylated GNPs (100 µL at 0.33 µM) were activated using EDC/NHS (0.4 M EDC, 0.118 M NHS) and incubated for 2 hours at room temperature. After centrifugation at 10000 rpm for 10 minutes, the pellet was washed with PBS, resuspended, and mixed with Pan (20 µL at 5 mg/mL) for 2 hours at 4°C. The conjugation efficiency was assessed using the BCA protein assay kit. The particle size and distribution were measured using the Nanotrac Zetasizer. Subsequently, SW480 CRC cells were cultured in RPMI-1640 with 10% FBS and 1% antibiotics at 37°C in a 5% CO_2 incubator. The cells were treated with different formulations (GNPs, GNPs-PEG, Pan, and GNP-PEG-Pan) at various concentrations (25, 50, 100, 150, and 200 µg/mL), and cell viability was measured using the MTT assay. IC50 values were determined after 24, 48, and 72 hours. Apoptosis was assessed using Annexin V staining and flow cytometry. The expression of apoptosis-related genes (*Bax*, *Bcl2*, *Caspase 3*, *PTEN*, and *AKT*) was analyzed by Real-time PCR. Statistical analyses were carried out using the analysis of variance (ANOVA) and Student's *t*-test. All analyses were conducted using SPSS version 19.0, with the significance level set at $P < 0.05$.

Results

The hydrodynamic diameters of GNPs, GNP-PEG, and GNP-PEG-Pan were 21 nm, 28 nm, and 40 nm, respectively, as determined by Dynamic Light Scattering (DLS). The zeta potential shifted positively during the formulation process, from −17.9 mV for bare GNPs to −8.7 mV for GNP-PEG-Pan, confirming successful conjugation. BCA assay results showed that approximately 82% of the added antibody was conjugated to the PEGylated GNPs.

According to the results of the MTT assay, the GNP-PEG-Pan nanostructure enhanced the toxicity in a concentration- and time-dependent manner, as with increasing exposure time, the IC50 values of GNP-PEG-Pan were significantly decreased compared to Pan and GNP alone. GNPs and GNP-PEG alone did not yield significant IC50 values. Pan had no significant effect at 24 hours but achieved IC50 values of 180 µg/mL and 169 µg/mL at 48 and 72 hours, respectively. In contrast, GNP-PEG-Pan exhibited IC50 values of 160 µg/mL, 125 µg/mL, and 97 µg/mL at 24, 48, and 72 hours, respectively. Based on these findings, the 48-hour time point was selected for further analyses. Apoptosis rates were assessed using Annexin V staining and flow cytometry. The rate of early and late apoptosis was higher for GNPs (13.34%) than for GNP-PEG (9.29%); however, neither showed significant differences compared to the control ($P > 0.05$). Pan alone induced significant apoptosis (23.9%, $P < 0.05$), while GNP-PEG-Pan demonstrated the highest apoptosis rate (67.29%, $P < 0.001$) compared to the control. Real-time PCR analysis revealed significant alterations in gene expression after 48 hours of treatment. GNP-PEG alone caused no significant changes in *AKT* or *PTEN* expression. Pan increased the expression levels of *Bax* and *Caspase 3* and decreased the expression level of *Bcl2*. GNP-PEG-Pan further enhanced the expression levels of *PTEN*, *Bax*, and *Caspase 3* while significantly reducing *AKT* and *Bcl2* levels. GNP-PEG-Pan showed higher upregulation of *PTEN* and *Bax* compared to Pan alone.

Conclusion

Based on the findings of this study, GNP-PEG-Pan exhibited the highest cytotoxicity and apoptosis

compared to GNPs or Pan alone. GNPs, when used alone, had no significant effect on cell death. The gene expression results for apoptosis-related genes (*Bax*, *Bcl2*, *Caspase 3*, *AKT*, and *PTEN*) further corroborate the cell cycle results. Overall, the conjugation of Pan to PEGylated gold nanoparticles enhances the cellular toxicity and apoptosis in *KRAS*-mutant Pan-resistant CRC cells. These promising results suggest that the GNP-PEG-Pan nanostructure could be a suitable candidate for targeted therapy in CRC with *KRAS* mutations, potentially overcoming common drug resistance mechanisms.

اکبرزاده خیاوی و صفری. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز.
doi: 10.34172/mj.025.33809
https://mj.tbzmed.ac.ir

مقاله پژوهشی

تأثیر پانیتومومب نانوفرموله شده بر بیان ژن‌های آپوپتوزی AKT/PTEN/Caspase 3 و مسیر سیگنالینگ BAX/Bcl2 در سلول‌های SW480 دارای جهش KRAS

مصطفی اکبرزاده خیاوی[۱]، اعظم صفری[۲،۳*]

[۱]مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
[۲]مرکز تحقیقات بیماری‌های بافت همبند، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
[۳]مرکز تحقیقات ریز فناوری‌های دارویی، پژوهشکده بیومدیسن، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۳/۶/۷
اصلاح نهایی: ۱۴۰۳/۱۰/۱۲
پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۵
انتشار برخط: ۱۴۰۴/۳/۲۶

کلیدواژه‌ها:
- سرطان کلورکتال
- پانیتومومب
- نانوذرات طلا
- آپوپتوز

چکیده

زمینه. مقاومت دارویی یکی از چالش‌های اساسی در درمان سرطان کولورکتال، به‌ویژه در سلول‌های دارای جهش در ژن *KRAS* است که نسبت به داروی شیمی‌درمانی پانیتومومب مقاوم هستند. هدف این مطالعه، طراحی و سنتز یک نانوساختار هدفمند مبتنی بر نانوذرات طلا (GNP) برای افزایش تأثیر پانیتومومب و بررسی اثرات بیولوژیکی آن در سلول‌های سرطان کولورکتال SW480 دارای جهش KRAS است.

روش‌کار. ابتدا نانوساختار هدفمند بر پایه نانوذرات طلاسنتز، پگیله و به پانیتومومب کونژوگه شد (GNP-PEG-Pan). سپس، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن تعیین گردید. اثرات سیتوتوکسیک این نانوساختار در سلول‌های سرطان کلورکتال SW480 با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. تاثیر این نانودارو بر روی آپوپتوز سلول‌های سرطانی با استفاده از تکنیک‌های فلوسایتومتری ارزیابی شد. همچنین، میزان بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز شامل *AKT, PTEN, Bax, Bcl2, Caspase 3* پس از تاثیر آنتی‌بادی نانوفرموله شده هدفمند، به روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها. نتایج نشان داد که نانوداروی هدفمند اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک قابل‌توجهی بر سلول‌های SW480 داشته و باعث غلبه بر مقاومت دارویی در این رده سلولی شده است. این نانودارو با افزایش بیان ژن‌های *PTEN*، *Caspase 3* و *Bax* و کاهش بیان ژن‌های *AKT* و *Bcl2*، تأثیر چشمگیری در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کلورکتال دارای جهش *KRAS* نشان داد.

نتیجه‌گیری. یافته‌های این مطالعه نشان داد که نانوساختار مهندسی‌شده قادر به مهار تکثیر سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کلورکتال دارای جهش *KRAS* است. بر این اساس، می‌توان آنتی‌بادی نانوفرموله‌شده را به‌عنوان یک درمان نوین برای سرطان کلورکتال و سایر تومورهای جامد پیشنهاد کرد.

پیامدهای عملی. نانوساختار هدفمند مهندسی‌شده (GNP-PEG-Pan) باعث افزایش اثرات سمیت سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های دارای جهش *KRAS* و مقاوم پانیتومومب شده است.

مقدمه

سرطان کولورکتال یکی از شایع‌ترین و مرگ‌بارترین سرطان‌ها در سراسر جهان است که از نظر تعداد مبتلایان، سومین و از نظر مرگ‌ومیر، دومین رتبه را دارد. این سرطان در مردان پس از سرطان‌های پروستات و ریه، و در زنان پس از سرطان‌های پستان و ریه، با اختصاص ۹ درصد از بروز و ۱۰درصد از مرگ‌ومیرهای ناشی از سرطان، یکی از چالش‌های اساسی پزشکی معاصر محسوب می‌شود. در ایران نیز روند ابتلا به این بیماری رو به افزایش است.[۱] روش‌های شیمی‌درمانی متداول مانند ۵-فلورویوراسیل، کپسیتابین و اگزالی‌پلاتین، علاوه‌بر عوارض جانبی شدید، با مقاومت دارویی همراه هستند که این امر لزوم جستجوی روش‌های درمانی جدید را برجسته می‌کند.[۲،۳] با توجه به محدودیت‌ها و عوارض روش‌های درمانی رایج، به‌ویژه شیمی درمانی، روش‌های درمانی هدفمند بیولوژیکی و استفاده از نانوتکنولوژی و نانومدیسین مورد توجه قرار گرفته است. در چند دهه اخیر، کاربرد نانومدیسین در تصویربرداری

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: azamsafary@yahoo.com

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز CC BY 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

تومور، شناسایی بیومولکول‌ها یا بیومارکرهای سرطان و هدفمند کردن حمل دارو به‌سرعت گسترش یافته است.[۴،۵] به‌منظور افزایش اثربخشی درمان، کاهش عوارض جانبی، نگهداری دوز مطلوب دارو و رساندن آن به بافت هدف بدون آسیب به سایر بافت‌ها، داروهای متداول سرطان کلورکتال به‌صورت ترکیبی یا کونژوگه با نانوذرات مختلف از جمله نانولیپوزوم، نانومیسیل، نانودندریمر، نانوپلیمرها (PLGA)، کوانتوم دات (QD) و نانوذرات فلزی مانند طلا و نقره و سوپرمگنیت‌ها مورد بررسی در ابعاد درون‌تنی (*In vitro*) و برون‌تنی (*In vivo*) قرار گرفته‌اند.[۲] برخی از این نانوداروهای هدفمند، مانند نانوذرات طلای کونژوگه با لیپوزوم (ایمنولیپوزوم‌ها) که حامل داروهای شیمی‌درمانی هستند، در مراحل کارآزمایی بالینی (فاز ۱ و ۲) قرار دارند.[۶]

گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) یک پروتئین تراپوسته‌ای است که در نقش یک گیرنده برای فاکتور رشد اپیدرمی با لیگاند خارج سلولی عمل می‌کند. این گیرنده یکی از اعضای خانواده بزرگ (Erythroblastic oncogene B, ErbB) و نوعی تیروزین کیناز گیرنده‌ای است. جهش در ژن‌های مسئول این پروتئین‌ها در بروز بسیاری از انواع سرطان‌ها نقش دارد. پروتئین EGFR یک گیرنده غشایی سرتاسری است که در بسیاری از سرطان‌ها، به‌ویژه سرطان‌های کلورکتال، بیان بیش از حد آن مشاهده می‌شود. فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی EGFR در سلول‌های سرطانی ارتباط مستقیم با افزایش تکثیر سلولی، رگ‌زایی و متاستاز دارد. در سلول‌های نرمال، به‌ویژه سلول‌های با منشأ اپیتلیال، میزان بیان EGFR در محدوده ۴۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ گیرنده به ازای هر سلول است، در حالی که در سلول‌های سرطانی این میزان به ۲ میلیون گیرنده به ازای هر سلول می‌رسد. در سرطان کولورکتال، میزان بیان این گیرنده بین ۲۵ تا ۷۵ درصد متغیر است.[۶،۷] افزایش بیان EGFR با مهار آپوپتوز، پیشرفت چرخه سلول، رگ‌زایی، حرکت سلولی و متاستاز همراه بوده و موجب تشدید فنوتیپ بدخیمی و پیش‌آگهی بد بیماری می‌شود. شواهد مبنی بر نقش این پروتئین در ایجاد انواع سرطان‌ها، منجر به طراحی و تهیه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال شده است که به‌طور انتخابی این گیرنده را هدف قرار می‌دهند.[۸] آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد EGFR باعث القای درونی‌سازی گیرنده‌های EGFR در سلول‌های سرطانی، به‌ویژه در سرطان کلورکتال می‌شوند.[۹] مطالعات نشان داده‌اند که آنتی‌بادی‌های ضد EGFR مانند سیتوکسیمب (آنتی‌بادی مونوکلونال IgG1 کایمریک انسان/ موش) و پانیتومومب (آنتی بادی IgG2 انسانی نوترکیب) که تاییدیه سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) را دارند، با تخریب و کاهش میزان EGFR از طریق انتقال به مسیر آندوزوم – لیزوزوم، باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی و القای آپوپتوز می‌شوند.[۲] با این حال، پاسخ درمانی این آنتی‌بادی‌های ضد EGFR، توسط مکانیسم‌های مقاومتی مختلف، از جمله جهش در ژن‌های کلیدی RAS/RAF/PI3K، فعال‌سازی مسیرهای ERBB2/MET/IGF-1R، افزایش لیگاندهای EGFR، تغییرات در گیرنده‌های EGF و تغییرات در ریزمحیط تومور مانع می‌شود. این تغییرات شامل بازسازی مسیرهای متابولیک و تغییرپذیری ژنتیکی است.[۱۰] علیرغم این چالش‌ها، تحقیقات در حال انجام بر درک و غلبه بر این مکانیسم‌های مقاومت برای ایجاد درمان‌های موثرتر متمرکز است. یک رویکرد امیدوارکننده شامل استفاده از نانوحامل-ها یا نانوذرات آلی/غیرآلی است که می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی بالقوه برای تقویت درمان‌های هدفمند علیه EGFR به‌شمار آید.[۱۱] از میان نانوذرات غیرآلی، نانو ذرات طلا به‌خاطر اثرات سیتوتوکسیک کمتر، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. نانوذرات طلایی که با آنتی-بادی‌های ضد سرطان کانژوگه شده‌اند، قادرند به‌طور موثری به سلول‌های سرطانی متصل شوند. از سوی دیگر، وقتی سلول‌های سرطانی به طلا متصل می‌شوند، نور را منعکس کرده و به‌راحتی از سلول‌های سالم تشخیص داده می‌شوند.[۱۲]

مطالعه‌ای نشان داده است که هرگونه اختلال در روند آپوپتوزیس می‌تواند منجر به سرطان شود. بنابراین، بسیاری از روش‌های درماني سرطان بر اساس القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطاني طراحی شده‌اند.[۱۳] از جمله ژن‌هاي مهمي که در آپوتوزیس سلول‌های سرطان کلورکتال دخیل هستند، می‌توان به ژن‌های *PTEN*، *AKT*، خانواده *Caspase*ها و ژن‌های میتوکندریایی *Bax* و Bcl2اشاره کرد.[۱۳] ژن PTEN که بر روی کروموزوم ۱۰ انسانی قرار دارد، به‌عنوان یک ژن سرکوبگر تومور، هم یک فسفاتاز لیپیدی و هم یک پروتئین فسفاتازی است. این ژن، PIP3 را به PIP2 تبدیل کرده و مسیر PI3K/AKT را مهار می‌کند. غیرفعال‌سازی PTEN منجر به فعال‌سازی این مسیر، افزایش تکثیر و بقا سلولی و در نتیجه رشد تومور می‌شود. در بسیاری از سرطان‌ها، جهش‌ها و حذف PTEN منجر به فعال‌سازی مسیر PI3K/AKT و تسریع پاتوژنز می‌شود.[۱۴] حذف و جهش PTEN با فعال کردن مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt در پاتوژنز سرطان نقش دارد. همچنین، PTEN از طریق دفسفریلاسیون *AKT* عمل کرده و کاهش فعالیت آن با پیشرفت سرطان ارتباط دارد.[۱۵]

از سوی دیگر، ژن‌های میتوکندریایی *Bax* و *Bcl2* نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز ایفا می‌کنند؛ به‌گونه‌ای که *Bax* یک پروتئین پروآپوپتوتیک است که فرایند مرگ سلولی را تحریک می‌کند، در حالی‌که *Bcl2* یک پروتئین ضدآپوپتوتیک است که مانع آپوپتوز می‌شود. در سرطان کولورکتال، کاهش بیان *Bax* و افزایش بیان *Bcl2*

موجب فرار سلول‌های سرطانی از آپوپتوز و مقاومت آنها در برابر درمان‌ها می‌شود.[۱۶]

کاسپازها یک خانواده ۱۵ عضوی از سیستئین پروتئازها هستند که نقش اساسی در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و التهاب ایفا می‌کنند. در میان آنها، کاسپاز ۳ یک واسطه آپوپتوتیک اولیه است که پس از فعال‌سازی توسط کاسپاز ۸ یا کاسپاز ۹، بسیاری از پروتئین‌های حیاتی را در سلول تجزیه کرده و موجب آپوپتوز می‌شود.[۱۷] بسیاری از درمان‌های ضد سرطان، از جمله داروهای سیتوتوکسیک، رادیوتراپی و ایمونوتراپی، از طریق فعال‌سازی کاسپاز ۳ باعث مرگ سلول‌های تومور می‌شوند. بر همین اساس، فعال‌سازی کاسپاز ۳ به‌عنوان یک نشانگر جایگزین برای ارزیابی اثربخشی درمان‌های ضدسرطانی مورد استفاده قرار گرفته است.[۱۸] بااین‌حال، مطالعات اخیر نشان می‌دهد که کاسپاز ۳ علاوه‌بر نقش آپوپتویک، در ترویج عود و رگ‌زایی تومور نیز نقش دارد. به نظر می‌رسد که هدف‌گیری درمانی کاسپاز ۳ نه‌تنها می‌تواند حساسیت سلول‌های سرطانی را به شیمی‌درمانی و رادیوتراپی افزایش دهد، بلکه از تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی نیز جلوگیری می‌کند.[۱۸]

هدف از مطالعه حاضر، طراحی و سنتز نانوساختاری مبتنی بر نانوذرات طلای پگیله شده هدفمند است که شامل نانوذرات طلای پگیله کانژوگه‌شده با آنتی‌بادی ضد EGFR پانیتومومب می‌باشد. در این پژوهش، تاثیرات این نانوساختار در دو سطح سلولی (سمیت سلولی و آپوپتوز) و مولکولی (بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز از جمله *AKT, PTEN*، *Bax*، *Bcl2*، *Caspase3*) بر روی سلول‌های سرطانی SW480 دارای جهش در ژن *KRAS* بررسی خواهد شد.

روش کار

نانوذرات طلا با استفاده از روش احیای سیترات سنتز شدند. مراحل سنتز به‌طور خلاصه به این شرح است: ابتدا محلول استوک $HAuCl_4$ (با غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار) را در یک ارلن ریخته و سپس ۱۲۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر به آن اضافه شد. محلول روی هات پلیت تا نقطه جوش گرم شد. در ادامه، با روشن کردن همزن، محلول تری‌سیترات سدیم (۴۰ میلی‌مولار در ۱۲/۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر) به‌صورت قطره‌قطره به محلول اضافه شد. پس از ایجاد رنگ قرمز یاقوتی، دستگاه خاموش شد و محلول حاصل در ظرف تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای افزایش پایداری و تقویت اتصال به آنتی‌بادی پانیتومومب، نانوذرات طلا (GNPs) توسط پلی‌اتیلن گلیکول تیوله (PEG ۲۰۰۰) به‌صورت SH-PEG-COOH پوشیده شد. برای این کار، به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محلول نانوذرات طلای سنتز شده، ۷ میلی‌گرم SH-PEG-COOH اضافه گردید. پس از ۴ ساعت، محلول سه بار با بافر PBS شستشو شده و در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

برای کونژوگاسیون نانوذرات طلای پگیله شده با آنتی‌بادی، به ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۳۳ میکرومولار نانوذرات طلای پگیله شده، ۳ میکرولیتر EDC/NHS (با غلظت ۰/۴ مولار EDC و ۰/۱۱۸ مولار NHS) اضافه شد. مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و تحت دور ملایم انکوبه گردید، سپس در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. این فرآیند در سه میکروتیوب مجزا انجام گرفت و رسوب حاصل سه بار با بافر PBS شسته شد. در ادامه، رسوبات با PBS به حجم ۲/۴ میلی‌لیتر رسانده شدند و به هر میکروتیوب ۲۰ میکرولیتر آنتی‌بادی پانیتومومب (با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه گردید. مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، میکروتیوب‌ها در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتیریفیوژ شدند و مایع رویی آنها برای سنجش غلظت پروتئین‌های لود نشده بر روی نانوذرات طلا با استفاده از کیت BCA (BCA protein assay kit) مورد بررسی قرار گرفت.

پارامترهای مربوط به اندازه ذرات و توزیع آنها با استفاده از دستگاه Zetasizer Nanotrac Wave™ (Microtrac, San Diego, CA, USA) بررسی شد. میزان آنتی‌بادی پانیتومومب کونژوگه‌شده با استفاده از کیت BCA تعیین گردید. برای تعیین درصد پروتئین لود شده (mAbs) در نانوذرات طلا، از معادله ۱ استفاده شد:[۳]

$$\text{معادله 1 : میزان پروتئین (mAbs) لود شده} = \frac{\text{پروتئین کل} - \text{پروتئین لود شده}}{\text{پروتئین کل}} \times 100$$

میزان mAb کونژوگه‌شده روی نانوذرات طلای پگیله‌شده (GNP) نیز با استفاده از معادله۲ محاسبه شد:[۳]

$$\text{معادله 2 : میزان پروتئین کونژوگه (mAbs)} = \text{پروتئین کل} - \text{پروتئین آنلود شده}$$

رده سلولی SW480 از انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت RPMI 1640 غنی‌شده با 10% FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (۵۰۰۰ U/mL)، در انکوباتور با دمای ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد،5% CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شد. تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شدند.

برای بررسی سمیت سلولی از آزمون رنگ‌سنجی MTT و تعیین IC50 استفاده شد. این آزمون بر پایه شکسته‌شدن نمک تترازولیوم MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) زردرنگ به کریستال‌های فورمازان بنفش توسط سلول‌های متابولیک فعال انجام شد.

سلول‌های SW480 در پنج گروه و در سه تکرار در پلیت‌های ۹۶ چاهکی (با غلظت 10^4 سلول در هر چاهک) کشت داده شدند:

گروه اول: تیمار با آنتی‌بادی مونوکلونال پانیتومومب

گروه دوم: تیمار با نانوذرات طلای خالص

گروه سوم: تیمار با نانوذرات طلای پگیله‌شده

گروه چهارم: تیمار با نانوذرات طلای پگیله‌شده کونژوگه با آنتی‌بادی EGFR پانیتومومب

گروه پنجم (کنترل): بدون هیچ ترکیب افزودنی

میزان زنده‌مانی سلول‌های SW480 با روش MTT assay در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد. همچنین، میزان دوزی که باعث زنده‌مانی حداقل ۵۰ درصد سلول‌ها می‌شود (IC50) با استفاده از دستگاه الایزا و نرم‌افزار GraphPad تعیین گردید.

پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون، محیط کشت از چاهک‌های حاوی سلول‌های تیمار شده خارج شد و پس از شستشو با بافر PBS، ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون، محلول رویی تخلیه شده و محلول DMSO به چاهک‌ها اضافه گردید. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا بررسی شد و مقدار IC_{50} برا هر ترکیب محاسبه گردید.

در مطالعه حاضر، رده سلولی SW480 در پنج سری و در سه تکرار در پلیت‌های ۶ چاهکی ($1*10^5$ سلول در هر چاهک) برای بررسی آپوپتوز سلول‌ها، کشت داده شد. بعد از سپری شدن ۲۴ ساعت، سری اول سلول‌ها با آنتی‌بادی مونوکلونال پانیتومومب به‌تنهایی، سری دوم با نانوذرات طلا به‌تنهایی، سری سوم نانوذرات طلای پگیله‌شده به‌تنهایی، سری چهارم با نانوذرات طلای پگیله کونژوگه‌شده با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد EGFR پانیتومومب و سری پنجم بدون تیمار به‌عنوان گروه کنترل، بدون افزودن ترکیبات در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. بعد از طی بازه زمانی مورد نظر (۴۸ ساعت)، سلول‌ها توسط تریپسین جمع‌آوری شده و مطابق با پروتکل کیت آنکسین V (شرکت exbio، کشور چک) با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (BD FACSCalibur™) مورد بررسی قرار گرفت.

همچنین، برای استخراج RNA از سلول‌های SW480 و سنتز cDNA، سلول‌ها در پنج سری و در سه تکرار در پلیت‌های ۶ چاهکی ($1*10^5$ سلول در هر چاهک) کشت داده شد. بعد از سپری شدن ۲۴ ساعت، سری اول سلول‌ها با آنتی‌بادی مونوکلونال پانیتومومب به‌تنهایی، سری دوم با نانوذرات طلا به‌تنهایی، سری سوم نانوذرات طلای پگیله‌شده به‌تنهایی، سری چهارم با نانوذرات طلای پگیله کونژوگه‌شده با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد EGFR پانیتومومب و سری پنج بدون تیمار به‌عنوان گروه کنترل و بدون افزودن ترکیبات، در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شد. سپس، سلول‌ها برای ۴۸ ساعت دیگر تحت شرایط مشابه انکوبه شدند. RNA تام با استفاده از کیت ستوني شرکت یکتا تجهیز آزما و طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. برای سنتز cDNA از روي mRNA تام، از کیت شرکت TAKARA مطابق با دستورالعمل کیت استفاده شد. نمونه‌های cDNA تا زمان آنالیز در ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای بررسي بیان ژن با استفاده از تکنیک Real-time PCR، پرایمرهای اختصای برای ژن‌های *Bax, Bcl2, Caspase 3, PTEN, AKT* و *β-actin* (به‌عنوان ژن داخلی) با استفاده از نرم‌افزارهای ncbi primer BLAST و oligo 7 طراحی و بررسی شدند (جدول ۱). پس از اطمینان از صحت پرایمرها، توالی‌های مورد نظر از شرکت Bioneer سفارش و خریداری شدند.

جدول ۱. توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای ژن‌های AKT، PTEN، Caspase3، Bax، Bcl2 و β-actin

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی پرایمر
AKT	Forward:5′-TCT ATG GCG CTG AGA TTG TG-3′ Reverse: 5′-CTT AAT GTG CCC GTC CTT GT-3′
PTEN	Forward:5′-ACGACGGGAAGACAAGTTCA-3′ Reverse:5′-AGGTTTCCTCTGGTCCTGGT-3′
Caspase 3	Forward: 5′-GTGGAACTGACGATGATATGGC-3′ Reverse: 5′-CGCAAAGTGACTGGATGAACC-3′
Bax	Forward: 5′- CTACAGGGTTTCATCCAG -3′ Reverse: 5′- CCAGTTCATCTCCAATTCG -3′
Bcl2	Forward: 5′- GTGGATGACTGAGTACCT -3′ Reverse: 5′- CCAGGAGAAATCAAACAGAG -3′
β-actin	Forward: 5′-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3′ Reverse: 5′-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3′

جدول۲. تجزیه و تحلیل اندازه و توزیع نانوذرات و پتانسیل زتا بوسیله پراکندگی دینامیکی نور (DLS).

Nanostructures	Size (nm)	Polydispersity index (PDI)	Zeta potential (mV)
GNPs	۲۱	۰/۳۸۷	-۱۷/۹
GNP-PEG	۲۸	۰/٦۱۱	-۱۰/۵
GNP-PEG-Pan	٤۰	۰/٤۹۲	-۸/۷

DLS: پراکندگی دینامیکی نور؛ GNPs: نانوذرات طلا؛ PEG: پلی‌تیلن گلیکول؛ GNP-PEG: نانوذرات طلای پگیله شده؛ GNP-PEG-Pan: نانوذرات پگیله کانژوگه‌شده به پانیتومومب.

از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها، از آزمون‌های آماری One-Way ANOVA و t-test استفاده شد و سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تصویر شماتیک نانوساختار سنتز شده در جدول ۲ ارائه شده است. اندازه نانوذرات طلای سنتز شده به این صورت تعیین شد: نانوذرات طلای خالص (GNPs) : 21 نانومتر، نانوذرات طلای پگیله‌شده (GNP-PEG) : 28 نانومتر و نانوذرات طلای کونژوگه‌شده با آنتی‌بادی (GNP-PEG-Pan): 40 نانومتر

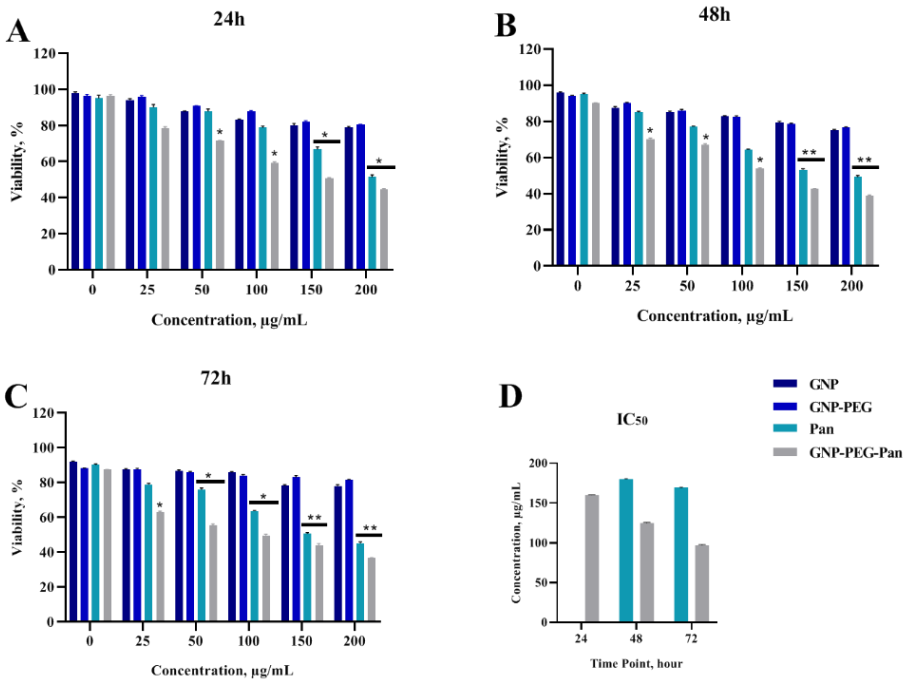
افزایش مثبت در مقدار پتانسیل زتا طی مراحل نانوفرمولاسیون، از مقدار ۱۷/۹- میلی‌ولت در نانوذرات خالی تا ۸/۷- میلی‌ولت در نانوذرات پگیله‌شده کونژوگه با پانیتومومب، تاییدی بر صحت کانژوگاسیون محسوب می‌شود. نتایج حاصل از کیت BCA نشان داد که حدود ۸۲ درصد از آنتی‌بادی مورد استفاده، به نانوذرات طلای پگیله کانژوگه‌شده است.

برای ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات طلا، آنتی‌بادی پانیتومومب و نانوساختار سنتزشده (GNP-PEG-Pan)، از روش استاندارد MTT در سه بازه زمانی ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت استفاده شد. غلظت‌های مورد استفاده برای سلول‌ها به‌ترتیب ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (µg/ml) در نظر گرفته شد. نتایج آزمون MTT در شکل ۱ نمایش داده شده است. مطابق این شکل، میزان زنده‌مانی سلولی به‌صورت وابسته به دوز و زمان کاهش یافت. لازم به ذکر است که کاهش زنده‌مانی در گروه‌های نانوذرات طلا و نانوذرات طلای پگیله‌شده از نظر آماری معنی‌دار نبود و مقدار IC_{50} برای این گروه تعیین نشد. همچنین، تیمار با پانیتومومب در ٢٤ ساعت تأثیر معنی‌داری بر زنده مانی سلول‌ها نداشت و منجر به تعیین IC50 نشد.

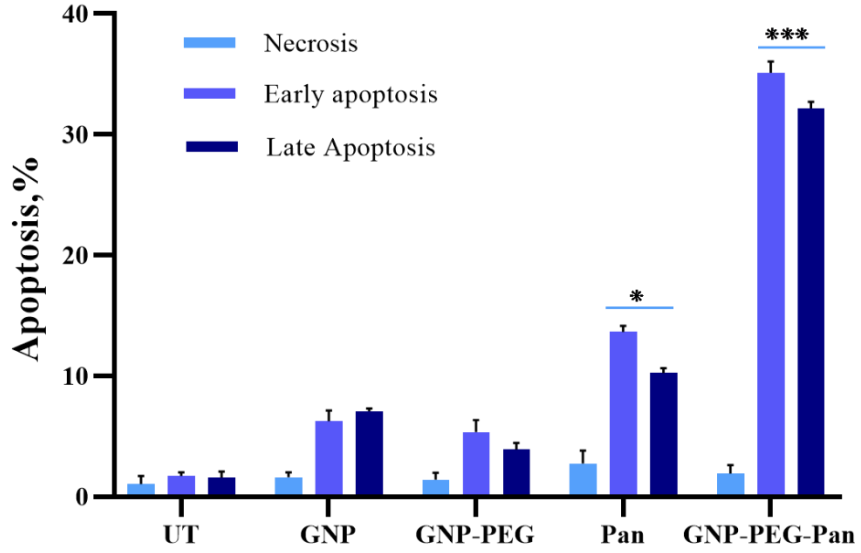
بر اساس معادله حاصل از رسم نمودار، مقدار IC_{50} برای آنتی‌بادی پانیتومومب در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت و برای نانوساختار GNP-PEG-Pan در هر سه بازه زمانی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) مطابق پنل D، شکل ۱ برآورد شد. مقدار IC_{50} در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت برای پانیتومومب به‌ترتیب ۱۸۰ µg/mL و ۱٦۹ و برای GNP-PEG-Pan در بازه‌های زمانی ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت به‌ترتیب ۱٦۰ µg/mL، ۱۲۵، ۹۷ تعیین گردید. پس از بررسی نتایج زنده‌مانی سلولی، بازه ۴۸ ساعت پس از تیمار برای ادامه بررسی‌های چرخه سلولی انتخاب شد.

شکل ۲ نتایج مربوط به بررسی آپوپتوز را با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری نشان می‌دهد. مطابق با یافته‌های حاصل، میزان آپوپتوز (Late+early) نانوذرات طلای غیرپگیله‌شده (۱۳/۳۴٪) بیشتر از نانوذرات طلای پگیله‌شده (۹/۲۹٪) می‌باشد. تفاوت میزان آپوپتوز در این دو گروه در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). میزان آپوپتوز برای پانیتومومب (۲۳/۹٪) بود که در مقایسه با گروه کنترل تغییرات آپوپتوتیک معناداری نشان داد ($P<۰/۰۵$). نانوذرات طلای پگیله کونژوگه‌شده با آنتی‌بادی پانیتومومب بیشترین درصد آپوپتوز (۶۷/۲۹٪) و تغییرات آپوپتوتیک را نسبت به گروه کنترل نشان داد و اختلاف آنها از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۰۱$).

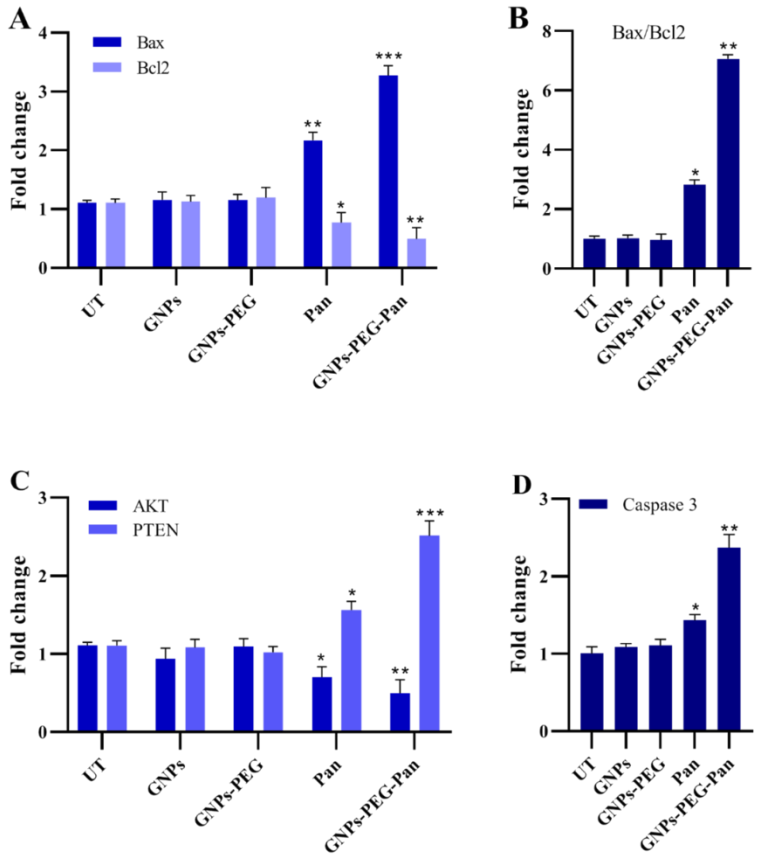
پس از تهیه مخلوط واکنش در دماهای انتخاب شده، بیان هریک از ژن‌های *AKT*، *PTEN*، *Caspase 3*، *Bax*، *Bcl2* و *β-actin* به‌وسیله تکنیک Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. بررسی بیان این ژن‌ها در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با ترکیبات سنتز شده مختلف انجام شد (شکل ۳). در مقایسه با گروه کنترل، سلول‌های تیمارشده با نانوذرات طلای پگیله‌شده و پانیتومومب تغییرات معنی‌داری از لحاظ آماری در بیان ژن‌های *AKT* و *PTEN* نشان ندادند. بیان ژن‌های *Caspase 3* و *Bax* در سلول‌های تیمارشده با آنتی‌بادی پانیتومومب برخلاف تیمار با نانوذرات طلای پگیله‌شده به‌تنهایی به‌طور معنی‌دار افزایش و بیان ژن *Bcl2* کاهش یافته بود. در حالی‌که در سلول‌های تیمار شده با نانو ساختار GNP-PEG-Pan بیان ژن‌های *PTEN* و *Caspase 3* و *Bax* به‌طور معنی‌داری افزایش و بیان ژن‌های *AKT* و *Bcl2* به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود. همچنین، مطابق با نتایج به‌دست آمده در مقایسه با پانیتومومب تنها، نانوساختار پانیتومومب افزایش بیشتری در بیان ژن‌های *PTEN* و *Bax* را نشان داد.



شکل۱. نمودار زنده‌مانی سلول‌های سرطانی SW480 . پنل‌های A، B و C به‌ترتیب نشان‌دهنده تیمار سلول‌های SW480 با غلظت‌های مختلف (۲۰، ۵۰،۱۰۰،۱۵۰، و ۲۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر) GNPs، GNPs-PEG، Pan و GNP-PEG-Pan برای بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت هستند. (D) مقادیر IC50 مقایسه‌ای Pan و GNP-PEG-Pan در سلول‌های SW-480 در انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۸ ساعت می‌باشد. داده‌های موجود به معنای ± انحراف معیار سه آزمایش جداگانه است. GNPs: نانوذرات طلا. PEG: پلی‌اتیلن گلیکول؛ GNP-PEG: نانوذرات طلای پگیله‌شده ؛ Pan : پانیتومومب؛ GNP-PEG-Pan: نانوذرات پگیله کانژوگه‌شده به پانیتومومب؛ 0 :گروه کنترل یا بدون تیمار.
* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل است (*$P<0.05$ و **$P<0.01$).



شکل ۲. آنالیز آپوپتوز سلولی با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری (Annexin V). GNPs: نانوذرات طلا. PEG: پلی‌اتیلن گلیکول؛ GNP-PEG: نانوذرات طلای پگیله‌شده ؛ Pan : پانیتومومب؛ GNP-PEG-Pan: نانوذرات پگیله کانژوگه‌شده به پانیتومومب؛ UT :گروه کنترل یا بدون تیمار.
* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل است (*$P<0.05$ و ***$P<0.001$).



شکل ۳. تجزیه و تحلیل میزان بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* (A)، نسبت Bax/*Bcl2* (B)، میزان بیان ژن‌های *AKT* و *PTEN* (C) و میزان بیان ژن *Caspase 3* (D) با استفاده از Real-time PCR بررسی شد. همچنین بررسی بیان نسبی ژن‌ها مطابق با معادله Pfaffl انجام گرفت. *β-actin* به‌عنوان کنترل داخلی جهت نرمالیزه کردن نتایج مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های موجود به معنای ± انحراف معیار سه آزمایش جداگانه است. GNPs: نانوذرات طلا. PEG: پلی‌اتیلن گلیکول؛ GNP-PEG: نانوذرات طلای پگیله‌شده ؛ Pan: پانیتومومب؛ GNP-PEG-Pan: نانوذرات پگیله کانژوگه‌شده به پانیتومومب؛ UT :گروه کنترل.

* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل است ($*P< 0.05$ و $**P< 0.01$).

بحث

نتایج نشان می‌دهد که EGFR در ۶۰ تا ۸۰ درصد از سرطان‌های کولورکتال بیش از حد بیان می‌شود، که این وضعیت با پیش‌آگهی ضعیف همراه است. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال هدفمند ضد EGFR نقش مهمی در درمان سرطان کلورکتال ایفا می‌کنند. با این حال، پاسخ درمانی به این آنتی‌بادی‌ها مانند پانیتومومب و سیتوکسیمب به دلیل مکانیسم‌های مقاومت متعدد محدود است.[۱۹] در این مطالعه، با اتصال نانوذرات طلا پگیله‌شده به آنتی‌بادی ضد EGFR پانیتومومب (GNP-PEG-Pan)، سلول‌های سرطانی کلورکتال که نسبت به سلول‌های سالم، گیرنده EGFR بیشتری را بیان می‌کنند، به‌طور هدفمند تیمار شدند. نتایج نشان داد که نانوساختار GNP-PEG-Pan در سلول‌های SW480 با جهش ژن KRAS که مقاوم به پانیتومومب بودند، در مقایسه با آنتی‌بادی تنها، اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیکی بیشتری دارد و به‌نظر می‌رسد که از طریق تأثیر بر روی ژن‌های *AKT*، *PTEN* ، *Bax*، *Bcl2* و *Caspase3* خصوصیات آپوپتوزی بیشتری را القا کرده و بر مقاومت سلولی در مقایسه با پانیتومومب تنها غلبه کرده باشد.

اندازه و شکل ذره‌ای نانوساختار سنتز شده (GNP-PEG-Pan) با استفاده از تکنیک‌های مختلف نظیر میکروسکوپ الکترونی SEM، DLS و Uv-Vis زیر ۵۰ نانومتر و به شکل کروی تعیین گردید. پتانسیل زتای آن نیز ۸/۷mV– گزارش شد. نتایج کشت سلولی و آزمایشات سیتوتوکسیتی نشان داد که در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، نانوساختار GNPs-PEG-Pan بیشترین سیتوتوکسیتی را در مقایسه با آنتی‌بادی و نانوذرات طلای خالی نشان می‌دهد. مقدار IC_{50} برای نانوساختار GNPs-PEG-Pan به‌ترتیب ۶۰، ۱۲۵، ۹۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. یافته‌های این مطالعه با نتایج

مطالعه هلال و همکاران که بر روی رده سلولی HT-29 کلورکتال انجام شده بود، مطابقت دارد. لازم به ذکر است که نانوساختار معرفی‌شده در این مطالعه، از اتصال مستقیم آنتی‌بادی ضد EGFR به نانوذرات طلای غیرپگیله تشکیل شده و از نظر سنتزی با نانوساختار مطالعه حاضر که نانوذرات از طریق لینکر COOH-PEG-SH به آنتی‌بادی کانژوگه‌شده بودند، تفاوت دارد.[۲۰] تکنیک فلوسایتومتری (Annexin V/PI) به‌عنوان یك روش مناسب براي شناسایی آپوپتوز زودرس و آپوپتوز دیررس شناخته شده است.[۲۱] در این مطالعه، تکنیک فلوسایتومتری نشان داد که میزان بروز آپوپتوز در سلول‌های سرطانی SW480 پس از تیمار با GNP-PEG-Pan بالغ بر ۶۷ درصد بوده است. در حالی که نتایج مطالعه کوآن و همکاران در سال ۲۰۱۴، میزان آپوپتوز سلول‌های A549 سرطان ریه پس از تیمار با آنتی‌بادی ضد EGFR کونژوگه با نانوذرات طلا را ۳۸ درصد گزارش کرده بود. [۲۲] تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که ژن‌های موجود در مسیرهای سیگنالینگ و بیان کاهشی یا افزایشی آنها نقش بسزایی در هدایت سلول‌ها به سمت آپوپتوز ایفا می‌کنند. از میان این مسیرها و ژن‌ها، سه مسیر سیگنالینگ مهم شناسایی شده‌اند که در تکثیر و توسعه سلول‌های سرطانی و همچنین در درمان سرطان‌های مختلف نقش دارند. این ژن‌ها شامل ژن‌های *Bax* و *Bcl2* در مسیر واسط میتوکندریایی (mitochondria- intrinsic pathway mediated)، ژن‌های مسیر PI3K-AKT-mTOR شامل *AKT*، *PTEN*، *mTOR*، *FOXO1* و ژن‌های مسیر MAPK/ERK شامل *Ras*، *Raf*، *Mek* و *ERK* هستند.[۲۳] مطالعات نشان داده‌اند که بیان ژن‌های *AKT* و *Bcl2* باعث مهار آپوپتوز و القای تکثیر سلولی می‌شوند، در حالی‌که بیان ژن‌های *Caspase 3, PTEN* و *Bax* آپوپتوز را القاء می‌کنند.[۲۴] با توجه به اینکه فعالیت پروتئین *AKT* به‌صورت تنظیم منفی بیان ژن *PTEN* را کنترل می‌کند، مسیر PTEN/AKT در درمان هدفمند سرطان‌های مختلف اهمیت بسزایی دارند.[۲۵] همچنین مشخص شده است که *کاهش AKT* نیز با فعال شدن مکانیزم آپوپتوز میتوکندری، به‌ویژه بیان *Bax* و *Bcl2* مرتبط بوده و این ارتباط می‌تواند در درمان سرطان مورد توجه قرار گیرد.[۲۶] از سوی دیگر، بیان *Bax* می‌تواند به‌طور غیرمستقیم بیان ژن Bcl2 را مهار کند و باعث افزایش بیان Caspase 3 شود. تشکیل هترودیمر Bax/Bcl2 می‌تواند باعث القای آپوپتوز گردد.[۲۷]

نتایج بررسی مولکولی بیان ژن‌های *AKT*، *PTEN*، *Bax*، *Bcl2* و *Caspase 3* نشان داد که پانیتومومب به‌تنهایی بر روی بیان ژن‌های *AKT* و *PTEN* تأثیر معنی‌داری ندارد و تنها باعث افزایش بیان ژن‌های *Caspase 3* و *Bax* و کاهش معنادار *Bcl2* می‌شود. در حالی‌که تیمار سلول‌های SW480 با نانوساختار GNP-PEG-Pan با افزایش بیان ژن‌های *PTEN*، *Caspase 3* و *Bax* و کاهش بیان ژن‌های *AKT* و *Bcl2* همراه بود. در مطالعه‌ای، چوندونگ ژو و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که نانوذرات طلای کانژوگه‌شده به آنتی‌بادی ضد EGFR باعث افزایش بیان ژن *Caspase 3* در سلول‌های SMMC-7721 سرطان کبد شده است و مطابق مطالعه حاضر، در مقایسه با پانیتومومب تنها، میزان تغییر بیشتری در بیان ژن را به خود اختصاص داده بود.[۲۸]

نتایج میزان بیان *Bax/Bcl2* در مطالعه حاضر که در شکل B3 نشان داده شده است، نشان می‌دهد که این میزان تحت تاثیر نانوساختار هدفمند (GNP-PEG-Pan)، حدود ۷/۱ برابر در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار) افزایش یافته است. در حالی‌که میزان تغییرات بیان *Bax/Bcl2* برای پانیتومومب تنها ۲/۸ برابر به‌دست آمده بود. نانوذرات طلا و نانوذرات طلای پگیله‌شده، اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نداشتند. میزان تغییرات بیان *Bax/Bcl2* برای پانیتومومب تنها با نتایج مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ برای آنتی‌بادی ضد EGFR انجام پذیرفته بود، همخوانی دارد.[۲۹] این مطالعه با وجود نتایج امیدوارکننده، دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد که باید در تحقیقات آتی مورد توجه قرار گیرد. نخست، تمامی آزمایش‌ها در شرایط آزمایشگاهی انجام شده و برای تأیید اثربخشی و ایمنی نانوساختار طراحی‌شده، مطالعات بیشتری در مدل‌های حیوانی و کارآزمایی‌های بالینی ضروری است. دوم، این تحقیق تنها بر روی SW480 متمرکز شده است و بررسی سایر رده‌های سلولی مرتبط می‌تواند به تعمیم‌پذیری یافته‌ها کمک کند. سوم، عوارض جانبی بالقوه این نانوساختار بر سلول‌های سالم و همچنین پاسخ سیستم ایمنی به آن به‌طور کامل ارزیابی نشده است. در نهایت، اثرات طولانی‌مدت این نانوساختار بر سلول‌ها و بافت‌ها بررسی نشده است و این امر نیازمند مطالعات جامع‌تری در آینده است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که نانوذرات طلای کونژوگه‌شده با آنتی‌بادی پانیتومومب (GNP-PEG-Pan) بیشترین میزان سیتوتوکسیتی و مرگ برنامه‌ریزی‌شده را در مقایسه با آنتی‌بادی پانیتومومب و نانوذرات طلا از خود بروز می‌دهند. همچنین، نانوذرات طلا به‌تنهایی تأثیر معنی‌داری در مرگ سلولی ندارند. نتایج بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز (*Bax*، *Bcl2*، *AKT*، *Caspase 3* و *PTEN*) نتایج فاز سلولی را تأیید می‌کند. در مجموع، به نظر می‌رسد کونژوگاسیون آنتی‌بادی پانیتومومب به نانوذرات طلای پگیله‌شده، باعث افزایش اثرات سمیت سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های دارای جهش *KRAS* و مقاوم به آنتی‌بادی پانیتومومب شده است.

در مجموع، نتایج رضایت‌بخش و اثرات درمانی موثرتر آنتی‌بادی مونوکلونال پانیتومومب در ترکیب با نانوذرات طلای پگیله‌شده نسبت به آنتی‌بادی پانیتومومب به‌تنهایی در سلول‌های سرطان کلورکتال، می‌تواند این نانوساختار هدفمند را به‌عنوان کاندیدای مناسب برای درمان سرطان کلورکتال دارای جهش در ژن *KRAS* و حتی غلبه بر مقاوت‌های دارویی رایج معرفی نماید.

قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد و همچنین مرکز تحقیقات ریز فناوری‌های دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تشکر و قدردانی می‌شود.

مشارکت پدیدآوران

طرح موضوع و ایده‌پردازی اولیه و نظارت بر نگارش مقاله توسط اعظم صفری انجام شده است. تهیه پیش‌نویس، انجام آزمایشات سلولی و مولکولی و جمع‌آوری، تحلیل یا تفسیر داده-ها، و نقد و بررسی مطالعه توسط مصطفی اکبرزاده خیاوی و اعظم صفری انجام گرفته است. همچنین، تمامی نویسندگان نسخه نهایی را مطالعه و تایید کرده اند و در مورد بخش های مختلف آن هیچ اختلاف نظری ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این مطالعه توسط مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تبریز (شماره گرنت ۶۸۸۰۵) تأمین گردیده است.

دسترس‌پذیری داده‌ها

تمامی داده‌های مورد استفاده در این مقاله و نتایج آن گنجانده شده است.

ملاحظات اخلاقی

مقاله حاضر مستخرج از طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.TBZMED.VCR.REC.1401.008 می‌باشد.

تعارض منافع

پدیدآوران اعلام می‌کنند که این اثر حاصل یک پژوهش مستقل بوده و هیچ تضاد منافعی با سازمان و اشخاص دیگری ندارد.

References

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: a cancer journal for clinicians. 2024;74(3):229-63. doi: 10.3322/caac.21834
2. Khiavi MA, Safary A, Somi MH. Recent advances in targeted therapy of colorectal cancer: impacts of monoclonal antibodies nanoconjugates. BioImpacts: BI. 2019;9(3):123. doi: 10.15171/bi.2019.16
3. Akbarzadeh-Khiavi M, Farzi-Khajeh H, Somi MH, Safary A, Barar J, Ansari R, et al. Eradication of KRAS mutant colorectal adenocarcinoma by PEGylated gold nanoparticles-cetuximab conjugates through ROS-dependent apoptosis. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2022;653:129890. doi: 10.1016/j.colsurfa.2022.129890
4. Akbarzadeh-Khiavi M, Torabi M, Olfati AH, Rahbarnia L, Safary A. Bio-nano scale modifications of melittin for improving therapeutic efficacy. Expert Opinion on Biological Therapy. 2022;22(7):895-909. doi: 10.1080/14712598.2022.2088277
5. Gutiérrez TJ. Bioengineered nanoparticles in cancer therapy, Volume III. Frontiers in Molecular Biosciences. 2024;11:1356081. doi: 10.3389/fmolb.2024.1356081
6. Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor–positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. Cancer. 2002;94(5):1593-611. doi:10.1002/cncr.10372
7. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. Annals of oncology. 2005;16(1):102-8. doi: 10.1093/annonc/mdi006
8. Cai WQ, Zeng LS, Wang LF, Wang YY, Cheng JT, Zhang Y, et al. The latest battles between EGFR monoclonal antibodies and resistant tumor cells. Frontiers in oncology. 2020;10:1249. doi: 10.3389/fonc.2020.01249
9. Yuan M, Wang Z, Lv W, Pan H. The role of anti-EGFR monoclonal antibody in mCRC maintenance therapy. Frontiers in Molecular Biosciences. 2022;9:870395. doi: 10.3389/fmolb.2022.870395
10. Cassidy J, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. XELOX vs FOLFOX-4 as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: NO16966

updated results. British journal of cancer. 2011;105(1):58-64. doi: 10.1038/bjc.2011.201.
11. Gressett SM, Stanford BL, Hardwicke F. Management of hand-foot syndrome induced by capecitabine. Journal of Oncology Pharmacy Practice. 2006;12(3):131-41. doi: 10.1177/1078155206069242.
12. Häfner MF, Debus J. Radiotherapy for colorectal cancer: current standards and future perspectives. Visceral medicine. 2016;32(3):172-7. doi: 10.1159/000446486
13. Khan H, Bangar A, Grewal AK, Bansal P, Singh TG. Caspase-mediated regulation of the distinct signaling pathways and mechanisms in neuronal survival. International Immunopharmacology. 2022;110:108951. doi: 10.1016/j.intimp.2022.108951
14. Świechowski R, Pietrzak J, Wosiak A, Mik M, Balcerczak E. Genetic Insights into Colorectal Cancer: Evaluating PI3K/AKT Signaling Pathway Genes Expression. International Journal of Molecular Sciences. 2024;25(11):5806. doi: 10.3390/ijms25115806
15. Zhang J, Zhang Y, Lin X, Han X, Meredith KL, Li Z. The effects of the tumor suppressor gene PTEN on the proliferation and apoptosis of breast cancer cells via AKT phosphorylation. Translational Cancer Research. 2023;12(7):1863. doi: 10.21037/tcr-23-826
16. Watson AJ. Apoptosis and colorectal cancer. Gut. 2004;53(11):1701-9. doi: 10.1136/gut.2004.052704
17. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. BMC cell biology. 2013;14:1-9. doi: 10.1186/1471-2121-14-32
18. Zhou M, Liu X, Li Z, Huang Q, Li F, Li CY. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. International journal of cancer. 2018;143(4):921-30. doi: 10.1002/ijc.31374.
19. Li QH, Wang YZ, Tu J, Liu CW, Yuan YJ, Lin R, et al. Anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: mechanisms and potential regimens of drug resistance. Gastroenterology report. 2020;8(3):179-91. doi: 10.1093/gastro/goaa026
20. El Hallal R, Lyu N, Wang Y. Effect of cetuximab-conjugated gold nanoparticles on the cytotoxicity and phenotypic evolution of colorectal cancer cells. Molecules. 2021;26(3):567. doi: 10.3390/molecules26030567
21. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Flow cytometry-based apoptosis detection. Apoptosis: methods and protocols, Second Edition. 2009;559:19-32. doi: 10.1007/978-1-60327-017-5_2
22. Qian Y, Qiu M, Wu Q, Tian Y, Zhang Y, Gu N, et al. Enhanced cytotoxic activity of cetuximab in EGFR-positive lung cancer by conjugating with gold nanoparticles. Scientific reports. 2014;4(1):7490. doi: 10.1038/srep07490
23. Rodríguez-González J, Gutiérrez-Kobeh L. Apoptosis and its pathways as targets for intracellular pathogens to persist in cells. Parasitology Research. 2024;123(1):60. doi: 10.1007/s00436-023-08031-x
24. Suroto H, Asriel A, De Vega B, Samijo SK. Early and late apoptosis protein expression (Bcl-2, bax and p53) in traumatic brachial plexus injury. Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2021;21(4):528-32.
25. Georgescu MM. PTEN tumor suppressor network in PI3K-Akt pathway control. Genes & cancer. 2010;1(12):1170-7. doi: 10.1177/1947601911407325
26. Kale J, Kutuk O, Brito GC, Andrews TS, Leber B, Letai A, et al. Phosphorylation switches Bax from promoting to inhibiting apoptosis thereby increasing drug resistance. EMBO reports. 2018;19(9):e45235. doi: 10.15252/embr.201745235
27. Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. Frontiers in oncology. 2022;12:985363. doi: 10.3389/fonc.2022.985363
28. Zhu C, Wang L, Cai Y, Wang G, Xu H, Wan Y, et al. Enhanced radiation effect on SMCC7721 cells through endoplasmic reticulum stress induced by C225-GNPs in vitro and in vivo. Oncology Letters. 2018;15(4):4221-8. doi: 10.3892/ol.2018.7864
29. Lin Z, Zhang L, Zhou J, Zheng J. Silencing Smad4 attenuates sensitivity of colorectal cancer cells to cetuximab by promoting epithelial-mesenchymal transition. Molecular medicine reports. 2019;20(4):3735-45. doi: 10.3892/mmr.2019.10597