

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-Khiavi¹ , Azam Safary^{2,3*} 

¹Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Connective Tissue Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Biomedicine Institute, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 28 Aug 2024

Revised: 4 Jan 2025

Accepted: 8 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):274-286. 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 $\mu\text{g/mL}$), 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 $\mu\text{g/mL}$ and 169 $\mu\text{g/mL}$ at 48 and 72 hours, respectively. In contrast, GNP-PEG-Pan exhibited IC50 values of 160 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, and 97 $\mu\text{g/mL}$ 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.

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 خیای^۱، اعظم صفری^{۲،۳*}

^۱مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

^۲مرکز تحقیقات بیماری‌های بافت همبند، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

^۳مرکز تحقیقات ریز فناوری‌های دارویی، پژوهشکده بیومدیسین، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

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 پانیتوموماب 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.

روش کار. ابتدا نانوساختار هدفمند بر پایه نانوذرات طلا سنتز، پیگله و به پانیتومومب کوئژوگه شد (GNP-PEG-Pan). سپس، ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی آن تعیین گردید. اثرات سیتوتوکسیک این نانوساختار در سلول‌های سرطان کولورکتال SW480 با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. تأثیر 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 تأثیر 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 کولورکتال 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 کولورکتال دارای جهش KRAS است. بر این اساس، می‌توان آنتی‌بادی نانوفرموله‌شده را به‌عنوان یک درمان نوین برای سرطان کولورکتال 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.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۳/۶/۷

اصلاح نهایی: ۱۴۰۳/۱۰/۱۵

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۹

انتشار برخط: ۱۴۰۴/۳/۲۶

کلیدواژه‌ها:

- سرطان کولورکتال
- پانیتومومب
- نانوذرات طلا
- آپوپتوز

مقدمه

روش‌های شیمی‌درمانی متداول مانند ۵-فلوروراسیل، کپسیتابین و آگزال‌پلاتین، علاوه بر عوارض جانبی شدید، با مقاومت دارویی همراه هستند که این امر لزوم جستجوی روش‌های درمانی جدید را برجسته می‌کند.^{۱،۲} 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

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 ۱۰ درصد 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

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: azamsafary@yahoo.com

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز 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 به سرعت گسترش یافته است.^{۴، ۵} به منظور 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 به صورت ترکیبی یا کوژوگه با نانوذرات مختلف از جمله نانولیپوزوم، نانومیسل، نانودندریمر، نانولیپرها (PLGA)، کوانتوم دات (QD) و نانوذرات فلزی مانند طلا و نقره و سوپرمگنیت‌ها مورد بررسی در ابعاد درون تنی (*In vitro*) و برون تنی (*In vivo*) قرار گرفته‌اند.^۶ برخی از این نانوداروهای هدفمند، مانند نانوذرات طلای کوژوگه 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، به ویژه 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، به ویژه سلول‌های با منشأ اپیتلیال، میزان بیان EGFR در محدوده ۴۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ 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.^{۷، ۸} 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 به طور انتخابی این گیرنده را هدف قرار می‌دهند.^۸ آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد EGFR باعث القای درونی‌سازی گیرنده‌های EGFR در سلول‌های سرطانی، به ویژه در سرطان کلورکتال می‌شوند.^۹ مطالعات نشان داده‌اند که آنتی‌بادی‌های ضد EGFR مانند سیتوکسمب (آنتی‌بادی مونوکلونال IgG1 کایمیریک انسان/ موش) و پانیتومومب (آنتی‌بادی 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 لیگندهای 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 نانوحامل‌ها یا نانوذرات آلی/غیرآلی است که می‌تواند به عنوان یک استراتژی بالقوه برای تقویت درمان‌های هدفمند علیه EGFR به شمار آید.^{۱۱} از میان نانوذرات غیرآلی، نانوذرات طلا به خاطر اثرات سیتوتوکسیک کمتر، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. نانوذرات طلایی که با آنتی‌بادی‌های ضد سرطان کانژوگه شده‌اند، قادرند به طور موثری به سلول‌های سرطانی متصل شوند. از سوی دیگر، وقتی سلول‌های سرطانی به طلا متصل می‌شوند، نور را منعکس کرده و به راحتی از سلول‌های سالم تشخیص داده می‌شوند.^{۱۲}

مطالعه‌ای نشان داده است که هرگونه اختلال در روند آپوپتوز می‌تواند منجر به سرطان شود. بنابراین، بسیاری از روش‌های درمانی سرطان بر اساس القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی طراحی شده‌اند.^{۱۳} از جمله ژن‌های مهمی که در آپوپتوز سلول‌های سرطان کلورکتال دخیل هستند، می‌توان به ژن‌های *AKT*، *PTEN*، خانواده *Caspase*‌ها و ژن‌های میتوکندریایی *Bax* و *Bcl2* اشاره کرد.^{۱۴} ژن *PTEN* که بر روی کروموزوم ۱۰ انسانی قرار دارد، به عنوان 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؛ به گونه‌ای که *Bax* یک پروتئین پروآپوپتوتیک است که فرایند مرگ سلولی را تحریک می‌کند، در حالی که *Bcl2* یک پروتئین ضدآپوپتوتیک است که مانع آپوپتوز می‌شود. در سرطان کولورکتال، کاهش بیان *Bax* و افزایش بیان *Bcl2*

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 ۳۳٪ میکرومولار نانوذرات طلای پگیله شده، ۳ میکرولیتر EDC/NHS (با غلظت ۴٪ مولار EDC و ۱۱۸٪ مولار NHS) اضافه شد. مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و تحت دور ملایم آنکوبه 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 سانتریفیوژ 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 کونژوگه شده 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 کونژوگه شده روی نانوذرات طلای پگیله شده (GNP) نیز با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد:^۳

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

رده سلولی SW480 از انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با ۱۰٪ FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک بنی‌سیلین/استریتومایسین (۵۰۰۰ U/mL)، در انکوباتور با دمای ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO₂ 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 شکسته شدن نمک تترازولیوم MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) زرد رنگ به کریستال‌های فورمازان بنفش توسط سلول‌های متابولیک فعال انجام شد.

موجب فرار سلول‌های سرطانی از آپوپتوز و مقاومت آنها در برابر درمان‌ها می‌شود.^{۱۶}

کاسپازها یک خانواده ۱۵ عضوی از سیستمین 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} با این حال، مطالعات اخیر نشان می‌دهد که کاسپاز ۳ علاوه بر نقش آپوپتوتیک، در ترویج عود و رگ‌زایی تومور نیز نقش دارد. به نظر می‌رسد که هدف‌گیری درمانی کاسپاز ۳ نه تنها 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 نانو ساختاری مبتنی بر نانوذرات طلای پگیله شده هدفمند است که شامل نانوذرات طلای پگیله کائوگه شده با آنتی‌بادی ضد EGFR پانیتومومب می‌باشد. در این پژوهش، تأثیرات این نانو ساختار در دو سطح سلولی (سمیت سلولی و آپوپتوز) و مولکولی (بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز از جمله Caspase3, Bcl2, Bax, AKT, PTEN) 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 HAuCl₄ (با غلظت 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

در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ 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 پگیله‌شده با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد EGFR پانیتومومب و سری پنجم 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 ستونی شرکت یکتا تجهیز آزما و طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. برای سنتز cDNA از روی mRNA تام، از کیت شرکت TAKARA مطابق با دستورالعمل کیت استفاده شد. نمونه‌های cDNA تا زمان آنالیز در ۲۰ - درجه سانتی-گراد نگهداری شدند.

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

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 کوثر وگه 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 IC₅₀ برا هر ترکیب محاسبه گردید.

در مطالعه حاضر، رده سلولی SW480 در پنج سری و در سه تکرار در پلیت‌های ۹۶ 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 پگیله‌شده با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد EGFR پانیتومومب و سری پنجم بدون تیمار به‌عنوان گروه کنترل، بدون افزودن ترکیبات

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'-AGGTTTCTCTGCTCCTGGT-3'
Caspase 3	Forward: 5'-GTGGAAGTACGATGATATGGC-3'
	Reverse: 5'-CGCAAAGTGACTGGATGAACC-3'
Bax	Forward: 5'-CTACAGGGTTTCATCCAG-3'
	Reverse: 5'-CCAGTTTCATCTCCAATTCG-3'
Bcl2	Forward: 5'-GTGGATGACTGAGTACCT-3'
	Reverse: 5'-CCAGGAGAAATCAACAGAG-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'

جدول ۲. 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	۰/۶۱۱	-۱۰/۵
GNP-PEG-Pan	۴۰	۰/۴۹۲	-۸/۷

DLS: پراکندگی دینامیکی نور؛ GNPs: نانوذرات طلا؛ PEG: پلی تیلن گلیکول؛ GNP-PEG: نانوذرات طلای پیگیده شده؛ GNP-PEG-Pan: نانوذرات پیگیده کانتروگه شده به پانیتومومب.

ساعت) مطابق پنل D، شکل ۱ برآورد شد. مقدار IC_{50} در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت برای پانیتومومب به ترتیب $180 \mu\text{g/mL}$ و $169 \mu\text{g/mL}$ برای GNP-PEG-Pan در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب $160 \mu\text{g/mL}$ ، $120 \mu\text{g/mL}$ ، $97 \mu\text{g/mL}$ 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 غیرپیگیده شده ($13/34\%$) بیشتر از نانوذرات طلای پیگیده شده ($9/29\%$) می‌باشد. تفاوت میزان آپوپتوز در این دو گروه در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). میزان آپوپتوز برای پانیتومومب ($23/9\%$) بود که در مقایسه با گروه کنترل تغییرات آپوپتوتیک معناداری نشان داد ($P < 0/05$). نانوذرات طلای پیگیده کانتروگه شده با آنتی‌بادی پانیتومومب بیشترین درصد آپوپتوز ($67/29\%$) و تغییرات آپوپتوتیک را نسبت به گروه کنترل نشان داد و اختلاف آنها از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0/001$).

پس از تهیه مخلوط واکنش در دماهای انتخاب شده، بیان هر یک از ژن‌های *AKT*، *PTEN*، *Caspase 3*، *Bax*، *Bcl2* و *β -actin* به وسیله 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 تیمار شده با نانوذرات طلای پیگیده شده و پانیتومومب تغییرات معنی‌داری از لحاظ آماری در بیان ژن‌های *AKT* و *PTEN* نشان ندادند. بیان ژن‌های *Caspase 3* و *Bax* در سلول‌های تیمار شده با آنتی‌بادی پانیتومومب برخلاف تیمار با نانوذرات طلای پیگیده شده به‌تنهایی به‌طور معنی‌دار افزایش و بیان ژن *Bcl2* کاهش یافته بود. در حالی که 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، نانو ساختار پانیتومومب افزایش بیشتری در بیان ژن‌های *PTEN* و *Bax* را نشان داد.

از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند. برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها، از آزمون‌های آماری One-Way ANOVA و t-test استفاده شد و سطح معنی‌داری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

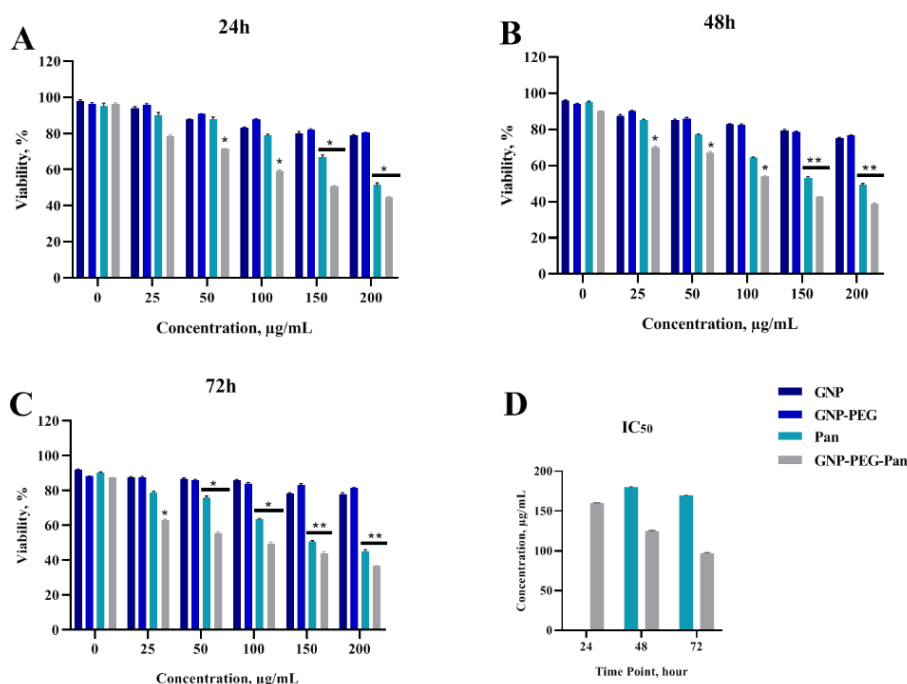
یافته‌ها

تصویر شماتیک نانو ساختار سنتز شده در جدول ۲ ارائه شده است. اندازه نانوذرات طلای سنتز شده به این صورت تعیین شد: نانوذرات طلای خالص (GNPs): ۲۱ نانومتر، نانوذرات طلای پیگیده شده (GNP-PEG): ۲۸ نانومتر و نانوذرات طلای کانتروگه شده با آنتی‌بادی (GNP-PEG-Pan): ۴۰ نانومتر.

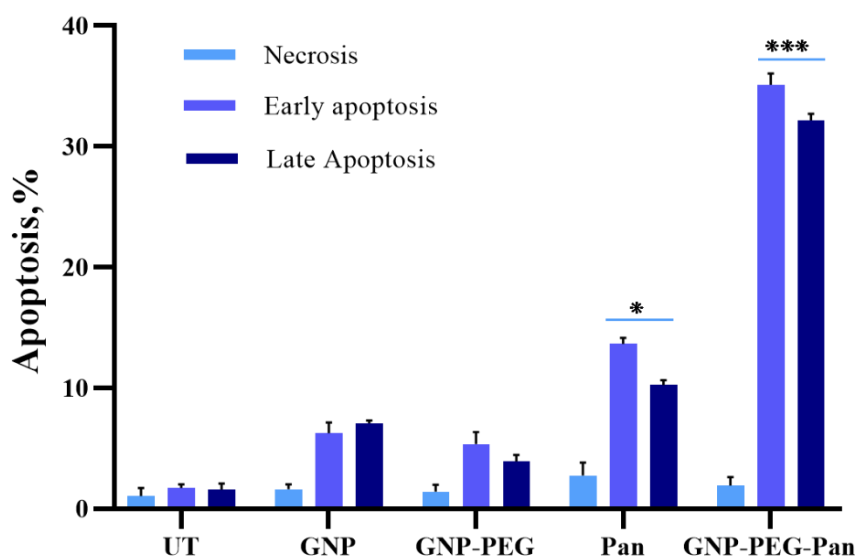
افزایش مثبت در مقدار پتانسیل زتا طی مراحل نانوفرمولاسیون، از مقدار $-17/9$ میلی‌ولت در نانوذرات خالی تا $-8/7$ میلی‌ولت در نانوذرات پیگیده شده کانتروگه با پانیتومومب، تاییدی بر صحت کانتروگاسیون محسوب می‌شود. نتایج حاصل از کیت BCA نشان داد که حدود ۸۲ درصد از آنتی‌بادی مورد استفاده، به نانوذرات طلای پیگیده کانتروگه شده است.

برای ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات طلا، آنتی‌بادی پانیتومومب و نانو ساختار سنتز شده (GNP-PEG-Pan)، از روش استاندارد MTT در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استفاده شد. غلظت‌های مورد استفاده برای سلول‌ها به ترتیب ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($\mu\text{g/mL}$) 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 پیگیده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود و مقدار IC_{50} برای این گروه تعیین نشد. همچنین، تیمار با پانیتومومب در ۲۴ ساعت تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی سلول‌ها نداشت و منجر به تعیین IC_{50} نشد.

بر اساس معادله حاصل از رسم نمودار، مقدار IC_{50} برای آنتی-بادی پانیتومومب در بازه‌های زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت و برای نانو ساختار GNP-PEG-Pan در هر سه بازه زمانی (۲۴، ۴۸ و ۷۲

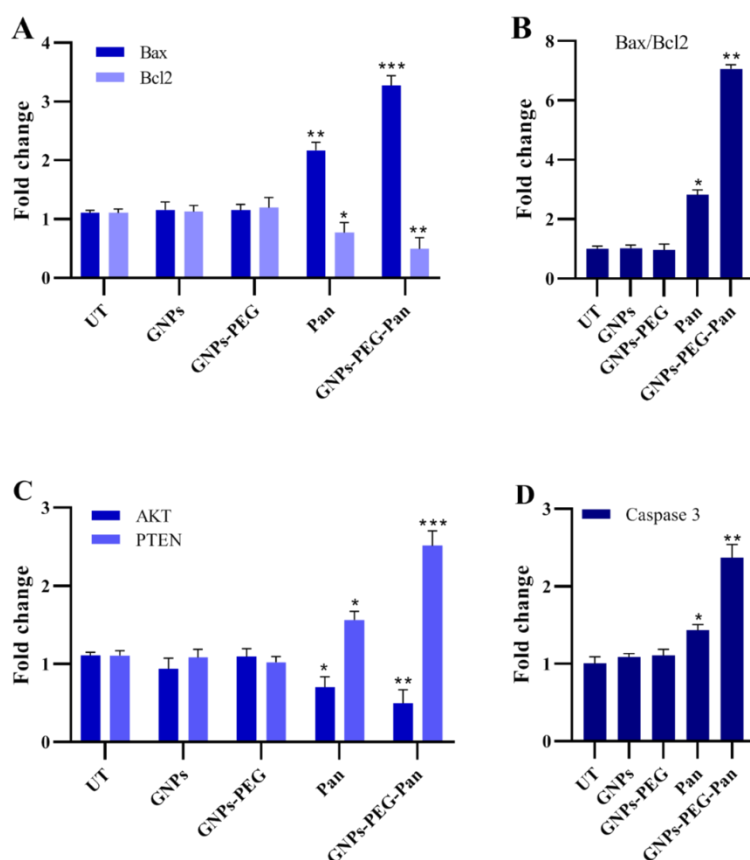


شکل ۱. نمودار زنده‌مانی سلول‌های سرطانی SW480. پتل‌های A، B و C به ترتیب نشان‌دهنده تیمار سلول‌های SW480 با غلظت‌های مختلف (۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) GNP-Pan، GNP-Pan، GNP-Pan برای بازه‌های زمانی ۴۸، ۷۲ ساعت هستند. (D) مقادیر IC50 مقایسه‌ای Pan و GNP-PEG در سلول‌های SW-480 در انکوباسیون ۴۸ و ۷۲ ساعت می‌باشد. داده‌های موجود به معنای $\pm$ انحراف معیار سه آزمایش جداگانه است. GNP: نانوذرات طلا. PEG: پلی‌اتیلن گلیکول؛ GNP-PEG: نانوذرات طلای پیچیده شده؛ Pan: پانتومومب؛ GNP-PEG-Pan: نانوذرات پیچیده کائوگه‌شده به پانتومومب؛ 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 فلو سایتومتری (Annexin V). GNP: نانوذرات طلا. PEG: پلی اتیلن گلیکول؛ GNP-PEG: نانوذرات طلا پیکیله شده؛ Pan: پانیتومومب؛ GNP-PEG-Pan: نانوذرات پیکیله کاذوگه شده به پانیتومومب؛ UT: گروه کنترل یا بدون تیمار.

* نشان دهنده تفاوت معنی دار، در مقایسه با گروه کنترل است ($P < 0.05$ و $P < 0.001$).



شکل ۳. تجزیه و تحلیل میزان بیان ژنهای *Bcl2* و *Bax* (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 به عنوان کنترل داخلی جهت نرمالیزه کردن نتایج مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های موجود به معنای $\pm$ انحراف معیار سه آزمایش جداگانه است. GNP: نانوذرات طلا. PEG: پلی اتیلن گلیکول؛ GNP-PEG: نانوذرات طلای پیگیده شده؛ Pan: پانیتومومب؛ GNP-PEG-Pan: نانوذرات پیگیده کاتر و گه شده به پانیتومومب؛ UT: گروه کنترل. * نشان دهنده تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل است ($P < 0.05$ و $P < 0.01$).

بحث

سیتوتوکسیک و آپوپتوتیکی بیشتری دارد و به نظر 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 $-8/7 \text{ mV}$ گزارش شد. نتایج کشت سلولی و آزمایشات سیتوتوکسیک نشان داد که در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، نانوساختار GNP-PEG-Pan بیشترین سیتوتوکسیکیتی را در مقایسه با آنتی‌بادی و نانوذرات طلای خالی نشان می‌دهد. مقدار IC_{50} برای نانوساختار GNP-PEG-Pan به ترتیب ۶۰، ۱۲۵، ۹۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. یافته‌های این مطالعه با نتایج

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 کولورکتال 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 پیگیده شده به آنتی‌بادی ضد EGFR پانیتومومب (GNP-PEG-Pan)، سلول‌های سرطانی کولورکتال 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

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 تأثیر نانوساختار هدفمند (GNP-PEG-Pan)، حدود ۷/۱ برابر در مقایسه با گروه کنترل (بدون تیمار) افزایش یافته است. در حالی که میزان تغییرات بیان *Bax/Bcl2* برای پانیتومومب تنها ۲/۸ برابر به دست 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 کانژوگه‌شده با آنتی‌بادی پانیتومومب (GNP-PEG-Pan) بیشترین میزان سیتوتوکسیته 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 کوژوگاسیون 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.

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.^{۳۰} تکنیک فلوسایتومتری (Annexin V/PI) به‌عنوان یک روش مناسب برای شناسایی آپوپتوز زودرس و آپوپتوز دیررس شناخته شده است.^{۳۱} 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 کوژوگه با نانوذرات طلا را ۳۸ درصد گزارش کرده بود.^{۳۲} 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 *FOXO1*، *mTOR*، *PTEN*، *AKT* و ژن‌های مسیر MAPK/ERK شامل *Ras*، *Raf*، *Mek* و *ERK* هستند.^{۳۳} مطالعات نشان داده‌اند که بیان ژن‌های *AKT* و *Bcl2* باعث مهار آپوپتوز و القای تکثیر سلولی می‌شوند، در حالی که بیان ژن‌های *PTEN*، *Caspase 3* و *Bax* آپوپتوز را القاء می‌کنند.^{۳۴} 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.^{۳۵} 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.^{۳۶} از سوی دیگر، بیان *Bax* می‌تواند به‌طور غیرمستقیم بیان ژن *Bcl2* را مهار کند و باعث افزایش بیان *Caspase 3* شود. تشکیل هترودایمر *Bax/Bcl2* می‌تواند باعث القای آپوپتوز گردد.^{۳۷}

نتایج بررسی مولکولی بیان ژن‌های *AKT*، *PTEN*، *Bax* و *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 حالی که تیمار سلول‌های SW480 با نانوساختار GNP-PEG-Pan با افزایش

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 منافی با سازمان و اشخاص دیگری ندارد.

در مجموع، نتایج رضایت‌بخش و اثرات درمانی موثرتر آنتی‌بادی مونوکلونال پانیتومومب در ترکیب با نانوذرات طلا 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 داده‌ها، و نقد و بررسی مطالعه توسط مصطفی اکبرزاده خیای و اعظم صفری انجام گرفته است. همچنین، تمامی نویسندگان نسخه نهایی را مطالعه و تایید کرده‌اند و در مورد بخش‌های مختلف آن هیچ اختلاف نظری ندارند.

References

- 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
- 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
- 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
- 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
- Gutiérrez TJ. Bioengineered nanoparticles in cancer therapy, Volume III. Frontiers in Molecular Biosciences. 2024;11:1356081. doi: 10.3389/fmolb.2024.1356081
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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, Balcerzak 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