

چکیده پایان‌نامه شماره ۲۷۰۰۸ کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه. سال تحصیلی ۱۴۰۳-۱۴۰۴

نگارنده: روشن جهانگشای ساریجلو

عنوان پایان‌نامه: ارزیابی اثرات ضد سرطانی نیتازوکسانید بارگذاری شده در آگروزوم های مشتق از سلولهای بنیادی مزانشیمال تیمار شده با لیپوپلی ساکارید بر روی رده سلولی سرطان پستان (4T1)

چکیده

مقدمه: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین و کشنده‌ترین بدخیمی‌ها در زنان است و با نرخ بالای مرگومیر و بروز مقاومت دارویی، همچنان چالش بزرگی در درمان‌های استاندارد به شمار می‌رود. محدودیت‌های داروهای شیمی‌درمانی مانند سمیت سیستمیک و مقاومت چنددارویی، نیاز به توسعه استراتژی‌های نوین و هدفمند دارورسانی را دوچندان کرده است. در این راستا، استفاده از آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال به عنوان حامل‌های زیستی دارو به دلیل زیست‌سازگاری بالا، قابلیت هدفمندی و توانایی عبور از موانع بیولوژیک مورد توجه قرار گرفته است. نیتازوکسانید، یک داروی ضدانگل با پتانسیل ضدتوموری، به عنوان یک مولکول کوچک کم‌عوارض، می‌تواند از طریق مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با آپوپتوز و تکثیر سلولی، اثرات ضدسرطانی قابل توجهی داشته باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان موش Balb/c استخراج، و پس از تیمار با LPS، آگروزوم‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمال به روش رسوبدهی جداسازی و با استفاده از تکنیک‌های DLS و فلوسایتومتری مشخصه‌یابی شدند. غلظت پروتئین‌های آگروزومی نیز با روش برادفورد اندازه‌گیری شد. سپس نیتازوکسانید به روش اولتراسوند و انکوباسیون، درون آگروزوم‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با LPS بارگذاری گردید. سلول‌های سرطان پستان (4T1) کشت داده شده و با غلظت‌های مختلفی از آگروزوم‌های خالی، آگروزوم‌های بارگذاری شده با نیتازوکسانید و نیتازوکسانید به تنهایی تیمار شدند. سمیت سلولی تیمارهای مختلف توسط آزمون MTT و LDH ارزیابی شد. میزان بروز آپوپتوز و نکروز با استفاده از آنالیز فلوسایتومتری (رنگ‌آمیزی Annexin V/PI) و میکروسکوپ فلورسانس (رنگ‌آمیزی AO/PI) مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی توانایی کلونی‌زایی، آزمون کلونوزنیک اجرا شد. فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ با بهره‌گیری از کیت اختصاصی و ثبت جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز (BAX و BCL2)، RNA کل سلول‌های تیمار شده و کنترل استخراج و پس از سنتز cDNA، بیان ژن‌ها با استفاده از qRT-PCR و ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع تعیین گردید. در این پژوهش، پس از جداسازی و مشخصه‌یابی آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمال (با و بدون تیمار LPS) و بارگذاری نیتازوکسانید در آن‌ها، ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی و راندمان انکپسولاسیون بررسی شد که اندازه ذرات در محدوده ۱۲۴ تا ۱۹۰ نانومتر و کارایی بارگذاری دارو در حدود ۵۸ تا ۶۲ درصد به دست آمد. بررسی زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی 4T1 با آزمون MTT نشان داد که نیتازوکسانید بارگذاری شده در آگروزوم‌های تیمار شده با LPS (NTZ-EXO-LPS) بیشترین سمیت سلولی را به ویژه پس از ۴۸ ساعت نشان داد و کمترین IC50 را در مقایسه با سایر تیمارها داشت. نتایج آزمون LDH نیز این یافته را تأیید کرده و گروه NTZ-EXO-LPS بالاترین سطح رهایش LDH را ایجاد کرد. ارزیابی آپوپتوز با روش‌های AO/PI و فلوسایتومتری نشان داد که تیمار NTZ-EXO-LPS بیشترین القای

آپوپتوز ثانویه را نسبت به سایر گروه‌ها به همراه داشت، و بیشترین درصد نکروز نیز مربوط به گروه نیتازوکسانید به تنهایی بود، در حالی که آگروزوم‌های بدون دارو تأثیر چندانی بر مرگ سلولی نداشتند. در آزمون کلونوزنیک نیز NTZ-EXO-LPS قوی‌ترین اثر مهارى بر توانایی کلنی‌زایی سلول‌ها را نشان داد. همچنین سنجش فعالیت کاسپاز-۳ بیانگر افزایش معنادار این آنزیم در گروه‌های تیماری بود که بیشترین سطح آن در گروه NTZ-EXO-LPS مشاهده شد. نتایج qRT-PCR نیز نشان داد که تیمار با NTZ-EXO-LPS باعث افزایش چشمگیر بیان ژن پروآپوپتوتیک BAX و کاهش نسبی بیان ژن ضدآپوپتوزی BCL2 گردید، به‌طوری‌که نسبت BAX/BCL2 در این گروه به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها بود. در مجموع، یافته‌ها نشان داد که بارگذاری نیتازوکسانید در آگروزوم‌های تیمار شده با LPS می‌تواند بیشترین اثر ضدسرطانی را از طریق القای آپوپتوز، مهار تکثیر و کاهش بقا در سلول‌های سرطانی 4T1 داشته باشد. با این حال برای تأیید این نتایج و بررسی کامل پتانسیل درمانی این فرمولاسیون، انجام مطالعات بیشتر آزمایشگاهی و کارآزمایی‌های بالینی ضروری است.

کلمات کلیدی: آگروزوم، سلول‌های بنیادی مزانشیمال، نیتازوکسانید، سلول‌های سرطانی، آپوپتوز