

فرشته کشتدار، دانشجوی گروه ژنتیک، دانشکده ی فناوری های نوین، واحد علوم دارویی  
دکتر طاهر ناجی، دانشیار گروه علوم پایه داروسازی، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی

## بررسی اثر اگزوزوم های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی و توانایی مهاجرت سلول های سرطان تخمدان

روش درمانی دیگر استفاده از هورمون درمانی است. استفاده از داروی Tamoxifen که اثرات ضد استروژن دارد همراه با شیمی درمانی در درمان سرطان تخمدان به کار می رود (۵). یکی از روش های ممکن برای بهبود سرطان تخمدان استفاده از Monoclonal antibody است که به گونه ی گزینشی سلول های تومور بیان کننده آنتی ژنهای وابسته به تومور را هدف قرار می دهد و بنابراین مزایای بالقوه ارائه می دهد، همانند نداشتن عوارض جانبی cytotoxic برای بافت سالم که در پیامد عوامل شیمی درمانی سنتی به وجود می آید. یکی از این روش ها استفاده از bevacizumab (avastin) که یک مونوکلونال آنتی بادی است که باعث مهار VEGF و در نتیجه آنژیوژنز می شود. هم چنین bevacizumab را همراه با شیمی درمانی نیز استفاده می کنند. که شواهد نشان داده باعث کاهش رشد تومور، متاستاز، کاهش آسیت ها و افزایش مرگ سلول تومور در مدل سرطان تخمدان می شود. در سرطان تخمدان EGFR نیز overexpress می شود. مطالعات preclinical نشان داد که مهار آن توسط مهار کننده های تیروزین کیناز مثل erlotinib و آنتی بادی مونوکلونال بر علیه EGFR مثل cetuximab انجام می شود. یک روش دیگر درمانی استفاده از مهار کننده های PARP در جهش های BRCA سرطان تخمدان است. هدف قرار دادن مسیر mTOR و PI3K/AKT از دیگر روش های درمانی محسوب می شود (۶, ۷). آنژیوژنز یا رگزایی روندی است که در آن مویرگ تازه از رگ هایی که از پیش موجود، به وجود می آید. این پدیده یکی از ویژگی های اصلی سرطان است که

سرطان تخمدان یکی از کشنده ترین بدخیمی های زنان در کشورهای پیشرفته است. هر ساله سرطان تخمدان ۲۰۴۰۰۰ زن را در سراسر جهان درگیر می کند. علت مرگ و میر بالا، تشخیص سخت بیماری در مرحله های آغازین، و فقدان یک روش تشخیصی زود هنگام برای سرطان تخمدان است. نرخ بقای ۵ ساله در مرحله های ۱ و ۲ حدود ۹۰ درصد تخمین زده می شود. بهترین روش برای تشخیص در گام های آغازین سرطان تخمدان: استفاده از سونوگرافی ترانسواژینال (TVS) و اندازه گیری بیومارکر سرم است. بهترین بیومارکر برای سرطان تخمدان CA-125 است که توسط اپیتلیوم تخمدان سالم بیان نمی شود. بالا بودن CA-125 با تومورهای سرروز ارتباط دارد که شایع ترین و کشنده ترین زیر گروه سرطان تخمدان است (۱, ۲). یکی از چالش های بزرگ در تشخیص و درمان سرطان تخمدان ماهیت ناهمگنی آن است. رویهمرفته تومورهای تخمدان می تواند یکی از ۳ گونه سلول زیر برخواسته باشد:

Epithelial cells (۲) Sex cord-stromal cell (۳) Germ cell (Oocytes) (۱)

تومورهای برخواسته از سلول های اپیتلیال تخمدان شکل غالب و کشنده بیماری را به وجود می آورند. سرطان اپیتلیال تخمدان خود یک گروه ناهمگن از نوپلاسم هستند که گستره ی گسترده ای از مورفولوژی تومور، نمود های بالینی و دگرگونی های ژنتیکی را نشان می دهند (۱). برای خانم های با مرحله های پیشرفته سرطان تخمدان پس از انجام جراحی، شیمی درمانی استاندارد با ترکیب Carboplatin و Paclitaxel انجام می شود. مشخص شده که شیمی درمانی با Platinum باعث بهبود پیش آگهی در خانم هایی با بدخیمی پیشرفته سرطان تخمدان می شود. به تازگی از نوع دیگری از داروها برای مهار رگزایی های خونی تازه (مهار آنژیوژنز) برای جلوگیری از رشد و گسترش تومورهای تخمدان استفاده می شود (۳, ۴).



وابسته به تشکیل غیرعادی رگهای خونی تازه برای یاری به بالندگی تومور، متاستاز و مهاجرت است. سلول های اندوتلیال توانایی تکثیر، مهاجرت و تشکیل لوله را دارند، که همه این ها در آنژیوژن نقش دارند. در بالغین تغییر اندکی در سلول های اندوتلیال رخ می دهد. گذر از مرحله پیش عروقی

به فنوتیپ پر عروق طی فرایند *Angiogenic switch*

رخ می دهد. می توان نتیجه گرفت که رگ زایی یک فرایند مهم در بدن است و از راه تعادل بین فاکتورهای برانگیزنده و مهار کننده رگ زایی تنظیم می شود و اگر این تعادل از بین برود زمینه بروز بیماری و رشد تومور فراهم می شود. بافت توموری مواد غذایی واکسیژن را تا محدوده ۱-۲ mm جذب می کند و از آن به بعد نیازمند ایجاد رگ های تازه ای برای تغذیه است و به این ترتیب با بزرگ شدن حجم تومور محیط سلول های توموری هیپوکسیک شده و شروع به ترشح چندین فاکتور رشد می کند که منجر به تشکیل رگ های خونی تازه می شود. مهم ترین محرک های فیزیولوژیک رگ زایی، هیپوکسی و التهاب هستند. افزون بر آن برخی فاکتورهای اختصاصی مانند: فاکتور رشد رگی، سایتوکاین های التهابی، مولکول های چسباننده و نیتریک اکساید رگ زایی را تحریک یا مهار می کنند. فاکتورهای فعال کننده رگ زایی می توانند به وسیله سلولهای توموری، ماکروفاژها و فیبروبلاست های وارد بافت ترشح شوند. از میان فعال کننده های رگ زایی می توان از *VEGF*, *FGF*, *MMPs* نام برد. اعضای خانواده *VEGF* نقش کلیدی در سراسر فرایند آنژیوژن دارند، و دارای رسپتورهای تیروزین کینازی هستند، که بر روی سلول های اندوتلیال عروق قرار دارند، با آنها اعمال آنژیوژنی خود را به انجام می رسانند. هیپوکسی و هیپوگلیسمی تحریک کننده های بیان *VEGF* هستند. از مکانیسم های اصلی در فرایند آنژیوژن هیپوکسی است که مولکول اصلی کنترل کننده سویچ آنژیوژنیک است که باعث افزایش نمود فاکتور برانگیزنده ی هیپوکسی *HIF* و ژن های پایین دست آن شده و تنظیم رونویسی پروتیین های وابسته با آنژیوژن از راه *HIF* انجام می شود (۸-۹).

آنژیوژن در سرطان تخمدان به عنوان فاکتوری بحرانی در بروز سرطان است و در بالندگی تومور، تهاجم و تشکیل متاستاز نقش دارد. پژوهش های بالینی و *preclinical* نقش بحرانی آنژیوژن را در تکوین سرطان تخمدان نشان می دهند.

فاکتورهای گوناگون *proangiogenic*، فرایند تشکیل رگ ها با *VEGF* را برمی انگیزد، و به عنوان یک عامل مرکزی در آنژیوژن مربوط به تومور شناخته می شوند. فاکتور رشد *VEGF* و رسپتورهای آن مهم ترین مسیرهای سیگنالینگ را در آنژیوژن تومور شکل می دهند ۷ عضو از خانواده *VEGF* شناسایی شده و سیگنال های آن ها از طریق ۳ رسپتور تیروزین کینازی که به فاکتورهای رشد وصل می شوند منجر به فعالیت آبخاری سیگنال های پایین دست می شوند. هر دو رسپتور *VEGFR1* و *VEGFR2* می توانند باعث ارتقا آنژیوژن شوند. اگرچه *VEGF* توسط تومورها و بافت های هیپوکسیک تولید می شود اما رسپتورهایش توسط سلول های اندوتلیال بیان می شوند. نشان داده شده است که *VEGF* در ارتباط با القای آنژیوژن در سرطان تخمدان در مرحله های آغازین است. *VEGFR2* توسط اتصال به *VEGF-A* فعال می شود. سلول های تومور تخمدان *VEGF-A* ترشح می کنند. این قضیه عملکرد *autocrine paracrine* / فاکتور رشد *VEGF-A* در سرطان تخمدان را از طریق مسیر *AKT/mTOR* نشان می دهد. سرطان تخمدان *VEGF* را در پاسخ به شرایط هیپوکسی و اسیدی در *solid tumor* ها رها می کند. مشخص شده سطح *VEGF* در حال گردش در سرم زنان دارای سرطان تخمدان نسبت به زنانی که تومورهای خوش خیم دارند بالاتر است. فاکتورهای ویژه آنژیوژنیک پیش بینی کننده در سرطان تخمدان شناسایی شدند که به طور ویژه *MVD* و *VEGF* را می توان نام برد (۱۰، ۱۱).

یکی از راه های درمانی تازه برای سرطان تخمدان مهار آنژیوژن است. با وجود تلاش هایی برای بهبود اثربخشی شیمی درمانی در سرطان پیشرفته تخمدان و استفاده از *carboplatin* و *paclitaxel* و همچنین اضافه کردن داروهای سایتوتوکسیک به شیمی درمانی استاندارد این درمان ها پاسخگو نبودند و مقاومت به شیمی درمانی و عود مجدد سرطان را در پی دارند. به همین دلیل درمان به سمت

درمان های مولکولی هدفمند رفته است که با ویژگی مهم سرطان تخمدان مثل آنژیوژنز مداخله می کند (۸). مهار آنژیوژنز می تواند از طریق مهارکننده های آنژیوژنز که مسیر VEGF را تارگت می کنند انجام شود. یا مهار فاکتورهای proangiogenic، هم چنین تارگت کردن  $\alpha$ -HIF-1 و مهار مسیر آن باعث مهار رگ زایی می شود (۸، ۱۲).

تبدیل سلول های اپیتلیال به سلول های مزانشیمی (EMT) نقش کلیدی در تکوین جنین و تهاجم سرطان و متاستاز ایفا می کنند. سلول هایی که تحت EMT قرار دارند مورفولوژی اپیتلیالی خود را از دست داده و اسکلت سلولی خود را مجددا سازمان دهی می کنند و باعث ایجاد یک فنوتیپ متحرک می شوند. اعتقاد بر این است که EMT توسط سیگنال های microenvironment neoplastic که شامل انواع سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد است اداره می شود. در EMT یک سری اتفاقات رقم می خورد که باعث افزایش توانایی مهاجرت، افزایش برهم کنش سلول-سلول و افزایش توانایی تهاجم می شود. در فرایند EMT سلول های اپیتلیال

سازماندهی فشرده خود را از دست داده و مورفولوژی دوکی شکل به دست می آورد و دارای قدرت تحرک و تهاجم بیش تر می شوند که باعث ایجاد رفتار مهاجرتی در آنها می شود. ویژگی کلیدی EMT تبدیل و سویچ E-cadherin به N-cadherin است. نقش EMT در تهاجم سرطان و متاستاز در چندین مدل سلولی اثبات شده است. مهار ویژه مسیرهای سیگنالینگ که منجر به EMT می شود مثل تغییر  $\beta$  TGF، EGF، HGF، ET-1 و BMP4 به عنوان هدف درمانی استفاده می شوند. سیگنال های سلولی القا کننده EMT شامل: اثر microenvironment است که میکرو محیط تومور نقش مهمی در القای EMT و متاستاز ایفا می کند. در واقع برهم کنش سلولهای تومور با local microenvironment خود می توانند ترشح اتوکرین و پاراکرین فاکتورهای رشد، سایتوکاین ها و پروتیین های ماتریکس خارج سلولی را القا کنند که منجر به EMT می شوند. بیان مولکول های کلیدی EMT مثل SNAIL (سرکوب کننده E-cadherin) مشخص شده که به طور مستقیم به وسیله سیگنالهای خارج سلولی کنترل می شوند (۱۳، ۱۴). سلول های بنیادی مزانشیمی به عنوان marrow stromal cell

یا mesenchymal progenitor cell شناخته شده اند که سلول های بنیادی چند توانی هستند که دارای قدرت تکثیر، خود نوسازی بالا و تمایز هستند. MSC ها می توانند از مغز استخوان، بافت چربی، خون بند ناف، آمیون، پالپ دندان، سینوویوم زانو به دست بیایند. این سلول ها توانایی تمایز به رده های مختلف سلولی از جمله استخوان، غضروف و چربی را دارند. MSC ها دارای ویژگی تعدیل کنندگی سیستم ایمنی هستند که برای اصلاح و باززایی استفاده می شوند. زیرا MSC ها می توانند پروفایل secretome سلول های دندریتیک را تغییر دهند و منجر به تغییرات مطلوب در ریز زیست محیطی شوند (۱۵-۱۶).



BM-ASC آنتی ژن های MHC I را به طور محدود بیان کرده و MHC II را بیان نمی کنند پس واکنش ایمنی را تحریک نکرده و دچار رد پیوند نمی شوند. آسیب به بافت باعث ایجاد سیگنال ویژه می شود که سبب های بنیادی ها را برای ترمیم و بازسازی بافت آسیب دیده فعال می کند. سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان از منابع مهم سلولی هستند، که به بازسازی سایر بافت ها از راه سیگنال های پاراکرین، کمک می کنند. دسترسی به کشت MSC ها شامل: جداسازی MNC دارای MSC از مغز استخوان و کاشتن این سلول ها روی پلیت کشت است، که سلولهای هماتوپوییتیک غیر چسبنده جدا می شود و سلول های چسبنده برای گسترش MSC پاساژ داده می شوند. سلول های بنیادی مزانشیمی از لحاظ مورفولوژی ظاهر فیروبلستی دارند و مارکرهای سطحی CD90, CD44, CDV1, CDV3, CD105 را بیان می کنند اما مارکرهای هماتوپوییتیک مثل CD45 را بیان نمی کنند. نشان داده شده است که MSC توانایی مداخله با تکثیر سلول سرطانی و بستن راه چرخه سلولی تومور را در فاز G1/G0 دارد (۱۷، ۱۸). مشخص شده که سلول های بنیادی مزانشیمی میکروپارتیکل هایی ترشح می کنند که حاوی RNA است. (۱۹، ۲۰)

#### منابع

1. Karst AM, Drapkin R. Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution. *Journal of Oncology*. 2010;13;2010.
2. Kinose Y, Sawada K, Nakamura K, Kimura T. The Role of MicroRNAs in Ovarian Cancer. *BioMed Research International*. 2014;11;2014.
3. Burges A, Schmalfeldt B. Ovarian Cancer: Diagnosis and Treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*. 41-635:(38)108;2011.
4. Rooth C. Ovarian cancer: risk factors, treatment and management. *British journal of nursing (Mark Allen Publishing)*. 17(22;2013):S-23 30.
5. Yokoyama Y, Mizunuma H. Recurrent epithelial ovarian cancer and hormone therapy. *World Journal of Clinical Cases : WJCC*. 90-187:(6)1;2013.
6. Mabuchi S, Kimura T. Treatment of ovarian cancer by monoclonal antibodies. *Discovery medicine*. 203-197:(46)9;2010.
7. Yap TA, Carden CP, Kaye SB. Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nature reviews Cancer*. 81-167:(3)9;2009.
8. van der Bilt ARM, de Vries EGE, de Jong S, Timmer-Bosscha H, van der Zee AGJ, Reyners AKL. Turning promise into progress for antiangiogenic agents in epithelial ovarian cancer. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*.42-224:(2)84.
9. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews*. 80-549:(4)56;2004.
10. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health and Risk Management*. 9-213:(3)2;2006.
11. Gómez-Raposo C, Mendiola M, Barriuso J, Casado E, Hardisson D, Redondo A. Angiogenesis and ovarian cancer. *Clinical and Translational Oncology*. 71-564:(9)11;2009.
12. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer cell*. -220:(3)15;2009 90-75:(2)1796;2009..31.

اخیرا مشخص شده که MSC ها EV ترشح می کنند و به بهبود عملکرد اعصاب آسیب دیده کمک می کنند(۱۸). EV های مشتق از MSC مشخص شده که توانایی درمانی در جراحات های مغزی و بیماری های کلیوی و قلبی را دارند. EV های مشتق از MSC دارای mRNA, noncoding RNA می باشند. مشخص شده که MSC-EV دارای ویژگی های آنتی توموری هستند و تکثیر hepatoma HePG2 و SKOV-3 ovarian cancer cell line را در vitro مهار می کنند. در هیپاتوما treat با MSC-EV آپوپتوز را القا می کند. (۱۹) EV ها نقش مهمی در ارتباط داخل سلولی از طریق مولکول هایش ایفا می کنند و به عنوان حاملی برای drug delivery استفاده می شوند. (۲۱)

EV ها به وزیکول ها و آگزوزوم ها دسته بندی می شوند. آگزوزوم ها دارای سایز ۱۰۰-۴۰ nm هستند. از (MVB multivesicular body) مشتق می شوند. دارای مورفولوژی tetraspanin cup shape هستند. دارای مارکرهای سطحی (CD۹, CD۸۱, CD۶۳) هستند. همچنین غنی از Annexin و پروتیین های شوک حرارتی (Hsp۹۰, Hsp۷۰, Hsp۶۰) است. افزون بر این ها (۱۰۱ tumor susceptibility gene) TSG۱۰۱، کلاترین و Alix در آگزوزوم ها بیان می شوند معمول ترین روش برای جداسازی آگزوزوم ها، اولتراسانتریفیوژ همراه با چگالی شیب غلظت ساکارز است. روش های متنوعی جهت شناسایی آگزوزوم ها استفاده می شود که این روش ها شامل مشاهده سایز این نانوزیکول ها توسط DLS و میکروسکوپ الکترونی است. آگزوزوم ها نقش اساسی در تعدیل ایمنی و ارتباط سلول با سلول دارند آگزوزوم های رها شده از stem cell ها پروتیین های bioactive, لیپیدها و نوکلئیک اسیدها را به سلول های دارای جراحی یا سلولهای بیمار مجاور منتقل می کند و باعث ایجاد تغییرات اساسی در سلول های گیرنده می شوند. (۲۲)

گزارش هایی نشان می دهد که آگزوزوم ها نقش مهمی در پاسخ ایمنی، پیشرفت تومور و اختلالات عصبی دارند. آگزوزوم ها حاوی مولکولهای متنوعی از قبیل lipid DNA, miRNA, mRNA هستند. از میان این مولکول ها miRNA ها بیش تر مورد توجه هستند زیرا نقش تنظیم بیان ژن ها را دارند. (۲۳).