

Dual Blockade of PD-L1 and AXL in SKOV3 Cell Line: A Novel Strategy for Immunotherapy in Ovarian Cancer

Hossein Rahavi^{1,2}
 Ahmad Najafi³
 Hossein Asgarian-Omran⁴
 Behrouz Aflatoonian⁵
 Mohsen Tehrani⁴
 Ehsan Farashahi-Yazd⁶

¹ Ph.D. Candidate in Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Stem Cell Biology Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

³ Ph.D. in Immunology, SABA Biomedicals Knowledge-Enterprise Co, Tehran, Iran

⁴ Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Associate Professor, Stem Cell Biology Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

⁶ Associate Professor, Genetics, Stem Cell Biology Research Center, Institute of Reproductive Sciences, Shahid Sadoughi Yazd University of Medical Sciences, Yazd, Iran

(Received July 21, 2025; Accepted November 25, 2025)

Abstract

Background and purpose: Ovarian cancer stands out as one of the most lethal forms of gynecological malignancy, marked by elevated mortality rates primarily due to its frequent late-stage diagnosis and the development of therapeutic resistance. This investigation sought to examine a novel combinatorial approach that targets both PD-L1-mediated immune evasion and AXL-driven epithelial-mesenchymal transition (EMT) in SKOV3 ovarian cancer cells.

Materials and methods: For therapeutic intervention, PD-L1 was silenced using sequence-specific siRNA (10 nM; 48-hour transfection), while AXL signaling was inhibited using the selective small-molecule inhibitor R428 ($IC_{50} = 2.9 \mu\text{M}$ at 48 hours). Experimental groups included scramble siRNA, PD-L1 siRNA, scramble siRNA combined with R428, PD-L1 siRNA combined with R428, R428 monotherapy, and untreated controls. Cell viability was assessed using the MTT assay, and gene expression levels were quantified by quantitative real-time PCR (qRT-PCR).

Results: This investigation demonstrated that SKOV3 cells intrinsically exhibit basal expression of AXL, Vimentin, PD-L1, TGF- β , and MMP-9, indicating a baseline metastatic potential and an inherent capacity for immune evasion. Both single agents (PD-L1 siRNA and R428) exhibited significant anti-proliferative activity ($P < 0.0007$ and $P < 0.0005$, respectively). Importantly, their combination revealed a synergistic effect, resulting in significantly greater growth inhibition ($P < 0.0001$). Gene expression analysis confirmed marked downregulation of PD-L1 ($P < 0.0001$) and multiple EMT markers following combination treatment, evidenced by a 72% reduction in vimentin, 65% in TGF- β , and 58% in MMP-9 compared to controls.

Conclusion: The findings showed that simultaneous inhibition of the PD-L1 and AXL pathways substantially suppresses cancer progression, resulting in a significant downregulation of EMT-regulating genes.

Keywords: Ovarian Cancer, Combinational Immunotherapy, PD-L1 siRNA, Axl Receptor Tyrosine Kinase.

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (251): 15-29 (Persian).

Corresponding Author: Ehsan Farashahi-Yazd - Associate Professor of Molecular Genetics, Stem Cell Biology Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran. (E-mail: ehsanfarashahi@gmail.com) & Mohsen Tehrani- Department of Immunology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences (Email: drmtehrani@gmail.com)

مهار همزمان *PD-L1* و *AXL*، یک رویکرد نوین در ایمونوتراپی سرطان تخمدان

حسین رهاوی^{۱،۲}
احمد نجفی^۳
حسین عسگریان عمران^۴
بهرز افلاطونیان^۵
محسن طهرانی^۴
احسان فراشاهی یزد^۶

چکیده

سابقه و هدف: سرطان تخمدان به عنوان یکی از کشنده ترین بدخیمی های زنان شناخته می شود که به دلیل مقاومت دارویی و نرخ بالای عود بیماری، درمان آن با چالش های متعددی همراه است. این مطالعه با هدف بررسی اثرات مهار همزمان دو مسیر سیگنالینگ *PD-L1* (درگیر در فرار ایمنی) و *AXL* (یکی از عوامل دخیل در متاستاز و تهاجم تومور) در رده سلولی سرطان تخمدان SKOV3 انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه آزمایشگاهی از نوع تجربی، سلول های SKOV3 در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و آنتی بیوتیک کشت داده شدند. ابتدا سطوح بیان پایه ژن های *PD-L1*، *AXL* و مارکرهای EMT (شامل *Vimentin*، *TGF-β* و *MMP-9*) با استفاده از تکنیک Real-time PCR ارزیابی گردید. بهینه سازی شرایط برای مهار *PD-L1* با siRNA اختصاصی (۱۰ نانومولار، ۴۸ ساعت) و مهار *AXL* با مهار کننده اختصاصی R428 (با تعیین IC50 برابر ۲/۹ میکرومولار در ۴۸ ساعت) انجام پذیرفت. گروه های آزمایش شامل شاهد منفی، مهار منفرد هر مسیر و درمان ترکیبی بودند. ارزیابی زیست پذیری سلولی با آزمون MTT و تغییرات بیان ژن های هدف با تکنیک Real-time PCR بررسی شد.

یافته ها: آنالیزهای اولیه، میزان بیان پایه ای از ژنهای *AXL*، *Vimentin*، *PD-L1*، *TGF-β* و *MMP-9* را در این رده سلولی نشان داد. تیمار منفرد با siRNA ضد *PD-L1* یا R428 به طور معنی داری موجب کاهش تکثیر سلولی گردید ($P < 0/0007$). با این حال، درمان ترکیبی، اثر سینرژیستی قابل توجهی در مهار رشد سلولی نشان داد ($P < 0/0001$). هم چنین این روش منجر به کاهش معنی دار بیان ژن های *PD-L1*، *Vimentin*، *TGF-β* و *MMP-9* گردید ($P < 0/0001$) که نشان دهنده مهار مؤثر مسیرهای EMT و متاستاز می باشد.

استنتاج: استراتژی مهار همزمان مسیرهای *PD-L1* و *AXL* می تواند به عنوان یک رویکرد درمانی نوید بخش در مدیریت سرطان تخمدان مقاوم به درمان مطرح باشد. با این حال، مطالعات تکمیلی در مدل های پیش بالینی و ارزیابی های ایمونولوژیک گسترده تر ضروری به نظر می رسد.

واژه های کلیدی: سرطان تخمدان، ایمونوتراپی ترکیبی، siRNA ضد *PD-L1*، گیرنده تیروزین کینازی *Axl*

E-mail: ehsanfarashahi@gmail.com

موفق مسئول: احسان فراشاهی یزد - یزد: مرکز تحقیقات بیولوژی سلول های بنیادی، پژوهشکده علوم تولید مثل یزد

E-mail: drmtehrani@gmail.com

محسن طهرانی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری

۱. دانشجوی دکتری تخصصی ایمنی شناسی پزشکی، گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیولوژی سلول های بنیادی، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۳. دکتری تخصصی ایمنی شناسی پزشکی، شرکت دانش بنیان سلول بافت آزما، تهران، ایران
۴. استاد، گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشیار، بیولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات بیولوژی سلول های بنیادی، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۶. دانشیار، ژنتیک، مرکز تحقیقات بیولوژی سلول های بنیادی، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۴/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۵/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۹/۴

مقدمه

سرطان‌های زنان از شایع‌ترین انواع سرطان در سطح جهانی محسوب می‌شوند. در میان این سرطان‌ها، سرطان تخمدان به دلیل مقاومت به شیمی‌درمانی، از عوامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان هستند. علیرغم پیشرفت‌های حاصل در جراحی و شیمی‌درمانی، بسیاری از بیماران هنوز در اثر انواع تهاجمی بیماری جان خود را از دست می‌دهند. میزان بالای مرگ و میر و تأثیر منفی این بیماری‌ها بر کیفیت زندگی و باروری زنان، ضرورت توسعه درمان‌های نوین مانند ایمونوتراپی را به شدت مورد تأکید قرار می‌دهد (۱، ۲). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که هدف قرار دادن عوامل محرک تومور در ریز محیط تومور می‌تواند پاسخ‌های ایمنی ضد سرطانی را تقویت و مقاومت به شیمی‌درمانی را کاهش دهد (۳).

سرطان تخمدان یکی از کشنده‌ترین بدخیمی‌ها در زنان به حساب می‌آید. بیش از ۲۲ هزار نفر از زنان آمریکایی هر ساله به این سرطان مبتلا می‌شوند و تقریباً ۱۴۰۰۰ مورد از آن به مرگ ختم می‌گردد. بیش‌تر سرطان‌های اپی‌تلیالی از طریق عروق وارد مرحله متاستاز می‌شوند ولی سرطان تخمدان از طریق حفره صفاقی و دست‌اندازی به ارگان‌های شکمی تهاجم خواهد داشت (۳) در اکثر موارد این سرطان در مرحله پیشرفته و تهاجمی تشخیص داده می‌شود که ریز محیط این تومور که شدیداً مهارکننده پاسخ‌های سیستم ایمنی هست می‌تواند یکی از دلایل تهاجمی بودن این سرطان باشد (۵).

پس از معرفی مفهوم فرسودگی سلول‌های T (T-cell exhaustion) در رابطه با برخورد سیستم ایمنی با مقادیر بالای آنتی‌ژن و توصیف حذف یا فرسوده شدن این سلول‌ها، مطالعات زیادی برای شناخت مولکول‌های سطحی این سلول‌ها و نقشی که آن‌ها برای به وجود آمدن این پدیده دارند انجام شد (۶). سلول‌های T فرسوده دچار یک نوع اختلال عملکرد هستند که به علت بیان بالا و همزمان گیرنده‌های مهارتی نظیر PD-1، Tim-3، CTLA-4، LAG-3 و غیره در سطح آن‌ها می‌باشد که

معروف به Immune checkpoint receptors هستند (۷). از طرفی سلول‌های توموری با بیان لیگاند‌های مناسب برای گیرنده‌های مهارتی مانند PD-L1 می‌توانند از سیستم ایمنی فرار کنند (۸). PD-L1 (Programmed death-1 ligand) یک پروتئین سرکوب‌گر ایمنی است که به میزان قابل توجهی در سطح سلول‌های توموری بیان می‌شود و می‌تواند با گیرنده خود (PD-1) روی لنفوسیت‌های T تعامل داشته باشد. پس از برهمکنش لیگاند-گیرنده، مهاجرت و تکثیر سلول‌های T مهار می‌شود که این امر منجر به تسهیل رشد تومور و متاستاز شده و در عین حال کارایی پاسخ ضد توموری را محدود می‌کند (۶). مطالعات متعددی بیان‌کننده PD-L1 و PD-1 را در استرومای سرطان تخمدان در مقایسه با بافت‌های نرمال آن ناحیه نشان دادند (۹، ۱۰).

درمان‌های مهارکننده نقاط بازرسی ایمنی (Immune checkpoint blocker; ICB) که PD-L1 را هدف قرار می‌دهند، به عنوان دسته‌ای نویدبخش از عوامل ضد توموری ظهور کرده‌اند. با این حال، این مهارکننده‌ها قادر به خنثی‌سازی تمام مکانیسم‌های مقاومت نبوده و تعداد بیماران سرطانی که از ایمونوتراپی مبتنی بر ICB بهره‌مند می‌شوند، همچنان محدود است (۱۱). فرآیند EMT (Epithelial mesenchymal transition) که منجر به متاستاز می‌شود، یک فرآیند چند مرحله‌ای است که طی آن سلول‌های اپی‌تلیالی قطبی، که به طور معمول دارای چسبندگی قوی و رفتار غیر متحرک هستند، به سلول‌هایی با ویژگی‌های مزانشیمی تبدیل می‌شوند. این تغییرات شامل از دست دادن چسبندگی بین سلولی و افزایش توانایی مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی می‌گردد که پیش‌آگهی ضعفی در بیماران سرطانی ایجاد می‌کند (۱۲). AXL، یک تیروزین کیناز گیرنده‌ای عملکردی است که در بسیاری از انواع سرطان‌ها به میزان زیادی بیان می‌شود و سیگنالینگ آن به دلیل نقش دوگانه‌اش هم در فرآیند EMT که متاستاز سرطان و مقاومت به شیمی‌درمانی را تقویت می‌کند و هم در

تعدیل پاسخ ایمنی در ریز محیط تومور، به طور حیاتی در تومورزایی چندین سرطان نقش دارد (۱۳، ۱۴). کارآزمایی‌های بالینی متعددی در حال ارزیابی امکان استفاده از ریز مولکول‌های مهارکننده AXL در سرطان‌های مختلف هستند که تا به امروز نتایج قابل قبولی روی پیامدهای بالینی بیماران داشته‌اند، اما اکثریت این کارآزمایی‌ها هنوز در حال انجام و بررسی درمان‌های ترکیبی همراه با این مهارکننده‌ها می‌باشند (۱۵).

مطالعات پیشین همبستگی بین بیان Axl و مقاومت به ایمونوتراپی مبتنی بر ICB را در مدل‌های توموری و بیماران سرطانی نشان داده‌اند (۱۶، ۱۷). از سوی دیگر بعضی مطالعات در بیماران دریافت‌کننده مهارکننده‌های تیروزین کینازی حاکی از فعال بودن مسیر ERK و افزایش بیان PD-L1 در این بیماران می‌باشد که باعث عدم کارایی مناسب این مهارکننده‌ها و مقاومت به آن‌ها خواهد شد (۱۸). بنابراین لزوم استفاده همزمان مهارکننده‌های PD-L1 همراه با مهارکننده‌های تیروزین کینازی برای حداکثر کارآمدی این مهارکننده‌ها منطقی به نظر می‌رسد. محققان اخیراً بر درمان‌های ترکیبی هدفمند در درمان سرطان تمرکز کرده‌اند، زیرا این روش‌ها اثر هم‌افزایی این عوامل را القا کرده و اختصاصیت درمان را افزایش می‌دهند (۱۹، ۲۰).

در طول دهه‌های گذشته، کارایی ترکیب مهارکننده‌های نقاط بازرسی ایمنی با مهارکننده‌های تیروزین کیناز در مطالعات پیش‌بالینی و بالینی بر روی سرطان‌های مختلف مورد بحث قرار گرفته است (۲۱-۲۳). با این وجود، برخی از بیماران در طول ایمونوتراپی با آنتی‌بادی علیه مسیر PD-1/PD-L1 با عوارض غیرمنتظره ناشی از اتصال غیر اختصاصی آنتی‌بادی و همچنین درجاتی از علائم خودایمنی مواجه شده‌اند (۱۱). مهار RNA یک مکانیسم تنظیم ژنی نسبتاً جدید است که سطح بیان ژن‌ها را در سطح رونوشت‌برداری و یا با فعال‌سازی فرآیند تجزیه‌توالی ویژه RNA، خاموشی پس از رونویسی کاهش می‌دهد. siRNA یک الیگونوکلئوتید دو رشته‌ای کوچک با طول ۲۲-۲۱ نوکلئوتید می‌باشد که به صورت

داخل سلولی و با صرف ATP به واسطه شکست RNA در رشته‌ای بلند توسط آنزیم دایسرایجیاد می‌شود. siRNA طی روندی در سیتوپلاسم در نهایت باعث شکست mRNA هدف می‌گردد. با تخریب mRNA بیان ژن متوقف می‌شود که به این حالت اصطلاحاً خاموشی ژن پس از رونویسی می‌گویند که در نهایت مانع از ترجمه ژن هدف می‌شوند. با ظهور فناوری تداخل RNA (RNA interference) و به‌کارگیری RNAهای کوچک یا همان siRNA جهت خاموش کردن بیان هر ژنی انقلاب بزرگی در دانش ژنتیک حاصل شده است. با توجه به بیان فرم‌های مختلف PD-L1 در چندین بخش سلولی (شامل هسته‌ای، سیتوپلاسمی و غشایی) که بر نتایج درمان سرطان تأثیر می‌گذارد، مولکول‌های RNA غیر کدکننده از جمله siRNA، توجه قابل ملاحظه‌ای را در تحقیقات متمرکز بر توسعه درمان‌های هدفمند و مؤثر به خود جلب کرده‌اند (۲۶-۲۴). علاوه بر این، استفاده از siRNA نه تنها می‌تواند بیان PD-L1 را کاهش دهد، بلکه می‌تواند از بیان مجدد PD-L1 نیز جلوگیری کند، در نتیجه فرار سلول‌های سرطانی را کاهش داده و مهار PD-L1/1 را طولانی‌تر می‌کند (۲۷). مولکول‌های PD-L1 و AXL به طور گسترده‌ای در ریز محیط تومور (TME) طیف وسیعی از سرطان‌ها از جمله سرطان تخمدان بیان می‌شوند و مهار این مولکول‌ها پاسخ‌های ضد توموری چشمگیری را نشان داده است (۲۸، ۲۹). در نتیجه، هدف این مطالعه بررسی اثرات ضد توموری PD-L1-siRNA در ترکیب با Bemcentinib (مهارکننده AXL) برای آشکار سازی پیامدهای حاصل بر رده سلولی سرطان تخمدان (SKOV-3) می‌باشد. انتظار می‌رود این درمان ترکیبی اثرات هم‌افزایی ضد توموری قابل تاملی را به ویژه در بیماران مقاوم به ICB، به عنوان یک ایمونوتراپی ترکیبی بالقوه ایجاد کند.

مواد و روش‌ها

معرف‌ها

درصد تراکم رشد داده شدند. سپس با ۱۰ نانومولار از PD-L1-si به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت ترانسفکت شدند. بیان mRNA ژن PD-L1 در سلول‌های ترانسفکت شده با siRNA به روش qRT-PCR ارزیابی شد. همچنین از siRNA هدفمند علیه ژن MALAT-1 (به عنوان RNA غیر کد کننده بلند) با غلظت ۲۰ نانومولار به عنوان کنترل مثبت برای ارزیابی کارایی ترانسفکشن استفاده گردید.

گروه‌های طراحی شده شامل Scramble-si لود شده روی LPs، PD-L1-si، LPs لود شده روی PD-L1-si، R428 +LPs لود شده روی R428، R428 +LPs و سلول‌های درمان نشده بودند. برای آزمون MTT، ۰/۲ درصد DMSO به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. پیش از انجام ترانسفکشن، سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در محیط فاقد سرم (-Serum starved) قرار داده شدند. برای آماده‌سازی کمپلکس‌های ترانسفکشن، غلظت بهینه siRNA در ۵۰ میکرولیتر محیط Opti-MEM I (محیط کاهش یافته سرم، Invitrogen) رقیق شده و با ۱ میکرولیتر از LipofectamineRNAiMAX (رقیق شده در ۵۰ میکرولیتر Opti-MEM) مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سپس به سلول‌های کشت داده شده در محیط DMEM فاقد آنتی‌بیوتیک به صورت قطره قطره اضافه گردید. درمان ترکیبی با استفاده از LPs بارگیری شده با PD-L1 si در غلظت ۱۰ نانومولار برای رده سلولی SKOV3 همراه با R428 در غلظت ۲/۹ میکرومولار انجام پذیرفت. تأثیر این روش درمانی بر سلول‌های سرطانی از طریق آزمون‌های مختلفی شامل MTT (برای ارزیابی زنده‌مانی سلولی)، qRT-PCR (برای سنجش سطح بیان ژن‌های هدف) مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی زیست‌پذیری سلولی

زیست‌پذیری سلول‌ها پس از درمان ترکیبی با PD-L1-si و R428 با استفاده از آزمون MTT ارزیابی شد.

در این مطالعه آزمایشگاهی از نوع تجربی، با کد اخلاق JR.MAZUMS.REC.1400.620، Bemcentinib (R428)، یک مهارکننده تیروزین کیناز، از شرکت MedChemExpress (آمریکا) تهیه شد. این ترکیب شیمیایی در ۰/۱ درصد دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل و به صورت الیکوت‌های منجمد نگهداری گردید. انواع تجاری siRNA (با نام‌های Scramble-si، MALAT-1-si و PD-L1-si) و لیپوفکتامین RNAiMAX (LPs) به عنوان معرف انتقال ژن، از شرکت Thermo Fisher Scientific (آمریکا) سفارش داده شدند. آزمون زیست‌پذیری با استفاده از کیت (Sigma-Aldrich، آمریکا) انجام شد.

رده سلولی و کشت

رده سلولی سرطان تخمدان (SKOV3) از مؤسسه پاستور (ایران) تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی غیرفعال شده با حرارت (FBS) و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco/Life Technologies) در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت‌دار و ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. پس از رسیدن به تراکم مناسب، سلول‌ها پاساژ داده شده و آنالیزهای بعدی در فاز لگاریتمی رشد انجام گردید.

بهینه‌سازی غلظت داروی R428 و شرایط مهار ژن PD-L1 رده سلولی SKOV3 با تراکم 1×10^4 در هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند. برای تعیین غلظت بهینه R428، سلول‌ها با غلظت‌های افزایشی تا ۲۰ میکرومولار از R428 به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. غلظت بهینه یا غلظت مهاری IC₅₀ برای تمام دارو‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ محاسبه شد.

برای بهینه‌سازی شرایط مهار PD-L1 توسط siRNA، سلول‌ها با تراکم 5×10^4 در پلیت ۲۴ خانه کشت و تا ۸۰

ت‌جزیه و تحلیل Real-Time PCR کمی (-qRT) با استفاده از سیستم Rotor-Gene Q و رنگ SYBR Green انجام شد. در ابتدا کارایی پرایمرها از طریق نرم افزار LinRegPCR تأیید گردید و در ادامه سطح بیان ژن‌های هدف (*MMP-9* و *Vimentin*, *TGF-β*, *PD-L1*) نسبت به ژن کنترل داخلی (*HPRT*) نرمالیز و با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. هم‌چنین برای تأیید اختصاصیت واکنش‌ها، آنالیز منحنی ذوب انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱، ارائه شده است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

<i>AXL</i>	F	5'-GTGAAGACGATGAAGATTGCCA-3'
	R	5'-GCTGTGTAGGCTCCATGTTTC-3'
<i>PDL-1</i>	F	5'-ACATTATCAATTTGTGCATGG-3'
	R	5'-TTTCACAGTAATTCGCTTGTAG-3'
<i>TGF-β</i>	F	5'-TGGACACCAACTATTGCTTCAG-3'
	R	5'-GTGTCCAGGCTCCAAATGTAG-3'
<i>Vimentin</i>	F	5'-AGGATTTCTGCTCTTCCAA-3'
	R	5'-ATCGTGATGCTGAGAAGTTTCG-3'
<i>MMP-9</i>	F	5'-GACGTCTCCAGTACCGAGAG-3'
	R	5'-CAGGATGTCATAGGTCACGTAG-3'
<i>HPRT</i>	F	5'-GGACTAATTATGGACAGGACTG-3'
	R	5'-GCTCTCAGTCTGATAAATCTAC-3'

تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8 انجام شد. داده‌های کمی به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شده‌اند. برای تعیین توزیع نرمال داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد و مقایسه‌های چندگانه با تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به دنبال آن آزمون Dunnett انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار از سه تکرار مستقل گزارش شده‌اند. مقادیر $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار آماری در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

رده سلولی SKOV3 بیان پایه ژن‌های مرتبط با مسیر EMT همان‌طور که در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است، نتایج qRT-PCR حاکی از آن بود که ژن‌های *AXL*, *Vimentin*, *PD-L1*, *TGF-β* و *MMP-9* در رده سلولی SKOV3 در سطح پایه بیان می‌شوند.

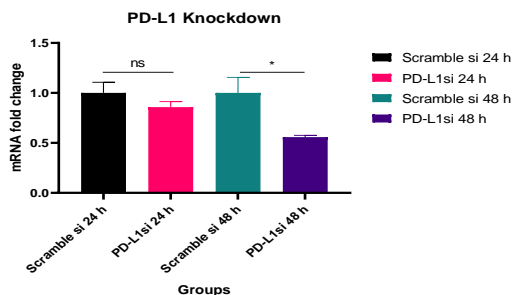
در ابتدا، سلول‌ها با تراکم 1×10^4 در پلیت ۹۶ خانه کشت داده و در شرایط استاندارد کشت تا رسیدن به ۸۰ درصد تراکم انکوبه شدند. پروسه ترانسفکشن با استفاده از ۱۰ میکرولیتر از حامل‌های لیپیدی (LPs) لود شده با siRNA (غلظت نهایی ۱۰ نانومولار) در محیط DMEM فاقد آنتی‌بیوتیک انجام پذیرفت. پس از ۶ ساعت انکوباسیون، محیط کشت حاوی حامل‌ها با محیط تازه حاوی غلظت بهینه شده R428 (با غلظت ۲/۹ میکرومولار) جایگزین گردید.

پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، محیط رویی چاهک‌ها برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر محیط فاقد سرم همراه با ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات) به هر چاهک اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در تاریکی و در شرایط استاندارد انکوبه شدند. در مرحله پایانی، پس از برداشت محیط، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه گردید و پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی انکوبه شدند تا کریستال‌های فورمازان کاملاً حل شوند. در مرحله نهایی، جذب پلیت با استفاده از دستگاه ELISA ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر نسبت به ۶۳۰ نانومتر (مقدار مرجع) اندازه‌گیری گردید. درصد زنده‌مانی سلولی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

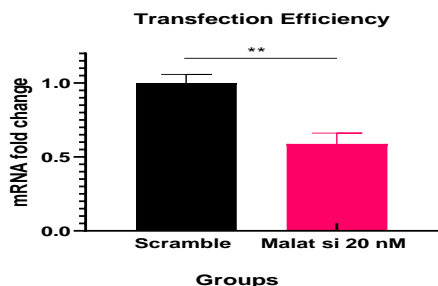
$$\text{Stimulation Index (SI)} = \frac{\text{OD stimulated}}{\text{OD Unstimulated cells}}$$

آنالیز بیان ژن

رده سلولی SKOV3 با تراکم 1×10^4 در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شده و در ادامه غلظت‌های بهینه شده siRNA و R428 به سلول‌ها اضافه شدند. پس از ۴۸ ساعت، استخراج RNA با استفاده از معرف RiboEX (شرکت GeneAll Biotechnology) مطابق با دستورالعمل سازنده انجام و سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA یکتا تجهیز (ایران) صورت پذیرفت.



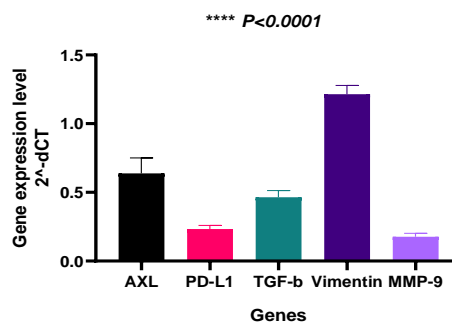
تصویر شماره ۲: بهینه سازی شرایط مهار بیان ژن *PDL-1* در رده سلولی SKOV3، رده سلولی مورد نظر تحت درمان های Scramble siRNA، *PD-L1* siRNA برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. پس از استخراج RNA توتال و سنتز cDNA، بیان ژن *PD-L1* با روش qRT-PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *PD-L1* و *HPRT* (کنترل داخلی) ارزیابی شد. سطوح بیان نسبی mRNA ژن *PD-L1* به صورت میانگین \pm انحراف معیار ($2^{-\Delta\Delta CT}$, Fold Change) پس از نرمال سازی با *HPRT* نشان داده شده است. مقادیر p-value حاصل از مقایسه هر گروه با گروه کنترل مربوطه با علامت * نمایش داده شده است (NS: $P=0.02$, Not significant).



تصویر شماره ۳: تایید کارآمدی پروسه ترانسفکشن siRNA، رده سلولی SKOV3 تحت درمان های Scramble siRNA، MALAT-1 siRNA (۱۰ و ۲۰ نانومولار به ترتیب) به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. بیان ژن *MALAT-1* با روش qRT-PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *MALAT-1* و *HPRT* (کنترل داخلی) ارزیابی گردید. سطوح بیان نسبی mRNA ژن *MALAT-1* به صورت میانگین \pm انحراف معیار ($2^{-\Delta\Delta CT}$, Fold Change) پس از نرمال سازی با *HPRT* نشان داده شده است. مقادیر p-value حاصل از مقایسه با گروه کنترل با علامت * نمایش داده شده است (** $P<0.005$).

کاهش قدرت زیست پذیری سلولی در اثر مهار همزمان مسیرهای *PD-L1* و *AXL*

ارزیابی اثرات مهار کننده *PD-L1*-si و مهار کننده *AXL* (R428) بر رشد سلولی نشان داد که این ترکیب



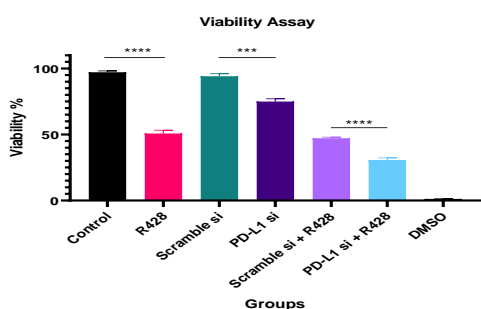
تصویر شماره ۱: *AXL*، *PD-L1*، *TGF-β*، *Vimentin* و *MMP-9* در سلول های SKOV3 به میزان پایه بیان می شوند. نتایج qRT-PCR بیان پایه *AXL*، *PD-L1*، *TGF-β*، *Vimentin* و *MMP-9* را در رده سلولی مورد مطالعه تأیید کرد. داده های بیان ژن به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) مقادیر $2^{-\Delta\Delta CT}$ پس از نرمال سازی با *HPRT* به عنوان کنترل داخلی ارائه شده اند.

کاهش بیان *PD-L1* پس از ترانسفکشن siRNA

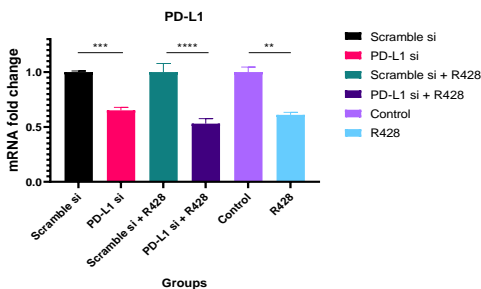
ترانسفکشن *PD-L1*-si به طور معنی داری بیان ژن *PD-L1* را در سلول های SKOV3 در غلظت ۱۰ نانومولار کاهش داد. به منظور تعیین زمان بهینه ترانسفکشن، *PD-L1*-si به صورت وابسته به زمان (۲۴ و ۴۸ ساعت) به سلول ها منتقل شد. در مقایسه با گروه siRNA-scramble، *PD-L1*-si در زمان ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن مؤثرتر بود و کاهش بیش تری در بیان *PD-L1* ایجاد کرد (تصویر شماره ۲). بر این اساس، غلظت ۱۰ نانومولار به عنوان دوز بهینه، و زمان ۴۸ ساعت به عنوان زمان بهینه برای آزمایش های بعدی انتخاب شدند.

کارایی ترانسفکشن siRNA لود شده روی لیپوفکتامین با روش qRT-PCR ارزیابی شد که در آن از *MALAT-1*-si به عنوان کنترل مثبت برای تأیید مهار ژن استفاده گردید. همان طور که در تصویر شماره ۳ نشان داده شده است، *MALAT-1*-si در غلظت ۱۰ نانومولار و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون به طور معنی داری بیان *MALAT-1* را مهار کرد. این نتایج نشان داد که لیپوفکتامین قادر است *MALAT-1*-si را به طور مؤثری به درون سلول های سرطانی منتقل کرده و منجر به کاهش بیان *MALAT-1* mRNA شود.

درمان ترکیبی با PD-L1-si و R428 می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر بیان ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر EMT داشته باشد. ارزیابی بیان ژن با روش qRT-PCR با استفاده از *HPRT* به عنوان کنترل داخلی نشان داد که این درمان ترکیبی به طور معنی‌داری بیان *PD-L1*، *TGF-β*، *Vimentin* و *MMP-9* را در رده سلولی SKOV-3 کاهش می‌دهد (تصاویر شماره ۶، ۷، ۸ و ۹).

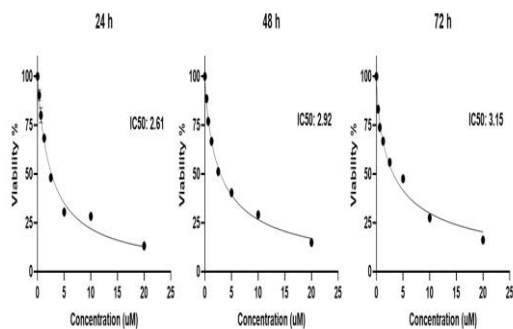


تصویر شماره ۵: بررسی تأثیر درمان ترکیبی siRNA علیه *PD-L1* و مهارکننده AXL (R428) بر قدرت زیست‌پذیری رده سلولی SKOV3 سلول‌ها تحت درمان‌های تعریف شده به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، زیست‌پذیری سلولی با روش MTT تعیین گردید. نتایج به صورت (میانگین ± انحراف معیار) نمایش داده شده است. (***) $P < 0.0007$ ، ****) $P < 0.0001$.



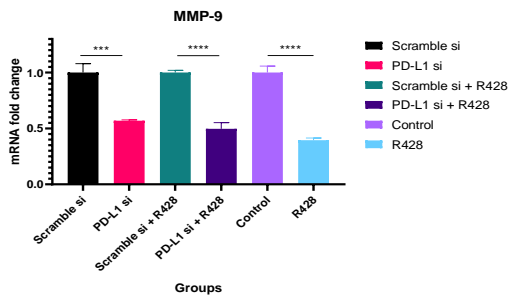
تصویر شماره ۶: تأثیر درمان ترکیبی siRNA علیه *PD-L1* و مهارکننده AXL بر بیان ژن *PD-L1* در رده سلولی SKOV3 سلول‌ها تحت درمان‌های کنترل (سلول‌های بدون مواجهه با دارو)، R428، Scramble siRNA، PD-L1 siRNA، ترکیب Scramble siRNA + R428 و ترکیب PD-L1 siRNA + R428 به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. بیان ژن *PD-L1* با روش qRT-PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *PD-L1* و *HPRT* (کنترل داخلی) ارزیابی شد. سطوح بیان نسبی mRNA ژن *PD-L1* به صورت میانگین ± انحراف معیار ($2^{-\Delta\Delta CT}$ Fold Change) پس از نرمال‌سازی با *HPRT* نشان داده شده است. مقادیر p-value حاصل از مقایسه هر گروه با گروه کنترل مربوطه با علامت * نمایش داده شده است ($P < 0.004$ ، ***) $P < 0.0008$ ، ****) $P < 0.0001$.

درمانی می‌تواند اثرات ضد تکثیر قابل توجهی در سلول‌های سرطانی ایجاد کند. در مرحله اول، در راستای بررسی غلظت بهینه R428، نتایج نشان داد که این ترکیب در غلظت‌های مختلف (تا ۲۰ میکرومولار) به صورت وابسته به دوز باعث کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها می‌شود (IC_{50} at 48 h: $2.9 \mu M$) (تصویر شماره ۴). در ادامه، هنگامی که اثرات منفرد و ترکیبی این عوامل مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده شد که هر یک از عوامل به تنهایی (PD-L1-si یا R428) قادر به مهار معنی‌دار تکثیر سلولی هستند، اما ترکیب همزمان این دو عامل منجر به اثر سینرژیستی قابل توجهی گردید که به طور چشمگیری مؤثرتر از درمان‌های منفرد بود (تصویر شماره ۵). این یافته‌ها حاکی از آن است که مهار همزمان این دو مسیر سیگنالینگ می‌تواند به عنوان یک راهبرد درمانی نوید بخش برای مقابله با سرطان تخمدان مورد توجه قرار گیرد، به ویژه در مواردی که مقاومت به درمان وجود دارد.



تصویر شماره ۴: محاسبه غلظت بهینه R428 در رده سلولی SKOV3، سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه به صورت سه تایی (Triplicate) کشت و با غلظت‌های افزایش یافته دارو R428 (تا ۲۰ میکرومولار) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. نتایج به صورت (میانگین ± انحراف معیار) نمایش داده شده است.

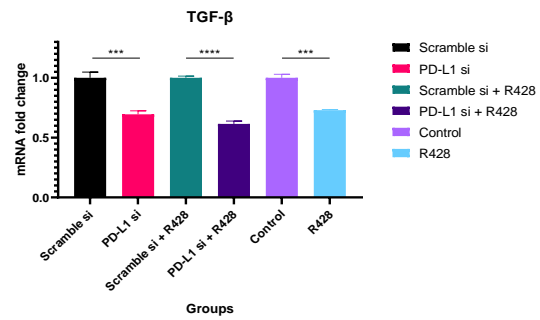
مهار همزمان *PD-L1* و *AXL* منجر به تنظیم کاهش‌ی ژن‌های مرتبط با EMT می‌شود
بررسی مکانیسم‌های مولکولی درگیر در فرار ایمنی و فرآیند انتقال اپیتلیال-مزانشیمی (EMT) نشان داد که



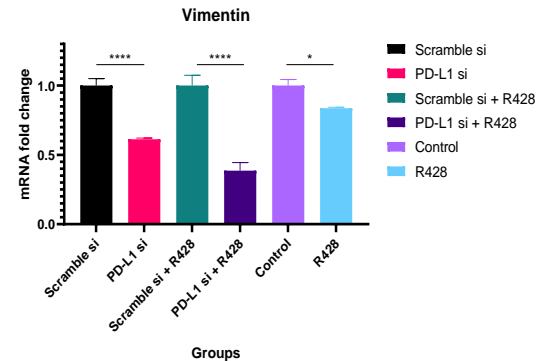
تصویر شماره ۹: تأثیر درمان ترکیبی siRNA علیه *PD-L1* و مهار کننده *AXL* بر بیان ژن *MMP-9* در رده سلولی SKOV3، سلول ها تحت درمان های تعریف شده به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. بیان ژن *MMP-9* با روش qRT-PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *MMP-9* و *HPRT* (کنترل داخلی) ارزیابی شد. سطوح بیان نسبی mRNA *MMP-9* به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Fold Change, $2^{-\Delta\Delta CT}$) پس از نرمال سازی با *HPRT* نشان داده شده است. مقادیر p-value حاصل از مقایسه هر گروه با گروه کنترل مربوطه با علامت * نمایش داده شده است (**** $P < 0.0001$, *** $P < 0.0007$).

بحث

اگر چه روش های متداول درمان سرطان های زنان تا حدی مؤثر بوده اند، اما نیاز مبرمی به توسعه رویکردهای نوین مانند ایمونوتراپی برای مهار تهاجم توموری و مقابله با مقاومت شیمی درمانی احساس می شود (۳، ۳۰). مهار کننده های نقاط بازرسی ایمنی (ICBs) که *PD-L1* را هدف قرار می دهند، به دلیل نقش محوری این مولکول در فرار ایمنی، پیشرفت سرطان، انتقال اپیتلیال-مزانشیمی (EMT) و متاستاز، به عنوان عوامل ضد توموری امیدبخش مطرح شده اند (۱۱). با این حال، این مهار کننده ها قادر به غلبه بر تمام مکانیسم های مقاومت نبوده و در نتیجه تنها بخشی از بیماران از ایمونوتراپی مبتنی بر ICB بهره می برند (۳۱). *AXL*، یک تیروزین کیناز گیرنده ای از خانواده TAM (شامل *TYRO3*، *AXL* و *MER*) است که به طور قابل توجهی پیشرفت سرطان و مقاومت به شیمی درمانی را از طریق عملکرد دوگانه خود در ریز محیط تومور و پاسخ های ایمنی تسهیل می کند (۳۲). مطالعات قبلی



تصویر شماره ۷: تأثیر درمان ترکیبی siRNA علیه *PD-L1* و مهار کننده *AXL* بر بیان ژن *TGF-β* در رده سلولی SKOV3، سلول ها تحت درمان های تعریف شده به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. بیان ژن *TGF-β* با روش qRT-PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *TGF-β* و *HPRT* (کنترل داخلی) ارزیابی شد. سطوح بیان نسبی mRNA *TGF-β* به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Fold Change, $2^{-\Delta\Delta CT}$) پس از نرمال سازی با *HPRT* نشان داده شده است. مقادیر p-value حاصل از مقایسه هر گروه با گروه کنترل مربوطه با علامت * نمایش داده شده است (*** $P < 0.0009$ ، **** $P < 0.0001$).



تصویر شماره ۸: تأثیر درمان ترکیبی siRNA علیه *PD-L1* و مهار کننده *AXL* بر بیان ژن *Vimentin* در رده سلولی SKOV3، سلولها تحت درمانهای تعریف شده به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. بیان ژن *Vimentin* با روش qRT-PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *Vimentin* و *HPRT* (کنترل داخلی) ارزیابی شد. سطوح بیان نسبی mRNA *Vimentin* به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Fold Change, $2^{-\Delta\Delta CT}$) پس از نرمال سازی با *HPRT* نشان داده شده است. مقادیر p-value حاصل از مقایسه هر گروه با گروه کنترل مربوطه با علامت * نمایش داده شده است (**** $P < 0.0001$ ، * $P = 0.04$).

ارتباط معنی‌داری بین سطح بیان *AXL* و مقاومت به درمان‌های ایمونوتراپی (ICB) و بلعکس فعال بودن مسیر سیگنالینگ *ERK* و *PD-L1* و مقاومت به مهارکننده‌های تیروزین کیناز را در مدل‌های آزمایشگاهی و بالینی نشان داده‌اند (۱۶، ۱۷). بنابراین، مهار همزمان *PD-L1* و تیروزین کیناز می‌تواند راهبردی منطقی برای افزایش اثربخشی درمان هدفمند باشد.

این یافته‌ها بر اهمیت توسعه استراتژی‌های ترکیبی که بتوانند به طور همزمان چندین مسیر سیگنالینگ مؤثر در پیشرفت تومور را هدف قرار دهند، تأکید می‌کنند. چنین رویکردی می‌تواند راه حلی برای غلبه بر محدودیت‌های درمان‌های تک‌عاملی و بهبود نتایج بالینی در بیماران مبتلا به سرطان‌های زنان باشد. در این راستا، درک عمیق‌تر از مکانیسم‌های مولکولی دخیل در مقاومت درمانی و تعامل بین مسیرهای مختلف سیگنالینگ ضروری به نظر می‌رسد. اگر چه درمان‌های مهارکننده محور *PD-1/PD-L1* منجر به بهبود نتایج بالینی در بیماران سرطانی شده‌اند، کارایی این روش‌ها در بسیاری از تومورهای جامع محدود باقی مانده است (۱۱، ۲۴). این محدودیت‌ها ممکن است ناشی از عوامل متعددی از جمله اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی‌ها و بیان فرم‌های مختلف *PD-L1* (بیان در هسته، سیتوپلاسم، غشای و فرم ترشحی) در داخل سلول‌ها باشد که علاوه بر نقش ایمونولوژیک، عملکردهای اضافی دیگری نیز داشته و با پیش‌آگهی ضعیف بیماری مرتبط است. بنابراین درک دقیق مکانیسم‌های تحت تأثیر *PD-L1* برای توسعه استراتژی‌های درمانی مؤثر که مستقیماً ژن‌های مرتبط با سرطان را هدف قرار داده و مسیرهای سیگنالینگ تنظیم‌کننده عملکرد سلول‌های سرطانی را تعدیل کنند، ضروری است. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که کینازهای درون‌سلولی مانند *PI3K* و فاکتورهای رونویسی مرتبط با *EMT* در تکثیر و مهاجرت تومورهای وابسته به *Axl* نقش دارند (۱۶). مسیر

Axl/PI3K با افزایش بیان گیرنده‌های نقاط بازرسی ایمنی و سیگنالینگ کموکاین‌ها، محیطی در راستای پیشرفت تومور ایجاد کرده و پاسخ‌های ایمنی را سرکوب می‌کند (۳۳). برخی مطالعات نیز ارتباط بین *PD-L1* و *EMT* را نشان داده‌اند، به طوری که بیان بیش از حد ژن‌های مرتبط با *EMT* مانند *Axl* با مقاومت به درمان‌های ضد *PD-1* در ملانوم مرتبط دانسته شده است (۳۴). این یافته‌ها حاکی از آن است که هدف‌گیری همزمان مسیرهای مرتبط با *PD-L1* و *Axl* می‌تواند راهبردی مؤثر برای غلبه بر مقاومت درمانی و بهبود پاسخ به ایمونوتراپی باشد. به ویژه این که این دو مسیر به صورت سینرژستیک در ایجاد محیط دلخواه و سرکوب پاسخ ایمنی مشارکت دارند. درک این تعاملات پیچیده مولکولی می‌تواند راه را برای توسعه درمان‌های ترکیبی نوین که به طور همزمان چندین مکانیسم فرار ایمنی و پیشرفت تومور را هدف قرار می‌دهند، هموار سازد.

مطالعه حاضر نشان داد که رده سلولی SKOV3 سطوح نسبتاً بالایی از بیان *AXL*، *PD-L1* و ژن‌های تنظیم‌کننده *EMT* را نشان می‌دهد. این یافته حاکی از حساسیت بالقوه این سلول‌ها به مهار همزمان *PD-L1* و ژن‌های مرتبط با *EMT* می‌باشد. در تایید این نتایج، مطالعات متعددی نشان داده‌اند که مهار انتخابی *Axl* با R428 منجر به کاهش بیان *PD-L1* و *CXCR6* در سلول‌های سرطان ریه می‌شود، بدون آن که مسیرهای *ERK* و *AKT* به میزان قابل توجهی درگیر باشند (۳۴). به‌طور مشابه، Yu و همکاران گزارش کردند که *PD-L1-siRNA* از طریق مسیریهای *PI3K/AKT/mTOR* و *ERK*، تکثیر سلول‌های سرطان ریه را تعدیل می‌نماید (۳۵). در پژوهش حاضر، مهار همزمان *PD-L1* و *AXL* (با استفاده از *PD-L1-siRNA* و R428) منجر به کاهش قابل توجه توان تکثیری در رده سلولی SKOV3 گردید. این یافته با نتایج سایر مطالعات همخوانی دارد که نشان داده‌اند ترکیب

مهارکننده‌های *Axl* مانند BGB324 با آنتی بادی علیه PD-1، پیشرفت تومور را در مدل‌های موشی KPL (حاوی جهش‌های *Kras/Tp53*) به‌طور مؤثری کاهش می‌دهد (۲۲). همچنین، *Li* و همکاران نشان دادند که ترکیب PD-L1-siRNA با ایماتینیب، تکثیر سلول‌های ملانوم B16F10 را مهار کرده و در مدل‌های موشی منجر به کاهش قابل توجه اندازه و نرخ رشد تومور می‌شود (۳۶). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این درمان ترکیبی منجر به کاهش بیان *Vimentin*، *TGF-β* و *MMP-9* می‌شود که از ژن‌های کلیدی تنظیم‌کننده EMT و متاستاز هستند. این یافته با گزارش Yu و همکاران همخوانی دارد که نشان دادند مهار *PD-L1* بیان *Claudin 1*، *MMP-9*، *Vimentin*، *N-cadherin* را کاهش داده و در مقابل بیان *E-cadherin* را در سلول‌های سرطان ریه افزایش می‌دهد (۳۵). همچنین، مطالعات دیگر نشان داده‌اند که مهار همزمان *PD-L1* و مسیر *JAK/STAT3* می‌تواند مهاجرت و EMT را در سلول‌های سرطان پروستات کاهش دهد و درمان با R428 بیان *MMP2* و *MMP9* را در سلول‌های کارسینوم مری TE1 کاهش می‌دهد (۳۷، ۳۸).

نوآوری اصلی این پژوهش در معرفی و امکان‌سنجی رویکرد جدید ایمونوتراپی در سرطان تخمدان می‌باشد به طوری که مهار همزمان *PD-L1* و *AXL* به عنوان گیرنده تیروزین کینازی می‌تواند به عنوان یک راهکار درمانی نوید بخش برای سرطان‌های تولید مثلی مقاوم به درمان از جمله سرطان تخمدان مورد توجه قرار گیرد.

این مجموعه یافته‌ها بر اهمیت رویکردهای ترکیبی که چندین مسیر سیگنالینگ را به‌طور همزمان هدف قرار می‌دهند، تأکید دارد. با این حال تفاوت در پاسخ رده‌های سلولی مختلف به این نوع درمان‌ها نشان می‌دهد که برای دستیابی به نتایج بالینی مطلوب، باید به ویژگی‌های اختصاصی هر نوع تومور و مکانیسم‌های مقاومت منحصر به فرد آن توجه ویژه‌ای داشت. شواهد

پژوهشی متعدد حاکی از توزیع گسترده *PD-L1* در بخش‌های مختلف سلولی شامل انواع غشایی (*mPD-L1*)، سیتوپلاسمی (*cPD-L1*)، هسته‌ای (*nPD-L1*) و سرمی (*sPD-L1*) می‌باشد و مؤید آن است که اشکال مختلف *PD-L1* می‌توانند اثرات متفاوتی بر پاسخ ایمنی ضد توموری داشته باشند و لزوم توسعه درمان‌های شخصی‌سازی شده بر اساس مشخصات مولکولی هر تومور را برجسته می‌سازد (۴۳-۳۹). با این حال، انتقال این استراتژی به محیط بالینی نیازمند مطالعات تکمیلی در زمینه بهینه‌سازی دوز، ارزیابی سمیت و بررسی فارماکوکینتیک این ترکیبات می‌باشد. این مطالعه دارای چند محدودیت است که باید در تفسیر نتایج در نظر گرفته شوند. نخست آن که بررسی‌ها تنها بر روی یک رده سلولی سرطان تخمدان (SKOV3) انجام شد و امکان تعمیم کامل یافته‌ها به سایر رده‌های سلولی یا انواع متفاوت تومور وجود ندارد؛ بنابراین ارزیابی در مدل‌های سلولی بیش‌تر ضروری است. محدودیت دیگر آن است که اثرات مهار همزمان *PD-L1* و *AXL* تنها در سطح بیان ژن و تکثیر سلولی سنجیده شد و آزمون‌های عملکردی مانند سنجش مهاجرت، تهاجم، آپوپتوز و بررسی پروتئینی مسیرهای پایین دست مورد ارزیابی قرار نگرفت. علاوه بر این، ماهیت کاملاً *in vitro* مطالعه اجازه نتیجه‌گیری مستقیم درباره کارایی درمان ترکیبی در شرایط درون‌تنی یا بالینی را نمی‌دهد و انجام مطالعات حیوانی و بررسی‌های ایمونولوژیک گسترده‌تر لازم به نظر می‌رسد. همچنین مسیرهای سیگنالینگ پایین دست *PD-L1* و *AXL* از جمله *PI3K/AKT* و *ERK* به صورت اختصاصی در این تحقیق تحلیل نشدند که می‌تواند درک عمیق‌تر سازوکارهای مقاومت و اثرات درمانی را محدود کند.

در این مطالعه، مهار همزمان *PD-L1* و *AXL* در رده سلولی سرطان تخمدان (SKOV3) باعث کاهش برخی از ویژگی‌های کلیدی پیشرفت تومور شد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که مهار هدفمند *Axl* در

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی انجام شده است. نویسندگان صمیمانه از راهنمایی‌ها و نظرات ارزشمند جناب آقای دکتر میثاق رجبی نژاد تقدیر و تشکر می‌نمایند.

سلول‌های بیان‌کننده *PD-L1* پتانسیل قابل قبولی را برای غلبه بر مقاومت به مهارکننده‌های نقاط بازرسی ایمنی (ICB) از خود نشان داد و می‌تواند دامنه بیماری‌هایی که از درمان‌های ترکیبی هدفمند بهره می‌برند را گسترش دهد. هر چند مطالعات بیش‌تری مورد نیاز است تا سازوکارهای ایمونولوژیک را در بافت‌های سرطانی مختلف به طور جامع بررسی نماید.

References

1. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474(7353): 609-615. PMID: 21720365.
2. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs* 2019. 35(2): 151-156. PMID: 30867104.
3. Jiang G, Wu Q, Li B. Evaluation of immunotherapy efficacy in gynecologic cancer. *Front Immunol* 2023. 14: 1061761. PMID: 36793735.
4. Song M, Yeku OO, Rafiq S, Purdon T, Dong X, Zhu L, et al. Tumor derived UBR5 promotes ovarian cancer growth and metastasis through inducing immunosuppressive macrophages. *Nat Commun* 2020. 11(1): 6298. PMID: 33293516.
5. Bogani G, Lopez S, Mantiero M, Ducceschi M, Bosio S, Ruisi S, et al., Immunotherapy for platinum-resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2020. 158(2): 484-488. PMID: 32518015.
6. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015. 15(8): 486-99. PMID: 26205583.
7. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol* 2019. 37: 457-495. PMID: 30676822.
8. Moreira RS, Bicker J, Musicco F, Persichetti A, Pereira AMPT. Anti-PD-1 immunotherapy in advanced metastatic melanoma: State of the art and future challenges. *Life Sci* 2020. 240: 117093. PMID: 31760100.
9. Nhokaew W, Kleebkaw P, Chaisuriya N, Kietpeerakool C. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Epithelial Ovarian Cancer: A Comparison of Type I and Type II Tumors. *Asian Pac J Cancer Prev* 2019. 20(4): 1161-1169. PMID: 31030490.
10. Wan C, Keany MP, Dong H, Al-Alem LF, Pandya UM, Lazo S, et al., Enhanced Efficacy of Simultaneous PD-1 and PD-L1 Immune Checkpoint Blockade in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancer Res* 2021. 81(1): 158-173. PMID: 33158814.
11. Akinleye A, Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol* 2019. 12(1): 92. PMID: 31488176.

12. Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, Rustgi AK. EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis. *Trends Cell Biol* 2020. 30(10): 764-776. PMID: 32800658.
13. Zhu C, Wei Y, Wei X. AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer* 2019. 18(1): 153. PMID: 31684958.
14. Yang Y, Li S, Wang Y, Zhao Y, Li Q. Protein tyrosine kinase inhibitor resistance in malignant tumors: molecular mechanisms and future perspective. *Signal Transduct Target Ther* 2022. 7(1): 329. PMID: 36115852.
15. Wium M, Ajayi-Smith AF, Paccetz JD, Zerbini LF. The Role of the Receptor Tyrosine Kinase Axl in Carcinogenesis and Development of Therapeutic Resistance: An Overview of Molecular Mechanisms and Future Applications. *Cancers (Basel)* 2021. 13(7). PMID: 33806258.
16. Skinner HD, Giri U, Yang LP, Kumar M, Liu Y, Story MD, et al. Integrative Analysis Identifies a Novel AXL-PI3 Kinase-PD-L1 Signaling Axis Associated with Radiation Resistance in Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res* 2017. 23(11): 2713-2722. PMID: 28476872.
17. Tsukita Y, Fujino N, Miyauchi E, Saito R, Fujishima F, Itakura K, et al. Axl kinase drives immune checkpoint and chemokine signalling pathways in lung adenocarcinomas. *Mol Cancer* 2019. 18(1): 24. PMID: 30744655.
18. Jiao Q, Bi L, Ren Y, Song S, Wang Q, Wang YS. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol Cancer* 2018. 17(1): 36. PMID: 29455664.
19. Jin H, Wang L, Bernards R. Rational combinations of targeted cancer therapies: background, advances and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2023. 22(3): 213-234. PMID: 36509911.
20. Yang C, Xia BR, Zhang ZC, Zhang YJ, Lou G, Jin WL., et al., Immunotherapy for Ovarian Cancer: Adjuvant, Combination, and Neoadjuvant. *Front Immunol* 2020. 11: 577869. PMID: 33123161.
21. Iinuma K, Yamada T, Kameyama K, Taniguchi T, Kawada K, Ishida T, et al., The Efficacy and Safety of Immune Checkpoint Inhibitor and Tyrosine Kinase Inhibitor Combination Therapy for Advanced or Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Multicenter Retrospective Real-World Cohort Study. *Cancers (Basel)* 2023. 15(3). PMID: 36765903.
22. Li H, Liu Z, Liu L, Zhang H, Han C, Girard L, et al., AXL targeting restores PD-1 blockade sensitivity of STK11/LKB1 mutant NSCLC through expansion of TCF1(+) CD8 T cells. *Cell Rep Med* 2022. 3(3): 100554. PMID: 35492873.
23. Li J, Zhu JX, Zhang YX, Li SQ. Effectiveness of immune checkpoint inhibitors in combination with tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced or metastatic colorectal carcinoma with either mismatch repair proficient or metastatic microsatellite stable disease: A systematic review and meta-analysis. *Oncol Lett* 2024. 27(4): 153. PMID: 38406596.
24. Wu Y, Chen W, Xu ZP, Gu W. PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer Immunotherapy-Blockade, Knockdown, or

- Inhibition. *Front Immunol* 2019. 10: 2022. PMID: 31507611.
25. Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct Target Ther* 2020. 5(1): 101. PMID: 32561705.
 26. Ozcan G, Ozpolat B, Coleman RL, Sood AK, Lopez-Berestein G. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015. 87: 108-19. PMID: 25666164.
 27. Teo PY, Yang C, Whilding LM, Parente-Pereira AC, Maher J, George AJ, et al., Ovarian cancer immunotherapy using PD-L1 siRNA targeted delivery from folic acid-functionalized polyethylenimine: strategies to enhance T cell killing. *Adv Healthc Mater* 2015. 4(8): 1180-1189. PMID: 25866054.
 28. Kang SW, Lee JY, Kang OJ, Kim YM, Choi EK, Lee SW. Transcriptome profiling and characterization of peritoneal metastasis ovarian cancer xenografts in humanized mice. *Sci Rep* 2024. 14(1): 11894. PMID: 38789484.
 29. Lee EH, Ji KY, Kim EM, Kim SM, Song HW, Choi HR, et al. Blockade of Axl signaling ameliorates HPV16E6-mediated tumorigenicity of cervical cancer. *Sci Rep* 2017. 7(1): 5759. PMID: 28720772.
 30. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet* 2019. 393(10167): 169-182. PMID: 30638582.
 31. Nagasaki J, Ishino T, Togashi Y. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Cancer Sci* 2022. 113(10): 3303-3312. PMID: 35848888.
 32. Bhalla, S. and D.E. Gerber, AXL Inhibitors: Status of Clinical Development. *Curr Oncol Rep* 2023. 25(5): 521-529. PMID: 36920638.
 33. Liu Y, Xu L, Dou Y, He Y. AXL: shapers of tumor progression and immunosuppressive microenvironments. *Mol Cancer*, 2025. 24(1): 11. PMID: 39799359.
 34. Boshuizen J, Pencheva N, Krijgsman O, Altimari DD, Castro PG, de Bruijn B, et al. Cooperative Targeting of Immunotherapy-Resistant Melanoma and Lung Cancer by an AXL-Targeting Antibody-Drug Conjugate and Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Res* 2021. 81(7): 1775-1787. PMID: 33531370.
 35. Yu W, Hua Y, Qiu H, Hao J, Zou K, Li Z, et al. PD-L1 promotes tumor growth and progression by activating WIP and beta-catenin signaling pathways and predicts poor prognosis in lung cancer. *Cell Death Dis* 2020. 11(7): 506. PMID: 32632098.
 36. Li, C. and X. Han, Melanoma Cancer Immunotherapy Using PD-L1 siRNA and Imatinib Promotes Cancer-Immunity Cycle. *Pharm Res* 2020. 37(6): 109. PMID: 32476052.
 37. Bastaki S, Aravindhan S, Ahmadpour Saheb N, Afsari Kashani M, Evgenievich Dorofeev A, Karoon Kiani F, et al. Codelivery of STAT3 and PD-L1 siRNA by hyaluronate-TAT trimethyl/thiolated chitosan nanoparticles suppresses cancer progression in tumor-bearing mice. *Life Sci* 2021. 266: 118847. PMID: 33309720.
 38. Han S, Wang Y, Ge C, Gao M, Wang X, Wang F, et al., Pharmaceutical inhibition of AXL suppresses tumor growth and invasion of esophageal squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med* 2020. 20(5): 41. PMID: 32952632.

39. Ukpo, O.C., W.L. Thorstad, and J.S. Lewis, Jr., B7-H1 expression model for immune evasion in human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol* 2013. 7(2): 113-21. PMID: 23179191.
40. Tang Y, Fang W, Zhang Y, Hong S, Kang S, Yan Y, et al., The association between PD-L1 and EGFR status and the prognostic value of PD-L1 in advanced non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. *Oncotarget* 2015. 6(16): 14209-19. PMID: 25895031.
41. Hua D, Sun J, Mao Y, Chen LJ, Wu YY, Zhang XG. B7-H1 expression is associated with expansion of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2012. 18(9): 971-8. PMID: 22408358.
42. Chowdhury, S, Veyhl J, Jessa F, Polyakova O, Alenzi A, MacMillan C, Ralhan R, et al. Programmed death-ligand 1 overexpression is a prognostic marker for aggressive papillary thyroid cancer and its variants. *Oncotarget* 2016. 7(22): 32318-28. PMID: 27086918.
43. Satelli A, Bath IS, Brownlee Z, Rojas C, Meng QH, Kopetz S, Li S. Potential role of nuclear PD-L1 expression in cell-surface vimentin positive circulating tumor cells as a prognostic marker in cancer patients. *Sci Rep* 2016. 6: 28910. PMID: 27363678.