# Evaluation of Exosomes Extracted from MCF7 Cells Treated with natural active substances Effective in inhibiting the growth of breast cancer cells with different mechanisms

**Shaghayegh Shafighi[1], Mohammad Zaefizadeh[2*], Behbood Jaafari[3], Mohammad Reza Alivand[4], Saeid Ghorbian[1]**

1. Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
2. Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran
3. Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
4. Department of Genetics, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

## Abstract

**Aim and Background:** Breast cancer is the most common cancer in women, which is the main cause of cancer-related death in women. The use of herbal compounds as anti-tumor with less side effects than chemotherapy has been considered. But it seems that over time drug resistance will reach this type of material. This study has been conducted to determine the effect of plant extracts and exosomes extracted from their effects on MCF7 cancer cells.

**Material and methods**: In this comparative study, MCF7 cells were cultured in medium and treated with different concentrations of oleuropein, quercetin, coumarin and Valproic acid for 24 hours. Then the cell viability was evaluated by MTT method and its IC50 values were calculated and exosome was extracted from the culture medium of the treatments and applied to MCF7 and their IC50 values were also calculated by MTT method.

**Results:** The results of MTT confirmed the inhibitory properties of four natural substances and their combination on MCf7 cells. Coumarin and quercetin were the most effective treatments of the studied materials. But the exosome obtained by applying 50% of their concentration had an inhibitory role with higher concentrations and the exosomes obtained from their IC75 actions had played their role in lower inhibitory concentrations.

**Conclusion:** Inhibition of breast cancer cells by the exosomes obtained from the combination of the above-mentioned 4 substances occurred in a lower dose Because at this concentration, all cell death-inducing substances and their signals accumulate in the exosome, and by transferring into cancer cells, they induce cell death.

**Key words:** Oleuropein, quercetin, coumarin, Valproic acid, exosome, Iau Science.



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]

**Corresponding author:**
Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran.
**Email**: Mzaefi@gmail.com

# بررسی اثر اگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های MCF7 تیمار شده توسط مواد موثره طبیعی با مکانیسم‌های متفاوت در مهار رشد سلول‌های سرطانی پستان

**شقایق شفیقی[۱]، محمد ضعیفی زاده[۲*]، بهبود جعفری[۳]، محمدرضا علیوند[۴]، سعید قربیان[۱]**

۱.گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
۲. گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران
۳.گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
۴. گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

## چکیده

**سابقه و هدف**: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان می‌باشد که علت اصلی مرگ ناشی از سرطان در زنان است. استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان ضد تومور با عوارض جانبی کمتر از شیمی درمانی مورد توجه قرار گرفته است. اما به نظر می‌رسد به مرور زمان مقاومت دارویی به این نوع مواد هم خواهد رسید. این مطالعه به منظور بررسی اثر ضد سرطانی چهار ماده مستخرج گیاهی بر روی سلول های MCF7 و تاثیر اگزوزوم‌های مستخرج تحت تیمار چهار ماده بر مهار رشد سلولی انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه قیاسی سلول‌های MCF7 در محیط کشت شد و با غلظت‌های متفاوت اولئوروپین، کوئرستین، کومارین و والپیروئیک اسید به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس زیست پذیری سلول‌ها با روش MTT ارزیابی و مقادیر IC50 آن محاسبه شد و از محیط کشت تیمار شده توسط چهار ماده طبیعی، اگزوزوم استخراج و بر روی سلول‌های MCF7 اعمال و به روش MTT میزان IC50 آن‌ها نیز محاسبه شد.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از MTT خاصیت مهار کنندگی چهار ماده طبیعی و ترکیب آن‌ها را بر روی سلول‌های MCf7 را تایید کرد. بیشترین تاثیر تیمارهای مواد مورد مطالعه را کومارین و کوئرستین به خود اختصاص داده بود. اما اگزوزوم حاصل از اعمال ۵۰ درصد غلظت آنها نقش مهاری با غلظت‌های بالاتر داشت و اگزوزوم‌های حاصل از اعمال IC75 آنها در غلظت‌های مهاری پایینتری نقش خود را ایفا کرده بودند. مهار سلول‌های سرطانی سینه توسط اگزوزوم‌های حاصل از ترکیب ۴ ماده فوق الذکر در دوز کمتر اتفاق افتاده بود زیرا در این غلظت، تمام مواد القا کننده مرگ سلولی و سینگال‌های آن در اگزوزوم تجمع می‌یابند و با انتقال به داخل سلول‌های سرطانی القای مرگ سلولی را عامل می‌شوند.

**نتیجه‌گیری:** مهار سلول‌های سرطانی MCF7 توسط اگزوزوم های مستخرج ازغلظت LC75 نشان‌دهنده محتویات القا کننده آپاپتوز در مسیرهای مختلف سلولی است. که برآیندی از تاثیر گرفتن سلول‌ها از داروهای به‌کار رفته بود.

**واژگان کلیدی:** اولئوروپین، کوئرستین،کومارین، والپیروئیک اسید، اگزوزوم، Iau Science .



## مقدمه

سرطان پستان شایع ترین سرطان در زنان می‌باشد و با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در تشخیص سریع و درمان، علت اصلی مرگ ناشی از سرطان در زنان در بیش از ۱۰۰ کشور است (۱،۲). آخرین آماری GLOBOCAN 2018 که توسط IARC (آژانس بین المللی تحقیقات سرطان) از ۱۸۵ کشور جمع‌آوری شده است، ۲/۳ میلیون مورد جدید (۱۱/۷ ٪) سرطان پستان و نرخ مرگ و میر ۶/۹٪ را گزارش کرده است(۳). درسال‌های اخیر پیشرفت‌های زیادی در جهت تشخیص دقیق بالینی و پاسخ به درمان در سرطان پستان وجود داشته است. با تشخیص زودهنگام سرطان پستان و ارائه درمان مؤثر و راهکارهای ویژه، می‌توان به افزایش بقا، کاهش مرگ و ارتقاء کیفیت زندگی بیماران کمک شایانی نمود. درمان‌های فعلی شامل جراحی همراه با شیمی درمانی و رادیوتراپی است. بزرگترین مسئله در مورد

**نویسنده مسئول:**
گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران
**پست الکترونیکی**: Mzaefi@gmail.com:
**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۰۹/۱۰
**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۰/۱۲

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]

شیمی درمانی سمیت آن‌ها بر روی سلول‌های طبیعی و عوارض جانبی آن است و متأسفانه سلول‌های توموری می‌توانند در برابر این روش‌های درمانی، به دلیل تواناییشان در مقابله با عوامل دارویی شیمی درمانی، افزایش تولید پروتئین‌های ضد آپوپتوز و عدم حساسیت به سیگنال‌های مختلف درگیر در سرطان‌زایی مقاوم شوند(۴،۵). به همین دلیل، نیاز به کشف داروهای جدیدتر و مؤثرتر یا ترکیبات دارویی وجود دارد. تحقیقات اخیر نشان داده است که استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان آنتی تومور برای کنترل و درمان سرطان نوید بخش بوده است و با توجه به مضرات داروهای شیمیایی گرایش به داروهای طبیعی با اثرات جانبی کم یا بدون اثرات جانبی افزایش یافته است. نشان داده شده است که استفاده از پلی فنول‌های طبیعی در درمان ترکیبی با شیمی درمانی می‌تواند اثرات ضد سرطانی در درمان سرطان را تعدیل کند(۶،۷). اولئوروپین، ماده شیمیایی فنلی اصلی زیتون است که در تمام بخش‌های درخت زیتون به ویژه در میوه و برگ زیتون یافت می‌شود. اولئوروپین با فرمول $C_{25}H_{23}O_{13}$ و وزن مولکولی ۵۴۰ یک استر از اسید اولئانولیک و هیدروکسی تیروزول (HT) است که در سال ۱۹۰۸ کشف شد(۸،۹). مطاللعات نشان داده است که ترکیبات فنلی روغن زیتون فعالیت شیمیایی محافظت کننده و ضد سرطانی در انواع مختلف سلول‌های سرطانی(۸،۱۰،۱۱)، سرطان پستان(۱۲،۱۳)، پروستات(۱۴،۱۵)، ملانوما(۱۶) و سایر سلول‌های سرطانی(۱۷) دارد. این ماده همچنین دارای چندین خاصیت شامل خاصیت‌های آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد پیری و حفاظت از پوست می‌باشد. علاوه بر آن یک عامل قدرتمند ضد رگ زایی می‌باشد، که به‌طور مستقیم از طریق مختل ساختن رشته‌های اکتین در سلول‌ها عمل می‌کند(۱۸). اولئوروپین بیان پروتئین‌های پروآپوپتوز p53 و Bax را افزایش می‌دهد در حالی که بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوز از جمله Bcl-2 و HIF-1 را کاهش می‌دهد. همچنین مسیرهای مهاری AKT را مورد هدف قرار می‌دهد و بیان سرین/ترئونین کیناز (Akt) و IB را کاهش می‌دهد(۸)، که اجزای آبشار فعال‌سازی NF-kB هستند (۱۹) اثرات اولئوروپین بر سلول‌های سرطانی تحت تأثیر غلظت آن، زمان قرار گرفتن در معرض آن و نوع سلول سرطانی قرار میگیرد. برای مثال نشان داده شده است که به دنبال درمان اولئوروپین در دوزهای مختلف IC50 تکثیر سلول‌های سرطان سینه MCF-7 در شرایط آزمایشگاهی به روشی وابسته به زمان کاهش می‌یابد(۲۰). کومارین از دیگر مواد طبیعی پلی فنولی است که می‌توان به خواص ضد سرطانی آن اشاره کرد. کومارین‌ها یک کلاس از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که متعلق به گروهی از ترکیبات هتروسیکلیک متشکل از حلقه‌های بنزن و ۲-پیرون بی رنگ و کریستالی هستند(۲۱،۲۲). کومارین و مشتقات آن دارای فعالیت ضد سرطانی در برابر انواع مختلف سرطان‌ها مانند پروستات، کلیه، پستان، حنجره، ریه، روده بزرگ، CNS، لوسمی، ملانوم بدخیم هستند که می‌تواند مسیرهای درون سلولی درگیر در عملکرد غیرطبیعی سلولی را مورد هدف قرار دهد و به این طریق فرایند سرطان زایی را به تاخیر اندازد. (۲۳). کومارین از طریق مهار آنژیوژنز، مهار کیناز، توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 و فاز G2/M، مهار آروماتاز، فعالیت آنتی بیوتیکی، مهار تلومراز، مهار سولفاتاز، مهار پروتئین شوک حرارتی (HSP90) ، القا آپوپتوز با واسطه کاسپاز ۹، تکثیر سلول‌های سرطانی را سرکوب می‌کنند (۲۴،۲۵،۲۶ سینناموئیل - کومارین بر روی سرطان های وابسته به استروژن، مانند رده های سلولی سرطان سینه (MCF7) و تخمدان (OVCAR) موثر بودند. این ترکیبات مهار کننده‌های غیراستروئیدی انتخابی β-۱۴ هیدروکسی استروئید دهیدروژناز نوع ۱ هستند (۲۷). مطالعات انجام شده نشان داد که سنتز یک مولکول هیبریدی جدید به نام coumarin - monastrol فعالیت انتخابی را در برابر رده‌ای سلولی سرطان سینه MCF-7 وMDA-MB-231 بروز داده است. این ترکیب باعث فعال شدن کاسپاز ۳ و آپوپتوز شده و باعث توقف چرخه سلولی MCF-7 در فاز G1 شده است(۲۸)Cui . N و همکاران اثرات ضد سرطانی سه کومارین سنتز شده از تری فنیل اتیلن(TCHs) را نشان دادند که از طریق مهار رگزایی در رده‌ای سلولی سرطان پستان رخ می‌هد. ترکیب TCH-5c تکثیر را مهار کرده، منجر به مرگ سلولی، افزایش بیان پروتئینp21 برای القای توقف G0/G1 و تغییر سازمان اسکلت سلولی سلول اندوتلیال شده است(۲۹). در برخی از مطالعات اثر پیشگیرانه و آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها که تقریباً در اکثر گیاهان و منابع غذایی گیاهی وجود دارد نشان داده شده است. کوئرستین (۳،۳،۴،۵،۷-پنتاهیدروکسی فلاون) متعلق به یک کلاس گسترده از ترکیبات فلاونوئیدی پلی فنولی است که در بسیاری از غذاها ازجمله سبزیجات و میوه‌های، دانه‌ها، آجیل، چای یافت می‌شود(۳۰) و قادر است استرس اکسیداتیو و سایتوتوکسیتی را در سلول‌های توموری به واسطه گونه های فعال اکسیژن، باعث افزایش آسیب و مرگ سلولی می‌شود افزایش دهد (۳۲و۳۱). تحقیقات نشاد داده است که کوئرستین پس از ۴۸ ساعت باعث کاهش بیان ژن‌های P53 و مهار ژن BCL2 شده و به موجب آن چرخه سلولی در فاز S را مهار کرده و باعث القای آپاپتوز می‌گردد(۳۳). کوئرستین یک آنتی اکسیدان اصلاح رادیکال آزاد عالی محسوب می‌شود و جدا از فعالیت



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]

آنتی اکسیدانی، اثر مستقیم بر آپوپتوز سلول‌های توموری دارد و در واقع می تواند رشد چندین لاین سلول سرطانی انسان را در مراحل مختلف چرخه سلولی مسدود کند(۳۴). کوئرستین تنظیم چرخه سلولی را با تعدیل چندین هدف مولکولی، از جمله p21 ، cyclin B، p27، کینازهای وابسته به سیکلین و توپوایزومراز II انجام میدهد و بسته به نوع سلول و منشا تومور، قادر است چرخه سلولی را در G2/M یا در انتقال G1/S مسدود کند. دوزهای پایین کوئرستین از تکثیر رده های سلولی سرطان پستان جلوگیری می‌کند. توقف چرخه سلولی در فاز G1 از طریق القای p21 و از طریق کاهش همزمان فسفوریلاسیون پروتئین رتینوبلاستوما (pRb) اتفاق می‌افتد. در همان مدل سلولی، کوئرستین سیکلین B1 و کیناز وابسته به سیکلین 1 (CDK)را کاهش می‌دهد، که در پیشرفت به فازهای G2/Mچرخه سلولی ضروری هستند(۳۴). طبق مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که یکی از موثرترین اثرات کوئرستین مهار رونویسی و چرخه سلولی و افزایش بیان پروتئین‌های پروآپوپتوتیک از طریق مهار مسیر انتقال پیام PI3K/Akt است که باعث مهار فسفریلاسیون AKt و در ادامه باعث مهار فسفریلاسیون mTOR و کاهش فعالیت NF-KB می‌شود(۳۵). طبق مطالعه نیازوند و همکاران نیز مشخص شد با کپسوله کردن کوئرستین اثرات ضد سرطانی آن در سلول‌های MCF7 افزایش می‌یابد که می‌تواند به علت افزایش نفوذ کوئرستین به سلول‌ها باشد(۳۶). همچنین فهمیه محمدیان و همکاران نشان دادند که کوئرستین بیان ژن‌های دآمیناز و متیل ترانسفراز را تغییر داده و با کاهش بیان آنزیم‌های APOBEC3B و DNMT-1 خواص پیشگیری‌کننده یا درمان‌کننده سرطان پستان را داشته باشد(۳۷). از مواد طبیعی دیگری که می‌توان به آن اشاره کرد والپیروئیک اسید (۲-پروپیل پنتانوئیک اسید،) متعلق به گروه اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه است که در سنبل کوهی یافت می‌شود و در سال ۱۸۸۲ توسط Burton شناسایی شد(۳۸) و اولین بار به عنوان داروی ضد صرع استفاده شد. شواهد نشان داده است والپیروئیک اسید در چندین فعالیت سلولی، از جمله تکثیر سلولی، مهاجرت، تهاجم، توقف چرخه سلولی، آپوپتوز، اتوفاژی و رگزایی نقش دارد و به عنوان مهارکننده هیستون داستیلاز عمل می‌کند، هیستون داستیلازها در سلول‌های سرطانی بیان بالایی دارند که منتهی به تغییر بیان و فعالیت تعدادی پروتئین‌های دخیل در سرطان می‌شوند(۳۹). مشخص شده است والپیروئیک اسید باعث مهار داستیلاسیون می‌شود. هیستون داستیلازها با عملکرد غیرطبیعی باعث سرکوبی نسخه برداری ژن‌های سرکوب گر تومور شده و باعث پیشرفت تومور می‌شوند (۴۰). نشان داده شده است که اختلالات هیستون استیلاسیون عامل مهمی در پیشرفت سرطان پستان است. آنزیم‌های اصلاح کننده هیستون استیلاسیون فرآیند رونویسی و وضعیت هیستون استیلاسیون و همچنین سایر عوامل رونویسی را که بیشتر در ناحیه پروموتر رخ می‌دهند کنترل می‌کند و از طریق متوقف کردن چرخه سلولی در فازهای G1 ، القای بیان پروتئین p21 و القای آپوپتوز، افزایش بیان Bak و کاهش بیان Bcl-2 ، در نتیجه افزایش نسبت Bax/Bcl-2و کاهش فعالیت تلومراز در سلول‌های سرطان پستان استروژن مثبت MCF7 ،بقای سلولی را کاهش می‌دهد(۴۱). یکی از ویژگی‌های مهم سلول‌های بدخیم فعالیت بالای هیستون داستیلاز در کروماتین‌های فشرده و متعاقب آن سرکوب ژن همراه آن است (۴۲). اگزوزوم‌های وزیکول‌های سلولی هستند که در هر مرحله‌ای چرخه سلولی تولید و به‌عنوان پیام رسان بین سلول‌ها استفاده می‌شوند(۴۳). این وزیکول‌ها با حداقل تحریک سیستم ایمنی می‌توانند انتقال دهنده‌های خوبی باشند(۴۴). محتویات اگزوزوم عموما نشان دهنده مرحله‌ای از چرخه سلولی است که می‌تواند حتی به‌عنوان مارکر مورد استفاده قرار گیرد(۴۵). اگر این فرضیه درست باشد استفاده از برآیند تاثیر مواد در تولید اگزوزوم در مهار سرطان مورد استفاده قرار خواهد گرفت. نتایج نشان داده است که اولئوروپین (موثر در بیش فعالی تومور ساپرسور)، کوئرستین (موثر در مهار رونویسی و چرخه سلولی )، کومارین (موثر در مهار آنژیوژنز و کیناز ها ) و والپیروئیک اسید (موثر در مهار هیستون داستیلاسیون) می‌توانند وابسته به دوز و سمیتشان از رشد سلول‌های MCF7 جلوگیری کنند. چند هدفی بودن این مواد طبیعی در برابر انواع بیماری ها از جمله سرطان پستان می‌تواند نوید بخش درمان هدفمندی باشد. از این رو با انتقال این مواد به‌طور همزمان با القای آپوپتوز ،توقف چرخه سلولی، اثرات آنتی-اکسیدانی وکاهش سمیت سلولی می‌توان به درمان سرطان پستان امیدوار بود. هدف ما نیز در این مطالعه تاثیر چهار ماده طبیعی اولئوروپین، کوئرستین ،کومارین و والپیروئیک اسید به‌صورت جداگانه و همزمان در مهار رشد سلول‌های سرطانی پستان رده MCF7 و سپس ارزیابی اثر ضد سرطانی اگزومهای مستخرج از سلول‌های MCF7 تیمار شده با چهار ماده طبیعی می‌باشد.

## روش کار

### کشت سلولی

در این تحقیق رده سلولی MCF-7 از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۰/۲



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]

گرم بیکربنات سدیم (NAHCO3) و ۱ml آنتی بیوتیک تریپسین/پنی سیلین به ازای هر ۱۰۰ml محیط کشت و ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) کشت داده شدند. سپس در انکوباتور دمای ۳۷ درجه سلسیوس در فشار ۵ درصد CO2 نگهداری شدند.پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، سرعت رشد سلولی با سنجش MTT ارزیابی شد.

### تست MTT: Microculture Tetrazolium Test

سمیت سلولی۴ ماده طبیعی اولئوروپین، کوئرستین، کومارین و والپیروئیک اسید بر روی سلول های رده سلولی MCF7 به روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا حدود ۱۰۰۰۰ از سلول‌های MCF7 و نرمال در پلیت‌های ۹۶ خانه و در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت در شرایط کاملا یکسان کشت داده شدند. سپس سلول‌ها در غلظت‌های ۲۵/۵، ۵۰،۷۵، ۱۰۰ ماکروگرم در ماکرولیتر از هر ماده و نسبت مساوی ترکیب آنها از نظر وزن ملکولی، در بازه زمانی ۲۴ ساعت مورد تیمار قرار گرفت. از هر غلظت هر ماده در ۳ چاهک تکرار صورت گرفت. بعد از گذشت بازه‌ی زمانی هر خانه با ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه و ۵۰ میکرو لیتر محلول MTT جایگزین شد. سلول‌های تیمار نشده به عنوان کنترل به کار برده شد. پس از ۴ ساعت ، انکوباسیون جهت ایجاد بلورهای فورمازان توسط سلول‌های زنده، داخل هرکدام ۱۰۰میکرولیترDMSO اضافه شد. به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه شیکینگ انجام گرفت. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر سنجیده شد. درصد بقای سلول هایی که تحت تأثیر غلظت های مختلف از هر ۴ ماده قرار گرفته بودند طبق فرمول زیر محاسبه شد:

۱۰۰× (جذب نوری کنترل/جذب نوری تست) = میزان بقای سلولی

IC50 , IC75 با نرم افزار آنلاین AAT Bioquest تعیین گشت.

### استخراج اگزوزوم

مجددا در فلاسک ها همان غلظت مواد در تست MTT ،اعمال گشت و استخراج اگزوزوم به روش کیت Exocib C انجام شد. بدین منظور ابتدا جهت حذف ذرات درشت و زباله های سلولی سلول های تیمار شده به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ RPM سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی با معرف A کیت به نسبت ۱ به ۵ به مدت ۵ دقیقه ورتکس شد بعد از ۱۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۴ درجه سلسیوس دوباره با دور ۳۰۰۰ RPM به مدت ۴۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را به طور کامل جدا کرده و رسوب را با ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر از معرف B تعلیق کرده و در انتها در دمای ۸۰- نگهداری کردیم. تایید آن از طریق وسترن بلات برای آنتی‌بادی CD9 و روش سایز سنجی dynamic light scattering(DLS ) انجام شد. غلظت اگزوزوم‌ها براساس روش براد فورد سینکرونایز شد و با غلظت سریالی بر روی سلول‌های MCF7 اعمال شد و نتیجه از طریق آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

## نتایج

هر ۴ ماده طبیعی اولئوروپین،کوئرستین،کومارین و والپیروئیک اسید جهت فعالیت ضد توموری خود در برابر رده سلولی سرطان پستان (MCF7) با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفتند. بین غلظت‌های مختلف در آنالیز واریانس اختلاف معنی دار ($P_{value}$< 0.01) از لحاظ میزان مهار در تیمارها دیده شد(جدول ۱).

جدول ۱: نتایج آنالیز غلظت‌های مختلف مواد مورد بررسی بر روی سلول‌های MCF-7 نتایج با تست MTT

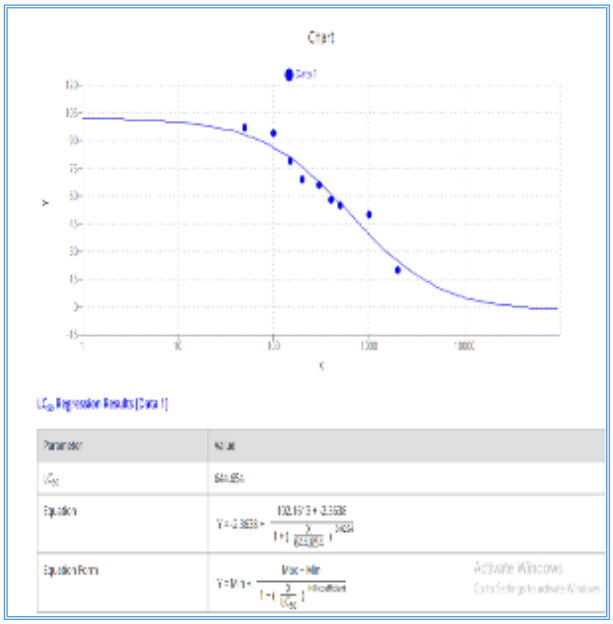
| S.OV | Df | MS(میانگین مربعات) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | کومارین | اولئوروپین | کوئرستین | والپیروئیک اسید |
| تیمار (غلظت) | ۸ | ۳۲۱/۵** | ۲۱۴/۵۱** | ۵۶۳/۵** | ۲۸/۳۵** |
| اشتباه آزمایش | ۹ | ۱۵/۲۵ | ۱۳/۲۵ | ۱۷/۴۷ | ۴/۴۷ |

**- معنی داری در سطح احتمال کمتر از ۱ درصد



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]

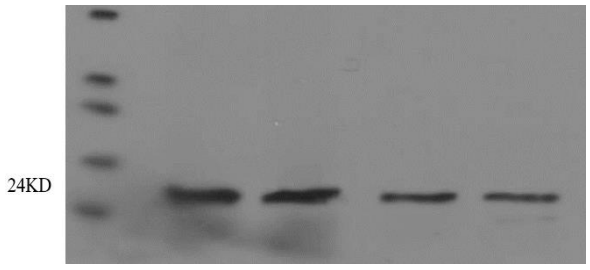
مقایسه میانگین میزان مهار با افزایش غلظت، افزایش می-یافت. مقادیر IC50 به ترتیب برابر ۴۵۸/۷۷ برای اولئوروپین، ۲۹۱/۴۵ برای کومارین، ۳۵۲/۱۱ برای کوئرستین ، ۷۱۵/۲۱ برای والپیروئیک اسید و ۶۴۴/۶۵ برای کمپلکس چهارگانه (شکل۱) برآورد شد.






شکل ۱- منحنی و معادله تعیین IC50 برای ترکیب فیزیکی چهار گانه و مهار ۵۰ درصدی در اعمال غلظت ۶۶۴ میکرو گرم بر میلی لیتر

اندازه اگزوزوم‌های استخراج شده از محیط کشت تیمارهای اعمال شده بر روی رده سلولی MCF7 به روش DLS انجام شد . اندازه اگزوزوم‌های استخراجی بین ۱۷/۷ در تیمار شاهد تا ۳۵ نانومتر بود که مطابق با اندازه استاندارد اگزوزوم بوده و قابل نفوذ به داخل سلول‌ها از طریق اندوسیتوز بود. همچنین تایید اگزوزوم استخراجی براساس آنتی بادی CD9 از طریق وسترن بلات انجام شد که نتیجه آن در شکل ۲ درج شده است. وجود باندهای آنتی‌بادی برای CD9 که از پروتیین‌های اختصاصی اگزوزوم‌ها می-باشد اثبات استخراج موفق اگزوزم‌ها را نشان می‌دهد.




شکل ۲- نتیجه وسترن بلات برای نمونه های مورد نظر از نظر وجود آنتی بادی CD9

آنالیز واریانس برای مهار سلول‌های سرطانی MCF7 تحت تاثیر اگزوزوم‌های مختلف استخراج شده از محیط کشت سلول‌های MCF7 تحت تیمار مواد مورد مطالعه و ترکیب آن‌ها نشان داد بین تیمارها (غلظت اگزوزوم ها) که از محیط کشت IC50 تیمارهای دارویی به‌دست آمده بود تفاوت معنی دار دیده نشد(جدول ۲).

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]

جدول۲: نتایج آنالیز غلظت‌های اگزوزم‌های مستخرج از IC50 مواد مورد بررسی بر روی مهار سلول‌های MCF-7

| S.OV | Df | MS (میانگین مربعات) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | اگزوزوم کومارین | اگزوزوم اولئوروپین | اگزوزوم کوئرستین | اگزوزوم والپیروئیک اسید |
| تیمار (غلظت) | ۸ | ۲۵/۱۵ns | ۱۴/۱۵ns | ۲/۵۲۵ns | ۸/۲۵ns |
| اشتباه آزمایش | ۹ | ۲۰/۲۵ | ۱۲/۵۲ | ۷/۱۶ | ۵/۴۵ |
| ns غیر معنی داری | | | | | |

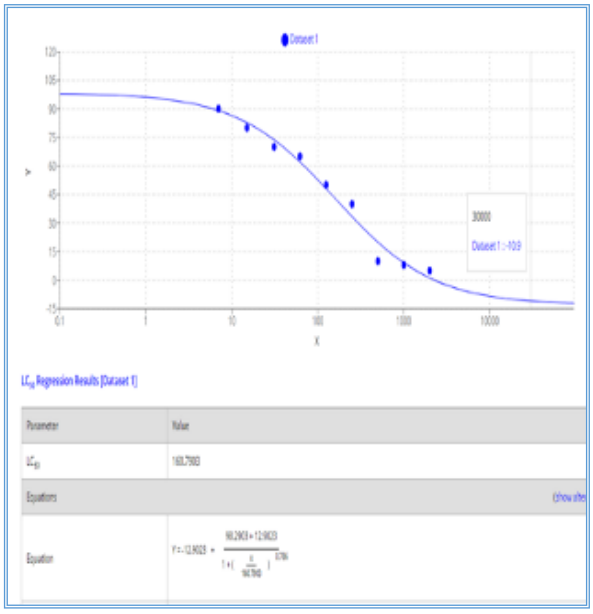
بدین معنی که اگزوزوم‌های مستخرج از محیط کشت سلول تیمار شده با غلظت IC50 مواد مورد مطالعه نقشی در مهار سلول‌های سرطانی نداشت. اما اگزوزوم‌های مستخرج از اعمال IC75 مواد مورد مطالعه تفاوت معنی داری در مهار سلول‌های MCF7 داشتند(جدول ۳) که IC50 مهاری آن ۱۶۰/۷۹ میکروگرم در میلی لیتر پروتئین اگزوزوم محاسبه شد(شکل۳).



جدول ۳: نتایج آنالیز غلظت‌های اگزوزم های مستخرج از IC75 مواد مورد بررسی بر روی مهار سلول‌های MCF-7

| S.OV | Df | *MS* *(میانگین مربعات)* | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | اگزوزوم کومارین | اگزوزوم اولئوروپین | اگزوزوم کوئرستین | *اگزوزوم والپیروئیک اسید* |
| تیمار (غلظت) | ۸ | ۲۶۴/۵۸** | ۱۸۴/۲۲** | ۱۶۱/۲** | ۱۵۶/۲۳ |
| اشتباه آزمایش | ۹ | ۲۱/۰۵ | ۲۳/۵۲ | ۷۱/۱۶ | *۱۵/۱۴* |
| ** معنی داری در سطح احتمال کمتر از ۱ درصد | | | | | |

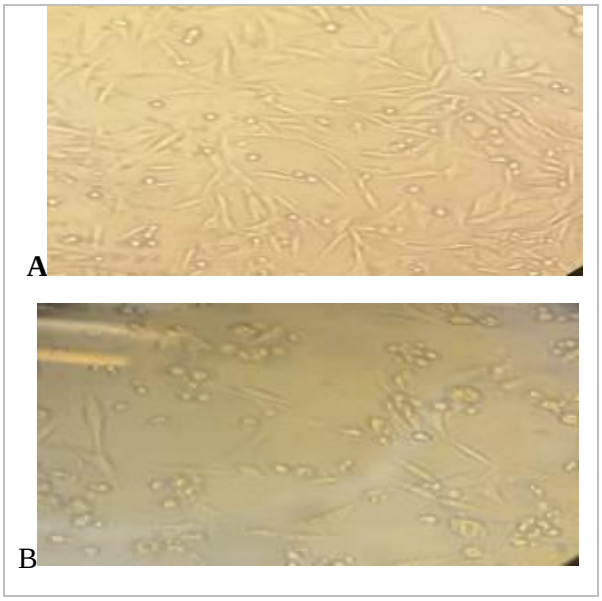
[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]




شکل۳- منحنی و معادله تعیین IC50 برای اگزوزم‌های مستخرج از ترکیب فیزیکی چهارگانه و مهار ۵۰ درصدی در اعمال اگزوزوم (غلظت ۱۶۰میکرو گرم بر میلی لیتر پروتئین )

در شکل ۴ می‌توان تصویر میکروسکوپی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های سرطانی MCF7 را بعد از تیمار با ترکیب چهارگانه فیزیکی و بعد از اعمال اگزوزوم‌های استخراج شده از محیط کشت مشاهده کرد.






شکل ۴- a) تصویر میکروسکوپی سلول‌ها پس از تیمار با ترکیب فیزیکی چهار گانه b) تصویر میکروسکوپی سلول‌ها پس از تیمار با اگزوزم‌های مستخرج از ترکیب فیزیکی چهار گانه

بررسی مقادیر IC50 برای اگزوزوم‌های مستخرج از اعمال غلظت IC75 هر کدام از از تیمارها در مهار MCF7 نشان داد که اگزوزوم حاصل از ترکیب چهارگانه مواد در حداقل دوز (۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر پروتئین اگزوزوم) مهار ۵۰ درصدی را داشت و بعد از آن والپیروئیک اسید و حداکثر دوز در مهار مربوط به اگزوزوم‌های حاصل از اولئوروپین را داشت (شکل ۵).

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]




شکل ۵- مقادیر IC50 برای اگزوزوم‌های مستخرج از اعمال غلظت IC75 هر کدام از از تیمار ها در مهار MCF7

## بحث

ثابت شده است که برخی عوامل فعال طبیعی نه تنها دوز مؤثر داروهای شیمی درمانی را کاهش می‌دهند، بلکه سلول های سرطانی را به نسبت به داروها شیمیایی حساس‌تر می‌کنند و از طریق کاهش دوزهای درمانی، اثر سیتوتوکسیک را در ارتباط با سلول‌های طبیعی انسان محدود می‌کنند. علاوه بر این، درمان ترکیبی با عوامل فعال جدید می‌تواند مقاومت چند دارویی رژیم‌های شیمی‌درمانی را کاهش دهد. در این زمینه، بسیاری از ترکیبات شیمیایی طبیعی، شناسایی شده‌اند و به گروهای دارویی جالبی از عوامل فعال برای درمان ترکیبی ضد سرطان تبدیل شده‌اند(۴۶).نتایج تاثیر انواع مواد گیاهی طبیعی در مهار سلول سرطانی MCF7 با مکانیزم متفاوت نشان داد که هر۴ ماده (اولئوروپین،کوئرستین،کومارین و والپیروئیک اسید) و ترکیب آنها در مهار سلول‌های MCF7 در شرایط اینویترو موثر بوده‌اند. اما نکته مهم اینکه دوزهای تاثیر (IC50) در تیمارها متفاوت بود. تاثیر والپیروئیک اسید در دوز بالای ۶۶۴/۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای مهار دیده شد. مکانیزم تاثیر والپیروئیک اسید از طریق غیرفعال کردن هسیتون داستیلاز می‌باشد (۴۷). نتیجه اینکه دوز بالای این ماده مربوط به ۲۴ ساعت مطالعه بوده است و اگر در زمان طولانی‌تری مطالعه شود شاید نتیجه در دوزهای پایین تر قابل حصول باشد. همچنین نشان داده‌شده است که مکانیسم ضد تکثیر والپیروئیک اسید در سلول‌های سرطانی پستان با وضعیت بیان HER2 آن‌ها مرتبط است. در نتیجه، والپیروئیک اسید ممکن است با داروهای مورد استفاده در درمان سرطان پستان با بیان بیش از حد HER2، مانند آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد HER2 یا شیمی‌درمانی هم‌افزایی کند تا به طور مؤثری از افزایش بیش‌ازحد بیان سلولی HER2 جلوگیری کند (۴۶).اولئوروپین در دوز ۴۵۸/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانست ۵۰ درصد ازسلول‌های سرطانی را مهار نماید. این یافته با یافته‌های قبلی (۴۸) هم خوانی داشت. دلیل دوز بالای تاثیر آن شاید غنی بودن محیط کشت RPMI1640 از گلوکز باشد. زیرا مکانیزم نفوذ اولئوروپین از طریق رسپتورهای گلوکز بخاطر حلقه گلوکز در فرمول اولئوروپین بوده است(۴۹). اولئوروپین از طریق آپوپتوز مهار سلول می‌کند (۸،۱۸،۲۰) که از طریق فعال کردن BAX،P53 و کاهش بیان BCL2 و HIF-1 (۸) و نیز کاهش IB و AKT و افزایش بیان آبشاری NF-KB (۱۹) سلول های سرطانی را مهار می‌کند. همچنین مطالعات نشان داده است که در حضور اولئوروپین، میزان بیان miR-125b ، miR-16، miR-34a، p53، p21، و TNFRS10B افزایش ، در حالی که میزان بیان bcl-2، mcl1، miR-221، miR-29a و miR-21 کاهش داده شده است. که ممکن است نه تنها از طریق افزایش بیان ژن‌های پرو آپوپتوز و miRNA های سرکوب‌کننده تومور، بلکه از طریق کاهش بیان ژن‌های ضد آپوپتوز و oncomiR، آپوپتوز را القا کند(۵۰). کوئرستین در دوز۵/۳۵۲ میکروگرم بر میلی لیتر ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی MCF7 رامهار کرده بود. در مورد مهار سلولی کوئرستین از مسیر آپوپتوز (P53 و BCL2) گزارش‌های متفاوتی ارائه شده است (۳۳و۵۱). کوئرستین از طریق مولکول‌های هدف P27،P21 ،سایکلین B و کینازها باعث توقف چرخه سلولی در مرحله G2/M میگردد(۳۰). القای آپاپتوز از طریق مهار چرخه PI3K/Akt و مهار MTOR(۳۵) در گزارش‌های دیگر آمده است. مطالعات همچنین نشان داده شده است کوئرستین بیان ncRNA ها را تنظیم می‌کند. ncRNA (شاملlncRNA و miRNA) نقش کلیدی در توسعه سرطان دارد. درنتیجه کوئرستین با تنظیم بیان ncRNA بر بیان ژن ها/پروتئین‌های مسیر سیگنال دهی مرتبط تاثیر می‌گذارد، رشد



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]

سلول‌های سرطانی را سرکوب می‌کند و آپوپتوز سلولی را ارتقا می‌دهد (۵۲). مطالعات تجربی موجود نشان می‌دهد که کوئرستین می‌تواند بیان miRNAهای مرتبط با سرطان شامل miR - ۲۱، miR - ۱۴۶a و miR - ۱۵۵ را تعدیل کند، در نتیجه شروع و توسعه سرطان را مهار می‌کند (۵۳). در این تحقیق کومارین در حداقل دوز ۲۹۱ میکروگرم در میلی لیتر مهار سلولی را به عهده داشت. مشخص شده است کومارین با القای بیان P21 و توقف چرخه سلولی در مرحله G0/G1 و مهار پروتئین های شوک حرارتی (HSP90) و فعال‌سازی کاسپاز ۳و ۹ سلول را به آپوپتوز هدایت می‌کند (۲۴،۲۵،۲۶،۲۸).

ترکیب چهارگانه اولئوروپین، کوئرستین، کومارین و والپیروئیک اسید نیز در دوز۶۶۴/۶۵ میکروگرم در میلی لیتر سلول‌های سرطانی MCF7 را مهار کرد که این غلظت دور از انتظار بود و انتظار می‌رفت در دوز پایین‌تر بتواند سلول‌های MCF7 را مهار نماید. زیرا با توجه به القای مسیرهای مختلف آپوپتوز در سلول‌های سرطانی توسط تک تک مواد به‌کار رفته در این ترکیب بیشتر در دوز پایین موثر باشد. اگزوزوم ها وزیکول‌های غشایی هستند که با واسطه ارتباط سلول به سلول و اصلاح ریز محیط تومور در هر دو مکان محلی و دوردست، پاسخ‌های ایمنی، رشد سلول، آنژیوژنز و متاستاز را تغییر می‌دهند. گزارش شده است که محتویات و مقدار اگزوزوم‌ها پس از بروز سرطان تغییر می‌کند و سلول‌های توموری اگزوزوم بیشتری آزاد می‌کنند که این ممکن است به این دلیل باشد که اگزوزوم‌های مشتق از تومور دسترسی آسان‌تری به سیستم عروقی دارند. در طول یک دهه گذشته، نقش اگزوزوم‌ها در سرطان پستان، مورد توجه زیادی قرار گرفته است. مطالعات اخیر نشان داده اند که آپوپتوز می‌تواند توسط اگزوزوم‌ها از طریق مسیرهای سیگنالینگ مختلف مانند مسیرهای سیگنالینگ Wnt/β-catenin، NF-κB و Akt/PI3K القا شود(۵۴) .

اگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های تحت تیمار پلی فنول‌ها محدودیت فراهمی زیستی پلی فنول را تا حدودی جبران کرده است و تاثیرات مهاری بهتری در مهار رشد سلول‌های سرطانی نسبت به پلی فنول‌های آزاد داشته است. برای مثال اگزوزوم‌های تولید شده از سلول‌های K562 لوسمی میلوژن مزمن تحت درمان با کورکومین به عنوان یک پلی فنول طبیعی، با miR-21 غنی می‌شوند که منجر به تنظیم مثبت PTEN و مدر ادامه مهار رشد سلول‌های لوسمیک می‌شود (۵۵،۵۶). همچنین، اگزوزوم‌های سلول‌های تحت درمان با کورکومین اثرات ضد رگ‌زایی مانند مهار مهاجرت اندوتلیال، کاهش بیان مولکول چسبنده سلولی عروقی -۱ و کاهش تشکیل ساختار مویرگی را نشان می‌دهند (۵۷). همچنین زنده ماندن سلولی رده‌های سلولی آدنوکارسینوم پانکراس که با اگزوزوم‌های جدا شده از سلول‌های تیمار شده با کورکومین کشت شده‌اند، کاهش یافته که نشان می‌دهد کورکومین کپسوله‌شده در اگزوزوم‌ها خواص ضد سرطانی را نشان داده است (۵۸). اما تاکنون در مورد تاثیر اگزوزوم های استخراج شده از محیط کشت سلول‌های سرطانی تحت تیمار با اولئوروپین ،کوئرستین، کومارین و والپیروئیک اسید تحقیقات زیادی انجام نشده است. در مجموع این داده‌ها نشان می‌دهند که اگزوزوم‌های سلول‌های تیمار شده با پلی‌فنول‌ها و مواد طبیعی ضد سرطان می‌توانند یک استراتژی جدید به منظور افزایش فراهمی زیستی و کارایی آنها در سلول‌های هدف باشند. با این حال، برخی از خطرات بالقوه در استفاده از اگزوزوم‌ها می‌تواند از منشاء سلولی ناشی شود .به عنوان مثال، استفاده از اگزوزوم‌ها از سلول‌های سرطانی نامناسب است زیرا آنها می‌توانند به تومورزایی کمک کنند (۵۹). اگزوزوم های حاصل از LC50 مواد مورد مطالعه ما در مهار سلول‌های MCF7 نشان داد که هیچ کدام از اگزوزوم های مستخرج از مواد تاثیری در مهار سلول‌های سرطانی MCF7 نداشتند. این نتیجه می‌تواند بدلیل عدم وجود محتوی القا کننده‌ی اگزوزوم باشد که در مرحله ۵۰ درصدی مهار توسط مواد اگزوزوم‌ها محتوی القا کننده‌ی آپاپتوز فعال سازی مسیرهای مرتبط با آپاپتوز را نداشته‌اند. در صورتی که در غلظت LC75 مواد اگزوزوم‌های مستخرجه توانسته سلول‌های سرطانی MCF7 رامهار نماید. نکته حائز اهمیت اینکه در غلظت LC50، مهار MCF7 توسط اگزوزوم‌های مستخرج از ترکیب چهارگانه در حداقل مقدار یعنی ۱۶۰/۷ میکروگرم بر میلی لیترپروتئین اگزوزوم بود هرچند که خود این ترکیب در دوز بالا عامل مهار می‌شد. این روند در تیمار اگزوزوم مستخرجه از اعمال والپیروئیک اسید نیز دیده می‌شد (شکل۵).

## نتیجه‌گیری

مهار سلول‌های سرطانی MCF7 توسط اگزوزوم‌های مستخرج ازغلظت LC75 نشاندهنده محتویات القا کننده آپاپتوز در مسیرهای مختلف سلولی است که برآیندی از تاثیر گرفتن سلول‌ها از داروهای به‌کار رفته بود. در نتیجه با توجه به، تغییرات گسترده در کمیت و تنوع و نقش‌های متفاوت اگزوزوم ها در سلول‌های توموری می‌توان به عنوان یک هدف برای استراتژی‌های درمانی جدید مورد استفاده قرار گیرد و اگر این نتیجه در شرایط INVIVO هم بدست



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]

آید می‌توانیم با مهندسی محتوی اگزوزوم با انتقال بین سلولی در القای مسیر آپاپتوزی بهره بجوئیم.

## پیشنهادات

با توجه به نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌گردد علاوه بر شناسایی محتویات اگزوزوم‌های استخراجی تحت تیمارهای مختلف ،تاثیر آن در رده‌های سلولی سرطانی و نیز پرایمری مورد ارزیابی قرار گیرد.

## سپاسگزاری

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه دوره دکتری تخصصی ژنتیک در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر می‌باشد.که کار عملی آن در آزمایشگاه‌های علوم پزشکی تبریز، آزمایشگاه جهاد دانشگاهی اردبیل، آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی اردبیل و آزمایشگاه مرکزی دانشگاه محقق اردبیلی و آزمایشگاه تحقیقاتی سارا تبریز انجام شده است. بدین وسیله مراتب سپاسگزاری خود را از اساتید و کارکنان این مراکز را اعلام می‌نماییم.



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]

## منابع

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA and Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018; (68): 394-424.
2. Zehuan Li, Zhanghan Chen, Guohua Hu, Ying Jiang.Roles of circular RNA in breast cancer. Am J Transl Res. 2019 ;11(7):3945-3954.
3. Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK, Goel N, Koundal D, Zaguia A, Koundal S, Belay A. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. BioMed Research International. 2022 (Apr )18;2022.
4. Li X, Corbett, A.L Taatizadeh, E, Tasnim N, Little J.P, Garnis C, Daugaard M, Guns E, Hoorfar M, Li I.T.S. Challenges and opportunities in exosome research-Perspectives from biology, engineering, and cancer therapy. APL Bioeng. 2019, (3), 011503.
5. Wang M, Yu F, Ding H, Wang Y, Li P, Wang K. Emerging Function and Clinical Values of Exosomal MicroRNAs in Cancer. Mol Ther Nucleic Acids. 2019 Jun 7; 16:791-804.
6. Ahmad Farooqi A, Fayyaz S, Silva AS, Sureda A, Nabavi SF, Mocan A, Nabavi SM, Bishayee A. Oleuropein and cancer chemoprevention: the link is hot. Molecules. 2017 Apr 29;22(5):705.
7. Zhou W, Feng X, Han H, Guo S, Wang G. Synergistic effects of combined treatment with histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid and TRAIL on human breast cancer cells. Scientific Reports. 2016 Jun 13;6(1):1-6.
8. Rishmawi S, Haddad F, Dokmak G, Karaman R. A Comprehensive Review on the Anti-Cancer Effects of Oleuropein. Life. 2022 Jul 28;12(8):1140.
9. Bulotta S, Oliverio M, Russo D, Procopio A. Biological Activity of Oleuropein and Its Derivatives.2013: 3605-3638.
10. Shamshoum H, Vlavcheski F, Tsiani E. Anticancer effects of oleuropein. Biofactors. 2017 Jul 8;43(4):517-528.
11. Morana JM, Leal-Hernande O, Canal-Macías ML, Roncero-Martin R, Guerrero-Bonmatty R, Aliaga I, Zamorano JD. Antiproliferative Properties of Oleuropein in Human Osteosarcoma Cells. Nat Prod Commun. 2016 Apr;11(4):491-2.
12. Khanfar MA, Bardaweel SK, Akl MR, El Sayed KA. Olive Oil-derived Oleocanthal as Potent Inhibitor of Mammalian Target of Rapamycin: Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies. Phytother Res. 2015 Nov;29(11):1776-82.
13. Calahorra J, Martínez-Lara E, De Dios C, Siles E. Hypoxia modulates the antioxidant effect of hydroxytyrosol in MCF-7 breast cancer cells. PLoS One. 2018 Sep 20;13(9): e0203892.
14. Zubair H, Bhardwaj A, Ahmad A, Srivastava SK, Khan MA, Patel GK, Singh S, Singh AP. Hydroxytyrosol Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest and Suppresses Multiple Oncogenic Signaling Pathways in Prostate Cancer Cells. Nutr Cancer. 2017 Aug-Sep;69(6):932-942.
15. Rakhshidan Z, Zaefizadeh M, Pahlavan B. Differential Proteomics analysis (2D) of prostate cancer cell lines under the treatment of natural antioxidant Oleuropein. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 December-2020 January; 41(5):56-64.
16. Song H, Do Young Lim JI, Cho HJ, Park SY, Kwon GT, Kang YH, Lee KW, Choi MS, Park JH. Dietary oleuropein inhibits tumor angiogenesis and lymphangiogenesis in the B16F10 melanoma allograft model: A mechanism for the suppression of high-fat diet-induced solid tumor growth and lymph node metastasis. Oncotarget. 2017 May 9;8(19):32027.
17. Torić J, KARKOVIĆ MARKOVIĆ AN, JAKOBUŠIĆ BRALA CV, Barbarić M. Anticancer effects of olive oil polyphenols and their combinations with anticancer drugs. Acta Pharmaceutica. 2019 Dec 31;69(4):461-82.
18. Hassan ZK, Elamin MH, Daghestani MH, Omer SA, Al-Olayan EM, Elobeid MA, Virk P, Mohammed OB. Oleuropein induces anti-metastatic effects in breast cancer. Asian Pacific journal of cancer prevention. 2012;13(9):4555-9.
19. Brasier, A.R. The nuclear factor-_B–interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. Cardiovasc. Res. 2010, (86),211–218.
20. Liman R, Çoban F, Ciğerci I, Bulduk İ, Bozkurt S. Antiangiogenic and apoptotic effects of oleuropein on breast cancer cells. Br. J. Pharm. Res. 2017 Jan (1); 16:1-0.
21. Bruneton, J. Immunotoxicity of Epicutaneously Applied Anti-Coagulant Rodenticide Warfarin; Intercept Ltd.: Hampshire, UK, 1999; pp. (2)45–263.



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]

22. Küpeli Akkol E, Genç Y, Karpuz B, Sobarzo-Sánchez E, Capasso R. Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer. Cancers. 2020; 12(7):1959.
23. Bhattarai N, Kumbhar AA, Pokharel YR, Yadav PN. Anticancer potential of coumarin and its derivatives. Mini Reviews in Medicinal Chemistry. 2021 Nov 1;21(19):2996-3029.
24. Yang F, Zhao N, Song J, Zhu K, Jiang CS, Shan P, Zhang H. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Coumarin-Based Hydroxamate Derivatives as Histone Deacetylase (Hdac) Inhibitors with Antitumor Activities. Molecules. 2019 Jul 15;24(14):2569.
25. Finn G, Creaven B, Egan D. Modulation of mitogen-activated protein kinases by 6-nitro-7-hydroxycoumarin mediates apoptosis in renal carcinoma cells. Eur J Pharmacol. 2003 Nov 28;481(2-3):159-67.
26. Vianna DR, Hamerski L, Figueiró F, Bernardi A, Visentin LC, Pires EN, Teixeira HF, Salbego CG, Eifler-Lima VL, Battastini AM, von Poser GL, Pinto AC. Selective cytotoxicity and apoptosis induction in glioma cell lines by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxycoumarins from Pterocaulon species. Eur J Med Chem. 2012 Nov;(57):268-74.
27. Kostova I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents. 2005 Jan 1;5(1):29-46.
28. Sashidhara KV, Avula SR, Sharma K, Palnati GR, Bathula SR. Discovery of coumarin–monastrol hybrid as potential antibreast tumor-specific agent. European journal of medicinal chemistry. 2013 Feb 1;(60):120-7.
29. Cui N, Lin DD, Shen Y, Shi JG, Wang B, Zhao MZ, Zheng L, Chen H, Shi JH. Triphenylethylene-Coumarin Hybrid TCH-5c Suppresses Tumorigenic Progression in Breast Cancer Mainly Through the Inhibition of Angiogenesis. Anticancer Agents Med Chem. 2019;19(10):1253-1261.
30. Rauf A, Imran M, Khan IA, Ur-Rehman M, Gilani SA, Mehmood Z, Mubarak MS. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. Phytother Res. 2018 Nov;32(11):2109-2130.
31. Heidarian E, Amini A, Abbasi-Veldani A, Ghatreh-Samani K. Effects of quercetin on signaling proteins (pSTAT3, pERK1/2, pAKT) and interleukin-6 gene expression in prostate cancer PC3 cells. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2017 Jan 10;26(144):290-300.
32. Vargas AJ, Burd R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. Nutr Rev 2010; 68(7): 418-428.
33. Xiang T, Tao X, Jiang Z, Wang P. Effects of quercetin on proliferation of gastric cancer lines BGC823 and the expression of p53, Bcl-2/Bax and PCNA [J]. Laser Journal. 2006; 1:048.
34. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, De Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, Cooper EL, Cossarizza A. Quercetin and cancer chemoprevention. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2011 Apr;2011.
35. Shahbazi R, Davoodi H, Esmaeili S. The anticancer effects of flavonoids: involvment of PI3K/ Akt signaling pathway. Iranian J Nutr Sci Food Technol. 2013; 7 (4).
36. Niazvand F, Khorsandi L S, Absalan F, Ashtari A. Effect of Quercetin Solid Lipid Nanoparticles on Autophagy and Atg5 Protein Expression Levels in Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7). yafte 2020; 22 (2) :144-159.
37. mohamadian F, mahmoodi M, mirzae M, khoshdel A, sheikh fathollahi M, zeinodini N et al. Expression of Some Genes Involved in Epigenetic in Breast Cancer Cell Lines: The Effect of Quercetin. J Fasa Univ Med Sci. 2015; 5 (3) :413-424.
38. Burton, BS. On the propyl derivatives and decomposition products of ethyl acetoacetate. American Chemical Journal. 1882;3(9):385-395.
39. Han W, Guan W. Valproic acid: a promising therapeutic agent in glioma treatment. Frontiers in Oncology. 2021 Sep (10); 11:687362.
40. Aalaei Diman S, Mohamadzade M, Pazhang Y. Evaluation of Antitumor Activity of Valproic Acid on K562 cells: In Vitro. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2016 Dec 10;6(3):365-72.
41. Aztopal N, Erkisa M, Erturk E, Ulukaya E, Tokullugil AH, Ari F. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in breast cancer stem cells. Chemico-Biological Interactions. 2018 Jan 25;(280):51-8.
42. Wawruszak A, Halasa M, Okon E, Kukula-Koch W, Stepulak A. Valproic acid and breast cancer: State of the art in 2021. Cancers. 2021 Jul 7;13(14):3409.
43. Matsumoto Y, Kano M, Murakami K, Toyozumi T, Suito H, Takahashi M, Sekino N, Shiraishi T, Kamata T, Ryuzaki T, Hirasawa S. Tumor-derived exosomes influence the cell cycle and cell migration of human esophageal cancer cell lines. Cancer science. 2020 Dec;111(12):4348-58.



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]

44. Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson GJ, Wei J, Nie G. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. Biomaterials. 2014 Feb 1;35(7):2383-90.
45. Matsumoto Y, Kano M, Murakami K,etal. Tumor-derived exosomes influence the cell cycle and cell migration of human esophageal cancer cell lines. *Cancer Sci* 2020;(111):4348–4358.
46. Wawruszak A, Halasa M, Okon E, Kukula-Koch W, Stepulak A. Valproic Acid and Breast Cancer: State of the Art in 2021. Cancers (Basel). 2021 Jul 7;13(14):3409.
47. Ma Z, Wang LZ, Cheng JT, Lam WS, Ma X, Xiang X, Wong AL, Goh BC, Gong Q, Sethi G, Wang L. Targeting hypoxia-inducible factor-1-mediated metastasis for cancer therapy. Antioxidants & Redox Signaling. 2021 Jun 20;34(18):1484-97.
48. Barzegar F, Zaefizadeh M, Yari R, Salehzadeh A. Synthesis of Nano-Paramagnetic Oleuropein to Induce KRAS Over-Expression: A New Mechanism to Inhibit AGS Cancer Cells. *Medicina*. 2019; 55(7):388.
49. Xu F, Li Y, Zheng M, Xi X, Zhang X, Han C. Structure properties, acquisition protocols, and biological activities of oleuropein aglycone. Frontiers in Chemistry. 2018 Aug 13; 6:239.
50. Asgharzade S, Sheikhshabani SH, Ghasempour E, Heidari R, Rahmati S, Mohammadi M, Jazaeri A, Amini-Farsani Z. The effect of oleuropein on apoptotic pathway regulators in breast cancer cells. European Journal of Pharmacology. 2020 Nov 5; 886:173509.
51. Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. Journal of cellular biochemistry. 2009 Jan 1;106(1):73-82.
52. Asgharian P, Tazekand AP, Hosseini K, Forouhandeh H, Ghasemnejad T, Ranjbar M, Hasan M, Kumar M, Beirami SM, Tarhriz V, Soofiyani SR. Potential mechanisms of quercetin in cancer prevention: focus on cellular and molecular targets. Cancer Cell International. 2022 Dec;22(1):1-20.
53. Dostal Z, Modriansky M. The effect of quercetin on microRNA expression: A critical review. Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc. 2019 Jun 1;163(2).
54. Han, L., Zhao, Z., Yang, K. *et al.* Application of exosomes in the diagnosis and treatment of pancreatic diseases. *Stem Cell Res Ther* 13, 153 (2022).
55. Taverna S, Giallombardo M, Pucci M, Flugy A, Manno M, Raccosta S, Rolfo C, De Leo G, Alessandro R. Curcumin inhibits in vitro and in vivo chronic myelogenous leukemia cells growth: a possible role for exosomal disposal of miR-21. Oncotarget. 2015 Sep 8;6(26):21918-33.
56. Soleti R, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Impact of polyphenols on extracellular vesicle levels and effects and their properties as tools for drug delivery for nutrition and health. Arch Biochem Biophys. 2018 Apr 15; 644:57-63.
57. Taverna S, Fontana S, Monteleone F, Pucci M, Saieva L, De Caro V, Cardinale VG, Giallombardo M, Vicario E, Rolfo C, Leo GD, Alessandro R. Curcumin modulates chronic myelogenous leukemia exosomes composition and affects angiogenic phenotype via exosomal miR-21. Oncotarget. 2016 May 24;7(21):30420-39.
58. Osterman CJ, Lynch JC, Leaf P, Gonda A, Ferguson Bennit HR, Griffiths D, Wall NR. Curcumin Modulates Pancreatic Adenocarcinoma Cell-Derived Exosomal Function. PLoS One. 2015 Jul 15;10(7): e0132845.
59. Whiteside TL. Tumor-derived exosomes and their role in tumor-induced immune suppression. Vaccines. 2016 Oct 20;4(4):35.



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-27 ]