



دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی

دانشکده علوم و فناوری زیستی

گروه ژنتیک

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک

مقایسه اثر آگزوزوم های مترشحه از سلول های بنیادی مشتق از خون قاعدگی و آگزوزوم های گیاهی  
زنجبیل بر اپوپتوز و مهاجرت سلول های رده سرطانی تخمدانی SKOV-3

استاد راهنما:

دکتر آذر شیخ الاسلامی

دکتر زهرا زمانزاده

استاد مشاور:

دکتر هدی فضائلی

افسانه رضایی

۱۴۰۲

کلیه حقوق مادی و معنوی مترتب بر دست آورد های مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از پژوهش موضوع این پایان نامه/ رساله متعلق به دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی است. دانشجو موظف به رعایت آیین نامه و منشور اخلاق در پژوهش برای ارائه و چاپ مطالب مستخرج از پایان نامه/ رساله می باشد.



دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی

دانشکده علوم و فناوری زیستی

گروه ژنتیک

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک خانم افسانه رضا فی تحت عنوان  
مقایسه اثر آگزوزوم های مترشحه از سلول های بنیادی مشتق از خون قاعدگی و آگزوزوم های  
گیاهی زنجبیل بر آپوپتوز و مهاجرت سلول های رده سرطانی تخمدانی SKOV-3

در تاریخ ۱۴۰۲/۶/۳۰ توسط هیات داوران بررسی و با درجه ..... به تصویب نهایی رسید.

- |      |   |                                |
|------|---|--------------------------------|
| امضا | دکتر آذر شیخ الاسلامی با مرتبه علمی استاد یار | ۱. استاد راهنما اول پایان نامه |
| امضا | دکتر زهرا زمانزاده با مرتبه علمی استاد یار    | ۲. استاد راهنما دوم پایان نامه |
| امضا | دکتر هدی فضا نلی با مرتبه علمی استاد یار      | ۳. استاد مشاور پایان نامه      |
| امضا | دکتر مرتضی آبکار با مرتبه علمی استادیار       | ۴. استاد داور داخل گروه        |
| امضا | دکتر حلیمه رضایی                              | ۵. استاد داور خارج از گروه     |

مهر و امضا مدیر گروه

از اساتید دلسوز و محترم، خانم دکتر آذر شیخ الاسلامی و خانم دکتر زهرا زمانزاده و خانم دکتر هدی فضا ئلی که با صبر و حوصله، از هیچ کمکی در این مسیر دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

چکیده :

سرطان تخمدان شایع‌ترین بدخیمی کشنده دستگاه تناسلی زنان است که اغلب در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود. زنجبیل با کاهش استرس اکسیداتیو و القای مرگ سلولهای توموری قادر به مهار سرطان است. ترکیبات فعال این گیاه مانند gingerol و shogaol به خوبی قادر به مهار تولید پروستاگلاندین‌های التهابی، مهار کننده‌های اکسید نیتریک حتی اینترلوکین‌های دخیل در التهاب هستند و در تمام مراحل تومورزایی بدخیم مانند افزایش تکثیر سلولی کاهش آپوپتوز، رگزایی و تحریک سلول‌های سرطانی نقش دارند. همچنین امروزه سلول‌های بنیادی خون قاعدگی (MenSCs) به عنوان منبع جدیدی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی معرفی می‌شوند. این منبع غنی، دارای قابلیت خود نوسازی طولانی مدت و رشد سریع‌تری در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمال بند ناف می‌باشد. مطالعه حاضر، مقایسه اثرات ضد سرطان آگروزوم‌های حاصل از زنجبیل و خون قاعدگی در بیان ژن‌های MMP9 ، MMP2 ، Bax ، BCL2 و قابلیت زنده ماندن سلول‌های سرطانی تخمدان SKOV3 را ارزیابی می‌کند. در این مطالعه، رده سلولی سرطان تخمدان SKOV3 در محیط RPMI1640 حاوی سرم جنین گاوی ۱۰% (FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک کشت گردید. جداسازی آگروزوم‌های سلولی و گیاهی (Cell-Exo و Plant-Exo) از محیط NE-MenSCs شرطی شده و عصاره زنجبیل به ترتیب انجام شد. با استفاده از تست بردفورد (Bradford) غلظت پروتئین‌های سلولی ارزیابی شد. سپس به منظور تعیین دز موثر آگروزوم‌ها برای تیمار، درصد زنده مانی سلول‌ها با روش متیل تیازول تترازولیم (MTT) در غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۰، ۳۰۰ mg/ml ارزیابی شد. از رده سلولی سرطان تخمدان SKOV3 در پاساژ سوم استفاده شد. پس از پر شدن ۷۰٪ پلیت کشت سلولی، C-Exo و P-Exo (به ترتیب با دز ۵۰ و ۱۰۰) به DMEM حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی سیلین-استرپتومایسین در هر چاه اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط استاندارد درون انکوباتور قرار گرفت شد. سپس سطح آپوپتوز و سطح بیان Bax، Bcl2، MMP2 و MMP9 به ترتیب با استفاده از تست Annexin V/PI و Real Time PCR ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که آگروزوم‌های حاصل از زنجبیل و خون قاعدگی به شکل وابسته به دوز و زمان، زنده ماندن سلول‌های سرطانی تخمدان را مهار می‌کنند. با توجه به تست Real Time PCR و Annexin V/PI، نسبت بیان ژن Bax و Bcl2 که یکی از نشانه آپوپتوز است افزایش یافته و در عین حال باعث کاهش بیان ژن‌های MMP2 و MMP9 می‌شوند. بنابراین نتایج بدست آمده از تیمار سلول‌ها با آگروزوم‌های گیاهی و سلولی، C-Exo نسبت به P-Exo تأثیر قابل توجهی بر آپوپتوز و مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی دارد. بنابر نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد C-EXO حاصل از MenSCs‌ها فعالیت‌های بسیار مهمی در برابر سلول‌های سرطانی تخمدان Skov3 دارد. بنابراین، با تحقیقات بیشتر در آینده، این ترکیبات را می‌توان برای توسعه داروهای ضد سرطان تخمدان استفاده کرد.

کلید واژه: سرطان تخمدان- رده سلولی SKOV-3- آگروزوم- سلول‌های بنیادی مزانشیمی- زنجبیل

۱-۱ تعاریف مفاهیم:	۱۳
۱-۱-۱ سرطان :	۱۳
۱-۱-۲ سرطان تخمدان :	۱۳
۱-۱-۳ علل ایجاد سرطان تخمدان:	۱۴
۱-۱-۴ علائم سرطان تخمدان:	۱۴
۱-۱-۵ درمان سرطان تخمدان:	۱۵
۱-۱-۶ وزیکول های خارج سلولی	۱۵
۱-۱-۷ آگزوزوم:	۱۶
۱-۱-۸ مزیت آگزوزوم ها به عنوان حامل:	۱۸
۱-۱-۹ برهم کنش آگزوزوم ها با سلول هدف:	۱۹
۱-۱-۱۰ سلول های بنیادی:	۲۰
۱-۱-۱۱ سلول های بنیادی براساس توان تمایزی	۲۱
۱-۱-۱۲ سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs):	۲۲
۱-۱-۱۳ سلول های بنیادی خون قاعدگی :	۲۴
۱-۱-۱۴ زنجبیل :	۲۵
۱-۲ اهداف :	۲۸
۱-۲-۱ مواد و وسایل مورد استفاده :	۳۰
۱-۲-۱-۱ دستگاه ها و وسایل :	۳۰
۱-۲-۲ روش ها:	۳۴
۱-۲-۲-۱ نمونه گیری:	۳۴
۱-۲-۲-۲ جداسازی سلول های تک هسته ای از نمونه خون قاعدگی:	۳۴

- ۳-۲-۲ جداسازی Conditioned Medium حاصل از کشت MenSCs جهت استخراج آگزوزوم : ۳۴.....
- ۴-۲-۲ جداسازی آگزوزوم ها از Conditioned Medium حاصل از MenSCs : ۳۵.....
- ۵-۲-۲ جداسازی آگزوزوم های زنجبیل : ۳۵.....
- ۶-۲-۲ فریز سلول : ۳۶.....
- ۷-۲-۲ ذوب سلول های منجمد : ۳۶.....
- ۸-۲-۲ پاساژ سلول: ۳۶.....
- ۹-۲-۲ شمارش سلولی : ۳۷.....
- ۱۰-۲-۲ ساخت MTT : ۳۸.....
- ۱۱-۲-۲ محاسبه دوز موثر آگزوزوم ها به روش MTT assay : ۳۸.....
- ۱۲-۲-۲ تیمار سلول ها : ۳۹.....
- ۱۳-۲-۲ تعیین غلظت پروتئین های تام سلولی با کیت BCA..... ۳۹.....
- ۱۴-۲-۲ ردیابی و تعیین کمیت آپوپتوز با روش Annexin V/PI : ۴۰.....
- ۱۵-۲-۲ Real Time PCR : ۴۰.....
- ۱-۱۵-۲-۲ روش استخراج RNA از سلول: ۴۴.....
- ۲-۱۵-۲-۲ پرایمر اختصاصی استفاده شده: ۴۵.....
- ۳-۲ تحلیل آماری : ۴۵.....
- ۱-۳ رده سلول های سرطانی تخمدان Skov3 و سلول های خون قاعدگی: ۴۸.....
- ۲-۳ تعیین دوز موثر سلول با آگزوزوم های خون قاعدگی (MenSCs) به روش MTT: ۴۹.....
- ۳-۳ تعیین دوز موثر سلول با آگزوزوم های گیاهی زنجبیل به روش MTT: ۵۰.....
- ۴-۳ بررسی تاثیر آگزوزوم های زنجبیل و MenSCs در آپوپتوز سلول سرطانی : ۵۱.....
- ۵-۳ بررسی بیان ژن های Bax ، Bcl2، MMP2، و MMP9 در سلول های سرطانی تخمدان رده SKOV-3 : ۵۲.....
- ۱-۴ بحث : ۵۵.....
- ۲-۴ نتیجه گیری: ۶۱.....



۶۲ ..... ۳-۴ پیشنهادات:

۶۳ ..... منابع:

## فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱: بیورنز آگزوزومی و مکانیسم های درونی سازی و نقش آنها در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیک (۱۷).....	۱۷
شکل ۲-۱: نمایش اندازه اجسام آپوپتوز، میکرووزیکول ها و آگزوزوم ها (۹).....	۱۸
شکل ۳-۱: جذب سلولی آگزوزوم های درمانی (۸).....	۲۰
شکل ۴-۱: توان تمایز سلول های بنیادی (۲۷).....	۲۲
شکل ۵-۱: خواص و ساختار ۴ ترکیب اصلی زنجبیل (۵۶).....	۲۷
شکل ۱-۲: فلاسک ها و پلیت های کشت سلول.....	۳۷
شکل ۲-۲: لام هموسیتومتر جهت شمارش سلول.....	۳۸
شکل ۳-۲: مراحل مختلف واکنش Real – time PCR.....	۴۲
شکل ۴-۲: دستگاه ترموسایکلر مربوط به Real time PCR.....	۴۴
شکل ۱-۳: رده سلول سرطانی تخمدان SKOV3.....	۴۸
شکل ۲-۳: کشت سلولی MenSCs.....	۴۹
شکل ۳-۳: نتایج MTT در ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت.....	۴۹
شکل ۴-۳: نتایج MTT در ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت.....	۵۰
شکل ۵-۳: آپوپتوز سلول سرطانی تخمدان رده SKOV-3.....	۵۱
شکل ۶-۳: مقایسه بیان ژن Bax، Bcl2 توسط Real Time PCR در سرطان تخمدان رده SKOV-3 تحت تیمار plant-Exo ، cell-Exo و بدون تیمار.....	۵۲
شکل ۷-۳: بیان ژن MMP2، MMP9 توسط Real Time PCR در سرطان تخمدان رده SKOV-3 تحت تیمار plant-Exo ، cell-Exo و بدون تیمار ارزیابی شد.....	۵۳

## فهرست جداول

صفحه	عنوان
۳۰.....	جدول ۱-۲: مشخصات تجهیزات بکاربرده شده در این مطالعه.....
۳۰.....	جدول ۲-۲: مشخصات وسایل به کار برده در این مطالعه.....
۳۳.....	جدول ۳-۲: مشخصات مواد مصرفی در این پژوهش.....
۴۵.....	جدول ۴-۲: توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه.....

# فصل اول

## کلیات پژوهش

## ۱-۱ تعاریف مفاهیم:

### ۱-۱-۱ سرطان:

سرطان، رشد کنترل نشده سلول های طبیعی و تبدیل آنها به سلول های غیر طبیعی در بدن است. این فرایند شامل تغییرات ژنتیکی است که منجر به ازدست دادن رشد طبیعی سلول، مهار آپوپتوز، تغییر مسیرهای سیگنالینگ، رشد غیر قابل کنترل سلول و ورود به مرحله متاستاز می شوند. این تغییرات در سلول موجب ایجاد تومور سلولی می شوند (۵). تومورها به دو دسته بدخیم و خوش خیم تقسیم می شوند. تومورهای خوش خیم می توانند رشد کنند، اما انتشار نمی یابند و قابل کنترل هستند. در حالی که تومورهای بدخیم می توانند به بافت های مجاور تهاجم کنند و یا به سایر قسمت های بدن انتشار یابند و در واقع به مرحله نهایی سرطان، همان مرحله متاستاز می رسند و تومورهای بدخیم را ایجاد می کنند. همچنین تومورها را بر اساس سلول مبدا تقسیم بندی می کنند (۶). شایع ترین سرطان ها از سلول های اپیتلیال، سارکوما از بافت همبند و یا سلول های مزانشیمی و لنفوم از سلول های خون ساز ایجاد می شوند (۷).

### ۱-۱-۲ سرطان تخمدان:

سرطان تخمدان نوعی سرطان است که در تخمدان ها آغاز شده و در مراحل پیش رفته لوله های فالوپ و صفاق را درگیر می کند. در سیستم تولید مثلی زنان دو تخمدان وجود دارد که در دو سوی جسم رحم قرار گرفته اند و در تولید تخمک و هورمون های استروژن و پروژسترون نقش دارند. سرطان تخمدان از نواحی اپیتلیال تخمدان و سلول های زایا و سلول های استرومای تخمدان منشاء می گیرد. سرطان اپی تلیال تخمدان رایج ترین نوع این سرطان بوده و تا هنگام متاستاز معمولاً بدون علامت باقی می ماند. به همین دلیل در بین همه بدخیمی های دستگاه تناسلی زنان، از بالاترین موارد مرگ و میر برخوردار است (۸). ژن های متعددی در شروع و پیدایش این سرطان دخیل هستند. در پژوهش های گسترده، جهش در KRAS، BRAF و p53 به اثبات رسیده است. از سوی دیگر افرادی که برای ژن BRCA1 و BRCA2 هتروزیگوت بوده اند، مستعد ابتلا به این نوع سرطان هستند. هم چنین تغییرات ریز RNA که بیان ژن را کنترل می کند، در این سرطان به چشم می خورد (۹).

### ۳-۱-۱ علل ایجاد سرطان تخمدان:

سرطان تخمدان معمولاً در دهه ششم و هفتم زندگی شایع تر است و با افزایش سن افزایش می یابد. بیشتر موارد سرطان تخمدان پس از یائسگی ایجاد می شوند (۱۰). در زنانی که تخمک گذاری بیشتری در طول زندگی خود داشته اند و همچنین افرادی که تخمک گذاری را در سنین پایین تر شروع کرده اند و در سنین بالاتر به یائسگی می رسند، شایع تر است (۵). هورمون ها، رژیم غذایی، سابقه خانوادگی، آلاینده های محیطی، موقعیت شغلی و جهش های ژنتیکی نیز از عوامل خطر سرطان تخمدان هستند.

- افزایش سن: با افزایش سن خطر ابتلا به سرطان تخمدان افزایش پیدا می کند. در اغلب مواقع این بیماری در افراد مسن شناسایی می شود.
- تغییرات ژنتیکی: جهش های که در ژن هایی از قبیل KRAS، BRAF، BRCA1، و BRCA2 اتفاق می افتد.
- سابقه خانوادگی: درصد کمی از سرطان های تخمدان به دلیل تغییرات ژنتیکی است که از والدین به ارث برده می شود.
- عدم تجربه بارداری: ابتلا به سرطان تخمدان در زنان که هرگز تجربه بارداری نداشته باشند دو برابر می شود (۱۱).

### ۴-۱-۱ علائم سرطان تخمدان:

علائم سرطان تخمدان با بسیاری از بیماری ها مشابه است به همین دلیل با بیماری های دیگر اشتباه گرفته می شود. زنان مبتلا علائم خفیف تا شدید را تجربه می کنند. علائم و نشانه های ناشی از این بیماری می تواند شامل موارد زیر باشد:

- نفخ یا تورم شکم
- احساس سیری مدت کمی پس از غذا خوردن
- کاهش وزن
- ناراحتی در ناحیه لگن
- خستگی

- کمردرد
- تغییر عملکرد روده مانند بیوست
- تکرر ادرار (۱۲).

### ۱-۱-۵ درمان سرطان تخمدان:

سرطان تخمدان یکی از شایع ترین علل مرگ و میر در جامعه زنان است و برای درمان آن، از روش های مختلفی نظیر جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی استفاده می شود. جراحی یکی از قدیمی ترین راه های درمان سرطان می باشد و امروزه هم برای درمان بسیاری از سرطان ها موثر است. روش دیگری که در درمان سرطان کاربرد دارد، شیمی درمانی است. داروهای شیمی درمانی با جلوگیری از تقسیم سلول های سرطانی، سرطان را درمان می کنند. بدن سالم دائماً از طریق تقسیم و رشد سلول ها را جایگزین می کند اما با بروز سرطان سلول ها به طور غیر قابل کنترل تکثیر می شوند. داروهای شیمی درمانی در تقسیم و تکثیر سلول های سرطانی تداخل ایجاد می کنند. پرتودرمانی از پرتوهای پر قدرت مانند اشعه X با پروتون برای از بین بردن سلول های سرطانی استفاده می کنند. پرتودرمانی به DNA سلول های سرطانی و ناحیه مورد هدف آسیب وارد می کند و از تقسیم و رشد سلول های سرطانی جلوگیری می کند. ایمونوتراپی یا ایمنی درمانی بعد از جراحی، شیمی درمانی و پرتودرمانی جزو درمان های تاثیرگذار محسوب می شود. هورمون درمانی نیز زمانی انجام می شود که سلول های سرطانی دارای گیرنده های هورمونی از جمله استروژنی و پروژسترونی باشند. از بین بردن هورمون ها از بدن یا مسدود کردن اثرات آنها می تواند رشد سلول های سرطانی را تا حدودی متوقف کند (۱۳).

### ۱-۱-۶ وزیکول های خارج سلولی

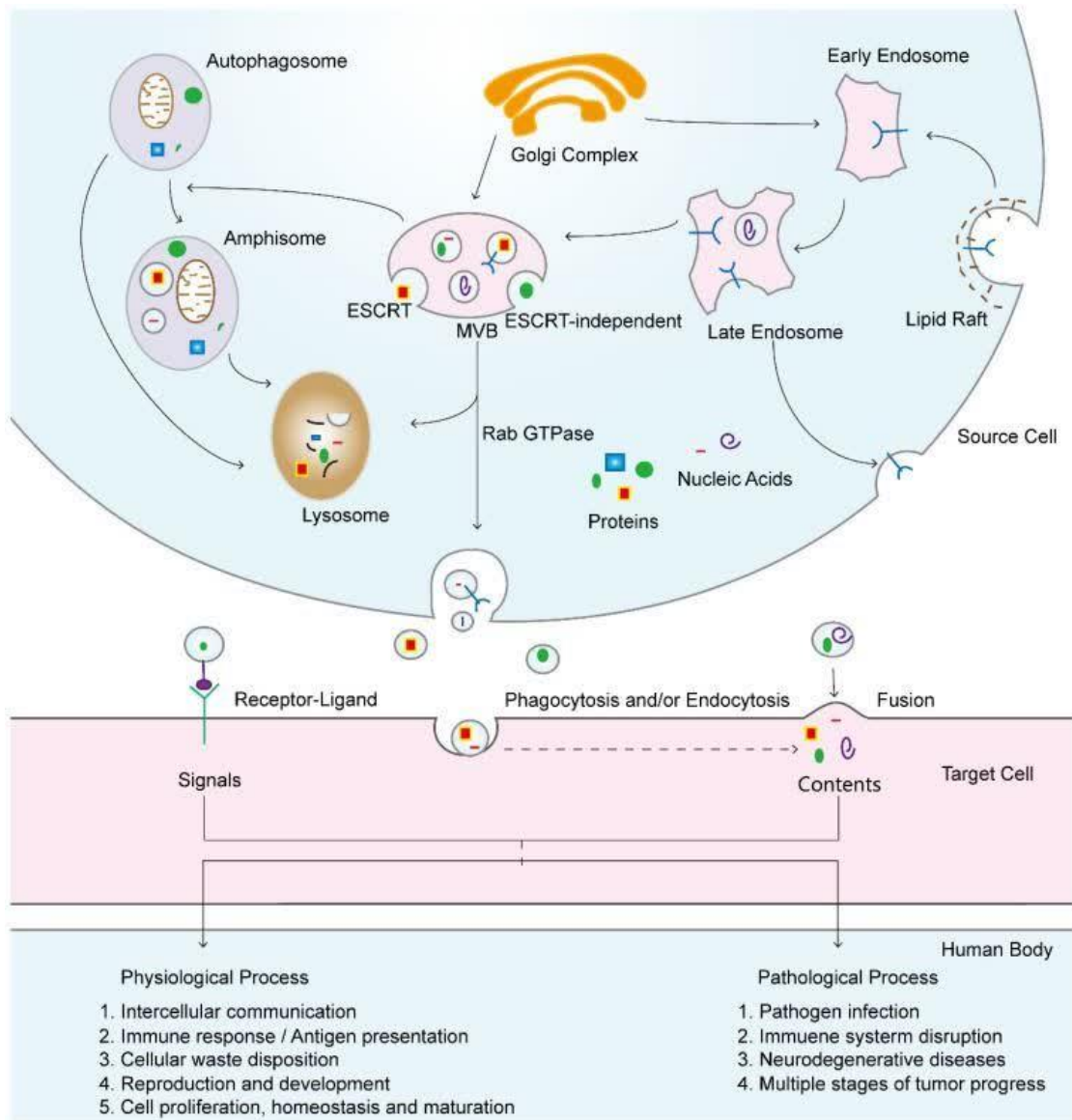
وزیکول های خارج سلولی شامل آگزوزوم ها، میکرووزیکول و اجسام آپوپتوزی هستند. اجسام آپوپتوزی زمانی تشکیل می شوند که سلول وارد فرآیند آپوپتوز شود و ممکن است شامل مواد داخل هسته مانند هیستون و DNA باشند. اندازه اجسام آپوپتوزی بین ۵۰۰۰ - ۱۰۰۰ نانومتر است. میکرووزیکول ها، وزیکول های با اندازه ۱۰۰۰ - ۵۰ نانومتر هستند که به وسیله جوانه زدن از غشای پلاسمایی تشکیل می شوند. دسته سوم آگزوزوم ها اندازه ۱۰۰ - ۳۰ نانومتر دارند. آگزوزم ها به واسطه اندازه، مسیر تشکیل شدن و مارکرهای سطحی از میکروویزیکول و اجسام آپوپتوزی قابل تشخیص هستند (شکل ۱-۲) (۹). وزیکول های

خارج سلولی بر اساس مسیر تشکیل و ترشح به دو کلاس تقسیم می شوند یکی از این کلاس ها میکرووزیکول نامیده می شوند که مستقیم از غشای پلاسمایی جدا می شوند. کلاس بعدی اگزوزوم ها هستند و وقتی مولتی وزیکول ها با غشای پلاسمایی ترکیب می شوند به وسیله اگزوسیتوز ترشح می شوند. اگزوزوم ها در اصل به وسیله اندوسیتوز تشکیل می شوند. ابتدا غشای سلولی به صورت اندوسیتوز وارد می شود، سپس تعداد زیادی وزیکول در داخل خود اندوزوم تشکیل می شود که به این اندوزوم اجسام مولتی وزیکولار می گویند و سرانجام این اجسام با غشای سلولی ترکیب شده و وزیکول های داخلی خود را در فضای خارج سلولی ترشح می کنند که به اگزوزوم تبدیل می شوند (۱۴).

### ۷-۱-۱ اگزوزوم:

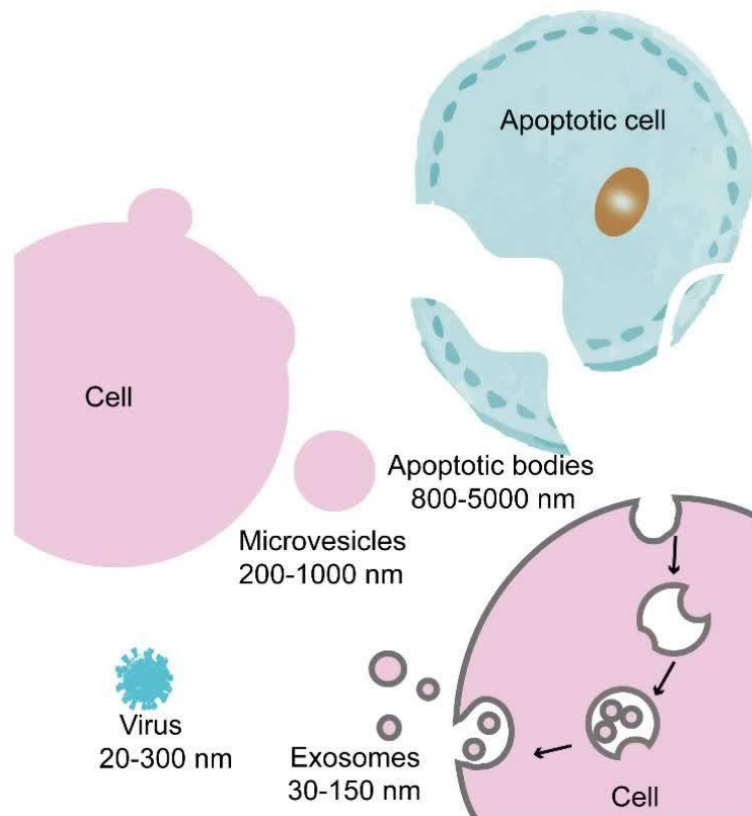
اگزوزوم ها وزیکول های با اندازه ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر هستند که توپولوژی شبیه غشای پلاسمایی دارند و در مایعات سلول های یوکاریوت شامل خون، ادرار، بزاق، مایع منی، سرم و... وجود دارند. محتویات آنها شامل پروتئین ها، لیپیدها، mRNA و RNA های کوچک است (۱۵). اگزوزوم ها به وسیله اندوسیتوز تشکیل شده و توسط تعداد زیادی از سلول ها مانند سلول های دندرتیک و ماست سل ها و پلاکت ها سلول های نرونی و توموری و... به فضای خارج سلولی ترشح می شوند (شکل ۱-۱). اگزوزوم ها در برقراری ارتباطات بین سلولی با تنظیم مسیرهای سیگنالینگ سلولی و به عنوان انتقال دهنده ماکرومولکول ها و پروتئین ها در درمان سرطان نقش دارند (۱). اگزوزوم ها به خاطر اندازه کوچک، دارای توانایی عبور از غشا، محافظت از تجزیه شدن پروتئین ها و RNA های محصور در آنها و پتانسیل انتقال ترکیبات مختلف سلول هستند. اگزوزوم ها در فعالیت های زیستی مختلفی نظیر پاسخ ایمنی و التهاب، انعقاد خون، و رگزایی نقش مهمی دارند. اگزوزوم ها به دلیل ویژگی هایی نظیر اختصاصیت گیرنده، تحریک نکردن سیستم ایمنی و از همه مهمتر امکان مهندسی کردن آنها به عنوان حامل دارو، یک گزینه جدید برای درمان محسوب می شوند (۱۶).





شکل ۱-۱: بیورنز آگزوزومی و مکانیسم های درونی سازی و نقش آنها در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی:

آگزوزوم ها با جوانه زدن به داخل از غشای اندوزومی تشکیل می شوند که منجر به تشکیل اجسام چند وزیکولی (MVBS) می شود. MVB ها را می توان برای تخریب لیزوزومی یا همجوشی با غشای پلاسمایی، که با آزاد شدن آگزوزوم ها همراه است، تعیین کرد. علاوه بر این، MVB ها همچنین در بلوغ اتوفآگزوزوم به عنوان شرکای همجوشی اندوسیتی که با اتوفآگزوزوم ها ملاقات می کنند، شرکت می کنند. سلول های هدف، آگزوزوم ها را با سه روش در گیر می کند، که می تواند سیگنال دهی و ارسال محتوا از منبع به سلول های هدف را تسهیل کند، بنابراین در پیشرفت بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی به عنوان واسطه عمل می کند (۱۷).



شکل ۱-۲: نمایش اندازه اجسام آپوپتوز، میکرووزیکول ها و آگزوزوم ها:

اجسام آپوپتوز وزیکول هایی هستند که از سلول های پس از آپوپتوز جدا می شوند. میکرووزیکول ها از غشای پلاسمایی انواع سلول ها مشتق می شوند. آگزوزوم ها EV هایی با منشأ اندوسیتی هستند که از انواع مختلف سلول ها مشتق شده اند. ویروس ها و آگزوزوم ها از نظر ساختار و اندازه به طرز چشمگیری شبیه هستند. (۹).

### ۱-۱-۸ مزیت آگزوزوم ها به عنوان حامل:

مهم ترین ویژگی هایی که باعث شده آگزوزوم ها به عنوان نانوحامل هایی برای انتقال دارو و ژن در نظر گرفته شوند شامل موارد زیر هستند:

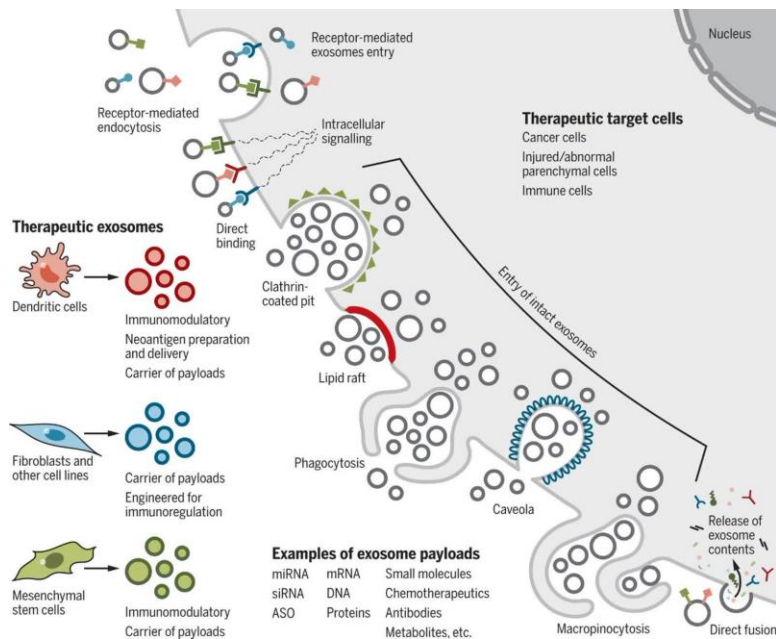
- آگزوزوم ها ساختاری شبیه غشای پلاسمایی دارند، بنابراین سیستم ایمنی را فعال نمی کنند.
- توسط بیشتر سلول ها ترشح می شوند، بنابراین می توانند به مقدار زیاد و به آسانی تولید شوند و در دسترس قرار بگیرند
- در مایعات بیولوژیک پایداری بالایی دارند.
- به خاطر اندازه کوچک به راحتی می توانند از سد خونی مغزی عبور کنند و محتویات داخلی خود را به سلول هدف منتقل کنند.

- به وسیله داشتن گیرنده های سطحی می توانند به طور بسیار اختصاصی به هدف متصل شوند.
  - برخلاف سایر ناقل های سنتزی سمیتی ندارند.
  - آگزوزوم ها را می توان مهندسی کرد و انواعی از داروها و نوکلئیک اسیدها را در آنها بار گذاری کرد.
  - محتویات داخلی آگزوزوم ها به واسطه داشتن غشای دولایه از تجزیه حفظ می شوند.
  - برای مدت طولانی می توان آگزوزوم ها را فریز کرد، بدون اینکه ویژگی های زیستی آنها تغییر کند.
- بنابراین این مزیت ها باعث شده از آگزوزوم به عنوان یک حامل مناسب نام برده شود (۹، ۱۸).

### ۹-۱-۱ برهم کنش آگزوزوم ها با سلول هدف:

به طور کلی آگزوزوم از طریق سه مکانیزم می تواند با سلول گیرنده برهمکنش پیدا کند:

- مکانیزم اول: پروتئین های غشایی آگزوزوم ها می توانند به طور مستقیم به گیرنده های سیگنالی غشای سلول هدف متصل شوند (۱۹).
  - مکانیزم دوم: آگزوزوم ها با غشای پلاسمایی سلول هدف ترکیب می شوند و محتویات خود را به سلول هدف می ریزند (۲۰).
  - مکانیزم سوم: آگزوزوم ها می توانند به سلول هدف وارد شوند که در این صورت دو حالت وجود دارد.
- آگزوزوم های بلعیده شده توسط سلول هدف می توانند با اندوزوم ها ادغام شوند و به سلول های مجاور منتقل شوند یا اینکه آگزوزوم ها وارد اندوزوم سلول هدف شده و به لیزوزوم هدایت شوند تا در آنجا تخریب شوند (شکل ۱-۳) (۲۱).



شکل ۳-۰۱: جذب سلولی آگزوزوم های درمانی:

آگزوزوم های درمانی جدا شده از سلول های دندریتیک، فیروبلست ها و سلول های مزانشیمی می توانند اثرات خاصی را بر روی سلول های هدف، از جمله نمایش نئوانتی ژن، تعدیل ایمنی، و تحویل بار دارو ایجاد کنند. تأثیر آگزوزوم های درمانی بر سلول های هدف ممکن است توسط مکانیسم های مختلف ورود یا تعامل کنترل شود. ورود آگزوزوم های دست نخورده می تواند شامل اندوسیتوز با واسطه گیرنده، حفره های پوشیده شده با کلاترین، رافت های لیپیدی، فاگوسیتوز و ... باشد. ورود محتوای آگزوزوم ها یا القای سیگنال ها توسط آگزوزوم ها، می تواند شامل سیگنال دهی یا همجوشی درون سلولی ناشی از گیرنده لیگاند برای رسوب محتویات آگزوزوم ها به سیتوپلاسم باشد. سلول های هدف شامل سلول های سرطانی، سلول های پارانشیمی آسیب دیده و سلول های ایمنی هستند. (۸).

### ۱-۱-۱۰ سلول های بنیادی:

همه سلول های بدن، دارای ژنوم واحد و کاملاً یکسانی هستند، اما طی فرایند تمایز، هر سلول به صورت هدفمند، گروه خاصی از ژن ها را خاموش و گروه دیگر را روشن می کند و با یک برنامه هماهنگ با سایر سلول ها، فعالیت های خود را به صورت تخصصی انجام می دهد، اما گروهی از سلول ها که سلول های بنیادی نام دارند، می توانند به هر نوع سلول تخصصی که بدن به آن نیاز دارد تبدیل شوند. در واقع سلول های بنیادی سلول های تمایز نیافته ای هستند که می توانند با توجه به نیاز بدن به سلول های تخصصی تبدیل شوند (۲۲).

سلول های بنیادی همزمان با رشد ارگانیزم، سلول های جدیدی را برای بدن فراهم می کنند و آن ها را جایگزین سلول های تخصص یافته آسیب دیده یا از دست رفته می کنند. سلول های بنیادی دو ویژگی منحصر به فرد دارند:

- خود تکثیری (self-renewal): این سلول ها توانایی تقسیم های متوالی را برای تولید سلول های جدید دارند.

- توانمندی (potency) هم زمان که این سلول‌ها تقسیم می‌شوند، می‌توانند به انواع سلول‌های مختلف و تخصصی تمایز پیدا کنند.

سلول‌های بنیادی را بر اساس خصوصیات و ویژگی به دو دسته سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می‌کنند.

سلول‌های بنیادی جنینی: از توده سلولی داخلی جنین ۱۶-۱۴ روزه گرفته می‌شود و قادر است تمام سلول‌ها و بافت‌های یک فرد کامل را بسازد (شکل ۴-۱).

سلول‌های بنیادی بالغ: به سلول‌هایی که پس از تولد از بافت‌های مختلف فرد بالغ جدا می‌شوند، گفته می‌شود. سلول‌های بنیادی مستقر در مغز استخوان، مغز، کبد و سایر بافت‌ها از این دسته هستند که قدرت تمایز به برخی از بافت‌ها را دارند (۲۳).

#### ۱-۱-۱۱ سلول‌های بنیادی براساس توان تمایزی

توانایی یعنی بروز قدرت تمایزی بالقوه (توانایی تمایز به سلول‌های مختلف) سلول‌های بنیادی. براساس توان تمایزی و برگشت پذیری، سلول‌های بنیادی را می‌توان به انواع سلول‌های همه توان (Totipotent)، پرتوان (Pluripotent)، چندتوان (Multipotent)، تک توان (Unipotent) و اولگپوتنت (Oligipotent) تقسیم نمود (۲۴).

- سلول‌های بنیادی همه توان (Omnipotent)(Totipotent stem cell) :

سلول بنیادی با قابلیت تمایز به گونه‌های سلولی جنینی و غیر جنینی. چنین سلول‌هایی توانایی ساخت کامل ارگانیسم‌های متنوع را دارا می‌باشند (۲۵). این سلول‌ها از ترکیب تخمک و اسپرم ایجاد می‌شوند. سلول‌های تولید شده ابتدا با تقسیمات اندک تخمک لقاح یافته نیز، همه توان هستند (۲۶).

- سلول‌های بنیادی پرتوان (Pluripotent stem cell) :

سلول‌های بنیادی از نسل سلول‌های همه توان که تقریباً توانایی تمایز به همه سلول‌ها را دارا می‌باشند (۲۵).

- سلول‌های بنیادی چندتوان (Multipotent stem cell) :

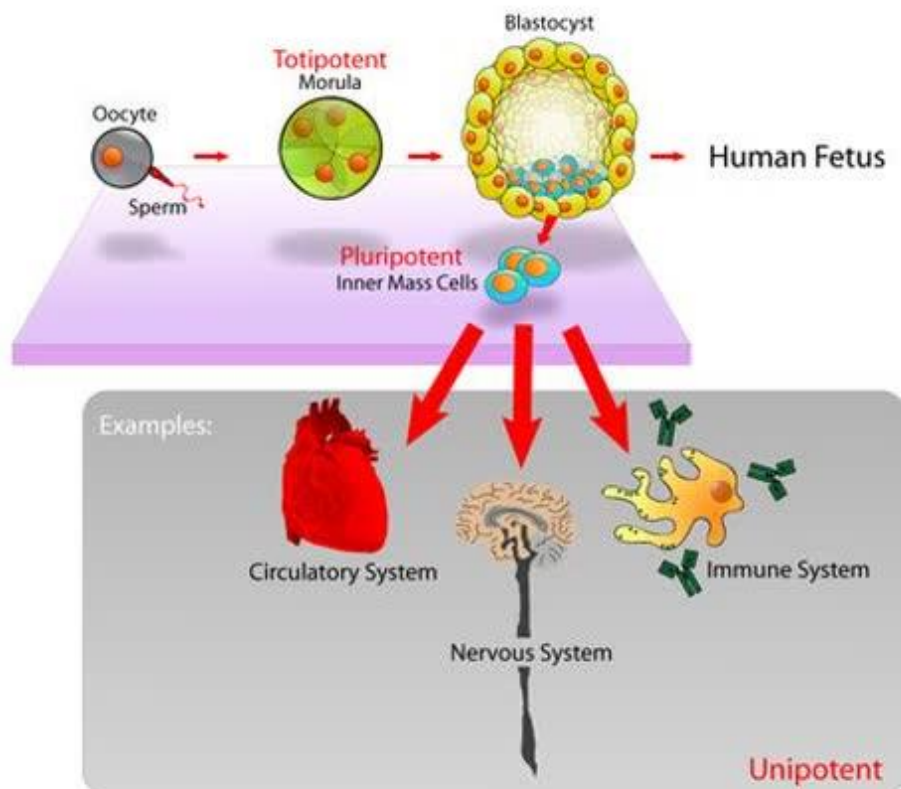
سلول‌های بنیادی با قابلیت تمایز به تعدادی از سلول‌ها با رابطه نزدیک با سلول‌های خویشاوند.

- سلول‌های بنیادی تک توان (Unipotent stem cell) :

سلول هایی که تنها قابلیت تولید سلول هایی از نوع خود را دارا بوده و به دلیل توانایی خود نوسازی قابل تشخیص از سلول های غیربنیادی هستند.

• سلول های بنیادی اولگپوتنت (Oligipotent stem cell):

سلول های بنیادی با توانایی تمایز به تعداد اندکی سلول، مانند سلول های لیمفونید (Lymphoid) هستند (۲۵).



شکل ۱-۴: توان تمایز سلول های بنیادی:

قدرت بروز تمایز بالقوه (توانایی تمایز به سلول های مختلف) سلول های بنیادی (۲۷).

### ۱-۱-۱۲ سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs):

سلول های بنیادی مزانشیمی سلول های استرومایی چند توانی هستند که در نواحی مختلف ساکن هستند. جداسازی این سلول ها از بافت های مختلف بدن از جمله بافت مغز استخوان، بافت های جنینی و بالغ گوناگون از جمله خون بند ناف<sup>۱</sup> (UC)، پرزهای کوریونیک جفت، مایع آمنیونی، کبد جنینی، سینه ویوم، پری استنوم، ماهیچه اسکلتی، بافت

<sup>۱</sup> Umbilical cord stem cells

چربی<sup>۱</sup>(AD)، خون محیطی<sup>۲</sup>(PB)، ریه و حتی دندان های شیری امکان پذیر است. این سلول ها قادرند به انواع رده ی سلول مزاشیمی از جمله استخوان، غضروف، ماهیچه، لیگامنت، تاندون، ماهیچه قلب، بافت چربی، سلول های بافت همبند مغز استخوان، سلول های بافت همبند تیموس، سلول های ادونوتورژنیک (دندان ساز)، و سلول های اپیتلیوم کبد، اپیتلیوم ریه و اپیتلیوم روده تمایز پیدا کنند. MSC ها دارای عملکرد تنظیم کنندگی سیستم ایمنی (ایمونومدولاتوری) هستند و بر روی سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی اثر می گذارند. ویژگی منحصر به فرد این سلولها توانایی سرکوب و تعدیل پاسخ های ایمنی می باشد. MSC ها بر انواع سلول های ایمنی بدن نظیر لنفوسیت های T، لنفوسیت های B، سلول های کشنده طبیعی (NK)، سلول های دندریتیک اثر مهاری داشته و در نهایت سبب کاهش و تنظیم پاسخ های ایمنی می شوند. علاوه بر این، MSC ها بیان MHC کلاس II، CD11c، CD83 و مولکول های کمک محرک را بر سطح مونسیت ها کاهش می دهند. بنابراین MSC ها باعث کاهش سایتوکین های پیش التهابی از جمله TNF- $\alpha$  و IL-12 شده و در درمان بیماری های التهابی قابل استفاده اند. MSC ها منجر به تمایز سلول های T به سلول های T تنظیم کننده می گردند که نقش حایز اهمیتی در حفظ تولرانس و جلوگیری از ایجاد بیماری های خود ایمنی دارند (۲۸).

MSC ها اثر مهاری روی تکثیر سلول های T تحریک شده توسط میتوزن های پلی کلونال، سلول های آلورژنیک و یا آنتی ژن های اختصاصی دارند. این سلول ها عملکرد مهاری خود را بر روی تکثیر لنفوسیت ها، از طریق توقف این سلول ها در فاز G1/G0 چرخه سلولی انجام می دهند (۲۹). MSC ها به واسطه ترشح سایتوکین های خود قادر به هدایت تمایز زبررده های لنفوسیت T هستند، به طوری که باعث کاهش ترشح سایتوکین های پیش التهابی IL-17 و IL-6، TNF- $\alpha$  و IFN- $\gamma$  تولید شده توسط سلول های T فعال شده در محیط خارج سلولی می شوند و در مقابل ترشح سایتوکین های ضد التهاب IL-4، IL-10 را افزایش می دهند (۳۰).

در سال های اخیر، گزارش های زیادی در رابطه با عملکرد ایمونولوژیک MSC ها منتشر شده است که حاکی از نقش سرکوبگر ایمنی این سلول ها از طریق تماس سلول به سلول و یا توسط ترشحات پاراکراینی می باشد. بسیاری از این گزارش ها نشان داده اند که این سلول ها پیام های سرکوب کننده سیستم ایمنی را بیشتر از طریق واسطه های پاراکراین ترشح می کنند. عمدتاً مزایای درمانی سرکوب کننده سیستم ایمنی بدن به واسطه تجویز MSC ها را به اثرات پاراکراینی وزیکول های خارج سلولی (EVs) مشتق از آنها منتسب می کنند (۳۱، ۳۲). EV ها وزیکول

---

<sup>۱</sup> Adipose tissue stem cells  
<sup>۲</sup> Peripheral blood stem cells

های ناهمگنی هستند که توسط ساختار دولایه فسفولیپیدی محدود شده و به عنوان واسطه های ارتباط بین سلولی از طریق پروتئین ها، RNA و یا DNA بارگذاری شده، عمل می کنند. بسیاری از گزارش ها نشان داده اند که EVs مشتق از MSCs می توانند اکثر ویژگی های این سلول ها را بروز دهند. همچنین در بسیاری از موارد، پتانسیل درمانی MSCs بر مبنای تعامل آنها با سلول های Treg استوار است، مانند نقش این سلول ها در جلوگیری از رد حاد پیوند (۳۳).

مجموعه ترشحات MSCs شامل اجزای مختلفی از جمله عوامل رشد، سایتوکاین ها، کموکاین ها، واسطه های ضد التهابی و آگزوزوم ها (exosome) می باشد. در واقع ترشح اغلب این فاکتورهای پاراکراین تحت تاثیر فاکتورهای محیطی میزبان قرار دارد، زیرا ویژگی های تعدیل ایمنی در MSCs اغلب هنگام قرار گرفتن در معرض التهاب بروز می کنند (۷۱). اثرات پاراکراینی تعدیل کننده ایمنی بر روی اجزای اصلی سیستم ایمنی اکتسابی، شامل لنفوسیت های B و T، سلول های دندریتی (DC) و سلول های NK، اعمال می شوند. این اثرات می توانند هم به طور مستقیم این سلول ها را درگیر کنند و یا از طریق سلول های واسطه ای مانند ماکروفاژها و منوسیت ها و یا پاسخ سلول های Treg اعمال شوند (۳۴).

### ۱-۱-۱۳ سلول های بنیادی خون قاعدگی :

سلول های بنیادی خون قاعدگی (MenSCs) منبع جدیدی از سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs) هستند. خون قاعدگی یک منبع غنی از سلول های بنیادی است که به آسانی در هر سیکل قاعدگی از دست می رود. این در حالیست که مطالعات اخیر نشان داده که سلول های بنیادی حاصل از خون قاعدگی دارای جمعیت بی نظیری از سلول ها است که دارای خصایصی مشابه با سلول های بنیادی بالغ می باشند (۱۳، ۳۵). در عین حال، شواهد مشهود این فرضیه را حمایت می کند که توانایی بالای بازسازی اندومتر در انسان به وسیله فرایندهای دوره ای تکثیر سلولی، تمایز و خونریزی (مراحل قاعدگی) مشخص می شود (۳۶). به نظر می رسد این سلول ها دارای خصایص هر دو نوع سلول های بنیادی مزانشیمی و جنینی باشند (۳۷). ضمن اینکه خطر ناهنجاری های کروموزومی، توانایی شکل گیری تومور یا سرعت تکثیر توموری در مدل های حیوانی در این سلول ها حداقل است (۳۸). علاوه بر آن، این منبع غنی دارای قابلیت خود نوسازی طولانی مدت و رشد سریع تری در مقایسه با سلول های بنیادی مزانشیمال بند ناف می باشد (۳۹). این حقیقت



که سلول های استرومایی می توانند به اکتودرم و مزودرم تمایز یابند چندان توانی آنها را آشکار می کنند (۴۰, ۴۱). این سلول های بنیادی استرومال در بافت اندومتربال شناسایی شده اند. پوشش اندومتربال رحم توانایی بالایی در بازسازی دارد لذا در طول هر دوره قاعدگی رشد زیاد بافت و عروق خونی وجود دارد که در پایان هر دوره از بین می رود (۴۲). یکی دیگر از مهمترین فواید سلول های بنیادی خون قاعدگی این است که روش جمع آوری آنها کاملاً غیرتهاجمی است (۴۳) و با وجود دوره قاعدگی در زنان در سنین باروری این سلول ها که در لایه اندومتربال رحم موجود است ماهانه به صورت تازه وجود خواهد داشت (۴۴). بنابراین سلول های بنیادی خون قاعدگی در مقایسه با سایر سلول ها مزایای متعددی دارند:

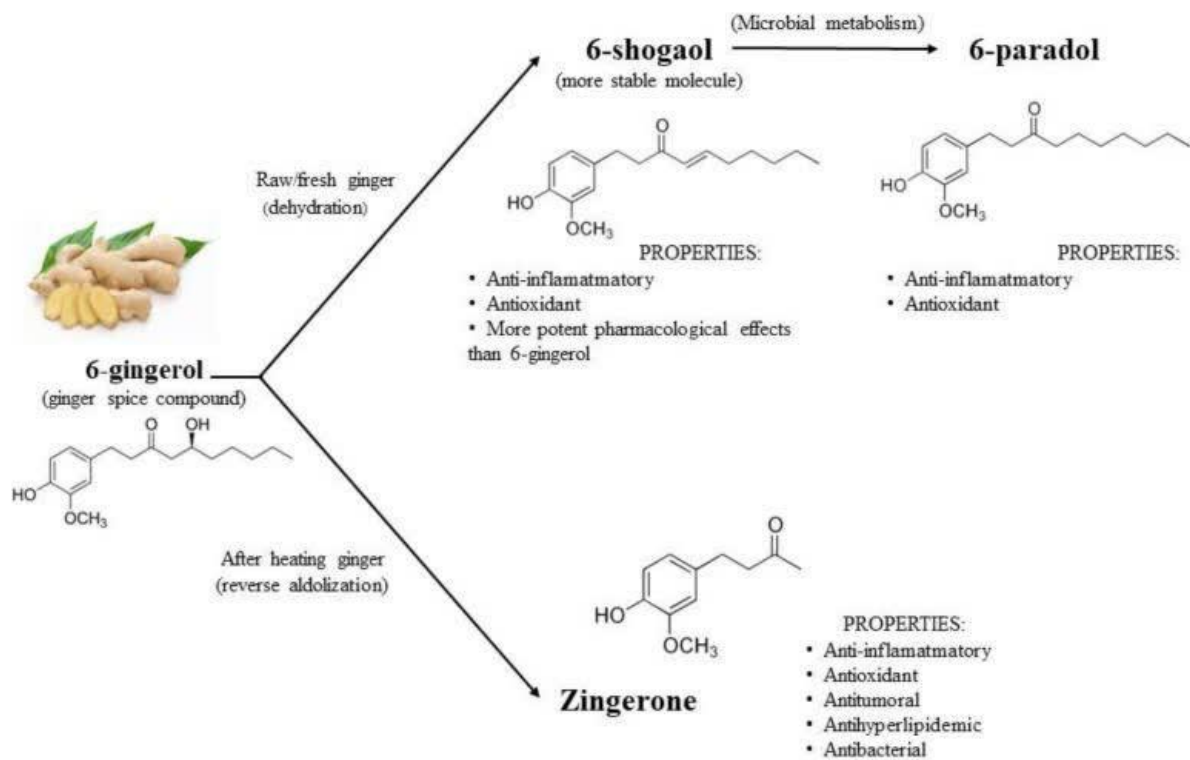
1. خون قاعدگی را می توان از خود زنان بیمار تهیه نمود و بدین ترتیب مشکل محدود بودن فرد اهدا کننده را کاهش داد.
2. با استفاده از سلول های بنیادی خون قاعدگی خود بیمار، امکان رد پیوند ایمونولوژیک کاهش می یابد که سبب طولانی تر شدن عمر بیمار پس از پیوند می شود.
3. جداسازی سلول های بنیادی خون قاعدگی به آسانی قابل انجام است.
4. تهیه نمونه به صورت ماهیانه و بدون بکارگیری روش تهاجمی امکان پذیر است.
5. اثرات استفاده از این سلول ها در موارد مختلف بالینی به اثبات رسیده است (۴۵).

## ۱-۱-۱۴ زنجبیل :

گیاه زنجبیل با نام علمی *officinale Zingiber* متعلق به خانواده *Zingiberaceae* است. گیاهی دارویی که در سراسر جهان به عنوان یک ادویه مهم و خوراک لذیذ مورد استفاده قرار می گیرد و همچنین در طب سنتی کاربرد فراوانی دارد کشت گیاه زنجبیل ابتدا در آسیا بوده که سپس به آفریقای غربی و پس از آن به کارائیب گسترش یافته است. اسانس آن حاوی بیش از ۴۶ ترکیب مختلف مانند *sesquiterpene*، *shogao*، *gingerol*، *gingerdion*، *terpenee* است که اغلب دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند (۴۶). بو و طعم خاص زنجبیل ناشی از مخلوط *shogaols*، *zingerone*، *gingerols* و روغن های فراری است که ۳ درصد وزن زنجبیل تازه را تشکیل می دهند. زنجبیل شامل بیش از سه درصد از چربی های اساسی معطر است که ترکیب اصلی سسکوئی ترین ها را دارا بوده و *zingerone* ترکیب

اصلی آن می باشد. مقدار کمتری از سسکوئی ترپن ها و farnesene و مقادیر کمی از مونوترپنوئیدها و citral نیز در آن وجود دارد. طعم تند زنجبیل ناشی از فنیل پروپانوئید غیر فرار و تا حدی gingerols و shogaols می باشد که در هنگام طبخ و خشک شده ی گیاه وجود دارد. زنجبیل خاصیت بزاق آور داشته و سبب تحریک تولید بزاق شده و در نتیجه عمل بلع را آسان می کند و طیف وسیعی از درمان های این گیاه شامل روماتیسم، تب، فشار، خون، استفراغ، درد، عفونت، آسم، دیابت، بیماریهای عصبی، مشکلات گوارشی، التهاب، سرطان و تقویت قوای جنسی است (۱۳). زنجبیل همچنین سبب کاهش درد در افراد مبتلا به آرتریت می شود و مطالعات نشان می دهد سبب رقیق شدن خون و کاهش کلسترول آن می گردد و در داروهای سنتی به عنوان ماده ی مؤثر در درمان بیماری های قلبی شناخته شده است (۴۷).

Gingerol از طریق القای مرگ طبیعی سلولی، از رشد و تکثیر سلول های سرطانی جلوگیری می کند و ظرفیت ضدالتهابی زنجبیل با توانایی آن در مهار سرطان با کاهش استرس اکسیداتیو و القای مرگ سلولی طبیعی مرتبط است (۳). Quercetin به عنوان یکی از ترکیبات موجود در زنجبیل به دلیل فعالیت آنتی اکسیدانی قوی، نقش ایمنی سلولی را در برابر استرس اکسیداتیو ایفا می کند، به نظر می رسد این ترکیب نه تنها به دلیل اثر آنتی اکسیدانی خود از سلول ها در برابر آسیب رادیکال های آزاد محافظت می کند، بلکه باعث مرگ برنامه ریزی شده سلولی از طریق فعالیت اکسیداتیو و جلوگیری از تومورزایی می شود (۲). ترکیبات فعال این گیاه مانند gingerol و shogaol به خوبی قادر به مهار تولید پروستاگلاندین های التهابی، مهارکننده های اکسید نیتریک و حتی اینترلوکین های دخیل در التهاب هستند (۴۸). سیکلوکسیژنازها در تمام مراحل تومورزایی بدخیم مانند افزایش تکثیر سلولی، کاهش آپوپتوز، رگزایی و تحرک سلول های سرطانی نقش دارند. آنزیمهای سیکلوکسیژناز عامل مهمی در ایجاد سرطان تخمدان هستند (۱۳). Gingerol و gingerdion با مهار آنزیم های سیکلوپیژناز، مهارکننده های قوی پروستاگلاندین ها هستند (۴۹). اثر ضد سرطانی عصاره زنجبیل بر رده های سلولی سرطان هایی مانند روده بزرگ (۵۰)، پوست (۵۱)، کبد، سینه (۵۲)، پروستات (۵۳)، اندومتر (۵۴) و تخمدان (۵۵) گزارش شده است.



شکل ۱-۵: خواص و ساختار ۴ ترکیب اصلی زنجبیل:

ترکیبات زنجبیل دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهاب، کاهش استرس اکسیداتیو، القای آپوپتوز و باعث جلوگیری از تکثیر سلول سرطانی می شوند (۵۶).

## ۲-۱ اهداف :

مطالعه در زمینه روش های درمانی بدون عوارض سرطان سال هاست مورد توجه محققان قرار گرفته است. امروزه یکی از موضوعات قابل توجه در مجامع علمی درمان سرطان بواسطه آگزوزوم سلولی است. جدا سازی آگزوزوم، از سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی به عنوان یک منبع غنی از سلول های بنیادی، علاوه بر فراوانی، دسترسی آسان و عدم تهاجمی بودن روش نمونه گیری، توانایی تکثیر فوق العاده، مورد توجه قرار گرفته است. علاوه بر این، آگزوزوم های گیاهی نیز در درمان سرطان مورد مطالعه قرار گرفته اند. بنابراین، با توجه به تحقیقات انجام شده نشان می دهند آگزوزوم ها در درمان سرطان های مختلف مورد توجه قرار گرفته اند.

در مطالعه حاضر هدف مشخص کردن میزان تاثیر آگزوزوم های سلولی و گیاهی در رده SKOV-3 سرطان تخمدان از لحاظ پارامترهایی همچون آپوپتوز، تهاجم و مهاجرت سلولی می باشد. تاکنون در خصوص مقایسه اثر آگزوزوم های مستخرج از سلول های بنیادی مشتق از خون قاعدگی و گیاه زنجبیل در رده SKOV-3 سرطان تخمدان مطالعه ای انجام نشده است. بنابراین، با توجه به ویژگی های خاص آگزوزوم ها، به نظر می رسد منبع مناسبی جهت سلول درمانی و مهندسی بافت می باشد.

# فصل دوم

## مواد و روش ها

۱-۲ مواد و وسایل مورد استفاده :

۱-۱-۲ دستگاه ها و وسایل :

مواد، وسایل و دستگاه های مورد استفاده در مطالعه حاضر در جدول های (۱-۲) ، (۲-۲) و (۳-۲) لیست شده اند.

جدول ۱-۲: مشخصات تجهیزات بکاربرده شده در این مطالعه

نام دستگاه	نام کمپانی	کشور سازنده
انکوباتور	Memmert	آلمان
ورتکس	Sahand Teb Aria	ایران
ترازوی دیجیتالی	Sartorius	آلمان
میکروسکوپ	Magnus	آلمان
اتوکلاو	HANDYCLAVE	ژاپن
یخچال ۲۰-	فیلور	ایران
فریزر ۷۰-	MVE	آمریکا
تانک ازت	Hettich	آلمان
سانتریفیوژ	Beasat	ایران
هود	ABI-Step One plus	ایران
دستگاه Real Time PCR		آمریکا

جدول ۲-۲: مشخصات وسایل به کار برده در این مطالعه

کشور سازنده	شرکت سازنده	نام وسایل
ایران	ایده زیست	Cell Culture plate 96 Well
ایران	ایده زیست	Cell Culture Flask T75
ایران	ایده زیست	Cell Culture Flask T25
ایران	ایده زیست	فالكون ۵۰
ایران	ایده زیست	فالكون ۱۵
ایران	ایده زیست	سر سمپلر آبی
ایران	ایده زیست	سر سمپلر زرد
ایران	ایده زیست	سر سمپلر کریستالی
ایران	ایده زیست	فیلتر ۰/۲۲ میکرو لیتر
ایران	ایده زیست	پلیت ۶ سانتی
ایران	ایده زیست	پلیت ۳ سانتی
ایران	ایده زیست	پیپت پاستور

ایران	ایده ریست	بیت پاستور
ایران	ایده زیست	میکرو تیوپ ۱/۵ میلی لیتر
ایران	ایده زیست	میکرو تیوپ ۱ میلی لیتر
ایران	ایده زیست	میکرو تیوپ ۰/۵ میلی لیتر
ایران	ایده زیست	سرنگ ۱۰ میلی لیتر
ایران	ایده زیست	سرنگ ۵ میلی لیتر



جدول ۲-۳: مشخصات مواد مصرفی در این پژوهش

کشور سازنده	شرکت سازنده	نام ماده ی مصرفی
ایران	انیستو پاستور تهران	سلول سرطانی رده Skov-3
ایران	ایده زیست	محیط کشت DMEM
ایران	ایده زیست	محیط کشت RPMI
ایران	ایده زیست	Penicilin streptomycin
ایران	ایده زیست	PBS
ایران	ایده زیست	Trypsin-EDTA
ایران	ایده زیست	FBS
ایران	ایده زیست	DMSO
ایران	ایده زیست	کیت استخراج RNA
ایران	ایده زیست	کیت RT-PCR
ایران	ایده زیست	الکل ۷۰٪
ایران	ایده زیست	فایکول
ایران	ایده زیست	اب مقطر
ایران	ایده زیست	زنجبیل
ایران	—	

## ۲-۲ روش ها:

### ۲-۲-۱ نمونه گیری:

خون قاعدگی از زنان سالم با متوسط سن ۲۱-۴۰ سال از مرکز جهاد دانشگاهی قم خریداری شد.

### ۲-۲-۲ جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از نمونه خون قاعدگی:

برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای، نمونه‌های خون قاعدگی با حجمی حدود ۱ تا ۵ میلی لیتر با PBS حاوی ۲٪ انتی بیوتیک به نسبت ۴ : ۱ رقیق گشته و به نسبت ۱:۱ داخل فایکول ریخته شد. سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از گرادیان غلظت با محلول فایکول جدا شدند. سپس به اندازه‌ی نمونه خون مخلوط شده با PBS، فایکول اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، ۳ لایه جدا شد که از پائین به بالا عبارتند از: گلبول‌های قرمز، حلقه سلول‌های تک هسته‌ای و پلاسما.

پس از اتمام سانتریفیوژ، لایه سلول‌های تک هسته‌ای به آرامی جمع‌آوری شدند و برابر حجمی که لایه سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده است PBS حاوی ۲٪ انتی بیوتیک اضافه شد و با دور rpm ۱۴۰۰ به مدت زمان ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. روی رسوب بدست آمده به میزان ۲ میلی لیتر PBS حاوی ۲٪ انتی بیوتیک اضافه شد و با دور rpm ۱۳۰۰ به مدت زمان دقیقه ۲۰ سانتریفیوژ گردید. سپس روی رسوب بدست آمده مقدار ۲۰۰ لاندا DMEM اضافه شد و سلول‌ها به حالت سوسپانسیون در آورده شدند بدین ترتیب سلول‌های تک هسته‌ای از نمونه خون قاعدگی جدا شدند.

### ۲-۲-۳ جداسازی Conditioned Medium حاصل از کشت MenSCs جهت استخراج اگزوزوم :

بعد از جداسازی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی، سلول‌ها به داخل فلاسک مخصوص کشت سلول حاوی DMEM با FBS حاوی ۲٪ انتی بیوتیک منتقل گردید. فلاسک‌های حاوی سلول داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> قرار گرفتند. هر ۳-۴ روز یک بار تعویض محیط انجام شد. بدین منظور محلول رویی فلاسک دور ریخته شد و سپس محیط کشت تازه DMEM حاوی ۱۰٪ FBS به فلاسک کشت اضافه شد و دوباره به داخل انکوباتور منتقل گردید. در این مرحله رشد سلول‌ها زیر میکروسکوپ اینورت ارزیابی شدند. در پاساژ سوم و در confluency حدود ۷۰٪ cell/cm<sup>2</sup> (۸×۱۰<sup>۵</sup>) سلول‌های بنیادی مزانشیمی تعویض محیط به صورت کم کردن درصد سرم (۷٪، ۵٪، ۳٪، ۱٪) صورت گرفت. Conditioned Medium بدون سرم جمع‌آوری شده با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت

۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شدند. محیط جمع آوری شده در دمای ۷۰ - درجه سانتیگراد نگهداری شد.

#### ۴-۲-۲ جداسازی آگزوزوم ها از Conditioned Medium حاصل از MenSCs :

جداسازی آگزوزوم ها با استفاده از کیت استخراج آگزوزوم Exocib بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده ( سیب زیست فن) انجام شد. به طور خلاصه، Medium حاصل از MenSCs در پاساژ سوم و در تراکم ۷۰ %  $(8 \times 10^2)$  cell/cm به منظور جداسازی آگزوزوم مورد استفاده قرار گرفتند. مراحل کار به ترتیب زیر بود:

- سانتریفیوژ نمونه به مدت ۱۱ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm جهت حذف پارتیکل ها و دبری ها
- عبور نمونه از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر به منظور نتیجه گیری بهتر
- مخلوط کردن نمونه Regente A به نسبت ۵ به ۱
- ۵ دقیقه ورتکس
- انکوباسیون نمونه به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد
- ۱ دقیقه ورتکس
- سانتریفیوژ نمونه با دور rpm 3000 در دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۴۱ دقیقه
- دور ریختن سوپرناتانت به طور کامل
- سوسپانسیون مجدد پلت آگزوزومی با ۳۱۱-۵۱ میکرولیتر از B Reagent

به منظور نگهداری طولانی مدت، نمونه خالص سازی شد آگزوزوم در دمای ۸۰ - درجه ذخیره شد.

#### ۵-۲-۲ جداسازی آگزوزوم های زنجبیل :

ابتدا با آگیری زنجبیل، عصاره آن را تهیه گردید و با استفاده از سانتریفیوژ rpm ۱۴۰۰۰ و به مدت ۳۰ دقیقه رسوبات زنجبیل را از مایع اصلی آن که حاوی آگزوزوم هست جدا کرده و با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر مایع اصلی فیلتر شد. کیت جداسازی آگزوزوم از مایعات بیولوژیک آگزوسیب این مرحله Reagent A اضافه گردید و در فویل آلومینیومی قرار داده شد و در دمای ۴ درجه به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفت و در مرحله بعد محلول را در سانتریفیوژ rpm ۳۰۰۰ به

مدت ۴ دقیقه قرار داده و بعد به رسوبات حاصل از مرحله قبل Reagent B اضافه گردید و در دمای منفی ۸۰ قرار داده شد.

#### ۶-۲-۲ فریز سلول :

ابتدا محیط روی سلول‌ها دور ریخته شد، سپس آنها تریپسینه شدند تا از بستر کشت رها شدند. برای انجماد، حداقل ۱۰۶ سلول در یک میلی لیتر محیط نگهدارنده مورد استفاده قرار گرفت تا تعداد سلول‌های زنده بعد از ذوب کردن برای استفاده مناسب باشد. بدین منظور به یک میلی لیتر از رسوب سلول‌ها به میزان ۹۰ درصد سرم استریل جنین گاو و ۱۰ درصد DMSO اضافه شد. بدلیل خاصیت سمی DMSO و جلوگیری از آسیب به سلول فریز با سرعت بالا انجام شد. برای حصول نتیجه مطلوب لازم بود تا دمای سلول‌ها را به آرامی کاهش داد تا به دمای لازم رسیدند. بدین منظور ابتدا نمونه‌های آماده شده جهت فریز، بمدت یک ساعت در ۲۰- درجه نگهداری شد. پس از آن، سلول ابتدا به فریزر ۷۰- درجه و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت به تانک ازت ۱۹۶- درجه انتقال داده شدند.

#### ۷-۲-۲ ذوب سلول های منجمد :

سلول‌ها را سریعاً از ازت مایع خارج کرده و در دمای محیط قرار داده تا ذوب گردند. سپس محتویات لوله انجماد به یک فالكون ۱۵ ml استریل حاوی محیط RPMI منتقل شد و در ۱۲۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاوی سلول‌ها را با محیط کشت سلولی به صورت سوسپانسیون در آورده و پس از انتقال به فلاسک کشت سلول در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت تعویض محیط انجام شد. سپس اجازه داده که سلولها در فلاسک رشد کردند. هر ۳ روز یکبار، تعویض محیط کشت انجام گرفت. بعد از اینکه سلول‌ها ۸۰-۷۰٪ کف فلاسک را پر کردند آنها را از کف فلاسک از طریق تریپسینه کردن جدا کرده و پاساژ داده شدند.

#### ۸-۲-۲ پاساژ سلول:

ابتدا محیط فلاسک را تخلیه، و با PBS ۲% شستشو داده شد. سپس تریپسین به فلاسک اضافه شد و به مدت ۳ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد و برای اطمینان از جداسدن سلول ها با میکروسکوپ چک شدند، سپس ۴ سی سی محیط کشت به فلاسک اضافه گردید و در نهایت کل محتوای فلاسک به یک فالکون انتقال داده شد و در ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید رسوب حاوی سلول را با FBS به صورت سوسپانسیون در آورده و پس از انتقال به فلاسک کشت سلول در انکوباتور CO2 دار در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد (شکل ۱-۲).



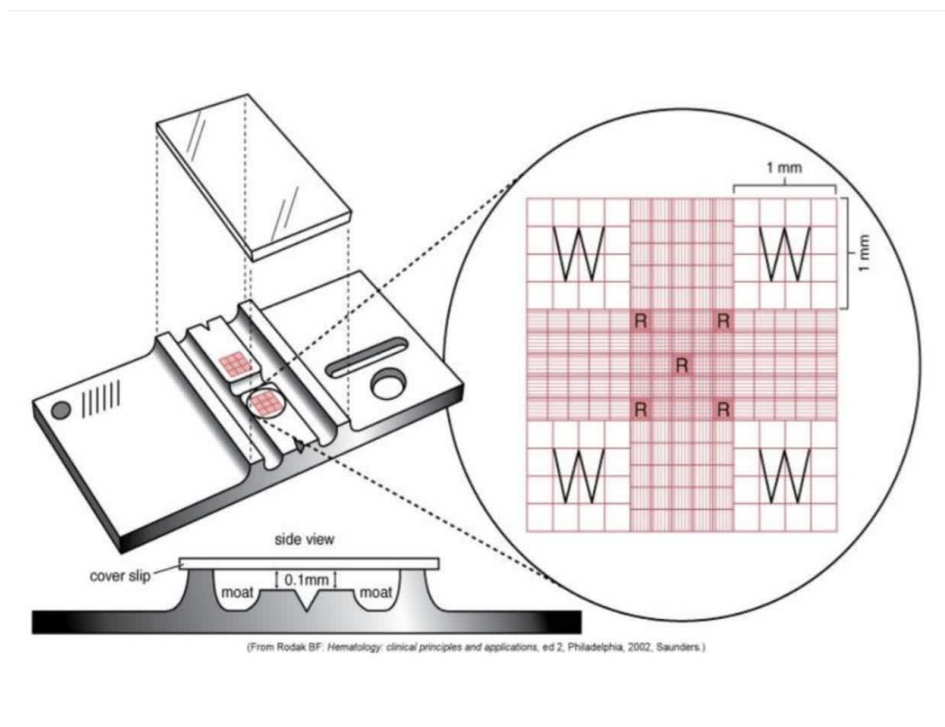
#### شکل ۱-۲: فلاسک ها و پلیت های کشت سلول:

انواع ظروف کشت سلولی در آزمایشگاه های مختلف وجود دارد و هرکدام از آن ظروف کاربرد خاص خود را دارند. کشت سلولی در یک محیط کشت غنی از مواد مغذی مانند ویتامین ها، قندها، مواد معدنی، هورمون ها، آمینواسید ها... انجام می شود.

#### ۹-۲-۲ شمارش سلولی :

به منظور شمارش سلولی، پس از تریپسین کردن و جدا نمودن سلول ها از کف فلاسک محیط حاوی سلول به لوله استریل منتقل شده و با دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و ۱ ml از محیط DMEM به رسوب اضافه و کاملاً مخلوط گردید، سپس با استفاده از لام نوبار تعداد سلول ها در خانه های مربوطه شمارش شد و از فرمول زیر تعداد سلول ها در یک میلی لیتر محاسبه شد.

تعداد سلول در ۱ میلی لیتر =  $10^4 \times$  میانگین تعداد سلول های شمارش شده در ۴ خانه



### شکل ۲-۲: لام هموسیتومتر جهت شمارش سلول :

لام هموسیتومتر که با نام لام نئوبار نیز شناخته می شود برای شمارش سلول ها است. لام هموسیتومتر از یک اسلاید میکروسکوپی شیشه ای ضخیم به همراه کنگره های مستطیلی شکل، تشکیل شده که یک محفظه را برای شمارش سلول به وجود می آورد.

### ۱۰-۲-۲ ساخت MTT :

۵ میلی گرم از پودر MTT به یک میلی لیتر محلول PBS و یا RPMI اضافه شده و با همزن مغناطیسی تا حد امکان حل شد. محلول حاصل از فیلتر ۰/۲۲ عبور داده شد و سپس در حجم های کم تقسیم و در منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. با توجه به حساسیت MTT به نور در لوله های تیره نگهداری شدند و یا سطح لوله ها با فویل آلومینیمی پوشیده شدند.

### ۱۱-۲-۲ محاسبه دوز موثر آگزوزوم ها به روش MTT assay :

ابتدا در پلیت ۹۶ well، ۵۰۰۰ سلول ها را کشت داد شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. سپس با استفاده از غلظت های بدست آمده از تست Bradford دوز های (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰) آگروزوم ها را به پلیت اضافه کرده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط روی تمام چاهک های پلیت را خالی کرده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI اضافه کرده و سپس ۱۰ میکرولیتر ترکیب MTT پس از تیمار با آگروزوم به هر چاهک اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید به محلول حاصل اضافه شد. در نهایت میزان جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا اندازه گیری شدند. سلولهای بنیادی بدون تیمار MTT به عنوان گروه شاهد به کار گرفته شد.

#### ۲-۲-۱۲ تیمار سلول ها :

سلول های Skov3 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شده تا به تراکم ۷۰ درصد رسیدند. پس از آن در سه گروه کنترل (عدم دریافت تیمار)، گروه آزمایشی ۱ تیمار شده با آگروزوم های حاصل از (MenSCs) با دز ۵۰ میکروگرم و گروه آزمایشی ۲ (تیمار شده با آگروزوم های حاصل از زنجبیل) با دز ۱۰۰ میکروگرم به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند.

#### ۲-۲-۱۳ تعیین غلظت پروتئین های تام سلولی با کیت BCA

برای اندازه گیری غلظت پروتئین های سلولی با کیت BCA، از کیت های حاوی محلول استاندارد Copper و محلول BCA Reagent برای تعیین غلظت استفاده شد و با ترکیب این دو محلول، با توجه به نسبت مواد و استفاده از ۱۰ چاهک دابل و طبق محاسبات انجام شده یک واحد Copper به ۵۰ واحد BCA Reagent، محلولی به نام Working ساخته شد. برای تعیین غلظت از میکرو تیوب های ۱/۵ استفاده شد.

- در میکرو تیوب شماره یک، ۵۰ لاندا محلول استاندارد و ۴۵۰ لاندا اب مقطر اضافه شد
- در میکرو تیوب شماره ۲ تا ۹، ۲۵۰ لاندا آب مقطر اضافه شد
- از میکرو تیوب های شماره ۱ تا ۸، ۲۵۰ لاندا محلول به میکرو تیوب بعدی اضافه گردید و در نهایت میکرو تیوب ۹ بدون تغییر و حاوی تنها اب مقطر باقی مانده است .

- به ۹ عدد از چاهک های دابل به ترتیب ۷۵ لاندا Working و ۲۵ لاندا از محلول های داخل میکروتیوب مرحله قبل اضافه گردید و چاهک دهم ۷۵ لاندا Working و ۲۵ لاندا سمپل (اکزوزوم سلول مورد نظر) اضافه گردید.
- چاهک ها را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه قرار داده شدند و در نهایت در دستگاه الایزا با طول موج ۶۵۰ قرار داده شدند.

#### ۱۴-۲-۲ ردیابی و تعیین کمیت آپوپتوز با روش Annexin V/PI :

برای انجام این تست ابتدا سلول ها درون ظرف کشت ۳ سانتی، کشت داده شد در هر خانه (۵ x ۱۰۵) و پس از ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفت. بعد از گذشت ۷۲ ساعت تیمار، سلول های گروه های کنترل و تیمار به میکروتیوب های جداگانه منتقل شده و درون سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس با خارج کردن محیط رویی، هر نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر بافر اتصال یابنده X1 سوسپانس شده، ۵ میکرولیتر انکسین V کونژوگه با فلوروسئین ایزوتیوسیانات و ۵ میکرولیتر propidium iodide (PI) به هر نمونه اضافه شده و پپیتاژ گردید. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شده و جهت تعیین کمیت آپوپتوز برای دستگاه فلوسیتومتری فرستاده شدند.

#### ۱۵-۲-۲ Real Time PCR :

Real time PCR به عنوان تکنیکی مناسب و دقیق برای مطالعه بیان ژن استفاده می شود. مبنای این روش براساس سنجش کمی نسخه های تکثیر شده در PCR از طریق مرحله تصاعدی واکنش و سنجش میزان نشر نور فلورسانس است. این روش اولین بار توسط هیگوچی و همکاران در سال ۱۹۹۱ ارائه شد. در Real time PCR، تمامی اصول واکنش گرهای که برای انجام یک PCR معمولی مورد نیاز است بکار می رود با این تفاوت که یک گزارشگر فلورسنت نیز در واکنش حضور دارد. طراحی این گزارشگرها به گونه ای است که در صورت تکثیر محصول، نور تولید کنند. از این رو میزان محصول به دست آمده با افزایش شدت نور ثبت شده در دستگاه نسبت مستقیم دارد. بطور معمول در صورتیکه واکنش بهینه سازی شده باشد، در ۸ تا ۱۱ چرخه ی ابتدایی تغییر قابل توجهی در شدت فلورسنت دیده نمی



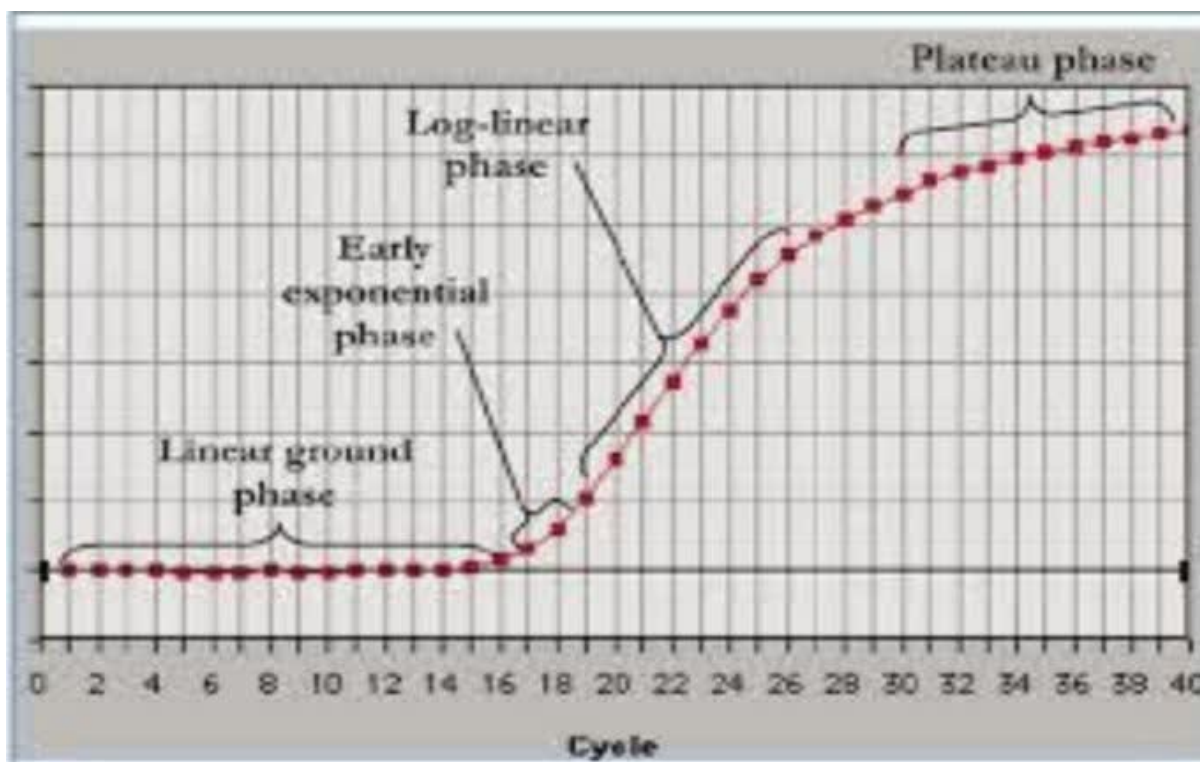
شود و به این ناحیه، خط پایه می گویند. اما در ادامه، شدت فلورسنت افزایش می یابد. در ابتدای مرحله دوم میزان سیگنال تولیدی به صورت نمایی افزایش می یابد و با پیشرفت تکثیر از فاز نمایی به سمت فاز خطی، تعداد مولکولهای پلیمراز محدود می شوند و به تدریج واکنش Real time PCR به پایان می رسد. به طور کلی Real time PCR چند مرحله دارد:

فاز اول: Linear ground: محصول دو رشته ای وجود دارد اما نور آن قابل ردیابی نیست.

فاز دوم: Early exponential: در هر چرخه، محصول دو رشته ای دو برابر می شود و رشد نمایی مربوط به واکنش شروع می شود و در مقایسه با فاز اول، مقدار فلورسنت به طور چشمگیری افزایش می یابد.

فاز سوم: Iog-linear: ترکیبات واکنش و کارایی آنها در حال اتمام است.

فاز چهارم: Plateau: ترکیبات و کارایی آنها از بین می رود و در مقدار فلورسنت افزایشی مشاهده نمی شود (شکل ۲-۲).



شکل ۲-۳: مراحل مختلف واکنش Real-time PCR

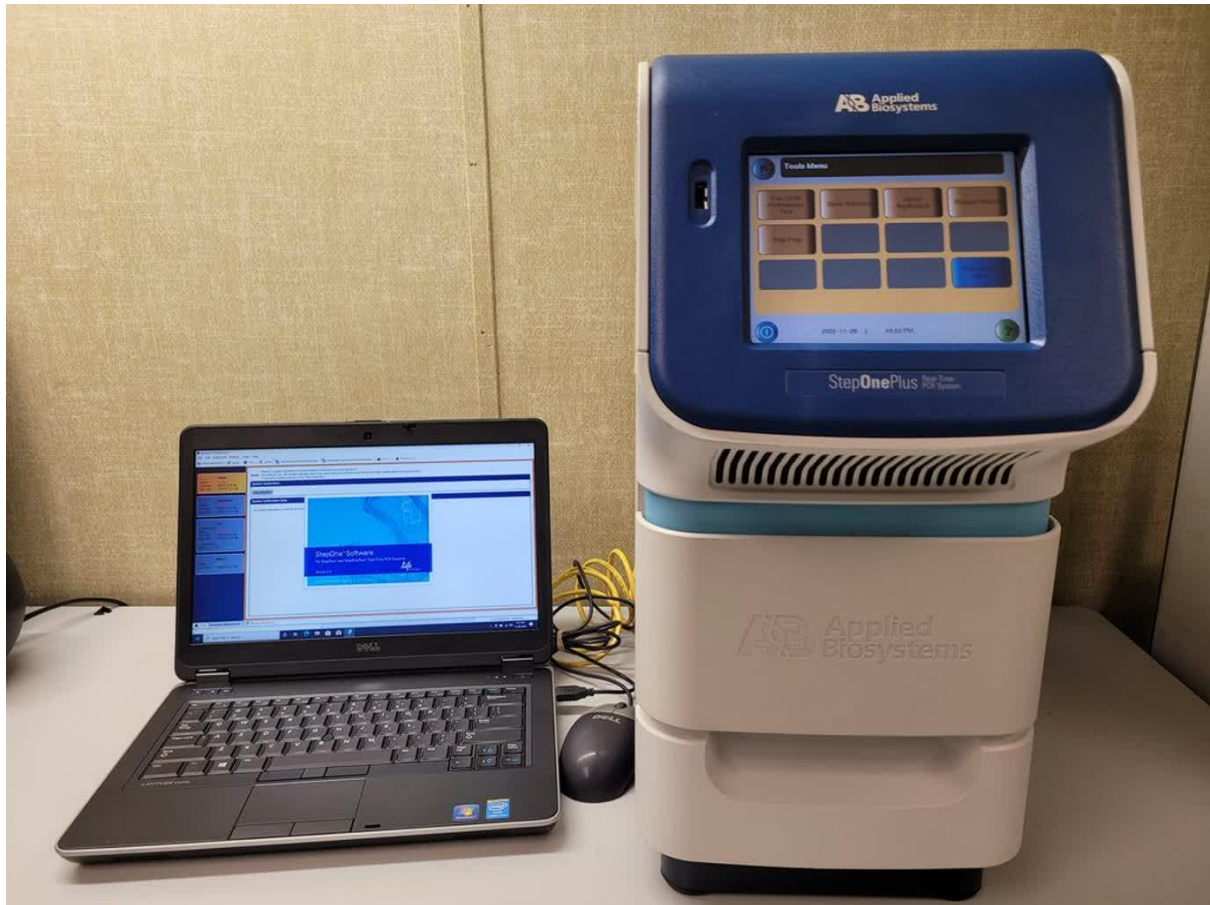
Real-time PCR از ۴ مرحله تشکیل شده است. در فاز اول محصول دو رشته ای وجود دارد اما نور آن قابل ردیابی نیست. فاز دوم محصول دو رشته ای دو برابر می شود و نور فلورسنت افزایش یافته و قابل ردیابی است. فاز سوم ترکیبات واکنش و کارایی آنها در حال اتمام است. فاز چهارم ترکیبات واکنش به اتمام رسیده است و در نور فلورسنت افزایش مشاهده نمی شود.

در مرحله ای که تکثیر در تمام نمونه ها در فاز خطی است باید اندازه گیری میزان بیان صورت گیرد. Threshold سطحی از سیگنال فلورسنت است که در واکنش PCR time Real به لحاظ آماری، افزایش معنی داری نسبت به سیگنال سطح پایه پیدا می کند. اولین چرخه هایی که در آن شدت فلورسنت بیشتر از خط پایه باشد، چرخه آستانه یا CT نام دارد. مقدار عدد CT رابطه معنی داری با مقدار الگوی اولیه دارد و با استفاده از آن می توان مقدار mRNA اولیه را تخمین زد. با افزایش مقدار الگوی اولیه، مقدار CT کاهش می یابد. به منظور برآورد کمی از مقدار الگوی اولیه با کمک این روش، یک نمودار استاندارد باید رسم کنیم. ابتدا از یک نمونه معلوم غلظت های مشخصی تهیه کرده و با دستگاه تکثیر و سپس منحنی استاندارد را رسم می کنیم، غلظت رونوشت اولیه را با تکثیر و ارزیابی CT برای نمونه مجهول می توان به دست آورد. بعد از انجام واکنش PCR time Real، به منظور بررسی صحت انجام تکثیر میتوان محصول Real-time PCR را روی الکتروفورز ژل آگارز بررسی نموده و باند مورد نظر را پس از عکس برداری، مشاهده کرد.

برای شناسایی فرآورده های حاصل از Real time PCR می توان از رنگهای متصل شونده به DNA استفاده کرد. از جمله رنگهای متصل شونده به DNA می توان SYBR Green I، PRO-YO-1، Eva Green و نام برد. رنگ SYBR Green I از رنگ های فلورسنت است و بدلیل عدم توانایی در اتصال به الگوهای تک رشته ای، در این موارد بازتاب ضعیفی دارد. این رنگ، زمانی که محصول دورشته ای در طی چرخه های PCR تولید شود به آنها متصل می شود بنابراین افزایش شدت فلورسنت با غلظت DNA دو رشته ای که توسط دستگاه ثبت می شود، متناسب است. بدلیل غیر اختصاصی بودن این رنگ نمی توان از آن برای تمامی آزمایش ها استفاده کرد. از مزیت های این رنگ، ساده و غیر سمی بودن آن و همچنین عدم تداخل با پلیمرها را می توان نام برد.

از این رو وجود محصولات غیر اختصاصی یا آغازگردایمر را نمی توان به کمک این رنگ تشخیص داد. البته این مشکل تا حدودی با استفاده از نمودار منحنی ذوب در دستگاه های امروزی برطرف شده است. به طور خلاصه واکنش Real time PCR با رنگ سایبرگرین شامل مراحل زیر است.

۱. در آغاز واکنش چون مولکول های رنگی به DNA متصل نشده اند، فلورسنت ضعیفی ساطع می شود.
۲. مولکول های رنگی پس از اتصال آغازگرها، به شیارهای کوچک DNA دو رشته ای متصل می شوند و به محض جذب طول موج ۴۹۱ نانومتر، نور ۱۱۱ نانومتری را ساطع می کند.
۳. در طول بساط، با اتصال مولکول های رنگی بیش تر و افزایشی در میزان فلورسنت مشاهده می شود. به محض واسرشت شدن، با آزاد شدن مولکول های رنگی برای چرخه بعدی، تشعشعات فلورسنت کاهش می یابد. این رنگ تحت شرایط PCR، باثبات و پایدار باقی می ماند. سطح مناسبی از درجه حرارت منجر به تنظیم القاء و نشر طول موج می شود.



شکل ۲-۴: دستگاه ترموسایکلر مربوط به Real time PCR:

ترموسایکلر دستگاهی است که در علوم بالینی برای تقویت DNA به کار برده می شود. دستگاه ترموسایکلر با کمک روش و اصول PCR موجب تکثیر DNA می گردد.

#### ۲-۲-۱۵-۱ روش استخراج RNA از سلول:

سلول های Skov3 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شده تا به تراکم ۷۰ درصد رسیدند. پس از آن در سه گروه کنترل (عدم دریافت تیمار)، گروه آزمایشی ۱ تیمار شده با آگزوزوم های حاصل از (MenSCs) و گروه آزمایشی ۲ (تیمار شده با آگزوزوم های حاصل از زنجبیل) به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول ها تریپسینه و جدا سازی شدند و آماده استخراج RNA شدند. برای استخراج RNA در این مطالعه از کیت استخراج RL Solution پارس توس استفاده شد. این کیت از خواص اتصال برگشت پذیر ستون مبتنی بر سیلیس که خواص لیز کنندگی دارد استفاده می کند. آلودگی ها و باز دارنده های آنزیمی را که باعث جداسازی سریع، راحت و قابل اعتماد RNA می شوند، از بین می برد. و سپس سنتز cDNA و در نهایت بررسی بیان ژن های Bax، BCL2، MMP2، MMP9 توسط پرایمر های اختصاصی با روش Real time PCR انجام شد.

## ۲-۲-۱۵-۲-۲ پرایمر اختصاصی استفاده شده:

پرایمرهای اختصاصی برای بیان ژن Bax، BCL2، MMP2، MMP9 طراحی شد. پرایمرهای مورد نظر به نحوی که بتوانند با حداکثر کارایی عمل نمایند با استفاده از نرم افزار طراحی و انتخاب شد. توالی پرایمر مورد استفاده در جدول زیر آورده شده است (۲-۴).

جدول ۲-۴: توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Gene symbol	Forward Primer	Reverse Primer
Bax	GCTTCAGGGTTTCATCCAG	TCGGAAAAAGACCTCTCGG
BCL2	CCCTGTGGATGACTGAGTAC	CGTACAGTTCCACAAAGGCA
MMP2	ACAGTGGATGATGCCTTTGC	GAGTCCGTCCTTACCGTCAA
MMP9	GCACCACCACAACATCACCT	ATACCCGTCTCCGTGCTCC
GAPDH	TGGCTACAGCAACAGGGTG	CTCTTGTGCTCTTGCTGGG

## ۲-۳ تحلیل آماری :

به منظور بررسی درست آماری، تست ها همگی به صورت ۳ بار تکرار انجام گرفت. نتایج حاصله برای متغیرهای کمی به صورت میانگین و انحراف استاندارد ( $mean \pm SD$ ) و برای متغیرهای کیفی طبقه ای به صورت درصد بیان

گردید. مقایسه بین متغیرهای کمی میان دو گروه در صورت نرمال بودن توسط آزمون t و بررسی مقایسه ای بیش از دو گروه به روش One Way Anova انجام شدند.

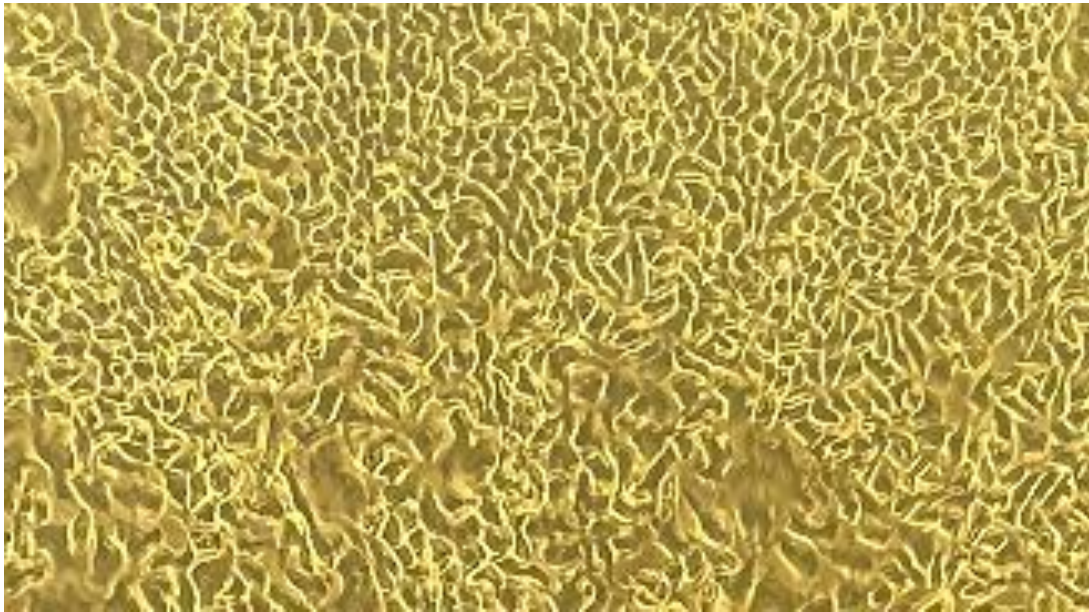
برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۳ استفاده شد. سطح معنی داری در این مطالعه ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

# فصل سوم

## نتایج

### ۱-۳ رده سلول های سرطانی تخمدان SKOV3 و سلول های خون قاعدگی:

در این مطالعه رده سلولی سرطان تخمدان SKOV3 از مرکز انیستو پاستور ایران خریداری شد. در محیط RPMI1640 حاوی سرم جنین گاوی ۱۰% (FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک کشت گردید (شکل ۱-۳). علاوه بر این نمونه خون قاعدگی از زنان سالم با متوسط سن ۲۱-۴۰ سال از مرکز جهاد دانشگاهی قم خریداری شد. در محیط DMEM جنین گاوی ۱۰% (FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک کشت گردید (شکل ۲-۳).



شکل ۱-۳: رده سلول سرطانی تخمدان SKOV3:

رده سلولی سرطان تخمدان SKOV3 از مرکز انیستو پاستور ایران خریداری شد. سلول های Skov3 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در محیط کشت RPMI کشت داده شده تا به تراکم ۷۰ درصد رسیدند.



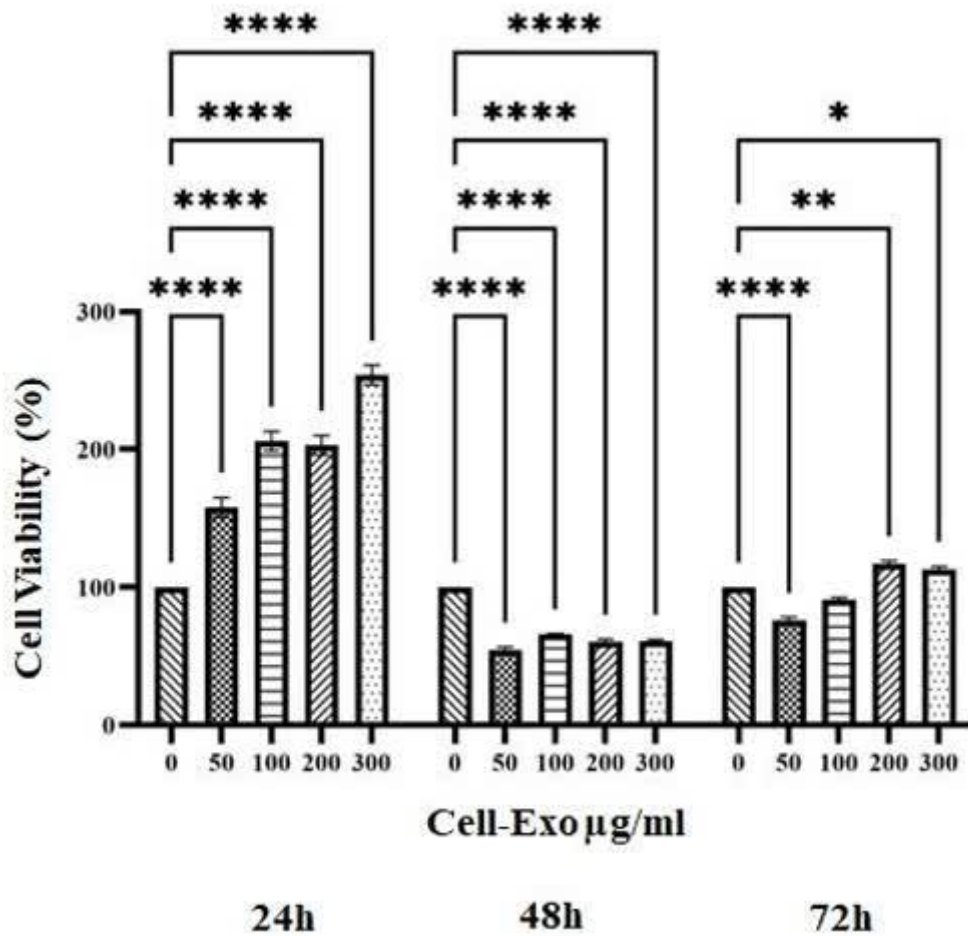


### شکل ۲-۳: کشت سلولی MenSCs:

نمونه خون قاعدگی از زنان سالم با متوسط سن ۲۱-۴۰ سال از مرکز جهاد دانشگاهی قم خریداری شد. در محیط DMEM و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شده تا به تراکم ۷۰ درصد رسیدند.

### ۲-۳ تعیین دوز موثر سلول با آگزوزوم های خون قاعدگی (MENSCLS) به روش MTT:

در ابتدا، ارزیابی دوز موثر سلول ها برای تعیین اثرات وابسته به دوز و زمان cell-Exo در غلظت های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میکرومولار و در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت برای مهار سلولهای سرطانی تخمدان SKOV-3 به روش تیزول تترازولیوم (MTT) انجام شد (شکل ۲-۳). نتایج نشان داد که cell-Exo با ۵۰ میکروگرم در ۴۸ ساعت، تأثیر مثبتی بر مهار سلول سرطانی دارد. بر اساس این نتایج، ۵۰ میکروگرم از cell-Exo در آزمایشهای بعدی به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد.

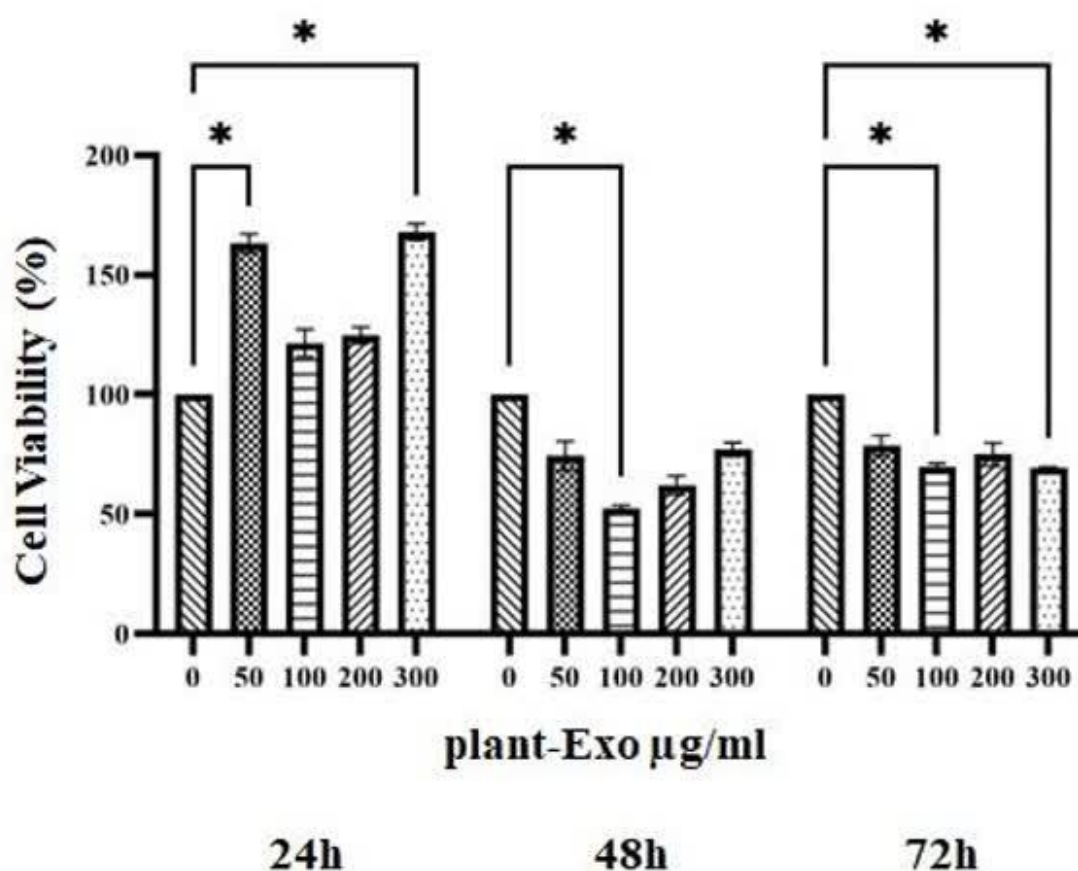


شکل ۱-۰: نتایج MTT در ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت:

ارزیابی دوز موثر سلول ها با استفاده از روش MTT در دوز های (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰) میکروگرم و زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت تعیین شد. نتایج نشان داد که cell-Exo با ۵۰ میکروگرم در ۴۸ ساعت، کاهش معنی داری نسبت به دوز و زمان های دیگری از خود نشان داده است.

### ۳-۳ تعیین دوز موثر سلول با آگزوزوم های گیاهی زنجبیل به روش MTT:

در ابتدا، ارزیابی دوز موثر سلول ها برای تعیین اثرات وابسته به دوز و زمان plant-Exo در غلظت های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میکرومولار و در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت برای مهار سلولهای سرطانی تخمدان SKOV-3 به روش تیزول تترازولیوم (MTT) انجام شد (شکل ۳-۴). نتایج نشان داد که plant-Exo با ۱۰۰ میکروگرم در ۴۸ ساعت، تأثیر مثبتی بر مهار سلول سرطانی دارد. بر اساس این نتایج، ۱۰۰ میکروگرم از plant-Exo در آزمایشهای بعدی به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد.

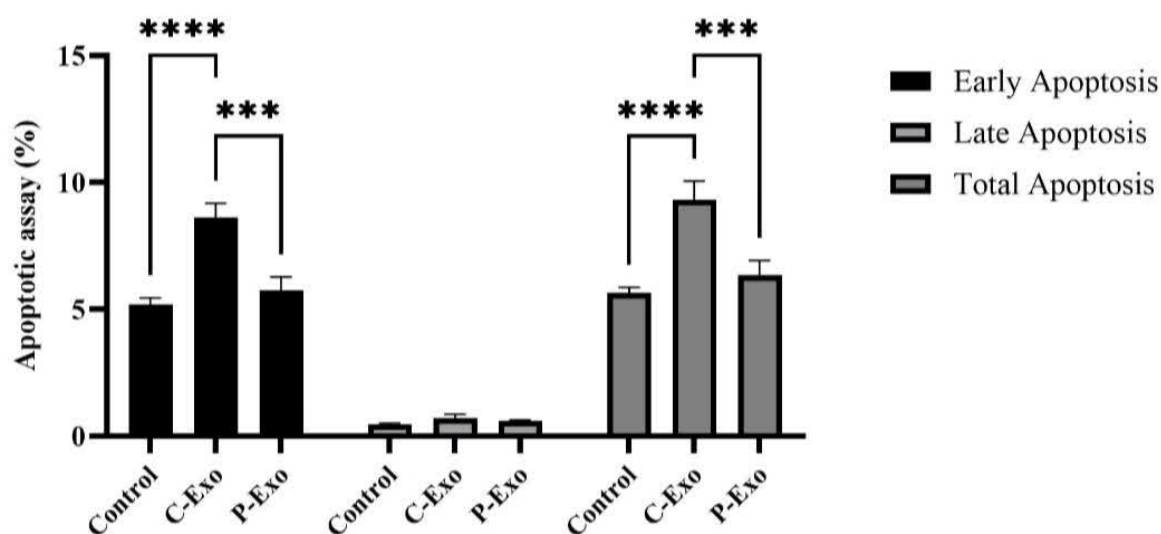


شکل ۳-۲: نتایج MTT در ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت:

ارزیابی دوز موثر سلول ها با استفاده از روش MTT در دوز های (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰) میکرو گرم و زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت تعیین شد. نتایج نشان داد که Plant-Exo با ۱۰۰ میکروگرم در ۴۸ ساعت، کاهش معنی داری نسبت به دوز و زمان های دیگری از خود نشان داده است.

### ۴-۳ بررسی تاثیر آگزوزوم های زنجبیل و MenSCs در آپوپتوز سلول سرطانی :

اثرات cell-Exo و plant-Exo بر آپوپتوز سلول سرطانی تخمدان رده Skov-3 با استفاده از فلوسایتمتری پس از رنگ آمیزی سلول ها با آنکسین V و پروپیدیوم یدید (PI) از طریق کیت تشخیص آنکسین PI/V بررسی شد. آپوپتوز کلی افزایش قابل توجهی در سلول سرطانی تخمدان رده Skov-3 درمان با cell-Exo و plant-Exo نشان داد، که یک نتیجه امیدوارکننده برای سلول های سرطانی با نرخ بالاتری مرگ سلولی برنامه ریزی شده بود (شکل ۳-۵).



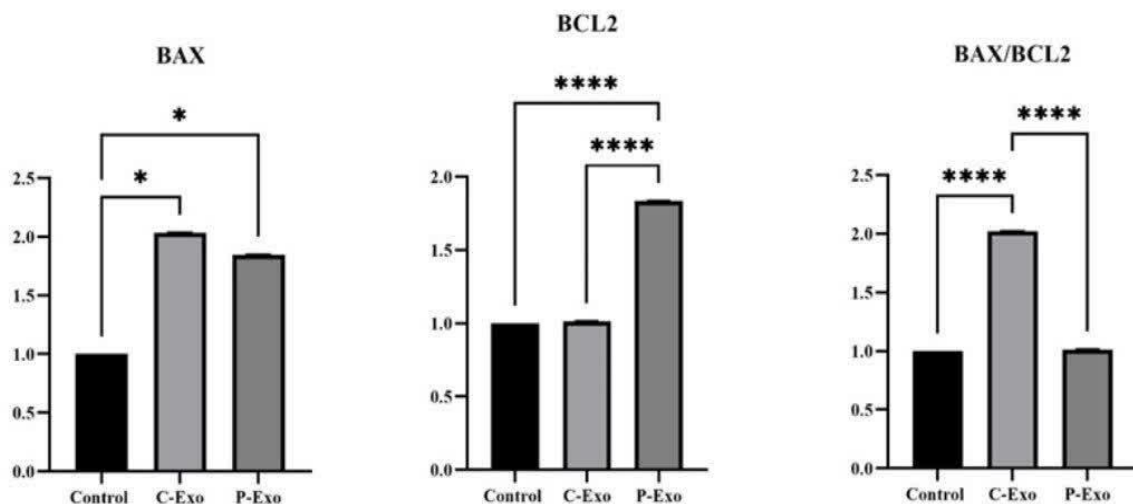
شکل ۳-۳: آپوپتوز سلول سرطانی تخمدان رده SKOV-3:

تشخیص آپوپتوز توسط فلوسایتمتری در رده SKOV-3 تیمار شده با cell-Exo (MenSCs) و Plant-Exo (آگزوزوم های زنجبیل) باعث افزایش آنکسین V سلول های سرطان تخمدان رده SKOV-3 آپوپتوز دیررس شد.

۳-۵ بررسی بیان ژن های Bax ، Bcl2 ، MMP2 و MMP9 در سلول های سرطانی تخمدان رده SKOV-3 : 3

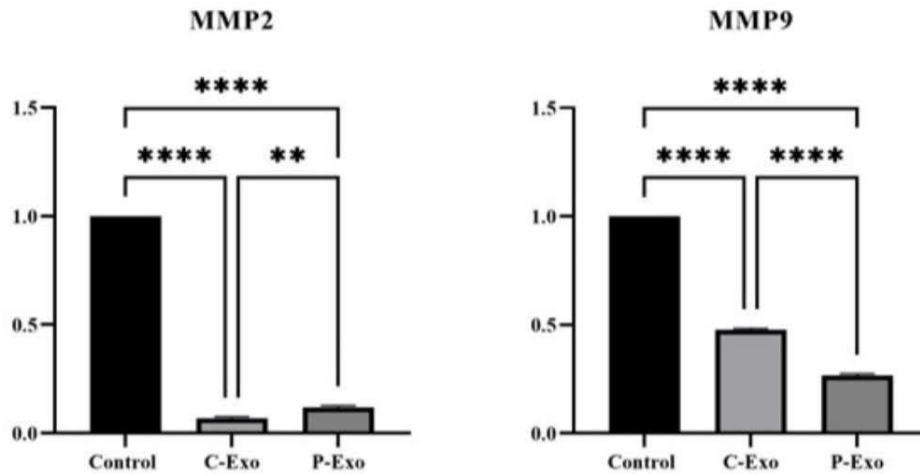
برای بررسی مهاجرت و تهاجم سلول های سرطانی تخمدان رده SKOV-3، بیان ژن های Bax ، Bcl2 و MMP2 در گروه (کنترل ، cell-Exo و Exo) ، که افزایش بیان بالاتری در گروه cell-Exo در مقایسه با plant-Exo و گروه کنترل را نشان می دهد. همچنین در مورد بیان ژن Bcl2 در ۳ گروه (کنترل ، cell-Exo و plant-Exo) ، که کاهش بیان بیشتری در گروه plant-Exo در مقایسه با cell-Exo دیده شد که در نهایت مقایسه مجموع ژن ها نشان داد نسبت بیان بالاتری از ژن های Bax ، Bcl2 در گروه cell-Exo در مقایسه با plant-Exo و گروه کنترل دیده شده است (شکل ۳-۶).

داده های ما بیان ژن MMP2 در ۳ گروه (کنترل ، cell-Exo و plant-Exo) که گروه plant-Exo نسبت به گروه cell-Exo کاهش معنی داری را نشان می دهد. همچنین در مورد بیان ژن MMP9 در ۳ گروه (کنترل ، cell-Exo و plant-Exo) که گروه cell-Exo نسبت به گروه plant-Exo کاهش معنی داری را نشان می دهد که مقایسه مجموع این دو ژن کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل از خود نشان دادند (شکل ۳-۷).



شکل ۳-۴: مقایسه بیان ژن Bcl2 ، Bax توسط Real Time PCR در سرطان تخمدان رده SKOV-3 تحت تیمار plant-Exo ، cell-Exo و بدون تیمار:

مقایسه مجموع ژن ها نشان داد نسبت بیان بالاتری از ژن های Bax ، Bcl2 در گروه cell-Exo در مقایسه با plant-Exo و گروه کنترل دیده شده است.



شکل ۳-۵: بیان ژن MMP2، MMP9 توسط Real Time PCR در سرطان تخمدان رده SKOV-3 تحت تیمار plant-Exo، cell-Exo و بدون تیمار ارزیابی شد.

مقایسه مجموع بیان ژن MMP2، MMP9 کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل از خود نشان دادند.

# فصل چہارم

## بحث و نتیجہ گیری

#### ۱-۴ بحث :

سرطان تخمدان شایع ترین بدخیمی کشنده دستگاه تناسلی زنان است که اغلب در مراحل پیشرفته تشخیص داده می شود. سرطان تخمدان از نواحی اپیتلیال تخمدان و سلول های زایا و سلول های استرومای تخمدان منشاء می گیرد. سرطان اپی تلیال تخمدان رایج ترین نوع این سرطان بوده و تا هنگام متاستاز معمولاً بدون علامت باقی می ماند (۲). در میان رده های سلولی ، رده سلولی SKOV-3 مقاوم به شیمی درمانی است و یکی از تهاجمی ترین رده های سلولی سرطان تخمدان محسوب می شود (۵۷). سلول های سرطان تخمدان انسانی در رده سلولی SKOV3 مورفولوژی شبه اپیتلیال دارند که در برابر فاکتور های نکروز مقاومت نشان می دهند. برای درمان سرطان تخمدان از روش های مختلفی استفاده شده است. در سال های اخیر در زمینه علم وابسته به سلول های بنیادی پیشرفت های شگرفی حاصل شده است. از جمله مهم ترین این پیشرفت ها می توان به ظهور روش سلول درمانی اشاره کرد، که در این روش سلول ها برای درمان طیف وسیعی از بیماری ها استفاده می شوند (۵۸). تحقیقات درباره سلول های بنیادی بدون شک یکی از هیجان انگیزترین و بحث انگیزترین موارد علم پزشکی می باشد (۵۹). سلول های بنیادی اکنون می توانند به صورت مصنوعی در محیط آزمایشگاه ها رشد و تکثیر یافته و در طول کشت سلولی به انواع سلول های تخصصی با خصایصی همانند سلول های بافت های مختلف مانند عضلات، اعصاب یا اپیتلیالی تمایز یابند (۶۰). در طول سال ها، تحقیقات مختلف نشان داده است که تزریق انواع مختلف سلول های بنیادی می تواند تاثیر شگرف و سریعی در بهبود عملکرد اعضای آسیب دیده بگذارد (۵۹). سلول های بنیادی فعالانه با قرار گرفتن در هر محیطی به وسیله ترشح سایتوکین ها، فاکتور های رشد و ماتریکس خارج سلولی روی سلول های خودی (اتوکرین) یا سلول های همسایه (پاراکرین) اثر می گذارند (۶۲). تحقیقات فعلی بر روی سلول های تخمدان نشان می دهد که وزیکول های خارج سلولی ممکن است در پاتوژنز سلول های سرطان تخمدان نقش داشته باشند. اندازه، منشا و عملکرد وزیکول های خارج سلولی بسته به سلول اهدا کننده متفاوت است. از آنجا که میکرووزیکول ها بلافاصله از غشای سلولی خارج می شوند، بار آنها عمدتاً از مواد سیئوپلاسمی مانند miRNA و پروتئین ها تشکیل می شود (۶۲). اگزوزومها، وزیکولهای متصل به غشاء (۳۱-۱۱۱ نانومتر) هستند که تقریباً توسط همه انواع سلولها ترشح می شوند و ممکن است به سیگنالینگ اتوکرین، پاراکرین یا اندوکرین کمک کنند (۶۱). RNA،DNA پیام رسانی، miRNA (microRNA، mRNA)، پروتئین ها و عوامل رشد، اگزوزوم ها را تشکیل می دهند (۶۱). اگزوزومها شامل اجزای فعال بیولوژیکی مانند مولکولهای غشای سلولی و

پروتئینهای سیتوپلاسمی از منابع مختلف سلولی هستند. اطلاعات بین سلولی از طریق ادغام غشای سلولی، سلولهای مجاور مبادله می شود (۶۳). آگزوزومها به عنوان یک ارتباط دهنده سلول به سلول شناخته شده اند که قادر به توصیف بیماری زایی انواع بیماری ها از جمله سرطان تخمدان با انتقال مواد شیمیایی مانند miRNA ها، RNA ها و پروتئین ها هستند (۶۴، ۱۳). همانطور که در مطالعات قبلی ذکر شد، سرطان تخمدان شامل مسیرهای مختلف سیگنال دهنده است و در این مطالعه برخی از ژنهای دخیل در این مسیرها را بررسی کردیم. تا آنجا که ما می دانیم، این اولین گزارشی است که به بررسی مقایسه اثر آگزوزومهای مشتق از خون قاعدگی و آگزوزوم های گیاهی زنجبیل بر سلولهای سرطان تخمدان رده SKOV-3 می پردازد.

مجموعه ای از شواهد بدست آمده از تحقیقات مختلف نشان می دهد که آگزوزوم ها، در پیشگیری و درمان سرطان های مختلف بسیار حایز اهمیت است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آگزوزوم تهیه شده از گیاه زنجبیل تازه بر سلول های سرطانی تخمدان، رده سلولی SKOV-3 اثرکشنده دارد. در این مطالعه مشاهده شد که با افزایش غلظت آگزوزوم های گیاه زنجبیل در ۴۸ ساعت، درصد زنده ماندن سلولی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت. علاوه بر این، با افزایش مدت زمان تیمار کردن سلول سرطانی با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آگزوزوم زنجبیل تاثیر مثبتی داشته است و درصد زنده ماندن سلولی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت. همچنین در این مطالعه مشاهده شد که با افزایش غلظت آگزوزوم های مشتق از خون قاعدگی در ۴۸ ساعت، درصد زنده ماندن سلولی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت. علاوه بر این، با افزایش مدت زمان تیمار سلول سرطانی با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر آگزوزوم مشتق از خون قاعدگی تاثیر مثبتی داشته است و درصد زنده ماندن سلولی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت. در این مطالعه با استفاده از تست انکسین V/PI نشان داد شد که آگزوزوم های زنجبیل و آگزوزوم های مشتق از خون قاعدگی در سلول های سرطان تخمدان SKOV-3 باعث افزایش قابل توجهی در آپوپتوز سلولی شده و آپوپتوز در سلول های سرطانی تیمار شده با آگزوزوم های خون قاعدگی به طور معنی داری افزایش یافته است. علاوه بر این بیان ژن های BAX، MMP2، BCL2، MMP9 با استفاده از تست Real time PCR نشان داد نسبت بیان بالاتری از ژن های Bax، Bcl2 و کاهش بیان در ژن های MMP9، MMP2 در گروه cell-Exo در مقایسه با plant-Exo و گروه کنترل دیده شد.

در مطالعات قبلی به خوبی تاثیرات گیاه زنجبیل بیان شده است از جمله، محققان با مطالعه روی اثر عصاره زنجبیل بر رده های سلولی سرطان تخمدان، با استفاده از سنجش سمیت سلول و Real time PCR نشان دادند که عصاره زنجبیل بر افزایش بیان ژن های P21، P53، BCL2 و القای آپوپتوز تاثیر گذار است و دارای خواص ضد سرطانی است (۱۳).



لیانگ و همکاران در مطالعه ای گزارش کرد که Shogaol-6 باعث افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS)، افزایش بیان Bax، 3 و Caspase 9 و کاهش بیان JAK، IL-6، PCNA، cyclinD1 و Bcl-2 در رده سلولی A2780 سرطان تخمدان شد. آنها نشان داد که Shogaol-6 با مهار انتقال STAT-3 در سلولهای سرطانی تخمدان و مهار رشد سلول های سرطانی تخمدان باعث آپوپتوز می شود (۵۴). در یک مطالعه بر روی زنجبیل ترکیب به نام zerombon یافت شد، نتایج نشان داد که zeromb

one با القای بهتر آپوپتوز باعث مرگ سلولی در رده های سلولی سرطان تخمدان و دهانه رحم می شود. Zerombon چرخه سلولی را در مرحله M/G2<sup>1</sup> به روشی وابسته به دز مهار می کند و به طور معنی داری سطح ترشح IL-6 را در رده های سلولی Caov-3 و HeLa کاهش می دهد (۶۵). راد و همکاران نشان دادند که زنجبیل به طور انتخابی از رشد سلول های سرطانی تخمدان در مقایسه با سلول های اپیتلیال طبیعی تخمدان جلوگیری می کند. علاوه بر این، زنجبیل محصولات ژن تنظیم کننده NF-KB از جمله IL-8 و VEGF را که در تکثیر سلولی و رگزایی سلول نقش دارند، مهار می کنند (۶۵). در تحقیقات دیگری، محققان کاهش وابسته به دز و زمان در تعداد سلولهای سرطانی تخمدان تحت درمان با gingerol-10 را گزارش کردند. کاهش تکثیر سلول های سرطانی با افزایش درصد سلول ها در فاز G2 چرخه سلولی و کاهش درصد سلول ها در مرحله G1 همراه بود. سلول های سرطانی تخمدان کاهش بیان سیکلین B1، A و D3 را پس از قرار گرفتن در معرض gingerol-10 نشان دادند (۳۰). با توجه به تحقیقاتی که روی سلول های سرطانی تخمدان انجام شد، رشد سلول های رده سلولی SKOV-3 به طور معنی داری توسط عصاره زنجبیل مهار شد. نتایج نشان داد که بیان ژن Bcl-2 کاهش و سطح بیان ژن P53 افزایش یافت. بنابراین محققان به این نتیجه رسیدند که ژن P53 با حذف ژن Bcl-2 باعث القای آپوپتوز می شود (۶۶). در مطالعه دیگری، عصاره زنجبیل بیان ژن MMP-9 را به روشی وابسته به غلظت کاهش داد. در نتیجه مهاجرت در سلولهای سرطان سینه، رده سلولی MB-MDA-۲۳۱ را مهار کرد (۶۷). Shogaol-6 و gingerol-6 از طریق مکانیسم های مولکولی مختلف، از جمله مهار مسیرهای MAPK و Akt/PI3k و فعالیت های NF-KB و STAT3 برای سرکوب بیان MMP2، MMP9، UPA و انسداد رگزایی به طور قابل توجهی از تهاجم و متاستاز کارسینومای سلولی کبدی جلوگیری می کنند (۶۵). پژوهشی بر روی سلول های سرطانی روده بزرگ، انجام شد نتایج نشان داد که عصاره زنجبیل با توقف چرخه سلولی در مرحله G1/G0 و کاهش سنتز DNA، تکثیر را مهار کرده و باعث القای آپوپتوز در رده های سلولی HT29 و HCT116 می شود (۱۶). در مطالعه دیگری، shogaol-6، gingerol-10، gingerol-6 و shogaol-10 با مهار پروتئینهای GST $\lambda$  و

MRP1 از تکثیر سلولهای سرطانی پروستات، رده های سلولی pc3R جلوگیری کردند (۶۸). محققان دریافته اند که ترپنوئیدهای موجود در عصاره زنجبیل با فعال کردن مسیر P53 باعث القای آپوپتوز در رده های سلولی سرطان اندومتر می شوند. همچنین درمان سلول های سرطانی اندومتر با عصاره زنجبیل منجر به افزایش قابل توجه کلسیم داخل سلولی، کاهش پتانسیل غشای میتوکندری، افزایش بیان کاسپاز ۳ و کاهش قابل توجه بیان Bcl-2 می شود (۵۳). ترکیب فنلی gingerol-6 از رشد و تکثیر سلول های سرطان پوست جلوگیری می کند و باعث القای آپوپتوز می شود. همچنین عملکرد میتوکندری را با تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) از طریق اختلال در نسبت BCL-2/Bax تنظیم می کند و سیتوکروم C، کاسپاز ۳ و ۹ را افزایش می دهد و باعث القای آبشارهای کاسپاز می شود. بنابراین، gingerol-6 می تواند به طور مؤثر برای درمان سرطان پوست استفاده شود (۴۹). کیم و همکاران فعالیت ضد توموری و ضد رگزایی عصاره ریزوم زنجبیل را بر روی فاکتورهای VEGF و MTA1 که نقش عمده ای در رگزایی در سلولهای سرطانی ایفا می کنند، ارزیابی کردند و به این نتیجه رسید که gingerol موجود در عصاره ریزوم زنجبیل می تواند در کاهش تکثیر سلولی القاکننده VEGF و MTA1 مؤثر باشد (۶۹). در مطالعه زنجبیل دریافتن، gingerolها به دلیل توانایی آنها در جلوگیری از فعال شدن NF-KB، القای آپوپتوز و مهار تکثیر، مهاجم، متاستاز و رگزایی، در درمان سرطان مؤثر خواهد بود. Gingerolهای وابسته به دز، سطوح شکستگی کاسپاز ۹، ۷، ۳ و PARP را افزایش و بیان BCL2 را کاهش می دهند (۷۰). عصاره متانولی زنجبیل دارای یک فعالیت بازدارنده بسیار مهم در برابر سلول های سرطانی کبد (HePG2) و سلول های سرطان سینه (MCF7) است. Gingerol و paradol نقش مهمی در مهار رشد سلولی از طریق واکنش کاهش اکسیداسیون با به دام انداختن رادیکال های آزاد ایفا کرده اند که در نهایت باعث کاهش اکسیژن فعال شد است (۵۱). در پژوهشی، محققان نقش ترکیبات gingerol-6 و shogaol-6 را به عنوان مهارکننده و تعدیل کننده مولکول های لنفزایی و رگزایی نشان دادند که در پیشرفت متاستاتیک سرطان پستان نقش دارند (۷۱). علاوه بر این در تحقیقاتی که در سال ۲۰۲۱ انجام شد نشان داده شده که ویتکس به عنوان یکی از ترکیبات چای کامبوجا، در بیان ژن های Kras، AHRI، P53 متابولومیکس سرطان تخمدان رده SKOV-3 تأثیر گذار بوده و باعث القای آپوپتوز و اثرات آنتی اکسیدانی و متابولیتی در مسیرهای سیگنالینگ سلول سرطانی شده است و همچنین اثرات ضد سرطانی ویتکس در نازوفارنکس (NPC)، لوسمی میلوئید مزمن (K-562)، پروستات، کبد، مری بررسی و تایید شده است (۷۲). در مطالعات دیگری که توسط امینی و همکاران انجام شده نشان داد والپروئیک اسید، نوعی اسید چرب با زنجیره کوتاه است که به شکل آنالوگ پنتانوئیک اسید استخراج شده از گیاه officinalis Valeriana ساخته شد در سرطان

تخمندان رده A2780 موثر بوده و با استفاده از تست MTT وابسته به دز و زمان والپروئیک اسید بررسی شد و باعث افزایش آپوپتوز سلول سرطانی شد است (۷۳). در نتایج پژوهش زمانی و همکاران مشخص شد عصاره پوست انار همانند آگزوزوم های زنجبیل باعث کاهش میزان بقاء سلول سرطانی تخمدان و کاهش بیان ژن VEGF در رده A2780 می شود (۷۵). Xingyi Chen در سال ۲۰۱۹ نشان داد با استخراج آگزوزوم های گیاهی (زنجبیل، گریپ فرت، انگور، سیر) و بررسی ژن های P53، Bax، Bcl-2 با استفاده از تست Real time PCR به این نتیجه رسید Plant-Exo باعث انتشار سیتوکین  $\beta$  IL-1 و Casp1، IL-18 شده و فعالیت NLRP3 التهاب، در کولیت موش می شوند (۷۶). سال ۲۰۱۲ طبق تحقیقات انجام شده توسط شکری و همکاران نشان داد که گیاه زنجبیل دلیل دارا بودن ترکیبات جینجروول، شوگاول و پارادول خاصیت ضد سرطانی و ضد اکسیداتیو و ضد التهابی است و می تواند از سرطان های مختلف جلوگیری کند (۷۷). در مطالعه ای دیگر در سال ۲۰۱۴ توسط رحمانی و همکاران انجام شد نشان داد که زنجبیل دلیل دارا بودن خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی قوی باعث القای آپوپتوز و فعال شدن ژن های سرکوبگر تومور شد (۷۸). در سال ۲۰۱۸ Yun Teng و همکاران با مطالعه روی میکروبیوتای روده دریافتن که آگزوزوم گیاهی مثل زنجبیل بر miRNA روده تاثیر مثبت دارد و می تواند در حیواناتی مانند موش، کولیت روده را بهبود بخشد (۷۹). در سال ۲۰۱۹ مشعوری و همکاران با مطالعه روی آگزوزوم ها نشان دادند که درک بیوژنز آگزوزوم ها، محتوای آنها و مکانیسم مولکولی آن نقش مهمی در سرکوب مسیرهای سیگنالینگ سرطان دارد علاوه بر آن در درمان مقاومت های دارویی موثر است (۸۰). در تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۴ توسط Jingyao Mu و همکاران بر روی آگزوزوم های ۳ گیاه، زنجبیل، گریپ فروت و هویج انجام دادند نشان داد نانو ذرات آگزوزوم مانند، حاوی پروتیین، لیپید و microRNA هستند و توسط ماکروفاژ ها و سلول های بنیادی روده جذب می شوند و باعث بیان ژن آنتی اکسیداسیون و ضد التهابی و فعال کردن سیتوکین و اینتر لوکین ۱۰ شده و علاوه بر آن حفظ هموستازی روده می شود (۸۱). در مطالعه ای که در سال ۲۰۲۱ توسط Sreeram Peringattu بر ریه بیماران COVID-19 با استفاده از تست Real time PCR انجام شد آگزوزوم های ۵ گیاه، سویا، زنجبیل، گریپ فروت، گوجه فرنگی و گلابی دلیل دارا بودن miRNA های متعدد و تجمع آنها در ریه باعث بهبود التهاب ریه می شود (۸۲). در مقایسه با مطالعه حاضر، در سال ۲۰۱۹، Lijun Chen و همکاران، مطالعه ای بر روی سلول های بنیادی مشتق از خون قاعدگی انجام دادند که نشان داد MenSCs تاثیرات قابل توجهی در درمان بیمار های کبد، دیابت، سکتة مغزی، دیستروفی عضلانی دوشن، انفارکتوس میوکارد، سندرم آشرمن، بیماری آلزایمر، آسیب حاد ریه، زخم پوستی، اندومتریوز و بیماری های عصبی دارند علاوه براین، نشان دادند MenSCs در بیماری های تخمدان، باعث کاهش آپوپتوز سلول گرانولوزا و بینابینی تخمدان فیروز و ترمیم تخمدان می شوند (۸۳). چندین

مطالعه به وضوح نشان داده که بسیاری از انواع سلول های بنیادی مزانشیمی می توانند رشد فولیکول های تخمدان را بطور مستقیم یا غیرمستقیم مانند پاراکرین، آگزوزوم یا مدولاسیون ایمنی تقویت کنند. پژوهشی که در سال ۲۰۱۹ انجام شد، بیانگر تاثیر MenSCها بر عملکرد تخمدان بوده و با تنظیم رشد طبیعی فولیکول تخمدان و چرخه سلولی، کاهش آپوپتوز در تخمدانها برای حفظ هموستاز ریزمحیط و تعدیل هورمون های جنسی سرم، تخمدانها به وضعیت نسبتاً طبیعی بازگردانده شده اند (۸۴). همچنین در سال ۲۰۱۹ با مطالعه بر روی سلول های بنیادی خون قاعدگی و مکانیسم های درمانی، تعدیل ایمنی در ژن های BCL2 و MMP-2، MMP-9 باعث افزایش آپوپتوز سلول سرطانی شده و اثرات پاراکرینی MenSCs را اثبات کردند که با مطالعه ما همسو بوده است (۸۵). در پژوهشی که در سال ۲۰۲۱ بر روی سلول های بنیادی خون قاعدگی و درمان التهاب های اندومتر یوز انجام شد، سطح بیان ژن های التهابی و سلول های مردانه در زنان اندومتر یوز با استفاده از Real Time PCR ارزیابی شد و نشان دهنده تاثیر MenSCها در کاهش سطح بیان ژن های التهابی HIF-1a، Cox-2، IL-1، CD10، و ژن های SOX-4، OCT-4، NANOG شده است (۹). در مقایسه با این تحقیق در سال ۲۰۲۱ مطالعه ای بر روی سلول های بنیادی بافت چربی و سرطان سینه انجام شد، در این تحقیق با استفاده از تست Real Time PCR ژن های دخیل در آپوپتوز و تهاجم سلولی بررسی شد که نشان دهنده تاثیر MSC در بیان ERBB2، MMP-9، P53 و... شده و نتایج این پژوهش بیانگر تاثیر سلول های بنیادی در درمان سرطان است که با مطالعه ما همسو است (۸۶). بررسی های بر روی سرکوب مسیرهای سیگنالینگ درگیر التهاب سرطان سینه رده های MDA-MB-231 و MCF-7 بوسیله miR-590 انجام شد. نتایج این مطالعه سطح بیان microRNA و ژن های کاندید توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز رونویسی معکوس کمی در Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند و سطح آپوپتوز در سلول های ترانسفکت شده با استفاده از روش Annexin V-7AAD اندازه گیری شد. در نتیجه ژن های MMP-2، MMP-9 بسیار کاهش یافته و علاوه بر این بر مسیر های سیگنالینگ MAPK و PI3K تاثیر گذار بوده و باعث افزایش آپوپتوز سلول شده است (۸۷). همچنین در سال ۲۰۲۲ مطالعه ای بر روی بیان ژن های خون قاعدگی در زنان مبتلا به اندومتر یوز و سالم انجام شد، نتایج نشان داد ژن های دخیل در مهاجرت و تهاجم MMP-9 و MMP-2 بیان بالاتری داشته اند علاوه بر این ژن های تکثیر سلول Bax و BCL-2 افزایش بیان را از خود نشان داد اند. هر دو گروه ژن با استفاده از تست Real Time PCR ارزیابی شد که با مطالعه ما همسو بود است (۸۸). پژوهش مبنی بر بیان تاثیر آگزوزوم های مشتق از سلول های بنیادی مغز استخوان و بافت چربی بر درمان استنوارتریت مدل موش انجام شد، داده های Real Time PCR بیانگر تاثیر بیشتر سلول های بنیادی مغز استخوان نسبت به بافت چربی بر سطح بیان کلاژن I، II و درمان استنوارترین مدل موش شده است این پژوهش از نظر تست های بکار برده

شده و استفاده از سلول های بنیادی در درمان با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۸۹). در سال ۲۰۱۷ میلادی محققان به منظور مقایسه اثر درمانی بین دو نوع سلول بنیادی مشتق از مغز استخوان با سلول بنیادی اندومتر و همچنین روش تزریق از طریق رحم یا داخل وریدی مطالعه ای روی موش انجام دادند. نتایج این تحقیق پس از ۳ هفته نشان داد که بهترین روش تزریق سیستمیک بوده و سلولهای بنیادی مشتق از مغز استخوان خیلی بیشتر از سلولهای اندومتر در رحم جا گرفته اند (۹۰). شواهد نشان داد که پیوند سلول های بنیادی مختلف از منابعی همچون مغز استخوان یا بافت چربی با اندومتر انجام شد. و روی کاهش نواحی فیبروزی، افزایش تعداد غدد و تحریک رگزایی و افزایش بازسازی اندومتر اثر داشته و با شکل گیری بهتر بافت رحم باعث حمایت از بارداری و بهبود میزان بارداری شده است. به نظری می رسد این عملکرد از طریق ورود به اندومتر و تمایز متقابل به اپیتلیوم و استروما یا با اثر ایمونومدولاتوری و فعال سازی پروژکتورهای اندومتر از طریق فاکتور رشد اعمال می شود. علاوه بر این با استفاده از سلولهای بنیادی مشتق از مغز استخوان، اندومتر، خون قاعدگی و خون بند ناف توانسته به بازسازی اندومتر و بهبود بیماری سندرم آشرمن و همچنین آتروفی اندومتر کمک کنند (۹۱).

#### ۲-۴ نتیجه گیری:

سلول های بنیادی خون قاعدگی جمعیت منحصر به فرد با توانایی تکثیر بالا و توانایی تمایز به سلول های مختلف می باشند. در مطالعه حاضر سطح بیان ژن های مرتبط با آپوپتوز و مهاجرت در آگزوزوم های سلول های بنیادی خون قاعدگی و آگزوزوم های زنجبیل، توسط تست انکسین PI/V و Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان می دهد، آگزوزوم های سلولی و گیاهی باعث کاهش مهاجرت و تهاجم و افزایش آپوپتوز سلول در رده های سلولی سرطان تخمدان SKOV-3 می شود. علاوه بر این، مطالعه حاضر نشان می دهد که آگزوزوم های مشتق از خون قاعدگی نسبت به آگزوزوم های زنجبیل تاثیر بسزایی در افزایش آپوپتوز سلول سرطان تخمدان دارند. آگزوزوم های گیاهی زنجبیل برای اولین بار روی رده SKOV-3 کار شد در نتیجه نیازمند مطالعات بیشتری بر روی دز موثر، میزان استفاده از آگزوزوم ها و زمان بندی آگزوزوم ها است تا بتوانند نتایج بهتری از آگزوزوم های گیاهی بدست آورند. لذا با توجه به مزیت های استفاده از آگزوزوم ها نظیر دسترسی آسان، فراوانی، مسیرهای انتقالی به نظر می رسد که آگزوزوم های مشتق از خون قاعدگی منبع مناسبی جهت بررسی در حوزه درمان سرطان تخمدان باشند.

#### ۳-۴ پیشنهادات:

- سطح بیان ژن های MMP2، MMP9، Bax، BCL2 در رده های مختلف سرطان تخمدان بررسی شود.
- تاثیر Cell-EXO و Plant-EXO در رده های دیگر سرطان تخمدان و همچنین در سرطان های دیگر بررسی شود.
- با مطالعات و تحقیقات بیشتر نتایج تاثیر Cell-EXO را به مرحله بالینی برسانند.

## Reference

۱. El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(5):347-57.
۲. Lantz R, Chen G, Sarihan M, Solyom A, Jolad S, Timmermann B. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. *Phytomedicine*. 2007;14(2-3):123-8.
۳. Rahman S, Salehin F, Iqbal A. Retraction: In Vitro antioxidant and anticancer activity of young *Zingiber officinale* against human breast carcinoma cell lines. *BMC complementary and alternative medicine*. 2012;12:206.
۴. Mashhadi NS, Ghiasvand R, Askari G, Hariri M, Darvishi L, Mofid MR. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of ginger in health and physical activity: review of current evidence. *International journal of preventive medicine*. 2013;4(Suppl 1):S36.
۵. Permuth-Wey J, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer. *Cancer epidemiology: modifiable factors*. 2009;413-37.
۶. Debies MT, Welch DR. Genetic basis of human breast cancer metastasis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2001;6:441-51.
۷. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *cell*. 2000;100(1):57-70.
۸. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478):eaau6.977
۹. Faure J, Lachenal G, Court M., Hirrlinger J., Chatellard-Cause C., Blot B., et al.(2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones *Mol Cell Neurosci*.31:642-8.
۱۰. دلویی ن, رشوند. ژنتیک مولکولی و ژن درمانی در سرطان تخمدان. *مجله علمی پژوهشی طب داخلی روز*. 5-19:(3)16;2010
۱۱. Zhao H, Yang Z, Wang X, Zhang X, Wang M, Wang Y, et al. Triptolide inhibits ovarian cancer cell invasion by repression of matrix metalloproteinase 7 and 19 and upregulation of E-cadherin. *Experimental & molecular medicine*. 2012;44(11):633-41.
۱۲. Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. *Breast Cancer Linkage Consortium. American journal of human genetics*. 1995;56(1):265.
۱۳. Abdullah S, Abidin SAZ, Murad NA, Makpol S, Ngah WZW, Yusof YAM. Ginger extract (*Zingiber officinale*) triggers apoptosis and G0/G1 cells arrest in HCT 116 and HT 29 colon cancer cell lines. *Afr J Biochem Res*. 2010;4(4):134-42.
۱۴. Gruenberg J, Van der Goot FG. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(7):495-504.
۱۵. Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current opinion in cell biology*. 2004;16(4):415-21.
۱۶. Hassanzadeh A ,Rahman HS, Markov A, Endjun JJ, Zekiy AO, Chartrand MS, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes in regenerative medicine and cancer; overview of development, challenges, and opportunities. *Stem cell research & therapy*. 2021;12(1):1-22.
۱۷. He C, Zheng S, Luo Y, Wang B. Exosome theranostics: biology and translational medicine. *Theranostics*. 2018;8(1):237.
۱۸. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 2013;200(4):373-83.
۱۹. Munich S, Sobo-Vujanovic A, Buchser WJ, Beer-Stolz D, Vujanovic NL. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology*. 2012;1(7):1074-83.

- .۲۰ Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of extracellular vesicles*. 2014;3(1):24641.
- .۲۱ Tian T, Zhu YL, Hu FH, Wang YY, Huang NP, Xiao ZD. Dynamics of exosome internalization and trafficking. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(71487-95).
- .۲۲ Prasad MGS, Ramakrishna J, Babu DN. Allogeneic stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHED) for the management of periapical lesions in permanent teeth: Two case reports of a novel biologic alternative treatment. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*. 2017;11(2):117.
- .۲۳ Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *Journal of cell science*. 2000;113(1):5-10.
- .۲۴ Aj W. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004;116:639-48.
- .۲۵ Scholer H. The potential of stem cells. An inventory. *BUNDESGESUNDHEITSBLATT GESUNDHEITSFORSCHUNG GESUNDHEITSSCHUTZ*. 2004;47(6):565-77.
- .۲۶ Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu W-s. Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2005;100(1):12-27.
- .۲۷ Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004;116(5):639-48.
- .۲۸ Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-X, Wu Y, Yu X-D, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105(10):4120-6.
- .۲۹ Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22.
- .۳۰ Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005;106(5):1755-61.
- .۳۱ Lai P, Weng J, Guo L, Chen X, Du X. Novel insights into MSC-EVs therapy for immune diseases. *Biomarker research*. 2019; 7:1-10.
- .۳۲ Lou G, Song X, Yang F, Wu S, Wang J, Chen Z, Liu Y. Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. *Journal of hematology & oncology*. 2015;8(1):1-11.
- .۳۳ Kadle RL, Abdou SA, Villarreal-Ponce AP, Soares MA, Sultan DL, David JA, et al. Microenvironmental cues enhance mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation and regulatory T-cell expansion. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193178.
- .۳۴ Fontaine MJ, Shih H, Schäfer R, Pittenger MF. Unraveling the mesenchymal stromal cells' paracrine immunomodulatory effects. *Transfusion medicine reviews*. 2016;30(1):37-43.
- .۳۵ Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Tian F, Kobayashi H, Tabata Y. Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide–amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor. *Biomaterials*. 2006;27(29):5089-98.
- .۳۶ Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Tian F, Kobayashi H, Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self-assembled peptide-amphiphile nanofibers. *Biomaterials*. 2006;27(22):4079-86.
- .۳۷ Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of translational medicine*. 2007;5(1):1-10.
- .۳۸ Patel AN, Park E, Kuzman M, Benetti F, Silva FJ, Allickson JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell transplantation*. 2008;17(3):303-11.
- .۳۹ Zhang M-J, Liu B, Xia W, Sun Z-Y, Lu K-H. Could cells from menstrual blood be a new source for cell-based therapies? *Medical Hypotheses*. 2009;72(3):252-4.
- .۴۰ Cho NH, Park YK, Kim YT, Yang H, Kim SK. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertility and sterility*. 2004;81(2):403-7.
- .۴۱ Kearns M, Lala P. Bone marrow origin of decidual cell precursors in the pseudopregnant mouse uterus. *The Journal of experimental medicine*. 1982;155(5):1537-54.



- .۴۲ Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Human reproduction*. 2007;22(11):2903-11.
- .۴۳ Taylor HS. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *Jama*. 2004;292(1):81-5.
- .۴۴ Zhong Z, Patel AN, Ichim TE, Riordan NH, Wang H, Min W-P, et al. Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *Journal of Translational Medicine*. 2009;7:1-7.
- .۴۵ McLENNAN CE, RYDELL AH. Extent of endometrial shedding during normal menstruation. *Obstetrics & Gynecology*. 19;26(5):605-2165.
- .۴۶ Sun Z, Zhang J, Li J, Li M, Ge J, Wu P, et al. Roles of mesenchymal stem cell-derived exosomes in cancer development and targeted therapy. *Stem Cells International*. 2021;2021.
- .۴۷ Moheghi N, Afshari JT, Brook A. The cytotoxic effect of zingiber officinale in breast cancer (MCF7) cell line. *Internal Medicine Today*. 2011;17(3):28-34.
- .۴۸ Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer research*. 2000;60(5):1306-11.
- .۴۹ Nigam N, Bhui K, Prasad S, George J, Shukla Y. [6]-Gingerol induces reactive oxygen species regulated mitochondrial cell death pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Chemico-biological interactions*. 2009;181(1):77-84.
- .۵۰ Tang DG, La E, Kern J, Kehrer JP. Fatty acid oxidation and signaling in apoptosis. 2002.
- .۵۱ El-Sayeh NE, Elsaadany S, Elmassry R, Hefnawy H. Cytotoxic effect of ginger root (*Zingiber officinale*) on liver and breast cancer. *Zagazig Journal of Agricultural Research*. 2018;45(3):995-1001.
- .۵۲ Liu C-M, Kao C-L, Tseng Y-T, Lo Y-C, Chen C-Y. Ginger phytochemicals inhibit cell growth and modulate drug resistance factors in docetaxel resistant prostate cancer cell. *Molecules*. 2017;22(9):1477.
- .۵۳ Liu Y, Whelan RJ, Pattnaik BR, Ludwig K, Subudhi E, Rowland H, et al. Terpenoids from *Zingiber officinale* (Ginger) induce apoptosis in endometrial cancer cells through the activation of p53. *PloS one*. 2012;7(12):e53178.
- .۵۴ Liang T, He Y, Chang Y, Liu X. 6-shogaol a active component from ginger inhibits cell proliferation and induces apoptosis through inhibition of STAT-3 translocation in ovarian cancer cell lines (A2780). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2019;24:560-7.
- .۵۵ Rhode J, Fogoros S, Zick S, Wahl H, Griffith KA, Huang J, Liu JR. Ginger inhibits cell growth and modulates angiogenic factors in ovarian cancer cells. *BMC complementary and Alternative Medicine*. 2007;7:1-9.
- .۵۶ Ballester P, Cerdá B, Arcusa R, Marhuenda J, Yamedjeu K, Zafrilla P. Effect of ginger on inflammatory diseases. *Molecules*. 2022;27(21):7223.
- .۵۷ Denel-Bobrowska M, Lukawska M, Oszczapowicz I, Marczak A. Histological subtype of ovarian cancer as a determinant of sensitivity to formamidine derivatives of doxorubicin-in vitro comparative studies with SKOV-3 and ES-2 cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2016;17(9):4223-31.
- .۵۸ Lazic SE, Barker RA. The future of cell-based transplantation therapies for neurodegenerative disorders. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. 2003;12(6):635-42.
- .۵۹ Bongso A, Lee EH. Stem cells: their definition, classification and sources. *Stem Cells: from bench to bedside*. 2005;1.
- .۶۰ Kaur S, Singhal B. When nano meets stem: the impact of nanotechnology in stem cell biology. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2012;113(1):1-4.
- .۶۱ Gurudutta G, Satija NK, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Tripathi R. Stem cell therapy: a novel & futuristic treatment modality for disaster injuries. *The Indian journal of medical research*. 2012;135(1):15.
- .۶۲ Baraniak PR, McDevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regenerative medicine*. 2010;5(1):121-43.
- .۶۳ Schneider A, Simons M. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell and tissue research*. 2013;352:33-47.

- .۶۴ Zhang L, Li H-H, Yuan M, Li D, Wang G-Y. Exosomal miR-22-3p derived from peritoneal macrophages enhances proliferation, migration, and invasion of ectopic endometrial stromal cells through regulation of the SIRT1/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2020;24.(۲)
- .۶۵ Abdelwahab SI, Abdul AB, Zain ZNM, Hadi AHA. Zerumbone inhibits interleukin-6 and induces apoptosis and cell cycle arrest in ovarian and cervical cancer cells. *International Immunopharmacology*. 2012;12(4):594-602.
- .۶۶ Rasmussen A, Murphy K, Hoskin DW. 10-Gingerol inhibits ovarian cancer cell growth by inducing G2 arrest. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2019;9(4):685.
- .۶۷ Ling H, Yang H, Tan SH, Chui WK, Chew EH. 6-Shogaol, an active constituent of ginger, inhibits breast cancer cell invasion by reducing matrix metalloproteinase-9 expression via blockade of nuclear factor- $\kappa$ B activation. *British journal of pharmacology*. 2010;161(8):1763-77.
- .۶۸ Policegoudra R, Aradhya S, Singh L. Mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.)—A promising spice for phytochemicals and biological activities. *Journal of biosciences*. 2011;36:739-48.
- .۶۹ Lee E, Surh Y-J. Induction of apoptosis in HL-60 cells by pungent vanilloids,[6]-gingerol and [6]-paradol. *Cancer letters*. 1998;134(2):163-8.
- .۷۰ Yadav VR, Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. The role of chalcones in suppression of NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and cancer. *International immunopharmacology*. 2011;11(3):295-309.
- .۷۱ Rampogu S, Baek A, Gajula RG, Zeb A, Bavi RS, Kumar R, et al. Ginger (*Zingiber officinale*) phytochemicals—Gingerone-A and shogaol inhibit SaHPPK: Molecular docking, molecular dynamics simulations and in vitro approaches. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2018;17:1-15.
- .۷۲ Adeli Z, Rajabian M, Sobhanian H, Zamani Z. Evaluation of Vitexin Effect on the Expression of AHRI, p53, Kras and Metabolic Genes of SKOV3 Ovarian Cancer Cells by 1HNMR Spectroscopic Method. *Experimental animal Biology*. 2022;10(3):11-23.
- .۷۳ Amini-Farsani Z, Sangtarash M, Teimori H, Shamsara M. Effect of valproic acid on Expression of Bim gene and viability of ovarian cancer cell line A2780. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*. 2017;19(3):60-6.
- .۷۴ Haghirsadat B, Naderifar M, Nikounahad-Lotfabadi N. Investigating the Antioxidant and Anti-Proliferative Activity of *Foeniculum vulgare* Seed Essential Oil on MCF-7 Breast Cancer Cell Line and A2780 Ovarian Cancer Cell Line. *Armaghane Danesh*. 2022;27(4):418-29.
- .۷۵ Zamani Esmati F, Nikoonahad Lotfabadi N, Haghiralssadat BF. Effect of Pomegranate peel extract on expression of angiogenesis stimulating gene (VEGF) in A2780 cell line of ovarian cancer. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*. 2020;22(2):68-74.
- .۷۶ Yang X, Meng S, Jiang H, Chen T, Wu W. Exosomes derived from interleukin-10-treated dendritic cells can inhibit trinitrobenzene sulfonic acid-induced rat colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2010;45(10):1168-77.
- .۷۷ Sahraei SS, Kowsari A, Sheykhasan M, Naserpoor L, Sheikholeslami A. Conditioned medium from healthy women's endometrial stem cells improve inflammatory and stemness-expression genes in endometriosis women. 2021.
- .۷۸ ( بر روی برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی *Zingiber officinale* جعفر ر. بررسی تاثیر مصرف زنجبیل )  
سرم و وزن نهایی در طیور گوشتی نژاد راس.
- .۷۹ Wang J, Chen Y, Hu X, Feng F, Cai L, Chen F. Assessing the effects of ginger extract on polyphenol profiles and the subsequent impact on the fecal microbiota by simulating digestion and fermentation in vitro. *Nutrients*. 2020;12(10):3194.
- .۸۰ Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Molecular cancer*. 2019;18:1-14.
- .۸۱ Mu J, Zhuang X, Wang Q, Jiang H, Deng ZB, Wang B, et al. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Molecular nutrition & food research*. 2014;58(7):1561-73.

- .<sup>۸۲</sup> Kalarikkal SP, Sundaram GM. Edible plant-derived exosomal microRNAs: Exploiting a cross-kingdom regulatory mechanism for targeting SARS-CoV-2. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2021;414:115425.
- .<sup>۸۳</sup> Chen L, Qu J, Xiang C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):1-10.
- .<sup>۸۴</sup> Jakovljević V, Đorđević N, Veljković B. Effects of a commercial detergent on the protease activity and biomass production of *Penicillium cyclopium*. Violeta Jakovljević, Nataša Đorđević, Bojana Veljković, Effects of a commercial detergent.1.
- .<sup>۸۵</sup> Dalirfardouei R, Jamialahmadi K, Jafarian AH, Mahdipour E. Promising effects of exosomes isolated from menstrual blood-derived mesenchymal stem cell on wound-healing process in diabetic mouse model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2019;13(4):555-68.
- .<sup>۸۶</sup> Sheykhhasan M, Kalhor N, Sheikholeslami A, Dolati M, Amini E, Fazaeli H. Exosomes of mesenchymal stem cells as a proper vehicle for transfecting miR-145 into the breast cancer cell line and its effect on metastasis. *BioMed Research International*. 2021;2021.
- .<sup>۸۷</sup> Sheikholeslami A, Nabiuini M, Arefian E. Suppressing the molecular signaling pathways involved in inflammation and cancer in breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 by miR-590. *Tumor Biology*. 2017;39(4):1010428317697570.
- .<sup>۸۸</sup> Sahraei SS, Davoodi Asl F, Kalhor N, Sheykhhasan M, Fazaeli H, Moud SS, Sheikholeslami A. A comparative study of gene expression in menstrual blood-derived stromal cells between endometriosis and healthy women. *BioMed research international*. 2022;2022.
- .<sup>۸۹</sup> Fazaeli H, Kalhor N, Naserpour L, Davoodi F, Sheykhhasan M, Hosseini SKE, et al. A comparative study on the effect of exosomes secreted by mesenchymal stem cells derived from adipose and bone marrow tissues in the treatment of osteoarthritis-induced mouse model. *BioMed research international*. 2021;2021:1-13.
- .<sup>۹۰</sup> Lai D, Wang F, Yao X, Zhang Q, Wu X, Xiang C. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *Journal of translational medicine*. 2015;13:1-13.
- .<sup>۹۱</sup> Mahmoodinia M, Rostaie M. Role of Stem Cells in the Future of Asherman Syndrome Treatment. *Sarem Journal of Medical research*. 2019;4(2):87-92.

## Abstract

Ovarian cancer is the most common fatal malignancy of the female reproductive system, which is diagnosed in advanced stages. Ginger is capable of causing cancer. The compounds of this plant, such as gingerol and shogaol, are able to produce active prostaglandins, are capable of producing GDP, even the interlocutors involved in them, and are effective in all stages of malignant tumorigenesis, such as increasing cell proliferation, reducing apoptosis, angiogenesis, and stimulating cancer cells. Also, menstrual blood stem cells (MenSCs) are introduced as a source of mesenchymal stem cells. This rich source has the ability of long-term self-renewal and faster growth compared to umbilical cord mesenchymal stem cells. The present study compares the anticancer effects of ginger and menstrual blood exosomes on the expression of MMP9, MMP2, Bax, BCL2 genes and the viability of SKOV3 ovarian cancer cells. In this study, SKOV3 ovarian cancer cell line was cultured in RPMI1640 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics. Isolation of cell and plant exosomes (Cell-Exo and Plant-Exo) from conditioned medium of NE-MenSCs and ginger extract was done respectively. The concentration of cellular proteins was evaluated using the Bradford test. Then, in order to determine the effective dose of exosomes for treatment, the percentage of cell viability was evaluated by methylthiazole tetrazolium (MTT) method at concentrations of 0, 50, 100, 200 and 300 mg/ml. Ovarian cancer cell line SKOV3 was used in the third passage. After filling 70% of the cell culture plate, C-Exo and P-Exo (with doses of 50 and 100 mg/ml, respectively) were added to DMEM containing 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin in each well. The cells were placed in an incubator under standard conditions for 48 hours. Then, the level of apoptosis and the expression level of Bax, Bcl2, MMP2 and MMP9 were evaluated using Annexin V/PI test and Real Time PCR, respectively. The results showed that the exosome obtained from ginger and menstrual blood increases the survival of ovarian cancer cells in a dose- and time-dependent manner. According to the Real Time PCR and Annexin V/PI test, the expression of Bax and Bcl2 genes, which is one of the signs of apoptosis, is increased and at the same time, it causes a decrease in the expression of MMP2 and MMP9 genes. Therefore, the results obtained from the cell treatment with plant and cellular exosomes, C-Exo compared to P-Exo has a significant effect on apoptosis and migration and invasion of cancer cells. According to the results of this study, it seems that C-EXO obtained from MenSCs has very important activities against Skov3 ovarian cancer cells. Therefore, with further research in the future, this compound can be used for anti-ovarian cancer drugs.

Keyword: ovarian cancer - SKOV-3 cell line - exosome - mesenchymal stem cells .



**Shahid Ashrafi Esfahani University**

**Faculty of Biological Sciences and Technology**

**Department of Genetics**

**Ph.D/M.Sc./M.A. Thesis**

**Title of the Thesis Comparison of the effect of exosomes secreted from stem cells derived from menstrual blood And ginger plant exosomes on apoptosis and migration of ovarian cancer cell line SKOV-3**

**Supervisor:**

**Dr Azar Sheikhul Islami**

**Dr. Zahra Zamanzadeh**

**Advisor:**

**Dr. Hoda Fazaeli**

**By:**

**Afsaneh Razaghi**

**September 2023**