

**Research Article****Inhibition of Breast Cancer Cells by Microvesicles Containing Doxorubicin****Fatemeh Akhavan Attar<sup>1</sup>, Shiva Irani<sup>\*1</sup>, Mana Oloomi<sup>2</sup>, Azam Bolhasani<sup>3</sup>, Loabat Geranpayeh<sup>4</sup>, Fatemeh Atyabi<sup>5</sup>**

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

4- Department of 4th Surgery, Sina Hospital, Tehran, Iran

5- Department of Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\*Corresponding author: shi\_irani@yahoo.com

Received: 24 June 2023

Accepted: 15 October 2023

DOI: 10.22034/ascij.2023.1989704.1504

**Abstract**

Breast cancer (BC) is the leading cause of cancer-related death among women in the whole world. Therefore, it is necessary to identify new methods for BC treatment. The purpose of this research is to investigate the effect of microvesicles containing doxorubicin (EV-Dox) on the MCF-7 cell line. Mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated from human adipose tissue. Microvesicles secreted from MSCs were extracted by ultracentrifugation. The shape and size of microvesicles were assessed by SEM and DLS, respectively. Doxorubicin (Dox) was loaded into microvesicles by sonication method. MCF-7 cells were treated with different concentrations of Dox (2.5, 5, 10, 20, and 40  $\mu\text{M}$ ) for 24 and 48 h and EV-Dox (0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10  $\mu\text{M}$ ) for 48 and 72h. IC50 was determined based on MTT assay. The findings from SEM and DLS showed that the extracted microvesicles are spherical in shape, with a size of about 592.3 nm. MTT results showed that microvesicles alone had no significant inhibitory effect on MCF-7 cells, and IC50 of Dox and EV-Dox were reported as 2.2  $\mu\text{M}$  and 2.4  $\mu\text{M}$ , respectively. EV-Dox can be a suitable strategy for treating BC because this study showed that the amount of cell death caused by this type of treatment is higher than the treatment with Dox. Also, the survival assay showed that the amount of apoptosis caused by EV-Dox (56.5%) was significantly higher than Dox (43%) ( $p < 0.01$ ).

**Keywords:** Breast cancer, Mesenchymal stem cells, Microvesicle, Doxorubicin.

## مقاله پژوهشی

## مهار سلول‌های سرطانی پستان توسط میکرووزیکول‌های حاوی دوکسوروبیسین

فاطمه اخوان عطار<sup>۱</sup>، شیوا ایرانی<sup>۱\*</sup>، مانا علومی<sup>۲</sup>، اعظم بولحسنی<sup>۳</sup>، لعبت گرانیپاه<sup>۴</sup>، فاطمه اطیابی<sup>۵</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- گروه هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- گروه چهارم جراحی، بیمارستان سینا، تهران، ایران

۵- گروه نانوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

\*مسئول مکاتبات: shi\_irani@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۳

DOI: 10.22034/ascij.2023.1989704.1504

## چکیده

سرطان پستان بیشترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان در کل جهان است. بنابراین شناسایی روش‌های جدید برای درمان سرطان پستان ضروری می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر میکرووزیکول‌های حاوی دوکسوروبیسین (EV-Dox) بر روی رده سلولی MCF-7 می‌باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسان جدا شدند. میکرووزیکول‌های مترشح از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با اولتراسانتریفوژ استخراج شدند. شکل و سایز میکرووزیکول‌ها به ترتیب با SEM و DLS بررسی شدند. دوکسوروبیسین با روش سونیکاسیون در میکرووزیکول‌ها بارگذاری شد. سلول‌های سرطانی پستان رده MCF-7 با مقادیر ۲.۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار از دوکسوروبیسین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت و هم‌چنین با مقادیر ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار از EV-Dox به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. IC50 براساس نتایج آزمایش MTT تعیین شد. یافته‌های حاصل از SEM و DLS نشان دادند که میکرووزیکول‌های استخراج شده شکلی کروی با اندازه ای حدود ۵۹۲/۳ نانومتر داشتند. نتایج MTT نشان داد که میکرووزیکول‌ها به تنهایی فاقد هرگونه اثر مهاری معناداری بر روی سلول‌های MCF-7 هستند و میزان IC50 را برای دوکسوروبیسین و EV-Dox به ترتیب ۲/۲ و ۲/۴ میکرومولار گزارش شد. EV-Dox می‌تواند به عنوان یک داروی شیمی درمانی، استراتژی مناسبی برای درمان سرطان پستان باشد چرا که این مطالعه نشان داد میزان مرگ سلولی ایجاد شده ناشی از این نوع درمان بیشتر از درمان با دوکسوروبیسین است. هم‌چنین سنجش زنده مانی نشان داد که میزان آپوپتوز ایجاد شده توسط EV-Dox (۵۶.۵ درصد) به میزان قابل توجهی بیشتر از Dox (۴۳ درصد) می‌باشد ( $p < 0.01$ ).

کلمات کلیدی: سرطان پستان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، میکرووزیکول، دوکسوروبیسین.

## مقدمه

شایع‌ترین سرطان تشخیص داده شده در میان زنان و دومین عامل مرگ پس از سرطان ریه، سرطان پستان می‌باشد (۱۰). امروزه در کشورهای پیشرفته میزان مرگ و میر ناشی از سرطان پستان به دلیل انجام غربالگری و در نتیجه تشخیص زود هنگام رو به کاهش است اما میزان بروز این نوع سرطان روز به

است که قبل از قرار گرفتن فرد در معرض یک داروی خاص وجود داشته است در حالیکه مقاومت اکتسابی پس از قرار گرفتن فرد در معرض دارو ایجاد می‌شود (۱). وزیکول‌های خارج سلولی (EV) ساختارهای ناهمگن مشتق شده از سلول‌های مختلف هستند که امروزه می‌دانیم بازیگران مهمی در ارتباطات سلولی، هموستاز بافت و تمایز سلولی هستند (۱۳). این ساختارها قطری بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر دارند (۲۱) و اغلب حاوی پروتیین، RNA و DNA سلول‌های مبدا هستند (۳۱). EVها حاوی دولایه لیپیدی هستند بنابراین می‌توان آنها را به عنوان لیپوزوم‌های فیزیولوژیکی در نظر گرفت (۲۴). از این رو از این ساختارها می‌توان به عنوان سیستم‌های طبیعی برای انتقال ژن یا دارو استفاده نمود. هدف اصلی این مطالعه بررسی اثر میکرووزیکول‌های خارج سلولی نشأت گرفته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی که حاوی دوکسوروبیسین (EV-Dox) می‌باشند بر روی رده MCF-7 از سلول‌های سرطانی پستان می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات با شماره IR.IAU.SRB.REC.1401.362 تایید و ثبت شده است.

**کشت سلولی:** در این مطالعه تجربی از رده سلولی سرطان پستان MCF-7 استفاده شد که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سلول‌ها در محیط کشت DMEM-F12 (شرکت Bio-Idea، کشور ایران) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و یک درصد آنتی بیوتیک پنسیلین - استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، و ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت داده شدند (۹). برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی، از فیچپی و تیغ برای حذف

روز در حال افزایش است (۵). عوامل ژنتیکی و غیر ژنتیکی در پیشرفت سرطان پستان نقش موثری دارند. از فاکتورهای ژنتیکی می‌توان به جهش‌های بیماری‌زا در ژن‌هایی همچون BRCA1، BRCA2 و CHEK2 اشاره نمود (۲۶) و از فاکتورهای غیرژنتیکی می‌توان به افزایش سن، عدم فعالیت فیزیکی، افزایش وزن و مصرف الکل اشاره نمود. طبق مطالعات مشخص شده که ۳۰ درصد از موارد ابتلا به سرطان پستان به فاکتورهای غیرژنتیکی مربوط می‌باشد (۱۹). زیر گروه‌های سرطان پستان از نظر هیستولوژیک با بیان یا عدم بیام گیرنده‌های هورمونی مثل گیرنده استروژن (ER)، گیرنده پروژسترون (PR) و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲ (HER2) تقسیم‌بندی می‌شوند (۴). روش‌های درمانی برای سرطان پستان به ویژگی‌های بیولوژیکی خاص تومور بستگی دارد. بطور کلی قبل از درمان‌های هدفمند بسته به وضعیت هورمونی/ ErBb2 تومور، شیمی‌درمانی انجام می‌شود. یکی از آنتراسایکلین‌ها که برای درمان سرطان پستان بطور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد، دوکسوروبیسین می‌باشد (۱۸). دوکسوروبیسین با بکارگیری مکانیسم‌های متفاوتی باعث مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود که یکی از کلیدی‌ترین مکانیسم‌ها مهار توپوایزومراز ۲ (TOP2A) می‌باشد (۷). با وجود اینکه یکی از حساس‌ترین تومورهای جامد در پاسخ به داروهای شیمی‌درمانی سرطان پستان است، بیشتر تومورهایی که به دارو پاسخ داده اند پس از مدتی مجدد عود کرده و در مقابل طیف وسیعی از داروها مقاومت پیدا می‌کنند (۲۷). مطالعه ای علت اصلی شکست در درمان حدود ۵۰ درصد از بیماران مبتلا به سرطان پستان را مقاومت آنها به دوکسوروبیسین گزارش کرد (۲۳). بطور کلی دو نوع مقاومت در برابر شیمی‌درمانی وجود دارد که شامل مقاومت درونی و مقاومت اکتسابی می‌باشد. مقاومت درونی مقاومتی

سونیکاسیون به مدت ۲۰ دقیقه، نمونه در دستگاه قرار داده شد و نتیجه با استفاده از نرم‌افزار Nano Zetasizer (شرکت Malvern Instrument، انگلیس) مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی شکل و ویژگی‌های مورفولوژیکی میکروویکول‌ها، ۵ میکرولیتر از محلول میکروویکول بر روی لام ریخته شده و در دمای اتاق خشک گردید. سپس با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد مطالعه قرار گرفت (۳). کیت سنجش پروتیین بیسینکینیک اسید (BCA) (شرکت Thermo Fischer Scientific، آمریکا) برای اندازه‌گیری غلظت میکروویکول‌ها مورد استفاده قرار گرفت. نمونه به میزان ۵۰ میکرولیتر و ولتاژ شتاب‌دهنده به میزان ۲۵ کیلو ولت بود.

#### بارگذاری دوکسوروبیسین در میکروویکول‌ها:

مقدار ۱ میلی لیتر از محلول میکروویکول با غلظت ۰/۳۸۵ میلی/گرم بر میلی لیتر با ۲ میلی لیتر دوکسوروبیسین (Ebedoxo 50mg/25 ml) با غلظت‌های ۰/۶۲۵، ۱/۲۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار ترکیب شد و سپس سونیکاسیون با استفاده از یک پروب اولترا سونیک (شرکت BANDELIN SONOPULS GM3200، آلمان) بصورت ۶ چرخه کامل، فرکانس ۲۰ کیلوهرتز، دامنه ۲۰ درصد و ۳۰ ثانیه روشن و خاموش با استراحت ۲ دقیقه بین هر چرخه در حمام یخ انجام شد. برای بازیابی غشاء میکروویکول‌ها، محلول به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. در مرحله آخر دوکسوروبیسین آزاد با استفاده از سانتریفوژ با دور 14000 g به مدت ۳۰ دقیقه جدا شد (۲۰).

**سنجش سمیت:** برای بررسی اثر سمیت دوکسوروبیسین و میکروویکول‌های حاوی دوکسوروبیسین (EV-Dox) بر روی رده سلولی MCF-7 از روش MTT استفاده شد. به این منظور به

بافت همبند استفاده شد. ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر کلاژناز به نمونه اضافه شد و به مدت ۴۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس ۵ میلی لیتر محیط کشت اضافه شده و محلول به مدت ۱۵ دقیقه در 427 g سانتریفوژ شد. رسوب به دست آمده در فلاسک کشت سلولی ۲۵ سانتی متر مربع حاوی محیط کشت DMEM-F12 به صورت ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی بیوتیک پنسیلین - استرپتومایسین کشت داده شد. پس از گذشت ۴ روز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ظاهر دوکی شکل و تراکم حدود ۶۰ درصد ظاهر شدند (۶). جهت بررسی شاخص‌های سطحی، فلوسایتومتری با دستگاه BD FACS Calibur (شرکت BD biosciences، آمریکا) برای آنتی‌بادی‌های CD34 و CD73 (شرکت BioLegend، آمریکا) انجام شد.

#### جداسازی میکروویکول: برای جداسازی میکرو-

ویکول‌ها، زمانیکه تراکم سلول‌های بنیادی مزانشیمی به ۸۰-۹۰ درصد رسیدند، محیط کشت DMEM-F12 تازه اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور باقی ماند. روش اولتراسانتریفوژ برای جداسازی میکروویکول‌ها استفاده شد. در این روش محیط رویی سلول‌ها جمع‌آوری شده ابتدا به منظور حذف سلول‌های مرده به مدت ۳۰ دقیقه با دور 2000 g در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد و رسوب سلولی خارج گردید. در مرحله بعد به مدت ۶۰ دقیقه با دور 100000 g در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد و مایع رویی خارج شده و به پلت، ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) اضافه گردید (۱۵).

#### شناسایی میکروویکول‌ها: جهت بررسی اندازه

میکروویکول‌ها با سنجش تفرق دینامیکی نور (DLS)، به ۵۰ میکرولیتر از محلول میکروویکول، حدود ۴۵۰ میکرولیتر PBS افزوده شد. پس از

### نتایج

**شاخص‌های سطحی:** فلوسایتومتری جهت تایید این که سلول‌های تخلیص شده متعلق به رده سلول‌های بنیادی مزانشیمی است، انجام شد. یافته‌ها نشان داد که از نظر شاخص CD73 (۹۵ درصد) مثبت بود و از نظر مارکر CD34 (۰/۷۴ درصد) بیانی مشاهده نشد که نشان می‌دهد سلول‌های استخراج شده از بافت چربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند.

**توصیف میکروویزیکول‌ها:** میکروویزیکول‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی شناسایی شدند. تجزیه و تحلیل میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) شکل کروی میکروویزیکول‌ها را نشان دادند (شکل ۱) و اندازه متوسط میکروویزیکول‌ها با استفاده از داده‌های حاصل از سنجش تفرق دینامیکی نور، ۵۹۲/۳ نانومتر گزارش شد (شکل ۲).

**سنجش سمیت:** شکل ۲ میزان زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 تحت درمان با دوکسوروبیسین پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت و هم چنین تحت درمان با EV-Dox را نشان می‌دهد. دوکسوروبیسین در مقایسه با گروه کنترل میزان زنده‌مانی سلول‌ها را به شکل معناداری  $p < 0/001$  کاهش داد. اثر مهاری دوکسوروبیسین بر سلول‌های MCF-7 با میزان زنده‌مانی ۲۷.۵ درصد در مقایسه با گروه کنترل در ۴۸ ساعت قابل توجه بود ( $p < 0/0001$ ). نتایج نشان داد که میکروویزیکول‌های حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی اثر مهاری بر روی زنده‌مانی سلول‌ها نداشتند ( $p = 0/096$ ). در حالیکه EV-Dox اثر مهاری قابل توجهی به شیوه وابسته به غلظت بر سلول‌های MCF-7 داشت ( $p < 0/0001$ ). به علاوه سنجش MTT نشان داد که این اثر مهاری تا ۷۲ ساعت در این گروه از سلول‌ها پایدار است. میزان IC50 برای دوکسوروبیسین و EV-Dox به ترتیب ۲/۲ و ۲/۴ میکرومولار گزارش شد (جدول ۱).

هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ۵۰۰۰ سلول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> قرار داده شد تا سلول‌ها به کف چاهک‌ها بچسبند. سپس سلول‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت توسط غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار و به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط غلظت‌های مختلف EV-Dox ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار تیمار شدند. برای هر غلظت سه تکرار گذاشته شد و سلول‌های MCF-7 بدون تیمار به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. پس از گذشت زمان‌های ذکر شده ۵ میکرولیتر از محلول MTT (با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS) (شرکت Sigma، آمریکا) به هر چاهک اضافه شد و بعد از ۴ ساعت محتویات چاهک‌ها تخلیه شده و به هر یک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آلی دی‌متیل-سولفوکسید (DMSO) (شرکت Sigma، آمریکا) اضافه شد. جذب هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش الایزا (شرکت Bio Tek، آمریکا) خوانده شد (۱۹).

**سنجش زنده‌مانی سلول‌ها:** برای رنگ‌آمیزی با آکریدین اورنج (AO) ۵۰۰۰ سلول MCF-7 در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت داده شدند. سپس با غلظت‌های IC50 از دوکسوروبیسین و EV-Dox تیمار شدند. سلول‌ها در مرحله بعد با PBS شسته و با پارافرمالدهید ۴ درصد تثبیت شدند، هسته‌ها با ۵۰ میکرولیتر AO (شرکت Sigma، آمریکا) رنگ‌آمیزی شدند و از میکروسکوپ فلورسنت (BLACK.L 5000MET) برای بررسی سلول‌های مرده و زنده استفاده شد (۲۹).

**آنالیز آماری:** برای انجام آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون T (t-test) از نسخه ۸ نرم افزار Graph Pad Prism استفاده شد.

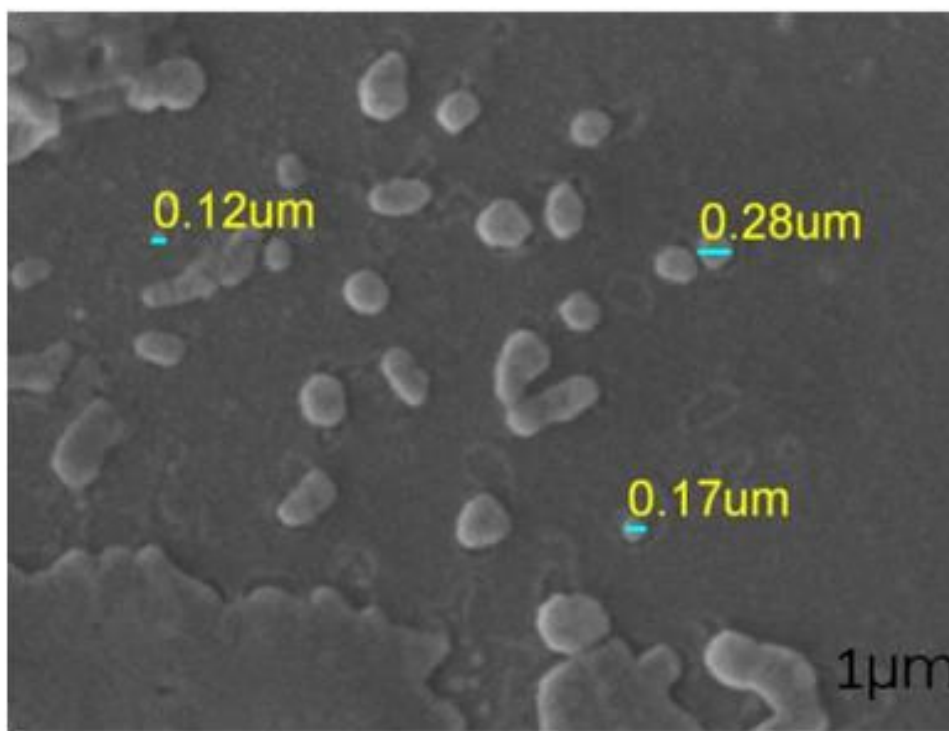
درصد) می‌باشد ( $p < 0/01$ ) (شکل‌های ۳، ۴، ۵، ۶).  
شکل ۷ نتایج رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج (AO) است  
که فلورسانس سبز و قرمز به ترتیب سلول‌های زنده و  
مرده را نشان می‌دهند.

سنجش زنده‌مانی: سلول‌های MCF-7 تحت تاثیر  
غلظت  $IC_{50}$  از دوکسوروبیسین و EV-Dox به منظور  
ارزیابی اثر ضد سرطانی قرار گرفتند. این سنجش  
نشان داد که میزان آپوپتوز ایجاد شده توسط EV-Dox  
(۵۶/۵ درصد) به میزان قابل توجهی بیشتر از Dox (۴۳)

جدول ۱- مقادیر  $IC_{50}$  دوکسوروبیسین و EV-Dox

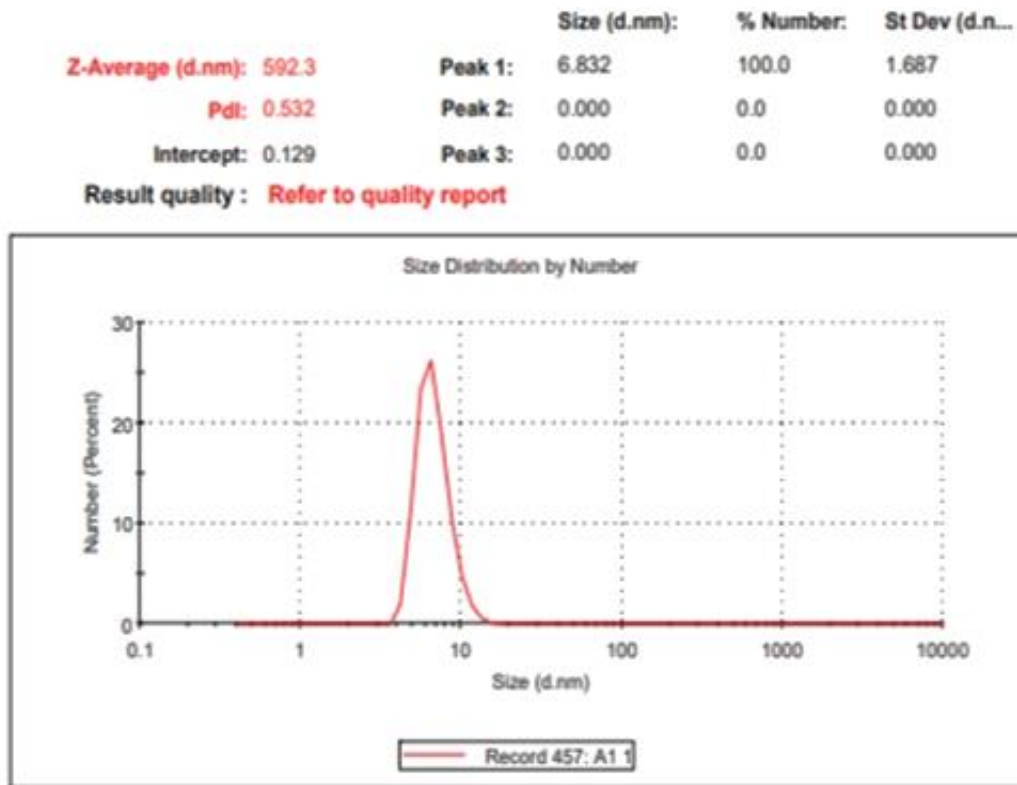
Table 1.  $IC_{50}$  values of doxorubicin and EV-Dox

Breast cancer cell type	$IC_{50}$ values of doxorubicin	$IC_{50}$ values of EV-Dox
MCF-7	2.2 $\mu$ M	2.4 $\mu$ M



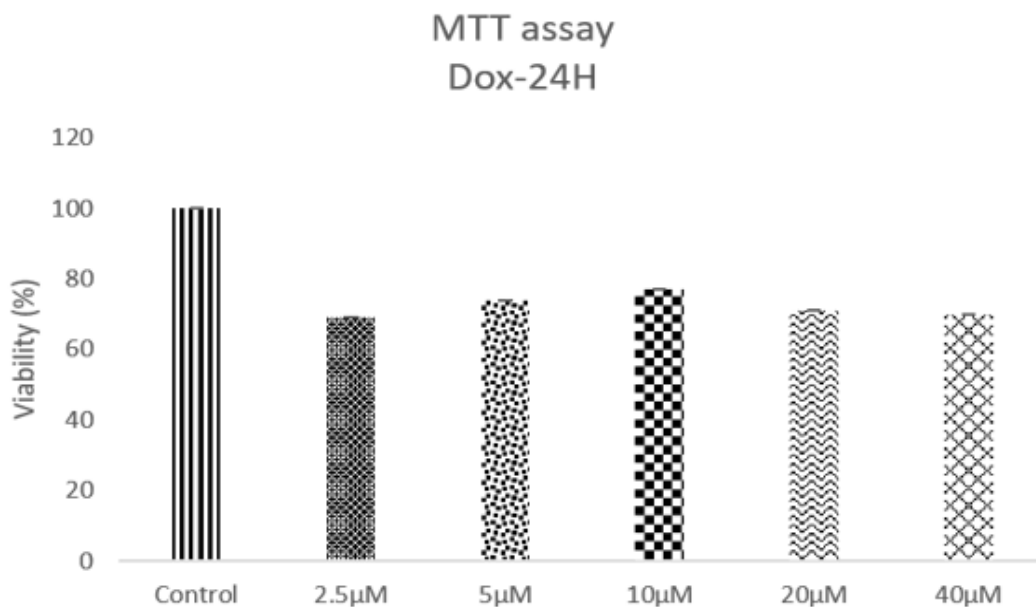
شکل ۱- خصوصیات میکرووزیکول‌ها. (الف): میکروگراف SEM میکرووزیکول‌ها (نوار مقیاس = ۱ میکرومتر)

Fig 1. Characteristics of microvesicles. (A): SEM micrograph of microvesicles (Scale bar = 1  $\mu$ m)



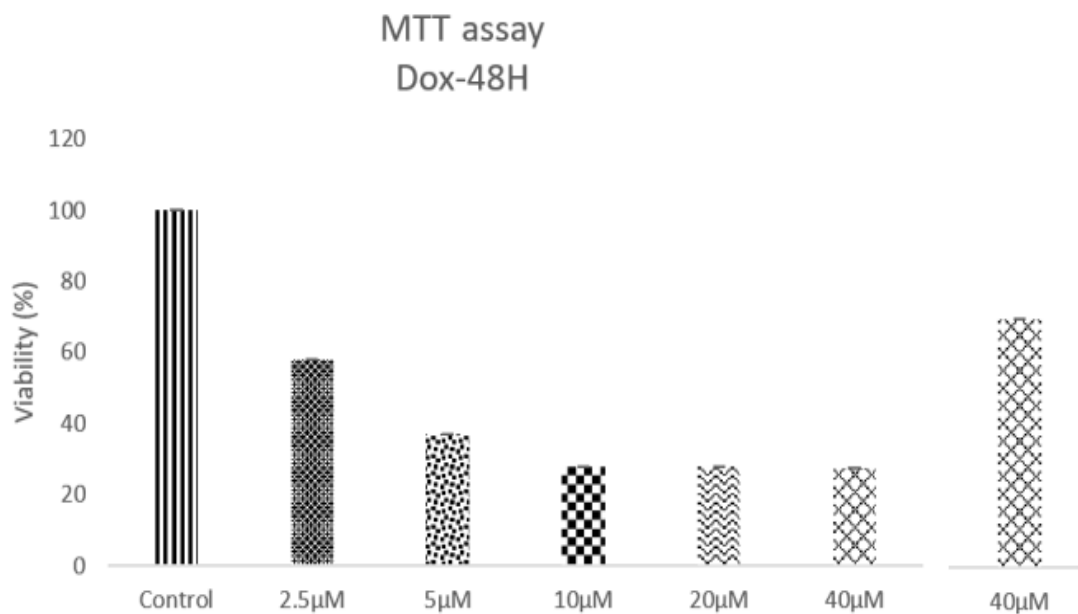
شکل ۲- خصوصیات میکرووزیکول‌ها. توزیع اندازه براساس تعداد میکرووزیکول‌های مترشحه از سلول‌های بنیادی

Fig 2. Characteristics of microvesicles. Size distribution based on the number of microvesicles secreted from stem cells

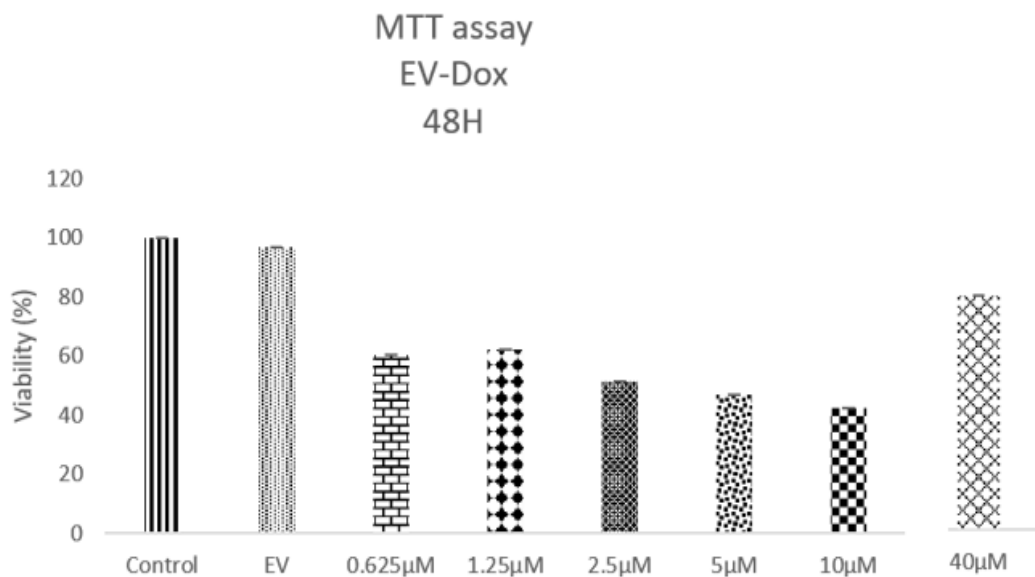


شکل ۳- بقای سلول‌های MCF-7 پس از کشت با دوکسوروبیسین (Dox) به مدت ۲۴ ساعت

Fig 3. Survival of MCF-7 cells after culture with doxorubicin for 24 hours

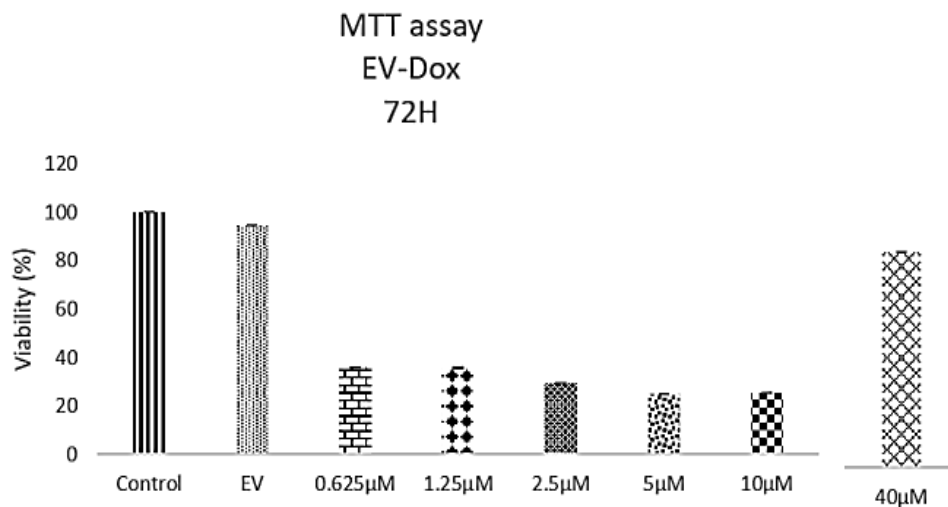


شکل ۴- بقای سلول‌های MCF-7 پس از کشت با دوکسوروبیسین به مدت ۴۸ ساعت  
Fig 4. Survival of MCF-7 cells after culture with doxorubicin for 48 hours

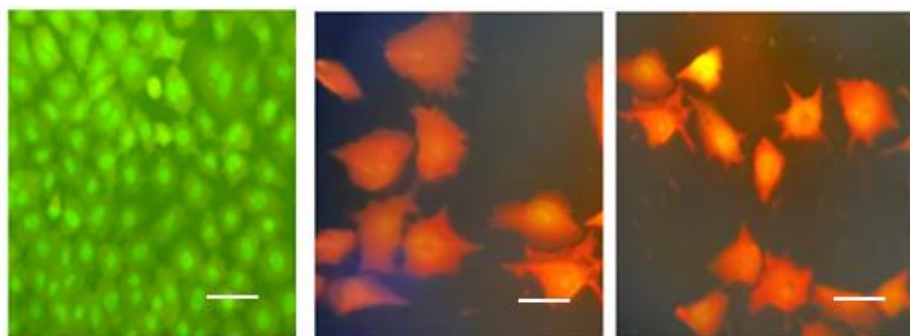


شکل ۵- بقای سلول‌های MCF-7 پس از کشت با EV-Dox و میکرووزیکول‌ها به تنهایی (EV) به مدت ۴۸ ساعت  
Fig 5. Survival of MCF-7 cells after culture with EV-Dox and microvesicles alone (EV) for 48 hours





شکل ۶- بقای سلول‌های MCF-7 پس از کشت با EV-Dox و میکرووزیکول‌ها به تنهایی (EV) به مدت ۷۲ ساعت  
 Fig 6. Survival of MCF-7 cells after culture with EV-Dox and microvesicles alone for 72 hours



شکل ۷- رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج (AO). فلورسانس سبز و قرمز به ترتیب سلول‌های زنده و مرده را نشان می‌دهند. تصاویر از راست به چپ به ترتیب، سلول‌های MCF-7 بدون تیمار، تیمار با دوکسوروبیسین، تیمار با EV-Dox، نوار مقیاس = ۵۰ میکرومتر، بزرگنمایی، 40X

Fig 7. Acridine orange (AO) staining. Green and red fluorescence indicate live and dead cells, respectively. Images from right to left, respectively, MCF-7 cells untreated, treated with doxorubicin, treated with EV-Dox, scale bar = 50 µm, Magnification, 40X.

## بحث

(۲). اخیراً میکرو-وزیکول‌های ترشح شده از سلول‌های مختلف برای انتقال مولکول‌های بیولوژی از جمله siRNA، lncRNA و پروتئین‌ها و هم چنین داروهایی مثل تاکسول و دوکسوروبیسین مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۲). در میان انواع میکرووزیکول‌ها، میکرووزیکول‌های نشات گرفته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی سازگاری زیستی مطلوب و همچنین

دوکسوروبیسین که اغلب به عنوان یک داروی ضد سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد معایب قابل توجهی از جمله سمیت قلبی و سیستمیک شدید دارد. به همین خاطر کپسوله کردن دوکسوروبیسین در ساختارهایی در مقیاس نانو جهت تحویل دارو می‌تواند فارماکوکینتیک و توزیع زیستی مطلوب را در حالیکه میزان سمیت را کاهش می‌دهد، فراهم کند

باشند (۱۶). نتایج سنجش MTT در مطالعه ما نشان داد که این میکروویکول‌ها اثر قابل توجهی بر روی سلول‌های MCF-7 نداشته و در نتیجه می‌توانند به عنوان حامل دارویی به کار گرفته شوند. یکی از مناسب‌ترین روش‌ها جهت بارگذاری دارو در میکروویکول‌ها روش سونیکاسیون می‌باشد (۸). از این روش در مطالعات قبلی برای بارگذاری داروهایی هم چون کورکومین، کروسین (۳۰) و هم چنین دوکسوروبیسین (۳) استفاده شده است. در این مطالعه نیز از EV-DoX برای درمان سلول‌های سرطانی پستان استفاده شد. مطالعه ای که توسط گوماری و همکارانش انجام شد نیز از آگروزوم‌های نشات گرفته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای بارگذاری داروی دوکسوروبیسین استفاده کردند و نتایج حاصل از MTT آن‌ها نشان داد که سمیت سلولی آگروزوم-های بارگذاری شده با دوکسوروبیسین نسبت به دوکسوروبیسین در غلظت‌های برابر برای رده سلولی TUBE در ۷۲ ساعت بیشتر بود ( $p < 0/05$ ) در حالیکه در ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معناداری دیده نشد (۱۱). نتایج این تحقیق نشان داد که زنده مانی سلول‌های MCF-7 در پاسخ به دوکسوروبیسین در ۲۴ و ۴۸ ساعت و EV-DoX در ۴۸ و ۷۲ ساعت به شکل وابسته به دوز کاهش پیدا کرد. مشاهدات مورفولوژیکی در سنجش زنده مانی رنگ قرمز سلول‌ها را نشان داد که نمایانگر ویژگی‌های آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پستان درمان شده با EV-DoX بود این امر نشان می‌دهد که میکروویکول‌ها به شکل مناسبی وارد سلول‌ها شده و باعث مرگ سلولی شده‌اند.

#### نتیجه‌گیری

میکروویکول‌های حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بسیاری از شرایط آزمایشگاهی مورد

تحریک ایمنی کمی را ایجاد می‌کنند. همین امر این مجموعه از میکروویکول‌ها را به حامل‌های مناسب برای انتقال دارو تبدیل می‌کند (۱۴). نکته قابل توجه این است که بطور کلی در مقایسه با سلول‌ها، میکروویکول‌ها از لحاظ عملکرد و ساختار از ثبات بیشتری برخوردار هستند (۱۷) و به عنوان یک سیستم جدید به منظور غلبه بر مشکلات و محدودیت‌های استفاده از سلول‌های درمانی در نظر گرفته می‌شوند (۲۵). روش‌های متعددی برای جداسازی میکروویکول‌ها وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش اولتراسانتریفوژ و جداسازی با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) اشاره کرد. هر یک از این روش‌ها از مزایا و معایبی برخوردار هستند. در این میان از مزایای روش اولتراسانتریفوژ می‌توان به ظرفیت و خلوص بالا برای میکروویکول‌ها و پایین بودن میزان آلودگی اشاره کرد در حالیکه سرعت بالای سانتریفوژ می‌تواند به ساختار میکروویکول آسیب بزند (۲۲) در مقایسه در روش PEG هیچ نیازی به تجهیزات ویژه نیست اما احتمال رسوب پروتیین به همراه میکروویکول‌ها وجود دارد (۲۸). در پژوهش حاضر از روش اولتراسانتریفوژ استفاده شد. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که میکروویکول‌های تخلیص شده شکل کروی خود را حفظ کرده‌اند و آسیبی به آن‌ها وارد نشده است. میکروویکول‌های حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش اولتراسانتریفوژ تخلیص و با تکنیک‌های DLS و SEM تایید شدند. میکروویکول‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندازه ۵۹۲ نانومتر را با توزیع اندازه باریک نشان دادند. میکروویکول‌های نشات گرفته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند رشد سلول‌های سرطانی را مهار یا تقویت کنند و نتایج عملکردی مشابهی با خود سلول‌های بنیادی مزانشیمی داشته

chemotherapy response in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(26):9053-9058.

8. Chen M., Li Y., Ma N., Zang J. 2022. Mesenchymal stem cell-derived exosomes loaded with 5-Fu against cholangiocarcinoma in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 25(6):1-6.

9. do Amaral J.B., Rezende-Teixeira P., Freitas V.M., Machado-Santelli G.M. 2011. MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 17(11):1097-1107.

10. Ghoncheh M., Pournamdar Z., Salehiniya H. 2016. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(S3):43-46.

11. Gomari H., Forouzandeh Moghadam M., Soleimani M., Ghavami M., Khodashenas S. 2019. Targeted delivery of doxorubicin to HER2 positive tumor models. *International Journal of Nanomedicine*, 14:7919.

12. Gong C., Tian J., Wang Z., Gao Y., Wu, X., Ding X., Gao S. 2019. Functional exosome-mediated co-delivery of doxorubicin and hydrophobically modified microRNA 159 for triple-negative breast cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(1):1-18.

13. Hopkin K. 2016. Extracellular vesicles garner interest from academia and biotech. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(33):9126-9128.

14. Kalluri R., LeBleu V.S. 2020. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478):6977.

15. Katsuda T., Tsuchiya R., Kosaka N., Yoshioka Y., Takagaki K., Oki K., Ochiya T. 2013. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Scientific Reports*, 3(1):1197-1208.

مطالعه قرار گرفته اند. می‌توان از آن‌ها به عنوان بستری برای انتقال انواع دارو و یا ژن‌های مختلف به سلول‌های هدف یا بافت مورد نظر استفاده نمود. در مطالعه حاضر می‌توانیم به این نتیجه برسیم که میکروویزیکول‌ها می‌توانند برای تحویل دوکسوروبیسین به سلول‌های سرطانی پستان مورد استفاده قرار گیرند و میزان آپوپتوز بالاتری را نسبت به دوکسوروبیسین ایجاد کنند.

#### منابع

1. AbuHammad S., Zihlif M. 2013. Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. *Genomics*, 101(4):213-220.

2. Bagheri E., Abnous K., Farzad S.A., Taghdisi S.M., Ramezani M., Alibolandi M. 2020. Targeted doxorubicin-loaded mesenchymal stem cells-derived exosomes as a versatile platform for fighting against colorectal cancer. *Life Sciences*, 261:118369.

3. Bai Y., Guo J., Liu Z., Li Y., Jin S., Wang T. 2020. The role of exosomes in the female reproductive system and breast cancers. *OncoTargets and Therapy*, 13:12567-12586.

4. Biggaard J., Stahlberg C., Jensen M.B., Ewertz M., Kroman N. 2012. Breast cancer incidence by estrogen receptor status in Denmark from 1996 to 2007. *Breast Cancer Research and Treatment*, 136:559-564.

5. Britt K.L., Cuzick J., Phillips K.A. 2020. Key steps for effective breast cancer prevention. *Nature Reviews Cancer*, 20(8):417-436.

6. Bunnell B.A., Flaat M., Gagliardi C., Patel B., Ripoll C. 2008. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45(2):115-120.

7. Burgess D.J., Doles, J., Zender L., Xue W., Ma B., McCombie W.R., Hemann M. T. 2008. Topoisomerase levels determine

- Thompson, F.H., Trent, J.M. 1991. Different mechanisms of decreased drug accumulation in doxorubicin and mitoxantrone resistant variants of the MCF7 human breast cancer cell line. *British Journal of Cancer*, 63(6):923-929.
24. Tkach M., Théry C. 2016. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*, 164(6):1226-1232.
25. Vakhshiteh F., Atyabi F., Ostad S.N. 2019. Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 14:2847-2859.
26. Venkitaraman A.R. 2019. How do mutations affecting the breast cancer genes BRCA1 and BRCA2 cause cancer susceptibility? *DNA Repair*, 81:102668.
27. Waks A.G., Winer E.P. 2019. Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3):288-300.
28. Weng Y., Sui Z., Shan Y., Hu Y., Chen, Y., Zhang L., Zhang Y. 2016. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *Analyst*, 141(15):4640-4646.
29. Wu H., Chen L., Zhu F., Han X., Sun L., Chen K. 2019. The cytotoxicity effect of resveratrol: cell cycle arrest and induced apoptosis of breast cancer 4T1 cells. *Toxins*, 11(12):731.
30. Xie X., Lian S., Zhou Y., Li B., Lu Y., Yeung I., Jia L. 2021. Tumor-derived exosomes can specifically prevent cancer metastatic organotropism. *Journal of Controlled Release*, 331:404-415.
31. Zhu S., Li S., Yi M., Li N., Wu K. 2021. Roles of microvesicles in tumor progression and clinical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 16:7071-7090.
16. Kibria G., Ramos E.K., Wan Y., Gius D. R., Liu H. 2018. Exosomes as a drug delivery system in cancer therapy: potential and challenges. *Molecular Pharmaceutics*, 15(9):3625-3633.
17. Lou G., Chen Z., Zheng M., Liu Y. 2017. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Experimental and Molecular Medicine*, 49(6):e346-e346.
18. Łukasiewicz S., Czezelewski M., Forma A., Baj J., Sitarz R., Stanisławek A. 2021. Breast cancer-epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—an updated review. *Cancers*, 13(17):4287-4317.
19. Momenimovahed Z., Salehiniya H. 2019. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 11:151-164.
20. Salarpour S., Forootanfar H., Pournamdari M., Ahmadi-Zeidabadi M., Esmaeeli M., Pardakhty A. 2019. Paclitaxel incorporated exosomes derived from glioblastoma cells: comparative study of two loading techniques. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27:533-539.
21. Samii A., Razmkhah F. 2020. Transformation of hematopoietic stem and progenitor cells by leukemia extracellular vesicles: a step toward leukemogenesis. *Stem Cell Reviews and Reports*, 16:1081-1091.
22. Skottvoll F.S., Berg H.E., Bjørseth K., Lund K., Roos N., Bekhradnia S., Wilson, S. R. 2018. Critical comparison of ultracentrifugation and a commercial kit for isolation of exosomes derived from glioblastoma and breast cancer cell lines. *BioRxiv*, doi.org/10.1101/274910.
23. Taylor C.W., Dalton W.S., Parrish P.R., Gleason M.C., Bellamy W.T.,