



Original Article

Evaluation of the Anti-Tumor Effects and Dose-Dependent Mechanisms of Gallic Acid in a Rat Model of Glioblastoma

Fatemeh Nasr Esfahani¹ , Fatemeh Azizi Farsani² , Elaheh Soltani Fard³ , Mohammad Rahimi Madiseh² , Samira Asgharzade^{4*}

1. Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
2. Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institute, University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
3. Student Research Committee, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
4. Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Iran.

* **Corresponding author:** Samira Asgharzade, Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.
E-mail: Asgharzade1396@gmail.com

DOI: 10.22034/cmja.16.2.109

How to Cite this Article:

Nasr Esfahani F, Azizi Farsani F, Soltani Fard E, Rahimi Madise M, Asgharzade S. Evaluation of the Anti-Tumor Effects and Dose-Dependent Mechanisms of Gallic Acid in a Rat Model of Glioblastoma. *Complement Med J*. 2026; 16(2): 109-118. DOI: 10.22034/cmja.16.2.109

Received: March 5, 2026

Accepted: July 28, 2026

Keywords:

Animal model
Anti-angiogenesis
Gallic acid
Glioblastoma
VEGF

© 2026 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Glioblastoma (GBM) is the most aggressive primary tumor of the central nervous system, with a poor prognosis. Given the chemo-resistance and rapid tumor recurrence, the development of new therapeutic strategies is essential. Gallic acid (GA) is a natural polyphenol with potent anticancer properties in *in vitro* studies. This study aimed to evaluate the antitumor effects of GA in a rat animal model of glioblastoma.

Methods: Rat glioblastoma cell line (C6) was transplanted into the striatum of female Wistar rats using the stereotaxic method. Animals were randomly divided into three groups: 1) control group, 2) group treated with gallic acid (GA) at a dose of 100 mg/kg, and 3) group treated with GA at a dose of 200 mg/kg. The GA was administered intraperitoneally daily for 14 days. After the end of the treatment period, animals were deeply anesthetized, and cardiac perfusion was performed. Then, brain tissue was prepared for histopathological examination by hematoxylin-eosin (H&E) staining, and tumor samples were stored at -80°C for evaluation of *VEGF* gene expression by Real-time PCR.

Results: Administration of GA resulted in a significant dose-dependent reduction in tumor volume compared to the control group. Histopathological studies showed a decrease in cell density and pseudopalisading necrosis, and a significant inhibition of angiogenesis in the treated groups, and the results of gene expression evaluation showed a dose-dependent decrease in α -*VEGF* expression in the treated groups.

Conclusion: The findings of this study indicate that GA has a significant antitumor effect in an animal model of glioblastoma. The mechanism of this effect is likely to be through inhibition of angiogenesis (reduction of *VEGF*) and inhibition of cell proliferation. Gallic acid can be investigated as a promising therapeutic agent for future studies in the field of glioblastoma.

INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive and lethal primary brain tumor in adults, characterized by rapid proliferation, diffuse invasion, extensive angiogenesis, and remarkable resistance to conventional therapies. Despite advances in surgical resection, radiotherapy, and chemotherapy with temozolomide, the prognosis of GBM remains poor, with a median survival of approximately 12–18 months after diagnosis (1, 2). Several factors contribute to treatment failure, including tumor recurrence, intratumoral heterogeneity, the presence of therapy-resistant cancer stem cells, and the highly immunosuppressive tumor microenvironment. Moreover, physiological barriers such as the blood–brain barrier restrict the effective delivery of therapeutic agents to tumor tissues (3).

Recent attention has focused on naturally occurring bioactive compounds as potential adjuncts for cancer treatment. Among these compounds, gallic acid (GA; 3,4,5-trihydroxybenzoic acid) is a naturally occurring polyphenol widely found in fruits, tea, nuts, and medicinal plants (1, 4, 5). Previous studies demonstrated that GA possesses multiple biological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative, pro-apoptotic, anti-invasive, and anti-angiogenic effects. In various cancer models, GA has been shown to inhibit key signaling pathways involved in tumor growth and vascular development, such as PI3K/Akt, Ras/MAPK, and HIF-1 α -mediated signaling (6).

Angiogenesis plays a central role in GBM progression, as the rapidly growing tumor requires continuous vascular support for oxygen and nutrient supply. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is considered one of the most important mediators of tumor angiogenesis and is highly expressed in glioblastoma. Therefore, targeting VEGF-mediated angiogenic pathways represents a promising therapeutic strategy (7). Although several *in vitro* studies have suggested anti-angiogenic effects of GA, evidence from *in vivo* glioblastoma models remains limited. The present study was designed to evaluate the anti-cancer effects of GA in a rat model of glioblastoma, with particular emphasis on its anti-angiogenic activity and its influence on *VEGF* gene expression.

METHODS

Rat C6 glioblastoma cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics under standard cell culture conditions (37°C, 5% CO₂). Female Wistar rats aged 12 weeks and weighing 250–300 g were housed under controlled environmental conditions before the experiment.

Glioblastoma was induced using a stereotaxic implantation technique (8). Approximately 1×10^6 C6 glioblastoma cells suspended in culture medium were injected into the right striatum of anesthetized rats. Following tumor establishment, animals were randomly assigned to three experimental groups (n=8

per group): a control group receiving normal saline, a GA-treated group receiving 100 mg/kg gallic acid, and a second GA-treated group receiving 200 mg/kg GA. Gallic acid was administered intraperitoneally for two weeks, beginning 10 days after tumor implantation. One day after the final treatment, animals were sacrificed, and brain tissues were collected for histological and molecular analyses. Histopathological evaluation was performed using hematoxylin and eosin (H&E) staining to assess tumor morphology, cellular density, necrosis, angiogenesis, and abnormal mitotic activity.

To investigate the molecular effects of GA on angiogenesis, total RNA was extracted from tumor tissues, converted to cDNA, and analyzed using quantitative Real-Time PCR. *VEGF-A* expression was measured as the primary angiogenic marker, while *B2M* served as the housekeeping gene. Relative gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Histopathological examination confirmed the successful induction of glioblastoma in the control group. Tumor tissues exhibited characteristic features of high-grade glioma, including dense cellularity, invasive and poorly defined tumor margins, extensive palisading necrosis, microvascular proliferation, intratumoral hemorrhage, cellular pleomorphism, hyperchromatic nuclei, and abnormal mitotic figures. Treatment with GA resulted in marked improvements in tumor morphology. Rats receiving 100 mg/kg GA showed reductions in tumor size, decreased necrotic areas, and lower microvascular density compared with untreated controls. These effects were more pronounced in animals treated with 200 mg/kg GA, which demonstrated substantial reductions in tumor volume, cellular density, and angiogenic activity. Histological observations indicated a clear dose-dependent inhibitory effect of GA on glioblastoma progression.

Molecular analysis further supported these findings. Quantitative Real-Time PCR revealed a significant downregulation of *VEGF-A* gene expression in both treatment groups. The reduction was observed at both tested doses and was more evident in the 200 mg/kg group, indicating a dose-dependent suppression of angiogenic signaling. The decrease in *VEGF-A* expression correlated with the reduced vascular density observed in histological sections, suggesting that inhibition of tumor angiogenesis is a major contributor to the anti-tumor activity of GA.

CONCLUSION

The present study demonstrates that GA exerts significant anti-tumor effects in an experimental glioblastoma model. Treatment with GA improved histopathological characteristics of the tumor, reduced cellular proliferation, diminished pathological

angiogenesis, and decreased tumor burden. These effects were accompanied by a significant downregulation of *VEGF-A* expression, indicating that suppression of angiogenic pathways is a key mechanism underlying its therapeutic activity.

The observed dose-dependent responses suggest that gallic acid effectively interferes with tumor growth and vascular development. In addition to its anti-angiogenic properties, previous evidence indicates that GA may also modulate apoptosis, oxidative stress, inflammation, and multiple oncogenic signaling pathways, further contributing to its anti-cancer potential.

Overall, the findings support the potential application of GA as a promising adjunct therapeutic agent for glioblastoma. Further investigations focusing on protein-level analyses, safety evaluation, and combination strategies with standard treatments, such as temozolomide, are warranted to validate its clinical relevance.

Ethical Considerations

All experimental procedures involving animals were conducted in accordance with the guidelines and regulations of Shahrekord University of Medical

Sciences for the care and use of laboratory animals. The study protocol was approved by the Institutional Animal Ethics Committee under the ethical approval code: IR.SKUMS.AEC.1403.049.

Authors' Contribution

Samira Asgharzadeh conceived and supervised the study. Fatemeh Azizi, Elahe Soltani-Fard, and Samira Asgharzadeh were responsible for establishing and conducting the animal model experiments. Fatemeh Nasr Esfahani, Mehdi Badiei, Elahe Soltani-Fard, and Samira Asgharzadeh performed the molecular and pathological analyses. Samira Asgharzadeh drafted the manuscript. All authors contributed to the final editing, critically reviewed the manuscript, and approved the final version for publication.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this study.

Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to the Vice-Chancellor for Research and Technology of Shahrekord University of Medical Sciences for financial support of this study (Grant No. 4683).



ارزیابی اثر ضدتوموری و مکانیسم‌های وابسته به دوز اسید گالیک در مدل موش صحرایی مبتلا به گلیوبلاستوما

فاطمه نصر اصفهانی^۱، فاطمه عزیزی فارسانی^۲، الهه سلطانی فرد^۳، محمد رحیمی مدیسه^۴، سمیرا اصغرزاده^{۵*}

^۱ دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
^۲ استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
^۳ دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
^۴ دانشیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
^۵ دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

* نویسنده مسئول: سمیرا اصغرزاده، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ایران.

ایمیل: Asgharzade1396@gmail.com

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۰۶

واژگان کلیدی:

اسید گالیک

گلیوبلاستوما

مدل حیوانی

ضد رگ‌زایی

VEGF

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

مقدمه: گلیوبلاستوما (GBM) تهاجمی‌ترین تومور اولیه سیستم عصبی مرکزی با پیش‌آگهی بسیار ضعیف است. با توجه به مقاومت شیمیایی و عود سریع تومور، توسعه راهبردهای درمانی جدید ضروری است. اسید گالیک (GA) یک پلی‌فنول طبیعی با خواص ضدسرطانی قدرتمند در مطالعات برون‌تنی است. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر ضدتوموری GA در یک مدل حیوانی موش صحرایی مبتلا به گلیوبلاستوما انجام شد.

روش کار: رده سلولی گلیوبلاستوما موش صحرایی (C6) با استفاده از روش استریوتاکسی و با تزریق به ناحیه استریاتوم مغز موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار پیوند زده شد. حیوانات به‌طور تصادفی در سه گروه قرار گرفتند: (۱) گروه کنترل، (۲) گروه تیمار شده با اسید گالیک (GA) با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، و (۳) گروه تیمار شده با GA با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. به‌صورت تزریق داخل صفاقی و به‌مدت ۱۴ روز به‌صورت روزانه تجویز گردید. پس از پایان دوره درمان، حیوانات تحت بییهوشی عمیق قرار گرفته و پرفیوژن قلبی انجام شد. سپس بافت مغز برای بررسی‌های هیستوپاتولوژیک با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) آماده شد و نمونه‌های توموری نیز برای ارزیابی بیان ژن فاکتور رشد عروقی (VEGF) به‌روش Real-time PCR در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

یافته‌ها: تجویز GA به‌صورت وابسته به دوز باعث کاهش معنی‌دار حجم تومور در مقایسه با گروه کنترل شد. بررسی‌های هیستوپاتولوژیک کاهش تراکم سلولی، کاهش کانون‌های نکروز پاليسادشده و مهار قابل‌توجه رگ‌زایی را در گروه‌های تیمار شده نشان داد و نتایج ارزیابی بیان ژن، کاهش بیان VEGF- α را به‌صورت وابسته به دوز در گروه‌های تحت تیمار نشان داد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد اسید گالیک دارای اثر ضدتوموری قابل‌توجهی در مدل حیوانی گلیوبلاستوما است. مکانیسم این اثر احتمالاً از طریق مهار رگ‌زایی (کاهش VEGF) و مهار تکثیر سلولی صورت می‌گیرد. اسید گالیک می‌تواند به‌عنوان یک عامل درمانی امیدوارکننده برای مطالعات آینده در زمینه گلیوبلاستوما مورد بررسی قرار گیرد.

گلیوبلاستوما — تومور مغز (Glioblastoma Multiforme/GBM) یکی از بدخیم‌ترین تومورهای مغزی در بزرگسالان است و به دلیل ویژگی‌های تهاجمی، پیش‌آگهی ضعیف، و مقاومت به درمان، به عنوان یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های نوروانکولوژی شناخته می‌شود. شیوع آن تقریباً ۳ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر در سال است و گرچه درمان‌های استاندارد شامل برداشت جراحی تا حد ممکن، رادیوتراپی، و شیمی‌درمانی با تموزولومید (TMZ) می‌شوند، متوسط بقا پس از تشخیص معمولاً ۱۲-۱۸ ماه باقی‌مانده است (۱، ۲). چندین عامل سبب دشواری درمان GBM شده‌اند؛ مقاومت دارویی: اکثر بیماران پس از درمان استاندارد با بازگشت تومور مواجه می‌شوند؛ سلول بنیادی سرطانی باقیمانده که از جراحی حذف نشده، یا سلول‌های مهاجم به بافت اطراف مغز، یکی از منابع عود هستند (۳). فاکتور دوم، همگونی درون توموری (GBM Heterogeneity) شامل زیرکلاس‌های متفاوت سلولی‌اند؛ مانند سلول‌های بنیادی سرطان، سلول‌های تمایز یافته، سلول‌هایی با تفاوت ژنتیکی و متابولیسمی که باعث پاسخ متفاوت به درمان‌ها می‌شود (۴). فاکتور سوم، موانع فیزیولوژیک و میکرو محیط توموری: این موانع شامل سد خون-مغز (Blood-Brain Barrier/BBB) است که مانع ورود داروها به مرکزی‌ترین نقاط تومور می‌شود، وجود شرایطی مثل کمبود اکسیژن (هیپوکسی)، سطوح بالای آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی، افزایش فشار داخل تومور (رشد سریع سلول‌ها، تراکم زیاد سلولی، رگ‌زایی غیرطبیعی، اختلال در تخلیه لنفاوی منجر به تجمع مایعات اضافی درون بافت تومور و افزایش فشار داخل تومور می‌شوند)، و حضور عوامل سرکوب‌کننده ایمنی در میکرو محیط است. چالش‌های درمان فعلی این سرطان عدم بهبود بقای کافی باوجود شیمی‌درمانی (تموزولومید)، پرتودرمانی، درمان هدفمند (Targeted thera) و ایمونوتراپی است (۵، ۶، ۷).

در سال‌های اخیر، تحقیقات بر روی ترکیبات طبیعی با فعالیت ضدسرطانی افزایش یافته است (۸، ۹). این ترکیبات به دلایل مختلف از جمله سمیت کمتر، قابلیت دسترسی، و امکان اثرات ترکیبی با درمان‌های موجود، جذابیت یافته‌اند. یکی از این ترکیبات اسید گالیک (Gallic Acid/GA) با ترکیب شیمیایی $-C_6H_3O_5$ تری‌هیدروکسی‌بنزوئیک اسید است. اسید گالیک یک پلی‌فنول طبیعی است که در بسیاری از گیاهان، میوه‌ها (انگور، توت‌ها، انار)، چای سبز و سیاه، گردو و برخی داروهای گیاهی یافت می‌شود این ترکیب به دلیل ساختار فنولی خود قادر است در مسیرهای متعددی از سلول‌های سرطانی مداخله کند (۷، ۹).

GA خواص زیستی فراوانی مانند خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، مهارکننده تکثیر سلولی، القای آپوپتوز، مهار مهاجرت و تهاجم سلولی، و تأثیر بر رگ‌زایی دارد. مثلاً با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد رادیکال آزاد از DNA و پروتئین‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند ولی در سلول سرطانی با افزایش تولید ROS باعث القای آپوپتوز می‌شود (۱۰) یا مهار تکثیر سلولی از طریق توقف چرخه

سلولی در فازهای G0/G1 یا G2/M مانع از تقسیم سلول‌های سرطانی می‌شود. یا باعث اثر مهار مهاجرت و تهاجم سلولی با کاهش بیان متالوپروتئین‌های ماتریکسی (MMP-2 و MMP-9) می‌شود (۱۱).

GA به صورت وابسته به دوز، با مهار مسیر سیگنالینگ PTEN/AKT/HIF-1 α ، منجر به کاهش ترشح فاکتور رشد عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor/VEGF) در سلول‌های سرطانی تخمدان می‌شود (۱۲).

اسید گالیک (GA) با مهار مسیرهای اصلی سیگنالینگ سلولی PI3K/Akt و Ras/MAPK با کاهش فسفریلاسیون Akt و Erk به طور هم‌زمان دو فرایند حیاتی برای تومور شامل کاهش تهاجم سلول‌های سرطانی و مهار رگ‌زایی، اثرات ضدسرطانی بر روی سلول‌های گلیوما (U87 و U251n) در محیط *in vitro* نشان داده است (۱۳).

با توجه به شواهد موجود درخصوص اثرات اسید گالیک مبنی بر خواص ضد رگ‌زایی سرطان در مطالعات *in vitro* این مطالعه به بررسی اثرات ضدسرطان‌زایی اسید گالیک با تمرکز بر خاصیت ضد رگ‌زایی آن در مدل حیوانی سرطان گلیوبلاستوما پرداخته است.

روش کار

کشت سلول

رده سلولی گلیوبلاستوما C6 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، تهران تهیه شدند. سلول‌ها در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture/F12 Fetal (DMEM/F-12) Ham، حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Bovine Serum/FBS) و آنتی‌بیوتیک‌ها (پنی‌سیلین-استرپتومایسین) (همه مواد مذکور از شرکت Gibco تهیه شدند) نگهداری شدند. شرایط کشت در دمای ۳۷ °C، با رطوبت ۹۵٪ و اتمسفر حاوی ۵٪ CO₂ انجام شد.

حیوانات

موش‌های صحرایی ماده نژاد Wistar با سن ۱۲ هفته و وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم، به مدت یک هفته پیش از آغاز آزمایش در حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد نگهداری شدند. شرایط محیطی شامل دمای ۲۳ ± ۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ ± ۵ درصد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته بود (کد اخلاق: IR.SKUMS.AEC.1403.049).

القاء تومور با روش استریوتاکیسک

القای گلیوبلاستوما مطابق روش‌های پیشین با اندکی اصلاحات انجام شد (۱۴). به طور خلاصه، سلول‌های گلیوبلاستوما C6 در حالت تراکم ۸۰٪ با استفاده از محلول تریپسین جدا شده، با محیط کشت شسته، سانتریفیوژ و سپس مجدداً در همان محیط معلق شدند. پس از آن، حدود یک میلیون سلول گلیوبلاستوما C6 در حجم ۱۰ میکرولیتر با استفاده از میکروسرنج همیلتون به جسم مخطط راست مغز موش‌ها تزریق شدند. این فرایند پس از بیهوش کردن حیوانات با تزریق داخل

تهیه و با روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شدند تا هسته ها و سیتوپلاسم قابل تمایز گردند. در نهایت، لام های آماده شده توسط میکروسکوپ نوری ($10\times$ و $40\times$) (Olympus, Tokyo, Japan) مورد بررسی قرار گرفتند تا تغییرات بافت شناسی از جمله تراکم سلولی، رگ زایی، میتوزهای غیرطبیعی و نکروز در بافت توموری ارزیابی شود.

استخراج RNA، سنتز cDNA و Real-Time PCR

از RNA بافت تومور گلیوبلاستوما (تعداد ۶ نمونه بافت تومور مورد بررسی قرار گرفت) با استفاده از RNx Plus تهیه شده از شرکت سینا کلون براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. غلظت و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, USA) در طول موج های ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد و نمونه هایی با نسبت جذبی بین ۱/۸ تا ۲/۰ برای مراحل بعدی انتخاب شدند. برای سنتز DNA مکمل (cDNA)، از ۱ میکروگرم RNA تام به همراه کیت سنتز cDNA یکتا تجهیز استفاده گردید. واکنش Real-Time PCR با SYBR Green Master Mix و دستگاه Rotor-Gene RG-3000 انجام شد. پرایمرهای mRNA (VEGF-A و B2M) با نرم افزار 7 Oligo طراحی و کیفیت آن ها با BLAST تأیید شد (لیست پرایمر در جدول شماره ۱ آورده شده است). چرخه حرارتی برای mRNA شامل دناتوراسیون در 95°C به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای 60°C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طولی سازی در 72°C به مدت ۳۰ ثانیه بود. ژن B2m به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت و تغییرات نسبی بیان ژن ها با روش $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ محاسبه شد.

جدول ۱. توالی پرایمر mRNA مربوط به موش صحرایی

Gene name	Sequencing	Size (Bp)
B2M	F: 5'- GCTTGCCATTCAGAAAACCTCC-3' R: 5'-GGAAGTTGGGCTTCCCATTCT-3'	۷۴
VEGF-A	F: 5'- TCGGAGAGCAACGTCACCTA-3' R: 5'- TCTTTGGTCTGCATTCACATC-3'	۱۰۹

necrosis) Pseudopalising شناسایی شدند. علاوه بر این، افزایش عروق زایی (Angiogenesis) و نقاط متعدد خون ریزی (شکل ۲-۱) مشاهده گردید. این تومورها درجه بالایی از ناهمگونی سلولی (Cellular pleomorphism) را نشان دادند که شامل حضور سلول های بزرگ و غول آسا، هسته های هیپرکروماتیک و همچنین میتوزهای غیرطبیعی (که با فلش سیاه در شکل ۲-۱ مشخص شده اند) بود.

در گروه های تیمار شده با GA بهبود قابل توجهی در ویژگی های پاتولوژیک مشاهده شد. در گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم GA، کاهش در اندازه تومور و مشخص تر شدن حاشیه آن نسبت به گروه کنترل مشهود بود. همچنین، کاهش در وسعت کانون های نکروز پالیزاسیون شده و کاهش نسبی در تراکم عروق خونی کوچک (Microvasculature) مشاهده شد (اشکال ۴-۱ و ۳-۱). در گروه دریافت کننده دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم GA، این اثرات

صفاقی کتامین (80 mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) انجام شد. معیار ورود این مطالعه القای تومور در موش ها و زنده بودن آنها معیار ورود در نظر گرفته شد و معیار خروج مرگ موش ها بعد از القای تومور بود که مجدد، موش ها جایگزین شدند. بعد از القای تومور در روز ۱۱ موش ها به صورت تصادفی به سه گروه تقسیم شدند.

گروه بندی موش ها:

تعداد موش در هر گروه: ۸ عدد

گروه کنترل: گروه القاء سرطان بدون درمان (دریافت کننده نرمال سالیین)

گروه درمان شونده با GA در غلظت 100 mg/kg و 200 mg/kg

پروتکل درمان و جمع آوری نمونه ها

درمان از روز دهم تا بیست و چهارم پس از کاشت سلول ها، به مدت دو هفته و به صورت تزریق داخل صفاقی انجام شد. یک روز پس از آخرین تزریق، حیوانات تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و پس از انجام پرفیوژن قلبی، با استفاده از گیوتین سر از بدن جدا شد و مغزها به طور کامل خارج شد. از مجموع نمونه ها، چهار مغز در محلول فرمالین ۱۰٪ برای بررسی های بافت شناسی تثبیت شدند و شش نمونه از بافت توموری نیز در شرایط استریل جداسازی و در دمای -80°C برای آنالیزهای مولکولی نگهداری شدند.

روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ئوزین (H&E)

بافت مغز پس از تثبیت در فرمالین، طی فرایندهای آگیری، شفاف سازی و قالب گیری در پارافین آماده شد. برش های میکرومتری

تجزیه و تحلیل آماری

داده ها با نرم افزار GraphPad Prism (نسخه ۵/۰) تجزیه و تحلیل شد. برای تجزیه و تحلیل آماری جهت مقایسه میانگین گروه های مختلف، از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد و با آزمون های مقایسه چندگانه Tukey اعتبارسنجی گردید. $P < 0.05$ به عنوان اختلاف آماری معنی دار بین گروه ها در نظر گرفته شد.

یافته ها

تأثیر GA بر تغییرات هیستوپاتولوژی تومور گلیوبلاستوما در مغز موش صحرایی

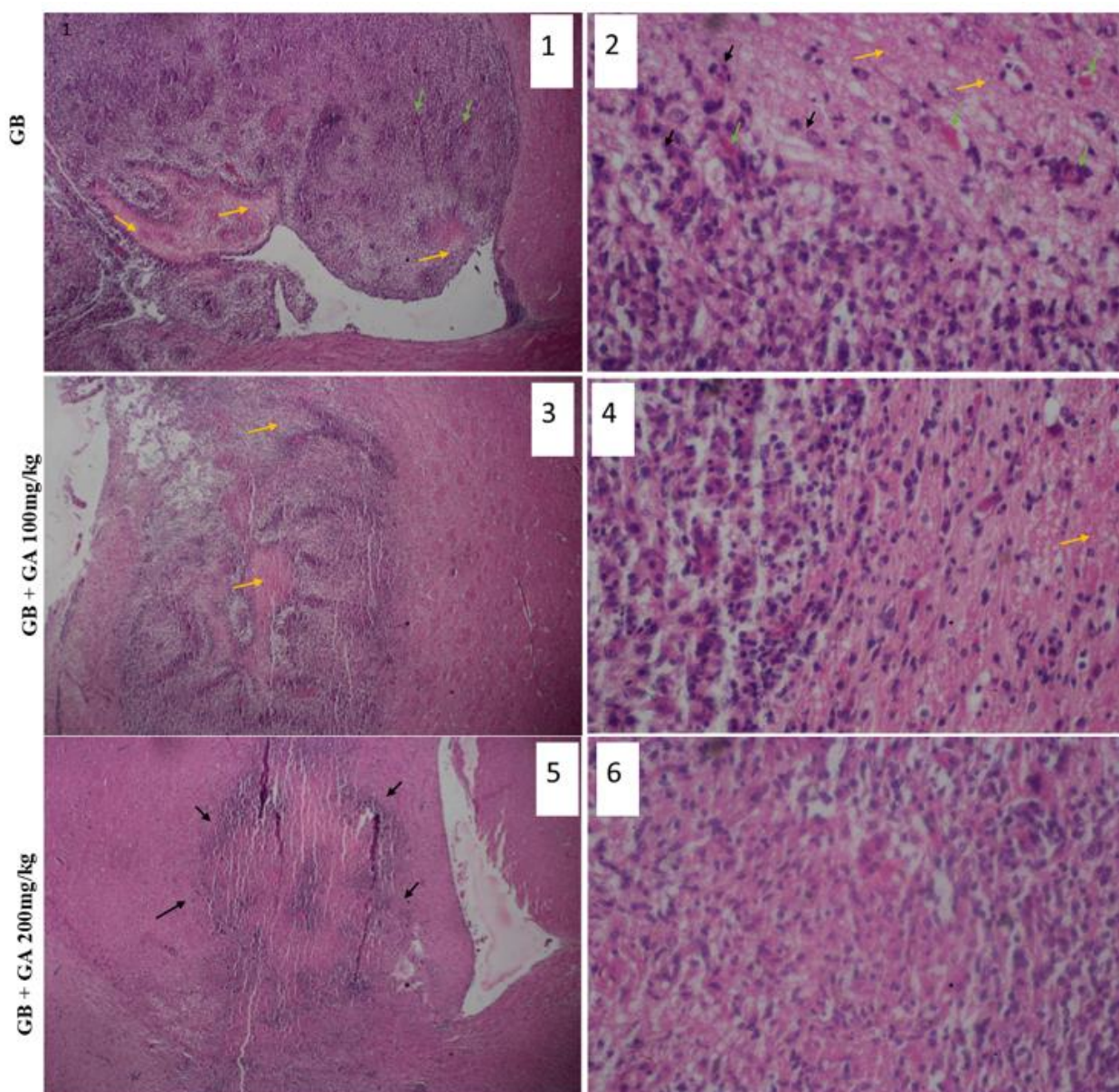
مشاهدات هیستوپاتولوژیک با استفاده از رنگ آمیزی H&E انجام شد. در گروه کنترل، تومورهای گلیوبلاستوما (GB) با ویژگی های تهاجمی کلاسیک شامل تراکم سلولی بالا، حاشیه نامشخص و مهاجم به بافت های مجاور (شکل ۱-۱) و همچنین وجود نکروز پالیزاسیون شده

غیرطبیعی (فلش سیاه در شکل ۲-۱) مشاهده می‌شود. محدود شدن ناحیهٔ توموری در گروه‌های تحت تیمار با GA در غلظت ۲۰۰ mg/kg در شکل ۵-۱ قابل مشاهده است.

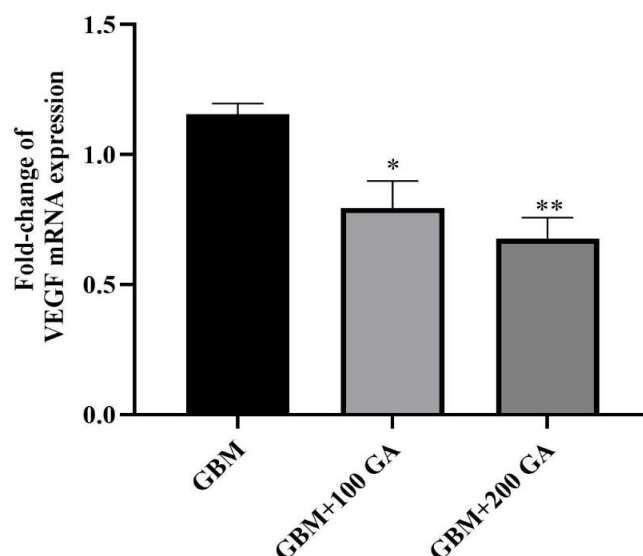
کاهش بیان ژن VEGF- α تحت تیمار GA

بیان VEGF- α به عنوان عامل رگ‌زایی در بافت گلیوبلاستوما با استفاده از آزمون Real-Time PCR ارزیابی شد. داده‌ها در شکل ۲ ارائه شده‌اند؛ پس از درمان با GA در مدل موش‌های گلیوبلاستوما، سطح بیان VEGF- α به طور معنی‌داری در دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش یافت (به ترتیب $P=0/015$ ؛ $P=0/001$).

بازدارنده به صورت بارزتری نمایان بود. کاهش قابل ملاحظه در حجم تومور، کاهش تراکم سلولی و کوچک شدن چشمگیر کانون‌های نکروز پاليساد شده قابل مشاهده بود. علاوه بر این، مهار قابل توجهی در فرایند عروق‌زایی جدید در این گروه ثبت شد (شکل‌های ۱-۶ و ۵-۱). تومور با تراکم سلولی بالا و حاشیه نامنظم و در حال دست‌اندازی و گسترش به ساختارهای مجاور است (شکل ۱). در قسمت‌هایی از تومور مناطق نکروز پاليساد شده (فلش زرد) دیده می‌شود. افزایش عروق خونی کوچک و وجود خونریزی‌های متعدد در شکل ۱-۲ با فلش سبز نشان داده شده است. ناهمگونی سلولی و پلیمورفیسم مانند سلول‌های بزرگ و غول‌آسا، هسته‌های هیپرکروماتیک، میتوزهای



شکل ۱. تصاویر هیستوپاتولوژیک از تومور گلیوبلاستوما در مغز



شکل ۲. بیان ژن VEGF-A در بافت تومور. ژن B2m به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. داده‌ها با استفاده از آزمون یک‌طرفه ANOVA (One-Way ANOVA) و تست Tukey's post hoc تحلیل قرار گرفتند. مقادیر ۰/۰۱۵ P=؛ * ۰/۰۰۱ P=؛ ** نسبت به گروه کنترل معنی‌دار شمرده شدند.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه به بررسی اثر ضدسرطان‌زایی اسید گالیک بر گلیوبلاستوما در مدل حیوان (موش صحرایی) با تمرکز بر ارزیابی سطح رگ‌زایی در ارزیابی پاتولوژی و بررسی بیان ژن VEGF- α پرداخته شده است. یکی از بارزترین یافته‌های هیستوپاتولوژیک و مولکولی ما، مهار رگ‌زایی تومورال تحت تأثیر اسید گالیک بود. رگ‌زایی یک روند پاتولوژیک ضروری برای تأمین مواد مغذی و اکسیژن مورد نیاز برای رشد و بقای تومورهای جامد، به‌ویژه گلیوبلاستوما که به‌دلیل هایپوکسی و ترشح سطوح بسیار بالای VEGF شناخته می‌شود، است (۱۵، ۱۶). داده‌های این مطالعه به‌وضوح نشان داد که اسید گالیک به‌صورت وابسته به دوز، بیان ژن VEGF را مهار می‌کند. این یافته کاملاً با کاهش مشاهده‌شده در تراکم عروق خونی (microvasculature) در گروه‌های تیمار شده همخوانی دارد و نشان می‌دهد مکانیسم اصلی عمل GA، سرکوب مسیر سیگنالینگ VEGF و در نتیجه مهار تشکیل شبکه‌های عروقی جدید است (۱۲). این اثر منجر به محرومیت تومور از منابع غذایی و در نهایت، نکروز و کاهش حجم تومور به‌صورت وابسته به دوز می‌شود.

اگرچه اثر ضد رگ‌زایی محوری به‌نظر می‌رسد، اما احتمالاً تنها مکانیسم عمل اسید گالیک نیست. این ترکیب فنلی به‌خوبی به‌خاطر توانایی‌اش در القای آپوپتوز و ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرطانی از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شناخته شده است (۱۷). نکروز پالیا شده که در گروه کنترل مشاهده شد، اغلب با هایپوکسی و مرگ سلولی غیر برنامه‌ریزی‌شده مرتبط است (۱۸). کاهش این مناطق در گروه‌های تحت درمان با اسید گالیک می‌تواند نشان‌دهنده القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) به‌جای نکروز

غیرقابل کنترل باشد. بنابراین، یک اثر سینرژیک بین القای آپوپتوز مستقیم در سلول‌های تومورال و ایجاد یک محیط نامساعد برای رشد به‌دلیل مهار رگ‌زایی، می‌تواند توجیه‌کننده اثربخشی قوی این ترکیب باشد.

وجود یک رابطه دوز-پاسخ واضح، هم در سطح هیستوپاتولوژیک و هم در سطح مولکولی بیان VEGF، بر خاصیت ذاتی اسید گالیک در ایجاد این اثرات ضدتوموری تأکید می‌کند. این یافته با نتایج مطالعات قبلی که اثرات ضدسرطانی و ضد رگ‌زایی اسید گالیک را بر روی مدل‌های مختلف سرطانی مانند رده سلولی سرطان تخمدان (۱۲) و گلیوم انسانی (۱۳) گزارش کرده‌اند، همسو است (۱۹). با این حال، مطالعه حاضر برای اولین بار (به دانش ما) این اثرات را به‌طور هم‌زمان بر روی معیارهای هیستوپاتولوژیک کلیدی گلیوبلاستوما و مهار بیان VEGF در یک مدل *in vivo* مورد بررسی قرار داده است.

مکانیسم ضدسرطانی GA فراتر از القای آپوپتوز و مهار رگ‌زایی اولیه است و شبکه‌ای پیچیده از مسیرهای سیگنالینگ را مختل می‌کند. شواهد قوی نشان می‌دهد که GA با مهار مستقیم فاکتور رونویسی NF- κ B در سطح زیر واحد P65، نه تنها بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند TNF- α و IL-6 را مهار می‌کند، بلکه از انتقال هسته‌ای آن جلوگیری کرده و به‌طور هم‌زمان بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی مانند Bcl-2 و Bcl-xL را کاهش و بیان پرو-آپوپتوزی مانند Bax را افزایش می‌دهد (۲۰). در بُعد متاستاز، GA با کاهش بیان ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP-2 و MMP-9) از طریق مسیرهای وابسته به NF- κ B و MAPK، توانایی تهاجم و مهاجرت سلول‌های سرطانی را به‌طور چشمگیری مهار می‌کند (۲۱). همچنین، مطالعات نشان داده‌اند GA یک مهارکننده قوی مسیر PI3K/Akt/mTOR است که نقش

آزمایشگاهی انجام شده است. کد کمیته اخلاق مربوط به آن IR.SKUMS.AEC.1403.049 است.

تشکر و قدردانی

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جهت حمایت تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود (کد گرنت: ۴۶۸۳).

تضاد منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان این مقاله در مراحل مختلف پژوهش مداخله داشتند. ایده‌پردازی و نظارت: سمیرا اصغرزاده؛ مدل حیوانی: فاطمه عزیز، الهه سلطانی و سمیرا اصغرزاده؛ بخش مولکولی و پاتولوژی: فاطمه نصر اصفهانی و الهه سلطانی و سمیرا اصغرزاده؛ نگارش مقاله: سمیرا اصغرزاده؛ و ادیت نهایی و تأیید مقاله: همه نویسندگان.

محوری در رشد، بقا و متاستاز سلول‌های سرطانی دارد (۲۲).

اگرچه این مطالعه شواهد ارزشمندی در مورد پتانسیل درمانی اسید گالیک ارائه می‌دهد، اما دارای محدودیت‌هایی است. بررسی‌های بیشتر در سطح پروتئینی مانند سنجش سطح پروتئین VEGF و پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز به‌روشنی و سترن بلات یا ایمونوهیستوشیمی برای تأیید نهایی مکانیسم‌های پیشنهادی ضروری است. به‌علاوه، ارزیابی سمیت سیستمیک GA در این دوزها و بررسی اثرات آن در ترکیب با درمان‌های استاندارد (مانند تموزولوماید) نیازمند بررسی‌های بیشتر است. به‌عنوان نتیجه‌گیری، داده‌های ما به‌طور قوی از این فرضیه حمایت می‌کند که اسید گالیک عمدتاً از طریق مهار وابسته به دوز بیان VEGF و مهار متعاقب آن رگ‌زایی، رشد گلیوبلاستوما را سرکوب می‌کند. این ترکیب می‌تواند به‌عنوان یک عامل کمکی امیدوارکننده در پروتکل‌های درمانی چندوجهی علیه گلیوبلاستوما مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با رعایت دستورالعمل‌های مربوط به حیوانات

References

1. Yu MW, Quail DF. Immunotherapy for glioblastoma: current progress and challenges. *Front Immunol.* 2021;12:676301. doi: [10.3389/fimmu.2021.782687](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.782687) pmid
2. Liu Y, Zhou F, Ali H, Lathia JD, Chen P. Immunotherapy for glioblastoma: current state, challenges and future perspectives. *Cell Mol Immunol.* 2024;21(12):1354-75. doi: [10.1038/s41423-024-01226-x](https://doi.org/10.1038/s41423-024-01226-x) pmid
3. Chiariello M, Inzalaco G, Barone V, Gherardini L. Overcoming challenges in glioblastoma treatment: targeting infiltrating cancer cells and harnessing the tumor microenvironment. *Front Cell Neurosci.* 2023;17:1327621. doi: [10.3389/fncel.2023.1327621](https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1327621) pmid
4. Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, et al. An integrative model of cellular states, plasticity and genetics for glioblastoma. *Cell.* 2019;178(4):835-49. doi: [10.1016/j.cell.2019.06.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024) pmid
5. Pineda E, Domenech M, Hernández A, Comas S, Balaña C. Recurrent glioblastoma: ongoing clinical challenges and future prospects. *Onco Targets Ther.* 2023;71-86. doi: [10.2147/OTT.S366371](https://doi.org/10.2147/OTT.S366371) pmid
6. Bahraminasab M, Asgharzade S, Doostmohamadi A, Satri A, Hasannejad F, Arab S. Development of a hydrogel-based three-dimensional (3D) glioblastoma cell line culture as a model system for CD73 inhibitor response study. *Biomed Eng Online.* 2024;23(1):127. doi: [10.1186/s12938-024-01320-1](https://doi.org/10.1186/s12938-024-01320-1)
7. Jiang Y, Pei J, Zheng Y, Miao Y-j, Duan B-z, Huang L-f. Gallic acid: a potential anti-cancer agent. *Chin J Integr Med.* 2022;28(7):661-71. doi: [10.1007/s11655-021-3345-2](https://doi.org/10.1007/s11655-021-3345-2) pmid
8. Arab S, Ghasemi S, Ghanbari A, Bahraminasab M, Satri A, Mousavi M, et al. Chemopreventive effect of spirulina microalgae on an animal model of glioblastoma via down-regulation of pl3k/akt/mtor and up-regulation of mir-34a/mir-125b expression. *Phytother Res.* 2021;35(11):6452-61. doi: [10.1002/ptr.7298](https://doi.org/10.1002/ptr.7298) pmid
9. Korani MS, Farbood Y, Sarkaki A, Moghaddam HF, Mansouri MT. Protective effects of gallic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive deficit and brain oxidative damage in rats. *Eur J Pharmacol.* 2014;733:62-7. doi: [10.1016/j.ejphar.2014.03.044](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.03.044) pmid
10. Yen G-C, Duh P-D, Tsai H-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food chem.* 2002;79(3):307-13. doi: [10.1016/s0308-8146\(02\)00145-0](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(02)00145-0)
11. Yang J-T, Lee I-N, Chen C-H, Lu F-J, Chung C-Y, Lee M-H, et al. Gallic acid enhances the anti-cancer effect of temozolomide in human glioma cell line via inhibition of Akt and p38-MAPK pathway. *Processes.* 2022;10(3):448. doi: [10.3390/pr10030448](https://doi.org/10.3390/pr10030448)
12. He Z, Chen AY, Rojanasakul Y, Rankin GO, Chen YC. Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the pten/akt/hlf-1 α /vegfr signaling pathway in ovarian cancer cells. *Oncol Rep.* 2016;35(1):291-7. doi: [10.3892/or.2015.4354](https://doi.org/10.3892/or.2015.4354) pmid
13. Lu Y, Jiang F, Jiang H, Wu K, Zheng X, Cai Y, et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *Eur J Pharmacol.* 2010; 641(2-3):102-7. doi: [10.1016/j.ejphar.2010.05.043](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.05.043) pmid
14. Townner R, Smith N, Doblas S, Tesiram Y, Garteiser P, Saunders D, et al. In vivo detection of c-met expression in a rat c6 glioma model. *J Cell Mol Med.* 2008;12(1):174-86. doi: [10.1111/j.1582-4934.2008.00220.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00220.x) pmid
15. Jensen RL. Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression and as a therapeutic target. *J Neurooncol.* 2009;92(3):317-35. doi: [10.1007/s11060-009-9827-2](https://doi.org/10.1007/s11060-009-9827-2) pmid
16. Arab S, Ghasemi S, Bahraminasab M, Ghanbari A, Heidari M, Kokhaei P, et al. Cd73 molecule inhibitor upregulates mir16 expression in experimental glioblastoma and inhibits angiogenesis by targeting VEGF. *J Mol Neurosci.* 2025;75(2):41. doi: [10.1007/s12031-025-02307-w](https://doi.org/10.1007/s12031-025-02307-w) pmid
17. Wang R, Ma L, Weng D, Yao J, Liu X, Jin F. Gallic acid induces apoptosis and enhances the anticancer effects of cisplatin in human small cell lung cancer H446 cell line via the ROS-dependent mitochondrial apoptotic pathway. *Oncol Rep.* 2016;35(5):3075-83. doi: [10.3892/or.2016.4690](https://doi.org/10.3892/or.2016.4690) pmid
18. Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 'Pseudopalising' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology hypoxia and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(6):529-39. doi: [10.1097/00005072-200606000-00001](https://doi.org/10.1097/00005072-200606000-00001) pmid
19. Liao C-L, Lai K-C, Huang A-C, Yang J-S, Lin J-J, Wu S-H, et al. Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma u-2 os cells through suppressing the matrix metalloproteinase-2/-9, protein kinase b (pkb) and pkc signaling pathways. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(5):1734-40. doi: [10.1016/j.fct.2012.02.033](https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.033) pmid

20. Verma S, Singh A, Mishra A. Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013;35(3):473-85. [doi: 10.1016/j.etap.2013.02.011](https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.011) [pmid](#)
21. Ho H-H, Chang C-S, Ho W-C, Liao S-Y, Lin W-L, Wang C-J. Gallic acid inhibits gastric cancer cell metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of akt/small gtpase signals, and inhibition of nF- κ b activity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;266(1):76-85. [doi: 10.1016/j.taap.2012.10.019](https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.10.019) [pmid](#)
22. Lin S, Qin H-Z, Li Z-Y, Zhu H, Long L, Xu L-B. Gallic acid suppresses the progression of triple-negative breast cancer HCC1806 cells via modulating p13k/akt/egfr and MAPK signaling pathways. *Front Pharmacol.* 2022; 13:1049117. [doi: 10.3389/fphar.2022.1049117](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1049117) [pmid](#)