بررسی آثار داروی ضدسرطانی تاکسول بر ویژگی‌های بیومکانیکی و متابولیسمی ناحیه تکثیرکننده اسفروئیدهای تشکیل‌شده از سلول‌های سرطانی سینه انسانی MCF-7 در بستر میکروفلوئیدیک

محسن حسین‌زاده[1]، عبدالله الله‌وردی[1*]

1 -گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: عبدالله وردی *a-allahverdi@modares.ac.ir*

تاریخ دریافت1402/1/11 **تاریخ پذیرش: 1402/4/14**

چکیده

بررسی ویژگی‌های بیومکانیکی سلول‌های سرطانی برای پیشرفت در درمان و شناخت بهتر سرطان ضروری است. بیشتر پژوهش‌های انجام‌شده در سال‌های پیشین بر سلول‌های کشت‌شده به‌صورت دوبعدی انجام شده است درحالی‌که مطالعه سلول‌های کشت‌شده در حالت سه‌بعدی به دلیل رشد سلول‌ها در همه ابعاد و همچنین وجود اتصال‌های سلول- سلول و سلول– ماتریکس خارج‌سلولی نسبت به کشت دوبعدی برتری دارد. کشت سه‌بعدی سلول درمقایسه با کشت دوبعدی، با اینکه از نظر فیزیولوژیکی به شرایط محیطی درون‌تنی نزدیک‌تر است، اما در حال حاضر روش متداولی برای کشت سلول و آزمایش‌های پیش‌بالینی به شمار نمی‌رود. نبود بستر مناسب و محدودبودن روش‌های رایج در مشخصه‌یابی پارامترهای مختلف سلول‌ها در حالت سه‌بعدی از محدودیت‌های این نوع کشت به شمار می‌آیند. در این پژوهش، نخست با استفاده از PDMS بستری برای ایجاد اسفروئید ساخته شد و سپس اسفروئیدهای تشکیل‌شده تحت تأثیر تاکسول به‌عنوان داروی ضداسکلت سلولی قرار گرفتند و با تصویربرداری از آنها در مدت زمان مشخص، میزان زنده‌مانی آنها بررسی شد. درنهایت برای به‌دست‌آوردن پارامترهای بیومکانیکی، سطح بیرونی آنها به‌وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی سنجش شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که داروی تاکسول علاوه بر کاهش زنده‌مانی و کنترل رشد تومور، ویژگی‌های بیومکانیکی سلول‌ها را نیز در حالت سه‌بعدی تحت تأثیر قرار می‌دهد. دراین‌حالت، مدول یانگ آنها تحت تیمار با داروی تاکسول از متوسط 4,84 کیلوپاسکال به 3,67 کیلوپاسکال کاهش پیدا کرده است. همچنین تغییر شکل آنها تحت تیمار با داروی تاکسول نیز از متوسط 1,32 به 2,05 میکرومتر افزایش پیدا کرد. به‌طور کلی مطالعه ویژگی‌های مکانیکی سلول‌ها در حالت سه‌بعدی علاوه بر اینکه در آزمایش‌های مبتنی بر اکتشاف دارو استفاده می‌شوند، می‌تواند در درک سازوکار پدیده تومورزایی و همچنین ریخت‌زایی نیز کمک‌کننده باشد.

واژه‌های کلیدی: تاکسول، خصوصیات مکانیکی، سلول‌های سرطانی MCF-7.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

1- مقدمه

مشخص شده است که خواص مکانیکی سلول‌ها با بسیاری از رفتارهای بیولوژیکی مهم سلول‌ها ازجمله چسبندگی، تقسیم، تحرک[1]، تمایز و تغییر شکل[2] مرتبط است. ازاین‌رو، بررسی خواص مکانیکی سلول‌ها ازجمله سفتی[3] آنها در سال‌های پیشین مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است [1؛2]. براساس یافته‌های انجام‌شده روی سلول‌های سرطانی منفرد کشت داده‌شده به‌صورت دوبعدی نشان داده شده است که این سلول‌ها مدول یانگ کمتری در مقایسه با سلول‌های طبیعی دارند، به‌گونه‌ای‌که تیمار این سلول‌ها با داروهای ضدسرطانی منجر به افزایش مدول یانگ این سلول‌ها می‌شود [3] . کاهش مدول یانگ در سلول‌های سرطانی سبب افزایش تمایل آنها به مهاجرت می‌شود. همچنین این امکان را می‌دهد تا آنها بتوانند با تغییر شکل از میان سلول‌های رگ‌های خونی عبور کنند [4] . توضیح پدیده‌های مکانیکی در سطح ساختارهای چندسلولی یکی از مراحل اصلی پی‌بردن به اصول پایه‌ای مکانیک بافت‌ها است. با وجود اینکه شواهد نشان می‌دهد بعضی از ویژگی‌های مکانیکی سلول‌های منفرد با ساختارهای چندسلولی مشابه هستند ولی همچنان تفاوت زیادی در بعضی از جنبه‌های اساسی مشاهده شده است [5]. در دهه‌های گذشته پژوهش‌های انجام‌شده بر خواص مکانیکی سلول‌ها (به‌وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی[4]) بیشتر با استفاده از سلول‌های منفرد کشت داده‌شده به‌صورت دوبعدی انجام شده است [6]. آسانی نسبی و استانداردسازی‌شدن پروتکل‌های کشت سلولی دوبعدی از دلایل تمایل پژوهشگران به این روش است. بااین‌حال، کشت سلولی دوبعدی نمی‌تواند بسیاری از خواص فیزیولوژیکی مرتبط با بافت‌های درون‌تنی را شبیه‌سازی کند [7؛ 8]، برای مثال سلول‌هایی که در محیط دوبعدی رشد می‌کنند، تماس‌های بین‌سلولی را که برای عملکرد و رفتار بافت‌ها اساسی هستند، برقرار نمی‌کنند. بسیاری از سلول‌هایی که در ظروف مسطح رشد می‌کنند، شکل مکعبی خود را از دست می‌دهند و مورفولوژی مسطح به خود می‌گیرند. درنتیجه حالت مکانیکی غیرطبیعی ایجاد می‌کنند [9]. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که الگوهای بیان ژن و پروتئین برای سلول‌های رشد پیداکرده در تک‌لایه‌های چسبنده دوبعدی به‌طور چشمگیری با آنچه که از همان سلول‌ها در داخل بدن مشاهده می‌شود، متفاوت است. ازاین‌رو کشت سه‌بعدی سلول می‌تواند به‌عنوان یک حد واسط بین کشت دوبعدی و شرایط درون‌تنی باشد [10؛ 11]. به همین دلیل روش‌های بسیاری برای کشت سلولی سه‌بعدی به وجود آمده است که آنها را می‌توان به‌طور کلی به دو دسته بر پایه داربست یا بدون داربست طبقه‌بندی کرد. روش‌های بدون داربست به‌طور معمول از راه کاهش برهم‌کنش سلول با بستر و همچنین افزایش برهم‌کنش سلول- سلول باعث تجمع سلول‌ها و تشکیل اسفروئید می‌شوند. بنابراین برای بافت‌هایی که درجه بالایی از برهم‌کنش‌های سلول - سلول دارند، سیستم‌های بدون داربست الگوی مناسبی به شمار می‌روند [12]. پلتفرم‌های میکروفلوئیدی با تأمین مداوم مواد مغذی، اکسیژن، حذف مواد زاید و ایجاد جریان پویا در محیط، منجر به کشت طولانی‌مدت سلول‌ها با درجه زنده‌مانی بالا می‌شوند. همچنین تعدادی از سنجش‌های مشخصه‌یابی[5] مانند رنگ‌آمیزی سلول زنده/ مرده[6]، آزمایش دارو و سنجش تحریک‌های شیمیایی، مکانیکی و الکتریکی در تراشه‌های میکروفلوئیدی امکان‌پذیر است. به همین دلیل در سال‌های گذشته به تشکیل اسفروئید در تراشه‌های

1 Motility
2 Deformation
3 Stiffness
4 Atomic Force Microscopy: AFM

5 Characterization assay
6 Live/dead staining

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

میکروفلوئیدی به‌وسیله پژوهشگران توجه شده است [13].

مشخصه‌یابی اسفروئیدها به‌طور کلی به دو دسته خارج از تراشه و روی تراشه تقسیم می‌شود. از مشخصه‌یابی‌های خارج از تراشه که به‌طور معمول بعد از آزمایش‌ها انجام می‌شوند و فقط ابزار ارزیابی نقطه پایانی هستند، می‌توان به روش‌های مبتنی بر میکروسکوپ نیروی اتمی، میکروسکوپ الکترونی روبشی[1]، میکروسکوپ الکترونی عبوری[2] و فلوسیتومتری اشاره کرد [14-16].

اندازه‌گیری پارامترهای بیومکانیکی به‌وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی، مبتنی بر سطح موضعی در مقیاس میکرو و نانو است. اساس کار این روش برهم‌کنش مکانیکی پروب (یک تیپ تیز یا کروی که در انتهای کانتیلور قرار دارد) با سطح نمونه می‌باشد و با تجزیه‌وتحلیل منحنی‌های نیرو که وابستگی نیروی اعمال‌شده به عمق فرورفتگی را توصیف می‌کنند، مدول یانگ محلی[3] یک نمونه محاسبه می‌شود [17]. هدف از این مطالعه، کشت سه‌بعدی سلول‌های سرطان سینه انسانی (MCF-7) به‌صورت سه‌بعدی در بستر میکروفلویدیک و تولید اسفرویید با قطرهای متفاوت است. سپس اثر داروی تاکسول بر خصوصیات مکانیکی نظیر مدول سانگ، استحکام و ریخت‌زایی در اسفرویدها مطالعه شدند.

2- مواد و روش‌ها

2-1 طراحی و ساخت تراشه میکروفلوئیدیک

به‌منظور طراحی تراشه از نرم افزار سالیدورکس[4] استفاده شد. ساخت و پرینت طرح موردنظر با دستگاه پرینتر سه‌بعدی انجام شد. به‌این‌منظور نخست طرح رسم شده در نرم‌افزار سالیدورکس به یک فایل با فرمت STL تبدیل شد و سپس فایل STL با نرم‌افزار Repetier-Host به فرمت GECODE تبدیل شد و درنهایت فایل موردنظر به‌وسیله دستگاه پرینتر سه‌بعدی پرینت شد. برای تهیه قالب PDMS، از کیت الاستومر سیلگارد 184(پلی دی‌متیل سیلوکسان (PDMS) + عامل پخت[5]) از شرکت Dow-corning استفاده شد. به‌منظور ساخت قالب نخست 5 گرم از پلیمر PDMS و 0,5 گرم عامل پخت (نسبت 1:10) به‌وسیله ترازوی دیجیتالی وزن شد. پس از مخلوط‌کردن کامل به ظرف حاوی تراشه پرینت‌شده منتقل شد. سپس به مدت 3 ساعت به‌وسیله دستگاه دسیکاتور حباب‌زدایی انجام گرفت. پس از اطمینان از نبود حباب به‌منظور پخت‌شدن پلیمر و ایجاد پل‌های عرضی ظرف موردنظر در دستگاه آون تحت دمای 65 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز قرار گرفت. درنهایت بعد از پخت‌شدن پلیمر در اتاق تمیز و زیر هود میکروفلوئیدیک از روی تراشه جدا شد.

2-2 بارگذاری سلول درون تراشه

پس از آماده‌سازی نهایی سلول و تراشه، 250 میکرولیتر از محیط کشت حاوی سلول با تراکم 10^5 Cells/mL و با استفاده از سمپلر به داخل تراشه وارد شد. سپس 30 دقیقه درون انکوباتور قرار گرفت تا سلول‌ها به‌طور کامل ته‌نشین شده و درون چاهک‌ها قرار بگیرند، پس از آن جریان مداوم محیط کشت با استفاده از پمپ اعمال شد. سرعت جریان سیال حاوی محیط کشت 20 میکرولیتر در دقیقه تنظیم شد و به مدت 5 ساعت در شبانه‌روز تحت جریان مداومی از محیط کشت تازه قرار گرفت.

1 SEM
2 TEM
3 Local Young's modulus
4 Solidworks

5 Curing agent

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

3-2 تیمار اسفروئیدها با دارو

بعد از به‌دست‌آوردن IC_{50} دارو با آزمون MTT، اسفروئیدهای ایجادشده در بستر میکروفلوئیدیک از روز سوم به بعد با تکرارهای متفاوت دارو تحت تیمار قرار گرفتند. اولین حالت تزریق دارو به‌صورت متناوب در روزهای سوم، پنجم و هفتم به مدت 5 ساعت در شبانه‌روز صورت گرفت و دومین حالت فقط یک بار به مدت چهار ساعت در روز سوم انجام شد. درنهایت برای بررسی میزان رشد اسفروئیدها از آنها به‌صورت روزانه به‌وسیله میکروسکوپ Olympus ix81 تصویربرداری و سپس برای کمی‌کردن اندازه رشد آنها سطح دوبعدی اسفروئیدها با نرم‌افزار IMAGJ محاسبه شد.

4-2 استخراج و بارگذاری اسفروئیدها روی پلیت

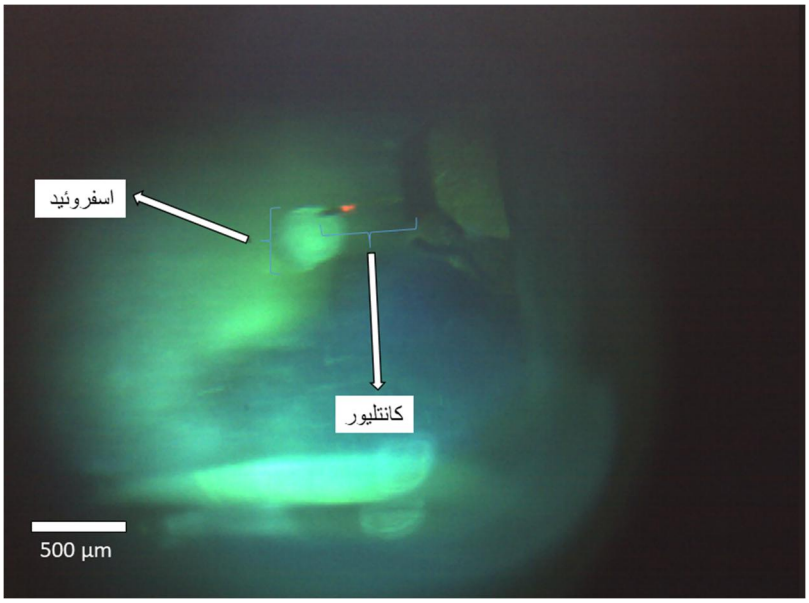
برای سنجش مستقیم اسفروئیدها با میکروسکوپ نیروی اتمی لازم است که اسفروئیدها از تراشه خارج شوند و تحت سنجش مستقیم قرار بگیرند. به‌این‌منظور، اسفروئیدهای کشت‌شده 24 ساعت پس از تیمار دارو از تراشه میکروفلوئیدیک خارج شدند و سپس با استفاده از سمپلر به پلیت کشت انتقال پیدا کردند و به مدت 12 ساعت در انکوباتور تحت اتمسفر 5 درصد دی‌اکسید کربن و دمای 37 Ċ انکوبه شدند. درنهایت برای انجام تست‌های AFM محیط کشت سطح پلیت با سمپلر به آرامی خارج شد و بافر PBS جایگزین شد. در انتها به دستگاه میکروسکوپ نیروی اتمی انتقال داده شدند و پارامترهای مکانیکی اسفروئیدها بررسی شد.

5-2 مشخصه‌یابی اسفروئیدها به‌وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی

پارامترهای مکانیکی اسفروئیدها در حالت تیمار با دارو و بدون دارو به‌وسیله AFM core (Nanosurf, Switzerland) در محلول PBS در دمای 37 درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد (شکل 1). میکروسکوپ نیروی اتمی ، ابزاری مناسب برای بررسی سلول‌های زنده است، به‌گونه‌ای‌که با اندازه‌گیری دقیق نیروهای کوچک (F) همراه با جابه‌جایی‌های نانومتری را به پارامتر تورفتگی[1] (δ) تبدیل می‌کند. با به‌دست‌آوردن منحنی‌های F(δ) می‌توان مدول الاستیک را با استفاده ازالگوی هرتز تعیین کرد [19]. در این پژوهش تمامی سنجش‌ها با آرایه 64×64 Force Indentations در یک ناحیه 25×25 میکرومتر ارزیابی شدند. درنهایت برای محاسبه پارامترهای مکانیکی از Sphere Hertz مدل و نسبت پواسون[2] 0,5 در نرم‌افزار AtomicJ برای تمامی نمونه‌ها لحاظ شد و نمودار داده‌های حاصل با نرم‌افزار OriginPro رسم شد [20].

1 Indentation values
2 Poisson ratio

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]



شکل 1 تصویر اسفروئید در دستگاه میکروسکوپ نیروی اتمی

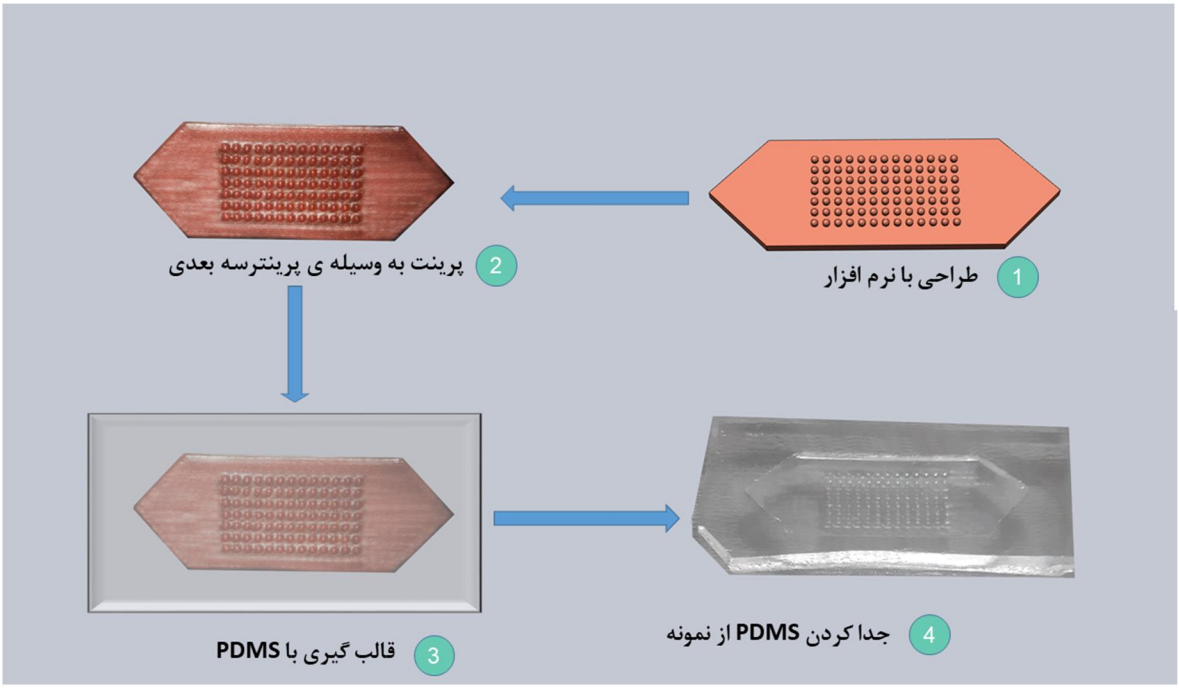
تصویر واقعی از اسفروئید با اندازه تقریباً 300 میکرومتر که در محلول PBS با دمای 37 درجه سانتی‌گراد و همچنین کانتلیور تنظیم‌شده با نور لیزر به همراه تیپ کروی روی آن قرار گرفته است.

3- نتایج

در این پژوهش به‌منظور تشکیل و کشت اسفروئید از روش مبتنی بر ریزچاهک[1] استفاده شد. توانایی کشت طولانی‌مدت، امکان تیمار اسفروئیدها با دارو از مزیت‌های این روش هستند. این طرح به‌گونه‌ای است که سلول‌ها براساس نیروی گرانش در چاهک‌ها ته‌نشین می‌شوند. وقتی تراکم مناسبی از سلول‌ها در ریزچاهک‌ها وجود داشته باشد، سلول‌ها شروع به اتصال و تجمع با یکدیگر می‌کنند که بعد از گذشت یک یا چند روز اتصال آنها قوی‌تر شده و تبدیل به اسفروئید می‌شوند. از مزیت‌های دیگر ریزچاهک‌ها توانایی خارج‌کردن اسفروئیدها از تراشه است به‌گونه‌ای‌که وقتی سرعت جریان در داخل تراشه بیشتر شود، نیروی واردشده از سیال به اسفروئید بیشتر شده و درنهایت منجر به خروج اسفروئید از درون ریزچاهک می‌شود. برای ایجاد یک بستر با تعداد مشخصی از ریزچاهک از طرح موردنظر با الاستومر PDMS قالب‌گیری شد (شکل 2). سپس به‌منظور ایجاد جریان و تشکیل اسفروئید قالب PDMS به پلکسی گلس متصل شد (شکل 3).

1 Micro well based

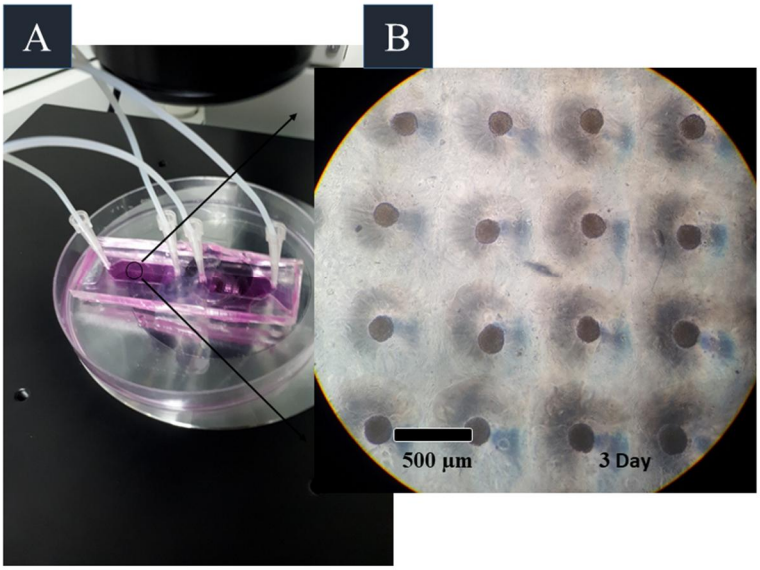
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]



شکل 2 مراحل ساخت تراشه میکروفلوئیدی به روش قالب‌گیری با PDMS

1- در مرحله اول نخست طرح موردنظر از تراشه میکروفلوئیدی، با استفاده از نرم‌افزار سالیدورکس رسم شده است. این طراحی شامل ارائه‌ای 13×7 از نیم‌کره‌های برجسته به قطر 0,5 میلی‌متر است که روی یک کانال بزرگ 10 در 30 میلی‌متر قرار گرفته شده‌اند؛ 2- در مرحله دوم با استفاده از پرینتر سه‌بعدی طرح موردنظر چاپ می‌شود. در شکل تصویر واقعی از طرح پرینت‌شده با دستگاه پرینتر سه‌بعدی نشان داده شده است؛ 3- در مرحله سوم، به‌منظور قالب‌گیری از طرح ساخته‌شده الاستومر PDMS ترکیب شده با عامل پخت که به‌صورت مذاب است، روی تراشه قرار می‌گیرد و سپس برای ایجاد اتصال‌های عرضی (پخت‌شدن) در دمای 65 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت درون آون قرار می‌گیرد؛ 4- در مرحله چهارم پس از پخت‌شدن PDMS و تبدیل‌شدن از حالت مذاب به حالت جامد، می‌توان قالب PDMS را از طرح پرینت‌شده جدا کرد. در شکل تصویر واقعی قالب PDMS (که به روش قالب‌گیری از طرح موردنظر به دست آمده) نشان داده شده است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]



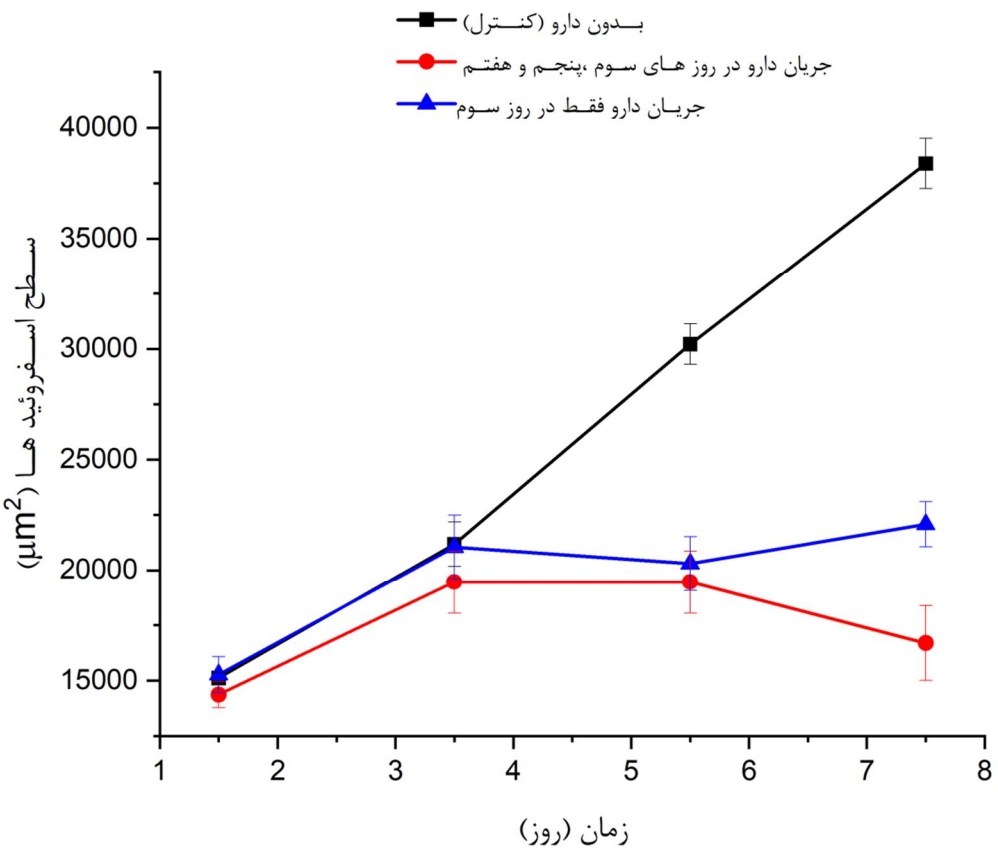
شکل 3 ایجاد جریان و تشکیل اسفروئید در تراشه میکروفلوئیدیک

الف) دو تراشه میکروفلوئیدیک مستقل که در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند و هرکدام از آنها برای ایجاد جریان به یک ورودی و یک خروجی متصل شده‌اند. نخست جریان محیط کشت حاوی سلول به تراشه تزریق می‌شود و پس از ته‌نشین‌شدن سلول‌ها درون ریزچاهک‌های محیط کشت بدون سلول تزریق می‌شود؛ ب) پس از گذشت سه روز که اسفروئیدها به‌طور کامل متراکم شده و رشد کرده‌اند، با تزریق محیط کشت حاوی داروی تاکسول به درون تراشه تحت تیمار قرار می‌گیرند. در شکل تصویر اسفروئیدهای ایجادشده در تراشه در روز سوم نشان داده شده است.

1-3 بررسی نرخ رشد اسفروئیدها در تراشه با دارو و بدون دارو

سرعت رشد اسفروئیدها بسته به نوع سلول و شرایط محیطی متفاوت است. یکی از عوامل افزایش سرعت رشد اسفروئیدها وجود مقدار زیاد مواد مغذی و اکسیژن است که در تراش‌های میکروفلوئیدی با جریان متناوب مواد مغذی تازه ، سرعت رشد اسفروئیدها نیز افزایش پیدا می‌کند. علاوه بر آن نبود مواد مغذی و وجود عوامل مهارکننده رشد مثل داروهای ضدسرطانی منجر به کاهش سرعت رشد و کنترل آنها می‌شود. در این پژوهش اسفروئیدها با تکرارهای متفاوتی از دارو تحت تیمار قرار گرفتند. حالت اول تزریق یک دوز دارو در روز سوم بود و در حالت دوم سه دوز از دارو در روزهای سوم، پنجم و هفتم به درون تراشه تزریق شد. بررسی نمودار سطح دوبعدی اسفروئیدها نشان می‌دهد تیمار اسفروئیدها با دارو با یک دوز با غلظت µg/mL IC_{50}= 3,24 می‌تواند باعث کنترل و مهار رشد آنها به مدت 4 روز شود. اما تیمار مداوم آنها با دارو علاوه بر مهار رشد سبب مرگ سلول‌ها و فروپاشی اسفروئیدها می‌شود (شکل‌های 4 و 5).

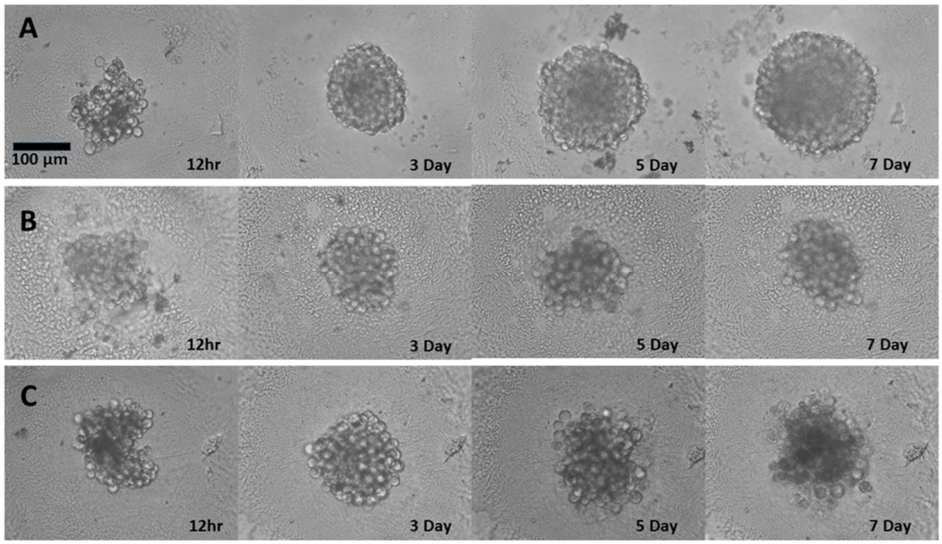
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]



شکل 4 نمودار بررسی رشد اسفروئیدها تحت تیمار دوزهای متفاوت از داروی تاکسول

نمودار مشکی که با نماد مربع رسم شده است، نشـان می‌دهد که سطح دوبعدی اسفروئیدها در حالـت کنتـرل و بدون تیمار دارو به‌صورت خطی رشـد کـرده و در طـول هفـــت روز از 15000 میکرومتـــرمربـــع بـــه 37000 میکرومترمربع افزایش پیدا می‌کند. نمودار آبی که با نمـاد مثلث رسم شده است، مربوط به اسفروئیدهایی است کـه فقط در روز سوم تحت تیمار دارو قرار گرفته‌اند و نشـان می‌دهد که تیمار اسفروئیدها با دارو در روز سوم منجر بـه مهار رشد اسفروئیدها در محدوده 21000 میکرومترمربـع می‌شود. درنهایت نمودار قرمز که با نماد دایره رسم شـده است، مربوط به اسفروئیدهایی است که به‌صورت مـداوم در روزهای سوم، پنجم و هفـتم تحـت تیمـار دارو قـرار گرفته‌اند و نشان می‌دهد که تیمار دارو در روز سوم منجر بـــه مهـــار رشـــد اســـفروئیدها در محـــدوده 19000 میکرومترمربع می‌شود ولی تیمـار دوبـاره اسـفروئیدها در روز پنجم و هفتم منجر به فروپاشی اسفروئیدها و کاهش سطح مؤثر آنها می‌شود.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]



شکل 5 بررسی رشد و مورفولوژی اسفروئیدهای تیمارشده با دوزهای متفاوت از داروی تاکسول در طول 7 روز به‌صورت کیفی با تصویربرداری به‌وسیله‌ی میکروسکوپ نوری

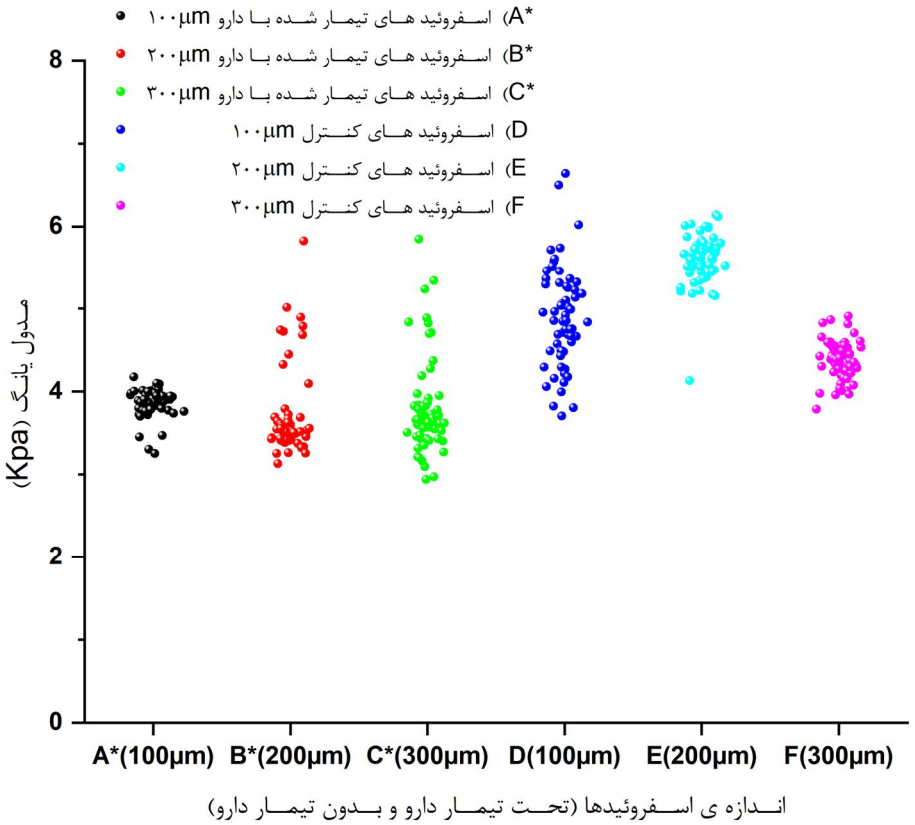
الف- اسفروئید تیمارنشده (کنترل) که در طول هفت روز علاوه‌بر افزایش قطر نشان می‌دهد که دایره‌وار بودن و استحکام آن نیز افزایش پیدا کرده و تقریباً به شکل یک کروی کامل تبدیل شده است؛ ب- اسفروئید تیمارشده با یک دوز در روز سوم را نشان می‌دهد. علاوه بر قطر آن مورفولوژی آن نیز تغییر محسوسی نداشته است. ج- اسفروئید تیمارشده در روزهای سوم پنجم و هفتم نشان می‌دهد که در روز پنجم سلول‌ها شروع به جداشدن از اسفروئیدها می‌کنند و مورفولوژی آن از حالت فشرده به حالت سست تغییر می‌کند.

2-3 بررسی مدول یانگ سطح اسفروئیدها

مدول یانگ اسفروئیدها در شرایط مختلف (اندازه‌های متفاوت و همچنین تیمار با دارو) بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که تغییر معناداری در مدول یانگ اسفروئیدهای کشت‌شده با اندازه‌های متفاوت دیده نمی‌شود. اما تیمار اسفروئیدها با دارو نشان می‌دهد که منجر به کاهش مدول یانگ آنها می‌شود. از دلایل کاهش مدول یانگ (که رابطه مستقیمی با سفتی[1] دارد) سست‌شدن اتصال سلول‌ها و کاهش فشردگی آنها به دلیل اختلال در تولید ماتریکس خارج‌سلولی و همچنین تأثیر مستقیم دارو بر اسکلت سلولی سلول‌های قرارگرفته در سطح اسفروئید است (شکل 6).

1 Stiffness

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]



شکل 6 نمودار بررسی مدول یانگ اسفروئیدها در اندازه‌های متفاوت و تحت تیمار با داروی تاکسول

ا*A- مدول یانگ مربوط به اسفروئیدهای با قطر 100 میکرومتر است که با داروی تاکسول تیمار شده‌اند و در محدوده 3 تا 4 کیلوپاسکال به دست آمده است. *B- مدول یانگ مربوط به اسفروئیدهای با قطر 200 میکرومتر است که با داروی تاکسول تیمار شده‌اند و در محدوده 3 تا 4 کیلوپاسکال به دست آمده است. *C- مدول یانگ مربوط به اسفروئیدهای با قطر 300 میکرومتر است که با داروی تاکسول تیمار شده‌اند و در محدوده 3 تا 4 کیلوپاسکال به دست آمده است. D- مدول یانگ مربوط به اسفروئیدهای با قطر 100 میکرومتر که در محدوده 4 تا 6 کیلو پاسکال به دست آمده است. E- مدول یانگ مربوط به اسفروئیدهای با قطر 200 میکرومتر که در محدوده 5 تا 6 کیلو پاسکال به دست آمده است. F- مدول یانگ مربوط به اسفروئیدهای با قطر 300 میکرومتر که در محدوده 4 تا 5 کیلو پاسکال به دست آمده است.

به‌طور کلی نتایج مدول یانگ سطح اسفروئیدها نشان می‌دهد که ارتباط معناداری با اندازه اسفروئیدها ندارد ولی با تیمار دارو مدول یانگ در تمام اندازه‌ها کاهش پیدا کرده است. (لازم به ذکر است که تمامی اندازه‌ها به‌صورت تقریبی و خطای مثبت و منفی 15 میکرومتر درج شده‌اند).

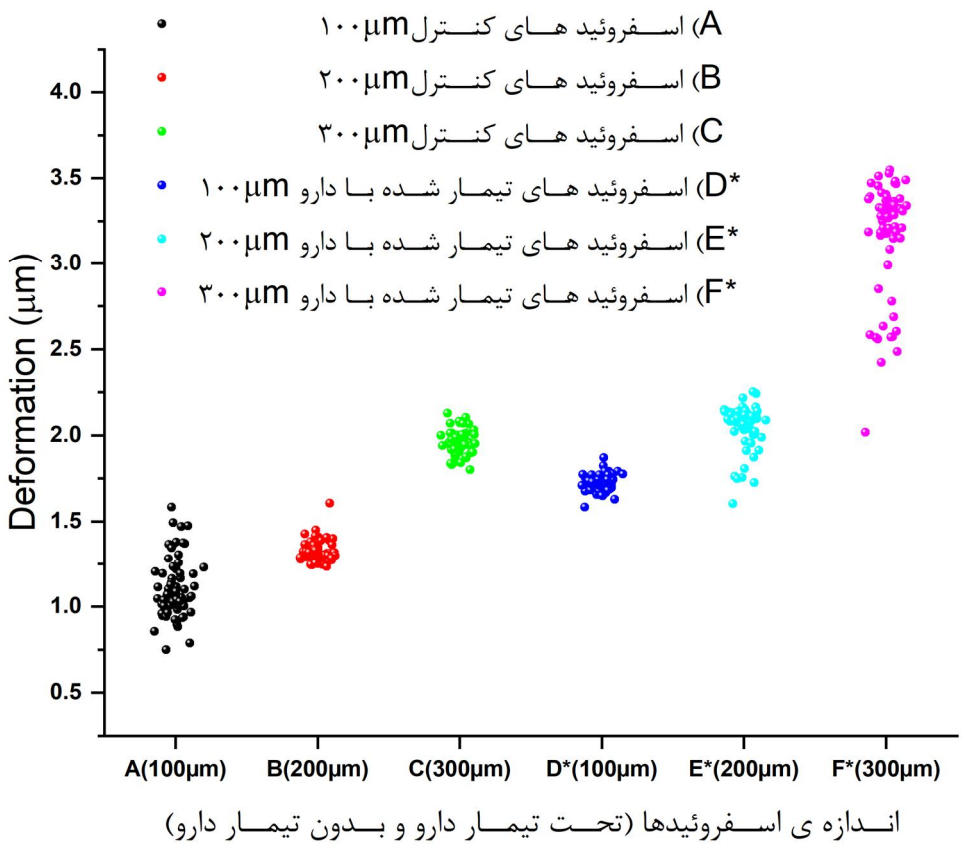
3-3 بررسی مقدار تغییر شکل[1] اسفروئیدها در شرایط مختلف

تغییر شکل سلولی که نشان‌دهنده میزان عمق خراش است، معیاری از تمایل سلول‌های موجود در سطح اسفروئید به تغییر شکل فرض می‌شود که می‌تواند به‌عنوان یک پارامتر مؤثر برای بررسی ویژگی‌های

1 Deformation

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

مکانیکی سلول‌ها باشد. نتایج نشان می‌دهد که میزان تغییر شکل در اسفروئیدها رابطه معناداری با اندازه اسفروئیدها و تحت تیمار قرارگرفتن با دارو دارد؛ به‌گونه‌ای‌که رابطه مستقیمی با اندازه اسفروئیدها دارد و با افزایش اندازه اسفروئیدها مقدار تغییر شکل آنها نیز افزایش پیدا می‌کند. همچنین نشان داده شده است که با تیمار دارو نیز مقدار تغییر شکل نیز بیشتر می‌شود. یکی از دلایل افزایش تغییر شکل در سلول‌های تیمارشده می‌تواند به دلیل سست‌شدن اتصال سلول- سلول و سلول – ماتریکس خارج سلولی باشد ضمن اینکه کاهش مدول یانگ در اسفروئیدهای تیمارشده نیز در نتایج قبلی نشان داده شده بود. همچنین براساس پژوهش‌های انجام‌شده نشان داده شده است که داروی تاکسول با اتصال به میکروتوبول‌ها اسکلت سلولی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد، با افزایش تغییر شکل در سلول‌های تحت تیمار می‌توان استنباط کرد که میکروتوبول‌ها در این سلول‌ها سرهم نشده‌اند و اسکلت سلولی در شرایط سست قرار دارد. افزایش تغییر شکل در اسفروئیدهای بزرگ‌تر می‌تواند درنتیجه افزایش تمایل سلول‌ها به مهاجرت باشد، درواقع می‌توان نتیجه گرفت با افزایش اندازه اسفروئیدها خاصیت متاستاتیک آنها نیز افزایش پیدا می‌کند و سلول‌ها تمایل به مهاجرت و متاستاز بیشتری پیدا می‌کنند (شکل 7).



شکل 7 نمودار بررسی تغییر شکل اسفروئیدها در اندازه‌های متفاوت و تحت تیمار داروی تاکسول

A- مقدار تغییر شکل مربوط به اسفروئیدهای با قطر 100 میکرومتر است که در محدوده 0,75 تا 1,25 میکرومتر است؛ B- مقدار تغییر شکل مربوط به اسفروئیدهای با قطر 200 میکرومتر است که در محدوده 1,25 تا 1,5 میکرومتر است؛ ج- مقدار تغییر شکل مربوط به اسفروئیدهای با قطر 300 میکرومتر است که در

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

محدوده 1,75 تـا 2 میکرومتـر اسـت؛ *C- تغییـر شـکل مربوط به اسفروئیدهای با قطر 100 میکرومتـر اسـت کـه تحت تیمار داروی تاکسول قرار گرفته‌انـد و مقـدار آن در محدوده 1,5 تا 1,75 میکرومتر اسـت. *D- تغییـر شـکل مربوط به اسفروئیدهای با قطر 200 میکرومتـر اسـت کـه تحت تیمار داروی تاکسول قرار گرفته‌انـد و مقـدار آن در محدوده 2 تـا 2,25 میکرومتـر اسـت؛ *F- تغییـر شـکل مربوط به اسفروئیدهای با قطر 300 میکرومتـر اسـت کـه تحت تیمار داروی تاکسول قرار گرفته‌انـد و مقـدار آن در محدوده 3 تا 3,5 میکرومتـر اسـت. بـه‌طـور کلـی نتـایج حاصل از تغییر شکل اسفروئیدها در اندازه‌های متفاوت و تحت تیمار دارو نشان می‌دهد که مقدار تغییر شکل رابطه معنادار و مستقیم با اندازه اسفروئیدها دارد به‌گونه‌ای‌که بـا افزایش قطر اسفروئیدها مقدار تغییر شکل نیز افزایش پیدا می‌کند. همچنین نتایج نشان می‌دهد که تیمـار دارو سـبب افـزایش مقـدار تغییـر شـکل در انـدازه‌هـای متفـاوت از اسفروئیدها می‌شود. (لازم به ذکر است که تمامی اندازه‌ها به‌صورت تقریبی و خطای مثبـت و منفـی 15 میکرومتـر درج شده‌اند).

4- بحث و نتیجه‌گیری

بررسی ویژگی‌های بیومکـانیکی سـلول‌هـا در حالـت In vitro نشان می‌دهـد کـه سـلول‌هـای کشـت داده‌شـده در حالت دوبعدی به دلیل مورفولوژی غیرطبیعـی و نبـود بـر همکنش سلول – سلول خصوصـیات مکـانیکی متفـاوتی نسبت به سلول‌ها در حالت سه‌بعدی نشان می‌دهند، برای مثال مدول یانگ سلول‌های MCF7 کشت‌شده به‌صـورت دوبعدی بین 0,2 تا 0,8 کیلوپاسکال گزارش شـده اسـت [21؛ 22]. درصورتی‌که در این پژوهش سلول‌های MCF7 کشـت‌شـده بـه‌صـورت اسـفروئید مـدول یانـگ 2 تـا 6 کیلـوپاسـکال دارنـد. همچنـین براسـاس پـژوهش‌هـای انجـام‌شـده روی آثـار داروی تاکسـول بـر خصوصـیات مکانیکی سلول‌های سـرطانی نشـان داده شـده اسـت کـه تیمار سلول‌های سرطانی با داروی تاکسول سبب افـزایش مدول یانگ در آنها می‌شود [3؛ 23]. درحـالی‌کـه در ایـن پـژوهش تیمـار اسـفروئیدها بـا داروی تاکسـول منجربـه کاهش مدول یانگ در آنها شده است، علاوه بر آن تیمـار سلول‌های سرطانی کشت داده شده به‌صورت دوبعدی بـا داروی تاکسول نشان داده است که منجر به کـاهش تغییـر شکل در آنها می‌شود. مطالعات انجام‌شده با میکروسکوپ نیروی اتمی نشان داده اسـت کـه خصوصـیات مکـانیکی اسفروئیدها به عوامل مختلفی مثل سفتی ریز محیط آنها و تنظیم بیان ژن وابسته اسـت و در شـرایط مختلـف دچـار تغییر می‌شود به‌گونه‌ای‌که با افـزایش سـفتی ریـز محـیط، سفتی اسـفروئیدها نیـز افـزایش پیـدا مـی‌کنـد. بنـابراین اندازه‌گیری خصوصیات مکانیکی اسفروئیدها می‌توانـد در آزمایش‌های غربالگری دارو[1] به‌طور مـؤثری کمـک‌کننـده باشد [18]. در این پژوهش تیمـار اسـفروئیدها بـا داروی تاکسول منجربه کاهش مدول یانـگ در آنهـا شـده اسـت علاوه‌بر آن تیمار سـلول‌هـای سـرطانی کشـت داده‌شـده به‌صورت دوبعدی با داروی تاکسول نشان داده اسـت کـه منجر به کاهش تغییر شکل در آنها می‌شود درحالی‌که در این پژوهش نشان داده شد سلول‌های کشت‌شده به‌صورت اسفروئید تحت تیمار با داروی تاکسول میزان تغیر شـکل بیشـتری دارنـد. بـه‌طـور کلـی مـی‌تـوان نتیجـه گرفـت اتصـال‌هـای سـلول- سـلول و سـلول- مـاتریکس خـارج‌سـلولی نقـش تعیـین‌کننـده‌ای در ویژگـی‌هـای بیومکانیکی سلول‌ها دارنـد و نبـود آنهـا سـبب تغییـر در خصوصیات مکانیکی سلول‌ها و همچنین تغییر پاسخ آنها به شرایط مختلف می‌شود. همچنین در این پژوهش نشان داده شده است که خصوصـیات بیومکـانیکی اسـفروئیدها

1 Drug screening

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

علاوه‌بر حساسیت نسبت به تیمار با داروی تاکسول نسبت به تغییرات اندازه اسفروئیدها نیز حساس است. درواقع به دلیل تغییر شرایط فیزیکوشیمیایی سلول‌های سطحی اسفروئیدها در اندازه‌های متفاوت، خصوصیات بیومکانیکی آنها نیز دچار تغییر می‌شود. تغییر شکل یکی از پارامترهای بیومکانیکی اسفروئیدها است که در این پژوهش نشان داده شد با افزایش اندازه اسفروئیدها رابطه مستقیم دارد. افزایش تغیر شکل نشان‌دهنده افزایش انعطاف‌پذیری و میل به مهاجرت در سلول‌های سرطانی است. به‌طور غیرمستقیم می‌توان نتیجه گرفت با افزایش اندازه اسفروئیدها میل به مهاجرت در سلول‌های سطحی نیز افزایش پیدا می‌کند. این پژوهش نشان می‌دهد که بررسی خصوصیات بیومکانیکی اسفروئیدها علاوه‌بر نزدیک‌بودن به شرایط درون‌تنی می‌تواند الگوی مناسب‌تری برای مطالعه خصوصیات بیومکانیکی تومورهای سرطانی و پدیده تومورزایی و متاستاز در آنها باشد. نتایج این پژوهش با پژوهش مشابه به‌وسیله قربانی و همکاران که از ورقه‌های نانویی گرافن اکسید بر مهاجرت سلول‌های MCF-7 استفاده کرده‌اند همخوانی دارد [24].

تشکر: به‌این‌ترتیب نگارندگان از صندوق حمایت پژوهشگران و فناوران کشور با شماره گرنت 96006759 تشکر می‌کنند.

منابع

[1] Huang H, Kamm RD, Lee RT. Cell mechanics and mechanotransduction: Pathways, probes, and physiology. Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 2004;287:1–11.

[2] Luo Q, Kuang D, Zhang B, Song G. Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. [Internet] 2016;1860:1953–60. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.010

[3] Ren J, Huang H, Liu Y, Zheng X, Zou Q. An atomic force microscope study revealed two mechanisms in the effect of anticancer drugs on rate-dependent Young's modulus of human prostate cancer cells. PLoS One 2015;10:1–14.

[4] Giannetti A, Revilloud J, Verdier C. Mechanical properties of 3D tumor spheroids measured by AFM. Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin. [Internet] 2020;23:S125–7. Available from: https://doi.org/10.1080/10255842.2020.1816297

[5] Blumlein A, Williams N, McManus JJ. The mechanical properties of individual cell spheroids. Sci. Rep. [Internet] 2017;7:1–10. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07813-5

[6] Li M, Dang D, Liu L, Xi N, Wang Y. Atomic force microscopy in characterizing cell mechanics for biomedical applications: A review. IEEE Trans. Nanobioscience 2017;16:523–40.

[7] Hashemzadeh H, Kelkawi AHA, Allahverdi A, Rothbauer M, Ertl P, Naderi-Manesh H. Fingerprinting Metabolic Activity and Tissue Integrity of 3D Lung Cancer Spheroids under Gold Nanowire Treatment. Cells 2022;11:1–14.

[8] Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? Front. Mol. Biosci. 2020;7:33.

[9] Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Paul Solomon FD. 3D cell culture systems: Advantages and applications. J. Cell. Physiol. 2015;230:16–26.

[10] Hashemzadeh AH. 573-580 A549 Lung Cancer and PC9 Normal Cell Lines under Treatment of Silver Nanoparticles. Modares J. Biotechnol. 2019;10:573–80.

[11] Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, Ploegert S, Demougin P, Heberer M, et al. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study. J. Cell. Physiol. 2005;204:522–31.

[12] LaBarbera D V., Reid BG, Yoo BH. The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. Expert Opin. Drug Discov. 2012;7:819–30.

[13] Ziółkowska K, Kwapiszewski R, Stelmachowska A, Chudy M, Dybko A, Brzózka Z. Development of a three-dimensional microfluidic system for long-term tumor spheroid culture. Sensors Actuators, B Chem.2012;173:908–13.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy. Biophys. J. 2003;84:2071–9.

[20] Guz N, Dokukin M, Kalaparthi V, Sokolov I. If Cell Mechanics Can Be Described by Elastic Modulus: Study of Different Models and Probes Used in Indentation Experiments. Biophys. J. [Internet] 2014;107:564–75. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.033

[21] Li QS, Lee GYH, Ong CN, Lim CT. AFM indentation study of breast cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008;374:609–13.

[22] Xu C, Wang Y, Jiang N, Yang H, Lin J, Xie S. Elasticity measurement of breast cancer cells by atomic force microscopy. Twelfth Int. Conf. Photonics Imaging Biol. Med. (PIBM 2014) 2014;9230:92300Y.

[23] Hung MS, Tsai MF. Investigating the Influence of Anti-Cancer Drugs on the Mechanics of Cells Using AFM.

[24] Ghorbani M, Soleymani M, Hashemzadeh H, Mortezazadeh S, Sedghi M, Shojaeilangari S, Allahverdi A, Naderi-Manesh H. Microfuidic investigation of the efect of graphene oxide on mechanical properties of cell and actin cytoskeleton networks: experimental and theoretical approaches. Scientific Reports. (2021) 11:16216 doi.org/10.1038/s41598-021-95624-0

[14] Patra B, Chen YH, Peng CC, Lin SC, Lee CH, Tung YC. A microfluidic device for uniform-sized cell spheroids formation, culture, harvesting and flow cytometry analysis. Biomicrofluidics [Internet] 2013 [cited 2023 Feb 21];7:054114. Available from: https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.4824480

[15] Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. Biotechnol. Adv. [Internet] 2016;34:1427–41. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002

[16] Andolfi L, Greco SLM, Tierno D, Chignola R, Martinelli M, Giolo E, et al. Planar AFM macro-probes to study the biomechanical properties of large cells and 3D cell spheroids. Acta Biomater. 2019;94:505–13.

[17] Meyer E. Atomic force microscopy. Prog. Surf. Sci. 1992;41:3–49.

[18] Taubenberger A V., Girardo S, Träber N, Fischer-Friedrich E, Kräter M, Wagner K, et al. 3D Microenvironment Stiffness Regulates Tumor Spheroid Growth and Mechanics via p21 and ROCK. Adv. Biosyst. 2019;3:1–16.

[19] Alcaraz J, Buscemi L, Grabulosa M, Trepat X, Fabry B, Farré R, et al. Microrheology of

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Investigation of the effects of Taxol as an anticancer drug on the biomechanical and metabolic properties at the proliferative zone of the spheroids generated from MCF-7 human breast cancer cells in a microfluidic platform

Mohsen Hosseinzadeh[1] and Abdollah Allahverdi[1*]

1. Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Jalal Ale Ahmad Highway, P.O. Box: 14115-111, Tehran, Iran.

*Corresponding author: a-allahverdi@modares.ac.ir

Received: 2023/3/31 Accepted: 2023/7/5

Abstract:

Investigation of the biomechanical properties of cancer cells is essential for progress in treatment and a better understanding of cancer's invasion mechanisms. Most of the research carried out in recent years has been done on two-dimensional cultured cells, while the study of cultured cells in three-dimensional mode is more difficult due to the growth of cells in all dimensions and the presence of cell-cell and cell-extracellular matrix connections. It is preferable to a two-dimensional culture. Three-dimensional cell culture, compared to two-dimensional culture, is physiologically closer to in-vivo environmental conditions, but it is currently not considered a common approach for cell culture and preclinical experiments. The lack of a suitable substrate and the limitations of common techniques in characterizing various parameters of cells in three-dimensional mode are considered limitations of this type of culture.

In this research, initially, the substrate was made using PDMS to generate a platform for spheroids, and then the formed spheroids were exposed to Taxol as an anti-cytoskeletal drug. Consequently, by imaging them for a certain period of time, their survival rate was checked, and finally, in order to obtain mechanical parameters, the spheroids' outer surface was scanned by an atomic force microscope.

The results show that the drug Taxol could reduce the survival rate of tumors, and also affect the biomechanical characteristics of cells in a three-dimensional state. In this case, their Young's modulus has decreased from an average of 4.84 kPa to 3.67 kPa under the treatment with Taxol. Moreover, their deformation increased from an average of 1.32 to 2.05 µm under the treatment with Taxol. In general, studying the mechanical properties of cells in 3D culture, in addition to being used in experiments based on drug discovery, can also help in understanding the mechanisms of tumorigenesis and morphogenesis.

Keywords: Taxol, Mechanical properties, MCF-7 cancer cells

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-22]