



Determination of ATP-Competitive Inhibitor Drug Toxicity in Anaplastic Thyroid Cancer Based on Cell Characteristics and Three-Dimensional Cell Culture

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Samimi H.¹ PhD,
Haghpanah V.² MD, PhD,
Irani Sh.¹ PhD,
Fallah P.³ PhD,
Arefian E.⁴ PhD,
Soleimani M.⁵ PhD

How to cite this article

Samimi H, Haghpanah V, Irani Sh, Fallah P, Arefian E, Soleimani M. Determination of ATP-Competitive Inhibitor Drug Toxicity in Anaplastic Thyroid Cancer Based on Cell Characteristics and Three-Dimensional Cell Culture. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):503-509.

¹Biology Department, Basic Sciences Faculty, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Endocrinology & Metabolism Research Center, Endocrinology & Metabolism Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Laboratory Science Department, Allied Medicine Faculty, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

⁴Microbiology Department, Biology Faculty, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

⁵Hematology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116

Phone: +98 (21) 82884508

Fax: +98 (21) 88220052

soleim_m@modares.ac.ir

Article History

Received: July 22, 2018

Accepted: April 11, 2019

ePublished: September 21, 2019

ABSTRACT

Aims Three-dimensional (3D) cell culture systems are important because simulating the physiological microenvironment and representing more similarity to “in vivo” conditions for anticancer drug screening. Taking the advantages of 3D cell culture in the cancer therapy field, we have developed the 3D in vitro anaplastic thyroid cancer (ATC) model for determining the cytotoxic dose of “BI-847325” chemotherapy agent in ATC cell lines with different genetic background.

Materials and Methods C643 and SW1736 ATC cell lines were grown in alginate scaffold. Beads were incubated in medium for one week. Cells were treated with different doses (1-64 μM) of BI-847325 for 24h. The cytotoxic effect of BI-847325 on 3D cultured cell lines was studied by MTT [3-(4, 5-dimethyl thiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] assay. The survival rate of alginate-encapsulated cells was analyzed by CFSE (5, 6-Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimidyl ester) staining in effective doses for each of the cell lines.

Findings Cytotoxic effect of BI-847325 anticancer drug was different for two ATC cell lines. Effective doses of BI-847325 for C643 and SW1736 cell lines were at 25 μM and 43 μM, respectively. CFSE staining analysis confirmed these data.

Conclusion Overall, the results of the present study showed that the cytotoxic effect of BI-847325 chemotherapy agent was different for two ATC cell lines. The importance of this subject in regard to the 3D cell culture methods can be useful for researchers in the design of the complementary experience in order to achieve the most appropriate chemotherapy drug with the most effective dose.

Keywords Anaplastic thyroid carcinoma; Cell Culture Technique; Drug Screening Assay

CITATION LINKS

[1] The role of chemotherapy and latest emerging target therapies in anaplastic thyroid ... [2] Targeted therapy: A new hope for thyroid ... [3] RAS/RAF/MEK inhibitors in oncology ... [4] Cancer pharmacogenomics, challenges in implementation, and patient-focused ... [5] Personalized therapy in patients with anaplastic thyroid cancer: Targeting genetic and ... [6] BRAF mutation-selective inhibition of thyroid cancer cells by the novel MEK inhibitor ... [7] Potent inhibition of thyroid cancer cells by the MEK inhibitor PD0325901 and its ... [8] Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant ... [9] Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in ... [10] Three-dimensional cell culture matrices: State of the ... [11] Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination ... [12] AlgMatrix™ based 3D cell culture system as an in-vitro tumor model ... [13] Three-dimensional culture of mouse renal carcinoma cells in agarose macrobeads ... [14] Establishment, characterization and comparison of seven authentic anaplastic ... [15] Adenovirus-mediated tumor suppressor p53 gene therapy for anaplastic thyroid ... [16] Anaplastic thyroid cancer an overview of genetic ... [17] Anaplastic thyroid carcinoma: Biology, pathogenesis, prognostic factors, and ... [18] Characterization of the mutational landscape of anaplastic thyroid cancer via ... [19] 3D cell culture: A review of current approaches and ... [20] Controlled release of paclitaxel from a self-assembling peptide hydrogel formed ... [21] 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer ... [22] Genetic alterations in the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway ... [23] Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying ... [24] Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell ... [25] Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular ... [26] Dual inhibition of HDAC and EGFR signaling with CUDC-101 induces ... [27] Antisense-miR-21 enhances differentiation/apoptosis and reduces cancer ... [28] Essential genes in thyroid cancers: Focus on ... [29] Genetic mutations in the treatment of anaplastic thyroid ...

تعیین اثر سمیت داروی مهارکننده رقابتی ATP در سرطان آناپلاستیک تیروئید براساس مشخصات سلولی بر پایه روش کشت سه‌بعدی

هیلتا صمیمی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

وحید حق‌پناه MD, PhD

مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

شیوا ایرانی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پرویز فلاح PhD

گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، تهران، ایران

احسان عارفیان PhD

گروه میکروپزشکی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مسعود سلیمانی PhD

گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: سیستم‌های کشت سه‌بعدی به دلیل شباهت‌های مورفولوژیکی به "محیط زنده" اهمیت بسیاری در حوزه مطالعات داروهای ضدسرطان دارند. در این مقاله سعی بر آن است که میزان سمیت داروی BI-847325 روی کشت سه‌بعدی دو رده سلولی متفاوت سرطان آناپلاستیک سنجیده شود و پیامد آن به‌عنوان یکی از اهداف یافتن تفاوت در میزان پاسخ‌دهی بر مبنای مشخصات سلول‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پس از آماده‌سازی داربست آلژینات، دو رده سلولی سرطان آناپلاستیک تیروئید C643 و SW1736 انکپسوله و به مدت یک هفته کشت شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول‌ها روی داربست، ارزیابی توانایی زنده ماندن سلول‌ها در حضور دوزهای مختلف (۱ تا ۶۴ میکرومولار) داروی BI-847325 توسط تست ۳- (۴ و ۵ دی‌متیل‌تيازول-۲-وای ال)- ۲ و ۵- دی‌فنیل‌تترازولیم‌پروماید (MTT) به عمل آمد. به منظور بررسی و مقایسه تکثیر سلول‌ها در دوز موثر دارو، پس از ۲۴ ساعت از اثر دارو در غلظت مربوطه برای هر یک از رده‌های سلولی رنگ‌آمیزی توسط کربوکسی‌فلورسئین ان- هیدروکسی‌سوکسینیمیدیل استر (CFSE) انجام شد.

یافته‌ها: اثر سمیت داروی BI-847325 در رده‌های مختلف سرطان آناپلاستیک تیروئید متفاوت است. دوز موثر دارو پس از گذشت ۲۴ ساعت برای رده C643 در ۲۵ میکرومولار و در مورد رده SW1736 در ۴۳ میکرومولار محاسبه شد. رنگ‌آمیزی توسط CFSE و مقایسه تکثیر سلول‌ها در دوز موثر دارو، یافته فوق را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: در مجموع، مطالعه حاضر نشان داد که اثر سمیت دارو در رده‌های مختلف سرطان آناپلاستیک تیروئید متفاوت است. اهمیت این موضوع در کنار توجه به مطالعات کشت سه‌بعدی می‌تواند محققان را در طراحی مطالعات تکمیلی بعدی در جهت دستیابی به مناسب‌ترین دارو با تأثیرگذارترین دوز کمک کند.

کلیدواژه‌ها: سرطان آناپلاستیک تیروئید، تکنیک کشت سلولی، تست غربالگری دارو

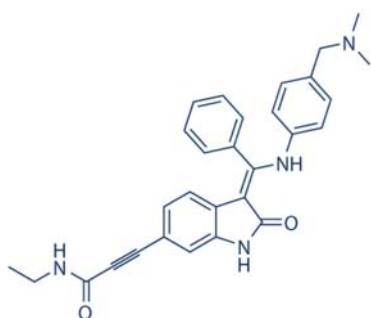
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۲

*نویسنده مسئول: soleim_m@modares.ac.ir

مقدمه

به‌طور کلی، سرطان تیروئید شایع‌ترین سرطان دستگاه غدد درون‌ریز به شمار می‌رود. از این میان، سرطان آناپلاستیک تیروئید حدود ۵-۲٪ موارد را به خود اختصاص داده و از نظر بالینی به شکل توده‌ای با رشد سریع ظاهر می‌کند. از این رو یکی از بدخیم‌ترین سرطان‌ها به شمار رفته و مبتلایان به‌طور متوسط بین ۶ تا ۸ ماه پس از مراجعه، به علت پیشرفت سریع بیماری فوت می‌کنند [1]. متأسفانه داروهای مورد استفاده نظیر داکسوروبیسیکس به‌علت هدمندنبودن نقش محدودی در درمان داشته و مرگ‌ومیر ناشی از این سرطان علی‌رغم پیشرفت‌های حوزه تشخیص و درمان همچنان به‌عنوان یکی از چالش‌های مهم در سراسر دنیا مطرح است. داروهای هدمند سرطان با تداخل در عملکرد مولکول‌های موثر در رشد و پیشرفت تومور، مانع از گسترش و رشد آن می‌شوند [1, 2]. افزایش دانش ژنتیکی، مولکولی و سلولی از فرآیند کارسینوزن در کنار علوم نوین در سال‌های اخیر، چندین داروی جدید را پیش روی نهاده است که با توجه به دخالت چندین مسیر در ایجاد سرطان، به‌طور همزمان بیش از یک هدف مولکولی را برای درمان تعدیل می‌کنند و به این ترتیب میزان خطر برهم‌کنش‌های دارویی و اثرات جانبی آنها را کاهش داده و از طرف دیگر نیز می‌توانند براساس تغییرات ژنتیکی هر فرد، منحصر به خود شخص باشند که از آن جمله می‌توان به داروی BI-847325 اشاره کرد [3-5]. این ترکیب به‌عنوان یک مهارکننده دوگانه آروراکیناز و MEK با مهار مسیر پیام‌رسانی MAPK و همچنین آرورا کینازهای A، B و C سبب کاهش تکثیر سلولی، مقاومت دارویی، رگ‌زایی و متاستاز شده و از طرف دیگر با القای آپوپتوز موجب درمان کارآمدتر سرطان و پیش‌آگهی بهتر آن می‌شود [3, 6-9]. شکل ۱ ساختار شیمیایی این دارو را نشان می‌دهد.



شکل ۱) ساختار شیمیایی داروی

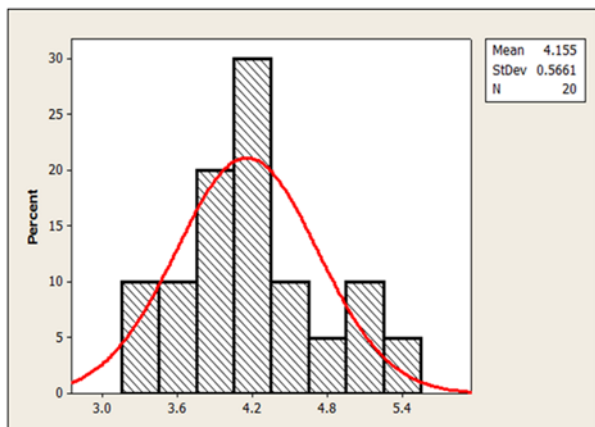
روش‌های رایج کشت سلول در دو بعد در بسیاری از زمینه‌ها ناکارآمد است زیرا با توجه به استفاده از بستر پلاستیکی، سلول‌ها تلاش می‌کنند تا حد امکان خود را پخش کنند. از طرف دیگر بسیاری از داروها در سیستم کشت دو بعدی در محیط "درون شیشه" موفق عمل کرده ولی در شرایط سه‌بعدی "محیط زنده" به دلیل تفاوت‌های مورفولوژی پاسخ متفاوتی ایجاد می‌کنند [10, 11]. انواع مختلفی از داربست‌ها برای کشت سه‌بعدی سلول‌ها وجود دارد. یکی از

به مدت ۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شد. سپس محصول احیای MTT در میتوکندری سلول‌ها که کریستالی تحت عنوان فورمازان است در 200 میکرولیتر دی‌متیل‌سولفواکساید (DMSO) حل شد. در نهایت جذب هر چاهک توسط دستگاه الیزریدر مدل ELx800 (BioTek؛ ایالات متحده آمریکا) در طول موج 570 نانومتر خوانده شد.

بررسی تکثیر سلول‌ها در دوز موثر دارو: به منظور بررسی و مقایسه تکثیر سلول‌ها در دوز موثر دارو پس از شست‌وشو کپسول‌ها با PBS، از رنگ‌آمیزی توسط کریوکسی‌فلورسئین ان-هیدروکسی‌سوکسینیمیدیل استر (CFSE؛ اینوپتروژن؛ ایالات متحده آمریکا) استفاده شد و پس از 24 ساعت از اثر دارو در غلظت مربوطه برای هر یک از رده‌های سلولی C643، 25 میکرومولار و SW1736، 43 میکرومولار توسط میکروسکوپ فلورسنت مدل TE2000-S (Nikon؛ ژاپن) عکس‌برداری صورت گرفت. **آنالیز آماری:** به منظور آنالیز آماری نتایج تست MTT از رگرسیون غیرخطی نرم‌افزار GraphPad Prism 5 استفاده شد.

یافته‌ها

تعیین سائز کپسول‌های آلژینات: طبق نتایج حاصل از اندازه‌گیری سائز کپسول‌ها با استفاده از نرم‌افزار آنالیز تصویر [ImageJ، میانگین سائز (قطر) کپسول‌های ساخته‌شده (با احتساب یک واحد انحراف معیار) برابر با 4.155 ± 0.561 میلی‌متر بود (نمودار ۱).



نمودار ۱) نمودار هیستوگرام توزیع سائز (قطر) کپسول‌های آلژینات

بررسی سمیت دارو: به منظور بررسی میزان سمیت داروی BI-847325، رده‌های سلولی C643 و SW1736 به مدت 24 ساعت پس از مداخله با غلظت‌های مختلف دارو مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۲). محاسبات آماری نشان داد که اثر سمیت دارو در رده‌های مختلف سرطان آناپلاستیک تیروئید به‌طور چشمگیری متفاوت است. دوز موثر دارو پس از گذشت 24 ساعت برای رده C643 در 25 میکرومولار و در مورد رده SW1736 در 43 میکرومولار تعیین شد (نمودار ۲).

بررسی تکثیر سلول‌ها در دوز موثر دارو: به منظور بررسی و مقایسه

روش‌های نوین استفاده از کپسول‌های آلژینات است. این کپسول‌ها هم مزایای کشت سوسپانسیون را دارند و هم سلول‌ها روی سطوح متخلخلی که تقلیدی از "محیط زنده" است، رشد می‌کنند [12, 13]. مطالعات انجام‌شده روی سرطان آناپلاستیک تیروئید منجر به جداسازی چندین رده سلولی شده است که هر کدام از آنها پیشینه ژنتیکی مخصوص به خود را دارند [14]. با توجه به این که اکثریت تغییرات ژنتیکی رخ داده در سرطان آناپلاستیک تیروئید از جمله موتاسیون در ژن‌های *RAS*، *TKRs* و *BRAF* آثار تومورزایی خود را از طریق مسیر پیام‌رسانی MAPK اعمال کرده و همچنین با در نظر گرفتن این مساله که بیان انکوژن‌های آرورا کینازهای A، B و C در این سرطان افزایش می‌یابد [15-18]، در این مقاله سعی بر آن است که میزان سمیت داروی مهارکننده MEK/Aurora kinase، BI-847325 روی کشت سه‌بعدی دو رده سلولی سرطان آناپلاستیک سنجیده شود و پیامد آن به‌عنوان یکی از اهداف پزشکی مبتنی بر فرد مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

کشت سه‌بعدی سلول‌ها

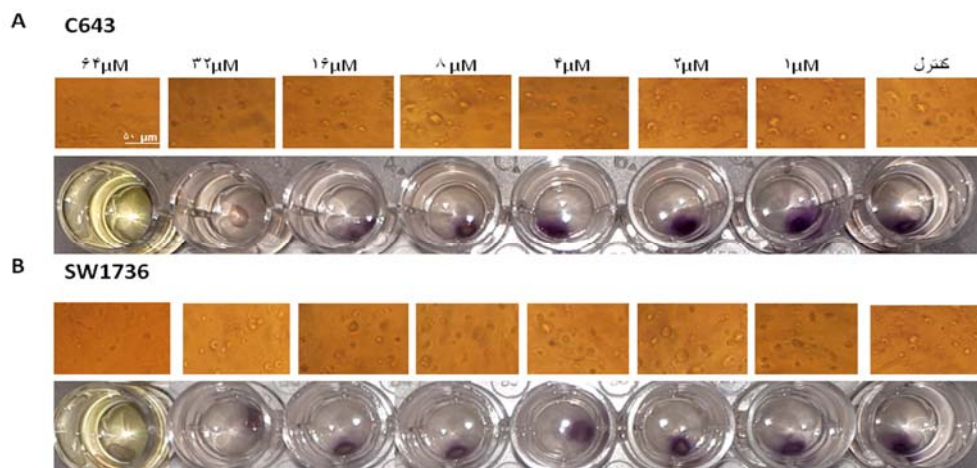
محلول آلژینات با حل کردن $1/2$ گرم از پودر سدیم آلژینات (سیگما؛ ایالات متحده آمریکا) در 100 میلی‌لیتر بافر HEPES (HEPES 155 میلی‌مولار + 20 میلی‌مولار سدیم کلرید؛ مرک؛ آلمان) تهیه شد. سلول‌های C643 و SW1736 به‌منظور تهیه سوسپانسیون سلول-آلژینات مورد استفاده قرار گرفتند. به این ترتیب که یک میلی‌لیتر از محلول آلژینات به پلیت سلولی محتوی 2×10^4 سلول اضافه و دوباره مخلوط‌سازی سلول‌ها انجام شد. کپسول‌های آلژینات از طریق تزریق مخلوط سلول-آلژینات توسط یک سرنگ 22G تولید شدند. به مدت 10 دقیقه اجازه داده شد تا کپسول‌ها در محلول کلسیم کلرید (102 میلی‌مولار؛ مرک؛ آلمان) پلیمریزه شوند. در مرحله بعد، پس از خروج کلسیم کلرید، کپسول‌ها چند مرتبه با PBS شست‌وشو و سپس با محیط RPMI 1640 و 10% FBS جایگزین شدند. محیط کشت هر دو روز یک‌بار مورد تعویض قرار گرفت.

بررسی سائز کپسول‌های آلژینات: به منظور بررسی سائز کپسول‌های آلژینات، 20 عدد از آنها درون پتری‌دیش قرار داده شده و با دوربین Leica M-D (لایکا؛ آلمان) مورد عکس‌برداری قرار گرفت. تصویر حاصل با استفاده از نرم‌افزار ImageJ (NIH) مورد پردازش قرار گرفت و سائز (قطر) کپسول‌ها اندازه‌گیری و در نهایت نمودار توزیع سائز با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 ترسیم شد.

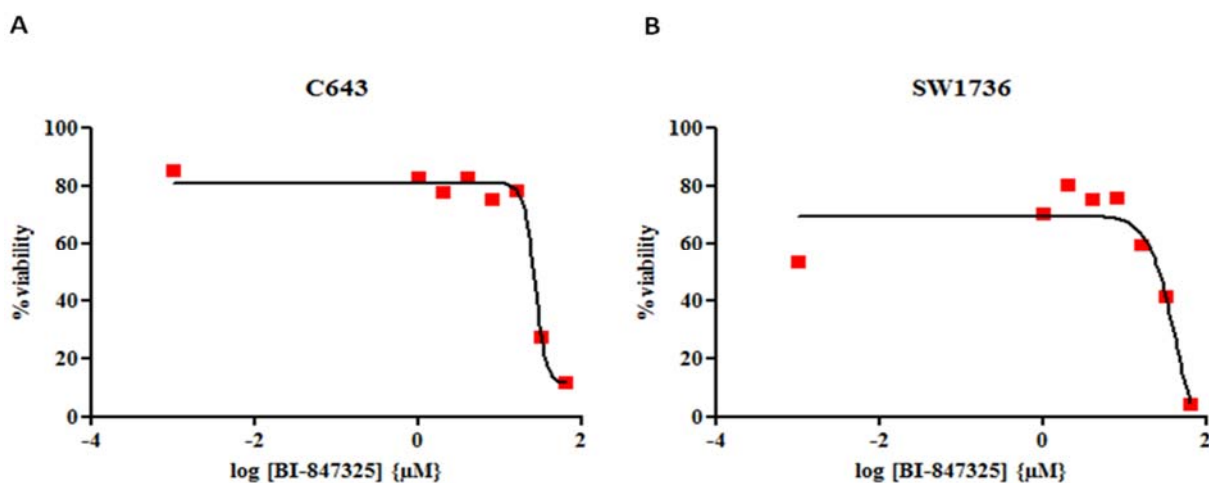
بررسی سمیت دارو: ارزیابی توانایی زنده ماندن سلول‌ها توسط تست MTT بررسی شد. سلول‌های C643، SW1736 به مدت 24 ساعت پس از مداخله با غلظت‌های مختلف دارو BI-847325 (Adooq Bioscience؛ ایالات متحده آمریکا) مورد بررسی قرار گرفتند. سپس 200 میکرولیتر از محلول MTT که حاوی 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ماده شیمیایی ۳- (۴ و ۵ دی‌متیل‌تيازول-۲-وای ال)- ۲ و ۵- دی‌فنیل‌تترازولیم بروماید (MTT) است، روی سلول‌ها اضافه و

CFSE انجام شد که نشان‌دهنده کاهش قابل توجه تکثیر سلول‌ها در دوز تعیین شده است (شکل ۳).

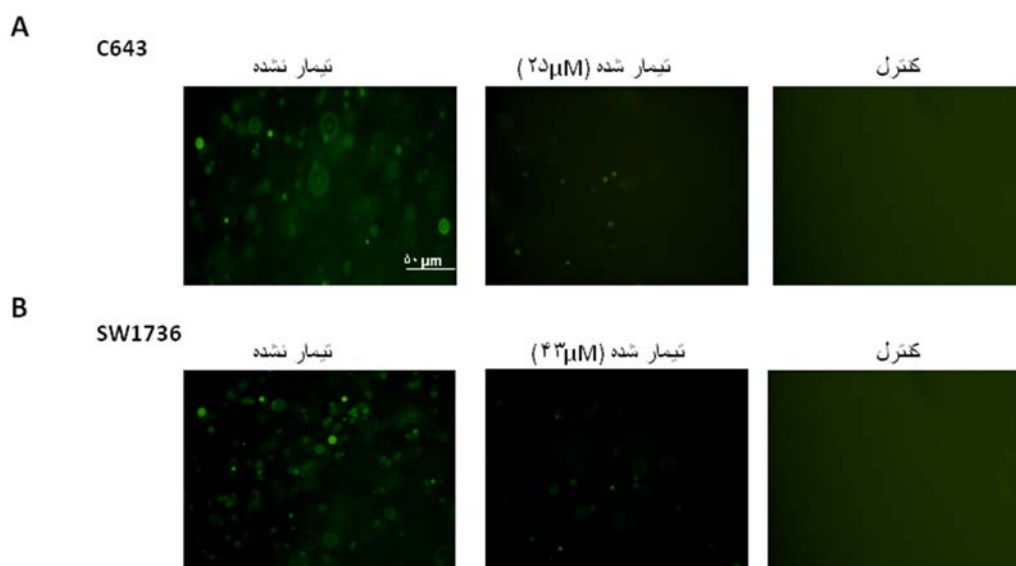
تکثیر سلول‌ها در دوز موثر دارو، پس از ۲۴ ساعت از اثر دارو در غلظت مربوطه برای هر یک از رده‌های سلولی رنگ‌آمیزی توسط



شکل ۲) اثر سمیت داروی BI-847325 روی بقا و تست MTT رده‌های سلولی سرطان آناپلاستیک تیروفید؛ رده‌های سلولی (A) C643 و (B) SW1736. ۲۴ ساعت پس از مداخله با غلظت‌های نشان داده‌شده با یک میکروسکوپ معکوس و بزرگ‌نمایی $\times 10$ مورد عکس‌برداری قرار گرفتند.



نمودار ۲) مقایسه درصد سلول‌های زنده ۲۴ ساعت پس از مداخله در غلظت‌های مختلف دارو در مورد رده‌های سلولی (A) C643 و (B) SW1736



شکل ۳) مقایسه میزان تکثیر سلول‌ها در دوز موثر دارو، پس از ۲۴ ساعت از اثر دارو در غلظت مربوطه برای هر یک از رده‌های سلولی (A) C643 (۲۵ میکرومولار) و (B) SW1736 (۴۳ میکرومولار) توسط رنگ‌آمیزی CFSE با بزرگ‌نمایی $\times 10$

بیش از ۴۰ سال است که توجه روی گسترش سامانه‌های دارورسانی متمرکز شده است. هدف از طراحی این سامانه‌ها افزایش اثر دارو و کاهش عوارض جانبی آن است. هیدروژل‌ها از جمله آلزینات پلیمرهای شبکه‌ای هستند که در دارورسانی استفاده می‌شوند [19]. از هیدروژل‌ها برای رهایش داروها استفاده می‌شود. به عنوان مثال، در سرطان تخمدان از هیدروژل بارگذاری شده با داروی پاکلی تاکسل برای درمان بهره گرفته شده است [19-21].

مطالعات انجام شده روی سرطان آناپلاستیک تیروئید منجر به جداسازی چندین رده سلولی شده است که هر کدام از آنها پیشینه ژنتیکی مخصوص به خود را دارند [14]. در این مطالعه میزان سمیت داروی مهارکننده MEK/Aurora kinase، BI-847325، روی کشت سه‌بعدی دو رده سلولی متفاوت سرطان آناپلاستیک C643 و SW1736 بررسی شد. تنوع ژنتیکی این رده‌های سلولی در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق مطالعات اکثر تغییرات ژنتیکی در سرطان آناپلاستیک تیروئید آثار تومورزایی خود را از طریق دو مسیر پیام‌رسانی MEK/ERK و PI3K/Akt اعمال می‌کنند [14, 16-18]. فعالیت این مسیرهای پیام‌رسانی یک سازوکار مشترک و مهم در پیدایش و پیشرفت سرطان است.

جدول ۱) مقایسه پیشینه ژنتیکی دو رده سلولی سرطان آناپلاستیک تیروئید

ژن	رده سلولی	SW1736	C643
EGFR	-	+	-
H-RAS	-	+	-
K-RAS	-	-	-
N-RAS	-	-	-
BRAF	+	-	-
PTEN	-	+	+
THRB	-	+	+
mTOR	-	-	-
PI3KCA	+	-	-
PIK3CB	+	-	-
PIK3CG	-	-	-
PIK3R1	+	+	+
PIK3R2	+	+	+
P53	+	-	-
MET	+	-	-
مراجع	[23, 24, 27]	[7, 22-26]	

مکانیزم‌های مولکولی که منجر به بروز چنین تنوعی بین رده‌های سلولی مشتق شده از سرطان آناپلاستیک تیروئید می‌شوند، به طور کامل شناخته نشده‌اند، با این حال بررسی آنها نشان می‌دهد که عموماً وقوع ۶ تا ۷ جهش در پروتئین‌های مختلف، طی دوره ۲۰ تا ۴۰ سال به منظور القای رشد تومور ضروری است [16]. اطلاعات حاصل از مطالعات نشان داده است که پیشرفت تدریجی از سلول طبیعی به سلول نئوپلاستیک در فرآیند ایجاد تومور، در نتیجه وقایع

ژنتیکی پشت سر هم است که از آن جمله می‌توان به جهش‌های رخ داده در تعدادی از پروتئین‌ها از جمله RAS و BRAF اشاره کرد که مسیر پیام‌رسانی MAPK را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در مواردی از سرطان تیروئید که جراحی یا ید رادیواکتیو موثر نیست مثل سرطان آناپلاستیک تیروئید، شیمی‌درمانی به عنوان یک روش جایگزین انتخاب می‌شود. متأسفانه داروهای مورد استفاده نظیر داکسوروبیسین، متوترکسات و سیس‌پلاتین نقش محدودی در درمان داشته و مرگ و میر ناشی از این سرطان علی‌رغم پیشرفت‌های تشخیصی و درمانی همچنان به عنوان یکی از چالش‌های مهم در سراسر دنیا مطرح است زیرا مطالعات شیمی‌درمانی نشان داده است که این داروها به واسطه وجود مکانیزم‌های مقاومت دارویی فقط پاسخی در حد ۳۰٪ ایجاد می‌کند. بسیاری از سرطان‌ها در طی درمان با داروهای شیمی‌درمانی نسبت به اثرات داروی مورد استفاده مقاوم می‌شوند. مکانیزم‌های مختلفی در ارتباط با مقاومت دارویی پیشنهاد شده است. یکی از مهم‌ترین دلایل مقاومت به دارو و بالاتر بودن دوز موثر داروها در سرطان‌ها جهش در ژن BRAF است. جهش‌های BRAF شایع‌ترین ناهنجاری ژنتیکی مرتبط با مقاومت به درمان در سرطان تیروئید محسوب می‌شود و بین ۵۰-۸۰٪ افراد مبتلا به سرطان آناپلاستیک تیروئید گزارش شده است. در ۹۸٪ موارد، این جهش‌ها مربوط به تغییر باز آلی تیمین به آدنین در نوکلئوتید ۱۷۹۶ است [28, 29]. همین عامل سبب می‌شود که اثر سمیت داروی BI-847325 در دو رده سلولی مورد بررسی متفاوت باشد. دوز موثر دارو پس از گذشت ۲۴ ساعت برای رده سلولی C643 در ۲۵ میکرومولار و در مورد رده سلولی SW1736 در ۴۳ میکرومولار محاسبه شد. این تفاوت‌های ژنتیکی را می‌توان با استفاده از آزمایشات مولکولی مورد ارزیابی قرار داد تا در کنار روش‌های نزدیک‌تر به شرایط "درون شیشه" به منظور مطالعات فاماکولوژی و یافتن مناسب‌ترین دارو با تأثیرگذارترین دوز موثر واقع شود.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر، بررسی اثر سمیت دارو پس از ۲۴ ساعت از کشت رده‌های سلولی با پیشینه ژنتیکی متفاوت است. اهمیت این مطالعه در کنار توجه به سیستم‌های کشت سه‌بعدی می‌تواند محققان را در طراحی مطالعات تکمیلی بعدی در فواصل زمانی بیشتر به منظور دستیابی به مناسب‌ترین دارو با تأثیرگذارترین دوز کمک کند.

پیشنهاد می‌شود به منظور ارتقای سطح نتایج به دست آمده و بررسی قابلیت شبیه‌سازی سیستم‌های کشت سه‌بعدی، این مطالعه روی مدل‌های حیوانی نیز صورت گرفته و پیامدهای آن در سطوح بالاتری سنجیده شود.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که اثر سمیت دارو در رده‌های مختلف سرطان آناپلاستیک تیروئید متفاوت است. اهمیت این موضوع در کنار توجه به مطالعات کشت سه‌بعدی می‌تواند محققان را در

- 10- Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: State of the art. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14(1):61-86.
- 11- Dhiman HK, Ray AR, Panda AK. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials*. 2005;26(9):979-86.
- 12- Godugu Ch, Patel AR, Desai U, Andey T, Sams A, Singh M. Algimatrix™ based 3D cell culture system as an in-vitro tumor model for anticancer studies. *PLoS One*. 2013;8(1):e53708.
- 13- Smith BH, Gazda LS, Conn BL, Jain K, Asina S, Levine DM, et al. Three-dimensional culture of mouse renal carcinoma cells in agarose macrobeads selects for a subpopulation of cells with cancer stem cell or cancer progenitor properties. *Cancer Res*. 2011;71(3):716-24.
- 14- Onoda N, Nakamura M, Aomatsu N, Noda S, Kashiwagi S, Hirakawa K. Establishment, characterization and comparison of seven authentic anaplastic thyroid cancer cell lines retaining clinical features of the original tumors. *World J Surg*. 2014;38(3):688-95.
- 15- Nagayama Y, Yokoi H, Takeda K, Hasegawa M, Nishihara E, Namba H, et al. Adenovirus-mediated tumor suppressor p53 gene therapy for anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(11):4081-6.
- 16- Reddi HV, Kumar A, Kulstad R. Anaplastic thyroid cancer an overview of genetic variations and treatment modalities. *Adv Genom Genet*. 2015;2015(5):43-52.
- 17- Are Ch, Shaha AR. Anaplastic thyroid carcinoma: Biology, pathogenesis, prognostic factors, and treatment approaches. *Ann Surg Oncol*. 2006;13(4):453-64.
- 18- Kunstman JW, Juhlin CC, Goh G, Brown TC, Stenman A, Healy JM, et al. Characterization of the mutational landscape of anaplastic thyroid cancer via whole-exome sequencing. *Hum Mol Genet*. 2015;24(8):2318-29.
- 19- Haycock JW. 3D cell culture: A review of current approaches and techniques. In: Haycock JW, editor. *3D cell culture: Methods and protocols*. Totowa: Humana Press; 2011. pp. 1-15.
- 20- Liu J, Zhang L, Yang Z, Zhao X. Controlled release of paclitaxel from a self-assembling peptide hydrogel formed in situ and antitumor study in vitro. *Int J Nanomed*. 2011;6:2143-53.
- 21- Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm JM, Krek W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;69-70:29-41.
- 22- Liu D, Hou P, Liu Z, Wu G, Xing M. Genetic alterations in the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway confer sensitivity of thyroid cancer cells to therapeutic targeting of Akt and mammalian target of rapamycin. *Cancer Res*. 2009;69(18):7311-9.
- 23- Pilli T, Prasad KV, Jayarama Sh, Pacini F, Prabhakar BS. Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19(12):1333-42.
- 24- Schweppe RE, Klopfer JP, Korch C, Pugazhenth U, Benezra M, Knauf JA, et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4331-41.
- 25- Meireles AM, Preto A, Rocha AS, Rebocho AP, Máximo V, Pereira-Castro I, et al. Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell

طراحی مطالعات تکمیلی بعدی در جهت دستیابی به مناسب‌ترین دارو با تاثیرگذارترین دوز کمک کند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله از خانم زهر/گوهری به‌منظور کمک بی‌دریغشان قدردانی می‌نمایند.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: هیلدا صمیمی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ وحید حق‌پناه (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ شیوا ایرانی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ پرویز فلاح (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی/روش‌شناس (۱۰٪)؛ احسان عارفیان (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ مسعود سلیمانی (نویسنده پنجم)، روش‌شناس (۱۰٪)

منبع مالی: این پژوهش با حمایت مالی پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات و فناوری بن‌یاخته انجام شده است.

منابع

- 1- Denaro N, Nigro CL, Russi EG, Merlano MC. The role of chemotherapy and latest emerging target therapies in anaplastic thyroid cancer. *Onco Targets Ther*. 2013;9(1):1231-41.
- 2- Perri F, Pezzullo L, Chiofalo MG, Lastoria S, Di Gennaro F, Scarpato GD, et al. Targeted therapy: A new hope for thyroid carcinomas. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;94(1):55-63.
- 3- Rusconi P, Caiola E, Brogini M. RAS/RAF/MEK inhibitors in oncology. *Curr Med Chem*. 2012;19(8):1164-76.
- 4- Patel JN. Cancer pharmacogenomics, challenges in implementation, and patient-focused perspectives. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2016;9:65.
- 5- Smith N, Nucera C. Personalized therapy in patients with anaplastic thyroid cancer: Targeting genetic and epigenetic alterations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(1):35-42.
- 6- Liu D, Xing J, Trink B, Xing M. BRAF mutation-selective inhibition of thyroid cancer cells by the novel MEK inhibitor RDEA119 and genetic-potentiated synergism with the mTOR inhibitor temsirolimus. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2965-73.
- 7- Liu D, Xing M. Potent inhibition of thyroid cancer cells by the MEK inhibitor PD0325901 and its potentiation by suppression of the PI3K and NF- κ B pathways. *Thyroid*. 2008;18(8):853-64.
- 8- McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul*. 2006;46(1):249-79.
- 9- Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf CR, Long J, Laidler P, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(3):192-222.

state on anaplastic thyroid cancer. *Tumor Biol.* 2016;37(1):1299-308.

28- Samimi H, Zaki Dizaji M, Ghadami M, Shahzadeh Fazeli A, Khashayar P, Soleimani M, et al. Essential genes in thyroid cancers: Focus on fascin. *J Diabetes Metab Disord.* 2013;12(1):32.

29- Guerra A, Di Crescenzo V, Garzi A, Cinelli M, Carlomagno Ch, Tonacchera M, et al. Genetic mutations in the treatment of anaplastic thyroid cancer: A systematic review. *BMC Surg.* 2013;13(Suppl 2):S44.

carcinoma-derived cell lines. *Thyroid.* 2007;17(8):707-15.

26- Zhang L, Zhang Y, Mehta A, Boufraquech M, Davis S, Wang J, et al. Dual inhibition of HDAC and EGFR signaling with CUDC-101 induces potent suppression of tumor growth and metastasis in anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget.* 2015;6(11):9073-85.

27- Haghpanah V, Fallah P, Tavakoli R, Naderi M, Samimi H, Soleimani M, et al. Antisense-miR-21 enhances differentiation/apoptosis and reduces cancer stemness