

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

محسن حسین‌زاده¹، عبدالله الله‌وردی^{*1}

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

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

تاریخ پذیرش: 1402/4/14

تاریخ دریافت: 1402/1/11

چکیده

بررسی ویژگی‌های بیومکانیکی سلول‌های سرطانی برای پیشرفت در درمان و شناخت بهتر سرطان ضروری است. بیشتر پژوهش‌های انجام شده در سال‌های پیشین بر سلول‌های کشت شده به صورت دوبعدی انجام شده است. درحالی‌که مطالعه سلول‌های کشت شده در حالت سه‌بعدی به دلیل رشد سلول‌ها در همه ابعاد و همچنین وجود اتصال‌های سلول-سلول و سلول-سلول-ماتریکس خارج سلولی نسبت به کشت دوبعدی برتری دارد. کشت سه‌بعدی سلول در مقایسه 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 محدود بودن 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 تشکیل شده تحت تأثیر تاکسول به عنوان داروی ضداسکلت سلولی قرار گرفتند و با تصویربرداری از آنها در مدت زمان مشخص، میزان زنده‌مانی آنها بررسی شد. در نهایت برای به دست آوردن پارامترهای بیومکانیکی، سطح بیرونی آنها به وسیله 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. در این حالت، 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. به طور 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.

1- مقدمه

مشخص شده است که خواص مکانیکی سلول‌ها با بسیاری از رفتارهای بیولوژیکی مهم سلول‌ها از جمله چسبندگی، تقسیم، تحرک¹، تمایز و تغییر شکل² مرتبط است. از این رو، بررسی خواص مکانیکی سلول‌ها از جمله سفتی³ آنها در سال‌های پیشین مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است [2:1]. براساس یافته‌های انجام‌شده روی سلول‌های سرطانی منفرد کشت داده‌شده به صورت دوبعدی نشان داده شده است که این سلول‌ها مدول یانگ کمتری در مقایسه با سلول‌های طبیعی دارند، به گونه‌ای که 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 اتمی⁴) بیشتر با استفاده از سلول‌های منفرد کشت داده‌شده به صورت دوبعدی انجام شده است [6]. آسانی نسبی و استانداردسازی شدن پروتکل‌های کشت سلولی دوبعدی از دلایل تمایل پژوهشگران به این روش است. با این حال، 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. در نتیجه حالت مکانیکی غیرطبیعی ایجاد می‌کنند [9]. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که الگوهای بیان ژن و پروتئین برای سلول‌های رشد پیدا کرده در تک‌لایه‌های چسبده دوبعدی به طور چشمگیری با آنچه که از همان سلول‌ها در داخل بدن مشاهده می‌شود، متفاوت است. از این رو کشت سه‌بعدی سلول می‌تواند به عنوان 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 به طور کلی به دو دسته بر پایه داربست یا بدون داربست طبقه‌بندی کرد. روش‌های بدون داربست به طور 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 زائد و ایجاد جریان پویا در محیط، منجر به کشت طولانی‌مدت سلول‌ها با درجه زنده‌مانی بالا می‌شوند. همچنین تعدادی از سنجش‌های مشخصه‌یابی⁵ مانند رنگ‌آمیزی سلول زنده/مرده⁶، آزمایش دارو و سنجش تحرک‌های 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

میکروفلوئیدی به وسیله 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 روبشی¹، میکروسکوپ الکترونی عبوری² 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 تجزیه و تحلیل منحنی‌های نیرو که وابستگی نیروی اعمال‌شده به عمق فرورفتگی را توصیف می‌کنند، مدول یانگ محلی³ یک نمونه محاسبه می‌شود [17]. هدف از این مطالعه، کشت سه‌بعدی سلول‌های سرطان سینه انسانی (MCF-7) به‌صورت سه‌بعدی در بستر میکروفلوئیدیک و تولید اسفروئید با قطرهای متفاوت است. سپس اثر داروی تاکسول بر خصوصیات مکانیکی نظیر مدول سانگ، استحکام و ریخت‌زایی در اسفروئیدها مطالعه شدند.

2- مواد و روش‌ها

2-1 طراحی و ساخت تراشه میکروفلوئیدیک

به‌منظور طراحی تراشه از نرم افزار سالدورکس⁴ استفاده شد. ساخت و پرینت طرح موردنظر با دستگاه پرینتر

سه‌بعدی انجام شد. به‌این‌منظور نخست طرح رسم شده در نرم‌افزار سالدورکس به یک فایل با فرمت STL تبدیل شد و سپس فایل STL با نرم‌افزار Repetier-Host به فرمت GCODE تبدیل شد و در نهایت فایل موردنظر به‌وسیله دستگاه پرینتر سه‌بعدی پرینت شد. برای تهیه قالب PDMS، از کیت الاستومر سیلگارد 184 (پلی دی‌متیل سیلوکسان (PDMS) + عامل پخت⁵) 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 مخلوط کردن 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. در نهایت 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

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 $37^{\circ}C$ 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

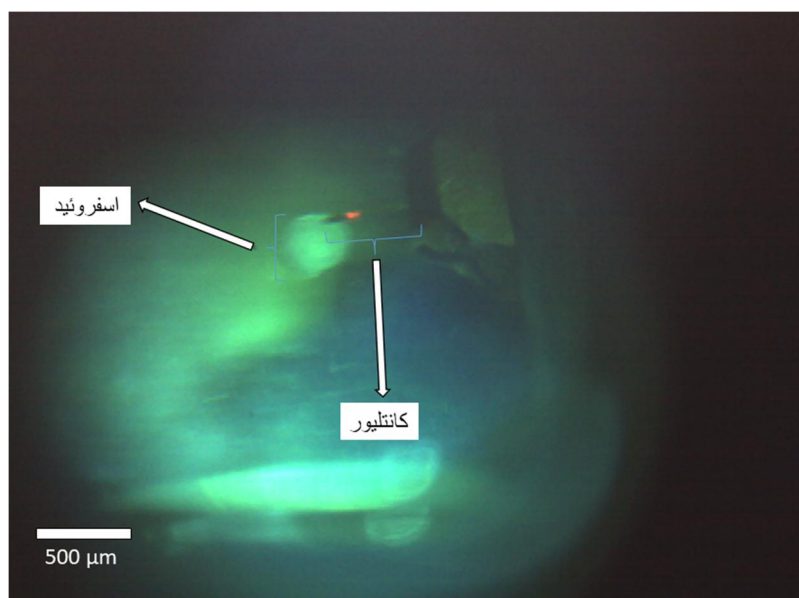
نیروی اتمی

پارامترهای مکانیکی اسفروئیدها در حالت تیمار با دارو و بدون دارو به‌وسیله AFM core Nanosurf (Nanosurf, core AFM Switzerland) در محلول PBS در دمای $37^{\circ}C$ درجه

سانتی‌گراد ارزیابی شد (شکل 1). میکروسکوپ نیروی اتمی، ابزاری مناسب برای بررسی سلول‌های زنده است، به‌گونه‌ای که با اندازه‌گیری دقیق نیروهای کوچک (F) همراه با جابه‌جایی‌های نانومتری را به پارامتر تورفتگی¹ (δ) تبدیل می‌کند. با به‌دست‌آوردن منحنی‌های $F(\delta)$ می‌توان مدول الاستیک را با استفاده از الگوی هرتز تعیین کرد [19]. در این پژوهش تمامی سنجش‌ها با آرایه Force Indentations 64×64 در یک ناحیه 25×25 میکرومتر ارزیابی شدند. درنهایت برای محاسبه پارامترهای مکانیکی از Sphere Hertz مدل و نسبت پواسون² 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



شکل 1 تصویر اسفروئید در دستگاه میکروسکوپ نیروی اتمی

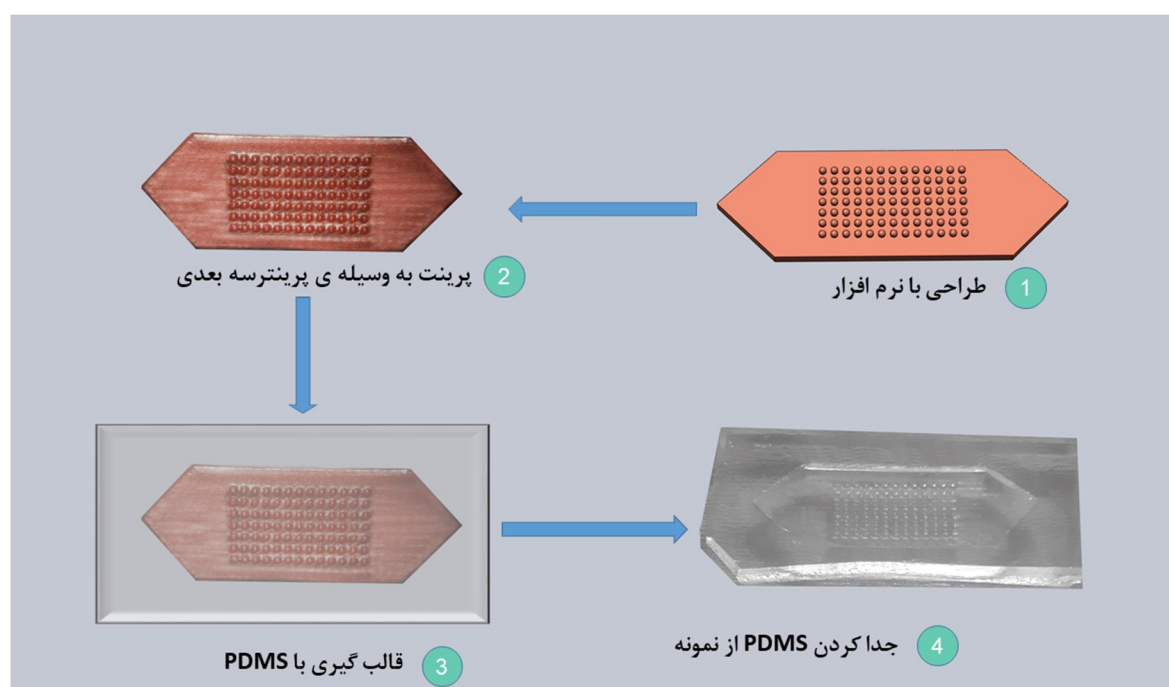
تراشه بیشتر شود، نیروی وارد شده از سیال به اسفروئید بیشتر شده و در نهایت منجر به خروج اسفروئید از درون ریزچاهک می‌شود. برای ایجاد یک بستر با تعداد مشخصی از ریزچاهک از طرح موردنظر با الاستومر PDMS قالب‌گیری شد (شکل 2). سپس به‌منظور ایجاد جریان و تشکیل اسفروئید قالب PDMS به پلکسی گلس متصل شد (شکل 3).

تصویر واقعی از اسفروئید با اندازه تقریباً 300 میکرومتر که در محلول PBS با دمای 37 درجه سانتی‌گراد و همچنین کانتلیور تنظیم شده 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 ریزچاهک¹ 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 خارج کردن اسفروئیدها از تراشه است به‌گونه‌ای که وقتی سرعت جریان در داخل

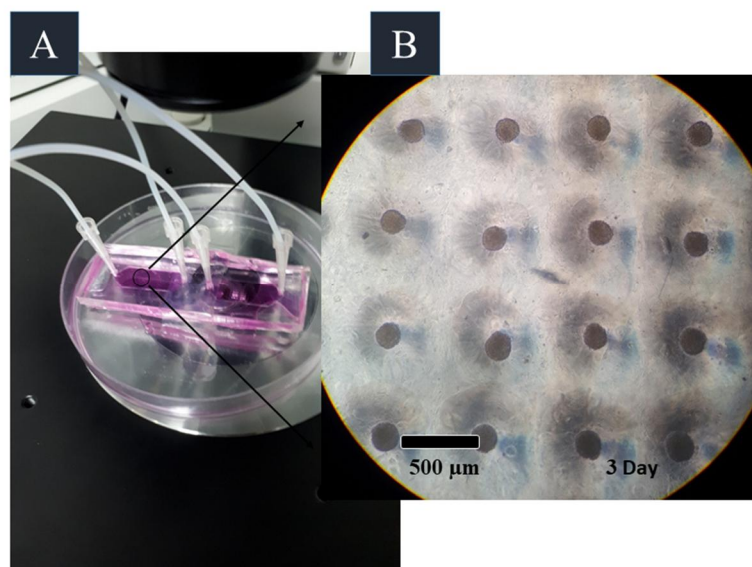
1 Micro well based



شکل 2 مراحل ساخت تراشه میکروفلوئیدی به روش قالب گیری با PDMS

الاستومر PDMS ترکیب شده با عامل پخت که به صورت مذاب است، روی تراشه قرار می گیرد و سپس برای ایجاد اتصالات عرضی (پخت شدن) در دمای 65 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت درون آون قرار می گیرد؛ 4- در مرحله چهارم پس از پخت شدن PDMS و تبدیل شدن از حالت مذاب به حالت جامد، می توان قالب PDMS را از طرح پرینت شده جدا کرد. در شکل تصویر واقعی قالب PDMS (که به روش قالب گیری از طرح موردنظر به دست آمده) نشان داده شده است.

1- در مرحله اول نخست طرح موردنظر از تراشه میکروفلوئیدی، با استفاده از نرم افزار سالدورکس رسم شده است. این طراحی شامل ارائه ای 7x13 از نیم کره های برجسته به قطر 0,5 میلی متر است که روی یک کانال بزرگ 10 در 30 میلی متر قرار گرفته شده اند؛ 2- در مرحله دوم با استفاده از پرینتر سه بعدی طرح موردنظر چاپ می شود. در شکل تصویر واقعی از طرح پرینت شده با دستگاه پرینتر سه بعدی نشان داده شده است؛ 3- در مرحله سوم، به منظور قالب گیری از طرح ساخته شده



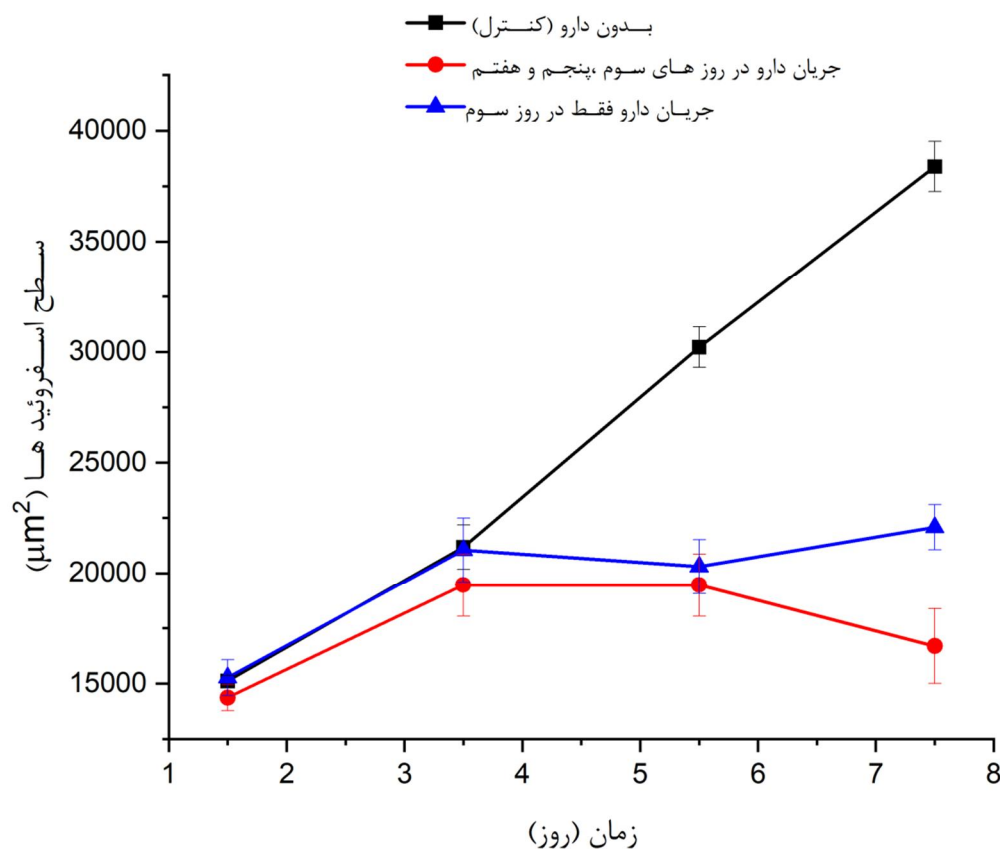
شکل 3 ایجاد جریان و تشکیل اسفروئید در تراشه میکروفلوئیدیک

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 $\mu\text{g/mL}$ $\text{IC}_{50} = 3,24$ 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).

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 ته‌نشین شدن 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.

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

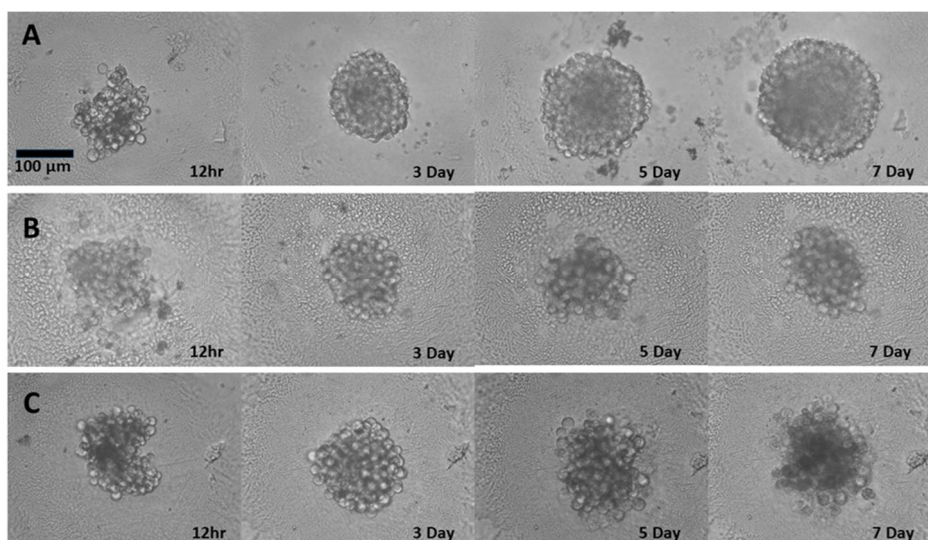
سرعت رشد اسفروئیدها بسته به نوع سلول و شرایط محیطی متفاوت است. یکی از عوامل افزایش سرعت



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

می شود. در نهایت نمودار قرمز که با نماد دایره رسم شده است، مربوط به اسفروئیدهایی است که به صورت مداوم در روزهای سوم، پنجم و هفتم تحت تیمار دارو قرار گرفته اند و نشان می دهد که تیمار دارو در روز سوم منجر به مهار رشد اسفروئیدها در محدوده 19000 میکرومترمربع می شود ولی تیمار دوباره اسفروئیدها در روز پنجم و هفتم منجر به فروپاشی اسفروئیدها و کاهش سطح مؤثر آنها می شود.

نمودار مشکی که با نماد مربع رسم شده است، نشان می دهد که سطح دویعدی اسفروئیدها در حالت کنترل و بدون تیمار دارو به صورت خطی رشد کرده و در طول هفت روز از 15000 میکرومترمربع به 37000 میکرومترمربع افزایش پیدا می کند. نمودار آبی که با نماد مثلث رسم شده است، مربوط به اسفروئیدهایی است که فقط در روز سوم تحت تیمار دارو قرار گرفته اند و نشان می دهد که تیمار اسفروئیدها با دارو در روز سوم منجر به مهار رشد اسفروئیدها در محدوده 21000 میکرومترمربع



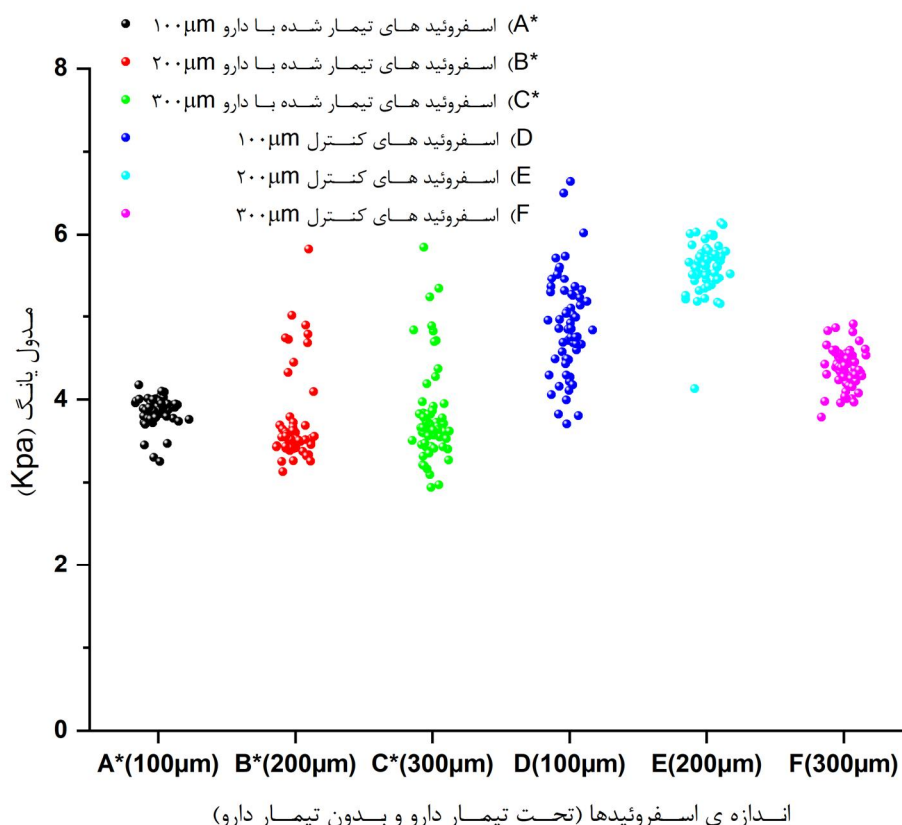
شکل 5 بررسی رشد و مورفولوژی اسفروئیدهای تیمار شده با دوزهای متفاوت از داروی تاکسول در طول 7 روز به صورت کیفی با تصویربرداری به وسیله میکروسکوپ نوری

مستقیمی با سفتی¹ دارد) سست شدن اتصال سلول‌ها و کاهش فشردگی آنها به دلیل اختلال در تولید ماتریکس خارج سلولی و همچنین تأثیر مستقیم دارو بر اسکلت سلولی سلول‌های قرار گرفته در سطح اسفروئید است (شکل 6).

الف - اسفروئید تیمار نشده (کنترل) که در طول هفت روز علاوه بر 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 تیمار شده با یک دوز در روز سوم را نشان می‌دهد. علاوه بر قطر آن مورفولوژی آن نیز تغییر محسوسی نداشته است. ج - اسفروئید تیمار شده 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 کشت شده 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



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

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 شکل¹ اسفروئیدها در شرایط مختلف

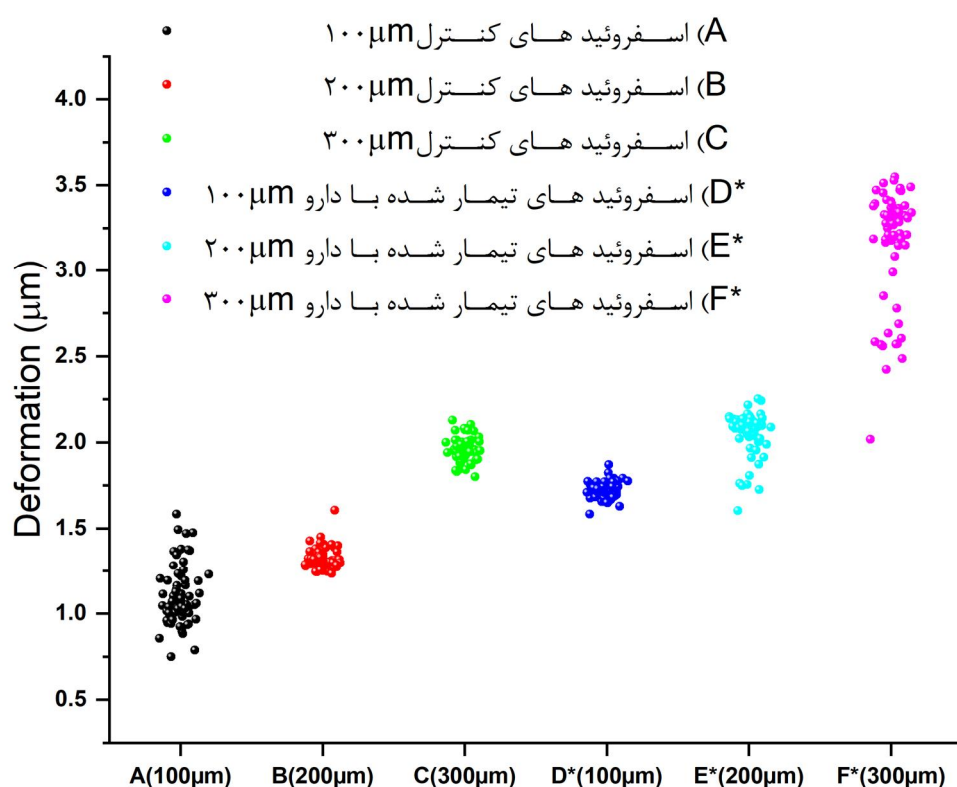
تغییر شکل سلولی که نشان‌دهنده میزان عمق خراش است، معیاری از تمایل سلول‌های موجود در سطح اسفروئید به تغییر شکل فرض می‌شود که می‌تواند به‌عنوان یک پارامتر مؤثر برای بررسی ویژگی‌های

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

1 Deformation

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 در نتیجه 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).

مکانیکی سلول‌ها باشد. نتایج نشان می‌دهد که میزان تغییر شکل در اسفروئیدها رابطه معناداری با اندازه اسفروئیدها و تحت تیمار قرارگرفتن با دارو دارد؛ به‌گونه‌ای که 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 تیمار شده می‌تواند به دلیل سست شدن اتصال سلول - سلول و سلول - ماتریکس خارج سلولی باشد ضمن اینکه کاهش مدول یانگ در اسفروئیدهای تیمار شده نیز در نتایج قبلی نشان داده شده بود. همچنین



اندازه ی اسفروئیدها (تحت تیمار دارو و بدون تیمار دارو)

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

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

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

محدوده 1,75 تا 2 میکرومتر است؛ C^* - تغییر شکل مربوط به اسفروئیدهای با قطر 100 میکرومتر است که تحت تیمار داروی تاکسول قرار گرفته‌اند و مقدار آن در محدوده 1,5 تا 1,75 میکرومتر است. D^* - تغییر شکل مربوط به اسفروئیدهای با قطر 200 میکرومتر است که تحت تیمار داروی تاکسول قرار گرفته‌اند و مقدار آن در محدوده 2 تا 2,25 میکرومتر است؛ F^* - تغییر شکل مربوط به اسفروئیدهای با قطر 300 میکرومتر است که تحت تیمار داروی تاکسول قرار گرفته‌اند و مقدار آن در محدوده 3 تا 3,5 میکرومتر است. به‌طور کلی نتایج 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 به‌گونه‌ای که با افزایش قطر اسفروئیدها مقدار تغییر شکل نیز افزایش پیدا می‌کند. همچنین نتایج نشان می‌دهد که تیمار دارو سبب افزایش مقدار تغییر شکل در اندازه‌های متفاوت از اسفروئیدها می‌شود. (لازم به ذکر است که تمامی اندازه‌ها به‌صورت تقریبی و خطای مثبت و منفی 15 میکرومتر درج شده‌اند).

4- بحث و نتیجه‌گیری

بررسی ویژگی‌های بیومکانیکی سلول‌ها در حالت *In vitro* نشان می‌دهد که سلول‌های کشت داده‌شده در حالت دوبعدی به دلیل مورفولوژی غیرطبیعی و نبود برهمکنش سلول - سلول خصوصیات مکانیکی متفاوتی نسبت به سلول‌ها در حالت سه‌بعدی نشان می‌دهند، برای مثال مدول یانگ سلول‌های MCF7 کشت‌شده به‌صورت دوبعدی بین 0,2 تا 0,8 کیلوپاسکال گزارش شده است [21؛ 22]. در صورتی که در این پژوهش سلول‌های MCF7 کشت‌شده به‌صورت اسفروئید مدول یانگ 2 تا 6 کیلوپاسکال دارند. همچنین براساس پژوهش‌های

انجام‌شده روی آثار داروی تاکسول بر خصوصیات مکانیکی سلول‌های سرطانی نشان داده شده است که تیمار سلول‌های سرطانی با داروی تاکسول سبب افزایش مدول یانگ در آنها می‌شود [3؛ 23]. درحالی‌که در این پژوهش تیمار اسفروئیدها با داروی تاکسول منجر به کاهش مدول یانگ در آنها شده است، علاوه بر آن تیمار سلول‌های سرطانی کشت داده شده به‌صورت دوبعدی با داروی تاکسول نشان داده است که منجر به کاهش تغییر شکل در آنها می‌شود. مطالعات انجام‌شده با میکروسکوپ نیروی اتمی نشان داده است که خصوصیات مکانیکی اسفروئیدها به عوامل مختلفی مثل سفتی ریز محیط آنها و تنظیم بیان ژن وابسته است و در شرایط مختلف دچار تغییر می‌شود به‌گونه‌ای که با افزایش سفتی ریز محیط، سفتی اسفروئیدها نیز افزایش پیدا می‌کند. بنابراین اندازه‌گیری خصوصیات مکانیکی اسفروئیدها می‌تواند در آزمایش‌های غربالگری دارو¹ به‌طور مؤثری کمک‌کننده باشد [18]. در این پژوهش تیمار اسفروئیدها با داروی تاکسول منجر به کاهش مدول یانگ در آنها شده است علاوه بر آن تیمار سلول‌های سرطانی کشت داده‌شده به‌صورت دوبعدی با داروی تاکسول نشان داده است که 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 تغییر شکل بیشتری دارند. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت اتصال‌های سلول - سلول و سلول - ماتریکس خارج‌سلولی نقش تعیین‌کننده‌ای در ویژگی‌های بیومکانیکی سلول‌ها دارند و نبود آنها سبب تغییر در خصوصیات مکانیکی سلول‌ها و همچنین تغییر پاسخ آنها به شرایط مختلف می‌شود. همچنین در این پژوهش نشان داده شده است که خصوصیات بیومکانیکی اسفروئیدها

1 Drug screening

[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.

علاوه بر حساسیت نسبت به تیمار با داروی تاکسول نسبت به تغییرات اندازه اسفروئیدها نیز حساس است. درواقع به دلیل تغییر شرایط فیزیکی و شیمیایی 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 تغییر 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 علاوه بر 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: به این ترتیب 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>

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, Mortezaazadeh S, Sedghi M, Shojaeilangari S, Allahverdi A, Naderi-Manesh H. Microfluidic investigation of the effect 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, Trepas X, Fabry B, Farré R, et al. Microrheology of

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 Hosseinzadeh¹ 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