

## شناسایی و مقایسه ویژگی‌های بنیادینگی سلول‌های سرطانی MDA-MB468 در کشت سه‌بعدی و دو- بعدی

پگاه عبداللهی<sup>۱</sup>، مرضیه ابراهیمی<sup>۲</sup>، نسرين معتمد<sup>۳</sup>، پردیس خسروانی<sup>۴</sup>

۱. کارشناس ارشد، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، تهران، ایران
۲. استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران
۳. دانشیار، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، تهران، ایران
۴. کارشناس ارشد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

## چکیده

**سابقه و هدف:** مطالعات در سرطان سینه بیان‌کننده حضور جمعیتی از سلول‌ها با ویژگیهای سلول‌های بنیادی می‌باشد که نقش مهمی در آغاز، پیشرفت و مقاومت به درمان‌های جاری دارد. از آنجایی که کشت سه‌بعدی در شرایط آزمایشگاهی محیط مناسبی برای مطالعه سلول‌های بنیادی سرطانی در مقابل محیط پیچیده بافتی ایجاد می‌کند، هدف ما در این مطالعه بررسی اثر کشت سه-بعدی بر ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطانی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های MDA-MB468 که به صورت سه‌بعدی و دوبعدی کشت داده شده‌اند تا از نظر قدرت ایجاد کلنی، اسفروئید، بیان مارکرهای سطحی بنیادینگی (CD44, CD133) توسط فلوسایتومتری و همین‌طور بیان ژن‌های بنیادینگی (Aldh, Sox2, Nanog, Oct4, Cmyc) توسط Real time PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** سلول‌های MDA-MB468 که به صورت دوبعدی و سه‌بعدی کشت داده شده بودند تفاوت معناداری از نظر قدرت کلنی-زایی و ایجاد اسفروئید نشان ندادند. کشت سه‌بعدی سبب ایجاد کاهش معناداری در بیان مارکر CD133+ نسبت به کشت دو بعدی شد. (۵۲٫۶۹±۵٫۸۴٪ در کشت سه بعدی در مقابل ۹۸٫۵۵±۰٫۳۴٪ در کشت دو بعدی) در حالی که تفاوت معناداری در بیان CD44+ در این دو نوع کشت مشاهده نشد. همین‌طور کشت سه بعدی سبب سرکوب بیان ژن‌های بنیادینگی شامل Oct4, Nanog, Aldh, Sox2, Cmyc نسبت به کشت دوبعدی شد.

**نتیجه‌گیری:** در مجموع نتایج حاصل از پژوهش انجام شده مؤید این بود که کشت سه‌بعدی که منعکس‌کننده معماری بافتی و شرایط *In vivo* می‌باشد و سبب کاهش ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطانی در رده سلولی MDA-MB468 می‌شود.

**کلمات کلیدی:** سلول‌های بنیادی سرطانی، کشت دوبعدی، کشت سه‌بعدی

## مقدمه

نویسنده مسئول: نسرين معتمد

پست الکترونیکی: Motamed2@khayam.ut.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۶/۰۲

## مواد و روش‌ها

### کشت دو بعدی سلول

رده سلولی MDA-MB468 از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران-ایران) به صورت تک لایه در محیط<sup>۱</sup> DMEM که شامل ۱۰٪ سرم جنین گاو، ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین استرپتومایسین، ۱٪ گلوتامین و ۱٪ آمینواسیدهای غیر ضروری می‌باشد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک اتمسفر مرطوب با غلظت ۵٪ CO<sub>2</sub> کشت داده شد. مواد نام برده شده جهت انجام کشت سلولی از شرکت Gibco (NY-USA) تهیه شد.

### کشت سه‌بعدی سلول

سلول‌هایی که به صورت تک‌لایه کشت داده شده بودند توسط تریپسین از کف ظرف کشت جدا شده و ۵۰۰۰۰ سلول در فلاسک T25 پوشیده شده با پلی‌هما در محیط DMEM که شامل ۱۰٪ سرم جنین گاو، ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین استرپتومایسین، ۱٪ گلوتامین و ۱٪ آمینواسیدهای غیرضروری، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در اتمسفر مرطوب با غلظت ۵٪ CO<sub>2</sub> کشت داده شد. جهت آماده‌سازی پلی‌هما (Sigma-Aldrich) محلول پلی‌هما با غلظت ۱۲۰ گرم در لیتر در اتانول ۹۵٪ تهیه شد و به مدت یک شبانه روز به آن اجازه داده شد تا در دمای ۳۷°C به هم خورده تا این پلیمر کاملاً حل شود، سپس این محلول ۱۰ برابر توسط اتانول ۹۵٪ رقیق شده و ۵ میلی‌لیتر از آن در سطح یک فلاسک ۲۵ ریخته شد و اجازه داده شده تا یک شبانه‌روز در زیر هود خشک شود (۱۰).

### فلوسایتومتري

برای بررسی میزان بیان شاخص‌های سطحی CD44 و CD133 بر روی رده سلولی MDA-MB468 که به صورت دو بعدی و سه‌بعدی کشت داده شده بودند پس از پاساژ، سلول‌ها با فسفات بافر سالین فاقد یون شستشو داده شد. ۱۰<sup>۵</sup> × ۲ سلول با آنتی‌بادی‌های CD44 و CD133 که به رنگ فلوروکروم PE (BD Biosciences-CA-USA) متصل بودند انکوبه شدند. به منظور از بین بردن آنالیزهای غیر اختصاصی در نتیجه حاصل از فلوسایتومتري به ازای هر لوله حاوی آنتی-

امروزه اعتقاد بر این است که بیشتر تومورها دارای جمعیت کوچکی از سلول‌ها با ویژگی‌های سلول‌های بنیادی می‌باشند. این سلول‌ها که سلول‌های بنیادی سرطانی می‌باشند در واقع توانایی نوزایی و تمایز به انواع سلول‌هایی که در بافت اصلی تومور هستند را دارا می‌باشد (۱۷، ۱۹). این سلول‌ها به واسطه ویژگی‌هایی از سلول‌های غیر بنیادی سرطان سینه تمیز داده می‌شوند، از جمله این ویژگی‌ها می‌توان بیان مارکرهای سطحی مشخص مانند CD133 و CD44 (۳)، بیان بالای ژن-های بنیادینگی و بالا بودن قدرت کلنی‌زایی و اسفروئیدزایی اشاره نمود (۲۳، ۲۱). شناسایی این سلول‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا که توانایی آغاز تومور را داشته و موجب مقاومت دارویی می‌شود (۵). امروزه استفاده از کشت سه‌بعدی به خصوص در مطالعات سلول‌های بنیادین سرطان افزایش یافته است و آنها را به ابزارهایی مناسب برای مطالعه سرطان تبدیل کرده است. در حقیقت کشت سه‌بعدی تصویر واقعی-تری از شرایط سلول‌ها در بدن موجود زنده بوده و منعکس کننده بافت‌ها و ارگان‌های بدن در شرایط *In vivo* نسبت به کشت دو بعدی می‌باشد. در کشت دو بعدی سلول‌ها در یک سطح صاف ساخته شده از پلی‌استیرن رشد کرده، به سطح پلاستیکی چسبیده و تشکیل اتصالات غیر معمول با پروتئین-های دناتور شده در کف ظرف را می‌دهند که نشان‌دهنده محیط واقعی رشد آنها در موجودات زنده نمی‌باشد. در واقع معماری اختصاصی بافتی، بر هم‌کنش سلول با سلول در این شرایط ساده کشت سلولی از دست می‌رود. در نتیجه در واقع مدل‌های بافتی سه‌بعدی در شرایط آزمایشگاهی به عنوان یک پل بین کشت سلول به روش قدیمی و مدل‌های حیوانی می‌باشد (۴، ۲۰). در کشت سه‌بعدی سلول‌ها به یکدیگر متصل شده تشکیل اتصالات طبیعی سلول به سلول و سلول با ماتریکس خارج سلولی می‌دهند و این اتصالات پیام لازم برای عملکرد سلول را به حداکثر می‌رساند (۱، ۱۱، ۱۸، ۲۴). روش-های کشت سه‌بعدی در زیست‌شناسی سلولی پتانسیل این را دارد که روش‌های سلولی را گسترش دهد و مدل‌سازی کمی سیستم‌های بیولوژیک را از سلول‌ها به موجودات زنده گسترش دهد. با توجه به اینکه تعیین نقش محیط اطراف تومور درک ما را در فهم بیولوژی سرطان افزایش داده است و منجر به کشف راه‌های جدید درمانی می‌شود (۲۵). هدف ما در این مطالعه بررسی اثر کشت غیر چسبنده سه‌بعدی سلول-ها بر روی پلی‌هما بر مورفولوژی و ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطان سینه در رده سلولی MDA-MB468 نسبت به کشت تک لایه سلول‌ها در یک محیط غنی از سرم بود.

<sup>1</sup> Dulbecco's Modified Eagle Medium

و واسرشت‌سازی اولیه DNA مکمل می‌شود به صورت  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم در دمای  $95^{\circ}\text{C}$  و به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله سوم دمای  $62^{\circ}\text{C}$  و به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه متوالی بود. واکنش‌های Real Time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط اصلی واکنش Power SYBER Green PCR master mix (2x) (Takara-CA-USA)، ۱ میکرولیتر پرایمر رشته Forward، ۱ میکرولیتر پرایمر رشته Reverse، ۶ میکرولیتر آب دیونیز، ۲ میکرو لیتر نمونه cDNA بود. ژن GAPDH به عنوان نرمال کننده برای تعیین بیان نسی به دیگر ژن‌ها ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) سنجیده شد. جدول ۱ توالی پرایمرهایی که در این مطالعه استفاده شده‌اند را نشان می‌دهد.

### تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه بر اساس حداقل سه تکرار استوار بود که به‌صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  محاسبه شد. آزمون مقایسه‌ای مورد استفاده Student's t-test بوده و سطح معناداری آن ( $p < 0.05$ ) در نظر گرفته شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده جهت

Real Time PCR

نام ژن	توالی Forward	توالی Reverse
Oct4	5'GTTCTTCATCTACTA AGGAAG3'	5'CAAGAGCATCATTG AACTTCAC3'
Sox2	5'GGGAAATGGGAGGG GTGCAAAAGA GG3'	5'TTGCGTGAGTGTGG ATGG GATTGGTG3'
Nanog	5'AAAGAATCTTCACC TATGCC 3'	5'GAAGGAAGAGGAGA GACAGT3'
Aldh	5'CCAAGCGTGATCCT GAACC 3'	5'GCTGCTGCCGAGGA GTAG 3'
Cmyc	5'CCAAGCGTGATCCT GAACC 3'	5'GCTGCTGCCGAGGA GTAG3'

### یافته‌ها

بادی لوله آزمایشی با شرایط مشابه لوله اصلی آزمایش تهیه گردید، که در آن از کنترل ایزوتایپ هر یک از آنتی‌بادی‌ها شامل PE- Mouse IgG2b (CA-USA-DAKO) استفاده شد. پس از آماده‌سازی لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در یخ انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون نمونه‌ها با فسفات بافر سالین فاقد یون شستشو داده شدند و در آخر نمونه‌های آماده شده توسط دستگاه BD FACS Calibur خوانده شد.

### آزمایش قدرت کلونی‌زایی

۱۰۰ عدد از سلول‌هایی که به صورت دوبعدی و سه‌بعدی کشت داده شده بودند به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت در پلیت‌های ۶ خانه‌ای ریخته شد. تعداد کلونی‌ها پس از گذشت ۹ روز توسط میکروسکوپ نوری معکوس در هر گروه مورد بررسی و شمارش قرار گرفت. برای به‌دست‌آوردن نتایج قابل اعتماد این آزمایش با سه بار تکرار انجام شد و در هر بار تکرار سلول‌ها در ۲ خانه از پلیت ۶ خانه قرار داده شد.

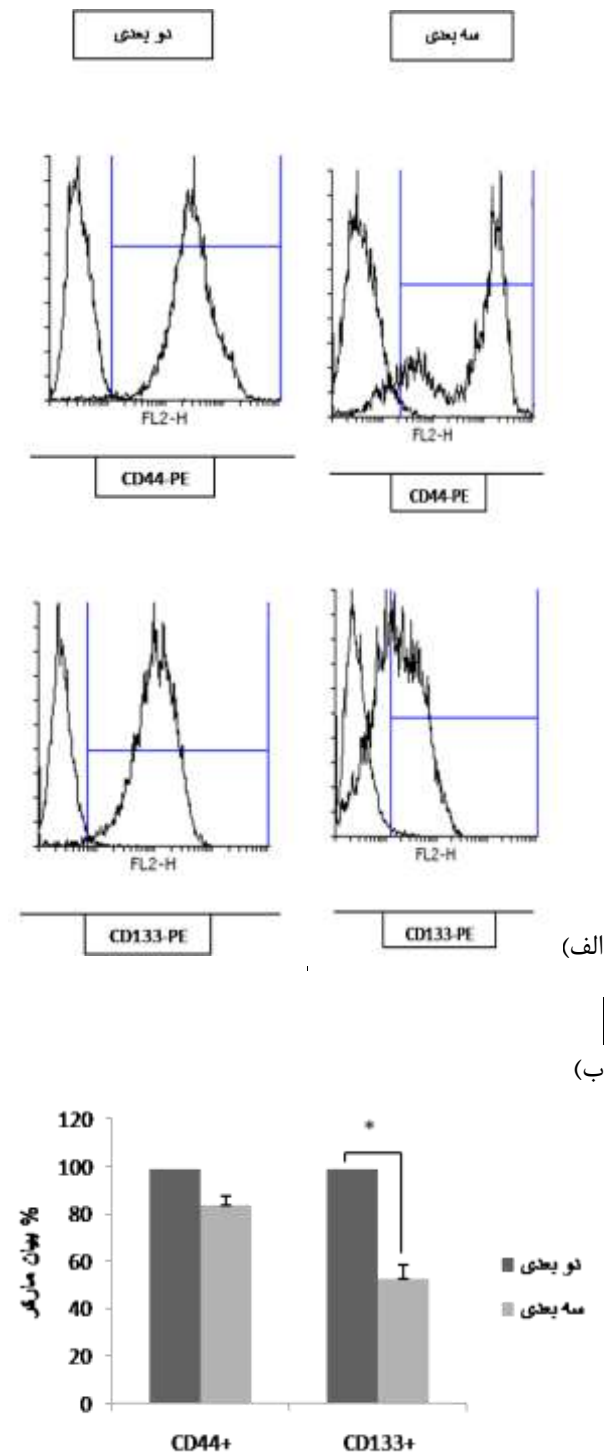
### آزمایش قدرت تشکیل اسفروئید

تعداد  $10^4$  سلول‌هایی که به صورت دوبعدی و سه‌بعدی کشت داده شده بودند به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت در پلیت-های ۶ خانه‌ای با چسبندگی پایین ریخته شد. محیط کشت استفاده شده فاقد سرم بوده و شامل فاکتورهای رشد EGF و bFGF با غلظت ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر بوده. تعداد اسفروئیدها پس از گذشت ۷ روز توسط میکروسکوپ نوری معکوس در هر گروه مورد بررسی و شمارش قرار گرفت. در واقع اسفروئیدهایی که اندازه آن بیشتر از ۱۰۰ میکرومتر بود مورد شمارش قرار گرفتند. این آزمایش با سه بار تکرار انجام شد و در هر بار تکرار سلول‌ها در ۲ خانه از پلیت ۶ خانه با چسبندگی پایین ریخته شد.

### Real-Time RT-PCR

تمام RNA از سلول‌های MDA-MB468 که به صورت دوبعدی و سه‌بعدی کشت داده شده بودند توسط تریزول (Ambion-NY-USA) و مطابق با دستورالعمل شرکت تولیدکننده استخراج شد. cDNA با استفاده از RevertAid H Minus first cDNA Fermentase-MA-USA) synthesis kit ( ساخته شد. در این مطالعه از دستگاه Real Time PCR مدل Corbett استفاده شد. برنامه زمانی-گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. مرحله اول که منجر به فعال‌سازی آنزیم

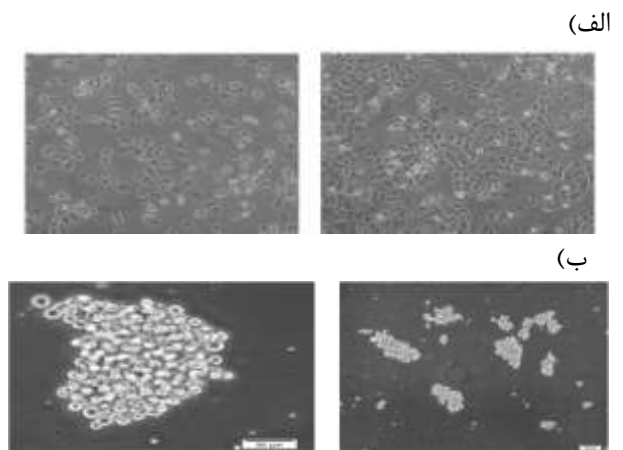
نتیجه کشت سه‌بعدی سبب کاهش معناداری در بیان CD133 شده ( $p < 0.05$ ) اما تفاوت چشمگیری در بیان CD44 ایجاد نکرده بود. در شکل ۲- نمودارهای آنالیز فلوسایتومتری و درصد بیان سلول‌های CD44+ و CD133+ نشان داده شده است.



شکل ۲: بیان CD133 و CD44 در کشت دو بعدی و سه‌بعدی. الف) بیان دو مارکر CD44-PE و CD133-PE به صورت پلات هیستوگرام در کشت دو بعدی (سمت چپ) و سه‌بعدی (سمت

## مورفولوژی سلول‌ها در کشت دو بعدی و سه‌بعدی

همان‌طور که در شکل ۱- مشخص است مورفولوژی سلول‌ها کاملاً وابسته به نوع کشت بود. سلول‌های MDA-MB468 به صورت دو بعدی بر سطح پلاستیکی کشت داده شده بودند به شکل بیضی و/ یا چندگوشه بودند و به شکل تک لایه در کف فلاسک رشد می‌کردند در حالی که کشت سه‌بعدی سلول‌ها بر روی پلی‌هما منجر به ایجاد اسفروئیدهایی با ارتباط ضعیف سلول با سلول و به شکل خوشه انگوری می‌گردید.



شکل ۱: مورفولوژی رده سلولی MDA-MB468 در کشت سه-بعدی و دو بعدی. الف) تصویر سمت راست شکل این سلول‌ها را با تعداد بالای سلول و شکل سمت چپ با تعداد کم سلول نشان می‌دهد. تصویر توسط میکروسکوپ فاز کنتراست گرفته شده است. مقیاس بزرگ‌نمایی تصاویر  $100 \mu\text{M}$  می‌باشد. ب) اسفروئیدهای تشکیل شده بر فلاسک‌های پوشیده شده با پلی-هما. مقیاس بزرگ‌نمایی تصویر سمت راست  $100 \mu\text{M}$  و تصویر سمت چپ  $50 \mu\text{M}$  می‌باشد.

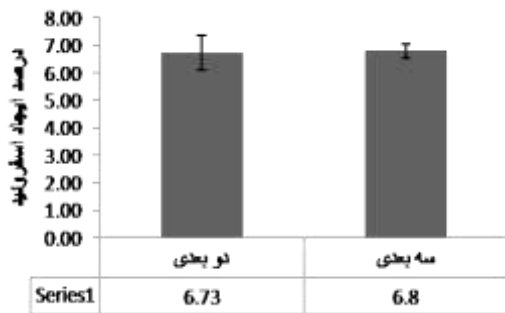
## مقایسه بیان شاخص‌های بنیادینگی در کشت دو بعدی و سه‌بعدی

میزان بیان شاخص‌های بنیادینگی CD44+ و CD133+ با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری در این سلول در دو نوع کشت دو بعدی و سه‌بعدی مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه حاصل از بیان این دو مارکر نشان می‌دهد که بیان CD44+ و CD133+ در سلول‌هایی که به صورت دو بعدی کشت داده شده بودند به ترتیب  $98.58 \pm 0.34\%$  و  $98.55 \pm 0.34\%$  در حالی که در کشت سه‌بعدی  $83.34 \pm 4.2\%$  و  $52.69 \pm 5.84\%$  بود. در

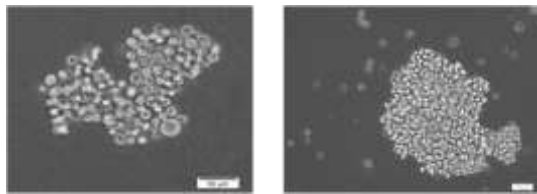
## مقایسه قدرت تشکیل اسفروئید در کشت سه-بعدی و دوبعدی

سلول‌هایی که در کشت دوبعدی و سه‌بعدی کشت داده شدند هر یک جهت مقایسه‌ی تغییری که در قدرت اسفروئیدزایی آنها ایجاد شده در ظروف ۶ خانه‌ای با چسبندگی پایین<sup>۲</sup> در محیط فاقد سرم کشت داده شده بودند. شکل-۴ قدرت ایجاد اسفروئید و مورفولوژی کلنی‌ها را در کشت سه‌بعدی دوبعدی نشان می‌دهد. اسفروئیدهای حاصل از کشت دوبعدی نسبت به کشت سه‌بعدی از فشردگی کمتری برخوردار بود. درصد اسفروئیدهای تشکیل شده در کشت سه‌بعدی  $6.8 \pm 0.26\%$  بود در حالی که در کشت دوبعدی  $6.3 \pm 0.73\%$  بوده که تفاوت معناداری از نظر قدرت ایجاد اسفروئید در سلول‌هایی که به صورت دوبعدی و سه‌بعدی کشت داده شده بودند مشاهده نشد.

(الف)



(ب)



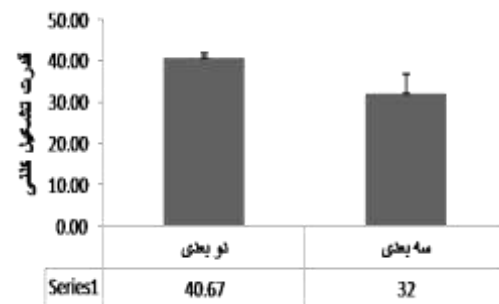
شکل ۴: مقایسه اسفروئیدهای تشکیل شده در کشت سه‌بعدی و دوبعدی. (الف) نمودار مقایسه درصد اسفروئیدهای تشکیل شده در کشت سه‌بعدی و دوبعدی را نشان می‌دهد (ب) مورفولوژی اسفروئید در سلول‌هایی که به صورت سه‌بعدی (سمت راست) و دوبعدی (سمت چپ) کشت داده شده‌اند را نشان می‌دهد. مقیاس بزرگ‌نمایی  $50 \mu\text{m}$  می‌باشد.

راست) نشان می‌دهد. (ب) نمودار مقایسه بیان دو شاخص  $CD133+$  و  $CD44+$  را در کشت دوبعدی و سه‌بعدی نشان می‌دهد. (علامت \* نشان دهنده  $P < 0.05$  می‌باشد).

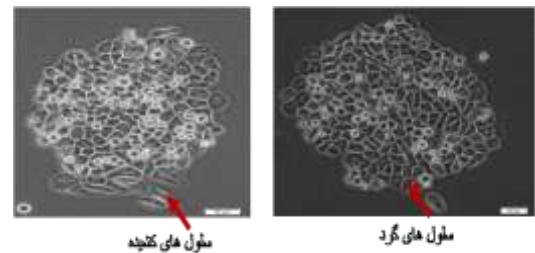
## مقایسه قدرت تشکیل کلنی در کشت سه‌بعدی و دوبعدی

سلول‌هایی که به صورت دوبعدی و سه‌بعدی کشت داده شده بودند هر یک برای توانایی تشکیل کلنی مورد بررسی قرار گرفتند. شکل-۳ قدرت کلنی‌زایی و مورفولوژی کلنی‌ها را در کشت سه‌بعدی و دوبعدی نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است از نظر مورفولوژیکی سلول‌های تشکیل‌دهنده کلنی‌ها در کشت دوبعدی کشیده‌تر بوده در حالی که در کشت سه‌بعدی گردتر می‌شوند. تعداد کلنی‌های تشکیل شده در کشت سه‌بعدی  $4.72 \pm 0.32$  و در کشت دوبعدی  $1.16 \pm 0.67$  بود که تفاوت معناداری از نظر قدرت کلنی‌زایی در سلول‌هایی که به صورت دوبعدی و سه‌بعدی کشت داده شده بودند مشاهده نشد.

(الف)



(ب)

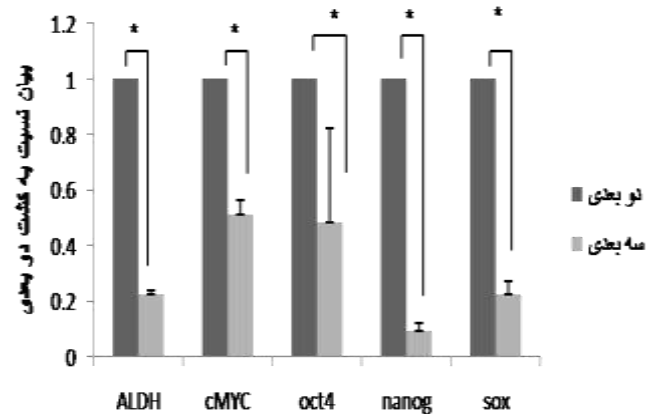


شکل ۳: مقایسه کلنی‌های تشکیل شده در کشت سه‌بعدی و دوبعدی. (الف) نمودار مقایسه تعداد کلنی‌های تشکیل شده در کشت سه‌بعدی و دوبعدی را نشان می‌دهد. (ب) مورفولوژی کلنی در سلول‌هایی که به صورت سه‌بعدی (سمت راست) و دوبعدی (سمت چپ) کشت داده شده‌اند را نشان می‌دهد. مقیاس بزرگ‌نمایی  $50 \mu\text{m}$  می‌باشد.

<sup>2</sup> Ultra low attach plates

## مقایسه بیان ژنهای بنیادینگی در کشت سه-بعدی و دوبعدی

در مرحله آخر هر یک از سلول‌هایی که به صورت دوبعدی و سه‌بعدی کشت داده شده‌اند جهت آنالیزهای مولکولی برای بیان ژن‌هایی که در بنیادینگی دخیل می‌باشند شامل Aldh, Sox2, Nanog, Oct4, Cmyc. بیان ژن‌های بنیادینگی Aldh, Sox2, Nanog, Oct4, Cmyc در کشت سه-بعدی نسبت به کشت دوبعدی به ترتیب  $0.1 \pm 0.22$ ، برابر،  $0.3 \pm 0.09$ ، برابر،  $0.34 \pm 0.48$ ، برابر،  $0.4 \pm 0.51$ ، برابر،  $0.03 \pm 0.09$ ، برابر،  $0.04 \pm 0.22$ ، برابر به صورت معناداری ( $p < 0.05$ ) کاهش یافته بود (شکل-۵). در نتیجه کشت سه‌بعدی سبب کاهش بیان ژن‌های بنیادینگی در سلول‌های MDA-MB468 شده بود.



شکل ۵: مقایسه میزان بیان ژن‌های بنیادینگی در سلول‌هایی که به صورت دوبعدی و سه‌بعدی کشت داده شده‌اند. (علامت \* نشانگر  $p < 0.05$  می‌باشد).

## بحث و بررسی

تئوری سلول‌های بنیادی سرطانی به عنوان عاملی که مسئول آغاز تومور، حفظ آن و مقاومت به درمان می‌باشد، امروزه از اهمیت بالایی در مطالعات در زمینه سرطان برخوردار است، زیرا شناسایی و مورد هدف قراردادن آن می‌تواند نقش مهمی در درمان سرطان داشته باشد (۱۷). سیستم‌های کشت مناسب برای شناسایی سلول‌های بنیادی سرطانی به روشن کردن مسائلی که هنوز در زمینه سلول‌های بنیادی سرطانی نامشخص است کمک می‌کند. رده‌های سلولی اکثراً به صورت دوبعدی کشت داده می‌شوند، اما آنها می‌توانند به صورت اسفروئیدهای سه‌بعدی نیز کشت داده شوند. این اسفروئیدها با

تجمعات سلولی شروع شده و در نهایت منجر به ایجاد ساختارهای سه‌بعدی شده و به نظر می‌رسد که برای مطالعات در شرایط آزمایشگاهی نسبت به کشت تک لایه مناسب‌تر می‌باشند. در واقع هدف این مطالعه این بوده است که اثر کشت سلول‌ها در شرایط سه‌بعدی را بر ویژگی‌های بنیادی سلول‌های سرطانی در رده سلولی MDA-MB468 بررسی نماید. در این مطالعه جهت بررسی اثر کشت سه‌بعدی بر ویژگی‌های بنیادینگی، اثر کشت سه‌بعدی را بر قدرت ایجاد اسفروئید و کلنی‌زایی بررسی شد. همان‌طور که در نتایج ذکر شد کشت سلول‌ها در شرایط سه‌بعدی افزایش معناداری در توانایی سلول‌ها برای کلنی‌زایی و ایجاد اسفروئید که از ویژگی‌های سلول‌های بنیادین سرطانی هستند ایجاد نکرد. از آنجایی که بیان مارکرهای خاص و افزایش بیان ژن‌های بنیادینگی از دیگر راه‌های شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان می‌باشد این دو فاکتور نیز مورد سنجش قرار گرفتند (۸،۷، ۱۲-۱۴). در نتیجه در مرحله اول با توجه به اهمیت بیان مارکرهای مشخص در سلول‌های بنیادی سرطان تست فلوسایتومتری برای جمعیت‌های CD133 و CD44 صورت گرفت. زیرا همان‌طور که در مطالعات نشان داده شده است CD133 و CD44 از جمله مارکرهای مهم برای جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی می‌باشند. ویژگی‌های عملکردی این دو مارکر به خوبی نشان دهنده آن است که این مارکرها معیارهای خوبی برای انتخاب تومورهای بدخیم می‌باشد، زیرا CD133 مارکری می‌باشد که توسط بسیاری از سلول‌های بنیادی نرمال بیان می‌شود و به نظر می‌رسد در مهاجرت و تقسیم نامتقارن سلول‌های بنیادی نقش دارد (۲،۱). CD44 نیز به عنوان گیرنده برای هیالورونیک اسید می‌باشد و در چسبندگی سلولی، مهاجرت و متاستاز سلول‌های سرطانی نقش دارد (۲۲). همان‌طور که مشاهده شد کشت سه‌بعدی کاهش معناداری در بیان سلول‌های CD133+ ایجاد نمود به گونه‌ای که بیان CD133+ در کشت سه‌بعدی  $5.84 \pm 52.69\%$  و در کشت دوبعدی  $0.34 \pm 98.55\%$  بود در حالی که تفاوت معناداری در بیان CD44+ در این دو نوع کشت مشاهده نشد. پس از انجام آزمایش‌های سلولی بیان ژن‌هایی از جمله Oct4, Sox2, Nanog, Cmyc, Aldh نیز سنجیده شد. مسئله حائز اهمیت این بود که کشت سه‌بعدی توانست بیان تمام ژن‌های بنیادینگی به طور معناداری کاهش یافت. نتایج به‌دست‌آمده مبنی بر عدم مشاهده تفاوت در قدرت کلنی‌زایی و ایجاد اسفروئید، کاهش بیان مارکر بنیادینگی CD133+ و کاهش بیان ژن‌های بنیادینگی در کشت سه‌بعدی نسبت به کشت

کاهش می‌یابد اما پس از کشت طولانی مدت در این شرایط دوباره با افزایش چشمگیری از بنیادینگی مواجه می‌شوند که با بافت اصلی آن متفاوت می‌باشد (۱۳).

به‌طور کلی این مطالعه نشان داد که سلول‌های MDA-MB468 توانایی حفظ و افزایش ویژگی‌های سلول‌ها بنیادی سرطانی در شرایط کشت سه‌بعدی را ندارد و احتمالاً آنچه که در شرایط واقعی و فیزیولوژیک مشاهده می‌شود شرایطی مشابه با نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه می‌باشد. اما به هرحال تلاش‌های بیشتری نیاز می‌باشد تا این مدل‌های سه-بعدی بیشتر به شرایط *In vivo* نزدیک‌تر شوند.

## سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از مسئولین آزمایشگاه سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سرطان، آزمایشگاه فلوسایتومتری و آزمایشگاه مولکولی پژوهشگاه رویان جهت فراهم‌نمودن امکانات و تجهیزات لازم برای این پژوهش قدردانی و تشکر به عمل آورند.

دوبعدی حاکی از این بود که کشت سه‌بعدی نتوانسته است سبب افزایش ویژگی‌های بنیادینگی این سلول‌ها شود. در توجیه تفاوت‌های مشاهده شده در مرفولوژی کلنی‌ها و اسفروئید، بیان مارکرهای سطحی و بیان ژنی در این دو نوع کشت باید ذکر کرد که سلول‌ها به واسطه تغییراتی که در میتوز و تولید ماتریکس خارج سلولی می‌کنند پاسخ‌های متفاوتی به محیطی که در آن کشت داده می‌شوند می‌دهند (۶). در نتیجه فنوتیپ فیزیولوژیک سلول‌ها در شرایط کشت دوبعدی نسبت به سلول‌ها در کشت سه‌بعدی متفاوت می‌باشد (۹). همین‌طور نشان داده شده که بر هم کنش سلول‌ها و محیط اطراف آن اثر زیادی بر شکل سلول، سیتواسکلتون، ساختار کروماتین و بیان ژن‌ها دارد. سلول‌ها هنگامی که در شرایط سه‌بعدی بر روی پلی‌هما رشد می‌کنند مرفولوژی گرد به خود گرفته و این مورفولوژی منجر به فشردگی کروموزومی و کاهش سایز هسته و در نتیجه داستیلاسیون هیستون‌ها می‌شود که این داستیلاسیون هیستون باعث سرکوب بیان ژن‌ها می‌شود (۱۵). ضمن اینکه در مطالعاتی نشان داده شده است که هنگامی که رده‌های سلول‌ها به صورت دوبعدی در یک مدت محدود کشت داده شوند خواص بنیادینگی آنها

## منابع

1. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100(7): 3983-8.
2. Beckmann J, Scheitza S, Wernet P, Fischer JC, Giebel B., Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins, *blood*, 2007; 109(12): 5494-501.
3. Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, Allan AL., High aldehyde de hydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability, *J Cell Mol Med*, 2009; 13(8B): 2236-52
4. Griffith LG, Swartz MA., Capturing complex 3D tissue physiology in vitro., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2006; 7(3): 211-24.
5. Grimshaw JM, Cooper L, Papazisis K et al, Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells, *Breast Cancer Research*, 2008; 10(3)
6. Gruber EH, Hanley ND, Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2000; 1:1
7. Gu G, Yuan J, Wills M, Kasper S., Prostate Cancer Cells with Stem Cell Characteristics Reconstitute the Original Human Tumor *In vivo*. *Cancer Res.*, 2007; 67(10): 4807-15
8. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tschlis PN, Struhl K., Metformin selectively targets cancer stem cells and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission, *Cancer Res*, 2009; 69(19): 7507-11
9. Ivascu A, Kubbies M, Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J. Biomol. Screen*, 2006; (11): 922-932.
10. Winkenwerder JJ, Palechek PL, Reece JS, Saarinen MA, Arnold MA, Cohen MB, Murhammer DW., Evaluating prostate cancer cell culturing methods: A comparison of cell morphologies and metabolic activity, *Oncol Rep*, 2003; 10(4): 783-9
11. Kim JB, Stein R, O'Hare MJ., Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer a review, *Breast Cancer Res Treat*, 2004; 85(3): 281-91
12. Klarmann GJ, Hurt EM, Mathews LA, Zhang X, Duhagon MA, Mistree T, Thomas SB, Farrar WL., Invasive prostate cancer cells are tumor initiating cells that have a stem cell-like genomic signature, *Clin Exp Metastasis*, 2009; 26(5): 433-446.

13. Kuch V, Schreiber C, Thiele W, Umansky V, Sleeman JP., Tumor-initiating properties of breast cancer and melanoma cells in vivo are not invariably reflected by spheroid formation in vitro, but can be increased by long-term culturing as adherent monolayers, *Int J Cancer*, 2013; 132(3): 94-105
14. Lawson DA, Witte ON., Stem cells in prostate cancer initiation, and progression, *J Clin Invest*, 2007; 117(8): 2044-50
15. Le Beyec J, Xu R, Lee SY, Nelson CM, Rizki A, Alcaraz J, Bissell MJ., Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells, *Exp Cell Res*, 2007; 313(14): 3066-75
16. Liu ZZ, Chen P, Lu ZD, Cui SD, Dong ZM., Enrichment of breast cancer stem cells using a keratinocyte serum-free medium. *Chin Med J (Engl)*, 2011; 124(18): 2934-6
17. Morrison JB, Schmidt WC, Lakhani RS et al, Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer, *Breast Cancer Research*, 2008
18. Pampaloni F, Stelzer EH, Masotti A., Three-Dimensional Tissue Models for Drug Discovery and Toxicology. *Recent Pat Biotechnol*, 2009; 3(2): 103-17
19. Qiao B, Johnson NW, Chen X, Li R, Tao Q, Gao J., Disclosure of a stem cell phenotype in an oral squamous cell carcinoma cell line induced by BMP-4 via an epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Rep.*, 2011; 26(2): 455-61.
20. Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, Weinberg RA., Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell*, 2004; 6(2): 171-83
21. Rhim JS, Li H, Furusato B., Novel human prostate epithelial cell culture models for the study of carcinogenesis and of normal stem cells and cancer stem cells, *Adv Exp Med Biol*, 2011; 720: 71-80
22. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J et al, Molecular definition of breast tumor heterogeneity, *Cancer Cell*, 2007; (3): 259-73.
23. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB., Cancer stem cells in nervous system tumors, *Oncogene.*, 2004; 23(43): 7267-73
24. Soares CP, Midlej V, de Oliveira WEM, Benchimol M, Costa ML, Mermelstein C., 2D and 3D-Organized Cardiac Cells Shows Differences in Cellular Morphology, Adhesion Junctions, Presence of Myofibrils and Protein Expression, *PLoS ONE*, 2012; 7(5)
25. Yeung TM., Gandhi SC, Bodmer WF., Hypoxia and lineage specification of cell line-derived colorectal cancer stem cells. *PNAS*, 2011