

بررسی نقش ماکروفاژهای مرتبط با تومور در مقاومت سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی به پاکلی تاکسل در شرایط کشت دوبعدی و سه‌بعدی سلول

مهناز سیاهی^۱، محمد کمال آبادی فراهانی^{۲*}، امیر آتشی^۳، سپهر زمانی^۴

^۱گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

^۲گروه مهندسی بافت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

^۳گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

^۴کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

*نویسنده مسئول: گروه مهندسی بافت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران. ایمیل: kamalabadi@shmu.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۹ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۴

چکیده

مقدمه: متاستاز مغزی یک عارضه ویرانگر در بیماران مبتلا به سرطان پستان است. ماکروفاژهای مرتبط با تومور، سلول‌هایی مؤثر در ایمنی ذاتی، ترمیم و هموستاز هستند. این سلول‌ها در ریز محیط متاستاتیک نقش مهمی در مقاومت دارویی دارند.

اهداف: در این مطالعه، نقش ماکروفاژهای مرتبط با تومور در مقاومت سلول‌های متاستاتیک مغزی به پاکلی تاکسل در شرایط کشت سلولی دوبعدی و سه‌بعدی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: پس از ایجاد مدل حیوانی سرطان پستان، سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی به نام 4T1B از ضایعات متاستاز مغزی موش‌ها جداسازی شدند. کشت هم‌زمان این سلول‌های توموری متاستاتیک به همراه رده سلولی ماکروفاژی موشی (RAW) در محیط کشت دوبعدی و سه‌بعدی (با کمک روش تشکیل اسفروئید) صورت گرفت. فعالیت سیتوتوکسیک پاکلی تاکسل روی سلول‌ها توسط آزمون MTT مورد ارزیابی واقع شد.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که صرفاً در شرایط کشت سه‌بعدی ماکروفاژهای مرتبط با تومور باعث افزایش معنی‌دار مقاومت نسبت پاکلی تاکسل در سلول‌های متاستاتیک مغزی می‌شوند. همچنین توانایی تشکیل اسفروئید در شرایطی که سلول‌های متاستاتیک و ماکروفاژها به‌طور هم‌زمان کشت می‌شوند از نظر تعداد و اندازه بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان استنباط کرد که ماکروفاژهای مرتبط با تومور باعث مقاومت دارویی در انواع متاستاتیک سرطان سینه می‌شوند. این نتایج می‌تواند بینش مناسبی را برای مطالعات پیش رو در زمینه مقاومت دارویی سرطان فراهم آورد.

کلمات کلیدی: ماکروفاژهای مرتبط با تومور، متاستاز مغزی، مقاومت دارویی، پاکلی تاکسل، اسفروئیدها

۱. مقدمه

سرطان زمانی رخ می‌دهد که سلول‌های بدن به شکل خارج از کنترل شروع به رشد می‌کنند. این بیماری به‌عنوان دلیل اصلی مرگ در کشورهای توسعه‌یافته و دومین دلیل مرگ در کشورهای در حال توسعه با برآورد سالانه ۷/۶ میلیون مرگ در جهان شناخته می‌شود (۱، ۲).

شناسایی مکانیسم‌های سلولی و مولکولی دخیل در سرکوب پاسخ ایمنی، که توسط سیستم ایمنی علیه تومورها ایجاد شده است، یک موضوع بسیار مهم در زمینه ایمونولوژی تومور است که اهداف جدیدی را برای ایمونوتراپی سرطان فراهم می‌کند (۳). ماکروفاژها جمعیتی از سلول‌های ایمنی با درجه بالایی از ناهمگونی فنوتیپی و عملکردی هستند. ماکروفاژها که به‌طور گسترده در تمام بافت‌ها توزیع شده‌اند، نقش عمده‌ای در پاسخ ایمنی ذاتی میزبان در برابر عفونت‌ها دارند. علاوه بر این، ماکروفاژها نقش مهمی در هموستاز و ترمیم بافت‌ها دارند (۴).

در دهه گذشته، گزارش‌های متعددی در مورد ارتباط بین ماکروفاژها و تومورها منتشر شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهند که ماکروفاژهای مرتبط با تومور tumor-associated macrophages (TAMs) می‌توانند تکثیر سلول‌های توموری، تهاجم و متاستاز را افزایش دهند (۵، ۶). بسیاری از داده‌های بالینی نشان می‌دهد که تجمع بیشتر TAMها در بافت تومور نشان‌دهنده پیش‌آگهی ضعیف برای بیماران سرطانی است (۷). مطالعات مشخص کرده‌اند که TAMها می‌توانند در فرآیند مقاومت دارویی هم نقش داشته باشند (۸). بنابراین ماکروفاژهای

سرطان زمانی رخ می‌دهد که سلول‌های بدن به شکل خارج از کنترل شروع به رشد می‌کنند. این بیماری به‌عنوان دلیل اصلی مرگ در کشورهای توسعه‌یافته و دومین دلیل مرگ در کشورهای در حال توسعه با برآورد سالانه ۷/۶ میلیون مرگ در جهان شناخته می‌شود (۱، ۲).

شناسایی مکانیسم‌های سلولی و مولکولی دخیل در سرکوب پاسخ ایمنی، که توسط سیستم ایمنی علیه تومورها ایجاد شده است، یک موضوع بسیار مهم در زمینه ایمونولوژی تومور است که اهداف جدیدی را برای ایمونوتراپی سرطان فراهم می‌کند (۳).

ماکروفاژها جمعیتی از سلول‌های ایمنی با درجه بالایی از ناهمگونی فنوتیپی و عملکردی هستند. ماکروفاژها که به‌طور گسترده در تمام بافت‌ها توزیع شده‌اند، نقش عمده‌ای در پاسخ ایمنی ذاتی میزبان در

مرتبط با تومور در مجموع می‌توانند رشد تومور، تهاجم، متاستاز و مقاومت دارویی را افزایش دهند.

با توجه به روند افزایشی ابتلا به سرطان سینه در جهان و همچنین ناکارآمدی روش‌های موجود در مواجهه با انواع متاستاتیک مغزی این سرطان (۹، ۱۰)، لزوم شناخت و ارتقا اهداف درمانی و پیگیری روش‌های جدید درمانی اهمیت فراوانی دارد.

۲. اهداف

با توجه به مقدمات ذکر شده و نقش احتمالی ماکروفاژهای مرتبط با تومور در کاهش اثربخشی دارویی، در این مطالعه به بررسی نقش ماکروفاژهای مرتبط با تومور در مقاومت دارویی سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی در شرایط کشت دوبعدی و سه‌بعدی می‌پردازیم تا بتوانیم به بینش عمیق‌تری از عملکرد این سلول‌های ایمنی در مقاومت به درمان دارویی سرطان دست یابیم.

۳. مواد و روش‌ها

۱.۳. بیانیه اخلاقی

کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود این مطالعه را در ارتباط با اخلاق در تحقیقات حیوانی مورد تایید قرار داده است. (شماره ثبت: IR.IAU.SHAHROOD.REC.1401.055)

۲.۳. مواد

سلول‌های ماکروفاژی RAW از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شد. محیط کشت Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) گلوکز بالا و سرم جنین گاوی (FBS) برند Gibco آمریکا از نمایندگی فروش (امین‌سان، تهران) تهیه گردید. آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، استرپتومایسین و تریپسین از نمایندگی فروش محصولات سیگما (امین‌سان، تهران) خریداری شد.

۳.۳. ایجاد مدل موشی سرطان سینه و جداسازی سلول‌های متاستاتیک از مغز موش‌ها

برای ایجاد مدل موشی سرطان سینه از رده سلولی 4T1 جهت القا تومور در موش‌های ماده BALB/c با سن ۶ تا ۸ هفته با وزن ۲۰ تا ۲۵ گرم استفاده گردید. برای ایجاد تومور ۱×۱۰۵ سلول 4T1 که در ۵۰ میکرولیتر فسفات‌بافر سالین (PBS) معلق شده را به‌صورت زیرپوستی و در ناحیه پهلوی (flank) موش‌ها تزریق کردیم. ۳۵ روز پس از تزریق اولیه سلول‌های توموری، موش‌ها کشته، تومورهای اولیه و همچنین بافت مغزی از بدن موش جدا و روی یک تکه از بافت توموری و همچنین بخشی از بافت مغزی، مراحل فرآوری بافتی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) انجام شد. ارزیابی پاتولوژیکی و تایید

توموری بودن نمونه جداسازی‌شده، توسط پاتولوژیست انجام شد. سلول‌های متاستاتیک از مغز موش‌ها به کمک روش‌های هضم آنزیمی و مکانیکی جداسازی گردیدند. در این روش پس از جداسازی بافت مغزی از بدن موش و در شرایط کاملاً استریل یک‌تکه از این بافت به آزمایشگاه کشت سلول منتقل شد. در آزمایشگاه کشت سلول و زیر هود، در شرایط کاملاً استریل مراحل هضم فیزیکی و آنزیمی بافت مغز پس از چندمرتب شستشو با PBS انجام گردید. هضم فیزیکی شامل تکه‌تکه کردن بافت به کمک تیغ جراحی و هضم آنزیمی شامل مواجه بافت توموری خردشده با آنزیم کلاژناز به مدت ۲ ساعت و در دمای ۳۷ درجه بود. پس از جداسازی سلول‌های مغزی، سوسپانسیون سلولی در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS، ۱٪ پنی‌سیلین و استرپتومایسین ایجاد و پس از انتقال به فلاسک T75 در انکوباتور ۵٪ CO₂ کشت شدند. در روزهای بعدی سلول‌های متاستاتیک موجود در بافت مغزی کلنی تشکیل داده و به‌مرور جمعیت غالب و خالصی از سلول‌های متاستاتیک را ساختند. این سلول‌های متاستاتیک مغزی تکثیر و پاساژ داده و برای ادامه بررسی‌ها از آن‌ها استفاده شدند (۱۱).

۴.۳. کشت و تکثیر رده سلولی ماکروفاژ موشی (RAW)

رده سلولی RAW به‌عنوان رده سلولی ماکروفاژی موشی از بانک سلولی پاستور تهیه و در شرایط آسپتیک کشت شد. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و در انکوباتور ۵٪ CO₂ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک فلاسک T25 کشت و پس از رسیدن تراکم ۷۰ درصدی، جهت افزایش سلول‌ها پاساژ داده شد.

۵.۳. کشت هم‌زمان رده سلولی ماکروفاژی و سلول‌های توموری

برای کشت دوبعدی، ابتدا سلول‌های متاستاتیک مغزی و سلول‌های ماکروفاژی را به کمک تیمار آنزیمی تریپسین از کف فلاسک کشت سلول جداسازی شده و پس از شمارش سلولی، تعداد ۱×۱۰^۴ عدد از سلول‌های توموری به همراه تعداد ۱×۱۰^۳ عدد از سلول‌های ماکروفاژی به‌صورت سوسپانسیون آماده و مخلوط شده و بعداً به‌همراه محیط کشت سلولی (محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و در انکوباتور ۵٪ CO₂ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. جهت کشت سه‌بعدی سلول‌ها با کمک روش تشکیل اسفروئید، سلول‌های کشت‌شده در مرحله قبل (اعم از رده سلولی ماکروفاژی و سلول‌های متاستاتیک مغزی) که در مرحله رشد لگاریتمی خود قرار داشتند، در محیط DMEM/F12 بدون سرم (FBS) و حاوی ۱ درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین در خانه‌های یک پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای با چسبندگی بسیار پایین (Ultra-Low Attachment 6-Well) در انکوباتور ۵٪ CO₂ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت

شدند. پس از ۷-۵ روز، اسفروئیدهای توموری تولید گردید (۱۲).

۶.۳. تیمار با پاکلی تاکسل و ارزیابی سمیت سلولی

ارزیابی سمیت سلولی پاکلی تاکسل روی سلول‌های توموری با آزمون رنگ‌سنجی MTT (۳-۵ و ۴-۵ دی‌متیل تیازول-۲-یل)-۵ و ۲-دی‌فنیل تترازولیوم بروماید) انجام شد (۱۳). برای این کار سلول‌های کشت‌شده در مرحله قبل با غلظت‌های مختلف و بالارونده پاکلی تاکسل تیمار گردیدند. بنابراین گروه‌های مورد بررسی در این مطالعه شامل تیمار دارویی سلول‌های 4T1B به‌تنهایی و سلول‌های 4T1B به‌همراه ماکروفاژهای RAW در شرایط کشت دوبعدی و سه‌بعدی و مقایسه آن‌ها بود. در گروه‌های کنترل یک ردیف از چاهک‌ها فاقد سلول و فقط حاوی محیط کشت (به‌عنوان blank) و یک ردیف نیز حاوی محیط کشت دارای سلول (به‌عنوان شاهد یا گروه کنترل) بود. در ادامه پلیت‌های مذکور به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور تحت تیمار قرار گرفتند و سپس محیط درون چاهک‌ها تخلیه و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT افزوده شد. پس از گذشت ۴ ساعت، محلول باقی‌مانده خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه شد تا فورمازان حاصل حل گردد. در نهایت پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در تکان‌دهنده قرار گرفتند و سپس جذب نوری فورمازان در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از میکروپلیت خوان (Anthos 2020 Biochrom، برلین، آلمان) پلیت ثبت گردید. درصد حیات سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۱۴):

$$100 \times \frac{\text{جذب‌های چاهک تیمار شده}}{\text{جذب‌های چاهک کنترل}} = \text{درصد میزان زنده‌مانی سلولی}$$

۷.۳. جمع‌آوری داده‌ها و آنالیز آماری

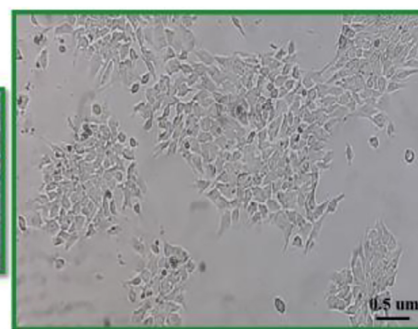
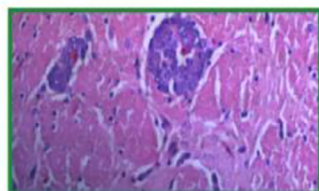
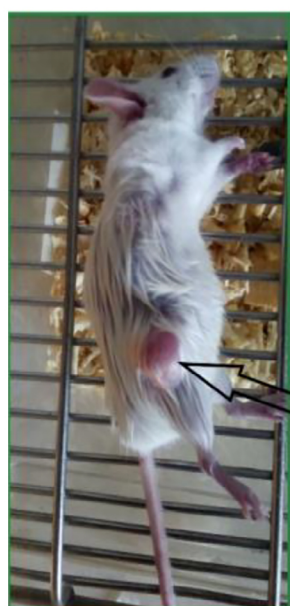
نتایج به‌دست‌آمده در آزمایشگاه به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار تجزیه و تحلیل شدند. برای ارزیابی داده‌ها از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 9.0 و با بهره‌گیری از آزمون‌های آماری t -test استفاده شد (نرم‌افزار، GraphPad، USA, CA, La Jolla). سطح معنی‌داری آماری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۴. نتایج

۱.۴. جداسازی سلول‌های توموری متاستاتیک

پس از ۳۵ روز از القای تومورهای اولیه در موش‌ها، یک مدل متاستاتیک سرطان سینه در موش‌های BALB/c ایجاد شد (تصویر ۱ الف). هنگامی که 4T1 به موش‌های BALB/c تزریق گردید، تومورهای متاستاتیکی ایجاد می‌شود که به ارگان‌های مختلف از جمله مغز متاستاز می‌دهد، درحالی‌که تومور اصلی در محل تزریق رشد می‌کند. روی نمونه‌های توموری و ضایعات متاستاتیک، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) و تائید پاتولوژیک انجام گردید. در ادامه سلول‌های توموری متاستاتیک، از مغز موش‌ها جدا شد (شکل ۱ ب)، پس از جداسازی اولیه، سلول‌های توموری متاستاتیک، کلونی‌هایی را در محیط کشت تشکیل دادند. سلول‌های توموری متاستاتیک جداسازی شده از مغز با عنوان 4T1B شناخته شدند.

الف

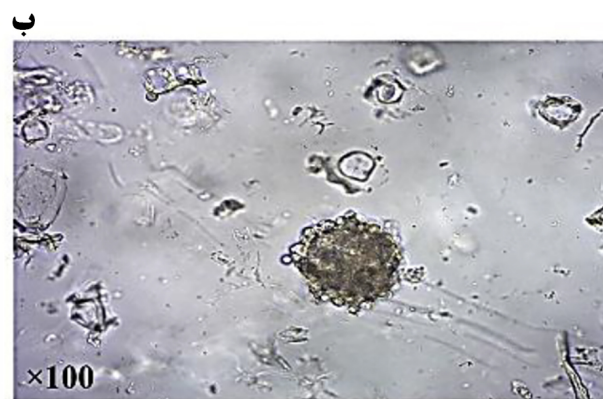


تومور اولیه

تصویر ۱. جداسازی سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی؛ الف، مدل موشی سرطان پستان متاستاتیک پس از ۳۵ روز از القای تومور در موش BALB/c ایجاد شد. ب، جداسازی تومور متاستاتیک مغزی، رنگ‌آمیزی H&E و استخراج سلول‌های توموری متاستاتیک از مغز موش‌های سرطانی انجام شد.

۲.۴. تشکیل اسفروئید

سلول‌های کشت‌شده در مرحله قبل (اعم از رده سلولی ماکروفاژی و سلول‌های توموری) که در مرحله رشد لگاریتمی خود قرار داشتند در محیط DMEM/F12 بدون سرم طی شش روز اسفروئید تشکیل دادند. مشاهدات مورفولوژیکی نشان داد

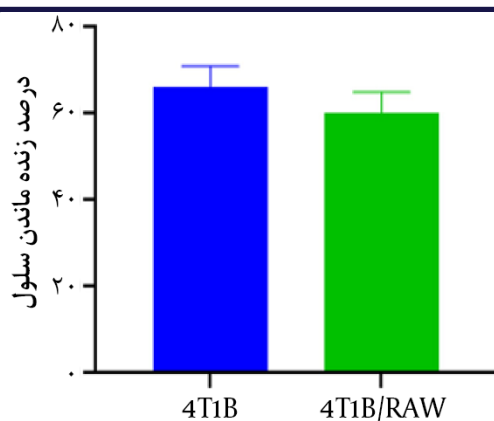


تصویر ۲. کشت سلول‌های متاستاتیک مغزی؛ سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی در شرایط کشت دوبعدی (الف) و سه‌بعدی (ب) کشت شدند.

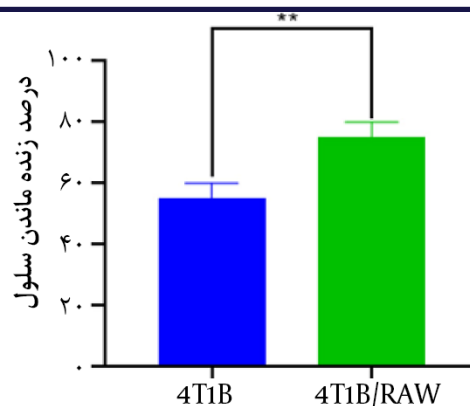
تیمار با پاکلی تاکسل قرار گرفتند تفاوت معنی‌داری در میزان زنده‌مانی سلولی مشاهده نگردید. در نقطه مقابل، زمانی که سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی همراه با ماکروفاژها در شرایط سه‌بعدی تحت تیمار با دارو قرار گرفتند، میزان مقاومت نسبت به اثرات سایتوتوکسیک پاکلی تاکسل به شکل معنی‌داری افزایش نشان داد (تصویر ۳).

۳.۴. ارزیابی زنده‌مانی سلولی در تیمار با پاکلی تاکسل

جهت ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک پاکلی تاکسل بر سلول‌های متاستاتیک از آزمون سمیت سلولی MTT استفاده گردید. نتایج نشان داد که در شرایط کشت دوبعدی، زمانی که سلول‌های متاستاتیک مغزی به تنهایی یا همراه با ماکروفاژها تحت



2D



3D

تصویر ۳. ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک پاکلی تاکسل بر سلول‌های توموری متاستاتیک به کمک آزمون MTT؛ سلول‌های توموری متاستاتیک هم در شرایط کشت دو و هم در شرایط کشت سه‌بعدی به تنهایی یا در کنار سلول‌های ماکروفاژی با پاکلی تاکسل تیمار شدند. نتایج نشان داد که فقط در شرایط کشت سه‌بعدی، میزان مقاومت سلول‌های توموری کشت‌شده با ماکروفاژها در مقایسه با شرایط کنترل به شکل معنی‌داری افزایش دارد ($P < 0.01$).

۵. بحث

انواع سلول‌های ایمنی نفوذکننده تومور را نشان می‌دهند و به‌طور کلی به یکی از دو زیرگروه متضاد عملکردی، یعنی ماکروفاژهای M_1 و ماکروفاژهای M_2 طبقه‌بندی می‌شوند.

ماکروفاژهای مرتبط با تومور (TAMs) یکی از اصلی‌ترین

در شکل‌دهی این ساختارهای کروی داشتند. در مطالعات متعددی نیز به این قابلیت ماکروفاژهای مرتبط با تومور مانند مطالعه Yin و همکاران (۲۱) اشاره شده است. TAMها تشکیل ساختارهای چندسلولی اسفروئید را در مدل موشی سرطان تخمدان اپیتلیال تسریع می‌کنند.

در مطالعه دیگری که توسط Devi و همکاران صورت گرفت گزارش شده است زمانی که اسفروئیدهای تومور HT_{29} با ماکروفاژها در نسبت ۱:۱ در محیط کشت حاوی محرک‌های ایمنی مانند هتروگلیکان یا LPS (lipopolysaccharide) انکوبه شده بودند ایجاد ساختارهای کروی و مهاجرت سلول‌های توموری از حاشیه اسفروئیدها افزایش معنی‌داری داشته و ۴۶ درصد تهاجم بالاتر مشاهده گردید (۲۲).

در بخش دیگری از مطالعه حاضر از پاکلی تاکسل (به‌عنوان مرجع بازدارنده رشد سلول‌های توموری) جهت بررسی نقش ماکروفاژهای مرتبط با تومور در مقاومت دارویی سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی استفاده گردید. نتایج مرتبط با بررسی زنده‌مانی سلولی نشان داد که فقط در گروه‌هایی که سلول‌های متاستاتیک توموری مغزی و ماکروفاژهای مرتبط با تومور در شرایط کشت سه‌بعدی و به‌طور هم‌زمان کشت شده بودند میزان اثربخشی دارویی پاکلی تاکسل کاهش و میزان زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به شرایط کنترل افزایش معنی‌داری داشت. براساس مطالعات گذشته و دانش موجود عوامل درمانی، ازجمله تاکسول، دینامیک میکروتوبول را مختل می‌کنند و باعث توقف طولانی‌مدت میتوزی و متعاقب آن مرگ سلولی می‌شوند. ماکروفاژهای مرتبط با تومور مدت توقف میتوزی ناشی از تاکسولین را در سلول‌های سرطان سینه سرکوب می‌کنند و باعث تغییرات میتوزی می‌شوند که این موضوع باعث کاهش شکل فسفریله هیستون H_2 ، کاهش فعال‌سازی P_{53} و درنهایت کاهش مرگ سلول‌های سرطانی در فاز اینترفاز مرتبط است. TAMها زنده ماندن سلول‌های سرطانی را به‌دنبال تغییرات میتوزی به شیوه‌ای حساس به مهار MAPK/ERK کیناز (MEK) افزایش می‌دهند (۲۳). همچنین در مطالعه دیگری فوتوایمونوتراپی با نانو میله‌های طلای کونژوگه با cetuximab مقاومت دارویی در اسفروئیدهای سرطان پستان سه‌گانه منفی را با افزایش نفوذ ماکروفاژهای مرتبط با توموری که به فنوتیپ ضدتومور M_1 تغییر کرده‌اند کاهش می‌دهد، درحالی‌که با افزایش نفوذ ماکروفاژهای مرتبط با تومور با فنوتیپ M_2 پاسخ دارویی کاهش می‌یابد (۲۴).

۱.۵. محدودیت‌های پژوهش

علی‌رغم تلاش بر طراحی مطالعه‌ای جهت نشان دادن عملکرد ماکروفاژهای مرتبط با تومور در مقاومت دارویی و

ماکروفاژهای M_1 معمولاً عملکردهای ضدتوموری و برعکس ماکروفاژهای M_2 قابلیت‌هایی در راستای تقویت و پیشرفت تومور دارند (۱۵).

بدیهی است که برای غلبه بر مقاومت دارویی تومورهای جامد، اثرات عوامل شیمی‌درمانی بر روی TAMها باید در نظر گرفته شود. بسیاری از مطالعات نقش TAMs را در پیشرفت تومور در سرطان‌های مختلف ازجمله پستان، پروستات، کولورکتال، معده، تخمدان، ملانوم، گلیوبلاستوما و غیره نشان داده‌اند (۱۶). درک مکانیسم‌های تعامل TAMs با عوامل شیمی‌درمانی در ریزمحیط توموری می‌تواند، ماکروفاژها و سایر اجزای التهابی و استرومایی را به‌عنوان اهداف بالقوه در مواجهه با توده‌های توموری تبدیل نماید (۱۷).

Wang و همکاران اظهار داشتند که هدف قرار دادن ماکروفاژهای مرتبط با تومور مانند M_2 یک رویکرد درمانی بالقوه برای غلبه بر مقاومت دارویی ضد تومور است و هدف‌گیری TAMهای شبه M_2 می‌تواند به‌طور مؤثر رشد تومور، متاستاز و غلبه بر مقاومت دارویی تومور را متوقف کند (۱۸).

در مطالعه‌ای در مورد افزایش مقاومت دارویی در سرطان پستان توسط ماکروفاژهای مرتبط با تومور و با بهره‌گیری از مسیر سیگنالینگ $L-10/STAT_3/bcl-2$ بیان شده است که مکانیسم احتمالی مقاومت دارویی تعدیل‌شده با TAMs ممکن است با افزایش بیان ژن $bcl-2$ و تنظیم بالا سیگنال‌دهی $STAT_3$ در سلول‌های تومور مرتبط باشد. علاوه بر این، انسداد $IL-10$ مشتق از TAMs توسط آنتی‌بادی خنثی‌کننده منجر به تضعیف فعال‌سازی $STAT_3$ و کاهش بیان $bcl-2$ mRNA و در نتیجه افزایش حساسیت سلول‌های سرطان سینه شد. داده‌های این مطالعه نشان می‌دهد که TAMs ممکن است مقاومت دارویی را از طریق مسیر سیگنالینگ $L-10/STAT_3/bcl-2$ القا کند و اهداف جدیدی را برای درمان تومور پستان فراهم کند (۱۹).

Xiao و همکاران در مطالعه‌ای دیگر با معرفی ماکروفاژهای مرتبط با تومور به‌عنوان بازیگران مهم در مقاومت دارویی سرطان پستان بیان کردند که براساس نقش کلیدی TAMها در مقاومت دارویی، امکان بالقوه‌ای برای هدف قرار دادن TAMها جهت کاهش مقاومت دارویی، با ممانعت از جذب، کاهش تعداد و افزایش فاگوسیتوز TAMs با توسعه استراتژی‌های درمانی جدید برای هدف قرار دادن TAMها برای غلبه بر درمان مقاومت حائز اهمیت است (۲۰).

در مطالعه حاضر و در جریان کشت سه‌بعدی، نتایج مربوط به تشکیل اسفروئید نشان‌دهنده ایجاد ساختارهای کروی چندسلولی توسط سلول‌ها توموری متاستاتیک بود. بررسی‌ها نشان می‌داد که توانایی سلول‌های توموری حین کشت هم‌زمان با سلول‌های ماکروفاژی توانایی بیشتری

مطالعه را از نظر اخلاق در تحقیقات حیوانی تأیید کرد (شماره ثبت: IR.IAU.SHAHROOD.REC.1401.055).

حمایت مالی و معنوی:

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود انجام شده است.

درمان سرطان متاستاتیک، محدودیت‌هایی نظیر بررسی فعالیت فارماکولوژیکی پاکلی تاکسل نظیر IC_{50} برای تعیین غلظت حداقلی اثربخشی دارو روی رده‌های سلولی و ارزیابی گروه‌های مورد مطالعه در یک مدل حیوانی با القا مجدد سرطان و بررسی آن می‌توانست نتایج این مطالعه را به شکل قوی‌تری اثبات گرداند، ادامه این بررسی در مطالعات آتی نویسندگان لحاظ و منتشر خواهد شد.

۲.۵. نتیجه‌گیری

بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان استنباط کرد که ماکروفاژهای مرتبط با تومور توانایی سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی را در زمینه تشکیل اسفروئید که بیانگر کشت در شرایط سه‌بعدی هستند را افزایش داد. همچنین این سلول‌ها باعث کاهش پاسخ به درمان و به عبارت دیگر مقاومت دارویی گردیدند. در ادامه ما برای درک بهتر و دقیق‌تر عملکرد TAMS و ارائه دیدگاه‌های درمانی در سرطان‌های متاستاتیک مطالعه بیشتری را در زمینه بهره‌گیری از این دانش جهت ادغام با رویکردهای جدید درمانی پیشنهاد می‌کنیم.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود و کلیه همکارانی که ما را در این طرح یاری کردند کمال تشکر را داریم.

مشارکت نویسندگان:

م. س.: انجام آزمایش‌ها (مطالعه حیوانی، کشت سلولی) و نوشتن پیش‌نویس اولیه؛ م. ک. ف.: مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، انجام آزمایش‌ها (مطالعه حیوانی، کشت سلولی)، نظارت بر آزمایشگران، نوشتن و ویرایش پیش‌نویس اولیه؛ الف. الف.: مفهوم‌سازی، روش‌شناسی؛ س. ز.: انجام آزمایش‌ها (مطالعه آزمایشگاهی)، نوشتن و بررسی.

تضاد منافع:

نویسنده اعلام می‌کند که هیچ تضاد منافی ندارد.

بازبایی داده‌ها:

مجموعه داده‌های ارائه شده در این مطالعه بنا به درخواست نویسنده مسئول در حین ارسال یا پس از انتشار در دسترس است. داده‌ها به صورت عمومی در دسترس نیستند.

کد اخلاق:

کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود، این

References

- Hajihosseini M, Amini P, Shahdoust M, Faradmal J, Sadeghyfar M, Sedighi-Pashaki A. [Application of log-normal parametric model in disability structure to predict metastasis and death due to breast cancer]. *Koomesh*. 2016;**18**(1):95-101. Persian.
- Saroukhani D, Norouzi R, Zali H, Sayehmiri K, Forozeshfard M. [The quality of life in cancer patients in Iran: A systematic review by using meta-analysis]. *Koomesh*. 2016;**18**(1):1-12. Persian.
- Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2013;**14**(10):1014-22. [PubMed ID:24048123]. [PubMed Central ID:PMC4118725]. <https://doi.org/10.1038/ni.2703>.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;**496**(7446):445-55. [PubMed ID:23619691]. [PubMed Central ID:PMC3725458]. <https://doi.org/10.1038/nature12034>.
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;**141**(1):39-51. [PubMed ID:20371344]. [PubMed Central ID:PMC4994190]. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;**140**(6):883-99. [PubMed ID:20303878]. [PubMed Central ID:PMC2866629]. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>.
- Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014;**41**(1):49-61. [PubMed ID:25035953]. [PubMed Central ID:PMC4137410]. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>.
- Yang Q, Guo N, Zhou Y, Chen J, Wei Q, Han M. The role of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor progression and relevant advance in targeted therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2020;**10**(11):2156-70. [PubMed ID:33304783]. [PubMed Central ID:PMC7714989]. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.004>.
- Firouzi Amandi A, Bahmanyar Z, Dadashpour M, Lak M, Natami M, Dogus Y, et al. Fabrication of magnetic niosomal platform for delivery of resveratrol: potential anticancer activity against human pancreatic cancer Capan-1 cell. *Cancer Cell Int*. 2024;**24**(1):46. [PubMed ID:38287318]. [PubMed Central ID:PMC10826113]. <https://doi.org/10.1186/s12935-024-03219-2>.

10. Khoshhravan L, Dadashpour M, Hashemi M, Zarghami N. Design and Development of Nanostructured Co Delivery of Artemisinin and Chrysin for Targeting hTERT Gene Expression in Breast Cancer Cell Line: Possible Clinical Application in Cancer Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2022;**23**(3):919-27. [PubMed ID:35345364]. [PubMed Central ID:PMC9360936]. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.3.919>.
11. Dylami S, Farahani MK, Kia V, Atashi A. Survival, Adhesion and Migration of Metastatic Breast Tumor Cells: Roles of Parvins (PARVA and PARVB). 2024. *Res Square.* 2024;**Preprint**.
12. Foty R. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *J Visualized Experime.* 2011(51). <https://doi.org/10.3791/2720-v>.
13. Alagheband Y, Jafari-gharabaghloou D, Imani M, Mousazadeh H, Dadashpour M, Firouzi-Amandi A, et al. Design and fabrication of a dual-drug loaded nano-platform for synergistic anticancer and cytotoxicity effects on the expression of leptin in lung cancer treatment. *J Drug Delivery Sci Technol.* 2022;**73**. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103389>.
14. Soheili M, Rezaei M, Salami M. [Anti-acetylcholine esterase activity of aqueous extract of lavandula angustifolia and its toxicity effect on HepG2 cell line]. *Koomesh.* 2017;**19**(2):263-8. Persian.
15. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol.* 2020;**11**:583084. [PubMed ID:33365025]. [PubMed Central ID:PMC7751482]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583084>.
16. Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology.* 2019;**8**(7):1596004. [PubMed ID:31143517]. [PubMed Central ID:PMC6527283]. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1596004>.
17. Heindryckx F, Gerwins P. Targeting the tumor stroma in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2015;**7**(2):165-76. [PubMed ID:25729472]. [PubMed Central ID:PMC4342599]. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i2.165>.
18. Wang S, Wang J, Chen Z, Luo J, Guo W, Sun L, et al. Targeting M2-like tumor-associated macrophages is a potential therapeutic approach to overcome antitumor drug resistance. *NPJ Precis Oncol.* 2024;**8**(1):31. [PubMed ID:38341519]. [PubMed Central ID:PMC10858952]. <https://doi.org/10.1038/s41698-024-00522-z>.
19. Yang C, He L, He P, Liu Y, Wang W, He Y, et al. Increased drug resistance in breast cancer by tumor-associated macrophages through IL-10/STAT3/bcl-2 signaling pathway. *Med Oncol.* 2015;**32**(2):352. [PubMed ID:25572805]. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0352-6>.
20. Xiao M, He J, Yin L, Chen X, Zu X, Shen Y. Tumor-Associated Macrophages: Critical Players in Drug Resistance of Breast Cancer. *Front Immunol.* 2021;**12**:799428. [PubMed ID:34992609]. [PubMed Central ID:PMC8724912]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.799428>.
21. Yin M, Li X, Tan S, Zhou HJ, Ji W, Bellone S, et al. Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *J Clin Invest.* 2016;**126**(11):4157-73. [PubMed ID:27721235]. [PubMed Central ID:PMC5096908]. <https://doi.org/10.1172/JCI87252>.
22. Devi KS, Mishra D, Roy B, Ghosh SK, Maiti TK. Assessing the immunomodulatory role of heteroglycan in a tumor spheroid and macrophage co-culture model system. *Carbohydr Polym.* 2015;**127**:1-10. [PubMed ID:25965450]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.035>.
23. Olson OC, Kim H, Quail DF, Foley EA, Joyce JA. Tumor-Associated Macrophages Suppress the Cytotoxic Activity of Antimitotic Agents. *Cell Rep.* 2017;**19**(1):101-13. [PubMed ID:28380350]. [PubMed Central ID:PMC5614506]. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.038>.
24. Emami F, Pathak S, Nguyen TT, Shrestha P, Maharjan S, Kim JO, et al. Photoimmunotherapy with cetuximab-conjugated gold nanorods reduces drug resistance in triple negative breast cancer spheroids with enhanced infiltration of tumor-associated macrophages. *J Control Release.* 2021;**329**:645-64. [PubMed ID:33022330]. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.001>.

Research Article

Investigating the Role of Tumor-Associated Macrophages in the Resistance of Brain Metastatic Tumor Cells to Paclitaxel in Two-Dimensional and Three-Dimensional Cell Culture Conditions

Mahnaz Siahi ¹, Mohammad Kamalabadi-Farahani ^{2,*}, Amir Atashi ³, Sepehr Zamani ⁴

¹Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

²Department of Tissue Engineering, School of Medicine, Shahrood University of Medical Sciences, Shahrood, Iran

³Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Shahrood University of Medical Sciences, Shahrood, Iran

⁴Student Research Committee, School of Medicine, Shahrood University of Medical Sciences, Shahrood, Iran

*Corresponding Author: Department of Tissue Engineering, School of Medicine, Shahrood University of Medical Sciences, Shahrood, Iran. Email: kamalabadi@shmu.ac.ir

Received 08/06/2024; Accepted 14/09/2024

Abstract

Background: Brain metastasis is a devastating complication in breast cancer patients. Tumor-associated macrophages (TAMs) are cells in innate immunity, repair, and homeostasis. These cells play an important role in drug resistance in the metastatic microenvironment.

Objectives: In this study, the roles of TAMs in the resistance of brain metastatic cells to paclitaxel were evaluated in two-dimensional and three-dimensional cell culture conditions.

Methods: After the generation of a mouse model of breast cancer, brain metastatic tumor cells named 4T1B were isolated from brain metastasis lesions in mice. Simultaneous cultivation of RAW macrophage cells and 4T1B tumor cells was done in 2D and 3D (multicellular spheroids) culture mediums. The cytotoxic activity of paclitaxel on cells was evaluated by MTT assay.

Results: The results of this study show that TAMs cause a significant increase in paclitaxel resistance in brain metastatic cells only in 3D cell culture. Also, spheroidal formation was greater in terms of number and size when metastatic cells and macrophages were cultured simultaneously.

Conclusion: Therefore, according to the results of this study, it can be concluded that tumor-related macrophages increased brain metastatic cells in terms of spheroid formation, which indicates that they are cultured in three-dimensional conditions. Also, these cells reduce the response to treatment, or, in other words, drug resistance. These results may provide useful insights for future studies in cancer chemoresistance.

Keywords: Tumor-Associated Macrophages, Brain Neoplasms, Drug Resistance, Paclitaxel, Spheroids