



The comparative study of growth and drug response of MCF-7 and MDA-MB231 human breast cancer cells in two- and three-dimensional culture

Sefidgar E^a, Akbari-Birgani SH^{b*}

^a Department of Biological Sciences, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan 45137-66731, Iran

^{b*} Department of Biological Sciences, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan 45137-66731, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Sefidgar E, Akbari-Birgani SH. The comparative study of growth and drug response of MCF-7 and MDA-MB231 human breast cancer cells in two- and three-dimensional culture. *Journal of Cell and Tissue*. 2022;13(2):121-134.

 <https://10.52547/ICT/13.2.121>

KEYWORDS

Breast cancer, Three-dimensional cell culture, Drug response, Molecular phenotype

ABSTRACT

Aim: The three-dimensional (3D) culture of cancer cells is a method that provides the possibility for growth and comprehensive communication of cells in a 3D space, leading to the generation of tumorspheres. In recent years, developing tumor models from cancer cells by using the 3D cell culture method has attracted a lot of attention because it has been introduced as an accurate and reliable strategy for studying cancer stem cells (CSCs) and CSC-based therapeutics. The 3D tumor models in comparison to the monolayer culture (two-dimensional (2D) culture) of cells more resemble in vivo conditions. Because in tumor models, the tumor microenvironment, cell to cell and cell to extracellular matrix interactions and hypoxia condition, which is necessary for the survival of CSCs, are well reproduced. Through the use of several types of cells, including cancer and stromal cells, tumor models have the ability to develop and reflect the complexity of the tissue of interest, which in such a case, are even more accurate models in reflecting the biochemical and physical conditions of the body. Therefore, in the present study, the 3D model of breast cancer has been constructed with the aim of investigating the relationship between the cell behavior and the cell culture conditions (2D and 3D), and a comparative study of the growth and drug response of the two human breast cancer cell lines; MCF-7, and MDA-MB-231. **Material**

* Corresponding author. Tel.: +98- 24-33159904 ; Fax: +98- 24-33159940

E-mail address: sh.akbari@iasbs.ac.ir

DOI: <https://10.52547/ICT/13.2.117>

Received: December 28, 2021; Received in revised form: February 27, 2022; Accepted: April 27, 2022

Original Article

© Author



and Methods: The two breast cancer cell lines, MCF-7, and MDA-MB-231, were cultured in 2D and 3D (in two modes; on top and embedded) on the Matrigel-based scaffold. The molecular phenotype of cells based on surface markers was examined by flow cytometry. Mammosphere growth was followed in 12 days and their growth kinetics was determined. To evaluate the drug response of cells, two anticancer drugs; actinomycin D and paclitaxel were applied. Primarily, the IC50 values of the two drugs were evaluated, then the generated mammospheres were treated at the indicated dose of the drugs, and their effect on the growth of the mammospheres was followed.

Results: The MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines cultured in 2 and 3D, showed a significant difference in their molecular phenotypes. So, it seems that the expression of CD44 has significantly decreased. On the other hand, the growth rate of cells in two different modes of 3D culture; on top and embedded, is different. Likely, the drug response evaluation shows a significant difference in 2D and 3D culture, so that the inhibitory effect of paclitaxel compared to actinomycin D has decreased in 3D culture. In addition, the results show that MCF-7 and MDA-MB231 have different drug responses, which can be affected by their different molecular phenotypes. **Conclusion:** The results of the study confirm that the molecular phenotype of cancer cells, their growth, and drug response are strongly affected by the type of the understudied cell lines, the cell culture method, and the applied drug. Consequently, conducting cancer studies as accurately as possible requires obtaining a model that is most similar to the corresponding tumor in the body.



مطالعه مقایسه‌ای رشد و پاسخ دارویی سلول‌های MDA-MB231 و MCF-7 سرطان پستان انسانی در کشت دو- و سه بعدی

عرفان سفیدگر^۱، شیوا اکبری بیرگانی^{۱*}

^۱ کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، ایران

^۲ دکتری تخصصی بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، ایران sh.akbari@iasbs.ac.ir

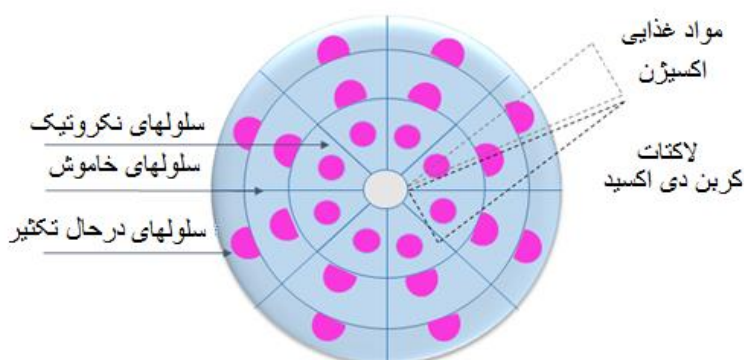
چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: کشت سه بعدی سلولهای سرطانی، روشی است که در آن سلول‌ها فرصت رشد و ارتباط همه جانبه در یک فضای سه بعدی داشته و توده های سلولی با نام توموسفر ایجاد می‌کنند. در سالهای اخیر، توسعه مدل های توموری از سلول های سرطانی با به‌کارگیری روش های کشت سه بعدی به عنوان استراتژی دقیق و قابل اعتماد جهت مطالعه سلول های بنیادی سرطانی و شناسایی رویکردهای درمانی مبتنی بر سلول بنیادی سرطانی شناخته می‌شود. مدل‌های سه‌بعدی در مقایسه با روش مرسوم کشت تک لایه، شباهت بیشتری به شرایط درون تنی دارند. زیرا در مدل‌های توموری، ریزمحیط توموری، تعاملات سلول-سلول و سلول-ماتریکس خارج سلولی و شرایط هیپوکسی که لازمه بقا سلول های بنیادی سرطان است به خوبی بازتولید می‌شود. مدل‌های توموری از طریق بکارگیری چندین گونه سلولی از جمله سلولهای سرطانی و استرومایی در ساخت، به خوبی قابلیت توسعه و بازتاب پیچیدگی بافتی را دارند که در چنین حالتی، حتی مدلی دقیقتر در بازتاب شرایط واقعی بدن محسوب می‌شوند. ازینرو در مطالعه حاضر، ساخت مدل سه بعدی سرطان پستان با هدف بررسی ارتباط رفتار سلولی با شرایط کشت (دو بعدی و سه بعدی)، مطالعه مقایسه‌ای رشد و پاسخ دارویی دو رده سلول سرطان پستان انسانی انجام شده است. مواد و روش‌ها: دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 به صورت دو بعدی و سه بعدی (به دو شیوه کشت در سطح و کشت غوطه ور) بر روی داربست ماتریزل کشت داده شدند. فنوتیپ مولکولی سلول‌ها بر حسب مارکرها سطحی با استفاده از روش فلوسایتومتری بررسی شد. رشد ماموسفرها در ۱۲ روز دنبال و کنتیک رشد آنها مشخص شد. برای بررسی پاسخ دارویی دو داروی ضدسرطان اکتینومایسین دی و پکلی تاکسل مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا مقادیر IC50 دو دارو برای رده های سلولی مورد مطالعه تعیین شد، سپس ماموسفرهای تولید شده با دوز مشخص دارو تیمار و اثر آنها بر رشد ماموسفرها دنبال شد. نتایج: دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 که به‌صورت دو بعدی و سه بعدی کشت داده شدند تفاوت معنی‌داری در فنوتیپ مولکولی نشان می‌دهند. به گونه ای که بنظر میرسد پس از کشت سه بعدی بیان مارکر سطحی CD44 بطور قابل توجهی کاهش داشته است. از طرفی ویژگی‌های رشدی سلولهای مورد مطالعه در دو حالت مختلف کشت سه بعدی اختلاف قابل توجهی نشان می‌دهند. مطالعات پاسخ دارویی نیز به‌طور مشابه گویای اختلاف پاسخ دارویی در شرایط کشت دو</p>	<p>سرطان پستان، کشت سلولی سه بعدی، پاسخ دارویی، فنوتیپ مولکولی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۷</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۷</p>

بعدی و سه بعدی است به گونه‌ای که اثر مهارکنندگی داروی پکلی‌تاکسل در مقایسه با داروی اکتینومیسین دی، در شرایط کشت سه بعدی کاهش داشته است. علاوه بر آن نتایج نشان می‌دهند که دو رده MCF-7 و MDA-MB231 نیز پاسخ دارویی متفاوتی دارند که می‌تواند متاثر از فنوتیپ مولکولی متفاوت آن‌ها باشد. نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج حاصل از پژوهش انجام شده، موید این نکته است که فنوتیپ مولکولی سلول‌های سرطانی، ویژگی‌های رشدی و پاسخ دارویی آن‌ها به شدت متاثر از نوع رده سلولی مورد مطالعه، شیوه کشت آن‌ها و نوع داروی به کار رفته است. بنابراین انجام هرچه دقیق‌تر مطالعات سرطانی مستلزم دستیابی به مدلی است که بیشترین شباهت را با تومور مربوطه در بدن داشته باشد.

۱- مقدمه

سرطان پستان یکی از انواع شایع سرطان در جمعیت زنان است. یکی از روش‌های درمانی مرسوم در درمان سرطان پستان، شیمی‌درمانی است که البته در بسیاری از موارد به دنبال آن، مقاومت دارویی گزارش شده است. عوامل مختلف از جمله ژنتیک، ریزمحیط و فاکتورهای دارویی می‌توانند اثربخشی یک دارو یا نحوه پاسخ سلول‌ها به داروی موردنظر را تحت تاثیر قرار دهند (۱).

امروزه کشت دو بعدی سلول یا کشت تک لایه، مرسوم‌ترین روش مطالعه آزمایشگاهی سلول‌های سرطانی، کشف دارو و بررسی پاسخ دارویی است. در روش کشت دو بعدی، سلول‌ها به صورت چسبیده به بستر پلاستیکی کشت داده می‌شوند، سلول‌ها به صورت جانبی با یکدیگر در ارتباط هستند و توده‌های سلولی که کلنی گفته می‌شوند را به وجود می‌آورند (۲). کشت سه بعدی سلول، نوع دیگر کشت سلولی است که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. در این روش، سلول‌های سرطانی به صورت همه جانبه در یک فضای سه بعدی با یکدیگر در ارتباط بوده و توده‌های سلولی با نام توموسفر ایجاد می‌کنند (۳). توموسفرها تا حدی شبیه به تومور، ساختار لایه‌ای ناهمگن دارند به طوری که سلول‌های سرطانی توزیع یکنواختی در این لایه‌ها ندارند. سلول‌های در حال تکثیر بیشتر در لایه بیرونی و سلول‌های خاموش در لایه‌های میانی قرار دارند. سلول‌های نکروزی شده در مرکز تومور تجمع می‌یابند (شکل ۱) (۴). در توموسفرها به ویژه در انواع بزرگ‌تر از ۴۰۰ میکرومتر، مشابه تومورهای با رگزایی ضعیف، شیب تغذیه و اکسیژن ایجاد می‌شود که بر ناهمگونی سلولی اثر مستقیم دارد (۵). در کشت‌های دو بعدی، ویژگی‌های بیوشیمیایی و بیومکانیکی سلول‌ها با آنچه در ریزمحیط اصلی آن‌ها مشاهده می‌شود، متفاوت است. به‌عنوان مثال، در بسیاری موارد سلول‌های سرطانی در شرایط کشت دو بعدی به داروهای ضدسرطان حساسیت خوبی نشان می‌دهند، اما در آزمایشات بالینی، زمانی که سلول‌ها به صورت توده سلولی توموری در بدن رشد کرده‌اند، در برابر همان داروها مقاومت بیشتری نشان می‌دهند (۶). بنابراین با توجه به این ناهمگونی سلولی در توموسفرها و از طرفی دیگر، با توجه به آرایش سلول‌ها در کنار هم و ارتباط همه جانبه آن‌ها انتظار می‌رود در مقایسه با کشت دو بعدی، رفتار سلول‌ها در کشت سه بعدی بازتاب واقعی‌تری از شرایط سلول‌های توموری در بدن انسان باشد.



شکل ۱: نمایش شماتیک موقعیت سلول‌های سرطانی در ساختار لایه‌ای توموسفر. لایه سطحی حاوی سلول‌هایی از نوع در حال تکثیر، لایه میانی حاوی سلول‌های خاموش و لایه داخلی حاوی سلول‌های نکروتیک است. هر چه موقعیت سلول‌های از سطح توموسفر به عمق تغییر می‌کند، فرصت دریافت اکسیژن و مواد غذایی کمتر شده و از طرفی میزان متابولیت‌های دفعی (دی اکسید کربن و لاکتات) بیشتر می‌شود.

کشت سه بعدی به دو شکل با داربست و بدون داربست انجام می‌شود. در کشت سه بعدی همراه با داربست، داربست زمینه‌ای مناسب جهت تعاملات بین سلولی و ماتریکس با سلول فراهم کرده و در حقیقت نقش ماتریکس خارج سلولی را ایفا می‌کند (۷). اخیراً داربست‌های متنوعی متشکل از مواد سنتزی زیست‌سازگار و یا مواد مشتق شده از بافت‌های طبیعی از قبیل اسید هیالورونیک، کلاژن، ماتریژل و همچنین ماتریکس خارج سلولی حاصل از سلول‌زایی مورد مطالعه قرار گرفته است (۸). از این میان، ماتریژل یکی از انواع پرکاربرد در کشت سه بعدی می‌باشد که با هدف ایجاد مدل‌های سلولی مانند ارگانوئیدها برای مطالعه رشد، متاستاز و تمایز سلولی استفاده شده است (۸، ۹). ماتریژل از ترکیبات لامینین، کلاژن نوع VI، انتاکتین، فاکتورهای رشد (EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor), TGF β (transforming growth factor beta), IGF (insulin-like growth factor)) و پلاسمینوژن فعال بافتی ساخته شده است که هر کدام در استحکام و برقراری اتصالات سلولی نقش دارند (۱).

در مطالعه حاضر به منظور بررسی ارتباط رفتار سلولی با شرایط کشت، مطالعه مقایسه‌ای رشد و پاسخ دارویی دو رده سلول سرطان پستان انسانی MCF-7 و MDA-MB231 در کشت دو بعدی و سه بعدی انجام شده است. در این مطالعه از ماتریژل به عنوان داربست سلولی برای کشت سه بعدی سلول‌ها بهره برده ایم. در کشت سه بعدی نیز دو حالت کشت سه بعدی/غوطه‌ور و کشت سه بعدی/در سطح در نظر گرفته شد. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که بسته به نوع سلول و نوع کشت، ویژگی‌های رشدی و پاسخ دارویی سلول‌های سرطان پستان با یکدیگر متفاوت است.

2- مواد و روش‌ها

رده‌های سلولی و کشت سلول: در این مطالعه از دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 (تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور) استفاده شد. سلول‌های مورد مطالعه در محیط کشت حاوی RPMI1640 (Gibco)، FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco) ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین استرپتومایسین ۱ درصد (Gibco) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و کربن دی اکسید ۵ درصد انکوبه شدند. پس از رشد سلول‌ها و رسیدن به تراکم مناسب برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

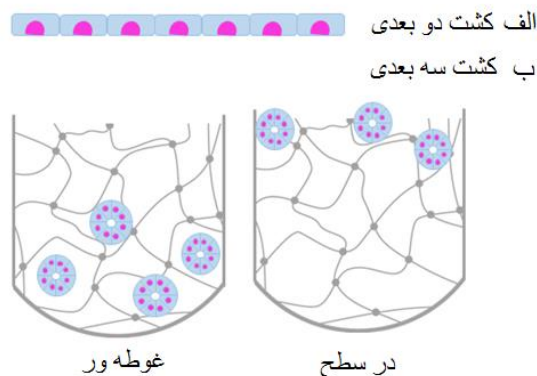
کشت سه بعدی روی داربست ماتریژل دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231: یکی از مهم‌ترین داربست‌های مورد استفاده در سیستم کشت سه بعدی، ماتریژل می‌باشد که از فاکتورهای رشد و پروتئین‌های تشکیل دهنده ماتریکس تشکیل

شده است (۸). در این مطالعه نیز به منظور ساخت داربست از ماتریزل (Corning) با دو روش کشت در سطح و کشت غوطه‌ور استفاده شد. شکل ۲ کشت سلول به حالت‌های مختلف را به صورت شماتیک نمایش می‌دهد.

الف) ساخت داربست‌های ماتریزلی به روش سه بعدی در سطح (On top): در روش کشت سه بعدی/در سطح، تعداد 2×10^4 سلول به همراه ۵۵ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰ میکرولیتر ماتریزل درون چاهک پوشیده شده با ۲۰ میکرولیتر ماتریزل، کشت داده شد.

ب) ساخت داربست‌های ماتریزلی به روش سه بعدی غوطه‌ور (Embedded): در روش کشت سه بعدی/غوطه‌ور، تعداد 2×10^4 سلول به همراه ۱۰ میکرولیتر محیط کشت و ۵۵ میکرولیتر ماتریزل درون چاهک پوشیده شده با ۲۰ میکرولیتر ماتریزل، کشت داده شد.

به صورت روزانه تعویض محیط انجام شد و به منظور انجام مطالعات مورفومتریکی و بررسی کنتیک رشد، سلول‌های کشت شده به مدت ۲۱ روز با میکروسکپ اینورت (sorcim) و بزرگنمایی $100 \times$ تصویربرداری شدند. برای هر نمونه ۴ تصویر ثبت شد و حداقل ۰۵ کلنی یا ماموسفر مورد بررسی قرار گرفت. به منظور مطالعات مقایسه‌ای نیز همزمان تعداد 2×10^4 سلول نیز به روش دو بعدی کشت داده شد.



شکل ۲: نمایش شماتیک کشت سلولی دو بعدی (تک لایه) و کشت سلولی سه بعدی بر روی داربست ماتریزل با دو روش روی سطح (تصویر سمت راست) و غوطه‌ور (تصویر سمت چپ)

آنالیز مارکرهای سطحی CD44 و CD24 با روش فلوسایتومتری: جهت آنالیز فلوسایتومتری هر دو رده سلولی کشت داده شده به روش دو بعدی و سه بعدی (بدون داربست در پلیت‌های غیرچسبنده)، ابتدا تریپسین شدند، سپس تریپسین موجود در سوسپانسیون سلولی با استفاده از محیط کشت خنثی شد. تعداد 5×10^5 سلول از هر گروه سلولی برداشت شد. پس از سه بار شستشو با بافر فسفات نمکی (Phosphate buffer saline; PBS)، سلول‌ها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد تثبیت شدند. سلول‌های تثبیت شده مجدداً دو بار با PBS شستشو داده شده و سوسپانسیون شدند. FITC-anti CD24 و PE-anti CD44 (Biolegend) در غلظت‌های ۱ میکرومولار به سلول‌ها اضافه شدند. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شده و سپس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری، BD FACS Calibur (BD Biosciences) خوانش مارکرهای سطحی انجام شد.

تعیین غلظت IC50 دو داروی اکتینومایسین دی و پکلی تاکسل: در این تحقیق از دو داروی پروآپتوتیک اکتینومایسین دی و پکلی تاکسل که به ترتیب مهارکننده رونویسی DNA و مهارکننده تقسیم سلولی هستند، استفاده شد. به منظور مشخص کردن غلظت موثر دو داروی اکتینومایسین دی و پکلی تاکسل، سنجش (2,5-diphenyl-2H-tetrazolium)

(MTT bromide) انجام شد. به این منظور در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول کشت داده شد. یک روز پس از انکوباسیون سلول‌ها، داروی اکتینومایسین دی در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و داروی پکلی تاکسل در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط کشت سلول‌ها اضافه شده و مجدداً سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت رویی تخلیه شده و محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سلول‌ها اضافه شد. سپس مجدداً سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور انکوبه شدند.

پس از انکوباسیون محلول رویی دور ریخته شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه پلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شده و غلظت IC50 (Half-maximal inhibitory concentration) محاسبه شد.

تیمار دارویی دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 به داروهای اکتینومایسین دی و پکلی تاکسل: به منظور بررسی پاسخ دارویی دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 به داروهای اکتینومایسین دی و پکلی تاکسل، سلول‌ها جهت تشکیل کلنی در کشت دو بعدی و ماموسفر در کشت سه بعدی، کشت داده شده و در روز ششم تیمار دارویی این دو رده با دو داروی مورد مطالعه که غلظت IC50 آن‌ها برای هر کدام از دو رده سلولی طبق جدول ۱ به دست آمده بود، انجام شد. غلظت IC50 داروی پکلی تاکسل در رده سلولی MCF-7 برابر ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در رده سلولی MDA-MB-231 برابر ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است و غلظت IC50 داروی اکتینومایسین دی در هر دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 برابر ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. پس از تیمار دارویی، تصویربرداری روزانه از آن‌ها تا روز ۲۱ ادامه پیدا کرد. آنالیز مورفومتریک تصاویر که مبتنی بر اندازه کلنی و ماموسفرها است، با استفاده از نرم‌افزار Image J انجام شده و در انتها تغییرات به صورت نمودار ثبت شد.

جدول ۱: مقادیر IC50* دو داروی اکتینومایسین دی و پکلی تاکسل برای دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB231

رده سلولی		داروها
MCF-7	MDA-MB-231	
۱۰۰	۱۰۰	اکتینومایسین دی (نانوگرم بر میلی‌لیتر)
۵۰	۱۰	پکلی تاکسل (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
		IC50*؛ غلظت مهار میانه

3- آنالیز آماری

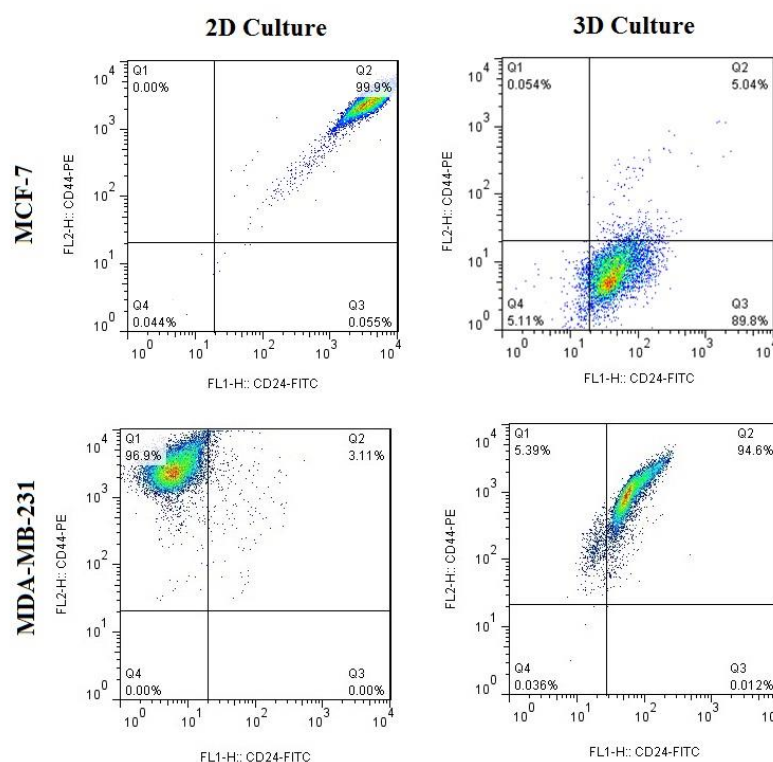
تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 7 انجام شد. برای تعیین تفاوت های معنی دار آنالیز آماری 2way ANOVA انجام شد. مقادیر $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

4- نتایج

زیر جمعیت‌های سلولی بر حسب فنوتیپ مولکولی چهارگانه

به منظور تعیین زیر جمعیت‌های سلولی بر حسب فنوتیپ مولکولی آنالیز فلوسایتومتری دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 انجام شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، در سلول‌های MCF-7 در کشت دو بعدی، ۹۹/۹ درصد سلول‌ها دارای

فنوتیپ مولکولی CD44+/CD24+، ۰/۰۵ درصد دارای فنوتیپ مولکولی CD44-/CD24+، ۰/۰۴ درصد دارای فنوتیپ مولکولی CD44-/CD24- بوده و فنوتیپ مولکولی CD44+/CD24- اصلا در جمعیت سلولی MCF-7 کشت شده به روش دو بعدی دیده نمی‌شود. در سلول‌های MCF-7 در کشت سه بعدی، ۵/۰۳ درصد سلول‌ها دارای فنوتیپ مولکولی CD44+/CD24+، ۸۹/۸ درصد دارای فنوتیپ مولکولی CD44-/CD24+، ۰/۰۵ درصد دارای فنوتیپ مولکولی CD44+/CD24- بوده و ۵/۱ درصد فنوتیپ مولکولی CD44-/CD24- اصلا در جمعیت سلولی MCF-7 کشت شده به روش سه بعدی دیده نمی‌شود. در کشت دو بعدی سلول‌های MDA-MB-231، ۳/۱۱ درصد سلول‌ها دارای فنوتیپ مولکولی CD44+/CD24+، ۹۶/۹ درصد دارای فنوتیپ مولکولی CD44+/CD24- بوده و اصلا دو فنوتیپ مولکولی CD44-/CD24+ و CD44-/CD24- اصلا در جمعیت سلولی MDA-MB-231 کشت شده به روش دو بعدی دیده نمی‌شود. در کشت سه بعدی سلول‌های MDA-MB-231، ۹۴/۶ درصد سلول‌ها دارای فنوتیپ مولکولی CD44+/CD24+، ۰/۰۱ درصد دارای فنوتیپ مولکولی CD44-/CD24+، ۵/۳۹ درصد دارای فنوتیپ مولکولی CD44+/CD24- بوده و ۰/۰۳ درصد فنوتیپ مولکولی CD44-/CD24- اصلا در جمعیت سلولی MDA-MB-231 کشت شده به روش سه بعدی دیده نمی‌شود.

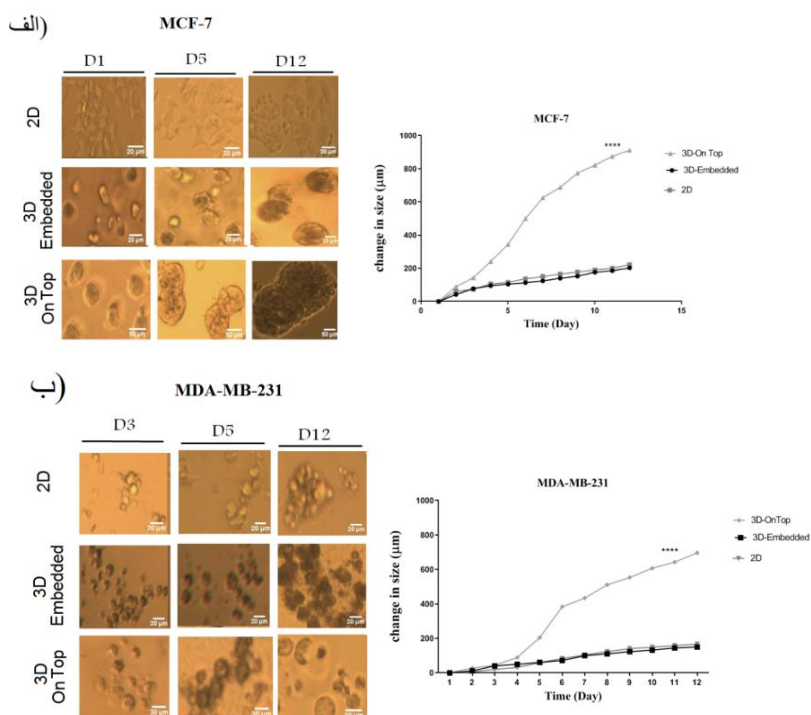


شکل ۳: نمایش توزیع زیرجمعیت‌های سلولی بر حسب فنوتیپ مولکولی چهارگانه (CD44⁺/CD24⁻, CD44⁺/CD24⁺, CD44⁻/CD24⁻, CD44⁻/CD24⁺) در جمعیت سلول‌های سرطانی MCF-7 و MDA-MB231 کشت شده به روش دو بعدی و سه بعدی.

کنتیک رشد دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 در کشت دو بعدی و سه بعدی

دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 به سه روش کشت دو بعدی، کشت سه بعدی/در سطح و کشت سه بعدی/غوطه‌ور کشت داده شدند. رشد توده‌های سلولی به صورت کلنی و ماموسفر در طول ۱۲ روز دنبال شد. با ارزیابی تغییرات سایز کلنی و

ماموسفرهای تشکیل شده ضمن کشت دو بعدی و سه بعدی، کنتیک رشد دو رده سلولی در سه حالت مختلف کشت بررسی شد (شکل ۴). همانطور که در شکل ۴-الف دیده می‌شود، تغییرات سایز توده‌های سلولی MCF-7 در دو وضعیت کشت دو بعدی و سه بعدی/غوطه‌ور مشابه یکدیگر است در حالی که سلول‌های کشت شده به‌روش سه بعدی/در سطح از روز دوم به بعد اختلاف سایز قابل توجهی را نشان می‌دهند. شکل ۴-ب وضعیت مشابهی را برای سلول‌های MDA-MB-231 نشان می‌دهد. با این اختلاف که ماموسفرهای تشکیل شده از رده سلولی MCF-7 در کشت به روش سه بعدی-در سطح در مقایسه با ماموسفرهای تشکیل شده از رده سلولی MDA-MB-231 حدوداً ۲۰۰ میکرومتر اندازه بزرگ‌تری دارند، درحالی که این دو رده در دو روش دیگر کشت (کشت دو بعدی و سه بعدی غوطه‌ور) اندازه نسبتاً یکسانی را نشان می‌دهند.



شکل ۴: مقایسه رشد سلولی در کشت دو بعدی و سه بعدی. الف) تصاویر میکروسکوپی سه گروه سلول‌های MCF-7 کشت شده به سه روش دو بعدی و سه بعدی/در سطح و سه بعدی/غوطه‌ور، نمودار سمت چپ تغییرات سایز کلنی سلولی در کشت دو بعدی و ماموسفرها را در طول ۱۲ روز نشان می‌دهد. ب) تصاویر میکروسکوپی سه گروه سلول‌های MDA-MB231 کشت شده به سه روش دو بعدی و سه بعدی/در سطح و سه بعدی/غوطه‌ور، نمودار سمت چپ تغییرات سایز کلنی سلولی در کشت دو بعدی و ماموسفرها را در طول ۱۲ روز نشان می‌دهد (انحراف معیار کمتر از ۵ درصد است و $P < 0.0001$).

تیمار سلولی با دو داروی اکتینومایسین دی و پکلی تاکسل و تعیین IC50

تیمار سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 با دو داروی اکتینومایسین دی و پکلی تاکسل در غلظت‌های مشخص به مدت ۲۴ ساعت انجام شد و غلظت IC50 برای هر دو رده سلولی با استفاده از تست MTT تعیین شد. نتایج حاصل از بقای سلول‌ها با استفاده از روش رگرسیون غیرخطی و معادله دوز-پاسخ در نرم‌افزار Graphpad prism 8 آنالیز شده و مقدار IC50 مشخص شد. همانطور که در شکل ۵-الف دیده می‌شود هر دو رده سلولی در پاسخ به تیمار دارویی رفتار وابسته به دوز نشان می‌دهند. مقدار

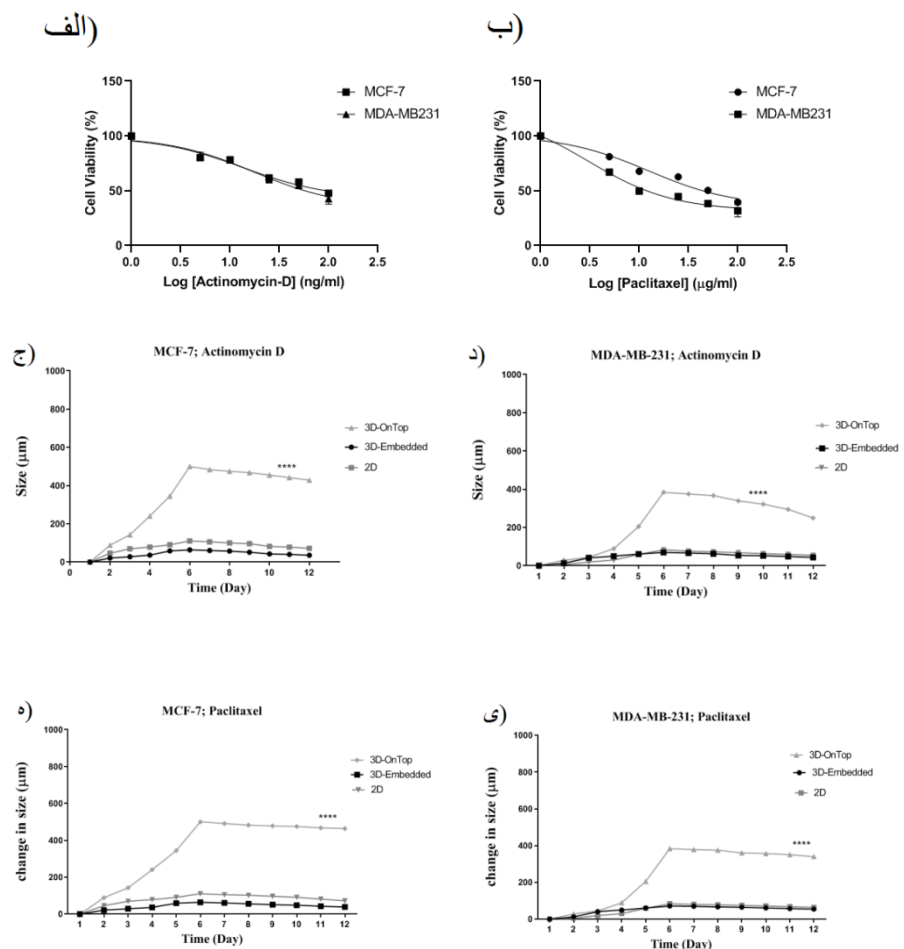
IC50 طبق جدول ۱ برای داروی اکتینومایسین دی در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 معادل ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و برای داروی پکلی تاکسل در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 به ترتیب معادل ۵۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

پاسخ سلول‌های کشت شده به روش‌های تک لایه، سه بعدی/در سطح و سه بعدی/غوطه‌ور به داروی اکتینومایسین دی

به منظور بررسی پاسخ دارویی سلول‌های کشت شده در وضعیت سه بعدی، ۶ روز پس از کشت سلولی، یعنی زمانی که سلول‌ها در فاز لگاریتمی رشد خود هستند، اسفروئیدهای هر دو رده سلولی در هر سه نوع کشت با غلظت ۱۰۰ نانوگرم از داروی اکتینومایسین دی تیمار شدند. تغییرات اندازه کلنی و ماموسفرها در حضور دارو طی ۶ روز به عنوان معیاری از پاسخ دارویی در نظر گرفته شد. بررسی تغییرات رشدی سلول‌ها در طول ۱۲ روز (پیش و پس از تیمار) در شکل ۵-ب نشان داده شده است. نتایج حاکی از آنست که پس از انجام تیمار دارویی، رشد توده‌های سلولی کاهش یافته و شیب خط منفی می‌شود.

پاسخ سلول‌های کشت شده به روش‌های تک لایه، سه بعدی-در سطح و سه بعدی-غوطه‌ور به داروی پکلی تاکسل

مقدار IC50 داروی پکلی تاکسل به دست آمده برای دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 در جدول ۱ حساسیت متفاوت دو رده سلولی را نشان می‌دهد به گونه‌ای که رده سلولی MDA-MB-231 در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و رده سلولی MCF-7 در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مرگ ۵۰ درصدی را نشان می‌دهند. بنابراین تیمار سلولی ماموسفرهای هر دو رده با مقادیر IC50 منطبق با هر رده در روز ۶ پس از کشت انجام شد و تصویر برداری تا روز ۱۲ ادامه پیدا کرد. همان‌طور که در شکل ۵-ج دیده می‌شود، پس از انجام تیمار دارویی، رشد توده‌های سلولی کاهش می‌یابد.



شکل ۵: پاسخ دارویی. سمیت سلولی: الف) داروی اکتینومایسین دی و ب) پکلی تاکسل بر روی دو رده سلولی MCF-7 و MDA-

MB231. سلول‌های سرطانی MCF-7 و MDA-MB231 با دوزهای مختلف داروی اکتینومایسین دی (۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و پکلی تاکسل (۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند. ۲۴ ساعت پس از تیمار میزان کشندگی داروها با روش MTT ارزیابی شد. (ج) نمودار رشد سه گروه سلول‌های MCF-7 کشت شده به سه روش دو بعدی و سه بعدی/در سطح و سه بعدی/غوطه‌ور پس از تیمار با داروی اکتینومایسین دی (۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)، (د) نمودار رشد سه گروه سلول‌های MDA-MB231 کشت شده به سه روش دو بعدی و سه بعدی/در سطح و سه بعدی/غوطه‌ور پس از تیمار با داروی اکتینومایسین دی (۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر). (ه) نمودار رشد سه گروه سلول‌های MCF-7 کشت شده به سه روش دو بعدی و سه بعدی/در سطح و سه بعدی/غوطه‌ور پس از تیمار با داروی پکلی تاکسل (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، (ی) نمودار رشد سه گروه سلول‌های MDA-MB231 کشت شده به سه روش دو بعدی و سه بعدی/در سطح و سه بعدی/غوطه‌ور پس از تیمار با داروی پکلی تاکسل (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). در هر دو گروه آزمایش، تیمار دارویی در روز ششم انجام شد و رشد ماموسفرها تا روز دوازدهم پس از کشت دنبال شد (انحراف معیار کمتر از ۵ درصد است و $P < 0.0001$ ***).)

۵- بحث

در سال‌های اخیر کشت سلولی سه بعدی به دلیل شباهت بیشتر به شرایط *in vivo* (در مقایسه با کشت دو بعدی)، به‌عنوان روشی مناسب برای مطالعه سلول‌های سرطانی، به ویژه شناسایی کاندیداهای دارویی علیه سرطان، معرفی شده است. در مطالعه حاضر فنوتیپ مولکولی دو رده سلولی سرطان سینه MCF-7 و MDA-MB-231 در کشت سه بعدی در مقایسه با دو بعدی بررسی شد. در ادامه رفتار رشدی و پاسخ دارویی سلول‌ها با سه حالت کشت؛ دو بعدی، سه بعدی/در سطح و سه بعدی/غوطه‌ور، مورد بررسی قرار گرفت.

مارکرهای سطحی سلول، گلیکوپروتئین‌هایی هستند که در سطح سلول‌ها قرار دارند و برای بقای سلول، تنظیم ویژگی‌های سلول و فعالیت‌های سلولی ضروری هستند (۱۰). اکثر سلول‌های سرطانی گلیکوزیلاسیون نابه‌جا را نشان می‌دهند (۱۱، ۱۲). دو مارکر اصلی شناسایی سلول‌های سرطان پستان، CD24 و CD44 هستند (۱۳). در حقیقت، سلول‌های سرطانی پستان از چهار زیر مجموعه $CD44+/CD24+$ ، $CD44+/CD24-$ ، $CD44-/CD24+$ و $CD44-/CD24-$ با فراوانی مختلف تشکیل شده‌اند. سلول‌های $CD44+/CD24+$ فراوان‌ترین و متمایزترین نوع هستند. فنوتیپ $CD44+/CD24-/low$ به CSCها نسبت داده شده است (۱۴). (۱۵). مطالعه فنوتیپ مولکولی دو رده سلول MCF-7 و MDA-MB-231 نشان می‌دهد که جمعیت غالب سلول‌های MCF-7 از نوع $CD44+/CD24+$ است در حالی که جمعیت غالب سلول‌های MDA-MB-231 از نوع $CD44+/CD24-$ است (شکل ۳). نکته جالب این‌که این سلول‌ها در کشت سه بعدی فنوتیپ مولکولی متفاوتی نسبت به همان سلول‌ها در کشت دو بعدی دارند. به گونه‌ای که جمعیت غالب سلول‌های MCF-7 در کشت سه بعدی از نوع $CD44-/CD24+$ است و جمعیت غالب سلول‌های MDA-MB-231 در کشت سه بعدی از نوع $CD44+/CD24+$ است. اختلاف مشاهده شده در فنوتیپ مولکولی دو رده سلولی مورد مطالعه به اختلاف رفتاری این سلول‌ها مرتبط می‌باشد. به گونه‌ای که سلول‌های MDA-MB-231 که به طور غالب از زیر جمعیت $CD44+/CD24-$ تشکیل شده‌اند، رفتار متاستاتیک بیشتری دارند. زیرا بیان بالای CD44 به‌عنوان یکی از شاخص‌های متاستاز معرفی شده است. تغییر فنوتیپ مولکولی به دنبال تغییر ریز محیط سلول‌ها (کشت سه بعدی) گویای پلاستیسیته سلول‌های سرطانی است که در اثر تغییر آرایش سلولی در محیط و تغییر ارتباطات سلولی، ارتباطات سلول-سلول و سلول-ماتریکس خارج سلولی به‌وجود می‌آید. این تغییر فنوتیپ مولکولی سلول‌ها پیشتر نیز گزارش شده است. گزارش‌های قبلی نیز نشان داده‌اند که تغییر شرایط کشت دو بعدی به سه بعدی تأثیر مستقیمی بر ناهمگونی زیرجمعیت‌های سلول سرطانی و غنی‌سازی سلول‌های بنیادی سرطانی دارد (۵، ۱۶).

مقایسه رشد دو رده سلول MCF-7 و MDA-MB-231، در شرایط کشت دو بعدی و سه بعدی، انجام شد (شکل ۴). همان طور که نشان داده شده، سرعت رشد سلول‌های MCF-7 در مقایسه با MDA-MB-231 بیشتر است به گونه‌ای که ماموسفرهایی با سایز بزرگ‌تر ایجاد می‌کنند. نکته قابل توجه دیگر، رشد زیاد هر دو رده سلولی در شرایط کشت سه بعدی/در سطح نسبت به سه بعدی/غوطه‌ور است و ماموسفرهایی با سایز ۵ برابر بزرگ‌تر ایجاد می‌کنند. چنین مشاهده‌ای اشاره مستقیم به اثر نوع کشت و ارتباطات سلولی بر ویژگی رشدی سلول‌ها دارد.

به‌منظور انجام مطالعات دارویی با دو داروی اکتینومایسین دی و پکلی تاکسل، ابتدا مقدار IC50 این دو دارو برای دو رده سلولی مورد مطالعه تعیین شد، سپس سلول‌های کشت داده شده به روش‌های دو بعدی و سه بعدی در روز ۶ پس از کشت در غلظت معادل IC50

تیمار شدند (شکل ۵). بررسی تغییرات رشدی سلول‌ها در طول ۱۲ روز (پیش و پس از تیمار) حاکی از آن است که پس از انجام تیمار دارویی، تغییرات رشد توده‌های سلولی نزولی و رو به کاهش است. شیب نمودار ماموسفرهای تشکیل شده از رده سلولی MDA-MB-231 در هر سه روش کشت تندتر از شیب نمودار پاسخ دارویی ماموسفرهای تشکیل شده از رده سلولی MCF-7 بوده که نشان دهنده حساسیت بیشتر رده سلولی MDA-MB-231 به داروی اکتینومایسین دی می‌باشد. درحالی‌که اندازه ماموسفرهای MCF-7 پس از تیمار دارویی همچنان حدود ۲۰۰ میکرومتر بزرگ‌تر از رده سلولی MDA-MB-231 است و به نظر می‌رسد که رده سلولی MCF-7 در مقایسه با رده سلولی MDA-MB-231 مقاومت دارویی بیشتری دارد.

تیمار دارویی با داروی پکلی تاکسل نیز نتایج مشابه را نشان می‌دهد به‌گونه‌ای که نمودار تغییرات رشد پس از تیمار دارویی با داروی پکلی تاکسل برای رده MCF-7 شیب کندتر از رده MDA-MB-231 را نشان می‌دهد. اندازه ماموسفرهای MCF-7 پس از تیمار دارویی همچنان حدود ۲۰۰ میکرومتر بزرگ‌تر از رده سلولی MDA-MB-231 است. بنابراین به نظر می‌رسد که رده سلولی MCF-7 در مقایسه با رده سلولی 132-BM-ADM مقاومت دارویی بیشتری دارد. درحالی‌که شیب نمودار پاسخ دارویی ماموسفرهای تشکیل شده از رده سلولی 132-BM-ADM، از شیب نمودار پاسخ دارویی ماموسفرهای تشکیل شده از رده سلولی MCF-7 تندتر بوده و این نشان دهنده حساسیت بیشتر رده سلولی 132-BM-ADM کشت شده در شرایط سه بعدی به داروی پکلی تاکسل می‌باشد و گویای اثر برهم کنش‌های سلولی افزایش یافته (برهم کنش‌های سلول-سلول و سلول-ماتریکس خارج سلولی) بر پاسخ دارویی سلول‌ها است.

البته همانطور که در جدول ۱ نیز نشان داده شد، سلول‌های MDA-MB231 در کشت تک لایه نیز در مقایسه با رده سلولی MCF-7 حساسیت بیشتری به داروی پکلی تاکسل داشته و عدد IC50 کوچکتری دارند. اختلاف پاسخ دارویی دو رده MCF-7 و MDA-MB231 می‌تواند با فنوتیپ مولکولی متفاوت آن‌ها نیز در ارتباط باشد. گزارشات متعددی پیرامون بررسی ارتباط مقاومت دارویی مشاهده شده در سلول‌های سرطانی و الگوی بیان مارکرهای سطحی سلول‌های سرطانی وجود دارد که تا حدی متناقض می‌باشند.

برخی مطالعات مقاومت دارویی را به الگوی فنوتیپ مولکولی CD24-/low/CD44+ مرتبط دانسته‌اند و برخی دیگر آن را به بیان بالای CD24 نسبت می‌دهند (۱۷). به عنوان مثال مطالعه ای نقش CD24 در تنظیم مقاومت دارویی را گزارش می‌دهد. این مطالعه نشان می‌دهد که مهار بیان CD24 بسته به نوع دارویی تواند مقاومت دارویی را تغییر دهد. به گونه‌ای که مهار بیان CD24 بر کاهش حساسیت سلولی به داروی ۵-فلوروراسیل موثر بوده ولی بر داروی سیس پلاتین اثر ندارد (۱۸). مطالعه ای دیگر نشان می‌دهد که زیر جمعیت CD44+/CD24+/high به داروی دوستاکسول مقاومت بالاتری نشان می‌دهند، درحالی‌که زیر جمعیت CD44+/CD24-/low به داروی دوکسوروبیسین مقاومت نشان می‌دهند. نتایج این مطالعه CD24 را به عنوان بیومارکری برای انتخاب داروی مناسب شیمی درمانی معرفی می‌کند (۱۹).

پژوهش‌های پیشین نیز حاکی از آنست که در کشت سه بعدی حساسیت سلول‌ها به داروهای ضد سرطان کاهش پیدا می‌کند و این کاهش را می‌توان به افزایش برهم کنش‌های سلول-سلول و سلول-ماتریکس خارج سلولی نسبت داد (۲۰). ماتریکس خارج سلولی شبکه‌ای فعال است که ویژگی‌های بیومکانیکی و بیوشیمیایی ریزمحیط را تعدیل و به نوبه خود رفتار سلولی را تنظیم می‌کند (۲۱). مطالعات سرطان نشان داده‌اند که برهم کنش‌های سلول به سلول و سلول به ماتریکس خارج سلولی در رشد تومور، پیشرفت متاستاز، بقای سلولی، آپوپتوزیس و پاسخ دارویی سلول‌های توموری دخیل هستند (۱۶). برهم کنش‌های سلولی به شدت تحت تأثیر ریزمحیط فیزیولوژیکی آنها از جمله خواص بیوشیمیایی آن مانند سطوح اکسیژن و مواد مغذی، اجزای بیوشیمیایی و خواص فیزیکی ماتریکس خارج سلولی قرار دارد. از سوی دیگر، شرایط فیزیولوژیکی سلول‌های تشکیل دهنده توموسفر، مانند محیط هیپوکسیک و لایه‌های سلولی مختلف، منجر به ایجاد موانعی برای دارو شده و نفوذ دارو به داخل ماموسفر را دشوار می‌کند. از طرفی خواص بیوشیمیایی و بیومکانیکی ماتریکس خارج سلولی به شدت بر تعاملات متقابل سلول‌های سرطانی با ماتریکس خارج سلولی تأثیر می‌گذارند و در نتیجه خواص و رفتار سلول سرطانی را تعیین می‌کنند (۲۲). جالب آنکه برهم کنش‌های سلولی و ماتریکس خارج سلولی ناهمگن درون توموری حتی می‌تواند با تغییر اپیژنتیکی سلول‌های سرطانی بر پاسخ دارویی سلول‌های سرطانی تأثیر بگذارد (۲۲). همچنین نشان داده شده است که برهم کنش سلول-ها و محیط اطراف آن اثر زیادی بر شکل سلول، اسکلت سلولی، ساختار کروماتین و بیان ژن‌ها دارند. وقتی سلول‌های اپی‌تلیالی پستان انسان بر روی داربست کشت داده می‌شوند، مورفولوژی گرد به خود می‌گیرد که این مورفولوژی منجر به فشردگی کروموزومی و کاهش سایز هسته و در نتیجه داستیلاسیون هیستون‌ها و متعاقباً منجر به سرکوب بیان برخی از ژن‌ها می‌شود (۲۳).

بنابراین شبیه‌سازی محیط کشت سلولی به شرایط بدن یکی از ملزومات اساسی مطالعات سلولی است. از آن‌جا که در کشت سه بعدی اتصالات و ارتباطات سلولی همه‌جانبه بوده و پتانسیل دست‌ورزی ماتریکس خارج سلولی از نظر شکل و جنس آن وجود دارد، این روش

رویکردی مناسب‌تر در مطالعات سرطان محسوب می‌شود. البته انتخاب داربستی با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب که به خوبی بازتاب شرایط بدن باشد، یکی از چالش‌های اساسی این دست مطالعات می‌باشد.

۶- نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داده شد که دو رده سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB-231 فنوتیپ‌های مولکولی متفاوتی دارند و در کشت سه بعدی تغییر فنوتیپی همچنان به صورت متفاوت اتفاق می‌افتد. رشد هر دو رده سلولی در کشت سه بعدی/درسطح بیشتر از کشت دو بعدی و سه بعدی/غوطه‌ور است. ماموسفرهای تشکیل شده از رده سلولی MCF-7 بر روی داربست ماتریژل بزرگتر از ماموسفرهای تشکیل شده از رده سلولی MDA-MB-231 است. با وجودی که تیمار سلولی با هر دو دارو در غلظت معادل IC50 انجام شد، داروی اکتینومایسین دی نسبت به داروی پاکلی تاکسل اثر مهارکنندگی بیشتری بر رشد ماموسفرها داشته است. رده سلولی MDA-MB-231 در مقایسه با رده سلولی MCF-7 نسبت به داروهای اکتینومایسین دی و پاکلی تاکسل حساسیت دارویی بیشتری از خود نشان داد. به‌طور کلی می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که فنوتیپ مولکولی سلول‌های سرطانی، ویژگی‌های رشدی و پاسخ دارویی آن‌ها بر حسب نوع رده سلولی مورد مطالعه، شیوه کشت آن‌ها و نوع داروی به‌کار رفته بسیار متغیر می‌باشد. بنابراین برای انجام هرچه دقیق‌تر مطالعات سرطانی دستیابی به مدلی که بیشترین شباهت را با تومور مربوطه در بدن داشته باشد امری ضروری است.

7- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه انجام جهت پروژه قدردانی می‌شود.

8- منابع

1. Mur C, Martinez-Carpio PA, Fernandez-Montoli ME, Ramon JM, Rosel P, Navarro MA. Growth of MDA-MB-231 cell line: different effects of TGF-beta(1), EGF and estradiol depending on the length of exposure. *Cell Biol Int*. 1998;22(9-10):679-84.
2. Hoarau-Vechot J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *Int J Mol Sci*. 2018;19.(۱)
3. Sayde T, El Hamoui O, Alies B, Gaudin K, Lespes G, Battu S. Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11.(۲)
4. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):786-۸۰۱-
5. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-18.
6. Lu WD, Zhang L, Wu CL, Liu ZG, Lei GY, Liu J, et al. Development of an acellular tumor extracellular matrix as a three-dimensional scaffold for tumor engineering. *PLoS One*. 2014;9(7):e103672.
7. Napolitano AP, Dean DM, Man AJ, Youssef J, Ho DN, Rago AP, et al. Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels. *Biotechniques*. 2007;43(4):494, 6-500.
8. Dewitt DD, Kaszuba SN, Thompson DM, Stegemann JP. Collagen I-matrigel scaffolds for enhanced Schwann cell survival and control of three-dimensional cell morphology. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(10):2785-93.
9. Rijal G, Li W. A versatile 3D tissue matrix scaffold system for tumor modeling and drug screening. *Sci Adv*. 2017;3(9):e1700764.

10. Varki A, Kannagi R, Toole BP. Glycosylation Changes in Cancer. In: nd, Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY)2009.
11. Barkeer S, Chugh S, Batra SK, Ponnusamy MP. Glycosylation of Cancer Stem Cells: Function in Stemness, Tumorigenesis, and Metastasis. *Neoplasia*. 2018;20(8):813-25.
12. Christiansen MN, Chik J, Lee L, Anugraham M, Abrahams JL, Packer NH. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics*. 2014;14(4-5):525-46.
13. Holst S, Deuss AJ, van Pelt GW, van Vliet SJ, Garcia-Vallejo JJ, Koeleman CA, et al. N-glycosylation Profiling of Colorectal Cancer Cell Lines Reveals Association of Fucosylation with Differentiation and Caudal Type Homebox 1 (CDX1)/Villin mRNA Expression. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2016;15(1):124-40.
14. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):3983-8.
15. Li W, Ma H, Zhang J, Zhu L, Wang C, Yang Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Scientific reports*. 2017;7(1):13856.
16. Walker C, Mojares E, Del Rio Hernandez A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2018;19.(۱۰)
17. Ravindranath AK, Kaur S, Wernyj RP, Kumaran MN, Miletti-Gonzalez KE, Chan R, et al. CD44 promotes multi-drug resistance by protecting P-glycoprotein from FBXO21-mediated ubiquitination. *Oncotarget*. 2015;6(28):۲۱-۲۶۳۰۸:(
18. Onishi H, Suyama K, Yamasaki A, Oyama Y, Fujimura A, Kawamoto M, et al. CD24 Modulates Chemosensitivity of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Anticancer Res*. 2017;37(2):561-5.
19. Deng X, Apple S, Zhao H, Song J, Lee M, Luo W, et al. CD24 Expression and differential resistance to chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(24):38294-308.
20. Uematsu N, Zhao Y, Kiyomi A, Yuan B, Onda K, Tanaka S, et al. Chemo-sensitivity of two-dimensional monolayer and three-dimensional spheroid of breast cancer MCF-7 cells to daunorubicin, docetaxel, and arsenic disulfide. 2018;38(4):2101-8.
21. Amorim S, Reis CA, Reis RL, Pires RA. Extracellular Matrix Mimics Using Hyaluronan-Based Biomaterials. *Trends Biotechnol*. 2021;39(1):90-104.
22. Rybinski B, Yun K. Addressing intra-tumoral heterogeneity and therapy resistance. *Oncotarget*. 2016;7(44):72322-42.
23. Le Beyec J, Xu R, Lee S-Y, Nelson CM, Rizki A, Alcaraz J, et al. Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells. 2007;313(14):3066-75.