DOI: 10.22122/jims.v37i535.11883 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هفتم/شماره‌ی ۵۳۵/هفته‌ی سوم شهریور ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۱۲ تاریخ چاپ: ۱۳۹۸/۶/۱۵

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

کاربرد کشت سه بعدی در بهینه‌سازی تحقیقات دارویی سرطان: از روش‌های سنتی تا تکنولوژی نوین میکروسیالی

شبنم شهریوری[۱]، زینب باقری[۲]، ندا سرای گرد افشاری[۳]، حمید لطیفی[۴]

مقاله مروری

چکیده

با وجود هزینه‌های هنگفت و زمان بسیاری که در مراحل پیش کارآزمایی‌های بالینی صرف می‌شود، بیش از نیمی از فراورده‌های دارویی به دلیل عدم اثربخشی یا بروز عوارض جانبی از چرخه‌ی تولید حذف می‌گردند. این در حالی است که بروز مقاومت‌های دارویی و تفاوت‌های فردی، در بیماری‌های پیچیده‌ای همچون سرطان و نیز گسترش روزافزون مفهوم پزشکی شخصی، نیاز به ارایه‌ی مدل‌های کارآمد و مؤثر را در بررسی‌های دارویی بیش از پیش نمایان می‌سازد. کشت‌های سلولی، ابزارهای مهمی بررسی‌های دارویی هستند که در مراحل پیش کارآزمایی بالینی به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. امروزه، مسجل شده است که سهم عظیمی از عدم موفقیت مراحل پیش کارآزمایی بالینی به عدم موفقیت کشت‌های سلولی در شبیه‌سازی شرایط بدن بر می‌گردد. به همین دلیل، امروزه ظهور کشت‌های سه بعدی، پنجره‌ای جدید را به روی مطالعات دارویی گشوده است. مطالعات متعددی نشان می‌دهند که شیوه‌های نوین کشت سلول با توانایی شبیه‌سازی تعاملات سلول–سلول، سلول– ماتریکس و ایجاد شیب غلظت دارو، اکسیژن، متابولیت‌ها و مواد غذایی، مشابه با شرایط بدن، به طور مستقیم یا غیر مستقیم (از طریق تأثیرگذاری بر بیان ژن‌ها و ایجاد فنوتیپ طبیعی)، مطالعات دارویی را قابل اعتمادتر کرده است. به تازگی، برای تطابق بیشتر با بدن، از کشت‌های سه بعدی در تراشه‌های میکروسیالی نیز استفاده می‌شود. ریزتراشه‌ها، به دلیل اندازه‌ی نزدیک به سلول‌ها و عروق بدن، امکان کشت سلول به شیوه‌ی پویا و غیره، شباهت بیشتری با بدن فراهم می‌کنند. در مقاله‌ی پیش‌رو، ضمن مروری بر روش‌های مختلف کشت سه بعدی، کاربردهای آن در مطالعات دارویی نیز مطرح می‌گردد.

واژگان کلیدی: سرطان، ریزتراشه میکروسیالی، کشت سلولی، توسعه و کشف فراورده‌ی دارو

ارجاع: شهریوری شبنم، باقری زینب، سرای گرد افشاری ندا، لطیفی حمید. **کاربرد کشت سه بعدی در بهینه‌سازی تحقیقات دارویی سرطان: از روش‌های سنتی تا تکنولوژی نوین میکروسیالی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۳۵): ۸۵۶-۸۴۵

مقدمه

معرفی یک داروی جدید به بازار، مستلزم سال‌ها مطالعه و تحقیق و صرف هزینه‌های گزاف است. این فرایند، از کشف ترکیبات زیست فعال و تبدیل آن‌ها به ترکیبات پیش‌رو (Hit to lead (H2L) on generation) شروع می‌شود و پس از طی مراحل «پیش کارآزمایی بالینی» و «کارآزمایی بالینی» (Preclinical and clinical trials)، راهی دراز را برای تجاری شدن می‌پیماید (شکل ۱- الف). متأسفانه، با وجود صرف هزینه‌های هنگفت، بیش از ۹۰ درصد از داروها در مراحل مختلف پیش کارآزمایی بالینی شامل تحقیقات برون‌تنی (In vitro) و درون‌تنی (In vivo) در حیوانات آزمایشگاهی به دلیل عدم موفقیت، در مرحله‌ی کارآزمایی بالینی از جریان تولید خارج می‌گردند (۳-۱).

این مهم در مورد بیماری‌های پیچیده‌ای همچون سرطان، بسیار بارزتر است. در مورد داروهای جدیدی که برای تیمار بدخیمی های سرطانی معرفی می‌شوند، نه تنها هزینه‌ی تمام شده‌ی دارو بسیار بالا می باشد؛ بلکه گاهی نرخ پاسخ گویی به درمان با داروهای جدید نیز پایین‌تر بوده است و بیمار با عوارض جانبی بیشتری مواجه می گردد. از این رو، با وجود نیاز به معرفی داروهای کارآمدتر، در مواردی، نظام‌های سلامت همچون انستیتوی ملی مزیت سلامتی و بالینی (UK's National institute for Health and Clinical Excellence یا NiCE) و سرویس سلامت ملی (National Health Service یا

۱- گروه زیست‌فن‌آوری پزشکی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه مهندسی زیستی و زیست نانو فن‌آوری، دانشکده‌ی علوم و فن‌آوری‌های زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه زیست فن‌آوری پزشکی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۴- استاد، پژوهشکده‌ی لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: ندا سرای گرد افشاری

Email: afshari.n@ums.ac.ir

NHS) بریتانیا، تصمیمات محدود کننده‌ای را برای بازپرداخت هزینه‌های مربوط به تجویز داروهای جدید در نظر گرفته‌اند (۲). مطالعات نشان می دهند که آمار بالای ناکامی داروهای جدید در مرحله ی کارآزمایی بالینی، به دلیل عدم تأمین اعتبار نخستین گام های بررسی‌های دارویی است که نیازمند تحولات بنیادی هستند (۴).

مطالعات پیش کارآزمایی بالینی، در فرایند توسعه‌ی فراورده‌های دارویی، از مطالعات سلولی شروع و به بررسی اثرات دارو در حیوانات آزمایشگاهی ختم می شوند. در این راستا، کشت سلول یکی از نقاطی است که می تواند در نتیجه‌ی آزمایش تأثیر به‌سزایی بگذارد. کشت سلول که به طور سنتی به صورت تک لایه های دو بعدی در محیط‌های بی حرکت (پتری‌دیش و/یا فلاسک) به انجام می رسد (۵). به دلیل تفاوت در تعاملات سلولی در کشت های دو بعدی (تعاملات سلول با سلول و سلول با محیط اطراف)، تفاوت در دسترسی به اکسیژن، مواد غذایی، مولکول‌های پیام‌رسانی و غیره و نیز تفاوت در قطبیت و ویژگی های فیزیکی و مکانیکی سلول ها و تأثیر این موارد بر بسیاری از فرایندهای حیاتی سلول (همچون، رشد، تمایز، پاسخ‌گویی به محرک‌ها و غیره) نسبت به شرایط طبیعی، کشت‌های دو بعدی نمی‌توانند مدل‌های مناسبی برای تعمیم نتایج بررسی های دارویی باشند (۶). به گونه‌ای که نرخ ریزش (Attrition rates) داروهای بررسی شده در کشت‌های دو بعدی در بالین گاهی به ۹۵ درصد نیز می‌رسد (۷).

برای رفع این مشکل در دهه ی ۱۹۸۰، Petersen و همکاران، پس از بررسی تأثیر ماتریکس خارج سلولی در ویژگی‌های سلول‌ها، راه‌کاری را برای کشت سلول به شیوه ی سه بعدی پیشنهاد دادند (۹-۸). در این روش، نه تنها ارتباطات بین سلولی به شرایط داخل بدن شبیه تر می شود و ویژگی های فیزیکی سلول حفظ می گردد، بلکه دسترسی سلول ها به محرک ها، مواد غذایی، داروها و غیره نیز به شرایط بدن شبیه‌تر است. کشت های سه بعدی حتی می توانند عوامل کلیدی بافت را تولید کنند. به دلیل امکان شبیه‌سازی ژنتیکی در کشت سلول سه بعدی، این روش را حتی مؤثرتر از مطالعات حیوانی می‌دانند (۱۰). در این‌جا، تلاش خواهد شد تا ضمن معرفی روش های متداول کشت سه بعدی، جایگاه آن در مطالعات دارویی مورد بحث قرار گیرد.

ویژگی‌های سلولی درکشت‌های دو و سه بعدی

بر خلاف کشت دو بعدی که در آن سلول ها به صورت تک لایه‌هایی با ضخامت تقریبی سه میکرون، به یک سطح صاف می‌چسبند و رشد می کنند، در کشت سه بعدی با شبیه‌سازی شرایط طبیعی، محیطی ایجاد می‌شود که در آن سلول‌ها بتوانند در تمامی جهت‌ها رشد کنند و کره‌هایی با ضخامت ۳۰-۱۰ میکرون را تشکیل دهند. این مهم، از طریق تأثیر بر میزان و تنوع ارتباطات سلولی، نه تنها بر قطبیت، فنوتیپ و ریخت‌شناسی سلول‌ها، آرایش و توزیع اندامک‌ها و در نهایت فعالیت متابولیک و عملکرد تأثیر می گذارد، بلکه بر میزان مواد غذایی و ترکیبات زیست فعال در دسترس سلول مؤثر است و آن ها را به شرایط طبیعی نزدیک‌تر می کند. این عوامل، زمینه را برای تغییر در الگوی بیان ژن و الگوی تکثیر سلولی، تأثیر بر فرایندهای تمایزی و مرگ سلولی و غیره فراهم می‌کند که نتیجه‌ی مستقیم آن، تغییر در فرایندهای جذب، متابولیسم، حساسیت و مقاومت دارویی است.

Souza و همکاران، الگوی تغییر بیان ژن‌ها به منظور تبیین تأثیر شیوه ی کشت بر رفتار تهاجمی سلول‌ها را مطالعه کردند. این گروه تحقیقاتی، رده‌های PC-3 و LNCaP را به روش‌های دو و سه بعدی کشت دادند و در هر مورد، بیان ژن‌های Annexin A1 (ANXA1) و CD44 را که مسؤول رفتار تهاجمی تومورهای پروستات و مقاومت آن‌ها به شیمی درمانی هستند، ارزیابی کردند. نتایج این بررسی، مبین افزایش بیان این ژن ها در کشت های سه بعدی و شباهت آن با حالت طبیعی بود (۱۱).

کاهش سرعت تکثیر سلول‌ها در کشت‌های سه بعدی (در نتیجه ی نرخ پایین حذف سلول های نکروتیک و سیر نزولی شیب غلظت ریز مغذی‌ها و اکسیژن در بخش‌های درونی کره‌های سلولی)، از دیگر مواردی است که در بسیاری از مطالعات به آن پرداخته شده است (۱۲). به عنوان مثالی از این مطالعات، می‌توان به مطالعه‌ی گروه تحقیقاتی Chignola اشاره کرد که میزان تکثیر سلول‌های گلیوبلاستوما در کشت های دو و سه بعدی را بررسی و با شرایط طبیعی مقایسه کردند و شباهت کشت سه بعدی را به شرایط درون تنی نشان می‌دهد (۱۳).

فرایندهای تمایزی در کشت سه بعدی کارآمدتر می باشند و به راحتی با میکروسکوپ بررسی می شوند (۱۴). به عنوان مثال، Caron و همکاران، نشان دادند که برای تمایز مجدد سلول‌های کندروسیت عروق انسانی، کشت سه بعدی پتانسیل غضروف سازی بیشتری را ارایه می‌دهد و این را می‌توان به بیان mRNAهای مواد غضروف‌ساز همچون کلاژن تیپ I، SRY (Sex determining region Y)-box 9 (SOX9) و اگریکان (Aggrecan) در کشت سه بعدی نسبت داد (۱۵). همچنین، می توان نشان داد که افزایش تعاملات سلول- سلول در کشت های سه بعدی، زمینه را برای مقاومت به آپوپتوز فراهم می‌کند که یکی از دلایل IC50 بالاتر داروها در کشت های سه بعدی معرفی می‌شود (۱۶).

عوامل مؤثر در تأثیر دارو بر سلول

عوامل دخیل در تأثیر دارو بر سلول ها را می‌توان در دو گروه

عوامل مستقیم فیزیکی و شیمیایی (سختی بستر و ماتریکس خارج سلولی، شیب pH و غیره) و عوامل غیر مستقیم زیستی (فرار از آپوپتوز، کاهش بیان هدف دارو و غیره) بررسی کرد. این عوامل خود به طور مستقیم و غیر مستقیم از چگونگی کشت سلول تأثیر می‌پذیرند. در ادامه، برخی از مهم‌ترین این عوامل به بحث گذاشته خواهند شد.

انتشار و خون یاری (Perfusion) دو مکانیسم اصلی دارورسانی مویرگی هستند (۱۷). هر دوی این مکانیسم ها، تحت تأثیر نوع و ترکیب اجزای ماتریکس خارج سلولی و بستر قرار می‌گیرند. سلول های تومور نیز برای کم کردن دسترسی به دارو، ترکیبات ماتریکس خارج سلولی خود را تغییر می دهند؛ به طوری که، بیشتر داروهای ضد سرطان با مشکل نفوذ به داخل تومور مواجه هستند (۱۸). ترکیبات ماتریکس خارج سلولی، همچنین می‌توانند باز یا بسته شدن کانال‌های یونی غشا را تحت تأثیر قرار دهند و بر تراوشات دارویی تأثیر بگذارند (۱۹).

نوع و ترکیب ماتریکس خارج سلولی، می تواند بر سختی بافت تأثیر بگذارد و فشار مکانیکی وارده بر سلول را تعیین کند؛ عاملی که یا به طور مستقیم بر تقسیم سلولی، چسبندگی سلولی، مورفوژنز، انتقال وزیکول ها، هموستاز مایعات و غیره تأثیر می گذارد و یا به طور غیر مستقیم میزان و چگونگی بیان ژن‌ها را تعیین می کند. این ژن‌ها، شامل ژن‌های مربوط به گیرنده‌های دارویی، فرار ازآپوپتوز، مکانیسم‌های تعمیر DNA و غیره هستند (۲۰).

به عنوان مثال، Lam و همکاران، در یک مطالعه‌ی برون تنی بر روی کشت سه بعدی سلول‌های MDA-MB-231 سرطان پستان، در غلظت های متفاوتی از کلاژن نوع I (به عنوان ماتریکس خارج سلولی)، ارتباط افزایش غلظت کلاژن (و در نتیجه افزایش سختی بستر) با افزایش مقاوت داروی Paclitaxel را تبیین کردند (۲۱). همچنین، در مطالعه‌ای که توسط Wei و همکاران بر روی تأثیر سختی بستر بر قدرت تهاجمی سلول‌های سرطان پستان (MCF10A) صورت گرفت، مشخص شد که سختی ماتریکس کلاژنی، باعث آزاد شدن عامل Twist-related protein 1 (TWIST1) (یک میانجی‌گر مکانیکی که منجر به انتقال اپی‌تلیال مزانشیمی می‌شود) از همراه سیتوپلاسمی G3BP2 خود می‌شود که پس از ورود TWIST1 به هسته و با افزایش بیان اینتگرین، باعث تغییر ویژگی‌های اپی‌تلیالی سلول به بافت مزانشیمی و افزایش تهاجم آن می‌شود (۲۲).

در بافت های داخل بدن، انتشار مولکول های محلول، مانند مواد غذایی، متابولیت‌ها، اکسیژن و pH، از عروق خونی به داخلی ترین لایه های توده های سلولی، شیب غلظتی از این مواد را ایجاد می کند. وجود این شیب غلظت، بسیاری از رفتارهای سلول نظیر مهاجرت (Migration)، تحرک (Motility) و پیام‌رسانی سلولی (Cell Signaling) را متأثر می‌کند. شیب غلظت مواد غذایی و اکسیژن از خارج به داخل توده‌ی سلولی، منجر به ایجاد یک ناحیه‌ی تکثیر شونده (Proliferative zone)، یک ناحیه‌ی خاموش (Hypoxic core) و یک ناحیه‌ی نکروزی می‌شود (شکل ۱- و).

به علت سرعت بالای رشد، سلول‌های موجود در لایه‌ی تکثیر شونده، اغلب به داروهای شیمی‌درمانی پاسخ می‌دهند؛ در مقابل، به علت پایین تر بودن سرعت تکثیر در ناحیه‌ی خاموش، سلول‌های این ناحیه اغلب به شیمی‌درمانی، رادیودرمانی و ایمنی‌درمانی مقاوم می‌باشند (۲۴-۲۳). همچنین، شیب غلظت اکسیژن، باعث وجود هیپوکسی در لایه‌های داخلی تومور می‌شود. این عامل، زمینه را برای فعال‌سازی ژن‌های پیش‌آنژیوژنیک و بقای سلول فراهم می‌کند و در نهایت، منجر به بروز مقاومت دارویی می‌شود (۲۵). همچنین، داروهایی نظیر Doxorubicin و Cisplatin که مرگ سلولی را در اثر ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen spicies یا ROS) القا می‌کنند (به اکسیژن نیاز دارند)، در نواحی داخلی توده‌ی سلولی اثربخشی کمی دارند.

شیب pH نیز روی اثربخشی دارو تأثیرگذار است. pH در بخش‌های داخلی و هیپوکسیک سلول‌های توموری، اسیدی‌تر است. از این رو، داروهای قلیایی (همچون Methotrexate)، در این نقاط پروتونه می‌شوند و توانایی خود را در ورود به سلول از دست می‌دهند (۲۶).

تمامی مثال‌های پیش‌گفته نشان می‌دهند که در شرایط طبیعی، نه تنها دسترسی تمامی سلول‌های توده‌های موجود در بدن به اکسیژن، pH، موادغذایی و غیره یکسان نیست؛ بلکه مجاورت با مواد دفعی و تأثیرپذیری آن ها از فشار مکانیکی نیز متفاوت است. این در حالی است که تمامی سلول‌ها در کشت‌های دو بعدی به طور یکسان از این عوامل تأثیر می پذیرند. به همین دلیل، مطالعات دارویی انجام شده در بستر دو بعدی، نمی‌توانند اطلاعات قابل اعتمادی را فراهم آورند. به نظر می‌رسد این مشکل، با استفاده از مدل‌های کشت سه بعدی مرتفع گردد. به همین دلیل، در ادامه تلاش خواهد شد تا برخی از مهم ترین روش‌های کشت سه بعدی و تأثیر آن در مطالعات دارویی به اختصار معرفی گردند.

مروری بر روش‌های کشت سه بعدی

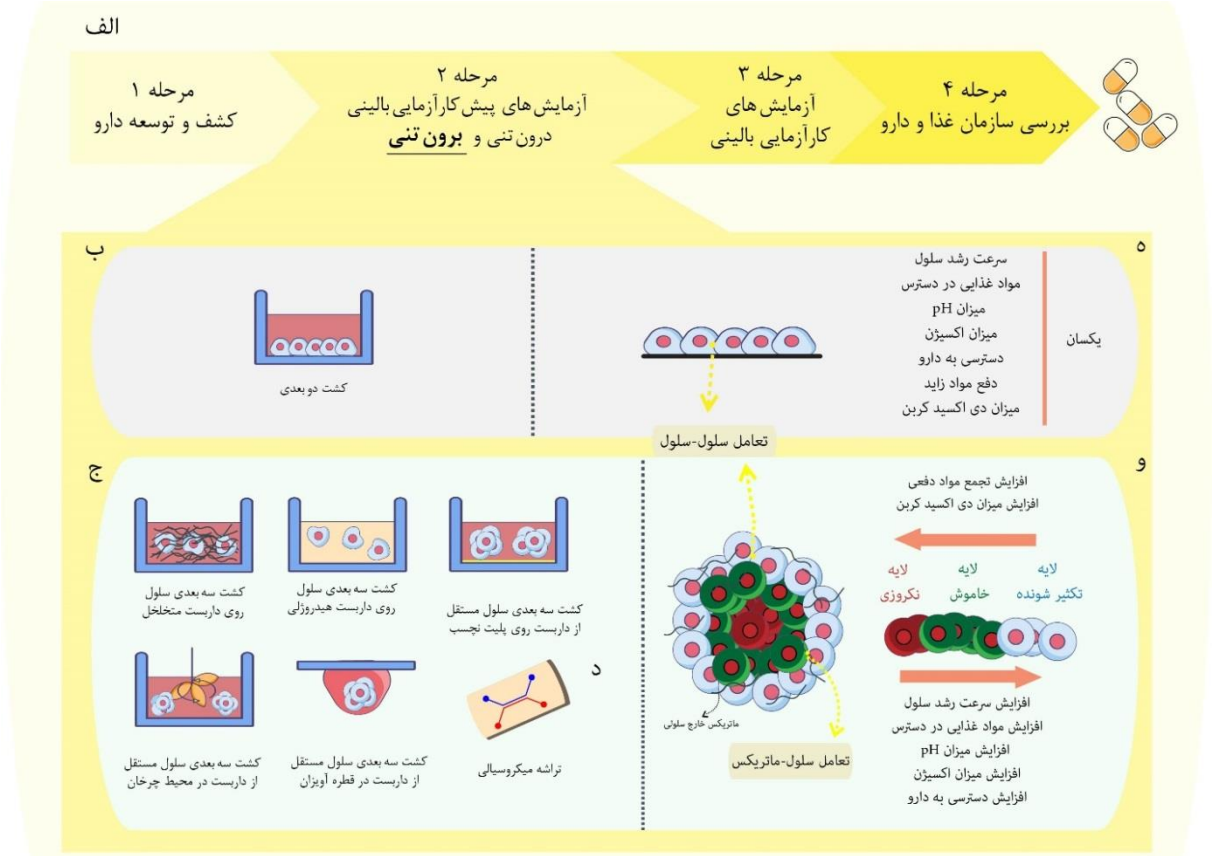
روش های مختلف کشت سه بعدی را می توان در دو گروه کلی کشت‌های مبتنی بر داربست (متخلخل و هیدروژلی) و کشت‌های مستقل از داربست نظیر قطره‌ی آویزان (Hanging Drop)، پلیت‌های

نچسب (Ultra-low attachment surface plate)، میکروپلیت‌های دارای سطوح ریز پردازش شده (Micro-patterned surfaces microplate)، فلاسک‌های چرخان (Spinner flask) و غیره طبقه‌بندی کرد (شکل ۱- ج). چنان‌که در ادامه ذکر خواهد شد، هر کدام از این روش‌ها مزایا و معایبی دارند و لازم است با در نظر گرفتن هدف از مطالعه، انتخاب گردند. برای سهولت مطالعه، برخی از ویژگی های متداول‌ترین روش‌های کشت سلول و کارآیی آن‌ها در مطالعات دارویی در جدول ۱ آمده است.

کشت سه بعدی مبتنی بر داربست: می‌توان با استفاده از داربست‌های از پیش ساخته شده یا ماتریکس خارج سلولی، کشت های دو بعدی را به سه بعدی تبدیل کرد و شرایط را به محیط درون‌تنی نزدیک نمود. این داربست‌ها، می‌توانند از مواد طبیعی (کلاژن و فیبرین، ابریشم، آلژینات، کیتوزان) یا مصنوعی (تیتانیوم، پلیمرها، شیشه‌های فعال شده) تهیه گردند. بدیهی است که داربست‌های مصنوعی نمی‌توانند نقش‌های عملکردی داربست‌های طبیعی را به طوری عینی منعکس کنند، اما در عوض، به دلیل قابل کنترل بودن شرایط ساخت و ترکیب مواد، تکرار پذیری بیشتری را برای مطالعات سلولی فراهم می‌کنند.

عواملی همچون جنس، زیست تخریب پذیری، زیست سازگار بودن، میزان تخلخل، اندازه‌ی حفره‌ها، هندسه‌ی فضایی و ویژگی‌های مکانیکی داربست و نیز امکان کشت همراه (Co-culture) (کشت های متشکل از چند نوع سلول) بر ویژگی های داربست و اثربخشی زیستی آن تأثیر می گذارند. هر پژوهشگر، می تواند با در نظر گرفتن هدف از مطالعه، داربست مورد نیاز خود را طراحی و استفاده کند. به طور کلی، داربست های مورد استفاده در کشت سلول در دو گروه داربست‌های متخلخل و هیدروژلی تقسیم می‌شوند (۲۷).

داربست های متخلخل، ساختارهای سه بعدی ساخته شده از زیست موادهای جامد هستند که بسته به نوع عملکرد، جنس و روش ساخت، می توانند منافذی بین ۵۰۰-۱۰ میکرومتر داشته باشند و فضای مناسبی را برای جاگیری سلول ها ایجاد کنند (۲۷). سه روش عمده برای تولید داربست های متخلخل وجود دارد. در روش اول، به ماده‌ی اولیه‌ی جامد یا حل شده در حلال، مواد پروژن (Porogens) (در حالت های گاز مانند کربن دی‌اکسید، مایع مانند آب یا جامد مانند پارافین) اضافه می‌شود.



شکل ۱. الف) مراحل توسعه‌ی داروی جدید، ب) کشت دو بعدی، ج) روش‌های متفاوت کشت سلول سه بعدی، د) استفاده از کشت سه بعدی در تراشه‌ی میکروسیالی، ه) ویژگی‌های کشت سلول دو بعدی و و) ویژگی‌های کشت سلول سه بعدی

جدول ۱. بررسی مقایسه‌ای مرسوم‌ترین روش‌های کشت سلول

روش کشت	آرایش سلولی	تکرارپذیری	شباهت ژنوتیپی و فنوتیپی با بدن	هزینه	میزان دسترسی دارویی	منابع
کشت دو بعدی	سلول به شکل تک لایه‌ای چسبنده بر بستر ظرف رشد می‌کند.	بالا	کم	کم	بسیار بالا و بدون مانع	(۵)
کشت سه بعدی در داربست‌های سخت پلیمری	سلول در ساختارهای ژل مانندی قرار گرفته و در سه بعد رشد می‌کند.	کم	زیاد	بسته به نوع داربست می‌تواند پرهزینه باشد (به عنوان مثال در مورد داربست‌های کلاژنی)	ممانعت نسبی داربست، ماتریکس خارج سلولی و لایه‌های سلولی محیطی برای فراهمی ترکیبات دارویی	(۳۴، ۲۷)
کشت سه بعدی در داربست‌های متخلخل	کره‌های سلولی در حفرات موجود در داربست‌های متخلخل شکل می‌گیرند.	بسته به نوع داربست و تکنولوژی ساخت آن متفاوت است.	بسیار زیاد	بسته به نوع داربست می‌تواند پرهزینه باشد.	ممانعت نسبی داربست، ماتریکس خارج سلولی و لایه‌های سلولی محیطی برای فراهمی ترکیبات دارویی	(۳۱، ۲۸)
کشت سه بعدی مستقل از داربست	کره‌های فشرده‌ی سلولی در شرایط غیر چسبنده به صورت آزاد ایجاد می‌شوند.	بالا	بسیار زیاد	کم	ممانعت بالا در نفوذ دارو به واسطه‌ی تعاملات فشرده‌ی سلول‌ها در ساختارهای اسفروئیدی	(۴۱-۳۹)

اندازه‌ی این مواد، می‌توانند اندازه‌ی نهایی منافذ را مشخص کند. پس از مخلوط شدن و شکل گرفتن داربست، مواد ایجاد کننده‌ی منفذ از طریق تصعید، تبخیر یا فرایند ذوب خارج می شوند و داربست متخلخل بر جا می ماند (۲۹-۲۸). در روش دوم، از الیاف بافته شده/ نشده استفاده می شود. این الیاف یا از قبل وجود داشته اند، یا با روشی مانند الکتروریسی ایجاد می شوند. سپس، الیاف به صورت یک توده‌ی به هم پیچ خورده در می آیند و از طریق گرما یا چسب، به هم متصل می‌شوند (۳۰). در روش آخر که نمونه‌سازی سریع (Rapid prototyping) می‌باشد، داربست‌ها با استفاده از پرینتر سه بعدی یا استریولیتوگرافی ساخته می‌شوند. در این روش، طرح نهایی داربست به صورت لایه به لایه در نرم‌افزار طراحی می‌شود و پس از پرینت گرفتن، لایه‌ها روی یکدیگر قرار می‌گیرند (۳۱).

هیدروژل ها، شبکه های سه بعدی تشکیل شده از پلیمرهای آب‌دوست هستند که از طریق پیوند کوالانسی یا جاذبه‌های بین‌مولکولی و درون مولکولی به یکدیگر اتصال می یابند و می توانند مقدار زیادی آب جذب کنند (۳۲). این داربست‌ها، می‌توانند در حین پلیمریزه شدن یا ژله‌ای شدن، سلول‌ها را در خود به دام انداخته و کپسوله کنند. پلیمریزه شدن یا ژله‌ای شدن هیدروژل ها از طریق تغییرات pH، دما، قدرت یونی محلول، نور و غیره کنترل می شود. هیدروژل‌ها، می توانند از مواد طبیعی نظیر آگارز یا کیتوزان یا مواد مصنوعی مانند پلی اتیلن گلیکول یا پلی وینیل الکل تهیه شوند (۳۳). البته، برخی مواد مانند آگارز و آلژینات، شرایط لازم برای اتصال و تمایز سلول را فراهم نمی کنند. از این رو، ترکیبات غنی از توالی آرژینین- لیزین- آسپارتیک اسید (مانند کلاژن) به این هیدروژل‌ها افزوده می شود تا اتصال سلول به داربست را تسهیل و نرخ زنده ماندن سلول را در این نوع از داربست‌ها بهبود ببخشد (۳۴).

کشت سه بعدی مستقل از داربست: Sutherland و همکاران، در مطالعه‌ای در خصوص بررسی اثر پرتودرمانی روی سلول‌های تومور انسان، برای اولین بار این نوع کشت سه بعدی را معرفی کردند (۳۵). کره‌های ایجاد شده در این نوع کشت، یا از تجمع تعداد زیادی سلول در کنار هم و یا از تکثیر یک تک سلول به وجود می آیند. در این روش، برخی از سلول ها می توانند خودشان ماتریکس خارج سلولی تولید کنند و ساختاری کروی به نام اسفروئید را تشکیل دهند. همه‌ی سلول‌ها توانایی تشکیل کره‌ی سلولی از طریق تکثیر یک سلول را ندارند. تشکیل اسفروئید از تک سلول به عواملی مانند حضور مولکول های اتصالی، بار سطحی سلول، تشکیل تجمعات کانونی (Junctional complexes) و حتی وجود پمپ سدیم- پتاسیم (K+/Na+) بستگی دارد (۳۶).

کشت سلول به شیوه ی اسفروئید از چندین وجه مشابه شرایط توده‌های توموری و بافت‌های چند لایه‌ای داخل بدن است. نخست این که لایه‌های سلولی در اسفروئید، همانند لایه‌های توده‌ی توموری در بدن، به گونه‌ای تجمع پیدا می کنند که در مرکز آن (به علت عدم دسترسی به محیط کشت، مواد غذایی و اکسیژن، تجمع مواد دفعی ناشی از متابولیسم و پایین بودن pH) یک ناحیه‌ی حاوی سلول های نکروتیک به وجود می‌آید.

این ناحیه‌ی نکروتیک توسط لایه‌ی میانی خاموش و لایه‌ی تکثیر شونده‌ی خارجی احاطه می‌گردد (شکل ۱- و). دوم این که، روند رشد اسفروئیدها نیز مشابه توده‌های توموری است. در داخل بدن، توده های توموری کوچک که از لایه های سلولی کمتری تشکیل شده اند، به دلیل دسترسی کافی به مواد غذایی و اکسیژن، با سرعت بالایی رشد می کنند. با افزایش ابعاد توده، کمبود مواد غذایی و اکسیژن موجب ورود توده به مرحله‌ی سکون رشد می‌شود (۳۸-۳۷). سوم این که، از نظر نیم‌رخ بیان ژن نیز شباهت زیادی بین اسفروئیدها و توده‌های توموری وجود دارد. برای مثال، پژوهشی توسط Ghosh و همکاران، روی بیان ۱۷۹ ژن کد کننده‌ی سیتوکاین‌ها، عوامل پیش آنژیوژنز و مولکول‌های مربوط به اتصال سلول‌های ملانوما صورت گرفت و مشخص شد که بعضی از این ژن ها، تنها در حالت اسفروئید دچار افزایش بیان می‌شوند و این ژن‌ها، همان ژن‌هایی بودند که در حالت توموری در پیشرفت، تهاجم و متاستاز سلول های ملانوما نقش مهمی داشتند. این تحقیقات، این ایده را تقویت می‌کند که می‌توان با هدف قرار دادن این ژن ها، داروهایی را برای درمان این بیماری پیشنهاد داد (۳۹).

روش های متعددی برای تشکیل اسفروئیدها وجود دارد. قطره ی آویزان، استفاده از پلیت های نچسب، میکروپلیت های دارای سطوح ریز پردازش شده و فلاسک‌های چرخان از مرسوم‌ترین این روش‌ها هستند (شکل ۱- ج). برای انجام روش قطره‌ی آویزان، قطره‌ای از سوسپانسیون سلولی روی درب پتری‌دیش یا لام پوشاننده‌ی حفرات پلیت های کشت چند خانه قرار داده می شود و سپس، پتری‌دیش یا پلیت حاوی مایع با درب یا لام حاوی قطرات سلولی مسدود می‌گردد. مایع موجود در پتری‌دیش یا پلیت، نقش متعادل‌سازی فرایند تبخیر را ایفا می کند و پس از مدتی، به دلیل عدم وجود سطوحی برای اتصال، توده‌ی اسفروئید تشکیل می‌شود. برای این روش، پلیت‌های تجاری نیز موجود است (۴۰).

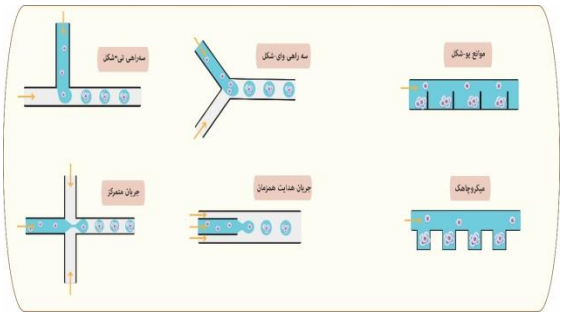
روش پلیت های نچسب نیز از این جهت که در آن سطحی برای اتصال سلول طراحی نشده است، مشابه روش قطره‌ی آویزان است. در این پلیت ها، چاهک ها به منظور کاهش نسبت سطح به حجم به شکل گرد یا مخروطی طراحی می شوند تا اتصال سلول ها به یکدیگر را برای تشکیل توده‌ی سلولی اسفروئید سرعت ببخشند. در برخی

موارد، لازم است که سطح داخلی پلیت با موادی همچون پلی هما و آگارز پوشانده می شود تا اتصال بین سلول و پلیت به کمترین مقدار ممکن کاهش یابد (۴۱). روش بعدی، استفاده از فلاسک‌های چرخان است. این فلاسک‌ها، به گونه‌ای طراحی می‌شوند که بتوان محیط کشت را به طور پیوسته در آن هم زد. در این شرایط، سلول‌ها اجازه‌ی ته‌نشین شدن و اتصال به سطوح را پیدا نمی کنند. در نتیجه، به یکدیگر اتصال می یابند و تشکیل اسفروئید می دهند. حجم بالای استفاده از محیط کشت، قرار گرفتن سلول ها تحت تنش های برشی و تشکیل اسفروئیدهای غیر هم‌شکل، از جمله معایب این روش است. میکروپلیت های دارای سطوح ریز پردازش شده، دارای طرح‌های ریزی در سطح پلیت هستند که می توانند با ایجاد حفراتی برای تشکیل اسفروئید، الگوی تشکیل آن و میزان چسبندگی سلول‌ها را تعیین کنند. تخریب و از دست رفتن این الگوها در اثر پیپتاژ (به علت ظریف و کوچک بودن الگوها) از معایب این روش می‌باشد (۴۲).

کشت سه بعدی سلول در ابزارهای میکروسیالی (Microfluidic)

ابزارهای میکروسیالی به تراشه‌هایی اطلاق می شود که می توانند مقادیر بسیار کمی از سیال (در حد میکرولیت، پیکولیتر و نانولیتر) را در کانال‌ها و اتاقک‌های ساخته شده در مقیاس میکرونی، تغییر دهند و کنترل کنند (۴۳). این ابزارها، قابلیت آن را دارند که آزمایش‌های زیستی و شیمیایی را با صرف هزینه و زمان کمتر انجام دهند. همچنین، قادر به انجام غربالگری‌های وسیع به صورت اتوماتیک می باشند (۴۶-۴۴). علاوه بر این، به دلیل اندازه‌ی میکرونی کانال‌ها و تناسب آن با اندازه‌ی سلول‌ها و عروق بدن، کشت‌های داخل تراشه، نسبت به روش‌های متداول کشت، به شرایط داخل بدن نزدیک‌تر هستند. همچنین، جریان پیوسته‌ی سیال در کانال‌ها و اتاقک‌های ریز تراشه، می‌تواند زمینه را برای کشت سلول به شیوه‌ی پویا نیز فراهم آورد (۴۸-۴۷). برای انجام کشت سه بعدی در ریز تراشه ها نیز از روش های مبتنی بر داربست و مستقل از داربست استفاده می شود. در روش اول، قطعاتی از داربست، داخل اتاقک های ریز تراشه گنجانده می‌شود تا سلول‌ها بتوانند در فضاهای خالی داخل آن به شیوه‌ی سه بعدی رشد کنند. روش مستقل از داربست در ریز تراشه‌ها با دو شیوه‌ی عمده‌ی ایجاد امولسیون سلولی و به دام انداختن سلول انجام می‌شود (۴۹).

در ایجاد امولسیون سلولی، از آمیختگی مایعات آلی و آبی، استفاده می‌شود؛ به نحوی که سلول‌ها در قطرات امولسیون به دام می‌افتند و تشکیل اسفروئید می‌دهند. قطرات امولسیونی، اسفروئید را از محیط بیرون جدا می سازند و شرایط قابل کنترلی را برای رشد و بررسی آن‌ها فراهم می کنند. برای تشکیل این امولسیون‌ها در ریز تراشه‌ها، ساختارهای نظیر سه راهی T شکل (T-junction)، ساختارهای تو در توی هدایت هم‌زمان و هم‌جهت جریان مایعات آلی و آبی با فشار متفاوت (Co-flowing junction) و تقاطع‌های طراحی شده برای آمیختگی متقابل حلال‌های آبی و آلی (Flow-focusing junction) طراحی شده‌اند (شکل ۲) (۵۱-۵۰). از متداول ترین سوسپانسیون‌های سلولی که در این روش‌ها تولید می‌شوند، می‌توان به سوسپانسیون محیط کشت در روغن و سوسپانسیون هیدروژل در روغن (ژل در روغن) اشاره کرد (۵۳-۵۲).



شکل ۲. طراحی انواع تراشه‌های میکروفلوئیدیک فاقد داربست برای تشکیل اسفروئید سلولی

مثالی از این ابزارها، مطالعه‌ی Wong و همکاران می باشد که امولسیون‌های سلولی (از نوع محیط کشت در روغن) از سلول‌های غیر چسبنده‌ی E6.1 (لوکمی) و چسبنده‌ی MDA-MB-231 (سرطان پستان)، که به ترتیب حاوی ترکیبات دارویی برتوزیمیب- ورینوستات و سیسپلاتین- اپیروبیسین بودند، در ریز تراشه ایجاد گردید تا اثرات این ترکیبات دارویی مورد مطالعه قرار گیرد. استفاده از ریز تراشه‌ها برای کشت سه بعدی، بر خلاف سایر روش‌ها، امکان بررسی سمیت دارویی در لحظه (Real time) را فراهم می‌کند (۵۴).

در روش بعدی، ریز تراشه به گونه‌ای طراحی می‌شود که بتواند سلول ها را در حین حرکت به دام بیندازد. طراحی های U شکل و میکروچاهک (شکل ۲) از مرسوم‌ترین ساختارهای مورد استفاده هستند (۵۶-۵۵). سلول‌های در حال حرکت در این ساختارها به دام می‌افتند و بعد از چند روز در کنار هم تجمع می‌یابند و به علت عدم اتصال به سطوح، تشکیل اسفروئید می‌دهند. اندازه و شکل اسفروئیدها را می‌توان با تغییر در طراحی، اندازه‌ی چاهک و میزان سلول به دام افتاده کنترل کرد.گاهی برای مطالعات دارویی، تراشه‌های ایجاد کننده‌ی شیب غلظت را با محفظه‌های کشت سلول ادغام می کنند تا هم‌زمان اثر غلظت های مختلف دارو بر اسفروئیدهای داخل یک تراشه مورد بررسی قرار گیرد (۵۷).

جایگاه کشت سه بعدی در کشف و توسعه‌ی فراورده‌های دارو

ظهور بیماری‌های جدید، مطلوب نبودن روش های درمانی موجود و گسترش مفهوم پزشکی شخصی، محرک‌هایی برای کشف فراورده‌های دارویی جدید هستند (۵۸). در این راستا، می‌توان اظهار داشت که به دلیل سادگی، سرعت، کم‌هزینه بودن و تنوع بالای کشت‌های سلولی، این ابزارها مدل‌های مناسبی در فرایندهای کشف و توسعه‌ی فراورده‌های دارویی می‌باشند و جایگاه بسیار با اهمیتی دارند. با توجه به برتری های کشت سه بعدی، بدیهی است که ظهور روش‌های متنوع کشت‌های سه بعدی و استفاده از آن‌ها در مدل‌سازی بیماری‌ها، فرایندهای کشف و توسعه‌ی فراورده‌های دارویی را متحول کرده باشد. امروزه، ثابت شده است کارایی کشت های سه بعدی در مدل‌سازی بیماری، می‌تواند تا آن جا گسترش یابد که گاهی پژوهشگران را از مدل‌های حیوانی نیز بی‌نیاز سازد. از جمله مدل‌هایی که با کمک کشت سه بعدی امکان بررسی آن به صورت برون تنی میسر شده است، مدل بررسی تأثیر دارو بر سلول‌های متاستازی، در مراحل ورود و خروج از عروق می‌باشد که امروزه با استفاده از تراشه های میکروسیالی امکان پذیر و تسهیل شده است (۵۹). برای مثال، Shin و همکاران، ریز تراشه‌ای متشکل از دو قسمت شامل اتاقک کشت سه بعدی سلول های سرطانی و اتاقک پوشیده شده با لایه‌ای از سلول‌های عروقی Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) را مورد استفاده قرار دادند. آنان با استفاده از این ابزار، قدرت تهاجم و توانایی ورود سلول‌های سرطانی LoVo و SW480 کلون (روی ماتریکس ماتری‌ژل) به عروق را مطالعه کردند و نشان دادند که مدل آن‌ها، در مقایسه با مدل‌های حیوانی، می‌تواند بررسی داروهای ضد متاستاز را در مقیاس کوچک‌تر، با هزینه ی کمتر و سهولت بیشتر انجام دهد. همچنین، مشکل تفاوت ژنتیکی مدل حیوانی و انسانی در این ریز تراشه نیز مرتفع شده است که یک مزیت افزوده به شمار می‌آید (۶۰).

از دیگر چالش های فرایند توسعه‌ی فراورده‌های دارویی که توسط کشت سه بعدی قابل مدیریت است، بررسی عوارض جانبی داروهای راه یافته به مرحله‌ی کارآزمایی بالینی در اندام‌های سالم است. راه حلی که کشت سه بعدی برای این بررسی عوارض جانبی روی اندام های حیاتی ارایه می دهد، بررسی اثر سمیت دارو روی ارگانوئیدهای بافت ها و اندام‌های سالم و استفاده از تراشه های میکروسیالی اندام روی تراشه (Organ-on-chips) یا بدن روی تراشه (Body-on-chips) است. این ارگانوئیدها و ریزتراشه‌ها، می‌توانند با شبیه سازی شرایط یک اندام، سمیت داروی مورد نظر را پیش از تجویز پیش‌بینی کنند. Huh و همکاران، ریز تراشه‌ای را مورد مطالعه قرار دادند که در آن از این ابزارها برای بررسی سمیت اینترلوکین-۲ (مورد استفاده در درمان برخی سرطان ها) در ادم ریوی استفاده شده است. در طراحی این ریز تراشه، که از دو اتاقک سوار بر هم تشکیل شده است، از سلول‌های عروقی اندوتلیال ریوی Lonza برای پوشاندن اتاقک پایینی و از سلول‌های اپی‌تلیال کیسه‌ی هوایی برای پوشاندن اتاقک بالایی تراشه استفاده شد. در حد فاصل بین این دو اتاقک نیز غشای متخلخلی، که از فیبرونکتین (برای اتصال سلول ها) پوشیده شده بود، قرار گرفت. سپس، به منظور ایجاد ساختاری مشابه با کیسه‌های هوایی ریه، پس از پوشیده شدن کامل غشا توسط سلول های اپی تلیال، در سمت اتاقک بالایی، محیط کشت تخلیه و محفظه هوادهی شد؛ در حالی که سلول ها همچنان مواد غذایی مورد نیاز خود را از طریق انتشار از محیط کشت اتاقک پایینی تأمین می کردند. همچنین، به منظور شبیه‌سازی شرایط تخلیه‌ی ریوی، دو اتاقک متصل به پمپ خلأ نیز در اطراف اتاق های بالایی و پایینی تعبیه گردید تا با پر و خالی کردن هوای داخل آن، سلول ها بتوانند انقباضاتی مشابه شرایط ریه را در بدن حس کنند. این تراشه، در نشان دادن بروز ادم ریوی در نتیجه‌ی استفاده از اینترلوکین-۲ موفق بود و مشخص کرد که استفاده از آنژیوپویتین-۱ و مهار کننده ی کانال یونی وانیلوئید-۴ ،می تواند نرخ بروز ادم را در بیمارانی که از اینترلوکین-۲ استفاده می‌کنند، کاهش دهد (۶۱).

بحث

کشت سه بعدی سلول‌های حاصل از نمونه برداری مستقیم، امکان یافتن داروی مناسب با دز بهینه به صورت فرد محور را فراهم ساخته است. با این حال، با وجود شباهت فیزیولوژیک کشت سه بعدی به شرایط بدن و وجود روش های متنوع کشت، همچنان مشکلاتی در استفاده‌ی گسترده از این روش‌ها در مطالعات دارویی وجود دارد. به عنوان مثال، به دلایلی همچون پخش، جذب و عدم عبور نور از میان لایه‌های کره‌های سه بعدی سلولی و همچنین، ایجاد توده‌های سلولی در ساختارهای پیچیده‌ی هندسی (انواع داربست‌ها)، بررسی اثرات دارویی را در مقیاس وسیع با مشکل روبه‌رو می‌کند. همچنین، تفاوت در اندازه، شکل و ساختار توده‌های سلولی، که تکرارپذیری آزمایش‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، از دیگر مشکلات استفاده از این روش‌های نوین است. با این حال، پیشرفت‌های اخیر در خصوص تولید ابزارهای بررسی توده‌های سلولی (نظیر پلیت‌های ۱۵۳۶ خانه‌ی نچسب) پاره‌ای از این مشکلات را مرتفع ساخته و قابلیت های کاربردی این ابزارها را افزایش داده است. به تازگی، استفاده از کشت سه بعدی در ابزارهایی نظیر بدن روی تراشه یا اندام روی تراشه نیز امیدهایی را در خصوص جایگزین کردن هر چه بیشتر آن‌ها با مطالعات مدل های حیوانی مطرح کرده است. به علاوه، ظهور این

ابزارهای پیشرفته، می تواند قدرت پیش گویی عوارض جانبی داروها را پیش از استفاده در بالین افزایش دهد. با توجه به تلاش‌های گسترده ای که برای ارتقای کیفی، افزایش سطح تکنیکی و تسهیل کاربری این روش‌ها به چشم می‌خورد، به نظر می‌رسد که این روش ها، در آینده جای خود را در بسیاری از مطالعات پایه و بالینی بیش از پیش باز کنند.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر، برگرفته از مطالعات و بررسی‌های انجام شده در راستای طرح تحقیقاتی با کد ۲۹۴۵۲-۳۱-۰۳-۹۵ است که توسط دانشگاه علوم پزشکی ایران تأمین مالی شده است. بدین وسیله، از این مجموعه قدردانی می‌گردد.

References

1. Mohs RC, Greig NH. Drug discovery and development: Role of basic biological research. Alzheimers Dement (NY) 2017; 3(4): 651-7.
2. Hait WN. Anticancer drug development: the grand challenges. Nat Rev Drug Discov 2010; 9(4): 253-4.
3. Polson AG, Fuji RN. The successes and limitations of preclinical studies in predicting the pharmacodynamics and safety of cell-surface-targeted biological agents in patients. Br J Pharmacol 2012; 166(5): 1600-2.
4. Begley CG, Ellis LM. Raise standards for preclinical cancer research. Nature 2012; 483(7391): 531-3.
5. Jedrzejczak-Silicka M. History of cell culture. In: Gowder SJT, editor. New insights into cell culture technology. London, UK: IntechOpen; 2017.
6. Larson B. 3D cell culture: A review of current techniques. BioTek [Online]. [cited 2015 Nov 12]; Available from: URL: https://www.biotek.com/ resources/ white-papers/3d-cell-culture-a-review-of-current-techniques/
7. Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? Nat Rev Drug Discov 2004; 3(8): 711-5.
8. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FD. 3D cell culture systems: advantages and applications. J Cell Physiol 2015; 230(1): 16-26.
9. Petersen OW, Ronnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(19): 9064-8.
10. Fang Y, Eglen RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. SLAS Discov 2017; 22(5): 456-72.
11. Souza AG, Silva IBB, Campos-Fernandez E, Barcelos LS, Souza JB, Marangoni K, et al. Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. Curr Pharm Des 2018; 24(15): 1689-94.
12. 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.
13. Chignola R, Schenetti A, Andrighetto G, Chiesa E, Foroni R, Sartoris S, et al. Forecasting the growth of multicell tumour spheroids: implications for the dynamic growth of solid tumours. Cell Prolif 2000; 33(4): 219-29.
14. Zhang X, Xie Y, Koh CG, James LL. A novel 3-D model for cell culture and tissue engineering. Biomed Microdevices 2009; 11(4): 795-9.
15. Caron MM, Emans PJ, Coolsen MM, Voss L, Surtel DA, Cremers A, et al. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. Osteoarthritis Cartilage 2012; 20(10): 1170-8.
16. Nunes AS, Costa EC, Barros AS, de Melo-Diogo D, Correia IJ. Establishment of 2D Cell Cultures Derived From 3D MCF-7 Spheroids Displaying a Doxorubicin Resistant Profile. Biotechnol J 2019; 14(4): e1800268.
17. Nizzero S, Ziemys A, Ferrari M. Transport Barriers and Oncophysics in Cancer Treatment. Trends Cancer 2018; 4(4): 277-80.
18. Tredan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. J Natl Cancer Inst 2007; 99(19): 1441-54.
19. Nourse JL, Pathak MM. How cells channel their stress: Interplay between Piezo1 and the cytoskeleton. Semin Cell Dev Biol 2017; 71: 3-12.
20. Tyler WJ. The mechanobiology of brain function. Nat Rev Neurosci 2012; 13(12): 867-78.
21. Lam CR, Wong HK, Nai S, Chua CK, Tan NS, Tan LP. A 3D biomimetic model of tissue stiffness interface for cancer drug testing. Mol Pharm 2014; 11(7): 2016-21.
22. Wei SC, Fattet L, Tsai JH, Guo Y, Pai VH, Majeski HE, et al. Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. Nat Cell Biol 2015; 17(5): 678-88.
23. Chouaib S, Noman MZ, Kosmatopoulos K, Curran MA. Hypoxic stress: obstacles and opportunities for innovative immunotherapy of cancer. Oncogene 2017; 36(4): 439-45.
24. Carrera S, de Verdier PJ, Khan Z, Zhao B, Mahale A, Bowman KJ, et al. Protection of cells in physiological oxygen tensions against DNA damage-induced apoptosis. J Biol Chem 2010; 285(18): 13658-65.
25. Kinoshita M, Johnson DL, Shatney CH, Lee YL, Mochizuki H. Cancer cells surviving hypoxia obtain hypoxia resistance and maintain anti-apoptotic potential under reoxygenation. Int J Cancer 2001; 91(3): 322-6.
26. Gerweck LE, Vijayappa S, Kozin S. Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base

chemotherapeutics. Mol Cancer Ther 2006; 5(5): 1275-9.
27. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Sakthi Kumar D. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. International Journal of Polymer Science 2011; 2011: 290602.
28. Chevalier E, Chulia D, Pouget C, Viana M. Fabrication of porous substrates: a review of processes using pore forming agents in the biomaterial field. J Pharm Sci 2008; 97(3): 1135-54.
29. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. Eur Spine J 2008; 17 Suppl 4: 467-79.
30. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. Tissue Eng 2002; 8(1): 1-11.
31. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. Nat Mater 2005; 4(7): 518-24.
32. El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. Glob Cardiol Sci Pract 2013; 2013(3): 316-42.
33. Fan L, Yang H, Yang J, Peng M, Hu J. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. Carbohydr Polym 2016; 146: 427-34.
34. Batorsky A, Liao J, Lund AW, Plopper GE, Stegemann JP. Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments. Biotechnol Bioeng 2005; 92(4): 492-500.
35. Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 1970; 18(5): 491-5.
36. Bjerkvig R. Spheroid Culture in Cancer Research (1991). Taylor & Francis Group; 2017.
37. Jeppesen M, Hagel G, Glenthoj A, Vainer B, Ibsen P, Harling H, et al. Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine. PLoS One 2017; 12(9): e0183074.
38. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. Genes Dev 2009; 23(5): 537-48.
39. 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(2): 522-31.
40. Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. Analyst 2011; 136(3): 473-8.
41. Close DA, Camarco DP, Shan F, Kochanek SJ, Johnston PA. The Generation of Three-Dimensional Head and Neck Cancer Models for Drug Discovery in 384-Well Ultra-Low Attachment Microplates. Methods Mol Biol 2018; 1683: 355-69.
42. Langhans SA. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. Front Pharmacol 2018; 9: 6.
43. Taromi N, Saraygord-Afshari N. Technology to aid the early detection of cancer: A review on the CTC detection techniques, from conventional methods to the advent of the microfluidic Lab-On-Chip devices. Tehran, Iran: Baraye Farda Publications; 2016. [In Persian].
44. Bagheri Z, Ehtesabi H, Hallaji Z, Aminoroaya N, Tavana H, Behroodi E, et al. On-chip analysis of carbon dots effect on yeast replicative lifespan. Analytica Chimica Acta 2018; 1033: 119-27.
45. Shahrivari S, Saraygord Afshari N, Bagheri Z, Arzaghy H. Lab-on-chip circulating tumor cell isolation micro devices: A new window for decoding the evolutionary model of cancer. Proceedings of 9th International Congress of Laboratory and Clinic; 2017 Feb 21-24; Tehran, Iran. [In Persian].
46. Shahrivari S, Saraygord-Afshari N, Bagheri Z. The emergence of micro-isolator devices for high throughput exosome analysis: A technological leap towards personalized cancer treatment. Proceedings of the 2nd International Personalized Medicine Congress, with Cancer Main Topics; 2018 Jan 13-15; Tehran, Iran. [In Persian].
47. Shahrivari S, Saraygord-Afshari N, Bagheri Z. Microfluidic 3D cell-culture platforms for drug response monitoring: potential applications for individualized cancer treatment. Proceedings of 1st International Congress on Biomedicine; 2017 Dec 18-21; Tehran, Iran. [In Persian].
48. Shahrabi Farahani M, Taromi N, Saraygord Afshari N, Farajollahi MM. diagnosis of prostate cancer, from conventional methods towards the new promising CTCS. Alborz University Medical Journal 2016; 5(1): 53-8. [In Persian].
49. Mintz PJ, Rietz AC, Cardo-Vila M, Ozawa MG, Dondossola E, Do KA, et al. Discovery and horizontal follow-up of an autoantibody signature in human prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2015; 112(8): 2515-20.
50. Bagheri Z, Ehtesabi H, Latifi H, Samimi A, Salehi Moghaddam M, Roshani S. Droplet-based Microfluidic Synthesis of Fluorescent Carbon Dot Hydrogel for Mercury Ions Detection. Proceedings of the EMBL Microfuidics 2018 Conference; 2018 Jul 15-17; Heidelberg, Germany. 2018.
51. Damiati S, Kompella UB, Damiati SA, Kodzius R. Microfluidic devices for drug delivery systems and drug screening. Genes (Basel) 2018; 9(2).
52. Chan HF, Zhang Y, Leong KW. Efficient one-step production of microencapsulated hepatocyte spheroids with enhanced functions. Small 2016; 12(20): 2720-30.
53. McMillan KS, Boyd M, Zagnoni M. Transitioning from multi-phase to single-phase microfluidics for long-term culture and treatment of multicellular spheroids. Lab Chip 2016; 16(18): 3548-57.
54. Wong AH, Li H, Jia Y, Mak PI, Martins RPDS, Liu Y, et al. Drug screening of cancer cell lines and human primary tumors using droplet microfluidics. Sci Rep 2017; 7(1): 9109.
55. Chen Y, Gao D, Liu H, Lin S, Jiang Y. Drug cytotoxicity and signaling pathway analysis with three-dimensional tumor spheroids in a microwell-based microfluidic chip for drug screening. Anal Chim Acta 2015; 898: 85-92.

56. Fu CY, Tseng SY, Yang SM, Hsu L, Liu CH, Chang HY. A microfluidic chip with a U-shaped microstructure array for multicellular spheroid formation, culturing and analysis. Biofabrication 2014; 6(1): 015009.
57. Lim W, Park S. A microfluidic spheroid culture device with a concentration gradient generator for high-throughput screening of drug efficacy. Molecules 2018; 23(12).
58. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. Br J Pharmacol 2011; 162(6): 1239-49.
59. Arzaghy H, Saraygord Afshari N, Bagheri Z, Shahrivari S. The Art of metastasis-on-chip platforms to create metastasis models and developing cancer understandings. Proceedings of 9th International Congress of Laboratory and Clinic; 2017 Feb 21-24; Tehran, Iran. [In Persian].
60. Shin MK, Kim SK, Jung H. Integration of intra- and extravasation in one cell-based microfluidic chip for the study of cancer metastasis. Lab Chip 2011; 11(22): 3880-7.
61. Huh D, Leslie DC, Matthews BD, Fraser JP, Jurek S, Hamilton GA, et al. A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. Sci Transl Med 2012; 4(159): 159ra147.

DOI: *10.22122/jims.v37i535.11883* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 37, No. 535, 3rd Week, September 2019**

Received: 02.06.2019 Accepted: 03.08.2019 Published: 06.09.2019

Three-Dimensional Cell Cultures in Anticancer Drug Researches: From Traditional Methods to Emerging Microfluidic Technology

Shabnam Shahrivari[1], Zeinab Bagheri[2], Neda Saraygord-Afshari[3], Hamid Latifi[4]

Review Article

Abstract

Despite the expensive and time-consuming pre-clinical assessments, more than 50% of medicines fail to reach manufacturing cycle due to the low therapeutic index or possible side effects. Moreover, the challenge of drug resistance and person-to-person variation in complex diseases, such as cancer, and the growing concept of personalized medicine has also made a strong demand for more reliable pre-clinical drug assessment models. Cell culture is an essential and widely-used model in pre-clinical trials, but today we know that traditional culture methods fail to mimic the real in-vivo microenvironment, and hence they are proven to be responsible for the trails' failure. It seems that the problem is going to be solved by the advent of three-dimentional (3D)-cell culture systems in which cell-cell and cell-matrix interaction, as well as the gradients of drugs, oxygen, metabolites, and nutrients, are well designed to efficiently mimic natural conditions, and provide more reliable results for drug assessments. A variety of researchers have purposed that this new paradigm, either directly or indirectly (by affecting gene expression and inducing natural phenotypes), affect cell behavior to meet the challenge of pre-clinical and clinical inconsistency. Recently, 3D-cultures on microfluidic platforms are used to provide a higher level of adaptation to living bodies. Due to the comparable similarity between microchips and living cells scales as well as the body vessels, besides the possibility to run a dynamic culture situation with real physical tension, etc. they are more potent to mimic actual in vivo microenvironment. Therefore, here, we are going to review various models of 3D-cell culture systems, and discuss their impact on pharmaceutical researches.

Keywords: Cancer, Microfluidic microchips, Cell culture, Drug discovery

Citation: Shahrivari S, Bagheri Z, Saraygord-Afshari N, Latifi H. **Three-Dimensional Cell Cultures in Anticancer Drug Researches: From Traditional Methods to Emerging Microfluidic Technology.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(535): 845-56.

1- Department of Medical Biotechnology, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology Engineering and Nanotechnology, School of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Professor, Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Neda Saraygord-Afshari, Email: afshari.n@iums.ac.ir