

## Breast Cancer Treatment in Balb/C Mice Using Dendritic Cells

Nowruz Delirez<sup>1</sup> , Akram Zangeneh<sup>1\*</sup> , Sanaz Sheikhzadeh<sup>1</sup> , Naser Abbasi<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Dept of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup> Biotechnology and Medicinal Plants Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

### Article Info

#### Article type:

Research article

#### Article History:

Received: Sep. 14, 2024

Received in revised form:

Oct. 08, 2024

Accepted: Oct. 15, 2024

Published Online: Feb. 03, 2025

#### \* Correspondence to:

Akram Zangeneh

Dept of Microbiology, Faculty of  
Veterinary Medicine, Urmia  
University, Urmia, Iran

Email:

Akramzangeneh2415@gmail.com

### ABSTRACT

**Introduction:** A fourth of all cancers in women in the country are breast cancer, making it the most common and fatal cancer in women. Some novel approaches are being implemented to reduce the impact of cancer. Thus, this study was conducted to treat breast cancer using dendritic cells in mice.

**Materials & Methods:** The study used the 4T1 cell line to induce breast cancer in Balb/C mice. After tumor induction, the mice were divided into three groups: healthy control, tumor control, and dendritic cell-treated groups. After developing palpable tumors, each group was treated with one million dendritic cells twice at a two-week interval. Body weight, tumor weight, and breast tissue samples were taken for pathological examination. Cells were photographed during the 9-day dendritic cell culture period. One-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test were used in SPSS V.24 to analyze the data at the 0.05 significance level.

**Results:** In the dendritic cell treatment group, the ratio of tumor weight to body weight went down, and the amount of tumor weight loss was balanced out compared to the tumor control group. The dendritic cell receiving group also had a lot more tumor growth inhibition. The dendritic cell-treated group showed an increase in the number of immune cells in the tumor tissue.

**Conclusion:** Treatment with dendritic cells for the treatment of breast tumors enhances the immune response against the tumor.

**Keywords:** Dendritic Cells, Breast Tumor, 4T1

**How to cite this paper:** Delirez N, Zangeneh A, Sheikhzadeh S, Abbasi N. Breast Cancer Treatment in Balb/C Mice Using Dendritic Cells. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2025;32(6):84-96.

### Introduction

Breast cancer is recognized as the second-leading cause of mortality worldwide and one of the primary causes of cancer-related deaths among women (1, 2). Early diagnosis and the identification of anti-tumor compounds are critical factors in managing this disease (1). Developing countries face significant challenges with cancer and new therapeutic approaches. Approaches are emerging that focus on inhibiting cellular death pathways (3). Dendritic cells play a vital role in eliciting immune responses and are utilized in the development of vaccines aimed at disease prevention (5). To create vaccines based on these cells, it is necessary to proliferate them from blood samples (4,5). Thus, this study was conducted to treat breast cancer using dendritic

cells in mice.

### Methods

The 4T1 cell line, obtained from the Pasteur Institute in Tehran was utilized. This cell line represents a type of metastatic breast cancer cell. The cultivation of these cells was conducted in an RPMI 1640 medium supplemented with 10%. Additionally, Balb/C mice, aged one week, were purchased from Urmia University of Medical Sciences and were maintained in the veterinary laboratory. In the process of isolating cells from bone marrow, the Mice were euthanized, and the bones were prepared under sterile conditions. Cells were extracted using a needle and culture medium. Following centrifugation and the removal of red blood cells, the quantity and viability of the cells were assessed using trypan blue staining.



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

Journal of Ilam University of Medical Sciences, Volume 32, Issue 6, 2025

Dendritic cell culture was conducted using one million viable cells in one milliliter of complete medium, with the addition of specific cytokines. On the third and fifth days, the cell medium was replaced, and on the sixth day, tumor antigen was introduced to the cells. The collection and assessment of cell viability were performed on the ninth day, along with the confirmation of dendritic cell markers. 4T1 cells were utilized to induce mammary tumors in Balb/C mice. A total of 100,000 4T1 cells were injected subcutaneously in the interscapular region of the mice, and the mice were monitored daily to confirm tumor induction. Upon confirmation, the mice were divided into three groups of eight: Group A (healthy untreated mice), Group B (untreated mice with tumors), and Group C (tumor-bearing mice treated with dendritic cells). Following tumor induction, the body weight of the mice was measured and recorded daily using a digital scale. After anesthetizing the mice with ketamine and xylazine, the mammary tumors were excised and weighed using a digital scale. Following the anesthesia of Balb/C mice, the Breast tumor tissue and control tissues were preserved in 10% formalin and prepared for histopathological studies. One-way Analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test were used in SPSS V.24 to analyze the data at the 0.05 significance level.

## Results

The findings indicate a significant weight loss in the tumor control group throughout the experiment. The groups treated with dendritic cells were able to partially compensate for the weight loss caused by the tumor. When the tumors were taken out of the mice and their weights were recorded, it was found that the group that received dendritic cells had significantly less tumor weight than the control group. Tumor growth analysis demonstrated that the treated group exhibited considerably less tumor growth than the untreated group. In the control group, predominantly viable tumor cells were observed, whereas the treated group showed a higher incidence of necrosis. Also, looking at immune cells inside the tumor tissue showed that there were no immune cells in the control group, but there were a lot of immune cells in the treated group. Finally, the analysis of dendritic cells revealed an increase in both their number and volume during the first 72 hours, with subsequent changes in the status of suspended cells observed over time.

## Conclusion

The high prevalence of breast cancer in the country underscores the necessity for further research to identify cancer mechanisms and develop new therapeutic approaches. This study utilized the 4T1 mouse breast cancer cell line, which exhibits characteristics similar to human breast cancer. The addition of LPS to these cells induces their maturation and the production of significant cytokines, such as IL-12, which directs the immune response toward a TH1 profile. Treatment with dendritic cells for the treatment of breast tumors enhances the immune response against the tumor.

## Authors' Contribution

This study was approved by the Ethics Committee of Urmia University (Iran) (IR-UU-AEC-3/40). The authors adhered to ethical standards by avoiding data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

## Ethical Statement

Honesty in library collection and data report, written informed consent from all samples according to the Declaration of Helsinki's announcement, and interventional human principles. The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Funding

This study was conducted with the Biotechnology and Medicinal Plants Research Center of Ilam University of Medical Sciences for their financial support and provision of laboratory equipment.

## Acknowledgment

Authors would like to thank Urmia University and the Biotechnology and Medicinal Plants Research Center of Ilam University of Medical Sciences for their financial support and provision of laboratory equipment for the PhD thesis (No. 25421).

## درمان سرطان پستان در موش Balb/C با استفاده از سلول‌های دندریتیک

نوروز دلیرز<sup>۱</sup>، اکرم زنگنه<sup>۱\*</sup>، ساناز شیخ‌زاده<sup>۱</sup>، ناصر عباسی<sup>۲</sup><sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

## اطلاعات مقاله

## چکیده

## نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۴

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۱۱/۱۵

## نویسنده مسئول:

اکرم زنگنه

گروه میکروبیولوژی، دانشکده

دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

Email:

Akramzangeneh2415@gmail.com

**مقدمه:** سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در زنان و دومین عامل مرگ‌ومیر در میان زنان است و حدود یک‌چهارم سرطان‌های زنان در کشور مربوط به سرطان سینه است. شیوع و تعداد بالای افراد مبتلا به این نوع سرطان در کشور ما ضرورت انجام تحقیقات بیشتر برای کشف سازوکارهای سرطان و ابداع روش‌های درمانی مؤثر را آشکار می‌سازد. سلول‌های دندریتیک به عنوان تأمین‌کننده حریفه‌ای آنتی‌ژن‌ها، با برداشت و پردازش آنتی‌ژن‌ها، نقش مهمی در کنترل و هدایت پاسخ ایمنی در برابر بیماری‌های مختلف به‌ویژه سرطان ایفا می‌کنند.

**مواد و روش‌ها:** برای القای سرطان سینه در موش‌های Balb/C از رده سلولی 4T1 استفاده شد. پس از القای تومور، حیوانات به‌طور تصادفی به سه گروه ۸ تایی تقسیم گردیدند. گروه‌ها شامل کنترل سالم، کنترل تومور و گروه تحت درمان با سلول‌های دندریتیک استخراج‌شده از مغز استخوان بودند. پس از ایجاد تومور قابل لمس در آن‌ها، هریک از آن‌ها با یک میلیون سلول دندریتیک دو بار به فاصله دو هفته تحت درمان قرار گرفتند. در طول دوره درمان، وزن بدن موش‌ها اندازه‌گیری شد. وزن تومور نیز اندازه‌گیری و نمونه بافت پستان نیز برای بررسی پاتولوژی جدا گردید؛ همچنین در طول دوره ۹ روزه کشت سلولی دندریتیک، از سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ عکس‌برداری شد. برای تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در نرم‌افزار SPSS vol.24 استفاده گردید.

**یافته‌های پژوهش:** نسبت وزن تومور به وزن بدن در گروه درمان با سلول‌های دندریتیک کاهش یافت و میزان کاهش وزن تومور در این گروه نسبت به گروه کنترل تومور جبران شد و میزان مهار رشد تومور در گروه دریافت‌کننده سلول‌های دندریتیک به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. تعداد سلول‌های ایمنی در بافت تومور در گروه درمان‌شده با سلول‌های دندریتیک افزایش یافت.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج می‌توان گفت که درمان با سلول‌های دندریتیک برای درمان تومورهای پستان باعث تقویت پاسخ ایمنی در برابر تومور می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های دندریتیک، تومور پستان، 4T1

**استناد:** دلیرز نوروز، زنگنه اکرم، شیخ‌زاده ساناز، عباسی ناصر. درمان سرطان پستان در موش Balb/C با استفاده از سلول‌های دندریتیک. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، بهمن

۱۴۰۳؛ ۳۲(۶): ۸۴-۹۶

## مقدمه

امروزه سرطان سینه دومین عامل مرگ و میر در جهان است. آمارها نشان می‌دهد که سرطان یک سوم جمعیت را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سرطان پستان یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان است (۱). تشخیص زودهنگام این بیماری و یافتن ترکیبات ضد تومور از عوامل مهم در کنترل سرطان سینه است (۲، ۳). از سوی دیگر، پس از سال‌ها پیشرفت در حوزه سلامت، امروزه کشورهای در حال توسعه درگیر مبارزه با بیماری‌های مهلک سرطان هستند (۴). روش‌های درمانی جدیدی ابداع شده است که هدف آن خنثی کردن مسیر رشد سرطان است؛ به همین علت، این روش‌های درمانی علاقه روزافزونی به سرکوب مسیر مرگ سلولی دارند و در نتیجه، سلول‌های سرطانی را وادار به مرگ می‌کنند. راه‌های مختلفی برای مرگ سلولی وجود دارد، از جمله آپوپتوز، اتوفاژی و نکروز (۵، ۶). سلول‌های دندریتیک با برداشت و پردازش آنتی‌ژن‌ها پاسخ ایمنی را ایجاد و هدایت و کنترل می‌کنند. این سلول‌ها می‌توانند انواع مختلفی از پاسخ‌های ایمنی را با توجه به عوامل و شرایط محیطی هدایت نمایند (۷). سلول‌های دندریتیک یکی از سلول‌های حرفه‌ای هستند و به سبب نقش مهم این سلول‌ها، در تهیه واکسن‌ها و پیشگیری از بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، آلرژی، بیماری‌های خودایمنی و نقص دستگاه ایمنی استفاده می‌شوند (۸، ۹). برای ساخت واکسن‌های مبتنی بر سلول‌های دندریتیک (DC) در انسان، باید در خارج از بدن، این سلول‌ها را به مقدار فراوان آماده کنیم. در ابتدا از DC خون محیطی به عنوان منبع این سلول‌ها استفاده می‌شد. در این روش از محصول لوکوفورز خون محیطی استفاده می‌گردد. مزیت این روش نبود شرایط کشت و سیتوکین است؛ اما مشکل محدود بودن تعداد سلول‌های دندریتیک خون محیطی است. امروزه در بیشتر آزمایش‌ها بالینی از مونوسیت‌های خون محیطی به عنوان منبع سلول‌های دندریتیک استفاده می‌شود. در نمونه‌های موش، سلول‌های دندریتیک مغز استخوان یا سلول‌های دندریتیک طحال نیز به عنوان منبع سلول‌ها استفاده می‌گردند و باید تحت شرایط کشت مشابه انسان قرار گیرند

(۱۰). روش‌های مختلفی برای کشت و تکثیر سلول‌های دندریتیک مغز استخوان موش وجود دارد. در مطالعه پیترو ورواک از یک روش کشت شش‌روزه برای تولید سلول‌های دندریتیک نابالغ استفاده شد و به دنبال آن، از یک کشت سه‌روزه با مواد بالغ شامل آنتی‌ژن‌های تومور به دست آمده از سلول‌ها استفاده گردید (۱۱، ۱۲)؛ بنابراین، مطالعه حاضر بر اساس تولید سلول‌های دندریتیک CD34+ بارگذاری شده با آنتی‌ژن‌های توموری به روش *ex vivo* در نمونه موشی سرطان سینه انجام شد. در این مطالعه، سلول‌های خون‌ساز از مغز استخوان ران و درشت نی موش نژاد Balb/c استحصال گردید و سپس سلول‌های پیش‌ساز استحصال شده از مغز استخوان در محیط کشت به همراه کوکتایل سایتوکاینی رشد داده می‌شوند؛ سپس آنتی‌ژن‌های مربوط به لیپوپلی ساکارید باکتری گرم منفی در سلول‌های دندریتیک بارگذاری خواهد شد (۱۵). و در سلول‌های دندریتیک نابالغ القای بلوغ خواهد گردید. از سوی دیگر، موش‌هایی که به طور تجربی دچار تومور سینه شده‌اند، پس از رسیدن تومور به اندازه ۱۰۰-۵۰ میلی‌متر مکعب، طی حداقل دو نوبت با سلول‌های دندریتیک بالغ تولید شده ایمونوتراپی خواهند شد (۱۵).

## مواد و روش‌ها

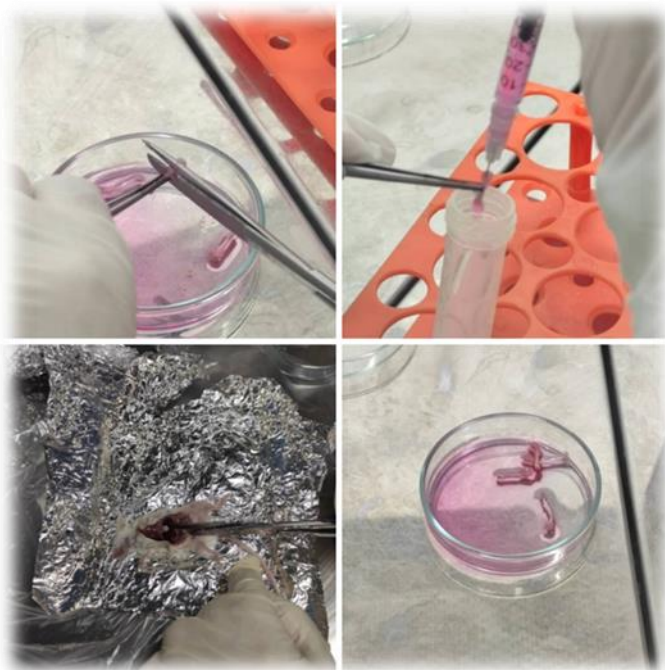
کشت سلولی: در این مطالعه از رده سلولی T14 استفاده گردید. این رده سلولی به صورت ویال از انستیتو پاستور تهران تهیه شد. رده سلولی T14 یکی از چندین رده سلولی سرطان سینه است که می‌تواند به طور مؤثر متاستاز دهد. برای کشت این رده سلولی از محیط کشت RPMI 1640+10% استفاده گردید. محیط کشت RPMI 1640 از شرکت سیگما خریداری شد.

در این تحقیق از موش‌های هفته‌ای Balb/C استفاده گردید که از دانشگاه علوم پزشکی ارومیه خریداری و تا زمان آزمایش در خانه حیوانات دانشکده دامپزشکی ارومیه نگهداری شدند.

جداسازی سلول‌ها از مغز استخوان موش: ابتدا موش‌ها کشته شدند و در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور گردیدند؛ سپس پوست استخوان ران و ساق پا برداشته و در شرایط

استریل، عضلات این نواحی به طور کامل از استخوان جدا شد. توسط سوزنی با گیج ۲۵ حاوی محیط کشت RPMI 1640 به داخل استخوان‌ها تزریق گردید. این کار تا زمانی ادامه یافت که رنگ استخوان‌ها کاملاً سفید شد. سوسپانسیون سلولی به مدت ۵ دقیقه در G1500 سانتریفیوژ گردید. با استفاده از آب

مقطر و بافر X10 فسفات، گلبول‌های قرمز خون حذف و سلول‌ها سه بار شسته شدند. تعداد و بقایای سلول‌ها با استفاده از رنگ تریان بلو ۵ درصد تعیین گردید. تصاویر انجام فرایند جداسازی سلول‌ها از مغز استخوان موش در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.



شکل شماره ۱. جداسازی سلول‌ها از مغز استخوان موش

کشت سلول دندریتیک: در هر پلیت ۲۴ خانه‌ای، یک میلیون سلول زنده در یک میلی‌لیتر محیط کامل ریخته شد و به سلول‌های  $20 \text{ ng/ml}$  و  $10 \text{ ng/ml}$  اینترلوکین-۴ اضافه گردید. در روز سوم و پنجم، دوسوم محیط سلول‌ها با محیط کامل دارای سیتوکین تعویض شدند. در روز ششم، ۵۰ میکروگرم پر میلی‌لیتر آنتی‌ژن تومور به سلول‌ها اضافه گردید. در روز هفتم،  $0/1$  میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS اضافه شد. در روز نهم، سلول‌های دندریتیک جمع‌آوری و زنده ماندن آن‌ها با استفاده از رنگ تریان بلو تعیین گردید. طی این دوره ۹ روزه، هرروز از سلول‌ها زیر میکروسکوپ عکس‌برداری شد. تصاویر انجام کشت سلول‌های دندریتیک در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. برای تأیید سلول‌های دندریتیک با مارکرهایی از جمله CD11c- CD80-CD8a- CD4- CD86- CD40- I-AK سنجیده گردیدند.

بخش حیوانات: در این مطالعه، ۲۴ موش ماده نژاد Balb/C با محدوده سنی ۸-۶ هفته از دانشکده پزشکی ارومیه خریداری و در خانه حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه با رطوبت  $55 \pm 5$  و دمای  $22 \pm 2$  نگهداری شدند. برنامه نور شامل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. حیوانات آزمایشی به غذا و آب دسترسی آزاد داشتند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه ارومیه (کد اخلاقی: IR-UU-AEC-3/40) تأیید شد.

القای تومور پستانی در موش Balb/C: رده سلولی T14 برای القای تومورهای پستانی در موش Balb/C استفاده گردید. برای این منظور، ۱۰۰۰۰۰ سلول T14 در ۵۰ میکرولیتر بافر PBS حل شد و به صورت زیر جلدی در ناحیه میان سینه ۴ و ۵ تزریق گردید. هرروز برای بررسی القای تومور، موش‌ها بررسی می‌شدند. پس از تأیید القای تومور در موش‌ها، آن‌ها

نگردیدند و گروه C شامل ۸ موش ماده Balb/C بود که پس از ایجاد تومور قابل لمس در آنها، هریک از آنها با یک میلیون سلول دندریتیک دو بار به فاصله دو هفته تحت درمان زیر جلدی قرار گرفتند (شکل شماره ۲).

به طور تصادفی به سه گروه ۸ تایی به شرح ذیل تقسیم گردیدند (۱۵): گروه A شامل ۸ موش ماده Balb/C سالم بود که تحت هیچ درمانی قرار نگرفتند؛ گروه B شامل ۸ موش ماده Balb/C بود که در آنها تومور القا شد؛ اما درمان



شکل شماره ۲. القای تومور پستانی با استفاده از سلول های 4T1 در موش های Balb/C

موش ها خارج و با ترازو دیجیتال اندازه گیری گردید. اندازه گیری مهار رشد تومور پستان در موش: به منظور ارزیابی مهار رشد تومور توسط تیمارهای مختلف، از فرمول زیر استفاده شد:

بررسی وزن بدن موش های Balb/C: پس از القای تومور در موش ها، وزن آنها روزانه با ترازو دیجیتالی اندازه گیری و ثبت شد.

اندازه گیری وزن تومور در موش Balb/C: پس از بیهوشی موش ها با کتامین و زایلازین، تومورهای پستانی

$$\frac{Ws - Wt}{Ws} \times 100$$

|    |                                          |
|----|------------------------------------------|
| Ws | وزن تومور پستان در گروه های درمانی       |
| Wt | وزن تومور پستان در گروه های کنترل توموری |

کنترل سالم جدا و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری گردید و برای مطالعات هیستوپاتولوژیک با هماتوکسیلین و انوزین

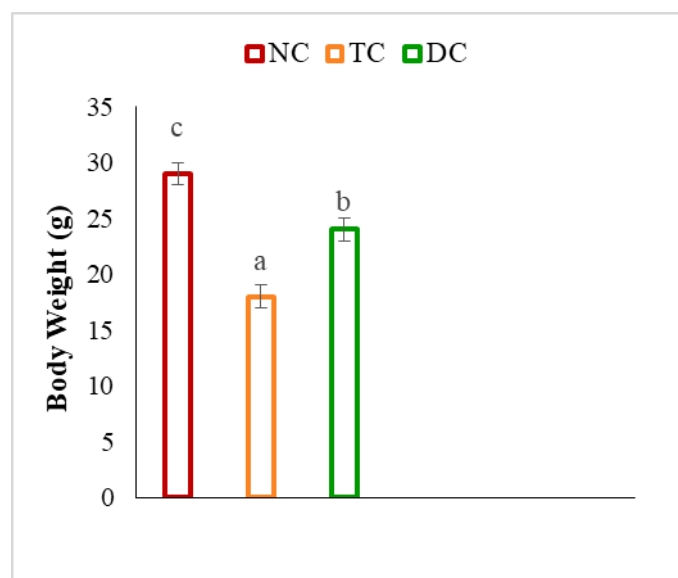
بررسی هیستوپاتولوژیک: پس از بیهوشی موش های Balb/C، تومور پستانی موش های مبتلا و بافت پستانی گروه

رنگ آمیزی شد.

### یافته‌های پژوهش

بررسی وزن بدن Balb/C: همان‌طور که در نمودار میانگین وزن بدن مشاهده می‌شود، در گروه کنترل توموری

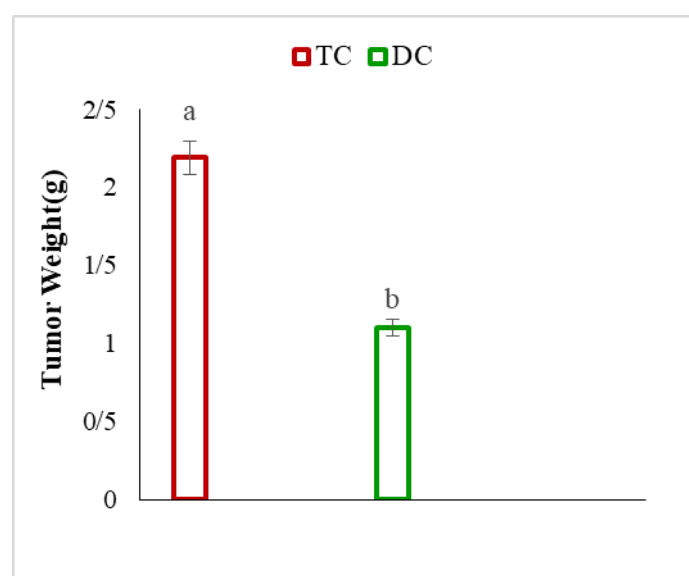
کاهش وزن مشخصی در طول دوره آزمایش مشاهده گردید و همچنین گروهی که تحت درمان با سلول‌های دندریتیک قرار گرفتند، توانستند مقداری از کاهش وزن به علت تومور را جبران کنند (نمودار شماره ۱). حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح  $P < 0.05$  است.



نمودار شماره ۱. مقایسه وزن بدن حیوانات در گروه درمانی و گروه کنترل سالم و کنترل توموری (کنترل سالم NC، کنترل توموری TC، سلول‌های دندریتیک DC)

دندریتیک نسبت به گروه تومور معنی‌دار است (نمودار شماره ۲). حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح  $P < 0.05$  است.

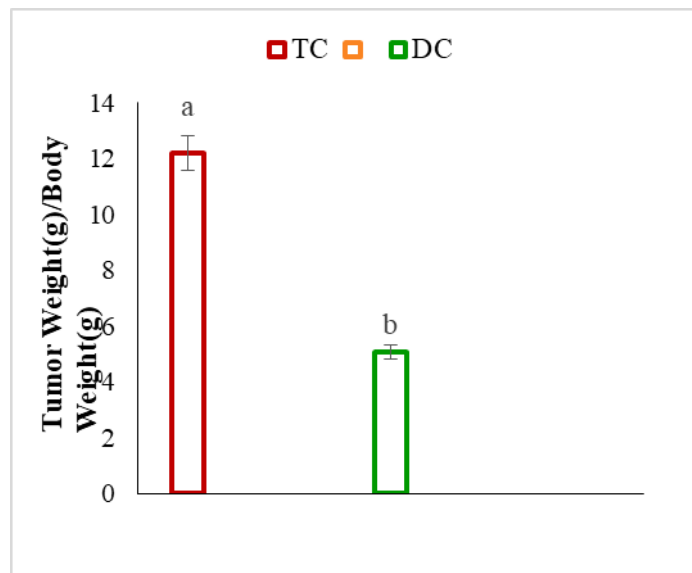
ارزیابی وزن تومور: پس از کشتن موش‌ها، تومور از بدن موش‌ها خارج شد و وزن تومورها با ترازو دیجیتال اندازه‌گیری گردید. نتایج مقایسه وزن تومور در گروه‌های مختلف نشان داد که میزان کاهش در گروه گیرنده سلول



نمودار شماره ۲. مقایسه وزن تومور حیوانات در گروه درمانی و کنترل توموری (کنترل توموری TC، سلول‌های دندریتیک DC)

بررسی نسبت وزن تومور به وزن بدن: پس از بیهوشی موش‌ها، تومورها از بدن آن‌ها خارج شد و وزن آن‌ها با ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری گردید. همان‌طور که دیده می‌شود، نسبت وزن تومور به وزن بدن در گروه درمان نسبت به

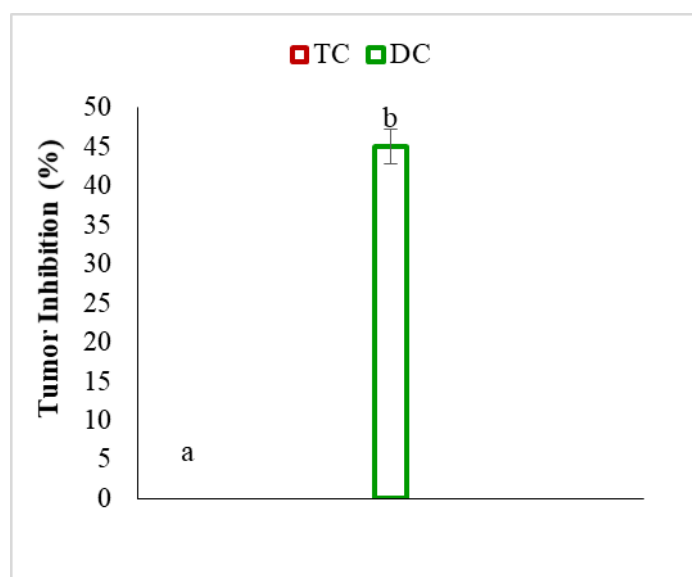
گروه کنترل کاهش یافته است (نمودار شماره ۳). حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح  $P < 0.05$  است.



**نمودار شماره ۳.** مقایسه نسبت وزن تومور به وزن بدن حیوانات در گروه‌های مختلف (کنترل توموری TC و سلول‌های دندریتیک DC)

ارزیابی میزان مهار رشد تومور: نتایج تجزیه و تحلیل مهار رشد تومور در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد، در گروهی که تحت درمان با سلول‌های دندریتیک قرار گرفته‌اند، رشد تومور در مقایسه با گروه تومور بدون درمان،

به‌طور چشمگیری کاهش یافته است (نمودار شماره ۴). حروف کوچک مختلف در سطح  $P < 0.05$ ، تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد.



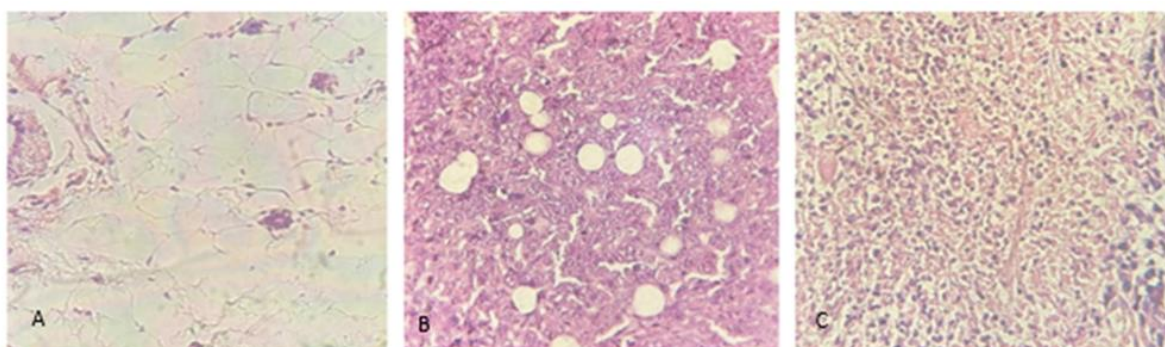
**نمودار شماره ۴.** ارزیابی میزان مهار رشد تومور حیوانات در گروه‌های مختلف (کنترل توموری TC، سلول‌های دندریتیک DC)

نتایج هیستوپاتولوژیک: در گروه کنترل تومور، ناحیه تومور عمدتاً از سلول‌های تومور زنده تشکیل شد و تنها ناحیه

کوچکی از نکروز در بخش تومور مشاهده گردید، درحالی که بیشترین میزان نکروز در گروه درمان‌شده با سلول‌های

دندریتیک دیده شد. برای بررسی سلول‌های ایمنی در بافت پستان، از لام‌های رنگ آمیزی با هماتوکسین و ائوزین استفاده گردید. همان‌طور که در شکل شماره ۳ مشاهده می‌شود، معمول‌ترین سلول‌های ایمنی در بافت تومور که شامل نوتروفیل‌ها، پلاسماسل‌ها و لنفوسیت‌ها هستند، در گروه‌های کنترل تومور، اثری از نفوذ این سلول‌های ایمنی دیده نشد؛ اما در گروه درمان‌شده با سلول‌های دندریتیک سل نفوذ سلول‌های ایمنی در بافت پستانی مشاهده گردید. پس از بررسی عکس‌های سلول‌های دندریتیک در مدت ۹ روز

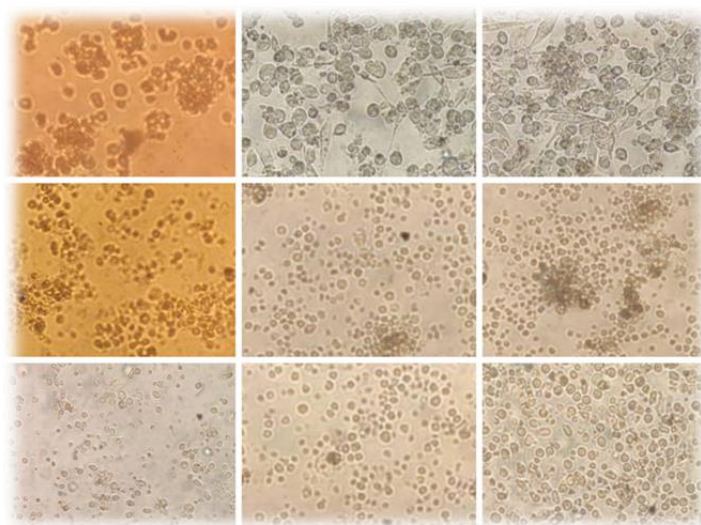
متوجه شدیم که پس از ۷۲ ساعت، تعداد سلول‌ها و حجم آن‌ها افزایش یافته است و با گذشت زمان، تعداد سلول‌های چسبنده کاهش یافت. پس از کاهش تعداد سلول‌های چسبنده، سلول‌های معلق با برآمدگی‌های دندریتی قابل مشاهده بود. در روز پنجم، تعداد سلول‌های معلق افزایش یافت و در روز هفتم، سلول‌های معلق پیچیده و برآمدگی‌های آن‌ها طولانی‌تر شد. پس از افزودن آنتی‌ژن و LPS، کلنی‌ها گسترش یافتند و سلول‌های دندریتیک طبیعی مشاهده گردیدند (شکل شماره ۳).



**شکل شماره ۳.** بررسی هیستوپاتولوژیک میان گروه‌های مختلف (A. گروه کنترل سالم؛ B. گروه کنترل توموری؛ C. گروه دریافت‌کننده سلول‌های دندریتیک)

بررسی میکروسکوپی سلول‌های دندریتیک: پس از بررسی عکس‌های سلول‌های دندریتیک در مدت ۹ روز دیده شد که پس از ۷۲ ساعت، تعداد سلول‌ها و حجم آن‌ها افزایش و با گذشت زمان، تعداد سلول‌های چسبنده کاهش می‌یابد. پس از کاهش تعداد سلول‌های چسبنده، سلول‌های معلق با

برآمدگی‌های دندریتی قابل مشاهده است. در روز پنجم، تعداد سلول‌های معلق افزایش یافت و در روز هفتم، سلول‌های معلق پیچیده و برآمدگی‌های آن‌ها طولانی‌تر شد. پس از افزودن آنتی‌ژن و LPS، کلنی‌ها گسترش یافتند و سلول‌های دندریتیک طبیعی مشاهده گردیدند (شکل شماره ۴).



**شکل شماره ۴.** بررسی میکروسکوپی سلول‌های دندریتیک از مغز استخوان موش Balb/C

## بحث و نتیجه گیری

شیوع بالای افراد مبتلا به سرطان سینه در کشور ما، ضرورت انجام تحقیقات بیشتر برای کشف سازوکارهای سرطان و ابداع روش های درمانی مؤثر را آشکار می سازد. سلول های دندریتیک به عنوان تأمین کننده حرفه ای آنتی ژن ها، با برداشت و پردازش آنتی ژن ها، نقش مهمی در کنترل و هدایت پاسخ ایمنی در برابر بیماری های مختلف به ویژه سرطان ایفا می کنند. در مطالعه حاضر، از رده سلولی سرطان سینه موش Balb/C به نام T14 استفاده شد. این رده سلولی قابلیت تهاجمی فراوانی دارد که از تومور خودبه خودی ایجاد شده در موش Balb/C مشتق گردیده است. این رده سلولی چندین ویژگی دارد که آن را به عنوان نمونه حیوانی سرطان سینه انسان مناسب می نماید؛ از جمله: ۱. سلول های توموری به آسانی در غدد پستانی جای می گیرند؛ بنابراین، تومور اولیه در مکان آناتومیک صحیح خود رشد می کند؛ ۲. همانند سرطان سینه انسان، سرطان متاستاتیک سینه T14 به طور خودبه خودی از تومور اولیه پیشرفت می کند؛ همچنین پیشروی متاستاز T14 به عقده لنفاوی و سایر اعضا از جمله گره لنفاوی، خون، کبد، ریه، مغز و استخوان بسیار مشابه سرطان سینه انسان است (۲۳ و ۲۷). سلول های دندریتیک می توانند انواع مختلفی از پاسخ های ایمنی را با توجه به شرایط محیطی و عواملی که می توانند باعث پاسخ های نوع یک یا دو شوند، آغاز و هدایت کنند (۱۳ و ۲۸) که در ایجاد ایمنی ضد تومور در درمان آسم و آلرژی و درمان بیماری های خودایمنی بسیار مؤثر هستند (۱۴ و ۲۹). سلول های دندریتیک به علت سیتوکین هایی که تولید می کنند، می توانند پاسخ ایمنی را هدایت نمایند و به عنوان مثال (۱۵ و ۱۶)، با تولید IL-12 و IL-18 پاسخ نوع یک و با تولید IL-4 و IL-10 پاسخ نوع دو را ایجاد می کنند (۱۷). در این مطالعه، افزودن LPS باعث بلوغ DC و تولید IL-12 می شود. IL-12 مهم ترین سیتوکین در هدایت پاسخ ایمنی به سوی TH1 است. این سیتوکین با تحریک Tcell و NK باعث تولید IFN Y می گردد (۱۸ و ۳۰). البته علاوه بر IL-12، پاسخ TH1 را القا می کند. LPS توسمی گردد (۱۹). این شناسایی باعث بلوغ این سلول ها و آزادسازی

سیتوکین هایی مانند IL-12 و IL-18 می شود و پاسخ ایمنی را به TH1 (۲۰ و ۳۱) هدایت می کند. با انجام این تحقیق می توان ثابت کرد که با کشت ۹ روزه سلول های مغز استخوان موش می توان سلول های کارآمد ایجاد کرد و با افزودن ترکیباتی به محیط کشت سلول های دندریتیک، باعث بلوغ این سلول ها و ایجاد آن ها شد. سیتوکین هایی که نوع پاسخ را القا می کنند (۲۱ و ۲۲)، آن ها یک یا دو می شوند که نشان دهنده ایمنونوترایی در برابر بیماری های مختلف از جمله سرطان است. در مطالعه ای که روی سلول های دندریتیک استخراج شده از مغز استخوان انجام گرفت، نشان داده شد، مبتلایان به تومور که با سلول های دندریتیک واکسینه شده بودند، به طور چشمگیری پاسخ بهتری از نظر کاهش حجم و اندازه تومور نسبت به مبتلایان واکسینه شده با یک آنتی ژن توموری مشخص داشتند. در مطالعه ما نیز، گروه دریافت کننده سلول های دندریتیک پاسخ بهتری را از نظر کاهش حجم و اندازه تومور نشان دادند (۲۴ و ۳۲). در مطالعه ژین میائو لو و همکاران نشان داده شد که درمان با سلول های دندریتیک رشد تومور را به طور چشمگیری مهار کرد و نشان داد که می تواند به عنوان راهبرد درمانی نوین سرطان استفاده گردد. در بررسی ما نیز گروه دریافت کننده سلول های دندریتیک نسبت به سایر گروه ها رشد تومور به طور چشمگیری مهار کرد (۲۵).

## سپاس گذاری

با تشکر و قدردانی از دانشگاه ارومیه و مرکز تحقیقات زیست فناوری و گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی ایلام به سبب حمایت در زمینه مالی و فراهم نمودن تجهیزات آزمایشگاهی از پایان نامه دکتری تخصصی به شماره ثبت ۲۵۴۲۱.

## تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که در انجام این پژوهش، هیچگونه تعارض منافع گزارش نشده است.

## کد اخلاق

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه ارومیه (کد اخلاقی: IR-UU-AEC-3/40) تایید شد.

## حمایت مالی

این مطالعه با همکاری مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

و گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی ایلام به منظور حمایت مالی و تهیه تجهیزات آزمایشگاهی انجام شد.

### مشارکت نویسندگان

نوروز دلیرز و اکرم زنگنه در بررسی روش های تحقیق، ساناز شیخ زاده و اکرم زنگنه و ناصر عباسی انجام آزمایشات *in vitro*، نوروز دلیرز و ساناز شیخ زاده و اکرم زنگنه انجام آزمایشات *in vivo*، نوروز دلیرز و اکرم زنگنه مدیریت تحقیق، نوروز دلیرز و اکرم زنگنه بررسی اماری داده ها، ساناز شیخ زاده و اکرم زنگنه جمع اوری داده ها، نوروز دلیرز و ناصر عباسی حمایت مالی. همه نویسندگان به طور مساوی در مفهوم سازی مقاله و نوشتن پیش نویس های اصلی و بعدی مشارکت داشتند.

## References

1. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, et al. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2017; 37: 163-76. doi: 10.3109/07388551.2015.1128876.
2. Aghaabbasi K, Hassani Kumleh H, Askari N, et al. Anticancer activity of *Blepharis persica* seed hydroalcoholic extract on (MCF-7) human breast cancer and (LNCaP) prostate cancer cell lines and its synergistic effect with doxorubicin. *JCT* 2018; 9: 206-21. doi: 10.52547/JCT.9.3.206.
3. Isetta AM, Fornasiero MC, Ferrari M, Trizio D. Immunosuppressive activity of 4'-iodo-4'-deoxy-doxorubicin on humoral and cell mediated immune responses in mice: comparison with doxorubicin. *Int J Immunopharmacol* 1990; 12: 665-73. doi: 10.1016/0192-0561(90)90104-u.
4. Anderson AR, Weaver AM, Cummings PT, Quaranta V. Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell* 2006;127: 905-15. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.042.
5. Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, et al. Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnol Appl Biochem* 2022; 69:1633- 45. doi: 10.1002/bab.2233.
6. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 2015; 72: 4-15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
7. Yousefi Sadeghloo A, Khorsandi K, Kianmehr Z. Synergistic effect of photodynamic treatment and doxorubicin on triple negative breast cancer cells. *Photochem Photobiol Sci* 2020; 19:1580-9. doi: 10.1039/d0pp00132e.
8. Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, Lind HT, Spoelstra NS, Babbs BL, et al. Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo. *Mol Cancer Ther* 2015; 14: 769-78. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0926.
9. Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa MC, Etxeberria I, Aznar MA, Pérez-Gracia JL, et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 2019; 120: 6-15. doi: 10.1038/s41416-018-0328-y.
10. Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, Weber BL. Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1365-72. doi: 10.1093/jnci/94.18.1365.
11. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Int J Mol Sci* 2020; 21:3233. doi: 10.3390/ijms21093233.
12. Chen S, Lv M, Fang S, et al. Poly(I:C) enhanced anti-cervical cancer immunities induced by dendritic cells-derived exosomes. *Int J Biol Macromol* 2018; 113: 1182-7. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.034.
13. Yang CY, Liu HW, Tsai YC, Tseng JY, Liang SC, Chen CY, et al. Interleukin-4 receptor-targeted liposomal doxorubicin as a model for enhancing cellular uptake and antitumor efficacy in murine colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2015;16: 1641-50. doi:10.1080/15384047.2015.1095397.
14. De Henau O, Rausch M, Winkler D, Campesato LF, Liu C, Cymerman DH, et al. Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3K $\gamma$  in myeloid cells. *Nature* 2016; 539:443-7. doi: 10.1038/nature20554.
15. De Vera AA, Gupta P, Lei Z, et al. Immunoncology agent IPI-549 is a modulator of P-glycoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1)-mediated multidrug resistance (MDR) in cancer: In vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2019; 442:91-103. doi: 10.1016/j.canlet.2018.10.020.
16. Dobosz P, Stępień M, Golke A, Dzieciatkowski T. Challenges of the Immunotherapy: Perspectives and Limitations of the Immune Checkpoint Inhibitor Treatment. *Int J Mol Sci* 2022;23: 2847. doi: 10.3390/ijms23052847.
17. Eskandari E, Eaves CJ. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. *J Cell Biol* 2022; 221: e202201159. doi: 10.1083/jcb.202201159.
18. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5:28. doi: 10.1038/s41392-020-0134-x.
19. Gebremeskel S, Johnston B. Concepts and mechanisms underlying chemotherapy induced immunogenic cell death: impact on clinical studies and considerations for combined therapies. *Oncotarget* 2015;6: 41600-19. doi: 10.18632/oncotarget.6113.
20. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci* 2021; 22:12827. doi: 10.3390/ijms222312827.
21. Ghotbi Z, Haddadi A, Hamdy S, Hung RW, Samuel J, Lavasanifar A. Active targeting of dendritic cells with mannan-decorated PLGA

- nanoparticles. *J Drug Target* 2011; 19:281-92. doi: 10.3109/1061186X.2010.499463.
22. Gibbert K, Schlaak JF, Yang D, et al. IFN- $\alpha$  subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy. *Br J Pharmacol* 2013; 168: 1048-58. doi: 10.1111/bph.12010.
  23. Hanlon DJ, Aldo PB, Devine L, Alvero AB, Engberg AK, Edelson R, et al. Enhanced Stimulation of Anti-Ovarian Cancer CD8+ T Cells by Dendritic Cells Loaded with Nanoparticle Encapsulated Tumor Antigen. *Am J Reprod Immunol* 2011; 65: 597-609. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00968. x.
  24. Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Mol Biol Educ* 2021; 49: 800-812. doi: 10.1002/bmb.21552.
  25. Hashimoto N, Nagano H, Tanaka T. The role of tumor suppressor p53 in metabolism and energy regulation, and its implication in cancer and lifestyle-related diseases. *Endocr J* 2019; 66:485-96. doi: 10.1507/endocrj. EJ18-0565.
  26. Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, Madiraju C. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. *Methods Mol Biol* 2023; 2612: 1-17. doi: 10.1007/978-1-0716-2903-1\_1.
  27. Hong DS, Postow M, Chmielowski B, et al. Eganalisib, a First-in-Class PI3K $\gamma$  Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors: Results of the Phase 1/1b MARIO-1 Trial. *Clin Cancer Res* 2023;29: 2210-19.
  28. Huang L, Rong Y, Tang X, Yi K, Qi P, Hou J, Liu W, et al. Engineered exosomes as an in situ DC-primed vaccine to boost antitumor immunity in breast cancer. *Mol Cancer* 2022; 21:45. doi: 10.1186/s12943-022-01515-x.
  29. Huo W, Yang X, Wang B, Cao L, Fang Z, Li Z, et al. Biomaterialized hydrogel DC vaccine for cancer immunotherapy: a boosting strategy via improving immunogenicity and reversing immune-inhibitory microenvironment. *Biomaterials* 2022; 288: 121722. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121722.
  30. Ilango S, Paital B, Jayachandran P, Padma PR, Nirmaladevi R. Epigenetic alterations in cancer. *Front Biosci* 2020; 25:1058-109. doi: 10.2741/4847.
  31. Jinmiao Lu, Nana Wei, Shilan Zhu, et al. Exosomes Derived from Dendritic Cells Infected with *Toxoplasma gondii* Show Antitumoral Activity in a Mouse Model of Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2022; 12: 899737. doi: 10.3389/fonc.2022.899737.
  32. Jozefczuk J, Adjaye J. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. *Methods Enzymol* 2011;500: 99-109. doi: 10.1016/B978-0-12-385118-5.00006-2.
  33. Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, et al, PI3K $\gamma$  is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature* 2016; 539: 437-42. doi: 10.1038/nature19834.
  34. Ling SP, Ming LC, Dhaliwal JS, et al. Role of Immunotherapy in the Treatment of Cancer: A Systematic Review. *Cancers (Basel)* 2022; 14:5205. doi: 10.3390/cancers14215205.