

The Effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) on the Mechanical Properties of Breast Cancer Epithelial Cells

Dornaz Milani¹, Siamak Khorramymehr^{1*}, Behnoosh Vasaghi-Gharamaleki²

¹Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Basic Sciences of Rehabilitation, Iran University of Medical Sciences (IUMS), Tehran, Iran

Abstract

Background and aims: Clinical and laboratory studies show that taking aspirin and ibuprofen during chemotherapy or before breast cancer reduces the number of cancer cells and prevents their transmission. This study aimed to investigate the mechanical properties of cells after cell treatment with these two drugs.

Methods: This study examined the effects of aspirin and ibuprofen, in combination and independently, at two concentrations of 5 μL and 10 μL on the mechanical properties of MCF-7 cancer cells. Next, it compared them with the mechanical properties of healthy MCF-10 cells. The mechanical properties of the cells were measured using an atomic force microscopy (AFM) device. Finally, the Young's modulus and the deformation of all cell groups were calculated and examined.

Results: Our results showed that the deformation chart of cancer cells approached that of healthy cells using aspirin and ibuprofen. In addition, the numerical value of Young's modulus in MCF-7 when using 10 μL of aspirin compared to other treatment groups had the highest value close to Young's modulus of healthy cells.

Conclusion: Using the separate or combined use of aspirin and ibuprofen, the mechanical properties of cancer cells were closer to those of healthy cells. The viable metastatic cell count probably decreased due to increased stiffness in cancer cell lines using aspirin and ibuprofen.

Keywords

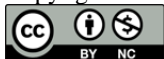
Breast Cancer, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug, Cell Mechanics, Atomic Force Microscopy, Cancer Cell

Received: 2023/01/04

Accepted: 2023/09/19

*Corresponding Author:
s.khorramymehr@srbiau.ac.ir

Ethics Approval:
Not applicable



Introduction

Recent studies have revealed that ibuprofen and aspirin may reduce the risk of various cancer types, including prostate, lung, colon, and breast cancers. Additionally, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) may complement chemotherapy as an adjunctive therapy. Both aspirin and ibuprofen work by inhibiting cyclooxygenase 1 and 2 enzymes, which play a crucial role in the production of inflammatory mediators. Continuous COX-1 controlled use of ibuprofen can reduce the risk of breast cancer by up to 50%. (1,2)

Ibuprofen contributes to cancer prevention by affecting cell proteins and inhibiting COX enzymes, thereby reducing cell migration and angiogenesis. Aspirin can delay or prevent the colonization of a tumor, with the most significant impact observed between 5 and 10 mmol. NSAIDs' anti-tumor mechanism also aids in regenerating cell cytoskeletons. (3)

Cell mechanics is a crucial characteristic of cells, and changes in these properties can be employed for cancer diagnosis. Drug efficacy can be assessed by examining alterations in the cytoskeleton and mechanical properties of cells. (4)

atomic force microscopy (AFM) is a widely used technique to evaluate cell mechanics using cantilevers. Young's modulus, a measure of cell stiffness, depends on factors such as probe type, temperature, and loading rate. Research indicates that breast cancer cells exhibit a 60% reduction in Young's modulus, signifying cancer progression. (5) This study aimed to investigate the effects of aspirin and ibuprofen on cancer cell mechanical properties and compare them with those of healthy cells.

Materials and Methods

Two cell lines, human mammary epithelial cells (MCF-10) and human breast cancer cells (MCF-7), were cultured in 100 ml flasks obtained from the Stem Cell Technology Research Center (STRC) of Iran University of Medical Sciences (IUMS). The culture medium consisted of Dulbecco's Modified

Eagle's Medium (DMEM) and high-glucose medium with 10% fetal bovine serum.

Ibuprofen and acetylsalicylic acid (ASA) in pure powder form were purchased from Rouzdarou Company and Hakim Pharmaceutical Company. These substances were combined with 2000 μ L of phosphate-buffered saline and 200 μ L of sodium hydroxide soluble in cell culture solution from Sigma after 48 hours.

Cell mechanical properties were analyzed using atomic force microscopy (JPK) with a quadrilateral pyramid of silicon nitride with a spring constant of 0.045 N/m. (Fig.1)

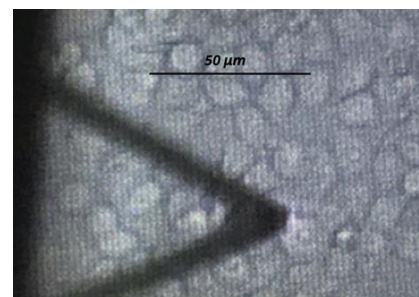


Fig 1: AFM cantilever tip on MCF-7 cancer cells after application of ibuprofen 10 μ l

The force-displacement curve of 20 individual cells per group was examined, and the data were averaged. The Young's modulus of the cell samples was calculated using the deformation-force curve of MCF-7 cells treated with aspirin, ibuprofen, and the control group. The Hertz model was utilized to compare results between the MCF-10 and MCF-7 groups. The Young's modulus for each cell was determined, and the data from five groups were averaged. The three groups receiving ibuprofen and aspirin were compared to the MCF-10 and MCF-7 control groups. Statistical analysis was performed using Minitab software, employing the Darling-Anderson test to assess the normality of Young's modulus data. The mean values and standard deviations of Young's modulus were calculated for each group. ANOVA was used to compare the means of the MCF-7 group and the MCF-10 treated group, with Dunnett's test as a post-hoc test.

Results

As depicted in the curve, the maximum deformation of the MCF-10 cell membrane was 800 nm, while it was 1796 nm for MCF-7

cancer cells. After the presentation of aspirin and ibuprofen to cancer cells, the curves exhibited prominent similarity to those of healthy MCF-10 cells (Fig. 2).

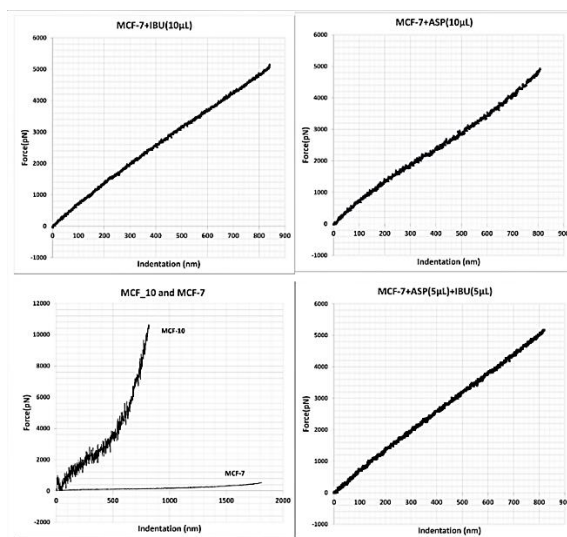


Fig 2: The curve of the mean cell force-indentation data in five cell groups

these three groups closer to those of healthy cells, thereby influencing their mechanical properties. After curve-fitting the force-displacement curve using the Hertz equation, Young's modulus was obtained for all five cell groups (Table 1).

The cell force-indentation curve in five groups indicated that cancer cells experienced approximately one-third of the deformation compared to healthy cells. Furthermore, the addition of aspirin and ibuprofen to cancer cells brought the mechanical parameters of

Table 1: The Young's modulus in five cell groups

Group cell	Mean and SD of Young's modulus (Pa)
MCF-10	21.2± 742.1
MCF-7	25.3± 235.2
MCF-7+ASP 10 µl	24.8± 840.0
MCF-7+IBU 10 µl	24.6± 551.2
MCF-7+ASP 5 µl, IBU 5 µl	20.7± 524.9

Discussion

The most pronounced change in Young's modulus, converging with the modulus of healthy cells, was observed in the group receiving 10 µL of aspirin, followed closely by the group with 10 µL of ibuprofen. Conversely, the group exposed to 5 µL each of aspirin and ibuprofen exhibited the least significant effect. Interestingly, these cancer cells displayed greater resistance to deformation compared to their healthy counterparts. Young's modulus alterations in MCF-7 cells following the administration of

aspirin and ibuprofen interventions are depicted in Figure 2. These findings suggest that the behaviour of the cancer cell group tended to align more closely with that of healthy cells when aspirin and ibuprofen were incorporated. The heightened stiffness observed in the cancer cell line can be attributed to the presence of NSAIDs. Moreover, it is noteworthy that the extensibility of cancerous cells (MCF7) exceeded that of both healthy and treated cell groups.

Previous studies have revealed distinct mechanical properties due to structural

changes in the cytoskeleton and actin fibers, with reduced properties observed in cancerous cells. Further research suggests that both ibuprofen and aspirin inhibit Cyclooxygenases (COX-1 and COX-2), potentially enhancing cell survival and reducing cancer cell migratory capacity. Gelen et al. elucidated how Cyclooxygenase activity could stimulate the formation of actin bundles containing myosin II, demonstrating the correlation between cytoskeletal organization and increased cell motility.(6)

Conclusion

The study conducted experiments on MCF-10 and MCF-7 cells. To do so, the researchers added aspirin and ibuprofen to these cells and measured their mechanical properties using AFM. The results showed that cancer cells were less stiff and had greater deformation than healthy cells. However, when aspirin and ibuprofen were introduced, cancer cells became stiffer and less deformable, resembling healthy cells more closely.

References

1. Dandah O, Najafzadeh M, Isreb M, Linforth R, Tait C, Baumgartner A, et al. Aspirin and ibuprofen, in bulk and nanoforms: Effects on DNA damage in peripheral lymphocytes from breast cancer patients and healthy individuals. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2018;826(July 2017):41–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.12.001>
2. Li W, Xu RJ, Lin ZY, Zhuo GC, Zhang HH. Effects of a cyclooxygenase-1-selective inhibitor in a mouse model of ovarian cancer, administered alone or in combination with ibuprofen, a nonselective cyclooxygenase inhibitor. *Medical Oncology*. 2009;26(2):170–7.
3. Wodarz D, Goel A, Boland CR, Komarova NL. Effect of aspirin on tumour cell colony formation and evolution. *journal of the Royal Society*. 2017;14(134).
4. Rianna C, Radmacher M. Cell mechanics as a marker for diseases: Biomedical applications of AFM. *AIP Conf Proc*. 2016;1760.
5. Ansardamavandi A, Tafazzoli-Shadpour M, Omidvar R, Jahanzad I. Quantification of effects of cancer on elastic properties of breast tissue by Atomic Force Microscopy. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2016; 60:234–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.12.028>
6. H. L. Glenn and B. S. Jacobson, “Cyclooxygenase and cAMP-dependent protein kinase reorganize the actin cytoskeleton for motility in HeLa cells,” *Cell Motil Cytoskeleton*, vol. 55, no. 4, 2003, doi: 10.1002/cm.10128.

اثرات داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی (NSAIDs) بر خواص مکانیکی سلول‌های اپیتلیال سرطان پستان

درناز میلانی^۱، سیامک خرمی مهر^{۱*}، بهنوش وثاقی قراملکی^۲

^۱ گروه مهندسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

^۲ گروه علوم پایه توانبخشی، دانشگاه علوم پزشکی ایران (IUMS)، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: مطالعات بالینی و آزمایشگاهی نشان می‌دهند که استفاده از آسپرین و ایبوپروفن در طی شیمی درمانی یا قبل از درمان سرطان پستان تعداد سلول‌های سرطانی را کاهش داده و انتقال آن‌ها را جلوگیری می‌کند. این مطالعه به بررسی ویژگی‌های مکانیکی سلول‌ها پس از درمان سلول با این دو دارو می‌پردازد.

روش بررسی: این مطالعه تأثیر آسپرین و ایبوپروفن به صورت مستقل و ترکیبی در دو غلظت ۵ میکرولیتر و ۱۰ میکرولیتر بر ویژگی‌های مکانیکی سلول‌های سرطانی MCF-7 بررسی می‌کند. سپس آن‌ها را با ویژگی‌های مکانیکی سلول‌های سالم MCF-10 مقایسه می‌کند. ویژگی‌های مکانیکی سلول‌ها با استفاده از دستگاه میکروسکوپ نیروی اتمی AFM اندازه‌گیری شد. در نهایت مدول یانگ و تغییر شکل تمام گروه‌های سلول محاسبه و بررسی شد.

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۰۹/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۸

* نویسنده مسئول:

s.khorramymehr@srbiau.ac.ir

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد که نمودار تغییر شکل سلول‌های سرطانی به نمودار سلول‌های سالم نزدیکتر شد با استفاده از آسپرین و ایبوپروفن. علاوه بر این، مقدار عددی مدول یانگ در MCF-7 هنگام استفاده از ۱۰ میکرولیتر آسپرین نسبت به سایر گروه‌های درمانی بیشترین مقدار را داشت که نزدیک به مدول یانگ سلول‌های سالم بود.

نتیجه‌گیری: با استفاده از استفاده مجزا یا ترکیبی آسپرین و ایبوپروفن، ویژگی‌های مکانیکی سلول‌های سرطانی به ویژگی‌های مکانیکی سلول‌های سالم نزدیک‌تر شد. احتمالاً تعداد سلول‌های تخمدانی قابلیت زنده‌مانی کاهش یافته است به دلیل افزایش سفتی در خطوط سلولی سرطانی با استفاده از آسپرین و ایبوپروفن است.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی، مکانیک سلول، میکروسکوپ نیروی اتمی، سلول سرطان

مقدمه

مطالعات اخیر بر اثرات بلندمدت ایبوپروفن و آسپرین بر سرطان‌های پروستات، ریه، کولون و پستان پرداخته‌اند. نتایج نشان داده است که هر دو دارو خطر ابتلا به سرطان را کاهش می‌دهند (۱،۲). همچنین گزارش شده است که داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (NSAID) با سرطان‌های ریه و کولون مقاومت توموری را کاهش می‌دهند (۲). NSAIDها همچنین به‌عنوان درمان تکمیلی در شیمی‌درمانی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳). در مطالعات گذشته، افرادی که بیش از سه‌بار در هفته دوز ۶۰۰ میلی‌گرمی ایبوپروفن به‌مدت بیش از یک‌سال مصرف کردند، کاهش ۴۳ درصدی در مبتلا شدن به سرطان تجربه کردند (۴). آسپرین و ایبوپروفن آنزیم‌های سایکلوآکسیژناز ۱ و ۲ (سایکلوآکسیژناز-۱ و ۲: COX-1 و COX-2) را مسدود می‌کنند. آنزیم‌های سایکلوآکسیژناز اهمیت بسیاری در تولید میانجی‌های التهابی در بدن دارند، از جمله پروستاگلاندین‌ها، پروستاگلین‌ها و ترومبوکسان‌ها. COX-1 اصولاً در سلول‌های غیرالتهابی مانند سلول‌های معده یافت می‌شوند و تولید آن‌ها یک فرآیند مداوم است. در همین حال، COX-2 در سلول‌های التهابی و سلول‌های خون سفید یافت می‌شوند و تولید آنها به‌دلیل تحریک است (۵). در این زمینه، افزایش COX-1 منجر به ابتلا به سرطان می‌شود و مصرف منظم ایبوپروفن با کنترل COX-1 خطر ابتلا به سرطان پستان را تا ۵۰ درصد کاهش می‌دهد (۶). ایبوپروفن با تأثیر بر پروتئین‌های سلولی و مهار آنزیم‌های COX، جلوگیری از حرکت سلول و آنژیوژنز را انجام می‌دهد (۷،۴). ایبوپروفن COX را مهار کرده و به‌عنوان یک مهارکننده تومور عمل می‌کند (۸). ارتباط بین خطر ابتلا به سرطان و NSAIDها بستگی به نوع سرطان دارد. تحقیقات نشان داده است که استفاده همزمان از متفورمین و آسپرین بر روی خطوط مختلف سلول‌های سرطانی نقش‌های مختلفی دارد؛ با این حال، به‌طور کلی رشد و حرکت سلول‌ها را در سلول‌های سرطان پستان با تنظیم COX-2 جلوگیری می‌کند (۹).

آسپرین تشکیل کولونی تومور تک‌سلولی را تا دزی میانی ۵ تا ۱۰ میلی‌مول تأخیر یا جلوگیری می‌کند (۱۰). مکانیسم ضد تومور NSAIDها همچنین به بازسازی سیتواسکلتون‌های سلول کمک می‌کند (۱۱). مکانیک سلولی یک ویژگی ضروری در سلول‌هاست و تغییرات در ویژگی‌های سلول می‌تواند به‌عنوان عامل تمایز فیزیولوژیکی در تشخیص سرطان‌ها استفاده شود (۱۲،۱۳). ویژگی‌های مکانیکی سلول‌ها در تمام مراحل رشد سلول، از جمله پیشرفت تومور، انباشت، تکامل و پخش تغییر می‌کنند (۱۴). تحقیقات درباره ویژگی‌های بیومکانیکی سلول معمولاً به بررسی سلول‌های سرطان اختصاص داده می‌شود. تغییرات در ساختار سلول نیز بیولوژی سلول را تغییر می‌دهد و باعث مهاجرت سلول می‌شود. از آنجا که تغییرات در سختی سلول مرتبط با سایتواسکلتون آن است، هدف‌گذاری از ویژگی‌های مکانیکی سلول و بازیابی این ویژگی‌ها نقش‌های حیاتی در مهاجرت سلول ایفا می‌کند (۱۵). سایتواسکلتون منبع ویژگی‌های مکانیکی است (۱۶). غشای سلول به‌عنوان یک چارچوب عمل می‌کند و تغییرات در سلیتواسکلتون تأثیرگذاری روی غشا دارد (۱۷). فیلامنت‌های آکتین و میکروتوبول به الاستیسیته سلول کمک می‌کنند به‌طوری که افزایش انعطاف‌پذیری سلول‌های سرطان متاستازی را ممکن می‌سازد (۱۸). رفتار مکانیکی بیشتر توسط سایتواسکلتون، شامل آکتین، میکروتوبول و میکروفیلانمت‌ها تعیین می‌شود. تأثیر داروها می‌تواند با بررسی تغییرات در سیتواسکلتون و ویژگی‌های مکانیکی سلول ارزیابی شود (۱۹). پاسخ‌های مکانیکی سلول‌ها به ترتیب از ترتیب سازمان‌دهی ساختار سیتواسکلتون آمده‌اند (۲۰). پاسخ‌های فرکانسی سلول‌های سرطان MCF-7 از سلول‌های سالم MCF-10 در بافت پستان متفاوت است. مطالعه تأثیر روزراترول بر مدول یانگ سلول‌های سرطان نشان داد که مدول یانگ و چسبندگی افزایش می‌یابد (۲۱).

میکرولیتزر سدیم هیدروکسید قابل حل در محیط کشت از محلول سیگما به آنها اضافه شد. پس از تجدید محیط کشت، محتوا در لوله فالكون مخلوط شد تا محلول یکنواختی به دست آید. پس از ۴۸ ساعت، دو دارو (یعنی آسپرین و ایبوپروفن) به محیط کشت اضافه شد. داروهای اضافه شده به محیط کشت به شرح زیر است: ۱۰ میکرولیتزر محلول آسپرین به ۴ پتری دیش، ۵ میکرولیتزر محلول ایبوپروفن به ۴ پتری دیش، ۵ میکرولیتزر محلول آسپرین به ۴ پتری دیش و ۱۰ میکرولیتزر ایبوپروفن به ۴ پتری دیش اضافه شد. تعداد سلول‌های زنده در هر پتری دیش تقریباً ۱۰،۰۰۰ بود و pH محیط ۷/۲ بود. پتری دیش‌ها برای ادامه فرآیند ۲۴ ساعت بعد به آزمایشگاه منتقل شدند. در این تحقیق، پنج گروه زیر مورد مطالعه قرار گرفتند: گروه اول: سلول‌های سالم بدون دارو کشت شده MCF-10 گروه دوم: سلول‌های سرطانی بدون دارو کشت شده MCF-7 گروه سوم: سلول‌های سرطانی کشت شده با ۱۰ میکرولیتزر آسپرین (MCF-7+ASP 10 میکرولیتر)، گروه چهارم: سلول‌های سرطانی کشت شده با ۱۰ میکرولیتر ایبوپروفن (MCF-7+IBU 10 میکرولیتر)، و گروه پنجم: سلول‌های سرطانی کشت شده با ۵ میکرولیتر آسپرین و ۵ میکرولیتر ایبوپروفن (MCF-7+ASP 5+IBU 5 میکرولیتر). از میکروسکوپی نیروی اتمی (JPK آلمان) برای بررسی ویژگی‌های مکانیکی گروه‌های مختلف سلولی استفاده شد. هرم چهارضلعی اپنانو، آمریکا، مدل HYDRA6V-200N، ساخته شده از نیتريد سیلیکون با ثابت پیچش ۰/۴۵ نیوتن بر متر استفاده شد. در نهایت، ما ویژگی‌های مکانیکی سلول‌های سالم، سلول‌های سرطانی و سلول‌های سرطانی که دارای داروها بودند (شکل ۱) را مقایسه کردیم.

تصویربرداری نیروی اتمی AFM از روش‌های پرکاربرد برای تشخیص مکانیک سلول با استفاده از یک کنتیلور دارای نوک تیز است. در AFM، ویژگی‌های سلول با استفاده از منحنی نیرو-انحراف و مدل هرتز ارزیابی می‌شوند (۲۲). مدول یانگ نشان‌دهنده سختی سلول است و به نوع پروب، دمای محیط و سرعت بارگذاری پروب با استفاده از دستگاه AFM وابسته است (۲۳). در مطالعات قبلی، سلول‌های سرطان پستان دارای ۶۰٪ کاهش در مدول یانگ نسبت به سلول‌های سالم بودند و مدول یانگ نشان‌دهنده پیشرفت سرطان بود (۲۴). مطالعه حاضر به بررسی تأثیر آسپرین و ایبوپروفن، به صورت ترکیبی و مستقل، بر ویژگی‌های مکانیکی سلول‌های سرطانی می‌پردازد. همچنین، ویژگی‌های مکانیکی سلول‌های سالم (انحراف و مدول یانگ) مقایسه می‌شوند.

مواد و روش‌ها

دو خط سلول، سلول‌های اپیتلیال پستان انسان MCF-10 و سلول‌های سرطان پستان انسان MCF-7 از مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی ایران IUMS در یک فلاسک ۱۰۰ میلی لیتری آماده شدند. سلول‌های MCF-10 در ۴ ظرف پتری با قطر ۳/۵ سانتی‌متر کشت شدند و سلول‌های MCF-7 در ۱۶ ظرف پتری با قطر ۳/۵ سانتی‌متر. محیط کشت سلول‌ها شامل محیط ایگل مودیفای شده دولبوکو DMEM و محیط با قند خون بالا با ۱۰٪ سرم جنینی گاوی (شرکت سیگما، ایالات متحده) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای ۲۴ ساعت بود. در این مرحله شرایط سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ از نظر چگالی و مورفولوژی بررسی شد. مقدار pH محیط در این مرحله ۷/۲ بود.

ایبوپروفن به عنوان پودر خالص از شرکت روزدارو تهیه شد و اسید استاتیل سالیسیلیک ASA (آسپرین) به عنوان پودر خالص از شرکت داروسازی حکیم تهیه شد. به علاوه، ۲ گرم از هر دو دارو به دو لوله فالكون اضافه شد. سپس ۲۰۰۰ میکرولیتر نمک فسفاتی مخصوص سلول و ۲۰۰

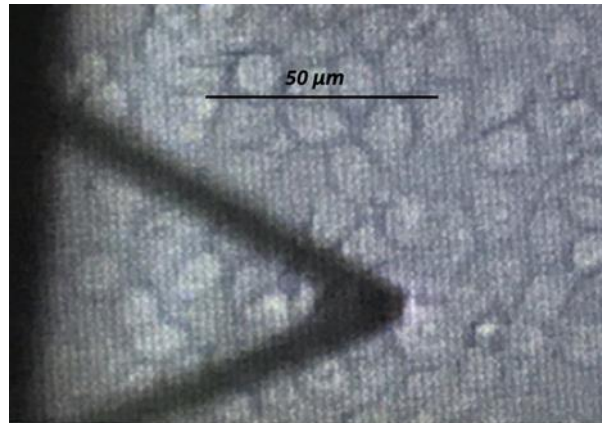
در اینجا از پیکره چهارضلعی E به‌عنوان مدول یانگ سلول، α به‌عنوان نیم‌زاویه به سمت صفحه پیکره (۴۵ درجه)، ν به‌عنوان نسبت پواسون برای نمونه‌های بیولوژیکی (به‌عنوان ۰/۵ در نظر گرفته شده)، δ به‌عنوان عمق تغییرشکل و F به‌عنوان نیروی اعمالی بر روی سلول استفاده شده است. مدول یانگ هر سلول محاسبه شد و داده‌ها از پنج گروه میانگین‌گیری شدند. پس از آن، سه گروه که به آن‌ها ایبوپروفن و آسپرین اعمال شده بود، با گروه‌های کنترلی MCF-10 و MCF-7 مقایسه شدند. در هر گروه، آزمون‌ها روی ۲۰ سلول انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار مینی‌تب انجام شد. آزمون دارلینگ-آندرسون برای بررسی عدم عادی بودن داده‌های مدول یانگ در هر گروه استفاده شد. میانگین و انحراف معیار مدول یانگ برای هر گروه محاسبه شد. میانگین گروه‌های MCF-7 و گروه‌های درمان‌شده (که تحت تأثیر دارو قرار گرفته‌اند) با استفاده از آزمون ANOVA در یک بازه اطمینان ۹۵٪ مقایسه شدند، و به‌عنوان یک آزمون نهایی Dunnett انجام شد.

یافته‌ها

همانطور که منحنی نشان می‌دهد، حداکثر تغییرشکل غشاء سلول MCF-10 برابر با ۸۰۰ نانومتر بود که برای سلول‌های سرطانی MCF-7 برابر با ۱۷۹۶ نانومتر بود. پس از افزودن آسپرین و ایبوپروفن به سلول‌های سرطانی، منحنی‌ها به منحنی‌های سلول‌های سالم MCF-10 نزدیک‌تر شدند (شکل ۲).

منحنی نیرو-تعبیر عمقی سلول در پنج گروه نشان داد که تغییرشکل سلول‌های سرطانی تقریباً یک سوم تغییرشکل سلول‌های سالم بود. علاوه بر این، افزودن آسپرین و ایبوپروفن به سلول‌های سرطانی باعث شد پارامترهای مکانیکی سه گروه به پارامترهای سلول‌های سالم نزدیک‌تر شوند و ویژگی‌های مکانیکی آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند.

پس از تناسب‌سازی منحنی نیرو-جابجایی با معادله هرتز، مدول یانگ سلول‌ها برای همه پنج گروه سلولی به‌دست آمد (جدول ۱).



شکل ۱: نوک کنتیلور AFM بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از استفاده از ۱۰ میکرولیتر ایبوپروفن

قبل از شروع آزمایش، دستگاه با تابش ماوراءبنفش طبق پروتکل ضدعفونی استریل شده و کالیبره شد. نیروی تماس حداکثر ۲۳۰ پیکونیوتن به ۲۵ نقطه از سلول‌ها در پتری‌دیش‌ها اعمال شد و سپس منحنی نیرو-جابجایی ۲۰ سلول انفرادی در هر گروه بررسی شد. منحنی تغییرشکل با رسم منحنی نیرو-جابجایی ثبت شد. داده‌های نیرو-تعبیر عمقی از بخش گسترده‌تر نتیجه AFM برای نیروی کنترلر بر روی سلول در نقطه ۰/۰ تصحیح شد و برای هر گروه سلولی تجزیه و تحلیل شد. در پایان، میانگین هر گروه داده‌ها بدست آمد. میانگین منحنی نیرو-تعبیر عمقی با انحراف معیار کشیده شد (شکل ۲).

کل فرآیند آزمایش و استخراج داده در ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک اتاق انجام شد.

در این مطالعه، سفتی سلول برای تعیین مدول یانگ نمونه‌های سلولی استفاده شد. مدول یانگ محاسبه شده بر اساس منحنی تغییرشکل-نیروی سلول‌های MCF-7 با ۱۰ میکرولیتر آسپرین، MCF-7 با ۱۰ میکرولیتر ایبوپروفن، MCF-7 با ۵ میکرولیتر آسپرین و ۵ میکرولیتر ایبوپروفن شد. در نهایت، مدل هرتز برای مقایسه نتایج با گروه‌های MCF-10 و MCF-7 (رابطه ۱) استفاده شد

$$E = \frac{\sqrt{2(1-\nu^2)}F}{\delta^2 \tan \alpha} \quad \text{رابطه (۱) (۳۷)}$$

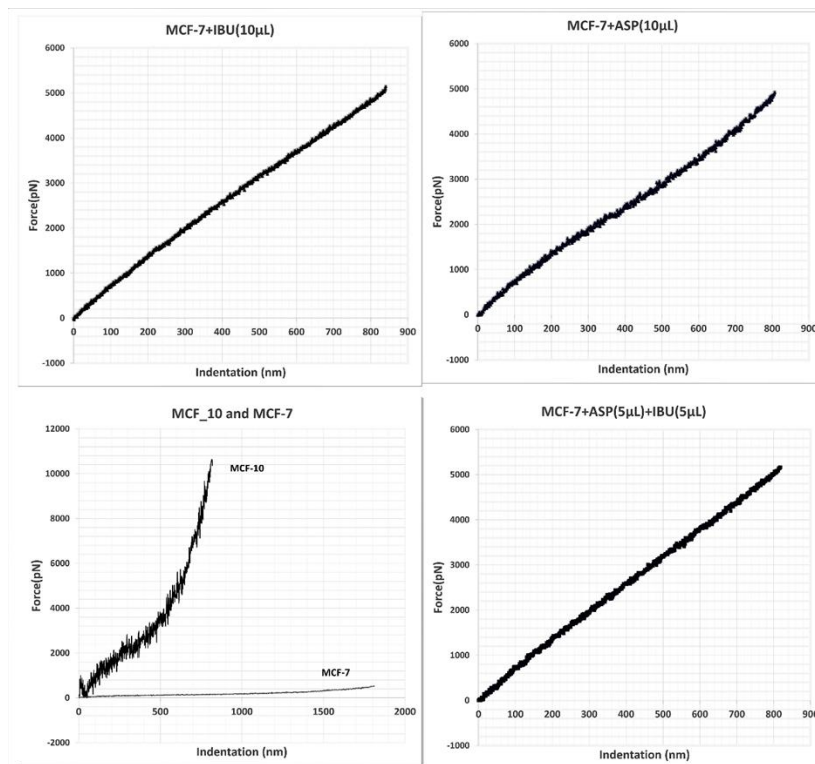
دارد، منتسب می‌شود. تغییرات مدول یانگ در سلول‌های MCF-7 پس از مداخله با آسپرین و ایبوپروفن در شکل ۲ نشان داده شده است. مهم این است که اضافه کردن ۱۰ میکرولیتر آسپرین منجر به افزایش تقریباً ۳/۵ برابری مدول یانگ این سلول‌ها شد. علاوه بر این، معرفی ۱۰ میکرولیتر ایبوپروفن منجر به افزایش ۲/۳ برابری شد، در حالی که ترکیب ۵ میکرولیتر آسپرین و ۵ میکرولیتر ایبوپروفن منجر به افزایش ۲/۲ برابری شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که رفتار گروه سلول‌های سرطانی با مشکل به تطابق نزدیک‌تری با رفتار سلول‌های سالم درآمد و سفتی افزایش یافته در خط سلول‌های سرطانی به وجود NSAIDs (داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی) منتسب می‌شود. علاوه بر این، مهم است که انعطاف‌پذیری سلول‌های سرطانی MCF7 بیشتر از سلول‌های سالم و گروه‌های درمان‌شده بود. این نشان می‌دهد که پس از افزودن NSAIDs به سلول‌های MCF7، آن‌ها تحت شرایط استرس نیرو معادل تغییر شکل کمتری تجربه کردند (ارجاع به شکل ۲).

جدول ۱: مدول یانگ در پنج گروه سلول

میانگین مدول یانگ برحسب پاسکال	گروه سلولی
742.1±21.2	MCF-10
235.2±25.3	MCF-7
840.0±24.8	MCF-7+ASP 10 μl
551.2±24.6	MCF-7+IBU 10 μl
524.9±20.7	MCF-7+ASP 5 μl, IBU 5 μl

بحث

بیشترین تغییر مشهود در مدول یانگ که با مدول سلول‌های سالم همگرا می‌شود، در گروهی که ۱۰ میکرولیتر آسپرین دریافت کرده‌اند، مشاهده شد که به آن گروهی که ۱۰ میکرولیتر ایبوپروفن دریافت کرده‌اند نزدیک است. به عکس، گروهی که به ۵ میکرولیتر آسپرین و ۵ میکرولیتر ایبوپروفن تحت تأثیر قرار گرفته‌اند، کمترین تأثیر معنی‌دار را نشان دادند. این نتیجه نشان‌دهنده کاهش قابل توجه سفتی سلول‌های سرطانی است. جالب است که این سلول‌های سرطانی نسبت به هم‌تایان سالم خود مقاومت بیشتری در برابر تغییر شکل دارند. این پدیده احتمالاً به ویژگی‌های مکانیکی خاصی که در داخل الیاف اکتین داخل سلول‌های سرطانی وجود



شکل ۲: منحنی داده‌های متوسط نیروی سلول-فشار در پنج گروه سلول

میکروتیوبول‌ها به طور قابل توجهی در سفتی الاستیک سلول‌ها مشارکت دارند، در حالی که الیاف اکتین تأثیر بیشتری بر سفتی سلول‌ها دارند و میکروتیوبول‌ها به طور اصلی در ایجاد کرنش واگرایی مشغول هستند (۱۸). تحقیقات نشان داده‌اند که ویژگی‌های مکانیکی الیاف اکتین را در مراحل پیشرفت سرطان مطالعه می‌کنند و تغییرات پویایی در ویژگی‌های مکانیکی سلول‌ها در این فرآیند نشان می‌دهند (۳۳). علاوه بر این، تحقیقات اضافی نشان داده‌اند که هم ایبوپروفن و هم آسپرین فعالیت سیکلواکسیژنازها COX-1 و COX-2 را ممکن است مهار کنند، که ممکن است باعث افزایش بقا سلولی و کاهش قابلیت مهاجرت سلول‌های سرطانی باشد با تأثیر بر سلول شود (۴،۶،۹،۳۴،۳۵). Gelen و همکاران نشان دادند که فعالیت سیکلواکسیژناز می‌تواند به ایجاد حزمه‌های اکتین حاوی میوزین دوم منجر شود و ارتباط بین این سازمان‌دهی سیتواسکلتون و افزایش حرکت سلول را نشان دادند (۳۶). احتمالاً این یافته‌ها نوری روی مسیرهای مکانوبیولوژیکی که تغییرات مشاهده شده در سفتی و تغییر شکل پس از مصرف NSAID را تحت الشعاع قرار می‌دهند، انداخته‌اند.

نتیجه‌گیری

آسپرین و ایبوپروفن به این سلول‌ها اضافه شده و خواص مکانیکی آنها با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) اندازه‌گیری شده است. نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم کمتر سفت بوده و تغییر شکل بیشتری دارند. با این حال، هنگامی که آسپرین و ایبوپروفن معرفی اضافه شدند، سلول‌های سرطانی سفت‌تر و کمتر تغییر شکل‌پذیر شدند و بیشتر شبیه سلول‌های سالم شده‌اند. به طور کلی، این مطالعه نشان می‌دهد که آسپرین و ایبوپروفن می‌توانند بر خواص مکانیکی سلول‌های سرطانی تأثیر بگذارند و آنها را از نظر سفتی و تغییر شکل کمتر سرطانی کند و به طور بالقوه ظرفیت مهاجرت آنها را کاهش دهد. این اثرات به اثر آنها بر روی آنزیم‌های COX و اسکلت سلولی نسبت داده می‌شود.

در یک تحقیق موازی، تأثیر آسپرین بر ویژگی‌های مکانیکی سلول‌های MCF-7 بررسی شد. تغییرات در تغییر شکل و سفتی گروه MCF-7 با گروه MCF-10 مقایسه شدند زمانی که آسپرین به دوز ۵ میکرولیتر به سلول‌های سرطانی اعمال شد. در این مطالعه، مدول یانگ گروه درمان‌شده نسبت به گروه MCF-7 افزایش یافت، در حالی که تغییر شکل کاهش یافت. یافته‌های این تحقیق با مشاهدات ما سازگار هستند (۲۵). علاوه بر این، در یک تحقیق جداگانه انجام شده توسط Bogara و همکاران، یک بررسی اختصاصی برای ارزیابی تأثیر ایبوپروفن و سطوح pH محیطی بر ویژگی‌های مکانیکی غشاء فسفولیپیدی دو لایه‌ای بدون سلول انجام شد. تحقیقات آنها نشان داد که افزایش در سطوح pH و معرفی ایبوپروفن منجر به کاهش سفتی غشاء شد (۲۶،۲۷). این نتایج به عدم وجود آلیسمان‌ها و سیتواسکلتون منطبق بودند، طبق یافته‌های آنها. تحقیقات بالینی که بر تأثیر آسپرین و ایبوپروفن تمرکز داشته‌اند، نشان داده‌اند که این داروها پتانسیل کاهش انتشار سلول‌های سرطانی را دارند. این داروها به عنوان درمان‌های تکمیلی به همراه شیمی در نظر گرفته می‌شوند (۱۱،۲۸-۳۰). در یک مطالعه دیگر، سه دارو به نام Everolimus، Exemestone و Letrozole به عنوان مهارکننده‌های شیمیایی سرطان مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که این سه دارو پتانسیل تأثیر بر الیاف اکتین را داشتند و منجر به تغییرات قابل مشاهده در مدول یانگ سلول‌های سرطانی پس از مصرف Everolimus و Letrozole شدند. پژوهشگران نتیجه گرفتند که این سه دارو تغییرات خاصی در رفتار سلول‌های سرطانی ایجاد می‌کنند که منجر به کاهش ظرفیت مهاجرت می‌شود (۳۱). مطالعات قبلی که به سفتی و تغییر شکل سلول‌های MCF7 و MCF10 پرداخته‌اند ویژگی‌های مکانیکی متمایزی را به عنوان نتیجه‌ای از تغییرات ساختاری در سیتواسکلتون و الیاف اکتین نشان دادند. بطور خاص، سفتی و تغییر شکل سلول‌های سرطانی کاهش یافتند (۲۴،۳۲). برای درک عمیق‌تر این نتایج، منطقی است به مکانوترانسدوکشن سلول‌ها پرداخته شود. پروتئین‌های سیتواسکلتون نقش مهمی در حفظ شکل و عملکرد سلول ایفا می‌کنند. تغییرات موقت در پروتئین‌های سیتواسکلتون برای مهاجرت سلول‌های سرطانی ضروری هستند (۱۱).

icles/501188-prognostic-significance-of-cox-2-expression-in-wilms-tumor

6. Li W, Xu RJ, Lin ZY, Zhuo GC, Zhang HH. Effects of a cyclooxygenase-1-selective inhibitor in a mouse model of ovarian cancer, administered alone or in combination with ibuprofen, a nonselective cyclooxygenase inhibitor. *Medical Oncology*. 2009;26(2):170–7.
7. Akrami H, Aminzadeh S, Fallahi H. Inhibitory effect of ibuprofen on tumor survival and angiogenesis in gastric cancer cell. *Tumor Biology*. 2015;36(5):3237–43.
8. Akrami H, Karimi B, Salehi Z, Sisakhtnezhad S. The effect of ibuprofen on expression of Cox-1/2-related miRNAs in MKN-45-derived cancer stem-like cells. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*. 2019;8(1):18–23.
9. Amaral MEA, Nery LR, Leite CE, de Azevedo Junior WF, Campos MM. Pre-clinical effects of metformin and aspirin on the cell lines of different breast cancer subtypes. *Invest New Drugs*. 2018;36(5):782–96.
10. Wodarz D, Goel A, Boland CR, Komarova NL. Effect of aspirin on tumour cell colony formation and evolution. *Journal of the Royal Society*. 2017;14(134).
11. Liggett JL, Zhang X, Eling TE, Baek SJ. Anti-tumor activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Cyclooxygenase-independent targets. *Cancer Lett [Internet]*. 2014;346(2):217–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.021>
12. Rianna C, Radmacher M. Cell mechanics as a marker for diseases: Biomedical applications of AFM. *AIP Conf Proc*. 2016;1760.
13. Azami A, Heydarian A, Jarahi A, Khoramymehr S. The Effect of Short-Range Type C and B UV Radiation on. 2019;50(2):366–74.
14. Alibert C, Goud B, Manneville JB. Are cancer cells really softer than normal cells? *Biol Cell*. 2017;109(5):167–89.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تعارض منافی در این پژوهش وجود ندارد.

References

1. Dandah O, Najafzadeh M, Isreb M, Linforth R, Tait C, Baumgartner A, et al. Aspirin and ibuprofen, in bulk and nanofoms: Effects on DNA damage in peripheral lymphocytes from breast cancer patients and healthy individuals. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen [Internet]*. 2018;826(July 2017):41–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.12.001>
2. Cheng KW, Nie T, Ouyang N, Alston N, Wong CC, Mattheolabakis G, et al. A novel ibuprofen derivative with anti-lung cancer properties: Synthesis, formulation, pharmacokinetic and efficacy studies. *Int J Pharm [Internet]*. 2014;477(1–2):236–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.019>
3. Lima RA, Cândido EB, De Melo FP, Piedade JB, Vidigal PVT, Silva LM, et al. Perfil da expressão gênica dos transportadores ABC e efeito citotóxico do ibuprofeno e acetaminofen em uma linhagem celular de cancer epitelial de ovário in vitro. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*. 2015;37(6):283–90.
4. Robertson FM, Parrett ML, Joarder FS, Ross M, Abou-Issa HM, Alshafie G, et al. Ibuprofen-induced inhibition of cyclooxygenase isoform gene expression and regression of rat mammary carcinomas. *Cancer Lett*. 1998;122(1–2):165–75.
5. Ceylan O, Caglar O. Prognostic Significance of COX-2 Expression in Wilms' Tumor. *Authorea Preprints [Internet]*. 2020 Dec 29 [cited 2021 Oct 8]; Available from: <https://www.authorea.com/users/385942/art>

- viscoelastic properties. *Sci China Life Sci*. 2018;61(1):57–67.
24. Ansardamavandi A, Tafazzoli-Shadpour M, Omidvar R, Jahanzad I. Quantification of effects of cancer on elastic properties of breast tissue by Atomic Force Microscopy. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2016;60:234–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.12.028>
 25. Milani D, Khorrammehr S, Vasaghi-Gharamaleki B. The Effect of Acetylsalicylic Acid (Asa) on the Mechanical Properties of Breast Cancer Epithelial Cells. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2022;17(4).
 26. Boggara MB, Faraone A, Krishnamoorti R. Effect of pH and ibuprofen on the phospholipid bilayer bending modulus. *Journal of Physical Chemistry B*. 2010;114(24).
 27. Ribeiro G, Benadiba M, Colquhoun A, de Oliveira Silva D. Diruthenium(II, III) complexes of ibuprofen, aspirin, naproxen and indomethacin non-steroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis, characterization and their effects on tumor-cell proliferation. *Polyhedron*. 2008 Feb 26;27(3):1131–7.
 28. Lima RA, Cândido EB, Melo FP de, Piedade JB, Vidigal PVT, Silva LM, et al. Gene expression profile of ABC transporters and cytotoxic effect of ibuprofen and acetaminophen in an epithelial ovarian cancer cell line in vitro. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* [Internet]. 2015 Jul 25 [cited 2021 Aug 20];37(6):283–90. Available from: <http://www.scielo.br/j/rbgo/a/48DkpFf8Jb6wmqszKsx64mJ/?format=html&lang=en>
 29. Pennock ND, Martinson HA, Guo Q, Betts CB, Jindal S, Tsujikawa T, et al. Ibuprofen supports macrophage differentiation, T cell recruitment, and tumor suppression in a model of postpartum breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):1–23.
 15. Azadi S, Tafazzoli-Shadpour M, Soleimani M, Warkiani ME. Modulating cancer cell mechanics and actin cytoskeleton structure by chemical and mechanical stimulations. *J Biomed Mater Res A*. 2019;107(8):1569–81.
 16. Pegoraro AF, Janmey P, Weitz DA. Mechanical properties of the cytoskeleton and cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(11).
 17. Sens P, Plastino J. Membrane tension and cytoskeleton organization in cell motility. *Journal of Physics Condensed Matter* [Internet]. 2015;27(27):273103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1088/0953-8984/27/27/273103>
 18. Grady ME, Composto RJ, Eckmann DM. Cell elasticity with altered cytoskeletal architectures across multiple cell types. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2016;61:197–207. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.01.022>
 19. Bai G, Li Y, Chu HK, Wang K, Tan Q, Xiong J, et al. Characterization of biomechanical properties of cells through dielectrophoresis-based cell stretching and actin cytoskeleton modeling. *Biomed Eng Online* [Internet]. 2017 Apr 4 [cited 2021 Aug 20];16(1). Available from: [/pmc/articles/PMC5381122/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/311122/)
 20. Rigato A, Miyagi A, Scheuring S, Rico F. High-frequency microrheology reveals cytoskeleton dynamics in living cells. *Nat Phys*. 2017;13(8):771–5.
 21. Iturri J, Weber A, Moreno-Cencerrado A, Vivanco MD, Benítez R, Leporatti S, et al. Resveratrol-induced temporal variation in the mechanical properties of MCF-7 breast cancer cells investigated by atomic force microscopy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
 22. Li M, Dang D, Liu L, Xi N, Wang Y. Atomic force microscopy in characterizing cell mechanics for biomedical applications: A review. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2017;16(6):523–40.
 23. Li M, Liu L, Xi N, Wang Y. Atomic force microscopy studies on cellular elastic and

- Behav Biomed Mater. 2021 Jul 1;119:104505.
34. A J, S S, K B, T J M, I W, G G, et al. p53 is important for the anti-proliferative effect of ibuprofen in colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2008 Jan 25 [cited 2021 Aug 20];365(4):698–703. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18036557/>
35. W S, X Z, R D, W G, J W, Y B, et al. Ibuprofen mediates histone modification to diminish cancer cell stemness properties via a COX2-dependent manner. *Br J Cancer* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Aug 20];123(5):730–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32528119/>
36. Glenn HL, Jacobson BS. Cyclooxygenase and cAMP-dependent protein kinase reorganize the actin cytoskeleton for motility in HeLa cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2003;55(4).
37. Wang Y li., Discher DE (Dennis E. Cell mechanics. 2007;608.
30. Moris D, Kontos M, Spartalis E, Fentiman IS. The Role of NSAIDs in Breast Cancer Prevention and Relapse: Current Evidence and Future Perspectives. *Breast Care*. 2016;11(5):339–44.
31. Mohammadi E, Tabatabaei M, Habibi-Anbouhi M, Tafazzoli-Shadpour M. Chemical inhibitor anticancer drugs regulate mechanical properties and cytoskeletal structure of non-invasive and invasive breast cancer cell lines: Study of effects of Letrozole, Exemestane, and Everolimus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Aug 6;565:14–20.
32. Heydarian A, Milani D, Moein Fatemi SM. An investigation of the viscoelastic behavior of MCF-10A and MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;529(2):432–6.
33. Onwudiwe K, Hu J, Obayemi J, Uzonwanne V, Ani C, Nwazojie C, et al. Actin cytoskeletal structure and the statistical variations of the mechanical properties of non-tumorigenic breast and triple-negative breast cancer cells. *J Mech*