

تحلیل محاسباتی تکنیک آزمایشگاهی مکش میکروپیپت بر یک سلول بنیادی

احسان چوکان^۱، بهمن وحیدی^{۲*}، محمد مهدی خانی^۳

۱- کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول:

bahman.vahidi@ut.ac.ir

صندوق پستی: ۱۴۳۹۹۵۶۱۹۱

پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۴

دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۲

چکیده

خصوصیات مکانیکی سلول‌های زنده نقش مهمی در کمک به درک فیزیولوژی سلول و آسیب‌شناسی دارند. ارزیابی خصوصیات مکانیکی سلول‌ها ممکن است به‌طور بالقوه منجر به ایجاد روش‌های جدید تشخیصی مکانیکی برای برخی از این بیماری‌ها شود. در این مطالعه، به کمک مدل جامد خطی استاندارد و خواص موجود ویسکو الاستیک هسته، خواص ویسکو الاستیک لایه بیرونی (سیتوپلاسم و غشا) استخراج و مدل‌سازی اجزای محدود دولایه سلول انجام شد و راستی‌آزمایی مدل به‌وسیله داده‌های آزمایشی انجام گرفت. در مدل دولایه، به مطالعه تأثیر شعاع هسته و مکان هسته در سلول بر خواص کلی سلول پرداخته شده است. با کاهش نسبت شعاع سیتوپلاسم تا نسبت ۴۳ درصد، خواص کل سلول پیرو خواص سیتوپلاسم بوده است که از اثر هسته می‌توان چشم‌پوشی کرد. مقدار افزایش جابه‌جایی در ثانیه ۵۰ از شبیه‌سازی در نسبت شعاعی ۰/۵۳، ۴/۵ درصد در مقایسه با نسبت شعاع ۱/۵۸ گزارش شد درحالی‌که در نسبت شعاع ۰/۴۳، مقدار ۶/۸ و ۹/۵ درصد کاهش جابه‌جایی در مقایسه با نسبت شعاع ۱/۵۸ و ۰/۵۳ به‌ترتیب مشاهده شده است. کاربرد این مطالعه با استفاده از آزمایش مکش میکروپیپت اهمیت این موضوع را نشان می‌دهد که مکان هسته و نسبت شعاع سیتوپلاسم به شعاع هسته می‌تواند در خواص ویسکو الاستیک و رفتار مکانیکی سلول تأثیرگذار بوده و ضرورت اطلاع از این داده‌ها را افزایش دهد.

کلیدواژه‌گان: خواص مکانیکی، سلول بنیادی، مکش میکروپیپت، سلول دولایه، مدل‌سازی اجزای محدود.

۱- مقدمه

پژوهش‌ها نشان می‌دهد که خصوصیات مکانیکی و الکتریکی سلولی نشانگرهایی بدون علامت برای تعیین حالت سلول، پتانسیل متاستاتیک و درجه تمایز سلولی هستند [۱]. خصوصیات مکانیکی سلولی از جمله مدول الاستیک و لزجت، خواص ذاتی سلول‌ها می‌باشند و نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای سلولی مانند تعامل ماتریس-سلول، بیان ژن و تشکیل اسکلت سلولی و هسته‌ای ایفا می‌کنند [۲]. سلول‌های سرطانی مانند سرطان پستان، سرطان ریه، سرطان کبد و سرطان پروستات نشان داده‌اند که مدول الاستیک پایین‌تر از سلول‌های عادی در مناطق قابل مقایسه دارند. سلول‌های سرطانی با پتانسیل متاستاتیک متفاوت نیز خصوصیات مکانیکی و الکتریکی مختلفی را نشان می‌دهند [۲؛ ۳]. تعدادی روش برای توصیف خصوصیات فیزیکی سلولی مانند تکنیک‌های میکروسیالی، میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)، مکش میکروپیپت و طیف‌سنجی امپدانس ایجاد شده است. با این حال، بسیاری از این تکنیک‌ها به خصوصیات مکانیکی یا خصوصیات الکتریکی یک سلول اختصاص داده شده است، برای مثال میکروسکوپ نیروی اتمی قادر به اندازه‌گیری پارامتر مکانیکی مانند مدول الاستیک، ویسکوزیته و چسبندگی است [۴]. محدودیت‌های مشابه در سایر روش‌های توصیف مکانیکی، مانند کشش نوری، تورفتگی، بهره‌برداری از لیزر نیز وجود دارد. در مکش میکروپیپت از یک لوله سوزنی شکل با قطر داخلی کوچک‌تر از قطر سلول استفاده می‌شود. هنگامی که فشار مکش اعمال می‌شود، سلول درحالی که در لوله وارد می‌شود، فرایند تغییر شکل را انجام می‌دهد. با اندازه‌گیری هندسه سلول درون مویرگی به‌عنوان تابعی از فشار مکش، می‌توان رفتار مکانیکی سلول را ارزیابی کرد.

1 Atomic force microscopy (AFM)

از دهه ۱۹۷۰، آزمایش‌های میکرومکش به‌طور گسترده در مطالعه مکانیک سلولی به‌کار می‌رود که شامل سنجش سلول‌های معلق مانند سلول‌های خونی و سلول‌های چسبنده، هسته سلولی و بافت است. رفتار تغییر شکل سلول‌ها بسته به مقیاس طول مشاهده، تحت تأثیر تغییر فعال و ساختار داخلی است که به‌وسیله حالت سلول تعیین می‌شود [۵]. در آزمایش‌های مکش میکروپیپت، فشار مکش با اتصال میکروپیپت به یک مخزن قابل تنظیم آب یا پمپ اعمال می‌شود. تغییرات سلول با استفاده از تجزیه و تحلیل تصویر میکروسکوپی تعیین می‌شود [۶].

برای بررسی کمی مشخصات استخراج‌شده از آزمایش‌های میکرومکش تاکنون چندین مدل بیومکانیکی ارائه شده است. در برخی از این مدل‌ها، سلول‌ها به‌صورت یک مدل پیوسته، همگن و ایزوتروپ در نظر گرفته شده‌اند که این دسته خود به دو دسته سیال و جامد تقسیم می‌شوند. در گروه اول ارائه یک مدل شبه سیال است، در این مدل تنها پارامتر ویسکوزیته محاسبه می‌شود [۷؛ ۸]. در دسته دوم که سلول به‌عنوان یک جسم جامد در نظر گرفته شده است، ساده‌ترین مدل استفاده از یک مدل الاستیک خطی نیمه‌فضایی است که در آن تنها محاسبه مدول یانگ لازم است [۹]. با توسعه این روش، مدل‌هایی مانند الاستیک خطی با در نظر گرفتن یک کره برای سلول [۱۰] و مدل‌های الاستیک غیرخطی مانند نئوهوکن نیز ارائه شدند [۱۱]. در ادامه، مدل‌های وابسته به زمان از جمله مدل ویسکوالاستیک خطی نیز بررسی شدند [۱۲-۱۴].

مدل‌های بحث‌شده در بالا فرض می‌کنند که سلول مکش‌شده، همگن است و برای تجزیه و تحلیل کمی که به مقایسه سلول‌های مختلف می‌پردازند، مفید می‌باشد. با این حال، سلول‌ها به‌شدت از یک محیط ایزوتروپیک همگن ایدئال فاصله می‌گیرند. تغییرات پویا، ناهمگونی و ناهمسانگردی به‌وسیله این مدل‌ها مورد توجه قرار

نمی‌گیرد و ممکن است به متفاوت بودن پارامترهای تغییر شکل‌پذیری ارزیابی شده کمک کند [۶]. محدودیت‌های عمده این پژوهش، اندازه‌گیری نکردن موثر تغییر شکل سلولی و آزمون‌های بیوشیمیایی متعاقب آن تغییر شکل‌ها و امکان‌نداشتن تصویربرداری نوری یا الکترونی از اجزای سلولی بود. با توجه به اهمیت بررسی تغییر شکل‌های اجزای سلول بنیادی در اثر بار مکانیکی دینامیکی در جهت فهم مراحل تمایز سلولی از راه اثرگذاری پیام‌رسانی مکانیکی بر آثار شیمیایی، این مطالعه‌ها در بازه بارگذاری‌های مکانیکی تعیین‌کننده بر رفتار سلولی در هر دو مسیر آزمایشگاهی و شبیه‌سازی پر اهمیت جلوه می‌کند.

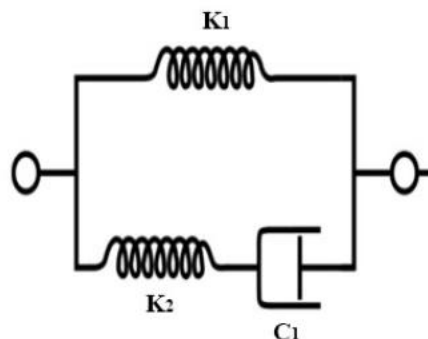
در این پژوهش، در قدم اول با استفاده از اطلاعات آزمایشگاهی و مطالعه‌های گذشته خواص ویسکوالاستیک سلول بنیادی مزانشیمال به‌صورت تقکیک‌شده در دولایه هسته و سیتوپلاسم بررسی و انتخاب شده است. در

مرحله بعدی خواص استخراج‌شده، در مدل‌سازی استفاده‌شده و داده‌های شبیه‌سازی با داده‌های آزمایشگاهی صحت‌سنجی شده است. همچنین تأثیر خواص لایه‌های مختلف سلولی بر نمودار جابه‌جایی برحسب زمان مورد مطالعه قرار گرفته که امکان مقایسه تأثیر این لایه‌ها بر پاسخ سلول و نیز خواص مکانیکی کلی سلول را می‌دهد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ مدل بیومکانیکی برای سلول

محاسبه‌های انجام‌شده این پژوهش در راستای به‌دست‌آوردن خواص ویسکوالاستیک (پارامترهای مدل جامد ویسکوالاستیک خطی) برای کل سلول در مرحله اول انجام شد و در مرحله بعدی برای به‌دست‌آوردن همین ثابت‌ها برای لایه سیتوپلاسمی (به‌علاوه غشا) تداوم پیدا کرد (شکل ۱).



شکل ۱ المان‌های معادل در یک مدل ویسکوالاستیک خطی

در مرحله اول برای به‌دست‌آوردن خواص ویسکوالاستیک، کل سلول به‌صورت یکپارچه (بدون در نظر گرفتن دولایه)، داده‌های آزمایشی به‌صورت میانگین برای ۴۰ سلول بنیادی مزانشیمال به دست آمد. نمودار حاصل از آن به‌عنوان مبنا قرار داده شد و منحنی غیرخطی روی آن برازش شد که به حالت پیش‌فرض به‌صورت معادله ۱ است

[۱۳]:

$$Y = A + Be^{-CX} \quad (۱)$$

$$J(t) = \frac{1}{K_1} + \left(\frac{1}{K_1 + K_2} - \frac{1}{K_1} \right) e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (۲)$$

$$A = \frac{1}{K_1} \quad (۳)$$

دلیل انتخاب این معادله برای به‌دست‌آوردن خواص ویسکوالاستیک سلول، معادله مدل جامد ویسکوالاستیک خطی می‌باشد که به‌صورت کلی به‌صورت رابطه ۲ بیان می‌شود. ضرایب موجود در رابطه ۱ به‌وسیله رابطه‌های ۳ و ۴ و ۵ معادل‌سازی می‌شوند:

$$B = \left(\frac{1}{K_1 + K_2} - \frac{1}{K_1} \right) \quad (۴)$$

$$C = \frac{1}{\tau} \quad (۵)$$

$J(t)$ در رابطه (۲) تابع انعطاف پذیری خزشی^۱ است. به کمک برازش منحنی بر داده‌های آزمایشگاهی، پارامترهای A ، B و C استخراج و سپس ثابت فنر محاسبه شد. با توجه به معادله‌های موجود، متغیرهای سلول به صورت معادله ۶، ۷ و ۸ محاسبه می‌شوند.

$$G_0 = \frac{1}{2}(K_1 + K_2) \quad (۶)$$

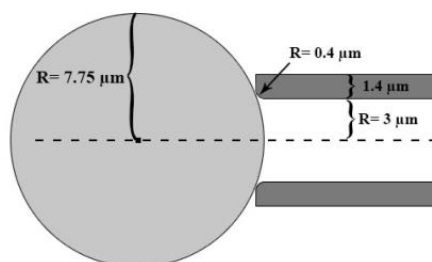
$$\alpha_1 = \frac{K_2}{K_1 + K_2} \quad (۷)$$

$$\tau = \frac{(K_1 + K_2)\mu}{K_1 K_2} \quad (۸)$$

به کمک این معادله‌ها و ضرایب به دست آمده از داده‌های آزمایشگاهی، ضرایب K_1 و K_2 و μ محاسبه می‌شوند. برای مرحله بعدی و همچنین برای مدل سازی سلول به صورت دولایه، نیازمند به دست آوردن همین ثوابت برای هر لایه می‌باشد و با توجه به نحوه لایه بندی انجام شده که یک لایه شامل هسته و لایه دیگر شامل سیتوپلاسم و غشا می‌باشد، هر لایه به صورت یک مدل جامد ویسکوالاستیک خطی در نظر گرفته شد که شامل همین ثوابت می‌باشد.

با توجه به حرکت دینامیکی سلول در طول مدل سازی، از حل صریح نرم افزار آباکوس استفاده شد. همان طور که در شکل ۲ نمایش داده شده است، برای مدل سازی از میانگین هندسه فیزیکی سلول های بنیادی مزانشیمال استفاده شده است. سلول به قطر ۱۵/۵ میکرومتر و لوله میکروپیت به قطر ۶ میکروپیت مدل شده اند.

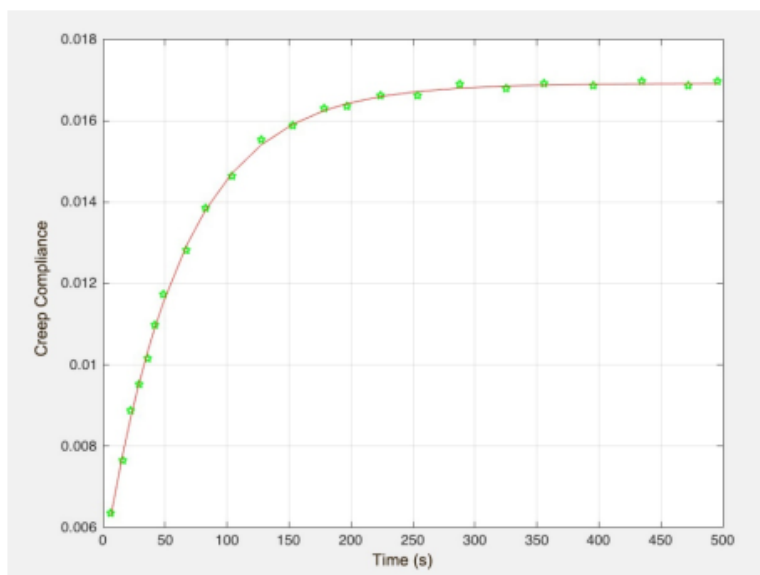
1 Creep Compliance Function



شکل ۲ ابعاد مدل‌سازی سلول و لوله پیپت در آزمایش مکش میکروپیپت

نمودار برازش شده به صورت شکل ۳ به دست آمده است. محور افقی زمان در واحد ثانیه می‌باشد و محور عمودی $J(t)$ می‌باشد.

نمودار حاصل از آزمایش ۴۰ سلول بنیادی مزانشیما [۱۵] برای به دست آوردن خواص ویسکوالاستیک این سلول‌ها به صورت میانگین نیازمند برازش نمودار غیرخطی می‌باشد.



شکل ۳ نمودار برازش شده بر داده‌های آزمایش مکش میکروپیپت

همان‌طور که در جدول ۱ آمده، تعریف شده است و لوله میکروپیپت به عنوان یک جامد صلب در نظر گرفته می‌شود.

در این مدل‌سازی با توجه به پردازش داده‌های آزمایشگاهی خواص مواد ویسکوالاستیک برای سلول

جدول ۱ خواص ویسکوالاستیک برای کل سلول [۱۶]

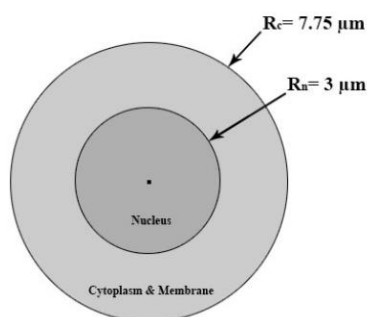
ویسکوزیته (Pa.s)	ثابت فنر اول (N/m)	ثابت فنر دوم (N/m)	ثابت زمانی (s)
۱۷۰۳	۵۹	۱۳۸	۴۱

دیواره میکروپیپت بدون اصطکاک در نظر گرفته شد و فشار اعمالی به دیواره سلول داخل میکروپیپت ۳۳۰ پاسکال بود که به صورت خطی در ۲ ثانیه به سمت داخل لوله میکروپیپت به

با توجه به شرایط آزمایش و برای کاهش درجه آزادی سلول، جابه‌جایی در یک محور قرار داده شد و دیگر درجه‌های آزادی مهار شد. همچنین اتصال میان سلول و

پژوهش‌های گیلک و همکاران برابر ۳ میکرومتر در نظر گرفته شد [۱۷]. در شکل ۴ نمای کلی هندسه سلول دولایه نمایش داده شده است. اندازه لوله میکروپیپت و همچنین شرایط مرزی مدل نسبت به حالت تک‌لایه تغییری نداشته و همان تعاریف در این مدل نیز حاکم است. خواص ویسکوالاستیک برای دولایه سلول در جدول ۲ ارائه شده است.

دیواره سلول اعمال می‌شود و به مدت زمان کلی ۱۵۰ ثانیه فشار ثابت می‌ماند. شرایط مرزی توصیف‌شده و کانتور فشار در آزمایش مکش میکروپیپت نیز به همین نحو بوده است. با توجه به هدف این پژوهش، مدل‌سازی به صورت دولایه انجام شد که لایه درونی شامل هسته است و لایه بیرونی شامل سیتوپلاسم و غشا می‌باشد. شعاع هسته نیز با توجه به



شکل ۴ هندسه سلول دولایه استفاده‌شده در مدل‌سازی اجزای محدود

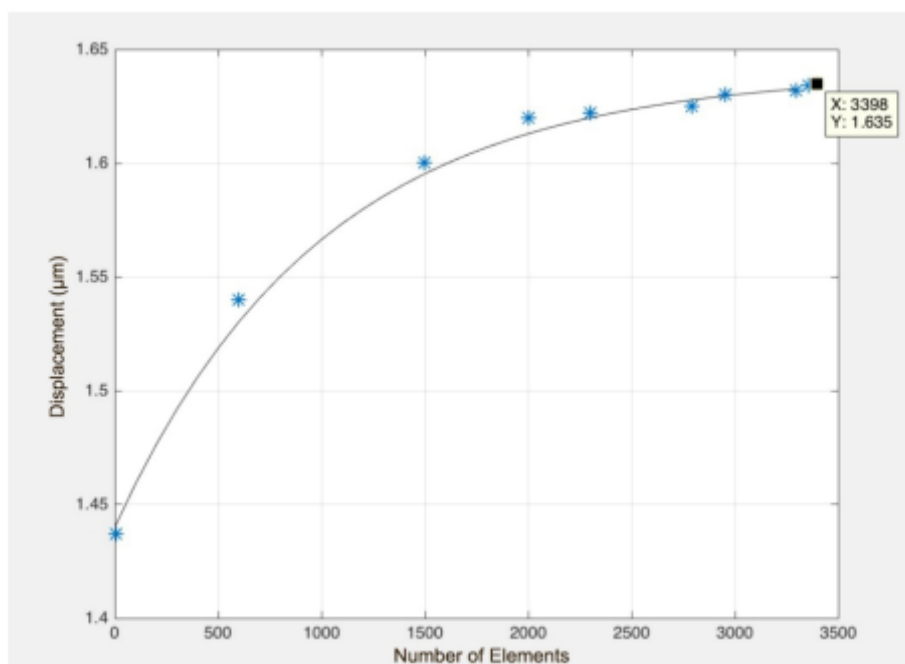
جدول ۲ خواص ویسکوالاستیک دولایه سلول [۱۶]

لایه	ویسکوزیته (Pa.s)	ثابت فنر اول (N/m)	ثابت فنر دوم (N/m)	ثابت زمانی (s)
هسته	۱۷۰۳	۵۹	۱۳۸	۴۱
سیتوپلاسم و غشا	۱۸۳۳	۶۴	۱۴۹	۴۱

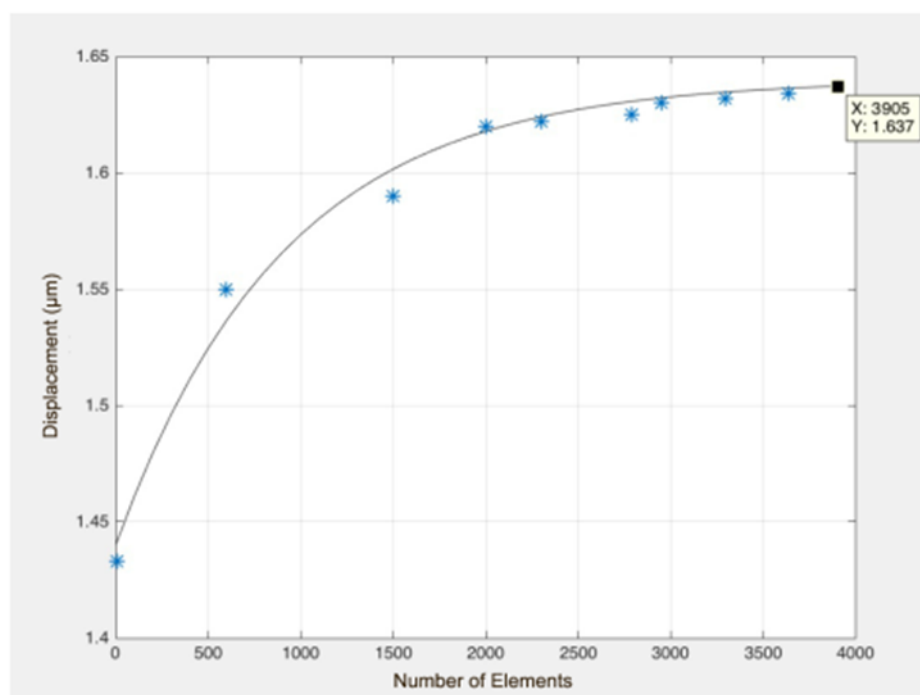
جابه‌جایی سلول است. با توجه به داده‌های استخراج‌شده، با افزایش تعداد المان‌ها، نتایج حاصل از جابه‌جایی به عدد ۶۳۵/۱ میکرومتر همگرا شده و این همگرایی نشانگر استقلال حل از تعداد المان‌ها می‌باشد.

۲-۲ شبکه‌بندی در مدل المان محدود

المان‌های استفاده‌شده در مدل‌سازی، چهاروجهی است. برای بررسی همگرایی داده‌های خروجی و استقلال حل از شبکه محاسباتی، شبیه‌سازی در بازه ۵ ثانیه با تعداد المان‌های مختلف تکرار شد که شکل ۵ نمودار خروجی همگرایی نتایج را در مش‌بندی‌های مختلف نشان می‌دهد. محور افقی نشان‌دهنده تعداد المان‌ها و محور عمودی بیانگر بیشترین



(الف)



(ب)

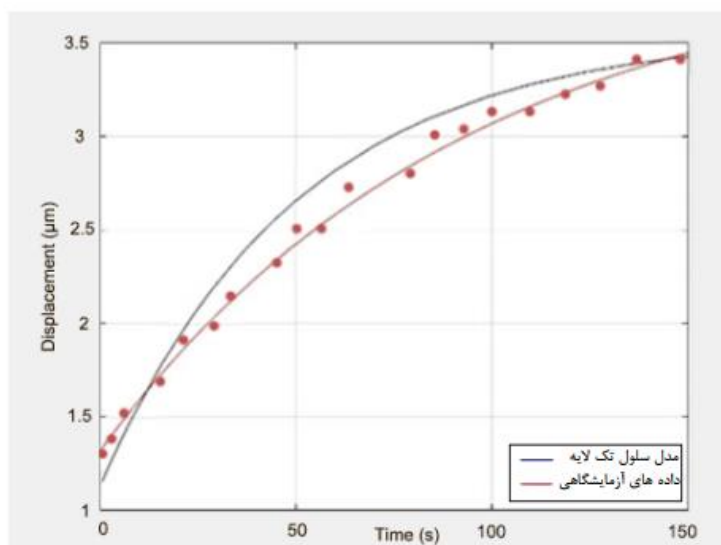
شکل ۵ الف- تعداد مش‌های هندسه تک‌لایه برحسب بیشترین جابه‌جایی در هندسه (در زمان ۵ ثانیه)؛ ب- تعداد مش‌های هندسه دو لایه برحسب بیشترین جابه‌جایی در هندسه (در زمان ۵ ثانیه).

۳- نتایج و بحث

۳-۱ اعتبارسنجی نتایج شبیه‌سازی

خروجی نسبت به داده‌های آزمایشگاهی دارد و با توجه به ساده‌سازی‌هایی که در شرایط مرزی انجام شد، توجیه‌پذیر می‌باشد. با توجه به نزدیکی داده‌های خروجی نرم‌افزار، می‌توان صحت مدل‌سازی انجام شده را تأیید کرد.

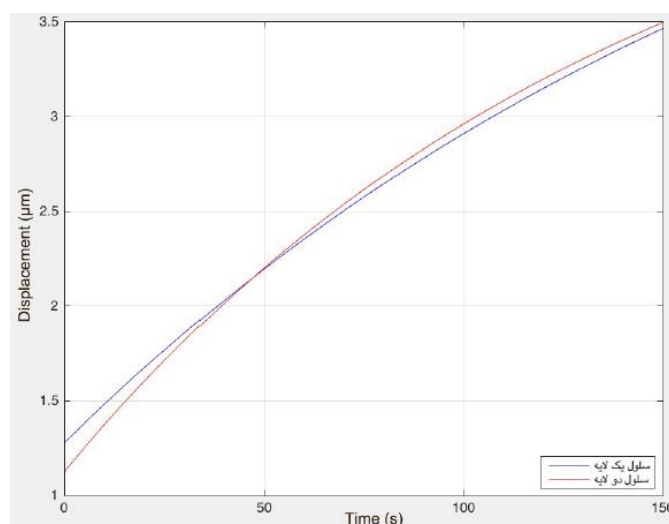
در نمودار گزارش شده شکل ۶، بیشینه جابه‌جایی در زمان ۷۰ ثانیه اتفاق می‌افتد که نشان از خطای ۱۰/۵ درصد داده‌های



شکل ۶ نمودار بیشترین جابه‌جایی سلول برحسب زمان برای مدل‌سازی تک‌لایه و داده‌های آزمایشگاهی خانی و همکاران [۱۵]

بررسی‌های بعدی باشد. در شکل ۷ جابه‌جایی سلول دولایه برای طول مکش‌شده در واحد زمان نشان داده شده است. با توجه به شکل ۷، بیشترین خطای گزارش‌شده ۸ درصد است که در زمان‌های آغازین نمودار این اختلاف دیده می‌شود. درنهایت با توجه به اعتبار سنجی انجام‌شده برای مدل‌سازی تک‌لایه و دولایه سلول با داده‌های آزمایشگاهی، می‌توان از مدل دولایه به‌عنوان مرجع بررسی‌های آتی استفاده کرد.

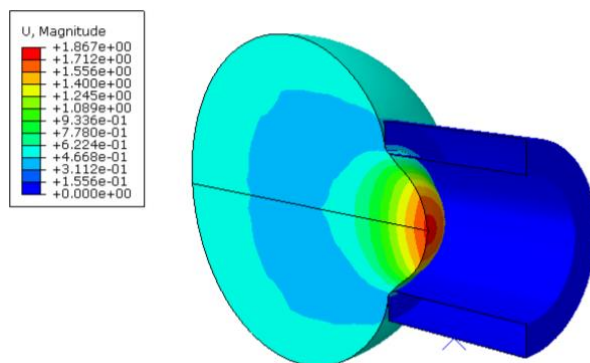
هندسه سلول مدل‌شده - همان‌طور که پیش‌تر نمایش داده شد (شکل ۴) - به شکل دو دایره با مرکز یکسان است که دایره داخلی به قطر ۶ میکرومتر، هسته سلول و کل سلول نیز به قطر ۱۵/۵ میکرومتر می‌باشد. در مرحله بعدی خروجی جابه‌جایی سلول در داخل لوله در مدل دولایه، با مدل یک‌لایه صحت‌سنجی شده مقایسه می‌شود، زیرا مدل دو لایه نیز باید نتیجه مشابهی داشته باشد تا سلول مدل‌شده تأیید و آماده



شکل ۷ نمودار بیشترین جابه‌جایی سلول برحسب زمان برای مدل‌سازی دولایه و تک‌لایه

در مرحله بعدی مطالعه خواص سلول، بررسی تأثیر نسبت شعاع هسته سلول به شعاع سیتوپلاسم انجام شد. با تغییر مقادیر، نمودارهای حاصل از جابه‌جایی برحسب زمان برای هریک به‌دست آمد و مقایسه شد. همچنین در مرحله آخر نیز برای بررسی تأثیر نقش هسته در آزمایش میکروپیپت، هسته سلول از مرکز سلول فاصله داده شد و اطلاعات آن نیز بررسی شد. با توجه به مطالعه گلاذیلین و همکاران [۱۸]، مقدار حجم هسته تا مقدار یک‌سوم حجم کل سلول قابل تغییر است و با فرض این مقدار، طول شعاع هسته افزایش داده شد. نمودار طول مکش شده براساس زمان برای سلول دو لایه برای حالت‌های مختلف $\frac{R_C}{R_N}$ بررسی شد که R_C شعاع سیتوپلاسم و R_N شعاع هسته می‌باشد. در تمام حالت‌ها، جمع این دو شعاع

برابر شعاع کل هسته، یعنی $7/75$ میکرومتر است. در جدول ۳ مقادیر در نظر گرفته‌شده مشاهده می‌شود. در شکل ۸ برای نسبت شعاع ۱ در ثانیه ۲۵، کانتور جابه‌جایی در نمای سه‌بعدی نمایش داده شده است. لازم به توضیح است مقادیر تغییر شکل به‌دست‌آمده در این پژوهش با بازه گزارش‌شده در شبیه‌سازی پیشین اوریک و همکاران [۱۹] همخوانی خوبی دارد. همچنین با توجه به یافته‌های آن پژوهش در اینکه اثر صلبیت خمشی بر ویژگی‌های الاستیک در آزمایش مکش میکروپیپت (طول مکش‌شده در لوله میکروپیپت) تأثیر چندانی ندارد؛ در جهت کاستن از هزینه محاسباتی، این ویژگی از فرضیه‌های مسئله حاضر حذف شد.



شکل ۸ جابه‌جایی در نتیجه مکش سلول در ثانیه ۲۵ در نسبت شعاع ۱ میان سیتوپلاسم و هسته به میکرومتر

جدول ۳ مقادیر در نظر گرفته‌شده برای $\frac{R_C}{R_N}$.

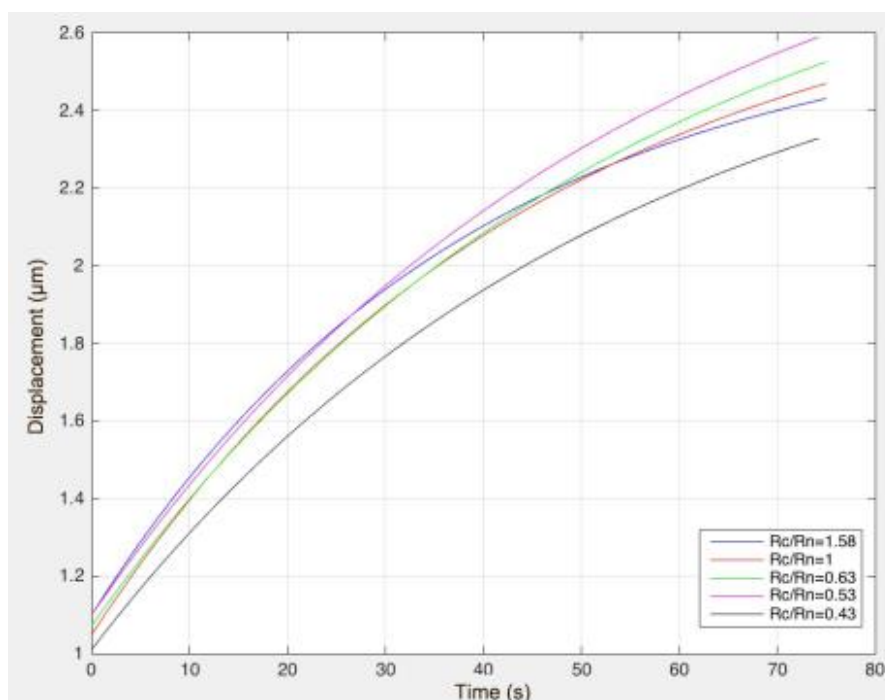
شماره	$\frac{R_C}{R_N}$	R_N, R_C
۱	۱/۵۸	۷/۷۵
۲	۱	۷/۷۵
۳	۰/۶۳	۷/۷۵
۴	۰/۵۳	۷/۷۵
۵	۰/۴۳	۷/۷۵

با توجه به شکل ۹-الف، با افزایش شعاع هسته و کاهش شعاع سیتوپلاسم، نمودار شباهت بیشتری به خواص سیتوپلاسم پیدا می‌کند و به دلیل کاهش حجم سیتوپلاسم با وجود ثابت‌بودن مقدار فشار واردشده، جابه‌جایی بیشتری

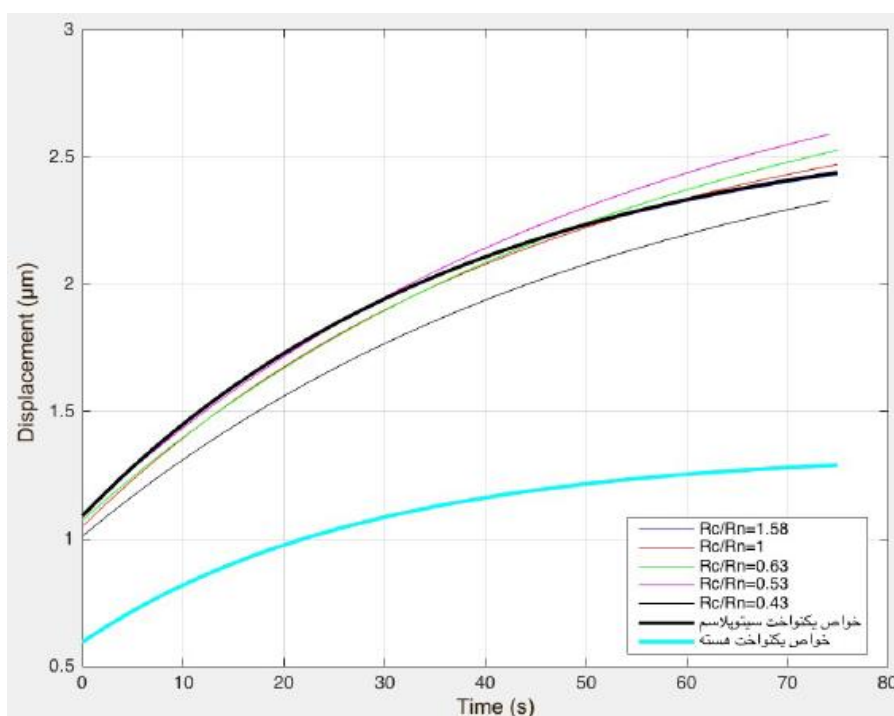
دید می‌شود. تغییر جابه‌جایی نمودار تا نسبت $۰/۵۳$ ، در ثانیه ۵۰ به مقدار $۴/۵$ درصد نسبت به حالت نسبت شعاع $۱/۸۵$ مشاهده می‌شود. در نمودار مشکی‌رنگ که شامل نسبت شعاعی $۰/۴۳$ است، شاهد تغییر رفتار سلول نسبت به رفتار

مدل یکنواخت بهتر انجام داد. با توجه به نمودارهای رسم شده در شکل ۹-الف و ۹-ب مشاهده می شود که با افزایش شعاع هسته، سلول مقدار بیشتری مکش می شود. به دلیل تغییر شعاع هسته و سیتوپلاسم به صورت همزمان نمی توان نتیجه گیری کرد که این افزایش طول مکش شده به دلیل افزایش طول شعاع هسته است یا کاهش طول شعاع سیتوپلاسم. این امر با توجه به این ویژگی است که سلول از نظر ابعادی ثابت بوده و مقدار کل حجم سلول ثابت است. همچنین به دلیل الاستیسیته بیشتر هسته به نسبت سیتوپلاسم، نتایج متأثر از کاهش مقدار حجم سیتوپلاسم می باشد. با توجه به این نتایج، در مرحله بعد براساس ثابت زمانی هرکدام از لایه ها جداگانه با ثابت نگه داشتن دیگری، داده های جدید استخراج شد تا تأثیر هرکدام در مقدار طول مکش شده مطالعه شود.

پیشین هستیم و در مقایسه حالت نسبت شعاع $1/58$ ، به مقدار $6/8$ درصد کاهش جابه جایی دیده می شود که نسبت به حالت قبلی، یعنی نسبت شعاع $0/53$ درصد، کاهش جابه جایی برابر $9/5$ درصد می باشد و نشان دهنده تأثیر نزدیک شدن هسته به لوله میکروپیپ است که در بخش بعدی مدل سازی به پارامتر نزدیکی هسته به لوله میکروپیپ پرداخته شده است. برای مقایسه بهتر نتایج نمودار اشاره شده، دو حالت برای سلول فرض و مدل سازی انجام شد. در هریک از حالت ها، سلول به صورت یکنواخت و تک لایه فرض شد و خواص ویسکوالاستیک کل سلول منفرد در نظر گرفته شد که در یک حالت، سلول خواص یکنواخت ویسکوالاستیک هسته و در حالت بعدی خواص ویسکوالاستیک سیتوپلاسم را دارد. در شکل ۹-ب می توان این مقایسه تغییر رفتار را با وجود این دو



الف
ب

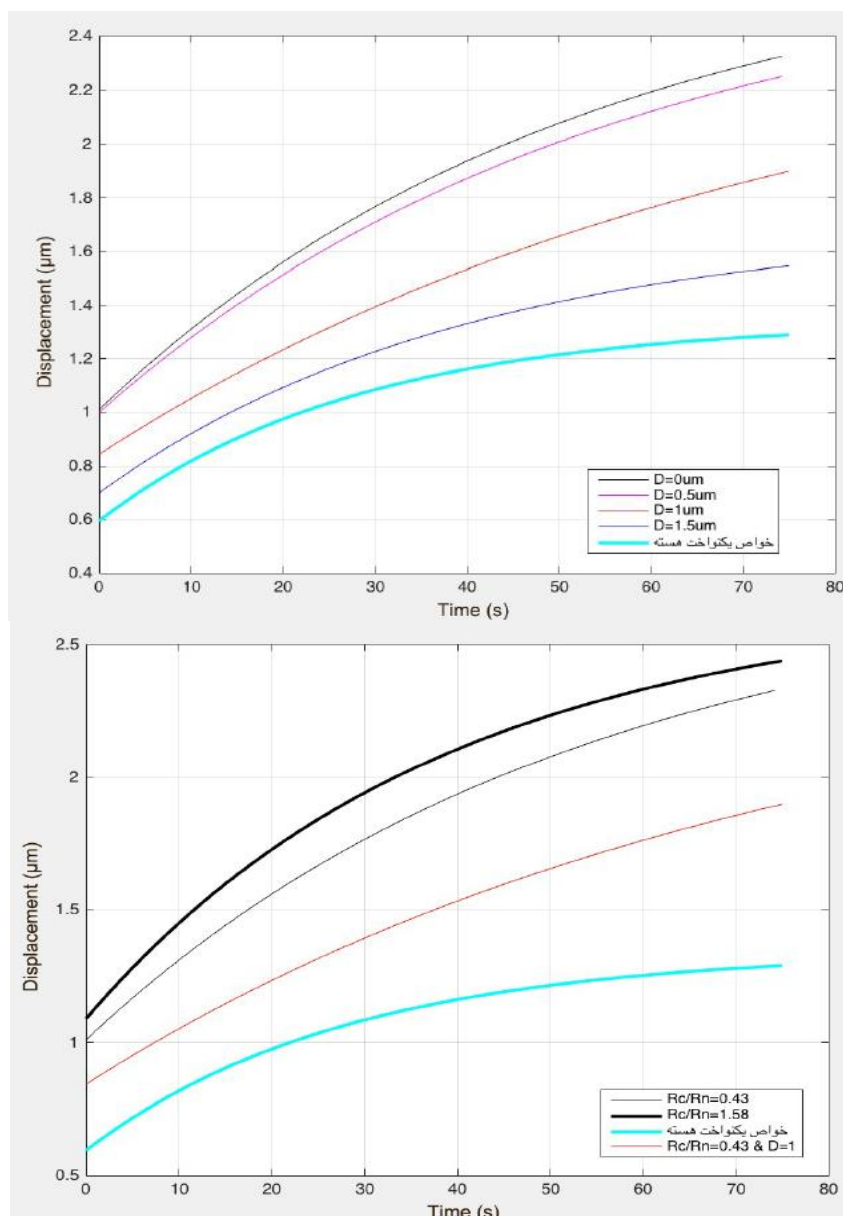


شکل ۹ جابه‌جایی بر حسب زمان؛ الف- نمودار مقایسه نتایج تغییر نسبت شعاع سیتوپلاسم به شعاع هسته، ب- نمودار تغییر نسبت شعاع سیتوپلاسم به هسته.

۳-۲ تأثیر فاصله هسته از لوله میکروپیپت

خواص مکانیکی هسته سلول در بسیاری از فرایندهای زیستی نقش مهمی ایفا می‌کند. از جمله اینکه تغییرات در ویژگی‌های مکانیکی هسته می‌تواند به عنوان بیومارکرهایی نوین در فرایندهایی نظیر پیشرفت سرطان یا تمایز سلول بنیادی مطرح باشد [۲۰]. ماده اساسی داخل هسته، کروماتین است که حاوی اطلاعات ژنتیکی است و وقتی با نیروهای مکانیکی تحریک می‌شود، رفتارهای خاصی نشان می‌دهد [۲۱؛ ۲۲]. با توجه به این اهمیت، در این مرحله برای بررسی تغییر مکان هسته در سلول به مقایسه نتایج پرداخته می‌شود که برای این مقایسه، پارامتر D تعریف شده است که نماینده فاصله مرکز دایره هسته از مرکز دایره سلول می‌باشد. شایان ذکر است که نقطه مرجع، مرکز دایره سلول می‌باشد و مقدار منفی D نشانگر دور شدن هسته از لوله میکروپیپت است. همان‌طور که

در شکل ۱۰-الف مشاهده می‌شود، با نزدیک شدن هسته به لوله میکروپیپت، رفتار سلول به رفتار ویسکوالاستیک هسته شباهت بیشتری پیدا می‌کند. در شکل ۱۰-ب برای مقایسه بهتر، تأثیر نزدیک شدن سلول به لوله میکروپیپت در کنار تأثیر تغییر نسبت شعاع قابل مشاهده است. این مقایسه نشان از نزدیک تر شدن رفتار سلول به رفتار هسته در حالتی است که هسته نزدیک لوله میکروپیپت باشد و با توجه به نمودارهای قبلی در صورت فاصله بیشتر هسته از لوله میکروپیپت، می‌توان در نظر گرفت که خواص استخراج شده از آزمایش میکروپیپت، خواص ویسکوالاستیک سیتوپلاسم می‌باشد. این یافته با یافته‌های پیشین درخصوص نتایج آزمایش مکش میکروپیپت از این منظر در تطابق است که این آزمایش بر خواص محلی سلولی دلالت دارد [۲۳].



الف

(

ب)

شکل ۱۰ جابه‌جایی برحسب زمان: الف- نمودار بررسی تأثیر جابه‌جایی هسته در راستای لوله میکروپیپت، ب- نمودار ترکیبی از جابه‌جایی هسته و تغییر شعاع‌های هسته و سیتوپلاسم

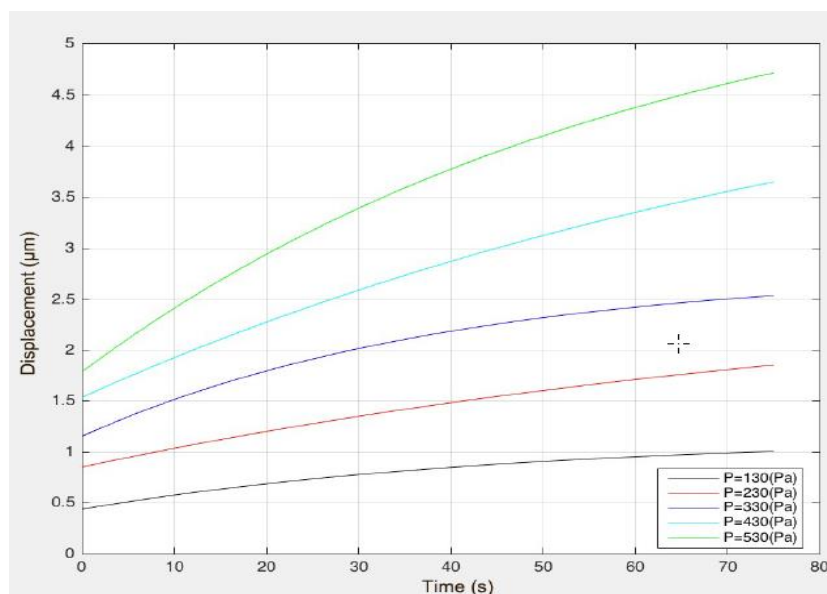
۳-۳ تأثیر فشار و ثابت زمانی

برای بررسی تأثیر فشار، فشار اعمالی در لوله تغییر داده شد. نخست فشار اعمالی به صورت خطی در ۲ ثانیه به حداکثر مقدار خود رسید و مقدار حداکثر فشار در شبیه‌سازی تغییر پیدا کرد. در شکل ۱۱-الف نمودارهای هریک از فشارهای اعمالی برای حداکثر جابه‌جایی سلول در طول لوله برحسب زمان مشخص شده است. با توجه به شکل ۱۱-الف، با افزایش فشار اعمال شده، طول سلول مکش شده داخل لوله با

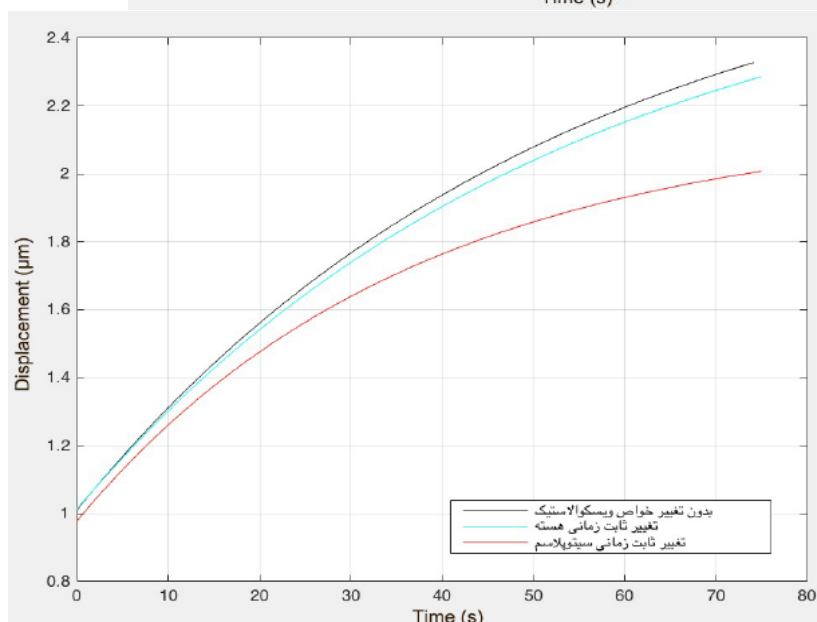
شیب بیشتری وارد آن می‌شود که نشان‌دهنده مقاومت کمتر سلول در فشارهای بالا می‌باشد که جابه‌جایی‌های زیادی را حاصل شده است. پیر و تحلیل نمودار استخراج شده، داده‌ها نشان از رفتار ویسکوالاستیک سلول است که در شروع مکش با افزایش فشار، مقدار بیشتری از جابه‌جایی رخ می‌دهد و با گذشت زمان، سلول رفتار شبیه‌تری به سلول تک‌لایه با خواص ویسکوالاستیک سیتوپلاسم را دارد. با توجه به شکل ۱۱-ب می‌توان نتیجه گرفت که سلول به رفتار

ویسکوالاستیک سیتوپلاسم بسیار حساس تر از رفتار متأثر از خواص ویسکوالاستیک هسته می باشد. همچنین با توجه به تأثیر تغییرات ثابت زمانی سیتوپلاسم و تغییر چشم گیرنداشتن در مقدار طول مکش شده در حالتی که ثابت زمانی هسته تغییر می کند، می توان نتیجه گرفت که سیتوپلاسم عامل تعیین کننده خواص ویسکوالاستیک در آزمایش میکروپیپت در بازه زمانی آزمایش شده در این پژوهش است. این یافته ها در تطابق با یافته های داویدسون و همکاران می باشد [۲۰]. آنها در آزمایشی از سلول های بنیادی پرتوان^۱ برای بررسی تأثیر تمایز سلول بنیادی بر خواص مکانیکی هسته سلول استفاده کردند. نتایج آزمایش مکش میکروپیپت آنها نشان داد که هسته سلول های بنیادی پرتوان نسبت به هسته سلول های فیبروبلاست پوست بسیار انعطاف پذیرتر است. با توجه به این تغییر شکل زیاد هسته سلول های بنیادی، آنها در آزمایش ۶۰ ثانیه ابتدایی تغییر شکل هسته را جهت مقایسه و بررسی ملاک قرار دارند که به مقیاس زمانی در نظر گرفته شده در پژوهش جاری نزدیک می باشد. در این بازه زمانی، هسته سلول به طور کامل وارد لوله میکروپیپت نشده است [۲۰]. از این رو خواص مکانیکی اندازه گیری شده سلول، بیشتر متأثر از خواص سیتوپلاسم می باشد.

1 pluripotent stem cells



(الف)



(ب)

شکل ۱۱ جابه‌جایی بر حسب زمان؛ الف- نمودار تغییر فشار و تأثیر آن بر طول مکش در لوله، ب- نمودار تغییر ثابت زمانی هر لایه

۴- نتیجه‌گیری

آزمایش مکش میکروپیپت می‌تواند به‌منظور به‌دست‌آوردن خواص ویسکوالاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمال انجام شود. با استفاده از داده‌های به‌دست‌آمده از این آزمایش درخصوص خواص سلول، مدل‌سازی سلول به‌صورت تک‌لایه انجام شد. مطالعه انجام‌شده با فرض کردن مدل دولایه، بررسی تغییر شعاع هسته نسبت به سیتوپلاسم را نیز در بر گرفت که با افزایش شعاع هسته (کاهش شعاع

سیتوپلاسم)، نمودار طول سلول مکش‌شده به داخل لوله مشمول تغییراتی شد که نشان از شباهت رفتار کل سلول به رفتار ویسکوالاستیک سیتوپلاسم می‌باشد. این شباهت رفتاری تا زمانی که شعاع هسته به‌مقدار معینی نرسیده باشد، کاملاً محسوس است. برای بررسی بیشتر این ادعا، در یکی از حالت‌های نسبت شعاعی، ثابت زمانی سیتوپلاسم و هسته به‌صورت جداگانه تغییر داده شد که نتایج نشان از تغییر نکردن محسوس خواص کل سلول در حالت تغییر ثابت زمانی هسته

می‌باشد. در شبیه‌سازی بعدی، هدف بررسی اثر نزدیک‌شدن هسته سلول به شعاع مرکز میکروپیپت می‌باشد. این شبیه‌سازی، نشان از تغییر نکردن خواص سلول در شرایطی است که هسته از مرکز لوله میکروپیپت دور می‌باشد. تأثیر هسته بر خواص کل سلول تا زمانی که نزدیک‌ترین فاصله میان لایه بیرونی هسته و مرکز لوله میکروپیپت کمتر از شعاع میکروپیپت نباشد، قابل چشم‌پوشی می‌باشد. در فاصله‌های کمتر، رفتار کل سلول شباهت بیشتری به رفتار سلول یکنواخت با خواص ویسکوالاستیک هسته داشته است. در مرحله نهایی نیز تأثیر افزایش فشار حداکثری اعمال‌شده بر سلول و همچنین مقدار زمان اعمال فشار مورد مطالعه قرار گرفت که نشان از تغییر محسوس رفتار سلول با افزایش فشار حداکثری می‌باشد. با افزایش حداکثر فشار اعمال‌شده در ۲ ثانیه ابتدایی (بارگذاری خطی اولیه)، طول سلول مکش‌شده افزایش پیدا کرد. همچنین به دلیل ماهیت ویسکوالاستیک لایه‌های سلول، با افزایش زمان اعمال بار حداکثری به سلول، رفتار سلول تغییر کرده و جابه‌جایی کمتری را تجربه کرده است که نشان از افزایش الاستیسیته سلول و وابستگی رفتار سلول به نرخ اعمال بار با توجه به خواص ویسکوالاستیک می‌باشد. باید در نظر داشت که سلول شامل سه بخش اصلی هسته، سیتوپلاسم و غشا می‌باشد که با توجه به محدودیت‌های داده‌های آزمایشگاهی و نبود اطلاعات کافی خواص ویسکوالاستیک برای هر یک از لایه‌ها، شبیه‌سازی به صورت دولایه در نظر گرفته شد که می‌توان تعداد لایه‌ها را با داشتن اطلاعات بیشتری از خواص ویسکوالاستیک هر لایه از سلول بنیادی مزانشیمال، افزایش داد. در ادامه این پژوهش، در راستای کنترل دقیق‌تر فشار مکشی بر سلول در آزمایش مکش میکروپیپت، در نظر گرفتن جریان سیال و اصل پل و تستون^۱ [۲۴] پتانسیل زیادی برای آزمایش‌های بیومکانیکی در تشخیص بالینی و پژوهش‌های زیست‌شناسی سلولی ایجاد می‌کند. همچنین، بررسی محاسباتی آزمایش مکش میکروپیپت

بر سلول‌های تمایز پیدا کرده و مقایسه نتایج با داده‌های مربوط به سلول‌های بنیادی با استفاده از تصویربرداری میکروسکوپ کونفوکال جهت به‌دست آوردن هندسه دقیق سه‌بعدی این سلول‌ها و بهره‌گیری از این هندسه‌ها در مدل‌سازی‌ها، به همراه استفاده از خواص مکانیکی دقیق‌تر اجزای سلولی می‌تواند در تحلیل مکانوبیولوژیکی پاسخ سلولی به بارگذاری مکانیکی و تفسیر مهندسی پاسخ‌های شیمیایی متعاقب آن مفید باشد.

1 Wheatstone bridge principle

۵- فهرست علائم

علائم انگلیسی

$I(t)$ تابع انعطاف پذیری خزشی
 D جابه جایی، m

E مدول الاستیسیته، N/m^2

k سفتی فنر، N/m^2

p فشار، Pa

علائم یونانی

ρ چگالی، kg/m^3

τ ثابت زمانی، S

μ ویسکوزیته، $Pa.s$

۶- منابع

- [6] B. González-Bermúdez, G. V. Guinea, and G. R. Plaza, "Advances in micropipette aspiration: applications in cell biomechanics, models, and extended studies," *Biophysical journal*, vol. 116, no. 4, pp. 587-594, 2019.
- [7] G. Plaza, *et al.*, "Simple measurement of the apparent viscosity of a cell from only one picture: Application to cardiac stem cells," *Physical Review E*, vol. 90, no. 5, p. 052715, 2014.
- [8] D. Needham, and R. Hochmuth, "Rapid flow of passive neutrophils into a 4 μm pipet and measurement of cytoplasmic viscosity," 1990.
- [9] D. P. Theret, M. Levesque, M. Sato, R. Nerem, and L. Wheeler, "The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell micropipette measurements," 1988.
- [10] G. Esteban-Manzanares, *et al.*, "Improved measurement of elastic properties of cells by micropipette aspiration and its application to lymphocytes," *Annals of biomedical engineering*, vol. 45, no. 5, pp. 1375-1385, 2017.
- [11] E. Zhou, C. Lim, and S. Quek, "Finite element simulation of the micropipette aspiration of a living cell undergoing large viscoelastic deformation," *Mechanics of Advanced Materials and Structures*, vol. 12, no. 6, pp. 501-512, 2005.
- [1] H. Liu, *et al.*, "Biophysical characterization of bladder cancer cells with different metastatic potential," *Cell biochemistry and biophysics*, vol. 68, no. 2, pp. 241-246, 2014.
- [2] E. M. Darling, M. Topel, S. Zauscher, T. P. Vail, and F. Guilak, "Viscoelastic properties of human mesenchymally-derived stem cells and primary osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes," *Journal of biomechanics*, vol. 41, no. 2, pp. 454-464, 2008.
- [3] H. Pu, *et al.*, "Micropipette aspiration of single cells for both mechanical and electrical characterization," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 66, no. 11, pp. 3185-3191, 2019.
- [4] M. Li, L. Liu, X. Xiao, N. Xi, and Y. Wang, "Viscoelastic properties measurement of human lymphocytes by atomic force microscopy based on magnetic beads cell isolation," *IEEE transactions on nanobioscience*, vol. 15, no. 5, pp. 398-411, 2016.
- [5] E. Evans, "New membrane concept applied to the analysis of fluid shear-and micropipette-deformed red blood cells," *Biophysical journal*, vol. 13, no. 9, pp. 941-954, 1973.

- insight," *Physical biology*, vol. 4, no. 2, p. 104, 2007.
- [19] G. Ourique, EF. Teixeira, and LG. Brunnet, "Modelling Micropipette Aspiration with Active Particles," arXiv preprint arXiv:2103.16532, pp. 1-6, 2021.
- [20] P. M. Davidson, et al., "High-throughput microfluidic micropipette aspiration device to probe time-scale dependent nuclear mechanics in intact cells," *Lab on a Chip*, vol. 21, no. 21, pp. 3652-3663, 2019.
- [21] H. Huang, et al., "Recent advances on the model, measurement technique, and application of single cell mechanics," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 17, pp. 6248:1-30, 2020.
- [22] E. Rahimpour, B. Vahidi, and Z. Mollahoseini, "A computational simulation of cyclic stretch of an individual stem cell using a nonlinear model," *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 13, no. 2, pp. 274-282, 2019.
- [23] CR. Ethier, and CA. Simmons, "Introductory biomechanics: from cells to organisms," Cambridge University Press, Chapter 2, pp. 43-53, 2007.
- [24] YJ. Li, et al., "A microfluidic micropipette aspiration device to study single-cell mechanics inspired by the principle of wheatstone bridge," *Micromachines*, vol.10, no. 2, pp. 131:1-12, 2019.
- [12] P. A. Pullarkat, P. A. Fernández, and A. Ott, "Rheological properties of the eukaryotic cell cytoskeleton," *Physics Reports*, vol. 449, no. 1-3, pp. 29-53, 2007.
- [13] R. Zhao, K. Wyss, and C. A. Simmons, "Comparison of analytical and inverse finite element approaches to estimate cell viscoelastic properties by micropipette aspiration," *Journal of Biomechanics*, vol. 42, no. 16, pp. 2768-2773, 2009.
- [14] E. Zhou, S. Quek, and C. Lim, "Power-law rheology analysis of cells undergoing micropipette aspiration," *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, vol. 9, no. 5, pp. 563-572, 2010.
- [15] M.-M. Khani, M. Tafazzoli-Shadpour, M. Rostami, H. Peirovi, and M. Janmaleki, "Evaluation of mechanical properties of human mesenchymal stem cells during differentiation to smooth muscle cells," *Annals of biomedical engineering*, vol. 42, no. 7, pp. 1373-1380, 2014.
- [16] A. Mohammadkarim, M. Mokhtari-Dizaji, A. Kazemian, H. Saberi, M. M. Khani, and M. Bakhshandeh, "The mechanical characteristics of human endothelial cells in response to single ionizing radiation doses by using micropipette aspiration technique," *Molecular & Cellular Biomechanics*, vol. 16, no. 4, p. 275, 2019.
- [17] F. Guilak, J. R. Tedrow, and R. Burgkart, "Viscoelastic properties of the cell nucleus," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 269, no. 3, pp. 781-786, 2000.
- [18] E. Gladilin, A. Micoulet, B. Hosseini, K. Rohr, J. Spatz, and R. Eils, "3D finite element analysis of uniaxial cell stretching: from image to

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از سرکار خانم مهندس یاسمن امیری برای انجام خدمات ویراستاری مقاله کمال تشکر را ابراز می‌کنند.

Computational analysis of micropipette aspiration technique on a stem cell

Ehsan Chokan¹, Bahman Vahidi^{2*}, Mohammad Mehdi Khani³

- 1.MSc, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
- 3.Assistant Professor, Department of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Corresponding Author: bahman.vahidi@ut.ac.ir
Postal Code: 1439957131

Receipt: 2021/03/02

Accepted: 2021/09/26

ABSTRACT

Mechanical properties of living cells play an important role in helping to understand cell physiology and pathology. Evaluation of mechanical properties of cells may potentially lead to new mechanical diagnostic methods for some of these diseases. In this study, viscoelastic properties of the outer layer (cytoplasm and membrane) were extracted using standard linear solid model. Finite element modeling of the two cell layers is performed and the model is validated by experimental data. In the two-layer model, the effect of the radius of the nucleus and the location of the nucleus in the cell are investigated on the cell properties. By reducing the cytoplasmic radius ratio up to 43%, the whole cell properties follow the cytoplasmic properties and the effect of the nucleus can be neglected. The 50-second displacement change at a radial ratio of 0.53 increased to 4.5% compared to radial ratio of 1.58. At a radial ratio of 0.43, a change in cell behavior was observed compared to the previous one, with a displacement change equals to 6.8% compared to radial ratio of 1.85 and a displacement reduction of 9.5% at a radial ratio of 0.53. The results demonstrate that the location of the nucleus and the ratio of the radius of the cytoplasm to the radius of the nucleus can effectively influence the viscoelastic properties and mechanical behavior of the cell.

KEYWORDS:

Keywords: Mechanical properties, Stem cell, Micropipette aspiration, Double layered cell, Finite element modeling.