



## A Microfluidic Device to Apply Uniform Shear Stress to the Cells

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original Research

#### Authors

Moghadas H.\*<sup>1</sup> PhD

#### How to cite this article

Moghadas H. A Microfluidic Device to Apply Uniform Shear Stress to the Cells. Pathobiology Research. 2020;23(3):121-128.

### ABSTRACT

The invention of microfluidic devices has led to a dramatic change in engineering, medicine, and biomedicine. Microfluidic devices provide the conditions for cell culture in real body dimensions. In the present study, a microfluidic chip was fabricated that is capable of keeping cells alive under dynamic flow conditions. This microchip consists of a microchannel in which cells are cultured. Different amounts of shear stress are exerted to the cells by passing culture media. The results of the flow field simulation show that in the flow rate of 1 to 100 microliters per minute, the shear stress distribution is uniform. In this range of flow rate, shear stress varies from 0.005434 to 0.5432 dyn/cm<sup>2</sup>, which is within the allowable shear stress for cells. Large shear stresses, such as a flow rate of 1000 microliters per minute, cause the cell wall to rupture, and eventually disintegration. The experimental results confirm that the growth and proliferation of cells vary for different amounts of growth factor as a chemical factor. The cells filled the microchannel for a growth factor of 15% on the fifth day of culture, while without growth factor, the microchannel was filled on the seventh day. The results indicate that this microchip can maintain cells alive for more than a week. Also, by adjusting the flow, different amounts of shear stress can be applied to the cells. Therefore, this microchip can perform various cellular tests to investigate the effect of shear stress on the cells.

**Keywords** Microfluidic Chip; Flow Simulation; Cell Culture; Shear Stress; Chemical Stimulation

### CITATION LINKS

[1] Review on microfluidic device applications for fluids separation ... [2] Application of microfluidic chip ... [3] Fluid-shear-stress-induced translocation of aquaporin-2 ... [4] Microfluidic device embedding electrodes for ... [5] Microfluidic platforms for evaluation of ... [6] Shear stress magnitude and transforming growth ... [7] Online analysis of drug toxicity ... [8] Development of the microfluidic device to regulate ... [9] Fluid shear stress suppresses osteoclast ... [10] Stem cell culture and differentiation in microfluidic ... [11] Intracellular calcium response of primary cilia ... [12] 3D microtissue-derived human stem cells seeded on ... [13] A microfluidic device with spatiotemporal wall shear stress ... [14] Heat shock protein 27 phosphorylation ... [15] Challenge in particle delivery to cells in a ... [16] Hele Shaw microfluidic device: A new tool for systematic ... [17] A microfluidics-based wound-healing assay ... [18] Fluid shear stress induces cell migration and invasion ... [19] Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design ... [20] Dynamic osmotic loading of chondrocytes ... [21] Stimulation of chondrocytes and chondroinduced mesenchymal ... [22] Dedifferentiated chondrocytes in composite ... [23] A microfabricated platform for the study of ... [24] Transient exposure to TGF-β3 improves the functional chondrogenesis of ... [25] Differential response of adult and embryonic mesenchymal ... [26] Dynamic compressive strain influences chondrogenic gene expression ... [27] Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell ... [28] Shear stress induces endothelial differentiation from a murine ... [29] Low-level shear stress induces differentiation of liver cancer ... [30] The rate of fluid shear stress is a potent regulator for the ... [31] Control of cyclin D1, p27Kip1, and cell cycle progression in ... [32] Matrix-dependent adhesion of vascular and valvular endothelial cells ... [33] Cdc42-mediated supracellular cytoskeleton induced cancer cell ... [34] Mechanical load modulates chondrogenesis of human ... [35] A microfluidic bioreactor with integrated transepithelial ... [36] Microfluidic models of physiological or pathological flow shear ... [37] From 3D cell culture ... [38] Mechanobiology of engineered cartilage cultured ... [39] A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal ... [40] The performance of primary human renal cells in hollow fiber bioreactors for bioartificial ... [41] Albumin handling by renal tubular epithelial cells ... [42] Microengineered physiological ... [43] Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity ...

<sup>1</sup>Department of Mechanical Engineering, Faculty of Gas and Petroleum, Yasouj University, Gachsaran, Iran

#### \*Correspondence

Address: Faculty of Gas and Petroleum, Yasouj University, Gachsaran, Iran. Postal Code: 75918-74831  
Phone: +98 (74) 31211351  
Fax: +98 (74) 31211320  
h.moghadas@yu.ac.ir

#### Article History

Received: January 24, 2020

Accepted: August 2, 2020

ePublished: September 20, 2020

## ریزتراشه سیالی برای اعمال تنش برشی یکنواخت بر سلول

هاجر مقدس\* PhD

گروه مهندسی مکانیک، دانشکده نفت و گاز، دانشگاه یاسوج، گچساران، ایران

### چکیده

ابعاد دستگاه‌های میکروفلوییدی (ریزتراشه سیالی) منجر به تحول شگرفی در حوزه مهندسی، پزشکی و زیست‌پزشکی شده است. دستگاه‌های میکروفلوییدی شرایط کشت سلول را در ابعاد واقعی بدن فراهم می‌کنند. در مطالعه حاضر، ریزتراشه سیالی با قابلیت زنده نگه‌داشتن سلول در شرایط جریان دینامیک ساخته شد. این ریزتراشه از یک میکروکانال اصلی تشکیل شده است که سلول‌ها در کف آن کشت داده می‌شوند. با عبور محیط کشت از روی سلول مقادیر مختلف تنش برشی به سلول‌ها اعمال می‌شود. نتایج شبیه‌سازی میدان جریان نشان می‌دهد که در محدوده دبی ۱ تا ۱۰۰ میکرولیتر بر دقیقه توزیع تنش برشی در ریزتراشه، یکنواخت است. در این محدوده، تنش برشی از ۵۴۳۴٪ تا ۵۴۳۲٪ دین بر سانتی‌مترمربع تغییر می‌کند که در محدوده مجاز برای سلول‌ها قرار دارد. مقادیر بزرگ‌تر تنش برشی مانند دبی ۱۰۰ میکرولیتر بر دقیقه منجر به پارگی جداره سلول و نهایتاً متلاشی شدن آن می‌شود. نتایج آزمایشات تایید می‌کند که روند رشد و تکثیر سلول‌ها به ازای مقادیر مختلف فاکتور رشد به‌عنوان یک فاکتور شیمیایی متفاوت است. سلول‌ها با فاکتور رشد ۱۵٪ در روز پنجم کشت، کف میکروکانال را پر کردند، در حالی که در نمونه بدون فاکتور رشد، میکروکانال در روز هفتم پر شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که این ریزتراشه قابلیت رشد و نگهداری سلول‌ها به مدت بیش از یک هفته را دارد و با تنظیم دبی سیال می‌توان مقادیر مختلف تنش برشی را به سلول‌ها اعمال کرد. بنابراین این ریزتراشه قابلیت اجرای آزمایشات مختلف سلولی و بررسی اثر تنش برشی بر واکنش آنها را دارد.

**کلیدواژه‌ها:** ریزتراشه سیالی، شبیه‌سازی جریان، کشت سلول، تنش برشی، تحریک شیمیایی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۲

نویسنده مسئول: h.moghadas@yu.ac.ir

### مقدمه

امروزه پیشرفت فناوری منجر به ظهور دستگاه‌های ریزتراشه سیالی در ابعاد میکرومتر شده است [1, 2]. این دستگاه‌های کوچک شرایطی را فراهم می‌کنند که در آن سلول، در محیطی مشابه حالت واقعی بدن کشت داده شود و پدیده‌های مختلف زیستی در کمترین زمان بر روی آنها بررسی شوند [3, 4]. روند رشد سلول‌ها در میکروکانال‌ها با فلاسک کشت سنتی کاملاً متفاوت است [5]. سیستم‌های ریزسیالی در مقایسه با روش کشت سنتی، قابلیت کنترل محیط زیست سلول را افزایش می‌دهند [6]. این دستگاه‌های بسیار کوچک به دلیل تعداد نسبتاً کم سلول موجود در ریزتراشه، عملیات بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت را تسریع می‌کنند [7]. این دستگاه‌ها همچنین با قابلیت ایجاد میکرومحیط پویا، مشابه و هم‌اندازه با حالت واقعی بافت، امکان کنترل دقیق عوامل مکانیکی و نیروهای وارد به سلول‌ها را نیز فراهم می‌کنند [8, 9].

اندازه کوچک میکروفلوییدی‌ها باعث شده است که تعداد سلول‌های مورد نیاز و مواد مصرفی در آزمایشات کم شود و بنابراین امکان انجام آزمایش‌های موازی و همزمان با بررسی اثر عوامل مختلف را با کاهش چشمگیر مواد مصرفی و هزینه‌ها فراهم می‌کند [10, 11]. تاکنون کاربردهای گسترده‌ای از سیستم‌های ریزسیالی در حوزه‌های مختلف علوم مهندسی، پزشکی و زیستی ارایه شده است. از این دستگاه‌ها برای مطالعات سلولی، انتقال دارو، تحریکات مکانیکی، تحریکات شیمیایی و ارزیابی جنبه‌های مختلف انواع بیماری‌ها مانند سرطان استفاده شده است [12-19]. به‌عنوان مثال ریزتراشه‌های متنوعی برای بررسی عملکرد و شکل‌گیری بافت زنده انسانی سلول‌های غضروفی، تولید میکروبیدهای حاوی کندروسیت، بررسی اثر تنش برشی سیال بر روی فنوتیپ سلول‌های بنیادی مشتق‌شونده به کندروسیت و کندروسیت و بررسی اثر تحریکات مکانیکی خالص با نیروی فشاری بر تمایز به سلول غضروفی به کار رفته‌اند [20-23].

امروزه اثبات شده است که تحریکات شیمیایی و مکانیکی می‌توانند روند رشد، واکنش و تمایز سلول‌های مختلف را تحت تاثیر قرار دهند [6, 10, 22, 24-26]. در تحقیقات پیشین نشان داده شد که تنش برشی به‌عنوان یک تحریک مکانیکی بر تمایز سلول‌ها اثر می‌گذارد [27-30]. تنش برشی همچنین می‌تواند باعث تغییرات مکانیکی و مورفولوژیکی مانند فعال‌کردن مسیر پیام‌های تکثیر سلولی، چسبندگی و مهاجرت سلول‌ها شود [12, 17, 18, 31-33]. بررسی اثر نیروی فشاری و همچنین نیروی برشی غیریکنواخت بر تمایز سلول‌های کندروسیت درون بایوراکتور نشان داد که نیروی فشاری باعث تسریع و نیروی برشی باعث کندشدن فرآیند تمایز سلول‌ها می‌شود [34]. در این بایوراکتور توزیع تنش برشی با اعمال حرکت چرخشی در سیال ایجاد شده بود و بنابراین تنش برشی وارد شده به سلول‌ها در آن حالت غیریکنواخت است. از این رو نمی‌توان ارزیابی درستی از تاثیر نیروی برشی بر تمایز سلول‌ها داشت. اخیراً نشان داده شد که تنش برشی در محدوده تنش برشی جریان اینترستیشیال بافت غضروف که برابر ۰/۵ تا ۰/۲۰ دین بر سانتی‌مترمربع است، باعث کاهش روند تمایز سلولی می‌شود، ولی همین مقدار تنش برشی در ترکیب با محرک شیمیایی باعث تسریع فرآیند تمایز می‌شود [21]. به‌علاوه پژوهش‌های پیشین نشان داده است که حداکثر مجاز تنش برشی برای سلول‌ها در محدوده ۰/۲-۰/۲۰ دین بر سانتی‌مترمربع است [35]. مطالعات زیادی اثر تنش برشی را برای انواع سلول‌ها مخصوصاً سلول‌های اندوتلیال که در حالت واقعی در بدن در مجاورت با جریان خون هستند بررسی کرده‌اند [36]. برای بررسی دقیق اثر تنش برشی بر سلول‌ها لازم است که شرایطی فراهم شود که تنش برشی به‌صورت یکسان و یکنواخت بر تمام سلول‌ها اعمال شود. به عبارت دیگر شرایط آزمایش باید به گونه‌ای باشد که تمامی سلول‌های تحت آزمایش تحت اثر مقدار یکسانی از تنش برشی قرار بگیرند. بدین ترتیب قابلیت ارزیابی اثر تنش برشی به‌صورت واضح فراهم می‌شود.

هر یک از حجم کنترل‌های دامنه محاسباتی انتگرال‌گیری و معادلات با الگوریتم SIMPLE حل شد. به منظور مشخص کردن حجم مناسب المان‌ها برای انجام محاسبات، مطالعه شبکه‌های ریزتر برای بررسی استقلال حل جریان از تعداد شبکه برای حدود یک میلیون المان و تعداد شبکه‌های محاسباتی زیادتر انجام شد. در تعدادی نقطه دلخواه مقدار سرعت و همچنین تفاوت تنش‌برشی متوسط در مجرای اصلی در شبکه‌های مختلف مبنای مقایسه و انتخاب تعداد شبکه مناسب برای محاسبات بعدی شد.

بر اساس نتایج شبیه‌سازی طرح اولیه ریزتراشه با استفاده از نرم‌افزار سالیدورک ۲۰۱۹ طراحی شد. سپس قالب اولیه از جنس پلکسی با استفاده از روش ماشین‌کاری سی‌ان‌سی تهیه شد. این قالب با ابعاد ۳×۱ سانتی‌متر دارای میکروکانالی به ارتفاع ۵۰۰ میکرومتر، عرض ۱ میلی‌متر و طول ۲ سانتی‌متر است (شکل ۱). برای ساخت میکروکانال پلیمر PDMS (پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان) به نسبت وزنی ۱۰ به ۱ با مایع تسریع‌کننده پخت به‌آرامی مخلوط شد. مخلوط به درون قالب ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در محفظه خلا حباب‌زدایی شد. نهایتاً به درون آن با دمای ۶۵°C به مدت دو ساعت قرار داده شد. سطح داخلی لایه بالایی ریزتراشه و یک لام شیشه‌ای آزمایشگاهی به‌طور همزمان به مدت ۱۱ ثانیه تحت پلاسما قرار داده شدند. در ادامه قالب میکروکانال بالایی بر روی لام شیشه‌ای قرار داده شد و ریزتراشه اسمبل‌شده به مدت ۱۵ دقیقه تحت فشارده‌سازی حرارتی و وزنه ۳۰۰ گرمی در دمای ۶۵°C قرار گرفت.

به‌منظور کشت سلول درون ریزتراشه، ابتدا ریزتراشه با الکل کاملاً شسته و سپس به مدت ۳۰ دقیقه تحت نور UV استریل شد. پس از آن میکروکانال‌ها با محلول بافر PBS (محلول نمک فسفات با خاصیت بافری) به‌خوبی شسته شدند. به‌منظور تسهیل چسبیدن سلول به کف میکروکانال ریزتراشه، مقداری کلاژن به درون کانال تزریق و به مدت دو ساعت درون آنکوباتور قرار داده شد. در این مطالعه از رده سلولی سرطانی ربه (A549) استفاده شده است. سوسپانسیون سلولی با دانسیته ۱۰<sup>۶</sup> سلول بر میلی‌لیتر به‌آرامی از ورودی به محل کشت سلول وارد شد. اتصالات ورودی و خروجی بسته و ریزتراشه به درون آنکوباتور منتقل شد. ۲۴ ساعت بعد اتصالات ورودی و خروجی محیط کشت مجدداً متصل و جریان یکنواخت محیط کشت به مدت ۵ ساعت از کانال عبور داده شد. سپس ریزتراشه و پمپ سرنگی به درون آنکوباتور منتقل شدند. جریان یکنواخت روزانه به مدت ۱۰ ساعت در دو نوبت ۵ ساعتی به فاصله دو ساعت استراحت درون آنکوباتور به سلول‌ها اعمال می‌شد. در نمونه کنترلی سلول‌ها درون ریزتراشه بدون جریان سیال و در حالت استاتیک کشت داده شدند و روزانه محیط کشت آن تعویض می‌شد. به‌منظور بررسی اثر فاکتور شیمیایی، فاکتور رشد FBS (سرم جنین گاوی) با غلظت‌های مختلف ۱۵ و ۱۰٪ محلول در محیط کشت، در حالت استاتیک بررسی شد و نمونه کنترلی آن محیط کشت بدون فاکتور رشد بود. روند تغییرات، رشد و مرگ و

در مطالعه حاضر ریزتراشه‌ای طراحی و ساخته شد که شرایط اعمال تنش‌برشی یکسان و یکنواختی را به‌طور همزمان بر تمام سلول‌ها فراهم می‌کند. برای اطمینان از چگونگی توزیع تنش‌برشی، در گام اول تغییرات آن بر روی سلول‌ها درون ریزتراشه شبیه‌سازی شد. قابلیت زنده‌ماندن سلول‌ها در حالت استاتیک (بدون جریان سیال) و دینامیک (با جریان سیال) با انجام آزمایشات تجربی، اعتبارسنجی شد. همچنین اثر غلظت‌های مختلف فاکتور رشد به‌عنوان یک محرک شیمیایی بر روی سلول‌ها و نحوه رشد و تکثیر آنها ارزیابی شد.

## مواد و روش‌ها

برای ساخت یک ریزتراشه مناسب و کارا، داشتن اطلاعات کاملی از میدان جریان سیال و نیروهای وارده به سلول‌ها در داخل ریزتراشه بسیار بارز است. بنابراین در این مطالعه نخست میدان جریان درون ریزتراشه شبیه‌سازی و نیرو و تنش‌های وارده بر سلول‌ها درون ریزتراشه محاسبه شدند. شماتیک ساده طرح میکروکانال مورد استفاده در ریزتراشه حاضر در شکل ۱، نشان داده شده است. دو لوله استوانه‌ای محل ورود و خروج سیال هستند. سیال پس از عبور از مجرای ورودی، به محل کشت سلول می‌رسد. محل کشت سلول‌ها کف کانال مکعبی است که با بزرگ‌نمایی در شکل مشخص شده است. سلول‌های کشت‌داده‌شده در کف میکروکانال با عبور سیال محیط کشت تغذیه می‌شوند و مقادیر مختلف تنش‌برشی به واسطه عبور جریان به آنها اعمال می‌شود. در ریزتراشه‌های سیالی به‌دلیل ابعاد کوچک میکروکانال‌ها و سرعت کم سیال، عدد رینولدز کوچکتر از یک و رژیم جریان درون آنها آرام است [37]. در این شرایط معادلات حاکم بر جریان به شرح زیر هستند:

$$\frac{\partial u_i}{\partial x_i} = 0 \quad (1)$$

$$\rho \left( \frac{\partial u_i}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x_j} (u_i u_j) \right) = -\frac{\partial p}{\partial x_i} + \frac{\partial}{\partial x_j} \left( \mu \left( \frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right) \right) \quad (2)$$

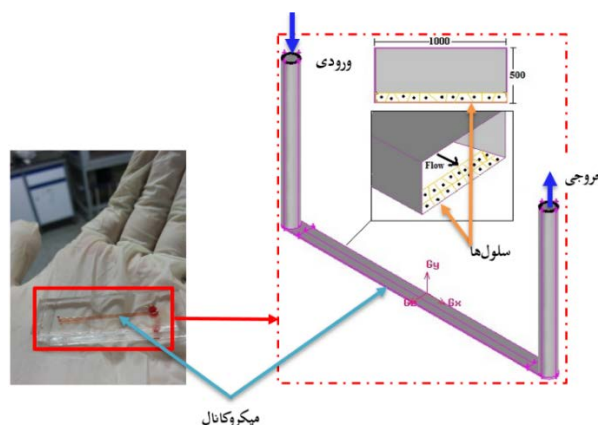
$\rho$  چگالی،  $u_i$  بردار سرعت جریان،  $p$  فشار و  $\mu$  ویسکوزیته دینامیکی سیال است.

در مطالعه حاضر از محیط کشت DMEM استفاده شد که سیالی نیوتنی، همگن و غیرقابل تراکم است [38]. شرایط مناسب برای نگهداری سلول‌ها دمای ۳۷°C است، بنابراین برای حل میدان جریان، خصوصیات فیزیکی سیال در این دما در نظر گرفته شد. معادلات بالا به ازای دبی‌های مختلف که منجر به ایجاد تنش‌برشی با مقادیر متفاوت می‌شود، در نرم‌افزار Ansys Fluent 19.2 حل می‌شوند.

برای ایجاد دامنه محاسباتی از المان‌های شش‌گوشه استفاده شد. بر اساس فرمول حجم محدود، مجموعه‌ای از معادلات جبری برای

عبارت دیگر در هر آزمایش هر سلول بسته به موقعیت مکانی که در آن قرار داشت مقدار متفاوتی از تنش برشی را تجربه می‌کرد [34]. همان‌گونه که در نمودار ۱ نشان داده شده است به ازای دبی‌های ۱ تا ۱۰۰ میکرولیتر بر دقیقه مقدار تنش برشی به ترتیب از ۰/۰۰۵۴۳۴ تا ۰/۵۴۳۲ دین بر سانتی‌متر مربع تغییر می‌کند. بنابراین تغییرات تنش برشی بر حسب دبی در این محدوده خطی است. به علاوه مقدار تنش برشی در محدوده مجاز (محدود ۰/۲-۰/۲۰ دین بر سانتی‌متر مربع) قرار دارد. عبور جریان بر روی سطح سلول‌ها منجر به اعمال تنش برشی به آنها می‌شود. بنابراین مقدار تنش برشی اعمال شده بر سلول‌ها را می‌توان با تنظیم مقدار دبی جریان با استفاده از میکروپمپ سرنگی کنترل کرد.

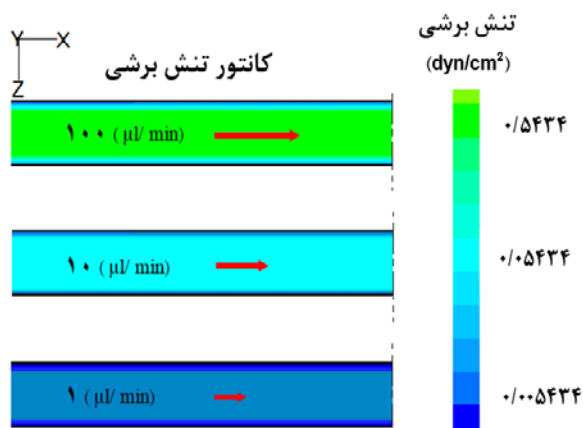
میر سلول‌ها در روزهای مختلف با استفاده از تصاویر میکروسکوپ اینورت بررسی شدند.



شکل ۱) دستگاه ریزتراشه سیالی به ابعاد ۳×۱ سانتی‌متر که دارای میکروکانالی به ارتفاع ۵۰۰ میکرومتر، عرض ۱ میلی‌متر و طول ۲ سانتی‌متر است. ورودی و خروجی جریان در تصویر شماتیک سمت راست نشان داده شده است. سلول‌ها در کف میکروکانال کشت داده شده‌اند.

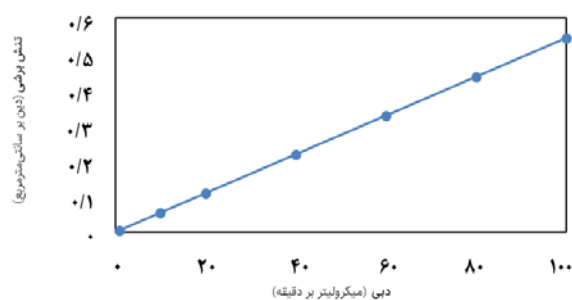
## یافته‌ها

در مطالعه حاضر، هدف ساخت ریزتراشه سیالی با قابلیت اعمال تنش برشی یکنواخت و یکسان بر روی سلول‌ها به‌طور همزمان است. همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شد، طراحی این ریزتراشه به گونه‌ای است که جریان محیط کشت با عبور از میکروکانال مواد مغذی را به سلول‌ها می‌رساند و مواد دفعی مانند ترشحات سلولی را از روی سلول‌ها خارج می‌کند. عبور جریان از روی سلول‌ها باعث اعمال تنش برشی به آنها می‌شود. در پژوهش‌های پیشین نشان داده شد که سلول‌ها نمی‌توانند تنش‌های برشی بزرگ را تحمل کنند [3, 35, 39-43]. بنابراین دبی اعمالی باید به گونه‌ای انتخاب شود که تنش وارده از طرف جریان باعث آسیب‌دیدگی و یا مرگ سلول نشود. از این رو در مطالعه حاضر نخست میدان جریان به ازای دبی‌های مختلف شبیه‌سازی شد و تنش برشی وارده به سلول‌ها محاسبه شدند. محدوده دبی برای آزمایشات تجربی به گونه‌ای انتخاب شد که تنش برشی وارده منجر به آسیب‌رساندن به سلول‌ها نشود. در مطالعه حاضر مدل‌سازی جریان به ازای دبی‌های ۱ تا ۱۰۰ میکرولیتر بر دقیقه انجام شد. کانتور تنش برشی بر روی سلول‌ها در کف میکروکانال در شکل ۲ رسم شده است. نتایج شبیه‌سازی در شکل ۱ نشان می‌دهد که توزیع تنش برشی در این محدوده از دبی در کف میکروکانال جایی که سلول‌ها کشت داده شده‌اند تقریباً یکنواخت است. با توجه به یکنواخت بودن توزیع تنش برشی بر روی کف میکروکانال، تمامی سلول‌ها مقدار تنش برشی یکسانی را به ازای هر دبی جریان تجربه می‌کنند و از این رو واکنش متوسط جمعیت سلولی تخمین قابل قبولی از واکنش یک سلول به مقدار مشخصی از تنش برشی است. در حالی که در مطالعات قبلی در هر آزمایش توزیع تنش برشی که به سلول‌ها اعمال می‌شد یکنواخت نبود. به



کف میکروکانال (محل کشت سلول)

شکل ۱) مدل‌سازی جریان به ازای دبی‌های ۱ تا ۱۰۰ میکرولیتر بر دقیقه؛ جهت جریان و مقدار دبی در تصویر مشخص شده است. کانتور تنش برشی نشان می‌دهد که توزیع تنش برشی در این محدوده از دبی در کف میکروکانال جایی که سلول‌ها کشت داده شده‌اند، تقریباً یکنواخت است.



نمودار ۱) تغییرات تنش برشی بر روی سلول‌ها بر حسب تغییرات دبی درون ریزتراشه

## آزمایشات سلولی

ریزتراشه متصل به میکروپمپ سرنگی در شکل ۳ نشان داده شده است. اتصالات ورودی و خروجی در تصویر مشخص شده‌اند. محیط کشت از طریق سرنگ با دبی قابل تنظیم توسط میکروپمپ به ریزتراشه تزریق می‌شود. به دلیل شفاف بودن ریزتراشه، فرآیند

یکنواخت و همزمان دیده شد (شکل ۵- الف). در این حالت تا قبل از روز هفتم تعداد اندکی از سلول‌ها می‌مردند که به صورت گرد روشن در تصویر میکروسکوپی دیده می‌شوند. این در حالی است که بدون اعمال فاکتور رشد یعنی نمونه سوم، مرگ و میر برخی از سلول‌ها همزمان با تکثیر دیگر سلول‌ها به وضوح دیده می‌شود (شکل ۵- ج). به عبارت دیگر در روزهای مختلف تا رسیدن به روز هفتم، تعداد نسبی سلول‌های مرده نسبت به آنچه که در نمونه اول دیده می‌شد بیشتر بود.



الف) زمان صفر



ب) زمان ۱۰ ثانیه



ج) زمان ۶۰ ثانیه

**شکل ۴)** تصویر یک سلول تحت جریان ۱۰۰۰ میکروولت بر دقیقه در زمان‌های صفر، ۱۰ و ۶۰ ثانیه پس از اعمال جریان؛ جهت جریان از سمت راست به چپ است. الف) در زمان صفر که هنوز جریانی اعمال نشده است، سلول شکلی نسبتاً دایره‌ای دارد؛ ب) ۱۰ ثانیه پس از اعمال جریان، نیروی وارده از طرف جریان به سلول، منجر به آسیب‌دیدن غشای سلولی و ترکیب شدن سلول شده است؛ ج) با گذشت ۶۰ ثانیه پس از اعمال جریان، سلول کاملاً متلاشی شده و قسمت‌هایی از آن با جریان شسته شده است.

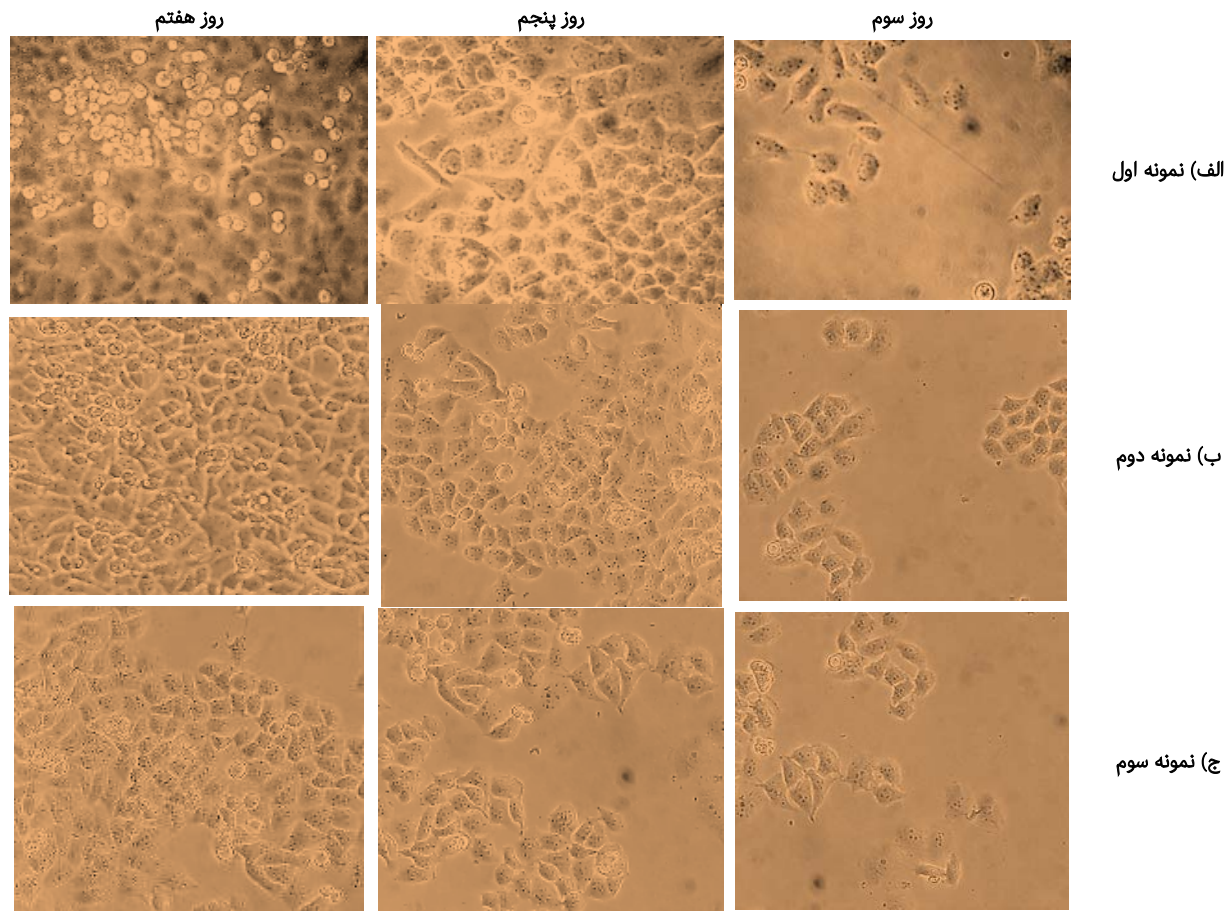
عبور سیال و سلول‌های چسبیده به کف میکروکانال به صورت همزمان و لحظه‌ای از طریق میکروسکوپ قابل مشاهده است.



شکل ۳) ریزتراشه متصل به میکروپمپ سرنگی

به ازای مقادیر مختلف جریان، در محدوده دبی‌های ۱ تا ۱۰۰ میکروولت بر دقیقه تغییرات محسوسی در روند رشد و مرگ سلول‌ها مشاهده نشد. این در حالی است که افزایش دبی به اندازه ۱۰ برابر معادل ۱۰۰۰ میکروولت بر دقیقه منجر به آسیب‌دیدگی غشای سلول، پارگی و متلاشی شدن آن شد. در شکل ۴ تصویر میکروسکوپی یک سلول تحت جریان ۱۰۰۰ میکروولت بر دقیقه در زمان‌های صفر، ۱۰ و ۶۰ ثانیه پس از اعمال جریان با یکدیگر مقایسه شده‌اند. در زمان صفر که هنوز جریانی اعمال نشده است، تصویر سلول از نمای بالا، شکلی نسبتاً دایره‌ای دارد (شکل ۴- الف). ۱۰ ثانیه پس از اعمال جریان، نیروی وارده از طرف جریان به سلول، منجر به آسیب‌دیدن غشای سلولی و ترکیب شدن سلول شده است (شکل ۴- ب). همان‌گونه که در شکل ۴- ج مشاهده می‌شود با گذشت ۶۰ ثانیه پس از اعمال جریان، سلول کاملاً متلاشی شده و قسمت‌هایی از آن با جریان شسته شده است.

از ریزتراشه‌های سیالی به‌طور گسترده‌ای برای بررسی اثرات فاکتورهای مختلف شیمیایی بر روی سلول‌ها استفاده می‌شود. به دلیل ابعاد کوچک در این دستگاه‌ها، مواد مصرفی مورد نیاز برای هر آزمایش اندک و به علاوه سرعت پاسخ به محرک‌ها در آنها نسبت به کشت سنتی سریع‌تر است. بدین ترتیب صرفه‌جویی قابل ملاحظه‌ای در هزینه مواد مصرفی و زمان آزمایش می‌شود. در این مطالعه اثر مقادیر مختلف فاکتور رشد به‌عنوان یک محرک شیمیایی بر روی روند رشد سلول‌ها با استفاده از سه ریزتراشه مجزا، بررسی شد. تصویر میکروسکوپی سلول‌ها در روزهای مختلف در شکل ۵ نشان داده شده است. در حالت ۱۵% فاکتور رشد، نمونه اول، سلول‌ها در روز پنجم از کشت ریزتراشه را پر کردند. در حالت ۱۰% فاکتور رشد، نمونه دوم، پس از شش روز و در حالت بدون فاکتور رشد، نمونه سوم، تقریباً پس از روز هفتم کف کانال ریزتراشه کاملاً پر شد. در نمونه اول سلول‌ها با شرایط نزدیک به هم از لحاظ سنی قرار داشتند و روند مرگ سلول‌ها به صورت



شکل ۵) تصویر میکروسکوپی سلول‌ها در روزهای سوم، پنجم و هفتم؛ الف) نمونه اول حالت ۱۵٪ فاکتور رشد؛ ب) نمونه دوم حالت ۱۰٪ فاکتور رشد؛ ج) نمونه سوم حالت بدون فاکتور رشد؛ سلول‌های سالم به کف میکروکانال چسبیده‌اند و سلول‌های مرده به‌صورت گرد روشن در تصویر میکروسکوپی دیده می‌شوند.

می‌تواند ابزار پیشرفته‌ای در کاربردهای ژنتیکی و پزشکی در اختیار محققان این عرصه قرار دهد.

**تشکر و قدردانی:** موردی توسط نویسنده گزارش نشده است.

**تاییدیه اخلاقی:** موردی توسط نویسنده گزارش نشده است.

**تعارض منافع:** موردی توسط نویسنده گزارش نشده است.

**سهم نویسندگان:** هاجر مقدس، نگارنده مقدمه/روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی یا کمکی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۱۰۰٪)

**منابع مالی:** موردی توسط نویسنده گزارش نشده است.

### منابع

- 1- Santana HS, Silva JL, Aghel B, Ortega-Casanova J. Review on microfluidic device applications for fluids separation and water treatment processes. *SN Appl Sci.* 2020;2(3):395.
- 2- Cui P, Wang S. Application of microfluidic chip technology in pharmaceutical analysis: A review. *J Pharm Anal.* 2019;9(4):238-47.
- 3- Jang KJ, Cho HS, Kang DH, Bae WG, Kwon TH, Suh KY. Fluid-shear-stress-induced translocation of aquaporin-2 and reorganization of actin cytoskeleton in renal tubular epithelial cells. *Integr Biol.* 2011;3(2):134-41.

### بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر یک ریزتراشه سیالی برای انجام آزمایشات سلولی طراحی و ساخته شد. این ریزتراشه شرایط کشت و رشد سلول را برای مدت طولانی فراهم می‌کند. علاوه بر این قابلیت اعمال تنش‌برشی یکنواخت با مقادیر مختلف قابل کنترل و همچنین اعمال فاکتورهای شیمیایی به سلول‌ها را دارد. در این سیستم به راحتی می‌توان مقادیر مختلف تنش‌برشی را با تنظیم دبی توسط میکروپمپ سرنگی به سلول‌ها اعمال کرد. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که در محدوده جریان شبیه‌سازی شده، طی گذشت زمان نرخ مرگ و میر در جریان‌های مختلف یکسان است و بنابراین این محدوده از تنش‌برشی منجر به افزایش مرگ و میر سلول‌ها نمی‌شود. از این رو این سیستم گزینه مناسبی برای بررسی اثر تنش‌برشی بر واکنش سلول‌ها در شرایط مختلف مثلاً روند تمایز سلول‌های بنیادی به کندورسیت است. در مطالعات آینده سلول‌های بنیادی درون ریزتراشه کشت داده می‌شوند. سپس اثر نیروهای برشی و فاکتورهای شیمیایی مختلف بر تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های کندورسیت بررسی می‌شود. دانش و فناوری ساخت ریزتراشه‌های سیالی با قابلیت کشت سلول در داخل ایران

- 20- Chao PG, Tang Z, Angelini E, West AC, Costa KD, Hung CT. Dynamic osmotic loading of chondrocytes using a novel microfluidic device. *J Biomech.* 2005;38(6):1273-81.
- 21- Bao X, Li Z, Liu H, Feng K, Yin F, Li H, et al. Stimulation of chondrocytes and chondroinduced mesenchymal stem cells by osteoinduced mesenchymal stem cells under a fluid flow stimulus on an integrated microfluidic device. *Mol Med Rep.* 2018;17(2):2277-88.
- 22- Angelozzi M, Penolazzi L, Mazzitelli S, Lambertini E, Lolli A, Piva R, et al. Dedifferentiated chondrocytes in composite microfibers as tool for cartilage repair. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017;5:35.
- 23- Kowsari-Esfahan R, Jahanbakhsh A, Saidi MS, Bonakdar Sh. A microfabricated platform for the study of chondrogenesis under different compressive loads. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018;78:404-13.
- 24- Kim M, Erickson IE, Choudhury M, Pleshko N, Mauck RL. Transient exposure to TGF- $\beta$ 3 improves the functional chondrogenesis of MSC-laden hyaluronic acid hydrogels. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012;11:92-101.
- 25- Terraciano V, Hwang N, Moroni L, Park HB, Zhang Z, Mizrahi J, et al. Differential response of adult and embryonic mesenchymal progenitor cells to mechanical compression in hydrogels. *Stem Cells.* 2007;25(11):2730-8.
- 26- Bonzani IC, Campbell JJ, Knight MM, Williams A, Lee DA, Bader DL, et al. Dynamic compressive strain influences chondrogenic gene expression in human periosteal cells: A case study. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012;11:72-81.
- 27- McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell.* 2004;6(4):483-95.
- 28- Wang H, Riha GM, Yan S, Li M, Chai H, Yang H, et al. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(9):1817-23.
- 29- Sun J, Luo Q, Liu L, Song G. Low-level shear stress induces differentiation of liver cancer stem cells via the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway. *Exp Cell Res.* 2019;375(1):90-6.
- 30- Yue D, Zhang M, Lu J, Zhou J, Bai Y, Pan J. The rate of fluid shear stress is a potent regulator for the differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2019;234(9):16312-9.
- 31- Huang S, Chen CS, Ingber DE. Control of cyclin D1, p27Kip1, and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Mol Biol Cell.* 1998;9(11):3179-93.
- 32- Young EW, Wheeler AR, Simmons CA. Matrix-dependent adhesion of vascular and valvular endothelial cells in microfluidic channels. *Lab Chip.* 2007;7(12):1759-66.
- 33- Liu L, Jiang H, Zhao W, Meng Y, Li J, Huang T, et al. Cdc42-mediated supracellular cytoskeleton induced cancer cell migration under low shear stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;519(1):134-40.
- 34- Li Z, Kupcsik L, Yao SJ, Alini M, Stoddart MJ. Mechanical load modulates chondrogenesis of human mesenchymal stem cells through the TGF- $\beta$  pathway. *J Cell Mol Med.* 2010;14(6a):1338-46.
- 35- Ferrell N, Desai RR, Fleischman AJ, Roy S, Humes HD, Fissell WH. A microfluidic bioreactor with integrated transepithelial electrical resistance (TEER)
- 4- Yao J, Zhu G, Zhao T, Takei M. Microfluidic device embedding electrodes for dielectrophoretic manipulation of cells-A review. *Electrophoresis.* 2019;40(8):1166-77.
- 5- Giridharan V, Yun Y, Hajdu P, Conforti L, Collins B, Jang Y, et al. Microfluidic platforms for evaluation of nanobiomaterials: A review. *J Nanomater.* 2012;2012:789841.
- 6- Mina SG, Wang W, Cao Q, Huang P, Murray BT, Mahler GJ. Shear stress magnitude and transforming growth factor- $\beta$ 1 regulate endothelial to mesenchymal transformation in a three-dimensional culture microfluidic device. *RSC Adv.* 2016;6(88):85457-67.
- 7- Feng Sh, Mao S, Zhang Q, Li W, Lin JM. Online analysis of drug toxicity to cells with shear stress on an integrated microfluidic chip. *ACS Sens.* 2019;4(2):521-7.
- 8- Kim TH, Lee JM, Ahrberg CD, Chung BG. Development of the microfluidic device to regulate shear stress gradients. *BioChip J.* 2018;12(4):294-303.
- 9- Ma C, Geng B, Zhang X, Li R, Yang X, Xia Y. Fluid shear stress suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells through extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) signaling pathway. *Med Sci Monit.* 2020;26:e918370-1-9.
- 10- Zhang J, Wei X, Zeng R, Xu F, Li X. Stem cell culture and differentiation in microfluidic devices toward organ-on-a-chip. *Future Sci OA.* 2017;3(2):FSO187.
- 11- Chikamori M, Kimura H, Inagi R, Zhou J, Nangaku M, Fujii T. Intracellular calcium response of primary cilia of tubular cells to modulated shear stress under oxidative stress. *Biomicrofluidics.* 2020;14(4):044102.
- 12- Schneider I, Baumgartner W, Gröninger O, Stark WJ, Märsmann S, Calcagni M, et al. 3D microtissue-derived human stem cells seeded on electrospun nanocomposites under shear stress: Modulation of gene expression. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020;102:103481.
- 13- Chen ZZ, Yuan WM, Xiang Ch, Zeng DP, Liu B, Qin KR. A microfluidic device with spatiotemporal wall shear stress and ATP signals to investigate the intracellular calcium dynamics in vascular endothelial cells. *Biomech Model Mechanobiol.* 2019;18(1):189-202.
- 14- Zhang B, Xie F, Shao Sh, Aziz A, Li W, Deng Sh, et al. Heat shock protein 27 phosphorylation regulates tumor cell migration under shear stress. *Biomolecules.* 2019;9(2):50.
- 15- Moghadas H, Saidi MS, Kashaninejad N, Nguyen NT. Challenge in particle delivery to cells in a microfluidic device. *Drug Deliv Transl Res.* 2018;8(3):830-42.
- 16- Delon LC, Guo Z, Kashani MN, Yang CT, Prestidge C, Thierry B. Hele Shaw microfluidic device: A new tool for systematic investigation into the effect of the fluid shear stress for organs-on-chips. *MethodsX.* 2020;7:100980.
- 17- Lin JY, Lo KY, Sun YS. A microfluidics-based wound-healing assay for studying the effects of shear stresses, wound widths, and chemicals on the wound-healing process. *Sci Rep.* 2019;9(1):20016.
- 18- Yan Z, Su G, Gao W, He J, Shen Y, Zeng Y, et al. Fluid shear stress induces cell migration and invasion via activating autophagy in HepG2 cells. *Cell Adhes Migr.* 2019;13(1):152-63.
- 19- Moshksayan K, Kashaninejad N, Warkiani ME, Lock JG, Moghadas H, Firoozabadi B, et al. Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture. *Sens Actuators B Chem.* 2018;263:151-76.

efficient culture and analysis of renal tubular cells. *Lab Chip*. 2010;10(1):36-42.

40- Oo ZY, Deng R, Hu M, Ni M, Kandasamy K, Bin Ibrahim MS, et al. The performance of primary human renal cells in hollow fiber bioreactors for bioartificial kidneys. *Biomaterials*. 2011;32(34):8806-15.

41- Ferrell N, Ricci KB, Groszek J, Marmorstein JT, Fissell WH. Albumin handling by renal tubular epithelial cells in a microfluidic bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(3):797-803.

42- Huh D, Torisawa YS, Hamilton GA, Kim HJ, Ingber DE. Microengineered physiological biomimicry: Organs-on-chips. *Lab Chip*. 2012;12(12):2156-64.

43- Jang KJ, Mehr AP, Hamilton GA, McPartlin LA, Chung S, Suh KY, et al. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integr Biol*. 2013;5(9):1119-29.

measurement electrodes for evaluation of renal epithelial cells. *Biotechnol Bioeng*. 2010;107(4):707-16.

36- Chen H, Yu Z, Bai S, Lu H, Xu D, Chen C, et al. Microfluidic models of physiological or pathological flow shear stress for cell biology, disease modeling and drug development. *TrAC Trends Anal Chem*. 2019;117:186-99.

37- Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol*. 2011;21(12):745-54.

38- Raimondi MT, Boschetti FE, Falcone L, Fiore GB, Remuzzi A, Marinoni E, et al. Mechanobiology of engineered cartilage cultured under a quantified fluid-dynamic environment. *Biomech Model Mechanobiol*. 2002;1(1):69-82.

39- Jang KJ, Suh KY. A multi-layer microfluidic device for