

تغییر شکل غشا سلول های سرطانی ریه تحت تاثیر مدول یانگ متفاوت بستر کشت بر پایه ی آگار

دل آرام ملک^۱، مهدی زکی پور^۲، منصور علیزاده^{۳*}

^۱ کارشناس ارشد مهندسی پزشکی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران.

^۲ کارشناس ارشد مهندسی پزشکی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران.

^۳ استادیار مهندسی مکانیک، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: منصور علیزاده

چکیده

هیدروژل، شبکه پلیمری سه بعدی نامحلول در آب است که توانایی جذب مایعات بدن را در محیط بیولوژیکی دارد. هیدروژل ها به دلیل دارا بودن ساختاری شبیه به ماتریکس خارج سلولی و توانایی جذب آب در کاربردهای مختلف پزشکی از قبیل مهندسی بافت و عوامل درمانی دارد همچنین توانایی تقلید ساختاری ماتریکس خارج سلولی را دارا هستند. تومور ها دارای ویژگی های منحصر به فردی هستند که آنها را از سلولهای سالم و طبیعی متمایز می کند. یکی از ویژگی های مختص به سرطانی تغییرات ساختاری و مکانیکی سلول ها است که به آنها اجازه می دهد سریعاً جدا شوند، حرکت کنند و در میکرومحیط حمله کنند. تغییرات مکانیکی تومور ها سلول های سرطانی تنها محدود به خود سلول های سرطانی نیست و مدول یانگ محیط هایی که سلول ها روی آن قرار دارند در این امر تاثیر دارد. افزایش مدول یانگ به تنهایی با افزایش سختی خود سلول های سرطانی ایجاد نمی شود و سختی ماتریس سلولی تاثیر خیلی زیادی روی رفتار سلول دارد. و این ارتباط دو طرفه میان سلول های سرطان و محیط آنها نشانه های مهم سرطان مانند رشد کنترل نشده، کشیدگی غشا سلول های سرطانی و همچنین میزان چسبندگی سلول به محیط را مشخص میکند.

در این مقاله بستر هایی با خواص مکانیکی و مدول یانگ متفاوت برای سلول سرطانی ریه طراحی شده است و سلول ها روی این محیط ها کشت داده شده اند و کشیدگی غشا آن ها بررسی شده است. تومورهای مستحکم سرطانی دارای خصوصیات بدنی فوق العاده ای هستند که برای تشخیص سرطان و همچنین تصمیمات درمانی بسیار حیاتی باشد.

به طور کلی، مکانیک سلول های سرطانی با بافت طبیعی تفاوت زیادی دارد. بنابراین، این ویژگی باید بیشتر برای استفاده در پیشگیری از سرطان، تشخیص و درمان مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: مکانیوبیولوژی، مدول یانگ ماتریکس خارج سلول، مکانیک سلولی، مهندسی بافت

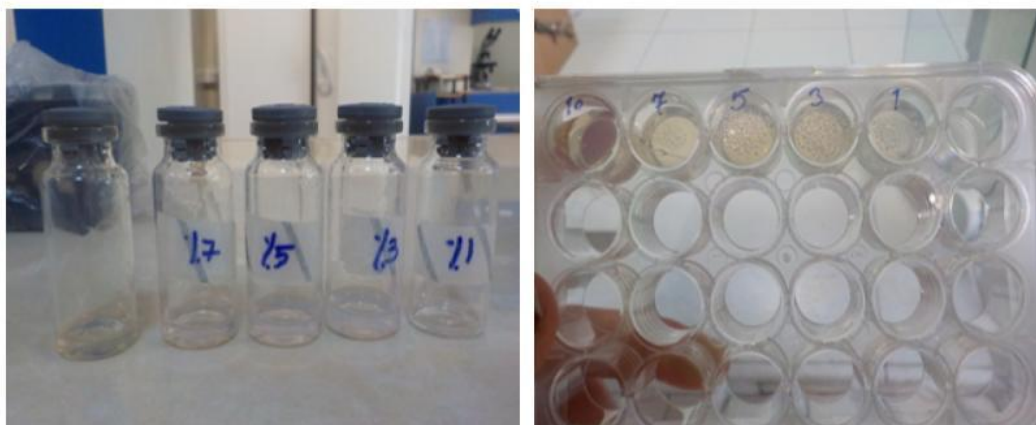
مقدمه

سرطان یک بیماری تکثیر سلولی کنترل نشده است که باعث حدود ۱۳ درصد از مرگ و میرها در سراسر جهان می شود. مکانیک سلول های سرطانی در حال حاضر موضوع مهمی برای بررسی در تشخیص سرطان است. مکانیک ریز محیط تومور نقشی در هدایت توسعه سرطان و تبدیل آن دارد. فرآیندهای تهاجمی ماتریکس خارج سلولی جزء مهمی از ریز محیط است. اجزای این ساختار منظم در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی حاوی خواص شیمیایی، فیزیکی و مکانیکی منحصر به فردی است که شامل: هموستاز، تمایز و مهاجرت و تغییر در ساختار غشا است. درمخصوصه سرطان تولید بیش از حد پروتئین های ماتریکس خارج سلولی از جمله کلاژن I، II، III، V، و IX است که منجر به فیبروز بافتی می شود و این به نوبه خود سفتی ریز محیط تومور را در مقایسه با تومور افزایش می دهد. سفت شدن فشار رفتار سلولی را کنترل می کند و اندازه سلول های سرطانی را تحت تأثیر آن قرار می دهد. علاوه بر این، سازماندهی رشته های کلاژن برای تأثیر آن بر سلول های تومور حیاتی است. اگر الیاف به صورت دسته های موازی دور تومور را احاطه کنند، تهاجم مهار می شود. با این حال، اگر فیبرها عمود بر لبه تومور در یک راستا قرار گیرند، تهاجم تسهیل می شود. فیبروبلاست های موجود در استرومای تومور، که فیبروبلاست های مرتبط با سرطان نیز شناخته می شوند، اغلب در اثر تأثیر عمیقی که بر تومورزایی دارند، دست کم گرفته می شوند. همچنین مکانیک تومور را به شدت تحت تأثیر قرار می دهد. بر حسب آزمایش های زیاد مشاهده شده است که این فیبروبلاست ها دارای ظرفیت ذخیره و سازماندهی مجدد پروتئین های ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن هستند و این می تواند ابزاری برای تشخیص سلول های بدخیم از سلول های طبیعی علاوه بر افزایش درک ما از پاتوفیزیولوژی بیماری باشد. شرایط کشت سلولی به عنوان عامل مهمی که بر مکانیک سلولی تأثیر می گذارد و باید مورد توجه قرار گیرد. شرایط کشت سلولی و تغییر مکانیک سلول های سرطانی میتواند در سازماندهی اکتین بین سلول های بدخیم و طبیعی تیروئید نقش داشته باشد. سلول ها واحد ساختمانی پایه ای تمام موجودات زنده محسوب می شوند. سلول ها همچنین حاوی مواد وراثتی بدن هستند و می توانند از روی خودشان نسخه برداری کنند. سلول ها بخش های زیادی دارند که هر کدام عملکرد مختلفی دارد. بعضی از این بخش ها که آن را اندامک می خوانیم ساختارهای تخصص یافته ای هستند که کارهای خاصی را در سلول اجرا می کنند. در زیست شناسی سلولی، هسته جزئی از سلول است که در بیشتر سلولهای یوکاریوتی وجود دارد و حاوی اکثر اطلاعات ژنتیکی است. هسته به طور کلی دو وظیفه دارد که شامل کنترل واکنش های شیمیایی درون سیتوپلاسم و نگاه داشتن اطلاعات لازم برای تقسیم سلولی است. این هسته یکپارچگی ژنها را حفظ می کند و فعالیت سلول را با تنظیم بیان ژن کنترل می کند. بنابراین هسته مرکزی مرکز کنترل سلول است. سلولهای سرطانی تعدادی ویژگی خاص دارند که آنها را از سلولهای سالم و طبیعی متمایز می کند. یکی از تغییرات اولیه مربوط به سرطانزایی تغییرات ساختاری و مکانیکی سلول ها است که به آنها اجازه می دهد سریعاً جدا شوند، حرکت کنند و در میکرومحیط حمله کنند. دنیای درون سلول با دنیای بیرون آن دائماً در حال تبادل و ارتباط هستند و هر تغییری در ساختار محیط خارجی سلول رخ بدهند سلول و هسته ی هوشمند سلول آن را حس میکند و باعث ایجاد تغییراتی در سلول میشود. علاوه بر این، میکرو محیط مکانیکی سلول ممکن است با تحت تأثیر قرار دادن فرایندهایی مانند ایجاد کلتی، تغییر در شکل غشا سلول، پیشرفت سرطان را افزایش دهد. ماتریکس خارج سلولی یک سیستم پویا است که به طور مداوم توسط سلول های ساکن در آن بازسازی می شود. این به نوبه خود سلول های مجاور را تحت تأثیر قرار می دهد تا رفتار آنها را تغییر دهند. سفتی ماتریکس خارج سلولی در بافت های بدن متفاوت است مثلاً در بافت های سخت مثل استخوان بیشتر از بافت های نرم است. علاوه بر این، مشخص شده است که این سختی تأثیر عمیقی بر رفتار سلول ها دارد. سختی ریز محیط بسترهای ماتریسی متشکل از هیدروژل ها به راحتی قابل اندازه گیری است که می تواند با تنظیم غلظت نسبی تغییر کند. خواص بیومکانیکی ماتریکس خارج سلولی مانند ویسکوالاستیسیته یا مدول یانگ آن نیز می تواند در توسعه و پیشرفت بیماری تأثیر بگذارد. ماتریکس خارج سلولی پشتیبانی مکانیکی را برای سلول های اطراف فراهم می کند و انواع سیگنال های بیوشیمیایی و بیوفیزیکی که بر رفتار سلولی تأثیر می گذارد را ایجاد میکند.

در این مقاله هیدروژل هایی با مدول یانگ و خواص مکانیکی مختلف ساخته شده و سپس سلول های سرطانی روی آن ها کشت داده شده و فونوتیپ غشا آن ها بررسی شده است. به مدت ۲۴ ساعت و بطور پیوسته رفتار سلول های سرطانی تحت خواص مکانیکی مختلف با میکروسکوپ مشاهده و بررسی شد و نتیجه ای که گرفته شده این است که هرچقدر خواص مکانیکی یا مدول یانگ هیدروژل ها و بستر کشت بیشتر میشود سلول های سرطانی از این سختی محیط تاثیر گرفته و بیشتر و محکم تر به بستر میچسبند و غشا آن ها بیشتر کشیده میشود و اصطلاحاً دست و پا میکشند.

روش پژوهش

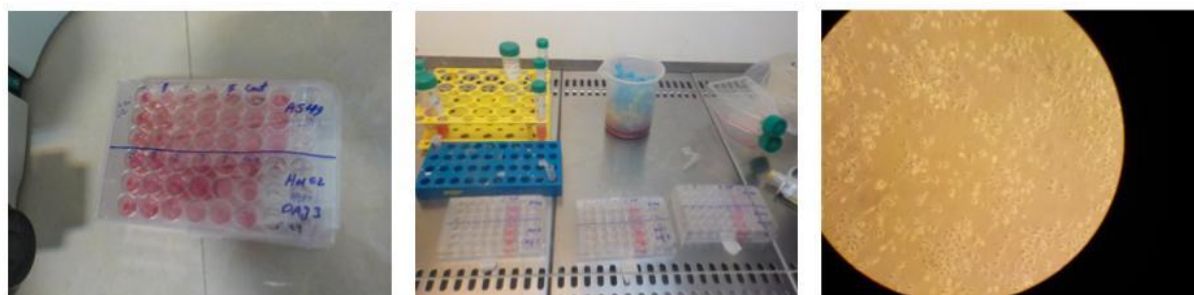
ابتدا مراحل انجام شده برای ساخت هیدروژل ها و انجام آزمایش های سلولی را بررسی میکنیم. ما در این آزمایش، ژل هایی با غلظت های ۱-۳-۵-۷-۱۰ ساختیم و سلول های سرطانی ربه را روی این هیدروژل ها کشت دادیم و نتایج را با میکروسکوپ مشاهده کردیم. (شکل ۱)



شکل (۱) مراحل آماده سازی هیدروژل ها

برای ساخت هیدروژل ها نیاز به پودر آگار و آب مقطر و ترازوی دیجیتال حساس و ورتکس داریم. ابتدا میزان گرم مورد نظر را با ترازوی حساس اندازه گیری میکنیم و سپس با آب مقطر داخل فالدون ۵۰ به وسیله ی ورتکس مخلوط میکنیم و این کار را به قدری ادامه میدهم تا ژل همگن و یکنواخت ما به دست بیاید. دستگاه ورتکس آزمایشگاهی وسیله پرکاربرد است که در بیشتر آزمایشگاه ها برای مخلوط کردن نمونه های داخل ویال ها یا لوله ها با حجم کم کاربرد دارد و حرکت چرخشی و حالت اوربیتالی روی محور خود را دارد. برای اینکه بتوانیم هیدروژل با مدول یانگ یا سختی های مختلف به دست بیاوریم باید غلظت هیدروژل ها را تغییر دهیم یعنی برای افزایش سفتی هیدروژل ها باید مقدار گرم پودر آگار بیشتری در یک حجم معین حل کنیم تا به غلظت مورد نظر برسیم. برای مثال برای درست کردن مدول یانگ هیدروژل ۵ درصدی، ۵ گرم پودر آگار به وسیله ی ترازوی حساس اندازه گیری میشود و سپس در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به وسیله ی ورتکس حل میشود. بعد از گذشت یک ربع یک هیدروژل کاملاً یکنواخت و همگن خواهیم داشت. در سیستم کشت سلول های جانوری، به دلیل کشت سلول های جدا شده از یک میزبان پرسلولی، به وجود آوردن شرایط یکسان با هومئوستازی میزبان بسیار حائز اهمیت می باشد. باید توجه داشت که در پستانداران سیستم گوارشی با هضم مواد غذایی کمپلکس، ترکیبات ساده قابل جذب برای سلول ها فراهم کرده و توسط سیستم گردش خون

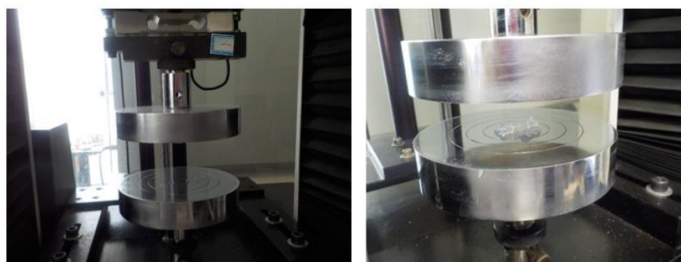
این ترکیبات را در سراسر بدن در معرض سلول ها قرار می دهد. محیط کشت کامل مخصوص سلول های جانوری عموماً از بخش های ثابتی تشکیل شده است. دو بخش عمده تشکیل دهنده یک محیط کشت کامل، محیط کشت پایه و سرم می باشد. برخی اوقات برای رشد رده های سلولی خاص، مواد مغذی مخصوصی مورد نیاز است. محیط کشت پایه محیطی را فراهم می آورد تا سلول ها بتوانند درون آن محیط و در pH مناسب رشد کنند بعد از آماده سازی هیدروژل ها سلول های سرطانی که از بانک سلولی تهیه کردیم را دو بار پاساژ میدهیم تا برای تست گرفتن آماده باشند. سپس با استفاده از پروتکل های کشت سلولی و محیط کامل سلولی (DMEM + 10% FBS) سلول ها را روی هیدروژل ها کشت میدهیم و هر روز با میکروسکوپ آن ها را رصد میکنیم. (شکل ۲)



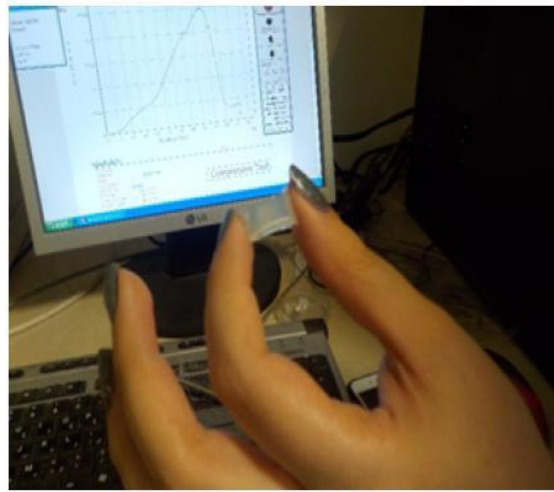
شکل (۲) مراحل انجام آزمایش

بحث و نتیجه گیری:

با انجام تست فشار مدول یانگ هیدروژل ها در مدت زمانی یک دقیقه اندازه گیری شده و یک مدول یانگ معادل به ازای اعمال یک تنش گرفته شد که در جدول زیر مقدار آن ها آورده شده است. (شکل ۳ و ۴) (جدول ۱)



شکل (۳) مراحل اندازه گیری مدول یانگ هیدروژل ها

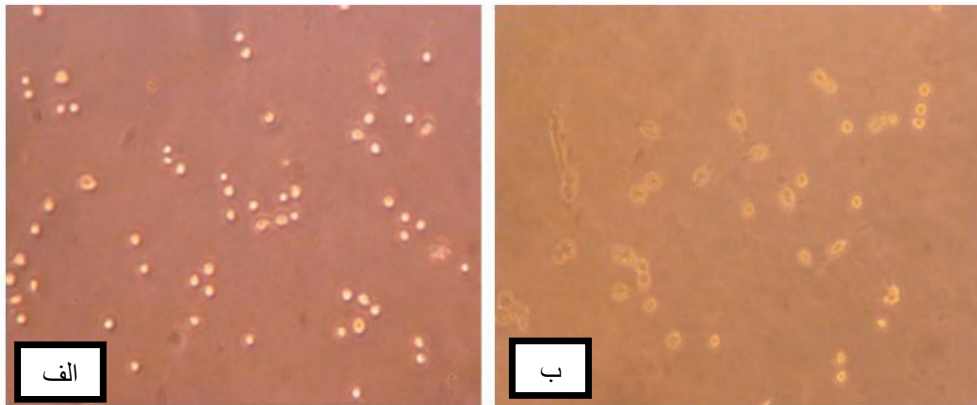


شکل (۴) نمونه ای از هیدروژل

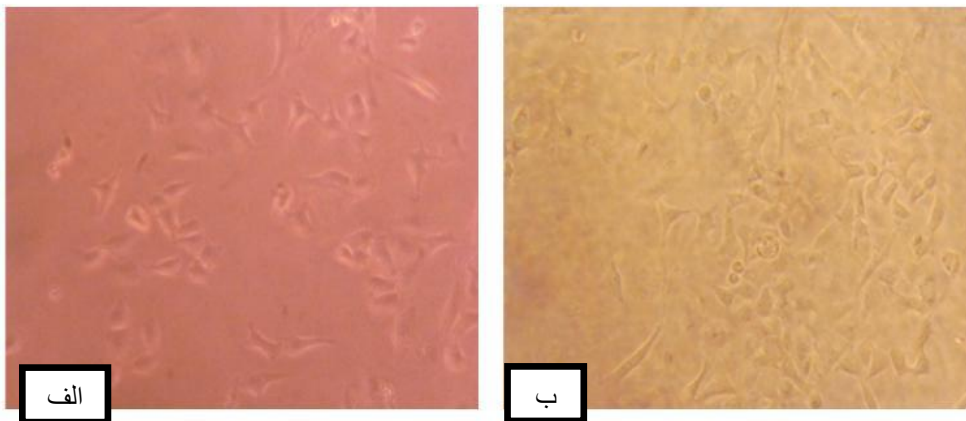
مدول یانگ [Mpa]	انرژی [J]	تنش [Mpa]	نیرو [N]	درصد آگار
۰,۲۹	-۲۳۳	-۰,۳	-۵۵	۱
۰,۳۱	-۱۹۸	-۰,۳	-۵۴	۳
۰,۵۷	-۸۵	-۰,۲	-۴۳	۵
۰,۷۹	-۷۹	-۰,۳	-۵۳	۷
۱	-۷۲	-۰,۳	-۵۳	۱۰

جدول ۱: داده های تست مدول یانگ برای هیدروژل ها بر پایه ی آگار

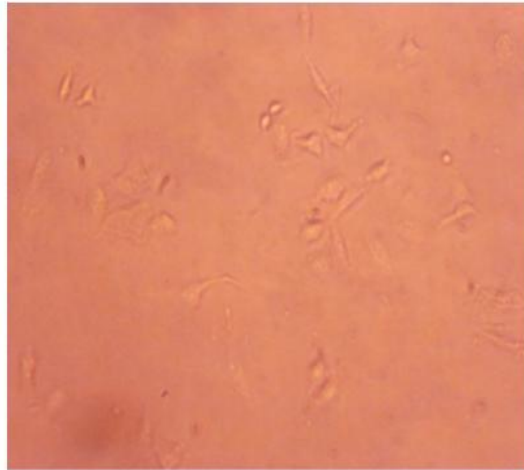
طبق پروتکل سلول های سرطانی ریه را روی هیدروژل ها با مدول یانگ و خواص مکانیکی مختلف بسترشان کشت می‌دهیم و حدود ۲۴ ساعت به طور متوالی این سلول ها را با میکروسکوپ دنبال می‌کنیم تا ببینیم چه رفتاری از خود نشان می‌دهند. با افزایش مدول یانگ و به تبع چسبندگی هیدروژل ها یا بستر کشت، غشا سلول های سرطانی بیشتر کشیده می‌شود و اصطلاحاً سلول ها دست و پای بیشتری میکشند. غشا سلول های سرطانی در هیدروژل ها به نسبت کنترل بیشتر کشیده شده است و این به این معنی است که سلول های سرطانی بستر های سفت را بیشتر دوست دارد و این یکی از مشخصه های سرطان می‌باشد چسبندگی زیاد بافت های بدن باعث ایجاد یک محیط بهینه برای ایجاد و رشد این سلول های سرطانی می‌شود. (شکل ۵ و ۶ و ۷)



شکل (۵) (الف) کشیدگی غشا سلولی در هیدروژل پنج در ساعت ۱ (ب) کشیدگی غشا سلولی در هیدروژل ده در ساعت ۱



شکل (۶) (الف) کشیدگی غشا سلولی در هیدروژل پنج در ساعت ۲۴ (ب) کشیدگی غشا سلولی در هیدروژل ده در ساعت ۲۴



شکل (۷) کشیدگی غشا در کنترل

هدف از تحقیق آزمایشگاهی این بود که مکانیک سلول های سرطانی با استفاده از علم مکانیک و ژنتیک بررسی شود و نیز با ساختن هیدروژل هایی با مدول یانگ برنامه ریزی شده، و القا این مدول یانگ بستر به هسته و ژن سلول دریچه ای برای تلاش های آتی سایر محققین باز شود و از جهتی دیگر برای استفاده در پیشگیری از سرطان، تشخیص و درمان مورد بررسی قرار گیرد. با افزایش مدول یانگ و به تبع چسبندگی هیدروژل ها یا بستر کشت، غشا سلول های سرطانی بیشتر کشیده میشود و اصطلاحاً سلول ها دست و پای بیشتری میکشند. البته محدودیت های زیادی از جمله تعداد کم داده ها، نبود بستر کافی برای بررسی بیشتر رفتار سلول ها، کم بودن رده های سلولی، نبود تجهیزات کافی آزمایشگاهی، مشکلات مربوط به بیماری کووید-۱۹ و تعطیلی بیش از حد آزمایشگاه ها و... در پیشبرد این تحقیق وجود داشت.

مراجع

- M. Prabhune, G. Belge, A. Dotzauer, J. Bullerdiek, and M. Radmacher, "Comparison of mechanical properties of normal and malignant thyroid cells," *Micron*, vol. 43, no. 12, pp. 1267–1272, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.micron.2012.03.023.
- P. Lu, V. M. Weaver, and Z. Werb, "The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression," *J. Cell Biol.*, vol. 196, no. 4, pp. 395–406, Feb. 2012, doi: 10.1083/jcb.201102147.
- X. Huang *et al.*, "Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 47, no. 3, pp. 340–348, Sep. 2012, doi: 10.1165/rcmb.2012-0050OC.
- S. E. Cross, Y.-S. Jin, J. Rao, and J. K. Gimzewski, "Nanomechanical analysis of cells from cancer patients," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 12, Art. no. 12, Dec. 2007, doi: 10.1038/nnano.2007.388.
- J. R. Tse and A. J. Engler, "Preparation of Hydrogel Substrates with Tunable Mechanical Properties," *Curr. Protoc. Cell Biol.*, vol. 47, no. 1, Jun. 2010, doi: 10.1002/0471143030.cb1016s47.

- R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, and C. S. Chen, "Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment," *Dev. Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 483–495, Apr. 2004, doi: 10.1016/s1534-5807(04)00075-9.
- G. C. Reilly and A. J. Engler, "Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation," *J. Biomech.*, vol. 43, no. 1, pp. 55–62, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.jbiomech.2009.09.009.
- S. F. Badylak, "Regenerative medicine and developmental biology: the role of the extracellular matrix," *Anat. Rec. B. New Anat.*, vol. 287, no. 1, pp. 36–41, Nov. 2005, doi: 10.1002/ar.b.20081.
- O. Chaudhuri *et al.*, "Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium," *Nat. Mater.*, vol. 13, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2014, doi: 10.1038/nmat4009.
- J. P. Winer, S. Oake, and P. A. Janmey, "Non-Linear Elasticity of Extracellular Matrices Enables Contractile Cells to Communicate Local Position and Orientation," *PLOS ONE*, vol. 4, no. 7, p. e6382, Jul. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0006382.
- A. J. Licup *et al.*, "Stress controls the mechanics of collagen networks," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 31, pp. 9573–9578, Aug. 2015.