

## طراحی و ساخت سامانه میکروفلوئیدیک به منظور آنالیز کمی مهاجرت سلولی در سطح تک سلولی

محمد قربانی، حسین سلیمانی، عبدالله اله وردی و حسین نادری منش\*

ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۲۳

### چکیده

مهاجرت سلول‌های سرطانی و حرکت آنها در طول رگها و مویرگها از مراحل اولیه و کلیدی در تهاجم سرطان است. در روشهای معمول بررسی مهاجرت سلولی امکان بررسی ناهمگونی سلولها و همچنین شبیه سازی مرحله محدود کننده تهاجم سلولی که عبور سلولها از مویرگها و رگهای لنفی را نداشته و اکثر روشهای آزمایشگاهی نقطه پایانی است. در مطالعه حاضر یک سیستم میکروفلوئیدیک برای مطالعه کمی مهاجرت و تهاجم سلولی با امکان بررسی ناهمگونی سلولها را فراهم شده است. در این سیستم میکروفلوئیدیک یکسری مسیرهای اصلی برای به دام افتادن سلولها تعبیه شده است. در ادامه یکسری کانالهای عمود بر کانالیهای اصلی با قطر ۱۰ میکرومتر وجود داشته که در واقع شبیه سازی مویرگها و رگهای لنفی هستند. مهاجرت سلولی در فرایند تهاجم نیازمند گرادیان از ترکیبات جذب کننده سلولی است. نتایج تنوری نشان دهنده عملکرد صحیح سیستم میکروفلوئیدیک در ایجاد گرادیان پایدار از ترکیب جذب کننده سلولی است. در راستای بررسی عملکرد صحیح چپ میکروفلوئیدیک تستهای زنده مانی سلولی در داخل سیستم میکروفلوئیدیک، بررسی مهاجرت سلولی دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 و آنالیزهای کمی حرکت سلولی در این دو رده سلولی انجام شد. نتایج زنده مانی سلولی نشان دهنده عملکرد صحیح چپ میکروفلوئیدیک در ایجاد شرایط مناسب برای رشد سلولی است. مهاجرت سلول در چپ میکروفلوئیدیک در چپ با افزایش اختلاف غلظت ماده جذب کننده افزایش یافته که نشان دهنده ایجاد شیب گرادیان مناسب چپ میکروفلوئیدیک است. طبق نتایج چپ مهاجرت سلولی در رده سلولی MDA-MB-231 بیشتر از رده سلولی MCF-7 است. همچنین میانگین حرکت سلولی برای دو رده سلولی MDA-MB-231 و MCF-7 ۲۲/۱ میکرومتر بر ساعت و ۱۸/۴ میکرومتر بر ساعت به دست آمد. نتایج به دست آمده از سیستم میکروفلوئیدیک مورد اشاره با نتایج قبلی همسو است. این سیستم میکروفلوئیدیک امکان مطالعه مهاجرت سلولی در سطح تک سلولی و همچنین ناهمگونی سلولی را فراهم می کند. و در پایان، چپ میکروفلوئیدیک ذکر شده امکان مطالعه اثر دارو ها بر روی تهاجم و حرکت سلولهای سرطانی را فراهم می کند.

واژه های کلیدی: مهاجرت سلولی، سیستم میکروفلوئیدیک، تهاجم سلولی، سرطان پستان

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۴۱۰، پست الکترونیکی: naderman@modares.ac.ir

### مقدمه

هاست. در برخی سرطانها نظیر سرطان پروستات و پستان چندین ترکیب مشخص شده که در مهاجرت سلولهای سرطانی به محل‌های ثانویه نقش به سزایی دارند (۴، ۵، ۷ و ۱۲).

تهاجم سلولی در واقع حرکت سلولها از تومور اولیه از طریق مویرگها و رگها خونی و لنفی به مناطق دورتر و لانه گزینی آنها در آنجاست. برای مثال متاستاز سرطان پروستات به مغز استخوان بسیار اندک است. متاستاز یک فرایند سلولی چند مرحله ای و متأثر از برخی کموکاین

همکاران یک چیپ میکروفلوئیدیکی سه بعدی جهت مطالعه حرکت سلولی و بررسی اثر عوامل محیطی بر روی مهاجرت سلولی طراحی کردند (۹).

سیستم‌های میکروفلوئیدیکی به واسطه فراهم کردن ساختار های میکرومتری و نیاز به مقادیر اندک سلول و مواد مورد استفاده و همچنین فراهم کردن شرایط برای مطالعه در سطح تک سلولی بسیار مورد توجه هستند. در این راستا برای برطرف کردن محدودیتهای موجود در این روش یک سیستم میکروفلوئیدیکی برای مطالعه مهاجرت سلولی در سطح تک سلولی طراحی شد. در این سیستم از مسیر های باریک میکرومتری برای شبیه سازی مویرگها و رگهای لنفی که نقش اصلی را در مهاجم سلولهای سرطانی برعهده داشته استفاده شده است (۱). در این سیستم یکسری ساختار های کاسه مانند برای به دام انداختن سلولها طراحی شد و در ادامه ساختار های مویرگی برای حرکت سلولی طراحی شد. سیستم میکروفلوئیدیکی مورد اشاره شرایط را برای مطالعه ناهمگونی سلولهای سرطانی و بررسی فنوتیپیک آن را فراهم خواهد کرد.

### مواد و روشها

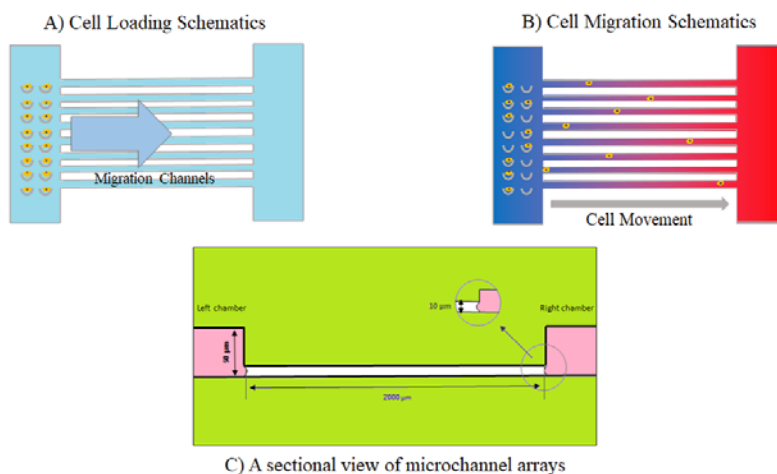
**لیتوگرافی و ساخت سیستم میکروفلوئیدیکی:** این سیستم میکروفلوئیدیکی شامل دو مسیر اصلی با قطر ۱۰۰ میکرومتری و ارتفاع ۳۰ میکرومتری در سمت راست و چپ ساختار است. در قسمت بینابینی این دو مسیر اصلی یکسری کانالهای با قطر ۱۰ میکرومتری و ارتفاع ۱۰ میکرومتری تعبیه شد. طول این ساختار ها ۱۰ میکرومتری ۲۰۰۰ میکرومتر است. این قسمت نقش اصلی را در این طراحی برعهده داشته و در واقع شبیه ساز ساختار های مویرگی و رگهای لنفی را در سیستم برعهده دارند. این ساختار شکل گرفته بر روی پلیمر پلی دی متیل سولفان را با استفاده از پلاسما کلینر به صورت کوالان بر روی لامل سائز بزرگ ( ۲/۵ و ۵/۰) میلی متر قرار داده شد. قبل از انتقال سلولها به داخل چیپ کانال مربوط به ورودی سلول

مهاجرت سلولی یکی از مهم ترین فرایندهای سلولی در بسیاری از مکانیسمهای سلولی نظیر مهاجم سلولی، رگ زایی و شکل گیری جنین نقش دارد. در فرایند مناساز ( مهاجم سلولی ) در سرطانها مهاجرت سلولی نقش اصلی را برعهده دارد. مهاجم سلولی یک فرایند چند مرحله ای هست، که در هر مرحله شامل یکسری فرایند های آبشاری است (۲، ۳ و ۱۰). یکی از مراحل محدود کننده در فرایند مهاجم سلولی حرکت سلولهای سرطانی در جهت ماده شیمیایی از محل تومور اولیه به سمت مویرگها و رگهای لنفی است (۱۳). تکنیکهای محدودی برای مطالعه فرایند مهاجم سلولی در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد. در حال های حاضر روشهای مطالعه مهاجرت سلولی نظیر Transwell و Wound-healing در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار می گیرد (۷ و ۱۸). با این وجود این روشها آزمایشات نقطه پایانی بوده و اطلاعاتی در مورد حرکت تک تک سلولها و فنوتیپ ناهمگون آنها در اختیار محققان قرار نمی دهد. در یک روش دقیق مطالعه مهاجرت سلولی، یافته هایی نظیر امکان مطالعه در طی زمان حرکت سلولها، مطالعه تک سلولی، نیاز به مقادیر اندک سلولی و کنترل گردیان ماده جذب کننده سلولی قابل دست یابی است (۱۱).

در دهه اخیر تکنولوژی میکروفلوئیدیکی با قابلیت‌هایی نظیر حجم نمونه کم، دقت بالا، سرعت بالا، هزینه پایین و ساده سازی فرایند به یک روش بسیار پرکاربرد برای بسیاری از حوزه های مطالعات پایه و بالینی به ویژه در حوزه سرطان تبدیل شده است (۱، ۱۶ و ۱۷). سیستم میکروفلوئیدیکی امکان شبیه سازی شرایط تومور و فرایند های سلولی نظیر مهاجم برای مطالعه مهاجرت سلولی و بررسی اثرات دارو را فراهم می کند. برای مثال ژانگ و همکاران چیپ میکروفلوئیدیکی که برای مطالعه در حجم بالا مهاجرت سلولی فراهم کرده اند (۲۰). نگین و همکاران یک چیپ میکروفلوئیدیکی مهاجرت سلولی بر پایه امپدانس الکتریکی طراحی کرده اند (۱۹). در مطالعه ای دیگر برسینی و

به صورت استریل انجام شد. ( پس از آن کانال ورودی سلول را با محلول بافر فسفات برای شستن فیبرونکتین های متصل نشده شسته شد.

را با استفاده از محلول فیبرونکتین ( ۵۰ نانو گرم بر میلی لیتر ) تیمار شد. سپس سیستم میکروفلوئیدیک را به مدت ۱ ساعت در داخل انکوباتر با شرایط دمای ۳۷ سانتی گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد قرار گرفت. ( تمامی مراحل



شکل ۱- تصویر شماتیک (A) فرایند انتقال سلول به داخل چیپ، (B) فرایند مهاجرت سلولی در طول کانالهای ۱۰ میکرومتری چیپ و (C) تصویر از مقطع عرض از چیپ میکروفلوئیدیک

عدد رینالدز: تعیین آرام یا آشفته بودن جریان را نشان می دهد. اگر عدد رینالدز از یک مقدار کمتر باشد جریان آرام و اگر بیشتر باشد جریان آشفته است. در واقع عدد رینالدز نشان دهنده نسبت لختی به گرانیروی است.

**کشت سلولی:** رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 از بخش سلولی پژوهشگاه رویان تهیه شد. برای کشت سلولی این دو رده سلولی از محیط کشت DMEM High-Glc ( gibco ، آمریکا ) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی ( gibco ، آمریکا ) و ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین ( gibco ، آمریکا ) استفاده شد.

**تست زنده ماننی سلولی:** در این روش سلولها بعد از ۴۸ ساعت کشت در داخل سیستم میکروفلوئیدیک با استفاده از روش Calcein-AM and PI رنگ آمیزی شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت الیمپوس IX81 در دو طول موج ۴۸۵-۵۳۰ و ۵۳۰-۶۱۵ عکس برداری صورت گرفت. شدت رنگ فلورسنت سبز به سبز و قرمز نشان

شبیه سازی گرادیان ماده جذب کننده در چیپ میکروفلوئیدیک توسط کامسول: شبیه سازی این بخش با استفاده از برنامه شبیه سازی کامسول مولتی فیزیک نسخه 5.3a استفاده شد. ابتدا ساختار چیپ میکروفلوئیدیک با استفاده از بخشهای طراحی برنامه ذکر شده ایجاد شد. در سیستم ذکر شده، جریان ورودی در این سیستم نزدیک به ۰/۹ میلی لیتر بر ثانیه اعمال شد. از طرف دیگر دانسیته و ویسکوزیته جریان نیز در محدوده ۱۰۰۰ کیلوگرم بر مترمکعب و ۰/۹ میلی پاسکال بر ثانیه در نظر گرفته شد. محدوده کانالها ۱۰ میکرومتر است و عدد رینالدز برای این سیستم ۰/۰۹ است. زمانی که عدد رینالدز برای سیستمها به زیر ۱ می رسد، معادلات جریانهای creeping در بررسی این سیستمها ضروری است.

$$Re = \frac{\rho UL}{\mu}$$

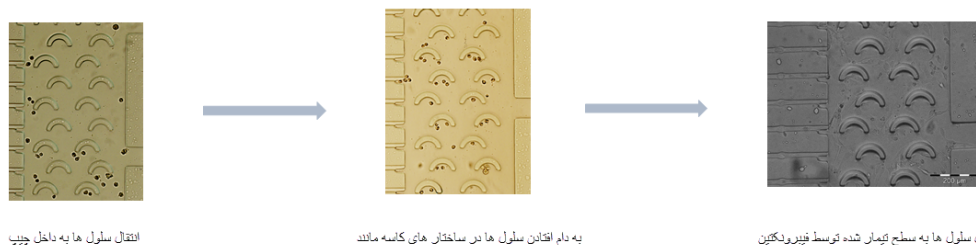
Re عدد رینالدز،  $\mu$  ویسکوزیته،  $\rho$  دانسیته، U مشخصات سرعت جریان، L مشخصات فیزیکی سیستم

شد. در ادامه ۲۰ میکرولیتر از این محلول سلولی در ورودی سلول قرار داده شد و به آرامی سلولها در طول کانال در محل کاسه‌ها به دام افتاد شکل (۲). همزمان در قسمت مقابل ورودی سلولی محلول محیط کشت سلولی حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی تزریق شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت حرکت سلولی در چیپ میکروفلوئیدیک بررسی شد.

دهنده درصد زنده مانی سلولهاست که شدت رنگ سبز و قرمز با استفاده از برنامه ImageJ به دست آمد.

**تست مهاجرت سلولی:** سلولهای کشت داده شده در فلاسک سلولی با استفاده از تریپسین - EDTA ۰/۰۵ درصد و سانتیفریوژ در ۲۰۰ g به مدت ۵ دقیقه جدا شد. سپس سلولها در محلول محیط کشت فاقد سرم جنین گاوی حل کرده و محلول نهایی ۵۰۰ هزار سلول بر میلی لیتر استفاده

### مراحل انتقال سلول به داخل چیپ میکروفلوئیدیک و اتصال به سطح



انتقال سلول ها به داخل چیپ

به دام افتادن سلول ها در ساختار های کاسه مانند

اتصال سلول ها به سطح تیار شده توسط فیروئدکین

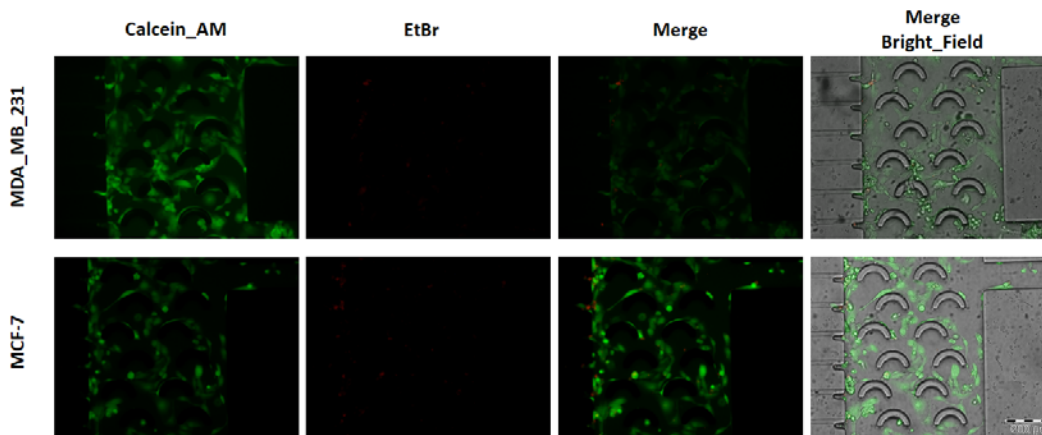
شکل ۲- تصاویر مربوط به مراحل مختلف انتقال سلولها به داخل چیپ میکروفلوئیدیک و همچنین اتصال آن به بستر چیپ میکروفلوئیدیک (بزرگنمایی تمامی تصاویر بالا ۲۰۰ میکرومتر است، که در تصویر سمت راست قابل مشاهده است.)

محاسبه شد. نتایج نشان می دهد در هر دو روش زنده مانی سلولها بالای ۹۰ درصد است و تمامی شرایط کشت سلول در داخل چیپ برای رشد و زنده مانی سلولها فراهم شده است.

**شبیه سازی شیب گرادیان ماده جذب کننده در سیستم میکروفلوئیدیک:** مطالعات متعددی حکایت از نقش گرادیان فاکتور های رشد، کموکینها در القای حرکت سلولهای سرطانی را در سیستم گردش خون برعهده دارد (۶). دو راه اصلی برای تهیه شیب گرادیان وجود دارد. (۱) استفاده از میکروکانالهای hoc شکل که با جریانهای با گردیان مواد امکان تهیه شیب غلظت را فراهم می سازد. (۲) استفاده از توانایی سلولها در ترشح مواد بیوشیمیایی و ایجاد یک شیب گرادیان در راستای میکروکانال. تهیه سیستمهای گرادیان به عنوان یک سیستم پویا و پرکاربرد در بیولوژی و پزشکی در حال توسعه است (۱۵).

### نتایج

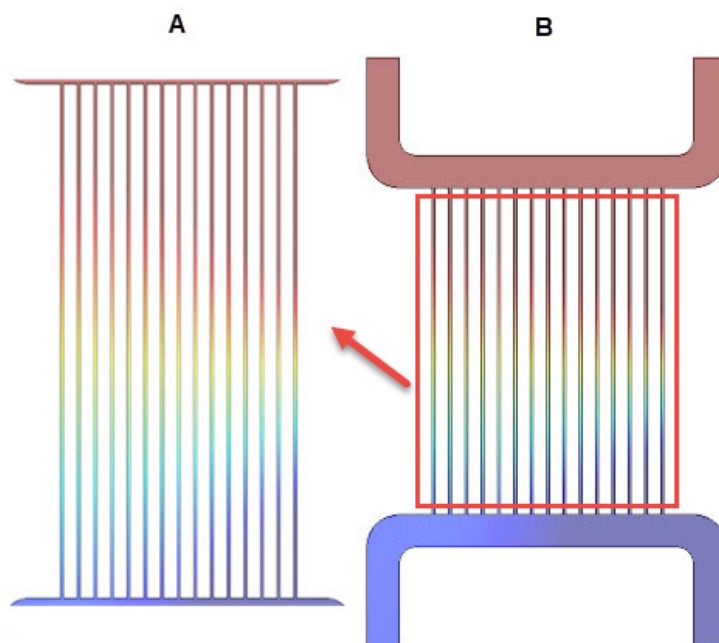
**مطالعه زنده مانی سلولی در سیستم میکروفلوئیدیک:** بعد از آماده سازی سیستم میکروفلوئیدیک در راستای مطالعه زنده مانی سلولها دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 در سیستم میکروفلوئیدیک از روش Calcein-AM & PI بهره برده شد. بعد از قرار دادن سلولها در چیپ میکروفلوئیدیک، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتر سلولی قرار داده شد. سپس با استفاده از روش ذکر شده زنده مانی مطالعه شد. در شکل (۳) رنگ قرمز در واقع معرف سلولهای مرده است، که مقادیر آن در هر دو رده سلولی بسیار اندک است شکل (۳). همچنین سلولهای سبز معرف سلولهای زنده بوده که همان طور که مشاهده می شود اکثر سلولها داخل چیپ میکروفلوئیدیک را شامل می شود. برای محاسبه درصد زنده مانی نسبت شدت رنگ سبز به مجموعه رنگ سبز و قرمز با استفاده از برنامه ImageJ



شکل ۳- بررسی زنده ماننی دو رده سلولی سرطان پستان در چیپ میکروفلوئیدیک با استفاده از روش Calcein-AM/PI (بزرگنمایی تمامی تصاویر بالا ۲۰۰ میکرومتر است، که در تصویر پایین راست نمایش داده شده است.)

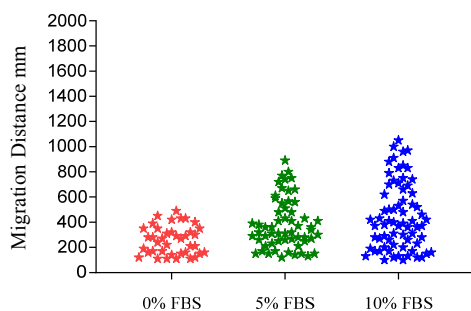
نتایج حاصل از شبیه سازی نشان دهنده ایجاد گردیان و پایداری آن در طول ۲۴ ساعت شبیه سازی است. در تمام کانالها شیب گرادیانی مشاهده می شود و تفاوت اندکی در این شیب گرادیانی وجود دارد. نتایج حاصل از شیب گرادیانی در شکل (۴) مشاهده می شود.

در بخش اول از طراحی چیپ در مطالعه حاضر تهیه شیب غلظت برای تحریک سلولها به مهاجرت در راستای شیب غلظت نیازمند است. علاوه بر این چنین شیب غلظتی باید دارای پایداری در مدت طولانی بوده تا چیپ در طول مطالعه امکان مهاجرت سلولها را فراهم کند.



شکل ۴- نتایج حاصل از شبیه سازی ایجاد شیب گرادیان در چیپ میکروفلوئیدیک با استفاده از برنامه کامسول ۵.۳- همان طور که مشاهده می کنید یک گردیان همگن و یک شکل در تمامی کانالها در چیپ میکروفلوئیدیک ایجاد شده است. در این شبیه سازی رنگ قرمز در واقع غلظت ۱ مولار و رنگ آبی غلظت صفر ماده جذب کننده است. گردیان ماده جذب کننده بعد از ۲۴ ساعت است. طبق انتظار به درستی شیب ماده جذب کننده در سیستم میکروفلوئیدیک ایجاد شده است.

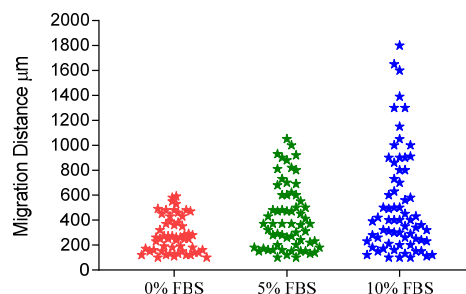
شد شکل (۵ و ۶). نتایج حاکی از حرکت سلولی سریع تر رده سلولی MDA-MB-231 نسبت به MCF-7 است. آنالیزهای آماری نشان می‌دهد متوسط مهاجرت سلولی دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 به ترتیب ۱۸/۴ میکرومتر بر ساعت و ۲۲/۱ میکرومتر بر ساعت است شکل (۵ و ۶). طبق انتظار رده سلولی MDA-MB-231 به واسطه پتانسیل تهاجمی بیشتر سرعت متوسط بالاتری نسبت به رده سلولی MCF-7 دارد. نتایج به دست آمده با نتایج قبلی در مورد حرکت سلولی در این دو رده سلولی مطابقت دارد (۸).



شکل ۶- اطلاعات کمی حرکت سلولهای رده سلولی MCF-7 در گرادیان سه غلظت ۰، ۵ و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی

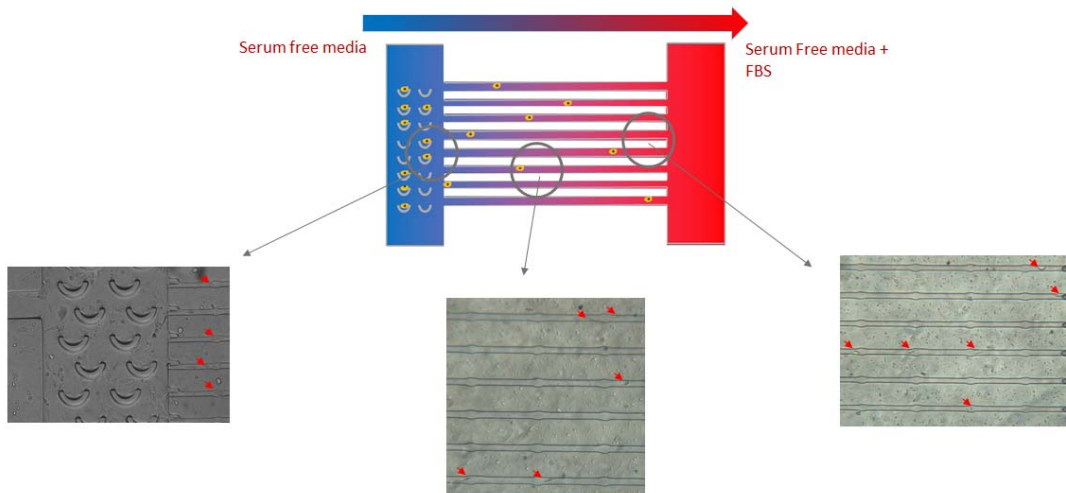
شکل (۷ و ۸)- نشان دهنده حرکت سلولها در طول کانال بعد از ۲۴ ساعت است. در شکل (۷) تصویر بالا مربوط به شکل شماتیک چیپ میکروفلوئیدیک و گرادیان ماده جذب کننده در طول چیپ میکروفلوئیدیک است. همان طور که مشخص است در سمت چپ چیپ میکروفلوئیدیک غلظت ۰ درصد سرم جنین گاوی وجود دارد در حالی که در سمت راست چیپ غلظت ۱۰ درصد سرم جنین گاوی وجود دارد. در سه تصویر پایین نیز موقعیت سلولها در بخشهای مختلف کانالهای ۱۰ میکرومتری مشاهده می‌شود. سلولهای حرکت کرده در طول کانالهای ۱۰ میکرومتری با فلش قرمز در تصویر نمایش داده شده است شکل (۷ و ۸). در واقع سلولها در این کانالهای میکرومتری بر پایه توانایی تهاجم و حرکت سلولی در طول کانالهای ۱۰ میکرومتری حرکت می‌کنند.

**تست مهاجرت سلولی:** در ابتدا با استفاده از دستگاه پلازما کلینر سطح پلی دی میتل سولفان به صورت کوالان به سطح لامل متصل گردید. جهت اتصال بهتر سلولها بستر مربوط به دام افتادن سلولها توسط فیبرونکتین یا پلی ال- لایزین و ترکیباتی این چنینی تیمار می‌شود (۱۴). بعد از تیمار مسیر مربوط به ورودی سلول با فیبرونکتین سلولها به آرامی وارد ورودی سلول شده و ورود سلول و به دام افتادن آن در کاسه های نعله اسبی مربوطه مشاهده می‌شود. جهت به دام افتادن سلول در سیستم میکروفلوئیدیک اشکال مختلفی طراحی شده نظیر ساختار های کاسه مانند، میله های با فواصل کم از ۱۰ میکرومتری. در مرحله بعدی چیپ میکروفلوئیدیک در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت قرار داده سپس بررسی حرکت آن مطالعه خواهد شد.

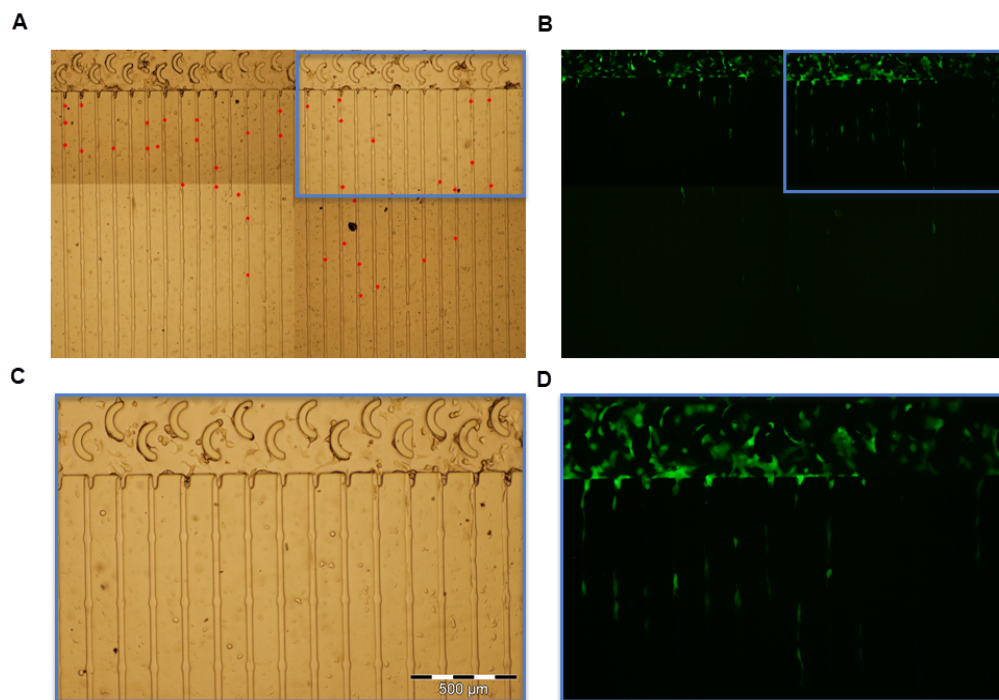


شکل ۵- اطلاعات کمی مهاجرت سلولهای رده سلولی MDA-MB-231 در گرادیان سه غلظت ۰، ۵ و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی ( نمودار بالا یک نمودار پراکنش سلولها در طول کانال مهاجرت است، و هر ستاره در واقع نشانگر موقعیت یک سلول در طول کانالهای مهاجرت چیپ میکروفلوئیدیک است).

در این مرحله برای بررسی و تأیید گرادیان در چیپ میکروفلوئیدیک از غلظتهای ۰، ۵ و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی برای ایجاد آن استفاده گردید. برطبق انتظارات با افزایش اختلاف غلظت ماده جذب کننده سلولی حرکت سلولی نیز افزایش یافته که گواهی بر تأیید ایجاد شیب غلظت در سیستم میکروفلوئیدیک مدنظر است. همچنین برای بررسی حرکت سلولی دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 از این سیستم میکروفلوئیدیک استفاده



شکل ۷- تصاویری از چیپ میکروفلوئیدیک، جهت حرکت سلولها در چیپ و همچنین موقعیت سلولها در داخل کانالهای ۱۰ میکرومتری چیپ میکروفلوئیدیک



شکل ۸- تصویر فلورسنت و Bright field کامل چیپ میکروفلوئیدیک، سلولها در تصویر فلورسنت به رنگ سبز قابل مشاهده است، ( بزرگنمایی تصاویر C و D ۵۰۰ میکرومتر است و تصویر A و B از کنار هم قرار گرفتن ۴ تصویر مشابه تصاویر C و D شکل گرفته است. )

### بحث

سرطانی دارای توانایی تهاجم سلولی یکسانی نیستند. ناهمگونی سلولهای سرطانی یکی از ویژگیهای اساسی سلولهای سرطانی است. در این راستا طراحی ابزاری جهت مطالعه تنوع سلولی با توانایی متفاوت تهاجم سلولی در

مهاجرت سلولهای توموری و متاستاز سلولهای سرطانی از طریق مویرگها از مراحل اولیه و کلیدی در طی تهاجم سلولهای سرطانی است، با این وجود تمامی سلولهای

شکل‌گیری شیب‌گردان از ماده مورد نظر در چپ میکروفلوئیدیک طراحی شده است. نتایج حاصل از شبیه‌سازی برنامه سلول‌حاکمی از شکل‌گیری و پایداری شیب‌ماده جذب‌کننده در چپ میکروفلوئیدیک است، و از سوی دیگر حرکت سلول‌ها در جهت شیب‌ماده جذب‌کننده و افزایش حرکت سلولی با افزایش اختلاف غلظت ماده جذب‌کننده در کانال‌های مهاجرت تعبیه شده در چپ میکروفلوئیدیک نیز تأیید‌کننده شکل‌گیری گردان ماده جذب‌کننده در طول کانال‌های مهاجرت است. مطالعه حرکت سلولی دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 در چپ میکروفلوئیدیک با نتایج قبلی مطابقت داشته و طبق انتظار رده سلولی MDA-MB-231 به واسطه پتانسیل مهاجمی بیشتر دارای متوسط حرکت سلولی بیشتری نسبت به رده سلولی MCF-7 است. این سیستم میکروفلوئیدیک امکان مطالعه مهاجرت سلولی در سطح تک سلولی و همچنین ناهمگونی سلولی را فراهم می‌کند. همچنین چپ میکروفلوئیدیک ذکر شده امکان مطالعه اثر دارو‌ها بر روی مهاجم و حرکت سلول‌های سرطانی را فراهم می‌کند. در نهایت سیستم ذکر شده امکان مطالعه اثر مواد مختلف بر روی حرکت سلولی و نقش جذب‌کنندگی یا دفع‌کنندگی آنها در حرکت سلولی را داراست.

جهت غلبه بر مکانیسم متاستاز بافت‌های سرطانی بسیار حائز اهمیت است. روش‌های معمول در مطالعه مهاجرت سلولی اکثراً به صورت آزمایش‌های نقطه پایانی بوده و اطلاعاتی در مورد حرکت سلولی در سطح سلولی و تنوع سلولی از نظر ویژگی‌های مهاجمی سلولی در مجموعه‌های سلولی در اختیار محققان قرار نمی‌دهد. سیستم‌های میکروفلوئیدیک به عنوان ابزاری مناسب برای مطالعه فرایند‌های در سطح تک سلولی با دقت بالا مطرح است. از این رو، در مطالعه پیش‌رو سیستم میکروفلوئیدیک با امکان مطالعه مهاجرت سلولی با امکان بررسی در سطح تک سلولی و ناهمگونی سلولی را فراهم شده است. در طراحی چپ میکروفلوئیدیک حاضر، دارای مزیت‌هایی نظیر شبیه‌سازی شرایط مشابه متاستاز سلول‌ها در بافت‌های سرطانی که در روش‌های معمول بررسی مهاجرت سلولی امکان پذیر نیست. همچنین به واسطه وجود کانال‌های ۱۰ میکرومتری، ساز و کار مهاجم سلولی نظیر عبور سلول‌های سرطانی از مویرگ‌ها و رگ‌های لنفی در طی متاستاز شبیه‌سازی شده است. یافته‌های زنده‌مانی سلول‌ها در داخل چپ حکایت از زنده‌مانی بالای ۹۰ درصد در هر دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 را دارد. در واقع این نشان‌دهنده طراحی مناسب چپ برای اتصال و زنده‌مانی سلول در داخل چپ است. نتایج تئوری و آزمایشگاهی تأیید‌کننده

#### منابع

- 1- A. Allahverdi, H. Naderi-manesh, E. Keshavarz, M. Sedghi, Surface modification in microfluidic platform to miR-21 and miR-486 detection from lung cancer cell, *Journal of cellular and molecular research*, (2019)
- 2- B.A. Yoshida, M.M. Sokoloff, D.R. Welch, C.W. Rinker-Schaeffer, Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field, *Journal of the National Cancer Institute* 92 (2000) 1717-1730.
- 3- B.M. MOTOVALI, F. Kouhkan, Z. Hojati, The role of snp in Fibroblast collagenase gene with increasing of metastasis risk and viability reduction in Breast cancer patients, *Journal of cellular and molecular research*(2014).
- 4- C.L. Chaffer, R.A. Weinberg, A perspective on cancer cell metastasis, *science* 331 (2011) 1559-1564.
- 5- D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *cell* 100 (2000) 57-70.
- 6- G.M. Walker, J. Sai, A. Richmond, M. Stremmer, C.Y. Chung, J.P. Wikswo, Effects of flow and diffusion on chemotaxis studies in a microfabricated gradient generator, *Lab on a Chip* 5 (2005) 611-618.
- 7- I.J. Fidler, The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited, *Nature reviews cancer* 3 (2003) 453.



- 8- J. Gao, L. Li, M. Wu, M. Liu, X. Xie, J. Guo, H. Tang, X. Xie, MiR-26a inhibits proliferation and migration of breast cancer through repression of MCL-1, *PLoS one* 8 (2013) e65138.
- 9- J.S. Jeon, S. Bersini, M. Gilardi, G. Dubini, J.L. Charest, M. Moretti, R.D. Kamm, Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (2015) 214-219.
- 10- N. Sethi, Y. Kang, Unravelling the complexity of metastasis—molecular understanding and targeted therapies, *Nature Reviews Cancer* 11 (2011) 735.
- 11- P.B. Gupta, C.M. Fillmore, G. Jiang, S.D. Shapira, K. Tao, C. Kuperwasser, E.S. Lander, Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells, *Cell* 146 (2011) 633-644.
- 12- P. Friedl, S. Alexander, Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity, *Cell* 147 (2011) 992-1009.
- 13- P.S. Steeg, Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges, *Nature medicine* 12 (2006) 895.
- 14- S. Mi, Z. Du, Y. Xu, Z. Wu, X. Qian, M. Zhang, W. Sun, Microfluidic co-culture system for cancer migratory analysis and anti-metastatic drugs screening, *Scientific reports* 6 (2016) 35544.
- 15- X. Wang, Z. Liu, Y. Pang, Concentration gradient generation methods based on microfluidic systems, *RSC Advances* 7 (2017) 29966-29984.
- 16- Y.-C. Chen, S.G. Allen, P.N. Ingram, R. Buckanovich, S.D. Merajver, E. Yoon, Single-cell migration chip for chemotaxis-based microfluidic selection of heterogeneous cell populations, *Scientific reports* 5 (2015) 9980.
- 17- Y.-H.V. Ma, K. Middleton, L. You, Y. Sun, A review of microfluidic approaches for investigating cancer extravasation during metastasis, *Microsystems & Nanoengineering* 4 (2018) 17104.
- 18- Y. Huang, B. Agrawal, D. Sun, J.S. Kuo, J.C. Williams, Microfluidics-based devices: New tools for studying cancer and cancer stem cell migration, *Biomicrofluidics* 5 (2011) 013412.
- 19- Y. Li, T. Xu, H. Zou, X. Chen, D. Sun, M. Yang, Cell migration microfluidics for electrotaxis-based heterogeneity study of lung cancer cells, *Biosensors and Bioelectronics* 89 (2017) 837-845.
- 20- Y. Zhang, W. Zhang, L. Qin, Mesenchymal mode migration assay and antimetastatic drug screening with high-throughput microfluidic channel networks, *Angewandte Chemie International Edition* 53 (2014) 2344-2348.

## Design and Fabrication of a Microfluidic Device for Quantitative Analysis of Single Cell Migration and Invasive Assay

Ghorbani M., Soleymani H., Allahverdi A. and Naderi-Manesh H.

Dept. of Biophysics, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran.

### Abstract

The cell migration and movement is a critical step in metastasis processes and moved from initial tumor to secondary through capillaries of lymphatic systems. Conventional methods for cell migration studies have significant limitation in study of cell heterogeneity and simulated the limited step in metastasis process which is moved cell through capillaries of lymphatic systems. Moreover, all of these systems are endpoint assays. In our study, we designed a microfluidic chip to study of cell migration, metastasis properties of cells and cell heterogeneity of cancer cells. In our designed pattern, there are several trapping shapes in main channel which the cells trapped in these positions. In addition, the narrow channels were designed in front of main channels which cell migrate through it and simulated the capillary of the lymphatic systems during metastasis process. In order to investigate the cell migration, we monitored the viability of the cells in microfluidic chip and the cell migration properties of MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines and carried out statistical analysis on cell migration properties of both cell lines. Our results showed the microfluidic chip support cell growth on both cell lines. The theoretical and experimental results indicated the gradient of chemoattractant agent was generated in microfluidic chip. Our findings show that the mean velocity of MDA-MB-231 cells were greater than MCF-7 cells. Based on our result, the mean velocity of MCF-7 and MDA-MB-231 cell line were  $18.4 \mu\text{m.h}^{-1}$  and  $22.1 \mu\text{m.h}^{-1}$ . The statistically analysis of cell migration in microfluidic chip showed the migrations results derived from microfluidic chip are consistent with previous results. This microfluidic device can help to study of cell heterogeneity of cancer cells at single cell level. Finally, this microfluidic chip can be used as a drug screening drug on cancer cells and how the anticancer drugs can affect on cells at single cell level.

**Key words:** Cell migration, Microfluidic approaches, metastasis properties, Breast cancer