

Designing and Constructing the Microfluidic System and Evaluating its Ability to Produce IL-2 by Jurkat Cells

Mohammad Reza Mehrabi¹,
Masoud Soleimani²,
Saeed Abroun²,
Mohammad Vasei³,
Mohammad Hossein Moghadasi¹

¹ PhD Student, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received April 14, 2014 ; Accepted September 28, 2014)

Abstract

Background and purpose: Microfluidic systems are microstructures that could be used to improve the conventional cell culture protocols used in laboratories. The aim of this research was to design and construct the microfluidic system and evaluating its ability to produce IL-2 by jurkat cells.

Material and methods: At first, the sketch of microfluidic canals was designed by Corel draw and was built on poly dimethyl siloxan using soft lithography. After embedding entry and exit pores, it was attached to glass slide via oxygen plasma technique. It was then connected to a pump containing RPMI1640 culture medium by 3 μ L/hour speed. Afterwards, Jurkat cells were inoculated in the system. In the course of incubation, a continuous flow of culture medium and stimulants were encountered with cells in system canals. Simultaneously, the cells were cultured in flasks regarding proliferation and IL-2 production. The cultured cells were then compared with microfluidic system.

Results: The rate of proliferation and IL-2 production by jurkat cells was about twice in microfluidic system compared with that of the conventional cell culturing method and the system did not show negative effect on cell viability.

Conclusion: Microfluidic system can create a condition similar to the in-vivo for proliferation and production of cell culture products due to dynamic condition resulted from continuous flow of food and waste removal. Moreover, this system showed higher performance and consumed less culture medium and materials, so it could be used as an alternative method for conventional cell cultures.

Keywords: Microfluidic system, Jurkat cell, cell culture, Interleukin-2

طراحی و ساخت سیستم میکروفلوئیدی و ارزیابی قابلیت آن جهت تولید اینترلوکین ۲ توسط سلول‌های جورکت

محمد رضا مهرابی^۱

مسعود سلیمانی^۲

سعید آبرون^۲

محمد واسعی^۳

محمد حسین مقدسی^۱

چکیده

سابقه و هدف: سیستم‌های میکروفلوئیدی ریزسازه‌هایی هستند که جهت تحقق کامل پروتوکل‌های کشت سلولی مرسوم در آزمایشگاه به کار گرفته می‌شوند. هدف این پژوهش طراحی و ساخت سیستم میکروفلوئیدی و ارزیابی قابلیت آن جهت تولید اینترلوکین ۲ توسط سلول‌های جورکت بود.

مواد و روش‌ها: ابتدا نقشه کانال‌های سیستم میکروفلوئیدی با نرم افزار کورل دراو طراحی و با استفاده از لیتوگرافی نرم روی پلیمر پلی دی متیل سیلوکسان ساخته شد و پس از تعبیه سوراخ‌های ورودی و خروجی روی آن، به کمک روش اکسیژن پلازما روی اسلاید شیشه‌ای چسبانیده و به یک پمپ حاوی محیط کشت ۱۶۴۰ RPMI با سرعت ۳ میکرولیتر در ساعت متصل گردید. سپس سلول‌های جورکت در سیستم تلقیح شدند. در تمام مدت انکوباسیون جریان پیوسته‌ای از محیط کشت و مواد محرک در کانال‌های این سیستم با سلول‌ها برخورد داشت. همزمان سلول‌ها در فلاسک نیز کشت داده شدند سپس از نظر تکثیر و تولید اینترلوکین با سیستم میکروفلوئیدی مقایسه شدند.

یافته‌ها: نتایج پژوهش حاکی از میزان تکثیر و تولید اینترلوکین ۲ توسط سلول‌های جورکت در سیستم میکروفلوئیدی، به مقدار تقریبی دو برابر نسبت به کشت معمول بود ضمن آن که این سیستم روی حیات سلول‌ها نیز اثر منفی نگذاشت. **استنتاج:** سیستم میکروفلوئیدی به دلیل ایجاد شرایط دینامیکی حاصل از جریان پیوسته مواد غذایی و حذف مواد زائد می‌تواند تقریباً شرایطی مشابه درون بدن برای تکثیر و تولید فرآورده‌های سلولی ایجاد کند علاوه بر این به دلیل کارایی بالاتر، مصرف مواد و محیط کشت به مراتب کم‌تر، می‌تواند جانسازین روش‌های کشت سلولی مرسوم گردد.

واژه‌های کلیدی: سیستم میکروفلوئیدی، سلول جورکت، کشت سلول، اینترلوکین ۲

مقدمه

یافته است اما از بسیاری جهات مانند ظروف کشت و مواد مورد استفاده در کشت‌های سلولی هنوز هم روش‌های امروزی شباهت زیادی به کشت سلول‌های قورباغه

بیش از یک صد سال از کشت سلول‌های پستانداران در آزمایشگاه می‌گذرد هر چند طی این مدت درک دانشمندان از زیست‌شناسی سلولی و مولکولی افزایش

E-mail: soleim_m@modares.ac.ir

مؤلف مسئول: مسعود سلیمانی - تهران: تقاطع بزرگراه چمران و آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. استاد، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۴/۲۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۷/۶

توسط هاریسون در سال ۱۹۰۷ دارد (۱).

در فلاکس ها و ظروف کشت مرسوم هیچ کنترلی بر توزیع فضایی سلول ها و بیومولکول های مورد نیاز آن ها وجود ندارد و بسیاری از نیازهای شیمیایی و تاثیرات فیزیکی سلول ها در تعامل با یکدیگر و ماتریکس خارج سلولی بر آورده نمی شود. ضمن آن که به تدریج محدودیت عرضه مواد غذایی و انباشت محصولات زائد حاصل از سوخت و ساز سلول ها روی غلظت فاکتورهای محلول رشد تاثیر گذاشته و پاسخ سلول به یک دارو یا ماده شیمیایی می تواند متأثر از محیط نامطلوب متابولیک آن تغییر کند. اخیرا به منظور بهبود شرایط کشت سلولی و شبیه سازی محیط درون بدن سیستم های میکروفلوئیدی پا به عرصه ظهور گذاشته اند (۲،۳).

سیستم های میکروفلوئیدی ریزسازه هایی می باشند که می توانند جهت تحقق کامل پروتکل های انجام شده در آزمایشگاه های سنتی به کار روند علاوه بر آن مزایایی همانند اندازه کوچک تر، زمان آنالیز و واکنش کم تر، مصرف نمونه و معرف کم تر، کاهش خطر آلودگی، افزایش حساسیت، بالا بردن اعتبار و مهم تر از همه توانایی اجرای چند فرآیند متوالی یا موازی در یک سیستم یکپارچه دارند. سیستم میکروفلوئیدی را می توان با استفاده از انواع فرآیندهای ساخت ریزسازه ها از موادی مثل پلی مر، شیشه، سیلیکون و فلزات، برحسب نوع نیاز ساخت. وسایل میکروفلوئیدی که بر پایه پلی دی متیل سیلوکسان (Polydimethylsiloxane= PDMS) ساخته شده اند چندویژگی مفید دارند که عبارتند از: الاستیسیتی، دوام، سازگاری زیستی، شفافیت نوری، نفوذپذیری گازی، عدم سمیت و هدایت الکتریکی پایین (۴). این سیستم یک روش جدید برای کشت سلول ها در میکروکانال هایی است که توانایی کنترل موضعی ریز محیط سلولی را به ما می دهد (۳،۵). ضمن آن که مواد به کار رفته در ساخت آن غیرفعال بوده و روی سلول ها اثرات سمی ندارد (۶). اما از سوی دیگر به دلیل توپوگرافی ایجاد شده روی سلول ها به صورت فعال،

تاثیرگذار است. به طوری که می توان تاثیرات ژئومتری، روی بقا سلول ها را با این تکنیک بررسی کرد (۷،۸). همچنین کنترل مکانی و زمانی در مقیاس میکرومتر (۱۰۰-۰/۱) امکان مطالعات عملی در حدی کم تر از اندازه یک سلول را امکان پذیر می کند (۹). برای ساخت سیستم میکروفلوئیدی با استفاده از PDMS از لیتوگرافی نرم استفاده می شود. فن آوری لیتوگرافی نرم شامل مجموعه ای از روش های ساخت و همانندسازی ساختارها با استفاده از مهرهای الاستومری (Stamps)، قالب و فتوماسک های منطبق شدنی است (۱۰).

در این پژوهش از سلول های جورکت (Jurkat) که دودمان لوسمیک سلول T (CD4⁺) هستند جهت تولید اینترلوکین ۲ استفاده شد (۱۱). این سلول ها در سطح خود گیرنده های کمو کاینی را به میزان کم بیان می کنند (۱۲). همچنین این سلول ها قادرند آنتی ژن FAS را روی سطح خود بیان کنند (۱۳). فعال شدن سلول T به طور طبیعی از طریق واکنش گیرنده سطح سلول با لیگاند اختصاصی اش آغاز می شود. این اتصال باعث آغاز سریع هیدرولیز اینوزیتول فسفولیپید به دی اسیل گلیسرول و ایتوزیتول فسفات بوسیله فسفولیپاز C (Phospholipase C= PLC) می شود. دی اسیل گلیسرول فعال کننده آلوستریگ پروتئین کیناز C (Protein kinase C=PKC) در سیتوپلاسم می باشد و اینوزیتول فسفات باعث رهاسازی کلسیم دی یونیزه و مجموعه ای از پاسخ های سلولی می گردد که حاصل آن فعال شدن سلول و تولید و ترشح اینترلوکین ۲ می باشد. در هنگام رشد طبیعی سلول میزان تولید این سیتو کاین بسیار ناچیز است. میتوژن فیتوهاگلو تینین (Phytohaemagglutinin= PHA) به تنهایی از طریق اتصال به کمپلکس گیرنده سطح سلول باعث فعال شدن سلول T به میزان کم و تولید اینترلوکین ۲ می گردد. اما وقتی سلول های جورکت به وسیله PMA (PHORBOL 12-MYRISTATE 13-ACETATE) با همراهی PHA تحریک می شوند از طریق فعال کردن پروتئین کیناز C، میزان تولید اینترلوکین ۲ به شدت

افزایش می‌یابد (۱۴-۱۷).

در این تحقیق، برای اولین بار در کشور سعی شده است تا با طراحی ابتکاری میکروکانال‌ها در یک سیستم پرفیوژن، ابزار میکروفلوئیدی برای استفاده در آزمایشگاه‌های کشت سلولی به عنوان یک بیوراکتور معرفی شود. در همین راستا از سلول‌های جورکت که در شرایط القایی قدرت تولید نیز دارند برای بررسی توان و تاثیرات احتمالی این میکروبیوراکتور بر روی رفتار سلول در مقایسه با روش مرسوم کشت سلول، سود برده شد.

مواد و روش‌ها

دی متیل سولفواکسید (DMSO)، فیتوهمانگلوتینین (PHA)، فوربول ۱۲ میریستات ۱۳ استات (PMA)، کیت الیزا برای اندازه‌گیری اینترلوکین ۲ و پنی‌سیلین و استرپتومایسین ساخت شرکت سیگما (SIGMA) - سرم جنین گاو (FBS) و محیط کشت RPMI1640 ساخت شرکت جیبکو (Gibco) - SU8-2015 ساخت شرکت MicroChem، پلی دی متیل سیلوکسان (PDMS) ساخت شرکت Dow Corning Sylgard - سلول‌های Jurkat (هدیه از شرکت بن یاخته) تهیه شد.

۱- کشت سلول‌های Jurkat

به ۶ فلاکس ۲۵ سانتی متر مربعی حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ و ۱۰ درصد FBS (سرم جنین گوساله) و ۱۰ میلی لیتر در لیتر پنی‌سیلین استرپتومایسین، تعداد $10^6 \times 0.5$ سلول در هر میلی لیتر اضافه شد. بعد فلاکس‌ها به سه گروه دوتایی تقسیم شدند و مواد زیر به هر گروه اضافه شد:

الف- دو فلاکس به عنوان گروه کنترل، فاقد مواد افزودنی.

ب- دو فلاکس با غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ فیتوهمانگلوتینین (PHA) (برای این منظور $10 \mu\text{L}$ از محلول ذخیره 0.5 mg/ml فیتوهمانگلوتینین تهیه شده در بافر فسفات نمکی (PBS) فیلتر و استریل شده و به هر فلاکس اضافه گردید).

ج- دو فلاکس با ۱ غلظت میکروگرم در میلی لیتر

PHA و ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر PMA (برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از محلول ذخیره PHA و ۲/۵ میکرولیتر از محلول ذخیره PMA $100 \mu\text{g/ml}$ میکروگرم در میلی لیتر PMA در DMSO) به هر فلاکس اضافه گردید (۱۸). سپس همه فلاکس‌ها فوراً به انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵ درصد CO_2 و رطوبت نسبی ۷۰ درصد منتقل شدند و در زمان‌های ۰، ۱۶، ۳۲، و ۴۸ ساعت پس از کشت، با برداشتن ۰/۵ میلی لیتر از سوپانسیون سلولی فلاکس، مقدار تولید اینترلوکین ۲ بررسی شد. به این ترتیب که سلول‌های برداشته شده ابتدا در در g ۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع بالای پلات سلولی رسوب نموده برداشته شد و مجدداً در g ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید سپس مایع شفاف و فاقد لاشه سلولی در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد و ظرف کم‌تر از ۲۴ ساعت آزمایش الیزا دوبار تکرار شد. در پایان ۴۸ ساعت تعداد سلول‌های باقیمانده در فلاکس‌ها به روش دستی با هموسیتومتر شمارش و درصد زنده بودن آن‌ها با رنگ آمیزی تریپان بلو تعیین شد.

۲- طراحی و ساخت سیستم میکروفلوئیدی

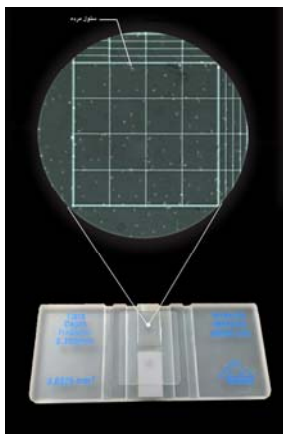
۱-۲- طراحی سیستم میکروفلوئیدی

در این پژوهش از نرم‌افزار کورل دراو (CorelDRAW) برای طراحی استفاده شد. در طراحی سعی شد نقشه کانال‌ها و جریان محیط کشت به گونه‌ای باشد که حداقل استرس به سلول‌ها در میکروکانال‌ها وارد آید به همین جهت فشار شکن‌ها و نحوه توزیع محیط بعد از هر بار طراحی میکروکانال‌ها به صورت عملی آزمایش گردید. هنگام طراحی با محاسبه عدد رینولد (زیر ۱۰۰) برای سیستم سعی شد از قبل استرس وارده به سلول‌ها کنترل و به حداقل برسد. در پایان، طرح بر روی فیلم چاپ شد.

۲-۲- قالب بندی با SU-8 (2015)

این ماده در صورت برخورد با اشعه ماورای بنفش پلی‌مریزه می‌گردد. برای تهیه قالب ابتدا روی یک ویفر سیلیکونی با استفاده از اسپینر (دور g ۲۰۰ به مدت ۴ دقیقه)،

منتقل شد. لازم به ذکر است محتویاتی که جهت رقیق‌سازی سلول‌ها و تغذیه آن‌ها در سرنگ قرار داده شد، یکبار شبیه محتوای محیط فلاکس گروه الف، یکبار شبیه گروه ب و یکبار هم شبیه گروه ج بود. در زمان‌های ۰، ۱۶، ۳۲ و ۴۸ مایع خروجی از سیستم میکروفلوییدی جمع‌آوری و پس از سانتریفوژ در ۱۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه مایع شفاف فوقانی برداشت و در یخچال نگهداری و ظرف ۲۴ ساعت جهت اندازه‌گیری اینترلوکین ۲ با کیت الیزا آزمایش شد. در پایان زمان ۴۸ ساعت، سلول‌ها از سیستم میکروفلوییدی خارج و با استفاده از روش دستی و لام هموسیتمتر شمارش شدند همچنین درصد زنده بودن آن‌ها با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو تعیین شد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: تصویر شمارش و تعیین درصد حیات سلول‌ها روی لام هموسیتمتر

۳- آنالیز آماری

نتایج حاصل از تولید اینترلوکین ۲ با آزمون Kruskal-Wallis و نتایج شمارش و زنده بودن سلول‌ها در فلاسک کشت و سیستم میکروفلوییدی با آزمون ANOVA آنالیز شد.

یافته‌ها

ابزار میکروفلوییدی با ابعادی مینیاتوری ساخته شد (تصویر شماره ۲).

SU-8 با ضخامت ۶۰ تا ۷۰ میکرون پخش شد. سپس روی ویفر پوشش یافته فیلم چاپ شده طرح ظهوریافته را قرار داده شد و این مجموعه در زیر اشعه ماورای بنفش (DEEP UV) گذاشته شد. قسمت‌هایی که با اشعه برخورد داشتند، پلی‌مریزه شده و قسمت‌هایی که زیر خطوط تیره طرح ظهوریافته واقع شده‌اند به دلیل عدم برخورد با اشعه پلی‌مریزه نشدند و در مرحله بعد با استفاده از یک حلال (اتیل لاکتات) شسته و حذف گردیدند.

۲-۳- تهیه ماکت پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان (PDMS Polydimethylsiloxane)

روی قالب (ویفر پوشیده شده از SU-8 با نقشه برجسته سیستم) تا ارتفاع ۳ میلی‌متر PDMS ریخته و روی پلیت داغ با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد تا پلی‌مریزه شود. سپس PDMS پلی‌مریزه شده از روی قالب جدا گردید. بعد از ذوب شدن از ایجاد تمامی فرورفتگی‌ها و برجستگی‌های طرح روی PDMS اطمینان حاصل شد. در واقع PDMS کپی مقابل قالب با استفاده از لیتوگرافی نرم است.

۲-۴- مونتاژ بیوراکتور

محل‌های ورود و خروج محیط کشت با استفاده از نیدل‌های فولادی روی PDMS ایجاد و با استفاده از تکنیک اکسیژن پلازما PDMS روی شیشه چسبانیده شد (۱۹-۲۱).

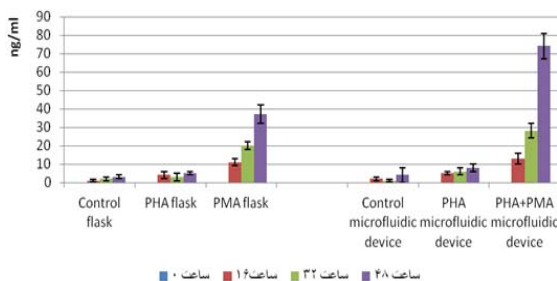
۲-۵- پس از عبور اتانل ۷۰ درصد از بیوراکتور یا سیستم میکروفلوییدی ساخته شده کل سیستم در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد.

۲-۶- سیستم میکروفلوییدی به کمک شلنگ‌های استریل باریک به یک سرنگ ۱ ml قرار گرفته در پمپ سرنگی SP-500 با سرعت ۳ $\mu\text{L}/\text{h}$ متصل شد. سپس سلول‌های Jurkat به تعداد $100 \mu\text{L}/\text{Cell}$ به سیستم تلقیح شدند و سیستم به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 و رطوبت نسبی ۷۰ درصد

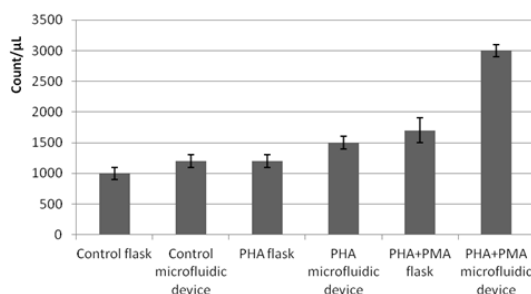
۴۸ ساعت در سیستم میکروفلوییدی تقریباً تولید اینترلوکین ۲ نسبت به فلاسک کشت دو برابر شده بود و آنالیز نتایج آزمون آماری Kruskal-Wallis تفاوت معنی داری را نشان داد ($p=0/033$) (نمودار شماره ۱). مقایسه نتایج شمارش سلول‌ها در دو سیستم میکروفلوییدی و فلاسک کشت در آزمون آماری ANOVA نشان‌دهنده تفاوت معنی دار تکثیر سلول‌ها در سیستم میکروفلوییدی بود ($p=0/000$; $CI=95\%$). به طوری که ۴۸ ساعت پس از آغاز کشت سلول‌ها در فلاسک کشت در حضور فیتوهمانگلوتینین و فیتوهمانگلوتینین به علاوه PMA به ترتیب تعداد سلول‌ها ($1200 \pm 100/mm^3$) و ($1700 \pm 200/mm^3$) و محرک‌ها در سیستم میکروفلوییدی به ترتیب ($1500 \pm 100/mm^3$) و ($3000 \pm 100/mm^3$) شد (نمودار شماره ۲). دو سیستم میکروفلوییدی و فلاسک کشت سلولی از نظر حیات سلولی (Viability test) در تفاوت معنی داری نداشتند (نمودار شماره ۳).



تصویر شماره ۲: مراحل ساخت و مونتاژ سیستم میکروفلوییدی ساخته شده. الف) تصویر چاپ شده نقشه کانال‌های سیستم میکروفلوییدی (پس از طراحی با نرم‌افزار کورل دراو) روی فیلم عکاسی با کیفیت بالا. ب) تصویر قالب ساخته شده بر روی ویفر سیلیکون با استفاده از SU-8. ج) تصویر ماکت PDMS پلی‌مریزه شده بر روی قالب SU-8 در یک پتری دیش. د) تصویر ماکت PDMS پس از ایجاد ورودی و خروجی کانال‌ها که روی یک اسلاید شیشه‌ای به وسیله اکسیژن پلاسما چسبانیده شده. ه) تصویر نحوه اتصال سیستم میکروفلوییدی به وسیله شلنگ باریک به پمپ SP-500 و برقراری جریان محیط کشت و مواد محرک.

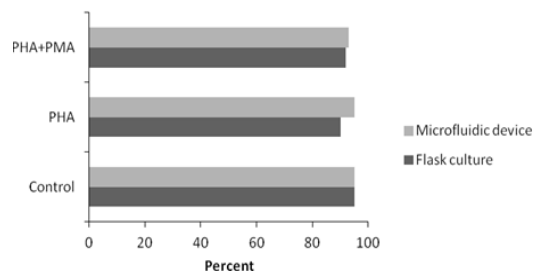


نمودار شماره ۱: مقایسه تولید اینترلوکین ۲ در فلاسک کشت سلول و سیستم میکروفلوییدی در زمان‌های مختلف در حضور محرک PHA و PMA+PHA با کنترل



نمودار شماره ۲: مقایسه شمارش سلول‌های جورکت در دو سیستم میکروفلوییدی و فلاسک کشت سلول ۴۸ ساعت پس از مجاورت با محرک PHA و PMA+PHA با کنترل

مقایسه تولید اینترلوکین ۲ در فلاسک کشت و سیستم میکروفلوییدی در غیاب مواد محرک (کنترل) حاکی از تولید در حد صفر این سیتوکین بود اما در حضور فیتوهمانگلوتینین مقدار تولید اینترلوکین ۲ در هر دو به میزان اندک افزایش یافت. به طوری که در فلاسک کشت ۳۲ و ۴۸ ساعت پس کشت سلول‌ها به ترتیب (3 ± 2) و (5 ± 1) نانوگرم در میلی‌لیتر اینترلوکین ۲ تولید شد. در حالی که در سیستم میکروفلوییدی این مقادیر به ترتیب (6 ± 2) و (8 ± 2) نانوگرم در میلی‌لیتر بود که نشان‌دهنده افزایش معنی دار تولید در سیستم میکروفلوییدی بود. در هر دو سیستم میکروفلوییدی و فلاسک کشت سلولی در حضور فیتوهمانگلوتینین و PMA مقدار تولید اینترلوکین ۲ متناسب با افزایش زمان، افزایش نشان داد. به طوری که این افزایش در فلاسک کشت ۳۲ و ۴۸ ساعت پس کشت سلول‌ها به ترتیب (20 ± 2) و (37 ± 5) نانوگرم در میلی‌لیتر و در سیستم میکروفلوییدی (28 ± 4) و (74 ± 7) نانوگرم در میلی‌لیتر بود به عبارت بهتر در پایان زمان



نمودار شماره ۳: مقایسه حیات سلولی (Viability) در دو سیستم میکروفلوییدی و فلاسک کشت ۴۸ ساعت پس از مجاورت با محرک PHA و PMA+PHA با کنترل

بحث

فن آوری سیستم‌های میکروفلوییدی در سال ۱۹۸۰ همراه با فن آوری سیستم میکروالکترومکانیکال گسترش یافت و توانایی واقعی تحقیق در روی یک تراشه (Lab_On_a_Chip = LOC) یا سیستم آنالیز میکروتوتال را فراهم نمود (۲۳،۲۲).

در این پژوهش با طراحی یک سیستم میکروفلوییدی سعی شد از طریق کنترل سطوح شیمیایی، ویژگی اندازه، هندسه فضایی و زمان بندی یک ریز محیط تعریف شده جهت آنالیز سلول‌ها ایجاد شود. چنین کیفیتی از نظر پیچیدگی شباهت زیادی به ریز محیط درون بدن برای سلول‌ها دارد (۲۴). تشابه بقا سلول‌ها در سیستم میکروفلوییدی و فلاسک کشت سلولی نشان دهنده عدم سمیت PDMS مورد استفاده و داشتن شرایط همانند برای زنده ماندن سلول‌های جورکت بود. سال‌ها است از سلول‌های جورکت به عنوان یک منبع مناسب برای تولید اینترلوکین ۲ استفاده می‌شود (۱۱). مقدار تولید اینترلوکین ۲ توسط این سلول‌ها در حضور میتوزن‌های مختلف مانند PHA و PMA افزایش می‌یابد. نتایج ما در هر دو سیستم میکروفلوییدی و فلاسک کشت روی این سلول‌ها حاکی از تاثیر بیش تر استفاده توام این دو ماده با هم بود که با تحقیقات انجام شده در فلاسک کشت توسط Caspi و همکارانش، روی این سلول‌ها کاملا مطابقت داشت (۲۵). Dash و همکارانش، نشان دادند ازدحام بیش از حد سلول‌ها در فلاسک کشت در مدت زمان رشد و

انکوباسیون، باعث افزایش مرگ سلولی و رها شدن آنزیم‌ها و محصولات حاصل از متلاشی شدن سلول‌های مرده می‌شود و علت کاهش اینترلوکین ۲ در سنجش آن‌ها تخریب احتمالی اینترلوکین ۲ به وسیله آنزیم‌های پروتئولیتیک آزاد شناخته شد (۲۶). این پژوهشگران میزان تولید اینترلوکین ۲ را نسبت به شمارش سلول‌ها در زمان‌های مختلف انکوباسیون مورد سنجش قرار دادند، یافته‌های آن‌ها نشان دهنده کندتر شدن تولید اینترلوکین ۲۳۰ ساعت پس از آغاز انکوباسیون بود. شاید به همین دلیل در پژوهش حاضر سرعت تولید اینترلوکین ۲ در سیستم میکروفلوییدی ۳۲ ساعت پس از شروع انکوباسیون روند تساعدی خود را ادامه داد ولی در فلاسک کشت تقریباً متوقف شد و ۴۸ ساعت پس از شروع انکوباسیون مقدار تولید اینترلوکین ۲ در سیستم میکروفلوییدی تقریباً به دو برابر میزان آن در فلاسک کشت سلول رسید. در تحقیقی که توسط Galesi و همکارانش انجام شد، بیشترین میزان اینترلوکین ۲ (۱۶۲ ng/ml) تولید شده توسط سلول‌های EL-4 در غلظت ۸۵۶ نانوگرم در میلی لیتر PMA اتفاق افتاد. آن‌ها نشان دادند که PMA قادر است با فعال کردن مسیرهای سیگنالی وابسته به PKC مانع آپتوز سلول‌ها شود و بقا سلول را تحریک کند (۲۷). Farrar و همکاران، قبلاً نشان داده بودند کاهش بقا سلول‌ها در هنگام افزایش غلظت PMA در محیط به دلیل تاثیر این ماده بر تعامل اینترلوکین ۲ با گیرنده‌اش روی سطح سلول‌ها است (۲۸). شاید بتوان گفت در سیستم میکروفلوییدی طراحی شده چون در تمام طول آزمایش غلظت ثابتی از مواد محرک جریان داشت سلول‌ها تحت تاثیر منفی غلظت این مواد قرار نگرفتند. فعال شدن سلول جورکت باعث تولید هر دو سیتوکاین اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما می‌گردد، که یکی به وسیله PHA و دیگری توسط PMA تحریک می‌شود (۲۹). به همین دلیل در پژوهش حاضر استفاده توام PMA و PHA اثر سینرژیک روی سلول‌ها داشت و افزایش بیش تر تکثیر و تولید سلول‌ها را در هر دو سیستم میکروفلوییدی و

میکروفلوئیدی باعث قرار گرفتن بهتر محرک‌های شیمیایی و بیوفیزیکی در دسترس سلول می‌شود و سلول‌ها با توجه به گرادیان غلظت و دستکاری وابسته به جریان بهتر تحریک می‌شوند (۳۵) با توجه به نقشی که کاسپازها در تکثیر و آپتوز دارند، اثر القای PMA و PHA روی تکثیر می‌تواند منجر به فعال شدن کاسپازها نیز گردد. ما تصور می‌کنیم میزان این فعال شدن در سیستم میکروفلوئیدی به مراتب بیشتر است ضمن آن‌که در سیستم میکروفلوئیدی جریان پیوسته‌ای که از کنار سلول‌ها می‌گذرد باعث دور شدن رادیکال‌های اکسیژن و نیتریک اکسید حاصل از تکثیر سلولی از محیط اطراف سلول‌های جورکت شده و مانع آپتوز آن‌ها می‌گردد (۳۶،۳۷). کشت سلول‌های جورکت در این بیوراکتور کوچک، به جهت برخی شباهت‌هایی که این سلول‌ها با سلول‌های بنیادی دارند تجربه‌ای مفید را در اختیار ما گذاشت. تجربه‌ای که امیدواریم از طریق تلفیق این سیستم با داربست‌های سه بعدی و شبیه‌سازی محیط مغز استخوان جهت تزیاد سلول‌های بنیادی خون بندناف به‌عنوان منبعی در دسترس برای پیوند به بزرگسالان در آینده به کار گرفته شود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان از همه دست‌اندار کاران شرکت بن یاخته که سلول‌های جورکت را در اختیار ما قرارداداند و همچنین سرکار خانم شوکتی (کارشناس گروه هماتولوژی) که همکاری صمیمانه‌ای در انجام پژوهش داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

فلاسک کشت سلول باعث شد. از طرفی به نظر می‌رسد تولید بیش‌تر اینترلوکین ۲ نه تنها به دلیل اثر سینرژیکی PMA و PHA روی سلول‌ها، بلکه به دلیل اثر سینرژیکی اینترلوکین ۲ با PHA است (۳۰). ما تصور می‌کنیم چون میزان تولید اینترلوکین ۲ از همان ابتدا در سیستم میکروفلوئیدی نسبت به فلاسک کشت پیش‌تر بود علاوه بر اثر مشترک سینرژیکی PMA و PHA بر هر دو حالت میکروفلوئیدی و فلاسک کشت سلول، سیستم میکروفلوئیدی پیش‌تر تحت اثر سینرژیکی اینترلوکین ۲ با PHA قرار گرفت که حاصل آن تولید بیش‌تر اینترلوکین ۲ توسط سلول جورکت در خاتمه بود. اتصال PMA به مولکول CD28 باعث افزایش mRNA سیتوکاین اینترلوکین ۲ و گیرنده آن (CD25) می‌گردد. مولکول CD28 در فعال کردن PKC نیز تاثیر سینرژیکی دارد (۳۱،۳۲). شاید به همین دلیل در پژوهش ما در هر دو حالت فلاسک کشت و سیستم میکروفلوئیدی در حضور PMA تکثیر و تولید بیش‌تر بود. البته ممکن است فعال شدن سلول‌های جورکت به وسیله PMA با فعال شدن mir155 و تنظیمات در سطح ژن باعث تکثیر و تولید بیش‌تر اینترلوکین ۲ شده باشد (۳۳). همواره کاهش تکثیر به دلیل افزایش مرگ سلول‌ها نیست بلکه گاهی نقص در آغاز سیکل سلولی است که کاسپازها نقش مهمی در آن دارند. مهار کاسپازها می‌تواند منجر به کاهش رها شدن اینترلوکین ۲ و گیرنده آن و پروتئین‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی شود. در این حالت فعالیت CD28 و IL-2B نیز به شدت کاهش می‌یابد. سال‌ها قبل نقش کاسپازها در تنظیم ترشح سیتوکاین‌ها و آپتوز شناخته شده است اما به‌طور غیرقابل‌تصوری تکثیر سلول‌های T نیز به فعال شدن کاسپازها وابسته است (۳۴). سیستم

References

1. Meyvantsson I, Beebe DJ. Cell culture models in microfluidic systems. *Annu Rev Anal Chem* 2008; 1: 423-449.
2. Folch A, Toner M. Microengineering of cellular interactions. *Annual review of biomedical engineering* 2000; 2(1): 227-256.

3. El-Ali J, Sorger PK, Jensen KF. Cells on chips. *Nature* 2006; 442(7101): 403-411.
4. Wu HW, Lin CC, Lee GB. Stem cells in microfluidics. *Biomicrofluidics* 2011; 5(1): 13401.
5. Voldman J, Gray ML, Schmidt MA. Microfabrication in biology and medicine. *Annu rev biomed Eng* 1999; 1(1): 401-425.
6. Beebe DJ, Mensing GA, Walker GM. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annu Rev Biomed Eng* 2002; 4(1): 261-286.
7. Andersson H, Van den Berg A. Microfluidic devices for cellomics: a review. *Elsevier, Sensors and Actuators B: Chemical* 2003; 92(3): 315-325.
8. Ravichandran R, Liao S, CH Ng C, Chan CK, Raghunath M, Ramakrishna S. Effects of nanotopography on stem cell phenotypes. *World J Stem Cells* 2009; 1(1): 55-66.
9. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of cell life and death. *Science* 1997; 276(5317): 1425-1428.
10. Xia Y, Whitesides GM. Soft lithography. *Annual Review of Materials Science* 1998; 28: 153-184.
11. Pawelec G, Borowitz A, Krammer PH, Wernet P. Constitutive interleukin 2 production by the JURKAT human leukemic T cell line. *Eur J Immunol* 1982; 12(5): 387-392.
12. Maki W, Morales RE, Carroll VA, Telford WG, Knibbs RN, Stoolman LM, et al. CCR6 colocalizes with CD18 and enhances adhesion to activated endothelial cells in CCR6-transduced Jurkat T cells. *J Immunol* 2002; 169(5): 2346-2353.
13. Sen CK, Sashwati R, Packer L. Fas mediated apoptosis of human Jurkat T-cells: intracellular events and potentiation by redox-active alpha-lipoic acid. *Cell Death Differ* 1999; 6(5): 481-491.
14. Foletta VC, Segal DH, Cohen DR. Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol* 1998; 63(2): 139-152.
15. Weiss A, Imboden J, Shoback D, Stobo J. Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(13): 4169-4173.
16. Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, et al. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* 1996; 240(1): 90-97.
17. De La Rosa J, Geller AM, LeGros HL Jr, Kotb M. Induction of interleukin 2 production but not methionine adenosyltransferase activity or S-adenosylmethionine turnover in Jurkat T-cells. *Cancer Res* 1992; 52(12): 3361-3366.
18. Mwimbi XK, Muimo R, Treharne KJ, Sijumbila G, Green M, Mehta A. 4 α -Phorbol negates the inhibitory effects of phorbol-12-myristate-13-acetate on human cilia and alters the phosphorylation of PKC. *FEBS Letters* 2002; 530(1-3): 31-36.
19. Sia SK, Whitesides GM. Microfluidic devices fabricated in poly (dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis* 2003; 24(21): 3563-3576.
20. McDonald JC, Whitesides GM. Poly (dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Acco Chem Res* 2002; 35(7): 491-499.
21. Melin J, Quake SR. Microfluidic large-scale integration: the evolution of design rules for

- biological automation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2007; 36: 213-231.
22. Reyes DR, Iossifidis D, Auroux P-A, Manz A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Anal Chem* 2002; 74(12): 2623-2636.
 23. Lee SJ, Lee SY. Micro total analysis system (μ -TAS) in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64(3): 289-299.
 24. Junkin M, Tay S. Microfluidic single-cell analysis for systems immunology. *Lab on a Chip* 2014; 14(7): 1246-1260.
 25. Caspi RR, Avtalion RR. Evidence for the existence of an IL-2 like lymphocyte growth promoting factor in a bony fish, *Cyprinus carpio*. *Dev Comp Immunol* 1985; 8(1): 51-60.
 26. Dash GR, Prasad KP, Sen SP. Production of Interleukin 2 like Growth Factor from the Mitogen Activated Peripheral Blood Lymphocytes of Indian Major Carp, *Labeo rohita*. *J Agr Sci Technol* 2011; 1(8): 90-96.
 27. Galesi A, Tamashiro W, Moraes A. The effect of medium composition on interleukin-2 production by murine EL-4 thymoma cells. *Braz J Chem Eng* 2004; 21(2): 165-173.
 28. Farrar JJ, Fuller-Farrar J, Simon PL, Hilfiker ML, Stadler B, Farrar W. Thymoma production of T cell growth factor (Interleukin 2). *J Immunol* 1980; 125(6): 2555-2558.
 29. Wiskocil R, Weiss A, Imboden J, Kamin-Lewis R, Stobo J. Activation of a human T cell line: a two-stimulus requirement in the pretranslational events involved in the coordinate expression of interleukin 2 and gamma-interferon genes. *J Immunol* 1985; 134(3): 1599-1603.
 30. Young HA, Ortaldo JR. One-signal requirement for interferon-gamma production by human large granular lymphocytes. *J Immunol* 1987; 139(3): 724-727.
 31. Wei P, Wong WW, Park JS, Corcoran EE, Peisajovich SG, Onuffer JJ, et al. Bacterial virulence proteins as tools to rewire kinase pathways in yeast and immune cells. *Nature* 2012; 488(7411): 384-388.
 32. June CH, Ledbetter JA, Gillespie MM, Lindsten T, Thompson CB. T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 1987; 7(12): 4472-4481.
 33. Wu M, Piccini M, Koh CY, Lam KS, Singh AK. Single cell microRNA analysis using microfluidic flow cytometry. *PloS one* 2013; 8(1): e55044.
 34. Falk M, Ussat S, Reiling N, Wesch D, Kabelitz D, Adam-Klages S. Caspase inhibition blocks human T cell proliferation by suppressing appropriate regulation of IL-2, CD25, and cell cycle-associated proteins. *J Immunol* 2004; 173(8): 5077-5085.
 35. Shin Y, Han S, Jeon JS, Yamamoto K, Zervantonakis IK, Sudo R, et al. Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels. *Nat Protoc* 2012; 7(7): 1247-1259.
 36. Kniss A, Lu H, Jones DP, Kemp ML. A Microfluidic Systems Biology Approach for Live Single-Cell Mitochondrial ROS Imaging. *Methods Enzymol* 2013; 526: 219-230.
 37. Beltrán B, Quintero M, García-Zaragoza E, O'Connor E, Esplugues JV, Moncada S. Inhibition of mitochondrial respiration by endogenous nitric oxide: a critical step in Fas signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(13): 8892-8897.