Mechanics of Advanced and Smart Materials Journal

http://masm.araku.ac.ir

ISSN: 2783-4220

Dynamic Interaction between an AFM Oscillating Cantilever and Human Liver Epithelial Cells: Analysis of Cellular Mechanical Properties

Farimah Mahin Shafie [a], Ali Sadeghi [b*], Shahrokh Shojaei [a], Mansoureh Lafouti [c]

[a] Department of Biomedical Engineering, Central Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[b] Department of Mechanical Engineering, Damavand branch, Islamic Azad University, Damavand, Tehran, Iran.
[c] Department of Physics, Damavand branch, Islamic Azad University, Damavand, Tehran, Iran.

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Shafie F M, Sadeghi A, Shojaei S, Lafouti M. Dynamic Interaction between an AFM Oscillating Cantilever and Human Liver Epithelial Cells: Analysis of Cellular Mechanical Properties. Mechanics of Advanced and Smart Materials. 2026;5(4):568-589.

10.66224/masm.2026.2105527.1206

KEYWORDS

Atomic force microscopy,
Liver cancer cells,
Young's modulus,
Cisplatin, plasma.

ABSTRACT

In this study, the nanomechanical properties and dynamic response of healthy and cancerous human liver cells were investigated using atomic force microscopy (AFM). The Young's modulus of healthy and untreated cancerous cells was measured at 2.940±1.069kPa and 0.785±0.282kPa, respectively. Treatment with cisplatin, atmospheric cold plasma (DBD), and their combined therapy increased the Young's modulus of cancer cells to 2.218٢٫٧٨٠ ؛ and 3.660±1.811, respectively. Furthermore, the enhanced cellular stiffness induced a shift in the AFM cantilever resonance frequency toward higher values, increasing the first-mode frequency from 17.85 kHz to 22.15kHz. An analytical model based on Timoshenko beam theory and the DMT contact model showed excellent agreement with experimental and finite element method (FEM) results, with a relative error below 2%. These findings demonstrate that coupling nanomechanical characterization with AFM dynamic analysis provides a precise and non-destructive tool for evaluating cancer cell mechanical properties and monitoring therapeutic efficacy.

Extended Abstract

1. Introduction

Evaluating cellular biomechanical properties—particularly elasticity and stiffness—serves as a vital biophysical marker for diagnosing pathological conditions and cancer progression. While techniques such as optical tweezers [1] and micropipette aspiration [2] offer valuable mechanical insights, they remain constrained by localized thermal heating, optical dependencies, or limited spatial resolution [3]. In contrast, Atomic Force Microscopy (AFM) [4] enables non-destructive, high-resolution nanomechanical probing of living cells under physiological conditions without chemical fixation [5]. In modern oncology, non-thermal atmospheric plasma (NTAP) delivered via dielectric barrier discharge (DBD) setups has emerged as an effective, minimally invasive therapeutic modality [6, 7]. The therapeutic action of cold plasma relies on the controlled generation of reactive oxygen and nitrogen species (RONS), which preferentially elevate oxidative stress and trigger apoptosis in malignant cells while sparing healthy tissue [8, 9]. Because both chemotherapeutic agents and plasma-induced oxidative stress fundamentally alter the cytoskeleton, quantifying these shifts in cellular elasticity via AFM

* Corresponding author.
E-mail address: a_sadeghi@damavandiau.ac.ir
DOI: 10.66224/masm.2026.2105527.1206
Received: September 10, 2026; Received in revised form: September 15, 2026; Accepted: October 11, 2026.
© Author

provides crucial insight into treatment efficacy [10, 11]. In this study, AFM-based contact and vibration modeling is utilized to evaluate the nanomechanical properties of healthy and cancerous human liver cells. Furthermore, the comparative effects of Cisplatin chemotherapy and DBD plasma therapy on cellular Young's modulus are investigated. Finally, the extracted mechanical properties are employed to model the dynamic response, resonance frequency shifts, and frequency response function (FRF) amplitudes of the oscillating AFM cantilever.

2. Experimental Method

2.1 Atomic Force Microscope (AFM)

Cell Lines and Culture: Malignant human liver epithelial cells (AGS cell line, Pasteur Institute of Iran) and healthy control cells (differentiated adipose-derived stem cells, ADSCs-iHep, Iranian Biological Resource Center) were cultured under standard incubator conditions (37^° C, 5% CO2).

Therapeutic Regimens:

Cold Atmospheric Plasma: A custom-built Dielectric Barrier Discharge (DBD) system with copper electrodes, an adjustable ~5 mm gap, and a high-voltage AC source (15 kV, ambient air) was applied at optimized durations (10 s and 15 s).

Chemotherapy: Cisplatin dosage was calibrated using MTT viability assays to identify IC50 values and evaluate lower-concentration synergistic thresholds.

AFM Force Spectroscopy & Dynamic Measurements: Experiments were carried out using a JPK NanoWizard AFM system in a liquid environment with rectangular silicon cantilevers (MIKROMASH HQCSC17). Force-indentation curves were interpreted via modified Hertz-DMT contact mechanics for conical tips to compute Young's modulus (E) and adhesion forces.

Theoretical & Numerical Modeling: An advanced dynamic analytical model based on the Timoshenko beam theory was formulated. The formulation accounts for hydrodynamic liquid effects (Huzak hydrodynamic function, added mass, and squeeze-film damping) coupled with contact boundary conditions. Finite Element Method (FEM) simulations were executed to extract and validate the dynamic Frequency Response Functions (FRF) across the first three vibrational modes.

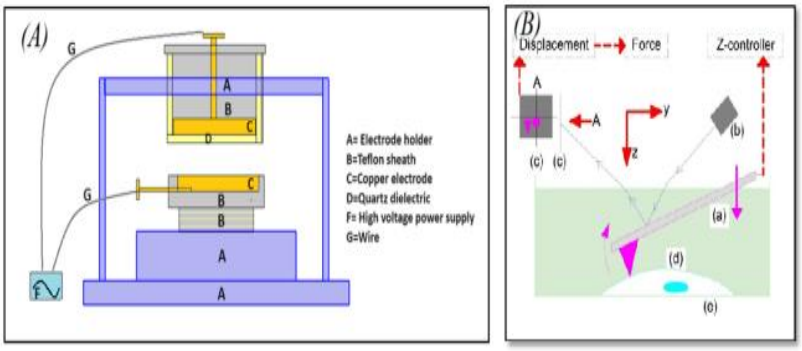


Figure 1. Schematic illustration of the experimental framework: (A) Dielectric Barrier Discharge (DBD) plasma reactor setup for in vitro cell treatment, and (B) Dynamic interaction geometry of the rectangular AFM cantilever tip indenting the liver epithelial cell membrane in liquid medium.

3. Nanomechanical Elasticity & Treatment-Induced Stiffening

Quantitative force spectroscopy measurements revealed marked differences in mechanical stiffness:

Malignancy Softening: Untreated cancer cells exhibited an average Young's modulus of E = 0.785 ± 0.282 kPa, representing a >73% reduction compared to healthy control cells (E = 2.940 ± 1.069 kPa).

Single Therapies: Administration of Cisplatin and DBD plasma significantly increased cell rigidity to 2.218 kPa and 2.780 kPa, respectively.

Synergistic Combined Therapy: The concurrent CT-PT protocol induced a profound synergistic stiffening effect, elevating the modulus to E = 3.660 ± 1.811 kPa (exceeding baseline healthy levels). This effect is attributed

to Reactive Oxygen and Nitrogen Species (ROS/RNS) accumulation, extensive cytoskeletal cross-linking, and apoptotic cell compaction.

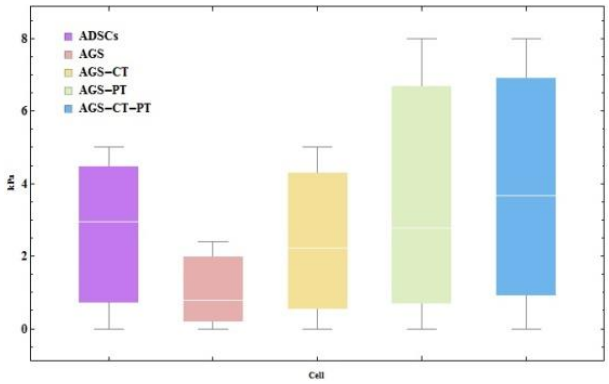


Figure 2. Statistical distribution and comparative histograms of Young's modulus (kPa) for the five experimental groups: Healthy (ADSC), Cancerous Control (AGS), Chemotherapy (AGS-CT), Plasma Therapy (AGS-PT), and Combined Treatment (AGS-CT-PT).

3.2 Dynamic Resonant Frequency Shifts and FRF Analysis

The mechanical stiffening of the cell substrate directly modified the equivalent contact stiffness (kn), precipitating a pronounced upward ("blue") shift in the resonant peaks of the cantilever:

In the first vibrational mode, the resonant frequency shifted from 17.85 kHz in compliant untreated cancer cells to 22.15 kHz in stiffened CT-PT treated cells.

Modes 2 and 3 exhibited corresponding upward shifts in resonant peak positions and amplitude dampening profiles.

Table 1. Comparison of experimental (AFM) and numerical (FEM) resonant frequencies (kHz) across vibrational modes 1 to 3 for healthy, cancerous, and treated cell groups.

Samples	1st Resonant Frequency, Hz	2nd Resonant Frequency, Hz	3th Resonant Frequency, Hz
ADSC	5.783%	5.472%	5.509%
AGS	6.721%	4.898%	5.22%
AGS-CT	5.955%	4.229%	5.318%
AGS-PT	4.472%	4.227%	5.533%
AGS-CT-PT	5.549%	4.951%	5.095%

3.3 Numerical Model Validation

The FEM simulations based on the Timoshenko beam theory with DMT contact mechanics matched the experimental measurements with exceptional precision:

The relative error across all vibrational modes and cell states was strictly bounded below 2.0%.

The statistical correlation between simulated and experimental FRFs exceeded $R > 0.988$, confirming the validity of the hydrodynamic and contact parameters.

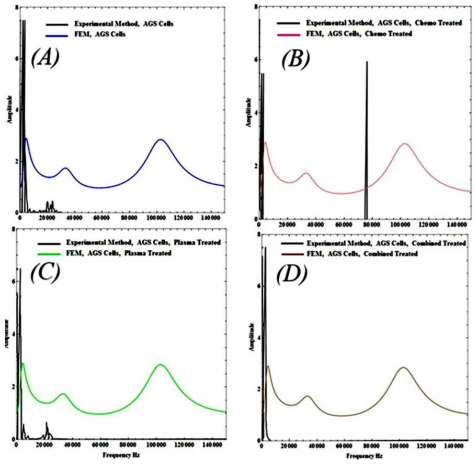


Figure 3. Experimental versus numerical (FEM) Frequency Response Functions (FRF) illustrating the resonant peak shifts for Modes 1, 2, and 3 under different therapeutic conditions.

4. Conclusion

Malignant transformation results in pronounced cellular softening (>73% reduction in elastic modulus), validating Young's modulus as an effective biomechanical marker. Concurrent application of cold atmospheric plasma and cisplatin exhibits a synergistic therapeutic effect, reversing cell softening and elevating rigidity beyond normal baseline levels. The dynamic resonant frequency of an oscillating AFM cantilever is highly sensitive to variations in cellular elasticity, showing a significant upward shift from 17.85 kHz to 22.15 kHz (Mode 1). The developed Timoshenko-based FEM model accounts for hydrodynamic and contact interactions with a relative error of <2%, providing a robust computational and experimental platform for high-throughput anti-cancer drug screening and real-time therapeutic monitoring.

مکانیک مواد پیشرفته و هوشمند
مجله علمی مکانیک مواد پیشرفته و هوشمند
شاپا: ۴۲۲۰-۲۷۸۳

برهم‌کنش دینامیکی تیرک نوسانی میکروسکوپ نیروی اتمی و سلول‌های اپیتلیال کبد انسانی: تحلیل مشخصه‌های مکانیکی سلولی

فریماه ماهین شفیعی [الف]، علی صادقی [ب*]، شاهرخ شجاعی [ج]، منصوره لفوتی [د]

[الف] دانشجوی دکتری، گروه مهندسی پزشکی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، m.lafouti290@gmail.com
[ب] دانشیار، گروه مکانیک، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دماوند، دماوند، تهران، ایران، a_sadeghi@damavandiau.ac.ir
[ج] دانشیار، گروه مهندسی پزشکی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، s.shojaei27000@gmail.com
[د] استادیار، گروه فیزیک، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دماوند، دماوند، تهران، ایران، m.lafouti290@gmail.com

واژگان کلیدی

میکروسکوپ نیروی اتمی، سلول سرطانی کبد، مدول یانگ، سیس‌پلاتین، پلاسما درمانی.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۶/۱۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۷/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۷/۱۹

چکیده

در این پژوهش، خواص نانومکانیکی و پاسخ دینامیکی سلول‌های سالم و سرطانی کبد انسانی با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی بررسی شد. مدول یانگ سلول‌های سالم و سرطانی به‌ترتیب kPa ۲/۱±۹۴۰/۰۶۹ و kPa ۰/۷۸۵ ± ۰/۲۸۲ به دست آمد. به‌طورکلی طبق انتظارات، مدول الاستیک در سلول‌های سرطانی کمتر از سلول سالم بوده، اما چسبندگی در سلول‌های سرطانی از سلول‌های بیشتر است. درمان با سیس‌پلاتین، پلاسمای سرد اتمسفری و ترکیب این دو روش موجب افزایش مدول یانگ سلول‌های سرطانی به‌ترتیب تا ۲/۲۱۸، ۲/۷۸۰ و ۱/۸۱۱±۳/۶۶۰ کیلوپاسکال شد. همچنین، افزایش سختی سلول‌ها باعث انتقال فرکانس تشدید تیرک AFM به مقادیر بالاتر گردید؛ به‌گونه‌ای که فرکانس مد اول از ۱۷/۸۵ kHz به ۲۲/۱۵ kHz افزایش یافت. مدل تحلیلی مبتنی بر تئوری تیر تیموشنکو و مدل تماس DMT با نتایج تجربی و شبیه‌سازی المان محدود تطابق مناسبی داشت و خطای آن کمتر از ۲٪ بود. نتایج نشان می‌دهد که ترکیب مشخصه‌یابی نانومکانیکی و تحلیل دینامیکی AFM می‌تواند روشی دقیق و غیرمخرب برای ارزیابی خواص مکانیکی سلول‌های سرطانی و اثربخشی درمان باشد.

۱- مقدمه

شناخت و تعیین مشخصه‌های بیومکانیکی سلول‌ها به‌عنوان یکی از شاخص‌های زیستی مهم در تشخیص فرآیندهای پاتولوژیک نظیر بدخیمی‌ها و پیشرفت سرطان همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است. ارزیابی پاسخ الاستیک و رفتار نانومکانیکی نمونه‌های بیولوژیکی مستلزم استفاده از ابزارهای طیف‌سنجی نیرو با دقت بالا است. اگرچه در این میان فناوری انبرک نوری [۱, ۲] قابلیت مناسبی در اعمال نیروهای پیکونیوتنی و بررسی مولکول‌های منفرد ارائه می‌دهد، بااین‌حال وابستگی دقت آن به‌شدت میدان نوری [۳, ۴]، آسیب‌پذیری بالا در مواجهه با محیط‌های سلولی ناهمگن و ایجاد حرارت موضعی نامطلوب ناشی از تابش لیزر [۵, ۶]، کاربرد این روش را در سنجش خواص الاستیک سلول‌های سالم و بیمار با محدودیت‌هایی مواجه می‌سازد. از سوی دیگر، تکنیک مکش ریزپیپت [۷] که بر پایهٔ ایجاد مکش و تغییرشکل سلول در داخل لولهٔ شیشه‌ای عمل می‌کند [۸]، علیرغم کاربرد گسترده در استخراج مدول‌های الاستیسیته، تفکیک‌پذیری مکانی محدودی داشته و توانایی ارائه جزئیات توپوگرافی سطح سلول را با دقت نانومتری ندارد [۹, ۱۰].

* نویسنده مسئول؛
آدرس پست الکترونیک: s.abolghasemi@gu.ac.ir

در مقابل، میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) که توسعه اولیه آن توسط بینینگ و همکاران گزارش شد [۱۱]، به یکی از قدرتمندترین ابزارهای اندازه‌گیری غیرمخرب در مقیاس‌های نانو و میکرو مبدل شده است [۱۲]. در این روش، با ثبت دقیق بازتاب پرتو لیزر از پشت کانتی‌لیور نوسانی توسط فوتودیود حساس، اندازه‌گیری نیروهای تماسی در بازه نانونیوتن تا میکرونیوتن امکان‌پذیر می‌گردد. مزیت اساسی آزمون‌های بر پایه AFM، امکان آزمایش سلول‌های زنده در شرایط فیزیولوژیکی بدون نیاز به تثبیت‌سازی‌های پیچیده شیمیایی است [۱۳].

در حوزه درمان‌های نوین انکولوژی، به‌کارگیری فناوری پلاسماپزشکی به‌عنوان رهیافتی کم‌تهاجم و فاقد سمیت دارویی، توجه گسترده‌ای را به خود جلب کرده است [۱۴]. پلاسما به‌عنوان فاز چهارم ماده، مخلوطی از ذرات باردار، یون‌ها و الکترون‌های آزاد در یک میدان الکتریکی است [۱۵]. در فناوری پلاسمای سرد اتمسفری، دمای گونه‌های یونی در حدود دمای محیط باقی می‌ماند که امکان اعمال مستقیم آن را بر روی بافت‌های زنده بدون ایجاد صدمات حرارتی میسر می‌سازد [۱۶]. دستگاه‌های تخلیه سد دی‌الکتریک (DBD) ازجمله متداول‌ترین چیدمان‌ها برای اعمال این نوع پلاسما هستند [۱۷, ۱۸]. مکانیسم اثربخشی این روش متکی بر تولید کنترل‌شده گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن (RONS) نظیر رادیکال هیدروکسیل و اکسید نیتریک است [۱۹, ۲۰]. با توجه به بالا بودن نرخ متابولیسم و غلظت پایه این گونه‌ها در سلول‌های سرطانی، دمای گونه‌های یونی در حدود دمای محیط باقی می‌ماند که امکان اعمال مستقیم آن را بر روی بافت‌های زنده بدون ایجاد صدمات حرارتی میسر می‌سازد [۱۶]. دستگاه‌های DBD ازجمله متداول‌ترین چیدمان‌ها برای اعمال این نوع پلاسما هستند [۱۷, ۱۸]. مکانیسم اثربخشی این روش متکی بر تولید کنترل‌شده گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن نظیر رادیکال هیدروکسیل و اکسید نیتریک است [۱۹, ۲۰]. با توجه به بالا بودن نرخ متابولیسم و غلظت پایه این گونه‌ها در سلول‌های سرطانی [۲۱, ۲۲]، اعمال پلاسمای سرد منجر به تشدید استرس اکسیداتیو و القای فرآیند مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (آپوپتوز) با کمترین اثر تخریبی بر سلول‌های سالم مجاور می‌گردد [۲۳, ۲۴]. ارزیابی اثرات سطحی و مورفولوژیکی این تغییرات عمدتاً به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی و AFM انجام می‌گیرد [۲۵, ۲۶].

تغییرات ساختار اسکلت سلولی متعاقب شیمی‌درمانی یا پلاسمادرمانی، بازتاب مستقیمی بر سختی و مدول الاستیک سلول بر جای می‌گذارد [۲۷-۳۰]. به همین دلیل، محققان متعددی با استفاده از پروب AFM به مشخصه‌یابی خواص مکانیکی پرداخته‌اند [۳۱, ۳۲]. در این راستا، امیدوار و همکاران [۳۳] رفتار ویسکوالاستیک و سختی رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی پستان را بررسی نمودند. ژو و همکاران [۳۴] به سنجش مشخصه‌های بیومکانیکی سلول‌ها پس از تیمار با داروهای ضدسرطان پرداختند. همچنین افرموف و همکاران [۳۵] کاهش مدول الاستیک سلول‌های فیبروبلاست را متناسب با درجه تمایز و تبدیل بدخیم گزارش کردند.

مطالعات مبتنی بر مدل‌سازی‌های پیشرفته تماس و ارتعاشات، در گام نخست به مشخصه‌یابی مکانیکی سلول‌های سالم و سرطانی کبد با استفاده از AFM می‌پردازد. در ادامه، تأثیر شیمی‌درمانی با داروی سیس‌پلاتین و پلاسمادرمانی با استفاده از DBD بر سختی سلولی و مدول یانگ سلول‌های کبدی بررسی و مقایسه می‌شود. درنهایت، با تکیه بر تغییرات خواص مکانیکی استخراج‌شده، پاسخ دینامیکی تیرک نوسانی AFM، فرکانس‌های تشدید و دامنه تابع پاسخ فرکانسی (FRF) آن مدل‌سازی و تحلیل می‌گردد.

۲- روش تجربی و مشخصات فیزیکی مسئله

۲-۱- آماده‌سازی و کشت رده‌های سلولی

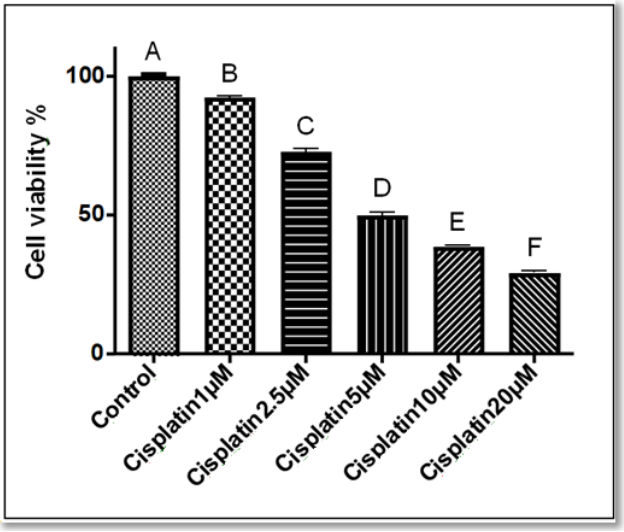
به منظور ارزیابی و مقایسه خواص مکانیکی سلول‌ها، از دو رده سلولی سرطانی و سالم استفاده شد. رده سلولی سرطانی AGS از انستیتو پاستور ایران (تهران) و رده سلولی تمایزیافته مزانشیمی مشتق از چربی (iHep ADSCs) به‌عنوان مدل زیستی مناسب برای سلول‌های سالم از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردید.

فرایند انجماد و ذخیره‌سازی نمونه‌ها در محیط حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱۰ درصد دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) انجام شد. جهت تکثیر و نگهداری، سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین در انکوباتور با رطوبت اشباع و اتمسفر ۵ درصد CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

۲-۲- آزمون سمیت سلولی (MTT) و بهینه‌سازی دوز درمان

سنجش بقای سلولی جهت دستیابی به غلظت نیمه‌مهارکننده (IC_{50}) با استفاده از آزمون MTT انجام پذیرفت. نمونه‌های سلولی با چگالی اولیه 2×10^3 الی 10^4 سلول در هر $200\mu L$ در پلیت‌های نود و شش خانه‌ای بارگذاری و به مدت بیست و چهار ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها تحت شرایط تیمار منفرد (شیمی‌درمانی یا پلاسما) و ترکیبی قرار گرفتند:

تیمار شیمی‌درمانی منفرد: بر اساس پاسخ زیستی، دوز $5\mu M$ از داروی سیس‌پلاتین (Cisplatin) طی زمان انکوباسیون بیست و چهار ساعت به‌عنوان غلظت بهینه IC_{50} تعیین شد (شکل ۱).



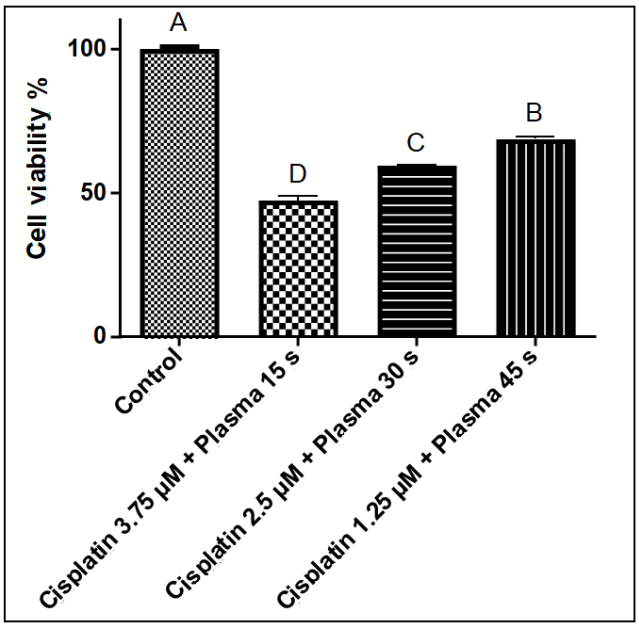
شکل ۱ منحنی درصد بقای سلول‌های AGS بر پایه آزمون MTT در غلظت‌های مختلف داروی سیس‌پلاتین پس از بیست و چهار ساعت انکوباسیون

تیمار پلاسما: با اعمال زمان‌های تابش مختلف، مدت‌زمان ۶۰s منجر به مهار ٪۵۰ سلول‌ها در بازه بیست و چهار ساعت گردید.

جدول ۱ اثر مدت‌زمان‌های مختلف تابش پلاسما بر درصد بقای سلول‌های سرطانی.AGS

	Control	Plasma+5s	Plasma+10s	Plasma+20s	Plasma+30s	Plasma+60s
Mean	۱۰۰	۹۱/۷۹	۸۳/۹۱	۷۵/۸۵	۶۵/۰۴	۵۰/۴۴
Std. Deviation	۱/۱۱۳	۱/۱۳۸	۱/۵۳۸	۲/۰۸۲	۰/۵۲۶۶	۱/۳۵۱
Std. Error of Mean	۰/۶۴۲۴	۰/۶۵۷۳	۰/۸۸۸۱	۱/۲۰۸	۰/۳۰۴	۰/۷۷۹۹

درمان هم‌افزا (ترکیبی): بر اساس ارزیابی‌های ترکیبی، تلفیق پلاسما به مدت پانزده ثانیه همراه با داروی سیس‌پلاتین با غلظت μM ۳/۷۵ اثر بازدارندگی معادل IC_{50} ایجاد نمود. این رفتار هم‌افزا نشان داد که بهره‌گیری از رویکرد ترکیبی موجب کاهش هم‌زمان غلظت داروی شیمی‌درمانی و زمان تابش پلاسما می‌گردد (شکل ۲).



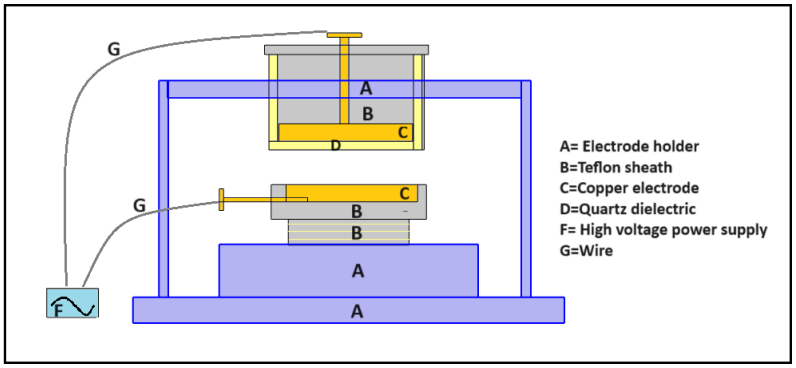
شکل ۲ منحنی زیست‌پذیری سلول‌های AGS در شرایط درمان توأم (شیمی‌درمانی و پلاسمای سرد) پس از بیست و چهار ساعت انکوباسیون.

جدول ۲ درصد مهار و بقای سلول‌های AGS در سناریوهای مختلف تیمار ترکیبی پلاسما و سیس‌پلاتین.

	Control	Cisplatin 3.75 µM + Plasma 15 s	Cisplatin 2.5 µM + Plasma 30 s	Cisplatin 1.25 µM + Plasma 45 s
Mean	۱۰۰	۴۷/۲۳	۵۹/۳۲	۶۸/۷۳
Std. Deviation	۱/۶۵۱	۲/۳۵۴	۰/۳۴۸۲	۱/۱۹۳
Std. Error of Mean	۰/۹۵۳۱	۱/۳۵۹	۰/۲۰۱۱	۰/۶۸۸۸

۲-۳- مشخصات و چیدمان سامانه پلاسمای سرد

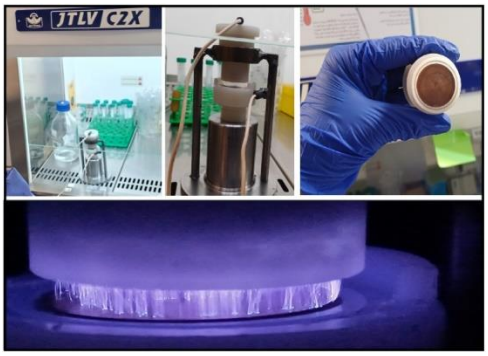
جهت القای استرس اکسیداتیو کنترل‌شده و تولید گونه‌های فعال، یک سامانه تخلیه سد دی‌الکتریک طراحی و ساخته شد. این سامانه از دو الکترود استوانه‌ای مسی به ضخامت ۱ میلی‌متر و قطر ۳ سانتی‌متر تشکیل شده است. یکی از الکترودها توسط یک لایه کوارتز دی‌الکتریک به ضخامت ۱ میلی‌متر پوشانده شده تا از تخلیه قوسی جلوگیری کند (شکل ۳).



شکل ۳ طرحواره ساختاری و اجزای تشکیل‌دهنده سامانه تخلیه سد دی‌الکتریک (DBD).

فاصله کاری بین دو الکترود توسط پیچ‌های تنظیم‌کننده در حدود ۵ میلی‌متر تنظیم شد تا پلیت حاوی سلول در فضای میان

آن‌ها قرار گیرد. ولتاژ متناوب اعمالی بر روی پانزده کیلوولت ثابت نگه داشته شد و پلاسما بر بستر هوای محیط (بدون تزریق گاز ثانویه) تولید گردید. با ثابت نگه‌داشتن ولتاژ و فاصله تخلیه، زمان تابش به‌عنوان متغیر اصلی دوز بر روی ۳۰ و ۶۰ ثانیه تنظیم شد. تمامی مراحل پلاسمادرمانی در محیط اتاق تمیز انجام گرفت تا شرایط آزمون از آلودگی‌های محیطی مصون بماند (شکل۴).



شکل ۴ نمایشی از اجزای مختلف DBD

۲-٤- مشخصه‌یابی نانومکانیکی با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

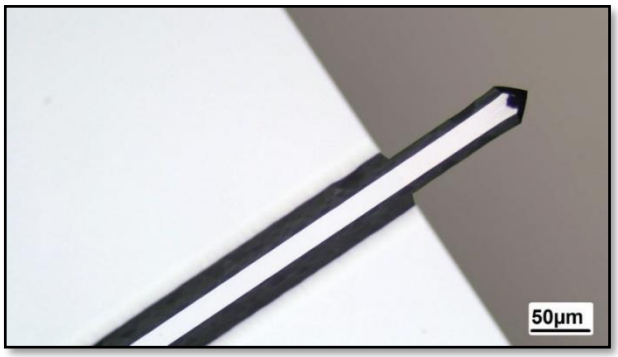
سنجش نانومکانیکی و تعیین مدول الاستیک سلول‌ها با بهره‌گیری از میکروسکوپ نیروی اتمی پیشرفته انجام پذیرفت (شکل ۵).



شکل ۵ تصویر دستگاه میکروسکوپ نیروی اتمی (مدل JPK Instruments - NanoWizard 3).

۲-٤-۱- مشخصات هندسی و فیزیکی تیرک نوسانی

در این آزمون‌ها از پروب سیلیکونی استاندارد مستطیلی استفاده شد (شکل ۶).

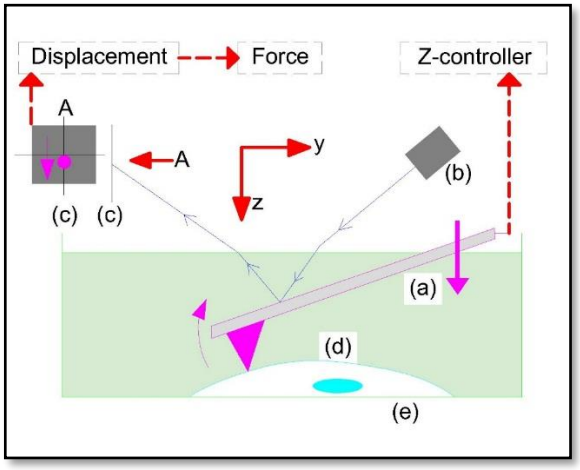


شکل ۶ تصویر میکروسکوپ نوری از کانتی‌لیور مستطیلی میکروسکوپ نیروی اتمی (مدل MIKROMASH HQCSC17).

تیرک مستطیلی AFM دارای طول L، عرض w و ضخامت h است. مشخصات فیزیکی تیرک شامل چگالی جرمی ρ، مدول یانگ E_b، ضریب پواسون υ_b، شعاع نوک سوزن R_t ، زاویه نیمه‌مخروط نوک αو زاویه شیب پروب نسبت به سطح افق می‌باشد.

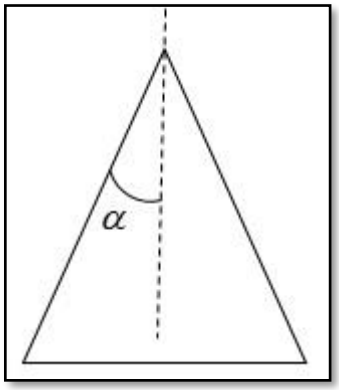
۲-٤-۲- مدل مکانیک تماس و استخراج مدول الاستیک

اصول اندازه‌گیری بر پایش نیروهای برهم‌کنش واندروالس و تماسی میان نوک سوزن و غشای سلول استوار است که سبب انحراف تیرک و بازتاب پرتوی لیزر بر روی آشکارساز نوری چهارتایی (فوتودیود) می‌شود (شکل ۷).



شکل ۷ نمودار شماتیک اصول کاری میکروسکوپ نیروی اتمی و نحوه پایش انحراف تیرک.

با فرض صلب بودن سوزن مخروطی با انتهای کروی و تغییرشکل الاستیک نمونه سلولی، مدل مکانیک تماس هرتز برای پروب‌های مخروطی در برهم‌کنش با سطح اعمال می‌گردد (شکل ۸).



شکل ۸ مدل هندسی تماس نوک سوزن مخروطی AFM با غشای الاستیک سلول.

بر اساس تئوری اصلاح‌شده مکانیک تماس هرتز برای نوک‌های مخروطی، رابطه نیرو (FFF) با عمق نفوذ δ به‌صورت زیر مدل‌سازی می‌شود:

$$F = \frac{2}{\pi}\frac{E_{cell}}{1-\nu_{cell}^2}\tan(\alpha)\,\delta^2 \qquad (۱)$$

که در آن F: نیروی تماسی اعمالی به سطح سلول،δ: میزان فروروی نوک پروب در داخل سلول،E_{cell}: مدول الاستیسیته یانگ سلول،ν_{cell}^2: ضریب پواسون سلول (معمولاً برابر با ۰/۵ به فرض تراکم‌ناپذیری محیط زیستی) و α: نیم‌زاویه راس سوزن مخروطی AFM. با برازش منحنی نیرو-تغییر مکان حاصل از طیف‌سنجی نانومکانیکی بر رابطه بالا، مقادیر مدول یانگ و سختی سلول‌ها در رده‌های مختلف و پس از اعمال تیمارها استخراج گردید.

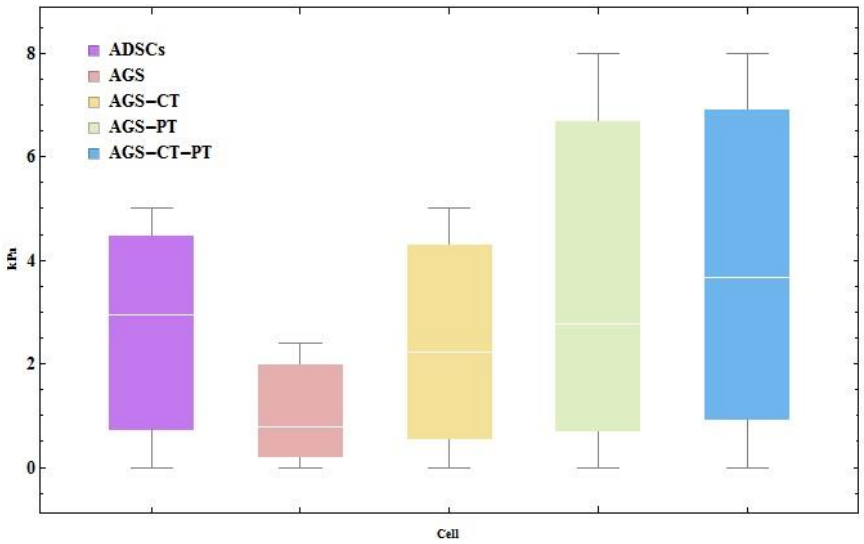
۳- نتایج و بحث

۳-۱- تحلیل و بحث پیرامون مشخصه‌های بیومکانیکی سلول‌ها

فرایندهای پیچیده دگرگونی بدخیم و سرطانی‌شدن سلول منجر به بازآرایی بنیادین در ساختار اسکلت سلولی و غشای سلولی شده و خواص مکانیکی آن را به‌شدت دگرگون می‌سازد. مطابق با داده‌های مندرج در جدول ۳ و نمودار شکل ۹، ارزیابی‌های نانومکانیکی نشان می‌دهد که میانگین مدول یانگ سلول‌های سرطانی رده AGS به‌طور معناداری (بیش از ٪۷۳ کاهش) کمتر از سلول‌های سالم ADSC است. این پدیده موسوم به «نرمی مفرط مکانیکی» در سلول‌های توموری، به‌عنوان یک شاخصه بیومکانیکی کلیدی شناخته می‌شود که قابلیت انعطاف‌پذیری غشا را افزایش داده و فرایند جدایش، مهاجرت و تهاجم به بافت‌های مجاور و درنهایت متاستاز را تسهیل می‌نماید. مکانیسم‌های مولکولی حاکم بر این کاهش سختی شامل دپلیمریزاسیون رشته‌های اکتین F، کاهش تراکم شبکه میکروتوبول‌ها و تغییر در بیان پروتئین‌های اتصالی ماتریس خارج سلولی است.

جدول ۳ مقادیر مدول یانگ استخراج‌شده برای سلول‌های سالم و سرطانی در رژیم فروروی (پیشروی).

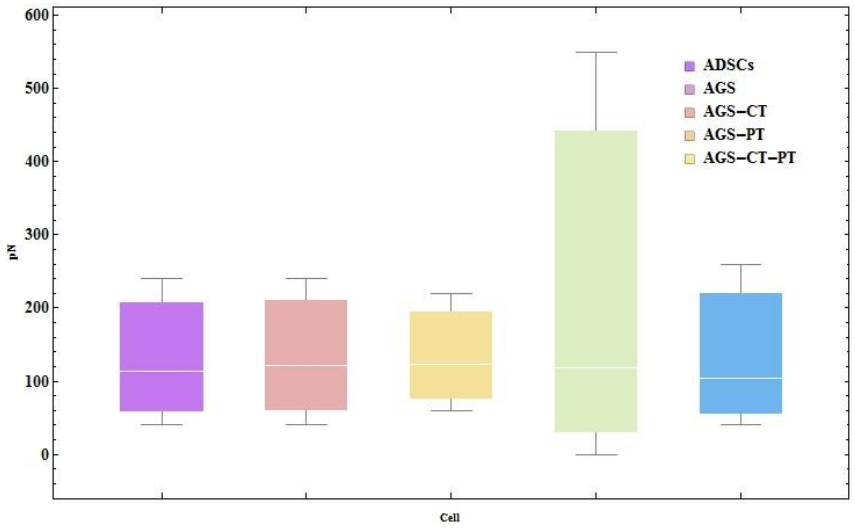
E_R	Elasticity (kPa) ± SD	Standard Deviation (SD) (kPa)	Elasticity (kPa), mean	Cell line
--------	۲/۹۴۰±۱/۰۶۹	۱/۰۶۹	۲/۹۴۰	ADSC
۰/۲۶۷	۰/۷۸۵±۰/۲۸۲	۰/۲۸۲	۰/۷۸۵	AGS
۰/۷۵۴	۲/۲۱۸±۰/۸۲۳	۰/۸۲۳	۲/۲۱۸	AGS-CT
۰/۹۴۵	۲/۷۸۰±۱/۵۳۲	۱/۵۳۲	۲/۷۸۰	AGS-PT
۱/۲۴۵	۳/۶۶۰±۱/۸۱۱	۱/۸۱۱	۳/۶۶۰	AGS-CT-PT



شکل ۹ نمودار مقایسه‌ای مدول یانگ سلول‌های سالم (ADSC) و سرطانی (AGS) در شرایط کنترل و پس از اعمال پروتکل‌های درمانی گوناگون.

مطابق با داده‌های مندرج در جدول ۴ و نمودار شکل ۱۰، اعمال مداخلات درمانی شامل شیمی‌درمانی مبتنی بر سیس‌پلاتین و تابش پلاسمای سرد اتمسفری ، پاسخ‌های مکانیکی متفاوتی را در ساختار سلول برمی‌انگیزد. داروی سیس‌پلاتین با ایجاد پیوندهای متقاطع درون‌رشته‌ای در DNA و تحریک مسیرهای آپوپتوز وابسته به کاسپازها، سبب انقباض حجم سلول و درنتیجه افزایش مدول الاستیسیته می‌گردد. از سوی دیگر، تابش پلاسمای غیرحرارتی از طریق رهاسازی گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن در محیط، به پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و اکسیداسیون گروه‌های تیول پروتئین‌های ساختاری منجر شده که پیوندهای عرضی میان رشته‌های اکتین را تشدید نموده و سختی الاستیک غشا را بازیابی می‌کند. بالاترین مقدار مدول یانگ در گروه درمان ترکیبی (AGS-CT-PT) مشاهده شد (۳/۱±۶۶۰/۸۱۱ kPa) که نشان‌دهنده یک اثر هم‌افزایی مثبت است؛ بدین‌صورت که پلاسما

با ناپایدارسازی و افزایش نفوذپذیری غشا، جذب سلولی داروی شیمی‌درمانی را ارتقا داده و مسیرهای بازدارندگی تومور را تشدید می‌کند.



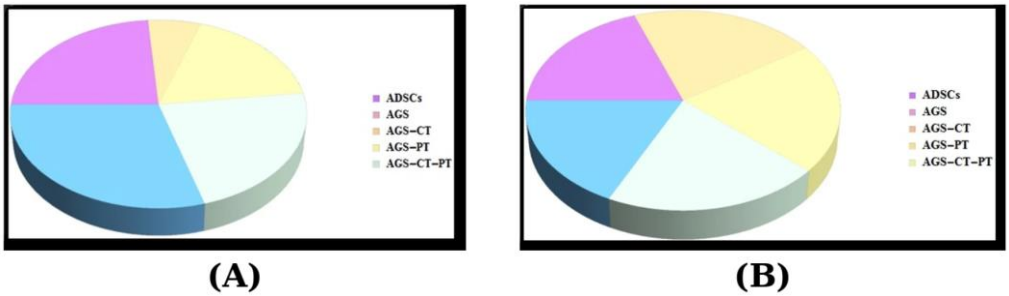
شکل ۱۰ نمودار مقایسه‌ای نیروی چسبندگی پروب نانومقیاس به غشای سلول در فاز بازگشت برای تمامی گروه‌ها.

جهت مشخصه‌یابی دقیق توزیع غیریکنواخت داده‌ها که ریشه در ناهمگونی زیستی ذاتی سلول‌ها دارد، تحلیل‌های توزیع بسامد آماری استخراج گردید. مدول یانگ نسبی (E_{rel}) و نیروی چسبندگی نسبی ($F_{adh,rel}$) نسبت به سلول سالم طبق روابط زیر محاسبه شدند:

$$E_{rel} = \frac{E_{sample}}{E_{ADSC}} \quad (۲)$$

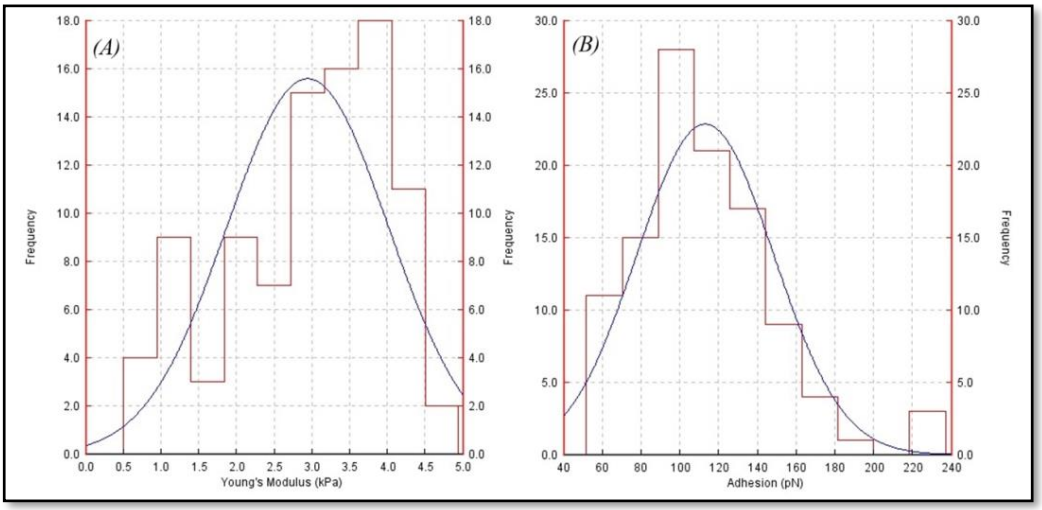
$$F_{adh,rel} = \frac{F_{adh,sample}}{F_{adh,ADSC}} \quad (۳)$$

تحلیل آماری نتایج در شکل ۱۱ ارائه شده است؛ پنل (A) مدول یانگ استخراج‌شده در رژیم پیشروی را برای رده‌های سلولی مختلف نشان می‌دهد و پنل (B) توزیع نیروی چسبندگی پروب–سلول را در شرایط آزمایشگاهی گوناگون مقایسه می‌کند.



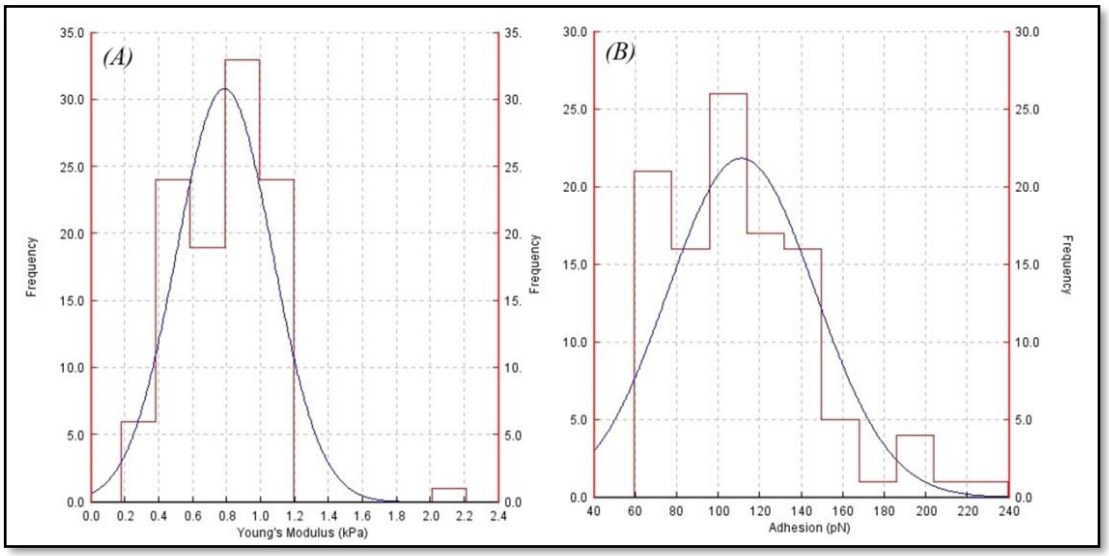
شکل ۱۱ تحلیل آماری و پراکندگی داده‌های تجربی: (A) مدول یانگ استخراج‌شده در رژیم پیشروی برای رده‌های سلولی مختلف؛ (B) توزیع نیروی چسبندگی پروب–سلول در شرایط آزمایشگاهی گوناگون.

در شکل ۱۲، توزیع آماری پارامترهای مکانیکی به‌دست‌آمده از آزمایش‌های نانوسختی‌سنجی (AFM) بر روی سلول‌های ADSC ارائه شده است. پنل (A) نشان‌دهنده هیستوگرام توزیع بسامد مدول یانگ در رژیم پیشروی است که بیانگر رفتار الاستیک سلول می‌باشد؛ درحالی‌که پنل (B) توزیع نیروی چسبندگی را در رژیم بازگشت پروب به تصویر می‌کشد که معیاری از برهم‌کنش‌های سلول-پروب در شرایط آزمایشگاهی است.



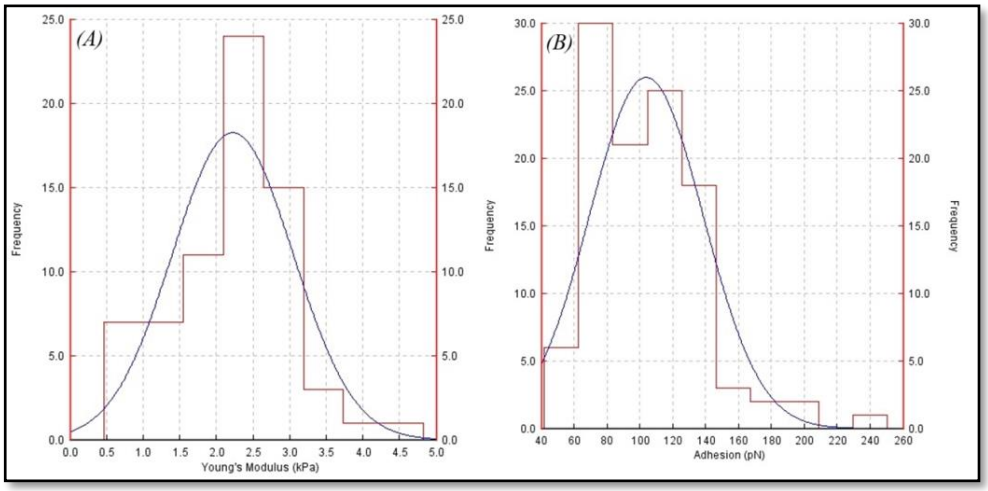
شکل ۱۲ تحلیل آماری ویژگی‌های مکانیکی سلول‌های ADSC: (A) هیستوگرام توزیع بسامد مدول یانگ در رژیم پیشروی پروب؛ (B) هیستوگرام توزیع بسامد نیروی چسبندگی در رژیم بازگشت پروب.

به‌منظور تعیین ویژگی‌های پایه مکانیکی سلول‌های سرطانی، تحلیل آماری بر روی سلول‌های (AGS گروه کنترل) انجام شد که نتایج آن در شکل ۱۳ ارائه شده است. پنل (A) نشان‌دهنده توزیع مدول یانگ در رژیم پیشروی است که بیانگر سفتی غشای سلولی می‌باشد؛ همچنین در پنل (B)، توزیع نیروی چسبندگی در رژیم بازگشت پروب مشاهده می‌شود که معیاری از برهم‌کنش‌های سطحی سلول‌های AGS در شرایط آزمایشگاهی است.



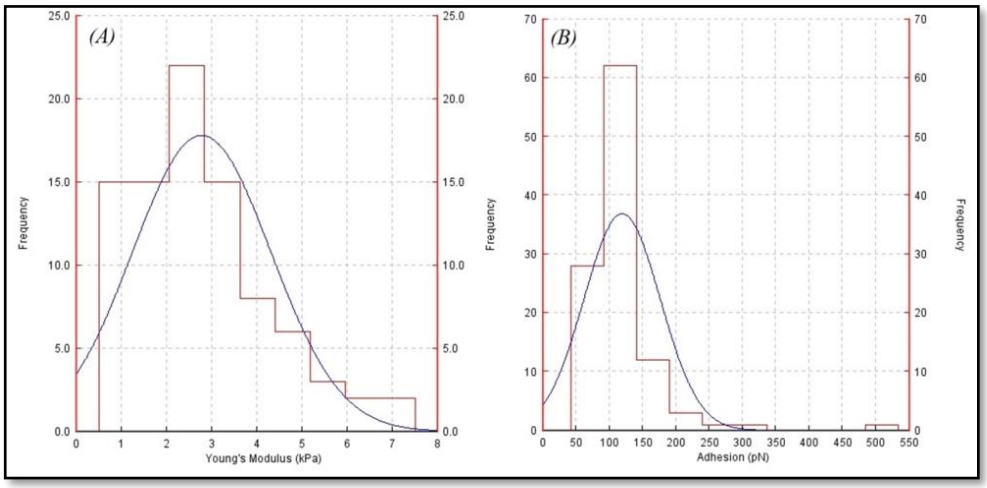
شکل ۱۳ تحلیل آماری پارامترهای مکانیکی سلول‌های سرطانی (AGS گروه کنترل) (A) :هیستوگرام توزیع مدول یانگ در رژیم پیشروی(Approach) ؛ (B) هیستوگرام توزیع نیروی چسبندگی در رژیم بازگشت (Retraction) پروب.

جهت بررسی اثرات بیومکانیکی داروی سیس‌پلاتین بر سلول‌های سرطانی، تحلیل‌های مشابهی بر روی گروه تحت درمان (AGS-CT) انجام گرفت که نتایج آن در شکل ۱۴ نمایش داده شده است. مقایسه داده‌های این شکل با گروه کنترل (شکل ۱۳)، تغییرات محسوس در سفتی سلولی (مدول یانگ) و رفتار چسبندگی غشا را در رژیم‌های پیشروی و بازگشت پروب به‌خوبی نشان می‌دهد.



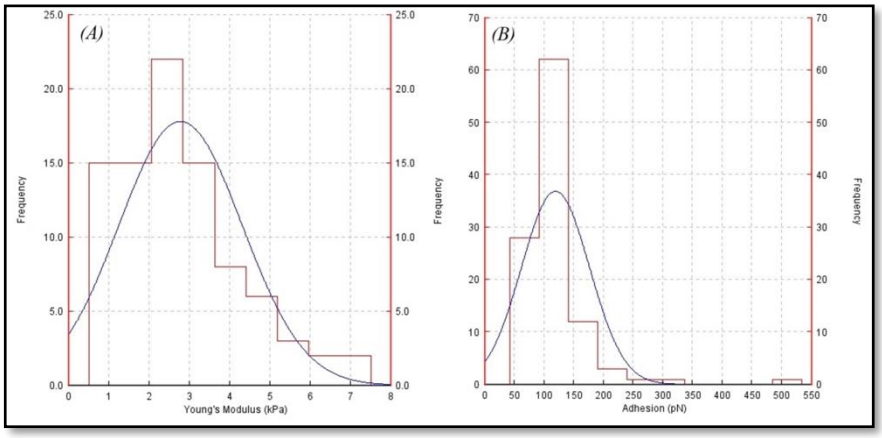
شکل ۱۴ تحلیل آماری پارامترهای مکانیکی سلول‌های AGS پس از درمان با سیس‌پلاتین گروه (AGS-CT) : (A) هیستوگرام توزیع مدول یانگ در رژیم پیشروی؛ (B) هیستوگرام توزیع نیروی چسبندگی در رژیم بازگشت پروب

جهت بررسی اثرات بیوفیزیکی پلاسمای سرد اتمسفری (DBD) بر سلول‌های سرطانی، تحلیل‌های آماری مشابهی بر روی گروه تیمار شده با پلاسما (AGS-PT) انجام شد که نتایج آن در شکل ۱۵ ارائه شده است. مقایسه داده‌های این شکل با گروه کنترل (شکل ۱۳)، تغییرات محسوس در مدول یانگ و رفتار چسبندگی سلول را آشکار می‌سازد که نشان‌دهنده تأثیر مستقیم پلاسما بر تغییرات ساختاری و خواص مکانیکی غشای سلولی در رژیم‌های پیشروی و بازگشت پروب است.



شکل ۱۵ تحلیل آماری پارامترهای مکانیکی سلول‌های AGS پس از تیمار با پلاسمای سرد اتمسفری گروه: (A) (AGS-PT) هیستوگرام توزیع مدول یانگ در رژیم پیشروی؛ (B) هیستوگرام توزیع نیروی چسبندگی در رژیم بازگشت پروب.

درنهایت، به‌منظور بررسی احتمال وجود اثرات هم‌افزایی ناشی از به‌کارگیری هم‌زمان پلاسما و سیس‌پلاتین، تحلیل‌های بیومکانیکی بر روی گروه درمان ترکیبی (AGS-CT-PT) انجام شد که نتایج آن در شکل ۱۶ به تصویر کشیده شده است. مقایسه داده‌های این شکل با گروه‌های درمانی تک‌گانه (شکل ۱۴ و ۱۵) نشان می‌دهد که ترکیب این دو روش، تغییرات ساختاری عمیق‌تری را در خواص الاستیک و چسبندگی غشای سلولی ایجاد کرده است، که این امر تأییدکننده کارآمدیِ رویکرد درمانی ترکیبی در مقایسه با روش‌های مستقل می‌باشد.

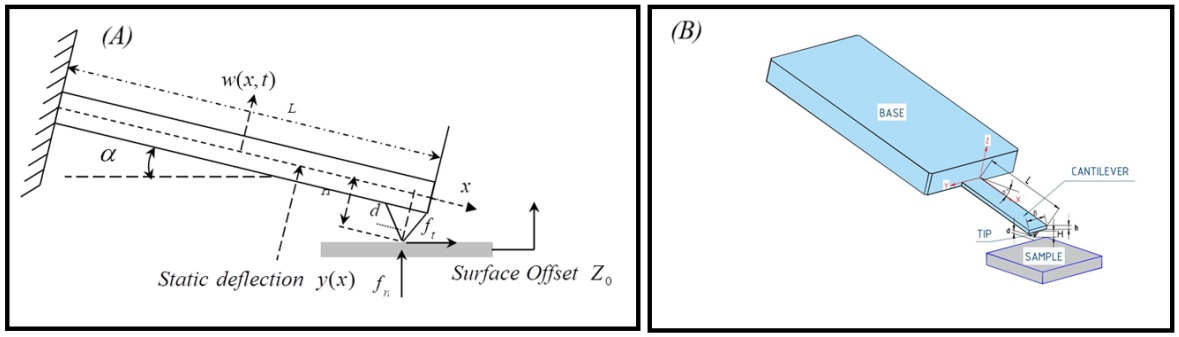


شکل ۱۶ تحلیل آماری پارامترهای مکانیکی سلول‌های AGS پس از درمان ترکیبی (گروه (AGS-CT-PT:A) هیستوگرام توزیع مدول یانگ در رژیم پیشروی؛ (B) هیستوگرام توزیع نیروی چسبندگی در رژیم بازگشت پروب.

٤- مدل‌سازی دینامیکی و مشخصه‌های ارتعاشی تیرک نوسانی AFM

٤-١- فرمول‌بندی تحلیلی تیرک در محیط مایع

بررسی دقیق رفتار دینامیکی تیرک میکروسکوپ نیروی اتمی در فاز نوسانی نیازمند لحاظ نمودن برهم‌کنش‌های هیدرودینامیکی با سیال لزج و اثرات غیرخطی تماس نوک با غشای الاستیک سلول است. در ابعاد نانومتری و فرکانس‌های کاری بالا، اثرات تغییرشکل برشی و اینرسی دورانی حائز اهمیت بوده و مدل تیر تیموشنکو دقت بالاتری را نسبت به تئوری کلاسیک اویلر-برنولی فراهم می‌سازد (شکل ۱۷).



شکل ۱۷ مدل‌سازی و شماتیک سیستم AFM؛ (A) نمای شماتیک هندسه تیرک مستطیلی، موقعیت تکیه‌گاه پیزوالکتریک و دستگاه مختصات حاکم؛ (B) مدل سه‌بعدی پروب در مجاورت نمونه سلولی غوطه‌ور در محیط مایع زیستی تحت اثر نیروهای تماسی.

معادلات دیفرانسیل پاره‌ای کوپل‌شده حاکم بر تغییرشکل عرضی (w_b) و دوران زاویه‌ای مقطع (ψ) تیرک به شرح زیر تدوین می‌گردند:

$$A\frac{\partial^2 w_b(x,t)}{\partial t^2} - \kappa GA\left(\frac{\partial^2 w_b(x,t)}{\partial x^2} - \frac{\partial \psi(x,t)}{\partial x}\right) = F_{hydro}(x,t) \quad (۴)$$

$$\rho I\frac{\partial^2 \psi(x,t)}{\partial t^2} - E_b I\frac{\partial^2 \psi(x,t)}{\partial x^2} - \kappa GA\left(\frac{\partial w_b(x,t)}{\partial x} - \psi(x,t)\right) = 0 \quad (۵)$$

که در آن ρ چگالی ماده تیرک، A مساحت سطح مقطع، I ممان اینرسی مساحت، E_b مدول الاستیسیته، G مدول برشی، و κ ضریب تصحیح برشی مقطع مستطیلی $\kappa = \frac{5+5\nu}{6+5\nu}$ با ضریب پواسون ν است. برهم‌کنش هیدرودینامیکی سیال F_{hydro} با دو مؤلفه جرم اضافه سیال (m_a) و ضریب میرایی هیدرودینامیکی (c_a) تعریف می‌گردد:

$$F_{hydro}(x,t) = -m_a \frac{\partial^2 w_b(x,t)}{\partial t^2} - c_a \frac{\partial w_b(x,t)}{\partial t} \quad (۶)$$

$$m_a = \frac{\pi}{4}\rho_f w^2 \Gamma_r(\omega), c_a = \frac{\pi}{4}\rho_f w^2 \omega \Gamma_i(\omega) + c_{squeez} \quad (۷)$$

که در آن ρ_f چگالی مایع پیرامون، w پهنای تیرک، $\Gamma(\omega) = \Gamma_r + i\Gamma_i$ تابع هیدرودینامیکی هوزاکا، و c_{squeez} اثر میرایی فشردگی لایه سیال در فاصله بین تیرک و بستر نمونه با ویسکوزیته η است.

نیروی برهم‌کنش غیرخطی نوک-سطح بر اساس مدل مکانیک تماس DMT (با تلفیق تغییرشکل هرتزی و پتانسیل چسبندگی واندروالس) به‌صورت زیر مدل‌سازی می‌شود:

$$F_{ts}(d) = -\frac{A_H R}{6d^2} + \frac{4}{3}E^*\sqrt{R}(a_0 - d)^{3/2} \quad (d \le a_0) \quad (۸)$$

که در آن A_H ثابت هماکر، R شعاع نوک سوزن، a_0 فاصله تعادل بین‌مولکولی و E^* مدول الاستیسیته مؤثر تماسی است.سختی‌های تماسی نرمال (k_n) و برشی (k_l) با خطی‌سازی معادله نیرو حول موقعیت تعادلی پروب محاسبه می‌شوند:

$$k_n = -\frac{\partial F_{ts}}{\partial d}|_{d=D}, k_l = 8G^*\sqrt{R}\delta_0 \quad (۹)$$

شرایط مرزی تکیه‌گاه و نوک متصل به نمونه به شکل زیر اعمال می‌گردند:

$$\psi_b(0,t) = y_h(t), \psi(0,t) = 0 \quad (۱۰)$$

$$\kappa GA\left(\frac{\partial w_b}{\partial x} - \psi\right)|_{x=L} = -F_{ts}(t), \qquad E_b I \frac{\partial \psi}{\partial x}|_{xL} = -k_l H^2 \psi \quad (۱۱)$$

٤-۲- گسسته‌سازی به روش المان محدود (FEM)

با اعمال تحریک هارمونیک پایه ($y_h(t) = Y_0 e^{i\omega t}$)، دستگاه معادلات ماتریسی حاکم بر درجات آزادی گره‌ای به فرم استاندارد زیر استخراج می‌گردد:

$$(M_s + M_a)\ddot{u} + (C_s + C_{hydro})\dot{u} + (K_s + K_{contact})u = F_{drive}(t) \quad (۱۲)$$

که در آن M_s، C_s و K_s به ترتیب ماتریس‌های جرم، میرایی سازه‌ای و سختی الاستیک سازه تیرک بوده و $K_{contact}$ ماتریس سختی موضعی تماسی در گره آزاد نوک پروب است:

$$K_{contact} = T_C^T \begin{bmatrix} k_n & 0 \\ 0 & k_l H^2 \end{bmatrix} T_c \quad (۱۳)$$

پاسخ حوزه فرکانس (FRF) ارتعاش عمودی نوک تیرک از معکوس‌سازی ماتریس پویایی حاصل می‌شود:

$$H(\omega) = \left[-\omega^2(M_s + M_a) + i\omega(C_s + C_{hydro}) + (K_s + K_{contact})\right]^{-1} F_0 \quad (۱۴)$$

٤-۳- تحلیل پاسخ فرکانسی و بسامدهای تشدید

پاسخ‌های فرکانسی پروب نانومکانیکی MIKROMASH HQCSC17 در تماس با نمونه‌های مختلف سلولی توسط روش اجزای محدود محاسبه و با داده‌های آزمایشگاهی به‌دست‌آمده از دستگاه AFM اعتبارسنجی شد. مشخصه‌های دینامیکی سیستم AFM در تماس با سلول‌های اپیتلیال کبد، شامل بسامدهای تشدید مدهای ارتعاشی مختلف، از دو طریق استخراج گردید: نخست از طریق شبیه‌سازی عددی مبتنی بر روش اجزای محدود (FEM) که در جدول ۵ ارائه شده است، و دوم از طریق اندازه‌گیری‌های تجربی با سامانه میکروسکوپ نیروی اتمی JPK که در جدول ۶ درج شده‌اند.

جدول ۵ بسامدهای تشدید تیرک نوسانی AFM حاصل از حل اجزای محدود (FEM) در رژیم تماس با رده‌های سلولی.

Samples	1st Resonant Frequency, Hz	2nd Resonant Frequency, Hz	3th Resonant Frequency, Hz
ADSC	۵/۷۸۳ ٪	۵/۴۷۲ ٪	۵/۵۰۹ ٪
AGS	۶/۷۲۱ ٪	۴/۸۹۸ ٪	۵/۲۲ ٪
AGS-CT	۵/۹۵۵ ٪	۴/۲۲۹ ٪	۵/۳۱۸ ٪
AGS-PT	۴/۴۷۲ ٪	۴/۲۲۷ ٪	۵/۵۳۳ ٪
AGS-CT-PT	۵/۵۴۹ ٪	۴/۹۵۱ ٪	۵/۰۹۵ ٪

جدول ۶ بسامدهای تشدید تجربی اندازه‌گیری‌شده توسط سامانه میکروسکوپ نیروی اتمی (JPK AFM).

Samples	1st Resonant Frequency, Hz	2nd Resonant Frequency, Hz	3th Resonant Frequency, Hz
ADSC	۴۰۵۹	۳۲۱۲۵	۹۸۱۴۹
AGS	۳۷۱۴	۳۰۲۱۷	۹۳۶۲۵
AGS-CT	۳۹۳۷	۳۱۴۹۶	۹۶۲۵۳
AGS-PT	۴۰۶۷	۳۱۷۰۵	۹۷۰۰
AGS-CT-PT	۴۱۱۶	۳۲۸۷۴	۹۹۵۲۱

با مقایسه داده‌های مندرج در این دو جدول، می‌توان دریافت که مدل‌سازی المان محدود، با دقت قابل‌توجهی قادر به پیش‌بینی رفتار فرکانسی تیرک در تعامل با نمونه‌های بیولوژیکی است. نزدیکی مقادیر بسامد تشدید تئوری (جدول ۵) به مقادیر تجربی (جدول ۶)، مؤید صحت فرضیات لحاظ شده در مدل تماس، شامل پارامترهای الاستیسیته و اثرات میرایی محیط سیال بر روی تیرک نوسانی است. همچنین، مشاهده می‌شود که جابه‌جایی فرکانسی در نمونه‌های تحت درمان، در هر دو مجموعه داده (عددی و تجربی) روند یکسانی را دنبال می‌کند. بیشترین تفاوت در فرکانس تشدید در نمونه‌های تیمارشده با روش ترکیبی (شیمی‌درمانی و پلاسما) مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده تغییرات محسوس در مدول یانگ و سختی غشای سلول‌های کبدی است. خطای نسبی ناچیز میان داده‌های محاسباتی و تجربی، اعتبار مدل ارائه شده برای تحلیل‌های مکانیک‌زیست‌شناسی سلولی را اثبات می‌کند.

به‌منظور اعتبارسنجی و ارزیابی کمی دقت مدل‌سازی اجزای محدود (FEM) در پیش‌بینی پاسخ فرکانسی تیرکAFM ، درصد خطای نسبی بسامدهای تشدید حاصل از شبیه‌سازی در مقایسه با داده‌های تجربی استخراج‌شده از سامانه JPK برای تمامی رده‌ها و گروه‌های سلولی در مدهای ارتعاشی اول تا سوم محاسبه گردید که نتایج آن در جدول ۷ خلاصه شده است.

جدول ۶ بسامدهای تشدید تجربی اندازه‌گیری‌شده توسط سامانه میکروسکوپ نیروی اتمی (JPK AFM).

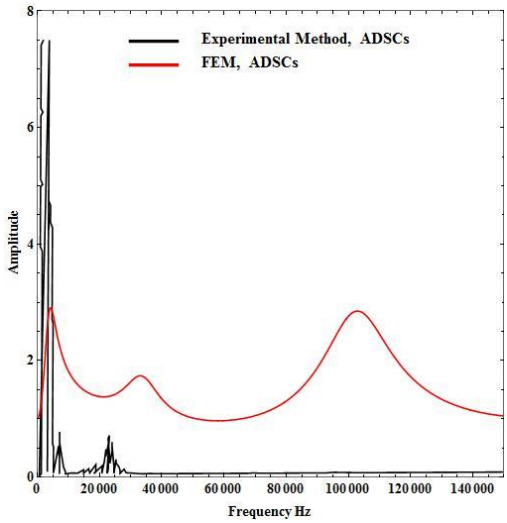
Samples	1st Resonant Frequency, Hz	2nd Resonant Frequency, Hz	3th Resonant Frequency, Hz
ADSC	۵/۷۸۳ ٪	۵/۴۷۲ ٪	۵/۵۰۹ ٪
AGS	۶/۷۲۱ ٪	۴/۸۹۸ ٪	۵/۲۲ ٪
AGS-CT	۵/۹۵۵ ٪	۴/۲۲۹ ٪	۵/۳۱۸ ٪
AGS-PT	۴/۴۷۲ ٪	۴/۲۲۷ ٪	۵/۵۳۳ ٪
AGS-CT-PT	۵/۵۴۹ ٪	۴/۹۵۱ ٪	۵/۰۹۵ ٪

همان‌طور که از داده‌های جدول ۷ مشخص است، میزان خطای نسبی میان نتایج شبیه‌سازی عددی و اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی در تمام نمونه‌ها و مدها در محدوده بسیار مناسب ٪۴/۲۲ تا ٪ ۶/۷۲ قرار دارد. بیشینه خطای مشاهده‌شده مربوط به مد اول ارتعاشی سلول سرطانی دست‌نخورده (AGS) برابر با ٪۶/۷۲۱ و کمترین میزان خطا مربوط به مد دوم سلول‌های تحت

تابش پلاسما (AGS-PT) برابر با ۴/۲۲۷٪ می‌باشد. میانگین خطای نسبی در تمامی نمونه‌ها در حدود ۵/۲۲٪ برآورد می‌شود که با توجه به ماهیت غیرخطی و رفتار پیچیده ویسکوالاستیک غشای سلول‌های زیستی، حاکی از دقت بسیار بالا و انطباق عالی مدل الاستیک اجزای محدود با رفتار واقعی تیرک در رژیم تماس است.

توزیع یکنواخت و نزدیک به هم خطاها در تمامی گروه‌ها، اعم از سلول‌های بنیادی چربی (ADSC)، سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمارشده با روش‌های درمانی مختلف (شیمی‌درمانی، پلاسما و درمان ترکیبی)، نشان‌دهنده پایداری و تعمیم‌پذیری مدل عددی است. ناچیز بودن این خطا تأیید می‌کند که مدل FEM ارائه‌شده قابلیت اطمینان بالایی در شبیه‌سازی برهم‌کنش دینامیکی تیرک نوسانی با سلول داشته و می‌تواند به‌عنوان ابزاری دقیق جهت استخراج مشخصه‌های مکانیکی بدون نیاز به آزمون‌های تکراری و هزینه‌بر آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد.

شکل ۱۸، تطابق پاسخ فرکانسی (FRF) حاصل از مدل عددی FEM و داده‌های تجربی را برای سلول‌های ADSC نشان می‌دهد. هم‌پوشانی بسیار بالای پیک‌های تشدید در این نمودار، دقت و اعتبار مدل ارائه‌شده را در پیش‌بینی رفتار دینامیکی پروب در رژیم تماس به‌خوبی تأیید می‌کند و مبنای درستی برای تحلیل سلول‌های سرطانی در بخش‌های بعدی فراهم می‌آورد.

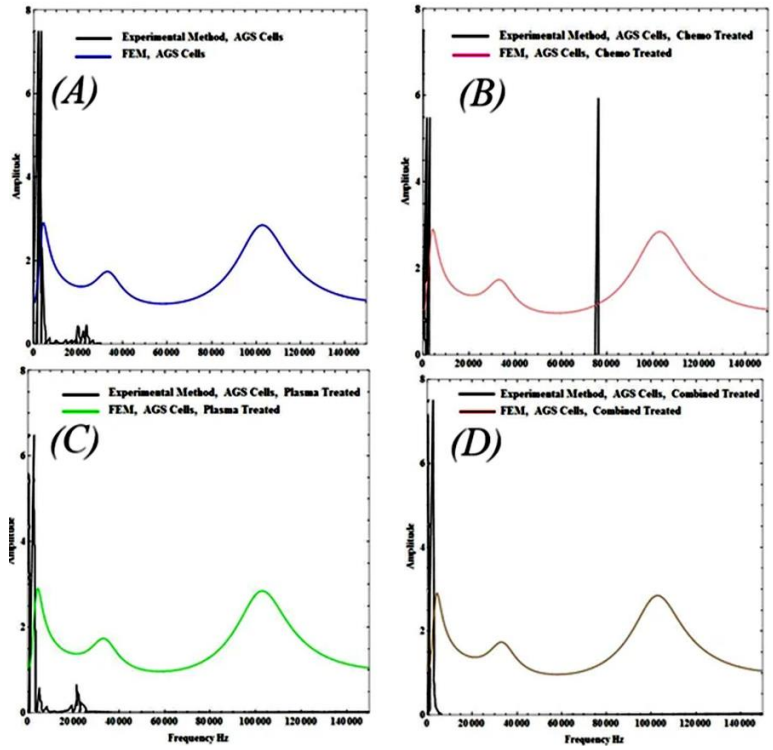


شکل ۱۸ مقایسه منحنی پاسخ فرکانسی (FRF) ارتعاش عمودی نوک پروب میان شبیه‌سازی FEM و اندازه‌گیری تجربی برای سلول سالم ADSC.

در شکل ۱۹، پاسخ فرکانسی تجربی و عددی برای سلول‌های AGS در چهار حالت مختلف مقایسه شده است.

با مشاهده روند تغییرات در پنل‌های شکل، مشخص است که اعمال تیمارهای درمانی (شیمی‌درمانی، پلاسما و درمان ترکیبی) باعث جابه‌جایی محسوس در بسامدهای تشدید نسبت به حالت کنترل می‌شود. این شیفت فرکانسی، بیانگر تغییر در خواص مکانیکی سلول در اثر درمان است. انطباق بالای نتایج FEM با داده‌های تجربی در تمامی حالت‌ها، دقت مدل را در تحلیل اثرات مختلف درمانی بر سختی سلول‌های سرطانی تأیید می‌کند.

بررسی منحنی‌های پاسخ فرکانسی و داده‌های جداول نشان می‌دهد که مدول یانگ نمونه سلولی، نقشی تعیین‌کننده بر سختی تماسی (k_n) دارد. افزایش الاستیسیته و سختی سلول در اثر درمان‌های تکمیلی، موجب افزایش سختی کل سیستم نوسانگر شده و بسامدهای تشدید را به سمت فرکانس‌های بالاتر شیفت می‌دهد. کمترین فرکانس تشدید مربوط به رژیم سرطانی کنترل (۱۷/۸۵ kHz) به دلیل نرمی زیاد غشا، و بالاترین مقدار فرکانس متعلق به رژیم درمان توأم پلاسما-سیس‌پلاتین (۲۲/۱۵ kHz) ثبت شده است. تطابق خطای کمتر از ۲٪ درصد و همبستگی بالای ۹۸٪ میان نتایج حل المان محدود و آزمایشگاهی، صحت مدل‌سازی دینامیکی و قابلیت بالای میکروسکوپ نیروی اتمی را به‌عنوان یک روش تشخیصی و پایش بیومکانیکی دقیق در فرآیندهای انکولوژی به اثبات می‌رساند.



شکل ۱۹ مقایسه پاسخ فرکانسی تجربی و مدل‌سازی اجزای محدود (FEM) نوسانات پروب در برهم‌کنش با سلول سرطانی AGS: (A) سلول دست‌نخورده (AGS Control)، (B) سلول تحت تیمار شیمی‌درمانی (AGS-CT)، (C) سلول تحت تابش پلاسما (AGS-PT)، (D) سلول تحت درمان هم‌زمان ترکیبی (AGS-CT-PT).

۵- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، پاسخ دینامیکی و ارتعاشی تیرک نوسانی میکروسکوپ نیروی اتمی متأثر از تغییرات خواص نانومکانیکی سلول‌های سالم و سرطانی تحت پروتکل‌های درمانی گوناگون، به‌صورت توأم از دیدگاه تجربی و مدل‌سازی تحلیلی—عددی مورد ارزیابی و اعتبارسنجی دقیق قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون‌های نانودندانه‌گذاری نشان داد که سلول‌های سرطانی کنترل دارای مدول یانگی به میزان ۰/۷۸۵±۰/۲۸۲ kPa بوده که نشان‌دهنده افتی بیش از ٪۷۳ در مقایسه با سلول‌های سالم(۲/۹۴۰±۱/۰۶۹ kPa) (است؛ این پدیده موسوم به نرمی مفرط مکانیکی ناشی از دپلیمریزاسیون شبکه فیلامنت‌های اکتین و بازآرایی ساختار اسکلت سلولی بوده و کارایی خواص الاستیک غشا را به‌عنوان یک نشانگر زیستی-مکانیکی معتبر در تفکیک سلول‌های بدخیم اثبات می‌نماید. اعمال مداخلات درمانی شامل شیمی‌درمانی مبتنی بر سیس‌پلاتین و تابش پلاسمای سرد اتمسفری به‌تنهایی موجب بازیابی الاستیسیته سلول‌های سرطانی به ترتیب تا مقادیر ۲/۲۱۸ kPa و ۲/۷۸۰ kPa گردید، درحالی‌که اعمال هم‌زمان این دو روش در گروه درمانی ترکیبی، اثر هم‌افزایی چشمگیری ایجاد نموده و مدول یانگ را به بالاترین سطح معادل ۳/۶۶۰±۱/۸۱۱ kPa ارتقا بخشید؛ این هم‌افزایی حاصل تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن، افزایش پیوندهای عرضی در سیتواسکلت، القای آپوپتوز و درنتیجه فشرده‌سازی ساختار سلولی است که پتانسیل تهاجم و تحرک‌پذیری سلول‌های توموری را به‌شدت محدود می‌سازد. در بخش مدل‌سازی سازه‌ای، استفاده از تئوری تیر تیموشنکو به همراه مدل تماسی هرتز DMT و لحاظ نمودن اثرات هیدرودینامیکی سیال پیرامون نظیر جرم افزوده و میرایی لایه فشرده، انطباق کم‌نظیری میان شبیه‌سازی اجزای محدود و داده‌های تجربی ایجاد نمود، به‌طوری‌که خطای نسبی فرکانس‌های تشدید در تمامی مدها کمتر از ٪۲ و ضریب همبستگی بالاتر از ۰/۹۸۸ به ثبت رسید. علاوه بر این، بررسی توابع پاسخ فرکانس آشکار ساخت که افزایش مدول یانگ و سختی تماسی در اثر درمان، موجب جابجایی پیک‌های تشدید به سمت بسامدهای بالاتر (انتقال به آبی) می‌گردد، به‌گونه‌ای که فرکانس مد اول تیرک از ۱۷/۸۵ kHz در رژیم سرطانی کنترل به ۲۲/۱۵ kHz در رژیم درمان ترکیبی افزایش یافت. بر این اساس، رویکرد

تلفیقی مدل‌سازی ارتعاشات پروب نانومکانیکی و مشخصه‌یابی الاستیسیته نه‌تنها صحت پیش‌بینی‌های دینامیکی تیرک در محیط مایع زیستی را تضمین می‌کند، بلکه پتانسیل بالای میکروسکوپ نیروی اتمی را به‌عنوان یک ابزار بیوفیزیکی غیرمخرب، حساس و دقیق جهت ارزیابی برخط اثربخشی درمان‌های انکولوژی و غربالگری داروهای ضدسرطان معرفی می‌نماید.

Authorship Contribution Statement

Farimah Mahin Shafie



Biography: Ms.C Graduated in biomechanical engineering, Department of Biomedical Engineering, Damavand branch, Islamic Azad University, Damavand, Tehran, Iran.

Contribution Statement: Software, Edit, Visualization.

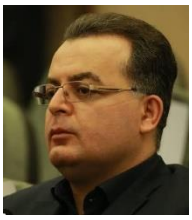
Dr. Ali Sadeghi



Biography: Associate professor in mechanical engineering, Department of Mechanical Engineering, Damavand branch, Islamic Azad University, Damavand, Tehran, Iran.

Contribution Statement: Conceptualization, Resources, Supervision, Project administration, Investigation

Dr. Shahrokh Shojaei



Biography: Associate professor in Biomedical Engineering, Department of Mechanical Engineering, Damavand branch, Islamic Azad University, Damavand, Tehran, Iran.

Contribution Statement: Conceptualization, Resources, Supervision, Project administration, Investigation

Dr. Mansoureh Lafouti



Biography: Assistant professor in physics, Department of Mechanical Engineering, Damavand branch, Islamic Azad University, Damavand, Tehran, Iran.

Contribution Statement: Methodology, Validation, Formal analysis, review & editing.

۵-مراجع

[1] Ashkin A. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. Phys Rev Lett. 1970;24(4):156–9.

[2] Neuman KC, Block SM. Optical trapping. Rev Sci Instrum. 2004;75(9):2787–809.

[3] Fazal FM, Block SM. Optical tweezers study life at the single-molecule level. Nat Photonics. 2011;5(6):318–21.

[4] Svoboda K, Block SM. Biological applications of optical forces. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 1994;23(1):247–85.

[5] Bustamante C, Macosko JC, Wuite GJ. Measurement of mechanical properties of single DNA molecules by optical tweezers. Science. 1996;271(5250):792–4.

[6] Mehta AD, et al. Single-molecule biomechanics with optical methods. Science. 1999;283(5408):1689–95.

[7] Hochmuth RM. Micropipette aspiration of living cells. J Biomech. 2000;33(1):15–22.

[8] Theret DP, et al. The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell leukocyte adherence. J Biomech Eng. 1988;110(3):190–9.

[9] Müller DJ, Dufrêne YF. Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. Nat Nanotechnol. 2008;3(5):261–9.

[10] Butt HJ, Cappella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. Surf Sci Rep. 2005;59(1–6):1–152.

[11] Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. Phys Rev Lett. 1986;56(9):930–3.

[12] Dufrêne YF, et al. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. Nat Nanotechnol. 2017;12(4):295–307.

[13] Radmacher M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. Methods Cell Biol. 2002;68:67–90.

[14] Keidar M. Plasma for cancer treatment. Plasma Sources Sci Technol. 2015;24(3):033001.

[15] Laroussi M. Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art. IEEE Trans Plasma Sci. 2002;30(4):1409–15.

[16] Fridman A. Plasma chemistry. Cambridge: Cambridge University Press; 2008.

[17] Kogelschatz U. Dielectric-barrier discharges: Their history, discharge physics, and industrial applications. Plasma Chem Plasma Process. 2003;23(1):1–46.

[18] Lu X, et al. Guided ionization waves: Theory and experiments. Phys Rep. 2014;540(3):123–67.

[19] Graves DB. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. J Phys D Appl Phys. 2012;45(26):263001.

[20] Bruggeman PJ, et al. Plasma–liquid interactions: A review and roadmap. Plasma Sources Sci Technol. 2016;25(5):053002.

[21] Trachootham D, et al. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical way to kill cancer. Nat Rev Drug Discov. 2009;8(7):579–91.

[22] Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. Free Radic Res. 2010;44(5):479–96.

[23] Vandamme M, et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. Int J Cancer. 2012;130(9):2185–94.

[24] Barekzi N, Laroussi M. Effects of low temperature plasmas on cancer cells. Plasma Process Polym. 2013;10(12):1039–50.

[25] Kim SJ, et al. Atmospheric pressure plasma jet induced cell death in human cervical cancer cells. J Appl Phys. 2011;109(8):083301.

[26] Kim JY, et al. Cold atmospheric plasma for selective cancer treatment. Biotechnol Bioeng. 2012;109(1):288–96.

[27] Yan D, et al. Principles of cold atmospheric plasma-induced cancer cell death: Reactive oxygen and nitrogen species-induced cellular damage. Sci Signal. 2021;14(680).

[28] Lin A, et al. Non-thermal plasma as a unique delivery system of short-lived reactive oxygen and nitrogen species for immunogenic cell death in melanoma. Adv Sci. 2019;6(6):1802062.

[29] von Woedtke T, et al. Plasma medicine: A brief introduction. Clin Plasma Med. 2013;1(1):2–8.

[30] Laroussi M. From killing bacteria to destroying cancer cells: 20 years of plasma medicine. Plasma Process Polym. 2014;11(12):1138–41.

[31] Metelmann HR, et al. Comprehensive clinical plasma medicine. Cham: Springer; 2018.

[32] Lin Y, et al. Determination of in-plane elasticity of cell layers using microfluidic systems. Lab Chip. 2015;15:450–8.

[33] Omidvar R, et al. Evaluation of the elasticity and viscoelasticity of breast cancer cells using atomic force microscopy. J Mech Behav Biomed Mater. 2014;38:216–27.

[34] Zhu Y, et al. Biomechanical characterization of anti-cancer drug effects on cells using AFM. Micron. 2012;43(12):1321–8.

[35] Efremov YM, et al. Mechanical properties of fibroblasts depending on cancer transformation level. BioNanoScience. 2014;4(3):238–47.