بررسی آثار زیست‌الهامی یک بستر پلیمری نوآرایی‌شده جدید بر اتصال، مورفولوژی و رشد سلول‌های فیبروبلاست انسانی

رضا مهدویان[1]، حسین نادری‌منش[1*]

۱ .گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت‌مدرس، تهران، ایران.

*naderman@modares.ac.ir

دریافت:۱۴۰۰/۰۷/۶ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷

چکیده

بسترهای کشت سلول، نقشی کلیدی در حوزه مهندسی بافت و زیست‌مواد دارند. ازاین‌رو ارائه بستری زیست‌سازگار با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مشابه با ماتریس خارج سلولی برای دستیابی به اتصال، زنده‌مانی، رشد و ریخت‌شناسی مناسب انواع سلول‌ها، توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است. توسعه بسترهایی دارای انواع توپوگرافی سطح که به‌عنوان فاکتور زیست‌الهام در اتصال هدایت‌شدهٔ سلول نقش بازی می‌کنند، از مهم‌ترین رویکردهای اتخاذشده در این حوزه به شمار می‌آیند. در پژوهش حاضر، با به‌کارگیری روشی جدید به طراحی، سنتز و مشخصه‌یابی بستری با آرایه‌های هم‌راستای سطحی در ابعاد چند صد نانومتری پرداخته شد. درنهایت نیز رفتار سلول‌های فیبروبلاست انسانی لاین HU02 کشت داده شده روی این بستر از نظر اتصال، رشد، زنده‌مانی و ریخت‌شناسی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که تیمار پلاسمای ۱۰۰ و ۲۰۰ ثانیه‌ای تحت کشش جانبی بستر باعث شکل‌گیری آرایه‌های هم‌راستا با ابعاد ۱۹±۳۰۵ نانومتر و ۱۴۱±۵۷۱ نانومتر بر سطح این بسترها می‌شود. با افزایش زمان تیمار پلاسما، طول موج، دامنهٔ ساختار و درجه آب‌دوستی سطح بسترهای موردمطالعه افزایش پیدا می‌کند که منجر به بهبود ۱۷ و ۴۶ درصدی کیفیت اتصال سلول می‌شود. همچنین آرایه‌های میکرونی شکل‌گرفته روی سطح بسترها ضمن کمک به افزایش کیفیت اتصال، رشد و زنده‌مانی سلول‌ها با اثر هدایت اتصال باعث جهت‌گیری سلول‌ها در راستای طولی آرایه‌ها می‌شود. در نتیجه بستر پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان این پژوهش کاملاً زیست‌سازگار بوده و از نظر مشخصه‌های شیمیایی، مکانیکی و فیزیکی قابلیت مطلوبی را برای کاربردهای کشت سلولی نشان می‌دهد. همچنین باعث بهبود کیفیت اتصال و هم‌راستاکردن سلول‌های فیبروبلاست انسانی می‌شود.

کلیدواژگان: بستر کشت سلول، پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان، رشد سلول، ریخت‌شناسی سلول، هدایت اتصال.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]

۱- مقدمه

سلول‌ها در محیط درون‌تنی[1] بیشتر در فضایی سه‌بعدی پوشیده از ماتریس خارج سلولی[2] قرار دارند. این محیط ساختار و ترکیبی خاص دارد که علاوه بر ایجاد حمایت سلولی با ارائهٔ مؤلفه‌های گوناگون فیزیکی و شیمیایی بر سلول‌های هر بافت اثری اختصاصی می‌گذارد [۱]. به این مؤلفه‌های محیطی در علم مهندسی بافت، نشانه‌های خارجی[3] گفته می‌شود. نخستین‌بار نقش نشانه‌های خارجی بر عملکرد سلول‌های جانوری با بررسی اثر مؤلفه‌های بیوشیمیایی مانند مولکول‌های کوچک شیمیایی، فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و مورفوژن‌ها سنجیده شده است. پس از آن، نقش نشانه‌های فیزیکی محیط نیز به‌عنوان انواعی از نشانه‌های خارجی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفت [۱, ۲]. در این راستا، دانشمندان با مطالعه‌های متعددی به بررسی نشانه‌های فیزیکی بستر مانند سفتی و توپوگرافی سطح پرداخته‌اند. انواع بسترهای سلولی به‌منظور شبیه‌سازی ساختار ماتریس خارج سلولی گسترش یافته‌اند. بسترهایی دارای انواع زبری سطح[4] شامل آرایه‌های با ابعاد، شکل و جهت‌گیری‌های خاص به‌عنوان نماینده‌هایی از شرایط فیزیکی ماتریس خارج‌سلولی گسترش یافته است. نقش این عوامل زیست‌الهام در بروز مشخصه‌های اساسی سلول ثابت شده است [۳]، برای مثال مشخص شده است که ساختار ماتریس خارج‌سلولی در بافت ماهیچه قلبی، عصبی، اپی‌درم پوست و استرومای قرنیه رشته‌هایی منظم با پایه کلاژن دارند و شبیه‌سازی بستری دارای این شرایط در آزمایشگاه به حفظ مشخصه‌ها و رفتار سلول یا القای تمایز هدایت‌شده در سلول‌های بنیادی کمک می‌کند. همچنین ثابت شده است که در شرایط آزمایشگاهی نیز مانند درون بدن جانداران، سلول‌های مجاور می‌توانند با برقراری ارتباط با یکدیگر بر کیفیت اتصال، جهت‌گیری و مهاجرت سلول‌ها اثرگذار باشند [۱, ۵-۳].

هدایت اتصال[5]، نام پدیده‌ای است که در آن رفتار سلول، شامل ریخت‌شناسی و کیفیت اتصال، تحت تأثیر مشخصه‌های توپوگرافی سطح بستر تغییر می‌کند. تاکنون، مطالعه‌های متعددی در این حوزه پیرامون بررسی اثر بسترهای مصنوعی آزمایشگاهی با ویژگی‌های ریخت‌شناسی مختلف شامل انواع آرایه‌ها با ابعاد نانو و میکرو، آرایه‌های ساخته‌شده از جنس پلیمر یا نانوذرات مختلف و آرایه‌های با الگوبرداری از بافت طبیعی یا شرایط مصنوعی، بر رفتار و کیفیت اتصال سلول انجام شده است. نتایج پژوهش‌ها، نقش مهم توپوگرافی بستر را در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی[6] بر مشخصه‌های اساسی سلولی نشان می‌دهد. این مشخصه‌ها، کیفیت اتصال، ریخت‌شناسی، جهت‌گیری، مهاجرت، رشد و تمایز سلول‌های مختلف را شامل می‌شود. این مطالعه‌ها به درک بهتر سازوکارهای عملکردی سلول و نیز باززایی بافت و اندام در پزشکی بازساختی کمک می‌کنند [۲, ۳, ۹-۶].

در مطالعه‌های این حوزه، انواع بسترهای توسعه‌یافته بر اساس مشخصه‌های توپوگرافیک بیشتر بر دو پایه دسته‌بندی می‌شوند، دسته‌بندی اول، ابعاد، شامل بسترهایی با آرایه‌های تکرارشوندهٔ تک‌بعدی در مقابل چندبعدی و دسته‌بندی دوم، پیوستگی که شامل بسترهایی با آرایه‌های سطحی پیوسته در مقابل گسسته است، برای مثال در مطالعه‌های متعددی از فیبرهای هم‌راستای الکترواسپین‌شده و یا خودآرا به‌عنوان آرایه‌های تک‌بعدی پیوسته و یا از آرایه‌های ستونی میکروساخت[7] به‌عنوان آرایه‌های یک یا چندبعدی گسسته استفاده شده است. همچنین در این مطالعه‌ها، اندازه‌های متفاوتی از آرایه‌ها، از چند ده میکرون تا آرایه‌های نانویی گزارش‌شده است

1 *In vivo*
2 Extracellular matrix
3 External cues
4 Surface roughness
5 Contact Guidance
6 *In vitro*
7 Microfabricated

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]

[۲, ۳, ۱۰]. در این میان آرایه‌های با ابعاد چندصد نانومتری می‌توانند اثرهای زیرسلولی[8] بر جایگاه‌های بالقوه اتصال هر سلول داشته باشند که با القای نواحی مجاز اتصال و از راه تغییر در نحوه آرایش اسکلت سلولی بر کیفیت اتصال، مهاجرت، ریخت‌شناسی، رشد و تمایز سلول‌ها اثر می‌گذارند [۲, ۳, ۵, ٦, ۱۰, ۱۱].

ازاین‌رو، ارائه پلتفرمی ارزان، قابل دست‌ورزی و تکرارپذیر برای ساختن بستری دارای آرایه‌هایی در ابعاد چند صد نانومتر که گستره طولی آن در مقیاس نزدیک به فواصل میان نقاط چسبندگی کانونی[9] و فواصل بین رشته‌های اکتین اسکلت سلولی است، از موضوعات موردتوجه در این حوزه به شمار می‌آید. آرایه‌های سطحی در این ابعاد با تحمیل فواصل و نواحی مجاز اتصال به سلول می‌توانند نقش هدایت اتصال خود را ایفا کنند. همچنین با اعمال تغییرات در فرایند آماده‌سازی بستر و درنتیجه با تغییر ابعاد و ویژگی‌های آرایه‌های سطح، می‌توان مشخصه‌های بستر را طوری تغییر داد که به ساختار ماتریس خارج سلولی در یک بافت خاص دارای سلول‌های هم‌راستا شبیه‌تر شود. این مهم درنهایت به گسترش پلتفرمی زیست‌الهام برای توسعهٔ مدل‌های آزمایشگاهی کشت سلولی با کاربردهایی همچون توسعه بسترهای تمایزی، داربست‌های استخوانی، ماهیچه‌ای و زخم‌پوش‌ها کمک می‌کند [٦, ۸, ۱۲]. در مطالعه حاضر با به‌کارگیری روشی نوین، به‌وسیله تیمار پلاسمای سطح بستر خام از جنس پلیمر پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان[10] (PDMS) همزمان با اعمال کشش جانبی به ایجاد بستری زیست‌سازگار، پایدار و ارزان با آرایه‌های میکرونی در سطح پرداخته‌ایم. پس از مشخصه‌یابی بستر با میکروسکوپ نیروی اتمی، میکروسکوپ الکترونی و انجام سنجش‌های مکانیکی، رفتار سلول‌های فیبروبلاست پوستی انسان شامل اتصال، زنده‌مانی، رشد و ریخت‌شناسی آنها بر بستر مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ تهیه بستر PDMS

الاستومر PDMS (Sylgard 184, Dow Corning, USA) با مخلوط‌سازی نسبت‌های ۱ به ۱۰ وزنی از محلول پیونددهنده به پلیمر پایه تهیه شد. سپس فرایند حباب‌زدایی به‌وسیله دستگاه خشک‌کن در خلأ[11] انجام شد. ترکیب پلیمر تهیه‌شده درون یک قالب مسطح از جنس پلی‌آکریلات به مدت ٦ ساعت و در دمای ٦٥ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس، نوارهایی در ابعاد مطلوب بریده شد و تعدادی از نوارهای تهیه‌شده، با استفاده از ابزار ساخته‌شده توسط پژوهشگر تحت کشش جانبی تا ۲۰ درصد طول هر نوار قرار گرفت. در مرحله بعد، جهت عامل‌دارکردن سطح و درنتیجه آب‌دوست‌شدن و نیز ایجاد چین و چروک‌های موردنظر در سطح بستر، نوارهای تهیه‌شده با و بدون کشش به مدت ۱۰۰ و ۲۰۰ ثانیه (جدول ۱) در دستگاه Harrick Plasma (High Power, 0.5-1 Torr) تحت تیمار پلاسما قرار گرفتند. درنهایت نمونه‌های تهیه‌شده برای تست‌های مشخصه‌یابی و کشت سلولی مورد استفاده قرار گرفتند.

8 Subcellular
9 Focal adhesion
10 Polydimethylsiloxane (PDMS)
11 vacuum desiccator

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]

جدول ۱ طبقه‌بندی بسترهای PDMS تهیه‌شده براساس زمان تیمار و اعمال کشش

کد قراردادی بستر	نام کامل نمونه	کشش	زمان تیمار پلاسما (ثانیه)
تیپ ۰	بستر بدون تیمار پلاسما	–	۰
تیپ ۱۰۰	بستر با تیمار پلاسما ۱۰۰ ثانیه	–	۱۰۰
تیپ ۲۰۰	بستر با تیمار پلاسما ۲۰۰ ثانیه	–	۲۰۰
آرپ ۱۰۰	بستر با آرایه سطحی و پلاسما ۱۰۰ ثانیه	✓	۱۰۰
آرپ ۲۰۰	بستر با آرایه سطحی و پلاسما ۲۰۰ ثانیه	✓	۲۰۰

۲-۲ مشخصه‌یابی با میکروسکوپ نیروی اتمی

ریخت‌شناسی سطح نمونه‌های PDMS پس از تیمار پلاسما، به‌وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM, Multi-mode AFM, Ara Research Co., Tehran, Iran) بررسی شد. نمونه‌های PDMS دارای آرایه سطحی تیمار پلاسماشده به مدت ۱۰۰ (بستر با کد آرپ ۱۰۰) و ۲۰۰ ثانیه (بستر با کد آرپ ۲۰۰) و نمونهٔ PDMS بدون اعمال کشش (کد تیپ ۰) برای این سنجش انتخاب شدند. سنجش‌ها در حالت غیرتماسی[12] این دستگاه انجام شد. تصاویر سطح بستر با فرکانس ۰٫۸ هرتز و ولتاژ ۰٫۷ ولت در پنجره‌های ۲۰ میکرومترمربعی با رزولوشن ۵۱۲ پیکسل تهیه شد. برای تحلیل تصاویر، سنجش سایزها و طول موج‌های بستر از ورژن 1.53c نرم‌افزار ImageJ (Fiji, Madison, WI, USA) استفاده شد.

۲-۳ مشخصه‌یابی با میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (MIRA III FESEM, TE-SCAN) از نمونه‌های PDMS دارای آرایه سطحی تیمار پلاسماشده آرپ ۱۰۰ و آرپ ۲۰۰ و نمونهٔ PDMS بدون اعمال کشش تیپ ۰ تهیه شد. برای این منظور پس از یک مرحله پوشش‌دهی نمونه‌های پلیمری بستر با طلا، تصویربرداری از سطح آنها در شرایط ولتاژ و جریان پایین دستگاه انجام شد.

12 NonContact mode

۲-۴ سنجش زاویه تماس[13] بستر

در این سنجش میزان آب‌دوستی سطح بستر در حالت تیمار پلاسماشدهٔ دارای توپوگرافی آرپ ۱۰۰ و آرپ ۲۰۰ در مقایسه با PDMS ساده تیپ ۰ و تیمار پلاسماشدهٔ بدون اعمال کشش در دو زمان ۱۰۰ و ۲۰۰ ثانیه (به‌ترتیب نمونه‌های تیپ ۱۰۰ و تیپ ۲۰۰) در شرایط رطوبت هوای ۱۹٫۰درصد دمای ۲۸٫۸C° و فشار هوای ۸۷kPa، به وسیله دستگاه سنجش زاویه تماس مدل CAG-20 (ژیکان، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۵ کشت سلولی

سلول‌های فیبروبلاست انسانی HU02 تهیه‌شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، در محیط کشت سلول DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco, NY, USA) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند. این سلول‌ها برای رسیدن به تراکم کافی به مدت ۴۸ ساعت در اتمسفر مرطوب با دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد گاز CO_2 انکوبه شدند. سنجش اتصال سلولی، رشد و زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست انسانی با آزمایش MTT برای سلول کشت داده‌شده روی نمونه‌های بستر PDMS تیپ ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، آرپ ۱۰۰ و آرپ ۲۰۰ صورت پذیرفت. برای سنجش زنده‌مانی تعداد ۸۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۳۰۰۰ سلول به‌ازای هر خانه از پلیت ۲۴ خانه به مدت، ۲۴، ۴۸ و ۷۲

13 Contact angle

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]

ساعت کاشته شد. تست سنجش اتصال کوتاه‌مدت سلول نیز با روش MTT انجام شد، با این تفاوت که در گام نخست و یک ساعت پس از کاشت سلول‌ها، دو مرحله شستشو بیشتر، سلول‌ها با بافر PBS انجام شد و سپس سلول‌های متصل باقیمانده به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در هر دو سنجش پس از زمان‌های مشخص، سلول‌ها در معرض غلظت ۰٫۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نمک MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium) قرار گرفته و به مدت ۳ ساعت در اتمسفر مرطوب با دمای ۳۷ درجه و ۵درصد گاز CO_2 انکوبه شدند. پس از این زمان و بعد از حذف محیط حاوی MTT، به‌منظور محلول‌سازی کریستال‌های بنفش‌رنگ فورمازان تولیدشده در میتوکندری سلول‌های زنده از دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) استفاده شد و سپس پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محیط تاریک روی شیکر قرار داده شدند. جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر و با کمک دستگاه خوانشگر میکروپلیت(Biotek®,Winooski, VT, USA) اندازه‌گیری شد. سلول‌های رشد داده‌شده بدون بستر PDMS (کف چاهک‌های پلیت کشت سلول)، به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سنجش‌های آماری و آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) روی نتایج این سنجش‌ها با نرم‌افزار GraphPad Prism™ v9.0 انجام شد.

۶-۲ میکروسکوپی

سلول‌ها در حالت‌های مختلف بستر، از نظر ریخت‌شناسی و میزان هم‌راستاشدن به‌وسیله تصویربرداری با میکروسکوپ نوری (Olympus Ltd, Olympus IX81 Tokyo, Japan) بررسی شدند. تصاویر میکروسکوپی برای سلول تثبیت‌شده با پارافرم‌آلدهید ٤ درصد، روی بسترهای از جنس PDMS با کدهای تیپ ۰ ، ۱۰۰، ۲۰۰، آرپ ۱۰۰ و آرپ ۲۰۰ و نیز کف چاهک پلیت کشت سلولی به‌عنوان کنترل تهیه شد. تصاویر گزارش‌شده برای این سنجش در 30 ساعت پس از کشت و پس از دو مرحله شستشو با بافر PBS برای اطمینان از حذف سلول‌های غیرمتصل تهیه شده‌اند. پس از تصویربرداری، مطالعه رفتار سلول‌ها در حضور این بسترها شامل میزان کشیدگی یا قطبش سلول‌ها و نیز زاویه جهت‌گیری سلول‌ها روی بستر با ورژن 1.53c نرم‌افزار ImageJ (Fiji, Madison, WI, USA) انجام شد.

۷-۲ محاسبه‌های آماری

داده‌های جمع‌آوری‌شده از تست‌های این مطالعه پس از نرمال‌سازی تجزیه‌وتحلیل آماری شدند. سنجش‌های آماری مانند مقایسه میانگین‌ها و تحلیل واریانس با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism™ v9.0 انجام شد. همچنین کمّی‌سازی طول‌ها، فاصله‌ها و نیز محاسبه‌ی زاویه‌ها از تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی، میکروسکوپ الکترونی و میکروسکوپ نوری با ورژن 1.53c نرم‌افزار ImageJ (Fiji, Madison, WI, USA) انجام شده است.

۳- نتایج

۱-۳ سنتز و مشخصه‌یابی بستر

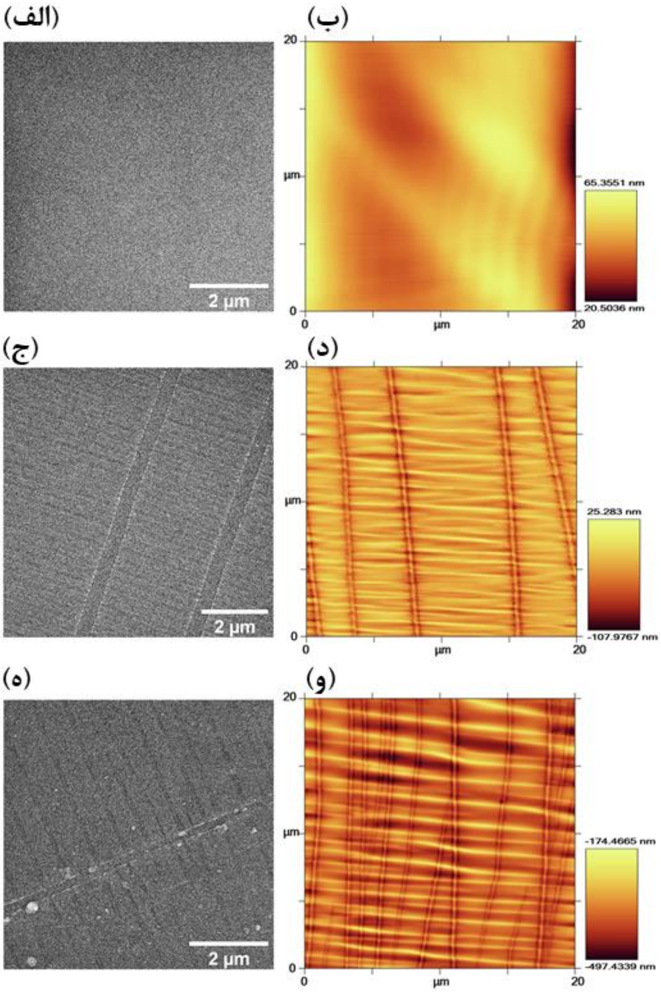
اندازه‌گیری‌ها نشان داد که تمام بسترهای پلیمریزه‌شدهٔ PDMS، با حفظ شرایط تکرارپذیر سنتز ضخامتی معادل ۰٫۰۵ ±۱ میلیمتر دارند، مطالعه‌های قبلی در اهمیت ضخامت بسترها نشان داده‌اند که ضخامت بستر PDMS با ضریب کشسانی یانگ رابطه عکس دارد و می‌تواند با اثرگذاری بر رفتار پلیمر تحت تنش کشش و نیز ایفای نقش بر رفتار سلول کشت داده‌شده روی بستر، به‌عنوان یک متغیر مهم شناسایی شود [۱۳]. ازاین‌رو در این مطالعه، با ثابت نگه‌داشتن این مؤلفه و متغیر قراردادن زمان تیمار پلاسما به بررسی امکان شکل‌گیری کنترل‌شدهٔ آرایه‌های سطحی چند صد نانومتری پرداخته شد. شکل ۱ تصاویر حاصل از سنجش‌های SEM و AFM را برای

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]

نمونه‌های تحت تیمار پلاسمای ۱۰۰ و ۲۰۰ ثانیه‌ای (بستر آرپ ۱۰۰ و ۲۰۰) در کنار نمونهٔ کنترل بدون کشش تحت تیمار پلاسما نشان می‌دهد. با مشاهدهٔ این تصاویر می‌توان شکل‌گیری چین‌وچروک‌های چند صد نانومتری براثر تیمار پلاسمای بستر PDMS تحت کشش جانبی ۲۰ درصدی را مشاهده کرد. بررسی‌های آماری روی نتایج این دو سنجش نشان می‌دهد که طول موج امواج شکل‌گرفته بر بستر، ارتباطی مستقیم با زمان تیمار پلاسمای آنها دارد. در این بررسی، با افزایش زمان تیمار پلاسما از ۱۰۰ به ۲۰۰ ثانیه، طول موج‌های شکل‌گرفته نیز از میانگین ۱۹±۳۰۵ نانومتر به ۱۴۱±۵۷۱ نانومتر افزایش پیدا کرده‌اند. همچنین مشاهده شد که افزایش زمان تیمار پلاسما، انحراف معیار در طول امواج را نیز به‌طور معناداری افزایش می‌دهد. این افزایش انحراف معیار، تنوع بیشتر در طول موج‌های سطحی نمونه‌های این حالت را نشان می‌دهد. در این مطالعه میزان دامنهٔ امواج شکل‌گرفته بر سطح به‌وسیله مطالعهٔ میکروسکوپ نیروی اتمی به‌عنوان فاکتور محور z یا زبری سطح بستر اندازه‌گیری شد. این مقدار به‌عنوان معرف بیشترین اختلاف در پستی‌وبلندی سطح بستر از ٤٤٫٨٥ نانومتر در سطح بدون‌آرایه نمونه کنترل تیپ ۰ به ۱۳۳٫۲٦ نانومتر در بستر آرپ ۱۰۰ و ۳۲۲٫۹۷ نانومتر در بستر آرپ ۲۰۰ رسیده است. با توجه به مطالعه‌های انجام‌شده پیرامون موضوع هدایت اتصال در بسترهای کشت سلولی، ثابت شده است که این افزایش عدد زبری سطح با ممانعت از شکل‌گیری اتصال‌های تصادفی سطحی به کنترل هدایت‌شدهٔ اتصال سلول و درنهایت منجر به القای ریخت‌شناسی مطلوب می‌شود [۷] (شکل ۱).

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]



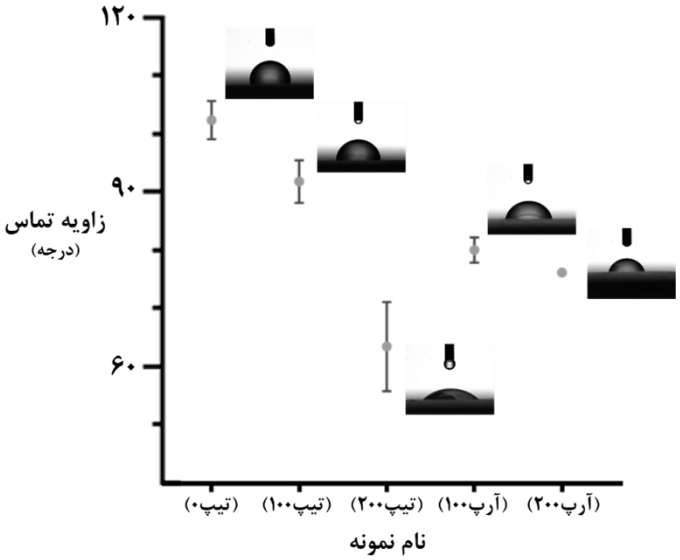
شکل ۱ تصاویر حاصل از سنجش‌های SEM و AFM بسترها. به‌ترتیب SEM و AFM نمونه‌های کنترل (الف) و (ب)، بستر آرپ ۱۰۰ (PDMS تحت کشش ۲۰ درصد با تیمار پلاسمای ۱۰۰ ثانیه) (ج) و (د)، و بستر آرپ ۲۰۰ (PDMS تحت کشش ۲۰ درصد با تیمار پلاسمای ۲۰۰ ثانیه‌ای) (ه) و (و)

همچنین تیمار پلاسما با عامل‌دارکردن سطح بستر PDMS منجر به آب‌دوست‌شدن سطح آب‌گریز آن شده و درنهایت می‌تواند موجب اتصال بهتر سلول‌ها شود [۱٤؛ ۱۵]. سنجش‌های زاویه تماس برای بستر PDMS نشان می‌دهد که با افزایش زمان تیمار پلاسما در نمونه‌ها، زاویهٔ تماس کاهش پیدا می‌کند. این موضوع نشان‌دهندهٔ افزایش میزان آب‌دوستی سطح بستر است. در این میان بسترهای دارای آرایهٔ سطحی آرپ ۱۰۰ و ۲۰۰ در مقایسه با نمونهٔ متناظر بدون آرایهٔ خود، یعنی تیپ ۱۰۰ و ۲۰۰ از نظر میزان آب‌دوستی قدری کاهش را نشان می‌دهند. این مشاهده می‌تواند نمایانگر تأثیرگذاری بیشتر آرایه سطحی بر زاویه تماس قطره آب در مقایسه با عوامل هیدروفیل سطح باشد [۱٦] (جدول ۲) (شکل ۲).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]

جدول ۲ جدول مقادیر زاویه تماس آب برای نمونه‌های بسترPDMS

	نام نمونه	میانگین زاویه تماس (درجه)
الف	بستر بدون تیمار پلاسما (تیپ ۰)	۱۰۲,۳۷±۳,۲٤
ب	بستر با تیمار پلاسما ۱۰۰ ثانیه (تیپ ۱۰۰)	۹۱,۸۳±۳,٦۷
ج	بستر با تیمار پلاسما ۲۰۰ ثانیه (تیپ ۲۰۰)	٦۳,٥۳±۷,٦۰
د	بستر با آرایه سطحی و پلاسما ۱۰۰ ثانیه (آرپ ۱۰۰)	۸۰,۱±۲,۱۲
ه	بستر با آرایه سطحی و پلاسما ۲۰۰ ثانیه (آرپ ۲۰۰)	۷٦,۲±۰,٦۱



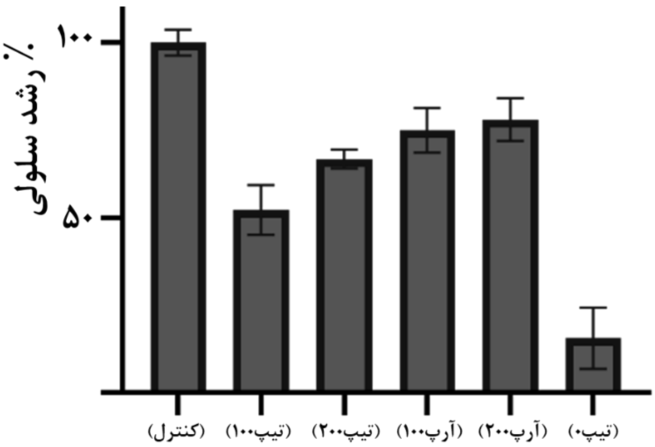
شکل ۲ نمودار سنجش زاویهٔ تماس برای نمونه‌های بستر در حالت‌های پنجگانه بستر PDMS، به همراه تصاویر زاویه تماس قطره آب متناظر هر نمونه

۲-۳ اتصال کوتاه‌مدت سلول

سنجش اتصال کوتاه‌مدت به‌منظور بررسی کیفیت اتصال سلول روی بستر در مدت‌زمان کوتاه پس از کشت انجام شده است. همان‌طور که در نمودار شکل ۳ مشخص است، در این سنجش اتصال سلول به بسترهای PDMS تیمار پلاسماشده به میزان معناداری بیشتر از بستر بدون تیمار پلاسما است که درنتیجهٔ افزایش آب‌دوستی سطح تیمارشدهٔ بسترها رخ می‌دهد. همچنین در هر دو حالت، بستر تیمار پلاسماشدهٔ دارای آرایه‌های سطحی و بدون آن، با افزایش زمان تیمار پلاسما و به‌دنبال آن افزایش میزان آب‌دوستی بسترها، کیفیت اتصال سلول‌ها نیز افزایش پیدا می‌کند. از سوی دیگر در میان نمونه‌های با زمان تیمار پلاسمای یکسان، وجود آرایه‌های سطحی علاوه بر تأثیر بر ریخت‌شناسی سلول‌ها، به افزایش اتصال سلول در کوتاه‌مدت نیز کمک کرده است. این نتایج در حالی است که درصد اتصال سلول‌ها به بستر در بهترین حالت خود که روی بستر دارای آرایهٔ سطحی با تیمار پلاسمای ۲۰۰ ثانیه است، کمتر از سلول کشت داده‌شده کف چاهک پلیت تجاری کشت سلول است. آنالیز ANOVA یک‌طرفه برای همهٔ حالتهای بستر PDMS نسبت به کنترل (ستون اول نمودار شکل ۳)، اختلافی معنادار را نشان می‌دهد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]

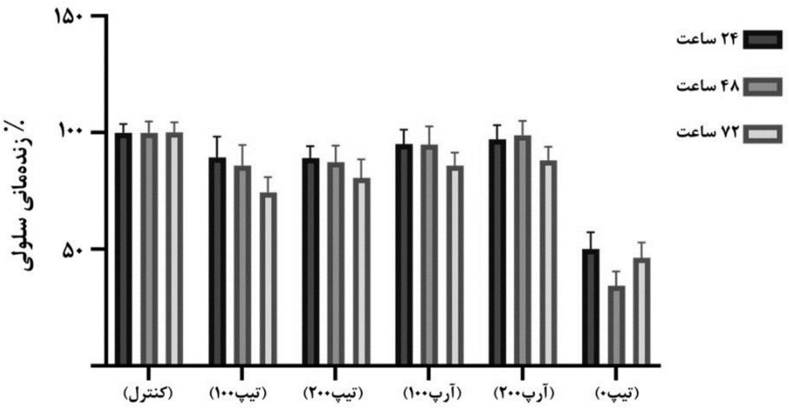


شکل ۳ نمودار مربوط به درصد اتصال سلول در سنجش اتصال کوتاه‌مدت پس از ۲٤ ساعت. سلول‌های رشدیافته کف چاهک پلیت کشت سلول به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شده‌اند.

۳-۳ رشد سلول

به‌منظور بررسی کیفیت رشد سلول‌های فیبروبلاست انسانی بر بسترهای PDMS، سنجش MTT در روزهای اول، دوم و سوم پس از کاشت سلول‌ها انجام شد. نتایج این سنجش نشان می‌دهد که وجود آرایه‌ها به‌عنوان یک عامل توپوگرافیک هدایت اتصال باعث رشد و زنده‌مانی بهتر سلول‌های فیبروبلاست انسانی در نمونه‌های بستر با زمان تیمار پلاسمای یکسان (برای مثال تیپ ۱۰۰ و آرپ ۱۰۰) شده است (شکل ٤). نتایج این سنجش برای زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت در دو نمونهٔ بستر با آرایهٔ سطحی آرپ ۱۰۰ و ۲۰۰ عدم وجود تفاوتی معنادار از رشد سلولی را نسبت به نمونهٔ کنترل نشان می‌دهد.

همچنین نتایج نشان می‌دهد که میزان رشد سلول‌ها بین زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت در هریک از حالت‌های بستر تیپ ۱۰۰، تیپ ۲۰۰، آرپ ۱۰۰ و آرپ ۲۰۰ تفاوت چندانی با هم ندارد، هرچند رشد سلولی روی این بسترها در روز سوم پس از کشت نسبت به نمونه کنترل متناظر خود همراه با کاهش بوده است. این رخداد می‌تواند در اثر محدودشدن اتصال سلول‌ها به سطح بستر همزمان با کاهش جزئی میزان آب‌دوستی سطوح تحت تیمار پلاسما در طی زمان باشد. همچنین در نمونه‌های بستر PDMS بدون تیمار پلاسمای تیپ ۰، پس از ۷۲ ساعت، به علت تمایل سلول‌ها به تشکیل توده‌های سلولی اسفیروئید، افزایش رشد مشهود است.

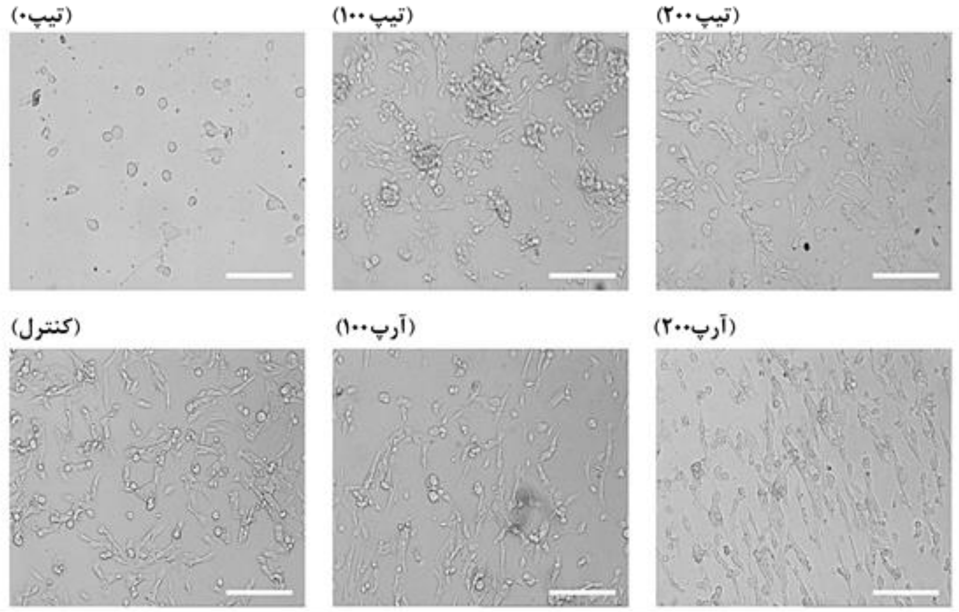


شکل ٤ نمودار مربوط به زنده‌مانی سلول فیبروبلاست انسانی در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت (به‌ترتیب: سیاه، خاکستری و طوسی). سلول‌های رشدیافته بر چاهک پلیت کشت سلول به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شده‌اند.

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

٤-۳ تصاویر میکروسکوپ نوری

علاوه بر ارزیابی کیفیت اتصال، رشد و زنده‌مانی سلول با کمک روش سنجش میتوکندریایی MTT، سنجش دیگری نیز با استفاده از حالت نوری میکروسکوپ فلورسانس Olympus IX81 انجام شد. این سنجش برای تأیید تغییر ریخت سلول‌ها با توجه به توپوگرافی بستر انجام شد. در این آزمایش،۳۰ ساعت بعد از کشت سلول‌ها روی بسترهای مربوط میزان کشیدگی یا قطبش سلول‌ها و همچنین زاویه جهت‌گیری آنها در هر یک از حالت‌های مختلف بستر ثبت شد (شکل ٥). در تأیید این نتایج، یافته‌های پیشین نشان داده‌اند جهت‌گیری یکسان در سلول‌هایی که هیچ‌گونه تماس یا ارتباط فیزیکی با یکدیگر ندارند، می‌توانند ناشی از اثر هدایت اتصال توپوگرافی موجود در سطح بستر PDMS آرپ ۱۰۰ و ۲۰۰ نمایش‌داده‌شده در شکل ٥ باشد [۷-٥, ۱۳, ١٤].



شکل ٥ تصاویر نوری حاصل از میکروسکوپ Olympus IX81. سلول‌های رشدیافته پس از ۳۰ ساعت روی بسترهای PDMS در مقایسه با سلول کف چاهک پلیت کشت سلول به‌عنوان کنترل (نوار مقیاس=۱۰۰ میکرومتر)

در سلول‌های فیبروبلاست انسانی HU02 ریخت قطبی به‌عنوان ریخت غالب شناخته شده است. در این مطالعه مشخص شد که میزان کشیدگی سلول‌های قطبی باکیفیت اتصال آنها ارتباط مستقیم دارد. این کیفیت اتصال متأثر از فیزیک و شیمی سطح بستر است چنان‌که میزان کشیدگی و قطبش سلول‌ها روی بستر PDMS بدون آرایه سطحی با تیمار پلاسمای ۱۰۰ و ۲۰۰ ثانیه‌ای (تیپ ۱۰۰ و ۲۰۰) نسبت به بستر بدون تیمار پلاسما (تیپ ۰) افزایش پیدا می‌کند. همچنین ارزیابی آماری طول سلول‌ها نشان داده است که این دو حالت اختلاف معناداری با حالت کنترل سلول بدون بستر (کف چاهک پلیت کشت سلول) از نظر طول و جهت‌گیری ندارند. از طرف دیگر درحالی‌که سلول‌های رشدیافته روی بستر تیپ۱۰۰ و ۲۰۰ میزان کشیدگی طولی ۸,۳۷۸±۲۳,٥۲۳ و ۸,۹۰۷±۲۳,۹٤۳ میکرونی را نشان می‌دهند، مقادیر ۱۲,۰۷۷±۳٦,٤۹۱ و ۹,۳٥۲±۳۹,۸۸٤ میکرونی برای به‌ترتیب سلول روی بسترهای آرپ ۱۰۰ و ۲۰۰، اثر مثبت حضور آرایه‌های سطحی بسترها را بر افزایش معنادار طول سلول‌ها تا ٦٦,٥ درصد نسبت به حالت کنترل متناظر خود نشان می‌دهد. همچنین سلول‌ها در این حالت‌های بستر هم‌راستا شده‌اند

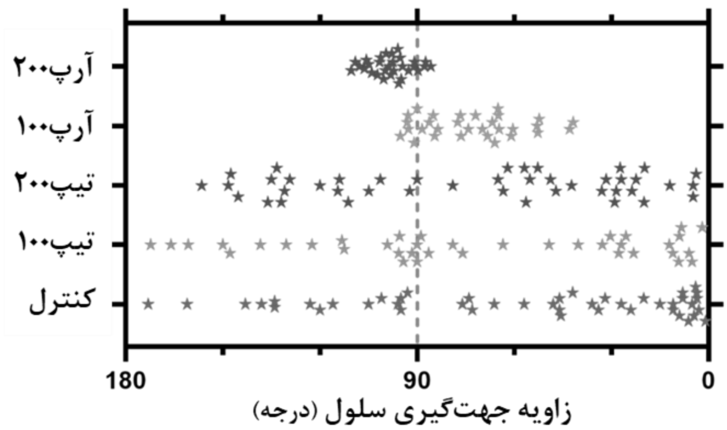
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]

(جدول ۳) (شکل ٦). هم‌راستاشدن سلول‌ها روی بستر در اثر هدایت اتصال آرایه‌های سطحی بستر رخ داده است. علاوه بر این مشاهده شد که در سلول‌های کشت‌شده روی بستر PDMS آرپ ۲۰۰، میزان انحراف معیار زاویه جهت‌گیری سلول‌ها به ۱۱,٤۹۳ درجه تقلیل پیدا کرده است که سطح بالاتری از هم‌راستا شدن را نسبت به سلول‌های هم‌راستا در نمونهٔ آرپ ۱۰۰ نشان می‌دهد. نتایج سنجش زاویه جهت‌گیری سلول‌ها در انواع حالت‌های بستر با به‌کارگیری روش پردازش تصاویر میکروسکوپی نرم‌افزار ImageJ-Fiji در شکل ٦ آمده است. محور افقی این نمودار زاویه جهت‌گیری سلول برحسب درجه است. در هر حالت از بستر، پراکنش کمتر درجه زاویه‌های اندازه‌گیری‌شده به معنای یکنواختی بیشتر در زاویه جهتگیری سلول‌ها و هم‌راستایی بیشتر آنهاست.

جدول ۳ مقادیر میانگین کشیدگی طولی برای جمعیت سلولی کشت‌شده روی حالت‌های مختلف بستر PDMS

	کشیدگی سلول‌ها (میکرومتر)	
نمونه	میانگین طول	انحراف معیار
سلول روی بستر بدون تیمار پلاسما (تیپ ۰)	۱۹,۸	۱۲,۹۱۹
سلول روی بستر با تیمار پلاسما ۱۰۰ ثانیه (تیپ ۱۰۰)	۲۳,۵۲۳	۸,۳۷۸
سلول روی بستر با تیمار پلاسما ۲۰۰ ثانیه (تیپ ۲۰۰)	۲۳,۹٤۳	۸,۹۰۷
سلول روی بستر با آرایه سطحی و پلاسما ۱۰۰ ثانیه (آرپ ۱۰۰)	۳٦,٤۹۱	۱۲,۰۷۷
سلول روی بستر با آرایه سطحی و پلاسما ۲۰۰ ثانیه (آرپ ۲۰۰)	۳۹,۸۸٤	۹,۳۵۲
سلول درون چاهک پلیت کشت سلولی	۲٤,۳٦۹	۷,۲۷

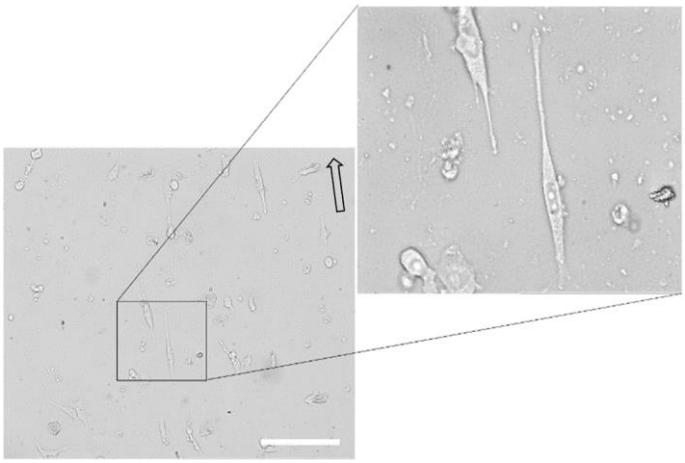


شکل ٦ نمودار پراکندگی زاویه جهت‌گیری سلول‌ها نسبت به خط افق برای حالت‌های مختلف بستر. هر ستاره از این نمودار، معادل یک‌بار اندازه‌گیری زاویه قطبش سلول به‌وسیله نرم‌افزار پردازش تصویر ImageJ-Fiji است.

مشاهده تصاویر سلول‌های دوکی‌شکل هم‌راستا در نمونه‌های بستر PDMS دارای آرایهٔ سطحی با بزرگ‌نمایی‌های ٤۰ برابر در پنجره‌های با تراکم سلولی کمتر تأیید می‌کند که هم‌راستاشدن سلول‌ها مستقل از ارتباط میان زایده‌های سلولی و یا اثر مجاورت بوده و تنها تحت تأثیر توپولوژی سطح بستر PDMS است (شکل ۷).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]



شکل ۷ تصویر میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ۱۰ و ٤۰ برابر از سلول‌های هم‌راستای فیبروبلاست انسانی لاین HU02 روی بستر آرپ ۲۰۰، تصویربرداری‌شده به‌وسیله میکروسکوپ Olympus IX81. نوار مقیاس ۱۰۰ میکرومتر را نشان می‌دهد، همچنین پیکان سیاه‌رنگ راستای تشکیل امواج آرایهٔ سطحی را نشان می‌دهد.

٤- بحث و نتیجه‌گیری

پلیمر PDMS به‌واسطهٔ کاربرد گسترده‌ای که در انواع سیستم‌های میکروفلویدیک و به‌طور خاص مطالعه‌های زیستی انجام‌شده با این سیستم دارد و نیز کاربرد آن در توسعه داربست‌های دو و سه‌بعدی کشت سلول همواره موردتوجه بوده است. با این حال، با وجود مطالعه‌های گوناگونی که بسترهای PDMS با انواع آرایه‌های توپوگرافیک سطحی ارائه کرده‌اند، تمایل ضعیف سلول به اتصال روی سطح PDMS به دلیل ماهیت غیر آب‌دوست این پلیمر، همواره از چالش‌های استفاده از آن بوده است. در همین راستا رویکردهای مختلفی نیز برای بهبود اتصال و ارزیابی اثر ریخت‌شناسی و رشد انواع سلول روی آنها موردمطالعه شده است [۳, ٦, ۱۵]. از این میان، تیمار پلاسما به‌عنوان یک روش متداول مهندسی سطح بسترهای PDMS به منظور آب‌دوست‌کردن سطح با تغییر عوامل شیمیایی سطح بستر و درنتیجه غلبه بر مشکل اتصال سلول استفاده می‌شود، هرچند که مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند، این اتصال می‌تواند در طی زمان با بازگشت خاصیت آب‌گریزی سطح، تضعیف شود [۱٦, ۱۷].

در این مطالعه با ایجاد آرایه‌های سطحی زیرمیکرونی تحت تیمار پلاسما بر سطح پلیمر PDMS به‌نوعی نوآرایی شده و به بررسی آثار حالت‌های مختلف بستر بر کیفیت اتصال، رشد و ریخت‌شناسی سلول‌های فیبروبلاست انسانی پرداخته شده است. نتایج این بررسی، شکل‌گیری آرایه‌های سطحی مواج با ابعاد چند صد نانومتری را در اثر تیمار پلاسمای تحت کشش روی سطح بسترها نشان می‌دهد. مطالعه‌های قبلی ثابت کرده‌اند، توپوگرافی سطح بستر کشت سلول می‌تواند به‌عنوان فاکتور زیست‌الهام در اتصال هدایت‌شدهٔ سلول نقش بازی کرده و با شبیه‌سازی شرایط طبیعی فیزیکی، شیمیایی و مکانیکی ماتریس خارج سلولی نقش به‌سزایی در کیفیت اتصال، رشد و ریخت‌زایی سلول‌ها ایفا کند [۲, ۳, ۱۰, ۱۸].

نتایج سنجش‌های زنده‌مانی و اتصال کوتاه‌مدت سلول روی بستر طراحی‌شده در این پژوهش نیز براساس پژوهش‌های پیشین در این حوزه بوده است و تأثیر مثبت حضور آرایه‌های سطحی بستر را بر کیفیت اتصال، زنده‌مانی و ریخت‌زایی سلول نشان می‌دهد. همچنین این بستر جدید که آرایه‌های هم‌راستای سطحی در ابعاد زیرمیکرونی دارد و همزمان با افزایش زمان تیمار پلاسما

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]

زمان شکل‌گیری آرایه‌ها سطحی، میزان آب‌دوستی سطح آن نیز افزایش پیدا می‌کند، با القای هدایت اتصال بر سلول‌های دوکی‌شکل فیبروبلاست انسانی HU02 منجر به کشیدگی طولی بیشتر و هم‌راستاشدن مستقل آنها تا تشکیل یک صفحهٔ دوبعدی سلولی منظم می‌شود. نتایجی که نشان داد، علاوه بر اثر آرایه‌ها بر مورفولوژی سلول و هم‌راستاشدن آنها، کیفیت اتصال سلول به بستر نیز در این بسترها افزایشی چشمگیر داشته است. مقایسهٔ این نتایج با نتایج سایر پژوهش‌ها تأیید می‌کند که هم‌راستاشدن و حفظ کیفیت اتصال سلول‌ها در اثر وجود آرایه‌های سطحی مواج بوده و این اثر با افزایش تعداد، توزیع یکنواخت و جهت‌گیری منظم نقاط چسبندگی کانونی در انتهای رشته‌های اکتین اسکلت سلولی رخ داده است [٦, ٧]. آرایه‌های منظم سطحی روی این بسترها با کنترل نواحی مجاز برای اتصال ساختارهای سلولی، موجب اتصال هدایت‌شده سلول می‌شوند. این هدایت اتصال از راه ارتباط پروتئین سطحی اینتگرین از کمپلکس پروتئینی نقاط چسبندگی کانونی با اسکلت سلولی و اثرگذاری آن بر نحوه شکل‌گیری رشته‌های اکتین درون سلول اتفاق می‌افتد. فرایندی که درنهایت به جهت‌گیری هدایت‌شده و بهبود کیفیت اتصال سلول‌های دوکی‌شکل منجر می‌شود [٦, ١٩]. به‌این‌ترتیب که سلول‌های فیبروبلاست علاقه‌مند به کسب ریخت دوکی‌شکل، این ریخت را تحت اثر بستر، تنها در یک راستای خاص (که راستای کشیدگی امواج سطحی بستر است) کسب می‌کنند و تعداد کمپلکس‌های پروتئینی سطحی نیز با تغییر سطح در دسترس سلول تعدیل می‌شود. این رخداد مولکولی در تصاویر میکروسکوپی حاصل از جمعیت سلولی به‌صورت هم‌راستاشدن مستقل و بهبود کیفیت اتصال آنها روی بستر دیده می‌شود.

با مقایسهٔ بین دو بستر با آرایه‌های سطحی میکرونی آرپ ١٠٠ و ٢٠٠، نظر به اینکه هر دو نمونه سطوح به‌نسبت یکسانی از آب‌دوستی (جدول ٢) و کیفیت اتصال سلول (شکل‌های ٣ و ٤) را نشان می‌دهند، اختلاف جزئی در هم‌راستاشدن جمعیت سلول‌ها و افزایش توزیع زوایای جهت‌گیری آنها می‌تواند به دلیل اختلاف موجود در طول و دامنه امواج سطحی بستربه وجود آید (شکل ١). در این رابطه می‌توان گفت که آرایه‌های سطحی با طول موج و دامنهٔ بیشتر مانند بستر آرپ ٢٠٠ با تحمیل فاصله‌ها و نواحی مجاز اتصال به سلول‌های فیبروبلاست انسانی نقش هدایت اتصال خود را بهتر ایفا کرده‌اند [٧, ٢٠].

به‌طور خلاصه، در این پژوهش بستری جدید برای بهبود اتصال، رشد و ریخت‌زایی انواع سلول‌ها بر سطح پلیمر آب‌گریز PDMS ارائه شد. روش تهیه این بستر در مقایسه با روش‌های پیشین، تهیه بسترهای با مورفولوژی زیست‌الهام مانند روش میکروساخت و الکتروریسی، روشی بسیار سریع، ارزان و در دسترس است. تیمار پلاسمای ورقه‌های PDMS تحت کشش جانبی در زمان‌های خاص، موجب شکل‌گیری توپوگرافی منحصربه‌فرد و دراختیارگذاشتن سطوح مطلوبی از آب‌دوستی سطح شد. مشخصه‌های تکرارپذیری که می‌تواند با تغییر در میزان تیمار پلاسمای تحت کشش بستر به‌سادگی مورد دست‌ورزی قرار گیرند. همچنین نتایج مشخصه‌یابی نشان داد که برای بهبود اتصال و ریخت‌زایی سلول، این بستر سطوح خوبی از آب‌دوستی سطح و ابعاد مناسبی از آرایه‌های مواج سطحی در مقایسه با سایر بسترهای مشابه دارد. همچنین سنجش‌های اتصال، زنده‌مانی و رشد سلول‌های فیبروبلاست انسانی روی این بستر، بهبود ٤٦ درصدی کیفیت بستر را نشان می‌دهند [٧, ١٩]. درنهایت، صفحه دوبعدی سلول‌های دوکی‌شکل هم‌راستای تشکیل‌شده روی بسترهای آرپ٢٠٠ حاصل از این پژوهش می‌تواند کاربردهای متنوعی از مطالعه‌های بنیادی سلولی تا توسعه مدلی برای شبیه‌سازی بالینی بافت

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]

پوستی، توسعه زخم‌پوش‌ها و داربست‌های نوین برای مهندسی و پیوند بافت داشته باشد.

۵- منابع

.۱ Bonnans, C., J. Chou, and Z. Werb, *Remodelling the extracellular matrix in development and disease.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(12): p. 786-801.

.۲ Kim, D.H., et al., *Matrix nanotopography as a regulator of cell function.* J Cell Biol, 2012. **197**(3): p. 351-60.

.۳ Higuchi, A., et al., *Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate.* Chem Rev, 2013. **113**(5): p. 3297-328.

.٤ Wong, S.T., et al., *Anisotropic rigidity sensing on grating topography directs human mesenchymal stem cell elongation.* Biomech Model Mechanobiol, 2014. **13**(1): p. 27-39.

.٥ Tamiello, C., et al., *Heading in the Right Direction: Understanding Cellular Orientation Responses to Complex Biophysical Environments.* Cell Mol Bioeng, 2016. **9**: p. 12-37.

.٦ Leclech, C. and C. Villard, *Cellular and Subcellular Contact Guidance on Microfabricated Substrates.* Front Bioeng Biotechnol, 2020. **8**: p. 551505.

.٧ Buskermolen, A.B.C., et al., *Cellular Contact Guidance Emerges from Gap Avoidance.* Cell Rep Phys Sci, 2020. **1**(5): p. 100055.

.٨ Baptista, D., et al., *Overlooked? Underestimated? Effects of Substrate Curvature on Cell Behavior.* Trends Biotechnol, 2019. **37**(8): p. 838-854.

.٩ Cheng, D., et al., *Studies of 3D directed cell migration enabled by direct laser writing of curved wave topography.* Biofabrication, 2019. **11**(2): p. 021001.

.۱۰ Khalili, A.A. and M.R. Ahmad, *A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications.* Int J Mol Sci, 2015. **16**(8): p. 18149-84.

.۱۱ Nguyen, T.D. and Y. Gu, *Investigation of Cell-Substrate Adhesion Properties of Living Chondrocyte by Measuring Adhesive Shear Force and Detachment Using AFM and Inverse FEA.* Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 38059.

.۱۲ Lee, I., et al., *Investigation of wound healing process guided by nano-scale topographic patterns integrated within a microfluidic system.* PLoS One, 2018. **13**(7): p. e0201418.

.۱۳ Saito, A.C., et al., *Contact guidance of smooth muscle cells is associated with tension-mediated adhesion maturation.* Exp Cell Res, 2014. **327**(1): p. 1-11.

.۱٤ Ray, A., et al., *Anisotropic forces from spatially constrained focal adhesions mediate contact guidance directed cell migration.* Nat Commun, 2017. **8**: p. 14923.

.۱٥ Chuah, Y.J., et al., *Surface modifications to polydimethylsiloxane substrate for stabilizing prolonged bone marrow stromal cell culture.* Colloids Surf B Biointerfaces, 2020. **191**: p. 110995.

.۱٦ Ruben, B., et al., *Oxygen plasma treatments of polydimethylsiloxane surfaces: effect of the atomic oxygen on capillary flow in the microchannels.* Micro &Nano Letters, 2017. **12**(10): p. 754-757.

.۱۷ Kim, B., K.P. ET, and I. Papautsky, *Long-term stability of plasma oxidized PDMS surfaces.* Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2004. **2004**: p. 5013-6.

.۱۸ Nguyen, T.D. and Y. Gu, *Investigation of Cell-Substrate Adhesion Properties of Living Chondrocyte by Measuring Adhesive Shear Force and Detachment Using AFM and Inverse FEA.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 38059.

.۱۹ Leclech, C. and A.I. Barakat, *Is there a universal mechanism of cell alignment in response to substrate topography?* Cytoskeleton (Hoboken), 2021. **78**(6): p. 284-292.

.۲۰ Ermis, M., E. Antmen, and V. Hasirci, *Micro and Nanofabrication methods to control cell-*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]

substrate interactions and cell behavior: A review from the tissue engineering perspective. Bioact Mater, :(٣)٣ .٢٠١٨p. 355-369.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

A novel rearranged polydimethylsiloxane substrate for human fibroblast cells: The case of biomimetic effects on binding, morphology, and growth

Reza Mahdavian[1], Hossein Naderi-Manesh[*1]

1-Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

[*]naderman@modares.ac.ir

Receipt: 2021/09/28 Accepted: 2021/12/18

Abstract:
Cell substrates play a crucial role in tissue engineering and biomaterial science. Various studies are performed to develop the appropriate cell substrates for using *in vitro* and *in vivo*. Therefore, a biocompatible substrate that mimics the native extracellular matrix properties with specified surface topography as a biomimicry factor is necessary under "the novel cell substrates development" approaches. Our aim in the current study was to design, synthesize, and characterize a substrate with aligned nanometric arrays on the surface. The rapid and easy capabilities of Polydimethylsiloxane to receive chemical and physical characteristics with simple modifications, make it a promised candidate for the cell substrate. The obtained results from the atomic force and scanning electron microscopy showed the formation of 305±19 and 571±141 nanometers wrinkled nanoarrays after regulating the substrate under lateral traction during the plasma treatment times of 100 and 200s. Then, the behavior of a human foreskin fibroblast cell line, in terms of adhesion, growth, viability, and morphology on this substrate was investigated. Increasing the plasma treatment time increased both nanoarray size and surface hydrophilicity, resulting in improved 17 and 46% of cell attachment quality, respectively. Additionally, the presence of the designed nanowrinkles surprisingly improved the number of the attached cells. The nanowrinkles caused the cells to align perfectly through the substrate's surface due to the contact guidance phenomena. Consequently, the biocompatible Polydimethylsiloxane substrate of this study with suitable chemical, mechanical, and physical properties showed fit capacities as a novel aligned cell culture platform.

Keywords: Cell substrates, Cell morphology, Fibroblast cells, Nanowrinkles, Polydimethylsiloxane,

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-22]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.13.1.8.7]