



Simulation of the Effects of Shear Flow of the Culture Medium Fluid on Stem Cells using the Scaffolds of Hard Tissue Engineering

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Bakhshian Nik A.¹ MSc,
Vahidi B.^{*1} PhD

How to cite this article

Bakhshian Nik A, Vahidi B. Simulation of the Effects of Shear Flow of the Culture Medium Fluid on Stem Cells using the Scaffolds of Hard Tissue Engineering. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):635-646.

ABSTRACT

Aims In bone tissue engineering, the scaffold as a supportive structure, plays a vital role. Putting the scaffold in dynamic cell culture, such as perfusion bioreactor, makes the role of mechanical parameters such as shear stress and hydrodynamic pressure more important. On the other hand, these mechanical parameters are influenced by scaffold architecture. In this study, the effects of bone scaffold architecture on mechanical stimuli have been analyzed and their effects on the mesenchymal stem cell fate have been predicted.

Material and Methods Using the tools of computer simulation, five bone scaffolds (Gyroid, high porous Gyroid, Diamond, IWP, and gradient architecture Gyroid) based on mathematical functions of minimal surfaces were designed and exposed in a simulated dynamic cell culture under the inlet velocities of 1, 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{m/s}$. Cell accumulation on the inner part of the scaffold was considered as an 8.5-micron layer. This layer was designed for Gyroid and IWP scaffolds.

Findings Based on the results, Diamond scaffold showed the most efficient performance from the homogeneity of stresses point of view. In the presence of the cell layer, the von Mises stress was reported as 60 and 50 mPa on the Gyroid and IWP scaffolds, respectively which eases osteogenic differentiation.

Conclusion In gradient architecture scaffolds under dynamic conditions, there is a gradient in shear stress that causes various signaling in different positions of these scaffold and facilitates multi-differentiation of the cells on the same scaffold.

Keywords Bone Tissue Engineering; Mechanical Environment; Stem Cell; Scaffold; Shear Stress; Computational Simulation

CITATION LINKS

- [1] Combined effects of chemical priming and mechanical stimulation on mesenchymal ... [2] The effect of bone scaffold gradient architecture design on stem cell ... [3] Effects of scaffold architecture on efficiency of mechanical stimulations of ... [4] Biomimetic porous scaffolds for bone tissue ... [5] Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue ... [6] Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: Design issues related to porosity, ... [7] Bioreactors to influence stem cell fate: Augmentation of mesenchymal stem cell signaling ... [8] Shear-induced force transmission in a multicomponent, multicell model of the ... [9] Structural and biological characterization of ... [10] Design optimization of scaffold microstructures using wall shear stress criterion ... [11] Mathematically defined tissue engineering scaffold architectures prepared ... [12] Engineering mesenchymal stem cell spheroids by incorporation of mechanoregulator ... [13] Fluid-structure interactions analysis of shear-induced modulation of a mesenchymal ... [14] Computational simulation of static/cyclic cell stimulations to investigate mechanical ... [15] Computer-aided porous scaffold design for tissue engineering using triply periodic ... [16] Cellular solids: Structure and ... [17] Biopolymers: Overview of several properties and ... [18] The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the ... [19] Mechanical and microstructural properties of polycaprolactone scaffolds with ... [20] Multiscale fluid-structure interaction modelling to determine the mechanical ... [21] Mechanical behavior of human mesenchymal stem cells during adipogenic and ... [22] Multiscale modeling and simulation of soft adhesion and contact of stem ... [23] Mechanical characterization of adult stem cells from bone marrow ... [24] Computational modelling of cell spreading and tissue regeneration in porous ... [25] Mechanical interaction between cells and fluid for bone tissue engineering scaffold ... [26] A computational and cellular solids approach to the stiffness-based design ... [27] Enhancement of mechanical signals for tissue engineering ...

¹Biological Sciences Engineering Department, New Sciences & Technologies Faculty, University of Tehran, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Science & Technology Faculty, North Kargar Street, Tehran, Iran. Postal Code: 1439957131
Phone: +98 (21) 86093021
Fax: +98 (21) 88497324
bahman.vahidi@ut.ac.ir

Article History

Received: June 26, 2018

Accepted: June 12, 2019

ePublished: December 21, 2019

شبیه‌سازی اثر جریان برشی سیال محیط کشت بر سلول‌های بنیادی با استفاده از داربست‌های مهندسی بافت سخت

امیرعلا بخشیان نیک MSc

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

بهمن وحیدی PhD*

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: داربست به‌عنوان سازه نگهدارنده سلول از اهمیت ویژه‌ای در مهندسی بافت استخوان برخوردار است. قرارگیری داربست در محیط کشت دینامیک، مانند بیوراکتور نفوذی، نقش پارامترهای مکانیکی از قبیل تنش برشی و فشار هیدروستاتیک را پررنگ‌تر می‌کند. از سویی دیگر، این پارامترهای مکانیکی به شدت متأثر از طرح داربست هستند. در این پژوهش به بررسی تأثیر طرح داربست استخوانی بر نحوه عملکرد تحریک‌های مکانیکی و پیش‌بینی سرنوشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها: با استفاده از ابزار شبیه‌سازی کامپیوتری و روش‌های اجزای محدود، پنج داربست استخوانی (با نام‌های جیروید، جیروید پرتخلخل، دیاموند، IWP و داربست با شیب اندازه تخلخل) مبتنی بر توابع ریاضی سطوح ضمنی طراحی شدند و در محیط کشت دینامیک شبیه‌سازی شده تحت عبور جریان سیال با سرعت‌های ورودی ۱، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومتر بر ثانیه قرار گرفتند. تجمع سلول‌ها روی داربست‌های جیروید و IWP به‌صورت یک لایه به ضخامت ۸/۵ میکرون در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، داربست با طرح دیاموند بهترین عملکرد را از منظر یکنواختی تنش‌های ایجادشده به خود اختصاص داد. در حضور لایه سلولی، تنش فون مایس به میزان ۶۰ و ۵۰ مگاپاسکال به‌ترتیب در داربست‌های جیروید و IWP به دست آمد که تمایز استخوانی را تسهیل خواهد نمود.

نتیجه‌گیری: استفاده از داربست با شیب اندازه تخلخل موجب اعمال تنش‌های متفاوت در بخش‌های مختلف داربست می‌شود و این امر در مورد کاربردهای نوین داربست‌های استخوانی برای ایجاد تمایزهای سلولی مختلف به‌طور همزمان بسیار مفید است.

کلیدواژه‌ها: مهندسی بافت استخوان، محیط مکانیکی، سلول بنیادی، داربست، تنش برشی، شبیه‌سازی محاسباتی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲۲

*نویسنده مسئول: bahman.vahidi@ut.ac.ir

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی منبع سلولی مناسبی برای مهندسی بافت است. این سلول‌ها به تحریک‌های بیوشیمیایی و مکانیکی پاسخ می‌دهند و قابلیت تمایز به کندروسیت‌ها، سلول‌های استخوان‌ساز و فیبروبلاست‌ها را دارند. تحریک‌های مکانیکی ممکن است پاسخ‌گویی سلول‌ها به فاکتورهای رشد را افزایش دهند و همچنین نیروهای مکانیکی تولید زمینه خارج سلولی را افزایش

داده و بر باز تولید بافت اثر می‌گذارد^[1]. داربست‌ها به‌عنوان فضای نگهدارنده سلول‌ها نقش ایفا می‌کنند و شرایط رشد سلول‌ها به داخل را برای بافت‌های میزبان به‌منظور بازسازی فراهم می‌کنند. بنابراین، آنها ساختارهایی را برای تکثیر سه‌بعدی، تمایز و جهت‌گیری سلولی با هدف ایجاد بافتی مشابه تسهیل می‌کنند^[2]. داربست‌ها همچنین انتقال تنش به بافت‌های اطراف را تسهیل نموده و آن را به سوی محل بازسازی بافت هدایت می‌کنند تا سلول‌ها از نظر مکانیکی در شرایط ایده‌آل باشند^[3]. برخی از مهم‌ترین عواملی که برای طراحی داربست ایده‌آل باید در نظر گرفته شود شامل موارد زیر هستند: (۱) دارای ساختار متخلخل به‌هم‌پیوسته باشد تا شرایط را برای جریان انتقال مواد غذایی و مواد زائد ناشی از فعالیت متابولیکی درون داربست فراهم شود^[4]، (۲) اندازه تخلخل باید به‌گونه‌ای باشد که رشد استخوان و تحرک سلولی صورت گیرد^[5] و (۳) سطح ویژه کافی برای اتصال، تکثیر و تمایز سلولی وجود داشته باشد^[6].

در شرایط داخل بدن، استخوان و غضروف همواره تحت نیروهای مکانیکی هستند و انتقال این سیگنال‌ها به‌عنوان انتقال مکانیکی شناخته می‌شود. کانال‌های سلولی مانند کانال‌های یون کلسیم و پروتئین‌هایی که در غشای سلول حضور دارند و اینترگرین‌ها همگی نقش چشمگیری در انتقال مکانیکی دارند. تنش برشی ناشی از جریان سیال استخوان‌سازی را از طریق مسیر $ERK1/2$ با تنظیم Runx2 ترغیب می‌نماید. جریان سیال بیان اینترگرین‌های $\beta1$ را از طریق مسیر سیگنال‌دهی فاکتور کاپا B که نشان‌دهنده مسیر احتمالی برای انتقال مکانیکی القا شده با سیال است، ترغیب می‌کند. جریان سیال نوسانی باعث ایجاد شارش کلسیم به داخل سلول‌ها می‌شود که این امر موجب بهبود تمایز و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی شده و همچنین بیان ژن‌های تمایز استخوانی را در سلول‌های استخوان‌ساز ترغیب می‌کند. این مطلب نشان می‌دهد که سیگنال‌دهی کلسیم که با کانال پروتئینی حساس به نیروهای مکانیکی فعال می‌شود، نقش مهمی در تمایز و عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی ایفا می‌کند. یکی دیگر از مسیرهای سیگنال‌دهی کلیدی در تعیین تمایز یا تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سیگنال‌دهی Wnt است^[7].

توزیع اولیه سلول‌ها پس از کشت می‌تواند توزیع نهایی بافت را تعیین نماید. داربست‌هایی که طرح نامنظم دارند، منجر به تحریک غیریکنواخت سلول‌ها شده و بافت غیریکنواختی را ایجاد می‌کند. در بیوراکتورهای نفوذی، چگونگی توزیع تنش برشی نه تنها به نرخ جریان واسط محیط کشت، بلکه به هندسه سه‌بعدی و طرح داربست وابسته است. در شرایط آزمایشگاهی، سلول‌های استخوانی به تنش برشی در بازه ۲-۶۰ پاسکال پاسخ می‌دهند^[7]. تفاوت در تنش‌های گزارش شده به تفاوت در طرح، ابعاد، ماده داربست و شرایط آزمایش از قبیل نرخ جریان، فرکانس و نوع بیوراکتور مربوط می‌شود. از سویی دیگر، تنش فون ماسیز یکی دیگر از پارامترهایی است که می‌تواند از تنش برشی حاصل شود. این تنش بر ساختارهای داخل سلولی و اجزا اسکلت سلولی نظیر اکتین‌ها اثر گذارد. تنش برشی توسط سلول

مکانیکی دارند [2, 3, 10]. خواص مکانیکی داربست یکی از پارامترهای اساسی در جایگزینی استخوان است. افزایش نفوذپذیری و درصد تخلخل بازتولید بافت را افزایش می‌دهد؛ شکل تخلخل‌ها نقش مهمی در مسیر سیال و رفتار مکانیکی دارد. از سویی دیگر، ایجاد شیب در اندازه و درصد تخلخل‌ها موجب ایجاد شیب در تحریک‌های مکانیکی می‌شود. در سطح میکروسکوپی، توزیع تنش برشی ناشی از نفوذ سیال به توزیع تخلخل‌ها داخل داربست وابسته است [3]. اثر ساختار هندسی داربست بر کاشت سلول و محیط کشت استاتیک با مقایسه دو ساختار تصادفی و جیروید (یکی از سطوح مینیمال) نشان داد داربست جیروید قابلیت نفوذی حدوداً ده‌برابر بیشتر دارد. دلیل این امر عدم حضور اتصال‌های داخلی محدودکننده است. قابلیت نفوذ بیشتر باعث اصلاح خواص ترشوندگی داربست‌های آب‌گریز شده، اتصال سلول‌ها را در محیط کشت استاتیک افزایش می‌دهد. با کشت سلول در محیط دینامیک بعد از ۵ روز حضور در محیط استاتیک، هندسه جیروید تجمع سلولی بیشتر را در مرکز داربست نشان داد، در حالی که در داربست با ساختار تصادفی هیچ سلولی در مرکز مشاهده نشد [11].

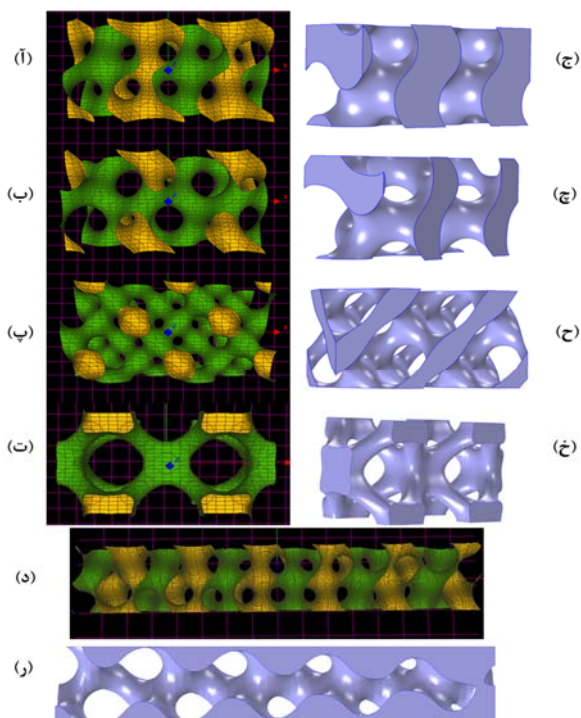
در حوزه مهندسی بافت، بیشتر محققین به بررسی عوامل و پارامترهای زیستی می‌پردازند و معمولاً از عوامل فیزیکی مانند نیروها و تحریکات مکانیکی که از جمله عوامل تأثیرگذار و با اهمیت هستند، صرف نظر می‌کنند. از سویی دیگر، به دلیل پیچیدگی ساختارهای مورد استفاده در مهندسی بافت، کنترل عوامل مختلف و بررسی دقیق نقش آنها نیاز به انجام آزمایش‌های متعدد دارد. به این ترتیب هزینه انجام این تحقیقات افزایش می‌یابد. راهکار کاهش هزینه‌های مربوط به تحقیقات و همچنین تحلیل دقیق‌تر نتایج حاصل، استفاده از شبیه‌سازی کامپیوتری است. همان‌طور که در سایر زمینه‌های فنی و مهندسی، شبیه‌سازی کامپیوتری به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد، بهره‌گیری از این روش در مهندسی بافت راهگشا است [12-14]. با در نظر گرفتن این موضوع، شبیه‌سازی داربست‌های استخوانی که در معرض نیروهای دینامیکی قرار گرفته‌اند، از منظر تأثیر ماده داربست (حوزه مهندسی بیومواد)، نیروها و تحریکات مکانیکی در میکرومحیط و هندسه داربست (حوزه طراحی داربست با استفاده از رویه‌های ریاضی) بسیار مهم است. از سویی دیگر، نتایج به‌دست‌آمده در جریان این سه مرحله، به‌طور مستقیم می‌تواند مورد استفاده زیست‌شناسان به‌ویژه در زمینه فناوری سلول‌های بنیادی قرار گیرد. هدف از انجام این پژوهش، مطالعه مهندسی عملکرد داربست‌های استخوانی با تأکید بر شبیه‌سازی بافت سخت در حضور جریان سیال به‌منظور بررسی نقش پارامترهای موثر بر سرنوشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود روی داربست است. تا امروز، در تحقیقات پیشین معمولاً با توجه به محدودیت‌های مربوط به بخش عملی، با فرضیات ساده‌کننده بسیار به شبیه‌سازی این عوامل پرداخته‌اند. در این مقاله، هدف بررسی همزمان این عوامل در سطح ماکروسکوپی و در ادامه ایجاد ارتباط بین شرایط ماکروسکوپی و میکروسکوپی و در نهایت

دریافت و از طریق کرنش به داخل سلول منتقل می‌شود و این کرنش بر اسکلت سلولی از طریق تنش فون ماسیز اثر می‌گذارد [8]. اندازه ناحیه پخش‌شوندگی سلول بسته به سختی زمینه‌ی خارج سلولی تغییر می‌کند. بین پخش‌شوندگی سلول‌ها و سختی زیرلایه رابطه‌ای مستقیم وجود دارد؛ هرچه سختی زیرلایه افزایش یابد، میزان پخش‌شوندگی سلول بیشتر می‌شود. سلول به‌صورت یک حسگر مکانیکی عمل می‌کند و تمامی اطلاعات و خواص مکانیکی زیرلایه را دریافت نموده و شکل، موقعیت سه‌بعدی و اندازه خود را تنظیم می‌کند. سیگنال‌دهی کلسیم برای بسیاری از عملکردهای سلول استخوانی از قبیل تکثیر و تمایز ضروری است. تحریک‌های مکانیکی مانند جریان سیال باعث جذب یون‌های کلسیم بین سلولی و سیگنال‌دهی کلسیم درون سلولی می‌شود [7]. علاوه بر خواص ماده، ساختار هندسی داربست تأثیر زیادی بر عملکرد آن دارد. این هندسه بر خواص مکانیکی، چسبندگی و تکثیر سلول، پدیده‌های انتقال و رفتار تخریب‌زیستی اثرگذار است. داربست‌ها باید بسیاری از قابلیت‌ها مانند اتصال سلول‌های استخوانی، نرخ تخریب‌زیستی مناسب، تخلخل پیوسته و قطر تخلخل در بازه گسترده (به‌عنوان مثال ۵۰۰-۱۰۰ میکرومتر) و استحکام مکانیکی مناسب را دارند. بنابراین، تعیین کامل خواص و ساختار داربست به‌عنوان اولین گام در ارایه داربست مناسب در مهندسی بافت استخوان محسوب می‌شود [9]. با افزایش درصد تخلخل داربست، مدول یانگ موثر کاهش می‌یابد. افزایش درصد تخلخل همچنین موجب کاهش در بیشینه مقدار سرعت و تنش برشی می‌شود. افزایش درصد تخلخل داربست‌ها بر مسیر سیال و تنش برشی دیواره اثر می‌گذارد. سطوح مینیمال، دسته‌ای از سطوح هستند که برای یک محیط بسته مورد نظر، کمترین مساحت سطح را دارند. از نظر ریاضی آنها به‌عنوان سطوحی با میانگین انحنای صفر در هر بخش سازه تعریف می‌شوند. از نقطه‌نظر سازه‌ای، کمینه‌کردن مساحت سطح موجب ایجاد سطوح صاف و هموار شده و بنابراین سازه ایجادشده با پرکردن یک طرف سطح، تمرکز تنش کمی را در حین اعمال بارگذاری نشان می‌دهد. در چنین هندسه‌هایی، تنش‌ها تمایل دارند تا در کل سازه‌ای که فضا را اشغال کرده است به‌طور یکنواخت تقسیم شوند. همزمان و به‌دلیل مشابه، مقدار فرورفتگی‌ها و برآمدگی‌ها که تمرکز تنش را موجب می‌شود، به کمترین مقدار خود می‌رسد. موقعیت حداثی موجب می‌شود که سطح مستقیم شود و کمترین سطح را برای هر انحنای بسته مورد نظر که روی آن قرار می‌گیرد، فراهم آورد. اولین نتیجه‌ای که حاصل می‌شود، این است که نقطه تسلیم در مقایسه با نمونه‌هایی که از ماده مشابه و کسر حجمی یکسان جامد اما با هندسه متفاوت ساخته شده‌اند، در بارگذاری بیشتر حاصل می‌شود. ساختار باز داربست‌های مبتنی بر سطوح مینیمال نفوذ سیال را تسهیل می‌کند. همچنین پیوستگی مناسب و دسترسی سیال به تمامی سطوح سازه موجب کشت سلولی با توزیع یکنواخت در کل تخلخل‌ها می‌شود. سه عامل اندازه، شکل و درصد تخلخل تأثیر زیادی در میزان اثربخشی تحریک‌های

ارتفاع (y و z) نیز [۰/۶، ۰/۶] انتخاب شد. در رابطه با هندسه جیروید با شیب اندازه تخلخل برای نمایش این تغییر اندازه، دامنه رسم تابع در راستای محور طولی [۰/۲، ۰/۲] و در راستای محور عرضی و ارتفاع [۰/۵، ۰/۵] است. رویه‌های اولیه در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به پیچیدگی ساختاری این رویه‌ها و به‌منظور کاهش هزینه‌های محاسباتی، دامنه‌های بالا انتخاب شد. خروجی این نرم‌افزار، همان‌طور که گفته شد، مختصات نقاط تشکیل‌دهنده رویه است که این نقاط نامیده می‌شود. با استفاده از این نقاط به‌دست‌آمده در مرحله اول، در گام بعدی، با بهره‌گیری از نرم‌افزار Solidworks 2014 هندسه‌ها مورد اصلاح قرار گرفت و به داربست تبدیل شدند. در شکل ۱، داربست‌های استخوانی طراحی‌شده مبتنی بر رویه‌های سطوح مینیمال نمایش داده شده است.

جدول ۱) توابع مثلثاتی توصیف‌کننده داربست‌های مبتنی بر سطوح مینیمال^[15]

نام رویه	تابع مثلثاتی
جیروید	$\Phi(r) = \cos(2\pi x)\sin(2\pi y) + \cos(2\pi y)\sin(2\pi z) + \cos(2\pi z)\sin(2\pi x) = 0$
دیاموند	$\Phi(r) = \sin(2\pi x)\sin(2\pi y)\sin(2\pi z) + \sin(2\pi x)\cos(2\pi y)\cos(2\pi z) + \cos(2\pi x)\sin(2\pi y)\cos(2\pi z) + \cos(2\pi x)\cos(2\pi y)\sin(2\pi z) - 0.6 = 0$
جیروید پر تخلخل	$\Phi(r) = \cos(2\pi x)\sin(2\pi y) + \cos(2\pi y)\sin(2\pi z) + \cos(2\pi z)\sin(2\pi x) - 0.6 = 0$
جیروید با شیب تخلخل	$\Phi(r) = \cos(2\pi x)\sin(2\pi y) + \cos(2\pi y)\sin(2\pi z) + \cos(2\pi z)\sin(2\pi x) - 0.1x = 0$
هندسه IWP	$\Phi(r) = 2[\cos(2\pi x)\cos(2\pi y) + \cos(2\pi y)\cos(2\pi z) + \cos(2\pi z)\cos(2\pi x)] - [\cos(4\pi x) + \cos(4\pi y) + \cos(4\pi z)] - 1 = 0$



شکل ۱) رویه‌ها و داربست‌های طراحی‌شده (آ و ج: جیروید)، (ب و د: جیروید پر تخلخل)، (پ و ح: دیاموند)، (ت و خ: IWP) و (د و ر): با شیب تخلخل

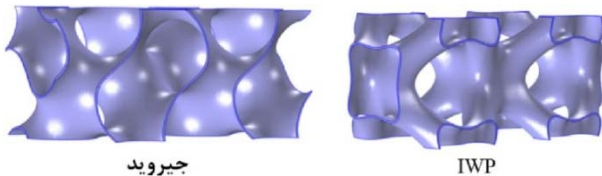
تعیین سرنوشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی (تمایز به سلول‌های استخوانی یا مرگ سلولی) است. به‌طور مشخص، هدف، بهبود طراحی داربست‌های کاربردی در مهندسی بافت استخوان با علم بر این که از میان پارامترهای طراحی از قبیل هندسه، شرایط اعمال تنش مکانیکی به داربست و خواص مکانیکی داربست از منظر آثار سلولی، دو عامل تنش‌های اعمالی از محیط به سلول و نیز برهمکنش سلول-داربست دارای اهمیت بیشتری است. بنابراین، نوآوری ویژه این تحقیق، بررسی عمیق‌تر برهمکنش سلول-داربست از منظر بررسی پاسخ تجربه‌شده توسط سلول‌ها به محیط مکانیکی (مجموعه بارگذاری‌های مکانیکی تجربه‌شده توسط سلول‌ها در یک بازه زمانی مشخص) است.

مواد و روش‌ها

استفاده از ابزار شبیه‌سازی کامپیوتری در زمینه مهندسی بافت، روشی قابل اطمینان برای ارزیابی پدیده‌های حاکم است. استفاده از تکنیک‌هایی که ساخت داربست‌های مهندسی بافت استخوان را ساده‌تر و قابل کنترل‌تر می‌نماید، با اقبال بسیاری همراه شده است. به‌طور کلی، داربست استخوانی، به‌دلیل شرایط ویژه‌ای که در آزمایشگاه و همچنین بعد از کاشت در بدن دارد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف این پژوهش، طراحی داربست‌هایی مبتنی بر معادلات ریاضی است که شرایط را برای کنترل پارامترهای تاثیرگذار از قبیل اندازه و درصد تخلخل مهیا می‌سازد. از سویی دیگر، این داربست‌های طراحی‌شده در شرایط شبیه‌سازی‌شده بیوراکتور قرار گرفته و از منظر تنش‌های برشی و فشار هیدرودینامیک مورد بررسی قرار گرفته‌اند. طرح هر یک از این داربست‌ها، بر نحوه اثر پارامترهای مکانیکی در داخل داربست اثر می‌گذارد^[15]. طراحی چنین داربست‌هایی به‌دلیل پیچیدگی خاص آنها و نیز تبدیل این رویه‌های ریاضی به داربست‌های قابل استفاده، مهم‌ترین بخش این تحقیق است. از سویی دیگر، آماده‌سازی این داربست‌ها برای حل معادلات حاکم در فصل مشترک داربست-سلول-سیال از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

به‌منظور طراحی سطوح اولیه که توصیف‌کننده پنج ساختار جیروید (G)، دیاموند (D)، جیروید پر تخلخل (HPG)، جیروید با گرادیان تخلخل (GAG) و هندسه IWP هستند، از نرم‌افزار رسم سطوح ریاضی K3DSurf v0.6.2 استفاده شد. نحوه عملکرد این نرم‌افزار به این گونه است که بعد از رسم رویه‌ها، خروجی نرم‌افزار، مختصات کلیه نقاطی است که رویه مورد نظر را می‌سازند. توابع مثلثاتی سازنده این رویه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که قابل ملاحظه است، این توابع به‌صورت ضمنی و متشکل از سه متغیر x، y و z هستند. از سویی دیگر، این توابع ضمنی دارای دوره‌های تناوبی هستند که قابلیت تکرار آنها را ایجاد می‌کند. به این ترتیب سادگی کنترل طراحی توجیه می‌شود. دامنه تابع چهار رویه جیروید، دیاموند، جیروید پرتخلخل و هندسه IWP در راستای محور طول‌ها (x) به‌صورت [۰/۲، ۰/۲] و در راستای محور عرض‌ها و

سلولی می‌تواند بر تمایز آنها تأثیرگذار باشد. مطالعات پیشین نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی را می‌توان ماده‌ای با خواص ویسکوالاستیک و مدول یانگ آتی، 890 ± 200 پاسکال با ضریب پواسون لایه سلولی ۰/۴۵ در نظر گرفت [22, 23]. با توجه به این که شبیه‌سازی در حالت پایا انجام شده است، از مدول یانگ آتی برای لایه سلولی استفاده شد.



شکل ۲) لایه‌های سلولی طراحی‌شده با ضخامت ۸/۵ میکرون

معادلات نویر- استوکس بر حرکت سیالات حکم‌فرما هستند و می‌توان آن را به‌عنوان قانون دوم نیوتون برای سیالات در نظر گرفت. در مورد سیال قابل فشرده‌شدن نیوتونی، به‌صورت معادله ۱ است:

$$\rho \left(\frac{\partial u}{\partial t} + u \cdot \nabla u \right) = -\nabla p + \nabla \cdot (\mu (\nabla u + (\nabla u)^T)) - \mu (\nabla \cdot u) I + F \quad \text{معادله ۱}$$

که در این رابطه u سرعت سیال و p فشار سیال است. p چگالی سیال و u لزجت دینامیک سیال است. عبارات‌های مندرج در این رابطه بیان‌کننده نیروهای اینرسیایی، فشاری، ویسکوز و خارجی اعمالی به سیال است. این معادلات همزمان و به همراه معادله پیوستگی حل می‌شوند (معادله ۲):

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho u) = 0 \quad \text{معادله ۲}$$

معادلات نویر- استوکس نشان‌دهنده پایستگی ممان است. در حالی که معادله پیوستگی، پایستگی جرم را بیان می‌کند. این معادلات در مدل‌سازی جریان سیال مورد استفاده قرار می‌گیرند.

معادله حاکم بر حل در مورد جامد الاستیک خطی به‌صورت معادله ۳ است:

$$\nabla \cdot \sigma + F_v = \rho \ddot{u} \quad \text{معادله ۳}$$

در رابطه بالا، p دانسیته و $\ddot{u}$ ، شتاب است. همچنین، در این رابطه σ ، تنش و F_v ، واحد حجم نیرو است. برای تحلیل استاتیک، طرف راست معادله برابر با صفر است و معادله ۳ به صورت معادله ۴ بازنویسی می‌شود.

$$-\nabla \cdot \sigma = F_v \quad \text{معادله ۴}$$

برهمکنش سیال- سازه حل معادلات فوق به‌طور همزمان با استفاده از قوانینی است که دینامیک سیالات و مکانیک جامد را توصیف می‌نماید. زمانی که جریان سیال یک جامد یا سازه را احاطه می‌کند، تنش‌ها و کرنش‌ها بر سطح فاز جامد اعمال می‌شوند. چهار معادله زیر در فصل مشترک دو فاز برقرار است (معادلات ۵-۸):

$$\sigma_{solid} \cdot n = \sigma_{fluid} \cdot n \quad \text{معادله ۵}$$

$$\sigma_{fluid} = -p_{fluid} + \mu (\nabla u_{fluid} + (\nabla u_{fluid})^T) - \frac{2}{3} \mu (\nabla \cdot u_{fluid}) I \quad \text{معادله ۶}$$

$$u_{fluid} = v_{wall} \quad \text{معادله ۷}$$

در این مطالعه، هر یک از سازه‌ها بخشی از یک داربست استخوانی به ابعاد $10 \times 5 \times 5$ میلی‌متر است. تعداد سلول‌های واحدی که در هر یک از وجوه تکرار می‌شود، به‌صورت $12 \times 6 \times 6$ در نظر گرفته شده است. به این ترتیب، ابعاد هر یک از این سازه‌ها متشکل از دو واحد متوالی $10/83 \times 5/83 \times 5/67$ میلی‌متر است. باید به این نکته توجه نمود که به‌دلیل طراحی این داربست‌ها براساس توابع ریاضی، اندازه تخلخل‌ها، خلاف داربست‌های معمول، در تمام بخش‌های داربست یکسان است. مقادیر طراحی‌شده با اندازه‌های گزارش‌شده برای داربست‌های استخوانی مطابقت دارد. در منابع گزارش شده که اندازه تخلخل در بازه $350-500$ میکرون برای داربست‌های استخوانی به‌منظور مهاجرت سلول و نیز رگ‌زایی مناسب است [16].

دامنه وسیعی از پلیمرهای طبیعی و مصنوعی برای استفاده به‌عنوان ماده داربست استفاده می‌شوند. در انجام پژوهش حاضر از خواص دو پلیمر پرکاربرد پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌لاکتیک‌اسید در مهندسی بافت استخوان استفاده شده است. رفتار این دو پلیمر مصنوعی الاستیک خطی در نظر گرفته شد. پلی‌لاکتیک‌اسید مورد استفاده در مهندسی بافت استخوان دارای مدول الاستیک $3/3$ گیگاپاسکال و ضریب پواسون برای این ماده $0/3$ است [17, 18]. از نظر خواص الاستیک، مدول یانگ پلی‌کاپرولاکتون در حدود $0/3$ گیگاپاسکال و ضریب پواسون برای این ماده $0/3$ است [19].

در انجام این پژوهش واسط محیط کشت DMEM مدل‌سازی شده است. این واسط یک سیال نیوتونی با لزجت $1/45$ میلی‌پاسکال ثانیه و چگالی 1000 کیلوگرم بر مترمکعب در نظر گرفته شد و سرعت سیال ۱، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و 100 میکرومتر بر ثانیه و تحت جریان لایه‌ای شبیه‌سازی شده است. شرط مرزی در بخش انتهایی داربست و محل خروج سیال، فشار صفر در نظر گرفته و شرایط حل مساله نیز پایا فرض شد [20].

به‌منظور تحلیل برهمکنش سیال- سلول- داربست، لایه سلولی طراحی شد. با استفاده از نرم‌افزار طراحی صنعتی Rhinoceros 4.0 برای دو رویه جبروید و IWP ضخامتی معادل با نصف قطر سلول یعنی $8/5$ میکرومتر طراحی شد [21]. شبیه‌سازی محیط کشت و برهمکنش سیال- سلول- داربست با استفاده از نرم‌افزار کامسول ۵/۱ انجام شد. در شکل ۲ لایه‌های سلولی طراحی‌شده نمایش داده شده است. سلول‌های بنیادی به میکرومحیط اطراف خود حساس هستند و پاسخ‌های آنها به تغییرات از طریق اسکلت سلولی است که با تغییر در سختی سلول همراه است. خواص مکانیکی سلول‌ها، برهمکنش فیزیکی آنها را با زمینه خارج سلولی تعیین می‌کند [21]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از مغز استخوان استخراج می‌شوند برای کاشت روی داربست‌های مهندسی بافت مناسب هستند زیرا از نظر مکانیکی مستحکم بوده و ساختارهای اسکلت سلولی پیشرفته دارند که اتصال پایدار سلول و ادامه حیات در محیط‌های جامد متخلخل را فراهم می‌آورد. سلول‌ها با بازآرایی اسکلت سلولی، غشا و هسته سلول به تحریکات مکانیکی پاسخ می‌دهند. سلول‌های بنیادی به تحریکات مکانیکی حساس هستند و سفتی زمینه خارج

$$v_{wall} = \frac{\partial u_{solid}}{\partial t}$$

به منظور گسسته سازی دامنه سیال و جامد از روش اجزای محدود استفاده شد. برای دامنه جامد از حلگر MUMPS بهره گیری شد که برای حل معادلات خطی جبر استفاده می شود. برای دامنه سیال از حلگر تکراری GMRES استفاده شد که از روش کمترین باقی مانده بهره می گیرد. در لایه مرزی سیال- داربست از المان منشوری برای مش بندی استفاده شد. سطح لایه سلولی نیز با المان های مثلثی مش بندی شد.

نتایج و بحث

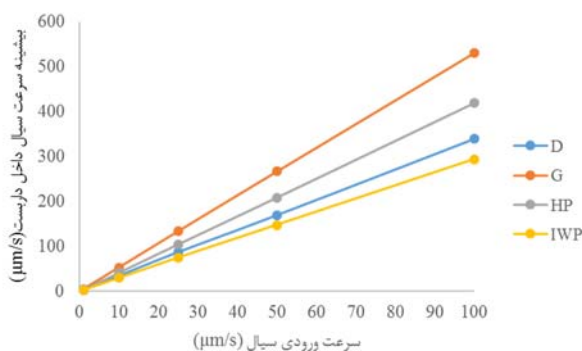
در این مطالعه، اثر جریان برشی سیال محیط کشت بر سلول های بنیادی با استفاده از داربست های سطوح ضمنی با استفاده از روش های محاسباتی بررسی شد. در این راستا، خواص مکانیکی داربست جنبه مهمی از طراحی است. داربست نه تنها تامین کننده سطحی برای حیات سلول است، بلکه نقش مهمی در تعیین رده و سرنوشت سلول و نیز حفظ یکپارچگی آن ایفا می کند. خواص مکانیکی داربست بر تعادل نیرو بین سلول- سلول و نیز سلول- داربست و مورفولوژی سلولی اثر دارد. پخش شونده گی سلول ها روی زمینه خارج سلولی بر حیات و نرخ مرگ آنها اثر می گذارد. به هر میزان که سطح پخش شونده گی سلول بزرگ تر باشد، احتمال حیات و تکثیر سلول ها بیشتر خواهد بود [24].

فرآیند کشت سلول های بنیادی مزانشیمی در شرایط آزمایشگاهی در یک بیوراکتور نفوذی علاوه بر بهبود نحوه تغذیه سلول ها، موجب القای تنش های برشی ناشی از سیال می شود که ممکن است تاثیر مثبتی بر رشد، تکثیر و تمایز سلول ها داشته باشد. بهره گیری از دینامیک سیالات محاسباتی در این پژوهش، نگاه دقیق تری از شرایط بیوراکتورهای نفوذی، پارامترهای مکانیکی موثر و نحوه انتقال جرم و تاثیر این موارد بر فرآیندهای سلولی به دست داد. برای دستیابی به بهینه شرایط فراهم شده توسط بیوراکتور و محیط کشت دینامیک، لازم است پارامترهای تاثیرگذار مانند نرخ سیال داخل بیوراکتور، شرایط قرارگیری سلول، ماده و طرح داربست به طور بهینه انتخاب شوند [14].

افزایش سرعت سیال درون بیوراکتور و به تبع آن در داخل داربست، انتقال جرم یا انتقال مواد غذایی برای سلول ها را بهبود می دهد و تنش برشی روی سلول ها را افزایش می دهد. این افزایش در تنش برشی ممکن است به گونه ای باشد که موجب مرگ سلولی و ایجاد بافت نامطلوب شود. تغییر در هندسه داربست منجر به تغییر در سرعت موضعی داخل آن و در ادامه تفاوت در تنش های موضعی می شود که بر سلول ها اعمال می شود. در تمامی داربست ها، بیشینه سرعت داخل داربست از سرعت ورودی سیال بیشتر گزارش شده است. این امر نیز قابل پیش بینی است. دلیل این اتفاق این است که سرعت ورودی سیال با سطح در دسترس برای عبور سیال رابطه ی عکس دارد. در دبی ثابت، با کاهش سطح در دسترس برای عبور

سیال، سرعت افزایش می یابد. در میان داربست های مورد بررسی، داربست IWP بهترین عملکرد را از نظر عبور جریان سیال نشان داد. به این معنا که اختلاف سرعت ورودی و بیشینه سرعت موجود داخل داربست کم بود. بعد از آن به ترتیب داربست دیاموند، جیروید پرتخلخل و جیروید قرار دارند. در نمودار ۱ سرعت ورودی بر حسب بیشینه سرعت داخل داربست رسم شده است. این نمودار رابطه خطی سرعت ورودی و سرعت بیشینه را نشان می دهد و دلیل این پدیده پایین بودن مقدار لزجت سیال است.

در مقایسه دو داربست جیروید و جیروید پرتخلخل، بیشینه سرعت در داربست جیروید که دارای درصد تخلخل کمتری است، مقدار بیش تری به دست آمد. دلیل این امر مربوط به ممانعت بیشتر داربست جیروید از عبور سیال است. از سویی دیگر، در مقایسه این چهار داربست، می توان مشاهده نمود که داربست IWP کمترین تفاوت بین سرعت ورودی و بیشینه سرعت درون داربست را دارد. همچنین دو داربست دیاموند و IWP یکنواختی سرعت بیشتری در بخش های مختلف داربست نشان می دهند. به هر حال، در مورد داربست IWP می توان به این نکته اشاره نمود که در بخش هایی از ناحیه داخلی، سرعت سیال به صفر میل می کند. این امر به دلیل هندسه خاص داربست است که باعث ایجاد شرایط استاتیک در بخش هایی از داربست می شود که مطلوب نخواهد بود. تحلیل دینامیک سیالات محاسباتی نشان می دهد که افزایش درصد تخلخل داربست موجب عبور راحت سیال از داخل آن می شود و در نتیجه، سلول هایی که روی این داربست ها کشت شده اند، سرعت های قابل پیش بینی تری با توجه به سرعت ورودی تجربه می کنند. این نکته نیز باید مد نظر قرار گیرد که وجود جریان سیال با سرعت صفر در ناحیه داخلی داربست مناسب نیست زیرا شرایط محیط کشت استاتیک را در آن ناحیه ایجاد کرده و باعث سیگنال دهی غیریکنواخت به سلول ها می شود. در جدول ۲، بازه سرعت های نزدیک به دیواره داربست ها ذکر شده است که می توان این مقادیر را به عنوان سرعت هایی که توسط سلول ها احساس می شوند، در نظر گرفت. میانگین سرعت سطحی سیال باید کمتر از ۴۵۰ میکرومتر بر ثانیه [25] باشد که در اینجا تمام سرعت های سطحی که سلول تجربه می کند، از این مقدار کمتر است.



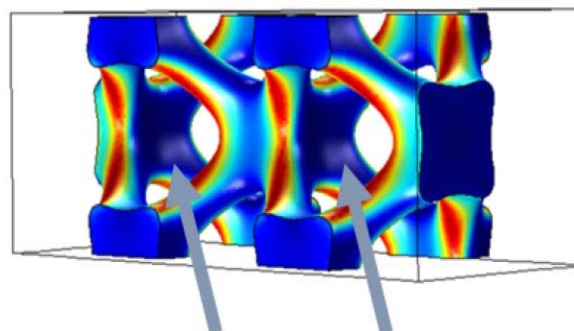
نمودار ۱) تغییرات بیشینه سرعت ورودی سیال داخل داربست های مختلف

نام رویه	1	10	25	50	100
جیروید	۰/۷۷-۱/۴۱	۷/۷-۱۴/۱	۲۲/۶-۳۵/۹	۳۵/۵-۵۲/۱	۷۷-۱۴۱
جیروید پرتخلخل	۰/۵۸-۱/۰۲	۵/۸-۱۰/۲	۱۱/۲-۲۶/۱	۲۱/۰۳-۵۲/۵	۵۸-۱۰۲
دیاموند	۰/۶۸-۱/۲۱	۶/۸-۱۲/۱	۱۷/۷-۳۰/۷	۳۰/۸-۵۴/۵	۶۸-۱۲۱
IWP	۰/۳۲-۰/۸۴	۳/۲-۴/۸	۶/۷-۱۸/۷	۱۱/۲-۳۶/۹	۸۴-۱۳۲

* واحد سرعت ذکر شده در جدول میکرومتر بر ثانیه است

افزایش درصد تخلخل از حدود ۵۵٪ (داربست جیروید) به حدود ۷۰٪ در داربست جیروید پرتخلخل بر نحوه عبور سیال و همچنین میزان تغییر جهت‌های آن در حین عبور از داخل داربست اثر گذاشته است. این مطلب باعث می‌شود که دامنه سرعت‌هایی که سلول‌ها در مجاورت دیواره احساس می‌کنند، محدودتر شده و به سرعت ورودی سیال به داربست نزدیک‌تر شود. به این ترتیب شرایط برای پیش‌بینی سرعت در این داربست دقیق‌تر خواهد بود (جدول ۲). داربست دیاموند عملکرد مناسبی در قبال عبور سیال نشان داده است. در مقایسه با دو داربست جیروید و جیروید پرتخلخل، تغییر جهت عبور سیال از داخل داربست دیاموند بسیار کم است و این امر سهولت بیشتر عبور سیال را ممکن می‌کند. از سویی دیگر، سیال می‌تواند به سطح بیشتری در داربست دست یابد. داربست IWP نیز عملکرد مناسبی دارد و دامنه سرعت‌هایی که انتظار می‌رود توسط سلول احساس شود، در این داربست محدود است؛ اما عبور سیال به دلیل هندسه این داربست موجب پدید آمدن مناطقی با سرعت صفر یا نزدیک به صفر ایجاد می‌شود که مطلوب نیست (شکل ۳).

تحریک مکانیکی از طریق تنش‌های برشی سیال بر تمایز سلول‌ها و مینرال‌شدن ساختار استخوان اثر می‌گذارد [23]. در شرایط داخل بدن این تحریک مکانیکی می‌تواند از طریق تنش‌های برشی سیال به سلول‌های استخوانی منتقل شود. زمانی که بارگذاری روی استخوان اعمال می‌شود، سیال موجود در بافت استخوان از داخل تخلخل‌های استخوان عبور کرده و تنش برشی توسط استئوسایت‌ها احساس می‌شود. بافت اطراف این استئوسایت‌ها شرایط انتقال چنین تنش‌هایی به سلول‌های استخوان‌ساز را فراهم می‌آورد. سلول‌های استخوانی در شرایط داخل بدن به بارگذاری برشی در بازه ۳-۸ پاسکال پاسخ می‌دهند [23].

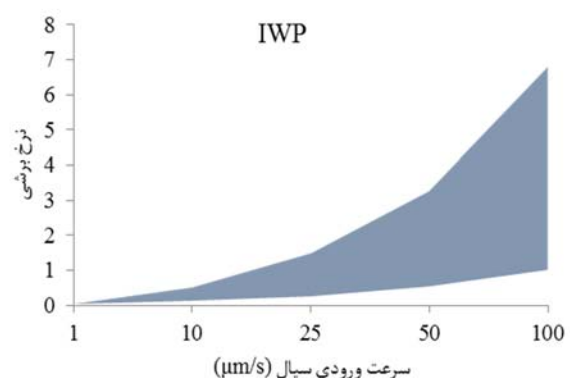
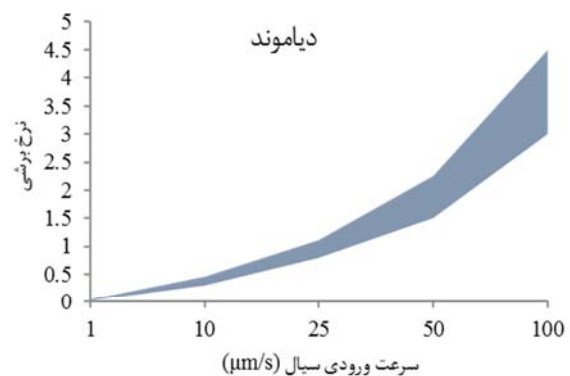
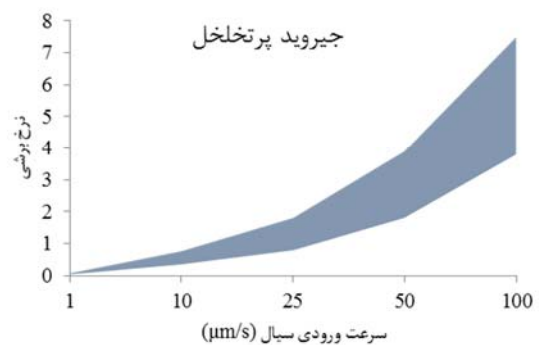
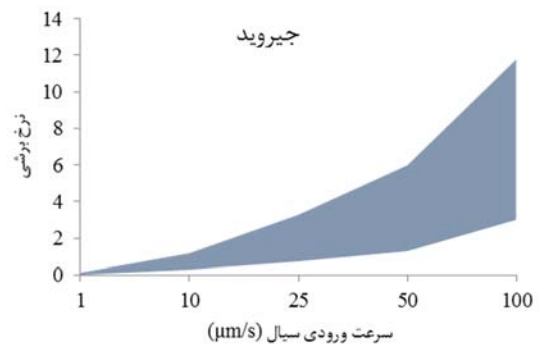


شکل ۳) مناطقی با تنش برشی نزدیک به صفر در داربست IWP

داربست‌های مبتنی بر سطوح ضمنی، از ایجاد مناطقی با تمرکز تنش و توزیع نامناسب جریان سیال در مقایسه با داربست‌هایی که با روش‌های رایج و با هندسه تصادفی، جلوگیری می‌کنند. در این تحقیق فرض شده است که تمام سطح در دسترس داربست توسط سلول‌ها احاطه شده است و از سایر فرآیندهای پیچیده‌ی شیمیایی و زیستی صرف نظر شده است. ساختار باز این داربست‌ها باعث سهولت در نفوذ بهتر سیال می‌شود. به هم‌پیوستگی تخلخل‌ها و ایجاد موقعیت برای دستیابی سیال به تمام بخش‌های داربست، موجب کشت یکنواخت در داربست می‌شود. افزایش درصد تخلخل و قابلیت نفوذ باعث افزایش سرعت بازتولید بافت می‌شود؛ شکل تخلخل‌ها در اینجا نقش مهمی در مسیر جریان سیال و رفتار مکانیکی ناشی از آن ایفا می‌کنند. ساختار دیاموند دارای درصد تخلخل بالاتری نسبت به ساختار جیروید و جیروید پرتخلخل دارد و این موضوع در کنار شکل تخلخل‌ها موجب عبور راحت‌تر سیال شده و همچنین یکنواختی بهتری از منظر نرخ کرنش برشی و به تبع آن، تنش برشی در سطح داربست ایجاد می‌نماید. این مطلب منجر به سیگنال‌دهی یکسان به سلول‌ها می‌شود. در سطح میکروسکوپی، توزیع تنش برشی ناشی از جریان سیال به توزیع و آرایش تخلخل‌ها درون داربست وابسته است. همان‌طور که در نمودار ۲ می‌توان دید، تغییر جزئی در آرایش تخلخل‌ها از حالت جیروید به جیروید پرتخلخل و همچنین افزایش درصد تخلخل، باعث کاهش اندازه نرخ کرنش برشی شده، اما یکنواختی بیشتر این پارامتر را موجب شده است. عبور جریان سیال با نرخ یکسان از داخل دو داربست با اندازه تخلخل، درصد تخلخل و هندسه تخلخل متفاوت، تنش‌های برشی متفاوتی را بر سلول‌های کشت‌شده داخل داربست اعمال می‌نماید. تنش برشی در بازه ۵-۵۰ پاسکال باعث تولید آلكالین فسفات، نیتریک اکسید و پرستاکلاندین شده و در نتیجه موجب تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز می‌شود [26].

با توجه به نمودار ۲، دامنه توزیع نرخ برشی در داربست دیاموند بسیار محدود بوده و این نشان از سیگنال‌دهی تقریباً یکنواخت بخش‌های مختلف داربست است. از سویی دیگر، اگرچه از نظر تفاوت سرعت ورودی و سرعت داخل داربست، داربست IWP مساعد به نظر می‌رسد، اما از نظر توزیع نرخ کرنش برشی دامنه وسیعی را شامل می‌شوند و این حاکی از سیگنال‌دهی متفاوت در بخش‌های مختلف داربست است. در مقایسه دو داربست جیروید و جیروید پرتخلخل، می‌توان گفت با افزایش درصد تخلخل، دامنه مربوط به توزیع نرخ کرنش برشی محدودتر می‌شود. پیش‌بینی می‌شود که سلول‌ها در داربست جیروید پرتخلخل، تنش‌های تقریباً یکسانی را در مواضع مختلف داربست احساس کنند. باید به این نکته توجه نمود که بزرگی تنش برشی ناشی از سیال در فصل مشترک سیال و داربست وابسته مدول الاستیک داربست است. تحلیل مبتنی بر دینامیک سیالات محاسباتی و بررسی برهمکنش سیال و سازه برای دو داربست پلی‌لاکتیک‌اسید و پلی‌کاپرولاکتون، به دلیل پایین بودن سرعت‌های اعمالی یکسان به دست آمد. از سویی دیگر، بزرگی مدول

الاستیک دو ماده داربست، باعث تغییر شکل ناچیز در داربست شده است که عملاً قابل نظر است.



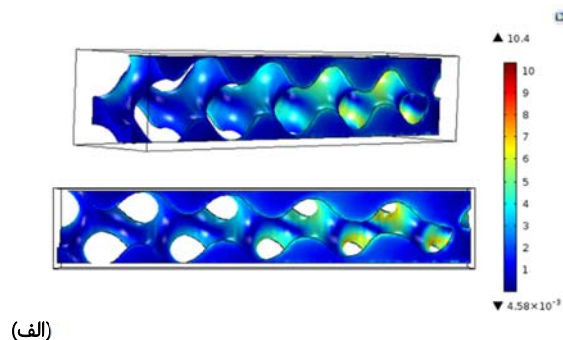
نمودار ۲) دامنه نرخ کرنش برشی (بر ثانیه) در داربست‌ها

یکی دیگر از پارامترهای موثر در تعیین سرنوشت سلول، فشار هیدرودینامیک است. فشار هیدرودینامیک معرف تنش نرمال

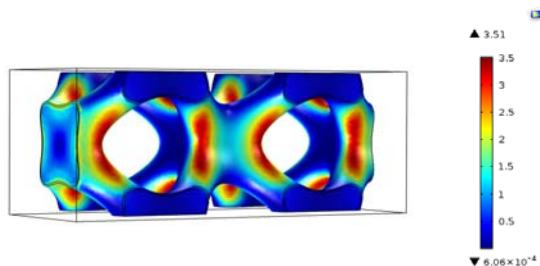
وارد شده از سیال به سطح داربست و سلول‌ها است. بازه بیشینه و کمینه فشار هیدرودینامیک در داربست‌های شبیه‌سازی شده در نمودار ۳ نشان داده شده است. فشار هیدرودینامیک برای داربست دیاموند دارای بازه محدودتری نسبت به سایر داربست‌ها است. در مورد داربست جیروید این پارامتر دامنه وسیع‌تری دارد و در جیروید پرتخلخل محدودتر می‌شود. در داربست IWP نیز مناطقی وجود دارد که تنش نرمال به صفر میل می‌کند و این عملکرد داربست را از مکانیکی تنش برشی سیال و فشار هیدرودینامیک به‌طور هم‌زمان بر سرنوشت سلول‌هایی موجود روی داربست تأثیرگذار باشند. وجود این دو تحریک، همان‌طور که در بالا اشاره شد، موجب فعال شدن مسیرهای سیگنال‌دهی می‌شود [27].

داربست‌هایی که دارای شیب اندازه تخلخل هستند، باعث القای همزمان سیگنال‌های مکانیکی مختلف در بخش‌های مختلف داربست می‌شوند. وجود شیب در اندازه تخلخل‌ها و همچنین درصد تخلخل، به تحریکات مکانیکی متفاوت به‌طور هم‌زمان در بخش‌های مختلف داربست منتج می‌شود. نتایج مربوط به عبور سیال از داخل داربست با شیب تخلخل، حاکی از آن است که در بخشی که دارای درصد تخلخل کمتری است، با توجه به یکسان بودن دبی جریان، سطح کاهش می‌یابد و سرعت در این منطقه افزایش یافته است. از سویی دیگر نرخ کرنش برشی که رابطه مستقیم با تنش برشی دارد، در بخش‌های مختلف داربست متفاوت است (شکل ۴). به این ترتیب می‌توان گفت سیگنال‌دهی به‌طور هم‌زمان در بخش‌های مختلف داربست دارای تنوعی قابل پیش‌بینی است. با توجه به این شکل، احتمال تمایز سلول بنیادی در بخشی از داربست با اندازه تخلخل زیاد و به تبع آن درصد تخلخل بیشتر به سمت سلول استخوانی بیشتر است. بخش انتهایی داربست با اندازه تخلخل کم تمایل به تمایز به سلول‌های غضروفی خواهد داشت. در قسمت‌هایی از داربست که درصد تخلخل کاهش یافته است، سرعت ورودی نسبت به سرعت موجود داخل داربست افزایش بیشتری را ناشی می‌شود. از سویی دیگر، مسیر عبور سیال در قسمت‌هایی که درصد و اندازه تخلخل بیشتر است، تسهیل شده و خطوط هم‌سرعت بیشتری را ایجاد نموده است.

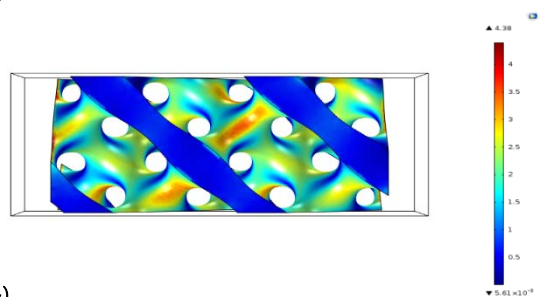
با مقایسه نتایج به‌دست‌آمده با مقادیر گزارش شده در منابع مطالعاتی جدول ۳ می‌توان نتیجه گرفت که تنش‌های برشی ناشی از عبور جریان سیال، از حداقل میزان لازم برای فعال‌نمودن مسیرهای سیگنال‌دهی به‌منظور ایجاد تمایز استخوانی بیشتر است. با افزایش سرعت، مقدار نرخ کرنش برشی ایجاد شده داخل داربست افزایش یافته است. نکته حائز اهمیت این است که در سرعت‌های ورودی کمتر از مقدار ۲۵ میکرومتر بر ثانیه نرخ کرنش برشی ایجاد شده در داربست‌ها کم است و پیشنهاد می‌شود سرعتی بالاتر از مقدار فوق برای سرعت ورودی سیال در نظر گرفته شود. از سویی دیگر، باید تغییرات سرعت داخل داربست در نظر گرفته شود، زیرا سرعت داخل داربست به دلیل کاهش سطح در دسترس برای عبور



(الف)



(ب)



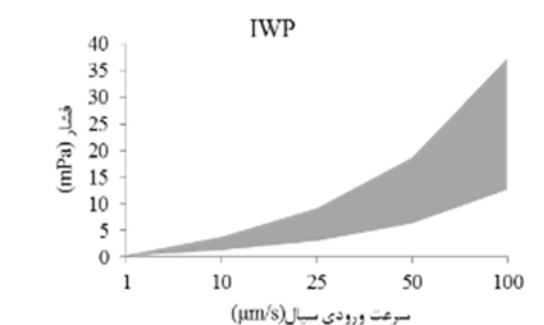
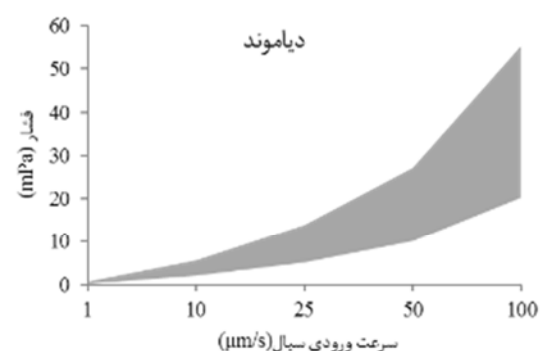
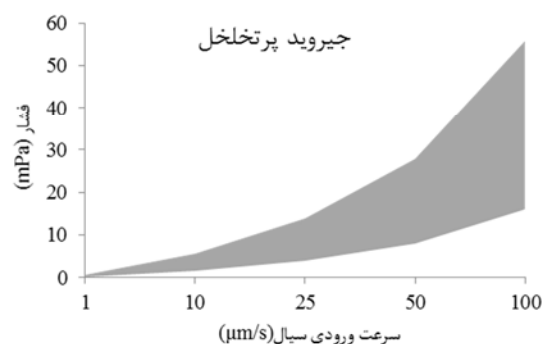
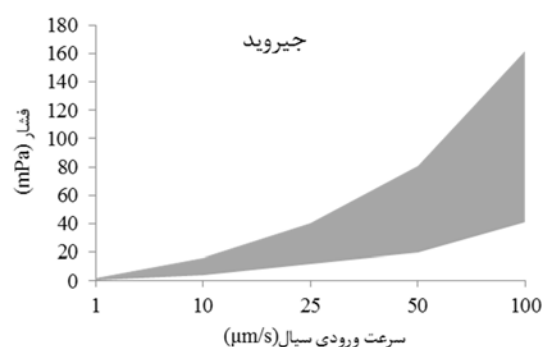
(ج)

شکل ۴ توزیع نرخ کرنش برشی در بخش‌های مختلف داربست (الف) چیرود با شیب اندازه تخلخل: (ب) داربست IWP؛ ج- داربست دیاموند؛ سرعت سیال ورودی ۵۰ میکرون بر ثانیه است.

جدول ۳ تاثیر تنش برشی بر نحوه تمایز سلولی [23]

تنش برشی (dyn/cm ²)	اثر بر تمایز استخوانی
حدود ۱	تسریع چشمگیر تمایز استخوانی دیر هنگام (رسوب کلسیم و استئوپونتین) در سلول‌های مزانشیمی موش در ۱۶ روز کشت
۰/۲-۰/۳	تاثیر چشمگیری در رسوب کلسیم در تنش ۰/۳ نسبت به ۰/۲ با تغییر در درصد تخلخل از ۷۵٪ به ۵۰٪ بعد از ۱۵ روز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش
۰/۰۵	رسوب کلسیم بعد از ۱۶ روز حضور در محیط کشت برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش
۰/۱-۰/۳	افزایش تنش برشی با افزایش ۲ و ۳ برابری لزجت محیط کشت، رسوب کلسیم حدود ۴ الی ۷ برابر بیشتر می‌شود.
۰/۱	با استفاده از محیط کشت نفوذی و سلول‌های بنیادی مشتق شده از چربی (hASC) بیان کلاژن، سیالوپروتئین‌های استخوانی و استئوپونتین را در مقایسه با محیط استاتیک افزایش می‌دهد.
۰/۰۰۷-۰/۱	افزایش نرخ نفوذ توزیع تعداد سلول و تولید پروتئین در سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بعد از ۵ هفته افزایش می‌دهد.
۱/۶	افزایش بیان مارکرهای استخوانی بعد از ۲۰ روز در سلول‌های بنیادی استرمال استخوانی
۰/۰۵-۰/۱۵	افزایش مینرال‌شدن و تسریع تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی استرمال استخوانی

سیال افزایش می‌یابد و اگر سرعت ورودی بیش از اندازه باشد ممکن است موجب جدایش سلول‌ها از سطح داربست شده و مرگ سلولی را سبب شود. در مجموع، با توجه به جدول ۳ انتظار می‌رود که در داربست با شیب اندازه تخلخل، مسیرهای سیگنال‌دهی متفاوتی فعال شوند و این امر موجب تمایزهای متفاوت در بخش‌های مختلف داربست شود. این گونه داربست‌ها در بخش‌هایی از اتصالات استخوانی که در محل تغییر از استخوان به غضروف قرار دارد، قابل استفاده است.



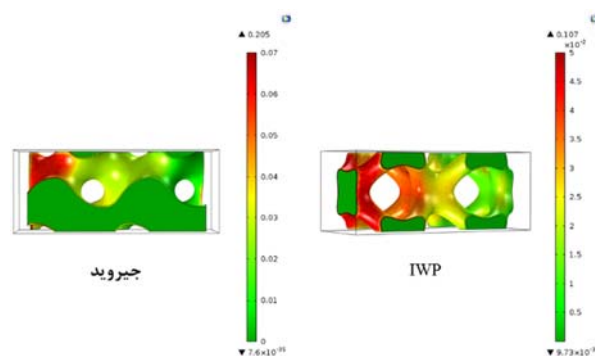
نمودار ۳ دامنه فشار هیدرودینامیک در داربست‌ها

می‌کنند و بخش‌های عمود به عبور جریان، تنش کمتری را دریافت می‌کنند. نکته قابل توجه آن است که داربست جبروید، اگرچه دارای مناطقی است که تنش برشی متفاوتی را تحمل می‌کنند، اما با توجه به تنش فون مایسز که معیاری از مجموع دو تنش برشی و نرمال است، این تفاوت جبران شده و بخش‌های مختلف لایه سلول در حال تجربه تنش‌های تقریباً یکسانی هستند. این تنش‌ها قطعاً در کنار عوامل بیوشیمیایی و زیستی نقش مهمی در تعیین سرنوشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارند.

نتیجه‌گیری

داربست به‌عنوان زمینه خارج سلولی که سلول با آن در تماس است، می‌تواند نقش مهمی ایفا نماید. داربست‌های مبتنی بر سطوح مینیمال به‌دلیل دارابودن نسبت سطح به حجم بالا و نیز فراهم‌نمودن خواص مکانیکی مناسب، برای استفاده در مهندسی بافت استخوان بسیار مفید هستند. باید در نظر داشت که برای انتخاب داربست مناسب از نقطه‌نظر پارامترهای مکانیکی، عوامل متعددی نقش ایفا می‌کنند. داربست‌های مبتنی بر سطوح ضعیفی شرایطی قابل پیش‌بینی از منظر تحریکات مکانیکی فراهم می‌آورند و این نکته و مزیت کلیدی استفاده از این داربست‌ها است. نه تنها تنش برشی عامل بسیار حیاتی در تعیین سرنوشت سلول است، بلکه فشار هیدروستاتیک ناشی از حضور و عبور سیال از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه، سرعت سیال داخل داربست، تنش برشی و فشار هیدروستاتیک در فصل مشترک داربست و سیال که محل قرارگیری سلول است، مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد داربست دیاموند بهترین عملکرد را از نظر یکنواختی اثر تنش برشی در فصل مشترک سیال و داربست دارد. داربست IWP اگرچه از نظر سطح در دسترس برای عبور سیال مناسب است، اما به‌دلیل ساختار مشابه با سازه‌های هگزاگونال، موضعی را در سطح داربست ایجاد می‌نماید که سرعت سیال در آن نقاط به صفر میل می‌کند و عملاً شرایط نامطلوبی را از نقطه‌نظر یکنواختی تحریکات مکانیکی نشان می‌دهد. استفاده از داربست با شیب اندازه تخلخل موجب اعمال تنش‌های متفاوت در بخش‌های مختلف داربست می‌شود و این امر در مورد کاربردهای نوین داربست‌های استخوانی برای ایجاد تمایزهای سلولی مختلف به‌طور همزمان بسیار مفید است. ترکیبی از تنش برشی و فشار هیدروستاتیک را می‌توان به‌عنوان عاملی کلیدی در کنار سایر عوامل از قبیل عوامل بیوشیمیایی و بیولوژیکی برای تعیین سرنوشت سلول بنیادی روی داربست در نظر گرفت. پیشنهاد می‌شود برای ادامه این موضوع لایه‌ی سلولی برای هر چهار داربست طراحی شود و تحت شرایط محیط کشت دینامیک قرار گیرد. از سویی دیگر، می‌توان از مواد مختلف به‌عنوان ماده زیرلایه با چنین الگویی استفاده نمود و تأثیر همزمان مدول الاستیک و طرح داربست بررسی شود. همچنین، در این تحقیق از مدل الاستیک خطی برای تعیین خواص لایه سلولی استفاده شده است. پیشنهاد می‌شود در تحقیقات

بازه تنش برشی در حضور لایه سلولی مشابه شرایط عدم حضور داربست است و این تأیید نتایج اولیه را به همراه دارد. الگوی تنش برشی نیز مشابه شرایط بدون لایه سلولی است. شرایط فشار هیدروستاتیک نیز در اینجا یکسان بود. پارامتر دیگری که در مورد لایه سلولی می‌توان به آن اشاره نمود، تنش فون مایسز است. این تنش به وضوح شرایط متفاوت ایجاد شده توسط دو داربست برای توده سلولی را نمایان می‌کند. با صرف نظر نمودن از بخش ورودی سیال و خروجی آن که شرایط فشار صفر را تجربه می‌کند و نباید در نظر گرفت، بخش میانی داربست جبروید از نظر تنش فون مایسز در مقایسه با داربست IWP الگوی بسیار یکنواختی را ایجاد نموده است. حال آن که در داربست IWP مناطق مرده از نظر تنش مشاهده می‌شود. حضور مسیرها و کانال‌های انتقال‌دهنده سیال در اینجا حائز اهمیت است. ممانعت از عبور سیال و کاهش سطح در دسترس برای عبور، باعث افزایش ناخواسته سرعت در فصل مشترک سیال و داربست که محل قرارگیری سلول‌ها است، می‌شود. دبی سیال ورودی ثابت است و کاهش سطح عبور سیال، سرعت را افزایش می‌دهد. به این ترتیب، با توجه به هندسه داربست IWP، این داربست مسیر عبور سیال را از میان تخلخل‌ها هموار می‌کند، اما در مناطق عمود به جریان سیال، منطقه مرده ایجاد می‌نماید و می‌توان گفت سلول‌هایی که به این مناطق مهاجرت کرده‌اند، شرایط متفاوتی را احساس می‌کنند (شکل ۳). می‌توان گفت بازدهی کشت سلول روی داربست خانواده جبروید بالاتر از IWP است، زیرا سطح ایجادشده از نقطه‌نظر تنش یکنواخت است. تحلیل تنش فون مایسز به فهم بهتر اثر بیومکانیکی داربست بر تجمع سلولی کمک می‌کند که در شکل ۵ آورده شده است. از آنجایی که الگوی تنش و فون مایسز جبروید، جبروید پرتخلخل و جبروید با شیب اندازه تخلخل یکسان است و مقادیر تنش و فون مایسز این سه داربست هم تفاوت ناچیزی را نشان می‌دهند، در شکل ۵ تنها داده‌های مربوط به دو داربست آمده است.



شکل ۵) تنش فون مایسز بر لایه سلولی

تنش فون مایسز به‌عنوان معیاری از تأثیر مشترک تنش‌های برشی و نرمال، در داربست جبروید دارای توزیع یکنواختی است. در مورد داربست IWP یکنواختی در بخش میانی مشاهده نشد و بخش‌هایی از داربست که در امتداد جریان سیال قرار دارند، این تنش‌ها را تجربه

- 9- Will J, Detsch R, Boccaccini AR. Structural and biological characterization of scaffolds. In: Bandyopadhyay A, Bose S, editors. Characterization of biomaterials. Amsterdam: Elsevier; 2013. pp. 299-310.
- 10- Chen Y, Schellekens M, Zhou Sh, Cadman J, Li W, Appleyard R, et al. Design optimization of scaffold microstructures using wall shear stress criterion towards regulated flow-induced erosion. *J Biomech Eng*. 2011;133(8):081008.
- 11- Melchels FP, Bertoldi K, Gabbriellini R, Velders AH, Feijen J, Grijpma DW. Mathematically defined tissue engineering scaffold architectures prepared by stereolithography. *Biomaterials*. 2010;31(27):6909-16.
- 12- Abbasi F, Ghanian MH, Baharvand H, Vahidi B, Eslaminejad MB. Engineering mesenchymal stem cell spheroids by incorporation of mechanoregulator microparticles. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018;84:74-87.
- 13- Vaez Ghaemi R, Vahidi B, Sabour MH, Haghighipour N, Alihemmati Z. Fluid-structure interactions analysis of shear-induced modulation of a mesenchymal stem cell: An image-based study. *Artif Organs*. 2016;40(3):278-87.
- 14- Alihemmati Z, Vahidi B, Haghighipour N, Salehi M. Computational simulation of static/cyclic cell stimulations to investigate mechanical modulation of an individual mesenchymal stem cell using confocal microscopy. *Mater Sci Eng C*. 2017;70(Pt 1):494-504.
- 15- Yoo DJ. Computer-aided porous scaffold design for tissue engineering using triply periodic minimal surfaces. *Int J Precis Eng Manuf*. 2011;12(1):61-71.
- 16- Gibson LJ, Ashby MF. Cellular solids: Structure and properties. 2nd Edition. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
- 17- Van De Velde K, Kiekens P. Biopolymers: Overview of several properties and consequences on their applications. *Polym Test*. 2002;21(4):433-42.
- 18- Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci*. 2010;35(10):1217-56.
- 19- Eshraghi Sh, Das S. Mechanical and microstructural properties of polycaprolactone scaffolds with one-dimensional, two-dimensional, and three-dimensional orthogonally oriented porous architectures produced by selective laser sintering. *Acta Biomater*. 2010;6(7):2467-76.
- 20- Zhao F, Vaughan TJ, Mcnamara LM. Multiscale fluid-structure interaction modelling to determine the mechanical stimulation of bone cells in a tissue engineered scaffold. *Biomech Model Mechanobiol*. 2015;14(2):231-43.
- 21- Yu H, Tay CY, Leong WS, Tan SC, Liao K, Tan LP. Mechanical behavior of human mesenchymal stem cells during adipogenic and osteogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393(1):150-5.
- 22- Zeng X, Li Sh. Multiscale modeling and simulation of soft adhesion and contact of stem cells. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4(2):180-9.
- 23- Ribeiro AJ, Tottey S, Taylor RW, Bise R, Kanade T, Badylak SF, et al. Mechanical characterization of adult stem cells from bone marrow and perivascular niches. *J Biomech*. 2012;45(7):1280-7.
- 24- Sengers BG, Taylor M, Please CP, Oreffo RO. Computational modelling of cell spreading and tissue regeneration in porous scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28(10):1926-40.
- 25- Blecha LD, Rakotomanana L, Razafimahéry F, Terrier A, Pioletti DP. Mechanical interaction between

آینده از خواص هایپرالاستیک و همچنین ویسکوالاستیک برای لایه سلولی استفاده شود. همچنین از مدل‌های ترکیبی مانند هایپر-ویسکوالاستیک نیز می‌توان استفاده نمود. تولید داربست‌های مبتنی بر سطوح مینیمال ضمنی از طریق پرینت یا چاپ سه‌بعدی روشی کاملاً عملی است. از این رو پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات آینده این داربست‌ها تولید شوند و با کشت سلول در محیط کشت به ویژه قرارگیری در بیوراکتور نفوذی، نتایج حاصل با نتایج به‌دست‌آمده از شبیه‌سازی مقایسه شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله از حمایت‌های دانشگاه تهران در انجام پژوهش قدردانی می‌نمایند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: امیرعلا بخشیان‌نیک (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۵۰٪)؛ بهمن وحیدی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۵۰٪)

منابع مالی: از محل بودجه طرح نوع ششم حمایت از پایان‌نامه‌های کارشناسی ارشد دانشگاه تهران تامین شده است.

منابع

- 1- Subramony SD, Su A, Yeager K, Lu HH. Combined effects of chemical priming and mechanical stimulation on mesenchymal stem cell differentiation on nanofiber scaffolds. *J Biomech*. 2014;47(9):2189-96.
- 2- Nik AB, Vahidi B. The effect of bone scaffold gradient architecture design on stem cell mechanical modulation: A computational study. 22nd Iranian Conference on Biomedical Engineering (ICBME), 25-27 November, 2015, Tehran, Iran. Piscataway: IEEE; 2015. pp. 309-13.
- 3- Bakhshian Nik A, Vahidi B, Moradkhani M. Effects of scaffold architecture on efficiency of mechanical stimulations of mesenchymal stem cells under fluid flow. 11th Congress on Stem Cell Biology & Technology. Royan International Twin Congress on Reproductive Biomedicine and Stem Cells Biology & Technology; 2015 Sep 2-4, Iran: Tehran. [Persian]
- 4- Wu Sh, Liu X, Yeung KW, Liu Ch, Yang X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng R Rep*. 2014;80:1-36.
- 5- Giannitelli SM, Accoto D, Trombetta M, Rainer A. Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering. *Acta Biomater*. 2014;10(2):580-94.
- 6- Karande TS, Ong JL, Agrawal CM. Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: Design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing. *Annal Biomed Eng*. 2004;32(12):1728-43.
- 7- Yeatts AB, Choquette DT, Fisher JP. Bioreactors to influence stem cell fate: Augmentation of mesenchymal stem cell signaling pathways via dynamic culture systems. *Biochimica Biophys Acta*. 2013;1830(2):2470-80.
- 8- Dabagh M, Jalali P, Butler PJ, Tarbell JM. Shear-induced force transmission in a multicomponent, multicell model of the endothelium. *J R Soc Interface*. 2014;11(98):20140431.

bone scaffolds. J Biomech Eng. 2011;133(9):091003.

27- Yang Y, El Haj A. Enhancement of mechanical signals for tissue engineering bone. In: Ashammakhi N, Reis RL, editors. 2nd Volume. Topics in Tissue Engineering. Oulu: University of Oulu; 2005.

cells and fluid for bone tissue engineering scaffold: Modulation of the interfacial shear stress. J Biomech. 2010;43(5):933-7.

26- Norato JA, Wagoner Johnson AJ. A computational and cellular solids approach to the stiffness-based design of