

Effect of Collagen Substrate Stiffness and Thickness on the response of a Mesenchymal Stem Cell in Cell Culture Environment: A Computational Study

M. Moradkhani¹, and B. Vahidi^{2*}

¹MSc of Biomedical Engineering-Biomechanics, Faculty of New Sciences and Technologies (FNST), University of Tehran, Tehran, Iran

²Assistant Professor of Biomedical Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies (FNST), University of Tehran, Tehran, Iran

Receipt in the online submission system 2 January 2016, received in revised form 5 May 2016, accepted 17 May 2016

Abstract

Investigating the mechanical stimuli on stem cells under *in vitro* and *in vivo* conditions is a very important topic to achieve an ability to control the cellular responses like growth, proliferation and differentiation. Many investigations carried out about biomechanical factors involved in this phenomenon and nowadays, it is proved that some factors like as cell morphology, subcellular elements configuration, scaffold architecture, substrate stiffness and mechanical stimulation via substrate displacement or fluid flow, have got an important effect on cellular responses. In this study, we have tried to evaluate the responses of a stem cell to the stiffness and thickness of the substrate by the means of finite element method. For this purpose, we have used collagen-based scaffolds as the artificial ECM and a cell culture in a bioreactor with fluid flow was simulated. By use of fluid-structure interaction method and solving the equations in two-way coupling scheme, the results show that the increase in thickness and stiffness of the substrate will result in 15 percent change in cell-substrate stresses, respectively. Also, it was seen that the change of substrate stiffness only in the range of 0.1-100 KPa could affect the cell response to an external stimulation. These results, along with other similar investigations, could be used as an instructor by the researchers to optimize the stem cell's microenvironment *in vitro*, and finally get the most out of their stem cell related investigations.

Key words: *Mechanical Modulation, Finite Element Method, Fluid Structure Interaction, Substrate Thickness and Stiffness, Collagen, Stem Cell*

*Corresponding author

Address: Faculty of New Sciences and Technologies (FNST), University of Tehran, Postal Code 14395-1561, Tehran, Iran

Tel: +98-21-61118407

Fax: +98-21-8861 7087

E-mail: bahman.vahidi@ut.ac.ir

بررسی محاسباتی اثر ضخامت و سختی بستر کلاژنی بر پاسخ سلول‌های بنیادی مزنشیمال در محیط کشت

مهدی مرادخانی^۱، بهمن وحیدی^{۲*}

^۱ کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی، بیومکانیک، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران
^۲ استادیار مهندسی پزشکی، گروه مهندسی علوم زیستی، بخش مهندسی پزشکی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

تاریخ ثبت در سامانه: ۱۳۹۴/۱۰/۱۲، بازنگری: ۱۳۹۵/۲/۱۶، پذیرش قطعی: ۱۳۹۵/۲/۲۸

چکیده

بررسی تحریکات مکانیکی موثر بر سلول بنیادی در شرایط طبیعی بدن و همچنین شرایط کشت آزمایشگاهی، موضوعی بسیار مهم در جهت دستیابی به توانایی کنترل بر رفتار و پاسخ‌های سلولی همچون رشد، تکثیر و تمایز می‌باشد. درمورد عوامل بیومکانیکی دخیل در این پدیده پژوهش‌های فراوانی انجام شده است. امروزه ثابت شده است که عواملی همچون مورفولوژی سلول، آرایش اجزای زیرسلولی، هندسه داربست، سختی بستر و تحریک مکانیکی اعمالی از جانب آن و یا جریان سیال تاثیر بسزایی در پاسخ‌های سلولی دارند. در پژوهش حاضر سعی شده است تا با استفاده از تحلیل اجزای محدود، یکی از عوامل مذکور در تحریک مکانیکی موثر بر سلول بنیادی مزنشیمال یعنی اثر سختی و ضخامت بستر و پاسخ سلول از جنس تنش و کرنش به این عامل ارزیابی شود. برای این منظور از بسترهای پایه کلاژنی به‌عنوان ماتریس خارج سلولی مصنوعی استفاده شد و شرایط کشت سلول درون یک بیوراکتور و در حضور جریان سیال شبیه‌سازی شد. با به‌کارگیری روش برهم‌کنش سیال و سازه برای شبیه‌سازی و حل آن به شیوه جفت‌شوندگی دوطرفه معادلات سیال و جامد، تاثیر افزایش سختی بستر و ضخامت آن به ترتیب در افزایش و کاهش تنش‌های وارده بر سلول از جانب بستر به میزان حداکثر ۱۵ درصد در نتایج مشاهده شد. همچنین مشاهده شد که تغییر سختی بستر تنها در بازه ۰/۱ تا ۱۰۰ کیلو پاسکال می‌تواند در تغییر رفتار سلول درمقابل تحریک خارجی موثر باشد. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق در کنار سایر تحقیقات مشابه می‌تواند یک راهنما برای محققان جهت بهینه‌سازی شرایط ریزمحیطی سلول بنیادی در محیط کشت آزمایشگاهی و در نهایت دستیابی به نتایج کارآمدتر در پژوهش‌های مرتبط با مهندسی سلول‌های بنیادی محسوب شود.

کلیدواژه‌ها: تحریک مکانیکی سلول، تحلیل اجزای محدود، برهم‌کنش سیال و سازه، سختی و ضخامت بستر، کلاژن، سلول بنیادی

* نویسنده مسئول

نشانی: خیابان کارگر شمالی، بعد از بزرگراه جلال آل احمد، دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران، ایران. کد پستی: ۱۵۶۱-۱۴۳۹۵

تلفن: +۹۸(۲۱)۶۱۱۱۸۴۰۷

دورنگار: +۹۸(۲۱)۸۸۶۱۷۰۸۷

پست الکترونیکی: bahman.vahidi@ut.ac.ir

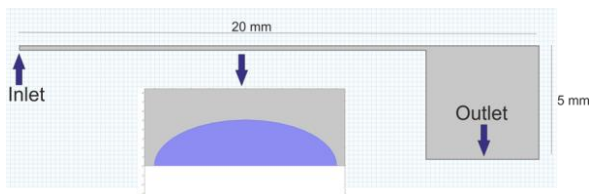
۱- مقدمه

دانشمندان و پژوهش‌گران بسیاری مطالعات گسترده و تحقیقات فراوان روی انواع متفاوت سلول بنیادی برای بررسی رفتار آنها در شرایط مختلف را سال‌ها در دستور کار خود قرار داده‌اند؛ تا به شناخت جامع‌تری نسبت به پدیده‌های مرتبط با این حوزه برسند و پیش‌بینی دقیق‌تری از رفتارهای مختلف سلولی چون تمایز، رشد، تکثیر و مهاجرت سلولی ارائه دهند. بررسی خواص بیوفیزیکی سلول بنیادی چون خواص مکانیکی و هندسه و نیز پاسخ این سلول در برابر تحریکات بیوفیزیکی خارجی مانند تنش و کرنش، از جمله این پژوهش‌ها می‌باشد. مطالعه رفتار سلول‌های بنیادی، در اثر عبور جریان سیال در زمان کشت در محیط آزمایشگاهی، همواره حوزه بسیار جذابی برای محققان بوده است. سیال واسط درون بیوراکتور وظیفه‌ی رساندن مواد غذایی و اکسیژن به سلول‌ها در نقاط مختلف محیط کشت را بر عهده داشته است؛ از طرف دیگر می‌تواند به‌عنوان یک عامل بیومکانیکی در تحریک سلول‌ها عمل کند و در تعیین سرنوشت آنها موثر باشد. پیش‌تر ثابت شده است این اثر با تحریک از طریق تنش برشی و فشار هیدرودینامیکی سیال صورت می‌گیرد [۱-۳]. همچنین برخی از محققان تاثیر سختی بستر سلول‌ها در تغییر سرنوشت سلول بنیادی را در زمان کشت آزمایش کردند و ثابت شده است که در شرایطی، سلول‌هایی که بر روی بستری با سختی نزدیک به سختی بافت استخوان قرار گرفته‌اند به سمت استخوان‌سازی تمایز یافته‌اند. رفتار مشابهی برای گرایش سلول‌های بنیادی جهت تمایز به سلول‌های مغزی و ماهیچه‌ای رفتار مشابهی مشاهده شده است [۴]. در تحقیق دیگری ارزیابی و مشاهده شده است که ضخامت لایه بستر می‌تواند در تحریک تمایز و رشد سلول استخوانی موثر باشد [۵]. می‌توان نتیجه گرفت در یک بیوراکتور که در آن از جریان سیال برای تحریک سلول استفاده شده است و سلول‌ها روی یک بستر یا داربست در اثر این جریان قرار دارند، عوامل بیوفیزیکی ذکر شده بر سرنوشت سلول بنیادی بسیار موثراند. چون اجرای آزمایشات برای بررسی دقیق‌تر اثر هر یک از این عوامل، به‌خصوص برای تمامی سرعت‌های ورودی سیال، سختی و ضخامت‌های متفاوت لایه بستر، بسیار

هزینه‌بر است؛ در این تحقیق سعی شده است تا با انجام شبیه‌سازی منطبق با این مسئله، پاسخ مکانیکی سلول بنیادی در معرض تحریک جریان سیال در سختی‌ها و ضخامت‌های مختلف لایه بستر را بررسی شود. در این تحقیق از سختی و ضخامت بستر کلاژنی در بازه‌های گزارش شده استفاده می‌شود تا اثر هم‌زمان این ضخامت و سختی و نیز مشخصه‌های دینامیکی جریان سیال درون بیوراکتور بررسی شود. برای دستیابی به این هدف از روش برهم‌کنش سیال و سازه استفاده شده است که سابقه استفاده از این روش برای شبیه‌سازی برهم‌کنش سلول و شرایط ریزمحیطی بسیار محدود است. گروه تحقیقاتی دکتر مک نامارا در دانشگاه ملی ایرلند تحقیقات وسیعی در زمینه شبیه‌سازی برهم‌کنش میان سیال و سلول استخوانی در محیط طبیعی و همچنین محیط آزمایشگاهی انجام داده‌اند [۶-۹]. از جمله بررسی پاسخ مکانیکی سلول استخوانی به فشار هیدرودینامیک و نرخ برش سیال در یک بیوراکتور PFFC در محیط آزمایشگاهی که هدف از انجام آن بررسی عامل موثر در تحریک سلول استخوانی از میان عوامل فشار هیدرودینامیکی و تنش برشی بوده است [۷]. به همین منظور با ثابت نگه‌داشتن سرعت ورودی و در نتیجه تنش برشی دیواره، فشار را در مرز خروجی سیال افزایش دادند که موجب افزایش فشار هیدرودینامیکی در تمامی دامنه سیال می‌شود. براساس نتایج این تحقیق، افزایش فشار هیدرودینامیکی موجب افزایش تنش‌های انتقالی به سلول می‌شود و افزایش تنش برشی دیواره به‌صورت ایزوله (یعنی به گونه‌ای که موجب افزایش فشار هیدرودینامیک نشود، مانند افزایش ارتفاع دامنه سیال) تغییر چندانی در میزان کرنش‌های وارده بر سلول ایجاد نمی‌کند [۷]. نتایج تحقیق مذکور در بخش ۲-۶ با جزئیات بیشتر تشریح خواهد شد. البته لازم به ذکر است در تمامی تحقیقات این گروه، بستر دوبعدی یا داربست سه‌بعدی، که با سلول در تماس است، صلب در نظر گرفته می‌شود و تاکنون اثر سختی و ضخامت این لایه در هیچ‌یک از پژوهش‌های محاسباتی مشابه بررسی نشده است.

هدف از نتایج مطالعه حاضر، شناسایی دقیق‌تر عوامل موثر و پیش‌بینی اثر رفتار آنها بر پاسخ سلول بنیادی در جهت

می‌شود. چون این مواد اضافی محلول در آب تأثیر ناچیزی در تغییر خواص هیدرودینامیک آن دارند، در شبیه‌سازی‌های انجام‌شده از خواص هیدرودینامیک آب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای خواص سیال استفاده شد؛ که این خواص در جدول ۱ مشخص شده است.



شکل (۱) - نمایی شماتیک از بیوراکتور مدل شده در نرم افزار همراه با محل قرار گیری سلول در آن

جدول (۱) - خواص هیدرودینامیکی آب در دمای ۳۷ درجه

پارامتر	چگالی Kg/m ³	لزجت دینامیکی (Pa. S)*(1/10 ⁴)	شماره مرجع
مقدار	۹۹۳	۶/۸	[۱۱]

۲-۲- مدل مواد و خواص مکانیکی

در این شبیه‌سازی که نقش سختی بستر در پاسخ سلول مورد بررسی بود، یک لایه نازک کلاژنی بین سلول و صفحه سخت زیرین سلول واقع در بیوراکتور در نظر گرفته شد (شکل ۲). مطابق بسیاری از شبیه‌سازی‌های مشابه [۱۰، ۱۱-۱۳]، مدل الاستیک خطی با تقریب خوبی برای این لایه کلاژنی انتخاب شد. برای بررسی تأثیر این لایه کلاژنی روی برهم‌کنش میان سلول بنیادی و لایه کلاژنی، دو مشخصه مطالعه شد و نمودارهای میزان تنش وارده به سلول در فصل مشترک کف سلول و لایه کلاژنی نسبت به تغییر این دو پارامتر رسم شد؛ اول، ضخامت لایه کلاژنی که تأثیر کاهش و افزایش آن در بازه ۱ تا ۲۰ میکرومتر، بر روی افزایش یا کاهش تنش بررسی شد و دوم تأثیر سختی لایه کلاژنی (E_{Sub}) که سعی شد با توجه به بررسی داربست‌های پایه کلاژنی، مقادیر انتخابی برای این پارامتر در بازه‌های ذکر شده برای سختی داربست‌های پایه کلاژنی، به صورت ژل یا کامپوزیت، قرار

دستیابی به روش‌های بهینه کشت و آزمایش سلولی می‌باشد. پس پیش‌بینی می‌شود که این نتایج بازه‌های دقیق‌تری از مشخصه‌های دینامیکی جریان سیال چون سرعت ورودی و فشار خروجی و نیز شرایط بستر کلاژنی مانند ضخامت و سختی را برای انتخاب و استفاده در کشت سلول در محیط آزمایشگاهی فراهم آورد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جریان سیال

برای شبیه‌سازی اثر جریان سیال بر پاسخ سلول‌های بنیادی در محیط کشت، هندسه یک بیوراکتور که سیال بین دو صفحه موازی آن جریان دارد؛ برای شبیه‌سازی انتخاب شد و جریان لایه‌ای درون این بیوراکتور در نرم افزار شبیه‌سازی شد. این مدل شامل یک ورودی برای سیال، یک کانال باریک بین صفحات موازی (که سلول در این بخش قرار می‌گیرد) با ضخامت ۰/۲ میلی‌متر و طول کلی ۲۰ میلی‌متر و همچنین یک محفظه خروجی به ضلع ۵ میلی‌متر، که سطح خروجی سیال در انتهای پایینی آن قرار دارد، می‌باشد (شکل ۱). در این شبیه‌سازی، سلول در نقطه‌ای در وسط طول این بیوراکتور قرار گرفته است. با توجه به مقادیر استفاده‌شده پژوهش‌گران در آزمایشات [۵]، محدوده سرعت میانگین سیال در ورودی و فشار خروجی به ترتیب ۱-۳۰ میلی‌متر بر ثانیه و ۰-۳۰ پاسکال به عنوان شرایط مرزی انتخاب شد و از شرط مرزی عدم لغزش در دیواره‌ها استفاده شد. با توجه به مشخصات هندسی کانال و همچنین سرعت‌های میانگین سیال در ورودی، عدد رینولدز در بازه‌ی جریان لایه‌ای قرار می‌گیرد ($17/52 < Re < 0/58$). پاسخ‌ها نیز در محدوده توسعه-یافتگی سیال مطرح شده‌اند. در شکل ۱ نمایی از هندسه طراحی شده از بیوراکتور PPFC در نرم‌افزار و نیز محل قرارگیری سلول در آن مشخص شده است.

سیال واسط استفاده‌شده در بیوراکتورها بیشتر بر پایه آب است؛ که عوامل تغذیه‌ای، برای فراهم کردن محیط بیوشیمیایی لازم برای رشد سلول‌های بنیادی، به آن اضافه

¹Parallel plate flow chamber (PPFC)

۳-۲- مدل ریاضی و نرم افزار مورد استفاده

نرم افزار با استفاده از مدل های ریاضی خود و طبق تنظیمات لازم به حل مسئله می پردازد. فرضیات اعمال شده در حل مسئله در ادامه توضیح داده می شوند.

۳-۲-۱- دامنه سیال

روابط استفاده شده برای حل دامنه سیال در این مسئله مانند معادلات حاکم برای یک سیال نیوتونی در رژیم جریان لایه ای پایا می باشد؛ که عبارت اند از:

۱- معادله عمومی ناویر- استوکس که عبارت های وابسته به زمان و نیروهای حجمی در آن حذف شده اند (معادله ۱)؛

۲- معادله پیوستگی یا بقای جرم که باید برای حل مسئله جریان پایا برقرار باشد (معادله ۲).

$$\rho (\mathbf{u}_{\text{سیال}} \cdot \nabla) \mathbf{u}_{\text{سیال}} = \quad (1)$$

$$\nabla \cdot \left[-p\mathbf{I} + \mu \left(\nabla \mathbf{u}_{\text{سیال}} + (\nabla \mathbf{u}_{\text{سیال}})^T \right) - \frac{2}{3} \mu (\nabla \cdot \mathbf{u}_{\text{سیال}}) \mathbf{I} \right]$$

$$\nabla \cdot (\rho \mathbf{u}_{\text{سیال}}) = 0 \quad (2)$$

در روابط بالا $\mathbf{u}_{\text{سیال}}$ بیان کننده تانسور سرعت سیال، ρ چگالی سیال، p فشار سیال و μ لزجت دینامیکی سیال می باشد.

۳-۲-۲- دامنه جامد

چون از مدل الاستیک خطی برای قسمت های جامد استفاده شده است، روابط حاکم بر این دامنه ها (معادله ۳) براساس رابطه تنش و کرنش می باشند که به وسیله تانسور ضرایب سختی \mathbf{C} برای یک ماده الاستیک خطی این دو به یکدیگر مرتبط می شوند [۱۴].

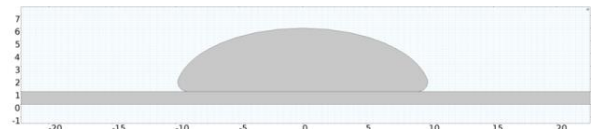
$$\sigma = \mathbf{s} \quad (3)$$

$$\mathbf{s} - \mathbf{s}_0 = \mathbf{C} : (\boldsymbol{\varepsilon} - \boldsymbol{\varepsilon}_0)$$

$$\boldsymbol{\varepsilon} = \frac{1}{2} \left[\left(\nabla \mathbf{u}_{\text{جامد}} \right)^T + \nabla \mathbf{u}_{\text{جامد}} \right]$$

گیرد [۱۰]، پس سختی متغیر بستر کلاژنی باید بین ۰/۵ و ۵۰۰ کیلو پاسکال فرض شود.

صفحه زیرین به دلیل سختی بسیار زیاد آن در مقایسه با سلول و لایه کلاژنی، صلب انتخاب می شود تا پاسخ سلول به تحریک مکانیکی در حضور این لایه کلاژنی و همچنین در غیاب آن بررسی شود. در فصل مشترک اتصال سلول به بستر نیز دودامنه باهم هم مرز می شوند. نمایی از قرارگیری لایه کلاژنی و سلول بنیادی مزنشیمال در شکل ۲ مشخص شده است.



شکل (۱)- نمایی از سلول بنیادی و بستر کلاژنی

در این شبیه سازی، سلول با تقریب خوبی به صورت ماده الاستیک خطی در نظر گرفته شد. مقادیر خواص مکانیکی استفاده شده در شبیه سازی برای جزء سلول بنیادی از اندازه گیری های آزمایشگاهی ذکر شده در مراجع معتبر اقتباس شده اند، که تمامی موارد در جدول ۲ ذکر شده اند.

جدول (۲)- خواص مکانیکی سلول در مراجع معتبر

جزء سلولی	خواص مکانیکی			
	مدول یانگ Pa	مرجع	ضریب پواسون	مرجع
سلول بنیادی مزنشیمال	۴۹۰	[۱۱]	۰/۴۹	[۱۲، ۱۳]

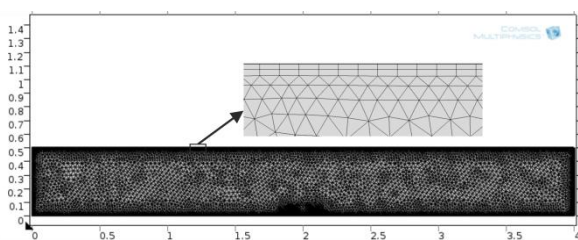
در شبیه سازی انجام شده، سلول بنیادی به صورت یک جسم بیضی گون ناقص با هندسه ایده آل فرض شده است و اندازه قطرهای بزرگ و کوچک این بیضی گون به ترتیب برابر با ۲۰ و ۵ میکرومتر می باشد، که از شبیه سازی گروه دکتر مک نامارا با اندکی تغییر به دست آمده اند [۷].

از مقدار ۰/۱ برای ضریب pivot threshold استفاده شد؛ که این‌ها از تنظیمات معمول نرم‌افزار کامسول در این حل‌کننده می‌باشند.

برای دامنه سیال از حل‌کننده تکراری از نوع GMRES استفاده شد. از روش چندشبکه‌ای هندسی^۲ دو مرحله‌ای برای کاهش مرتبه معادلات در خانه‌ها و در نتیجه کاهش هزینه محاسباتی و درعین حال حفظ دقت مطلوب استفاده شد.

۲-۵- شبکه محاسباتی و رعایت شرط استقلال از شبکه

طبق تمام شبیه‌سازی‌های عددی، برای حل مسئله باید شبکه محاسباتی تعریف شود. نرم‌افزار کامسول امکانات بسیار قدرتمندی برای تولید خودکار شبکه دارد؛ اما با توجه به هندسه مدل، باید شبکه اولیه تولید شده اصلاح شود. با توجه به تفاوت بسیار زیاد اندازه سلول در مقابل بیوراکتور، برای رسیدن به دقت لازم باید شبکه‌بندی سلول به‌طور دستی اصلاح شود. به همین منظور توزیع خانه‌ها در محل اتصال سلول به داربست را ریزتر کردیم تا دامنه سلولی شبکه ریزتری داشته باشد. همچنین نرم‌افزار برای خانه‌بندی در لایه مرزی سیال به‌طور خودکار از المان‌های منشوری^۳ استفاده می‌کند. برای دیگر قسمت‌های دامنه سیال و همچنین تمامی دامنه سلول از المان‌های چهاروجهی استفاده شد (شکل ۳).



شکل (۲)- از المان‌های منشوری برای لایه مرزی سیال و از المان‌های چهاروجهی برای تمامی قسمت‌های دیگر دامنه سیال و همچنین دامنه جامد استفاده شد.

مانند تمامی تحقیقات در زمینه شبیه‌سازی عددی، در این پژوهش نیز سعی شد تا اصل استقلال از شبکه محاسباتی

در عبارات بالا s بیان‌کننده تانسور تنش کوشی، C تانسور ضرایب سختی، ε تانسور کرنش و جامد u تانسور جابجایی دامنه جامد است.

۳-۲- فصل مشترک دامنه جامد و سیال

نظریه مفید برای انتقال اطلاعات و پاسخ‌ها در فصل مشترک جامد و سیال در روش جفت‌شوندگی دوطرفه معادلات FSI، شیوه فرضی لاگرانژی-اولری می‌باشد؛ که با جفت‌شوندگی مرحله‌به‌مرحله اطلاعات و حل‌گرهای هر دامنه می‌تواند موجب همگرایی پاسخ‌ها، از جنس تنش‌های انتقالی و تغییر شکل سازه و رژیم جریان در اثر آن شود [۱۵]. معادله حاکم برای فصل مشترک جامد و سیال در این روش به صورت رابطه (۴) است. همان‌طور که در این رابطه مشخص است؛ در این روش، دو قسمت اول به جفت‌شوندگی سرعت سیال و جامد (که حاصل تغییر شکل آن در اثر جریان سیال است) در فصل مشترک این دو دامنه مربوط می‌شود و بخش سوم نیز در ارتباط با انتقال تنش‌های ناشی از جریان سیال به دامنه جامد است. در صورت نیاز به مطالعه بیشتر به مرجع [۱۵] رجوع کنید.

$$u_{\text{سیال}} = u_w$$

$$u_w = \frac{\partial u_{\text{جامد}}}{\partial t} \quad (4)$$

$$\sigma \cdot n = \Gamma \cdot n$$

$$\Gamma = \left[-pI + \mu \left(\nabla u_{\text{سیال}} + (\nabla u_{\text{سیال}})^T \right) - \frac{2}{3} \mu (\nabla \cdot u_{\text{سیال}}) I \right]$$

در عبارات بالا u_w بیان‌کننده تانسور سرعت دیواره فصل مشترک سیال و سازه می‌باشد و Γ نماینده تنش هیدرودینامیک انتقالی از دامنه سیال به دامنه جامد است.

۴-۲- الگوریتم حل معادلات سیال و جامد

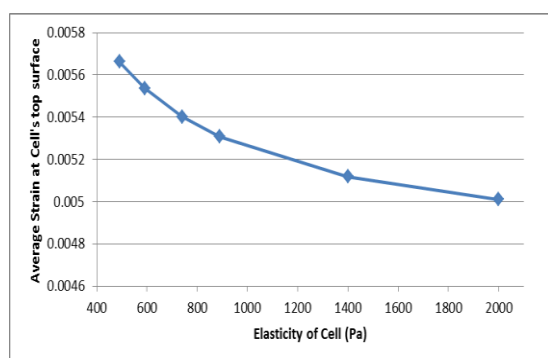
حل‌کننده لازم برای دامنه جامد در این تحقیق، حل‌کننده مستقیم می‌باشد؛ که در میان گزینه‌های موجود در نرم‌افزار کامسول (COMSOL Multiphysics® 5.2)، از حل‌کننده مستقیم MUMPS برای یافتن پاسخ‌ها استفاده شد. در این روش، از الگوریتم پیش‌آرایش^۱ خودکار استفاده شده است و

^۲Geometric Multigrid

^۳Prism

^۱Preordering

آزمایشگاهی به دست آمده‌اند و با توجه به روش استفاده شده در آن آزمایش، برای هر دسته از خاصیت‌ها اعداد مختلفی در یک بازه خاص ذکر شده‌اند؛ بنابراین حساسیت پاسخ‌های حاصل از شبیه‌سازی به تغییر ثابت‌های به‌کار رفته را در بازه‌های ذکر شده بررسی کردیم تا اثر آن در نتایج مشاهده شود. برای این منظور الاستیسیته کلی سلول بنیادی در بازه ۰/۴۹ تا ۲/۵ کیلو پاسکال تغییر داده شد و تغییر میزان کرنش میانگین نیز در سطح بالایی سلول مشاهده شد (شکل ۴). مشخص است که با تغییر میزان الاستیسیته کلی سلول در این بازه، مقدار میانگین کرنش کمتر از ۱۵ درصد تغییر می‌کند؛ در نتیجه پاسخ‌های به دست آمده وابستگی اندکی به تغییر ثابت‌های استفاده شده در مدل‌سازی در بازه مقادیر آزمایشگاهی دارد.



شکل (۳) - تحلیل حساسیت کرنش میانگین در سطح بالایی سلول نسبت به تغییر میزان الاستیسیته کلی سلول در بازه مقادیر آزمایشگاهی

برای بررسی اعتبار مدل استفاده شده و همچنین صحت پاسخ‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار کامسول، باید دست کم یکی از مدل‌ها به صورت مقایسه با یکی از شبیه‌سازی‌های مشابه انجام شده در این حوزه، اعتبارسنجی شود. برای این منظور از فیزیک مسئله استفاده شده در پژوهش تیم دکتر مک نامارا در دانشگاه ملی ایرلند [۷] برای این سلول استفاده شد، تا بتوان نتایج به دست آمده در این نرم‌افزار را با نتایج تحقیق مذکور مقایسه کرد. کلیات این کار تحقیقاتی در بخش مقدمه مطرح شده است.

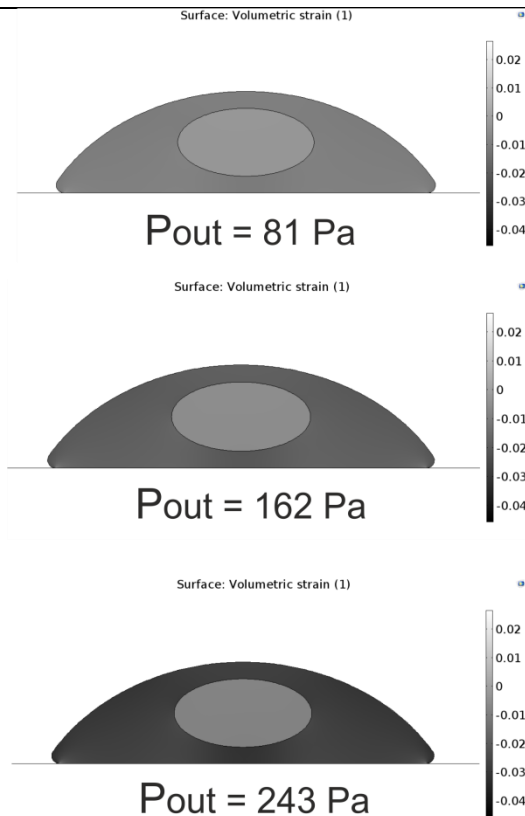
رعایت شود. به همین منظور در هر شبیه‌سازی با ریزتر کردن شبکه و اجرای اصلاحات در آن، به خصوص در نواحی مرزی و فصل‌های مشترک سلول با سیال، بستر و داربست، دقت پاسخ‌های حاصل درباره متغیرهایی بررسی شد که می‌خواستیم از آنها به عنوان نتیجه نهایی استفاده کنیم یا از آن‌ها در استخراج نمودارها و عملیات پس‌پردازش استفاده کرد. شبکه محاسباتی کوچک‌تر برای مدل‌های مختلف و پارامترهای انتخابی تصادفی چون میانگین تنش اعمالی و نرخ برشی سیال در سطح بالایی سلول به پاسخ‌هایی معتبر و بازه ۰/۰۱ تا ۰/۰۲ برای خطای میانگین می‌رسد؛ اما برای کاهش هزینه محاسباتی، از شبکه درشت‌تر استفاده شد که دقت آن به روش مذکور ثابت شده بود. نمونه‌ای از تاثیر ریزتر کردن دو مرحله - ای شبکه بر تغییر مقدار میانگین تنش انتقالی در فصل مشترک سلول و بستر در جدول ۳ قابل مشاهده است. در این نمونه با توجه به اثبات اصل استقلال از شبکه، از شبکه شماره ۱ برای اجرای شبیه‌سازی استفاده شد.

جدول (۳) - تاثیر ریز تر کردن شبکه انتخابی بر پاسخ مطلوب شبیه سازی برای سه شبکه با تعداد المان متفاوت

شبکه	تعداد المان‌ها	میانگین تنش انتقالی در فصل مشترک سلول و بستر (Pa)	سرعت سیال در فصل مشترک (nm)	نرخ برشی سیال در فصل مشترک (1/s)	میانگین کرنش سلول در فصل مشترک
شبکه ۱	۴۸۰۶۲	۴/۳۷۰۰	۰/۰۱۴	۴۴/۶۴۹	۰/۰۱۱۴۹۸
شبکه ۲	۶۸۱۲۳	۴/۳۶۹۹	۰/۰۱۴	۴۴/۵۵۹	۰/۰۱۱۴۹۷
شبکه ۳	۱۳۳۷۸۱	۴/۳۷۰۱	۰/۰۱۴	۴۴/۵۴۵	۰/۰۱۱۴۹۷

۶-۲- تحلیل حساسیت و اعتبارسنجی

برخی از ثابت‌ها و اعداد استفاده شده در مدل‌سازی از جمله مدول الاستیسیته اجزای سلولی، از اندازه‌گیری‌های



شکل (۴) - نتایج به دست آمده از تاثیر افزایش فشار هیدرودینامیکی بر افزایش کرنش‌های وارده به سلول

۳- نتایج

۳-۱- تأثیر سختی و ضخامت بستر

در این شبیه‌سازی، نقش سختی بستر در تنش‌های انتقالی به سلول و پاسخ آن بررسی شد و با تعیین دو پارامتر ضخامت بستر t و سختی بستر E_{Sub} ، نیروهای وارده به سلول در فصل مشترک آن با بستر رصد به دست آمدند.

با توجه به بازه گسترده ذکر شده برای سختی زیرلایه‌ها و داربست‌های پایه کلاژنی، که از چند کیلو پاسکال تا چندین گیگا پاسکال را شامل می‌شوند، و تغییر این پارامتر در این دسته شبیه‌سازی‌ها، نتایج اولیه نشان می‌دهند که نیروهای انتقالی در کف سلول با تغییر سختی بستر کاهش یا افزایش می‌یابند. حساسیت این نیروی انتقالی نسبت به سختی بستر در (شکل ۶) نشان داده شده است.

جدول (۴) - شرایط مرزی استفاده شده در شبیه‌سازی انجام شده در

مرجع [۷]

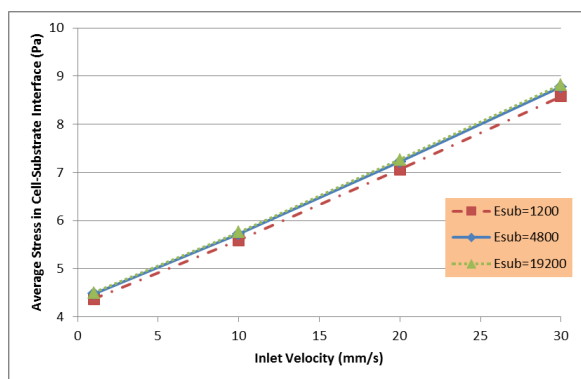
پارامتر	سرعت میانگین ورودی (m/s)	تنش برشی دیواره (Pa)	فشار خروجی (Pa)
۱	۳۷/۴۶	۱	۸۱
۲	۳۷/۴۶	۱	۱۶۲
۳	۳۷/۴۶	۱	۲۴۳

نتایج شبیه‌سازی مذکور نشان داده است که افزایش فشار هیدرودینامیکی موجب افزایش تنش‌های انتقالی به سلول می‌شود و افزایش تنش برشی دیواره به صورت ایزوله (یعنی به گونه‌ای که موجب افزایش فشار هیدرودینامیک نشود، مانند افزایش ارتفاع دامنه سیال) تغییر زیادی در میزان کرنش‌های اعمالی به سلول ایجاد نمی‌کند [۷].

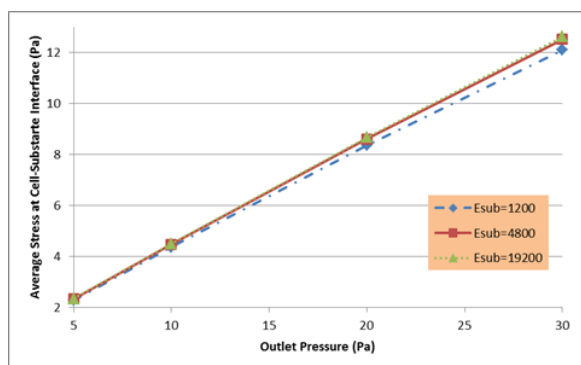
در تحقیق حاضر نیز همین شرایط مرزی در همان دامنه برای مقایسه اعمال شد و نتایج به لحاظ کیفی و کمی، مطابقت بسیاری با تحقیق اصلی دارد. نتایج این شبیه‌سازی در شکل ۵ قابل مشاهده است. مشاهده می‌شود که با افزایش فشار خروجی و به دنبال آن افزایش فشار هیدرودینامیکی اعمالی به سلول، کرنش به وجود آمده در سلول افزایش می‌یابد. با دقت نظر در نتیجه به دست آمده برای فشار خروجی ۱۶۲ پاسکال (نمودار میانی)، مشخص است که بیشترین کرنش در مناطقی اتفاق می‌افتد که با نتیجه همین شبیه‌سازی در تحقیق اصلی منطبق است. به لحاظ کمی نیز این مقدار کرنش برای این شبیه‌سازی نزدیک به ۰/۰۲ است، که مطابق با همین مقدار در شبیه‌سازی اصلی است.

با مقایسه نتایج حاصل از این شبیه‌سازی و مطابقت بسیار بالای آن با نتایج ارائه شده در مرجع [۷]، اعتبار مدل استفاده شده در شبیه‌سازی‌ها و همچنین نرم افزار استفاده شده به خوبی ثابت می‌شود.

فشار در بازه ۳۰-۵ پاسکال در شکل ۹ به نمایش درآمده است.



شکل (۷) - اثر افزایش سرعت ورودی سیال بر افزایش تنش‌های انتقالی در فصل مشترک سلول و بستر (ضخامت بستر ۱ میکرومتر)

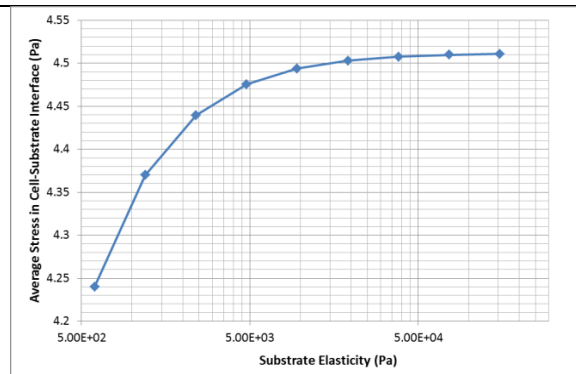


شکل (۸) - تأثیر افزایش فشار خروجی سیال بر افزایش تنش‌های انتقالی در فصل مشترک سلول و بستر (ضخامت بستر ۱ میکرومتر)

نمونه‌ای از نمودار رنگی به دست آمده برای میزان تنش‌های وارده به سلول از جانب سیال در حضور یک لایه بستر کلاژنی با ضخامت ۱ میکرومتر در شکل ۱۰ مشخص شده است.

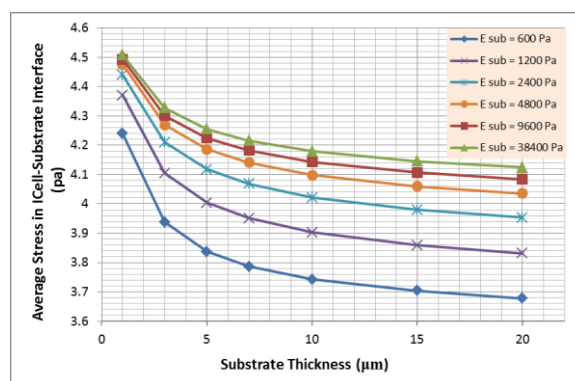
۴- بحث

نتایج حاصل از دسته شبیه‌سازی اول (شکل‌های ۵ و ۶) به خوبی رفتار سلول را مطابق با نظریه‌های مطرح شده و آزمایش‌های انجام شده در این خصوص [۱۰، ۱۷، ۱۸] پیش‌بینی می‌کند. همان‌طور که از شکل ۶ مشخص است؛ با افزایش سختی بستر، میزان تنش انتقالی در فصل مشترک سلول و بستر افزایش می‌یابد. این افزایش تا جایی ادامه دارد که سختی بستر تا مقیاس ۱۰۰ برابری سختی سلول بنیادی



شکل (۵) - رابطه افزایش سختی بستر و میانگین تنش‌های انتقالی در فصل مشترک سلول و بستر

ضخامت لایه کلاژنی پارامتر دیگری است که بر اساس گزارشات آزمایشات انجام شده، تاثیر غیرقابل انکاری در سرنوشت سلول بنیادی دارد [۱۰، ۱۷، ۱۸]. برای بررسی تاثیر ضخامت بر تنش‌های انتقالی به سلول در فصل مشترک، ضخامت بستر در بازه ۱ تا ۲۰ میکرومتر برای مدل استفاده شده در شبیه‌سازی تغییر داده شد و اینکار برای داربست با سختی‌های متفاوت تکرار شد. نتایج این شبیه‌سازی‌ها در شکل (۷) قابل مشاهده است.



شکل (۶) - تأثیر افزایش ضخامت بستر بر کاهش تنش انتقالی در فصل مشترک سلول و بستر برای بسترهایی با سختی متفاوت

در بخش دیگری از شبیه‌سازی، اثر سرعت ورودی سیال در بازه ۱-۳۰ میلی‌متر بر ثانیه بر میزان تنش‌های انتقالی در فصل مشترک سلول و بستر بررسی شد، که نتایج این قسمت در شکل ۸ آمده است.

اثر افزایش فشار خروجی بر افزایش تنش‌های انتقالی در فصل مشترک سلول و بستر نیز بررسی شد، که تاثیر این تغییر

ایجاد می‌شود، در مطالعات آزمایشگاهی در نظر داشت تا خطا و اشتباه در نتایج آزمایشگاهی از بین برود.

در این پژوهش چند دسته محدودیت وجود دارد؛ اولین دسته مربوط به کمبود مقادیر آزمایشگاهی اندازه‌گیری شده برای خواص مکانیکی و سایر مشخصه‌های هندسی و فیزیکی اشکال و مدل‌های استفاده شده است، به طوری که گزارش مطمئنی برای برخی از این موارد در مراجع وجود نداشت.

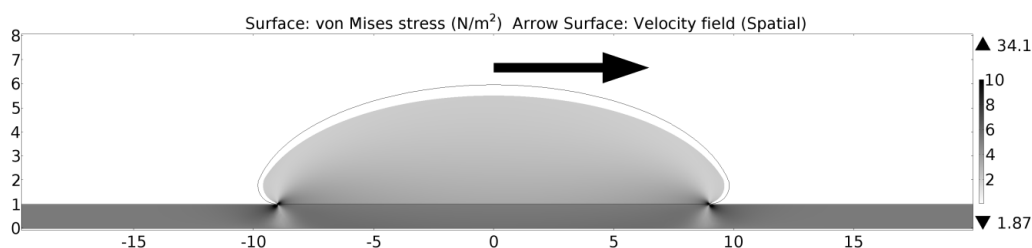
دومین محدودیت در روش‌های استفاده شده، مدل کردن این پدیده‌ها است. برای اجرای یک تحقیق چندمقیاسی، باید دامنه سیال به روش اجزای محدود تولید شود. از سوی دیگر، در نظر گرفتن اجزای زیرسلولی در مدل، که اختلاف ابعاد استفاده شده برای آن دامنه را تا ۱۰۰۰۰ برابر کوچک‌تر از دامنه سیال می‌کند، به خطا در شبکه‌های درشت‌تر یا افزایش زمان حل برای شبکه‌های ریزتر منجر می‌شود و در نهایت باید یک هماهنگی و تعادل میان این دو عامل (دقت و زمان) فرض شود.

برای مطالعات آینده می‌توان در وهله اول برخی دیگر از عوامل محیطی بیومکانیکی و اثرات آنها بر رفتار سلولی را ارزیابی کرد. به عنوان مثال، اثرات بیومکانیکی خارجی چون نانوتوپوگرافی بستر، مورفولوژی سلولی و چسبندگی سلولی، گزینه‌های جذابی برای ادامه راه در مسیر این دسته از شبی-سازی‌ها به نظر می‌رسند. تغییر مدل مکانیکی انتخاب شده برای مواد جامد از الاستیک خطی به مدل‌های پیچیده‌تر مانند ویسکوالاستیسیته نیز برای ادامه کار پیشنهاد می‌شود. می‌توان برخی فیزیک‌های دیگر را نیز در حل مسئله گنجانده؛ برای مثال، جدای از اثر هیدرودینامیکی جریان سیال، می‌توان توزیع و غلظت مواد محلول در دامنه سیال در نقاط مختلف داربست را نیز به دست آورد و نحوه توزیع غلظت اکسیژن و مواد غذایی در حفره‌های مختلف داربست را بررسی کرد. پیشنهاد

برسد (۵۰ تا ۱۰۰ کیلو پاسکال) و پس از آن، افزایش سختی بستر تاثیر زیادی بر تنش انتقالی در آن سطح ندارد. چون از مقداری به بعد، سختی بستر در مقیاس چندصد برابری سختی سلول است و از طرف سلول مانند یک بستر تقریباً صلب احساس می‌شود و پس از آن هر اندازه سختی بستر افزایش یابد، تاثیر قابل‌ذکری در پاسخ سلول ندارد. پیش‌تر، یکی از محققان مشهور در این زمینه از بازه سختی ۰/۵ تا ۱۰۰ کیلو پاسکال برای بررسی آزمایشگاهی نقش سختی بستر در تعیین سرنوشت سلول بنیادی استفاده کرد [۴] و نتیجه آن از- نظر اثر سختی بستر بر هدایت سلول بنیادی به یک سرنوشت خاصا نتایج این شبیه‌سازی، که شامل تغییر در میزان تنش انتقالی در فصل مشترک سلول و بستر است، مطابقت منطقی دارد.

تاثیر ضخامت بستر نیز در این دسته شبیه‌سازی بررسی شد، که نتایج حاصل از آن برای بسترهایی با سختی متفاوت در شکل ۷ آمده است. همان‌طور که نتایج در این نمودار نشان می‌دهند؛ با افزایش ضخامت بستر، میزان تنش‌های انتقالی در فصل مشترک سلول و بستر کاهش می‌یابد. یکی از دلایل این موضوع می‌تواند کمتر شدن تاثیرات لایه صلب زیر بستر در تنش‌های اعمالی در فصل مشترک سلول و بستر باشد. نتایج آزمایشگاهی مشابهی برای این نظریه وجود دارد، که نشان می‌دهد افزایش ضخامت لایه بستر میزان مدول الاستیک موثر بستر را کاهش می‌دهد [۱۸].

دیگر نکته مهم حاصل از نتایج، تاثیر حیرت‌انگیز سرعت ورودی و فشار خروجی بر تنش‌های انتقالی در فصل مشترک سلول و سیال است (شکل‌های ۸ و ۹). این نتایج نشان می‌دهند تا چه اندازه تنظیم دقیق این دو پارامتر بر تحریکات انتقالی به سلول تأثیرگذار است؛ بنابراین باید اثرات جانبی افزایش سرعت که برای افزایش تنش برشی در دامنه سیال



شکل (۹) - نمایی از تنش‌های به وجود آمده در سلول و زیرلایه کلاژنی به ضخامت ۱ میکرون در اثر عبور سیال

یک راهنما، اجرای شبیه‌سازی و پیش‌بینی نتایج آزمایشات را قبل از اجرای عملی آنان ممکن کنند و محققان را در هر چه بهتر تنظیم کردن متغیرهای موثر بر آزمایش یاری کنند.

۶- مراجع

- [1] Melchels, Ferry PW, Beatrice Tonarelli, Andy L. Olivares, Ivan Martin, Damien Lacroix, Jan Feijen, David J. Wendt, and Dirk W. Grijpma. "The influence of the scaffold design on the distribution of adhering cells after perfusion cell seeding." *Biomaterials* 32, no. 11 (2011): 2878-2884.
- [2] Kapur, Sonia, David J. Baylink, and K-H. William Lau. "Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways." *Bone* 32, no. 3 (2003): 241-251.
- [3] Angele, P., J. U. Yoo, C. Smith, J. Mansour, K. J. Jepsen, M. Nerlich, and B. Johnstone. "Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro." *Journal of Orthopaedic Research* 21, no. 3 (2003): 451-457.
- [4] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 126:677-689. (2006)
- [5] Fridley, Krista M., Melissa A. Kinney, and Todd C. McDevitt. "Hydrodynamic modulation of pluripotent stem cells." *Stem Cell Res Ther* 3 (2012): 45.
- [6] Verbruggen, Stefaan W., Ted J. Vaughan, and Laoise M. McNamara. "Fluid flow in the osteocyte mechanical environment: a fluid-structure interaction approach." *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 13.1 (2014): 85-97.
- [7] Vaughan, T. J., M. G. Haugh, and L. M. McNamara. "A fluid-structure interaction model to characterize bone cell stimulation in parallel-plate flow chamber systems." *Journal of The Royal Society Interface* 10.81 (2013): 20120900.
- [8] Zhao, Feihu, Ted J. Vaughan, and Laoise M. McNamara. "Multiscale fluid-structure interaction modelling to determine the mechanical stimulation of bone cells in a tissue engineered scaffold." *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 14.2 (2015): 231-243.
- [9] Zhao, Feihu, Ted J. Vaughan, and Laoise M. McNamara. "Quantification of fluid shear stress in bone tissue engineering scaffolds with spherical and cubical pore architectures." *Biomechanics and modeling in mechanobiology* (2015): 1-17.

آخر نیز بر ترکیب شبیه‌سازی‌ها تاکید دارد؛ به این صورت که اثرات مختلف تنظیمات مکانیکی را در یک دسته شبیه‌سازی تا حد ممکن بررسی کند و نتایج را با حالتی که تنها یک عامل در شبیه‌سازی حضور دارد و باقی عوامل ایزوله شده‌اند، مقایسه کند. البته تعدد عوامل و دامنه‌ها در شبیه‌سازی و همچنین افزایش فیزیک‌های شرکت‌کننده در حل مسئله، نیازمند طراحی دقیق فرایند شبیه‌سازی برای جلوگیری از واگرایی پاسخ‌ها و همچنین بهره‌مندی از سیستم محاسباتی با توان بسیار بالا برای انجام چنین شبیه‌سازی خواهد بود.

۵- نتیجه‌گیری

هدف این پژوهش بررسی پاسخ سلول‌های بنیادی کشت شده در محیط یک بیوراکتور نسبت به عبور جریان سیال و همچنین سختی و ضخامت بستر است. برای اجرای این شبیه‌سازی روش برهم‌کنش سیال و سازه استفاده شده است، که خود یک نوآوری است. برای این منظور، محیط یک بیوراکتور شبیه‌سازی شده است که سیال در محفظه بین صفحه‌های موازی جریان می‌یابد و با توجه به عدد رینولدز، شرایط جریان لایه‌ای برای سیال در نظر گرفته شد. با پاسخ‌های مسئله، که میدان سرعت و فشار هیدرودینامیک در دامنه سیال و همچنین تنش و کرنش در دامنه جامد هستند، با استفاده از روش‌های حل عددی به دست می‌آیند.

نتایج این تحقیق نشان داد که هر دو عامل سختی و ضخامت لایه کلاژنی، در افزایش یا کاهش تنش‌های انتقالی به سلول بنیادی در معرض جریان سیال بسیار موثراند. اگر این نتایج را به انواع دیگر تحریکات بیومکانیکی موثر بر سرنوشت سلول بنیادی تعمیم دهیم و با توجه به اینکه لایه کلاژنی در بیشتر آزمایشات کشت سلولی حضور دارد، می‌توان به این نتیجه رسید که تنظیم مقادیر دقیق برای سختی و ضخامت بستر تا چه اندازه در میزان تنش‌ها و کرنش‌هایی موثر است که سلول بنیادی تحمل می‌کند. این تفاوت در میزان تنش و کرنش به یقین با راه‌گاه‌های انتقال پیام به هسته منتقل می‌شود و احتمال دارد که هسته تغییراتی در بیان ژن به وجود آورد و در نهایت رفتار متفاوتی از کل سلول مشاهده کنیم. این شبیه‌سازی و شبیه‌سازی‌های مشابه می‌توانند به عنوان

- explain cell mechanics variability."Journal of the mechanical behavior of biomedical materials 38 (2014): 219-231.
- [15] Lai, W. Michael, David H. Rubin, David Rubin, and Erhard Krempf. Introduction to continuum mechanics. Butterworth-Heinemann, 2009.
- [16] Donea, J., Huerta, A., Ponthot, J.-P. and Rodríguez-Ferran, A. 2004. Arbitrary Lagrangian–Eulerian Methods. Encyclopedia of Computational Mechanics. 1:14.
- [17] Feng, Chia-hsiang, Yu-chen Cheng, and Penhsiu Grace Chao. "The influence and interactions of substrate thickness, organization and dimensionality on cell morphology and migration."Acta biomaterialia 9, no. 3 (2013): 5502-5510.
- [18] Leong, Wen Shing, Chor Yong Tay, Haiyang Yu, Ang Li, Shu Cheng Wu, Duong-Hong Duc, Chwee Teck Lim, and Lay Poh Tan. "Thickness sensing of hMSCs on collagen gel directs stem cell fate." Biochemical and biophysical research communications 401, no. 2 (2010): 287-292.
- [10] Mullen, Conleth A., Ted J. Vaughan, Kristen L. Billiar, and Laoise M. McNamara. "The Effect of Substrate Stiffness, Thickness, and Cross-Linking Density on Osteogenic Cell Behavior."Biophysical journal 108, no. 7 (2015): 1604-1612.
- [11] Fox, Robert W., Alan T. McDonald, and Philip J. Pritchard. Introduction to fluid mechanics. Vol. 7. New York: John Wiley & Sons, 1985.
- [12] Mathieu, Pattie S., and Elizabeth G. Lobo. "Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways." Tissue Engineering Part B: Reviews 18.6 (2012): 436-444.
- [13] Barreto, Sara, Casper H. Clausen, Cecile M. Perrault, Daniel A. Fletcher, and Damien Lacroix. "A multi-structural single cell model of force-induced interactions of cytoskeletal components."Biomaterials 34, no. 26 (2013): 6119-6126.
- [14] Barreto, Sara, Cecile M. Perrault, and Damien Lacroix. "Structural finite element analysis to