این مقاله در مرحله ویراستاری بوده و نسخه نهایی آن به زودی در سایت مجله قرار داده خواهد شد

Published by: Iranian Society for Biomedical Engineering / www.isbme.ir

**Iranian Journal of Biomedical Engineering**

www.ijbme.org / P-ISSN: 2008-5869 / E-ISSN: 8006-9685

**Volume 16, Issue 3, Autumn 2022, 289-299**

# Analysis of the Effect of Shear Stress on the Differentiation Response of Mesenchymal Stem Cells in Multi-Layered Nanocomposite Scaffold for Bone-Cartilage Tissue Engineering Using Computational Methods

**Zadegan, Sara [1] / Vahidi, Bahman [2*] / Haghighipour, Nooshin [3]**

1- M.Sc. in Biomedical Engineering-Biomechanics, Faculty of New Sciences and Technologies (FNST), University of Tehran, Tehran, Iran

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

3- Professor, Pasteur Institute of Iran (IPI), Tehran, Iran

**ARTICLE INFO**

DOI: 10.22041/ijbme.2023.1989428.1828

Received: 13 February 2023 Revised: 10 March 2023 Accepted: 12 March 2023

**KEYWORDS**

*perfusion bioreactor*

*osteochondral tissue*

*multi layered scaffold*

*Computational fluid dynamics*

*stem cells*

*silk fibroin*

**ABSTRACT**

Repairing osteochondral defects (OCD) remains a formidable challenge due to the high complexity of native osteochondral tissue and the limited self-repair capability of cartilage. In this regard, the development of osteochondral tissue engineering with scaffolds seeded with stem cells along with mechanical stimulation has been considered by the researchers as a new proposed technique for the repair of this tissue. In this study, at first we fabricated an integrated and biomimetic trilayered Silk Fibroin (SF) scaffold containing SF nano fibers in each layer. Then fluid wall shear stress in different areas of the scaffold was predicted in dynamic cell culture condition under the inlet velocity of 0.4 ml/min in a perfusion bioreactor using finite elements and fluid-structure interactions methods. Finally, using the simulation results, osteogenesis and chondrogenesis of rabbit adipose derived stem cells (RADSCs) were analyzed. The results showed that this novel osteochondral graft has a seamlessly integrated layer structure and a high degree of pore interconnectivity. The average size of the pores in the bone layer, middle layer, and cartilage were 76, 152, and 102 microns, respectively. In addition, this biomimetic scaffold presented compressive moduli of 0.4 MPa and uitimate tensile strength of 10 MPa in the wet state. Also, based on the simulation analyses, the shear stress distribution is more uniform if the bone layer is exposed to the fluid inlet path which facilitates bone differentiation. Good adhesion and infiltration of cells were observed after 14 days dynamic culture. The results of expression analysis of differentiated genes in bone and cartilage layer containing RADSc after 21 days of culture under static and dynamic conditions showed that perfusion flow significantly upregulated the expression of bone and cartilage genes in the respective layers and downregulated the hypertrophy gene expression in intermediate layer of scaffold.

**[*]Corresponding Author**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Address** | Department of New Sciences and Technologies (FNST), University of Tehran, Tehran, Iran | | |
| **Postal Code** | 14395-1561 | **Tel** | *+98-21-86093021* |
| **E-Mail** | *bahman.vahidi@ut.ac.ir* | **Fax** | *+98-21-88617087* |

این مقاله در مرحله ویراستاری بوده و نسخه نهایی آن به زودی در سایت مجله قرار داده خواهد شد

ناشر: انجمن مهندسی پزشکی ایران / www.isbme.ir

مجله‌ی مهندسی پزشکی زیستی

شاپای چاپی: ۵۸۶۹-۲۰۰۸ / شاپای الکترونیکی: ۹۶۸۵-۸۰۰۶ / www.ijbme.org

دوره: ۱۶، شماره: ۳، پاییز ۱۴۰۱، ۲۸۹-۲۹۹

# تحلیل اثر تنش برشی بر پاسخ تمایزی سلول های بنیادی مزانشیمی در داربست نانو کامپوزیتی چند لایه برای کاربرد در مهندسی بافت استخوانی-غضروفی با استفاده از روش‌های محاسباتی

**زادگان، سارا [۱] / وحیدی، بهمن [۲*] / نوشین حقیقی پور [۳]**

۱- دکتری مهندسی پزشکی-بیومواد، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- دانشیار، بخش مهندسی پزشکی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- استاد، بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

**مشخصات مقاله**

شناسه‌ی دیجیتال: 10.22041/ijbme.2023.1989428.1828

ثبت در سامانه: ۲۴ بهمن ۱۴۰۱ | بازنگری: ۱۹ اسفند ۱۴۰۱ | پذیرش: ۲۱ اسفند ۱۴۰۱

**واژه‌های کلیدی**

بیوراکتور پرفیوژن
بافت استئوکندرال
داربست چند لایه
دینامیک سیالات محاسباتی
سلول های بنیادی
فیبروین ابریشم

**چکیده**

ترمیم آسیب های بافت استئوکندرال به دلیل پیچیدگی بسیار زیاد این بافت و توانایی محدود در خود ترمیمی بافت غضروف آن را با چالش بزرگی روبرو کرده است. در این راستا مهندسی بافت با ارائه داربستهای حاوی سلول های بنیادی همراه با اعمال تنش های مکانیکی به عنوان راهکار پیشنهادی جدید برای ترمیم این بافت مورد توجه محققان قرار گرفته است. این مطالعه در مرحله نخست شامل ساخت داربست سه لایه فیبروین ابریشم- نانو الیاف فیبروین به روش خشکایش انجمادی و پس از آن شبیه سازی محاسباتی تحریک مکانیکی داربست حاوی سلول های بنیادی در بیوراکتور پرفیوژن به روش اجزای محدود و برهمکنش سیال-سازه جهت طراحی بهینه آزمون های سلولی و در مرحله آخر شامل انجام آزمون های سلولی بود. آزمون های مشخصه یابی نشان داد که این داربست از به‌هم پیوستگی بسیار خوبی در بین لایه ها برخوردار است و اندازه متوسط تخلخل ها در لایه استخوان، لایه میانی و غضروف به ترتیب ۷۶،۱۵۲ و ۱۰۲ میکرون بود. این داربست بیومیمتیک، مدول فشاری ۰/۴ MPa و حداکثر مقاومت کششی ۱۰ MPa را در حالت مرطوب دارد. نتایج شبیه‌سازی حاصل از عبور جریان سیال از داربست نشان داد که چنان‌چه لایه‌ی استخوان در مسیر ورودی جریان قرار گیرد، دامنه توزیع تنش برشی در داربست یکنواخت تر بوده و باعث تسهیل تمایز استخوانی و غضروفی می شود. همچنین نتایج تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که پس از ۱۴روز اعمال تنش مکانیکی، علاوه بر گسترش سلولی موجب نفوذ سلول ها به لایه های پایین تردارست شده است. علاوه بر این اعمال جریان پرفیوژن به‌مدت ۲۱ روز منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های استخوان و غضروف توسط سلول‌های بنیادی بافت چربی خرگوش در لایه استخوان و غضروف داربست در مقایسه با کشت استاتیک شد.

*نویسنده‌ی مسئول

**نشانی** بخش مهندسی پزشکی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده ی علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

**کد پستی** ۱۵۶۱-۱۴۳۹۵ **تلفن** ۸۶۰۹۳۰۲۱-۲۱-۹۸+

**پست الکترونیک** bahman.vahidi@ut.ac.ir **دورنگار** ۸۸۶۱۷۰۸۷-۲۱-۹۸+

این مقاله در مرحله ویراستاری بوده و نسخه نهایی آن به زودی در سایت مجله قرار داده خواهد شد



## ۱- مقدمه

استئوکندرال بافت فصل مشترکی است که در لایه فوقانی آن غضروف مفصلی قرار دارد و به نحو موثّری در برابر فشارها، نیروی کششی و برشی مقاوم بوده و تا حدودی خاصیت انعطاف پذیری و الاستیسیتی دارد و در لایه زیرین این بافت، استخوان ساب کندرال قرار دارد که حفاظت از شکل مفصل و ایجاد اتصال ناقص بین دو استخوان مفصلی را به عهده دارد [۱].

آسیب‌های استئوکندرال یکی از بیماری‌های شایع ارتوپدی است که بافت غضروف مفصلی و استخوان زیرین را تحت تاثیر قرار می‌دهد و به‌دلایلی از جمله تروما، استئوآرتریت و ضربات شدید ناگهانی، روماتوئید ایجاد می شود[۲]. استراتژی‌های متداول برای درمان آسیب‌های این بافت شامل دبریدمان[۱]، تحریک مغز استخوان و تعویض کامل مفصل می‌باشد که به‌دلیل پیچیدگی زیاد این بافت و ظرفیت محدود خود درمانی غضروف منجر به درمان کامل نمی‌شود [۳].

مهندسی بافت یکی از جدیدترین روش‌ها برای درمان آسیب‌های استئوکندرال می‌باشد [۴]. مهم‌ترین رویکرد برای موفقیت در این روش، انتخاب مواد سازنده داربست، طراحی ساختار داربست‌های سه‌بعدی چند لایه و گرادیانی، روش‌های ساخت، سلول‌های مورد استفاده، فاکتورهای رشد و تنش‌های مکانیکی اعمالی تحت شرایط کنترل شده می‌باشد که بتواند به‌خوبی ساختار طبیعی فیزیولوژیکی و محیط این بافت را تقلید کند [۵].

فیبروین ابریشم یکی از بیوپلیمرهای طبیعی است که به‌دلیل دارا بودن خواصی از جمله زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری قابل کنترل و داشتن خواص مکانیکی برجسته به‌طور روز افزون در مهندسی بافت استخوان و غضروف مورد توجه واقع شده است [۶, ۷]. اگر چه انتخاب داربست و بیومتریال از اهمیت ویژه‌ای در مهندسی بافت استئوکندرال برخوردار است؛ اما حضور فاکتورهای رشد درکنار سلول‌های بنیادی نقش به‌سزایی در بازسازی این بافت خواهد داشت؛ به‌گونه‌ای که تعامل مناسب داربست با بافت احاطه کننده میزبان را فراهم کرده و منجر به ترمیم خوب آسیب بافتی خواهد شد [۸].

یکی دیگر از مولفه های موثر بر تکثیر و تمایز سلول-های بنیادی با هدف ترمیم آسیب‌های استئوکندرال، تحریک-های مکانیکی می باشد [۹]. در مطالعات صورت گرفته نشان داده شده است که تحریک‌های مکانیکی می‌تواند از طریق اعمال تغییر شکل در ساختار پمپ‌ها و کانال‌های یونی، تاثیر فیزیکی بر اینتگرین‌های سطح سلولی و ایجاد تغییرات اسکلت سلولی، تاثیر بر هسته و ایجاد تغییر در منافذ روی آن و متاثر کردن فرایند رونویسی DNA، رفتار سلولی را تحت تاثیر قرار دهد [۹ و۱۰]. نتایج مطالعات نشان داده است که جریان پرفیوژن در شرایط برون‌تنی، هم برای مهندسی بافت استخوان و هم غضروف مناسب می‌باشد. کاشت کندروسیت‌ها تحت جریان مستقیم پرفیوژن و در تنش برشی کم باعث گسترش سلول‌ها شده و تجمع مارکرهای غضروفی را در پی دارد و به حفظ فنوتیپ کندروسیتی کمک می‌کند [۱۱].

از نوآوری‌های این تحقیق می‌توان به ساخت داربست چند لایه فیبروین ابریشم بدون استفاده از چسب در لایه های مختلف، ساخت بیوراکتور پرفیوژن برای اعمال تنش برشی سیال و همچنین شبیه سازی داربست و شرایط حاکم بر بیوراکتور برای بررسی اثر تنش برشی ناشی از جریان سیال بر سرنوشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در راستای ترمیم بافت استئوکندرال اشاره کرد.

## ۲- مواد و روش‌ها

برای تهیه نانو الیاف فیبروین ابریشم و ساخت داربست چند لایه، ابتدا پیله‌های کرم ابریشم به قطعات کوچکتری تبدیل شد. سپس برای حذف ماده صمغ مانند سریسین از فیبروین، پیله‌های کرم ابریشم در دمای $^{o}C$ ۱۰۰ و به‌مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۰/۵ درصد مولار از سدیم کربنات قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، رشته‌های ابریشم صمغ‌زدایی شده در محلول ۹/۳ مولار لیتیم برماید حل شد و در نهایت محلول فیبروین ابریشم توسط غشای دیالیز (۱۲۰۰۰ دالتون) در برابر آب دیونیزه دیالیز شد [۴]. در مرحله بعد، محلول الکتروریسی با غلظت ۱۳ درصد از حل کردن فیبروین اسفنجی در اسید فرمیک حاصل شد و پس از انتقال به سرنگ cc ۱ با اعمال ولتاژ ۲۰ کیلو ولت، نرخ ۰/۲۵ میلی لیتر بر ساعت، قطر سرنگ با گیج ۲۱ و رعایت فاصله ۱۳ سانتیمتری سر سوزن از فویل آلومینیوم، الکتروریسی انجام شد [۱۲].

برای ساخت داربست، در ابتدا لایه مربوط به بافت استخوان با غلظت ۵ درصد تهیه و پس از اضافه کردن نانو الیاف قیبرون ابریشم-۳ درصد هیدروکسی آپاتیت (SF-3%Hap) فریز درای شد. پس از اتوکلاو کردن، داربست‌های

---

[۱] debridement

این مقاله در مرحله ویراستاری بوده و نسخه نهایی آن به زودی در سایت مجله قرار داده خواهد شد



حاصل سپس درون قالب قرار گرفتند و این بار محلول فیبرویین لایه دوم با غلظت ۱۲ درصد همراه با نانو الیاف SF-1%HAp ریخته شد. پس از فریزدرای کردن مجدد داربست این بار محلول فیبرویین با غلظت ۹ درصد همراه با نانو الیاف SF آماده شد و بر روی داربست‌های دو لایه ریخته شد و برای بار سوم داربست های حاصل فریز درای شد و برای بررسی سطح مقطع، برش عرضی از آن تهیه شد. پس از ساخت داربست سه لایه فیبرویین-نانو الیاف فیبرویین، بیوراکتور پرفیوژن طراحی و ساخته شد. بیوراکتور پرفیوژن شامل یک پمپ پریستالتیک، کارتریج پرفیوژن، شیلنگ‌های رابط و ظرف نگهداری محیط کشت است.

پس از این مرحله، یک مدل مکانیکی برای بررسی رفتار مدولاسیون مکانیکی سلول بنیادی مزانشیمی درون داربست تحت تاثیر تنش اعمالی از جریان سیال با استفاده از روش برهم‌کنش سیال- جامد توسعه داده شد. در این مدل، داربست به شکل دیسکی با حفرات دایره‌ای و تغییرات تخلخل گرادیانی در نظر گرفته شد. در مدل محاسباتی، رفتار این پلیمر طبیعی به‌صورت الاستیک خطی با مدول الاستیک ۰/۴ مگاپاسکال و ضریب پواسون ۰/۳ در نظر گرفته شد (شکل ۱). سیال در این پژوهش، محیط کشت DMEM در نظرگرفته شده است. این سیال نیوتنی با لزجت ۱/۴۵ میلی پاسکال بر ثانیه و چگالی ۱۰۰۰ کیلو گرم بر متر مکعب فرض شد و از معادلات پیوستگی و تراکم ناپذیر ناویر- استوکس به‌عنوان معادلات حاکم بر سیال بهره گرفته شد. شرایط مرزی خروجی در بخش انتهایی داربست و محل خروج سیال، فشار صفر در نظر گرفته شد و برای بررسی برهمکنش میان سیال و داربست از نرم افزار کامسول 5.2 استفاده شد. فرمول‌های مورد استفاده برای حل دامنه‌ی سیال در این مسأله مطابق معادلات حاکم برای یک سیال نیوتونی در رژیم جریان لایه‌ای پایا می باشد که در فرمول عمومی ناویر- استوکس عبارات وابسته به زمان در آن حذف شده است (رابطه ۱). از سوی دیگر شرط دیگری که باید در حل مسأله‌ی جریان پایا برقرار باشد، شرط پیوستگی جریان است که برای این منظور بایستی فرمول شماره‌ی (۲) ارضا شود. همچنین علائم ضخیم در این فرمول‌ها بیانگر ماهیت ماتریسی آن عبارات می‌باشند. همانطور که در رابطه ۱ مشخص است از ماتریس واحد برای هم مرتبه نمودن ماتریس‌ها در برخی عبارات استفاده شده است.

نرم افزار کامسول با حل عددی و خانه به خانه این دو رابطه، اقدام به یافتن پاسخ مجهولات دامنه‌ی سیال (میدان سرعت سیال و همچنین فشار هیدرودینامیک و نرخ کرنش برشی در نقاط مختلف) نمود. در این روابط $\boldsymbol{u}_{fluid}$ سرعت سیال، $\boldsymbol{p}$ فشار سیال، $\boldsymbol{\rho}$ چگالی سیال و $\boldsymbol{\mu}$ لزجت دینامیکی سیال می-باشد [13]:

$$\rho(\boldsymbol{u}_{fluid}\cdot\nabla)\boldsymbol{u}_{fluid} = \nabla\cdot\left[-p\boldsymbol{I} + \mu\left(\nabla\boldsymbol{u}_{fluid} + (\nabla\boldsymbol{u}_{fluid})^T\right) - \frac{2}{3}\mu(\nabla\cdot\boldsymbol{u}_{fluid})\boldsymbol{I}\right] + \boldsymbol{F} \qquad (۱)$$

$$\nabla\cdot(\rho\boldsymbol{u}_{fluid}) = 0 \qquad (۲)$$

در مدل اجزای محدود، شبکه‌ی محاسباتی برای گسسته‌سازی مکانی مسأله تعریف شد. در این پژوهش، در لایه‌ی مرزی سیال با سطوح داربست از المان‌های چهارضلعی برای خانه بندی استفاده شد. برای دیگر قسمت‌های دامنه‌ی سیال از المان‌های مثلثی استفاده شد که بهترین گزینه برای استفاده در هندسه‌های نامتقارن می‌باشند. برای بررسی استقلال حل از شبکه محاسباتی، ریزتر کردن شبکه تا رسیدن اختلاف پاسخ‌های تنش برشی دیواره به کمتر از ۱ درصد مد نظر قرار گرفت. در نهایت، تعداد کل آلمان های دامنه ۲۰۷۲۸۲ می‌باشد.

*شکل ۱. نمای کلی بیوراکتور و داربست قرار گرفته در آن*

پس از تحلیل نتایج شبیه‌سازی، برای انجام آزمون‌های زیستی در ابتدا سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی خرگوش (RASCs) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. برای بررسی تاثیر کشت دینامیک بر چسبندگی و نفوذ سلول‌های بنیادی به لایه‌های داربست، نمونه‌ها و اجزای بیوراکتور با استفاده از اتوکلاو در دمای $^{o}$C ۱۲۱ و فشار ۱/۲ اتمسفر به‌مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. پس از بذر پاشی سلول‌ها بر روی داربست‌ها، نمونه‌ها به‌مدت دو هفته تحت کشت استاتیک و دینامیک قرار گرفتند. سپس محیط کشت از روی نمونه‌ها خارج شد و به مدت ۳۰ ثانیه با PBS شستشو داده شد و پس از آن، از پارافرمالدئید برای تثبیت سلول‌ها استفاده شد و چسبندگی سلول بر روی نمونه‌ها توسط میکروسکوب الکترونی روبشی بررسی گردید. به‌منظور بررسی

این مقاله در مرحله ویراستاری بوده و نسخه نهایی آن به زودی در سایت مجله قرار داده خواهد شد



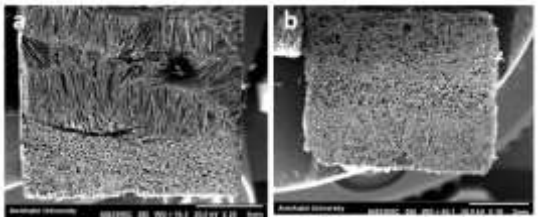
تاثیر محیط کشت پرفیوژن بر تمایز سلول های RASCs در لایه‌های مختلف داربست، نمونه‌ها در دو گروه کشت استاتیک و دینامیک در انکوباتور نگهداری شدند و محیط کشت مورد استفاده حاوی فاکتورهای شیمیایی تمایز استخوانی و غضروفی بود. سپس لایه‌های داربست از هم جدا شدند و بیان ژن‌های تمایزی غضروف و استخوان در لایه‌های مربوطه بررسی شد.

تمام آزمایش ها حداقل سه بار انجام شده و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده است. تفاوت‌های آماری با استفاده از تحلیل یک طرفه واریانس (ANOVA) بررسی شد. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری برای همه آزمایش‌ها معنادار در نظر گرفته شد.

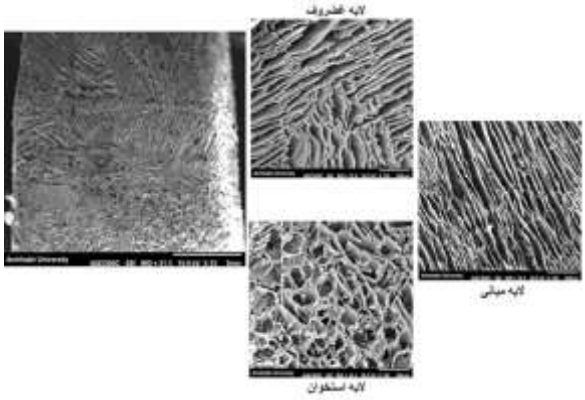
## ۳- نتایج و بحث

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح مقطع داربست های فیبرویین ابریشم ساخته شده در یک و سه مرحله در شکل ۲ نشان داده شده است. همچنین، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح مقطع داربست فیبرویین ابریشم در شکل ۳ نشان داد که هیچ شکافی در فصل مشترک بین لایه‌ها مشاهده نشد و سطح مقطع داربست کاملا به‌هم پیوسته و یکپارچه با جهت‌گیری و مورفولوژی مختلف تخلخل‌ها در لایه‌های مختلف بود.

همچنین توزیع تخلخل، میانگین اندازه و درصد تخلخل در لایه‌های مختلف داربست با استفاده از نرم افزار Image J محاسبه شد که در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که تخلخل‌های لایه استخوانی دارای مورفولوژی گرد بوده و دامنه توزیع تخلخل‌ها در محدوده‌ی صفر تا ۲۵۰ میکرون بود.




*شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست های چند لایه فیبرویین ابریشم ساخته شده به روش خشکایش انجمادی: a. خشکایش انجمادی در یک مرحله، b. خشکایش انجمادی در سه مرحله.*




*شکل۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌های چند لایه فیبرویین ابریشم ساخته شده به‌روش خشکایش انجمادی.*

بسیاری از مطالعات درون تنی و برون تنی در داربست-های پلیمری نشان داده است که داربست‌های مناسب برای استخوان‌زایی دارای حداقل اندازه تخلخل به‌میزان ۱۰۰ تا ۱۳۵ میکرون می باشند [۱۴].

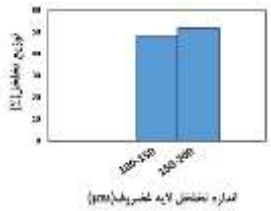
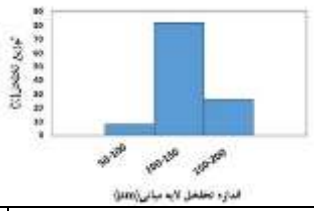
از آن‌جایی که فیبرویین ابریشم به‌تنهایی دارای خاصیت استخوان‌زایی نیست؛ لذا برای تسهیل در تمایز سلول‌های بنیادی از نانو الیاف SF-3%HAp در این لایه استفاده شد که به‌طور موثّر در ترمیم بافت استخوان مورد استفاده قرار گیرد. در لایه‌ی میانی و لایه‌ی غضروف، تخلخل‌ها دارای مورفولوژی جهت‌دار و کشیده بودند که مشابه با ساختار طبیعی غضروف می‌باشد. اندازه متوسط تخلخل‌ها در لایه‌ی میانی نسبت به دو لایه‌ی دیگر کوچکتر و دامنه‌ی توزیع اندازه تخلخل‌ها نیز باریک‌تر بود. نکته‌ی قابل توجه آن بود که از نانو الیاف SF-1%HAp در لایه‌ی میانی و از نانو الیاف SF در لایه غضروف استفاده شد تا این لایه‌ها نیز علاوه بر شکل و اندازه تخلخل‌ها به‌لحاظ ترکیب و ریخت‌شناسی به بافت طبیعی نزدیک‌تر باشند. جزئیات نتایج مربوط به مورفولوژی، توزیع اندازه قطری، خواص مکانیکی و زیست تحزیب پذیری نانوفایبرها در مطالعه پیشین [۱۵] ارائه شده است. این نتایج نشان داد که غلظت محلول فیبرویین ابریشم برای شکل‌دهی داربست در لایه‌های مختلف مناسب بود و منجر به تشکیل ساختار متخلخل به‌هم پیوسته و اندازه مناسب برای هر لایه از این بافت شد. اندازه تخلخل‌ها در این روش به دمای پیش از انجماد و یکنواختی و به‌هم پیوستگی آن‌ها به کنترل کردن سرعت انجماد بستگی دارد [۱۶]. نتایج نشان داد که اولین

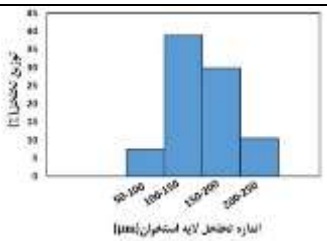
این مقاله در مرحله ویراستاری بوده و نسخه نهایی آن به زودی در سایت مجله قرار داده خواهد شد



لایه‌ای که با این روش ساخته شد، اغلب دارای تخلخل‌های گرد و به‌هم پیوسته و در لایه‌های بعدی شکل آن‌ها جهت‌دار بود که می‌توان علت آن را به ایجاد گرادیان دمایی در حین جدایش فازی در فرایند انجماد ربط داد که منجر به رشد کریستال‌های هگزاگونال یخ در جهت این گرادیان می‌شود [۱۷]. نتایج تحقیقات نشان داده است که داربست‌های مهندسی بافت با تخلخل‌های جهت‌دار دارای خواص بیومکانیکی فوق‌العاده خوبی بوده و سلول‌ها را از فشار اولیه بحرانی پیش از ترشح مقدار فراوان از ماتریس خارج سلولی محافظت می‌کند و آن‌ها را به‌عنوان قالب مناسبی برای گسترش و تمایز سلول‌های کندروسیت معرفی می‌کند. ضمن آن‌که مدول فشاری این نوع داربست‌ها نسبت به داربست‌های با تخلخل‌های تصادفی بیشتر است [۱۸]. لذا در ساخت این داربست چند لایه، ابتدا داربست استخوانی با تخلخل‌های گرد شکل داده شد و سپس لایه‌ی میانی و لایه‌ی غضروف ساخته شد.

*جدول ۱. اندازه، توزیع و درصد تخلخل‌ها در لایه‌های مختلف داربست.*

| میانگین قطر حفرات (µm) | توزیع تخلخل (µm) | درصد تخلخل (٪) |
|---|---|---|
| ۱۰۲,۶۹ ±۱۲,۴۸ |  | ۷۸,۳۴±۳,۳۴ |
| ۷۶,۳۳ ± ۱۰,۲۲ |  | ۶۸,۳۷ ± ۶,۴۷ |
| ۱۵۲,۰۶ ± ۲۴,۰۲ | | ۸۰,۳۸± ۳,۴۷ |



در این پژوهش داربست به صورت یک داربست گرادیانی شبیه سازی شد که درآن اندازه تخلخل ها از لایه استخوان به لایه غضروف کاهش یافت. قرار گیری داربست درون بیوراکتور پرفیوژن در دو حالت بررسی شد. در حالت اول، جریان سیال از قسمت بافت استخوان وارد شد (حالت الف) و از لایه غضروف خارج شد و در حالت دوم این جریان از قسمت غضروف وارد شد و از لایه استخوان خارج شد (حالت ب) و سرعت ورودی سیال برای هر دو حالت مقدار ثابت ۰/۴ میلی لیتر بر دقیقه در نظر گرفته شد و تحلیل دینامیک سیالات محاسباتی برای هر دو حالت بررسی شد.

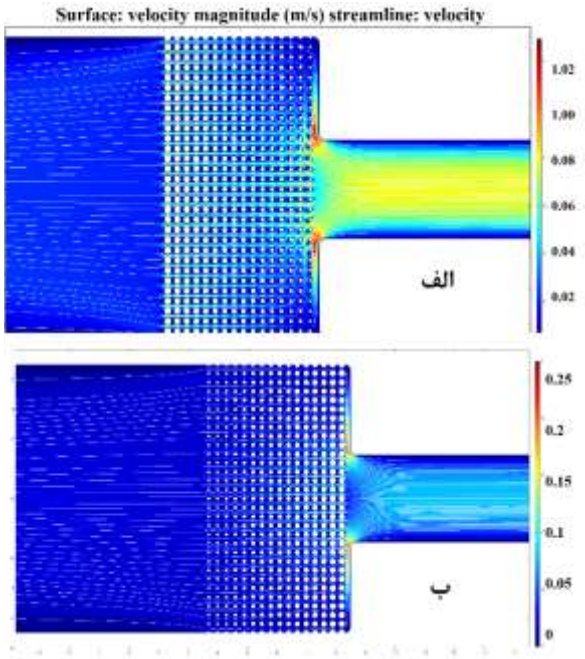
نتایج مربوط به شبیه‌سازی در شکل ۴ نشان داد که سرعت جریان در لایه‌ی ورودی که اندازه‌ی تخلخل‌ها بزرگ‌تر می‌باشد، بیشینه است و هرچه از مرکز به‌سمت دیواره‌ی داربست نزدیک می‌شویم (نواحی مرزی)، سرعت سیال به صفر نزدیک می‌شود که باعث ایجاد شرایط استاتیک می‌شود که مطلوب نخواهد بود اما هر چه از سطح به عمق نزدیک می-شویم، جریان سیال سطح مقطع بیشتری از داربست را پوشش می دهد که آن را به انحراف مسیر سیال می‌توان ربط داد.

همچنین، در لایه‌ی میانی و لایه‌ی غضروف به‌دلیل کاهش اندازه‌ی تخلخل‌ها، سرعت سیال نسبت به لایه‌ی استخوان کاهش می‌یابد که به‌دلیل ممانعت بیشتر لایه‌های پایینی داربست نسبت به عبور سیال می باشد. از سوی دیگر، می‌توان مشاهده کرد که کمترین اختلاف بین سرعت ورودی و بیشینه‌ی سرعت درون داربست وجود دارد. تحلیل دینامیک سیالات محاسباتی نشان می دهد که افزایش اندازه تخلخل داربست باعث عبور راحت سیال از داخل آن می شود و در نتیجه سلول‌هایی که در این قسمت از داربست کشت شده اند، سرعت‌های قابل پیش بینی‌تری با توجه به سرعت ورودی

این مقاله در مرحله ویراستاری بوده و نسخه نهایی آن به زودی در سایت مجله قرار داده خواهد شد



تجربه می کنند. این نکته نیز باید مد نظر قرار گیرد که وجود سیال با سرعت صفر در ناحیه مماس با دیواره بیوراکتور مناسب نیست. زیرا شرایط کشت استاتیک را در آن ناحیه ایجاد کرده و باعث سیگنال‌دهی غیر یکنواخت به سلول‌ها می‌شود. در حالتی که داربست به گونه‌ای در بیوراکتور قرار گیرد که سیال از لایه‌ی غضروف وارد داربست شود، بیشینه‌ی سرعت در داربست در لایه‌ی غضروف مشاهده می‌شود و هرچه به لایه‌های پایین‌تر نزدیک می‌شویم، این سرعت کاهش می‌یابد؛ به‌گونه‌ای که در لایه‌ی استخوان، میزان سرعت سیال به صفر میل می‌کند. در این حالت نیز همانند حالت الف، هرچه از قسمت مرکزی داربست به دیواره‌ی بیوراکتور نزدیک می‌شویم، خطوط عبور جریان بسیار کمتر می‌شود که مطلوب نخواهد بود.




*شکل۴. سرعت سیال در حالت الف و ب.*

عبور جریان سیال با نرخ یکسان از لایه‌ی استخوان و غضروف داربست، تنش‌های برشی متفاوتی را بر سلول‌های کشت شده داخل لایه‌های مختلف داربست اعمال می‌نماید که می‌توان آن را به داشتن اندازه‌ی تخلخل متفاوت در این لایه‌ها ربط داد. با توجه به شکل ۵، دامنه‌ی توزیع نرخ کرنش برشی در حالت الف وسیع بوده و این نشان از سیگنال‌دهی بسیار متفاوت و غیر یکنواخت بخش‌های مختلف داربست می‌باشد. نکته‌ی قابل توجه دیگر آن است که هر چه از سطح ورودی سیال دور می‌شویم، میزان نرخ کرنش برشی افزایش می‌یابد و سطح مقطع بزرگتری از داربست در لایه‌ی غضروف را دربرمی‌گیرد. بازه نرخ کرنش برشی در این داربست در محدوده ۰/۷۵تا ۱/۵ بر ثانیه و دامنه تنش برشی ۱/۴۵تا ۲/۱۷۵ مگاپاسکال تخمین زده می‌شود. در حالت ب از شکل ۵، دامنه توزیع نرخ کرنش برشی در داربست بسیار وسیع‌تر از حالت الف می‌باشد؛ به‌طوری‌که میزان نرخ کرنش برشی در لایه‌ی غضروف در محدوده ۱/۲۵تا ۱/۷۵ بر ثانیه تغییر می‌کند. در صورتی‌که این مقدار در لایه‌ی میانی و لایه‌ی استخوان در محدوده‌ی ۰/۲۵تا ۰/۷۵ می باشد و هر چه به لایه‌ی استخوان نزدیک‌تر می‌شویم، میزان آن کم‌تر می‌شود. پیش‌بینی می‌شود که در این حالت، چنان‌چه لایه‌ی غضروف در مسیر جریان ورودی قرار گیرد، سلول‌ها تنش‌های بسیار متفاوتی را در مواضع مختلف احساس خواهند کرد. دامنه‌ی تنش برشی در این حالت در بازه‌ی ۰/۳۶۳ تا ۲/۵۴ پاسکال تغییر می‌کند که بیشینه‌ی آن در لایه‌ی غضروف و کم‌ترین مقدار در لایه‌ی استخوان مشاهده می‌شود. اگرچه پارامترهای موثّر بر مدولاسیون سلول بنیادی بسیار زیاد و غالباً دارای طبیعت پیچیده می‌باشد و سازوکارهای عملکردی اغلب آن‌ها به‌طور کامل شناسایی نشده است، ولی منطقی به‌نظر می‌رسد که بتوان عوامل شناسایی شده را تا حدی کنترل نمود. در داربست‌های بافت استئوکندرال، گرادیان تخلخل موجب می‌شود که ناحیه‌ای با گرادیان تنش برشی ایجاد شود که نتیجه‌ی آن اعمال تحریک‌های مکانیکی متفاوت خواهد بود. نتایج به‌دست آمده در این شبیه‌سازی نشان داد که با توجه به حداقل مقدار ذکر شده برای تحریک مکانیکی موثر سلول از جانب سیال که حدود ۱ پاسکال گزارش شده است، قرارگیری داربست در حالت الف مطابقت بسیار خوبی دارد [۱۹]. بررسی‌های پیشین نشان می‌دهد که سلول‌های استخوانی در شرایط آزمایشگاهی به تنش برشی در بازه ۰/۵ تا ۱/۵ پاسکال پاسخ می‌دهند که منجر به تولید آلکالین فسفات می شود [۹].

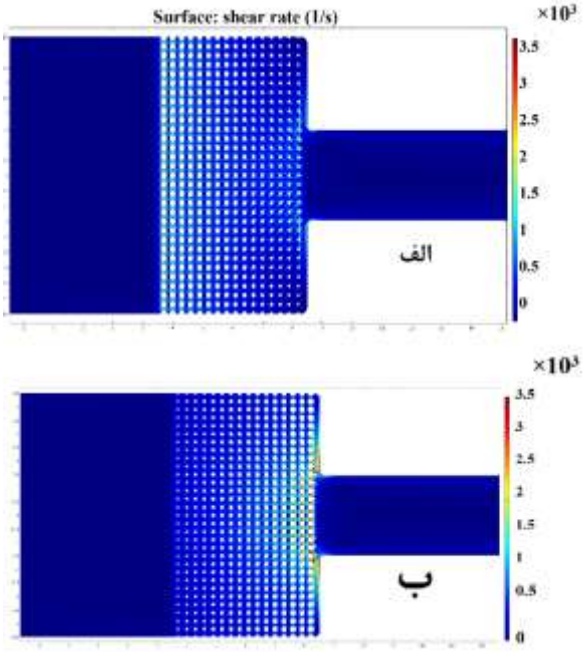
مورفولوژی، چسبندگی و توزیع سلول‌های بنیادی

پس از ۱۴ روز کشت استاتیک و دینامیک بر روی لایه‌های مختلف داربست در شکل ۶ نشان داده شده است. همان‌گونه که در تصاویر مشاهده می‌شود، سلول‌های بنیادی در هر دو

این مقاله در مرحله ویراستاری بوده و نسخه نهایی آن به زودی در سایت مجله قرار داده خواهد شد



گروه کشت استاتیک و دینامیک توسط ایجاد پاهای کاذب روی سطح تخلخل‌ها چسبیده‌اند. این چسبندگی نشان‌دهنده‌ی آن است که داربست فیبروبین ابریشم/نانوالیاف فیبروبین شرایط مناسبی را برای مهاجرت، چسبندگی و پهن‌شدگی سلول‌ها فراهم نموده است. علاوه بر آن، مشخص است که در

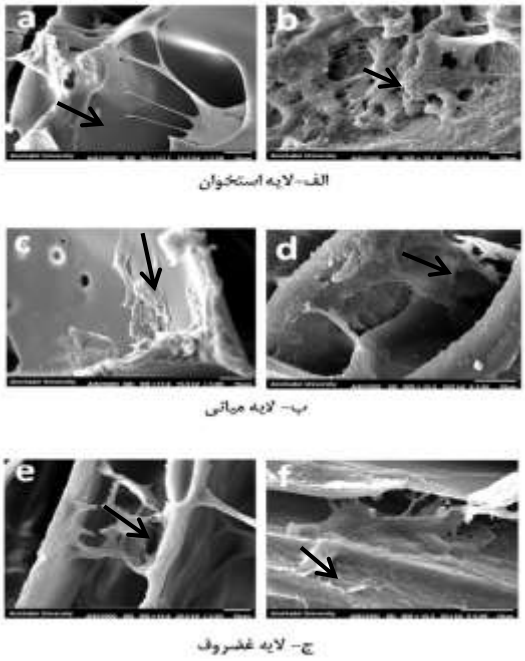



*شکل۵. توزیع نرخ کرنش برشی در لایه‌های مختلف داربست.*

نمونه‌هایی که در معرض کشت دینامیک قرار گرفته‌اند، تجمع سلولی بسیار بیشتر از نمونه‌های کشت استاتیک می‌باشد. همچنین اعمال جریان پرفیوژن نه تنها باعث تکثیر و گسترش سلولی شده است؛ بلکه به‌طور قابل توجّهی باعث نفوذ سلول‌ها به لایه‌ی میانی شده است.

نتایج حاصل از بیان ژن‌های تمایزی غضروف حاصل از سلول‌های بنیادی بافت چربی خرگوش در لایه‌ی غضروف بافت استئوکندرال پس از ۲۱ روز در شرایط کشت استاتیک و دینامیک توسط آزمون Real- Time در شکل ۷ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های تمایزی غضروف یعنی SOX-9، اگریکان وکلاژن نوع ۱ و ۲ در لایه‌ی غضروف این بافت در شرایط کشت دینامیک نسبت به کشت استاتیک تنظیم مثبت شده است که نشان دهنده‌ی پتانسیل تمایزی بهتر در جریان پرفیوژن نسبت به کشت استاتیک می‌باشد [۱۱و ۲۰]. نتایج Real- Time افزایش مقادیر ماتریس خارج سلولی را در شرایط کشت دینامیک نسبت به استاتیک تایید می‌کند که نتایج این بررسی با مطالعات گذشته بر روی بافت غضروف همخوانی دارد [۱۰و۲۱].

نتایج بررسی‌های پیشین نشان داده است که جریان سیال از طریق ممانعت کشش در اکتین سایتواسکلتون باعث افزایش بیان ژن SOX-9 می‌شود و به‌طور کلی اسکلت سلولی اکتین دست نخورده و پویا برای تمایز غضروفی ناشی از جریان سیال ضروری است [۲۲ و ۲۳]. همچنین، افزایش بیان ژن حاصل از تنظیم مثبت بیان ژن SOX-9 است. نکته‌ی قابل توجه آن است که اعمال جریان پرفیوژن بر سازه‌ی استئوکندرال نه تنها باعث بهبود بیان ژن‌های غضروفی شده، بلکه باعث افزایش بیان ژن استخوانی کلاژن نوع یک در این لایه شده است. نتایج تحقیقات گذشته نیز نشان داده است که اعمال جریان مستقیم پرفیوژن بر داربست‌های غضروفی علاوه بر افزایش بیان مارکرهای غضروفی، تنظیم مثبت بیان ژن استخوانی را نیز در پی‌دارد [۲۴] که به احتمال زیاد می‌توان این موضوع را به ترشح ماتریس خارج سلولی غنی از هیالورونیک و کلاژن نوع یک توسط سلول‌های پیش ساز غضروفی پیش از مرحله‌ی متراکم شدن در طی روند



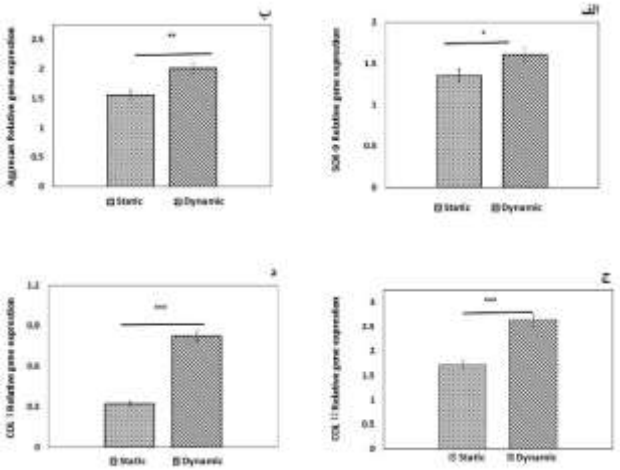

*شکل۶. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از چسبندگی سلول‌های RASCs بر روی نمونه‌های استاتیک و دینامیک پس از ۱۴ روز در بزرگنمایی x1700(الف- لایه استخوان، ب-لایه میانی، ج-لایه غضروف؛ a، c،e : کشت استاتیک b، d، f:کشت دینامیک). جهت تشخیص سلول از داربست، سلول‌ها با فلش روی تصاویر مشخص شده‌اند.*

این مقاله در مرحله ویراستاری بوده و نسخه نهایی آن به زودی در سایت مجله قرار داده خواهد شد



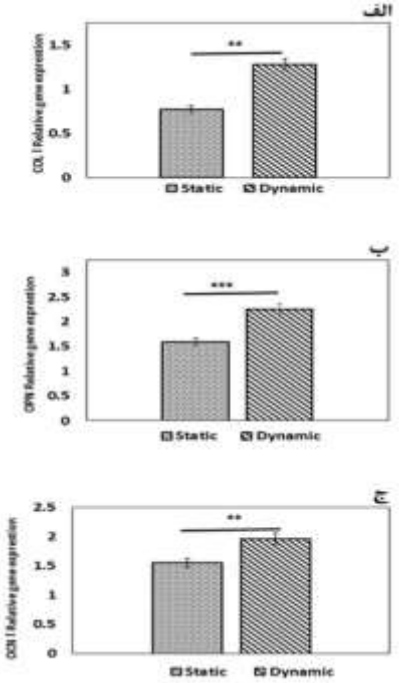
تمایز غضروفی ربط داد [۲۵]. نتایج حاصل از بیان ژن‌های تمایزی استخوانی توسط سلول‌های بنیادی بافت چربی خرگوش در لایه‌ی استخوان بافت استئوکندرال پس از ۲۱ روز از قرارگیری داربست‌ها در شرایط کشت استاتیک و دینامیک توسط آزمون Real-Time مورد بررسی قرار گرفت و در شکل ۸ نمایش داده شد. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های استخوان یعنی کلاژن نوع یک، استئوپونتین و استئوکلسین در لایه استخوان این بافت در شرایط کشت دینامیک نسبت به کشت استاتیک تنظیم مثبت شده است که نشان دهنده‌ی پتانسیل تمایزی بهتر در جریان پرفیوژن نسبت به کشت استاتیک بود.

نتایج تحقیقات گذشته [۲۰] نشان داده است که دو مسیر سیگنال‌دهی غیر کانونیکال *Wnt5a* و بتا-کاتنین برای تمایز استخوانی القاء شده توسط جریان سیال ضروری می‌باشند. مسیر سیگنال‌دهی بتا-کاتنین ممکن است به‌طور جزئی توسط مسیر سیگنال کادهرین-کاتنین تنظیم شود.



*شکل۷. بیان ژن های غضروفی الف) SOX-9 ، ب) اگریکان، ج) کلاژن نوع دو و د)کلاژن نوع یک در لایه غضروف پس از ۲۱روز کشت استاتیک و دینامیک (* به معنای $p < ۰,۰۵$ ، ** به معنای $p < ۰,۰۱$ و *** به معنای $p < ۰,۰۰۱$ است).*

کادهرین‌ها مولکول‌های چسبندگی هستند که در تماس دو سلول به یکدیگر درگیر می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که جریان سیال باعث کاهش معنی‌دار در به‌هم پیوستگی کادهرین-کاتنین می‌شود که افزایش بتا-کاتنین را در سیتوپلاسم سلول به‌همراه خواهد داشت [۲۶].




شکل۸. بیان ژن های استخوانی الف) کلاژن نوع یک، ب) استئوپونتین و ج) استئونکتین در لایه استخوان پس از ۲۱روز کشت استاتیک و دینامیک (** به معنای $p < ۰,۰۱$ و *** به معنای $p < ۰,۰۰۱$ است).

## ۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش داربست کامپوزیتی نانوالیاف فیبروئین/ فیبروئین ابریشم با موفقیت به روش خشکایش انجمادی سنتز شد که به‌دلیل داشتن ریزساختار بیومیمتیک و به‌هم پیوسته همراه با خواص مکانیکی مناسب به‌عنوان بستری مناسب برای بازسازی آسیب بافت استئوکندرال معرفی شد. همچنین، با کمک مدل‌سازی دینامیک سیالات محاسباتی، داربست مورد نظر و شرایط حاکم بر بیوراکتور شبیه سازی شد تا بدون انجام آزمون های سعی و خطا در آزمایشگاه، اثر جریان سیال بر سرنوشت سلول های بنیادی مزانشیمی در جهت بافت استئوکندرال با توجه به موقعیت قرارگیری داربست در بیوراکتور مورد بررسی قرار گیرد. یافته‌ها نشان داد که سیستم پرفیوژن طراحی‌شده بسته به هندسه داربست و جهت جریان سیال ورودی نسبت به گرادیان تخلخل در کنار فاکتورهای شیمیایی می‌تواند شرایط مطلوبی را برای تمایز استخوانی وغضروفی سلول‌های بنیادی فراهم کند.

## ۵- مراجع

[1] H. Upmeier, B. Brüggenjürgen, A. Weiler, C. Flamme, H. Laprell, and S. Willich, "Follow-up

این مقاله در مرحله ویراستاری بوده و نسخه نهایی آن به زودی در سایت مجله قرار داده خواهد شد



Journal of Biomedical Materials Research Part A, vol. 96, pp. 21-28, 2011.

[12] S. Zadegan, B. Vahidi, J. Nourmohammadi, and N. Haghighipour, "Biocompatibility and bioactivity behaviour of coelectrospun silk fibroin-hydroxyapatite nanofibres using formic acid," Micro & Nano Letters, vol. 13, pp. 709-713, 2018.

[13] F. Klocke, M. Zeis, and L. Heidemanns, "Fluid structure interaction of thin graphite electrodes during flushing movements in sinking electrical discharge machining," CIRP Journal of Manufacturing Science and Technology, vol. 20, pp. 23-28, 2018.

[14] C. M. Murphy, M. G. Haugh, and F. J. O'brien, "The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering," Biomaterials, vol. 31, pp. 461-466, 2010.

[15] S. Zadegan, J. Nourmohammadi, B. Vahidi, and N. Haghighipour, "An investigation into osteogenic differentiation effects of silk fibroin-nettle (Urtica dioica L.) nanofibers," International journal of biological macromolecules, 133, 795-803, 2019.

[16] M. G. Haugh, C. M. Murphy, and F. J. O'Brien, "Novel freeze-drying methods to produce a range of collagen–glycosaminoglycan scaffolds with tailored mean pore sizes," Tissue Engineering Part C: Methods, vol. 16, pp. 887-894, 2010.

[17] H. Zhang, I. Hussain, M. Brust, M. F. Butler, S. P. Rannard, and A. I. Cooper, "Aligned two- and three-dimensional structures by directional freezing of polymers and nanoparticles," Nature materials, vol. 4, pp. 787-793, 2005.

[18] X. Zheng, F. Yang, S. Wang, S. Lu, W. Zhang, S. Liu, et al., "Fabrication and cell affinity of biomimetic structured PLGA/articular cartilage ECM composite scaffold," Journal of Materials Science: Materials in Medicine, vol. 22, pp. 693-704, 2011.

[19] H. Huang, R. D. Kamm, and R. T. Lee, "Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology," American Journal of Physiology-Cell Physiology, vol. 287, pp. C1-C11, 2004.

[20] E. J. Arnsdorf, P. Tummala, and C. R. Jacobs, "Non-canonical Wnt signaling and N-cadherin related β-catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate," PloS one, vol. 4, p. e5388, 2009.

[21] S. Nagel-Heyer, C. Goepfert, F. Feyerabend, J. P. Petersen, P. Adamietz, N. M. Meenen, et al., "Bioreactor cultivation of three-dimensional costs up to 5 years after conventional treatments in patients with cartilage lesions of the knee," Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, vol. 15, pp. 249-257, 2007.

[2] P. J. Yang and J. S. Temenoff, "Engineering orthopedic tissue interfaces," Tissue Engineering Part B: Reviews, vol. 15, pp. 127-141, 2009.

[3] I. Martin, S. Miot, A. Barbero, M. Jakob, and D. Wendt, "Osteochondral tissue engineering," Journal of biomechanics, vol. 40, pp. 750-765, 2007.

[4] P. Gupta, M. Adhikary, M. Kumar, N. Bhardwaj, and B. B. Mandal, "Biomimetic, osteoconductive non-mulberry silk fiber reinforced tricomposite scaffolds for bone tissue engineering," ACS applied materials & interfaces, vol. 8, pp. 30797-30810, 2016.

[5] Q. Wang, Y. Chu, J. He, W. Shao, Y. Zhou, K. Qi, et al., "A graded graphene oxide-hydroxyapatite/silk fibroin biomimetic scaffold for bone tissue engineering," Materials Science and Engineering: C, vol. 80, pp. 232-242, 2017.

[6] J. Nourmohammadi, F. Roshanfar, M. Farokhi, and M. H. Nazarpak, "Silk fibroin/kappa-carrageenan composite scaffolds with enhanced biomimetic mineralization for bone regeneration applications," Materials Science and Engineering: C, vol. 76, pp. 951-958, 2017.

[7] J. Melke, S. Midha, S. Ghosh, K. Ito, and S. Hofmann, "Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering," Acta biomaterialia, vol. 31, pp. 1-16, 2016.

[8] W. L. Grayson, S. Bhumiratana, P. G. Chao, C. T. Hung, and G. Vunjak-Novakovic, "Spatial regulation of human mesenchymal stem cell differentiation in engineered osteochondral constructs: effects of pre-differentiation, soluble factors and medium perfusion," Osteoarthritis and cartilage, vol. 18, pp. 714-723, 2010.

[9] A. B. Yeatts, D. T. Choquette, and J. P. Fisher, "Bioreactors to influence stem cell fate: augmentation of mesenchymal stem cell signaling pathways via dynamic culture systems," Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, vol. 1830, pp. 2470-2480, 2013.

[10] D. Pazzano, K. A. Mercier, J. M. Moran, S. S. Fong, D. D. DiBiasio, J. X. Rulfs, et al., "Comparison of chondrogensis in static and perfused bioreactor culture," Biotechnology progress, vol. 16, pp. 893-896, 2000.

[11] R. S. Tığlı, C. Cannizaro, M. Gümüşderelioğlu, and D. L. Kaplan, "Chondrogenesis in perfusion bioreactors using porous silk scaffolds and hESC-derived MSCs,"

این مقاله در مرحله ویراستاری بوده و نسخه نهایی آن به زودی در سایت مجله قرار داده خواهد شد



cartilage-carrier-constructs," Bioprocess and biosystems engineering, vol. 27, pp. 273-280, 2005.

[22] A. Woods, G. Wang, and F. Beier, "RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis," Journal of Biological Chemistry, vol. 280, pp. 11626-11634, 2005.

[23] E. J. Arnsdorf, P. Tummala, R. Y. Kwon, and C. R. Jacobs, "Mechanically induced osteogenic differentiation–the role of RhoA, ROCKII and cytoskeletal dynamics," Journal of cell science, vol. 122, pp. 546-553, 2009.

[24] A. Gonçalves, P. Costa, M. T. Rodrigues, I. R. Dias, R. L. Reis, and M. E. Gomes, "Effect of flow perfusion conditions in the chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured onto starch based biodegradable scaffolds," Acta biomaterialia, vol. 7, pp. 1644-1652, 2011.

[25] V. Lefebvre and P. Smits, "Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation," Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, vol. 75, pp. 200-212, 2005.

[26] D. J. Kelly and C. R. Jacobs, "The role of mechanical signals in regulating chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells," Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, vol. 90, pp. 75-85, 2010.