

## 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<sup>1</sup> / Vahidi, Bahman<sup>2\*</sup> / Haghhighipour, Nooshin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> - M.Sc., Biomedical Engineering Department, Faculty of New Sciences and Technologies (FNST), University of Tehran, Tehran, Iran

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

<sup>3</sup> - 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*

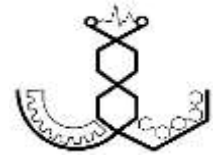
### ABSTRACT

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 ultimate 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

<b>Address</b>	Biomedical Engineering Department, Faculty of New Sciences and Technologies (FNST), University of Tehran, Tehran, Iran		
<b>Postal Code</b>	14395-1561	<b>Tel</b>	+98-21-86093021
<b>E-Mail</b>	bahman.vahidi@ut.ac.ir	<b>Fax</b>	+98-21-88617087





## تحلیل اثر تنش برشی بر پاسخ تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داربست نانوکامپوزیتی چندلایه برای کاربرد در مهندسی بافت استخوانی-غضروفی با استفاده از روش‌های محاسباتی

زادگان، سارا<sup>۱</sup> / وحیدی، بهمن<sup>۲\*</sup> / حقیقی‌پور، نوشین<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> - کارشناسی ارشد، بخش مهندسی پزشکی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده‌ی علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> - دانشیار، بخش مهندسی پزشکی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده‌ی علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران  
<sup>۳</sup> - استاد، بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

### مشخصات مقاله

شناسه‌ی دیجیتال: 10.22041/ijbme.2023.1989428.1828

پذیرش: ۲۱ اسفند ۱۴۰۱

بازنگری: ۱۹ اسفند ۱۴۰۱

ثبت در سامانه: ۲۴ بهمن ۱۴۰۱

### چکیده

ترمیم آسیب‌های بافت استئوکندرال به دلیل پیچیدگی بسیار زیاد این بافت و توانایی محدود در خودترمیمی بافت غضروف، با چالش بزرگی مواجه است. در این راستا مهندسی بافت با ارائه‌ی داربست‌های حاوی سلول‌های بنیادی همراه با اعمال تنش‌های مکانیکی به عنوان راه‌کار پیشنهادی جدید برای ترمیم این بافت مورد توجه محققان قرار گرفته است. این مطالعه در مرحله‌ی نخست شامل ساخت داربست سه لایه‌ی فیبروین ابریشم-نانوالیاف فیبروین به روش خشک‌کایش انجمادی و پس از آن شبیه‌سازی محاسباتی تحریک مکانیکی داربست حاوی سلول‌های بنیادی در بیوراکتور پرفیوژن به روش اجزای محدود و برهم‌کنش سیال-سازه جهت طراحی بهینه‌ی آزمون‌های سلولی و در مرحله‌ی آخر شامل انجام آزمون‌های سلولی است. آزمون‌های مشخصه‌یابی نشان داده که این داربست از به‌هم‌پیوستگی بسیار خوبی در بین لایه‌ها برخوردار بوده و اندازه‌ی متوسط تخلخل‌ها در لایه‌ی استخوان، لایه‌ی میانی و غضروف به ترتیب ۷۶، ۱۵۲ و ۱۰۲ میکرون است. این داربست بیومیمتیک دارای مدول فشاری ۰/۴ MPa و حداکثر مقاومت کششی ۱۰ MPa در حالت مرطوب است. نتایج شبیه‌سازی حاصل از عبور جریان سیال از داربست نشان داده که چنان‌چه لایه‌ی استخوان در مسیر ورودی جریان قرار گیرد، دامنه‌ی توزیع تنش برشی در داربست یک‌نواخت‌تر بوده و باعث تسهیل تمایز استخوانی و غضروفی می‌شود. همچنین نتایج تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داده که پس از ۱۴ روز اعمال تنش مکانیکی، علاوه بر گسترش سلولی، نفوذ سلول‌ها به لایه‌های پایین‌تر داربست نیز رخ داده است. علاوه بر این اعمال جریان پرفیوژن به مدت ۲۱ روز منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های استخوان و غضروف توسط سلول‌های بنیادی بافت چربی خرگوش در لایه‌ی استخوان و غضروف داربست در مقایسه با کشت استاتیک شده است.

### واژه‌های کلیدی

بیوراکتور پرفیوژن  
بافت استئوکندرال  
داربست چندلایه  
دینامیک سیالات محاسباتی  
سلول‌های بنیادی  
فیبروین ابریشم

### \*نویسنده‌ی مسئول

بخش مهندسی پزشکی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده‌ی علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تلفن ۹۸-۲۱-۸۶۰۹۳۰۲۱

۱۴۳۹۵-۱۵۶۱

دورنگار ۹۸-۲۱-۸۸۶۱۷۰۸۷

bahman.vahidi@ut.ac.ir



## ۱- مقدمه

استئوکندرال بافت فصل مشترکی است که در لایه‌ی فوقانی آن غضروف مفصلی قرار داشته که به نحو موثری در برابر فشارها، نیروی کششی و برشی مقاوم بوده و تا حدی خاصیت الاستیک و انعطاف‌پذیری دارد. در لایه‌ی زیرین این بافت، استخوان ساب‌کندرال قرار داشته که حفاظت از شکل مفصل و ایجاد اتصال ناقص بین دو استخوان مفصلی را بر عهده دارد [۱].

آسیب‌های استئوکندرال یکی از بیماری‌های شایع ارتوپدی است که بافت غضروف مفصلی و استخوان زیرین را تحت تاثیر قرار داده و به دلایلی از جمله تروما، استئوآرتریت و ضربات شدید ناگهانی، روماتوئید ایجاد می‌شود [۲]. استراتژی‌های متداول برای درمان آسیب‌های این بافت شامل دریدمان<sup>۱</sup>، تحریک مغز استخوان و تعویض کامل مفصل بوده که به دلیل پیچیدگی زیاد این بافت و ظرفیت محدود خوددرمانی غضروف منجر به درمان کامل نمی‌شود [۳].

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

فیبروین ابریشم یکی از بیوپلیمرهای طبیعی بوده که به دلیل دارا بودن خواصی مانند زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیری قابل کنترل و داشتن خواص مکانیکی برجسته به طور 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 در کنار سلول‌های بنیادی نقش به‌سزایی در بازسازی این بافت خواهد داشت به طوری که تعامل مناسب داربست با بافت احاطه‌کننده‌ی میزبان را فراهم کرده و منجر به ترمیم خوب آسیب بافتی خواهد شد [۸].

یکی دیگر از مولفه‌های موثر بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی با هدف ترمیم آسیب‌های استئوکندرال، تحریک‌های مکانیکی است [۹]. در مطالعات پیشین نشان داده شده 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، ۱۰]. نتایج مطالعات نشان داده که جریان پرفیوژن در شرایط برون‌تنی، هم برای مهندسی بافت استخوان و هم غضروف مناسب است. کاشت کندروسیت‌ها تحت جریان مستقیم پرفیوژن و در تنش برشی کم باعث گسترش سلول‌ها شده و تجمع مارکرهای غضروفی را در پی دارد که به حفظ فنوتیپ کندروسیتی کمک می‌کند [۱۱].

از نوآوری‌های این تحقیق می‌توان به ساخت داربست چندلایه‌ی فیبروین ابریشم بدون استفاده از چسب در لایه‌های مختلف، ساخت بیوراکتور پرفیوژن برای اعمال تنش برشی سیال و نیز شبیه‌سازی داربست و شرایط حاکم بر بیوراکتور برای بررسی اثر تنش برشی ناشی از جریان سیال بر سرنوشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت ترمیم بافت استئوکندرال اشاره کرد.

## ۲- مواد و روش‌ها

برای تهیه‌ی نانوالیاف فیبروین ابریشم و ساخت داربست چندلایه، ابتدا پیل‌های کرم ابریشم به قطعات کوچک‌تری تبدیل شده و سپس برای حذف ماده‌ی صمغ مانند سریسین از فیبروین، پیل‌های کرم ابریشم در دمای ۱۰۰ °C به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۰/۵ درصد مولار سدیم کربنات قرار داده شده است. در مرحله‌ی بعد رشته‌های ابریشم صمغ‌زدایی شده در محلول ۹/۳ مولار لیتیم‌برماید حل شده و در نهایت محلول فیبروین ابریشم توسط غشای دیالیز (۱۲۰۰۰ دالتون) در برابر آب دیونیزه دیالیز شده است [۴]. سپس محلول الکتروریسی با غلظت ۱۳ درصد از حل کردن فیبروین اسفنجی در اسید فرمیک حاصل شده و پس از انتقال به سرنگ ۱ cc با اعمال ولتاژ ۲۰ کیلوولت، نرخ ۰/۲۵ میلی‌لیتر بر ساعت، قطر سرنگ با گیج ۲۱ و رعایت فاصله‌ی ۱۳ سانتی‌متری سر سوزن از فویل آلومینیوم، الکتروریسی انجام شده است [۱۲].

برای ساخت داربست، در ابتدا لایه‌ی مربوط به بافت استخوان با غلظت ۵ درصد تهیه شده و پس از اضافه کردن نانوالیاف فیبروین ابریشم-۳٪ هیدروکسی آپاتیت (SF-3% HAp) فریزدرای شده است. پس از اتوکلاو کردن، داربست‌های به دست آمده درون قالب قرار گرفته و این بار محلول فیبروین لایه‌ی دوم با غلظت ۱۲ درصد همراه با نانوالیاف SF-1% HAp ریخته شده است. پس از فریزدرای کردن مجدد داربست این بار محلول فیبروین با غلظت ۹ درصد همراه با نانوالیاف SF آماده شده و روی داربست‌های دولایه ریخته شده و برای بار سوم داربست‌های حاصل فریزدرای شده و برای بررسی سطح مقطع، برش عرضی از آن تهیه شده است. پس از ساخت داربست

<sup>۱</sup> Debridement

در نرم‌افزار کامسول با حل عددی و خانه‌به‌خانه‌ی این دو رابطه، برای یافتن پاسخ مجهولات دامنه‌ی سیال (میدان سرعت سیال و نیز فشار هیدرودینامیک و نرخ کرنش برشی در نقاط مختلف) اقدام شده است. در این روابط  $u_{fluid}$  سرعت سیال،  $p$  فشار سیال،  $\rho$  چگالی سیال و  $\mu$  لزجت دینامیکی سیال است [۱۳].

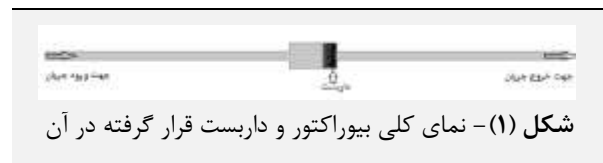
در مدل اجزای محدود، شبکه‌ی محاسباتی برای گسسته‌سازی مکانی مساله تعریف شده است. در این پژوهش برای خانه‌بندی در لایه‌ی مرزی سیال با سطوح داربست از المان‌های چهارضلعی و برای سایر قسمت‌های دامنه‌ی سیال از المان‌های مثلثی استفاده شده که بهترین گزینه برای استفاده در هندسه‌های نامتقارن است. برای بررسی استقلال حل از شبکه‌ی محاسباتی، ریزتر کردن شبکه تا رسیدن اختلاف پاسخ‌های تنش برشی دیواره به کم‌تر از ۱٪ مد نظر قرار گرفته است. در نهایت تعداد کل المان‌های دامنه برابر با ۲۰۷۲۸۲ است.

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 شده است. برای بررسی تاثیر کشت دینامیک بر چسبندگی و نفوذ سلول‌های بنیادی به لایه‌های داربست، نمونه‌ها و اجزای بیوراکتور با استفاده از اتوکلاو در دمای  $121^{\circ}\text{C}$  و فشار  $1/2$  اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه استریل شده است. پس از بذریاشی سلول‌ها روی داربست‌ها، نمونه‌ها به مدت ۲ هفته تحت کشت استاتیک و دینامیک قرار گرفته است. سپس محیط کشت از روی نمونه‌ها خارج شده و به مدت ۳۰ ثانیه با PBS شست‌وشو داده شده، پس از آن از پارافمالدئید برای تثبیت سلول‌ها استفاده شده و چسبندگی سلول روی نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روشی بررسی شده است. به منظور بررسی تاثیر محیط کشت پرفیوژن بر تمایز سلول‌های RASCs در لایه‌های مختلف داربست، نمونه‌ها در دو گروه کشت استاتیک و دینامیک در انکوباتور نگهداری شده و محیط کشت مورد استفاده حاوی فاکتورهای شیمیایی تمایز استخوانی و غضروفی بوده است. سپس لایه‌های داربست از هم جدا شده و بیان ژن‌های تمایزی غضروف و استخوان در لایه‌های مربوطه بررسی شده است.

تمام آزمایش‌ها حداقل ۳ بار انجام شده و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است. تفاوت‌های آماری با استفاده از تحلیل یک‌طرفه‌ی واریانس (ANOVA) بررسی شده است. مقادیر  $P$  کم‌تر از  $0.05$  از نظر آماری برای تمام آزمایش‌ها معنادار در نظر گرفته شده است.

سه‌لایه‌ی فیبروین-نانوالیاف فیبروین، بیوراکتور پرفیوژن طراحی و ساخته شده است. بیوراکتور پرفیوژن شامل یک پمپ پرستالتیک، کارتريج پرفیوژن، شلنگ‌های رابط و ظرف نگهداری محیط کشت است.

پس از آن 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 شده است. در این مدل، داربست به شکل یک دیسک با حفره‌های دایره‌ای و تغییرات تخلخل گرادانی در نظر گرفته شده است. در مدل محاسباتی، رفتار این پلیمر طبیعی به صورت الاستیک خطی با مدول الاستیک  $0.4$  مگاپاسکال و ضریب پواسون  $0.3$  در نظر گرفته شده است (شکل ۱). سیال در این پژوهش، محیط کشت DMEM در  $1/45$  میلی‌پاسکال بر ثانیه و چگالی  $1000$  کیلوگرم بر متر مکعب فرض شده و از معادلات پیوستگی و تراکم‌ناپذیر ناویر-استوکس به عنوان معادلات حاکم بر سیال بهره گرفته شده است. شرایط مرزی خروجی در بخش انتهایی داربست و محل خروج سیال، فشار صفر در نظر گرفته شده و برای بررسی برهم‌کنش میان سیال و داربست از نرم‌افزار کامسول 5.2 استفاده شده است. روابط مورد استفاده برای حل دامنه‌ی سیال در این مساله مطابق معادلات حاکم برای یک سیال نیوتنی در رژیم جریان لایه‌ای پایا بوده که در فرمول عمومی ناویر-استوکس عبارت‌های وابسته به زمان در آن حذف شده است (رابطه‌ی ۱). شرط دیگری که باید در حل مساله‌ی جریان پایا برقرار باشد، شرط پیوستگی جریان است که برای این منظور باید رابطه‌ی (۲) ارضا شود. همچنین علائم ضخیم در این فرمول‌ها بیان‌گر ماهیت ماتریسی آن عبارت‌ها است. مطابق رابطه‌ی (۱) از ماتریس واحد برای هم‌مرتب نمودن ماتریس‌ها در برخی عبارت‌ها استفاده شده است.

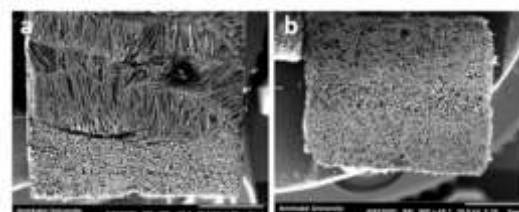


$$\rho(\mathbf{u}_{fluid} \cdot \nabla)\mathbf{u}_{fluid} = \nabla \cdot \left[ -p\mathbf{I} + \mu(\nabla\mathbf{u}_{fluid} + (\nabla\mathbf{u}_{fluid})^T) - \frac{2}{3}\mu(\nabla \cdot \mathbf{u}_{fluid})\mathbf{I} \right] + \mathbf{F} \quad (1)$$

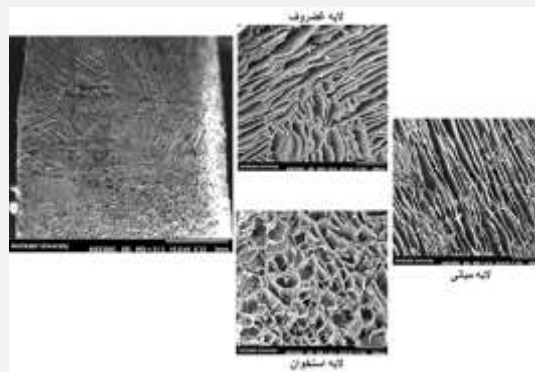
$$\nabla \cdot (\rho\mathbf{u}_{fluid}) = 0 \quad (2)$$

### ۳- نتایج و بحث

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح مقطع داربست‌های 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 می‌دهد که هیچ شکافی در فصل مشترک بین لایه‌ها وجود نداشته و سطح مقطع داربست کاملاً به هم پیوسته و یک‌پارچه با جهت‌گیری و مورفولوژی مختلف تخلخل‌ها در لایه‌های مختلف است.



شکل (۲) - تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌های چندلایه‌ی فیبرویین ابریشم ساخته شده با روش خشک‌کایش انجمادی، (a) خشک‌کایش انجمادی در یک مرحله، (b) خشک‌کایش انجمادی در سه مرحله



شکل (۳) - تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از داربست‌های چندلایه‌ی فیبرویین ابریشم ساخته شده با روش خشک‌کایش انجمادی

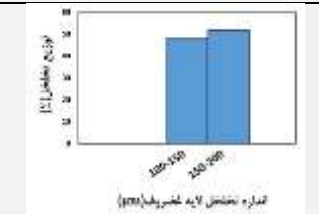
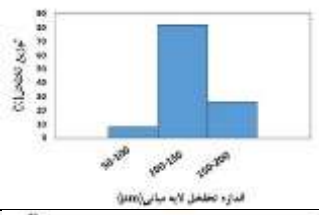
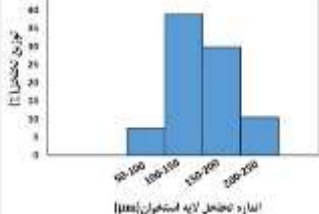
از نانوالیاف SF-3% HAp در این لایه استفاده شده که به طور موثر در ترمیم بافت استخوان مورد استفاده قرار گیرد. در لایه‌ی میانی و لایه‌ی غضروف، تخلخل‌ها دارای مورفولوژی جهت‌دار و کشیده بوده که مشابه ساختار طبیعی غضروف است. اندازه‌ی متوسط تخلخل‌ها در لایه‌ی میانی نسبت به دو لایه‌ی دیگر کوچک‌تر و دامنه‌ی توزیع اندازه‌ی تخلخل‌ها نیز باریک‌تر است. نکته‌ی قابل توجه این است که از نانوالیاف SF-1% HAp در لایه‌ی میانی و از نانوالیاف SF در لایه‌ی غضروف استفاده شده تا این لایه‌ها علاوه بر شکل و اندازه‌ی تخلخل‌ها به لحاظ ترکیب و ریخت‌شناسی نیز به بافت طبیعی نزدیک‌تر باشند. جزئیات نتایج مربوط به مورفولوژی، توزیع اندازه‌ی قطری، خواص مکانیکی و زیست تخریب‌پذیری نانوفایبرها در مطالعه‌ی پیشین [۱۵] ارائه شده است. این نتایج نشان داده که غلظت محلول فیبرویین ابریشم برای شکل‌دهی داربست در لایه‌های مختلف مناسب بوده و منجر به تشکیل ساختار متخلخل به هم پیوسته و اندازه‌ی مناسب برای هر لایه از این بافت شده است. اندازه‌ی تخلخل‌ها در این روش به دمای پیش از انجماد و یک‌نواختی و به هم پیوستگی آن‌ها به کنترل کردن سرعت انجماد بستگی دارد [۱۶]. نتایج نشان داده که اولین لایه‌ی ساخته شده با این روش، اغلب دارای تخلخل‌های گرد و به هم پیوسته بوده و در لایه‌های بعدی شکل آن‌ها جهت‌دار است که می‌توان دلیل 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 اولیه‌ی بحرانی پیش از ترشح مقدار فراوان از ماتریس خارج سلولی محافظت کرده و آن‌ها را به عنوان قالب مناسبی برای گسترش و تمایز سلول‌های کندروسیت معرفی می‌کند. هم‌چنین مدول فشاری این نوع داربست‌ها نسبت به داربست‌های با تخلخل‌های تصادفی بیش‌تر است [۱۸]. لذا در ساخت این داربست چندلایه، ابتدا داربست استخوانی با تخلخل‌های گرد شکل داده شده و سپس لایه‌ی میانی و لایه‌ی غضروف ساخته شده است.

در این پژوهش داربست به صورت یک داربست گرادپانی شبه‌سازی شده که در آن اندازه‌ی تخلخل‌ها از لایه‌ی استخوان به لایه‌ی غضروف کاهش یافته است. قرارگیری داربست درون بیوراکتور پرفیوژن در دو حالت بررسی شده است. در حالت اول، جریان سیال از قسمت بافت استخوان وارد و از لایه‌ی غضروف خارج شده (حالت الف) و در حالت دوم این جریان از قسمت

توزیع تخلخل، میانگین اندازه و درصد تخلخل در لایه‌های مختلف داربست با استفاده از نرم‌افزار Image J محاسبه شده و نتایج آن در جدول (۱) ارائه شده است. این نتایج نشان می‌دهد که تخلخل‌های لایه‌ی استخوانی دارای مورفولوژی گرد بوده و دامنه‌ی توزیع تخلخل‌ها در بازه‌ی صفر تا ۲۵۰ میکرون است. در مطالعات درون‌تنی و برون‌تنی در داربست‌های پلیمری نشان داده شده که داربست‌های مناسب برای استخوان‌زایی دارای حداقل اندازه‌ی تخلخل ۱۰۰ تا ۱۳۵ میکرون است [۱۴]. از آن‌جا که فیبرویین ابریشم به تنهایی دارای خاصیت استخوان‌زایی نیست، برای تسهیل در تمایز سلول‌های بنیادی

غضروف وارد و از لایه‌ی استخوان خارج شده است (حالت ب).  
سرعت ورودی سیال برای هر دو حالت مقدار ثابت ۰/۴ میلی‌لیتر بر دقیقه در نظر گرفته شده و تحلیل دینامیک سیالات محاسباتی برای هر دو حالت بررسی شده است.

جدول (۱) - اندازه، توزیع و درصد تخلخل‌ها در لایه‌های مختلف داربست

درصد تخلخل	توزیع تخلخل ( $\mu\text{m}$ )	میانگین قطر حفره‌ها ( $\mu\text{m}$ )
۷۸/۳۴±۳/۳۴		۱۰۲/۶۹±۱۲/۴۸
۶۸/۳۷±۶/۴۷		۷۶/۳۳±۱۰/۲۲
۸۰/۳۸±۳/۴۷		۱۵۲/۰۶±۲۴/۰۲

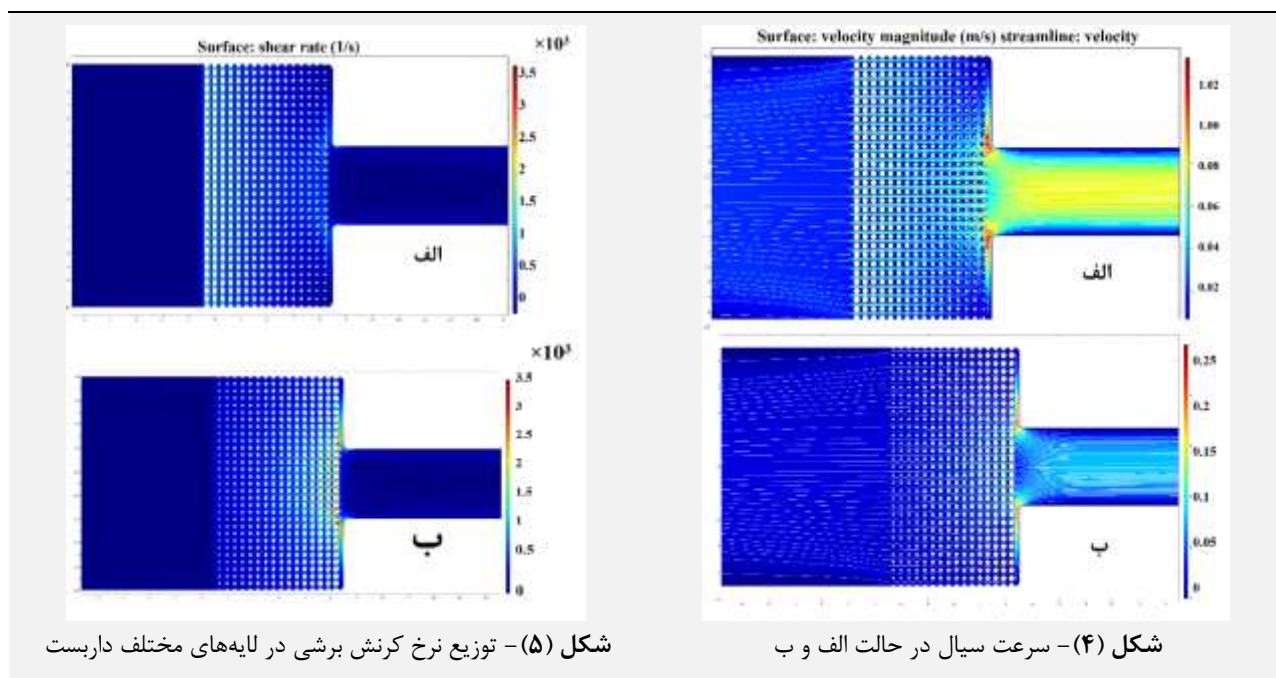
باعث سیگنال‌دهی غیریک‌نواخت به سلول‌ها شده است. در حالتی که داربست به گونه‌ای در بیوراكتور قرار گیرد که سیال از لایه‌ی غضروف وارد داربست شود، بیشینه‌ی سرعت در داربست در لایه‌ی غضروف مشاهده شده و با نزدیک شدن به لایه‌های پایین‌تر، این سرعت کاهش یافته به طوری که در لایه‌ی استخوان، میزان سرعت سیال به صفر میل کرده است. در این حالت نیز مانند حالت الف، با نزدیک شدن از قسمت مرکزی داربست به دیواره‌ی بیوراكتور، خطوط عبور جریان بسیار کم‌تر شده است که مطلوب نمی‌باشد.

عبور جریان سیال با نرخ یکسان از لایه‌ی استخوان و غضروف داربست، تنش‌های برشی متفاوتی را بر سلول‌های کشت شده‌ی داخل لایه‌های مختلف داربست اعمال کرده که می‌توان آن را به داشتن اندازه‌ی تخلخل متفاوت در این لایه‌ها نسبت داد. با توجه به شکل (۵) دامنه‌ی توزیع نرخ کرنش برشی در حالت الف وسیع بوده و این نشان دهنده‌ی سیگنال‌دهی بسیار متفاوت و غیریک‌نواخت بخش‌های مختلف داربست است. هم‌چنین با دور شدن از سطح ورودی سیال، میزان نرخ کرنش برشی افزایش یافته و سطح مقطع بزرگ‌تری از داربست در لایه‌ی غضروف احاطه شده است. بازه‌ی نرخ کرنش برشی در این داربست در محدوده‌ی ۰/۷۵ تا ۱/۵ بر ثانیه و بازه‌ی دامنه‌ی

نتایج مربوط به شبیه‌سازی در شکل (۴) نشان می‌دهد که سرعت جریان در لایه‌ی ورودی (با اندازه‌ی تخلخل‌های بزرگ‌تر) بیشینه است و با نزدیک شدن از مرکز به سمت دیواره‌ی داربست (نواحی مرزی)، سرعت سیال به صفر نزدیک شده که باعث ایجاد شرایط استاتیک شده و مطلوب نمی‌باشد. اما با نزدیک شدن از سطح به عمق، جریان سیال سطح مقطع بیش‌تری از داربست را پوشش داده است که می‌توان آن را به انحراف مسیر سیال نسبت داد. هم‌چنین در لایه‌ی میانی و لایه‌ی غضروف به دلیل کاهش اندازه‌ی تخلخل‌ها، سرعت سیال نسبت به لایه‌ی استخوان کاهش یافته که دلیل آن ممانعت بیش‌تر لایه‌های پایینی داربست نسبت به عبور سیال است. از سوی دیگر می‌توان مشاهده کرد که کم‌ترین اختلاف بین سرعت ورودی و بیشینه‌ی سرعت درون داربست وجود دارد. تحلیل دینامیک سیالات محاسباتی نشان می‌دهد که افزایش اندازه‌ی تخلخل داربست باعث عبور راحت سیال از داخل آن شده و در نتیجه سلول‌های کشت شده در این قسمت از داربست، سرعت‌های قابل پیش‌بینی‌تری را با توجه به سرعت ورودی تجربه کرده‌اند. این نکته نیز باید مد نظر قرار گیرد که وجود سیال با سرعت صفر در ناحیه‌ی مماس با دیواره‌ی بیوراكتور مناسب نیست زیرا شرایط کشت استاتیک را در آن ناحیه ایجاد کرده و

غالباً دارای طبیعت پیچیده بوده و سازوکارهای عمل‌کردی اغلب آن‌ها به طور کامل شناسایی نشده است، اما منطقی به نظر می‌رسد که بتوان عوامل شناسایی شده را تا حدی کنترل نمود. در داربست‌های بافت استئوکندرال، گرادیان تخلخل موجب ایجاد ناحیه‌ای با گرادیان تنش برشی شده که نتیجه‌ی آن اعمال تحریک‌های مکانیکی متفاوت است. نتایج به دست آمده در این شبیه‌سازی نشان داده 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 داده که سلول‌های استخوانی در شرایط آزمایشگاهی به تنش برشی در بازه‌ی ۰/۵ تا ۱/۵ پاسکال پاسخ داده که منجر به تولید الکالین فسفات شده است [۹].

تنش برشی ۱/۴۵ تا ۲/۱۷۵ مگاپاسکال است. در حالت ب از شکل (۵) دامنه‌ی توزیع نرخ کرنش برشی در داربست بسیار وسیع‌تر از حالت الف بوده به طوری که میزان نرخ کرنش برشی در لایه‌ی غضروف در محدوده‌ی ۱/۲۵ تا ۱/۷۵ بر ثانیه تغییر کرده در صورتی که این مقدار در لایه‌ی میانی و لایه‌ی استخوان در محدوده‌ی ۰/۲۵ تا ۰/۷۵ بوده و با نزدیک‌تر شدن به لایه‌ی استخوان، میزان آن کم‌تر شده است. 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 کرده که بیشینه‌ی آن در لایه‌ی غضروف و کم‌ترین مقدار در لایه‌ی استخوان است. اگر چه پارامترهای موثر بر مدولاسیون سلول بنیادی بسیار زیاد و



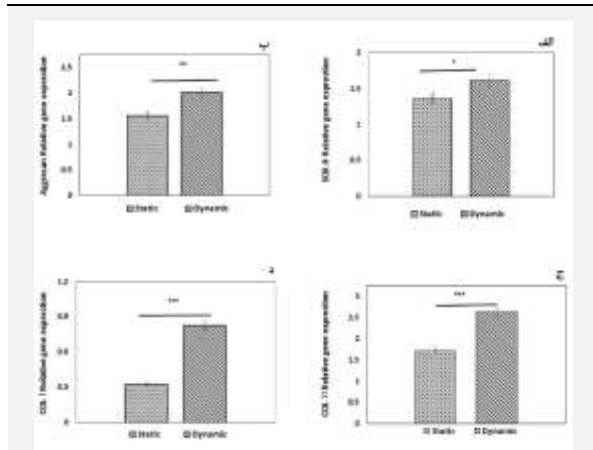
شکل (۵) - توزیع نرخ کرنش برشی در لایه‌های مختلف داربست

شکل (۴) - سرعت سیال در حالت الف و ب

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) نشان داده شده است. نتایج نشان داده که بیان ژن‌های تمایزی غضروف (SOX-9)، اگریکان و کلاژن نوع ۱ و ۲ در لایه‌ی غضروف این بافت در شرایط کشت دینامیک نسبت به استاتیک تنظیم مثبت شده که بیان‌گر پتانسیل تمایزی بهتر در جریان پرفیوژن نسبت به کشت استاتیک است [۱۱، ۲۰]. نتایج Real-Time افزایش مقادیر ماتریس خارج سلولی را در شرایط کشت دینامیک نسبت به استاتیک تایید کرده است که نتایج این بررسی با مطالعات گذشته روی بافت غضروف هم‌خوانی دارد [۱۰، ۲۱].

مورفولوژی، چسبندگی و توزیع سلول‌های بنیادی پس از ۱۴ روز کشت استاتیک و دینامیک روی لایه‌های مختلف داربست در شکل (۶) نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که سلول‌های بنیادی در هر دو گروه کشت استاتیک و دینامیک توسط ایجاد پاهای کاذب روی سطح تخلخل‌ها چسبیده است. این چسبندگی بیان‌گر این است که داربست فیبروین ابریشم/نانوالیاف فیبروین شرایط مناسبی را برای مهاجرت، چسبندگی و پهن‌شدگی سلول‌ها فراهم کرده است. به علاوه در نمونه‌هایی که در معرض کشت دینامیک قرار گرفته، تجمع سلولی بسیار بیش‌تر از نمونه‌های کشت استاتیک است. اعمال جریان پرفیوژن نه تنها باعث تکثیر و گسترش سلولی شده بلکه به طور قابل توجهی باعث نفوذ سلول‌ها به لایه‌ی میانی شده است.

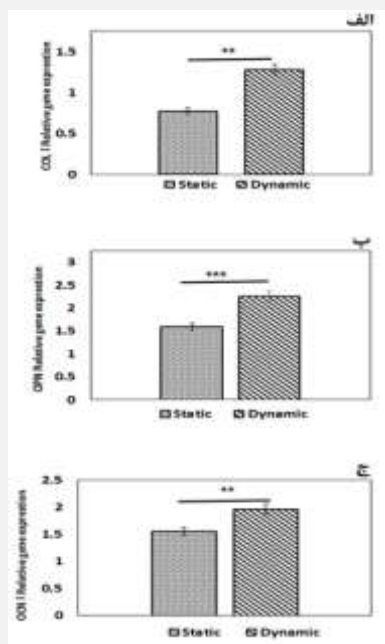
مورد بررسی قرار گرفته و در شکل (۸) نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که بیان ژن‌های استخوان (کلاژن نوع ۱) استئوپونتین و استئوکلسین در لایه‌ی استخوان این بافت در شرایط کشت دینامیک نسبت به کشت استاتیک تنظیم مثبت شده که نشان دهنده‌ی پتانسیل تمایزی بهتر در جریان پرفیوژن نسبت به کشت استاتیک است.



شکل (۶) - تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از چسبندگی سلول‌های RASCs روی نمونه‌های استاتیک و دینامیک پس از ۱۴ روز در بزرگ‌نمایی x1700 (الف: لایه‌ی استخوان، ب: لایه‌ی میانی، ج: لایه‌ی غضروف، c و e: کشت استاتیک، d و f: کشت دینامیک)، برای تشخیص سلول از داربست، سلول‌ها با فلش روی تصاویر مشخص شده است



شکل (۷) - بیان ژن‌های غضروفی (الف: SOX-9، ب: اگریکان، ج: کلاژن نوع ۲، د: کلاژن نوع ۱ در لایه‌ی غضروف پس از ۲۱ روز کشت استاتیک و دینامیک) (\* به معنای  $p < 0.05$ ، \*\* به معنای  $p < 0.01$  و \*\*\* به معنای  $p < 0.001$  است)



شکل (۸) - بیان ژن‌های استخوانی (الف: کلاژن نوع ۱، ب: استئوپونتین و ج: استئوکلسین در لایه‌ی استخوان پس از ۲۱ روز کشت استاتیک و دینامیک) (\*\* به معنای  $p < 0.01$  و \*\*\* به معنای  $p < 0.001$  است)

نتایج تحقیقات گذشته [۲۰] نشان داده که دو مسیر سیگنال‌دهی گیرکانونیکال a5Wnt و بتا-کاتنین برای تمایز

نتایج بررسی‌های پیشین نشان داده که جریان سیال از طریق ممانعت کشش در اکتین سائتواسکتون باعث افزایش بیان ژن SOX-9 شده و به طور کلی اسکلت سلولی اکتین دست نخورده و پویا برای تمایز غضروفی ناشی از جریان سیال ضروری است [۲۲، ۲۳]. هم‌چنین افزایش بیان ژن حاصل از تنظیم مثبت بیان ژن SOX-9 است. اعمال جریان پرفیوژن بر سازه‌ی استئوکندرال نه تنها باعث بهبود بیان ژن‌های غضروفی شده، بلکه باعث افزایش بیان ژن استخوانی کلاژن نوع ۱ در این لایه شده است. نتایج تحقیقات گذشته نشان داده که اعمال جریان مستقیم پرفیوژن بر داربست‌های غضروفی علاوه بر افزایش بیان مارکرهای غضروفی، تنظیم مثبت بیان ژن استخوانی را نیز به همراه داشته است [۲۴] که به احتمال زیاد می‌توان این موضوع را به ترشح ماتریس خارج سلولی غنی از هیالورونیک و کلاژن نوع ۱ توسط سلول‌های پیش‌ساز غضروفی پیش از مرحله‌ی متراکم شدن در طی روند 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 گذشت ۲۱ روز از قرارگیری داربست‌ها در شرایط کشت استاتیک و دینامیک توسط آزمون Real-Time

- [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 chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture," *Biotechnology progress*, vol. 16, pp. 893-896, 2000.
- [11] R. S. Tıglı, C. Cannizaro, M. Gümüşderelioğlu, and D. L. Kaplan, "Chondrogenesis in perfusion bioreactors using porous silk scaffolds and hESC-derived MSCs," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 96, pp. 21-28, 2011.
- [12] S. Zadegan, B. Vahidi, J. Nourmohammadi, and N. Haghhighipour, "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. Haghhighipour, "An investigation into osteogenic differentiation effects of silk fibroin-nettle (*Urtica dioica* L.) nanofibers,"

استخوانی القا شده توسط جریان سیال ضروری است. مسیر سیگنال دهی بتا-کاتنین ممکن است به طور جزئی توسط مسیر سیگنال کادهیرین-کاتنین تنظیم شود.

کادهیرین‌ها مولکول‌های چسبندگی هستند که در تماس دو سلول به یکدیگر درگیر می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که جریان سیال باعث کاهش معنی‌دار در به هم پیوستگی کادهیرین-کاتنین می‌شود که افزایش بتا-کاتنین را در سیتوپلاسم سلول به همراه دارد [۲۶].

#### ۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش داربست کامپوزیتی نانوالیاف فیبروین/فیبروین ابریشم با موفقیت به روش خشک‌کایش انجمادی سنتز شده که به دلیل داشتن ریزساختار بیومیمتیک و به هم پیوسته همراه با خواص مکانیکی مناسب به عنوان بستری مناسب برای بازسازی آسیب بافت استئوکندرال معرفی شده است. همچنین با کمک مدل‌سازی دینامیک سیالات محاسباتی، داربست مورد نظر و شرایط حاکم بر بیوراکتور شبیه‌سازی شده است تا بدون انجام آزمون‌های سعی و خطا در آزمایشگاه، اثر جریان سیال بر سرنوشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در جهت بافت استئوکندرال با توجه به موقعیت قرارگیری داربست در بیوراکتور مورد بررسی قرار گیرد. یافته‌ها نشان داده است که سیستم پرفیوژن طراحی شده بسته به هندسه‌ی داربست و جهت جریان سیال ورودی نسبت به گرادیان تخلخل در کنار فاکتورهای شیمیایی می‌تواند شرایط مطلوبی را برای تمایز استخوانی و غضروفی سلول‌های بنیادی فراهم کند.

#### ۵- مراجع

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

- [21] S. Nagel-Heyer, C. Goepfert, F. Feyerabend, J. P. Petersen, P. Adamietz, N. M. Meenen, et al., "Bioreactor cultivation of three-dimensional 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.
- 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  $\beta$ -catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate," *PloS one*, vol. 4, p. e5388, 2009.