تاثیر سفتی بستر کشت بر رفتار مکانیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمال حین تمایز به سلول‌های ماهیچه‌ای عضله صاف

محمدمهدی خانی [*۱] (Ph.D)، محمد تفضلی شادپور [۲] (Ph.D)

۱- *گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران*

۲- *گروه بیومکانیک، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی‌تکنیک تهران).*

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان (hMSCs) توانمندی قابل توجهی در پزشکی باز تولید به خصوص مهندسی بافت عروق دارد. خواص مکانیکی داربست کشت سلولی به عنوان یک محیط مکانیکی در فعالیت‌های فیزیولوژیک سلول از جمله تکثیر، تمایز و توسعه ساختار اسکلتی سلول تاثیرگذار بوده و در کارامدی سلول مهندسی شده در خارج از بدن موثر است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق hMSCها در گروه‌های کنترل و القای تمایز با فاکتور رشد در دو گروه با بسترهایی با سفتی‌های مختلف کشت داده شده و با روش آزمون مکش میکروپیپت رفتار مکانیکی آن‌ها (مدول الاستیک موثر (E) و تمایل به خزش ویسکوالاستیک) حین تمایز به سلول‌های عضله صاف اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در مقایسه با گروه کنترل، در گروه القای تمایز برای هر دو بستر شاهد کاهش قابل توجه آماری در میزان E هستیم در حالی که تمایل به خزش سلول‌ها افزایش چشمگیری داشت. با افزایش زمان کشت تا چهار و شش روز، مقادیر E سلول‌ها در گروه‌های القای تمایز در مقایسه با گروه‌های کنترل متناظر افزایش قابل توجه آماری داشته در حالی که تمایل به خزش کاهش پیدا کرده است. میزان افزایش یا کاهش تمایل به خزش با سفتی بستر ارتباط دارد به گونه‌ای که سلول‌های کشت داده شده بر بستر سفت‌تر تمایل کم‌تری به خزش ویسکوالاستیک دارند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق زمینه مناسبی در حوزه مهندسی بافت سلول‌های بنیادی جهت بهینه‌سازی شرایط کشت و استفاده موثر از محرک‌های فیزیکی خارجی (شامل خواص مکانیکی بستر کشت) در کنترل فرایند تمایز و تولید سلول‌های مهندسی شده کارآمد فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: مهندسی بافت، سلول‌های بنیادی، تمایز سلول، مکانیک سلولی

مقدمه

سلول‌ها در داخل بدن دائماً تحت تاثیر محیط فیزیکی ماتریس خارج سلولی و نیروهای مکانیکی از جمله بارگذاری فشاری و کششی قرار دارند. این تنش‌ها و کرنش‌های متفاوت ناشی از محیط خارجی و یا شرایط فیزیولوژیکی داخل بدن، باعث شده تا سلول‌های بدن علاوه بر فنوتیپ‌های گوناگون خواص مکانیکی متفاوتی نیز داشته باشند [۱]. خواص مکانیکی یک سلول به عنوان یک "بیومارکر" برای شناسایی نوع سلول و تایید فنوتایپ آن به‌کار گرفته می‌شود [۲]. هم‌چنین فیزیولوژی سلول از جمله رشد، تکثیر، مهاجرت و

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۹۸۴۸

Email: khani@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۱۶

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

بیان ژن و سنتز پروتئین و مواد خارج سلول و هم‌چنین تمایز سلول متاثر از بیومکانیک سلول (Cell Biomechanics) است [۵-۳]. بررسی تاثیر بارهای مکانیکی دینامیکی (نیروهای خارجی) و محیط مکانیکی استاتیکی (خواص مکانیکی داربست کشت سلول) بر عمل‌کرد سلول‌ها و تغییر خواص مکانیکی آن‌ها یکی از حوزه‌های مهم تحقیقاتی بیومکانیک سلولی بوده و در حوزه مهندسی بافت (Tissue engineering) و پزشکی بازتولید (Regenerative medicine) کاربرد دارد.

از اهداف اصلی در مهندسی بافت و درمان سلولی ساخت بافت‌ها و سلول‌های مهندسی شده در خارج از بدن به گونه‌ای است که علاوه بر شرایط زیست سازگاری، کارکرد فیزیکی بافت را نیز تامین کند که این مساله اهمیت تاثیر محیط مکانیکی را قبل از پیوند، در مراحل تکثیر و تمایز نشان می‌دهد [۸-۶]. انطباق بین خواص مکانیکی سلول مهندسی شده با محیط مکانیکی بافت همبند اطراف، برای کارامدی بافت مهندسی شده ضروری است. از طرفی کارایی و عمل‌کرد سلول مهندسی شده به فرایندی که از طریق آن القای تمایز صورت گرفته بستگی دارد. تحقیقات نشان داده که تحریک‌های شیمیایی، مکانیکی، ایجاد قیود هندسی برای جهت دادن به سلول‌ها در فرایند رشد و تمایز و نیز تغییرات خواص مکانیکی داربست در فرایند تمایز می‌تواند باعث تنظیم رشد و تمایز سلول‌های بنیادی می‌شود. تمایز سلول‌های بنیادی توسط فاکتورهای شیمیایی مانند فاکتور رشد نیز صورت می‌گیرد، اما تاثیر بر روی عمل‌کرد سلول‌ها و قوام لازمه آن‌ها جهت برآورد کارکرد فیزیکی بافت‌ها از مهم‌ترین دلایلی است که باعث ارجحیت فاکتورهای مکانیکی بر شیمیایی می‌شود. مکانیک سلولی بر عوامل مختلفی از جمله تکثیر، مورفولوژی و آرایش سلول‌ها، ساختار درونی سلول، خواص مکانیکی سلول، مهاجرت سلولی، متابولیسم سلول‌ها، فعالیت کانال‌های یونی، میزان و عمل‌کرد ترکیبات پروتئینی سلول و مرگ سلول‌ها تاثیرگذار است، که این پارامترها مستقل از یک‌دیگر نیستند [۱۲-۹].

با توجه به خصوصیات منحصر به فرد سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان (MSCs) از جمله داشتن حداقل پاسخ‌های ایمنی، توانایی تولید سلول‌های نظیر خود و قابلیت تمایز به سلول‌های مختلف دیگر باعث شده تا کارایی‌های زیادی در ترمیم و یا ساخت اکثر بافت‌ها در خارج از بدن از جمله بافت دیواره رگ‌ها و القای تمایز به سلول‌های ماهیچه‌ای عضله صاف رگ‌ها (SMCs) از خود نشان دهند. سلول‌های ماهیچه‌ای عضله صاف رگ‌ها به طور طبیعی با شکل‌هایی کشیده و جهت‌گیری محیطی در جداره رگ‌ها قرار گرفته‌اند [۱۳] و عمل‌کرد فیزیولوژیک آن‌ها انقباض و حفظ استحکام مکانیکی بافت است [۱۵،۱۴]. به دلیل اهمیت عمل‌کرد انقباضی و حفظ استحکام بافت در کارکرد طبیعی رگ‌ها، در ساخت رگ‌های مصنوعی برای درمان بیماری‌های قلبی و عروقی، مکانوبیولوژی سلول‌های مزانشیمال مغز استخوان و کارایی آن‌ها در ترمیم بافت قلب و عروق کاربرد زیادی پیدا کرده است.

سلول‌های بنیادی به محیط فیزیکی و شیمیایی اطراف خود حساس می‌باشند در ضمن پاسخ سلولی به محیط مکانیکی ـ شیمیایی اطراف با تغییرات در جهت‌گیری فیبرهای تنشی سلول و بازآرایی ساختار اسکلتی سلول همراه است [۱۷،۱۶]. از آن‌جایی‌که ساختار اسکلتی سلول فراهم‌کننده بخش عمده‌ای از خواص مکانیکی سلول است تغییرات در ساختار اسکلتی سلول با تغییر در خواص مکانیکی آن از جمله خواص الاستیک و ویسکوالاستیک همراه می‌شود [۱۸،۲]. در واقع خواص مکانیکی سلول‌ها می‌تواند از تعامل مکانیکی آن‌ها با ماتریس خارج سلولی تاثیر بپذیرد [۱۹].

این مشاهدات به ارتباط میان تمایز MSCها با تغییر خواص مکانیکی آن‌ها صحه گذاشته و نیاز به مطالعات و بررسی‌های بیش‌تر در مقیاس بیومولکولی در خصوص چگونگی ارتباط میان شکل‌گیری و توسعه فیلامان‌های اکتین و ژن‌های ساختار اسکلتی با تغییرات خواص مکانیکی سلول را مشخص می‌کند. فهم بیش‌تر تعامل میان مکانیک سلولی و تمایز سلول باعث افزایش توانایی در کنترل فرایند تمایز

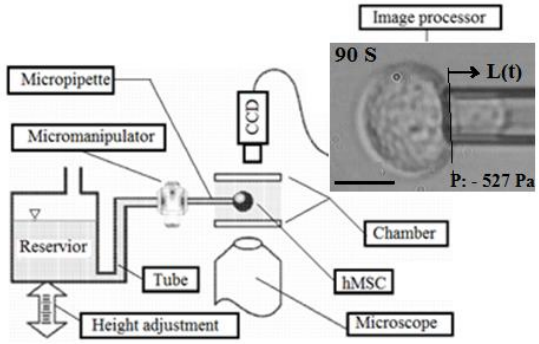
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

می‌شود. کنترل فرایند تمایز در ساخت سلول‌ها و بافت‌های کارامد در مهندسی بافت و درمان سلولی از جمله بهینه‌سازی خواص داربست‌ها جهت القای شرایط مکانیکی مناسب به سلول بنیادی در حین تمایز می‌شود. در این تحقیق اثر سفتی بستر کشت به عنوان یک محرک مکانیکی استاتیکی بر میزان توسعه ساختار اسکلتی سلول‌های بنیادی مزانشیمال حین تمایز به سلول‌های ماهیچه‌ای عضله صاف عروق ارزیابی می‌شود.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و القای تمایز. سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسان (hMSCs) از بانک سلولی پژوهشگاه رویان (RSCB)، تهیه شد. از محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - lowglucose) DMEM با ۱۰٪ سرم گاوی (FBS)، ۱٪ آنتی‌بوتیک (penicillin-streptomycin) و ۱٪ ماده ضد قارچ (fungizone) به عنوان محیط کشت پایه برای کشت و تکثیر hMSCها بدون القای تمایز استفاده گردید [۲۲-۲۰]. در گروه‌های القای تمایز، از فاکتور رشد TGF-β1 (Transforming Growth Factor-β1) با غلظت ۱۰ ng/ml جهت تحریک شیمیایی hMSCها استفاده شد. در کلیه گروه‌های کنترل و القای تمایز سلول‌های مزانشیمال به مدت شش روز بر دو نوع داربست با سفتی متفاوت شامل غشاء نرم سیلیکونی زیست سازگار polydimethylsiloxane (Dowcorning-Sylgard184)، و Well Plate-۶ آزمایشگاهی به عنوان بستر سفت کشت داده شده‌اند. دانسیته اولیه کشت، ۱۰۰۰ سلول بر هر سانتی‌متر مربع در نظر گرفته شده و در تمامی آزمایش‌ها از hMSCها با پاساژ ۳ الی ۷ استفاده شد. جهت افزایش چسبندگی سلول‌ها با بستر کشت تمانی بسترها در گروه‌های کنترل و القای تمایز با کلاژن نوع اول (۲۵ µg/cm) پوشیده شده و تمامی مراحل رشد و تکثیر در داخل دستگاه انکوباتور با رطوبت ۹۰٪ و دمای ۳۷ °c و حضور ۵٪ گاز CO2 انجام گرفته است. متناسب با هر گروه آزمایشی ۲۴ساعت بعد از کشت اولیه، محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت مناسب تعویض شده و این روز به عنوان روز صفرم آزمون در نظر گرفته شده است و سپس در روزهای دوم، چهارم و ششم آزمون خواص الاستیک و ویسکوالاستیک سلول‌ها در گروه‌های القای تمایز و کنترل برای هر دو بستر نرم و سفت ارزیابی شد.

آزمون مکش میکروپیپت و مدل تئوری. در روزهای آزمون مقادیر مدول یانگ موثر سلول‌ها و منحنی تمایل به خزش ویسکوالاستیک سلول‌ها با روش آزمون مکش میکروپیپت اندازه‌گیری شد. در این روش مطابق شکل (۱) با ایجاد یک فشار مکشی مشخص به بدنه سلول‌های معلق در محیط کشت، سلول داخل لوله شیشه‌ای مکیده شده و میزان طول مکیده شده داخل لوله با یک سیستم فیلم‌برداری میکروسکوپی ثبت می‌شود. در این تحقیق با توجه به اندازه متفاوت سلول‌ها از سوزن‌هایی با قطر ۶-۱۰ mµ استفاده شد. قبل از هر آزمون سوزن‌ها با ماده Sigma cote پوشش داده می‌شوند تا چسبندگی بین سلول و محیط داخلی سوزن پیپت حین مکش به حداقل برسد [۲۳]. در هر روز آزمون حداقل ۳۰ سلول مورد آزمایش قرار گرفته و تمامی آزمون‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد.



شکل۱. شماتیک آزمون مکش میکروپیپت جهت ارزیابی رفتار مکانیکی تک سلول معلق زنده، خط مشکی معرف μm ۱۰ است.

جهت ارزیابی خزش ویسکوالاستیک سلول‌ها ابتدا یک فشار اولیه به میزان Pa ۱۰ به سلول معلق در محیط کشت اعمال شده و یک دقیقه زمان داده می‌شود تا به حالت تعادل برسد (شکل ۲- الف). با اعمال این فشار اولیه به سلول‌ها قبل

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

از هر آزمایش، سلول توسط دهانه سوزن پیپت به گونه‌ای گرفته می‌شود که نه داخل پیپت مکیده شده و نه از آن فاصله بگیرد و با این کار از هر گونه نشتی میان دهانه پیپت و سلول در عبور محیط کشت به درون پیپت جلوگیری کرده و خطا در میزان فشار مکشی اعمالی به حداقل می‌رسد. سپس فشار مکشی بحرانی به گونه‌ای به سلول اعمال می‌شود که تصویر یک نیمکره در داخل سوزن پیپت شکل بگیرد (شکل ۲- ب). بعد از اعمال فشار مکشی بحرانی به سلول، طول مکیده شده داخل پیپت در این فشار ثابت طی ۳۰۰ ثانیه تا رسیدن به نقطه تعادل نهایی ثبت می‌شود (شکل ۲-ج). با استفاده از نرم‌افزار Axio vision میزان طول مکیده شده سلول داخل پیپت در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شده و بر حسب زمان رسم می‌شود. در این تحقیق از مدل جامد ویسکوالاستیک خطی استاندارد [۲۴،۲۳] جهت ارزیابی تمایل به خزش ویسکوالاستیک سلول‌ها در گروه‌های مختلف استفاده شده است این مدل متشکل از یک فنر با ثابت K1 است که با یک مجموعه سری فنر با ثابت K2 و یک ضربه‌گیر با ثابت μ موازی شده است. با این مدل‌سازی منحنی تمایل به خزش ویسکوالاستیک هر سلول بر حسب زمان و هندسه سوزن میکروپیپت مطابق معادله زیراست [۲۴]:

$$J(t)=\frac{e^{\frac{-t}{\tau}}}{k_1+k_2}+\frac{1}{k_1}[1-e^{\frac{-t}{\tau}}]$$

در روابط بالا k1 و k2 ضرایب فنرها، τ ثابت زمانی مدل است. با برازش معادله فوق از داده‌های آزمایشی منحنی تمایل به خزش ویسکوالاستیک هر سلول شکل می‌گیرد (شکل ۲- د).

جهت اندازه‌گیری مدول الاستیک موثر سلول‌ها بعد از اعمال فشار مکشی اولیه (۱۰ Pa) و گرفتن اولیه سلول توسط سوزن پیپت (شکل ۳-الف)، طی چند مرحله ازدیاد فشار پله‌ای سلول به درون پیپت مکیده می‌شود. یک دقیقه زمان بعد از هر مرحله ازدیاد فشار به سلول داده می‌شود و طول مکیده شده به درون پیپت برای هر ازدیاد در پایان این یک دقیقه اندازه‌گیری و ثبت می‌شود (شکل ۳- ب تا و).

با در نظر گرفتن تئوری الاستیسیته برای یک محیط پیوسته الاستیک ایزوتروپ و تراکم‌ناپذیر برای سلول میزان مدول یانگ موثر سلول بر اساس هندسه سوزن مطابق معادله زیر قابل اندازه‌گیری است [۲۴،۲۳]:

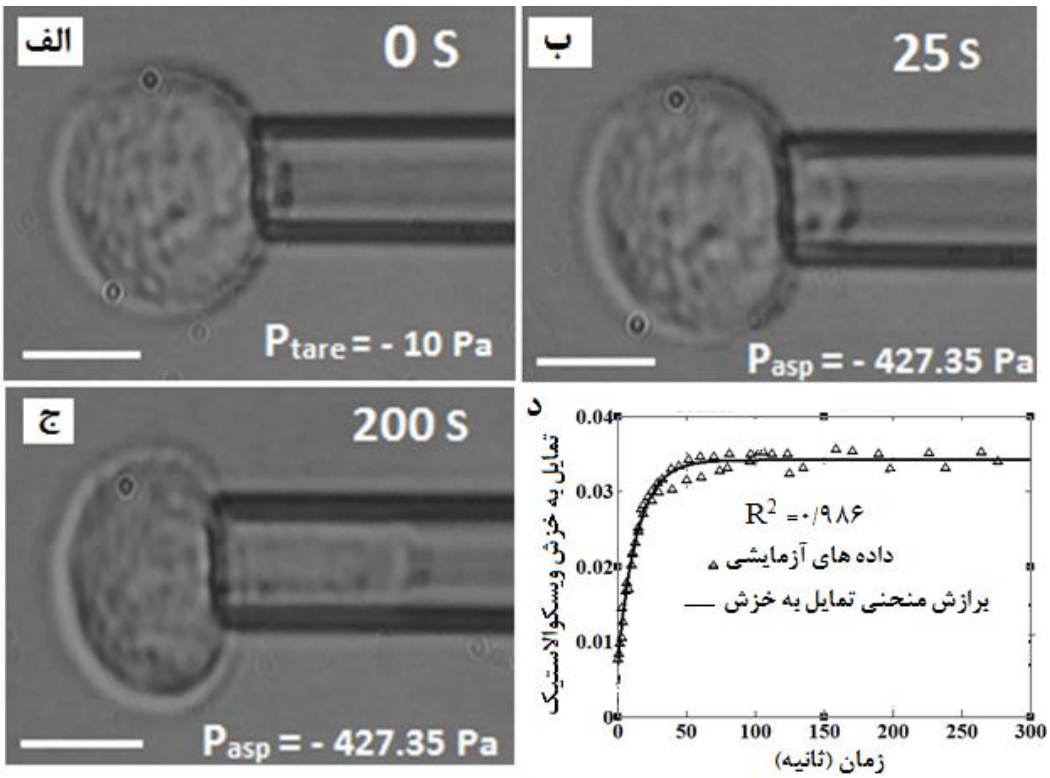
$$\Delta p= 2\pi L\varphi/3a\ E$$

که در آن a شعاع داخلی سوزن میکروپیپت، L میزان طول مکیده شده داخل پیپت و φ تابعی از هندسه سوزن میکروپیپت است. در این تحقیق بر اساس مدل پانچ [۲۵] φ برابر ۲ در نظر گرفته شد. با برازش خطی معادله فوق از داده‌های آزمایشی میزان مدول یانگ موثر سلول‌ها در هر گروه اندازه‌گیری می‌شود.

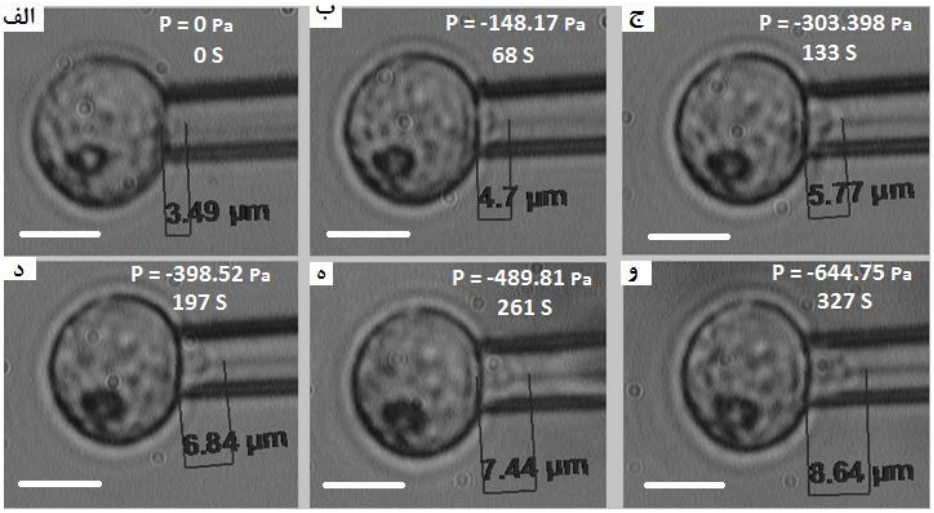
بررسی تمایز سلول‌ها. جهت بررسی تمایز در hMSCها، میزان کمی بیان مارکرهای تخصصی انقباضی ماهیچه عضله صاف پی‌گیری شد. با روش quantitative polymerase chain reaction (qPCR) در گروه‌های مختلف آزمایش بیان مارکرهای انقباضی از جمله مارکرهای SMMHC و ASMA به عنوان مارکرهای نشان‌دهنده تمایز به SMCها [۱۳،۱۰] ارزیابی شد. به این منظور در ابتدا کل RNAهای سلول‌ها توسط کیت‌های استخراج RNA مطابق دستورالعمل سازنده (Qiagen, USA) استخراج شده و سپس جهت استفاده PCR، تمامی cDNAها نیز توسط کیت‌های مخصوص (Qiagen, USA) سنتز شده‌اند. آنالیز کمی PCR توسط دستگاه ABI StepOne Real Time-PCR و با Master Mix SYBR® Green مطابق دستورالعمل سازنده (Applied Biosystems, USA) انجام گرفت.

تحلیل آماری. در روزهای آزمون در گروه‌های مختلف القای تمایز و کنترل، تمامی آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شدند و نتایج به‌صورت مقدار متوسط ± انحراف از معیار نمایش داده شده است. جهت مقایسه نتایج دو گروه از روش t-test استفاده شد. در هر تست مقدار p-values محاسبه شده و مقادیر p-values<۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنی‌دار آماری تعریف می‌شود.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]



شکل۲. آزمون مکش میکروپیپت در ارزیابی خزش ویسکوالاستیک hMSCها، (الف) اعمال فشار اولیه به سلول، (ب) افزایش فشار تا فشار بحرانی، شکل‌گیری تصویر نیمکره داخل سلول، (ج) افزایش طول مکیده شده داخل پیپت تا رسیدن به نقطه تعادلی جدید با فشار ثابت، هر خط سفید معرف μm ۱۰ است. (د) برازش منحنی تمایل به خزش ویسکوالاستیک از داده های آزمایشگاهی.



شکل۳. آزمون مکش میکروپیپت جهت اندازه‌گیری مدول الاستیک (E) hMSCها (الف) با اعمال فشار مکش اولیه ۱۰ پاسکالی سلول یک دقیقه زمان داده شده تا به تعادل برسد (ب- و) چند مرحله ازدیاد فشار به صورت پله ای و یک دقیقه زمان استراحت بین هر ازدیاد فشار، هر خط سفید معرف μm ۱۰ است.

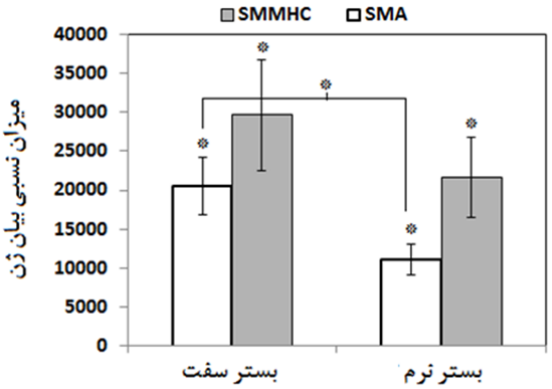
نتایج

بیان ژن‌های تخصصی انقباضی عضله صاف عروق

برای hMSCهای کشت داده شده بر هر دو بستر سفت و نرم در گروه‌های القای تمایز با فاکتور رشد شاهد افزایش معنی‌دار در میزان بیان ژن‌های تخصصی نشان‌دهنده تمایز به سلول‌های ماهیچه‌ای عضله صاف عروق (SMC) در قیاس با گروه‌های کنترل متناظر هستیم (شکل ۴). هم‌چنین مطابق شکل ۴، شاهد افزایش در سطح بیان ژن‌های انقباضی برای

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

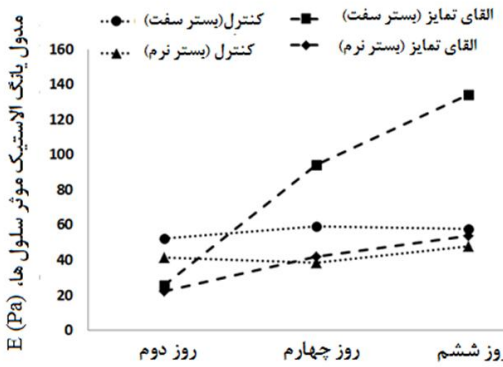
hMSCهای کشت داده شده بر بستر سفت در مقایسه با نمونه‌های کشت داده شده بر بستر نرم هستیم که از این میان تنها در سطح بیان ژن SMA که از مارکرهای ابتدایی پی‌گیری تمایز به سمت SMCهاست افزایش معنی‌دار آماری دیده می‌شود.



شکل ۴. بیان نسبی مارکرهای انقباضی و تخصصی در روز ششم کشت بر هر دو بستر نرم و سفت در گروه القای تمایز با فاکتور رشد $TGF\text{-}\beta_1$، میزان بیان ژن در هر گروه با میزان بیان ژن GAPDH در همان نمونه بی بعد شده و سپس سطح بیان ژن با گروه کنترل متناظر بی بعد شده است.

تاثیر سفتی بستر کشت بر مدول الاستیک موثر سلول‌ها. شکل (۵) روند تغییرات مدول الاستیک موثر hMSCها در روزهای دوم، چهارم و ششم کشت در هر چهار گروه را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است میزان مدول الاستیک موثر hMSCها در گروه‌های کنترل برای هر دو نوع بستر کشت در روزهای آزمون تقریباً بدون تغییر باقی می‌ماند این در حالی است که در روزهای آزمون مقدار مدول الاستیک hMSCها در گروه کنترل با بستر کشت سفت از گروه کنترل با بستر سیلیکونی نرم بیش‌تر است.

روند تغییرات مدول الاستیک موثر در گروه القای تمایز شیمیایی در هر دو نوع بستر کشت مشابه است به طوری که بعد از یک کاهش در روز دوم کشت شاهد یک روند صعودی در میزان مدول الاستیک متوسط hMSCها در روزهای چهارم و ششم هستیم. روند صعودی در مدول الاستیک موثر hMSCهای کشت داده شده بر بستر سیلیکونی نرم در مقایسه با گروه کنترل متناظر در هر روز آزمون بسیار کم‌تر از روند تغییرات در hMSCهای کشت داده شده بر بستر سفت (۶-Well plate) است به‌گونه‌ای که حتی در روز ششم آزمون که مقدار بیشینه مدول الاستیک را برای گروه‌های القای تمایز شاهدیم این مقدار برای hMSCهای کشت داده شده بر بستر سیلیکونی نرم کم‌تر از میزان مدول یانگ متوسط hMSCها کشت داده شده بر بستر سفت در گروه کنترل است.

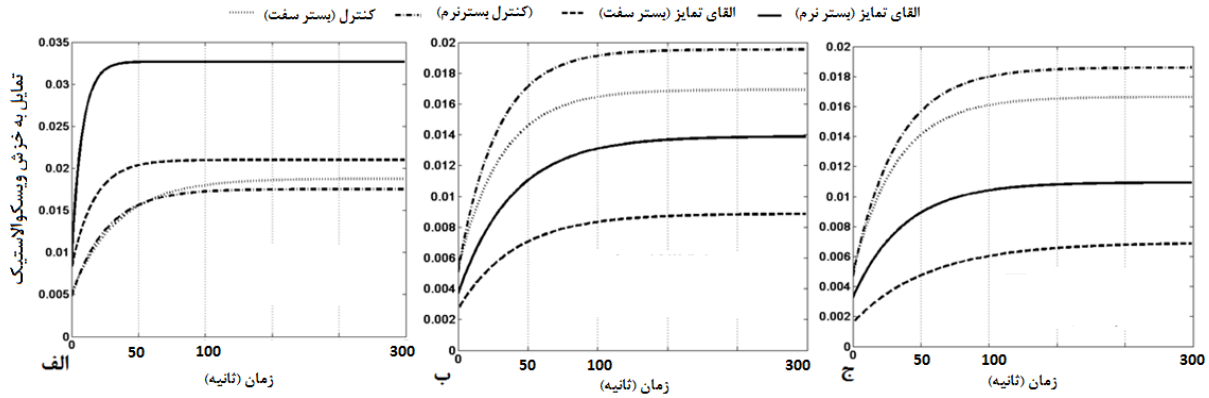


شکل ۵. تاثیر سفتی بستر کشت سلول بر مدول یانگ موثر hMSCهای کشت داده شده در گروه القای تمایز شیمیایی و گروه کنترل بر دو نوع بستر کشت سفت و نرم در روزهای آزمون

تاثیر سفتی بستر کشت بر تمایل به خزش ویسکوالاستیک سلول‌ها. سفتی بستر کشت سلول بر رفتار ویسکوالاستیک hMSCها از جمله منحنی تمایل به خزش ویسکوالاستیک سلول‌ها تاثیرگذار است. در شکل۶ تاثیر بستر کشت سلول بر منحنی تمایل به خزش ویسکوالاستیک در hMSCهای کشت داده شده بر دو بستر کشت در گروه القای تمایز شیمیایی و گروه کنترل در روزهای آزمون مقایسه شده است. همان‌طور که مشخص است منحنی تمایل به خزش سلول‌ها در گروه‌های کنترل در روزهای آزمون تقریباً مشابه است در حالی که در مقایسه میان دو گروه کنترل در هر یک از روزهای چهارم و ششم آزمون، شاهد بیش‌تر بودن این خاصیت ویسکوالاستیک در hMSCهای کشت داده شده بر بستر سیلیکونی نرم نسبت به میزان آن در نمونه کشت داده شده بر بستر سفت هستیم. در

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

روز دوم آزمون منحنی تمایل به خزش سلول‌ها در گروه کنترل تقریباً مشابه است اما در گروه‌های القای تمایز شاهد افزایش در خاصیت ویسکوالاستیک هستیم به گونه‌ای که در hMSCهای کشت داده شده بر بستر سیلیکونی نرم میزان افزایش به مراتب بیش‌تر از میزان آن در hMSCهای کشت داده شده بر بستر سفت است. با گذشت زمان کشت در روز چهارم و ششم آزمون در مقایسه با گروه‌های کنترل متناظر شاهد افت در منحنی تمایل به خزش سلول‌ها در گروه‌های القای تمایز هستیم که البته این میزان افت در hMSCهای کشت داده شده بر بستر سفت بیش‌تر از hMSCهای کشت داده شده بر بستر سیلیکونی نرم دیده می‌شود.



شکل ۶. تاثیر سفتی بستر کشت سلول بر منحنی خزش ویسکوالاستیک در گروه های القای تمایز و کنترل (الف) روز دوم آزمون، (ب) روز چهارم آزمون و (ج) روز ششم آزمون.

بحث و نتیجه‌گیری

سلول‌ها علاوه بر این‌که به تحریکات مکانیکی دینامیک اطراف خود حساس هستند به محیط مکانیکی استاتیک اطراف خود نظیر میزان سفتی ماتریس خارج سلولی از جمله بستر کشت سلول نیز حساسند [۲۶]. سفتی داربست کشت سلول در تنظیم رشد، مهاجرت و تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی تاثیرگذار است [۲۷]. در این تحقیق hMSCها در دو گروه کنترل و گروه القای تمایز با فاکتور رشد TGF-β1 در دو دسته با بسترهایی با سفتی‌های مختلف شامل غشاء سیلیکونی نرم با پوشش کلاژن نوع اول و همچنین Well plate-۶ آزمایشگاهی طی شش روز کشت داده شده و خواص الاستیک و ویسکوالاستیک آن‌ها در روزهای آزمون اندازه‌گیری شد.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که شرایط شیمیایی محیط کشت hMSCها در ترکیب با فاکتورهای مکانیکی استاتیکی (سفتی بستر کشت سلول) باعث شده تا hMSCها در فرایند تمایز خود به SMCها مسیرهای متفاوتی را از نظر روند تغییرات در رفتار مکانیکی سلول طی کنند. تغییرات در رفتار مکانیکی hMSCها در فرایند تمایز به SMCها از جمله تغییر مدول الاستیک متوسط و منحنی تمایل به خزش ویسکوالاستیک سلول‌ها نشان‌دهنده بازآرایی متفاوت در ساختار اسکلتی سلول‌ها در گروه‌های مختلف القای تمایز است. با توجه به نقش ساختار اسکلتی سلول در تنظیم و کنترل بسیاری از فعالیت‌های متابولیک سلول از جمله بیان ژن‌ها و سنتز پروتئین‌های خاص سلولی شاهد سطوح مختلف بیان ژن تخصصی انقباضی SMCها در گروه‌های مختلف القای تمایز هستیم. با توجه به عملکرد فیزیولوژیک SMCها که انقباض و حفظ استحکام در بافت دیواره رگ‌ها است، کارایی و عملکرد سلول ماهیچه‌ای عضله صاف مهندسی شده نه تنها نیازمند بیان ژن‌ها و سنتز پروتئین‌های مخصوص انقباضی است بلکه مستلزم داشتن خواص مکانیکی مناسب جهت فراهم کردن کارکرد مکانیکی بافت رگ است. از دستاوردهای

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

این تحقیق کمی کردن خواص مکانیکی الاستیک hMSCها در فرایند تمایز به SMCها در گروه‌های مختلف القای تمایز است. روش‌های مختلف القای تمایز باعث ایجاد خواص مکانیکی متفاوت در سلول‌های مهندسی شده می‌شود و لزوم تطبیق خواص مکانیکی سلول‌های مهندسی شده با رده خاص سلولی هدف ایجاب می‌کند تا با کنترل فرایند تمایز به سمت سلول‌های مهندسی شده کارامد در مهندسی بافت برویم.

به طور کلی در هر یک از گروه‌های کنترل و القای تمایز با فاکتور رشد TGF-β1 سلول‌های کشت داده شده بر بستر سفت در هر روز آزمون دارای مدول الاستیک متوسط بیش‌تری در مقایسه با نمونه‌های کشت داده شده بر بستر نرم‌تر هستند. در هر روز آزمون روند تغییرات مدول الاستیک متوسط hMSCها بر عکس روند تغییرات منحنی تمایل به خزش ویسکوالاستیک سلول‌ها است به گونه‌ای که با هر افزایش در میزان مدول الاستیک سلول‌ها در هر گروه شاهد افت در منحنی تمایل به خزش آن‌ها هستیم. اما میزان افزایش یا کاهش در ظرفیت خزش ویسکوالاستیک با سفتی بستر کشت ارتباط دارد به گونه‌ای که در hMSCهای کشت داده شده بر بستر سفت‌تر شاهد تمایل کم‌تری به ویسکوالاستیک بودن هستیم چرا که مطابق شکل‌های (۵) و (۶) در روز دوم آزمون در hMSCهای کشت داده شده بر بستر سیلیکونی سفت شاهد کاهش بیش‌تر در مدول الاستیک متوسط و افزایش کم‌تری در ظرفیت خزش ویسکوالاستیک سلول‌ها در مقایسه با نمونه‌های کشت داده شده بر بستر نرم هستیم. در حالی که با گذشت زمان کشت در روزهای چهارم و ششم آزمون با افزایش در میزان مدول الاستیک متوسط افت بیش‌تری در تمایل به خزش سلول‌های کشت داده شده بر بستر سفت در مقایسه با نمونه‌های کشت داده شده بر بستر نرم شاهد هستیم.

نتایج این تحقیق در درمان سلولی و پزشکی بازتولید (Regenerative Medicine)، هنگامی که کشت سلول بنیادی و القای تمایز به رده خاصی از سلول‌ها در خارج از بدن نیاز است کاربرد دارد. دانش ارتباط میان خواص مکانیکی با ژن‌های ساختار اسکلتی سلول باعث کنترل بیش‌تر فرایند تمایز شده و یک زمینه مناسب در حوزه مهندسی بافت سلول‌های بنیادی در راستای بهینه‌سازی شرایط کشت و استفاده موثر از محرک‌های فیزیکی خارجی از جمله خواص داربست کشت به عنوان مکانیزم تنظیم‌کننده تمایز به سلول‌های مهندسی شده کارآمد فراهم می‌کند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مربوط به طرح پژوهشی مصوب با شماره ۶۳۱۶ انجام شده است.

منابع

[1] Lim CT, Zhou EH, Quek ST. Mechanical models for living cells ـ a review. J Biomech 2006; 39: 195-216.

[2] Darling E, Topel M, Zauscher S, Vail T, Guilak F. Viscoelastic properties of human mesenchymally-derived stem cells and primary osteoblasts, chondrocytes, and adipocyte. J Biomech 2008; 41: 454-464.

[3] Gonzalez-Cruz RD, Fonseca VC, Darling EM. Cellular mechanical properties reflect the differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109: 1523-1529.

[4] McBeath R, Pirone D, Nelson C, Bhadiraju K. Chen C. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. Dev Cell 2004; 6: 483-495.

[5] Settleman J. Tension proceeds commitment-even for a stem cell. Mol Cell 2004; 14: 148-150.

[6] Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, et al. In vivo cardiovasculogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 2003; 288: 51-59.

[7] Kurpinski K, Park J, Thakar RG, Li S. Regulation of vascular smooth muscle cells and mesenchymal stem cells by mechanical strain. Mol Cell Biomech 2006; 3: 21-34.

[8] Park JS, Chu JS, Cheng C, Chen F, Chen D, Li S. Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. Biotechnol Bioeng 2004; 88: 359-368.

[9] Mangi A, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall J, Dzau V. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. Nat Med 2003; 9: 1195-1201.

[10] Cortesini R. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation. Transpl Immunol 2005; 15: 81-89.

[11] Griensven M, Diederichs S, Kasper C. Mechanical strain of bone marrow stromal cells induces proliferation and differentiation into osteoblast-like cells. Top Tissue Engin 2005; 2: 2-20.

[12] McGarry J, Murphy B, McHugh P. Computational mechanics modeling of cell substrate contact during cyclic substrate deformation. J Mech Phys Solids 2005; 53: 2597-2637.

[13] Thakar RG, Ho F, Ngan NF, Liepmann D, Li S. Regulation of vascular smooth muscle cells by

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

micropatterning. Biochem Biophys Res Commun 2003; 307: 883-890.

[14] Oishi K, Ogawa Y, Gamoh S, Uchida MK. Contractile responses of smooth muscle cells differentiated from rat neural stem cells. J Physiol 2002; 540: 139-152.

[15] Owens G. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. Physiol Rev 1995: 75: 487-517.

[16] Titushkin I, Cho M. Modulation of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J Biophys 2007; 93: 3693-3702.

[17] Ingber D. Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. Ann Med 2003; 35: 564-577.

[18] Rodríguez JP, González M, Ríos S, Cambiazo V. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. J Cell Biochem 2004; 93: 721-731.

[19] Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. FASEB J 2006; 20: 811-827.

[20] Wang D, Li S. Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor beta1 stimulation. J Biol Chem 2004; 279: 43725-43734.

[21] Kurpinski K, Chu J, Wang D, Li S. Proteomic profiling of mesenchymal stem cells responses to mechanical strain and TGF-β1. Cell Mol Bioeng 2009; 2: 606-614.

[22] Narita Y, Yamawaki A, Kagami H. Effects of transforming growth factor-beta1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. Cell Tissue Res 2008; 333: 449-459.

[23] Khani M, Tafazzoli-Shadpour M, Rostami M, Peirovi H, Janmaleki M. Evaluation of mechanical properties of human mesenchymal stem cells during differentiation to smooth muscle cells. Annals Biomed Eng 2014; 42: 1373-1380.

[24] Khani M, Tafazzoli-Shadpourb M, Goli-Malekabadi Z, Haghighipour N. Mechanical characterization of human mesenchymal stem cells subjected to cyclic uniaxial strain and TGF-β1. J Mech Behav Biomed Mater 2015; 43: 18-25.

[25] Theret DP, Levesque MJ, Sato M, Nerem RM, Wheeler LT. The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell micropipette measurements. J Biomech Eng 1988; 110: 190-199.

[26] Park JS, Huang NF, Kurpinski KT, Patel S, Hsu S, Li S. Mechanobiology of mesenchymal stem cells and their use in cardiovascular repair. Front Biosci 2007; 12: 5098-5116.

[27] Discher D. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell 2006; 126: 677-689.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

Substrate stiffness effect on mechanical behavior of mesenchymal stem cells during differentiation to smooth muscle cells

Mohammad-Mehdi Khani (Ph.D) [*1], Mohammad Tafazzoli-Shadpour (Ph.D) [2]
1 - Department of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 - Cardiovascular Engineering Lab, Faculty of Biomedical Engineering ,Amir kabir University of Technology (Tehran Polytechnic), Tehran, Iran

(Received: 16 Aug 2015 ; Accepted: 7 Sep 2015)

Introduction: Human mesenchymal stem cells (hMSCs) have shown a great potential in the field of regenerative medicine as well as vascular tissue engineering. Mechanical properties of the cell substrate provides an environment that influences physiological activity of cells such as proliferation, differentiation and cell cytoskeleton developments and consequently modulates functionality of in vitro engineered cells.

Materials and Methods: hMSCs were cultured under two groups of control and growth factor-induced differentiation within two types of substrates with different stiffness. We used Micropipette aspiration technique to evaluate mechanical behavior of cultured cells (effective Young's modulus (E) and creep compliance value) during their differentiation into smooth muscle cells phenotype.

Results: hMSC with growth factor-induced differentiation showed significant decrease in E value in relation to both substrates in compare to control group, within 2 days of cell culture, whereas the creep compliance of these cells sharply increased. Consequently, by increasing the cultivation time to 4 to 6 days, the E values of induced-differentiation cells significantly increased in compare to control samples, with a decrease in the creep compliance of these cells. Furthermore, the state of increase or decrease in creep compliance was depended on substrate stiffness in which the cells were seeded on. Cells cultured on soft substrates showed high tendency for preserving their viscoelastic properties.

Discussion: Our results provides groundwork for stem cell-based tissue engineering in order to optimize culture conditions due to effective usage of external physical cues as well as substrate properties as the regulatory mechanisms of differentiation to functional target cells.

Key words: Tissue engineering, Stem cells, Cell differentiation, Mechanics cell

* Corresponding author. Fax: +98 21 82884507 Tel: +98 21 22439848
khani@sbmu.ac.ir

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]