

تأثیر کرنش سیکلی تک‌محوره بر مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمال حین تمایز به سلول‌های عضله صاف عروق

ندا رشیدی^۱ (M.Sc)، محمد تفضلی شادپور^۱ (Ph.D)، نوشین حقیقی‌پور^۲ (Ph.D)، محمدمهدی خانی^۳ (Ph.D)، حکیمه زالی^۴ (Ph.D)

۱- گروه بیومکانیک، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر (پلی‌تکنیک تهران)

۲- بانک سلولی انستیتو پاستور ایران

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

۴- مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌ها و بافت‌ها در بدن دائماً در معرض اشکال مختلفی از نیروهای مکانیکی هستند که برای کارکرد طبیعی‌شان ضروری است. دیواره‌ی عروق در معرض کرنش‌های محیطی ناشی از پالس فشاری است. تنظیم فنوتیپ و کارکرد سلول‌های عضله صاف عروقی متأثر از عوامل شیمیایی و محیط مکانیکی سلول‌ها است. تحریکات مناسب مکانیکی و شیمیایی باعث تمایز کارآمد سلول‌های بنیادی به سلول‌های هدف از جمله عضله صاف شده و پتانسیل زیادی برای به‌کارگیری در درمان سلولی و مهندسی بافت دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات کرنش سیکلی تک‌محوره کوتاه‌مدت بر مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمال خرگوشی مشتق از چربی است. مواد و روش‌ها: با بیوراکتور ساخته شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمال تحت کرنش ۵٪ در فرکانس ۱ هرتز به مدت ۴ و ۸ و ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بیان ژن‌های انقباضی عضله صاف به صورت کمی بررسی گردید. قبل و بعد از آزمایش‌ها، تصاویر سلولی گرفته شده و تصاویر جهت ارزیابی پارامترهای مورفولوژیکی پردازش شده‌اند. یافته‌ها: کرنش سیکلی سبب شده تا سلول‌ها در جهتی که بدنه‌ی سلولی کم‌ترین نیروی ممکن را حس کند، جهت‌گیری کنند. با ۲۴ ساعت بارگذاری شاهد افزایش بیان ژن‌های انقباضی تا ۲ برابر هستیم. اعمال کرنش سیکلی سبب تغییر در پارامترهای مورفولوژیک نظیر کاهش شاخص شکل سلول (CSI) تا ۴۱٪ و افزایش شاخص کشیدگی سلول (AR) تا ۴۵٪ پس از ۲۴ ساعت تحریک مکانیکی نسبت به نمونه کنترل گردید. نتیجه‌گیری: کرنش سیکلی تک‌محوره آشکارا باعث کشیده‌تر شدن سلول‌ها و نزدیک‌شدن به مورفولوژی دوکی شکل سلول‌های عضله صاف عروقی می‌شود. نتایج می‌توانند در مهندسی بافت شریانی در دستیابی به سلول‌های عضله صاف با کارکرد مناسب به کار گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمال، کرنش سیکلی، تمایز، مورفولوژی، سلول عضله صاف

مقدمه

کارکرد فیزیولوژیک و توسعه آن‌ها ضروری است. با توجه به طبیعت پالسی فشار و جریان خون، دیواره‌ی عروق به‌طور مداوم در معرض تنش‌های مکانیکی از جمله فشار، کشش و

سلول‌ها و بافت‌های حیاتی به صورت دائمی در معرض اشکال مختلفی از نیروهای مکانیکی هستند که برای بقای

برش هستند. در حالی که سلول‌های اندوتلیال عروقی در معرض برش هستند، سلول‌های عضله صاف عروق در معرض کرنش مکانیکی قابل توجه در جهت محیطی در طول چرخه قلبی قرار دارند [۱]. این تنش‌های مکانیکی، عمل‌کرد فیزیولوژیک این سلول‌ها را با سهم بودن در تنظیم رشد و فنوتیپشان تحت تاثیر قرار می‌دهند. سلول‌های عضله صاف عروق، لایه‌ی مدبای رگ‌های خونی را مفروش می‌سازند و نقش مهمی در کنترل وازواکتیویته و بازسازی دیواره‌ی عروقی دارند [۲]. این سلول‌ها توسط سطوح بالای بیان مارکرهای پروتئین انقباضی نظیر α -smooth muscle actin (α -SMA)، caldesmon، h1-calponin و smooth muscle myosin-heavy chin شناسایی می‌شوند [۳-۵]. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که فنوتیپ و عمل‌کرد سلول‌های عضله صاف عروقی توسط عوامل شیمیایی مانند $TGF-\beta$ و عوامل مکانیکی نظیر کرنش سیکلی تنظیم می‌گردد [۶-۸]. هم‌چنین در غیاب تحریک مکانیکی، این سلول‌ها از فنوتیپ انقباضی به فنوتیپ تکثیری تغییر می‌یابند [۹]. این مطالب اهمیت محیط مکانیکی فیزیولوژیک را در کارکرد اصلی سلول‌های عضله صاف عروق که همان انقباض و حفظ استحکام مکانیکی بافت است، نشان می‌دهند.

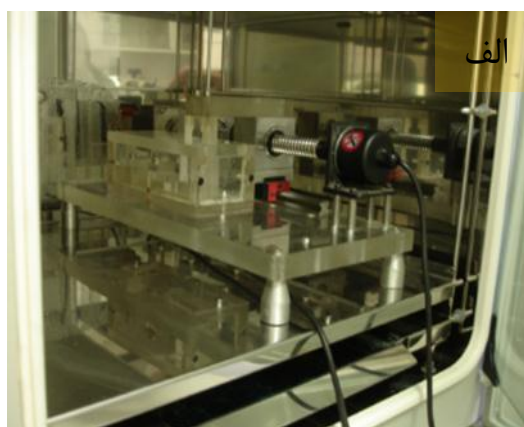
با توجه به خصوصیات منحصر به فرد سلول‌های بنیادی مزانشیمال از جمله داشتن حداقل پاسخ‌های ایمنی، توانایی تولید سلول‌های نظیر خود و قابلیت تمایز به انواع سلول‌ها باعث شده تا این سلول‌ها کارایی قابل توجهی در ترمیم و یا ساخت اکثر بافت‌ها در خارج از بدن از جمله بافت دیواره‌ی رگ‌ها و القای تمایز به سلول‌های عضله صاف عروق از خود نشان دهند. به دلیل اهمیت کارکرد انقباضی و حفظ استحکام بافت در کارکرد طبیعی رگ‌ها، در ساخت رگ‌های مصنوعی برای درمان بیماری‌های قلبی و عروقی، مکانوبیولوژی سلول‌های مزانشیمال و کارایی آن‌ها در ترمیم بافت قلب و عروق کاربرد زیادی پیدا کرده است. سلول‌های بنیادی به محیط فیزیکی و شیمیایی اطراف خود حساس هستند. پاسخ سلولی به محیط مکانیکی - شیمیایی اطراف با تغییرات در

مورفولوژی و جهت‌گیری سلولی و نیز جهت‌گیری فیبرهای تنشی سلول و بازآرایی ساختار اسکلتی سلول همراه است [۱۰-۱۲].

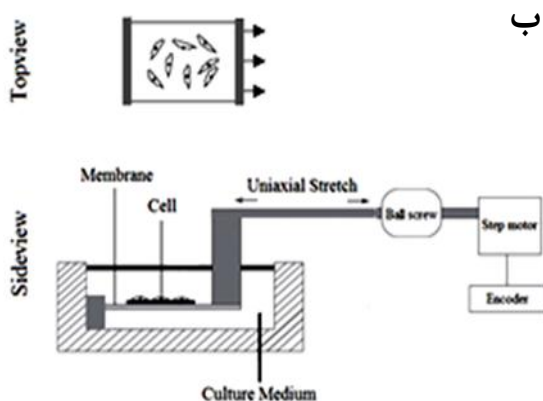
در مطالعات دو دهه‌ی گذشته به‌خوبی نشان داده شده است که تنظیم فنوتیپ و کارکرد سلول‌های عضله صاف عروقی نه تنها توسط عوامل شیمیایی مانند $TGF-\beta$ صورت می‌پذیرد، بلکه حضور عوامل مکانیکی نظیر کرنش تک‌محوره نیز ضرورت دارد. در سال ۲۰۰۴ برای اولین بار پارک و همکاران تاثیر محیط مکانیکی عروقی را بر سلول‌های بنیادی کشت داده شده بر روی غشای سیلیکونی بررسی کردند. این گروه به مطالعه‌ی تاثیر اعمال کرنش‌های مکانیکی سیکلی تک‌محوره و دومحوره در بیان ژن‌های مخصوص سلول‌های عضله صاف پرداختند و نشان دادند که کرنش مکانیکی بیان ژن را در سلول‌های بنیادی تحت تاثیر قرار می‌دهد و مودهای مختلف این کرنش، پاسخ‌های متفاوتی را سبب می‌شود [۱۳]. پس از آن در مطالعات مختلفی نشان داده شد که کرنش سیکلی تک‌محوره موجب افزایش بیان ژن‌های اختصاصی عضله صاف می‌گردد [۲۱-۱۴]. در این تحقیق نیز این نوع تحریک مکانیکی جهت القای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول عضله صاف مناسب در نظر گرفته شده است.

در یک مطالعه برون‌تنی، بررسی اثر کرنش سیکلی تک‌محوره بر تکثیر سلولی و تمایز به سمت سلول عضله صاف با پی‌گیری بیان ژن α -SMA با استفاده از روش ایمنوسیتوشیمی و هم‌چنین بازآرایی ساختار رشته‌های اکتین با تحلیل فرکتال انجام شد [۹]. در تحقیقی دیگر، اثر دامنه و تعداد سیکل‌های بارگذاری بر مورفولوژی سلول‌های بنیادی با تحلیل فرکتال و با استفاده از کدهای طراحی شده پردازش تصاویر، بررسی گردیده است [۱۵]. هم‌چنین اثر بارگذاری سیکلی تک‌محوره در افزایش خواص ساختاری سلول‌های بنیادی مزانشیمال و تمایز به سلول‌های عضله صاف عروق ارزیابی شده است [۲۲]. نتایج کاهش پیچیدگی در تصاویر سلولی و افزایش نظم سلولی را پس از اعمال تحریک مکانیکی نشان دادند. هم‌چنین جهت‌گیری و ضخیم‌شدن

به منظور افزایش رطوبت دوستی سطح غشا از فرآیند اکسیژن پلاسما استفاده شد. فرآیند اکسیژن پلاسما به مدت ۱ دقیقه با دستگاه اکسیژن پلاسما، ساخته شده در دانشکده مهندسی پزشکی دانشگاه صنعتی امیرکبیر، با فرکانس ۲/۴۵ GHz و فشارکاری ۰/۷ mbar، توان ۶۰۰ وات و دبی اکسیژن ۷۰ sccm به مدت ۹۰ ثانیه با سیکل کاری ۳۰٪ انجام گردید. پس از شمارش و انتقال سوسپانسیون سلولی بر روی غشا، ۲۴ ساعت به سلول‌ها فرصت داده شد تا چسبندگی مناسب با سطح ایجاد گردد (زمان صفر در آزمایش). در تمام گروه‌های آزمایشی تا اتمام آزمایش‌های تحریک مکانیکی از زمان صفر، ۴۸ ساعت زمان صرف گردید (شکل ۱ ب).



الف



ب

شکل ۱. الف) تصویر تجهیز اعمال بار کرنش سیکلی تک محوره داخل انکوباتور. ب) شماتیک دستگاه، نمای بالا و مقابل

سلول‌های بنیادین پس از ۴۸ ساعت کشت بر روی غشای سیلیکونی را نشان می‌دهد. برای انجام آزمایش‌های تحریک مکانیکی از بیوراکتور موجود در بانک سلولی

رشته‌های اکتین و تشکیل فیبرهای تنشی در اثر اعمال بارگذاری مشاهده شد [۲۲، ۱۵].

مطالعات قبلی اثرات بارگذاری بلندمدت را بررسی کردند. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر کرنش مکانیکی تک‌محوره سیکلی کوتاه‌مدت بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از چربی بر تغییرات مورفولوژی سلول‌ها در مسیر تمایز به سمت رده‌ی سلولی عضله است. سلول‌های بنیادی در دو گروه مختلف القای تمایز مکانیکی و گروه کنترل تقسیم‌بندی شده و تغییرات پارامترهای مورفولوژیک شاخص شکل سلول (CSI) و شاخص کشیدگی سلول (AR) پیش و پس از اعمال تحریک مکانیکی مقایسه گردیده است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و اعمال بارگذاری سیکلی. در این تحقیق سلول مورد استفاده، سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از چربی خرگوشی است. این سلول‌ها از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. طراحی آزمایش‌ها به این گونه بوده است که این سلول‌ها در گروه کنترل و گروه‌های مختلف تحریک مکانیکی ۰،۴ و ۸، ۲۴ ساعت تقسیم‌بندی شدند. سلول‌های بنیادی موجود تا پاساژ ۳ کشت داده شده و سپس برای انجام آزمایش‌های تحریک مکانیکی استفاده شدند. از محیط کشت DMEM/ Ham's F12 (1:1) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ پنسیلین/استرپتومایسین به‌عنوان محیط کشت پایه برای کشت و تکثیر این سلول‌ها استفاده شد. سلول‌ها در تمامی گروه‌های آزمایشی در داخل دستگاه انکوباتور در دمای ۳۷ °C با رطوبت ۹۰٪ و حضور ۵٪ گاز CO₂ نگهداری می‌کردند.

برای انجام آزمایش‌های تحریک مکانیکی، پس از پاساژ سلول‌های موجود در فلاسک کشت سلولی و تهیه سوسپانسیون سلولی، سلول‌ها بر روی غشای سیلیکونی کشت داده شدند (شکل ۱ الف). به‌منظور ایجاد چسبندگی بهتر سلول‌ها بر روی غشای سیلیکونی از پوشش کلاژنی نوع ۱ استفاده شد. هم‌چنین قبل از انتقال محلول کلاژن بر روی غشا

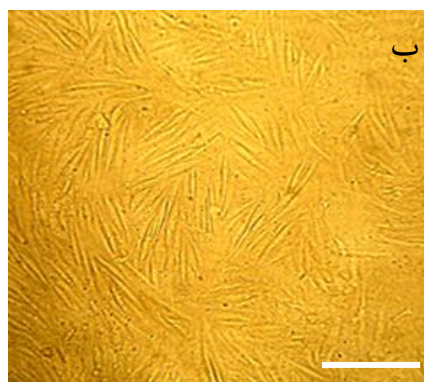
است. جدول ۱ توالی پرایمرهای طراحی شده را نمایش می‌دهد. برای انجام آزمون، ابتدا RNAهای سلول‌ها توسط کیت استخراج RNA مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (QIAGEN) استخراج گردیده و سپس جهت استفاده PCR، تمامی cDNAها نیز توسط کیت‌های مخصوص سنتز cDNA (شرکت TaKaRa) سنتز شده‌اند. آنالیز کمی PCR توسط دستگاه ABI StepOne Real Time-PCR و با SYBR Green Master Mix مطابق دستورالعمل سازنده (Applied Biosystem, USA) انجام گرفت.

تصویرگیری و پردازش تصاویر سلول‌ها. برای بررسی اثر تحریک‌های مکانیکی بر مورفولوژی سلول‌های بنیادی، تصاویر سلولی در گروه‌های آزمون و کنترل و بعد از انجام هر یک از آزمایش‌های القای تمایز، در نواحی مختلف گرفته شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار پردازش تصاویر پارامترهای مورفولوژیک کمی‌سازی گردیدند. همه تصاویر سلولی با استفاده از میکروسکوپ نوری وارون و دوربین دیجیتال با رزولوشن ۳ مگاپیکسل تهیه شد. با انتقال تصاویر به نرم‌افزار پردازش تصاویر ImageJ پارامترهای مورفولوژیک مورد نظر نظیر شاخص شکل سلول (CSI) و شاخص کشیدگی سلول (AR) را به دست آمدند. یکی از پارامترهای مهم در اندازه‌گیری‌های مورفولوژیک سلولی، شاخص شکل سلول (CSI) است که از رابطه‌ی زیر به دست می‌آید. مقدار پارامتر به دست آمده از محاسبات در محدوده‌ی صفر تا یک است. در حقیقت، با نزدیک شدن مقدار این پارامتر به صفر، سلول به مورفولوژی خطی و کشیده نزدیک می‌شود. با نزدیک شدن CSI به ۱، سلول پهن شده و به شکل دایروی نزدیک می‌شود [۲۳-۲۵].

$$CSI=4\pi SP^2$$

در این رابطه S مساحت سلول و P محیط سلول است. پارامتر مهم دیگر در تحلیل‌های مورفولوژیک سلولی، شاخص کشیدگی سلول (AR) است. این پارامتر در حقیقت نسبت قطر بزرگ به قطر کوچک در بیضی برآزش شده به شکل سلولی است و افزایش آن بیانگر کشیده‌تر شدن شکل موجود است

انستیتوپاستور ایران استفاده گردید (شکل ۲) و کرنش سیکلی تک‌محوره ۵٪ در فرکانس ۱ Hz به مدت ۴، ۸ و ۲۴ ساعت اعمال گردید.



شکل ۲. الف) سوسپانسیون سلولی بر روی غشای سیلیکونی (ب) تصویر میکروسکوپی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از جری خروگوشی پس از ۴۸ ساعت کشت بر روی غشای سیلیکونی. خط سفید نشانگر ۵۰ μm است.

طراحی پرایرها و انجام آزمون qPCR. جهت بررسی تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمال خروگوشی در گروه‌های کنترل و تحریک مکانیکی از روش qPCR استفاده شد. به این منظور بیان مارکرهای انقباضی عضله صاف از جمله αSMA و SM22α به عنوان مارکرهای نشان‌دهنده مراحل اولیه تمایز به سلول عضله صاف مورد توجه قرار گرفت. برای ارزیابی میزان بیان ژن‌ها توسط آزمون qPCR، ابتدا پرایمرهای مناسب هر ژن طراحی شد. پرایمرهای مورد نظر برای ژن‌های عضله صاف خروگوشی با استفاده از نرم‌افزارهای Primer Express (Ver.4)، Gene Runner (Ver.3)، Beacon Designer (online use) طراحی گردیده و در نهایت کارآیی آن‌ها به روش Blast با استفاده از سایت NCBI مورد تأیید قرار گرفته

نتایج به صورت مقدار متوسط \pm انحراف از معیار نشان داده شده است. جهت مقایسه نتایج دو گروه از روش t-test استفاده شد به این ترتیب در هر آزمون مقدار P-Values محاسبه شده و مقادیر $P-Values < 0.05$ به عنوان تفاوت معنی دار آماری تعریف می شود.

[۲۶]. برای به دست آوردن پارامترهای مورفولوژیک سلول از حداقل ۴۰ سلول در ۳ ناحیه مختلف غشای سیلیکونی تصویربرداری شد. تحلیل آماری. در گروه های کنترل و تحریک مکانیکی، تمامی آزمایش های انجام شده حداقل ۳ بار تکرار شدند و

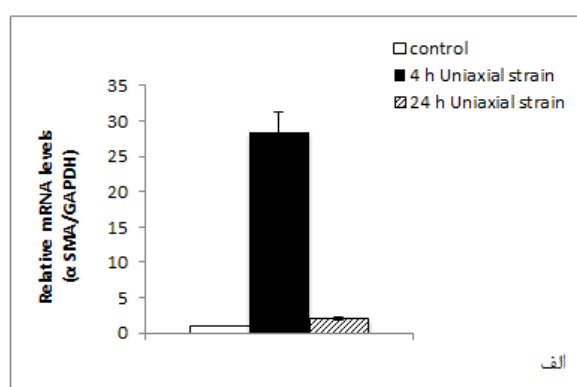
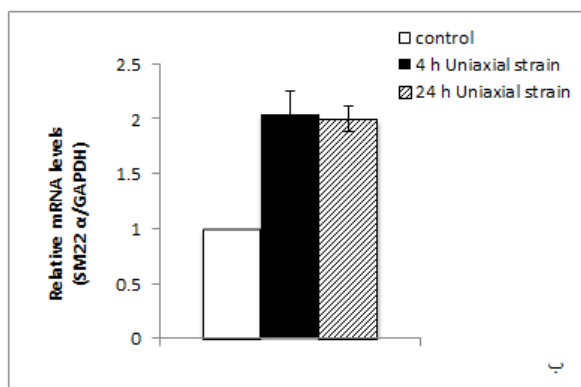
جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده

اندازه و باند (bp)	توالی پرایمر	پرایمر	نام ژن
196	GTTGCTGTCCCGTTC	Forward	GAPDH
	CGACAACATCCACTTTGCCA	Reverse	
165	GCACCACTCCTTCTACAATGA	Forward	SMA α
	GACAGCACCGCCTGAATAG	Reverse	
218	ACAAGCGGGAGTTCACAGAG	Forward	SM22 α
	GATACAGGTGTGGGTGAGGC	Reverse	

می رسد. پس از آن در ۲۴ ساعت بارگذاری بیان این ژن نسبت به نمونه ی ۴ ساعت بارگذاری کاهش یافته و به حدود ۲ برابر نمونه کنترل رسیده است. هم چنین مطابق شکل ۳ ب سطح بیان ژن SM22 α در هر دو گروه تحریک مکانیکی ۴ و ۲۴ ساعته با افزایش تقریباً ۲ برابری نسبت به نمونه کنترل مواجه شده است.

نتایج

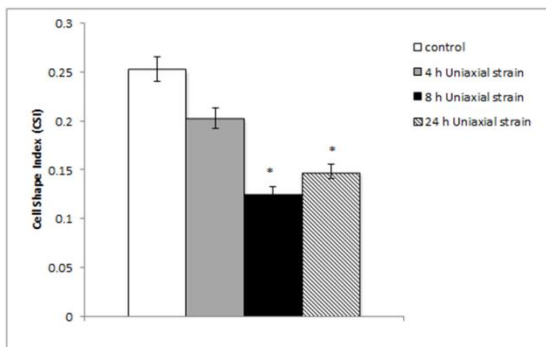
نتایج بررسی تمایز سلول های بنیادی به سلول های ماهیچه ای عضله صاف در گروه های مختلف کنترل و تحریک مکانیکی در شکل ۳ ارائه شده است. همان طور که در شکل ۳ (الف) دیده می شود، ژن α -SMA نسبت به اعمال تحریک مکانیکی بسیار حساس بوده و در ۴ ساعت بارگذاری افزایش چشمگیری داشته و به حدود ۲۸/۵ برابر نمونه ی کنترل



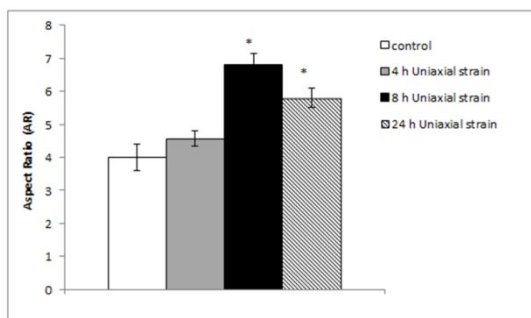
شکل ۳. نتایج آنالیز کمی میزان بیان مارکرهای تخصصی انقباضی سلول های عضله صاف در سلول های بنیادی مزانشیمال کشت داده شده بر غشای سیلیکونی با پوشش کلاژن نوع ۱ در گروه های کنترل، القای تمایز مکانیکی ۴ و ۲۴ ساعت اعمال کرنش تک محوری. (الف) ژن α -SMA (ب) ژن SM22 α . میزان کمی بیان هر ژن با میزان بیان ژن GAPDH در همان نمونه نرمالیزه شده و سپس میزان بیان نسبی هر ژن با تقسیم بر میزان بیان همان ژن در نمونه کنترل نمایش داده شده است.

تعداد سیکل‌های بارگذاری بیش‌تر گردید. شکل ۵ تغییرات شاخص شکل سلول را بر اساس مدت زمان بارگذاری در مقایسه با نمونه کنترلی نشان می‌دهد. با استفاده از آزمون T-Test هر کدام از نمونه‌های آزمایشی با نمونه کنترلی مقایسه شده و در تمامی نمونه‌ها به جز نمونه ۴ ساعت تحریک مکانیکی، افزایش معنادار شاخص شکل سلول نسبت به نمونه کنترل مشاهده شد ($P < 0.05$).

شاخص کشیدگی سلول در اثر اعمال بارگذاری افزایش یافت و این افزایش با بالا رفتن تعداد سیکل‌های بارگذاری بیش‌تر شد. در شکل ۶ تغییرات شاخص کشیدگی سلول در این مدت زمان‌های اعمال بار نشان داده شده است. با استفاده از آزمون T-Test، هر کدام از نمونه‌های آزمایشی با نمونه کنترلی مقایسه شده و در تمامی نمونه‌ها به جز نمونه ۴ ساعت تحریک مکانیکی کاهش معنادار شاخص شکل سلول نسبت به نمونه کنترل مشاهده شد ($P < 0.05$).

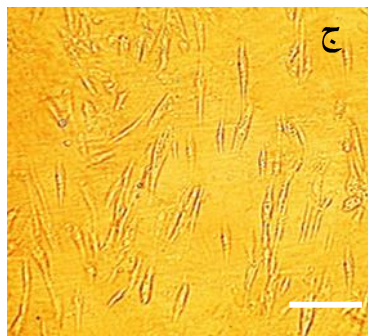
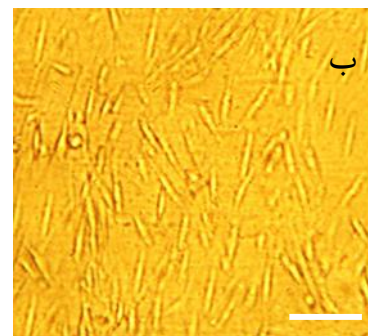


شکل ۵. تغییرات شاخص شکل سلولی (CSI) در مسیر القای تمایز مکانیکی با شرایط کرنش تک‌محوره با دامنه ۵٪ و فرکانس ۰.۸ Hz.* تفاوت معنادار آماری).



شکل ۶. تغییرات شاخص کشیدگی سلول (AR) در مسیر القای تمایز مکانیکی با شرایط کرنش تک‌محوره با دامنه ۵٪ و فرکانس ۰.۸ Hz.* تفاوت معنادار آماری).

تحلیل توپولوژیکی تصاویر سلولی قبل و بعد از آزمایش نشان‌دهنده تغییرات مشهود مورفولوژی سلول‌ها پس از بارگذاری است. همچنین جهت‌گیری سلولی در اثر اعمال تحریک مکانیکی ایجاد شده است، به گونه‌ای که با افزایش ساعات بارگذاری، جهت‌گیری سلولی افزایش یافته و پس از ۲۴ ساعت بارگذاری جهت‌گیری سلول‌ها به راستای عمود بر محور کرنش سیکلی نزدیک می‌شود. شکل ۴ تصویر میکروسکوپی سلول‌ها را پیش و پس از اعمال تحریکات مکانیکی نشان می‌دهد.



شکل ۴. تصویر میکروسکوپی از تغییر مورفولوژی و جهت‌گیری سلول‌های بنیادی. (الف) نمونه کنترلی (ب) نمونه تحت ۸ ساعت تحریک مکانیکی (ج) نمونه ۲۴ ساعت تحت تحریک مکانیکی. کرنش تک‌محوری در راستای افقی با فرکانس ۱ Hz و دامنه ۵٪ است. هر خط سفید نشانگر ۵۰ μm است.

کرنش سیکلی تک‌محوره پارامترهای مورفولوژیکی سلول‌ها را دست‌خوش تغییرات کرد. شاخص شکل سلول در اثر اعمال بارگذاری کاهش یافت و این کاهش با بالا رفتن

بحث و نتیجه گیری

هدف مطالعه‌ی حاضر بررسی تاثیر کرنش مکانیکی تک‌محوره سیکلی کوتاه‌مدت بر تمایز و مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیم مشتق از چربی خرگوشی به سمت سلول عضله صاف بوده است. با استفاده از روش qPCR و بررسی بیان ژن‌های اختصاصی انقباضی سلول‌های عضله صاف α -SMA و α SM22، نشان داده شد که کرنش تک‌محوره‌ی سیکلی به‌تنهایی با افزایش بیان این ژن‌ها می‌تواند باعث القای تمایز در سلول‌های بنیادی به سمت سلول عضله صاف گردد. همچنین نشان داده شد که مورفولوژی سلول‌ها تحت تحریک‌های مکانیکی مختلف دست‌خوش تغییر می‌شود. پردازش تصاویر میکروسکوپی کاهش شاخص شکل سلول و نیز افزایش شاخص کشیدگی سلولی را در اثر اعمال کرنش‌های تک‌محوره سیکلی نشان دادند که هر دوی این تغییرات مورفولوژیک موید کشیده‌تر شدن سلول‌ها و نزدیک شدن سلول به مورفولوژی دوکی شکل سلول‌های عضله صاف عروقی است.

کلید درک تمایز سلول‌های عضله صاف، شناسایی سیگنال‌های محیطی کلیدی و عواملی است که موجب القای تمایز یا حفظ حالت تمایز یافته‌ی این سلول‌ها می‌شود. همچنین شناسایی مکانیزم‌های مولکولی که بیان ژن‌های اختصاصی که برای عمل‌کرد انقباضی آن‌ها لازم است را کنترل می‌نمایند [۷]. نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیم مشتق از چربی می‌توانند به انواع سلول‌ها تمایز یابند و دارای پتانسیل زیاد به‌عنوان یک منبع سلولی برای مهندسی بافت و پزشکی باز تولید هستند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیم در کشت طولانی‌مدت توانایی تمایز به سلول‌های عضله صاف را دارند. تاثیرات محیط مکانیکی عروقی بر سلول‌های بنیادی مزانشیم در سال‌های اخیر مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج بیانگر تاثیر محیط مکانیکی بر تمایز و تکثیر سلولی بوده است [۲۷، ۲۶، ۱۳]. گزارش شده که تحت کرنش سیکلی دو محوره بیان ژن‌های

Calponin1 و α -SMA کاهش می‌یابد، در حالی که کرنش تک‌محوره بیان این ژن‌ها را افزایش می‌دهد [۲۸، ۲۱]. در حین مورفونسیس، سلول‌ها حین تمایز به رده‌های سلولی مختلف، تحت تغییرات اساسی در شکل سلولی می‌گردند. سلول‌های استخوانی در ابتدا مورفولوژی تخت به خود گرفته، در حالی که شروع به کلسیفه نمودن ماتریس می‌نمایند. سلول‌های غضروفی و چربی در تمایز اولیه‌شان دایروی شکل می‌گردند و سلول‌های ماهیچه‌ای برای اجرای کارکرد عضلانی خود، دوکی شکل و کشیده می‌گردند. تا حد زیادی تصور شده است که این تغییرات ساختاری در نتیجه‌ی برنامه‌های تمایزی هستند. با این حال مطالعات متعددی اشاره کرده‌اند که تغییرات در شکل سلولی خود می‌تواند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال را تنظیم نماید. اگر چه انبوه داده‌ها نشان از نقش شکل سلولی در فرآیندهای مهم بیولوژیک نظیر تقسیم سلولی، مرگ سلولی، سازمان‌دهی هسته و تمایز دارند، اساس مولکولی این تاثیرات واسطه‌ای شکل سلول هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است [۳۰، ۲۹، ۱۲].

سلول‌های عضله صاف عروق به‌طور طبیعی با شکل‌هایی کشیده و جهت‌گیری محیطی در دیواره‌ی رگ‌ها قرار گرفته‌اند و عمل‌کرد فیزیولوژیک آن‌ها انقباض و حفظ استحکام مکانیکی بافت است [۲۳]. در این تحقیق، یکی از اهداف بررسی مورفولوژی سلول‌ها پس از القای تمایز با اعمال تحریک مکانیکی بر روی سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های عضله صاف، این بوده است که به‌صورت کمی بررسی گردد که آیا سلول‌ها پس از القای تمایز صورت گرفته به مورفولوژی دوکی شکل و کشیده‌ی سلول‌های عضله صاف برای اجرای عمل‌کرد انقباضی خود نزدیک می‌شوند یا خیر. به‌عبارت دیگر کارکردی بودن تمایز القاشده از این منظر مورد مطالعه قرار گرفت. با بررسی پارامترهای مورفولوژیک شاخص شکل سلول (CSI) و شاخص کشیدگی (AR) به‌صورت کمی دیده شد که شاخص شکل سلول در اثر القای تمایز مکانیکی کاهش یافته و شاخص کشیدگی سلول افزایش می‌یابد. هر دو این تغییرات مبین نزدیک شدن به مورفولوژی

cells into smooth muscle for vascular tissue engineering. *J Surg Res* 2011; 168: 306-314.

[9] Stegemann JP, Nerem RM. Phenotype modulation in vascular tissue engineering using biochemical and mechanical stimulation. *Ann Biomed Eng* 2003; 31: 391-402.

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

[11] Ingber DE. Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Ann Med* 2003; 35: 564-577.

[12] Liu WF. Mechanical regulation of cellular phenotype: implications for vascular tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 2012; 95: 215-222.

[13] 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.

[14] Ghazanfari S, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA. Effects of cyclic stretch on proliferation of mesenchymal stem cells and their differentiation to smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388: 601-605.

[15] Ghazanfari S, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Haghighipour N, Amirizadeh N. Analysis of alterations in morphologic characteristics of mesenchymal stem cells by mechanical stimulation during differentiation into smooth muscle cells. *Yakhteh Med J* 2010; 12: 73-80. (Persian).

[16] Kurpinski K, Chu J, Hashi C, Li S. Anisotropic mechanosensing by mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103: 16095-16100.

[17] 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.

[18] Lee WC, Maul TM, Vorp DA, Rubin J, Marra KG. Effects of uniaxial cyclic strain on adipose-derived stem cell morphology, proliferation, and differentiation. *Biomech Model Mechanobiol* 2007; 6: 265-273.

[19] Riha GM, Wang X, Wang H, Chai H, Mu H, Lin PH, et al. Cyclic strain induces vascular smooth muscle cell differentiation from murine embryonic mesenchymal progenitor cells. *Surgery* 2007; 141: 394-402.

[20] Kurpinski K, Chu J, Wang D, Li S. Proteomic profiling of mesenchymal stem cell responses to mechanical strain and TGF- β 1. *Cell Mol Bioeng* 2009; 2: 606-614.

[21] Hamilton DW, Maul TM, Vorp DA. Characterization of the response of bone marrow-derived progenitor cells to cyclic strain: implications for vascular tissue-engineering applications. *Tissue Eng* 2004; 10: 361-369.

[22] Khani MM, Tafazoli-Shadpour M, Goli-Malekabadi Z, Haghighipour N. Mechanical characterization of human mesenchymal stem cells subjected to cyclic uniaxial strain and TGF- β 1. *J Mech Behav Biomed Mater* 2015; 43: 18-25.

[23] Thakar RG, Ho F, Huang NF, Liepmann D, Li S. Regulation of vascular smooth muscle cells by micropatterning. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307: 883-890.

[24] Thakar RG, Cheng Q, Patel S, Chu J, Nasir M, Liepmann D, Komvopoulos K, Li S. Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation. *Biophys J* 2009; 96: 3423-3432.

[25] Alford PW, Nesmith AP, Seywerd JN, Grosberg A, Parker KK. Vascular smooth muscle contractility depends on cell shape. *Integr Biol* 2011; 3: 1063-1070.

دوکی شکل در فنوتیپ انقباضی سلول‌های عضله صاف است.

با توجه به نتایج ارائه شده در شکل‌های ۱ و ۲ دیده شد که ۴ ساعت بارگذاری برای ایجاد تغییر معنادار با نمونه کنترل در مورفولوژی کافی نیست. در ساعات بالاتر بارگذاری (۸ و ۲۴ ساعت) تغییرات در پارامترهای مورفولوژیک تحت تحریک مکانیکی افزایش یافته و به‌طور معنادار با گروه کنترل اختلاف داشته است.

نتایج این تحقیق در درمان سلولی و مهندسی بافت هنگامی که کشت سلول بنیادی و القای تمایز به رده خاصی از سلول‌ها در خارج از بدن نیاز است، کاربرد دارد. جهت تامین اهداف مهندسی بافت که تولید سلول‌های مهندسی شده‌ی کارکردی در خارج بدن است، در تمایز سلول‌های بنیادی مطالعه‌ی تغییرات مورفولوژیک جهت دستیابی به سلول کاربردی در کنار بررسی‌های بیان ژن و پروتئین ضرورت دارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.

منابع

[1] Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Davis GE, Hill MA, Meininger GA. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H1427-H1433.

[2] Low RB, White SL. Lung smooth muscle differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 869-83.

[3] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004; 84: 767-801.

[4] Shi ZD, Abraham G, Tarbell JM. Shear stress modulation of smooth muscle cell marker genes in 2-D and 3-D depends on mechanotransduction by heparan sulfate proteoglycans and ERK1/2. *PLoS One* 2010; 5: e12196.

[5] Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 2011; 7: 463-477.

[6] Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* 2000; 12: 435-445.

[7] Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995; 75: 487-517.

[8] Harris LJ, Abdollahi H, Zhang P, McIlhenny S, Tulenko TN, DiMuzio PJ. Differentiation of adult stem

use in cardiovascular repair. *Front Biosci* 2007; 12: 5098-5116.

[29] Gao L, McBeath R, Chen CS. Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-Cadherin. *Stem Cells* 2010; 28: 564-572.

[30] Kim HN, Jiao A, Hwang NS, Kim MS, Kim DH, Suh KY. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 536-558.

[26] Yao X, Peng R, Ding J. Effects of aspect ratios of stem cells on lineage commitments with and without induction media. *Biomaterials* 2013; 34: 930-939.

[27] Kobayashi N, Yasu T, Ueba H, Sata M, Hashimoto S, Kuroki M, et al. Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells. *Exp Hematol* 2004; 32: 1238-1245.

[28] Park JS, Huang NF, Kurpinski KT, Patel S, Hsu S, Li S. Mechanobiology of mesenchymal stem cells and their

Effects of cyclic uniaxial strain on morphology of mesenchymal stem cells during differentiation to smooth muscle cells

Neda Rashidi (MSc)¹, Mohammad Tafazzoli-Shadpour (Ph.D)¹, Nooshin Haghighipour (Ph.D)², Mohammad-Mehdi Khani (Ph.D)^{*3}, Hakimeh Zali (Ph.D)⁴

1 - Cardiovascular Engineering Lab, Faculty of Biomedical Engineering, Amir kabir University of Technology (Tehran Polytechnic), Tehran, Iran

2 - National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3 - Dept. of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 - Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 10 Aug 2015; Accepted: 7 Sep 2015)

Introduction: Cells and tissues are mainly exposed to different mechanical stimuli, which are essential for their function. Blood vessels are subjected to circumferential straining induced by pulse pressure. The phenotype regulation and function of vascular smooth muscle cells depend on both chemical factors and their mechanical environment. Chemical and mechanical stem cell stimulations can contribute to their differentiation to functional target cells, including smooth muscle cells. This makes a great potential subject for cell therapy and tissue engineering. Here, we evaluated effects of short term uniaxial cyclic strain on morphology of rabbit adipose derived mesenchymal stem cells.

Materials and Methods: Using a custom made bioreactor, a 5% cyclic uniaxial strain with 1Hz frequency were applied on mesenchymal stem cells for 4, 8 and 24 hours. Smooth muscle specific gene expression was analyzed by Real Time PCR. Before and after experiments, cell images were taken and processed for morphological parameters evaluation.

Results: Cyclic strain caused cells to re-orient to the direction that cell body were experiencing minimal force. Two fold increases in smooth muscle gene expression was observed after 24 hour mechanical stimulation. Cyclic strain caused morphological alterations including reduction of cell shape index up to 41%, and elevation of aspect ratio up to 45% after 24 hours loading compared to control samples.

Conclusion: Cyclic strain caused significant elongation of mesenchymal stem cells close to contractile smooth muscle phenotype. This method can be applied in cardiovascular tissue engineering to provide functional smooth muscle cells.

Keywords: Cell Differentiation, Uniaxial Strain, Mesenchymal Stem Cells, Smooth Muscle Cells, Mechanobiology

* Corresponding author. Tel: 21 22439848

khani@sbmu.ac.ir