تاثیر 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 متاثر از عوامل شیمیایی و محیط مکانیکی سلول‌ها است. تحریکات مناسب مکانیکی و شیمیایی باعث تمایز کارامد 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 کنترلی گردید.

نتیجه‌گیری: کرنش سیکلی تک‌محوره آشکارا باعث کشیده‌تر شدن سلول‌ها و نزدیک‌شدن به مورفولوژی دوکی‌شکل 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

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

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۹۸۴۸ Email: khani@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۱۶

برش هستند. در حالی‌که سلول‌های اندوتلیال عروقی در معرض برش هستند، سلول‌های عضله صاف عروق در معرض کرنش مکانیکی قابل توجه در جهت محیطی در طول چرخه‌ی قلبی قرار دارند [۱]. این تنش‌های مکانیکی، عمل‌کرد فیزیولوژیک این سلول‌ها را با سهیم بودن در تنظیم رشد و فنوتیپشان تحت تاثیر قرار می‌دهند. سلول‌های عضله صاف عروق، لایه‌ی مدیای 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)، h1-calponin، caldesmon، smoothelin 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-β 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 منحصربه‌فرد سلول‌های بنیادی مزانشیمال از جمله داشتن حداقل پاسخ‌های ایمنی، توانایی تولید سلول‌های نظیر خود و قابلیت تمایز به انواع سلول‌ها باعث‌شده 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-β 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 طراحی‌شده 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

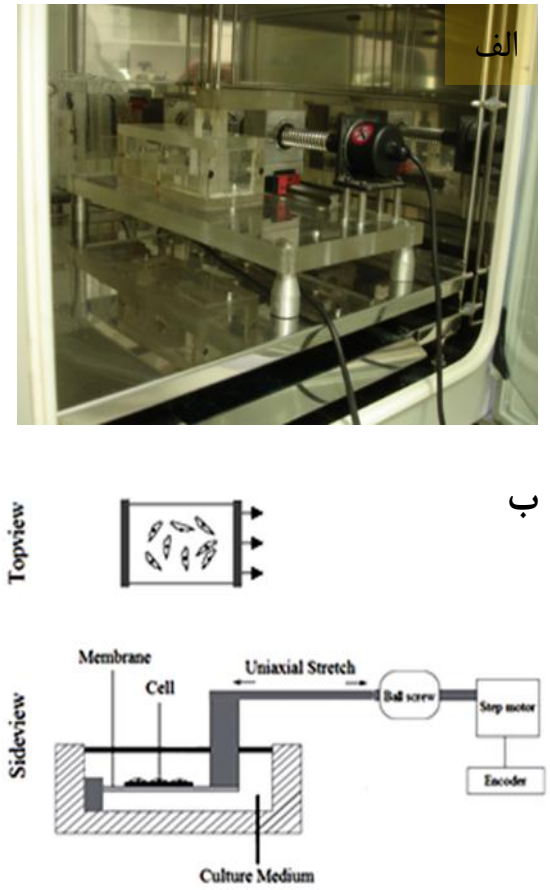
رشته‌های اکتین و تشکیل فیبرهای تنشی در اثر اعمال بارگذاری مشاهده شد [۲۲،۱۵].

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 انستیتوپاستور ایران تهیه گردید. طراحی آزمایش‌ها به این گونه بوده است که این سلول‌ها در گروه کنترل و گروه‌های مختلف تحریک مکانیکی ۴، ۸ و 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٪ پنیسیلین/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.

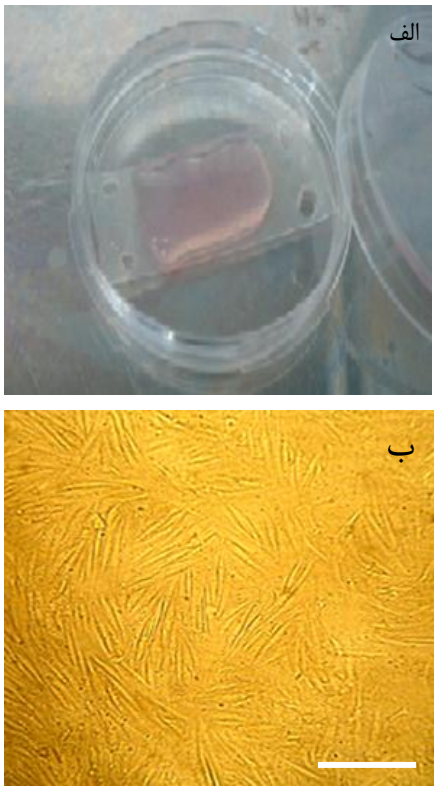
برای انجام آزمایش‌های تحریک مکانیکی، پس از پاساژ سلول‌های موجود در فلاسک کشت سلولی و تهیه سوسپانسیون سلولی، سلول‌ها بر روی غشای سیلیکونی کشت داده شدند (شکل ۱ الف). به‌منظور ایجاد چسبندگی بهتر سلول‌ها بر روی غشای سیلیکونی از پوشش کلاژنی نوع ۱ استفاده شد. هم‌چنین قبل از انتقال محلول کلاژن بر روی غشا به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



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

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 چربی خرگوشی پس از ۴۸ ساعت کشت بر روی غشای سیلیکونی. خط سفید نشانگر ۵۰ µm است.

طراحی پرایمرها و انجام آزمون qPCR. جهت بررسی تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمال خرگوشی در گروه‌های کنترل و تحریک مکانیکی از روش qPCR استفاده شد. به این منظور بیان مارکرهای انقباضی عضله صاف از جمله αSMA و SM22α به‌عنوان 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 خرگوشی با استفاده از نرم‌افزارهای Primer Express (Ver.4)، Gene Runer (Ver.3)، Beacon Designer (online use) طراحی گردیده و در نهایت کارآیی آن‌ها به روش Blast با استفاده از سایت NCBI مورد تائید قرار گرفته است. جدول ۱ توالی پرایمرهای طراحی‌شده 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 به‌دست آمدند. یکی از پارامترهای مهم در اندازه‌گیری‌های مورفولوژیک سلولی، شاخص شکل سلول (CSI) است که از رابطه‌ی زیر به‌دست 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].

$$CSI=4\pi S/P^2$$

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 برازش‌شده به شکل سلولی است و افزایش آن بیانگر کشیده‌تر شدن شکل موجود است

[۲۶]. برای به‌دست آوردن پارامترهای مورفولوژیک سلول از حداقل ۴۰ سلول در ۳ ناحیه مختلف غشای سیلیکونی تصویربرداری شد.

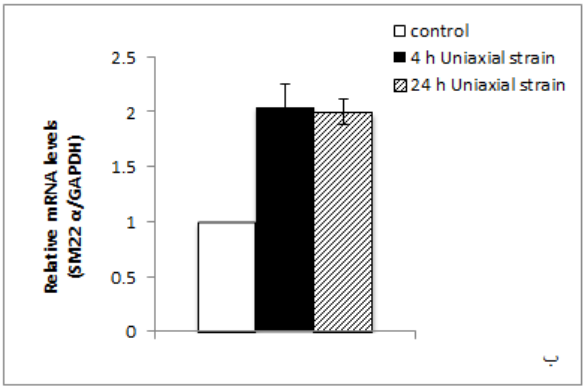
تحلیل آماری. در گروه‌های کنترل و تحریک مکانیکی، تمامی آزمایش‌های انجام شده حداقل ۳ بار تکرار شدند و نتایج به صورت مقدار متوسط ± انحراف از معیار نشان داده شده است. جهت مقایسه نتایج دو گروه از روش t-teat استفاده شد به این ترتیب در هر آزمون مقدار P-Values محاسبه شده و مقادیر P-Values<۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنی‌دار آماری تعریف می‌شود.

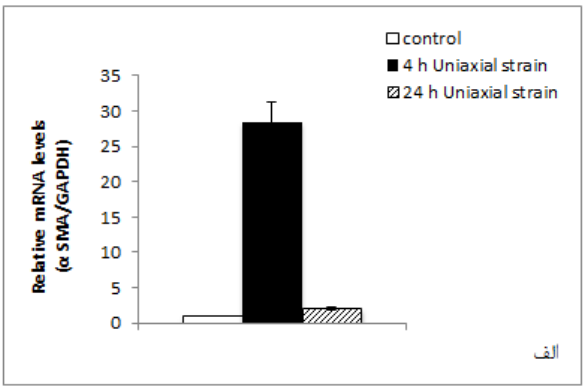
جدول۱. توالی پرایمرهای طراحی شده

نام ژن	پرایمر	توالی پرایمر	اندازه و باند (bp)
GAPDH	Forward Reverse	GTTGCTGTCGCCCGTTC CGACAACATCCACTTTGCCA	196
SMAα	Forward Reverse	GCACCACTCCTTCTACAATGA GACAGCACCGCCTGAATAG	165
SM22α	Forward Reverse	ACAAGCGGGAGTTCACAGAG GATACAGGTGTGGGTGAGGC	218

نتایج

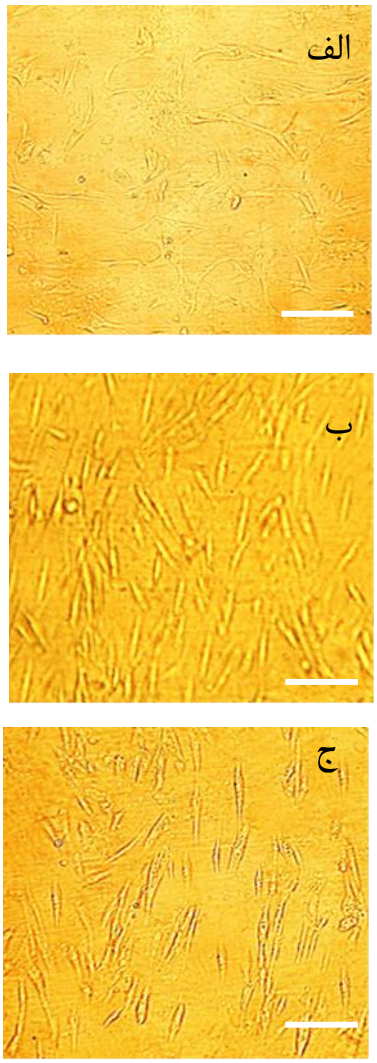
نتایج بررسی تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های ماهیچه‌ای عضله صاف در گروه‌های مختلف کنترل و تحریک مکانیکی در شکل ۳ ارائه شده است. همان‌طور که در شکل ۳ (الف) دیده می‌شود، ژن α-SMA نسبت به اعمال تحریک مکانیکی بسیار حساس بوده و در ۴ ساعت بارگذاری افزایش چشمگیری داشته و به حدود ۲۸/۵ برابر نمونه‌ی کنترل می‌رسد. پس از آن در ۲۴ ساعت بارگذاری بیان این ژن نسبت به نمونه‌ی ۴ ساعت بارگذاری کاهش یافته و به حدود ۲ برابر نمونه کنترل رسیده است. همچنین مطابق شکل ۳ ب سطح بیان ژن α SM22 در هر دو گروه تحریک مکانیکی ۴ و ۲۴ ساعته با افزایش تقریباً ۲ برابری نسبت به نمونه کنترل مواجه شده است.





شکل ۳. نتایج آنالیز کمی میزان بیان مارکرهای تخصصی انقباضی سلول های عضله صاف در سلول های بنیادی مزانشیمال کشت‌داده‌شده بر غشای سیلیکونی با پوشش کلاژن نوع ۱ در گروه‌های کنترل، القای تمایز مکانیکی ۴ و۲۴ ساعت اعمال کرنش تک‌محوری. (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.

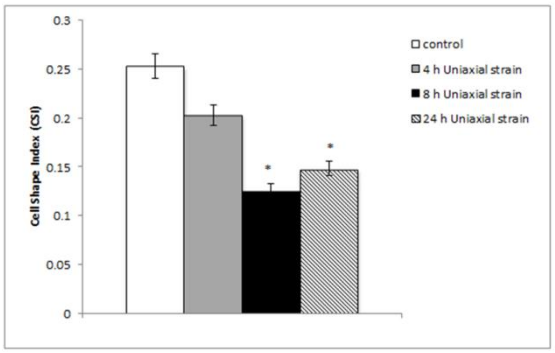
تحلیل توپولوژیکال تصاویر سلولی قبل و بعد از آزمایش نشان‌دهنده تغییرات مشهود مورفولوژی سلول‌ها پس از بارگذاری است. هم‌چنین جهت‌گیری سلولی در اثر اعمال تحریک مکانیکی ایجاد شده است، به گونه‌ای که با افزایش ساعات بارگذاری، جهت‌گیری سلولی افزایش یافته و پس از ۲۴ ساعت بارگذاری جهت‌گیری سلول‌ها به راستای عمود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



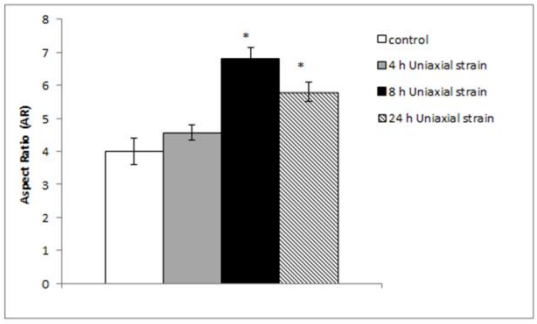
شکل ۴. تصویر میکروسکوپی از تغییر مورفولوژی و جهت‌گیری سلول‌های بنیادی. (الف) نمونه کنترلی (ب) نمونه تحت ۸ ساعت تحریک مکانیکی (ج) نمونه ۲۴ ساعت تحت تحریک مکانیکی. کرنش تک محوری در راستای افقی با فرکانس 1Hz و دامنه ۵٪ است. هر خط سفید نشانگر 50 mμ است.

کرنش سیکلی تک‌محوره پارامترهای مورفولوژیک سلول‌ها را دست‌خوش تغییرات کرد. شاخص شکل سلول در اثر اعمال بارگذاری کاهش یافت و این کاهش با بالا رفتن تعداد سیکل‌های بارگذای 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<۰/۰۵).

شاخص کشیدگی سلول در اثر اعمال بارگذاری افزایش یافت و این افزایش با بالارفتن 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<۰/۰۵).



شکل ۵. تغییرات شاخص شکل سلولی (CSI) در مسیر القای تمایز مکانیکی با شرایط کرنش تک‌محوره با دامنه ۵٪ و فرکانس ۱Hz. (* تفاوت معنادار آماری).



شکل ۶. تغییرات شاخص کشیدگی سلول (AR) در مسیر القای تمایز مکانیکی با شرایط کرنش تک‌محوره با دامنه ۵٪ و فرکانس ۱Hz. (* تفاوت معنادار آماری).

بحث و نتیجه‌گیری

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 ژن ها 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 تمایزیافته‌ی 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 دومحوره بیان ژن‌های α-SMA و Calponin1 کاهش می‌یابد، در حالی‌که کرنش تک‌محوره بیان این ژن‌ها را افزایش می‌دهد [۲۸،۲۱].

در حین مورفوژنسیس، سلول‌ها حین تمایز به رده‌های سلولی مختلف، تحت تغییرات اساسی در شکل سلولی می‌گردند. سلول‌های استخوانی در ابتدا مورفولوژی تخت به خود گرفته، در حالی‌که شروع به کلسیفه نمودن ماتریس می‌نمایند. سلول‌های غضروفی و چربی در تمایز اولیه‌شان دایروی شکل می‌گردند و سلول‌های ماهیچه‌ای برای اجرای کارکرد عضلانی خود، دوکی‌شکل 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 مورفورلوژی دوکی‌شکل 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

دوکی‌شکل در فنوتیپ انقباضی سلول‌های عضله صاف است. با توجه به نتایج ارائه شده در شکل‌های ۱ و۲ 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 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-β1. 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 charactrization of human mesenchymal stem cells subjected to cyclic uniaxial strain and TGF-β1. 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.

[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 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.

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