

تاثیر سیکلی تک-فولوزی سلول های بنیادی - انشیمال ز به سلول های صاف عروق

ندا رشیدی^۱ (M.Sc)، محمد تفضلی شادپور^۱ (Ph.D)، نوشین حقیقی پور^۲ (Ph.D)، محمدمهدی خانی^{۳*} (Ph.D)، حکیمه زالی^۴ (Ph.D)

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

۲- بانک سلولی انستیتو پاستور ایران

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

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

چکیده

هدف: لول های بافت های دائمی در اشکال مختلفی از نید های کانیکلی که برای کرد طبیعی شان در روری است. دیواره های عرض کرنش های محیطی ناشی از فشاری است. تنظیم نوتیپ در سلول های بافت عروقی با عوامل شیمیایی محیط کانیکلی لول ها است. تحرکات مکانیکی شیمیایی است تمایز در سلول های بنیادی سلول های بافت صاف شده و انسیل زیادی برای به کارگیری در سلول های مهندسی بافت است. هدف از این مطالعه بررسی اثر کرنش سیکلی تک-ه کوتاه مورفولوژی سلول های بنیادی انشیمال در گوشه های چربی است. روش ها: با استفاده از اکتور ساخته شده، سلول های بنیادی انشیمال تحت کرنش ۵٪ و ۲۴٪ و ۸٪ قرار گرفتند. بیان ژن های انتبازی در این صورت کمی بررسی گردید. پس از آزمایش تصاویر مولی ساخته شده و تصاویر تحت ارزیابی آمترهای فولوزیکلی انجام شده اند. یافته ها: کرنش سیکلی در سلول ها در جهتی که بدنه ی مولی کمترین درجه ی انحنای حس کند، بهت گیری کرد. با ۲۴٪ بارگذاری شاهد افزایش بیان ژن های انتبازی تا ۲-هستیم از کرنش سیکلی با تغییر آمترهای فولوزیک نظیر کاهش شکل سلول (CSI) تا ۴۱٪ افزایش انحنای کشیدگی لول (AR) تا ۴۸٪ از ۲۴٪ تحت تحریک کانیکلی در نمونه کنترل گردید. نتیجه: کرنش سیکلی تک-ه در کار باعث کشیده تر شدن لول ها و نزدیک شدن مورفولوژی وکی شکل لول های بافت عروقی می شود. نتایج سی-انند مهندسی بافت شریانی دستیابی به لول های بافت های دائمی مناسب به کار گرفته شوند.

اژه ها: کلیدی: سلول بنیادی - انشیمال، کرنش سیکلی، تمایز، فولوزی، بافت صاف

مقدمه

کارکرد فیزیولوژیک و توسعه آنها ضروری است. با توجه به طبیعت پالسی فشار و جریان خون، دیواره ی عروق به طور مداوم در معرض تنش های مکانیکی از جمله فشار، کشش و

سلول ها و بافت های حیاتی به صورت دائمی در معرض اشکال مختلفی از نیروهای مکانیکی هستند که برای بقای

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 $\alpha-SMA$ 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 عروقی 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

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 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

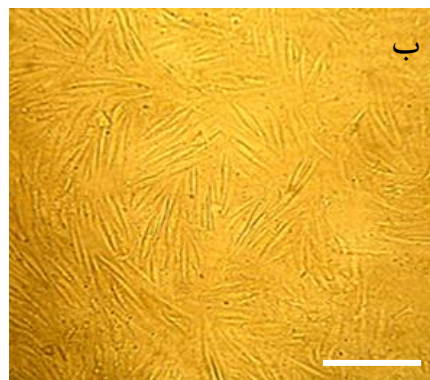
است. جدول ۱ توالی پرایمرهای طراحی شده را نمایش می‌دهد. برای انجام آزمون، ابتدا RNAهای سلول‌ها توسط کیت استخراج RNA مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (QIAGEN) استخراج گردیده و سپس جهت استفاده PCR، تمامی cDNAها نیز توسط کیت‌های مخصوص سنتز cDNA (شرکت TaKaRa) سنتز شده‌اند. آنالیز کمی PCR توسط دستگاه ABI StepOne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

تمویب‌گیری - ۱۰: ش 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 برآش شده به شکل سلولی است و افزایش آن بیانگر کشیده‌تر شدن شکل موجود است

انستیتوپاستور ایران استفاده گردید (شکل ۲) و کرنش سیکنی 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 رایج‌ها - ۱۰: 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 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 خروگوشی با استفاده از نرم‌افزارهای Primer Express (Ver.4)، Beacon Designer (Gene Runner (Ver.3)، (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 $P\text{-Values} < 0.05$ 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 گروه‌های کنترل و تحریک مکانیکی، تمامی آزمایش‌های انجام شده حداقل ۳ بار تکرار شدند و

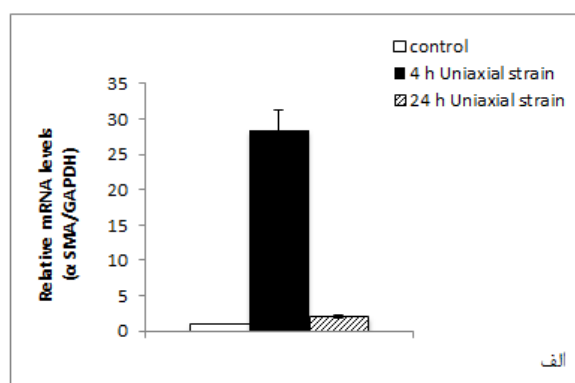
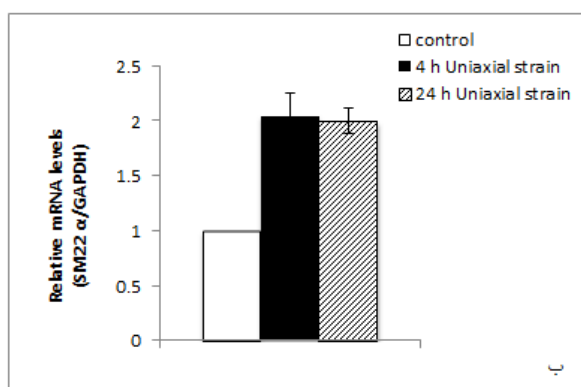
جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده

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

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 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

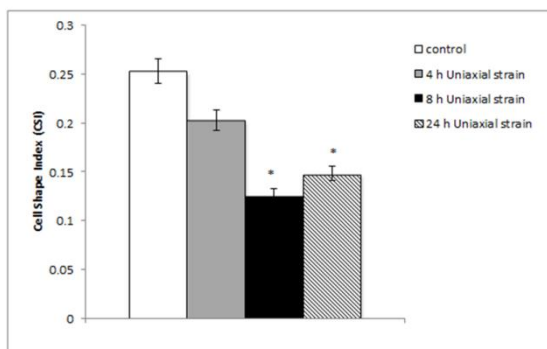
نتایج بررسی تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های ماهیچه‌ای عضله صاف در گروه‌های مختلف کنترل و تحریک مکانیکی در شکل ۳ ارائه شده است. همان‌طور که در شکل ۳ (الف) دیده می‌شود، ژن α -SMA نسبت به اعمال تحریک مکانیکی بسیار حساس بوده و در ۴ ساعت بارگذاری افزایش چشمگیری داشته و به حدود ۲۸/۵ برابر نمونه‌ی کنترل



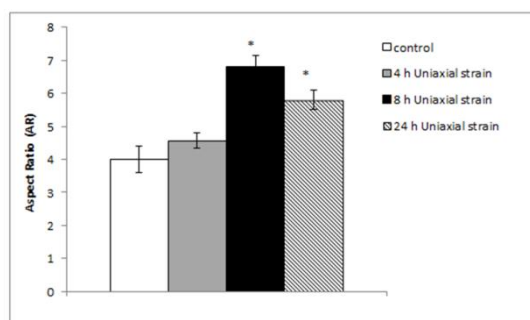
شکل ۳. نتایج آنالیز کمی میزان بیان مارکرهای تخصصی انقباضی سلول‌های عضله صاف در سلول‌های بنیادی مزانشیمال کشت داده‌شده بر غشای سیلیکونی با پوشش کلاژن نوع ۱ در گروه‌های کنترل، القای تمایز مکانیکی ۴ و ۲۴ ساعت اعمال کرنش تک‌محوری. (الف) ژن α -SMA (ب) ژن SM22 α . میزان کمی بیان هر ژن با میزان بیان ژن GAPDH 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.

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 کنترلی 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 کنترلی مشاهده شد ($P < 0.05$).

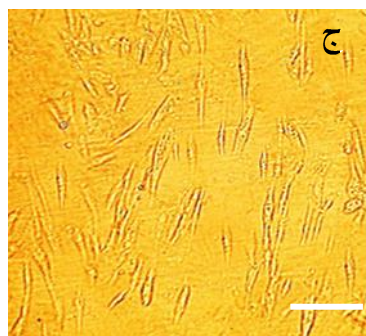
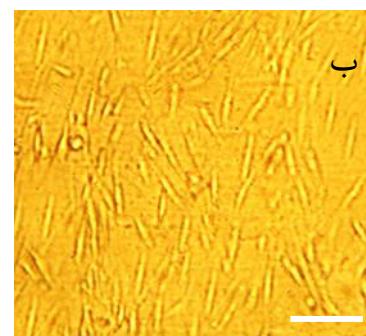


شکل ۵. تغییرات شاخص شکل سلولی (CSI) در مسیر القای تمایز مکانیکی با شرایط کرنش تک‌محوره با دامنه ۵٪ و فرکانس ۰.۸ Hz.* (تفاوت معنادار آماری).



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 دو‌محوره بیان ژن‌های

Calponin1 و α -SMA کاهش می‌یابد، در حالی‌که 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 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، 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 مزانشیم 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