Arc Qom University of Medical Sciences Journal

August 2021. Volume 15. Number 5

Research Paper:

Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Into Cardiac-like Cells by Co-induction of Lentiviruses Containing Mir-1 and Myocd in Chitosan Collagen Hydrogel Scaffold

Samaneh Khazaei[1], Masoud Soleimani[2], Seyed Hossein Ahmadi Tafti[3], *Zohreh Hojati[1]

1. Department of Cell and Molecular Biology, School of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
2. Department of Tissue Engineering and Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Research Center for Advanced Technologies in Cardiovascular Medicine, Tehran Heart Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Khazaei S, Soleimani M, Ahmadi Tafti SH, Hojati Z. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Into Cardiac-like Cells by Co-induction of Lentiviruses Containing Mir-1 and Myocd in Chitosan Collagen Hydrogel Scaffold. Qom University of Medical Sciences Journal. 2021; 15(5):368-377. https://doi.org/10.32598/qums.15.5.1961.2

doi https://doi.org/10.32598/qums.15.5.1961.2

CC BY NC

Received: 11 Jul 2021

Accepted: 25 Jul 2021

Available Online: 01 Aug 2021

Keywords:
Cardiovascular diseases, Mesenchymal stem cells, miR-1, Organ culture techniques, Cell differentiation

ABSTRACT

Background and Objectives Cardiovascular disease is one of the leading causes of death worldwide. Mesenchymal stem cells (MSCs) are one of the most common sources of cell-based therapies in heart regeneration. There are several approaches to differentiate MSCs into cardiac-like cells, such as genetic modification. In addition, using of 3D culture, such as hydrogels, increases the efficiency of differentiation.

Methods In the present study, lentiviruses containing microRNA 1 (miR- 1) and myocardium (Myocd) were co-transducted to mouse adipose-derived MSCs. Three days after, transduced MSCs were transferred to a hydrogel containing chitosan and collagen. After 21 days, the differentiation of encapsulated cells was evaluated. In this regard, the expression of cardiac markers such as NK2 homeobox 5 (Nkx2-5), GATA binding protein 4 (Gata4) and troponin T type 2 (Tnnt2) at the level of gene and protein were investigated.

Results The results of real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and immunocytochemistry showed that co-induction of miR-1 and Myocd in MSCs followed by transfer to composite hydrogel increased the expression of cardiac markers.

Conclusion The use of 3D culture such as chitosan/collagen hydrogel improves the differentiation of MSCs and subsequently obtains more mature cells for use in cell-based regenerative medicine

Corresponding Author:
Zohreh Hojati
Address: Department of Cell and Molecular Biology, School of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
Tel: +98 (913) 3287903
E-Mail: z.hojati@sci.ui.ac.ir

www.SID.ir

مقاله پژوهشی:

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های شبه قلبی با انتقال همزمان لنتی ویروس‌های حاوی miR-۱ و Myocd در داربست هیدروژلی کیتوزان/کلاژن

سمانه خزایی[۱]، مسعود سلیمانی[۲]، سید حسین احمدی تفتی[۳]، *زهره حجتی[۱]

۱. گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
۲. گروه مهندسی بافت و خون شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت‌مدرس، تهران، ایران.
۳. مرکز تحقیقات فناوری‌های پزشکی قلب و عروق، مرکز قلب تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۲۰ تیر ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۰۳ مرداد ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۰ مرداد ۱۴۰۰

چکیده

زمینه و هدف بیماری‌های قلبی‌عروقی یکی از مهم‌ترین دلایل مرگ‌ومیر در سراسر جهان است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) یکی از متداول‌ترین منابع در روش‌های درمانی مبتنی بر سلول در بازسازی قلب است. روش‌های مختلفی برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های شبه‌قلبی وجود دارد، مانند القای ژنتیکی. علاوه بر این استفاده از کشت سه‌بعدی مانند هیدروژل‌ها باعث افزایش کارایی تمایز می‌شود.

روش بررسی در مطالعه حاضر لنتی ویروس‌های حاوی microRNA-1 (miR-1) و میوکاردین (Myocd) به طور هم‌زمان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی موش انتقال یافتند. سه روز پس از القای ژنتیکی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسداکت‌شده به هیدروژل حاوی کیتوزان و کلاژن انتقال یافتند و پس از ۲۱ روز تمایز این سلول‌ها به سلول‌های شبه‌قلبی سنجیده شد. در همین راستا بیان مارکرهای قلبی مانند NK2 homeobox 5 (Nkx2-5), GATA binding protein 4 (Gata4) , troponin T type 2 (Tnnt2) در سطح ژن و پروتئین در هر دو محیط دوبعدی و سه‌بعدی بررسی شد.

یافته‌ها نتایج حاصل از واکنش کمی زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (qRT-PCR) و ایمونوسیتوشیمی نشان داد که القای هم‌زمان miR-1 و Myocd در سلول‌های بنیادی مزانشیمی و به دنبال آن انتقال به محیط هیدروژلی متشکل از کیتوزان / کلاژن باعث افزایش بیان مارکرهای قلبی در هر دو سطح ژن و پروتئین می‌شود.

نتیجه‌گیری استفاده از کشت سه‌بعدی منجر به بهبود شرایط تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و به دنبال آن به دست آوردن سلول‌های بالغ تر برای استفاده در پزشکی بازسازی مبتنی بر سلول درمانی می‌شود.

کلیدواژه‌ها:
بیماری‌های قلب و عروق، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، miR-1، تکنیک‌های کشت بافت، تمایز سلولی

مقدمه

بیماری‌های قلبی‌عروقی دلیل اصلی مرگ‌ومیر در جهان است [۱]. در دهه‌های اخیر پیشرفت‌های چشمگیری در تکنیک‌های جراحی و درمان‌های دارویی حاصل شده است. با وجود این، بیماری‌های قلبی‌عروقی همچنان دلیل اصلی نارسایی قلبی در سراسر جهان است [۲]. به همین دلیل اتخاذ روش‌های نوین مانند رویکردهای بازسازی‌کننده قلب و درمان‌های مبتنی بر سلول ضروری به نظر می‌رسد [۳]. در میان منابع سلولی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل خواص منحصربه‌فرد از جمله اثرات پاراکراین، تعدیل سیستم ایمنی، ایمنی‌زایی کم و توانایی تمایز به چندین رده سلولی مانند کاردیومیوسیت به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند [۴]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در منابع مختلفی مانند مغز استخوان، جفت، خون بند ناف و بافت چربی یافت می‌شوند. در این میان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی دارای مزایای متعددی از جمله قابلیت دسترسی، برداشت آسان و عوارض کم هستند. اخیراً استراتژی‌های ترکیبی مانند القای ژنتیکی و استفاده از مواد بیولوژیکی برای افزایش اثربخشی درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ایجاد شده است [۵].

* **نویسنده مسئول:**
زهره حجتی
نشانی: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی.
تلفن: ۳۲۸۷۹۰۳ (۹۱۳) ۹۸+
رایانامه: z.hojati@sci.ui.ac.ir

www.SID.ir

در چندین مطالعه با استفاده از القای ژنتیکی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های شبه‌کاردیومیوسیت القاشده (iCM) تمایز یافته‌اند که در همین راستا از ژن‌ها و microRNAهای مختلف استفاده می‌شود [۶، ۷]. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که miRNAهای مختلفی در کاردیومیوژنز نقش دارند که به miRNAهای قلبی معروف هستند، مانند ، miR-133 miR-499 و miR-1[۸]. miR-1یکی از miRNAهایی است که با القای بیان ژن‌های Gata4 و Nkx2-5 و فعال کردن مسیر سیگنالینگ Wnt/β-Catenin باعث تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های شبه‌قلبی می‌شود [۹]. در تمایز عضلانی، فاکتور پاسخ سرم (SRF)[1] به عنوان فعال‌کننده ژن‌های عضلانی از جمله miR-1 عمل می‌کند. با این حال نشان داده شده که SRF یک فعال‌کننده ضعیف است که برای عملکرد بهتر به یک فعال‌کننده دیگر به نام میوکاردین وابسته است. بدین ترتیب SRF و MyoCD با اتصال به توالی‌های تقویت‌کننده miR-1 بیان آن را به صورت هم‌افزایی افزایش می‌دهند [۱۰].

علی‌رغم پیشرفت‌های فراوان در القای ژنتیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز آن‌ها به سلول‌های شبه‌قلبی، این سلول‌ها در درمان مبتنی بر سلول به اندازه کافی مؤثر نیستند. زیرا کاردیومیوسیت‌های مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در یک محیط دوبعدی به صورت نابالغ بوده و فنوتیپی مشابه فنوتیپ کاردیومیوسیت جنینی به جای کاردیومیوسیت بالغ دارند [۱۱]. بنابراین در بسیاری از مطالعات از کشت سه‌بعدی برای بهبود شرایط تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شده است. مانند استفاده از داربست پلیمری، ماتریکس خارج سلولی دسلولارشده و هیدروژل‌های مختلف [۱۲، ۱۳]. هیدروژل‌ها به عنوان اولین ماده زیستی متورم در آب که در مهندسی بافت استفاده می‌شود می‌توانند یک ساختار سه‌بعدی ایجاد کنند. کیتوزان یکی از مواد پرکاربرد در هیدروژل‌هاست که به دلیل داشتن بار مثبت دارای ویژگی هایی مانند تجزیه بیولوژیکی، سازگاری زیستی، آب‌دوستی، غیرسمی بودن و مقاومت فشاری است. در مطالعات مختلف از کیتوزان به عنوان حامل سلول استفاده شده است که باعث بهبود شرایط تمایز، افزایش قدرت زنده‌مانی سلول‌ها و بهبود عملکرد قلب در مدل رت دارای انفارکتوس پس از پیوند به ناحیه آسیب‌دیده شده است [۱۴]. یکی دیگر از راهکارهای مورداستفاده در مهندسی بافت، استفاده از هیدروژل‌های ترکیبی است. هیدروژل کیتوزان / کلاژن یکی از پرکاربردترین هیدروژل‌های ترکیبی برای بهبود تمایز و بازسازی سلول‌های قلبی است [۱۵]. کلاژن یکی از اجزای اصلی ماتریکس خارج‌سلولی است که باعث تقویت مقاومت کششی در دیواره قلب می‌شود. کلاژن باعث بقا، تکثیر و چسبندگی سلول می‌شود. این در صورتی است که کلاژن دارای سرعت تجزیه‌پذیری بالا با مقاومت مکانیکی ضعیف است. با وجود این به علت پایداری مکانیکی و بار مثبت کیتوزان ترکیب کیتوزان / کلاژن باعث بهبود قدرت مکانیکی و کاهش میزان تخریب‌پذیری کلاژن می‌شود [۱۶]. بنابراین در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی موش به طور هم‌زمان با لنتی ویروس‌های حاوی miR-1 و MyoCD ترانسداکت شد و تمایز آن در محیط دوبعدی و سه‌بعدی با یکدیگر مقایسه شد.

روش بررسی

به منظور بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های شبه‌قلبی با القای ژنتیکی، لنتی ویروس‌های حاوی miR-1 و MyoCD به طور جداگانه ساخته شد. به این صورت که ابتدا سلول HEK293T به روش کلسیم فسفات با وکتورهای miR-1 و MyoCD و وکتورهای کمکی به نام‌های psPAX2 و pMD ترانسفکت شدند. مواد لازم برای ترانسفکت شامل بافر HEPES، کلسیم کلراید (۲/۵ میلی مولار) و آب استریل است. محیط سلول‌ها در زمان ترانسفکت High glucose DMEM با FBS 5% و فاقد آنتی‌بیوتیک است. نسبت وکتورهای miR-1 psPAX2، و pMD به ترتیب ۱:۳:۳ است. همچنین از وکتور فاقد توالی اینسرت‌شده به عنوان کنترل استفاده شد. سپس هر ۱۲ ساعت یک بار و به مدت ۳ روز مایع رویی سلول‌ها که حاوی ویروس‌های مد نظر است، جمع‌آوری شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تغلیظ ویروس‌های جمع‌آوری‌شده از اولتراسانتریفوژ یخچال‌دار با دور ۴۰ هزار g و به مدت ۲ ساعت استفاده شد. پس از ساخت ویروس، هیدروژل ترکیبی کیتوزان / کلاژن با کمک بتا گلیسرول فسفات (۷/۵ درصد) به عنوان کراس لینکر ساخته شد [۱۷] و تست‌های تورم و قدرت زنده‌مانی سلول‌ها در محیط هیدروژلی انجام شد. پس از اتمام مراحل ساخت ویروس و بعد از آن هیدروژل، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی موش با روش آنزیمی طبق پروتکل جداسازی شد [۱۸]. به منظور تأیید هویت سلول‌های جداسازی‌شده تست فلوسایتومتری برای مارکرهای سطحی CD۷۳، CD۹۰ و CD۱۰۵ (مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی) و عدم بیان CD۴۵ (مارکر اختصاصی سلول‌های خونی) انجام شد. همچنین سلول‌های جداشده در محیط‌های اختصاصی قرار گرفته وتوانایی تمایزشان به سلول‌های چربی و استخوان به ترتیب با رنگ‌آمیزی Oil Red O و Alizarin Red سنجیده شد (داده‌ها نشان داده نشده است). سلول‌های جداشده در پایان پاساژ ۳ در پلیت‌های ۱۲خانه سیدشده و با ویروس‌های حاوی miR-1 و MyoCD ترانسداکت شدند. ۴۸ ساعت پس از ترانسداکشن، سلول‌های GFP مثبت با کمک میکروسکوپ فلئورسنت و فلوسایتومتری ارزیابی شدند. میزان افزایش بیان miR-1 و MyoCD در سلول‌های ترانسداکت‌شده با روش qRT-PCR سنجیده شد. ۳ روز پس از ترانسداکشن، سلول‌ها از پلیت جدا شده و در هیدروژل

1. microRNA 1

www.SID.ir

کیتوزان / کلاژن اینکپسوله شدند. روش کار به این صورت بود که پس از تریپسینه کردن سلول‌های ترانسداکت‌شده، این سلول‌ها به همراه هیدروژل کیتوزان / کلاژن به چاهک‌های پلیت ۱۲خانه منتقل شده و به منظور ایجاد ژل، NaHCO3 اشباع‌شده به مخلوط سلول هیدروژل اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار داده شدند. پس از پایان ۱۵ دقیقه، محیط کشت به سطح چاهک‌ها اضافه شد و در سه گروه مختلف به مدت ۷ روز، ۱۴ روز و ۲۱ روز در انکوباتور حاوی ۵ CO2 درصد نگهداری شدند. همچنین سلول‌های ترانسداکت‌شده با لنتی ویروس حاوی miR-1 و MyoCD در محیط دوبعدی به عنوان گروه کنترل استفاده شد. پس از پایان هرکدام از زمان‌های تعیین‌شده در گروه‌های مختلف، سلول‌های هر گروه برای انجام تست qRT-PCR و ایمونوسیتوشیمی [۱۹] جمع‌آوری شدند. برای انجام qRT-PCR سلول‌ها به کمک ترایزول لیز شده و استخراج RNA طبق پروتکل انجام شد [۲۰]. RNAهای استخراج‌شده به صورت کیفی با بردن روی ژل آگاروز ۱ درصد و به صورت کمی با دستگاه نانودراپ سنجیده شد. سپس با توجه به دستورالعمل کیت (Takara, Korea) سنتز CDNA انجام شد. پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های Gata4، Nkx2-5 و Tnnt2 به کمک Gene runner و UCSC genome browser طراحی و به صورت آنلاین با NCBI blast به منظور اختصاصی بودن برای اتصال به نواحی مدنظر، ارزیابی شد. توالی پرایمرها در جدول شماره ۱ آورده شده است. تست qRT-PCR– در حجم ۲۰ لاندا انجام شد که شامل ۱۰ λ مستر میکس، ۱ λ CDNA، ۱ λ پرایمر میکس Forward و Reverse و ۸ λ آب استریل بود. سپس با استفاده دستگاه Applied Biosystems real time PCR ۷۵۰۰ بیان هرکدام از ژن‌ها به صورت کمی سنجیده شد. برنامه زمانی داده‌شده به دستگاه به صورت ۹۵ درجه ابتدایی ۱۵ دقیقه و ۴۰ سیکل به صورت دومرحله‌ای شامل ۹۵ درجه ۵ ثانیه و ۶۰ درجه ۳۰ ثانیه تنظیم شد. در این آزمایش از ژن U6 و Gap-dh به ترتیب به عنوان کنترل داخلی برای نرمالیزه کردن بیان miRNA و ژن‌های موردمطالعه استفاده شد. همچنین از روش 2^-ΔΔCt برای آنالیز داده‌های qRT-PCR استفاده شد. برای بیان پروتئین مارکرهای قلبی ذکرشده، تست ایمونوسیتوشیمی به کمک آنتی‌بادی‌های ضد GATA، NKX2-5 و cTnT با آنتی‌بادی ثانویه کانژوگه با FITC طبق پروتکل انجام شد و نتایج با کمک میکروسکوپ فلئورسنت (Olympus, Japan) ارزیابی شد.

تحلیل آماری

داده‌های کمی به صورت میانگین و انحراف معیار با حداقل سه تکرار برای هر آزمایش ارائه شد. اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایش و کنترل با استفاده از آزمون‌های آماری تی تست و آنووا و با استفاده از نرم‌افزار Prism Graphpad نسخه ۹، انجام شد. سطح معناداری در تمام آزمون‌ها ≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پس از ساخت ویروس و جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی موش، این سلول‌ها با مقادیر مناسب از ویروس ترانسداکت‌شده و میزان سلول‌های GFP مثبت با روش فلوسایتومتری ارزیابی شد. افزایش بیان miR-1 و MyoCD در سلول‌های مزانشیمی ترانسداکت‌شده با ویروس‌های miR-1 و MyoCD به ترتیب ۸۸ برابر و ۴۳ برابر نسبت به گروه کنترل است (تصویر شماره ۱ الف). همچنین همان‌طور که در تصویر شماره ۱ ب مشخص است، حدود ۷۰ درصد از سلول‌های ترانسداکت شده GFP مثبت هستند.

نمودارهای مربوط به تست تورم در تصویر شماره ۲ الف و زنده‌مانی سلول‌ها در تصویر شماره ۲ ب نشان داده شده است. طبق نمودار تورم میتوان نتیجه گرفت ترکیب هیدروژل کیتوزان / کلاژن دارای قدرت جذب آب مناسب است و در صورت قرارگیری در محیط آبی ساختار ژل از بین نمیرود. همچنین طبق نمودار نرخ تورم در کیتوزان خالص بیشتر از هیدروژل کیتوزان / کلاژن است، زیرا کیتوزان خالص نسبت به کیتوزان / کلاژن خاصیت آب‌دوستی بیشتری دارد. علاوه بر این ترکیب هیدروژل کیتوزان /کلاژن برای سلول‌ها سمی نبوده و سلول‌ها قادر به رشد و زنده ماندن در این محیط پس از ۱۴ روز هستند. انحراف معیار با حداقل سه تکرار است. سطح معناداری ≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

پس از ارزیابی صحت کارایی ویروس‌های ساخته‌شده در توانایی ترانسداکت کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی که با روش فلوسایتومتری تأیید شد و همچنین سمی نبودن ترکیب هیدروژل ساخته‌شده، ابتدا سلول‌های مزانشیمی توسط لنتی ویروس‌های حاوی miR-1 و MyoCD ترانسداکت شده و سپس در هیدروژل اینکپسوله شده و نهایتاً پس از پایان زمان‌های تعیین‌شده تست‌های مربوطه انجام شد. با انجام تست qRT-PCR برای سلول‌ها در گروه‌های مختلف مشخص شد که بیان مارکرهای قلبی در محیط سه‌بعدی نسبت به محیط دوبعدی به طور معناداری افزایش یافته است. به طوری که بر اساس تست qRT-PCR بیان ژن‌های Gata4 ، Nkx2-5 و Tnnt2 در گروه سه‌بعدی در هر سه زمان ۷ روز، ۱۴ روز و ۲۱ روز نسبت به گروه دو بعدی به طور معناداری افزایش بیان نشان می‌دهد (تصویر شماره ۳ الف). همچنین نتایج حاصل از ایمونوسیتوشیمی تأییدکننده نتایج qRT-PCR است. به این صورت که بیان پروتئین مارکرهای قلبی در محیط سه‌بعدی نسبت به دوبعدی افزایش دارد (تصویر شماره ۳ ب).

بحث

miRNAها به عنوان تنظیم کننده در فرایندهای زیستی مانند تمایز، تکثیر و تکامل در نظر گرفته می‌شوند. همچنین آن‌ها نقش مهمی در کاردیوژنز دارند [۱۷]. در میان miRNAهای ویژه

www.SID.ir

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای هرکدام از ژن‌های موردمطالعه

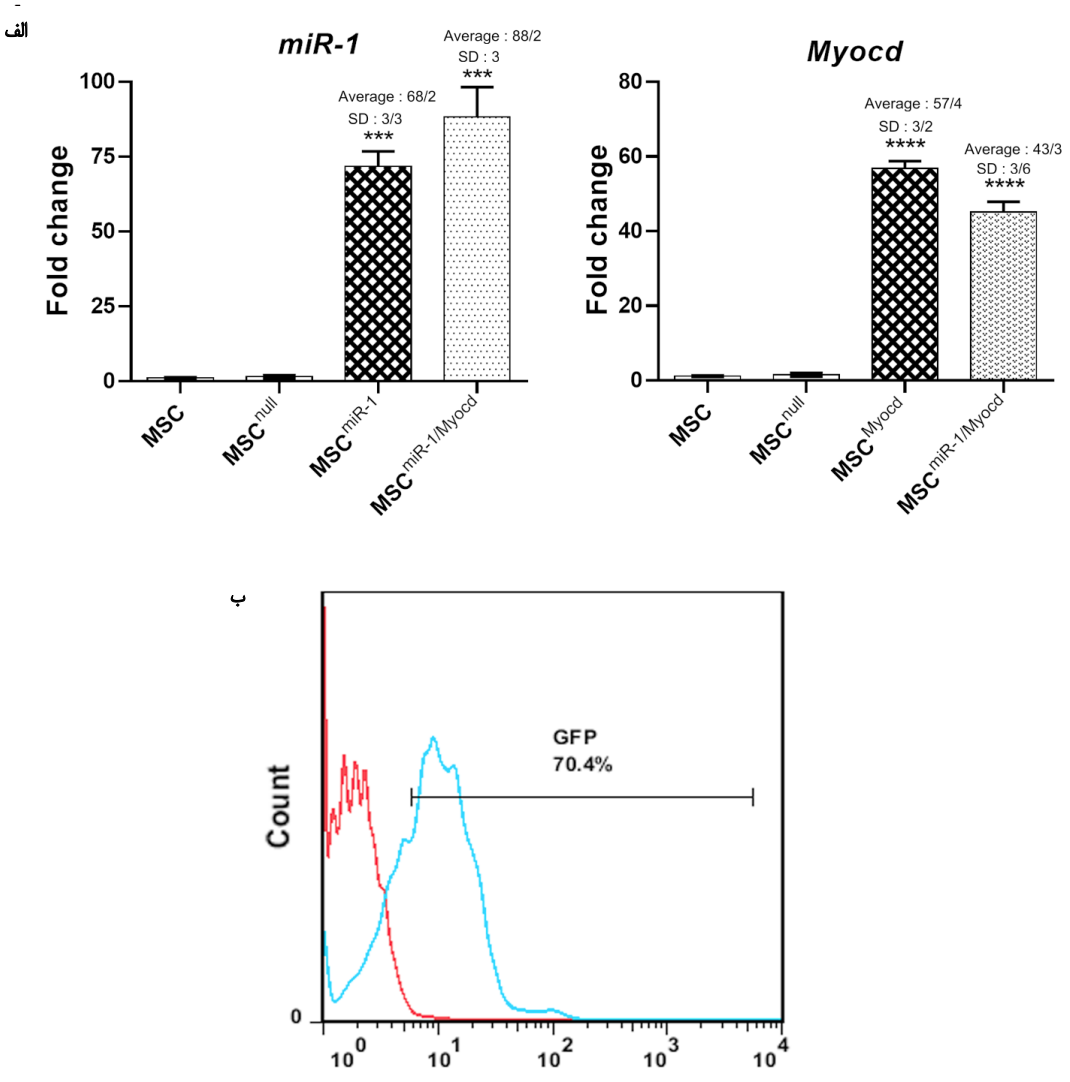
Gene Symbol	Primer	Product Size (bp)
miR-1	F: GTAGGCACCTGAAATGGAA R: TTGATGGTGCCTACAGTACAT	85
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA R: AACGCTTCACGAATTTGCGT	94
Myocd	F: CAAGCCAAAGGTGAAGAAGC R: TAGCTGAATCGGTGTTGCTG	177
Gata4	F: TCATCTCACTACGGGCACAG R: GGGAAGAGGGAAGATTACGC	233
Nkx2-5	F: CCTCAACAGCTCCCTGACTC R: GGGGACAGCTAAGACACCAG	201
Tnnt2	F: GGCAGCTGCTGTTCTGAGGGAG R: TGCCCTGGTCTCCTCGGTCT	191
Gapdh	F: CCTGGAGAAACCTGCCAAGTA R: GGCATCGAAGGTGGAAGAGT	148

مجله دانشگاه علوم پزشکی قـــم

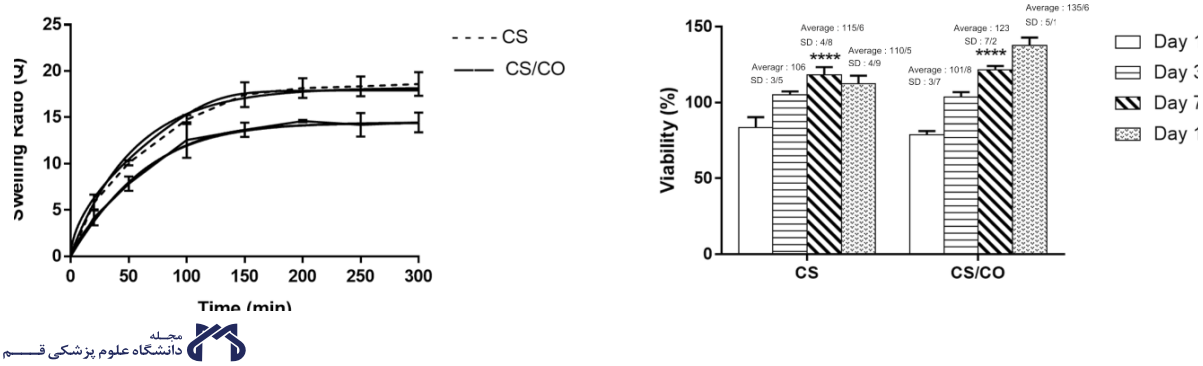
قلبی miR-1 با هدف قرار دادن مسیرهای سیگنالینگ مختلف از جمله مسیر Wnt/β-catenin در مراحل اولیه رشد قلب نقش دارد [۹]. مطالعات مختلف نشان داده است که miR-1 در بیان مارکرهای ویژه قلبی از جمله Gata4، Nkx2-5 و Tnnt2 نقش ویژه‌ای دارد. همچنین مشخص شده است که افزایش بیان miR-1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی سبب تمایز این سلول‌ها به سلول‌های شبه‌قلبی می‌شود [۱۸]. علاوه بر این، ژانگ و همکاران نشان داده‌اند که القای همزمان miR-1 و MyoCD سبب بهبود تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های شبه‌قلبی می‌شود. بنابراین به دلیل اثر هم‌افزایی فاکتور MyoCD بر عملکرد miR-1 و بهبود تمایز به سمت سلول‌های شبه‌قلبی، در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت همزمان با لنتی ویروس‌های حاوی miR-1 و MyoCD القا شدند [۱۹].

در گذشته بیشتر مطالعات مرتبط با فرایند تمایز در کشت دوبعدی بررسی می‌شد، اما به دلیل مزایای متعدد محیط سه‌بعدی نسبت به محیط دوبعدی، مطالعات زیادی در این راستا انجام شده است. در کشت سه‌بعدی سلول‌ها علاوه بر تعامل با یکدیگر با ماتریکس خارج سلولی نیز ارتباط دارند. در حالی که در کشت دوبعدی سلول‌ها فقط با سلول‌های اطراف خود ارتباط برقرار می‌کنند. علاوه بر این، نیروهای مکانیکی بین سلول سلول و محیط سلول در کشت سه‌بعدی مجموعه‌ای از سیگنال‌ها را تنظیم کرده که عملکردهای مختلف سلولی از قبیل تکثیر، تمایز و مهاجرت را تنظیم می‌کند. علاوه بر این، ساختار و سازمان‌دهی سلول‌ها در کشت سه‌بعدی در مقایسه با کشت دوبعدی تغییر می‌کند که بر عملکرد و سیگنالینگ سلول‌ها مؤثر است [۲۰]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت رفتارهای سلولی در کشت سه‌بعدی با کشت دوبعدی کاملاً متفاوت است. مجموعه این ویژگی‌ها سبب بهبود شرایط تمایز سلول‌ها از جمله تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های شبه‌قلبی می‌شود [۲۱]. در مهندسی بافت قلب از هیدروژل‌های مختلفی استفاده می‌شود که کیتوزان و کلاژن یکی از پرکاربردترین آن‌هاست. کیتوزان به عنوان یک پلی‌ساکارید زیست‌سازگار به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی و عدم ایمنی‌زایی غالباً در مهندسی بافت استفاده می‌شود. مطالعات نشان داده است که کیتوزان به عنوان یک داربست هیدروژلی در ترکیب با سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند عملکرد قلب را در مدل‌های انفارکتوس موش صحرایی بهبود بخشد [۲۲]. همچنین کلاژن، چسبندگی سلول را با گیرنده‌های اینتگرین تسهیل می‌کند و به این ترتیب مسیرهای سیگنال‌دهی را فعال کرده که به نوبه خود بقا، تکثیر و تمایز سلول را تنظیم می‌کند [۱۹]. بنابراین در صورت ترکیب با کیتوزان کارایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های شبه‌قلبی بهبود می‌یابد. به این صورت که شبکه هیدروژلی یکپارچه متخلخل کیتوزان / کلاژن یک

www.SID.ir

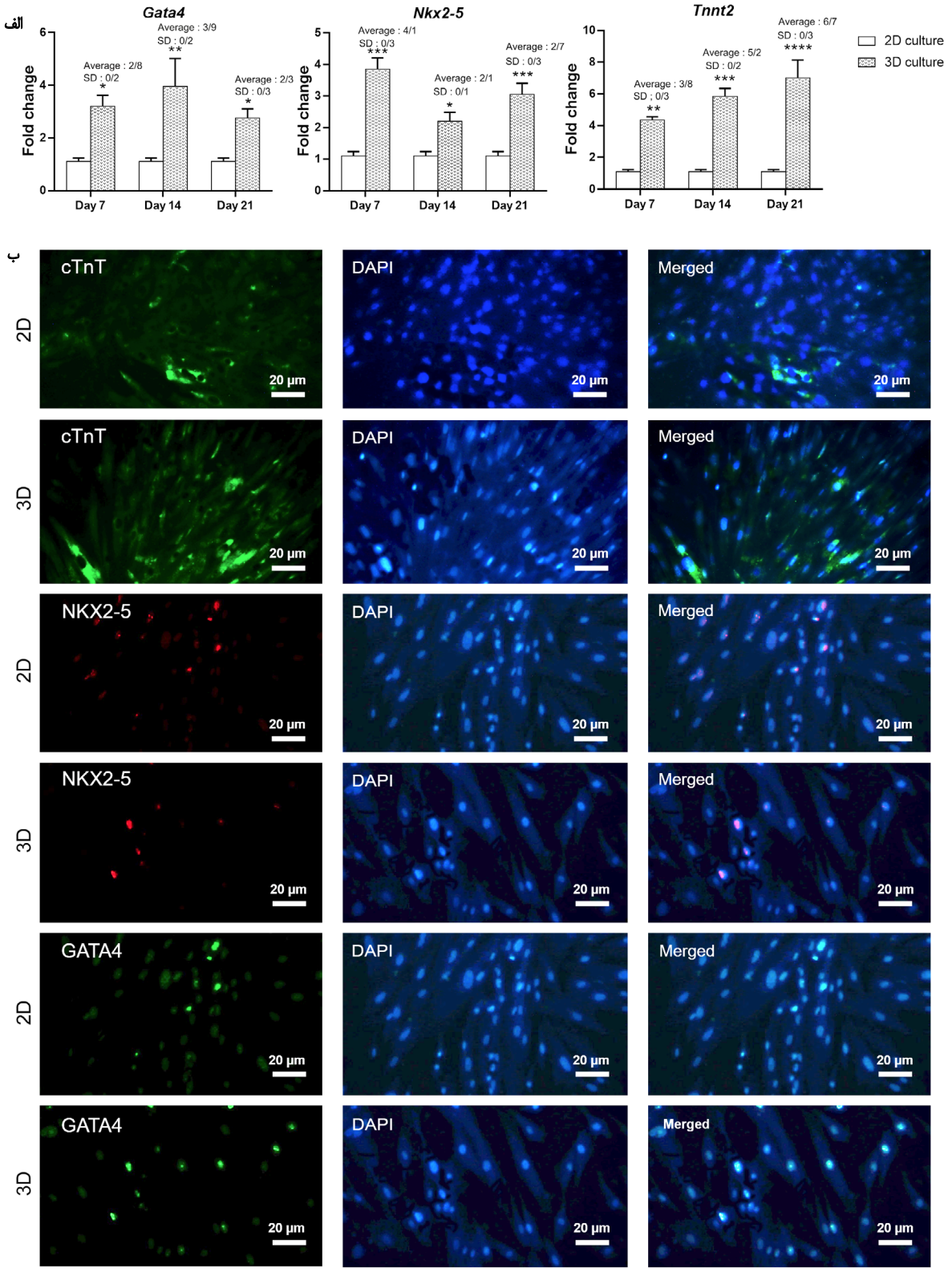


تصویر ۱. ارزیابی ترانسداکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با لنتی ویروس‌های حاوی miR-1
الف: MyoCDبیان miR-1 و MyoCD در گروه‌های مختلف با تست qRT-PCR ارزیابی شد. ***P<۰/۰۰۱و ****P<۰/۰۰۰۱؛ **ب:** درصد سلول‌های مزانشیمی ترانسداکت‌شده با روش فلوسایتومتری سنجیده شد.



تصویر ۲. ارزیابی هیدروژل کیتوزان/کلاژن
الف: ارزیابی قدرت تورم هیدروژل کیتوزان و کیتوزان / کلاژن در زمان‌های مختلف؛ **ب:** نمودار MTT برای سلول‌های اینکپسوله در هیدروژل کیتوزان خالص و کیتوزان/کلاژن. درصد زنده‌مانی سلول‌ها در روزهای ۷ و ۱۴ بعد از اینکپسوله شدن نسبت به روز ۳ به طور معناداری افزایش پیدا کرده است. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه شده است.

www.SID.ir



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قـــم

تصویر ۳. تمایز سلول‌های ترانسداکت‌شده به سلول‌های شبه‌قلبی بعد از اینکپسوله شدن در هیدروژل کیتوزان / کلاژن
الف: بیان ژن‌های Nkx2-5، Gata4 و Tnnt2 در محیط دوبعدی و سه‌بعدی با روش qRT-PCR سنجیده شد. *P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱، ***P<۰/۰۰۱، ****P<۰/۰۰۰۱
ب: تست ایمونوسیتوشیمی برای سلول‌های ترانسداکت‌شده و اینکپسوله‌شده ۲۱ روز بعد از تمایز حاکی از افزایش بیان مارکرهای قلبی در محیط سه‌بعدی نسبت به محیط دوبعدی است. هسته سلول‌ها با رنگ DAPI رنگ‌آمیزی شده‌اند.

www.SID.ir

ریزمحیط مناسب برای تکثیر و تمایز سلول از طریق نفوذپذیری مواد مغذی و مولکول‌های بیولوژیکی و توسعه مسیر سیگنالینگ در میان سلول‌های اینکپسوله در هیدروژل فراهم کرده است [۲۰]. در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی موش با لنتی ویروس‌های حاوی miR-1 و MyoCD به طور هم‌زمان ترانسداکت شده و پس از سه روز، سلول‌های القاشده در هیدروژل کیتوزان / کلاژن قرار گرفتند. نتایج حاصل از تست‌های in vitro نشان داد بیان مارکرهای قلبی در سطح ژن و پروتئین در سلول‌های اینکپسوله‌شده در هیدروژل در مقایسه با سلول‌های موجود در کشت دوبعدی به طور معناداری افزایش پیدا کرده است. با وجود اینکه بیان ژن‌ها در محیط سه‌بعدی نسبت به محیط دوبعدی افزایش معناداری نشان می‌دهد، اما با توجه به اینکه Gata4 یک مارکر اولیه و Tnnt2 یک مارکر ثانویه در تمایز سلول‌های قلبی است، الگوی بیانی این دو ژن در روزهای مختلف تمایز متفاوت است.

این نتایج نشان‌دهنده تأثیر مثبت کشت سه‌بعدی بر بهبود تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت سلول‌های شبه‌قلبی است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که القای هم‌زمان miR-1 و MyoCD در سلول‌های بنیادی مزانشیمی و به دنبال آن کشت در محیط هیدروژل حاوی کیتوزان / کلاژن منجر به تمایز بیشتر سلول‌ها به سمت سلول‌های شبه‌قلبی می‌شود. این یافته‌ها اهمیت کشت سه‌بعدی در تمایز سلول‌های بنیادی را نشان می‌دهد. بنابراین در مطالعات آینده می‌توان با بهبود شرایط تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی و به دنبال آن به دست آوردن سلول‌های قلبی بالغ، شاهد پیشرفت‌هایی در بازسازی قلب مبتنی بر سلول‌درمانی باشیم.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

تمام آزمایشات حیوانی بر اساس دستورالعمل‌های مورد تأیید مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و کمیته اخلاق دانشگاه تربیت‌مدرس انجام شد (کد اخلاق: IR.MODARES.REC.1398.125).

حامی مالی

این تحقیق هیچ‌گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه تربیت‌مدرس، دانشگاه اصفهان و مرکز قلب تهران کمال تشکر و قدردانی را دارند.

www.SID.ir

References

[1] Zhao Y, Londono P, Cao Y, Sharpe EJ, Proenza C, O'Rourke R, et al. High-efficiency reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes requires suppression of pro-fibrotic signalling. Nat Commun. 2015; 6:8243. [DOI:10.1038/ncomms9243] [PMID] [PMCID]

[2] Muiesan ML, Paini A, Rosei CA, Bertacchini F, Stassaldi D, Salvetti M. Current pharmacological therapies in heart failure patients. High Blood Press Cardiovasc Prev. 2017; 24(2):107-14. [DOI:10.1007/s40292-017-0194-3] [PMID]

[3] Hénon P. Key success factors for regenerative medicine in acquired heart diseases. Stem Cell Rev Rep. 2020; 16(3):441-58. [DOI:10.1007/s12015-020-09961-0] [PMID] [PMCID]

[4] Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. Circ Res. 2015; 116(8):1413-30. [DOI:10.1161/CIRCRESAHA.116.303614] [PMID] [PMCID]

[5] Musialek P, Mazurek A, Jarocha D, Tekieli L, Szot W, Kostkiewicz M, et al. Myocardial regeneration strategy using Wharton's jelly mesenchymal stem cells as an off-the-shelf 'unlimited' therapeutic agent: Results from the acute myocardial infarction first-in-man study. Postepy Kardiol Interwencyjnej. 2015; 11(2):100-7. [DOI:10.5114/pwki.2015.52282] [PMID] [PMCID]

[6] McGinley L, McMahon J, Strappe P, Barry F, Murphy M, O'Toole D, et al. Lentiviral vector mediated modification of mesenchymal stem cells & enhanced survival in an in vitro model of ischaemia. Stem Cell Res Ther. 2011; 2(2):12. [PMID] [PMCID]

[7] Satija NK, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma Sh, Afrin F, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy: A new paradigm in regenerative medicine. J Cell Mol Med. 2009; 13(11-12):4385-402. [DOI:10.1111/j.1582-4934.2009.00857.x] [PMID] [PMCID]

[8] Piubelli C, Meraviglia V, Pompilio G, D'Alessandra Y, Colombo GI, Rossini A. microRNAs and cardiac cell fate. Cells. 2014; 3(3):802- 23. [DOI:10.3390/cells3030802] [PMID] [PMCID]

[9] Shen X, Pan B, Zhou H, Liu L, Lv T, Zhu J, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes is regulated by miRNA-1-2 via WNT signaling pathway. J Biomed Sci. 2017; 24(1):29. [DOI:10.1186/s12929-017-0337-9] [PMID] [PMCID]

[10] Wang D, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, et al. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. Cell. 2001; 105(7):851- 62. [DOI:10.1016/S0092-8674(01)00404-4] [PMID]

[11] Fong AH, Romero-López M, Heylman CM, Keating M, Tran D, Sobrino A, et al. Three-dimensional adult cardiac extracellular matrix promotes maturation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Tissue Eng Part A. 2016; 22(15-16):1016-25. [DOI:10.1089/ten.tea.2016.0027] [PMID] [PMCID]

[12] Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, Gepstein A, Arbel G, Habib IHM, et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. Circ Res. 2007; 100(2):263-72. [DOI:10.1161/01.RES.0000257776.05673.ff] [PMID]

[13] Bejleri D, Davis ME. Decellularized extracellular matrix materials for cardiac repair and regeneration. Adv Healthc Mater. 2019; 8(5):e1801217. [DOI:10.1002/adhm.201801217] [PMID] [PMCID]

[14] Fukuda J, Khademhossieni A, Yeo Y, Yang X, Yeh J, Eng G, et al. Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures. Biomaterials. 2006; 27(30):5259- 67. [DOI:10.1016/j.biomaterials.2006.05.044] [PMID]

[15] Shaghiera AD, Widiyanti P, Yusuf H. Synthesis and characterization of injectable hydrogels with varying collagen-chitosan-thymosin β4 composition for myocardial infarction therapy. J Funct Biomater. 2018; 9(2):33. [DOI:10.3390/jfb9020033] [PMID] [PMCID]

[16] Deng C, Zhang P, Vulesevic B, Kuraitis D, Li F, Yang AF, et al. A collagen-chitosan hydrogel for endothelial differentiation and angiogenesis. Tissue Eng Part A. 2010; 16(10):3099-109. [DOI:10.1089/ten.tea.2009.0504] [PMID]

[17] Synnergren J, Améen C, Lindahl A, Olsson B, Sartipy P. Expression of microRNAs and their target mRNAs in human stem cell-derived cardiomyocyte clusters and in heart tissue. Physiol Genomics. 2011; 43(10):581-94. [DOI:10.1152/physiolgenomics.00074.2010] [PMID]

[18] Zhao XL, Yang B, Ma LN, Dong YH. MicroRNA-1 effectively induces differentiation of myocardial cells from mouse bone marrow mesenchymal stem cells. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2016; 44(7):1665-70. [DOI:10.3109/21691401.2015.1080168] [PMID]

[19] Christoforou N, Chakraborty S, Kirkton RD, Adler AF, Addis RC, Leong KW. Core transcription factors, microRNAs, and small molecules drive transdifferentiation of human fibroblasts towards the cardiac cell lineage. Sci Rep. 2017; 7:40285. [DOI:10.1038/srep40285] [PMID] [PMCID]

[20] Ronaldson-Bouchard K, Ma SP, Yeager K, Chen T, Song L, Sirabella D, et al. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. Nature. 2018; 556(7700):239-43. [DOI:10.1038/s41586-018-0016-3] [PMID] [PMCID]

[21] Synnergren J, Ameen C, Lindahl A, Olsson B, Sartipy P. Expression of microRNAs and their target mRNAs in human stem cell-derived cardiomyocyte clusters and in heart tissue. Physiol. Genomics. 2011; 43(10):581-594. [DOI:10.1152/physiolgenomics.00074.2010]

[22] Zhao X, Yang B, Ma L, Dong Y. MicroRNA-1 effectively induces differentiation of myocardial cells from mouse bone marrow mesenchymal stem cells. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2016; 44(7):1665-70. [DOI:10.3109/21691401.2015.1080168]

[23] Christoforou N, Chakraborty S, Kirkton RD, Adler AF, Addis RC, Leong KW. Core transcription factors, microRNAs, and small molecules drive transdifferentiation of human fibroblasts towards the cardiac cell lineage. Sci Rep. 2017; 7(1):1-5. https://www.nature.com/articles/srep40285

[24] Ronaldson-Bouchard K, Ma s, Yeager K, Chen T, Song L, Sirabella D, et al. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. Nature. 2018; 556(7700):239-43. [DOI:10.1038/s41586-018-0016-3]

www.SID.ir

Archive of SID

This Page Intentionally Left Blank

www.SID.ir