

تولید داربست پلی کاپرولاکتون-ژلاتین به منظور تمایز سلولهای پروژنیاتور قلبی

زهرا شمس M.Sc.^۱، بابک اکبری Ph.D.^۱، سارا رجبی Ph.D.^{۲*}، ناصر اقدمی Ph.D.^۲

- ۱- دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فنون نوین، گروه مهندسی علوم زیستی، تهران، ایران
- ۲- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلولهای بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلولهای بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: sarahrajabi83@gmail.com ، babakbari@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱۳

چکیده

هدف: در این پژوهش، تهیه یک داربست ترکیبی با دارا بودن شرایط مورد نیاز جهت رشد، تکثیر و تمایز سلولهای پروژنیاتور قلبی، مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روشها: داربست ترکیبی با نانوفیبرهای موازی از پلیمرهای پلی کاپرولاکتون و ژلاتین با درصد ترکیبی ۷۰ به ۳۰ و با بیشترین شباهت از لحاظ ساختار موازی نانوفیبرها، قدرت الاستیسیته و همگونی نانوفیبرها با ماتریکس خارج سلولی قلب توسط روش الکتروریسی تهیه شد. با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی و آزمونهای زاویه تماس و آنالیز استحکام مکانیکی در جهت نانوفیبرها، داربست ترکیبی ایجاد شده، به منظور دارا بودن بیشترین مشخصات مورد نیاز جهت داربست قلبی، مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت از آزمون Real time-PCR به منظور بررسی میزان بیان ژنهای مرتبط با تمایز سلولهای پروژنیاتور قلبی (*MYH-6, TTN and CX-43*) استفاده شد.

نتایج: آزمونهای زاویه تماس و آنالیز استحکام مکانیکی نشان داد که داربست از نظر چسبندگی و استحکام شرایط مناسبی برای کشت سلولهای پروژنیاتور قلبی را دارا بوده و آزمون Real time-PCR نیز نتایج خوبی از بیان ژنهای مرتبط با ضربان سلولهای کشت داده شده بر روی داربست را در برداشت.

نتیجه گیری: از آنجاکه مهمترین تفاوت سلول قلبی با سایر سلولهای بدن در داشتن ضربان است که ژنهای خاصی مسئول همزمان-سازی آن هستند، نتایج این پژوهش نشان داد که داربست تولید شده می تواند گزینه مناسبی برای القای تمایز سلولهای پروژنیاتور قلبی و مهندسی بافت قلب باشد.

واژگان کلیدی: بیان ژنهای قلبی، داربست الکتروریسی، سلولهای پروژنیاتور قلبی، مهندسی بافت قلب

مقدمه

بیماری‌های قلبی یکی از دلایل عمده مرگ‌ومیر در دنیا محسوب می‌شوند به طوری که تقریباً ۴۰ درصد از مرگ و ناتوانی در کشورهای پیشرفته و جهان سوم را در بر می‌گیرند (۱). طبق تخمین‌های انجام شده در سال ۲۰۱۳، بیش‌تر از ۱۷,۳ میلیون از مرگ‌های گزارش شده مربوط به بیماری‌های قلبی بوده و انتظار می‌رود که این میزان در سال ۲۰۳۰ به ۲۳/۶ میلیون افزایش یابد (۲). قلب یکی از ارگان‌های پیشرفته در بدن ماست که وظیفه پمپاژ خون به سرتاسر بدن را برعهده دارد. زمانی که بنا به هر دلیلی، خونرسانی به قسمتی از بافت قلب به خوبی انجام نشود، سلول‌های آن قسمت از بافت می‌میرند و از آن‌جائی که سلول‌های قلبی توانایی ترمیم ندارند، شخص دچار نارسایی قلبی می‌شد. در نارسایی قلبی، عملکرد قلب نیز مختل می‌شود (۳). از گذشته تاکنون درمان‌های زیادی در بیماران دارای نارسایی قلبی انجام شده است که برخی از جمله مصرف دارو، غیرتهاجمی و برخی نیز هم‌چون آنژیوپلاستی، دستگاه حمایت‌کننده قلبی، پیس‌میکر و درنهایت پیوند قلب، تهاجمی هستند (۴، ۵). در این روش‌ها هدف اصلی، کمک به قلب است که باوجود این که قسمتی از سلول‌های خود را از دست داده است، تاحدی عمل کرد خود را بهبود بخشد و توسط دارو تا حدی از پیشرفت بیماری جلوگیری شد، ولی هیچ‌کدام راه حلی برای ترمیم بافت از دست رفته ارائه نمی‌کنند. در نهایت پیوند قلبی نیز که در بیماران مرحله آخر استفاده می‌شود، به‌علت کمبود اهدا کننده و همین‌طور واکنش سیستم ایمنی بدن دچار محدودیت‌های زیادی شده است. لذا در سال‌های اخیر، دانشمندان به‌سراغ روش‌های نوین هم‌چون سلول‌درمانی و مهندسی بافت رفته‌اند (۵). در روش‌های نوین، سعی بر آن است که سلول‌های زنده بتوانند جایگزین سلول‌های مرده شدند. تزریق سلول‌های بنیادی به‌محل آسیب دیده یکی از روش‌های مورد استفاده است که می‌تواند از طریق تزریق مستقیم به قسمت آسیب‌دیده و یا تزریق شریانی صورت گیرد (۶).

این روش‌ها مشکلاتی نیز در بردارند، به طوری که در صورت تزریق به شریان کرونری، تنها ۱۵ درصد از سلول‌ها به‌محل مورد نظر رسیده (۷) و در صورت تزریق مستقیم به بافت نیز با وجود این که اکثر سلول‌ها به قسمت موردنظر می‌رسند ولی به‌علت عدم وجود داربست مناسب برای تغذیه و رشد، میزان کمی از آن‌ها دارای عمل‌کرد مناسب خواهند بود. لذا ترکیب داربست و سلول‌های پروژنیاتور قلبی می‌تواند گزینه مناسبی برای درمان باشد (۸-۱۰). داربست مناسب جهت مهندسی بافت قلب باید دارای شاخصه‌های ذیل باشد:

از نانوفیبرهای هم‌گون با قطر یک‌نواخت تشکیل شده باشد. توسط روش‌های الکتروریسی و یا پرینت سه بعدی می‌توان به داربستی با این مشخصه دست یافت (۱۱، ۱۲).

ناهمسان‌گرد باشد، یکی از خواص عضله قلبی آن است که بارهای مکانیکی در جهت خاصی انتقال می‌یابند و همین باعث شده که داربست قلبی، خواص ناهمسان‌گردی داشته باشد (۱۳، ۱۴). در روش پرینت سه بعدی می‌توان حرکت نازل را به‌صورتی برنامه‌ریزی کرد که در نهایت داربستی متشکل از نانوفیبرهای موازی داشت (۸). الکتروریسی بر روی ماندربول چرخان نیز یکی از روش‌های تولید داربست نانوفیبری موازی است که از نظر هزینه نیز مناسب‌تر از روش پرینت سه بعدی می‌باشد (۱۳، ۱۵)

چسبندگی و استحکام مناسب داشته باشد، از آن‌جائی که بافت قلبی به‌صورت مداوم و سیکل‌وار تحت نیروی کششی حاصل از انقباض و انبساط می‌باشد، لذا داربست مناسب باید بتواند این میزان کشش را تحمل کند و در طول زمان ترمیم، از سلول‌ها حمایت مکانیکی داشته باشد (۱۶). ماهیچه‌ی قلبی، مدول یانگی در حدود ۱۰ تا ۲۰ کیلو پاسکال در زمان دیاستول با کشش کمتر از ۱۰ درصد دارد که در پایان دیاستول تا ۵۰ کیلو پاسکال در عضله قلبی سالم و تا ۲۰۰ تا ۳۰۰ کیلو پاسکال در قلب آسیب دیده افزایش می‌یابد. بنابراین داشتن یک داربست الاستومر برای استفاده در سیکل‌های انقباضی بافت قلب بسیار مناسب است (۱۷). پلیمرهای مصنوعی نه‌تنها خواص مکانیکی خوبی دارند بلکه نرخ تخریب‌پذیری قابل‌کنترلی را نیز دارا می‌باشند (۱۵، ۱۷). پلی کاپرولاکتون (PCL)، یک پلیمر مصنوعی از خانواده‌ی پلی یورتان‌هاست که به‌داشتن خواص

الاستومری خیلی خوب شناخته شده است (۱۸) ولی در عین حال از آن جایی که ذاتا هیدروفوب است نمی تواند شرایط مناسبی جهت چسبندگی سلول مهیا کند، لذا ترکیب آن با یک داربست طبیعی همچون ژلاتین می تواند هر دو فاکتور چسبندگی و استحکام مکانیکی را ایجاد نماید. البته درصد ترکیب این دو پلیمر نیز اهمیت بسیار بالایی دارد. درصد انتخابی ترکیبی باید به گونه ای باشد که داربست علاوه بر داشتن استحکام مکانیکی، چسبندگی سلولی مناسبی نیز داشته باشد و در عین حال نیز هم گون باشد (۱۵، ۱۷).

در این مطالعه با ساخت داربست نانوفیبری ترکیبی از ۲ پلیمر PCL و ژلاتین با درصد ترکیب مناسب توسط روش الکتروریسی با ماندربول چرخان، سعی شده که داربست مناسبی جهت کشت سلول های پروژنیاتور قلبی ایجاد شد. عضله ی قلبی از چندین لایه که روی هم قرار گرفته اند، تشکیل شده است که هر لایه که از ماتریکس خارج سلولی ساخته شده است، متشکل از نانوفیبرهای موازی و هم راستا می باشد (۱۹). لذا با استفاده از روش الکتروریسی بر روی ماندربول چرخان می توان به ساختاری مشابه با ماتریکس خارج سلولی قلبی دست یافت. در شکل ۱، بستر نانوفیبری تشکیل دهنده بافت قلبی قابل مشاهده است.

علاوه بر ساختار فیزیکی داربست، یکی از عوامل مهم دیگر در بررسی کاربردی بودن داربست ایجاد شده جهت کشت سلول های قلبی، بررسی میزان بیان ژن های مرتبط با هم زمان سازی انقباض قلبی می باشند. زیرا یکی از ویژگی های مهم سلول های قلبی انقباض هم زمان آن ها جهت خون رسانی به کلیه اعضا می باشد. در این پژوهش میزان بیان سه ژن TTN (تشکیل دهنده پروتئین Titin)، MYH-6 (تشکیل دهنده پروتئین Alpha-MHC) و GJAI (تشکیل دهنده پروتئین Connexin-43) در سلول های پرونیاتور قلبی کشت شده بر روی داربست، توسط روش Real time-PCR بررسی شد.

مواد و روش ها

مواد: پلی کاپرولاکتون ((PCL (MW 80,000 g/mol)، ژلاتین خوکی نوع A و محیط کشت IMDM تهیه شده از سیگما آلدریچ، اسیداستیک، اسیدفرمیک، گلو تارآلدئید، اتانول و فسفات بافرسالین (PBS) تهیه شده از مرک و آمینواسید، پنی سیلین و ال گلو تامین تهیه شده از اینویتروژن و در نهایت سرم جنین گاوی (FBS) خریداری شده از Gibco مواد مورد استفاده در این پژوهش می باشند. سلول های پروژنیاتور قلبی نیز از پژوهشگاه رویان تهیه شدند.

به دست آوردن پارامترهای بهینه الکتروریسی جهت تهیه داربست نانوفیبری جهت دار: در ابتدا برای به دست آوردن محلولی با غلظت پلیمر ۱۴ درصد، حلال را که ترکیبی از اسیدفرمیک و اسیداستیک تهیه شده از MERK آلمان با نسبت های ۷ به ۳ است را آماده کرده (۲۰) (از آن جاکه اسید فرمیک ثابت دی الکتریک بالاتری دارد و برای الکتروریسی مناسب تر است به میزان بیش تری در حلال استفاده شد). سپس برای به دست آوردن پارامترهای بهینه جهت الکتروریسی و داشتن نانوفیبرهای موازی و هم گون، پلیمرهای PCL و ژلاتین نوع A خوکی که هر دو از کمپانی Sigma Aldrich تهیه شده بودند با نسبت PCL/Gelatin=70/30 مخلوط شده و به حلال اضافه شد و سپس به مدت ۱ ساعت بر روی استیرر با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه و بدون اعمال حرارت قرار داده شد. برای تهیه داربست از محلول تهیه شده، از روش الکتروریسی استفاده شد. برای داشتن نانوفیبرهای موازی از ماندربول چرخان استفاده شد. ماندربول چرخان یکی از بهترین انتخاب ها برای سیستم جمع کننده دستگاه الکتروریسی است که با توجه چرخش، امکان تولید نانوالیاف یکنواخت را می دهد. از جمله مزایای این روش می توان به امکان دستیابی به یک نواختی بالا و امکان تنظیم میزان آرایش یافتگی نانوالیاف با تنظیم سرعت چرخش ماندربول اشاره کرد. در حال حاضر انواع ماندربول ها با ابعاد مختلف و با سرعت های چرخش متغیر تا ۳۵۰۰ دور در دقیقه

ساخته شده و آماده ارائه هستند. در این روش جهت به دست آوردن پارامترهای بهینه الکترونیسی، با تغییر نرخ تغذیه، فاصله سوزن تا کالکتور، ولتاژ و سرعت چرخش ماندربول (۲۱) طبق جدول ۱، تعداد ۶ نمونه به دست آمد. نمونه‌ها به منظور مشخص شدن مورفولوژی، میزان هم‌گون بودن و جهت‌دار بودن نانوفیبرها برای تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) فرستاده شدند. برای این که با تابش الکترونی بتوان از سطح پلیمر تصویر تهیه کرد، بایستی روی سطح آن پوششی از طلا ایجاد می‌شد تا سطح رسانا شود. سپس با اعمال ولتاژ ۲۰۰۰ ولت از نمونه‌ها تصویر برداری شد.

به دست آوردن درصد ترکیبی بهینه برای دو پلیمر PCL و ژلاتین: پس از مشخص شدن پارامترهای مناسب جهت الکترونیسی و به دست آوردن داربست با نانوفیبرهای موازی و توزیع یک‌نواخت، درصدهای ترکیبی مختلف از لحاظ میزان آب‌دوستی و همین‌طور استحکام مکانیکی مورد آزمایش قرار گرفتند. برای این منظور، ۳ داربست با درصدهای ترکیبی PCL/Gelatin=80/20، PCL/Gelatin=70/30 و PCL/Gelatin=60/40 با در نظر گرفتن پارامترهای بهینه الکترونیسی تولید شدند.

بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی داربست: با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی، توزیع قطری داربست‌ها و میزان پراکندگی آن‌ها، توسط نرم افزار تحلیل آماری SPSS با هم مقایسه شد تا همگون‌ترین حالت مشخص شد. میزان آب‌دوستی داربست‌ها نیز با استفاده از روش ارزیابی زاویه تماس در ۳ داربست با درصدهای ترکیبی مختلف به دست آمد. زاویه تماس استاتیک به روش قطره-سایل اندازه‌گیری شد که در آن یک قطره به حجم ۳ میکرولیتر بر روی پلیمر قرار داده شده و هنگامی که قطره بر روی سطح پایدار شد، با دوربین از آن عکس برداری شد. مقایسه استحکام مکانیکی در ۳ درصد ترکیبی مختلف با استفاده از دستگاه اینسترون مدل TM-SM ساخت کشور انگلستان انجام شد. در ابتدا طول و ضخامت نمونه‌ها اندازه‌گیری و سپس با نرخ کرنش ۵ میلی‌متر در دقیقه، نیروی کششی در جهت نانوفیبرها به نمونه‌ها وارد شد (۲۲). پس از ۵ بار تکرار برای هر نمونه، نمودارهای تنش-کرنش به دست آمده و با یکدیگر مقایسه شد.

تست سمیت سلولی: در قدم اول، رده سلولی مورد نظر که سلول‌های پروژنیاتور قلبی بودند، در پژوهشگاه رویان در محیط کشت IMDM برند سیگما حاوی ۱ درصد آل گلوتامین اینویتروزن، آمینواسید اینویتروزن، آنتی‌بیوتیک اینویتروزن و ۱۰ درصد FBS گیکو کشت یافتند. پیش از استفاده از داربست در محیط کشت سلولی، به منظور جلوگیری از به هم ریختن مورفولوژی نانوفیبری آن در محیط آبی به سبب وجود پلیمر آب‌دوست ژلاتین، داربست در محیط حمام بخار گلو تار آلدئید ۲۵ درصد، به مدت ۶ روز شبکه‌ای شد. به منظور بررسی اندرکنش سلول با داربست، در روزهای ۲، ۴ و ۶ پس از کشت، از نمونه‌ها تست سمیت سلولی (MTS, Promega, G5421) گرفته شد تا میزان زنده‌مانی سلول‌ها بررسی شد. از آن جایی که رنگ ارغوانی حاصل از زنده‌مانی سلول‌ها در طول موج ۴۹۰ تا ۵۴۰ نانومتر جذب می‌شد، لذا نمونه را تحت جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر اشعه فرابنفش قرار دادیم تا میزان زنده‌مانی از روی میزان جذب در مقایسه با داربست PCL مقایسه شد.

کشت ثابت سلول بر روی داربست با نانوفیبرهای موازی: سلول‌های پروژنیاتور قلبی تهیه شده از پژوهشگاه رویان، بر روی داربست کامپوزیتی نانوفیبری به تعداد ۲ میلیون در مساحت ۲ سانتی‌متر مربعی داربست، تزریق شده و در محیط کشت قرار گرفتند. به منظور فراهم آوردن شرایط محیطی مناسب جهت رشد و تمایز سلول‌ها، دما، رطوبت، اکسیژن و pH محیط نیز باید کنترل می‌شد. به مدت ۷ روز سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست در داخل انکوباتور قرار گرفتند. پس از گذشت یک هفته از کشت سلولی، قسمتی از داربست برای تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی و قسمتی نیز برای انجام تست Real Time PCR فرستاده شد.

آنالیز تصاویر میکروسکوپ الکترونی حاصل از جهت‌گیری سلول‌های پروژنیاتور قلبی بر روی داربست: قسمت‌هایی از نمونه اصلی داخل محلول فیکساتور قرار گرفت تا جای سلول‌ها بر روی داربست ثابت شود. سپس به ترتیب با الکل‌های ۳۰ درصد، ۵۰ درصد، ۷۰ درصد، ۸۰ درصد و ۹۰ درصد هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه و سپس دوبار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه نیز در الکل ۱۰۰ درصد قرار داده شد تا آب داخل سلول‌ها با الکل جایگزین شود. پس از خشک شدن کامل نمونه، از آن تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شد.

آنالیز بیان ژن‌های قلبی با روش Real Time PCR در این پژوهش، ۳ ژن TTN، MYH-6 و GJA1 در سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست، توسط تست Real Time PCR مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. طراحی پرایمرها جهت انجام تست طبق جدول ۳ انجام شد.

در انجام این تست از کیت استخراج RNA برند Qiagen و کیت سنتز cDNA برند Thermo استفاده شد. تست Real Time PCR برای دو نمونه کنترل (سلول‌های قلبی فاقد داربست) و نمونه اصلی (کشت بر روی داربست)، با ۴ بار تکرار انجام شد و با توجه به واریانس کمتر از ۱ درصد، داده‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار شدند.

نتایج

بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی حاصل از تغییر پارامترهای الکتروروسی

همان‌طور که در بخش قبل توضیح داده شد الکتروروسی بر روی ماندربول چرخان، یکی از روش‌های کاربردی برای ساخت داربست‌های نانوفیبری دو بعدی با نانوفیبرهای یک‌نواخت و جهت‌دار می‌باشد. در تنظیمات دستگاه عواملی همچون نرخ تغذیه، فاصله سوزن تا کالکتور، ولتاژ و سرعت چرخش ماندربول باید بهینه شد. در این مطالعه از آن‌جایی که بافت هدف، ماتریکس خارج سلولی قلبی می‌باشد، باید با انتخاب پارامترهای الکتروروسی مناسب بتوانیم تا حد امکان به داربستی با نافیبرهای موازی و هم‌گون دست پیدا کنیم که با بیش‌ترین شباهت را از نظر فیزیکی و ساختار با ماتریکس قلبی (شکل ۱) داشته باشد.

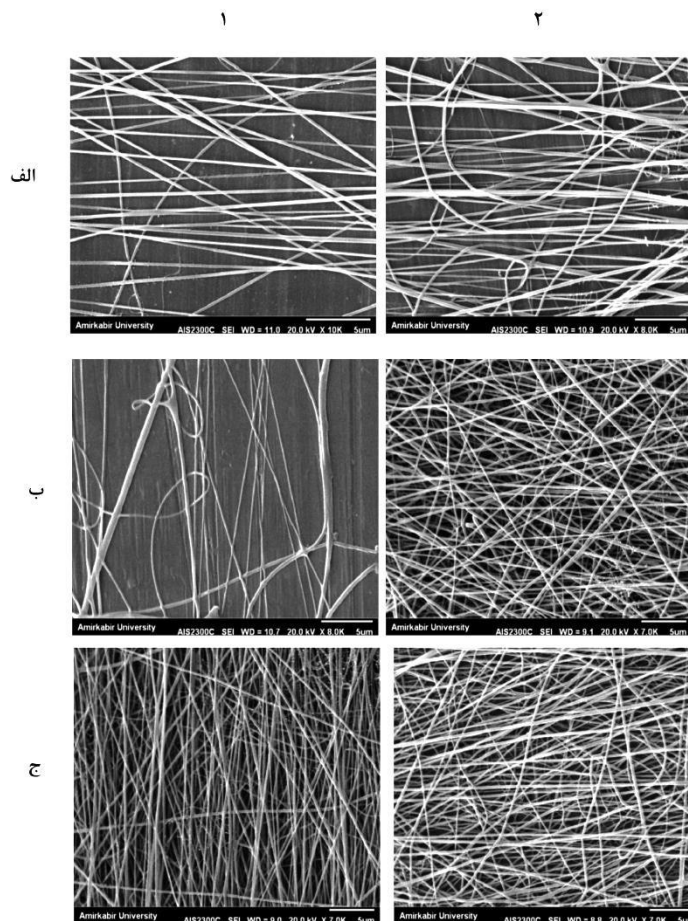


شکل ۱: تصویر بستر فیبری تشکیل دهنده بافت قلبی به کمک تصویربرداری رزونانس مغناطیسی با تئسور نفوذ کننده (۱۷)

لذا، با تغییر پارامترهای الکتروریسی طبق جدول ۱، داربست های شکل ۲ تولید شد تا بتوان با اطمینان، بهترین داربست را جهت کشت سلولی انتخاب کرد.

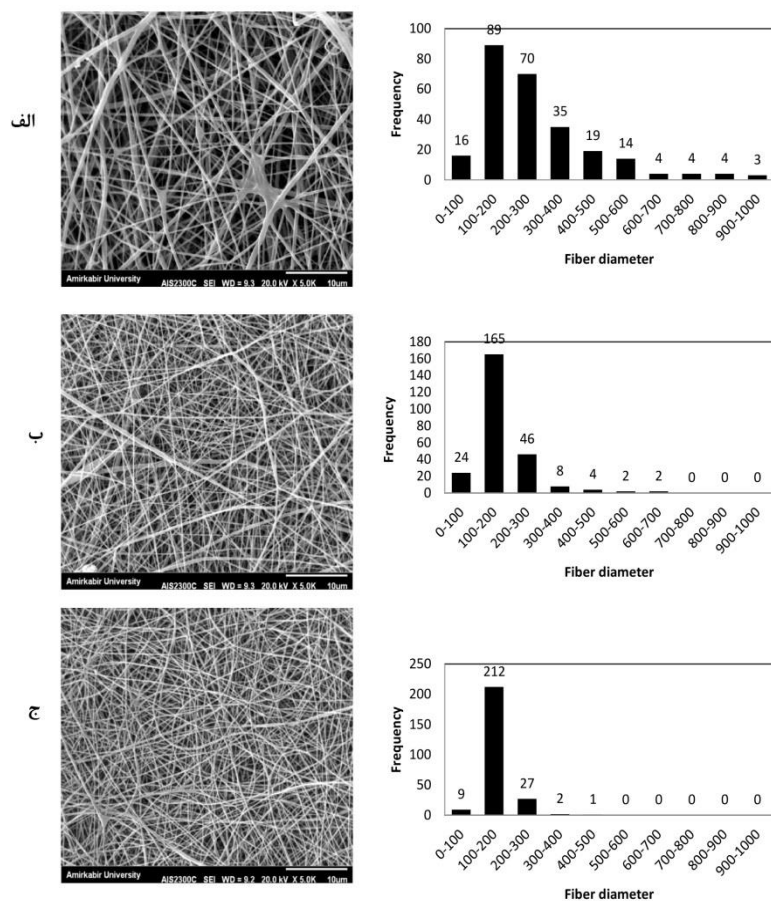
جدول ۱: ساخت ۶ داربست ترکیبی PCL/Gelatin=70/30 با تغییر پارامترهای مختلف الکتروریسی. غلظت داربست (w/v) ۱۴ درصد بوده و فرآیند الکتروریسی در دمای محیط انجام گرفت.

نمونه	نرخ تغذیه (میلی لیتر / ساعت)	فاصله سوزن تا کالکتور (سانتی متر)	ولتاژ (کیلو ولت)	سرعت چرخش ماندروال (دور بر دقیقه)
الف - ۱	۰,۱	۱۵	۱۷	۲۰۰۰
الف - ۲	۰,۲	۱۲	۱۵	۲۰۰۰
ب - ۱	۰,۱	۱۲	۱۲	۱۸۰۰
ب - ۲	۰,۳	۱۰	۱۷	۱۵۰۰
ج - ۱	۰,۳	۱۰	۱۷	۲۰۰۰
ج - ۲	۰,۳	۱۰	۱۷	۲۵۰۰



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ الکترونی داربست ترکیبی PCL/Gelatin=70/30 با پارامترهای مختلف الکتروریسی مشخص شده در جدول (۱)

بررسی توزیع قطری نانوفیبرها با درصدهای ترکیبی مختلف یکی دیگر از نتایج جالب در این مطالعه رابطه ناهمگونی الیاف با افزایش ژلاتین می‌باشد. در نمونه‌های حاصل از الکترورسی با پارامترهای بهینه و با درصدهای ترکیبی مختلف PCL/Gelatin=80/20، PCL/Gelatin=70/30 و PCL/Gelatin=60/40، پس از تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی طبق شکل ۳، نمودارهای توزیع قطری تهیه شد.



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی و درصد توزیع قطری داربست ترکیبی پلی کاپرولاکتون-ژلاتین با درصدهای ترکیبی (الف) PCL/Gelatin=60/40، (ب) PCL/Gelatin=70/30 و (ج) PCL/Gelatin=80/20

نتایج حاصل از ارزیابی زاویه تماس و استحکام مکانیکی

علاوه بر هم‌گونی و جهت دار بودن نانوفیبرها، برای دستیابی به بهینه‌ترین درصد ترکیبی لازم بود که داربست‌ها از لحاظ استحکام مکانیکی و میزان چسبندگی سلولی نیز مورد بررسی قرار گیرند.

چسبندگی سلولی داربست توسط آزمون زاویه تماس اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل از ارزیابی زاویه تماس در شکل (۴-الف) نشان داده شده است.

در ادامه به منظور ارزیابی استحکام مکانیکی، داربست‌ها تحت کشش ۵ میلی‌متر در دقیقه در جهت نانوفیبرهای موازی قرار گرفتند. پس از ۵ بار تکرار برای هر نمونه، نتایج به صورت نمودار تنش-کرنش برای هر یک از نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴-ب).

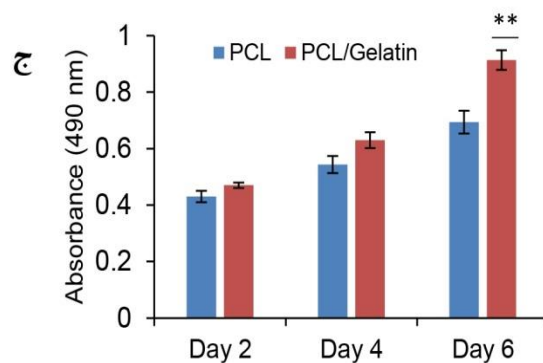
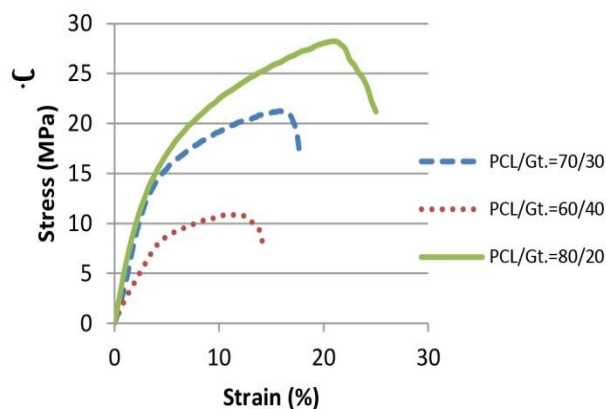
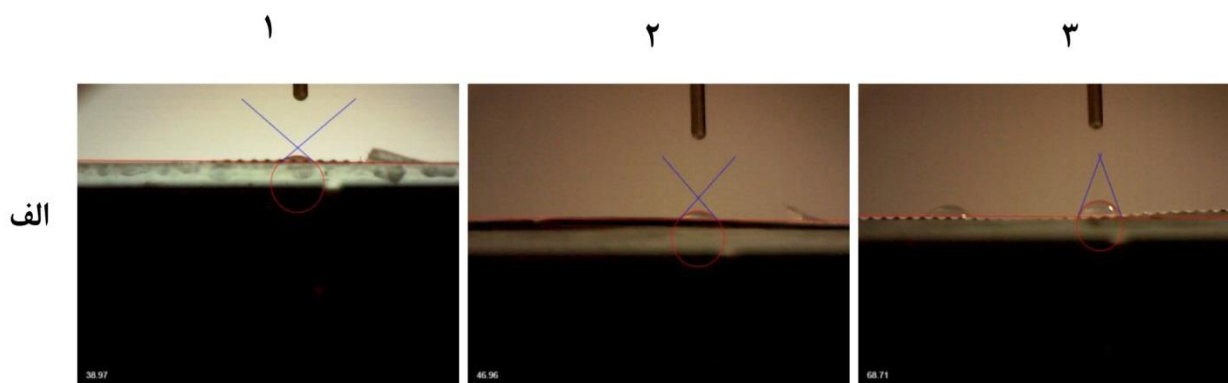
نتایج حاصل از تست‌های استحکام مکانیکی و زاویه تماس به صورت مقایسه‌ای نیز در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: مدول یانگ و زاویه تماس داربست های ترکیبی پلی کاپرولاکتون-ژلاتین با درصدهای مختلف

زاویه تماس	مدول یانگ (مگا پاسگال)	نسبت ترکیب (ژلاتین / پلی کاپرولاکتون)
۳۸/۹۷°	۲۰۰	۴۰/۶۰
۴۶/۹۶°	۴۶۰	۳۰/۷۰
۶۸/۷۱°	۵۰۴	۲۰/۸۰

نتایج حاصل از تست سمیت سلولی

جهت انجام کشت سلول بر روی داربست، لازم است که قبل از آن ثابت شد که تست سمیت سلولی برای داربست بررسی شود. نتایج حاصل از تست سمیت سلولی MTS، در شکل (۴-ج) مشخص می باشد.

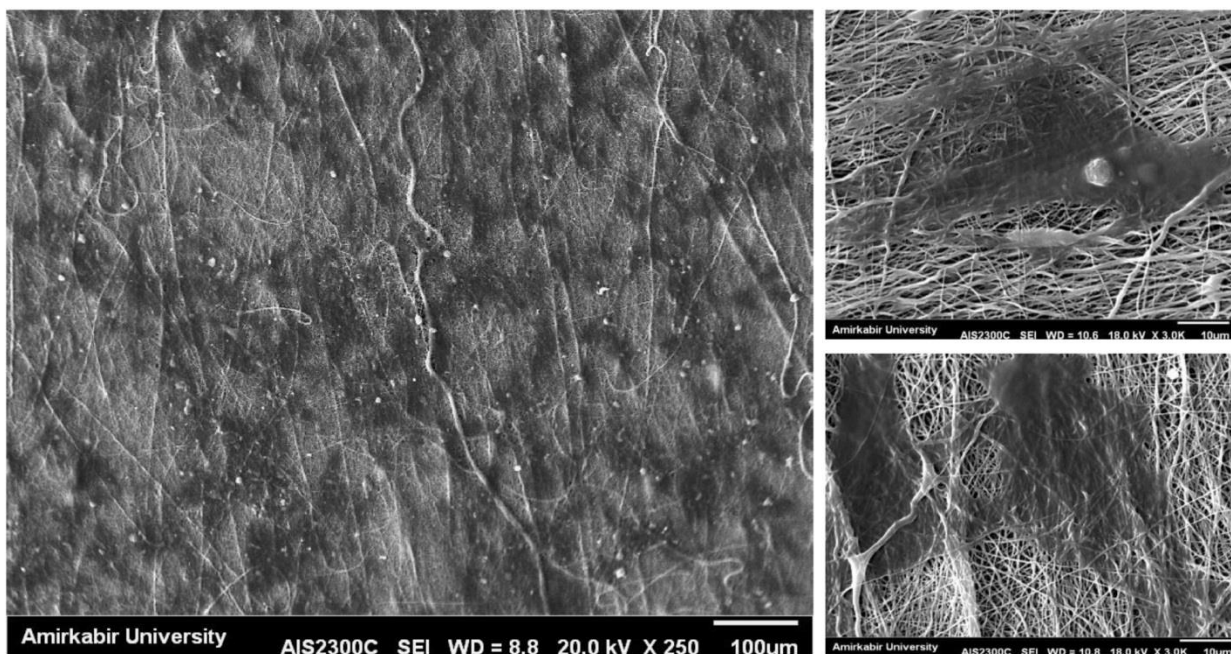


شکل ۴: ویژگی های فیزیکی و شیمیایی داربست، (الف) اندازه گیری زاویه تماس در داربست های ترکیبی (۱) PCL/Gelatin=60/40، (۲)

(ب) نمودار تنش-کرنش داربست های نانوفیبری ترکیبی و (ج) نمودار زنده ماندن سلول ها بر روی داربست ترکیبی PCL/Gelatin=70/30 و PCL/Gelatin=80/20، (د) نمودار تنش-کرنش داربست های نانوفیبری ترکیبی و (ه) نمودار زنده ماندن سلول ها بر روی داربست ترکیبی PCL/Gelatin=70/30 در روزهای دوم، چهارم و ششم با واریانس کمتر از ۱ درصد، PCL به عنوان داربست کنترل استفاده شد (تعداد تکرار=۱۲).

نتایج حاصل از اندرکنش سلول با داربست

تصاویر میکروسکوپ الکترونی در روز هفتم از داربست طبق شکل ۵ تهیه شد که چسبندگی سلول های پروژنیاتور قلبی بر روی داربست را در جهت نانوفیبرها نشان می دهد.



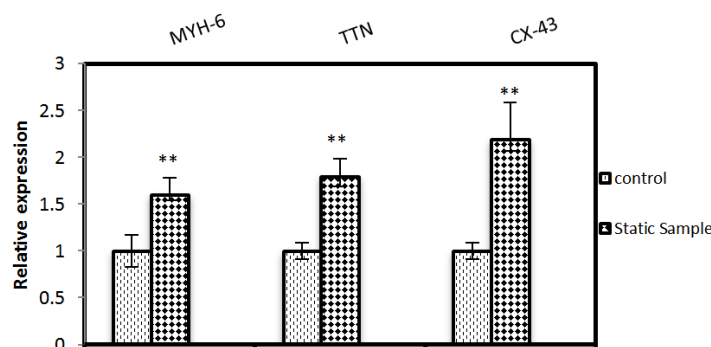
شکل ۵: تصاویر میکروسکوپ الکترونی حاصل از سلول‌های پروژنیاتور قلبی کشت داده شده بر روی داربست نانوفیبری ترکیبی PCL/Gelatin=70/30 پس از هفت روز کشت ثابت در داخل انکوباتور

نتایج حاصل از آزمون Real time-PCR

پس از کشت ۷ روزه سلول‌های پروژنیاتور قلبی بر روی داربست ترکیبی PCL/Gelatin=70/30 در داخل انکوباتور، سلول‌ها جهت انجام آزمون Real Time PCR آماده شد و طبق نمودار شکل ۶، میزان بیان ژن‌های TTN (تشکیل دهنده پروتئین Titin) و MYH-6 (تشکیل دهنده پروتئین Alpha-MHC) و همین‌طور ژن GJAI (تشکیل دهنده پروتئین Connexin-43 بررسی شد. توالی پرایمرهای تهیه شده جهت آزمون Real Time PCR، به شرح جدول ۳ می‌باشد.

جدول ۳: توالی پرایمرها جهت سه ژن TTN، MYH-6 و GJAI به منظور استفاده در آنالیز Real Time PCR

Prime r Name	Oligo Sequence 5'.....3'	Length (bp)	Tm (°C)	Product length
TTN-F	ATCATCAATGTA GCACCGAGT	21	59.1	120
TTN-R	AAAAGCCCAAG AAATCAACCAA C	23	59.2	
MYH 6-F	GCCCACTTCTCC CTGATCCAC	21	62.2	195
MYH 6-R	CTTGCCTCCTTT GCTTTTACCAC	23	61.2	
CX43 -F (GJA 1)	CCAATCTCTCAT GTGCGCTTC	21	59.0	105
CX43 -R (GJA 1)	CAGTTTCTCTTC CTTTCGCATC	22	58.1	



شکل ۶: نمودار نتایج آنالیز Real Time PCR برای سه ژن MYH-6، TTN و CX-43 در سلول‌های پروژنیاتور قلبی کشت داده شده بر روی داربست الکتروروسی ترکیبی با نانوفیبرهای موازی و مقایسه با نمونه کنترل (سلول‌های پروژنیاتور قلبی) $n=4$, $p<0.01$

بحث

بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی حاصل از تغییر پارامترهای الکتروروسی

با بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی حاصل از داربست ترکیبی PCL/Gelatin=70/30 با تغییر پارامترهای مختلف الکتروروسی (شکل ۲)، می‌توانیم به نتایج زیر دست یابیم:

با کاهش نرخ تغذیه پلیمر و افزایش فاصله سوزن تا کالکتور، همان‌طور که در نمونه‌های (الف-۱) و (الف-۲) از شکل ۲ مشخص است، قطر نانوفیبرها به میزان زیادی کاهش پیدا کرده و تا حدی هم‌گون بودن الیاف از دست رفته است.

با کاهش ولتاژ، همان‌طور که در نمونه (ب-۱) مشخص است، نانوفیبرها تا حد بسیار زیادی به صورت از هم گسسته و با توزیع قطری ناهم‌گون بر روی جمع‌کننده قرار گرفتند و این نشان می‌دهد که این ولتاژ برای تشکیل مخلوط تیلور در فرآیند الکتروروسی کافی نبوده است (۲۱).

وقتی از منظر سرعت چرخش ماندروول، به تصاویر نگاه می‌کنیم، این نتیجه حاصل می‌شد که افزایش سرعت چرخش ماندروول وقتی که از حدی بیشتر شده است، نه تنها باعث جهت دار شدن بیشتر نمونه‌ها نشده بلکه باعث پخش شدن پلیمر در اطراف کالکتور شده و همان‌طور که در تصویر (ج-۲) مشخص است، نانوفیبرهایی در خلاف جهت نانوفیبرهای موازی به صورت ناهم‌گون بر روی سطح داربست تشکیل شده است. متقابلاً اگر سرعت چرخش ماندروول از حدی کمتر باشد، همانند نمونه (ب-۲)، شاهد داربستی با درصد کمی از جهت آرایی خواهیم بود.

با توجه به مطالب مذکور، نمونه (ج-۱) به عنوان مناسب‌ترین داربست انتخاب شده و بهترین پارامترهای الکتروروسی به این روش مشخص شدند.

بررسی توزیع قطری نانوفیبرها با درصد‌های ترکیبی مختلف

همان‌طور که در نمودارها و تصاویر SEM شکل ۳ مشخص است، با افزایش درصد ژلاتین، ناهم‌گونی نانوفیبرها افزایش پیدا کرده است (۱۵). بنابراین با توجه به این موضع مشخص است که با وجود این که با افزایش ژلاتین در ترکیب داربست، می‌توان به میزان موثرتری از چسبندگی سلولی دست پیدا کرد، ولی هم‌گونی داربست کاهش می‌یابد. لذا می‌بایست درصد مشخصی از میزان ژلاتین انتخاب شد تا داربست ایجاد شده علاوه بر هم‌گونی نانوفیبرها، چسبندگی قابل قبولی را نیز دارا باشد. علاوه بر هم‌گونی و جهت‌دار بودن نانوفیبرها، برای دستیابی به بهینه‌ترین درصد ترکیبی لازم بود که داربست‌ها از لحاظ استحکام مکانیکی و میزان چسبندگی سلولی نیز مورد بررسی قرار گیرند.

نتایج حاصل از ارزیابی زاویه تماس و استحکام مکانیکی

همان طور که انتظار می‌رفت، نتایج حاصل از ارزیابی زاویه تماس در شکل (۴-الف) نشان داد که با افزایش میزان ژلاتین که یک پلیمر آب‌دوست است، زاویه تماس کاهش پیدا کرده و بنابراین چسبندگی سلولی افزایش یافته است (۱۵). نمودار (۴-ب) نشان داد که با افزایش درصد PCL، شیب نمودار تنش-کرنش و مدول الاستیسیته افزایش یافته است (۱۵، ۲۳). نقطه شکست در داربست با درصد PCL بیشتر نیز با میزان درصد کشش بیشتری اتفاق می‌افتد (۲۳). در نهایت با بررسی نتایج حاصل از آزمایش‌های زاویه تماس و استحکام مکانیکی و همین طور تصاویر SEM، باید بهترین درصد ترکیبی برای داربست تعیین می‌شد. با توجه به تصاویر SEM شکل ۳ و همین‌طور داده‌های موجود در جدول ۳، داربست PCL/Gelatin=70/30 هم از لحاظ هم‌گون بودن نانوفیبرها مناسب بود و هم از لحاظ میزان چسبندگی سلولی و استحکام مکانیکی می‌توانست داربست مناسبی جهت مهندسی بافت قلب باشد. بنابراین داربست ترکیبی PCL/Gelatin=70/30، با زاویه تماس ۴۶/۹۶ درجه و نقطه شکست با ۱۷ درصد کشش به‌عنوان داربست مورد استفاده جهت کشت سلولی انتخاب شد. از آنجائی که ماهیچه قلبی مدول یانگی در حدود ۱۰ تا ۲۰ کیلو پاسکال در زمان دیاستول با کشش کمتر از ۱۰ درصد دارد (۱۷)، بنابراین داربست ایجاد شده برای استفاده در سیکل‌های انقباضی بافت قلب مناسب است.

نتایج حاصل از تست سمیت سلولی

نتایج حاصل از تست سمیت سلولی MTS، در شکل (۴-ج) که در روزهای دوم، چهارم و ششم بر روی داربست ترکیبی PCL/Gelatin و داربست کنترل PCL به‌دست آمده است، نشان داد که تعداد سلول‌های کشت داده شده بر روی داربست‌ها به‌مرور زمان افزایش پیدا کرده و البته در مقایسه با داربست کنترل، می‌توان فهمید که افزودن ژلاتین، باعث افزایش چسبندگی سلولی شده است.

نتایج حاصل از اندرکنش سلول با داربست

تصاویر میکروسکوپ الکترونی در روز هفتم از داربست طبق شکل ۵ تهیه شد که چسبندگی سلول‌های پروژنیاتور قلبی بر روی داربست را در جهت نانوفیبرها نشان می‌دهد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی در روز هفتم، با مشخص بودن چسبندگی سلول‌های پروژنیاتور قلبی بر روی داربست در جهت نانوفیبرها، نشان داد که سلول‌ها به‌میزان مناسبی بر روی داربست مورد نظر رشد و تکثیر یافته‌اند و این نشان‌گر آن است که داربست تهیه شده شرایط مطلوب مشابه با ماتریکس خارج سلولی را برای سلول‌ها فراهم نموده است.

نتایج حاصل از آزمون Real time-PCR

پس از هفت روز کشت سلولی، میزان بیان ژن‌های TTN (تشکیل دهنده پروتئین Titin) و MYH-6 (تشکیل‌دهنده پروتئین Alpha-MHC) که هر دو موثر در انقباض عضله قلبی هستند و همین‌طور ژن GJAI (تشکیل‌دهنده پروتئین Connexin-43) که یکی از ترکیبات Gap-Junction بوده و در منظم‌سازی روابط بین سلولی و همین‌طور انقباض همزمان سلول‌های قلبی نقش به‌سزایی دارد، بررسی شد (۲۴، ۲۵). در نتایج حاصل، واضح است که بیان ژن‌های مذکور در سلول‌های پروژنیاتور قلبی کشت داده شده بر روی داربست به‌خوبی انجام شده و این نشان‌گر تمایز مناسب این سلول‌ها به‌سمت سلول‌های بالغ قلبی می‌باشد. سه ژن مورد بررسی در این پژوهش، با بررسی و مقایسه مقالات قبلی در زمینه تمایز سلول‌های قلبی انتخاب شد. در سایر مقالات به‌میزان زیادی به بحث بیان بیشتر و موثرتر ژن GJAI (تشکیل‌دهنده پروتئین Connexin-43) پرداخته شده است (۲۶، ۲۷). ولی در هیچ کدام به‌صورت جامع، اثر داربست مناسب بر میزان بیان هر سه

ژن موثر در انقباض و ضربان عضله قلبی شامل TTN، MYH-6 و GJAI در سلول‌های پروژنیاتور قلبی مورد بحث و بررسی قرار نگرفته است.

نتیجه‌گیری

هدف از این آزمایش، ساخت یک داربست به‌منظور شبیه‌سازی مناسب ماتریکس خارج سلولی قلبی در محیط آزمایشگاه بود. ماتریکس خارج سلولی قلبی از لایه‌های نانوفیبری روی هم قرار گرفته، تشکیل شده است. همان‌طور که از تصاویر حاصل از تصویربرداری رزونانس مغناطیس با تنسور نفوذ کننده (شکل ۱)، مشخص است هر یک از لایه‌های تشکیل دهنده این ماتریکس از نانوفیبرهای موازی و هم‌جهت تشکیل شده که وظیفه انتقال نیروی الکتریکی حاصل از انقباض سلولی را در یک جهت خاص برعهده دارند. داربست دو بعدی متشکل از نانوفیبرهای موازی اگر بتواند از نظر چسبندگی سلولی و استحکام مکانیکی مشابه با ماتریکس خارج سلولی قلبی عمل کند، می‌تواند شرایط مناسبی برای رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های پروژنیاتور قلبی را ایجاد نماید.

با استفاده از الکتروریسی پلیمرهای PCL و ژلاتین بر روی ماندربول چرخان، توانستیم داربستی دوبعدی با نانوفیبرهای موازی با توزیع قطری یک‌نواخت و هم‌گون و هم‌مین‌طور با چسبندگی سلولی و استحکام مکانیکی مناسب تولید کنیم که از نظر خواص شیمیایی و فیزیکی تا حدی شبیه به ماتریکس خارج سلولی قلبی باشد. سپس با کشت سلول‌های پروژنیاتور قلبی بر روی داربست و بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی پس از ۷ روز کشت سلولی، شاهد جهت‌گیری سلول‌ها در جهت نانوفیبرهای موازی بودیم و هم‌چنین رشد و تکثیر سلول‌ها نیز از تصاویر حاصل شده کاملاً مشهود بود. جهت‌گیری منظم سلول‌ها بر روی داربست دو بعدی و تقویت روابط بین سلولی توانست به تمایز سلول‌های پروژنیاتور قلبی کمک کند به‌طوری‌که پس از بررسی نتایج حاصل از آزمون Real-time PCR و میزان بیان ژن‌های TTN، MYH-6 و Connexn-43 مشخص شد که که ژن‌های مربوط به هم‌زمان‌سازی انقباض قلبی و رابطه منظم بین سلولی، به‌میزان بیشتری در این سلول‌ها بیان شده و لذا این داربست سلولی می‌تواند گزینه مناسبی برای پیوند به بافت آسیب دیده قلبی باشند.

منابع

1. Sidney S., Rosamond WD, Howard VJ, Luepker RV, et al. The "heart disease and stroke statistics—2013 update" and the need for a national cardiovascular surveillance system, ed: Am Heart Assoc. 2013. 127(1): e6–e245.
2. Henderson K, Sligar AD, Le VP, Lee J. et al. Biomechanical Regulation of Mesenchymal Stem Cells for Cardiovascular Tissue Engineering. *Advanced healthcare materials*. 2017; 6(22): 1700556.
3. Gallagher GL, Jackson CJ, Hunyor SN. Myocardial extracellular matrix remodeling in ischemic heart failure. *Front Biosci*. 2007; 12(1): 1410-1419.
4. Remme W, Swedberg K. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *European heart journal*. 2001; 22(17): 1527-1556.
5. Chen Q-Z, Harding SE, Ali NN, Lyon AR, et al. Biomaterials in cardiac tissue engineering: ten years of research survey. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 2008; 59(1-6): 1-37.
6. Jawad H, Ali N, Lyon A, Chen Q, et al. Myocardial tissue engineering: a review. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2007; 1(5): 327-342.
7. Donato BB. Addressing the heart failure epidemic: from mechanical circulatory support to stem cell therapy. 2014.
8. Gaetani R. Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells. *Biomaterials*. 2012; 33(6): 1782-1790.

9. Rajabi S. Human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitor cells efficiently colonize in bFGF-tethered natural matrix to construct contracting humanized rat hearts. *Biomaterials*. 2018; 154: 99-112.
10. Jalili-Firoozinezhad S, Rajabi-Zeleti S, Marsano A, Aghdami N, et al. Influence of decellularized pericardium matrix on the behavior of cardiac progenitors. *Journal of Applied Polymer Science*. 2016; 133(14):43255.
11. Teo WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*. 2006; 17(14): R89.
12. Gross BC, Erkal JL, Lockwood SY, Chen C, et al. Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. ed: ACS Publications. 2014; 86(7):3240-53.
13. Wu H, Fan J, Chu CC, Wu J. Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010; 21(12): 3207-3215.
14. Ayaz HGŞ, Perets A, Ayaz H, Gilroy KD, et al. Textile-templated electrospun anisotropic scaffolds for regenerative cardiac tissue engineering. *Biomaterials*. 2014; 35(30): 8540-8552.
15. Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani M.-H, et al. Electrospun poly (ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials*. 2008; 29(34): 4532-4539.
16. Khait L, Hecker L, Blan NR, Cohan G, et al. Getting to the heart of tissue engineering. *Journal of cardiovascular translational research*. 2008; 1(1): 71-84.
17. Boffito M, Sartori S, Ciardelli G. Polymeric scaffolds for cardiac tissue engineering: requirements and fabrication technologies. *Polymer International*. 2014; 63(1): 2-11.
18. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 2008; 60(2): 184-198.
19. Wu Y, Wang L, Guo B, Ma PX. Interwoven aligned conductive nanofiber yarn/hydrogel composite scaffolds for engineered 3D cardiac anisotropy. *ACS Nano*. 2017; 11(6): 5646-5659.
20. Van der Schueren L, Steyaert I, De Schoenmaker B, De Clerck K. Polycaprolactone/chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system. *Carbohydrate Polymers*. 2012; 88(4): 1221-1226.
21. Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue engineering*. 2006; 12(5): 1197-1211.
22. Kai D, Prabhakaran MP, Jin G, Ramakrishna S. Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2011; 98(2): 379-386.
23. Zheng R. The influence of Gelatin/PCL ratio and 3-D construct shape of electrospun membranes on cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2014; 35(1): 152-164.
24. Shimko VF, Claycomb WC. Effect of mechanical loading on three-dimensional cultures of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Engineering Part A*. 2008; 14(1): 49-58.
25. Radisic M., Park H., Gerecht S., Cannizzaro C, et al. Biomimetic approach to cardiac tissue engineering. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2007; 362(1484): 1357-1368.
26. Allison S. Electroconductive nanoengineered biomimetic hybrid fibers for cardiac tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*. 2017; 5(13): 2402-2406.
27. Tsui JH. Conductive silk-polypyrrole composite scaffolds with bioinspired nanotopographic cues for cardiac tissue engineering. 2018; 6(44): 7185-7196.

Fabrication of Polycaprolactone-Gelatin scaffold for Cardiac Progenitor Cells differentiation

Shams Z, M.Sc¹, Akbari B Ph.D.¹, Rajabi S, Ph.D.^{2*}, Aghdami N Ph.D.³

1. Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Department of Cell Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

* Email corresponding author: sarahrajab83@gmail.com, babakbari@ut.ac.ir

Received: 18 Mar. 2018

Accepted: 24 Jul. 2018

Abstract

Aim: This research, design and fabrication of a composite scaffold for growth, proliferation and differentiation of Cardiac Progenitor Cells (CPCs) has been considered.

Material and method: Polycaprolactone / Gelatin composite scaffolds with a ratio of 70:30 and with the most similarities to the cardiac extracellular matrix was fabricated with aligned nanofibers. Using scanning electron microscopy (SEM), mechanical strength analysis and also contact angle test, the scaffold was investigated due to have the most necessary characteristics to be proportional for cardiac scaffold. Finally, By Real time-PCR test, the expression of the specific genes related to the Cardiac Progenitor Cells differentiation (MYH-6, TTN and CX-43) has been analyzed.

Results: Based on our results from contact angle test and mechanical strength experiments, we concluded that our designed scaffold is suitable for the culture of Cardiac Progenitor Cells on it. The Real time-PCR analysis also showed the good expression of genes associated with contraction.

Conclusion: What makes the cardiomyocytes different from other cells is their contraction related to specific cardiac genes being responsible for beating synchronization. The results of this study showed that aligned Polycaprolactone / Gelatin composite scaffold has the appropriate potential for induction of cardiac progenitor cells differentiation and application in heart tissue engineering.

Keywords: Electrospun Scaffold, Cardiac Genes Expression, Cardiac Progenitor Cells, Cardiac Tissue Engineering