

Effect of Static Stretch on Alignment of Human Mesenchymal Stem Cells

M. Rabbani¹, M. Tafazoli Shadpour^{2*}, Z. Goli Malekabadi³, M. Janmaleki⁴,

M.T. Khorasani⁵, M. A. Shokrgozar⁶

¹ PhD Candidate, Biomechanics Group, School of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran, mrabbani@aut.ac.ir

² Associate Professor, Biomechanics Group, School of Biomedical Engineering, Amir Kabir University of Technology, Tehran, Iran

³ M.Sc Student, Biomechanics Group, School of Biomedical Engineering, Amir Kabir University of Technology, Tehran, Iran, zgmalekabadi@aut.ac.ir

⁴ Research Scientist, Nano Medicine & Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, janmaleki@sbmu.ac.ir

⁵ Associate Professor, Iran Polymer and Petrochemical Research Institute, Tehran, Iran, m.khorasani@ippi.ac.ir

⁶ Associate Professor, National Cell Bank, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran, mashokrgozar@pasteur.ac.ir

Abstract

Vital function of the cell is correlated with the mechanical loads that the cell experiences. The cell shape and morphology are also related to its mechanical environments. Different methods have been proposed to obtain cell groups with the same morphology and alignment which considered desirable features in tissue engineering applications. For instance, applying cyclic loading makes cells elongated and aligned as bundles in a specific direction to the tension axis. Applying static stretches also affect the cells morphology, extra-cellular matrix, enzymes secretion and genes expression. The effect of applying in vivo static stretch on cellular alignment was evaluated in this study. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) were cultured on the elastic membrane, and then subjected to static stretch. The results demonstrated that applying a 10% static stretch for 24 hours aligns intra-structure actin filaments and applying a 20% static stretch had a significant effect on the arrangement of the oriented fibers.

Keywords: Static stretch, Cellular loading, Cellular alignment, Human Mesenchymal stem cell, Tissue engineering.

* Corresponding author

Address: Mohammad Tafazoli Shadpour, Cardiovascular Lab, School of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Hafiz St, Po.Box: 15875-413, Tehran, Iran

Tel: +98 21 64542375

Fax: +98 21 66468186

E-mail: tafazoli@aut.ac.ir

اثر کشش استاتیک بر جهت‌گیری سلول‌های مزانشیمال انسانی

محسن ربانی^۱، محمد تفضلی شادپور^{۲*}، زهرا گلی ملک آبادی^۳، محسن جانملکی^۴،
محمد تقی خراسانی^۵، محمد علی شکرگزار^۶

^۱ دانشجوی دکترا، گروه بیومکانیک، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران mrabbani@aut.ac.ir

^۲ دانشیار، گروه بیومکانیک، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران

^۳ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیومکانیک، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران zgmalekabad@aut.ac.ir

^۴ مربی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران janmaleki@sbmu.ac.ir

^۵ دانشیار، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران m.khorasani@ippi.ac.ir

^۶ دانشیار، بانک سلولی ایران، انیستیتو پاستور ایران، تهران mashokrgozar@pasteur.ac.ir

چکیده

کارکرد حیاتی سلول‌های بدن به بارهای مکانیکی که این سلول‌ها تجربه می‌کنند؛ وابسته است. سلول‌ها بسته به شرایط مکانیکی محیط مجاور خود ریخت و شکل ویژه‌ای دارند. در مهندسی بافت، دستیابی به سلول‌های هم‌ریخت و همسو در اغلب موارد مطلوب است و روش‌های گوناگون برای این کار پیشنهاد شده است. به‌عنوان مثال، سلول پس از بارگذاری چرخه‌ای، باریک‌تر می‌شود و به‌صورت دسته‌های همسو با زاویه‌ای مشخص نسبت به محور کشش قرار می‌گیرد. کشش استاتیک (ثابت) نیز تغییراتی در ریخت سلول، ماتریس برون سلولی، بیان آنزیم‌ها و ترشح ژن‌ها ایجاد می‌کند. در این تحقیق به بررسی نقش کشش استاتیک سلول‌ها در همسو نمودن آنها پرداخته شده است. به این منظور، سلول‌های مزانشیال روی بستر الاستیک کاشته شدند و تحت بارگذاری استاتیک قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بارگذاری ۱۰٪ پس از ۲۴ ساعت رشته‌های اکتین در ساختار درون سلولی را همسو می‌کند. همچنین کشش ۲۰٪ تأثیر قابل ملاحظه‌ای در همسو کردن سلول‌ها داشت.

کلید واژگان: کشش استاتیک، بارگذاری سلول‌ها، همسو شدن سلول‌ها، سلول مزانشیمال انسانی، مهندسی بافت.

*عهده‌دار مکاتبات

نشانی: تهران، خیابان حافظ، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، گروه بیومکانیک، آزمایشگاه مهندسی قلب و عروق، صندوق پستی ۴۱۳-۱۵۸۷۵
تلفن: ۶۴۵۴۲۳۷۵، دورنگار: ۶۶۴۶۸۱۸۶، پیام‌نگار: tafazoli@aut.ac.ir

۱- مقدمه

می‌سازد (رابطه ۱). بدین ترتیب، با اعمال کشش در یک جهت بستر در جهت عمود بر محور کشش، کرنش منفی وجود دارد و در واقع کرنشی در دو جهت بر سلول‌ها وارد می‌شود. چون ضریب پوآسون برای غشای سیلیکونی ۰/۳۸ است، براینده نیروهای وارد بر سلول‌ها در اثر کشش تک محوری تقریباً زاویه ۷۰° با محور کشش دارد [۱۰].

$$\nu = \frac{\mathcal{E}_{transversal}}{\mathcal{E}_{axial}} \quad (1)$$

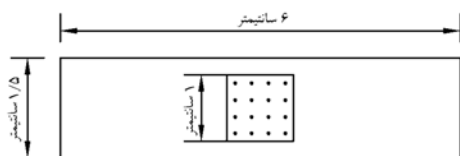
بافت‌هایی از بدن همواره در معرض بارهای ثابت و کشش استاتیک هستند. تنش مانده در دیواره عروق و بافت‌های پوستی از آن جمله‌اند. در معده و مثانه که افزایش حجم به آهستگی رخ می‌دهد، کشش‌های استاتیک بر بافت و در نتیجه بر سلول‌ها وارد می‌شود. این کشش بر سلول‌های این بافت اثر گذاشته، آنها را وادار به ترشح آنزیم‌های مختلف می‌کند [۱۱]. در آزمایشی دیگر، سلول‌های عضله صاف، تحت بار استاتیک قرار گرفت. این آزمایش که ۴۸ ساعت طول کشید، باعث افزایش بیان آنزیم‌های MMP-۲^۵ و MMP-۹ شد [۱۲]. همچنین، سلول‌های اندوتلیال^۶ نیز نسبت به این نوع بارگذاری واکنش نشان می‌دهد. کشش استاتیک، بیان پروتئین‌های MMP-۲ و VEGF را در سلول‌های اندوتلیال افزایش می‌دهد [۱۳]. تاکنون تحقیقات چندی برای بررسی اثر بار کششی استاتیک بر سلول‌های مختلف صورت گرفته است. به‌عنوان مثال بارگذاری استاتیک بر سلول‌های قلبی موش، باعث کشیدگی قد و درهم پیچیدگی این سلول‌ها می‌شود [۱۴].

از آنجا که تاکنون عمده فعالیت‌های انجام شده، درباره نقش بارگذاری مکانیکی دینامیک با فرکانس‌های متفاوت بر سلول‌ها و یا نقش بارگذاری استاتیک در تنظیم آنزیم‌ها و پروتئین‌های ویژه بوده است، در این تحقیق به نقش بارگذاری استاتیک در همسو کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی^۷ (hMSC) پرداخته شده که در مهندسی بافت کاربرد دارد.

سلول‌های بدن در اثر ساختار آناتومی و عملکرد بافت‌های گوناگون، همواره در معرض نیروهای مکانیکی قرار دارند. این نیروها در آرایش سلول‌ها و شکل ظاهری^۱ آنها اثرگذار است. سلول‌ها تغییر ریخت پیدا می‌کنند و این تغییر ریخت، در رشد، تمایز، جابه‌جایی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول اثر می‌گذارد. همچنین بافت بدن و ساختار آن، از فعالیت مداوم ژن‌ها و متابولیسم سلولی اثر می‌پذیرد که البته این دو به‌طور قابل ملاحظه‌ای از عوامل مکانیکی متأثر هستند. تنش‌های مکانیکی بر گیرنده‌های چسبنده بر سطح سلول^۲ اثر می‌گذارد، راه‌های سیگنالی درون سلولی را فعال می‌کند و باعث تحریک ژن‌ها می‌شود [۱].

از آنجا که سلول در بافت‌های گوناگون نظیر بافت قلبی، دیواره شریان، سیستم اسکلتی و عضلانی در معرض نیروهای مکانیکی قرار دارند، در تحقیقات *In vitro* به بررسی این امر پرداخته شده است. در بدن انسان اعمال نیروهای متناوب و چرخه‌ای^۳ در بسیاری از بافت‌ها مانند دیواره عروق و بافت قلبی رخ می‌دهد، و تحقیقات متعدد *In vitro* برای بررسی این امر صورت پذیرفته است. یافته‌ها نشان می‌دهند کشش چرخه‌ای باعث همسو شدن سلول‌ها در امتدادی مشخص می‌شود [۲]. فرایند تغییر ریخت و آرایش سلول‌ها از طریق مفاهیم مکانیکی قابل بیان است [۳]. سلول‌های تحت بارگذاری دینامیک در جهت مشخصی قرار می‌گیرند به‌ترتیبی که فرایند هماهنگ‌سازی (دوباره مدل شدن) تنش‌های وارد بر سلول (بافت) به کمترین مقدار برسد [۴]. سلول‌های چسبنده بر بستر الاستیک به‌گونه‌ای دوباره مدل می‌شود که تغییرات انرژی کرنشی آنها در اثر کشش بستر به کمترین مقدار برسد [۵]. زاویه‌ای که سلول‌ها در آن جهت قرار می‌گیرند به نوع سلول [۶]، اندازه کرنش، زمان بارگذاری [۷] و فرکانس کشش [۸، ۹] بستگی دارد. همچنین در بارگذاری و کشش تک محوری ضریب پوآسون^۴ بستر الاستیک سلول‌ها می‌تواند در همسویی سلول‌ها اثرگذار باشد، زیرا ضریب پوآسون مشخصه‌ای از ماده الاستیک است که کرنش مواد در دو جهت عمود بر هم را به هم مربوط

¹ Cell phenotypes⁵ Matrix Metalloproteinases² Cell surface adhesion receptor⁶ Endothelial³ Cyclic⁷ human Mesenchymal Stem Cells⁴ Poisson's ratio



شکل ۱- نوار سیلیکونی و نمایش ابعادی منطقه کشت سلولی

۲- روش و مواد

۲-۱- ابزار کشش استاتیک تک محوری

در تحقیقات *In vitro* بارگذاری و اعمال کشش بر سلول‌ها معمولاً از طریق بستر الاستیک زیست‌سازگاری که سلول بر آن کشت داده شده، انجام می‌شود. بخشی از تغییر طول وارد بر بستر الاستیک به سلول منتقل می‌شود. اندازه جابه‌جایی منتقل شده از بستر به سلول بر حسب نوع ماده بستر، پوشش آن و نوع سلول در آزمایشگاه از طریق روش‌های دقیق نشان‌گذاری و تصویربرداری قابل محاسبه‌اند [۱۵].

کشش استاتیک و یا پیش‌بار در بستر الاستیک سیلیکونی به‌وسیله ابزاری اعمال شد که بنا بر نیاز این پروژه طراحی شده بود. نوارهای سیلیکونی در گیره‌های دو فک ابزار که از جنس پلکسی گلاس^۸ و فولاد زیست‌سازگار است، قرار گرفت. دستگاه پس از نصب نوار سیلیکون با استفاده از اتوکلاو قابل استریل شدن است. این ابزار به اندازه‌ای کوچک ساخته شد که درون ظرف‌های ۱۰cm قرار می‌گیرد و امکان بارگذاری بستر الاستیک سلول‌ها و مشاهده سلول‌ها در زمان‌های مشخصی پس از بارگذاری وجود دارد. فاصله بین دو فک به‌وسیله پیچ تعبیه شده در ابزار تغییر می‌کند تا بارگذاری اعمال شود. بدین ترتیب بستر کشت پس از بارگذاری بدون آنکه ابزار کشش سلول از محیط استریل ظرف خارج شود، پس از ۲، ۴، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت تصاویر سلولی تهیه شد و مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۲- کشت سلول‌های مزانشیمال

سلول‌های مزانشیمال انسانی تهیه شده از مغز استخوان در محیط کشت DMEM-LG^{۱۱} (اینویتروژن^{۱۲}، ساخت آمریکا) با ۱۰٪ سرم جنین گاوی^{۱۵} (گیبکو^{۱۶}، ساخت آمریکا) کشت داده شد و در انکوباتور مخصوص کشت سلول (دمای ۳۷°C و ۵٪ دی اکسید کربن) نگهداری شدند. محیط کشت هر ۳ روز یک بار تعویض می‌شد و پس از تکثیر سلول‌ها و پوشاندن ۷۰٪ سطح ظرف کشت با استفاده از آنزیم تریپسین ۰/۲۵٪ پاساژ^{۱۷} داده شد. سلول‌های اضافی پس از تکثیر برای استفاده مجدد منجمد شده و در مخزن نیتروژن نگهداری شدند. از سلول‌های مزانشیمال در پاساژهای ۴ تا ۷ در این آزمایش استفاده شد. پس از هر پاساژ، تعداد ۵۰۰۰ سلول بر روی محدوده ۱cm^۲ از بستر سیلیکونی (شکل ۱) کاشته شد. برای شمارش سلول‌های زنده از محلول رنگی تریپان‌بلو^{۱۸} که سلول‌های مرده را رنگ می‌کند، استفاده شد. بدین ترتیب در شمارش به‌وسیله هموسایتومتر^{۱۹} تفکیک سلول زنده از مرده به‌خوبی انجام می‌شود.

۲-۳- کاشت سلول بر سیلیکون پوشش داده شده با

کلاژن

به منظور فراهم کردن شرایط مناسب برای چسبیدن سلول‌های مزانشیمال، نوارهای سیلیکونی با کلاژن نوع اول (سیگما^{۲۰} ساخت آمریکا) پوشش داده شد. ضخامت زیاد این پوشش باعث کنده شدن سلول از روی نوار سیلیکونی در هنگام کشش می‌شود. همچنین اگر مقدار کلاژن کمتر از حد معمول باشد، سلول‌ها به‌خوبی روی آن نمی‌چسبند. بنابراین ضخامت آن باید بهینه باشد. کلاژن نوع I با نسبت وزنی-حجمی ۰/۱ در محلول ۰/۱ مولار اسید استیک حل شد.

۲-۴- تهیه نوارهای سیلیکونی

غشای سیلیکون شفاف از جنس سیلیکون رابر^{۱۰} (PDMS^{۱۱}) زیست‌سازگار به‌صورت نوارهایی به ضخامت ۲۵μm و ۵۰μm با طول و عرض ۶۰mm و ۱۵mm ساخته شد. شفاف بودن بستر باعث می‌شود تا مشاهده و تصویربرداری از سلول‌ها به‌وسیله میکروسکوپ فلورسنس وارون^{۱۲} انجام شود. در قسمت میانی نوار در محدوده ۱۰×۱۰mm با استفاده از نقاط رنگی ۹ منطقه علامت‌گذاری شدند تا بتوان تغییرات دسته‌های سلولی متناظر و ریخت آنها را پیش و پس از آزمایش مورد بررسی قرار داد (شکل ۱).

⁸ Plexiglass¹² Inverted fluorescence microscope¹⁵ Fetal bovine serum¹⁹ Hemacytometer⁹ Silicone strip¹³ Low-glucose dulbecco's modified eagle medium¹⁶ GIBCO²⁰ Sigma¹⁰ Silicone rubber¹⁷ Passage¹¹ Poly dimethyl siloxane¹⁴ Invitrogen¹⁸ Trypan blue

۷-۲- تصاویر میکروسکوپی و پردازش آنها

همه تصاویر سلولی با استفاده از میکروسکوپ نوری وارون نیکون^{۲۷} با بزرگنمایی شیئی و چشمی ۱۰X و دوربین سونی (کولپیکس^{۲۸}، ژاپن) با قدرت تفکیک ۶MPix (۲۸۱۶×۲۱۱۲) تهیه شدند، سپس به نرم افزار پردازش تصویر ایمج-جی (نسخه ۱/۴۴f)^{۲۹} وارد شده و مورد پردازش قرار گرفتند.

۸-۲- محاسبه آنتروپی^{۳۰} مجموعه زوایای جهت گیری

در تصاویر تهیه شده از هر گروه آزمایش و شاهد، زاویه جهت گیری سلولها نسبت به محور کشش با استفاده از نرم افزار ایمج-جی اندازه گیری شد. آنتروپی معیاری برای کمی کردن نظم در مقدار متغیرهای یک مجموعه است [۹]. از این معیار برای ارزیابی همسویی (یکسان بودن زاویهها) سلولها استفاده شد. اگر کاهش آنتروپی زاویه سلولها نسبت به محور کشش قابل ملاحظه شود، تأثیر بارگذاری در همسو نمودن سلولها اثبات شده است. اندازه آنتروپی از رابطه (۲) محاسبه شد:

$$E = -\sum_{i=1}^n q_i \log_n q_i \quad (2)$$

به منظور اندازه گیری آنتروپی، زوایای سلولها نسبت به محور کشش به طور متقارن از ۰ تا ۹۰ اندازه گیری و در ۱۰ گروه (۰-۹، ۹-۱۸، ۱۸-۲۷، ۲۷-۳۶، ۳۶-۴۵، ۴۵-۵۴، ۵۴-۶۳، ۶۳-۷۲، ۷۲-۸۱، ۸۱-۹۰) دسته بندی شدند (n=۱۰). تعداد سلولها در دسته i از n دسته فوق به وسیله q_i نشان داده شده است. اندازه زاویه سلولها با استفاده از نرم افزار ایمج-جی به دست آمد و سپس به کمک برنامه ای که در نرم افزار MATLAB (۷/۴) نوشته شد، آنتروپی زوایا در هر نمونه از گروه شاهد و آزمایش محاسبه شد.

۹-۲- تحلیل آماری و ارزیابی نتایج آزمون

هر آزمون حداقل سه بار در دو گروه شاهد و آزمایش تکرار شد تا نتایج از نظر آماری قابل اعتماد باشد. همچنین در هر گروه حداقل از ۴ منطقه از مناطق نه گانه نشانه گذاری شده

سپس این محلول با نسبت ۱:۳ به وسیله PBS^{۲۱} رقیق می شود. پس از خشک شدن پوشش کلاژن بر روی نوارهای سیلیکونی، دوباره آن را با PBS شسته و از نور UV برای ضد عفونی کردن آن استفاده می شود [۱۵].

۵-۲- رنگ آمیزی رشته های اکتین

بررسی ریخت شناخت سلولی، مشاهده ساختار درون سلول را نیز شامل می شود. از آنجا که رنگ آمیزی رشته های اکتین درون سلول می تواند در به تصویر کشیدن ساختار اسکلتی درون سلول کمک کند؛ رشته های اکتین درون سلولهای مزانشیمال رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس وارون مشاهده شد.

سلولهای مزانشیمال با استفاده از فرمالین ۴٪ تثبیت شده با تریتون X100^{۲۲} (ساخت مرک^{۲۳} آلمان) نفوذ پذیر شدند. پیوندهای ناخواسته با استفاده از BSA^{۲۴} یا آلبومین فرکشن پنچ^{۲۵} (ساخت مرک آلمان) بلوک شدند. سپس برای رنگ آمیزی رشته های اکتین، سلولها به مدت ۳۰ دقیقه در پالویدین^{۲۶} قرار داده شدند [۱۶]. رشته های اکتین رنگ آمیزی شده پس از تحریک با پرتوی نوری به طول موج ۲۹۴nm، پرتوهایی با طول موج ۵۱۳nm منتشر می کنند که در میکروسکوپ فلورسنس به رنگ سبز دیده می شود.

۶-۲- بارگذاری سلولها

بستر سیلیکونی در گروه شاهد روی سطح ظرفی قرار داده شد به گونه ای که این نوار به سطح زیرین چسبیده، در جهات مختلف درگیر باشد. در گروه آزمایش بستر الاستیک سیلیکونی در فاصله بین دو فک درگیر و تحت پیش بار ثابت ۵٪ قرار داده شد. دسته های آزمایش تحت بارگذاری ۱۰٪ و ۲۰٪ قرار داده شد. پس از ۶ و ۲۴ ساعت پیگیری و از سلولها تصویربرداری شد. بارگذاری ۲۴ ساعت پس از کشت سلول بر نوارهای سیلیکونی انجام شد.

²¹ Phosphate Buffered Saline

²⁵ Albumin Fraction V

²⁹ Image J (v. 1.44f)

²² Triton® X-100

²⁶ Phalloidin

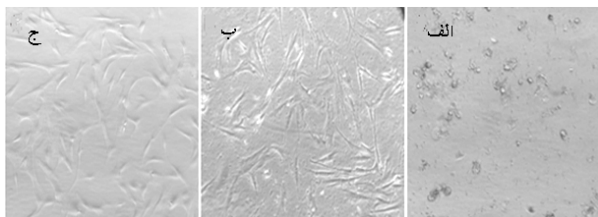
³⁰ Entropy

²³ Merck

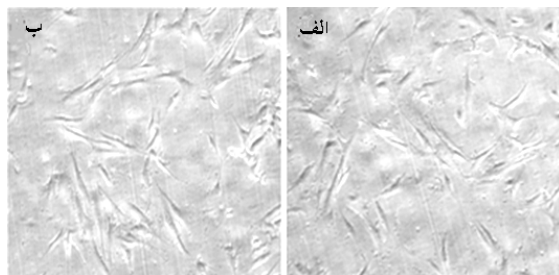
²⁷ Nikon

²⁴ Bovine serum albumin

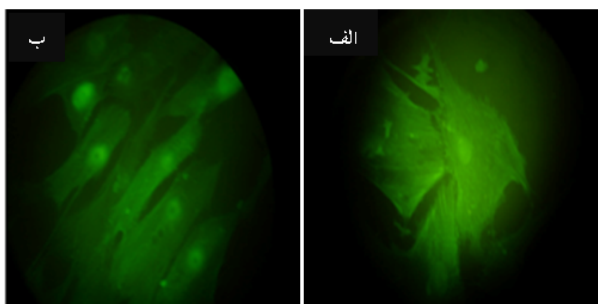
²⁸ Coolpix



شکل ۲- نمایش ریخت و آرایش سلول‌های مزانشیما ۲۴ ساعت (الف) پس از کاشت روی سیلیکون؛ (ب) روی سیلیکون پوشش داده شده با کلاژن و (ج) در فلاسک کشت سلول



شکل ۳- سلول‌های مزانشیما (۱۰۰X). الف) گروه شاهد؛ (ب) گروه آزمایش ۲۴ ساعت پس از کشت استاتیک ۱۰٪



شکل ۴- نمایش سلول و رشته‌های اکتین رنگ آمیزی شده (۶۰۰X). الف) گروه شاهد؛ (ب) گروه آزمایش ۲۴ ساعت پس از بارگذاری استاتیک ۱۰٪

۳-۳- اثر کشش استاتیک ۲۰٪ بر جهت‌گیری سلول‌ها

بدین ترتیب همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، کشش تک محوری ۲۰٪ سبب همسویی سلول‌ها شده است. نمودار شکل ۶ نشان می‌دهد که در اثر بارگذاری استاتیک به مدت ۶ ساعت آنتروپی زاویه‌های سلولی، به‌طور قابل ملاحظه کاهش یافته است ($p = 0/0058$). در گروه شاهد که نوار سیلیکونی بر سطح ظرف کشت سلول قرار داشت و تحت کشش قرار نگرفت کاهش قابل ملاحظه اندازه آنتروپی دیده نشد ($p = 0/369$). شکل ۷ مبین این امر است و در ظاهر آرایش سلول‌ها نیز به‌خوبی دیده می‌شود.

گروه حداقل از ۴ منطقه از مناطق نه‌گانه نشانه‌گذاری شده، تصویر تهیه شد و میانگین متغیر مورد نظر در هر نمونه گزارش شد. در هر تصویر زاویه سلول‌ها اندازه‌گیری شد تا به‌صورت آماری ارزیابی شود. متوسط اندازه زاویه‌ها و انحراف معیار آنها محاسبه شد. به منظور تأیید آماری، از آزمون تی^{۳۱} استفاده شد و مقادیر p کوچک‌تر از ۰/۰۵ به‌عنوان معیار تغییر قابل ملاحظه در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

۳-۱- اثر پوشش کلاژن بر سلول روی نوار سیلیکونی

پوشش کلاژن با ضخامت مناسب امکان چسبیدن سلول به بستر سیلیکونی را فراهم می‌سازد. همان‌طور که در شکل الف-۲ دیده می‌شود؛ پس از ۲۴ ساعت سلول‌های مزانشیما انسانی روی سیلیکون همچنان به‌صورت دایره‌ای قرار گرفته‌اند و توسعه و تکثیر آنها ممکن نیست. در حالی که این سلول‌ها به‌خوبی روی سیلیکون پوشش داده شده با کلاژن چسبیده و توسعه پیدا می‌کنند (شکل ب-۲). در شکل ج-۲ نمونه‌ای از تصویر سلول در ظرف‌های کشت سلول برای مقایسه به‌عنوان نمونه شاهد ارائه شده است. بدیهیست که ریخت و آرایش سلول‌ها در فلاسک کشت سلولی به‌عنوان نمونه شاهد با سلول‌ها روی بستر پوشش داده شده شباهت دارد.

۳-۲- اثر کشش استاتیک ۱۰٪ بر آرایش سلول‌ها

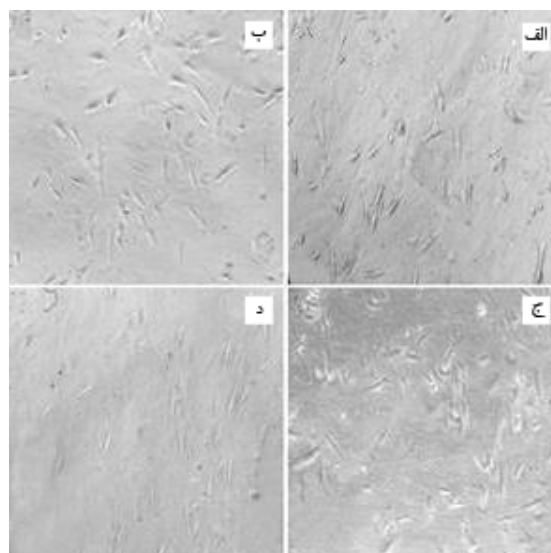
تأثیر کشش استاتیک ۱۰٪ در زمان ۲۴ ساعت بر هم‌جهت کردن سلول‌ها در جهتی مشخص نسبت به امتداد کشش قابل اثبات نبود (شکل ۳). اما در تصاویری که به‌وسیله میکروسکوپ فلورسنس از رشته‌های اکتین سلول‌ها پس از بارگذاری تهیه شد، سلول‌ها حالت کشیده و باریک‌تری نسبت به گروه شاهد داشتند. همچنین رشته‌های اکتین هم‌جهت شده بودند (شکل ۴). به‌عبارت دیگر تغییر جهت ساختار درونی سلول‌ها آسان‌تر از تغییر جهت سلول‌ها به‌نمایش در می‌آید.

³¹ T-test

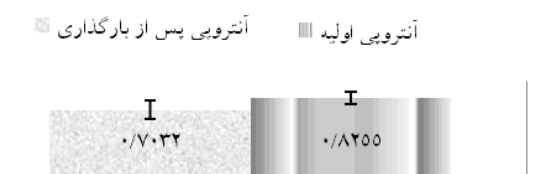
در همسو نمودن سلول‌ها مؤثر است [۳]، این اندازه کشش در حالت استاتیک در همسو کردن سلول‌ها چندان مؤثر نبود. به نظر می‌رسد، عواملی مانند خزش سلول (آزاد شدن تنش وارده بر سلول) و کاهش کرنش انتقالی از بستر به سلول باعث کم شدن اثر کشش استاتیک نسبت به کشش دینامیک در همسو نمودن سلول‌ها می‌شود. به دلیل خزش سلول‌های تغییر شکل یافته، تنش وارد بر سلول‌ها پس از چند ساعت رها می‌شود. در حالی که کشش چرخه‌ای، در یک بازه زمانی، مرتب تکرار می‌شود و بر آرایش سلول‌ها اثر می‌گذارد. همچنین با توجه به نتایج محاسبات گذشته، تنها ۶۳٪ از این تنش استاتیک به سلول منتقل می‌شود [۱۵].

اعمال کششی معادل ۲۰٪ بر بستر سلول‌هایی که ۲۴ ساعت پس از کاشت به‌خوبی بر بستر خود چسبیده و توسعه یافته‌اند، کرنش قابل ملاحظه‌ای به سلول منتقل می‌کند و سلول در یک فرایند هماهنگ‌سازی (دوباره مدل شدن) درصدد خنثی کردن اثر آن است. البته همسو شدن سلول‌ها در اثر بار استاتیکی به اندازه همسویی ناشی از بار چرخه‌ای در زمان برابر نیست [۱۷]. از نظر تئوری، در هنگام بارگذاری تک‌محوری، سلول در یک جابه‌جایی جزئی زاویه خود با محور کشش را تغییر می‌دهد تا تغییر انرژی کرنشی به حداقل برسد. اما در بارگذاری چرخه‌ای این تغییر جهت هماهنگ‌سازی تا پایان زمان بارگذاری تکرار می‌شود. واضح است که با افزایش زمان بارگذاری بیشتر سلول‌ها در جهتی ویژه قرار می‌گیرند. از آنجا که در هنگام بارگذاری جابه‌جایی سلول‌ها در یک دوره زمانی محدود رخ می‌دهد؛ تغییر زاویه سلول‌هایی که تقریباً در امتداد جهت کشش هستند قابل توجه نیست و در بسیاری موارد دیده شد که جهت بعضی سلول‌ها تغییر قابل ملاحظه نداشت و فقط ریخت آنها تغییر کرده است.

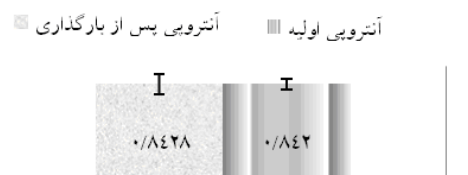
همان‌طور که ذکر شد، در بارگذاری چرخه‌ای دسته‌های هم‌جهت سلولی پس از مدتی بارگذاری در زاویه‌ای ۶۰° تا ۷۰° قرار می‌گیرند و پراکنندگی اندازه زاویه سلول‌ها در مقایسه با بارگذاری استاتیک بسیار کم است. به منظور همسو کردن سلول‌های بیشتر، پیشنهاد می‌شود با استفاده از کشش



شکل ۵- سلول‌های مزانشیمال (۱۰×): الف) سلول گروه شاهد؛ ب) سلول گروه شاهد، پس از آزمایش؛ ج) سلول گروه آزمایش پیش از بارگذاری؛ د) سلول گروه آزمایش، ۶ ساعت پس از بارگذاری ۲۰٪



شکل ۶- نمایش آنتروپی زاویه سلول‌ها در گروه آزمایش، پیش و پس از بارگذاری ۲۰٪



شکل ۷- نمایش آنتروپی زاویه سلول‌ها در گروه شاهد، پیش و پس از آزمایش ۲۰٪

۴- بحث و نتیجه‌گیری

در این بررسی مشاهده شد، کشش ۲۰٪ تک‌محوری پس از ۶ ساعت بارگذاری می‌تواند موجب همسویی سلول‌ها شود. نتایج کشش ۱۰٪ تک‌محوری با مشاهدات کشش ۱۰٪ دو محوری مشابه بود و اثر قابل ملاحظه در همسو کردن سلول‌ها نداشت [۹]. بنابراین، اگرچه کشش متناوب ۱۰٪ تک‌محوری

- [7] Cha J.M., Park S.N., Noh S.H., Suh H., Time-dependent modulation of alignment and differentiation of smooth muscle cells seeded on a porous substrate undergoing cyclic mechanical strain, *Artif Organs*, 2006; 30: 250-258.
- [8] Liu B., Qu M.J., Li Z.K., Li H., Jiang Z.L., Effect of frequency of cyclic tensile strain on vascular smooth muscle cell alignment, *Journal of Biomechanics*, 2006; 39: 314-314.
- [9] Liu B., Qu M., Qin K., Li H., Li Z., Shen B, Role of Cyclic Strain Frequency in Regulating the Alignment of Vascular Smooth Muscle Cells In Vitro, *Biophysical Journal* 2008; 94: 1497-1507.
- [10] Zhang L., Kahn C., Chen H., Tran N., Wang X., Effect of uniaxial stretching on rat bone mesenchymal stem cell: Orientation and expressions of collagen types I and III and tenascin-C, *Cell Biology International*, 2008; 32: 344-352.
- [11] Guyton C., textbook of medical physiology, Elsevier 2005.
- [12] Asanuma K., Magid R., Johnson C., Nerem R., Galis Z., Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 284: 1778-1784.
- [13] Milkiewicz M., Mohammadzadeh F., Ispanovic E., Gee E., Haas T.L., Static strain stimulates expression of matrix metalloproteinase-2 and VEGF in microvascular endothelium via JNK- and ERK-dependent pathways, *J Cell Biochem*, 2007; 100: 750-761.
- [14] Yu J.G. and Russell B., Cardiomyocyte remodeling and sarcomere addition after uniaxial static strain in vitro, *J Histochem Cytochem*, 2005; 53: 839-844.
- [15] Wall M.E., Weinhold P.S., Siu T., Brown T.D., Banes A.J., Comparison of cellular strain with applied substrate strain in vitro, *J Biomech*, 2007; 40: 173-181.
- [16] Kurpinski K., Chu J., Hashi C., Li S., Anisotropic mechanosensing by mesenchymal stem cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103: 16095-16100.
- [17] Moretti M., Prina-Mello A., Reid A.J., Barron V., Prendergast P.J., Endothelial cell alignment on cyclically-stretched silicone surfaces, *J Mater Sci Mater Med*, 2004; 15: 1159-1164.

استاتیک در فاصله زمانی مشخص و محدود، کشش سیکلی شبیه‌سازی شود. به عبارت دیگر، پس از کشش و تغییر در ساختار سلولی، کشش بستر را آزاد کرده و مجدداً پس از مدت زمانی بارگذاری انجام می‌شود. مزیت این روش برای همسو کردن سلول‌ها، اعمال تنش‌های مکانیکی کمتر به سلول است. بدین ترتیب امکان بسیاری از تغییرات فنوتیپی^{۳۲} که در تحقیقات دینامیکی گذشته اثبات شده است، کاهش می‌یابد و روش جدیدی برای همسو نمودن سلول‌ها در مهندسی بافت فراهم می‌شود.

مراجع

- [1] Huang S., Ingber D.E., The structural and mechanical complexity of cell-growth control, *Nat Cell Biol*, 1999; 5: 131-8.
- [2] Neidlinger-Wilke C., Grood E.S., Wang J.H.C., Brand R.A., Claes L., Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates, *Journal of Orthopaedic Research*, 2001; 19: 286-293.
- [3] Jungbauer S., Kemkemer R., Gao H., Dynamics of cell alignment and altered morphology induced by cyclically stretched substrates, *Journal of Biomechanics*, 2006; 39: 232-232.
- [4] Park J.S., Chu J.S., 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.
- [5] Haghhighipour N., Tafazzoli M., Topological remodeling of cultured endothelial cells by characterized cyclic strains, *Mol Cell Biomech*, 2007; 4: 189-199.
- [6] Iba T., Sumpio B.E., Morphological response of human endothelial cells subjected to cyclic strain in vitro, *Microvascular Research*, 1991; 42: 245-254.

³² Phenotypical changes