

تأثیر کشش ترکیبی دوره‌ای - ثابت بر جهت‌گیری و تکثیر سلول‌های مزانشیمال انسانی

محسن ربانی^۱، محمد تفضلی‌شادپور^{۲*}، محمدعلی شکرگزار^{۳*}، حبیب‌اله پیروی^۴، محسن جانملکی^۵، ناصر امیری‌زاده^۶،
نوشین حقیقی‌پور^۷

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیومکانیک، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه بیومکانیک، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۴- استاد، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۵- مربی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۶- دانشیار، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران
- ۷- استادیار، بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۹/۰۹/۲۰

دریافت مقاله: ۸۹/۰۶/۲۳

چکیده

هدف: بارگذاری مکانیکی بر کارکرد حیاتی سلول‌های بدن تأثیر می‌گذارد. در این تحقیق به بررسی نقش کشش ترکیبی دوره‌ای - ثابت بر تکثیر سلول‌ها پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: به این منظور، سلول‌ها روی بستر الاستیک پوشش داده شده با ژلاتین کاشته شد و چهار دسته آزمایش با بارگذاری‌های دوره‌ای، ثابت، ترکیب دوره‌ای - ثابت و دوره‌ای به همراه دوره استراحت از بار روی سلول‌ها انجام شد. میزان کشش در همه موارد ۱۰ درصد انتخاب شد. مدت زمان بارگذاری دوره‌ای ۵ ساعت با فرکانس ۱ هرتز و برای بارگذاری ثابت ۱۲ ساعت بود.

نتایج: یافته‌ها نشان داد که بارگذاری دوره‌ای، سلول‌ها را در جهتی نسبت به محور کشش همسو نمود ولی تأثیر قابل ملاحظه در تعداد سلول‌ها ایجاد نکرد. در آزمایش بارگذاری ترکیبی دوره‌ای - ثابت، این بارگذاری باعث کاهش قابل ملاحظه تکثیر سلول‌های مزانشیمال در مقایسه با گروه کنترل شد. در دسته سوم، بارگذاری با دوره زمانی استراحت از بار، تعداد سلول‌ها افزایش قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه شاهد (بدون بارگذاری) داشت. بالاخره در گروه چهارم (بارگذاری استاتیک)، تفاوت قابل ملاحظه در تعداد سلول‌های گروه آزمایش در مقایسه با گروه شاهد (بدون بار) مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نوع بارگذاری اعم از دوره‌ای و ثابت و نیز زمان سپری شده پس از بارگذاری‌ها در روند تکثیر سلول‌ها تأثیر دارند.

کلیدواژگان: کشش ثابت، کشش دوره‌ای، تکثیر سلول‌ها، سلول بنیادی مزانشیمال انسانی، مهندسی بافت

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، گروه بیومکانیک، کدپستی: ۱۵۹۱۶۳۴۳۱۱

Email: tafazoli@aut.ac.ir

*نشانی مکاتبه: تهران، انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی ایران، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

Email: mashokrgozar@pasteur.ac.ir

۱- مقدمه

سلول‌های بدن در اثر ساختار آناتومی و عملکرد بافت‌های گوناگون همواره در معرض نیروهای مکانیکی قرار دارند. این نیروها در آرایش سلول‌ها و فنوتیپ آن‌ها تأثیرگذار است. سلول‌ها تغییر ریخت (Morphology) پیدا می‌کند و این تغییر ریخت، در رشد، تمایز، جابه‌جایی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis) تأثیر می‌گذارد. همچنین تنش‌های مکانیکی مسیرهای سیگنالی درون سلولی را فعال می‌کند و باعث بیان برخی ژن‌ها می‌شود [۱]. سلول‌های بدن در بافت‌های گوناگون مانند بافت قلبی، دیواره شریان، سیستم اسکلتی و عضلانی در معرض نیروهای مکانیکی قرار دارند. در دیواره عروق و قلب نیروهای متناوب دوره‌ای وجود دارد. تحقیقات تجربی درون آزمایشگاهی (In vitro) متعددی برای بررسی تأثیر این نیروها صورت گرفته است. به‌عنوان نمونه، کشش دوره‌ای باعث همسو شدن سلول‌ها در امتدادی مشخص می‌شود [۲]. این فرایند تغییر ریخت و آرایش سلول‌ها از طریق مفاهیم مکانیکی قابل بیان است [۳]. به بیان دیگر، سلول‌هایی که به‌صورت دوره‌ای بارگذاری شده‌اند، در جهت مشخصی قرار می‌گیرند تا در یک فرایند هماهنگ‌سازی (دوباره مدل شدن) نیروهای وارد بر سلول‌ها کاهش یابد [۴]. همچنین بافت‌هایی از بدن در معرض بارهای ثابت (استاتیک) است. تنش مانده در دیواره عروق و بافت‌های پوستی از آن جمله است. در معده و مثانه که افزایش حجم به آهستگی رخ می‌دهد، در بازه‌های زمانی گوناگون کشش‌های دینامیک یا ثابت به‌طور متوالی بر بافت (سلول‌ها) وارد می‌شود. کشش بر سلول‌های این بافت‌ها تأثیر گذاشته، با ترشح آنزیم‌های ویژه‌ای همراه است [۵]. به‌عنوان مثال، سلول‌های عضله صاف، تحت بار ثابت قرار گرفت و افزایش بیان آنزیم‌های ماتریس متالوپروتئیناز-۲ (Matrix Metalloproteinase-2: MMP-2) و MMP-9 دیده شد [۶]. کشش ثابت، بیان پروتئین VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor) و MMP-2 را در سلول‌های اندوتلیال افزایش داد [۷]. بارگذاری ثابت بر

سلول‌های قلبی موش، باعث کشیدگی قد و در هم پیچیدگی این سلول‌ها شد [۸].

بارگذاری کششی بر تکثیر سلول‌ها نیز مؤثر است [۹، ۱۰]. تکثیر سلول‌های عضله صاف در مثانه و افزایش رشد بافت دیواره قلبی (هایپرتروفی: Hypertrophy) مواردی است که از کشش وارده شده بر این بافت‌ها اثر می‌پذیرد [۱۱، ۱۲]. اگرچه بارگذاری سلول‌ها در مواردی با افزایش تکثیر سلول‌ها همراه بود [۱۳]، اما در بعضی مواقع کاهش رشد سلول‌ها را به همراه دارد. به‌عبارت دیگر، این تغییر در رشد سلول‌ها می‌تواند تحت تأثیر تعداد دوره و فرکانس بارگذاری [۱۴] و نیز نوع سلول و درصد کشش باشد [۱۵، ۱۶].

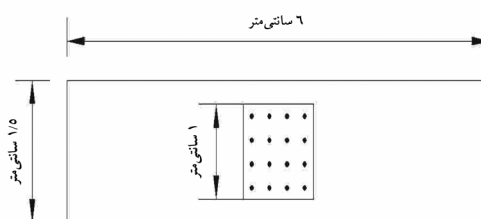
میزان تکثیر سلول‌های بنیادی و اثرپذیری آن‌ها از بارگذاری‌های مکانیکی در بررسی سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از آن‌جا که تاکنون اکثر تحقیقات انجام شده، نقش بارگذاری مکانیکی دوره‌ای (دینامیک) با فرکانس‌های متفاوت یا نقش بارگذاری ثابت (استاتیک) را به‌طور مجزا بر سلول‌ها بررسی نموده است، در تحقیق حاضر نقش ترکیبی بارگذاری کششی دوره‌ای و ثابت در همسو نمودن سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی (Human Mesenchymal Stem Cell: HMSC) و نیز تکثیر آن‌ها بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

ابتدا لاستیک سیلیکون از جنس پلی دی متیل سیلوکسان (Poly (Dimethyl Siloxane): PDMS) ساخته شد. این ماده الاستیک به دلیل آب‌گریز بودن سطح مناسبی برای کاشت سلول نیست. بنابراین با ماده دیگر نظیر ژلاتین پوشش داده شد. این لاستیک سیلیکونی درون دستگاه کشش قرار داده شد تا انواع بارگذاری کشش دینامیک و ثابت بر آن اعمال شود. براساس طرح آزمایش‌ها تعداد سلول‌ها در زمان‌های مختلف در دو گروه آزمایش (با بارگذاری) و شاهد (بدون بارگذاری) مقایسه شد.

۲-۱- سنتز نوارهای سیلیکونی بستر کشت سلول

غشای سیلیکونی پخته شده با پلاتینیوم (Platinum Cured Silicone Membrane) با دارا بودن ویژگی‌هایی نظیر شفافیت و سطح هموار که پروکسید و کتون هم از خود بیرون نمی‌دهد، بسیار مناسب کاربردهای پزشکی و غذایی است. شفاف بودن بستر سیلیکونی، مشاهده و تصویربرداری از سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ معکوس (Invert) را ممکن می‌سازد. این غشای الاستیک از جنس PDMS با کاربرد پزشکی که پایدار، غیرسمی و زیست‌سازگار است، ساخته شد. PDMS (Wacker Chemie AG, Germany) با دیکومیل پروکسید (Dicumil Peroxide) ۹۰ درصد در دمای ۸۰ درجه پخته شد. سپس در قالب فلزی گرم با ضخامت ۰/۲۵ میلی‌متر تحت فشار در دمای ۱۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه فشرده شد. غشای ساخته شده به صورت نوارهایی به طول ۶۰ میلی‌متر و عرض ۱۵ میلی‌متر بریده شد. در قسمت میانی نوار، محدوده ۱۰×۱۰ میلی‌متر با استفاده از نقاط رنگی علامت‌گذاری شد تا بتوان تغییرات ریخت دسته‌های سلولی متناظر را قبل و بعد از آزمایش مورد بررسی قرار داد (شکل ۱).



شکل ۱ نوار سیلیکونی و نمایش ابعادی محدوده علامت‌گذاری شده برای کاشت سلول

۲-۲- اصلاح خواص سطحی سیلیکون با

پوششی از ژلاتین

با وجود زیست‌سازگاری نوارهای سیلیکونی، ویژگی‌های سطح این ماده به گونه‌ای است که سلول نمی‌تواند به خوبی بر

آن بچسبد و توسعه پیدا کند. به منظور فراهم نمودن شرایط مناسب برای چسبیدن سلول‌ها بر نوارهای سیلیکون، عملیات سطحی برای بهبود خواص سطحی، و یا پوشش سطح با یک ماده مناسب آب‌دوست و زیست‌سازگار لازم است. در تحقیقات گذشته پوشش با لَمینین (Laminin) [۱۷]، کلاژن (Collagen) و فیبرونکتین (Fibronectin) [۱۸] به عنوان پوشش پیشنهاد شده است.

در تحقیق حاضر، پوشش سیلیکون رابر با ژلاتین (Gelatin-from porcine skin Type A, Sigma, Germany) که البته قیمت مناسبی دارد، پیشنهاد شد. در پوشش بهینه ژلاتین، ضخامت لایه پوشش آنقدر زیاد نیست که سلول در هنگام بارگذاری از روی نوار سیلیکونی کنده شود یا به خوبی با کشش بستر جابه‌جا نشود. همچنین اگر ژلاتین به خوبی با سطح سیلیکون پیوند حاصل نکند، در هنگام کاشت سلول یا بارگذاری بسترهای سیلیکونی، ممکن است ژلاتین و به همراه آن سلول از بستر کنده شود. پوشش بهینه با استفاده از ژلاتین ۰/۲ درصد محلول در آب دیونیزه به دست آمد. پس از هر پاساژ تعداد ۱۰۰۰۰ سلول روی محدوده ۱ سانتی‌متر مربعی از بستر سیلیکونی که علامت‌گذاری شده، کاشته شد. برای شمارش سلول‌ها در این مرحله از هموسایتومتر (Haemocytometer) استفاده شد.

۲-۳- دستگاه کشش تک محوری سلول

در تحقیقات آزمایشگاهی بارگذاری و اعمال کشش بر سلول‌ها معمولاً از طریق کشش بستر الاستیک انجام می‌شود. سلول‌ها بر این بستر زیست‌سازگار چسبانده و رشد داده می‌شوند. اگرچه همه تغییر طول بستر الاستیک به سلول منتقل نمی‌شود، اندازه جابه‌جایی منتقل شده از بستر به سلول بر حسب نوع ماده بستر، پوشش بستر (کلاژن یا ژلاتین) و نوع سلول از طریق روش‌های دقیق نشان‌گذاری و تصویربرداری قابل محاسبه است [۱۹].

کشش دوره‌ای و کشش ثابت در بستر الاستیک سیلیکونی

کشت داده شد و در انکوباتور مخصوص کشت سلول (دمای ۳۷ درجه و دی اکسید کربن ۵ درصد) نگهداری شد. محیط کشت هر ۳ روز یکبار تعویض شد. سلول‌ها پس از تکثیر و پوشاندن تقریباً ۷۰ درصد سطح فلاسک با استفاده از آنزیم تریپسین ۰/۲۵ درصد پاساژ داده شدند. برای استفاده مجدد در دفعات بعد، سلول‌های اضافی پس از تکثیر و پر کردن ۷۰ تا ۸۰ درصد سطح فلاسک، منجمد شدند و در تانک نیتروژن برای مدت طولانی نگهداری شدند. در این آزمایش از HMSC در پاساژهای ۴ تا ۷ استفاده شد.

۲-۵- بارگذاری سلول‌ها

بسترهای سیلیکونی برای کاشت دو گروه شاهد و آزمایش روی سطح دیش قرار داده شد. بارگذاری پس از پوشش بستر با ژلاتین و چسبیدن سلول‌ها به سطح آن‌ها انجام شد. ۲۴ ساعت زمان مناسبی بود تا سلول‌ها به‌خوبی بر بستر سیلیکونی بچسبند و توسعه پیدا کنند. بستر سیلیکونی گروه آزمایش در دو فک از جنس استیل درگیر شد و تحت بارگذاری ۱۰ درصد قرار داده شد. بارگذاری دوره‌ای با فرکانس ۱ هرتز و تعداد دوره ۱۵۰۰۰ بار تکرار شد. همچنین در بارگذاری ثابت، بستر سیلیکون در حالت کشت استاتیک ۱۰ درصد در محفظه دستگاه نگه داشته شد.

۲-۶- تصاویر میکروسکوپی و پردازش آن‌ها

همه تصاویر سلولی با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (Nikon, TE2000-U) با بزرگنمایی شیئی و چشمی ۱۰X و دوربین سونی (Coolpix, Japan) با قدرت تفکیک (Resolution) ۶ مگاپیکسل (۲۱۱۲×۲۸۱۶) تهیه شده و توسط نرم‌افزار پردازش تصویر (ImageJ) (نسخه ۱/۴۳u) پردازش شد. مقایسه تصویر اولیه و تصویر مورد پردازش قرار گرفته در شکل ۳ آمده است. بدین ترتیب سلول‌ها از زمینه خود به‌خوبی قابل تشخیص است.

به‌وسیله دستگاهی اعمال شد که مناسب نیازهای این پروژه بود. این دستگاه با قابلیت کشت ثابت یا دوره‌ای با فرکانس‌ها و درصد کشت‌های گوناگون ساخته شده بود [۲۰]. به‌منظور بهینه‌سازی عملکرد دستگاه و کنترل شرایط استرلیزاسیون برای کشت سلول‌ها، محفظه‌ای ویژه از جنس پلی اتیلن و دو گیره از جنس استیل زیست‌سازگار به‌گونه‌ای طراحی و ساخته شد تا آزمایش کشت با دقت کافی در محیط تمیز انجام شود. این محفظه به آسانی قابل شستشو و استریل شدن است و هنگام انتقال به انکوباتور اجازه جریان هوای ناپاک به داخل محفظه را نمی‌دهد، بنابراین سلول‌ها در شرایط پاک تحت بارگذاری قرار می‌گیرند (شکل ۲).



شکل ۲ محفظه کشت سلول و بخش الکترومکانیکی کنترل حرکت آن داخل انکوباتور

۲-۴- کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی

HMSC ها از مغز استخوان انسان استخراج شدند و فنوتیپ آن‌ها به‌وسیله فلوسایتومتری تأیید شد. این سلول‌ها مطابق مراجع [۲۱]، نسبت به نشانگرهای سطحی CD105، CD166، CD90 و CD44 مثبت و نسبت به نشانگرهای CD34 و CD45 منفی بودند. لازم به ذکر است که سلول‌های بنیادی از سازمان انتفال خون تهیه شد و مجوز اخلاق برای استفاده از این سلول‌ها در پروژه مصوب سازمان انتفال خون ایران اخذ شده است.

سلول‌ها در محیط کشت (DMEM-LG) با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS: Fetal Bovin Serum) (Gibco)

(Merck, Germany) به مدت ۲۰ دقیقه برای حل فورمازان استفاده شد. جذب نوری (Optical Density: OD) محلول فورمازان در طول موج‌های ۵۷۰ نانومتر و ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Visible Cecil, USA) قرائت و تفاضل آن محاسبه و به عنوان معیاری برای اندازه‌گیری تعداد سلول‌ها به کار برده شد.

۲-۸- روش تحلیل آماری و ارزیابی نتایج آن

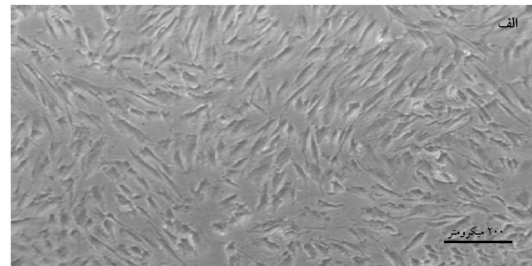
هر آزمایش حداقل سه بار در دو گروه شاهد و آزمایش به‌طور همزمان تکرار شد تا نتایج از لحاظ آماری قابل اعتماد باشد. در نمونه‌های مختلف تفاضل OD اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری Student t-test برای مقایسه تعداد سلول‌ها در نمونه‌های گروه آزمایش و شاهد که همزمان انجام شده به کار گرفته شد. مقادیر P کوچکتر از ۰/۰۵ معیار اختلاف معنی‌دار اندازه OD (یا تکثیر سلول‌ها) در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

۳-۱- بهبود خواص سطحی سیلیکون برای

چسبندگی و توسعه (تکثیر) سلول‌ها

در شکل الف-۴ نمونه‌ای از تصویر سلول در فلاسک‌های کشت سلول برای مقایسه به عنوان نمونه شاهد مثبت ارائه شده است. همچنین سلول‌ها به خوبی روی سیلیکون پوشش داده شده با ژلاتین چسبیده و توسعه پیدا می‌کند، (شکل ب-۴). پوشش سیلیکون با کلاژنی با ضخامت مناسب امکان چسبیدن سلول به بستر سیلیکونی را فراهم می‌نماید. واضح است که ریخت و آرایش سلول‌ها در فلاسک کشت سلولی به عنوان نمونه شاهد با سلول‌های روی بستر پوشش داده شده شباهت زیادی دارد و نشان می‌دهد که سلول‌ها به خوبی بر سطح توسعه پیدا کرده‌اند. به عبارت دیگر؛ پوشش ژلاتین سطح زیست‌سازگاری برای کشت سلول فراهم نموده است. اما در شکل ۴ ج) دیده می‌شود که HMSC ها بر سیلیکون پس از



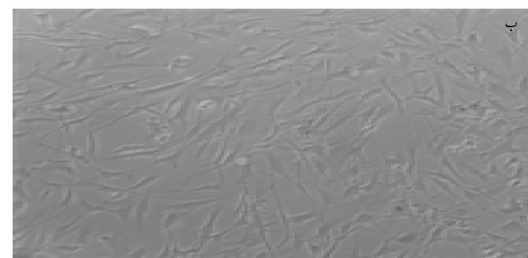
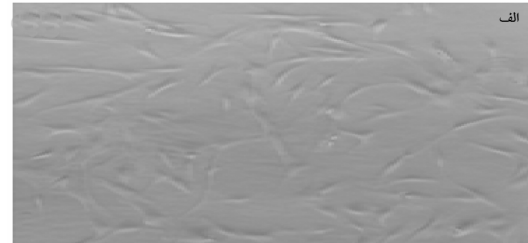
شکل ۳ الف) تصویر اولیه (۱۰۰X)، ب) تصویر پردازش شده در نرم‌افزار ImageJ (۱۰۰X)

۲-۷- ارزیابی کمی سلول‌های بنیادی مزانشیمال

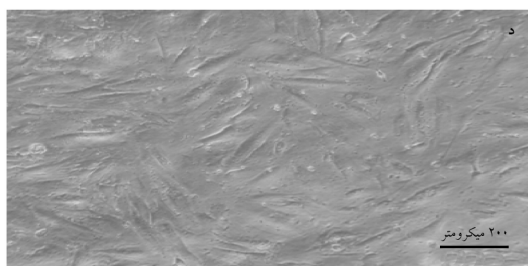
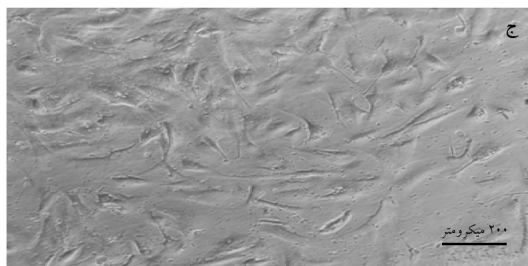
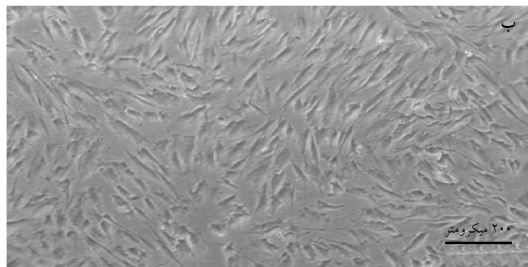
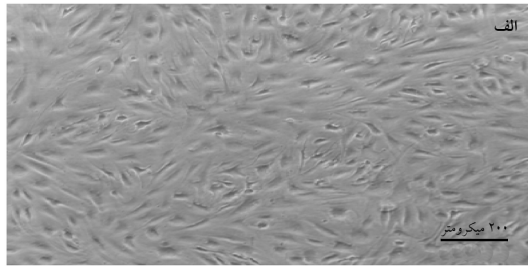
پس از بارگذاری

به منظور مقایسه تعداد سلول‌های روی نوارهای سیلیکونی در دو گروه آزمایش و شاهد از روش MTT استفاده شد. این ماده از شرکت Sigma آلمان با نام 5-(4, 3-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide تهیه شد. در واقع روش‌های گوناگون برای اندازه‌گیری تکثیر سلول و زنده بودن سلول‌ها استفاده می‌شود که کاهش نمک تترازولیوم امروزه به عنوان روش رایجی پذیرفته شده است. تترازولیوم موجود در MTT به رنگ زرد است و در حضور سلول‌هایی که متابولیک فعال دارند، کاهش می‌یابد و در عوض آنزیم‌های دهیدروناز معادل آن را تولید می‌نماید. فورمازان (Formazan) حاصل از این فرآیند قابل حل است و به صورت کمی به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود. در این آزمایش سلول‌ها به مدت دو ساعت در مجاورت MTT محلول با غلظت ۰/۵ درصد وزنی- حجمی در محیط کشت DMEM استفاده شد و از Dimethyl Sulfoxide, DMSO

۲۴ ساعت همچنان به صورت دایره‌ای قرار گرفته و امکان توسعه و تکثیر آن‌ها فراهم نبوده است.



شکل ۴ نمایش ریخت و آرایش سلول‌های مزانشیمال ۲۴ ساعت پس از کاشت (۱۰۰X): الف) فلاسک کشت سلول، ب) سیلیکون پوشش داده شده با ژلاتین، ج) سیلیکون



شکل ۵ جهت‌گیری سلول‌های بنیادی مزانشیمال (۱۰۰X) در گروه بارگذاری ترکیبی؛ الف) قبل از کشش و ب) پس از کشش سیلیکی ۱۰ درصد و در گروه بارگذاری ثابت ج) قبل از کشش و د) پس از کشش ثابت ۱۰ درصد

۳-۳- تأثیر بارگذاری بر تکثیر HMSC ها

۳-۳-۱- تأثیر بارگذاری دوره‌ای بر تکثیر HMSC ها
(زمان بارگذاری ۵ ساعت)

در آزمایش‌های فوق مشاهده شد که ۵ ساعت بارگذاری دوره‌ای با فرکانس ۱ هرتز تأثیر قابل ملاحظه در تعداد

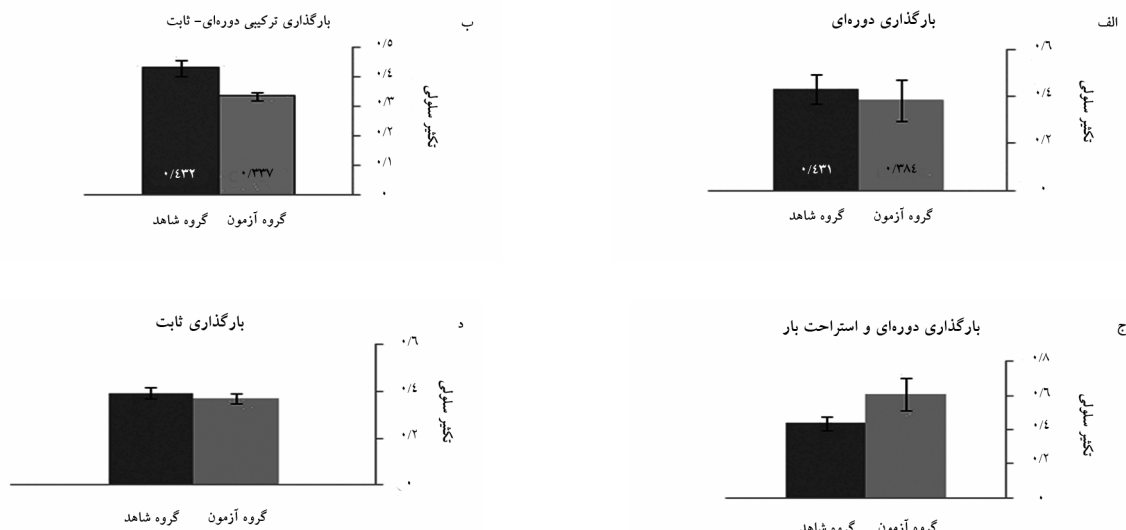
۲-۳- تأثیر انواع بارگذاری کششی دوره‌ای و

ثابت (۱۰ درصد) در جهت‌گیری سلول‌ها

چنانچه با مقایسه تصاویر الف و ب در شکل ۵ مشاهده می‌شود، سلول‌ها بعد از بارگذاری دوره‌ای در زاویه‌ای مشخص نسبت به محور کشش جهت‌گیری کرده‌اند. همچنین کشش ثابت (استاتیک) ۱۰ درصد باعث شد تا سلول‌های مجاور در کنار هم و هم‌جهت قرار بگیرد. اما این جهت‌گیری در یک راستا ویژه به‌خوبی قابل مشاهده نیست [شکل (ج، د)].

سلول‌های گروه آزمون در مقایسه با گروه کنترل نداشت ($P=0/253$) (شکل ۶ الف). بررسی دقیق سلول‌های مشخص در گروه آزمایش نشان می‌دهد که سلول‌ها پس از این مدت

زمان از سطح جدا نشده‌اند. بنابراین، عدم افزایش تعداد سلول‌ها نسبت به گروه شاهد بیانگر تأثیر غیرقابل ملاحظه این بارگذاری در تکثیر سلول‌ها است.



شکل ۶ مقایسه تکثیر سلولی دو گروه شاهد و آزمایش؛ الف) بارگذاری دوره‌ای به مدت ۵ ساعت ($P=0/253$) ب) بارگذاری ترکیبی به مدت ۱۷ ساعت ($P=0/007$) ج) بارگذاری دوره‌ای (۵ ساعت)، ارزیابی تکثیر ۱۷ ساعت پس از شروع بارگذاری انجام شد. ($P=0/038$) د) بارگذاری ثابت به مدت ۱۷ ساعت ($P=0/323$). محور عمودی OD طول موج‌های ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر است.

۳-۳-۲- تأثیر بارگذاری ترکیبی دوره‌ای - ثابت بر تکثیر HMSC ها (زمان بارگذاری ۱۷ ساعت)

بارگذاری دوره‌ای با فرکانس ۱ هرتز (۵ ساعت و ۱۰ درصد کشش) که با بار ثابت ۱۰ درصد به مدت ۱۲ ساعت همراه بود، منجر به کاهش قابل ملاحظه رشد سلول‌ها در مقایسه با گروه شاهد شد ($P=0/007$) (شکل ۶ ب).

می‌شود که بارگذاری دوره‌ای در این مورد نقش تحریکی برای افزایش تکثیر سلول‌ها دارد. به بیان دیگر با وجود ثابت بودن تعداد سلول‌ها بلافاصله پس از بارگذاری، پس از ۱۲ ساعت، افزایش تعداد سلول‌ها در گروه آزمایش قابل ملاحظه است (شکل ۶ ج).

۳-۳-۳- تأثیر بارگذاری دوره‌ای، ۱۲ ساعت پس از بارگذاری (زمان آزمون ۱۷ ساعت)

اگر سلول‌های مزانشیمال تحت بارگذاری ۱۰ درصد دوره‌ای به مدت ۵ ساعت قرار بگیرد و مقایسه سلول‌ها با گروه شاهد ۱۲ ساعت بعد از بارگذاری انجام شود؛ ملاحظه

۳-۳-۴- تأثیر بارگذاری استاتیک (زمان بارگذاری ۱۷ ساعت)

چنانچه در نمودار مشاهده می‌شود، بارگذاری ثابت (استاتیک) کششی ۱۰ درصد در مدت زمان ۱۷ ساعت کاهش غیرقابل ملاحظه میانگین تعداد سلول‌ها را نمایش می‌دهد (شکل ۶ د).

۴- بحث

در این تحقیق تأثیر بارگذاری ۱۰ درصد در همسو نمودن سلول‌ها مشاهده شد. البته میزان همسوسازی در بارگذاری ۱۰ درصد ترکیبی دروه‌ای- ثابت نسبت به بارگذاری ثابت بیشتر ملاحظه می‌شود. در تحقیقات گذشته نقش بارگذاری دینامیک در هم‌جهت‌سازی سلول‌ها به اثبات رسیده است [۳]. در بارگذاری ثابت خزش سلول (آزاد شدن تنش وارده بر سلول)، خزش بستر سلولی و کاهش کشش منتقل شده از بستر به سلول می‌تواند باعث کم شدن اثر کشش نسبت به کشش دوره‌ای در همسو نمودن سلول‌ها شود. لازم به ذکر است که با توجه به نتایج محاسبات تجربی، تنها ۶۳ درصد از تنش استاتیک بستر الاستیک به سلول منتقل می‌شود [۱۷]. همچنین به دلیل خزش سلول‌های تغییر شکل داده در هنگام سپری شدن زمان، تنش وارد بر سلول‌ها پس از چند ساعت رها می‌شود. در حالی‌که کشش دوره‌ای، در یک بازه زمانی، مرتب تکرار می‌شود و در آرایش سلول‌ها تأثیر متناوب می‌گذارد. براساس تئوری‌های بیومکانیکی، در هنگام بارگذاری تک محوری، سلول در یک جابه‌جایی جزئی زاویه خود با محور کشش را تغییر می‌دهد تا تغییر انرژی کرنشی به حداقل برسد. اما در بارگذاری دوره‌ای این تغییر جهت و هماهنگ‌سازی تا پایان زمان بارگذاری تکرار می‌شود. پر واضح است که با افزایش زمان بارگذاری اکثریت سلول‌ها در جهتی ویژه قرار می‌گیرند. با توجه به نتایج این تحقیق، به‌منظور همسو نمودن سلول‌ها پیشنهاد می‌شود، با استفاده از کشش استاتیک در فاصله زمانی مشخص و محدود، کشش دوره‌ای شبیه‌سازی شود. به عبارت دیگر، پس از کشش و تغییر در ساختار سلولی، کشش بستر را آزاد کرده و مجدداً پس از مدتی بارگذاری انجام می‌شود. همچنین می‌توان بارگذاری دوره‌ای را به‌طور متناوب با بارگذاری ثابت همراه نمود. مزیت این روش برای همسو کردن سلول‌ها، اعمال تنش‌های مکانیکی کمتر به سلول است. بدین ترتیب امکان بسیاری از تغییرات

فنوتیپی که در تحقیقات دینامیکی گذشته اثبات شده است، کاهش می‌یابد و روش جدیدی برای همسو نمودن سلول‌ها در مهندسی بافت فراهم می‌شود.

در آزمایش‌های اولیه مشاهده شد که بارگذاری دینامیک در مدت محدود ۵ ساعت، تغییر معنی‌داری در تعداد سلول‌ها در مقایسه با گروه شاهد ایجاد نکرد ($P=0/253$). سپس با فرض ثابت ماندن تکثیر سلولی پس از ۵ ساعت بارگذاری دوره‌ای، نقش بارگذاری ترکیبی و استراحت از بار در تکثیر سلول‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که ترکیب بارگذاری دینامیک (۵ ساعت) و بارگذاری ثابت به مدت ۱۲ ساعت کاهش قابل ملاحظه تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال را به همراه دارد ($P=0/007$). در دسته سوم، سلول‌ها پس از بارگذاری دوره‌ای از دستگاه خارج شد و درون دیش‌هایی قرار داده شد تا سلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت بدون هرگونه بارگذاری مکانیکی رشد کند و سپس تعداد آن‌ها با گروه شاهد (بدون بارگذاری) مقایسه شود. در گروه آزمایش این نوع بارگذاری (با استراحت از بار)، افزایش تعداد سلول‌ها در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد ($P=0/038$). همچنین تأثیر بار ثابت ۱۰ درصد پس از ۱۷ ساعت ملاحظه شد که کاهش معنی‌داری نداشت ($P=0/323$). لازم به ذکر است که تکثیر سلولی در این سه گروه ۱۷ ساعت پس از شروع آزمایش ارزیابی شد. بنابراین با فرض ثابت بودن زمان کل آزمایش، در بررسی تأثیر بارگذاری بر رشد یا تکثیر سلولی باید پارامترهای نوع بارگذاری (دوره‌ای، ثابت و ترکیبی) و زمان سپری شده پس از بارگذاری در نظر گرفته شود.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر خود را از همکاری‌های مؤثر مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی در پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و بانک سلولی انستیتو پاستور ایران بابت پشتیبانی بی‌دریغ و حمایت‌های مالی ابراز می‌دارند.

۶- منابع

- [1] Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol* 1999; 1(5): E131-8.
- [2] Neidlinger-Wilke C, Grood ES, Wang JH-C, Brand RA, Claes L. Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates. *J Orthop Res* 2001; 19(2): 286-93.
- [3] Jungbauer S, Kemkemer R, Gao H. Dynamics of cell alignment and altered morphology induced by cyclically stretched substrates. *J Biomech* 2006; 39(Suppl 1): S232.
- [4] Park JS, Chu JS, Cheng C, Chen F, Chen D, Li S. Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. *J Biotechnol Bioeng* 2004; 88(3): 359-68.
- [5] Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 9th ed. Elsevier Saunders; 2005; p: 171-80.
- [6] Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, Galis ZS. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284(5): H1778-84.
- [7] Milkiewicz M, Mohammadzadeh F, Ispanovic E, Gee E, Haas TL. Static strain stimulates expression of matrix metalloproteinase-2 and VEGF in microvascular endothelium via JNK- and ERK-dependent pathways. *J Cell Biochem* 2007; 100(3): 750-61.
- [8] Yu JG, Russell B. Cardiomyocyte remodeling and sarcomere addition after uniaxial static strain in vitro. *J Histochem Cytochem* 2005; 53(7): 839-44.
- [9] Aitken K, Bāgl DJ. Stretch-induced bladder smooth muscle cell (SMC) proliferation is mediated by RHAMM-dependent extracellular-regulated kinase (erk) signaling. *Urology* 2001; 57(6Suppl 1): 109.
- [10] Webb K, Hitchcock RW, Smeal RM, Li W, Gray SD, Tresco PA. Cyclic strain increases fibroblast proliferation, matrix accumulation, and elastic modulus of fibroblast-seeded polyurethane constructs. *J Biomech* 2006; 39(6): 1136-44.
- [11] Wang JG, Miyazu M, Xiang P, Li SN, Sokabe M, Naruse K. Stretch-induced cell proliferation is mediated by FAK-MAPK pathway. *Life Sci* 2005; 76(24): 2817-25.
- [12] Han HC, Lee Y, Vito RP, Sprague EA. A comparison of cell proliferation in arteries under hypertensive pressure and longitudinal stretch. *J Biomech* 2006; 39(Suppl 1): S316.
- [13] Grossi A, Yadav K, Lawson MA. Mechanical stimulation increases proliferation, differentiation and protein expression in culture: stimulation effects are substrate dependent. *J Biomech* 2007; 40(15): 3354-62.
- [14] Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, Beck A, Claes L, Ignatius A. Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. *J Biomech* 2002; 35(7): 873-80.
- [15] Lee WC, Maul TM, Vorp DA, Rubin JP, Marra KG. Effects of uniaxial cyclic strain on adipose-derived stem cell morphology, proliferation, and differentiation. *Biomech Model Mechanobiol* 2007; 6(4): 265-73.

- [16] Song G, Ju Y, Shen X, Luo Q, Shi Y, Qin J. Mechanical stretch promotes proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007; 58(2): 271-7.
- [17] Wall ME, Weinhold PS, Siu T, Brown TD, Banes AJ. Comparison of cellular strain with applied substrate strain in vitro. *J Biomech* 2007; 40(1): 173-81.
- [18] Haghighipour N, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Amini S, Amanzadeh A, Khorasani MT. Topological remodeling of cultured endothelial cells by characterized cyclic strains. *Mol Cell Biomech* 2007; 4(4): 189-99.
- [19] Narita Y, Yamawaki A, Kagami H, Ueda M, Ueda Y. Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. *Cell Tissue Res* 2008; 333(3): 449-59.
- [20] De Silva MN, Desai R, Odde DJ. Micro-patterning of animal cells on PDMS substrates in the presence of serum without use of adhesion inhibitors. *Biomed Microdevices* 2004; 6(3): 219-22.
- [21] Wang L, Sun B, Ziemer KS, Barabino GA, Carrier RL. Chemical and physical modifications to poly(dimethylsiloxane) surfaces affect adhesion of Caco-2 cells. *J Biomed Mater Res A* 2010; 93(4): 1260-71.