

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 Khazaei¹, Masoud Soleimani², Seyed Hossein Ahmadi Tafti³, *Zohreh Hojati¹

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.



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>



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-transduced 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

مقاله پژوهشی:

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های شبه قلبی با انتقال همزمان لنتی ویروس‌های حاوی miR-1 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 تربیت مدرس، تهران، ایران.

۳. مرکز تحقیقات فناوری‌های پزشکی قلب و عروق، مرکز قلب تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۲۰ تیر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۰۳ مرداد ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۱۰ مرداد ۱۴۰۰

زمینه و هدف: بیماری‌های قلبی-عروقی 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 شبه قلبی 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 میوکاردين (Myocd) به طور همزمان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی موش انتقال یافتند. سه روز پس از القای ژنتیکی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسداکت شده به هیدروژل حاوی کیتوزان و کلاژن انتقال یافتند و پس از ۲۱ روز تمایز این سلول‌ها به سلول‌های شبه قلبی سنجیده شد. در همین راستا بیان مارکرهای قلبی مانند troponin T type 2 (Tnnt2)، GATA binding protein 4 (Gata4)، NK2 homeobox 5 (Nkx2-5) در سطح ژن و پروتئین در هر دو محیط دو بعدی و سه بعدی بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از واکنش کمی زنجیرهای پلیمرز 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 تمایز 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

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].

بیماری‌های قلبی-عروقی 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 قلبی-عروقی همچنان دلیل اصلی نارسایی قلبی در سراسر جهان است [۲]. به همین دلیل اتخاذ روش‌های نوین مانند رویکردهای بازسازی کننده قلب و درمان‌های مبتنی بر سلول ضروری به نظر می‌رسد [۳]. در میان منابع سلولی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل خواص منحصر به فرد از جمله اثرات

* نویسنده مسئول:

زهره حجتی

نشانی: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی.

تلفن: ۰۳۲۸۷۹۰۳ (۹۱۳) ۹۸+

رایانامه: z.hojati@sci.ui.ac.ir

تجزیه پذیری 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 تخریب پذیری کلاژن می شود [۱۶]. بنابراین در مطالعه حاضر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی موش به طور همزمان با لنتی ویروس های حاوی miR-1 و MyoCD ترانسداکت شد و تمایز آن در محیط دوبعدی و سه بعدی با یکدیگر مقایسه شد.

روش بررسی

به منظور بررسی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های شبه قلبی با القای ژنتیکی، لنتی ویروس های 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 نام های psPAX2 و pMD ترانسفکت شدند. مواد لازم برای ترانسفکت شامل بافر HEPES، کلسیم کلراید (۲/۵ میلی مولار) و آب استریل است. محیط سلول ها در زمان ترانسفکت High glucose DMEM با ۵٪ FBS و فاقد آنتی بیوتیک است. نسبت وکتورهای miR-1 و psPAX2، pMD و به ترتیب ۱:۳:۳ است. همچنین از وکتور فاقد توالی اینسرت شده به عنوان کنترل استفاده شد. سپس هر ۱۲ ساعت یک بار و به مدت ۳ روز مایع رویی سلول ها که حاوی ویروس های مد نظر است، جمع آوری شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای تغلیظ ویروس های جمع آوری شده از اولتراسانتریفوژ یخچال دار 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 تست های تورم و قدرت زنده ماندنی سلول ها در محیط هیدروژلی انجام شد. پس از اتمام مراحل ساخت ویروس و بعد از آن هیدروژل، سلول های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی موش با روش آنزیمی طبق پروتکل جداسازی شد [۱۸]. به منظور تأیید هویت سلول های جداسازی شده تست فلوسایتومتری برای مارک های سطحی CD۷۳، CD۹۰ و CD۱۰۵ (مارک های اختصاصی سلول های بنیادی مزانشیمی) و عدم بیان CD۴۵ (مارکر اختصاصی سلول های خونی) انجام شد. همچنین سلول های جدا شده در محیط های اختصاصی قرار گرفته و توانایی تمایزشان به سلول های چربی و استخوان به ترتیب با رنگ آمیزی Oil Red O و Alizarin Red سنجیده شد (داده ها نشان داده نشده است). سلول های جدا شده در پایان پاساژ ۳ در پلیت های ۱۲ خانه سید شده و با ویروس های حاوی miR-1 و MyoCD ترانسداکت شدند. ۴۸ ساعت پس از ترانسداکشن، سلول های GFP مثبت با کمک میکروسکوپ فلئورسنت و فلوسایتومتری ارزیابی شدند. میزان افزایش بیان miR-1 و MyoCD در سلول های ترانسداکت شده با روش qRT-PCR سنجیده شد. ۳ روز پس از ترانسداکشن، سلول ها از پلیت جدا شده و در هیدروژل

در چندین مطالعه با استفاده از القای ژنتیکی، سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های شبه کاردیومیوسیت القاشده (iCM) تمایز یافته اند که در همین راستا از ژن ها و microRNA های مختلف استفاده می شود [۶، ۷]. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که miRNA های مختلفی در کاردیومیوژنز نقش دارند که به miRNA های قلبی معروف هستند، مانند، miR-133، miR-499 و miR-1 [۸]. miR-1 یکی از miRNA هایی است که با القای بیان ژن های Gata4 و Nkx2-5 و فعال کردن مسیر سیگنالینگ Wnt/ β -Catenin باعث تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های شبه قلبی می شود [۹]. در تمایز عضلانی، فاکتور پاسخ سرم (SRF) به عنوان فعال کننده ژن های عضلانی از جمله miR-1 عمل می کند. با این حال نشان داده شده که SRF یک فعال کننده ضعیف است که برای عملکرد بهتر به یک فعال کننده دیگر به نام میو کاردین وابسته است. بدین ترتیب SRF و MyoCD با اتصال به توالی های تقویت کننده miR-1 بیان آن را به صورت هم افزایی افزایش می دهند [۱۰].

علی رغم پیشرفت های فراوان در القای ژنتیکی سلول های بنیادی مزانشیمی و تمایز آن ها به سلول های شبه قلبی، این سلول ها در درمان مبتنی بر سلول به اندازه کافی مؤثر نیستند. زیرا کاردیومیوسیت های مشتق شده از سلول های 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 سه بعدی برای بهبود شرایط تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی استفاده شده است. مانند استفاده از داربست پلیمری، ماتریکس خارج سلولی دسلولار شده و هیدروژل های مختلف [۱۲، ۱۳]. هیدروژل ها به عنوان اولین ماده زیستی متورم در آب که در مهندسی بافت استفاده می شود می توانند یک ساختار سه بعدی ایجاد کنند. کیتوزان یکی از مواد پر کاربرد در هیدروژل هاست 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 زنده ماندنی سلول ها و بهبود عملکرد قلب در مدل رت دارای انفارکتوس پس از پیوند به ناحیه آسیب دیده شده است [۱۴]. یکی دیگر از راهکارهای مورد استفاده در مهندسی بافت، استفاده از هیدروژل های ترکیبی است. هیدروژل کیتوزان / کلاژن یکی از پر کاربردترین هیدروژل های ترکیبی برای بهبود تمایز و بازسازی سلول های قلبی است [۱۵]. کلاژن یکی از اجزای اصلی ماتریکس خارج سلولی است که باعث تقویت مقاومت کششی در دیواره قلب می شود. کلاژن باعث بقا، تکثیر و چسبندگی سلول می شود. این در صورتی است که کلاژن دارای سرعت

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 ≤ 0.05 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

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 ۱۲ خانه منتقل شده و به منظور ایجاد ژل، NaHCO_3 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 CO_2 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 هر کدام 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 تریزول 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، 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 هر کدام 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 مورد مطالعه استفاده شد. همچنین از روش $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ برای آنالیز داده‌های qRT-PCR استفاده شد. برای بیان پروتئین مارکرهای قلبی ذکر شده، 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 ≤ 0.05 در نظر گرفته شد.

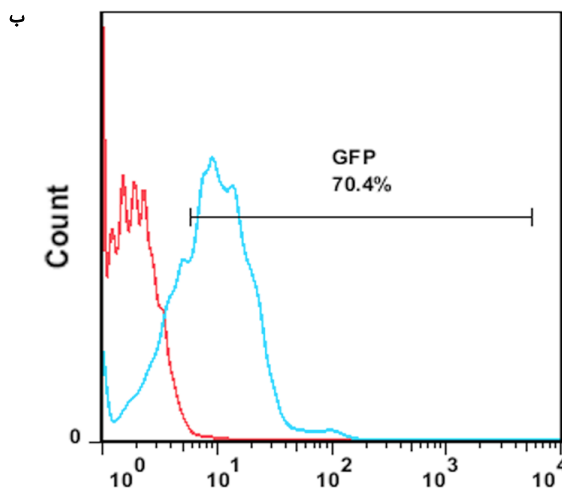
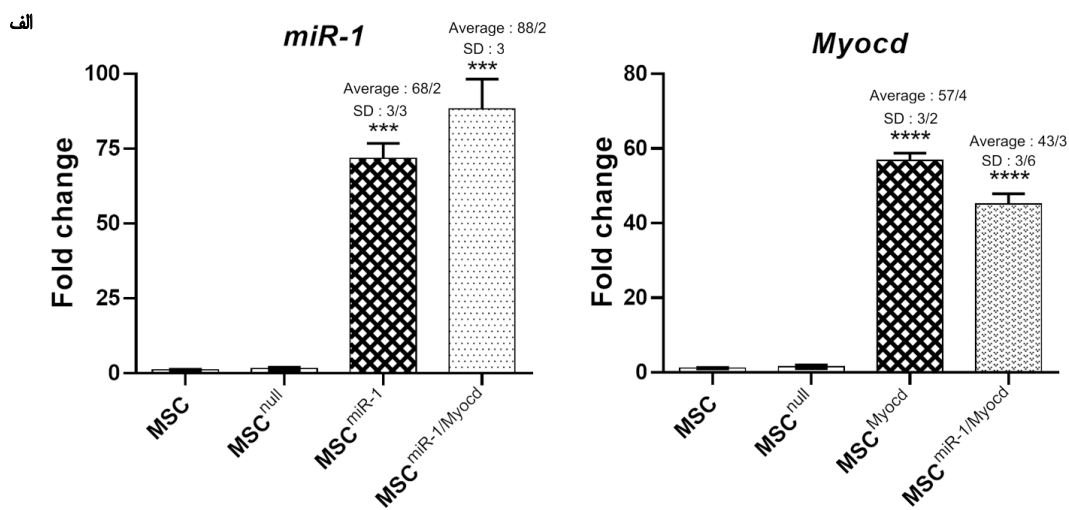
جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای هر کدام از ژن‌های مورد مطالعه

Gene Symbol	Primer	Product Size (bp)
miR-1	F: GTAGGCACCTGAAATGGAA	85
	R: TTGATGGTGCCTACAGTACAT	
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA	94
	R: AACGCTTCACGAATTTGCGT	
Myocd	F: CAAGCCAAAGGTGAAGAAGC	177
	R: TAGCTGAATCGGTGTTGCTG	
Gata4	F: TCATCTCACTACGGGCACAG	233
	R: GGGAAGAGGGGAAGATTACGC	
Nkx2-5	F: CCTCAACAGCTCCCTGACTC	201
	R: GGGGACAGCTAAGACACCAG	
Tnt2	F: GGCAGTCTGCTGTTCTGAGGGAG	191
	R: TGCCCTGGTCTCCTCGGTCT	
Gapdh	F: CCTGGAGAAACCTGCCAAGTA	148
	R: GGCATCGAAGGTGGAAGAGT	

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 اینترگرین 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

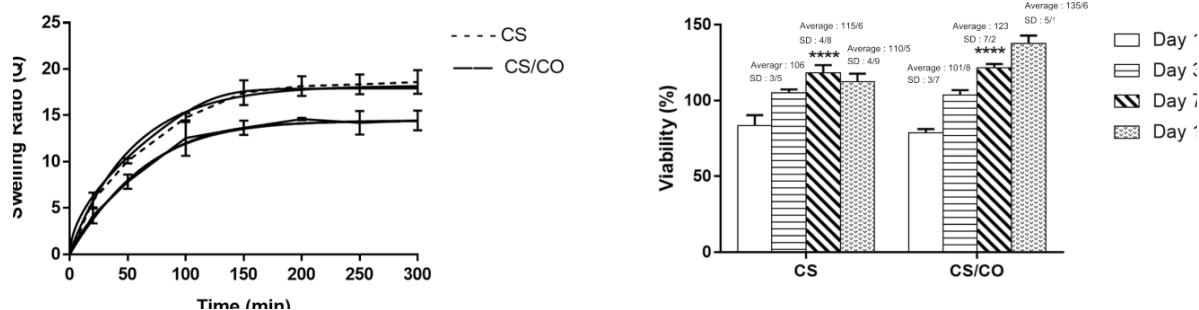
قلبی miR-1 با هدف قرار دادن مسیرهای سیگنالینگ مختلف از جمله مسیر Wnt/ β -catenin در مراحل اولیه رشد قلب نقش دارد [۹]. مطالعات مختلف نشان داده است که miR-1 در بیان مارکرهای ویژه قلبی از جمله Gata4، Nkx2-5 و Tnt2 نقش ویژه‌ای دارد. همچنین مشخص شده است که افزایش بیان miR-1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی سبب 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 می‌شده، 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



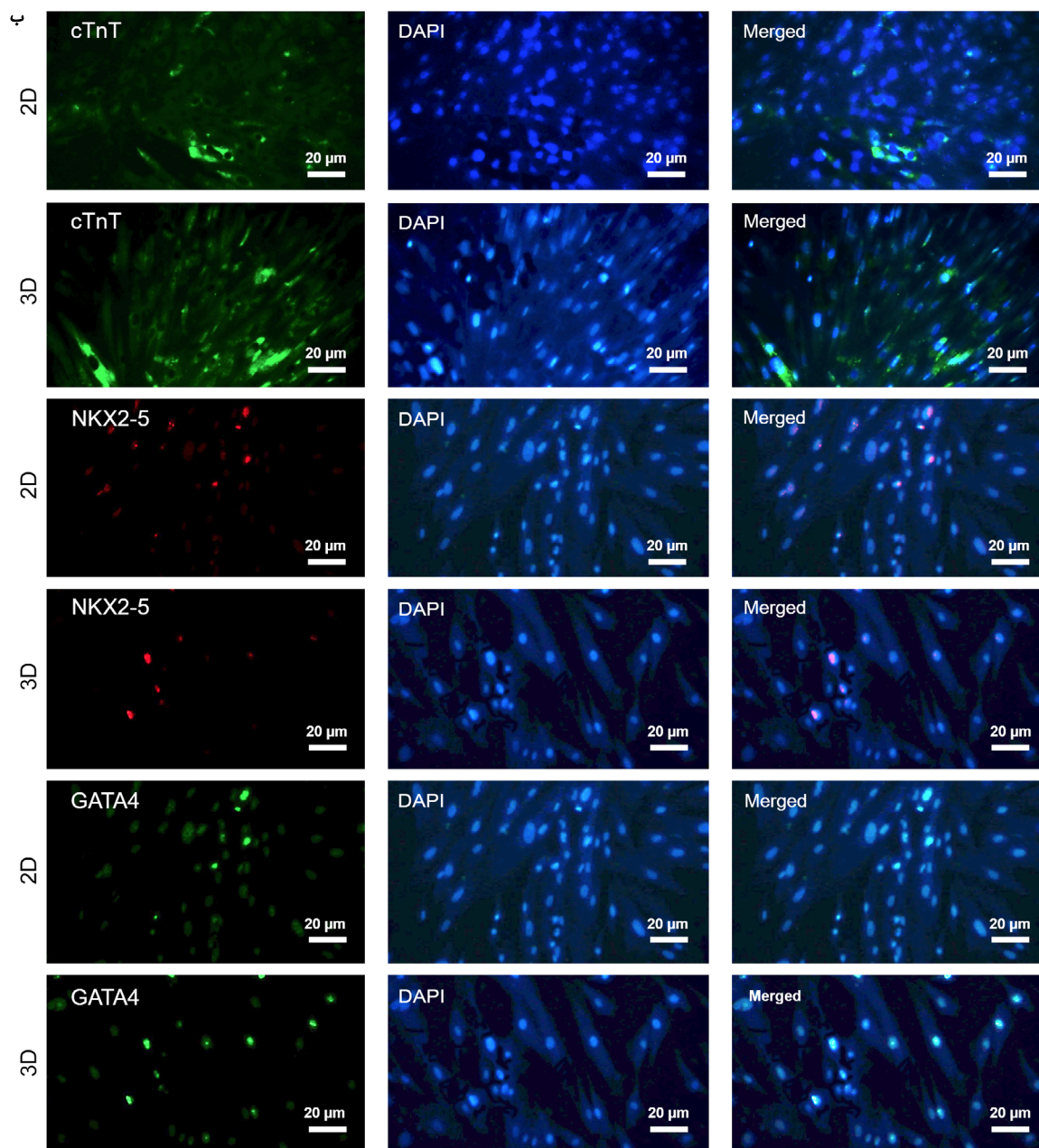
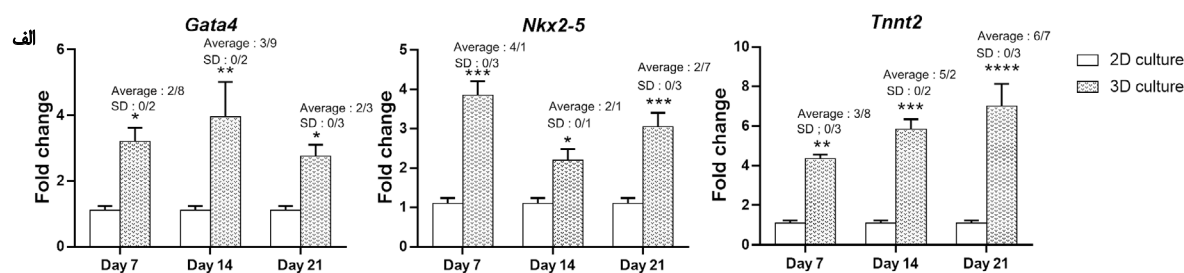
مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۱. ارزیابی ترانسداکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با لنتی ویروس‌های حاوی miR-1
الف: MyoCD بیان miR-1 و MyoCD در گروه‌های مختلف با تست qRT-PCR ارزیابی شد. $P < 0.001$ و $P < 0.0001$ ؛ ب: درصد سلول‌های مزانشیمی ترانسداکت‌شده با روش فلوسایتومتری سنجیده شد.



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

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.



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۳. تمایز سلول‌های ترانسداکت‌شده به سلول‌های شبه‌قلبی بعد از اینکپسوله شدن در هیدروژل کیتوزان / کلاژن

الف: بیان ژن‌های Gata4 و Tnnt2 در محیط دوبعدی و سه‌بعدی با روش qRT-PCR سنجیده شد. $P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$

ب: تست ایمنونوسیتوشیمی 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.

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 تربیت مدرس، دانشگاه اصفهان و مرکز قلب تهران کمال تشکر و قدردانی را دارند.

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 سلول درمانی 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 تربیت مدرس انجام شد (کد اخلاق: 125.IR.MODARES. (REC.1398).

حامی مالی

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

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] Muesan 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, Jarocho 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 Kardiologii 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, Khademhosseini 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 $\beta 4$ 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]

This Page Intentionally Left Blank