مقاله پژوهشی

بررسی داربستِ ترکیبی پلی پیرول-کاردیوژل بر زنده‌مانی سلول‌های قلبی موش

ملیکا پارچه باف کاشانی[۱]، محمود تلخابی[۱*]، سارا رجبی[۲*]

۱- گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه فناوری نانو و زیست مواد، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۰/۰۳

چکیده

زمینه و هدف: مهندسی بافت یک رویکرد امیدوارکننده برای درمان بیماری‌های قلبی است. با توجه به اهمیت رسانایی الکتریکی در عملکرد قلب، در این پژوهش تلاش گردیده تا با استفاده از پلی پیرول (Ppy) به‌عنوان پلیمر رسانا و کاردیوژل (هیدروژلِ مشتق شده از قلبِ سلول زدایی شده)، یک داربست ترکیبی زیست-رسانا جهت مهندسی بافت قلب ساخته شود.

مواد و روش‌ها: قلب تازه گوسفند از کشتارگاه تهیه‌شده و با استفاده از SDS سلول زدایی شد. سپس با استفاده از آنزیم پپسین هضم شده و کاردیوژل (CG) آماده شد. CG با نسبت‌های خاص با Ppy ترکیب‌شده و هیدروژل ترکیبی ایجاد شد. سپس هیدروژل ترکیبی تحت خشکایش انجمادی قرار گرفت و داربست زیست-رسانای (CG-Ppy) آماده شد. سپس سلول‌های قلبی موش بر روی داربست CG-Ppy کشت‌شده و میزان بقاء آن‌ها با استفاده از MTS و رنگ‌آمیزی Live/Dead ارزیابی شد.

نتایج: رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، آلسیان بلو و ماسون تری کروم و نیز بررسی مقدار کلاژن و DNA نشان دادند که در طی فرایند سلول زدایی تمام سلول‌ها حذف‌شده و ماتریکس خارج سلولی قلب حفظ‌شده است. بررسی فرایند ژل شدن نشان داد که ترکیب CG با ۲/۵٪ Ppy مناسب‌ترین ترکیب برای ساخت هیدروژل ترکیبی است. رنگ‌آمیزی Live/Dead و تست MTS نشان دادند داربست CG-Ppy هیچ‌گونه سمیتی برای سلول‌های کشت‌شده نداشته و بیش از ۹۰٪ سلول‌های قلبی کشت‌شده بعد از یک هفته زنده بودند.

نتیجه‌گیری: داربست ترکیبی زیست-رسانایِ CG-Ppy مدل مناسبی برای مهندسی بافت قلب بوده و از بقاء سلول‌های قلبی حمایت می‌کند.

کلمات کلیدی: مهندسی بافت قلب، سلول زدایی، داربست زیست-رسانا، سلول‌های قلبی، پلی پیرول، زیستایی

مقدمه

مهندسی بافت به‌عنوان یکی از رویکردهای امیدوارکننده برای درمان بیماری‌های قلبی پیشنهادشده است. این علم فرصت بی-نظیری را برای درمان/کنترل بیماری‌ها و نواقص قلبی فراهم کرده است. مهندسی بافت قلب، زیست‌شناسی (فاکتورها و سلول‌های قلبی) و مهندسی (طراحی داربست‌های مناسب سه‌بعدی) را باهم ترکیب کرده تا ساختارهایی سه‌بعدی و زنده در شرایط آزمایشگاهی تولید کند که بیشترین شباهت را به ساختار طبیعی و عملکرد فیزیولوژیک قلب داشته باشند. جزء اصلی ماده زمینه خارج سلولی (ECM) قلب را کلاژن تشکیل می‌دهد. کلاژن موجود در ماده زمینه قلب، به‌عنوان یک پروتئین تحمل‌کننده بار عمل می‌کند که نیروهای ایجادشده توسط سلول‌های قلبی را در سیستول انتقال می‌دهد و موجب سفتی در حالت دیاستول می‌شود. دو نوع از کلاژن‌های اصلی ماهیچه‌ی قلب شامل کلاژن نوع I و کلاژن نوع III می‌شوند. در ماهیچه‌ی قلب، کلاژن نوع I نقش استحکام مکانیکی و خواص سختی مقاوم به تغییر شکل را

***نویسندگان مسئول: ۱. محمود تلخابی**، گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران Email: m_talkhabi@sbu.ac.ir
https://orcid.org/0000-0002-8268-7234
۲. سارا رجبی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه فناوری نانو و زیست مواد، تهران، ایران
Email: srajabi@royaninstitute.org
https://orcid.org/0000-0001-9939-1504

دارد، درحالی‌که کلاژن نوع III علاوه بر خاصیت کشسانی، نقش مهمی در ایجاد ارتباط بین عناصر انقباضی سلول‌های قلبی مجاور را دارد. دیگر اجزاء ماده زمینه خارج سلولی ماهیچه قلب به‌غیراز ساختارهای شبکه‌ای پروتئینی، شامل پروتئین‌های چسبندگی فیبرونکتین، لامینین، پروتئوگلیکان‌های هیدراته و گلیکوز آمینوگلیکان‌ها هستند (۱). مطالعات اخیر نشان داده است که ساختار سه‌بعدی و ماتریکس خارج سلولی قلب و دیگر بافت‌ها، بعد از سلول زدایی تقریباً به‌طور کامل حفظ می‌شود. ماتریکس خارج سلولی مشتق از بافت سلول زدایی شده به‌طور فزاینده‌ای در طب ترمیمی و استراتژی‌های مهندسی بافت موردتوجه قرارگرفته است، به‌طوری‌که داربست سه‌بعدی تهیه‌شده به‌وسیله‌ی سلول زدایی کردن تمام‌اندام، به‌عنوان یک رویکرد برای ساخت ارگان نیز اهمیت دارد (۲). امروزه با توسعه روش‌های سلول زدایی، ماتریکس خارج سلولی بافت به‌عنوان یک بیومتریال کاملاً جدید توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. با توجه به اینکه ماتریکس خارج سلولی در حالت طبیعی به‌عنوان یک ماده‌ی پشتیبان عمل کرده و در بقاء، تکثیر، سیگنال دهی سلولی، مورفوژنز و تمایز سلولی نیز نقش دارد، لذا داربست سلول زدایی شده و نیز هیدروژل مشتق از آن می‌تواند به‌عنوان یک اسکلت و داربست مناسب در مهندسی بافت و حتی سلول درمانی مورداستفاده قرار گیرد. تاکنون ماتریکس خارج سلولی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای بازسازی انواع بافت‌ها و اندام‌ها ازجمله رگ خونی، دریچه‌ی قلب، قرنیه، نای، مری، مثانه، کلیه، کبد و شش استفاده‌شده است (۳). همچنین مشخص‌شده است که کشت سلول‌های قلبی موش تازه متولدشده و سلول‌های اندوتلیال در داربست سلول زدایی شده قلب، می‌تواند باعث ایجاد قلب جدید و شروع تپش شود (۴). علاوه بر آن قلب سلول زدایی شده جهت تولید هیدروژل‌های ترکیبی از قبیل ECM قلب-ژلاتین-کیتوزان، ECM قلب -آلژینات و ECM قلب -پلی‌اتیلن گلیکول مورداستفاده قرارگرفته است (۵).

تاکنون ترکیبات طبیعی و سنتزی مختلفی از قبیل پلی-لاکتیک اسید، پلی‌گلیکولیک اسید، پلی گلیسرول سباسات، آلژینات و کلاژن برای ساخت داربست‌های قلبی مورداستفاده قرارگرفته و در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی موردبررسی و مطالعه قرارگرفته‌اند (۶)؛ اما ترکیبات فوق خاصیت رسانایی نداشته و به همین دلیل نتوانسته‌اند در مهندسی بافت قلب موفق باشند. استفاده از پلیمرهای رسانا در ساخت داربست قلبی سبب بهبود ویژگی‌های الکتریکی هیدروژل/داربست شده و از هدایت پتانسیل عمل در ساختار هیدروژل/داربست حمایت می‌کند (۷). پلیمرهای رسانایی که به‌طور گسترده برای کاربردهای زیست پزشکی موردبررسی قرار گرفتند، شامل: پلی پیرول، پلی آنیلین، پلی تیوفن و مشتقات آن ازجمله پلی ۳ و ۴-اتیلن دی اکسی تیوفن می‌باشند (۸, ۹). این پلیمرها می‌توانند به هر دو روش شیمیایی و الکتروشیمیایی سنتز شوند و خواص مکانیکی‌شان از طریق ترکیب آن‌ها با سایر پلیمرها بهبود می‌یابد (۱۰, ۱۱). اخیراً از نانوتیوب‌های کربنی همراه با انواع دیگر مواد رسانا مانند نانوسیم‌های طلا برای افزایش و بهبود عملکرد سلول‌های قلبی استفاده می‌شود. همچنین گزارش‌شده است که نانوتیوب‌های کربنی با داربست‌های هیدروژلی ژلاتینی ترکیب‌شده و قادر به فراهم کردن ریز محیط سلولی مناسب برای انقباض سلول‌های قلبی می‌باشند؛ اما یکی از معایب آن‌ها سمیت سلولی نانوتیوب‌های کربنی برای سلول‌های قلبی است (۱۲).

پلی پیرول یکی از پلیمرهای رساناست که در شرایط درون‌تن و برون تن زیست سازگار بوده و در آب‌وهوا ازنظر شیمیایی پایدار است. هم‌چنین در شرایط فیزیولوژیکی، رسانایی الکتریکی بالایی دارد (۱۳). از میان داربست‌های مطالعه شده درزمینه مهندسی بافت قلب، بافت‌های سلول زدا شده جایگاه خاصی در این علم دارند زیرا بافت‌های سلول زدا شده همان ترکیبات طبیعی ECM و ساختار سه‌بعدی بافت را دارا هستند (۱۴). ترکیب این پلیمر باکاردیوژل (هیدروژل مشتق از قلب سلول زدایی شده) می‌تواند مزایای هر دو جزء را به‌طور هم‌زمان داشته و باعث بهبود عملکرد داربست شده و از عملکرد و بقاء سلول‌های قلبی حمایت بیشتری کند. اخیراً مشخص‌شده است که داربست CG-Ppy دارای رسانایی و تخلل مناسب بوده و می‌تواند از عملکرد و بلوغ سلول‌های قلبی موش در شرایط آزمایشگاهی حمایت کند (۱۵). لذا هدف این مطالعه ترکیب کاردیوژل و پلی پیرول و ساخت یک داربست قلبی زیست رسانا است که بتواند از بقاء سلول‌های قلبی در شرایط آزمایشگاهی حمایت کند.

مواد و روش‌ها

سلول زدایی بافت قلب

قلب تازه گوسفند از کشتارگاه تهیه شد و در شرایط خنک و درون محلول فسفات بافر سالین (PBS) به پژوهشگاه رویان منتقل گردید. قلب به قطعات یک سانتی‌متری بریده شد و پس

از شستشو با PBS، قطعات قلب به محلول سدیم دو دسیل سولفات (SDS) یک درصد انتقال داده‌شده و سه روز در این محلول درروی شیکر نگهداری شدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محلول تریتون X-100 یک درصد، قرار گرفتند تا فرآیند سلول زدایی تکمیل گردد. سپس بافت سلول زدایی شده در آب دو بار تقطیر به مدت ۴۸ ساعت شستشو داده شد تا کاملاً SDS حذف شود (۱۶).

ارزیابی‌های بافت قلب سلول زدایی شده

نمونه‌هایی از عضله قلبی طبیعی و نیز سلول زدایی شده دومرتبه با PBS شستشو داده‌شده و سپس با استفاده از پارافرمالدهید ۴٪ فیکس شدند. بعد از انجام مراحل بافت‌شناسی، نمونه قالب‌گیری شده و به ضخامت ۶ میکرومتر برش گیری شده و با استفاده از هماتوکسیلین-ائوزین (H&E)، ماسون تری کروم (MT) و آلسین بلو (AB) رنگ‌آمیزی شدند.

بررسی محتوای DNA بافت قلب طبیعی و سلول زدایی شده

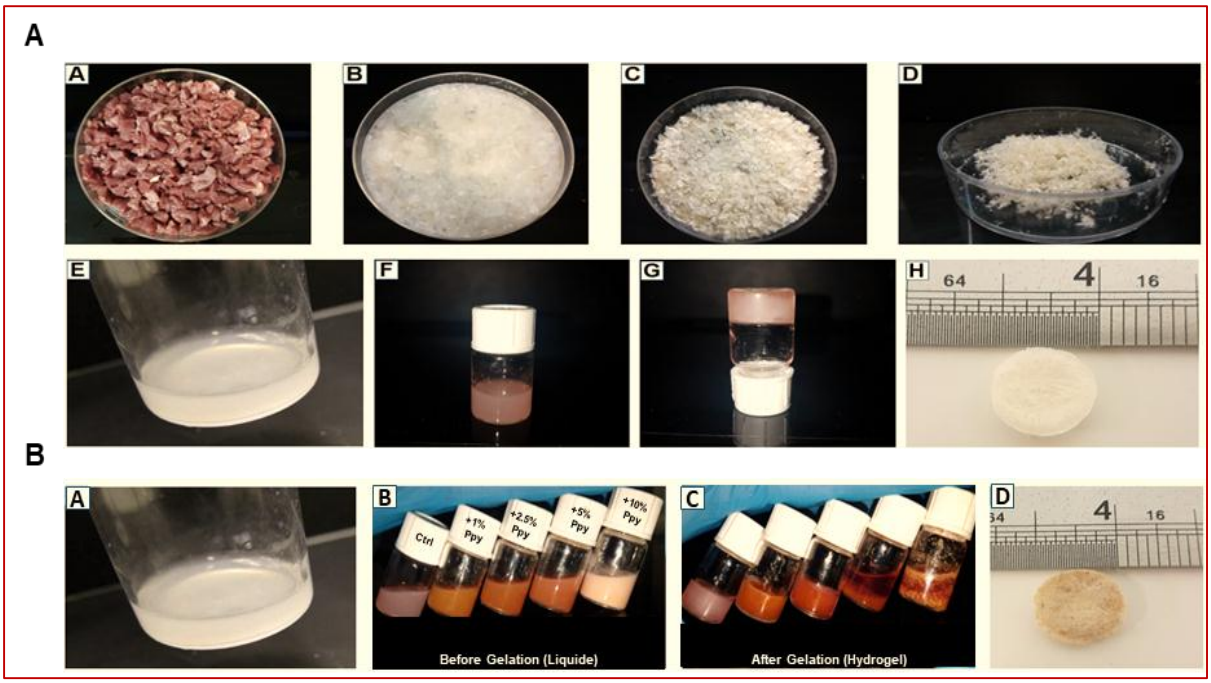
۳۰ میلی‌گرم بافت قلب طبیعی و سلول زدایی شده به مدت ۷۲ ساعت تحت خشکایش انجمادی (Freeze-drying) قرار گرفت. نمونه‌ها در بافر لیز کننده و در حضور پروتئیناز K به مدت یک‌شب درون بن ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داشته شدند. سپس استخراج DNA با روش فنل کلرفرم انجام شد و جذب DNA در دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. بر طبق مقالات قبلی چاپ‌شده، مقدار DNA استاندارد و موردقبول بافت‌های سلول زدا شده باید کمتر از ۵۰ نانوگرم/ میلی‌گرم از بافت باشد (۳, ۱۷).

بررسی محتوای کلاژن بافت قلب طبیعی و سلول زدایی شده

۳۰ میلی‌گرم از پودر خشک از بافت قلب طبیعی و سلول زدایی شده با استفاده از 0.1 M HCL/Pepsin به مدت ۶۰-۵۰ ساعت هضم آنزیمی شدند. ادامه مراحل برای بررسی مقدار کلاژن نمونه‌ها بر اساس دستورالعمل کیت (Sircol, Collagen assay Bioclolor, UK) انجام شد.

سنتز داربست کاردیوژل (CG) و داربست ترکیبی پلی پیرول-کاردیوژل (CG-Ppy)

ابتدا از بافت قلب تازه، پیش-ژل و کاردیوژل تهیه شد (شکل A.۱). برای تهیه پیش-ژل‌ها، از غلظت‌های ۵، ۷ و ۱۰ میلی‌گرم



شکل ۱- مراحل سنتز گروه داربست هیبرید CG-PPy. A) مراحل ساخت CG. [A: قطعات قلب طبیعی، B: قطعات قلب سلول زدایی شده، C: خشکایش انجمادی قطعات قلب سلول زدا شده، D: تهیه‌ی پودر ماده زمینه خارج سلولی قلبی، E: تهیه‌ی پیش-ژل از پودر ماده زمینه خارج سلولی قلبی، F: پیش-ژل قلبی خنثی‌شده، G: کاردیوژل (پیش-ژل قلبی خنثی‌شده بعد از قرارگیری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد). B) مراحل سنتز داربست ترکیبی CG-Ppy. A: پیش-ژل تهیه‌شده در بخش A (قبل از خنثی‌سازی)، B: افزودن درصدهای حجمی متفاوت پیرول و محلول آهن III کلراید به پیش-ژل قلبی (PH=11)، C: تکمیل فرآیند ژل شدن و تشکیل هیدروژل ترکیبی CG-Ppy، D: ایجاد داربست ترکیبی CG-Ppy 2.5% پس از خشکایش انجمادی.

بر میلی‌لیتر از پودر قلب سلول زدایی شده استفاده شد. بر اساس فرایند ژل شدن پیش-ژل‌ها و خاصیت ویسکوالاستیسیته کاردیوژل‌های حاصله، غلظت ۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان غلظت مناسب جهت پلیمریزاسیون مونومرهای پیرول و ساخت هیدروژل ترکیبی CG-Ppy انتخاب گردید (شکل ۱). به‌منظور سنتز هیدروژل ترکیبی CG-Ppy، پیرول در نسبت‌های حجمی مختلف شامل ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد به پیش-ژل قلبی (تهیه‌شده از ۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پودر قلب سلول زدایی شده) اضافه‌شده و به‌منظور تکمیل پلیمریزاسیون مونومرهای پیرول در بستر پیش-ژل قلبی، ترکیب به مدت یک‌شب در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد (شکل B.۱).

جهت ساخت CG، بافت قلب سلول زدایی شده تحت خشکایش انجمادی قرارگرفته، پودر شده و سپس در استیک اسید ۰/۵ مولار حاوی ۰/۱٪ پپسین به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درروی دستگاه همزن مغناطیسی چرخشی (استیرر) قرار داده شد. پس از اطمینان از هضم کامل بافت، غیرفعال سازی آنزیم به‌وسیله ۲NaOH مولار و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و pH به ۱۱ رسانده شد. این مرحله به‌عنوان تهیه پیش-ژل قلبی تعیین شد. برای تهیه CG، پیش-ژل قلبی به مدت یک ساعت در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت تا فرآیند ژل شدن تکمیل گردد. سپس CG در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد فریز شده و به مدت ۷۲ ساعت تحت خشکایش انجمادی قرار گرفت. به‌منظور تهیه گروه هیدروژل ترکیبی CG-Ppy، غلظت‌های مختلف پیرول (۱٪، ۲/۵٪، ۵٪ و ۱۰٪) به پیش-ژل قلبی اضافه شد. به‌منظور آغاز پلیمریزاسیون مونومرهای پیرول در پیش-ژل قلبی، به مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول $Fecl_3$ (۰/۱۸ مولار) به‌صورت قطره‌قطره به هر گروه اضافه شد. سپس به مدت یک‌شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا فرآیند پلیمریزاسیون پیرول تکمیل گردد. درنهایت گروه منتخب در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد فریز شده و تحت خشکایش انجمادی قرار گرفت.

استخراج سلول‌های کاردیومایوسایت از قلب موش تازه متولدشده

سلول‌های قلبی از نوزاد موش ۲-۱ روزه و به‌صورت زیر استخراج شدند. در روز اول قلب‌های نوزادان ۲-۱ روزه موش تازه متولدشده استخراج‌شده و به درون پتری دیش‌های حاوی محلول نمکی (سالین) خنک منتقل شدند. عروق، چربی‌ها و قسمت دهلیز قلب‌ها با پنس جداسازی شده و قلب‌ها مجدداً به پتری دیش‌های حاوی سالین جدید منتقل گشتند. قلب‌ها به‌وسیله‌ی اسکالپل تیز به ۴ قسمت تقسیم‌شده و به لوله‌ی آزمایش حاوی تریپسین (0.5 mg/ml) منتقل شدند. لوله‌ی آزمایش ۱۲ ساعت روی شیکر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در روز دوم، نصف حجم تریپسین به‌آرامی تخلیه شد و به همان حجم محیط کشت اضافه شد. لوله‌ی آزمایش به‌آرامی ۴-۳ دقیقه در بن ماری (در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) تکان داده شدند تا آنزیم تریپسین خنثی شود. به‌دقت تمام محیط کشت از روی بافت تخلیه شد و محلول کلاژناز (0.8 mg/ml) به بافت اضافه گردید. لوله‌ی آزمایش به مدت ۷ دقیقه در بن ماری تکان داده شد. سپس محیط رویی (سوپرناتانت) در لوله‌ی آزمایش حاوی محیط کشت روی یخ اضافه شد. این مرحله سه بار تکرار شد و هر مرتبه سوپرناتانت به لوله‌ی آزمایش حاوی محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم اسب و ۵ درصد سرم گاو اضافه شد. پس از سانتریفیوژ، پلت سلولی ته‌نشین شده در محیط کشت حل‌شده و در پلیت پوشانده شده با ژلاتین به مدت یک ساعت و ۱۵ دقیقه کشت داده شد. این مرحله مجدداً به‌منظور اطمینان از حذف سلول‌های فیبروبلاست تکرار شد. سوپرناتانت سلولی از فیلتر 0.7 µm عبور داده شد و مجدداً با دور 400 rpm به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شد تا سلول‌ها ته‌نشین شوند. سپس پلت سلولی مجدداً در محیط کشت حل‌شده و در داربست‌ها کشت داده شدند.

ارزیابی زیستایی سلول‌های قلبی با استفاده از MTS

آزمون MTS به‌منظور بررسی بقای سلول‌های کشت‌شده درون داربست ترکیبی CG-Ppy انجام شد (این آزمون دو بار تکرار شده است). برای انجام این آزمون، از روش عصاره گیری استفاده شد. در این روش، ابتدا به میزان ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت Dark به داربست‌ها اضافه شد و در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت برداشته شد و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد فریز گردید. هم‌زمان تعداد ۱۰ هزار سلول قلبی موش در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه پوشیده شده با ژلاتین ۰.۱٪ کشت داده شدند و ۲۴ ساعت بعد محیط کشت رویی سلول‌ها تخلیه شد و عصاره روزهای مختلف داربست‌ها از منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد خارج‌شده و پس از گرم شدن به سلول‌ها اضافه شدند. پس از ۲۴ ساعت، عصاره داربست‌ها از چاهک‌ها خارج‌شده و محلول MTS ترکیب‌شده با محیط کشت بدون سرم (نسبت ۱

MTS به ۵ از محیط کشت) بر روی سلول‌ها ریخته شد و پس از ۳ ساعت انکوباسیون در تاریکی در انکوباتور (۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2) جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی زیستایی سلول‌های قلبی در داربست‌ها با استفاده از کیت Live/Dead

به‌منظور بررسی زیستایی سلول‌های قلبی کشت‌شده در داربست ترکیبی CG-Ppy، سلول‌های قلبی با تراکم ۵۰۰ هزار سلول به ازای هر سانتی مترمربع از داربست ترکیبی، بر روی آن‌ها کشت شدند. ۷ روز پس از کشت، میزان زیستایی سلول‌ها با استفاده کیت Live/Dead رنگ‌آمیزی شدند. به این صورت که ابتدا رنگ Calcein (سبز) به غلظت ۲ میلی مولار و رنگ Ethidium homodimer-1 (قرمز) به غلظت ۴ میلی مولار در PBS در تاریکی آماده‌سازی شدند. سپس محیط کشت روی سلول‌ها به‌آرامی خارج شد و به میزان مساوی از رنگ‌ها به هر داربست اضافه شد. داربست‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شدند. سپس با PBS شسته شده و تصاویر فلوئورسنت با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت ثبت گردید. در این روش سلول‌های زنده بارنگ سبز و سلول‌های مرده بارنگ قرمز مشخص می‌شوند.

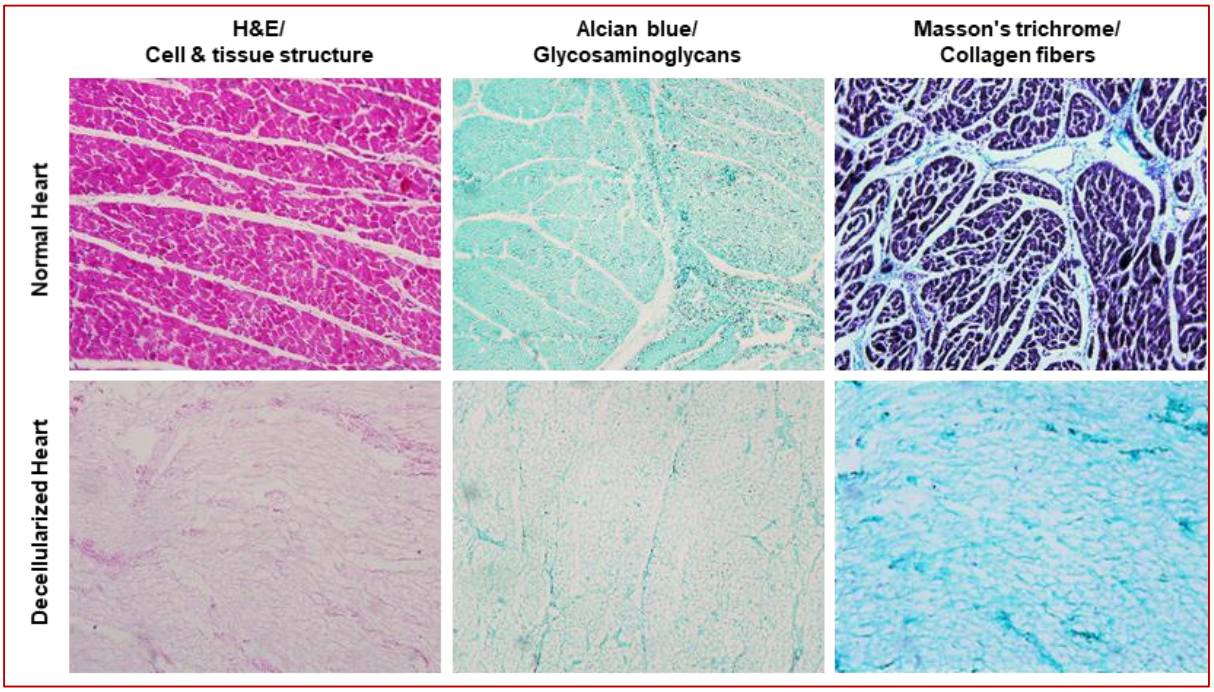
آنالیزهای آماری

همه‌ی آزمایش‌ها حداقل با سه بار تکرار مجزای بیولوژیک انجام پذیرفتند (به استثنا آزمایش‌هایی که تکرار در آن‌ها قیدشده باشد). داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean±SD) گزارش گردیدند. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶) انجام شد و آزمون واریانس یک‌طرفه ANOVA، آزمون T-test و سپس آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مورداستفاده قرار گرفتند و $p<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌داری برای نتایج آزمون‌های کمی استفاده شد.

نتایج

آنالیز مطالعات بافت‌شناسی

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی H&E نشان داد که فرایند سلول زدایی به‌طور موفقیت‌آمیزی انجام‌شده است (شکل A.۲). در بافت طبیعی، سلول‌ها در عروق خونی و در ماتریس بین رشته‌های کلاژن مشاهده می‌شوند. درحالی‌که در بافت سلول زدایی شده بدون آنکه فرآیند سلول زدایی بر ترکیبات ماتریس خارج سلولی اثر مخربی داشته باشد، سلول‌ها به‌خوبی حذف گردیدند. همچنین رنگ‌آمیزی آلسیان بلو (AB) و ماسون تری کروم (MT) نشان داد که فرایند سلول زدایی بر ترکیبات گلیکوز آمینوگلیکان



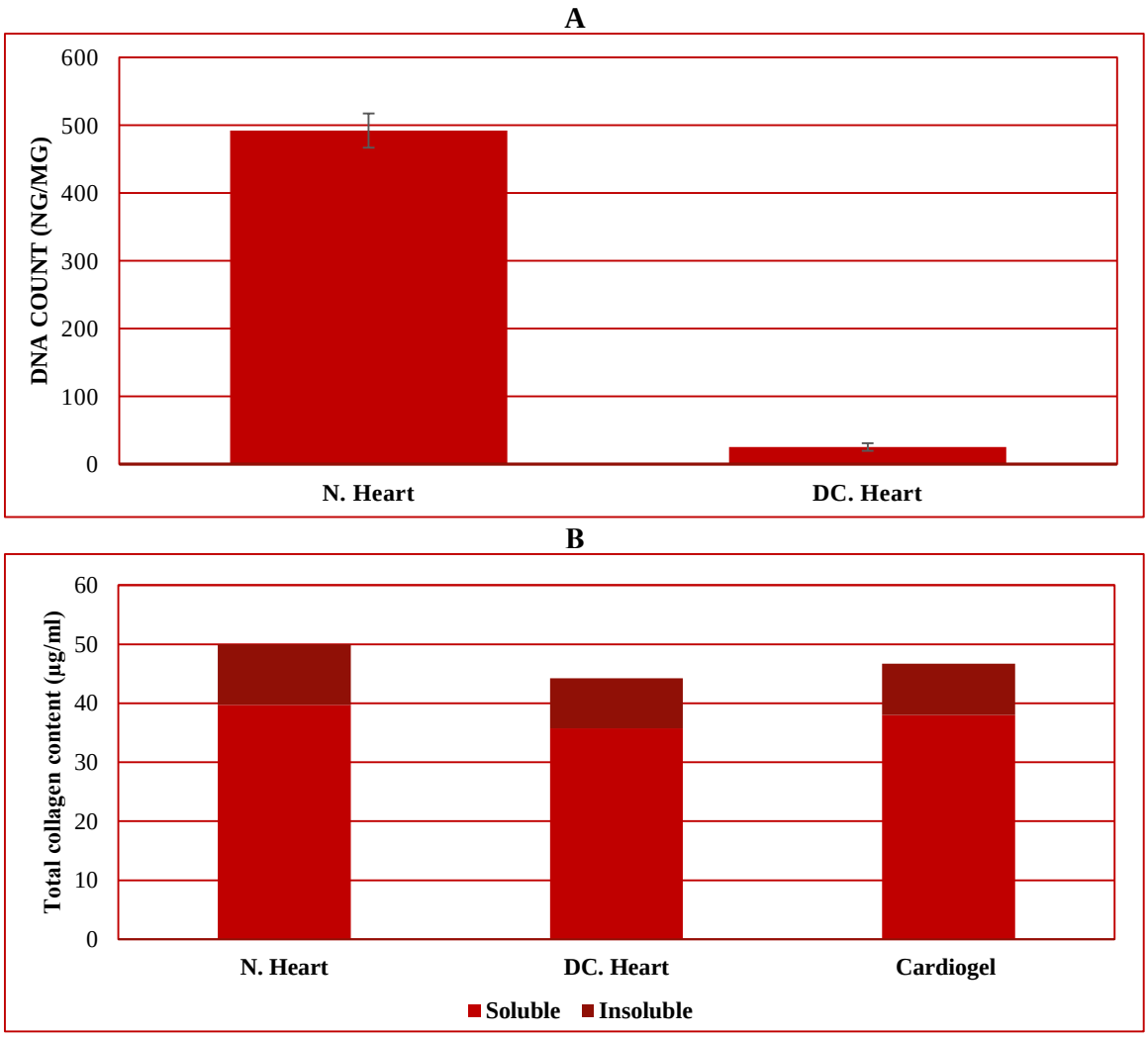
شکل۲- ارزیابی‌های بافت قلب سلول زدایی شده. رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) و آلسیان بلو (AB) و ماسون تری کروم (MT) قلب طبیعی (N-Heart) و سلول زدایی شده (DC- Heart)

و کلاژن ماتریس خارج سلولی اثر تخریبی نداشته و این ترکیبات در بافت سلول زدایی شده حفظ شدند (شکل A.۲).

مطالعات حاصل از نتایج اندازه‌گیری کمی DNA در بافت طبیعی قلب و بافت سلول زدایی شده‌ی قلب نشان داد که میزان DNA در بافت طبیعی ۴۸۸ ng/mg و در بافت سلول زدا شده ۲۲ ng/mg است که به‌طور معنی‌داری کمتر از بافت طبیعی بود (آزمون t-test، p<۰/۰۵) (نمودار ۱. A). آنالیز حاصل از اندازه‌گیری مقادیر کلاژن نشان داد که کلاژن (محلول و نامحلول) بافت قلب طبیعی ۵۰ µg/mg، بافت قلب سلول زدایی شده ۴۴ µg/mg و داربست ژل قلبی (CGel) ۴۷ µg/mg بوده و مقدار کلاژن در این گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت (آنالیز واریانس یک‌طرفه، p >۰/۰۵) (نمودار ۱. B).

آنالیز داربست هیبریدی پلی پیرول-هیدروژل قلبی (CG-PPy)

پس از قرارگیری پیش-ژل‌های CG-Ppy در انکوباتور به مدت یک ساعت، مشخص شد که غلظت ۱ و ۲/۵ درصد پیرول، برای ساخت هیدروژل ترکیبی CG-Ppy مناسب است (شکل B.۲). به علت تراکم بیشتر مونومرهای پیرول در غلظت ۲/۵ درصد، این گروه به‌عنوان گروه بهینه انتخاب گردید. سپس هیدروژل

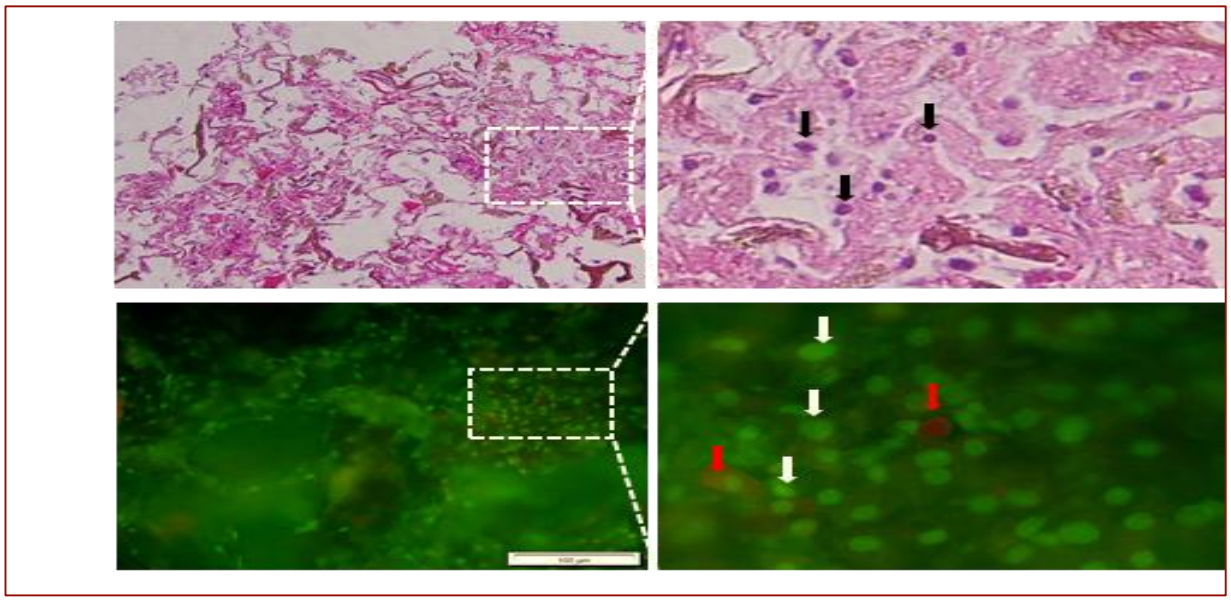


نمودار ۱- ارزیابی‌های ترکیبات بافت قلب سلول زدایی شده. **A**) اندازه‌گیری محتوای DNA قبل و بعد از سلول زدایی (آزمون t-test، p<۰/۰۵)، **B**) آنالیز کمی سازی مقدار کلاژن قبل و بعد از سلول زدایی و در هیدروژل ترکیبی CG-Ppy(آنالیز واریانس یک‌طرفه، p >۰/۰۵). قلب طبیعی (N-Heart) و سلول زدایی شده (DC- Heart) است.

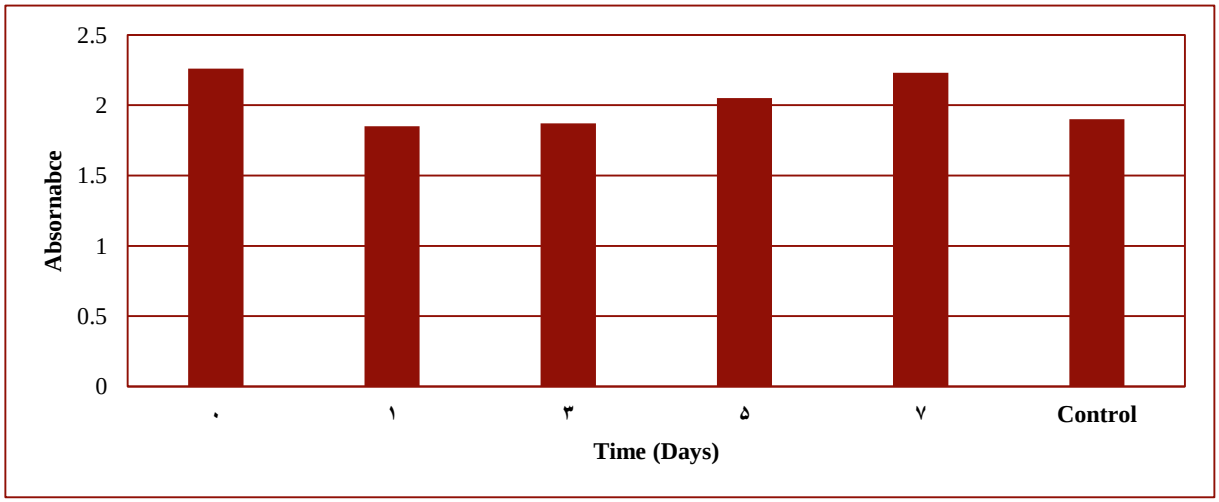
انتخاب‌شده با استفاده از خشکایش انجمادی به داربست ترکیبی CG-Ppy تبدیل شد.

بررسی بقاء و زیستایی سلول‌های قلبی در داربست هیبرید

برای بررسی حضور سلول‌های قلبی کشت‌شده درون داربست ترکیبی CG-Ppy، رنگ‌آمیزی H&E انجام شد. نتایج نشان داد که سلول‌های قلبی توانسته‌اند به درون داربست CG-Ppy نفوذ کرده و به تمام بخش‌های داربست گسترش پیدا کنند (شکل ۳. بالا). همچنین رنگ‌آمیزی Live/Dead نشان داد که سلول‌های قلبی که به داخل داربست نفوذ کرده بودند زیستایی خوبی داشتند. به‌طوری‌که بعد از یک هفته تقریباً تمام سلول‌ها زنده بوده و تنها تعداد اندکی سلول‌های مرده درون داربست مشاهده می‌شد (شکل ۳. پایین). بررسی سمیت داربست ترکیبی CG-Ppy با استفاده از MTS نیز نشان داد که میزان زیستایی سلول‌های قلبی درون این داربست مشابه ماتریژل (به‌عنوان



شکل ۳- ارزیابی بقاء سلول‌های قلبی کشت‌شده در داربست CG-PPy. بالا) ارزیابی حضور و نفوذ سلول‌ها به داربست با استفاده از رنگ‌آمیزی H&E، موقعیت سلول‌ها با استفاده از فلش‌های سیاه‌رنگ مشخص‌شده است. پایین) ارزیابی زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از کیت Live/Dead، سلول‌های زده سبزرنگ (فلش‌های سفید) و سلول‌های مرده قرمزرنگ (فلش‌های قرمز) مشخص هستند. ارزیابی‌ها یک هفته بعد از کشت انجام شدند.



نمودار ۲- ارزیابی بقاء سلول‌های قلبی کشت‌شده در داربست CG-PPy. بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌های با استفاده از آزمون MTS (ماتریژل به‌عنوان کنترل استفاده‌شده است). نمودار بر اساس میانگین دو تکرار بیولوژیک است. ارزیابی‌ها یک هفته بعد از کشت انجام شدند.

کنترل) بوده و در مدت یک هفته سلول‌ها بقاء داشته و داربست هیچ‌گونه سمیت برای سلول‌ها نداشته است (نمودار ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

ماده زمینه خارج سلولی قلب از رایج‌ترین بیومتریال‌های طبیعی برای اهداف مهندسی بافت است. ماده زمینه خارج سلولی قلب حاوی مواد مغذی، پروتئین‌ها، پپتیدها، پلی ساکاریدها و خصوصیات ویسکوالاستیکی است می‌تواند بستری مناسب برای رشد و توسعه‌ی سلول‌های قلبی فراهم آورد. علاوه بر این اجزا موجود در ماده زمینه خارج سلولی قلب به‌راحتی توسط بدن شناخته‌شده و به‌صورت هیدرولیتیک و پروتئولیتیک به محصولاتی تخریب می‌شوند که ذاتاً برای بدن مضر نمی‌باشند. در مطالعه‌ی حاضرت اثیر داربست زیست-رسانای قلبی بر روی زنده‌مانی سلول‌های قلبی بررسی گردید. به این منظور، ابتدا بافت قلب سلول زدایی شد و با استفاده از ارزیابی‌های بافت‌شناسی و بیوشیمیایی مشخص شد که ترکیبات ماده زمینه خارج سلولی از قبیل کلاژن در طی فرایند سلول زدایی حفظ‌شده و از بین نمی‌روند. بررسی ما نشان داد که داربست سلول زدایی شده قلبی به‌خوبی قابلیت تبدیل‌شدن به هیدروژل قلبی (کاردیوژل) را دارد. در این مطالعه مشخص شد که غلظت مناسب برای تولید کاردیوژل، ۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پودر قلب سلول زدایی شده است. برای ساخت هیدروژل ترکیبی زیست رسانای CG-Ppy مقادیر مختلفی از مونومر پیرول استفاده شد. نتایج ما نشان داد که در غلظت ۱ و ۲/۵ درصد پلی پیرول (نسبت به کاردیوژل)، هیدروژلِ ترکیبی قابلیت شکل‌گیری مناسبی دارد. برای بهبود خاصیت رسانایی هیدروژل، گروه ۲/۵ درصد برای ادامه مطالعه انتخاب شد که حاوی نسبت بیشتری از پلی پیرول بود. هیدروژل ترکیبی CG-Ppy بعد از خشکایش انجمادی به‌صورت داربست درآمده و برای بررسی زیستایی سلول‌های استفاده شد. هرچند ترکیبات درون هیدروژل و داربست CG-Ppy یکسان است، اما هرکدام می‌توانند کاربردهای متفاوتی در مهندسی بافت داشته باشند.

با توجه به اینکه سلول‌های قلبی اصلی‌ترین سلول‌های قلب هستند، لذا میزان بقاء این سلول‌ها درون داربست زیست-رسانا CG-Ppy موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تا هفت روز بعد از کشت، سلول‌ها توانسته بودند به درون داربست نفوذ کنند و بقا داشته باشد؛ که نشان می‌دهد داربست هیچ‌گونه سمیتی برای سلول‌ها نداشته و توانسته از بقاء آن‌ها حمایت کند. البته بررسی بقاء و عملکرد فیبروبلاست‌های قلبی، سلول‌های اندوتلیال عروق خونی و نیز عضله صاف دور رگی نیز همچنان موردنیاز هست تا به‌طور قطعی نشان دهد که داربست CG-Ppy می‌تواند از بقاء و عملکرد تمام سلول‌های قلبی حمایت کرده و گزینه مناسبی برای مهندسی بافت قلب باشد. هرچند این مطالعه در شرایط برون تنی انجام شد و نشان داد که داربست ترکیبی CG-Ppy از بقاء سلول‌های قلبی حمایت می‌کند، اما پیش‌بینی می‌شود که از مهاجرت و بلوغ سلول‌های قلبی نیز حمایت کند. در مطالعات قبلی نقش حمایتی هیدروژل‌های ترکیبی شامل پلی پیرول و سایر پلیمرها مورد ارزیابی قرارگرفته است و یافته‌های آن‌ها نتایج مطالعه حاضر را تائید می‌کنند. برای مثال Kai و همکاران داربست زیست رسانایی متشکل از پلیمرهای پلی پیرول، پلی کاپرولاکتون و ژلاتین سنتز کردند نشان دادند که نانوفیبرهای حاوی ۱۵ درصد پلی پیرول متعادل‌ترین خواص رسانایی، مکانیکی و زیست‌تخریب‌پذیری را برای ترمیم بافت قلبی ارائه کرده و از چسبندگی و تکثیر سلولی حمایت می‌کنند (۱۸). هرچند در مقایسه بامطالعه آن‌ها، نتایج ما نشان داد که هیدروژل ترکیبی شامل ۲/۵ درصد پلی پیرول (نسبت به کاردیوژل) بهترین حالت برای ساخت داربست ترکیبی CG-Ppy است. همچنین Mihic و همکاران از کیتوسان و پلی پیرول برای ساخت هیدروژل رسانا استفاده کرده و نشان دادند که تزریق آن به قلب موش پس از ایجاد سکته، سبب بهبود عملکرد قلب می‌شود (۱۹). با توجه بااینکه کاردیوژل از قلب مشتق شده است احتمال می‌رود که تزریق هیدورژل ترکیبی CG-Ppy نیز بتواند درترمیم قلب و بهبود عملکرد قلب مفید باشد. مطالعات دیگر نیز نقش حمایتی پلی پیرول را بر سایز رفتارهای سلول‌های قلبی نشان دادند. در یک مطالعه Spearman و همکاران نشان دادند که داربست زیست رسانای پلی پیرول- پلی کاپرولاکتون بستر مناسبی برای چسبندگی و مهاجرت سلول‌های کاردیومایوسایت رده HL1 فراهم می‌کند (۲۰). همچنین آن‌ها نشان دادند که قدرت و سرعت انقباض سلول‌های قلبی در داربست پلی پیرول-پلی کاپرولاکتون بهبودیافته و این داربست زمینه مناسبی برای رفتار الکتروفیزیولوژیک و تمایز سلول‌های قلبی فراهم می‌کند. دریکی از مطالعات اخیر پارچه باف و همکاران نشان دادند که ترکیب پلی پیرول با کاردیوژل می‌تواند از بقاء، تمایز و بلوغ سلول‌های قلبی موش در شرایط برون تنی حمایت کند (۱۵).

همچنین آن‌ها نشان دادند که پلی پیرول باعث بهبود رسانایی هیدروژل ترکیبی کاردیوژل-پلی پیرول می‌شود. با توجه اینکه رسانایی یکی از پارامترهای مهم برای عملکرد قلب است لذا احتمال می‌رود استفاده هیدروژل ترکیبی CG-Ppy به همراه سلول‌های دودمان قلبی یا حتی بدون سلول‌های دودمان قلبی، بتواند درترمیم آسیب‌های قلبی مؤثر باشد.

این مطالعه با استفاده از ارزیابی‌های اولیه برای اثبات نقش حمایتی داربست ترکیبی CG-Ppy از بقاء سلول‌های قلبی انجام شد. برای مطالعه دقیق‌تر نقش پلی پیرول و کاردیوژل نیاز به مطالعات درون تنی و بیرون تنی بیشتری هست. برای مثال ارزیابی ساختار داربست ترکیبی CG-Ppy با استفاده از میکروسکوپ الکترونی می‌تواند میزان و اندازه تخلخل درون داربست و قرارگیری سلول‌های قلبی درون داربست را نشان دهد. همچنین بررسی میزان تکثیر، تمایز، مهاجرت و عملکرد سلول‌ها با استفاده از تکنیک‌های اختصاصی از قبیل رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوفلورسنت/ایمونوهیستوشیمی و تکنیک‌های الکتروفیزیولوژی بسیار باارزش خواهد بود. همچنین در این مطالعه از سلول‌های قلبی مشتق از موش تازه متولدشده و قلب گوسفند استفاده شد. برای بررسی‌های بهتر نیاز هست که سلول‌های قلبی مشتق از سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی (سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی) و پروژنیتورهای قلبی انسانی نیز موردمطالعه قرار بگیرند. همچنین ممکن است ترکیبات ماتریکس خارج سلولی قلب گوسفند با انسان تفاوت‌هایی داشته باشد، لذا مطالعه کاردیوژل مشتق از قلب انسان فوت‌شده نیز جذاب خواهد بود. به‌طورکلی این مطالعه نشان داد که داربست ترکیبی CG-Ppy از بقاء سلول‌های قلبی حمایت می‌کند و پیش‌بینی می‌شود که داربست فوق بتواند برای غربال‌گری دارو، مطالعات پایه، تست سمیت و نیز کاربردهای درمانی مورداستفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه از محل گرنت پژوهشگاه رویان انجام‌شده است و مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی (مشترک بین دانشگاه شهید بهشتی و پژوهشگاه رویان) است و با کد ۹۶۰۰۰۱۵۰ در پژوهشگاه رویان ثبت‌شده است.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان‌نشده است.

References

1. Chang CW, Dalgliesh AJ, López JE, Griffiths LG. Cardiac extracellular matrix proteomics: challenges, techniques, and clinical implications. PROTEOMICS–Clinical Applications. 2016;10(1):39-50.
2. Lu T-Y, Lin B, Kim J, Sullivan M, Tobita K, Salama G, et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. Nature communications. 2013;4(1):1-11.
3. Gilpin A, Yang Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. BioMed research international. 2017;2017.
4. Ott HC, Matthiesen TS, Goh S-K, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. Nature medicine. 2008:14(2):213.
5. Grover GN, Rao N, Christman KL. Myocardial matrix-polyethylene glycol hybrid hydrogels for tissue engineering. Nanotechnology. 2014;25(1):014011.
6. Boffito M, Sartori S, Ciardelli G. Polymeric scaffolds for cardiac tissue engineering: requirements and fabrication technologies. Polymer International. 2014;63(1):2-11.
7. Solazzo M, O'Brien FJ, Nicolosi V, Monaghan MG. The rationale and emergence of electroconductive biomaterial scaffolds in cardiac tissue engineering. APL bioengineering. 2019;3(4):041501.
8. Guimard NK, Gomez N, Schmidt CE. Conducting polymers in biomedical engineering. Progress in polymer science. 2007;32(8):876-921.
9. Guo B, Glavas L, Albertsson A-C. Biodegradable and electrically conducting polymers for biomedical applications. Progress in polymer science. 2013;38(9):1263-86.

10. Huang Z-B, Yin G-F, Liao X-M, Gu J-W. Conducting polypyrrole in tissue engineering applications. Frontiers of Materials Science. 2014;8(1):39-45.
11. Chen J, Xu J, Wang K, Qian X, Sun R. Highly thermostable, flexible, and conductive films prepared from cellulose, graphite, and polypyrrole nanoparticles. ACS applied materials & interfaces. 2015;7(28):15641-8.
12. Zhou J, Chen J, Sun H, Qiu X, Mou Y, Liu Z, et al. Engineering the heart: evaluation of conductive nanomaterials for improving implant integration and cardiac function. Scientific reports. 2014;4:3733.
13. Li Y, Neoh KG, Kang E-T. Plasma protein adsorption and thrombus formation on surface functionalized polypyrrole with and without electrical stimulation. Journal of colloid and interface science. 2004;275(2):488-95.
14. KC P, Hong Y, Zhang G. Cardiac tissue-derived extracellular matrix scaffolds for myocardial repair: advantages and challenges. Regenerative biomaterials. 2019;6(4):99-185.
15. Parchehbaf-Kashani M, Sepantafar M, Talkhabi M, Sayahpour FA, Baharvand H, Pahlavan S, et al. Design and characterization of an electroconductive scaffold for cardiomyocytes based biomedical assays. Materials Science and Engineering: C. 2020;110603:109.
16. Singelyn JM, DeQuach JA, Seif-Naraghi SB, Littlefield RB, Schup-Magoffin PJ, Christman KL. Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. Biomaterials. 2009;30(29):5409-16.
17. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials. 2011;32(12):3233-43.
18. Kai D, Prabhakaran MP, Jin G, Ramakrishna S. Polypyrrole-contained electrospun conductive nanofibrous membranes for cardiac tissue engineering. Journal of biomedical materials research Part A. 2011;99(3):376-85.
19. Mihic A, Cui Z, Wu J, Vlacic G, Miyagi Y, Li S-H, et al. A conductive polymer hydrogel supports cell electrical signaling and improves cardiac function after implantation into myocardial infarct. Circulation. 2015;132(8):772-84.
20. Spearman BS, Hodge AJ, Porter JL, Hardy JG, Davis ZD, Xu T, et al. Conductive interpenetrating networks of polypyrrole and polycaprolactone encourage electrophysiological development of cardiac cells. Acta biomaterialia. 2015;28:109-20.

Original Article

Study of Polypyrrole-Cardiogel Combined Scaffold on Viability of Cardiac Cells

Parchehbaf-Kashani M[1], Talkhabi M[1*], Rajabi S[2*]

1. Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2. Department of Cell Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

Received: 12 Nov 2020 Accepted: 23 Dec 2020

Abstract

Background & Objective: Cardiac tissue engineering is a promising approach for treating cardiac diseases. Since electro-conductivity is an important parameter for cardiac function, here we attempted to produce a conductive scaffold by combining Polypyrrole (as a conductive polymer) and Cardiogel (decellularized heart-derived hydrogel).

Materials & Methods: The fresh sheep heart was purchased from a slaughterhouse and decellularized using SDS. Then it was digested using pepsin and cardiogel (CG) was prepared. The specific percentages of polypyrrole combined with CG and combined hydrogel were prepared. Then, the combined hydrogel was freeze-dried and the electro-conductive scaffold a CG-Ppy was prepared. Then, cardiac cells were cultured on CG-Ppy scaffold and their viability was assessed using MTS and Live/Dead staining.

Results: Hematoxylin and eosin (H&E), Alcian Blue and Masson's trichrome staining and examination of collagen and DNA showed that all heart cells were removed through decellularization, and only heart extracellular matrix was preserved. Evaluation of the gelation process showed that the combination of CG with 2.5% Ppy was the most suitable combination for the production of CG-Ppy combined hydrogel. MTS and Live/Dead staining showed that CG-Ppy scaffold didn't have any toxicity for cardiac cells, and more than 90% of cultured cardiac cells were viable after one week.

Conclusion: The electro-conductive combined scaffold CG-Ppy is an appropriate model for cardiac tissue engineering and it supports cardiac cells viability.

Keywords: Cardiac Tissue Engineering, Decellularization, Electro-Conductive Combined Scaffold, Cardiac cells, Polypyrrole, Viability

***Corresponding Authors: 1. Talkhabi Mahmood,** Department of Cell Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
Email: m_talkhabi@sbu.ac.ir
https://orcid.org/0000-0002-8268-7234
2. Rajabi Sara, Department of Cell Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
Email: srajabi@royaninstitute.org
https://orcid.org/0000-0001-9939-1504

Journal of Advanced Biomedical Sciences; 10 (2020): 2905-2915