

مقاله پژوهشی

بررسی داربست 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 پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۰/۰۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۲۲

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 (هیدروژل مشتق شده از قلب سلول زدایی شده)، یک داربست ترکیبی زیست-رسانا جهت مهندسی بافت قلب ساخته شود.

مواد و روش‌ها: قلب تازه گوسفند از کشتارگاه تهیه شده 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 ترکیب شده 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 کشت شده و میزان بقا آن‌ها با استفاده از MTS و رنگ‌آمیزی Live/Dead ارزیابی شد.

نتایج: رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، آلسیان بلو و ماسون تری کروم و نیز بررسی مقدار کلاژن و DNA نشان دادند که در طی فرایند سلول زدایی تمام سلول‌ها حذف شده و ماتریکس خارج سلولی قلب حفظ شده 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 کشت شده نداشته و بیش از ۹۰٪ سلول‌های قلبی کشت شده بعد از یک هفته زنده بودند.

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

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

مقدمه

ترکیب کرده تا ساختارهایی سبب‌دهی 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 ایجاد شده توسط سلول‌های قلبی را در سیستم انتقال می‌دهد و موجب سفتی در حالت دیاستول می‌شود. دو نوع از کلاژن‌های اصلی ماهیچه‌ای قلب شامل کلاژن نوع I و کلاژن نوع III می‌شوند. در ماهیچه‌ای قلب، کلاژن نوع I نقش استحکام مکانیکی و خواص سختی مقاوم به تغییر شکل را

مهندسی بافت به‌عنوان یکی از رویکردهای امیدوارکننده برای درمان بیماری‌های قلبی پیشنهاد شده است. این علم فرصت بی‌نظیری را برای درمان/کنترل بیماری‌ها و نواقص قلبی فراهم کرده است. مهندسی بافت قلب، زیست‌شناسی (فاکتورها و سلول‌های قلبی) و مهندسی (طراحی داربست‌های مناسب سبب‌دهی) را باهم

*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>

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 مورد بررسی قرار گرفتند، شامل: پلی پیرول، پلی آنیلین، پلی تیوفن و مشتقات آن از جمله 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 گزارش شده است که نانوتیوب‌های کربنی با داربست‌های هیدروژلی ژلاتینی ترکیب شده 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 درون تن و برون تن زیست سازگار بوده و در آب و هوا از نظر شیمیایی پایدار است. همچنین در شرایط فیزیولوژیکی، رسانایی الکتریکی بالایی دارد (۱۳). از میان داربست‌های مطالعه شده در زمینه 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 با کاردیوژل (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 مشخص شده است که داربست CG-Ppy دارای رسانایی و تخلخل 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

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 مورد توجه قرار گرفته است، به‌طوری‌که داربست سه‌بعدی تهیه شده به‌وسیله 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، مورفوژن 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 مورد استفاده قرار گیرد. تاکنون ماتریکس خارج سلولی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای بازسازی انواع بافت‌ها و اندام‌ها از جمله رگ خونی، دریچه‌ی قلب، قرنیه، نای، مری، مثانه، کلیه، کبد و شش استفاده شده است (۳). همچنین مشخص شده است که کشت سلول‌های قلبی موش تازه متولد شده 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 مورد استفاده قرار گرفته است (۵).

تاکنون ترکیبات طبیعی و سنتزی مختلفی از قبیل پلی-لاکتیک اسید، پلی‌گلیکولیک اسید، پلی گلیسرول سبسات، آلژینات و کلاژن برای ساخت داربست‌های قلبی مورد استفاده قرار گرفته و در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته‌اند (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

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/ میلی گرم از بافت باشد (۳، ۱۷).

بررسی محتوای کلاژن بافت قلب طبیعی و سلول زدایی شده

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

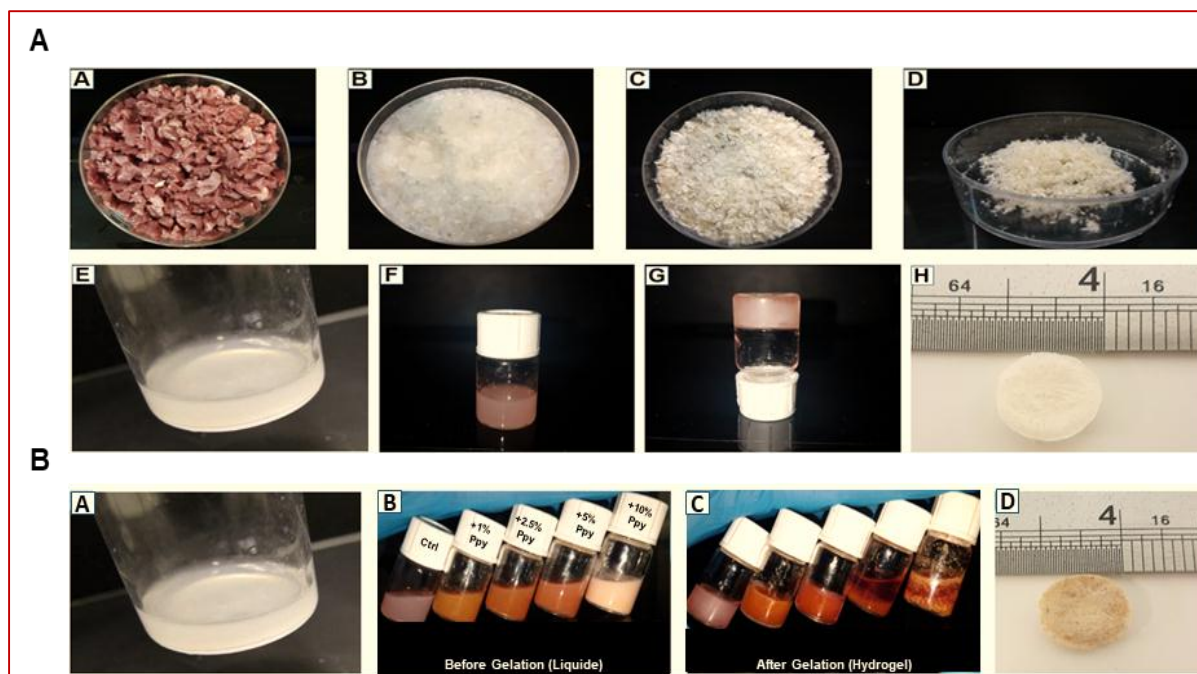
از شستشو با PBS، قطعات قلب به محلول سدیم دو سولفات (SDS) یک درصد انتقال داده‌شده و سه روز در این محلول درروی شیکر نگهداری شدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محلول تریتون X-100 یک درصد، قرار گرفتند تا فرآیند سلول زدایی تکمیل گردد. سپس بافت سلول زدایی شده در آب دو بار تقطیر به مدت ۴۸ ساعت شستشو داده شد تا کاملاً 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 برش‌گیری شده و با استفاده از هماتوکسیلین-ئاوزین (H&E)، ماسون تری کروم (MT) و آلسین بلو (AB) رنگ‌آمیزی شدند.

بررسی محتوای DNA بافت قلب طبیعی و سلول زدایی شده

۳۰ میلی گرم بافت قلب طبیعی و سلول زدایی شده به مدت ۷۲ ساعت تحت خشک‌کشی انجمادی (Freeze-drying) قرار



شکل ۱- مراحل سنتز گروه داربست هیبرید CG-Ppy. A: مراحل ساخت CG. B: قطعات قلب طبیعی، C: خشک‌کشی انجمادی قطعات قلب سلول زدا شده، D: تهیه پودر ماده زمینه خارج سلولی قلبی، E: تهیه 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 2.5%، D: ایجاد داربست ترکیبی CG-Ppy 2.5% پس از خشک‌کشی انجمادی.

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 به آرامی تخلیه شد و به همان حجم محیط کشت اضافه شد. لوله‌ی آزمایش به آرامی ۳-۴ 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 کلاناز (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 عصاره‌گیری 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 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

بر میلی‌لیتر از پودر قلب سلول زدایی شده استفاده شد. بر اساس فرایند ژل شدن پیش‌ژل‌ها و خاصیت ویسکوالاستیسیته کاردیوژل‌های حاصله، غلظت ۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان غلظت مناسب جهت پلیمریزاسیون مونومرهای پیرو و ساخت هیدروژل ترکیبی CG-Ppy انتخاب گردید (شکل ۱). به‌منظور سنتز هیدروژل ترکیبی CG-Ppy، پیرو در نسبت‌های حجمی مختلف شامل ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد به پیش‌ژل قلبی (تهیه‌شده از ۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پودر قلب سلول زدایی شده) اضافه‌شده و به‌منظور تکمیل پلیمریزاسیون مونومرهای پیرو در بستر پیش‌ژل 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 خشک‌کایش انجمادی قرار گرفته، 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، غیرفعال‌سازی آنزیم به‌وسیله ۲NaOH مولار و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و pH به ۱۱ رسانده شد. این مرحله به‌عنوان تهیه پیش‌ژل قلبی تعیین شد. برای تهیه CG، پیش‌ژل 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 خشک‌کایش انجمادی قرار گرفت. به‌منظور تهیه گروه هیدروژل ترکیبی CG-Ppy، غلظت‌های مختلف پیرو (۱٪، ۲/۵٪، ۵٪ و ۱۰٪) به پیش‌ژل قلبی اضافه شد. به‌منظور آغاز پلیمریزاسیون مونومرهای پیرو در پیش‌ژل قلبی، به مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول FeCl₃ (۰/۱۸ مولار) به‌صورت قطره‌قطره به هر گروه اضافه شد. سپس به مدت یک‌شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا فرآیند پلیمریزاسیون پیرو تکمیل گردد. درنهایت گروه منتخب در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد فریز شده و تحت خشک‌کایش انجمادی قرار گرفت.

استخراج سلول‌های کاردیومایوسایت از قلب موش تازه

متولدشده

سلول‌های قلبی از نوزاد موش ۱-۲ روزه و به‌صورت زیر استخراج شدند. در روز اول قلب‌های نوزادان ۱-۲ روزه موش تازه متولدشده استخراج‌شده و به درون پتری دیش‌های حاوی محلول نمکی (سالین) خنک منتقل شدند. عروق، چربی‌ها و قسمت

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 $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ 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) مورد استفاده قرار گرفتند و $p < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری برای نتایج آزمون‌های کمی استفاده شد.

نتایج

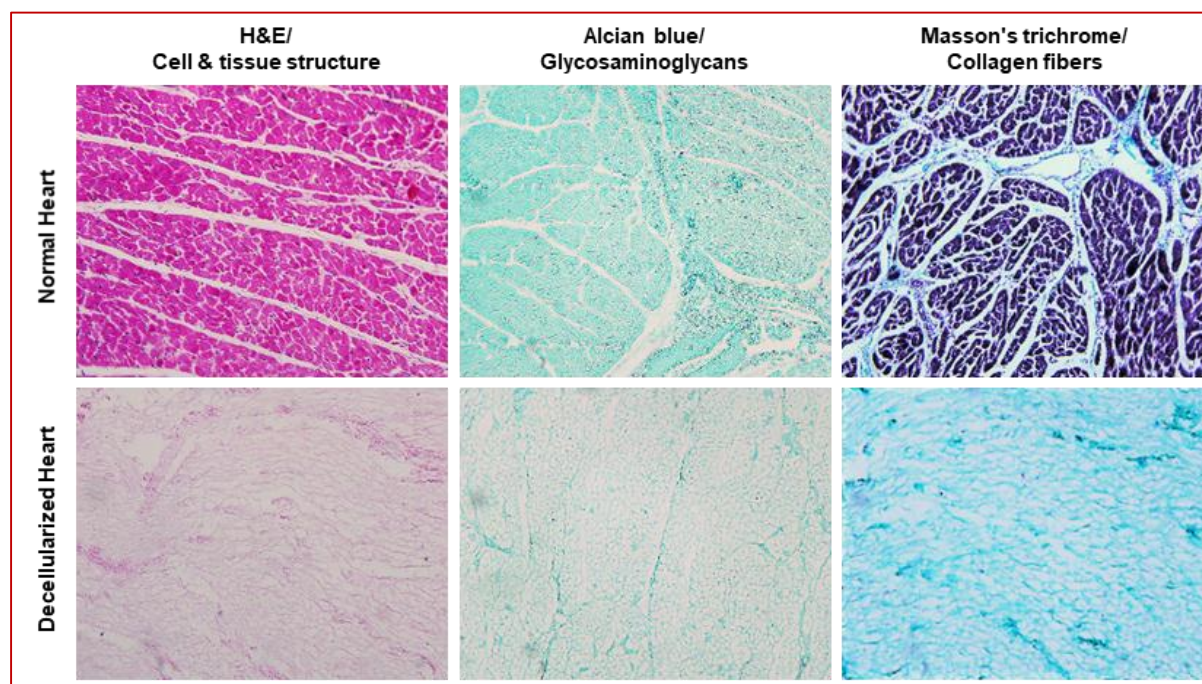
آنالیز مطالعات بافت‌شناسی

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی H&E نشان داد که فرایند سلول زدایی به‌طور موفقیت‌آمیزی انجام‌شده است (شکل ۲.۱). در بافت طبیعی، سلول‌ها در عروق خونی و در ماتریس بین رشته‌های کلاژن مشاهده می‌شوند. درحالی‌که در بافت سلول زدایی شده بدون آنکه فرایند 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

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٪ CO₂) جذب نمونه‌ها در طول موج 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 از 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 فلوروسنت با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت ثبت گردید. در این روش سلول‌های زنده با رنگ سبز و سلول‌های مرده با رنگ قرمز مشخص می‌شوند.



شکل ۲- ارزیابی‌های بافت قلب سلول زدایی شده. رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) و آلسیان بلو (AB) و ماسون تری کروم (MT) قلب طبیعی (N-Heart) و سلول زدایی شده (DC-Heart)

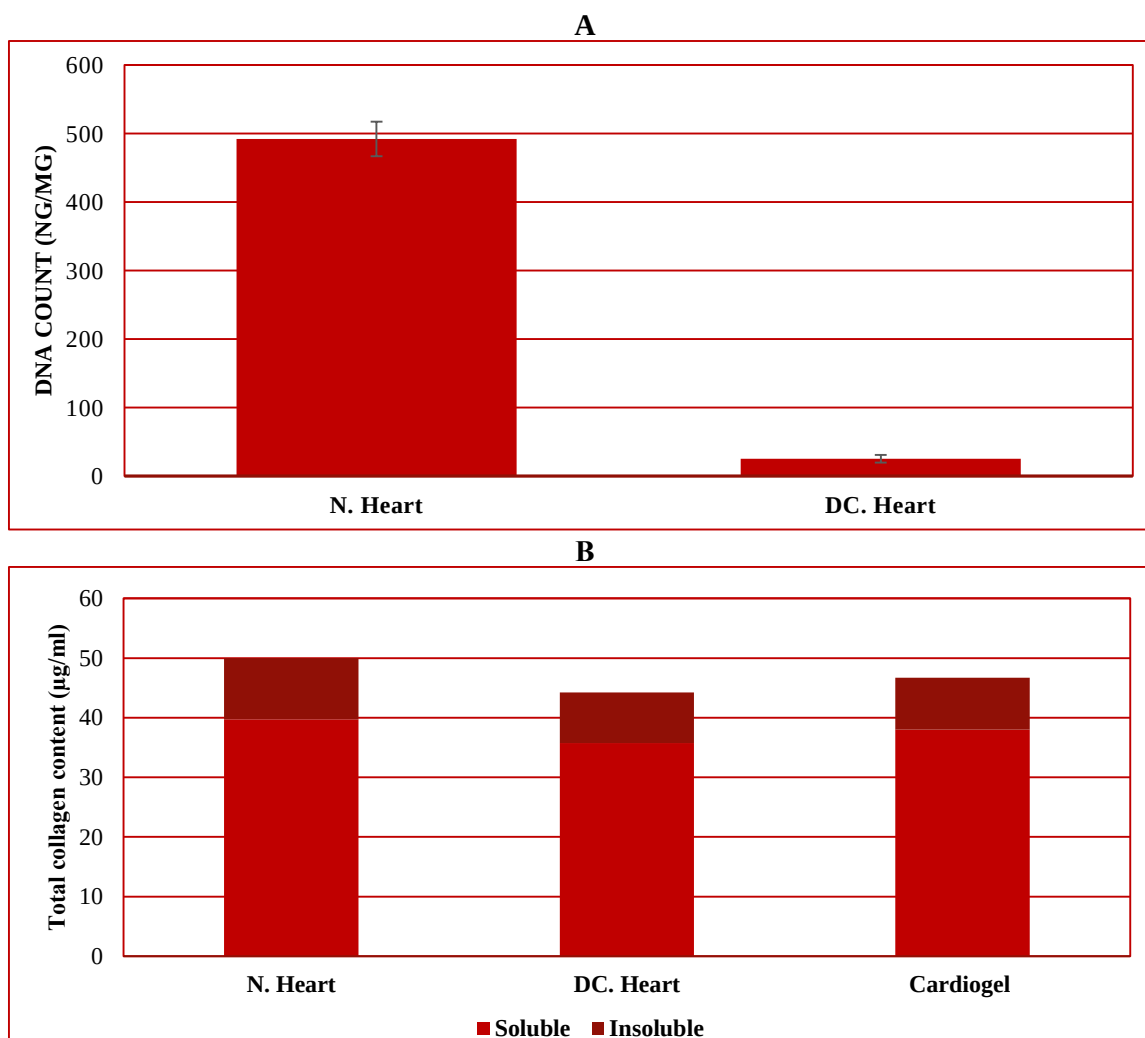
مقدار کلاژن در این گروه‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت (آنالیز واریانس یک‌طرفه، $p > 0.05$) (نمودار ۱. B).

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 ۲. B). به علت تراکم بیشتر مونومرهای پیرول در غلظت ۲/۵ درصد، این گروه به‌عنوان گروه بهینه انتخاب گردید. سپس هیدروژل

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

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، $p < 0.05$) (نمودار ۱. A). آنالیز حاصل از اندازه‌گیری مقادیر کلاژن نشان داد که کلاژن (محلول و نامحلول) بافت قلب طبیعی ۵۰ $\mu\text{g/mg}$ ، بافت قلب سلول زدایی شده ۴۴ $\mu\text{g/mg}$ و داربست ژل قلبی (CGel) ۴۷ $\mu\text{g/mg}$ بوده و



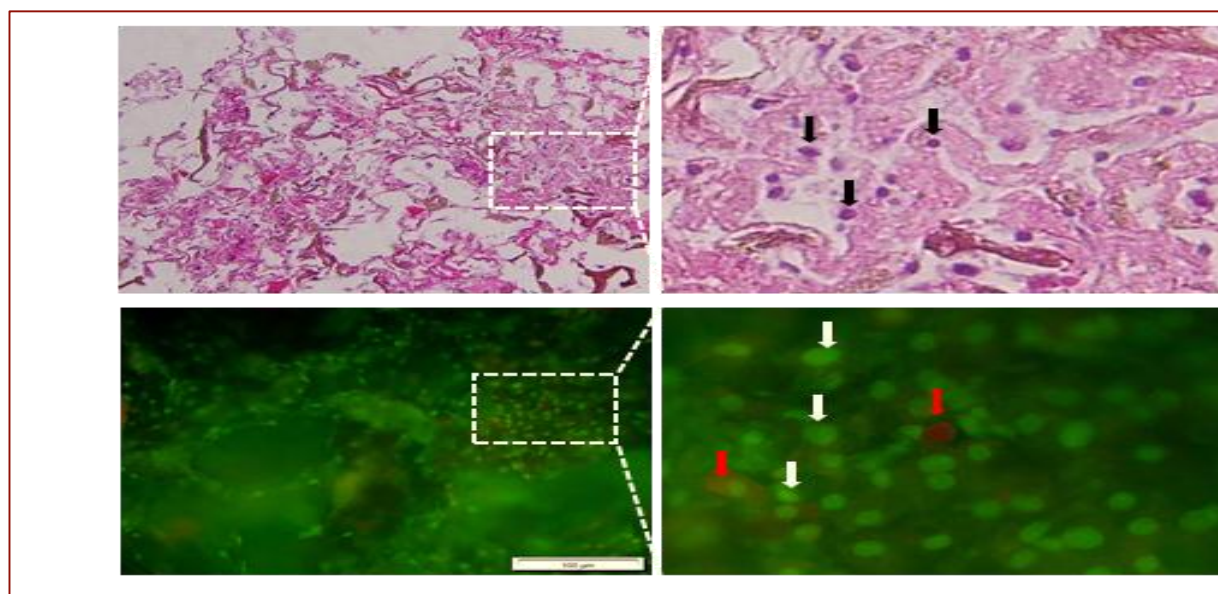
نمودار ۱- ارزیابی‌های ترکیبات بافت قلب سلول زدایی شده. (A) اندازه‌گیری محتوای DNA قبل و بعد از سلول زدایی (آزمون t-test، $p < 0.05$)، **(B)** آنالیز کمی سازی مقدار کلاژن قبل و بعد از سلول زدایی و در هیدروژل ترکیبی CG-PPy (آنالیز واریانس یک‌طرفه، $p > 0.05$). قلب طبیعی (N-Heart) و سلول زدایی شده (DC-Heart) است.

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

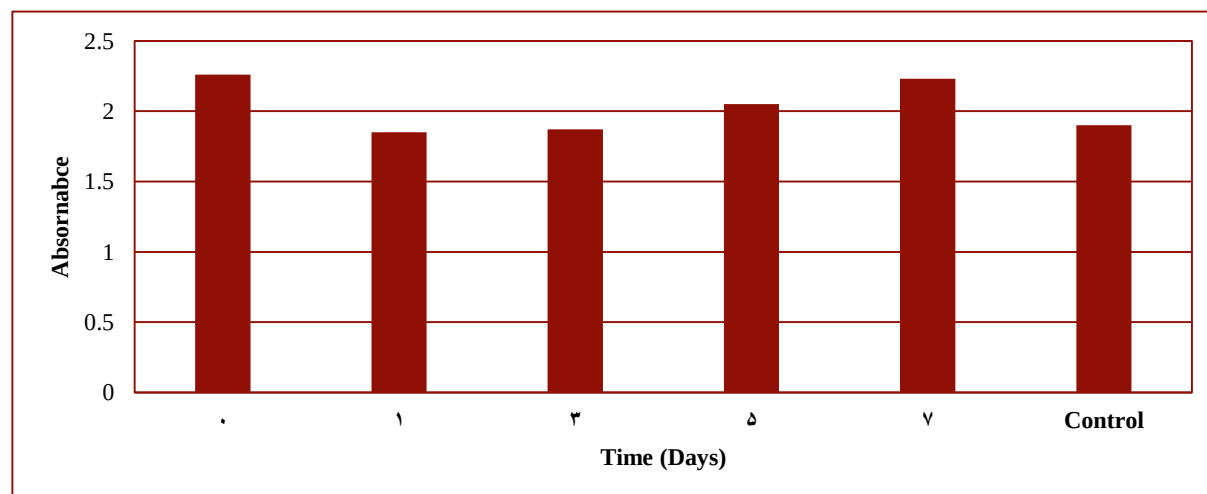
انتخاب‌شده با استفاده از خشک‌ایش انجمادی به داربست ترکیبی CG-Ppy تبدیل شد.

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).



شکل ۳-۳ 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 مشخص شده است. پایین) ارزیابی زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از کیت Live/Dead، سلول‌های زنده سبز (فلش‌های سفید) و سلول‌های مرده قرمز (فلش‌های قرمز) مشخص هستند. ارزیابی‌ها یک هفته بعد از کشت انجام شدند.



نمودار ۳-۲ ارزیابی بقاء سلول‌های قلبی کشت‌شده در داربست CG-Ppy. بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌های با استفاده از آزمون MTS (ماتریژل به‌عنوان کنترل استفاده شده 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 به راحتی توسط بدن شناخته شده و به صورت هیدرولیتیک و پروتئولیتیک به محصولات تخریب می‌شوند که ذاتاً برای بدن مضر نمی‌باشند. در مطالعه‌ی حاضر اثر 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 حفظ شده و از بین نمی‌روند. بررسی ما نشان داد که داربست سلول زدایی شده قلبی به خوبی قابلیت تبدیل شدن به هیدروژل قلبی (کاردیوژل) را دارد. در این مطالعه مشخص شد که غلظت مناسب برای تولید کاردیوژل، ۷ میلی گرم بر میلی لیتر 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)، هیدروژل 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 به صورت داربست درآمد و برای بررسی زیست‌تایی 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 مورد بررسی 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 مورد نیاز هست تا به طور 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 قرار گرفته است و یافته‌های آن‌ها نتایج مطالعه حاضر را تأیید 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 با مطالعه 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 سکت، سبب بهبود عملکرد قلب می‌شود (۱۹). با توجه به اینکه کاردیوژل از قلب مشتق شده است احتمال می‌رود که تزریق هیدروژل ترکیبی CG-Ppy نیز بتواند در ترمیم قلب و بهبود عملکرد قلب مفید باشد. مطالعات دیگر نیز نقش حمایتی پلی پیرول را بر سبب 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 کاردیومیوسایت رده HL1 فراهم می‌کند (۲۰). همچنین آن‌ها نشان دادند که قدرت و سرعت انقباض سلول‌های قلبی در داربست پلی پیرول- پلی کاپرولاکتون بهبود یافته و این داربست زمینه مناسبی برای رفتار الکتروفیزیولوژیک و تمایز سلول‌های قلبی فراهم می‌کند. در یکی 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).

سلول‌های قلبی مشتق از سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی (سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی) و پروژنیوتورهای قلبی انسانی نیز مورد مطالعه 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. به‌طور کلی 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 مورد استفاده 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.

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 در ترمیم 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 بارز 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

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 M¹, 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>