تاثیر ماده زمینه برون سلولی بر خصوصیات کرونوتروپی (ضرباهنگی) کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلولهای بنیادی جنینی

حسین بهاروند M.Sc. ☆★♦، مهناز آذرنیا Ph.D.☆، کاظم پریور Ph.D. ☆، سعید کاظمی آشتیانی Ph.D. ★

☆ دانشگاه تربیت معلم، گروه زیست شناسی

★ پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

♦ آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

پست الکترونیک: Email:Baharvand50@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۴/۲، پذیرش مقاله: ۸۳/۸/۶

* **هدف:** بررسی اثر ماده زمینه برون سلولی (ECM) بر خصوصیات ژنوتیپی و فیزیولوژیکی کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی

* **مواد و روشها:** اجسام شبه جنینی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی موش رویان B1 (مشتق از موش C57BL/6) تهیه شدند و بر ECM مشتق از فیبروبلاست قلب (کاردیوژل)، ECM تجاری (ماتریژل) و بدون ECM (کنترل) برای ۲۱ روز کشت شدند. خصوصیات کاردیومیوسیتها با ایمونوسیتوشیمی، RT-PCR و داروهای کرونوتروپی ارزیابی گردید.

* **یافته ها:** میزان ضربان در دقیقه طی روزهای ۹-۷ در گروه کاردیوژل بیش از کنترل و ماتریژل بود ($P<0.05$). سلولهای ضرباندار حاصل از سلولهای بنیادی جنینی نشانگرهای کاردیومیوسیتی شامل آلفا-اکتینین، دسیمن، تروپونینی I، زنجیره سنگین میوزین سارکومری (MHC)، پان – کادهرین و کانکسین ۴۳، زنجیره سنگین میوزینی آلفا و بتا و زنجیره سبک میوزینی بطنی و فاکتور ناتری یورتیک دهلیزی (ANF) را بیان می کنند. علاوه بر این ضربان کاردیومیوسیتهای کشت یافته بر ECMs نسبت به ایزوپرنالین بیشتر افزایش می‌یابد، و کاردیومیوسیتهای کشت یافته بر ماتریژل نسبت به کارباکول بیشتر کاهش می‌یابد. اما تعداد ضربان بین سه گروه با به کارگیری فنیل افرین، پروپرانولول و یا بای -K تفاوت نکرد.

* **نتیجه گیری:** ماده زمینه برون سلولی بعضی صفات کرونوتروپی کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

گل واژگان: سلولهای بنیادی جنینی، تمایز کاردیومیوسیت، ماده زمینه برون سلولی، صفات کرونوتروپی

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، پاییز ۸۳، شماره ۲۳، صفحات ۱۵۹-۱۵۲

مقدمه

مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که ماده زمنیه برون سلولی (ECM) و فاکتورهای رشد، تمایز سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. لذا برای تمایز آزمایشگاهی سلولهایی که از نظر ساختار و عملکرد مناسب باشند، ریز محیط (Microenviyonment) یا کنام (niche) مشابه شرایط موجود زنده حائز اهمیت است. نشان داده شده است که ماهیت ماده زمینه برون سلولی بر صفات ژنوتیپی و فنوتیپی سلولها اثر می‌گذارد (۱، ۲). از طرفی ترکیبات ماده برون سلولی هر اندام اختصاصی است. بنابراین بر هم کنشهای آن با سلولهای هر اندام منحصر به فرد است. در نتیجه ماده زمینه برون سلولی هر بافت ممکن است بر سرنوشت تکوینی و تمایز سلولهای آن اثر بگذارد.

تا کنون کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی بر ظروف پلاستیکی کشت یافته‌اند (۳، ۴، ۵، ۶) و یا کاردیومیوسیت بالغ بر انواعی از ترکیبات کلاژنی، لامینینی، فیبرونکتینی و یا غیره کشت شده‌اند (۱، ۷). گزارش شده است که بر هم کنش کاردیومیوسیتهایی که بر ماده زمینه برون سلولی رشد می‌یابند از نظر بیوشیمیایی و مکانیکی پیچیده‌تر از حتی یک نوع پروتئین نظیر کلاژن، فیبرونکتین، لامینین است. به طور طبیعی کاردیومیوسیتها توسط پایه‌ای متشکل از کلاژن نوع IV، لامینین، فیبرونکتین و انواعی از پروتئوگلیکانها محصور شده‌اند (۸). این مواد عمدتا توسط فیبروبلاستهای قلبی ترشح می‌شوند (۹). این ماده زمینه برون سلولی طبیعی، کاردیوژل نامیده می‌شود (۱۰).

لذا در این مطالعه، کاردیومیوسیتهایی که از سلولهای بنیادی جنینی موش به دست آمده‌اند، بر ماده زمینه برون سلولی اختصاصی قلب (کاردیوژل) ماده زمینه برون سلولی غیر اختصاصی (ماتریژل) و گروه کنترل (بدون ماده برون سلولی) کشت شدند. ماتریژل، ماده زمینه‌ای تجاری است که از سارکومای موش به دست می‌آید و دارای فاکتورهای رشد، لامینین (۶۰درصد)، کلاژن IV (۳۰درصد) و هپاران سولفات (۸درصد) است (۱۱). کاردیومیوسیتهایی رشد یافته در گروههای مختلف فارماکولوژی، ایمونوهیستوشیمی و تجلی ژنهای خاص قلب مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روشها

کشت سلولهای بنیادی جنینی

در این مطالعه از رده سلولهای بنیادی جنینی (رویان B1) مشتق از

Archive of SID

www.SID.ir

موش نژاد C57BL/6 استفاده شد (۱۲). این سلولهای به صورت تمایز نیافته بر فیبروبلاستهای جنین موشی که تقسیم آنها با مایتویسین C-(Sigma, M0503) متوقف شده بود، کشت شدند. محیط کشت این سلولها شامل Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEN, Gibco, 10829-018) همراه با افزودنیهای ۱۵درصد سرم جنین گاوی (FCS, Gibco, 16141-079) 0.1mM, بتامرکاپتواتانول (sigma, M7522) 2mM، گلوتامین (Gibco, 15039-027) 0.1mM, اسید آمینه غیر ضروری (sigma, M7145) و 1000iu/ml فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (LIF, Chemicon, ESGRO, ESG1107) بود.

نحوه تمایز کاردیومیوسیتها

کاردیومیوسیتهای ضربان دار به صورت خود به خود از سلولهای بنیادی جنینی به روش که قبلا بیان شده است تمایز یافتند (۱۳). به طور خلاصه مراحل کار شامل کشت ۸۰۰ سلولهای بنیادی جنینی در قطرات آویزان ۲۰ میکرولیتری بود تا اجسام شبه جنینی (EB) تشکیل شود. پس از دو روز اجسام شبه جنینی به ظرف باکتریایی منتقل شدند تا پنج روز دیگر رشد یابند. اجسام شبه جنینی هفت روزه به صورت منفرد در ظروف ۲۴ خانه به صورت منفرد به مدت ۲۱ روز کشت شدند. کف ظرفها با کاردیوژل، ماتریژل و یا بدون ECM (گروه کنترل) مفروش شده بود. در اجسام شبه جنینی کشت شده، کاردیومیوسیتها به صورت مجموعه‌های سلولی ضربان‌دار مشاهده شدند.

تهیه کاردیوژل و ماتریژل

کاردیوژل و ماتریژل مطابق روشی که قبلا توصیف شده (۱۴)، تهیه شدند.

ایمونوسیتوشیمی

نواحی ضربان‌دار ۱۰-۵ جسم شبه جنینی به روش مکانیکی تحت میکروسکوپ اینورت فاز کنتراست جدا شده و پس از شستشو در محلول فسفات بافر (PBS) عاری از $Mg^{2+}Ca^{2+}$، تریپسینه شدند. سپس سلولهای جدا شده مجددا کشت شدند. بعد از یک تا دو روز ابتدا دو بار با PBS شستشو شدند و بعد با محلول متانول: استن (۳ به ۱) سلولها برای ایمونوسیتوشیمی رنگ‌آمیزی شدند. به طوری که سلولها در در ۲۰- درجه سانتیگراد و یا پارافرمالدیید ۴درصد در دمای اتاق تثبیت شدند. به دنبال شستشوی مجدد، سلولها (دوبار با PBS)، سلولها با سرم ۱۰درصد نر پوشانده شدند (۳۰ دقیقه). آنتی‌بادیهای اولیه (جدول ۱) به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷درجه سانتی گراد جداگانه به مجموعه‌های سلولی متفاوت اضافه شد. سپس سلولها سه بار با PBS شستشو شده (هر بار ۱۰ دقیقه) و به دنبال آن آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار با FITC(Sigma F9006) اضافه شد (۱:۱۰۰) و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در پایان سلولها سه بار با PBS شستشو و با میکروسکوپ فلورسنس (Nikon/TE 2000) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۱: آنتی‌بادیهای اولیه مورد استفاده در ایمونوسیتوشیمی

نام آنتی بادی	کمپانی و شماره کاتالوگ	غلظت مورد استفاده
آنتی بادی دسمین	Sigma (D1033)	1:20
آنتی آلفا اکتینین	Sigma (A7811)	1:800
آنتی کانکسین – ۴۳	Sigma (C8093)	1:200
آنتی تروپونین I	Chemicon (MAB169)	1:250
آنتی پان کادهرین	Sigma (C1821)	1:400
آنتی سارکومریک MHC	MF-20(Hybridoma bonk)	سوپ روی سلولی ۱:۱

تجلی ژنهای خاص قلبی

از روش نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (RT-PCR) برای ارزیابی تجلی رونوشتهای (transcripts) خاص قلبی استفاده شد. سلولهای ضربان‌دار تحت میکروسکوپ اینورت فاز کنتراست به روش مکانیکی (پیپت) جدا شدند و RNA آنها با استفاده از RNX Plus ™(RN7713C, Fermentas) استخراج شد. با استفاده از پرایمرالیگو dT و آنزیم ریورس تراسکرپیتاز cDNA(K 1632, Fermentas) ساخته شد.

پرایمرهای مورد استفاده جهت PCR در جدول ۲ آمده است. محصولات PCR روش ژل آگاروز ۲درصد (Fermentas) جدا با اتیدیوم بروماید رنگ و با ترانس لومینوتور UV (Uvido, UK) مشاهده شدند.

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده در PCR

Genes	Primer Sequences (5′-3′)	Size (bp)	Annealing Tempreture	Refrences
Cardiac α-MHC (α-myosin heavy chain)	CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG GGAAGAGTGAGCGGGGCATCAAGG	301	65	5
Cardiac β-MHC (β-myosin heavy chain)	TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC GCCAACACCAACCTGTCCAAGAAC	205	68	5
Myosin light chain - isoform 2V (MLC-2V)	TGTGGGTCACCTGAGGCTGTGGTTCAG GAAGGCTGACTATGTGTCCGGGAGATGC	189	68	5
ANF (Atrial natriuretic factor)	TGATAGATGAAGGCAGGAAGCCGC AGGATTGGAGCCCAGAGTGGACTAGG	203	68	5
Oct-4	GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC CTCGAACCACATCCACATCCTTCTCT	317	61	12
β-tubulin	GGAACATAGCCGTAAACTGC TCACTGTGCCTGAACTTACC	317	63	5

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعات فارماکولوژیکی

کاردیومیوسیتهای ضربان دار که بیش از ۱۰درصد از سطح جسم شبه جنینی رشد یافته را اشغال کرده بودند.

مطابق سه مرحله تکوینی که قبلا توسط Maltseve و همکاران (۳) توصیف شده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفتند. این مراحل شامل:

(۱) ابتدایی تمایز (روز ۳+۷) (۲) میانه تمایز (روز ۷+۷) (۳) انتهایی تمایز (روز ۱۴+۷) بودند. فرکانس ضربان خود به خود با کمک میکروسکوپ فاز کنترل است اینورت (Olympus, CKX41) انجام شد. اثرات وابسته به دوز و مرحله تکوینی با به‌کارگیری دوزهای مختلف دارویی (جدول ۳) در مراحل تکوینی مختلف انجام شد. اثرات وابسته به دوز و مرحله تکوینی با به کارگیری دوزهای مختلف دارویی (جدول ۲) در مراحل تکوینی مختلف انجام شد. میزان ضربان کاردیومیوسیتهایی ۹۸۴، ۱۰۳۴، ۹۵۶ مجموعه (Cluster) مستقل کاردیومیوسیتی به ترتیب رشد یافته بر کاردیوژل، ماتریژل و کنترل ارزیابی شد.

جدول ۳: داروها و غلظتهای مختلف به کار گرفته شده

نام ماده	غلظتهای مورد استفاده (M)	شماره کاتالوگ سیگما
ایزوپرنالین	$10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}$	1-6504
فنیل افرین	$10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$	P-6126
پروپانولول	$10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}$	P-0884
کاربالوکول	$10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}$	C-4382
K8644 بای	$10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}$	B-133

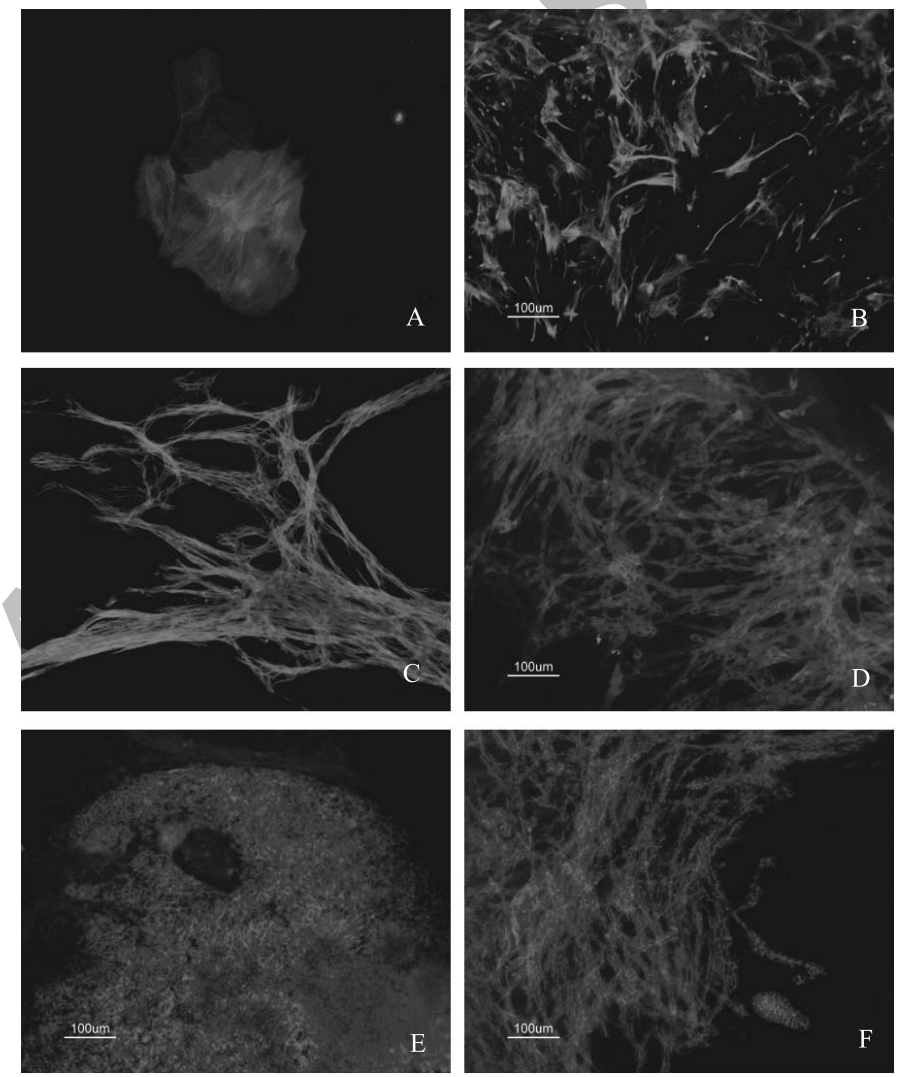
آزمون آماری

داده‌های فارماکولوژیکی با استفاده از آزمون آماری Anova و با نرم‌افزار SPSS ارزیابی شدند. نتایج به صورت [میانگین ± خطای استاندارد (SEM)] نشان داده شده‌اند، $P<0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تمایز سلولهای بنیادی جنینی به کاردیومیوسیت

معمولا هفت روز بعد از کشت سلولهای بنیادی جنینی در قطرات آویزان تمایز کاردیومیوسیتها با وجود ضربان شروع شد.



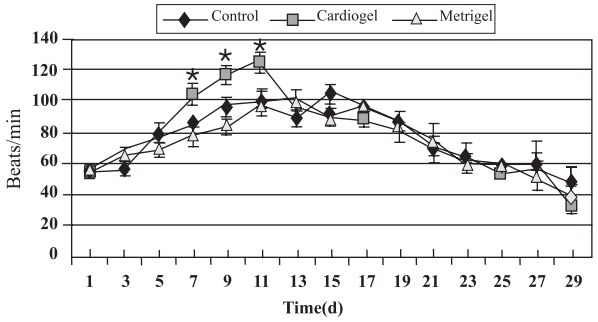
شکل ۱: ایمونوسیتوشیمی کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی آنتی بادی علیه آلفالکتینین (A)، دسیمن (B)، تروپونین I(C)، MF-20(D)، کانکسین ۴۳ (E)، پان- کادهرین (F).

www.SID.ir

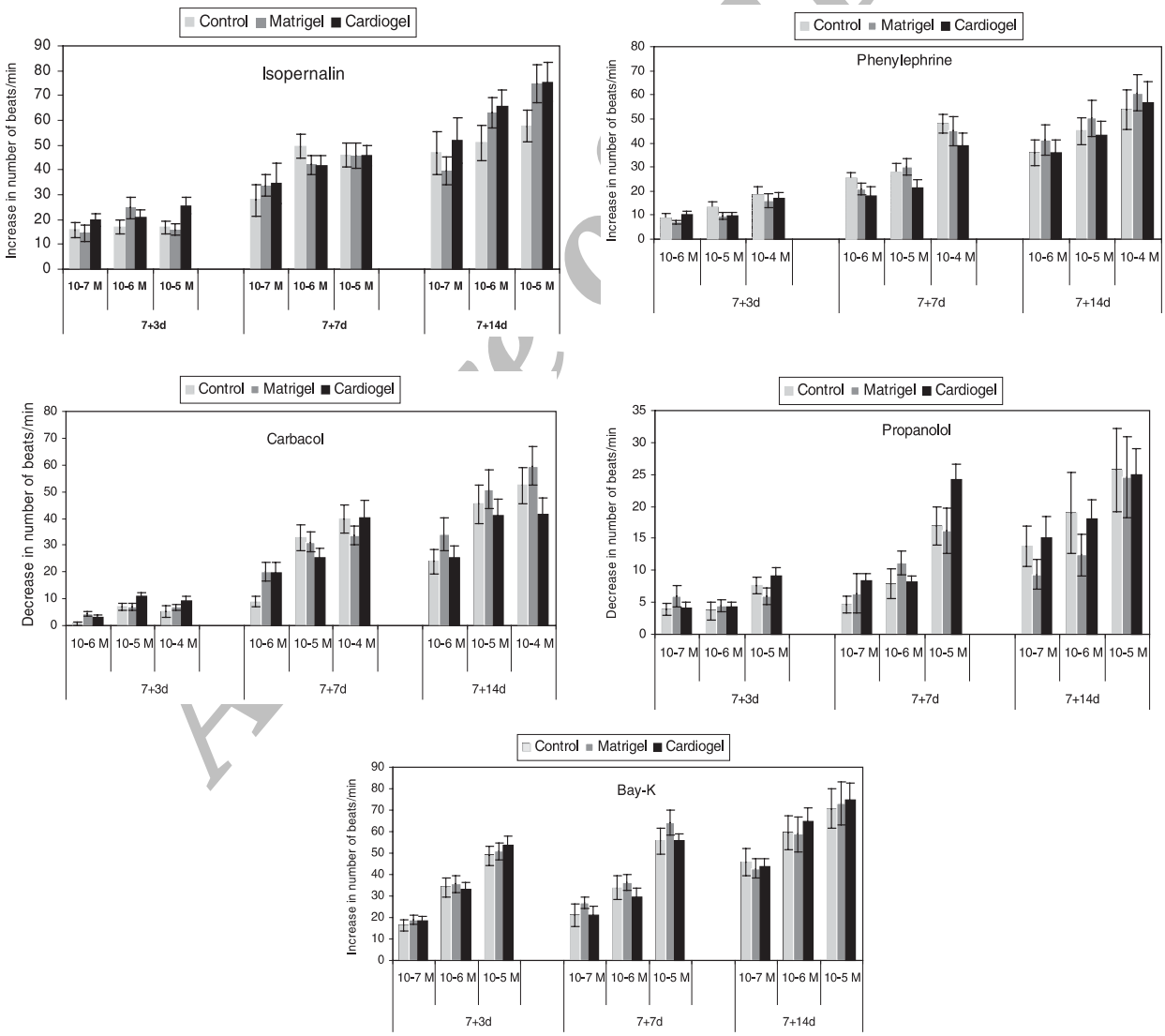
به منظور مشاهده سلولهای ضربان‌دار در هر جسم شبه جنینی به کف ظرف چسبیده و تکثیر نمودند و جمعیت ناهماهمگنی از سلولها، از جمله کاردیومیوسیتهای ضربان‌دار تمایز نمودند.

از آنجا که ظرفیت تمایزی سلولهای بنیادی جنینی به تعداد اولیه آنها در جسم شبه جنینی بستگی دارد (۱۵، ۱۶) و قبلا نیز نشان دادیم که تعداد ۸۰۰ سلول در هر قطره آویزان برای رده سلولی رویان B1 مناسب است (۱۳) لذا این تعداد سلول ES برای تشکیل جسم شبه جنینی به کار رفت.

فرکانس ضربان کاردیومیوسیتهای حاصل نیز به درمان کشت اجسام شبه جنینی در ظرفهای ۲۴ خانه بستگی داشت، به طوری که تعداد ضربان با افزایش زمان افزایش می‌یافت.



نمودار ۱: میزان ضربان در دقیقه در طی سی روز در اجسام شبه جنینی کشت یافته بر کاردیوژل، ماتریژل و کنترل* (P<0.05)



نمودار ۲: اثرات کرونوتروپی در مراحل مختلف تکوین کاردیومیوسیت‌ها ایزوپرنالین، فنیل افرین، پروپانولول و بای -K با غلظت‌های مختلف بر میزان ضربان در دقیقه کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی در سه گروه کاردیوژل، ماتریژل و کنترل.

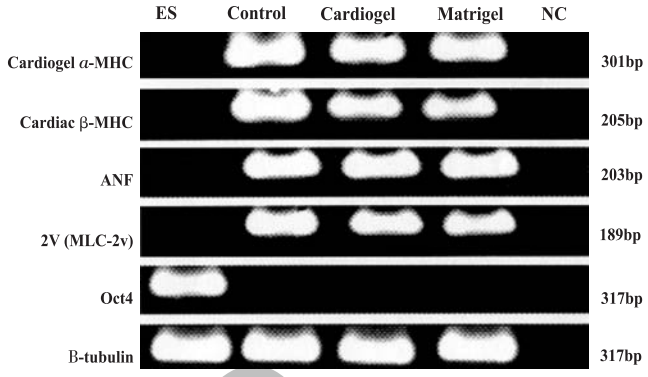
www.SID.ir

در تمام گروهها فرکانس ضربان در طول سی و یک روز به طور یک روز در میان در نمودار ۱ آمده است.

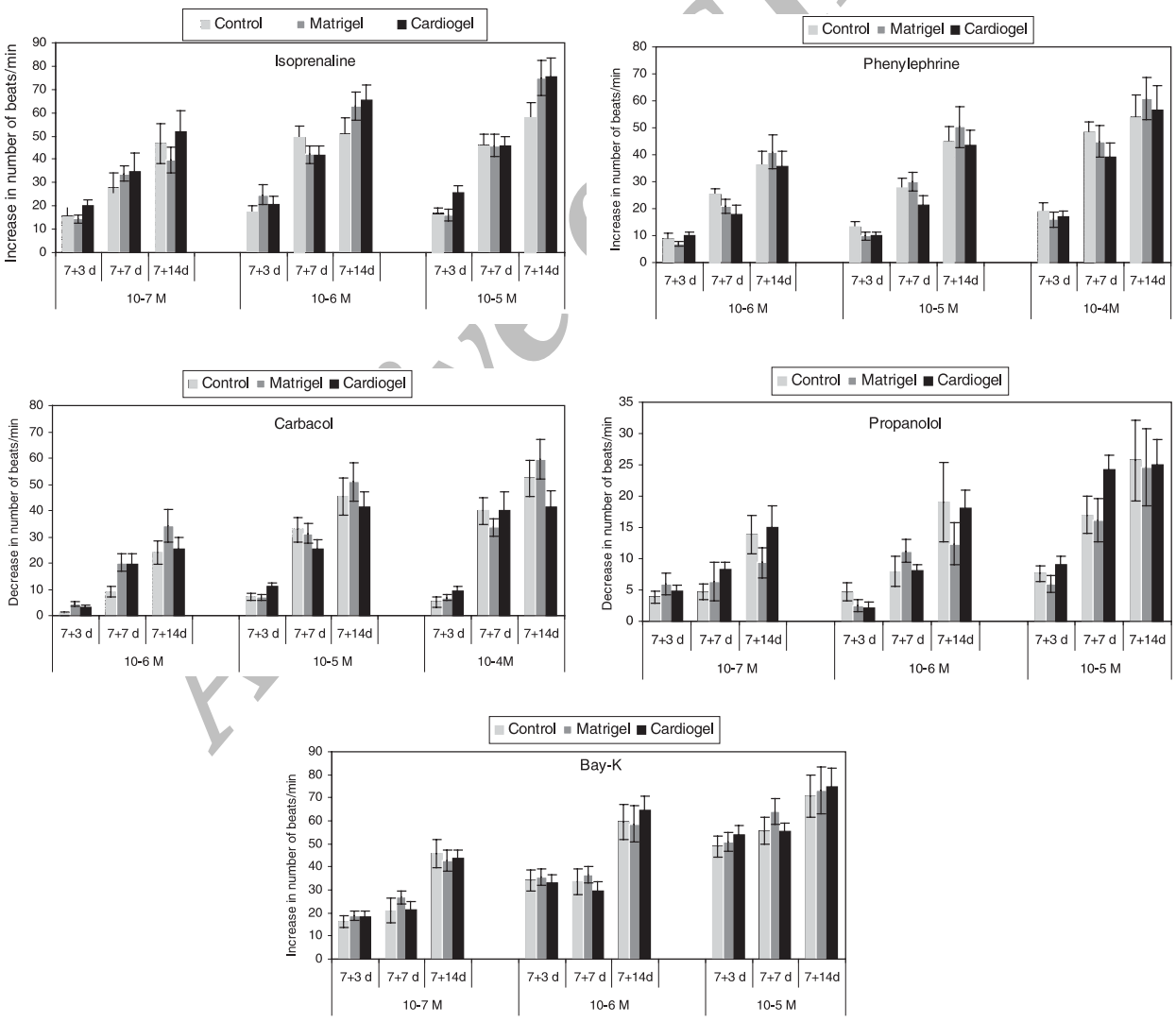
به طوری که میزان ضربان در دقیقه در کاردیومیوسیتهای رشد یافته در روزهای هفت تا یازده بیش از گروه کنترل و ماتریژل بوده است ($P<0.05$) ولی در روزهای قبل و بعد تفاوتی در تعداد ضربان آنها مشاهده نمی‌شود.

تجلی نشانگرهای قبلی در کاردیومیوسیتها مشتق از سلولهای بنیادی جنینی

ایمونوسیتوشیمی سلولها نشان داد که کاردیومیوسیتهای حاصل به صورت دوکی، گرد و سه تا چند وجهی هستند دارای ساختارهای سارکومری سلولهای ماهیچه‌ای هستند که به طوری که به صورت مخطط جلوه می‌کردند. در ضمن آنکه کاردیومیوسیتها در تمام گروهها نشانگرهای ماهیچه‌ای آلفاکتینین، دسیمن، تروپونین I، زنجیره سنگین میوزین سارکومری، پان کادهرین و کانکیسن ۴۳ را بیان می‌کردند (شکل ۱).



شکل ۲: بررسی تجلی ژنهای خاص کاردیومیوسیتی با روش RT-PCR در کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای جنینی. NC، نشان دهندهٔ بدون cDNA است.



نمودار ۳: اثرات کرونوتروپی غلظتهای مختلف ایزوپروترونالین (a)، فنیل افرین (b)، کارباکول (c)، پروپرانولول (d) و بای -(e)K در زمانهای مختلف تکوین بر میزان ضربان در دقیقه کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی در سه گروه کاردیوژل،ماتریژل و کنترل.

www.SID.ir

علاوه بر این بررسی RT-PCR کاردیومیوسیتها نشان داد که در تمام گروهها، پروتئینهای کاردیاکی شامل α-MHC و β-MHC و MLC-2V و ANF تجلی می‌یابند (شکل ۲).

خصوصیات فارماکولوژی

اثرداروهای کرونوتروپی (ضرباهنگی) بر کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی کشت یافته بر کاردیوژل، ماتریژل و کنترل ارزیابی شد (نمودار ۲ و ۳). فرکانس ضربان با به کار گیری بای -K به طور معنی‌داری بسته به مقدار به کار رفته (dose-dependent) و زمان تکوینی(developmental stage-dependent) افزایش یافت و این موضوع در تمام گروهها دیده شد. ولی تفاوت معنی‌دار بین گروهها مشاهده نگردید. همچنین انقباضها بعد از چند ساعت بعد از حذف دارو به حالت اولیه برمی‌گشتند. این نتایج نشان دهنده وجود کانالهای کلسیمی فعال در کاردیومیوسیتهای حاصل بود. سلولها با ایزوپرنالین (آگونیست بتا آدرسپتور) و فنیل آفرین (آگونیست آلفا آدرنوسپتور) تیمار شدند. به کار گیری این داروها در تمام گروهها به سبب افزایش معنی‌دار تعداد ضربان افزایش بیشتری می‌یافت. از طرفی به کار گیری کارباکول (آگونیست کولینوسپتور) نیز نشان داد که میزان ضربان با افزایش غلظت و مرحله تکوینی، بیشتر کاهش می‌یابد. نکته جالب توجه آن که، هیچ کدام از داروها، تعداد ضربان را به میزان قابل توجه‌ای در مرحله ابتدایی (روز ۳+۷) در قیاس با مرحله میانی (روز ۷+۷) و نهایی (روز ۱۴+۷) تحت تاثیر قرار ندادند. از سوی دیگر کاردیومیوسیتهای رشد یافته بر کاردیوژل یا ماتریژل، بیشتر تحت تاثیر ایزوپرنالین قرار گرفتند و ضربان کاردیومیوسیتهای رشد یافته بر ماتریژل در مقایسه با کاردیوژل بیشتر کم شد. اما اختلاف معنی‌داری بین تعداد ضربان در به کار گیری فنیل آفرین و بای -K مشاهده نشد.

بحث

تولید کاردیومیوسیتهای فعال از سلولهای بنیادی جنینی دارای کاربردهای بالقوه در مطالعات زیست‌شناسی تکوینی، طب پیوند و توسعه داروسازی و ناهنجار شناسی است. اما این کاربردها و سایر توانیهای بالقوه کاردیومیوسیتها مشتق از سلولهای بنیادی جنینی به طور عمده به جنبه‌های عملی تولید شرایط کشت مطلوب این سلولها بستگی دارد.

در این مطالعه ما به بیان خصوصیات کاردیومیوسیتها مشتق از سلولهای بنیادی جنینی پس از کشت بر کاردیوژل که ماده زمینه برون سلولی و عمدتا از فیبروبلاستهای قلبی ساخته می‌شود پرداخته شد. کاردیوژل غنی از لامینین، فیبرونکتین، پروتئوگلیکان و کلاژنهای I و III است (۱۰). همچنین کاردیومیوسیتهای حاصل بر ماتریژل که یک ماده زمینه برون سلولی تجاری است و دارای هپاران سولفات، کلاژن IV، Nidogen و entactin است (۱۱)، کشت شدند. مشاهدات ما نشان داد که سلولهای بنیادی جنینی به خوبی به کاردیومیوسیتهای فعال تمایزی می‌یابند و می‌توان آنها را همچون گروه کنترل بر ماده زمینه برون سلولی (کاردیوژل و ماتریژل) کشت داد. این نتیجه‌گیری بر اساس مشاهدات ذیل است: (۱) ضربان مجموعه‌های تمایز نیافته (۲) تجلی نشانگرهای سلولی و مولکولی خاص سلولهای قلبی (۳)، پاسخ مناسب سلولهای مذکور در مقابل داروهای کرونوتروپی (ضرباهنگی).

اگر چه تغییرات دقیق کانالهای یونی غشاء یا اجزایی که همراه این خصوصیات تکوین می‌یابند مشخص نیست، اما به نظر می‌رسد کاردیومیوسیتهای رشد یافته بر ماده زمینه برون سلولی در پاسخ به بعضی داروها متفاوت عمل می‌کنند. به طوری که به کار گیری ایزوپرنالین در کاردیومیوسیتهای کشت شده بر کاردیوژل یا ماتریژل در مقایسه با کاردیوژل در پاسخ به کارباکول به نسبت بیشتری کاهش ضربان دارند. از طرفی در مطالعه قبلی نیز ما مشاهده کردیم که کاردیوژل نسبت به ماتریژل سبب بلوغ سریعتر کاردیومیوسیتها می‌شود به طوری که نوارهای M، H و لوله‌های T در کاردیومیوسیت‌های حاصل وجود دارد ولی در گروه کنترل وجود ندارد (۱۳). نتایج پاسخهای دارویی نشان داد که افزودن آگونیست β- آدرنوسپتور ایزوپرنالین، سبب افزایش معنی‌دار تعداد ضربان از مرحله ابتدایی تانهایی شد ولی افزایش غلظت آن در یک مرحله به خصوص، تعداد ضربانها را افزایش نداد. نتایج در مورد فنیل افرین به عنوان آگونیست گیرنده آدرنرژیک α_1 همچون تاثیر ایزوپرنالین بود. اما در مراحل حد واسط و نهایی تمایز، افزایش غلظت پروپانولول سبب مهار بیشتر گیرنده‌ها و کاهش ضربان شد. کاهش معنی‌دار در اثرات ضرباهنگی (کرونوتروپی) منفی با به کارگیری کارباکول که مشتق پایدار استیل کولین است و به گیرنده موسکارینی کولینوسپتور متصل می‌شود به غیر از مرحله ابتدایی در سایر مراحل دیده شد. از سوی به کار گیری بای-K به عنوان فعال کننده کانال کلسیمی نیز نشان داد که افزایش غلظت در روزهای ابتدایی و حد واسط، سبب افزایش تعداد ضربان می‌شود.

در واقع بن‌یاخته‌های تمایز نیافته فعالیت الکتریکی ندارند این سلولها قادر به تولید پتانسیل عمل نیستند و تنها ولتاژ خطی (Linear Current Voltage) دارند (۱۷). شکلهای متفاوت پتانسیل کاردیومیوسیتهای حاصل از بن‌یاخته‌های جنینی به تجلی انواع متفاوت کانالهای یونی برمی‌گردند (۳) کاردیومیوسیتهای در مراحل ابتدایی دارای دو کانال یونی اصلی یعنی کانال کلسیمی نوع L وابسته به ولتاژ (L_{Ca}) و کانال پتاسیمی (K) گذرا ($I_{K, to}$) هستند، این در حالی است که در مراحل نهایی تمایز کاردیومیوسیتها، انواع دیگری از کانالهای نظیر کانالهای Na^+ وابسته به ولتاژ (I_{Na})، کانالهای K^+ تاخیری Outword rectifying(I_K) و کانالهای K^+ تاخیری Inward Recifying(I_{N1}) کانالهای K^+که با استیل کولین موسکارینی فعال می‌شوند ($I_{K, Ach}$) و کانالهای پیشاهنگ فعال شونده با هیپرپلاریزاسیون (I_f) تجلی می‌یابد. بیشتر خصوصیات بیوفیزیکی و فارماکولوژیکی جریانهای یونی کاردیومیوسیتهای مشتق از بن‌یاخته‌های جنینی مشابه آنچه است که در مورد بزرگسالان و یا کاردیومیوسیتهای

Archive of SID
www.SID.ir

جنین‌ها گزارش شده است (۱۸، ۱۹، ۲۰). با این حال اختلاف اندکی با هم دارند.

از سوی دیگر اگر چه افزایش غلظت کارباکول به عنوان آگونیست گیرنده کولیزژیک موسکارینی در مرحله ابتدایی سبب کاهش معنی‌دار تعداد ضربان نشده ولی در مراحل بعدی این موضوع مشاهده گردید و این موضوع با افزایش زمان در مورد هر غلظت نیز دیده شده. به عبارت دیگر در مرحله ابتدایی تعداد گیرنده‌های موسکارینی کم است و با تمایز بیشتر تعداد گیرنده‌ها افزایش می‌یابد. به طوری که با افزایش غلظت در مراحل بعدی نیز مشاهده می‌شود که تعداد ضربان به شدت کاهش می‌یابد.

نتایج تاثیر بای-K نیز نشان داد که از همان ابتدا کانالهای کلسیمی نوع L در کاردیومیوسیتهای حاصل وجود دارد و با افزایش غلظت آن، در مراحل ابتدایی و حد واسط تعداد ضربان افزایش می‌یابد. نشان داده شده است که بیشترین جزء جریان کاردیومیوسیتها مشتق از بن‌یاخته‌ها حاصل I_{ca} وابسته به ولتاژ است و این شبیه جریان Ca^{2+} نوع L است (۲۱، ۲۲، ۲۳). Van Winkle و همکاران (۱۰) نشان داد که کاردیومیوسیتهایی که از قلب نوزادان موش جدا می‌شوند، نسبت به لامینین و فیبرونکتین بر کاردیوپل سریعتر می‌چسبند و زودتر ضربانهای خود به خودی خود را شروع می‌کنند و علاوه بر این از لحاظ ساختاری سازمان یافته‌ترند. مشاهدات مشابهی نیز توسط Bick و همکاران (۲۴) گزارش شد. به طوری که ایشان با رنگ‌آمیزی هیستوشیمی محتوای میوسیتهای قلب نوزادان موش نشان داد که سلولهایی رشد یافته بر کاردیوژل از نظر میتوکندریایی سریعتر تکوین می‌یابند و جذب کلسیم و فسفریلاسیون آنها افزایش می‌یابد. این یافته‌ها بر بلوغ سریعتر دستگاه انقباضی در کشت بر کاردیوژل است (۲۵). علاوه بر این نشان داده شده است که سلولها مشابه بسته به ماهیت ماده زمینه برون سلولی دارای خصوصیات مورفولوژیکی و رشدی متفاوت هستند (۲۶). به طوری که مشاهده شده آرایش اجزاء ماده زمینه برون سلولی بر فنوتیپ کاردیومیوسیتها اثر می‌گذارند (۱). احتمالا همکاری بین مسیرهای پیام رسانی که با عواملی چون عوامل تمایزی و رشدی و پروتئینهای ماده زمینه برون سلولی تحریک می‌شود، تعیین کننده تکثیر و تمایز سلولی است (۲۷).

Mahfoudi و همکاران (۲۸) گزارش کردند که ماتریژل سبب کسب مورفولوژیکی تمایزی سلولهای اپیتلیال اندومتریوم می‌گردد. همچنین کشت سلولهای بنیادی بزرگسالان مغز استخوان بر ماتریژل همراه با فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF-4) و فاکتور رشد هپاتوسیتی (HGF)، سبب کسب خصوصیات مورفولوژیک، عملکردی و فنوتیپی هپاتوسیتها می‌گردد (۲۹). به طور مشابه سلولهای بنیادی جنینی میمون و با کشت در حضور ماتریژل ساختارهای شبه غده‌ای بالغ می‌رسازند (۳۰). از طرفی نشان داده شده است که فقدان اینتگرینها (دسته‌ای از گیرنده‌های پروتئینهای ماده زمینه برون سلولی) عمیقا بر تکوین قلب موثر است و نبود اینتگرین β1، سبب مرگ جنین در روز ۵/۵ می‌شود (۳۱، ۳۲، ۳۳). همچنین حذف اینتگرین β1 در سلولهای بنیادی جنینی نشان داد که این گیرنده‌ها در قلب زایی طبیعی مهم هستند (۳۳، ۳۴). نبود اینتگرین β1 سبب تاخیر در تمایز قلب می‌شود و این موضوع با تاخیر در تجلی ژنهای خاص قلبی و پتانسیل عمل نشان داده شد. در مطالعه ما نیز دیده شد که بر هم‌کنش کاردیوژل که حاوی القاء کننده‌های اینتگرینها است واینتگرینهای کاردیومیوسیتها سبب بلوغ سریعتر کاردیومیوسیتها می‌شود.

در مجموع، کاردیومیوسیتهای مشتق از سلولهای بنیادی جنینی کشت یافته بر ماده زمینه برون سلولی سبب اثر بر کاردیومیوسیتها می‌شود. همچنین به نظر می‌آید که خود ماده زمینه‌ای و بعضی از ترکیبات آن در رشد و نمو سلولی موثرند.

References

1. Simpson DG, Terracio L, Terracio M, Price RL, urner DC, Borg TK: Modulation of cardiac myocyte phenotype in vitro by the composition and orientation of the extracellular matrix. J Cell Physiol 1994;161:89-105
2. Thyberg J, Hultgardh-Nilsson A. Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. Cell Tissue Res 1994;276: 263-271
3. Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J: Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. Circ Res 1994; 75: 233-244
4. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J: Gepstein L Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. J Clin Inv 2001;108: 407-414
5. Wobus AM, Guan K, Yang HT, Boheler KR: Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. Methods Mol Biol 2002;185:127-156
6. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK: Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Circ Res 2002; 91: 501-508
7. VanWinkle WB, Snuggs M, Miller JC, Buja LM: Cytoskeletal alterations in cultured cardiomyocytes following exposure to the lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal. Cell Motil Cytoskeleton 1994; 28: 119-134
8. Terracio L, Borg TK: Immunohistochemical

Archive of SID
www.SID.ir

characterization of isolated cultured cardiac myocytes. In: Clark, W.A.; Decker R.S.; Borg , TK, ed. Biology of isolated adult cardiac myocytes. Elsevier; Science Publishing, Inc., NY; 1988; 54-67
9. Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF, Zern MA, Giambrone MA: Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. J Mol Cell Cardiol 1989; 21: 103-13
10. VanWinkle WB, Snuggs MB, Buja LM: Cardiogel: a biosynthetic extracellular matrix for cardiomyocyte culture. In Vitro Cell Dev Biol Anim 1996; 32: 478-85
11. Kleinman HK, Luckenbill-Edds L, Cannon FW, Sephel GC: Use of extracellular matrix components for cell culture. Anal Biochem 1987; 166: 1-13
12. Baharvand H, Matthaei KI: Culture Condition Difference for Establishment of New Embryonic Stem Cell lines From the C57BL/6 and BALB/c Mouse Strains. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2004; 40:76-81
۱۳. حسین بهاورند، مهناز آذرنیا، کاظم پریور، سعید کاظمی‌آشتیانی: خصوصیات ضرباهنگی (کرونوتروپی) سلولهای عضله قلبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی، مجله علمی – پژوهشی کوثر، ۱۳۸۳، در دست چاپ
۱۴. حسین بهاورند، مهناز آذرنیا، کاظم پریور، سعید کاظمی‌آشتیانی: تاثیر مادهٔ زمینه برون سلولی بر فراساختار کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلولهای بنیادی جنینی. مجله علمی – پژوهشی علوم تشریح، ۱۳۸۳، در دست چاپ
15. Smith SC, Reuhl KR, Craig J, McBurney MW: The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation. J Cell Physiol 1987; 131: 74-84
16. Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J: Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers. Differentiation 1991; 48: 173-182
17. Kleppisch T, Wobus AM, Strubing C, Hescheler J: Voltage-dependent L-type Ca channels and a novel type of non-selective cation channel activated by cAMP-dependent phosphorylation in mesoderm-like (MES-1) cells.Cell Signal. 1993; 5(6): 727-734
18. Huynh TV, Chen F, Wetzel GT, Friedman WF, Klitzner TS: Developmental changes in membrane Ca2+ and K+ currents in fetal, neonatal, and adult rabbit ventricular myocytes. Circ Res. 1992; 70(3): 508-515
19. Kilborn MJ, Fedida DA: Study of the developmental changes in outward currents of rat ventricular myocytes. J Physiol. 1990; 430: 37-60
20. Sakmann B, Noma A, Trautwein W: Acetylcholine activation of single muscarinic K+ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart.Nature. 1983; 303: 250-253
21. Trautwein W, Hescheler J: Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G proteins. Annu Rev Physiol. 1990; 52: 257-274
22. Schultz G, Rosenthal W, Hescheler J, Trautwein W. Role of G proteins in calcium channel modulation. Annu Rev Physiol. 1990; 52: 275-292
23.Pelzer D, Cavialie A, McDonal TF, Trautwein W: Calcium channels insingle heart cells. In: Piper HM, Isenberg G, editors. Electrophysiology and contractile function., vol 2. Boca Raton: CRC Press, 1989: 29-73
24. Bick RJ, Snuggs MB, Poindexter BJ, Buja LM, Van Winkle WB: Physical, contractile and calcium handling properties of neonatal cardiac myocytes cultured on different matrices. Cell Adhes Commun 1998; 6: 301-310
25. Merle PL, Feige JJ, Verdetti J: Basic fibroblast growth factor activates calcium channels in neonatal rat cardiomyocytes.J Biol Chem 1995; 270: 17361-67
26. Watt F: The extracellular matrix and cell shape. Trends Biochem Sci 1986; 11: 482-485
27. Boudreau NJ, Jones PL: Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. Biochem J 1999; 339: 481-88
28. Mahfoudi A, Fauconnet S, Bride J, Beck L, Remy-Martin JP, Nicollier M, Adessi GL: Serum-free culture of stromal and functionally polarized epithelial cells of guinea-pig endometrium: a potential model for the study of epithelial-stromal paracrine interactions. Biol Cell 1992; 74: 255-65
29. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu W-S , Verfaillie CM: Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. J Clin Invest 2002; 109: 1291–1302
30. Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP: Role of the extracellular matrix in morphogenesis. Curr Opin Biotechnol 2003; 14: 526-532
31. Fassler, R, Meyer M: Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. Genes Dev 1995; 9: 1896-1908
32. Fassler, R, Georges-Labouesse E, Hirsch E: Genetic analyses of integrin function in mice. Curr Opin Cell Biol 1996; 8: 641-646
33. Fassler R, Rowwedel J, Maltsev V, Bloch W, Lentini S, Kaomei G, Gullberg D, Hescheler J, Addicks K, Wobus AM: Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in absence of integrin. J Cell Sci 1996; 222: 111-116
34. Guan K, Czyz J, Frst DO, Wobus AM: Expression and cellular distribution of 1v integrins in integrin-deficient embryonic stem cell-derived cardiac cells. J Mol Cell Cardiol 2001; 33: 521-532

Archive of SID
www.SID.ir