

# تاثیر فاکتور رشد فیبروبلاستی در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کاردیومیوسیت‌ها

شیوا خضری M.Sc.<sup>\*</sup>، مجتبی رضازاده ولوجردی Ph.D.<sup>\*\*</sup>، حوری سپهری Ph.D.<sup>\*</sup>، حسین بهاروند Ph.D.<sup>\*</sup>

\* دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

\* پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

\* پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

\* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه آناتومی

✉ آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

پست الکترونیک: [info@royaninstitute.org](mailto:info@royaninstitute.org)

## چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۴/۲۶، پذیرش مقاله: ۸۴/۷/۲۶

**\* هدف:** بررسی تاثیر فاکتور رشد فیبروبلاستی بر تمایز کاردیومیوسیت‌های حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی موش و خصوصیات فارماکولوژیکی آنها

**\* مواد و روش‌ها:** تعداد ۸۰۰ سلول بنیادی جنینی موش (RoyanB1) در قطرات آویزان و در پتری دیش کشت شدند. پس از دو روز سلول‌های (Embryonic Stem: ES) در هر قطره جمع شده و تشکیل اجسام شبه جنینی (Embryoid Body: EB) را دادند. به دنبال آن EBها به مدت پنج روز دیگر در ظروف باکتریایی کشت شدند. در دو روز اول، سلول‌ها با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی (basic Fibroblast Growth Factor: bFGF) تیمار شدند. سپس EBها در ظروف ۲۴ خانه کشت شدند. تعداد ضربان در دو گروه کنترل و bFGF هر روز شمارش شد و تاثیر داروهای کروماتروپی ایزوپرنالین و فنیل افرین و کارباکول بر کاردیومیوسیت‌های حاصل در روزهای ۷+۳، ۷+۷، ۷+۱۴ بررسی شد. همچنین بیان ژن‌های خاص قلبی از جمله  $\alpha$ -MHC (Myosin Heavy Chain)،  $\beta$ -MHC، MLC-2V (Myosin Light Chain)، ANF (Atrial Natriuretic Factor)،  $\beta$ -Tubulin،  $\alpha$ -Tubulin،  $\alpha$ -actinin در روز ۷+۱۴ در دو گروه کنترل و bFGF با استفاده از RT-PCR ارزیابی شد. به علاوه ایمونوهیستوشیمی با رنگ آمیزی کاردیومیوسیت‌ها با آنتی‌بادی علیه  $\alpha$ -actinin انجام شد.

**\* یافته‌ها:** نتایج شمارش روزانه نشان داد که EBهای گروه کنترل تعداد ضربان در دقیقه بیشتری نسبت به گروه bFGF دارند. همچنین تست فارماکولوژیکی نشان داد که افزایش تعداد ضربان در دقیقه در پاسخ به ایزوپرنالین و فنیل افرین در مراحل اولیه تکوین (روز ۷+۳) در گروه bFGF نسبت به گروه کنترل بیشتر بود ( $P < 0.0035$  و  $P < 0.019$ ). داروی کارباکول سبب کاهش تعداد ضربان در دقیقه در هر دو گروه شد اما تفاوتی در میزان ضربان هر دو گروه دیده نشد. نتیجه آنالیز RT-PCR نشان داد که ژن‌های  $\beta$ -tubulin،  $\alpha$ -MHC، MLC-2V،  $\beta$ -MHC و ANF در روز ۷+۱۴ بیان شد اما تفاوتی در بیان ژن‌ها در دو گروه کنترل و bFGF در این روز مشاهده نشد و  $\alpha$ -actinin در هیچ گروه بیان نشد همچنین ایمونوهیستوشیمی سازماندهی سارکومریک کاردیومیوسیت‌ها را در هر دو گروه نشان داد ولی تفاوتی در آرایش میوفیبریلی آنها دیده نشد.

**\* نتیجه‌گیری:** از نتایج به دست آمده می‌توان استنباط کرد که bFGF با اینکه بر تجلی یا عملکرد گیرنده‌های  $\alpha$ 1-آدرنژیک و  $\beta$ 1-آدرنژیک در کاردیومیوسیت‌ها موثر است ولی با شرایط موجود به تنهایی در تمایز کاردیومیوسیت‌ها از سلول‌های بنیادی جنینی نقشی ندارد.

**کلیدواژگان:** سلول‌های بنیادی جنینی، تمایز، کاردیومیوسیت‌ها، فاکتور رشد فیبروبلاستی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هفتم، شماره ۳، پاییز ۸۴، صفحات ۱۷۲-۱۷۷

## مقدمه

آن‌ها در محیط آزمایشگاهی مطالعه شده است. سلول‌های مذکور توانایی تمایز به انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های قلبی را دارند. این موضوع در مطالعه تکوین قلب پستانداران بسیار حائز اهمیت است زیرا مدل آزمایشگاهی مناسبی فراهم می‌شود تا ما را در شناسایی فاکتورهای رشد، فاکتورهای نسخه‌برداری و مسیرهای سیگنالی قلب‌زایی برای تکوین کاردیومیوسیت‌ها کمک نماید.

اولین اندام جنینی مشتق از مزودرم، قلب است که بعد از

سلول‌های بنیادی جنینی سلول‌هایی پرتوان با خاصیت نامیرایی و خود تکثیری هستند (۱). این سلول‌ها از توده سلولی داخلی جنین‌های ۳ تا ۵ روزه گرفته شده و روی لایه تغذیه کننده فیبروبلاست جنینی موش کشت می‌شوند. سلول‌های بنیادی جنینی توانایی متمایز شدن به انواع رده‌های سلولی مثل کاردیومیوسیت، عضله اسکلتی، صاف، کندروسیت، نورون و غیره را دارند (۱، ۲، ۳).

ویژگی‌های سلول‌های بنیادی جنین موش و توانایی تمایز و تکثیر

## مواد و روش‌ها

### کشت سلول‌های بنیادی

سلول‌های بنیادی جنینی (RoyanB1) از موش‌های نژاد G57BL/6 روی لایه تغذیه کننده فیبروبلاست جنینی موشی (TGF- $\beta$ ) همراه با فاکتور مهارکننده لوکمیمیایی (LIF) کشت شدند (۱۵). محیط کشت سلول‌های بنیادی عبارت بود از: (Gibco, 10439-024) 15%FCS, (Gibco, 10829-018) Knockout DMEM، ۱۰۰ میکرولیتر  $\beta$  - مکرکاپتوتانول، (Sigma, M-7522)، L2mM - گلوتامین (Sigma, G-5763)، ۰/۱ میلی‌متر اسیدهای آمینه غیر ضروری (Gibco, 11140-035) و فاکتور ممانعت کننده لوکمیمیایی (LIF) (chemicon, ESG) (LIF) 1000iu/ml (1107).

### تمایز سلول‌های بنیادی جنینی (ES)

سلول‌های بنیادی تمایز نیافته از روی لایه تغذیه کننده جدا شدند و تعداد ۸۰۰ سلول بنیادی جنینی در قطرات آویزان و در پتری دیش کشت شدند. در داخل پتری دیش ۱۵ میلی‌لیتر آب بدون یون ریخته شد. پس از دو روز سلول‌های ES در هر قطره جمع شده و تشکیل اجسام شبه جنینی (Embryoid Body: EB) را دادند. به دنبال آن EBها به مدت پنج روز دیگر به صورت سوسپانسیون در ظروف باکتریایی کشت شدند. در دو روز اول کشت در ظروف باکتریایی، سلول‌ها با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF (Invitrogen, 13256-029) تیمار شدند. سپس EBها به صورت منفرد در ظروف کشت سلولی ۲۴ خانه که قبلاً با ژلاتین ۰/۱ درصد (sigma, G-2500) مفروش شده بود کشت شدند. محیط تمایزی استفاده شده Knockout DMEM حاوی ۱۵ درصد FCS خاص ES بود. EBها بعد از چند ساعت به کف ظروف کشت چسبیدند و کاردیومیوسیت‌های دارای ضربان با تمایز خود به خود ظاهر و با میکروسکوپ اینورت فاز کنتراست Nikon مشاهده شدند. همچنین تعداد ضربان در دقیقه به صورت روزانه در دو گروه کنترل و bFGF شمارش شده و میانگین گرفته شد و مراکز ریزی که دارای ضربان بودند شمارش نشدند.

### آزمون دارویی

کاردیومیوسیت‌ها طی روزهای ۷+۳، ۷+۷ و ۷+۱۴ با داروهای ایزوپرنالین (Sigma, I-5879) و فنیل آفرین (Sigma p-6126) و کارباکول (Sigma, G4382) با غلظت ۱۰<sup>-۵</sup> مولار تیمار شدند. ایزوپرنالین آگونیست گیرنده‌های  $\beta$ 1- آدرنرژیک و فنیل آفرین آگونیست گیرنده‌های  $\alpha$ 1- آدرنرژیک و کارباکول آگونیست گیرنده‌های موسکارینی است (۱۶). تعداد ضربان در دقیقه قبل از تیمار با داروها شمارش شده و بعد از اضافه کردن دارو حدود ۳ دقیقه داخل انکوباتور قرار داده شدند سپس دوباره تعداد ضربان در دقیقه شمارش شد تفاضل این دو شمارش نشان دهنده تأثیر دارو روی کاردیومیوسیت‌ها بوده است به علاوه محیط تمایزی knockout

گاسترولاسیون تکامل می‌یابد. به طور کلی اضافه شدن سیگنال‌های تحریکی و مهاری منجر به تولید قلب می‌شود. مطالعات انجام شده نشان داده که تکوین سلول‌های پیش قلبی مزودرمی به سلول‌های قلبی اولیه به وسیله سیگنال‌های تحریکی ترشح شده از اندودرم قدامی تنظیم می‌شود (۴). به علاوه سیگنال‌های مختلف از مناطق جانبی جنین برای تشکیل قلب ضروری است (۵). از جمله فاکتورهایی که در القای تشکیل قلب مه‌داران نقش مهمی ایفا می‌کند (Bone Morphogenetic Protein: BMP2) است که سبب تحریک بیان فاکتورهای نسخه‌برداری NKX2.5 و GATA4 می‌شود (۶).

TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) در تشکیل مزودرم و تکوین قلب در جنین موش نقش دارد (۷). از فاکتورهای دیگر در تشکیل قلب IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) و EPO (Erythropoietin) است که در تکامل قلبی حایز اهمیت است (۸، ۹).

سیگنال‌های FGF (Fibroblast Growth Factor) فعالیت میتوزی و بقای میوسیت‌های جنینی را در مراحل اولیه قلب‌زایی تنظیم می‌کنند به طوری که مهار سیگنال‌های FGF از القای سلول‌های مزودرمی محتوی پیش‌سازهای قلبی ممانعت می‌کند (۱۰، ۱۱).

مطالعه انجام شده روی گورخرماهی (Zebrafish) نشان داد که fgf8 نقش مستقیمی در تکوین سلول‌های پیش‌ساز قلبی دارد به طوری که جهش این فاکتور از شروع بیان نهایی فاکتورهای نسخه‌برداری مثل NKX2.5 و GATA4 جلوگیری می‌کند (۱۲).

bFGF به عنوان عضوی از خانواده FGF در القای مزودرم، تنظیم تمایز و رشد سلولی، چسبندگی، مهاجرت، مرگ سلولی و غیره نقش مهمی ایفاء می‌کند. bFGF به وسیله گیرنده‌های سطح سلولی خاص از خانواده تیروزین کینازی به نام FGFR1 عمل می‌کند که حضور این گیرنده برای تکوین قلبی ضروری است (۱۳).

میوسیت‌های قلبی پرنده‌گان و پستانداران، فعالیت میتوزی خود را در دوره نوزادی به پایان می‌برند و تولید دوباره ماهیچه قلبی در دوره بلوغ بعد از آسیب میوکاردیال روی نمی‌دهد (۱۴). بنابراین شناسایی فاکتورهای رشد محلول و یا فاکتورهای رشد متصل به ماتریکس برون سلولی، فاکتورهای رونویسی و آبشارهای پیام‌رسانی برای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های قلبی برای بهبود درمان بیماری‌های قلبی بر اساس سلول‌های ES بسیار مهم است (۱۰).

در این مطالعه از سلول‌های ES به عنوان مدلی برای بررسی اثر bFGF بر کاردیومیوسیت‌های متمایز شده از آنها استفاده شد و تأثیر bFGF روی تمایز کاردیومیوسیت‌های حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی موش و خصوصیات فارماکولوژیکی آنها بررسی و مشخصات فارماکولوژیکی کاردیومیوسیت‌های متمایز شده در گروه bFGF بررسی شده و با کاردیومیوسیت‌های گروه کنترل مقایسه شد.

جنینی و مشاهده سازماندهی سارکومریک آنها رنگ آمیزی ایمنی به کار برده شد. برای این منظور در روز ۷+۱۴ کاردیومیوسیت‌های دو گروه کنترل و bFGF با پیپت جدا شده و با آنتی‌بادی علیه  $\alpha$ -اکتینین (Sigma, A- 5044) رنگ آمیزی شدند.

#### آزمون آماری

داده‌ها با برنامه SPSS و با روش آماری Mann-Whitney Test آنالیز شدند و به صورت  $\pm$ SEM میانگین (خطای استاندارد) نمایش داده شدند. اختلاف میانگین تعداد ضربان روزانه در دقیقه در گروه کنترل و bFGF با این تست مقایسه و همچنین اختلاف داده‌های قبل و بعد از تیمار با داروها به صورت  $\pm$ SEM میانگین در گروه کنترل و bFGF هم با این تست بررسی شدند.  $P < 0.05$  به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

##### نتایج شمارش روزانه ضربان

سلول‌های بنیادی جنینی بنا به ماهیتشان و پس از ساخت اجسام شبه جنینی به طور خودبه‌خود به کاردیومیوسیت‌های ضربان‌دار تمایز می‌یابند.

نتایج شمارش نشان داد که کاردیومیوسیت‌های گروه کنترل تعداد ضربان بیشتری نسبت به گروه bFGF دارند به طوری که اوج ضربان در گروه کنترل روز ۷+۹ با تعداد ۱۱۷ ضربان در دقیقه و در گروه bFGF روز ۷+۱۱ با تعداد ۹۹ ضربان در دقیقه بود همچنین پایداری تعداد ضربان در دقیقه در طول زمان در گروه کنترل بیشتر از گروه bFGF بود.

(تفاوت دو گروه در روز ۷+۵ با  $P < 0.012$ ، روز ۷+۷ با  $P < 0.002$ ، روز ۷+۹ با  $P < 0.0001$ ، روز ۷+۱۷ با  $P < 0.014$  و روز ۷+۱۹ با  $P < 0.001$  معنی‌دار بود) (نمودار ۱).

DMEM بدون سرم (سرم جایگزین) نیز استفاده شد و تمایز کاردیومیوسیت‌ها در این محیط مورد بررسی قرار گرفت.

#### آنالیز RT-PCR

در روز ۷+۱۴ مناطق ضربانی در دو گروه کنترل و bFGF به وسیله پیپت پاستور جدا شده و بیان ژن‌های خاص قلبی از جمله،  $\alpha$ -MHC،  $\beta$ -MHC، ANF، MLC-2V،  $\beta$ -Tubulin و Oct4 به وسیله RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت که مراحل آن عبارتند از:

۱- استخراج RNA از کاردیومیوسیت‌ها: به منظور جداسازی RNA از سلول‌های ES از کیت RNXTM(PLUS) شرکت سیناژن استفاده شد.  
۲- نسخه‌برداری معکوس: cdNA با کمک پرایمرهای همگام تصادفی و با استفاده از کیت

Revert AidTM H Minus First strand cDNA synthesis (Fermentas, k1632) که دارای آنزیم M-Mulv Reverse transcriptase بود سنتز شد. برای کنترل مثبت و چک کردن واکنش RT از  $\beta$ -Tubulin استفاده شد.

۳- انجام PCR: PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (Reverse) R، (Forward) F ژن‌های ذیل انجام شد. اندازه و دمای ذوب پرایمرها در جدول زیر آمده است (۱۷).

۴- تهیه ژل آگارز: ژل آگارز مصرفی با غلظت ۱/۵ درصد آگارز در بافر TAE (Tris acetate EDTA) تهیه شد.

۵- رنگ افزودنی به نمونه DNA: رنگ بروموفنل یا گزینل سیانول با محصول واکنش PCR مخلوط شد.

۶- الکترو فورز DNA: دستگاه در آمپراژ ۳۰ میلی‌آمپر ولتاژ ۸۰ ولت تنظیم شد.

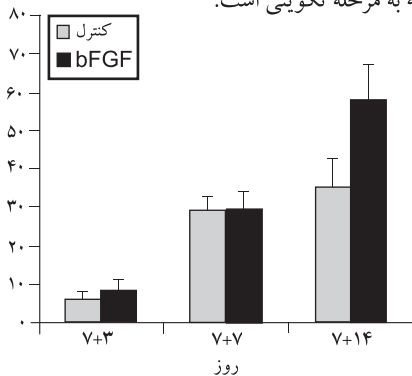
۷- رنگ آمیزی ژل: ژل با رنگ اتیدیوم بروماید (EB) رنگ‌آمیزی و سپس ارزیابی شد.

#### ایمونوهیستوشیمی

برای تایید ماهیت کاردیومیوسیت‌های حاصل از سلول‌های بنیادی

ژنها	اندازه	دمای ذوب
$\alpha$ -MHC CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCC GGAAGAGTGAGGGGGCATCAAGG	bp 301	۶۴ درجه سانتی‌گراد
$\beta$ -MHC TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC GCCAACCAACCTGTCCAAGTTC	bp 205	۶۴ درجه سانتی‌گراد
MLC-2V TGTGGGTCSTGAGGCTGTGGTTTCAG GAAGGCTGACTATGTCCGGGATGC	bp 189	۶۰ درجه سانتی‌گراد
ANF TGATAGATGAAGGCAGGAAGCCGC AGGATTGGAGCCAGTGGACTAGG	bp 203	۶۴ درجه سانتی‌گراد
Oct-4 GGCGTTCTCTTTGAAAAGGTCTTC CATACTCGAACACATTCTCTA	bp 317	۷۰ درجه سانتی‌گراد
$\beta$ -Tubulin GGAACATAGCCGTAACCTGC TCACTGAGCTGAACCTACC	bp 317	۶۰ درجه سانتی‌گراد

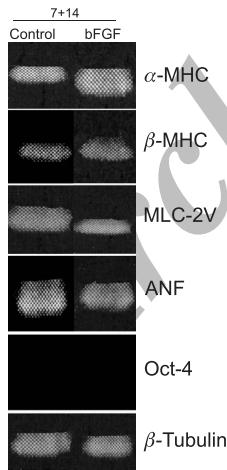
فنیل افرین ( $P < 0.01$ ) سبب افزایش معنی دار تعداد ضربان گروه bFGF نسبت به گروه کنترل در روز ۷+۳ شد (نمودار ۲ و ۳). کاهش ضربان کاردیومیوسیت‌های تیمار شده با کارباکول در تمام روزها در گروه bFGF بیشتر از کنترل بود ولی این تفاوت‌ها معنی دار نبود (نمودار ۴). تاثیر تمام داروها بر کاردیومیوسیت‌های حاصل در دو گروه کنترل و bFGF نشان داد که پاسخ کرونوتروپی با افزایش روند تکوین کاردیومیوسیت‌ها از مرحله ابتدایی (روز ۷+۳) تا مرحله نهایی (روز ۷+۱۴) افزایش معنی داری می‌یابد و به عبارتی پاسخ کاردیومیوسیت‌ها به داروها وابسته به مرحله تکوینی است.



نمودار ۴: مقایسه کاهش ضربان کاردیومیوسیت‌های تیمار شده با کارباکول در دو گروه کنترل و bFGF

#### نتایج آنالیز RT-PCR

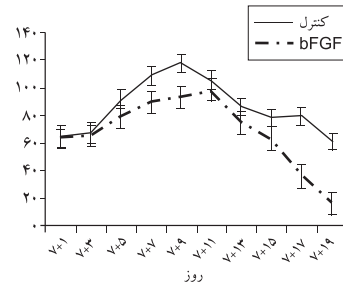
آنالیز RT-PCR بیان ژن‌های  $\alpha$ -MHC،  $\beta$ -MHC، ANF،  $\beta$ -tubulin و MLC-2V را در دو گروه کنترل و bFGF نشان داد و ژن Oct4 در هیچ گروهی مشاهده نشد همچنین بیان ژن‌ها تفاوتی در دو گروه نداشت (شکل ۱).



شکل ۱: بیان ژن‌های خاص قلبی در دو گروه کنترل و bFGF به وسیله RT-PCR

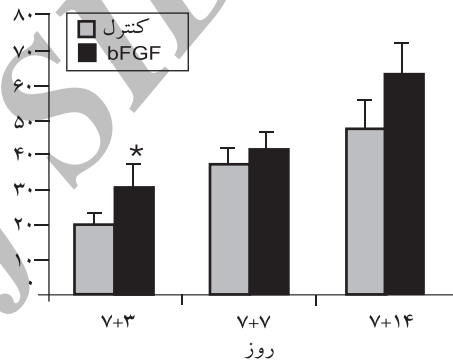
#### نتیجه مطالعات ایمونوهیستوشیمی

با استفاده از ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی علیه  $\alpha$ -اکتینین سازماندهی سارکومریک کاردیومیوسیت‌ها در دو گروه کنترل و

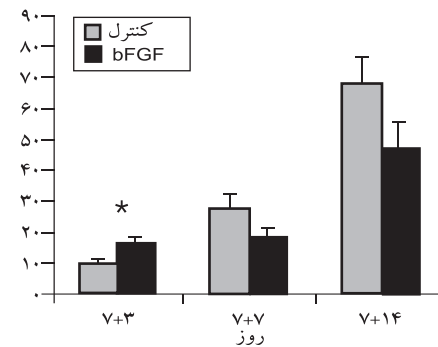


نمودار ۱: مقایسه تعداد ضربان روزانه در دو گروه کنترل و bFGF ( $*P < 0.05$ )

نتیجه کشت EBها در محیط Knockout DMEM بدون سرم (دارای سرم جایگزین) نشان داد که bFGF باعث تمایز EBها به کاردیومیوسیت‌های ضربان دار نمی‌شود و سلول‌های شبه فیبروبلاست، چربی و عصبی تولید می‌شود.



نمودار ۲: مقایسه افزایش ضربان کاردیومیوسیت‌های تیمار شده با ایزوپرنالین در دو گروه کنترل و bFGF ( $*P < 0.05$ )



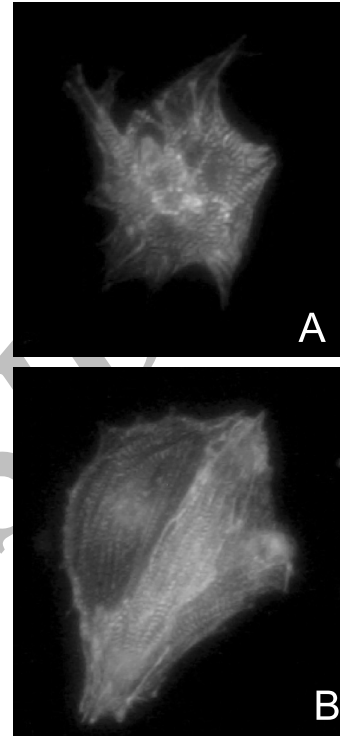
نمودار ۳: مقایسه افزایش ضربان کاردیومیوسیت‌های تیمار شده با فنیل افرین در دو گروه کنترل و bFGF ( $*P < 0.01$ )

#### نتایج مطالعات فارماکولوژیکی

بنا به مطالعه هسلر و همکاران (۱۶) تغییرات تکوینی کاردیومیوسیت‌ها با توجه به طول زمان کشت به سه مرحله تمایزی تقسیم می‌شود: ابتدایی، میانی و نهایی. که به ترتیب شامل روزهای ۷+۱ تا ۷+۴، ۷+۴ تا ۷+۸ و ۷+۸ تا ۷+۹ می‌شود. لذا روزهای ۷+۳، ۷+۷، ۷+۱۴ را به عنوان روزهای شاخص در سه دوره مذکور انتخاب کرده و داروهای مورد نظر به کار برده شد. آزمون دارویی نشان داد به کارگیری ایزوپرنالین ( $P < 0.035$ ) و

جوجه، BMP2 به طور اکتوپیک، سبب افزایش تجلی ژن *fgf8* می‌شود. بنابراین *fgf8* به عنوان فرودست BMP2 عمل می‌کند (۱۴). به طور مشابه فقدان BMP4 در جنین‌های موش باعث عدم بیان *fgf8* می‌شود و جهش حذفی ژن *fgf8* در موش باعث ایجاد تفران راست-چپ غیرعادی و سایر ناهنجاری‌های قلبی می‌شود. در مزودرم خلفی، همراهی BMP2 و FGF4 می‌تواند تشکیل قلب را تحریک کند به طوری که هیچ کدام از این فاکتورها به تنهایی نمی‌توانند چنین کاری انجام دهند. بنابراین سیگنال‌های BMP، FGF، برای مشتق شدن سلول‌های مزودرمی قلبی تمایز یافته با هم همکاری می‌کنند (۱۸، ۱۹). در مطالعه ما هم شاید علت بی‌تاثیر بودن bFGF بر تمایز کاردیومیوسیت‌ها در محیط آزمایشگاهی این باشد که به تنهایی نقشی در تمایز ندارد و باید همراه فاکتورهای دیگر استفاده شود. علاوه بر این گزارشات، تمایز سلول‌های p19 به سلول‌های قلبی و اسکلتی در حضور FGF و غلظت مناسب اسید رتینوئیک هم مطالعه شده است. مشاهدات نشان می‌دهد که (acidic Fibroblast Growth Factor: aFGF) خارج‌جی، ژن  $\alpha$ -MHC قلبی را با القای BMP4 و GATA4 فعال می‌کند و باعث تمایز قلبی می‌شود اما برخلاف bFGF، bFGF aFGF خارج‌جی بیان *noggin* (آنتاگونیست BMP4) را افزایش داده و بیان GATA4 را مهار می‌کند و در کل باعث تمایز ماهیچه اسکلتی می‌شود (۲۰). نتیجه تحقیق ما نیز مشابه این گزارش بود به طوری که bFGF تمایز ماهیچه اسکلتی را بیشتر کرد (داده‌ها منتشر نشده است) ولی اثر فزاینده‌ای بر تمایز سلول‌های قلبی نداشت. مطالعات انجام شده در *in vivo* روی کاردیومیوسیت‌های موشی نشان می‌دهد که این سلول‌ها انواع گیرنده‌ها از جمله  $\alpha 1$ ،  $\beta 1$  و  $\beta 2$ -آدرنوسپتورها و گیرنده‌های موسکاریتی را بیان می‌کنند (۲۱). نتایج ما هم نشان داد که کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی این گیرنده‌ها را بیان می‌کنند به طوری که پاسخ این سلول‌ها به ایزوپرنالین و فنیل افرین در مرحله ابتدایی تکوین (روز ۳+۷) در گروه bFGF بیشتر از گروه کنترل بود بنابراین bFGF تجلی یا عملکرد گیرنده‌های  $\alpha 1$ ،  $\beta 1$ -آدرنورژیک را تسریع می‌کند. در کاردیومیوسیت‌های متمایز شده از ES شکل‌های مختلف پتانسیل عمل با بیان انواع کانال‌های یونی هماهنگ است (۲۲). کاردیومیوسیت‌های مراحل اولیه تمایز، کانال‌های  $Ca^{2+}$  نوع L وابسته به ولتاژ و کانال‌های  $K^+$  را بیان می‌کنند. در کاردیومیوسیت‌های مراحل میانی، کانال‌های  $Na^+$  و  $Ca^{2+}$  و  $K^+$  تولید می‌شود. در مرحله نهایی تمایز کانال‌های  $Ca^{2+}$  سه برابر مرحله اولیه تمایز بیان می‌شود. به علاوه انواع کانال‌های  $K^+$  و کانال‌های  $Na^+$  هم در این مرحله بیشتر می‌شوند (۱۶). کانال‌های  $Ca^{2+}$  نوع L وابسته به ولتاژ نقش مهمی در تولید ضربان در کاردیومیوسیت‌ها و تولید پتانسیل عمل سینوسی گرهی و دهلیزی بطنی ایفا می‌کنند به طوری که مهارکننده‌های کانال‌های کلسیمی اثرات کرونوتروپیک منفی روی کاردیومیوسیت‌ها ایجاد می‌کنند (۲۳). کانال‌های  $Na^+$  در مراحل اولیه تمایز (۲ تا ۷+۳) دیده نمی‌شوند اما در مدت تکوین ظاهر می‌شوند. تراکم این کانال‌ها با پیشرفت تکوین کاردیومیوسیت‌ها بیشتر می‌شود (۱۶). افزایش پاسخ کاردیومیوسیت‌ها به داروها با پیشرفت تکوین از روز ۳+۷ تا ۱۴+۷ به دلیل افزایش کانال‌های یونی است.

bFGF مشاهده شد. در سلول‌های ماهیچه‌ای  $\alpha$ -اکتینین به Z-دیسک‌ها متصل شده و سارکومرهای ماهیچه‌ای مشخص می‌شود. لازم به ذکر است که تفاوتی در آرایش میوفیبریلی دو گروه کنترل و bFGF مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۲: رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی کاردیومیوسیت‌ها با آنتی‌بادی علیه در دو گروه (A) کنترل و (B) bFGF (مشاهده نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)

### بحث

در این مطالعه سلول‌های بنیادی جنینی به طور خود به خودی به کاردیومیوسیت‌های ضربان‌دار متمایز شدند. نتیجه آنالیزهای انجام شده نشان داد که پاسخ کاردیومیوسیت‌های گروه bFGF به داروها بیشتر از گروه کنترل بود ولی تعداد ضربان در دقیقه در گروه کنترل بیشتر از bFGF بود. افزایش ضربان کاردیومیوسیت‌های تیمار شده با فنیل افرین و ایزوپرنالین و کاهش ضربان این سلول‌ها در پاسخ به کارباکول در هر دو گروه با پیشرفت تکوین، بیشتر شد. آنالیز RT-PCR نیز هیچ تفاوتی در بیان ژن‌های خاص قلبی در دو گروه کنترل و bFGF نشان نداد. از جمله فاکتورهای رشدی که در *in vivo* بر تشکیل قلب مهره‌داران تاثیر می‌گذارد، FGF است. مطالعه انجام شده روی جوجه نشان می‌دهد که سیگنال‌های FGF رشد میوسیت‌های قلبی را در مرحله توبولار تنظیم می‌کند و تخریب گیرنده‌های FGF، تکثیر و بقا قلب جنینی جوجه را در این مرحله متوقف و القا سلول‌های مزودرمی محتوی پیش‌سازهای میوسیتی را در هفته اول تکوین جنینی مهار می‌کند اما بعد از هفته دوم چنین تاثیری ندارد (۱۴). در مطالعه ما هم bFGF تاثیری بر تمایز کاردیومیوسیت‌ها از سلول‌های بنیادی جنینی در مراحل انتهایی تکوین (روز ۳+۷) نداشت. گزارشات نشان می‌دهد که در جنین‌های



## نتیجه گیری

به طور کلی از مطالعات انجام شده چنین به نظر می‌رسد که bFGF با اینکه در محیط *in vivo* سبب القا مزودرم قلب‌زا و تکوین قلب می‌شود ولی در محیط آزمایشگاهی به تنهایی چنین نقشی را ندارد و تعداد ضربان کاردیومیوسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی افزایش فزاینده‌ای نمی‌یابد ولی تجلی گیرنده‌های  $\beta 1$ ,  $\alpha 1$  آدرنرژیک یا عملکرد آنها در ابتدای تکوین (V+3) بیشتر می‌شود، به طوری که به

کارگیری ایزوپرنالین و فنیل‌افرین در این روز سبب افزایش معنی‌دار تعداد ضربان در گروه bFGF نسبت به گروه کنترل می‌شود.

## تقدیر و تشکر

مقاله حاضر، حاصل طرح تحقیقاتی مصوب شورای علمی پژوهشکده رویان (کد: ۱۳۷-۱-۲) است که نویسندگان بدین وسیله از حمایت‌های مسئولین محترم پژوهشکده رویان تشکر می‌نمایند.



## References

1. Gorba T, Allsopp TE: Pharmacological potential of embryonic stem cells. *Pharmacol Res*. 2003; 47: 269-278
2. Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292: 154-156
3. Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78: 7634-7638
4. Montgomery MO, Litvin J, Gonzalez-Sanchez A, Bader D: Staging of commitment and differentiation of avian cardiac myocytes. *Dev Biol*. 1994; 164: 63-71
5. Schultheiss TM, Xydas S, Lassar AB: Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development*. 1995; 121: 4203-4214
6. Orkin SH: GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*. 1992; 80: 575-581
7. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Pucaat M: Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J*. 2002; 16: 1558-1566
8. Fishman MC, Chien KR: Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development*. 1997; 124: 2099-2117
9. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML: Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development*. 1999; 126: 3597-3605
10. Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J: Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 278-291
11. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N: Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 11307-11312
12. Reifers F, Walsh EC, Leger S, Stainier DY, Brand M: Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar). *Develop* 2000; 127: 225-235
13. Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, Cattini PA: Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res*. 2003; 57: 8-19
14. Mima T, Ueno H, Fischman DA, Williams LT, Mikawa T: Fibroblast growth factor receptor is required for *in vivo* cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 467-471
15. Baharvand H, Matthaehi 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
16. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K: Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 1997; 36: 149-162
17. Fassler R, Rohwedel J, Maltsev V, Bloch W, Lentini S, Guan K, Gullberg D, Hescheler J, Addicks K, Wobus AM: Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *J Cell Sci* 1996; 109: 2989-2999
18. Brand T: Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 2003; 258: 1-19
19. Lough J, Barron M, Brogley M, Sugi Y, Bolender DL, Zhu X: Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precordial embryonic mesoderm. *Dev Biol* 1996; 178: 198-202
20. Hidai C, Masako O, Ikeda H, Nagashima H, Matsuoka R, Quertermous T, Kasanuki H, Kokubun S, Kawana M: FGF-1 enhanced cardiogenesis in differentiating embryonal carcinoma cell cultures, which was opposite to the effect of FGF-2. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 421: 5-35
21. Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, Suzuki Y, Umezawa A, Ogawa S: Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 2002; 22; 105: 380-386
22. kleppish T, Wobus AM, Hescheler J: Voltage-dependend L-type  $Ca^{2+}$  channels and a novel type of non selective cation channel activated by cAMP-dependend phosphorylation in mesoderm-like cells. *cell signal* 1993; 5: 727-734
23. 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  $Ca^{2+}$  channel blockers. *Different* 1991; 48: 173-182

