

بررسی بیان ژن‌های اختصاصی کاردیومیوسیت‌های اولیه در اجسام جنینی سیستم قلبی-عروقی

نویسنده: اکرم سادات طباطبائی پناه

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی - واحد تهران شرق، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: اکرم سادات طباطبائی پناه E-mail: tabatabaeipanah@gmail.com

چکیده

مقدمه و هدف: سلول‌های بنیادی جنینی انسانی (hESC) در محیط آزمایشگاهی می‌توانند به کاردیومیوسیت‌های ضربان دار تبدیل شده و مدلی را به وجود آورند که بتوان مراحل اولیه تکاملی این سیستم را بررسی نمود. زمانی که این سلول‌ها از لایه مغذی خود جدا می‌شوند، hESC ها اجسام جنینی (EB) را به وجود می‌آورند که پس از کشت، نواحی از سلول‌های ضربان دار را به وجود می‌آورند. هدف از انجام این تحقیق، بررسی و مطالعه زمان بیان ژن‌های قلبی در طی ایجاد قلب است.

مواد و روش‌ها: پس از کشت سلول‌های بنیادی، استخراج mRNA کاردیومیوسیت‌های اولیه در زمان‌های مختلف پس از تمایز انجام شد. بیان ژن‌های اختصاصی کاردیومیوسیت‌ها به نام OCT-4, CD-34, Brachyury, α -cardiac actin, FLK1 (Vegfr-2/KDR), ANF, MLC-2a و MLC-2v در EB انسانی (hEB) از طریق RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: بیان ژن‌های CD-34 و Brachyury در EB از روز ۲۱ افزایش می‌یابد. بیان ژن OCT-4 در EB ۵ روزه مشاهده شد. بیان ژن α -cardiac actin از روز ۱۰ افزایش می‌یابد. بیان ژن FLK1 (Vegfr-2/KDR) برای اولین بار در EB ۱۰ روزه مشاهده گردید و در روز ۱۴ به شدت افزایش یافت. افزایش بیان ژن MLC-2a و MLC-2v از روز ۲۰ و ژن ANF از روز ۲۵ در EB مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی جنینی انسانی ابزاری مفید جهت بررسی تکامل و عملکرد سیستم قلبی-عروقی هستند.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی جنینی انسان، اجسام جنینی، کاردیومیوسیت‌ها.

دانشور

پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و نهم - شماره ۱۳۱
آبان ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۱

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۰۷/۱۹

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۲۶

مقدمه

بیان ژن قلبی در EB تمایز یافته با استفاده از سلول‌های ES موشی به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از سلول‌های ES، mRNA ژن‌های اختصاصی قلب را به‌صورت یک فرایند تکاملی کنترل شده بیان می‌کنند. اطلاعات کمی در مورد ژن‌ها و پیام‌های مولکولی دخیل در تکامل قلب جنینی انسانی موجود است (۱۷، ۲۲).

عدم توانایی قلب در پمپ کافی خون جهت حفظ عملکردهای فیزیولوژیکی باعث ایجاد نارسایی قلبی که یکی از معمول‌ترین بیماری‌های قلبی-عروقی در جهان است، می‌گردد. بیماری قلبی به‌وسیله کاهش عملکرد کاردیومیوسیت‌ها به وجود آمده که باعث نارسایی قلبی می‌گردد. از آنجاکه کاردیومیوسیت‌های بالغ قابلیت بازتولید ندارند، تنها درمان مؤثر بیماری که دچار نارسایی قلبی شدید هستند پیوند عضو است.

مطالعات حیوانی در دهه گذشته باعث به وجود آمدن شواهد زیادی در رابطه با پیوند کاردیومیوسیت‌های جداسازی شده یا به‌عبارت‌دیگر کاردیومیوپلاستی^۱ گردید که می‌تواند یک راهکار جایگزین برای درمان نارسایی شدید قلبی باشد. اگرچه بسیاری از مطالعات حیوانی پیوند موفق میوسیت‌های قلبی به قلب بالغ را نشان می‌دهند (۳، ۱۳، ۱۴، ۱۹)، فاکتور محدود کننده درمان بیماری‌های قلبی-عروقی، تعداد ناکافی سلول‌های منتقل‌شونده است. به علت وجود مسائل اخلاقی، درمان نارسایی قلبی در انسان‌ها به‌وسیله کاردیومیوپلاستی امکان‌پذیر نیست. بنابراین در سال‌های گذشته بسیاری از تلاش‌ها در جهت ایجاد راهکارهای تمایز کاردیومیوسیت‌های اولیه از سلول‌های بنیادی جنینی و انتخاب رده سلولی متمرکز شده است (۲۴).

در طی جنین‌زایی، اولین سیستمی که تشکیل می‌گردد سیستم قلبی-عروقی است که این فرایند به‌وسیله میانکنش با سلول‌های هایپوبلاستیک اندودرم اولیه آغاز می‌گردد (۹). سلول‌های بنیادی جنینی (ES) جدا شده از توده سلولی داخلی^۱ بلاستوسیست‌ها می‌توانند به‌عنوان لایه سلولی زایای مداوم مورد استفاده قرار بگیرند (۴، ۲۰).

سلول‌های ES قابلیت ساخته شدن مجدد خود را به مدت طولانی حفظ می‌کنند و ظرفیت تشکیل بافت‌های مختلف را دارند (۴، ۲۰). سلول‌های ES موشی، مدلی را جهت بررسی مراحل اولیه تکامل قلب به وجود آورده‌اند (۵، ۸، ۱۶) و مطالعات اخیر این مطلب را در مورد سلول‌های ES های انسانی نیز نشان داده‌اند (۷، ۱۱، ۱۲، ۱۵، ۲۱). برداشت سلول‌های متمایز نشده از لایه مغزی و کشت آن‌ها در سوسپانسیون باعث تشکیل اجسامی جنین مانند می‌شوند که اجسام جنینی (EB) نامیده می‌شوند (۱۰) و ممکن است به‌طور خود به خودی به سلول‌هایی با ویژگی‌های کاردیومیوسیتی متمایز شوند.

این سلول‌ها زمانی که در پلیت کشت قرار می‌گیرند، ممکن است به‌طور خود به خودی نواحی ضربان دار ایجاد کنند (۷، ۱۲، ۲۱) که این نواحی دارای سلول‌هایی هستند که ویژگی‌های ساختاری و عملکردی مراحل ابتدایی کاردیومیوسیت‌ها را دارند (۱۲). تمایز بیشتر کاردیومیوسیت‌ها از سلول‌های hES ممکن است از طریق کاهش حجم EB کشت شده (۲۱) یا به‌وسیله تیمار سلول‌ها با ترکیب ۵-آزا-دوکسی سائیدین بوجود آید (۲۱). بعلاوه، تمایز کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از سلول‌های hES از طریق کشت هم‌زمان با سلول‌های اندودرم نیز امکان‌پذیر است (۶، ۱۵، ۲۳). چنین سیستم کشت هم‌زمانی نیازی به تشکیل EB جهت تولید کاردیومیوسیت‌ها ندارد.

¹. Cardiomyoplasty

¹. Inner cell mass

مواد و روش‌ها

کشت سلول

پس از گذشت این زمان میکروتیوب بلافاصله در ظرف یخ قرار گرفت تا دوباره حالت پیچ‌خوردگی در mRNA برقرار نشود.

RT-RCR

بیان ژن *Alpha-cardiac Brachyury, OCT-4 CD-34* و همچنین ژن گلیسر آلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) ارزیابی گردید. نحوه انجام PCR با توجه به مطالعات قبلی در این مطالعه صورت گرفت (۶). توالی و غلظت پرایمرها (تکاپو زیست، ایران) در جدول ۱ ارائه شده است.

غلظت‌های مورد استفاده در این مطالعه عبارت بودند از: بافر PCR (10 x)، $MgCl_2$ (25 mM)، dNTP (10 mM)، آنزیم Taq polymerase (5 U/μl) (که همگی از شرکت Roche, Germany بودند).

مراحل PCR به شکل زیر انجام شد: $95^{\circ}C$ به مدت ۲ دقیقه (۱ چرخه)، $95^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال اختصاصی هر پرایمر (جدول ۱) به مدت ۱ دقیقه، $72^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه (۴۰ چرخه) و $72^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه (۱ چرخه). همه نمونه‌ها با *GAPDH* مقایسه گردیدند.

پس از انجام PCR نمونه‌ها به روی ژل آگارز ۲٪ برده شدند و نتیجه مورد بررسی قرار گرفت. روش ارزیابی در این مطالعه به صورت نیمه کمی بود به این ترتیب که عکس‌های حاصل از این ژل‌ها را پس از اسکن در کامپیوتر با نرم‌افزار Lab works مورد ارزیابی قرار داده و بر اساس شدت باند حاصل از ژن‌ها عدد نسبی به دست آمد.

سلول‌های بنیادی شمارش و درصد حیات آن‌ها به روش *tripan blue exclusion* مشخص شد. سپس در محیط کشت DMEM حاوی ۲۰٪ FBS کشت داده شده و تکثیر یافتند. اجسام جنینی در سوسپانسیون به مدت یک هفته رشد داده شده و سپس به پلیت های ۲۴ خانه پوشیده شده با ژلاتین منتقل شدند، به طوری که هر جسم جنینی در یک خانه قرار گرفت. هر جسم جنینی به طور متوسط دارای ۱۰۰۰۰ سلول بود.

تعیین نواحی ضربان دار
پلیت ها روزانه توسط میکروسکوپ بررسی و نواحی ضربان دار خودبه‌خودی EB تعیین شد.

استخراج mRNA

استخراج mRNA کاردیومیوسیت‌های اولیه در اجسام جنینی رشد یافته در سوسپانسیون در زمان‌های مختلف با استفاده از کیت استخراج mRNA (Invitrogen, California, USA) انجام گرفت.

ساخت cDNA از روی mRNA استخراج شده

تولید cDNA با توجه به نحوه دستورالعمل کیت (Invitrogen, California, USA) با استفاده از پرایمرهای الگو- dT انجام شد. ابتدا با توجه به میزان جذب mRNA از هر نمونه، مقداری از mRNA برداشته می‌شود که حاوی ۱ میکروگرم از mRNA باشد. این حجم به یک میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری انتقال داده شد و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید. سپس میکروتیوب حاوی mRNA در دستگاه ترموسایکلر به مدت ۲/۵ تا ۳ دقیقه در حرارت $90^{\circ}C$ قرار گرفت. این کار باعث می‌شود تا پیچ‌خوردگی‌های mRNA باز شود.

جدول ۱. غلظت و توالی پرایمرهای مورد استفاده

ژن	نوع پرایمر	دمای اتصال پرایمر	غلظت پرایمر	توالی پرایمر
<i>CD-34</i>	Forward	۶۰°C	(10 pmol/ul)	5'CATCACAGAAACGACAGTCAA-3'
	Reverse		(10 pmol/ul)	5'ACTCCGCACAGCTGGAGG-3'
<i>OCT-4</i>	Forward	۵۹°C	(10 pmol/ul)	5'TAGGTGAGCCGCTTTCCAC3'
	Reverse		(10 pmol/ul)	5'GCTTAGCCAGGTTGAGGAT3'
<i>Brachyury</i>	Forward	۶۰°C	(10 pmol/ul)	5'GCTTCAAGGAGCTAACTAACGAG 3'
	Reverse		(10 pmol/ul)	5'CCAGCAAGAAAGAGTACATGGC 3'
<i>Alpha-cardiac actin</i>	Forward	۶۰°C	(10 pmol/ul)	5'GCCTTCCTCATTAAAGCTC3'
	Reverse		(10 pmol/ul)	5'AACACCACTGCTCTAGCCACG3'
<i>FLK1 Vegfr-2/KDR</i>	Forward	۵۶°C	(10 pmol/ul)	5'TCTCAATGTGGTCAACGTTCTAGG3'
	Reverse		(10 pmol/ul)	5'CTTCCCTCAGGCGACTGC3'
ANF	Forward	۶۱°C	(10 pmol/ul)	5'GAACCAGAGGGGAGAGACAGA3'
	Reverse		(10 pmol/ul)	5'CCCTCAGCTTGCTTTTATAGGAG3'
MLC- 2a	Forward	۵۹°C	(10 pmol/ul)	5'GAGGAGAATGGCCAGCAGGAA3'
	Reverse		(10 pmol/ul)	5'CGAACATCTGCTCCACCTCA3'
MLC-2v	Forward	۵۸/۵°C	(10 pmol/ul)	5'GCGCCAACCTCAACGTTCT3'
	Reverse		(10 pmol/ul)	5'GTGATGATGTGCACCCAGTTC3'
<i>GAPDH</i>	Forward	۶۰°C	(10 pmol/ul)	5'CATGACCAAGTCCATGCCATCACT 3'
	Reverse		(10 pmol/ul)	5'TGAGGTCCCCACCCTGTTGCTGTA 3'

نتایج

بیان *Alpha-cardiac actin*, *Brachyury*, *CD-34*, *OCT-4* در *MLC-2v*, *MLC-2a*, *ANF*, *FLK1 Vegfr-2/KDR* کاردیومیوسیت‌های اولیه در اجسام جنینی رشد یافته در سوسپانسیون در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. mRNA از هر جسم جنینی جداسازی گردید و به دنبال آن RT-PCR انجام گرفت و با ژن *GAPDH* از همان نمونه کنترل گردید.

نتایج نشان داد که بیان اولیه *CD-34* در اجسام جنینی ۷ روزه مشاهده گردید که به شدت در روز ۲۱ افزایش یافت. بیان اولیه و شدت بیان *OCT-4* در اجسام جنینی ۵ روزه مشاهده گردید که به شدت در روز ۳۰ کاهش یافت. همچنین بیان اولیه *Brachyury* در اجسام جنینی ۱ روزه مشاهده گردید که به شدت در روز ۲۱ افزایش یافت. بیان اولیه *FLK1 (Vegfr-2/KD)* در اجسام جنینی ۴ روزه مشاهده گردید که به شدت در روز ۱۴ افزایش یافت. بیان اولیه *Alpha-cardiac actin* در اجسام جنینی ۲ روزه مشاهده گردید که به شدت در روز ۱۰ افزایش یافت. بیان اولیه *MLC-2a* در اجسام جنینی ۱ روزه مشاهده گردید که به شدت در روز ۱۵ افزایش یافت. بیان اولیه *MLC-2v* در اجسام جنینی ۳ روزه مشاهده

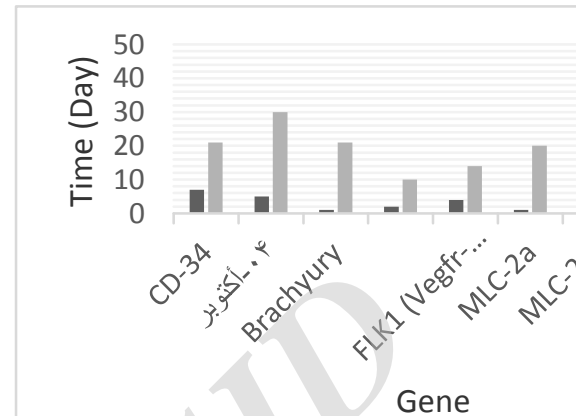
مشاهده روزانه وجود ضربان در اجسام جنینی نشان داد که یک روز پس از کشت، ۴٪ از آن‌ها دارای ضربان خود به خودی بودند. بیشتر اجسام جنینی پس از گذشت ۱۷ روز ضربان دار شدند. ضربان در برخی از اجسام جنینی از روز ۲۸ آغاز گردید. نواحی ضربان دار در ۵۰-۲۵٪ از اجسام جنینی مشاهده گردید. درصد نواحی ضربان دار در اجسام جنینی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی که پس از ذوب شدن بیشتر از ۱۰ بار پاساژ داده شده بودند نسبت به حدود ۱۰٪ در چند پاساژ اولیه افزایش نشان داد. نواحی ضربان دار حدود ۱/۱-۰/۱ mm قطر داشته و در حاشیه‌ها قرار گرفته بودند. نواحی ضربان دار در محیط کشت به شدت تا ۴ ماه و به میزان 10 ± 10 ضربان در دقیقه ادامه یافت اما این نواحی رشد بیشتری نداشتند. گاهی اوقات رشد بیش از حد سلول‌های دیگر که از جسم جنینی متمایز شده‌اند با ضربان این نواحی تداخل می‌کنند. به دلیل ایجاد شدن توانایی در تشخیص نواحی ضربان دار با گذشت زمان، این نواحی به طور مکانیکی هر ۱۴-۷ روز جداسازی شده و دوباره در پلیت‌ها قرار داده شدند.

استفاده از سلول‌های hES، میانگینی از ۲۱/۵ درصد از EBها، نواحی انقباضی را به وجود می‌آورند. این موضوع نشان می‌دهد که کشت‌های قدیمی که بیشتر از ده پاساژ پس از ذوب شدن رشد می‌کنند و همچنین میزان کم EB های کم پلیت شده با درصد بالای نواحی ضربان دار درون EB در ارتباط است. در این مطالعه پس از ۷ روز کشت در سوسپانسیون، EB ها به‌طور جداگانه بر روی دیش‌های کشت پوشیده شده با ژلاتین قرار داده شدند. یک تا هفت ناحیه ضربان دار از روز ۸ تا ۲۱ کشت به وجود آمد. این نواحی با شدت ضربان خود را در کشت تا پس از ۴ ماه (طولانی‌ترین مدت مورد مطالعه) به‌طور متوسط 99 ± 8 ضربان در دقیقه ادامه دادند.

با استفاده از RT-PCR و تشخیص مورفولوژیکی بافت ضربان‌دار، سلول‌های ضربان دار خودبه‌خودی ویژگی‌هایی شبیه به کاردیومیوسیت‌هایی که قبلاً از سلول‌های ES موشی به‌دست‌آمده بود، نشان دادند. بعلاوه این مطالعه الگوی بیان ژن‌های خاص کاردیومیوسیتی در EB تولیدشده نشان داد. نتایج ما نشان داد که سلول‌های مشتق شده از نواحی ضربان‌دار hEB پروتئین‌های درون‌سلولی قلبی را بیان کرده و ساختاری سارکومری دارد. سلول‌های منفرد و سلول‌های شبه کاردیومیوسیتی در بخش‌های نواحی ضربان‌دار هیستولوژی شبیه به کاردیومیوسیت‌ها را نشان داد. هسته‌های گرد یا بیضی، عموماً دو هسته‌ای در مرکز قرار گرفته بودند. سلول‌های جداشده ساختار سلولی کاردیومیوسیتی ظاهری دوکی شکل، گرد، سه گوشه یا چند هسته‌ای داشته که شبیه به کاردیومیوسیت‌های جنین‌های موشی، میوکاردیوم بالغ موش و EB ضربان‌دار موشی بودند.

نواحی ضربان دار مشتق شده از سلول‌های hES ژن‌های متعدد اختصاصی کاردیومیوسیت‌ها را بیان کرده که این ژن‌ها تکامل کاردیومیوسیت‌ها را از سلول‌های پیش‌ساز قلبی ابتدایی تا سلول‌های کاملاً تمایز یافته، باعث می‌شوند.

گردید که به‌شدت در روز ۴۵ افزایش یافت. همچنین بیان اولیه ANF در اجسام جنینی ۱ روزه مشاهده گردید که به‌شدت در روز ۲۰ افزایش یافت (شکل ۱).



شکل ۱. بیان OCT-4, CD-34, Brachyury, CD-34, OCT-4, ANF, FLK1 Vegfr-2/KDR, Alpha-cardiac actin, Brachyury در کاردیومیوسیت‌های اولیه در اجسام جنینی رشد یافته در سوسپانسیون در زمان‌های مختلف

بحث

درصد نواحی ضربان دار در اجسام جنینی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی که پس از ذوب شدن بیشتر از ۱۰ بار پاساژ داده‌شده بودند نسبت به حدود ۱۰٪ در چند پاساژ اولیه افزایش نشان داد. از آنجاکه سلول‌های بنیادی جنینی انسانی نسبت به ترکیبات محیط کشت حساس بوده و نسبتاً قدرت زیست خود را پس از انجماد از دست می‌دهند، آغاز دیر هنگام ضربان احتمالاً به علت بازیابی آهسته ویژگی‌های فیزیولوژیکی سلول‌ها پس از ذوب شدن می‌باشد.

استفاده از قابلیت‌های عملکردی کاردیومیوسیت‌های مشتق شده از سلول‌های hES در گذشته مورد مطالعه قرار گرفته است. پتانسیل استفاده درمانی از این کاردیومیوسیت‌ها، زیاد بوده که از جمله می‌توان به استفاده پیوندی از آن‌ها جهت بهبود یا درمان نارسائی میوکاردیال اشاره نمود. این سلول‌ها ابزار جدیدی را جهت کشف تمایز کاردیومیوسیت‌ها و ژن‌ها و فاکتورهای دخیل در این فرایند به وجود می‌آورند.

به‌عنوان یک مارکر زوددهنگام و مفید برای کاردیومیست‌ها شناخته می‌شود (۱۹). این ژن یک مارکر سلول‌های غیر تمایز یافته است و این مسئله، ناپدید شدن سلول‌های غیر تمایز یافته را به‌عنوان ادامه فرایند تمایز نشان می‌دهد. درصد مارکر تمایز یافته را به‌عنوان ادامه فرایند تمایز نشان می‌دهد. درصد مارکر *OCT-4* با ادامه رشد محیط کشت تغییری نداشت.

بیان اولیه *Brachyury* در اجسام جنینی ۱ روزه مشاهده گردید که به‌شدت در روز ۲۱ افزایش یافت. *Brachyury*، مارکری برای تشخیص تمایز ضروری است که در گاسترولاسیون بیان می‌شود و در مراحل بعدی در نوتوکورد مشاهده می‌گردد. این ژن همان‌طور که تمایز پیش می‌رود به‌عنوان یک مارکر مزودرمی بیانش در موش افزایش می‌یابد. ژن *Brachyury* به‌طور کلی به‌عنوان یک مارکر شکل‌گیری مزودرم اولیه شناخته می‌شود که به شکل ناپایدار در مزودرم در حال پیدایش و مزودرم اولیه در حال مهاجرت بیان می‌گردد (۲۱). به‌طور کلی نتایج ما نشان داد که *Brachyury* مارکری است که در EB ۲۱ روزه، بیشترین افزایش بیان را نشان می‌دهد. بررسی‌های محققین دیگر افزایش بیان این ژن را در روز ۲۱ نشان داد که کاملاً با نتایج این مطالعه منطبق است.

FLK1 (Vegfr-2/KDR) به‌عنوان یک مارکر سلولی برای سلول‌های اندوتلیال سیستم عروقی و پیش ساز آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیان این ژن نقش مهمی در نمو عروقی جنین‌های موش بازی می‌کند. *FLK1 (Vegfr-2/KDR)* در سلول‌های hES تمایز نیافته بیان می‌شود و خیلی آهسته در طی تمایز، افزایش پیدا می‌کند. این ژن افزایش بیان را در روز ۱۴ نشان داد. نتایج سایر محققین نشان می‌دهد که ژن *FLK1 (Vegfr-2/KDR)* در روز ۱، ۲۵ درصد، در روز ۷، ۸۰ درصد و در روز ۲۱، ۱۰۰ درصد افزایش بیان داشته است (۲۱) که به نتایج ما نزدیک است.

بیان اولیه *Alpha-cardiac actin* در اجسام جنینی ۲ روزه مشاهده گردید که به‌شدت در روز ۱۰ افزایش یافت.

ایجاد سیستم تمایزی کاردیومیوسیتی مشتق شده از hES می‌تواند به‌عنوان یک ابزار بالقوه جدید برای درک تکامل و عملکرد قلب و همچنین طراحی راهکارهای جدید درمانی ممکن مورد استفاده قرار بگیرد و سلول‌های hES همچنین منبع مناسبی برای پیوند سلولی هستند. در موش سلول‌های ES که با یک وکتور دارای پروموتور مقاوم به نئومايسين آلوده شده است. سلول‌هایی را به وجود می‌آورند که به قلب موش پیوند زده شده و نشانی از بهبود عملکرد آن دارد. علوم ناشی از چنین مطالعاتی می‌تواند جهت ساخت حامل‌هایی برای انتخاب کاردیومیوسیت‌ها و ارزیابی زمان خاص مورد نیاز برای چنین انتخابی را به وجود آورد.

CD-34 به‌عنوان یک مارکر رگ زایی اولیه موش در سلول‌های اجدادی و سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک و اندوتلیال بیان می‌شود و همراه با رشد محیط کشت، بیانش افزایش می‌یابد. این ژن افزایش بیان را در روز ۲۱ نشان داد.

مطالعات دیگر محققین نشان داده که *CD-34* در تمایز EB انسان افزایش یافته و به روزهای ۱۵-۱۳ می‌رسد. همچنین نشان داده شده است که این ژن در hEB افزایش معنی‌داری دارد (۱۹، ۲۲). به‌طور کلی نتایج ما نشان داد که *CD-34* مارکری است که در EB ۲۱ روزه، بیشترین افزایش بیان را نشان می‌دهد. ما در روزهای ۱۳-۱۵ که سایر محققین اشاره به بیان این ژن دارند نیز بیان مشاهده کردیم؛ اما بیشترین بیان را در روز ۲۱ بدست آوردیم. نتایج این مطالعه، نتایج سایر محققین را تأیید می‌کند.

بیان اولیه *OCT-4* در اجسام جنینی ۵ روزه مشاهده گردید که به‌شدت در همان روز ۵ افزایش یافت. تعداد ۱۰ جسم جنینی در سوسپانسیون در زمان‌های مختلف جمع‌آوری گردید. نتایج نشان داد که *OCT-4* باگذشت زمان در EB تمایز یافته، قابل مشاهده است و بیشتر در روز ۵ افزایش یافته و در روز ۳۰ کم می‌شود. نتایج سایر محققین هم این مسئله را تأیید کرد (۲۱). در بیشتر مطالعات، *OCT-4* در روز ۵ افزایش بیان داشته است و

جنین‌های موش بازی می‌کند. سلول‌های hES تمایز نیافته بیان می‌شود و خیلی آهسته در طی تمایز، افزایش پیدا می‌کند. این ژن افزایش بیان را در روزهای ۲۰ نشان داد. نتایج سایر محققین نشان می‌دهد که ژن *ANF* در روز ۱، ۲۵ درصد، در روز ۱۰، ۸۰ درصد و در روز ۱۸، ۱۰۰ درصد افزایش بیان داشته است (۲۱) که به نتایج ما نزدیک است.

در مجموع، دسترسی به رده‌های سلولی hES در بچه‌های نو رو به امکان‌پذیر شدن مطالعه تکامل قلب انسانی و بیان ژن‌های جدید در طی تکامل جنینی گشوده است (۱۸، ۲۳، ۲۰). به‌طور خاص، تحقیقات در این رابطه باعث بیشتر شدن انگیزه بررسی پتانسیل سلول‌های hES جهت تولید بافت‌های قلبی جدید با اهداف درمانی گردیده است. این سلول‌ها می‌توانند به روشن شدن فرایندهای پیچیده دخیل در تکامل قلب انسان و ایجاد یک سیستم سلولی مناسب جهت مطالعه تکامل و تمایز بافت‌ها در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) کمک کرده و ممکن است سرانجام باعث ایجاد قابلیت تولید سلول‌های انسانی تمایز یافته با اهداف درمانی گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌هایی مانند نارسائی‌های قلبی که درمان آن‌ها ناممکن و یا بسیار مشکل است، کاربرد این سلول‌ها می‌تواند کمک شایانی به دورنمای درمان این بیماری‌ها کند. این مطالعه یک مدل آزمایشگاهی (*in vitro*) جهت بررسی و مطالعه زمان بیان ژن‌های قلبی *FLK1*، *Alpha-cardiac actin*، *Brachyury*، *OCT-4*، *CD-34*، *ANF*، *(Vegfr-2/KDR)* و *MLC-2a* و *MLC-2v* در طی ایجاد قلب است. این ژن‌ها به‌عنوان مارکرهای سلولی برای سلول‌های اندوتلیال سیستم عروقی و پیش‌سازهای آن انتخاب شده است.

به‌طور کلی می‌توان گفت کاردیومیوسیت‌های بدست آمده در کشت حاصل از سلول‌های hES به دنبال دور تکاملی جنین‌های انسانی را تقلید کرده و بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک سیستم مدلی مؤثر جهت درک

نتایج نشان داد که *Alpha-cardiac actin* با گذشت زمان در EB تمایز یافته، افزایش پیدا می‌کند. این افزایش بیشتر در روزهای ۲۰-۱۰ مشاهده گردید. نتایج سایر محققین هم این مسئله را تأیید کرد. در بیشتر مطالعات، *Alpha-cardiac actin* در روز ۱۰ افزایش بیان داشته است و به‌عنوان یک مارکر زودهنگام و مفید برای کاردیومیوسیت‌ها شناخته می‌شود (۲۱). مطالعات نشان می‌دهند که همان‌طور که کاردیومیوسیت‌ها در این مرحله تمایز، تکثیر پیدا می‌کنند، *Alpha-cardiac actin* هم تکثیر شده و این تکثیر احتمالاً ناشی از افزایش در سلول‌های عضله قلبی در EB بوده است (۱۹).

MLC-2a به‌عنوان یک مارکر سلولی برای سلول‌های اندوتلیال سیستم عروقی و پیش‌ساز آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیان این ژن نقش مهمی در نمو عروقی جنین‌های موش بازی می‌کند. *MLC-2a* در سلول‌های hES تمایز نیافته بیان می‌شود و خیلی آهسته در طی تمایز، افزایش پیدا می‌کند. این ژن افزایش بیان را در روز ۲۰ نشان داد. نتایج سایر محققین نشان می‌دهد که ژن *MLC-2a* در روز ۱، ۲۵ درصد، در روز ۱۰، ۸۰ درصد و در روز ۱۵، ۱۰۰ درصد افزایش بیان داشته است (۲۱) که به نتایج ما بسیار نزدیک است.

نتایج نشان داد که *MLC-2v* با گذشت زمان در EB تمایز یافته، افزایش پیدا می‌کند. این افزایش بیشتر در روزهای ۳۵-۴۵ مشاهده گردید. نتایج سایر محققین هم این مسئله را تأیید کرد. در بیشتر مطالعات، *MLC-2v* در روز ۴۵ افزایش بیان داشته است و به‌عنوان یک مارکر زودهنگام و مفید برای کاردیومیوسیت‌ها شناخته می‌شود (۲۱). مطالعات نشان می‌دهند که همان‌طور که کاردیومیوسیت‌ها در این مرحله تمایز، تکثیر پیدا می‌کنند، *MLC-2v* هم تکثیر شده و این تکثیر احتمالاً ناشی از افزایش در سلول‌های عضله قلبی در EB بوده است (۱۹).

ANF، به‌عنوان یک مارکر سلولی برای سلول‌های اندوتلیال سیستم عروقی و پیش‌ساز آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیان این ژن نقش مهمی در نمو عروقی

ناممکن و یا بسیار مشکل است، کاربرد این سلول‌ها می‌تواند کمک شایانی به دورنمای درمان این بیماری‌ها کند. آن‌ها همچنین ابزار بالقوه‌ای را در زمینه‌هایی چون ساخت و تست داروهای تکامل اولیه قلب و درمان بالینی مبتنی بر پیوند سلولی و مهندسی بافت به وجود می‌آورند.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی - واحد تهران شرق جهت حمایت مالی از این پروژه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Antin PB, Taylor RG, Yatskievych T. Precardiac mesoderm is specified during gastrulation in quail. *Developmental Dynamics* 1994; 2:4-14.
2. Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circulation Research* 2002; 91:189-201.
3. Delcarpio JB, Claycomb WC. Cardiomyocyte transfer into the mammalian heart. Cell-to-cell interactions in vivo and in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 752:267-85.
4. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292:154-6.
5. Grepin C, Nemer G, Nemer M. Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development* 1997; 124:2387-95.
6. Segev H, Kenyagin-Karsenti D, Fishman B, Gerecht-Nir S, Ziskind A, Amit M, et al. Molecular analysis of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Development Growth & Differentiation* 2005; 47:295-306.
7. He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circulation* 2003; 93:32-9.
8. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, et al. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovascular Research* 1997; 36:149-62.
9. Icardo JM. Developmental biology of the vertebrate heart. *Journal of Experimental Zoology* 1996; 275:144-61.
10. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular Medicine* 2000; 6:88-95.
11. Kehat I, Gepstein A, Spira A, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. *Circulation Research* 2002; 91:659-6.
12. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 108:407-14.
13. Koh GY, Soonpaa MH, Klug MG, Field LJ. Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium. *American Journal of Physiology* 1993; 264:1727-33.
14. Koh GY, Soonpaa MH, Klug MG, Pride HP, Cooper BJ, Zipes DP, et al. Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 96:2034-42.
15. Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 2003; 33:27-40.
16. Narita N, Bielinska M, Wilson DB. Cardiomyocyte differentiation by GATA-4-deficient embryonic stem cells. *Development* 1997; 124:3755-64.
17. Olson EN, Srivastava D. Molecular pathways controlling heart development. *Science* 1996; 272:671-6.
18. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology* 2000; 18:399-404.
19. Roell W, Lu ZJ, Bloch W, Siedner S, Tiemann K, Xia Y, et al. Cellular cardiomyoplasty improves survival after myocardial injury. *Circulation* 2002; 105:2435-41.
20. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-7.
21. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circulation Research* 2002; 91:501-8.
22. Chicha L, Feki A, Boni A, Irion O, Hovatta O, Jaconi M. Human Pluripotent Stem Cells Differentiated in Fully Defined Medium Generate Hematopoietic CD34+ and CD34- Progenitors with Distinct Characteristics. *PLoS One* 2011; 6: e14733.
23. Lian X, Bao X, Al-Ahmad A, Liu J, Wu Y, Dong W, et al. Efficient Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Endothelial Progenitors via Small-Molecule Activation of WNT Signaling. *Stem Cell Reports* 2014; 3:804-16.
24. Toivonen S, Ojala M, Hyysalo A, Ilmarinen T, Rajala K, Pekkanen-Mattila M, et al. Comparative analysis of targeted differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and human embryonic stem cells reveals variability associated with incomplete transgene silencing in retrovirally derived hiPSC lines. *Stem Cells Translational Medicine* 2013; 2:83-93.

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
25th Year, No.131
October- November
2017*

Received: 23/08/2017

Last revised: 11/10/2017

Accepted: 18/10/2017

Candidate gene expression of primary cardiomyocytes in cardiovascular embryoid bodies

Akram Sadat Tabatabaei Panah*

Department of Biology, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran.

* Corresponding author e-mail: tabatabaeipanah@gmail.com

Abstract

Background and Objective: Human embryonic stem cells (hESCs) can differentiate in vitro into spontaneously contracting cardiomyocytes and produce a model to investigate the early developmental stages of this system. After removing of cells from their feeder layer, hESCs create embryoid bodies (EB). Plating of EB results in developing areas of beating cells. In the present study, cardiomyocyte gene expression time-points during heart development was investigated.

Materials and Methods: After stem cell culture, cardiomyocyte's mRNA was extracted in different time-points after differentiation. The expression pattern of candidate genes CD-34, OCT-4, Brachyury, Alpha-cardiac actin, FLK1 (Vegfr-2/KDR), ANF, MLC-2a, and MLC-2v was analyzed in human EB (hEB) by RT-PCR.

Results: There was an enhanced expression of CD-34 from day 21 in EB in suspension. The OCT-4 gene expression was in 5-day-old EB and Brachyury expression was significantly increased by day 21. There was an enhanced expression of as Alpha-cardiac actin from day 10 in EB in suspension. The FLK1 (Vegfr-2/KDR) gene expression was first specified in 4-day-old EB and was significantly increased by day 14. There was an enhanced expression of MLC-2a and MLC-2v from day 20 and ANF by day 45 in EB in suspension.

Conclusion: hESCs might be useful as an effective model system for understanding the developmental processes and functioning of the human heart.

Key words: Human embryonic stem cell, Embryoid bodies, Cardiomyocyte.