مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۸، شماره ۳، پاییز ۹۷، صفحات ۱۹۵ تا ۲۰۶

Original Article

بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از کوریون انسان به سلول‌های شبه میوبلاست

نیکو بناء[۱]، فائزه فقیهی[۲]، منصوره سلیمانی[۳]، نسیم حیاتی رودباری[۴]

[۱] کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
[۲] استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۳] دانشیار، دانشکده پژشکی، گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۴] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران ، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *به منظور بازیابی سلول های از دست رفته بیماران مبتلا به بیماری های مخرب ماهیچه، سلول درمانی اخیرا به عنوان یک رویکرد موثر ثابت شده است. کوریون یک منبع اخلاقی مورد تایید، شامل سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توانایی خود تجدید پذیر و تمایز به رده های سلولی است. از این رو هدف از این مطالعه بررسی تمایز میوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از کوریون انسان برای اولین بار بود.*

روش بررسی: *سلول‌های کوریون با استفاده از کلاژناز II ۰/۳٪ هضم آزیمی شدند. سلول‌ها با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و تمایز به رده‌های سلولی چربی و استخوان شناسایی شدند. به منظور القای میوژنیک، سلول‌ها به مدت یک شبانه روز در محیط کشت حاوی DMEM F/12، ۲درصد FBS و ۱۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین کشت داده شدند. سپس محیط کشت حاوی DMEM F/12، ۱۰درصد FBS به مدت دو هفته جایگزین شد. Real-time PCR و ایمونوسیتوشیمی برای بررسی بیان مارکرهای میوژنیک استفاده شدند.*

یافته‌ها: *بیان آنتی ژن های CD90,CD73,CD44 و توانایی تمایز به رده‌های سلولی استخوان و چربی تایید شد. اگرچه کاهش بیان CTNT, MYH6 در هفته دوم مشاهده شد، اما نتایج Real-time PCR بیان بالای DESMIN, CTNT, MYH6 در پایان هفته اول را تایید کرد ($p<۰/۰۵$). بیان GATA4,MYOD در پایان هفته اول و دوم تمایز مشاهده شد. نتایج ایمونوسیتوشیمی بیان Desmin، cTnT,αMHC را تایید کرد.*

نتیجه‌گیری: *نتایج نشان داد که سلول‌های مذکور، قادر به تمایز به میوبلاست هستند.*

واژگان کلیدی: *سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون انسان، ۵ -آزاسیتیدین، تمایز به میوبلاست.*

مقدمه

اخیرا سلول‌های بنیادی مزانشیمی، منجر به پیشرفت علم پزشکی در زمینه‌های مختلف شده‌اند. این سلول‌ها در واقع یک منبع تجدید پذیر هستند که می‌توانند برای درمان بسیاری از بیماری‌ها، از جمله بیماری‌های عضلانی، استفاده شوند. این سلول‌ها توانایی تکثیر و قدرت خودنوزایی بالایی دارند و می‌توانند در شرایط مناسب به انواع سلول‌ها تمایز یابند. از این رو، این سلول‌ها را می‌توان جهت مطالعات درمانی و به ویژه سلول درمانی و پزشکی ترمیمی به کار برد (۱،۲).

این سلول‌ها، هم چنین می‌توانند در بازسازی و ترمیم بافتهای مختلف بدن موثر باشند و جایگزین سلول‌های آسیب دیده شده و به ترمیم در آن بافت بپردازند. به دلیل توانایی منحصر به فرد سلول‌های بنیادی، این سلول‌ها امروزه از مباحث جذاب در زیست شناسی و علوم درمانی هستند.

آدرس نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، فائزه فقیهی (**email**: Faghihi.f@iums.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۵/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۹/۸

www.SID.ir
Archive of SID

سلول‌های ماهواره‌ای در واقع همان سلول‌های بنیادی عضله اسکلتی هستند که به دلیل قابلیت خودنوسازی و تمایز نیافته بودن می‌توانند در ترمیم بافت های عضلانی شرکت کنند (۳). اگرچه سلول‌های ماهواره‌ای می‌توانند گزینه مناسبی برای بازسازی بافت‌های عضلانی باشند، ولی به دلیل محدود بودن تعداد این سلول‌ها و وسعت بافت‌های آسیب دیده محققان به دنبال یافتن منبع سلولی دیگری بودند. به همین دلیل استفاده از سلول‌های بنیادی می‌تواند راه گشای محققان در زمینه تمایز و ترمیم بافت‌های عضلانی اسیب دیده باشد (۴،۵).

علاوه بر موارد ذکر شده، ویژگی تعدیل کنندگی ایمنی این سلول‌ها، می‌تواند دلیل دیگری برای استفاده از این سلول‌ها در مهندسی بافت و درمان بیماری‌هایی با واسطه ایمنی باشد (۶). تحقیقات نشان داده‌اند که این سلول‌ها را می‌توان از بافت‌های مختلف مانند بافت چربی (۷)، خون بندناف و پرزهای جنینی جفت (۸)، مایع آمنیوتیک (۹)، خون محیطی (۱۰)، کبدجنین (۱۱)، ریه (۱۲) و حتی دندان‌های شیری کنده شده (۱۳) جداسازی کرد.

فاکتور ۵-آزاسیتیدین عامل دمتیله کننده‌ای است که می‌تواند منجر به فعال شدن بیان ژن‌ها و تمایز سلول‌ها شود و نشان داده شده است که موجب تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به میوبلاست می‌شود (۱۴).

از آنجایی که قدرت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از کوریون انسان به سلول‌های شبه میوبلاست بررسی نشده است؛ لذا در این مطالعه، پتانسیل تمایز این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از ۵- ازاسیتیدین به عنوان القاگر استفاده شد.

مواد و روشها

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون جفت انسان

نمونه بافت کوریون، تحت شرایط کاملا استریل در ظرف مخصوص حمل دارای مقادیر یخ خشک به آزمایشگاه منتقل شد. جداسازی و استفاده از این سلول‌ها برای تحقیقات زیر نظر کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی ایران و بر اساس پروتکل انجام شد (۱۵). پس از جدا کردن پرده آمنیون و لایه‌های کوریونی، بافت کوریون به دقت جدا و به لوله های فالکون (SPL,Korea) حاوی۷ میلی لیتر محلول بافر فسفات سالین (PBS, Caisson, USA) و آنتی بیوتیک منتقل شد.

نمونه‌ها و محیط کشت به منظور حذف سلول‌های خونی به دقت با PBS شسته شدند و سپس نمونه‌ها زیر هود، در درون یک بشقاب پتری به قطعه های کوچک بریده شدند. این قطعه‌ها به یک لوله حاوی ۵ میلی لیترکلاژناز تیپ II (۰/۳ ٪) (SIGMA,USA) منتقل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در این محلول نگهداری شدند. لوله حاوی آنزیم و نمونه‌ها هر ۱۰ دقیقه چند بار تکان داده شدند تا سلول‌های بیشتری از بافت آزاد شوند. سپس برای خنثی کردن اثر آنزیم از محیط کشت استفاده شد.

سپس، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰g سانتریفیوژ شدند و پس از حذف محیط رویی، محیط زیرین که حاوی سلول بود، پس از پیپت کردن و شمارش سلول به فلاسک‌های کشت T25 حاوی محیط کشت DMEM/F12(Caisson, USA) همراه با ۱۰درصدFBS(Caisson, USA) و پنی سیلین / استرپتومایسین(Caisson, USA) منتقل شدند. سلول‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد در انکوباتور، انکوبه شدند. روز بعد از آن تمام محیط کشت را خالی کرده و محیط کشت تازه‌ای به فلاسک حاوی سلول‌ها اضافه شد. این کار برای حذف گلبول‌های قرمزی به کار می‌رود که ممکن است در حین روند جداسازی بافت وجود داشته باشد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب ۷۰ الی ۸۰ درصد ، با تریپسین ۰/۲۵ درصد (Caisson, USA) پاساژ داده شدند.

بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط تکنیک فلوسایتومتری

در این مطالعه برای اطمینان از ماهیت مزانشیمی بودن سلولها از تکنیک فلوسایتومتری به منظور شناسایی مارکرهای سطح سلولی استفاده شد.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاساژ ۳ تریپسینه شده و مورد شمارش سلولی قرار گرفتند. در حدود ۱۰۰۰۰۰سلول شمارش شده و به لوله‌های مخصوص سانتریفیوژ منتقل شده و به مدت ۱ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد با Goat (Sigma, USA) serum انکوبه شده. پس از یک ساعت و حذف سرم، سلول‌ها با آنتی بادی‌های کونژوگه با FITC, PE به مدت ۴۵دقیقه در ۴درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در مرحله آخر، پس از ۴۵ دقیقه سلول‌ها باPBS شسته شده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰g سانتریفیوژ شدند. محلول سلولی آماده شده با دستگاه فلوسایتومتری (Faces caliber, BD, USA) بررسی شد و مورد آنالیز قرار گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

در جدول ۱ فهرست آنتی بادی‌های مورد نیاز برای بررسی مارکرهای سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی آورده شده است (جدول ۱).

تمایز سلول‌های بنیادی جداشده از کوریون انسان به سلول های استخوانی

علاوه بر بررسی مارکرهای سطح سلولی به منظور اثبات مزانشیم بودن سلول‌های جداشده از کوریون از تمایز به رده-های چربی، استخوان و غضروف استفاده می‌شود. در این بررسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از کوریون به دو رده چربی و استخوان بر اساس پروتکل تمایز داده شدند (۱۶). به این منظور، سلول‌های پاساژ ۳ در ظروف کشت ۶ چاهکی(SPL, Korea) محتوی DMEM/F12 با FBS ۱۰٪ به تعداد ۵×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک کشت شدند و پس از پر شدن ۹۰-۸۰ ٪ ظرف کشت، محیط DMEM/F12 با محیط استئوژنیک شامل ۱۰درصد FBS، بتا- گلیسرول فسفات (۱۰میلی مولار)، دگزامتازون ($۱۰^{-۷}$ مولار)، اسکوربیک اسید (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) تعویض شد. محیط هر ۳ روز یک بار تا ۱۷ روز تعویض شد. برای ارزیابی تمایز استئوژنیک از رنگ آمیزی اختصاصی آلیزارین رد استفاده شد.

تمایز سلول‌های بنیادی جدا شده به سلول‌های چربی

برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلولهای چربی نیز، سلول‌ها به تعداد ۵×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک، در پلیت‌های ۶ خانه‌ای به مدت ۱۷ روزبا محیط ادیپوژنیک حاوی FBS٪۱۰، انسولین (۱۰g/ml)، دگزامتازون ۱M، ایندومتاسین ۲۰۰ M تیمار شدند. محیط هر ۳ روز یک بار تعویض شد. قطرات چربی بدون رنگ آمیزی نیز در زیر میکروسکوپ فاز متضاد قابل مشاهده بودند. برای ارزیابی تمایزسلولهای بنیادی مورد آزمایش به سلولهای چربی از رنگ آمیزی اویل رد استفاده شد.

جدول ۱. لیست مشخصات آنتی‌بادی‌های استفاده شده

Antibody Name	Brand	Catalog No.
PE Mouse Anti-Human CD73	BD Biosciences	550257
Mouse Anti-Human CD45 FITC/CD34 PE	BD Biosciences	341071
PE Mouse Anti-Human CD90	BD Biosciences	561970
FITC Mouse Anti-Human CD44	BD Biosciences	347943
PE Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD Biosciences	555749
FITC Mouse IgG1, κ Isotype Control	eBioscience	11-4714-71
Mouse Anti-Desmin antibody	Abcam	ab8470
Mouse Anti-Cardiac Troponin T antibody	Abcam	ab8295
Rabbit Anti-heavy chain Myosin antibody	Abcam	ab124205
Rabbit Anti-GATA4 antibody	Abcam	ab134057
Mouse Anti-MyoD antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-32758
Donkey Anti-Mouse IgG H&L (PE)	Abcam	ab7003
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam	ab150077

www.SID.ir

تمایزسلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های شبه میوبلاستی در in vitro **به مدت دو هفته**

برای القای تمایز میوبلاست از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاساژ ۳ استفاده شد. سلول‌های مزانشیمی به تعداد ۵۰۰۰۰ تا سلول در هر یک از خانه‌های یک پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، محیط کشت را تعویض کرده و ۰/۵میلی لیتر محیط تمایزی شامل DMEM-F12، ۲ درصد FBS، ۵-آزاسیتیدین با غلظت ۱۰ میکرومولار به آرامی به سلول‌ها اضافه شد. سپس پلیت‌ها به درون انکوباتور به مدت یک شبانه روز قرار داده شدند. روز بعد، محیط تمایزی دور ریخته شد و ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱۰درصد FBS به آرامی به سلول‌ها اضافه شد. سپس سلول‌ها به مدت دوهفته، داخل انکوباتور نگه‌داری شدند. تعویض محیط نیز به صورت یک روز درمیان انجام شد.

بررسی کیفی بیان ژن با استفاده از ایمونوسیتوشیمی

برای تشخیص بیان پروتیین‌های مربوط به سلول حاصل از تمایز یا تعیین مارکرهای پروتیینی سطح سلول‌های بنیادی از تکنیک ایمونوسیتوشیمی استفاده شد.

پس از تیمار سلول‌ها با القاگر تمایزی، آنالیز ایمونوسیتوشیمی در پایان هفته دوم انجام شد. مراحل کار به این صورت بود که درپایان هفته دوم سلول‌ها با پارافرمالدهید ۴ درصد (Sigma, USA)به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴درجه فیکس شدند. پس از حذف پارافرمالدهید و شستشو با PBS، از تریتون Triton X-100 ۰/۲ ٪ (رقیق شده با PBS) (Merk ,Germany) برای نفوذپذیر کردن غشای سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. سپس محلول بلاک کننده Goat serum ٪۵ (Sigma, USA), (به مدت ۱ساعت) برای جلوگیری از اتصال آنتی بادی‌های غیراختصاصی اضافه شد. در مرحله بعد سلول‌ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد با آنتی بادی اولیه رقیق شده با PBS با نسبت۱:۱۰۰ انکوبه شدند. سپس افزودن آنتی بادی ثانویه رقیق شده با PBS با نسبت۱:۲۰۰ (به مدت ۱ساعت در دمای اتاق) انجام شد. پس از آن شستشوی سلولها با Tween20 ٪۰/۱ (Sigma, USA) (سه بار هر بار ۵ دقیقه) صورت گرفت و در مرحله آخر رنگ آمیزی هسته سلول‌ها با DAPI(Sigma, USA) به مدت ۵ دقیقه و شستشو با PBS و مشاهده با میکروسکوپ فلورسنت (IX71 Olympus) انجام گرفت. اطلاعات مربوط به مشخصات آنتی بادی در جدول ۱ قید شده است.

بررسی کمی بیان ژن با استفاده از تکنیک Real- time PCR

در این مطالعه سلول‌های حاصل از کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت کوریون انسان در محیط کشت تمایزی حاوی ۵-آزاسیتیدین به مدت دوهفته تیمار شدند. سپس در انتهای هفته اول و هفته دوم، به منظور بررسی بیان ژن‌های دخیل در تمایز شامل CTNT، MYOD، GATA4، MYH6 و DESMIN در دو گروه سلولی شامل سلول‌های تیمار شده با ۵-آزاسیتیدین(آزمون) و سلول‌های تیمار نشده(کنترل)، از روش کمی Real-time PCR استفاده شد.

برای ارزیابی بیان ژن‌ها، فرآیندهایی شامل استخراج RNA، سنجش غلظت RNA استخراج‌شده توسط اسپکتروفتومتر، سنتز cDNA با استفاده از کیت Katara، انجام واکنش Real-Time PCR و درنهایت آنالیز داده‌ها صورت گرفت.

قبل از این‌که واکنش Real-time PCR برای ژن‌های هدف انجام شود، صحت واکنش سنتز cDNA و کیفیت cDNA سنتز شده مورد تائید و ارزیابی قرار گرفت. به این منظور ابتدا

جدول ۲. لیست مشخصات پرایمر های استفاده شده

Gene	Primer sequence($5^{\delta}\rightarrow3^{\delta}$)	Accession number
α-MHC (MYH6)	F-ATTGCTGAAACCGAGAATGG R-CGCTCCTTGAGGTTGAAAAG	NM_002471.3
GATA4	F- CCT GTC ATC TCA CTA CGG R- GCT GTT CCA AGA GTC CTG	NM_002052.3
MyoD	F-CGCCATCCGCTATATCGAGG R-CTGTAGTCCATCATGCCGTCG	NM_002478.4
Troponin T	F-ATGATGCATTTTGGGGGTTA R-CAGCACCTTCCTCCTCTCAG	NM_000364.2
Desmin	F-TCGGCTCTAAGGGCTCCTC R-CGTGGTCAGAAACTCCTGGT	NM_001927
GAPDH	F-CTCATTTCCTGGTATGACAACGA R-CTTCCTCTTGTGCTCTTGCT	NM_001256799.1

Archive of SID

www.SID.ir

برای هر نمونه cDNA سنتز شده، یک واکنش Real-Time PCR با پرایمر ژن GAPDH (ژن House Keeping)، انجام شد. برای این فرایند از دستگاه ABI مدل 7500 Real Time PCR System استفاده شد. مشخصات مربوط به پرایمرها در جدول ۲ ذکر شده است.

یافته‌ها

در ابتدا ویژگی‌های ریخت شناسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول‌های جدا شده از کوریون انسان توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی درصد کمی از جمعیت سلول‌های اولیه کشت داده شده از هر بافت انسان را شامل می‌شوند، لذا در کشت‌های اولیه به صورت جمعیت ناخالص هستند، ولی در پاساژهای بعدی به صورت خالص در می آیند؛ سلول‌های مزانشیمی از لحاظ مورفولوژیکی شبیه به سلول‌های فیبروبلاستی هستند. همچنین بررسی مورفولوژیکی سلول‌ها در پایان دوره تمایز توسط میکروسکوپ نوری انجام شد. سلول‌ها در این مرحله تغییر مورفولوژی اندکی پیدا کردند و پس از پایان دوره تماز سلول‌ها کمی کشیده‌تر و دوکی شکل شدند (شکل ۱).

برای اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های جداشده از کوریون انسان، ابتدا مارکرهای سطح سلولی به روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. سپس قدرت تمایز این سلول‌ها به دو رده چربی و استخوان نیز بررسی شد.

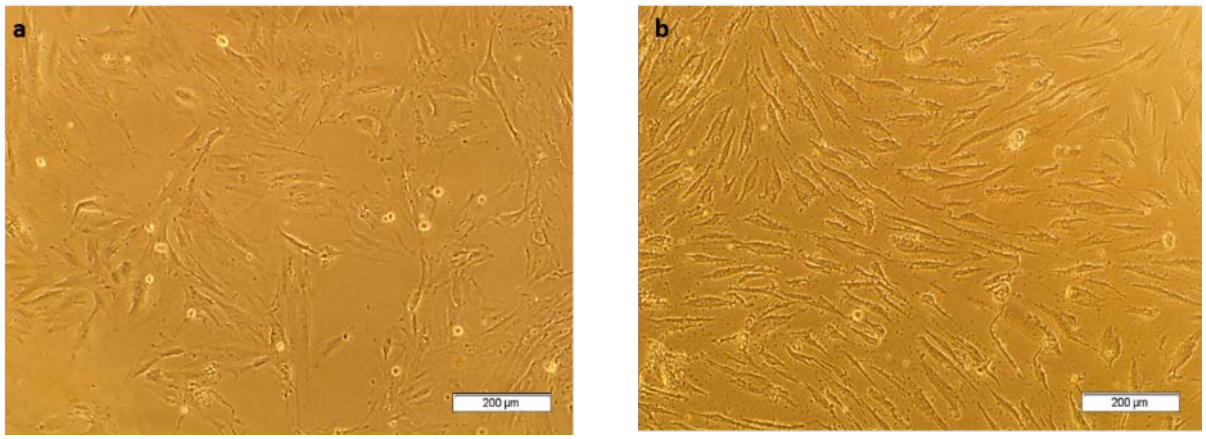
نتایج آنالیز فلوسایتومتری در سلول‌های پاساژ ۳ بیان مارکرهای CD44، CD73 و CD90 را نشان داد؛ از طرفی این سلول‌ها مارکرهای هماتوپویتیکی CD34 و CD45 را بیان نکردند (شکل ۲).

همچنین پتانسیل تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون در پاساژ۳با کشت این سلول‌ها در محیط‌های ادیپوژنیک و استئوژنیک مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های جدا شده به مدت ۱۷ روز در محیط تمایزی استئوژنیک قرار گرفتند، که با رنگ آمیزی اختصاصی آلیزارین رد به رنگ قرمز در آمدند که ناشی از معدنی شدن ماتریکس ترشح شده از سلول‌ها بود (شکل ۳a).

همچنین پس از ۱۷روز کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط آدیپوژنیک، به تدریج در آنها واکوئل‌های چربی ظاهر شدند و رنگ آمیزی اویل رد نشان داد که قطرات چربی در سیتوپلاسم سلولها تجمع یافته‌اند و سلول‌های تمایز یافته به چربی به رنگ قرمز مشاهده شدند (شکل ۳b).

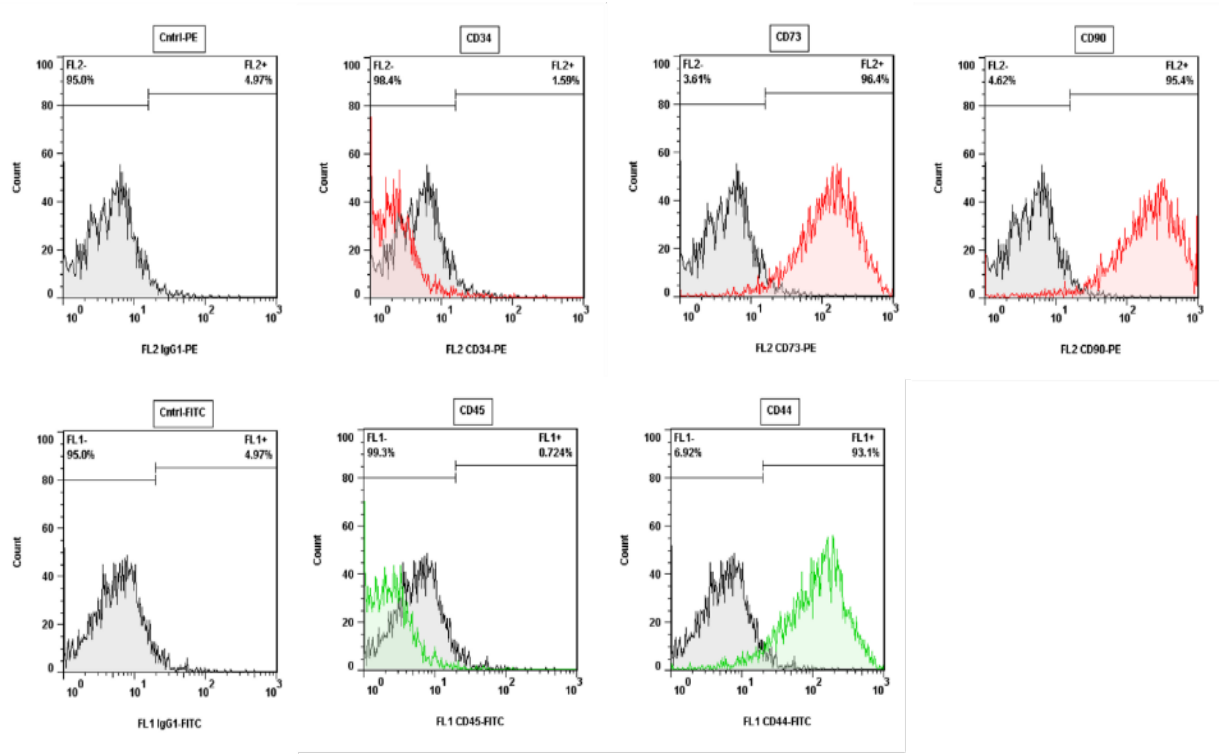
در پایان دوره تمایز توسط فاکتور تمایزی ۵-آزاسیتیدین، رنگ آمیزی با مارکرهای اختصاصی به وسیله تکنیک ایمونوسیتوشیمی نشان داد که این سلول‌ها بعد از ۱۴ روز تیمار، مارکرهای Desmin، cTnT و αMHC را بیان کردند (شکل ۴).

نتایج کمّی حاصل از این مطالعه نیز نشان داد، سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از کوریون انسان تحت القا محیط کشت حاوی ۵-آزاسیتیدین ۱۰میکرومولار قادر به بیان برخی مارکرهای میوبلاستی هستند.

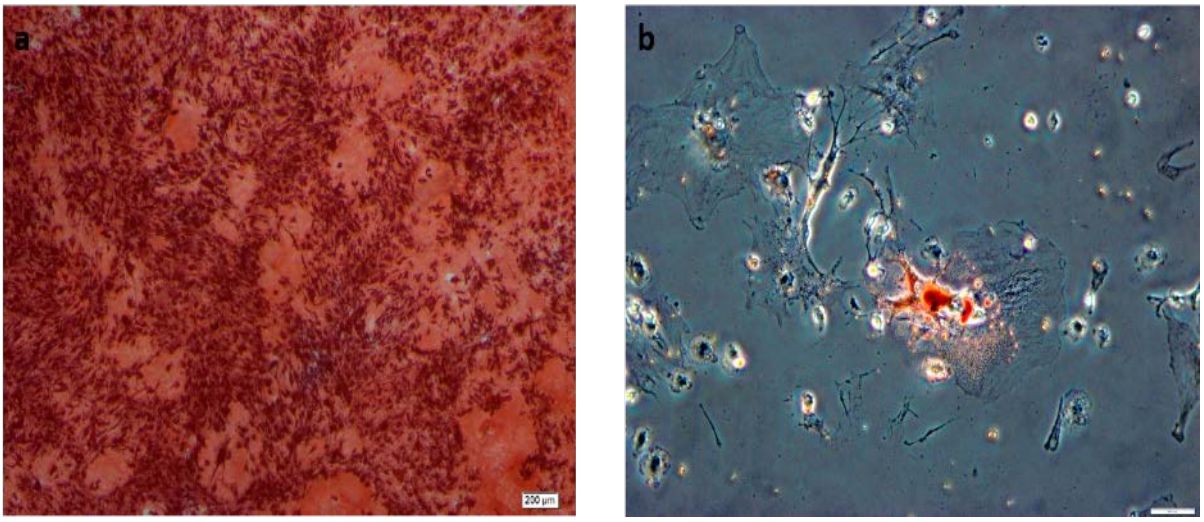


شکل ۱. مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از کوریون انسان قبل و بعد از تمایز. در این شکل سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از کوریون انسان در پاساژ ۳ (a) و سلول های تمایز یافته (b) نمایش داده شده‌اند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۲. نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون انسان. سلول‌های مذکور توانایی بیان مارکرهای مزانشیمی CD73, CD44 و CD90 را داشتند و نسبت به مارکرهای هماتوپویتیکی CD34 و CD45 منفی بودند.



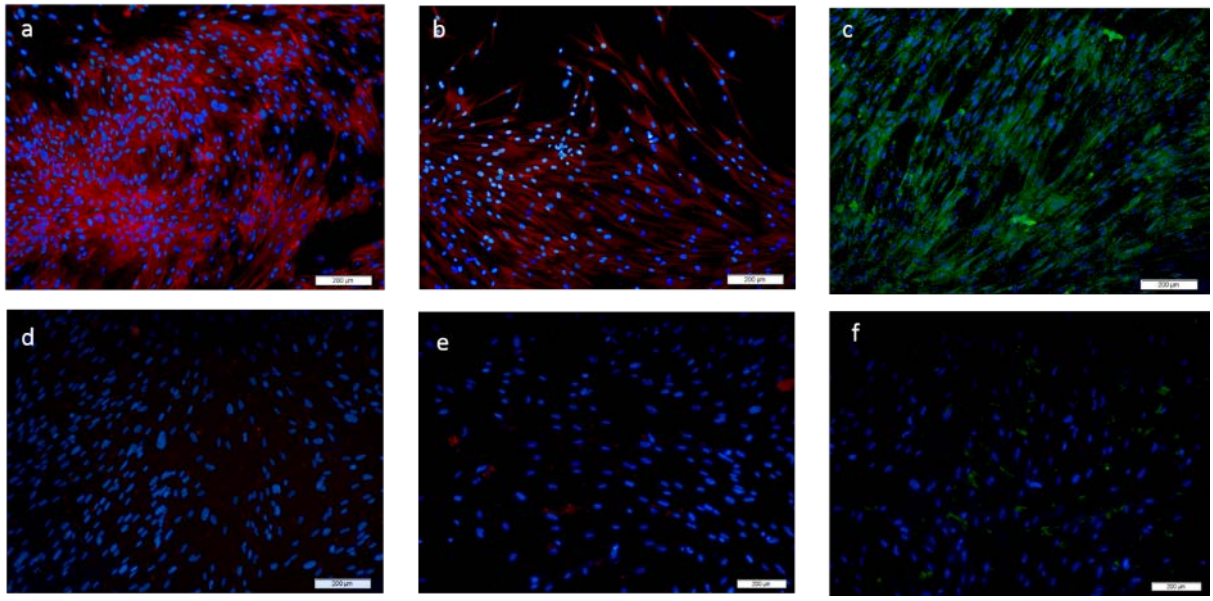
شکل۳. اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های مشتق از کوریون. سلول های بنیادی مشتق از کوریون انسان در حضور عوامل القایی به سلول های استخوانی(a) و چربی(b) تمایز پیدا کردند.

بررسی نتایج حاصل از Real-time PCR در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون انسان نشان دهنده بیان بالای ژن‌های DESMIN، CTNT و MYH6 در پایان هفته اول بود ($p<۰/۰۵$). با این وجود با کاهش بیان ژن‌های CTNT و MYH6 در هفته دوم مواجه شدیم. همچنین بیان GATA4 و MYOD نیزدر پایان هفته اول و دوم تمایزمشاهده شد (شکل ۵).

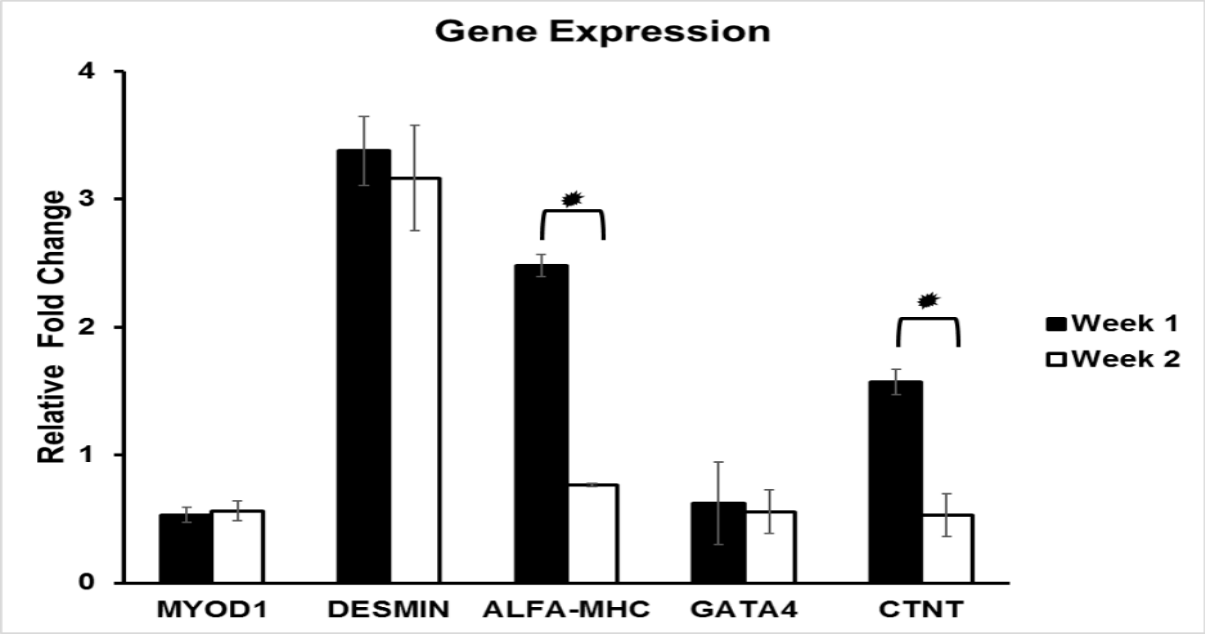
بحث

امروزه افراد زیادی از نقص‌های عضلانی و اختلالاتی که ماهیچه را در گیر می‌کنند، رنج می‌برند. به عنوان مثال،

www.SID.ir



شکل۴. بررسی کیفی بیان مارکرهای اختصاصی درتمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون انسان به سلول های شبه میوبلاست در پایان هفته دوم. شکل(a) بیان پروتیین دسمین را در سلول های تمایز یافته نشان می دهد. شکل(b) نشان دهنده بیان مارکر کاردیاک توپونینT می باشد. شکل(c) بیان پروتیین زنجیره سنگین میوزین را در هفته دوم تایید می کند. تصاویر(d,e,f) مربوط به گروه کنترل می باشد که تیمار نشده اند.



شکل ۵. نتایج حاصل از آنالیز کمّی ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش Real-time PCR در سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از کوریون انسان. معنی‌داری در سطح $p<۰/۰۵$ است که با علامت * نشان داده شده است. مقادیر به صورت Mean±SE نمایش داده شده‌اند.

دیستروفی عضلانی نوعی از اختلالات عضلانی ارثی است که عضلات را درگیر کرده و با تخریب فیبرهای عضلانی همراه است (۱۷). همچنین بیماری‌هایی که قلب و ماهیچه قلب را درگیر می‌کنند، از جمله مشکلات دیگری هستند که جوامع بشری با آن روبه رو هستند (۱۸). وجود چنین بیماری‌هایی پژوهشگران را به دنبال راه‌هایی برای درمان این بیماری‌ها کشانده است. از جمله این روش‌ها، استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان است.

اگرچه بافت‌های عضلانی تا حدودی قدرت بازسازی بافت های آسیب دیده رادارند ، اما در بازسازی نقص های بزرگ عضلانی نمی توانند کارامد باشند. از سوی دیگر، روش های دارویی در برخی موارد کارامد نبوده است، بنابر این درمان با استفاده از

www.SID.ir

سلول‌های بنیادی مزانشیمی توجه بسیاری از محققین را به سوی خود جلب کرده است (۱۹).

با توجه به مطالعاتی که پیش‌تر در این زمینه صورت گرفته است، مشخص شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند تحت شرایط مختلف به رده‌های مختلف سلولی تمایز یابند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل داشتن توانایی خودنوزایی، تعدیل کنندگی سیستم ایمنی و توان تمایزی به سلول‌های رده مزانشیمی مانند چربی و استخوان (۲۰) در سلول درمانی و مهندسی بافت مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته‌اند. این سلول‌ها در بافت‌های مختلف پستانداران وجود دارند و برای حفظ و ترمیم این بافت ها در طول زندگی ضروری هستند.

از آنجایی که اکثر مطالعات در زمینه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی سلول‌های جداشده از مغز استخوان بوده است و استفاده از این منبع سلولی مشکلات خاص خود، از جمله فرایند دردناک نمونه‌گیری را به همراه داشته است؛ بنابراین محققین به دنبال یافتن منبع سلولی مناسب هستند که ویژگی‌هایی نظیر قابل دسترس بودن آسان، قابلیت تکثیر بالا و خودنوزایی و قدرت تمایز به رده‌های مختلف سلولی را دارا باشند (۲۱).

همان طور که تحقیقات نشان داده‌اند سلول‌های بنیادی را می‌توان از منابع مختلف جدا کرد؛ از جمله این منابع، بافت کوریون است که جزو بافت‌های خارج جنینی و دور ریختنی به حساب می‌آید و دارای تمام ویژگی‌های سلول‌های بنیادی از جمله پتانسیل خودنوزایی و تمایز بالا است و استفاده از آنها برای مطالعات هیچ خطری را برای مادر و نوزاد به همراه ندارد و کاربرد آنها مشکل اخلاقی نیز ندارد (۲۲). بنابراین با توجه به این ویژگی‌ها و قابلیت تمایز به دودمان عضلانی، این سلول-ها می‌توانند کاندید مناسبی در پزشکی ترمیمی و سلول درمانی محسوب شوند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از بافت کوریون قابلیت تکثیر و تعدیل کنندگی سیستم ایمنی را نشان داده‌اند؛ بنابراین می‌توانند برای پژوهش و درمان استفاده شوند (۲۳).

از آنجایی که پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از کوریون به سلول‌های شبه میوبلاست تاکنون ارزیابی نشده است؛ بنابراین ما در این مطالعه به بررسی قدرت تمایز این سلول‌ها به رده های میوژنیک در حضور ۵-آزاسیتیدین پرداختیم.

تحقیقات زیادی در این زمینه انجام شده است که محققان توانستند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون را به رده‌های سلولی مختلف تمایز دهند. از جمله، در یکی از این تحقیقات که توسط شفیع آبادی انجام شد، توانستند سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون انسان را به استئوبلاست تمایز بدهند (۲۴). در پژوهش دیگری که توسط فقیهی و همکارانش انجام شد، توانستند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون را به سلول‌های شبه موتورنورون تمایز دهند (۱۵). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی را دارند.

در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون انسان جدا شدند و کشت داده شدند. نتایج حاصل از بررسی های فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون، مارکرهای مزانشیمی را بیان کردند و مارکرهای خونی را بیان نکردند. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از کوریون به چربی و استخوان توسط رنگ آمیزی اختصاصی تایید شد.

در این تحقیق به منظور تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیم جداشده از کوریون به سلول‌های شبه میوبلاست، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون در محیط کشت حاوی ۵-آزاسیتیدین با غلظت ۱۰ میکرومولاربه مدت ۲۴ساعت قرار گرفتند، سپس به مدت ۲هفته در محیط فاقد ۵-آزاسیتیدین کشت داده شدند. مورفولوژی سلول‌ها پس از تیمار با ۵-آزاسیتیدین کمی تغییر کرد.

۵-آزاسیتیدین به عنوان یک عامل دمتیله کننده است که باعث مهار عملکرد متیل ترانسفراز می‌شود. بنابراین موجب فعال شدن بیان ژن‌ها شده و در مسیر تمایز می‌تواند موثر باشد (۱۴).

بررسی‌های کیفی که در مطالعه حاضر انجام شد، تمایز مارکرهای میوژنیک MHCα–Desmin- cTnT در سطح پروتئین با روش ایمونوسیتوشیمی در پایان هفته دوم را تایید کرد.

همچنین در این تحقیق بیان ژن تعدادی از مارکرهای میوژنیک شامل DESMIN، GATA4، MYOD-CTNT و MYH6 توسط تکنیک Real-time PCR به صورت کمی در انتهای هفته اول و دوم ارزیابی شد. نتایج حاصل از آنالیز Real-time PCR بیان بالای DESMIN، CTNT و MYH6 را در پایان هفته اول نشان داد ($p<۰/۰۵$). با این حال بیان CTNT و MYH6 در هفته بعد کاهش پیدا کرد. همچنین بیان MYOD و GATA4 در هفته اول و دوم تمایز مشاهده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعاتی که در این زمینه انجام شد، نشان دهنده نقش این ژن‌ها در مسیر میوژنیک و کاردیومیوژنیک بود.

در راستای مطالعات انجام شده توسط Antonitisis و همکاران، مشخص شد که سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسان قادر هستند که توسط ۵-آزاسیتیدین به کاردیومیوژنیک تمایز یابند. ۵-آزاسیتیدین با اثر شیمیایی روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و با مهار آنزیم متیل ترانسفراز در DNA منجر به تمایز میوژنیک می‌شود. ۵-آزاسیتیدین یک القاگر ضعیف سلول‌های ماهیچه ای و مهارکننده ضعیف متیلاسیون DNA است که نقش مهمی برای مدیفیکاسیون DNA در تمایز بازی می‌کند (۲۵).

نتایج آنالیزهای مطالعه حاضر بیان بالای دسمین را در پایان هفته اول و دوم نسبت به سایر مارکرها بیان کرد. از این رو تفاوت معنی‌داری در بیان ژن، در هفته اول و دوم مشاهده نشد. همچین شاهد بیان پروتین این ژن در روز ۱۴ توسط ایمونوسیتوشیمی بودیم. دسمین پروتئین رشته‌ای حد واسط است که به طور اختصاصی در سلول‌های ماهیچه‌ای وجود دارد. همچنین می‌توان گفت که یک پروتئین ویژه عضلانی است که در سلول‌های ماهیچه‌ای قلبی، اسکلتی و صاف بیان می‌شود (۲۶). دسمین به عنوان یک مارکر اولیه و ابتدایی در روند میوژنزیس است، که در سطوح اولیه بیان دارد و با نزدیک شدن به انتهای تمایز بیان آن افزایش می‌یابد (۲۷).

همین طور در پژوهشی که توسط محققین انجام شد، بیان ژن های دخیل در تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و آندومتریوم به سلول‌های شبه میوبلاست از جمله DESMIN، MYOD و TroponinT توسط ۵-آزاسیتیدین مورد بررسی قرار گرفت که مطابق با نتایج این مطالعه بیان دسمین در هفته اول و دوم تمایز گزارش شد (۲۸). بنابراین گفته می‌شود که دسمین یکی از اولین مارکرهای عضلانی است که بیان آن برای تعیین تمایز میوژنیک ضروری است (۲۹).

MyoD نیز پروتئینی است که نقش عمده‌ای در تنظیم عضلانی دارد و اولین مارکر مرتبط در فرآیند میوژنیک است. MyoD به عنوان یک فاکتور رونویسی هلیکس –لوپ – هلیکس به طور مستقیم بیان و تمایز میوسیت‌ها را تنظیم می‌کند (۳۰). این ژن به عنوان یک عامل نظارتی در فرایند میوژنزیس در سطوح اولیه بیان می‌شود (۳۱).

نتایج بررسی مارکر MyoD به عنوان فاکتور نسخه برداری در مطالعه ما نشان داد که این مارکر در پایان هفته اول و دوم بیان بالایی ندارد و تفاوت معنی‌داری بین بیان هفته اول و دوم وجود ندارد. از سوی دیگر بیان این پروتئین توسط ایمونوسیتوشیمی در روز ۱۴ تایید نشد. بر اساس تحقیقات Eunji Gang وهمکارانش نیز گزارش شد که بیان MYOD برای اولین بار از روز ۳پس از القا در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بندناف بیان شد و سپس کاهش پیدا کرد (۳۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مارکر MYOD جزو مارکرهای اولیه میوژنیک است و نتایج حاصل از آنالیز Real-time PCR نیز این موضوع را تایید می‌کند. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که بهتر است بیان این ژن در روزهای ابتدایی پس از تمایز نیز بررسی شود.

میوزین زنجیره سنگین، ایزوفرم α یک پروتیین انسانی است که به وسیله ژن MYH6 کد می‌شود (۳۳).

همچنین بیان بالای α-MHC در طی تکامل اولیه سلول‌های بنیادی جنینی مشاهده شده است (۳۴).

همچنین عده‌ای از محققان توانستند بیان بالای این ژن را در روز ۹ تمایز سلول‌های P19 طی تمایز میوژنیک ثابت کنند (۳۵).در مطالعه حاضر نیز بیان بالای این ژن در هفته اول و دوم مشاهده شد. بیان پروتئین این ژن نیز در روز۱۴ با تکنیک ایمونوسیتوشیمی مشخص شد.

تروپونین مجموعه‌ای از ۳پروتئین تنظیمی است که این ۳پروتئین جدایی ناپذیر هستند و در انقباض عضله اسکلتی و عضله قلب شرکت می‌کنند (۳۶).

بررسی نتایج به دست آمده از آنالیز Real-time PCR مطالعه ما نشان داد که CTNT در هفته اول افزایش بیان داشته و در پایان هفته دوم با کاهش بیان آن رو به رو شدیم و بین بیان هفته اول و دوم تفاوت معنی‌داری مشاهده شد.

Aung kava وهمکارانش توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به کاردیومیوسیت را در دوزهای مختلف ۵-آزاسیتیدین بررسی کردند (۳۷). بررسی نتایج حاصل از Real-time PCR در روز ۷ نشان داد بیان ژن‌های اختصاصی کاردیاک از جمله کاردیاک تروپونین T و ژن‌های اختصاصی ماهیچه اسکلتی افزایش یافت. این سطح بیان در یک هفته پس از آن کاهش یافت. این نتایج پیشنهاد می‌دهد که ۵-آزاسیتیدین می‌تواند بیان را برای یک دوره کوتاه افزایش دهد یا به عبارتی نتیجه گرفتند که ۵-آزاسیتیدین ممکن است به عنوان یک پیش درمان برای القای تمایز کامل کاردیاک استفاده شود (۳۸). در مطالعه حاضر نیز ما شا هد افزایش بیان این ژن در هفته اول و کاهش بیان آن در هفته دوم بودیم.

Archive of SID

www.SID.ir

بیان پروتئین این ژن در روز ۱۴ توسط ایمونوسیتوشیمی تایید شد.

ژن GATA-4 یک عضو از خانواده GATA از فاکتورهای رونویسی انگشت روی است. تصور می‌شود این پروتئین ژن‌های درگیر در تمایز میوکاردی را تنظیم می‌کند. GATA- 4 یک فاکتور رونویسی حیاتی و مناسب برای توسعه تکامل قلبی پستانداران و برای بقای جنین ضروری است. همچنین در قلب جنین و بزرگسالان در سلول‌های کاردیومیوسایت بیان می‌شود (۳۹).

در بررسی که توسط Trixi hollweok انجام شد (۴۰)، مشاهده شد که تمایز کاردیومیوژنیک باعث افزایش بیان فاکتور رونویسی جنینی GATA- 4 می‌شود (۴۱). پروتئین GATA- 4 تنها برای توسعه قلبی مهم نیست، بلکه یکی از اولین مارکرهای قلبی را تشکیل می‌دهد (۴۲).

نتایج به دست آمده از آنالیز Real- time PCR مطالعه حاضر، نشان داد که ژن GATA 4 به عنوان یک مارکر اولیه و فاکتور رونویسی برای تمایز کاردیومیوسیت بیان بالایی نداشته است. تقریبا بیان هفته اول و دوم با هم تفاوت معنی‌داری نداشت و در سطح پایین بیان ژن قابل مشاهده بود. همچنین بر اساس این مطالعه بیان پروتئین این ژن نیز توسط تکنیک ایمونوسیتوشیمی مشاهده نشد.

در پایان از نتایج حاصل از این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون می‌توانند در محیط کشت حاوی ۵-آزاسیتیدین در مدت دو هفته به سلول‌های میوبلاست تمایز یابند. ولی با این حال مطالعات بیشتری به منظور بررسی تمایز و نقش های عملکردی در شرایط آزمایشگاه مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با هزینه و مساعدت دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است که بدین وسیله از کارکنان دانشگاه علوم پزشکی ایران و همچنین دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Tang Y, Yasuhara T, Hara K, Matsukawa N, Maki M, Yu G, et al. Transplantation of bone marrow-derived stem cells: a promising therapy for stroke. Cell Transplant 2007;16:159-69.

2. Fuches E, Segre JA. Stem cells: a new lesson on life. Cell 2000;100:143-55.

3. 3- Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration .Physiol Rev 2004 84:209-38.

4. Bär H, Strelkov SV, Sjöberg G, Aebi U, Herrmann H. The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure assembly and organization. J Struct Biol 2004;148:3752.

5. Chamberlain J, Rando T. Duchenne muscular dystrophy: advances in therapeutics. Marcel Dekker 2004:240-65 .

6. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A. Enhancing the Migration Ability of Mesenchymal Stromal Cells by Targeting the SDF-1/CXCR4 Axis. Biomed Res Int 2013;2013:561098.

7. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. J Cell Physiol 2001;189:54-63.

8. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. Cytotherapy 2004;6:543-53.

9. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from secondtrimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Hum Reprod 2004;19:1450-6.

10. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. Arthritis Res 2000;2:477-88.

11. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennet PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. Blood 2001;98:2396-402.

12. Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. Haematologica 2003;88:845-52.

13. Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R, Karbanová J, Hubková V, Pytlík R, et al. Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation. Acta Medica (Hradec Kralove) 2007;50:195-201.

Archive of SID

www.SID.ir

14. Ryusuke Nakatsuka, Tadashige Nozaki, Yasushi Uemura, Yoshikasu Matsuoka, , Yutaka Sasaki, Mitsuko Shinohara, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment induces skeletal myogenic differentiation of mouse dental pulp stem cells. Arch Oral Biol 2010;55:350-7.

15. Faghihi F , Mirzaei E, Ai J , Lotfi A, Azam Sayahpour F , Ebrahimi Barough S, et al. Differentiation Potential of Human Chorion-Derived Mesenchymal Stem Cells into Motor Neuron-Like Cells in Two- and Three-Dimensional Culture Systems. Mol Neurobiol 2016;53:1862-72.

16. Faghihi F, Mirzaei E, Sarveazad A, Ai J, Ebrahimi Barough S, Lotfi A, et al. Differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells into motorneuron-like cells on electrospun gelatin membrane. J Mol Neurosci 2015;55:845-53.

17. Ai J, Mehrabani D. Are endometrial stem cells novel tools against ischemic heart failure in women?A hypothesis. Iran Red Crescent Med J 2010;12:73-5.

18. Rosenstrauch D, Poglajen G, Zidar N, Gregoric ID. Stem cell therapy for ischemic heart failure.Tex Heart Inst J 2005;32:339-47.

19. Li Y, Huard J. Differentiation of musclederived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. Am J Pathol 2002;161:895-907.

20. Faghihi F, Papadimitropoulos A, Martin I, Baghban Nejad MR. Effect of Purmorphamine on Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in a Three-Dimensional Dynamic Culture System. Cell Mol Bioeng 2014;7:575-84.

21. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999;284:143-7.

22. Li CD, Zhang WY, Li HL, Jiang XX. Identification of A multilinage Potential Mesenchymal Cell From Human Placenta. Placenta 2005;19. pii: S0143-4004(05)00226-2.

23. Witkowska-Zimny M, Wobble E. Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion, , Cell Mol Biol Lett 2011;16:493-514.

24. Ali Aghaei Shafi Abadi A, Seyyed Jafari SS. Differentiation of human Placenta-dived Chorionic Stem Cells. Journal Gums 2009;71:1-6.

25. Antonisis P, Ioannidou-Papagiannali E, Kaidoglou A, Charokopos N, Kalogeridis A, Kouzi-Koliakou K ,et al. Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. Thorac Cardiovasc Surg 2008;56:77-82.

26. Ishikawa H, Bischoff R, Holtzer H. Mitosis and intermediatesized filaments in developing skeletal muscle. J Cell Biol 1968;38:538555.

27. Zhao C, Andersen H, Ozyilmaz B, Ramaprabhu S, Pastorin G, Ho HK. Spontaneous and specific myogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on polyethylene glycol-linked multi-walled carbon nanotube films for skeletal muscle engineering. Nanoscale 2015;7:18239-49.

28. Faghihi F, Jalali H, Parivar K, Kajbafzadeh A, Roozafzoon R, Somayeh Ebrahimi- Barough, et al. Evaluation Of Differentiation Potential Of Endometrial- Versus Bone Marrow Drived Mesenchymal Stem Cells Into Myoblast-Like Cells. IJCRLS 2014;4:3992-7.

29. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. J Transl Med 2007;5:57-63.

30. Edmondson DG, Olson EN. Helix-loophelix proteins as regulators of muscle-specific transcription. J Biol Chem 1993;268:755-7.

31. Aurade F, Pinset C, Chafey P, Gros F, Montarras D. Myf5, MyoD, myogenin and MRF4 myogenic derivatives of the embryonic mesenchymal cell line C3H10T1/2 exhibit the same adult muscle phenotype. Differentiation 1994;55:185-92.

32. Eun Ji Gang, Ju Ah Jeong, Seung Hyun Hong, Soo Han Hwang, Seong Whan Kim, Il Ho Yang, et al. Skeletal Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood. Stem cells 2004;22:617-24.

33. Tanigawa G, Jarcho JA, Kass S, Solomon SD, Vosberg HP, Seidman JG, et al. "A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: an alpha/beta cardiac myosin heavy chain hybrid gene". Cell 1990;62:9091-8.

34. Sharon SY Wong, Harold S Bernstein. Cardiac regeneration using human embryonic

35. stem cells: producing cells for future therapy. Regen Med 2010;5:763-75.

Archive of SID

www.SID.ir

36. Voronova A, Coyne E, Madhoun A, Fair JV, Bosiljcic N, St-Louis C, et al. Hedgehog Signaling Regulates MyoD. Expression and Activity. J Biol Chem 2013;288:4389-404.

37. Anderson PA, Malouf NN, Oakeley AE, Pagani ED, Allen PD. "Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle". Circ Res 1991;69:1226-33.

38. Aungkura S, Pakpoom K, Kuneerat N, Yaowalak U, Sirikul M, Methichit Ch, et al. Cardiogenic and Myogenic Gene Expression in Mesenchymal Stem Cells After 5AzacytidineTreatment. Turk J Haematol 2013;30:115-21.

39. Bel A, Messas E, Agbulut O, Richard P, Samuel JL, Bruneval P, et al. Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. Circulation 2003;108:47-52.

40. Perrino C, Rockman HA. GATA4 and the two sides of gene expression reprogramming. Circ Res 2006;98:837-45.

41. Hollweck T, Hagl C, Eissner G. Mesenchymal stem cells from umbilical cord tissue as potential therapeutics for cardiomyodegenerative diseases. Int J Mo1 Cell Med Summer 2012;1:119-32.

42. Thurisch B. Untersuchung der Funktion des Transkriptionsfaktors GATA-4 durch eine Mausmutante mit einem induzierbaren RNA-Interferenz System. . Dissertation: Humboldt- Universität Berlin; 1979.

43. Xu CH, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Circ Res 2002;91:501-8.

Archive of SID

www.SID.ir