

## بازبرنامه ریزی مستقیم سلول‌های فیروبلاست موشی به سلول‌های شبه پیش ساز قلبی

محمود تلخابی<sup>۱\*</sup>، فیروز جنت‌علیپور<sup>۲</sup> و المیرا رضائی زنون<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دپارتمان علوم جانوری و بیوتکنولوژی

<sup>۲</sup> کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۳

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۸

### چکیده

بیماری‌های قلبی-عروقی شایع‌ترین عامل مرگ و میر در دنیا هستند. سلول درمانی به عنوان یکی از رویکردهای امیدوارکننده برای درمان این بیماری‌ها پیشنهاد شده‌است. تاکنون سلول‌های بنیادی مختلفی از قبیل سلول‌های بنیادی پرتوان (سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی پرتوان القائی) و سلول‌های بنیادی چند توان (سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پروژنیوتورهای قلبی) برای تولید سلول‌های قلبی (سلول‌های پیشساز و کاردیومیوسیت بالغ) استفاده شده‌اند. جدیدترین روش برای تولید کاردیومیوسیتها، بازبرنامه ریزی مستقیم سلول‌های فیروبلاست به این سلولها می باشد. این رویکرد، روشی سریع، آسان و مطمئن برای تولید سلول‌های قلبی در شرایط آزمایشگاهی و نیز درون موجود زنده است. در این مطالعه، سلول‌های فیروبلاست جنینی موش (MEFs) با استفاده از بازبرنامه ریزی مستقیم، به سلول‌های بیان کننده مارکرهای سلول‌های پیشساز قلبی تبدیل شدند. به این منظور دو عامل رونویسی کلیدی Oct4 (فاکتور رونویسی ویژه پرتوانی) و Mef2C (فاکتور رونویسی قلبی) در سلول‌های فیروبلاست بیان شدند. کشت سلول‌های ترانسدیوس شده با دو عامل فوق، بعد از ۳ هفته ساختارهایی شبیه کلونی پیشسازهای قلبی را ایجاد کردند. بررسی‌های بیان ژنی و رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت برای مارکرهای پرتوانی و دودمان قلبی نشان داد که کلونی‌های شکل گرفته به سلول‌های پیشساز قلبی شباهت داشته که در اثر باز برنامه ریزی مستقیم سلول‌های فیروبلاست ایجاد شده اند و هرگز از مرحله پرتوانی عبور نکرده‌اند. نتایج این مطالعه نشان می دهد باز برنامه ریزی مستقیم می‌تواند مسیر جدیدی را برای تولید سلول‌های قلبی (سلول‌های پیشساز/سلول‌های کاردیومیوسیت بالغ) مورد نیاز برای سلول درمانی قلب باز کند.

**واژه های کلیدی:** دگرتمایزی، بازبرنامه ریزی مستقیم، پیش ساز قلبی، فیروبلاست، فاکتور نسخه برداری

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۹۵۵۷۱۷۸۵، پست الکترونیکی: m\_talkhabi@sbu.ac.ir

### مقدمه

رفته (۵) و مرگ آنها، یک سری از رویدادهای سلولی و مولکولی را به راه می اندازد که منجر به پاسخ التهابی، تجمع فیروبلاست‌ها، تولید ماتریکس خارج سلولی و در نهایت ایجاد بافت غیر عملکردی "اسکار" می‌شود (۲۳). شکل گیری بافت اسکار خود باعث از بین رفتن بیشتر کاردیومیوسیت ها شده و از آنجایی که کاردیومیوسیت های پستانداران بعد از تولد فاقد ظرفیت تکثیری هستند، سلول‌های از دست رفته، جایگزین نشده و قلب به تدریج عملکرد انقباضی خود را از دست داده و در نهایت نارسایی

قلب پستانداران به عنوان اندامی با قدرت ترمیم بسیار پایین شناخته می‌شود (۲۱). هرگونه آسیب به بافت قلب از طریق انفارکتوس مایوکاردی (Myocardial infarction)، ایسکمی، آلودگی با ویروس و دیگر عوامل پاتولوژیک، باعث می‌شود سلول‌های اصلی قلب که کاردیومیوسیت (Cardiomyocytes) گفته می‌شوند، از بین رفته و تعداد آنها بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کند (۷). گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهند در حدود یک میلیون کاردیومیوسیت بعد از یک انفارکتوس مایوکاردی از بین

عنوان "تبدیل مستقیم (Direct conversion)" و "دگرتمایزی (Transdifferentiation)" نیز شناخته می‌شود، هیچگاه سلول‌های پرتوان (induced pluripotent stem cells or iPSC) ایجاد نمی‌شوند (۱۵). تاکنون گزارشات متعددی در مورد بازبرنامه ریزی مستقیم سلول‌های فیبروبلاست به کاردیومیوسیت، منتشر شده اند (۸). در اولین مطالعه Ieda و همکارانش گزارش کردند که Gata4، Mef2C و Tbx5 می‌توانند سلول‌های فیبروبلاست موشی را به کاردیومیوسایت تبدیل کنند (۱۵). مطالعات بعدی نشان دادند که اضافه کردن فاکتورهای دیگر قلبی مانند Hand2 (۳) و یا جایگزین کردن GATA4 با Myocardin (۱۹) می‌تواند باعث بهبود بازده دگرتمایزی شود. از طرف دیگر گزارش شده است که فاکتور پرتوانی Oct4 می‌تواند باعث بازبرنامه ریزی مستقیم سلول‌های فیبروبلاست به سلول‌های خونی شود. این فاکتور اخیراً به همراه سایر فاکتورهای ویژه سلول‌های پرتوان القایی (Sox2، Klf4 و C-myc) (۱۳) و نیز به همراه تعدادی کوچک مولکول اختصاصی (۱۱) برای تبدیل سلول‌های فیبروبلاست به قلبی مورد استفاده قرار گرفته است.

در مطالعه حاضر، سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش (MEF) با استفاده از وکتورهای ویروسی بیان‌کننده Oct4 و Mef2C ترانس‌دیفوس شدند. این سلول‌های به مدت ۳ هفته در محیط اختصاصی سلول‌های قلبی کشت شدند. طی این دوره تجمعات سلولی شبه کلونی ایجاد شدند که مارکرهای پیشساز قلبی را بیان کرده، در حالیکه مارکر پرتوانی را بیان نمی‌کردند. کلونی‌های شکل گرفته از لحاظ مورفولوژی به کلونی‌های سلول‌های پیشساز قلبی شباهت بسیاری داشته و بصورت کلونال برای دو پاساژ قابلیت پاساژ پذیری داشتند.

### مواد و روشها

**تولید فیبروبلاست جنینی موش:** جهت تولید فیبروبلاست جنینی موش (Mouse embryonic fibroblasts or MEFs)

قلبی (Heart failure) ایجاد می‌شود (۱۲). از این رو بیماری‌های قلبی، یکی از عوامل شایع مرگ و میر کودکان و افراد بالغ در سراسر جهان هستند. این بیماری‌ها تقریباً عامل ۳۳٪ کل مرگ و میر در دنیا بوده و ۵۵٪ کل مرگ و میر اتفاق افتاده در آمریکا در سال ۲۰۰۸ (۶) و بیش از ۴ میلیون فوت بطور سالانه در اروپا (۹)، به علت بیماری‌های قلبی گزارش شده است. همچنین بیماری‌های قلبی هزینه گزافی را برای سیستم‌های سلامت ملی گذاشته و هزینه‌های مربوط به مدیریت و کنترل آنها از ۳۰۰ میلیارد دلار فراتر می‌رود (۱۶). از این رو روش‌های درمانی متفاوتی برای درمان بیماری‌های قلبی ابداع شده و توسعه یافته‌اند. البته با اینکه نرخ بقاء بیماران افزایش پیدا کرده ولی در حال حاضر هیچ تکنیک درمانی ثابت شده‌ای برای برگرداندن کاردیومیوسیت‌های از دست رفته وجود ندارد. از این رو پیوند قلب تنها روش درمانی موجود است که برای بیماران با نارسایی‌های بسیار شدید انجام می‌شود (۲۲)، اما این گزینه هم به علت مشکلاتی مانند رد پیوند و پایین بودن تعداد افراد دهنده، با محدودیت همراه است. استراتژی دیگر "سلول درمانی" است که بر استفاده از سلول برای درمان نقایص قلبی استوار بوده و در این استراتژی سلول‌های بنیادی با توانایی تمایزی محدود شامل سلول‌های بنیادی چندتوان (Multipotent stem cells) و نیز کاردیومیوسیت‌های جدید برای جایگزینی کاردیومیوسیت‌های از بین رفته در طی آسیب‌های قلبی، بکار گرفته می‌شوند (۱۰ و ۲۰). سلول‌های مشتق از مغز استخوان و میوبلاست‌های عضله اسکلتی اولین سلول‌هایی بودند که برای برگرداندن فعالیت قلبی بعد از انفارکتوس مایوکاردی مورد مطالعه قرار گرفتند (۴). جدیدترین روش برای تولید سلول‌های قلبی بازبرنامه ریزی مستقیم (Direct reprogramming) است که بوسیله آن از سلول‌های سوماتیک مانند فیبروبلاست که فاقد هر گونه پتانسیل تمایزی هستند، به سلول‌های تمایز یافته دیگر از قبیل سلول‌های قلبی تولید می‌شود (۱۸). در این فرایند که تحت

حاوی Oct4 و Mef2c (مقدار ۹ میکروگرم از هر پلازمید) انجام شد. ۲۴ ساعت بعد از انجام ترانسفکشن، محیط رویی سلول‌ها توسط سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری جمع‌آوری شده و بوسیله یک فیلتر ویژه با قطر منافذ  $0.45 \mu\text{m}$  فیلتر شدند و برای ترانسداکشن سلول‌های MEF مورد استفاده قرار گرفتند.

**ترانسداکشن سلول‌های MEF به وسیله رتروویس‌های حاوی Oct4 و Mef2c:** سلول‌های MEF در پاساژ سوم برای ترانسداکشن مورد استفاده قرار گرفتند. بدین صورت که این سلول‌ها در ظرف‌های کشت ۶ سانتی‌متری کشت شده، سپس یک میلی‌لیتر از محیط حاوی هر رتروویروس (Oct4، Mef2C) و یک میلی‌لیتر محیط کشت تازه سلول‌های فیروبلاستی به سلول‌ها اضافه شد. برای افزایش بازده ترانسداکشن ماده Polybrene (غلظت نهایی  $\mu\text{g/mL}$  ۶) به لوله حاوی مخلوط ویروسی اضافه شد. ۲۴ ساعت بعد از ترانسداکشن با رتروویروس‌ها، سلول‌های MEF بوسیله آنزیم تریپسن کنده شده و بعد از شمارش به ظرف‌های کشت ۶ چاهکی کوت شده با ماتریژل منتقل شده ( $4/5 \times 10^4$  سلول به ازای هر چاهک) و در محیط سلول‌های قلبی (DMEM/M199/10%FBS, ) کشت شدند. تغییرات سلولی با استفاده از میکروسکوپ و بصورت روزانه انجام شد و در تمام مراحل مطالعه، از سلول‌ها تصاویری میکروسکوپی گرفته شد.

**رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس:** برای انجام رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس ابتدا محیط کشت روی سلول‌ها حذف شد و سلول‌ها یک بار با محلول شستشو (۰/۵ درصد PBS/Tween) شستشو داده شده و با پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس شدند. سپس سلول‌ها دوبار (هر کدام به مدت ۵ دقیقه) با محلول شستشو در دمای اتاق شستشو داده شدند و برای نفوذپذیر کردن سلول‌ها، انکوباسیون سلول‌ها با

به عنوان سلول‌های مورد نظر برای دگرتمایزی قلبی، از موش نژاد NMRI استفاده گردید. به طور خلاصه جنین‌های ۱۲/۵ روزه از داخل رحم جدا شده و به ظرف حاوی PBS منتقل شدند. کبد و سر جنین‌ها با استفاده از یک جفت پنست جدا شد و باقی مانده لاشه جنین (در صورت زیاد بودن تعداد جنین، فقط دست و پا جنین) به سرنگ ۲ میلی‌لیتر منتقل و با استفاده از سوزن شماره ۱۸، جنین‌ها به قطعات کوچک تبدیل گردید و به فلاسک حاوی محیط کشت سلول‌های فیروبلاستی (DMEM/15%FBS, 1%Penicillin/Streptomycin, )  $1\text{mM NaHCO}_3$  انتقال داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، قطعات سلولی به کف فلاسک چسبیدند و مهاجرت سلولی از آن‌ها آغاز گشت. معمولاً ۷۲ ساعت بعد از کشت اولیه (primary culture) پوشش سلولی کف فلاسک ۱۰۰٪ (confluent) می‌شود. پس از آن‌که سلول‌ها کف فلاسک را کاملاً پوشاندند، با استفاده از آنزیم Trypsin/EDTA سلول‌ها منفرد شده و در فلاسک‌های جدید کشت داده شدند. سلول‌های MEF در پاساژ سوم برای ترانسداکشن استفاده شدند.

**تولید رتروویروس‌های حاوی ژن Oct4 و Mef2C:** برای تولید رتروویروس‌های بیان‌کننده ژن Oct4 و Mef2C از رده سلولی Plat-E استفاده شدند (محیط کشت: DMEM/10%FBS, , 1%Penicillin/Streptomycin, 1mM NaHCO<sub>3</sub>, 1  $\mu\text{g/mL}$  Puromycin, 10  $\mu\text{g/mL}$  Blasticidin). یک روز قبل از آغاز فرایند انجام ترانسفکشن و تولید ویروس، سلول‌های Plat-E توسط آنزیم Trypsin/EDTA کنده شده و در پلیت‌های کشت ۱۰ سانتی‌متری کوت شده با ژلاتین و به تعداد  $2 \times 10^6$  سلول به ازای هر پلیت کشت شدند ( $37^\circ\text{C}$  و ۳٪  $\text{CO}_2$ ). از این مرحله به بعد آنتی‌بیوتیک‌ها از محیط کشت حذف شدند. یک روز بعد و با مشاهده تراکم سلولی مناسب (۹۰٪-۸۰٪) ترانسفکشن با استفاده از عامل ترانسفکشن FuGENE 6 و بصورت مستقل برای پلاسمیدهای ویروسی

DNA ۰/۵ میکروگرم از نمونه را در ژل آگارز ۱٪ بارگزاری کرده و باندهای 18s و 28s و عدم وجود باند DNA را در نمونه بررسی شد. DNA مکمل (cDNA) با استفاده از oligo(dT)20 primer به عنوان پرایمر و کیت Super Script III First-Strand Synthesis System انجام شد. برای انجام واکنش‌های Real-Time PCR از دستگاه Corbett Research Rotor-Gene 3000 استفاده شد. برای افزایش دقت، از هر گروه آزمایشی سه تکرار مستقل زیستی در نظر گرفته شد. ژن *Gapdh* به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد و از روش  $2^{-\Delta\Delta ct}$  برای مقایسه تغییرات بیان ژن‌ها استفاده شد (توالی آغازگرهای مورد استفاده در شکل ۲).

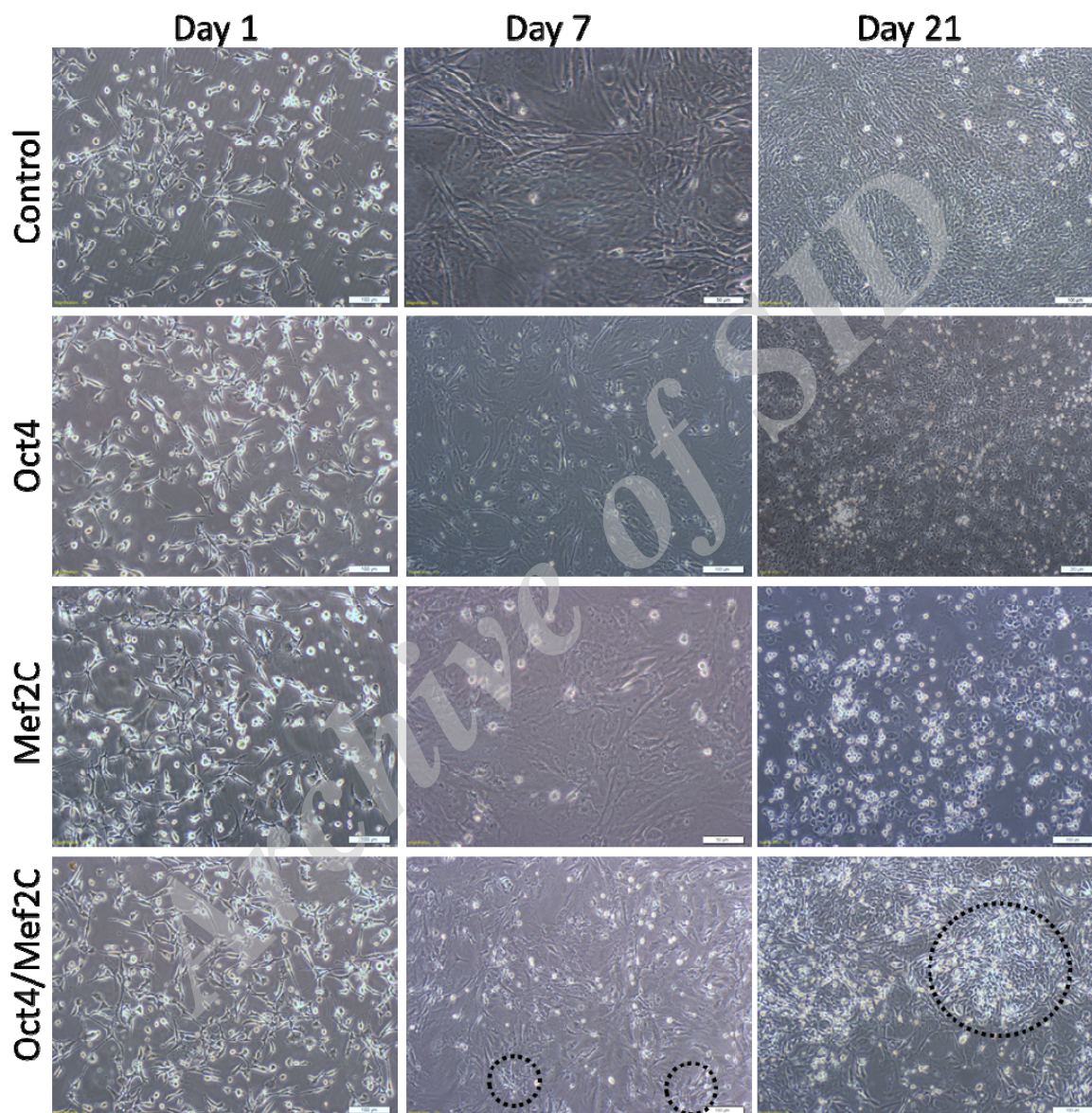
## نتایج

**شکل‌گیری سلول‌های پیش‌ساز قلبی:** سلول‌های فیروبلاستی بعد از افزایش بیان *Oct4* و *Mef2C* دچار تغییراتی مورفولوژیکی مشخصی شدند. یک هفته بعد از ترانسداکشن، یکسری ساختارهای شبه کلونی آشکار شدند که به مرور اندازه آنها بزرگتر شد (شکل ۱). این کلونی‌ها، ۳ هفته بعد از ترانسداکشن مورفولوژی مشخص تری پیدا کردند. در گروه کنترل که هیچ کدام از رتروویروسها را دریافت نکرده بود، هیچ گونه تغییر مورفولوژیک خاصی مشاهده نشد. و سلول‌ها بطور کامل کف ظرف را اشغال کرده و مورفولوژی سلول‌های پیر را نشان دادند. در گروهی که تنها با استفاده از *Oct4* یا *Mef2C* ترانسدیوس شده بودند، تغییرات سلولی قابل رویت بود ولی هیچگونه ساختار شبه کلونی مشاهده نشد (شکل ۱). برای بررسی هویت سلول‌هایی که بواسطه افزایش بیان *Oct4* و *Mef2C* ایجاد شده بودند، بیان یکسری از ژن‌های قلبی مورد بررسی قرار گرفت. ۳ هفته بعد از افزایش بیان دو فاکتور نسخه برداری فوق، بیان مارکرهای ویژه سلول‌های پیش‌ساز قلبی (*Nkx2.5*, *Gata4*, *Isl1*, *Mef2C*) و مارکر ویژه سلول‌های کاردیومیوسایت بالغ (*Mlc2v*) با استفاده از Real-Time

محلول ۰/۲ درصد Triton X-100 به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. بعد از دو بار شستشوی سلول‌ها (هر بار به مدت ۵ دقیقه) در دمای اتاق، مسدود کردن جایگاه‌های غیراختصاصی اتصال آنتی‌بادی (بلوکه کردن) به وسیله تیمار سلول‌ها با سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۶۰ دقیقه، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بعد از یک بار شستشو، آنتی‌بادی‌های اولیه *GATA4* (abcam, ab84593) و *ISL1* (abcam, ab20670) با رقت ۱:۱۰۰ به سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون صورت گرفت. سپس ۳ بار شستشو (هر بار به مدت ۱۵ دقیقه) در دمای اتاق انجام شد و آنتی‌بادی ثانویه (Goat Anti-Rabbit (Alexa Fluor® 488) (abcam, ab150077) با رقت ۱:۵۰۰ به سلول‌ها اضافه شد و انکوباسیون به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در ادامه سلول‌ها سه بار (هر بار به مدت ۱۵ دقیقه) در دمای اتاق شستشو داده شدند و رنگ DAPI به منظور رنگ‌آمیزی هسته اضافه شد. مشاهده و تصویر برداری از نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Carl Zeiss Axioplan-2) صورت گرفت.

**بررسی بیان ژن‌ها به روش qRT-PCR:** ابتدا سلول‌ها به وسیله آنزیم Trypsin/EDTA به صورت منفرد درآمدند و بعد از سانتریفیوژ، پلاک خشک سلولی در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور جداسازی کل RNA از سلول‌ها از محلول ترایزول استفاده شد. برای اجتناب از آلودگی RNase، در همه مراحل از میکروتیوب‌ها و سرسمپلرهای عاری از RNase و DNase و اتوکلاو شده استفاده شد. بررسی کیفی RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Nanodrop (ND-1000) پس از تعیین میزان جذب (spectrophotometer) انجام شد. پس از تعیین میزان جذب نمونه، معادل ۵ میکروگرم RNA برداشته و با نصف میزان RNA یعنی ۲/۵ میکروگرم DNase تیمار شد. پس از انجام تیمار آنزیمی برای کسب اطمینان از عدم وجود آلودگی

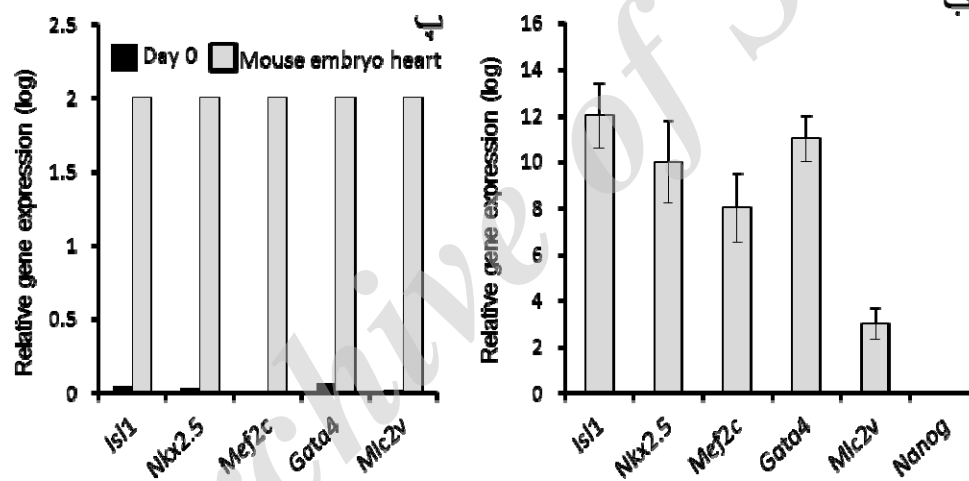
PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بطور مشخصی مارکرهای ویژه سلولهای پیشساز قلبی بیان بسیار بالایی در سلولهای بازبرنامه ریزی شده داشتند (شکل ۲، ب).



شکل ۱. شکل‌گیری ساختارهای شبه کلونی در سلولهای ترانسدیوس شده با Oct4 و Mef2C. سلولهای گروه کنترل هیچگونه تغییرات سلولی خاصی از خود بروز نداده و سلولهای گروه Oct4 تنها و نیز Mef2C تنها اگرچه تغییرات مورفولوژیک بروز دادند که در گروه Oct4 بیشتر با تکثیر سلولی و در گروه Mef2C با کنده شدن سلولی همراه بود. Oct4 و Mef2C باعث شکل‌گیری تجمعات سلولی شبه کلونی شدند که تاحدی مشابه کلونی پیشسازها و سلولهای بنیادی قلبی بودند (دوایر نقطه چین)

## الف

Gene	Primer sequence (F)	Primer sequence (R)
<i>Isl1</i>	TCATCCGAGTGTGGTTTCAA	CCATCATGTCTCTCCGGACT
<i>Nkx2.5</i>	CAAGTGCTCTCCTGCTTTC	ATCCGTCTCGGCTTTGTC
<i>Mef2c</i>	GAAGCAGAAAGGCACTGG	CCTGCATTCTGTCCTC
<i>Gata4</i>	CAGGTCTGCTGGTGAGA	AGTACTGAATGTCTGGGACATG
<i>Mic2v</i>	GAAGCCTTCACAATCATGG	GTTAATTGGACCTGGAGCC
<i>Nanog</i>	CTCTCCTTCCCAAGAATAAGTG	GTCTTCTGTCTCATCCTCG
<i>Gapdh</i>	AAGGGCTCATGACCACAGTC	CAGGGATGATGTTCTGGGCA

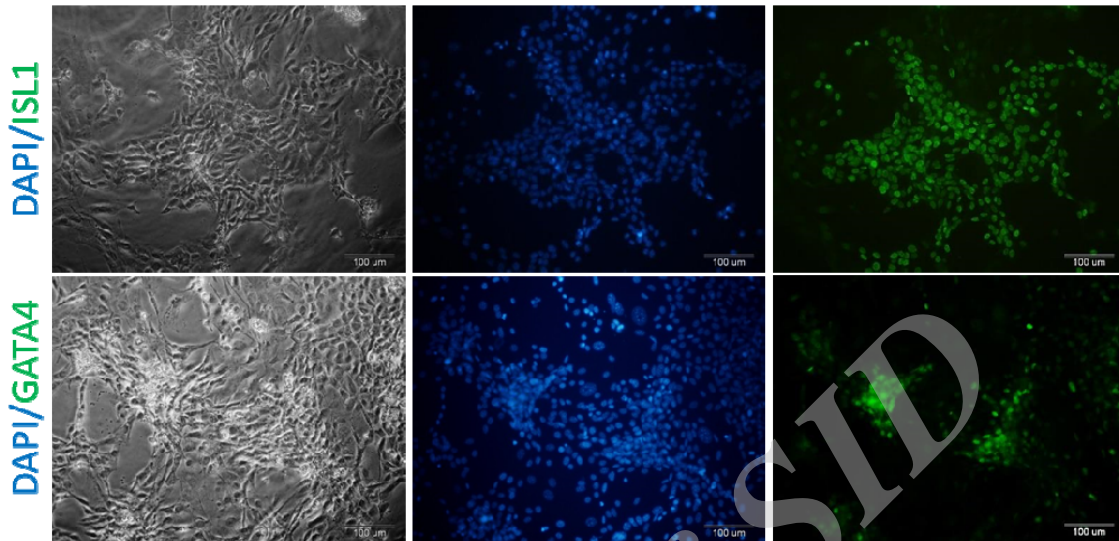


شکل ۲. سلولهای پیشساز قلبی بواسطه بازبرنامه ریزی مستقیم ایجاد شدند. الف) توالی پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژنهای قلبی و پرتوانی. ب) سلولهای بازبرنامه ریزی شده مارکرهای پیشسازهای قلبی را بطور مشخصی بیان می‌کنند. بررسی ۳ هفته بعد از ترانسداکشن (شروع فرایند دگرتمایزی) انجام شده است. *Gapdh* به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است. مارکر پرتوانی *Nanog* هیچگونه بیان را نشان نمی‌دهد. پ) فیبروبلاستهای اولیه استفاده شده برای بازبرنامه ریزی فاقد هرگونه آلودگی سلولی به سلولهای قلبی بوده و مارکرهای ویژه دودمان قلبی در آنها بیان نمی‌شود (قلب جنین موش به عنوان کنترل سلولی و *Gapdh* به عنوان کنترل داخلی برای بررسی بیان ژن استفاده شد).

مرکزی کلونی‌های ایجاد شده فاکتورهای نسخه برداری *Isl1* و *GATA4* را بطور مشخصی بیان می‌کنند (شکل ۳). این نتایج بطور کلی نشان می‌دهد که افزایش بیان *Oct4* و *Mef2C* می‌تواند باعث بازبرنامه ریزی سلولهای فیبروبلاستی به سلولهای شبه پیشساز قلبی شود. اگرچه این

البته مارکر بلوغ (*Mic2v*) نیز تا حدی بیان داشت که در مقایسه با مارکرهای سلولهای پیشساز بسیار پایین تر بود. سلولهای بازبرنامه ریزی شده، مارکرهای ویژه سلولهای پیشساز را در سطح پروتئین نیز بیان می‌کردند. رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت نشان داد که سلولهای بخش‌های

سلول‌های تنها قابلیت تکثیر برای دو پاساژ در محیط مورد استفاده در مطالعه را داشتند و به سرعت مورفولوژی خود را از دست دادند.



شکل ۳. کلونی‌های شبه پیشساز قلبی مارکرهای قلبی را بیان می‌کنند. تجمعات شبه کلونی ایجاد شده بعد از ۲۱ روز از ترانسداکشن، مارکرهای هسته ایی Is1 و GATA4 را بیان می‌کنند. بیان این مارکرها که فاکتورهای نسخه برداری ویژه سلولهای پیشساز قلبی (سلولهای بینادی قلبی) هستند به خوبی درون هسته قابل مشاهده است. هسته‌ها همچنین با DAPI نیز رنگ شده‌اند.

می‌تواند سبب شکل‌گیری کلونی‌هایی شود که مارکرهای ویژه پیشساز قلبی را بیان می‌کنند. این کلونی‌های مارکر پرتوانی Nanog را بیان نمی‌کردند. سلولهای شبه پیشساز قلبی شکل گرفته در این مطالعه در محیط کشت سلولهای قلبی بالغ شکل گرفتند. احتمالاً این علت اصلی عدم پاساژ پذیری این سلولها بود، بطوریکه این سلولها بسیار سریع و در عرض دو پاساژ ماهیت خود را تغییر دادند. البته در این مطالعه بررسی نشد که سلولها بعد از این ماهیت خود را تغییر می‌دهند به چه سلولهای قلبی و احیاناً غیر قلبی تبدیل می‌شوند. حتی این سلولها در ۳ هفته بعد از ترانسداکشن و همراه با مارکرهای ویژه سلولهای پیشساز قلبی، مارکر سلول قلبی بالغ (Mlc2v) را نیز بیان می‌کردند، که نشان دهنده مناسب نبودن محیط و شرایط کشت برای سلولهای پیشساز قلبی می‌باشد. از آنجاییکه تاکنون هیچ فاکتوری به تنهایی نتوانسته است سلولهای پرتوان القایی را در شرایط کشت سلولهای پرتوان ایجاد کند پس شکل‌گیری سلولهای پرتوان در محیط کشت سلولهای قلبی و در حضور یک فاکتور تمایزی قلبی (Mef2C) غیر

سلولهای شبه پیشساز قلبی به واسطه بازبرنامه ریزی مستقیم ایجاد شدند: برای اطمینان از اینکه سلولهای شبه پیشسازی شکل گرفته از ابتدا در بین سلولهای فیبروبلاست نبوده‌اند، سلولهای فیبروبلاست جنینی موش تنها از دست و پا، دم و نیمه تحتانی جنینهای موش استخراج شد. در نتیجه کشت اولیه فاقد هرگونه سلولی قلبی بود. بیان ژنهای قلبی نشان داد که این ژنها در سلولهای فیبروبلاستی مورد استفاده برای بازبرنامه ریزی بیان نداشتند (شکل ۲، پ). از طرفی در طی فرایند بازبرنامه ریزی مارکر پرتوانی Nanog نیز بیان نشد (شکل ۲، ب) که نشان می‌دهد هیچگونه سلول پرتوانی در طی فرایند باز برنامه ریزی شکل نگرفتند. بطورکلی این نتایج نشان می‌دهند که سلولهای شبه پیشساز قلبی بواسطه بازبرنامه ریزی مستقیم سلولهای فیبروبلاست شکل گرفته‌اند.

### بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه نشان دادیم که افزایش بیان Oct4 و Mef2C

داشته باشند گزینه مناسبی را برای تولید سایر سلول‌های قلبی (کاردیومیوسایت، اندوتلیال و عضله صاف دوررگی) فراهم می‌کنند. تاکنون مواد مختلفی برای القا تکثیر و یا مهار تکثیر سلول‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند که این عوامل می‌توانند در افزایش تکثیر سلول‌های پیشساز قلبی حاصل از دگرتمایزی موثر باشند (۲). در این مطالعه، دگرتمایزی سلول‌های فیبروبلاست به سلول‌های پیشساز قلبی تنها با استفاده از دو فاکتور Oct4 و Mef2C صورت گرفته است و سایر ترکیبات فاکتورهای پرتوانی و فاکتورهای قلبی می‌توانند سلول‌های پیشساز قلبی و یا سلول‌های بالغ قلبی را با بازده و کیفیت بالاتری تولید کنند. تمام این موارد نیاز به مطالعات بیشتر و دقیق‌تری دارد.

منطقی و عجیب می‌باشد. همانطور که در گروهی که تنها با Oct4 تنها ترانسدیپوس شده بود، هیچ‌گونه کلنی شبه iPSC و یا شبه پیشساز قلبی شکل نگرفت. در این مطالعه نشان دادیم که فاکتورهای پرتوانی به همراه فاکتورهای قلبی می‌توانند برای بازبرنامه‌ریزی مستقیم سلول‌های فیبروبلاست به سلول‌های دودمان قلبی استفاده شوند. این رویکرد برای تبدیل سلول‌های فیبروبلاست به غضروف (۱۷) و استخوان (۱۴) گزارش شده است. مطالعات بعدی می‌توانند با بررسی شرایط کشت اختصاصی‌تر، تولید کارآمد سلول‌های پیشساز قلبی را سبب شوند. همچنین این احتمال وجود دارد که کشت سه بعدی بازده دگرتمایزی را افزایش دهد (۱). چنانچه این سلول‌ها قابلیت پاساژ پذیری

## منابع

۱. دیزجی، ع.، هدایی، ل.، سهیلی، ز.س.، (۱۳۹۳)، زیست پلیمرآلژینات بعنوان بستر سه بعدی جهت کشت و تمایز سلول‌های بنیادین مزانشیمی بافت چربی انسان به سلول‌های کندروسیت غضروف، مجله پژوهش‌های جانوری. دوره ۲۷، شماره ۴، ۵۲۱-۵۳۴
۲. منصوری، ف.، سپهری، ح.، دلفی، ل.، (۱۳۹۵) اثر مواد پکتینی بر القا رها سازی نیتریک اکساید و مهار تکثیر سلولی در دودمان سلولی سرطان پروستات انسانی LNCaP، مجله پژوهش‌های جانوری. دوره ۲۹، شماره ۴، ۴۸۰-۴۹۲.
3. Acharya A., Huang G.N., Luo X., Nam Y.-J., Song K., (2012) Heart repair by reprogramming non- myocytes with cardiac transcription factors, *Nature*, 485, 599-604.
4. Ardehali, R., Chen, C.H., Sereti, K.I., Wu, B.M., (2015) Translational aspects of cardiac cell therapy, *Journal of cellular and molecular medicine*, 19, 1757-1772.
5. Bassel-Duby, R., Olson, E.N., Xin, M., (2013) Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair, *Nature reviews Molecular cell biology*, 14, 529-541.
6. Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Go, A.S., Mozaffarian, D., (2013) Heart disease and stroke statistics-- 2013 update: a report from the American Heart Association, *Circulation*, 127e6.
7. Boudoulas, K.D., Hatzopoulos, A.K., (2009) Cardiac repair and regeneration: the Rubik's cube of cell therapy for heart disease, *Disease models & mechanisms*, 2, 344-358.
8. Budniatzky I., Gepstein L., (2014) Concise review: reprogramming strategies for cardiovascular regenerative medicine: from induced pluripotent stem cells to direct reprogramming, *Stem cells translational medicine*, 3, 448-254.
9. Burkhoff, D., Edwards, N., Homma, S., Kocher, A., (2001) Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function, *Nature medicine*, 7, 430-436.
10. Burridge, P.W., Gold, J.D., Keller, G., Wu, J.C., (2012) Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming, *Cell stem cell*, 10, 16-28.
11. Cao N., Ma T., Nie B., Spencer C.I., Srivastava D., (2014) Small molecules enable cardiac reprogramming of mouse fibroblasts with a single factor, Oct4, *Cell reports*, 6, 951-960.
12. Davis, R.P., Krieger, J.E., Mummery, C.L., (2010) Challenges in using stem cells for cardiac repair, *Science translational medicine*, 27ps17-27ps17.



13. Efe J.A., Chen J., Hilcove S., Kim J. , Ouyang K., (2011) Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy, *Nature cell biology*, 13, 215-222.
14. Ejima A., Kishida T., K. Fujiwara H., Nishioka K., Kubo T., (2015) Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts by defined factors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 6152-6157.
15. Fu J.-D., Ieda M., (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors, *Cell*, 142, 375-386.
16. Gaskin, D.J., Richard, P., (2012) The economic costs of pain in the United States, *The Journal of Pain*, 13, 715-724.
17. Hiramatsu K., Nakagawa K., Outani H., Sasagawa S., Yoshikawa H., Tsumaki N., (2011) Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors, *The Journal of clinical investigation*, 121, 640-657.
18. Khaloughi, K., Pournasr, B., Salekdeh, G.H., Totonchi, M., (2011) Concise review: alchemy of biology: generating desired cell types from abundant and accessible cells, *Stem cells*, 29, 1933-1941.
19. Khattak S., Lindemann D., Poulet C., Protze S., (2012) A new approach to transcription factor screening for reprogramming of fibroblasts to cardiomyocyte-like cells, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 53, 323-332.
20. Lee, R.T., Segers, V.F., (2008) Stem-cell therapy for cardiac disease, *Nature*, 451, 937-942.
21. Lee, R.T, Steinhauser, M.L., (2011) Regeneration of the heart, *EMBO molecular medicine*, 3, 701-712.
22. Lietz, K., Miller, L.W., (2007) Improved survival of patients with end-stage heart failure listed for heart transplantation: analysis of organ procurement and transplantation network/US United Network of Organ Sharing data, 1990 to 2005, *Journal of the American College of Cardiology*, 50.1282-1290.
23. Nichols, M., Rayner, M., Scarborough, P., Townsend, N., (2013) European cardiovascular disease statistics, 2, 12-20.

Archive of SID

## Direct reprogramming of mouse fibroblasts to cardiac progenitor-like cells

Talkhabi M.<sup>1</sup>, Jannat Alipoor F.<sup>2</sup> and Rezaei Zonooz E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Animal Sciences and Biotechnology Dept., Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Biotechnology Dept., Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

### Abstract

Heart diseases are the most significant cause of morbidity and mortality in the world. Cell therapy has been proposed as a promising approach to treat the cardiac diseases. To this end, different types of stem cells such as pluripotent stem cell (embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells) and multipotent stem cells (mesenchymal stem cells and cardiac progenitor cells) have been used for producing cardiac cells (cardiac progenitor cells/cardiomyocytes) in vitro. Direct reprogramming of fibroblasts to cardiac cells is the newest strategy for de novo generation of cardiac lineage cells. This approach is a shortcut for easy and safe production of cardiac lineage cells in vitro and in vivo. In the current study, mouse embryonic fibroblasts were directly reprogrammed to the cells expressing cardiac progenitor markers. To reprogram fibroblasts to cardiac lineage cells, pluripotency key transcription factor Oct4 and cardiac specific transcription factor Mef2C were overexpressed in mouse embryonic fibroblasts. After three weeks, the transduced cell formed some cardiac progenitor like colonies. Gene expression analysis and immunostaining for cardiac lineage and pluripotency markers demonstrated that the emerged colonies were cardiac progenitor colonies derived through direct reprogramming process. The results of this study indicate that direct reprogramming can open a new avenue for producing cardiac cells required in cell therapy including cardiomyocytes and cardiac progenitor cells.

**Key words:** transdifferentiation, direct reprogramming, cardiac progenitor, fibroblast, transcription factor